

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2016～2020

課題番号：16H06468

研究課題名（和文）生殖をモデルとした植物ホルモン機能拡張

研究課題名（英文）Roles of phytohormone in plant reproduction

研究代表者

上口 美弥子（田中美弥子）（Ueguchi-Tanaka, Miyako）

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授

研究者番号：70377795

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 92,000,000円

研究成果の概要（和文）：ジベレリン（GA）は核内受容体GID1によって受容される。シダの造精器誘導がGID1-GAシステムを介することが明らかとなり（Science 2014）、GAは生殖ホルモンとして誕生し雄性器官の発達や受精に重要な役割を担うようになったと考えられる。一方、代表者はGID1-GAの構造解析結果から、構造情報の進化の理解に重要だと考えた。

本研究ではこれらを念頭に、(1)シダから種子植物までのGA-GID1の結合を調べ、(2) GAの合成・不活化酵素の構造・機能解析を行った。これらの解析から、生殖過程のGA生産と不活化の機構においてevolutionary arms raceが起きていると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生殖過程におけるGAと受容体の共進化をX線結晶構造解析と活性相関から明らかにするという極めて独創的な試みである。また、本研究により進められる植物タンパク質の構造解析に対するブレークスルーテクノロジーは、本新学術内だけではなく、植物研究全体に対して構造解析をより確実にを行う技術であり、今後様々な植物生理現象や応用研究に波及できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Gibberellins (GAs) are perceived by its nuclear receptor GID1. Previously, we found that the induction of antheridium in ferns is mediated by the GID1-GA system (Science 2014). Therefore, it is considered that GA was born as a reproductive hormone. In addition, the structural analysis of GID1-GA let me know that the structural information was important for understanding the evolutionary function of GA.

In this study, we (1) investigated GA-GID1 binding from ferns to seed plants, and (2) performed structural and functional analyses of GA synthesis and inactivation enzymes. Based on these analyses, we hypothesized that an evolutionary arms race occurs in the mechanism of GA production and inactivation in plant reproduction.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：gibberellin GID1 進化 X線結晶構造解析 ジベレリン不活化酵素 ジベレリン合成酵素 ジベレリンシグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

GAは植物の成長を促進するホルモンと理解されているが、シダ植物では、孢子形成に必須である一方で、シダ孢子体の伸長を誘導しない (Nature Comm. 2011)。シダ植物あるカニクサの生殖世代(n 世代)である前葉体の成熟個体は、アンセリジオーゲンというジベレリン様物質を分泌し、周りの未成熟な個体を雄化する。我々は、最近、アンセリジオーゲンが未成熟な個体に特異的に取り込まれた後、活性型 GA に変換され GA 受容体に受容されることにより、雄化を引き起こすことを明らかにした (Science 2014)。これらのことから、植物の進化初期段階での GA と受容体の本来的機能は、生殖過程に特化していたと考えられる (Nature Comm. 2011, Science 2014)。一方、進化が進んだ被子植物の場合も、GA は成長を促進するだけでなく、我々の研究により雄性器官の発達や花粉管伸長を促進する生殖ホルモンとして機能することが明らかにされた (Plant Cell 2009, Plant Cell 2011)。

我々は、イネの GA 受容体 (GID1) を単離し (Nature 2005)、GA との共結晶の X 線構造解析によりその構造を解明した (Nature 2008)。GID1 受容体は、リパーゼに類似した構造を持つユニークな核内受容体で、リパーゼ活性中心に対応する箇所でも GA と結合する。出現初期と進化が進んだ GID1 の構造を比較した結果、GA と相互作用するアミノ酸が変化することで GA との結合や特異性を高めると同時に、GA 側も代謝や合成酵素により様々な派生分子を産出し、相互依存的に共進化したと考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、植物の生殖過程において重要な役割を果たす GA の合成・代謝・受容とその後のシグナル伝達因子について構造的な解析をすることにより、これらの生殖過程における共進化の分子機構を理解し、ひいては新植物誕生の機構を GA という観点から解明することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) シダから種子植物までの様々な進化段階における GID1 受容体と多様な GA 分子種との構造や結合特性を調べ、両者の共進化の機構を理解する。
 1. シダから被子植物までの GID1、GA3ox, GA2ox の分子系統的解析を行い、植物進化の過程でこれらの遺伝子がどのように出現し変化したかを明らかにする。
 2. イネ GID1 の構造解析結果から特定された GA と相互作用するアミノ酸を変異し、それぞれのアミノ酸の GA 結合への関与を *in vitro* / *in vivo* の両面から解析する。
 3. 表面プラズモン共鳴分析装置を用いて、イネ、シダ型 GID1 と各種 GA 分子との結合性・特異性を調べ、構造と進化の関係性を明らかにする。
 4. イネ GID1 の構造解析結果、ループが変化し GA の感受性が変化したと考えられる様々な植物種の GID1 の GA に対する感受性を Y2H で調べ、その構造活性相関から GID1 のループにおける進化的重要性を考察する。
- (2) GA の合成・不活化酵素の結晶化と解析により生殖の特異的的局面における GA の多様性を理解する
 1. GA 不活化酵素、GA2ox3 については、結晶化、構造解析について終了し、GA 依存的な 2 量体化が酵素活性を上昇させることが明らかになっている。GA 依存性に重要なアミノ酸の変異による変異酵素の酵素活性減少についても、すでにデータは得られているので、その機構の

