

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310147

研究課題名(和文) 生物現象を制御する細胞間グリコシドシグナル分子の発見と生物有機化学

研究課題名(英文) Intracellular glycoside signal participating in the regulation of biological phenomena

研究代表者

上田 実(Ueda, Minoru)

東北大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60265931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円、(間接経費) 4,590,000円

研究成果の概要(和文)：ジャスモン酸グルコシドの投与によって運動細胞は収縮するが、その際には、同じタイムスケールでのROS生産が確認できる。外部からのROS投与によって細胞収縮が誘導されることから、細胞収縮はCOI1-JAZ非依存的、ROS依存的な機構で誘導されることが分かった。また、ジャスモン酸グルコシドの標的タンパク質に関しても、コンパクト分子プローブを用いることで、良好な結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：JAG induced motor cell shrinking and concomitant ROS production. External addition of ROS also induced motor-cell shrinking, the JAG-induced shrinking of motor cell is independent to COI1-JAZ signaling pathway and dependent ROS-mediated path. The molecular target of JAG was also revealed by using our compact molecular probe approach.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：就眠運動 ジャスモン酸グルコシド 配糖体 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンを中心とする植物生理活性分子の作用機構は、Nature Chemical Biology 誌で特集が組まれるなど、現在、最もホットな研究分野の一つとなりつつある (Nat. Chem. Biol. 2009, 5, Vol.5)。中でも、植物の生体防御応答などに関与するジャスモン酸の作用機構解明は、細胞質受容体 COI1 タンパク質の同定により飛躍的に発展した (ACS Chemical Biology 2010, 5, 63.)。現在の所、ジャスモン酸のもつ多様な生物活性の大部分は、COI1-JAZs タンパク質複合体形成とそれに続く遺伝子発現制御によって説明できると考えられている (Nature 2007, 448, 661; Nature 2007, 448, 666; Nat. Chem. Biol. 2009, 5, 344; Plant Cell 2009, 21, 2220.)。

申請者は、アメリカネムノキ (Samanea saman) の就眠運動を制御する内因性物質として、ジャスモン酸の配糖体である LCF (Leaf-closing factor) を同定した (Tetrahedron, 2000, 56, 8101.)。マメ科植物の多くは、夜に葉を閉じて眠り、朝には再び葉を開く、一日周期の葉の開閉運動 (就眠運動) を行うことが知られている。この運動は生物時計によって制御され、進化論のダーウィンをはじめとする多くの研究者を魅了したが、その分子機構は未だ未解明である。

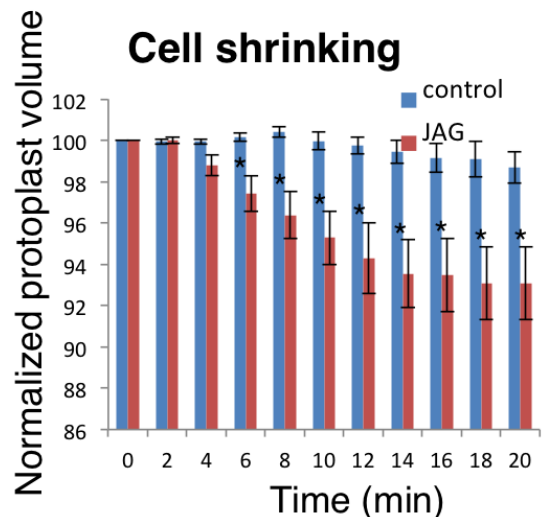
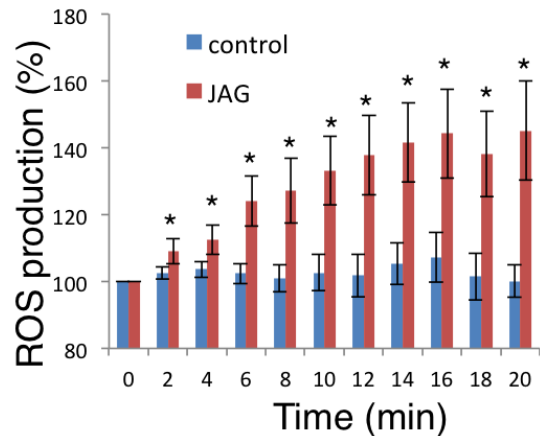
2. 研究の目的

ジャスモン酸グルコシドは、アメリカネムノキ (Samanea saman) の就眠運動 (生物時計で制御される 24 時間周期の葉の開閉運動) を制御する天然物リガンドとして同定された (1; Tetrahedron, 2000, 56, 8101.)。その後 1 は、食虫植物ハエトリソウの捕虫運動を誘導する内因性リガンドでもあることが明らかになった (ChemBioChem, 2010, 11, 2378.)。これらはいずれも、イオンチャネルの活性化を経て起こる生物現象であり、申請者は、1 がカリウムチャネル活性化によってアメリカネムノキ運動細胞の細胞収縮を引き起こすことを明らかにした (Plant Physiol., 2011, 155, 1226.)。申請者は、1 の同定以後、各種機能性分子プローブを用いた生物有機化学的研究を行い (Tetrahedron, 2006, 62, 8805; Angew. Chem. Int. Ed., 2008, 47, 7289.) 1 の作用機構が親化合物のジャスモン酸 2 と全く異なることを示した (Plant Physiol., 2011, 155, 1226.)。LCF は、過去に例のない細胞間シグナル分子として働く内因性グリコシドであることが示された。本申請は、これまであまり重要視されてこなかった内因性グリコシド分子に注目し、その細胞間シグナル分子としての機能を証明することで、生物の新しい情報伝達機構の全貌解明を目指す挑戦的な試みである。

