

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26711018

研究課題名(和文)植物生長制御に関わるアブシジン酸シグナル伝達の解明

研究課題名(英文)Elucidation of abscisic acid signaling pathway in plant growth by chemical genetic analysis

研究代表者

岡本 昌憲 (Okamoto, Masanori)

鳥取大学・乾燥地研究センター・助教

研究者番号：50455333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：アブシジン酸(ABA)の単量体型受容体に選択的に作用するABAアゴニストを探し出すためのABAセンサーを開発した。このセンサーを用いて、単量体型ABA受容体に作用する115C07を同定した。115C07は種子発芽阻害を引き起こさず、暗所胚軸成長阻害のみの活性を有する。115C07を用いた化学遺伝学的手法により、暗所胚軸成長に関わるABAシグナル経路を明らかにした。PYL8受容体を介して、下流シグナル因子のABI3やABI4を中心に、RNAプロセッシング関連因子やキナーゼ関連因子が協調して、胚軸の成長制御に関わっている事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Physiological function of monomeric abscisic acid (ABA) receptors among ABA receptor has not been revealed. We have developed ABA sensor using yeast two-hybrid system, and it's sensor was used for finding selective ABA agonist to monomeric receptor. As the result, we found 115C07 compound, which inhibited only hypocotyl growth in the dark condition. Chemical genetic screens with 115C07 have identified PYL8, ABI3, ABI4, RNA processing and kinase component mutants, suggesting that these components are involved in tissue specific plant growth.

研究分野：Plant molecular physiology

キーワード：Abscisic acid Chemical biology Molecular physiology Plant hormones

1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンの1つであるアブシジン酸 (ABA) は、気孔の閉鎖、乾燥などの環境ストレスにおける抵抗性の向上、種子の休眠と発芽抑制、植物の成長制御など植物の生理応答に広く作用する。これら ABA の生理作用は様々な植物種間に多数存在する PYR/PYL と呼ばれる受容体を介して、時空間的に様々な下流因子を介して引き起こされる。ABA 受容体は生化学的に高親和性型の単量体型受容体と低親和性型の二量体型受容体に区別される。二量体型 ABA 受容体に選択的に作用するキナバクチンは、種子発芽阻害および気孔閉鎖や乾燥ストレスに対する抵抗性向上など植物体における主要な ABA 応答を誘導することができる。また、二量体型受容体をほぼ欠損した *pyr1pyl1pyl2pyl4* 四重変異株は、植物体の主要な ABA 応答が欠損しており、乾燥ストレスに弱い。この事から二量体型 PYL 受容体が主要な ABA 応答に関与している事が示唆されてきたが、単量体型受容体の機能については不明な点が多かった。

2. 研究の目的

ストレス応答に関わる ABA シグナル伝達因子の多くが明らかにされたが、ABA がどのように植物の成長を制御しているか明らかになっていない。本研究では、単量体型 ABA 受容体だけに結合し、特異的な組織に作用する新奇バイオプローブを用いて、ABA が関わる植物の成長制御のシグナル伝達機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 単量体型受容体に選択的に作用するアゴニスト開発のためのセンサー開発

酵母ツーハイブリッドアッセイ (Y2H) では PYR1, PYL1 から PYL4 の 5 種類のみが標的タンパク質の PP2C と ABA 依存的に相互作用するが、単量体型 ABA 受容体 PYL5 から PYL13 に関しては、僅かに存在する ABA 非依存的な相互作用により、Y2H ではこれら単量体型 ABA 受容体の ABA 応答はモニターすることができなかった。ABA 受容体と PP2C の 1 つである HAB1 との複合体結晶構造解析を解析することで、HAB1 に特定のアミノ酸置換を導入し、単量体型 ABA 受容体に対しても ABA 応答をモニター可能な Y2H システムを構築させる事とした。

