

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06227

研究課題名（和文）植物成長のON・OFFを決定する新規植物調整剤の開発

研究課題名（英文）Development of new plant regulators that turn plant growth on and off

研究代表者

竹原 清日（Takehara, Sayaka）

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・研究員

研究者番号：70614139

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：植物調整剤及びそのターゲットとなるタンパク質の構造解析に基づいた新規植調剤の開発や新たな分子育種の方法を探索しているものはほとんどない。そこで、草葉伸長などに寄与するジベレリンの生合成及び不活化酵素をターゲットとして、植調剤であるプロヘキサジオンとの共結晶構造を解明し、酵素の改変や新規植調剤開発に有用なデータを提供することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GAの生合成・不活化酵素が属する2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ(20DD)は、p450に次いで植物に多い酵素であり、様々な植物ホルモンの生合成および代謝に寄与するにも関わらず、国内外を見渡しても本来の基質との共結晶として構造解析できたものはない。また、植調剤とターゲットとなるタンパク質の構造解析に基づいた新規植調剤の開発や新たな分子育種の方法の探索を行っているものもほとんどない。飼料作物や資源作物といった実用性の高い植物での応用が期待され、これまでにない新しい栽培技術の開発へと展開する可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：Few plant growth regulators and their target proteins have explored the development of new planting regulators or new molecular breeding methods based on structural analysis. In this study, we targeted the biosynthesis and inactivation enzyme of gibberellin, which contributes to shoot elongation, etc., and elucidated its co-crystal structure with prohexadione, a plant regulator, to provide useful data for modifying the enzyme and developing new plant conditioners.

研究分野：農芸化学

キーワード：gibberellin plant hormone crystal structure plant growth regulator

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ジベレリン(GA)は、草丈の伸長促進や発芽促進、花芽形成促進などさまざまな生理作用をもつ植物ホルモンのひとつである。これまでに当研究室では、GAの受容体であるGID1のX線結晶構造を明らかにし、数多くの水素結合や疎水結合を介して厳密にGAを認識していることを示した(Ueguchi-Tanaka *et al*, *Nature* 2008)。しかしながら、その厳密さゆえに、いまだGAのアゴニストやアンタゴニストは見出されておらず、GID1受容体に対する新規の植物成長調整剤(植調剤)の創生は困難であると考えられてきた。植調剤は主に植物ホルモン作用を利用しており、GAをターゲットとしたものでは「プロヘキサジオン」が良く知られている。これは、GA生合成の最終段階で働く酵素であるGA3酸化酵素(GA3ox)を阻害して作物を矮化させ、倒伏軽減などの効果により生産性を上げる働きをする。ヨーロッパでは、小麦栽培の80%、大麦栽培の60%で使用され、収量の増加に役立っている。これまで、プロヘキサジオンがイネの生合成酵素GA3oxのみならず、GAの代謝酵素であるGA2酸化酵素(GA2ox)に対しても阻害効果を示すという結果を得ている。このことは、本植調剤が伸長を抑制する一方で(GA3oxの抑制)、矮化も抑制(GA2oxの抑制)していることを示唆するものであるが、その阻害機構は明らかとなっていない。また、酵素の改変や植調剤の開発には構造生物学的アプローチは極めて有効であり、その中でもX線結晶構造解析は最も有力な研究手段であるが、植物の分野で構造解析を用いた植物調節物質の開発を目指したものはほとんどないのが現状である。

### 2. 研究の目的

GID1受容体のGA認識には、受容体リガンド結合ポケット周りの20個ほどのアミノ酸が関わっており、GID1受容体に対する新規の植調剤の創生は困難であると考えられてきた。そこで、GID1受容体に替わる新たなターゲットとしてGA合成酵素(GA3ox)及びGA不活化酵素(GA2ox)に着目し、GID1と同様に構造や機能を理解し、このバランスを巧妙に調整する新規植調剤の創生を目指すことを考えた。従って、特異性を上げた植調剤の開発において極めて重要な「植調剤とGA生合成及び代謝酵素との結合様式はどのようなものか」という問いの解明を目指す。さらにはGAシグナル応答の複雑・多様化したシステムの理解にもつながると考える。そして得られた結果により、酵素の改変や新規の植調剤開発に有用なデータを提供し、植物におけるタンパク質の構造活性相関に基づいた新たな分子育種の可能性を探ることが本申請の目的である。

### 3. 研究の方法

(1) イネにおいて、茎で発現が見られるGA生合成酵素GA3ox2ならびに不活化酵素GA2ox3について、阻害剤であるプロヘキサジオン存在下でX線結晶構造解析を行った。さらに、得られた構造解析結果からそれぞれの構造比較を行い、変異体タンパク質の構造や活性測定から阻害剤との結合に関与するアミノ酸の同定を行った。

(2) 阻害剤の結合部位及びその相互作用について、ロックアウト変異体イネを作製し検証した。

(3) 植調剤と酵素とのMDシミュレーション解析により、どのようなアミノ酸がどのような仕組みで阻害するのかを推定した。

(4) 様々な植物種に対する新規植調剤の評価

プロヘキサジオンに対してイネとは逆の反応するストック植物についてゲノム情報を取得し、反応性の違いを生み出すアミノ酸を特定した。この事から様々な植物種を調整できるように特

