



名古屋大学
NAGOYA UNIVERSITY



関西学院大学
KWANSEI GAKUIN UNIVERSITY

配布先: 文部科学記者会、科学記者会、名古屋教育記者会、大阪科学・大学記者クラブ

報道の解禁日(日本時間)

(テレビ, ラジオ, インターネット) : 2024 年 10 月 23 日(水) 18 時

(新聞) : 2024 年 10 月 24 日(木) 付朝刊

2024 年 10 月 23 日

報道機関 各位

植物の気孔を減らす化合物の合成に成功 ～気孔発生司令因子の機能を妨害する化合物の発見～

【本研究のポイント】

- ・気孔数を減らす低分子化合物を発見
- ・気孔関連変異体の解析や、生化学的解析により、化合物の標的タンパク質を同定
- ・計算化学、生化学により化合物が結合する標的タンパク質のアミノ酸部位を特定

【研究概要】

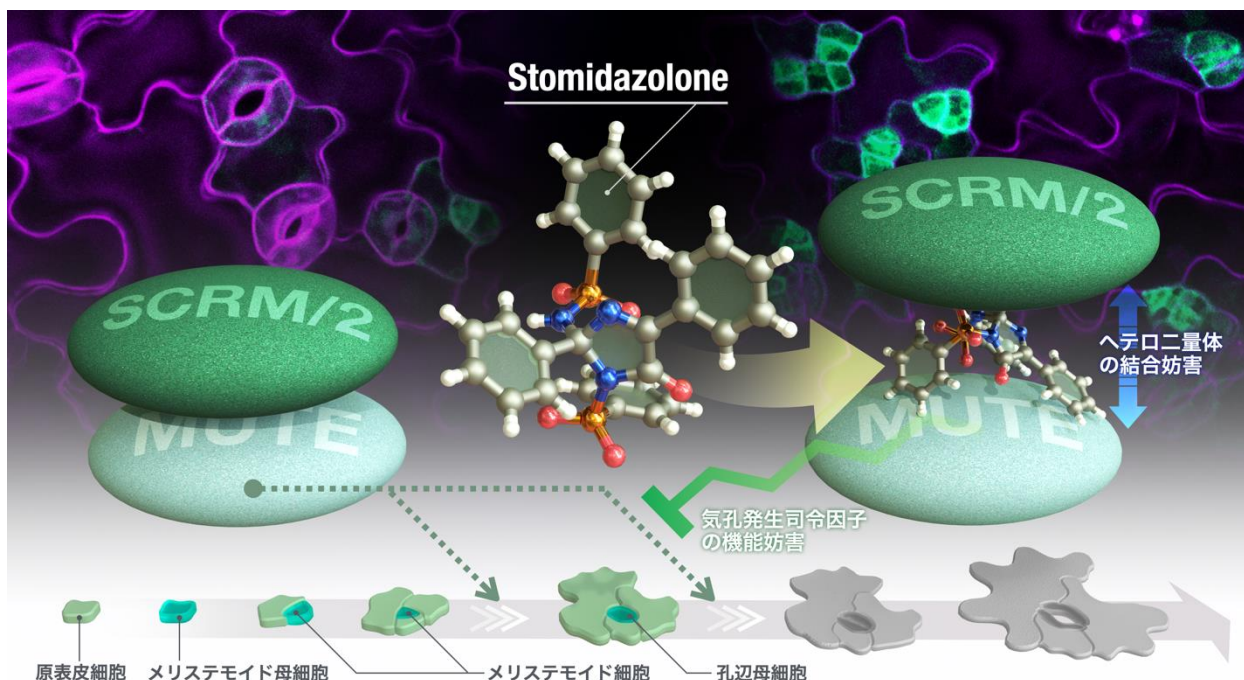
名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所(WPI-ITbM)*の中川 彩美 研究員、鳥居 啓子 主任研究者/客員教授(米国テキサス大学オースティン校 教授)、理学研究科のシュー・ジャン・イップ博士後期課程学生、村上 慧 特任准教授(現 関西学院大学)、スンキ・ハン特任助教(現 韓国 亜洲大学校)らの研究グループは、植物の気孔を減らす低分子化合物を新たに発見し、その作用機序を解明しました。

