

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21322

研究課題名（和文）作物の葉緑体オートファジーを抑制できる化合物の開発

研究課題名（英文）Development of small molecules to manipulate chloroplast degradation activity in crop plants

研究代表者

泉 正範（Izumi, Masanori）

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・上級研究員

研究者番号：80714956

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：植物の葉は、展開した後、光合成を担うオルガネラである葉緑体が分解されることで光合成効率が徐々に減衰していく。本研究では、この分解現象を特定の時期や部位を狙って遅らせることで、光合成産物を増加させる技術の開発につなげるため、葉緑体の分解現象を抑制する小分子化合物の開発に挑戦した。化合物ライブラリからのスクリーニング、得られたヒット化合物の詳細な活性評価、構造活性相関解析を行い、葉の老化過程で葉緑体を部分的に分解するオートファジー経路を抑制する化合物を同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の葉の光合成活性は、作物の生産性に強く関わる重要な形質である。今回同定された小分子化合物群は、遺伝子組み換え技術を用いずとも、葉に散布するだけで光合成の減退を抑え、光合成産物の量を増加させる技術・薬剤開発の基礎となり得る成果であり、今後の学術研究や作物生産技術の新しい発展を可能にすることが期待される。また、本解析で同定した小分子化合物の情報をもとに、その生体内での結合ターゲットを同定する基礎研究が進んでいくことで、多くが未解明である葉緑体オートファジーの分子機構解明が進展することも期待できる。

研究成果の概要（英文）：Photosynthesis efficiency in plant leaves gradually declines as the leaves senesce. To develop the technology that retards the decline of photosynthesis capacity and increase net photosynthetic production, this study prompted to identify the small compounds that suppress the degradation of chloroplasts in leaves. Through the screening of the candidate compounds from chemical libraries and the evaluation of their inhibitory activities, the study isolated the compounds that suppress autophagy-dependent, partial degradation of chloroplasts.

研究分野：植物栄養学

キーワード：葉緑体 植物 オートファジー ケミカルバイオロジー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

農作物のバイオマス、収量、品質は、二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) から炭水化物を生産する光合成の効率に強く規定される。よって光合成をより効率化する技術は今後の食糧生産を支える一つの柱になることが期待される。植物の葉は、一定の期間をかけて展開し、数十日間といった長い期間光合成を行うが、その葉一枚の一生の間で、光合成の最大能力が発揮されるのは葉が若い展開直後であり、徐々に減衰していつてしまう。この減衰は植物の老化現象の一つであり、植物細胞内で光合成を担う細胞小器官である「葉緑体」が分解されることによって起こる。ゆえに葉緑体の分解を適切に抑制することができれば、光合成の低下を抑えその効率を一定程度高く維持し、正味の光合成産物を増やすことができる可能性がある。

ただし、「老化葉の葉緑体分解」そのものは、環境要因により光合成が阻害された葉（例えば稲作では、個体群が育つにつれ光が届かなくなる下部の葉）の葉緑体を分解し、栄養分を回収、新しい葉に再分配する役割がある。例えば遺伝子組み換えで老化しない植物を作っても、光が届かない葉の葉緑体分解を阻害してしまうと、個体全体の栄養利用を強く阻害してしまう可能性が示されてきた。つまり光合成を盛んに行える時期や部位（光が当たる時期や部位）だけを狙って葉緑体分解を抑制する「時期・部位特異的な抑制」が実現できれば、栄養利用を阻害せず光合成を効率化できる革新的な技術となるのでは、との着想を持った。例えば稲作の場合で言えば、もみが実る登熟期の最上位の葉（止め葉）は光が当たり続けるため、その部位の葉緑体分解を抑制し光合成活性を高く維持できれば、登熟が促進され収量や品質の向上につながることを期待される。以上を踏まえ本研究では、「葉緑体分解を止める薬剤」を作り、光合成を行える時期や部位を狙って散布しその活性を高く維持する新しい技術開発につながる萌芽的研究として、葉緑体分解の抑制化合物の開発に挑むこととした。

