

別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 **Controlling Plant Circadian Clock by Synthetic Small Molecules**
(合成小分子による植物の生物時計の制御)

氏 名 上原 貴大

論 文 内 容 の 要 旨

生物は24時間周期で変動する地球環境に合わせて生命活動を行うために、生物時計(概日時計)と呼ばれる計時システムをもっている。生物時計は、複数の時計遺伝子が互いに転写、翻訳、翻訳後修飾(リン酸化)を制御し合う、複雑なフィードバック機構によって構成される。特に植物の生物時計は複雑で、これまでに20種類以上もの時計遺伝子が発見されている。これに加えて未同定の遺伝子が多数存在すると考えられているが、既存の遺伝学的解析手法は飽和してきており、新たな時計遺伝子の発見は限界に近づいている。このような背景のもと、申請者は化学的手法を加えた新たなアプローチにより植物の生物時計の全容解明を目指した。トランスフォーマティブ生命分子研究所(ITbM)の中道らは、化合物スクリーニングにより植物の生物時計を変調させる分子(生物時計制御分子)を見出している。本申請者は、このうち概日リズムを長周期化する三つの分子(PHA767491、BML-259、TU-892)に着目し、分子ツールとしての展開を行った。本論文は、これらの分子の構造活性相関、標的タンパク質の同定、作用機序解明および効率的合成法の開発について論じており、四章より構成されている。

第一章では、PHA767491(PHA)の標的タンパク質同定について論じている。PHAは哺乳類のCdc7キナーゼとサイクリン依存性キナーゼ9(Cdk9)の阻害剤として知られているが、植物にこれらのキナーゼは存在しない。このため、植物の生物時計に対するPHAの作用機序は不明であった。本申請者は、PHA誘導体の合成及び、それらの周期変調活性を評価した。その結果、PHAの周期変調活性を維持したまま誘導化可能な部位を明らかにした。この知見を基に、PHAを固定化したアガロースビーズを作成し、植物抽出液から標的タンパク質の同定を行った。これにより、リン酸化酵素の一つであるカゼインキナーゼ1 (CK1)ファミリーがPHAの標的タンパク質であることを見出した。CK1が植物の生物時計に関わることはこれまでに知られていない。さらにITbMのKay-廣田グループと共に、PHAには植物だけでなく哺乳類の概日リズムも長周期化する効果があり、哺乳類におけるPHAの標的もCK1であることを見出した。以上の結果から、哺乳類と同様に植物においてもCK1が生物時計の制御に関わっていると考えられる。

第二章ではBML-259(BML)の標的タンパク質の同定について論じている。BMLはこれまでに見

つかった中で最も高活性な生物時計制御分子であり、通常24時間の植物の概日リズムを最大48時間に長周期化する。本申請者は、BMLの構造活性相関研究及び標的時計タンパク質の同定を行い、同分子の作用機序の解明に取り組んだ。本分子の誘導体合成の過程で、チアゾールC5位にシクロブチル基を有する誘導体がBMLより高い長周期活性をもつことを見出した。同時に、BMLのベンゼン環上への置換基導入が同分子の長周期化効果を損ねないことを明らかにした。この結果を基にBML誘導体にポリエチレングリコールリンカー並びにアガロースビーズを導入した分子プローブを調製し、アフィニティ精製による標的タンパク質探索を行った。その結果、BMLの標的タンパク質がサイクリン依存性キナーゼ(CDK)ファミリーとクリプトクローム(CRY)ファミリーであることを見出した。本研究によって、CDKが植物の生物時計に関与することを世界で初めて証明した。

第三章ではTU-892の構造活性相関および標的タンパク質同定について論じている。TU-892は、中枢神経抑制活性をもつ化合物であるが、本研究で新たに概日リズムの周期延長活性があることを見出した。TU-892は、シロイヌナズナの概日リズムを24時間から26時間に長周期化する。本申請者は、TU-892の生物時計に対する構造活性相関研究を行った。市販のピラゾール誘導体とアリーールイソシアナートから二段階でTU-892およびその誘導体を合成する経路を確立した。得られた誘導体の活性評価により、シロイヌナズナの概日リズムを短周期化させる化合物TU-923を新たに発見することに成功した。TU-923はTU-892と非常に近い構造を有しているにもかかわらず、TU-892とは対照的にシロイヌナズナの概日リズムを24時間から22時間に短周期化する。また、TU-892のピラゾール上のアリーール基は他のアリーール基に変換可能であることが判明した。この知見を基に、TU-892をベースとした分子プローブを計三種類合成した。現在は、合成した分子プローブを用いてTU-892の標的タンパク質同定を行っている。

アミノチアゾール誘導体は第二章で論じたBMLのような生物時計制御活性のみならず、様々な生物活性を示す重要な化合物である。第四章ではアミノチアゾール誘導体の効率的な供給法の開発を念頭に置き、パラジウム触媒を用いたアミノチアゾールのC-H結合及びC-N結合アリーール化反応の開発を行った。初めに、2-アミノチアゾール誘導体のC4位選択的C-Hアリーール化反応の開発を行った。2-アミノチアゾール誘導体とアリーールボロン酸を用いて、酢酸パラジウム/1,10-フェナンスロリン(phen)触媒、酸化剤に2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシド(TEMPO)、添加剤にホウフッ化リチウムを加えて反応を行うことで、良好な収率と高いC4位選択性でアミノチアゾールのC-Hアリーール化が進行することを見出した。加えて、本反応の配位子をphenから2,2'-ビピリジル(bipy)に変えることで、脱アミド型のカップリング反応が進行することを見出した。すなわち、Pd(OAc)₂/bipy触媒存在下、アミノ(ベンゾ)チアゾール類とアリーールボロン酸がC-N結合の切断を伴いながらカップリングし、2-アリーールベンゾチアゾールを与えることを見出した。

以上本申請者は、植物の生物時計の解明及び制御を指向し、中道らによって同定された生物時計制御分子を誘導化することで、植物の生物時計に対する作用機序の解明研究を行った。その結果、植物の生物時計制御に関連するタンパク質としてCK1とCDKを新たに同定することに成功した。このような合成化学と植物科学を融合した分野横断型研究は、未解明の植物生物時計機構の解明に寄与するのみならず、植物生長調節剤の創製に貢献することが期待される。