

令和 7 年 2 月 25 日

国立大学法人静岡大学

学校法人明治大学

国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）

高温ストレス下で植物の発芽を調節できるタンパク質の活性化機構を解明 ～植物の高温発芽阻害の解決に向けた新たな知見を提供～

静岡大学の竹内純准教授は、同大学の中村彰彦教授と明治大学の瀬戸義哉准教授と共同で、高温ストレス下での植物の発芽制御に関わる KAI2（KARRIKIN INSENSITIVE 2）^{注1）}というタンパク質がどのような分子構造を持つ物質（リガンド）と結びつくことで生理応答が起こるのかを明らかにしました。

地球温暖化により、高温ストレスが原因で植物の発芽が妨げられることは、農作物の収穫量に大きな影響を与える深刻な問題です。最近の研究で、植物ホルモンであるストリゴラクトン^{注2）}の受容体（D14）の仲間である KAI2 が、高温環境での植物の休眠や発芽の調節に関与していることが報告されています。しかし、KAI2 と結合する植物内生リガンド^{注3）}（KL）はまだ同定されておらず、そのメカニズムもよく分かっていません。

そこで本研究では、KAI2 のリガンドがどのような分子構造を持っている必要があるのか、また KAI2 がどのように活性化されるのかを解明しました。具体的には、KAI2 と結合することが知られている dMGer ^{注4）}という物質（KAI2 アゴニスト^{注5）}）の構造を改変して、KAI2 と結合するが、KAI2 によって加水分解されないような構造とした dMGer アナログ（類似物質）を設計しました。このアナログを使って、KAI2 との結合活性や植物への効果を詳しく調べました。解析の結果、KAI2 を活性化するためには、リガンドが KAI2 と結合するだけでは不十分であり、リガンドのブテノライド環^{注6）}が加水分解され、その後 KAI2 の触媒残基^{注7）}と共有結合を形成することが重要であることが分かりました（図 1）。

本成果は、10 年以上発見されていなかった KL の構造的特徴に関する新しい知見を提供し、KL の探索研究を大きく前進させるものと期待されます。また、植物の高温発芽阻害の解決に KAI2 経路を利用した新規農薬ターゲットを創り出せる可能性もあります。この研究成果は、2025 年 2 月 20 日に国際学術誌「Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)」のオンライン版で公開されました。

