博士論文

ストリゴラクトンシグナルの分子調節を

目的とした化合物創製研究

指導教官　　浅見　忠男

平成 24 年度博士課程進学
福井　康祐

目次 i

図表目次 iii
略語表 vi

第１章　序論
1-1　ストリゴラクトン研究の歴史的背景 1
1-2　SLs の構造活性相関研究について 4
1-3　SL の生合成と植物ホルモンとしての情報伝達機構について 8
1-4　植物ホルモンとしての SL の役割 15
1-5　植物におけるケミカルバイオロジー的研究手法の有用性について 17
1-6　本研究の目的 20

第２章　新規ストリゴラクトンミミックの創製と作用解析
2-1　緒言 21
2-2　イネを用いた化合物スクリーニングと作用解析 24
2-2-1　新規 SL 様活性候補化合物の合成 24
2-2-2　イネ SL 生合成変異体 *d10* を用いた分げつ（枝分かれ）抑制活性の評価 24
2-2-3　長期水耕条件下でのイネ *d10* 変異体に対する分げつ抑制効果 26
2-2-4　化合物 **1c** の作用解析 30
2-2-5　**1c** が SL ミミックとして SL 情報伝達経路に与える影響 35
2-3　シロイヌナズナを用いた化合物 **1c** と作用解析 39
2-3-1　化合物 **1c** のシロイヌナズナ SL 関連変異体に対する枝分かれ抑制効果 39
2-3-2　化合物 **1c** がシロイヌナズナの根の形態形成に与える影響 43
2-3-3　シロイヌナズナの SL 応答性遺伝子発現量に対する化合物 **1c** の影響 47
2-4　根寄生植物に対する化合物の効果とその応用可能性 47
2-4-1　根寄生植物 *Striga hermonthica* に対する各化合物の発芽誘導活性 47
2-4-2　根寄生植物防除法としての 4BD の応用可能性 49
2-5 第２章まとめ 53
2-6 実験の部 55

第３章　機能選択的デブラノンの創製
3-1　緒言 72
3-2　イネ分げつ抑制作用と根寄生植物種子発芽誘導作用に対して
機能選択性を有する化合物の創製 75
3-2-1　構造の変化がデブラノン類の SL 様活性に与える影響の検討 75
3-2-2　ベンゼン環上官能基置換位置の組み合わせが
デブラノン類の SL 機能選択性に与える影響 81
3-2-3　イネ分げつ抑制作用に特化したデブラノンの創製 85
3-2-4　イネと *Striga* の双方に作用するデブラノンの創製 89

3-2-5　*Striga* の種子発芽誘導活性に特化したデブラノンの創製　93
3-2-6　デブラノン化合物の特性について　97
3-2-7　イネ SL 非感受性変異体に対する代表化合物の効果　99
3-3　SL のイネにおける枝分かれ抑制以外の植物ホルモン作用　101
3-3-1　イネ SL 生合成変異体幼植物体におけるクロロフィル含量の減少と回復　101
3-3-2　代表的デブラノンによるイネ幼植物体の緑化効果　103
3-3-3　各選択的化合物が SL 遺伝子発現に与える影響　105
3-4　第３章のまとめ　109
3-5　実験の部　110

第４章　デブラノン類の機能選択性に関する詳察
4-1　緒言　129
4-2　各機能選択的デブラノンがシロイヌナズナにおける
SL 生理作用に与える影響の評価　130
4-3　ジクロロデブラノンを用いた各 SL 生理作用における構造要求性の比較　136
4-4　代表型デブラノンの各光学異性体による SL 生理作用の検証と
OsD14 に対する親和性の評価　140
4-5　第４章まとめ　151
4-3　実験の部　152

総括　156

本論文の要旨　159

参考文献　163

謝辞

図表目次

図 1-1　これまでに発見された天然型ストリゴラクトン（一部）　2
図 1-2　SL の基本骨格とこれまでに合成された SL 類（一部）、
及び Zwanenburg らによる推定 SL 受容メカニズム　6
表 1-1　これまでに単離された SL 関連変異体のかいせきにより同定された
SL 関連機能タンパク質　9
図 1-3　現在提唱されている SL 生合成経路　10
図 1-4　26S プロテアソームによるタンパク質分解を伴う
植物ホルモンの受容・転写制御メカニズム　11
図 1-5　現在提唱されている SL 情報伝達機構　14
図 1-6 これまでに報告された SL による（と考えられる）様々な生理作用　16

図 2-1　リード化合物の発見　23
表 2-1　合成した 4 位置換型化合物　25
図 2-2　イネを用いた試験のタイムスケジュール　27
図 2-3　イネ第 2 分げつ伸長抑制作用を指標とした
合成化合物のスクリーニング１　28
図 2-4　イネ第 2 分げつ伸長抑制作用を指標とした
合成化合物のスクリーニング２　29
図 2-5　長期間育成した場合の化合物処理による形態の変化　31
図 2-6　化合物処理による形態の回復　32
図 2-7　想定される **1c** 分解物の第二分げつ伸長抑制試験に対する効果　33
図 2-8　想定される **1c** 分解物の第二分げつ伸長抑制試験に対する効果　（写真）　34
図 2-9　**1c** の SL 非感受性変異体に対する分げつ抑制効果　36
図 2-10 化合物が SL 生合成遺伝子 *D10* の発現量に与える影響　37
表 2-2　化合物が SL 根内生量及び根浸出量に与える影響　38
図 2-11 シロイヌナズナ *max3* に対する化合物の効果　40
図 2-12 化合物を処理したシロイヌナズナ *max3* の形態　41
図 2-13 シロイヌナズナ各 *max* 変異体に対する化合物の効果　42
図 2-14 シロイヌナズナの根毛伸長に対する化合物の効果　44
図 2-15 シロイヌナズナの側根形成に対する化合物の効果　45
図 2-16 各化合物処理によるシロイヌナズナにおける
SL 応答性遺伝子の発現量の変化　46
図 2-17 各化合物の根寄生植物 *Striga hermonthica* 種子発芽誘導活性の比較　48
図 2-18 GR24 と 4BD の根寄生植物 *Striga hermonthica* 種子発芽誘導活性の
広い濃度範囲での活性比較　50
図 2-19 野生型イネと各化合物処理時の SL 生合成変異体イネの
想定される育成状況と根寄生植物による寄生状況モデル図　51

図 2-20 野生型イネと各化合物処理時の *d10* 変異体イネの第二分げつ長と、
水耕培地抽出物の *S.hermonthica* 種子発芽誘導活性 52

図 3-1 デブラノン類の選択性をコントロール出来た場合の概念図 74
図 3-2 初期的な検討に用いた化合物の構造 76
図 3-3 置換基の位置がイネ第二分げつ伸長抑制活性に与える影響 77
図 3-4 置換基の位置が根寄生植物種子発芽誘導活性に与える影響 78
図 3-5 2 環性デブラノンがイネ第二分げつ伸長抑制活性に与える影響 79
図 3-6 2 環性デブラノンの根寄生植物種子発芽誘導活性 80
図 3-7 全ジクロロデブラノンの構造 82
図 3-8 官能基の置換位置組み合わせが
イネ第二分げつ伸長抑制活性に与える影響 83
図 3-9 官能基の置換位置組み合わせが
根寄生植物種子発芽誘導活性に与える影響 84
図 3-10 合成した全 2,4-二置換型デブラノンの構造 86
図 3-11 2,4-二置換型デブラノンのイネ第二分げつ伸長抑制作用の評価 87
図 3-12 2,4-二置換型デブラノンの根寄生植物種子発芽誘導作用の評価 88
図 3-13 合成した全 2,5-二置換型デブラノンの構造 90
図 3-14 2,5-二置換型デブラノンのイネ第二分げつ伸長抑制作用の評価 91
図 3-15 2,5-二置換型デブラノンの根寄生植物種子発芽誘導作用の評価 92
図 3-16 合成した全 2,6-二置換型デブラノンの構造 94
図 3-17 2,6-二置換型デブラノンのイネ第二分げつ伸長抑制作用の評価 95
図 3-18 2,6-二置換型デブラノンの根寄生植物種子発芽誘導作用の評価 96
図 3-19 各代表化合物の SL 生理活性を二次元プロットしたグラフ 98
図 3-20 代表化合物の SL 非感受性変異体に対する枝分かれ抑制活性 100
図 3-21 GR24 処理によるイネ *d10* 第３葉のクロロフィル含量回復試験 102
図 3-22 GR24 処理によるイネ野生型、*d10*、*d14* 第３葉の
クロロフィル含量回復試験 104
図 3-23 代表化合物処理によるイネ *d10* 第３葉のクロロフィル含量回復試験 106
図 3-24 代表化合物処理によるイネ d10 の SL 応答性と
非応答性遺伝子の発現解析 108

図 4-1 機能選択的デブラノンがシロイヌナズナの枝分かれ抑制に与える影響 131
図 4-2 機能選択的デブラノンがシロイヌナズナの根毛伸長に与える影響 132
図 4-3 機能選択的デブラノンがシロイヌナズナの
高温での種子発芽に与える影響 134
図 4-4 GR24 が各 SL 関連情報伝達因子の機能欠損変異体シロイヌナズナの
高温での種子発芽に与える影響 135

図 4-5　各ジクロロデブラノンがシロイヌナズナの枝分かれ抑制に与える影響　137
図 4-6　各ジクロロデブラノンがシロイヌナズナの根毛伸長に与える影響　138
図 4-7　各ジクロロデブラノンがシロイヌナズナの
　　高温での種子発芽に与える影響　139
図 4-8　各ジクロロデブラノンがイネのクロロフィル含量に与える影響　141
図 4-9　各受容体と GR24 のジアステレオマーが影響を与える生理作用　143
図 4-10　各代表化合物の光学異性体 CD スペクトル比較　144
図 4-11　光学分割した各代表デブラノンのイネ第２分げつ伸長抑制活性　146
図 4-12　光学分割した各代表デブラノンの
　　シロイヌナズナ高温条件下での種子発芽誘導活性　147
図 4-13　^{3}H ラベルしたジヒドロ GR7 と各化合物の
　　OsD14 に対する競争的結合試験　149
図 4-14　光学分割した各代表デブラノンの
　　OsD14 に対するジヒドロ GR7 との競争的結合試験　150

表 5　各生物試験に対して各デブラノンが示す活性　158

《略語表》

5DS	5-deoxy strigol
epi-5DS	2'-*epi*-5-deoxy strigol
ABA	abscisic acid
AcOEt	ethyl acetate
AM	arbuscular mycorrhizal
BRC	BRANCHED
CCD	carotenoid cleavage dioxygenase
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
D	dwarf
DAD	DECREASED APICAL DOMINANCE
DMF	N,N-dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	deoxyribonuclease
dNTP	deoxyribonucleoside 5'-triphosphate
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
FC	FINE CULM
GID1	GA-INSENSITIVE DWARF 1
HPLC	high performance liquid chromatography
HTD	HIGH-TILLERING DWARF
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
MAX	MORE AXILLARY GROWTH
MS	Murashige & Skoog
PCR	polymerase chain reaction
PYR	PYRABACTIN RESISTANCE
RMS	RAMOSUS
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
SL	strigolactone
TB	TEOSINTE BRANCHED
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin layer chlomatography
UPLC	ultra high performance liquid chromatography

第 1 章　序論

1-1 ストリゴラクトン研究の歴史的背景

Orobanche 属や *Striga* 属の根寄生植物が宿主の根の近傍でのみ発芽するという観察・実験結果に基づき、宿主植物の根から放出する物質を感知して発芽している可能性が 1950 年ごろから報告されるようになった（Yoneyama et al., 2010）。その約 20 年後、*Striga* 属の一種である *Striga lutea*（*Striga asiatica* と同一種）の種子発芽を誘導する物質として、ワタの根の滲出液から strigol と strigyl acetate と名付けられた二つの化合物が単離・構造決定されたが（Cook et al., 1966, 1972）（図 1-1）、ワタは *S. lutea* の宿主とはならない植物であったため宿主植物が根から放出する発芽刺激物質の探索が更に続けられた結果、根寄生植物の種子発芽を誘導するいくつかの天然由来の化合物が単離・構造決定された。これら *Orobanche* 属や *Striga* 属の根寄生植物種子発芽誘導物質は、ラクトン環を含む縮環した三つの環構造と、エノールエーテルを介して結合した一つのラクトン環という共通骨格を有しており、故 Lurry Buttler によって"Strigolactones"と総称されることとなった（Buttler, 1995）。このように、ストリゴラクトン（SL）は当初 *Orobanche* 属や *Striga* 属の根寄生植物の種子発芽誘導物質として認識されていたが、先述のとおり宿主とならない植物であるワタも生産していることや、自身が不利となってしまう根寄生植物の寄生を呼び込むような物質をなぜ宿主植物が放出するのかという疑問から、何か他の役割があるのではないか、と考えられるようになった。これら SL の役割に対する疑問は、2000 年代に入って二つの異なる研究から解決されることとなった。地上の植物の 80%以上が共生していると考えられているアーバスキュラー菌根菌（AM 菌）は、共生相手である植物の根の近傍に達すると菌糸の分岐が活発になることが知られていた

strigol

strigyl acetate

solgolactone

5-deoxystrigol

2’-*epi*-5-deoxystrigol

sorgomol

orobanchol

orobanchyl acetate

ent-2’-*epi*-5-orobanchol

solanacol

fabacyl acetate

strigone

図1-1. これまでに発見された天然型ストリゴラクトン（一部）

が、AM 菌が絶対共生菌でありシャーレ内での単独培養が困難であることから、植物の根をどのように感知して菌糸を分岐させるのかは長い間不明であった。しかし、Nagahashi と Douds らによって Gigaspora 属の AM 菌を用いた単独培養系が構築されたことにより（Nagahashi & Douds, 1999, 2000）、*in vitro* 系での菌糸分岐誘導物質の探索が可能となり、2005 年に秋山らによって SL の一種である (+)-5-deoxystrigol（5DS）が AM 菌の菌糸分岐を誘導する植物内生物質として同定された（Akiyama et al., 2005）。この報告により、植物が根から SL を放出するのは AM 菌との共生を促進し、自身がリン酸や硝酸といった無機栄養素を獲得しやすくするためであり、根寄生植物は植物が放出する SL を宿主の存在を確かめる情報伝達物質として利用し発芽しているという解釈が一般的になった。しかしながら、AM 菌の非共生相手であるシロイヌナズナなども SL を生産していることが知られており（Goldwasser et al., 2008, Yoneyama et al., 2008）、SL が植物体内で何らかの機能を持つ可能性が提唱されるようになった。また SL の生合成におけるカロテノイド酸化開裂酵素（CCDs）の関与も報告されていた（Matusova et al., 2005）。一方で、植物の枝分かれ過剰変異体の解析から、それまで枝分かれを制御していると考えられてきたオーキシンやサイトカイニンといった植物ホルモンの情報伝達系に属さない遺伝子の変異を原因とする変異体がいくつか発見されており、それらの中には CCDs や、いくつかの植物ホルモンの情報伝達系に関わることが知られている F-box タンパク質ファミリーの一種をコードする遺伝子の欠損変異体が含まれていた。また、それら変異体を用いた接ぎ木実験などから、カロテノイドから生合成される移動性の小分子が枝分かれを制御する新規植物ホルモンである可能性も報告されるようになった（Johnson et al., 2006）。そのような状況下、当時理化学研究所のチームリーダーであった山口らは、枝分かれ過剰形態を示す変異体に合成 SL アゴニストである GR24 を処理すると過剰な枝分かれが抑制されることを見いだした（梅原, 2010）。この実験結

果を手がかりに、植物の内生 SL の探索と枝分かれ過剰変異体に対する SL の枝分かれ抑制作用が調べられ、植物体において SL（またはその代謝産物）が植物の枝分かれを抑制していることが報告された（Umehara et al., 2008）。また、ほぼ同時にエンドウマメを実験植物に用いたフランスのグループからも同様の報告がなされた（Gomez-Roldan et al., 2008）。以上のような様々な角度からの研究の結果、SL は根圏情報伝達物質として AM 菌の菌糸分岐を誘導し、根寄生植物の種子発芽を刺激する一方で、植物ホルモンとして枝分かれの抑制をはじめとした形態形成に広く関わることが明らかとなってきた。

1-2 SLs の構造活性相関研究について

SLs の構造活性相関研究や合成 SL の開発研究は、これまで多くの場合根寄生植物の種子発芽誘導活性を指標に行なわれてきた。それには、大きく分けて実用的理由と歴史的理由の二つがある。というのも、*Striga* や *Orobanche* と言った根寄生植物の作物に対する寄生被害は、サハラ以南のアフリカ諸地域や地中海周辺地域で深刻な農業上の問題となっており、被害総額が 10 億ドルを超えるとの試算もある（Yoneyama et al., 2010）。そのため、根寄生植物の種子発芽のメカニズムや SL 受容体の解明は効果的な防除法を構築する上で重要な課題であり、圃場試験にも耐えうる安価に合成できる SL アゴニストの創製が求められていたからである。また同時に、SL が発見された経緯から、長い間 SL が根寄生植物の種子発芽誘導物質として考えられてきたため、合成 SL を含む多様な SL の構造活性相関研究が *Striga* 等の種子発芽刺激活性を指標にする以外に活性の評価系が存在しなかったからである。Strigol の発見以来 SLs の合成研究が広く行なわれるようになったが、Strigol そのものの合成研究が行なわれた後、初期の検討は構造の簡略化、すなわち活性発現に必要な最小限の構造の探索であ

った。ストリゴラクトンの基本骨格は、縮環した３環構造とエノールエーテル骨格を挟んだメチルフラノン環からなる（図 1-2)。この３環構造の６員環を A 環、次の５員環を B 環、ラクトン環を C 環、そして単独のメチルフラノン環を D 環と呼ぶが、Jhonson らは A 環や AB 環を失った構造の化合物を合成し、それら化合物が *Striga* や *Orobanche* の種子発芽を誘導する活性の強さを比較した（Jhonson et al., 1981)。その結果、ABC 環や D 環だけでは発芽しないことや、A 環が無いもの（GR7)、AB 環が無いもの（GR5）と環数が少なくなるにつれて活性が弱くなることを明らかにした。また D 環の構造活性相関についても検討しており、D 環のメチル基部分が *t*-ブチル基に置換されたものや、D 環の代わりにフタリドを用いたもの等を合成しその根寄生植物種子発芽誘導活性を比較しているが、天然型が最も活性が高いことなど、現在までの合成 SL 研究の基礎となる活性発現に重要な多くの構造要求性が明らかにされた。現在最も広く用いられている合成 SL アナログである GR24 も、この時に開発された。その後、新規合成 SL の開発や、合成法の改良等を Zwanenburg らが精力的に行っている。彼らは C 環のラクトン環が開いたような構造を持つ Nijmegen-1 という化合物をフタルイミドから合成し、*Orobanche* に汚染されたタバコ圃場で自殺発芽による防除法の試験を行う等、実用へ向けた化合物の開発を行なってきた (Zwanenburg et al., 2009)。ここで、自殺発芽とは、根寄生植物に汚染された土壌に宿主となる作物を作付けする前に、種子発芽刺激物質等を処理することにより強制的に発芽を誘導し、寄生による栄養補給ができない根寄生植物を枯死させることを示す。また、根寄生植物による SL の推定受容メカニズムを提唱し、GR24 の不斉合成法の開発や、単純な構造の合成 SL（種子発芽誘導物質）の開発を行なっている（Mangnus and Zwanenburg, 1992, Thuring et al., 1997, Mwakaboco et al., 2011)。しかし近年、Kondo らによって報告されたイミノアナログ類が、Zwanenburg らの提唱する受容メカニズムに合致しないが各種根寄生植物の種子

SLの基本骨格

Zwanenburgらによる
推定SL受容メカニズム
(Mangnus & Zwanenburg, 1992より抜粋)

GR24

GR7

GR5

Karrikin(KAR_1)

Nijmegen-1

keton-type

imino GR24

Dimethyl-type

(+)-GR24

(-)-GR24

図1-2. SLの基本骨格とこれまでに合成されたSL類（一部）、
及びZwanenburgらによる推定SL受容メカニズム

発芽を誘導することから、彼らの提唱するメカニズムが事実とは異なることが示唆された（Kondo et al., 2007）。根寄生植物に対する SL の構造活性相関研究は天然から単離されたものでも行なわれており、*Striga gesnerioides* を代表として、各根寄生植物によって種子発芽を誘導する活性の強い化合物の構造が少しずつ異なり、感知する各種 SL 量のバランス等により宿主の判別を行っているのではないか、との見方もある（Nomura et al., 2013, Kisugi et al., 2013）。

近年、SL の植物ホルモンとしての作用が明らかとなってからは、筆者を始めとして植物ホルモン活性に着目した化合物の合成研究も進められており、筆者らの開発したデブラノン類（Fukui et al., 2011, 2013）の他に、フランスの研究グループからジメチル D 環を用いた化合物が報告されており、エンドウやシロイヌナズナの枝分かれは抑制するが根寄生植物の種子発芽は誘導しないという選択性を有することが示されている（Boyer et al., 2012, 2014）。また、SL と類似する構造を有する Karrikin の研究を行っているグループからは、D 環の 2’位のキラリティーによって、植物体内において合成化合物が SL シグナル物質として作用するのか Karrikin シグナル物質として作用するのかが異なるという報告もなされている（Scaffidi et al., 2014）。これらの情報から、植物ホルモンとしての SL の受容には、D 環近傍の構造が大きく寄与していることが推測される。一方、AM 菌に対する SL の構造活性相関研究は Akiyama らによって行なわれており、根寄生植物種子発芽作用や植物ホルモン作用における SL の構造要求性とは若干異なることが示唆されている（Akiyama et al., 2010）。以上の様に、現在の知見として各生物種によって親和性の高い構造が若干異なっていることが示唆される結果が得られているため、各生物種に特異的な化合物の合成も可能になるのではないかと考えられる。本研究もその一助となることを動機付けとして研究を継続した経緯がある。

1-3 SL の生合成と植物ホルモンとしての情報伝達機構について

SL は現在でこそ枝分かれを抑制する以外にも植物の各成長段階で様々な器官の発達に関わる植物ホルモンとして認識されるようになったが、これらの知見が得られるまでに単離された多くの変異体が、その機能解析に非常に重要な手がかりとなったことは明らかである。これまでに単離された各種 SL 生合成変異体、情報伝達系変異体を表 1-1 にまとめる。これら変異体の単離や、異種発現させたタンパク質等を用いての *in vitro* での実験及び内生物質の単離等によって、現在 SL の生合成は以下の様に提唱されている（図 1-3）。まず、植物ホルモンであるアブシジン酸（ABA）の前駆体と同様の all-*trans*-β-carotene から鉄含有タンパク質である D27 によって 9 位二重結合の置換様式が *cis* へと変換されることでそれを基質とする CCD7 によって酸化的開裂を受けるようになる。次いで CCD8 によって酸化的開裂に次ぐ未知の変換反応を受け、生合成中間体である(*Z*)-(*R*)-Carlactone に変換される（Alder et al., 2012, Seto et al., 2014）。続いてシトクロム P450 ファミリーである MAX1 とそのホモログ（オルソログ）によって Carlactone が酸化や環化を受け、シロイヌナズナでは Carlactonic acid から Methyl carlactonate へ、イネでは 2’-epi-5 DS や Orobanchol へと変換されることが示された（Zhang et al., 2014, Abe et al., 2014）。MAX1 以下の経路は極最近報告された SL 生合成の最終ステップである。一方で SL 信号伝達経路の研究も同様に進められてきた。2000 年代は SL の植物ホルモンとしての機能が明らかになるまでに単離されていた SL 非感受性変異体（*max2*, *d3*, *rms4*; *arabidopsis*, rice, pea）が F-box タンパク質をコードする遺伝子の変異株であった事から、他の植物ホルモン（オーキシンにおける TIR1、ジベレリンにおける SLY1、ジャスモン酸における COI1 が F-box タンパク質）と同様に F-box タンパク質が構成する SCF 複合体によるタンパク質のユビキチン化とそれに続く 26S プロテアソーム系による

Protein type	*Arabidopsis*（At）	Rice（Os）	Pea（Ps）	Petunia（Ph）
SL生合成関連				
Fe containing *cis/trans* isomerase		D27 (Lin et al., 2009)		
CCD7	MAX3 (Booker et al., 2004)	D17/ HTD1 (Zou et al., 2006 Umehara et al., 2008)	RMS5 (Johnson et al., 2009)	DAD3 (Drummond et al., 2006)
CCD8	MAX4 (Sorefan et al., 2003)	D10 (Arite et al., 2007)	RMS1 (Sorefan et al., 2003)	DAD1 (Snowden et al., 2005)
Cytochrome P450	MAX1 (Booker et al., 2005)	Os MAX1s (Zhang et al., 2014 Abe et al., 2014)		
SL情報伝達関連				
α/β-fold hydrolase	D14 (Waters et al., 2012)	D14/D88 /HTD2 (Arite et al., 2009 Gao et al., 2009 Liu et al., 2009)	RMS3? (Beveridge et al., 2006)	DAD2 (Simons et al., 2007, Hamioux et al., 2012)
	KAI2 (Waters et al., 2012)	D14-like (Yoshida et al., 2012)		
F-box	MAX2 (Stirnberg et al., 2002)	D3 (Ishikawa et al., 2005)	RMS4 (Johnson et al., 2006)	MAX2a MAX2b (Hamioux et al., 2012)
HSP101/ chaperonin-like	SMXLs SMAX1 (Stanga et al., 2013)	D53 D53-like (Zhou et al., 2014 Jiang et al., 2014)		
TCP transcription factor	BRC1 BRC2 (Aguilar-Martinez et al., 2002)	FC1/ OsTB1 (Takeda et al., 2003 Minakuchi et al., 2010)	BRC1 (Braun et al., 2012)	

