

研究終了報告書

「植物の特化代謝物による新規の翻訳後修飾機構」

研究期間：2019年10月～2022年3月

研究者：相原 悠介

1. 研究のねらい

翻訳後修飾は、翻訳後のタンパク質の化学的な修飾によりその特性が変化する現象であり、すべての生命が備える基本的かつ重要な機能である。その重要性を裏付けるように、これまで知られる修飾分子はすべて一次代謝物(アミノ酸、糖、脂肪酸、リン酸など)である。では、生命維持に必ずしも必須でない、特定の生物種だけが持つ二次代謝物(特化代謝物)が、翻訳後修飾に働くことはないのだろうか？

イソチオシアネート(ITC)類はアブラナ目植物が豊富に産生する特化代謝物であり、前駆体であるグルコシノレートから代謝酵素ミロシナーゼにより産生される。天然に100種類以上存在し、 $-N=C=S$ 基の高い反応性によりタンパク質などの生体高分子に結合する(ITC修飾)。植物の防御物質として働くことが知られ、ヒトにとってはアブラナ目食品の辛味成分である(Ca^{2+} チャネルTRPA1に結合)。このようにITCの植物細胞「外」への効果は知られる一方、植物細胞の「内」での働きおよび標的タンパク質についてはほとんど解っていない。ミロシナーゼ遺伝子は孔辺細胞や根端、花粉といった部位に特異的に発現しており、これらは生体防御のためだけにあるとは考えにくい。もしITCが植物細胞内で何らかの標的タンパク質の機能を変化させるとすれば、それは新規な翻訳後修飾と言える。

申請者は、ある種のイソチオシアネートが比較的低濃度で植物に対して特異的な生理作用を持つことを見出した。この結果より、何らかの標的タンパク質のITC修飾を介してその生理機能が制御されると考えられる。本研究ではこの仮説の検証を足がかりに、①植物におけるITC修飾機構の実体解明と②その応用展開を目指した。

2. 研究成果

(1)概要

研究目標①「ITC修飾を介した植物生理機能の解明」

ITC修飾の標的タンパク質候補を複数取得することができた。ITCをベースとした分子プローブを作成してプルダウン精製を行ったところ、その標的候補因子として機能未知のキナーゼファミリーを見出した。このキナーゼの三重変異体植物を作出したところ、仮説を支持する表現型(特許準備中のため詳細割愛)が見られた。この他にも、新規かつ複数の標的候補タンパク質を再現性良く取得することに成功した。

また、遺伝学的解析により、植物の内生のITCの役割に対して新しい知見を得た。ITCを欠損した変異体として、グルコシノレートを産生できない既知の4重変異体およびミロシナーゼ2重変異体を調べたところ、環境刺激の有無にかかわらず当該生理機能が促進していることがわかった。従って、内生のITCが当該生理機能の「ブレーキ」として働いていることが示唆された。



研究目標②「植物の生理機能に作用する ITC 新薬の開発」

活性を大幅に増大したスーパーITCを開発した。まず、BITCの構造活性相関解析により、多数の改変 ITC で活性増大を確認し、標的への親和性を最適化する化学スペースの推定に成功した。最大で **66 倍の活性が増強したスーパーITC** については、類似の活性を持つ植物ホルモンに迫るものである。

このようにして創出したスーパーITC を用いて、花卉や野菜などの生理機能を改善する実用実証に成功した。スーパーITC の作用は BITC よりはるかに低濃度で有効であり、枯死などの副作用を抑え、長時間持続するなど、優位性を示すことができた。

以上のスーパーITC 創出の成果について、現在、国際誌への論文投稿と特許申請を準備している。また、スーパーITC の実用試験を、商社・農業企業との協働で開始している。

