

令和 5 年 4 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21272

研究課題名（和文）改変型キナーゼとプロテオミクスで解く植物リン酸化ネットワーク

研究課題名（英文）Analysis of Protein Phosphorylation Networks with Designed Kinase and Proteomics

研究代表者

中道 範人（Nakamichi, Norihito）

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：90513440

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）： これまでに我々は、阻害剤を用いた解析、プロトプラストでの多重遺伝子ノックダウン法を用いた解析から、CKL(Casein Kinase 1-like)遺伝子群はシロイヌナズナの概日時計調節に関わることを報告してきた。しかし、CKLが時計以外の生理現象に関わることはあまり知られていない。本研究では、改変型CKLを作成し、そのCKLを発現する植物体のプロテオミクスを実施することなどでリン酸化基質を同定し、最終的にはCKLの関わる生理現象を明らかにすることを目的としていた。

材料の作成で、想定外の問題にあたったが、部分的には乗り越えることができたため、これらの材料をつかった基質の同定が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の発生・生理・代謝などあらゆる生命現象の分子機構は、おもに変異体スクリーニングを起点とする遺伝学と原因遺伝子の解析から進められてきた。順遺伝学の弱点として遺伝学的冗長性のある遺伝子を生命現象の鍵因子として発見しにくい。現存する植物は染色体倍加の過程を経ており、重複機能をもつ遺伝子が多く存在していると考えられる。

本研究は、プロテオミクス解析によってCK1の基質タンパク質およびCK1の関わる生理機能を網羅的に同定することを旨とした。このようなアプローチは、重複性の問題だけでなく、タンパク質翻訳後修飾を俯瞰する上で重要な取り組みとなる。

研究成果の概要（英文）： We have previously reported that the CKL (Casein Kinase 1-like) gene family is involved in circadian clock regulation in *Arabidopsis thaliana*, based on analyses using small molecule inhibitors and multiple gene knockdown. However, it is less known that CKL is involved in physiological phenomena other than the clock. The objective of this study was to identify the phosphorylation substrates by creating a modified CKL and performing proteomics of the plant expressing the modified CKL, and ultimately to clarify the physiological processes in which CKL is involved.

Although we ran into unexpected problems in the preparation of the materials, we were able to overcome some of them, and we expect to identify substrates using these materials.

研究分野：植物生理学，農芸化学

キーワード：植物 遺伝子重複 キナーゼ CK1

1. 研究開始当初の背景

現存する被子植物は染色体倍加の過程を経ており、重複機能をもつ遺伝子が多く存在していると考えられる。応募者は、植物の概日時計の研究に取り組んできたが、この研究分野も他の植物科学と同じく順遺伝学によって時計関連遺伝子が取得されていた。応募者は重複機能が問題となってこれまで隠れていた時計因子あるいはメカニズムを明らかにするため、新たに時計攪乱物質の探索とそのヒット化合物の標的特定を進めた。応募者は、まず時計周期を自動で解析できる実験系を確立し、その実験系を用いて化合物探索を実施し、長周期化合物として低分子化合物 PHA767491 を発見した。PHA767491 に結合するタンパク質(標的タンパク質候補)をアフィニティープロテオミクスで探索したところ、13種類のカゼインキナーゼ 1(CK1)タンパク質を同定した (Uehara *et al.*, *PNAS* 2019)。また PHA767491 をリード化合物とした構造活性相関研究によって、より強力かつ選択性の高い CK1 阻害剤 (AMI-331)を開発した (Saito *et al.*, *Plant Direct* 2019)。さらに全く構造の異なる 3,4-Dibromo-7-Azaindole も CK1 阻害剤として時計を攪乱することを突き止めた (Ono *et al.*, *Plant Cell Physiol.* 2019)。一連の CK1 阻害剤の研究より、CK1 ファミリーは植物の時計機能に関わることが強く示唆された。また CK1 の基質候補を、CK1 阻害剤処理後の遺伝子発現解析から時計転写因子 PSEUDO-RESPONSE REGULATOR (PRR)ファミリーと推定した。生化学実験や変異体を用いた実験から、PRR ファミリーのうちの PRR5 と TOC1(別名 PRR1)が CK1 によってリン酸化され、そのリン酸化によって PRR5 と TOC1 が分解系に持ち込まれることを見出した (Uehara *et al.*, *PNAS* 2019)。この研究で CK1 の基質とそのリン酸化の意義を見出すために、PRR5、TOC1 や時計に絞った研究を行った。