表1-1. これまでに単離されたSL関連変異体の解析により同定されたSL関連機能タンパク質

イネにおける
SL生合成経路

Zhang et al., 2014より抜粋

シロイヌナズナにおける
SL生合成経路

Abe et al., 2014より抜粋

図1-3. 現在提唱されているSL生合成経路

Shan et al., 2012より抜粋

図1-4. 26Sプロテアソームによるタンパク質分解を
伴う植物ホルモンの受容・転写制御メカニズム

分解が、SL の受容機構から下流遺伝子の発現制御機構に関わっているのではないかと考えられるようになった（図 1-4）。また、その後 SL 非感受性変異体として単離された *d14*（*dad2*）における原因遺伝子の野生型タンパク質である D14 が、ジベレリンの受容体である GID1 が属するα/β fold hydrolase ファミリーに属していたことから、SL の受容や情報伝達機構がジベレリンのアナロジーで考えられるようになってきた。以上のような類推に基づき、酵母ツーハイブリッド法を用いた *in vitro* 系での DAD2 と PhMAX2 の結合試験が行なわれた結果、SL 依存的な結合が確認されるとともに DSF 法により SL が DAD2 に結合することも確かめられ、また X 線結晶構造解析による DAD2 の構造決定もなされた（Hamioux et al., 2012）。これによって D14（DAD2）が SL の受容体であるということが確実性をもって受け入れられるようになり、イネやシロイヌナズナにおいても同様に D14 が SL 受容体であるとの報告がなされた（Nakamura et al., 2013, Kagiyama et al., 2013）。ただし Nakamura らの報告では SL 依存的に結合する D14 の相手は F-box タンパク質ではなくジベレリン情報伝達の要となっている DELLA タンパク質である点（イネにおいては SLR1 タンパク質）が Hamioux らの報告とは大きく異なっている。一方、西オーストラリア大学のグループは、以前から Karrikin と呼ばれる煙に含まれるラクトン構造を有する化合物に関する研究を行っており、この外生物質の受容体がシロイヌナズナ D14 のホモログである KAI2（D14-like）であることを報告している（Waters et al., 2012）。Karrikin（図 1-2）は SL の D 環と同様の構造を一部有しており、弱光下胚軸伸長抑制や、種子発芽促進など一部の生理機能において SL と冗長的に働くこと、また *max2* 変異体が Karrikin に対しても非感受性であることから、内生の KAI2 活性化物質は明らかとなっていないものの SL と Karrikin が情報伝達や生理機能において深く関連していることが示唆されている。また最近では、更に SL や Karrikin の情報伝達のメカニズムが類似していることが明らかにされた。イネにおいて単離

された *d53* 変異体は多分げつ矮性形質を示し、SL に対して非感受性を示していた。この D53 タンパク質は D14 と SL 依存的に結合するとともに、SL 処理により D14 や D3 依存的にユビキチン化に次ぐ分解を受けること、また、いくつかの植物ホルモンシグナルにおいて co-repressor として働くことが知られている TOPLESS ファミリーに属するタンパクとも結合することがプルダウンアッセイ等により示され、SL シグナルの転写抑制因子として機能していると考えられた（Zhou et al., 2014, Jiang et al., 2014）。同様に、シロイヌナズナでも *max2* 変異体を背景に EMS による変異を導入した植物を用いて *max2* における形態異常を回復させる遺伝子の探索が行なわれ、SUPPRESSOR OF MORE AXILLARY GROWTH2 1（SMAX1）とそのファミリーSMAX-like（SMXL）2～8 が同定されている（Stanga et al., 2013）。単離された *smax1* 変異体は Karrikin 処理形態を示す変異体であり、弱光下でも胚軸が伸長しないなど、WT に Karrikin を処理した場合と同様の形態を示した。また、常に Karrikin 処理した場合と同様に Karrikin 応答性遺伝子が変動していた。これら D53/D53-likes と SMAX/SMXLs は 40%程度の相同性を持ち、互いに共通遺伝子を祖先とするオルソログであると考えられている。以上のようなことから、SL 情報伝達経路の下流で転写抑制因子として働くと考えられる D53 と Karrikin 情報伝達経路の下流で転写抑制因子として働くと考えられる SMAX1 が高い相同性をもち、共に MAX2 の下流で働くことから、情報伝達の様式も非常に類似していると考えられる。Karrikin 情報伝達のメカニズムに関しては未だ提唱されてはいないが、現在では SL 情報伝達のメカニズムは図 1-5 の様に考えられている。また、下流で働くと考えられる遺伝子も単離されており、トウモロコシの枝分かれ過剰変異体で単離された枝分かれ抑制因子 *TB1* のオルソログである *BRC1/2* が SL 処理により発現量が上昇し、*brc1* 変異体では SL 処理による枝分かれ過剰形態の回復が観察されないことも報告されている（Aguilar-Marinez et al., 2007）。しかしながら、現象は観察されている

Jiang et al., 2014より抜粋

図1-5. 現在提唱されているSL情報伝達機構

ものの、その生理的な意義が未解明な実験的事実もいくつか残っている。SL の受容体である D14 はα/β fold hydrolase ファミリーに属しており、同ファミリーに属するジベレリン受容体 GID1 では欠損している加水分解に関わる触媒残基を保存しているため、SL の加水分解能を有している。この D14 による加水分解が SL の不活化であるのか SL が加水分解を受けることにより真の活性種となるのか議論が分かれており、現在著者の所属する研究室では、加水分解後に生成すると考えられる 5-hydroxy-3-methyl-2(5*H*)-furanone と D14 の共結晶が得られていることから後者の説を支持しているものの、結論を得るには更に精密な実験が必要であると考えている。また、D14 タンパク質と SL 依存的に結合するタンパク質としてジベレリンの情報伝達因子の一つである DELLA が、MAX2 タンパク質と結合するタンパク質としてブラシノステロイドの情報伝達因子の一つである BES1 が得られてきているが、現在確かめられている生理的な面での SL とブラシノステロイドやジベレリンとのクロストークと、どのように関わっているのかは明らかとなっていない（Nakamura et al., 2013, Wang et al., 2013）。それ以外にも、先に挙げた *BRC1* のイネでのオルソログである *FC1* は SL 処理で大きく変動しないこと等から、SL の情報伝達経路が植物種によって少しずつ異なるのではないか、といった疑問も浮上してきている（Minakuchi et al., 2010）。以上の様に、今後は SL の受容機構とともに下流の情報伝達因子や植物ホルモン間クロストークなどが研究の対象になると考えられる。

1-4 植物ホルモンとしての SL の役割

これまで、SL 関連変異体はシロイヌナズナ、イネなどのモデル植物の他に、エンドウ、ペチュニア、トマト、ヒメツリガネゴケ等で見つかっており、各植物体において様々な機能を有していることが明らかにされてきた。SL の代

図1-6. これまでに報告されたSLによる
（と考えられる）様々な生理作用

表的な生理作用である枝分かれの抑制の他、休眠の進んだ種子の発芽誘導（Nelson et al., 2011, Toh et al., 2012）や、光形態形成（Shen et al., 2012, Mayzlish-Gati et al., 2010）、根の形態形成（Rasmussen et al., 2012）、また胚軸の肥大（Agsti et al., 2011）などのほか、葉の老化や緑化を促進すること（Yamada et al., 2014）、乾燥ストレス耐性（Bu et al., 2014）等、その作用は多岐にわたる（図 1-6）。しかしながら、多くの実験に合成 SL として処理されてきた GR24 のラセミ体（またはジアステレオマー混合物）は、先にも述べた通り 2'位のキラリティーによって SL として作用するのか、Karrikin として作用するのかが異なるため、実際にはこの二つの異なる情報伝達因子による影響が混同して SL の生理作用として報告されてきたのが現状である（Scaffidi et al., 2014）。しかし、内生の SL による形態形成は SL 生合成変異体と *d14* 変異体、*d14-like* 変異体の形態比較から、おそらく D14 によって制御されていると考えられるため、これまで報告されてきたいくつかの GR24 処理による植物への影響を改めて評価し直し、真に SL の効果と言えるのかを整理する必要があると考えられる。

1-5 植物におけるケミカルバイオロジー的研究手法の有用性について

これまでの植物ホルモン研究における知見の多くは、生化学的手法や遺伝学的手法を用いて得られてきたが、近年では全ゲノムが既知のモデル植物が増加してきただけでなく、シークエンサーの性能の向上などによりゲノムの解読が以前よりも高速化・高精度化し、逆遺伝学的手法も有用な研究手段としてより一層用いられるようになってきた。それらと合わせて最近の植物ホルモン研究において大きな成果を上げている手法がケミカルバイオロジー的研究手法である。ケミカルバイオロジーという概念は 1990 年代に Schreiber によって提

唱されたものであるが、広義には化合物を用いてタンパク質等の生体高分子の機能を解明していこうとするアプローチを意味すると理解している。これまでに発見された植物ホルモンを植物から同定された年代順に列記すると、エチレン（1934)、オーキシン（1946)、ジベレリン（1958)、アブシジン酸（1963)、サイトカイニン（1964)、ブラシノステロイド（1979)、ジャスモン酸（1980)、（フロリゲン、ストリゴラクトン、サリチル酸に関してはホルモンとしての認識等の都合により不明瞭であるが、2000 年代と仮定する）となるが、俯瞰して見ると早期に発見された植物ホルモンほど人為的に処理した場合の植物の形態の変化が明瞭であると考えられる（小柴・神谷、新しい植物ホルモンの科学　第２版、2010)。すなわち、明瞭な形態の変化から原因物質や関連遺伝子を探索することが可能であったと考えられる。しかし、近年発見されたものになればなるほど、その作用が形態の変化として現れ難かったり、作用部位や機能が特異的だったりするため、原因物質や関連遺伝子の探索に困難が伴うと考えられる。本論文で取り扱う SL も、欠損した場合には明瞭な形態の変化が観察されるものの、処理による形態の変化が明瞭でなく、遺伝子発現量の変化もジベレリンやオーキシンと比較してあまり大きくないことが知られている（Mashiguchi et al., 2009)。このような中、化合物と変異体を組み合わせて用いることにより、形態の変化が明瞭になることも多く、化合物に対する非感受性変異体を取得してくることで、特定の形態形成に関わる因子を同定することが可能となる場合も多い。例えば ABA の受容体として知られる PYR1/PYLs は 14 のホモログがあり、それぞれに機能的冗長性を有しているためにシングル変異体では ABA を処理しても抵抗性が現れない。しかし、この PYR1 の発見に貢献した Pyrabactin という化合物は、14 の PYRs の内 PYR1 を含むいくつかにのみ結合して ABA アゴニストとして作用していたために、一つの遺伝子の変異体 *PYRABACTIN RESISTANCE 1*（*PYR1*）を非感受性変異体として単離に成功した経緯がある（Park et al., 2009)。

このように、一般的に言われている化合物利用の利点の一つは、遺伝子の冗長性を克服できることである。多くの場合、植物の生命維持に重要な因子ほどそのホモログをいくつか有しており、一つのみが欠損した場合では形態が明瞭に変化しない。しかし化合物を利用した場合はそれらホモログのうち、複数種に選択性をもって作用することで化合物に対する抵抗性変異体が取得できることもある。また、阻害剤の場合は受容体ホモログの全ての機能を阻害することも可能となる場合があるため、多重変異体の作出という時間と労力を伴う作業を経ずに同様の効果を得ることが出来る。また、生命維持に重要な因子の多重ノックアウト体は胚性致死に至ることも多く、作出が不可能な場合もあるが、化合物ならば処理するタイミングや濃度を任意に調節できるため、より詳細な機能解析に用いることが出来ると考えられる。以上のような化合物利用の利点は、化合物の構造がある程度任意に変換できることに起因している。例えば、シトクロム P450 は全て中心にヘムを有しており、イミダゾールなどのジアゾールやトリアゾール系化合物がヘムに強力に配位することによりその触媒機能が阻害されることが知られている（大村ら、P450 の分子生物学 第２、2009）。植物ホルモンの生合成に関わる P450 に対するアゾール系阻害剤もいくつか報告されており、ジベレリンの生合成阻害剤であるパクロブトラゾールやウニコナゾール、ブラシノステロイドの生合成阻害剤であるブラシナゾール等が広く用いられている。また、最近では SL の生合成阻害剤も伊藤らによって報告されており（Ito et al., 2010）、アゾール系阻害剤の構造を少し変えることにより、標的分子に対する選択性を制御できることが明らかになっている。つまり、化合物の場合は自由な構造改変が可能であるために機能の多様性・選択性を制御することが可能となり、その結果遺伝子の冗長性を克服できると考えられる。以上をまとめると、植物ホルモン研究における化合物利用の有用性は、遺伝子の冗長性を克服できることと、処理する濃度やタイミング

を制御できるために詳細な解析が可能であるということ。さらに付け加えれば、発見した化合物が植物の成長調節剤として応用可能となることだと考えられる。

1-6 本研究の目的

植物ホルモン研究を通して得られた知見や化合物は、研究だけでなく農業へも応用可能となる。例えば、所謂『緑の革命』ではジベレリンの生合成変異体や情報伝達変異体のイネ・コムギを用いることで、肥料による栄養が植物の徒長ではなく種子を作ることに使われるようになったため穀類の収量を飛躍的に増加させることができたことはよく知られている。またジベレリンにより果実の肥大を誘導することで種無しぶどうを作れるようになったこと、また除草剤として合成オーキシンが用いられていること等、植物ホルモンの研究成果は人間社会にとって数多くの利益に結びついている。前節までに述べてきたSLの研究背景から考えると、枝分かれは地上部バイオマスに直結する形態であり、穀物などは枝分かれが単位個体あたりの収量を決める重要な因子であるため、SLによる枝分かれの制御機構を明らかにすることで作物の増産に結びつけることや、SLによる根寄生植物の種子発芽機構等を解明することで寄生による農業被害を軽減させること等、今後人類が向き合わなくてはなくなる農業上の課題（食料問題やエネルギー問題等）に対してSL研究が少なからず貢献できると確信できる。そこで、本研究では各種ストリゴラクトンの生理機能の解明に資するため、SLの各作用を個別に発現させることが出来る化合物の創製を目的とし、化合物の合成ならびに特性の評価を行なうこととした。

第 2 章　新規ストリゴラクトンミミックの創製と作用解析

2-1 緒言

序論で述べたように、著者がストリゴラクトン（SL）様活性化合物の創製研究を始めた 2010 年当時は、シロイヌナズナやイネにおける SL 関連変異体がある程度報告されてはいたものの、植物ホルモンとしての SL の生合成経路や情報伝達経路は断片的にしか明らかとなっていなかった。また、それぞれの変異体で機能欠損している遺伝子がコードしている野生型タンパク質の機能も未知のものがあった。そこで、植物の変異体スクリーニングや大規模な圃場実験に用いることが出来る大量合成可能な SL 様活性化合物は科学的にも実用的にも有用性が高いと考えられた。しかし、これまでの SL アゴニスト創製研究では天然から単離された strigol や 5-deoxy strigol（5DS）といった天然型 SL の骨格を模倣した合成アナログの創製が行われたのみで、大きな構造の変化がなかったため合成には依然として 4 ステップ以上の反応を要し、またアルカリ条件下での安定性も低かった。それと同時に、これら合成された化合物のほとんどが *Striga* 属や *Orobanche* 属の根寄生植物の種子発芽誘導活性試験によってその SL 活性を評価されており、それらの構造活性相関研究から Zwanenburg らが提案していた『想定される SL 受容のメカニズム』とも相まって、活性を有するにはエノールエーテル構造と、それにつながる D 環（メチルフラノン環）が必要であるとの認識が一般的であった（図 1-2, Mangnus & Zwanenburg, 1992）。つまり、合成簡便で大量に合成することが可能となる為には構造の簡略化が必要であったが、根寄生植物に対する活性を指標とした化合物探索では構造の改変に限界があった。そこで、本研究では植物の形態変化に対する効果を指標として新規 SL 様活性化合物（SL ミミック）を探索することで、これまでとは異なる骨格を

有する合成簡便な化合物が創製できるのではないかと考えた。

検討の初期段階において、研究室内で行っていたジベレリン受容体阻害剤の *in silico* スクリーニングによって見出されていた阻害剤候補化合物中に 5-(4-chlorophenoxy)-2(5*H*)-furanone（CPF）が存在しており、SL の D 環と CPF のフラノン環構造が類似していたため、試みに D 環構造を有する誘導体である 5-(4-chlorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone（**1a**）を合成し、ストリゴラクトン生合成遺伝子欠損変異体イネ *d10* を用いた試験系に供した（図 2-1）。その結果、CPF は *d10* 変異体の第二分げつ伸長を抑制するという SL 様活性を示すことはなかった一方で、化合物 **1a** は一般的に用いられている SL アナログ GR24 と同程度の第二分げつ伸長抑制活性を示した。そこで、この化合物 **1a** をリード化合物としてベンゼン環上の４位の官能基が異なる化合物を種々合成し、構造活性相関を行うことで代表化合物を選抜した後、詳細な作用解析を行うこととした。本章ではまず、植物ホルモンとしての SL の枝分かれ抑制活性を指標として化合物をスクリーニングするため、比較的早く結果の出る試験系として単子葉のモデル植物であるイネを用いて試験を行い、代表化合物を選抜した。その後、代表化合物を用いて長期間育成した場合の副作用や遺伝子発現に与える影響等を調べた。次に双子葉のモデル植物であるシロイヌナズナに対する代表化合物の枝分かれ抑制活性を評価する一方で、シロイヌナズナで報告されていた枝分かれ抑制作用以外の SL の作用についても評価を行った。最後に、合成化合物の植物ホルモン以外の活性を評価するため、根寄生植物を用いた種子発芽誘導試験も行い、合成化合物の SL ミミックとしての活性を多面的に評価した。また、上記実験により得られた知見に基づいて、この新規 SL ミミックを利用した新たな根寄生植物防除法の提案をした。

図2-1. リード化合物の発見

化合物CPFと、ラクトン環部分をSLと同様の構造に変化させた化合物**1a**、およびそれぞれをSL生合成変異体*d10*に処理したときの第二分げつ長。各化合物は1 μMで処理した。例数は6。エラーバーはSEを示す。N.D.はNot Detectedを表す。

2-2　イネを用いた化合物スクリーニングと作用解析

2-2-1　新規 SL 様活性候補化合物の合成

合成簡便で大量供給可能な新規 SL ミミックの創製を目的とし、化合物 **1a** をリード化合物として類縁体合成を行った。合成法は既出の方法に従った（Wolff & Hoffmann, 1988）。まず、D 環の原料となる 3-methyl-2(5*H*)-furanone の 5 位を N-bromo-succinimide（NBS）を用いてブロモ化し、次いで塩基性条件下、種々のフェノールと反応させた後、シリカゲルカラムクロマトグラフィにて精製し、再結晶にて各々のフェノキシフラノン誘導体を得た。合成した化合物と収率を表 2-1 に示した。反応はほぼ完全に進行していたが、収率が著しく低いのは、化合物の種類を揃えることを優先しこの段階での再結晶化の最適条件について検討しなかったためである。

2-2-2　イネ SL 生合成変異体 *d10* を用いた分げつ（枝分かれ）抑制活性の評価

SL 生合成遺伝子が欠損した変異体では、SL が生産できなくなった結果として枝分かれが多くなった形態を示すことが報告されている（Umehara et al., 2008）。イネ SL 生合成変異体である *d10* 変異体は、Carotenoid Cleavage Dioxygenase8（CCD8）をコードする遺伝子に点変異が生じており、CCD8 の 112 番目のロイシン残基がプロリン残基に置換されることで機能が欠損し、その結果 SL の生合成が出来なくなり多分げつ矮性形質を示す（Arite et al., 2007）。なお、分げつとはイネにおける分枝であり、分げつは茎に相当する稈の各節につく葉の葉腋から一本ずつ出る。以後、第一葉から出る分げつを第一分げつ、第二葉から出る分げつを第 2 分げつと呼ぶ。イネ *d10* 変異体は発芽後 2 週間程度

表2-1. 合成した4位置換型化合物

Entry	R =	R' =	yield/%
1a	Cl	Cl	29
1b	F	F	40
1c	Br	Br	53
1d	I	I	73
1e	CF_3	CF_3	59
1f	CN	CN	55
1g	Me	Me	29
1h	^{t}Bu	^{t}Bu	24
1i	OMe	OMe	38
1j			50
1k	OH		13

で、視認できる程度に第一および第二分げつが伸長するが、GR24 などの SL 類を外部から処理することで分げつの伸長が抑制され、野生型と同様の形態に回復することが梅原らによって報告されていた（Umehara et al., 2008）。そこで、梅原らの報告したイネ *d10* 変異体を用いた SL 活性評価試験を一部改変し、2-2-1 で合成した化合物（表 2-1）の SL 活性評価試験を行った（図 2-2-A）。この際、第一分げつの伸長は安定して観察されなかった為、第二分げつの長さを指標として化合物の活性を評価した。具体的には、化合物を処理したことにより伸長が抑制されていれば SL 様活性があると判断した。なお、同時に植物体の背丈も測定し、植物体全体の伸長が抑制されていないことを確認した。結果を図 2-3 に示す。**1a-1k** の全ての化合物でイネの第二分げつ伸長抑制効果が観察され、試験した濃度では **1a-1g** はほぼ完全に伸長を抑制していた。一方で、植物体全体の背丈に関しては処理区ごとの大きな差は観察されず、植物体全体が矮化してしまった為に第二分げつの伸長が抑制された訳ではないことがわかった。濃度を 1 μM の一点のみで比較しても **1a-1g** 間で活性差が観察できなかったため、再現性の悪かった **1g** を除いた化合物 **1a-1f** を一次選抜化合物とし、さらに低濃度も含めた 0.01 μM, 0.1 μM, 1 μM において再度試験を行い、活性の強さを比較した（図 2-4）。その結果、4-bromophenol から誘導される化合物 **1c** が 0.01 μM でも十分な分げつ伸長抑制活性を示し、他の化合物よりも高い活性を有すると判断できた。そこでこの **1c** を代表化合物とし、以下の植物ホルモンとしての SL 活性を調べる試験に供した。

2-2-3　長期水耕条件下でのイネ *d10* 変異体に対する分げつ抑制効果

上述の第二分げつ長を観察する 16 日間の試験系では、化合物 **1c** の副作用等は観察されなかったため、長期間処理した場合の枝分かれ抑制活性と、

A. 16日間のスクリーニング時

B. 長期観察時

C. SL内生量及び根滲出量測定時

図2-2. イネを用いた試験のタイムスケジュール

図2-3. イネ第2分げつ伸長抑制作用を指標とした合成化合物のスクリーニング1

吸水後16日目のイネの背丈(A)及び第二分げつ長(B)。
例数は6。エラーバーはSEを示す。cont.は無処理を表す。

図2-4. イネ第2分げつ伸長抑制作用を指標とした合成化合物のスクリーニング2

選抜した化合物を1 μM, 0.1 μM, 0.01μM処理した場合の第2分げつ長を示す。GR24は1 μMで処理し、cont.は無処理を表す。例数は6。エラーバーはSEを示す。

副作用の有無を調べることとした（図 2-2-B）。16 日間の試験の後、17 日目に 500 mL 容の容器に移植し、化合物を 1 μM で処理したのち水耕液が半分程度まで無くなった時点で新たに調整した水耕液（化合物を含まない）を継ぎ足すことで育成した。吸水後 17 日目から 10 日置きに背丈を測定し、27 日目から 10 日置きに分げつ数を計測した結果を図 2-5 に示す。無処理の *d10* 変異体では生育するに従って分げつ数が著しく増加しているが、化合物 **1c** や GR24 を処理した場合には分げつ数が抑制され、野生型と同程度の増加となっている。同様に、背丈に関しても *d10* 変異体では観察される半矮性形質が化合物処理では回復していることがわかる。また、47 日目の植物体の生育状態（図 2-6）については、化合物 **1c** 処理による葉の枯死や病班様の細胞死等が出ることもなく、白化なども見られなかった為、特に目立った副作用は観察されなかったと判断した。以上のことから、化合物 **1c** は植物体に対して成長異常効果を示すことなく、SL 生合成変異体の SL 欠損による形態の変化を野生型と同等にまで回復させることが明らかとなった。

2-2-4　化合物 **1c** の作用解析

ここまでの結果から、化合物 **1c** の処理は SL 生合成変異体イネ *d10* の分げつ伸長を抑制し、SL 欠失による多分げつ矮性形質からの回復を促すことが明らかとなったが、**1c** 自体が作用しているのか、あるいは **1c** のエーテル結合が加水分解した場合に生ずると予想される 4-bromophenol や 5-hydroxy-3-methyl-2(5*H*)-furanone が作用しているのかを明らかとする必要があった。そこで、これらの化合物をそれぞれ処理した場合の第二分げつ伸長抑制効果を、上述の 16 日間の試験系を用いて調べることとした（図 2-7）。処理濃度はこれまでと同様参照区である GR24 がほぼ第二分げつ伸長を抑制する濃度の 1 μM で処理した。

図2-5. 長期間育成した場合の化合物処理による形態の変化

長期間育成した場合の分げつ数と背丈を測定した。各化合物は17日目に1 μM処理した。例数は4。エラーバーはSEを示す。

Bar = 10 cm

図2-6. 化合物処理による形態の回復

吸水後47日目のイネの形態写真。化合物は17日目に写真の500 mL容褐色分に移植した際に処理し、以降は水耕培地が半分程度に減ったら化合物を含まない水耕培地のみを継ぎ足した。左から野生型、*d10*変異体未処理、*d10*変異体+**1c** 1 μM処理。スケールバーは10 cmを示す。

5-hydroxy-3-methyl-2(5*H*)-furanone
（D-OH）

4-bromophenol
（4-Br）

図2-7. 想定される**1c**分解物の第二分げつ伸長抑制試験に対する効果

選抜した化合物**1c**が加水分解された場合の分解物と想定される化合物D-OH (5-hydroxy-3-methyl-2(5*H*)furanone)と4-Br (4-bromophenol)の分げつ伸長抑制効果の比較。各化合物は1 μMで処理し、cont.は無処理を表す。例数は6。エラーバーはSEを示す。

図2-8. 想定される**1c**分解物の第二分げつ伸長抑制試験に対する効果（写真）

図2-7の植物体写真。各化合物は1 μMで処理した。矢尻は第一および第二分げつを示す。スケールバーは2 cmを表す。

結果として、当該濃度では 4-bromophenol や D-OH は分げつ伸長抑制活性を全く示さず、また副作用も観察されなかった（図 2-8）。従って、少なくとも化合物 **1c** そのものの構造が活性発現に重要であると考えられた。一方で、化合物 **1c** の分げつ伸長抑制活性が SL の情報伝達経路を介して発現しているのか、他の情報伝達経路を介しているのかという疑問は依然として残っていた。そのことを明らかにするため、SL 非感受性変異体であるイネ *d14* 変異体と *d3* 変異体に対する化合物 **1c** の分げつ伸長抑制効果を調べた（図 2-9）。イネ *d14* と *d3* 変異体はそれぞれ SL 受容体と ubiquitin E3 ligase を構成する F-box タンパク質をコードする遺伝子の欠損変異体であり、GR24 などの SL 処理に対しても非感受性であることが報告されている。図 2-9 に示したように、化合物 **1c** はこれら二つの変異体に対して分げつ伸長抑制効果を示さなかったため、SL 情報伝達経路を介して分げつ伸長を抑制していると考えた。

2-2-5　**1c** が SL ミミックとして SL 情報伝達経路に与える影響

既存の合成 SL アナログである GR24 では、処理した場合にネガティブフィードバック制御により SL 生合成遺伝子の発現量が低下することが知られていた（Umehara et al., 2008）。化合物 **1c** が SL として作用しているならば、同様に生合成遺伝子の発現量が低下し、それによってイネ内生の SL である 2'-*epi*-5-deoxystrigol (*epi*-5DS)の根内生量と根滲出量が減少すると考えられたため、SL 生合成変異体イネ *d10* を用いて生合成遺伝子 *D10* に対するフィードバック制御をリアルタイム q-RT PCR で比較し、野生型イネを用いて根内生量および滲出量を LC-MS/MS により定量分析した（図 2-10, 表 2-2）。その結果、化合物 **1c** 処理時の SL 生合成遺伝子 *D10* の発現量は GR24 処理時と同程度に発現量の低下が観測され、*epi*-5DS の根内生量および滲出量についても化合物処理をして

図2-9. **1c**のSL非感受性変異体に対する分げつ抑制効果

吸水後16日目のイネ各SL変異体の第2分げつ長を測定した。例数は6。化合物**1c**は1 μMで処理した。cont.は未処理を表す。エラーバーはSEを示す。*d10*は生合成、*d3*と*d14*は非感受性変異体。スケールバーは5 cmを表す。

図2-10. 化合物がSL生合成遺伝子 *D10*の発現量に与える影響

図2-2Aに示したタイムスケジュールで育成したイネの根部の遺伝子発現量をリアルタイムPCRで測定した。例数は3。エラーバーはSDを示す。

	根浸出量（pg/ml）	根内生量（pg/g）
control	4.64±0.93	43.9±20.7
1c 5 μM 処理区	1.53±0.16	N.D.

