

# 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

鳥取大学  
乾燥地研究センター  
科学技術振興機構・さきがけ

岡本 昌憲

## はじめに

植物ホルモンのアブシジン酸 (abscisic acid: ABA) は、気孔閉鎖、乾燥などの環境ストレスに対する抵抗性や種子の休眠誘導、シュートや根の成長制御に関わる。これら ABA の生理作用は陸上植物の多くで観察され、植物種によっては果皮色素の蓄積促進など特異的な生理作用を示す。したがって、ABA が農業に広く利用されていても良いと思えるが、オーキシンやジベレリンなどの他の植物ホルモンに比べれば、利用の普及は十分とは言えない。その理由として、ABA の価格の問題、投資に見合った利益・有益性がもたらされるのか不明である点など複合的な問題があるように思われる。一方で、ABA を多量に生産するカビの発酵技術を利用して、ABA を配合した肥料が販売され、ミヨビ農法として多様な植物において ABA の効果が認められている。野外における ABA の効果は、環境の安定した実験室内で見られる効果とは大きく異なり、植物の成長促進、果実の肥大や成熟促進、耐病性獲得など農業において有益である効果が認められることが示されている (禿 2011)。近年の気候変動により、環境ストレスによる農作物被害が増えており、ABA の働きを制御する化合物を利用することで、これら被害が緩和できれば、ABA の特性を利用した植物成長調整剤の普及が拡大するかもしれない。ABA 受容体

が明らかにされたことから、受容体に作用する化合物開発が加速し、新たな植物成長調整剤が創出されることも期待される。そこで、ABA 受容体の発見や特徴について解説するとともに、受容体発見から期待される新たな展開を述べるとする。

## 1. ABA の特性を生かした植物成長調整剤

ABA は陸上植物に普遍的に存在し、植物が乾燥ストレスを受けると内生 ABA 量が増加し、乾燥ストレスから解放されると、内生 ABA 量は減少する。また、乾燥種子には多くの ABA が蓄積しており、種子が発芽する際には、種子内の ABA 量が減少する必要がある。さらに、植物種や器官によって ABA の内生量は様々であり、例えば、トマト、アボカドやブルーベリーなどの果実には、一般的なホルモンと定義されている内生量としては、信じられないくらいの多量の ABA が蓄積している。我々人類は、食糧に含まれている ABA を日常的に摂取していることから、ABA が人体に及ぼす毒性はほとんど無いと考えられる。したがって、ABA を利用したミヨビ農法は、人体に毒性のない安全性の高い方法といえる。一方で、ABA は、強光によりその半分は活性の無い異性体へ平衡的に変化し、さらには空気酸化や土壌細菌・微生物などによる加水分解のほか、植物体内では ABA 不活性化酵素によって不活性化されてしまうな

ど不安定な化学特性を有している。実際に、農業市場で広く利用されている植物ホルモンに関連した植物成長調整剤の多くは、天然の植物ホルモンとは異なる化学構造を有しており、受容体に作用するアゴニストやアンタゴニストであったりする。このことから、ABA の特性を広く活用するためにも、ABA アゴニストやアンタゴニストの開発や利用も必要と思われる。しかし、ABA 受容体の実体が分からなければ、多数の人工化合物ライブラリーが利用できる現代においても、それら化合物を狙い撃ちで開発するのは容易なことではない。

## 2. ABA 受容体のシグナル伝達機構

2009 年に ABA 受容体の実体が報告されてから、高等植物において ABA のシグナル伝達経路は、明瞭なシグナル経路が確立されている (図 1) (Cutler ら 2010)。ABA 受容体が ABA に結合していない場合、PP2C は通常タンパク質リン酸化酵素である SnRK2 のキナーゼ活性を抑えている。一方、ABA が受容体に結合すると、ABA を取り囲んだ受容体は、PP2C に結合し、PP2C の脱リン酸化活性を阻害する。その結果、SnRK2 は PP2C からの阻害制御から解放され、SnRK2 の自己リン酸化活性により、標的タンパク質をリン酸化することで、ABA の生理作用が誘導される。SnRK2 の標的タンパク質は、気孔閉

