

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05451

研究課題名(和文) 低分子有機化合物を利用した転写因子の人為的な機能制御

研究課題名(英文) Artificial regulation of function of transcription factors by organic compounds

研究代表者

豊増 知伸 (TOYOMASU, Tomonobu)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：60272085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌が生産する二次代謝ジテルペノイド配糖体のフシコクシンは、植物において膜H⁺-ATPaseと真核生物に普遍的に存在する制御アダプタータンパク質である14-3-3タンパク質との相互作用を安定化させ、H⁺-ATPaseを恒常的に活性化する。本研究では、シロイヌナズナの花成関連転写因子FDに着目し、H⁺-ATPaseを参考にして、フシコクシン依存的にフロリゲン受容体である14-3-3と相互作用するFDを創製することに成功した。しかし、その改変FDを組み込んだシロイヌナズナの花成時期をフシコクシン処理により早めることはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、目的生物において内生に存在しない低分子有機化合物とそれが作用できるように細工・改変した標的タンパク質とを組み合わせる生命現象を制御する次世代型ケミカルバイオロジー的システムの構築を目指したものである。本システムが構築できれば、生命現象の人為制御という応用的側面(社会的意義)だけでなく、目的タンパク質の機能解析のための新たな手法の提案という基礎研究的な側面(学術的意義)も持ち合わせている。

研究成果の概要(英文)：Fusicoccin, a diterpenoid glucoside, stabilizes interaction of plasma-membrane H⁺-ATPase in higher plants and 14-3-3 proteins, resulting in constitutive activation of ATPase. 14-3-3 proteins are eukaryotic regulatory proteins that regulate functions of client proteins by phosphorylation-dependent interaction. In this study, FD, an Arabidopsis bZIP transcription factor that is involved in flowering, was successfully modified to interact with 14-3-3 proteins in fusicoccin-dependent manner. However, fusicoccin treatment didn't induce flowering of transgenic Arabidopsis plants in which modified FD cDNA was introduced. It means that exogenously applied fusicoccin can't stabilize the interaction of modified FD and 14-3-3 proteins in plant cells.

研究分野：農芸化学・分子生物学

キーワード：14-3-3タンパク質 転写因子 フシコクシン タンパク質-タンパク質相互作用 生命現象制御 花成

1. 研究開始当初の背景

(1) 14-3-3 タンパク質について : 14-3-3 タンパク質 (以降、14-3-3 と略記) は、真核生物普遍的な制御タンパク質であり、それ自身に特有の機能はないが、リン酸化されたタンパク質に結合し、その結合相手のタンパク質 (クライアント) の機能を制御する (①Fu et al., 2000)。クライアントにおける 14-3-3 結合モチーフには、mode1~mode3 まで知られ、そこにはリン酸化 S/T (pS/pT) が含まれる。例えば、クライアントが酵素であれば、リン酸化依存で 14-3-3 が結合すると活性化状態になる、転写因子であれば、14-3-3 が結合すると核外に排出される、など多くの例が知られている。

(2) フシコクシンについて : クライアントの例として、高等植物の膜結合[H⁺]ATPase は、その C 末端の mode 3 モチーフ QSYpTV-COOH を介して 14-3-3 と結合して活性化状態になるが、フシコクシン (図 1) はその相互作用を安定化し、[H⁺]ATPase は恒常的に活性化されることは有名である。[H⁺]ATPase の C 末端のペプチド、14-3-3、フシコクシンの三者複合体は結晶化され、立体構造も示されている (②Wurtele et al., 2003)。フシコクシンは、植物病原性糸状菌が生産するジテルペノイド配糖体である。フシコクシンは、動物細胞においては制ガン作用がみられ、その関連化合物は制がん剤として上市が期待されている。細胞分裂抑制剤とは異なり、フシコクシンとその関連化合物は細胞を正常化してアポトーシスに導く作用があると考えられている。