気孔は植物の葉などの表皮に存在する孔(あな)で、酸素や二酸化炭素などのガス交換や水分調節に使われています。気孔の機能は水分調節や環境応答であるので、気孔の数を調節する低分子化合物があれば、基礎研究だけでなく農業への応用も期待されます。しかしながら、気孔の数やパターンを制御する低分子化合物の報告例は少なく、そのメカニズムも不明でした。

本研究では、イミダゾロン骨格を持つ化合物(Stomidazolone)が顕著に気孔数を減らすことを発見し、生化学的解析により、この分子が気孔の発生に重要なタンパク質の MUTE-SCRM のヘテロ二量体の結合を妨害していることを明らかにしました。気孔をつくる司令因子は、ヒトの幹細胞や神経の分化の司令因子と類似していますが、植物の司令因子だけに特徴的な領域の ACT ドメインに Stomidazolone が作用することで、植物の転写因子の機能阻害が生じ、気孔数が減ることが明らかになりました。さらに、計算化学と生化学的実験により、この分子と結合している MUTE タンパク質のアミノ酸残基を同定し、タンパク質構造設計を用いて Stomidazolone 耐性をもつ植物体の作出にも成功しました。

今後は、農作物に Stomidazolone を投与し、乾燥地や干ばつ時での植物の乾燥耐性を高めるなど、応用開発研究、農業への可能性が期待されます。

本研究成果は、2024 年 10 月 23 日 18 時(日本時間)付英国の科学雑誌『Nature Communications』に掲載されます。



【研究背景と内容】

本研究の始まりは、世界に先駆けて発見した分子合成法です。研究グループは、気孔数を調節する分子の発見を目指して、さまざまな化合物の合成に取り組みました。その結果、市販のオキサゾールを原料としてわずか1工程で、三次元骨格をもつイミダゾロン化合物 (AYSJ929, Stomidazolone) を与える新規合成法の確立に成功しました(図1)。AYSJ929 は過去に報告例のない構造を有しており、その性質に興味をもたれました。野生型のシロイヌナズナに AYSJ929 を投与したところ、気孔数が減少し、気孔幹細胞(以下、メリステモイド)^{注1)}が増えるという表現型を示すことを発見しました(図2、左パネル)。そこで、研究グループは AYSJ929 を Stomidazolone と名付けました。さらに、メリステモイドマーカー植物^{注2)}の解析により、Stomidazolone を投与するとメリステモイドが増えていることを確認しました(図2、右パネル)。このことから、この化合物は気孔の発生過程を途中で止めているのではないかと考え、さまざまな気孔関連の変異体の表現型を調べました。

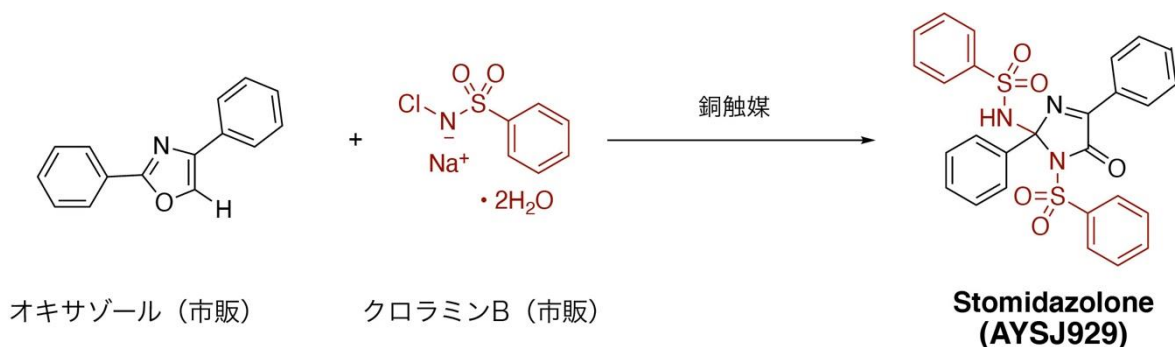
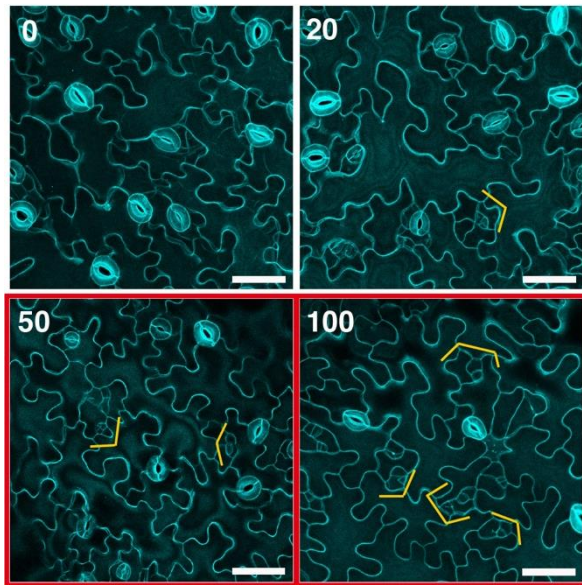


