

ジャスモン酸関連転写因子活性の化学制御の試み

高岡 洋輔¹, 上田 実^{1,2}

¹東北大学大学院理学研究科化学専攻

²東北大学大学院生命科学研究科

〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3

Challenges to chemical regulation of jasmonate-related transcription factors

Yousuke Takaoka¹, Minoru Ueda^{1,2}

¹Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University

²Department of Molecular and Chemical Life Sciences, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University

6-3 Aramaki-Aza Aoba, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, 980-8578, Japan

Keywords: Jasmonate, Plant hormone, Protein-protein interaction, Transcription factor

DOI: 10.24480/bsj-review.13b4.00227

1. はじめに

1-1. ジャスモン酸

植物が腐生菌による感染を受けたり害虫にかじられたりすると、植物ホルモンであるジャスモン酸 (JA) を合成し、様々な防御応答を引き起こす (Wasternack 2007; Wasternack and Hause 2013)。多くの植物ホルモンにも見られるように、この JA 応答には様々な転写因子が関与していることが知られている。ジャスモン酸は最終的に、イソロイシンと縮合されることで生成するジャスモン酸イソロイシン (JA-Ile) が活性本体として働き (Fonseca et al. 2009)、ユビキチンリガーゼの構成要素である F-box タンパク質 CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1) と、転写リプレッサータンパク質である JASMONATE-ZIM-domain (JAZ) との間のタンパク質間相互作用 (PPI) を誘起することで、JAZ のユビキチン化による 26S プロテアソーム系での分解を促す。JAZ は定常状態で様々な転写因子を抑制しており、JA-Ile 依存的な JAZ タンパク質の分解に応じて、これらの転写因子が同時に活性化され、その下流の遺伝子群の発現を促すとされる (図 1) (Wasternack and Kombrink 2010)。これにより上記の防御応答として、病原菌や害虫に対する忌避物質である毒性タンパク質の発現や、抗がん活性をもつ様々な二次代謝産物の生合成を一挙に引き起こす。その一方で、ジャスモン酸は生長抑制作用や老化を促すことも知られており、このジャスモン酸が引き起こす活性の「生長と防御のトレードオフ」の関係は、未だその制御メカニズムに不明な点が残されている。

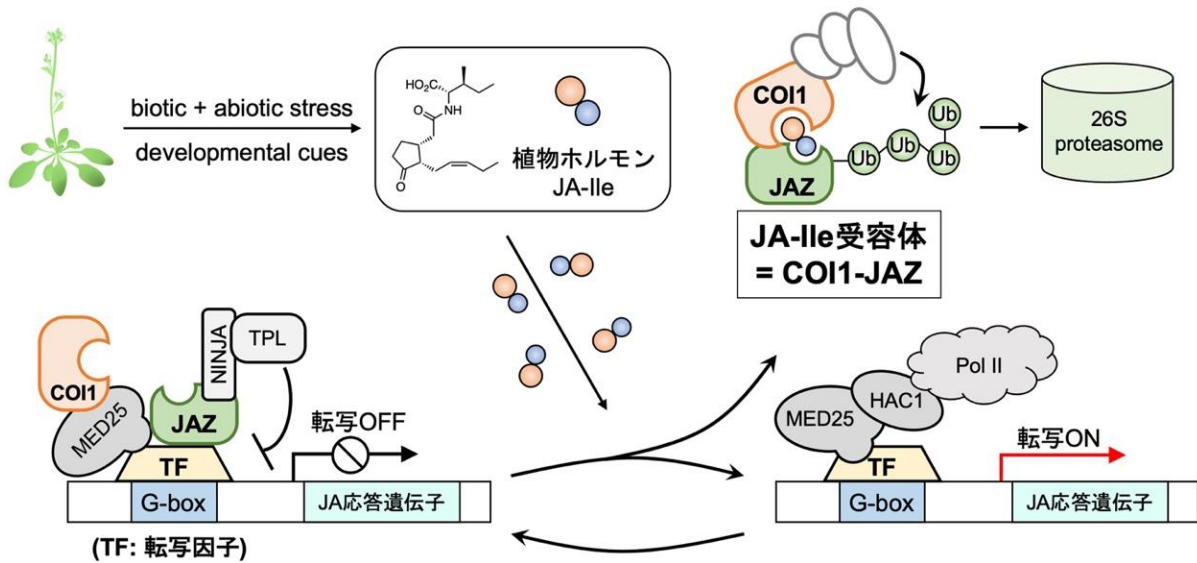


図1. ジャスモン酸シグナル伝達機構の全体図: JA-Ile が COI1-JAZ の PPI を誘起することで JAZ が分解され、JAZ により抑制されていた転写因子が JA 応答遺伝子の転写を促す。

