

形態変化を指標にした青色光受容体阻害化合物の同定

栗原 (大窪) 恵美子¹, 朽名 夏磨², 栗原 志夫¹, 松井 南¹

1 理化学研究所 環境資源科学研究センター

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

2 エルピクセル株式会社

〒100-0004 東京都千代田区大手町 1-6-1 大手町ビル 6F

Emiko Okubo-Kurihara¹, Natsumaro Kutsuna², Yukio Kurihara, Minami Matsui¹

Identification of cryptochrome inhibitor using phenotype-based chemical genetics

Key words: chemical biology, cryptochrome, image quantify, phenotype-based screening, photomorphogenesis

1 Center for Sustainable Resource Science, RIKEN,

Tsurumi-Ku, Yokohama, 230-0045 Japan

2 LPixel Inc., Chiyoda-Ku, Tokyo, 100-0004 Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10b2.00155

1 はじめに

植物個体の形態を指標としたケミカルスクリーニングにより青色光受容体の阻害剤を同定した例を紹介する。特に原著論文(Ong et al. 2017)では触れなかった形態の抽出, 数値化, 可視化方法について解説する。

2 ケミカルジェネティクスにおけるスクリーニング

ケミカルジェネティクスとは目的の生体反応を引き起こす生理活性物質や分子プローブとなるような化合物を選抜し, それを道具として利用することにより, 複雑な生命現象の解明をめざす方法である。ケミカルジェネティクスの利点として, 低分子化合物の添加, 除去, 処理濃度などを自在に変えることで, 迅速な反応のオン/オフができることやゲノムが解明されていない生物種にも処理することができること, 遺伝学的な制限(致死性あるいは冗長性)を補うことができるといったことが挙げられる(Toth et al. 2009)。ケミカルスクリーニングでいかに効率よく適切な候補を得られるかが, 実験の成功を決める鍵の1つである。しかし, 短期間において数千~数百万程度の化合物の反応の中から候補の選抜(ハイスループットスクリーニング)を行うとなると, アッセイのミニチュア化や簡易化, 自動化など効率的なアッセイ系を樹立するとともに, 測定したデータについて定量的に評価する必要が生じる。

ケミカルスクリーニングの方法は大きく2つに分けられる。1つ目はターゲットベーススクリーニングである。ターゲットベーススクリーニングは、特定のターゲット分子がすでに決定しているため、化合物の結合の強さなどの解析から始める解析アプローチである。もう1つは細胞、組織、個体レベルにおいて特定の表現型を指標にした顕微鏡やデジタルカメラ画像からのスクリーニングを行うフェノタイプベーススクリーニングである。新薬開発分野においては1999年～2008年において、ターゲットベーススクリーニングより、フェノタイプベーススクリーニングのほうが画期的な化合物のヒット率が高いという報告もあり(Swinney and Anthony 2011)、改めて有力な方法として認識され、注目されている。フェノタイプベーススクリーニングは統計的な処理を考慮しても数十～数百細胞といった小規模からの解析が可能でかつ非破壊で行うことができる。さらに、画像からは形態、局在、膜透過性、細胞毒性など多くの情報を取り出すことができる(Futamura et al. 2017)。また、想定した標的分子詳細な作用機構が不明であってもよく、偏りが無いアプローチともいえよう。植物分野の研究においてもフェノタイプベースのスクリーニングにより植物ホルモン、細胞壁、膜交通や導管要素、気孔形成関連など実に多くの低分子が同定されている(Dejonghe and Russinova 2017)。一方、フェノタイプベーススクリーニングは表現型として評価可能なアウトプットを見出すことが前提であり、時間や効率を含む安定的なアッセイ系の樹立に工夫を要する。また、ターゲットを決定していないため、すなわち最終ステップとして、ターゲット同定をしなければならず、ここで困難に直面することも多い。どちらもの長所と短所を理解して、選択する必要がある。本総説ではフェノタイプベーススクリーニングに焦点を当て、処理したシロイヌナズナを青色光非感受性にできる化合物を選抜するとともに、それがクリプトクロムの阻害剤であることを同定した。実際の実験の流れとともに画像の利用を紹介する。