図1

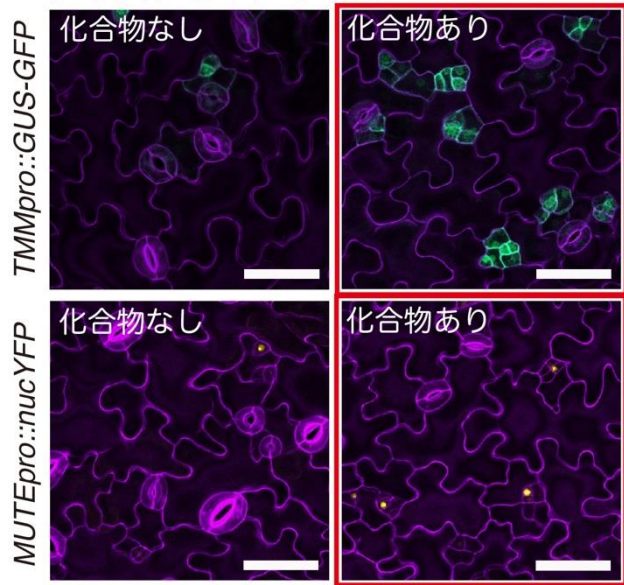
AYSJ929 (Stomidazolone)の合成スキーム。

Stomidazoloneを添加した野生型
(左上の数字は濃度 (μM) を示す)



化合物を添加すると気孔が減少する！

メリステモイドマーカー



化合物を添加すると
メリステモイドが増
加する！

図2

左パネル 野生型植物に Stomidazolone (0, 20, 50, 100 μM)添加した時の気孔表現型。50, 100 μM 添加するとメリステモイド(気孔の幹細胞)が多く見られる。黄色く囲った細胞が、分裂の止まったメリステモイドを示す。

右パネル メリステモイドマーカーである TMMp::GUS-GFP と MUTEpro::nucYFP に Stomidazolone を添加した時の表現型。Stomidazolone を添加した方が GFP/YFP シグナル(メリステモイド)が多く見られる。

気孔の発生には、SPCH, MUTE, FAMA という3つの bHLH 転写因子が SCRM という bHLH 転写因子とヘテロ二量体を形成し、発生段階特異的に機能することが知られています。細胞分裂の過程で、この3つの bHLH 転写因子の SPCH、MUTE、FAMA が順に作用することで孔辺細胞への分化・分裂が厳密に制御されています。(図3、上パネル)。Stomidazolone の作用するメカニズムを調べるため、まず、*spch*, *mute*, *fama* 変異体にそれぞれこの化合物を投与しました。その結果、*spch* 変異体、*mute* 変異体に化合物を投与しても変化がありませんでしたが、*fama* 変異体では、メリステモイドが増加していることが分かりました(図3、下パネル)。このことから、Stomidazolone は MUTE の機能する段階で気孔発生を阻害することが予想されました。