表2-2. **1c**がSL根内生量及び根浸出量に与える影響

吸水後19日目の*epi*-5DSの根内生量及び根滲出量をLC-MS/MSにより測定した値。タイムスケジュールは図2-2Cに示す。例数は3。±SDを表す。N.D.はNot Detected を表す。

いない対象区と比較して減少していることが分かった。ここで、遺伝子発現解析において *d10* 変異体を用いた理由は、イネの *D10* 遺伝子は野生型での発現量が低く、化合物処理による発現量の減少を観測するのが困難を伴うことが判明したこと、一方 *d10* 変異体では SL 欠乏によるフィードバック制御で *D10* 遺伝子の発現量が恒常的に上昇していることから SL ミミックによるフィードバック制御の効果を観察しやすいと考えた為である。以上のことから、化合物 **1c** は SL として機能し、SL 応答性遺伝子の発現制御を介してイネの分げつ伸長を抑制していると考えられる。

2-3　シロイヌナズナを用いた化合物 1c の作用解析

2-3-1　化合物 1c のシロイヌナズナ SL 関連変異体に対する枝分かれ抑制効果

ここまでのすべての実験はイネを用いて行ってきたが、化合物 **1c** の SL 様活性が単子葉のモデル植物であるイネ特異的な活性でなく広汎な植物体に効果を示す可能性を確かめるため、双子葉のモデル植物であるシロイヌナズナに対する効果も調べる事とした。まず、SL 生合成に関わるタンパク質 Carotenoid Cleavage Dioxygenase7 (CCD7)をコードする遺伝子が欠損したシロイヌナズナ SL 生合成変異体 *max3* を水耕栽培で育成し、陽性参照区として GR24 と化合物 **1c** を各 5 μM で処理した。シロイヌナズナの SL 欠損変異体はロゼット葉からの分枝が増加する事が知られているため、幼植物体を用いた試験ができず、SL 活性を調べるためにはある程度成熟するまでの育成が必要となり、実験期間が長期になる点が特徴である。発芽後 33 日目の各区の分枝数を図 2-11 に示す。未処理の *max3* と比較して化合物 **1c** を処理した区では GR24 と同程度まで枝分かれを抑制しており、同条件で育成した野生型と同様の形態に回復した（図 2-12)。

図2-11. シロイヌナズナ*max3*に対する化合物の効果

低温処理後33日目のシロイヌナズナ*max3*変異体（SL生合成変異体）の枝分かれ数を測定した。例数はWTが12、*max3* control が13、**1c**処理とGR24処理が11。エラーバーはSEを示す。各化合物は5 μMで処理した。controlは無処理を表す。

図2-12. 化合物を処理した シロイヌナズナ*max3*の形態

図2-11に用いたシロイヌナズナの形態写真。各化合物は5 μMで処理した。cont.は無処理を表す。スケールバーは3 cmを示す。

図2-13. シロイヌナズナ各*max*変異体に対する化合物の効果

低温処理後37日目のシロイヌナズナ各*max*変異体の枝分かれ数を測定した。例数は6（*max1* cont.のみ5）。各化合物は5 μMで処理した。*max1*と*max4*は生合成、*max2*は非感受性変異体。cont.は無処理を表す。エラーバーはSEを示す。

次に、上述のイネでの場合と同様にシロイヌナズナにおける他の SL 生合成変異体と SL 非感受性変異体に対する枝分かれ抑制効果を検証した（図 2-13)。結果として、シロイヌナズナにおいても化合物 **1c** は SL 様活性を示し、SL 生合成変異体である *max1*, *max3*, *max4* に対しては枝分かれ抑制作用を発揮する一方で、SL 非感受性変異体である *max2* に対しては枝分かれ抑制作用を示さなかった(各変異体遺伝子の機能に関しては表 1-1 を参照)。従って、単子葉のイネだけでなく双子葉のシロイヌナズナにおいても **1c** は SL 様活性として SL 情報伝達系を通して枝分かれ抑制作用を示すことを指示する結果となった。

2-3-2　化合物 **1c** がシロイヌナズナの根の形態形成に与える影響

以上の実験から化合物 **1c** が SL 様活性化合物として植物の枝分かれを抑制する事が明らかとなった。一方、植物ホルモンとしての SL の他の作用として、根の形態形成に与える影響が報告されている（Rasmussen et al., 2012)。具体的には GR24 などの SL 処理により、シロイヌナズナの根毛が伸長し単位根長辺りの密度が高くなること、また側根の形成阻害や主根の伸長なども報告されている。そこで前項での実験に加えて、化合物 **1c** の SL 様活性として、シロイヌナズナの根毛の伸長試験と側根形成阻害試験を行った。というのも、主根の伸長は濃度が高すぎれば逆に阻害される事もあり、また陽性参照区としての GR24 処理においても差がはっきりとは現れないため、再現性が確保しにくかった事が理由として挙げられる。根毛の長さをグラフ化したものと写真を図 2-14 に、全側根数をグラフ化したものを図 2-15 に示す。根毛伸長試験と側根形成阻害試験のいずれにおいても、化合物 **1c** は GR24 と同程度の活性は示さず、根の形態形成に対する化合物 **1c** の効果と枝分かれ抑制の効果との間には相関が認められなかった。これらの結果は植物体内において SL による枝分かれの制御と根の形

図2-14. シロイヌナズナの根毛伸長に対する化合物の効果

低温処理後10日目のシロイヌナズナの根毛の長さを測定した。各化合物は10 μMで処理し、低温処理後6日目から化合物含有培地に移植した。例数は100（10個体から10本ずつ）。エラーバーはSEを示す。スケールバーは600 μmを示す。

図2-15. シロイヌナズナの側根形成に対する化合物の効果

低温処理後10日目のシロイヌナズナの側根数を測定した。各化合物は10 μMで処理し、低温処理後6日目から化合物含有培地に移植した。例数は10。エラーバーはSEを示す。

図2-16. 各化合物処理によるシロイヌナズナにおけるSL応答性遺伝子の発現量の変化

低温処理後2週間生育したシロイヌナズナの遺伝子発現をリアルタイムPCRにて測定した。各化合物は5 μMで24時間処理した。mock処理を1として標準化した。例数は3。エラーバーはSDを示す。

態制御が独立している可能性を示唆しているが、このことは 4 章で後述する。

2-3-3　シロイヌナズナの SL 応答性遺伝子発現量に対する化合物 **1c** の影響

シロイヌナズナにおいても SL 応答性遺伝子が報告されていることから、先のイネの場合と同様に化合物 **1c** 処理によるそれら遺伝子の応答を調べることとした。SL 生合成遺伝子として SL 処理によりネガティブフィードバックを受け発現が減少する *MAX3* と、SL 処理により発現が上昇する *STH7* に対して **1c** が与える影響をリアルタイム q-RT PCR を用いて調べたところ、いずれも陽性参照区としての GR24 処理と同等の発現量の変動が見られた（図 2-16）。なお、シロイヌナズナの場合にはイネとは異なり、野生型を用いても十分に発現量の変動が見られた。以上より、化合物 **1c** の SL 様活性は植物種に依存しない可能性が高いことを示すことができたと考えている。

2-4　根寄生植物に対する化合物の効果とその応用可能性

2-4-1　根寄生植物 *Striga hermonthica* に対する各化合物の発芽誘導活性

ここまでの実験結果から、化合物 **1c** は植物ホルモン作用としての SL 様活性を有し、植物の枝分かれを抑制する効果を示すと考えられた。そこで次に、根寄生植物の種子発芽誘導活性を調べることとした。ハマウツボ科に属する根寄生植物の *Striga* や *Orobanche* は湿度や温度条件を整えただけでは発芽せず、宿主が根から放出する SL を感知して発芽することが知られている（Yoneyama et al., 2010）。本章の緒言でも述べたように、この根寄生植物の種子発芽試験を合成 SL の活性評価系として用いることが古くから行われてきた。ここまで、

図2-17. 各化合物の根寄生植物*Striga hermonthica*種子発芽誘導活性の比較

各化合物を1 μM, 10 μM, 100 μMで処理し、2日後の*S. Hermonthica*の発芽率を測定した。例数は3。エラーバーはSDを示す。GR24は陽性参照区。

合成化合物の植物ホルモン作用としての詳細を調べる為に、化合物 **1c** を選抜して試験を行ってきたが、ここでは改めて今回合成した **1a-1k** の全ての化合物に関して、根寄生植物 *S. hermonthica* の種子発芽誘導活性を調べることとした（図 2-17)。今回合成した化合物は全て、陽性参照区である GR24 と比較して高濃度でのみ発芽を誘導した。このように、本化合物群は根寄生植物の種子発芽誘導活性が弱く枝分かれ抑制活性は強いことから、今回合成したような phenoxyfuranone 化合物を、分枝を減らすフラノンと言う意味でデブラノン（debranone; de-branching furanone）と呼称し、代表化合物 **1c** を 4-bromo debranone から 4BD と略称することとした。

2-4-2　根寄生植物防除法としての 4BD の応用可能性

4BD が示した植物の枝分かれは抑制するが根寄生植物の種子発芽は誘導しないという SL としての機能選択性を利用して、根寄生植物の防除法を提案できるのではないかと考えた。GR24 と 4BD の根寄生植物種子発芽誘導活性における濃度依存性の差を図 2-18 に示す。このように GR24 が $1x10^{-10}$ 程度でも根寄生植物の種子発芽を誘導するのに対し、4BD は $1x10^{-5}$ 程度でなければ種子発芽を誘導しない。そこで、SL 生合成変異体作物と 4BD を組み合わせれば、根寄生植物に汚染された土壌でも寄生されずに作物を収穫できると考えた。概念図を図 2-19 に示す。野生型では根から SL を放出してしまうため寄生されてしまい、無処理の SL 生合成変異体では枝が多すぎる為に栄養成長にエネルギーが消費されることとなり作物の収量は減少してしまう。一方で、SL 生合成変異体の形態を回復させる為に GR24 などの SL 類を用いた場合、根寄生植物の種子発芽も誘導してしまい、より多く寄生されることになる。しかし、4BD の様な枝分かれ抑制作用に特化した化合物を用いれば、根寄生植物の種子発芽を誘導させ

図2-18. GR24と4BDの根寄生植物*Striga hermonthica*種子発芽誘導活性の広い濃度範囲での活性比較

S.hermonthicaにGR24と4BDを処理した場合の発芽率の比較。14日間のコンディショニング後に各化合物を当該濃度で2日間処理した時の発芽率を示す。▲ がGR24、● が4BDを示す。例数は3。エラーバーはSEを示す。

図2-19. 野生型イネと各化合物処理時のSL生合成変異体イネの想定される生育状況と根寄生植物による寄生状況モデル図

図2-20. 野生型イネと各化合物処理時の*d10*変異体イネの第二分げつ長と、水耕培地抽出物の*S.hermonthica*種子発芽誘導活性

（A）16日間育成したイネの第二分げつ長。例数は6。エラーバーは±SEを示す。（B）16日間育成したイネの水耕培地抽出物処理時の*S.hermonthica*種子発芽率。右4処理区が培地抽出物処理区。例数は3。エラーバーは±SEを示す。

ずに植物の形態を回復させることが出来ると考えられる。実際の圃場試験は許可を取ることが非常に困難であった為、実験室レベルでの検証を行った。これまでと同様、野生型イネと SL 生合成変異体イネ *d10* を水耕栽培で育成し、*d10* 変異体は未処理区、GR24 処理区、4BD 処理区に分けて育成した。さらに、これら 4 処理区の水耕液を集め、酢酸エチルによる抽出を行った後、濃縮乾固させたものを改めて希釈し、根寄生植物に処理した。結果を図 2-20 に示す。このように、*d10*+4BD 処理区は野生型や *d10*+GR24 処理区と同様に第二分げつの伸長を抑制する一方で、根寄生植物の種子発芽試験ではほとんど発芽を誘導しなかった。

2-5 第 2 章まとめ

本章では、植物の枝分かれ抑制活性を指標とした活性型化合物の探索と合成展開を行うことで、新規 SL ミミックの創製に成功した。今回発見したデブラノン類は、１）合成 SL としての植物の枝分かれ抑制作用を有するが、２）一方で根寄生植物の種子発芽誘導活性は既存の SL アナログと比較して著しく低い、という選択性を示す点が特徴である。つまり、これまでの SL 様活性化合物探索で用いられた根寄生植物の種子発芽誘導活性を指標として用いた場合には、このような SL ミミックは発見できなかったと考えられる。また、デブラノン類の優位な点は合成が非常に簡便であるということである。市販のフェノールとブロモ化したメチルフラノンを塩基性条件下で混合するだけでよく、スケールアップも容易である。今回収率として算出した値は再結晶の条件検討を省略したために低くなっているが、シリカゲルカラム精製だけで十分な純度が得られることも分かっている。従って、今後デブラノン類が広く実験や応用に用いられることを期待している。現在でもいくつかの論文で使用されており、今

後更に広まることも想像に難くない（Jiang et al., 2014）。加えて、デブラノンの有する機能特異性を利用した根寄生植物の新たな防除法も提案しているが、このように機能特異的な化合物でしか出来ない用途にも応用の可能性を展開していけると考えている。

2-6　実験の部

装置・器具

核磁気共鳴スペクトル（NMR）：JEOL ECA 500 II

液体クロマトグラフータンデム型質量分析計（LC-MS/MS）：

UPLC unit : SHIMADZU LC-20AD

MS/MS unit : AB SCIEX Triple TOF™ 5600 System(Analyst® TF software)

分析用逆相カラム：ACQUITY UPLC® BEH-C_{18}, φ2.1×50 mm, 1.7 μm (Waters)

薄層クロマトグラフィー（TLC）：silica gel 60F254（Merck 社）

シリカゲルカラムクロマトグラフィー：ワコーゲル® C-200（Wako 社）

逆転写：TaKaRa Thermal Cycler Dice TP600

リアルタイム q-RT PCR：TaKaRa Thermal Cycler Dice RealTime System TP800

溶媒

- 有機合成用

ジクロロメタンは関東化学社の特級をそのまま用いた。THF は関東化学社の有機合成用脱水溶媒（安定剤無添加）をそのまま用いた。酢酸エチル、ノルマルヘキサン、四塩化炭素は関東化学社の鹿１級をそのまま用いた。

NMR 用 $CDCl_3$ は関東化学社の NMR 用 D 化率 99.8%以上 0.03%TMS 含有溶媒を用いた。

（製品番号：ジクロロメタン 10158-70、THF 41001-05、酢酸エチル 14029-81、ノルマルヘキサン 18041-81、四塩化炭素 07140-01、$CDCl_3$ 20956）

- 植物試験用

DMSO はナカライテスク社の GR をそのまま用いた。アセトンは関東化学社の特級をそのまま用いた。（製品番号：DMSO 13407、アセトン 01026）

- 質量分析用

アセトニトリル、純水、メタノール、ギ酸は関東化学社の HPLC 用をそのまま用いた。

（製品番号:アセトニトリル 01033-79、純水 11307-79、メタノール 25185-79、ギ酸 16233-97）

植物材料

シロイヌナズナは野生型として Col-0 を、変異体は *max1-1*、*max2-1*、*max3-9*、*max4-1* を用いた。イネはシオカリ WT、*d10-1*、*d3-1*、*d14-1* を用いた。

2-6-1　化合物の合成

5-Bromo-3-methyl-2(5*H*)-furanone

N-Bromosuccinimide (10.65 g/ 1.0 Eq)とαα'-Azobisisobutyronitrile (0.20 g/ 0.02 Eq)を 200 ml２径ナスフラスコに量りとり、窒素置換した。窒素雰囲気下で四塩化炭素を溶媒として 60 ml 加え、3-methyl-2(5H)-furanone (5 ml/1.0 Eq)をゆっくりと滴下した。その後、オイルバス（90 °C）で四時間加熱還流した。室温まで冷ました後、析出してきた個体を吸引濾過でろ別し、エバポレーターで減圧濃縮後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）にて精製し、淡黄色液体を得た。(9.95 g, 90%収率)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 2.02(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.84(s, 1H, C=CHC*H*), 7.20(s, 1H, C=C*H*)

上記 ^{1}H NMR のスペクトルデータは文献値と一致した。(Chapleo et al., 1976)

3-methyl-2(5*H*)-furanone は東京化成社から購入した市販品を用いた。

5-(4-Chlorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**1a)**

20 ml ナスフラスコに炭酸カリウム（0.17 g/ 1.2 Eq）と TBABr (0.32 g/ 1.0Eq)を量りとり、ジクロロメタン 2 ml と純水 3 ml を溶媒として加えた。 撹拌しながら 4-Chlorophenol (0.13 g/1.0 Eq)を加え、5-Bromo-3-methyl-2(5*H*)-furanone (0.18 g/1.0 Eq)をジクロロメタン 2 ml に溶かしたものを室温下ゆっくりと滴下した。全量を滴下したものを８時間以上撹拌した後、水と酢酸エチルを加えて分

液操作した。酢酸エチルで更に２回抽出し、有機層を brine で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水させた。脱水後、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）で精製し、白色個体を得た。これをヘキサン／酢酸エチルで再結晶し、白色針状結晶を得た。(0.07 g, 29%収率)（本合成法を以下 Method A とする）

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 2.010(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.230(s, 1H, C=CHC*H*), 6.966(s, 1H, C=C*H*), 7.065(d, 2H, Ar*H*), 7.286(d, 2H, Ar*H*)

HRMS (ESI+) m/z calcd. For $C_{11}H_{10}ClO_3$ (M+H) 225.0313 found 225.0314

以下の化合物は **1a** と同様の方法で合成した（Method A)。また、合成に用いたフェノール類は東京化成社から購入した市販品をそのまま用いた。

5-(4-Fluorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**1b)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 2.01(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.22(s, 1H, C=CHC*H*), 6.99(s, 1H, C=C*H*), 7.03(d, 2H, Ar*H*), 7.10(d, 2H, Ar*H*)

HRMS (ESI+) m/z calcd. For $C_{11}H_{10}FO_3$ (M+H) 209.0608 found 209.0610

5-(4-Bromophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**1c)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 2.01(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.24(s, 1H, C=CHC*H*), 6.98(s, 1H, C=C*H*), 7.01(d, 2H, Ar*H*), 7.43(d, 2H, Ar*H*)

HRMS (ESI+) m/z calcd. For $C_{11}H_{10}BrO_3$ (M+H) 268.9808 found 268.9804

5-(4-Iodophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**1d)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 2.013(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.238(s, 1H, C=CHC*H*), 6.905(s, 2H, Ar*H*),6.971(d, 1H, C=C*H*), 7.625(d, 2H, Ar*H*)

HRMS (ESI+) m/z calcd. For $C_{11}H_{10}O_3I$ (M+H) 316.9669 found 316.9674

5-(4-Trifluoromethylphenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**1e)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 2.035(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.335(s, 1H, C=CHC*H*), 7.007(s, 1H, C=C*H*), 7.215(d, 2H, Ar*H*), 7.610(d, 2H, Ar*H*)

HRMS (ESI+) m/z calcd. For $C_{12}H_{10}O_3$ F_3 (M+H) 259.0577 found 259.0579

5-(4-Cyanophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**1f)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 2.039(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.341(s, 1H, C=CHC*H*), 7.011(s, 1H, C=C*H*), 7.205(d, 2H, Ar*H*), 7.654(d, 2H, Ar*H*)

HRMS (ESI+) m/z calcd. For $C_{12}H_{10}NO_3$ (M+H) 216.0655 found 216.0660

3-Methyl-5-(4-methylphenoxy)-2(5*H*)-furanone (**1g)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.002(s, 3H, CH=CC*H*$_3$) , 2.317(s, 3H, ArC*H*), 6.250(s, 1H, C=CHC*H*), 6.972(s, 1H, C=C*H*), 7.025(dd, 2H, Ar*H*), 7.127(d, 2H, Ar*H*)

HRMS (ESI+) m/z calcd. For $C_{12}H_{13}O_3$ (M+H) 205.0859 found 205.0866

5-(4-*tert*-Butylphenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**1h)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 1.308(s, 9H, C(C*H*$_3$)$_3$), 2.006(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.272(s, 1H, C=CHC*H*), 6.972(s, 1H, C=C*H*), 7.063(d, 2H, Ar*H*), 7.344(d, 2H, Ar*H*)

HRMS (ESI+) m/z calcd. For $C_{15}H_{19}O_3$ (M+H) 247.1329 found 247.1318

5-(4-Methoxycarbonylphenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**1i)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.03(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 3.91(s, 1H, (CO)OC*H*$_3$), 6.36(s, 1H, C=CHC*H*), 7.01(s, 1H, C=C*H*), 7.16(d, 2H, Ar*H*), 8.04(d, 2H, Ar*H*)

HRMS (ESI+) m/z calcd. For $C_{13}H_{13}O_5$ (M+H) 249.0758 found 249.0770

5-(4-Methoxyphenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**1j)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 1.996(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 3.788(s, 3H, -O-CH_3), 6.191(s, 1H, C=CHC*H*), 6.851(s, 2H, Ar*H*), 6.962(d, 1H, C=C*H*), 7.075(d, 2H, Ar*H*)

HRMS (ESI+) m/z calcd. For $C_{12}H_{13}O_4$ (M+H) 221.0808 found 221.0819

5,5'-[1,4-phenylenebis(oxy)]bis[3-methyl-2(5*H*)-furanone] (**1k)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.028(s, 6H, CH=CC*H*$_3$), 6.250(s, 2H, C=CHC*H*), 6.994(s, 2H, C=C*H*), 7.123(dd, 4H, Ar*H*)

HRMS (ESI+) m/z calcd. For $C_{16}H_{15}O_6$ (M+H) 303.0863 found 303.0873

2-6-2　イネ第二分げつ伸長抑制試験（図 2-1, 2-3, 2-4, 2-7, 2-8, 2-9, 2-20）

植物体の生育条件

籾殻を除いたイネ種子に滅菌溶液（2.5%次亜塩素酸ナトリウム、0.01%Tween-20）を加え、室温にて 25 分間震盪した。クリーンベンチ内にて滅菌溶液を捨て、滅菌蒸留水で種子を５回洗浄し、暗所 25 °C で 2 日間静置した。発芽種子を 0.65%寒天で固化させたイネ水耕用培地に移植し、連続光下 25 °C にて 7 日間生育させた。その後、12 mL 容褐色バイアル瓶に化合物含有イネ水耕用培地を 12 mL 加え、寒天培地よりイネを移植し、25 °C、明期 16 時間/暗期 8 時

間の光条件下にて７日間生育させた後、イネの第２分げつ長及び全長を測定した。各化合物は 100 mM DMSO 溶液を作成し、植物体に処理する濃度の 1000 倍の濃度までアセトンで希釈した後、12 μL を水耕用培地に加えた。（例えば、1 μM で植物に処理した場合には 1 mM までアセトン希釈溶液を作成した。）

イネ水耕用培地

1 mM	NH_4NO_3
0.6 mM	Na_2HPO_4
0.3 mM	K_2SO_4
0.4 mM	$MgCl_2$
0.2 mM	$CaCl_2$
0.045 mM	Fe-EDTA
0.05 mM	H_3BO_3
0.009 mM	$MnSO_4$
0.0003 mM	$CuSO_4$
0.0007 mM	$ZnSO_4$
0.0001 mM	Na_2MoO_4

pH を KOH で 5.7 に調整した後、120 °C で 15 分間オートクレーブした。

2-6-3　長期水耕栽培によるイネ分げつ数及び草丈の測定試験（図 2-5, 2-6）

500 mL 容褐色瓶に化合物含有イネ水耕培地を 550 mL 加え、2-5-2 の実験で 16 日間生育したイネを移植した。移植時に終濃度 1 μM になるように化合物を処理し、７日ごとに化合物を含まない水耕培地を注ぎ足し、元の水位まで戻るようにした。吸水開始後 17 日目から全長を、27 日目からイネの分げつ数を 10 日ごとに測定した。25 °C、明期 16 時間、暗期 8 時間の光条件下にて育成した。化合物の処理方法は 2-5-2 に準ずる。

2-6-4　遺伝子発現解析（図 2-10）

植物サンプルの調製

籾殻を除いたイネ種子に滅菌溶液（2.5%次亜塩素酸ナトリウム、0.01%Tween-20）を加え、室温にて 25 分間震盪した。クリーンベンチ内にて滅菌溶液を捨て、滅菌蒸留水で種子を５回洗浄し、暗所 25 °C で 2 日間静置した。発芽種子を 0.65%寒天で固化させたイネ水耕用培地に移植し、連続光下 25 °C にて７日間生育させた。その後、12 mL 容褐色バイアル瓶に化合物含有リン欠乏イネ水耕用培地を 12 mL 加え、寒天培地よりイネを移植し、25 °C、明期 16 時間、暗期 8 時間の光条件下にて７日間生育させた。得られたイネの根を植物サンプルとして用いた。

