

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02075

研究課題名（和文）真核生物におけるppGppの機能解明を目指した分子プローブの開発

研究課題名（英文）Molecular probe for the evaluation of ppGpp function in eukaryote

研究代表者

清尾 康志（SEIO, KOHJI）

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：20313356

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではppGppが固定化されたアフィニティービーズを作製し、真核生物からppGpp結合タンパク質を単離・同定する技術の開発と同定したタンパク質の機能解析を行い、真核細胞におけるppGppの機能発現メカニズムを解明するための方法論を確立することを目的に研究を行った。分子内にビオチンを有する2種類の分子プローブの創製に成功し、そのひとつを用いてppGpp結合タンパク質を同定するための実験を行い、複数の候補タンパク質を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では植物の光合成の制御分子であるppGppに関して、その誘導体の合成法の開発とその植物での機能探索のための研究を行った。本研究の成果はバイオテクノロジーに有用なppGppの化学的合成に関する知見を提供するとともに、植物の機能制御に関する新しい視点を提供するものとして学術的・社会的に意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a technique to isolate and identify ppGpp-binding proteins from eukaryotes by creating affinity beads immobilized with ppGpp and analyzing the function of the identified proteins. The ultimate goal was to establish a methodology to elucidate the mechanism of ppGpp function expression in eukaryotic cells. We successfully created two molecular probes with biotin within their molecules and conducted experiments using one of them to identify ppGpp-binding proteins, resulting in the acquisition of several candidate proteins

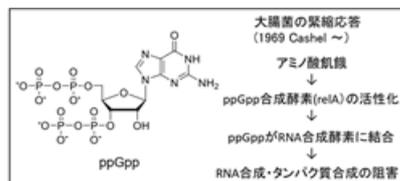
研究分野：生体関連化学

キーワード：ppGpp 緊縮応答 分子プローブ 植物

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グアノシン 3'-ジリン酸 5'-ジリン酸 (ppGpp) は、細菌がアミノ酸飢餓状態を生き延びるための「緊縮応答シグナル」である。大腸菌をアミノ酸欠乏環境下に置くと、ppGpp は Dks と共に RNA ポリメラーゼに結合して RNA



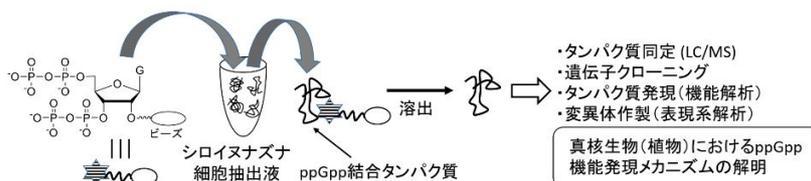
合成を抑制しアミノ酸飢餓状態をやり過ごす。その後、大腸菌においては EF-Tu を始め 26 種以上の ppGpp 結合タンパク質が同定され ppGpp の多彩な機能の解明が進みつつあった。

一方、分担研究者の増田らは植物のストレス応答において ppGpp が機能していることや、ショウジョウバエやヒト細胞からの ppGpp の検出が報告され、ppGpp が真核生物においてもストレス応答を制する可能性を明らかにしていた。

しかし、大腸菌と比べて極めて多数のタンパク質を含む真核細胞から ppGpp 結合タンパク質を迅速に単離するための手法は存在せず、真核生物における ppGpp の機能発現メカニズムの解明は全く進展していなかった。

2. 研究の目的

本研究では ppGpp が固定化されたアフィニティービーズを作製し、真核生物から ppGpp 結合タンパク質を単離・同定する技術の開発と同定したタンパク質の機能解析を行い、真核細胞における ppGpp の機能発現メカニズムを解明するための方法論を確立することを目的に研究を開始した。