植物以外の動物やカビ、酵母などの CK1 の基質は多様で、これらの生物では、免疫応答、細胞周期、概日時計、アポトーシスや発生などの幅広い生命現象に CK1 が関わっている。一方で、植物の CK1 の基質タンパク質は上記の PRR5 や TOC1 を含めて数例しか知られておらず、CK1 の関わる植物の生理現象は、ほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

応募者が開発したユニークな植物のカゼインキナーゼ 1 (CK1) の阻害剤 AMI-331 や、化合物との結合状態に基づいて人工設計する CK1 を利用したプロテオミクス解析、*in vivo* での近接標識を利用したプロテオミクス解析などによって、遺伝的重複性が障壁になって不明な点の多いシロイヌナズナの CK1 ファミリーの関わる生理現象を明らかにする。本研究の成果は、遺伝的重複性が問題となって解析が遅れている植物の多くのキナーゼの機能解明へ向けたプロテオミクス研究のモデル系となる。

3. 研究の方法

CK1 の基質を探るために、応募者らが開発した強力かつ選択性の高い CK1 阻害剤である AMI-331 (Saito *et al.*, *Plant Direct* 2019)の処理によってリン酸化状態が低下するタンパク質を同定する。質量分析によるプロテオミクスは、解析ごとによる量的な変化を決めることができない。そこで、比較する 2 サンプルの片方を安定同位体標識(15N ラベル)したものを供与し、2 サンプルを混合したものを解析する(SiLAC)。プロテオミクス解析は、これまでの研究と同様に応募者の所属するトランスフォーメティブ生命分子研究所の分子構造センターとの共同研究として取り組む (Uehara *et al.*, *PNAS* 2019、Saito *et al.*, *Plant Direct* 2019)。

CKL4 の基質候補の探索を、さらに別の方法 [合成 ATP アナログ (Allen *et al.*, *Nature Methods*, 4, 511-516, 2007)を用いたプロテオミクス解析] で実施する。合成 ATP アナログは 1)立体障害によりキナーゼの ATP 結合ポケットに入らない、2)変異によって ATP 結合ポケット深部を広げたキナーゼによって加水分解され、基質に対して自己のガンマ位のチオリン酸が転移される。このチオリン酸基は最終的に特異的抗体によって認識される。したがって、仮に合成 ATP アナログを使用できるキナーゼが作成できれば、このキナーゼの基質候補を容易に濃縮することができる。すでに CKL4 のアミノ酸 M82 から L85 まだが ATP 結合ポケット深部に相当することを突き止めており、この 4 つのアミノ酸側鎖を縮小させるためにアラニンに置換したものを設計する。設計した CKL4 が実際に合成 ATP アナログを加水分解できることを試験管内のテストで確認する。さらにこの設計 CKL4 をシロイヌナズナの *ckl4* 変異体に形質転換し (*mCKL4*)、合成 ATP アナログを処理し、チオリン酸化した基質を特異的抗体によって濃縮し、プロテオミクスに供与することで、CKL4 の基質の同定につなげる。

AMI-331 の処理によってリン酸化状態が変化するタンパク質は、わずかではあるが AMI-331 のオフターゲット効果の結果で得られるものもある。そこで CK1 タンパクファミリーの中でも既知の基質との相互作用が強いシロイヌナズナ CASEIN KINASE LIKE 4 (CKL4) (Uehara *et al.*, *PNAS* 2019)の植物体内での相互作用因子の同定を行うことで基質候補を得る。しかしキナーゼと基質の相互作用は一過的であることが多く、キナーゼをアフィニティー精製するだけでは必ずしも基質は濃縮されない。そこで近年開発された一過的な相互作用を検出できる新たなタグ (Tourbold; Branon *et al.*, *Nature Biotech.*, 36, 880-, 2018)を用いる。融合 CKL4-Tourbold タンパク質を発現する植物を作出し、CKL4 と相互作用する因子を Tourbold で標識し、それを

