

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07768

研究課題名(和文)新規標的タンパク質同定法を用いた植物シグナル伝達物質受容体の同定

研究課題名(英文) Identification of a receptor of a plant signal compound using new method for target protein identification

研究代表者

高橋 公咲 (TAKAHASHI, Kosaku)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：30374622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アジド基(N3)は小さな官能基であり、生理活性物質と標的タンパク質の親和性の阻害を最小限にとどめることが期待される。そこで、アジド基のみを生理活性物質に導入したプローブを用いた標的タンパク質同定法を開発した。本方法により植物生長促進物質であるアザヒポキサンチンの結合タンパク質としてイネのV-ATPアーゼBサブユニット2およびV-ATPアーゼAサブユニットが同定された。また、植物ホルモンのアブシジン酸の新たな結合タンパク質としてシロイヌナズナの手オレドキシンの一種であるAtTrxh3が同定された。本手法が生理活性物質の標的タンパク質の同定に有効であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小さな官能基のアジド基を生理活性物質に導入したプローブを用いることで、標的タンパク質とプローブの親和性をできるだけ保ちつつ標的タンパク質を同定する方法を開発した。本方法により、植物生長促進物質のアザヒポキサンチンの結合タンパク質が同定された。この結果は、作物の収量を増加させるメカニズムの解明につながる。また、チオレドキシンは植物のストレス応答に関わっていることが知られている。チオレドキシンの一種であるアブシジン酸の結合タンパク質であるという結果は、アブシジン酸の新たな生理活性発現機構の解明にもつながる。

研究成果の概要(英文)：A method to identify a target protein of a bioactive compound using a probe, which has an azido group, was developed. Using this method, V-ATPase B subunit 2 and V-ATPase in rice were identified as binding proteins of azahypoxanthine, which is a plant growth promoter. Additionally, AtTrxh3, a thioredoxin in Arabidopsis thaliana, has been identified as a binding protein of abscisic acid, which is a plant hormone. It is shown that this method is effective in identifying a target protein of a bioactive compound.

研究分野：生物有機化学

キーワード：標的タンパク質 生理活性物質 アフィニティークロマトグラフィー ペプチドマスフィンガープリンティング ウェスタンブロットリング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 多くの生理活性物質は受容体や酵素などの標的タンパク質と結合することではじめて生理活性を示す。従って、生理活性物質の標的タンパク質の同定は、その作用機構を解明するうえで非常に重要である。既存の標的タンパク質同定法は、生理活性物質にビオチンや光親和性標識基などの大きな官能基を導入したプローブを用いていたため、標的タンパク質とプローブの親和性が減少してしまうという問題があった。そのため、この問題を解決した生理活性物質の標的タンパク質同定法の開発が期待されていた。

(2) アザヒポキサンチン (AHX) は、キノコの種類 *Lepista sordida* が生産する植物生長促進物質として発見された。¹⁾ また、AHX は、フィールド実験においても様々な作物の収量を増加させた。その作用機構の解明は、作物の収量を増加させる新しい農業技術開発への貢献が期待されていた。また、12-オキソファイトジエン酸 (OPDA) は、植物ホルモンの一種であるジャスモン酸 (JA) の生合成中間体であり様々な生理活性が報告されている。²⁾ OPDA は JA とは異なる独自の生理作用を持つことが示されているが、その作用機構は未解明であった。

2. 研究の目的

(1) 生理活性物質に小さな官能基であるアジド基 (N_3) のみを導入したプローブ (アジドプローブ) を用いた新規標的タンパク質同定法の開発を目的とした。その有効性を示すため、アブシジン酸 (ABA)³⁾ にアジド基を導入したプローブ (ABA- N_3) を用いて、ABA 受容体 AtPYLs の同定を試みた。

