

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05869

研究課題名（和文）イネ粒重抑制を解除するアンタゴニストの開発

研究課題名（英文）Designing of TGW6 antagonist toward improving grain size in rice.

研究代表者

廣津 直樹（Hirotzu, Naoki）

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：40584389

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：THOUSAND-GRAIN WEIGHT 6 (TGW6) は遺伝的機能喪失によってイネの粒重を増加させることから、TGW6を特異的に阻害するアンタゴニストにより粒重を増加させることが期待される。本研究ではTGW6アンタゴニストの創薬に向けてリコンビナントTGW6を取得し、X線結晶構造解析によってTGW6の立体構造を明らかにした。さらに、サーマルシフト解析や¹⁹F NMR競合実験によりTGW6と相互作用する化合物のスクリーニングを行ない、複数の阻害剤候補を取得した。このうちいくつかの化合物は活性部位に結合することが示唆されたため、TGW6アンタゴニストの有効な候補化合物として期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集技術を用いてTGW6を改変したイネの栽培試験が行われているなど、TGW6は栽培品種の収量を向上させるために育種応用されはじめている。一方で、TGW6の遺伝的機能欠損を国内外の様々な品種へ導入するには膨大な時間と作業が必要となる。本研究で実施したタンパク質立体構造を基盤とした創薬によりTGW6阻害剤候補を取得できたことから、TGW6アンタゴニストの開発は大きく前進した。今後、より安定かつ効果の高い候補化合物の選抜と作物へ影響評価により、汎用的で簡単に収量を増加させることができるTGW6アンタゴニストの取得が期待される。

研究成果の概要（英文）：THOUSAND-GRAIN WEIGHT 6 (TGW6) increases grain weight in rice by genetic loss of function, antagonists that specifically inhibit TGW6 can be expected to increase grain weight. In this study, we obtained recombinant TGW6 and determined the protein structure of TGW6 by X-ray crystallography. Furthermore, we screened compounds that interact with TGW6 by thermal shift assay and ¹⁹F NMR competition experiments, and obtained several candidates of antagonist. Some of these compounds were suggested to bind to the active site of TGW6, these compounds can be expected as the effective candidate for TGW6 antagonists.

研究分野：作物遺伝生理

キーワード：イネ 収量 アンタゴニスト リコンビナントタンパク質 タンパク質結晶化 X線結晶構造解析 サーマルシフトアッセイ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

イネはアジアを中心に世界人口の半数以上の主食であり、増大する食料需要に対してその収量増加が求められている。イネの収量は、穂数、粒数、粒重の積で構成される。これまでに粒重を制御する遺伝子が多数報告されている。これまでにイネの玄米サイズを制御する遺伝子として *GW2*、*GS3*、*qSW5*、*GIF1* などが単離されているが、これらはすべて機能喪失型により玄米サイズを増加させる。このことから、イネは本来、粒重を抑制するメカニズムを有していることが示唆される。人類は、これまでの長いイネの栽培化の歴史において、これら遺伝子の機能喪失型変異を選抜し、遺伝的制御によりイネの粒重を増加させてきた。

研究代表者らは、粒重に関わる *TGW6* 遺伝子をクローニングし、その遺伝子が、インドール酢酸 (IAA) - グルコースを加水分解する活性をもつ新規タンパク質をコードすることを明らかにした (Ishimaru and Hirotsu *ら Naure Geneics* 2013)。「日本晴」や「コシヒカリ」など日本で広く栽培されているイネでは、*TGW6* タンパク質により IAA が生成され、胚乳細胞数や粒重が抑制されていた。つまり *TGW6* タンパク質が粒重を抑制する方向に すなわち “リミッター” として働いている。一方、インドの在来品種「カサラス」では、1塩基の欠損により *TGW6* タンパク質は機能を失い、IAA を生成できず抑制は起こらない。そのため、胚乳細胞の数が増加することにより玄米の粒長が伸長し、粒重が増加した。さらに、機能喪失型では出穂前のデンプン蓄積が増加し、ソース能も向上することも明らかになっている。実際に、カサラス型の機能喪失型 *TGW6* に置き換えたコシヒカリでは、粒重が増加し、収量の増加が確認された。つまり、*TGW6* タンパク質というリミッターを解除することで、収量の増加がもたらされたと言える。

