

# 博士論文

## ジベレリン信号伝達制御剤の創製とその機能解析

平成 23 年度進学 大谷 征史

指導教官 浅見 忠男

# 目次

## 図表目次

## 略語表

### 【第1章】背景及び本研究の目的

1-1 ジベレリンの制御に関する歴史的経緯 .....	1
1-2 ジベレリンの機能の化学制御に関する問題点 .....	8
1-3 本研究の目的 .....	1

### 【第2章】ジベレリン代謝酵素阻害剤の探索と作用解析

2-1 緒言 .....	17
2-2 化合物ライブラリーからのジベレリン代謝酵素阻害剤探索 .....	20
2-2-1 AtGA2ox2 リコンビナント酵素の活性確認	
2-2-2 酵素活性阻害を指標とする CBTC の選抜	
2-2-3 GA 結合活性阻害を指標とする M14 の選抜	
2-3 ジベレリン代謝酵素阻害剤の作用解析 .....	41
2-3-1 選抜化合物の作用特異性の検討	
2-3-2 CBTC 構造類縁体の有機合成と効力評価	
2-3-3 イネ GA 2-oxidase 結晶構造情報に基づく結合シミュレーション	
2-3-4 結晶構造解析を目的とする AtGA2ox2 調製法の最適化	
2-4 実験の部 .....	67

## 【第3章】ジベレリンアゴニストの探索と作用解析

3-1 緒言 .....	85
3-2 新規ジベレリンアゴニスト候補の探索と作用解析 .....	87
3-2-1 化合物ライブラリーからの候補化合物 67D の選抜	
3-2-2 67D の作用解析① -GA 受容体に対する結合性-	
3-2-3 67D の作用解析② -GA からの信号伝達に与える影響-	
3-2-4 67D の作用解析③ -受容体結晶構造情報を用いた <i>in silico</i> 解析-	
3-2-5 67D 構造類縁体の有機合成と活性評価	
3-2 ジベレリン様活性を示す既知化合物 AC94377 の作用解析 .....	108
3-3-1 植物に対する AC94377 のジベレリン様活性	
3-3-2 AC94377 の作用解析① -GA 受容体に対する結合性-	
3-3-3 AC94377 の作用解析② -GA からの信号伝達に与える影響-	
3-3-4 AC94377 の作用解析③ -受容体結晶構造情報を用いた <i>in silico</i> 解析-	
3-4 総合考察 .....	122
3-5 実験の部 .....	123
参考文献 .....	134

謝辞

## 図表目次

図 1-1 GA 生合成・不活性化経路	2
図 1-2 GA 生合成阻害活性化合物	4
図 1-3 GA の主要な信号伝達機構	6
図 1-4 ABA 8'-水酸化酵素阻害剤 AHI1	9
図 1-5 GA の化学構造	11
図 1-6 GA の各種不活性化経路	13
図 1-7 ABA アゴニスト pyrabactin	15
図 2-1 GA 代謝経路における GA2ox の役割	18
図 2-2 GA2ox の系統樹	19
図 2-3 SDS-PAGE による AtGA2ox2 の発現確認	21
図 2-4 GA2ox2 による 16,17-dihydro-GA <sub>4</sub> の代謝	22
表 2-1 GA2ox2 による GA <sub>4</sub> 代謝物の GC/MS 測定	24
図 2-5 代謝活性測定系への PHX の影響	25
図 2-6 スクリーニングの一例	27
図 2-7 シロイヌナズナ発芽に対する Pac の影響	28
図 2-8 種子発芽の系による最終選抜	29
図 2-9 CBTC の構造	31
図 2-10 幼植物体伸長への CBTC の影響	32
図 2-11 MultiScreen vacuum manifolds による反応系の分離概念図	34
図 2-12 新規スクリーニング法の概略	36
図 2-13 新スクリーニングの一例	37
図 2-14 GA 結合阻害活性を指標にした最終選抜	38
図 2-15 M14 の構造	39
図 2-16 M14 と CBTC の GA2ox に対する阻害効果比較	40



図 2-17 2ODD に対する CBTC、M14 の影響	42
図 2-18 CBTC、M14 の葉柄長に対する影響	44
図 2-19 Herz 反応	46
図 2-20 CBD 化合物一覧	47
図 2-21 GA2ox に対する CBD 化合物の阻害効果	48
図 2-22 追加合成した CBD 化合物	49
図 2-23 CBD14-18 の GA2ox 阻害効果比較	50
図 2-24 GA3ox に対する CBD 化合物の阻害効果	51
表 2-2 CBD 化合物の GA2ox と GA3ox に対する阻害効果	52
図 2-25 GA3ox 阻害効果を持つ CBD 化合物の葉柄長に与える影響	54
図 2-26 CBD 化合物により伸長が抑制された葉柄長の GA による回復	55
図 2-27 CBTC のイネに与える影響	57
図 2-28 CBD 化合物のイネに対する影響	58
図 2-29 各種化合物の OsGA2ox3 に対する計算による予測 $pK_d$ 値一覧	60
図 2-30 ドッキングシミュレーションによる GA2ox と CBTC、M14 の結合様式	62
図 2-31 AtGA2ox2 発現ベクター pET19b	64
図 2-32 GA2ox2 の大量発現の状況	65
図 3-1 GA アゴニストスクリーニング模式図	88
図 3-2 67D の構造式と発芽率に与える影響	90
図 3-3 発芽率・胚軸長に対する 67D と PAC の共処理の影響	91
図 3-4 67D の <i>ga1-3</i> に対する発芽促進活性	92
図 3-5 67D の GID1 との結合活性	94
図 3-6 67D による RGA の消失の確認	96
図 3-7 フィードバック制御による遺伝子変動	97
図 3-8 ドッキングシミュレーションによる GID1 と 67D の結合様式	99
図 3-9 67D 類縁体の合成	100
図 3-10 67D 類縁体の結合活性試験結果	102

図 3-11 67D 類縁体の発芽率検討	103
図 3-12 67D-14 の発芽促進活性における濃度依存性	105
表 3-1 ドッキングシミュレーションの予想 $pK_d$ 値と GID1 に対する結合活性値	107
図 3-13 AC94377 の構造	109
図 3-14 AC94377 の胚軸長に与える影響	110
図 3-15 AC94377 の葉柄長に与える影響	111
図 3-16 他の 2ODD に対する CBTC と PHX の活性	112
図 3-17 AC94377 の GID1 三種の結合活性試験	114
図 3-18 酵母 two-hybrid 系のモデル	115
図 3-19 酵母 two-hybrid 系による GID1、DELLA 因子の複合体形成実験	116
図 3-20 AC94377 による RGA の消失の確認	118
図 3-21 応答性遺伝子の発現状況	119
図 3-22 ドッキングシミュレーションによる GID1 と AC94377 の結合様式	121

## 【略語表】

2ODD	2-oxoglutarate dependent dioxygenase
2-OG	2-oxoglutaric acid
2-ox	gibberellin 2-oxidase
3-ox	gibberellin 3-oxidase
20-ox	gibberellin 20-oxidase
AcOH	acetic acid
APS	ammonium persulfate
AsA	ascorbic acid
CBB	coomassie brilliant blue
CCC	chlorocholine chloride
cDNA	complementary DNA
CDP	copalyl diphosphate
CPS	copalyl diphosphate synthase
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleoside 5' -triphosphates
DMSO	dimethyl sulfoxide
dpm	disintegrations per minute
DW	distilled water
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
<i>eui</i>	<i>elongated uppermost internode</i>
EtOAc	ethyl acetate
EtOH	ethanol
GA	gibberellin
GC/MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GFP	Green Fluorescent Protein
GID1	GA-INSENSITIVE DWARF 1
GGPP	geranylgeranyl diphosphate

IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
KAO	ent-kaurenoic acid oxidase
KO	entkaurene oxidase
KS	entkaurene synthase <sup>3</sup>
LB	Lysogeny Broth, Luria-Bertani medium
LC/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
MCS	multi cloning site
MeOH	methanol
NaHCO <sub>3</sub>	sodium hydrogen carbonate
NaOAc	sodium acetate
OD	optical density
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PYR	pyrabactin resistance
RGA	repressor of the <i>ga1-3</i> mutant
<i>Rht</i>	<i>Reduced height</i>
RI	radioisotope
rpm	revolution per minute
<i>sd1</i>	<i>semi-dwarf1</i>
SDS	sodium dodecyl sulfate
sDW	sterilized distiller water
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine
TLC	Thin-Layer Chromatography
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Trx	thioredoxin
UDP	Uridine diphosphate
UGT	Uridine diphosphate glycosyl transferase
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside

# 第1章 背景および本研究の目的

## 1-1 ジベレリンの制御に関する歴史的経緯

ジベレリン(GA)は、種子の発芽、茎部の伸長促進作用、花芽形成や種子の発達など、植物における種々の生理現象を制御する植物ホルモンであり、GA機能の制御は広く農業技術として利用されてきた。例えば、1940年代から始まったいわゆる「緑の革命」がその好例である。1950年代に農業上重要性の高い作物、特に主食となる穀類へ半矮性遺伝子を導入することにより、矮性という新しい形質を植物に与えることができるようになった。その結果、産業的に発展して大量生産が可能となった化学肥料の多用に伴い新たに問題視された倒伏の抑制が可能になった。さらに、肥料の有効利用による種子部位の著しい収量増加がもたらされ、世界中の農業生産性が上昇し発展途上国における食料不足が著しく改善された。この大きな変化を「緑の革命」と呼んでいる。このような半矮性遺伝子としてイネ(*Oryza sativa*)では*sd1*が、コムギ(*Triticum aestivum*)では*Rht1*もしくは*Rht2*が用いられた。

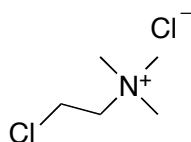
この*sd1*の導入による変異形質は、GAの生合成経路上で機能するC<sub>20</sub>-GA酸化酵素の機能欠損型変異に基づく半矮性の形質であった。ここで、高等植物において一般的に知られるGAの生合成経路に触れておく(図1-1)。ゲラニルゲラニルニリン酸(GGPP)は、2段階のジテルペン型環化酵素コパリルニリン酸合成酵素(CPS)、および、*ent*-カウレン合成酵素(KS)の各触媒反応を通じて*ent*-カウレンに変換される。その後、シトクロムP450型モノオキシゲナーゼである*ent*-カウレン酸化酵素(KO)と*ent*-カウレン酸酸化酵素(KAO)の各触媒作用により、*ent*-ジベレラン骨格を有するGA<sub>12</sub>が生成する。分岐経路として、GA<sub>12</sub>の13位に対する水酸基導入によりGA<sub>53</sub>が生成するが、これもシトクロムP450型モノオキシゲナーゼが関与する(Yamaguchi *et al.*,



2008; Magome *et al.*, 2013)。GA<sub>12</sub>およびGA<sub>53</sub>は、既出のC<sub>20</sub>-GA酸化酵素(GA20ox)と、3位酸化酵素(GA3ox)が触媒する計4段階の反応過程を経て、それぞれ活性型であるGA<sub>4</sub>およびGA<sub>1</sub>に変換される。GA20oxとGA3oxはいずれも可溶性で、 $\alpha$ -ケトグルタル酸(別名2-オキソグルタル酸)要求性ジオキシゲナーゼ(2ODD, 2-oxoglutarate dependent dioxygenase)に属する(Olszewski *et al.* 2002)。

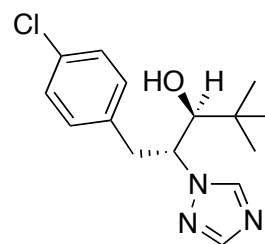
上記したイネ*sd1*変異の場合、GA生合成経路上で機能するGA20oxに機能的な異常が生じ、それに伴って生合成過程に支障が生じた結果、GA内生量が通常よりも低下し半矮性の形質を示すようになった。そして、半矮性形質を示すイネは肥料の大量投入による徒長に伴う倒伏から免れることができた結果、収量の増加という有益性をもたらすことに繋がった。このような遺伝子機能の変化を利用したGAの制御技術は、「生物学的」制御と言える。これとは別に、GA生合成過程を「化学的」に制御する方法である制御剤の利用も、重要な農業上の技術として活用されてきた。主立ったところでは、クロルメコート、パクロブトラゾール、ウニコナゾール-P、プロヘキサジオンなどがGA制御剤として知られている(図1-2)。うち、クロルメコート(別名CCC)は、生合成過程初発段階のGGPPを基質とする環化反応を標的とする(Jung, 1967)。また、パクロブトラゾール(以下、PAC)や、ウニコナゾール-Pは、*ent*-カウレンから*ent*-カウレン酸への酸化過程を標的とする(Hedden *et al.*, 1985; Funaki *et al.*, 1980)。これらは、特に園芸の分野において植物の生長を抑制し、草姿を改善する矮化剤として一般に利用されている。残るプロヘキサジオン(以下、PHX)も、倒伏防止剤として欧州のコムギ(*Triticum aestivum*)やオオムギ(*Hordeum vulgare*)の栽培において、現在でも広く用いられている。これらの制御剤はいずれも、GAの生合成過程の進行を阻害する。従って、節間の伸長抑制が生じ、草丈を低く維持することから、先述のイネ半矮性品種*sd1*と類似の有用形質を化学的に与えることが出来る。

クロルメコート



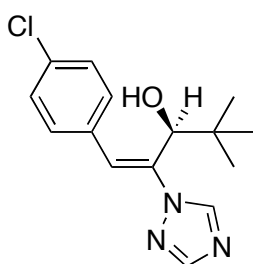
Chemical Formula:  $C_5H_{13}ClN^+$   
Molecular Weight: 122.6159

パクロブトラゾール



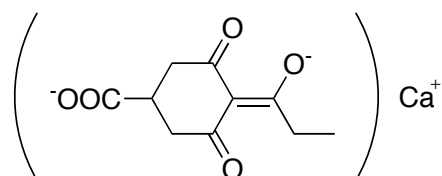
Chemical Formula:  $C_{15}H_{20}ClN_3O$   
Molecular Weight: 293.7918

ウニコナゾールP



Chemical Formula:  $C_{15}H_{18}ClN_3O$   
Molecular Weight: 291.7759

プロヘキサジオンカルシウム



Chemical Formula:  $C_{10}H_{10}O_5^{2-}$   
Molecular Weight: 210.1845

## 図1-2 GA生合成阻害活性化合物

GA生合成過程を阻害する化合物として知られるクロルメコート、パクロブトラゾール、ウニコナゾールP、プロヘキサジオンカルシウムの構造を示す。各化合物の作用標的は、クロルメコートはGGPPを基質とした環化過程、パクロブトラゾールやウニコナゾールPは、*ent*-カウレンから*ent*-カウレン酸への酸化過程、プロヘキサジオンは2ODD酵素である。ここで、プロヘキサジオンは2ODD酵素を阻害標的とするため、GA生合成酵素の機能を阻害すると同時に、GA不活性化酵素2-oxidaseがGA生合成酵素と同じ2ODDに属する酵素であるために不活性化経路も標的として阻害する。



イネ *sd1* と同様に、コムギについても半矮性品種が「緑の革命」として食糧増産に貢献しており、1940年初頭から1970年の間で導入国のコムギ収量を約4倍にまで増加させた。この半矮性コムギは *Rht1* あるいは *Rht2* と呼ばれ、イネの場合と異なり生合成過程における変異ではなく、GAからの信号伝達過程における変異が矮性形質を示す原因であった。ここで、植物体内におけるGAの信号伝達経路について述べておく。2005年、GA受容体分子が特定されたことで、主たる信号伝達の過程は極めて明確になった (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005) (図1-3)。GAが存在しない状況では、常時信号を伝えないように抑制的にはたらくDELLAと呼ばれる因子が核内で機能し続けている。この状況に対してGAが存在するようになると、GAは受容体と結合して複合体を形成した結果、新たにDELLA因子に対する親和性を持つように性状が変化する。その結果、GA依存的に受容体とDELLA因子の間に複合体が形成される。この時、複合体形成に伴いDELLA因子の信号伝達抑制機能は弱まる。結果、信号伝達の抑制状態が緩和されることに伴い、GAからの信号が下流に向けて伝わり始める (Ariizumi and Steber, 2007)。上記過程において重要な役割を担うDELLA因子こそが半矮性コムギ *Rht1* や *Rht2* の原因遺伝子であった。両者ともにDELLA因子の変異体である *Rht1* や *Rht2* の場合、受容体-GA複合体存在下でも自身の機能が弱まらない機能獲得型変異が導入されたため、いずれも農業的に適度な矮性を示したと考えられる。なお、筆者所属の研究室では、このGAからの信号伝達過程、特に受容体の機能制御剤を創製する研究が展開されており、すでに有望な化合物がいくつか見出されている (Yoon *et al.*, 2013)。

これまで述べてきたように、「緑の革命」と呼ばれた一大農業革命の根幹は、GAの生合成過程や信号伝達過程の制御に基づくものであった点が後世において明らかとなった。緑の革命が世界中の農業を変革した結果、1950年を基準に1984

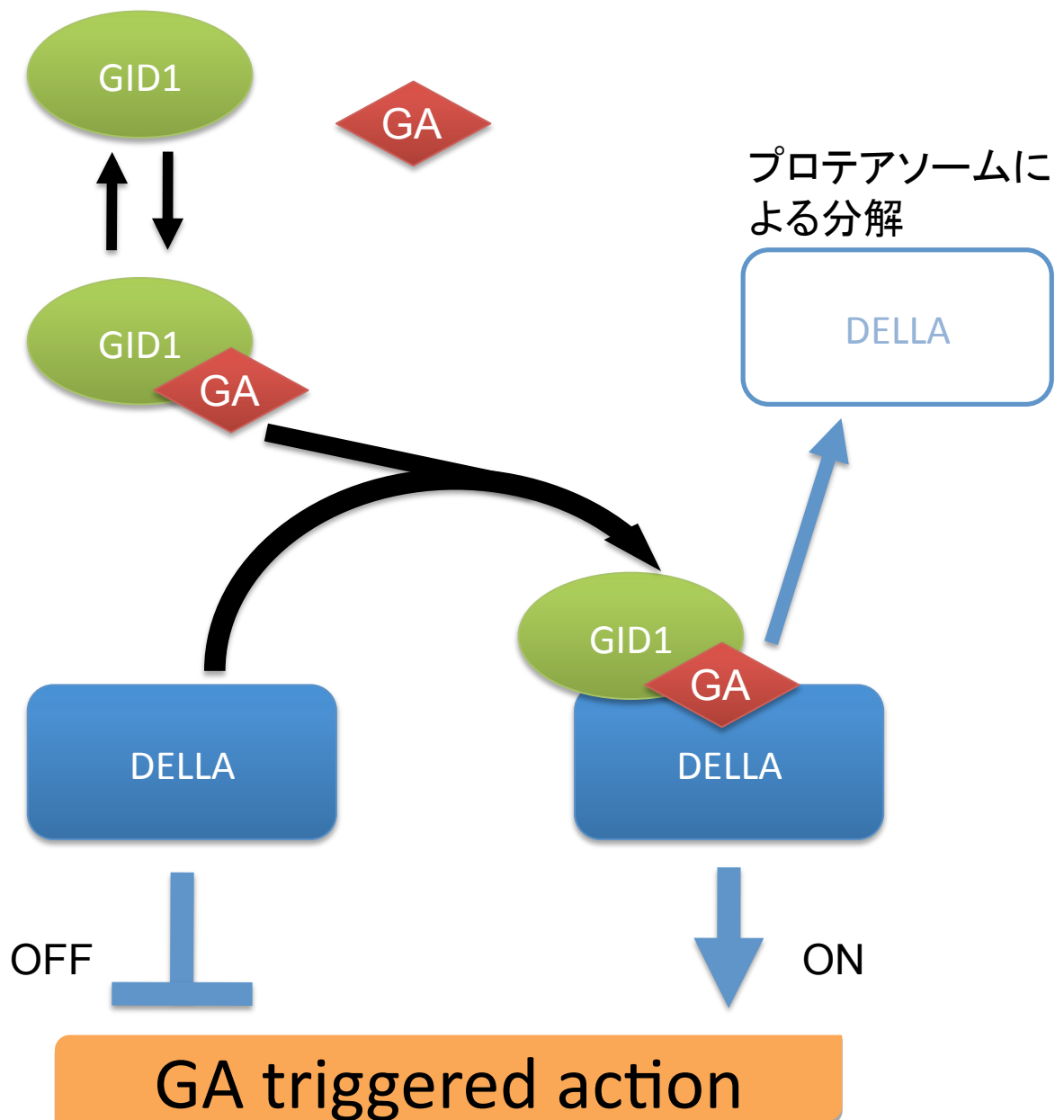


図1-3 GAの主要な信号伝達機構

受容体GID1の発見により明らかになったGAの信号伝達に関する主要経路を示す。DELLA因子は抑制的に働きGAからの信号を伝えないように機能している。受容体がGAと結合すると、DELLA因子との親和性を獲得し、GID1-GA-DELLAの高次複合体を形成する。これにより、DELLA因子の機能は弱められ、それまで抑制されていたGAからの信号伝達が下流へと伝達される。また、GID1とGAに捕捉されたDELLA因子は26Sプロテアソームに引き渡され分解される。

年までの約30年間で世界の穀物生産は250%増加したことから、産業的にもGAの制御が非常に重要なポイントであることを裏付けている。

## 1-2 ジベレリン機能の化学制御に関する問題点

前項で述べたとおり、「緑の革命」の中核としての役割を果たした半矮性品種は、イネの場合はGAの生合成過程に支障が生じており、コムギの場合はGAからの信号伝達過程に支障を生じていた。これら品種では、変異が導入されていた過程こそ異なるものの、いずれもGAの信号が伝わりにくくなるという負の制御法が利用されていた。他方、ブドウ (*Vitis* spp.) の種無し化 (単為結実化) や、イチゴ (一般的な栽培種オランダイチゴ; *Fragaria* × *ananassa* Duchesne ex Rozier) 花枝の伸長促進など、植物生長調節剤としてもGAは農業上たいへん有用である。こうしたいわゆる正の制御法としては、GAそのものが専ら利用されており、これに代わる化学的制御法、あるいは生物学的制御法はあまり知られていない。こうした状況において、本来植物の体内で生合成されて各器官において様々に機能する植物ホルモンGAを生長調節剤という名目で大量に使用し、外部から投与することについての是非が問われている。投与量が多くなると処理対象以外の植物もGAの影響を受けるようになることから、付近の生態系維持の観点からもその使用量の低減が社会的には歓迎される状況となっている。この点に関する他のホルモン研究からの知見として、生理活性を有する「活性型」分子の代謝・不活性化過程を制御する例が報告されている。種子休眠や乾燥耐性などしばしばGAに対して拮抗的な作用を示すアブシジン酸 (ABA) の不活性化過程として、8' 位に対する水酸化反応が知られるが、この反応の触媒酵素に対し選択的な機能阻害能を示すAHI類が創製されている (Saito *et al.*, 2004; Kushiro *et al.*, 2004; Ueno *et al.*, 2005) (図1-4)。植物に対するAHI1投与により、ABA不活性化過程が選択的に阻害され、その結果として内生ABA量が低下しづらくなる。すなわち、AHI4投与に伴い発芽率の低下や乾燥耐性能の向上など、ABA関連の信号伝達はより効率的になる (Araki *et al.*, 2006; Ueno *et al.*, 2007; 近藤ら, 2008)。この

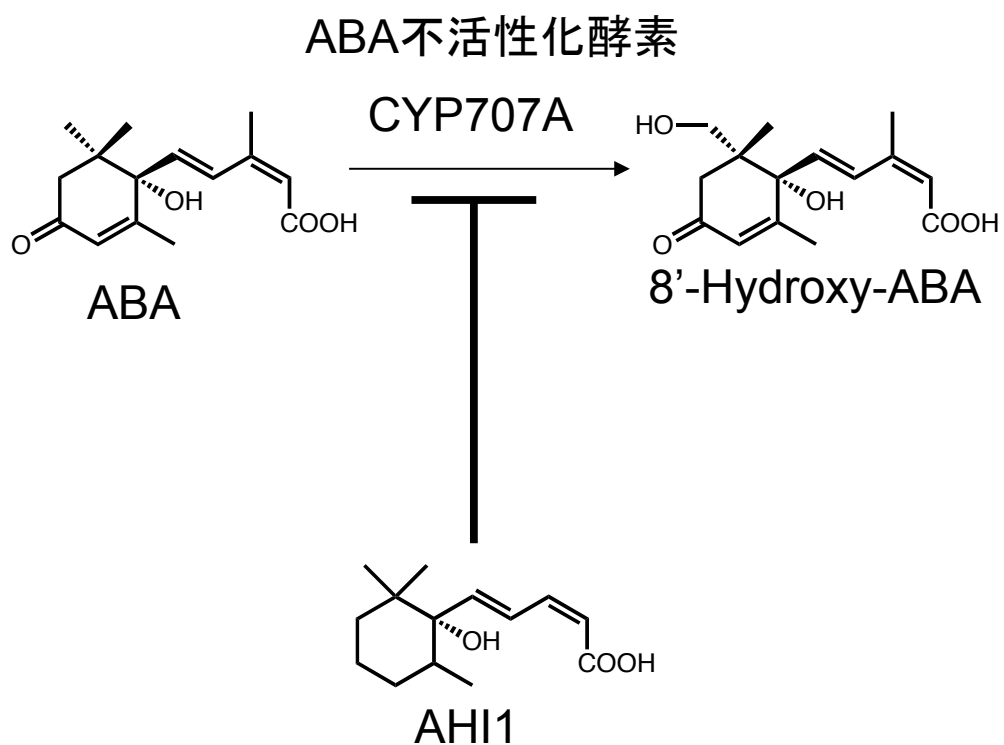


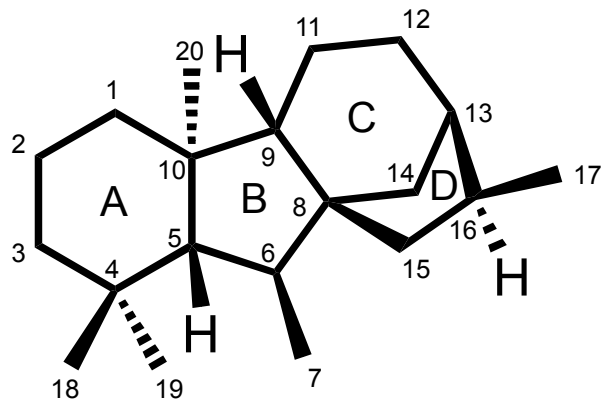
図1-4 ABA 8'-水酸化酵素阻害剤AHI1

AHI1はABA生物活性を有しないCYP707A選択的阻害剤である。AHI1を植物に投与することで内生のABA濃度が上昇し、その後の乾燥処理に対する耐性が高まることが明らかになった。

例が示すとおり、生理活性物質の不活性化過程の進行を選択的に制御できれば内生量が低下しづらく、結果として外からのホルモン投与効果がより持続することが期待できる。これに倣って、GAに関しても代謝・不活性化過程を制御する化合物が創製できれば、多くの局面で利用が期待できる。

もう1点、最近指摘されるようになったGA利用に関する側面に触れておく。現在の工業的なGAの生産法では、生産菌の培養過程と精製過程を経ている。従って、GA成分としては生産菌の合成能力に依存しており、ジベレリン酸(GA<sub>3</sub>)が主要活性成分の位置を占める。このGA<sub>3</sub>は、図1-1に示したGA<sub>1</sub>やGA<sub>4</sub>と同様に、それ自体が生理活性を示すいわゆる活性型に属す。近年、イネおよびシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のGA受容体が特定された段階で、活性型GAの構造要求性が明確になった(Ueguchi-Tanaka *et al.* 2005; Nakajima *et al.* 2006)。すなわち、*ent*-ジベレラン骨格上の2β位に水酸基を持たず、3β位に水酸基を有し、6位に遊離カルボキシル基を持ち、A環内4位→10位γ-ラクトン環構造を有するC<sub>19</sub>-GAが活性型GAである(図1-5)。この情報に基づくと、GA<sub>3</sub>は活性型としての構造要求性をすべて満たしていることが理解できる。しかし、イネおよびシロイヌナズナ由来の各受容体を用いたインビトロ解析から、GA<sub>3</sub>は13位に水酸基を持たない活性型GA<sub>4</sub>の1/20程度しか効力を示さないことが明らかとなっており、本来なら最も効力の高いGA<sub>4</sub>を産業的に用いるべきところを、菌体生産量が最も多いという理由からGA<sub>3</sub>が農業的に利用されているのが現状である。ところが、ナシ(*Pyrus pyrifolia*)など果樹の肥大効果をGAに期待して進められている研究から、安価なGA<sub>3</sub>と比較してGA<sub>4</sub>が格段の肥大効果を示すことが明らかとなっており(板井ら, 2008)、このようなGA<sub>3</sub>とGA<sub>4</sub>の効果の違いはワケギ(*Allium fistulosum*)でも報告されている(Shiraiwa *et al.*, 2011)。以上の状況から、今後は限られた生産量故に高価なGA<sub>3</sub>以外の活性型GAに農業上のニーズが高まる可能性が考えられる。

(a)



(b)

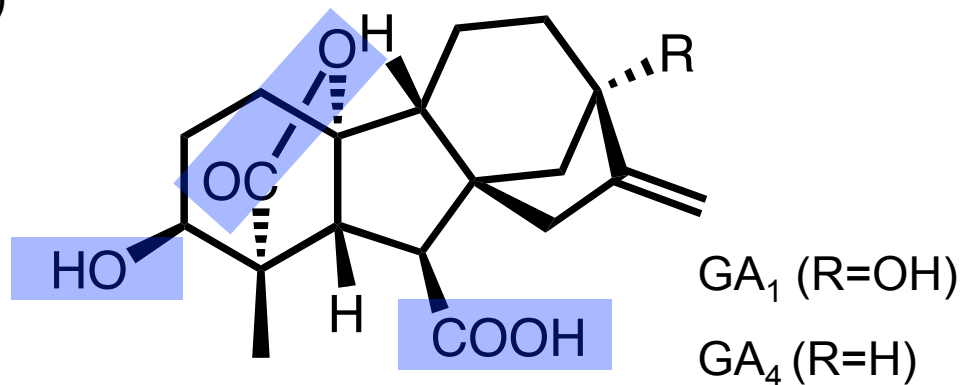


図1-5 GAの化学構造

- (a) ent-ジベレラン骨格。GAにおける炭素番号1から20までを示した。アルファベットのAからDは、各環構造の慣用的な名称を示す。
- (b) 活性型ジベレリンGA<sub>1</sub>とGA<sub>4</sub>の構造式

GAはジテルペン化合物で、ent-ジベレラン骨格を有するものの総称である。GAにおいて活性型ホルモンとして働くためには、2β位に水酸基が存在しない状態で3β位の水酸基、7位のカルボキシル基、A環のγ-ラク톤の3つ((b)の青で示した)が存在することが必要である。

### 1-3 本研究の目的

以上の背景をもとにして本研究を計画するにあたり、まずはGAに関する代謝・不活性化過程に着目した。現在までにGAの不活性化過程としては幾つか異なる様式が報告されている(図1-6)。主なものとして、*ent*-ジベレラン骨格の2 $\beta$ 位に対する水酸基の導入反応がある。これを触媒する酵素も、先述のGA20oxやGA3oxと同様に可溶性2ODDに分類され、2-oxidase (GA2ox)と呼ばれる。なお、図1-1に示す通り、基質としては必ずしも活性型GAだけに限られず、その前駆体も活性型に変換されないまま不活性化される場合もある。この他、シロイヌナズナあるいはイネなどモデル植物限定の情報ではあるが、6位カルボキシル基に対するメチルエステル化反応も知られており、この反応を触媒するメチル基転移酵素GAMT1およびGAMT2がシロイヌナズナで特定されている(Varbanova *et al.*, 2007)。また、イネでは上位節間のみが異常に伸びる*elongated uppermost internode(eui)*変異株の原因遺伝子産物として、16位-17位エポキシ化反応を触媒する酵素EUIが同定されている(Zhu *et al.* 2006)。EUIはシトクロムP450型酵素で、13位に水酸基を持たない活性型であるGA<sub>4</sub>のみを基質とする(図1-1)。EUI過剰発現形質転換イネは、GA欠損変異株同様に矮性形質を示すため、EUIがGA不活性化に関わることは確かである。しかし、EUI遺伝子の発現部位はイネ上位節間に限定されることから、EUIは他の部位におけるGA不活性化に関与しないと考えられる。また、反応後に生成する16 $\alpha$ ,17-epoxy-GA<sub>4</sub>は植物体内において非常に不安定で、大半は16 $\alpha$ ,17-diol-GA<sub>4</sub>の分子形態となり蓄積され则认为られている。この16 $\alpha$ ,17-diol-GA<sub>4</sub>はイネ以外の植物からも同定されており、生理活性を示さないことが報告されている(Kobayashi *et al.*, 1993; Santes *et al.*, 1995; Yamane *et al.*, 1988; Blake *et al.*, 2000; Pearce *et al.*, 2002)。さらに、その存在は想定されながらも未だ遺伝子が同定されていない不活性化触媒酵素として、



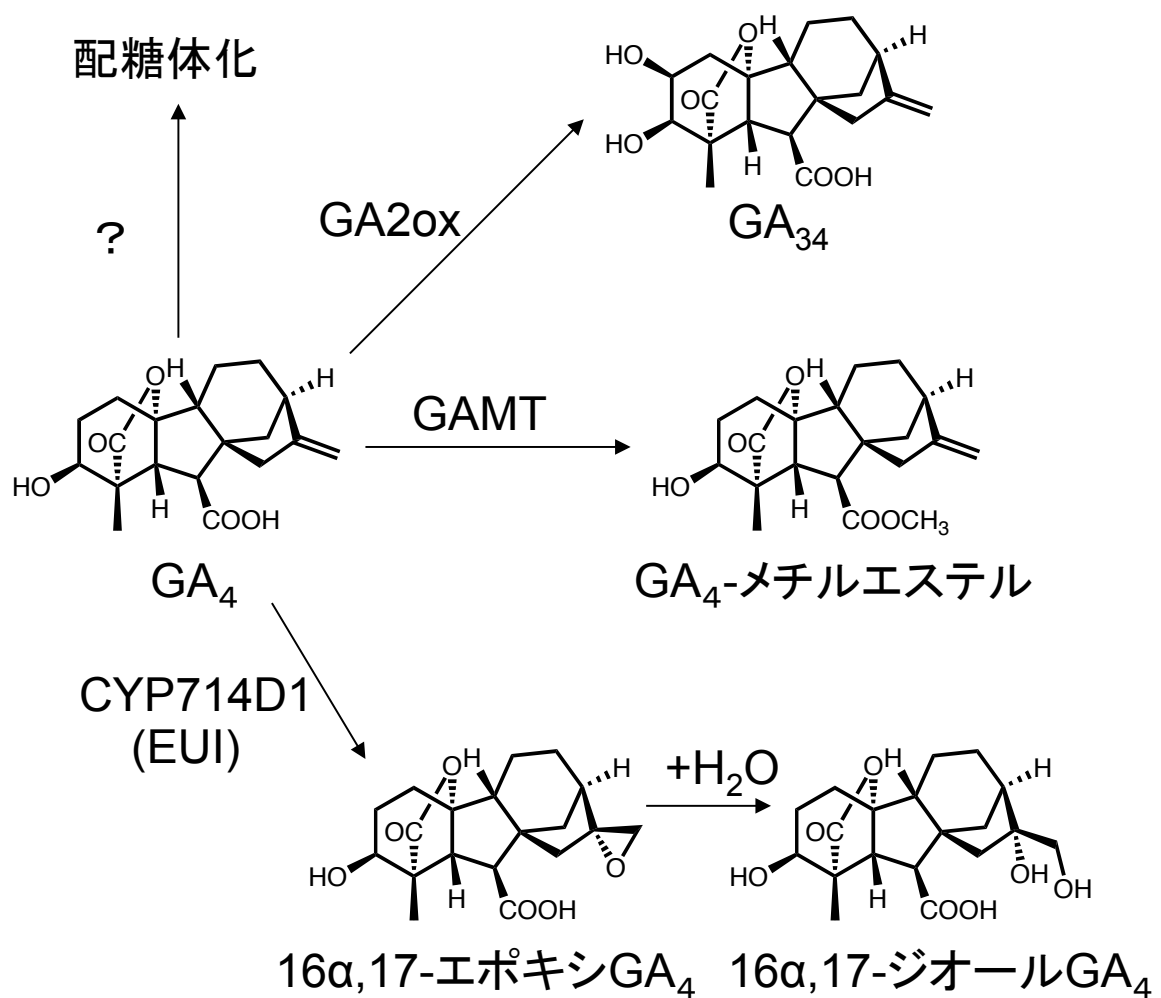


図1-6 GAの各種不活性化経路

GA不活性化反応における4つの酵素の働きの模式図。GA2-oxidase(GA2ox)は、GA生合成にかかわるGA3oxやGA20oxと同様に2-オキソグルタル酸要求性の酵素であり、2-オキソグルタル酸、Fe(II)イオン、アスコルビン酸がある状態でGAの2β位を水酸化する。ジベレリンメチル基転移酵素(GAMT)は、GAが活性を持つために必要な6位のカルボキシル基をメチルエステルに変換する。EUIタンパク質は13位に水酸基を有しないGAに対して16位、17位をエポキシ化する。配糖体化酵素の詳細は不明である。

GA配糖体化酵素がある。このように、GAには複数種の代謝・不活性化過程が存在するが、機能欠損型多重変異体を用いた解析から、このうちのGA2oxが主要なGAの代謝過程を触媒する酵素であることがすでに報告されている(Rieu *et al.*, 2008)。これらの状況から本研究では、最も主要なGA代謝反応を触媒するGA2oxを対象に据えて、GA2oxに対する選択的機能制御剤の創製に向けた化合物スクリーニングを計画した。この詳細について第2章で述べる。

これに加えて、GA使用量の低減を図るための異なるアプローチとして、あるいは、現在市場で出回っている活性型GA(GA<sub>3</sub>)ではなくGA<sub>4</sub>様のより効率的な果樹肥大誘導化合物の新しい提供法になり得る、GA同様の生理作用を示しながら、構造的に異なるいわゆる受容体アゴニストの創製も重要である。GA様活性を示す化合物の分子構造がGAよりも単純で、有機合成的にGAより格段に調製が容易であれば、それら活性化合物の農業への提供が従来よりも効率的になるばかりか、水溶性や土壌分解性など環境負荷に関わる観点において、元のGAだけしか利用できない状況と比べて、より多くの選択肢の提示が可能になる。植物ホルモンに関するアゴニスト研究は活発な分野であり、古くは2,4-Dを始めとする各種合成オーキシシン(Ferro *et al.*, 2010)、比較的最近のところではウレア型サイトカイニン(Ricci and Bertolotti, 2009)やジャスモン酸アナログのコロナチン(Weiler *et al.*, 1994; Koda *et al.*, 1996; Bender *et al.*, 1999)、ストリゴラクトンの受容体アゴニストであるGR24(Umehara *et al.*, 2008)などの創製研究が知られている。また、アブシジン酸の数ある作用の中で発芽抑制や乾燥耐性のみを誘発する作用限定アゴニストpyrabactin(図1-7)の活用が、未同定であった受容体PYR1の同定に大きく貢献したことは記憶に新しい(Park *et al.* 2009)。GAのアゴニストについても科学的な利用法だけでなく実用面への応用が期待出来る状況である。そこで上記のとおりGA受容体はすでに特定され、その結晶構造も明らかなことから(Shimada *et al.*, 2008; Murase *et al.*,

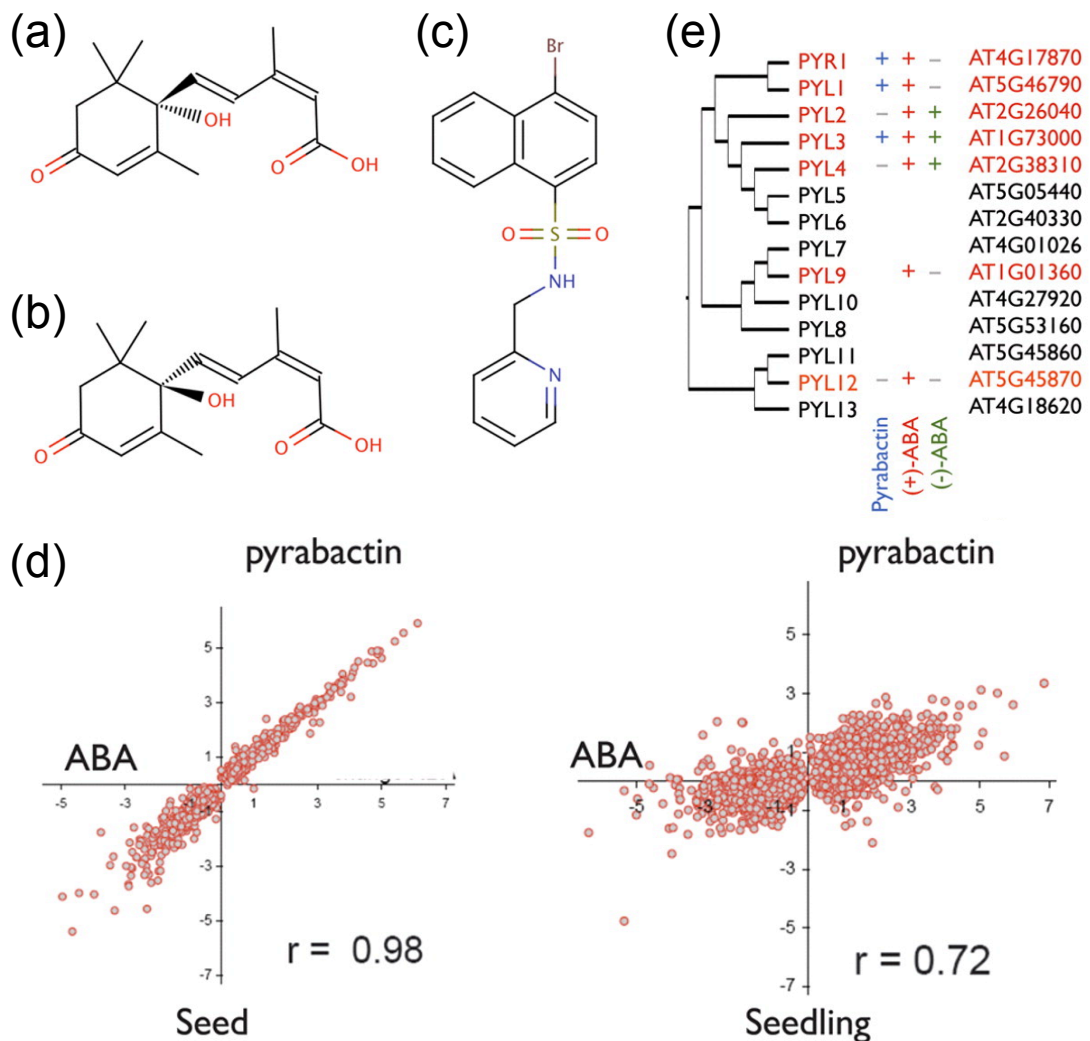


図1-7 ABAアゴニストpyrabactin

- (a) (S)-(+)-アブシジン酸の構造式
- (b) (R)-(-)-アブシジン酸の構造式
- (c) アブシジン酸アゴニストpyrabactinの構造式
- (d) 各化合物投与時に変動する遺伝子の種子発芽と芽生えの時期におけるpyrabactinとアブシジン酸の相関。種子発芽に関しては高い相関性を示すのに対して芽生えの時期には相関性が低く違いが生じている。
- (e) pyrabactinがアブシジン酸受容体Pyr/PYLとPP2Cの複合体形成に与える影響。pyrabactinやアブシジン酸依存的にPyr/PYLとPP2Cは複合体を形成するが、試験した全てのPyr/PYLに対して形成を誘導する(+)-ABAと違い、pyrabactinは選択性を持っている。+は複合体が形成されたもの。

(Park *et al.*, 2009より抜粋)

2008)、GA受容体を対象とするアゴニストの創製研究についても並行して実施することを計画した。この詳細について第3章で述べる。

このように、本研究で対象とした「代謝酵素GA2ox選択的な機能制御剤」および「GA受容体アゴニスト」は、いずれも創製後の応用面を見据えつつ、研究対象としても新規性が高いことから注目に値する化合物になると期待して研究を展開した。

## 第 2 章 ジベレリン代謝酵素阻害剤の探索と作用解析

### 2-1 緒言

序論で紹介した Rieu *et al.*, (2008)らが報告しているように、複数の存在が報告されている GA 不活性化過程のうち GA2ox が関与する過程がシロイヌナズナ植物体内で支配的に機能している(図 2-1)。さらに、この報告の中の GA2ox に関する多重変異体の解析結果から、シロイヌナズナにおける GA 不活性化に最も深く関わる GA2ox は、AtGA2ox2 または AtGA2ox6 であることも示されている。この 2 種の GA2ox をコードする遺伝子の発現はいずれも、様々な時期や種々の器官で高発現状態であり、中でも AtGA2ox2 は AtGA2ox6 よりも GA に対する応答性に優れていることから、本研究で扱う分子ターゲットの第 1 候補として AtGA2ox2 を選ぶことが妥当であると判断した。

なお、シロイヌナズナにおける GA2ox として、本研究で焦点を当てようとしている分子種とは異なる反応基質特異性を有する AtGA2ox7、AtGA2ox8 と呼ばれる (Schomburg *et al.*, 2003) GA2ox が存在することから、混乱を及ぼさないように注意を喚起しておく。本研究で焦点を当てる AtGA2ox2 など 5 種がいわゆる活性型 GA の代謝に関与するのに対して、AtGA2ox7 や AtGA2ox8 は GA 生合成過程における上流域で前駆体の代謝に関わっている。なお、こうした早期前駆体を基質とする GA 代謝酵素はイネにも同様に存在する(Lo *et al.*, 2008)。シロイヌナズナおよびイネの GA2ox について、推定アミノ酸配列情報を元に描いた系統樹解析の結果を図 2-2 に纏める。

上記の知見に従い、以降の検討ではシロイヌナズナ GA2ox の中で主に機能する AtGA2ox2 に焦点を当て、本酵素に対する阻害化合物の探索を計画した。

(a)

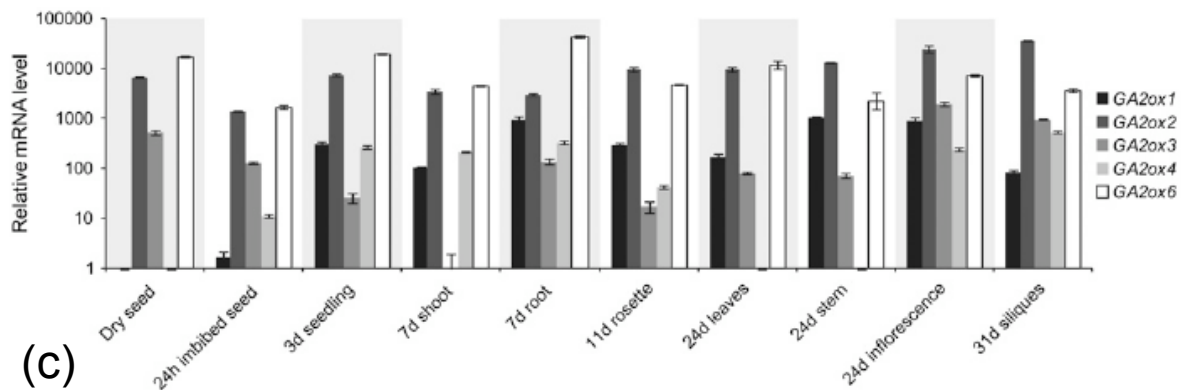
Table 2. Developmental Phenotype of the *ga2ox* quintuple Mutant

	Hypocotyl Length (mm)	Root Length (cm)	First Leaf with Trichomes	LD Flowering Time (d)	LD Flowering Time (Leaves)
Wild type	0.9 ± 0.0 (-2.3) <sup>a</sup>	5.8 ± 0.1	5.1 ± 0.1	18.6 ± 0.1	15.0 ± 0.3
Wild type + GA	1.7 ± 0.0 (-1.8) <sup>**</sup>	5.9 ± 0.1	3.0 ± 0.0 <sup>**</sup>	15.8 ± 0.1 <sup>**</sup>	12.7 ± 0.3 <sup>**</sup>
<i>ga2ox</i> quintuple	1.2 ± 0.0 (-2.2) <sup>**</sup>	6.0 ± 0.1 <sup>*</sup>	4.0 ± 0.1 <sup>**</sup>	17.0 ± 0.2 <sup>**</sup>	14.2 ± 0.3
<i>ga2ox</i> quintuple + GA	1.8 ± 0.0 (-1.7) <sup>**</sup>	5.9 ± 0.1	3.0 ± 0.0 <sup>**</sup>	15.5 ± 0.1 <sup>**</sup>	12.8 ± 0.3 <sup>**</sup>
LSD <sub>within</sub> GA treatments (5%/1%) (df)	0.06/0.10 <sup>a</sup> (6)	0.21/0.28 (67)	0.45/0.69 (6)	0.41/0.68 (4)	0.93/1.55 (4)
LSD <sub>between</sub> GA treatments (5%/1%) (df)	0.09/0.13 <sup>a</sup> (8)	0.37/0.52 (10)	0.33/0.48 (8)	0.28/0.44 (5)	0.67/1.01 (7)
n	32	20-25	32	18	18

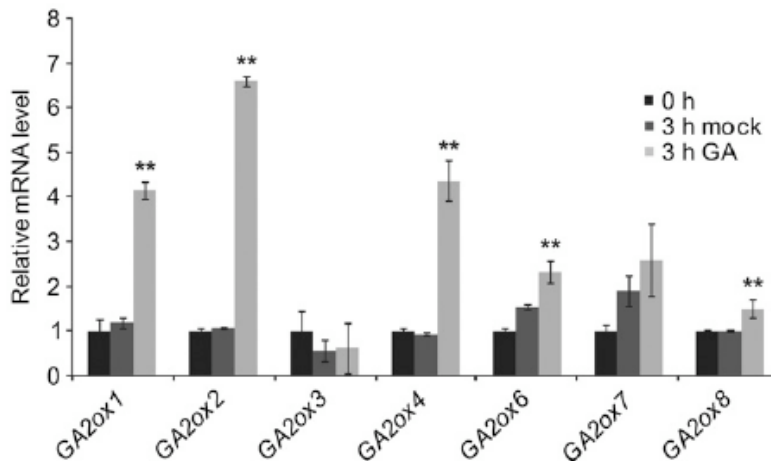
See Methods for details on design and statistical analysis. The measurements are the means ± SE. \*, Significantly different from the wild type ( $P < 0.05$ ); \*\*, significantly different from the wild type ( $P < 0.01$ ).