(2) 植物生長促進物質 AHX の作用機構解明のため、アジドプローブ (AHX- N_3) を用いて AHX 結合タンパク質の同定を試みた。

(3) OPDA の作用機構解明のため、アジドプローブ (OPDA- N_3) を用いて OPDA 結合タンパク質の同定を試みた。

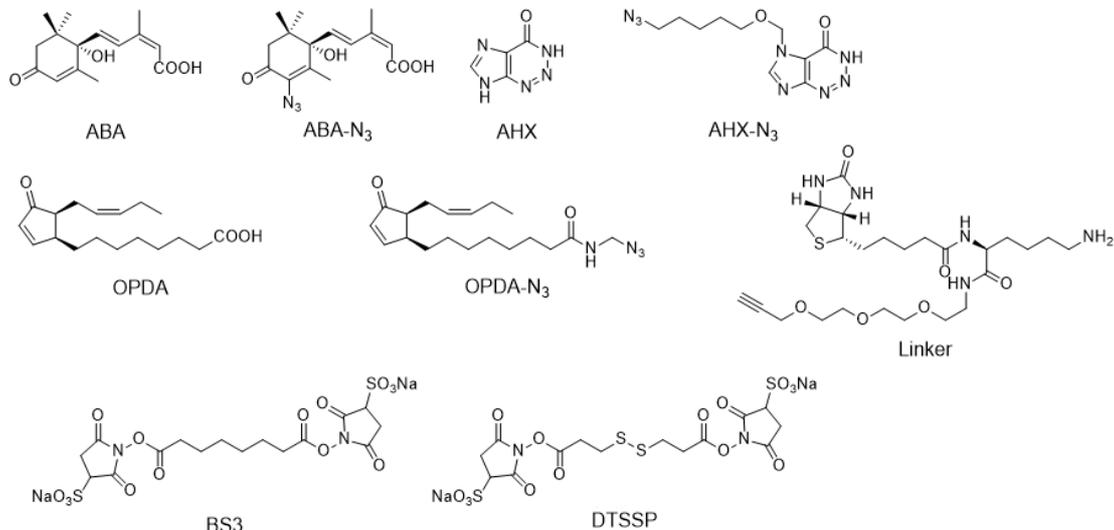


図1. 本研究に用いた化合物の構造.

3. 研究の方法

(1) ウェスタンブロットングによる標的タンパク質の検出

アジドプローブを用いた新規標的タンパク質検出法の概略を図2に示す。⁴⁾ タンパク質抽出液にアジドプローブを添加しインキュベートすることで標的タンパク質とアジドプローブの複合体が形成される。

このタンパク質抽出液にビオチン、アミノ基および末端アルキンを含むリンカーを添加する。クリック反応によりアジドプローブとリンカーを結合させることで、標的タンパク質 - アジドプローブ - リンカーから成る3者複合体が形成される。

標的タンパク質とリンカーのアミノ基同士をタンパク質架橋剤で架橋する。

SDS-PAGEの後、ウェスタンブロットングにより架橋された3者複合体を検出する。

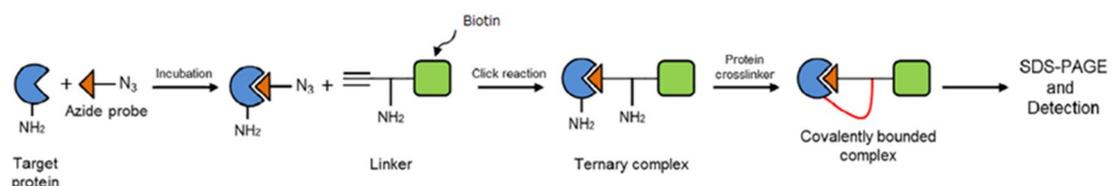


図2. アジドプローブを用いた新規標的タンパク質検出法.

(2) ペプチドマスフィンガープリンティングによる標的タンパク質の同定

アジドプローブを用いた新規標的タンパク質同定法の概略を図3に示す。標的タンパク質 - アジドプローブ - リンカーから成る3者複合体形成までは、(1)と同様に行う。分子内にジスルフィド結合を持つタンパク質架橋剤を用いて3者複合体を架橋させる。本複合体をビオチン特異的に結合するストレプトアビジン担体に結合させ、洗浄バッファで洗浄後、還元剤を含むバッファを用いてアジドプローブに結合した標的タンパク質を選択的に溶出させる。標的タンパク質は、トリプシン消化したペプチド断片の nano LC-MS/MS 分析およびデータベース検索により同定する。

(3) 標的タンパク質と生理活性物質の結合の検証

同定された標的タンパク質の組換えタンパク質を作成する。この組換え標的タンパク質を用いて、(1)と同様の方法でウェスタンブロッティングを行う。過剰量の生理活性物質を添加することでアジドプローブの標的タンパク質への結合が阻害される。この操作により、ウェスタンブロッティングにおいて標的タンパク質由来のシグナルが消失していれば、標的タンパク質と生理活性物質の結合が証明される。

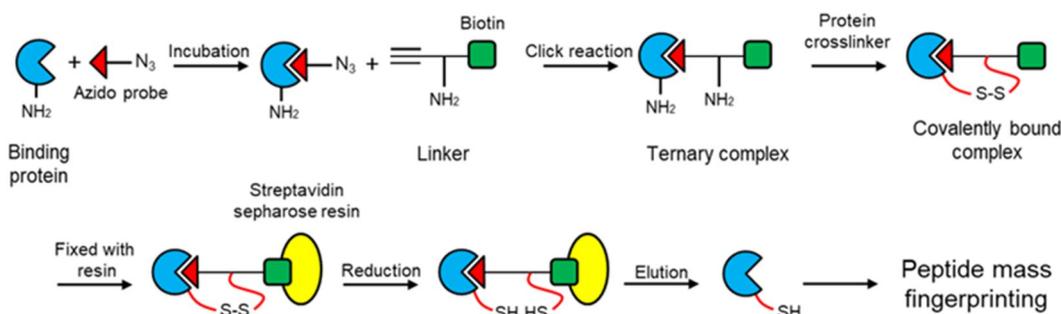


図3. アジドプローブを用いた新規標的タンパク質同定法.