1-2. ジャスモン酸関連転写因子の化学制御

この JA シグナル伝達経路を構成するタンパク質として、モデル植物シロイヌナズにおいて COI1 は 1 種類だが、JAZ リプレッサーには 13 種類のサブタイプが、JAZ と直接相互作用する転写因子にはさらに多くの種類の遺伝子群がコードされている (図2) (Chini et al. 2016)。さらにこれらの転写調節因子 (JAZ リプレッサー及び転写因子) は、遺伝的重複性が高いだけでなく、各々がクロストークしたりすることで解析が困難となっている。このような場合、特定のタンパク質に対する選択的なケミカルツールが有効であると考えられる。例えば我々は最近、13 種の COI1-JAZ 共受容体のうち 2 種類のサブタイプ JAZ9 及び 10 に選択的に結合する小分子リガンドを開発した (Takaoka et al. 2018)。この分子は、生長抑制作用は弱い一方で、病原菌耐性応答を選択的に誘導することが明らかとなった。またこれをケミカルツールとして用いることで、この応答に JAZ9 が関与していることなどが示された。JAZ サブタイプは遺伝的重複性が高く、*jaz9* ノックアウト株ではこのような表現型を示さないが、ケミカルツールであれば複数あるジャスモン酸応答のうち、選択的な応答を引き起こせることを示している。

我々はこのような背景のもと、JA 応答に関わる転写因子の活性化メカニズムの解析 (2 章)、並びに化学的に JA 関連転写因子を制御する方法論の開発 (3 章) に着手した。以下に詳細を述べる。

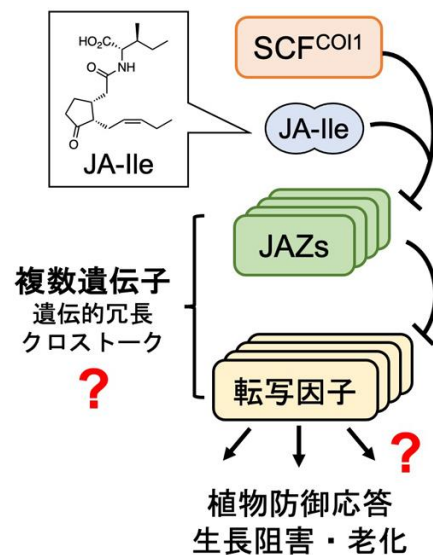


図2. ジャスモン酸シグナルにおける JAZ と転写因子の複雑性: シロイヌナズナでは 1 種類の SCF^{COI1} に対し、13 種類 JAZ と複数の転写因子が複雑にシグナルを制御する。

2. ジャスモン酸関連転写因子の活性化機構の解析

2-1. 主要転写因子MYCの抑制と活性化

再びジャスモン酸シグナル伝達の全体図に話を戻す。近年、複数のグループからジャスモン酸シグナルに関連するタンパク質の構造解析が相次いで報告されている。まず JAZ の C 末端領域に存在する保存度の高い Jas motif が COI1 結合サイトとして同定され、この Jas motif を用いて COI1-JA-Ile との三者複合体の構造解析が達成された (Sheard et al. 2010)。この時、Jas motif の N 末端側はランダムループ構造を形成して JA-Ile と直接相互作用し、C 末端側は α -ヘリックス構造を形成することが明らかとなった (図 3a)。一方 2015 年に発表された JAZ と MYC との結晶構造解析から、JAZ は同じ Jas motif を用いて MYC と結合するが、その構造は劇的に変化し、Jas motif 全体が α -ヘリックス構造を形成していた (図 3b) (Zhang et al. 2015)。つまり、定常状態では α -ヘリックス構造によって MYC と結合しその活性を抑制する JAZ が、ジャスモン酸の生合成によって JA-Ile が産生されると、その結合ドメインの N 末端側の構造をランダムループ構造に変化させて、COI1-JA-Ile と結合するという興味深い構造スイッチが起こることが示された。