質量分析（プロテオミクス解析）することで、CKL4の基質候補を同定する。

4. 研究成果

CK1の基質を探るために、強力かつ選択性の高いCK1阻害剤であるAMI-331の処理によってリン酸化状態が低下するタンパク質を同定することを目指した。質量分析によるプロテオミクスは、解析ごとによる量的な変化を決めることができないため、比較する2サンプルの片方を安定同位体標識(15Nラベル)したものを供与し、2サンプルを混合したものを解析することを確立しようとした(SiLAC)。しかし、発芽後すぐの植物では種子に含まれる窒素栄養が、外部投与した15Nラベルした窒素と同時に合成タンパク質に存在することとなり、SiLACの解析を困難にすることが分かった。種子に含まれる窒素分子を消費してしまい、外環境からの窒素だけをタンパク質に取り入れる生育ステージの植物を利用することでこの問題が解決できそうであった。しかし、大きく育った植物へのAMI-331化合物処理の効果(時計周期の延長を指標とする)は検討中であり、一旦SiLAC実験を中断している。

合成ATPアナログを用いたプロテオミクス解析へ向けて、合成ATPアナログをCKL4が加水分解し、基質に対してガンマ位のチオリン酸を転移できるかを解析した。リコンビナントタンパク質として合成されていたシロイヌナズナのCKL4(Uehara et al., PNAS 2019, Ono et al., Plant Cell Physiol. 2019)をCK1ファミリーの代表酵素として解析した。チオリン酸化は、p-ニトロベンジルメチレートと抗チオフォスフェートエステル抗体を用いたウエスタンブロットティングで検出した。ATPのガンマ位がチオリン酸化したアナログのうち、アデニン骨格を持つものはCKL4タンパク質によってガンマ位が加水分解され、基質がチオリン酸化されたことが確認できた。弱いながらも、アデニン骨格に分子修飾されたATPガンマ位チオリン酸アナログ2種類も、CKL4によって基質へガンマ位のチオリン酸が転移されていた。これらの反応はCKL阻害剤であるAMI-331によって完全に阻害されることも判明した。

次にアデニン骨格が分子修飾されたATPガンマ位チオリン酸アナログ2種類を、ATPよりも効率的に利用することができることが期待されたCKL4変異体タンパクを3種類合成し、この可能性を解析した。結果として、これら3種類のCKL4変異体タンパクは、いずれのATPアナログの加水分解能力が落ちていたことが分かった。以上の取り組みから、ATPのガンマ位がチオリン酸化したアナログを特異的に加水分解し、基質をチオリン酸化するCKL4の合成は中断している。

CKL多重変異体を使ったリン酸化プロテオミクスに向け、変異体のさらなる作成および多重変異体の作成を行った。ゲノム編集によって、複数のコンビネーションのCKL五重変異体の作成が完了している。これら変異体の概日時計の周期を測定したが、目立った形質は確認されていない。今後はさらなる多重変異体の作成を進める予定である。

TurboIDタグによるCKLの近接タンパク質のin vivoラベリングの実施を目指した。これまでの方法論によりCKL4-TurboIDタグ融合タンパクを植物体で過剰発現しようとしたが、全く発現しないという問題が発生した。同様の現象は、タグを変えた際にもみられた。したがって、CKLは従来の方法では過剰発現できないと判断し、発現ベクターや発現に用いるCKLのコード領域の検討を行った。条件検討の結果、過剰発現のための特殊なDNA配列が必要であることが判明した。この知見を利用して作成したFLAGタグを融合させたCKL4の過剰発現体の時計の形質を観察したところ、連続明条件下で短周期性を示すことが分かった。これはCKL阻害剤でみられた長周期効果(Uehara et al., PNAS 2019, Ono et al., Plant Cell Physiol. 2019, Saito et al., Plant Direct 2019)と逆の形質であり、CKLの活性が周期を短縮化するという以前の推察とも合致するものであった。現在はCKLとTurboIDタグの融合発現植物の過剰発現株を上記の作成方法にしたがって作成している。