TGW6 によるイネの粒重制御メカニズムを応用し、育種により、従来品種にカサラス型 *TGW6* を導入することで、収量が増加した新品種を作出することも可能である。実際、機能喪失型 *TGW6* に置き換えたコシヒカリは、育種母本として新品種の育成に利用されてきている。また、ゲノム編集技術により *TGW6* 遺伝子を人為的に欠損させる研究も進められている。このように、*TGW6* の研究は育種による応用局面へも遷移してきている。しかしながら、これら育種による応用は、改良ターゲットとする品種ごとにそれぞれ行う必要があり、国内外で各地域に最適化された多様な品種それぞれに育種応用を行うためには膨大な時間と作業を必要とする。*TGW6* によるイネの粒重制御メカニズムの知見を、国内外の栽培品種に広く普及させるためには、より汎用的な手法が必要である。

以上のことから、遺伝的な機能喪失型の導入以外にも *TGW6* タンパク質の特異的阻害によって収量を増加させることが可能ではないか、という仮説に至った。近年明らかになってきたイネの粒重制御機構をモデルとして、作物形質の遺伝的制御を化学的制御に転換することが可能なか、検証する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、*TGW6* の基質結合部位に結合し *TGW6* タンパク質の機能を阻害するアンタゴニストの開発を目的とする。遺伝的制御を化学的制御に置き換えることにより、育種の時間的労力を省くことが可能となり、薬剤散布という汎用的な手法で *TGW6* のリミッターを解除することが可能となる。これまで機能喪失型 *TGW6* はイネ栽培化過程や育種で利用されてきていないため、*TGW6* アンタゴニストにより国内外のほぼすべての品種の収量を増加させることが期待できる。これまで、農業用の薬剤は除草剤や殺虫剤などが主であり、収量の低下を防ぐことが主たる目的であった。収量を直接的に改善しようとする薬剤は例がなく、独創的な視点による新規な試みである。

目的を達成するためには、医療用薬剤の開発で盛んに行われているタンパク質立体構造を基盤とした創薬が有効と考えられるが、植物分野での創薬例はほとんど知られていない。本研究では、タンパク質科学と植物科学との連携により、農業分野へも立体構造を基盤とした創薬手法を取り入れて、これまでにない新規な収量アクティベーターの創薬を目指すとともに、このような異分野融合の有効性を実証することも本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 発現用プラスミドコンストラクトの構築と大腸菌への形質転換

イネ (*Oryza sativa*, L. cv. Nipponbare) 由来の *TGW6* (na*TGW6*)、コドン最適化した *TGW6* (co*TGW6*) に加え、コドン最適化および N 末端から 30 アミノ酸残基をコードする領域を切削した *TGW6* (co 30*TGW6*) の 3 種類の *TGW6* をクローニングした。さらに、3 種類の *TGW6* それぞれを 4 種のプラスミドベクター ; pET-16b、pET-25b、pET-32a, b、および pET-40b に導入し、発現用プラスミドベクターを作製した。作製したプラスミドコンストラクトを、BL21(DE3)、Rosetta(DE3)、Rosetta-gami 2(DE3) (Merck, Darmstadt, Germany) の 3 種の大腸菌株に形質転換した。

(2) リコンビナントタンパク質の発現レベルと可溶性

pET-32a、-16b、および-25b コンストラクトを形質転換された大腸菌株を培養し、IPTG を添加してリコンビナント *TGW6* の発現を誘導した。pET-40b コンストラクトを形質転換された大腸菌株は、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンを添加した LB 培地を用いて同様に培養を行った。5 mL の培地から集菌した大腸菌を 1 mL の界面活性剤バッファーで溶解し、タンパク質を抽出した。SDS-PAGE でタンパク質が発現誘導されていることを確認した。

