

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15456

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Development of ABA receptors agonists/antagonists more photochemically and metabolically stable than ABA

研究代表者

竹内 純 (Takeuchi, Jun)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：00776320

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)：アブシシン酸(ABA)は植物の環境ストレス耐性誘導を担っている植物ホルモンであり、長年農業への利用が期待されてきたが、未だその実用化には至っていない。この要因の一つは、ABAの光安定性が低いことであり、これは側鎖ジエン構造のE/Z異性化とシクロヘキセノン環部、 α -不飽和カルボニル基の重合・分解に起因している。本研究では、ABA受容体(PYL)の立体構造に基づいてABAを構造改変することで、これらの構造的要因を出来るだけ取り除いたABAアナログ、BP2Aシリーズを設計・合成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでも、ABAの光安定性を向上させ、植物成長調節剤としての農業利用を目的に複数のABAアナログが合成されてきたが、それらの多くでは生物活性が著しく低下したことから、いずれも実用化には至っていないのが現状である。本研究で合成したMe 1',4'-trans-diol-BP2Aは、UVBおよび日光照射下で殆ど分解されることなく、シロイヌナズナの発芽抑制や乾燥耐性誘導に対しては高いABA様活性を示した。これらの知見は、長年期待されてきた環境ストレス耐性付与剤としてのABAアナログの農業利用を強力に推進するものである。

研究成果の概要(英文)：The plant hormone abscisic acid (ABA) plays a central role in adaptive responses to abiotic stresses that adversely affect crop growth and productivity. However, ABA photo-instability limits its use in agriculture. To overcome this drawback, in this study, we developed photostable ABA analogs, the BP2A compound series, in which the dienoid acid side chain of ABA was replaced with a phenylacetic acid. All BP2A analogs showed higher stability against UVB irradiation at 302 nm than ABA, and one BP2A analog, Me 1',4'-trans-diol-BP2A, barely decomposed even under sunlight conditions. In physiological assays, BP2A and Me 1',4'-trans-diol-BP2A exhibited ABA-like activities, including inhibition of seed germination and induced drought tolerance in Arabidopsis. Furthermore, Me 1',4'-trans-diol-BP2A inhibited seed germination of tomato, lettuce and rice. Thus, this compound represents a potential plant growth regulator that induces ABA-type responses in agricultural fields.

研究分野：生物有機化学

キーワード：アブシシン酸 受容体アゴニスト 光安定性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化が進む現在、食糧をいかに安定供給するかは喫緊の課題となっており、環境ストレス耐性を農作物に付与する技術が種々検討されている。アブシシン酸(ABA)は悪環境下での発芽抑制や耐乾燥性・耐塩性などを担っている植物ホルモンであり、農業現場での利用が可能となれば、農作物の環境ストレス耐性を向上させることで、効率的/安定的な作物生産に繋がると考えられている。しかし、現在この様な目的での ABA の農業利用は殆ど進んでいない。この原因の一つは効果の持続性が低いことであり、これは ABA の光安定性の低さと植物体内での代謝不活性化の速さに起因している。代謝不活性化に関しては、これまでに ABA の 8'位水酸化酵素である CYP707A を標的とした選択的阻害剤が創出されている。一方で、光安定性の向上を目的とした ABA アナログも複数報告されているが、それらの多くは生物活性が著しく低下したことから、いずれも実用化には至っていないのが現状である。

そこで研究代表者らは、ABA が光に不安定である構造的要因に着目し、ABA 受容体 (PYL) の立体構造に基づいて ABA を構造改変することで、高い生物活性を保持したまま光安定性を向上させる ABA アナログの創出を計画した。

