

令和元年6月10日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18662

研究課題名(和文)化合物アレイを用いた拮抗作用を示さない植物ホルモン受容体結合化合物の探索

研究課題名(英文) Screening of plant hormone receptor ligands by chemical array platform

研究代表者

由田 和津子 (Yoshida, Kazuko)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別研究員

研究者番号：50536480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ケミカルアレイを用いたスクリーニングによって単離されたアブシジン酸(ABA)受容体アンタゴニストRK460の立体制御による受容体特異性の違いを明らかにした。RK460の構造活性相関研究によりアンタゴニスト活性に必須な構造が明らかとなり、また置換基によってABA受容体への特異性を制御できることが判った。また理研NPDepoライブラリーよりABA受容体と結合するPP2Cタンパク質の活性を阻害する化合物を見出し、これがABAだけでなくジャスモン酸応答遺伝子にも影響を与えることが遺伝子発現評価により明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は様々な環境ストレスに対し、植物ホルモンを合成して防御機構を発揮する。しかし異なるストレスに応答するシグナル伝達経路は相互に拮抗することが知られている。特定の防御応答を助長する方法は、遺伝学、生化学の両手法からよく研究されているが、複数のストレスに晒されてる自然界の状況に対応した研究が求められている。本研究では、植物ホルモン受容体のうち一部のみ作用する化合物を開発した。このような化合物は、まだ知られていない受容体の機能分化の解明のためのバイオプローブだけでなく、植物ホルモンシグナル伝達における拮抗作用を制御できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We revealed that receptor specificity of the abscisic acid (ABA) receptor antagonist RK460 which was isolated by screening with a chemical array, can be changed by steric control of this compound. Structure-activity relationship studies of RK460 revealed a chemical structure essential for its antagonist activity, and it was found that specificity for the ABA receptor can be controlled by different substituent. In addition, a compound that inhibits the activity of PP2C protein that bind to ABA receptor was screened from Riken NPDepo library. It was revealed that the hit compound affects not only ABA but also jasmonic acid responsive gene expression by transcript analysis.

研究分野：植物科学

キーワード：アブシジン酸 受容体 アンタゴニスト

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) 動いて安全な生育環境を選ぶことのできない植物は、様々な環境ストレスに対応するための独自の防御機構を兼ね備えている。その代表的な機構は、植物ホルモンの合成とそのシグナル伝達である。植物は周りの環境からの刺激に応答して植物ホルモンを合成し、様々なストレスに対する防御機構を発現させる。植物ホルモンはその受容体と相互作用することにより、受容体と他の因子との相互作用を変化させ、下流のシグナル伝達を開始させる。植物ホルモン受容体には複数のホモログが存在することが多く、各々の機能分化について未だ不明瞭な点が多い。例えばシロイヌナズナにおけるアブシジン酸 (ABA) 受容体は PYR1、PYL1-13 の 14 種存在するが、それぞれの機能分化については一部の受容体サブタイプを除いて明らかになっていない。ABA はまた植物ホルモンのシグナル伝達は互いにクロストークすることもわかっているが、その詳細な分子機構は明らかになっていない。特に ABA は植物の免疫応答において重要な役割を果たすサリチル酸 (SA) のシグナル伝達に対して拮抗的に作用する事が知られている。このような拮抗作用に関与する ABA 受容体がどれであるのかは明らかとなっていないが、一部の受容体の欠損変異体植物では SA シグナル下流の防御遺伝子の発現が上昇するという報告 ( Sánchez-Vallet et al. Plant Physiol. 2012 ) もあるため、一部の受容体のみを制御することにより、他の植物ホルモンへの拮抗作用をコントロールすることができると思われる。
- (2) 当研究グループの先行研究で、ケミカルアレイを用いたスクリーニングにより ABA 受容体アンタゴニスト RK460 が単離された (Ito et al. ChemBioChem, 2015)。シロイヌナズナの ABA 受容体は系統学的に 3 つのサブファミリーに分けられるので、それぞれのサブファミリーに属する受容体との特異性を評価したところ、これは PYR1 に選択的なアンタゴニストであることが判った。これまでに受容体特異的な ABA アンタゴニストは報告されていないため、この化合物は受容体機能解明に適するバイオプローブとなることが期待された。

### 2. 研究の目的

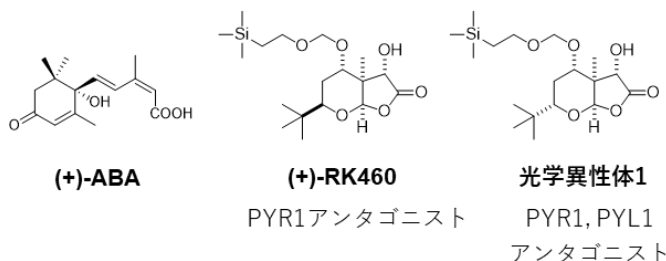
ケミカルバイオロジーの手法を用いて植物ホルモン受容体に結合する化合物をバイオプローブとして用いることにより受容体機能の解明を目指すとともに、一部の受容体または植物ホルモンのシグナル伝達因子の機能を制御する事で他の植物ホルモンシグナル伝達経路に対する影響を軽減または増幅させる化合物を探索・創製する。