理解のために分子動力的シミュレーションを用いる。

2. 花粉特異的な、GA合成酵素、GA3ox1に関しては、結晶化を試みる。イネのシュートで発現するGA3ox2に関しては、結晶化に成功したため、アミノ酸変異により、GA3ox1型酵素に変異させ、酵素活性の変化を調べる。CRISPR-Cas9および、相同組替えによるknockout変異体がすでに得られているので、その変異形質を調べ、花粉でのGA₇の機能を調べる。
3. GA2ox3およびGA3ox1の進化系統樹ならびに、鍵となる種の酵素活性を調べることで、どのようにして、生殖器官におけるGA合成ならびに、代謝の軍拡競争が行われたのかを考察する。

(3) DELLAの構造解析

GAシグナル伝達の鍵因子であるDELLAタンパク質は、DELLAドメインを介してGID1-GA-DELLA複合体を形成する。一方で、最近の代表者らの研究により、DELLAタンパク質は、GRASドメインを介してC2H2ジンクフィンガー型転写因子(IDD)と複合体を作りDNAと結合することがわかってきた(PNAS, 2014)。複合体によるX線結晶構造解析を進めるにあたり、GID1-GA-DELLA複合体とIDD-DELLA (GRAS)複合体のどちらが、結晶化に適しているかをゲルろ過等で調べていく。AlphaScreenを用いてIDDとGRASとの結合領域を詳細に決定する。

また、結晶化実験で得られたブレイクスルーテクノロジーを領域内で共有する。

(4) 生殖関連アソシエーション解析

瀬々班と連携して、我が国で栽培されているイネ系統を用いて生殖過程における形質の多様性に基つきアソシエーション解析を行い、イネにおける生殖過程に關与するQTLの解析を行う。

4. 研究成果

(1) GID1受容体の構造的な理解

イネGID1の構造解析結果から特定されたGAと相互作用する18個のアミノ酸をそれぞれアラニンに変異し、変異GID1を*gid1 null*変異体に形質転換、その相補性を調べた。さらに、表面プラズモン共鳴分析装置により変異GID1タンパク質と様々なGA種に対する結合性を定量した。これら*in vitro*/*in vivo*の結合活性の結果から、現在の活性型GAであるGA₄のC3/C2位構造の認識、すなわちC3位の水酸基と水素結合を形成し、C2位が非水酸化であると結合できるという結合特異性が生じたことが、現在広く植物で使われているC13位水酸化GA、GA₇の誕生を可能にしたことを明らかにした。原始的なシダ型のGID1ではGA₇は結合できないが、C2に対峙するアミノ酸を1個だけ被子植物型に変化させるだけでGA₇を認識できるようになる。

さらに、真正双子葉植物にのみ見られるGID1の冗長性(単子葉植物では、GID1は1つつつである)の意味について調べた。真正双子葉植物のGID1は、系統樹上AタイプとBタイプをそれぞれの植物が持つ。一部のBタイプGID1のループ領域は、非同義置換率(dN)と同義置換率(dS)の比dN/dS(ω)が有意に高くなっており(図1)、 ω の高いGID1はGAに対する感度が高いこと、感度が高いループをそうでないループを持つGID1と入れ替えると感度が高くなることから、このループが高感度の原因であると推定した。シロイヌナズナを含むアブラナ科は、高感度BタイプGID1bを持ち、主に根に発現していた。Aタイプに属するAtGID1a、AtGID1cとともに、それ