一方、JA 応答が活性化されると、JAZ10 の Jas motif が一部もしくは完全に欠損したスプライスバリエント JAZ10.3, JAZ10.4 が発現するという興味深い現象が報告された。詳細に解析された結果、JAZ10 には C 末端付近の Jas motif の他に、N 末端領域に MYC と強力に結合するドメイン: Cryptic MYC-interacting domain (CMID) が存在し、これが転写因子を抑制する機能があることが明らかとなった (Chung and Howe 2009; Moreno et al. 2013; Zhang et al. 2017)。すなわち、スプライスバリエント JAZ10.4 は、Jas motif を持たないことで JA-Ile 存在下でも COI1 と結合することができず、ユビキチン化とそれに続くタンパク質分解を受けることがないが、MYC を抑制する機能のみを有することになり、これがシグナル活性化状態の後期で発現してくることで、ジャスモン酸応答を沈静化するとされている。

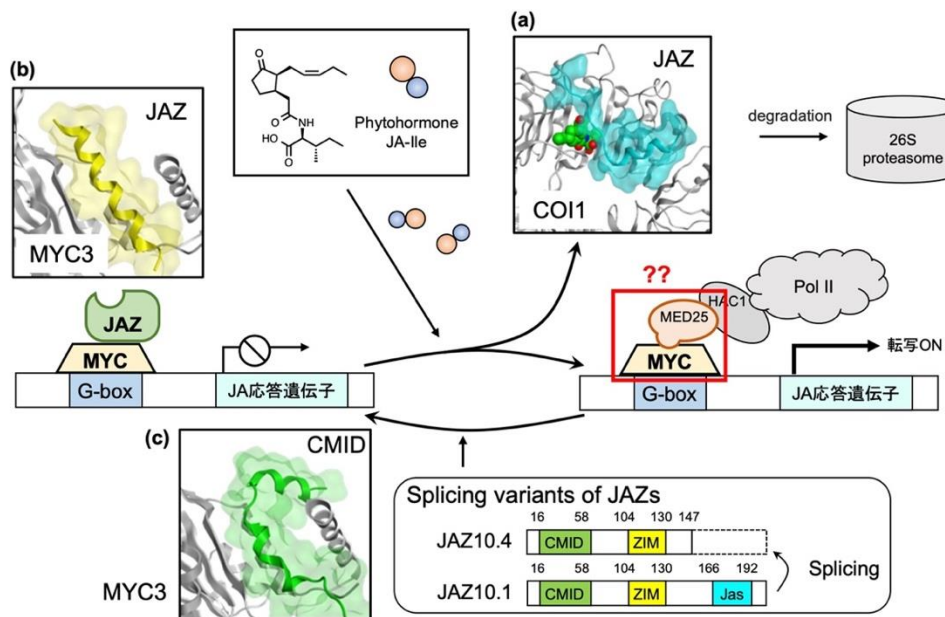


図 3. JA シグナル伝達における各タンパク質の構造解析結果 (a: JA-Ile 共受容体 COI1-JAZ1^{Jas} (PDB ID: 3OGL), b: 転写因子 MYC3 と JAZ9^{Jas} (PDB-ID: 4RS9), c: 転写因子 MYC3 と JAZ10^{CMID} (PDB ID: 5T0F))

