

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14870

研究課題名(和文)ケミカルジェネティクスに基づく酸およびアルミニウムシグナル伝達の解明

研究課題名(英文)Characterization of low pH and aluminum signal transduction based on chemical genetics

研究代表者

小林 佑理子(KOBAYASHI, Yuriko)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：40610952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：リンゴ酸トランスポーター遺伝子AtALMT1は、酸(低pH)及びアルミニウム(AI)応答性遺伝子であり、根部リンゴ酸分泌を制御する。本研究では、創薬研究で使用される低分子化合物ライブラリーのスクリーニングから、リンゴ酸分泌とAtALMT1遺伝子発現を抑制する化合物を複数同定した。このうち、シグナル伝達脂質のリン酸化酵素阻害剤はSTOP1核局在及び、複数のAI応答性遺伝子発現も抑制した。また、in silicoドッキングによりシロイヌナズナ推定標的タンパク質と同阻害剤との結合が予測された。以上の結果から、AIシグナル伝達にはリン脂質によるシグナル伝達が重要な役割を果たすことが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Low pH and Al-responsive AtALMT1 (Arabidopsis Al-activated malate transporter1) regulates malate secretion from roots. In this study, we identified some compounds inhibiting malate secretion and AtALMT1 gene expression in screening of small molecule library used in drug discovery research. Additionally, among these compounds, a kinase inhibitor for phospholipid signaling inhibited expression of some Al-responsive genes and STOP1 nuclear localization. Furthermore, in silico docking study indicated that the inhibitor may bind the Arabidopsis homologue of target protein in human. These results strongly suggested that phospholipid signaling play an important role in Al signaling.

研究分野：植物栄養学

キーワード：アルミニウムシグナル ケミカルスクリーニング 酸性土壌耐性 ALMT1 STOP1 in silicoドッキング
kinase阻害化合物ライブラリー

1. 研究開始当初の背景

(1)酸性土壌中の酸及びアルミニウム (Al) ストレス耐性は世界的に重要な農業形質とされている。いくつかの重要な耐性遺伝子が同定されたが、それらを制御するストレス受容・伝達機構などを担う分子の多くは明らかにされていない。

(2)酸及び Al 耐性に必須である転写因子 STOP1 に制御される植物の酸性耐性に関する遺伝子発現は、低酸素環境に適応する腫瘍内部のがん細胞と類似していた。一方、Al 耐性機構では、有機酸分泌を担う有機酸トランスポーター (*AtALMT1*) が重要な役割を果たし、その遺伝子発現に STOP1、リン酸化シグナル伝達や動植物に共通の免疫受容やシグナル伝達が関与していた。

(3)このようなことから、ヒトのがん細胞や免疫系応答と植物の酸、Al ストレス応答との共通性に着目し、がん細胞のシグナル伝達解明、創薬研究などの手法を植物に適応することで、植物の酸及び Al ストレス受容・伝達機構の解明を大きく進展させる着想を得た。

2. 研究の目的

(1)がん創薬研究などで使用される約 600 低分子化合物ライブラリーから酸及び Al 相当性 *AtALMT1* の転写活性化を担う Al ストレス受容や Al シグナル伝達に影響をあたえる化合物を選抜、同定する。

(2)ヒット化合物について、ヒト標的タンパク質と相同性の高いシロイヌナズナでの標的分子を同定し、それが関与するシグナル伝達経路の解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 酸及び Al ストレス応答性である耐性遺伝子 *ALMT1* や *STOP1* の発現や活性をレポーターとしたシロイヌナズナに対して、低分子化合物阻害剤ライブラリーをアッセイし、酸及び Al ストレス応答に影響をあたえる化合物を選抜する。具体的には、コントロール処理、阻害剤処理時の *AtALMT1*Promoter-GFP, *STOP1*-GFP の GFP 蛍光観察、RT-PCR による *AtALMT1* 遺伝子発現定量、野生型及び、35S プロモーター-*AtALMT1* 過剰発現体における酵素法による根圏へのリンゴ酸分泌定量を行う。

(2)ヒット化合物の作用機序、ヒト標的タンパク質とシロイヌナズナタンパク質との相同性解析や、*in silico* ドッキング計算による化合物-タンパク質間相互作用予測、遺伝子破壊株を用いた逆遺伝学的解析等から候補遺伝子を選抜、同定する。