<sup>a</sup>Log-transformed values (shown in parentheses) were used for statistical analysis (see Methods), and the LSDs correspond to these values.

(b)



(c)



## 図2-1 GA代謝経路におけるGA2oxの役割

- 植物の初期生育過程におけるGA2oxの5重欠損変異株の表現形。5重欠損変異株は野生型株と比較してGA蓄積による形質が見られる。
- 各種GA2oxの各植物生育段階における発現量の比較。GA2ox2がどの段階でも高発現している。
- GAを添加してから3時間での反応。GA2oxの中でGA2ox2が特にGA応答性が高い。

(Rieu *et al.*, 2008より抜粋)

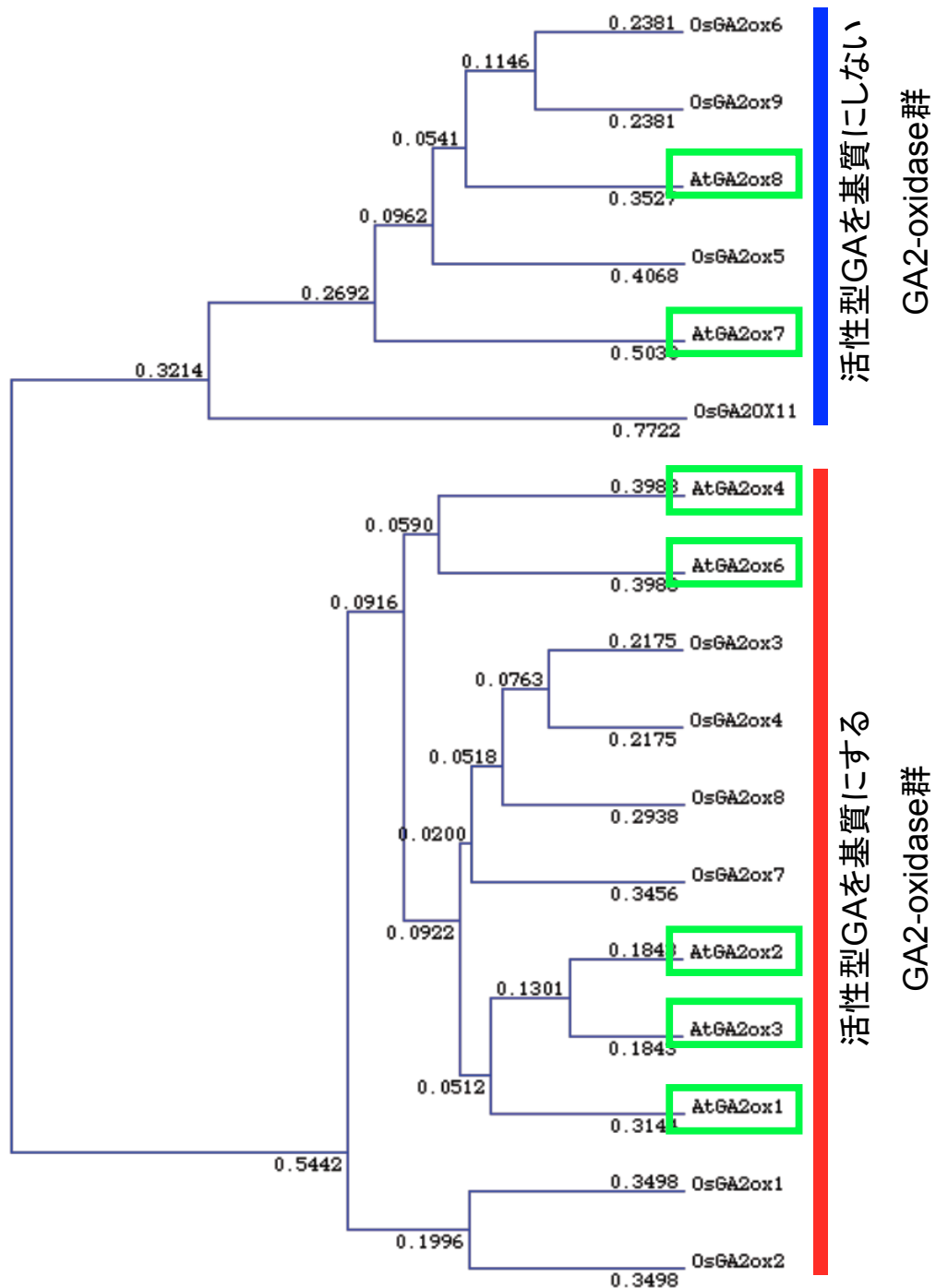


図2-2 GA2oxの系統樹

シロイヌナズナ (At)、イネ (Os) に存在する GA2ox の推定アミノ酸配列による系統樹。シロイヌナズナにおいて活性型 GA を基質にする GA2ox1,2,3,4,6 の五種と基質にしない GA2ox7,8 の二種が離れていて性質が異なることがわかる。

## 2-2 化合物ライブラリーからのジベレリン代謝酵素阻害剤探索

### 2-2-1 AtGA2ox2 リコンビナント酵素の活性確認

阻害剤探索に必要な酵素活性を維持した可溶性のAtGA2ox2を用いたアッセイ系の準備に向けて、常法に従い可溶化タグとしてチオレドキシンを、また、精製用および検出用タグとしてポリヒスチジン(Hisタグ)を融合させたAtGA2ox2の調製を計画し、そのために必要な制限酵素サイト配列を両末端に持つ全長AtGA2ox2遺伝子断片を取得して、発現用ベクターpET-32a(+)内MCSにライゲートした。大腸菌Rosetta (DE3) の形質転換株を取得した後、0.5 L容坂口フラスコを用いて0.1 L規模で試験的に培養し、可溶性画分中にリコンビナントAtGA2ox2 (約55 kDa)の誘導をSDS-PAGE解析の結果から確認した。そこで、5 L容三角フラスコを用いて培養規模を1.5 Lに拡大してリコンビナントAtGA2ox2 の誘導状況を調べた。結果、図2-3に示すとおり、単位培養液あたりの可溶化効率が0.1 L規模の時と比べて同等であったことから、培養規模拡大に伴い可溶化AtGA2ox2の収量を約10倍に高めることができた。以上により、化合物のスクリーニングにおいて必要となる酵素量の供給に見通しがついた。

筆者所属の研究室ではGA2oxの酵素活性検出系をすでに構築しており(Park *et al.*, 2005)、この系を利用して得たタンパク質の酵素活性を検出した。タグ精製したAtGA2ox2溶液中に、基質となる活性型 $^3\text{H}_4$ -16,17-dihydro-GA<sub>4</sub>のほか、2-オキソグルタル酸、鉄(II)イオン、アスコルビン酸の各補欠因子を添加し、30℃で2時間反応させた。酢酸添加による反応停止後、溶媒分画を行い抽出したものをTLCへ供し、酵素反応の進行をイメージングアナライザーで解析した。図2-4に示した結果のように、基質 $^3\text{H}_4$ -16,17-dihydro-GA<sub>4</sub>の放射活性が減少し、代わって高極性代謝物の生産を確認した。そこで、今度は非標識GA<sub>4</sub>を基質として用いて同様の酵素反応を行わせ、GC/MSを用いて代謝物の同定を行った。メチルエステル・トリメチルシリ



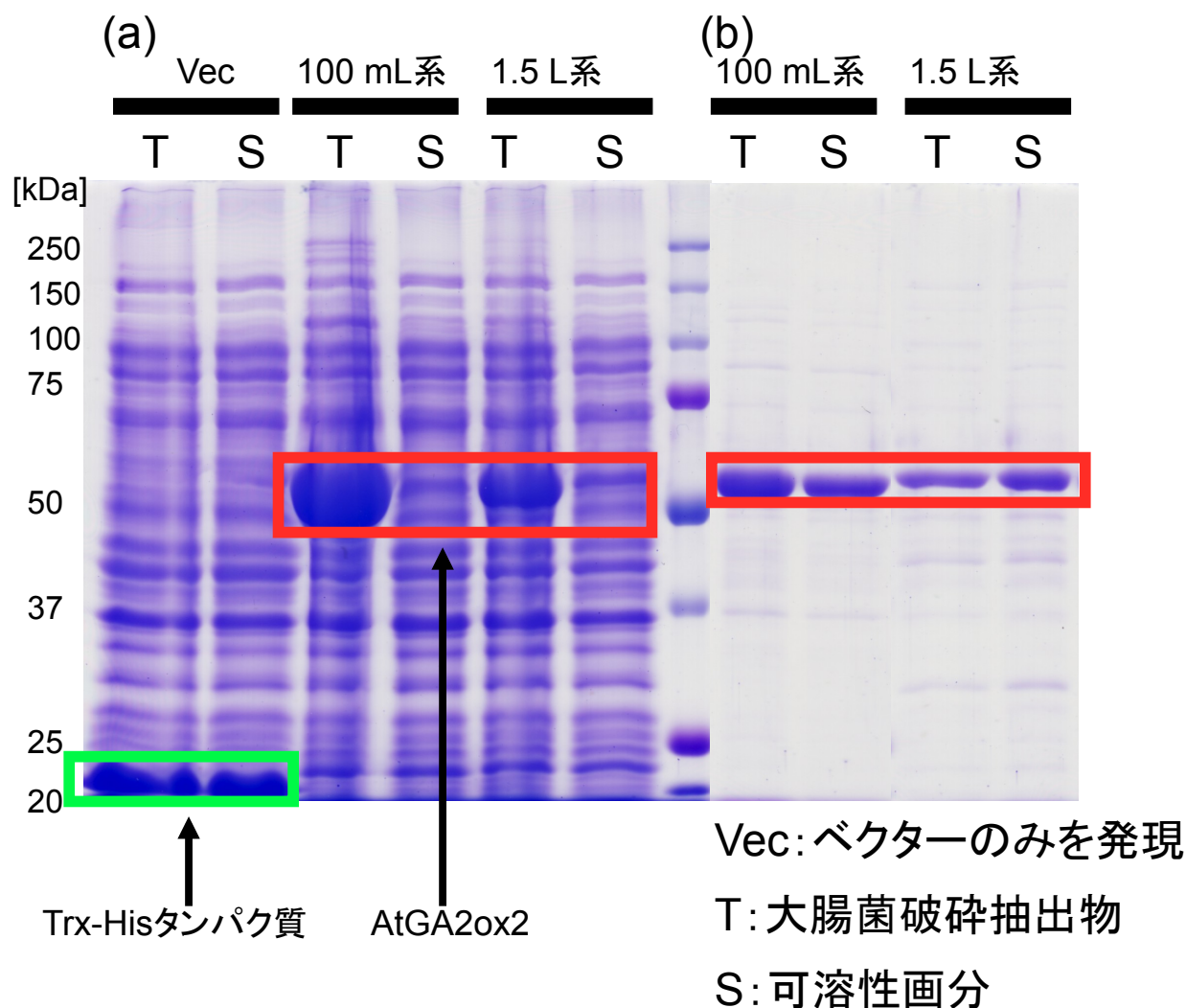


図2-3 SDS-PAGEによるAtGA2ox2の発現確認

- (a) 可溶性画分中に、ベクターのみを発現させた大腸菌の抽出物にはみられない約55 kDaのリコンビナントAtGA2ox2が発現していることを確認した。
- (b) (a)のサンプルに対してポリヒスチジンタグを用いて精製を行ったもの。100 mL規模で行った発現量と培養規模を1.5 Lに拡大した系との発現量の比較をしたところ可溶性画分においてはほぼ差がないことを確認した。

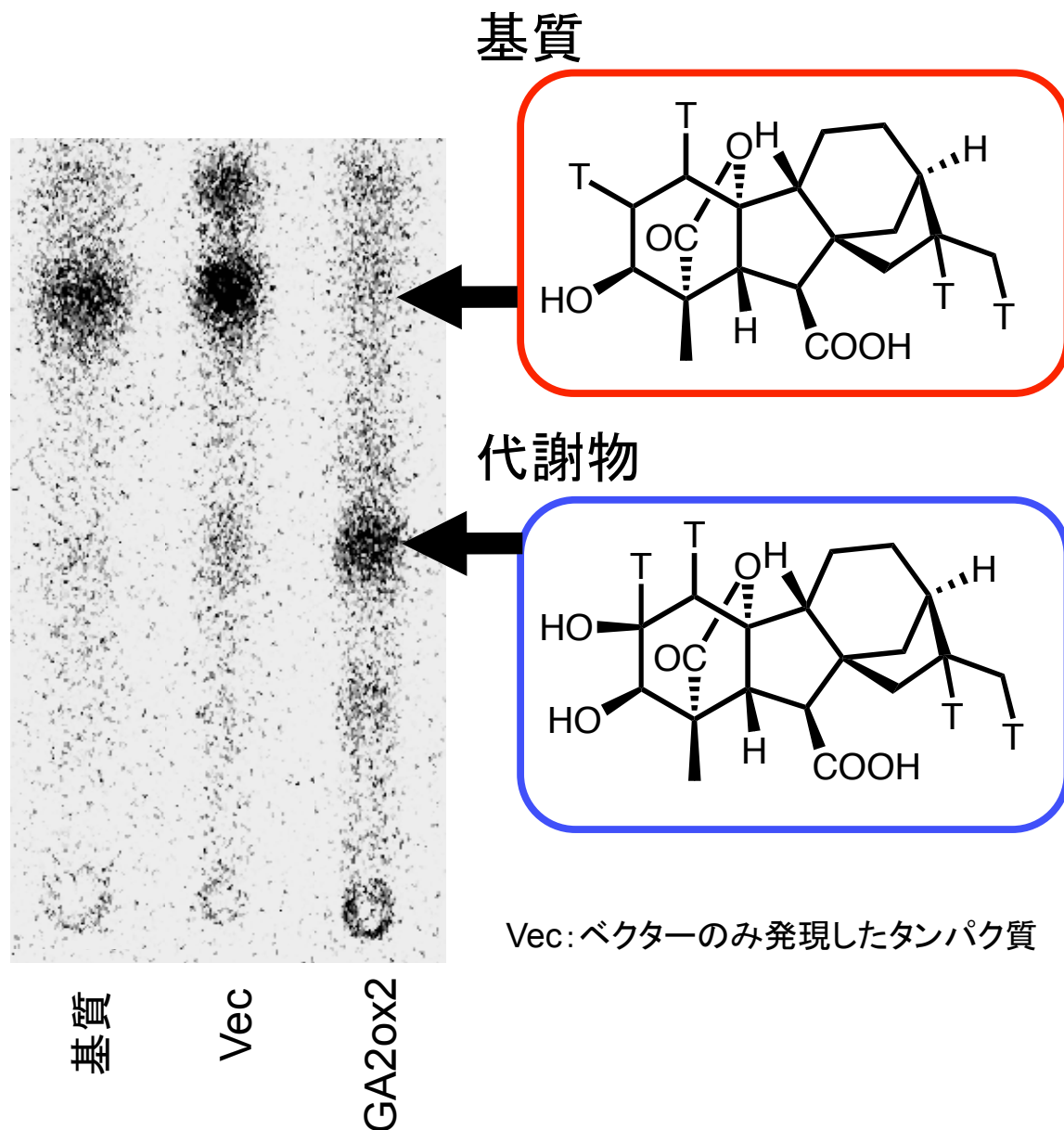


図2-4 GA2ox2による16,17-dihydro-GA<sub>4</sub>の代謝

リコンビナントAtGA2ox2に活性型GA誘導体の一種16,17-dihydro-GA<sub>4</sub>のトリチウム標識体、2-オキシグルタル酸・Fe(II)イオン・アスコルビン酸を添加して、30℃で2時間反応させた。酢酸の添加により反応停止後、酢酸エチルによる溶媒分画を行い、酢酸エチル抽出物を濃縮乾固した。これを少量のメタノールで溶解させて、TLC上で展開しイメージングプレートへ晩露光し、画像解析して測定した。左から、基質である16,17-dihydro-GA<sub>4</sub>を反応させずに流したものの、ベクターのみのタンパク質をネガティブコントロールとして用いたものの、リコンビナントAtGA2ox2に代謝させたものである。

ルエーテル誘導体化したものを分析に供したところ、GA<sub>4</sub>の2β位が水酸化されたGA<sub>34</sub>が同定された(表2-1)。従って、調製したリコンビナントAtGA2ox2は期待どおり、活性型GAを基質としてGA2oxとしての酵素活性を示すことが確認できた。

## 2-2-2 酵素活性阻害を指標とするCBTCの選抜

前項で用いた<sup>3</sup>H<sub>4</sub>-16,17-dihydro-GA<sub>4</sub>の代謝状況をTLCとイメージングアナライザーを用いて確認する方法を、そのままAtGA2ox2阻害化合物の探索系へ転用した。ところで、序論で紹介したGA生合成阻害剤プロヘキサジオン(PHX)は、GA3oxやGA20oxなどのGA生合成に関わる2ODD酵素機能を阻害し矮化を誘導することから、穀類の倒伏防止剤として欧州などでは広く用いられている。しかしながらPHXはGA生合成酵素特異的な阻害剤という訳ではなく、2ODD酵素に属する代謝酵素であるGA2oxに対しても阻害効果を示すことが知られている。そこで、このPHXを既知GA2ox阻害剤と位置づけ、本選抜系における陽性対照として用いた。本研究のような阻害化合物の探索時に重要視すべきことの1つとして、用いる系に各試験化合物をどの程度の濃度で添加するか、という点が挙げられる。特に、*in vitro*試験系に限って言えば生体を扱わないため、毒性などを考慮する必要がない。そのため、設定が可能な限り化合物を高濃度で試験すること自体は可能で、より効力の弱い化合物までを選抜できる可能性がある。そこでまず、陽性対照のPHXを試験系に添加して、AtGA2ox2の触媒反応が阻害される添加濃度域を調べた。図2-5に示した結果から、終濃度30 μMのPHXを添加した場合の阻害率は約50%と見積もられた。また、PHXの阻害効力はライブラリー中の化合物の大半よりはおそらく高いであろうと想定された。この2点を加味して、試験化合物の添加濃度を100 μM以上に設定することに決め、少なくともPHXの1/3程度の阻害活性を有する化合物であれば、陽性化合物として選抜できる条件を採用した。これとは別に、TLCにおける分離時間の短

GA <sub>4</sub> 代謝物	KRI 2721 506 (100), 459 (15), 416 (12), 387 (18), 372 (18), 356 (11), 313 (15), 288 (13), 272 (17), 241 (20), 223 (38), 217 (36);
標品GA <sub>34</sub>	KRI 2708 506 (100), 459 (12), 416 (15), 387 (15), 372 (16), 356 (15), 313 (20), 288 (25), 272 (15), 241 (20), 223 (40), 217 (35);

表2-1 GA2ox2によるGA<sub>4</sub>代謝物のGC/MS測定

調製したリコンビナントAtGA2ox2タンパク質に、基質のGA<sub>4</sub>、補欠因子として2-オキソグルタル酸・Fe(II)イオン・アスコルビン酸を添加し30℃で2時間反応させた。酢酸の添加により反応を停止させ、酢酸エチルを用いて溶媒分画を行い酢酸エチル抽出物を濃縮乾固した。これによって得られた産物をメチルエステル化・トリメチルシリルエーテル化の誘導体化反応を行ったものと、GA<sub>4</sub>のGA2ox1による代謝物であるGA<sub>34</sub>を上記の誘導体化したものをGC/EI-MSにより分析し比較した。

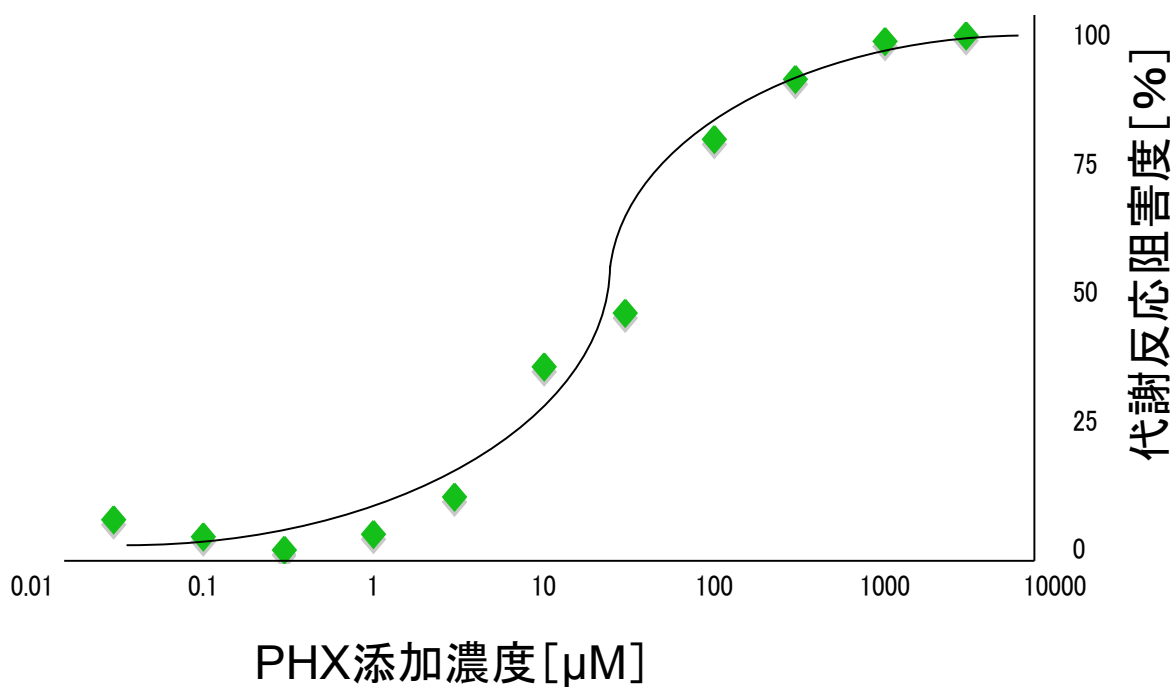


図2-5 代謝活性測定系へのPHXの影響

リコンビナントAtGA2ox2に、補欠因子と活性型GA誘導体の一種16,17-dihydro-GA<sub>4</sub>のトリチウム標識体を加え、PHXの濃度を変化させ代謝活性の試験区に添加しその阻害効果について検討した。これにより、終濃度300  $\mu\text{M}$ でほぼ完全に阻害することが明らかとなった。

縮化に向けて、溶媒移動距離を縮めることでハイスループット化を図った。総計で約 1,000 種の化合物をこの系を用いて試験した結果、6 化合物に明瞭な阻害活性が検出された。その実施例について図 2-6 に示す。

選抜した 6 化合物を対象として、シロイヌナズナへの投与試験を行った。2-1 項で触れたとおり、AtGA2ox2 をコードする遺伝子はシロイヌナズナにおける様々な時期および器官において発現しており、もちろん種子発芽の過程や直後の幼植物体の成長過程においても発現している(Rieu *et al.*, 2008; Yamauchi *et al.*, 2007)。このことから、種々の過程に AtGA2ox2 が存在し、少なくともこれを含む GA2ox の触媒機能が化合物により阻害されるのであれば、何らかの異常形質の出現が期待できると考えた。そこで、準備開始から比較的短時間での評価が可能な「種子発芽過程」と「幼植物体の成長過程」に着目して、選抜化合物の投与試験を行った。

初めに、「種子発芽過程」に対する選抜化合物の評価結果について述べる。GA はこの過程の進行を促進するため、代謝酵素の機能阻害はさらに活性型 GA の存在量を高め、結果として発芽を促進するようになると予測できる。しかし、正常なシロイヌナズナ種子は通常であれば 100% 近い発芽率を示すため、このままでは化合物添加による発芽率の上昇を確認することが難しい。そこで、既存の GA 生合成阻害剤を用いて種子中の GA 生合成過程を抑制し、発芽率をいくらか低下させ、その状況下での候補化合物の効果を調べることにした。具体的には、GA 生合成阻害剤 PAC の利用を検討した。PAC 投与に伴う発芽率の低下傾向を図 2-7 に示す。この結果から、1  $\mu\text{M}$  の PAC 投与により、23°C・明所下、45 時間経過時点の発芽率が 50% 前後まで低下することが明らかになったことため、この条件を採用した。すなわち、1  $\mu\text{M}$  PAC 水溶液中で、4°C・2 日間低温処理した種子を、100  $\mu\text{M}$  の各選抜化合物水溶液を染み込ませた濾紙上に播種し、23°C・明所下で 45 時間生育させ、各処理区の発芽率を測定した。その結果を図 2-8 に示す。mock 処理区の発芽率が 45% 程度

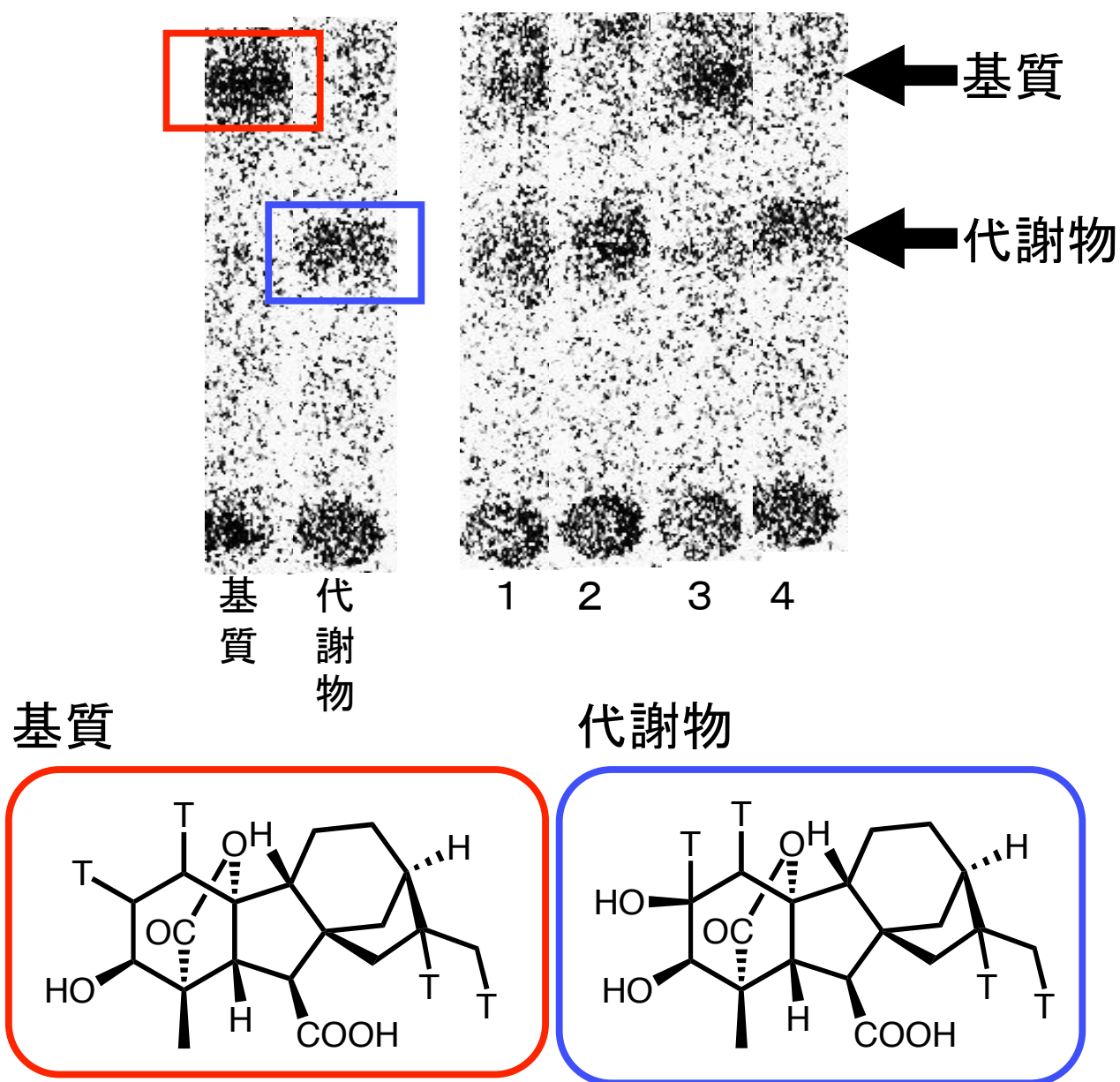


図2-6 スクリーニングの一例

試験化合物をリコンビナントAtGA2ox2による活性型GA誘導体の一種16,17-dihydro-GA<sub>4</sub>のトリチウム標識体の代謝系に添加した。上左図の対照区の移動度を参考に、基質が残り代謝物がほぼ生成しないものを選抜した。上図においては3番のみを阻害剤候補として残した。

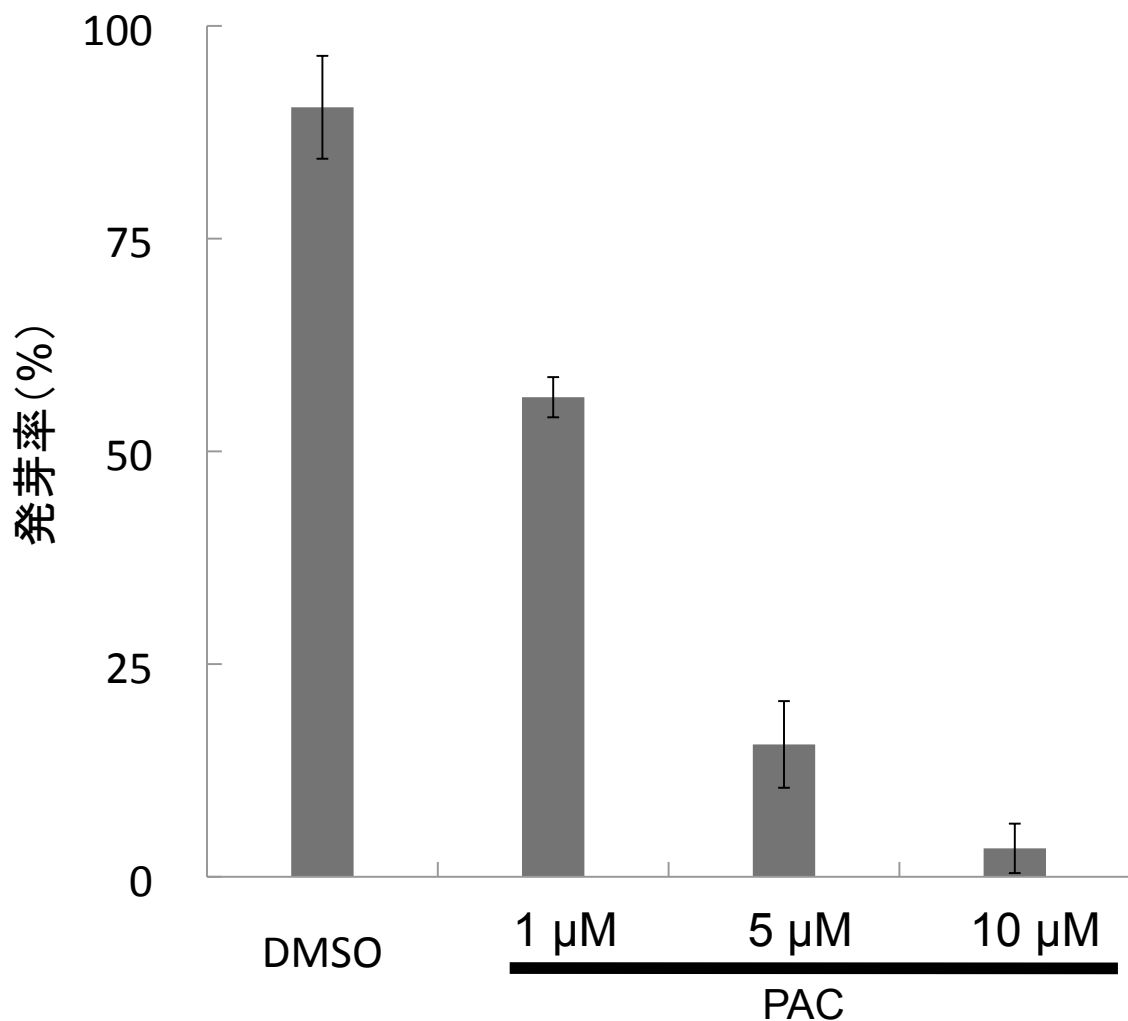


図2-7 シロイヌナズナ発芽に対するPACの影響

GA合成過程上流域を阻害するPACの投与による発芽率の低下を調べた。23°C・明所で45時間経過した時点での発芽率を測定した。PAC 1  $\mu$ M処理により発芽率は50%前後まで低下した。n=3。エラーバーはSDを示す。



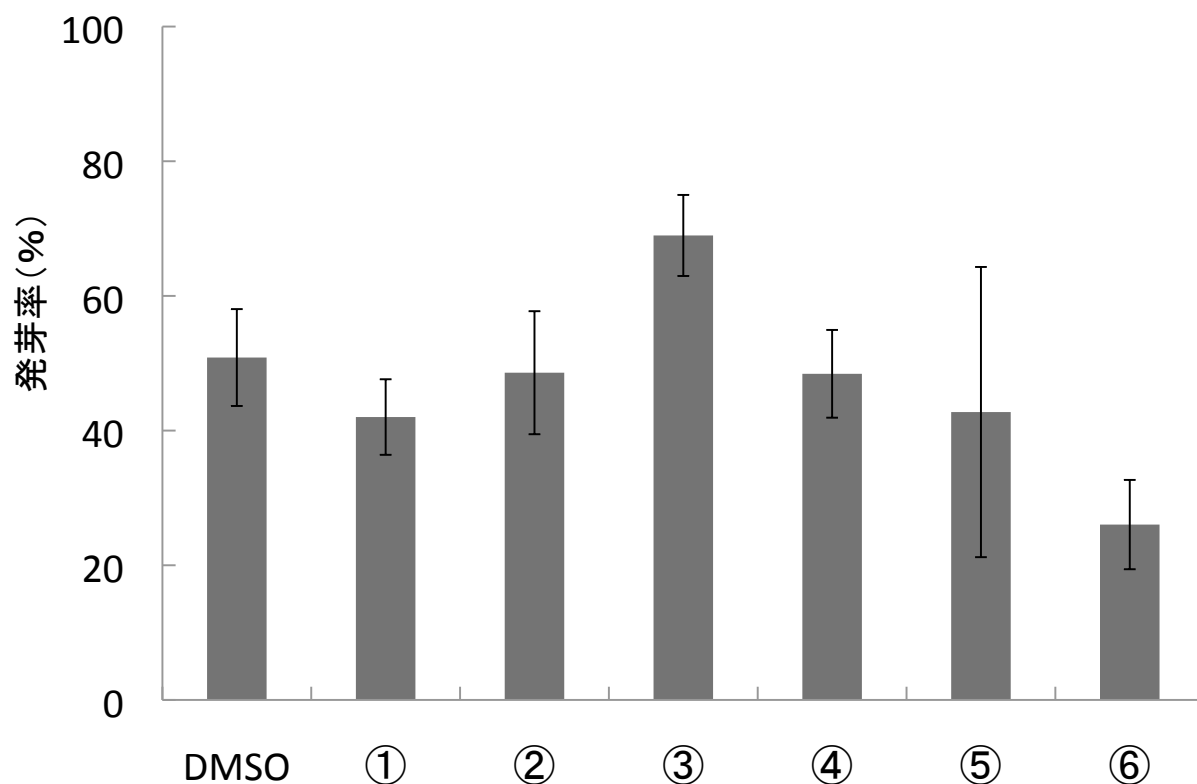


図2-8 種子発芽の系による最終選抜

代謝反応系を利用したスクリーニングにより得られた6化合物に対して種子発芽に与える影響を試験した。PAC 1  $\mu\text{M}$ 水溶液中で2日間4°Cで低温処理し、各化合物100  $\mu\text{M}$ 水溶液を染み込ませた濾紙上に播種し23°C・明所で45時間経過した時点での発芽率を測定した。n=3。エラーバーはSDを示す。

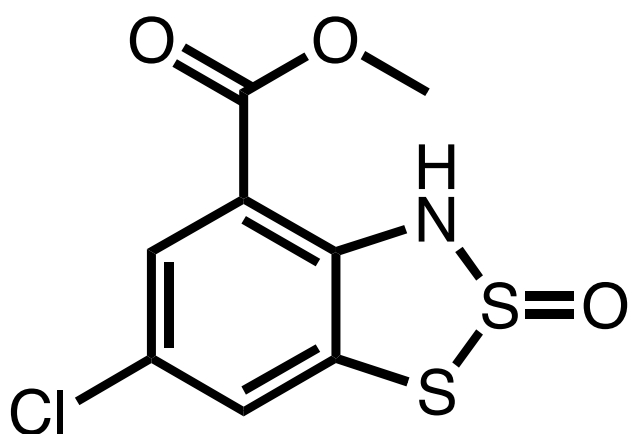
これより一種の化合物(図の③)が発芽促進効果を示すことが判明した。

であったのに対して、試験に用いた選抜化合物 6 種のうち、methyl 6-chloro-3H-1,2,3-benzodithiazole-4-carboxylate 2-oxide (以下 CBTC と称す)のみ発芽率が 65%にまで上昇した。CBTC の分子構造を図 2-9 に示す。なお、残り 5 種の化合物については mock 処理区に対する差が認められなかった。

次に、「幼植物体の生長過程」に対する効果について述べる。この系は上記「種子発芽過程」と比較して GA 生合成過程がそれほど活発ではないことから、PAC 等の GA 生合成阻害剤の添加は必要ないと判断した。そこで、GA 生合成阻害剤を添加しない条件で発芽させ、2 日経過した幼植物体を用いて 10, 30, 100  $\mu\text{M}$  の CBTC 添加区とその mock 区に移植し、23°C・明所下、48 時間経過時の胚軸長を測定した。その結果を図 2-10 に示す。種子発芽過程に対する効果と同様に、CBTC 添加区は mock 処理区と比較して胚軸の伸長促進効果が認められ、内生 GA 量の増加が示唆される結果が得られた。以上から、CBTC が GA2ox 阻害作用を示すことで 2 つの過程いずれに対しても促進効果を示す可能性が示された。2-1 項で触れたとおり、数あるシロイヌナズナの GA2ox の中で、AtGA2ox2 は支配的に機能すると考えられているが、AtGA2ox6 など植物内における存在量の点で AtGA2ox2 に比肩するものがある。それにも関わらず、CBTC がこれほど明瞭に添加効果を示したことは、単にその阻害標的が AtGA2ox2 だけに留まらず、他の GA2ox の機能までを阻害している可能性を強く示唆している。この点については、2-3 項において具体的に検証する。

#### 2-2-3 GA 結合活性阻害を指標とする M14 の選抜

酵素活性阻害を指標とする選抜により、約 1,000 種の化合物の中から CBTC を選抜することができた。このこと自体は当初の目的とした GA 代謝酵素を標的する



Chemical Formula:  $\text{C}_8\text{H}_6\text{ClNO}_3\text{S}_2$   
 Molecular Weight: 263.7211

図2-9 CBTCの構造

発芽過程に対する影響によるスクリーニングで発芽促進効果を示し選抜されたmethyl 6-chloro-3H-1,2,3-benzodithiazole-4-carboxylate 2-oxideの構造式。

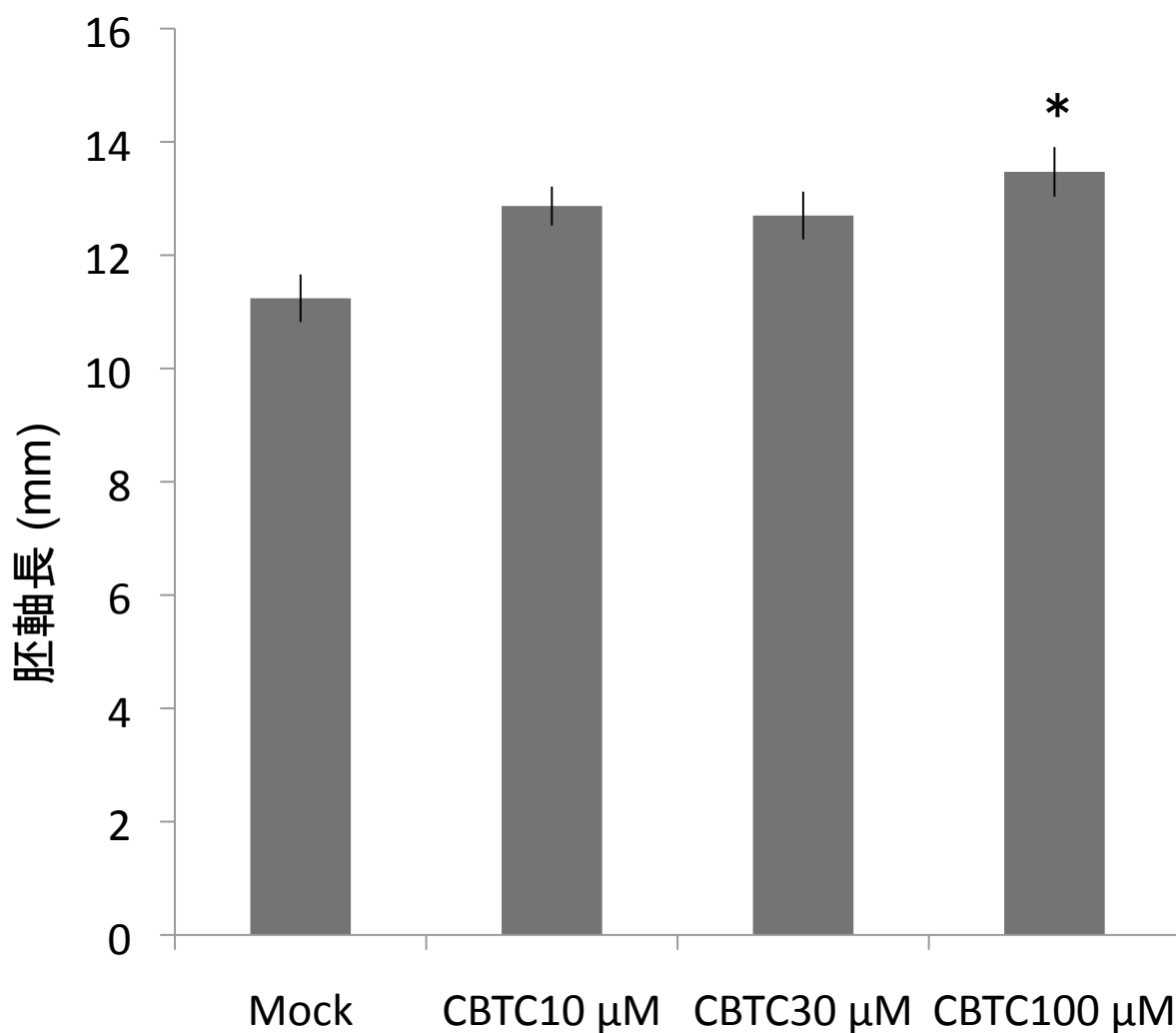


図2-10 幼植物体伸長へのCBTCの影響

幼植物体の成長過程に対するCBTCの効果を測定した結果。阻害剤等の無添加条件下で発芽させ、2日程度経過した幼植物体をCBTC100  $\mu\text{M}$ 入りの1/2MS培地に移植して23°C・明所下、48時間後に測定した。n=15。エラーバーはSDを示す。

これにより、種子発芽過程の系と同様に成長促進的な効果を示すことがわかった。

\* = $p < 0.05$

制御剤創製の足がかりになるものであり幸運に恵まれたと考えたが、ライブラリーとしては約9,000種近くが未評価のまま積み残しとなった。この原因として手間と労力を必要とするアッセイ系であったために効率的なスクリーニングができなかった点を挙げることができる。そこで、CBTCとは構造的に大きく異なる陽性化合物の選抜を目的として、更なるハイスループット化が期待される探索系の開発を行った。この新たな系構築のヒントになったのは、GA2oxが示すGA結合活性である。これは、GA2oxが2-オキソグルタル酸や鉄(II)イオン、アスコルビン酸など補欠因子存在下では酵素活性を示すのに対して、鉄(II)イオンに代えてコバルトイオンを添加すると酵素活性は喪失する代わりに基質であるGAの結合性が維持されることに起因する(Park *et al.*, 2005)。GA2oxが示すこの性状を選抜系に転用すべく、前項で用いた $^3\text{H}_4$ -16,17-dihydro-GA<sub>4</sub>と、ハイスループット化を目指して96穴プレート型RI検出装置との組合せにより、約9,000種の化合物評価が達成可能となった。

GA結合活性量の測定についてもう少し具体的に記す。装置としては、ミリポア社製MultiScreen vacuum manifoldsを用いた。その概要を図2-11に示す。イモビロンP膜が底面に付いた96穴プレートを用いることにより、常圧ではウェル内の液体が底面から流れ出ることがないのに対して、マニホールドにセットして底面外側から陰圧にするとウェル内の液体が底面より下に排出される。この時、タンパク質のような高分子はイモビロンP膜上、すなわち、ウェル内に残る。従って、GA2oxは酵素タンパク質としてウェル内に残るが、その際にGA2oxと結合した $^3\text{H}_4$ -16,17-dihydro-GA<sub>4</sub>もウェル内に残り、結合しなかった $^3\text{H}_4$ -16,17-dihydro-GA<sub>4</sub>は下へ流れ出てしまうため、ウェル内に残った放射活性量を測定すれば酵素に対するGA結合量が判明する。そして、この系においてGA結合量を変化させる化合物がウェル内に存在する場合には、その添加濃度に応じて検出される

 =GA 2-oxidase      =GA

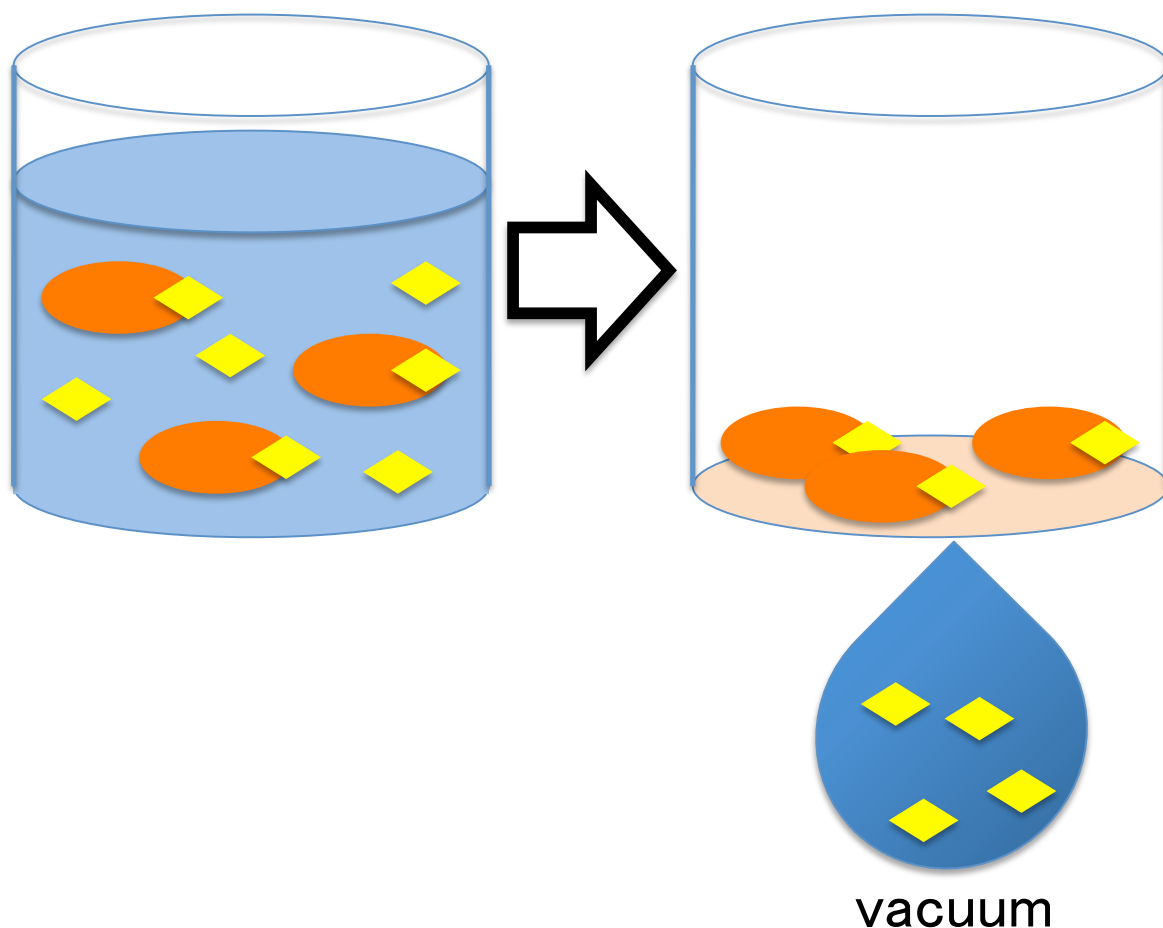


図2-11 MultiScreen vacuum manifoldsによる  
 反応系の分離概念図

イモビロンP膜が底面に付いた96穴プレートを用いた。常圧ではウエル内の液体が底面から流れ出ることがないのに対して、底面外側から陰圧にするとウエル内の液体が底面より下に排出される。タンパク質のような高分子はイモビロンP膜上に残る。これにより、GA2oxはウエル内に残るが、結合しなかった $^3\text{H}_4$ -16,17-dihydro-GA<sub>4</sub>は下へ流れ出てしまうため、ウエル内に残った放射活性量を測定すれば酵素に対するGA結合量が判明する。

