

平成 31 年 5 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15258

研究課題名(和文)植物ホルモン・ストリゴラクトン作用機構を利用した有用形質制御に資する分子基盤研究

研究課題名(英文)Structural approach to the regulatory mechanism of strigolactone signaling

研究代表者

平林 佳(Hirabayashi, Kei)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特別研究員

研究者番号：00778730

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)：ストリゴラクトンは植物ホルモンの一種で、「枝分かれ」という有用な形質制御を担っており、ストリゴラクトン機能の薬剤による化学的制御は農業分野での応用が期待されている。本研究では、ストリゴラクトン受容タンパク質D14に結合する阻害剤の候補化合物を開発した。そして各種の生化学的な試験、またイネを使った植物実験を経て、より強力な阻害活性を示す派生化合物の創製にも成功した。またその過程において、逆の作用(促進活性)を示す派生化合物も発見した。さらにX線結晶構造解析から、この阻害/促進の変換を可能とする構造基盤について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストリゴラクトンは比較的最近になって発見された植物ホルモんで、まだまだ開発が遅れており、農業分野での応用研究が強く望まれている。しかしながら、自然界でのソースは限られており、合成コストも高いため、より単純で効率的な制御剤の開発が期待されている。

本研究で開発された新規制御剤は、簡便に合成できるだけでなく、阻害/促進の変換を可能とする画期的なものであり、農業適用にとって潜在的に強力なツールとなることは間違いない。またストリゴラクトン受容に関する複雑なメカニズムの解明(基礎研究の適用)にも極めて有用であることが予想される。

研究成果の概要(英文)：Strigolactones (SLs) are plant hormones that regulate various physiological processes, such as shoot branching, root development and leaf senescence. Therefore, chemical regulation of SL functions is expected to be applied in agriculture.

In this study, we developed lead compounds of SL antagonists, which covalently bind to SL receptor D14, by preparing an array of triazole urea compounds. With subsequent biochemical and physiological analyses, we identified some derivatives which show stronger inhibitory activity. Intriguingly, we also found that one derivative shows agonistic activity promoting the interaction between D14 and its partner D53. These results indicate that triazole urea compounds are potentially powerful tools for agricultural application and are extremely useful for the elucidation of the complicated mechanism underlying SL signaling.

研究分野：構造生物学

キーワード：植物ホルモン X線結晶構造解析 構造生物学

## 1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンを中心とする内生生理活性物質は、植物生産性に関する重要な形質を制御しており、二酸化炭素固定能の向上とそれに基づくバイオマス増産に大きく寄与する物質である。植物ホルモンの機能制御は、1950年代に始まった「緑の革命」でも鍵となる技術として使われており、その応用可能性は計り知れない。

ストリゴラクトンは、最近になって植物ホルモンとして見出されたため、世界中から新しい報告が続いている非常にホットな領域である。枝分かれという重要な形質を制御することから、農業上の応用研究が喫緊の課題となっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、2つの植物ホルモン、ジベレリンとストリゴラクトンに焦点を当てる。ジベレリンは植物の「生長肥大」に関与しており、ブドウの種なし化や果樹果肉部の充実に活用されていることは有名である。またストリゴラクトンは、最近になって新しく発見された植物ホルモンで、植物の「枝分かれ」という農業的にも極めて有用な形質制御を担っている。ストリゴラクトンは、ジベレリン同様バイオマス増加に資する高い可能性を秘めているが、農業上における効果やその利用法に先立つ基礎的知見の収集が圧倒的に遅れているため、化学的/遺伝子的利用に向けた早急な技術整備が求められている。

本研究では植物のバイオマス強化に直結する「枝分かれ」と「生長肥大」を主とする形質に着目し、基礎研究を新しい技術開発/応用展開に結びつけることを目的にしている。

## 3. 研究の方法

2つの植物ホルモン、ストリゴラクトンとジベレリンは、それぞれ植物の「枝分かれ」「成長肥大」という、農業バイオマスに寄与する極めて有用な形質を制御している。本研究では、2つの植物ホルモンの有用形質に基づく技術開発を見据え、植物ホルモンクロストークの観点から、ストリゴラクトン、ジベレリンの情報伝達系に関わる因子の生化学/構造生物学的解析を押し進める。さらに、植物ホルモン機能制御剤の結合モデルを決定し、それをベースに構造活性相関研究を展開する。得られた成果は、植物本来が持っている生長のための潜在能力を顕在化・活性化させるための知見・技術として利用できる。

