

研究報告書

「植物ホルモン受容の可視化技術」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年12月～2019年3月

研究者: 萩原 伸也

1. 研究のねらい

植物は、周囲の状況を感じ、その情報を内外の各所へ伝達することで、環境への応答を起こす。この過程で、植物ホルモンは感知した情報を植物全体に伝えるシグナル分子として働く。これまでに、オーキシン、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。例えば、植物はリンや窒素が欠乏すると、ストリゴラクトンの合成量を増やし、分枝を抑制するとともに菌根菌との共生を促進することで、貧栄養状態を脱しようとする。このような環境応答は、複数の遺伝子がはたらいて起こる複雑な生理機能であるが、局所間のシグナル伝達は多くの場合限られた数の植物ホルモンが行っている。最近、各植物ホルモンの受容体が続々と同定され、こうしたシグナル伝達の分子機構が明らかになってきた。今後は、これらの受容体がいつ・どこで機能するのか、さらには他の植物ホルモンとのクロストークを明らかにし、植物機能の人工的な制御へ展開することが求められている。

将来的な作物生産への発展性を見据えると、こうした解析にはモデル植物に限定されず、フィールド展開可能な手法を用いるのが理想的である。植物に限らず遺伝子の機能解析には、ノックアウトなど遺伝学的手法がこれまで多く用いられてきた。しかし、フィールドで組換え体を用いた解析を実施するには、乗り越えるべき問題が多々存在する。このため、フィールドで植物の生命現象を解明するには、従来多用されてきた遺伝学的手法にとらわれない革新的な方法の開発が望ましい。

こうした背景から、本研究では植物ホルモンの受容を可視化する分子プローブを開発し、これを用いた植物の環境応答機構の解明・制御を行う。本手法は、植物の示す複雑な生理作用を定量的に解析し、理解するうえで極めて有用であり、ここから得られる成果は、将来的に環境適応型植物を分子レベルで設計するうえで基盤的な技術・情報となることが期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究期間は、最も古くから知られている植物ホルモン「オーキシン」、最も新しく発見された植物ホルモン「ストリゴラクトン」に関する取り組みを行った。

オーキシンは発生、分化、成長など植物の生活環の全般にわたり重要な役割を果たす植物ホルモンである。例えば、黄化芽生えが短時間で著しく伸長生長したり光の方向へ屈曲したりする現象は、オーキシンによって引き起こされる。オーキシンの働く仕組みが分子レベルで明らかになってきたのは 21 世紀に入ってからで、2005 年によくオーキシンの受容体 TIR1 が同定された。TIR1 は、F-box タンパク質の一種で、オーキシンの結合により転写抑制因子 Aux/IAA の分解を促進する。これによりオーキシン応答性の転写因子 ARF が活性化さ

れ、生理応答を引き起こすと考えられている。一方、黄化芽生えの伸長生長などオーキシンによって引き起こされる応答は極めて速いものが多いことから、遺伝子発現制御を介さない別のシグナル伝達機構の存在も示唆されている。本課題では、こうしたオーキシンの分子機構の謎に迫るべく、合成化学的アプローチから研究を行なった。

ストリゴラクトンは、ブテノライド構造をもつ一連の化合物群の総称で、2008年に植物の分枝を抑える植物ホルモンであることが示された。そもそも、ストリゴラクトンは1960年代に寄生植物ストライガの発芽誘導物質として発見された化合物である。ストライガは穀物の根に寄生して宿主を枯らす有害植物で、宿主が放出するストリゴラクトンを感知して寄生する。我々はこれまでに、ストリゴラクトン受容体が働く瞬間を可視化する分子 YoshimulactoneGreen (YLG)を開発することで、ストライガのストリゴラクトン受容体10種類を同定している。本研究では、YLGを用いた化合物スクリーニングにより、ストリゴラクトン受容体の機能を阻害してストライガの発芽を制御する分子の開発を行った。この分子はストライガの農業被害を軽減する新規農薬としての展開が期待される。また、非寄生植物のもつストリゴラクトン受容体を標的とした化合物スクリーニングから、シロイヌナズナやイネにおいてストリゴラクトンシグナルを阻害することで枝分かれを誘起する分子の開発を行った。本化合物は新規植物成長調整物質としての応用が期待される。

