

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23658

研究課題名(和文)次世代「緑の革命」植物の創生に資するDELLAと転写因子の複合体構造基盤解析

研究課題名(英文)Structural study of DELLA proteins and their target transcription factors for the generation of the next Green Revolution

研究代表者

野崎 翔平 (NOSAKI, Shohei)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：20850910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：世界の食糧増産に貢献した「緑の革命」植物は、背丈が低く倒れにくいという有用形質を示す一方、窒素吸収能が低下し膨大な肥料を要求するという欠点を持ち合わせる。これは「緑の革命」植物内で高濃度に蓄積される転写抑制因子「DELLAタンパク質」が有する生長肥大や窒素吸収能など多岐にわたる生理作用を同時に抑制するという分子機能に基づいた形質である。本研究では、従来の欠点を克服した「緑の革命」植物の創生を見据え本研究では、従来の欠点を克服した「緑の革命」植物の創生を見据え、DELLAが多様なクラスの転写因子を認識する機構に着目し、DELLAおよびその標的の転写因子群の構造生物学的研究を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で対象とする転写制御因子はいずれも植物が成長・発達や窒素栄養吸収に関与する極めて重要な因子である。そのため、それらの分子機能を分子または原子レベルで明らかにした本研究成果によって、有用形質植物を合理的に創出するための基盤技術開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The Green Revolution plants, which have contributed to the food supply around the world, are difficult to fall over due to their low height. On the other hand, they have a disadvantage of requiring a huge amount of fertilizer due to their reduced nitrogen absorption capacity. Both of these traits of the Green Revolution plants are in fact caused by a high accumulation of DELLA protein, a key transcriptional regulator which recognize diverse classes of transcription factors. In this study, we conducted biochemical and structural studies on the mechanism of the recognition of diverse transcription factors by DELLA, and even the mechanism of the regulation in gene expression by the target transcription factors.

研究分野：植物生化学、構造生物学

キーワード：緑の革命 転写制御因子 ジベレリン DELLAタンパク質 ブラシノステロイド BZR転写因子 X線結晶
構造解析 DNA結合特異性

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界の食糧増産に貢献した「緑の革命」植物は、背丈が低く倒れにくいという有用形質を示す一方、窒素吸収能が低下し膨大な肥料を要求するという欠点を持ち合わせる。これは「緑の革命」植物内で高濃度に蓄積される転写抑制因子「DELLAタンパク質」が有する生長肥大や窒素吸収能など多岐にわたる生理作用を同時に抑制するという分子機能に基づいた形質である。

本研究では、従来の欠点を克服した「緑の革命」植物の創生を見据え、DELLAが多様なクラスの転写因子を認識する機構に着目する。生化学的・構造生物学的アプローチから、DELLAが分子内に備える「仕掛け」を原子レベルで解明する。

2. 研究の目的

本研究では、「緑の革命」植物の形質に密接に関わるDELLAと各種転写因子の複合体構造基盤をX線結晶構造解析法で解明し、DELLAが多様なクラスの転写因子を認識できる仕組みを原子レベルで理解する。得られた構造情報を基に、DELLAの標的転写因子群に対する結合特異性を改変することで、有用形質体 (= 従来の「緑の革命」植物の欠点を克服しうる形質) の創生への礎を築く。

3. 研究の方法

(1) DELLAと標的転写因子の相互作用解析・複合体再構成

これまで先行研究で報告されているDELLAおよびその標的である転写因子を大腸菌との異種発現系で作製し、相互作用解析を実施する。in vitroで相互作用が確認された転写因子については、どの領域がDELLAとの結合に関与するのか絞り込む。また、DELLA-転写因子複合体の簡便かつ効率的な調製方法を確立する。

(2) DELLA-転写因子複合体のX線結晶構造解析

(1)で調製方法を確立したDELLA-転写因子複合体について、結晶化スクリーニングに供する。X線回折実験で高分解の回折データが得られれば、既知のパラログ構造を鋳型とし分子置換法で位相を決定する。構造精密化後の構造より、DELLAが多様なクラスの転写因子を認識できる構造基盤を明らかにする。

