

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成 20 年度博士課程 入学  
氏 名 伊藤 晋作  
指導教員名 浅見 忠男

### 論文題目

ストリゴラクトン生合成の化学的制御に関する研究

ストリゴラクトン (SL) は世界的に大きな農業被害を引き起こしている根寄生植物の発芽誘導や共生菌であるアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導を起こす根圏情報物質として知られていたが、近年、SL またはその代謝物が植物の枝分かれを負に制御する植物ホルモンとして認識されるようになった。植物における SL の生合成やシグナル伝達に関連する遺伝子は変異体を用いた解析によって幾つか同定されてきてはいるが、未だ未知の部分が非常に多い。特に、生合成経路に関してはカロテノイド由来であることを除いて全く確定していない。また、枝分かれ抑制以外の SL の生理機能に関しても明らかとなっていない。そのため、新たな SL 生合成、シグナル伝達関連遺伝子の同定、SL の生理機能の発見のためには変異体の解析と併せて別の解析方法を用いる必要がある。

生理活性物質の生合成阻害剤は、機能重複した酵素を一度に制御できることや植物種を選ばず生理活性物質の欠損状態を現出させることができる点が特徴である。そのため、変異体を取得しづらい植物種においても生理活性物質を欠損状態にすることでその生理機能解析を行うことができる。また、阻害剤と近年整備が進んだ変異体植物資源を併用することで新たな変異体の取得も可能となる。

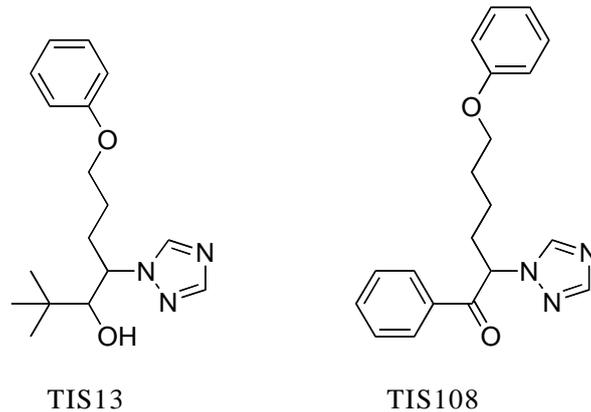
本研究では、SL 研究の新たなツールとして使用可能な生合成阻害剤の創製を目指し、これまで、当研究室で整備されてきたトリアゾール型化合物の中から、SL

生合成阻害剤のリード化合物を選抜し、リード化合物を構造展開することで特異性の高い SL 生合成阻害剤の合成を行った。また、リード化合物選抜の過程で得られた知見により、ストリゴラクトンの生合成に関わる新たな因子として植物ホルモンであるジベレリン (GA)を見だし、GA の根寄生植物防除への利用可能性を検討した。

#### ストリゴラクトン生合成阻害剤リード化合物 (TIS13) の選抜

ストリゴラクトンの生合成には少なくとも 2 つのカロテノイド酸化開裂酵素 (CCD)、1 つのシトクロム P450 一酸化酵素 (CYP711A)、1 つの鉄含有タンパク質が関与していることが明らかとなっており、またウニコナゾール-P やパクロブトラゾールのようなトリアゾール環を有する化合物は様々な P450 を阻害することが知られている。そこで本章では、当研究室でこれまで合成し整備してきたトリアゾール型化合物を用いて、CYP711A または SL の生合成に関与する未知の P450 を阻害する化合物をスクリーニングすることとした。選抜方法としては、ストリゴラクトン生合成変異イネでは吸水後 2 週間で野生型イネには見られない第一分げつ及び第二分げつ伸長が観察されることを利用して、吸水後 2 週間のイネの分げつ伸長を指標として選抜を行った。その結果、第一分げつ伸長を促進する化合物は見つからなかったものの、第二分げつ伸長を促進する化合物が複数見つかった。しかしほとんどの化合物は同時に強い矮化作用も示した。これらの化合物の中にはパクロブトラゾールや、その類縁体が多く含まれていた。GA 欠損イネにおいて分げつ伸長が誘導されるという報告があることから、得られた化合物が GA 生合成阻害剤である可能性も考えられたため、強く第二分げつ伸長を促進した TIS13 と TIS29 について、SL の 1 つである 2'-*epi*-5-deoxystrigol (*epi*-5DS) の根内生量及び滲出量を測定することとした。その結果、どちらの化合物も *epi*-5DS 根内生量及び滲出量が減少していた。特に TIS13 は強く *epi*-5DS 量を減少させており、10  $\mu$ M の TIS13 を処理することで 90%以上の抑制効果が観察された。一方、GA の生合成阻害剤であるウニコナゾールやパクロブトラゾールは *epi*-5DS 根内生量及び滲出量を減少させず、1  $\mu$ M 処理時ではむしろ若干の増加傾向が観察された。以上のことから TIS13 や TIS29 は SL の生合成を阻害している可能性が示唆された。また TIS13 処理によって観察された第二分げつの伸長が合成 SL である GR24 処理によって一部回復したことから TIS13 処理によって誘導された第二分げつ伸長は少なくとも一部は SL の生合成を阻害したことに起因すると考えられた。次に TIS13 処理したイネの根滲出液を根寄生植物で