(2) 詳細

研究目標①「ITC 修飾を介した植物生理機能の解明」

ITC 標的キナーゼの候補

生理活性を保持した ITC の分子プローブを作成し、これにより植物細胞内で標識される 110kDa の標的候補が検出できた。ITC 修飾タンパク質のプルダウン精製を行ったところ、その標的候補として機能未知のキナーゼファミリーを見出した。これら遺伝子の**三重変異体植物**を CRISPR/Cas9 システムにより作出したところ、この変異体は葉やトライコーム(棘)の形態異常に加えて、申請者の着目する生理機能が環境刺激の有無にかかわらず促進するという表現型を示した。このことから、「この標的候補キナーゼに当該生理機能を抑制する働きがあり、BITC がそれを促進する」という作業仮説を立てた。現在、この変異体の生化学的解析と、当該キナーゼが BITC の標的であることの検証を進めている。

ITC 標的タンパク質の網羅的探索

上記のキナーゼ候補に加えて、ITC 標的タンパク質を網羅的に同定しそのはたらきを検証することも計画した。しかしながら、先行して開発した ITC プローブを用いたプルダウン法では精製収率が極端に低いことが問題となった。原因として「標的タンパク質の被修飾サイトが埋め込まれてプローブ認識抗体が結合しにくい」と想定されたので、より小型の新規 ITC プローブを開発した(論文公開前のため詳細は割愛)。これを用いてプルダウン精製したところ、**複数の標的候補タンパク質を再現性良く取得することに成功した**。現在、これら標的候補因子のうち ITC に関連する生理機能が推定されるものに関して多重変異体の作出を進めており、これらが BITC の生理的な標的であることの是非を明らかにすることを計画している。

ITC 欠損変異体の生理表現型

ミロシナーゼ遺伝子を完全に欠損した六重変異体の作出を行っていたが、新型コロナウイルス感染拡大に伴う研究活動制限により植物の継続的な継代が困難になり、中断を余儀なくされた。代替案としてグルコシノレートを生産できない既知の 4 重変異体(qKO)を取り寄せ、生理応答を解析した。その結果、環境刺激の有無にかかわらず当該生理機能が促進していることがわかった。従って、内生の ITC が当該生理機能の「ブレーキ」として働いている

ことが示唆された。

研究目標②「植物の生理機能に作用する ITC 新薬の開発」

BITC の骨格改変により数倍の活性をもつ類縁体を発見

関西学院大の村上慧准教授グループとの連携により、研究期間内で 50 種の ITC 分子を合成し、構造と生理活性の相関を解析した。その結果、連結位に関わりなく薬理活性が最大 4 倍強まで増強することを見出した。この他にも、多数の改変 ITC で活性増大を確認し、標的への親和性を最適化する化学スペースの推定に成功し、標的への親和性を最適化する化学スペースの推定に成功した。

スーパーITC の開発に成功

上述の構造活性相関の過程で、偶然の発想から、最大 66 倍の生理活性を有するスーパーITC を合成した(特許・論文公開前につき詳細は割愛)。このような飛躍的強化が見られたことは、当初想定しなかった発見である。また、この活性は類似の活性を持つ植物ホルモンに迫るものである。

スーパーITC による実用的生理作用を実証

スーパーITC を用いて、植物の生理活性を調節するための実用に適したプロトコルの開発を行った。種々の植物を検討した結果、**菊の切り花を用いて当該生理作用の亢進を実証**することに成功した。この観察法により、スーパーITC の以下の優位性を確かめた:

- ① BITC より低濃度(1/50)で作用
- ② 枯死など BITC での副作用が軽減
- ③ BITC や比較対象となる植物ホルモンより効果が持続

さらにこれらの利点を基に、スーパーITC の長時間における生理作用を、**ハクサイを用いて実証**した。以上のスーパーITC 創出の成果について、現在、国際誌への論文投稿と特許申請を行っている。また、スーパーITC の実用試験を、商社・農業企業との協働で開始している。

3. 今後の展開

研究目標①②ともに独自の研究技術を整備でき、機能解析の対象となる標的遺伝子の網羅的な取得に成功した。続く1年で研究を加速し、その後の新分野開拓と実用展開へと繋げる。