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

科学技術振興機構（JST） 戦略的創造研究推進事業 ACT-X

研 究 領 域：「環境とバイオテクノロジー」

（研究総括：野村 暢彦 筑波大学 生命環境系 教授）

研究課題名：「高温ストレスによる発芽阻害メカニズムの解明」（課題番号：JPMJAX21BE）

研究代表者：竹内 純 静岡大学 農学部 准教授

研 究 期 間：令和3年10月～令和6年3月

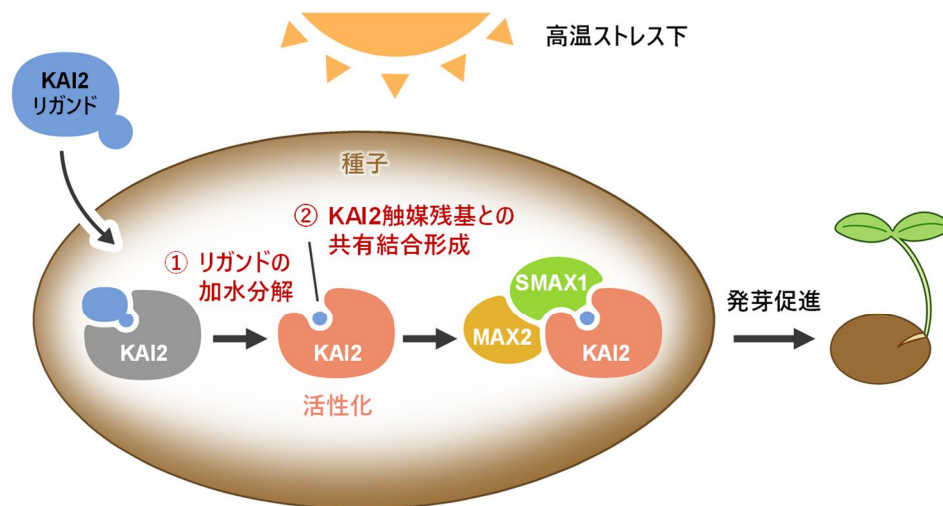


図1 研究概要. KAI2リガンドの構造を一部改変した化合物を合成し、それらの活性を詳細に解析することで、KAI2の活性化には①リガンドが加水分解され、②その後KAI2触媒残基と共有結合を形成することが重要であると明らかにしました。

<研究の背景と経緯>

農作物の収量が不安定になる主な理由の一つが気候変動です。全体の 28～34%が気候変動の影響を受け、そのうち 2～10%が高温日数の割合が増えることが原因とされています。そのため、地球温暖化による高温障害に対応できる農業技術の開発が急務となっています。

高温障害の具体的例として、水稻栽培では米粒が白濁する白未熟粒の発生、果実栽培では着色不足、様々な農作物での発芽不良などがあります。本研究グループでは特に発芽不良（高温発芽阻害）に注目しています。高温発芽阻害は、葉茎菜類、果菜類および根菜類といった多くの農作物・植物種で生じる現象で、例えば、ホウレンソウやキャベツなど、あるいは植物研究のモデル植物として利用されるシロイヌナズナにおいては、気温が 30℃以上になると発芽率が極端に低下します。この要因は主に、高温ストレスを受けた植物の体内でアブシシン酸 (ABA) ^{注8)}が増加し、これによって休眠が誘導されるためだと考えられています。一方で、発芽にはジベレリンやストリゴラクトン (SL) といった他の植物ホルモンも関与することが以前から知られています。また最近の研究で、SL 受容体 DWARF14 (D14) のパラログ^{注9)}である KARRIKIN INSENSITIVE 2 (KAI2) というタンパク質が高温ストレス下での発芽制御（高温発芽阻害の緩和）に関与することが報告されています。

生体での情報伝達において、リガンドと受容体の役割は大変重要です。細胞膜などに存在する受容体（タンパク質から成る）は、情報伝達物質であるリガンドが結合すると細胞内に情報を伝えます。このとき、リガンドと受容体は 1 対 1 で対応することから、リガンドが鍵、受容体が鍵穴に例えられます。KAI2 は、山火事などで植物が燃焼した際の煙に含まれる発芽刺激物質（カリキン）と結合するタンパク質として 2012 年に同定されました。それから 10 年以上経った現在でも、KAI2 と結合する KL は見つかっていません。これまでの研究により、KAI2 はブテノライド化合物（例えば、人工 SL である GR24^{ent-5DS} や dMGer）と結合することで活性化することが分かっていたましたが、その作用メカニズムの詳細は明らかになっていませんでした。

<研究の内容>

本研究では、KAI2 アゴニストとして必要な分子構造や KAI2 の活性化機構を明らかにすることを目的に、ブテノライド環部分を構造改変した新しい KAI2 リガンドを設計・合成しました。KAI2 は、 α/β -加水分解酵素ファミリー^{注10)}に属するタンパク質です。特徴的なのは、受容体でありながら触媒三つ組残基 (Ser-His-Asp) が保存されており、GR24^{ent-5DS} や dMGer を加水分解する能力を持つ点です。本研究では、KAI2 がリガンドを加水分解し、その後の共有結合形成がシグナル伝達にどのように関与するのかを明らかにすることを目指しました。

KAI2 アゴニストである dMGer をリード化合物として、dMGer の 2-フラノン環をシクロペンテノン環に置換した 1'-carba-dMGer と、フェノールエーテル結合を炭素-炭素結合に置換した 6'-carba-dMGer を合成しました (図 2)。これにより、1'-carba-dMGer は加水分解されず、6'-carba-dMGer は仮に加水分解されても KAI2 と共有結合しない分子構造にしました。いずれの dMGer アナログも、鏡像異性体^{注11)}を分割した後、各種試験に用いました。以降は、鏡像異性体間で活性の強かった(+)-体の結果について示しています。