## 4. 研究成果

(1) ストリゴラクトン反応機構を理解するため、ストリゴラクトン受容体タンパク質 D14 におけるストリゴラクトン結合様式の決定を目指し、保存された活性残基についての単一/多重変異体を用いて、各種ストリゴラクトンアナログ存在下における結晶化スクリーニングを実施した。得られたいくつかの結晶について回折測定を行うとともに、より適切な結晶化条件の探索を進めた。

また、D14 について高濃度ストリゴラクトン溶液ソーキングとクライオトラッピング法を組み合わせて、ストリゴラクトン分解の中間状態を時分割で捕捉し、加水分解反応の追跡も試みた。基質の占有率の問題で、反応状態の同定が難しい条件も複数あるが、いくつかの条件での構造決定に成功している。より詳細な議論を行うため、さらなる条件検討も進めた。ストリゴラクトンの正確な反応時結合様式情報が得られれば、周辺残基への変異導入等、ストリゴラクトン結合の安定化 (= 情報伝達因子との結合安定化) にも応用することができる。

(2) ストリゴラクトン情報伝達機構の全容解明に向けて、ストリゴラクトンシグナル情報伝達抑制因子である D53 に関して、その全長および報告されている機能ドメインの調製に取り組み、単離精製に成功した。また野生型および変異型 D14 と調製した D53 を用いて、ストリゴラクトンアナログ存在下における *in vitro* 相互作用実験を行い、ストリゴラクトン加水分解の必要性、シグナル伝達に必要な領域の検討を行った。さらに、D14-D53-ストリゴラクトンアナログ三者複合体の結晶構造解析に向けて結晶化スクリーニングも行い、得られた微小結晶を用いて回折測定も行った。まだ構造決定には至っていないが、良質な結晶を与える基礎条件までは明らかにすることができた。

(3) ストリゴラクトン情報伝達機構の構造基盤解明に向けて、D14 とストリゴラクトン機能制御リード化合物の複合体構造解析、および展開中のアゴニスト/アンタゴニスト候補と D14 の複合体結晶化スクリーニングを実施した。得られたいくつかの結晶について回折測定を行うとともに、より適切な結晶化条件の探索を進めた結果、良好な回折斑点を与える結晶を安定的に得

られる条件を見出した。ここから多くの化合物と D14 の複合体結晶を取得し、様々な複合体立体構造の決定に成功した。

さらに、決定した結合モデルをベースにした、制御剤の構造活性相関研究(新規制御剤のデザイン・創製)を行い、デザインした新規制御剤を用いた植物生理実験を共同研究グループと実施した。いくつかの新規化合物については、デザインの期待通り、またそれ以上の活性を示すものも得られている。これらの活性/特異性の高い新規制御剤についても、D14 との複合体構造解析を目指し結晶化スクリーニングを実施した。

以上の通り、本研究最大の目的の一つであった植物ホルモン機能制御剤の結合モデルを決定することに成功し、この構造情報と生化学データ、また共同研究先のデータを合わせて著名な国際学術雑誌への掲載が複数実現された。本成果は、本研究分野の更なる発展に資することが大いに期待できる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

(1) Nakamura H.\*, Hirabayashi K.\*, Miyakawa T., Kikuzato K., Hu W., Xu Y., Jiang K., Takahashi I., Niiyama R., Dohmae N., Tanokura M., Asami T. \*Contributed equally  
“Triazole ureas covalently bind to strigolactone receptor and antagonize strigolactone responses” *Molecular Plant*, 査読有, 12(1), 44-58, January 2019  
DOI: 10.1016/j.molp.2018.10.006

(2) Nosaki S., Miyakawa T., Xu Y., Nakamura A., Hirabayashi K., Asami T., Nakano T., Tanokura M.  
“Structural basis for brassinosteroid response by BIL1/BZR1” *Nature Plants*, 査読有, 4(10), 771-6, October 2018  
DOI: 10.1038/s41477-018-0255-1

(3) 平林佳  
最近の研究動向「金属補因子である鉄硫黄クラスターの機能と生合成メカニズム」  
“Functions and Biosynthetic Systems of Iron-Sulfur Clusters” 日本結晶学会誌、査読有、  
Vol. 60 No. 4, p.165-6、2018年8月  
DOI: 10.5940/jcrsj.60.165

(4) Takeuchi J.\*, Jiang K.\*, Hirabayashi K.\*, Imamura Y., Wu Y., Xu Y., Miyakawa T., Nakamura H., Tanokura M., Asami T. \*Contributed equally  
“Rationally Designed Strigolactone Analogs as Antagonists of the D14 Receptor”  
*Plant and Cell Physiology*, 査読有, 59(8), 1545-54, May 2018  
DOI: 10.1093/pcp/pcy087