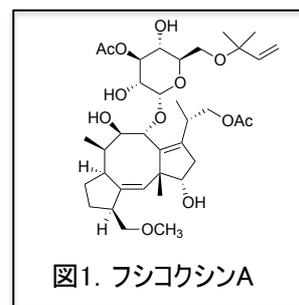


図1. フシコクシンA

(3) 標的転写因子 FD について : 別のクライアントの例として、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の花成関連の bZIP 型転写因子、FD である。FD は C 末端にある mode 1 モチーフ RSSpTAPF-COOH を介して 14-3-3 と結合し、その 14-3-3 とフロリゲン FT が結合して三者複合体を形成して、花成関連の遺伝子の発現を誘導するが、最初の報告はイネ (*Oryza sativa*) におけるそれらのオーソログについてであった (③Taoka et al., 2011)。筆者らの研究グループは、FD と 14-3-3 の相互作用はフシコクシンによっては安定化されないことを予備的に示したが (未発表データ)、それは[H⁺]ATPase と比べて FD は C 末端のアミノ酸が 2 個分長いので、フシコクシンがはまるポケットがなくなるからと考えた。

2. 研究の目的

以上の背景を受け、本研究では、[H⁺]ATPase の C 末端の mode 3 モチーフを参考にして、14-3-3 結合がフシコクシン依存となる改変 FD を創製・利用することを主な目的とする。目的改変 FD が創製できれば、それを *fd* 欠損シロイヌナズナに導入し、その遺伝子組換え体にフシコクシンを処理することで、茎頂細胞内での改変 FD と 14-3-3 結合を人為的に安定化させ、花成を誘導できるかどうかを検討する。さらに、FD 以外の別の標的転写因子を模索し、「フシコクシンを利用した人為的機能操作のシステム」に適用可能かどうかを検討することも目指す。

これらの実験を行うことで、フシコクシンのように植物に存在しない化合物に依存して 14-3-3 と相互作用するように標的タンパク質を改変し、その化合物と改変標的をセットで利用して、リン酸化依存ではなく、化合物依存で標的と 14-3-3 相互作用を操り、植物の生命現象を制御する新たなケミカルバイオロジーのシステム構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) FD の改変 : FD をコードする cDNA について、アミノ酸配列改変計画にあわせてコドン在设计し、PCR を駆使して改変 cDNA を調製した。C 末端部分、3'末端を改変するので、アンチセンスプライマーに改変コドンを入れた。

(2) 大腸菌発現組換えタンパク質を用いた in vitro プルダウン法 : 改変 FD については pGEX-4T-3 ベクターを用いて大腸菌体内でグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) タグを付けた融合組換えタンパク質を発現させ、それを抽出、GST/グルタチオンのアフィニティー精製により GST-改変 FD を得た。14-3-3 は pQE30 ベクターを利用して、大腸菌体内で His タグを付加した組換え 14-3-3 を発現させ、それを菌体より抽出し可溶画分を得た。その可溶画分について、Ni カラムを用いて His-14-3-3 をそこに吸着させ、精製 GST-改変 FD を加え (フシコクシン処理は 10⁻⁵M 含むようフシコクシンを添加)、Ni カラムビースを沈殿させて得られた共沈画分について SDS-PAGE に供した。CBB 染色により GST-改変 FD の共沈の有無を調べた。FD のリン酸化には、大腸菌発現組換え CPK33 (Ca 依存性タンパク質リン酸化酵素の一種; ④

Kawamoto et al., 2015) を用いた。目的タンパク質のリン酸化は、Phos タグを使用した SDS-PAGE により検定した。

(3) 酵母 2-hybrid 法 (Y2H) : クロンテックの Y2H システムを利用し、activation domain(AD) と binding domain (BD) を付加するベクターとして、pGADT7 と pGBKT7 をそれぞれ用いた。改変 FD の cDNA を pGBKT7、14-3-3 の cDNA を pGADT7 に組み込み、ホスト酵母 Y2H Gold に供導入した。その組換え酵母を、栄養選択培地である His 欠損培地に滴下、培養し、そこで生育するかいなかでレポーター遺伝子 *HIS3* の発現を検定し、相互作用を調べた。

