

研究終了報告書

「次なる「緑の革命」植物の創出を目指した転写中核因子の研究」

研究期間：2021年10月～2024年3月

研究者：野崎 翔平

1. 研究のねらい

本研究のねらいは、「緑の革命」の利点と欠点をともにもたらした転写中核因子が分子内に備える巧みな仕組みをタンパク質科学的視点から解き明かすことによって、従来の「緑の革命」植物がもつ欠点の克服への足掛かりとなる基礎的な知見を得ることにある。

1960代に起こった「緑の革命」では、肥料を与えても背丈が高くなりすぎず倒れにくい半矮性の品種が育種され、世界中で食糧増産がもたらされた。しかしながら、「緑の革命」植物は、窒素栄養の吸収・同化能が低下しているため、膨大な化学肥料を要求するという欠点も持ち併せている。世界中に豊かな恵みをもたらす化学肥料は、同時に環境問題や地球温暖化を引き起こす危険性を孕む。そのため、従来の欠点を克服し、環境負荷に配慮した次世代型「緑の革命」植物の創生が喫緊の課題となっている。

転写中核因子Aは、共通性をもたない多様なクラスの転写因子ファミリー群を認識し、それらのはたらきを抑制する。具体的には、「緑の革命」植物で高蓄積したAが、生長肥大促進または窒素吸収・同化促進を司る転写因子群のはたらきを強く制限する。したがって、「緑の革命」植物における利点と欠点の分子機構、すなわち、Aが多様なクラスの転写因子を認識できる仕組みを理解することができれば、Aの転写因子認識選択性を自在に改変できるようになり、欠点のみを打破した「緑の革命」植物の創出に繋がると考える(図1)。しかし、Aの幅広い転写因子認識選択性を説明できる基礎的な知見は未だ得られておらず、Aの分子機能改変を通じた応用展開への扉は依然として閉ざされたままである。

そこで、本研究では、「大腸菌や植物を用いた高難度タンパク質の発現および調製」および「植物転写因子のタンパク質科学的解析」で実績を積んだ研究代表者が、これまで長年謎だったAの多機能性を説明する分子構造基盤の解明に挑む。

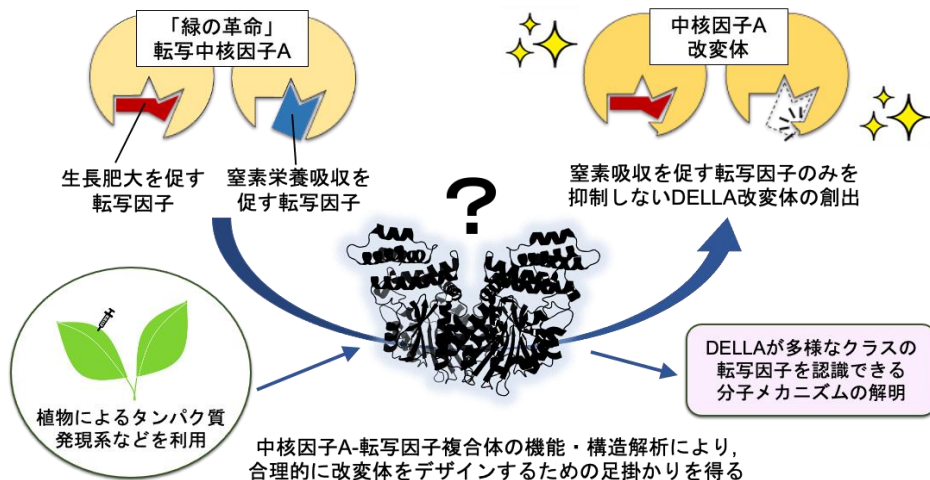


図1. 本ACT-X研究のコンセプト(開始当初)

2. 研究成果

(1) 概要

本研究の目的は、「緑の革命」をもたらした転写中核因子 A が多様な転写因子群を認識できる根本的な仕組みを明らかにし、A の機能制御を通じた応用展開への足掛かりとなる基礎的知見を得ることである。この目的に対し、ACT-X 研究期間内では、以下の成果が得られた。

- ① タンパク質の調製が困難であるが故にその分子機能が長年不明であった A の高効率な異種発現系(大腸菌およびベンサミアタバコ)および種々の生化学解析系を確立した。
- ② A は「未知分子結合による制御」と「酸化還元による制御」という2つの異なる制御を通じた多量体形成スイッチング機構をもつことが示唆された。
- ③ 窒素利用(吸収・同化)の促進にはたらく転写因子複合体の新たな複合体形成様式および A との相互作用による機能抑制様式を見出した。

