

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H00402

研究課題名（和文）植物ホルモン受容体の遺伝的冗長性を解決する天然物ケミカルバイオロジー

研究課題名（英文）Chemical biology of natural products on plant hormones

研究代表者

上田 実（Ueda, Minoru）

東北大学・理学研究科・教授

研究者番号：60265931

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 35,200,000円

研究成果の概要（和文）：反応性アンタゴニスト戦略では、合成したRAプローブがCysを導入したCysJAZペプチドのみとCO11-CysJAZ共受容体を形成することを、in vitroおよびin vivoのいずれにおいても、確認できた。また、コロナチン立体異性体戦略では、CORの16種の立体異性体とシロイヌナズナの13種のCO11-JAZ共受容体サブタイプとの親和性を網羅的に解析した。その結果、立体異性体のひとつが13種の内の1種に特異的に結合することを確認し、遺伝子発現プロファイルの解析から、単一のJAZが制御する遺伝子発現を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界の食糧生産量のおよそ30%が病原菌・害虫による被害を受けている。このため、植物の病原菌感染や虫による食害への防御応答を担うJA-Ileの重要性は論を待たない。しかしJA-Ileは、外敵への防御応答と同時に、副作用として植物生長を抑制する。この作用と副作用のトレードオフ現象は、JA-Ile研究の深刻な問題であり、その解決が模索されている。本研究は、その解決への道を拓く成果である。

研究成果の概要（英文）：In the reactive antagonist strategy, the synthesized RA probe formed CO11-CysJAZ co-receptors with only Cys-transfected CysJAZ peptides, both in vitro and in vivo. In the coronatine stereoisomer strategy, we also comprehensively analyzed the affinity of 16 stereoisomers of COR with 13 CO11-JAZ co-receptor subtypes in Arabidopsis thaliana. As a result, we confirmed that one of the stereoisomers specifically binds to one of the 13 species, and analysis of gene expression profiles revealed that gene expression is regulated by a single JAZ.

研究分野：天然物ケミカルバイオロジー

キーワード：植物ホルモン ジャスモン酸 受容体 遺伝的冗長性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界の食糧生産量のおよそ 30% が病原菌・害虫による被害を受けている (E-C. Oerke, “Crop Production and Crop Protection”, Elsevier, **1994**, 808 p)。このため、植物の病原菌感染や虫による食害への防御応答を担う JA-Ile (図 1、*Nat. Chem. Biol.* 2009, 5, 344) の重要性は、論を待たない。また JA-Ile が示す、抗がん剤などの有用二次代謝産物生合成の活性化 (*Front. Plant Sci.* 2018, 9, 863) は、化学者にとって極めて魅力的である。しかし JA-Ile の副作用である生長抑制は、その実用性を大きく制限している。JA-Ile が示す多様な活性は、そのユニークな受容体に由来する。JA-Ile は、F-box タンパク質 COI1 と転写リプレッサータンパク質 JAZ の間で「分子接着剤」として機能してタンパク質間相互作用を誘導し、COI1-JAZ 共受容体形成により上記の活性を引き起こす (図 1、*Nature* 2010, 468, 400)。JAZ 遺伝子には重篤な遺伝的冗長性が見られ、モデル植物シロイヌナズナには 13 種類のサブタイプ (JAZ1-JAZ13) が存在する。COI1 遺伝子は 1 種類であるため、計 13 種の COI1-JAZ 共受容体ペアが存在し得る。これらは冗長性を持ちつつ各々異なる生物活性制御を分担しており (*Curr. Opin. Plant Biol.* 2016, 33, 147) JA-Ile はほとんどの JAZ サブタイプと COI1 とのタンパク質間相互作用を非選択的に誘導するため、外敵への防御応答や生合成昂進と同時に、副作用として植物生長を抑制する。この作用と副作用のトレードオフ現象は、JA-Ile 研究の深刻な問題であり、その解決が模索されている (*PNAS*, 2018, 115, 10768; *Nat. Commun.* 2016, 7, 12570)。