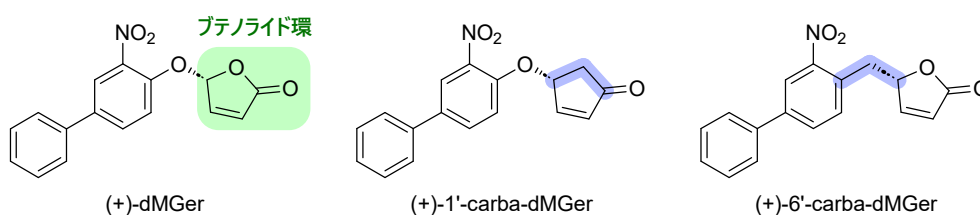


図2 加水分解抵抗性(+)-dMGerアナログの構造. (+)-dMGerから構造改変した部位を青マーカで表示.

(+)-1'-Carba-dMGer と(+)-6'-carba-dMGer は、いずれも *in vitro* の実験で KAI2 と結合し、(+)-dMGer と同様に、KAI2 の熱安定性を低下させました (図 3A 及び B)。しかし、(+)-dMGer と異なり両化合物は高温ストレスによるシロイヌナズナ種子の発芽阻害を緩和せず (図 3C)、赤色光下での胚軸伸長阻害活性も(+)-dMGer のそれと比較して非常に弱いものでした (図 3D)。また酵母ツーハイブリッド法^{注 12)}においても、(+)-dMGer は KAI2 と下流のシグナル制御因子である SUPPRESSOR OF MAX2_1 (SMAX1) との相互作用を誘導した一方、(+)-1'-carba-dMGer と(+)-6'-carba-dMGer はこの相互作用を誘導しませんでした。さらに X 線結晶構造解析により、(+)-6'-carba-dMGer は加水分解されることなく、図 2 で示した分子構造のまま KAI2 の触媒ポケットに結合することが分かりました (図 4)。