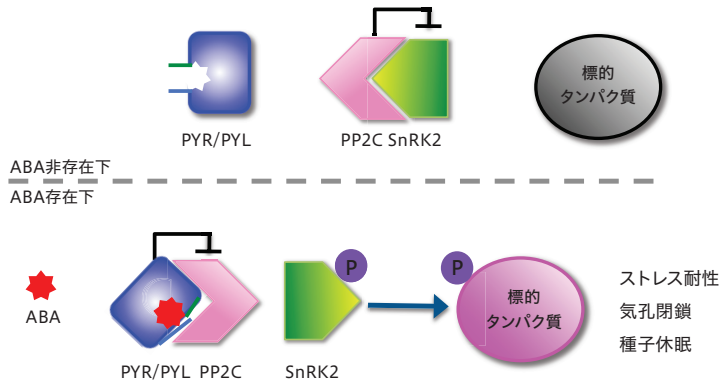


図-1 高等植物における ABA シグナル伝達経路

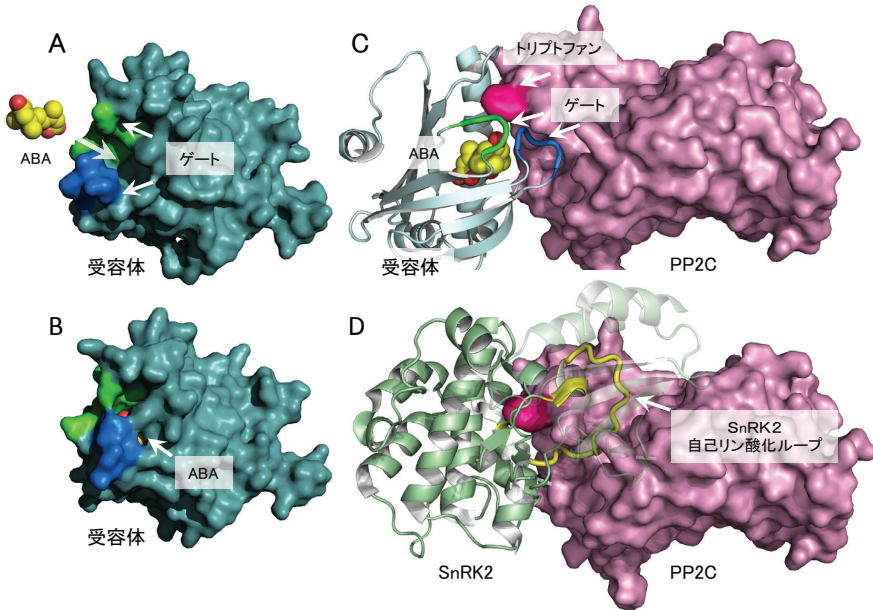


図-2 A. ABAが受容する前の受容体。ゲートが開いており、リガンドがはまるポケットが見える。  
 B. ABAを受容した受容体。ゲートが閉じて、ABAを包み込んでいる。  
 C. ABAを受容した ABA 受容体と PP2C の複合体。ABA 受容体の青いゲート部分が PP2C の活性部位に蓋をするように結合して、PP2C の活性を阻害している。また、PP2C のトリプトファン残基（マゼンダ色）は ABA と ABA 受容体のゲート部分と強固な水分子を介した水素結合ネットワークにより、受容体と PP2C の結合に鍵をかける（図-5 参照）。  
 D. PP2C が SnRK 2 の自己リン酸化ループ（黄色）を挟み込み、SnRK2 の活性を阻害する様子。

鎖に関わる孔辺細胞の細胞膜に存在する陰イオンチャネル (SLAC1) や核内で機能する転写因子である。転写因子は、ABA 応答性遺伝子のの上流によく共通してみられる ABA 応答性のシス配列 (ABRE) に結合する bZip 型転写因子の AREB や ABI5 などが知られており、これらは、ストレスに抵抗性を示すための LEA、プロリンや糖などの適合溶質の蓄積のための合成遺伝子を標的として、植物のストレス耐性

に寄与する。

### 3. ABA 受容体の特徴

ABA 受容体が明らかにされると、ABA がどのように受容体に結合しているかを分子レベルで理解できる。ABA と受容体のタンパク質結晶構造解析から得られる情報は、新たな化合物開発にも大きな貢献をもたらす。受容体には低分子が入り込む空洞部分

