

平成 30 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13083

研究課題名(和文)多様な植物二次代謝産物を輸送する多機能輸送体の生物有機化学

研究課題名(英文)Chemical biology of multifunctional transporter GTR1

研究代表者

上田 実(Ueda, Minoru)

東北大学・理学研究科・教授

研究者番号：60265931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物ホルモンの植物体内での時空間的分布は、輸送体タンパク質によって厳密に制御されている。我々は、植物の免疫ホルモン ジャスモノイルイソロイシン(JA-Ile)の輸送体GTR1を発見した。GTR1は53種の膜輸送体が属するNPFファミリーのメンバーであり、既知の硝酸イオン輸送体NPF6.3と同様に膜上で二量体を形成する。本研究において我々は、GTR1が二量体を形成する際、そのパートナーによって輸送基質のスイッチングが起こるといふ画期的な現象を発見した。GTR1はこれまでの輸送体の概念を一新する新しいタイプの輸送体である。

研究成果の概要(英文)：Spatiotemporal distributions of plant hormones are regulated strictly through corresponding transporter proteins. GTR1 was first found as a transporter of a jasmonoyl isoleucine (JA-Ile) and belongs to a NPF family to which 53 member proteins belong. Surprisingly, further studies strongly suggested that GTR1 is a unique 'multi-functional' transporter which can transport three different kinds of plant metabolites, JA-Ile, gibberelin, and glucosinolate, across the membrane with structure recognition. We also found that the homo-dimerization of GTR1 is responsible for glucosinolate transport and heterodimerization with other NPF family protein is responsible for the transport of JA-Ile and GA. This is the first example of dimerization-mediated switching of substrate for transporter.

研究分野：ケミカルバイオロジー、天然物化学

キーワード：植物ホルモン輸送体 GTR1 NPR family

1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンは、植物の発生、成長、環境変化や外敵への防御応答など、ほぼ全ての生理機能制御に関わる化学因子である。その植物体内での時空間的分布は、輸送体タンパク質によって厳密に制御されている (*Science* **1998**, 282, 2226; *PNAS* **2010**, 107, 2361; *Nature* **2012**, 483, 341; *Nature Commun.* **2014**, 5, 3274)。我々は、植物の免疫ホルモン ジャスモノイルイソロイシン (JA-Ile) の輸送体 GTR1 を発見した (*Nature Commun.*, **2015**, 6, 6095)。GTR1 は、JA-Ile を輸送するが、その 12 位アルコール体やグルコシド体などの誘導體、あるいは植物ホルモンのアブシシン酸などは輸送せず、厳密な構造認識によって輸送基質を選択していると考えられた。一方で GTR1 は、JA-Ile と構造的に全く類似しない植物ホルモン ジベレリンやグルコシノレート (*Nature* **2012**, 488, 7412) も輸送する。GTR1 の極めてユニークな基質認識機構は、既知のいかなる輸送体とも異なる。

2. 研究の目的

我々は、GTR1 が二量体を形成し、単量体と二量体で異なる基質を認識することを示す結果を得た。またモデル植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) には GTR1 のホモログ GTR2 が存在し、GTR1-GTR2 ヘテロ二量体はさらに異なる基質を認識すると推定された。GTR1 の一見不可解であるがユニークな性質は、単量体・ホモ/ヘテロ二量体が各々異なる基質特異性を持つという過去に例のないユニークなモデルでクリアに説明できる。本研究では、GTR1 の基質輸送モデルを証明する。

3. 研究の方法

我々は、GTR1 の二量体形成による輸送基質スイッチングを利用して、植物の最も重要な生理活性物質である植物ホルモン (図 1a) の時空間的分布を制御する分子技術を開発する。植物ホルモンの多くは、タンパク質間相互作用 (PPI) 型共受容体をもち (図 1b)、2 種のタンパク質間に PPI を誘導することでシグナル伝達を引き起こす (*Nature* **2009**, 459, 1071)。PPI 型共受容体を構成する 2 種のタンパク質に、それぞれ転写因子の DNA 結合領域