それぞれの欠損変異体の低温ストレス化における GA 応答性の観察結果は、高感度 B タイプ GID1b が、シュートの伸長を伴わない根の伸長(冬場のロゼット植物の根のみの成長)に關与している可能性が考えられた。

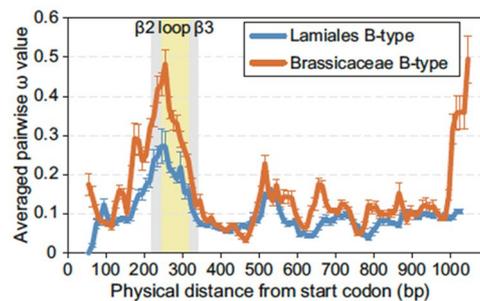


図 1 dN/dS 値

(2) GA の合成・不活化酵素の結晶化と構造解析

(2)-1 GA 不活化酵素の構造解析

GA 不活化酵素について、イネの GA2ox の結晶構造解析を行ったところ、4 量体構造をしていることが明らかになった。この多量体形成の意味を解析した。その多量体構造には活性中心の GA だけでなく、多量体分子間にも GA が存在していた。多量体形成は、GA 濃度に依存し、多量体形成に伴い酵素活性が増大した。YFP の観察や形質転換体イネの解析から、GA 依存的多量体形成はイネの細胞内、植物内でも起こっていることを明らかにした。さらに、多量体形成による酵素活性増大の機構について結晶構造データを用いた分子動力学 (MD) 法により推定した結果、分子間のジベレリンは次の反応のための基質として待機していると考えられた。この多量体間の GA の保持に関わるアミノ酸は、調べたすべての C19 型、C20 型 GA2ox に保存されていたことから、基質依存的な多量体形成機構を持つことが進化的に GA 不活化酵素の誕生に必須であったとも考えられた。

(2)-2 GA 合成酵素の構造解析

イネの花粉には、GA₇ が多量に含まれていることが明らかになった。GA₇ は、馬鹿苗病菌が作る GA₃ と同じように C2 と C3 の間に 2 重結合があり、GA 不活化酵素が働けない GA である。この GA の合成には、花粉でのみ発現している OsGA3ox1 が関わることを CRISPR-Cas9 knockout 変異体により明らかにした。ホモログである OsGA3ox2 を構造解析し、そのアミノ酸の比較からこの GA₇ 高合成の特性は、非常に保存性が高い活性中心の 1 アミノ酸の違いから生じていることを明らかにした。このアミノ酸は、ある野生イネの GA3ox1 では OsGA3ox2 型になっていた。生殖過程における花粉特異的な GA 合成酵素 GA3ox1 について、イネ属の進化の中で、いつ誕生し、GA₇ の合成に関わるようになったかを、野々村賢一博士、赤木剛士博士、水多陽子博士、榊原均博士らとの共同研究により解析した。その結果、GG から FF ゲノムに進化する過程で鍵となるアミノ酸が変化し、酵素活性として GA₇ 高変換が可能となったことを、構造解析と *in vitro* の酵素活性測定により明らかにすることができた。一方、GA3ox1 の遺伝子発現についても、GG FF BB AA と進化するに伴って茎・根を含む器官から徐々に薬特異的になったことにより茎葉や根の徒長デメリットが回避されたことが、薬での高発現を可能にしたと考えられた。

GA は、シダの時代に生殖ホルモンとして誕生したと考えられる。その後、裸子、被子植物の初期段階に GA 代謝酵素が出現し、そのホモログ数の急拡大、転写調節と多量体形成による蛋白レベルでのフィードバック調節により、巧みに量を調節されるようになり伸長成長に利用されるようになった。一方で、イネの花粉においては、GA の合成酵素は馬鹿苗菌と同様の戦略で代

謝を回避するような特殊な活性型 GA、GA₇ を合成するようになり、これがイネ属 AA ゲノムの生殖の有利さの一因になったと考えられた。この生殖の特異的的局面における evolutionary arms race は、伸長しない花粉にのみに GA3ox1 が発現したことにより進化的に可能になったと考えられた。

(3) DELLA の構造解析

GID1-GA-DELLA 複合体は、DELLA/THYNP ドメインと GRAS ドメインの間で固定した構造を作らないことが予想されたため、IDD-DELLA (GRAS) の結晶化のほうを進めた。IDD 側、GRAS 側とも複合体を作るペプチド部分を含む様々な長さのタンパク質を作ったが、結晶化できなかった。次に、IDD-DELLA(GRAS)複合体、DELLA(GRAS)単体で、Protein Thermal Shift assay により安定な結晶化条件を検討し結晶を得たが、X 線回析像は得られなかった。結晶化実験で得られたブレイクスルーテクノロジーは領域内で共有することができた。

