

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14542

研究課題名(和文) 化合物ライブラリースクリーニングによるオルガネラ分布制御因子の同定と解析

研究課題名(英文) Chemical library screening to identify novel key regulators of organelle distribution in plants

研究代表者

佐藤 良勝 (SATO, YOSHIKATSU)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任准教授

研究者番号：30414014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内小器官の細胞内配置は、細胞の正常な機能維持にとっても重要である。本研究では、植物における細胞小器官の細胞内分布を制御する新規因子を同定するため、20,000種の化合物を対象に化合物ライブラリースクリーニングを行った。その結果、構造的に4つのグループに分類される9種のヒット化合物の同定に成功した。本研究では、これらのうち1つのグループに絞って解析を進めたところ、共通骨格を有する5種のヒット化合物の薬効を確認した。さらに、薬効に重要な構造を同定し、薬効が強まるダイマー構造の合成に成功した。本研究により、細胞小器官の基本的な細胞内配置制御機構の解明に大きな端緒となる成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Proper distribution of organelles is essential for proper cell function in eukaryotic cells. In this study, we performed chemical library screening to identify novel key regulators of organelle distribution in plants. As a result of high-throughput but careful screening design, we obtained 9 candidates from 20,000 chemicals, which can be divided into 4 groups by structure-activity relationships. We focused 1 of these groups and evaluated by time-lapse analysis. Then, we confirmed 5 candidates having common structures. Furthermore, we succeeded to identify the essential and non-essential part from hit compounds and to synthesize the dimer compound having strong effect on organelle distribution. Therefore, we conclude that we could obtain important tools and information to elucidate the basic mechanism of organelle distribution in plants.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：化合物ライブラリースクリーニング

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞内に存在する細胞小器官は、細胞それぞれの場における細胞極性に応じて細胞内配置が制御されている。緑色植物特有の細胞小器官である葉緑体は、光環境に応じて光合成効率を最適に保つよう定位する。この現象は、葉緑体光定位運動と呼ばれ藻類から被子植物まで保存されている。葉緑体光定位運動の分子機構は、近年の分子遺伝学的手法により飛躍的に進展し、光受容体から運動機構に至るまで陸上植物に共通の制御因子が明らかになってきている (Suetsugu et al. 2016)。また、同様の機構で細胞核も光定位運動することが分かってきた (Wada 2017)。さらに、ミトコンドリアやペルオキシソームの配置は直接光により制御されるものではないものの、葉緑体との配置関係が光条件によって変化することが明らかされている (Oikawa et al. 2015)。一方、細胞小器官の配置制御機構は、細胞分裂により細胞質が娘細胞に分配される際にも重要である。しかし、細胞小器官が細胞質分裂時に娘細胞に均等あるいは不均等に分配される仕組みや極性成長時の不均一な配置制御などの基本的な細胞内分布制御機構についてはあまり知られておらず、制御因子もほとんど分かっていない状態であった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、大規模な化合物ライブラリースクリーニングに適した表現型スクリーニングによって、植物細胞内の細胞小器官の基本的な細胞内配置機構を制御する新規因子を見出すことであった。

### 3. 研究の方法

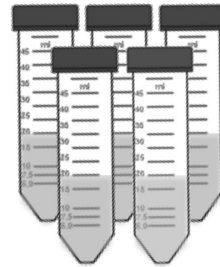
本研究では、植物細胞における細胞小器官の配置制御に関する因子を同定するため、化合物ライブラリースクリーニング法による表現型スクリーニングを行った。化合物ライブラリースクリーニングにおいて、得られたヒット化合物と構造的に類似した化合物間の薬効を比較し、構造による薬効を予測する構造活性相関による情報を最大限に引き出すためには、スクリーニングの規模は非常に重要である。そこで、本研究では、圧倒的多数の化合物が利用可能な名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所ケミカルライブラリーセンターの化合物ライブラリー 20,000種類を対象にスクリーニングを行った。また、植物材料は、コケ植物蘚類のヒメツリガネゴケを用いた。ヒメツリガネゴケを活用する利点として、96ウェルプレートそれぞれに異なる化合物の入った各ウェルに植物破碎液を注いだ直後から薬効を観察することが可能であること (高いスループット性) 実体顕微鏡あるいは光学顕微鏡の低倍対物レンズを用いた観察により、細胞内の核や葉緑体などの細胞小器官の配置まで観察できるため、1視野で多くの細胞を

