

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15747

研究課題名(和文) 寄生植物の自殺発芽誘導剤の開発に資するストリゴラクトン受容機構の構造基盤解析

研究課題名(英文) Structural approach to the mechanism of strigolactone signaling for the control of parasitic plants

研究代表者

平林 佳 (Hirabayashi, Kei)

東京理科大学・理学部第一部応用化学科・助教

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)：アフリカや中東アジアで農業生産に甚大な被害を及ぼす寄生植物は、その宿主となる植物から放出されるストリゴラクトン(SL)を感知して発芽し、寄生している。寄生植物の防除法の中でも、宿主のいない農地で発芽を誘導する薬剤「自殺発芽誘導剤」の開発が強く望まれているが、未だ実現していない。本研究では、SL受容機構を標的とした自殺発芽誘導剤の開発を目指し、SLが受容体であるKAI2タンパク質を選択的に制御している構造基盤とシグナル伝達経路の解析に取り組んだ。その結果、寄生植物に対する新たな自殺発芽誘導剤の候補化合物を提案することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストリゴラクトン(SL)は比較的最近になって発見された植物ホルモンで、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薬剤の開発が期待されていた。本研究では、SL受容機構を標的とした薬剤の開発を行い、SLが受容体であるKAI2タンパク質を選択的に制御している構造基盤とシグナル伝達経路の解析に取り組んだ。今回提案した寄生植物に対する新たな自殺発芽誘導剤の候補化合物は、農業的に有用なことはもちろんだが、同時にケミカルバイオロジー手法によるSL応答機構の解明にも繋げることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Parasitic plants that cause enormous damage to agricultural production in Africa and Middle East Asia sense strigolactone (SL) released from their host plants, germinate and parasitize. Among the methods for controlling parasitic plants, the development of a drug "suicide germination inducer" that induces germination in agricultural land without a host is strongly desired, but it has not been realized yet. In this study, we aimed to develop a suicide germination inducer targeting the SL receptor mechanism, and worked on the analysis of the signal transduction pathway controlled by the SL receptor KAI2. As a result, we were able to propose a new candidate compound for a suicide germination inducer against parasitic plants.

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

ストリゴラクトン (SL) は、植物の枝分かれや発芽を制御する植物ホルモンであると同時に、根から分泌され、土壌からの養分吸収を促進させる共生根菌の誘引シグナル分子としても働いている。一方、ストライガをはじめとする寄生植物は、土壌中の SL を受容することで近くに宿主となる植物の存在を感知して発芽し、宿主植物の根に寄生する。国際連合食糧農業機関 (FAO) の報告によると、サバンナ地域で、ストライガによる年間被害見込額は 7000 億円であり、1 億以上の人口が食糧収量の低下により飢餓の脅威にさらされている。ストライガの種子は直径 0.2-0.5 mm で非常に小さく、大量かつ広範囲にわたって農地に存在しているため、物理的な除去は困難である。さらにストライガの種子は休眠状態での寿命が長く、15-20 年間休眠しても発芽能力を失わない。ストライガが宿主から独立して生育できないことを利用して、農作前 (宿主のいない) 農地に SL を撒き、ストライガの種子発芽を誘導する「自殺発芽誘導」という防除法が提唱されている。しかしながら、SL の人工合成には莫大なコストがかかるため、SL に代わる誘導剤の開発が望まれているが、寄生植物の種子発芽誘導機構の理解が不十分であることから、未だに市場価値のある誘導剤は開発されていない。

2. 研究の目的

本研究は、寄生植物の種子発芽制御における SL 受容メカニズムに立脚して、自殺発芽誘導剤の開発を目指すものである。これにより、寄生植物を防除し、主にアフリカ・中東アジアにおける作物の増産と安定供給への貢献が期待される。また SL シグナル伝達は、寄生植物の最重要な生存システムの一つであり、本研究は構造生物学的アプローチにより SL シグナル伝達の中心的な制御機構の解明に取り組むものでもある。

3. 研究の方法

シロイヌナズナやイネなどのモデル植物において、D14 タンパク質が SL 受容体として機能し、主として植物の枝分かれ抑制に働くことが知られている。一方、SL による植物の発芽誘導に関しては、D14 ホモログである KAI2 タンパク質が SL 受容体として機能している。また KAI2 は、山火事などで生じた煙に含まれるカリキン (KAR) も受容し、発芽誘導を引き起こすことも知られている。最近、寄生植物ストライガの KAI2 (ShKAI2) をコードする遺伝子を、*kai2* 欠損シロイヌナズナに導入した結果、SL や KAR による発芽誘導が ShKAI2 によって相補されることが示された。この結果から、寄生植物の KAI2 による制御機構を標的とした自殺発芽誘導剤の開発に期待が高まっている。しかしながら、ストライガには複数の ShKAI2 パラログが存在し、その分子系統樹から、各クレードの ShKAI2 が SL や KAR に対して異なる応答性を示すことが明らかにされている。これはストライガにおける ShKAI2 を介した発芽誘導制御システムの複雑さを示しており、その理解はまだ不十分である。