3. 研究の方法

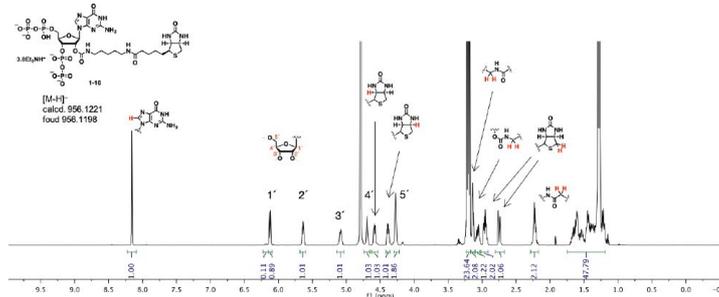
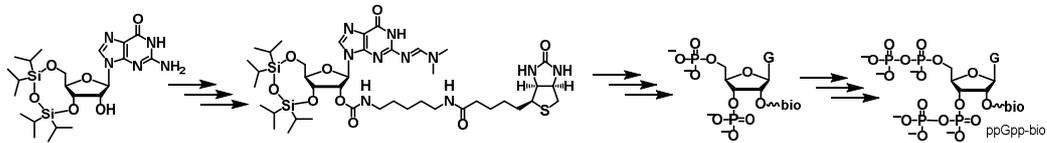
本研究では、真核生物のモデル生物としてシロイヌナズナを用い研究を行うことを計画した。まず、ppGpp を固定化したアフィニティービーズを開発のための合成研究を行った。また、シロイヌナズナから ppGpp 結合タンパク質を単離・同定するための研究を行った。

4. 研究成果

ppGpp を固定化したアフィニティービーズを開発のための合成研究

< ビオチン結合型 ppGpp プロープの合成 >

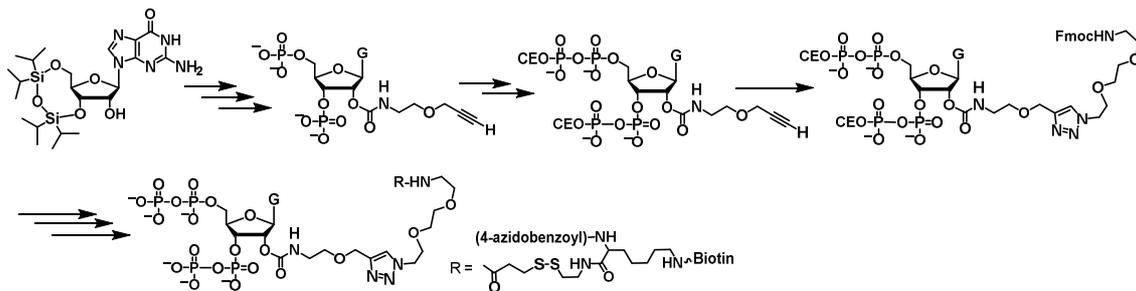
下図に従い、ppGpp の 2'-水酸基からビオチンが伸長した ppGpp-bio を合成した。3', 5'-水酸基が保護されたグアノシンのアミノ基からアミノ基の保護をビオチンリンカーの導入を行った。ついで、3', 5'-保護基の脱保護とリン酸化を行い、さらにこのリン酸基をピロリン酸化することで目的とする ppGpp-bio を合成した。合成した ppGpp-bio は増田に提供し、ppGpp 結合タンパク質の同定実験に用いた。



< photoaffinity ビオチン結合型 ppGpp プロープの合成 >

ppGpp-bio よりも、ppGpp 結合タンパク質に強く結合するプローブとして光架橋部位をもった光架橋型 ppGpp-bio の合成を行った。

合成は先と同様の出発原料から行い、ビオチンの代わりにプロパルギル基を導入したのち脱保護を行い、3',5'-ジリン酸体を合成した。このものに対し、ピロリン酸化を行いシアノエチル基をふたつ残した状態で単離した。その後、アルキン部位に対してクリック反応で Fmoc 化されたアミンの導入を行い、最後にリン酸部のシアノエチル基および Fmoc の除去を行った。さらに、光クロスリンク試薬とのカップリングを段階的に行い光架橋型 ppGpp-bio を合成した。現在最終目的物の光架橋型 ppGpp-bio の精製法を検討中である。