4. 研究成果

(1) ABAのアジドプローブを用いた新規標的タンパク質同定法の検証

植物ホルモンのABAおよびその受容体AtPYL2をモデルとして、アジドプローブを用いた標的タンパク質同定法の確立を目指した。ABAのアジドプローブABA-N₃と、末端アルキン、アミノ基およびビオチンを持つリンカーを合成した(図1)。組換えAtPYL2を発現させた大腸菌のタンパク質抽出液とABA-N₃をインキュベートさせた後、ABA-N₃とリンカーをクリック反応で結合させた。分子内ジスルフィド結合を持つタンパク質架橋剤DTSSPでリンカーとAtPYL2のアミノ基を架橋した。その後、3者複合体を含む本タンパク質溶液をビオチンと特異的に結合するストレプトアビジン担体と相互作用させた。ストレプトアビジン担体と非特異的に結合したタンパク質を、十分に洗浄した後、還元剤含有バッファで架橋を切断しABA結合タンパク質を溶出した。本溶出液のSDS-PAGEの結果、分子量約20 kDaに単一のタンパク質バンドが確認された。nano LC-MS/MS分析およびデータベース解析の結果、AtPYL2が同定された。本結果より、アジドプローブと末端アルキン、アミノ基およびビオチンを持つリンカーを用いて生理活性物質の標的タンパク質を同定できることが示された。

本方法を用いて、シロイヌナズナのタンパク質抽出液からAtPYLsの同定を試みた。前述の方法に従い、ABA結合タンパク質を含む画分を取得しSDS-PAGE解析を行った。その結果、AtPYLs(分子量約20 kDa)ではなく、分子量が約12 kDaのタンパク質がABA結合タンパク質として得られた。続いて、得られたABA結合タンパク質をゲルから切り出し、ペプチドマスフィンガープリンティングによりタンパク質の同定を試みた。その結果、本タンパク質はチオレドキシンの一種であるAtTrxh3(NP_199112)と同定された。ウェスタンブロッティングにより、組換えAtTrxh3とABA-N₃の結合が示され、過剰のABAの添加でウェスタンブロッティングのシグナルが消えたため、AtTrxh3はABAの結合タンパク質であることが示された。チオレドキシンの一種とABAは、いずれも植物のストレス応答に関与していることが知られている。^{3,5)} ABAとAtTrxh3の結合が植物のストレス応答に影響を及ぼしている可能性がある。目的としたAtPYLsの同定には至らなかったが、本手法が生理活性物質の標的タンパク質同定法として有効であることが示された。

(2) 植物生長促進物質AHXの結合タンパク質の同定

イネのタンパク質抽出液とAHXのアジドプローブAHX-N₃をインキュベートさせた後、AHX-N₃とリンカーをクリック反応で結合させた。タンパク質架橋剤BS3でリンカーとAHX結合タンパク質のアミノ基を架橋した後、本タンパク質溶液をビオチンと特異的に結合するストレプトアビジン抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。その結果、分子量が約70 kDaおよび約55kDaにAHX結合タンパク質と推定されるシグナルが確認された。