本研究の最終的な目標は、ShKAI2 の選択的制御を標的にして、寄生植物ストライガの防除に有効な自殺発芽誘導剤を開発することである。この目標を達成するためには、ストライガの発芽誘導を制御する ShKAI2 の機能的構造基盤を理解し、それに基づいた化合物設計を行う必要がある。そこで本研究は、まず各種 ShKAI2 のリガンド選択性を検証する。さらに ShKAI2 に対する SL および KAR の選択的作用の構造基盤を明らかにする。そして、取得した構造情報を用いて *in silico* スクリーニングを実施し、各種 ShKAI2 を選択的に制御する自殺発芽誘導剤の候補化合物を選抜する。

4. 研究成果

(1) 各種 ShKAI2 タンパク質について、その精製方法を確立し、リガンド選択性を検証するための試料として調製することに成功した。これらを試料とし、等温滴定カロリメトリー (ITC) 装置及び表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置を用いて SL および KAR の結合を解析した。また結果の再現性を確認するために、タンパク質のトリプトファン残基の蛍光変化を利用した結合測定法も利用して、リガンド選択性を定量的にも解析した (リガンド評価系の構築)。

(2) リガンド選択性の評価が完了したものについては、ShKAI2 と各種リガンド複合体の結晶化スクリーニングを行い、大型放射光施設 (PF/SPring-8) にて X 線回折データを収集した。複

合体構造を得るために、リガンドとの共結晶化に加え、濃度や時間を変化させたソーキングも検討した。その結果、いくつかの組み合わせについては、複合体立体構造の決定に成功した。

(3) 決定した複合体立体構造については、そこからリガンド結合に重要なアミノ酸残基を特定し、それらの部位特異的変異体を調製することに成功した。これらを試料とし、構築したリガンド評価系を用いた検証実験を実施した。

さらにリガンド選択性の異なる ShKAI2 間でのアミノ酸残基のスイッチを行うため、それらの変異体も各種調製し、同様な評価系を用いてリガンド選択性の変化も解析した。これらの結果から、各種 ShKAI2 のリガンド選択性の構造基盤の一端を明らかにすることができた。

(4) 得られた立体構造に対して、種々の化合物のドッキングシミュレーションも実施した。シミュレーションの結果から候補化合物をいくつか選定し、それらについても構築したリガンド評価系を用いた検証実験を行った。これらの結果から、寄生植物に対する新たな自殺発芽誘導剤の候補化合物を提案した。

以上の通り、本研究最大の目的の一つであった SL 活性の新たな制御化合物の提案に辿り着くことができた。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5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

