

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18380192

研究課題名（和文）半乾燥地帯における植物の環境ストレス保護剤の開発

研究課題名（英文）Development of drugs protecting plants from environmental stress in semi-arid land

研究代表者

平井 伸博（HIRAI NOBUHIRO）

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：00165151

研究成果の概要：半乾燥地帯における植物の環境ストレス保護剤の開発を目的として、環境ストレスへの適応反応を誘導する植物ホルモン・アブシシン酸の代謝不活性化酵素に関する研究を行った。その結果、アブシシン酸水酸化酵素の選択的阻害剤の開発に成功するとともに、アブシシン酸の最終不活性化酵素であるファゼイン酸還元酵素活性の諸性質を明らかにした。これにより、アブシシン酸の不活性化制御による植物保護の道を拓いた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2007 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2008 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：生物環境、環境保全、植物、生理活性、有機化学

1. 研究開始当初の背景

現在、地球レベルで砂漠周辺に半乾燥地帯が拡大しつつある。これらの半乾燥地帯では、乾燥に加えて不適切な灌漑による塩害によっても植物の生産力が急激に低下している。半乾燥地帯の緑化は、砂漠化を防ぐという地球環境の修復・保護の見地から強く望まれているだけでな

く、農業生産の増加とも密接にリンクしている。

近未来に予測される食糧危機を克服するためには、安定した食糧生産と人口増加に見合うだけの食糧の増産が必要であり、農耕地の拡大が必要である。しかし、地球上で容易に作物を栽培できる土地はほとんど利用されており、残されているのは土地改良に莫大な費用と時間がかか

る半乾燥地や塩害地、寒冷地などである。したがって、これらの地域においても農作物を少ない労力と費用で栽培できる方法が強く望まれている。

2. 研究の目的

遺伝子組み換え技術を用いて、半乾燥地帯のような栽培不適地でも生育できる植物の開発も試みられているが、同技術は特定の植物に限定され、果樹や防風林などの樹木への応用にはまだかなりの時間が必要である。またそれだけでなく、遺伝子組み換え植物の栽培には消費者の抵抗感も根強い。そこで本研究は、砂漠化を防ぎ植物生産を増加するために、半乾燥地帯における植物を乾燥や塩害ストレスから保護する薬剤を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

半乾燥地帯における植物の環境ストレス保護剤を開発するにあたって、植物固有のホルモンであるアブシシン酸 (ABA) に着目した。ABA は、乾燥や塩害、低温などに対する防御反応を誘導することによって植物を環境ストレスから守る重要なホルモンである。乾燥条件に置かれた植物では、急速に増加した ABA が気孔を閉鎖し蒸散を抑制するとともに、ストレス耐性を付与する各種遺伝子やタンパク質を誘導する。したがって、ABA の作用を持続することができれば、植物自身が有している能力以上に環境ストレス抵抗性を高めることが可能になる。このように ABA は農業生産上極めて有用な性質を有しているため、農作物への投与試験も精力的に行われている。しかし、ABA の

効果を発揮するためには薬剤を反復散布しなければならないという問題を抱えている。さらに ABA の生合成酵素遺伝子を過剰発現させた組み換え植物は、期待したほど ABA も乾燥耐性も増加しないことが明らかになっている。これらの主な原因は、投与した ABA が植物体内で代謝により急速に不活性化され、その作用が持続しないためである。したがって、ABA の作用を有効利用するためには、ABA そのものを投与したり増加させたりするよりも、代謝不活性化を制御した方が効果的である。

ABA の代謝には、六員環部分の修飾と複合型化がある。ABA を本質的に不活性化するのは前者である。六員環部分の代謝 (図 1) では、ABA は先ずシトクロム P450 の ABA 8' 位水酸化酵素によって 8'-ヒドロキシ ABA に変換される。生じた 8'-ヒドロキシ ABA は、容易に非酵素的にファゼイン酸に異性化する。ファゼイン酸は、さらにその 4' 位還元酵素によりジヒドロファゼイン酸とそのエピ体まで代謝される。代謝物質の生理活性は、8'-ヒドロキシ ABA が ABA の約 20%、ファゼイン酸が同じく約 10%、ジヒドロファゼイン酸はほとんど不活性であることが明らかにされている。したがって、この代謝による ABA の段階的不活性化を阻害し ABA の作用を持続させることができれば、ABA がホルモンとして持っている美点を最大限に利用することが可能になる。