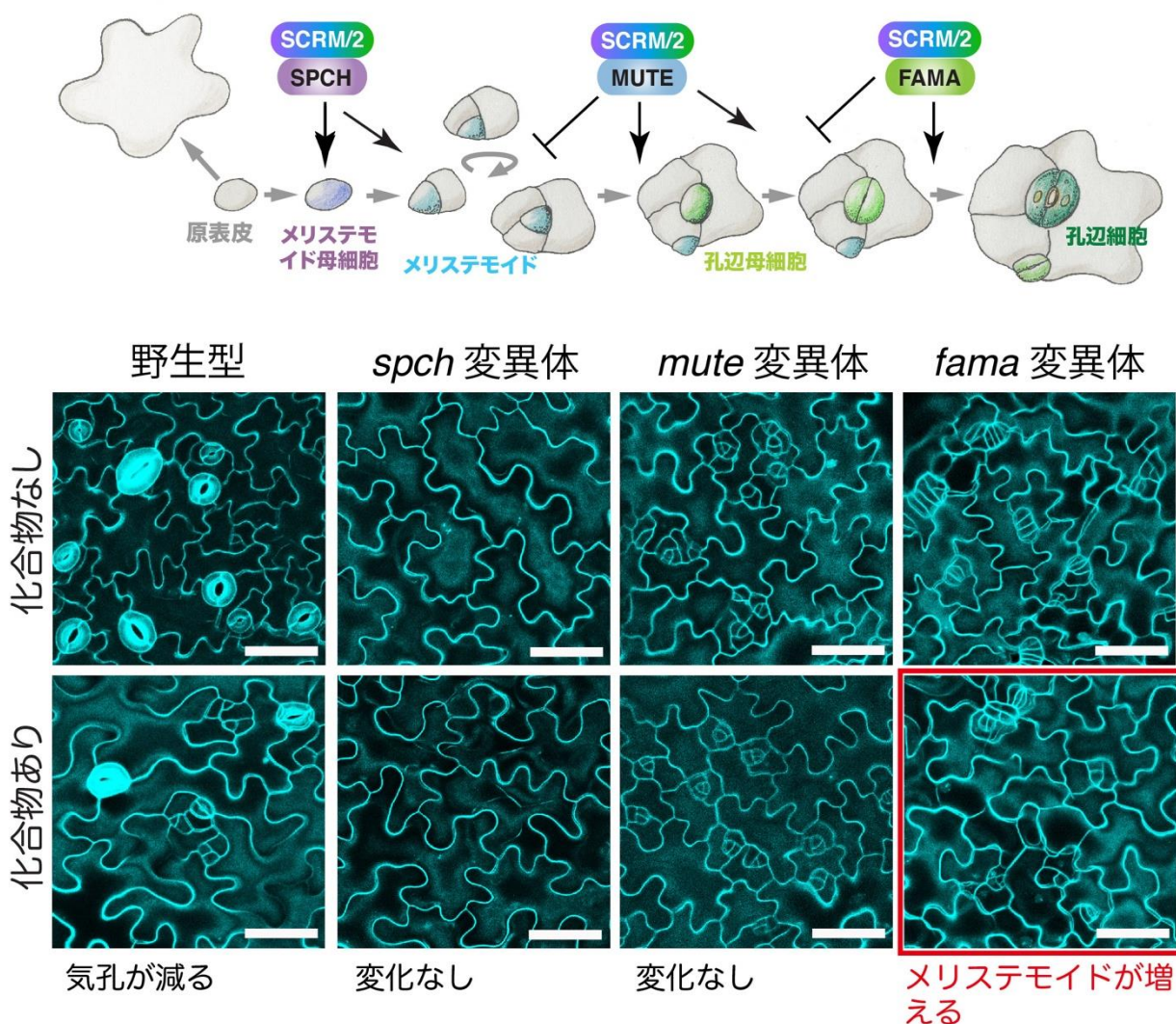


図3

上パネル 気孔発生の細胞分化のモデル図と、それぞれの分化過程に関わる bHLH 型転写因子。

下パネル 野生型、*spch* 変異体、*mute* 変異体、*fama* 変異体に Stomidazolone を添加した時の表現型。

次に研究グループは、Stomidazolone の MUTE-SCRM との相互作用をさらに調べるために、rBiFC 法を用いた生化学的解析を行いました。rBiFC 法は、相互作用が予想される2つのタンパク質にそれぞれ YFP(蛍光タンパク質)の N 末端半分と YFP の C 末端半分を連結して発現させ、2つのタンパク質が結合すると YFP の光シグナルが検出されるという仕組みです。タバコの葉に SPCH-SCRM、MUTE-SCRM、FAMA-SCRM を発現させたところ、これらのタンパク質は相互作用するので YFP シグナルが観察されました(図4、上パネル)。ところが Stomidazolone を投与し、同様に相互作用を調べたところ、図4下パネルのように、MUTE-SCRM ヘテロ二量体ではシグナルがみられず、Stomidazolone は MUTE-SCRM ヘテロ二量体の結合を特異的に妨害することが分