2-2. MYCとMED25間のタンパク質間相互作用解析

JA 応答のうち、定常状態における転写因子 MYC-JAZ 間のタンパク質間相互作用 (PPI), JA-Ile 産生によって誘導される COI1-JA-Ile-JAZ 三者複合体構造, 及び JA 応答の再抑制化に関わる MYC-CMID 間 PPI については構造が解かれたが, JA 応答の活性化状態については構造的知見に乏しかった。具体的には, JA-Ile 存在下で JAZ が分解されることによって, MYC の空いた結合サイト (JID ドメインと TAD ドメイン) に転写メディエーターである MED25 が結合し, これに続いてヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAC1), RNA 合成酵素 (Poll II) などがリクルートされ, 転写開始前複合体 (transcriptional pre-initiation complex, PIC) と呼ばれる複合体が形成されることで, MYC 下流遺伝子の発現が引き起こされる (An et al. 2017; Cevik et al. 2012; Zhang et al. 2015)。ここで, MYC と MED25 との結合には MED25 の C 末端側にある ACID 領域 (activator interaction domain, 551-680 番目のアミノ酸) と呼ばれる比較的大きなドメインが結合サイトとして同定されていたものの, 詳細は不明であった。そこで我々は, MYC と MED25 との相互作用様式について考察を加えるため, それぞれのアラニン変異体を調整してこの PPI を詳細に解析した。それぞれのタンパク質は, 様々なタンパク質の効率的調整法として有用な, 愛媛大澤崎らが確立したコムギ胚芽由来無細胞翻訳系を用いた (Sawasaki et al. 2002)。構造的知見の豊富な JA 主要転写因子 MYC3 に FLAG タグを導入した FLAG-MYC3 と, GST タグ及びビオチン修飾サイトを導入した MED25 (GST-BIs-MED25) について発現を行ない, PPI を高感度かつハイスループットに検出可能な AlphaScreen を利用して MYC3-MED25 間の相互作用を評価した結果, MYC3-MED25 間の相互作用に重要な複数のアミノ酸を同定できた。またこの相互作用は, MYC3-JAZ 間の相互作用よりも, MYC3-CMID 間に見られる相互作用様式に近いことが示唆されたことから, MYC3 に対する MED25 の結合ドメインを CMID-like MYC-interacting domain (CMIDM) と名付けた (Takaoka et al. 2022)。これにより, MYC3 に対する JAZ 及び MED25 の結合サイトが同定されたので, それぞれに対し蛍光色素を修飾したペプチド群 (JAZ9^{Jas}, JAZ10^{CMID}, 及び MED25^{CMIDM}) を別途用意し, それぞれの結合親和性を蛍光異方性によって定量的に解析した。その結果, 親和性の序列は MYC3-JAZ9^{Jas}, MYC3-MED25^{CMIDM}, MYC3-JAZ10^{CMID} の順で強くなることを示された (図 4)。この結果は, シグナル伝達が進むにつれて機能するタンパク質の序列に沿って結合が強くなっていることを意味し, このシグナル伝達経路が効率的に進行することを再認識させる結果であった。

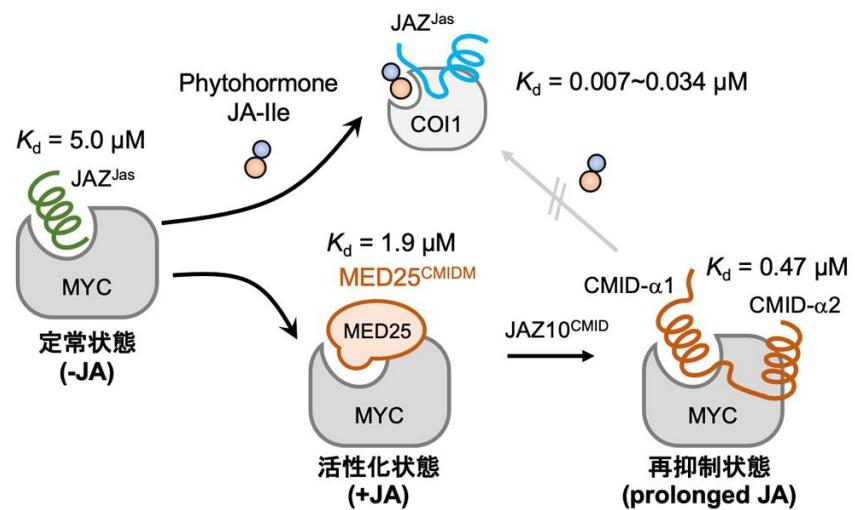


図 4. MYC3 と JAZ9^{Jas}, MED25^{CMIDM}, JAZ10^{CMID} および COI1 と JAZ9^{Jas} 間の結合定数の比較。

3. ジャスモン酸関連転写因子に対するペプチド型阻害剤の開発

我々はジャスモン酸関連転写因子に対するケミカルツールを開発すべく、主要転写因子 MYC3 と JAZ9^{Jas} との相互作用に着目した。前述の通り、JAZ の Jas motif は MYC3 と結合する際は全体が α -ヘリックス構造を形成するが、COI1 と結合する時には一部をランダムループ構造に変形する。すなわち、Jas motif を基に、MYC3 との結合フォームに構造を規定すれば、シグナル伝達の上流である COI1 には結合せず、さまざまな応答を制御する転写因子に対する選択的なケミカルツールが創出できると期待される。さらには、Jas motif は MED25 との結合を阻害することで MYC の転写活性を抑制しているため、このケミカルツールは MYC に対する転写阻害剤になる可能性が高い。このような発想のもと、 α -ヘリックス構造に規定するペプチドのステーブル化技術を用いて、MYC 阻害剤の開発に着手した。