3 光形態形成を指標とした青色光受容体阻害剤の単離

3-1 青色光と光形態形成

植物にとって光は光合成によるエネルギー源であるだけでなく、環境の情報を感知するための情報源としても重要な役割を担っている(Jiao et al. 2007)。植物は光波長に応じて異なる光受容体を通して光を感知するが、その光の波長、強さなどに適応して、種子の発芽や胚軸の生長、気孔の発達や開閉、光周期、花芽形成など様々な発生、生長過程が制御されている(Galva and Fankhauser 2015, Kami et al. 2010)。この光によって誘導される形態変化を伴う一連の応答を光形態形成という(Kendrick and Kronenberg 1994)。通常、暗所では発芽後、光を求めて胚軸の伸長が起こる。一方で、光条件下では植物の胚軸の伸長は抑制され、子葉の拡大やエチオプラストから葉緑体への変換が促進される(Wang et al. 2014)。光を受容できない変異体などでは、暗条件で育成した野生株のように形態は胚軸が長くなり、子葉が小さくなる。光の中でも、青色光は脱黄化、花芽形成、避陰反応など農業で重要な数多くの生長・発達の過程を制御している。青色光の情報伝達機構が解明されれば、青色光形態形成の制御だけでなく、農業への応用にも貢献するツールになると期待できる。

3-2 形態変化を指標にした青色光受容阻害剤の単離

植物は青色光を受容すると伸長が抑制される。もし、青色光の受容が阻害されるならば、この伸長抑制が起こらなくなるはずである。統計的処理が可能であり、なるべく個体同士が重ならない画像を取得するために、シロイヌナズナの種子を5-7個に限定してウェルに播種した後、種々の低分子化合物を添加し、青色光下で3日間培養した。画像は蛍光顕微鏡に電動ステージを取り付け作製した自動撮影顕微鏡を用いて取得し、9枚の画像をタイリング（画像連結）することにより、ウェル全体が写るように調整した。ウェル全体の顕微鏡画像を撮影することにより、胚軸の1細胞の形態を抽出することができるだけでなく、発芽率の算出や化合物の効果などを統計的に測定することができる。画像撮影結果の一例を図1に示す。エルピクセル株式会社により開発された画像解析プログラムによって、スクリーニング結果の定量解析をおこなった。画像処理により元画像から測定に不要であるウェル領域を消去し、植物個体全体、胚軸・根、子葉、種子の候補領域を抽出した（図2）。抽出した各画像データにおいて面積や周長、複雑度や異形度など22種の定量値を計測した。さらに形態について把握しやすくするために、コントロールの値の平均値、標準偏差をもとに、それぞれの形態に対しての偏差値を計算し、平均値を50とした場合、それぞれのデータがどのような位置にあるかを求めた。今回は胚軸面積と子葉面積の2種のパラメータについて偏差値を用いて、結果を散布図に示した（図3）。1次スクリーニングにおいて、候補となるのは、青色光に非感受に特徴的な形態（平均より胚軸が長く、子葉が小さい）を示す図3の左上領域にプロットされることが期待される。2次スクリーニングでは1次スクリーニングで選抜した候補の中から、青色光にのみ非感受性を示し、他の単色光の赤、遠赤色光には感受性となる化合物に候補を絞り込んだ。その結果、低濃度で青色光にのみ影響する化合物として3B7N（3-bromo-7-nitroindazole）を同定した(Ong et al. 2017)。

