

機関番号: 35302

研究種目: 基盤研究 (C)

研究期間: 2008~2010

課題番号: 20611019

研究課題名 (和文) オーキシン受容体 TIR1 と ABP1 特異的プローブの開発とオーキシンシグナルの解析

研究課題名 (英文) Development of specific probes for auxin receptors, TIR1 and ABP1, and Study for auxin signaling.

研究代表者

林 謙一郎 (HAYASHI KEN-ICHIRO)

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号: 30289136

研究成果の概要 (和文): 植物ホルモンであるオーキシンは、植物の成長分化を多面的に調節する。オーキシンの受容体には核内受容体である TIR1 オーキシン受容体と細胞膜受容体と考えられている ABP1 受容体があり、多様なオーキシンの生理活性は、この2種類の受容体から伝達される信号により制御されると考えられる。これらオーキシン受容体の機能分担について解析をするために、TIR1 受容体に特異的あるいは ABP1 受容体に特異的な分子プローブの開発を試みた。その結果、TIR1 特異的プローブを開発することに成功した。また同時に、ABP1 を特異的に活性化する分子プローブについて、ABP1 の結晶構造に基づいて分子設計を行った。

研究成果の概要 (英文): Auxin plays a crucial role in plant development. Auxin is perceived by two types of receptors, TIR1 nuclear receptor and ABP1 membrane receptor. These two auxin receptors regulate various auxin responses in plant. Small molecule probes specific for TIR1 and ABP1 were developed to investigate the physiological function of TIR1 and ABP1 receptors in auxin signaling. As the results, small molecule probes were designed to show specific effects for each auxin receptor.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野: ケミカルバイオロジー(時限)

科研費の分科・細目: ケミカルバイオロジー

キーワード: オーキシン・分子プローブ・TIR1 受容体・阻害剤・植物ホルモン

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナを用いた分子生物学的手法と変異体解析より、オーキシンの分子レベルでの作用、特に、その信号伝達系にかかわる因子とその機構が、飛躍的に解明されてきた。さらに、2005年に、多くの研究にもかかわらず、長い間発見されなかったオーキシン受容体が、F-Box タンパクである TIR1 と同定され

た。この TIR1 受容体は SCF^{TIR} ユビキチンリガー複合体を形成しており、オーキシンは TIR1 受容体に結合することで、転写抑制因子 (Aux/IAA) と TIR1 の相互作用を促進する。その結果、ユビキチン化された Aux/IAA はプロテアソームにより分解されるため、最終的に転写抑制が解除され、オーキシン応答性遺伝子の発現が誘導される。TIR1 受容体の結晶構

造解析より、オーキシンの受容機構の詳細が解明された。TIR1 はマッシュルーム型の立体構造をとり、オーキシンは TIR1 表面の窪みに結合し、さらに、そのオーキシン結合部位を埋めるように Aux/IAA タンパクが結合する。すなわち、オーキシンは、TIR1 と Aux/IAA タンパクの両者と疎水結合を行うことで、両タンパク間の相互作用を促進する“分子接着剤”として機能する。このように、オーキシンの TIR1 を介した基本的な情報伝達機構は明らかとなったが、その一方で、オーキシンの分化・成長の各段階での役割や他の植物ホルモンとの協調作用については、不明な点が多い。さらには、それらの分子レベルでの生理作用の解析についてもゲノム情報や分子遺伝学的手法を駆使できるシロイヌナズナに限られているのが現状である。

オーキシンの受容体には、TIR1 とそのホモログである AFB1-5 の計 6 種と、さらに機能未知の受容体である Auxin Binding Protein 1 (ABP1) が知られている。これらの受容体ホモログは互いに機能を相補し、また、その多重遺伝子破壊株では、胚性致死や胚発生異常が観察され、分化の各段階でのこれら受容体の詳細な役割については、解析が困難であるのが現状である。実際、オーキシン受容体 TIR1/AFB の多重欠損変異株や、ABP1 遺伝子欠損株は胚性異常や致死になるため、その生理的機能の解析はほとんど進んでいなかった。