3-1. 分子設計と合成

G. Verdine らが 2000 年ごろに開発したペプチドのステーブル化技術は、タンパク質間相互作用を制御するペプチド型阻害剤として、臨床応用が期待される薬剤開発技術の一つである (Schafmeister et al. 2000)。具体的には、剛直な炭化水素の末端に二重結合を配した非天然アミノ酸を、 α -ヘリックスの螺旋上の同じ向きに配置するように導入したペプチドを固相合成により調整し、Grubbs らが開発したルテニウム触媒を用いて、二重結合同士を連結するオレフィンメタセシス反応でこの非天然アミノ酸を連結することで、ペプチドが共有結合で α -ヘリックス構造にステーブル (ホチキス留め) される。このステーブル部分は立体障害になりうるため、MYC3-JAZ9^{Jas} 間の相互作用を邪魔しないように、結合面とは反対の位置に向くように末端オレフィン型の非天然アミノ酸を導入したペプチドを、Fmoc 固相合成によって調整した (図 5a)。JAZ9^{Jas} は計 4 箇所の螺旋構造を有するため、最大 2 箇所をステーブルすることができる。そこで、COI1 との結合時にランダムループ構造に変形する N 端側 (St1)、常に α -ヘリックス構造を形成する C 端側 (St2)、及び両方を同時にステーブル化するペプチド (St3) をそれぞれ用意し、ステーブル化しない野生型ペプチド (Wt) とともに、MYC3 との結合評価に用いた (図 5b)。なお、これらが溶液中で α -ヘリックス構造を形成しているかを CD スペクトルで確認した結果、予想通りステーブル化の頻度に応じて α -ヘリックス含量が向上した。一方、全くステーブル化しない野生型ペプチドはほぼ完全なランダムループ構造であることから、Jas motif は天然変性領域であり、結合相手に応じて二次構造を巧みに変形させることが強く示唆された (Suzuki et al. 2021)。

3-2. 試験管内での転写因子への阻害能と選択性

合成したステーブルペプチドについて、結晶構造が取られている MYC3 との結合親和性を蛍光異方性によって確認したところ、野生型ペプチド (Wt) の結合が約 5 μ M の K_d 値であるのに対し、1 箇所ステーブル化した St1 および St2 は約 10 倍、2 箇所ステーブル化した St3 ペプチドは約 50 倍と親和性が向上し、 K_d 値にして約 100 nM であることが明らかとなった (図 5c)。また、MYC3 のアイソフォームである MYC2,4 に対してもその傾向が見られ、これらのタンパク質に対しても JAZ の Jas motif は α -ヘリックス構造で結合していることが強く示唆

された。一方、同様に蛍光異方性を用いて COI1-JA-Ile に対する結合を確認したところ、N 端側をステーブル化した二種類のペプチドは全く結合しないことが明らかとなった。つまり設計通り、MYC との結合フォームに構造を規定することで、シグナル伝達上流の COI1 には結合せず、下流の MYC 選択的に結合するケミカルツールとなることが期待された。

