

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18687

研究課題名(和文)CO11-JAZ受容体の選択的アンタゴニストの開発

研究課題名(英文)Development of selective antagonist of CO11-JAZ receptor

研究代表者

石丸 泰寛 (Yasuhiro, Ishimaru)

東北大学・理学研究科・助教

研究者番号：80590207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：強力な活性をもつジャスモン酸ミミックであるコロナチンを基に、ジャスモン酸類の多彩な生理機能のうち、必要な機能を選択的に活性化するJAZサブタイプ選択的なアゴニストの開発を行なった。

JAZ選択的アゴニスト開発に用いるリード化合物を、JAZのCO11との結合ドメインであるJAZ断片ペプチドを用いたプルダウンアッセイ系CO11-JAZ相互作用の評価系を用いて見出した。これをもとに、in silico docking studyによって、さらなる選択性向上が高いと考えられる化合物を設計した。同様のプルダウンアッセイにより、その中から2種類のJAZに結合するサブタイプ選択的アゴニストを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, JAZ subtype-selective agonists, which selectively activate useful functions among diverse physiological roles by jasmonic acids signaling, are developed based on coronatine which is a mimic of jasmonoyl-L-isoleucine with potent activities. A lead compound used for JAZ selective agonist development was found using an evaluation system of pull-down assay system CO11-JAZ interaction using JAZ fragment peptide which is a binding domain with CO11 of JAZ. Based on the knowledge, we designed several compounds that are thought to be more selective improvement by in silico docking study. By a similar pull-down assay, two subtype-selective agonists that bind to some of JAZ were found among them.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：アゴニスト 植物ホルモン コロナチン

1. 研究開始当初の背景

食料問題は、爆発的な人口増大と地球温暖化に伴う乾燥地域拡大が招く耕作可能面積の縮小に伴い、人類が直面する深刻な課題の一つである。乾燥地域での作物生産を可能にする技術、植物病原菌耐性の付与などへの科学者の貢献が望まれている。この食料問題解決に化学を学んだ者として貢献する方法の一つとして、植物の機能を制御する分子の開発がある。近年の植物生理学は、植物を分子レベルで理解する方向へと大きく展開しており、植物の各種機能を制御する分子の開発が実現可能な状況である。

植物の成長や分化など植物体内で起こる生理現象の多くは、植物自身が作り出す様々な植物ホルモンによって制御される。植物ホルモンの関わるシグナル伝達の理解は、植物の生長や環境応答を制御する新農薬開発に直結し、食料生産の向上に大きく寄与すると期待できる。中でもジャスモン酸イソロイシン (JA-Ile) は、成長抑制、老化誘導などの他に、病原菌感染や虫害に対する植物の免疫応答誘導など多彩な生理機能をもつ重要な植物ホルモンである。JA-Ile の生理機能には、免疫応答誘導のように植物増産上の観点から有益なもの、成長抑制や老化誘導のように不利益なものがあり、JA-Ile の投与でこれらが同時に活性される。もしも有益な応答のみを誘導できる JA-Ile 関連分子があれば、それによって植物が本来もつ外敵への耐性機能を増強することが可能となり、食料増産につながる画期的な植物生長補助剤となる。このため、我々は、JA-Ile のもつ多彩な機能の切り分けを可能にする分子の開発に取り組んだ。

2. 研究の目的

JA-Ile は、COI1 と JAZ という 2 種類のタンパク質のタンパク質間相互作用 (Protein-Protein interaction; PPI) を誘導することで、各種の生理機能を引き起こす。モデル植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のゲノム中には、COI1 は 1 種類、JAZ は 12 種類のサブタイプがコードされており、この COI1 と 12 種類の JAZ の組み合わせが各々異なる生理機能を制御することで、JA-Ile の多彩な生理機能を誘導すると考えられている。しかし JAZ 間の遺伝子配列は非常に相同性が高く、高度な遺伝的重複系を苦手とする現代の分子生物学では、各 JAZ サブタイプが特異的に誘導する生理活性を特定することは極めて難しい。そのため COI1-JAZ 系における各 JAZ サブタイプの機能の解明と制御には、COI1 と特定の JAZ サブタイプとの PPI を選択的に誘導する JAZ サブタイプ選択的アゴニストの開発が必要であると考えられる。

植物病原菌 *Pseudomonas syringae* の産生する植物毒素コロナチン (COR) は JA-Ile の構造ミミックであり、JA-Ile と同じ

COI1-JAZ 共受容体に強く結合して同じ応答を引き起こすことが知られている。我々は、この COR の分子構造をもとにして、JAZ サブタイプ選択的アゴニストの開発に挑戦した。