2. 研究の目的

ABA が光に不安定である要因は、シクロヘキセノン環と側鎖にカルボニル基を含む共役二重結合を有することに起因している。ABA の側鎖 2 位の幾何異性は Z であるが、弱い UVA (315–400 nm) 照射下で容易に不活性な 2E 体に異性化してしまう。さらに、シクロヘキセノン環部の α,β -不飽和カルボニル基は 320 nm 付近に $n-\pi^*$ 吸収を有するため、光照射によって $n-\pi^*$ 三重項状態になるとラジカルとして振る舞い、その高い反応性によって分解あるいは重合を引き起こす。本研究では、PYL-ABA 複合体の結晶構造に基づいて ABA を構造改変することで、これらの構造的要因を出来るだけ取り除いた ABA アナログを創出し、環境ストレス付与剤として農業利用を実現するための分子基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1) ABA よりも光に安定な ABA アナログ、BP2A シリーズの設計

ABA は PYL との結合時に PYL の配座変化(ゲート閉鎖)を誘導し、フォスファターゼ (PP2C) との三者複合体を形成することでキナーゼ (SnRK2) を開放して、下流の転写因子等を活性化する。X 線結晶構造解析から、ABA が PYL アゴニストとして機能する作用機構が明らかになっている。それによると、側鎖カルボキシ基とシクロヘキセノン環部の疎水性領域が PYL のゲート閉鎖誘導に重要であり、さらに 4'位のカルボニル酸素が水分子を介して PP2C の Trp 側鎖インドール基と水素結合を形成することで PYL-ABA-PP2C 複合体の安定化に寄与している。以上の知見を踏まえ、ABA 側鎖ジエン酸をフェニル酢酸に置換することで光異性化しない構造にした BP2A を設計した。また、Me BP2A (BP2A のメチルエステル体) の α,β -不飽和カルボニル基を還元した Me 2',3'-dihydro-BP2A と Me 1',4'-trans-diol-BP2A、および Me 1',4'-trans-diol-BP2A の 4'位水酸基にホルミル基またはアセチル基を導入した Me 4'-O-formyl-BP2A と Me 4'-O-acetyl-BP2A も設計した。

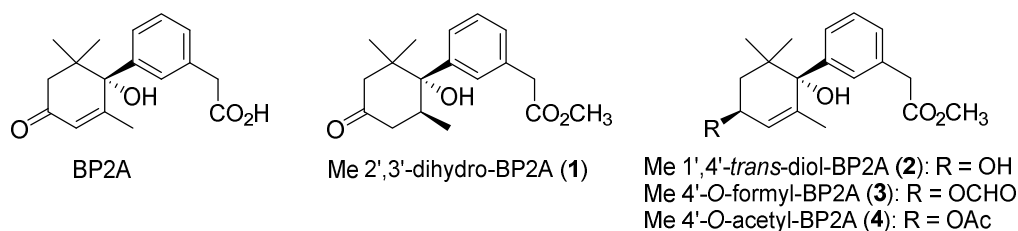


図1. 高光安定性ABAアナログ (BP2Aシリーズ) の構造

(2) UVA/UVB および日光照射に対する光安定性の検証

365 nm (UVA) および 302 nm (UVB) の光を BP2A シリーズに照射し、経時的に残存化合物量を HPLC で測定する。また、屋外での使用を想定して、太陽光照射に対する安定性についても検証する。

(3) in vitro および in vivo における ABA アゴニスト活性の検証

BP2A シリーズが ABA 様の生物活性を有しているかどうかは、主としてシロイヌナズナを用いた種子発芽試験および乾燥耐性試験により調査する。また、大腸菌発現系により調製した PYL と PP2C を用いて、BP2A (アナログ) の PYL-PP2C 相互作用の誘導活性を検証する。

4. 研究成果

(1) 高光安定性 ABA アナログ、BP2A シリーズの合成

2-(3-bromophenyl)ethanol のヒドロキシ基を 4-methoxyphenol で保護した後、4-oxoisohorone の一

方のカルボニル基をアセタール保護したケトアセタールに *n*-BuLi を用いてこれを導入し cerium ammonium nitrate (CAN) を用いてカルボニル基とヒドロキシ基の保護基を外した。その後、AZADOL®を用いてヒドロキシ基を酸化し、BP2A を総収率 12% で得た。