2. 研究の目的

先に述べたように、オーキシンの分化、成長の各段階での役割や他の植物ホルモンとの協調作用については、不明な点が多い。さらには、オーキシンの分子レベルでの生理作用についてはモデル植物であるシロイヌナズナに限られているのが現状である。そこで、TIR1 に対して、親和性の高いプローブの設計と合成を行うとともに、機能未知であるオーキシン受容体タンパク ABP1 に特異的なプローブを設計・合成し、その生理活性を評価する。特に、TIR1-Aux/IAA 経路以外のオーキシニングナル伝達系については未解明であり、そのオーキシン作用発現機構は、分子遺伝学的手法のみでは解析が困難である。そこで、我々の生物有機化学的アプローチと分子遺伝学的手法を組み合わせることで、新たな知見が得られると期待できる。すなわち、オーキシン受容体 TIR1、および ABP1 にそれぞれ特異的なプローブを用いて、変異体スクリーニングや、表現型解析を行うことで、新規なオーキシン作用発現機構を解析できると期待している。さらに応用面では、プローブを用いて、分子遺伝学的手法が確立されていない作物や園芸植物などのオーキシンの生理的役割を検討する。

3. 研究の方法

(1) TIR1 特異的プローブの設計と合成

平成 18 年からの研究で、IAA, 2,4-D および NAA の α 位にアルキル基を導入すると、短鎖の Methyl~Propyl 基では、オーキシン活性が観察され、n-Butyl 基以上の炭素鎖を導入すると、オーキシン活性が消失し、強いアンチオーキシン活性が観察されることを見出した。その後の詳細な生理活性の解析と、最終的には、TIR1 とプローブの複合体の結晶構造解析により、その作用機構を明らかとした。すなわち、オーキシンと同様に、 α -propyl-IAA は TIR1 と結合し、TIR1-Aux/IAA タンパク間の疎水相互作用を促進する“分子接着剤”の働きをするが、炭素鎖 4 以上のアルキル長鎖を有する BH-IAA などでは、そのアルキル基が、Aux/IAA の TIR1-オーキシン複合体への結合を阻害することが判明した。過去の IAA の構造活性相関から、インドール環の化学修飾より、飛躍的に親和性を高めることは困難であると考えられた。そこで、TIR1 と BH-IAA プローブ複合体の結晶構造を参考に、分子設計を試みた。プローブの設計にあたっては、分子ドッキングプログラムを用いて、その相互作用を検討しながら、Structure-Based Drug Design を行った。TIR1 のフェニルアラニンと疎水結合をする側鎖を持つ分子が有望であると推定した。また、分子ドッキングプログラムで、インドール化合物を対象にした化合物ライブラリーをインシリコスクリーニングで評価し、得られた高活性化合物を合成し、生物活性を評価した。

(2) ABP1 特異的プローブの設計と合成

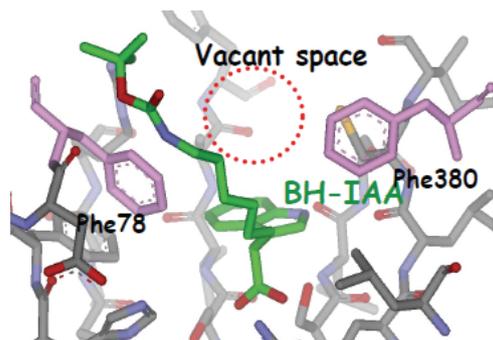
ABP1 は、1994 年にオーキシン結合タンパクとして、同定された。しかしながら、オーキシンによる膜の脱分極や細胞伸長に関与しているとの報告があるが、その機能は明らかとされていない。ABP1 とオーキシン複合体の結晶構造は、2002 年に報告されており、今回、TIR1 の構造が明らかとなったことにより、ABP1 と TIR1 では、オーキシンの結合様式がまったく異なることが明らかとなった。このことから ABP1 に特異的なプローブを設計することが可能となった。ABP1 では、オーキシンは、タンパクの小さなポケットにカルボキシル基をタンパク内部に向けて Zn を介して結合する。すなわち、ABP1 では TIR1 とは異なり、IAA のインドール環の NH は結合に関与しないので、この部位にタンパク外部に配向するように置換基を導入する。このような置換基を導入すると、TIR1 のオーキシン結合部位には結合できないため、ABP1 特異的なプローブとなることが期待できる。また、ABP1 の結晶構造に対して、強い結合活性を示す化合