3. 研究の方法

先行研究において、**3** が JAZ サブタイプ選択的アゴニストの候補分子である可能性が示唆された。しかし、**3** が 12 種類の JAZ サブタイプのうちいずれと結合するのかわかり不明であった。JAZ サブタイプ選択的アゴニストの開発には、すべての JAZ サブタイプと COI1 との PPI を評価する実験系が必要であるが、そのような網羅的評価系の報告例はなかった。

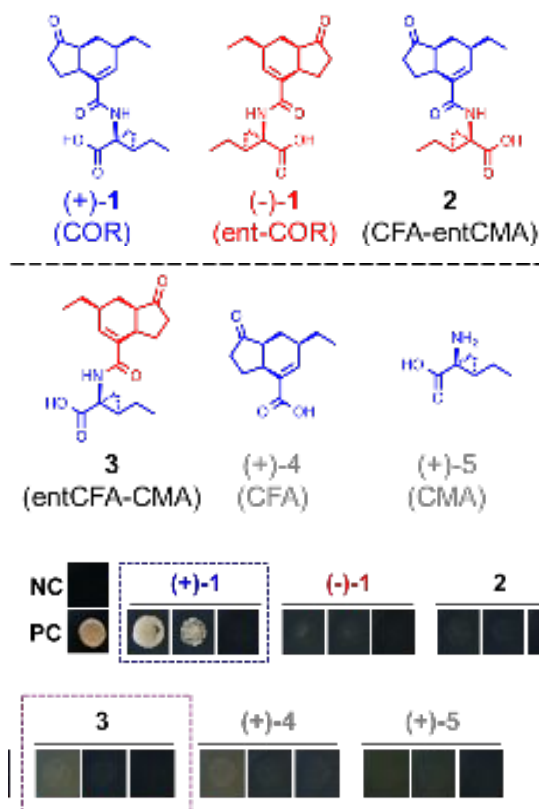
数種類の JAZ サブタイプについては、前述の Y2H や表面プラズモン共鳴法、JAZ 全長タンパク質にタグとなるタンパク質を融合したりコンビナントタンパク質を用いた免疫沈降法 (immunoprecipitation, IP) などによって PPI を評価した報告例があるが、いずれも煩雑な操作や準備が必要となる上、結果の信頼性と再現性にも問題があった。従って共同研究者の上田実博士、高岡洋輔博士 (東北大) と共に、全ての JAZ サブタイプについて PPI を簡便に評価できる *in vitro* アッセイ系の構築に着手した。2010 年に Zheng らによって、JAZ1-COI1 と COR との共結晶構造解析が報告された。彼らは X 線結晶構造解析において、全長 JAZ タンパクではなく、COI1 結合ドメインのみを切り出した JAZ1 degron (断片) ペプチドと呼ばれる 30 残基程度のペプチドを用いた。この JAZ degron ペプチドは、JAZ1 では全長 JAZ に匹敵する COI1 親和性を有すると報告されている。我々は、この報告に基づいて、JAZ1 以外の JAZ サブタイプについても同じ長さの degron ペプチドを用意した。さらに、degron ペプチドにエピトープ (抗原) として蛍光物質オレゴングリーン (Oregon Green, OG) を導入した OG 修飾 JAZ (JAZ-OG) ペプチドを設計した。この小分子をエピトープとすることで、通常のタンパク質をエピトープとした場合よりも立体障害が小さく抑えられ、COI1-JAZ と化合物の三者複合体形成能を阻害する危険性が低下することを期待した。評価したいアゴニスト候補分子を、JAZ-OG および GST-COI1 と混合した後、抗フルオレセイン抗体によってプルダウンし、抗 GST 抗体を用いて検出する。この共免疫沈降 (Co-IP) 系ではアゴニスト候補分子が COI1-JAZ 間の PPI を誘導したときのみ、プルダウンしたタンパク質が抗体検出される。幸運なことに、JAZ1-12 の全ての degron ペプチド配列中にシステインが含まれなかったため、JAZ1-12 ペプチドの N 末端にシステイン残基を挿入した後、システイン上のチオールと OG マレイミドをマイケル付加反応により結合させ、HPLC 精製することで、OG

修飾 JAZ1-12 ペプチド (JAZ degron ペプチドの配列は JAZ1 = JAZ2, JAZ5 = JAZ であるため計 10 種類) を得た。一方 COI1 については, GST タグを融合させた融合タンパク質を昆虫細胞に発現させて実験に用いた。

4. 研究成果

合成した OG-JAZs を用いて, 4 種類の COR 立体異性化合物の IP アッセイを行った。その結果, COR の立体異性体である化合物 **3** は, JAZ3/11/12 と比較的強く結合することが分かった (図 1)。すなわち **3** は JAZ サブタイプ選択的アゴニスト候補分子となる可能性が示唆された。