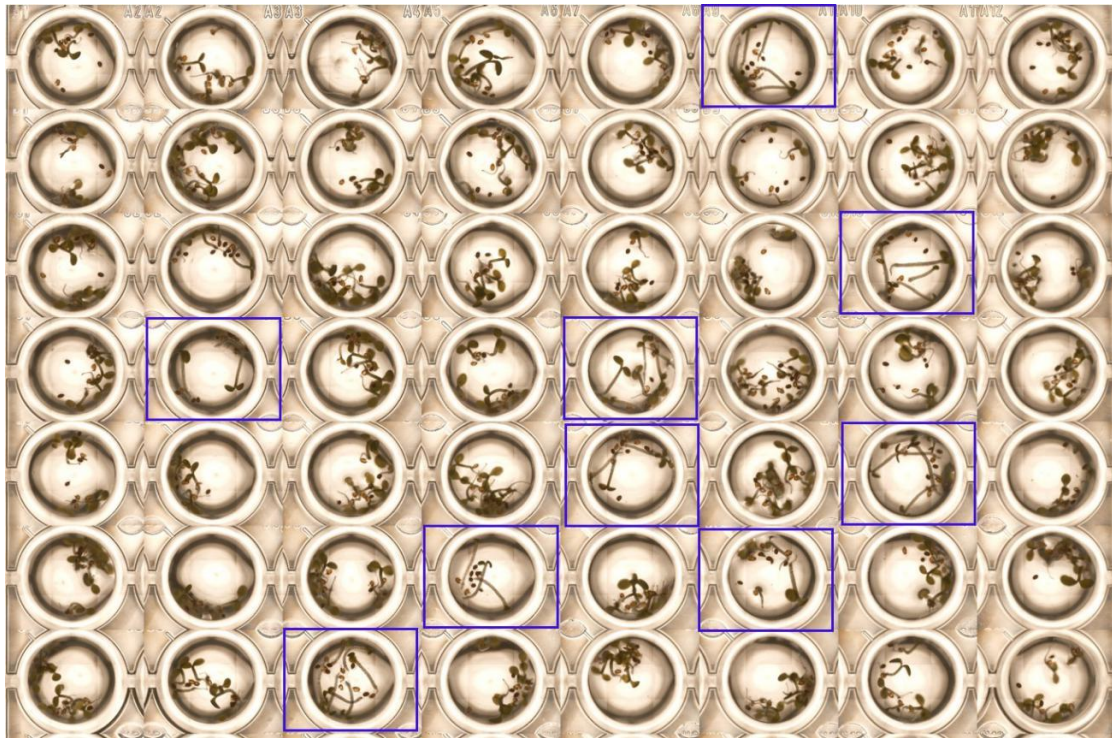


図1 自動撮影顕微鏡による画像撮影例. 左1列がコントロールの植物個体. 青色の枠線で囲んだウェル内の個体では胚軸が伸長している.

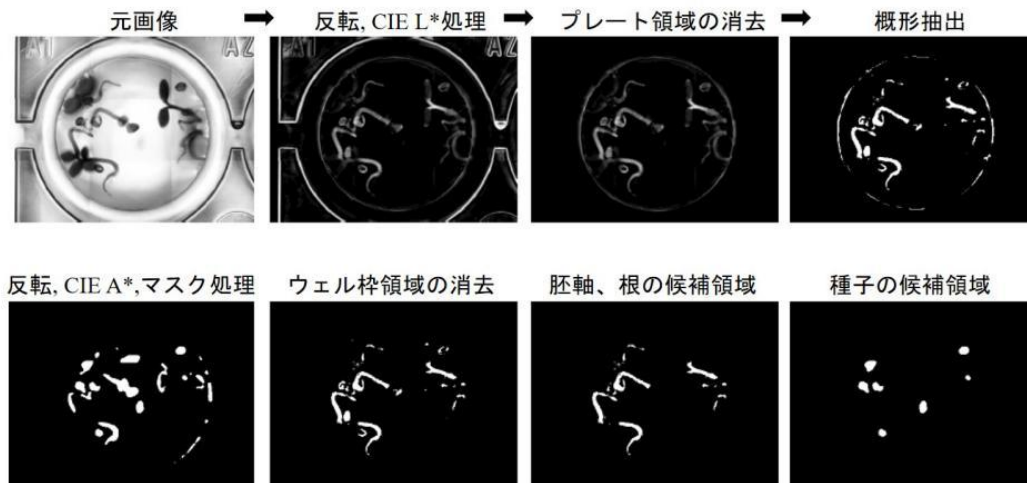


図2 画像処理による植物の特定領域の抽出の概略図.

