

研究終了報告書

「高温ストレスによる発芽阻害メカニズムの解明」

研究期間：2021 年 10 月～2024 年 3 月

研究者：竹内 純

1. 研究のねらい

地球温暖化が進む現在、高温ストレスによる発芽阻害は作物生産性を左右する深刻な問題となっている。例えば、ホウレンソウやキャベツ、シロイヌナズナでは 30℃以上になると極端に発芽率が低下する。この要因は主に、高温ストレスを受けた植物ではアブシシン酸(ABA)内生量が増加し、これによって二次休眠が誘導されるためだと考えられてきた。しかし、研究代表者らが ABA 受容体(PYL)の結晶構造に基づいて創出した PYL アンタゴニスト(受容体阻害剤)は、高温ストレス下(32 °C)においてシロイヌナズナ種子の発芽率を回復させることなく、高温発芽阻害を緩和しなかった。一方で、人工ストリゴラクトン(SL)である *rac*-GR24 を処理した種子では発芽率が顕著に回復した。*rac*-GR24 はブテノライド環の付け根 2'位の不斉炭素の立体配置が天然型(2'*R*)である GR24^{5DS}と非天然型(2'*S*)である GR24^{ent-5DS}のラセミ体であり、GR24^{5DS}が SL 受容体(D14)を、GR24^{ent-5DS}がカリキン受容体(KAI2)をそれぞれ活性化し、GR24^{ent-5DS}のみが高温発芽阻害を緩和することが報告されていた。これらの知見から、「高温ストレスによる発芽阻害は ABA 応答の増強ではなく、主に KAI2 シグナル伝達の抑制によって引き起こされるのではないか？」という「問い」が浮上した。

KAI2 は、山火事などで植物が燃焼した際の煙に含まれる発芽誘導物質カリキンと結合するタンパク質として同定されたが、未だ植物における内生リガンドは発見されていないオーファン受容体である。一方で、KAI2 の標的タンパク質およびシグナル伝達機構に関してはその概要が明らかになっている。KAI2 はカリキン(または GR24^{ent-5DS})と結合後、F-box タンパク質である MAX2(MORE AXILLARY GROWTH2)および転写抑制因子である SMAX1(SUPPRESSOR OF MAX2_1)と複合体を形成し、SMAX1 をプロテアソーム分解へと導くことで下流のシグナル伝達を活性化して種子発芽を促進する。従って、高温ストレスを受けた植物では KAI2 を活性化する内生リガンド KLa(KAI2 Ligand as agonist)の生合成が抑制される、または KAI2 を不活性化する内生リガンド KLaN(KAI2 Ligand as antagonist)の生合成が促進されるのではないかと推測した。この仮説を証明するために、本研究では、KLa または KLaN の同定を第一目的として、それらと高温発芽阻害との関係を明らかにすることを目指した。

2. 研究成果

(1)概要

研究開始当初は、KAI2 依存的に高温発芽阻害を緩和するカリキンの構造的特徴に着目し、loliolide や dihydroactinidiolide といった植物内生の二員環性のブテノライド化合物が KAI2 内生リガンドではないかと予測していた。しかし、合成した両化合物はいずれも KAI2 アゴニストまたはアンタゴニストとしての生物活性を示さなかった。さらに研究を進めていく中で、カリキン自体も KAI2 と結合しないことが判明した。そこで KAI2 リガンドの構造要求性を解明し、その情報から内生リガンドの構造を推測する戦略に転換した。KAI2 のパラログである D14 は SL を加水

分解し、切断されたブテノライド環の加水分解物と触媒三つ組残基との間で共有結合中間体を形成することでシグナル伝達を活性化することから、KAI2 シグナル伝達においてもリガンドの加水分解が鍵因子となっている可能性が高いと考えた。そこで、KAI2 の選択的アゴニストとして報告されていた desmethyl-germinone-A (dMGer) をリード化合物として、dMGer の 2-フラン環をシクロペンテン環に置換することで加水分解されない構造とした 1'-carba-dMGer と、フェノールエーテル結合を炭素-炭素結合に置換することで、加水分解されたとしても 2-フラン環が脱離しない構造とした 6'-carba-dMGer を設計・合成した。両化合物を光学分割して KAI2 アゴニスト活性を評価したところ、(+)-1'-carba-dMGer と(+)-6'-carba-dMGer はいずれも *in vitro* で KAI2 と結合した。しかし、生物活性試験においては両化合物とも殆どアゴニスト活性を示さず、酵母 Two-hybrid assay においても KAI2 と SMAX1 との相互作用を誘導しなかった。また X 線結晶構造解析により、(+)-6'-carba-dMGer は加水分解されずインタクトの状態に KAI2 の触媒ポケットに結合していることが分かった。以上の結果から、KAI2 の活性化には、リガンドが受容体に結合するだけでは不十分であり、ブテノライド環部分の加水分解が重要な役割を担っていることが強く示唆された。これは D14 のリガンド構造要求性と非常に類似していた。これらの知見から、KAI2 の植物内生リガンドも SL と同様に、ブテノライド環が被加水分解・解離可能な結合で連結した構造を有している可能性が高いと考えている。