が存在し、ABA を受容すると、二つのループの構造（以降、ゲートと呼ぶ）が変化を起こし、ABA が入り込んだ後に、ちょうど蓋をしたような安定的な構造をとる（図-2）。ABA の活性に重要なカルボキシル基やカルボニル酸素に注目すると、なぜこれらの官能基が ABA の生理活性に重要であるかが見えてくる (Melcher ら 2009; Miyazono ら 2009)。ABA のカルボキシル基は、受容体の空洞部とイオンペアや水分子を介した水素結合ネットワークによって受容体内部にしっかりと ABA を固定するための機能があることが明らかにされた。さらに、ABA の環上のカルボニル酸素は、受容体ゲート部分と共に、水分子を介した水素結合ネットワークによって PP2C のトリプトファン残基のインドール環と強力に結ばれる（図-5）。この結合は、PP2C のトリプトファン残基が受容体との結合に鍵をかけてロックするような機能を有する。さらに、受容体の構造変化を起こしたゲートの一つが、PP2C の活性部位に蓋をするような形で結合しており、この結合様式により PP2C の活性を阻害する。では、なぜ PP2C の活性阻害が ABA のシグナル伝達に必要なのかは、PP2C と SnRK2 のタンパク質結晶構造をみると理解しやすい。ABA 非存在下においては PP2C の活性部位は、SnRK2 の自己リン酸化ループを挟み込むようにして、SnRK2 の活性を阻害している。つまり、ABA 存在下では、ABA 受容体複合体が PP2C と結合で

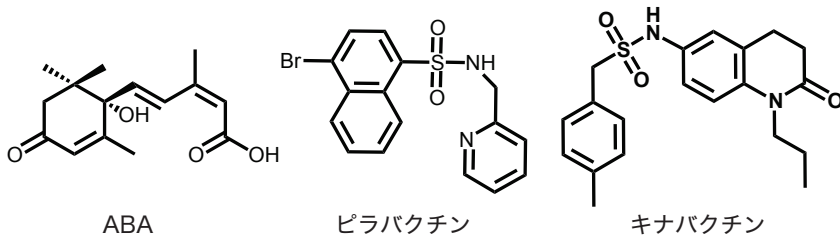


図-3 ABAとABAアゴニストであるピラバクチンとキナバクチンの化学構造。ピラバクチンとキナバクチンはスルホンアミドを共通に有している。

きるようになり、SnRK2はPP2Cが離れることで、自己リン酸化活性を回復させて、標的タンパク質をリン酸化することで、ABAシグナルが伝えられる(図-1, 2)。

#### 4. ABAアゴニストの開発とABA受容体の機能

ABA受容体の発見以降、受容体に作用して、ABAシグナルを制御する

化合物が次々と報告されてきている(図-3)。ピラバクチンは、ABA受容体の発見の立役者になったものであり、先に述べたように、シロイヌナズナの種子発芽試験によるケミカルスクリーニングによって発見され、分子生理学的解析からABAアゴニストとして定義された。ピラバクチンは、シロイヌナズナのPYR1とPYL1に作用する選択的ABAアゴニストであり(図-4)、この化合物は種子の発芽阻害の

みに作用し、植物の乾燥ストレス耐性には作用しない。そのために、PYR1とPYL1以外のABA受容体がシロイヌナズナの植物体のABA応答に重要であることが示された。一方で、ピラバクチンはPYL2受容体に対してはアンタゴニストとしても作用する(Melcherら2010)。つまり、ピラバクチンは受容体によってアゴニストであったり、アンタゴニストであったりする。したがって、植物のABA応答