化した植調剤の情報が得られることが期待でき、植物分子育種の可能性を探るものである。

#### 4. 研究成果

##### (1) GA2ox と GA3ox の構造と阻害剤に対する阻害活性相関

まず、生合成酵素 OsGA3ox2、代謝酵素 GA2ox3 について PHX に対する阻害定数  $K_i$  を測定したところ、GA3ox の方が低く、確かに GA3ox の方が PHX に対する親和性が高いことが確認された。さらに GA2ox3 ならびに GA3ox2 とプロヘキサジオンおよび基質 GA との共結晶化に成功し、放射光施設 SPring-8 にて測定した結果、GA3ox2 については 1.75 Å の反射を得て精密化を行った (図 1)。一方、GA2ox3 は現在のところ 2.2 Å の反射が得られている。

OsGA3ox2 の構造決定を行った結果、PHX が活性ポケット内において本来の補基質である 2OG が結合するアミノ酸残基と結合していることが確認され、PHX が 2OG と競合的に働いていることが裏付けされた。また、OsGA3ox2-PHX 複合体と OsGA2ox3-PHX 複合体を比較すると、OsGA2ox3 では活性中心において疎水性アミノ酸残基と PHX が立体障害を生じている可能性が示唆された。そこで、OsGA2ox3 のこのアミノ酸残基を阻害されやすい GA3ox 型に改変した変異体酵素を作製し、阻害定数を測定したところ、OsGA2ox3-WT と比較して約 18 倍も PHX との親和性が増加していることが分かった。一方、阻害されにくい GA2ox 型に改変した GA3ox の変異体酵素では、約 17 倍も PHX との親和性が低下していることが明らかとなり、このアミノ酸残基が両酵素間での阻害様式の違いを生み出す一因となっていることが示唆された。



図 1. イネ GA3ox2-プロヘキサジオン共結晶構造

##### (2) ノックアウト変異体イネを用いた阻害剤に対する反応性の検証

OsGA2ox3 ノックアウト変異体の種子を用いて阻害剤との反応に重要なアミノ酸置換を導入した形質転換体を作製し、PHX に対する反応性を調べた。GA2ox を GA3ox 型に、つまり阻害されやすく改変した形質転換イネでは、野生型よりも PHX によるシュート伸長阻害が軽減された。これは PHX が改変型 GA2ox も阻害するために、野生型ほど活性型 GA の減少が起こらなかったためであると考えられる。つまり、in vivo においても、阻害剤との反応に寄与するアミノ酸の重要性が示されたことから、PHX との親和性を制御することで植物の形質をも制御することができる可能性が示唆された。これらの結果により、今後、両酵素それぞれに特異的な植調剤の開発につながる事が期待できる。

##### (3) MD による基質及び植調剤のダイナミック解析

新規阻害剤の検討を行った。計算化学ソフトウェアを用いて GA2ox への選択性を高めた候補化合物を検討し、酵素との共結晶構造解析及び阻害活性測定を進めた結果、予想通り GA2ox との親和性が増加していることが確認された。GA3ox と GA2ox の阻害のバランスが緩和されているため、草丈をあまり変えることなく、他の 2ODD に対する阻害剤として利用できる可能性が示唆された。

##### (4) ストックに対する PHX の阻害作用

PHX 処理による草丈を調べたところ、PHX-10, 100 ppm 処理では control よりも大きい値を示した一方で、PHX-1000 ppm 処理では著しく草丈が短くなっていることが確認された。これは、低濃度の PHX 処理では GA2ox が主に阻害されて活性型 GA の蓄積を引き起こし、高濃度の PHX 処理では GA3ox が阻害されて活性型 GA の減少が起こっているためだと考えられる。さらに、RNA-seq 解析により遺伝子の単離を行い、発現解析によって各成長段階で主に機能している GA3ox、GA2ox を同定した。それらの活性測定を行ったところ、GA2ox でもサイズの小さな残基であるため、イネとは逆に GA2ox がより阻害され、伸長が促進される可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawai Kyosuke, Takehara Sayaka, Kashio Toru, Morii Minami, Sugihara Akihiko, Yoshimura Hisako, Ito Aya, Hattori Masako, Toda Yosuke, Kojima Mikiko, Takebayashi Yumiko, Furuumi Hiroyasu, Nonomura Ken-ichi, Mikami Bunzo, Akagi Takashi, Sakakibara Hitoshi, Kitano Hidemi, Matsuoka Makoto, Ueguchi-Tanaka Miyako	4. 巻 5
2. 論文標題 Evolutionary alterations in gene expression and enzymatic activities of gibberellin 3-oxidase 1 in <i>Oryza</i>	5. 発行年 2022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/s42003-022-03008-5	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 上口(田中) 美弥子、竹原 清日	4. 巻 93
2. 論文標題 植物ホルモン代謝酵素の活性調節機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 404 ~ 408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930404	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 上口(田中) 美弥子、竹原 清日	4. 巻 79
2. 論文標題 ジベレリンの輸送および代謝の分子メカニズム	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー(B&I)	6. 最初と最後の頁 456 ~ 461
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹原 清日、尾原 寛之、服部 将子、三上 文三、上口(田中) 美弥子
2. 発表標題 植物成長調整剤によるイネジベレリン生合成・代謝酵素の選択的な阻害機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会 2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹原 清日、三上 文三、桜庭 俊、松岡 信、上口（田中）美弥子
2. 発表標題 構造解析から明らかとなったジベレリン及びオーキシン不活化酵素の共通した代謝メカニズム
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹原清日、尾原寛之、服部将子、三上文三、松岡信、上口（田中）美弥子
2. 発表標題 イネジベレリン生合成・代謝酵素に対する選択的阻害剤創製への試み
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹原清日、尾原寛之、三上文三、芦荻基行、上口（田中）美弥子
2. 発表標題 構造解析から明らかとなった植物成長調整剤によるイネジベレリン生合成・代謝酵素の選択的阻害機構
3. 学会等名 日本農芸化学会 2024年度大会
4. 発表年 2024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
---------	---------