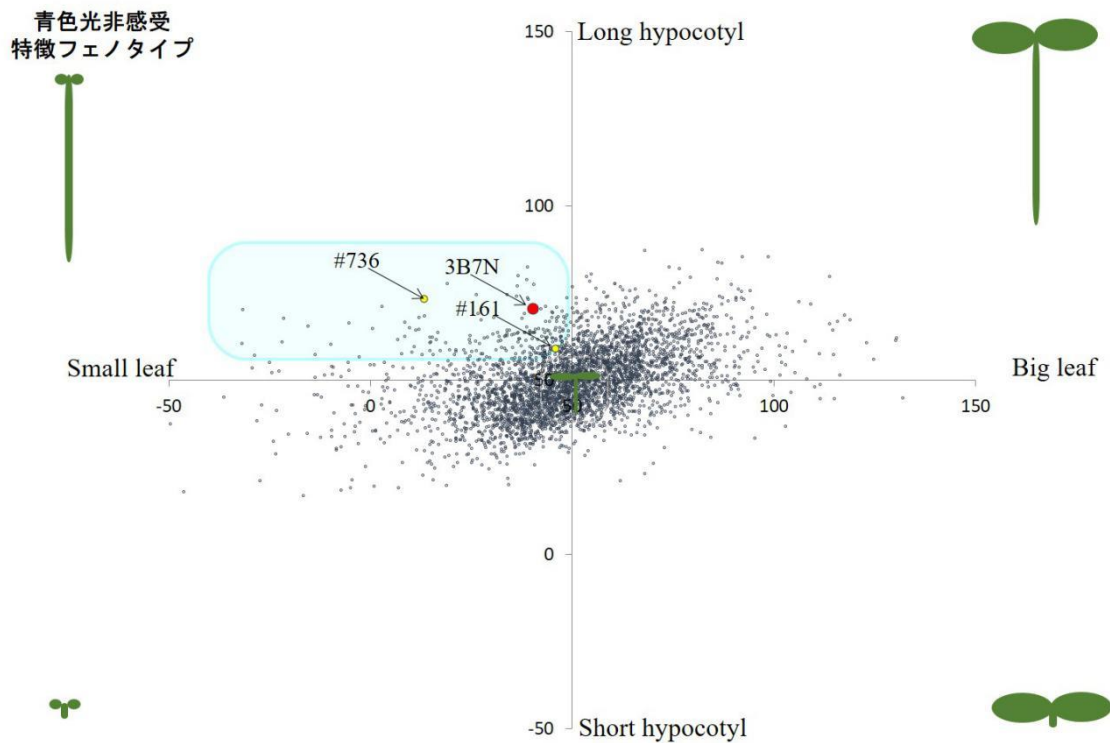


図3 画像定量値による散布図. 左上領域に胚軸が長く、子葉の小さい青色光非感受に特徴的な形態を示すものがプロットされる. 値はそれぞれ偏差値として示す. 3B7N, #161, #736 は目視においても顕著に差異を認めるものであった.

4 青色光受容阻害剤 3B7N の機能解析, ターゲット同定まで

まず、化合物の機能を示すのに必要な構造を明らかにするために、化合物の側鎖の位置や構造を変化させることで化合物の構造と形態変化との関連（活性相関）を明らかにし、作用を引き起こすのに重要な構造を決定した。次に、3B7Nによる胚軸伸長に光受容体由来する光シグナル伝達系が関わっているかどうかを明らかにするために、様々な光受容体変異体に3B7Nを添加し、評価を行った。その結果、青色光受容体クリプトクロムの変異体である *cry1*, *cry1cry2* でのみ3B7Nを添加しても青色光下で野生型と比較してさらなる胚軸伸長は見られなかった。また、光シグナル下流の *HY5* 遺伝子の変異体 *hy5* に3B7Nを添加するとさらに伸長を起こすことから3B7Nは青色光受容体であるクリプトクロムを介した光シグナル経路に影響を及ぼしていることが推測された。