同時に観察可能であること (スクリーニングにおける高い再現性) 陸上植物において発生に関わる多くの因子が保存されていることから、ヒメツリガネゴケに薬効を示す化合物は、被子植物にも同様の薬効を示す可能性が高いこと (農作物にも効力のある波及効果) などが挙げられる。

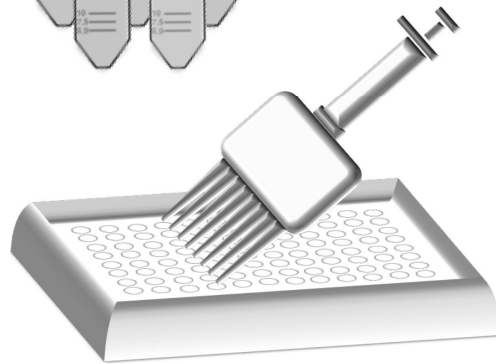


① ホモジナイズしたヒメツリガネゴケ原系体を8枚プレートにプレATINGし、5日間培養する。

② 原系体を集め50 mlチューブ5本に分けた後、BCDAT液体培地を20ml注ぐ。



③ 再びホモジナイズした後、96ウェルプレート各ウェルに100μlずつ注ぐ。



④ 化合物処理後翌日に実体顕微鏡にて観察する。



⑤ 化合物処理1週間後、電動顕微鏡にて、10倍対物レンズで4視野のタイル撮影を行う。

図1 化合物スクリーニングの模式図

図1に、本研究で実際に行ったケミカルスクリーニングの手順を示す。まず、ヒメツリガネゴケ原系体をホモジナイザーにより破碎しプレート8枚にプレATINGし、5日間培養した。プレート8枚分のヒメツリガネゴケ原系体を集め50ミリリットルチューブ5本に分け、ヒメツリガネゴケ生育用液体培地 (BCDAT) を20ミリリットル注いだ。それぞれのチューブの原系体を再びホモジナイザーで破碎し、96ウェルプレートそれぞれに異なる化合物の入った各ウェルに1

00マイクロリットルずつ分注した。

観察は、化合物処理した翌日に実体顕微鏡で1ウェルずつ観察しておき、処理1週間後に、電動顕微鏡 (Axio Observer) を用いて10倍対物レンズで各ウェル4ポジションをタイル状に自動撮影し、貼り合せ機能により広い視野を獲得する方法を用いて行った。葉緑体の配置に変化のあったウェルについては、対物レンズを20倍に上げて高解像度撮影を行った。

化合物濃度は明条件下で10, 30, 100マイクロモルの濃度で行った。その結果、処理1日後に比べて、一週間後の薬効が弱まる化合物が見られたため、培養中の光による化合物の分解の可能性を考慮し、暗条件下で化合物濃度10, 30マイクロモルの実験も行った。また、化合物標品はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、すべてのスクリーニング条件において表現型に影響のないDMSO濃度は1%で行った。

#### 4. 研究成果

化合物ライブラリースクリーニングは、まずはヒット化合物を得なければ始まらない。そのため、時間を要してもヒット化合物を獲得する確率が上がるような至適なスクリーニング法が望まれる。そこで、本研究では当初計画を見直し、1化合物の1つの実験につき日数を分けた2度の観察を行い、異なる化合物濃度条件、さらには暗条件下での実験も加えてスクリーニングを断行し、20000化合物すべてのスクリーニングを本研究期間中に完了した。その結果、葉緑体の配置に影響を与える9つのヒット化合物が得られた。9つのヒット化合物の薬効には構造的な相関があり、4グループ (A、B、C、D) に大別された。このことは、グループごとに内在性のターゲット因子は異なり、葉緑体の配置を制御する複数の異なる因子に対する化合物が得られた可能性が考えられる。本研究では、4グループのうち、5つの化合物を含む最も大きなグループのAグループについて、更に詳細な薬効評価を遂行した。具体的には、Aグループの5化合物について、化合物濃度10, 30マイクロモルで、インターバル時間20分おきのタイムラプスイメージングを暗条件下で行った。その結果、4化合物 (A-1, A-2, A-3, A-4) において、葉緑体の配置の変化を確認できた。次に、これらの類似化合物のタイムラプス解析を進めたところ、新たに薬効を示す1つの化合物 (A-5) の同定に成功した。タイムラプス解析により明らかになった薬効を示す合計5化合物の構造を比較したところ、すべてに共通する五員環構造を見出した (図2)。また、R1の構造多様性は大きくても活性を維持していることから、ヒット化合物の標的タンパク質を同定するためのプローブ化は、この部位で行うことができると考えられた。さらに、R1部位を中心に共通骨格の二量体を有機合

