

## 「苗」研究のエントリーシート

研究テーマ	植物ステロイドホルモンに関する化学生物学的研究 生合成阻害剤の開発からブラシノステロイドアゴニスト創製への展開		
研究代表者	王 敬銘	役職	准教授
フリガナ	オウ ケイメイ	学位	博士(農学)
学科等	応用生物科学科	Eメール	<a href="mailto:jmwang@akita-pu.ac.jp">jmwang@akita-pu.ac.jp</a>
主な共同研究者 (学外)	本研究は東京大学創薬オープンイノベーションセンターの支援を受けた研究である		
研究の内容			
<p><b>研究の概要</b></p> <p>近年、ブラシノステロイド (BR) のストレス耐性を植物付与する機能やコメの収穫量を向上させる活性など、農業の生産性の向上に直結する生理作用が解明されてきたことを受けて、農業生産における BR の利用に対する関心がかつてなく高まっている。しかしながら、天然物である BR は大量の入手が困難であるために、農業面においては、BR は利用されていない。</p> <p>BR と異なる構造を有する非ステロイド型の化合物で、BR の受容体に働いて、その活性化を促す物質である BR アゴニストの研究開発は、BR の利用を図るための有効なアプローチである。本研究では、BR アゴニストを開発するために、高効率 BR アゴニストのスクリーニング系を開発することを目的とする。また、BR 受容体の立体構造に基づくコンピュータースクリーニングを通して構築した化合物ライブラリーを用いて、BR アゴニストを追求することも意図している。</p>			
<p><b>研究の背景と目的</b></p> <p>BR の生理作用研究において、BR 生合成遺伝子 DWF4 を稲に過剰発現させると、稲の収穫量は 15~44% 増加したとの報告がある (Wu, C. Y. <i>et al.</i>, <i>Plant Cell</i> <b>2008</b>, <i>20</i>, 2130–2145)。また、BR は植物の病原菌抵抗性反応を誘導する役割を果たしていることが明らかにされており (Nakashita, H. <i>et al.</i>, <i>Plant J.</i> <b>2003</b>, <i>33</i>, 887–898; Albrecht, C. <i>et al.</i>, <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> <b>2012</b>, <i>109</i>, 303–308), さらに植物の耐塩機能を向上させる作用を有することも示されている (Shahbaz, M. Ashraf, <u>M. Athar</u>, H. R. <i>Plant Growth Regul.</i> <b>2008</b>, <i>55</i>, 51–64)。これら農業の生産性の向上に直結する BR の生理作用に基づき、植物細胞内 BR 内生量を調節する技術の研究開発がクローズアップされ、農業の生産性の向上における BR の利用に対する関心が高まっている。しかしながら、天然物である BR は大量入手が極めて困難であるなどの理由から、BR を実用化するには幾つかの課題が残されている。</p> <p>安定性に優れ、安価で大量生産可能な BR 活性を示す化合物の開発は、BR の利用における重要な研究課題として注目されている。これを解決するため有力な手法としては、BR 受容体に働いて BR と同様の機能を示す非天然型作動物質 (BR アゴニスト) の研究開発である。</p> <p>近年、BR の情報伝達に深く関わっているタンパク質である BRI1 が BR の細胞膜受容体であることが証明され (Wang, Z. Y.; Seto, H.; X. Fujioka, S.; Yoshida, S.; Chory, J. <i>Nature</i> <b>2001</b>, <i>410</i>, 380–383)、細胞膜上に存在する BRI1 の細胞外ドメインの結晶構造を明らかにされた (Hothorn, M. <i>et al.</i>, <i>Nature</i> <b>2011</b>, <i>474</i>, 467–471)。BR 受容体とリガンドの結合部位に関する重要な情報が得られたことを受けて、BRI1 に作用するリガンド構造の推測を可能になり、BR 受容体に作用する BR アゴニスト開発の機運がかつてなく高まっている。</p>			

