

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」

研究期間：2019年10月～2022年3月

研究者：相原 悠介

加速フェーズ期間：2022年4月～2023年3月

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。加速フェーズでは、①ITC修飾の標的候補因子の更なる探索と、その機能解明に向けた解析を行った。また、②で開発したスーパーITCの社会実装に向けて、効果の特異性および長期毒性の検証を行った。

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生産できない既知の 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。

加速フェーズでは、ITC プローブの分子改良を行い、より広範な標的候補タンパク質の取得を試みた。その結果、新たに複数の標的候補キナーゼファミリーを再現性良く取得することに成功した。また、これまで着目していた標的候補因子ファミリーの一つで 3 重変異体入手して表現型を解析したところ、ITC による生理表現型が緩和することがわかった。

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。

(加速フェーズ実施後修正・追記) 以上のスーパーITC 創出の成果について、国際誌に論文投稿し、ピアレビューを経て、追加実験を含めた改訂を行なった。具体的には、スーパーITC の効果の特異性および長期毒性の検証を行い、将来の実用に支障のない性質を示すことを確認した。また、本発明に関する特許申請を行い、発明概要を公開して国内 13 社の商社・農業企業と実用化に向けた企業面談を行なった。その中で、当初想定した以上の多様なケースで植物活性制御剤としての要望を得ることができ、これらに対しての実用化試験を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 標的候補: ストリゴラクトン・カリキン受容体ファミリー (加速フェーズ実施後追記)

後述する新規 ITC プローブを用いたプルダウン精製により、当初想定していなかった標的候補として、ある植物ホルモンの受容体ファミリーが取得された。これら受容体ファミリーの 3 重変異体を入手して表現型を解析したところ、ITC による生理表現型が緩和することがわかった。これにより、ITC の植物作用について、気孔開口制御に留まらない多面的な機能があることが示唆された。

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。

(加速フェーズ実施後追記)プルダウン精製の手法に以下の改良を加えた。まず、より広範な標的を認識できるように ITC プローブの分子改良を行なった。加えて、精製ステップにおいて、ビーズ消化後の陽イオンカラム分画を行うことにした。これら改良を経たプルダウン精製により、複数の新規標的候補キナーゼファミリーを再現性良く取得することができた。

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なっていたが、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 ABA 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。

(加速フェーズ実施後追記) スーパーITCの特異性、長期毒性を検証した。天然ITCに暴露された植物で大規模なトランスクリプトームの変動が見られるという知見から、スーパーITCに暴露したシロイヌナズナのトランスクリプトーム変動を解析した。その結果、元の天然ITCに比べてスーパーITCでは顕著にトランスクリプトーム変動が抑制されていることが明らかとなった(図 8)。したがって、スーパーITCは副作用的な遺伝子発現変動を抑えながら気孔開口を特異的に制御できることが示唆された。また、無傷植物へのスーパーITCの処理で長期間(10日)の状態・成長に影響が見られないことを確認した。

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)。(加速フェーズ実施後追記)ITCプローブの改良開発により、新規標的候補をさらに複集取得することができた。その中でも複数の新規キナーゼファミリーを重要候補と見なし、これらを中心にITCによる結合の是非や遺伝学的解析を進めることで、生理的標的を確実に同定したい。また、研究期間終盤、ITC標的候補の多面性から、標的への作用特異性を最適化する「テイラーメイドITC」の着想に至った。この研究構想で2022年10月からのJSTさきがけ『植物分子』に採択された。今後は特化代謝物による翻

訳後修飾のより広範な機能解明に向けて研究を展開していきたい。

「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)。分子構造シミュレーションは名古屋大学 ITbM の藤本和宏准教授との協力関係をすでに構築している。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)。(加速フェーズ実施後追記)加速フェーズにおいて行なった企業面談から、当初想定した用法のみならず、多様なケースで植物活性調節剤としての要望を得ることができた。これらに対しての実用化試験を協働で開始している。

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。(加速フェーズ実施後追記)以上の研究成果について論文投稿を行い、ピアレビューと改訂を経て、一流誌への掲載に手が届くところまで来ている。

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。(加速フェーズ実施後追記)引き続き、村上准教授との緊密な協力体制のもと、新規 ITC 分子の設計・合成・試験のサイクルを加速させている。

また、ACT-X『生命と化学』を通じての研究ネットワークの構築も加速フェーズにてさらに進んだ。班員コミュニティ内の定期的なオンライン勉強会の世話人の 1 人となり、また、JST の他の研究領域の研究者も巻き込んだ研究交流企画を主導している。このような姿勢は、今後も学際交流や異分野共同研究の立ち上げに積極的に活かしていきたい。

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。(加速フェーズ実施後追記)名古屋大学の知財部門と効率的に連携し、BITC およびスーパーITC に関して特許出願を済ませて複数のパートナー企業への技術公開および共同研究に移行している。

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

特許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

○相原 悠介, 前田 文平, 後藤 栞奈, 藤 茂雄, 叶 文秀, 戸田 陽介, 村上 慧, 佐藤 綾人, 伊丹 健一郎, 木下 俊則, イソチオシアネートを基盤とした植物の乾燥耐性付与剤の発見と改良, 日本植物学会第 86 回年会, 2022 年 9 月, 京都

