

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02085

研究課題名(和文)植物ホルモン受容の精密制御

研究課題名(英文)Precise regulation of plant hormone perception

研究代表者

萩原 伸也(Hagihara, Shinya)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：80373348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：分子設計に基づきサイトカイニン受容体AHK4とサイトカイニンの構造を改変することで、サイトカイニンと受容体AHK4のbump-hole ペアを開発した。この改変型AHK4を発現するシロイヌナズナに人工サイトカイニンを添加したところ、化合物の濃度依存的にサイトカイニン応答性遺伝子の発現量が増加した。一方、野生型AHK4を過剰発現させたシロイヌナズナや野生型シロイヌナズナに人工サイトカイニンを与えても、サイトカイニン応答性遺伝子の発現量に変化は見られなかった。以上の結果から、我々の開発したサイトカイニンとAHK4のbump-hole ペアは、植物体で機能することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物ホルモン受容体の多くは冗長性をもつため、遺伝学手法だけでは解明不可能な仕組みが多々存在している。さらに、植物ホルモンがいつ・どこで受容されると対象とする生理応答が引き起こされるかは、未解明な点が多く残されている。こうした課題を解決するため、本研究ではbump-hole法を植物科学に取り入れることで、植物ホルモンの効果を細胞や器官特異的に誘起する手法を開発する。本手法は、植物科学にパラダイムシフトを起こすのみならず、農業を飛躍的に効率化する革新的技術を提供でき、幅広い分野への波及効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed a bump-and-hole pair of cytokinin and its receptor AHK4. The synthetic cytokinin induced the expression of cytokinin-inducible genes in Arabidopsis expressing the modified AHK4, but not in wild-type plants. These data clearly demonstrate that the bump-and-hole cytokinin-AHK4 pair works in planta and will be a powerful molecular tool for cytokinin biology.

研究分野：植物ケミカルバイオロジー

キーワード：サイトカイニン ジベレリン

1. 研究開始当初の背景

植物は、発芽から成長、生殖に至るライフサイクルの全てにおいて、多くの生理機能を植物ホルモンによって制御している。これまでに、オーキシシン、ジベレリン、サイトカイニン、アブシシン酸、エチレン、ブラシノステロイド、ジャスモン酸、ストリゴラクトンなど様々な植物ホルモンが発見され、その役割が明らかにされてきた。特にこの10年で、これらの植物ホルモンの受容体タンパク質が続々と同定され、植物ホルモンを介したシグナル伝達の分子機構がわかってきている。

一方、植物ホルモンがいつ・どこで受容されると対象とする生理応答が引き起こされるかは、未解明な点が多く残されている。これは、植物ホルモンを組織・細胞特異的に作用させる方法が無いのが主な原因である。また、たとえ特定の組織に注入できたとしても、植物ホルモンは能動輸送や拡散により非局在化する。このため、植物ホルモンの機能を組織レベルや細胞レベルで解析した例は未だ少ない。

こうした機能解明を目指した基礎研究とは別に、植物ホルモンの生理作用は古くから植物成長調整剤として農業利用されてきた。例として、オーキシシンによるトマトの着果促進やジベレリンによる種なしブドウの生産がよく知られている。ただし、これらの植物ホルモンは多くの生理機能に關与しているため、副作用を避けて望みの効果を起こすには特定の器官(花、花房)のみに対して処理する必要がある。この作業は非常に手間がかかるため大規模農業には適さない。このため、植物ホルモンのもつ多彩な機能を植物成長調整剤として有効活用できていないのが現状である。

以上のことから、植物ホルモンの受容を局所的に制御する手法は植物科学・農業利用の両面において革新的技術になると考えられる。

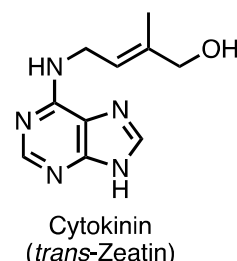
2. 研究の目的

植物ホルモン受容体の多くは冗長性をもつため、遺伝学手法だけでは解明不可能な仕組みが多々存在している。さらに、植物ホルモンがいつ・どこで受容されると対象とする生理応答が引き起こされるかは、未解明な点が多く残されている。こうした課題を解決するため、本研究では bump-hole 法を植物科学に取り入れることで、植物ホルモンの効果を細胞や器官特異的に誘起する手法を開発する。本手法は、植物科学にパラダイムシフトを起こすのみならず、農業を飛躍的に効率化する革新的技術を提供でき、幅広い分野への波及効果が期待される。

3. 研究の方法

植物ホルモン受容の局所的制御を実現するため、本研究では bump-hole 法を植物科学に取り入れる。bump-hole 法とは、変異を導入して受容体の構造を改変し、この改変型受容体に結合するリガンドを設計することで、天然型のリガンド-受容体ペアとは独立にシグナル伝達を誘起する人工ペアを作る手法である。申請者はこれまでの研究で、植物の成長全般において極めて重要な役割を担う植物ホルモン「オーキシシン」について、bump-hole ペアを作成している(*Nat. Chem. Biol.*, 2018)。我々は、この改変受容体を対象とする器官で発現させることで、オーキシシンの効果を器官特異的に誘起することに成功した。これは bump-hole 法を個体レベルで実現した初めての例である。本申請課題では、bump-hole 法を他の植物ホルモンへ適用し、より広範な植物ホルモンの生理機能を細胞・器官レベルで制御する手法の開発を目指した。