リン欠乏イネ水耕用培地

1 mM	NH_4NO_3
1 mM	MES
0.3 mM	K_2SO_4
0.4 mM	$MgCl_2$
0.2 mM	$CaCl_2$
0.045 mM	Fe-EDTA
0.05 mM	H_3BO_3
0.009 mM	$MnSO_4$
0.0003 mM	$CuSO_4$
0.0007 mM	$ZnSO_4$
0.0001 mM	Na_2MoO_4

pH を KOH で 5.7 に調整した後、120 °C，15 分間オートクレーブした。

cDNA の合成

total RNA の精製は Plant RNA Isolation Kit (Invitrogen) を用いて、添付のプロトコルに従い行った。抽出した total RNA を以下の組成の DNase 処理反応液と混合し 37 °C にて１時間 DNase 処理し、その後クエン酸飽和フェノール／クロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿により total RNA を回収した。cDNA 合成は、1 μg の total RNA 溶液を用い、滅菌水で 11.5 μL に調整し、65 °C で５分間熱変性した後、氷上で急冷した。反応液を 95 °C にて５分間処理し、酵素を失活させた。これを２倍希釈し、以後の PCR に用いた。

DNase 処理反応液

24.5 μL	total RNA 溶液
3 μL	DNase buffer(TaKaRa)
0.5 μL	RNase Inhibitor(Toyobo)
2 μL	DNaseI(TaKaRa)

逆転写酵素液

4 μL	5X1st strand buffer (Invitrogen)
2 μL	0.1 M DTT (Invitrogen)
1 μL	10 mM dNTPs (Invitrogen)
1 μL	Oligo $(dT)_{12\text{-}18}$ Primer (0.5 μg/μL, Invitrogen)
1 μL	RNase Inhibitor(40 U/μL, Toyobo)
2 μL	M-MLV RTase (200 U/μL, Invitrogen)

リアルタイム PCR

任意の cDNA 溶液より 1 μL あたり 25 ngRNA 由来 cDNA、2.5 ngRNA 由来 cDNA、0.25 ngRNA 由来 cDNA の希釈系列を調製して検量線作成に用いた。解析に供する cDNA はいずれも、1 μL あたり 2.5 ng RNA 由来 cDNA の濃度に統一した。cDNA サンプルを以下の組成の PCR 溶液と混ぜ PCR 反応を行った。相対定量値は付属ソフトウェアを用いて算出した。

PCR 溶液

12.5 μL	SYBR® *Premix Ex Taq*™ (TaKaRa)
0.5 μL	10 μM 5’プライマー
0.5 μL	10 μM 3’プライマー
2 μL	cDNA 溶液
9.5 μL	滅菌水

反応条件

35 °C 10 秒　【95 °C 5 秒→60 °C 30 秒】40 サイクル

用いたプライマーは以下の通りである。

OsACT1 5'プライマー　：5’- CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA -3’

OsACT1 3'プライマー　：5’- TTCCTGTGCACAATGGATGG -3’

D10 5’プライマー　：5’-CGTGGCGTGGAAGAGTGT-3’

D10 3’プライマー　：5’-TCAGGTACGTGCCATCCAG-3’

2-6-5　化合物 **1c** 処理時のイネ 2'-*epi*-5DS 内生量の定量（表 2-2）

植物サンプルの調製

籾殻を除いたイネ種子に滅菌溶液（2.5%次亜塩素酸ナトリウム、0.01%Tween-20）を加え、室温にて 25 分間震盪した。クリーンベンチ内にて滅菌溶液を捨て、滅菌蒸留水で種子を５回洗浄し、暗所 25 °C で 2 日間静置した。発芽種子を 0.6%寒天入りイネ水耕培地に移植し、25 °C にて 7 日間生育させた。12 mL 容褐色バイアル瓶に化合物含有リン欠乏イネ水耕培地を 12 mL 加え、寒天培地よりイネを移植し、25 °C にて 9 日間生育させた。化合物含有水耕液を取り替え、更に 1 日育成し、得られたイネの根、および水耕液をサンプルとして用いた。

水耕用培地サンプルの精製

6 mL の水耕用培地サンプルに内部標準として 400 pg の d6-*epi*-5DS を加えた後、3 mL の酢酸エチルで 2 回抽出した。有機層を乾固させ、LC-MS/MS に供した。

根サンプルの調製

生重量を測定したイネ根に内部標準として 400 pg の d6-*epi*-5DS を加えたアセトンに浸し、破砕した。破砕物をろ過し、乾固させた後、飽和食塩水を 1 mL 加え、3 mL の酢酸エチルで 2 回抽出した。有機層を乾固させ、3 mL の 10%のアセトン水に溶かし、10%アセトン水で平衡化した Oasis HLB 3 mLcartridge (Waters)にのせた後、3 mL の 10%アセトン水で洗浄した。6 mL のアセトンを加えて溶出し、溶出液を乾固させた。1 mL のヘキサン/酢酸エチル(85/15)に溶解し、ヘキサン/酢酸エチル(85/15)で平衡化した Sep-Pak Silica 1 mL cartridge (Waters)にのせた後、3 mL のヘキサン/酢酸エチル(85/15)で洗浄し、ヘキサン/酢酸エチル（65/35）を加えて溶出した。溶出液を乾固させ、LC-MS/MS に供した。

LC-MS/MS による *epi*-5DS の分析

サンプルを 45 μL のメタノールに溶解し、そのうち 40 μL を UPLC に inject した。LC-MS/MS を用いた Product ion モードより、parent ion から生じた product ion を用いて以下の条件で分析した。定量値の計算は解析ソフト「Multiquant™ software2.0」を用いて行った。

0-4min.	アセトニトリル 20%-40%
4-7min.	アセトニトリル 40%-70%
7-9min.	アセトニトリル 70%-99%
流速	0.3 mL/min.

2-5-6 化合物 **1c** のシロイヌナズナ SL 変異体に対する効果（図 2-11, 2-12, 2-13）

シロイヌナズナ種子を 70%エタノール水で 30 分間表面殺菌後、エタノールで１分間表面殺菌し、クリーンベンチ内で風乾した。あらかじめ角シャーレ（滅菌２号、栄研化学）において固化させた 0.7%寒天入り 1/2MS 培地上に播種し、4 °C で４日間低温処理を行った。その後、23 °C、連続光下にて 5 日間生育させた。あらかじめ 1.5 mL エッペンドルフチューブに 1/2MS 培地を 1.8 mL 加え、生育させたシロイヌナズナの芽生えを移植し、同条件で 10 日間生育させた。抽台直前のシロイヌナズナを、5 μM の **1c** 含有シロイヌナズナ水耕液 16 mL を入れた 12 mL 容褐色バイアル瓶に移植し、同条件で 15 日間生育させた。

1/2MS 培地

2.3 g	Murashige&Skoog Salt Mixture(Gibco BRL)
8.0 g	Sucrose
1.0 mL	1000 X ビタミンストック

NaOH で pH5.7 に調整した後、1.0 L にメスアップし、植物用寒天（0.7%）を加え、オートクレーブした。

1000 X ビタミンストック

50 mg	ニコチン酸
50 mg	ピリドキシン塩酸塩
20 mg	チアミン塩酸塩
200 mg	グリシン
5 mg	ビオチン
50 mg	葉酸

約 80 mL の蒸留水で懸濁し、溶解するまで 1N NaOH を加え、蒸留水で 100 mL にメスアップした。

シロイヌナズナ水耕用培地

5 mM	KNO_3
1 mM	KH_2PO_4
1 mM	$MgSO_4$
1.5 mM	$Ca(NO_3)_2$
1 mM	NH_4Cl
50 nM	Fe-EDTA
46 μM	H_3BO_3
10 μM	$MnSO_4$
0.77 μM	$ZnSO_4$
0.58 μM	Na_2MoO_4
0.32 μM	$CuSO_4$
0.25 μM	NH_4VO_3

2-6-7 化合物 **1c** がシロイヌナズナ根の形態に与える影響の評価（図 2-14, 2-15）

シロイヌナズナ種子を 70%エタノール水で 20 分間表面殺菌した後、エタノールで１分間表面殺菌し、クリーンベンチ内で風乾した。あらかじめ角シャーレ（滅菌２号、栄研化学）に固化させた 0.7%寒天入り 1/2MS 培地上に播種し、4 °C で２日間低温処理を行った。その後、23 °C、連続光下にて６日間生育させた。発芽後の幼植物体の胚軸長や主根長が同程度の個体を選抜し、予め角シャーレに 0.7%寒天で固化させた化合物含有 1/2MS 培地上に移植し、シャーレ裏面から根端位置に印を付けておいた。移植した幼植物体を 23 °C、連続光下にて更に 4 日間生育させた個体の、根端から 1 cm 程度の位置を撮影し、画像処理ソフト Image J を用いて根毛長を計測した。一個体から 10 本の長さを測り、10 個体分計 100 本の平均値を求めた。また、個体ごとの側根数を計数し、10 個体分の平均値を求めた。

2-6-8 化合物 **1c** がシロイヌナズナの SL 応答性遺伝子発現量に与える影響の評価（図 2-14, 2-15）

植物サンプルの調製

シロイヌナズナ種子を 70%エタノール水で 20 分間表面殺菌した後、エタノールで１分間表面殺菌し、クリーンベンチ内で風乾した。あらかじめ角シャーレ（滅菌２号、栄研化学）に固化させた 0.7%寒天入り 1/2MS 培地上に播種し、4 °C で２日間低温処理を行った。その後、23 °C、明期 16 時間/暗期 8 時間の光条件下にて 15 日間生育させた。その際、シャーレを縦置きにし、根が培地上を這うように生育させた。生育後の個体を化合物含有滅菌水に移植し、同様の生育条件で一日化合物処理した。4〜5 個体を一つのサンプルとし、液体窒素にて凍結させたものを RNA 抽出に用いた。

cDNA の合成

total RNA の精製は Plant RNA Isolation Kit (Invitrogen) を用いて、添付のプロトコルに従い行った。抽出した total RNA1 μg を以下の組成の DNase 処理反応液と混合し室温にて 5 分間 DNase 処理した。cDNA 合成は、gDNase 処理した 1 μg の total RNA 溶液 10 μL を用い、以下の組成の逆転写酵素液を加えて 37 °C で 15 分間逆転写反応させた後、85 °C で 5 秒間酵素を失活させた。これを２倍希釈し、以後の PCR に用いた。

DNase 処理反応液

7 μL	total RNA 溶液
2 μL	5 x gDNA Eraser Buffer(TaKaRa)
1 μL	gDNA eraser (TaKaRa)

逆転写酵素液

4.0 μL	5 x PrimeScript® Buffer 2 (for Real Time) (TaKaRa)
1.0 μL	PrimeScript® RT Enzyme Mix I (TaKaRa)
1 μL	RT Primer Mix (TaKaRa)
1 μL	滅菌水

リアルタイム PCR

任意の cDNA 溶液より 1 μL あたり 25 ngRNA 由来 cDNA、2.5 ngRNA 由来 cDNA、0.25 ngRNA 由来 cDNA の希釈系列を調製して検量線作成に用いた。解析に供する cDNA はいずれも、1 μL あたり 2.5 ng RNA 由来 cDNA の濃度に統一した。cDNA サンプルを以下の組成の PCR 溶液と混ぜ PCR 反応を行った。相対定量値は付属ソフトウェアを用いて算出した。

PCR 溶液

10.0 μL	SYBR® *Premix Ex Taq*™ (2 x) (TaKaRa)
0.4 μL	10 μM 5’プライマー
0.4 μL	10 μM 3’プライマー
1.6 μL	cDNA 溶液
7.6 μL	滅菌水

反応条件

35 °C 10 秒　【95 °C 5 秒→60 °C 30 秒】40 サイクル

用いたプライマーは以下の通りである。

Act2 5’プライマー　：5’- CGCCATCCAAGCTGTTCTC -3’

Act2 3’プライマー　：5’- TCACGTCCAGCAAGGTCAAG -3’

MAX3 5’プライマー　：5’- GTGTATTTAAGATGCCACCGA -3’

MAX3 3’プライマー　：5’- CTTGAATTCCGAATCATACTCAC -3’

STH7 5’プライマー　：5’- CCAATAAACTAGCCGGGAAA -3’

STH7 3’プライマー　：5’- GCTCTGTCTTCTTGGCAAAAT-3’

2-6-9 新規枝分かれ抑制物質の根寄生植物種子発芽誘導活性の評価（図 2-17, 2-18, 2-20）

S. hermonthica 種子に滅菌溶液（1%次亜塩素酸ナトリウム、0.01%Tween-20）を加え、室温で 15 分間震盪した。クリーンベンチ内にて滅菌溶液を捨て、滅菌蒸留水で５回洗浄した後、0.1%滅菌寒天水を加え、滅菌蒸留水で湿らせたガラスろ紙（ADVANTEC）上に滴下した。暗所、30 °C にて 14 日間静置し、コンディショニングした。各化合物 10 mM アセトン溶液を順次滅菌蒸留水で 10 倍希釈していき、任意の濃度に調製した溶液または陽性区、陰性区としてそれぞれ任意濃度の GR24、滅菌蒸留水を加え暗所、30 °C にて 2 日間静置した。全種子数及び発芽種子数を計測し、発芽率を求めた。

第 3 章　機能選択的デブラノンの創製

3-1 緒言

前章ではストリゴラクトン（SL）の植物ホルモンとしての枝分かれ抑制作用をミミックする化合物をリード化合物として構造展開した結果、これまで根寄生植物の種子発芽誘導活性を指標として創製されてきた SL アゴニストとは異なる構造と作用特性を有する化合物を創製することに成功した。前章で示した 4BD の様に、選択性を有する化合物は任意の SL 機能のみを発揮することが出来るため農業利用上の利点があると考えられる。その利用法の一つが根寄生植物の防除であり、前章では 4BD の応用例として SL 生合成変異体との共利用を提案した。また、任意の SL 機能のみを発揮する化合物は、各々の SL 受容体を特定する評価系の確立にも利用できると考えられる。植物における SL 受容体は既にα/β fold hydrolase D14 であると報告されているが、根寄生植物や AM 菌における SL 受容体は未だ解明されていない。現在ゲノムの解読が進められている *Striga* では、D14 タンパク質や D14-like タンパク質をコードする遺伝子と相同性の高い遺伝子が既に 10 個以上発見されているものの（Yoshida et al., 2010）、これらの遺伝子産物がすべて SL による生理作用に関与するのか、あるいは他の機能を有するのかは不明である。こうした遺伝子機能を調べるには機能欠損変異体の作製が有効であるが、*Striga* や AM 菌での遺伝子組み換え技術は未だ確立されておらず、機能の冗長性が存在する可能性も否定できない。また相同性の高い遺伝子がコードするタンパク質同士もまた高い相同性を有しており、配列情報のみでそれぞれの遺伝子産物が有する特定の機能を推定することは困難である。そこで、機能選択性を有している化合物が合成できれば、異種発現させた受容体候補タンパク質に対する各機能選択的な化合物の親和性を比較するこ

とで、当該生物での SL 活性を有する化合物のみが高い親和性を有するタンパク質に絞り込みができ、受容体の特定に役立てることができると考えた。また受容体候補遺伝子を絞り込む際には、各化合物処理に対する対象遺伝子の発現変化の差も重要な知見となる。各種植物や根寄生植物、AM 菌が受容している SL という物質が同一であったとしても、それぞれの生物で受容体の構造は異なっていると考えられ、このことは 4BD のような枝分かれ抑制活性特異的な選択性を有する化合物が既に得られていることからも有力に支持される。従って、化合物の構造を的確に改変することで、各生物種の SL に対する構造要求性に適合する化合物の合成も可能であると考えられる。そこで、デブラノン類の構造改変による選択性の調節を目的として本研究を開始した（図 3-1)。本研究により多様な SL 活性の各々に対して特異的なミミックを創製することができれば、今後農業利用だけでなく受容体の同定における上記利用法の可能性も高くなる。本章では主に、合成した化合物のイネ SL 生合成変異体 *d10* の分げつ抑制活性と根寄生植物 *S. hermonthica* の種子発芽誘導活性を比較することにより、化合物の SL 活性と機能選択性を評価し、構造活性相関を行った。

図3-1. デブラノン類の選択性をコントロール出来た場合の概念図

3-2　イネ分げつ抑制作用と根寄生植物種子発芽誘導作用に対して機能選択性を有する化合物の創製

3-2-1　構造の変化がデブラノン類の SL 様活性に与える影響の検討

前章でおこなった構造活性相関研究では、リード化合物におけるベンゼン環上の官能基の置換位置が 4 位であったため、4 位の官能基の種類がデブラノン類の SL 活性に与える影響を調べた。本章では、官能基の種類だけでなく、官能基のベンゼン環上の位置やベンゼン環周辺の環の数など、より大きな構造の変化がデブラノン類の SL 活性に与える影響を調べることとした。まず、図 3-2 に示したように、リード化合物 **1a** の官能基であるクロロ基が 4 位以外の 3 位、2 位に置換された化合物 **2a**, **2b** を合成し、そのイネ第二分げつ伸長抑制活性と、根寄生植物 *S. hermonthica* の種子発芽誘導活性を比較した（図 3-3、図 3-4）。その結果、いずれの試験に対しても官能基の位置が 4 位、3 位、2 位の順に高い SL 活性を示しており、官能基の位置が化合物の SL 活性を決定する大きな因子であることが明らかとなった。一方で、官能基の位置ではなく環構造を増やしたタイプの化合物も合成し、その SL 活性を評価した。というのも、根寄生植物の種子発芽誘導活性の高い天然型 SL や広く用いられている SL アゴニストの GR24 は、ラクトン環を含む ABC 環と呼ばれる三つの縮環構造を有しており、デブラノンにおいても環構造を増加させた場合に活性の向上が期待できると考えた為である。具体的には、図 3-2 に示したように芳香環ではなくシクロヘキサノン環を縮環させたテトラロン類から合成される化合物 **2c** や、ヒドロキシ基の位置異性体である 1-naphthol と 2-naphthol から合成された化合物 **2d** と **2e**、naphthol がクロロ基で修飾された化合物 **2f**、複素環を有する化合物 **2g** の５種類を合成し、上記二種の試験に供した（図 3-5、図 3-6）。しかし、想定に反してイ

図3-2. 初期的な検討に用いた化合物の構造

図3-3. 置換基の位置がイネ第二分げつ伸長抑制活性に与える影響

吸水後16日目のイネの第二分げつ長。各化合物は0.1 μMで9日目から水耕にて処理。例数は6。エラーバーはSEを示す。controlは無処理を表す。

図3-4. 置換基の位置が根寄生植物種子発芽誘導活性に与える影響

14日間のコンディショニング後、各化合物を1 μM, 10 μM, 100 μMで処理し、2日後の*S. Hermonthica*の発芽率。例数は3。エラーバーはSDを示す。GR24は陽性参照区。DWは滅菌蒸留水を示す。

図3-5. ２環性デブラノンがイネ第二分げつ伸長抑制活性に与える影響

吸水後16日目のイネの第二分げつ長。各化合物は1 μMで9日目から水耕にて処理。例数は6。エラーバーはSEを示す。controlは無処理を表す。

図3-6. ２環性デブラノンの根寄生植物種子発芽誘導活性

14日間のコンディショニング後、各化合物を1 μM, 10 μM, 100 μMで処理し、2日後の*S. Hermonthica*の発芽率。例数は3。エラーバーはSDを示す。GR24は陽性参照区。DWは滅菌蒸留水を示す。

ネの第二分げつ伸長抑制試験では GR24 と同程度の活性にとどまり、前章の結果との比較から 4BD と比肩できるほど活性の高いデブラノンを見出すことはできなかった。また、根寄生植物の種子発芽試験においても、これまでのデブラノン類の活性を超える化合物はなく、5-chloro-8-hydroxyquinoline から合成されたヘテロ環を有する **2g** が比較的良好な結果を与えたのみであった。以上、官能基置換位置の検討と環の数の検討から、デブラノンにおいては環の数よりも官能基置換位置の活性に与える影響の方が大きいと判断し、以降の実験を行うこととした。なお、本章中では以降のイネ第二分げつ伸長抑制試験を「分げつ抑制試験」、*S.hermonathica* 種子発芽誘導試験を「種子発芽誘導試験」と略記することとする。

3-2-2　ベンゼン環上官能基置換位置の組み合わせがデブラノン類の SL 機能選択性に与える影響

3-2-1 での検討により、デブラノン類においては官能基の置換位置が SL 活性に大きく影響することが示唆されたため、本項では二置換型デブラノンの官能基の置換位置の組み合わせが SL 活性や機能選択性に与える影響を調べることとした。まず、官能基の全ての位置の組み合わせが揃えられるジクロロフェノールを用いて、全ジクロロデブラノン位置異性体 **3a-3f** を合成した（図 3-7）。次いで、先と同様に分げつ抑制試験と、種子発芽誘導試験に供した（図 3-8、図 3-9）。分げつ抑制試験では、化合物 **3a**, **3b**, **3c** が比較的高い活性を示し、**3d**, **3e**, **3f** も分げつ伸長抑制作用は示したものの **3a-3c** には及ばなかった。一方、種子発芽誘導試験では **3c** と **3d** が比較的高い活性を示し、次いで **3f**, **3b** の順に高い発芽率を示した。以上の結果に基づき、2,4-二置換のデブラノンをより枝分かれ抑制に特化したタイプのデブラノンとして、2,5-二置換のデブラノンを枝分かれ抑制

3a

3b

3c

3d

3e

3f

図3-7. 全ジクロロデブラノンの構造

図3-8. 官能基の置換位置組み合わせがイネ第二分げつ伸長抑制活性に与える影響

吸水後16日目のイネの第二分げつ長。各化合物は10 nMで9日目から水耕にて処理。例数は6。エラーバーはSEを示す。cont.は無処理を表す。

図3-9. 官能基の置換位置組み合わせが根寄生植物種子発芽誘導活性に与える影響

14日間のコンディショニング後、各化合物を1 μM, 10 μM, 100 μMで処理し、2日後の*S. Hermonthica*の発芽率。例数は6。エラーバーはSDを示す。GR24は陽性参照区。DWは滅菌蒸留水を示す。

にも根寄生植物種子発芽にも作用するタイプのデブラノンとして、そして 2,6-二置換のデブラノンを根寄生植物種子発芽に特化したタイプのデブラノンとして、それぞれ官能基の最適化を行うこととした。以降の試験では活性の強弱の基準が必要であると考えたため、分げつ抑制試験では第２分げつ長を 5 mm 以下に抑えられる濃度を、種子発芽誘導試験では 20%以上の発芽率を示す濃度を、それぞれ化合物の有効濃度として設定し、有効濃度が低いほど活性が強い化合物であると判断した。なお、ここで 2,3-二置換のデブラノンを枝分かれ抑制に特化したものとして選抜しなかった理由は、その原料となる 2,3-二置換フェノールの市販品の種類が乏しかった為である。

3-2-3　イネ分げつ抑制作用に特化したデブラノンの創製

3-2-2 の検討から、2,4-二置換のデブラノン類を種々合成し、これまでの実験と同様にイネと *Striga* を用いたそれぞれの試験に供した。第２章の官能基検討の結果からハロゲンを含む電子吸引性の官能基で置換された化合物が良好な結果を与えると結論できたため、フッ素から臭素までのハロゲンと、シアノ基、ニトロ基を有する化合物を合成した（図 3-10）。分げつ抑制試験では、2 位の官能基に依らず 4 位の置換基が F、Cl、Br の順に大きくなるほど活性の低下が見られた。また、2 位の官能基が F、Cl、Br と大きくなるほど、4 位の官能基の活性向上への影響が大きくなる傾向が見られ、2 位が F で修飾された化合物（**4a-4c**）がいずれも高い活性を示す中で、結果的には 2-bromo-4-fluoro debranone（**4f**）が最も高い分げつ伸長抑制作用を示した（図 3-11）。シアノ基やニトロ基などの強い電子吸引性の官能基を有する化合物 **4i-4l** はいずれも比較的低い分げつ抑制活性を示した。一方で、*S.hermonthica* 種子発芽誘導試験では **4i-4l** が比較的高い活性を示し、次いで 2 位にフルオロ基を有する **4a-4c** が 10 μM でも 20%

図3-10. 合成した全2,4-二置換型デブラノンの構造

図3-11. 2,4-二置換型デブラノンのイネ第二分げつ伸長抑制作用の評価

吸水後16日目のイネの第二分げつ長。各化合物は100 nM, 10 nMで9日目から水耕にて処理。例数は6。エラーバーはSEを示す。GRはGR24を、BDは4BDを、cntは無処理を表す。

図3-12. 2,4-二置換型デブラノンの根寄生植物種子発芽誘導作用の評価

14日間のコンディショニング後、各化合物を1 μM, 10 μM, 100 μMで処理し、2日後の*S. Hermonthica*の発芽率。例数は3。エラーバーはSDを示す。GRはGR24（陽性参照区）を、BDは4BDを、DWは滅菌蒸留水を表す。

以上の発芽率を示した（図 3-12)。イネの分げつ抑制効果が高かった **4f** は中程度の *S.hermonthica* 種子発芽誘導活性であった。以上の結果から、化合物 **4f** を分げつ抑制特化型のデブラノンとして選抜した。化合物の選択性について比較すると、第２章の代表化合物である 4BD が 10^{-7} M でイネ分げつ伸長を抑制し 10^{-5} M 程度から *S.hermonthica* の種子発芽を誘導するのに対し、**4f** は 10^{-8} M でイネ分げつ伸長を抑制し 10^{-6} M では *S.hermonthica* の種子発芽を誘導しないことから、選択性は若干向上したものの、ほぼ 4BD と同等の選択性を示すと言える。しかしイネの分げつ抑制活性は 10 倍以上向上しており、イネ分げつ抑制に特化した化合物と言って差し支えないと考えられる。