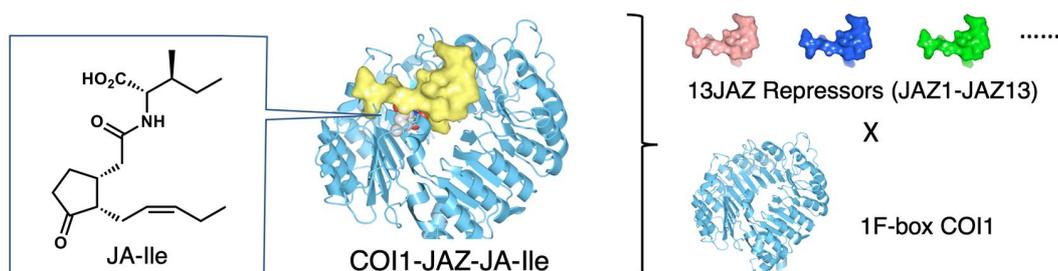


図 1 植物ホルモン JA-Ile と重篤な遺伝的重複を持つ 13 種の COI1-JAZ 共受容体ペア

植物ホルモン受容体遺伝子はその生理的重要性故に強度の遺伝的冗長性をもち、ホルモンの作用機構研究と人為的制御実現を妨げる高いハードルとなっている。なお、植物ホルモン オーキシンの共受容体 TIR1/AFB-AUX/IAA は、COI1-JAZ 共受容体と相同性が高く、計 $6 \times 29 = 174$ 種 (TIR1/AFB6 種 \times AUX/IAA29 種) の共受容体ペアが存在する。このうち、6 種の TIR1/AFB1 (COI1 に相当) に関しては、bump-and-hole 法による選択的活性化の可能性が報告されているが (*Nat Chem Biol.* 2018, 14, 299) 29 種の AUX/IAA (JAZ に相当) に関する選択性付与は現状不可能であり、遺伝的冗長性の解決には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、植物ホルモン JA-Ile の構造的・機能的ミミックである天然物コロナチン (COR、図 3) をツールとして用い、目的の生物応答に關与する COI1-JAZ 共受容体ペアを選択的に活性化する普遍的方法論を構築する。研究代表者は最近、COR 立体異性体をベースに、JAZ9/10 選択的に COI1 との相互作用を誘導するリガンド NOPh を論理的設計によって開発した (図 3、*Nat. Commun.* 2018, 9, 3654)。これにより、副作用の生長阻害を伴わずに病原菌感染耐性のみを活性化することに初めて成功した。天然物ケミカルバイオロジーによって JA-Ile の作用-副作用トレードオフ現象を解決できたことで、遺伝的冗長性に関する問題の解決に道を拓いた。しかし、JAZ9/10 以外のサブタイプに選択的なリガンドの開発には至らず、より強力な病原菌耐性獲得、その他の有用活性 (虫害耐性や二次代謝産物生合成) の利用と解明には、13 種いずれの JAZ サブタイプに対しても COI1 との相互作用を選択的に誘導できる網羅的方法論が必要である。世界的に見ても、多くの研究者が植物ホルモン受容体サブタイプの網羅的機能解明を目指しているが、未だ成功例は

ない。本研究計画では、研究代表者のこれまでの成果を進展させ、植物ホルモン受容体の遺伝的冗長性問題に、世界に先駆けて最終的な解決を与える。

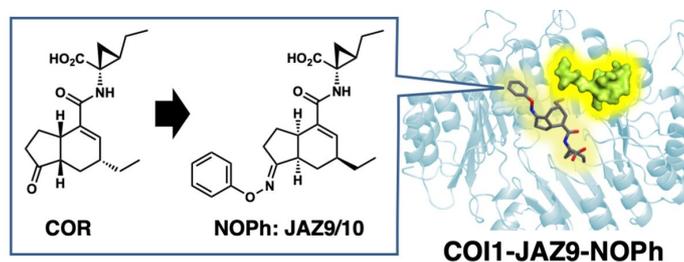


図 3 COR と COI1-JAZ9/10 選択的アゴニスト NOPh

3. 研究の方法

(1) 反応性アンタゴニスト戦略

COR-MO は、COI1-JAZ 共受容体の強力なアンタゴニストである (図 4a、*Nat. Chem. Biol.* 2014, 10, 671)。COR-MO のメチルオキシム基は COI1 の結合ポケットから突き出て、JAZ のアクセスを妨げる。研究代表者は、COR-MO のメチルオキシム基をハロゲン化アルキルオキシム基に置換した反応性アンタゴニスト (RA; Reactive antagonist) を開発した。任意の JAZ サブタイプのリガンド近傍部位に、求核性のシステイン残基を導入することで、RA は共有結合的に共受容体形成を誘導し、特定の共受容体ペア由来のシグナル経路を選択的に活性化する一方、その他のペアに由来する経路を阻害すると期待される (図 4c)。JAZ タンパク質は、リガンドとの相互作用部位に Cys をもたないため、この戦略が可能となる。RA は、*In vitro* 実験において Cys-JAZ1 に対して高い反応性を示し、天然型 JAZ1 を含むその他の JAZ に対して COI1 との結合を阻害した (図 4d、未発表)。反応性アンタゴニスト戦略を用いて特定の JAZ サブタイプのシグナル経路を選択的に活性化し、任意の共受容体ペアひとつひとつを個別に機能制御・解析できる。これによって、共受容体の遺伝的冗長性を回避し、外敵防御応答や有用二次代謝産物生合成昂進に關与する JAZ サブタイプを特定することが可能になる。具体的には以