(2) 単量体型受容体に選択的に作用するアゴニストの同定

選択的 ABA アゴニストであるピラバクチンとキナバクチンは偶然にもスルホンアミドを有している。アゴニストと PYL 受容体との結晶構造解析により、これら 2 つの ABA アゴニストは ABA のカルボキシル基をミミックしている。ABA のカルボキシル基は ABA 活性に必須であり、ABA の他の部分はある程度構造を変化させても ABA の活性を維持することが

できる。この知見を利用して、より効率的に ABA アゴニストを同定するため、スルホンアミドを有する化合物ライブラリーを用いて、新奇の ABA アゴニストをスクリーニングすることとした。ライブラリーはサプライヤーの特性を加味して 2 社を利用し、合計 2 万の化合物をアッセイした。

(3) 新奇 ABA アゴニストの機能解析

ABA アゴニストを生化学的に特徴づけるため、大腸菌にて機能的 ABA 受容体及び標的タンパク質 PP2C の精製タンパク質を発現できるシステムを構築させる。また、組織特異的な ABA 応答をモニター可能なトランスジェニックを利用するほか、代表的な ABA 受容体変異株を中心に、ABA 関連の変異株の整備を行い、特定した ABA アゴニストの特徴付けを行う事とした。

(4) 新奇 ABA アゴニスト非感受性変異株の単離と原因遺伝子の同定

EMS 変異種子集団から、特定した ABA アゴニストを用いて非感受性変異株を単離し、原因遺伝子を特定することで、ABA が関与する成長制御のシグナル伝達を明らかにすることとした。

4. 研究成果

(1) PYL2 受容体-ABA-HAB1 のタンパク質複合体の結晶構造解析から、受容体と HAB1 と相互作用するアミノ酸部位に変異を導入することで、単量体型 ABA 受容体においても ABA 依存的な相互作用が起きると予想された。受容体側あるいは標的タンパク質側のどちらかに変異を導入すれば良いが、通常の Y2H で ABA 応答が検出できない単量体型 ABA 受容体は 9 種あることから、実験操作の手間を簡略化させるために、標的タンパク質の HAB1 側に変異を導入した。その結果、HAB1 の特定の 1 箇所をチロシンからアスパラギン酸に変換することで単量体型 ABA 受容体が ABA 依存的に HAB1 と相互作用することを確認し、単量体型 ABA 受容体に対して選択的に作用するアゴニストを検出するためのバイオセンサーの開発に成功した。改変型シロイヌナズナ HAB1 は、異なる種の単量体型 ABA 受容体に対しても、ABA 依存的に応答を示す事から、他の植物種における ABA 受容体の ABA 応答もモニターできる。ただし、例外としてシロイヌナズナ単量体型 PYL7 と PYL13 受容体に対しては、改変 HAB1 が有効に機能しなかった。また、生化学解析においても、PYL7 と PYL13 による ABA 依存的な HAB1 活性の阻害効果が見出せていないため、この点に関しては今後の課題とした。

(2) 単量体型受容体に選択的に作用するアゴニストの同定

開発したバイオセンサーを利用し、スルホンアミドからなるライブラリーを用いて、新

奇 ABA アゴニストのスクリーニングを行った。その結果、幾つかの新奇 ABA アゴニストを発見することができた。単量体および二量体型受容体をランダムに活性化することのできるアゴニストを発見できたが、ここでは単量体だけに作用するアゴニストに着目した。単量体型に作用する新奇の ABA アゴニスト 4 種はいずれも興味深いことに、25 μ M の高濃度では、種子発芽阻害を示さず、暗所での胚軸抑制を示すというこれまでの ABA アゴニストには無い活性を有していた。