また、青色光下で3B7Nを添加し、野生株と *cry1cry2* 変異体を生育させ、マイクロアレイ解析を行った。主成分分析の結果、3B7Nを処理した野生型と3B7Nを処理した *cry1cry2* 変異体ともに非常に近い遺伝子発現傾向を示したことから3B7Nの作用へのクリプトクロムの関与が示唆された。つまり、クリプトクロムが3B7Nの直接のターゲットであると推測された。

3B7Nの直接のターゲットがクリプトクロムであることを証明するために、3B7Nを結合させたアガロースビーズとクリプトクロムの1つであるCRY1タンパク質との結合実験を行った。その結果、3B7NはCRY1と直接結合することが明らかになった (Ong et al. 2017)。また最近、他の研究グループによる報告では3B7NがCRYのATP結合サイトに入り込むことにより機能を阻害していることが明らかにされた (Orth et al. 2017)。

5 青色光受容体クリプトクロム (CRY) と 3B7N

クリプトクロム (CRY) は植物において青色光の受容体である (Ahmad and Cashmore 1993)。青色光下において活性化されると脱黄化、避陰反応 (Van Gelder et al. 2003)、開花時期 (Guo et al. 1998, El-Din El-Assal et al. 2001)、気孔形成や開閉 (Mao et al. 2005, Kang et al. 2009) など色々な光形態形成を制御している。CRYは二量体を形成し機能する (Sang et al. 2005)。シロイヌナズナにはCRY1、CRY2、CRY3の3つのCRY遺伝子が存在する。その中でも主に形態形成に関わる青色光受容体として機能するのがCRY1、CRY2の2つである (Ahmad and Cashmore 1993, Guo et al. 1998, El-Din El-Assal et al. 2001)。CRY1とCRY2の配列は似ているが、これらは、共通の役割とそれぞれ別の役割があり、主にCRY1は芽生えの伸長抑制に、CRY2は開花時期の制御に関わっている。クリプトクロムがどのようにしてこのような分けられた反応を起こすのかについては不明な点も多い。この受容体の作用を制御することができれば、これら種々の反応の制御が可能になり、基礎的にも応用的にも重要に道具となると期待できる。

6. おわりに

ここではフェノタイプベーススクリーニングによる一例を示した。この例のようにスクリーニングの成功のためには、まずハイスループットなアッセイ系の確立が必須といえるだろう。植物の場合、顕微鏡画像には収まりきらないような個体の大きさも問題となり、RIPPS (RIKEN Integrated Plant Phenotyping System) のようなよりマクロな撮影装置の構築が有用となるかもしれない (Fujita et al. 2018)。さらに、スクリーニングの結果、目的の化合物が同定できたとしても、その分子レベルでの作用点 (ターゲット) の同定に至るにはさまざまな困難が立ちはだかると考えられる。3B7Nとクリプトクロムの関係のように多様な科学的アプローチから如何にターゲット候補を絞り込んでいくかが成功への鍵となるだろう。

ケミカルジェネティックスのアプローチは、シロイヌナズナのようなゲノム情報が豊富なモデル植物だけではなく、ゲノム情報の乏しい作物にも適応することが可能である。また、致死性あるいは冗長性といった遺伝学的な制限を打破することも可能で、これまでずっと不明であったABAのレセプターとしてPYR/PYLファミリーが同定されABAシグナル経路の研究がめざましく前進したように (Park et al. 2009, Ma et al. 2009)、大きなブレークスルーを生み出せるアプローチ法である。以上のように、ケミカルジェネティックスには新たな事象を明らかにできる可能性が秘められている。