4. 研究成果

(1) DELLAと標的転写因子の相互作用解析・複合体再構成

大腸菌発現系で作製したDELLAといくつかの転写因子との間で相互作用を確認することができた。特に、植物の成長を制御する植物ホルモン・ブラシノステロイドの鍵転写因子BZR(シロイヌナズナ由来)との間に、強固な結合が見出された。BZR転写因子の相互作用領域を絞り込んだところ、BZRのN末端側のDNA結合ドメインはDELLAとの直接的な相互作用がなく、C末端の天然変性領域(特定の立体構造をとらない領域)で直接相互作用することが明

らかとなった。また、天然変性領域単独では DELLA との結合は弱い、DNA 結合ドメインを介した二量体形成により DELLA との結合力が増強されることも明らかになった。本結果より DELLA は、BZR が BR 非存在下でプロテアソーム分解を受ける際に、BZR との結合を解除しプロテアソーム分解を免れる巧妙な仕組みをもつ可能性が示唆された。

(2) DELLA-転写因子複合体のX線結晶構造解析

構造解析を行うには均一なサンプル調製が不可欠である。そこで DELLA の調製法の改善を試みる中で、シロイヌナズナ由来 DELLA には恒常的二量体形成型と恒常的単量体型が存在することを見出した。さらに、二量体形成型の DELLA のみが代表的な標的転写因子 BZR と相互作用することが明らかになった。これらの結果は、DELLA の分子内に二量体形成能を変化させる未知の制御スイッチング機構が備わっていることを強く示唆している。期間内では、構造解析に適する良質な複合体結晶は得られなかったが、DELLA をハブとする多様な転写制御機構の解明を進展させるための基礎データとして今後も活用していく。

(3) DELLAが標的とする転写因子の遺伝子制御機構解明

また、DELLA が標的とする転写因子の遺伝子制御機構により深く迫るため、植物ホルモン・ブラシノステロイドの鍵転写因子である BZR の生化学的・構造生物学的解析にも取り組んだ。これまで BZR は 6 塩基の DNA をコア配列として認識すると考えられてきたが、周辺 2 塩基ずつを含んだ計 10 塩基を特異的に認識することが明らかとなった。また、Plant Cistrome Database から抽出した *in vitro* ゲノムワイド解析の結果、および共同研究チーム独自のマイクロアレイの結果と照らし合わせてみたところ、この周辺配列 2 塩基の認識が BIL1/BZR1 を介した転写抑制制御に大きく寄与することが示唆された。さらに、X 線結晶構造解析によって、BIL1/BZR1 は DNA の歪みやすさを認識することで、周辺 2 塩基への特異性を生み出していることを明らかにできた。本成果は 2021 年度中に論文としてまとめ投稿する予定である。