### 2. 研究の目的

代表者らは、本研究開始前に、真核生物に保存される細胞内自己分解系である「オートファジー」が葉緑体の分解を担うことを明らかにしてきた。特に葉の老化の初期には、葉緑体を部分的に分解するオートファジーが活性化することも知られていた。ゆえに、この老化時に起こる葉緑体のオートファジーを抑制する化合物を確立できれば、その施与により葉緑体分解を一時的に抑制し、光合成効率の向上につなげることができるのではないかと考えた。よって本研究では、葉緑体を部分的に分解するオートファジー経路を抑制する小分子化合物を化合物ライブラリから単離し、さらにその詳細な活性評価や構造活性相関解析を行うことで、葉に散布するだけで効果が出ることを期待できる高活性な化合物（低濃度で抑制効果を持つ化合物）を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 化合物スクリーニング系の構築

まず、モデル植物シロイヌナズナを用いて葉緑体を部分分解するオートファジーを抑制する化合物スクリーニングを行うため、その解析をハイスループット化するための形質転換植物の作出、評価を行った。哺乳類細胞でのオートファジー活性評価に用いられた実績のある蛍光タンパク質 pHRed、あるいは同じく哺乳類細胞での使用実績のあった緑色蛍光タンパク質 (GFP) と赤色蛍光タンパク質 (RFP) の GFP-RFP tandem tag の融合タンパク質を葉緑体内腔に発現するシロイヌナズナ形質転換体を作成した。そしてくりぬいた leaf disc を 96 well plate 上で暗所に置く処理によって葉緑体を部分分解するオートファジーを誘導し、その活性を正確にモニタリングできるかを共焦点顕微鏡、プレートリーダー等を用いて検討した。

#### (2) 候補化合物の単離

植物の生理現象を制御する化合物の単離実績が多数ある名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所ケミカルライブラリセンターが管理するライブラリから、本解析用の化合物 20 プレート (1600 化合物) を選抜し、それらを対象に葉緑体を部分分解するオートファジーを抑制する化合物を探索した。まず 20 μM の濃度で網羅的に活性を評価し、抑制効果を持つ化合物を絞り込んだ。絞り込まれた化合物を対象に、再現性の確認を行うとともに、より低濃度 (4 μM, 0.8 μM) での効果を調査した。これらの解析を、結果の再現性を確認しながら行うことで、比較的低い 1 μM 以下の濃度で安定して阻害活性を持つ化合物を絞り込んだ。絞り込まれた化合物の一種については、構造展開、構造活性相関解析を行った。

#### (3) 作物種での評価系の構築

単離されてきた化合物の活性を、作物イネで評価する実験系の検討を行った。顕微鏡下での評価に加え、生化学的な活性評価を行うための形質転換イネ系統の整備も行った。イネ以外の作物での化合物湿潤活性を、蛍光小分子を用いて評価することで、他の作物での活性評価が可能かについての検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 得られた主な成果

本研究で使用した蛍光タンパク質 pHRed は低 pH に応答して自身の励起波長を変化させる特性を持つため、酸性オルガネラである液胞へのオートファジーを介した輸送に伴う励起波長の変化をモニターすることで、葉緑体オートファジー活性の検出を試みた。しかしながら、pHRed は葉緑体内部にいる時点から、酸性寄りの励起波長特性を示しており、液胞への移行に伴う変化を定量的に検出するのは困難である可能性が生じた。また、マクロレベルで葉の蛍光を詳細に検討した結果、蛍光タンパク質の挙動を上回る葉の自家蛍光の変動が起こることが確認された。以上のことから、当該タンパク質により葉緑体オートファジーの活性を正確に評価することは困難と判断した。