成し薬効を調べたところ、1マイクロモルでも薬効を示し強い薬効をもつ化合物であることが示唆された。一方、R3の構造が変わることで薬効効果がやや弱まる2つの化合物の同定にも成功した。細胞小器官が細胞質分裂時に娘細胞に均等あるいは不均等に分配される仕組みや極性成長時の不均一な配置制御などへの薬効は今後の課題であるが、本研究により、細胞小器官の基本的な細胞内配置制御機構の解明に大きな端緒となる成果が得られた。

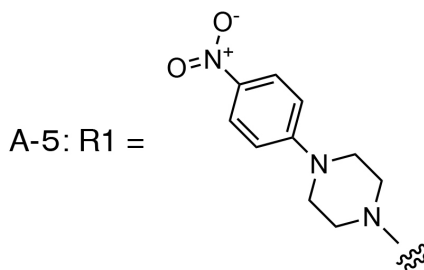
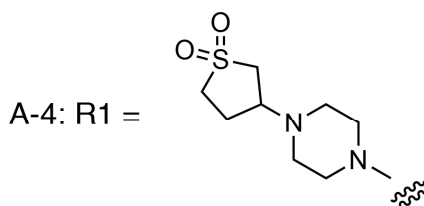
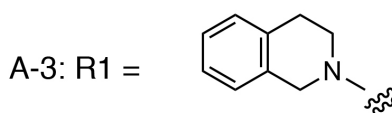
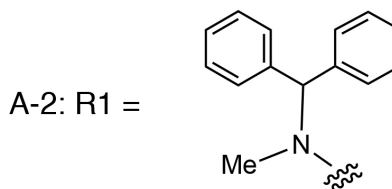
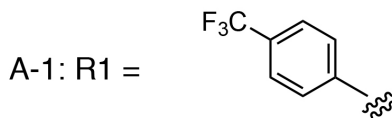
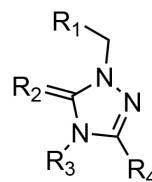


図2 葉緑体の配置に薬効を示す化合物

## <引用文献>

Noriyuki Suetsugu, Takethi Higa, Masamitsu Wada (2016) Ferns, mosses, and liverworts as model systems for light-mediated chloroplast movements. *Plant, Cell & Environment* **40**, 2447-2456.  
DOI: <https://doi.org/10.1111/pce.12867>

Masamitsu Wada (2017) Nuclear movement and positioning in plant cells. *Semin. Cell Dev. Biol.*  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.10.001>

Kazusato Oikawa, Shigeru Matsunaga, Shoji Mano, Maki Kondo, Kenji Yamada, Makoto Hayashi, Takatoshi Kagawa, Akeo Kadota, Wataru Sakamoto, Shoichi Higashi, Masakatsu Watanabe, Toshiaki Mitsui, Akinori Shigemasa, Takanori Iino, Yoichiroh Hosokawa, Mikio Nishimura (2015) *Nat. Plants* **1**, 15035.  
DOI: 10.1038/nplants.2015.35

### 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6件)

Taeko Sasaki, Yoshikatsu Sato, Tetsuya Higashiyama, Narie Sasaki (2017) Live imaging reveals the dynamics and regulation of mitochondrial nucleoids during the cell cycle in Fucci2-HeLa cells. *Sci. Rep.* **7**, 11257.  
DOI: 10.1038/s41598-017-10843-8  
査読有

Naoki Yanagisawa, Nagisa Sugimoto, Hideyuki Arata, Tetsuya Higashiyama, Yoshikatsu Sato (2017) Capability of tip-growing plant cells to penetrate into extremely narrow gaps. *Sci. Rep.* **7**, 1403.  
DOI: 10.1038/s41598-017-01610-w  
査読有