謝辞

本稿で紹介した研究は、日本学術振興会・科学研究費補助金（挑戦的萌芽研究 25560421 ケミカルフェノミクスによる植物のサイズを制御する低分子化合物の探索）による支援を受けて行ったものである。

引用文献

- Ahmad, M. & Cashmore, AR. 1993. Hy4 gene of *A.thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366: 162-166
- Dejonghe, W. & Russinova, E. 2017. Plant Chemical Genetics: From Phenotype-Based Screens to Synthetic Biology. *Plant Physiol.* 174: 5-20
- El-Din El-assel, S., Alonso-Blanco, C., Peeters, AJ., Raz, V. & Koornneef, M. 2001. A QTL for flowering time in Arabidopsis reveals a novel allele of CRY2. *Nat Genet.* 29: 435-440
- Fujita, M., Tanabata, T., Urano, K., Kikuchi, S. & Shinozaki, K. 2018. RIPPS: A plant phenotyping system for quantitative evaluation of growth under controlled environmental stress conditions. *Plant Cell Physiol.* 59: 2030-2038
- Futamura, Y., Yamamoto, K. & Osada, H. 2017. Phenotypic screening meets natural products in drug discovery. *Biosci Biotechnol Biochem.* 81: 28-31
- Galvao, V. C. & Fankhauser, C. 2015. Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps. *Curr. Opin. Neurobiol.* 34: 46-53
- Guo, H., Yang, H., Mockler, TC. & Lin, C. 1998. Regulation of flowering time by Arabidopsis photoreceptors. *Science.* 379: 1360-1363
- Kan, CY., Lian, HL., Wang, FF., Huang, JR. & Yang, HQ. 2009. Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in Arabidopsis. 21: 2624-2641
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P. & Fankhauser, C. 2010. Light-regulated plant growth and development. *Curr Top Dev Biol.* 91:29-66.
- Kendrick, R. E. & Kronenberg, G. H. M. (1994). *Photomorphogenesis in Plants*, 2nd ed. K. A. (Publishers, ed.), Kluwer, Dordrecht.
- Jiao, Y., Lau, O. S. & Deng, X. W. 2007. Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet.* 8: 217-230
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A. & Grill, E. 2009. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. 324: 1064-1068
- Mao, J., Zhang, YC., Sang, Y., Li, QH. & Yang, HQ. 2005. A role for *Arabidopsis* cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 12270-12275
- Ong, WD., Okubo-Kurihara, E., Kurihara, Y., Shimada, S., Makita, Y., Kawashima, M., Honda, K., Kondoh, Y., Watanabe, N., Osada, H., Cutler, SR., Sudesh, K. & Matsui, M. 2017. Chemical-induced inhibition of blue light-mediated seedling development caused by disruption of upstream signal transduction involving cryptochromes in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 58: 95-105
- Orth, C., Niemann, N., Hennig, L., Essen, LO. & Batschauer, A. 2017. Hyperactivity of the

- Arabidopsis* cryptochrome (cry1) L407F mutant is caused by a structural alteration close to the cry1 ATP-binding site. *J Biol Chem.* 292: 12906-12920
- Park, SY. *et al.* 2009. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/ PYL family of START proteins. *Science.* 324: 1068-1071
- Sang, Y., Li, QH., Rubio, V., Zhang, YC., Mao, J., Deng, XW. & Yang, HQ. 2005. N-terminal domain-mediated homodimerization is required for photoreceptor activity of *Arabidopsis* CRYPTOCHROME 1. *17: 1569-1584*
- Swinney, D. C. & Anthony, J. 2011. How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov.* 10: 507-519
- Toth, R. & van der Hoorn, R. 2009. Emerging principles in plant chemical genetics. *Trends in Plant Science* 15: 81-88
- Van Gelder, RN., Wee, R., Lee, JA. & Tu, DC. 2003. Reduced pupillary light responses in mice lacking cryptochromes. *Science.* 299: 222
- Wang, X., Wang, Q., Nguyen, P. & Lin, C. 2014. Cryptochrome-mediated light responses in plants. *Enzymes.* 35: 167-189