GFP-RFP tandem tag はオートファジーを介して液胞に運ばれると、GFP が優先的に分解・消光する一方、RFP が残存するため、RFP/GFP 蛍光比をモニターすることで葉緑体オートファジー活性を評価できると考えた。共焦点顕微鏡による細胞レベルの観察では、確かに RFP のみが液胞に蓄積する様子を簡易に観察できた。ただしその GFP/RFP 蛍光比をマクロな葉の次元で評価しようとする、葉緑体オートファジーの誘導処理や化合物湿潤にともない変化する葉由来の自家蛍光変化が、蛍光タンパク質由来の変化を上回ってしまうことが示された。以上の結果から、本研究では、GFP-RFP tandem tag 発現植物を用いた顕微鏡観察により、葉緑体を部分分解するオートファジーの活性評価を行う系を確立し、それを用いて抑制化合物を単離することとした。加えて、96 well plate 上での leaf disc のインキュベーションと脱気処理を組み合わせることにより、多検体となる化合物を同時かつ安定に葉に湿潤させる処理法を構築した。

確立したスクリーニング系を用いて、本解析用に選抜した 1600 化合物からのヒット化合物の探索を行った。網羅的な一次スクリーニングの後に、選抜された化合物を対象に、再現性の調査、より低濃度での活性評価を行い、1  $\mu$ M 以下の比較的低濃度で安定して阻害活性を持つ化合物 12 種を絞り込むことができた。そのうちのひとつについて、構造展開、構造活性相関解析を行い、阻害に特に重要な構造に関する情報を得ることができた。

得られた化合物がイネにおいても効果を持つか調査したが、硬いイネの葉では化合物溶液の湿潤効率が極めて低いこと、化合物が湿潤した細胞と湿潤していない細胞が混在すること、そしてそれらを見分けることが困難であることから、顕微鏡による活性評価を安定して行うことが難しいと判断した。そこで顕微鏡観察に頼らない評価系、特に生化学的なタンパク質解析から葉緑体分解の活性を評価する系を構築するため、葉緑体に移行する赤色蛍光タンパク質を安定発現する系統の選抜・整備を行った。また、イネ以外の作物で安定な解析が行えるかを評価するため、蛍光小分子を用いることで複数の作物種で葉への溶液湿潤効率を評価し、コムギやトマトといった植物種では安定して葉の内部に小分子化合物を湿潤可能であることを確認できた。

### (2) 得られた成果の位置づけ、今後の展望

前述したように、植物の葉で起こる葉緑体の分解現象は、作物の生産性に強く関わる農学的に重要な現象である。また、オートファジーによる細胞内成分の分解、特に光合成生物に特有のオルガネラである葉緑体を対象とするオートファジーの分子機構は、国内外の関連する研究分野で注目される研究対象となりつつあるが、その実体説明はまだ発展途上であり、抑制化合物が報告された例もない。本研究は、葉緑体を部分分解するオートファジーの抑制化合物を始めた単離した成果となった。今後、得られた 12 種の抑制化合物対象に、詳細な構造活性相関解析を進め、かつ生体内でのそのターゲットタンパク質を同定することができれば、生体内で葉緑体オートファジーに関わる遺伝子の同定を行うことができ、その基本メカニズムの解明が進むことが期待される。本研究は、葉緑体分解の基本的な仕組みを理解しようとする基礎研究の発展を生み出す成果にも位置付けられる。

そして本研究で目的としたように、今回得られた抑制化合物自身、あるいはそこから得られた主要な阻害構造などを基本情報とすることで、「葉緑体分解を止める薬剤」を開発することができれば、遺伝子組み換え技術を用いずに光合成を効率化するための新しい技術開発につながっていくことも期待できる。化合物を用いた生命現象の制御は、遺伝子組み換え技術を必須としないため、組換え技術が確立されていない広範な作物種への研究展開が行えるという利点もある。本研究でも複数の作物種で化合物活性評価が可能であることを確認しており、多様な作物で化合物による葉緑体分解の制御、およびその有効性調査を実施していくためのベースとなる成果が得られたと言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	草野 修平  (Kusano Shuhei)  (80759291)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員    (82401)	

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