

研究報告書

「植物ホルモン活性のあいまい制御による環境応答バイオマーカ一群の機能解明」

研究タイプ：通常型

研究期間：2016年10月～2020年3月

研究者：高岡 洋輔

1. 研究のねらい

植物の分化、生長等を司る植物ホルモンには、そのシグナルを受容する植物ホルモン受容体サブタイプが「複数」存在し、多様なホルモンの活性をそれぞれのサブタイプが制御する。本研究では、この受容体サブタイプのいくつかと選択的に結合し活性化する分子を開発し、植物ホルモンの複雑な活性の発現機構の網羅的解析と、効率的な植物増産技術につなげることを目指す。例えばジャスモン酸イソロイシン(JA-Ile)は、F-box タンパク質 COI1 と転写リプレッサーJAZ のタンパク質間相互作用を誘起することで、JAZ のユビキチン化による分解を促して活性を発現する。モデル植物シロイヌナズナでは1種の COI1 に対して JAZ は 13 種のサブタイプが存在し、これらの組み合わせが複雑な応答を制御していると考えられる。JA-Ile の複雑な活性には、「食害や病原菌感染などの環境ストレスへの耐性をもたらす免疫応答」と、「生長抑制や老化誘導などの応答」など様々にあるが、JAZ のような遺伝的重複性の高い標的では解析が困難であり、どの JAZ がどの応答を制御しているかについては多くが解明されていない。これが制御できれば、過酷な環境でも生育する作物の作出につながるなどが期待される。

このような背景のもと、本研究ではいくつかの JAZ に選択的に結合する小分子リガンドを設計し、植物ホルモンの根幹となる複雑なシグナル伝達制御メカニズムを解明する有力なツールを開発する。サブタイプ選択的に結合するリガンドが複数開発できれば、それを用いて活性化できる JAZ サブタイプのバリエーションは無量大である。一方、様々な JAZ サブタイプの組み合わせを、何の指標もなく同時に遺伝子改変するのはほぼ不可能(例えば3種類の JAZ を同時に遺伝子改変する組み合わせは ${}_{12}C_3 = 220$ 通りにもなる)であり、サブタイプの様々な組み合わせを網羅的に解析し理解するには、このような化学的アプローチが有効な手段と考えられる。例えば植物の生長阻害を起こすことなく、環境ストレス耐性の付与のみを実現するケミカルツールを開発し、それら化合物を基盤にバイオマーカ一群を網羅的に解析して、ジャスモン酸応答、ひいては植物の生長と防御メカニズムの全容を解明することを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

世界の農作物生産量の 10-15%は病害によって失われており、その解決は喫緊の世界的課題である。植物は病原菌に感染すると、ジャスモン酸と呼ばれる免疫ホルモンを分泌して様々な防御応答を活性化するが、防御に必要なエネルギーを産生するため生長を停止させる。この生長と防御のトレードオフを解消できれば、植物病原菌の感染を防ぐ強力な手段となるが、その制御メカニズムは不明な点が多く残されているのが現状である。ジャスモン酸の活性本体、ジャスモン酸イソロイシン(JA-Ile)は、F-box タンパク質 COI1 と転写リプレッサーJAZ とのタンパク質間相互作用(PPI)を誘起するが、JA-Ile は COI1 と 13 種類の JAZ サ

ブタイプのほぼ全ての組み合わせの相互作用を誘起することで、免疫応答や生長阻害／老化など様々な応答を同時に引き起こす。この複雑な活性を切り分ける分子の開発を目指す上で、まず全ての COI1-JAZ 共受容体に対する定量的リガンドスクリーニング系を世界に先駆けて開発した。この技術を用いて、JA-Ile の構造類縁体をリードとして COI1-JAZ との親和性を評価しつつ、構造最適化を施し、2 種類の共受容体にのみ結合する分子の開発に成功した。この化合物はモデル植物に対して生長阻害を引き起こすことなく、病原菌感染への抵抗性を示した。この成果は、化合物によって植物の生長と防御のトレードオフの関係が解消できる可能性を示唆するものである。また、JAZ 変異株等を用いたアッセイなどから、この選択的な遺伝子応答と病原菌耐性に、JAZ9 というサブタイプが主要な役割を果たしていることも明らかにするなど、ジャスモン酸シグナル伝達における重要な知見を得た。現在独自のスクリーニング系を拡張するとともに、新たな選択的 PPI 誘導技術を開発中で、様々な植物種に有用なケミカルツールの開発を検討している。