(3) 115C07 の機能解析

4 つの単量体型 ABA アゴニストのうち、ケミカルサプライヤーから追加オーダー可能な 115C07 の機能解析を行った。115C07 は、ABA 欠損変異株 *aba2* に対しては、野生株と同等に暗所における胚軸伸長阻害を示すが、ABA 非感受性変異株 *abi1* などは耐性を示した。このことから、115C07 が ABA のシグナルに関与する新たな ABA アゴニストであることが明らかとなった。組織特異的な ABA 応答をモニター可能なトランスジェニック *AtMAPKKK18::GUS* を用いた解析により、115C07 はシロイヌナズナの胚軸特異的な ABA 応答を引き起こしていることが明らかとなった。大腸菌で精製した受容体群および、PP2C の HABI1 を用いた解析から、115C07 は PYL11 に特異的な作用を示すアゴニストであることが示され、この結果は Y2H と一致した。しかし、PYL12 受容体に対しては機能的な精製タンパク質が得られなかったために、PYL11 と類似性の高い PYL12 に対しても 115C07 が作用するかどうかは不明なままである。この点に関しては、PYL12 の機能的タンパク質の獲得を今後の課題とした。

また、115C07 の *in vivo* で明らかにするために変異株解析を行った。PYL11 の T-DNA 変異株が存在しないために、人工 miRNA により PYL11 の発現を低下させるトランスジェニックを作成したが、これらのトランスジェニックは 115C07 において暗所胚軸阻害において、非感受性を示さなかった。このことから、115C07 は PYL12 も標的にしている可能性も考えられ、人工 miRNA により PYL11 と PYL12 の両方の発現を低下させたトランスジェニックを作成したが、これらも 115C07 に対して非感受性を示さなかった。そこで、他の ABA 受容体変異株の T-DNA について解析した結果、PYL8 変異株のみが、115C07 に対して非感受性の表現型を示した。このことから、115C07 が植物体内で代謝され、代謝物が PYL8 に対してアゴニストとして作用している事が推測された。なお、115C07 の代謝物の同定を試みたが、特定には至らなかった。

(4) 新奇 ABA アゴニスト非感受性変異株の単離と原因遺伝子の同定

115C07 は生体内で PYL8 を標的としている事が判明した。そこで、PYL8 受容体以降の胚

軸伸長制御のシグナル伝達因子を特定するために、EMS 変異種子集団から 115C07 非感受性変異株を単離した。その結果、PYL8 遺伝子に変異を持つ変異株は得られたものの、他の受容体変異株については 60 以上の変異株からは見出せなかった。また、単離した変異株には、既存の ABA シグナル因子の ABI3 と ABI4 遺伝子にも変異を持っている事が判明した。興味深いことに ABA シグナル因子の ABI5 などの bZIP 転写因子の変異株は得られなかった。このことから、ABA の暗所の胚軸伸長抑制には、PYL8 受容体を介して、ABI3 や ABI4 へと ABA シグナルが伝えられることが推測された。一方、次世代シーケンズを用いた変異株の解析から、mRNA プロセッシングに関わる因子が 2 種類、キナーゼ活性を有する因子、ペプチダーゼ活性を有する因子などが単離された。これらについては、現在までに ABA との関連性に報告が無い。今後、これらの機能解析を進める事で ABA が関わる植物の成長制御の分子機構が明らかになると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

(1) 岡本昌憲 (2017) 「アブシジン酸受容体と受容体に作用する化合物について」 植調 50 (12): 66-37 査読無し

(2) 岡本昌憲 (2016) 「アブシジン酸の代謝と受容に関する化学遺伝学的研究」 植物の生長調節 51 (1): 16-23 査読無し

(3) Takeuchi J, Okamoto M, Mega R, Kanno Y, Ohnishi T, Seo M, Todoroki Y. (2016) Abscisazole-E3M, a practical inhibitor of abscisic acid 8'-hydroxylase for improving drought tolerance. Scientific Reports 10.1038/srep37060 査読有り

(4) Yan D, Easwaran V, Chau V, Okamoto M, Ierullo M, Kimura M, Endo A, Yano R, Pasha A, Gong Y, Bi YM, Provart N, Guttman D, Krapp A, Rothstein SJ, Nambara E. (2016) NIN-LIKE PROTEIN 8 is a master regulator of nitrate-promoted seed germination in Arabidopsis. Nature Communications 7:13179 査読有り