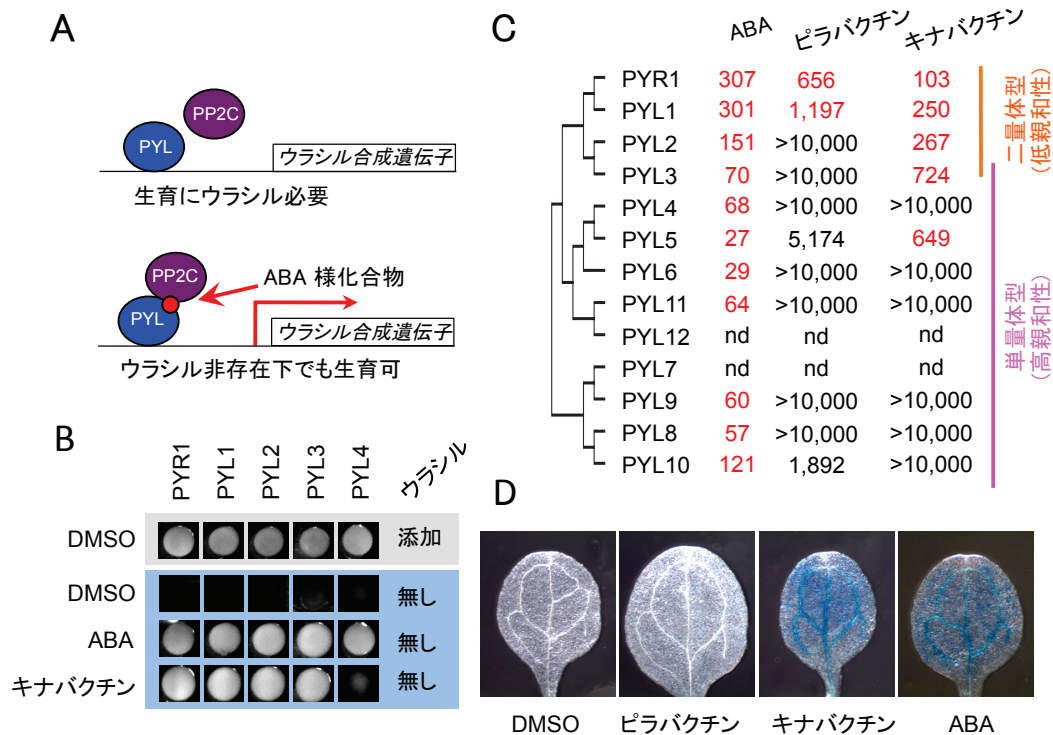


図-4 A. ウラシル要求性酵母を使ったABAアゴニストの検出システム。ABA受容体とPP2Cが結合すれば、ウラシル合成が起きるようなシステム。B. ABA受容体に作用する化合物が培地中に存在すれば、ウラシル非存在下でも酵母が生育できる様子。大量の化合物ライブラリーからABAアゴニストをバイオアッセイ無しに、高速で検出することができる。C. シロイヌナズナのABA受容体におけるリガンド選択性。リガンド依存的なABA受容体(100nM)によるPP2C(50nM)活性の半数阻害濃度(IC50; 単位はnM)を示す。キナバクチンは主に二量体型ABA受容体に作用し、PYR1受容体の活性化はABAよりも強い。10uMの化合物によりPP2Cの活性が80%以上阻害された場合には赤い数字で示した。単量体型ABA受容体の方は二量体型に比べ、低濃度のABAでPP2Cの活性を阻害できる。D. *proMAPKKK18::GUS*を用いたキナバクチンの作用部位の検出。キナバクチンはABAと同等の組織と細胞で作用する。



を制御するには、ピラバクチンとは異なるタイプの ABA アゴニストが求められていた。そこで、筆者らは、植物体の ABA 応答を起こすことのできる ABA アゴニストを探索するために、ABA 応答をモニターできる酵母ツーハイブリットアッセイ (Y2H) とシロイヌナズナ種子発芽試験から、ABA と同程度の濃度で強力に種子発芽阻害をもたらす ABA アゴニストを発見し、キナバクチンと名付けた (図-3, 4) (Okamoto ら 2013)。同定したキナバクチンは幸運なことに、シロイヌナズナやダイズにおける植物体の ABA 応答を ABA と同程度の強さで誘導することができ、乾燥ストレス耐性を向上させることができた。興味深いことに、キナバクチンは PYR1 から PYL3 の 4 種の 2 量体型 ABA 受容体をほぼ完全に活性化しているのみで、単量体型 ABA 受容体に対してはピラバクチンと同様に作用が弱い。この結果から、種子の発芽阻害に加えて植物体の ABA 応答には、2 量体型 ABA 受容体の活性化だけで十分であることが推測された。実際に、シロイヌナズナのキナバクチンが標的とする受容体をほぼ欠損する *pyr1pyl1pyl2pyl4* 四重変異株においては、キナバクチンによる ABA 応答が消失した。さらに、この *pyr1pyl1pyl2pyl4* 四重変異株は、9 種の単量体型 ABA 受容体が正常であるにもかかわらず、ABA 応答が大幅に減少していることから、植物体の ABA 応答には、2 量体型 ABA 受容体が主要な役割を果たしていることが考えら