BP2A のカルボキシ基を塩化オキサリルを用いメチルエステルとし、水素化ホウ素ナトリウム (NaBH₄) で α,β -不飽和カルボニル基を還元した後、ヒドロキシ基を PDC で酸化することで Me 2',3'-dihydro-BP2A (1) を合成した。Me 1',4'-*trans*-diol-BP2A (2) は、Me BP2A を塩化セリウム共存下で NaBH₄ と反応させることでカルボニル基を選択的に還元して合成した。また、Me 1',4'-*trans*-diol-BP2A の 4'位水酸基にホルミル基またはアセチル基を導入することで Me 4'-*O*-formyl-BP2A (3) と Me 4'-*O*-acetyl-BP2A (4) を合成した。

(2) UVB および日光照射に対する安定性評価

ABA, BP2A および BP2A アナログ (化合物 1-4) の MeOH 溶液に 302 nm の光を照射し、一定時間ごとにサンプリングして残存量を HPLC で測定した。ABA は 81 分間の光照射でほとんどが異性化または分解し、BP2A も 243 分間で 70% 程度が分解した。一方、化合物 1-4 はいずれも殆ど分解することなく、ABA および BP2A と比較して高い UVB 安定性を示した (図 2 左)。356 nm (UVA) 照射に対しても同様の実験を行い、ABA 以外の化合物は異性化/分解されないことを確認した。

次に、屋外での使用を想定して太陽光に対する安定性を調べた。ABA, BP2A および化合物 1-4 の水溶液 (100 μ g/mL) をガラスシャーレに入れ、屋上に 6 時間静置した。6 時間後の各化合物残存量を測定したところ、ABA および BP2A は 40-50% 程度が異性化または分解した一方、化合物 1-4 はいずれも 90% 程度が分解されずに残存していた (図 2 右)。以上の結果より、ABA 側鎖ジエン酸およびシクロヘキセノン環部 α,β -不飽和カルボニル基の構造改変は、UVB および太陽光に対する光安定性の向上に有効であることが実証された。

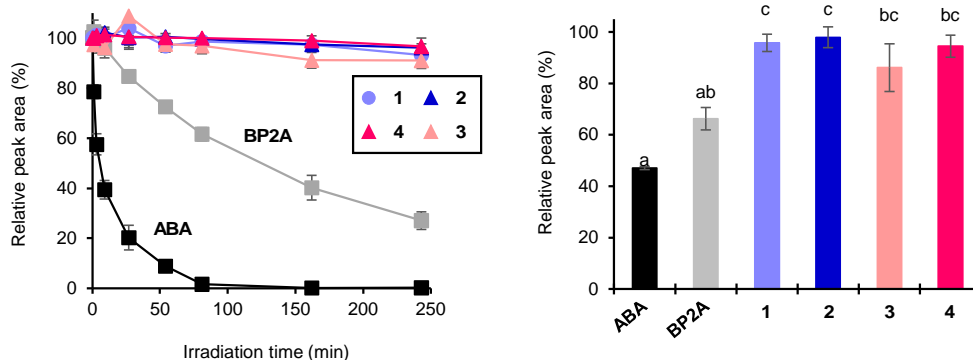


図2. ABAアナログ (化合物1-4) のUV 302 nm照射 (左) および日光照射 (右) に対する安定性評価。
(*n*=3, エラーバー: SDs, *P*-value <0.05, Tukey's test)

(3) BP2A アナログ (化合物 1-4) の生物活性評価

BP2A アナログ (1-4) の ABA 様活性を調べるために、シロイヌナズナ種子発芽に対する阻害活性を ABA および BP2A のそれと比較した。化合物 1 は 3 μ M 処理しても全く種子発芽を阻害しなかったが、化合物 2 と 3 は BP2A と同程度の阻害活性を示した。また、化合物 4 も BP2A と比較すると僅かに弱いものの、1 μ M 以上の処理でシロイヌナズナの種子発芽を阻害した。以上の結果から、BP2A のシクロヘキセノン環上の二重結合は ABA 受容体との結合に重要であることが示唆された。一方、4'位カルボニル基の改変は *in vivo* における ABA 様活性に殆ど影響を与えないことが分かった。