シロイヌナズナから ppGpp 結合タンパク質を単離・同定するための研究

ppGpp のターゲットタンパク質を解析するにあたり、ppGpp の合成量が大きく増加または減少したシロイヌナズナ変異体を単離し、その表現型解析を行なうことにした。まず植物内の ppGpp 定量を安定的に行うために、安定同位体標識した ppGpp を内在性スタンダードとする新規の定量法の確立を目指した。精製した枯草菌の ppGpp 合成酵素 YjbM と大腸菌のピロリン酸分解酵素 PPX を用いて、¹³C 標識 GTP から ¹³C 標識 ppGpp を合成した。HPLC を用いて ¹³C 標識 ppGpp を分離し、固相抽出法によって精製、濃縮を行なった。植物サンプルへの ¹³C 標識 ppGpp 添加量の検討を行い、LC-MS/MS 検出法を最適化した。これにより、従来の測定法と比較し、コストや時間、正確性が格段に上がった。この新たに確立した ppGpp 定量法を用いて、シロイヌナズナのゲノムにコードされている 4 つの ppGpp 合成・分解酵素遺伝子 (*RSH1*, *RSH2*, *RSH3*, *CRSH*) のうち、*rsh2-rsh3* の 2 重変異をバックに *RSH3* を高発現するシロイヌナズナ (*RSH3ox2*) の詳細な表現型解析を行なった。その結果、*RSH3ox2* は野生型に比べ新鮮重が増

加するが、その増加は窒素欠乏条件においてより顕著になることを明らかにした。次に 4 つの ppGpp 合成・分解酵素遺伝子の完全欠損体を作成しその表現型を精査した。その結果、ゲノム編集技術により作成したその 4 重変異体は ppGpp の基底レベルが WT の 1/20 に減少しており、葉緑体における緊縮応答が不全になっていることがわかった。この緊縮応答を欠失したシロイヌナズナ変異体は、サリチル酸量が WT に比べ増加し、その増加は窒素欠乏条件下において顕著となり細胞死が過剰に引き起こされることを見出した。このことから ppGpp 依存の葉緑体の代謝制御はサリチル酸を介した病虫害応答と密接に関連している可能性が考えられた。この表現型はオートファジー欠損植物体のそれと類似していたことから、オートファジーに関連する遺伝子の発現動態を調べた。その結果、オートファジーを誘導するタンパク質の TOR によるリン酸化を介して緊縮応答が制御される可能性が高いことや、葉緑体の緊縮応答がサリチル酸を介した核遺伝子の発現制御を誘導することがわかった。

上記変異体に対し、研究代表者（清尾）が開発したビオチン融合型 ppGpp (ppGpp-bio) を用いたアフィニティークロマトグラフィーを実施し、ppGpp の結合タンパク質を網羅的に同定することを試みた。まず単離葉緑体の可溶化条件の検討を詳細に行なったところ、ジギトニンによる可溶化がアフィニティークロマトグラフィーの条件として最適であることがわかった。アフィニティークロマトグラフィー後、nano-LC-MS/MS による網羅的なタンパク質の定量解析を実施した。その結果、ネガティブコントロールのクロマトグラム画分に比べ、ビオチン融合型 ppGpp を用いた画分内で有意に増加した葉緑体タンパク質を複数同定した。ppGpp は G タンパク質の GTP 結合領域に競合的に作用することが知られている。同定したタンパク質の中に GTP 結合タンパク質が複数みられたことから、それらは ppGpp のターゲットタンパク質である可能性が高い。今後同定したタンパク質の ppGpp による酵素活性変化を生化学的に解析することで、この仮説の検証を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Trinh, M.D.L., Hashimoto, A., Kono, M., Takaichi, S., Nakahira, Y. and Masuda, S.	4. 巻 5
2. 論文標題 Lack of plastid-encoded Ycf10, a homolog of the nuclear-encoded DLG1 and the cyanobacterial PxcA, enhances the induction of non-photochemical quenching in tobacco	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Direct	6. 最初と最後の頁 e368
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pld3.368	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 -
1. 著者名 Mina Goto, Akira Oikawa, Shinji Masuda	4. 巻 255
2. 論文標題 Metabolic changes contributing to large biomass production in the Arabidopsis ppGpp-accumulating mutant under nitrogen deficiency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00425-022-03835-0	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 -
1. 著者名 Masaki Y, Tabira A, Hattori S, Wakatsuki S, Seio K.	4. 巻 20
2. 論文標題 Insertion of a methylene group into the backbone of an antisense oligonucleotide reveals the importance of deoxyribose recognition by RNase H.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Insertion of a methylene group into the backbone of an antisense oligonucleotide reveals the importance of deoxyribose recognition by RNase H.	6. 最初と最後の頁 8917-8924
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d2ob01667b.	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 -
1. 著者名 Ito, K., Ito, D., Goto, M., Suzuki, S., Masuda, S., Iba, K. and Kusumi, K.	4. 巻 63
2. 論文標題 Regulation of ppGpp synthesis and its impact on chloroplast biogenesis during early leaf development in rice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol	6. 最初と最後の頁 919-931
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcac053	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 -