(2) 詳細

研究項目 A 「植物ホルモン類の誘導体化による選択的アゴニスト候補分子の合成と in silico 解析」

JA-Ile と、その構造ミミックで、COI1-JAZ 共受容体への強力なアゴニストであるコロナチン(COR)は、COI1-JAZ のタンパク質間の相互作用を誘起する糊付け分子として機能することが、過去の X 線結晶構造解析から明らかとなっている。この COR の全合成過程で得られる立体異性体は所属研究室で開発されており、それらを B で開発した JAZ サブタイプ選択性の評価系を用いて検討した結果、13 種類の JAZ サブタイプのうち少なくとも 5 種類のサブタイプに結合するサブタイプ選択的アゴニストのリード分子を見出した。この分子について、COI1-COR-JAZ1 の三次元立体構造を基にした in silico docking study を実施した。計算方法の最適化などを経て、このリード分子の結合様式について検討した結果、いくつかのサブタイプにおいて、COR のケトン部位への水素結合パターンの変化に気づき、この官能基を足がかりに誘導体化するという設計戦略に結びつけた。この分子設計指針に基づき、COR の立体異性体の誘導体化を行い、再びサブタイプ選択性を評価した結果、13 種類の JAZ サブタイプのうち 2 種類にのみ結合する分子を得ることに成功した。この研究方針を基に、COI1-JAZ に対するさらなる高活性な分子、あるいはこれまでと異なる有用な生理活性分子を開発する基礎を固めることができた。

研究項目 B 「サブタイプ選択的アゴニストの in vitro アッセイ系の構築」

本研究の目的である、特定の JAZ サブタイプ選択性を有する小分子リガンドを創製するには、まず 13 種類ある COI1-JAZ 共受容体全ての組み合わせのタンパク質間相互作用を正確かつ定量的に評価する実験系が必須となる。しかし研究開始当初は、酵母細胞を使った Yeast-two-Hybrid 法(Y2H)や、全長タンパク質を用いた pull-down アッセイ系が、各論文でいくつかの組み合わせでのみ評価されている状態であった。特に JAZ 全長タンパク質は溶液系で不安定であり、再現性良く定量的な解析を行うには問題が散見された。そこで、前述の COI1-COR-JAZ1 の X 線結晶構造解析に用いられた JAZ の結合ドメインを切り出した

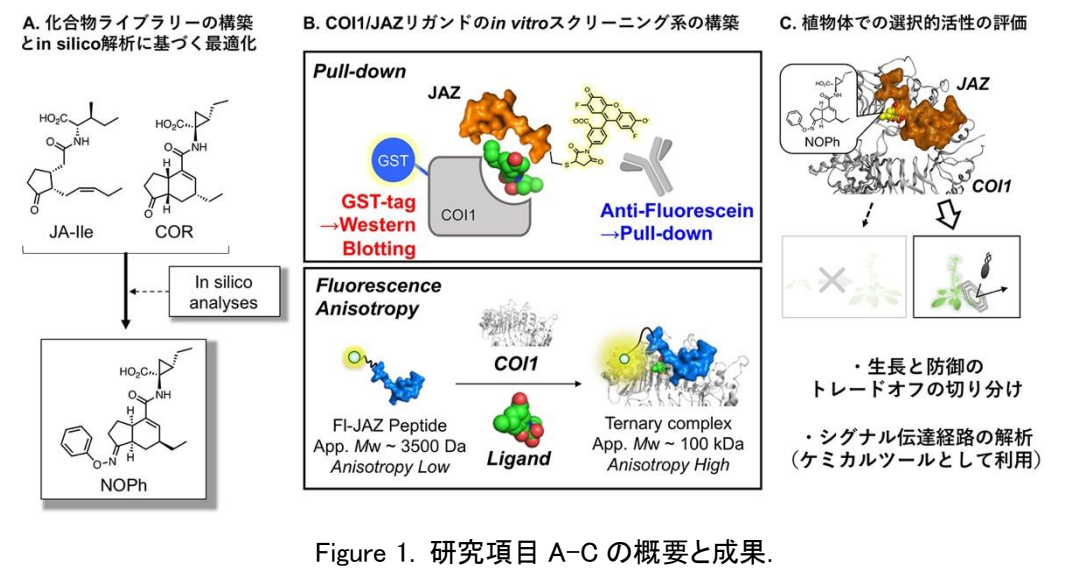
断片ペプチド(Jas motif)を利用し、このペプチドにエピトープとなる蛍光色素を導入した、蛍光色素コンジュゲート JAZ ペプチドを設計し、これを利用した binary-tag pull-down アッセイ系を構築した。これにより蛍光色素の高いモル吸光係数によって正確な濃度決定が可能となり、全 JAZ サブタイプを横並びに評価できるようになった。この手法を用いて、A で挙げたリガンドの focused library の結合親和性を正確に評価することで、サブタイプ選択的アゴニストの創製、および選択的な生理活性を有する候補分子を得ることに成功した。