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 3879
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 該当する
1. 著者名 Sato Hideaki, Sugishima Masakazu, Tsukaguchi Mai, Masuko Takahiro, Iijima Mikuru, Takano Mitsunori, Omata Yoshiaki, Hirabayashi Kei, Wada Kei, Hisaeda Yoshio, Yamamoto Ken	4. 巻 478
2. 論文標題 Crystal structures of hydroxymethylbilane synthase complexed with a substrate analog: a single substrate-binding site for four consecutive condensation steps	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 1023 ~ 1042
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BCJ20200996	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 Tanaka N., Yuda E., Fujishiro T., Hirabayashi K., Wada K., Takahashi Y.	4. 巻 112
2. 論文標題 Identification of IscU residues critical for de novo iron-sulfur cluster assembly	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 1769-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mmi.14392	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 Mizuno Takeshi, Hirabayashi Kei, Miyazawa Sae, Kobayashi Yurika, Shoji Kenta, Kobayashi Masakazu, Hanaoka Fumio, Imamoto Naoko, Torigoe Hidetaka	4. 巻 26
2. 論文標題 The intrinsically disordered N terminal region of mouse DNA polymerase alpha mediates its interaction with POT1a/b at telomeres	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 360 ~ 380
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12845	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 Hirabayashi Kei, Adachi Saki, Ono Akira, Kondo Jiro, Torigoe Hidetaka	4. 巻 77
2. 論文標題 Structural basis for the specific binding between metal ions and chemically modified mismatched base pairs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section A Foundations and Advances	6. 最初と最後の頁 C1135 ~ C1135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S0108767321085706	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22件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 平林佳
2. 発表標題 二機能性酵素が制御する植物ホルモン・ストリゴラクトン情報伝達機構の構造基盤
3. 学会等名 第93回日本生化学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山澄玲、安達咲希、小野晶、平林佳、鳥越秀峰
2. 発表標題 分子夾雑環境における金属イオンとミスマッチ塩基対の特異的結合の熱力学的特性
3. 学会等名 第56回熱測定討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平林佳、鳥越秀峰
2. 発表標題 3本鎖核酸結合蛋白質の3本鎖核酸認識機構
3. 学会等名 東京理科大学研究推進機構総合研究院核酸創薬研究部門 第3回核酸創薬研究部門シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirabayashi K., Adachi S., Yaguchi A., Ono A., Kondo J., Torigoe H.
2. 発表標題 X-ray Crystallographic Structure for the Specific Binding between Metal Ion and Chemically Modified Mismatched Base Pairs
3. 学会等名 The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2019 (ISNAC2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Adachi S., Hirabayashi K., Ono A., Kondo J., Torigoe H.
2. 発表標題 Thermodynamic Properties of the Specific Binding between Metal Ion and Mismatched Base Pairs Involving 5-Fluorouracil
3. 学会等名 The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2019 (ISNAC2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakayama S., Adachi S., Ono A., Hirabayashi K., Torigoe H.
2. 発表標題 Specific Binding between Metal Ion and Mismatched Base Pair under Molecular Crowding Condition
3. 学会等名 The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2019 (ISNAC2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Arakawa F., Kida H., Adachi S., Ono A., Urata H., Hirabayashi K., Torigoe H.
2. 発表標題 Increase of Melting Temperature does not Usually Indicate Specific Binding between Metal Ion and Mismatched Base Pair
3. 学会等名 The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2019 (ISNAC2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimmura M., Hirai S., Sugiyama K., Kiuchi K., Sato N., Katayama T., Hirabayashi K., Torigoe H.
2. 発表標題 Recognition of Triplex Nucleic Acid by Triplex Nucleic Acid-Binding Protein
3. 学会等名 The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2019 (ISNAC2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平林佳
2. 発表標題 X線結晶構造解析のメリット・デメリット：植物ホルモン情報伝達系の構造基盤と制御薬剤の開発
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 第70回日本電気泳動学会総会 (JPrOS/JES2019) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平林佳、湯田瑛樹、田中尚志、宇都卓也、湯井敏文、福山恵一、高橋康弘、和田啓
2. 発表標題 鉄硫黄クラスターの生合成を担う蛋白質複合体の構造・機能解析
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平井咲紀、新村真依子、木内一樹、佐藤憲大、片山拓馬、平林佳、鳥越秀峰
2. 発表標題 3本鎖核酸結合蛋白質が3本鎖核酸を特異的に認識する機構の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平林佳、安達咲希、矢口礼望、小野晶、近藤次郎、鳥越秀峰
2. 発表標題 化学修飾塩基を含むミスマッチ塩基対と金属イオンの特異的結合
3. 学会等名 日本結晶学会令和元年（2019年）度年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達咲希、小野晶、平林佳、鳥越秀峰
2. 発表標題 5-フルオロウラシルを含むミスマッチ塩基対と金属イオンの特異的結合の金属イオン種による変化
3. 学会等名 未来核酸テクノロジー研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirabayashi K., Adachi S., Ono A., Kondo J., Torigoe H.
2. 発表標題 Structural basis for the specific binding between metal ion and chemically modified mismatched base pairs
3. 学会等名 XXV Congress of the International Union of Crystallography (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakamura K., Hirabayashi K., Torigoe H.
2. 発表標題 Molecular recognition mechanism of the binding between quadruplex nucleic acids and budding yeast quadruplex nucleic acid binding protein
3. 学会等名 The 48th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2021 (ISNAC2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakayama S., Ono A., Hirabayashi K., Torigoe H.
2. 発表標題 Thermodynamic properties of the specific binding between metal ion and mismatched base pair under molecular crowding condition
3. 学会等名 The 48th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2021 (ISNAC2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kida H., Ono A., Hirabayashi K., Torigoe H.
2. 発表標題 Thermodynamic properties of the specific binding between metal ion and mismatched base pair in a duplex containing 2'-O,4'-C-methylene bridged nucleic acid
3. 学会等名 The 48th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2021 (ISNAC2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平林佳、湯田瑛樹、高橋康弘、和田啓
2. 発表標題 鉄硫黄クラスター生合成マシナリーの構造・機能解析
3. 学会等名 生理研研究会「生命を支える硫黄生物学の最前線」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平林佳、安藤千尋、柴田篤志、鳥越秀峰
2. 発表標題 大腸菌内組換え蛋白質発現系におけるリン酸化修飾蛋白質の調製と精製
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村一哉、平林佳、鳥越秀峰
2. 発表標題 出芽酵母4本鎖核酸結合蛋白質Stm1と4本鎖核酸の結合に関する分子認識機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鶴沢壮太、星野秀和、小島駿、平林佳、鳥越秀峰
2. 発表標題 SUMO化修飾を受けた大腸菌内発現組換え蛋白質を調製する方法の開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田篤志、安藤千尋、庄司ちなみ、平林佳、鳥越秀峰
2. 発表標題 Cdk1によるリン酸化修飾を受けた大腸菌内発現組換え蛋白質を調製する方法の開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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			
中国	南方科技大学			