

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2017～2020

課題番号：17KT0017

研究課題名(和文)局所的なホルモン応答操作技術の創成による環境適応型植物成長システムの構成的理解

研究課題名(英文) Analysis of plant growth through the creation of freehand manipulation of hormone responses

研究代表者

打田 直行 (Uchida, Naoyuki)

名古屋大学・遺伝子実験施設・教授

研究者番号：40467692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ホルモン応答を細胞種特異的に自在操作する技術を実現した。解析対象として、植物ホルモンの中で最も様々な部位で多様な現象に関わることが知られているオーキシンに着目し、オーキシン分子とその受容体を同時に改変して人工ホルモンと人工受容体の人工ペアを創出した。人工ペアを用いることで、オーキシン応答を細胞種特異的に精密操作することが可能になった。また、動物細胞においてオーキシン添加により狙ったタンパク質だけを消失させる技術であるオーキシンドグロン法(AID法)に本成果を適用することで、従来法と比べて1000倍程度低い濃度の化合物添加により細胞毒性無くタンパク質を消失させる手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、人工化合物の作成と受容体の改変により創生に成功したオーキシン応答の操作技術は、今後は基礎植物科学における未解明課題の解決に加え、オーキシン作用を作物栽培に応用する展開においても大きく活用されていくと期待される。また、植物で働く低分子植物ホルモンは他にも多数存在するが、オーキシンと同様にその自在応答操作が困難なものは多い。今後、今回の成果をきっかけに、同様の手法を用いた様々な植物ホルモンの応答操作が生み出されていくことも期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study has developed a molecular tool to manipulate hormone responses in a cell type-specific manner. We focused on auxin, a plant hormone known to be involved in various phenomena in various parts of the plant body. We created artificial pairs of artificial hormones and artificial receptors by simultaneously modifying the auxin molecule and its receptor. Using the artificial pairs, it became possible to precisely manipulate the auxin response in a cell type-specific manner. Also, we applied the artificial pairs to the auxin degron (AID) method, which is a technique to eliminate only the targeted proteins in animal cells by exogenously adding auxin. We succeeded in developing a method to eliminate proteins without cytotoxicity by adding the compounds at concentrations 1000 times lower than those of the conventional method.

研究分野：植物成長制御学

キーワード：オーキシン 受容体

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンは植物の生活環全般をとらして成長調節に関わる低分子化合物群である。植物ホルモンとしては、オーキシシン、ジベレリン、サイトカイニン、エチレン、アブシシン酸、ブラシノステロイド、ジャスモン酸、サリチル酸、ストリゴラクトンがこれまでに知られている。これら植物ホルモンは、作用部位の細胞に存在する特異的な受容体に結合することによってシグナル伝達を引き起こし、その結果として様々な生理反応を誘導する。このような植物ホルモン応答を人為的に操作する技術は、植物ホルモンが関与する生理現象を解明する重要な基礎研究の手法になるだけでなく、農業や園芸の分野でも広く応用されてきている。

一般に植物ホルモンの各々は植物体内の様々な場所における多岐にわたる生理現象に関わり、現象ごとに異なる細胞や部位でのホルモン応答が重要な働きを持つ。すなわち、内因性のホルモン応答は、全身的な調和が乱れないように、影響を及ぼす範囲の制御を含めて巧みに制御される。しかし一方で、この点が、ホルモン応答を理解しようとする実験における不利点にもなる。例えば、工夫もなくホルモンを投与する実験を行うと、本来は個体の各部位で巧みに制御されるべき調和が全身的に攪乱され悪影響が生じる（この攪乱作用は除草に活用される）。この解決法は、ホルモンを細胞レベルで局所的に投与し局所的な応答を誘導することであるが、その実現が達成できない状態が現在まで続いてきた。局所的なホルモン応答を自在に誘導できる画期的な技術が実現すると、この困難を克服することが可能となり、これまでの植物ホルモン分野で解明に至っていない制御機構や、これまでの解析ではそもそも発見されないまま見逃されてきた新たな現象の発見も可能になることが期待される。