本研究では、BR アゴニストの高効率スクリーニング系を開発し、化合物ライブラリーを用いた大規模 BR アゴニストのスクリーニングと化学合成研究を計画している。

## 研究の手法

### 【BR アゴニスト高効率スクリーニング系の開発】

BR アゴニストのスクリーニング系を開発するには、簡便且つ効率良く BR の活性を検定する方法が必要である。BR の活性を検討する方法としては、稲を用いたラミナジョイントアッセイ法が開発されたが、この方法は手間がかかり、多数の被験化合物の BR 活性を測定するには適していない。我々は、BR 生合成に作用する生理活性物質を研究する過程で、極めて低濃度で ( $IC_{50}=50\pm 10$  nM) BR 生合成を選択的に阻害する薬剤 (**Ycz**) を発見した (Oh, K.; Yamada, K.; Asami, T.; Yoshizawa, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*,1625-1628)。

**Ycz** は暗発芽したシロイヌナズナ幼植物に対して、特異的に矮化と子葉展開 (脱黄化) の形態を同時に誘導する生理活性を示す。また **Ycz** 処理によって誘導される植物形態の変化は BR 処理により打ち消されることが明らかにされている。我々は、**Ycz** の持つ生理活性が BR アゴニストの活性を測定する時に極めて有用であることを見出した。

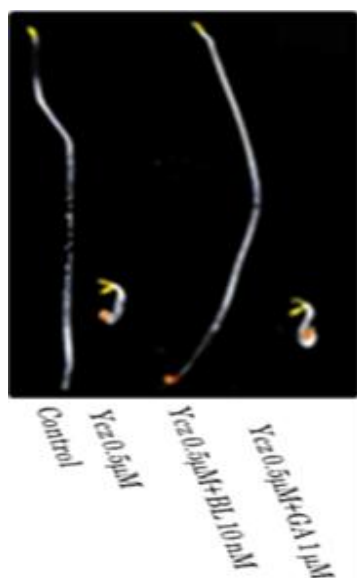


図 I **Ycz** を利用した BR 活性検定法

その一例を図 I に示す。**Ycz** 或いは **BR** などの化合物を所定濃度で MS 寒天培地に添加し、シロイヌナズナ種子を寒天培地に播種した後、五日間暗条件下で発芽させ、化合物処理により誘導される植物の形態を観察することにより BR の活性を選択的に観測することができる。即ち、無処理区では (図 I 左の植物)、暗発芽 5 日目の植物が約 2 cm まで伸長し、子葉が閉じた状態であった。**Ycz** 添加区においては (図 I 左から二番目の植物)、植物の伸長が強く抑制され、黄色の子葉を展開する形態が観測された。一方、**Ycz** と BR の活性本体と考えられているブラシノリド (BL) を同時に処理した植物においては (図 I 右から二番目)、著しい生長回復が見られ、また、伸長回復した植物の子葉は無処理区と同じように閉じた状態であった。他方、植物の伸長生長に関わるホルモンであるジベレリン ( $GA_3$ ) と **Ycz** を同時に処理した植物においては (図 I 右の植物) 植物の胚軸伸長が強く抑制され、子葉も **Ycz** 処理区と同じように展開する形態を示した。この実験結果から、**Ycz** 処理で誘導される植物の矮化と脱黄化の形態は、BL 処理により打ち消されたが、 $GA_3$  処理では打ち消されなかったことを示している。

以上の実験結果から、**Ycz** 処理により作成したシロイヌナズナ幼植物を用いて、被験化合物をこれらの植物に添加し、**Ycz** で誘導される矮化と脱黄化の形態を打ち消すことができるかどうかを観測することにより、**被験化合物の BR アゴニスト活性を示すかどうかを容易に判定できる**。本方法は、シロイヌナズナの暗発芽を基本とする実験系であるので、一度に大量の種子を播種することが可能であり、多数の被験化合物の BR アゴニスト活性を評価することができる。本研究では多数のサンプルを一度処理可能な 96 ウェルマイクロプレートを利用し、BL をポジティブコントロールとする多数の被験化合物に適する BR アゴニストのスクリーニング系を確立する。