Mina Ohtsu, Yoshikatsu Sato, Daisuke Kurihara, Takuya Suzuki, Masayoshi Kawaguchi, Daisuke Maruyama, Tetsuya Higashiyama (2017) Spatiotemporal deep-imaging of syncytium induced by the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Protoplasma* **254**, 2107-2115  
DOI: 10.1007/s00709-017-1105-0

Mina Ohtsu, Daisuke Kurihara, Yoshikatsu Sato, Takuya Suzuki, Masayoshi Kawaguchi, Daisuke Maruyama, Tetsuya Higashiyama (2017) Fluorescent labeling of the cyst nematode *Heterodera glycines* for deep tissue live imaging using two-photon microscopy. *Cytologia* **82**,

251-259.

DOI: <https://doi.org/10.1508/cytologia.82.251>  
査読有

Kakishi Uno, Taeko Sasaki, Nagisa Sugimoto, Hideto Ito, Taishi Nishihara, Shinya Hagihara, Tetsuya Higashiyama, Narie Sasaki, Yoshikatsu Sato, Kenichiro Itami (2017) Key structural elements of unsymmetrical cyanine dyes for highly sensitive fluorescence turn-on DNA probe. *Chem. An Asian J.* **12**, 233-238.  
DOI: <https://doi.org/10.1002/asia.201601430>  
査読有

Yusuke Kimata, Takumi Higaki, Tomokazu Kawashima, Daisuke Kurihara, Yoshikatsu Sato, Tomomi Yamada, Seiichiro Hasezawa, Frederic Berger, Tetsuya Higashiyama, Minako Ueda (2016) Cytoskeleton dynamics control the first asymmetric cell division in *Arabidopsis* zygote. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**, 14157-14162.  
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1613979113>  
査読有

[学会発表](計2件)

佐藤 良勝 「バイオイメージング展開を見据えた有機小分子の概念実証の場として機能する ITbM ライブイメージングセンター」第69回日本細胞生物学会シンポジウム化合物を用いたイメージングの新展開 - ライブセルによる分子・細胞実態の解明に向けて- 2017年6月7-9日 仙台

Yoshikatsu Sato

ITbM Live Imaging Center as a joint use imaging facility for a beginner to a skilled researcher  
The 1st ABiS Symposium: Towards the Future of Advanced Bioimaging for Life Sciences  
Feb. 19-20, 2017. Okazaki

[図書](計1件)

佐藤 良勝 「植物の蛍光イメージング」生細胞多様性解明に資する光技術-見て、動かす 公益財団法人金原一郎医学医療振興財団 「生体の科学」第68巻5号 2017年10月号(増大号)

[産業財産権]

出願状況(計3件)

名称: ホスファローダミン化合物若しくはその塩、並びにそれを用いた蛍光色素  
発明者: 山口茂弘、多喜正泰、中(深澤) 愛子、マレクガージボウスキーグジャゴツシュ、佐藤良勝  
権利者: 同上

種類：特許権  
番号：31203  
出願年月日：2017年8月30日  
国内外の別：外国

名称：長波長で励起可能な新規ターンオン型  
蛍光染色シアニン色素  
発明者：佐藤 良勝、宇野何岸  
権利者：同上  
種類：特許権  
番号：C20180048  
出願年月日：平成29年7月10日  
国内外の別：外国

名称：水溶性ワーブドナノグラフェン化合物  
及びその用途  
発明者：伊丹 健一郎、瀬川 泰知、林 興  
安、東山 哲也、佐藤 良勝、桑田 啓子、  
加藤 健太  
権利者：同上  
種類：特許権  
番号：特願 2017-051732  
出願年月日：平成29年3月16日  
国内外の別：国内

取得状況（計0件）

〔その他〕  
ホームページ等  
Nagoya University Live Imaging Center  
<http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/liveimagingcenter/en/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 良勝 (SATO, Yoshikatsu)  
名古屋大学・トランスフォーマティブ生命  
分子研究所・特任准教授  
研究者番号：30414014

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

佐藤 綾人 (SATO, Ayato)  
名古屋大学・トランスフォーマティブ生命  
分子研究所・特任准教授  
研究者番号：10512428

桑田 啓子 (KUWATA, Keiko)  
名古屋大学・トランスフォーマティブ生命  
分子研究所・特任助教  
研究者番号：70624352

### (4) 研究協力者

( )