

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻
平成 23 年度博士課程 進学
氏 名 大谷 征史
指導教員名 浅見 忠男

論文題目

ジベレリン信号伝達制御剤の創製とその機能解析

1. 背景及び目的

植物ホルモンの 1 つであるジベレリン(GA)は、種子の発芽、茎や葉の伸長、花芽誘導、花器官の発達や種子の成熟など、植物の生活環における様々な生理現象を制御することで知られ、GA からの信号伝達を生物学的に制御する技術が、農業上広く利用されてきた。例えば、1940 年代頃から 1960 年代にかけて穀類の飛躍的増産が達成されたいわゆる「緑の革命」は、その好例と言える。同時期に産業として発達した化学肥料の量産と農地への大量投入により穀類の収量は増加したものの、過剰伸長による倒伏という新たな問題を生じた。その解決策として導入されたのが半矮性遺伝子の利用であった。この時に実用化された半矮性コムギ *Rht1* は、GA からの信号伝達を負に制御する因子 DELLA の機能獲得型変異体であり、他方、半矮性イネ *sd1* は、GA の生合成過程を担う C20 水酸化酵素 (GA20ox) の機能欠損型変異体であることが後の研究で明らかにされた。こうした

半矮性品種の利用で、化学肥料の大量投入による倒伏現象の抑制が可能になり収量を増加させることができるようになった。この農業上の革命は、1950 年を基準として 1984 年までに世界の穀物生産を 250%も増加させた。しかしながらこの食料生産の増加に伴うその後の爆発的な人口増加が再び食糧生産が需要に追いつかない事態を引き起こし、今後を見据えた「第 2 の緑の革命」が切望される状況に至っている。このような状況下、既存の農業技術のさらなる改良も重要な方策であろう。現在欧州におけるコムギ・オオムギ栽培では、GA 生合成阻害剤が倒伏防止策として積極的に利用されているが、この事実は化学的か生物学的かという制御法の違いはあっても GA 信号伝達過程の制御が以前にも増して食料の安定供給にとって重要な技術となる可能性を示唆している。

これまでに用いられている多くの GA 関連制御法は大部分が GA シグナルの負の制御法であり、花芽形成、花器官や種子の発達など GA 自体が有する農業上の有用性にもかかわらず、正の制御法が使われている例は少ない。そこで本博士論文研究では、GA からの信号伝達過程を化学的に制御することを目指し、特にこれまで開発例に乏しい GA 代謝酵素特異的な制御剤創製と、GA よりも廉価で同様の作用を植物にもたらすいわゆるアゴニスト探索を並行して進め、GA 受容体および代謝酵素を標的とする制御剤創製に向けた技術基盤の整備を図った。

2. ジベレリン代謝酵素制御剤の探索と作用解析

(1) ジベレリン代謝酵素制御剤の候補選抜 GA の代謝・不活性化過程として、①2 位水酸化、②6 位カルボキシル基に対するメチルエステル化、③配糖体化、④16・17 位末端メチレンに対するエポキシ化、⑤13 位水酸化などが知られる。このうち、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)における機能欠損型多重変異体の解析などから、代表的な GA 代謝過程は①2 位水酸化過程であり、その反応は 2-oxidase (GA2ox)と呼ばれる 2-オキソグルタル酸要求性ジオキシゲナーゼ (2ODD) が触媒することが報告されている。そこで、大腸菌発現系を用いて調製したシロイヌナズナ GA2ox の 2 位水酸化酵素活性に対する阻害活性を指標として、市販化合物ライブラリー中約 1,000 個の化合物に対して選抜を実施した。続いて、陽性候補のみを対象としてシロイヌナズナに対する投与効果を調べ、最終的に methyl 6-chloro-3H-1,2,3-benzodithiazole-4-carboxylate 2-oxide (略称 CBTC)が、発芽過程および幼植物体の生長過程に対して共に促進作用を示すこと