研究当初の最終目的である、「緑の革命」転写中核因子 A および A-標的転写因子複合体も立体構造解明、および、その構造情報に基づく A の機能改変体のデザインは研究期間内に達成できなかった。しかし、国内外の多くの研究者が挑戦してきた A の構造解析が何故これまで全く成功しなかったのか、その原因ともいえる②の知見を発見できたことは大きな成果ではないかと考える。また、②は A の最大の謎である「どのように多様なクラスの転写因子群を適切なタイミングで選択的に認識できるのか?」という問いに対する答えそのものである可能性も高い。したがって、本 ACT-X 研究では、「緑の革命」をもたらした A のもつ多機能性の全容解明に至るための足掛かりを得たといえる。また、A に関わる幅広い研究分野に新機軸を打ち出すのみならず、環境にやさしい次世代「緑の革命」をはじめとしバイオマス産業そして園芸産業、さらには世界レベルでの環境問題やエネルギー問題の克服といった応用展開につながる点でも大きな波及効果が期待される。

(2) 詳細

研究項目1 「転写中核因子 A の高効率な調製系確立と多量体形成スイッチング」

大腸菌およびベンサミアタバコによる発現系を基盤として、シロイヌナズナ由来転写中核因子 A の高効率な発現系および精製系を確立した。特にベンサミアタバコを用いた発現系については、400 g の植物体から高純度の A を、1 mg 以上(10 mg/mL x 100 μ L 以上)という結晶化をも可能にする量(研究開始当初の 10 倍相当)を取得できるようになった。また、ゲル濾過クロマトグラフィー精製によって、大腸菌およびタバコで生産した A はいずれも二量体と単量体が混在しており、その二量体と単量体は非平衡的に存在していることも明らかとなった。タバコで作製した A の方が二量体型の割合が大きかったこと、また、高精度構造予測プログラム ColabFold を用いた予測構造より二量体形成界面の近くに低分子が結合可能な存在も示唆されたことから、植物が豊富にもつ何らかのシグナル分子 X が A の単量体型 \leftrightarrow 二量体型スイッチングを制御していることも予期される。さらに、単量体型の A は酸化されることで四量体化しやすいこと、四量体型は還元されることで単量体になることも見出した。植物間で高く保存されたシステイン残基の変異体実験によって、酸化還元スイッチングに関わるシステイン残基の同定にも成功している。以上のことから、転写中核因子 A は少なくとも「未知分子結合による制御」と「酸化還元による制御」という2つの異なる制御を通じた多量体形成スイッチング機構をも

つことが示唆された。また、これらの状態変化は、国内外の多くの研究者が挑戦してきた A の構造解析がこれまで尽く成功しなかったことの原因の 1 つであると考えられるため、本研究により構造解明の突破口が開かれたといえる。

研究項目2「転写中核因子 A の転写因子結合パターンに関する生化学的特徴」

これまで信頼性のある中核因子 A-転写因子の in vitro 相互作用解析系は報告されていなかったが、研究代表者は中核因子 A と伸長成長の鍵転写因子 B の結合強度を比較可能なプルダウンアッセイ系を確立した。B は分解かつ凝集しやすい天然変性領域を含んでいたため調製が極めて難しいものであったが、研究代表者がこれまで培ってきた天然変性タンパク質の調製技術が本実験系の確立につながったといえる。確立させたプルダウンアッセイ系により、単量体型(還元型)A は B との結合が弱い一方で、二量体型(未知分子結合型)A および四量体型(酸化型)A は B と強固に結合できるという驚くべき事実が明らかになった。以上の知見は、中核因子 A が未知分子および酸化還元センサーとしてはたらき多種多様な転写因子との結合パターンをダイナミックに変化させることで(図2)、自ら動くことができない植物の成長段階や環境変化における柔軟性と可塑性を生み出していることを強く示唆している。そして、長年謎であった「A が多様なクラスの標的転写因子群を適切なタイミングかつ選択的に認識する根本的な仕組み」に迫りうるための足掛かりになると期待される。

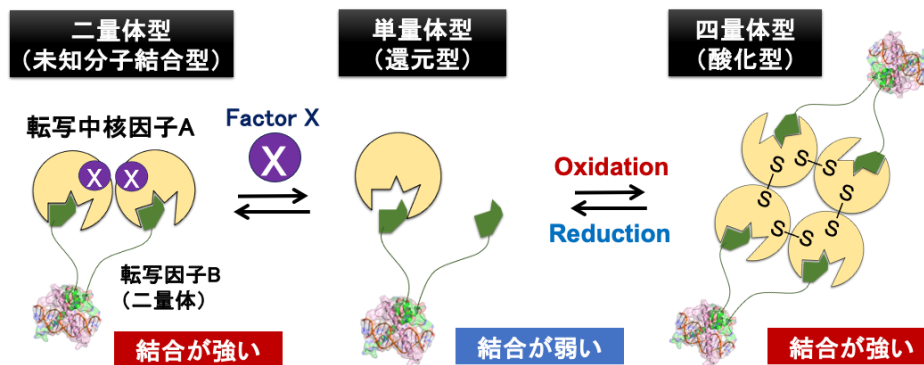


図2. 転写中核因子Aの転写因子結合パターンに関する生化学的特徴

研究項目3「窒素利用の促進にはたらく転写因子複合体の活性化/抑制化の分子基盤」

面接審査会・領域会議・サイトビジット等でアドバイザーからのご助言もあり、窒素利用のマスター因子である DNA 結合転写因子 C とその転写補因子 D の転写活性化機構、および A による抑制機構の詳細にも迫ることにした。ゲルシフトアッセイを用いて、転写因子 C-D-DNA 複合体の in vitro 相互作用解析系を構築することができた。上記の実験系に中核因子 A を添加したところ、二量体型(未知分子結合型)A が B の DNA 結合を強く阻害することが示唆された窒素利用を司る転写因子複合体の結合動態には想定以上に複雑なメカニズムが備わっていたことから、今後はその分子構造基盤を原子分解能レベルで理解することを目指したい。そして最終的に、植物の窒素利用を自由自在に制御するための技術基盤を築きたい。