かりました。

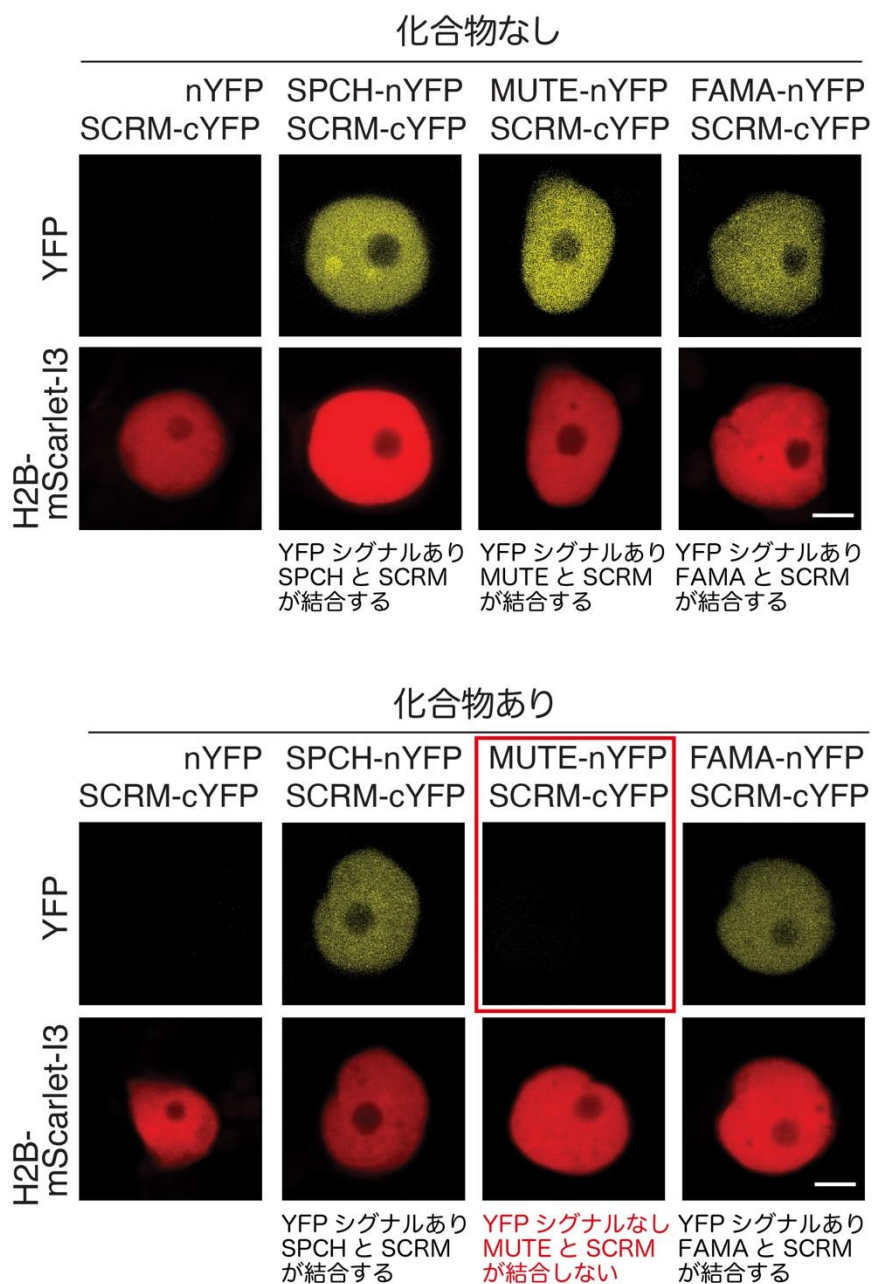


図4

rBiFC による SCRM と SPCH, MUTE, FAMA との相互作用解析。

上パネル 化合物なしでは、SPCH, MUTE, FAMA-nYFP と SCRM-cYFP が近傍にあり YFP を発現する。コントロールとして導入した H3-mScarlet-I3 も発現する。

下パネル Stomidazolone 添加時では、SPCH, FAMA-nYFP と SCRM-cYFP が近傍にあり YFP を発現するが、MUTE-nYFP と SCRM-cYFP が近傍になく YFP シグナルが検出されない。

さらに、計算化学的手法により、Stomidazalone と結合している MUTE タンパク質のアミノ酸残基を予想しました。Stomidazalone は MUTE タンパク質の C 末端にある ACT ドメイン上の、162 番目のグルタミン酸(E162)、163 番目のグルタミン酸(E163)、133 番目のアルギニン(R133)、134 番目のアルギニン(R134)に結合すると予測しました(図 5、上パネル)。そこでこの分子モデルを検証するため、in vitro で MUTE タンパク質と Stomidazalone との結合を調べました。その結果、E162 と E163 をそれぞれアラニンに置換した変異型 MUTE と R133 と R134 をそれぞれアラニンに置換した変異型 MUTE では、野生型と比較してその結合が弱まっており、さらに E162, E163, R133, R134 の4つのアミノ酸残基をアラニン置換した変異型 MUTE では、結合がほとんどみられなくなることが分かりました(図 5、下パネル)。つまり、これら 4 つのアミノ酸残基が、Stomidazalone との結合に重要であることが強く示唆されました(図 5)。