$^3\text{H}_4$ -16,17-dihydro-GA<sub>4</sub>由来の放射活性量が低下することになり、その低下状況を指標とした選抜が可能になる。実際には、これに加えて酵素と結合したGAを回収するための酵素変性溶液の組成、結合のための反応時間、変性時間、標識GA添加量、酵素量などを検討して、図2-12に示す化合物選抜系を構築した。

ライブラリーに収納されていた化合物を平均終濃度250  $\mu\text{M}$ で系に添加し、CBTCが陽性判定となることを確認してから、2-2-2項においてすでに試験済みの化合物も加え直して約10,000種に対する選抜を実施した。その一例について図2-13に示す。最終的に、14種の化合物がAtGA2ox2に対する結合活性、正確に言えばAtGA2ox2に対するGA結合を阻害する活性を示した。再度同様のGA結合活性阻害試験において検証を加えたところ、2-[5-(3-chlorophenyl)-1,3,5-dithiazinan-2-ylidene] malononitrile (以下、M14と称す)が明瞭なGA結合阻害活性を示すことが確認された(図2-14)。M14の分子構造を図2-15に示す。この選抜系はGA2oxに対するGA結合阻害を指標としていたため、M14が酵素としての機能を期待どおり阻害しているかについては改めて確認しておく必要がある。そこで、2-2-2項の選抜系に戻り、M14をCBTCとの比較において評価した。その結果を図2-16に示す。これによると、AtGA2ox2の酵素活性に対する $IC_{50}$ (50%阻害濃度)はCBTCが43.6  $\mu\text{M}$ であったのに対して、M14は20.9  $\mu\text{M}$ であった。このことから、M14の方がより強い効力を示すことが判明した。ここまでの検討により、有望な制御剤候補として2種の選抜を達成した。次節ではCBTCとM14に関する作用解析の状況を述べる。

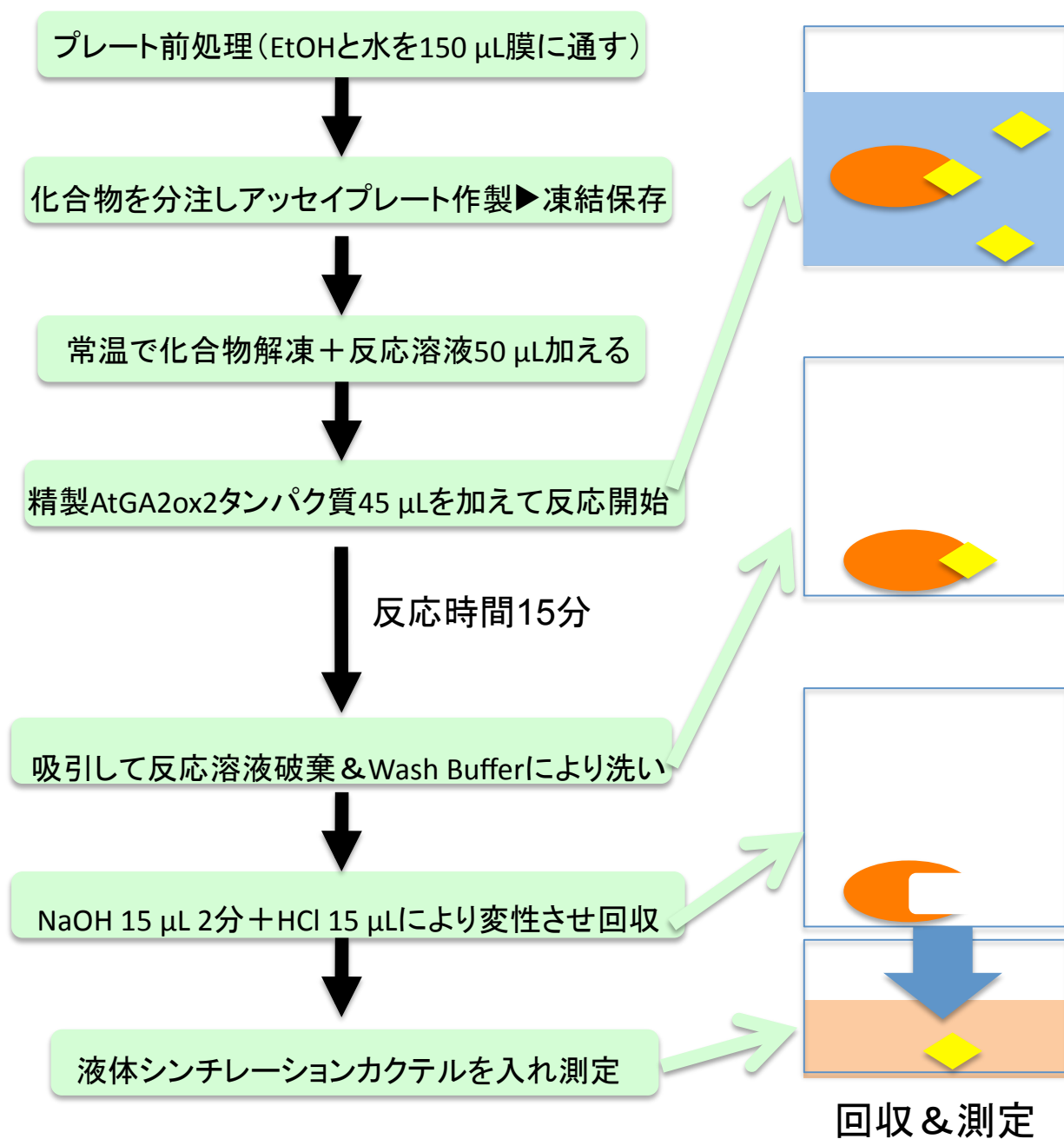


図2-12 新規スクリーニング法の概略

GA2oxに対する結合活性を指標にし新たに開発した、ミリポア社製 MultiScreen vacuum manifoldsを用いた96穴プレートによる新規スクリーニング法の概略。なお、解析は全て1連で行った。



## スクリーニングプレート No.34

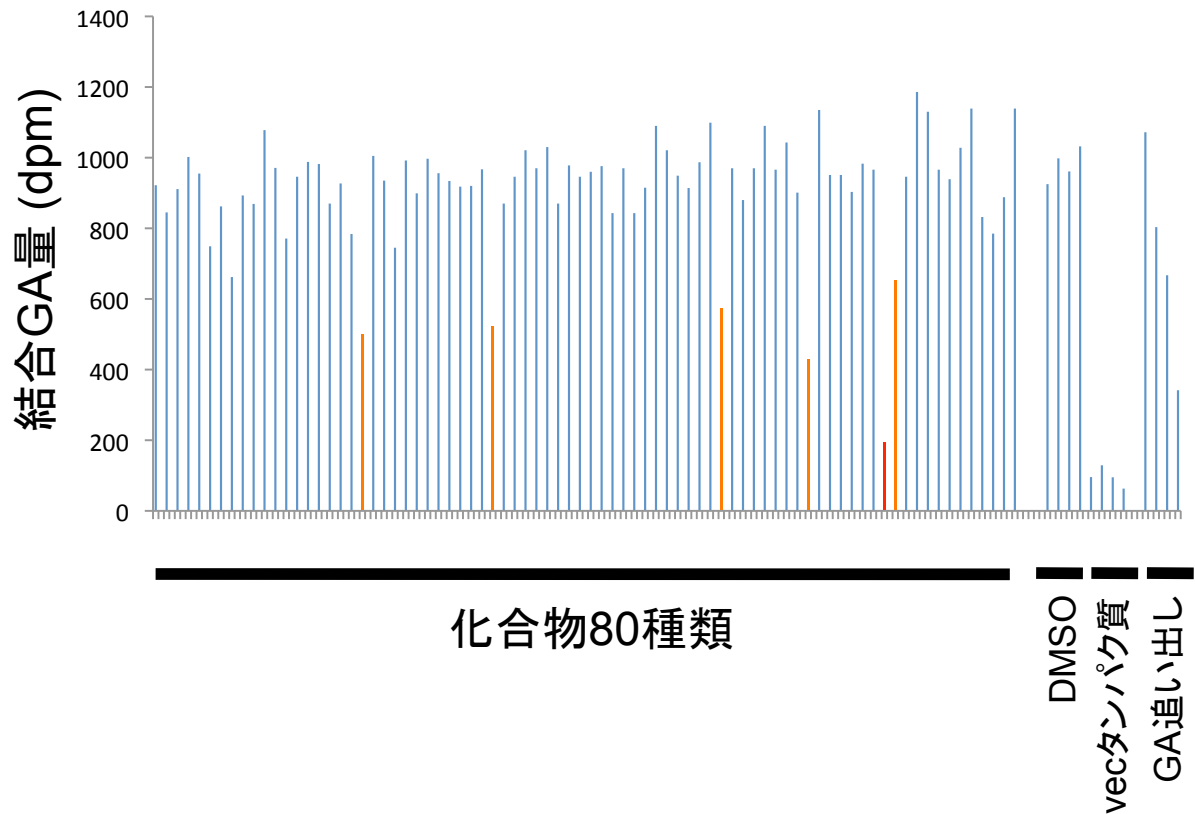


図2-13 新スクリーニングの一例

化合物ライブラリー(Maybridge)の化合物10000種においてスクリーニングを行った結果の一例。vectorタンパク質はHisタグとチオレドキシンの融合タンパク質。GAによる追い出しは左からGA<sub>4</sub> 1  $\mu$ M、3  $\mu$ M、10  $\mu$ M、30  $\mu$ M添加区。

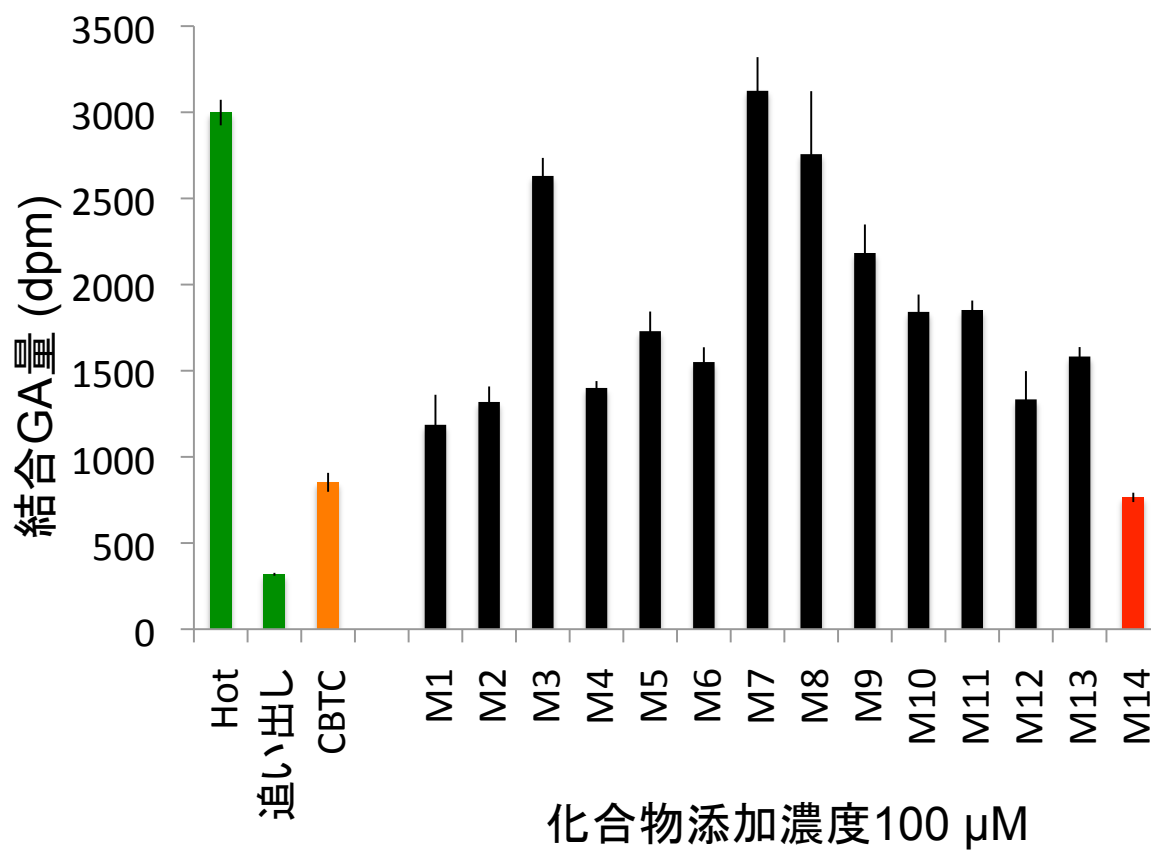
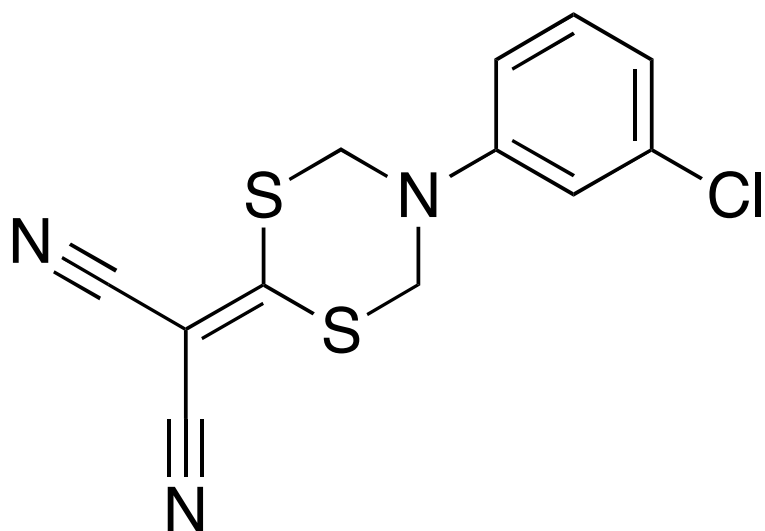


図2-14 GA結合阻害活性を指標にした最終選抜

スクリーニングにより選抜された14種の化合物の添加濃度100  $\mu$ MにおけるAtGA2ox2に対するGA結合阻害活性。n=3。エラーバーはSDを示す。  
 一種M14が前スクリーニングにより選抜されたCBTCと同程度もしくはそれより高い活性を有していた。



Chemical Formula:  $C_{12}H_8ClN_3S_2$   
Molecular Weight: 293.80

図2-15 M14の構造

GA2ox2の代謝活性に対する阻害を指標にした最終スクリーニングで最も強い活性を示し選抜された2-(5-(3-chlorophenyl)-1,3,5-dithiazinan-2-ylidene) malononitrileの構造式。

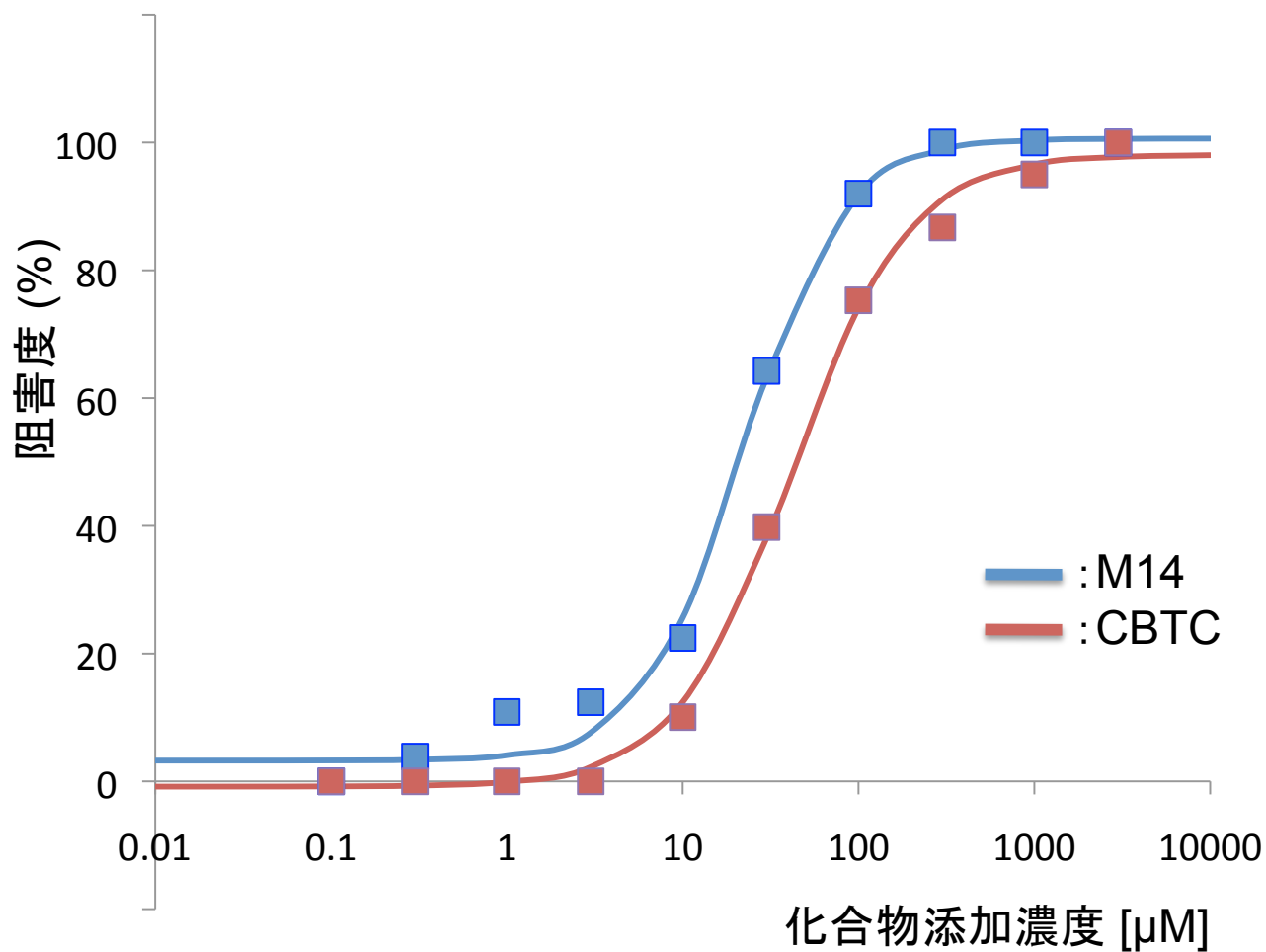


図2-16 M14とCBTCのGA2oxに対する  
阻害効果比較

GA2ox2の代謝反応に対するM14とCBTCの添加効果。

GA2ox2の酵素活性に対する阻害効果 ( $IC_{50}$ ) としてCBTCが43.6  $\mu$ Mであったの  
に対して、M14は20.9  $\mu$ Mであった。

## 2-3 ジベレリン代謝酵素阻害剤の作用解析

### 2-3-1 選抜化合物の作用特異性の検討

前節で実施した選抜の結果、GA<sub>2ox</sub> 阻害剤候補として CBTC と M14 を取得することができた。しかし、序論でも触れたとおり、GA 生合成酵素の GA<sub>3ox</sub> や GA<sub>20ox</sub> も GA<sub>2ox</sub> と同じ 2ODD 型可溶性酵素に属しており、化合物が作用する部位によっては「GA<sub>2ox</sub> 特異的」と言えない可能性があった。すでに、PHX が GA<sub>3ox</sub> や GA<sub>20ox</sub> だけでなく、GA<sub>2ox</sub> に対しても阻害効果を示す 2ODD 阻害剤であることは述べた。そこで、CBTC と M14 両化合物の阻害標的に関する特異性について詳細に検討を加えるため、AtGA<sub>2ox2</sub> 以外の GA 関連 2ODD リコンビナントタンパク質も追加調製して用いることを計画した。結果、GA<sub>3ox</sub> として 2 種 (AtGA<sub>3ox1</sub>、AtGA<sub>3ox4</sub>)、GA<sub>2ox</sub> としてこれまで用いてきた AtGA<sub>2ox2</sub> 以外に 2 種 (AtGA<sub>2ox1</sub>、AtGA<sub>2ox6</sub>) を 2-2-1 項と同様の手順により調製した。各酵素活性は、各々に対する基質 GA (1 μg) を用いて、期待される代謝物の生産を LC/MS/MS を用いて確認した。すなわち、GA<sub>3ox</sub> の場合は GA<sub>4</sub> の直前の前駆体 GA<sub>9</sub> を、また、GA<sub>2ox</sub> の場合は GA<sub>4</sub> を基質として用いた。

調製した各酵素の活性確認を終えて、それぞれの反応系に CBTC および M14 を添加して、反応の阻害状況を調べた。なお、化合物の添加濃度として AtGA<sub>2ox2</sub> に対して両化合物ともその阻害が明瞭となる 500 μM 添加条件を採用した (図 2-16 参照)。検討の結果について図 2-17 に示す。これによると、CBTC は AtGA<sub>2ox1</sub> および AtGA<sub>2ox6</sub> に対して明瞭な阻害活性を示したが、AtGA<sub>3ox1</sub> および AtGA<sub>3ox4</sub> のいずれに対しても阻害活性を確認することができなかった。すなわち、CBTC の作用が及ぶ範囲として、少なくとも GA<sub>2ox</sub>・GA<sub>3ox</sub> の範囲の中では GA<sub>2ox</sub> 特異性が確認できた。他方、M14 の添加効果としては、AtGA<sub>2ox1</sub> および AtGA<sub>2ox6</sub> に対する阻害活性が認められたものの、AtGA<sub>3ox1</sub> および AtGA<sub>3ox4</sub> に対しても明

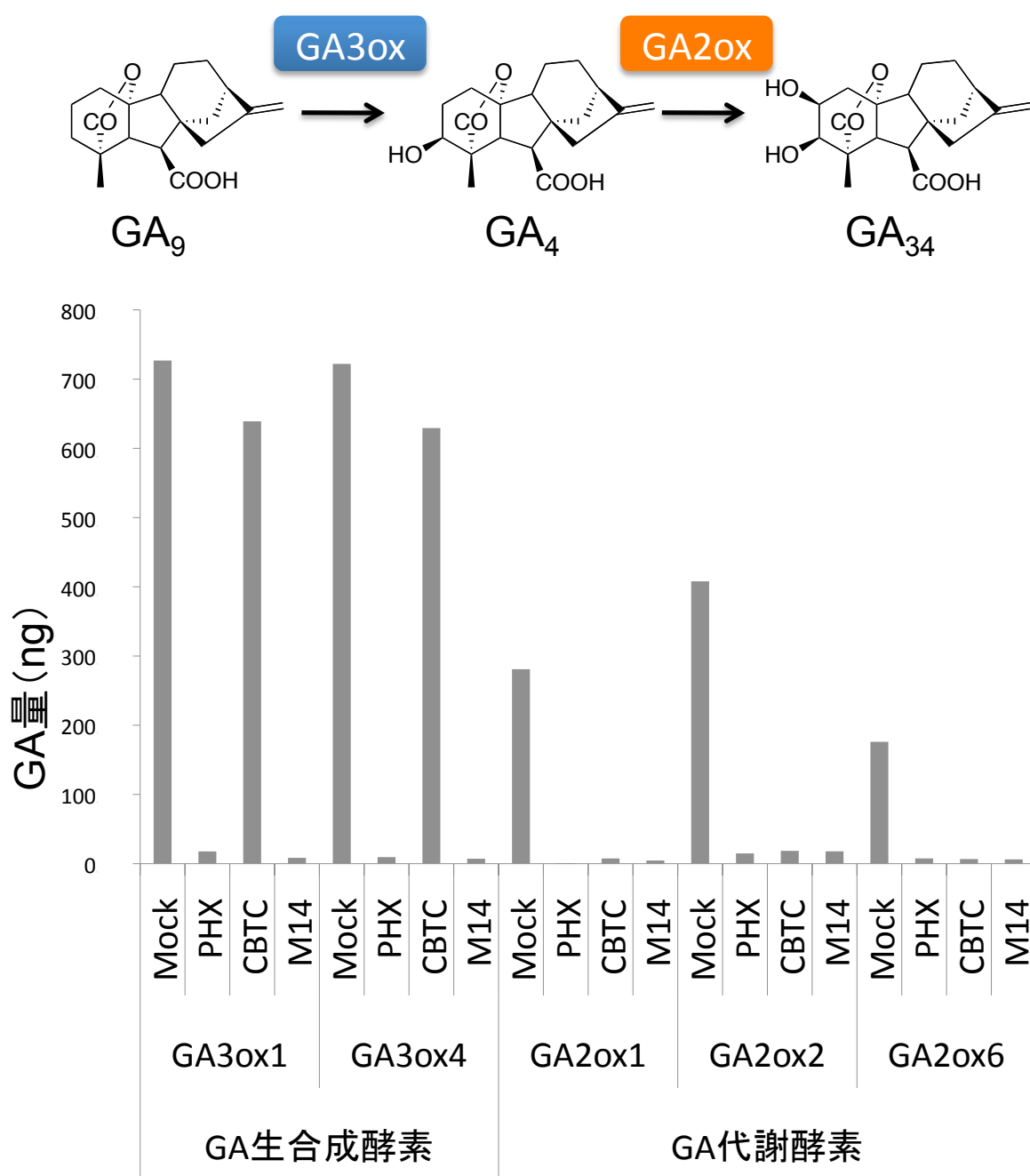


図2-17 2ODDに対するCBTC、M14の影響

1  $\mu\text{g}$ の基質GAを2ODDに代謝させる系に各化合物を500  $\mu\text{M}$ で添加し代謝物のGA量をLC/MS/MSを用いて定量した。GA生合成酵素GA3oxの基質はGA<sub>9</sub>を用い、代謝によりできるGA<sub>4</sub>を測定した。また、GA代謝酵素GA2oxの基質はGA<sub>4</sub>を用い、代謝物のGA<sub>34</sub>測定した。CBTCは生合成酵素GA3oxに対して阻害効果を持たないのに対して、M14は生合成酵素にも代謝酵素にも阻害効果を持つ。

瞭な阻害活性が確認されたことから CBTC と同様の特異性は持っておらず、PHX 同様の幅広い 2ODD 阻害活性を持つ可能性が示される結果となった。

次に、シロイヌナズナ幼植物体を用いて生長過程に対する化合物の投与効果を調べた。何ら阻害剤を含まない培地上で発芽させ、9 日経過した幼植物体を、50  $\mu$ M の CBTC あるいは M14 が添加された培地上に移植し、23°C・明所下で 5 日経過した時点の葉柄の長さを測定した。その結果を図 2-18 に示す。これによると、CBTC 添加区は mock 区と比べて葉柄長の増加傾向が確認され、この試験からも内生 GA 量の増加が示唆される結果が得られた。これに対して、M14 処理区では、mock 処理区と比べて葉柄長が短く、*in vitro* 試験系の結果である「GA2ox だけでなく GA3ox の機能も阻害する」性状を反映する結果となった。

これまでの検討結果から、選抜した 2 つの化合物のうち CBTC は、代謝酵素 GA2ox を標的とし、GA 生合成酵素 GA3ox に対する阻害効果を持たないことが示された。植物体の生育にも促進傾向が認められた点から、実際に試験は行っていないが恐らく GA20ox に対する阻害効果も持たないであろうと予想される。そして、AtGA2ox2 に加えて別の GA2ox 分子種をも標的としたことから、シロイヌナズナ植物体内における内生 GA の代謝過程の抑制に明瞭な効力を示したと考えられる。この段階において、当初想定した GA 代謝酵素制御剤として具体的に特異性が高いものを 1 種選抜できたと判断した。

### 2-3-2 CBTC 構造類縁体の有機合成と効力評価

CBTC が GA 代謝過程の有望な制御剤となり得ることが判明し、さらに高活性な化合物創製に向けて、構造類縁体の化学的合成を計画した。合成法の探索の結果、CBTC 分子構造内の窒素および硫黄を含む複素 5 員環構造は Herz 反応、すなわち、アニリン類縁体に二塩化二硫黄、次いで水を作用させる反応を用いて構

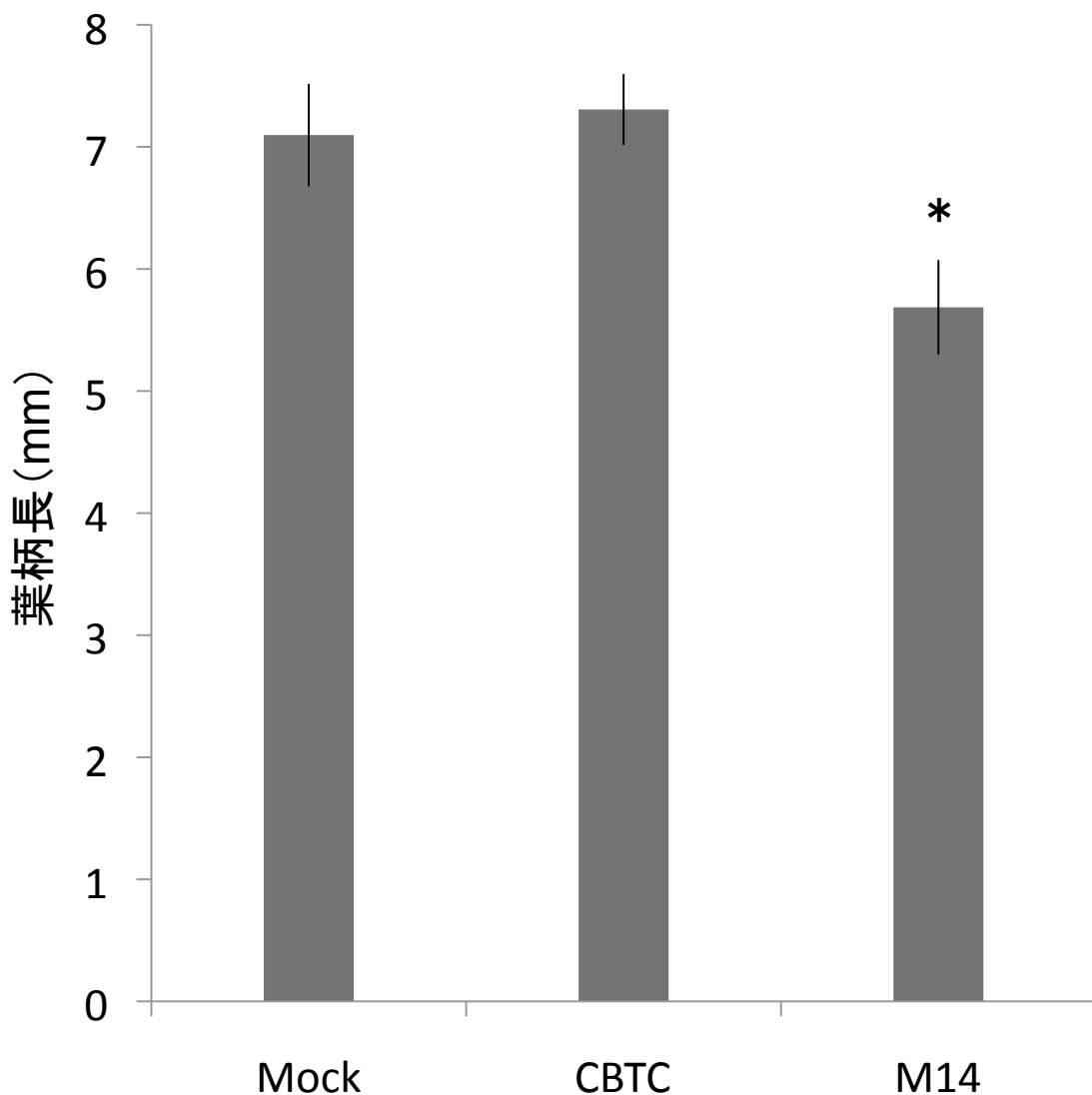


図2-18 CBTC、M14の葉柄長に対する影響

幼植物体の成長過程に対するCBTCとM14の効果を測定した結果。阻害剤を無添加の条件下で発芽させ、9日程度経過した幼植物体を各化合物50  $\mu$ M入りのMS培地に移植して23°C・明所下、5日後に葉柄長を各個体長い2本ずつ測定した。n=14。エラーバーはSEを示す。 \* = $p<0.05$

CBTCは伸長促進、M14は伸長阻害の傾向が観察された。

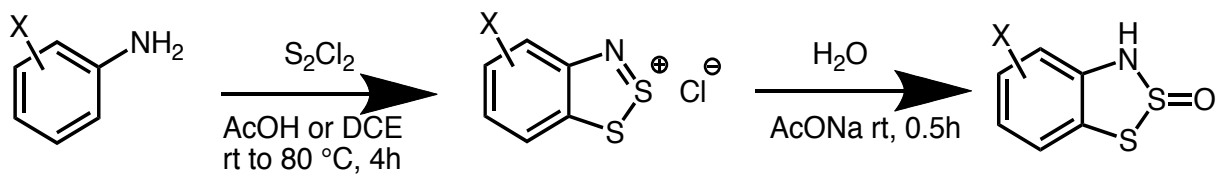


築可能であると考えられた(図 2-19) (Huestis *et al.*, 1965, Neo *et al.*, 2011)。種々のアニリン誘導体を用いて Herz 反応を行い、市販の類似化合物と合わせて CBTC 構造類縁体を計 13 種用意した。それぞれの構造類縁体は CBTC Derivatives を略して「CBD+番号」という形式で以下称することとし、各分子構造をその略称とともに図 2-20 に示す。CBD 化合物は複素 5 員環構造の有無や、芳香環に結合する置換基、メキシカルボニル基が置換している CBTC 中芳香環の窒素原子隣接部位などにバリエーションをもたせた。これら 13 種を用いて、AtGA2ox2 に対する阻害効力を比較した。CBTC が 50%程度の阻害効力を示す 30  $\mu$ M の添加濃度にそれぞれを設定して、AtGA2ox2 反応系に CBD 化合物を添加した。その結果を図 2-21 に示す。これにより、以下の 3 点が判明した。①CBTC と CBD1、CBD2、CBD3、CBD4、CBD9、CBD13 を比較して、複素 5 員環構造の喪失により阻害効力が低下する。②CBTC と CBD5、CBD6、CBD10 の比較から、芳香環に結合しているハロゲンは塩素が一番強い阻害効力を示す。③CBD10、CBD11、CBD12 の比較から、メキシカルボニル基が置換している芳香環窒素原子隣接部位については嵩高い基が存在するほど阻害効力が低下する。

この点をふまえて、窒素原子隣接部位の構造を変えて、図 2-22 に示す 5 種の CBTC 構造類縁体を新たに化学合成した。これらについて、AtGA2ox2 の酵素活性に対する阻害効力を比較したところ、予想される通り CBD14 と CBD15 は強い阻害効力を示さなかったのに対し、CBD16、CBD17、CBD18 は CBTC と同程度かそれ以上の効力を有していた(図 2-23)。

CBTC 構造類縁体全 18 種を対象として、2-3-1 項に倣いこれら CBD 化合物の GA2ox 特異性について検討した。化合物の添加濃度は前述のとおり 500  $\mu$ M 条件を採用し、反応時間を 1 時間に設定して AtGA3ox1 に対する阻害効力を調べた。その結果を図 2-24 に示し、AtGA2ox2 に対する阻害効力と併せて表 2-2 に一覧で示

(a)



(b)

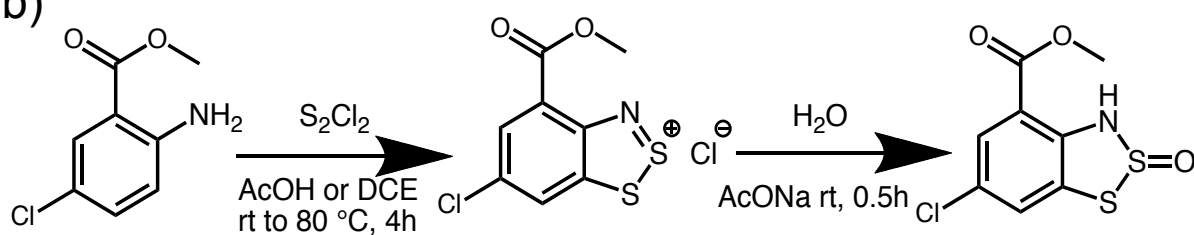
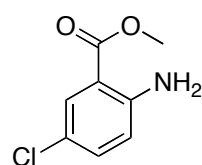


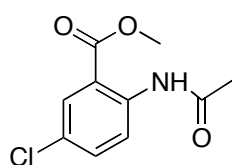
図2-19 Herz反応

(a) Herz反応の反応式。

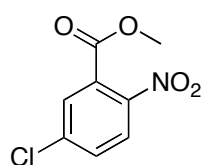
(b) アントラニル酸メチルを出発原料としてHerz反応によりCBTCを合成した。



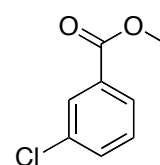
CBD1



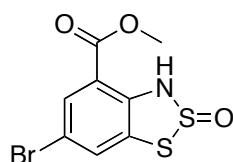
CBD2



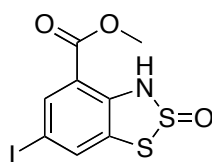
CBD3



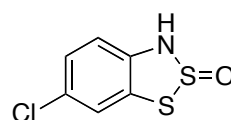
CBD4



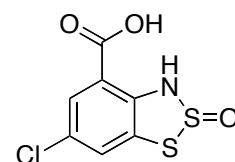
CBD5



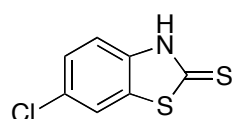
CBD6



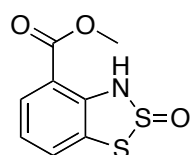
CBD7



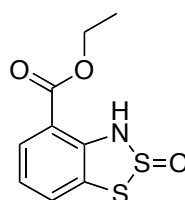
CBD8



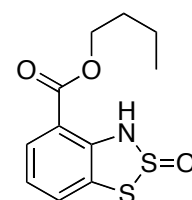
CBD9



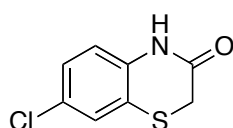
CBD10



CBD11



CBD12



CBD13

## 図2-20 CBD化合物一覧

CBTCの類縁体(CBTC DerivativesからCBD+番号で略称する)の一覧。

CBD化合物はCBTCの窒素・硫黄を含んだ五員環の構造の有無や、芳香環に結合している塩素を他のハロゲンで置換した誘導体、メキシカルボニル基が置換しているCBTC中芳香環の窒素原子隣接部位の置換したものなどが含まれている。CBD1,2,3,4,9,13は市販の類似化合物。

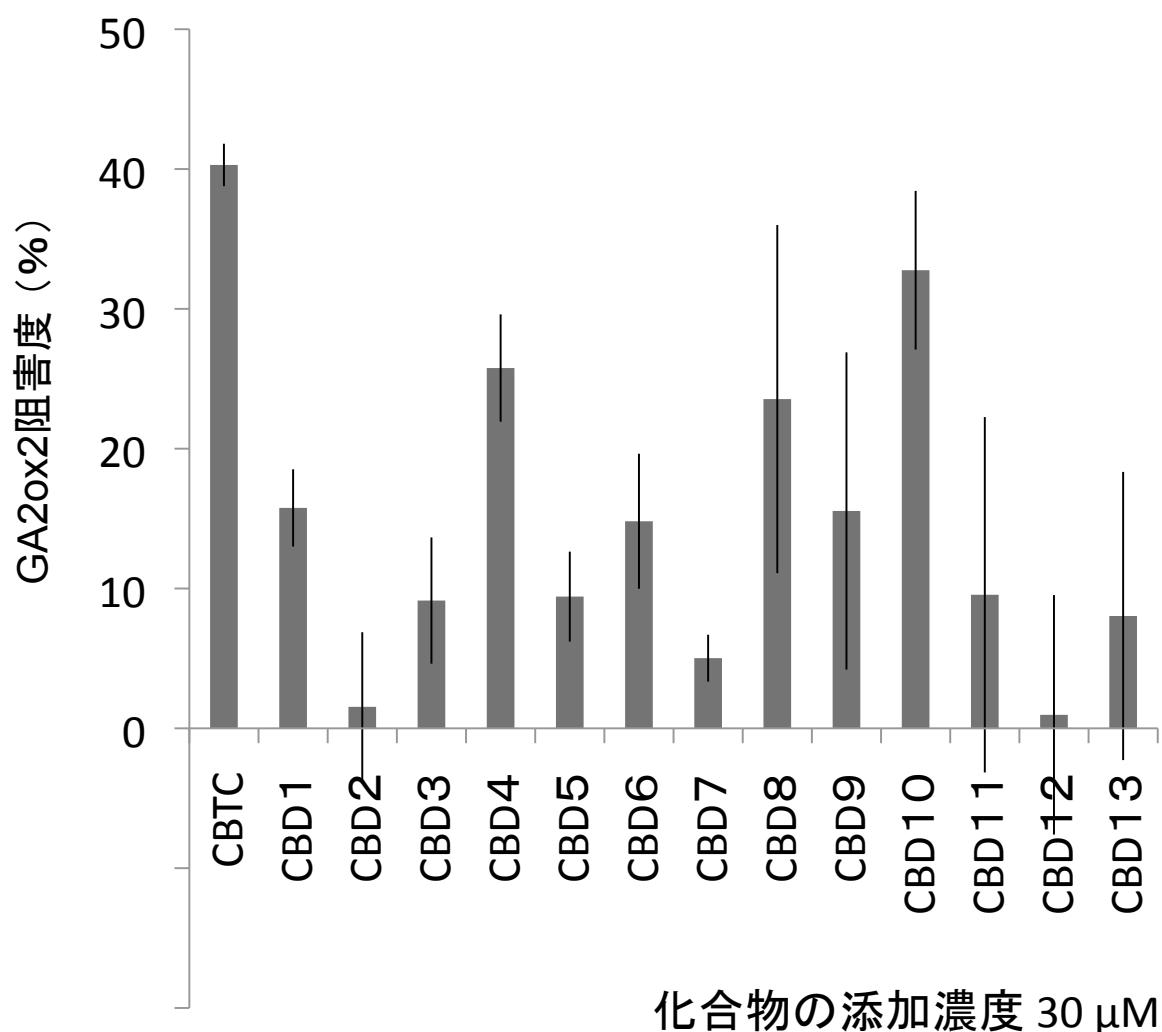
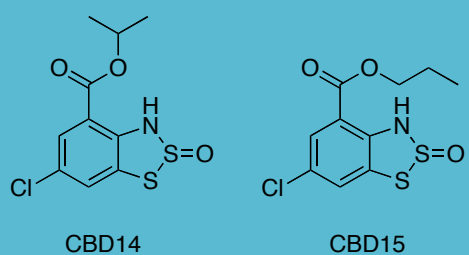


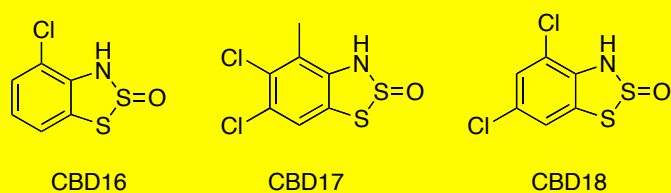
図2-21 GA2oxに対するCBD化合物の阻害効果

AtGA2ox2の代謝反応系に対してCBD化合物が30  $\mu$ Mで与える影響。n=3。エラーバーはSDを示す。

- ①CBTCとCBD1、CBD2、CBD3、CBD4を比較して、複素5員環構造の喪失により阻害効力が低下する。
- ②CBTCとCBD5、CBD6、CBD10の比較から、芳香環に結合しているハロゲンは塩素が一番強い阻害効力を示す。
- ③CBD10、CBD11、CBD12の比較から、メキシカルボニル基が置換している芳香環窒素原子隣接部位については嵩高い基が存在するほど阻害効力が低下する。



芳香環窒素原子隣接部位の  
嵩高い基により阻害活性が  
低いことが予想されるグループ



阻害活性が高いことが  
予想されるグループ

## 図2-22 追加合成したCBD化合物

図2-21で得られた構造活性相関から得られた情報をもとに、新たに合成した5種の化合物。

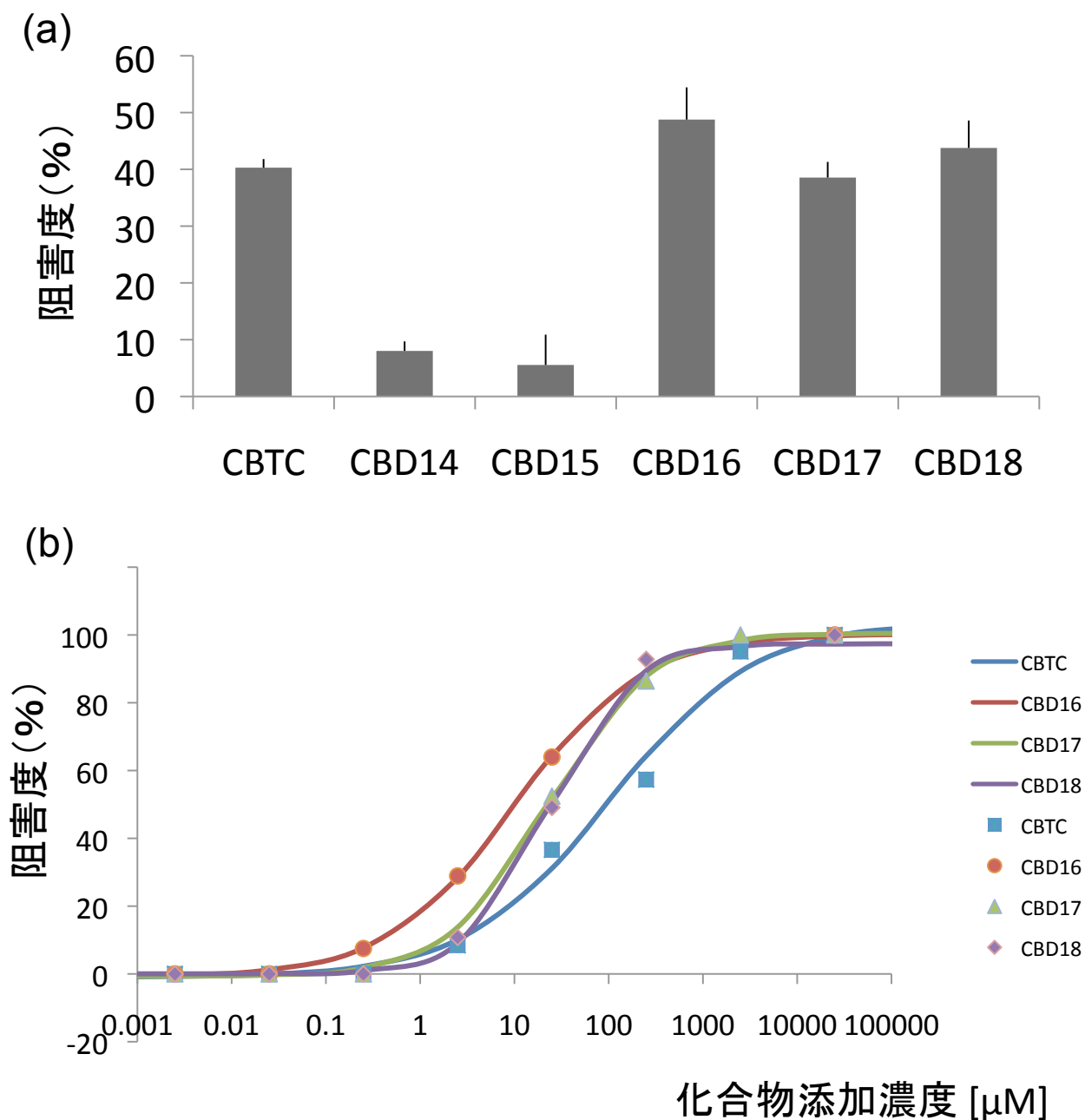


図2-23 CBD14-18のGA2ox阻害効果比較

- (a) GA2ox2の代謝反応系に対してCBD化合物が30  $\mu$ Mで与える影響。n=3。  
エラーバーはSDを示す。
- (b) AtGA2ox2の代謝反応に対するCBTCとCBD16、CBD17、CBD18の添加による阻害度。