ただし、受容体の種類自体が 10 種類以上あり、これらに対して多くの分子を複数同時に評価するためには、pull-down アッセイ系ではスループット性が低いことが問題となった。そこで、リガンド分子を混ぜてすぐに起こる COI1-JAZ 間のタンパク質間相互作用 (PPI) を簡便に検出する新手法として、PPI の結合評価に広く用いられる「蛍光異方性」による解析を COI1/JAZ に適用した。具体的には、binary-tag pull-down システムで採用した蛍光修飾 JAZ ペプチドと、全長の COI1 とが相互作用する際、ペプチド側の見かけの分子量が劇的に増大する現象を利用することによって、リガンドの添加によって引き起こされる三者複合体形成を、異方性の増大で検出することができた。ただし元の分子設計では S/N 比が高くなかったため、結晶構造を基にした合理的設計によって色素とペプチドとのリンカー構造／導入位置、蛍光色素の種類などを最適化し、最終的に COI1/JAZ の PPI によって 2 倍以上にシグナルを増大させる系の開発に成功した。この手法は低濃度のリガンド添加にも鋭敏なシグナルの変化を引き起こし、その結果、リガンドの共受容体との親和性を定量的に解析することができ、これまで詳細に調べられていなかったジャスモン酸類 (JA, JA-Ile, 12OH-JA-Ile など) の全ての COI1/JAZ サブタイプとの結合定数を得ることができた。また本評価系は、十分なシグナル変化によってプレートリーダーでの検出も可能であることから、ハイスループット化も対応でき、さらなる広範囲なリガンドをスクリーニングすることができるようになった。

研究項目 C 「モデルおよび実用植物での選択的リガンドの in vivo アッセイによる環境応答バイオマーカー群の機能解析」

研究項目 A, B で得られた JAZ サブタイプ選択的アゴニストの候補分子について、モデル植物シロイヌナズナを用いて、ジャスモン酸類の代表的な生理活性である生長阻害やアントシアニン蓄積、さらにはマイクロアレイ解析、およびジャスモン酸応答遺伝子のリアルタイム定量 PCR などで活性を評価した。その結果興味深いことに、COI1-JAZ9, 10 選択的なリガンドとして見出された NOPh という化合物が、植物の生長阻害を引き起こすことなく、病原菌耐性遺伝子である PDF1.2 などの転写を選択的に活性化することを見出した。実際に病原菌の一つとして necrotrophic pathogen の一つである *Alternaria brassicicola* の感染耐性試験を行ったところ、天然物である COR と同等に、この菌の感染耐性をもたらすことも実証できた。さらにこの分子が標的とする JAZ9 および 10 のノックアウト株 (*jaz9, jaz10*) による確認を行ったところ、*jaz10-KO* 株では活性が保持されるものの、*jaz9-KO* 株では全く活性が消失した。つまり、この分子の選択的な防御応答は JAZ9 の下流で起こっていることが示唆された。このように、曖昧ではあるがある程度のサブタイプ選択性を持つリガンドを in vitro で開発することにより、豊富にあるシロイヌナズナの変異株を組み合わせることで、素早く特定の生理活性を制御する JAZ サブタイプの同定につながる実証されたと考えられる。