### 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では、ホルモン応答を細胞種・部位特異的に精密に局所操作する技術の開発を目指した。その解析対象としては、これまでに知られる低分子性の植物ホルモン類の中で最も多様な現象に関わるとともに、実に様々な部位で働くことが知られるオーキシシンに着目した。オーキシシン応答は、それが誘導される部位次第でその後に調節される生理応答が変わることが顕著であり、局所的で精密なオーキシシン応答惹起操作が特に渴望されてきた。

### 3. 研究の方法

細胞種・部位特異的なホルモン刺激を精密操作するために、ホルモン自身とその受容体を同時に改変して人工ホルモンと人工受容体の新しい人工ペアを創出するという手法に挑戦した(図1)。

まず対象のホルモンの分子構造を改変し、内因性の受容体に結合しない人工ホルモン(通常植物には生理活性の無い非天然化合物)を化学合成する。一方で、ホルモン受容体のホルモン結合ポケットにも変異を導入し、内因性のホルモンには反応しないが人工ホルモンにのみ反応できるように改変受容体を創成する。このような改変受容体を生み出すことができると、この改変受容体を細胞種・部位特異的プロモーターにより望んだ箇所だけに発現させ、人工ホルモンを投与することで、投与のタイミングに合わせて狙った細胞や部位だけで局所的にホルモン応答を引き起こすことが可能になると期待できる。

本研究では、受容メカニズムの過去の知見の多いオーキシシンとその受容体の TIR1 に焦点を当て、モデル植物のシロイヌナズナを用いて実験を行う。

### 4. 研究成果

(1) TIR1 タンパク質に内在性のオーキシシン分子である IAA (インドール酢酸) が結合した複合体の構造は既に報告されていた。そこで、TIR1 のオーキシシン結合ポケットの構造をもとに、内因性の TIR1 には結合できずに植物には何の作用も発揮しないと想定される人工化合物と、内因性の IAA には結合しないもののその人工化合物には結合できるように変異を導入した改変 TIR1 の設計を試みた。まず、TIR1 の 79 番目のフェニルアラニン残基 (F79) の大きな芳香環が IAA のインドール環のすぐ横に存在することに着目した(図2左)。この大きな芳香環を持つフェニルアラニンを側鎖を持たない小さいアミノ酸であるグリシン (G) に置換すると、オーキシシン結合ポケットが大きくなりすぎるために IAA が安定的にポケットにフィットできなくなると考えた。すなわち、この F79G 改変型 TIR1 は内因性のオーキシシンに応答しないと期待できた。一方で、この改変受容体にうまくフィットする人工化合物のデザインも行った。構造情報から考えると、

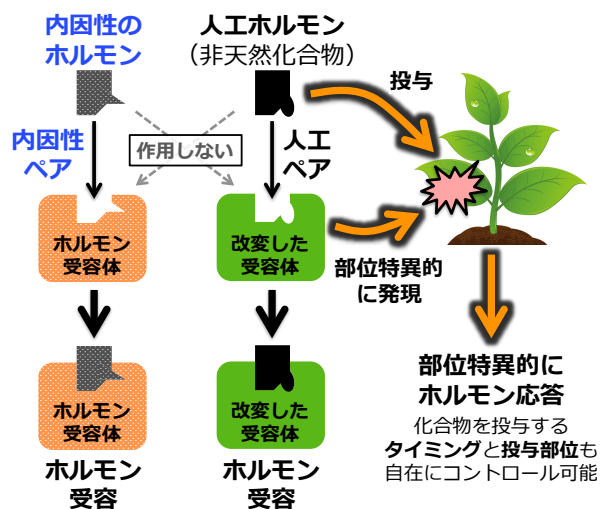


図1 ホルモン応答を部位特異的に操作するための人工ペアの創出に基づく戦略

IAA のインドール環の 5 位の位置に何かしらの芳香環を導入すれば、オーキシン結合ポケットが通常より広がっている改変受容体にフィットする化合物になると期待した (図 2 右)。この改変オーキシンは、付加した芳香環部分が野生型 TIR1 の F79 とは立体的に干渉すると考えられるため、野生型 TIR1 のオーキシン結合ポケットには結合できないと考えられた。すなわち、改変オーキシンは野生型の植物に対してはオーキシンとしての活性を發揮しないと期待できた。