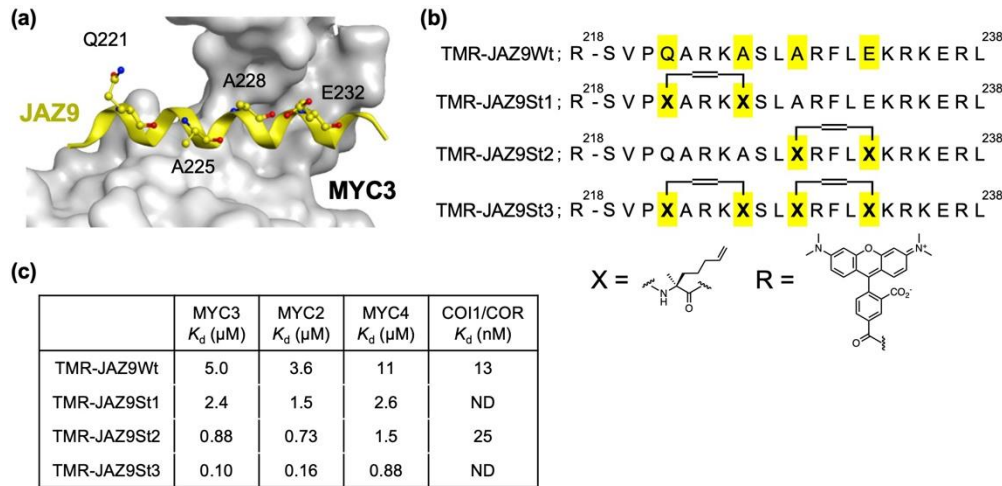


図 5. (a) MYC3-JAZ9 の結晶構造 (PDB ID: 4RS9) と、(b) 合成したステーブルペプチド。(c) 各種ペプチドとタンパク質との結合親和性 (ND: シグナル変化が小さく解析不可)。

3-3. 植物個体内での阻害能評価

COI1 には結合せず、JA 主要転写因子である MYC ファミリーに選択的に結合するステーブルペプチドが開発できたので、次に植物個体内での機能評価を行なった。ダブルステーブル化した St3 ペプチドは、MYC が活性化される際に形成される MYC-MED25 との相互作用をも阻害することで、MYC の下流で起こる遺伝子発現を抑制することが期待される。そこで、シロイヌナズナ幼植物に対してジャスモン酸前駆体であるメチルジャスモン酸 (MeJA) を投与して起こる MYC 下流のジャスモン酸応答マーカ遺伝子の転写活性化を、本ステーブルペプチドが抑制するかどうかを、リアルタイム PCR で解析を行なった。具体的には MYC2 それ自体やジャスモン酸生合成遺伝子の一つである AOS, 虫害耐性遺伝子 VSP2 などが MeJA 添加によって活性化されるのに対し、St3 ペプチドを MeJA と同時投与したところ、その転写活性化が有意に抑制された (図 6b)。すなわち、本ステーブルペプチドは植物個体内に浸透し、MYC の転写活性化を阻害できることが示された (Suzuki et al. 2021)。本成果は、ステーブルペプチドが植物個体内で機能することを実証した初の例であり、今後様々な機能性ペプチドの植物科学での展開が期待される。

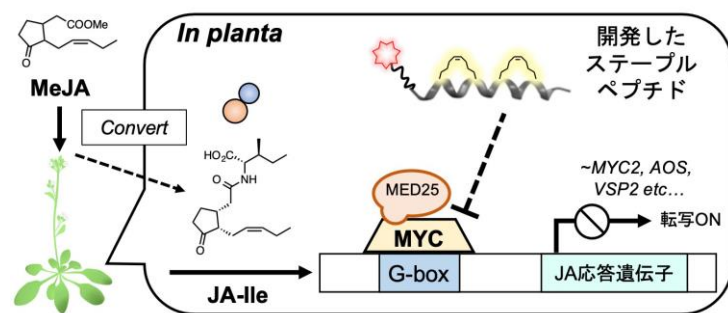


図 6. ステーブルペプチドの植物への投与のイメージ図。

4. おわりに

植物防御応答に関連するジャスモン酸シグナル伝達の最新の知見と、それに基づいて設計・開発したステーブルペプチドによるジャスモン酸シグナルの転写制御の試みについて述べた。ジャスモン酸に限らず、植物ホルモンの多くは、低濃度でも植物全体の転写ネットワークを巧みに調節することで、植物のライフサイクルにおける重要な多くのイベントを制御する。その過程では、多種類の転写因子が複雑にタンパク質間相互作用を引き起こすことが明らかになりつつあり、そのタンパク質間相互作用を制御するペプチド型ケミカルツールは今後ますます注目を集めるものと期待される。今後我々も、これらに関連する転写因子の中で選択的に狙った遺伝子のみを時空間的に制御する方法論の開発を目指して、検討を続ける。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、愛媛大学 澤崎達也教授、野澤彰准教授、高橋宏隆准教授に、タンパク質無細胞翻訳系や AlphaScreen 解析技術などについて有益なご助言を多数いただいた。また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 (17H06407, 18KK0162, 20H00402, 19H05283, 21H00270) および武田ライフサイエンス研究助成による支援を受けて行なったものである。この場を借りて感謝申し上げる。

