

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19226

研究課題名(和文)人工光受容体によるアブシジン酸シグナルの局所的且つ局時的制御

研究課題名(英文)Spatiotemporal control of abscisic acid signaling by artificial photoreceptors

研究代表者

竹内 純 (Takeuchi, Jun)

静岡大学・農学部・助教

研究者番号：00776320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：アブシジン酸(ABA)は受容体PYLと結合する際に、PYLの配座を不活性型から活性型にする。活性型配座のPYLは、ABAシグナル伝達の正の制御因子SnRK2(キナーゼ)を負の制御因子PP2C(ホスファターゼ)から解放することによってリン酸化カスケードを活性化し、ABAシグナルをONにする。本研究では、光による立体構造変化と連動してPYLの配座を活性型/不活性型に切り替えることの出来る化合物の創出を目的に、異なる波長の光でE/Z互変異性化するアゾベンゼンをABAのシクロヘキセン環部分に導入したLIAP/iLIAP(LIAPのantagonist型)を設計・合成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人を対象とした創薬研究においては、リガンドの活性(構造変化)を光で制御した例は報告されていたが、それを植物ホルモンに適用した例はこれまでなかった。本研究で合成したLIAP/iLIAPは365 nmの光照射により90%以上がZ体(LIAP)となり、ABAと比較すると完全ではないものの、PYLの配座を活性型にするアゴニストとして機能した。また、Z体は自然条件下で徐々に安定型であるE体(iLIAP)に戻っていき、E体はPYLの配座を不活性型にするアンタゴニストとして作用した。これらの知見は、植物ホルモン受容体の活性を光によってON/OFF制御する技術基盤の構築に大きく貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Signaling by the plant stress hormone abscisic acid (ABA) is triggered by activation of PYR/PYL/RCAR receptors (PYLs). By binding to PYLs, ABA induces a conformational change associated with gate closure that enables the receptor to bind to, and inhibit, group-A protein phosphatases 2C (PP2Cs), which normally repress ABA signaling as a negative regulator. Based on this mechanism for activating the receptor, we predicted that a PYL ligand capable of switching the conformation between the gate-opened and the gate-closed forms in response to light can activate or inactivate PYLs by light irradiation. To test this prediction, LIAP/iLIAP, in which the planar vinyl methyl portion of ABA was replaced with an azobenzene group, was designed and synthesized as a photoswitchable PYL agonist/antagonist.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：植物 有機化学 生理活性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アブシシン酸 (ABA) の受容体 PYR/PYL/RCAR (PYL) が同定されて以来、ABA シグナル伝達と植物の環境ストレス応答の関係について多くの知見が得られたものの、まだ不明な点も多い。こうした研究を行う上で、ABA シグナル伝達を人工的に制御できる化合物は強力な化学ツールとなる。ABA 受容体制御剤としては、研究代表者らが創出した人工アゴニスト・アンタゴニスト (*Nat Chem Biol* 2014, 10, 477 他) の他、光によって ABA を遊離するケージド ABA がある (*ChemBioChem* 2015, 16, 254 他)。ケージド ABA には、光照射で局所的に瞬時に ABA 受容体を活性化できるという利点があるが、時間の経過とともに ABA が拡散して局所性が下がることは避けられず、その効果は化合物の代謝とともに成り行きで減衰・消滅するため、ON/OFF の切替を短時間で繰り返し行い、植物の応答を連続的に観測することはできない。

そこで研究代表者らは、ケージド化合物としての性質に、代謝による効果の減衰が起こりにくい性質、さらに ON/OFF を繰り返せる可逆的な性質を付与した新規 ABA シグナル制御剤の創出を計画した。

2. 研究の目的

植物の環境ストレス耐性誘導を担う ABA の受容体 PYL を局所的かつ局時的に光受容体として機能させる人工分子を創出し、これを用いて ABA シグナル伝達を光で可逆的に ON/OFF し、ABA シグナル伝達とその結果である生理応答を、高い時間・空間分解能で解析する新たな手法を提案する。

ABA は PYL との結合時に、PYL の配座を不活性型 (gate opened) から活性型 (gate closed) に変化させる。活性型配座の PYL は、ABA シグナル伝達の正の制御因子 SnRK2 (キナーゼ) を負の制御因子 PP2C (ホスファターゼ) から開放することによって転写因子やイオンチャネルを活性化し、ABA シグナルを ON にする。本研究では、PYL の配座変化が ABA シグナルの ON/OFF と連動している点に着目し、光照射による脱保護 (ケージ解除) 後に ABA 受容体 PYL と共有結合し、光による立体構造変化によって PYL の配座を活性型/不活性型にスイッチ可能な化合物 LICAP (Light-activated Covalently-linked Agonist of PYL) /iLICAP (LICAP の antagonist 型) を創出し、局所的にかつ局時的に ABA シグナル伝達を ON/OFF する機能について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) i-LICAP の合成