(4) 生殖関連アソシエーション解析

研究分担者である松岡信博士らを中心に、イネの稈長・穂構造・分蘖数・到穂日数等に関する主成分分析を行った。この主成分スコアを用いた GWAS 解析の結果、ジベレリンシグナル伝達因子抑制因子として知られていた OsSPY が、イネの生殖成長期の草型決定に最大の貢献をしていることを明らかにした。これらの共同研究の結果については、2019 年の *PNAS* に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Agata Ayumi, Ando Koki, Ota Sadayuki, Kojima Mikiko, Takebayashi Yumiko, Takehara Sayaka, Doi Kazuyuki, Ueguchi-Tanaka Miyako, Suzuki Takamasa, Sakakibara Hitoshi, Matsuoka Makoto, Ashikari Motoyuki, Inukai Yoshiaki, Kitano Hidemi, Hobo Tokunori	4. 巻 3
2. 論文標題 Diverse panicle architecture results from various combinations of Pr15/GA20ox4 and Pbl6/AP01 alleles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	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/s42003-020-1036-8	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 Kawai Kyosuke, Ueguchi-Tanaka Miyako, Matsuoka Makoto	4. 巻 13
2. 論文標題 Future Strategy of Breeding: Learn by Two Important Genes of Miracle Rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Plant	6. 最初と最後の頁 823 ~ 824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molp.2020.05.001	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 Takehara Sayaka, Sakuraba Shun, Mikami Bunzo, Yoshida Hideki, Yoshimura Hisako, Itoh Aya, Endo Masaki, Watanabe Nobuhisa, Nagae Takayuki, Matsuoka Makoto, Ueguchi-Tanaka Miyako	4. 巻 11
2. 論文標題 A common allosteric mechanism regulates homeostatic inactivation of auxin and gibberellin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	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/s41467-020-16068-0	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 Yano Kenji, Morinaka Yoichi, Wang Fanmiao, Huang Peng, Takehara Sayaka, Hirai Takaaki, Ito Aya, Koketsu Eriko, Kawamura Mayuko, Kotake Kunihiro, Yoshida Shinya, Endo Masaki, Tamiya Gen, Kitano Hidemi, Ueguchi-Tanaka Miyako, Hirano Ko, Matsuoka Makoto	4. 巻 116
2. 論文標題 GWAS with principal component analysis identifies a gene comprehensively controlling rice architecture	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 21262 ~ 21267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1904964116	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 Yoshida H, Tanimoto E, Hirai T, Miyanoiri Y, Mitani R, Kawamura M, Takeda M, Takehara S, Hirano K, Kainosho M, Akagi T, Matsuoka M, Ueguchi-Tanaka M.	4. 巻 115
2. 論文標題 Evolution and diversification of the plant gibberellin receptor GID1.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 115: E7844-E7853.	6. 最初と最後の頁 E7844-E7853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1806040115	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 -

[学会発表] 計30件(うち招待講演 4件/うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Ueguchi-Tanaka, M.
2. 発表標題 Evolutionary history of a gibberellin receptor, GID1.
3. 学会等名 19th IBC2017. (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tanaka, J., Matsuoka, M., Ueguchi-Tanaka, M.
2. 発表標題 Antheridiogen determines sex in ferns via a spatiotemporally split gibberellin synthesis pathway.
3. 学会等名 22nd IPGSA (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yoshida, H., Hirano, K., Matsuoka, M., Ueguchi-Tanaka, M.
2. 発表標題 DELLA, IDD and SCL3 cooperate in the gibberellin feedback system.
3. 学会等名 22nd IPGSA
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Takehara S., Ueguchi-Tanaka M.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 13
3. 書名 Plant Structural Biology: Hormonal Regulations	

1. 著者名 上口(田中)美弥子、中嶋正敏	4. 発行年 2016年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 37-52
3. 書名 植物ホルモンの科学第3版	

〔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	松岡 信 (MATSUOKA MAKOTO) (00270992)	名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授 (13901)	
研究分担者	渡邊 信久 (WATANABE NOBUHISA) (70212321)	名古屋大学・シンクロトロン光研究センター・教授 (13901)	
研究分担者	永江 峰幸 (NAGAE TAKAYUKI) (90735771)	名古屋大学・シンクロトロン光研究センター・助教 (13901)	

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