(2) 詳細

研究テーマ A「オーキシン受容体の応答解析」

オーキシ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、トマトの着果促進がよく知られている。ただし、オーキシンは多くの生理機能に関与しているため、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、現状では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。そもそも、オーキシンの示す多様な効果のそれぞれを分子レベルで解明すること自体困難であり、未解明な部分が多く残されていた。

この課題を解決するため、私は Bump-Hole 法(凸凹法)を用いることでオーキシンの作用を受容体レベルで制御する新技術を開発した。凸凹法とは、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。まず、受容体 TIR1 のオーキシン結合ポケットに1アミノ酸の変異を導入し、天然オーキシンに結合しない改変型 TIR1(凹 TIR1)を作成した。そして、この凹 TIR1 へ選択的に結合する人工オーキシン(凸オーキシン)を合成した。凸オーキシンは、凹 TIR1 を発現させた植物でのみオーキシン応答(根の伸長阻害など)を起こすことから、凹 TIR1-凸オーキシンのペアが天然の仕組みとは独立に植物体内で機能することがわかった。これは個体レベルで凸凹法を実現した初の例である(*Nat. Chem. Biol.*, 2018)。

シロイヌナズナには TIR1 およびそのファミリータンパク質が5種類存在し、互いに機能を相補している。このため、単独変異体では表現型が明確に見られない。また、これらのファミリー全てを欠損させると成長が著しく悪くなるため、これまで TIR1 と様々なオーキシン応答との関

連を明確にする手法は存在しなかった。一方、本手法を用いると、解析対象とするオーキシン応答が TIR1 を介したシグナル伝達であるか否かを明確にすることができる。実際に、凹 TIR1 を発現する植物に凸オーキシンを作用させたところ、黄化芽生えの迅速な伸長生長が確認された。すなわち、このオーキシン応答は TIR1 を介して誘導されることが明らかになった。さらに、我々はこの手法を用いて、オーキシンによる根の可逆的な伸長抑制も TIR1 を介して誘導されることを明らかにした (*Nat. Plants.*, 2018)。

さらに、我々は本手法の将来的な農業応用を目指し、より低濃度で効果を示す凹 TIR1-凸オーキシンペアの開発を行った。凹 TIR1 に導入するアミノ酸置換や凸オーキシンの構造を検討することで、天然のオーキシン-TIR1 ペアと比べて1万倍低濃度で相互作用を起こす凹 TIR1-凸オーキシンペアを見出した (*Plant. Cell. Physiol.*, 2018)。例えば、この凹 TIR1 を花で特異的に発現するトマトに対して凸オーキシンを散布すれば、着果促進を選択的に誘起することが可能と考えられ、農業を効率化する新規植物成長調整剤としての応用が期待される。

研究テーマ B「ストリゴラクトン受容体の機能制御」

ストライガは、穀物の根に寄生して養分を吸い取り、収穫高を激減させる有害植物である。ストライガに汚染された土壌はアフリカのサハラ沙漠以南を中心に年々広がっており、その面積は4千万ヘクタール(日本の総面積に相当)にのぼる。これによる農業被害は年間1兆円を超える見積もられ、アフリカの飢餓・貧困の要因の一つとなっている。ストライガを抑え、こうした土地を農地活用できれば、飢餓地域における作物生産量を向上し、世界的な食糧需給バランスの確保に大きく貢献すると考えられる。こうした背景のもと、私はストライガの発芽を選択的に抑える薬剤の開発を目指した。