4. 研究成果

(1)タンパク質リン酸化酵素 (kinase) 阻害剤、ユビキチン阻害剤、ヒートショックプロテイン阻害剤など約 600 種の低分子化合物をシロイヌナズナ幼植物に添加し、リンゴ酸分泌及び *AtALMT1* 遺伝子発現に影響を及ぼす化合物を同定した。Kinase 以外の約 300 種の阻害剤について、リンゴ酸分泌試験を行ったところ、9 種のリンゴ酸抑制化合物を同定した。有機アニオン輸送阻害剤、インテグラーゼ阻害剤、分子シャペロン阻害剤リンゴ酸分泌を抑制した。このうち、数個の化合物は Al 誘導による *AtALMT1* Promoter-GFP 蛍光を抑制したが (図 1)、その多くはリンゴ酸分泌のみを抑制した。それらは、*AtALMT1* トランスポータータンパク質活性化に作用する化合物であることが示唆された。しかし、GFP 観察は不安定であったことから、次の実験には遺伝子発現定量実験を行うこととした。

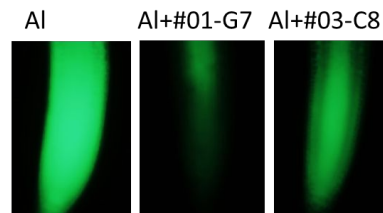


図 1 阻害剤による *AtALMT1*Promoter-GFP における Al 誘導による GFP 蛍光の抑制。

(2)約 300 種の kinase 阻害剤ライブラリーから、阻害剤処理 24 時間後のリンゴ酸分泌を 20%抑制した 31 種類の化合物を同定した (図 2)。二次スクリーニングとして、その中から 6 時間後のリンゴ酸分泌を 20%抑制した 10 種類の化合物を同定した。それらには、チロシンキナーゼ阻害剤、細胞周期阻害剤、セリン/スレオニンキナーゼ阻害剤等が含まれていた。

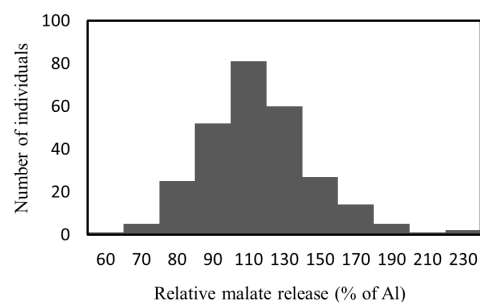


図 2 コントロール区に対する kinase 阻害剤処理区 (24 時間) のシロイヌナズナ根部リンゴ酸分泌量の分布。

(3)選抜した 10 種の kinase 阻害剤のうち、作用機序重複を除いた 7 種に関して詳細な解析を行った。*AtALMT1* 遺伝子過剰発現組換え体について、Al 存在下阻害剤処理 2 時間後のリンゴ酸分泌を測定したところ、2 種の化合

物がリンゴ酸分泌を 50%阻害した。しかし、他 5 種は、過剰発現株においては有意なリンゴ酸放出の抑制はみられなかった。このことから、この 2 種の阻害作用は、ALMT1 タンパク質の活性化阻害によるリンゴ酸分泌抑制を含むことが強く示唆された。

(4)同 7 種の阻害剤について、AI 存在下阻害剤処理 24 時間後の *AtALMT1* の遺伝子発現を定量した。その結果、2 種の化合物が *AtALMT1* 転写量を約 70%抑制した。そのうち 1 つはシグナル伝達脂質のリン酸化酵素特異的阻害剤であり、前出の過剰発現体リンゴ酸分泌も抑制していた。同じ阻害効果をもつシグナル伝達脂質のリン酸化酵素特異的阻害剤においても同様な結果が得られた。

(5)同定したシグナル伝達脂質のリン酸化酵素阻害剤を用いて AI シグナル受容に関する更に詳細な解析を進めた。同阻害剤は、*AtALMT1* 遺伝子発現だけでなく、主要 AI 応答性 AI 耐性遺伝子 *ALS3*, *MATE* 及び、他 AI 応答性遺伝子の発現についても著しい抑制効果を示した。加えて、転写因子 STOP1 の AI 応答性核移行発現も抑制していた。しかし、もう一方の *AtALMT1* 転写抑制阻害剤は細胞周期阻害剤であり、STOP1 の核移行は阻害していなかった。AI シグナル伝達にはリン脂質によるシグナル伝達が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