(3) 30*TGW6* の精製手順

Trx-(His)₆ タグを付帯した 30*TGW6* が形質転換された Rosetta-gami 2(DE3) を集菌し、タンパク質抽出バッファーに懸濁して超音波破碎した。大腸菌破碎液を遠心分離し、ÄKTA Explorer (Cytiva, Marlborough, MA) を用いたクロマトグラフィーによる精製を行った。まず、破碎後の遠心上清を HisTrap HP 5 mL カラム (Cytiva) で目的のタンパク質を含む画分を得た。溶出したタンパク質溶液を、HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade ゲルろ過カラム (Cytiva) で目的のタンパク質を分離し、各フラクション成分を 6 mL ずつ分取した。*TGW6* が溶出していると予想されるフラクションを回収し、SDS-PAGE を行い目的タンパク質の存在を確認した。回収したタンパク質溶液に Thrombin (Cytiva) を添加し *Trx*-(His)₆ タグを切断した。最後に、回収したタンパク質溶液を HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade ゲルろ過カラムにロードし、溶出したタンパク質を回収した。

(4) タンパク質結晶化

精製した 30*TGW6*(+Ca²⁺)を濃縮して結晶化に用いた。4 種類の結晶化条件スクリーニングキットを用いて Sitting-drop vapor-diffusion 法によるリコンビナント *TGW6* 結晶化条件の初期スクリーニングを行った。次に、結晶が得られた条件に限定して結晶化温度やタンパク質濃度などの条件検討を行った。タンパク質濃度 6.04 mg/mL、タンパク質のバッファー (20 mM HEPES-NaOH, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 7.5)、結晶化温度 283 K、沈殿剤 (0.8 M Sodium citrate tribasic, 0.1 M CHES-NaOH at pH 9.6, 3% Sucrose)、母液量 50 μL 、1.0 μL のドロップ (タ

ンパク質溶液と沈殿剤の量比 1:1) の条件で最良な結晶が得られた。

(5) X 線回折実験

X 線回折実験を SPring-8 (Hyogo, Japan) の Eiger 4 M (Dectris) を搭載するビームライン 26B1 にて行った。波長 1.00000 、撮影距離 180 mm、X-ray exposure 0.3 s with 0.1° oscillation per image で取得した回折データは XDS で処理した。立体構造は Collaborative Computation Project Number 4 (CCP4 program) を用いて解析した。TGW6 と 36% のアミノ酸相同性をもつ STR1 (PDB: 2FPB) をテンプレートとし、分子置換プログラムである MOLREP を用いて分子置換を行った。続いて、モデル構築プログラムである BUCCANEER を用いて TGW6 の分子モデルを作製した。グラフィックスプログラムの COOT を用いて、作製したモデルを電子密度マップに合わせて修正を行った。さらに、プログラム REFMAC5 を用いてモデルの精密化を行った。

自身で解析したタンパク質の立体構造と Protein Data Bank (PDB) に登録されている立体構造との比較を行う DALI server を用いて TGW6 と類似した構造を持つタンパク質を探索した。ヒットしたタンパク質と TGW6 の立体構造を統合計算化学システムの Molecular Operating Environment (MOE) を用いて比較した。

(6) サーマルシフトアッセイ

TGW6 の酵素反応機構を解析するため、TGW6 と基質や酵素反応物との相互作用を調査した。タンパク質物性評価装置の UNCLE (Unchained Labs, Pleasanton, CA) を用いた Thermal shift assay を行い、化合物添加の有無による TGW6 の熱安定性の変化を測定した。また、アンタゴニスト候補についても同様の実験を行い、TGW6 と候補化合物との相互作用を調査した。