3-2-4　イネと *Striga* の双方に作用するデブラノンの創製

3-2-2 の検討から、2,5-二置換のデブラノンを種々合成し、イネと *Striga* を用いたそれぞれの試験に供した。前項の検討から、ハロゲン性官能基ではイネ分げつ抑制活性が高くなり、シアノ基やニトロ基では *S.hermonthica* の種子発芽誘導活性が高くなる傾向が見られたため、2,5-二置換型のデブラノンでもそれらの官能基を検討した。合成の容易さがデブラノンのメリットであるため、原料は市販のフェノール類にのみ限定した。合成した化合物を図 3-13 に示す。分げつ抑制試験では、**5a**、**5b**、**5d** が 4BD と同程度の活性を示し、**3c** と **5c** は若干劣るものの GR24 より高い活性を示した（図 3-14)。**5e-5g** の強い電子吸引性官能基で置換された化合物はデブラノンとしては低いイネ分げつ抑制活性を示した一方で、種子発芽誘導に対しては比較的高い活性を示し、1 μM でも発芽を誘導した（図 3-15)。二位にフルオロ基を有する **5a** と **5b** はハロゲン性置換基のみを有するデブラノンとしては高い *S.hermonthica* 種子発芽誘導活性を示したが、1 μM での発芽誘導能は発芽率 20%を下回った。以上の結果をまとめると、2,5-二

5a

5b

3c

5c

5d

5e

5f

5g

図3-13. 合成した全2,5-二置換型デブラノンの構造

図3-14. 2,5-二置換型デブラノンのイネ第二分げつ伸長抑制作用の評価

吸水後16日目のイネの第二分げつ長。各化合物は100 nM, 10 nMで9日目から水耕にて処理。例数は6。エラーバーはSEを示す。GRはGR24を、BDは4BDを、cntは無処理を表す。

図3-15. 2,5-二置換型デブラノンの根寄生植物種子発芽誘導作用の評価

14日間のコンディショニング後、各化合物を0.1 μM, 1 μM, 10 μM, 100 μMで処理し、2日後の*S. Hermonthica*の発芽率。例数は3。エラーバーはSDを示す。GRはGR24（陽性参照区）、BDは4BD、DWは滅菌蒸留水を表す。

置換のデブラノンでは双方に有効に作用するデブラノンは得られなかった。

3-2-5　*Striga* の種子発芽誘導活性に特化したデブラノンの創製

3-2-2 の検討から、2,6-二置換のデブラノンを種々合成し、これまでと同様にイネと *Striga* を用いたそれぞれの試験に供した。3-2-3 の検討から、ハロゲン性官能基で置換された化合物ではイネ分げつ抑制活性が高くなり、シアノ基やニトロ基では *Striga* の種子発芽誘導活性が高くなる傾向が見られたため、2,6-二置換型のデブラノンでもそれらの官能基を検討した。合成した化合物を図 3-16 に示す。分げつ抑制試験では、先と同様ハロゲン性置換基のみで修飾された **6a-6c**（**3d** を含む）が比較的高い分げつ抑制活性を示し、GR24 と同程度の抑制作用であった（図 3-17)。しかし、いずれも 2,4-二置換型デブラノンのハロゲン性置換基のみで修飾された化合物群を上回る活性を示すものはなく、官能基の種類に限らずその位置によって選択性が変わることが示された。またニトロ基やシアノ基で修飾された化合物 **6d-6f** は 1 μM 処理でもほとんど枝分かれ抑制活性を示さず、“デブラノン”の語源からはほど遠い結果となった。一方、種子発芽誘導試験ではハロゲン性置換基で修飾された化合物も比較的高い活性を示し、最も活性の低い **6b** や **6c** でも 1 μM で 20%程度の発芽率を記録した（図 3-18)。このことは、デブラノンの根寄生植物に対する種子発芽誘導活性が低いという基本的性質を改変できていることを示す結果である。特にニトロ基やシアノ基で修飾された化合物 **6d-6f** はこれまで合成した全てのデブラノンの中で最も高い *S.hermonthica* 種子発芽誘導活性を示し、中でもシアノ基で修飾された 6f は 0.1 μM でも 20%を超える発芽率を示した。一般的に用いられている SL アゴニストである GR24 と本試験中で比較すると約 1/100 程度の活性を有しており、4BD が GR24 の $1/10^5$ 程度の活性であることから約 1000 倍活性が上昇したと言える。以

6a

3d

6b

6c

6d

6e

6f

図3-16. 合成した全2,6-二置換型デブラノンの構造

図3-17. 2,6-二置換型デブラノンのイネ第二分げつ伸長抑制作用の評価

吸水後16日目のイネの第二分げつ長。各化合物は100 nM, 10 nMで9日目から水耕にて処理。例数は6。エラーバーはSEを示す。cont.は無処理を表す。

図3-18. 2,6-二置換型デブラノンの根寄生植物種子発芽誘導作用の評価

14日間のコンディショニング後、各化合物を0.01 μM, 0.1 μM, 1 μM, 10 μM, 100 μMで処理し、2日後の*S. Hermonthica*の発芽率（GR24のみ0.001 μMを含む）。例数は3。エラーバーはSDを示す。GR24は陽性参照区。DWは滅菌蒸留水を示す。

上の結果から、化合物 **6f** を根寄生植物種子発芽誘導選択的なデブラノンとして選抜した。化合物 **6f** は 1 μM でもイネ分げつ抑制活性を示さないのに対し、0.1 μM でも最大発芽率の約 50%の発芽率を示すという選択性の高い化合物である。以上より **6f** は根寄生植物種子発芽に特化した化合物であり、これまでのデブラノンの選択性（枝分かれ抑制選択的性質）を逆転させることに成功した化合物であると考えている。

3-2-6　デブラノン化合物の特性について

ここまでの結果から、デブラノン化合物はその名の由来通り、基本的には枝分かれ抑制作用を筆頭とした植物ホルモンとしての SL ミミックであると言える。というのも、デブラノンの基本骨格であるフェノキシフラノン構造を有するほとんどの化合物が、弱くとも枝分かれ抑制活性を示し、限られたごく一部のみが 1 μM 程度での根寄生植物の種子発芽誘導活性を示しているからである。また、このイネに対する分げつ抑制の効果と、*Striga* に対する種子発芽誘導の効果はある程度トレードオフだと考えられる。3-2-2 の結果から、同じ官能基でもその位置組み合わせによって選択性が異なり、さらに 3-2-3 以降の結果から官能基の種類も 2 つの SL 作用間の選択性を変化させる要因であることが読み取れる。従って、どちらの活性も上げるような構造と官能基の組み合わせは成立しなかった。傾向としては、2,5-二置換がイネ分げつ抑制活性も *Striga* 種子発芽誘導活性も中程度であり、フルオロ基を有する化合物、特にジフルオロフェノール由来のデブラノンはイネ分げつ抑制活性も *S.hermonthica* 種子発芽誘導活性もジクロロフェノール由来のものより向上する傾向にあったが、1 μM での活性を基準に考えると化合物 **5a** では種子発芽誘導活性が十分ではなく、結果的には化合物 **6a** がイネと *Striga* 双方に有効な化合物であった。以上の結果を踏ま

図3-19. 各代表化合物のSL生理活性を二次元プロットしたグラフ

イネの枝分かれ抑制活性をy軸に、*S. hermonthica*の種子発芽誘導活性をx軸にとり、各代表化合物を二次元プロットしたグラフ。

えて、図 3-19 にそれぞれの活性における代表的化合物を示す。Y 軸にイネの第二分げつ伸長を 100%阻害する時の濃度をとり、X 軸に *S.hermonthica* の種子発芽を最大発芽率の 50%で誘導する時の濃度をとって、二次元でプロットした。図の様に、デブラノンは官能基の位置と種類を選択することにより、広い範囲で活性の強さと選択性を調節できると言える。しかし、根寄生植物の種子発芽誘導活性では、最も強いものでも GR24 には及ばず、デブラノンとしての基本骨格の性質が主要な問題であると考えているが、新しい官能基とその置換位置の組み合わせを導入することにより GR24 を凌駕する活性を示す化合物を見出しうる可能性も否定できない。

3-2-7　イネ SL 非感受性変異体に対する代表化合物の効果

上述の構造活性相関の結果から、イネ分げつ抑制活性に特化した代表化合物として **4f** を、*S.hermonthica* 種子発芽誘導活性に特化した代表化合物として **6f** を、それぞれ選抜した。これら代表化合物、特に **4f** の効果が SL としての選択性が上昇した効果によるものなのかもしくは副作用のような他の要因によるものなのかを評価するため、イネ SL 非感受性変異体である *d14* 変異体に対して濃度 1 μM での分げつ伸長抑制試験を行った（図 3-20）。結果として、**4f**, **6f** いずれの化合物も *d14* 変異体においては分げつ伸長を抑制するような傾向は見られず、副作用による分げつ伸長抑制効果は、少なくとも実験を行なった濃度では無いと考えている。

図3-20. 代表化合物のSL非感受性変異体に対する枝分かれ抑制活性

吸水後16日目のイネの第二分げつ長。各化合物は1 μMで9日目から水耕にて処理。例数は6。エラーバーはSEを示す。controlは無処理を表す。

3-3　SL のイネにおける枝分かれ抑制以外の植物ホルモン作用

3-3-1　イネ SL 生合成変異体幼植物体におけるクロロフィル含量の減少と回復

これまでのイネ第二分げつ伸長抑制試験では、給水後 2 日経過した発芽種子を 6.5%の植物培養用寒天で固化させた水耕培地に移植し、7 日間連続光条件下 25 °C で培養した後、水耕栽培へと移植していたが、上記試験を幾度も繰り返す中で、著者は寒天培地での生育後の SL 生合成変異体イネ *d10* の葉の色が野生型と比較して薄くなっている事を発見した。この形態の変化が SL の減少によるものであると考えられたため、SL アゴニストとして一般的に用いられている GR24 を培地に添加する事で、イネ *d10* 変異体の葉の色の濃さが野生型程度まで回復するかどうかを試験した（図 3-21）。これまでと同様の条件で、イネ *d10* 変異体の寒天培地に GR24 を加えた試験区と mock の試験区、陽性参照区として野生型の試験区を育成した後、移植後 7 日目の第 3 葉葉端を 2 cm 程度切り取ってクロロフィル含量を測定した。測定法として DMF による抽出法を用い、波長 647 nm と 664 nm の吸光度を測定した後、報告されている計算式を用いてクロロフィル *a* 及びクロロフィル *b* の濃度を算出した（Moran, 1982）。その結果、GR24 が SL 生合成変異体の第二分げつ伸長をほぼ完全に抑制する濃度である 1 μM である程度のクロロフィル量の回復を見せ、それ以上の濃度では回復が増加することはなく効果は飽和状態に達した。ここでの結果では 1 μM の試験区から 20 μM の試験区までほぼ同程度の回復度合いであるが、1 μM で対照区に対して 1% 水準で優位差が見られないのはサンプル間での回復度合いに若干の誤差が見られた為である。この結果より、SL 生合成変異体では SL 欠損により何らかの理由でクロロフィル含量が減少し、SL を処理する事でそれが回復すると考えられた。なお、先にも述べたが GR24 を 1 μM 処理した個体での矮化は観察されず、

図3-21. GR24処理によるイネ*d10*第3葉のクロロフィル含量回復試験

吸水後9日目のイネの第3葉のクロロフィル含量。GR24は各濃度で2日目から水耕液寒天培地にて処理。例数は3。エラーバーはSEを示す。*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001

本現象は矮化による個体の緑化ではない。野生型と比較した場合の SL 欠損体におけるクロロフィル含量の減少メカニズムは明らかではないが、非常に興味のある現象であり更なる研究にその解明を任せたい。しかしながら、これまで緑化という観点からの SL と植物のクロロフィル含量の関係についてはいくつか報告がなされており、トマトの SL 生合成変異体ではイネと同様にクロロフィル含量が低下する事や、SL 処理によりイネの老化が促進され、クロロフィル含量の減少が早くなる事などが報告されている（Mayzlish-Gati et al., 2010, Yamada et al., 2014）。また、一般的に弱光条件下ではクロロフィル含量が低下することが知られているが、光シグナルと SL の関係に関する報告として、光シグナルで転写量が上昇する遺伝子の一つである *HY5* の転写量が、SL 処理により上昇する事なども報告されている（Tsuchiya et al., 2010）。以上の先行研究から、イネ幼植物体の緑化には SL 情報伝達系が関わっていると考え、*d14* 変異体を用いた SL 非感受性変異体に対する GR24 の緑化作用を調べた（図 3-22）。野生型、SL 生合成変異体 *d10*、SL 非感受性変異体 *d14* イネに、それぞれ GR24 を 1 μM で処理した場合と mock 処理した場合のクロロフィル含量を比較した結果、*d10* 変異体でのみクロロフィル含量が有意に増加しており、*d14* 変異体では mock 処理との差がほとんど見られなかった。したがって、イネ幼植物体の緑化には分げつ伸長と同様 SL 情報伝達が関わっており、SL が欠損する事が原因でクロロフィル含量が減少し、SL 処理によりクロロフィル含量が回復するものの、無制限に上昇するわけではない事が明らかとなった。

3-3-2　代表的デブラノンによるイネ幼植物体の緑化効果

前節 3-2 ではデブラノンの構造活性相関研究の結果、イネ分げつ抑制に特化した化合物 **4f** と根寄生植物種子発芽誘導に特化した化合物 **6f** の創製に成功

図3-22. GR24処理によるイネ野生型、*d10*、*d14*第３葉のクロロフィル含量回復試験

吸水後9日目のイネの第3葉のクロロフィル含量。GR24は1 µMで2日目から水耕液寒天培地にて処理。例数は3。エラーバーはSEを示す。*=p<0.05

した。ここで、前項で創製した各化合物のイネ幼植物体の緑化に対する効果を評価することにした。既に *d14* を用いた上記実験より、緑化促進における SL の効果は分げつ抑制効果と同様にD14によるSLの認識を経た結果であることを明らかにしている。つまりイネでは D14 というひとつの受容体で SL が受容された後に下流で情報伝達系が分岐し、分げつ抑制や緑化が起きていると予想できる。化合物 **6f** は SL のイネ受容体である D14 に認識されにくいために分げつ抑制効果が低いと考えているが、同様に D14 に認識されずに緑化を促進しないと予想できたため、その点を確認することを目的として化合物 **6f** についても緑化に対する効果を調べることとした。この実験により、これまで述べてきた両化合物の選択性が植物ホルモン作用と根寄生植物に対する発芽誘導作用という点で分別できることを重ねて確認できると考えている。具体的な試験として、先述の条件を用い、GR24、4BD、**4f**、**6f** の各化合物を、GR24 が活性を示しうる濃度である 1 μM で処理した（図 3-23）。その結果、イネの分げつ抑制に効果の高かった 4BD と **4f** はクロロフィル濃度の高い回復活性を示し、**6f** はほぼ mock 処理と同程度にしか回復させない弱い活性である事が判明した。この結果は少なくとも緑化活性は分げつ抑制活性と相関があり、各 SL ホルモン作用における GR24 の有効濃度の相関とも合わせて考えると、イネの分げつ抑制と幼植物体の緑化を調節しているSL情報伝達経路はD14までは共通しているであろう事を再確認させる結果となった。

3-3-3　各選択的化合物が SL 遺伝子発現に与える影響

化合物の機能選択性を確認する最後の試験として、各化合物処理による SL 応答性遺伝子の発現量の変化をリアルタイム PCR で調べた。用いた遺伝子は、SL 処理によるネガティブフィードバックで発現量が低下する SL 生合成

図3-23. 代表化合物処理によるイネ*d10*第３葉のクロロフィル含量回復試験

吸水後9日目のイネの第3葉のクロロフィル含量。各化合物は１µMで2日目から水耕液寒天培地にて処理。例数は3。エラーバーはSEを示す。*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001

遺伝子 *D10* と、SL 処理により発現量が上昇する枝分かれ制御に関わる転写制御因子 *D53*、そして他の植物では SL に応答して発現量が上昇するがイネでは SL による影響を受けない枝分かれ抑制因子のホモログ *FC1* を用いた（表 1-1）。結果を図 3-24 に示す。幼植物体における緑化作用と同様に、遺伝子発現においてもイネ生体内で **4f** は GR24 と同様の傾向を見せており、*D10* の発現量を低下させ *D53* の発現量を上昇させていた。一方の **6f** は *D10* の発現量を低下させず、*D53* の発現量も GR24 を処理した場合のレベルには上昇させなかった。非応答性遺伝子である *FC1* は GR24 処理区、4f 処理区、6f 処理区の 3 処理区間で発現量に差はなく、mock 処理と比較して若干の上昇は見られるものの、植物体の形態変化から考えても生理的な意義は小さいと考えられる。なお、**6f** 処理区の *D53* 発現量で統計的な有意差が示されたが、これは **6f** 処理時にも若干イネの第二分げつ長が control と比較して短くなっていることから（図 3-17）、1 μM では大きな形態の変化は誘導しないが、遺伝子発現量には多少変化を与えているのだと推察される。一方、**6f** 処理区の *FC1* 発現量においても統計的有意差はあるが、これは個体差の小ささによるものであり、上述の通り生理的に意味のある有意差ではないと考えられる。以上、本章の結果から化合物 **4f** はイネにおける SL 情報伝達系を活性化し、各種遺伝子発現の調節を介して植物ホルモンとしての SL の機能である分げつ抑制作用と幼植物体の緑化促進作用を発揮していると考えられ、一方 **6f** に関してはイネに対する効果がデブラノンとしては非常に弱く、基準として用いている濃度の 1 μM では植物体に対して大きな形態の変化を誘導するような遺伝子発現の変動を与えないと考えられる。したがって、本章の目的である機能選択的な SL ミミックの合成に成功したと考えられ、**4f** はイネにおける植物ホルモンとしての SL の選択的ミミック、**6f** はイネ植物体に影響を与えない根寄生植物に対する選択的 SL ミミックであると言える。

図3-24. 代表化合物処理によるイネ*d10*のSL応答性と非応答性遺伝子の発現解析

吸水後14日目のイネの*d10*変異体に。各化合物は1 μMで24時間、水耕にて処理。例数は3。エラーバーはSEを示す。
*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001

3-4　第３章まとめ

本章では、デブラノン類の機能選択性を構造の変化によって調節することを目的として検討を行った。その結果、ベンゼン環上の官能基の置換位置と種類によってイネの分げつ伸長抑制活性と根寄生植物の種子発芽誘導活性がそれぞれ調節できることが明らかとなった。官能基の位置による活性（選択性）への影響として、2,3 位、2,4 位、2,5 位が修飾された場合にはイネの分げつ伸長抑制効果が高くなり、2,5 位、2,6 位が修飾された場合には *Striga* の種子発芽誘導活性が高くなることが分かった。これらのことは、イネと Striga では SL の受容体ポケットの構造、あるいはデブラノンの輸送や細胞内への取り込みに関わるタンパク質の構造に差異があり、それぞれに対して親和性の高い構造が比較的高い活性を示した可能性している。また、官能基の種類に関しては、どちらの試験においても比較的フルオロ基で修飾された場合に高い活性を示すが、ハロゲン性官能基が活性に与える影響はベンゼン環への修飾による電子的な効果よりは、ハロゲンが形成すると考えられる弱い相互作用がタンパク質との間に生じるためと考えられる。というのも、化合物 **4c** と **4f** の様に同じ官能基の組み合わせで導入位置が逆の場合に、化合物が示す活性の傾向が大きく異なるからである。一方で強い電子吸引性官能基の場合には、官能基導入によるベンゼン環への電子的な影響が主に活性に影響を与えていると考えられる。このことは、化合物 **4i** と **4j**、**4k** と **4l** の活性がそれぞれ大きく変わらないことから示唆される。以上の構造活性相関の結果、合成したデブラノンの中で最も分げつ抑制活性の高い化合物（**4f**）と根寄生植物種子発芽誘導活性の高い化合物（**6f**）をそれぞれ得ることができた。これら代表化合物を用いてイネの分げつ抑制以外の SL の作用としてクロロフィル含量の変化を定量した結果、二つの生理作用は受容体 D14 を介した情報伝達系により制御されていることを示す結果が得られた。

3-5　実験の部

装置・器具

核磁気共鳴スペクトル（NMR）：JEOL ECA 500 II

液体クロマトグラフータンデム型質量分析計（LC-MS/MS）：

UPLC unit : SHIMADZU LC-20AD

MS/MS unit : AB SCIEX Triple TOF™ 5600 System(Analyst® TF software)

分析用逆相カラム：ACQUITY UPLC® BEH-C_{18}, φ2.1×50 mm, 1.7 μm (Waters)

薄層クロマトグラフィー（TLC）：Merck 社（silica gel 60F254）

シリカゲルカラムクロマトグラフィー：Wako 社（ワコーゲル® C-200）

逆転写：TaKaRa Thermal Cycler Dice TP600

リアルタイム q-RT PCR：TaKaRa Thermal Cycler Dice RealTime System TP800

溶媒

- 有機合成用

ジクロロメタンは関東化学社の特級をそのまま用いた。THF は関東化学社の有機合成用脱水溶媒（安定剤無添加）をそのまま用いた。酢酸エチル、ノルマルヘキサン、四塩化炭素は関東化学社の鹿１級をそのまま用いた。

NMR 用 $CDCl_3$ は関東化学社の NMR 用 D 化率 99.8%以上 0.03%TMS 含有溶媒を用いた。

（製品番号：ジクロロメタン 10158-70、THF 41001-05、酢酸エチル 14029-81、ノルマルヘキサン 18041-81、四塩化炭素 07140-01、$CDCl_3$ 20956）

- 植物試験用

DMSO はナカライテスク社の GR をそのまま用いた。アセトンは関東化学社の特級をそのまま用いた。（製品番号：DMSO 13407、アセトン 01026）

- 質量分析用

アセトニトリル、純水、メタノール、ギ酸は関東化学社の HPLC 用をそのまま用いた。

（製品番号:アセトニトリル 01033-79、純水 11307-79、メタノール 25185-79、ギ酸 16233-97）

植物材料

生理活性試験に用いたイネはシオカリ WT と *d10-1* であり、遺伝子発現解析でのみ日本晴 WT と *d10-2* を用いた。

3-5-1　化合物の合成

以下の化合物は 2-5-1 の方法(Method A)に従って対応するフェノール類から合成した。

5-(3-Chlorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**2a)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.02(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.27(d, 1H, C=CHC*H*), 6.98(d, 1H, C=C*H*), 7.03(dd, 1H, Ar*H*), 7.10(d, 1H, Ar*H*) , 7.16(t, 1H, Ar*H*) , 7.62(t, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_{10}ClO_3$ (M+H) 225.0313 found 225.0320

5-(2-Chlorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**2b)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.020(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.253(d, 1H, C=CHC*H*), 7.080(m, 2H, C=C*H,* Ar*H*), 7.262(dd, 1H, Ar*H*), 7.343(dd, 1H, Ar*H*), 7.406(dd, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_{10}ClO_3$ (M+H) 225.0313 found 225.0317

5-(4-oxo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yloxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**2c)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.02(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 2.08-2.19(m, 1H, ArC*H*), 2.61-2.68(m, 2H, $COCH_2CH_2$), 2.87-2.94(m, 2H, COC*H*$_2$), 6.30(d, 1H, C=CHC*H*), 7.02(d, 1H, C=C*H*), 7.22-7.37(m, 2H, Ar*H*), 7.43(dd, 1H, Ar*H*), 7.83(dd, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{15}H_{15}O_4$ (M+H) 259.0965 found 259.0970

5-(1-Naphthoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**2d)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.05(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.47(d, 1H, C=CHC*H*), 7.12(d, 1H, C=C*H*), 7.31(d, 1H, Ar*H*), 7.42(t, 1H, Ar*H*), 7.47-7.53(m, 2H, Ar*H*), 7.60(d, 1H, Ar*H*),7.84(dd, 1H, Ar*H*), 8.14(dd, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{15}H_{13}O_3$ (M+H) 241.0859 found 241.0859

5-(2-Naphthoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**2e**)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz δ 2.07(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.47(d, 1H, C=CHC*H*), 7.12(d, 1H, C=C*H*), 7.31(d, 1H, Ar*H*), 7.43(dd, 1H, Ar*H*), 7.51(m, 2H, Ar*H*), 7.60(d, 1H, Ar*H*),7.84(m, 1H, Ar*H*), 8.15(m, 1H, Ar*H*),

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{15}H_{13}O_3$ (M+H) 241.0859 found 241.0867

5-(4-Chloro-1-naphthoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**2f**)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.07(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.44(d, 1H, C=CHC*H*), 7.12(d, 1H, C=C*H*), 7.23(m, 1H, Ar*H*), 7.48-7.66(m, 3H, Ar*H*), 8.17(dd, 1H, Ar*H*), 8.25(dd, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{15}H_{12}ClO_3$ (M+H) 275.0469 found 275.0469

5-(5-Chloroquinolin-8-yloxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**2g**)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.03(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.62(d, 1H, C=CHC*H*), 7.27(d, 1H, C=C*H*), 7.50(m, 1H, Ar*H*), 7.54-7.63(m, 2H, Ar*H*), 8.59(dd, 1H, Ar*H*), 9.01(d, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{14}H_{11}NO_3Cl$ (M+H) 276.0422found 276.0426

5-(2,3-Dichlorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone(**3a**)の合成

20 ml ナスフラスコに水素化ナトリウム（60% dispersion in mineral oil）（0.05 g/ 1.2 Eq）を量りとり、THF2 ml を溶媒として加えた。 撹拌しながら 2,3-Dichlorophenol (0.163 g)/THF2 mL を加え、5-Bromo-3-methyl-2(5H)-furanone を THF2 ml に溶かしたものを室温下ゆっくりと滴下した。添加後、4 時間以上撹拌したものに水を加えて反応を止めた。酢酸エチルで２回抽出し、有機層を brine で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水させた。脱水した有機層をひだ折りろ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）で精製し、白色個体を得た。これをヘキサン／酢酸エチルで再結晶し、白色針状結晶を得た。（0.10 g, 40%収率）（本合成法を以下 Method B とする）

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.03(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.24(d, 1H, C=CHC*H*), 7.07(d, 1H, C=CHC*H*), 7.20(t, 1H, Ar*H*), 7.25-7.28(m, 2H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9O_3Cl_2$ (M+H) 258.9923 found 258.9928

以下の化合物は Method B に従い対応するフェノール類から合成した。

5-(2,4-Dichlorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**3b)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.02(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.20(d, 1H, C=CHC*H*), 7.05(d, 1H, C=CHC*H*), 7.22-7.29(m, 2H, Ar*H*), 7.41 (d, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9O_3Cl_2$ (M+H) 258.9923 found 258.9925

5-(2,5-Dichlorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**3c)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.03(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.24(d, 1H, C=CHC*H*), 7.06-7.08(m, 2H, C=CHC*H,* Ar*H*), 7.33(d, 1H, Ar*H*), 7.37 (d, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9O_3Cl_2$ (M+H) 258.9923 found 258.9932