1. 著者名 Qiu, D., Lange, E., Hass, T.M., Prucker, I., Masuda, S., Wang, Y.L., Felix, G., Schaaf, G. and Jessen, H.J.	4. 巻 145
2. 論文標題 Bacterial pathogen infection triggers magic spot nucleotide signaling in Arabidopsis thalianachloroplasts through specific RelA/SpoT Homologues.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J. Am. Chem. Soc.	6. 最初と最後の頁 16081-16089.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.3c04445	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 該当する

1. 著者名 Inazu, M., Nemoto, T., Omata, Y., Suzuki, S., Ono, S., Kanno, Y., Seo, M., Oikawa, A. and Masuda, S.	4. 巻 65
2. 論文標題 Complete loss of RelA and SpoT homologs in Arabidopsis reveals the importance of the plastidial stringent response in the interplay between chloroplast metabolism and plant defense response.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 631-643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcad136	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 -

1. 著者名 Goto, M., Imamura, S., Takaya, K. and Masuda, S.	4. 巻 103
2. 論文標題 Significance of the plastidial stringent response for plant growth on soil.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant Growth Regulation	6. 最初と最後の頁 425-437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10725-023-01109-7	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13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 後藤美奈 増田真二
2. 発表標題 緊縮応答強化による葉緑体内の窒素利用スリム化は植物バイオマスを増大させる
3. 学会等名 第11回日本光合成学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根本岳忠、稲津匡貴、増田真二
2. 発表標題 葉緑体のセカンドメッセンジャーppGppの合成酵素完全欠損体の作出と解析
3. 学会等名 日本光合成学会2022年度年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takanari Nemoto, Masataka Inazu, Shinji Masuda
2. 発表標題 Complete loss of relA-spoT homologs reveals the importance of the plastidial stringent response for controlling photosynthesis and chloroplast metabolism
3. 学会等名 International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Regulation (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井分彩乃 赤井恒 友利貴人 清尾康志 正木慶昭
2. 発表標題 リンカーを介して2'-水酸基にピオチンを有するグアノシンテトラリン酸誘導体の合成
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小山彩 友利貴人 江利川友紀 正木慶昭 清尾康志
2. 発表標題 2'カルバモイルエチルリンカーの脂溶性残基を導入したアンチセンスオリゴヌクレオチドの合成と特性評価
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 後藤美奈 及川彰 増田真二
2. 発表標題 緊縮応答因子ppGppが引き起こす代謝変化は窒素欠乏下での植物バイオマス増加に寄与する
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 根本岳忠、稲津匡貴、鈴木紗絵、小野すみれ、菅野裕理、瀬尾光範、増田真二
2. 発表標題 葉緑体における緊縮応答の不全がサリチル酸を介した病虫害応答を引き起こす
3. 学会等名 日本植物生理学会2022年度年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shinji Masuda
2. 発表標題 Significance of the plastidial stringent response for controlling chloroplast metabolism and plant growth
3. 学会等名 US-Japan Binational Photosynthesis Workshop. Arizona State University, (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 増田 真二
2. 発表標題 緊縮応答による時間スケールの葉緑体代謝・光合成の制御
3. 学会等名 第13回日本光合成学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kohji Seio, Kentaro Ohno, Daiki Sugiyama, Koh Akai, Ayano Iwake, Yudai Suzuki, Yukine Suda, Yoshiaki Masaki
2. 発表標題 Synthesis of guanosine 3', 5'-tetrphosphate (ppGpp) and its 2'-modified derivatives
3. 学会等名 The 50th International symposium on Nucleic Acids Chemistry
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 尾亦雄斗、増田真二
2. 発表標題 葉緑体型緊縮応答と植物バイオマスの関係性の解明
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 根本岳忠、稲津匡孝、増田真二
2. 発表標題 シロイヌナズナの大腸菌GppAホモログはグアノシン-5-リン酸の脱リン酸化を行う
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鈴木雄大 須田雪音 井分彩乃 正木慶昭 清尾康志
2. 発表標題 光架橋ピオチンリンカーを有するグアノシンテトラリン酸類似体の合成
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会
4. 発表年 2024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
研究 分担 者	増田 真二 (Masuda Shinji) (30373369)	東京工業大学・生命理工学院・教授 (12608)	

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
---------	---------