(6)ヒト標的タンパク質とのシロイヌナズナ相同性タンパク質のホモロジーサーチから、シロイヌナズナ標的タンパク質候補を同定した。その kinase をコードする遺伝子破壊株では、*AtALMT1* 遺伝子の発現がわずかに抑制される系統が確認できた。現在、二重組換え体や RNAi による遺伝子発現抑制株において *AtALMT1* 遺伝子の発現を確認中である。

(7) ホモロジーモデリングによるシロイヌナズナ標的タンパク質の立体構造を予測し、ヒット化合物との *in silico* ドッキング計算を行った。その結果、ヒトおよびシロイヌナズナ標的タンパク質シグナル伝達脂質のリン酸化酵素の kinase ドメインの立体構造は非常に似通っていることが分かった(図 3)。

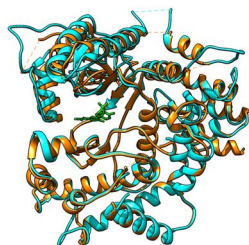


図 3 シグナル伝達脂質のリン酸化酵素阻害剤ヒト標的タンパク質(オレンジ)とシロ

イヌナズナ相同タンパク質(ブルー)の kinase ドメイン重ね合わせ。

(8)そこで同定した kinase 阻害剤がシロイヌナズナ標的タンパク質の予測立体構造において、kinase ドメインに結合するかどうか AutoDockVina を用いてドッキング解析した。その結果、ATP 結合部位に配位することが判明した(図 4)。これはヒトで分かっている同様な阻害剤とタンパク質の共結晶構造と同様であったことから本ドッキングの妥当性は高いと考えられた。

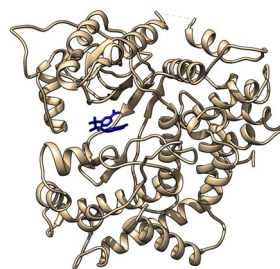


図 4 シロイヌナズナ標的タンパク質 kinase ドメインへの kinase 阻害剤(ブルー)ドッキング結果

(9)ヒット化合物細胞周期阻害剤については、ヒト標的タンパク質と相同性が高いシロイヌナズナタンパク質候補は見出されなかった。したがって、標的以外のタンパク質について、上記で行った *in silico* モデリングによるナズナでの候補タンパク質の探索が有効であると考えられた。

(10)本研究により、創薬研究に使用される低分子化合物のスクリーニングにより AI 応答性のリンゴ酸分泌抑制化合物、*AtALMT1* 転写抑制化合物及び、STOP1 核局在阻害化合物を同定し、そのシロイヌナズナ標的タンパク質候補が同定された。これは AI シグナル分子として新規発見であり、今後それらの詳細な解析により AI シグナル伝達が解明されることが期待される。

(11)*AtALMT1* 転写及び、STOP1 核局在は酸応答性でもあるため、酸シグナル経路との関連性の解明が期待される。さらに、本研究で同定された標的タンパク質は、がん細胞の生存分化、増殖に重要な役割を担う経路に含まれる相同分子であり、がんの低酸素耐性と植物の STOP1 を介した酸性土壌耐性の分子進化の一端が明らかになることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

小郷尚久. 共有結合フラグメントライブラリーを用いた生体内標的タンパク質の網羅的な探索 *Chemical Biology*, 査読無 10.

p.15 (2017)

〔学会発表〕(計 2 件)

WU LIUJIE, 時澤睦朋, 小郷尚久, 浅井章良, 小林佑理子, 小山博之. Characterization of Aluminum Signal Transduction Pathway in AtALMT1 Expression Base on Chemical Genetics 日本土壤肥料学会 2017 年度仙台大会 (2017)

WU LIUJIE, 河合 翼, 小郷尚久, 浅井章良, 小林佑理子, 小山博之. Profiling of Al-responsive signaling pathway regulating AtALMT1 by chemical screening. 日本土壤肥料学会 2016 年度佐賀大会 (2016)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 佑理子 (KOBAYASHI, Yuriko)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号: 40610952

(2) 研究分担者

小郷尚久 (OGO, Naohisa)
静岡県立大学大学院・薬学研究院・講師
研究者番号: 20501307