5-(2,6-Dichlorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**3d)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.03(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.30(d, 1H, C=CHC*H*), 7.10(t, 1H, Ar*H*),7.14(d, 1H, C=CHC*H*), 7.35 (d, 2H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9O_3Cl_2$ (M+H) 258.9923 found 258.9923

5-(3,4-Dichlorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**3e)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.02(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.23(d, 1H, C=CHC*H*), 6.97-7.01(m, 2H, C=CHC*H*, Ar*H*), 7.27(d, 1H, Ar*H*), 7.40 (d, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9O_3Cl_2$ (M+H) 258.9923 found 258.9925

5-(3,5-Dichlorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**3f**)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.48(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.24(d, 1H, C=CHC*H*), 6.97(d, 1H, C=C*H*), 7.06(d, 2H, Ar*H*), 7.12 (t, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9O_3Cl_2$ (M+H) 258.9923 found 258.9929

5-(2,4-Difluorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**4a**)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.00(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.20(d, 1H, C=CHC*H*), 6.82-6.92(m, 2H, Ar*H*), 7.02(d, 1H, C=C*H*), 7.28 (m, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9O_3F_2$ (M+H) 227.0514 found 227.0508

5-(4-Chloro-2-fluorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**4b**)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.03(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.23(s, 1H, C=CHC*H*), 7.02(s, 1H, C=C*H*),7.10(d, 1H, Ar*H*), 7.16(d, 1H, Ar*H*), 7.25(d, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9O_3FCl$ (M+H) 243.0219 found 243.0217

5-(4-Bromo-2-fluorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**4c**)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.00(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.23(d, 1H, C=CHC*H*), 7.03(d, 1H, C=CHC*H*), 7.18-7.31 (m, 3H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9O_3FBr$ (M+H) 286.9714 found 286.9713

5-(2-Chloro-4-fluorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**4d**)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.64(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.23(s, 1H, C=CHC*H*), 7.04 (s, 1H, C=C*H*), 7.24(m, 1H, Ar*H*), 7.33(m, 2H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9O_3FCl$ (M+H) 243.0219 found 243.0222

5-(4-Bromo-2-chlorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**4e**)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.02(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.21(s, 1H, C=CHC*H*), 7.05(s, 1H, C=C*H*), 7.22(d, 1H, Ar*H*), 7.38(dd, 1H, Ar*H*), 7.56(d, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9O_3ClBr$ (M+H) 302.9418 found 302.9418

5-(2-Bromo-4-fluorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**4f**)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.04(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.35(t, 1H, C=CHC*H*), 7.03(td, 1H, Ar*H*), 7.07(d, 1H, C=C*H*), 7.29-7.34(m, 2H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9O_3FBr$ (M+H) 286.9714 found 286.9690

5-(2-Bromo-4-chlorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**4g**)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.03(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.19(d, 1H, C=CHC*H*), 7.06(d, 1H, C=C*H*), 7.26-7.30(m, 2H, Ar*H*), 7.58(d, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9O_3ClBr$ (M+H) 302.9418 found 302.9409

5-(2,4-Dibromophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**4h**)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.03(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.12(d, 1H, C=CHC*H*), 7.06(d, 1H, C=CHC*H*), 7.21(d, 1H, Ar*H*), 7.43(dd, 1H, Ar*H*), 7.72 (d, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9O_3Br_2$ (M+H) 346.8913 found 346.8892

5-(4-Bromo-2-cyanophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**4i**)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.03(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.31(d, 1H, C=CHC*H*), 7.15(m, 1H, Ar*H*), 7.26(m, 1H, Ar*H*), 7.89 (dt, 2H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9NO_3Br$ (M+H) 293.9760 found 293.9759

5-(2-Bromo-4-cyanophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**4j**)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.05(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.31(s, 1H, C=CHC*H*), 7.08(s, 1H, C=CHC*H*), 7.40(d, 1H, Ar*H*), 7.64(dd, 1H, Ar*H*), 7.88(d, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9NO_3Br$ (M+H) 293.9760 found 293.9760

5-(4-Chloro-2-nitrophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone(**4k**)の合成

20 ml ナスフラスコに炭酸カリウム（0.166 g/ 1.2 mmol, 1.2 Eq）を量りとり、アセトン 4 ml を溶媒として加えた。撹拌しながら 4-chloro-2-nitrophenol (0.173 g/ 1 mmol, 1 Eq)アセトン 2 mL 溶液を加え、5-bromo-3-methyl-2(5*H*)-furanone (0.177g/ 1 mmol, 1 Eq)をアセトン 2 ml に溶かしたものを室温下ゆっくりと滴下した。滴下後 2 時間以上撹拌したものの反応が終了したことを TLC にて確認し、水を加えて酢酸エチルで２回抽出した。有機層を brine で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水させた。脱水した有機層をひだ折りろ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＝4：１）で精製し、白色個体を得た。これをヘキサン／酢酸エチルで再結晶し、白色粉状結晶を得た。(0.175g, 65%収率)（本合成法を以下 Method C とする）

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.06(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.36(s, 1H, C=CHC*H*), 7.10(s, 1H, C=CHC*H*), 7.46(d, 1H, Ar*H*), 8.19(dd, 1H, Ar*H*), 8.33(d, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{12}H_9NO_5Cl$ (M+H) 270.0164 found 270.0164

以下の化合物は Method C の合成法に従い、対応するフェノール類から合成した。

5-(2-Chloro-4-nitrophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**4l**)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.03(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.25(s, 1H, C=CHC*H*), 7.06(s, 1H, C=CHC*H*), 7.47(d, 1H, Ar*H*), 7.57(dd, 1H, Ar*H*), 7.88(d, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{12}H_9NO_5Cl$ (M+H) 270.0164 found 270.0163

5-(2,4-Difluorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**5a**)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.01(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.25(s, 1H, C=CHC*H*), 6.79(d, 1H, Ar*H*), 7.03(s, 1H, C=C*H*), 7.07 (m, 2H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9O_3F_2$ (M+H) 227.0514 found 227.0508

以下の化合物は Method B の合成法に従い、対応するフェノール類から合成した。

5-(5-Bromo-2-fluorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**5b)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.02(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.25(d, 1H, C=CHC*H*), 6.99-7.04(m, 2H, C=CHC*H*, Ar*H*), 7.21 (ddd, 1H, Ar*H*) 7.48(dd, 1H, Ar*H*),

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_{11}FBrO_3$ (M+H) 286.9714 found 286.9713

以下の化合物は Method C 合成法に従い、対応するフェノール類から合成した。

5-(5-Bromo-2-chlorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**5c)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.03(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.23(s, 1H, C=CHC*H*), 7.06(s, 1H, C=C*H*), 7.22(d, 1H, Ar*H*), 7.07 (d, 1H, Ar*H*), 7.50 (d, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9O_3ClBr$ (M+H) 302.9418 found 302.9411

以下の化合物の Method B の合成法に従い、対応するフェノール類から合成した。

5-(2-Bromo-5-fluorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**5d)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.04(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.23(d, 1H, C=CHC*H*), 6.77(dt, 1H, Ar*H*), 7.07(d, 1H, C=CHC*H*), 7.11 (dd, 1H, Ar*H*) 7.52(dd, 1H, Ar*H*),

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9O_3FBr$ (M+H) 286.9714 found 286.9715

5-(5-Bromo-2-cyanophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**5e**)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.05(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.32(s, 1H, C=CHC*H*), 7.09(s, 1H, C=CHC*H*), 7.35(dd, 1H, Ar*H*), 7.48(dd, 1H, Ar*H*), 7.59(d, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{12}H_9NO_3Br$ (M+H) 293.9760 found 293.9756

以下の化合物は Method C の合成法に従い、対応するフェノール類から合成した。

5-(2-Fluoro-5-nitrophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**5f**)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.04(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.29(s, 1H, C=CHC*H*), 6.97(dd, 1H, Ar*H*), 7.09(s, 1H, C=C*H*), 7.25 (dd, 1H, Ar*H*), 7.99 (dd, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{12}H_9NO_5F$ (M+H) 254.0459 found 254.0459

5-(2-Chloro-5-nitrophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**5g**)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.06(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.37(s, 1H, C=CHC*H*), 7.09(s, 1H, C=C*H*), 7.59 (d, 1H, Ar*H*), 7.97 (d, 1H, Ar*H*), 8.21(s, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{12}H_9NO_5Cl$ (M+H) 270.0164 found 270.0164

5-(2,6-Difluorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**6a)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 1.99(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.28(d, 1H, C=CHC*H*), 6.92-6.97(m, 2H, C=C*H*, Ar*H*), 7.06-7.11 (m, 2H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9O_3F_2$ (M+H) 227.0514 found 227.0514

5-(2,6-Dichlorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**6b)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.04(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.35(s, 1H, C=CHC*H*), 6.96(t, 1H, Ar*H*), 7.17(s, 1H, C=C*H*), 7.57(d, 2H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9O_3Br_2$ (M+H) 346.8913 found 346.8913

5-(6-Chloro-2-fluorophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**6c)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.02(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.27(s, 1H, C=CHC*H*), 7.07-7.11(m, 3H, C=C*H*, Ar*H*), 7.21(dt, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{11}H_9O_3FCl$ (M+H) 243.0219 found 243.0219

5-(2-Fluoro-6-nitrophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**6d)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.02(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.35(s, 1H, C=CHC*H*), 7.12(s, 2H, C=C*H*), 7.32(td, 1H, Ar*H*), 7.45(t, 1H, Ar*H*) , 7.73(d, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{12}H_9NO_5F$ (M+H) 254.0459 found 254.0455

以下の化合物は Method A の合成法に従い、対応するフェノール類から合成した。

5-(2-Bromo-6-nitrophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**6e)**

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.05(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.30(d, 1H, C=CHC*H*), 7.09(d, 1H, C=C*H*), 7.30(d, 1H, Ar*H*), 7.70(d, 1H, Ar*H*), 7.73(d, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{12}H_9NO_5Br$ (M+H) 313.9659 found 313.9663

以下の化合物はMethod Cの合成法に従い、対応するフェノール類から合成した。

5-(2-Fluoro-6-nitrophenoxy)-3-methyl-2(5*H*)-furanone (**6f**)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz) δ 2.05(s, 3H, CH=CC*H*$_3$), 6.38(s, 1H, C=CHC*H*), 7.18(s, 2H, C=C*H*), 7.21(t, 1H, Ar*H*), 7.63(dd, 1H, Ar*H*) , 7.86(dd, 1H, Ar*H*)

HRMS (ES+) m/z calcd. For $C_{12}H_9NO_3Br$ (M+H) 293.9760 found 193.9764

3-5-2　イネ第二分げつ伸長抑制試験（図 3-3, 3-5, 3-8, 3-11, 3-14, 3-17, 3-20）

2-5-2 と同様の条件で行なった。

3-5-3　根寄生植物 *S. hermonthica* 種子発芽試験（図 3-4, 3-6, 3-9, 3-12, 3-15, 3-18）

S. hermonthica 種子に滅菌溶液（1%次亜塩素酸ナトリウム、0.01%Tween-20）を加え、室温で 15 分間震盪した。クリーンベンチ内にて滅菌溶液を捨て、滅菌蒸留水で５回洗浄した後、100%EtOH に懸濁し、予め滅菌しておいたろ紙状で風乾させた。これを滅菌済み種子ストックとし、30 °C で保管した。クリーンベンチ内にて滅菌済み種子をミクロスパーテルで 3 杯程度 1.5 mL エッペンドルフチューブに分注し、0.1%滅菌寒天水 1 mL に懸濁したものを、滅菌蒸留水 2 mL で湿らせたガラスろ紙（ADVANTEC）上に滴下した。暗所、30 °C にて 14 日間静置し、コンディショニングした。各化合物 10 mM アセトン溶液を順次滅菌蒸留水で 10 倍希釈していき、任意の濃度に調製した溶液または陽性区、陰性区としてそれぞれ任意濃度の GR24、滅菌蒸留水を加え、暗所下 30 °C にて 2 日間静置した。全種子数及び発芽種子数を計測し、発芽率を求めた。

3-5-4　イネ第３葉のクロロフィル含量測定試験

植物サンプルの調製

籾殻を除いたイネ種子に滅菌溶液（2.5%次亜塩素酸ナトリウム、0.01%Tween-20）を加え、室温にて 25 分間震盪した。クリーンベンチ内にて滅菌溶液を捨て、滅菌蒸留水で種子を５回洗浄し、暗所下 25 °C で 2 日間静置した。発芽種子を 0.65%寒天で固化させた化合物含有イネ水耕培地に移植し、明期 16 時間暗期 8 時間の光条件下 25 °C にて 7 日間生育させた。各化合物は、1 mM アセトン溶液を作成し、水耕培地で 1000 倍希釈して処理した。植物体は滅菌済み植物培養管内で生育した。

クロロフィルの抽出及び定量

化合物含有（または非含有）培地上で 7 日間生育させた稲の第三葉葉端を 2 cm 程度切断し、新鮮重量を量った。２個体分を１サンプルとし、DMF 1mL に浸漬させ暗所下 4 °C にて 12 時間以上静置し、クロロフィルを DMF 中に抽出した。静置後、室温にもどしたサンプル溶液の吸光度を測定した。波長は 647 nm と 664 nm にて測定し、論文記載の下式を用いてクロロフィル *a* 及びクロロフィル *b* の含有量を算出した（Moran, 1982）。算出した含量を新鮮重量で割り、新鮮重量あたりのクロロフィル含量を求めた。

$$\text{Chl } a = 12.64\ A_{664} - 2.99\ A_{647}$$

$$\text{Chl } b = -5.6\ A_{664} + 23.26\ A_{647}$$

3-5-5　遺伝子発現解析（図 3-24）

植物サンプルの調製

2-5-4 と同様の条件でイネを生育させ、得られたイネの基部から上下 5 mm を RNA 抽出用植物サンプルとして用いた。各化合物は 1 μM で 24 時間処理した。

cDNA の合成

total RNA の精製は Plant RNA Isolation Kit (Invitrogen) を用いて、添付のプロトコルに従い行った。抽出した total RNA1 μg を以下の組成の DNase 処理反応液と混合し室温にて 5 分間 DNase 処理した。cDNA 合成は、gDNase 処理した 1 μg の total RNA 溶液 10 μL を用い、以下の組成の逆転写酵素液を加えて 37 °C で 15 分間逆転写反応させた後、85 °C で 5 秒間酵素を失活させた。これを２倍希釈し、以後の PCR に用いた。

DNase 処理反応液

7 μL	total RNA 溶液
2 μL	5 x gDNA Eraser Buffer(TaKaRa)
1 μL	gDNA eraser (TaKaRa)

逆転写酵素液

4.0 μL	5 x PrimeScript® Buffer 2 (for Real Time) (TaKaRa)
1.0 μL	PrimeScript® RT Enzyme Mix I (TaKaRa)
1 μL	RT Primer Mix (TaKaRa)
1 μL	滅菌水

リアルタイム PCR

任意の cDNA 溶液より 25 ngRNA 由来 cDNA/μL、2.5 ngRNA 由来 cDNA/μL、0.25 ngRNA 由来 cDNA/μL の希釈系列を調製して検量線作成に用いた。解析に供する cDNA はいずれも、2.5 ng RNA 由来 cDNA/μL の濃度に統一した。cDNA サンプルを以下の組成の PCR 溶液と混ぜ PCR 反応を行った。相対定量値は付属ソフトウェアを用いて算出した。

PCR 溶液

10.0 μL	SYBR® *Premix Ex Taq*™ (2 x) (TaKaRa)
0.4 μL	10 μM 5’プライマー
0.4 μL	10 μM 3’プライマー
1.6 μL	cDNA 溶液
7.6 μL	滅菌水

反応条件

35 °C 10 秒　【95 °C 5 秒→60 °C 30 秒】40 サイクル

用いたプライマーは以下の通りである。

Ubq 5’プライマー　：5’-AACCAGCTGAGGCCCAAGA-3’

Ubq 3’プライマー　：5’-ACGATTGATTTAACCAGTCCATGA-3’

D10 5’プライマー　：5’-CGTGGCGATATCGATGGT-3’

D10 3’プライマー　：5’-CGACCTCCTCGAACGTCTT-3’

D53 5’プライマー　：5’-CCAAGCAGTTTGAAGCGAC-3’

D53 3’プライマー　：5’-CCGCAAGTTTATCAAAGTCAA-3’

FC1 5’プライマー　：5’-CGACAGCGGCAGCTACTAC-3’

FC1 3’プライマー　：5’-GCGAATTGGCGTAGACGA-3’

第４章　デブラノン類の機能選択性に関する詳察

4-1 緒言

前章までデブラノン類が SL の機能を選択的にミミック出来ること、またその選択性を構造の改変によって調節できることを示した。また、各種 SL 非感受性変異体を用いた解析から、デブラノンが恐らく SL 受容体にリガンドとして結合し、SL として認識されているであろうことが示唆された。本章では、デブラノンの選択性が各化合物と各受容体間の親和性の違いによって生じるものなのか、あるいは何か他にも機能選択性に関わる因子が存在するのかという点に焦点を当て実験を行なった。まず、植物ホルモンとしての SL が有するいくつかの作用に対して、デブラノンが植物種間によって効果の強さや選択性が異なるのか調べるため、前章で選抜したイネ分げつ抑制に特化した作用を有するデブラノン **4f** と *Striga* 種子発芽誘導に特化した作用を有するデブラノン **6f** を用いて、シロイヌナズナにおける枝分かれ抑制に対する効果、根毛伸長に対する効果、高温ストレス条件下での種子発芽誘導に対する効果を評価することとした。また、これら二つの代表化合物に加え 4BD を含めた三種のデブラノンに対しキラルカラムを用いた光学分割を行い、いくつかの SL 試験系に対する各エナンチオマーの活性を評価した。最後に、リコンビナント OsD14 タンパク質と ^{3}H ラベルしたジヒドロ GR7 を用いて、各代表デブラノンとの競争結合試験を行った。

4-2 各機能選択的デブラノンがシロイヌナズナにおける SL 生理作用に与える影響の評価

前章で選抜したイネ分げつ伸長抑制に特化したデブラノン **4f** と、*Striga* 種子発芽誘導に特化したデブラノン **6f** を用いて、まずシロイヌナズナの枝分かれ抑制に対する効果及び選択性を評価した（図 4-1)。シロイヌナズナの水耕栽培による枝分かれ抑制試験は先述したように 30～40 日程度の育成期間を要するためスクリーニングには適さない。従って、出来るだけ選抜した化合物で試験を行なった。試験の結果、イネと同様の 1 μM 処理では **4f** と **6f** の間に大きな活性の差はなく、イネでは分げつ（枝分かれ）伸長抑制効果の低かった **6f** が、この試験濃度で変異体の形態を野性型と同等の形態までに回復させるという活性の強さを示した。また、イネの試験では GR24 の 100 倍以上と圧倒的に高い活性を示した **4f** であるが、シロイヌナズナにおいては GR24 よりも低い活性を示した。以上の結果から、イネとシロイヌナズナでは枝分かれ抑制活性発現に対する SL 構造要求性が異なることが示唆された。そこで、枝分かれ抑制作用以外でシロイヌナズナにおける SL 生理作用として報告されている機能のうち、根毛伸長促進作用と高温ストレス条件下における種子発芽誘導作用の二つを用いて GR24、**4f**、**6f** の評価を行った。この二つの試験系は著者本人が報告された論文の再現性を再現率よく確認できたために使用した。まず、根毛伸長促進作用を調べた結果（図 4-2)、化合物 **6f** が非常に高い活性を示した。一方で、化合物 **4f** は GR24 よりも活性が低く、mock 処理と比較しても大きな差は観察されなかった。根毛の伸長にはオーキシンを代表として様々な植物ホルモンが影響を与えることが報告されているが、詳細な根毛発生・伸長の機構に関しては明らかとなってはおらず、SL 処理による根毛伸長もオーキシン関連変異体として単離されてきた *shy2* 変異体が非感受性を示すことが報告された以外、形態変化の報告

図4-1. 機能選択的デブラノンがシロイヌナズナの枝分かれ抑制に与える影響

低温処理後40日目のシロイヌナズナ*max4*変異体（SL欠損変異体）の枝分かれ数を測定した。例数は12。エラーバーはSEを示す。各化合物は低温処理後16日目から1 μMで処理した。

図4-2. 機能選択的デブラノンがシロイヌナズナの根毛伸長に与える影響

低温処理後7日目のシロイヌナズナの根毛の長さを測定した。各化合物は1 μMで処理し、低温処理後4日目から化合物含有培地に移植した。例数は100（10個体から10本ずつ）。エラーバーはSEを示す。

がそのほとんどである（Koren et al., 2013）。次に、高温ストレス条件下での種子発芽誘導試験を行った（図 4-3）。シロイヌナズナなど多くの植物は生育至適温度よりも高い温度では自身でABAの内生量を調節するなどして発芽を抑制する機構が働くが、SL を処理することによりこの発芽抑制機構の働きが弱められ、高温ストレス条件下でも通常通り発芽が誘導されることが報告されている（Toh et al., 2012）。試験の結果、先の二つの試験とは異なり **4f** が最も高い活性を示し、GR24 と **6f** がほぼ同等の発芽率を示した。また、4BD や karrikin 処理によっても若干の発芽が観察された。本実験では野生型植物だけでなく SL の枝分かれ抑制作用に非感受性を示す *d14* 変異体を用いた試験も行ったが、*d14* 変異体は高温ストレス条件下種子発芽誘導試験に対する非感受性は示さず、むしろ全ての処理区で野生型よりも高い発芽率を示した。このことから、いくつかの SL 関連変異体に対する高温ストレス条件下種子発芽誘導試験を行った（図 4-4）。その結果、*d14* 変異体とその野生型である Columbia-0 (Col-0)では GR24 処理に対し発芽率が向上するが、*kai2* 変異体とその野生型である Landsberg erecta (L*er*)では GR24 処理によって発芽率が低下することが分かった。また、*d14* と *kai2* の二重変異体や双方の情報伝達に関わる MAX2 の機能欠損変異体 *max2* では GR24 処理に対して非感受性を示すことも確認された。これらの結果から、恐らく高温ストレス条件下での種子発芽の制御には D14 が抑制的に、KAI2 が促進的に作用すると推察できるが、正確な判断は背景が揃った双方の機能欠損変異体等を用意して比較する必要があるため、ここでは更なる言及は避けることとする。以上、シロイヌナズナに対する三種類の SL（と言われている）生理作用に対する各代表化合物の活性評価を行なった結果、それぞれの生理作用においてイネ分げつ抑制作用に対する効果とは相関が得られなかった。従って、イネとシロイヌナズナ間でも、シロイヌナズナにおける各生理作用間でも、活性発現に対する構造要求性が異なる可能性が示唆された。このことは、それぞれの SL 生理作用が発現

図4-3. 機能選択的デブラノンがシロイヌナズナの高温での種子発芽に与える影響

収穫後半年以上経過した休眠が深いシロイヌナズナ種子を30 °Cの高温ストレス条件下で発芽させた時の発芽率を調べた。各化合物は10 μMで処理した。例数は3。エラーバーはSDを示す。

図4-4. GR24が各SL関連情報伝達因子の機能欠損変異体シロイヌナズナの高温での種子発芽に与える影響

収穫後半年以上経過した休眠が深いシロイヌナズナ種子を30 °Cの高温ストレス条件下で発芽させた時の発芽率を調べた。GR24は10 µMで処理した。例数は3。エラーバーはSDを示す。

するまでの情報伝達因子が異なっていることを示唆している。

4-3　ジクロロデブラノンを用いた各 SL 生理作用における構造要求性の比較

前項での実験結果から、各 SL 生理作用における活性発現に対する構造要求性が異なることが示唆されたため、前章で行なったように官能基位置による機能選択性の変化が存在すると考え、同様にジクロロデブラノン全種を用いて比較を行なった。実際に行なった実験は前項と同様シロイヌナズナの枝分かれ抑制試験（図 4-5)、根毛伸長促進試験（図 4-6)、高温ストレス条件下種子発芽誘導試験 (図 4-7) である。まず、枝分かれ抑制試験の結果では化合物 **3b**、**3c**、**3d**、**3f** が同程度に比較的高い活性を示し、**3a** や **3e** は比較的低い活性を示した。SL による枝分かれの抑制は D14 を介した情報伝達により制御されていると考えられているが、イネにおける構造活性相関（図 3-8）とシロイヌナズナにおける構造活性相関とでは比較的高い活性を示す構造が異なることが示されたため、同じホモログ間でも SL を受容するポケットの形状が少しずつ異なっていると推測できた。次に、根毛伸長促進試験の結果では化合物 **3c** と **3d** が比較的高い活性を示した。この傾向は *S. hermonthica* の種子発芽誘導活性における傾向と相関が見られた。しかし、*S. hermonthica* における受容体や発芽のメカニズムは明らかとなっていないことから、情報伝達における分子生物学的な類似性に関しては現在のところ残念ながら議論できない。最後に、高温ストレス条件下での種子発芽誘導試験の結果を見ると、**3e** 以外の全てのジクロロデブラノンが同程度の活性を示し、**3a** 以外は枝分かれ抑制効果の比較的高かった化合物と一致した。以上、シロイヌナズナにおける三種類の試験の結果、SL による根毛伸長促進作用に関しては他の二種と構造要求性が大きく異なることが明らかとなり、

図4-5. 各ジクロロデブラノンがシロイヌナズナの枝分かれ抑制に与える影響

低温処理後42日目のシロイヌナズナ*max4*変異体（SL欠損変異体）の枝分かれ数を測定した。例数は12（**3a**のみ11）。エラーバーはSEを示す。各化合物は低温処理後21日目から1 μMで処理した。

図4-6. 各ジクロロデブラノンがシロイヌナズナの根毛伸長に与える影響

低温処理後7日目のシロイヌナズナの根毛の長さを測定した。各化合物は1 μMで処理し、低温処理後4日目から化合物含有培地に移植した。例数は100（10個体から10本ずつ）。エラーバーはSEを示す。

図4-7. 各ジクロロデブラノンがシロイヌナズナの高温での種子発芽に与える影響

収穫後半年以上経過した休眠が深いシロイヌナズナ種子を30 °Cの高温ストレス条件下で発芽させた時の発芽率を調べた。各化合物は10 μMで処理した。例数は3。エラーバーはSDを示す。