CBD14とCBD15は強い阻害効力を示さなかったのに対し、CBD16、CBD17、CBD18はCBTCと同程度かそれ以上の効力を有していた。

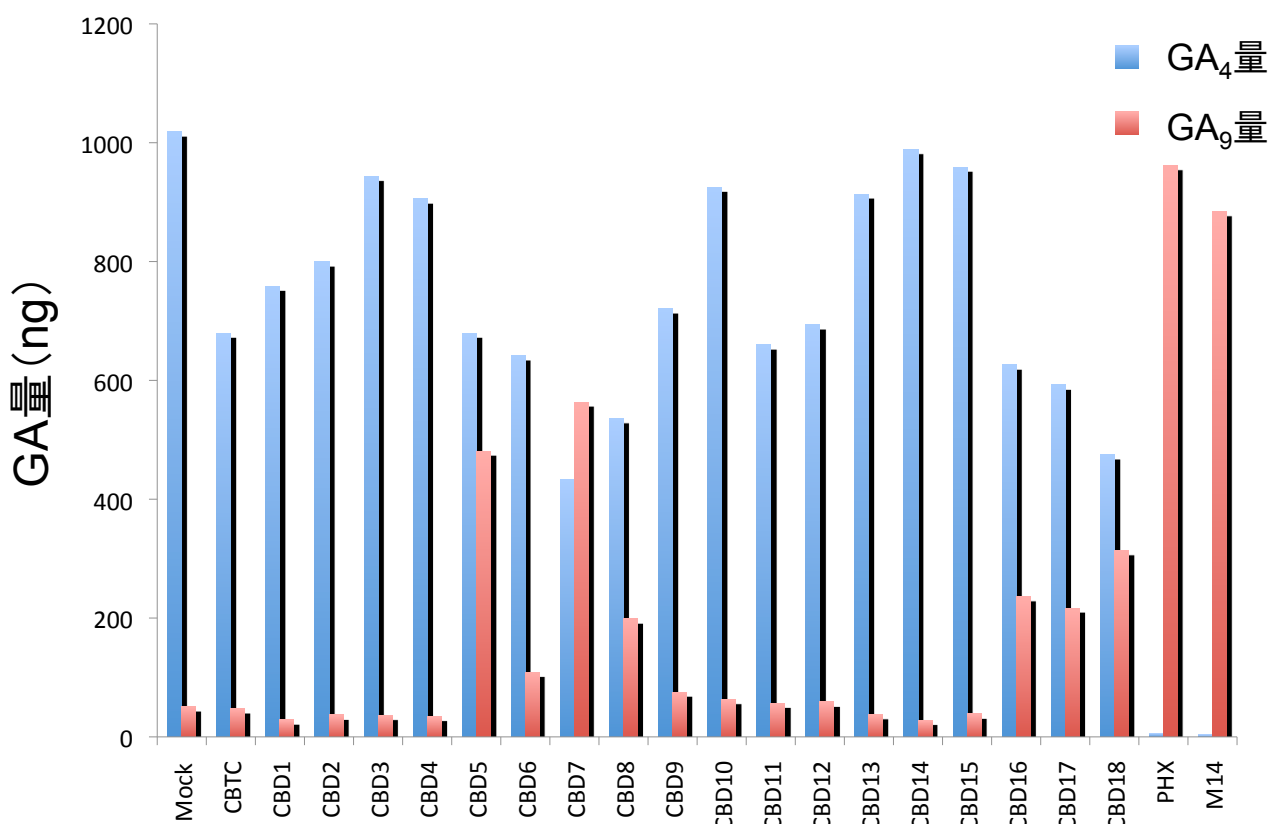
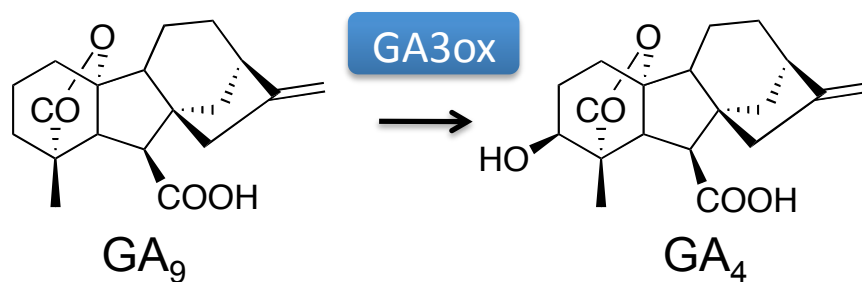


図2-24 GA3oxに対するCBD化合物の阻害効果

1  $\mu\text{g}$ の基質をGA3ox1に代謝させる系に各化合物を500  $\mu\text{M}$ で添加し代謝物のGA量をLC/MS/MSを用いて定量した。GA生合成酵素GA3oxの基質はGA<sub>9</sub>を用い、代謝によりできるGA<sub>4</sub>を測定した。

生合成酵素GA3oxに対して阻害効果を持たないCBTCから構造展開したCBD化合物の中に、生合成酵素GA3oxに対して阻害効果を有する化合物が含まれていた。

## GA生合成酵素GA3oxとGA代謝酵素GA2oxに対する CBD化合物の阻害効果一覧

	CBTC	PHX	CBD1	CBD2	CBD3	CBD4	CBD5	CBD6	CBD7	CBD8	CBD9	CBD10	CBD11	CBD12	CBD13	CBD14	CBD15	CBD16	CBD17	CBD18
GA3ox1	×	◎	×	×	×	×	○	△	○	△	×	×	×	×	×	×	×	○	△	○
GA2ox2	○	○	△	×	×	△	×	△	×	△	△	○	×	×	×	×	×	◎	○	○

表2-2 CBD化合物のGA2oxとGA3oxに対する  
阻害効果

GA代謝酵素GA2ox特異的であるCBTCをリード化合物として構造展開したCBD化合物群のGA生合成酵素GA3oxとGA代謝酵素GA2oxに対する阻害効果まとめ図。

- ①CBTC同様にGA2ox特異性を示すものの4種
- ②PHXやM14と同様にGA2ox・GA3oxとも阻害効力を示すものの5種
- ③GA2oxに対する阻害効果は低いですがGA3oxに対して阻害能を示すものの2種に分類された。



す。これによれば、CBD 化合物中には GA2ox のみに阻害効力を示すものだけではなく、新たに GA3ox に対しても効力を示すもの、むしろ 主に GA3ox に効力を示すものなど様々な作用スペクトルを持つ化合物が含まれていることが判明し、①CBTC 同様に GA2ox 特異性を示すもの 4 種、②M14 同様に GA2ox・GA3ox とも阻害効力を示すもの 5 種、③GA2ox への効力は低く、GA3ox に対してある程度の阻害効果を示すもの 2 種、にそれぞれ分類された。

ここで、CBD 化合物の中から新たに GA3ox に対して阻害効力を示した 7 種の CBD 化合物(CBD5、CBD6、CBD7、CBD8、CBD16、CBD17、CBD18)に対して、2-3-1 項で用いたシロイヌナズナ幼植物体の生長過程に対する投与効果を調べた。何ら阻害剤を含まない条件で発芽させ、9 日経過した幼植物体を、50  $\mu$ M の CBD 化合物添加上に移植して 23°C・明所下、5 日経過時点の葉柄長を測定した。その結果を図 2-25 に示す。これによれば、CBD6 以外の 6 種に関して、明瞭な伸長阻害効果が観察された。また、CBD 化合物の投与により伸長が抑制された葉柄長について、再び GA の投与により回復することができるか検討したところ、CBD8 以外の 5 種では回復が認められた(図 2-26)。ただし、CBD16 や CBD18 については、GA による回復は十分でなく、GA 生合成過程以外を標的とする何らかの副作用を伴う可能性が示唆された。他方、CBD5 や CBD7 については mock 区と同程度まで回復が確認されたことから、GA3ox を標的とする阻害効果によって内生 GA が欠乏する状態を引き起こし、それが原因となって生長抑制が起きていることが示唆された。GA3ox のみを選択的に標的とする化合物もこれまで報告例がなく、CBTC 構造類縁体の中からそのような化合物を見いだせたことの意義は大きいと考えられる。

ここまで、代謝酵素 GA2ox に対する阻害効力を評価するため、最初に行った *in vitro* 選抜系がシロイヌナズナ由来の AtGA2ox2 リコンビナント酵素を用いたことから、*in planta* における評価としてもシロイヌナズナの種子発芽過程か、その幼植物

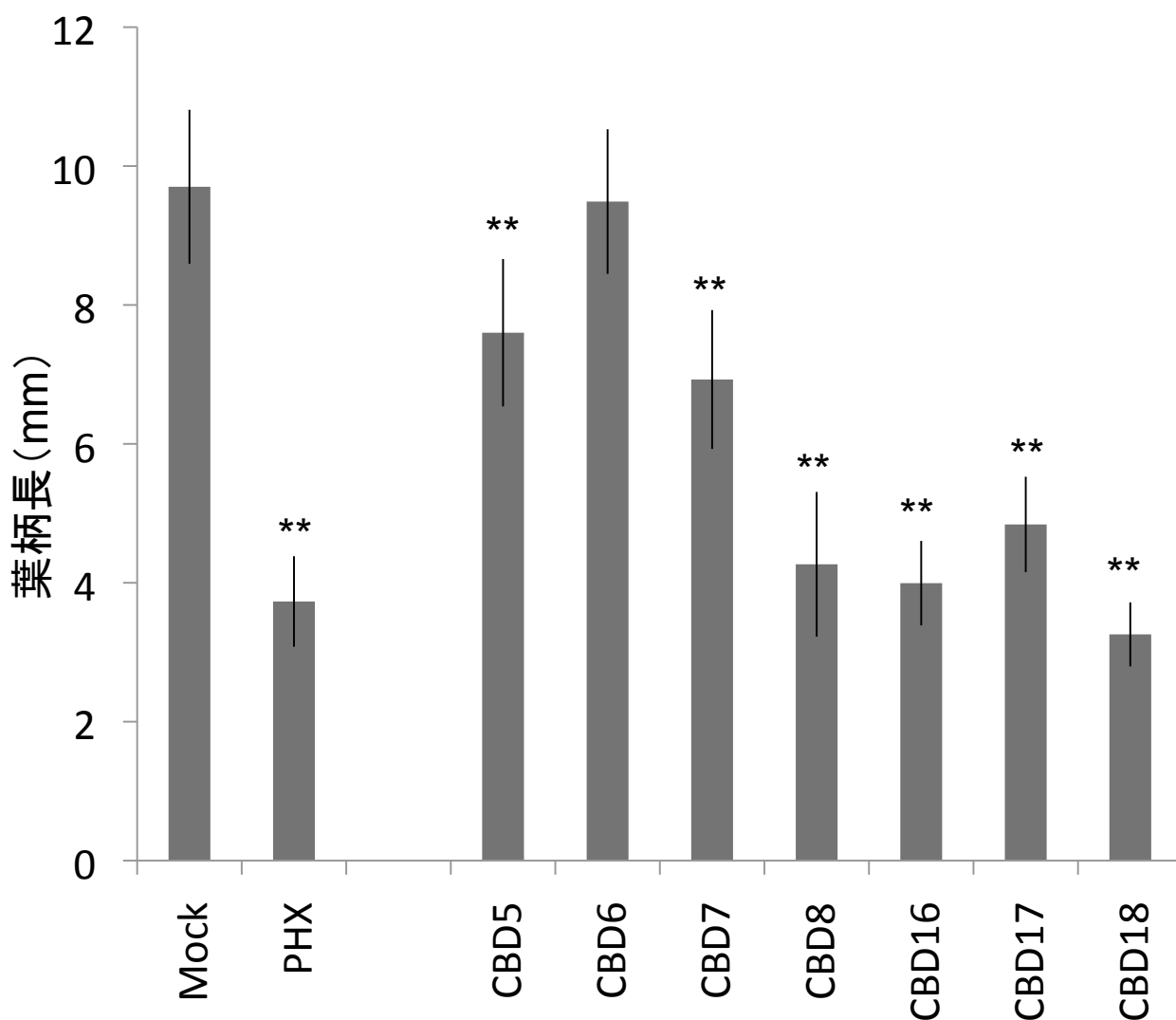


図2-25 GA3ox阻害効果を持つCBD化合物の  
葉柄長に与える影響

幼植物体の葉柄長に対するCBD化合物の効果を測定した結果。阻害剤等の無添加条件下で発芽させ、9日程度経過した幼植物体を各化合物50  $\mu$ M入りのMS培地に移植して23°C・明所下、5日後に葉柄長を各個体長い2本ずつ測定した。n=10。エラーバーはSDを示す。

CBD6以外の6種で伸長阻害効果が見られた。

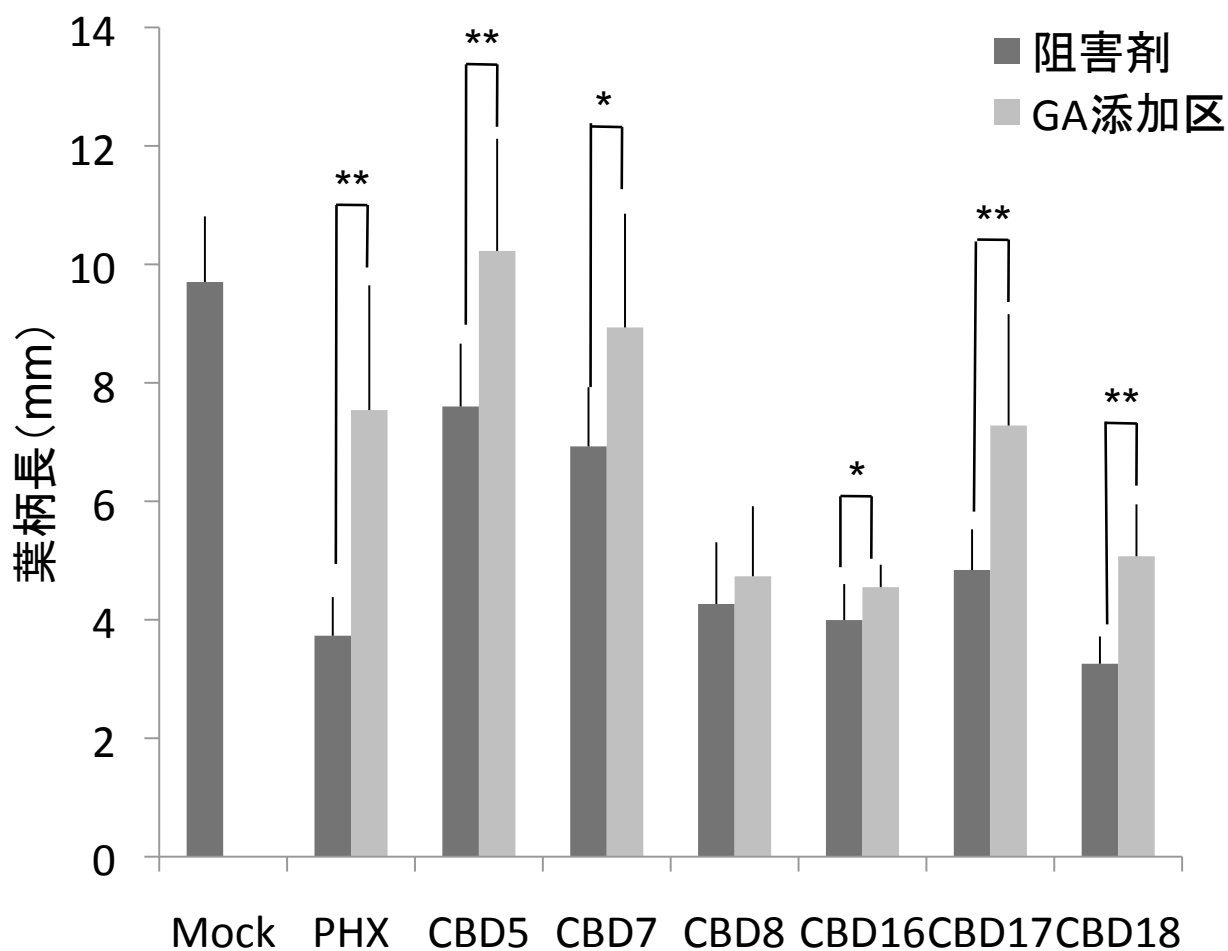


図2-26 CBD化合物により伸長が抑制された  
葉柄長のGAによる回復

幼植物体の葉柄長に対するCBD化合物によるの伸長抑制効果のGAによる回復を測定した。阻害剤等の無添加条件下で発芽させ、9日程度経過した幼植物体を各化合物50  $\mu$ M入りのMS培地に移植して23°C・明所下、5日後に葉柄長を各個体長い2本ずつ測定した。n=10。エラーバーはSDを示す。GA添加区はGA<sub>4</sub>100 nM投与。

CBD8とCBD16以外のCBD化合物で伸長阻害のGAによる回復が見られた。

体を用いてきた。しかし、より鋭敏な GA 応答系として知られるイネ葉鞘伸長応答系も新たに導入することにより、①CBD 化合物間において、より精密な効力評価を行えるか、そして、②シロイヌナズナ以外の他の植物においても同様に、GA 代謝酵素阻害活性およびその選択性が認められるか、という点に着目して情報を得ることにした。すなわち、シロイヌナズナと同様にイネ種子の吸水時に 10  $\mu$ M PAC を処理し、内生 GA 量を低下させた状態で試験化合物を投与し、5 日生育させた時点の葉鞘長を測定した。初めに CBTC 処理区の結果を図 2-27 に示す。これによると、対照区と比べて第二葉鞘長および全長とも有意に伸長が認められた。次に、CBD 化合物を処理した場合の結果について図 2-28 に示す。これによると、CBD16 や CBD18 などシロイヌナズナ GA3ox に対しても阻害効果を有する化合物は、イネ葉鞘伸長に対しても阻害活性が認められ、他方、シロイヌナズナ GA2ox に対する特異性が確認された CBD10 については CBTC と同様にイネ葉鞘に対しても伸長の促進効果を示すという科を超えた相関性が認められた。これらの結果より特に上記観点②において、シロイヌナズナを用いて得た評価結果がイネにおいてもある程度反映される傾向がうかがえた。

これらの検討の結果、分子構造上のわずかな差異が制御対象を大きく変化した点について、CBTC および CBD 化合物が 2ODD 酵素内の基質結合部位を標的とすることの状況的な証拠と理解できる。逆に言えば、GA 代謝酵素 GA2ox の特異的阻害剤 CBTC に関する構造類縁体の中にその特異性が種々に変化した化合物が含まれていたことは、M14 のような「特異性は低いが効力は高い化合物」をリード化合物に設定して、効力が強く特異性も高い阻害剤が見つかる可能性を期待させる。

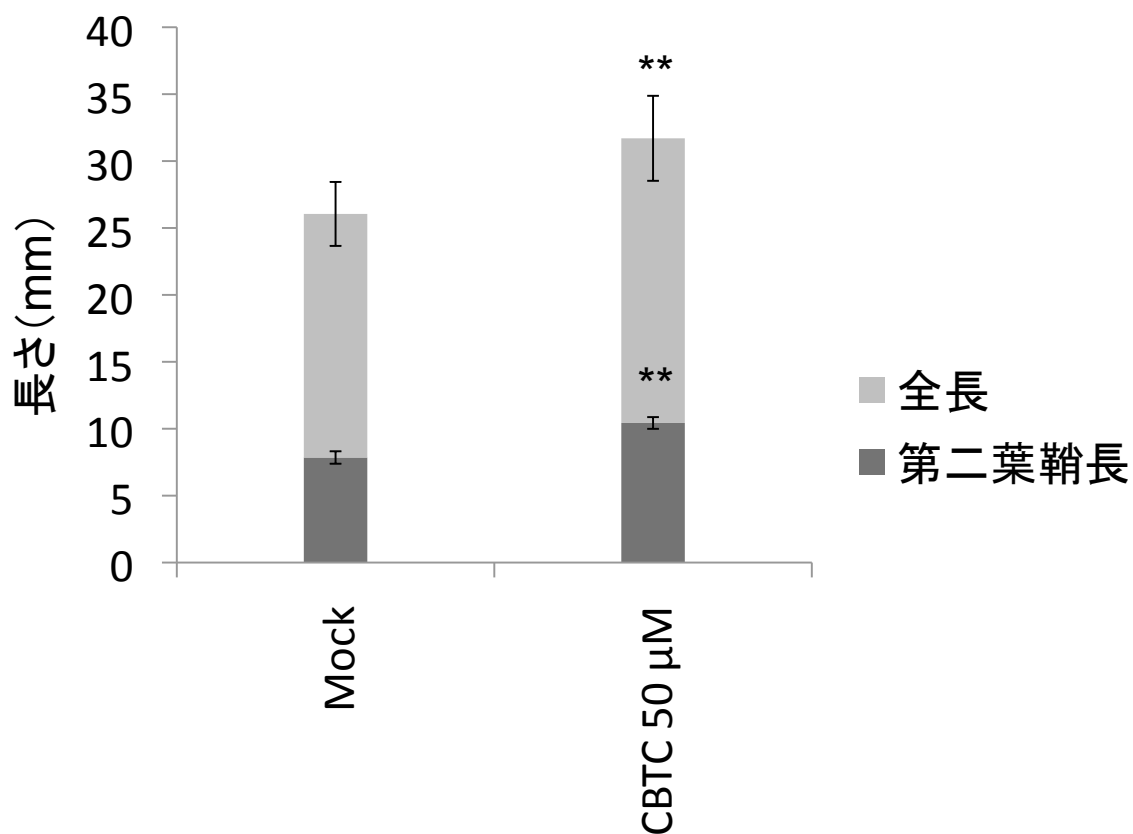


図2-27 CBTCのイネに与える影響

イネの全長と第二葉鞘長に与えるCBTCの影響。イネ種子の吸水時にPAC 10  $\mu$ Mを処理し、内生GA量を低下させた状態でCBTCを投与し、5日生育させた時点の全長と第二葉鞘長を測定した。n=12。エラーバーはSDを示す。

CBTCは50  $\mu$ MでMock処理区と比べ伸長促進効果が観察された。

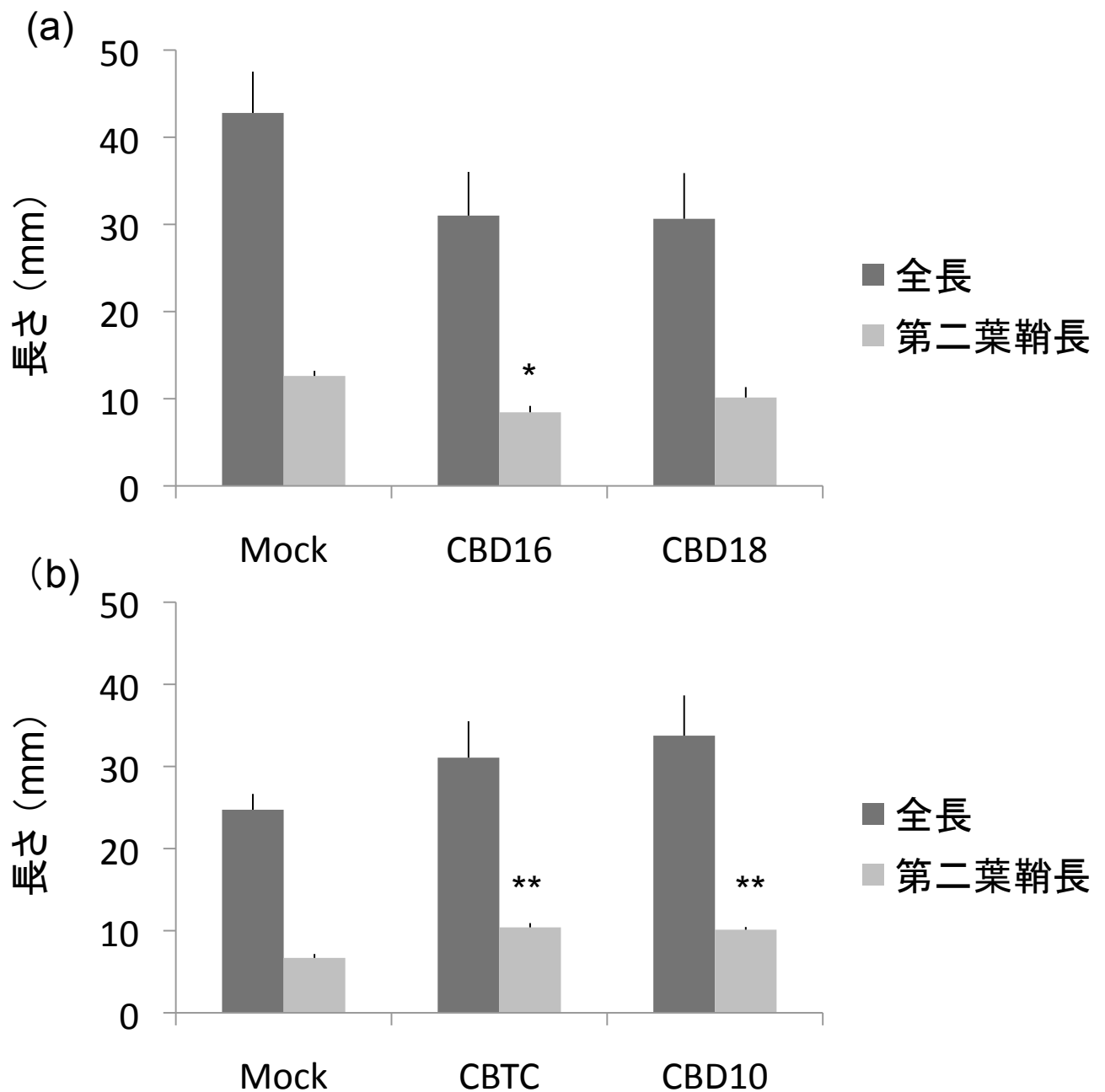


図2-28 CBD化合物のイネに対する影響

イネの全長と第二葉鞘長に与えるCBTCの影響。イネ種子の吸水時にPACを処理し、内生GA量を低下させた状態で各化合物を投与し、5日生育させた時点の全長と第二葉鞘長を測定した。n=6。エラーバーはSDを示す。

(a) シロイヌナズナの酵素において生合成酵素GA3oxも阻害するCBD16とCBD18の効果。PAC 5 $\mu$ Mとの共処理。

(b) シロイヌナズナの酵素において代謝酵素GA2oxのみ作用するCBTCとCBD10の効果。PAC 10 $\mu$ Mとの共処理。

シロイヌナズナで得られた結果とある程度の相関がある。

### 2-3-3 イネ GA 2-oxidase 結晶構造情報に基づく結合シミュレーション

最近になり名古屋大学の研究グループは、イネの GA 2-oxidase の一種 OsGA2ox3 の結晶構造について報告している(竹原ら., 2013)。このグループから投稿前ではあったものの、OsGA2ox3 と GA の共結晶に関する構造情報を提供してもらった。これを用いて CBD 化合物の OsGA2ox3 に対する結合シミュレーションを計画した。OsGA2ox3 は筆者が研究対象としている AtGA2ox2 と同様に、活性型 GA を基質とする GA2ox に分類され、かつ、2-3-2 項で述べたとおり CBD 化合物の GA2ox/GA3ox 作用特異性についてはシロイヌナズナとイネとの間である程度相関性が認められたことから、これまでに得た情報に基づいて OsGA2ox3 に対する CBD 化合物の結合状態をある程度の信頼度を維持して予測することは可能であろうと期待した。

シミュレーション用解析ソフト Surflex を用いて、OsGA2ox3 の GA との共結晶情報の中から GA 結合部位および 2-オキシグルタル酸結合部位に着目した。この 2 つの部位それぞれを対象として、活性型 GA である GA<sub>4</sub>、2-オキシグルタル酸、広域の 2ODD 阻害剤として知られる PHX の分子情報を用いて結合予測 pK<sub>d</sub> 値を算出した。加えて、同様の手順で CBTC や CBD 化合物、M14 についても結合予測 pK<sub>d</sub> 値を算出した。それらの予測結果を図 2-29 に示す。これによれば、GA<sub>4</sub> については予想どおり、OsGA2ox3 の GA 結合部位に高い親和性を持って結合し、2-オキシグルタル酸結合部位には結合しないと予測された。ところが、2-オキシグルタル酸は OsGA2ox3 の 2-オキシグルタル酸結合部位に対して高い親和性を伴って結合することに加えて、GA 結合部位に対しても同様に結合すると予測された。この状況で、PHX については 2-オキシグルタル酸と同様に、OsGA2ox3 の GA 結合部位および 2-オキシグルタル酸結合部位の双方に対して高い親和性を伴って結合するとの予測結果が得られたが、PHX の示す GA2ox・GA3ox 両方の阻害活性が、両者の共通サ

(a)

		GAサイト			2OGサイト		
		1位	2位	3位	1位	2位	3位
GA4		7.7	7.33	7.32	2.72	-13.45	-13.8
GA9		6.78	6.73	6.66	-10.5	-12.78	-12.78
2OG		5.3	5.03	4.98	5.22	5.01	5.01
PHX		6.72	6.51	6.13	5.23	4.67	4.54
M14		3.92	3.72	3.33	0.96	0.88	0.48
CBTC		4.09	3.58	3.44	1.43	0.6	0.13
3ox阻害	CBD5	2.77	2.69	2.55	1.06	1.04	0.82
	CBD7	2.55	2.4	2.39	2.63	2.2	2.18
両方阻害	CBD16	2.99	2.89	2.7	1.65	1.48	1.46
	CBD17	3.02	2.97	2.91	1.17	0.39	0.24
	CBD18	2.16	1.96	1.96	1.34	1.21	1.2
2ox阻害	CBD10	5	4.59	4.23	3.74	2.53	2.11

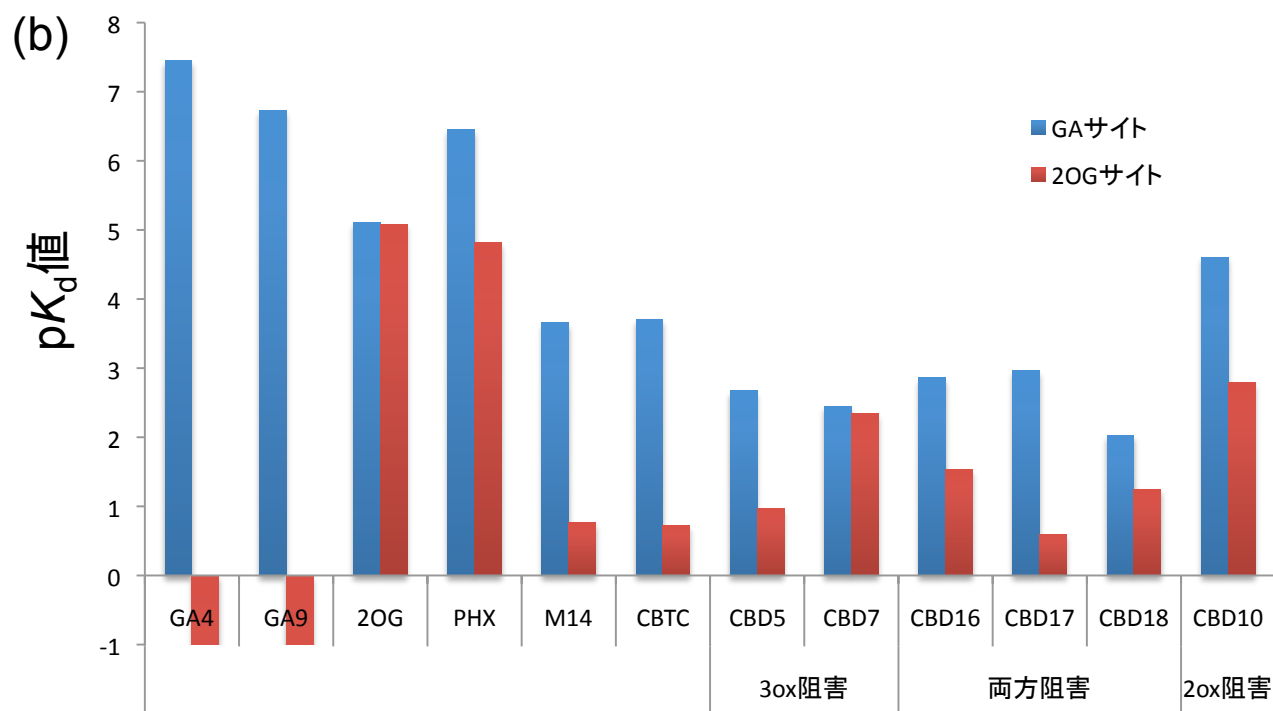


図2-29 各種化合物のOsGA2ox3に対する  
計算による予測pK<sub>d</sub>値一覧

- (a) ドッキングシミュレーションによる予測pK<sub>d</sub>値一覧。結合予測が高い順に3位までの結果を表示した。
- (b) (a)の3位までの予測pK<sub>d</sub>値の平均をグラフ化したもの。



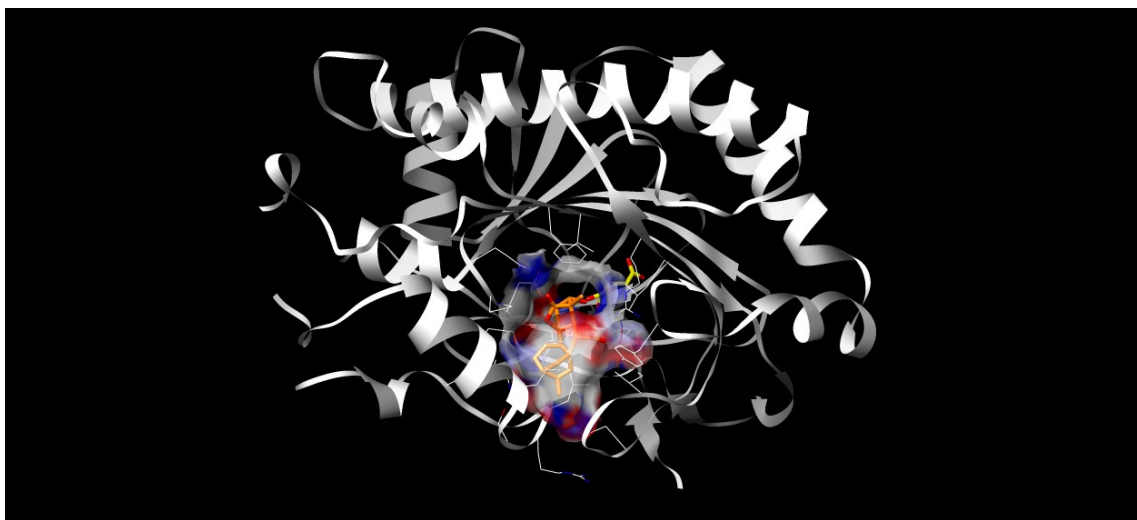
イト・2-オキソグルタル酸結合部位に結合することが原因であると考えれば矛盾ない説明が一応は可能である。そして、注目すべき CBTC や CBD 化合物に関する予測値を見ると、多くの 2-オキソグルタル酸結合部位に対する予測  $pK_d$  値よりも GA 結合部位に対する予測  $pK_d$  値が高い、つまり親和性が高く、GA2ox・GA3ox の特異性の如何に関わらず CBD 化合物が GA 結合部位を標的としているとの予想結果を得た。また、GA2ox・GA3ox 両方に対する阻害作用を示す M14 についても CBTC や CBD 化合物と同様に、OsGA2ox3 の GA 結合部位に高い親和性を示すことが予想された。従って、作用特異性の観点からは M14 と、2-オキソグルタル酸の結合部位を阻害していると考えられている PHX は類似しているが、その結合部位はこの予想に従って異なっていて、M14 が CBTC などと同様に GA 結合部位を狙う制御剤であるとするなら、CBD 化合物の中で種々の選択性を認めたように M14 の構造類縁体には CBD 化合物よりも効力が高く、かつ、GA2ox 特異性や GA3ox 特異性を示すものが見つかる可能性が期待できる。最後に、CBTC と M14 に関して、それぞれ最も高い親和性を示すと予想された OsGA2ox3 の GA 結合部位に対する結合状態を図 2-30 に示しておく。

#### 2-3-4 結晶構造解析を目的とする AtGA2ox2 調製法の最適化

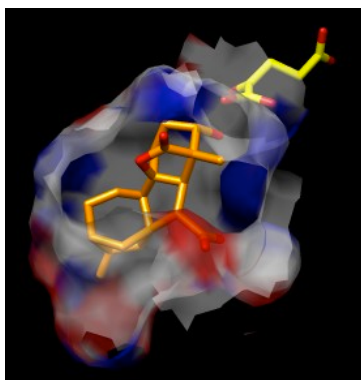
本論文冒頭で準備したように、各種 *in vitro* 解析に必要な程度のリコンビナント AtGA2ox2 であれば既に調製が可能な状況であったが、選抜化合物の作用点を明確に示すため AtGA2ox2 と化合物との共結晶構造情報を入手するためには、再度の検討が必要であった。すなわち、可溶化とそれに伴う酵素活性維持を最優先とする従来のリコンビナント AtGA2ox2 ではなく、結晶調製を前提とするリコンビナント AtGA2ox2 調製の最適化を検討した。

従来は、可溶化に有用なチオレドキシントグと精製に有用な His タグを目

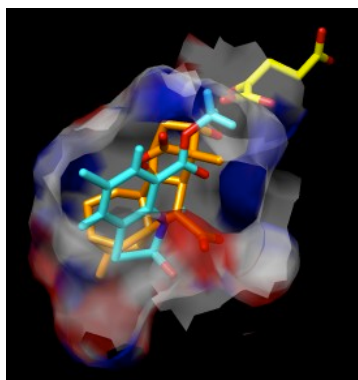
(a)



(b)



(c)



(d)

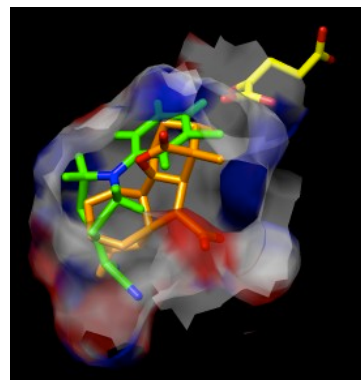


図2-30 ドッキングシミュレーションによる  
GA2oxとCBTC、M14の結合様式

(a) イネGA代謝酵素OsGA2ox3とGA<sub>4</sub>の結合状態

(b) 結合ポケットの拡大図

(c) イネGA代謝酵素OsGA2ox3とCBTC(青色)の結合予測

(d) イネGA代謝酵素OsGA2ox3とM14(緑色)の結合予測

予測には解析用ソフトSurflexを用いて計算し、Chimeraで描画した。

オレンジの化合物はGA<sub>4</sub>であり、この結合状態はすでに報告されているものである。黄色で示した結合部位の奥に位置する化合物は補酵素の2-オキソグルタル酸。

的リコンビナントに付与する pET32a ベクターを用いて AtGA2ox2 を調製していたが、可溶化タグの存在は結晶化に不向きとされるためこれを見直し、His タグのみを付与する pET17、pET19、pET21、pET23 各ベクターを用いてリコンビナント誘導状況を比較した。結果、誘導量で比較すると pET19 が最も適していることが判明した。ベクター情報を図 2-31 に示す。また、菌体培養温度を変化させることで誘導条件を検討した結果、18°C が最適と判明した。大量培養化のため、5 L 容三角フラスコ中で 1.5 L の培地を入れ、18°C で AtGA2ox2 の誘導生産を行ったところ、結晶化に対して十分な量の AtGA2ox2 調製に目途がついた。

当初、他でも用いていた pH7.6 付近の緩衝液を Ni カラム精製時に転用していたが、扱うタンパク質量の増加に伴い、精製完了から数時間以内に明瞭な沈殿が認められたことから精製法の改良が必要となった。ExPASy の ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>)を用いて AtGA2ox2 の等電点が 7.68 と予測されたことを受け、おそらく等電点沈殿を生じやすい緩衝液を使用したことが不良状態を引き起こす原因と判断した。そこで、精製時に用いる緩衝液の pH を 8.0 および 7.2 に設定して再度検討したところ、pH8.0 では依然沈殿を生じるのに対して、pH7.2 では生じなかった。ただし、pH7.2 環境における Ni カラムを用いた精製効率も pH7.6 の環境下と比較して若干落ちる。しかし、その点には関しては今後の課題と考え、以降の精製時の緩衝液をすべて pH7.2 で設定して改善を図った。Ni カラムクロマトグラフィーを行った状況を図 2-32 に纏めた。また、Ni カラムを用いた精製のみでは図 2-32 に示す通り、AtGA2ox2 以外の共雑タンパク質が精製画分中に含まれることから、2 段階目の精製としてゲル濾過カラムを用いた精製を導入した。緩衝液の組成について検討を加え、50 mM Tris-HCl (pH7.2)、150 mM NaCl に加えて、2-オキソグルタル酸、鉄(II)イオン、アスコルビン酸の添加によりゲル濾過カラムからの精製画分に関しても沈殿を生じず安定的な保存が可能となった。以上の精製を行うことにより、

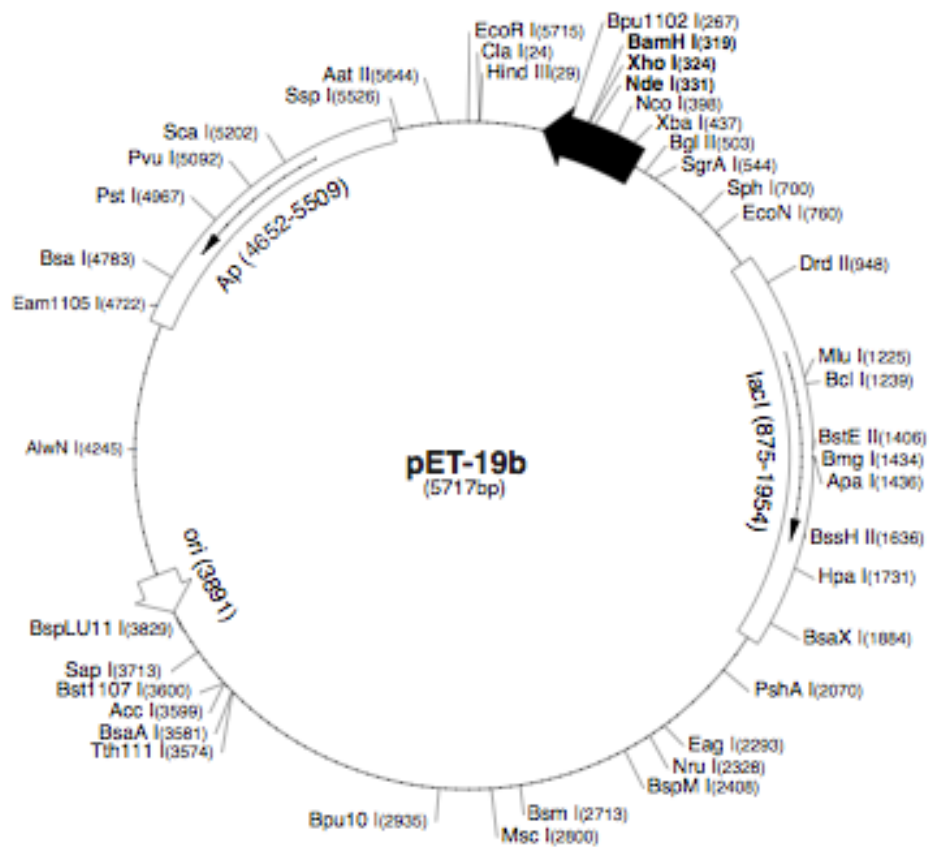


図2-31 AtGA2ox2発現ベクターpET19b

本ベクターは東京大学大学院伏信教授にご提供いただいた。

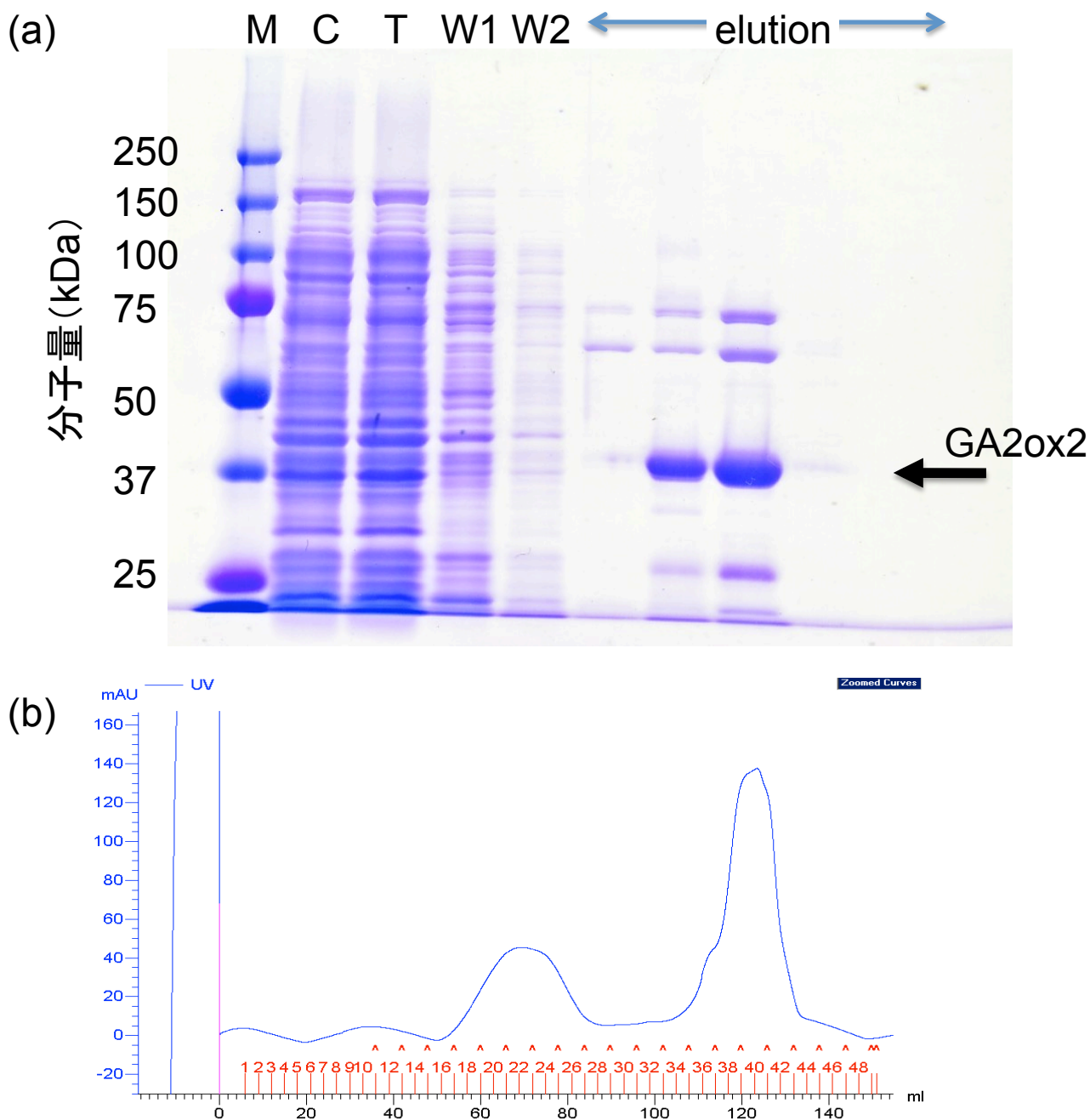


図2-32 GA2ox2の大量発現の状況

- (a) Niカラムクロマトグラフィー後のサンプルの純度をSDS-PAGEで確認した。  
 (M: 分子量マーカー、C: 菌体破碎上清、T: Niカラムクロマトグラフィー非吸着画分、W: 洗いにより溶出した非吸着画分、Elute: Niカラムクロマトグラフィー吸着画分) AtGA2ox2の分子量は約38 kDaである。
- (b) Gel-filtrationクロマトグラフィー時のUVモニターリング結果。

最終的に 30 mg/mL 程度の精製 AtGA2ox2 の調製がようやく可能となった。これら蓄積した情報に基づき、化合物と AtGA2ox2 の結晶情報の取得を目指したい。

## 2-4 実験の部

### *in vitro* 実験

#### 2-4-1 大腸菌発現系を用いたリコンビナント AtGA2ox2 の調製

##### (1) 各因子の全長 cDNA の取得

GA2-oxidase (AtGA2ox2) の全長 cDNA は、pUNI ベクターに挿入されているプラスミドを保持している大腸菌 PIR1 を ABRC から入手した。