本研究課題で得られた結果は、植物の成長肥大制御を詳細に理解する上で極めて重要な知見であり、植物の生長を自在に制御できる基盤技術の創出につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shohei Nosaki, Miura Kenji	4. 巻 in press
2. 論文標題 Transient expression of recombinant proteins in plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Enzymology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.mie.2021.04.021	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 Furuya Tomoyuki, Saito Masato, Uchimura Haruka, Satake Akiko, Nosaki Shohei, Miyakawa Takuya, Shimadzu Shunji, Yamori Wataru, Tanokura Masaru, Fukuda Hiroo, Kondo Yuki	4. 巻 online published
2. 論文標題 Gene co-expression network analysis identifies BEH3 as a stabilizer of secondary vascular development in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plcell/koab151	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 Bui Thi Bao Chau, Nosaki Shohei, Kokawa Mito, Xu Yuqun, Kitamura Yutaka, Tanokura Masaru, Hachimura Satoshi, Miyakawa Takuya	4. 巻 41
2. 論文標題 Evaluation of spice and herb as phyto-derived selective modulators of human retinaldehyde dehydrogenases using a simple in vitro method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BSR20210491	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishida Hanna, Nosaki Shohei, Suzuki Takamasa, Ito Momoyo, Miyakawa Takuya, Nomoto Mika, Tada Yasuomi, Miura Kenji, Tanokura Masaru, Kawaguchi Masayoshi, Suzaki Takuya	4. 巻 online published
2. 論文標題 Different DNA-binding specificities of NLP and NIN transcription factors underlie nitrate-induced control of root nodulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plcell/koab103	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 Nosaki Shohei, Kaneko Mika K, Tsuruta Fuminori, Yoshida Hideki, Kato Yukinari, Miura Kenji	4. 巻 online published
2. 論文標題 Prevention of necrosis caused by transient expression in Nicotiana benthamiana by application of ascorbic acid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiab102	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 Nosaki Shohei, Terada Tohru, Nakamura Akira, Hirabayashi Kei, Xu Yuqun, Bui Thi Bao Chau, Nakano Takeshi, Tanokura Masaru, Miyakawa Takuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Highlighting the potential utility of MBP crystallization chaperone for Arabidopsis BIL1/BZR1 transcription factor-DNA complex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83532-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miura Kenji, Yoshida Hideki, Nosaki Shohei, Kaneko Mika K., Kato Yukinari	4. 巻 11
2. 論文標題 RAP Tag and PAb-2 Antibody: A Tagging System for Detecting and Purifying Proteins in Plant Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.510444	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Yoshiaki, Nosaki Shohei, Sakuraba Yasuhito, Miyakawa Takuya, Kiba Takatoshi, Tanokura Masaru, Yanagisawa Shuichi	4. 巻 16
2. 論文標題 NIGT1 family proteins exhibit dual mode DNA recognition to regulate nutrient response-associated genes in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 1009197 - 1009197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1009197	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野崎 翔平、光田 展隆、坂本 真吾、山上 あゆみ、寺田 透、徐 玉群、Bui Thi Bao Chau、三浦 謙治、中野 雄司、田之倉 優、宮川 拓也
2. 発表標題 統合的アプローチによるブラシノステロイド応答遺伝子制御の実態解明
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦 謙治、野崎 翔平、金子 美華、加藤 幸成
2. 発表標題 RAPタグとタグ抗体PMab-2 抗体：植物細胞における検出、精製のためのタグシステム
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野崎 翔平
2. 発表標題 生体高分子の X 線結晶構造解析に向けたコンストラクトデザイン戦略
3. 学会等名 第55回形質転換植物デザイン研究拠点セミナー・T-PIRCセミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 植田 佳明、野崎 翔平、宮川 拓也、木羽 隆敏、田之倉 優、柳澤 修一
2. 発表標題 シロイヌナズナのNIGT1転写因子間の相互作用が標的配列の認識と栄養応答に及ぼす影響
3. 学会等名 日本土壌肥料学会 2020年度岡山大会プログラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古谷 朋之、齊藤 真人、内村 悠、佐竹 暁子、野崎 翔平、宮川 拓也、島津 舜治、矢守 航、田之倉 優、福田裕穂、近藤 侑貴
2. 発表標題 BES/BZR転写因子の競争的関係性は維管束幹細胞制御の堅牢性に貢献する
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西田 帆那、野崎翔平、鈴木 孝征、伊藤 百代、宮川 拓也、西嶋 遼、田之倉 優、川口 正代司、川勝 泰二、寿崎 拓哉
2. 発表標題 硝酸に応答して根粒共生を抑制するNLPを介した転写制御機構の解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野崎 翔平、宮川 拓也、光田 展隆、寺田 透、山上 あゆみ、徐 玉群、Bui Thi Bao Chau、中野 雄司、田之倉 優
2. 発表標題 ブラシノステロイド情報伝達における鍵転写因子のDNA結合特異性の究明
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野崎 翔平
2. 発表標題 構造生物学的・生化学的アプローチによる植物特異的な転写制御の理解 - 植物ホルモンの情報を伝達するマスター転写因子を例として -
3. 学会等名 第52回形質転換植物デザイン研究拠点セミナー・T-PIRCセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野崎 翔平、宮川 拓也、光田 展隆、寺田 透、山上 あゆみ、中野 雄司、田之倉 優
2. 発表標題 ブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1/BZR1のプロモーター選択特異性の解明 Study on gene promoter-binding specificity by the brassinosteroid-dependent master transcription factor BIL1/BZR1
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（要旨のみ）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 BUI Chau Thi Bao、野崎 翔平、徐 玉群、田之倉 優、宮川 拓也、八村 敏志
2. 発表標題 Study on food ingredients that regulate the activity of Retinaldehyde dehydrogenase isozymes (RALDHs)
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（要旨のみ）
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------