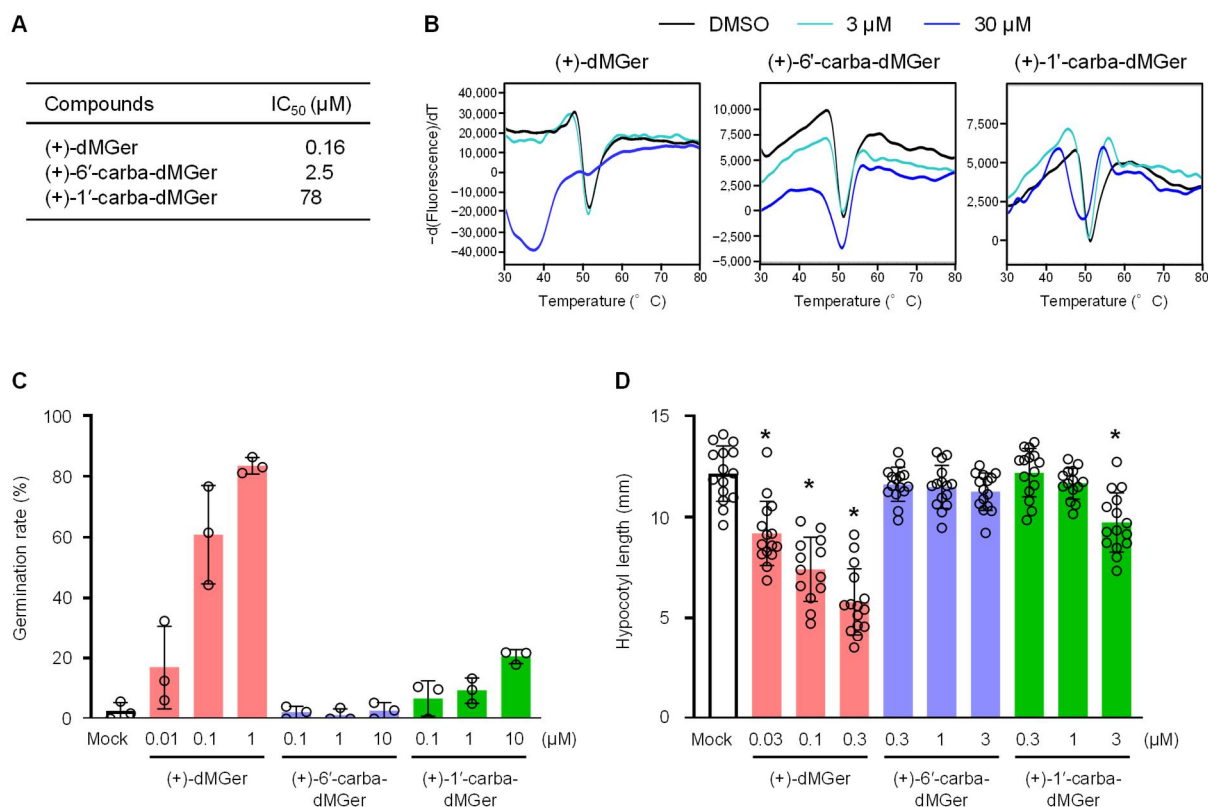


図3 (+)-6'-carba-dMGerおよび(+)-1'-carba-dMGerの*in vitro* KAI2結合活性と植物に対する生理活性。

- (A) KAI2によるdYLGの加水分解に対する(+)-dMGerアナログの阻害活性。IC₅₀値は、dYLGの加水分解を50%阻害する際の各化合物濃度を示している。この結果から、(+)-6'-carba-dMGerと(+)-1'-carba-dMGerもKAI2のリガンド結合ポケットに結合することが分かった。
- (B) KAI2の熱安定性に対する(+)-dMGerアナログの効果。(+)-6'-Carba-dMGerと(+)-1'-carba-dMGerは30 μM処理で、DMSO処理と比較してKAI2の熱変性温度を低温側にシフトさせた。つまり、両化合物もKAI2の熱安定性を低下させることが分かった。
- (C) 高温ストレス下での(+)-dMGerアナログの発芽促進活性。(+)-dMGerは0.1 μMで明確に発芽促進活性を示したが、(+)-1'-carba-dMGerと(+)-6'-carba-dMGerは10 μMでも殆ど発芽を促進しなかった。
- (D) シロイヌナズナ胚軸伸長に対する(+)-dMGerアナログの阻害活性。(+)-dMGerは0.03 μMから胚軸伸長を阻害した一方、(+)-1'-carba-dMGerは3 μMで僅かに伸長を阻害し、(+)-6'-carba-dMGerは阻害活性を全く示さなかった。