##### (2) GA2-oxidase 発現プラスミドの構築

AtGA2ox2 を Trx-His タグ融合タンパク質発現ベクターである pET-32a(+) (Merck) ベクターに構築した AtGA2ox2 を保持している大腸菌 PIR1 を滅菌されたようじを用いて LB 液体培地[3 mL, 100 mg/mL Ampicillin 4.5  $\mu$ L, 100 mg/mL kanamycin 30  $\mu$ L]を入れた金属キャップ付き試験管中に接種し、37°C、16 時間振盪培養(200 rpm、単振動)した。培養液を 1.5 mL 容マイクロチューブに 1 mL 程度入れて遠心分離[8,000 rpm (6,200  $\times$  g), 常温, 1 分, himac CF 15D2、HITACHI]を行い、上清を除去した後、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)を用いて以下の要領でプラスミドを抽出した。RNaseA 混合済み P1 buffer 250  $\mu$ L を加えてボルテックスミキサーにより完全にペレットを懸濁後、P2 buffer 250  $\mu$ L を加えて穏やかに転倒・混和した。続いて N3 buffer 350 mL を加えて速やかかつ穏やかに転倒・混和後、遠心分離[15,000 rpm (21,800  $\times$  g), 常温, 10 分]した後、上清を QIA prep カラムに入れて遠心分離[条件 B; 15,000 rpm (21,800  $\times$  g), 常温, 1 分]を行い、カラムからの通過液を除去後に PB buffer 500  $\mu$ L をカラムに加えて遠心分離[条件 B]した。通過液除去後、70%(v/v)エタノールを含む PE buffer 750  $\mu$ L を加えて再度、遠心分離[条件 B]してから通過液を除去した。空のまま遠心分離[条件 B]して PE buffer 中のエタノールを通過させた後、カラムを別の 1.5 mL 容マイクロチューブ上に設置して BE buffer 50  $\mu$ L を加えて遠心分離[条件 B]することにより通過液を回収した。これにより得たプラスミド溶液をテンプレートとして PCR を行い増幅断片を取得した。挿入予定の制限酵素サイトを適宜付与した 5'側 forward プライマーおよび 3'側 reverse プライマーを設計して外注(FASMAC)によりオリゴマーを入手した。用いたプライマーの配列情報は以下に示す通り。

AtGA2ox2 用 5'-primer: GTGAGCTCATGGTGGTTTTGCCACAG

AtGA2ox2 用 3'-primer: GGCTCGAGTACAAGGGTTTTATGATTGAGAAGAG

反应用チューブ一本あたりに[sDW 13  $\mu$ L, 10 $\times$  Ex taq Buffer (TaKaRa) 2  $\mu$ L, 2.5 mM dNTP Mix (TaKaRa) 1.8  $\mu$ L, テンプレートとなるプラスミド溶液 1  $\mu$ L, 100  $\mu$ M forward プライマー 1  $\mu$ L, 100  $\mu$ M reverse プライマー 1  $\mu$ L, Ex taq (TaKaRa) 0.2  $\mu$ L]の混合溶液を調製し、PCR Thermal Cyclor Dice TP600 (TaKaRa)を用いてPCR反応を行った。反応条件については 94 $^{\circ}$ Cで3分維持後、[94 $^{\circ}$ C $\cdot$ 30秒, 60 $^{\circ}$ C $\cdot$ 30秒, 72 $^{\circ}$ C $\cdot$ 60秒]を15サイクル繰り返し、72 $^{\circ}$ Cで5分維持した後、4 $^{\circ}$ Cで静置した。電気泳動緩衝液として TAE 緩衝液(40 mM Tris-HCl, 1M 酢酸, 1 mM EDTA (pH8.0))を用い(以下アガロースゲル電気泳動では当該緩衝液を用いた)、0.8%(w/v)アガロースゲルにて電気泳動(100 V, 定電圧)を行って、目的の遺伝子断片を切り出し、1.5 mL 容マイクロチューブに移し以下のように gene clean 処理を行った。切り出したゲルに 600  $\mu$ L の 6 N ヨウ化ナトリウム(Qbiogene)を加え、ゲルが完全に溶けるまでマイクロチューブを 55 $^{\circ}$ C(Dry Thermo Unit DTU-18, TAITEC)で静置後、ガラスミルク(Qbiogene)を加え混合し、常温で10分間回転振盪(16 rpm)してから遠心分離[条件 A; 12,000 rpm (14,000 $\times$  g), 4 $^{\circ}$ C, 7秒, himac CF 15D2, HITACHI]を行った。上清を除去後、氷冷 80%(v/v)エタノール 600  $\mu$ L を加えてピペッティングにより沈殿物を懸濁後、再度遠心分離[条件 A]を行い、上清除去後に氷冷 80%(v/v)エタノールでの洗浄と遠心分離[条件 A]を2セット繰り返し、最後のみ3分間の遠心分離を行った。上清を可能な限り除去した後、10  $\mu$ L の TE buffer (10 mM Tris-HC, 1 mM EDTA (pH8.0))を加え、ボルテックスミキサーでよく混合・溶解した後、55 $^{\circ}$ C (Dry Thermo Unit DTU-18, TAITEC)で3分間加温してから、遠心分離[15,000 rpm (21,800 $\times$  g), 4 $^{\circ}$ C, 3分]を行い上清を回収することを二回繰り返し、インサート用断片溶液を得た。得られた DNA 断片溶液 5  $\mu$ L, 25 ng/ $\mu$ L T-vector (pGEM-T Easy Vector, Promega)溶液 0.5  $\mu$ L, DNA Ligase (Promega) 1  $\mu$ L, 2 $\times$  Lig Buffer (Promega) 6.5  $\mu$ L を加えて 16 $^{\circ}$ C、1時間のライゲーション反応を行った。大腸菌 XL10-GOLD (Stratagene)のコンピテントセルを氷上で溶かし、1.5 mL 容マイクロチューブに 50  $\mu$ L 分注し、上記のライゲーション反応により得た DNA 溶液を加えて静かに混合後、10分間氷上で静置した。42 $^{\circ}$ C、45秒温水浴(THERMO REGURATOR, CTR-210, IWAKI)でインキュベートし、ただちに氷上に2分間静置した。100 mg/mL Ampicillin 30  $\mu$ L と 100 mg/mL kanamycin 30  $\mu$ L を塗布した LB 固形プレート( $\Phi$ 9 cm, IWAKI)にコンピテントセル懸濁液を全量塗布し、37 $^{\circ}$ C、16時間静置培養し大腸菌 XL10-GOLD (Stratagene)に形質転換を行った。ただし、LB 固形プレートには[100 mg/mL Ampicillin 30  $\mu$ L, 100 mM IPTG (イソプロピル- $\beta$ -D-



チオガラクトピラノシド) 100  $\mu$ L, 5%(w/v) X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-b-D-Galactoside) 20  $\mu$ L]を塗布した。生じた白色コロニーは以下の要領でコロニーPCRを行った。反应用チューブ一本あたりに[sDW 7.5  $\mu$ L, 10 $\times$  Paq Buffer (Stratagene) 1  $\mu$ L, 2.5 mM dNTP Mix (TaKaRa) 1  $\mu$ L, 50  $\mu$ M forward プライマー0.2  $\mu$ L, 50  $\mu$ M reverse プライマー0.2  $\mu$ L, Paq (Stratagene) 0.1  $\mu$ L]の混合溶液を調製し、滅菌されたようじを用いて反应用チューブに接種し、PCR Thermal Cycler Dice TP600 (TaKaRa)を用いてPCR反応を行った。前述の記載の通りアガロースゲル電気泳動によって配列が挿入されているか確認し、目的の配列が挿入されていたコロニーに対し、滅菌されたようじを用いて[LB 液体培地 3 mL, 100 mg/mL Ampicillin 4.5  $\mu$ L]を入れた金属キャップ付き試験管中に接種し、37°C、15 時間振盪培養(200 rpm、単振動)した。回収溶液について吸光光度計 (DU640, BECKMAN)を用いて DNA の定量を行い、その結果に基づき BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems)を用いて自動 DNA シークエンサー(ABI PRISM 310 Genetics Analyzer, Applied Biosystems)により塩基配列の確認を行った。

塩基配列情報が正しいことを確認済みの DNA 断片挿入プラスミド溶液と pET-32a(+)溶液を用いて *Sac I* と *Xho I* による制限酵素処理(37°C, 1.5 時間)を行い、前述の要領に従ってライゲーション反応と大腸菌への形質転換を行ってプラスミドの構築を行った。大腸菌への形質転換および、プラスミド回収作業、制限酵素処理、アガロースゲル電気泳動により、pET-32a(+)への目的遺伝子挿入の確認を行った。

#### (3)タンパク質発現大腸菌株への形質転換

Rosetta (DE3, Merck)に形質転換。大腸菌コンピテントセルを氷上で溶かし、1.5 mL 容マイクロチューブに 50  $\mu$ L 分注し、プラスミド溶液を 5  $\mu$ L 加えて静かに混合後、2-5-1(2)項記載の要領に従って形質転換を行った。ただし、Roatta (DE3)株は Chloramphenicol 耐性であるので、予め固形 LB 培地上にプラスミドの耐性マーカー抗生物質以外に 34 mg/mL Chloramphenicol (エタノール溶液) 20  $\mu$ L も塗布しておいたプレートを用いた。

#### (4)組換えタンパク質の発現誘導

金属キャップ付き試験管に抗生物質(Ampicillin 終濃度 150  $\mu$ g/mL、Chloramphenicol 終濃度 34  $\mu$ g/mL)を加えた液体 LB 培地 2.5 mL を入れ、さらに制限培地で形成された1コロニーずつを植菌して37°C、16時間振盪培養(130 rpm、

単振動, FMC-100, EYELA)した。0.5 L 容坂口フラスコに Ampicillin を終濃度 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Chloramphenicol を終濃度 34  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるように加えた液体 LB 培地 0.1 L に上記菌体培養液 2 mL を加え  $\text{OD}_{600}=0.4-0.6$  になるまで 25°C で振盪培養(130 rpm, 単振動, FMC-100, EYELA)した。 $\text{OD}_{600}$  目標値到達後、17°C で約 30 分間静置して液温を 17°C に下げた。約 100 mL の培養液に終濃度 0.15 mM になるよう IPTG を添加し、17°C、18 時間振盪培養(130 rpm, 単振動)した。50 mL 容高速遠心チューブ(himac 50TC チューブ, HITACHI)に二回に分けて遠心分離[3,500 rpm (1,820  $\times$  g), 4°C, 6 分, himac CR 21, HITACHI]により集菌して上清除去後、20 mg/mL リゾチーム 0.5 mL を加え、ボルテックスミキサーで懸濁して 10 分間室温で静置した。さらに DW 9.5 mL を加え、-80°C で 2 時間静置した。室温にて融解後、氷水に容器を浸して超音波式ホモジナイザー (ASTRASON S3000, MISONIX) のマイクロチッププローブを用いて 1 秒-3 秒のサイクルで ON と OFF を繰り返し、出力 5.5 で 5 分間の菌体破碎を行った。遠心分離[10,000 rpm (14,900  $\times$  g), 4°C, 15 分, himac CR 21, HITACHI]を行い、上清のみ-80°C で保存し組み替えタンパク質を得た。

(5) 大スケールによる組換えタンパク質の発現誘導

50 mL 容ファルコンチューブ(IWAKI)に 2-5-(4)項記載の適切な抗生物質を加えた液体 LB 培地 30 mL を入れ、さらに制限培地で形成された 1 コロニーずつを植菌して 37°C、16 時間、振盪培養(200 rpm, 単振動)した。5 L 容三角フラスコに Ampicillin を終濃度 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Chloramphenicol を終濃度 34  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるように加えた液体 LB 培地 1.5 L に上記菌体培養液 30 mL を加え  $\text{OD}_{600}=0.4-0.6$  になるまで 37°C で振盪培養(250 rpm 回転振盪, Excella E25R, NBS)した。目標  $\text{OD}_{600}$  値到達後、18°C で約 1 時間静置して液温を 18°C に下げた。約 1.5 L の培養液に終濃度 0.15 M になるよう IPTG を添加し、18°C、18 時間振盪培養(250 rpm, 回転振盪)した。500 mL 容遠心管に遠心分離[4,000 rpm (3,010  $\times$  g), 4°C, 6 分, himac CR 21, HITACHI]により集菌して上清除去後、20 mg/mL Lysozyme 7.5 mL を加え、ボルテックスミキサーで懸濁し 10 分間室温で静置した。DW 142.5 mL を加え、-80°C で 1 時間以上静置した。室温にて融解後、300 mL 容プラスチックビーカーに移し、氷水に容器を浸して超音波式ホモジナイザー (ASTRASON S3000, MISONIX) のフラットチップを用いて 1 秒-3 秒のサイクルで ON と OFF を繰り返し、出力 7.5 で 10 分間の菌体破碎を行った。遠心分離[10,000 rpm (7,830  $\times$  g), 4°C, 15 分, himac CR 21, HITACHI]を行い、上清のみ-80°C で保存した。

(6) SDS-PAGE によるリコンビナントタンパク質の誘導状況の把握

各溶液の調製は以下のとおり。30%(w/v)アクリルアミド A-B 溶液:[アクリルアミド 58 g、*N,N'*-メチレンビスアクリルアミド 2 g を全量 200 mL となるように DW に溶かした]。SDS-PAGE 用泳動緩衝液(10x): [Tris (トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン) 30 g、SDS (ラウリル硫酸ナトリウム) 10 g、グリシン 144 g を加え DW で全量を 1 L とした]。SDS-PAGE 用サンプルバッファー(2x): [1M Tris-HCl (pH6.8) 1.25 mL、10%(w/v) SDS 4.0 mL、スクロース 1.0 g、BPB(ブロムフェノールブルー)少量を混合し、サンプル調製時に 1/10 液量(v/v)の 2-メルカプトエタノールを添加]。SDS-PAGE の要領は以下のとおり。分離ゲル[3M Tris-HCl (pH8.8) 750 mL, 30%(v/v)アクリルアミド A-B 溶液 2.0 mL, DW 3.19 mL, 10%(w/v)APS (ペルオキシ二硫酸アンモニウム) 60 mL, TEMED (N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン) 3 mL]を充填し、DWを少量重層した。ゲル境界面が明瞭になったら DW を除去して、分離ゲル[1 M Tris-HCl (pH6.8) 700 mL, 30%(w/v)アクリルアミド A-B 溶液 600 mL, DW 3.3 mL, 10%(w/v) APS 80 mL, TEMED 5 mL]を重層し、コームを挿して 20 分程度静置した。サンプルと等量(v/v)の SDS-PAGE 用サンプルバッファー(2x)を加えて攪拌後、100°Cで 3 分煮沸して氷冷した。泳動槽を設置し SDS-PAGE 用泳動緩衝液(10x)を DW で 10 倍(v/v)希釈した SDS-PAGE 用泳動緩衝液(1x)を入れ、ゲル 1 枚あたり 20 mA (定電流)で約 1.5 時間泳動した。タンパク質の発現状況は CBB 染色液(Rapid CBB KANTO, 関東化学)および脱色液[DW 750 mL, 酢酸 100 mL, メタノール 150 mL]を用いて確認した。

## 2-4-2 GA2-oxidase の活性検出

RI 標識 GA を用いた GA2-oxidase 代謝活性測定

放射性標識 GA<sub>4</sub> 誘導体:カスタム合成(DuPont)により調製され、-20°Cで保管されている[1,2,16,17-<sup>3</sup>H<sub>4</sub>]-16,17-dihydro-GA<sub>4</sub> [120 Ci/mmol, 4.55 TBq/mmol]の HPLC 精製品(放射活性濃度 850,000 dpm/μL)について使用直前に DW により 2,500 dpm/μL に希釈し標識 GA 溶液を作って用いた。反応添加物[Tris-HCl(pH7.6) 0.1 M、2-OG 4 mM、FeSO<sub>4</sub> 0.5 mM、AsA 4 mM]: 反応の際に終濃度が上記のようになるように添加物を混合し DW で希釈して調整した。

被検タンパク質溶液(GA2-oxidase 溶液) 50 μL、反応添加物 30 μL、標識 GA 溶液 20 μL を加え、混ぜて 3000 rpm で 1 分 spindown(HIGH SPEED MICRO REFRIGERATED CENTRIFUGE MR-150、TOMY)して、湯浴(WATER BATH WTB-7、IWAKI)を用いて 30°Cで 2 時間 Incubation し、AcOH 10 μL で反応停止し

た。EtOAc 100  $\mu$ L 加え混合した後、10000 rpm、5分遠心し上清を取る EtOAc 抽出を2回行い、speed-vac(微量遠心濃縮機 DNA プチ vac PV-1200、WAKENYAKU)で30分蒸発乾固する。得られた物質を80% EtOH 4  $\mu$ L に溶かしてから TLC プレートにポインティングし、展開溶媒(EtOAc:CHCl<sub>3</sub>:AcOH=20:20:1)で展開した。イメージングプレート(BAS-TR2040 Imaging Plate、FUJIFILM)に16時間露光し、FLA-5000(FUJIFILM)を用いて測定した。

### 2-4-3 代謝活性測定を指標にしたスクリーニング

2-4-2 項の RI 標識 GA を用いた GA2-oxidase 代謝活性測定と同様に、化合物ライブラリー(Maybridge)の平均濃度 5 mM で DMSO に溶解した化合物を 5  $\mu$ L を系の中に添加し代謝活性を測定した。終濃度は平均 250  $\mu$ M となる。

### 2-4-4 GA 結合活性測定を指標にしたスクリーニング

TS buffer: 20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl (pH7.6)のように調整したものを使用した。放射性標識 GA<sub>4</sub> 誘導体: カスタム合成(DuPont)により調製され、-20°Cで保管されている[1,2,16,17-<sup>3</sup>H<sub>4</sub>]-16,17-dihydro-GA<sub>4</sub> [120 Ci/mmol, 4.55 TBq/mmol]の HPLC 精製品(放射活性濃度 850,000 dpm/mL)について使用直前に標識 GA 希釈溶液[TS buffer 1824.1  $\mu$ L, 0.2 MCoCl<sub>2</sub> 18.5  $\mu$ L, 0.5 M2-OG 7.4  $\mu$ L]により 36,000 dpm/ $\mu$ L に希釈し標識 GA 溶液を作って用いた。

イモビロン P 膜付 96 穴プレート(MultiScreen HTS, IP, MILLIPORE)のすべてのウェルに Vaccu-Pette/96(Bel-Art Products)を用いて 99.5%EtOH 150  $\mu$ L を入れて、MultiScreen vacuum manifolds(MILLIPORE)を用いて吸引し膜に 99.5%EtOH を通す。その直後、DW 150  $\mu$ L を同様に Vaccu-Pette/96 を使用して加え、吸引する。乾燥を避けるために Vaccu-Pette/96 を用いて DW 150  $\mu$ L をウェルに置いておく。DWをよく取り除いたのち、化合物ライブラリーの化合物をプレートに 5  $\mu$ L ずつ分注し、-20°Cフリーザーで凍結保存。

ジベレリン2-酸化酵素の精製溶液 2170  $\mu$ L を 2510  $\mu$ L の希釈溶液[TS buffer 472  $\mu$ L, 0.2 MCoCl<sub>2</sub> 20  $\mu$ L, 0.5 M2-OG 8  $\mu$ L]で希釈した被検タンパク質溶液を作る。イモビロン P 膜付 96 穴プレートを常温にして化合物を解凍し、各ウェルに標識 GA 溶液 50  $\mu$ L を加え、被検タンパク質溶液を 45  $\mu$ L 加え、15 分後ただちに MultiScreen vacuum manifolds(MILLIPORE)を用いて反応溶液を廃棄した。その後、各ウェルを冷蔵庫でよく冷やした 300  $\mu$ L の Wash buffer[TS buffer 496.5 mL, 0.2 M CoCl<sub>2</sub> 2.5

mL, 0.5 M 2-OG 1 mL]で洗い、1 M NaOH を 15  $\mu$ L 加え、2分静置した後、測定用 96 穴プレート(Iso plate-96HB、Perkin Elmer)に回収、さらにイモビロン P 膜付 96 穴プレートに 1 M HCl を 15  $\mu$ L 加え、測定用 96 穴プレートに回収した。液体シンチレーター(MICROSCINT PS、Perkin Elmer) 150  $\mu$ L を各ウェルに加えて混合し、シンチレーションカウンター(Micro Beta TRILUX、WALLAC)で放射活性を測定した。なお、解析は全て 1 連で行った。

#### 2-4-5 RI 標識 GA とゲルろ過カラムを用いた GA 結合活性測定

TS buffer: 20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl (pH7.6)のように調製したものを使用した。放射性標識 GA<sub>4</sub> 誘導体: カスタム合成(DuPont)により調製され、-20°Cで保管されている[1,2,16,17-<sup>3</sup>H<sub>4</sub>]-16,17-dihydro-GA<sub>4</sub> [120 Ci/mmol, 4.55 TBq/mmol]の HPLC 精製品(放射活性濃度 850,000 dpm/mL)について使用直前に標識 GA 希釈溶液[TS buffer 1824.1 mL, 0.2 M CoCl<sub>2</sub> 18.5 mL, 0.5 M 2-OG 7.4 mL]により 30,000 dpm/mL に希釈し標識 GA 溶液を作って用いた。

1.5 mL 容マイクロチューブに被検タンパク質溶液(GA2-oxidase 溶液) 300  $\mu$ L、標識 GA 溶液 50  $\mu$ L を加え、無添加区(-ColdGA 区)には 10%(v/v)エタノール溶液を、非標識 GA 添加区(+ColdGA 区)には 10%(v/v)エタノールに溶解した 1 mM GA<sub>4</sub> 溶液を各々 50  $\mu$ L ずつ添加し攪拌し、1時間静置した後、5分以上氷冷した。予め氷冷 TS buffer を用いて平衡化しておいたディスポーザブルゲル濾過カラム(Nap<sup>TM</sup> 5, GE Healthcare)によく冷やした反応液 100  $\mu$ L を添加し、氷冷 TS buffer 600  $\mu$ L で洗浄後、氷冷 TS buffer 200  $\mu$ L を加え溶出液を別のマイクロチューブに回収した。液体シンチレーター(クリアゾル I、ナカライテスク) 1.0 mL を加えて混合し、シンチレーションカウンター(LSC-6100, ALOKA)で放射活性を測定した。なお、解析は全て 3 連で行った。

#### 2-4-6 大腸菌発現系を用いた各種2ODDリコンビナント酵素の調製

各種 2ODD リコンビナント酵素発現プラスミドの構築

GA2ox で 2 種類 *AtGA2ox1*, *AtGA2ox6*, GA3ox で 2 種類 *AtGA3ox1*, *AtGA3ox4* を、Trx-His タグ融合タンパク質発現ベクターである pET-32a(+) (Merck)ベクターに構築した。

方法は 2-4-1-(2)項と同様に行った。以下必要な 2-4-1-(2)項と異なる点について記す。挿入予定の制限酵素サイトを適宜付与した 5'側 forward プライマーおよび

3'側 reverse プライマーを設計して外注(FASMAC)によりオリゴマーを入手した。用いたプライマーの配列情報は以下に示す通り。

*AtGA2ox1* 用 5'-primer:GTGAATTCATGGCGGTATTGTCTAAACCG

*AtGA2ox1* 用 3'-primer:GGCTCGAGATTTAGGAGATTTTTTATAGTCTTCC

*AtGA2ox6* 用 5'-primer:GTGAATTCATGGTTTTGCCATCTTCAACACC

*AtGA2ox6* 用 3'-primer:GGAAGCTTTAAAGTCTTGAAAACTCGAGACG

*AtGA3ox1* 用 5'-primer:ACGTGAATTCATGCCTGCTATGTTAACAGA

*AtGA3ox1* 用 3'-primer:CCCCCTCGAGTTCTTCTCTGTGATTTCTAA

*AtGA3ox4* 用 5'-primer:GGGGGAATTCATGCCTTCACTAGCAGAAGA

*AtGA3ox4* 用 3'-primer:ACCTCTCGAGATTGGTGGGATTAACGACCC

塩基配列情報が正しいことを確認済みの DNA 断片挿入プラスミド溶液と pET-32a(+)溶液を用いて *AtGA2ox1* に関しては *EcoRI* と *Xho I*、*AtGA2ox6* に関しては *EcoRI* と *Hind I*、*AtGA3ox1* に関しては *EcoRI* と *Xho I*、*AtGA3ox4* に関しては *EcoRI* と *Xho I*、による制限酵素処理(37°C, 1.5 時間)を行い、2-4-1-(2)項の要領に従ってライゲーション反応と大腸菌への形質転換を行ってプラスミドの構築を行った。大腸菌への形質転換および、プラスミド回収作業、制限酵素処理、アガロースゲル電気泳動により、pET-32a(+)への目的遺伝子挿入の確認を行った後、2-4-1-(3)、(4)項に従いタンパク質発現大腸菌株への形質転換と発現誘導を行った。SDS-PAGE によるリコンビナントタンパク質の誘導状況の把握に関しては 2-4-1-(6)参照。

## 2-4-7 2ODD 代謝活性測定

反応添加物[Tris-HCl(pH7.6) 0.1 M、2-OG 4 mM、FeSO<sub>4</sub> 0.5 mM、AsA 4 mM]: 反応の際に終濃度が上記のようになるように添加物を混合し DW で希釈して調整した。各種被検タンパク質溶液 50  $\mu$ L、反応添加物 30  $\mu$ L、基質となる GA(3ox1 と 3ox4 は GA<sub>9</sub>、2ox1 と 2ox6 は GA<sub>4</sub>) 溶液 20  $\mu$ L を加え、混ぜて 3000 rpm で 1 分 spindown(HIGH SPEED MICRO REFRIGERATED CENTRIFUGE MR-150、TOMY)して、湯浴(WATER BATH WTB-7、IWAKI)を用いて 30°C で 16 時間 Incubation し、AcOH 10  $\mu$ L で反応停止した。EtoAc100  $\mu$ L 加え混合した後、10000 rpm、5分遠心し上清を取る EtOAc 抽出を2回行い、speed-vac(微量遠心濃縮機 DNA プチ vac PV-1200、WAKENYAKU)で 30 分蒸発乾固する。代謝物の測定は、LC/MS/MS を用いて行った。2-4-8 項に詳細を記載する。

## 2-4-8 LC/MS/MS を用いたGA の定量分析

2-4-7項で乾固したGAをメタノール20  $\mu$ Lに十分に溶かした後、蒸留水を80  $\mu$ L加え、LC/MS/MSサンプルとした。分析条件を以下に示す。

LC/MS/MS型式: Waters Acquity UPLC

カラム: Acquity BEH C18 1.7  $\mu$ m 2.1  $\times$  50 mm

カラム温度: 24°C

流速: 0.2 mL/min

移動層: A:0.1%ギ酸水溶液／B:0.1%ギ酸アセトニトリル

グラジエント条件	min	flow	%A	%B
	0	0.2	80.0	20.0
	1	0.2	55.0	45.0
	8	0.2	25.0	75.0
	9	0.2	0.0	100.0
	12	0.2	0.0	100.0
	12.1	0.2	80.0	20.0
	14	0.2	80.0	20.0

### プローブ部

キャピラリー電圧: 1.50 keV

コーン電圧: 30 V

デゾルベーション温度: 400°C

コーンガス流量: 50 L/h

デゾルベーションガス流量: 200 L/h

### MS部

検出モード: MRM

GA検出メソッド	Dwell	Cone	Collision
GA9, Parent315.304 m/z → Daughter253.27 m/z	0.995s	32V	28V
GA4, Parent331.3 m/z → Daughter257.17 m/z	0.995s	38V	20V
GA34, Parent347.294 m/z → Daughter259.257 m/z	0.995s	34V	18V

データ解析: Waters MassLynx V4.1 SCN714

## 2-4-9 X線結晶構造解析に向けた検討

### (1) GA2-oxidase 発現プラスミドの構築

*AtGA2ox2* を N 末端側 His タグ融合タンパク質発現ベクターである pET-19b (Merck) ベクターに構築した。

方法は 2-4-1-(2) 項と同様に行った。以下必要な 2-4-1-(2) 項と異なる点について記す。挿入予定の制限酵素サイトを適宜付与した 5' 側 forward プライマーおよび 3' 側 reverse プライマーを設計して外注(FASMAC)によりオリゴマーを入手した。用いたプライマーの配列情報は以下に示す通り。

*AtGA2ox2* 用 5'-primer: ggaattcCATATGATGGTGGTTTTGCCACAG

*AtGA2ox2* 用 3'-primer: cgGGATCCCCTCATACAAGGGTTTTATGAT

塩基配列情報が正しいことを確認済みの DNA 断片挿入プラスミド溶液と pET-19b 溶液を用いて *Nde1* と *BamH1* による制限酵素処理(37°C, 1.5 時間)を行い、2-4-1-(2) 項の要領に従ってライゲーション反応と大腸菌への形質転換を行ってプラスミドの構築を行った。大腸菌への形質転換および、プラスミド回収作業、制限酵素処理、アガロースゲル電気泳動により、pET-32a(+)への目的遺伝子挿入の確認を行った後、2-4-1-(3), (4) 項に従いタンパク質発現大腸菌株への形質転換と発現誘導を行った。SDS-PAGE によるリコンビナントタンパク質の誘導状況の把握に関しては 2-4-1-(6) 参照。大スケールによる発現誘導は 2-4-1-(5) の通り行った。

### (2) Ni カラムクロマトグラフィーによるタンパク質精製

この精製の制御には、ペリスタポン(Econo gradient pump, Bio-RAD)を用いた。C 16/20 column(GE Healthcare Bioscience)に Ni-NTA superflow resin(QIAGEN)を 5 mL 充填し、50 mM Tris-HCl(pH 7.2)を用いて平衡化した。そこに、サンプルを添加し 50 mM Tris-HCl(pH 7.2)+ 30 mM Imidazole で非吸着画分を溶出した。十分に非吸着画分を溶出した後、50 mM Tris-HCl(pH 7.2)+ 300 mM Imidazole を用いて吸着画分を溶出した。分離した吸着画分を Amicon Ultra-15 10K(Millipore)を用いて濃縮・脱塩した。脱塩後のバッファーは 50 mM Tris-HCl(pH 7.2)を用いた。

### (3) Gel filtration column chromatography によるタンパク質精製

Running Buffer は 50 mM Tris-HCl(pH 7.2)+ 150 mM NaCl + [2-OG 4 mM、FeSO<sub>4</sub> 0.5 mM、AsA 4 mM]を用いた。Ni カラムクロマトグラフィーで分離した吸着画分は



Ultrafree-MC 0.45  $\mu\text{m}$  を用いて微粒子を除去した後、Hiload 16/60 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare Bioscience) カラムを Running Buffer で平衡化した。流速は 1.0 mL/min。2 mL 容量のサンプルループを用いてサンプルをカラムに吸着させ、Running Buffer で溶出した。280 nm の UV モニターリングでタンパク質の分離を確認し、分離した画分を Amicon Ultra-15 10K (Millipore) を用いて濃縮・脱塩した。

#### (4) タンパク質定量

タンパク質の定量は、BCA (Bicinchoninic acid) 法により行った。BCA working reagent (PIERCE) の A と B バッファーを 50:1 で混合した溶液とサンプルを 20:1 で混合し、60°C で 30 分間反応した後、562 nm の吸光を測定した。標準タンパク質としては、BSA (Bovine Serum Albumin) を用いて 0、0.05、0.1、0.2、0.25、0.5 mg/mL の濃度で検量線を描いた。

## *in vivo* 実験

### 2-4-10 シロイヌナズナへの投与試験

#### (1) 発芽への影響測定 : 発芽率測定

シロイヌナズナ種子を 1.5 mL 容マイクロチューブに取り 70%(v/v) エタノールで 30 分間攪拌して表面を殺菌した後、滅菌水を用いて十分に洗い DMSO に溶かした Pac を 1  $\mu\text{M}$  添加した滅菌水に浸し 4°C で 2 日間低温処理を行った。その後、各化合物をスクリーニングの際には終濃度 100  $\mu\text{M}$ 、CBTC の詳細検討の際にはそれぞれ 10、30、100  $\mu\text{M}$  添加した水溶液を染み込ませた滅菌濾紙 ( $\phi$  90 mm, ADVANTEC) 上に種子を播種し 23°C・明所下 (18.2~46.5 mmol/m<sup>2</sup>・sec) で生育させた。発芽率の測定は光学顕微鏡 (SZX12, Olympus) を用いて 48 時間後に測定した。

#### (2) 幼植物体の胚軸長への影響測定

育成用の培地は以下のように調製した。1/2MS 固形培地: Murashige & Skoog Salt Mixture (日本製薬) 2.3 g、スクロース 30 g、myo-イノシトール 0.1 g、1,000×ビタミンストック (100 mL の DW にニコチン酸 50 mg、ピリドキシン塩酸塩 50 mg、チアミン塩酸塩 20 mg、グリシン 200 mg、ビオチン 5 mg、葉酸 50 mg を溶解したもの) 1

mL、DW 0.9 L を混合し、1N NaOH 水溶液を用いて pH 5.7 に合わせた後、1 L にメスアップして寒天末(ナカライテスク) 8 g を加えオートクレーブにより滅菌し、シャーレ(φ 9 cm, IWAKI)に 20 mL ずつ分注し固化させた。シロイヌナズナ種子を 70%(v/v) エタノールで 30 分間表面殺菌後、エタノールで 1 分間表面殺菌し、風乾した。予め上記のようにシャーレ(φ 9 cm, IWAKI)において固化させた 1/2MS 培地上に播種し、4°C で 2 日間低温処理を行った後、23°C・明所下 2 日間で発芽させ薬剤を添加して固化させた 1/2MS 培地上に移し替え 2 日後に植物体の大きさを測定した。

### (3) 幼植物体の葉柄長への影響測定

育成用の培地は上述と同様に調製した。シロイヌナズナ種子を 70%(v/v) エタノールで 30 分間表面殺菌後、エタノールで 1 分間表面殺菌し、風乾した。予め上記のようにシャーレ(φ 9 cm, IWAKI)において固化させた 1/2MS 培地上に播種し、4°C で 2 日間低温処理を行った後、23°C・明所下 9 日間で発芽・育成させ薬剤をそれぞれ添加したで添加して固化させた 1/2MS 培地上に移し替え 5 日後に植物体の葉柄長の長さを測定した。

## 2-4-11 イネへの投与試験

籾殻を除いたイネ種子を 25 mL 容ファルコンチューブ(IWAKI)に取り 0.01% Tween-20 を含む 2.5%(v/v) 次亜塩素酸ナトリウムで 30 分間攪拌して表面を殺菌した後、クリーンベンチ内において滅菌蒸留水で 5 回洗浄し、PAC 5 μM もしくは 10 μM 入りの蒸留水中で暗所 30°C にて 2 日間静置した。発芽種子を化合物を添加した 0.6% 寒天入り蒸留水に移植し、30°C にて 5 日間生育させた後、全長と第二葉鞘長を測定した。

## 有機合成実験

### 2-4-13 CBTC の構造展開

methy1 6-chloro-3H-1,2,3-benzodithiazole-4-carboxylate 2-oxide (CBTC) の合成  
50 ml 容ナス型フラスコにアントラニル酸メチルを 0.9 g、酢酸を 0.8 mL、二塩化二硫黄 2 mL を入れ常温で 30 分攪拌した後、オイルバス中で 80°C に温度を上げて 4 時間攪拌し還流した。さらに酢酸エチルを 10 mL 加えた、5% 酢酸ナトリウム水を

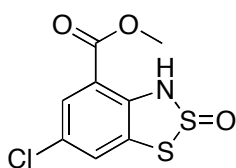
10 mL を添加し常温で 30 分攪拌した。brain で 3 回有機相を洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水させた。脱水した有機相をひだ折り濾過し無水硫酸ナトリウムを取り除いた後、エバポレーターで減圧濃縮したものをシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル=15:1)により単一物質を取得し、ヘキサン/酢酸エチルで再結晶し、黄色針状結晶を得た。CBTC 0.91 g(収率 69.2%)を取得した。

methyl 6-chloro-3*H*-1,2,3-benzodithiazole-4-carboxylate 2-oxide (CBTC)

<sup>1</sup>H-核磁気共鳴スペクトル(<sup>1</sup>H-NMR)は JEOL-A500 Plus (500 MHz)で測定し、CDCl<sub>3</sub> [基準シグナル: 内部標準 Me<sub>4</sub>Si (0.00 ppm)]もしくは CD<sub>3</sub>OCD<sub>3</sub> [基準シグナル: CH<sub>3</sub>OCH<sub>3</sub>(2.04 ppm)]を用いた。

<sup>1</sup>H NMR(500MHz CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 3.99 (3H, s, -O-CH<sub>3</sub>), 7.59 (1H, d, Ar-H), 7.88 (1H, d, Ar-H)

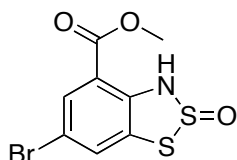
HRMS (ESI+) m/z calcd. for C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>ClNO<sub>3</sub>S<sub>2</sub> (M+H) 263.9556, found 263.9550



CBD5-8、10-12、CBD16-18 も同様に合成した。

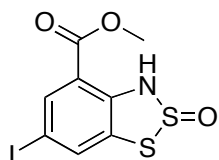
methyl 6-bromo-3*H*-1,2,3-benzodithiazole-4-carboxylate 2-oxide (CBD5)

<sup>1</sup>H NMR(500MHz CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 3.99 (3H, s, -O-CH<sub>3</sub>), 7.59 (1H, d, Ar-H), 7.88 (1H, d, Ar-H)



methyl 6-iodo-3*H*-1,2,3-benzodithiazole-4-carboxylate 2-oxide (CBD6)

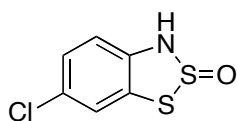
<sup>1</sup>H NMR(500MHz CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 3.97 (3H, s, -O-CH<sub>3</sub>), 7.59 (1H, d, Ar-H), 7.88 (1H, d, Ar-H)



6-chloro-3*H*-1,2,3-benzodithiazole 2-oxide (CBD7)

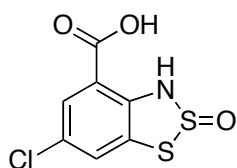
<sup>1</sup>H NMR(500MHz CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 2.81 (1H, s, -NH), 7.02–7.22 (2H, m, Ar-H), 7.41 (1H, d, Ar-H)

紫色針狀結晶



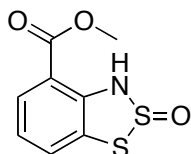
6-chloro-3*H*-1,2,3-benzodithiazole-4-carboxylic acid 2-oxide (CBD8)

<sup>1</sup>H NMR(500MHz CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 6.63 (1H, d, Ar-H), 7.88 (1H, d, Ar-H), 10.02 (1H, s, -COO-H)



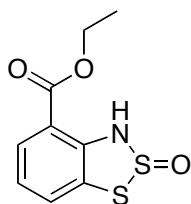
methyl 3*H*-1,2,3-benzodithiazole-4-carboxylate 2-oxide (CBD10)

<sup>1</sup>H NMR(500MHz CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 3.99 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 7.14 (1H, t, Ar-H), 7.59 (1H, d, Ar-H), 7.88 (1H, d, Ar-H)



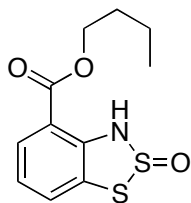
ethyl 3*H*-1,2,3-benzodithiazole-4-carboxylate 2-oxide (CBD11)

<sup>1</sup>H NMR(500MHz CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 1.44. (3H, t, -CH<sub>3</sub>), 4.45. (2H, q, -O-CH<sub>2</sub>-), 7.14 (1H, t, Ar-H), 7.58 (1H, d, Ar-H), 7.88 (1H, d, Ar-H)



butyl 3*H*-1,2,3-benzodithiazole-4-carboxylate 2-oxide (CBD12)

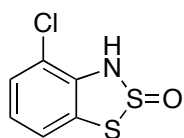
<sup>1</sup>H NMR(500MHz CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 1.00. (3H, t, -CH<sub>3</sub>), 1.46. (2H, 6, -CH<sub>2</sub>-), 1.79. (2H, 5, -CH<sub>2</sub>-), 4.38. (2H, t, -O-CH<sub>2</sub>-), 7.14 (1H, t, Ar-H), 7.58 (1H, d, Ar-H), 7.86 (1H, d, Ar-H)



4-chloro-3*H*-1,2,3-benzodithiazole 2-oxide (CBD16)

紫色針狀結晶

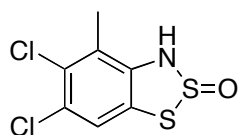
$^1\text{H}$  NMR(500MHz  $\text{CD}_3\text{OCD}_3$ ):  $\delta$  7.13 (1H, t, Ar-H), 7.42 (1H, d, Ar-H), 7.60 (1H, d, Ar-H)



4-methyl-5-chloro-3*H*-1,2,3-benzodithiazole 2-oxide (CBD17)

紫色針狀結晶

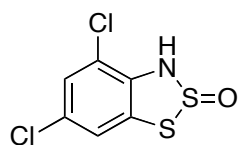
$^1\text{H}$  NMR(500MHz  $\text{CD}_3\text{OCD}_3$ ):  $\delta$  2.51 (3H, s,  $-\text{CH}_3$ ), 7.64 (1H, s, Ar-H)



4,6-dichloro-3*H*-1,2,3-benzodithiazole 2-oxide (CBD18)

紫色針狀結晶

$^1\text{H}$  NMR(500MHz  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  7.28 (1H, d, Ar-H), 7.31 (1H, d, Ar-H),



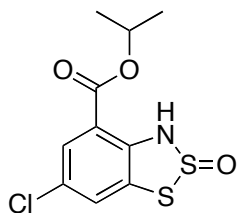
1-methylethyl 6-chloro-3*H*-1,2,3-benzodithiazole-4-carboxylate 2-oxide (CBD14) の

合成

100 ml 容ナス型フラスコに 2-プロパノール 25 mL と水素化ナトリウム 60 mg を加え、常温で 30 分攪拌した。そこに、CBTC 100 mg 加え、さらに常温で 3 時間攪拌した。brain で 3 回有機相を洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水させた。脱水した有機相をひだ折り濾過し無水硫酸ナトリウムを取り除いた後、エバポレーターで減圧濃縮したものをシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝15：1）により単一物質を取得し、黄色針状結晶を得た。CBD14 を 0.23 g (収率 20.9 %) を取得した。

1-methylethyl 6-chloro-3*H*-1,2,3-benzodithiazole-4-carboxylate 2-oxide (CBD14)

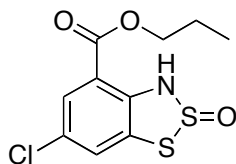
$^1\text{H NMR}$ (500MHz  $\text{CD}_3\text{OCD}_3$ ):  $\delta$  1.36 (6H, d,  $-\text{CH}_3$ ), 5.20 (1H, 7,  $-\text{O}-\text{CH}-$ ), 7.12 (1H, d, Ar-H), 7.90 (1H, d, Ar-H)



CBD15 も同様に合成した。

propyl 6-chloro-3*H*-1,2,3-benzodithiazole-4-carboxylate 2-oxide (CBD15)

$^1\text{H NMR}$ (500MHz  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  1.04 (3H, t,  $-\text{CH}_3$ ), 1.80 (2H, 6,  $-\text{CH}_2-$ ), 4.25 (2H, t,  $-\text{O}-\text{CH}_2$ ), 7.17 (1H, d, Ar-H), 7.93 (1H, d, Ar-H)



## *in silico* 解析

### 2-4-14 OsGA2ox3とのドッキングシミュレーション

結晶構造情報(名古屋大学上口准教授からご提供いただいた)から UCSF CHIMERA (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics)を利用して受容体とリガンド、2-オキソグルタル酸のデータを抜き出した。水素原子を付加させてスクリーニング用の受容体データとした。リガンドのデータは水素原子を付加してスクリーニング用のリガンドデータとした。配座の計算においては、surflex-dock (Biopharmics LLC)を用いてドッキングシミュレーションを行った。また、得られた計算結果は UCSF CHIMERA を利用しデータを可視化した。



## 第3章 ジベレリンアゴニストの探索と作用解析

### 3-1 緒言

前章において GA 代謝酵素 GA2ox 特異的な制御剤を求めて実施した化合物スクリーニングにより、GA 機能の正の制御剤として作用する CBTC を選抜することができた。CBTC の GA2ox 阻害活性は市販されている薬剤などと比較するとまだまだ強い効力を持つとは言えないが、GA 生合成・代謝に関与する複数種の 2ODD 型酵素のうち GA2ox に対する特異性が付与された化合物を取得できたという点で、本研究開始の時点での目標を達成できたと考えている。本章では、もう一つ別の探索目標であった GA アゴニストの追究結果について報告する。

GA 生産菌の培養により工業的に GA の大量生産が行われていることは、序論において述べたとおりである。これら GA は、種無しブドウの生産など幾つかの農業生産の現場において生長調節剤として利用されている。しかしながらその製造法の故に、一般的な農薬と比較して高価でありかつ大量供給が難しいという問題点を有している。例えば、この生産コストの軽減に繋がるような、GA と比較してより調製が容易で安価な GA アゴニストが開発できれば、現場における利用方法も変わるであろうし、低コストに起因した応用面の拡大も期待される。加えて、既出の pyrabactin(1-3 項参照)のように、GA に関しても数ある生理作用のうちの一部に限定したアゴニストを創製できれば、その用途の拡大も期待できる。例えば茎葉部の徒長活性を示さずに果実の肥大化を促すような化合物があれば園芸上有用であろう。実際に GA 受容体が 3 種存在するシロイヌナズナにおける受容体多重変異体の解析から、この中の特定の受容体のみが特有の生理作用の発現に関与する可能性が指摘されている(Suzuki *et al.*, 2009)。このため、作用限定的なアゴニストの活用により、様々な GA の生理作用の中の特定の作用だけを誘導することにより従来

には無い有益な薬剤創製に繋がる可能性が期待できる。

本章では、はじめに GA アゴニストとして機能し得る化合物候補を化合物ライブラリーの中から植物体を用いたスクリーニング系を利用して探索し、選抜した新規候補化合物に関する作用解析を実施した(3-2 項)。続いて、GA 様の生理作用を示すことで長年知られていた既存化合物に焦点をあて、この化合物の GA アゴニストとしての可能性について、作用解析を展開して検証した(3-3 項)。以下に詳述する。

## 3-2 新規ジベレリンアゴニスト候補の探索と作用解析

### 3-2-1 化合物ライブラリーからの候補化合物 67D の選抜

アゴニスト候補探索のため、できるだけ簡便に、かつ、ハイスループットな選抜系の利用を目指し、GA による種子発芽の誘導現象に着目した。発芽過程を選抜系に応用する場合、扱う種子が小さく、多検体を試験する場合でも使用スペースが少なく済むという利点がある。また、陽性判定を下すためには種子が確実に発芽する時期を確認しておくことが重要であるが、シロイヌナズナを用いた場合はその判定まで処理開始から約 1 週間で十分であることが数多く報告されている。またこの期間は植物体を用いた選抜系としては十分に短いと判断できる。そして、この発芽過程であるが、GA 投与により濃度依存的に促進され、GA 生合成阻害剤の投与により濃度依存的に遅延することが知られている。そこで GA 生合成酵素阻害剤パクロブトラゾール(PAC)を用いて人為的に内生 GA 量を低下させることにより発芽過程の進行を遅らせた条件で、PAC との共処理に伴い発芽過程の遅れを回復させる効果を示す化合物を探索できる系を整えることにした。

はじめに、適正な PAC 投与量を決めるため発芽過程の進行と PAC 添加濃度との関係を調べた図 2-7 を参照すると、5  $\mu$ M の PAC 投与時に無処理条件と比べてシロイヌナズナ正常種の種子発芽は 10%程度まで低下している。化合物の選抜系への利用を想定した場合、PAC 投与量が少なすぎると発芽率はそれほど下がらず安定した評価を難しくする一方、投与量が多すぎる場合は効力の低い陽性化合物を見落とす可能性が高いと予想された。これらの事情より、適度な発芽率低下をひき起こす PAC 投与量が求められる状況であったので、5  $\mu$ M の PAC 投与条件がこれに合致すると判断し採用した(図 3-1)。なお、用いたライブラリー中に納められている試験化合物は、1 区あたり終濃度 2 mg/L で投与したことから、平均分子量 300 ~ 500 との情報と照合して平均終濃度約 5  $\mu$ M の添加条件となった。この系を用いて