(4) シロイヌナズナへの遺伝子導入 : FD 欠損シロイヌナズナ変異体 *fd1* をホストとして、FD プロモーター配下に改変 FD の cDNA を配置した遺伝子カセットを、アグロバクテリウムを介して花序浸漬法により組み込んだ。得られた T2 世代種子を用いて花成実験に供した。

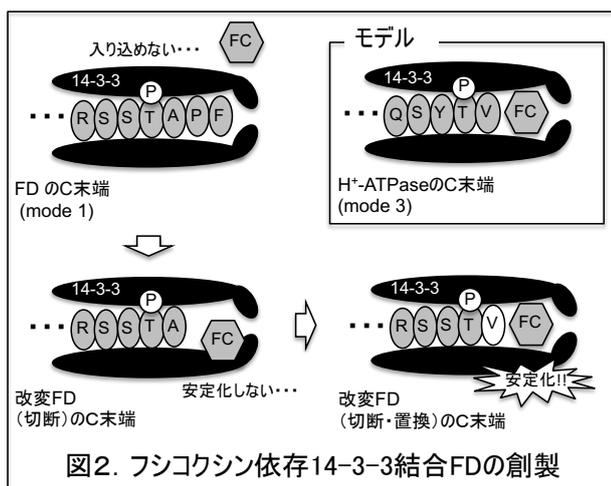
(5) 花成実験 : 試験するシロイヌナズナの T2 世代種子について、表面滅菌後、低温処理により休眠を打破し、発芽・生育した芽生えを鉢植えした。ロゼット葉が展開した段階で、フシコクシンを処理し、抽だい茎が 1 cm となった発芽後日数を花成時期として評価した。

(6) 化合物ライブラリースクリーニング : 東京大学創薬機構の Core Library である 9600 種の化合物のライブラリーを利用した。創薬機構より一定量滴下された化合物を含む 96 ウェルプレートを提供いただき、それに His 欠損液体培地に懸濁した AD-改変 FD/BD-FT を組み込んだ組換え酵母を加え、振とう培養後、3 日で酵母の生育を観察した。14-3-3 は酵母の内生のものであり、BD には FT を使用した (3-ハイブリッド様のアッセイ)。酵母の 14-3-3 は 2 種しかゲノムに存在せず、選択性が低いと考えてそれを利用した。

(7) cDNA クローニング : 目的 cDNA は、植物体 (イネあるいはシロイヌナズナ) 由来の cDNA プールを鋳型とした RT-PCR により増幅し (酵素 KOD plus ver.2 ; 東洋紡)、サブクローニングしたものを用いた。点変異導入は、inverse PCR とセルフライゲーションにより行った。

4. 研究成果

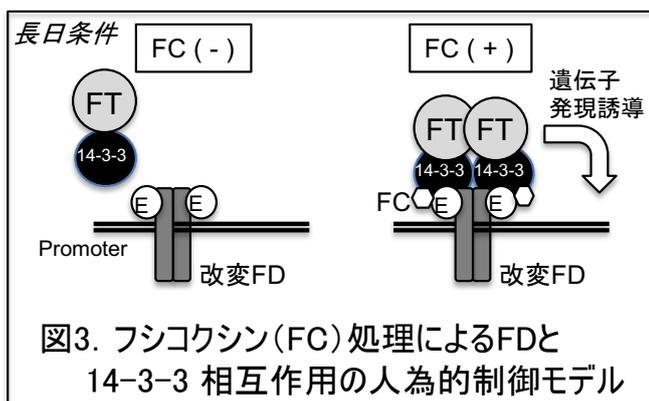
(1) フシコクシンに依存して 14-3-3 と相互作用する FD の創製 : フシコクシンによる安定化作用を検出するために大腸菌発現組換え FD と 14-3-3 を用いて *in vitro* プルダウンアッセイを行った。大腸菌体内では FD はリン酸化されないことを確認したので、リン酸化標的 T を酸性アミノ酸 E に置換したリン酸化模倣変異体を利用した。FD の C 末端 mode 1 モチーフの RSSEAPF-COOH について、2 アミノ酸削った変異体 FD-RSSEA については、14-3-3 との相互作用は極めて弱まったが、フシコクシンによる相互作用安定化は検出されなかった。これは C 末端のアミノ酸が、側鎖がメチル基だけの A だったことが理由と考えられ、[H⁺]ATPase の C 末端アミノ酸の V など大きい疎水性側鎖をもつアミノ酸に置換する必要があると推測した。そこで、C 末端を A 以外の 19 種類のアミノ酸にそれぞれ置換した変異体を調製し、フシコクシンによる 14-3-3 相互作用安定化を調べた。その結果、I、C、V の場合で安定化が検出された。大神田先生のグループは、フシコクシンの 12 位の水酸基がないコチレニン型の改変フシコクシンとヘキサペプチド RSHpSXP (X は任意の 20 種アミノ酸) とで 14-3-3 結合安定化を調べたところ、上位 3 位は、I、V、C であり (5 Takahashi et al., 2012)、本研究の場合と良い相関であった。そこで、FD-RSSEV を目的改変型とすることとした。