サイトカイニンは、オーキシシンと並んで植物の成長を制御する重要な植物ホルモンである。特に茎頂や根端の分裂組織の形成と維持に関わることが知られている。農業利用としては、温州みかんやリンゴの側芽の生長促進に用いられる。また、稲穂の分岐と穀粒形成に関連していることから、サイトカイニンシグナルの人工調節は穀物生産への応用も期待される。一方、サイトカイニンを過剰に投与すると植物の生長に異常をきたすため、

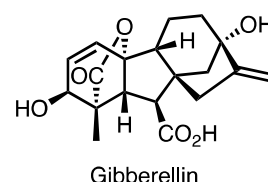


器官特異的に受容を制御する技術の開発が望まれている。

サイトカイニンの受容体はキナーゼ活性をもつ膜タンパク質で、シロイヌナズナで 3 種類 (AHK2, AHK3, AHK4) のホモログが見ついている。このうち AHK4 について、サイトカイニンとの複合体の結晶構造解析が為されている (Hothorn *et al*, 2011, 右図)。AHK4 の構造変化を伴う複合体形成において、アスパラギン酸 (D262) - サイトカイニン - ロイシン (L284) の水素結合ネットワークが重要であることがわかっている。本研究では、このネットワーク損なわないように、新たなリガンド-受容体ペアを設計した。

サイトカイニン-AHK4 相互作用の解析には、大腸菌におけるレポーターアッセイを用いた。活性の見られた誘導体についてはタンパク質レベルでの結合解析を行うとともに、改変型受容体を発現するシロイヌナズナを用いた評価を実施した。

ジベレリンは、発芽や伸長成長の促進に関わる植物ホルモンで、農業利用としては種無しブドウの生産によく用いられる。さらに、ジベレリンの生合成量や感受性は植物の背丈と強く関連しており、これらの性質を変化させることで草丈が低く倒伏し難くした品種の開発は、「緑の革命」と呼ばれ、穀物生産高を大きく向上させた。



ジベレリン受容体 GID1 は、2005 年に発見され、2008 年には複合体

の結晶構造解析が日本の 2 つのグループによって同時に報告された。この構造において、我々は疎水性ポケットを形成するアミノ酸残基に着目した。これらのアミノ酸をグリシンまたはアラニンへ置換するとジベレリン近傍に空間が生まれる。この空間を満たすようにジベレリンに置換基を導入することで、新たなリガンド-受容体ペアを設計した。

ジベレリン-GID1 相互作用の解析には、精製タンパク質を用いた *in vitro* での実験系が報告されている。本研究ではこれを参考に、改変型 GID1 を作成し、合成したジベレリン誘導体との相互作用解析を行い、活性の見られた誘導体については改変型受容体を発現するシロイヌナズナを用いた評価を実施することとした。

4. 研究成果

上記分子設計に基づき構造を改変したサイトカイニン受容体 AHK4 と合成した人工サイトカイニンとの親和性を、大腸菌を用いたレポーターアッセイで評価した。その結果、人工サイトカイニンは、野生型 AHK4 には結合せず、改変型 AHK4 に強く結合することが明らかになった。この改変型 AHK4 を発現するシロイヌナズナに人工サイトカイニンを添加したところ、化合物の濃度依存的にサイトカイニン応答性遺伝子の発現量が増加した。一方、野生型 AHK4 を過剰発現させたシロイヌナズナや野生型シロイヌナズナに人工サイトカイニンを与えても、サイトカイニン応答性遺伝子の発現量に変化は見られなかった。以上の結果から、我々の開発したサイトカイニンと AHK4 の bump-hole ペアは、植物体で機能することが明らかになった。

また、改変したジベレリン受容体 GID1 と人工ジベレリンとの相互作用をタンパク質レベルで評価したところ、野生型受容体には結合せず、改変受容体に対して選択的に結合する人工ジベレリンを見出した。現在、この改変受容体を発現する植物を作成中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 Uchida Naoyuki, Takahashi Koji, Iwasaki Rie, Yamada Ryotaro, Yoshimura Masahiko, Endo Takaho A, Kimura Seisuke, Zhang Hua, Nomoto Mika, Tada Yasuomi, Kinoshita Toshinori, Itami Kenichiro, Hagihara Shinya, Torii Keiko U	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 Chemical Biology	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 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 Yamada Ryotaro, Murai Keiichiro, Uchida Naoyuki, Takahashi Koji, Iwasaki Rie, Tada Yasuomi, Kinoshita Toshinori, Itami Kenichiro, Torii Keiko U, Hagihara Shinya	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 and Cell Physiology	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 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2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 萩原伸也
2. 発表標題 植物ホルモン受容体の機能制御
3. 学会等名 酵素工学研究会 第85回講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 萩原伸也
2. 発表標題 Controlling Plant Hormone Signaling with Synthetic Molecules
3. 学会等名 Asian Chemical Congress（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019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
---------	---------