(5) Yamashita Y, Ota M, Inoue Y, Hasebe Y, Okamoto M, Inukai T, Masuta C, Sakihama Y, Hasidoko Y, Kojima M, Sakakibara H, Inage Y, Takahashi K, Yoshihara T, Matsuura H. (2016) Chemical Promotion of Endogenous Amount of ABA in Arabidopsis thaliana by a Natural Product, Theobroxide. Plant & Cell Physiology 57: 986-999 査読有り

(6) Takeuchi J, Ohnishi T, Okamoto M, Todoroki Y. (2015) The selectivity of

6-nor-ABA and 7'-nor-ABA for abscisic acid receptor subtypes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25 3507-3510 査読有り

(7) Takeuchi J. Ohnishi T. Okamoto M. Todoroki Y. (2015) Conformationally restricted 3'-modified ABA analogs for controlling ABA receptors. *Organic & Biomolecular Chemistry* 13, 4278-4288. 査読有り

(8) Takeuchi J. Okamoto M. Akiyama T. Muto T. Yamaji S. Sue M. Seo M. Kanno Y. Kamo T. Endo A. Nambara E. Hirai N. Ohnishi T. Cutler SR. Todoroki Y. (2014) Designed abscisic acid analogues as antagonists of PYL-PP2C receptor interactions. *Nature Chemical Biology* 10:477-482 査読有り

[学会発表] (計 12 件)

(1) Okamoto M.: Enhancement of abscisic acid receptor improves water use efficiency in crop production. International Symposium on Environmental Stress Adaptation and Memory in Plants, (Yokohama, Kanagawa), 2017 年 2 月 28 日

(2) 岡本昌憲: アブシジン酸受容体に作用する人工化合物の開発とその利用 第 8 回植物ストレス科学研究シンポジウム (岡山県倉敷市), 2016 年 3 月 8 日

(3) 岡本昌憲: 植物ホルモンのアブシジン酸受容体に作用する化合物開発 第 7 回農芸化学の未来開拓セミナー (岡山県岡山市), 2015 年 5 月 16 日

(4) 岡本昌憲: 植物の乾燥ストレス応答を制御するアブシジン酸の働きとその応用 第 16 回 極限環境生物学会シンポジウム (京都府京都市), 2015 年 6 月 6 日

(5) 岡本昌憲: アブシジン酸シグナル伝達を制御する低分子化合物の同定と利用 第 56 回日本植物生理学会 (東京都世田谷区), 2015 年 3 月 16 日

(6) Okamoto M., Peterson FC and Cutler SR. : Chemical genetic dissection for abscisic acid receptor function by using a synthetic ABA agonist. THE 38th NAITO CONFERENCE, Molecule-based biological systems (Sapporo, Hokkaido), 2014 年 9 月 7~10 日

[図書] (計 2 件)

(1) Yan D. Tatematsu K. Nakabayashi K. Endo A. Okamoto M. Nambara E. (2015) A comparison of transcriptomes between

germinating seeds and growing axillary buds of Arabidopsis, *Advances in Plant Dormancy*, Springer, p223-234

(2) Endo A. Okamoto M. Koshiba T. (2014) ABA biosynthetic and catabolic pathways. *Abscisic acid: Metabolism, Transport and Signaling*, Springer 21-45.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称: Synthetic compounds for vegetative ABA responses

発明者: Sean R. Cutler & Masanori Okamoto
権利者: The Regents Of The University Of California

種類: B2 登録特許

番号: US 9345245

取得年月日: 2016 年 5 月 24 日

国内外の別: 米国

[その他]

(1) プレスリリース

・植物の乾燥耐性能を向上させる化合物の開発に成功 (2016 年 11 月 17 日)

・植物のストレス応答を制御する化合物の開発に成功 (2014 年 5 月 7 日)

(2) ホームページ等

<http://www.alrc.tottori-u.ac.jp/staff204/okamoto/TOP.html>

(3) 受賞

・植物化学調節学会 奨励賞

・Highly Cited Researchers 2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 昌憲 (Okamoto Masanori)

鳥取大学・乾燥地研究センター・助教

研究者番号: 50455333