(2) 詳細

研究テーマ A

「二員環性ブテノライド化合物の合成と KAI2 アゴニスト/アンタゴニスト活性の検証」

KAI2 の外生リガンドであるカリキンとの構造類似性に基づき、発芽阻害活性が報告されていたブテノライド化合物、loliolide および dihydroactinidiolide (dhA) を K_Lan 候補物質として選抜した。既報 (JOC 2006, 71, 9513) に従って両化合物を合成した後、キラル HPLC を用いて光学分割し、天然型の(-)-loliolide と(-)-dhA およびそれらのエナンチオマーを準備した。大腸菌発現系により KAI2 を発現・精製し、合成した(+)-/(-)-loliolide および(+)-/(-)-dhA の KAI2 結合活性を dYLG assay および示差走査蛍光定量法 (DSF) により評価した。dYLG assay は、KAI2 によって加水分解されると蛍光を発する profluorescent probe (dYLG) を基質として用い、試験化合物を共処理した際の蛍光強度の減少を指標に化合物の KAI2 結合活性を評価する試験方法である。(+)-/(-)-Loliolide を共処理した際には蛍光強度の減少が見られなかった一方、(+)-/(-)-dhA では濃度依存的な蛍光強度の減少が確認され、KAI2 と結合することが示唆された (図 1)。また、50%阻害濃度 (IC₅₀ 値) で比較すると、天然型である(-)-dhA の方が非天然型である(+)-dhA よりも強い KAI2 結合活性を示した。さらに、タンパク質が化合物と結合した際の熱安定性の変化 (ΔT_m) を指標として、標的タンパク質に対する低分子リガンドの結合活性を評価する DSF においても、KAI2 の人工リガンドである GR24^{ent-5DS} と同様に、(-)-dhA は KAI2 の T_m 値を低温側にシフトさせた。しかし、シロイヌナズナ胚軸伸長試験において(-)-dhA は、KAI2 アゴニスト様の伸長阻害活性を示さず、また GR24^{ent-5DS} による伸長阻害を抑制することもなかった。発芽試験においても、(-)-dhA は高温ストレスによる発芽阻害を緩和することなく、また GR24^{ent-5DS} による高温発芽阻害の緩和を殆ど抑制しなかった。以上の結果から、(-)-dhA が植物内生の KAI2 アゴニストまたはアンタゴニストとして機能している可能性は極めて低いと結論づけた。そこで、カリキン (KAR₁ および KAR₂) の KAI2 結合能を改めて評価するために、両

化合物を合成して上記 *in vitro* 試験に供したところ、KAR₁ と KAR₂ はいずれも KAI2 とは殆ど結合しないことが判明した。これらは研究開始当初の想定とは大きく異なる結果であったため、研究戦略を変更することにした。