通常の植物は季節や水分などを感じ取り発芽を開始する。これとは異なり、ストライガは寄生先となる穀物が土壌中に放出する植物ホルモン「ストリゴラクトン(SL)」を感知することで発芽する。このストライガ特有の仕組みを担うタンパク質は、ストライガ制圧に向けた分子標的の有力候補である。しかし、50年以上もの間、このタンパク質「SL 受容体」は見つかっていなかった。私は、ストライガが SL を受容する際に加水分解するという現象に着目し、加水分解されると蛍光性を示す SL 様分子「ヨシムラクトングリーン(YLG)」を開発した。この分子を使うことにより受容活性の可視化が可能となり、世界に先駆けてストライガの SL 受容体の同定に成功した。さらに YLG を用いたライブイメージングにより、ストライガが発芽時にいつ・どこで SL を受容するのかを明らかにし、発芽機構の全容解明を大きく前進させた (*Science*, 2015)。

本研究課題ではこうした成果を基盤に、SL 受容体に結合しストライガの発芽を制御する分子の開発に取り組んだ。YLG は、SL 受容体に結合すると加水分解を受け蛍光を発する。この蛍光を抑える、すなわち SL 受容体の機能を抑える化合物には、ストライガの発芽を抑制する作用が期待される。実際に、SL 受容体による YLG 加水分解を阻害する分子を ITbM 化合物ライブラリーから探索したところ、22 個のヒット化合物が得られた。このうちの一つの化合物 SGI-1 には、SL によって誘導されるストライガの発芽を阻害する効果が見られた。さらに、この化合物を誘導体化することで、より高活性な化合物 SGI-3 が得られた。本ストライガ発芽阻害分子は、ストライガによる農業被害を抑え、食糧難地域に農地を回復する突破口になると期待される。

一方、通常植物(非寄生植物)のもつ SL 受容体 DWARF14(D14)は、枝分かれを抑制することが知られている。本課題では、YLG の蛍光を指標とした化合物スクリーニングを D14 に対しても実施し、4 化合物を D14 の競合阻害剤として同定した。この中で最も阻害活性の強い化合物(DL1)の存在下でシロイヌナズナを生育したところ、枝分かれの増加が確認された。また、イネにおいても同様の効果が見られた(*ACS Central Science*, 2018)。植物の枝分かれの数は農作物の収量やバイオマス生産量と相関することから、DL1 は新規植物成長調整剤としての応用が期待される。

3. 今後の展開

研究テーマ A「ストリゴラクトン受容体の機能制御」

SGI-3 はストライガ被害を軽減する農薬として、DL1 は新規植物成長調整剤として、それぞれ応用が期待される。今後はこれらの化合物の安全性試験を実施するとともに、ポット試験や圃場試験を行い、社会実装に向けた取り組みを進める。

研究テーマ B「オーキシン受容体の応答解析」

本手法をフィールドへ展開するため、凹 TIR1 を部位特異的に発現する実用植物(トマトなど)の作成を行っている。これらの植物を用いた試験を進めるとともに、凸オーキシンの安全性評価を行い、本技術実用化への取り組みを進める。また、オーキシン以外の植物ホルモンについても、同様の手法で応答を精密に制御する系を確立し、様々な植物の機能を自在にコントロールする汎用的手法を構築する。

4. 自己評価

植物科学は、これまで遺伝学や分子生物学といった生物学的手法を基盤に進められてきた。これにより、植物の環境応答や成長の仕組みなどに関する膨大な知見が蓄積している。一方、冗長性などの問題により、遺伝学的手法では手付かずにあった領域も存在する。また、変異体や組換え体の作成法が確立されていない植物種も存在しており、過去にモデル植物を用いて得られてきた知見を有用作物へ展開するうえでの足かせとなっている。本研究のねらいは、植物科学にケミカルバイオロジーを融合することで、このような課題を解決できる可能性を示すことにある。特に、植物研究者が多く集う本さがけ領域においてこうした研究を遂行することで、新たな共同研究を生み出すとともに、気鋭の植物研究者とケミカルバイオロジー的手法の有用性を共有することを目指した。本研究期間中に化合物を提供した領域メンバーは 9 名にのぼり、概ねこの目的は達成されたとと言える。