下の通りである。

Watson らの効率的ラセミ体 COR 合成法 (*Nat. Commun.* 2018, 9, 1105) を改良し、RA 天然型立体異性体の供給法を確立する。その後、RA が JAZ1 以外の全ての JAZ サブタイプに有効であるか検証する。早期遺伝子応答制御には、RA の反応速度向上が望ましい。コバレントドラッグ新戦略 (*Nat. Chem. Biol.* 2019, 15, 250) やタンパク質化学修飾法 (*Chem. Biol.* 2010, 17, 213; *Nat. Chem.* 2015, 8, 103) を応用し反応速度向上を検討する。次に、目的とする天然型 JAZ サブタイプ遺伝子 (以下 JAZX) をノックアウトした植物体に、Cys-JAZX 遺伝子を導入して遺伝子変異体植物を作成する (図 4e)。これに RA を投与することで、植物個体中での効果を検証する。RA 投与によって、JAZX に制御される表現型が現出するので、下流の遺伝子発現を RNA シークエンス法で調べる。概念実証のため、機能既知の JAZ2 サブタイプ (*New Phytol.* 2017, 213, 1378) を用い成否を判定した後、機能未知の他の JAZ サブタイプに適用し、防御応答 (共同研究: スペイン国立生物工学研 Solano 教授) への効果と遺伝子発現を調べる。これらを通じ、重篤な遺伝的冗長性をもつ転写リプレッサー JAZ が制御する遺伝子発現を、JAZ サブタイプ毎にグルーピングしてデータベース化する (図 4f)。

(2) コロナチン立体異性体ケミカルライブラリー戦略

研究代表者は、COR 全立体異性体 16 種から成るケミカルライブラリーを構築し、各異性体の JAZ サブタイプ選択性が異なることを明らかにした (図 5a、論文投稿予定)。各種生物試験実施には化合物供給量が不十分であるので、Watson らの合成法 (*Nat. Commun.* 2018, 9, 1105) を立体異性体合成に適するよう改良し、供給を実現する。特に、RA 戦略がうまく機能しない JAZ サブタイプに注目し、*in silico* ドッキング計算を併用した分子設計により、サブタイプ高選択的なリガンド開発 (*Nat. Commun.* 2018, 9, 3654) と作用機構解析を行う。

4. 研究成果

本研究で検討した、「反応性アンタゴニスト戦略」および「コロナチン立体異性体ケミカルライブラリー戦略」の結果を以下に述べる。反応性アンタゴニスト戦略を実施するために、合成 RA プローブを化学合成し、同じく化学合成した JAZ ショートペプチドを用いて *in vitro* での概念実証を行った。その結果、合成した RA プローブが Cys を導入した CysJAZ ペプチドのみと COI1-CysJAZ 共受容体を形成することが確認できた。また、CysJAZ を発現する遺伝子組み換え植物体を調整することに成功し、これらに RA プローブを投与したところ、CysJAZ 選択的な共受容体形成が確認できた。これらの結果から、*in vitro* および *in vivo* のいずれにおいても、RA が機能することを確認できた。