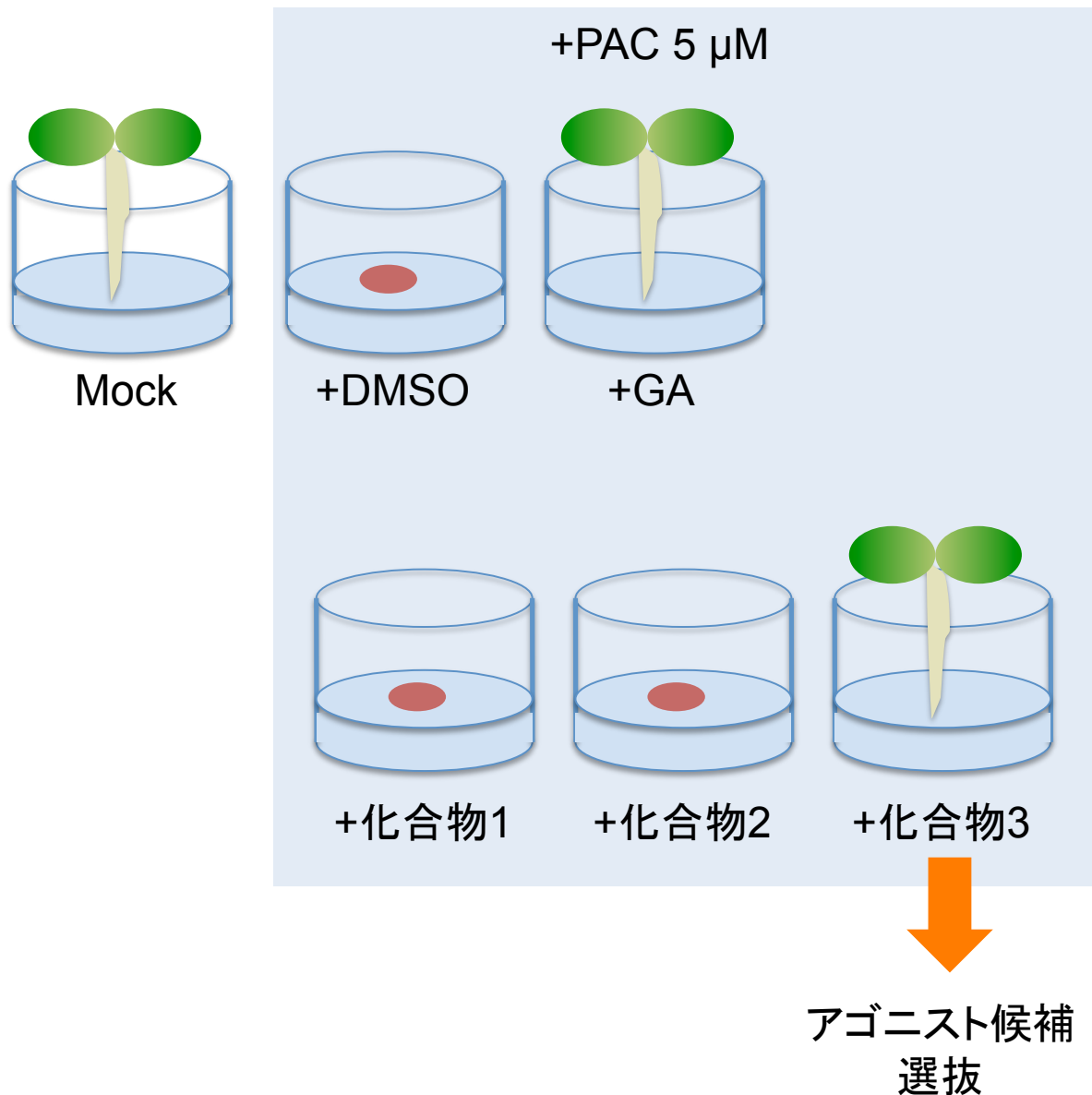


図3-1 GAアゴニストスクリーニング模式図

PACはGAの生合成を抑えるため発芽を抑制する。PAC投与下であってもGAを投与することで発芽が誘導される。PACの阻害点である*ent*-カウレン酸への酸化過程以降でGAと同様の機能を示す化合物は、PACの発芽阻害効果を打ち消し、発芽率を上昇させると考えスクリーニングを行った。

約 4,000 種の試験化合物を 5  $\mu$ M の PAC と共投与し、シロイヌナズナ正常種の種子発芽に関して回復傾向を示すものの選抜を行った。その結果、

(S)-3-phenyl-2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)

propanoic acid (略称 67D)が複数回の試験においていずれも安定して陽性と判定された(図 3-2)。図 3-2 に示す通り、この候補化合物 67D は、PAC との共処理において低濃度での投与時には期待どおりの発芽促進効果を示したが、100  $\mu$ M を超える高濃度投与時には発芽抑制傾向がうかがえた。また、種子発芽過程に加えて、幼植物体の胚軸長についても測定したところ、PAC との共処理により 67D の伸長促進効果が認められた(図 3-3)。

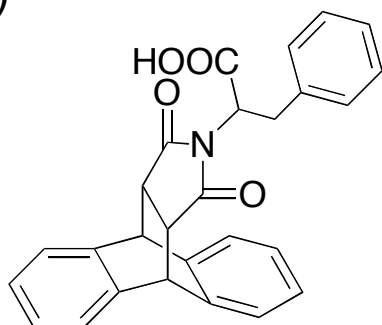
シロイヌナズナ *ga1-3* 変異株は、ゲラニルゲラニルニリン酸(GGDP)からコパリルニリン酸(CDP)への変換反応を触媒する酵素 CPS に機能的な異常が生じており、それが原因となって GA の生合成過程がうまく進行せず、結果として著しい矮性形質を示す(Koorneef and Veen, 1980; Sun and Kamiya, 1994)。GA 内生量が低下していることから、*ga1-3* 変異株種子は適度な GA 投与を行わない限り発芽の過程が進行しない。そこで、この変異株を用いた応答系を利用して、67D の発芽過程に対する投与効果を再度確認した。結果、67D 投与により濃度依存的に *ga1-3* 変異株の発芽が促進されることが分かり、この系からも GA 同様の発芽促進傾向が認められた(図 3-4)。

以上の結果から、67D は PAC 投与あるいは CPS 遺伝子変異に伴ういずれの GA 欠損状態に対しても共に回復効果を示す化合物であり、GA アゴニストの候補化合物として有望と判断した。

### 3-2-2 67D の作用解析① —GA 受容体に対する結合性—

選抜化合物 67D が GA のアゴニストである可能性をさらに追究するために、

(a)



(S)-3-Phenyl-2- (9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)propanoic acid

67D

(b)

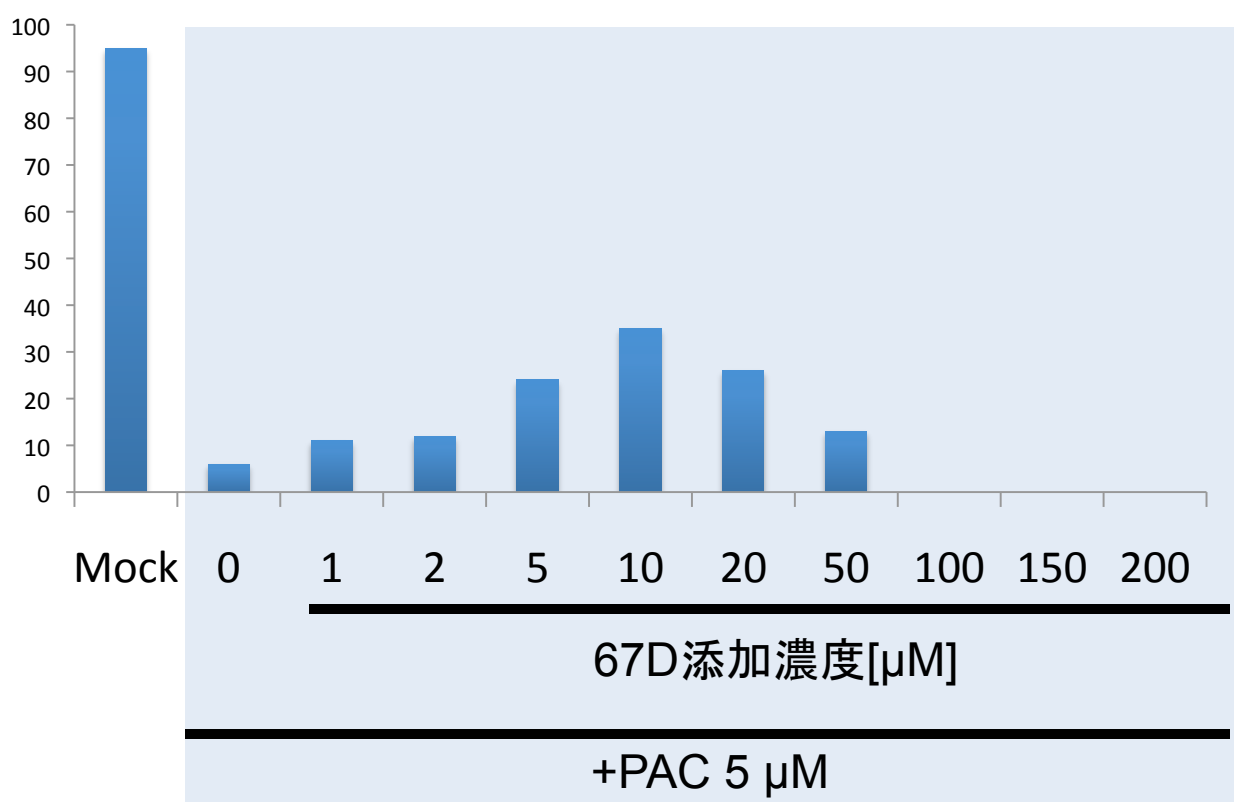


図3-2 67Dの構造式と発芽率に与える影響

- (a) スクリーニングにより選抜されてきた67Dの構造
- (b) シロイヌナズナの発芽試験に対する67Dの影響。GA生合成阻害剤であるPAC 5 μMによる発芽阻害を67Dは5 μMから50 μMの濃度範囲で打ち消して発芽率を増加させる効果を持つ。また、67Dは高濃度では逆に発芽阻害効果を有することも確認された。

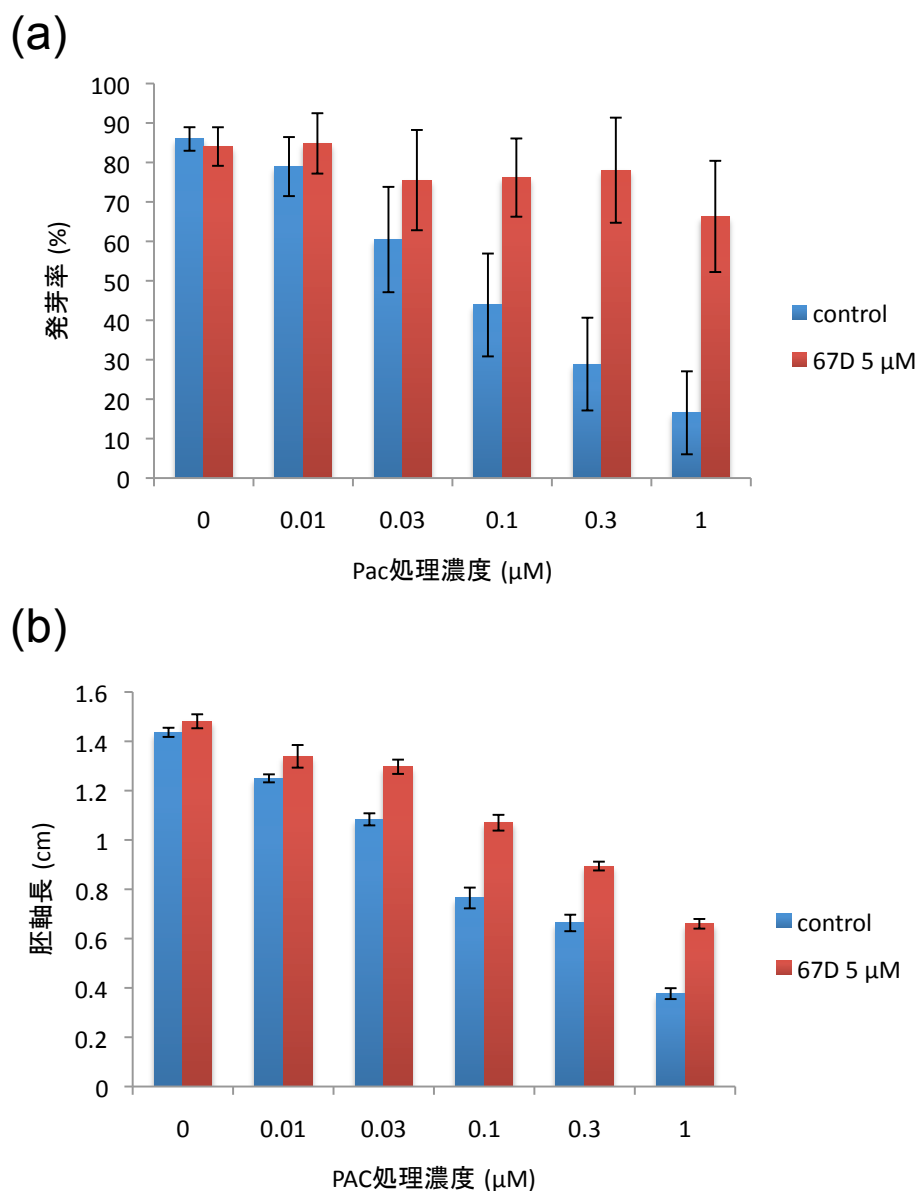


図3-3 発芽率・胚軸長に対する  
67DとPACの共処理の影響

- (a) 化合物を処理した培地で暗所下1週間生育させたシロイヌナズナの発芽率を測定したもの。n=6。エラーバーはSEを示す。
- (b) 化合物を処理した培地で暗所下1週間生育させたシロイヌナズナの胚軸長を測定したもの。n=17~30。エラーバーはSEを示す。

両方の系において生合成阻害剤PACによる生長抑制効果に対して67Dは回復作用を示している。

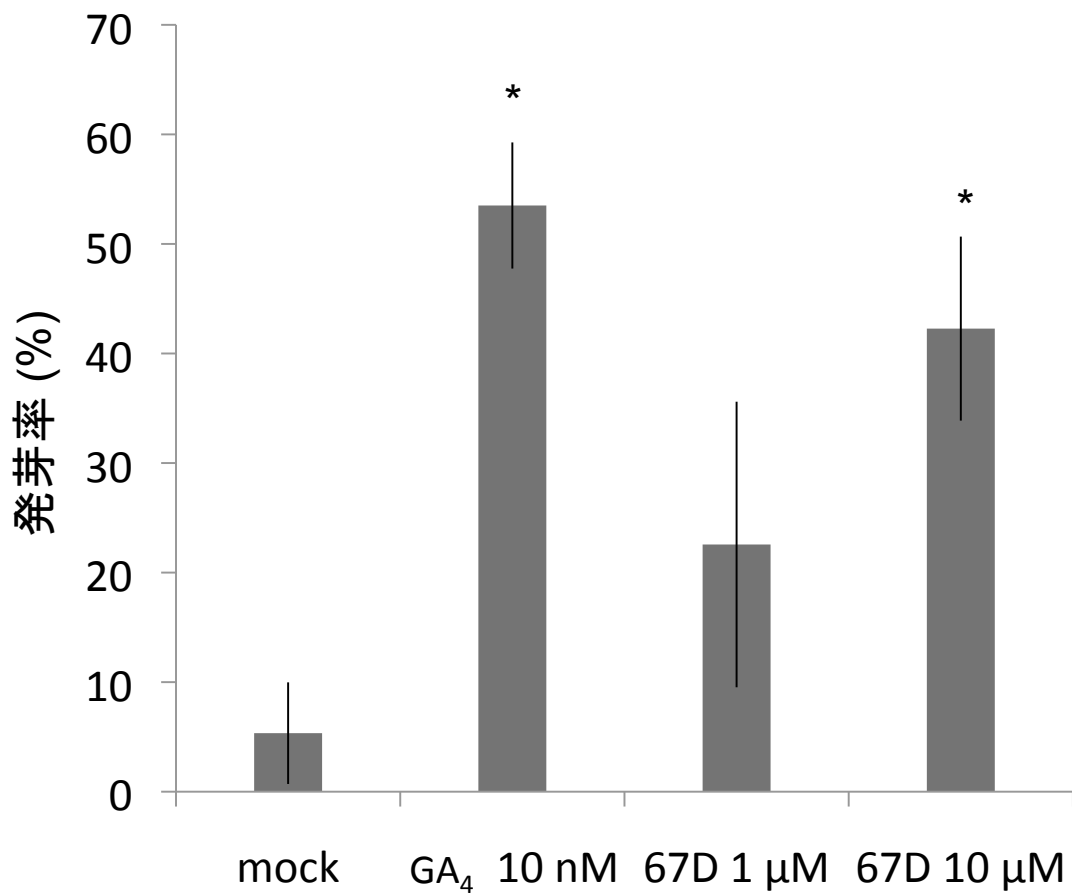


図3-4 67Dの*ga1-3*に対する発芽促進活性

GA内生量が著しく低下していることから発芽率の低いGA生合成欠損変異体である*ga1-3*に対するGA<sub>4</sub>と67Dの投与効果。各化合物を含んだ1/2MS培地に*ga1-3*を播種し、発芽率を測定した。n=3。エラーバーはSDを示す。

*ga1-3*の低い発芽率をGA<sub>4</sub>が回復したのと同様に、67Dでも濃度依存的に発芽率が上昇することが判明した。

\*=p<0.05



まず受容体に対する 67D の結合活性を測定した。すでに、大腸菌発現系を用いて調製したシロイヌナズナ GA 受容体のリコンビナントタンパク質と、放射性標識された活性型 GA とを用いた *in vitro* 試験系が確立されており、この系を用いて 67D の投与効果を調べた。図 3-5 にその結果を示す。この試験系では、放射性標識 GA が受容体に結合する状況において、投与する試験化合物が受容体のリガンド結合部位への結合活性を示す場合には、放射性標識 GA と試験化合物との間で濃度依存的に交換反応が生じる。その結果、最終的に受容体へ結合する放射性標識 GA 量が添加する試験化合物の濃度上昇に応じて減少することが期待される。実際、陽性対照として用いた非標識 GA を投与した場合、検出された結合放射活性量には明瞭な低下が認められたが、67D 投与の場合もこれと同様に放射量の低下が認められた。以上の結果より、67D が受容体に対する結合能を有することが明らかとなった。67D 投与量を変化させて試験したところ、期待どおり濃度依存的に結合放射活性量を低下させることが判明した。これにより、67D は GA と受容体結合サイトを巡り競合的に結合することが判明した。

### 3-2-3 67D の作用解析② —GA からの信号伝達に与える影響—

GA 信号伝達における中心的過程は、受容体が GA 依存的に信号伝達抑制因子 DELLA の機能を弱める結果、植物体が信号伝達抑制状態から信号伝達活性化状態へと変化するものである。この際、DELLA 因子は 26S プロテアソームが関与するタンパク質分解系で分解されることで、その存在量が低下する(Dill *et al.*, 2001; Gubler *et al.*, 2002; Itoh *et al.*, 2002)。この DELLA 因子の分解過程を観察する目的で、シロイヌナズナ由来の DELLA 因子 RGA のレポーター GFP ライン(*pRGA::GFP-RGA*)がしばしば利用される。そこで、この形質転換体を利用して、67D 投与が GA からの信号伝達過程に与える影響について解析した。播種後 7 日目の *pRGA::*

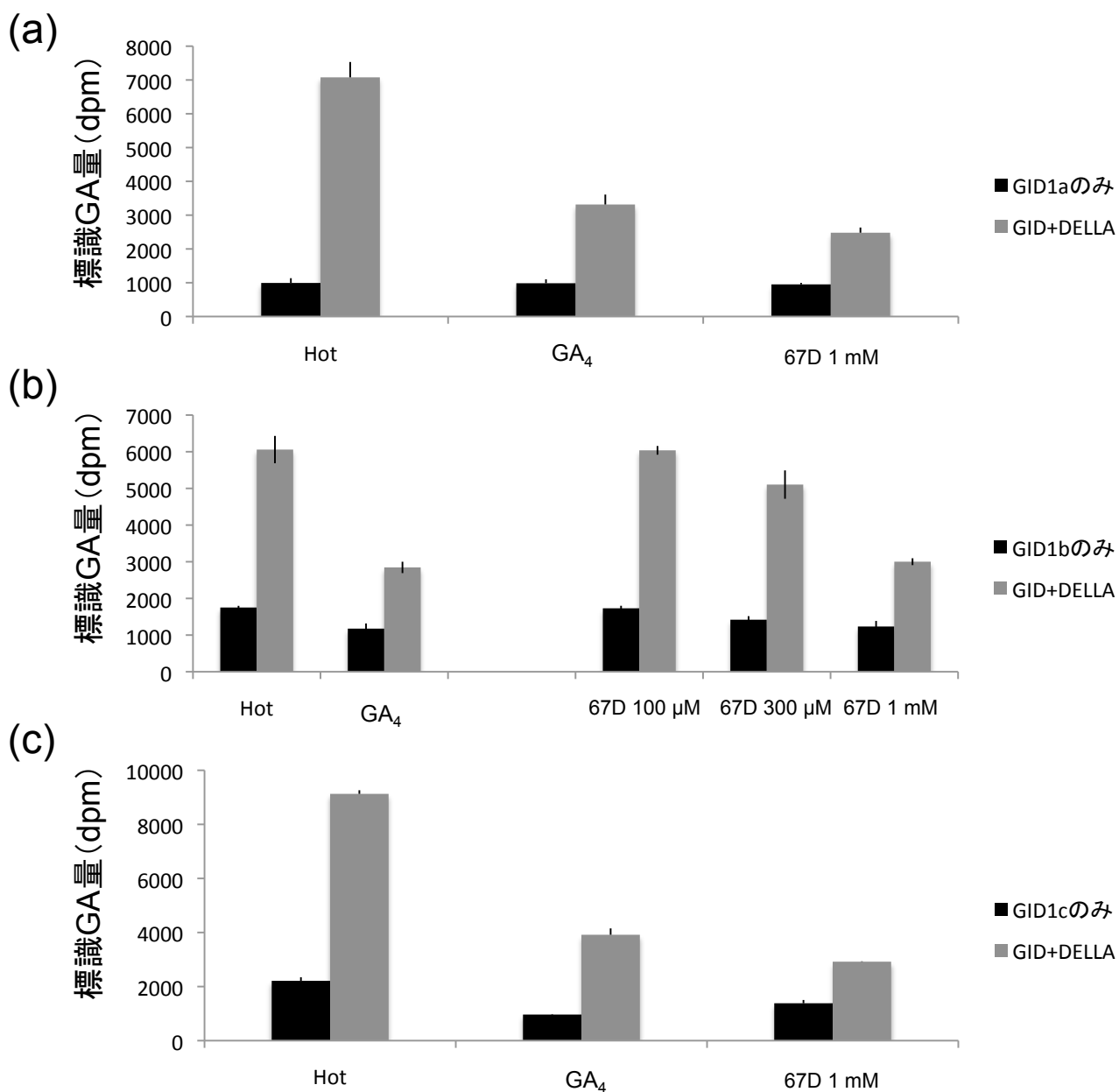


図3-5 67DのGID1との結合活性

シロイヌナズナの三種のGID1に対する67Dの結合活性。n=3。エラーバーはSDを示す。

(a) AtGID1aに対する67Dの結合活性

(b) AtGID1bに対する67Dの結合活性

(c) AtGID1cに対する67Dの結合活性

標識されたGAをGID1に結合させた後、標識GAと置き換わることのできる結合活性を有する化合物を添加することで検出される標識体GAの量が減る。67Dの添加で三種のGID1全てで標識GAの追い出しが確認できた。

GFP-RGA 幼植物体を用いて、終濃度 30  $\mu$ M の 67D 溶液に浸漬した後、蛍光顕微鏡を用いて GFP 由来の蛍光を観察した。その結果、陽性対照として用いた GA 処理区と同様に、67D 処理区でも GFP 蛍光強度の低下が観察された(図 3-6)。以上の結果から、67D は受容体に対する結合と、それに伴う DELLA 因子の機能抑制、26S プロテアソームが関与するタンパク質分解系への DELLA 因子の引き渡しに至るまで、GA と同じ様式に従って信号を伝達していると考えることが可能である。

さらに、上記観点について遺伝子発現制御の点からも確認を行った。植物に対する GA 投与に伴い、既に幾つかの遺伝子群の発現状況には大きな変動が生じることが報告されている。たとえば、シロイヌナズナの GA 生合成酵素遺伝子 *AtGA20ox2*(At5g51810) や *AtGA3ox1*(At1g15550) の発現状況を調べれば GA からの信号伝達状況の概要が把握できる。なぜならば、これら GA 応答性遺伝子の発現に関しては、最終産物である活性型 GA 存在下で抑制されるいわゆるフィードバック制御機構が働いているためであり、このシステムを用いて遺伝子発現応答に対する 67D 投与の効果と GA 投与の効果の類似性を検討することにした。10 日間生育させたシロイヌナズナ幼植物体を 67D 添加培地上に移植し、3 時間経過時点で植物体全体を収穫して全 RNA 抽出を行った。常法に従い両遺伝子に対する特異的プライマー (Ogawa *et al.*, 2003; Goda *et al.*, 2008) と Real time-PCR 装置を用いてそれぞれの発現状況を解析した。結果、GA と同様に 67D を投与した場合も、いずれの遺伝子発現についてもフィードバック制御が働いた結果と考えられる有意な発現量の減少が認められた(図 3-7)。

#### 3-2-4 67D の作用解析③ 一受容体結晶構造情報を用いた *in silico* 解析一

上記の検討結果より、67D は GA 同様に GA 受容体である GID1 を経由して信号伝達経路を活性化することが強く示唆された。シロイヌナズナ由来の GA 受容

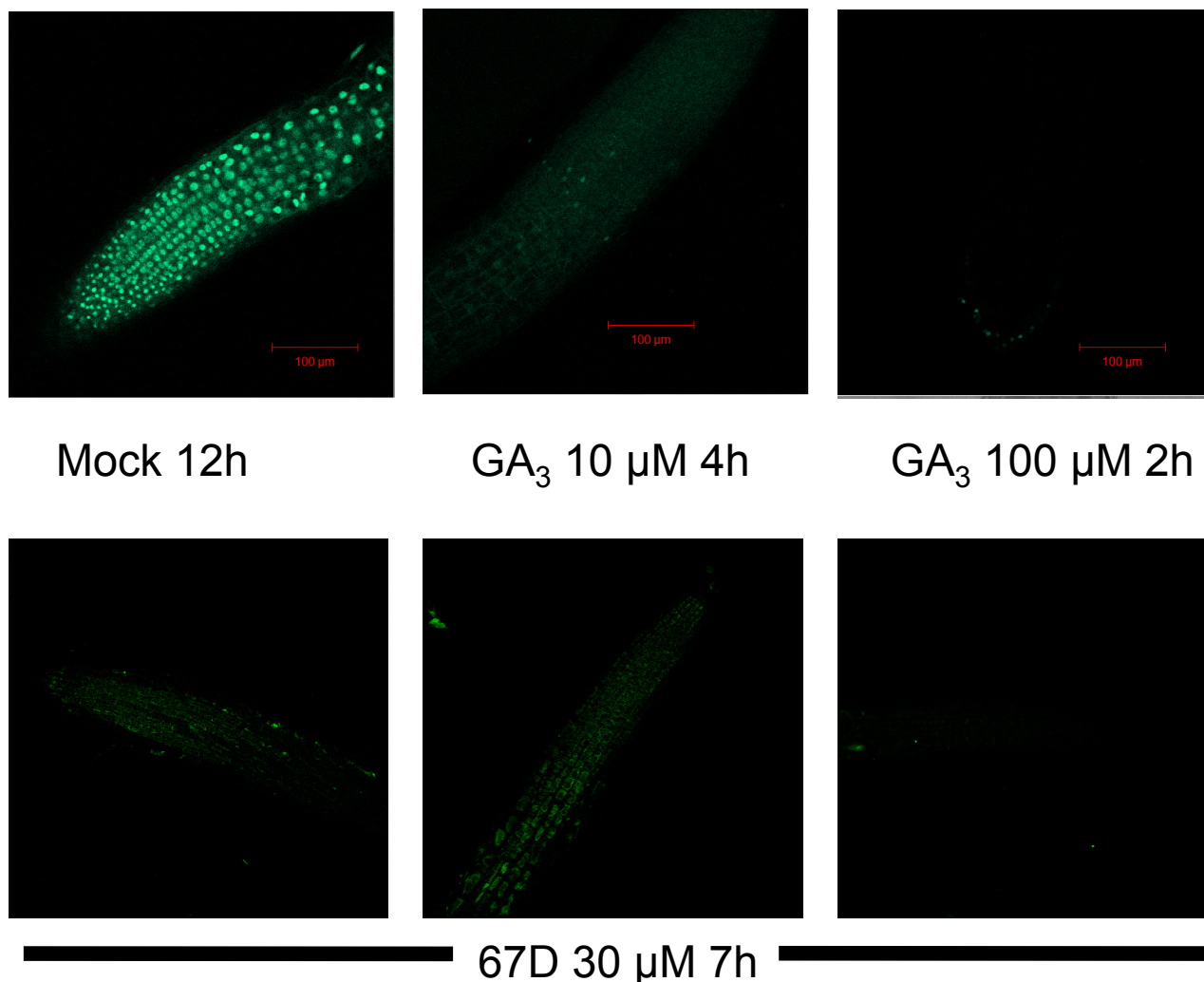


図3-6 67DによるRGAの消失の確認

*pRGA::GFP-RGA*はシロイヌナズナにおけるDELLA因子の一種RGAのレポーター発現ラインであり、根の核に局在するGFP融合RGAを共焦点レーザー顕微鏡で観察できる。このGFP蛍光はGAによるRGAの分解によって消失する。67D投与時にも同様の蛍光の消失が見られた。図は生育一週間後の*pRGA::GFP-RGA*幼植物体を観察したもの。

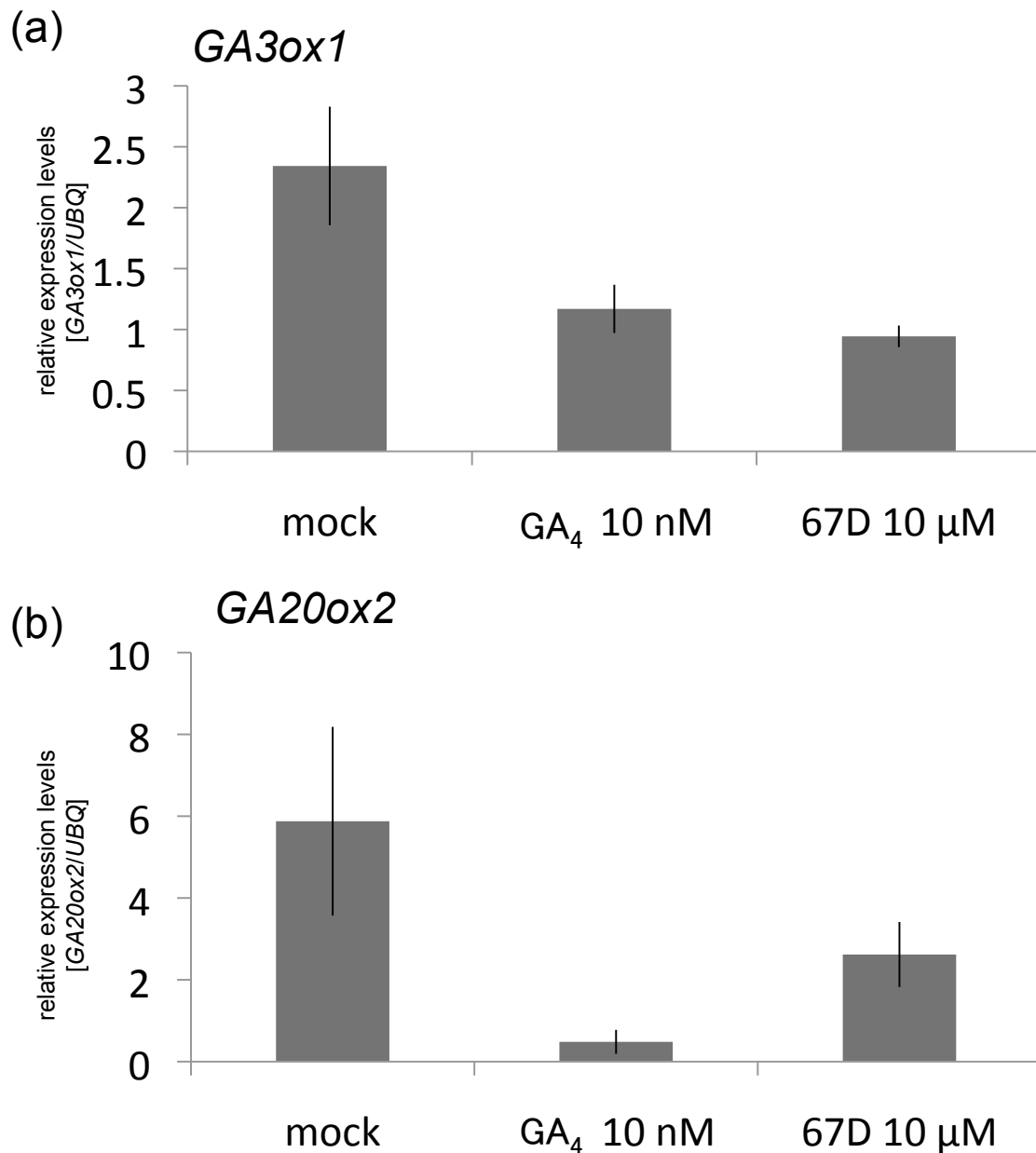


図3-7 フィードバック制御による遺伝子変動

(a) 生合成酵素遺伝子*AtGA3ox1* (AT1G15550) の相対的発現量。

(b) 生合成酵素遺伝子*AtGA20ox2* (AT5G51810) の相対的発現量。

エラーバーはSEを示す。

67D投与によりGA<sub>4</sub>と同様にフィードバック制御がかかりGA生合成関連遺伝子の発現量が減少していることが判明した。

体 GID1a と活性型 GA の共結晶構造について既に報告されており (Murase *et al.*, 2008)、この情報を利用して 67D の受容体に対する結合シミュレーションを試みた。解析用ソフト Surflex を用いて、GID1a と 67D との結合をシミュレートした結果を図 3-8 に示す。まず、実際の結晶解析情報では、図中右上側が受容体ポケットの入口で、活性型 GA<sub>4</sub> (ピンク) がこの結合ポケットに対して結合していた。そして、シミュレーション結果では 67D が本来なら GA が結合するポケットにうまく収まっており、アントラセン部分の構造が結合ポケットの奥側に、フェニル環部分の構造はポケット上部の、本来であれば GA の A 環部分構造が位置する領域に存在すると予想された。これらの結果は、67D が受容体を標的とする GA アゴニストであることをさらに支持している。

### 3-2-5 67D 構造類縁体の有機合成と活性評価

67D の示す GA 様生理活性のさらなる上昇を意図して類縁体の合成を計画した。67D は、図 3-9(a) に示す 2 段階の反応を経て合成可能であった。すなわち、1 段階目は酢酸エチル中でのアントラセンと無水マレイン酸の Diels-Alder 反応で (Diels *et al.*, 1931; Bachmann *et al.*, 1938)、2 段階目は、先の反応で得られた anthracene-9,10-endo- $\alpha,\beta$ -succinic anhydride と L-phenylalanine を酢酸中で還流する反応であり、反応生成物を再結晶化することにより 67D を得ることができる (Mallakpour *et al.*, 2009)。この合成経路に基づいて、anthracene-9,10-endo- $\alpha,\beta$ -succinic anhydride に対して L-phenylalanine 以外の各種 L 型アミノ酸を反応させて、67D の構造類縁体を計 13 種調製した。それらの構造を図 3-9(b) に示す。

構造類縁体のジベレリンアゴニストとしての活性を評価するために、まず *in vitro* 測定系 (3-2-2 項) を用いて受容体に対する結合性を調べた。図 3-5 の結果よ

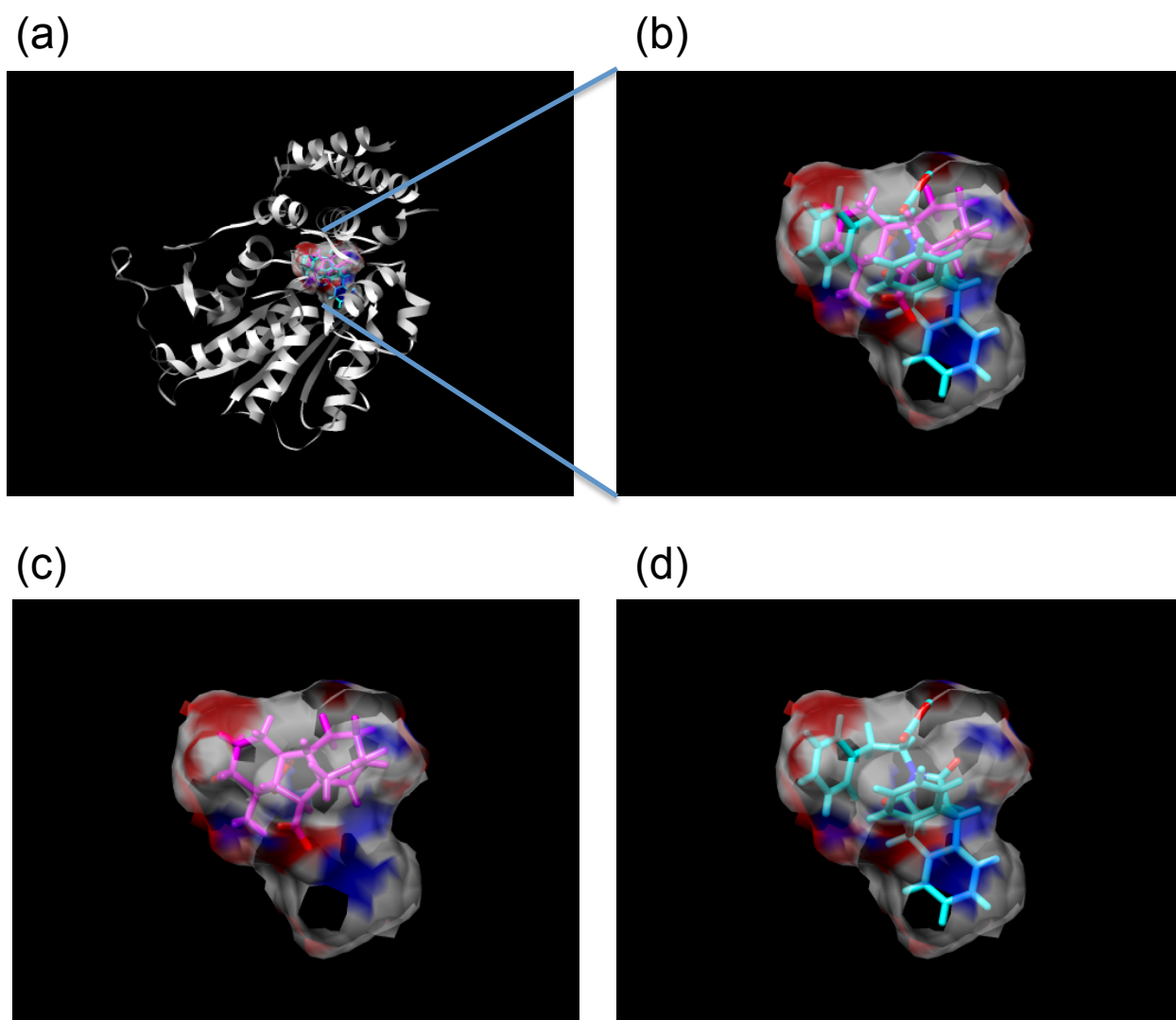


図3-8 ドッキングシミュレーションによる  
GID1と67Dの結合様式

(a) シロイヌナズナGA受容体GID1aとGA<sub>4</sub>、67Dの結合状態

(b) (a)の拡大図

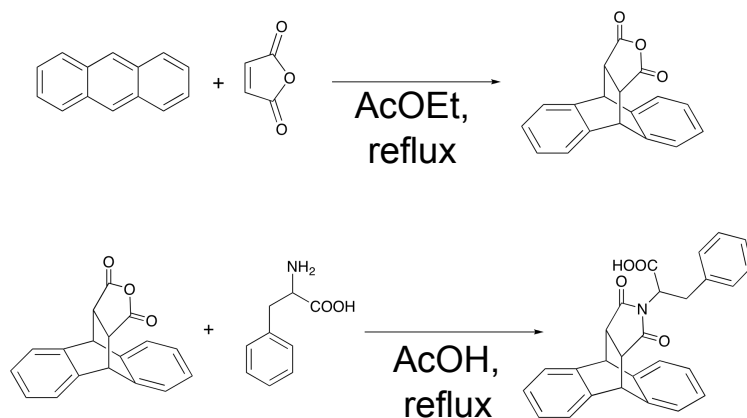
(c) GID1aとGA<sub>4</sub>の結合状態

(d) GID1aと67Dの結合状態予測

予測には解析用ソフトSurflexを用いて計算し、Chimeraで描画した。赤い化合物はGA<sub>4</sub>であり、この結合状態はすでに報告されているものである。青い化合物は67Dの結合状態を示している。

(a)

### 合成法



(b)

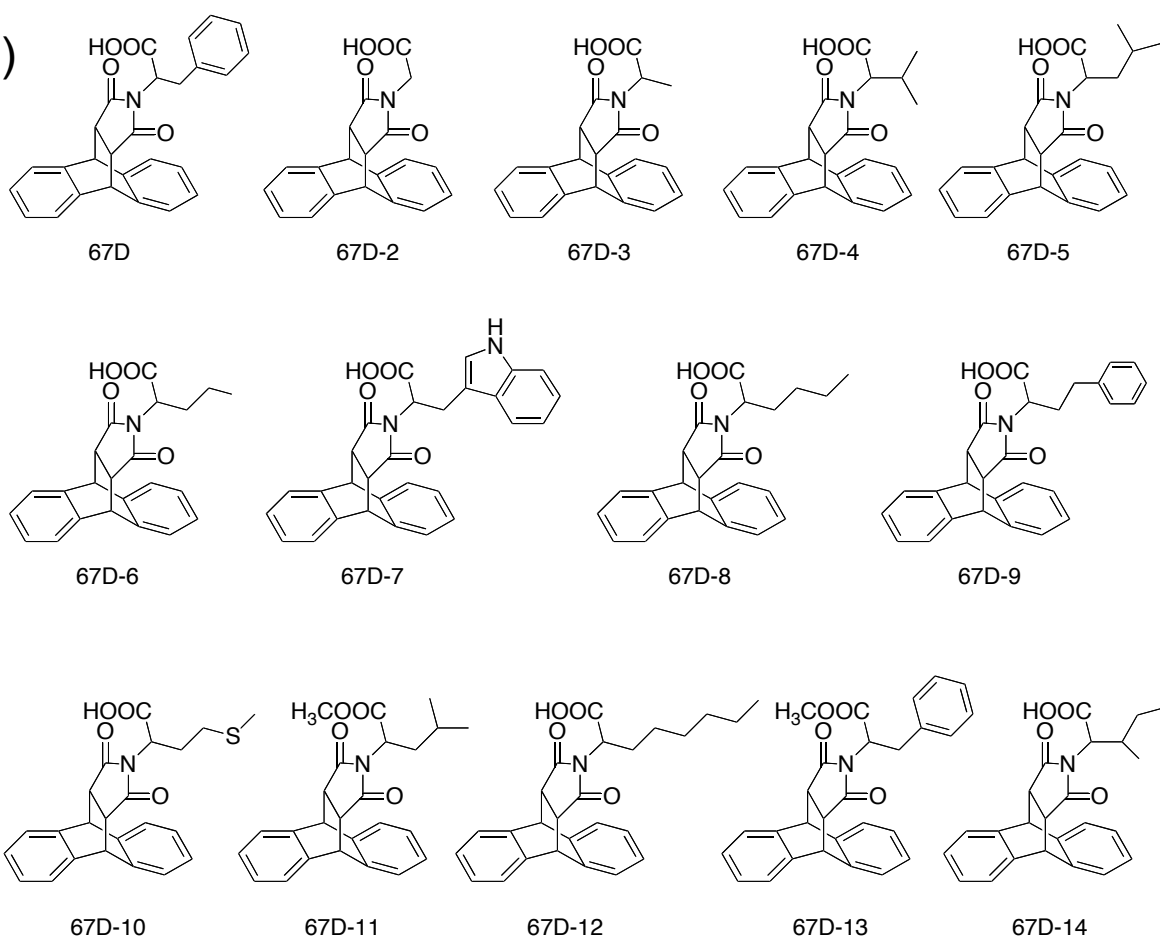


図3-9 67D類縁体の合成

(a) 67Dの合成方法

(b) 合成した67D類縁体化合物一覧

67Dは2段階の比較的容易な反応で合成できる。



り、親化合物である 67D は受容体に対して 300  $\mu$ M 添加条件で、検出される放射活性量の半減が認められていたことから、構造類縁体の添加濃度を 300  $\mu$ M に統一して相対的に評価した。その結果について、図 3-10 上段に示す。これによれば、受容体に対して微弱な結合能しか持たないか、あるいは、完全に喪失している 6 種 (67D-2、-3、-6、-10、-11、-13)、67D と同程度の結合能を示す 5 種 (67D-4、-5、-7、-8、-14)、67D より結合能が上昇した 2 種 (67D-9、-12) にそれぞれを分類できた。なお、67D 分子構造内のベンジル基を水素に置き換えた 67D-2 が受容体に対する結合能を喪失していたことから、この炭素鎖が結合能維持に重要であることが判明した。さらに、67D-3、-6、-8、-12 の各構造類縁体に着目すると、ベンジル基部分構造における炭素鎖長が大きくなるに連れて、受容体に対する結合能が高くなる傾向が認められることから、ベンジル基部分に関する疎水領域がこの結合には大きく寄与することが示唆された。67D と比較して炭素鎖が一つ伸びた 67D-9 が受容体に対する強い結合能を示すことも、この考察を支持する。また、構造類縁体のカルボン酸部位をメタノール中で塩化チオニルと反応させ (Costa *et al.*, 2012)、メチルエステル化した 67D-11、-13 が共に結合能を喪失したことから、遊離状態のカルボン酸構造が結合能維持に重要であることが判明した。

これらの構造類縁体に関する受容体との結合性が明らかになったところで、植物体に処理した場合の効果との関連性を調べることにした。すなわち、3-2-1 項で利用した PAC 共処理条件下での発芽促進活性について評価を行った。各構造類縁体の処理濃度を 10  $\mu$ M で固定した場合の評価結果を図 3-11 に示す。これによると、67D よりも高い受容体結合能を示した 67D-9、67D-12 (図 3-9 参照) が、67D と比べて発芽促進活性が低いことが判明した。また、67D-3、-6、-8、-12 の構造類縁体の中では、ベンジル基部分の炭素鎖長に依存して受容体結合能が高くなっていた (図 3-10 参照) のに対して、発芽促進活性については 67D-3、-6、-8 まではその結合能