物物をインシリコスクリーニングで見出し、ABP1 への結合に必要なファーマコアモデルを構築し、モデルをもとに分子設計を行った。

4. 研究成果

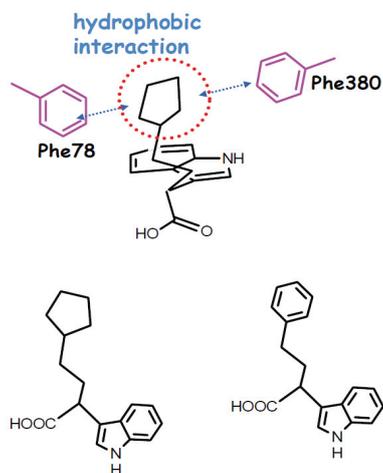
(1) TIR1 特異的プローブの設計と合成

TIR1 と BH-IAA プローブ複合体の結晶構造を参考に、分子設計を試みた結果、TIR1 受容体に結合する α -アルキルオーキシニン誘導体として、そのアルキル側鎖に、TIR1 の Phe78 と Phe380 と疎水的な相互作用ができる置換基を導入した誘導体を設計した。

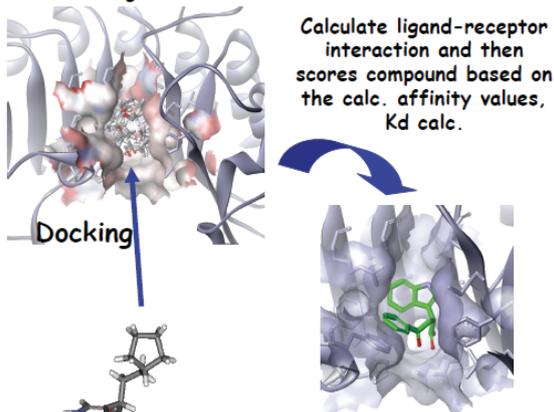


TIR1 と BH-IAA プローブ複合体の結晶構造

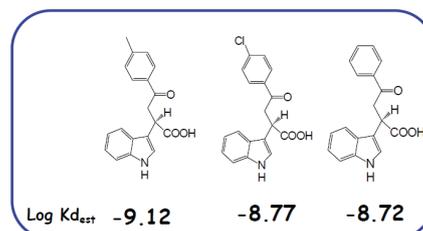
すなわち、IAA の α 位に、フェニルエチル基やシクロプロピルエチル基のような環構造を導入すると、それらの側鎖は、TIR1 の Phe78 や Phe380 と疎水結合することで、高い TIR1 結合活性を示すと推定された。実際、これらの誘導体は、高いアンチオーキシニン活性を示した。また、TIR1 受容体- α -アルキルオーキシニン複合体の結晶構造に基づき、タンパク-リガンド間の Docking 計算によるスクリーニングを試みた。リガンドとして、低分子化合物データベースである ZINC データベースから、インドール環を有する構造式を抽出し、ADME フィルターで通過した構造式をスクリーニング対象とした 3 次元構造データベースを構築し、Surflex および e-HiTS docking プログラムを用いて、TIR1 オーキシ