その他項目

「緑の革命」転写中核因子 A およびその変異体の転写因子結合特異性を評価するための、タバコの葉を用いたタンパク質間相互作用系 (BiFC 法) を構築した。A 変異体をシロイヌナズナで過剰発現させ窒素利用効率を調べる実験系確立のために、A を発現させるベクターを構築した。共同研究先で形質転換する予定であったが、研究代表者の時間的都合で ACT-X 期間中の実験は叶わなかった。

3. 今後の展開

「緑の革命」転写中核因子 A が制御する生命現象の多種多様さ(伸長成長・窒素利用・発芽・開花・着果・生殖・根粒共生など)を考えると、長年謎であった「A が多様なクラスの標的転写因子群を適切なタイミングかつ選択的に認識する仕組み」を明らかにすることができれば、**A の分子機能を選択的に制御できる技術の開発に直結できる**と期待できる。今後 10 年は、タンパク質科学的な立場から得られた知見を基軸とし、A の多量体形成スイッチング機構の全容を明らかにしていきたいと考える。特に、モデル植物であるシロイヌナズ由来の A のみならず、イネやダイズといった農業上重要な作物における A の分子機能についても突き詰めたい。そして、ACT-X で知り合うことができた育種分野、園芸分野、植物バイオテクノロジー分野、ケミカルバイオロジー分野、そして有機化学分野などの多彩な研究者らと連携することで、**植物のもつ潜在能力を最大限に引き出すことができる有用植物や植物調節剤を合理的に創出し、実用化とともに 20-30 年後の食の未来を切り拓きたいと考える。**

4. 自己評価

● 研究目的の達成状況

当初の最終目的である中核因子 A の構造解明および改変体デザインを達成できなかったことに関しては課題が残るが、一方で植物ホルモン学に残された大きな謎の 1 つの解明につながる基礎的知見および突破口を得たことは評価に値するのではないかと考える。また、ACT-X 研究期間内での論文化も叶わなかったが、今後数年以内にハイインパクトジャーナルへの掲載とともに関連分野への大きな波及効果をもたらしうると確信している。

● 研究の進め方

本 ACT-X 採択が後押しとなりテニュアトラック助教のポジションを得られた反面、承継枠の教員として教務・校務が劇的に増え、想定以上に研究時間の確保が非常に難しくなってしまった。幸い、ACT-X 研究費で技術補佐員を週3日勤務で雇用したことにより、研究が中断するという事態を防ぐことができた。消耗品の使用も過不足なく適切であり、増額経費で購入した微量分光光度計も当該研究で絶え間なく使用され研究加速に貢献したことから、研究代表者のリソースを最大限に活用できたのではないかと考える。

● 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

本研究の研究対象である転写中核因子 A は「緑の革命」の利点(伸長成長抑制)と欠点(窒素利用能の低下)をもたらしたのみならず、発芽・開花・生殖・果実類の着果・マメ科植物の根粒共生などといった多岐にわたる生命現象を制御する。したがって、本研究が足掛かりとなって「**多様なクラスの標的転写因子群を適切なタイミングかつ選択的に認識する根本的な仕組み**」の全容が解明されることは、**上記の生命現象を選択的かつ適切に制御できる技術の開発に**

直結するものと期待できる。具体的には、環境にやさしい農業をはじめとしバイオマス産業そして園芸産業、さらには世界レベルでの環境問題やエネルギー問題の克服といった様々な応用展開につながると考える。

● ACT-X 領域内での交流に関して

本領域は分野が全く異なる ACT-X 研究者や各分野を牽引するトップ研究者(アドバイザー)が参画されていたため、自身にとって新しい研究対象・研究手法・研究に対する考え方を知ることができ、研究者としての視野やヒューマンネットワークを大きく拡張することができた。また、すでに領域内の ACT-X 研究者らと3件の共同研究を開始しており、ACT-X 研究の加速化、さらに重要な農作物への応用を見据えた基盤研究にも取り組み始めている。多くの方との出会いが本領域参画の中で最も価値あることであった。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0件(特許公開前のもも含む)

(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. Shohei Nosaki 「"Shaping" gene regulations for the second green revolution」

TSUKUBA CONFERENCE 2023 (2023-09-27)

2. 野崎 翔平 「食の未来に資する植物タンパク質研究」

日本農芸化学会 2024 年度大会 創立 100 周年記念大会「これから 100 年の農芸化学研究を展望する」(パネルディスカッション形式) (2024-03-27)