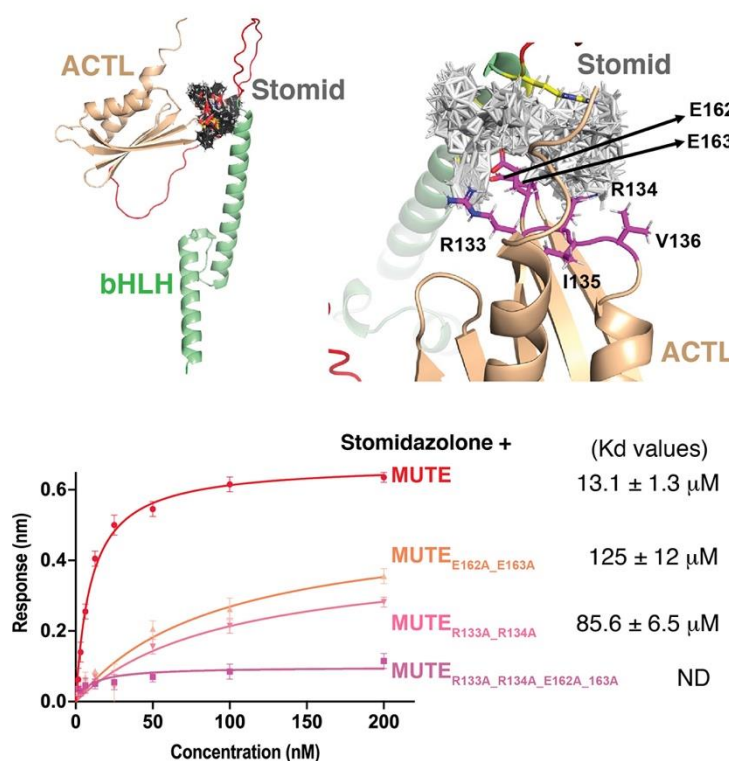


図5

左上パネル Stomidazalone-MUTE の結合モデル。

右上パネル 拡大した Stomidazalone-MUTE 結合モデル。結合推定部位 E162, E163, R133, R134 をピンクで示す。

下パネル MUTE と Stomidazalone との相互作用を示す BLI 解析。変異型 MUTE では結合が弱まる。

これらのアミノ酸変異の効果を、植物体でも観察しました。*mute* 変異体に野生型 MUTE-GFP を発現させた植物、*mute* 変異体に変異型 MUTE_{E162A_E163A}-GFP を発現させた植物、*mute* 変異体に変異型 MUTE_{R133A_R134A}-GFP を発現させた植物の 3 種類を作製し、Stomidazalone を投与し気孔数を観察しました。野生型 MUTE-GFP を発