また、COR の 16 種の立体異性体を化学合成し、これらを用いてシロイヌナズナの 13 種の COI1-JAZ 共受容体サブタイプとの親和性を網羅的に解析した。その結果、立体異性体のひとつが 13 種の内の 1 種に特異的に結合することを確認した。また、遺伝子発現プロファイルの解析から、単一の JAZ が制御する遺伝子発現を明らかにできた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hayashi Kengo, Kato Nobuki, Bashir Khurram, Nomoto Haruna, Nakayama Misuzu, Chini Andrea, Takahashi Satoshi, Saito Hiroaki, Watanabe Raku, Takaoka Yousuke, Tanaka Maho, Nagano Atsushi J., Seki Motoaki, Solano Roberto, Ueda Minoru	4. 巻 6
2. 論文標題 Subtype-selective agonists of plant hormone co-receptor COI1-JAZs identified from the stereoisomers of coronatine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-04709-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Saito Rina, Muto Toshiya, Urano Haruyuki, Kitajima Tsumugi, Kato Nobuki, Kwon Eunsang, Ueda Minoru	4. 巻 114
2. 論文標題 (3R, 7S)-12-Hydroxy- jasmonoyl-L-isoleucine is the genuine bioactive form of a jasmonate metabolite in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.16256	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 -
1. 著者名 Ueda Minoru, Kato Nobuki, Kurata Yoshinori, Imai Masaki, Yang Gangqiang, Taniguchi Keigo	4. 巻 18
2. 論文標題 Host-Selective Phytotoxins Incorporating the Epoxy-Triene-Decarboxylate Moiety Function through the Hijacking of the Plant-Microbe Interaction System	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 12 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.2c00777	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 -
1. 著者名 Kneeshaw Sophie, Soriano Gonzalo, Monte Isabel, Hamberg Mats, Zamarreno Angel M., Garcia-Mina Jose M., Franco-Zorrilla Jose Manuel, Kato Nobuki, Ueda Minoru, Rey-Stolle Ma Fernanda, Barbas Coral, Michavila Santiago, Gimenez-Ibanez Selena, Jimenez-Aleman Guillermo H., Solano Roberto	4. 巻 119
2. 論文標題 Ligand diversity contributes to the full activation of the jasmonate pathway in Marchantia polymorpha	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2202930119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2202930119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takaoka Yousuke, Suzuki Kaho, Nozawa Akira, Takahashi Hirotaka, Sawasaki Tatsuya, Ueda Minoru	4. 巻 298
2. 論文標題 Protein-protein interactions between jasmonate-related master regulator MYC and transcriptional mediator MED25 depend on a short binding domain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101504 ~ 101504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101504	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 -

1. 著者名 Hayashi Kengo, Kato Nobuki, Bashir Khurram, Nomoto Haruna, Nakayama Misuzu, Chini Andrea, Takahashi Satoshi, Saito Hiroaki, Watanabe Raku, Takaoka Yousuke, Tanaka Maho, Nagano Atsushi J., Seki Motoaki, Solano Roberto, Ueda Minoru	4. 巻 6
2. 論文標題 Subtype-selective agonists of plant hormone co-receptor COI1-JAZs identified from the stereoisomers of coronatine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-04709-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Saito Rina, Muto Toshiya, Urano Haruyuki, Kitajima Tsumugi, Kato Nobuki, Kwon Eunsang, Ueda Minoru	4. 巻 114
2. 論文標題 (3R, 7S)-12-Hydroxy- jasmonoyl-L-isoleucine is the genuine bioactive form of a jasmonate metabolite in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.16256	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 -

1. 著者名 Ueda Minoru, Kato Nobuki, Kurata Yoshinori, Imai Masaki, Yang Gangqiang, Taniguchi Keigo	4. 巻 18
2. 論文標題 Host-Selective Phytotoxins Incorporating the Epoxy-Triene-Decarboxylate Moiety Function through the Hijacking of the Plant-Microbe Interaction System	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 12 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.2c00777	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 -

1. 著者名 Kneeshaw Sophie, Soriano Gonzalo, Monte Isabel, Hamberg Mats, Zamarreno Angel M., Garcia-Mina Jose M., Franco-Zorrilla Jose Manuel, Kato Nobuki, Ueda Minoru, Rey-Stolle Ma Fernanda, Barbas Coral, Michavila Santiago, Gimenez-Ibanez Selena, Jimenez-Aleman Guillermo H., Solano Roberto	4. 巻 119
2. 論文標題 Ligand diversity contributes to the full activation of the jasmonate pathway in <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2202930119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2202930119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takaoka Yousuke, Suzuki Kaho, Nozawa Akira, Takahashi Hirotaka, Sawasaki Tatsuya, Ueda Minoru	4. 巻 298
2. 論文標題 Protein-protein interactions between jasmonate-related master regulator MYC and transcriptional mediator MED25 depend on a short binding domain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101504 ~ 101504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101504	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0件

〔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	高岡 洋輔 (Takaoka Yousuke) (80599762)	東北大学・理学研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	加治 拓哉 (Kaji Takuya) (80835520)	東北大学・理学研究科・助教 (11301)	

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