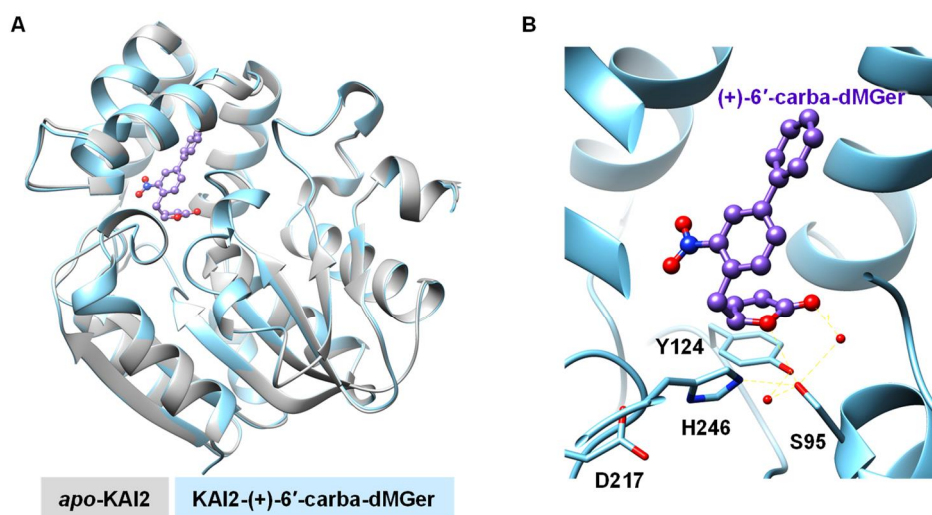


図4 KAI2-(+)-6'-carba-dMGer複合体の結晶構造。(A) リガンドが結合していないapo-KAI2とKAI2-(+)-6'-carba-dMGer構造の重ね合わせ。(B) KAI2のリガンド結合ポケットにおける(+)-6'-carba-dMGerの結合様式。(+)-6'-carba-dMGerは加水分解されず、ラクトン環のエーテル酸素が触媒Serに配向するように結合していた。触媒三つ組残基 (Ser-His-Asp) をスティックで表示。

以上の結果から、KAI2 シグナル伝達の活性化にはリガンドが受容体に結合するだけでは不十分であり、ブテノライド環部分の加水分解とそれに続く KAI2 触媒残基との間の共有結合形成が重要な役割を担っていることを明らかにしました。従って、KL も同様に、KAI2 によって加水分解・切断されるブテノライド環を有していると推測されます。

<今後の展開>

本成果は、10 年以上にわたって未発見な KAI2 の植物内生リガンドの構造的特徴に関する新たな知見を提供するものであり、新たな植物ホルモン候補である KL の同定研究に繋がるものと期待されます。KL が同定されれば、植物の高温ストレス応答に対する KAI2 の生理機能・役割を明らかにすることができ、高温発芽阻害の制御に KAI2 経路という新たな視点(新規農薬ターゲット)を創り出せる可能性があります。また本研究により得られた知見から、KAI2 を人工的に制御するアゴニスト(活性化剤)やアンタゴニスト(阻害剤)の合理的な設計・合成が可能となり、KAI2 を標的とした植物成長調整剤^{注13)}(環境ストレス耐性付与剤)の創出へと繋がることも期待されます。

<用語解説>

注1) KARRIKIN INSENSITIVE 2 (KAI2)

山火事などで植物が燃焼した際の煙に含まれる発芽刺激物質(karrikin)と結合するタンパク質として 2012 年に同定された。しかし、未だ植物内生リガンド(KAI2 ligand, KL)が同定されていないオーファン受容体(オーファンとは孤児の意。特異的に結合するリガンドが同定されていない受容体)。

注2) ストリゴラクトン (SL)

地上部において枝分かれ・分げつを抑制する植物ホルモンである一方、根圏においては共生・寄生の化学シグナルとして作用する生理活性物質。ABA と同様に、カロテノイドの酸化開裂によって生合成される。

注3) 植物内生リガンド

植物が生合成し、特定のタンパク質(受容体)と特異的に結合して生理活性を誘導する分子。KAI2 に関しては、外因性のリガンドとして karrikin や人工 SL が報告されているが、内生リガンド(KAI2 ligand, KL)は未だ発見されていない。

注4) dMGer

2023年に明治大学の瀬戸らによって開発された KAI2 選択的アゴニスト。KAI2 は活性化する一方で、そのパラログであるストリゴラクトン受容体に対してはアゴニスト活性を示さない化合物。

注5) アゴニスト

受容体に特異的に結合し、受容体の機能を活性化することで細胞内情報伝達系を作動させる物質。KAI2 にアゴニストが結合すると、KAI2 の構造が不安定化して、パートナータンパク質との相互作用を介してシグナル伝達が誘導される。

注6) ブテノライド

ラクトンの一つで、炭素数4の複素環式化合物。最も単純なブテノライドは2-フラノンであり、天然に多く存在し、ストリゴラクトンも分子内にこの構造を含んでいる。

注7) 触媒残基

タンパク質（酵素）が反応を触媒する際に必須となるアミノ酸残基。基質への求核攻撃を行うセリン（Ser）と、セリンの求核性を高める役割を果たすヒスチジン（His）とアスパラギン酸（Asp）の三つのアミノ酸残基がこれに相当する。KAI2 においては、リガンドへの求核反応によってリガンドと触媒残基が共有結合を形成する。