れている。興味深いことに、単量体のみで構成されている ABA 受容体の六重変異株を筆者らは作成しているが、典型的な萎れなどの表現型を示していない。単量体型の機能はまだよく明らかにされていないが、シロイヌナズナ ABA 受容体 PYL8 は側根形成に関わるオーキシン関連の転写因子と ABA 非依存的に結合していることが示されている (Zhao ら 2014)。さらに、シロイヌナズナ ABA 受容体 PYL 6 はブラシノステロイド、サイトカイニン、ジャスモン酸、サリチル酸のシグナル伝達に関わる BZR1, bHLH064, MYC2, TGA1 と核内で ABA 非依存的に結合することから、単量体型 ABA 受容体は、他のホルモンとの相互作用に関わっている可能性が示唆されており、今後より詳細な機能解析が期待されている (Yazaki ら 2016)。

一方、モデル植物以外においても徐々にではあるが、ABA 受容体の機能が示されてきている。イチゴの ABA 受容体を RNAi により発現を抑えることで、果実の成熟が遅くなり、色づきの程度 (アントシアニンの蓄積) も低下することが示された。このことから、ABA 受容体はイチゴの果実の成熟に関わっていることが示されている (Chai ら 2011)。イネにおいては、ABA 受容体を過剰発現することで、乾燥ストレス耐性や塩ストレス耐性を向上できるが、収量に関しては、逆に減少する (Kim ら 2014)。したがって、ABA 受容体の過剰作用による負の形質を低減させるためにも、器官特異的

あるいはステージ特異的な ABA 受容体の制御が必要かもしれない。

## 5. ABA 活性の強いアゴニストとは

多くのスクリーニング方法により、ABA アゴニストが *in vitro* 系の実験系によって次々と発見されているが、特定した化合物が実際の植物で生理活性が認められない場合や生理活性が非常に弱いことが多い。その理由として、化合物の可溶性、植物体への取り込みや植物体内での輸送・代謝などの原因が考えられる。しかし、一方で、活性の弱いピラバクチンと活性の強いキナバクチンとの受容体タンパク質結晶構造解析から、化合物活性の強弱に関わる要因の一つが判明した (Okamoto ら 2013)。ピラバクチンとキナバクチンの受容体結合様式を比較すると、スルホンアミドという部分は ABA のカルボキシル基をミミックするように、同じ作用をしていることが分かる。一方、キナバクチンのカルボニル酸素と ABA の環上のカルボニル酸素は、水分子を介して PP2C のトリプトファン残基のインドール環 (マゼンダ色) や受容体ゲート部分 (薄茶色部分) と水素結合ネットワークを形成しており、同じ機能を果たしていることが判明した。一方、ピラバクチンはその結合ネットワークが欠損していることが分かった (図-5)。このことから、活性の強い ABA アゴニストとしての特徴は、ABA のカルボキシル基とカ