(DBD)および活性化領域 (AD)を結合させ、これらをヒスチジン要求性酵母変異株に形質転換する (図 1c 左)。この酵母変異株に GTR1 を発現させ (図 1c 左) さらに残り 52 種の NPF ファミリータンパク質を各々共発現させることで (図 1c 右)、ホルモンを輸送する GTR1-NPF の組み合わせでのみ、酵母の成長が起こるスクリーニングシステムを構築する。

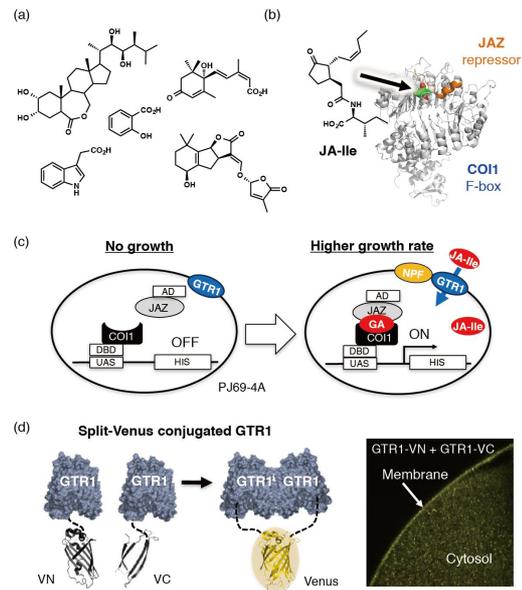


図 1 (a)植物ホルモンの構造、(b)PPI 型植物ホルモン共受容体の例: JA-Ile と COI1-JAZ 共受容体、(c) JA-Ile による COI1-JAZ 共受容体形成を例とした酵母ツーハイブリッドスクリーニング系、(d)split-Venus-GTR1 による BiFC 実験で二量体形成を評価できる。

4. 研究成果

我々は、split-Venus を用いる BiFC 実験によって GTR1 の二量体形成を評価できる実験系を構築し (図 1d)、GTR1 中の Thr135 がリン酸化/脱リン酸化により単量体/二量体となることを確認した (図 1)。GTR1 は 53 種の膜輸送体が属する NPF ファミリーのメンバーであり、既知の硝酸イオン輸送体 NPF6.3 と同様に膜上で二量体を形成する (*Nature* **2012**, 488, 531; *Plant Signal. Behav.*, **2017**, e1334749)。我々は偶然、GTR1 が二量体を形成する際、そのパートナーによって輸送基質のスイッチングが起こるという画期的な現象を発見した (図 2、未発表)。例えば、GTR1 ホモ二量体は植物の防御物質グルコシノレートの輸送体として、また GTR1-NPF4.1 ヘテロ二量体は

JA-Ile、GTR1-NPF1.2-ヘテロ二量体はジベレリンを、各々輸送する植物ホルモン輸送体として機能する。GTR1 はこれまでの輸送体の概念を一新する新しいタイプの輸送体であることがわかった。

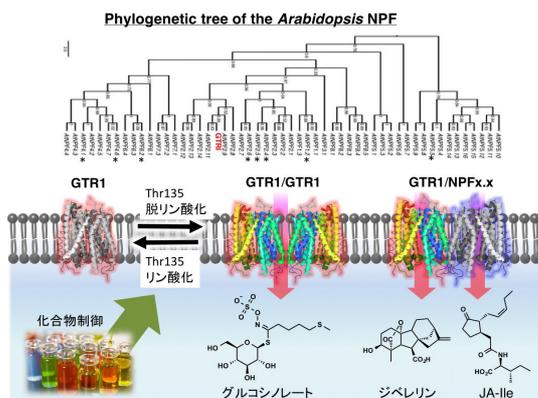


図 2 (上) NPF ファミリーの系統樹 (*は GTR1 とヘテロ二量体を形成するもの)(下) ホモ / ヘテロ二量体形成と輸送基質スイッチング

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1) Y. Ishimaru, T. Oikawa, T. Suzuki, H. Matsuura, K. Takahashi, S. Takeishi, S. Hamamoto, N. Uozumi, T. Shimizu, M. Seo, H. Ohta, M. Ueda, GTR1 is a jasmonic acid and jasmonoyl-L-isoleucine transporter in *Arabidopsis thaliana*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81**, 249-255 (2017).