イネのタンパク質抽出液にAHX-N₃を添加しインキュベートした。その後、リンカーのアミノ

基と標的タンパク質は、分子内ジスルフィド結合を有するタンパク質架橋剤 DTSSP で結合させ、ピオチンを介してストレプトアビジン担体に結合させた。研究成果(1)と同様に非特異的にストレプトアビジン担体に結合するタンパク質を十分に洗浄した後に、AHX-N₃と結合するタンパク質を選択的に溶出させた画分(Fr.1)が得られた。イネのタンパク質抽出液に過剰のAHXを添加し、Fr.1を得た方法と同様の方法で得られた画分をFr.2とした。この操作では、AHX結合タンパク質はストレプトアビジン担体に結合できないため、Fr.2にはAHX結合タンパク質は含まれていないことが推定された。さらに、タンパク質抽出液を無処理のストレプトアビジン担体と相互作用させた後、タンパク質を溶出した画分をFr.3とした。Fr.3には、ストレプトアビジン担体に非特異的に結合するタンパク質が含まれていることが推定された。これらの画分をそれぞれ nano LC-MS/MS で分析し、データベース検索を行うことで、各画分に含まれるタンパク質が同定された。Fr.1にのみ含まれ、Fr.2およびFr.3には含まれないタンパク質が14個あり、これらはAHXに特異的に結合するタンパク質であることが示唆された。ウェスタンブロッティングの結果を考慮すると、その分子量からV-ATPase B subunit 2 (Os01t0711000、55 kDa) およびV-ATPase A subunit (Os02t0175400、69 kDa) がAHX結合タンパク質と推定された。両タンパク質の組換えタンパク質を作製し、前述と同様の方法でウェスタンブロッティングを行った。その結果、それぞれのタンパク質由来のシグナルが観察された。また、それぞれのシグナルは、過剰のAHXを添加することで消失した。本結果からV-ATPase B subunit 2 およびV-ATPase A subunit がAHX結合タンパク質であることが明らかとなった。

(3) 12-オキソフアイトジエン酸(OPDA)の結合タンパク質の同定

シロイヌナズナのタンパク質抽出液とOPDAのアジドプローブ OPDA-N₃をインキュベートし、研究成果(2)と同様の方法でウェスタンブロッティングを行った。その結果、非常に多くのバンドが確認された。また、過剰のOPDAを添加しても、これらのバンドはほとんど消失することがなかった。これらの結果から、ウェスタンブロッティングで確認されたバンドは非特異的にOPDAに結合したタンパク質に由来していることが予想された。このため、OPDAの結合タンパク質の同定には至らなかった。

(4) 考察

本研究により、アジド基のみを導入したプローブを用いて標的タンパク質を同定できることが証明された。本方法は、2種類のリンカーを用い、類似の工程でウェスタンブロッティングとアフィニティークロマトグラフィーを行えるという利点があり、今後さらなる応用が期待される。その一方で、標的タンパク質の同定に至らない場合もあった。アジド基は小さな官能基であるが、その導入部位によっては、標的タンパク質との親和性を大きく減少させることも推定される。そのため、アジド基の導入部位が異なる複数のプローブを用意して実験を行う事で、標的タンパク質同定の可能性が高くなることが期待される。

また、本研究において、ABAの新たな結合タンパク質としてAtTrxh3が、AHXの結合タンパク質としてV-ATPase B subunit 2 およびV-ATPase A subunit が同定された。これらのタンパク質がABAやAHXの標的タンパク質であることを証明するため、タンパク質をコードした遺伝子に変異が生じた植物を作製し、その表現型を観察する予定である。

<引用文献>

- Choi JH, Fushimi K, Abe N *et al.* *ChemBioChem* **11**, 1373-1377 (2010).
- Böttcher C, Pollmann S. *FEBS J* **276**, 4693-4704 (2009).
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR *et al.* *Annu Rev Plant Biol* **61**, 651-679 (2010).
- Anabuki T, Tsukahara M, Okamoto M *et al.* *Bioorg Med Chem Lett* **28**, 783-786 (2018).
- Park SK, Jung YJ, Lee JR *et al.* *Plant Physiol* **150**, 552-561 (2009).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 穴吹友亮、高橋公咲	4. 巻 3
2. 論文標題 光親和性標識基を用いない新規な標的タンパク質検出法	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 346、350
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Tomoaki Anabuki, Yusuke Ito, Taichi E. Takasuka, Hideyuki Matsuura, Kosaku Takahashi	4. 巻 21
2. 論文標題 Identification of recombinant AtPYL2, an abscisic acid receptor, in E. coli using a substrate-derived bioactive small molecule, a biotin linker with alkyne and amino groups, and a protein cross-linker	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 126634
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.bmcl.2019.126634.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 穴吹友亮、伊藤祐輔、塚原美宙、高須賀太一、岡本昌憲、松浦英幸、高橋公咲
2. 発表標題 新規なリンカーとタンパク質架橋剤を用いる生理活性化化合物の標的タンパク質解析
3. 学会等名 第60回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 穴吹友亮、伊藤祐輔、塚原美宙、高須賀太一、岡本昌憲、松浦英幸、高橋公咲
2. 発表標題 新規なリンカーとタンパク質架橋剤を用いる生理活性化化合物の標的タンパク質精製法
3. 学会等名 日本農芸化学会 2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 穴吹友亮、大橋慧介、高須賀太一、松浦英幸、高橋公咲
2. 発表標題 新たなアブシジン酸結合タンパク質の同定
3. 学会等名 植物化学調節学会第54回大会
4. 発表年 2019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	松浦 英幸 (MATSUURA Hideyuki) (20344492)	北海道大学・農学研究院・教授 (10101)	