(7) ¹⁹F NMR 競合実験

¹⁹F NMR によるスクリーニングは Bruker AV500 (Billerica, MA) を用いて、T2 filtering 実験による測定を行った。キシダ化学 (Osaka, Japan) オリジナルビルディングブロックのフッ素含有フラグメント化合物を用い、TGW6 の添加の有無によるシグナル強度の減衰率をもとにフラグメント化合物の評価を行った。得られたヒット化合物について、UNCLE (Unchained Labs, Pleasanton, CA) を用いた Thermal shift assay を行った。TGW6 溶液にヒット化合物を添加し、15 から 75 まで加温した際のトリプトファンの蛍光強度の変化を測定した。TGW6 の変性温度中点 (T_m 値) を算出し、化合物の有無による TGW6 の熱安定性の変化をもとにタンパク質-リガンド相互作用を評価した。ヒット化合物のクラスタリング解析には Cresset を用いた。

4 . 研究成果

(1) コンストラクトとリコンビナント TGW6 の取得

リコンビナント TGW6 の最適な発現条件として、発現量および可溶性が最も優れた条件を検討した。本研究では主に (i) 大腸菌種、(ii) コドン最適化、(iii) シグナルペプチドの切除、(iv) 共発現タンパク質タグの種類 の 4 項目を検討した。その結果、実験に用いた 12 種類の条件において、Rosetta-gami 2(DE3) を用いて Trx-(His)₆-(co) 30TGW6 を発現させる組み合わせがリコンビナント TGW6 の精製に最適な組み合わせであった。Ca²⁺が TGW6 の構造安定性に寄与することが明らかになったことから、バッファーに Ca²⁺を添加して 30TGW6 の大量精製を行ったところ、精製された 30TGW6 の収量は 4 L 培養物から 90%以上の純度で 3.8 mg であり、結晶化に十分な量を確保することができた。

(2) X線結晶構造解析

精製した 30TGW6(+Ca²⁺)を濃縮し、蒸気拡散法の sitting-drop 法を用いて結晶化を行った。沈殿剤 0.8 M sodium citrate tribasic, 0.1 M CHES-NaOH at pH 9.6, 3% sucrose、結晶化温度 283 K の条件で最良のリコンビナント TGW6 の結晶が得られた。この結晶を用いて、X線回折実験により、2.6Å の分解能で回折データの取得に成功した。X線回折実験によって得られた回折データを解析し、分子モデルの信頼性を示す R 値が 22.1%、および R_{free} 値が 26.4%の値を示し、基準を満たす立体構造を構築することができた。TGW6 の全体的な構造は six-bladed propeller 構造であった。さらに、TGW6 の blade 構造を形成するアミノ酸配列をそれぞれ対応する スtrandごとに比較すると、Strand B と Strand C の保存性が他の 2 つの Strand よりも高かった。Strand B は疎水性アミノ酸残基 (X) が 3 つ続き、小さな側鎖を持つアミノ酸残基 (#; Ser/Thr/Ala/Val/Gly) が配列された XXX# というアミノ酸配列が保存されていた。また、Strand C では塩基性アミノ酸残基 (\$)、疎水性アミノ酸残基 (X)、含硫アミノ酸残基 (@)、塩基性アミノ酸残基 (\$)、疎水性アミノ酸残基 (X) が配列された \$X@\$X というアミノ酸配列が保存されていた。

(3) ¹⁹F NMR 競合実験

TGW6 の添加によってシグナル強度が 45%以上減衰したフラグメント化合物をヒット化合物とした。1134 化合物のスクリーニングを行い、6 種のヒット化合物を選抜した。これらの構造を比較すると、ニトロフェニル基を持った化合物とインドール環を持った化合物の 2 種類に分類することができた。前者のうち 1 種の化合物 (CK0-00681) は 100%のシグナル強度の減衰を示したが、その他の 5 種の化合物のシグナル強度の減衰率はいずれも 50%前後であった