Auxin binding site of TIR1



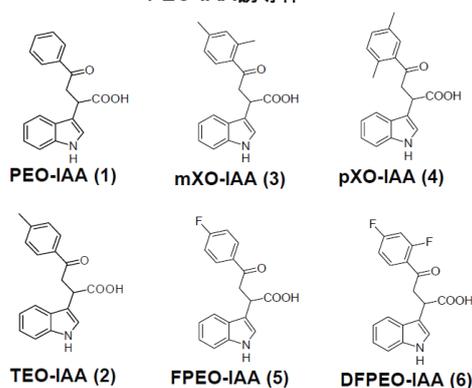
High scored ligands of TIR1 by virtual screening (Top 0.03%)



TIR1 結合リガンドのインシリコスクリーニング

ン結合部位に結合するリガンドのインシリコスクリーニングを試みた。また、得られた活性化環状置換基を導入した物を α -IAA 誘導体物を再度、スコアリングプログラムである X-SCORE や DRUG SCORE-X によってスコアリングした。その結果、PEO-IAA を母核と

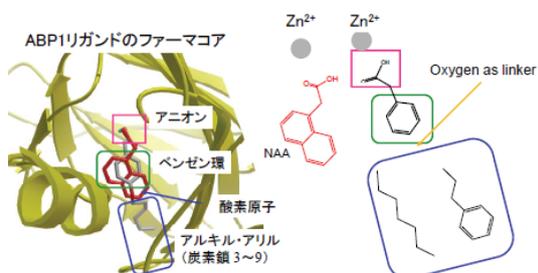
PEO-IAA 誘導体



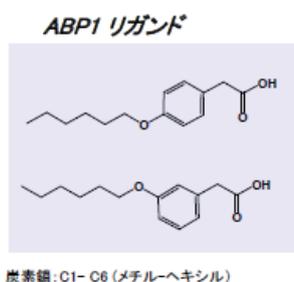
するリード化合物を見出した。最終的に、選択した化合物を合成し、生理活性を評価したところ、それらは強いアンチオーキシニン活性を示した。このスクリーニングで得られた PEO-IAA をリード化合物として、その構造最適化を試みた。その結果、PEO-IAA の芳香環に、各種置換基を導入した誘導体を合成したところ、それらの中で、mXO-IAA (3) が最も強いアンチオーキシニン活性を示した。

(2) ABP1 特異的プローブの設計と合成

TIR1 オーキシン受容体と ABP1 の結晶構造は、これまでに報告されていることから、それらの結晶構造に基づいて、ABP1 にのみ特異的に結合するプローブを設計可能であると考えた。TIR1 と ABP1 のそれぞれのオーキシン結合部位に対して、surflex プログラムを用いて、ケミカルライブラリーを対象にインシリコスクリーニングを行った。その結果、得



られたヒット化合物から、活性構造に共通な



部分構造、すなわちファーマコア構造を抽出し、それを基に、ABP1 に特異的に結合する化合物を設計・合成した。

ABP1 結合リガンドのファーマコアモデル合成した化合物の中には、オーキシン応答性 DR5-GUS レポーター遺伝子の発現誘導しないが、シロイヌナズナの胚軸伸長を促進する活性を示す化合物が見出された。現在、それら誘導体の詳細な生理活性を検討している。

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 Alkoxy-auxins are selective inhibitors of auxin transport mediated by PIN, ABCB, and AUX1 transporters. E. Tsuda, H. Yang, T. Nishimura, Y. Uehara, T. Sakai, M. Furutani, T. Koshiba, M. Hirose, H. Nozaki, AS. Murphy, K. Hayashi: J Biol Chem., 286, 2354-64 (2011) [査読有]

② ABP1 Mediates auxin inhibition of clathrin-dependent Endocytosis in Arabidopsis. S. Robert, J. Kleine-Vehn, E. Barbez, M. Sauer, T. Paciorek, P. Baster,