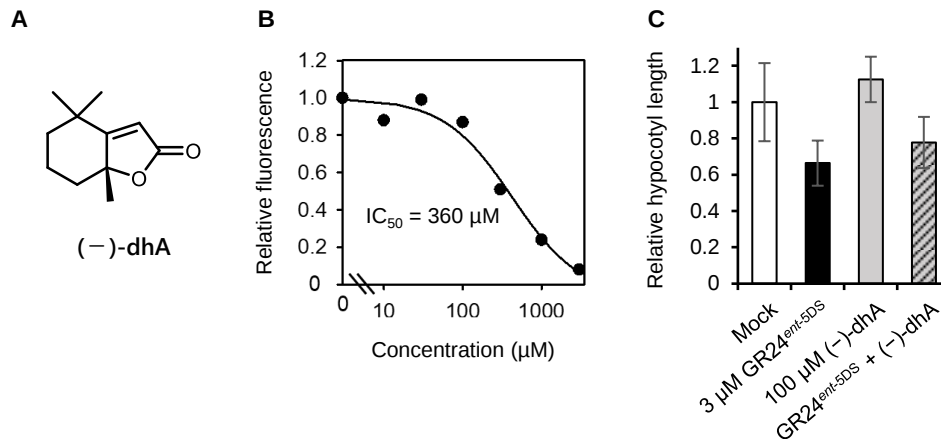


図1 (-)-dhAの構造とKAI2アゴニスト/アンタゴニスト活性評価 (A) (-)-dhAの構造式. (B) *In vitro* dYLG assayによるKAI2結合活性の評価. (C) シロイヌナズナ胚軸伸長試験を用いたKAI2アゴニスト/アンタゴニスト活性の評価

研究テーマ B

「KAI2 シグナル伝達を活性化するリガンドの構造要求性の解明」

上記研究 A により、カリキンとの構造類似性を指標に KAI2 内生リガンドを発見することは難しいと判断して、まず KAI2 リガンドの構造要求性を解明し、その情報から内生リガンドの構造を推測する戦略に転換した。KAI2 は SL 受容体 D14 のパラログであり、触媒三つ組残基 (Ser-His-Asp) を含めたリガンド結合ポケットの構造は両者の間でよく類似している。D14 は SL のブテノライド環 (D 環) を加水分解して、その加水分解物と触媒三つ組残基 (His247) との間で共有結合を形成することで活性化し、下流のシグナル伝達を誘導する。KAI2 も D14 と同様の機構で活性化すると考えられているが、シグナル伝達におけるリガンド被加水分解および、その後の共有結合形成の要否に関する実験的証拠は無い。そこで研究テーマ B では、KAI2 シグナル伝達におけるリガンドの構造要求性の解明を目的に、ブテノライド環部分を構造改変した KAI2 リガンドを設計した。

KAI2 の強力かつ選択的アゴニストとして報告されていた desmethyl-germinone-A (dMGer; BBRC 2023, 649, 110) をリード化合物として、dMGer の 2-フラノン環をシクロペンテンン環に置換することで加水分解されない構造とした 1'-carba-dMGer と、フェノールエーテル結合を炭素-炭素結合に置換することで、加水分解されたとしても 2-フラノン環が解離しない構造とした 6'-carba-dMGer を合成した (図 2; 日本農薬学会 第 48 回大会)。(+) - 1'-Carba-dMGer と (+) - 6'-carba-dMGer はいずれも *in vitro* で KAI2 と結合して、KAI2 の熱安定性を低下させた。しかし、(+) - dMGer と異なり両化合物は高温ストレスによるシロイヌナズナ種子発芽阻害を緩和せず、赤色光下での胚軸伸長阻害活性も (+) - dMGer と比較して非常に弱かった。酵母 Two-hybrid assay においても、(+) - dMGer は KAI2 とパートナータンパク質である SMAX1 との相互作用を誘導した一方、(+) - carba-dMGers はいずれも KAI2-SMAX1 間相互作用を誘導しなかった。また X 線結晶構造解析により、(+) - 6'-carba-dMGer は加水分解されることなくインタクトの状態で

KAI2 の触媒ポケットに結合していることが分かった。以上の結果から、KAI2 シグナル伝達の活性化にはリガンドが受容体に結合するだけでは不十分であり、ブテノライド環部分の加水分解が重要な役割を担っていることが強く示唆された。従って、内生リガンドも KAI2 によって加水分解・切断されるブテノライド環を有している可能性が高いと考えている。

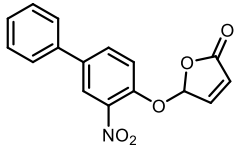
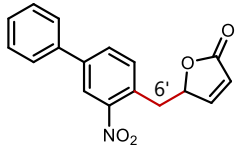
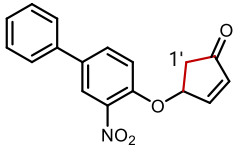
			
	dMGer	6'-carba-dMGer	1'-carba-dMGer
被加水分解	○	○	×
ブテノライド環の解離	○	×	×
KAI2結合活性	○	○	○
KAI2-SMAX1相互作用の誘導	○	×	×
生物活性	○	×	×