このデザインに基づいた改変型 IAA を多種類合成し、これらの化合物の中から期待通りの働きをする化合物を、酵母 2 ハイブリッド法と組換えタンパク質を用いた *in vitro* 結合アッセイにより選抜したところ、図 2 右上に記した 5-(2-MeOPh)-IAA (27B) が最も理想的な作用を持っていた。すなわち、27B は、内因性の野生型 TIR1 との結合能力は劇的に低下する一方で、改変受容体 (F79 変異体) とは相互作用した。一方で、改変受容体は想定どおりに内因性の IAA には結合しなかった。

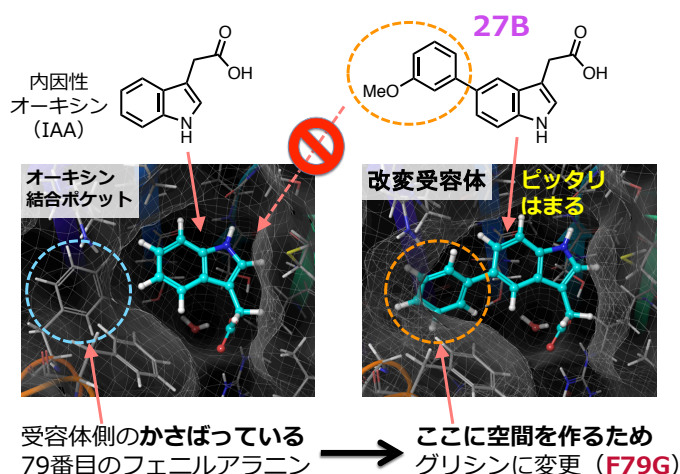


図 2 改变化合物と改変受容体の人工ペア

(2) この 27B と改変受容体のペアが植物体を用いた実験でも想定通りに働くのかを調べるために、改変受容体を全身で発現させた形質転換シロイヌナズナを作成して検証を行った。野生型植物を 27B で処理してもオーキシン応答は誘導されなかった。この時、オーキシン応答以外に関しても何の変化も見られず、27B は野生型の植物に対しては何の効果も持たない化合物であると考えられた。一方で、改変受容体を発現させた植物に 27B を処理すると、根の伸長阻害、植物体全体の矮小化、側根 (根の枝分かれ) の形成の促進など、野生型の植物を IAA で処理した場合に見られる効果と同じ効果が見られた。すなわち、27B と改変受容体のペアは、植物で用いた際には、期待通りに内因性のオーキシンと同様の生理作用を惹起させることができることが明らかとなった。

(3) この 27B と改変受容体のペアを用いて細胞種特異的にオーキシン応答を誘導することができるのかを検証するために、オーキシンによって引き起こされる現象の中でも解明が進んでいる側根形成をモデルケースにした実験を行った。過去の報告から、側根形成においては、xylem pole pericycle (XPP) と呼ばれる特定の細胞でオーキシン応答が起きると側根が形成されることが分かっている。そこで、XPP 細胞に特異的なプロモーターで改変受容体を発現させた植物に 27B を作用させる実験を行ったところ、27B 添加時にのみ側根形成が誘導された、すなわち、27B と改変受容体のペアは細胞種特異的にオーキシン応答を誘導するツールとして使用できることが明らかとなった。

(4) 改変受容体を様々な細胞種に特異的なプロモーターで発現させたシロイヌナズナを作成し、その各々に対する 27B の添加実験を行ったところ、それぞれ極めて限定された細胞種でのオーキシン応答の誘導により過去に報告のない生理現象が引き起こされることが明らかとなった。すなわち、当初の目論見通り、局所的なオーキシン応答の操作を行なって初めて見えてくる現象がまだまだ存在しており、今回開発した人工ペアによりそれら未解明現象の開拓が進む可能性が提示された。