### 3. 研究の方法

- (1) 当研究グループではケミカルアレイを用いたスクリーニングによりアブシジン酸受容体のアンタゴニスト RK460 を単離した。そこで RK460 を基盤構造として類縁化合物の有機化学合成が実施された。
- (2) ABA 受容体は、ABA と結合する事により II 型の脱リン酸化酵素 (PP2C) と結合して PP2C を不活化し、その結果下流のリン酸シグナル伝達経路が活性化し、ABA 応答を引き起こす。この初期シグナル活性化は PP2C の活性抑制を指標として評価する事ができる。シロイヌナズナの 14 種のアブシジン酸受容体のうち、11 種類の組換えタンパク質を精製し、これらをホスファターゼアッセイに供することで化合物の受容体に対するアゴニスト・アンタゴニスト活性評価を行った。脱リン酸化酵素活性は、基質であるリン酸化ペプチドからの遊離リン酸をマラカイトグリーンによる呈色反応により検出した。
- (3) PP2C 活性を指標とした (2) の反応系を小スケール化し、特定の受容体のアゴニストまたは PP2C 活性阻害剤を、NPDepo ライブラリー化合物よりハイスループットスクリーニングを行った。
- (4) ホスファターゼアッセイで評価した化合物の植物体での評価は、シロイヌナズナを用いて植物ホルモン応答遺伝子発現解析により行った。シロイヌナズナを 1/2MS 寒天培地の入った 96 well plate に播種し、少なくとも 2 日間 4℃、暗所に静置した後 22℃、長日条件 (16 時間明期、8 時間暗期) で育成し、化合物処理を 6 時間行った。GUS レポーター形質転換体はその後  $\beta$ -Glucuronidase アッセイを行った。qPCR による解析では凍結破砕したシロイヌナズナより RNA を抽出し、逆転写反応後 qPCR に呈した。

#### 4. 研究成果

- (1) PYR1 選択的な ABA 受容体アンタゴニスト RK460 の全立体異性体を合成し、シロイヌナズナの 11 種の ABA 受容体と PP2C を用いたホスファターゼアッセイにより、立体異性体による受容体特異性の違いを明らかにした。全立体異性体の中でも (+)-RK460 が最も強い活性を有しており、これが PYR1 に特異性を示したのに加え、PYR1 と PYL1 両受容体に対してアンタゴニスト活性を示した光学異性体も見出した。



- (2) このような受容体選択性のあるアンタゴニストは植物ホルモンシグナル伝達系の解析のための有用なバイオプローブとなることが期待されたため、強い活性の見られた化合物について構造展開を行うことにした。20 種類以上の(+)-RK460 誘導体と 11 種の ABA 受容体を用いたホスファターゼアッセイにより、アンタゴニスト活性に必要な構造が明らかとなり、また置換基によって各受容体への活性を制御できることが判った。PYR1 を含む ABA 受容体の変異株は SA 応答遺伝子の発現と防御応答が亢進することが報告されているため、今後、これら誘導体処理をした植物での植物ホルモン応答遺伝子の発現解析を行う予定である。
- (3) また理研 NPDepo ライブラリー約 10000 化合物のハイスループットスクリーニングにより ABA 受容体と結合する PP2C タンパク質の活性を阻害する化合物を見出した。この化合物をシロイヌナズナ芽生えに処理し、遺伝子発現解析を行ったところ、この化合物が ABA 応答遺伝子の発現を誘導することを確認した。よって、PP2C 活性を阻害する化合物によって ABA シグナルを誘導できることが判った。さらに、この化合物を処理した植物ではジャスモン酸 (JA) 応答遺伝子にも影響を与えることが遺伝子発現評価により明らかとなった。よってこの化合物は ABA、JA 両植物ホルモンシグナル伝達経路を活性化する可能性がある。一方、この化合物含有培地にシロイヌナズナを播種したところ、生育阻害が見られた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Mikame Y.\*, Yoshida K.\*, Hashizume D, Hirai G, Nagasawa K, Osada H, Sodeoka M. Synthesis of all stereoisomers of RK460 and evaluation of activity and selectivity as abscisic acid receptor antagonists. (2018) Chem. Eur. J. 3496–3500 doi:10.1002/chem.201806056

\* These authors contributed equally to this work

査読有り

〔学会発表〕(計 5 件)

1. アブシジン酸 (ABA) 受容体アンタゴニスト RK460 を基盤とする構造活性相関研究

三瓶 悠、由田 和津子、平井 剛、長澤 和夫、長田 裕之、袖岡 幹子

日本化学会第 99 春季年会 (2019)

2. 三瓶 悠、由田 和津子、橋爪 大輔、平井 剛、長澤 和夫、長田 裕之、袖岡 幹子

アブシジン酸アンタゴニスト RK460 を基盤とする構造活性相関研究

日本有機合成化学協会 第 114 回有機合成シンポジウム (2018)

3. Yu Mikame, Kazuko Yoshida, Daisuke Hashizume, Go Hirai, Kazuo Nagasawa, Hiroyuki Osada, Mikiko Sodeoka, Synthesis of all stereoisomers of RK460 and their activity and selectivity as ABA antagonists

日本ケミカルバイオロジー学会 第13回年会 (2018)

4. 由田 和津子、三瓶 悠、平井 剛、伊藤 卓也、近藤 恭光、清水 猛、長澤 和夫、袖岡 幹子、長田裕之、RK460 を基盤とした ABA 受容体選択的アンタゴニストの開発  
日本農芸化学会 2017 年度大会 (2017)

5. 平井 剛、三瓶 悠、由田 和津子、長澤 和夫、長田 裕之、袖岡 幹子、 Synthesis of all the possible isomers of RK460 and its activity evaluation  
日本化学会第 97 春季年会 (2017)

#### 6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。