(2) 改変 FD の特徴付け : *in vitro* プルダウンにより FD-RSSEV と 14-3-3 相互作用がフシコクシンにより安定化されることを示したので、Y2H アッセイ (His 要求性アッセイ) でも検討した。そのアッセイでは、リン酸化模倣していない FD-RSSTV も用いた。その結果、FD-RSSEV/14-3-3 では相互作用を示す酵母の生育はみられなかったが、FD-RSSTV/14-3-3 では生育がみられ、RSSTV が酵母細胞内でリン酸化されること (RSSpTV)、14-3-3 との相互作用が弱まらないことが示された。さらに、大腸菌発現組換え FD-RSSTV についても CPK33 によりリン酸化してプルダウンアッセイに供したところ (FD-RSSpTV)、14-3-3 と共沈し、相互作用は弱まらなかった。そこで、フシコクシン依存の相互作用には、FD-RSSEV が最適と判断した。ところが、

Y2H アッセイによっては、FD-RSSEV/14-3-3 のフシコクシン処理による相互作用安定化はみられず、*in vitro* プルダウンアッセイとは異なる結果となった。[H⁺]ATPase の C 末端と 14-3-3 相互作用についても Y2H アッセイではフシコクシンによる安定化はみられないことから、酵母細胞内では何らかの原因によりフシコクシンの効力が失われると考えられるが、詳細は不明である。

(3) 改変 FD を組み込んだシロイヌナズナの作出と花成アッセイ：改変 FD (FD-RSSEV) をコードする cDNA を *FD* 遺伝子の native プロモーター配下で *fd* 欠損変異体に組み込み、T3 世代種子を得た。その T3 世代種子の異なる 3 ラインを用いて花成アッセイ (長日条件下) を行った (図 3 参照)。その結果、改変 FD トランスジェニック植物については、開花時期は野生型より若干遅れ、14-3-3 相互作用が低下した改変 FD の影響が現れたことまでは確認できたが、フシコクシン処理により開花時期は早まらなかった。フシコクシン処理 10⁻⁵M~10⁻⁷M で行い、処理方法は、抽だい直前に 1 回処理、あるいは定期的に複数回処理など、いくつかの条件で行ったが、フシコクシン処理の影響は見られなかった。前述のように、酵母細胞においてもフシコクシンによる安定化作用は検出できなかったことから、酵母細胞と同様に植物細胞でもフシコクシンの効力は失われると考えられたが、原因は不明のままである。そこで、AD-FT/BD-改変 FD を供導入した組換え酵母 (14-3-3 は酵母内生を利用) を用いて、その相互作用を安定化する化合物をライブラリーよりスクリーニングし、フシコクシンの代替化合物を得ることに計画変更した。



(4) 改変 FD/14-3-3 相互作用を安定化する化合物のスクリーニング：東大創薬機構の Core Library の 9600 化合物について一次スクリーニングを行った。この探索で目的化合物 (フシコクシン作用を模倣する化合物) が得られれば、標的と 14-3-3 相互作用の安定化において、フシコクシンとは異なる細胞内動態の化合物を得る可能性があり、新たな制がん剤リード化合物となることも期待された。His 要求性アッセイは、液体培養で行い、生育して濁度が高くなるものをヒットとした。その結果、8 種の化合物がヒットしたので、寒天培地を用いて、AD-empty/BD-empty などネガティブコントロールも含めて His 要求アッセイを行ったが (二次スクリーニング)、全てで偽陽性であることが明らかとなった。今後は、東大創薬機構の Advanced Core Library の 22400 種についてスクリーニングする予定である。