### 【化合物ライブラリーを用いた BR アゴニストの大規模スクリーニング】

BR アゴニスト候補化合物群は、東京大学創薬オープンイノベーションセンターで確立された 21 万化合物を含む化合物ライブラリーをベースに、BR 受容体の立体構造に基づくコンピューターによるスクリーニングを通じて構築した 1 万化合物の化合物ライブラリーを用い、BR アゴニストのスクリーニングを行う。スクリーニング結果を常に東京大学創薬オープンイノベーションセンターにフ

イードバックし、新しい化合物群の選択に集中し、BR アゴニストの発見に努める。目的に適した化合物（以下、ヒット化合物と略記）が得られた場合には、有機合成の手法でヒット化合物の構造修飾を行い、新規 BR アゴニストの開発研究を行う。

#### 研究の独自性・アピール点

これまでに BR アゴニストの開発研究が行われていたものと考えられるが、本研究のように、独自開発した BR 生合成阻害剤を利用することを特徴とする BR アゴニストの探索研究、並びに受容体の立体構造に基づくコンピューターによるスクリーニングを通して構築した化合物ライブラリーをスクリーニングする研究開発は、世界で初めての試みである。さらに、生合成阻害剤を利用したスクリーニング系では、500 被験化合物の活性を一度検定することが可能である点において、従来法より 10 倍～50 倍の処理能力があることから、高いスクリーニング効率が保障されている。

#### 期待される成果・波及効果

現時点において、生物活性を示す化合物が非ステロイド化合物であることを想定しているが、このような BR アゴニストが開発されれば、BR シグナル伝達機構の解明に新たな低分子プローブとして利用できる可能性が高く、BR シグナル伝達機構解明の新たな展開をもたらす可能性が考えられる。さらに、これら化合物が低価格で大量生産を可能にする化学合成研究を通じて、実用可能な BR アゴニストの開発を進め、将来的には、BR アゴニストの利用に基づく農業の生産性の向上新技術の開発、例えば、植物のストレス耐性と植物に耐塩機能を付与する薬剤の開発にもつながり、農業の生産性向上における新たな技術基盤を確立させる研究開発の推進が期待される。

#### 関連する主な業績

- 1). **Keimei OH\***, Kazuhiro Yamada, Tadao Asami, Yuko Yoshizawa: Synthesis of novel brassinosteroid biosynthesis inhibitors based on the ketoconazole scaffold. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter* **2012**, 22, 1625-1628.
- 2). Kazuhiro Yamada, Yuko Yoshizawa and **Keimei Oh\***: Synthesis of 2RS,4RS-1-[2-Phenyl]-4-[2-(2-trifluoromethoxyphenoxy)-ethyl]-1,3-dioxolan-2-yl-methyl]-1H-1,2,4-triazole Derivatives as Potent Inhibitors of Brassinosteroid Biosynthesis. *Molecules* **2012**, 17, 4460-4473.
- 3). Kazuhiro Yamada, Yuko Yoshizawa and **Keimei Oh\***: Synthesis and Biological Evaluation of Novel Azole Derivatives as Potent Inhibitors of Brassinosteroid. Submitted to *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. (BMC-D-12-01361).

\*: Corresponding Author.

4).特願2011-230776

5).王敬銘、浅見忠男、吉澤結子、第 46 回植物化学調節学会年会、宇都宮、新規ブラシノステロイド生合成阻害剤、2011 年 11 月 2 日

6).王敬銘、中居宏大、橘京佑、山田和弘、吉澤結子、第 46 回植物化学調節学会年会、宇都宮、ジャスモン酸生合成阻害剤の構造修飾、2011 年 11 月 2 日

7).王敬銘、山田和弘、吉澤結子（秋田県立大・応用生物）日本農芸化学大会 2012、京都、新規ブラシノステロイド生合成阻害剤の生物活性、2012 年 3 月 24 日

8).王敬銘、山田和弘、山上あゆみ、松本直、小川敦史、中野雄司、吉澤結子、第 47 回植物化学調節学会年会、鶴岡、新規ブラシノステロイド生合成阻害剤の生物活性、2012 年 10 月 27 日

など

#### キーワード

バイオマス生産、再生可能なエネルギー源 食糧生産新技術、環境ストレス耐性、植物ホルモン

