

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 大谷 征史

ジベレリン(GA)は植物ホルモンのひとつとして種子の発芽、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。現時点で GA 関連制御法は大部分が GA シグナルを伝わりにくくする負の制御法であり、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 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ジベレリン制御剤の開発を行った。本論文は、その研究成果をまとめたもので4章からなる。

第1章の序論で現状を概観した後、第2章では GA 代謝酵素制御剤の探索と創製を試みた。GA の代謝・不活性化過程において主導的役割を果たしていると報告されている GA 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)による 2 位水酸化過程に着目し、大腸菌発現系により発現したリコンビナント GA 2-oxidase を用いランダムスクリーニングを行った。GA 2-oxidase の酵素活性に対する化合物の阻害効果を指標にしたスクリーニングと、GA 2-oxidase と GA の結合を阻害する活性を指標にしたスクリーニングの二種類の選抜を行い、約 10,000 種の化合物の中から methyl 6-chloro-3H-1,2,3-benzodithiazole-4-carboxylate 2-oxide (略称 CBTC)と 2-(5-(3-chlorophenyl)-1,3,5-dithiazinan-2-ylidene)malononitrile (略称 M14)を GA 2-oxidase を阻害する化合物として見出した。選抜した CBTC および M14 について、GA2ox と GA 生合成酵素である GA 3-oxidase (GA3ox)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、M14 は GA2ox だけでなく GA3ox に対しても強い阻害活性を示すのに対して、CBTC は GA3ox を阻害せず、GA2ox 特異的に作用したことから、植物に対して CBTC が生長促進的に作用することを合わせて、CBTC が GA 代謝酵素阻害剤であると結論付けている。CBTC の GA2ox 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。Herz 反応によりアナログ化合物を有機合成により調製し市販の化合物と合わせ 18 種の類縁体を準備し、GA2ox・GA3ox の阻害効果を評価したところ、GA3ox に対しても阻害効果を有する化合物が含まれていることが判明した。構造上のわずかな差異が制御対象を大きく変化させた点は、GA2ox・GA3ox が類似した構造を有しながら基質である GA の違いを認識していることと考え合わせることで酵素内における基質 GA 結合部位を CBTC が標的とするこの状況証拠と捉えている。

第3章と4章ではGAアゴニストの探索・創製・同定を試みた。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のスクリーニングを化合物ライブラリーに対して行った。その結果、(S)-3-phenyl-2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)propanoic acid (略称67D)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。さらに67Dと併せて、その作用機構は未解明であったが発芽や茎部の伸長促進、果実肥大などGA様の活性を示すことが古くから知られていたフタルイミド誘導体であるAC94377についても、受容体を標的とするGAアゴニストである可能性について検討した。まず67DとAC94377がGA生合成変異体である*ga1-1*の発芽率を劇的に向上させることを確認した。さらにRI標識GAを用いるGA受容体との結合活性測定系、負の制御因子DELLAと受容体との相互作用をGA依存的に検出可能な酵母two-hybridシステム、負の制御因子DELLAのGAシグナル依存的な分解系、各種GA応答性遺伝子の発現誘導系における試験で、いずれの化合物もGAと同様の効果を示すことを確認した。これらの結果は67DとAC94377が受容体に対するGAアゴニストであることを強く示唆した。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、結合活性と発芽促進活性に基づいて構造要求性を検討し、フェニルアラニン由来構造をL-イソロイシンに置換した67D-14がより強いGA様の活性を示すことを明らかにした。以上GAアゴニストとして、67D-14とAC94377の二種を新たに提示することに成功した。

第5章では、本研究の総括と今後のブラシノステロイド情報伝達系の解明と応用に向けた展望がまとめられている。

以上、本研究で申請者は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が期待できる。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。