引用文献

- An C, Li L, Zhai Q, You Y, Deng L, Wu F, Chen R, Jiang H, Wang H, Chen Q, Li C (2017) Mediator subunit MED25 links the jasmonate receptor to transcriptionally active chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E8930-E8939. doi :10.1073/pnas.1710885114.
- Cevik V, Kidd BN, Zhang P, Hill C, Kiddle S, Denby KJ, Holub EB, Cahill DM, Manners JM, Schenk PM, Beynon J, Kazan K (2012) MEDIATOR25 acts as an integrative hub for the regulation of jasmonate-responsive gene expression in Arabidopsis. *Plant Physiol* 160:541-555. doi :10.1104/pp.112.202697.
- Chini A, Gimenez-Ibanez S, Goossens A, Solano R (2016) Redundancy and specificity in jasmonate signalling. *Curr Opin Plant Biol* 33:147-156. doi :10.1016/j.pbi.2016.07.005
- Chung HS, Howe GA (2009) A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in Arabidopsis. *Plant Cell* 21:131-145. doi :10.1105/tpc.108.064097
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R (2009) (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol* 5:344-350. doi : 10.1038/nchembio.161
- Moreno JE, Shyu C, Campos ML, Patel LC, Chung HS, Yao J, He SY, Howe GA (2013) Negative feedback control of jasmonate signaling by an alternative splice variant of JAZ10. *Plant Physiol* 162:1006-1017. doi :10.1104/pp.113.218164
- Sawasaki T, Hasegawa Y, Tsuchimochi M, Kamura N, Ogasawara T, Kuroita T, Endo Y (2002) A bilayer cell-free protein synthesis system for high-throughput screening of gene products. *FEBS Letters* 514:102-105. doi :10.1016/s0014-5793(02)02329-3.

- Schafmeister CE, Po J, Verdine GL (2000) An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides. *J Am Chem Soc* 122:5891-5892. doi :10.1021/ja000563a
- Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu FF, Sharon M, Browse J, He SY, Rizo J, Howe GA, Zheng N (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* 468:400-405. doi :10.1038/nature09430
- Suzuki K, Takaoka Y, Ueda M (2021) Rational design of a stapled JAZ9 peptide inhibiting protein-protein interaction of a plant transcription factor. *RSC Chemical Biology* 2:499-502. doi : 10.1039/d0cb00204f
- Takaoka Y, Iwahashi M, Chini A, Saito H, Ishimaru Y, Egoshi S, Kato N, Tanaka M, Bashir K, Seki M, Solano R, Ueda M (2018) A rationally designed JAZ subtype-selective agonist of jasmonate perception. *Nat Commun* 9:3654. doi :10.1038/s41467-018-06135-y
- Takaoka Y, Suzuki K, Nozawa A, Takahashi H, Sawasaki T, Ueda M (2022) Protein-protein interactions between jasmonate-related master regulator MYC and transcriptional mediator MED25 depend on a short binding domain. *Journal of Biological Chemistry* 298:101504. doi :10.1016/j.jbc.2021.101504
- Wasternack C (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* 100:681-697. doi :10.1093/aob/mct079
- Wasternack C, Hause B (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann Bot* 111:1021-1058. doi :10.1093/aob/mct067
- Wasternack C, Kombrink E (2010) Jasmonates- Structural Requirements for Lipid-Derived Signals Active in Plant Stress Responses and Development. *ACS Chem Biol* 5:63-77. doi :10.1021/cb900269u
- Zhang F, Ke J, Zhang L, Chen R, Sugimoto K, Howe GA, Xu HE, Zhou M, He SY, Melcher K (2017) Structural insights into alternative splicing-mediated desensitization of jasmonate signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:1720-1725. doi :10.1073/pnas.1616938114
- Zhang F, Yao J, Ke J, Zhang L, Lam VQ, Xin XF, Zhou XE, Chen J, Brunzelle J, Griffin PR, Zhou M, Xu HE, Melcher K, He SY (2015) Structural basis of JAZ repression of MYC transcription factors in jasmonate signalling. *Nature* 525:269-273. doi :10.1038/nature14661