ある *Striga* の種子に処理したところ、未処理のイネの根滲出液を処理した対照区に比べ、発芽率の減少が観察された。このことから、TIS13 は *epi-5DS* だけでなくその他の SL 類の生合成も阻害していることが示唆された。以上より、TIS13 は副作用を有するものの、SL 生合成阻害剤であり、TIS13 を構造展開することで特異的 SL 生合成阻害剤が創製できる可能性が示唆された。



#### 特異的ストリゴラクトン生合成阻害剤 (TIS108) の開発

TIS13 の特異性を高めるため、複数の TIS13 アナログを合成し、その *epi-5DS* 滲出量抑制活性と矮化活性を評価した。その結果 TIS13 の t-ブチル基をフェニル基に、ヒドロキシル基をケトンに、フェノキシ基に結合しているアルキル鎖の炭素数を 1 つ増やした TIS108 を高活性型化合物として選抜した。TIS108 においては、*epi-5DS* 滲出量抑制活性が約 100 倍上昇し矮化活性が減少していた。TIS108 をイネに処理することで *epi-5DS* の滲出量や根内生量が減少していただけでなく、TIS108 処理イネの根滲出液中の *Striga* 発芽刺激活性も減少していたことから、この化合物は特異的 SL 生合成阻害剤であると考えられた。

#### ストリゴラクトン生合成におけるジベレリンの効果

GA 生合成阻害剤が *epi-5DS* 根内生量及び滲出量を増加させたことから、GA 処理時の *epi-5DS* 根内生量及び滲出量を測定した結果、GA<sub>3</sub> 処理によって *epi-5DS* 根内生量及び滲出量の減少が確認された。*Epi-5DS* の減少が観察される濃度は 1 nM と非常に低濃度であり、この濃度の GA<sub>3</sub> をイネに処理した場合でも背丈の伸長など GA による形態変化は観察されなかった。また GA による *epi-5DS* 根内生量の減少は GA<sub>3</sub> 以外の活性型 GA でも観察され、不活性型 GA では観察されなかった。続いて GA 生合成変異体やシグナル伝達変異

体を用いて、*epi-5DS* 根内生量、滲出量を測定した。その結果、GA 生合成変異体では野生型に比べ、*epi-5DS* 量が増加しており、GA 処理によって *epi-5DS* の減少が観察された。一方 GA シグナル伝達変異体であり、GA シグナルが抑制された形態を示す *gid2-2* 変異体では野生型と比べ *epi-5DS* 量の増加が観察され、GA 処理によって *epi-5DS* 量は変化しなかった。また GA シグナルが過剰な状態である *slr1* 変異体では *epi-5DS* 滲出量が野生型と比べ減少していた。以上の結果から、GA による *epi-5DS* 量の減少には既知の GA シグナル伝達因子の正常な働きが必要であることが示唆された。続いて、根寄生植物防除に対する GA の効果を検討した。まず GA 処理したイネの根滲出液中の *Striga* 発芽刺激活性を調べたところ対照区に比べ明瞭に減少していた。さらに、より圃場に近い条件のリゾトロンを用いて *Striga* の感染率を調べた結果、GA 処理によって有意に *Striga* の感染が抑制され、この時、イネの形態変化は観察されなかった。以上より GA は根寄生植物防除に有用であり、低濃度の GA 処理または根特異的な GA シグナルの過剰状態を作り出すことにより、根寄生植物の防除が可能となる可能性が示唆された。

上述した通り、SL 生合成阻害剤リード化合物のスクリーニング、リード化合物の構造展開を行うことにより、SL 生合成を阻害する化合物を見いだすことができた。また、GA 生合成阻害剤処理により *epi-5DS* 量が増加するという現象より、GA による SL 生合成調節経路の存在が明らかとなった。

Ito S, Kitahata N, Umehara M, Hanada A, Kato A, Ueno K, Mashiguchi K, Kyojuka J, Yoneyama K, Yamaguchi S, Asami T. (2010) A new lead chemical for strigolactone biosynthesis inhibitors. *Plant Cell Physiol.* **51**:1143-1150.