研究目標①「ITC 修飾を介した植物生理機能の解明」

これまで取得した ITC 修飾の標的候補因子について、標的であることの是非に決着をつけ、植物における機能を明らかにする(～2022年)。加えて、ITC 修飾標的の網羅的な取得と機能解析をさらに進める。新規 ITC プローブの分子構造をさらに改良し修飾タンパク質の精製効率を高め、上述の標的候補以外にも ITC 修飾標的を探索する(～2023年)。

「特化代謝物による翻訳後修飾」という新概念を拡張する。ITC の他にも、高い反応性を有する植物代謝物が多い。例えばナツシロギクに含まれるセスキテルペンであるパルテノリドが、ITC



とは異なる作用機序により同様の生理作用を発揮するという予備的結果を得ている。これらが植物自身のタンパク質を修飾することで機能を変化させる例を探索する(2022~25年)。特化代謝物の代謝酵素に着目した遺伝学解析に加えて、プローブ作成やプルダウン精製のノウハウを活用することで、研究グループとして独自の強みを展開していきたい。

研究目標②「植物の生理機能に作用する ITC 新薬の開発」

社会実装に向けた活動をすぐにも開始する。研究成果の項目で述べたように、すでに商社・農業企業との協働を開始しており、社会実装に必要な課題の整理は進められている。これまでスーパーITC の開発とその実用についての基礎を固めることができたことから、直近の特許申請と論文出版を2021年度内に行う。その成果を以って、名古屋大学の知財部門を通じ、企業への周知と共同研究促進を活発化させる(~2023年)。

企業への働きかけと並行して、基礎研究としてスーパーITC のさらなる改良を行う。具体的には、目標①の展開で ITC の修飾標的との結合様式を明らかにし、分子構造シミュレーションから ITC の基本骨格の最適化を行うことで、活性と特異性の飛躍的向上を目指す(~2024年)。将来的に、植物の特化代謝物を改変して応用するという、植物薬理学における新分野の開拓となる。以上の改良を経た次世代スーパーITC により、簡便かつ効果的な植物活性調節剤の社会実装を実現する(~2026年)。

4. 自己評価

目標到達状況

研究目標①「ITC 修飾を介した植物生理機能の解明」については、ITC 修飾タンパク質の「同定」および「機能解明」について未だ検証の途上である。しかしながら、ITC 修飾タンパク質の精製法を確立でき、それにより複数の候補タンパク質の取得にも成功し、一部の候補タンパク質の遺伝学的な機能解析も進められたことから、目標達成のための基礎段階をクリアすることはできたと考えている。

研究目標②「植物の生理機能に作用する ITC 新薬の開発」については、スーパーITC の活性増強および応用実証のいずれも想定以上の成果を達成した。

研究の進め方

研究遂行にあたっては、研究支援員との協働で生化学・生理学・遺伝学解析およびケミカルスクリーニングの手法を効率的に確立できた。新型コロナウイルスの感染拡大に伴い一年近くに渡って研究制限を受け、植物の遺伝学解析については大幅な遅延を余儀無くされたが、総合的には ITC 標的探索およびスーパーITC の開発でカバーすることができた。

共同研究体制については、ITC プローブをはじめとする新規 ITC の合成を関西学院大の村上慧准教授グループとの連携にて行い、村上准教授との親密な協力関係を築くことに成功した。今後も継続してスーパーITC を改良していくのみならず、ITC に限らない新しい生命活性分子の創出に向けて共同研究を発展できると考えている。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果



研究成果の項目で述べたように、スーパーITC の植物活性調節剤としての利用について商社・農業企業との協働を開始することができた。研究期間を通じて特許としての新規性を十分に確保できたため、今後の 1~2 年で社会実装を本格化させる準備を整えることができた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:1件(特許公開前のもも含む)

特許情報公開前のため詳細は割愛する

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

○相原悠介, 藤茂雄, 戸田陽介, 井上心平, 佐藤綾人, 村上慧, 伊丹健一郎, 木下俊則, 氣孔開口を制御する小分子の作用点解析と分子改良, 日本植物生理学会第 62 回年会, 2021 年 3 月, オンライン開催