現在、本研究方針で様々な植物において活性を担う受容体の特定、およびジャスモン酸類の引き起こす複雑なシグナル伝達の全容解明に向けて、さらなる検討を続けている。



3. 今後の展開

本さがけ研究にて、モデル植物の生長と防御を小分子リガンドで制御できることを示すとともに、病原菌感染に対する防御応答に強く影響を及ぼす受容体サブタイプの特定に成功した。このアプローチと今後の展開によって、他のサブタイプに選択的なリガンドの創製は実現可能性が高く、これらのケミカルツールによって、ジャスモン酸の持つ生長・病原菌耐性以外の生理応答（障害応答、有用二次代謝産物合成、老化など）に関わる受容体サブタイプ、あるいはそれらが冗長的に作用するネットワークを解析でき、ジャスモン酸に関わるシグナル伝達機構に重要な知見を与えるものと期待される。また、このアプローチによって同定された重要な共受容体をバイオマーカーとすることで、病気・害虫・環境変化に耐性のある作物などの創製につながる事が期待される。

4. 自己評価

当初の目標であった、植物ホルモン共受容体のサブタイプ選択的リガンドの作成と、それによって植物の生長と防御の制御、並びに防御応答に関連する受容体を同定することに成功し、小分子リガンドの精密設計と簡便かつ正確な評価系の構築が、共受容体のあいまい制御につながり、環境応答バイオマーカーの絞り込みと機能解明につながることを実証できた点で、一定の成果が得られたと考えられる。このアプローチを使って複数のリガンド開発とそれによって様々な環境応答バイオマーカーの同定までは実現できていないが、今後の展開によって環境応答型植物の設計・構築も可能となると期待され、引き続き検討を続けていく。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Takaoka, Y.*, Nagumo, K., Azizah, I. N., Oura, S., Iwahashi, M., Kato, N., Ueda, M.*, A comprehensive in vitro fluorescence anisotropy assay system for screening ligands of the jasmonate COI1–JAZ co–receptor in plants, *J. Biol. Chem.* 2019, 294, 5074–5081.
 2. Takaoka, Y., Iwahashi, M., Chini, A., Saito, H., Ishimaru, Y., Egoshi, S., Kato, N., Tanaka, M., Bashir, K., Seki, M., Solano, R., Ueda, M.*, A rationally designed JAZ subtype–selective agonist of jasmonate perception, *Nat. Commun.* 2018, 9, 3654.
 3. Takaoka, Y., Uchinomiya, S., Kobayashi, D., Endo, M., Hayashi, T., Fukuyama, Y., Hayasaka, H., Miyasaka, M., Ueda, T., Shimada, I., Hamachi, I.*, Endogenous membrane receptor labeling by reactive cytokines and growth factors to chase their dynamics in live cells, *Chem* 2018, 4, 1451–1464.
 4. Ueda, M.*, Hayashi, K., Egoshi, S., Ishimaru, Y., Takaoka, Y., Yamakoshi, H., Dodo K., Sodeoka, M.*, The alkyne–tag Raman imaging of coronatine, a plant pathogen virulence factor, in *Commelina communis* and its possible mode of action, *Org. Biomol. Chem.* 2018, 16, 3348–3352.
 5. Takaoka, Y., Imai, M., Shigenaga, M., Ueda, M.*, Design and synthesis of a second–generation ligand–tethered calcium indicator for plant cell biology based on the fundamental analyses of the structure and physical property, *Tetrahedron Lett.* 2017, 73, 3079–3085.
- (* corresponding author)

(2)特許出願

研究期間累積件数： 0 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. 高岡洋輔、「ジャスモン酸受容体のサブタイプ選択性を制御する化合物の創製」植物化学調節学会 第 54 回大会、2019 年 11 月 15–17 日(とりぎん文化センター、鳥取県鳥取市)(奨励賞受賞講演)
2. Yousuke Takaoka, 「Development of subtype–selective agonist for phytohormone co–receptor, the 2nd International Symposium on Chemical Communications」, 2018 年 5 月 28–29 日(東北大学理学研究科、宮城県仙台市)(国際シンポジウム、招待講演)
3. Yousuke Takaoka, 「Development of subtype selective agonist for jasmonate co–receptor」, Asian International Symposium – Medicinal Chemistry (日本化学会第98春季年会)、2018 年 3 月 20–23 日(日本大学工学部船橋キャンパス)(国際シンポジウム、招待講演)
4. Takaoka, Y., Hayashi, K., Suzuki, K., Azizah, I. N., Ueda, M. Fluorescence anisotropy–based comprehensive method for in vitro screening of COI1–JAZs agonist/antagonist, *Methods Mol. Biol.*, 2020, 2085, 145–160.
5. 東北大学・理化学研究所、「植物の病原菌感染を防ぐ画期的な植物免疫強化剤を開発」、2018 年 9 月 18 日(プレスリリース)