現させた植物では、気孔数が減り、メリステモイドの増加がみられました。一方、2種類の変異型 MUTE-GFP を発現させた植物では、気孔数は化合物添加により変化せず、Stomidazolone 耐性を示しました。以上の結果から、MUTE の E162, E163, R133, R134 のアミノ酸残基が Stomidazolone との結合と活性発現に重要であることが明らかになりました。

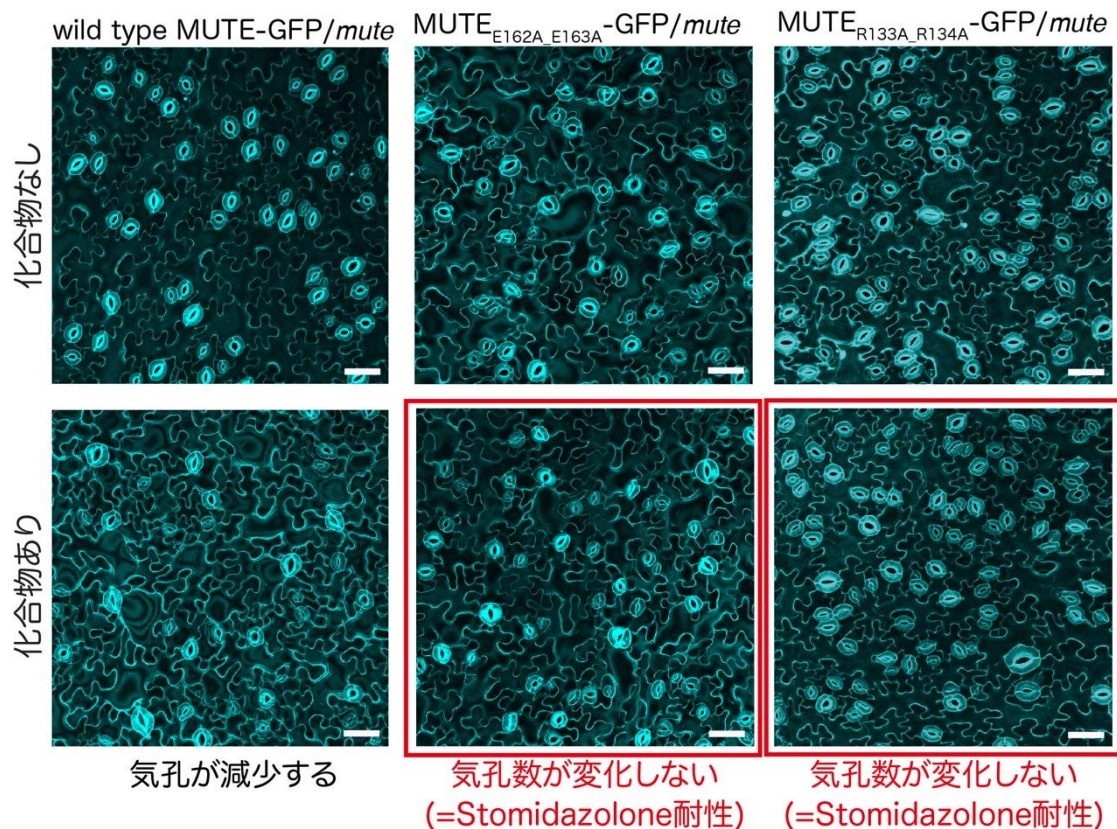


図6

mute 変異体に野生型および変異型 MUTE-GFP を発現させた植物の Stomidazolone 添加時の表現型。変異型 MUTE-GFP 植物は Stomidazolone に耐性を示す。