注8) アブシシン酸（ABA）

植物ホルモン（植物が自ら生産し、微量で生体反応を制御する化合物の総称）の一つで、種子成熟・休眠維持において中心的な役割を担っている生理活性物質。乾燥ストレスを受けた植物では ABA 生合成が活性化され、気孔閉鎖が誘導されることで葉からの蒸散量を抑制する。

注9) パラログ

進化の過程で遺伝子重複によって生じた、異なる機能を持つ遺伝子。種子植物の共通祖先で起こった KAI2 の遺伝子重複によって、ストリゴラクトン受容体 D14 遺伝子が生じ、分化したと考えられている。

注10) α/β -加水分解酵素

基本骨格は β -シートと数本の α -ヘリックス（ α -ヘリックスと β -シートはともに、アミノ酸が二次元に積み上がったタンパク質の立体構造。前者はらせん、後者は平面である）から構成されており、活性中心に触媒トライアドと呼ばれる Ser-His-Asp 残基を有している加水分解酵素。活性中心のセリンの水酸基が基質に求核攻撃することで触媒反応が進行する。

注11) 鏡像異性体

立体異性体のうち、不斉炭素原子をもち、実物と鏡に映った像（鏡像）のように、原子団の位置関係が異なる異性体のこと。光学異性体ともよばれ、偏光面を回転させる旋光性の方向によって(+) - 体と(-) - 体が存在する。

注12) 酵母ツーハイブリッド法

酵母内に導入したレポーター遺伝子の転写活性を指標に、タンパク質間相互作用を調べることができる手法。KAI2 アゴニストは、KAI2 と SMAX1 の相互作用を誘導するため、本手法を用いて KAI2 アゴニスト活性の有無や強弱を評価することができる。

注13) 植物成長調整剤

農作物などの成長や発育をコントロールして、品質を高めたり、収量を増加させたり、不良条件（環境ストレス下）でも収量を安定させたり、生産上の労力を省いたりするために用いる薬剤。Plant Growth Regulator（PGR）などとも呼ばれることがある。

<論文情報>

【タイトル】

Structural requirements of KAI2 ligands for activation of signal transduction

【著者名】

Rito Kushihara, Akihiko Nakamura, Katsuki Takegami, Yoshiya Seto, Yusuke Kato, Hideo Dohra, Toshiyuki Ohnishi, Yasushi Todoroki, and Jun Takeuchi*

【雑誌】

Proceedings of the National Academy of Sciences

DOI : 10.1073/pnas.2414779122

<お問い合わせ先>

<研究に関すること>

竹内 純（タケウチ ジュン）

静岡大学 農学部 准教授

〒422-8529 静岡県静岡市駿河区大谷 8 3 6

Tel: 054-238-4881

E-mail : takeuchi.jun[at]shizuoka.ac.jp

瀬戸 義哉（セト ヨシヤ）

明治大学 農学部 准教授

〒214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田 1 丁目 1 - 1

E-mail : yoshiya[at]meiji.ac.jp

< J S T 事業に関すること >

原田 千夏子（ハラダ チカコ）

科学技術振興機構 戦略研究推進部 先進融合研究グループ

〒102-0076 東京都千代田区五番町 7 K's 五番町

Tel : 03-6380-9130 Fax : 03-3222-2066

E-mail : act-x[at]jst.go.jp

<報道担当>

静岡大学 広報・基金課

〒422-8529 静岡県静岡市駿河区大谷 8 3 6

Tel : 054-238-5179 Fax : 054-238-4450

E-mail : koho_all[at]adb.shizuoka.ac.jp

明治大学 経営企画部 広報課

〒101-8301 東京都千代田区神田駿河台 1 - 1

Tel : 03-3296-4082 Fax : 03-3296-4087

E-mail : koho[at]mics.meiji.ac.jp

科学技術振興機構 広報課

〒102-8666 東京都千代田区四番町 5 番地 3

Tel : 03-5214-8404 Fax : 03-5214-8432

E-mail : jstkoho[at]jst.go.jp