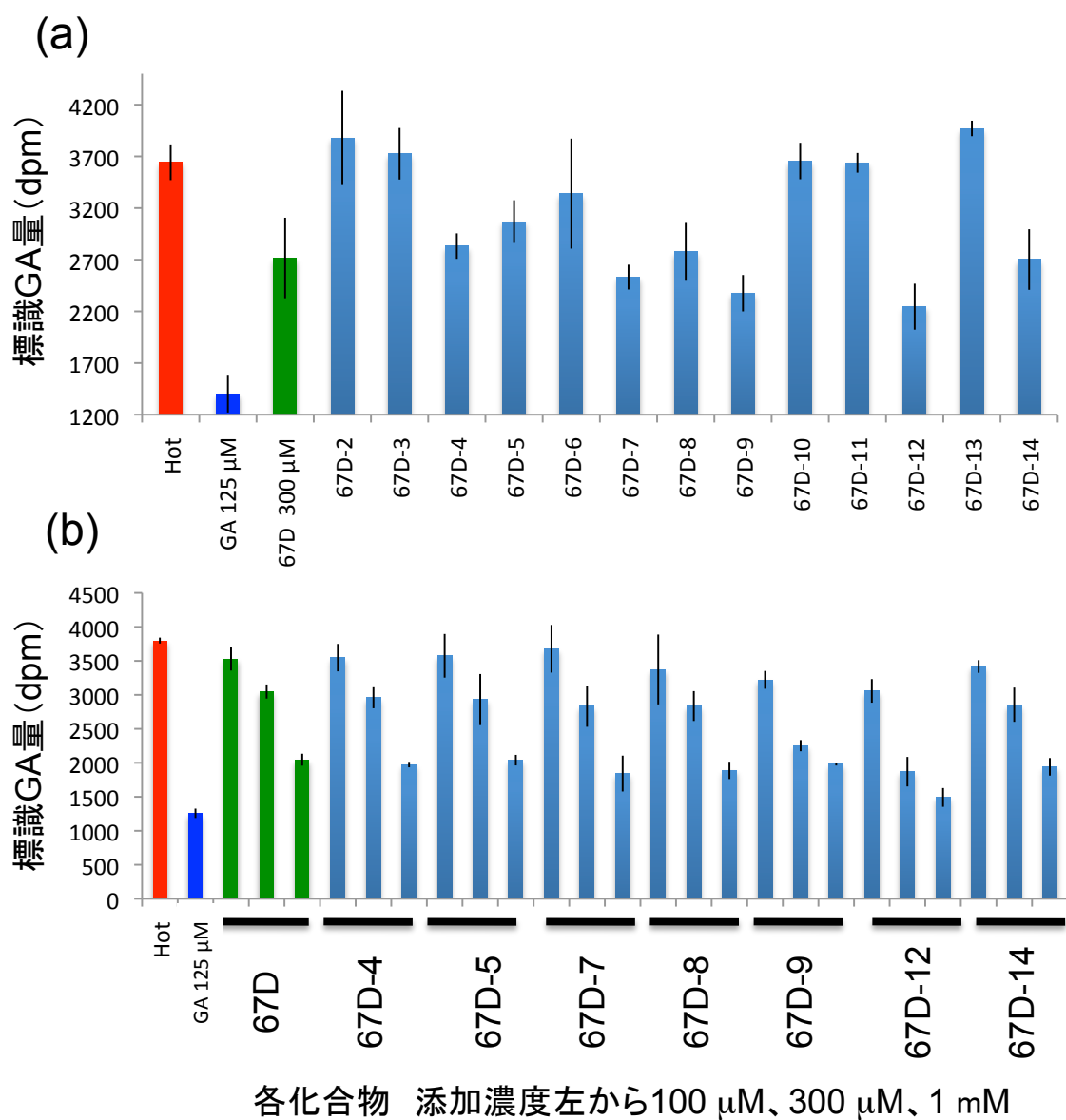


図3-10 67D類縁体の結合活性試験結果

(a) 各化合物300 mMでのGID1bに対する結合活性

(b) 効果の強い7種の化合物のGID1bに対する結合活性(濃度3点)

n=3。エラーバーはSDを示す。

67D-9と67D-12が300 mMの添加濃度において67Dよりも強いGID1bに対する結合活性を示した。

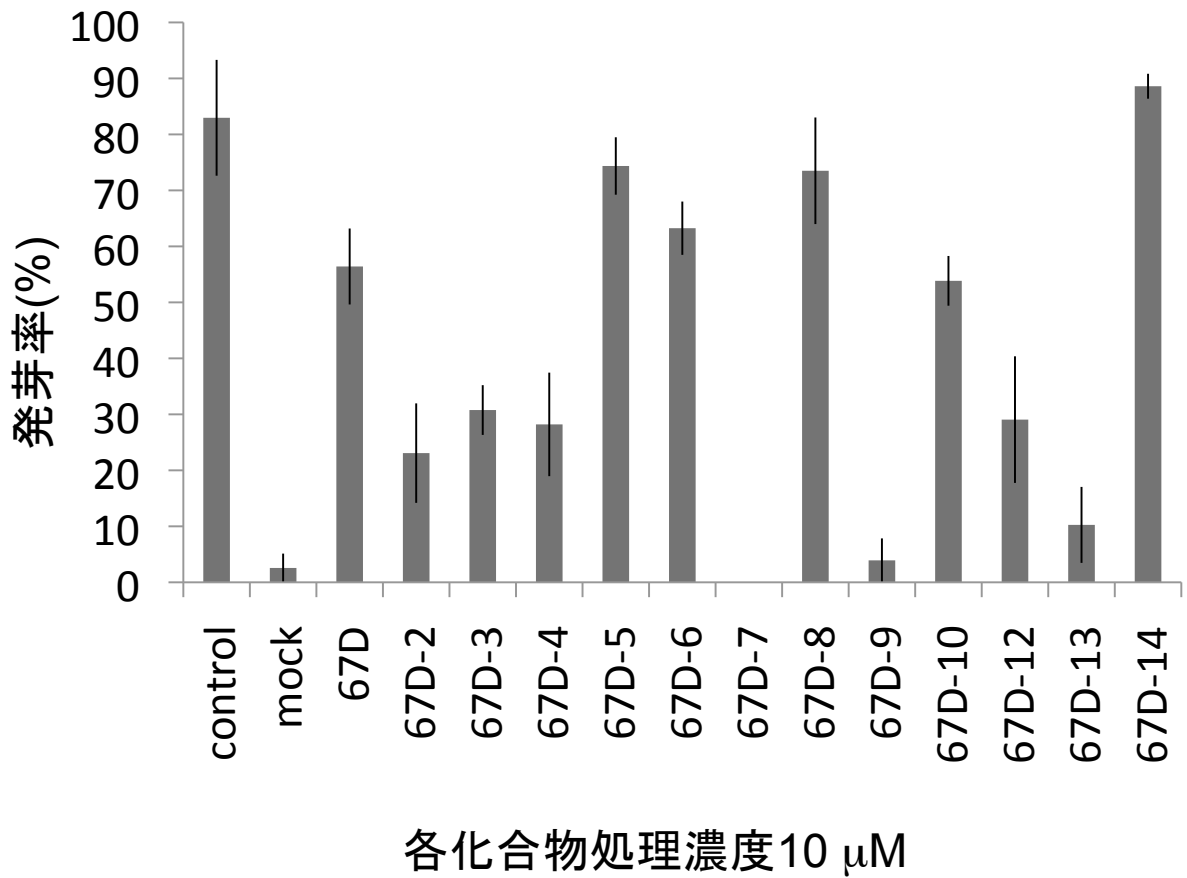


図3-11 67D類縁体の発芽率検討

PAC1 mMと各化合物10  $\mu$ Mを含む培地で暗所下1週間生育させたシロイヌナズナの発芽率を測定したもの。n=6。エラーバーはSEを示す。  
67D-14が67Dよりも高い発芽促進効果を有している。

との連動が認められたものの、67D-12 では低下することが判明した。このことは、67D-9、67D-12 が高い受容体結合能を示しながらも、おそらく植物に対する浸透性などの問題により高い生理活性の発現に至らないという可能性や、DELLA 因子との複合体形成過程まで含めて考えた場合に 67D-9、67D-12 には何らかのマイナス要因が存在している可能性が考えられた。他方、67D と同程度の受容体結合能を有していた 67D-14 (図 3-10 参照) が、67D よりも強い発芽促進活性を示した点についても、植物に対する浸透性が原因かもしれない。この 67D-14 の発芽促進活性について濃度依存性を調べた結果を図 3-12 に示す。これによれば、67D と比較して 10 倍程度、発芽促進活性が上昇していた。これらの結果、化学合成した 67D 構造類縁体の中から、リード化合物となった 67D よりもさらに高い GA 様生理活性を示す新規化合物の取得に成功した。比較的安価な原料からこれら構造類縁体は調製可能であるため、将来の実用化に期待が持てる状況となった。

本項の最後に、67D とその構造類縁体に関する受容体結合能と GA 様生理活性の大小について、3-2-4 項で述べた受容体結晶構造に基づく結合シミュレーションの結果を加味しつつ考察を加える。まず、受容体ポケット構造内において本来であれば GA の A 環部分構造が位置する部位に、67D 分子内のフェニル環部分構造が位置するとシミュレーションでは予想されたが(3-2-4 項)、フェニル環構造を持たない 67D-2 では受容体に対する結合能の喪失が認められた(図 3-10、図 3-11)。しかし、置換するアルキル鎖長の延長に応じて受容体結合能の上昇傾向がうかがえた(図 3-10、図 3-11)ことから、この領域にはある程度の脂溶性を持った官能基が存在することが受容体との結合能維持に重要と考えられる。一方、GA の A 環部分構造の中で特に 3 位の水酸基が生理活性維持には必要であり、フェニル基部分構造に代わってアルキル鎖を導入した構造類縁体の場合、このアルキル鎖に対する水酸基の導入により GA 様生理活性の上昇が期待できるかもしれない。結合シミュ

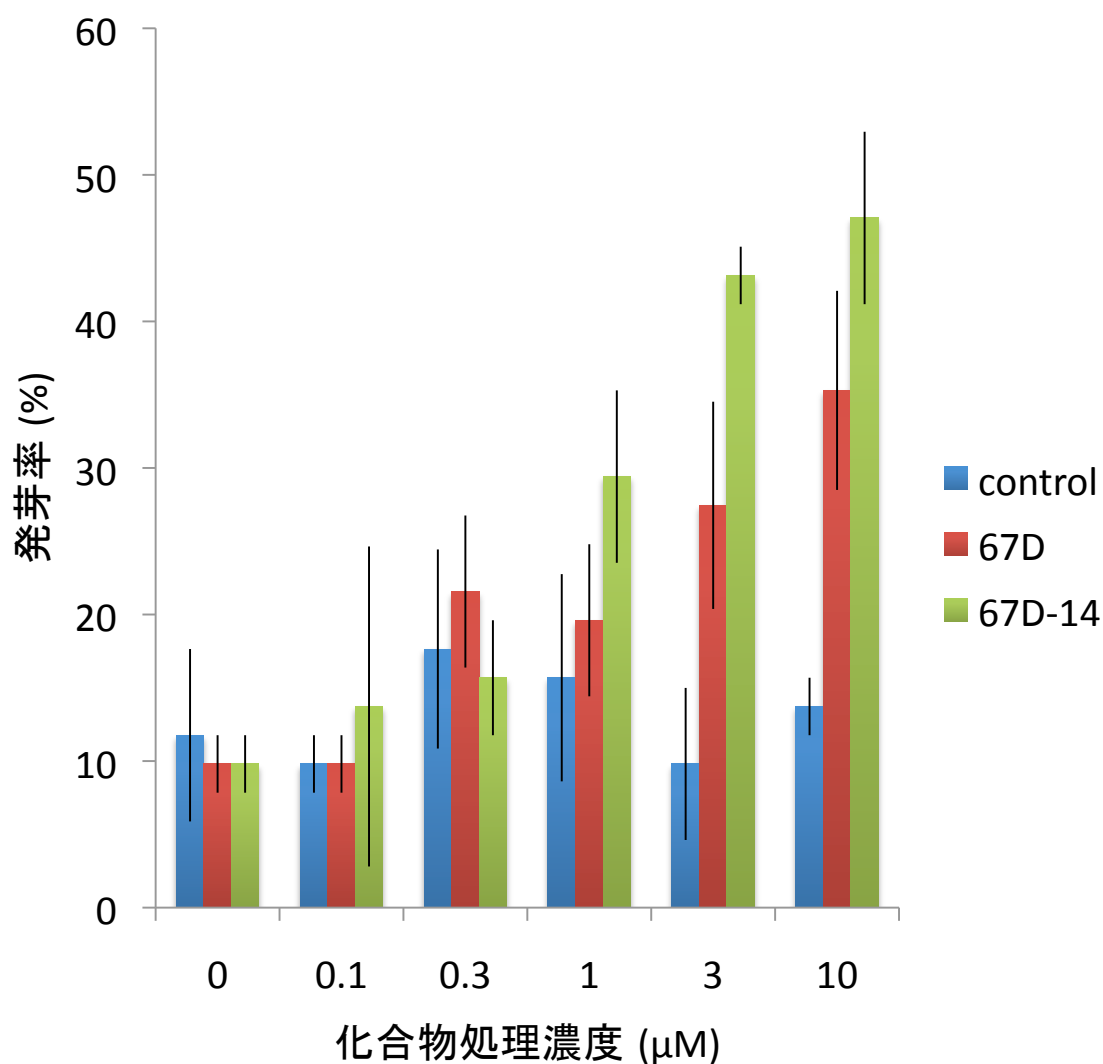


図3-12 67D-14の発芽促進活性における  
濃度依存性

濃度を変化させた各化合物を処理したPAC3 mMを含む培地で暗所下1週間生育させたシロイヌナズナの発芽率を測定したもの。n=6。エラーバーはSEを示す。

67D-14は67Dよりも低濃度でPACにより低下した発芽率を回復する効果を有し、10倍近く強い活性を示す。

レーションを行った際、各構造類縁体と受容体との結合に関する  $pK_d$  予測値を求めた。その一覧を表 3-1 に示す。これによると、 $pK_d$  予測値に関する限り、67D およびその構造類縁体は GA を凌ぐほどの高い親和性を示した。また、これらの  $pK_d$  予測値は、受容体結合能の大小とある程度相関する傾向が認められ、特に 67D-3、-6、-8、-12 の構造類縁体間で議論したベンジル基部分構造の炭素鎖長依存的に受容体結合能が向上した点(図 3-10)を支持する結果であった。ただし、受容体結合能(図 3-10)が認められず、また、発芽促進活性(図 3-11)も認められなかった 67D-11 および 67D-13 までもがこの結合シミュレーションにおいては高い親和性を示す  $pK_d$  予測値を有すると算出されたことから、確度の高いシミュレーション結果を得るためにまだ十分に情報が揃っていないと理解している。

	予測pK <sub>d</sub> 値			結合活性値
	1位	2位	3位	
GA <sub>4</sub>	7.05	6.82	6.73	–
67D	8.95	8.85	8.72	41.4
67D-2	5.66	5.57	5.35	0.0
67D-3	6.06	5.17	5.14	0.0
67D-4	8.63	8.59	8.23	36.2
67D-5	8.29	8.22	8.15	25.6
67D-6	7.20	6.21	6.04	13.6
67D-7	7.88	6.50	6.45	49.6
67D-8	9.38	8.88	8.88	38.7
67D-9	9.06	8.78	8.69	56.6
67D-10	9.18	8.98	8.94	0.0
67D-11	9.07	9.00	8.89	0.2
67D-12	9.83	9.73	9.21	62.4
67D-13	8.50	8.15	7.55	0.0
67D-14	9.26	9.26	9.11	42.0

表3-1 ドッキングシミュレーションの予想pK<sub>d</sub>値  
とGID1に対する結合活性値

67D類縁体化合物のドッキングシミュレーションによる予想pK<sub>d</sub>値の結合強度1位から3位までと、図3-10に示した300 μMにおけるGID1aに対する結合活性の相対値一覧。

GID1との結合活性の値とドッキングシミュレーションによる予想pK<sub>d</sub>値はある程度の相関を示す。

### 3-3 ジベレリン様活性を示す既知化合物 AC94377 の作用解析

#### 3-3-1 植物に対する AC94377 のジベレリン様活性

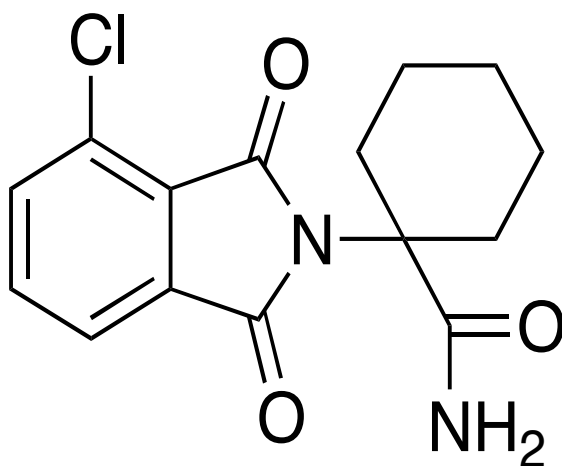
フタルイミド誘導体として種々の植物生長調節剤が創製されているが、その中の 1-(3-chlorophthalimido)-cyclohexanecarboxamide (通称 AC94377、図 3-13) は作用機構が不明ながらも GA 様の生理活性を示す化合物として長年知られていた (Tanaka *et al.*, 1991)。具体的には AC94377 は種子発芽、茎部の伸長促進、休眠打破、果実の肥大など本来 GA が示す生理作用の多くを引き起こす (Donald *et al.*, 1985; Suttle *et al.*, 1987; Thomas, 1984; Gott *et al.*, 1986; Yalpani *et al.*, 1989)。さらには、ブドウやウメの単為結果まで誘起する (松井ら, 1996)。そこで、前項で述べた GA アゴニスト化合物 67D およびその構造類縁体を見出した評価系を AC94377 の評価系として転用して、AC94377 が GA アゴニストとして機能している可能性について調べた。

まず初めに、AC94377 が、報告どおりに GA 様生理活性を示すことを確認することにした。正常なシロイヌナズナ種子を発芽させ、AC94377 添加培地上に移植後、4 日経過時点において観察した結果、GA 添加区と同様に有意な胚軸の伸長促進作用が認められた (図 3-14)。また、播種後 9 日目の幼植物体を AC94377 添加培地上に移植して 5 日後には、葉柄に関しても GA 同様の伸長促進効果を有することが確認された (図 3-15)。さらに、前出の GA 生合成変異体 *ga1-3* に対する発芽促進活性も検証した。その結果、5  $\mu$ M、50  $\mu$ M の AC94377 添加培地において *ga1-3* 種子の発芽が濃度依存的に促進されることが判明した (図 3-16)。以上の結果より、AC94377 について GA アゴニストとしての作用を詳細に検討することにした。

#### 3-3-2 AC94377 の作用解析① —GA 受容体に対する結合性—

3-2-2 項で用いた受容体との結合活性測定系に AC94377 を供し、その効





Chemical Formula:  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_3$   
 Molecular Weight: 306.7442

図3-13 AC94377の構造

作用機構が不明ながらもGA様の生理活性を示す化合物として長年知られていたフタルイミド誘導体1-(3-chlorophthalimido)-cyclohexanecarboxamide（通称AC94377）の構造式。

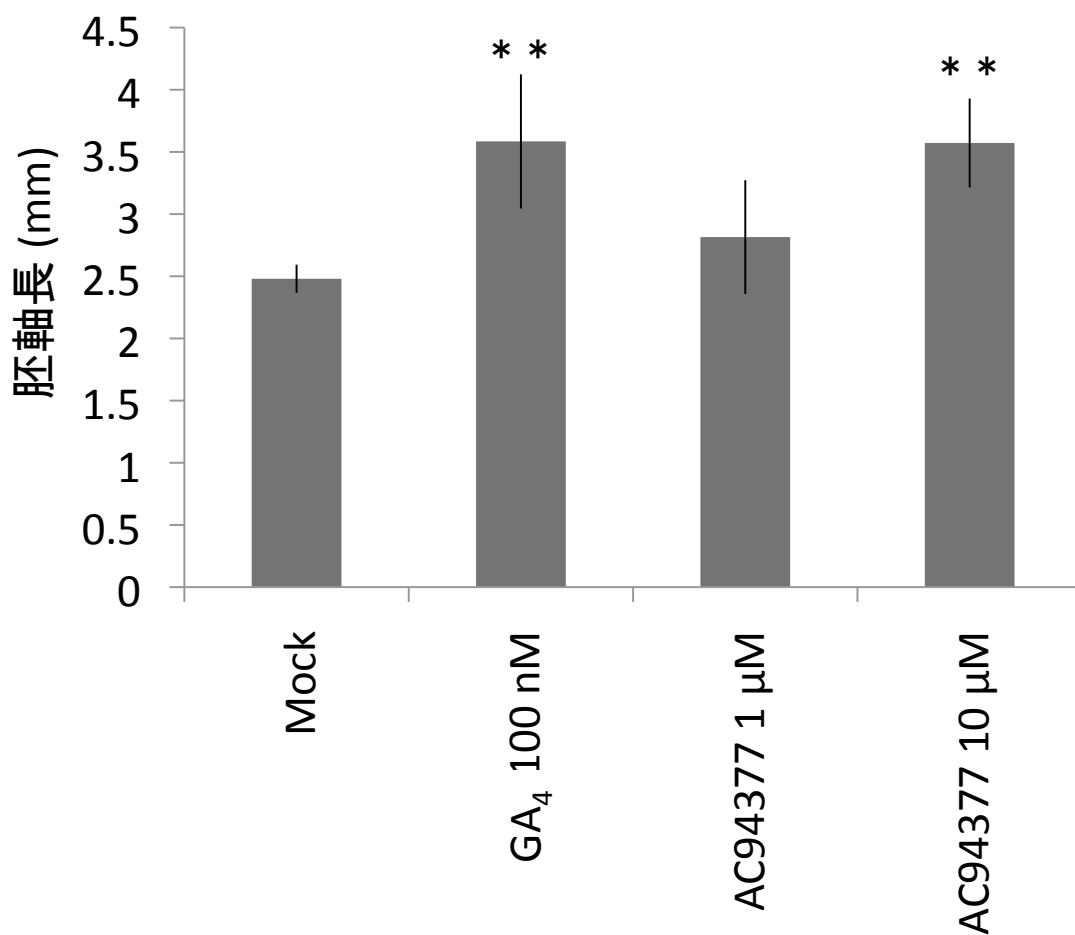


図3-14 AC94377の胚軸長に与える影響

発芽させたシロイヌナズナの種子を、GA<sub>4</sub>やAC94377を添加した1/2MS培地に移植して6日後に観察した。n=15。エラーバーはSDを示す。

AC94377はGAと同様にシロイヌナズナの胚軸長を伸ばす作用がある。

\* \* =p<0.01

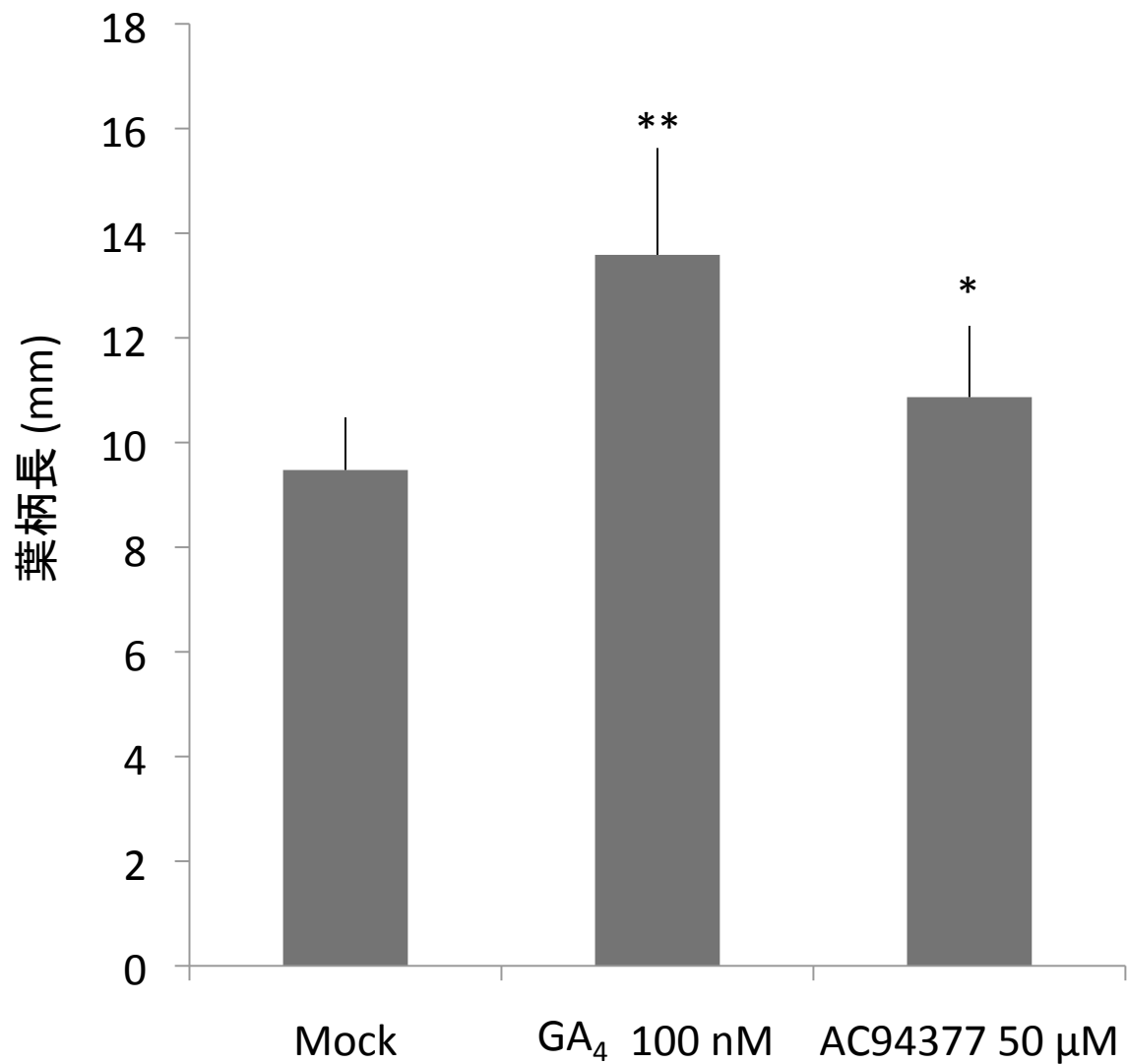


図3-15 AC94377の葉柄長に与える影響

培地に播種してから9日後のシロイヌナズナを、GA<sub>4</sub>やAC94377を添加した1/2MS培地に移植して5日後に観察した。n=10。エラーバーはSDを示す。胚軸長においても、GAと同じく葉柄に関しても伸長促進効果を有していることを確認した。

\* \* =  $p < 0.01$ 、\* =  $p < 0.05$

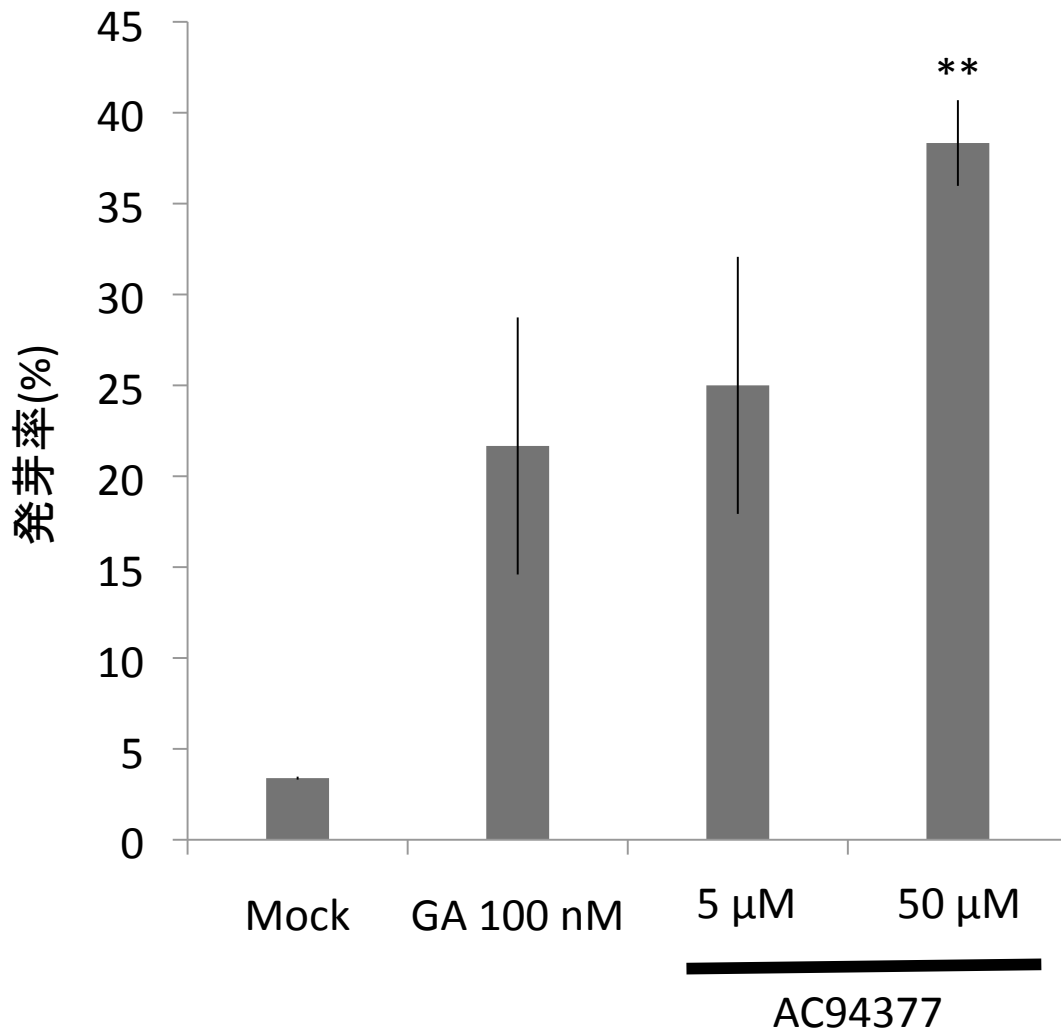


図3-16 AC94377の*ga1-3*に対する発芽促進活性

GA生合成欠損変異体である*ga1-3*に対するGA<sub>4</sub>とAC94377の投与効果。各化合物を含んだ1/2MS培地に*ga1-3*を播種し、発芽率を測定した。n=3。エラーバーはSDを示す。

*ga1-3*の低い発芽率をGA<sub>4</sub>は回復したのと同様にAC94377でも濃度依存的に発芽率が上昇することが判明した。

\* \* =p<0.01

果を調べた。その結果図 3-17 に示したように、67D と同様に受容体に対する AC94377 の結合活性が検出された。ただし、シロイヌナズナに 3 種存在する GA 受容体のうち、GID1b に対しては明瞭な結合活性を検出できなかった。これについて、pyrabactin のように AC94377 が限定的な GA アゴニストである可能性も考えられるが、他の受容体に比べて GID1b は GA に対する親和性が 1 桁高いことから (Nakajima *et al.* 2006)、今回の実験で用いた AC94377 の添加量が GID1b に対してのみ競合的に標識 GA を追い出すほど十分では無かった可能性も考えられる。

AC94377 の受容体結合性を検証するもう一つの方法として、酵母 two-hybrid 系が報告されている (Nakajima *et al.* 2006)。これは、受容体と DELLA 因子との間の結合 (相互作用と表現される) が GA 依存的に生じることを利用して、GA が何ら作用しない酵母核内でこの 2 分子間の結合を再現させ、それに伴い酵母の生育に必要な成分をコードする遺伝子の発現を生じさせることにより、「2 分子間相互作用が成立すること」を「生育が制限された環境下で生存すること」に置き換えて評価することが可能なシステムである (図 3-18)。このシステムを用いて、GA と同様に AC94377 依存的な受容体と DELLA 因子間の相互作用について検討した。その結果図 3-19 に示すように、試験に用いた 6 つの組合せ、すなわち、3 種の受容体と 2 種の DELLA 因子との相互作用に関して、AC94377 はいずれも酵母の生育維持に有効であった。つまり、受容体と DELLA 因子間の複合体形成を促進したと言える。ただし、3 種の受容体のうち GID1b・GID1c を用いる場合は 1  $\mu$ M 以上の AC94377 添加条件で、他方、GID1a を用いる場合は 10  $\mu$ M 以上の AC94377 添加条件で DELLA 因子 RGA との相互作用を引き起こしたのに対して、別の DELLA 因子 RGL2 の場合はいずれの受容体とも 10  $\mu$ M 以上の AC94377 添加が必要であった。なお、67D についてもこの評価系を用いることを予定していたが、酵母に対する生育阻害能を有しているため試験ができなかった。

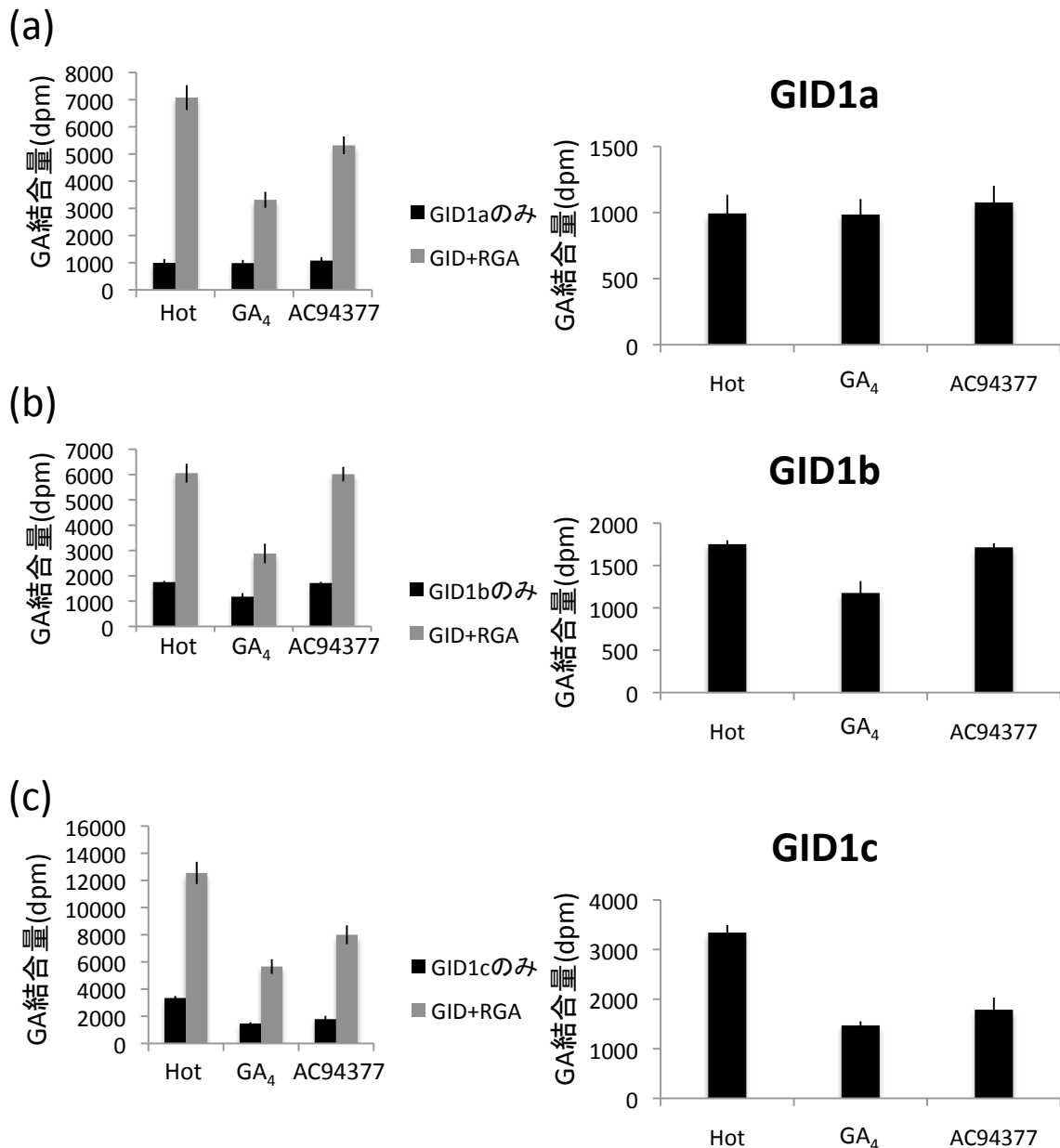


図3-17 AC94377のGID1三種との結合活性試験

シロイヌナズナの三種のGID1に対するAC94377の結合活性。n=3。エラーバーはSDを示す。

(a) AtGID1aに対するAC94377の結合活性

(b) AtGID1bに対するAC94377の結合活性

(c) AtGID1cに対するAC94377の結合活性

各左図; DELLA添加時の結合活性 各右図; GID1のみとの結合活性

AC94377の添加でGID1aとGID1cで標識GAの追い出しがかった。しかし、GID1bにおいては結合活性は確認できなかった。

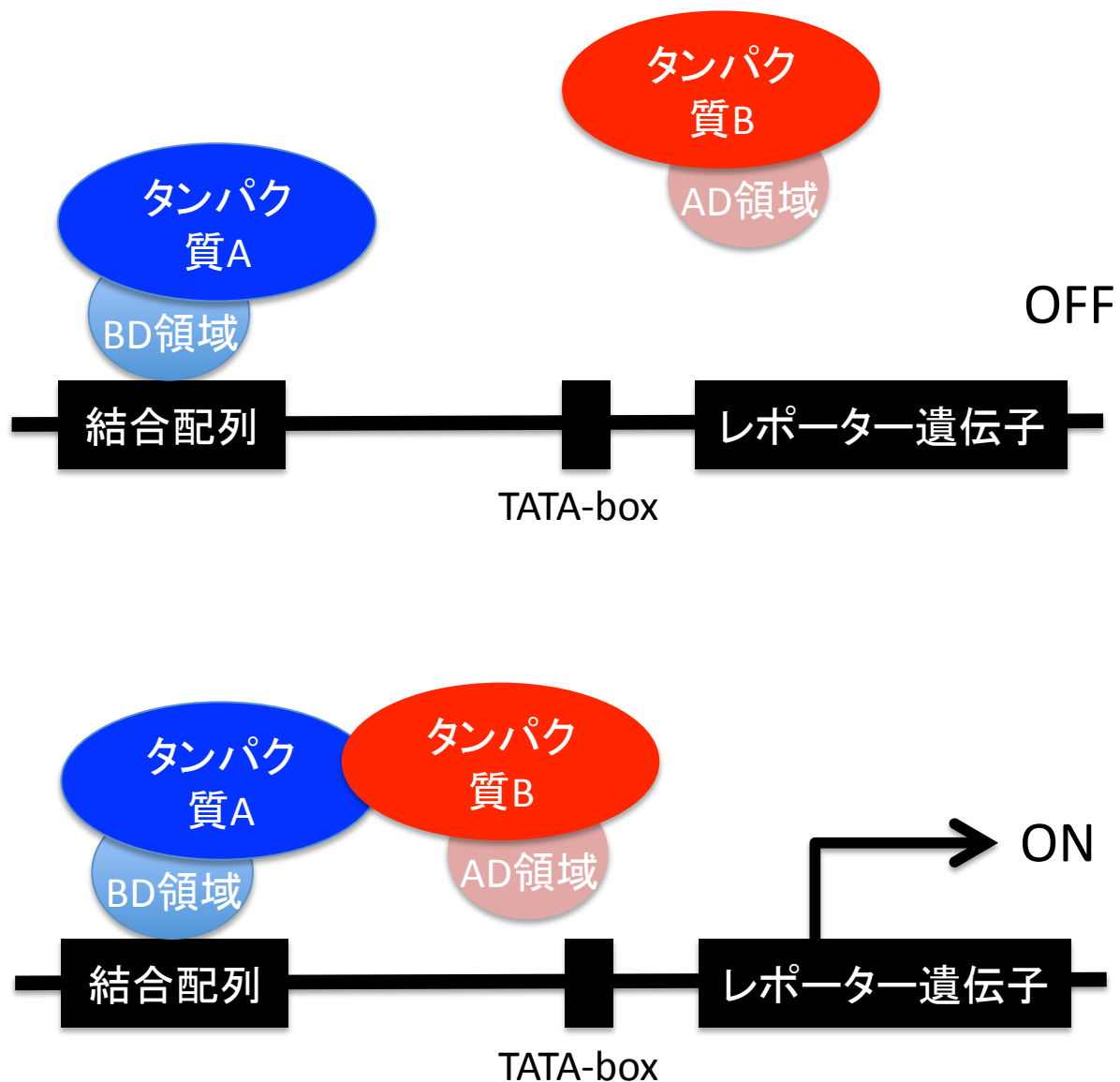
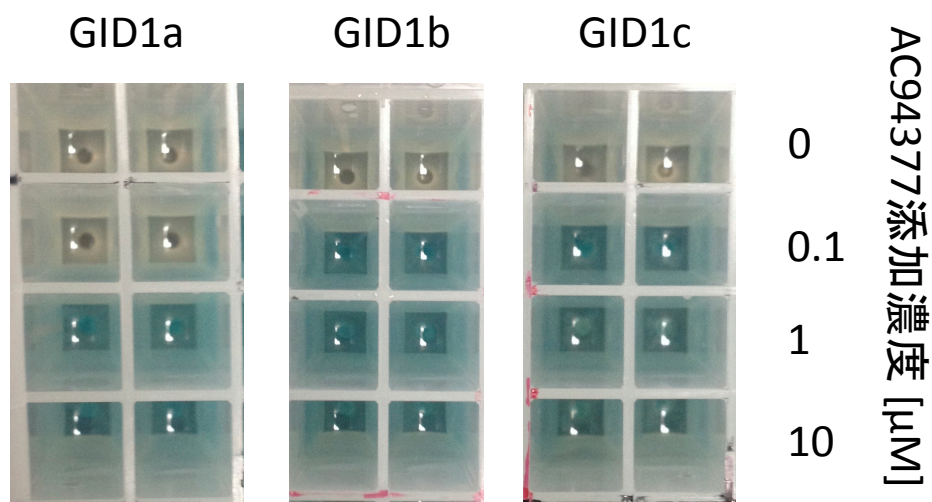


図3-18 酵母two-hybrid系のモデル図

酵母のDNA結合タンパク質GAL4を、DNA結合能を示す領域(DNA Binding Domain; BD領域)と転写活性化能を示す領域(Trans-Activate Domain; AD領域)に分割し、それぞれに相互作用の解析対象の二種のタンパク質(仮にA,Bとする)を融合させる。タンパク質A,Bが相互作用し、複合体を形成したときAD領域がTATA-boxと空間的に接近するため、レポーター遺伝子の転写活性が活性化される。

### (a) GID1:RGA



### (b) GID1:RGL2

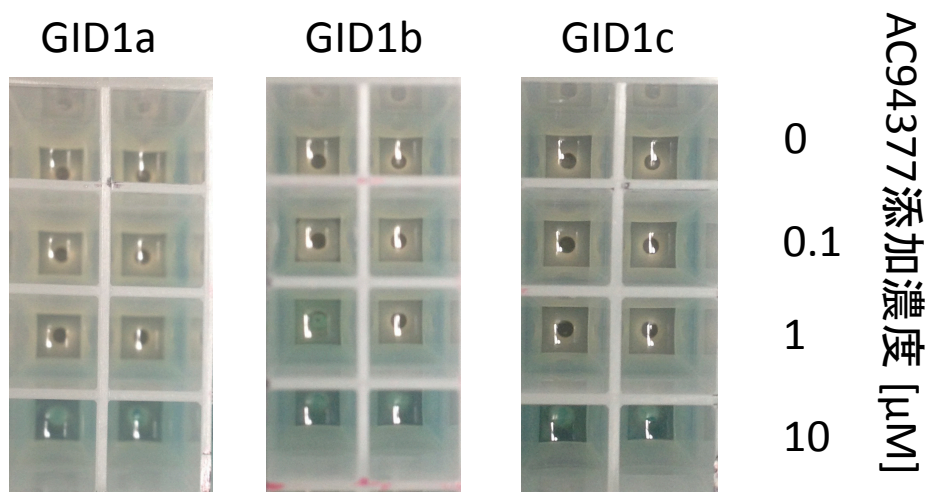


図3-19 酵母two-hybrid系による  
GID1、DELLA因子の複合体形成実験

(a) AC94377によるシロイヌナズナ三種のGID1とRGAの結合実験

(b) AC94377によるシロイヌナズナ三種のGID1とRGL2の結合実験

複合体が形成されると酵母が栄養制限培地で生育し、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼが酵母体外に分泌される。それに伴い、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼが系に添加してあったX- $\alpha$ -galを分解し青色を呈する。AC94377によりGID1とDELLA因子の結合が誘導されることが判明した。



### 3-3-3 AC94377 の作用解析② ―GA からの信号伝達に与える影響―

3-2-3 項で用いた *pRGA::GFP-RGA* 形質転換体に AC94377 を処理して GFP 蛍光の消失状況を解析した。終濃度 30  $\mu$ M の AC94377 溶液に形質転換体の幼植物体を浸漬し、一定時間が経過した時点の蛍光を観察した。その結果、GA 処理区と同様に AC94377 処理区においても、蛍光の消失が観察された(図 3-20)。そこで、AC94377 が GA 応答性遺伝子の発現状況に与える影響について、GA からの信号伝達を活性化することが明らかとなった 67D の場合と同様の要領で調べた。解析対象とした遺伝子は 4 種あり、うち 2 種は 3-2-3 項においても用いた GA 生合成酵素遺伝子 *AtGA20ox2* と *AtGA3ox1* で、これらはフィードバック制御機構が働くため GA 投与に伴って発現量が低下することが知られている。そして他の 2 種は、マイクロアレイ解析に関するオープンな情報(Goda *et al.*, 2008)に基づいて選抜した GA 応答性遺伝子 *alpha-expansin 1 (EXP1, At1g69530)* と *cysteine proteinase1 (CP1, At4g36880)* で、GA 投与に伴ってこれらの発現量は増加することが知られている。これら 4 種を対象として、AC94377 が GA からの信号と同様な信号を植物体に伝えている可能性について、その発現量の変動状況を調べることで判断を下すことにした。播種後 14 日目のシロイヌナズナ幼植物体を 50  $\mu$ M の AC94377 を添加した液体培地中に 1、3、6 時間浸漬してから収穫した後、全 RNA を調製して各遺伝子に対する特異的プライマー(Ogawa *et al.*, 2003; Goda *et al.*, 2008)と Real time-PCR 装置を用いて発現状況を解析した。その結果図 3-21 に示すように、各遺伝子の変動状況は GA 投与時、67D 投与時と同様であり、この試験からも AC94377 が GA と同様に GA 応答性遺伝子の発現に影響を与えていることが判明した。

### 3-3-4 AC94377 の作用解析③ ―受容体結晶構造情報を用いた *in silico* 解析―

3-2-4 項で実施した 67D と GA 受容体との結合シミュレーションの解析例に

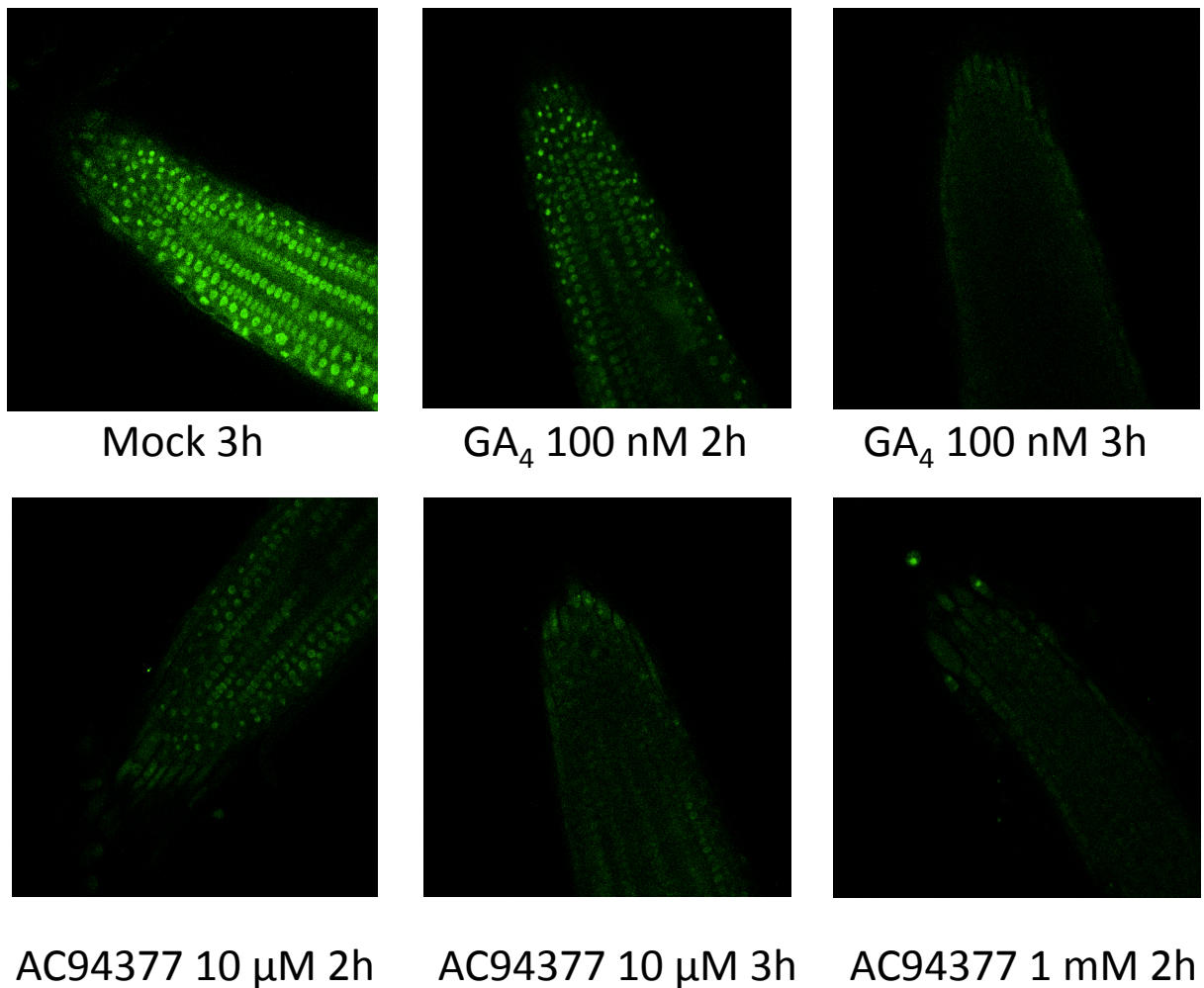


図3-20 AC94377によるRGAの消失の確認

*pRGA::GFP-RGA*はシロイヌナズナにおけるDELLA因子の一種RGAのレポーター発現ラインであり、根の細胞の核に局在するGFP融合RGAを共焦点レーザー顕微鏡で観察できる。このGFP蛍光はGAによるRGAの分解によって消失する。AC94377投与時にも同様の蛍光の消失が見られた。図は生育一週間後の*pRGA::GFP-RGA*幼植物体を観察したもの。