S. Vanneste, J. Zhang, S. Simon, M. Covanova, K. Hayashi, P. Dhonukshe, Z. Yang, S.Y. Bednarek, A.M. Jones, C. Luschnig, F. Aniento, E. Zazimalova, J. Friml*: Cell, 143, 111-121 (2010) [査読有]

③ Endogenous diterpenes derived from ent-kaurene, a common gibberellin precursor, regulate protonema differentiation of the moss *Physcomitrella patens*. K. Hayashi*, K. Horie, Y. Hiwatashi, H. Kawaide, S. Yamaguchi, A. Hanada, T. Nakashima, M. Nakajima, L.N. Mander, H. Yamane, M. Hasebe, H. Nozaki: Plant Physiol., 153, 1085-97 (2010) [査読有]

④ Toyocamycin specifically inhibits auxin signaling mediated by SCFTIR1 pathway., K. Hayashi*, S. Kamio, Y. Oono, L.B. Townsend, H. Nozaki: Phytochemistry, 70, 190-97 (2009) [査読有]

⑤ Differential Downward Stream of Auxin Synthesized at the Tip Has a Key Role in Gravitropic Curvature via TIR1/AFBs-Mediated Auxin Signaling Pathways., T. Nishimura, H. Nakano, K. Hayashi, C. Niwa, T. Koshiba: Plant Cell Physiol, 50, 1874-1885 (2009)

⑥ Manipulation of intracellular auxin in a single cell by light with esterase-resistant caged auxins., N. Kusaka, J. Maisch, P. Nick, K. Hayashi*, H. Nozaki: Chembiochem, 10, 2195-2202 (2009) [査読有]

⑦ Small-molecule agonists and antagonists of F-box protein-substrate interactions in auxin perception and signaling., K. Hayashi*, X. Tan, N. Zheng, T. Hatate, Y. Kimura, S. Kepinski, H. Nozaki: Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 105, 5632-37 (2008) [査読有]

[学会発表] (計 6 件)

① 廣瀬正和, Stefan Kepinski, 嶋田幸久, 野崎 浩, 林謙一郎: ” TIR1/AFB オーキシン受容体特異的拮抗剤の分子設計” 第 45 回植物化学調節学会 (2010 年 11 月 1 日) 神戸

② 林謙一郎: ” オーキシンのケミカルバイオロジー: オーキシン プローブの応用—コケからシロイヌナズナまで—” 第 74 回日本植物学会大会 (2010 年 9 月 10 日) 名古屋

③林謙一郎：”オーキシン分子プローブの開発”日本農芸化学会中部支部 第155回例会・シンポジウム・植物のケミカルバイオロジー (2009年7月18日) 静岡

④中尾幸生, 林謙一郎, 野崎 浩：”ABP1 (Auxin binding Protein 1) 特異的プローブの設計と合成”第44回植物化学調節学会 (2009年10月29日) 仙台

⑤林謙一郎：”Chemical Biology for Auxin Signaling and Transport”AUXIN2004 国際会議. (2008年10月5日). マラケッシュ・モロッコ

⑥林謙一郎, 幡手達也, Stefan Kepinski, 野崎 浩：”新規オーキシン受容体阻害剤の分子設計と合成”第43回植物化学調節学会. (2008年10月29日) 筑波

[図書] (計1件)

林謙一郎 (分担)：”オーキシン受容体の拮抗阻害剤の開発”植物のシグナル伝達 一分子と応答一, 柿本 辰男他 編, 共立出版, Pp 216-221 (2010年)

[その他]

ホームページ等

<http://www.dbc.ous.ac.jp/labs/KHayashi/Khayashi.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 謙一郎 (HAYASHI KEN-ICHIRO)

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号：30289136

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

野崎 浩 (NOZAKI HIROSHI)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：60159085

Stefan Kepinski. Ph. D.

University of Leeds・Center for

Plant Sciences.