3. 研究の方法

本研究では、新規に開発した分子プローブを用いて、LCF 標的膜タンパク質 MTJG を同定す

JAG-triggered ROS P



るとともに、これが COI1- JAZ1 シグナル伝達経路とは異なる情報伝達系に属することを示す。これらの研究を通じて、細胞間を移動するグリコシドシグナル分子の存在を証明する。

4. 研究成果

JAG の投与によって運動細胞は収縮するが、その際には、同じタイムスケールでの ROS 生産が確認できる (右カラム図)。外部からの ROS 投与によって細胞収縮が誘導されることから、細胞収縮は COI1-JAZ 非依存的、ROS 依存的な機構で誘導されることが分かった。また、JAG の標的タンパク質に関しても、コンパクト分子プローブを用いることで、良好な結果が得られた。

就眠運動の直接の引き金となるのは、葉枕部分 (葉の付け根にある茎との接合部分) に存在する運動細胞の収縮である (J. Gen. Physiol., 1974, 64, 413)。この収縮は、主としてカリウムイオンの細胞外放出によって引き起こされ、収縮の前後で細胞内のカリウムイオンの実に 60% が細胞外へと放出される (J. Cell. Biol., 1982, 95, 893)。アメリカネムノキ (Samanea saman) 運動細胞中のカリウムチャネルに関しては、2000 年頃に複数のグループによる研究が行われ、3 種のカリウムチャ

ネル候補遺伝子がクローニングされた (*Plant Physiol.*, **2002**, *128*, 634), しかし、いずれもアフリカツメガエル卵母細胞においてカリウムイオン輸送活性を示さなかったことから (*J. Exp. Bot.*, **2006**, *57*, 3583)、機能を持つ *Samanea* カリウムチャンネルは未同定であった。申請者らは、次世代シーケンサーを用いて *Samanea* 運動細胞のトランスクリプトーム解析を行い、36,000 個の遺伝子(平均長 1700 bp)を取得した。その中から放出型・吸収型のカリウムチャンネル候補遺伝子 7 種がクローニングされた。当初、これらの遺伝子をアフリカツメガエル卵母細胞で発現させたが、過去の報告通りカリウムイオン輸送活性が確認できなかった。しかし、慎重な条件検討によって、ついにカリウムイオン輸送活性の確認に成功し、過去に成功例の無かった *Samanea* 運動細胞で働くカリウムチャンネルの異種発現系を構築することができた。

近年、活性酸素種 (ROS; 下記文献では H_2O_2 とされている) が植物の外向きカリウムチャンネルを活性化するセカンドメッセンジャーとして働くという例が、複数の研究グループから報告されている (例えば、*J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, 29286; *New Phytol.*, **2013**, *198*, 1039)。クローニングした *Samanea* カリウムチャンネルにもそのホモログが含まれる。また、運動細胞に H_2O_2 を添加すると、JAG と同程度の細胞収縮が誘導された。

我々が構築した *Samanea* カリウムチャンネルの異種発現系において、クローニングされた 7 種のカリウムチャンネルを各々発現させて、活性酸素種 (H_2O_2) の添加によるチャンネル活性化を確認した。これらの実験により、細胞収縮のメインプレイヤーとして働くカリウムチャンネルを同定した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

S. Inomata, M. Ueda, T. Sugai, M. Shoji, Synthesis of methyl epi-anhydroquinone utilizing [2,3]-sigmatropic rearrangement of iodosoalkene. *ChemLett* 査読有 42,1273-1275(2013)

Y. Ikuta, Y. Koseki, T. Murakami, M. Ueda, H. Oikawa, H. Kasai. Fabrication of Pure nanodrugs of podophyllotoxin Dimer and their Anticancer Activity. *ChemLett* 査読有 42,900-901(2013)

S. Tamura, S. Inomata, M. Ebine, T. Genji, I. Iwakura, M. Mukai, M. Shoji, T. Sugai, M. Ueda. Triazolyl-phenyl linker system enhancing the aqueous solubility of a molecular probe and its efficiency in affinity labeling of a target protein for

jasmonate glucoside *Bioorg Med Chem Lett* 査読有 23 (188-193) 2013
DOI 10.1016/j.bmcl.2012.10.124

E. Suzuki, M. Ueda, S. Ohba, T. Sugai, M. Shoji Stereoselective Construction of cis-Decalin Framework via Radical Domino Cyclization, *Tetrahedron Lett.* 査読有 54 (1589-1592) 2013
DOI なし