(5) ここまで述べてきた人工ペア (27B と F79G 変異体) は、内在性のペアと比べて活性が一桁ほど弱いという欠点があった。そこで、その改良を目指したところ、内在性のペアと比べて一万倍強い人工ペアの開発に成功した。具体的には、5-Adamantyl-IAA (RY-621) と F79A 変異体である。この極めて強力な人工ペアをさらに活用することを目指し、動物細胞へのオーキシン添加により狙ったタンパク質だけを消失させる技術であるオーキシンドェグロン法 (AID 法) に今回の人工ペアを適用することにトライした。従来の AID 法では、狙ったタンパク質をしっかりと消失させるには、かなり高濃度のオーキシンを添加する必要があり、その細胞毒性が問題となっていた。そこで、今回の人工ペアを用いた改変型オーキシンドェグロン法を開発したところ、従来と比べて 1000 倍程度低い濃度の RY-621 添加により細胞毒性がない形で狙ったタンパク質を消失させることができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 13件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 高橋宏二, 萩原 伸也, 鳥居 啓子, 打田 直行	4. 巻 57
2. 論文標題 オーキシン応答の自在操作を実現する人工ホルモン・受容体ペアの創成	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 80-87
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 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 該当する
1. 著者名 Yamada R, Murai K, Uchida N, Takahashi K, Iwasaki R, Tada Y, Kinoshita T, Itami K, Torii KU and Hagihara S	4. 巻 59
2. 論文標題 A super strong engineered auxin-TIR1 pair.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 1538-1544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy127	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 該当する
1. 著者名 Torii KU, Hagihara S, Uchida N and Takahashi K	4. 巻 202
2. 論文標題 Harnessing synthetic chemistry to probe and hijack auxin signaling.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 New Phytol.	6. 最初と最後の頁 417-424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.15337	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 該当する
1. 著者名 Uchida N, Takahashi K, Iwasaki R, Yamada R, Yoshimura M, Endo TA, Kimura S, Zhang H, Nomoto M, Tada Y, Kinoshita T, Itami K, Hagihara S and Torii KU	4. 巻 14
2. 論文標題 Chemical hijacking of auxin signaling with an engineered auxin-TIR1 pair	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Chem. Biol.	6. 最初と最後の頁 299-305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nchembio.2555	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 該当する

1. 著者名 打田 直行、高橋 宏二、萩原 伸也、鳥居 啓子	4. 巻 N/A
2. 論文標題 凸凹戦略でデザインした人工オーキシン・受容体ペアにより植物のオーキシンシグナル経路をハイジャックする	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ライフサイエンス新着論文レビュー	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7875/first.author.2018.016	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 該当する

1. 著者名 Nishimura K, Yamada R, Hagihara S, Iwasaki R, Uchida N, Kamura T, Takahashi K, Torii KU, Fukagawa T	4. 巻 48
2. 論文標題 A super sensitive auxin-inducible degron system with an engineered auxin-TIR1 pair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 e108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkaa748	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 該当する

1. 著者名 Fendrych M, Akhmanova M, Merrin J, Glanc M, Hagihara S, Takahashi K, Uchida N, Torii KU and Friml J	4. 巻 4
2. 論文標題 Rapid and reversible root growth inhibition by TIR1 auxin signalling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 453-459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-018-0190-1	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 該当する

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Uchida N
2. 発表標題 A bump-and-hole strategy toward freehand manipulation of plant hormone signaling
3. 学会等名 日本学術振興会サンフランシスコ研究連絡センター設立15周年記念「World Premier Research in Japan」(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Uchida N
2. 発表標題 A bump-and-hole strategy toward freehand manipulation of plant hormone signaling
3. 学会等名 IoC-IPMB-ITbM Joint Symposium on New Frontiers by Fusing Chemistry and Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 打田直行, 高橋宏二, 萩原伸也, 鳥居啓子
2. 発表標題 植物ホルモン応答の自在操作に向けた合成生物学的凸凹戦略
3. 学会等名 日本植物生理学会年会第59回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Uchida N, Nishimura K
2. 発表標題 Manipulation of plant hormone responses and its application to rapid depletion of target proteins in animal cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
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			
米国	テキサス大学			
オーストリア	オーストリア科学技術研究所			