個別の研究課題を進めるにあたっては、化合物の化学合成に必要な装置や植物での評価に必要な顕微鏡など、設備面での充実に予算を執行し、3 名の大学院生が参画した。その結果得られた成果は、化学、植物科学、ケミカルバイオロジーの各分野におけるトップジャーナルに掲載されている。このうち一報(*Nat. Plants.*, 2018)は、本研究成果が即座に海外との共同研究へ発展したものであり、本研究の学術的波及効果の高さを示している。また、さがけ研究を含め、我々の開発した化合物群は、植物の環境適応を補助する農薬となるだけでなく、植物がもつ環境適応の仕組みを分子レベルで解明するためのツールとしても利用可能であり、産学ともに新たな連携の構築が期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Naoyuki Uchida, Koji Takahashi, Rie Iwasaki, Ryotaro Yamada, Masahiko Yoshimura, Takaho A. Endo, Seisuke Kimura, Hua Zhang, Mika Nomoto, Yasuomi Tada, Toshinori Kinoshita, Kenichiro Itami, Shinya Hagihara*, and Keiko U. Torii* Chemical hijacking of auxin signaling with an engineered auxin-TIR1 pair <i>Nat. Chem. Biol.</i> , 2018 , <i>14</i> , 299–307.
2. Masahiko Yoshimura, Ayato Sato, Keiko Kuwata, Yoshiaki Inukai, Toshinori Kinoshita, Kenichiro Itami, Yuichiro Tsuchiya, and Shinya Hagihara Discovery of shoot branching regulator targeting strigolactone receptor DWARF14 <i>ACS Central Science</i> , 2018 , <i>4</i> , 230–234.
3. Matyáš Fendrych, Maria Akhmanova, Jack Merrin, Matouš Glanc, Shinya Hagihara, Koji Takahashi, Naoyuki Uchida, Keiko U. Torii & Jiří Friml Rapid and reversible root growth inhibition by TIR1 auxin signaling <i>Nat. Plants.</i> , 2018 , <i>4</i> , 453–459.
4. Ryotaro Yamada, Keiichiro Murai, Naoyuki Uchida, Koji Takahashi, Rie Iwasaki, Yasuomi Tada, Toshinori Kinoshita, Kenichiro Itami, Keiko U. Torii, Shinya Hagihara A super strong engineered auxin-TIR1 pair <i>Plant. Cell. Physiol.</i> , 2018 , <i>59</i> , 1538–1544.
5. Hiroyuki Kitano, Jae-Hoon Choi, Ayaka Ueda, Hideto Ito, Shinya Hagihara, Toshiyuki Kan, Hirokazu Kawagishi, Kenichiro Itami Discovery of Plant Growth Stimulants by C-H Arylation of 2-Azahypoxanthine <i>Org. Lett.</i> , 2018 , <i>20</i> , 5684–5687.

(2) 特許出願

研究期間累積件数： 2 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. “Small molecules that regulate plant hormone signaling”
The 2nd International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2017), Kyoto, 2017.12.14. (招待講演)
2. 「植物ホルモン受容体を介したシグナル伝達の精密制御」
第 18 回日本蛋白質科学会年会, 新潟, 2018.6.27. (招待講演)
3. 「植物ホルモンシグナルの人工的制御」
日本農芸化学会 2018 年度大会, 名城大学, 2018.3.16. (招待講演)
4. 「有機化学と合成生物学を駆使して植物ホルモンの作用をハイジャック ～化学の力でダーウインのつけた植物の運動の謎に迫る～」 2018.1.23. (プレスリリース)