Selected as a front cover picture. doi.org/10.1080/09168451.2016.1246174,

BBB 論文賞受賞論文

2) Y. Ishimaru, K. Washiyama, T. Oikawa, S. Hamamoto, N. Uozumi, and M. Ueda, Dimerization of GTR1 regulates their plasmamembrane localization, *Plant Signal. Behav.*, e1334749 (2017). DOI: 10.1080/15592324.2017.1334749.

3) M. Ueda, S. Egoshi, K. Dodo, Y. Ishimaru, H. Yamakoshi, T. Nakano, Y. Takaoka, S. Tsukiji, M. Sodeoka, Non-canonical function of a small-molecular virulence factor coronatine against plant immunity: An *In vivo* Raman imaging approach, *ACS Cent. Sci.*, **3**, 462-472 (2017). DOI:

10.1021/acscentsci.7b00099

4) N. Shinohara, N. Sunagawa, S. Tamura, R. Yokoyama, M. Ueda, K. Igarashi, K. Nishitani, The plant cell-wall enzyme AtXTH3 catalyses covalent cross-linking between cellulose and cello- oligosaccharide. *Sci. Rep.*, **7**, 46099; doi: 10.1038/srep46099 (2017). Selected as an F1000 article

5) Y. Takaoka, Y. Nukadzuka, M. Ueda, Reactive group-embedded affinity labeling reagent for efficient intracellular protein labeling, *Bioorg. Med. Chem.* (invited paper), **25**, 2888-2894 (2017). doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.059

6) Y. Takaoka, M. Imai, M. Shigenaga, M. Ueda, 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*, **73**, 3079-3085 (2017). doi.org/10.1016/j.tet.2017.04.023

7) H. Oishi, Y. Takaoka, T. Nishimaki-Mogami, H. Saito, M. Ueda, A Novel Nuclear Receptor Ligand, Digoxigenin, is a Selective Antagonist of Liver-X-receptors, *Chem. Lett.*, **46**, 313-314 (2017). doi.org/10.1246/cl.161071

[学会発表](計 7 件)

1) Minoru Ueda, GTR1, a Unique Multifunctional Transporter, Asian Chemical Biology Initiative 2017 Ulaanbaatar Meeting, Ulaanbaatar, Monglian (Sep 2-5, 2017).

2) Minoru Ueda, GTR1, a Unique Multifunctional Transporter, The Second A3 Roundtable Meeting on Chemical Probe Research Hub, Hangzhou, China (Nov 23-25, 2017).

3) Minoru Ueda, Plant Chemical Biology with Bioactive Natural Products, the International Symposium on Systems, Synthetic and Chemical Biology, Bose Institute, Kolkata, India (Dec 5-7, 2017).

4) 上田 実, 「植物の天然物ケミカルバイオロジー」、新学術領域 天然物ケミカルバイオロジー 成果取りまとめシンポジウム(慶應義塾大学)、2016年7月1日。

5) 上田 実, 「植物生理活性物質のケミカルバイオロジー」、第 89 回日本生化学会大

会(仙台)シンポジウム「生物活性と創薬のケミカルバイオロジー」, 2016年9月24日。

6) 上田 実、「植物の天然物ケミカルバイオロジー」、第21回天然薬物の開発と応用シンポジウム(千葉市)、2016年10月27-28日。

7) 上田 実、「植物の生態と化学物質：植物の化学コミュニケーション、植物の運動」東北植物学会第6回大会(宮城大会)、2016年12月10日。

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 実 (UEDA, Minoru)

東北大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：60265931

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()