全ての試験において、**3e** は比較的低い活性を示すことが明らかとなった。また、枝分かれ抑制試験と高温ストレス条件下種子発芽誘導活性試験では、それぞれの情報伝達を制御すると考えられる SL 受容体（D14 と KAI2）が異なるにも拘らず **3a** 以外は類似する傾向を示した。ここで、イネにおいても分げつ伸長抑制作用における構造要求性とクロロフィル含量回復作用における構造要求性が異なるのではないかと考え、ジクロロデブラノンを用いてイネのクロロフィル含量回復試験を行った（図 4-8）。その結果、**3d** の活性が低いことは変わらなかったが、イネ分げつ伸長抑制効果の比較的低かった **3e** の活性が高いことが明らかとなった。前章での *d14* 変異体を用いた解析からイネにおける SL の分げつ伸長抑制作用とクロロフィル含量回復作用は、共に D14 を介した情報伝達系により制御されていると考えられたが、この結果はデブラノンの場合は D14 に対する親和性のみで選択性が発現している訳ではないことが示唆される結果となった。以上のシロイヌナズナにおける構造活性相関とイネにおける構造活性相関の結果から、デブラノンは受容体である D14 に対する親和性の違いの他に何か他の要因で選択性が発現していると考えられた。

4-4　代表型デブラノンの各光学異性体による SL 生理作用の検証と OsD14 に対する親和性の評価

ここまでの結果から、これまで SL の植物ホルモンとしての生理作用として報告されてきたいくつかの作用は、D14 を経由する情報伝達経路により制御されるものと D14-like（KAI2）を経由する情報伝達経路により制御されるもの、及びその二つでは説明できないもの（特に根の形態形成）の三種類の存在を示唆する結果が得られた。D14 や D14-like を介さない SL の活性発現に関しては Shinohara らにより SL が DNA の転写から始まるタンパク質合成の制御を介さ

図4-8. 各ジクロロデブラノンがイネのクロロフィル含量に与える影響

吸水後9日目のイネの第3葉のクロロフィル含量。各化合物は 100 nMで2日目から水耕液寒天培地にて処理。例数は3。エラーバーはSEを示す。*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001

ない早い様式で、オーキシンの極性輸送を制御する因子の一つであるトランスポーター（エクスポーター）の一つ、PIN1 の細胞内局在（細胞膜局在）に影響を与えることが報告されているが（Shinohara et al., 2013）、今回の構造活性相関の結果、他の二つの実験とは構造活性相関の傾向が著しく異なった根の形態制御には、D14 や KAI2 と言った既に知られている SL 関連の情報伝達因子以外の因子が関わっていることが予想される。このことは、SL が PIN2 の局在にも影響を与えていることからも示唆される（Pandya-Kumar et al., 2014）。従って、SL が根の形態形成に与える影響がどのような機構に基づき制御されているのかが明らかとなっていないため、ここでは既にある程度情報伝達機構が明らかとなっている D14 と D14-like に焦点を絞って、それぞれが制御していると考えられる枝分かれ抑制作用と高温ストレス条件下での種子発芽誘導作用に対して代表的デブラノンの各光学活性体が与える影響を評価することとした。既に先行研究として Scaffidi らによって GR24 の四種あるジアステレオマーの内、(+)-GR24 と *ent*-2'-epi-GR24 が D14 を介して制御されると考えられる枝分かれ抑制に効果を示し、(-)-GR24 が KAI2 を介して制御されると考えられる弱光下胚軸伸長抑制や種子発芽に効果を示すことが報告されており（図 4-9）、またデブラノンの一種である 4-CN debranone も同様に(*R*)体と(*S*)体のそれぞれが胚軸伸長と枝分かれの制御に効果を示すことが報告されているためである（Scaffidi et al., 2014）。光学分割した化合物は 4BD、**4f**、**6f** の三種類の代表化合物であり、光学分割はダイセル化学工業社のキラルカラムを用い、HPLC にて行なった。リテンションタイムが早い方の異性体を F、遅い方の異性体を L として区別し、得られた異性体がそれぞれ>99%ee であることを確認した後 CD スペクトルの測定を行ない、得られたスペクトルを既に報告された 4-CN debranone の CD スペクトルと比較することでそれぞれの絶対立体配置を決定した結果、全ての化合物で F の 2'位の立体が(*S*)、L の 2'位の立体が(*R*)であると帰属した（図 4-10）。以下、光学異性

図4-9. 各受容体とGR24のジアステレオマーが影響を与える生理作用

図4-10. 各代表化合物の光学異性体のCDスペクトル比較

アセトニトリルを溶媒としてCDスペクトルを測定した。

体の表記は(*R*)/(*S*)表記とする。なお、より信頼度が高いと言われている X 線結晶構造解析による絶対立体配置の決定も合わせて必要であると考えられるが、本博士論文執筆段階では準備中である。得られた各光学活性化合物を用いて、まずイネ分げつ伸長抑制に対する効果を評価した（図 4-11）。その結果、GR24 は報告の通り(+)体（2'位の立体が(*R*)のエナンチオマー）がラセミ体と同程度の活性を示し、(-)体（2'位の立体が(*S*)のエナンチオマー）はほとんど活性を示さなかった。一方、イネ分げつ抑制効果の高かったデブラノンである 4BD と **4f** は(*S*)体がラセミ体と同等かそれ以上の活性を示し、(*R*)体の活性は有意に弱く、特に **4f** の場合はほとんど活性を示さなかった。このことから、デブラノンにおいても D 環 2'位の立体が活性に大きく影響することが明らかとなった。なお、試験は活性の変化を観察しやすいように、ラセミ体が分げつ長を無処理の場合の半分程度に抑制する濃度で行ない、**6f** に関してはラセミ体で非常に活性が低かったため、試験は行わなかった。次に、シロイヌナズナの高温ストレス条件下での種子発芽誘導試験を行った（図 4-12）。本試験でも GR24 は報告通り(-)体がラセミ体と同程度の活性を示し、(+)体は活性を示さなかった。4BD と **4f** に関しては先ほどのイネ分げつ抑制試験で活性を示したエナンチオマーとは反対のエナンチオマーである(*R*)体がラセミ体と同程度の活性を示した一方で(*S*)体は活性を示さず、**6f** は GR24 と 2'位の立体が同じである(*S*)体がラセミ体と同様の活性を示した。このことは、デブラノンの場合にはベンゼン環上の官能基の位置と種類によって、どちらのエナンチオマーが何れの活性を示すかが変化することを示している。以上の結果と、SL 処理による枝分かれの制御を D14 が、高温種子発芽の制御を D14-like が行なっているであろうとの Scaffidi らの結果を考慮すると、4BD や **4f** のように枝分かれ抑制に高い効果を示し、*Striga* の種子発芽誘導には効果が低い化合物では D14 に対して(*S*)体が、D14-like に対して(*R*)体が結合すると考えられ、**6f** のように *Striga* の種子発芽誘導に対して効果の高い化合

図4-11. 光学分割した各代表デブラノンのイネ第二分げつ伸長抑制活性

吸水後16日目のイネの第二分げつ長。GR24は100 nM, 4BDは10 nM, **4f**は1 nMで9日目から水耕にて処理。例数は6。エラーバーはSEを示す。

図4-12. 光学分割した各代表デブラノンのシロイヌナズナ高温条件下での種子発芽誘導活性

収穫後半年以上経過した休眠が深いシロイヌナズナ種子を30 °Cの高温ストレス条件下で発芽させた時の発芽率を調べた。各化合物は10 μMで処理した。例数は3。エラーバーはSDを示す。

物では D14-like に対して(*S*)体が結合するのではないかと推測された。そこで、最後にそれぞれのエナンチオマーが OsD14 に対して結合するかどうかを、^{3}H ラベルしたジヒドロ GR7 を用いた結合実験により調べることとした。本試験系は OsD14 溶液にラベル体のジヒドロ GR7 と各化合物を加えて静置した後、精製用のカラムにロード、洗浄し、タンパクに結合しているラベル体を溶出させ、液体シンチレーションカウンターでタンパク質中に残存する ^{3}H の毎分壊変数（disintegration per minutes : DPM）を計測すると言った方法である（図 4-13）。加えた化合物とラベル体が受容体ポケットに対して競争的に結合する場合には低い DPM を示し、ラベル体の方が受容体ポケットに対して親和性が高い場合や、競争しない結合様式の場合には高い DPM を示す。試験の結果を図 4-14 に示す。4BD はラセミ体も何れのエナンチオマーも mock 処理と同程度の DPM を示したのに対し、**4f** と **6f** は(*S*)体処理のみがラセミ体処理と同程度に mock 処理よりも低い DPM の値を示した。また、より詳細に解析すると植物体を用いた実験において枝分かれ抑制活性が非常に弱かった **6f** の方が、活性が非常に強かった **4f** よりも DPM の値が低く、より競争的にラベル体の結合を阻害していることが分かった。従って、リコンビナント OsD14 タンパク質を用いた *in vitro* 試験系での化合物の D14 に対する親和性と、植物体を用いた *in vivo* 試験系での化合物の枝分かれ抑制効果の強さは単純には一致しないことが明らかとなった。しかし、**4f** のみに限って考えれば、*in vivo* で活性を示した(*S*)体が *in vitro* でも活性を示し、同一化合物内での相関はあると考えられた。しかしながら、デブラノンの機能選択性を受容体との親和性に帰属させることは出来なかったことから、今後更なる検討を要すると考えられる。

図4-13. ^{3}Hラベルしたジヒドロ GR7と各化合物の OsD14に対する競争的結合試験

図4-14. 光学分割した各代表デブラノンのOsD14に対するジヒドロGR7との競争結合試験

大腸菌を用いて合成したリコンビナントOsD14に対する各化合物と^{3}Hラベル体ジヒドロGR7の競争結合試験。各化合物は250 μM、GR7は2.84 μM、OsD14は25 ng/μL。例数は3。エラーバーはSEを示す。mはmock（DMSO）処理、GRはGR24を表す。

4-5 第４章まとめ

本章ではデブラノンの機能選択性に焦点を当て、植物種間、同一植物種内での各作用におけるデブラノンに対する構造要求性を比較した。その結果、異なる植物種間での同様の生理作用における構造要求性が異なるだけでなく、同一植物種内での異なる生理作用においても構造要求性が異なることが明らかとなった。これらのことから、デブラノン類の SL 受容体とそのホモログ（D14 や D14-like）に対する親和性の違いによって、機能選択性が発現しているものと考え、リコンビナントタンパク質を用いて親和性の評価を行ったが、残念ながら受容体に対する親和性だけではデブラノン類の機能選択性を説明することは出来なかった。今回の結合試験では定性的な評価が可能であろうとの推測から濃度を一点に限定して実験を行なっていたが、今後はより広い濃度範囲での親和性の評価を行い、結合定数を求めるなどして評価する必要があると考えられる。また、各代表化合物の植物体内での移動なども含めて、化合物の植物体内での動態を調べていく必要があると考えられた。一方で、イネにおける分げつ伸長抑制とクロロフィル含量の制御が同様に D14 受容体を介している制御系であると考えられたが、それぞれの試験系において各ジクロロデブラノンが示す活性の強さが微妙に異なることから、単純に SL 受容体との親和性の違いのみで機能選択性が発現している訳ではないことも示唆された。

4-6　実験の部

装置・器具

紫外可視吸光度測定：Gene Quant 100（GE healthcare）

高速液体クロマトグラフ分析計（HPLC）：JASCO PU-1580

検出器：JASCO MD-1510 multiwavelength detector(ChromNAV)

光学分割用キラルカラム（分析併用）：DICEL CHIRALPAK IA (φ10 mm×250 mm, 5 μm)

円二色性分散計（CD スペクトル）：JASCO J-820

液体シンチレーションカウンター: Aloka LSC-5100

溶媒

- 植物試験用

DMSO はナカライテスク社の GR を、アセトンは関東化学社の特級をそのまま用いた。（製品番号：DMSO 13407、アセトン 01026）

- 機器分析用

アセトニトリルはナカライテスク社の GR を、DMF は関東化学社の特級をそのまま用いた。（製品番号：アセトニトリル 00405-23、DMF 10344-00）

液体シンチレーション用特製試薬はナカライテスク社のクリアゾル I をそのまま用いた。（製品番号：09135-93）

植物材料

シロイヌナズナは野生型として Col-0、L*er* を、変異体は *max4-1*、*d14-1*、*d14-1+kai2-2*、*max2-1*、*kai2-2* を用いた。イネはシオカリ WT、*d10-1* を用いた。

4-6-1　シロイヌナズナ枝分かれ抑制試験（図 4-1, 4-5）

シロイヌナズナ種子を 70%エタノール水で 20 分間表面殺菌後、エタノールで１分間表面殺菌し、クリーンベンチ内で風乾した。あらかじめ 200 μL 容 PCR チューブにおいて 0.6%寒天で固化させた 1/2MS 培地上に播種し、4 °C で 2 日間低温処理を行った。低温処理後、PCR チューブの下部 5 mm 程度をクリーンベンチ内で切除し、23 °C、連続光下にて 5 日間生育させた。あらかじめ 1.5 mL エッペンドルフチューブに 1/2MS 培地を 1.8 mL 加え、生育させたシロイヌナズナの芽生えを PCR チューブごと移植し、同条件で 14 日間生育させた。抽台直前のシロイヌナズナを、シロイヌナズナ水耕培地 300 mL（滅菌済み）を入れたオートクレーブにて滅菌済みの 330 mL 容ポリプロピレン製容器に移植し、明期 16 時間/暗期 8 時間の光条件下 23 °C で生育させた。２日後に任意の濃度で化合物を処理したのち、同条件でさらに 19～21 日間生育させた。水耕培地は移植後 12 日目と 18 日目に取り替えた（化合物処理は継続）。1/2MS 培地とシロイヌナズナ水耕培地は 2-5-7 と同様に調製した。

4-6-2　シロイヌナズナ根毛伸長促進試験（図 4-2, 4-6）

シロイヌナズナ種子を 70%エタノール水で 20 分間表面殺菌した後、エタノールで１分間表面殺菌し、クリーンベンチ内で風乾した。あらかじめ角シャーレ（滅菌２号、栄研化学）に固化させた 0.8%寒天入り 1/2MS 培地上に播種し、4 °C で２日間低温処理を行った。その後、23 °C、連続光下にて 4 日間生育させた。発芽後の幼植物体の胚軸長や主根長が同程度の個体を選抜し、予め角シャーレに 0.8%寒天で固化させた化合物含有 1/2MS 培地上に移植し、シャーレ裏面から根端位置に印を付けておいた。移植した幼植物体を 23 °C、連続光下にて更に 3 日間生育させた個体の、根端から 1 cm 程度の位置を撮影し、画像処理ソフト Image J を用いて根毛長を計測した。一個体から 10 本の長さを測り、10 個体分計 100 本の平均値を求めた。1/2MS 培地は 2-5-7 と同様に調製した。

4-6-3　シロイヌナズナ高温ストレス条件下種子発芽誘導試験
（図 4-3, 4-4, 4-7, 4-12）

収穫後半年以上保管した、よく乾燥して休眠が進んだシロイヌナズナ種子を、予め 24 穴プレート（IWAKI、1820-024）の各 well に入れておいた化合物含有/非含有滅菌水 400 μL に 1well につき 30～50 粒程度浸漬し、明期 16 時間/暗期 8 時間の光条件下、30 °C で 48 時間静置した。静置後の全種子数と発芽種子数を計数し、発芽率を求めた。

4-6-4　イネ第３葉のクロロフィル含量測定試験（図 4-8）

3-4-4 と同様の方法で行なった。

4-6-5　代表的デブラノン 4BD, **4f**, **6f** の光学分割（図 4-10）

各化合物は酢酸エチルに 15 mg/mL で溶解させ、一回につき 150 μL ずつインジェクトして光学分割を行なった。各化合物の分離条件を以下に示す。

- 4BD

流量：　6 mL/min.　　溶媒組成：″Hex/AcOEt = 85/15
リテンションタイム（tR）: Faster (F) - tR = 7.0 min.
: Latter (L) - tR = 7.8 min.

- **4f**

流量：　6 mL/min.　　溶媒組成：″Hex/AcOEt = 90/10
リテンションタイム（tR）: Faster (F) - tR = 6.8 min.
: Latter (L) - tR = 7.8 min.

- **6f**

流量：　6 mL/min.　　溶媒組成：^{n}Hex/AcOEt = 85/15

リテンションタイム（tR）: Faster (F) - tR = 9.7 min.

: Latter (L) - tR = 11.7 min.

4-6-6　代表的デブラノン 4BD, **4f**, **6f** の光学活性体の CD スペクトル測定（図 4-10）

各光学活性体の CD スペクトルをアセトニトリル溶媒で測定した。用いたセルは光路長 10 mm の石英セル。室温で測定を行なった。各化合物の測定時の濃度は 4BD：0.9 μM、**4f**：0.7 μM、**6f**：0.6 μM。

4-6-7　イネ第二分げつ伸長抑制試験（図 4-11）

2-5-2 と同様の方法で行なった。

4-6-8　OsD14 に対する化合物結合試験（図 4-13, 4-14）

結合試験に用いた[5,6-^{3}H]-5,6-dihydro-(–)-*ent*-2'-*epi*- GR7（ジヒドロ GR7）は、合成した *ent*-2'-*epi*-GR7 をもとに Institute of Isotopes Co., Ltd（Budapest, Hungary）に依頼して合成して頂いた。また、OsD14 タンパク質は論文記載の方法で食品生物構造学研究室に合成して頂いた（Nakamura et al., 2013）。また、結合試験も論文記載（Nakamura et al., 2013）の方法に従い、OsD14 タンパク質 10 μg と各化合物 250 μM を含む総量 400 μL の PBS バッファー溶液に 10 μL の 113.6 μM ジヒドロ GR7 溶液を加え、15 分間静置した後、NAP™-5 カラム（GE Healthcare：17-0853-02）に 100 μL ロードした。その後、500 μL の PBS バッファーで洗浄し、200 μL の PBS バッファーで溶出した。溶出した各分に液体シンチレーション用特製溶液を 1 mL 加え、液体シンチレーションカウンターにて DPM を測定した。

総括

第２章では、ジベレリンの受容体である GID1 の阻害剤として *in silico* スクリーニングにより選抜された化合物 CPF をリード化合物として、枝分かれ抑制活性を指標とした評価系を用いた新規 SL ミミックの探索を行なった。その結果、それまで主流であった根寄生植物の種子発芽誘導活性を指標とした評価系では選抜されなかったと考えられる、SL の植物ホルモン活性のみを選択的に示す新規 SL ミミックの創製に成功した。また、本章で発見したフェノキシフラノン構造を有する化合物をデブラノンと命名した。第３章では、第２章の結果を受けて機能選択性の調節に挑戦した。第２章で創製した代表化合物 4BD の選択性が、これまでの天然型 SL を鋳型とした人工 SL の構造とは大きく異なるその構造によって発現していると考え、デブラノンの構造を変化させることで選択性も変化させられるのではないかという仮定を立て、検証を行なった。その結果、二置換型のデブラノンにおいてベンゼン環上の官能基置換位置の組み合わせを変えることで、選択性が変化することを見いだした。加えて、官能基の種類を検討することによって、SL ミミックとしてのデブラノンのイネ分げつ伸長抑制活性を向上させるのか、*S.hermonthica* 種子発芽誘導活性を向上させるのかを制御できることを見いだした。その結果、官能基の位置と種類を最適化することにより、4BD よりもイネの分げつ伸長抑制活性が向上した **4f** や、4BD よりも *S.hermonthica* の種子発芽誘導活性が大幅に向上した化合物 **6f** の創製に成功した。これらの化合物はそれぞれイネの枝分かれ抑制作用と *S.hermonthica* の種子発芽誘導作用に対する機能選択性を有しており、第３章での目標を達成できたと考えている。第４章では、代表的化合物 **4f** と **6f** を用いて、その機能選択性が植物ホルモンとしての SL 機能と、根寄生植物種子発芽誘導物質としての SL の機能として一般化できるのかを検証するとともに、化合物の機能選択性が何

に起因するのかを調べることとした。その結果、イネとシロイヌナズナという異なる植物種間では、同様の SL の機能と考えられる枝分かれ抑制作用においても化合物の活性発現に対する構造要求性が異なることを見いだした。加えて、シロイヌナズナにおいて報告されているいくつかの SL の機能間でも、化合物の活性発現に対する構造要求性が異なることが示唆される結果を得た。そこで、これら生物種間や SL の作用間での構造要求性の違いが、SL 受容体である D14 や、そのホモログである D14-like（KAI2）への各化合物の親和性に起因するものであると推測し、大腸菌を用いて合成したリコンビナント OsD14 タンパク質に対する結合実験を行なった。その結果、推測とは異なり、単純に化合物の受容体に対する親和性だけではデブラノン類の機能選択性を説明できないことが分かった。このことは、現在推定されている SL の受容から SL 処理によって変動する下流の遺伝子発現の制御までの間に、多くのブラックボックスが存在することを示唆している。現在、SL に関する研究報告は年々増加しており、2014 年の間にもいくつもの重大な報告がなされたことから、今後の SL による植物の形態制御や根寄生植物の種子発芽、AM 菌との共生のメカニズムの解明が精力的に進められていくと予想されるが、本研究で創製したデブラノン類がその一助となることを期待する。また、それら基礎研究を通して根寄生植物による作物への寄生被害を減少させる防除法の開発や、枝分かれの制御による多収量作物の作出にも本研究が少しでも役立つことを願ってやまない。

最後に、ジクロロデブラノンと各代表的デブラノンの各種生物試験に対する活性の強さを次ページに表としてまとめた（表 5)。

	Rice Tillering	*Arabidopsis* Branching	*Arabidopsis* Germination	*Striga* Germination
(±)GR24	$1x10^{-6}$	$5x10^{-7}$	$1x10^{-5}$	$1x10^{-9}$
4BD	$1x10^{-7}$	$5x10^{-6}$	$>1x10^{-5}$	$1x10^{-4}$
3a	$1x10^{-7}$	$5x10^{-6}$	$1x10^{-5}$	$1x10^{-4}$
3b	$1x10^{-7}$	$1x10^{-6}$	$1x10^{-5}$	$1x10^{-5}$
3c	$1x10^{-7}$	$1x10^{-6}$	$1x10^{-5}$	$5x10^{-6}$
3d	$1x10^{-6}$	$1x10^{-6}$	$1x10^{-5}$	$5x10^{-6}$
3e	$1x10^{-6}$	$>5x10^{-6}$	$>1x10^{-5}$	$1x10^{-4}$
3f	$1x10^{-6}$	$1x10^{-6}$	$1x10^{-5}$	$1x10^{-5}$
	$1x10^{-8}$	$1x10^{-6}$	$1x10^{-5}$	$1x10^{-5}$
	$>1x10^{-6}$	$1x10^{-6}$	$1x10^{-5}$	$1x10^{-7}$
	(M)	(M)	(M)	(M)

表5. 各生物試験に対して各デブラノンが示す活性

各試験における活性の強さを◆>◆>◆>◆>◆>◆の順に色分けして示した。

論文内容の要旨

応用生命化学　専攻
平成24年度博士課程　進学
氏　　名　　福井　康祐
指導教員名　　浅見　忠男

論文題目

ストリゴラクトンシグナルの分子調節を目的とした化合物創製研究

1. 背景及び目的

ストリゴラクトン（SLs）は、ストライガやオロバンキといったハマウツボ科に属する根寄生植物の種子発芽誘導物質として発見されたラクトン骨格を有するアポカロテノイドの総称である。初めて発見されたSLは根寄生植物の宿主とはならないワタの根の滲出液から発見された。そのため、SLには根寄生植物の種子発芽の誘導以外にも何か役割があるのではないか、と考えられていた。SLの発見から数十年間、このSLの根寄生植物の種子発芽誘導以外の役割は謎のままであったが、2000年代に入って二つの研究からその役割が明らかとなった。一つは、地上の植物の約80%と共生すると言われている根共生菌の一種である、アーバスキュラー菌根菌（AM菌）の菌糸分岐を誘導する作用であり、このことから植物が根からSLを放出するのはAM菌と共生することによって自身が窒素やリンなどの無機栄養素や水を獲得しやすくするためであると一般的に認識される様になった。もう一つは、植物ホルモンとしての作用であり、枝分かれの抑制を含む多くの形態形成に関わることが明らかとなってきた。最近では、新規植物ホルモンであるSLに関する研究が急速に進み、生合成経路や情報伝達経路に関する知見が次々に報告されている。

これまで植物ホルモン研究の成果は様々な点で農業生産に貢献してきた。例えば、所謂『緑の革命』では植物の徒長を促進するジベレリンの生合成や情報伝達レベルが低下した半矮性の穀類を用いることで、肥料の栄養を徒長ではなく穀物生産量の飛躍的向上に結びつけることに成功してきた。このように、植物ホルモンの研究過程で得られる様々な遺伝子機能の情報や、成長制御剤は、直接に農業生産の質や量の向上に結びつきやすい。そこで、本研究では新たに植物ホルモン作用が報告されたSLを対象として新規SLミミックの

探索を行なうとともに、SL の多様な機能の一つ一つを理解しやすくするために機能特異的な SL ミミックを創製することを目的として、研究を行った。

2. 新規ストリゴラクトンミミックの創製と作用解析

これまでの SL アゴニスト創製は SL が根寄生植物の種子発芽誘導物質として発見されたこともあり、根寄生植物の種子発芽誘導活性を指標として探索されてきた。しかし、根寄生植物を対象とした化合物探索で提唱されていた活性発現に必要な最小限の構造を構築するには多段階の反応を要し、圃場などで多量に用いるために大量合成することが困難であった。そこで、新たに植物ホルモンとしての SL の枝分かれ抑制活性を指標に SL ミミックの探索を行なうことで、合成簡便で使い勝手の良い新規物質の探索が出来るのではないかと考え、化合物の探索を行なった。筆者の所属する研究室でジベレリンの受容体 GID1 の阻害剤として *in silico* スクリーニングでヒットしていた物質が SL と部分構造の一致を見せたことから、より SL の構造に近くなるよう一部構造改変したものを合成し、SL 生合成遺伝子の欠損変異体イネ *d10* への処理を試みた。その結果、イネの枝分かれである分げつの伸長を強く抑制することを見いだした。そこで、本化合物 **1a** をリード化合物として合成展開し、構造活性相関研究の過程で最も強い枝分かれ抑制活性化合物を選抜することとした。リード化合物が 4-クロロフェノールと 5-ブロモ-3-メチル-2(*5H*)-フラノンから合成されるため、フェノールの 4 位の置換基を様々検討した。その結果、ハロゲン性置換基を有する化合物の分げつ抑制活性が比較的高く、代表化合物として 4-ブロモフェノールから合成される化合物 **1c** を選抜した。化合物 **1c** を用いて、イネに対して長期処理した場合の副作用の有無や、SL 非感受性変異体への効果、SL 応答性遺伝子の発現量の変化、SL 内生量に与える影響を評価したところ、処理濃度における副作用は観察されず、それ以外は既に報告されている SL アゴニストである GR24 処理と同様の結果を示した。従って、化合物 **1c** は SL として作用しイネの分げつ伸長を抑制していると考えた。更に、シロイヌナズナの SL 生合成遺伝子の欠損変異体と SL 非感受性変異体を用いて同様に枝分かれ抑制効果を調べたところ、シロイヌナズナにおいても生合成遺伝子の欠損変異体でのみ枝分かれを抑制し、非感受性変異体の枝数の減少は観察されなかった。以上から、化合物 **1c** は植物に対して広く SL として作用し、枝分かれを抑制する化合物と判断した。次に、化合物 **1c** の枝分かれ抑制以外の SL 生理作用を評価するためシロイヌナズナの根毛伸長促進など根の形態形成に与える影響を評価した。その結果、根の形態形成に与える影響は GR24 と比較して弱く、若干の作用