異なる波長の光で E/Z 互変異性化するアゾベンゼンを ABA のシクロヘキセノン環部分に、また PYL のリガンド結合ポケットに存在する Lys 残基側鎖と Sciff 塩基を介して共有結合可能なアルデヒド基を ABA の側鎖末端に導入した i-LICAP を合成する。その後、反応性の高いアルデヒド基を光分解性保護基で保護することで、光照射した部位の受容体近傍でのみアルデヒド基を露出させるケージド ABA 受容体制御剤を合成する。

(2) 光照射による iLICAP から LICAP への異性化を検証

アゾベンゼンの E/Z 異性化反応は 365 nm の光照射によって促進することが分かっているので、365 nm 付近の波長を用いて iLICAP (E 型) から LICAP (Z 型) への異性化条件を検討する。また、アゾベンゼンは E 型が安定で、Z 型は暗所下で徐々に E 型に異性化することが知られているため、LICAP の暗所下での iLICAP への異性化速度についても確認する。

(3) *in vitro* での光スイッチ機能を検証

大腸菌発現系により調製した PYL と PP2C に iLICAP を加え、365 nm の光を照射し、PYL の活性制御および PYL との共有結合形成について調べる。光照射によりアゴニストまたはアンタゴニスト活性が観測され、且つその活性の濃度依存性から PYL と共有結合している可能性が高いと予測された場合には、トリプシン消化後に LC-MS/MS 分析を行って、ラベル化の有無とラベル化位置を明らかにする。

(4) 植物体で光スイッチ機能を検証

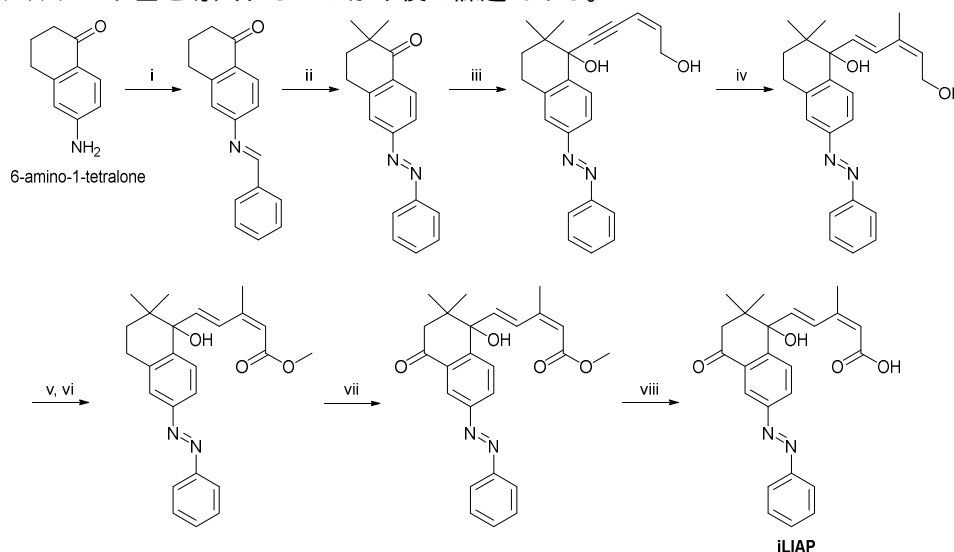
(1) ~ (3) の実験で、設計通りの機能を有するケージド iLICAP が合成できたと考えられる場合は、それをシロイヌナズナの種子や実生に投与し、植物体の様々な部位に光を照射した後、ABA 応答性遺伝子の発現量を qRT-PCR によって調べ、植物体においても光による PYL の活性制御が可能かどうか検証する。

4. 研究成果

(1) LIAP (Light-activated Agonist of PYL) iLIAP (LIAP の antagonist 型) の合成

6-Amino-1-tetralone をトリフルオロ酢酸 (TFA) 存在下でニトロソベンゼンと反応させることによりアゾベンゼン骨格を形成し、カルボニル基の α 位をジメチル化した後、側鎖ジエンカルボン酸のメチルエステルを 4 段階で導入した。続いて環部ベンジル位を酸化した後、アルカリ加水分解により iLIAP を 7 ステップ、総収率 0.6% で合成した (Scheme 1)。一方で、合成経路

を種々検討したものの、**i-LICAP** の合成には至らなかった。**ABA** 側鎖の炭素数を一つ増やして末端にアルデヒド基を導入することが今後の課題である。



Scheme 1 Synthesis of iLIAP. (i) nitrosobenzene, TFA, THF; (ii) CH₃I, NaH, THF; (iii) (Z)-3-methylpent-2-en-4-yn-1-ol, *n*-BuLi, THF; (iv) SMEAH, THF; (v) MnO₂, acetone; (vi) MnO₂, NaCN, AcOH, MeOH; (vii) PDC, *t*-BuOOH, benzene; (viii) 2 M NaOH, MeOH.