を明らかにした。

GA の生合成過程には、GA_{2ox} と同じく 2ODD 型酵素として上記 GA_{20ox} や GA の活性制御に直接関わる 3-oxidase (GA_{3ox}) が関与する。GA_{2ox} 特異的に制御する化合物をより効率的に選抜するため、酵素活性を指標とするのではなく基質 GA と GA_{2ox} との結合活性を指標として再選抜を計画した。酵素活性の消失に有効なコバルトイオン添加条件を採用して、ハイスループットな GA_{2ox} の GA 結合活性検出系を構築し、これを用いて約 10,000 種の化合物の中から GA 結合活性に対する阻害効力を示すものを選抜した。この系を用いた場合でも CBTC が選抜可能であることを確認しただけでなく、他の骨格を有する M14 が CBTC を越える高い GA 結合阻害活性を示すことを見出した。

(2) ジベレリン代謝酵素制御剤の作用解析 選抜した CBTC および M14 について、GA_{2ox} および GA_{3ox} に対する阻害効力を *in vitro* で検討した。LC/MS/MS を用いて、各酵素反応を定量的に解析したところ、CBTC は GA_{3ox} を阻害せず、GA_{2ox} 特異的に作用するのに対して、M14 は GA_{2ox} だけでなく GA_{3ox} に対しても強い阻害活性を示した。この結果は、CBTC がシロイヌナズナの発芽過程や生長過程に対して GA と同様の生長促進作用を示す一方、M14 が抑制的に機能するという事実を分子レベルで説明することを可能にしている。

CBTC の GA_{2ox} 特異性について、より詳細な検討を類似の化合物を用いて行った。市販化合物と有機合成により計 18 種のアナログ化合物を有機合成により準備し、GA_{2ox}・GA_{3ox} の阻害効果を評価したところ、①CBTC 同様に GA_{2ox} 特異性を示すもの、②M14 同様に GA_{2ox}・GA_{3ox} とも阻害効力を示すもの、③新たに GA_{3ox} 特異性を示すもの、に分類された。構造上のわずかな差異が制御対象を大きく変化した点は、酵素内における基質 GA 結合部位を CBTC が標的とするものの状況証拠と捉えている。最終的な結論は、GA_{2ox}-CBTC 共結晶構造の解明に糸口を求めようと考え、それに向けた GA_{2ox} 再調製と精製についても検討を加えた。

3. ジベレリン様活性化合物の探索と作用解析

(1) 新規ジベレリン様活性化合物の候補選抜と作用解析 GA の生合成阻害剤パクロブトラゾール(PAC)の投与はシロイヌナズナ種子の発芽を阻害する。この

状況においてGAの共投与は発芽を回復させる。そこで、この系を用いて約4000種の化合物中からPACとの共投与により発芽回復傾向を示すGA様活性化化合物候補を選抜した。結果、67Dを陽性と判定し、発芽過程だけに留まらず幼植物体の伸長過程も促進することを確認した。植物体を用いる解析としてさらに、GA生合成欠損変異体に対しても67Dが発芽促進効果を示すことを確認した。続いて、RI標識GAを用いてGA受容体に対する67Dの結合活性を調べたところ、受容体に結合することが判明した。次に、負の制御因子DELLAのGA依存的な分解について調べ、67D投与によってもGA同様にDELLA因子の分解が認められることを確認した。さらに、67D投与によりGA応答性遺伝子がGA同様にフィードバック制御を受けることも確認した。これらの結果は、67Dが受容体に対するGAアゴニストであることを強く示唆する。なお、有機合成の手法を用いて67Dの構造的類似化合物を13種調製してそれらの効力を検討したところ、構造を変化させた67D-14がより強いGA様の活性を示すことが明らかになった。

4. まとめ

本研究の進展によりGAの信号伝達効率の向上に役立つ代謝酵素や受容体の制御剤候補物質を複数種提示できた。GAは、植物の生長調節剤として広く利用されるがそれは一部の活性型GAに限られ、醗酵生産ラインでは供給されない他の活性型GAも知られる。そのような希少GAのみがある種の果実肥大効力を持つとの報告もあり、そのような局面では本研究で取り上げた制御剤の希少GAとの共投与、あるいは、代謝酵素制御剤と受容体アゴニストの併用などにより現状よりも格段にGA使用量を低減できる可能性が高い。加えて、有機合成による大量調達が比較的容易なものを含むため、本研究で見出した化合物の実用化に期待している。

1) M. Otani, J.-M. Yoon, S.-H. Park, T. Asami and M. Nakajima. Screening and characterization of an inhibitory chemical specific to *Arabidopsis* gibberellin 2-oxidases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**: 4259-4262 (2010).