このように、残念ながら現在までのところ、改変 FD を利用してフシコクシン処理により 14-3-3 相互作用を操り、開花を制御することには成功していない。

(5) 別の標的タンパク質の検討：花成のようにシグナルの閾値を超えるか超えないかで、現象発生の有無が決まる生命現象と比べて、茎部伸長は定量的生理現象であり、制御がしやすいことから、植物ホルモンの一つジベレリン関連の転写因子に着目した。その中で、ジベレリンシグナル伝達の負の制御因子である DELLA タンパク質 (以降、DELLA と表記) は、ジベレリンが受容体と結合するとユビキチン・プロテアソーム系を介して分解され、DELLA による抑制が解除されてジベレリン誘導遺伝子の発現が誘導される (⑥Nelson and Steber, 2016)。14-3-3 相互作用を操ることで改変 DELLA の安定化を制御できれば、dominant negative となり、野生型に導入の可能となる。そこで、イネ (*Oryza sativa*) のゲノムで唯一の DELLA である SLR1 について、14-3-3 相互作用を調べることにした。SLR1 はリン酸化されると安定化されることが報告されているので (⑦Dai and Xue et al., 2010)、その安定化が 14-3-3 相互作用を介している可能性について検討することを計画した。しかしながら、14-3-3 結合モチーフ検索サイトにより推定したリン酸化部位を D 置換してリン酸化模倣体を使って Y2H アッセイで調査したが、14-3-3 との相互作用を示す結果は得られなかった。シロイヌナズナのゲノムで 5 種存在する DELLA のうちのひとつ、RGA は 14-3-3 相互作用タンパク質のリストに掲載されていることから (⑧Jaspert et al., 2011)、今後は RGA について 14-3-3 結合を検討する予定である。

<引用文献>

- ① Fu H, Subramanian RR and Masters SC (2000) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 40, 617-647.
- ② Wurtele M, Jelich-Ottman C, Wittinghofer A and Oecking C (2003) Structural view of a fungal toxin acting on a 14-3-3 regulatory complex. *The EMBO Journal*, 22, 987-994.

- ③ Taoka K, Ohki I, Tsuji H, Furuita K, Hayashi K, Yanase T et al. (2012) 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature*, 476, 332-335.
- ④ Kawamoto N, Sasabe M, Endo M, Machida Y and Araki T (2014) Calcium-dependent protein kinases responsible for the phosphorylation of a bZIP transcription factor FD crucial for the florigen complex formation. *Scientific Report*, 5, 8341.
- ⑤ Takahashi M, Kawamura A, Kato N, Nishi T, Hamachi I and Ohkanda J (2012) Phosphopeptide-dependent labeling of 14-3-3 proteins by fusicoccin-based fluorescent probes, *Angewandte. Chemie International Edition*, 51, 509-512.
- ⑥ Nelson SK and Steber CM (2016) Gibberellin hormone signal perception: down-regulating DELLA repressors of plant growth and development. *Annual Plant Reviews*, 49, 153-188.
- ⑦ Dai C and Xue H-W (2010) Rice *early flowering 1*, a CKI, phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signalling. *The EMBO Journal*, 29, 1916-1927.
- ⑧ Jaspert N, Throm C and Oecking C (2011) *Arabidopsis* proteins: fascinating and less fascinating aspects. *Frontiers in Plant Science*, 2, 96.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂井 優生、川本 望、TANAKA-JAROENSANTI Naiyanate、深澤 壽太郎、荒木 崇、中嶋 正敏、浅見 忠男、三橋 渉、加藤 修雄、豊増 知伸
2. 発表標題 低分子化合物を利用した花成関連転写因子の機能制御
3. 学会等名 農芸化学会2019年度大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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