(4) サーマルシフトアッセイ

サーマルシフトアッセイでは、TGW6 の基質である IAA-glucose、酵素反応物の IAA と Glucose、およびこれらの類似化合物の合計 14 種の化合物を実験に供した。TGW6 溶液にそれらの化合物溶液をそれぞれ添加した際の TGW6 の熱安定性の変化を測定し、タンパク質の変性温度中点 (T_m 値) が 3 以上上昇した際、TGW6 の熱安定性が向上したものとした。その結果、IAA-glucose、IAA、およびこれらの類似化合物の計 4 種の化合物が TGW6 の熱安定性を向上させた。その一方で、Glucose やその類似化合物を添加した条件では、TGW6 の熱安定性は変化しなかった。これらの結果から、TGW6 の基質認識にあたり IAA-glucose における IAA の部分構造が重要であることが示唆された。また、同様の手順でアンタゴニスト候補と TGW6 との相互作用を調査した結果、6 種の候補化合物のうち IAA と類似した化学構造を有する 2 種の化合物が TGW6 の熱安定性を向上させた。したがって、薬剤開発におけるリード化合物としても IAA の化学構造が重要であることが示唆された。

計算化学ソフトウェアの Cresset Flare を利用し、TGW6 と候補化合物の結合様式を予測した。IAA-glucose のドッキングシミュレーションの結果、活性部位の深部に IAA の部分構造が結合し、分子表面側に Glucose の部分構造が位置する結合様式であることが予測された。IAA と類似した化学構造を持つアンタゴニスト候補においても活性部位深部に結合することが予測され、IAA-glucose の IAA 部分と共通して相互作用する重要なアミノ酸残基が予測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 赤羽根 健生、廣津 直樹、加藤 悦子	4. 巻 7
2. 論文標題 イネの収量および栄養価を向上させる創薬	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 88-91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akabane Tatsuki, Suzuki Nobuhiro, Tsuchiya Wataru, Yoshizawa Takuya, Matsumura Hiroyoshi, Hirotsu Naoki, Kato Etsuko	4. 巻 188
2. 論文標題 Expression, purification and crystallization of TGW6, which limits grain weight in rice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protein Expression and Purification	6. 最初と最後の頁 105975 ~ 105975
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pep.2021.105975	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 廣津直樹	4. 巻 4
2. 論文標題 イネの収量エンハンサーの創薬に向けて	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 76-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 赤羽根健生、長門石曉、津本浩平、廣津直樹、加藤悦子
2. 発表標題 イネ粒重を抑制する TGW6 の阻害剤開発を目指した19F NMR フラグメントスクリーニング
3. 学会等名 第61回NMR討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤羽根健生、廣津直樹、神野智司、加藤悦子
2. 発表標題 イネのミネラル利用効率を向上させるIN01アンタゴニストの開発を目指した薬剤探索
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 赤羽根健生、市川円香、加藤悦子、廣津直樹
2. 発表標題 イネの粒重を制御するTGW6の阻害剤候補の選抜と作物科学的評価
3. 学会等名 日本作物学会第255回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tatsuki Akabane, Nobuhiro Suzuki, Wataru Tsuchiya, Etsuko Katoh, Naoki Hirotsu
2. 発表標題 The purification of recombinant TGW6, which limits the grain size
3. 学会等名 10th Asian Crop Science Association Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤羽根健生、鈴木喜大、土屋渉、吉澤拓也、松村浩由、加藤悦子、廣津直樹
2. 発表標題 イネの穀粒サイズを抑制するTGW6の立体構造解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤羽根健生、鈴木喜大、土屋渉、吉澤拓也、松村浩由、加藤悦子、廣津直樹
2. 発表標題 イネの粒重を抑制するTGW6とそのホモログの立体構造比較
3. 学会等名 第253回日本作物学会講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤羽根健生、鈴木喜大、土屋渉、吉澤拓也、松村浩由、加藤悦子、廣津直樹
2. 発表標題 イネの粒重を抑制するTGW6のX線結晶構造解析
3. 学会等名 2021年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤羽根健生、土屋渉、鈴木喜大、加藤悦子、廣津直樹
2. 発表標題 イネ穀粒サイズを抑制するTGW6のリコンビナントタンパク質の結晶化
3. 学会等名 第 62 回植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	加藤 悦子 (Katoh Etsuko) (00355752)	東洋大学・食環境科学部・教授 (32663)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------