【成果の意義】

今回、研究グループは、イミダゾロン骨格を持つ化合物の Stomidazolone が顕著に気孔数を減らすことを発見しました。生化学的解析から、Stomidazolone は気孔をつくる司令因子の MUTE の ACT ドメインに結合し、MUTE とそのパートナー因子の SCREAM のヘテロ二量体の形成を妨害していることを見出しました。気孔をつくる司令因子は、ヒトの幹細胞や神経の分化の司令因子と類似していますが、植物の司令因子だけに特徴的な領域の ACT ドメインに Stomidazolone が作用することで、植物の転写因子の機能阻害が生じ、気孔数が減ることが明らかになりました。さらに、計算化学を利用し、Stomidazolone と結合しない MUTE タンパク質を設計し、Stomidazolone 薬剤耐性を持つ植物体の創出にも成功しました。

本研究成果は、低分子化合物による植物の転写因子の機能阻害の新たな作用機序を明らかにするとともに、薬剤による気孔数を自在にコントロールすることが可能となり、乾燥

地での農作物の栽培にも役立つなどの応用研究が期待されます。

【付記】

本研究は、科研費(JP16H01237, JP17H06476, JP19H00990)、名古屋大学高等研究院 Young Leaders Cultivation プログラム、JST さきがけ(JPMJPR20D8)、日本学術振興会 JST CREST 多細胞(JPMJCR1924)、ITbM アワード、戸部眞紀財団、立松財団の支援のもとで行われたものです。

【用語説明】

注1) 気孔幹細胞:

気孔を作る孔辺細胞の元となる細胞のことで、メリステモイドと呼ばれる。図 3 上図にあるように、孔辺細胞の最初にメリステモイドが作られる。

注2) メリステモイドマーカー植物:

メリステモイドで強く発現する遺伝子のプロモーターに GFP や YFP のような蛍光タンパク質で連結させ、メリステモイドであることを簡単に見分けることができる植物。この論文では、*TMM* 遺伝子プロモーターに GUS-GFP を繋いだ *TMMpro::GUS-GFP* と、*MUTE* 遺伝子プロモーターに核移行型 YFP を繋いだ *MUTEpro::nucYFP* を用いた。

【論文情報】

雑誌名: Nature Communications

論文タイトル: Chemical inhibition of stomatal differentiation by perturbation of the master-regulatory bHLH heterodimer via an ACT-Like domain

著者: Ayami Nakagawa*, Krishna Mohan Sepuru*, Shu Jan Yip*, Hyemin Seo, Calvin M. Coffin, Kota Hashimoto, Zixuan Li, Yasutomo Segawa, Rie Iwasaki, Hiroe Kato, Daisuke Kurihara, Yusuke Aihara, Stephanie Kim, Toshinori Kinoshita, Kenichiro Itami, Soon-Ki Han, Kei Murakami⁺, and Keiko U. Torii⁺ *共筆頭著者 ⁺責任著者

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53214-4>

※【WPI-ITbM について】(<http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp>)

名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所(WPI-ITbM)は、2012年に文部科学省の世界トップレベル研究拠点プログラム(WPI)の1つとして採択されました。

WPI-ITbM では、精緻にデザインされた機能をもつ分子(化合物)を用いて、これまで明らかにされていなかった生命機能の解明を目指すと共に、化学者と生物学者が隣り合わせになって融合研究をおこなうミックス・ラボ、ミックス・オフィスで化学と生物学の融合領域研究を展開しています。「ミックス」をキーワードに、人々の思考、生活、行動を劇的に変えるトランスフォーマティブ分子の発見と開発をおこない、社会が直面する環境問題、食料問題、医療技術の発展といったさまざまな課題に取り組んでいます。これまで 10 年間の

取り組みが高く評価され、世界トップレベルの極めて高い研究水準と優れた研究環境にある研究拠点「WPI アカデミー」のメンバーに認定されました。