は見られるものの枝分かれ抑制活性ほど強くはなかった。また、根寄生植物の種子発芽誘導活性も評価した結果、化合物 **1c** は GR24 と比較して著しく活性が低く非常に高濃度でのみ根寄生植物の一種である *Striga hermonthica* の種子発芽を誘導することが明らかとなった。以上のことから、本章で創製した新規 SL ミミックは植物の枝分かれ抑制に特異性を有する化合物であると考えた。このようなフェノールとフラノン環から合成される化合物を、その構造と活性から枝分かれを減らすフラノンという意味でデブラノン（de-branching furanone）と呼称することとした。また、この枝分かれ抑制効果に特化した化合物の応用法として、SL 生合成変異体を用いた新規な根寄生植物防除法を考案した。

3. 機能選択的デブラノンの創製

前章で創製した化合物 **1c** の様に SL の様々な作用を選択的にミミックできる化合物は研究上にも実用上にも利便性が高いと考え、本章ではデブラノン類の選択性と構造の相関関係を詳細に調べることとした。活性の評価には、比較的短期間で結果の得られるイネの第２分げつ伸長抑制試験と根寄生植物 *S.hermonthica* の種子発芽試験を用いた。その結果、原料となるフェノールのベンゼン環上の置換基の位置と、官能基の種類によって選択性が制御できることが明らかとなった。置換基の位置と官能基の種類を適切に選択することにより、イネの分げつ伸長抑制に関して選抜した化合物では 10 倍以上の活性の向上と若干の選択性の向上が達成された。一方、*S.hermonthica* の種子発芽誘導選択的に作用する化合物の創製も検討した結果、1 μM ではイネの第二分げつ伸長をほとんど抑制しないが、100 nM でも *S.hermonthica* の種子発芽を誘導する化合物の取得に成功した。これら二つの機能選択的化合物について、イネにおける分げつ伸長抑制以外の SL 活性試験として、SL 欠損変異体で低下が見られるクロロフィル含量の回復試験を行ったところ、SL によるイネのクロロフィル含量の回復は分げつ伸長抑制と同様の情報伝達系で制御されていることが明らかとなった。

4. デブラノン類の機能選択性に関する詳察

前章までにデブラノン類がその構造によって SL の様々な作用の各々を選択的にミミックできる可能性を示してきた。本章では、前章で選抜した代表化合物がシロイヌナズナにおいて報告されている様々な SL 生理作用に対して与える影響を評価した。その結果、イネや *S.hermonthica* に対する選択性と完全には一致しないことが明らかとなった。そこで、シ

ロイヌナズナにおいて報告されているSL生理作用に対する化合物の効果を再評価することとした。その結果、イネや *S.hermonthica* に対する活性の傾向とは異なるものの、シロイヌナズナにおける各生理作用間で、相関があることが明らかとなった。また、化合物のキラリティーが各活性に与える影響も評価するため、前章で選抜した代表化合物を光学分割し、イネの分げつ伸長抑制試験や、シロイヌナズナの高温種子発芽試験などに供し、何れのエナンチオマーが活性を示すのかを調べた。その結果、いくつかの試験間では高い活性を示すエナンチオマーが異なることを見いだした。従って、各 SL 受容体に対する親和性が各エナンチオマーによっても異なることが示されたと考える。

5. まとめ

新規 SL ミミックであるデブラノンは各種フェノール類とブロモフラノン環から１ステップで収率よく合成でき、ベンゼン環上の官能基の位置と種類を適切に選択することで、様々な生理作用に対して特化した活性を示す。これら様々な活性を有する化合物を用いることにより、これまで天然型 SL では解明できなかった各作用における情報伝達経路の違いなどを明らかできると考えられる。SL は枝分かれなど穀物の生産量やバイオマスに直接結びつく形態を制御しているだけでなく、根寄生植物の発根を促進し寄生を促すことで世界の諸地域における寄生被害による作物生産量の減少の要因ともなっていることから、今後人類が直面すると言われている食料問題やエネルギー問題に少しでも本研究が貢献できることを期待している。

1) Fukui, K., Ito, S., Ueno, K., Yamaguchi, S., Kyozuka J. & Asami, T. New branching inhibitors and their potential as strigolactone mimics in rice. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 4905-4908 (2011).
2) Fukui, K., Ito, S. & Asami, T. Selective mimics of strigolactone actions and their potential use for controlling damage caused by root parasitic weeds. *Mol. Plant* **6**, 88–99 (2013).

参考文献

Abe, S., Sado, A., Tanaka, K., Kisugi, T., Asami, K., Ota, S., Kim, H.I., Yoneyama, K., Xie, X., Ohnishi, T., et al. (2014) Carlactone is converted to carlactonoic acid by MAX1 in Arabidopsis and its methyl ester can directly interact with AtD14 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 18084-18089.

Aguilar-Martínez, J.A., Poza-Carrión, C., and Cubas, P. (2007) *Arabidopsis* BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *Plant Cell* 19: 458-472.

Agusti, J., Herold, S., Schwarz, M., Sanchez, P., Ljung, K., Dun, E.A. et al. (2011) Strigolactone signaling is required for auxin-dependent stimulation of secondary growth in plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108: 20242-20247.

Akiyama, K., Matsuzaki, K. and Hayashi, H. (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824-827.

Akiyama, K., Ogasawara, S., Ito, S. and Hayashi, H. (2010) Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant Cell Physiol.* 51: 1104-1117.

Alder, A., Jamil, M., Marzorati, M., Bruno, M., Vermathen, M., Bigler, P., Ghisla, S., Bouwmeester, H., Beyer, P. and Al-Babili, S. (2012) The Path from beta-Carotene to Carlactone, a Strigolactone-Like Plant Hormone. *Science* 335: 1348-1351.

Arite, T., Iwata, H., Ohshima, K., Maekawa, M., Nakajima, M., Kojima, M. et al. (2007) DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J.* 51: 1019-1029.

Arite, T., Umehara, M., Ishikawa, S., Hanada, A., Maekawa, M., Yamaguchi, S. et al. (2009) d14, a strigolactone-insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers. *Plant Cell Physiol.* 50: 1416-1424.

Booker, J., Auldridge, M., Wills, S., McCarty, D., Klee, H. and Leyser, O. (2004) MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr. Biol.* 14: 1232-1238.

Booker, J., Sieberer, T., Wright, W., Williamson, L., Willett, B., Stirnberg, P. et al. (2005) MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Dev. Cell* 8: 443-449.

Boyer, F.D., de Saint Germain, A., Pillot, J.P., Pouvreau, J.B., Chen, V.X., Ramos, S., Stévenin, A., Simier, P., Delavault, P., Beau, J.M., et al. (2012) Structure–activity relationship studies of strigolactone-related molecules for branching inhibition in garden pea: molecule design for shoot branching. *Plant Physiol*. 159: 1524-1544.

Boyer, F.D., de Saint Germain, A., Pouvreau, J.B., Clavé, G., Pillot, J.P., Roux, A., Rasmussen, A., Depuydt, S., Lauressergues, D., Frei dit Frey, N., et al. (2014) New Strigolactone Analogs as Plant Hormones with Low Activities in the Rhizosphere. *Mol. Plant* 7: 675-690.

Braun, N., de Saint Germain, A., Pillot, J.P., Boutet-Mercey, S., Dalmais, M., Antoniadi, I., Li, X., Maia-Grondard, A., Le Signor, C., Bouteiller, N. et al. (2012) The pea TCP transcription factor PsBRC1 acts downstream of Strigolactones to control shoot branching. *Plant Physiol.* 158: 225-238.

Bu, Q., Lv, T., Shen, H., Luong, P., Wang, J., Wang, Z., Huang, Z., Xiao, L., Engineer, C., Kim, T.H., Schroeder, J.I. and Huq, E. (2014) Regulation of Drought Tolerance by the F-Box Protein MAX2 in Arabidopsis *Plant Physiol.* 164: 424-439.

Butler, L.G. (1995) Chemical communication between the parasitic weed *Striga* and its crop host. A new dimension in allelochemistry. *In* Allelopathy, Organisms, Processes and Applications. Edited by Inderjit, K.M., Dakshini, M. and Enhelling, F.A. pp. 158–166. American Chemical Society, Washington, DC.

Chapleo, C.B., Svanholt, K.L., Martin, R. and Dreding, A.S. (1976) Synthesis of Bromo-substituted 2-Buten- and 2 -Penten-4-olides. *Helv. Chim. Acta* 59: 100-107.

Cook, C.E., Whichard, L.P., Turner, B., Wall, M.E., and Egley, G.H. (1966) Germination of Witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. *Science* 154: 1189-1190.

Cook, C.E., Whichard, L.P., Wall, M.E., Egley, G.H., Coggon, P., Luhan, P.A., et al. (1972) Germination stimulants. II. The structure of strigol—a potent seed germination stimulant for witchweed (*Striga lutea* Lour.). *J. Am. Chem. Soc.* 94: 6198-6199.

Drummond, R.S.M., Martínez-Sánchez, N.M., Janssen, B.J., Templeton, K.R., Simons, J.L. Quinn, B.D. et al. (2009) Petunia hybrida CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 7 is involved in the production of negative and positive branching signals in petunia. Plant Physiol 151:1867–1877.

Dun, E.A., Hanan, J., Beveridge, C.A. (2009) Computational Modeling and Molecular Physiology Experiments Reveal New Insights into Shoot Branching in Pea. *Plant Cell* 21: 3459-3472.

Fukui, K., Ito, S., Ueno, K., Yamaguchi, S., Kyozuka, J. and Asami, T. (2011) New branching inhibitors and their potential as strigolactone mimics in rice. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21: 4905-4908.

Fukui, K., Ito, S. and Asami, T. (2013) Selective mimics of strigolactone actions and their potential use for controlling damage caused by root parasitic weeds. *Mol. Plant* 6: 88-99.

Gao, Z., Qian, Q., Liu, X., Yan, M., Feng, Q., Dong, G., Liu, J. and Han, B. (2009) Dwarf 88, a novel putative esterase gene affecting archtecture of rice plant. *Plant. Mol. Biol.* 71: 265-276.

Goldwasser, Y., Yoneyama, K., Xie, X. and Yoneyama, K. (2008) Production of strigolactones by *Arabidopsis thaliana* responsible for *Orobanche aegyptiaca* seed germination. *Plant Growth Regul.* 55: 21-28.

Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P.B., Puech-Pagès, V., Dun, E.A., Pillot, J.P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J.C., et al. (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455: 189-194.

Hamiaux, C., Drummond, R.S.M., Janssen, B.J., Ledger, S.E., Cooney, J.M., Newcomb, R.D. and Snowden, K.C. (2012) DAD2 is an α/β hydrolase likely to be involved in the perception of the plant branching hormone, strigolactone. *Curr. Biol.* 22: 2032-2036

Ishikawa, S., Maekawa, M., Arite, T., Onishi, K., Takamure, I. and Kyozuka, J. (2005) Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant Cell Physiol.* 46: 79-86.

Ito, S., Kitahata, N., Umehara, M., Hanada, A., Kato, A., Ueno, K. et al. (2010) A new lead chemical for strigolactone biosynthesis inhibitors. *Plant Cell Physiol.* 51: 1143-1150.

Jiang, L., Liu, X., Xiong, G., Liu, H., Chen, F., Wang, L., Meng, X., Liu, G., Yu, H., Yuan, Y., et al. (2013) DWARF 53 acts as a repressor of strigolactone signalling in rice. *Nature* 504: 401-405.

Johnson, A., Gowda, G., Hassanali, A., Knox, J., Monaco, S., Razavi, Z., and Rosebery, G. (1981) The preperation of synthetic analogs of strigol. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1: 1734-1743.

Johnson, X., Brcich, T., Dun, E.A., Goussot, M., Haurogné, K., Beveridge, C.A., and Rameau, C. (2006) Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiol.* 142: 1014-1026.

Kagiyama, M., Hirano, Y., Mori, T., Kim, S.Y., Kyozuka, J., Seto, Y., Yamaguchi, S. and Hakoshima, T. (2013) Structures of D14 and D14L in the strigolactone and karrikin signaling pathways. *Genes Cells* 18: 147-160.

Kisugi, T., Xie, X., Kim, H.I., Yoneyama, K., Sado, A., Akiyama, K., Hayashi, H., Uchida, K., Yokota, T., Nomura, T. and Yoneyama, K. (2013) Strigone, isolation and identification as a natural strigolactone from Houttuynia cordata. *Phytochemistry* 87: 60-64.

Kondo, Y., Tadokoro, E., Matsuura, M., Iwasaki, K., Sugimoto, Y., Miyake, H., Takikawa, H., and Sasaki, M. (2007) Synthesis and seed germination stimulating activity of some imino analogs of strigolactones. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 2781-2786.

Koren, D., Resnick, N., Mayzlish, G.E., Belausov, E., Weininger, S., Kapulnik, Y., Koltai, H. (2013) Strigolactone signaling in the endodermis is sufficient to restore root responses and involves SHORT HYPOCOTYL 2 (SHY2) activity. New Phytol. 198: 866-874.

Lin, H., Wang, R., Qian, Q., Yan, M., Meng, X., Fu, Z. et al. (2009) DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *Plant Cell* 21: 1512-1525.

Liu, W., Wu, C., Fu, Y., Hu, G., Si, H., Zhu, L., Luan, W., He, Z. and Sun, Z. (2009) Identification and characterization of HTD2: a novel gene negatively regulating tiller bud outgrowth in rice. *Planta* 230: 649-658.

Mangnus, E.M. and Zwanenburg, B. (1992) Tentative molecular mechanism for germination stimulation of *Striga* and *Orobanche* seeds by strigol and its synthetic analogues. *J. Agric. Food Chem*. 40: 1066-1070.

Mashiguchi, K., Sasaki, E., Shimada, Y., Nagae, M., Ueno, K., Nakano, T., Yoneyama, K., Suzuki, Y. and Asami, T. (2009) Feedback-regulation of strigolactone biosynthetic genes and strigolactone-regulated genes in Arabidopsis. *Biosci. Biotech. Biochem.* 73: 2460-2465.

Matusova, R., Rani, K., Verstappen, F.W.A., Franssen, M.C.R., Beale, M.H. and Bouwmeester, H.J. (2005) The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanche* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol.* 139: 920-934.

Mayzlish-Gati, E., LekKala, S.P., Resnick, N., Wininger, S., Bhattacharya, C., Lemcoff, J.H., Kapulnik, Y. and Koltai, H. (2010) Strigolactones are positive regulators of light-harvesting genes in tomato. *J. Exp. Bot.* 61: 3129-3136.

Minakuchi, K., Kameoka, H., Yasuno, N., Umehara, M., Luo, L., Kobayashi, K., Hanada, A., Ueno, K., Asami, T., Yamaguchi, S., et al. (2010) FINE CULM1 (FC1) works downstream of strigolactones to inhibit the outgrowth of axillary buds in rice. *Plant Cell Physiol.* 51: 1127-1135.

Moran, R. (1982) Formulae for Determination of Chlorophyllous Pigments Extracted with *N*,*N*-Dimethylformamide. *Plant Physiol.* 69: 1376-1381.

Mwakaboko, A.S. and Zwanenburg, B. (2011) Strigolactone analogs derived from ketones using a working model for germination stimulants as a blueprint. *Plant Cell Physiol.* 52: 699-715.

Nagahashi, G. and Douds, D.D. (1999) Rapid and sensitive bioassay to study signals between root exudates and arbuscular mycorrhizal fungi. *Biotechnol. Tech.* 13: 893-897.

Nagahashi, G. and Douds, D.D. (2000) Partial separation of root exudate compounds and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycol. Res.* 104: 1453-1464.

Nakamura, H., Xue, Y.L., Miyakawa, T., Hou, F., Qin, H.M., Fukui, K., Shi, X., Ito, E., Ito, S., Park, S.H., et al (2013) Molecular mechanism of strigolactone perception by DWARF14. *Nat. Commun.* 4: 2613.

Nelson, D.C., Scaffidi, A., Dun, E.A., Waters, M.T., Flematti, G.R., Dixon, K.W., Beveridge, C.A., Ghisalberti, E.L., and Smith, S.M. (2011) F-box protein MAX2 has dual roles in karrikin and strigolactone signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 8897-8902.

Nomura, S., Nakashima, H., Mizutani, M., Takikawa, H. and Sugimoto, Y. (2013) Structural requirements of strigolactones for germination induction and inhibition of *Striga gesnerioides* seeds. *Plant cell reports* 32: 829-838.

Pandya-Kumar, N., Shema, R., Kumar, M., Mayzlish-Gati, E., Levy, D., Zemach, H., Belausov, E., Wininger, S., et al. (2014) Strigolactone analog GR24 triggers changes in PIN2 polarity, vesicle trafficking and actin filament architecture. *New Phytol.* 202: 1184-1196.

Park, S.Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.F. et al. (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324: 1068-1071.

Rasmussen, A., Mason, M.G., De Cuyper, C., Brewer, P.B., Herold, S., Agusti, J. et al. (2012) Strigolactones suppress adventitious rooting in Arabidopsis and pea. *Plant Physiol.* 158: 1976-1987.

Scaffidi, A., Waters, M.T., Sun, Y.K., Skelton, B.W., Dixon K.W., Ghisalberti, E.L., Flematti, G.R. and Smith S.M. (2014) Strigolactone hormones and their stereoisomers signal through two related receptor proteins to induce different physiological responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 165: 1221-1232.

Seto, Y., Sado, A., Asami, K., Hanada, A., Umehara, M., Akiyama, K. and Yamaguchi, S. (2014) Carlactone is an endogenous biosynthetic precursor for strigo- lactones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 1640-1645.

Shan, X., Yan, J. and Xie, D. (2012) Comparison of phytohormone signaling mechanisms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 84-91.

Shen, H., Zhu, L., Bu Q-Y. and Huq, E. (2012) MAX2 Affects Multiple Hormones to Promote Photomorphogenesis. *Mol. Plant* 5: 750-762.

Shinohara, N., Taylor, C. and Leyser, O. (2013) Strigolactone Can Promote or Inhibit Shoot Branching by Triggering Rapid Depletion of the Auxin Efflux Protein PIN1 from the Plasma Membrane. PLOS Biol. 11: e1001474.

Simons, J.L., Napoli, C.A., Janssen, B.J., Plummer, K.M., and Snowden, K.C. (2007) Analysis of the DECREASED APICAL DOMINANCE genes of petunia in the control of axillary branching. *Plant Physiol.* 143: 697-706.

Snowden, K.C., Simkin, A.J., Janssen, B.J., Templeton, K.R., Loucas, H.M., Simons, J.L. et al. (2005) The Decreased apical dominance 1/petunia hybrida carotenoid cleavage dioxygenase8 gene affects branch pro- duction and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *Plant Cell* 17: 746-759.

Sorefan, K., Booker, J., Haurogné, K., Goussot, M., Bainbridge, K., Foo, E., Chatfield, S., Ward, S., Beveridge, C., Rameau, C., et al (2003) MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in Arabidopsis and pea. *Genes Dev.* 17: 1469-1474.

Stirnberg, P., van de Sande, K. and Leyser, H.M.O. (2002) MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in Arabidopsis. *Development* 129: 1131-1141.

Takeda, T., Suwa, Y., Suzuki, M., Kitano, H., Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Matsuoka, M. and Ueguchi, C. (2003) The OsTB1 gene negatively regulates lateral branching in rice. *Plant J.* 33: 513-520.

Thuring, J.W.J.F., Nefkens, G.H.L. and Zwanenburg, B. (1997) Asymmetric synthesis of all stereoisomers of the strigol analogue GR24. Dependence of absolute configuration on stimulatory activity of *Striga hermonthica* and *Orobanche crenata* seed germination. *J. Agric. Food Chem*. 45: 2278-2283.

Toh, S., Kamiya, Y., Kawakami, N., Nambara, E., McCourt, P. and Tsuchiya, Y. (2012) Thermoinhibition uncovers a role for strigolactones in Arabidopsis seed germination. *Plant Cell Physiol.* 53: 107-117.

Tsuchiya, Y., Vidaurre, D., Toh, S., Hanada, A., Nambara, E., Kamiya, Y. et al. (2010) A small-molecule screen identifies new functions for the plant hormone strigolactone. *Nat. Chem. Biol.* 6: 741–749.

Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., Magome, H., Kamiya, Y., Shirasu, K., Yoneyama, K., et al. (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455: 195-200.

Wang, Y., Sun, S., Zhu, W., Jia, K., Yang, H., and Wang, X. (2013) Strigolactone/ MAX2-induced degradation of brassinosteroid transcriptional effector BES1 regulates shoot branching. *Dev. Cell* 27: 681-688.

Waters, M.T., Nelson, D.C., Scaffidi, A., Flematti, G.R., Sun, Y.K.M., Dixon, K.W. and Smith, S.M. (2012) Specialisation within the DWARF14 protein family confers distinct responses to karrikins and strigolactones in *Arabidopsis*. *Development* 139: 1285-1295.

Wolff, S. and Hoffmann, H.M.R. (1988) Aflatoxins Revisited: Convergent Synthesis of t he ABC-Moiety. Synthesis 1988(10): 760-763.

Yamada, Y., Furusawa, S., Nagasaka, S., Shimomura, K., Yamaguchi, S. and Umehara, M. (2014) Strigolactone signaling regulates rice leaf senescence in response to a phosphate deficiency. *Planta* 240: 399-408.

Yoneyama, K., Xie, X., Sekimoto, H., Takeuchi, Y., Ogasawara, S., Akiyama, K., and Hayashi, H. (2008) Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytol.* 179: 484-494.

Yoneyama, K., Awad, A.A., Xie, X., and Takeuchi, Y. (2010) Strigolactones as germination stimulants for root parasitic plants. *Plant Cell Physiol.* 51: 1095-1103.

Yoshida, S., Ishida, J.K., Kamal, N.M., Ali, A.M., Namba, S. and Shirasu, K. (2010) A full-length enriched cDNA library and expressed sequence tag analysis of the parasitic weed, Striga hermonthica. *BMC Plant. Biol.* 10: 55.

Zhang, Y., van Dijk, A.D., Scaffidi, A., Flematti, G.R., Hofmann, M., Charnikhova, T., Verstappen, F., Hepworth, J., van der Krol, S., Leyser, O., et al. (2014) Rice cytochrome P450 MAX1 homologs catalyze distinct steps in strigolactone biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* 10: 1028-1033.

Zou, J., Zhang, S., Zhang, W., Li, G., Chen, Z., Zhai, W. et al. (2006) The rice HIGH-TILLERING DWARF1 encoding an ortholog of Arabidopsis MAX3 is required for negative regulation of the out- growth of axillary buds. *Plant J.* 48: 687-698.

Zhou, F., Lin, Q., Zhu, L., Ren, Y., Zhou, K., Shabek, N., Wu, F., Mao, H., Dong, W., Gan, L., et al. (2013) D14-SCF(D3)-dependent degradation of D53 regulates strigolactone signalling. *Nature* 504: 406-410.

Zwanenburg, B., Mwakaboko, A.S., Reizelman, A., Anilkumar, G. and Sethumadhavan, D. (2009) Structure and function of natural and synthetic signalling molecules in parasitic weed germination. *Pest Manag. Sci.* 65: 478-493.

梅原　三貴久 (2010) 宿主植物におけるストリゴラクトンの生理作用―最近の知見から―. 植物の生長調節 45: 104-111.

小柴恭一、神谷勇治　編 (2010) 新しい植物ホルモンの科学　第２版. 講談社

大村恒雄、石村巽、藤井義明　編 (2009) P450 の分子生物学　第２版. 講談社

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々のご指導、ご協力を賜りました。

ストリゴラクトン関連変異体イネを御分与くださった東京大学の経塚淳子准教授、根寄生植物 *Striga hermonthica* の種子を御分与くださった宇都宮大学の米山弘一教授並びに College of Agricultural StudiesのA. G. Babiker 教授、シロイヌナズナ *d14-1* 変異体や *kai2-2* 変異体を御分与くださった The University of Western Australia の S. M. Smith 教授には、貴重な植物材料を御分与頂いただけでなく、実験的なアドバイスも頂きました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。また、本研究を行う上で重要となった有機合成化学の基礎的な知識と実験技術を培って下さった慶応義塾大学の山田徹教授並びに反応有機化学研究室の皆様にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

指導教官である浅見忠男教授には、本研究に携わる機会を与えて下さった上、国内外の学会で発表する機会や他の研究施設で研究する機会などを与えて下さったこと、また投稿論文や本論文の執筆にあたっても丁寧にご指導くださったこと、ここに深く感謝致します。中嶋正敏准教授には、私生活や研究生活についてご指導いただいたこと、また『化学と生物』に記事を執筆させて頂く機会を与えて下さったこと、ここに深く感謝致します。中村英光助教には、本研究を遂行するにあたり実験や議論などにおいて大変ご助力いただきましたこと、ここに深く感謝致します。

OB・OG を含む生物制御化学研究室の皆様には、5 年という長い研究室生活を送る中で様々な心に残る思い出と、研究におけるアドバイスを頂きました。充実した時を過ごせたのは偏に皆様のお陰です。ありがとうございました。

最後に、それぞれの道を歩みながらも共に励まし合い、語り合い、笑い合った友人達と、私の長い学生生活を資金面や精神面で支えてくれた両親に最大限感謝し、謝辞とさせて頂きます。

2014 年 12 月

福井　康祐