(4) シロイヌナズナの ABA 受容体 (PYLs) に対する BP2A アナログの活性評価

次に、PP2C の脱リン酸化活性を指標にして BP2A アナログ (化合物 2 と化合物 3) の PYL アゴニスト活性を評価した。メチルエステル体では PYLs と結合しないことが分かっているので、化合物 2 と 3 はカルボン酸フリー体 [2'および 3'] として試験に供した。ABA の様な PYL アゴニストは、PYLs と結合して PYL-アゴニスト-PP2C 複合体を形成することで、PP2C の脱リン酸化活性を阻害する。本試験では、PP2C として HAB1 を、PYLs として PYR1, PYL1-6, PYL8-10 を用いて、BP2A アナログのアゴニスト活性の強さおよび PYL サブタイプ選択性を検証した。

化合物 2'および 3'は PYL5 を除く試験した全ての PYLs に対して殆どアゴニスト活性を示さなかった。また PYL5 に対しても、50% 阻害濃度 (IC₅₀) は 39 μ M (2') と 1.8 μ M (3') であり、ABA (0.078 μ M) や BP2A (0.11 μ M) の 20-500 倍の値であった。これらの結果から、ABA/BP2A の 4'位カルボニル基の構造改変は PYL アゴニスト活性を著しく低下させることが分かった。また、シロイヌナズナ種子発芽試験で見られた化合物 2 および 3 の ABA 様活性は、それら自体の PYL アゴニスト活性に由来するものではなく、両化合物は植物体内で PYL アゴニスト (恐らく

BP2A) に変換されることが強く示唆された。

(5) Me 1',4'-trans-diol-BP2A (化合物 2) の作用機構解明

上記仮説を確かめるために、化合物 2 の 2,3',5',7' 位の水素が重水素で置換された [2,2,3',5',5',7',7',7'-²H₈]-2, *d*₈-2, を合成し、10 日齢のシロイヌナズナ子葉に投与して、その植物抽出液を LC-MS で分析した。化合物 2 を投与した植物体の抽出液からは BP2A のピークが検出され、*d*₈-2 を投与した植物体からは *d*₈-BP2A のピークが検出された。以上の結果から、化合物 2 は植物体内で BP2A へと代謝され、ABA 様活性を示すプロドラッグとして機能することが示唆された。

(6) 他の植物種に対する Me 1',4'-trans-diol-BP2A (化合物 2) の効果

化合物 2 がシロイヌナズナ以外の植物種に対しても ABA 様活性を示すかどうかを確かめるために、トマト (*Lycopersicon esculentum*), レタス (*Lactuca sativa*) およびイネ (*Oryza sativa*) の種子を用いて発芽試験を行った。シロイヌナズナに対する効果と同様に、化合物 2 はトマトとレタスの種子発芽を阻害し、その効果は BP2A よりも僅かに強い結果となった。また単子葉植物であるイネに対しても発芽阻害活性を示し、化合物 2 の効果はシロイヌナズナに限定されるものではないことが分かった。

以上の研究成果をまとめて、第 55 回植物化学調節学会で発表し、*J. Agric. Food Chem.* に報告した [Takeuchi, J., Mimura, S., Ohnishi, T. & Todoroki, Y. Photostable Abscisic Acid Agonists with a Geometrically Rigid Cyclized Side Chain. *J. Agric. Food Chem.* **70**, 869–876 (2022)]。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Takeuchi Jun, Mimura Saya, Ohnishi Toshiyuki, Todoroki Yasushi	4. 巻 70
2. 論文標題 Photostable Abscisic Acid Agonists with a Geometrically Rigid Cyclized Side Chain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 869 ~ 876
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jafc.1c06321	査読の有無 有
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹内 純, 御村紗也, 松橋みなみ, 轟 泰司
2. 発表標題 ABAよりも光に安定な受容体アゴニストの創出
3. 学会等名 第55回植物化学調節学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------