図2 dMGerアナログの化学的特徴とin vitroおよびin vivo試験におけるKAI2アゴニスト活性の概要

3. 今後の展開

これまでの研究により、KAI2 アゴニスト(KLa)として機能するには、ブテノライド環(D 環)が KAI2 によって加水分解・切断可能な結合(例えば、エノールエーテル結合やフェノールエーテル結合)によって連結した構造を有することが重要であると分かってきた。この知見に基づいて、KAI2 内生リガンドの探索を進めたところ、非典型 SL の一つであるカーラクトン酸メチルが KAI2 と *in vitro* で結合することを見出した。また、本研究を実施したことで新たな問いも浮上した。その一つは、カリキン(KAR₁およびKAR₂)の“真”の標的タンパク質は何か?である。カリキンの受容体としては、2012 年に KAI2 が報告されているが、本研究で KAR₁ 及び KAR₂ を合成して *in vitro* 試験に供したところ、KAI2 とは結合しないことが判明した。一方で、*kai2* 欠損体では KAR₁ および KAR₂ による高温発芽阻害の緩和(発芽率の回復)が見られなくなることから、カリキンの生理活性に KAI2 が関与していることは間違いない。これらの知見から、カリキンの作用機構として次の 3 つを想定している。①植物体内で KAI2 アゴニストへと代謝された後に KAI2 を活性化する、②KLa の生合成を促進、または代謝を阻害することで KLa の内生量を増加させて KAI2 を活性化する、③KAI2 の標的タンパク質である MAX2 または SMAX1 と結合し、これらの安定性を変化させることで SMAX1 の分解を促進する。植物生理学・遺伝学・バイオインフォマティクスを専門とする研究者と連携してこれらの仮説を検証し、カリキン標的タンパク質の同定→作用機構の解明研究を展開したい(凡そ 5 年計画)。カリキンは高温ストレスによる発芽阻害を低濃度で緩和する一方、SL と比較して溶液中での安定性が高く、また根寄生植物の発芽を誘導しないことから、標的タンパク質と作用機構を解明することができれば、カリキンをリード化合物とした環境ストレス耐性付与技術の創出に繋がる可能性がある。

4. 自己評価

カリキンが KAI2 に結合しないという研究開始当初は全く想定しなかった結果に直面しながらも、研究戦略を転換することで KAI2 リガンドの構造要求性を検証し、内生リガンドの構造に関する新たな洞察を得た。故に、予期せぬ結果に陥った際の修正力は高く評価できる。一方で、当初計画に沿って研究を実施した約 1 年間の時間的ロスもあり、研究期間内に KAI2 の内生リガンドを同定することは出来ておらず、研究目的の達成状況としては不十分と言わざるを得ない。独自のアイデアからなる作業仮説においても、日々の実験によって得られた結果と照らし合わせて常に冷静に比較検証していれば、もっと早い段階で研究戦略を見直すことが出来た可能性があるため、この点については今後の研究に活かしていく必要がある。また、本研究課題で学会発表(5 件)は行っているものの、原著論文としての発表が無いのは力不足である。現在、carba-dMGers の仕事(研究テーマ B)に関しては論文投稿中あり、その後、KAI2 阻害剤の創出に関するものを合わせて計 2 報を 2 年以内に発表出来そうな状況であり、今後に期待したい。研究を進めていく中で新たな問いも見出しており、ACT-X 研究を通じて独自の研究領域を確立するという目的は概ね達成できたと考えている。

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

研究期間全出願件数:0 件(特許公開前のものも含む)

(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)

1. KAI2 シグナル伝達におけるリガンド加水分解の重要性(2023), 櫛原立冬, 福井康祐, 轟 泰司, 竹内 純, 日本農薬学会第 48 回大会, 東京
2. KAI2 のリガンド構造要求性に基づいた阻害剤の分子設計(2023), 竹上克樹, 櫛原立冬, 轟 泰司, 竹内 純, 日本農芸化学会 中部・関西支部合同大会, 三重
3. KAI2 シグナル伝達を活性化するリガンドの構造要求性(2023), 櫛原立冬, 竹上克樹, 中村彰彦, 瀬戸義哉, 岡部聖真, 加藤優佑, 轟 泰司, 竹内 純, 植物化学調節学会第 58 回大会, 神奈川
4. カラクトン酸メチルは *in vitro* および *in vivo* で KAI2 を活性化する(2023), 田中恒平, 轟 泰司, 竹内 純, 植物化学調節学会第 58 回大会, 神奈川
5. *In vitro* および *in vivo* で KAI2 を阻害する β -プロピオラクトン化合物の創出(2023), 竹上克樹, 道羅英夫, 轟 泰司, 竹内 純, 植物化学調節学会第 58 回大会, 神奈川