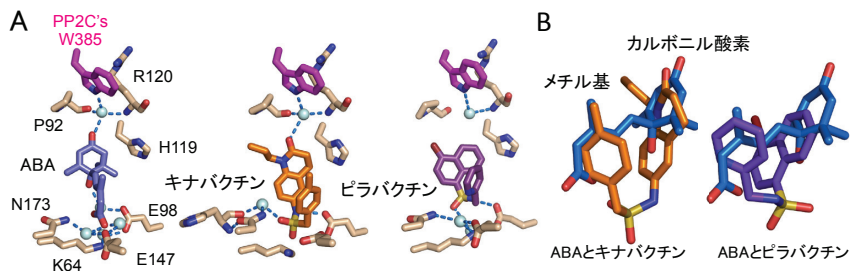


図-5 A. 水分子を介した受容体-リガンド-PP2Cの結合ネットワーク。ABAとキナバクチンのカルボニル酸素が水分子を介してPP2Cのトリプトファン残基のインドール環(マゼンダ色)や受容体ゲート部分(薄茶色部分)と水素結合ネットワークを形成している。ピラバクチンではこの結合ネットワークが不完全である。  
B. リガンド結合ポケット内におけるABAとキナバクチン、ABAとピラバクチンの配座比較。ABAとキナバクチンのカルボニル酸素およびABA活性に必要な側鎖6位のメチル基をキナバクチンのメチル基は、リガンド結合ポケット内で綺麗オーバーラップしている。

ルボニル酸素の機能を上手くミミックできているどうかにあると思われる。実際に、カルボキシル基をミミックできるスルホンアミドをもつケミカルライブラリーをバイオアッセイすると、高確率でABAのアゴニストを発見できる。受容体構造の情報に基づき、化合物の改変や特徴を見出すことで、だれでも容易にABAのアゴニストが開発できる時代になったと言える。しかし、ABAアゴニストを市場へと展開するには、化合物の安全性試験を徹底的に行わなければならない、膨大なコストを必要とする。この欠点を補うために、すでに病原菌のための殺菌剤農薬として登録されているマンジプロバミドがABAの受容体にはまり込み、さらには、ABA活性がもたらされるように、ABA受容体側のリガンド結合ポケットに複数の変異を導入したトランスジェニックがシロイヌナズナとトマトで作出された。これらの植物は、マンジプロバミドが投与されるだけで、ABA受容体を改変して人工的に創出されたマンジプロバミド受容体を介してPP2Cの活性が阻害され、ABA応答が引き起こされることが示された(Parkら2015)。この研究事例は、既存農薬の再利用方法を示した画期的な方法と言えるかもしれない。

## 6.ABA アнтаゴニスト

ABA受容体に結合し、ABA作用を阻害するアンタゴニストの開発はアゴニスト開発と比べて困難と言える。理由は、異なるタイプのABA受容体が多数存在し、すべての受容体に結合して、さらに標的タンパク質の結合を阻害する必要があるからである。人工化合物であるピラバクチンは、

ABA受容体PYR1やPYL1に対してはアゴニストであるが、PYL2に関してはアンタゴニストとして作用する(Melcherら2010)。実際に、ピラバクチンが選択的にPYL2受容体に対してアンタゴニスト活性を有していても、植物に投与した場合、ピラバクチンはABAの効果を遮断できる活性はない。では、どのようにアンタゴニストを開発すればよいのだろうか？ そのヒントは、ABA受容体のタンパク質結晶構造の情報に隠されていた。報告されているABA受容体の構造を解析すると、ABAを包み込んだ受容体には、必ずトンネルが二つ存在している(図-2)。トンネルの一つは、先述