(2) 365 nm の照射による iLIAP から LIAP への異性化反応を検証

DMSO 溶液中で iLIAP (*E*型) に 365 nm の光を 100 分照射すると 90%以上が LIAP (*Z*型) になることを確認した。また、*Z*型の安定性(熱による *E*型への異性化)についても調べたところ、*Z*型は暗所下で徐々に *E*型に戻っていくものの、100 時間の時点では約 50%が *Z*型を保持していることが分かった。

(3) LIAP/iLIAP の活性を *in vitro* および *in vivo* で検証

シロイヌナズナ種子発芽試験において、LIAP/iLIAP (*Z/E*=2:8 の混合物)は弱い ABA 様の活性を示し、ABA との共処理においては ABA 拮抗活性を示した。*Z*型が PYL アゴニスト、*E*型がアンタゴニストとして機能した結果、このような生物活性を示したと予測し、*in vitro* PP2C 活性試験により各異性体の活性を評価した。*Z*型は予想通りアゴニスト活性を示したものの、その強さは ABA のそれと比較して 1/10 以下であった。ABA との共処理においては、予想に反して、*Z*型と *E*型のいずれも弱いアンタゴニスト活性を示した。また、*Z*型の生物活性を評価する目的で行った暗所胚軸伸長試験においても、*in vitro* 試験の結果と同様に、両異性体はいずれも弱い ABA 拮抗活性を示した。従って、*Z*体であってもアゾベンゼンの立体障害ゆえに PYL の配座を完全には活性型に誘導することが出来ず、フルアゴニストではなくパーシャルアゴニストとして作用したことが強く示唆された。

(4) ABA よりも光に安定な PYL アゴニストの創出

ABA は長年農業への利用が期待されてきたが、未だその実用化がなされていないのが現状である。この要因の一つは、ABA の側鎖ジエン構造の異性化に由来する光安定性の低さである。本研究で LICAP/i-LICAP の合成検討を進める際に、ABA の側鎖構造を改変した ABA アナログを種々合成しており、その中の一つに ABA よりも光安定性の高い化合物 (BP2A) を見出した。BP2A は側鎖部分にベンゼン環を導入した化合物であり、245/356 nm の照射に対して ABA よりも高い光安定性を示し、シロイヌナズナ種子に対しては ABA に匹敵する発芽阻害効果を示した。本成果は、第 52 回植物化学調節学会で発表し、BP2A をリード化合物として、「光に安定で且つ代謝されにくい ABA 受容体アゴニスト/アンタゴニストの構造基盤設計」を立案した。この研究は、科研費 若手研究 (課題番号: 20K15455) により遂行予定である。

(5) PYL-PP2C 相互作用を完全に妨害する配座制限型 PYL アンタゴニストの創出

(4) と同様に LICAP/i-LICAP の合成検討を進める中で、tetralone-ABA を母骨格とした ABA アナログについても数種類合成しており、その中に既存の PYL アンタゴニストよりも強力に ABA 応答を抑制する化合物(+)-PAT3 を見出した。(+)PAT3 はシロイヌナズナやレタスだけではなく、単子葉植物イネにおいても ABA による種子発芽阻害を抑制したことから、双子葉・単子葉植物いずれに対しても利用可能な化学ツール(ABA 応答阻害剤)であることが示唆された。この研究成果をまとめて、第 53 回植物化学調節学会で発表し、現在、*Organic & Biomolecular Chemistry* に投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 竹内 純, 轟 泰司	4. 巻 54
2. 論文標題 アブシシン受容体の機能制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 植物の生長調節	6. 最初と最後の頁 143-150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岡本昌憲, 竹内 純, 轟 泰司	4. 巻 55
2. 論文標題 アブシシン酸アゴニストの理論設計	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 植物の生長調節	6. 最初と最後の頁 40-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 竹内 純
2. 発表標題 配座制限型ABA受容体アンタゴニストPA04の構造展開
3. 学会等名 植物化学調節学会第53回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋みなみ
2. 発表標題 新規ABA受容体アゴニストの創出
3. 学会等名 植物化学調節学会第52回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹内 純
2. 発表標題 ABA受容体アンタゴニストの構造基盤設計
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第30回若手シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内 純
2. 発表標題 Structure-based development of potent ABA antagonists that completely block PYL-PP2C interactions
3. 学会等名 23rd International Conference on Plant Growth Substances (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高橋 みなみ (Takahashi Minami)	静岡大学・農学部 (13801)	