(5) Jamil M., Kountche A. B., Haider I., Guo X., Ntui O. V., Jia K., Ali S., Hameed S. U., Nakamura H., Lyu Y., Jiang K., Hirabayashi K., Tanokura M., Arold T. S., Asami T., Al-Babili S.  
“Methyl phenlactonoates are efficient strigolactone analogs with simple structure”  
*Journal of Experimental Botany*, 査読有, 69(9), 2319-31, December 2017  
DOI: 10.1093/jxb/erx438

(6) Yuda E., Tanaka N., Fujishiro T., Yokoyama N., Hirabayashi K., Fukuyama K., Wada K., Takahashi Y.  
“Mapping the key residues of SufB and SufD essential for biosynthesis of iron-sulfur clusters” *Scientific Reports*, 査読有, 7(1), 9387, August 2017  
DOI: 10.1038/s41598-017-09846-2

(7) 中村顕、平林佳、田之倉優  
最近の研究から「擬似的微小重力環境の設計と結晶化」  
“Development of Quasi-Microgravity Environment for Protein Crystallization”  
日本結晶学会誌、査読有、Vol. 59 No. 4, p.182-7、2017年8月  
DOI: 10.5940/jcrsj.59.182

〔学会発表〕（計 15 件）

(1) Hirabayashi K., Nakamura H., Miyakawa T., Xu Y., Kikuzato K., Hu W., Jiang K., Asami T., Tanokura M.

“Structural approach to the regulatory mechanism by novel covalent antagonists of strigolactone receptor” The 1st International Symposium on the Chemical Communication (ISCC2019), P-58, Tokyo Japan, January 2019

(2) Nakamura H., Hirabayashi K., Kikuzato K., Hu W., Niiyama R., Sakai T., Xu Y., Jiang K., Takahashi I., Dohmae N., Miyakawa T., Tanokura M., Asami T.

“Chemical regulation of strigolactone responses in plants” The 1st International Symposium on the Chemical Communication (ISCC2019), P-27, Tokyo Japan, January 2019

(3) Hirabayashi K., Miyakawa T., Xu Y., Nakamura H., Kikuzato K., Hu W., Jiang K., Asami T., Tanokura M.

“Structural basis for the regulation by novel chemical compounds involved in strigolactone signaling” AsCA 2018/CRYSTAL 32, 35, Auckland New Zealand, December 2018

(4) Takao H., Hirabayashi K., Harada J., Sato H., Fukuyama K., Sugishima M., Wada K.

“Crystal structure of the substrate bound form of biliverdin reductase with unpredicted substrate-stacked geometry revealed unique reaction mechanism” AsCA 2018/CRYSTAL 32, 271, Auckland New Zealand, December 2018

(5) 平林佳、宮川拓也、徐玉群、中村英光、喜久里貢、胡文倩、姜凱、浅見忠男、田之倉優  
「植物ホルモン・ストリゴラクトン情報伝達系を制御する新規薬剤の開発と作用機構」  
日本結晶学会平成 30 年度年会、PC-II-03、東京（東京）、2018 年 11 月

(6) 平林佳、宮川拓也、徐玉群、中村英光、喜久里貢、胡文倩、姜凱、浅見忠男、田之倉優  
「ストリゴラクトン情報伝達系における新規制御剤作用機構の構造基盤」  
第 91 回日本生化学会年会、2T12a-06、京都（京都）、2018 年 9 月

(7) Takahashi Y., Yokoyama N., Fujishiro T., Yuda E., Tanaka N., Hirabayashi K., Wada K.

“Novel Insights into Bacterial Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis Systems”  
Iron-Sulfur Proteins-Biogenesis, Regulation and Function (39th Steenbock Symposium), 招待講演 (Oral Talk #8), Wisconsin USA, May 2018

(8) Wada K., Yuda E., Hirabayashi K., Tanaka N., Fujishiro T., Yokoyama N., Fukuyama K., Takahashi Y.

“Structural and Functional Analyses of *E. coli* SufBCD complex”  
Iron-Sulfur Proteins-Biogenesis, Regulation and Function (39th Steenbock Symposium), Poster #75, Wisconsin USA, May 2018

他 7 件

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

植物の枝分かれをコントロールする新しい薬剤の開発

<https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2018/20181122-1.html>

植物ホルモンのマスター転写因子 BIL1/BZR1 の特異的な立体構造を解明

<https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2018/20181002-1.html>

## 6. 研究組織

### 研究代表者のみ

※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、研究者個人に帰属されます。