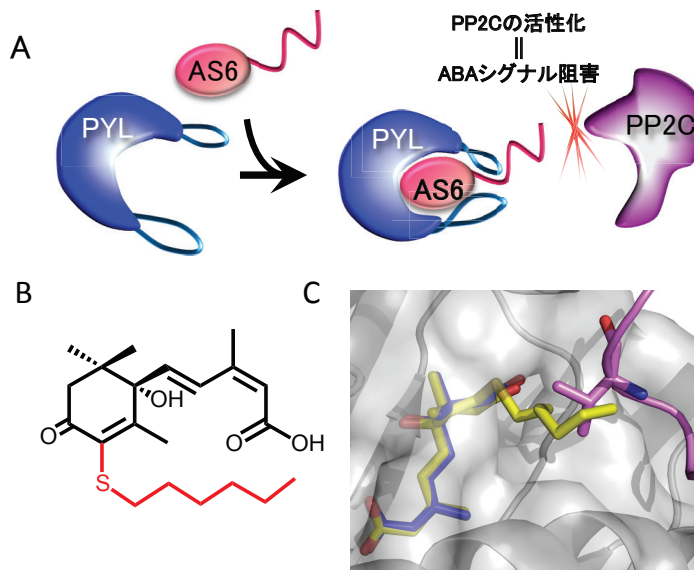


図-6 A. ABAアンタゴニストの設計理論。ABA受容体に存在するトンネルからPP2Cとの結合を阻害するような化合物であれば、ABAのシグナルを遮断できる。ABA受容体の制御を受けなくなったPP2CはSnRK2を不活性化して、ABAのシグナルをブロックする。  
B. 理論に基づき設計・合成されたABAアンタゴニストのAS6。  
C. AS6(黄色)とABA(青)との立体配座比較。受容体リガンドポケット内から細いトンネルを通じて受容体表面の外へ突き出たAS6のヘキシル鎖はPP2C(マゼンダ色)のバリン残基と障害を起こす位置にある。この障害によって受容体とPP2Cの結合が阻害され、ABAの生理作用を抑制できる。

したように受容体と ABA が PP2C のトリプトファン残基と水分子を介した水素結合のために必要なトンネルである。残りのトンネルは、PP2C との結合に特に関係しておらず、ゲートが閉鎖してそれに伴ってできたトンネルであり、しかもそのトンネルは PP2C の方向へ向いている。そこで、ABA の 3' 位にアルキル鎖を導入して、このトンネルを通じて PP2C の結合を阻害するための障害物を有する ABA アナログが合成された (図 -6)。アルキル鎖が受容体表面から突き出ると想定される長さになると、植物に対して ABA のアンタゴニスト活性を有することが示された (Takeuchi ら 2014)。適度なアルキル鎖と適度な可溶性を有したアンタゴニスト AS6 は ABA 受容体と標的タンパク質の相互作用を阻害し、さらにタンパク質結晶構造解析においても、AS6 が ABA 受容体にはまり込んで、障害物のみが外に突き出ていることが確かめられた。この発表以降、ABA 骨格を基本にした活性の強い阻害剤が開発されはじめてきている。将来的には、ABA アナログではない合成の容易なアンタゴニストが開発されれば、利用普及が期待できるかもしれ

ない。

## おわりに

ABA 受容体に作用する化合物が次々と開発されている。しかし、本当に使えるものかどうかは、地道に、様々な環境下や植物種、投与方法や濃度、投与タイミングそして安全性の確認など多くの課題が残っている。一方で、気候変動は確実に世界の食糧生産性に影響を与えており、安定的かつ高品質の農作物の生産に ABA が寄与できるのかどうか？ まさに ABA が植物成長調節剤として利用価値があるのかどうか？ 評価・検証する時期が到来したものと思われる。

## 引用文献

- 禿泰雄 2011. ミヨビ農法 150pp. 農山漁村文化協会
- Chai, Y.M. *et al.* 2011. FaPYR1 is involved in strawberry fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 62, 5079-5089.
- Cutler, S.R. *et al.* 2010. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 651-679.
- Kim, H. *et al.* 2014. Overexpression of PYL5 in rice enhances drought tolerance, inhibits growth, and modulates gene expression. *J. Exp. Bot.*

65, 453-464.

- Melcher *et al.* 2009. A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* 462, 602-608.
- Melcher, K. *et al.* 2010. Identification and mechanism of ABA receptor antagonism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1102-1108.
- Okamoto, M. *et al.*, 2013. Activation of dimeric ABA receptor elicits guard cell closure, ABA-regulated gene expression and drought tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110, 12132-12137.
- Park, S.Y. *et al.* 2009. Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science* 324, 1068-1071.
- Park, S.Y. *et al.* 2015. Agrochemical control of plant water use using engineered abscisic acid receptors. *Nature*, 520, 545-548.
- Takeuchi, J. *et al.* 2014. Designed abscisic acid analogs as antagonists of PYL-PP2C receptor interactions. *Nat. Chem. Biol.* 10, 477-482.
- Yazaki, J. *et al.* 2016. Mapping transcription factor interactome networks using HaloTag protein arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113, E4238-4247.
- Zhao, Y. *et al.* 2014. The ABA receptor PYL8 promotes lateral root growth by enhancing MYB77-dependent transcription of auxin-responsive genes. *Sci. Signal.* 7, ra53.