CKLの近接タンパク質のin vivo近接ラベリングを実施する前段階として、別のタンパク質(ある時計転写因子)とTurboIDの融合タンパクを発現させる植物体を取得することに成功した。この形質転換植物は、この時計タンパク質のみの過剰発現体と類似した表現型を示したため、本時計タンパクはTurboIDと融合しても機能的だと考えられた。この植物をピオチン処理すると、この時計タンパク質および未知のタンパク質がピオチン化されることがウエスタンブロットティング解析によって示された。一方ピオチン処理なしのサンプルや、野生型株をピオチン処理したもので若干のピオチン化タンパクが見られものの、時計タンパク-TurboID融合発現植物をピオチン処理したものでは特異的なタンパクがピオチン化されていた。非形質転換体と時計タンパク-TurboID発現植物に対してピオチン化処理を行い、その後アビジンビーズを利用したプルダウンを行い、ピオチン化したタンパク質を濃縮し、質量分析(プロテオミクス)解析を行った。時計タンパク-TurboIDによって、生体内でピオチン化されたタンパク質には、核内で転写に関わるタンパク質が有意に濃縮されていた。また時計タンパク-TurboID発現植物に対して、ピオチン処理ありとピオチン処理なしで比較解析した結果からも、上記の実験と同様に核内で転写に関わるタンパク質がピオチン処理ありで濃縮されていた。またこのうちあるタンパク質をコードする遺伝子を欠損させると、本時計タンパク質の過剰発現による形質が抑圧されることが分かり、遺伝的な相互作用が判明した。以上のように、in vivo近接ラベリングをする

ことで、着目するタンパク質の機能メカニズムが明らかになると期待される。また本研究室における、TurboIDによる近接ラベリングとビオチン化タンパク質のプロテオミクスの実験条件が確立されたと判断している。CKL4-TurboID 発現植物体が作成出来次第、CKL4 が細胞内で近接するタンパク質を同定する。

参考文献

Uehara *et al.*, *PNAS* 116, 11528-11536 (2019).

Saito *et al.*, *Plant Direct* 3, e00172 (2019).

Ono *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, 60, 2360-2378 (2019).

Allen *et al.*, *Nature Methods*, 4, 511-516 (2007).

Branon *et al.*, *Nature Biotech.*, 36, 880-887 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Uehara Takahiro N, Nonoyama Takashi, Taki Kyomi, Kuwata Keiko, Sato Ayato, Fujimoto Kazuhiro J, Hirota Tsuyoshi, Matsuo Hiromi, Maeda Akari E, Ono Azusa, Takahara Tomoaki T, Tsutsui Hiroki, Suzuki Takamasa, Yanai Takeshi, Kay Steve A, Itami Kenichiro, Kinoshita Toshinori, Yamaguchi Junichiro, Nakamichi Norihito	4. 巻 63
2. 論文標題 Phosphorylation of RNA Polymerase II by CDKC;2 Maintains the Arabidopsis Circadian Clock Period	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 450 ~ 462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Maeda Akari E, Nakamichi Norihito	4. 巻 in press
2. 論文標題 Plant clock modifications for adapting flowering time to local environments	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiac107	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakamichi Norihito	4. 巻 11
2. 論文標題 The Transcriptional Network in the Arabidopsis Circadian Clock System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1284 (13pages)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes11111284	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Masuda Kosaku, Tokuda Isao T., Nakamichi Norihito, Fukuda Hirokazu	4. 巻 12
2. 論文標題 The singularity response reveals entrainment properties of the plant circadian clock	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 864 (7pages)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-21167-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 中道範人	4. 巻 58
2. 論文標題 有用品種から紐解く植物の概日時計メカニズム	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 646-648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Norihito Nakamichi
2. 発表標題 Small-molecule modulators of the plant clock
3. 学会等名 5th Asia Forum on Chronobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田明里、松尾宏美、木下俊則、中道範人
2. 発表標題 シロイヌナズナの概日時計における周期の温度補償性に関わるタンパク質の量的制御
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田明里、松尾宏美、藤本和宏、木下俊則、山口潤一郎、中道範人
2. 発表標題 時計長周期化合物と標的タンパクの結合モデル
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田明里、松尾宏美、木下俊則、中道範人
2. 発表標題 植物概日時計の温度補償性に関わるタンパク質の量的制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中道範人、松尾宏美、大野梓、前田明里、佐藤綾人、伊丹健一郎、木下俊則、山口潤一郎
2. 発表標題 時計攪乱化合物の作用機序
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田明里、松尾宏美、木下俊則、中道範人
2. 発表標題 シロイヌナズナの概日時計の温度補償性が減衰した変異体について
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------