さらに **3** をベースとし, *in silico* ドッキングスタディを用いて, より選択性の高いアゴニストの設計を行った。ドッキングスタディには既に報告されている COI1-COR-JAZ1 の結晶構造をもとに, JAZ の配列を他の JAZ サブタイプに変更して分子動力学 (MD) 計算を行い, 十分な平衡化後にリガンドである COR を化合物 **3** に変更して再び MD 計算を



【図 1. Y2H による COI1-JAZ9 複合体形成アッセイの結果

行い, COI1-**3**-JAZ の構造を得た。

ここで得られた計算結果を, IP アッセイで **3** と強い親和性を示した JAZ3, JAZ11 について比較した。その結果, 化合物 **3** にあるケトン基は, COI1-**3**-JAZ11 複合体中において COI1 や JAZ11 上のアミノ酸残基と水素結合を形成するが, 一方で COI1-**3**-JAZ3 中では周囲との水素結合形成に寄与しないことが示唆された。

この計算結果から, 化合物 **3** を基本骨格とし CFA のケトン部分に置換基を導入した化合物は, より JAZ3 選択性の高いアゴニストになるのではないかと予想した。

我々は, **3** のケトン基にオキシム結合を介して置換基を導入した図 12 のような化合物群を候補化合物として設計した。これらの化合物群についてさらに *in silico* ドッキングスタディを行った結果, ベンジル基を導入した化合物が, JAZ3 に選択性を示すアゴニストの候補分子であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

- Masuda, H., Shimochi, E., Ishimaru, Y., (他 7 名, 7 番目) A new transgenic rice line exhibiting enhanced ferric iron reduction and phytosiderophore production confers tolerance to low iron availability in calcareous soil. *PLoS ONE* in press 査読有 (2017)
- Ishimaru, Y., Oikawa, T., Suzuki, Y. (他 9 名, 1 番目) GTR1 is a jasmonic acid and jasmonoyl-L-isoleucine transporter in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* in press 査読有 (2016)
- Kanno, Y., Oikawa, T., Ishimaru, Y. (他 8 名, 4 番目) AtSWEET13 and AtSWEET14 regulate gibberellin-mediated physiological processes. *Nat Commun* in press 査読有 (2016)
- Kobayashi, T., Itai, R.N., Ishimaru, Y. (他 5 名, 5 番目) Jasmonate signaling is activated in the very early stages of iron deficiency responses in rice roots. *Plant Mol Biol.* **91**, 533-547 査読有 (2016)
- Egoshi, S., Takaoka, Y., Ishimaru, Y. (他 7 名, 6 番目) Dual function of coronatine as a bacterial virulence factor against plants: possible COI1-JAZ-independent role. *RSC Adv.* **6**, 19404-19412 査読有 (2016)
- Takaoka, Y., Shigenaga, M., Ishimaru, Y. (他 6 名, 5 番目) Protein ligand-tethered synthetic calcium indicator for localization control and spatiotemporal calcium imaging in plant cells. *Bioorg Med Chem Lett.* **26**, 9-14 査読有 (2016)
- Bashir, K.*, Ishimaru, Y.*, Nakanishi, R.I. (他 9 名, 2 番目) Iron deficiency regulated OsOPT7 is essential for iron homeostasis in rice. *Plant Mol. Biol* **88**, 165-176 査読有 (2015) (*equally contributed)
- Kurotani, K., Havashi, K., Ishimaru, Y. (他 9 名, 7 番目) Elevated levels of CYP94 family gene expression alleviate the jasmonate response and enhance salt tolerance in rice. *Plant Cell Physiol* **56**: 779-789 査読有 (2015)
- Vigani, G., Bashir, K., Ishimaru, Y. (他 7 名, 3 番目) Knocking down mitochondrial iron

- transporter (MIT) reprograms primary and secondary metabolism in rice plants. *J Exp Bot.* 67, 1357-1368 査読有 (2015)
10. Saito, H., Oikawa, T., Ishimaru, Y. (他 12 名, 4 番目) The jasmonate-responsive GTR1 transporter is required for gibberellin-mediated stamen development in Arabidopsis. *Nat Commun* 6, 6095 査読有 (2015)
 11. Ueda, M., Yang, G., Ishimaru, Y. (他 3 名, 4 番目) Importance of D-glycopyranoside structure to the bioactivity and target affinity of jasmonic acid glucoside. *Org Biomol Chem* 13, 55-58 査読有 (2015)

[学会発表](計 1 件)

1. 石丸泰寛, 鈴木健史, Christian Meesters(Max Planck Institute), Erich Kombrink(Max Planck Institute), 高橋公咲(北大), 松浦英幸(北大), 林 謙一郎(岡山理科大), 深城英弘(神戸大), 上田 実 ジャスモン酸によるオーキシシグナル抑制機構 第151回日本農芸化学会東北支部 2016年10月9日 山形大学農学部(山形県・鶴岡市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

石丸 泰寛 (Ishimaru Yasuhiro)
東北大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：80590207