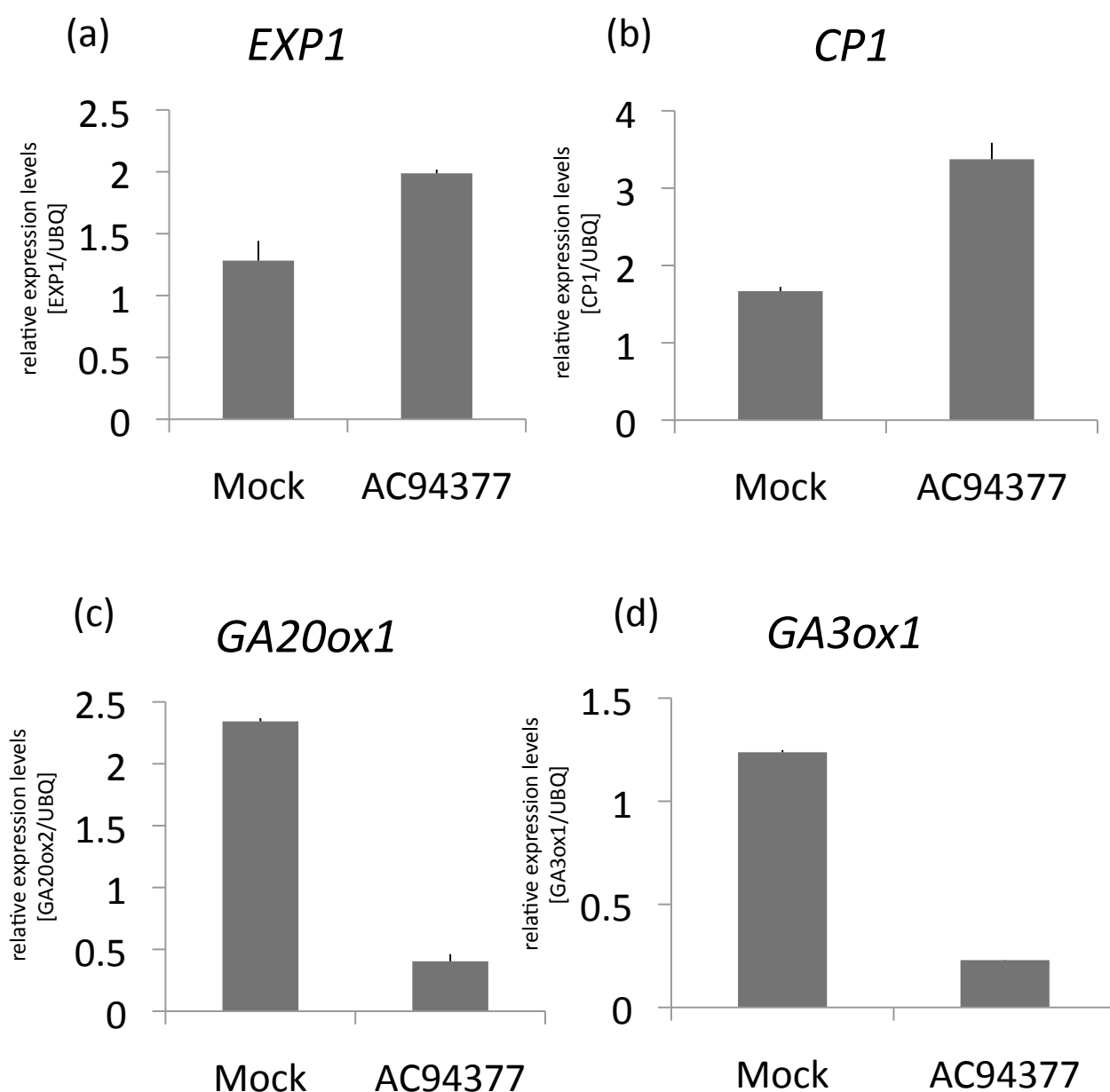


図3-21 応答性遺伝子の発現状況

各GA応答性遺伝子のAC94377に対する応答。n=2。エラーバーはSEを示す。

(a) *Alpha-expansin 1*遺伝子 (*EXP1*, AT1G69530) AC94377 50  $\mu$ M 6時間処理

(b) *cysteine proteinase1*遺伝子 (*CP1*, AT4G36880) AC94377 50  $\mu$ M 1時間処理

(c) GA生合成*AtGA20ox2* (AT5G51810) AC94377 50  $\mu$ M 3時間処理

(d) GA生合成*AtGA3ox1* (AT1G15550) AC94377 50  $\mu$ M 3時間処理

GA処理に伴い発現量が増加する*EXP1*、*CP1*、逆に発現量が減少するGA生合成酵素遺伝子の*AtGA20ox2*、*AtGA3ox1*に対して試験した。AC94377処理でMock処理と比べGAと同様の傾向が観察された。

倣い、AC94377 についても受容体との結合様式をシミュレートした。解析ソフト Surflex を用いて得た AC94377 と GID1a との結合シミュレーションの結果を図 3-22 に示す。これによると、本来であれば GA 分子内の A 環部分構造が位置する受容体ポケット部位に、AC94377 分子内のシクロヘキサン部分構造とアミド部分構造がうまく収まり、かつ、GA 分子内の B 環部分構造および C 環部分構造が本来なら位置する部位に AC94377 分子内のフタルイミド部分構造がうまく収まるとの計算結果を得た。この結合予測状態をさらに微視的に観察したところ、AC94377 分子内のアミド部分における水素原子が、受容体分子内の  $^{190}\text{Asp}$  や、 $^{127}\text{Tyr}$  および  $^{322}\text{Tyr}$  の酸素原子と水素結合を形成することにより AC94377 の受容体への結合を強めているとの結果が得られた。今後は、実際にこれらの結合を念頭に置いた構造活性相関的追究を行い計算結果の正当性を検証していくことが AC94377 の活性発現機構を理解する上で重要になると考えている。

以上の結果を統合して考えると、長年その作用発現機構が不明とされてきた AC94377 は、67D と同様に受容体を經由する GA アゴニストであると結論できる。

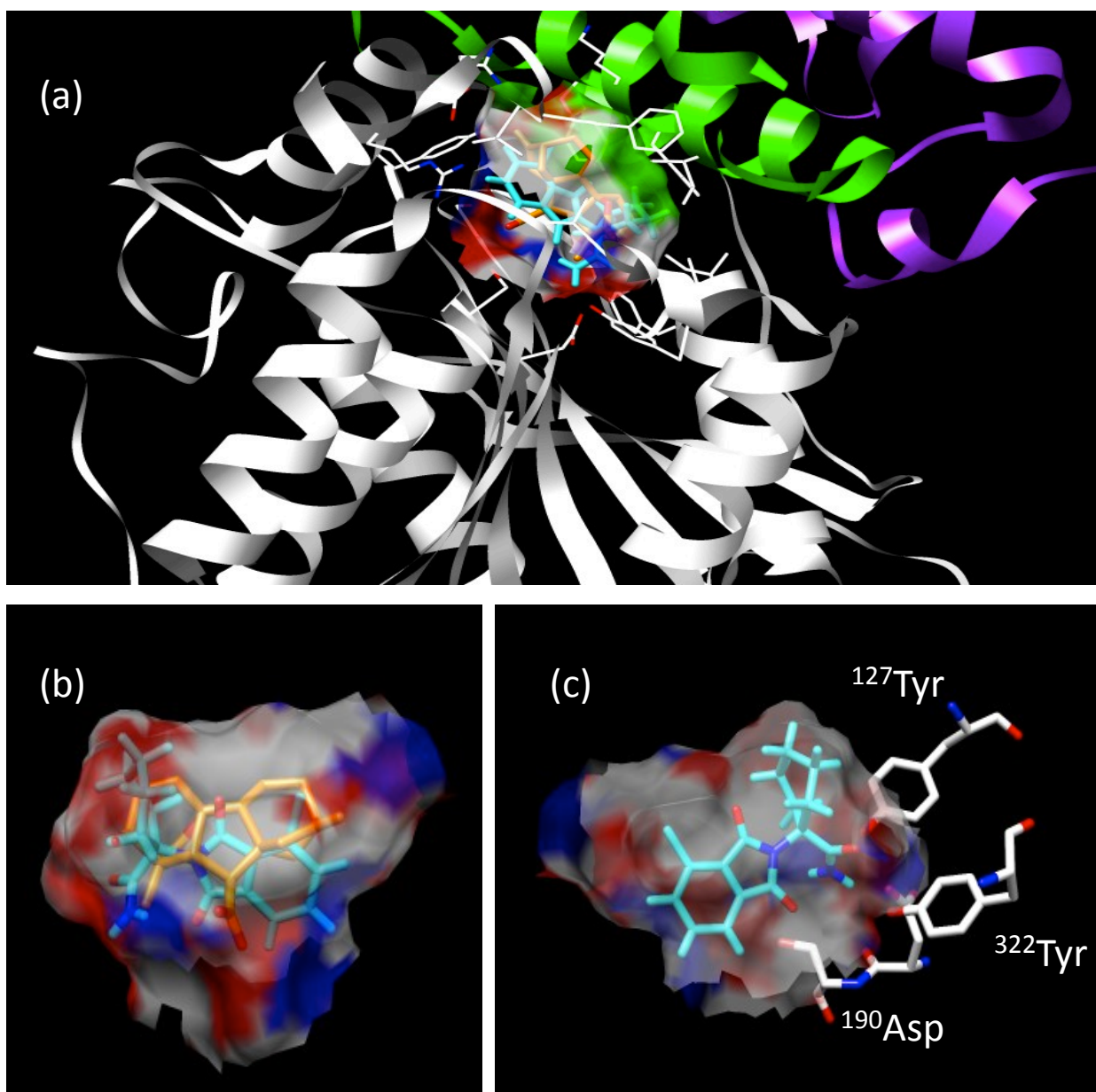


図3-22 ドッキングシミュレーションによる  
GID1とAC94377の結合様式

- (a) シロイヌナズナGA受容体GID1aとGA<sub>4</sub>やAC94377の結合状態
- (b) 結合ポケットの拡大図
- (c) GID1aとAC94377の結合状態予測

予測には解析用ソフトSurflexを用いて計算し、Chimeraで描画した。オレンジの化合物はGA<sub>4</sub>であり、この結合状態はすでに報告されているものである。青い化合物はAC94377の結合状態を示している。(a)において緑色の部分はLid構造、紫色の部分はDELLA因子を表す。

### 3-4 総合考察

本研究を通して、目的であった GA シグナルの正の作用の制御剤として「代謝酵素 GA2ox 選択的な機能制御剤」CBTC、「GA 受容体アゴニスト」67D と AC94377 を提示することに成功した。

67D と AC94377 に関しては最終的には受容体との共結晶構造情報を得てアゴニストであることを確定しなければいけないと考えている。CBTC や 67D に関しては構造類縁体の調製を継続することでさらに高効力・高選択性な化合物を見出すことができると思料しているが、これら化合物はジベレリンと比較して生産コストも低く抑えられる可能性が高いことから、将来の実用化が大いに期待できる。さらには、両者の効力が代謝酵素阻害活性と GA アゴニスト活性の異なる作用に基づくものであるため、共投与にともなってさらに互いの効率を高めることに繋がるかもしれない。他方、AC94377 に関しては既存製剤であるため、おそらく権利化などは想定することが困難であるが、67D およびその構造類縁体と合わせ十数種を越える GA アゴニストが実際に呈示できたことにより、序論で述べたとおり活性型 GA と言っても一括りにできるものではなく、いわゆる市販ベースにあるジベレリン酸( $GA_3$ )に類するものであるか、希少な  $GA_4$  と同様の効果を示すものであるか今後の検証を行う必要がある。本研究で見出した化合物群が農業現場に新たな流れを作ることを期待してやまない。

## 3-5 実験の部

### *in vitro* 実験

#### 3-5-1 67D、AC94377のGA受容体結合活性

[1,2,16,17- $^3\text{H}_4$ ]-16,17-dihydro-GA<sub>4</sub>[120Ci/mmol、4.55 TBq/mmol]のHPLC精製品(放射活性濃度 850,000 dpm/ $\mu\text{l}$ )について使用直前にTS buffer(20 mM Tris-HCL(pH7.6)、0.1 M NaCl)で30,000 dpm/ $\mu\text{l}$ に希釈して用いた。GID1溶液のみの結合活性を測る場合は、1.5 ml容マイクロチューブに精製済みのリコンビナントAtGID1bタンパク質溶液300  $\mu\text{l}$ 、標識GA溶液50  $\mu\text{l}$ を加え攪拌し、5分後に無添加区(-cold GA区)には10%(v/v)エタノール溶液50  $\mu\text{l}$ を、非標識GA添加区(+cold GA区)には10%(v/v)エタノールに溶解した1 mM GA<sub>4</sub>溶液50  $\mu\text{l}$ を、試験区には試験化合物溶液50  $\mu\text{l}$ を加え攪拌し、15分間静置した後、40分間氷冷した。予め氷冷TS bufferを用いて平衡化しておいたディスポーザブルゲル濾過カラム(Nap<sup>TM</sup>5、GE Healthcare)によく冷やした反応液100  $\mu\text{l}$ を添加し、氷冷TS buffer 600  $\mu\text{l}$ で洗浄後、氷冷TS buffer 200  $\mu\text{l}$ を加えよう出液を別のマイクロチューブに回収した。液体シンチレーター(クリアゾル I、ナカライテスク)1 mlを加えて混合し、シンチレーションカウンター(LSC-6100、ALOKA)で放射活性を測定した。

#### 3-5-2 酵母Two-Hybrid系を用いたGID-DELLA複合体形成の検討

##### (1) 酵母生育用培地の調製

通常の酵母の生育には、Difco<sup>TM</sup> Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Becton, Dickinson and Company) 6.6 g、D-グルコース 20 g、Synthetic Complete Drop Out Mix 0.83 g、DW 1 Lを混合して121°C・15分間のオートクレーブ滅菌したもの(SD培地)を使用した。固形培地作製時は、上記の混液にBacto<sup>TM</sup> Agar (Becton, Dickinson and Company) 16.6 gを加えた。なお、Synthetic Complete Drop Out Mixの組成は以下の通り;adenine hemisulfate 2.0 g、L-arginine HCl 2.0 g、L-histidine 2.0 g、L-isoleucine 2.0 g、L-leucine 4.0 g、L-lysine HCl 2.0 g、L-methionine 2.0 g、L-phenylalanine 3.0 g、L-serine 2.0 g、L-threonine 2.0 g、L-tryptophan 3.0 g、L-tyrosine 2.0 g、uracil 1.2 g、L-valine 9.0 gの混合粉末。また、生育に関する制限条件として必要に応じてSynthetic Complete Drop Out Mixの中からadenine

hemisulfate、L-histidine、L-leucine、L-tryptophan、uracil の一部を加えない組成で培地を調製した。一方、特定の成分を後から添加する場合には、以下に示す終濃度になるように各 100 倍濃度のストック溶液を添加した。adenine hemisulfate 5 mg/mL、L-histidine 4 mg/mL、L-leucine 10 mg/mL、L-tryptophan 2 mg/mL、uracil 1 mg/mL。

## (2) Two-hybrid 系の実施

96 穴ディープウェルプレート (WATSON) の各ウェルに adenine hemisulfate、L-histidine、uracil、L-leucine、L-tryptophan を抜いた酵母液制限培地を 1.0 mL ずつ分注し、定常期の AtGID1b-RGL2 解析用酵母の懸濁液 2.5  $\mu$ L、6 mg/mL X- $\alpha$ -gal 5  $\mu$ L (終濃度 30  $\mu$ g/mL) を加えた。ポジティブ対照区では終濃度 0.1% (v/v) エタノール溶液を、ネガティブ対照区では終濃度 2  $\mu$ M となるように 0.1mM、1 mM GA<sub>4</sub>/10% (v/v) エタノール溶液を、試験区では上記の終濃度 2  $\mu$ M GA<sub>4</sub> 溶液および各試験化合物 5  $\mu$ L (1mg 分注品を 0.5 mL の DMSO 溶液としてストックしたもの) を添加し、30°C で 16 時間回転振盪培養した。常温・遮光条件下で 1 日間静置した後、両対照区間で発色状況に十分有意な差が認められることを確認した上で、試験区の呈色を観察した。

## *in vivo* 実験

### 3-5-3 GA アゴニストスクリーニング

1/2MS 培地中に Pac を 5  $\mu$ M と化合物ライブラリー (理研化合物ライブラリー) の試験化合物を平均終濃度が 5  $\mu$ M になるように添加し、MICROPLATE 12well (IWAKI) にて固化させたものとスクリーニング用のプレートとし、シロイヌナズナの滅菌、低温処理などの準備は 2-4-10(2) 項の手法に従った。種子は 10 個体/well 播種した。

### 3-5-4 DELLA タンパク質分解誘導活性

pRGA::GFP-RGA の種子を 2-4-10(2) 項の手法に従って滅菌、1/2MS 培地に播種し、2 日間低温処理を行った。23°C 連続光下で 5 日間生育させ、化合物を所定の濃度にした sDW に植物体を浸透させた。各処理時間において共焦点顕微鏡 LAM5 PASCAL Laser Scanning Microscope 700 (Carl Zeiss) を用いて GFP の蛍光を観察した。



### 3-5-5 遺伝子の発現に対する 67D、AC94377 の投与効果

#### (1) Real-time PCR による遺伝子発現量の解析

##### (a) 植物体の調製

上記の要領に従ってシロイヌナズナ種子を滅菌・低温処理・播種し、14 日間生育させた後、50  $\mu$ M の候補化合物入りの 1/2 MS 液体培地に浸漬して 1,3,6 時間経過ごとにサンプリングを行った。

##### (b) 植物体からの全 RNA の抽出

操作時は全てポリエチレン製手袋（サニメント手袋、井内）を着用した。予め液体窒素で冷却したサンプルをオートクレーブ済みの 1.5 mL 容マイクロチューブ内にてホモジェナイザーペッスル、ペッスルモーター（アズワン）を用いて粉末状に破碎した。以降は Total RNA Extraction Kit Mini (Plant, RBC Bioscience) を用いて以下の要領で RNA を抽出した。5  $\mu$ L の 2-メルカプトエタノール混合済み RB buffer 500  $\mu$ L を加えてボルテックスミキサーにより完全に粉末を懸濁後、常温で 5 分間静置した。懸濁液をフィルターカラムに入れて遠心分離 [条件 D; 10,800  $\times g$ 、常温、2 分、himac CF 15D2、HITACHI] を行い、カラムからの通過液を別の 1.5 mL 容マイクロチューブに移した。続いて 0.5 倍量 (v/v) のエタノールを加えて静かに混合後、混合液を RB カラムに入れて遠心分離 [条件 D] を行った。カラムからの通過液を除去後に 10  $\times$  DNase I Buffer 10  $\mu$ L、DNase I (RNase free, 30U) 6  $\mu$ L、sDW (RNase free) 100  $\mu$ L をカラムに加えて、常温で 10 分間静置した。W1 Buffer 400  $\mu$ L をカラムに入れて遠心分離 [条件 D] を行い、カラムからの通過液を除去後に Wash Buffer 600  $\mu$ L をカラムに加えて再度、遠心分離 [条件 D] した。通過液除去後、空のまま遠心分離 [条件 D] した後、カラムを別の 1.5 mL 容マイクロチューブ上に設置した。RNase-free water 50  $\mu$ L を加えて常温で 3 分間静置した後、遠心分離 [条件 D] を行い、通過液を回収することにより RNA 溶液を得た。

##### (c) cDNA の合成

得られた RNA 溶液について吸光光度計 (GeneQuant 100、GE Healthcare) により RNA 濃度を定量した後、RNA 1  $\mu$ g 分の溶液に対して sDW を加えて合計 10.5  $\mu$ L にし、70°C で 5 分間静置後、氷上にて急激に冷却した。この RNA 溶液に対し、4  $\mu$ L の 5  $\times$  first strand buffer、2  $\mu$ L の 0.1 M DTT、1  $\mu$ L の 2.5 mM dNTP mixture、0.5  $\mu$ L の RNase Inhibitor、1  $\mu$ L の M-MLV RTase (Invitrogen)、1  $\mu$ L の Oligo dT primer (Invitrogen) を混合し、37°C で 90 分逆転写反応を行った。反応後、90°C で 5 分間インキュベートして酵素を失活させ、冷却後に 20  $\mu$ L の sDW を加えて

cDNA 溶液を得た。

(d) Real-time PCR を用いた遺伝子発現量の解析

Real-time PCR は Thermal Cycler Dice RealTime System TP800 (TaKaRa) を用いた。

任意の cDNA 溶液の原液、10 倍希釈 (v/v) 液、100 倍希釈 (v/v) 液の希釈系列を調製して検量線作製に用いた。解析サンプルは 10 倍希釈 (v/v) 液を用いて PCR を行い、1 チューブ当たりの反応溶液は、sDW 8  $\mu$ L、SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) 10  $\mu$ L、10  $\mu$ M 5'プライマー0.4  $\mu$ L、10  $\mu$ M 3'プライマー0.4  $\mu$ L、cDNA テンプレート 2  $\mu$ L とした。反応条件は、まず 95°C で 10 秒間保った後、[95°C・5 秒、60°C・30 秒] のサイクルを 40 回繰り返した。各反応チューブにおける Ct 値、最終的な相対定量値は付属ソフトウェアを用いて算出した。用いたプライマーは以下の通り。

*Ubiquitin-conjugating enzyme* の 5'プライマー、5'-CTACTGAAAGGGCTCATCGC-3'

*Ubiquitin-conjugating enzyme* の 3'プライマー、5'-ACGGACCGGCTAATACTGTC-3'

*AtGA20ox2* の 5'プライマー、5'-CCCAAGGCTTTTCGTTGTCAA-3'

*AtGA20ox2* の 3'プライマー、5'-CCGCTCTATGCAAACAGCTCT-3'

*AtGA3ox1* の 5'プライマー、5'-TGCCTTCCAAATCTCAAACC-3'

*AtGA3ox1* の 3'プライマー、5'-ACCGGTGAGAACTCAATGTC-3'

*AtEXP1* の 5'プライマー、5'-AACGCACACGCCACATTCTAC-3'

*AtEXP1* の 3'プライマー、5'-TTTCCGTATCCACAAGCACCTC-3'

*AtCP1* の 5'プライマー、5'-GGAGACAGAAAGGAGCCGTTAA-3'

*AtCP1* の 3'プライマー、5'-GTTCGAAAACGCCCAACAAC-3'

## 有機合成実験

### 3-5-6 67Dの構造展開

#### 9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-acetic anhydride

100 ml フラスコにアントラセンを 7.0 g、マレイン酸を 19 g 入れ、トルエン 140 ml に溶解した。攪拌しながら 120~130°C のオイルバス中で 4 h 還流した。析出した結晶を限外濾過し、酢酸エチルで洗って 9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-acetic anhydride 9.0 g を得た。

(S)-3-phenyl-2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)-  
propanoic acid (67D)

100 ml なすフラスコに 9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-acetic anhydride 1.00 g ( $0.36 \times 10^{-2}$  mol), L-phenylalanine 0.66 g ( $0.40 \times 10^{-2}$  mol)を入れ酢酸 20 ml に溶解した。攪拌しながら 120~130°C のオイルバス中で 12 h 還流した。反応後、減圧濃縮した。残留物に塩酸 (水:12N 塩酸=100 ml:5 ml) を攪拌しながら少しずつ加えた。白い沈殿物を限外濾過し、水で洗った後、減圧下で乾燥させ、酢酸に溶解させた。水を加えて再結晶し、(S)-3-phenyl-2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)-propanoic acid 1.2 g (77.0 %) を得た。

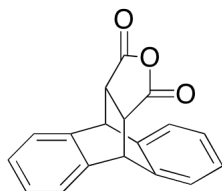
他の 67D 骨格も同様の反応を行い合成した。

(S)-3-phenyl-2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)-  
propanoic acid methyl ester (67D-13)

50 ml なすフラスコに 67D 1.70 g ( $4.0 \times 10^{-3}$  mol)を入れ、メタノールを 10 ml 加えた。氷冷し、攪拌しながら塩化チオニル 1.5 ml ( $2.1 \times 10^{-2}$  mol)を少しずつ加えた。24 時間室温で攪拌した後、減圧濃縮して残留物を減圧下で乾燥させ、酢酸に溶解させた。水を加えて再結晶し、(S)-3-phenyl-2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)propanoic acid methyl ester 1.3 g (74.3%)を得た。

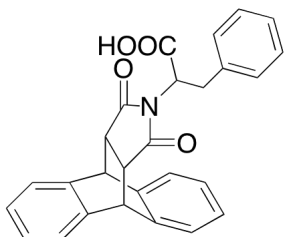
67D-11 も 67D-5 を同様にメチルエステル化することで合成した。

9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-acetic anhydride



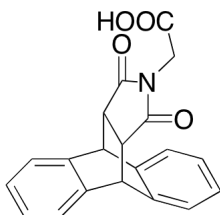
$^1\text{H}$  NMR(500MHz  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  3.52–3.53(dd, 2H, 11,12-*H*),  $\delta$  4.82–4.83(d, 2H, 9,10-*H*),  $\delta$  7.19–7.40(m, 8H, Ar*H*)

(S)-3-phenyl-2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)-  
propanoic acid (67D)



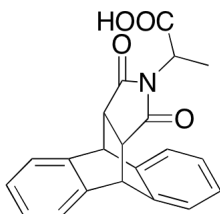
$^1\text{H}$  NMR(500MHz  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  2.50–2.54(dd, 1H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  3.03–3.06(dd, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  3.15–3.18(dd, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  3.20–3.24(dd, 1H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  4.60–4.63(dd, 1H,  $\text{CHCOOH}$ ),  $\delta$  4.72(d, 1H, 9,10- $H$ ), 4.78–4.79(d, 1H, 9,10- $H$ ),  $\delta$  7.02–7.37(m, 13H,  $\text{ArH}$ )

2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)-acetic acid (67D-2)



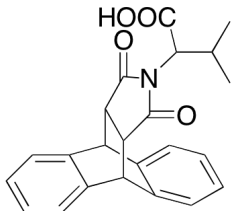
$^1\text{H}$  NMR(500MHz  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  1.25(s, 2H,  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ),  $\delta$  3.31–3.33(d, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  3.84–3.86(d, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  4.80–4.81(d, 2H, 9,10- $H$ ),  $\delta$  7.02–7.37(m, 8H,  $\text{ArH}$ )

(S)-2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)-propanoic acid  
(67D-3)



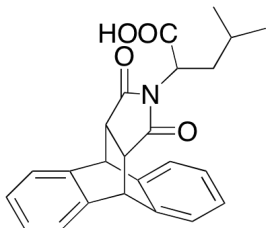
$^1\text{H}$  NMR(500MHz  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  0.78–0.79(d, 3H,  $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  3.20–3.22(dd, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  3.27–3.29(dd, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  4.39–4.43(q, 1H,  $\text{CHCOOH}$ ),  $\delta$  4.78–4.80(dd, 2H, 9,10- $H$ ),  $\delta$  7.11–7.39(m, 8H,  $\text{ArH}$ )

(S)-3-methyl-2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)-  
butyric acid (67D-4)



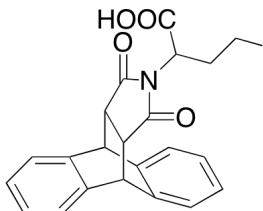
$^1\text{H}$  NMR(500MHz  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  0.22–0.23(d, 3H,  $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  0.74–0.76(d, 3H,  $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  2.23–2.27(q, 1H,  $\text{CH}$ ),  $\delta$  3.25–3.27(dd, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  3.29–3.31(dd, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  4.13–4.14(d, 1H,  $\text{CHCOOH}$ ),  $\delta$  4.80–4.83(d, 2H, 9,10- $H$ ),  $\delta$  7.10–7.40(m, 8H,  $\text{ArH}$ )

(S)-4-methyl-2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)-  
pentanoic acid (67D-5)



$^1\text{H}$  NMR(500MHz  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  0.57–0.59(d, 3H,  $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  0.61–0.62(d, 3H,  $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  1.49–1.55(m, 2H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  2.08–2.14(m, 1H,  $\text{CH}$ ),  $\delta$  3.21–3.24(dd, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  3.28–3.30(dd, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  4.45–4.48(dd, 1H,  $\text{CHCOOH}$ ),  $\delta$  4.78(d, 2H, 9,10- $H$ ),  $\delta$  7.10–7.37(m, 8H,  $\text{ArH}$ )

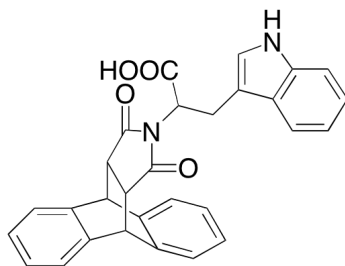
2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)-  
pentanoic acid (67D-6)



$^1\text{H}$  NMR(500MHz  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  0.18–0.24(m, 1H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ),  $\delta$  0.51–0.57(m, 1H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ),  $\delta$  0.61–0.64(t, 3H,  $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  1.43–1.48(m, 1H,  $\text{CHCH}_2$ ),  $\delta$  1.70–1.75(m, 1H,

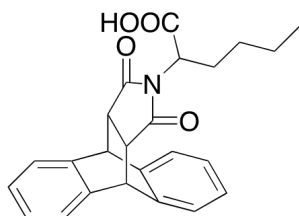
$\text{CHCH}_2$ ),  $\delta$  3.22–3.24(dd, 1H, 11,12-*H*),  $\delta$  3.28–3.31(dd, 1H, 11,12-*H*),  $\delta$  4.34–4.37(dd, 1H,  $\text{CHCOOH}$ ),  $\delta$  4.77–4.79(dd, 2H, 9,10-*H*),  $\delta$  7.10–7.40(m, 8H, *ArH*)

(*S*)-3-(1H-indol-3-yl)-2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)-propanoic acid (67D-7)



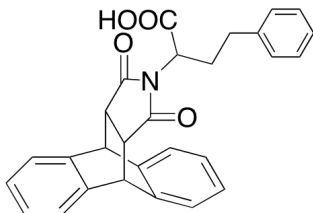
$^1\text{H}$  NMR(500MHz  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  2.57–2.62(dd, 1H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  2.98–3.00(dd, 1H, 11,12-*H*),  $\delta$  3.13–3.16(dd, 1H, 11,12-*H*),  $\delta$  3.30–3.35(dd, 1H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  4.66–4.67(dd, 1H,  $\text{CHCOOH}$ ),  $\delta$  4.70(d, 1H, 9,10-*H*), 4.79–4.80(d, 1H, 9,10-*H*),  $\delta$  7.02–7.37(m, 13H, *ArH*)

2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)-hexanoic acid (67D-8)



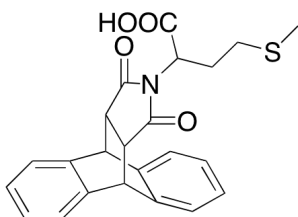
$^1\text{H}$  NMR(500MHz  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  0.27–0.32(m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ),  $\delta$  0.57–0.63(m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ),  $\delta$  0.75–0.78(t, 3H,  $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  1.01–1.10(m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ),  $\delta$  1.35–1.43(m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2$ ),  $\delta$  1.74–1.81(m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2$ ),  $\delta$  3.21–3.24(dd, 1H, 11,12-*H*),  $\delta$  3.27–3.30(dd, 1H, 11,12-*H*),  $\delta$  4.30–4.33(dd, 1H,  $\text{CHCOOH}$ ),  $\delta$  4.77–4.79(dd, 2H, 9,10-*H*),  $\delta$  7.10–7.40(m, 8H, *ArH*)

(S)-4-phenyl-2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)-  
butanoic acid (67D-9)



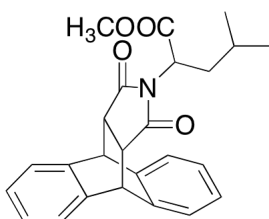
$^1\text{H}$  NMR(500MHz  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  1.84–1.87(dd, 1H,  $\text{CHCH}_2$ ),  $\delta$  1.88–1.92(m, 2H,  $\text{CCH}_2$ ),  $\delta$  2.06–2.09(dd, 1H,  $\text{CHCH}_2$ ),  $\delta$  3.14–3.17(dd, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  3.19–3.21(dd, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  4.35–4.38(dd, 1H,  $\text{CHCOOH}$ ), 4.77–4.78(d, 1H, 9,10- $H$ ), 4.78–4.79(d, 1H, 9,10- $H$ ),  $\delta$  7.02–7.37(m, 13H,  $\text{ArH}$ )

(S)-4-methylthio-2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)-  
butanoic acid (67D-10)



$^1\text{H}$  NMR(500MHz  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  1.46–1.49(dd, 1H,  $\text{SCH}_2$ ),  $\delta$  1.62–1.66(t, 2H,  $\text{CHCH}_2$ ),  $\delta$  1.95(s, 3H,  $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  2.05–2.09(dd, 1H,  $\text{SCH}_2$ ),  $\delta$  3.22–3.24(dd, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  3.30–3.32(dd, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  4.62–4.64(dd, 1H,  $\text{CHCOOH}$ ), 4.78–4.79(dd, 2H, 9,10- $H$ ),  $\delta$  7.14–7.37(m, 8H,  $\text{ArH}$ )

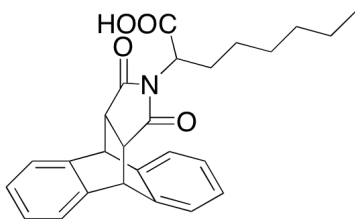
(S)-4-methyl-2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)-  
pentanoic acid methyl ester (67D-11)



$^1\text{H}$  NMR(500MHz  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  0.57–0.58(d, 3H,  $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  0.60–0.61(d, 3H,  $\text{CH}_3$ ),  $\delta$

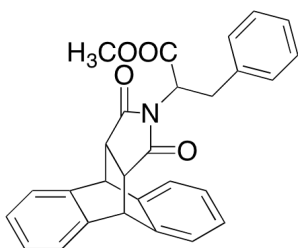
1.50–1.57(m, 2H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  2.12–2.17(m, 1H,  $\text{CH}$ ),  $\delta$  3.22–3.25(dd, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  3.29–3.32(dd, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  3.61(s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ )  $\delta$  4.41–4.44(dd, 1H,  $\text{CHCOOCH}_3$ ),  $\delta$  4.77–4.77(d, 1H, 9,10- $H$ ),  $\delta$  4.78–4.79(d, 1H, 9,10- $H$ ),  $\delta$  7.10–7.37(m, 8H,  $\text{ArH}$ )

2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)-octanoic acid  
(67D-12)



$^1\text{H}$  NMR(500MHz  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  0.31–0.39(m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2$ ),  $\delta$  0.61–0.69(m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2$ ),  $\delta$  0.86–0.89(t, 3H,  $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  0.98–1.08(m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ),  $\delta$  1.08–1.18(m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ ),  $\delta$  1.20–1.27(m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ),  $\delta$  1.33–1.40(m, 1H,  $\text{CHCH}_2$ ),  $\delta$  1.73–1.80(m, 1H,  $\text{CHCH}_2$ ),  $\delta$  3.22–3.24(dd, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  3.27–3.30(dd, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  4.30–4.33(dd, 1H,  $\text{CHCOOH}$ ),  $\delta$  4.77–4.79(dd, 2H, 9,10- $H$ ),  $\delta$  7.09–7.39(m, 8H,  $\text{ArH}$ )

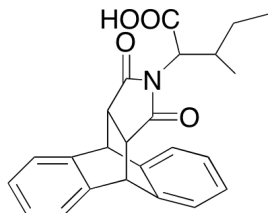
(S)-3-phenyl-2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)-  
propanoic acid methyl ester (67D-13)



$^1\text{H}$  NMR(500MHz  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  2.41–2.46(dd, 1H,  $\text{CHCH}_2$ ),  $\delta$  2.99–3.01(dd, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  3.13–3.15(dd, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  3.19–3.23(dd, 1H,  $\text{CHCH}_2$ ),  $\delta$  3.47(s, 3H,  $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  4.53–4.56(dd, 1H,  $\text{CHCOOCH}_3$ ),  $\delta$  4.70–4.71(d, 1H, 9,10- $H$ ),  $\delta$  4.77–4.78(d, 1H, 9,10- $H$ ),  $\delta$  7.01–7.36(m, 13H,  $\text{ArH}$ )



(S)-3-methyl-2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)-  
pentanoic acid (67D-14)



$^1\text{H}$  NMR(500MHz  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  0.23–0.26(m, 2H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  0.56–0.59(t, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ),  
 $\delta$  0.72–0.73(d, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ),  $\delta$  1.96–1.97(m, 1H,  $\text{CH}$ ),  $\delta$  3.23–3.25(dd, 1H, 11,12- $H$ ),  
 $\delta$  3.27–3.30(dd, 1H, 11,12- $H$ ),  $\delta$  4.17–4.19(d, 1H,  $\text{CHCOOH}$ ) ,  $\delta$  4.78–4.79(d, 2H,  
9,10- $H$ ),  $\delta$  7.10–7.37(m, 8H,  $\text{ArH}$ )

HRMS (ESI+)  $m/z$  calcd. for  $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{NO}_4$  (M+H) 388.1554, found 388.1550

## *in silico* 解析

### 2-4-12 GID1aとのドッキングシミュレーション

結晶構造情報はPDB ID: 2ZSIを用いた。

2-4-12と同様の手法を用いてドッキングシミュレーションを行った。

## 参考文献

- Araki, Y., Miyawaki, A., Miyashita, T., Mizutani, M., Hirai, N., & Todoroki, Y. (2006). A new non-azole inhibitor of ABA 8'-hydroxylase: effect of the hydroxyl group substituted for geminal methyl groups in the six-membered ring. *Bioorg Med Chem Lett*, 16(12), 3302-3305.
- Ariizumi, T., & Steber, C. M. (2007). Seed germination of GA-insensitive *sleepy1* mutants does not require RGL2 protein disappearance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19(3), 791-804.
- Bachmann, WE, & Kloetzel, MC. (1938). The reaction between maleic anhydride and polycyclic hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society*, 60(2), 481-485.
- Bender, C. L., Alarcon-Chaidez, F., & Gross, D. C. (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63(2), 266-292.
- Blake, P. S., Browning, G., Benjamin, L. J., & Mander, L. N. (2000). Gibberellins in seedlings and flowering trees of *Prunus avium* L. *Phytochemistry*, 53(4), 519-528.
- Chandler, P. M., Harding, C. A., Ashton, A. R., Mulcair, M. D., Dixon, N. E., & Mander, L. N. (2008). Characterization of gibberellin receptor mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Mol Plant*, 1(2), 285-294.
- Da Costa, Cristiane F., Pinheiro, Alessandra C., De Almeida, Mauro V., Lourenço, Maria C. S., & De Souza, Marcus V. N. (2012). Synthesis and Antitubercular Activity of Novel Amino Acid Derivatives. *Chem Biol Drug Des*, 79, 216-222.
- Da Costa, Cristiane F., Pinheiro, Alessandra C., De Almeida, Mauro V., Lourenço, Maria C. S., & De Souza, Marcus V. N. (2012). Synthesis and Antitubercular Activity of Novel Amino Acid Derivatives. *Chemical Biology & Drug Design*, 79(2), 216-222.
- Diels O and Alder K. (1931). *Justus Liebigs Ann.* 490: 236-42
- Dill, A., Jung, H. S., & Sun, T. P. (2001). The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(24), 14162-14167.
- Donald, William W. (1985). AC-94,377 For Breaking Dormancy of Wild Mustard Seed in Soil. *Farm Research*, 43(1), 28-31.

- Ferro, N., Bredow, T., Jacobsen, H. J., & Reinard, T. (2010). Route to novel auxin: auxin chemical space toward biological correlation carriers. *Chem Rev*, 110(8), 4690-4708.
- Goda, H., Sasaki, E., Akiyama, K., Maruyama-Nakashita, A., Nakabayashi, K., Li, W., . . . Shimada, Y. (2008). The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *Plant J*, 55(3), 526-542.
- Gott, Kathleen A, & Thomas, Tudor H. (1986). Comparative effects of gibberellins and an N-substituted phthalimide on seed germination and extension growth of celery (*Apium graveolens* L.). *Plant growth regulation*, 4(3), 273-279.
- Gubler, F., Chandler, P. M., White, R. G., Llewellyn, D. J., & Jacobsen, J. V. (2002). Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression. *Plant Physiol*, 129(1), 191-200.
- Hedden, Peter, & Graebe, JanE. (1985). Inhibition of gibberellin biosynthesis by paclobutrazol in cell-free homogenates of *Cucurbita maxima* endosperm and *Malus pumila* embryos. *J Plant Growth Regul*, 4, 111- 122.
- Huestis, Laurence D, Walsh, Marilyn L, & Hahn, Nancy. (1965). The Herz reaction. The formation and hydrolysis of Herz compounds. *The Journal of Organic Chemistry*, 30(8), 2763-2766.
- Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Sato, Y., Ashikari, M., & Matsuoka, M. (2002). The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *Plant Cell*, 14(1), 57-70.
- Jung, J. (1967). [Synthetic growth regulators, particularly chlorocholine chloride]. *Naturwissenschaften*, 54(14), 356-360.
- Kobayashi, M., Gaskin, P., Spray, C. R., Suzuki, Y., Phinney, B. O., & MacMillan, J. (1993). Metabolism and Biological Activity of Gibberellin A4 in Vegetative Shoots of *Zea mays*, *Oryza sativa*, and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 102(2), 379-386.
- Koda, Yasunori, Takahashi, Kiyoshi, Kikuta, Yosio, Greulich, Friedemann, Toshima, Hiroaki, & Ichihara, Akitami. (1996). SIMILARITIES OF THE BIOLOGICAL ACTIVITIES OF CORONATINE AND CORONAFACIC ACID TO THOSE OF JASMONIC ACID. *Phytochemistry*, 41(1), 93-96.
- Koornneef, M., & van der Veen, J. H. (1980). Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) heynh. *Theor Appl Genet*, 58(6), 257-263.

- Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., . . . Nambara, E. (2004). The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J*, 23(7), 1647-1656.
- Lo, S. F., Yang, S. Y., Chen, K. T., Hsing, Y. I., Zeevaart, J. A., Chen, L. J., & Yu, S. M. (2008). A novel class of gibberellin 2-oxidases control semidwarfism, tillering, and root development in rice. *Plant Cell*, 20(10), 2603-2618.
- Magome, H., Nomura, T., Hanada, A., Takeda-Kamiya, N., Ohnishi, T., Shinma, Y., . . . Yamaguchi, S. (2013). CYP714B1 and CYP714B2 encode gibberellin 13-oxidases that reduce gibberellin activity in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(5), 1947-1952.
- Mallakpour, Shadpour, & Rafiee, Zahra. (2009). Expeditious synthesis of novel aromatic polyamides from 5-[3-phenyl-2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)-propanoylamino]isophthalic acid and various diamines using microwave-assisted polycondensation. *Reactive & Functional Polymers*, 69, 252-258.
- Murase, K., Hirano, Y., Sun, T. P., & Hakoshima, T. (2008). Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature*, 456(7221), 459-463.
- Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y. C., Park, S. H., Ueguchi-Tanaka, M., . . . Yamaguchi, I. (2006). Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. *Plant J*, 46(5), 880-889.
- Neo, Ana G, Carrillo, Rosa M, & Marcos, Carlos F. (2011). A straightforward synthesis of 2-aminobenzothiazoles from Herz compounds. *Organic & biomolecular chemistry*, 9(13), 4850-4855.
- Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y., & Yamaguchi, S. (2003). Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. *Plant Cell*, 15(7), 1591-1604.
- Olszewski, N., Sun, T. P., & Gubler, F. (2002). Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell*, 14 Suppl, S61-80.
- Park, S. H., Nakajima, M., Sakane, M., Xu, Z. J., Tomioka, K., & Yamaguchi, I. (2005). Gibberellin 2-oxidases from seedlings of adzuki bean (*Vigna angularis*) show high gibberellin-binding activity in the presence of 2-oxoglutarate and Co<sup>2+</sup>. *Biosci Biotechnol Biochem*, 69(8), 1498-1507.

- Park, S. Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., . . . Cutler, S. R. (2009). Absciscic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, 324(5930), 1068-1071.
- Pearce, D. W., Hutt, O. E., Rood, S. B., & Mander, L. N. (2002). Gibberellins in shoots and developing capsules of *Populus* species. *Phytochemistry*, 59(6), 679-687.
- Ricci, A., & Bertolotti, C. (2009). Urea derivatives on the move: cytokinin-like activity and adventitious rooting enhancement depend on chemical structure. *Plant Biol (Stuttg)*, 11(3), 262-272.
- Rieu, I., Eriksson, S., Powers, S. J., Gong, F., Griffiths, J., Woolley, L., . . . Phillips, A. L. (2008). Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20(9), 2420-2436.
- Rodaway, Shirley J., Gates, Donald W., & Brindle, Cheimi. (1991). Control of early seedling growth in varietal lines of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*), durum wheat (*Triticum durum*), and barley (*Hordeum vulgare*) in response to the phthalimide growth regulant, AC 94,377. *Plant growth regulation*, 10, 243-259.
- Saito, S., Hirai, N., Matsumoto, C., Ohigashi, H., Ohta, D., Sakata, K., & Mizutani, M. (2004). *Arabidopsis* CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiol*, 134(4), 1439-1449.
- Santes, Cristina M., Hedden, Peter, Gaskin, Paul, & Garcia-Martinez, José L. (1995). Gibberellins and related compounds in young fruits of pea and their relationship to fruit-set. *Phytochemistry*, 40(5), 1347-1355.
- Schomburg, F. M., Bizzell, C. M., Lee, D. J., Zeevaart, J. A., & Amasino, R. M. (2003). Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell*, 15(1), 151-163.
- Shimada, A., Ueguchi-Tanaka, M., Nakatsu, T., Nakajima, M., Naoe, Y., Ohmiya, H., . . . Matsuoka, M. (2008). Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature*, 456(7221), 520-523.
- Shiraiwa, Nobutaka, Kikuchi, Kaori, Honda, Ichiro, Shigyo, Masayoshi, Yamazaki, Hiroko, Tanaka, Daisuke, . . . Itai, Akihiro. (2011). Characterization of Endogenous Gibberellins and Molecular Cloning of a Putative Gibberellin 3-Oxidase Gene in Bunching Onion. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136(6), 382-388.

- Sun, T. P., & Kamiya, Y. (1994). The Arabidopsis GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell*, 6(10), 1509-1518.
- Suttle, J. C., & Hultstrand, J. F. (1987). Physiological Studies of a Synthetic Gibberellin-Like Bioregulator: II. Effect of Site of Application on Biological Activity. *Plant Physiol*, 84(4), 1068-1073.
- Suzuki, H., Park, S. H., Okubo, K., Kitamura, J., Ueguchi-Tanaka, M., Iuchi, S., . . . Nakajima, M. (2009). Differential expression and affinities of Arabidopsis gibberellin receptors can explain variation in phenotypes of multiple knock-out mutants. *Plant J*, 60(1), 48-55.
- Tanaka, Fred S, Wien, Ronald G, & Suttle, Jeffrey C. (1991). Synthesis and bioactivity of photoaffinity labels of the plant growth regulator 1-(3-chlorophthalimido) cyclohexanecarboxamide (AC 94377). *Journal of agricultural and food chemistry*, 39(3), 554-559.
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., . . . Matsuoka, M. (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, 437(7059), 693-698.
- Ueno, K., Araki, Y., Hirai, N., Saito, S., Mizutani, M., Sakata, K., & Todoroki, Y. (2005). Differences between the structural requirements for ABA 8'-hydroxylase inhibition and for ABA activity. *Bioorg Med Chem*, 13(10), 3359-3370.
- Ueno, K., Yoneyama, H., Mizutani, M., Hirai, N., & Todoroki, Y. (2007). Asymmetrical ligand binding by abscisic acid 8'-hydroxylase. *Bioorg Med Chem*, 15(18), 6311-6322.
- Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., . . . Yamaguchi, S. (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 455(7210), 195-200.
- Varbanova, M., Yamaguchi, S., Yang, Y., McKelvey, K., Hanada, A., Borochoy, R., . . . Pichersky, E. (2007). Methylation of gibberellins by Arabidopsis GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell*, 19(1), 32-45.
- Weiler, E. W., Kutchan, T. M., Gorba, T., Brodschelm, W., Niesel, U., & Bublitz, F. (1994). The Pseudomonas phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants. *FEBS Lett*, 345(1), 9-13.
- Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol*, 59, 225-251.

- Yamane, H., Fujioka, S., Spray, C. R., Phinney, B. O., Macmillan, J., Gaskin, P., & Takahashi, N. (1988). Endogenous Gibberellins from Sporophytes of Two Tree Ferns, *Cibotium glaucum* and *Dicksonia antarctica*. *Plant Physiol*, 86(3), 857-862.
- Yamauchi, Y., Takeda-Kamiya, N., Hanada, A., Ogawa, M., Kuwahara, A., Seo, M., . . . Yamaguchi, S. (2007). Contribution of gibberellin deactivation by AtGA2ox2 to the suppression of germination of dark-imbibed *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell Physiol*, 48(3), 555-561.
- Yoon, J. M., Nakajima, M., Mashiguchi, K., Park, S. H., Otani, M., & Asami, T. (2013). Chemical screening of an inhibitor for gibberellin receptors based on a yeast two-hybrid system. *Bioorg Med Chem Lett*, 23(4), 1096-1098.
- Zhu, Y., Nomura, T., Xu, Y., Zhang, Y., Peng, Y., Mao, B., . . . He, Z. (2006). ELONGATED UPPERMOST INTERNODE encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *Plant Cell*, 18(2), 442-456.
- Patent: Yuji Funaki, Toyonaka; Hirofumi Oshita, Takarazuka; Shizuya Tanaka, Minoo; Shigeo Yamamoto, Ikeda; Toshiro Kato, Ibaraki, all of Japan.  
1-Phenyl-2-azolyl-4,4-dimethyl-1-penten-3-ols and the fungicidal use thereof.  
937,384 (US).
- 板井章浩, 金城慶一, 久富哲也, 千郷峻弘, 田辺堅二, 本田久志: 植物化学調節学会  
第 43 回大会, 2008 年 10 月 29 日 30 日, 筑波  
須川瞬, 大川克哉, 小原均, 上野琴巳, 水谷正治, 轟泰司, 平井伸博, 近藤悟: 園芸大  
会 平成 20 年度春季大会, 2008 年 3 月 28~29 日, 厚木  
松井 弘之: ウメの生産安定に関する研究(課題番号 06660027) 平成6年度科学研究費  
補助金(一般研究C) 研究成果報告書