H. Kasai, T. Murakami, Y. Ikuta, Y. Koseki, K. Baba, H. Oikawa, H. Nakanishi, M. Okada, M. Shoji, M. Ueda, H. Imahori, M. Hashida. Creation of Pure Nanodrugs and Their Anticancer Properties *Angew. Chem. Int. Ed.* 査読有 51 (10315-10318) DOI なし 2012

M. Ueda, Y. Manabe, Y. Otsuka, N. Kanzawa Cassia occidentalis MetE as a cytosolic target for potassium isolespedezate, a leaf-opening factor of Cassia plants: target exploration by compact molecular probe (CMP) strategy *Chem. Asian J.* 査読有 6 (3287-3297) 2011 DOI 10.1002/asia.201100392

M. Ueda, Y. Manabe, and M. Mukai The high-performance of 3XFLAG for target purification of bioactive metabolite: a tag combined with highly effective linker structure *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 査読有 21 (1359-1362) 2011
DOI 10.1016/j.bmcl.2011.01.038

Y. Nakamura, A. Mithöfer, E. Kombrink, W. Boland, S. Hamamoto, N. Uozumi, K. Tohma, M. Ueda 12-Hydroxyjasmonic Acid Glucoside is a CO11-JAZs Independent Activator of Leaf Closing Movement in *Samanea saman* *Plant Physiology* 査読有 155(1226-1236) 2011 DOI 10.1104/pp.110.168617

[学会発表](計 15 件)

上田 実 Chemistry and Biology of Plant Leaf-movement ナカニシシソボジウム (日本化学会第 94 春季年会(2014)) 2014 年 3 月 27 日名古屋

上田 実 植物の就眠ならびに捕虫運動の制御機構の化学的解明 (受賞講演 / 学会賞受賞) 植物化学調節学会第 48 回大会 2013

年 11 月 1 日 新潟

及川貴也、石丸泰寛、浜本 普、魚住信之、上田 実 就眠運動に関わるアメリカネムノキの K⁺ チャネルの解析 (ポスター)
植物化学調節学会第 48 回大会
2013 年 11 月 1 日 新潟

江越脩祐、田下 諒、山越博幸、どど孝介、石丸泰寛、源治尚久、袖岡幹子、上田 実 アルキン型コロナチンの合成と in vivo ラマンイメージング (ポスター)
植物化学調節学会第 48 回大会
2013 年 10 月 31 日 新潟

上田 実 Glycosylation Switching : 生物に学ぶ新しい化学的活性制御 第 24 回万有仙台シンポジウム 2013 年 6 月 15 日仙台

上田 実 "Glycosylation Switching" による天然物リガンドの活性制御 日本化学会第 93 春期年会特別企画 (招待講演)
2013 年 3 月 22 日 滋賀

上田 実 "Glycosylation Switching" : Glycosylation regulates mode-of-action of bioactive natural products
3rd International Symposium on Creation of Functional Materials-Life Science and Materials- (招待講演) 2012 年 12 月 11 日筑波

上田 実 配糖体型天然物リガンドのケミカルバイオロジーに見る活性制御の新戦略 後期 (秋期) 有機合成化学講習会 (招待講演) 2012 年 11 月 20 日 東京

上田 実 Chemical Biology of Naturally Occurring Glycosides: "Glycosylation Switching" The International Symposium on Chemical Biology of Natural Products (招待講演) 2012 年 10 月 31 日 京都

上田 実 配糖体型天然物リガンドのケミカルバイオロジーに見る活性制御の新戦略 生命医薬情報学連合大会 (招待講演) 2012 年 10 月 14 日 千葉

上田 実 天然物ケミカルバイオロジー : 配糖体リガンドの新しい機能 早稲田大学 FBT 生物学・化学・情報科学融合のための戦略的先進理工学研究基盤の形成 (招待講演)
2012 年 9 月 19 日 東京

上田 実 Chemical Biology of Glycoside Natural Products
Chemical Biology of Glycoside Natural

Products, The Second Asian Chemical Biology Conference (ACBC2) (招待講演)
2012 年 7 月 8 日 沖縄

上田 実 天然物ケミカルバイオロジー : 生物現象と天然物リガンド 名古屋大学 IGER グリーン自然科学レクチャー (招待講演) 2012 年 6 月 12 日 名古屋

上田 実 配糖体型天然物リガンドのケミカルバイオロジー 日本化学会第 92 春期年会 特別企画「天然物ケミカルバイオロジー」 2012 年 3 月 25 日 慶応義塾大学 横浜

上田 実 眠る植物と食虫植物の科学 不思議な生物現象の化学 日本化学会 市民公開講座 2012 年 3 月 25 日 横浜

〔図書〕(計 1 件)
Y. Ishimaru, S. Hamamoto, N. Uozumi, and M. Ueda A. Volkov eds. " Plant Electrophysiology Signaling and Responses " Springer-Verlag 2012 (125-142)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等 : 該当なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
上田 実 (Ueda Minoru)
東北大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号 : 60265931

(2) 研究分担者
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号：