ABA 8' 位水酸化酵素はすでに遺伝子が同定され発現系がつくられており、その酵素阻害剤としてウニコナゾール-P が見出されている。しかし、ウニコナゾール-P はジベレリン生合成も阻害するという副作用がある。そこで同酵素の選択的阻

害剤を開発することとした。さらにまだ遺伝子が同定されていないファゼイン酸 4' 位還元酵素の遺伝子同定を行い、その酵素活性検定系を確立して阻害剤開発を試みることにした。両方の酵素阻害剤の併用によってより ABA 不活性化抑制効果が上がることが期待された。

4. 研究成果

1) ウニコナゾール-P の作用確認

ウニコナゾール-P をシロイヌナズナに投与後、乾燥ストレスを与え、ウニコナゾール-P の保護作用を調べた。その結果ウニコナゾール-P は、実際に乾燥ストレスからの保護作用を示すことが確認された。さらに、シロイヌナズナの ABA を定量した結果、実際に ABA 含量がより高く維持されることを確認した。これにより、ABA 8' 位水酸化酵素阻害剤が乾燥などの環境ストレス保護剤として有望であることが確認された。そこで、より選択的な ABA 8' 位水酸化酵素阻害剤の開発を行った。

2) ABA 8' 位水酸化酵素活性検定系の確立

酵素阻害剤の開発に必須である ABA 8' 位水酸化酵素活性検定系の確立を行った。シロイヌナズナの ABA 8' 位水酸化酵素 CYP707A をバキュロウイルス-昆虫細胞系により発現させ、同細胞のミクロソームを用いて粗 ABA 8' 位水酸化酵素を調製した。その酵素活性を 8'-ヒドロキシ ABA とその異性体ファゼイン酸への変換を検出することによって測定できる系を確立した。主にこの検定系を用いて、合成された酵素阻害剤候補物質の酵素活性阻害試験を行った。

3) ABA 8' 位水酸化酵素と P450 還元酵素を

共発現した大腸菌の調製

より簡便で早く培養できる大腸菌への ABA 8' 位水酸化酵素遺伝子導入を試みた。その結果 ABA 8' 位水酸化酵素のシトクロム P450 CYP707A3 の組換え酵素の大腸菌における発現系を構築することに成功した。さらに、水酸化酵素活性を大腸菌で測定できるように、P450 の電子供与酵素である NADPH-P450 還元酵素を大腸菌で P450 と共発現させる系を構築し、CYP707A3 と P450 還元酵素を共発現した大腸菌から調製した膜画分で酵素活性を確認することができた。さらに、本大腸菌に ABA を投与したところ、培地中に代謝物であるファゼイン酸を多量に検出した。本発現系により、化合物の阻害活性を簡便に評価することが可能となった。さらに、本発現系はファゼイン酸還元酵素を探索する上で有用なスクリーニング系となることが期待できる。

4) 基質型 ABA 8' 位水酸化酵素阻害剤のデザイン合成と活性

基質 ABA と拮抗する型の酵素阻害剤を見出すため、合計 35 種の ABA 誘導体の ABA 8' 位水酸化酵素阻害活性を測定し、ABA 8' 位水酸化酵素の基質特異性の詳細を明らかにした。この知見をもとに、ABA 活性を示さずに水酸化酵素阻害活性を示す ABA 誘導体 AHI1 をデザイン・合成した。そのリング芽生えに対する乾燥耐性付与効果を調べた結果、非常に強い ABA 8' 位水酸化酵素阻害活性を有するウニコナゾール-P に匹敵する効果を示すことがわかった。AHI1 は、アゾール型以外では初めての強い水酸化酵素阻害剤である。

5) ABA 8' 位水酸化酵素の ABA 認識部位の特定

ABA 8' 位水酸化酵素の ABA 認識に関わるアミノ酸残基をホモロジーモデリングによっ

て予想し、これらを改変した変異酵素を作製してABA水酸化活性を調べ、Lys109とAsn207がABAの1位カルボン酸と相互作用している可能性が高いことを明らかにした。さらに、AHI1とその誘導体をプローブとして、ABA 8'位水酸化酵素がABAのキラリティを認識するメカニズムについて調べ、ABAの環部エノン構造が酵素によるキラル認識に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

6) アゾール系ABA 8'位水酸化酵素特異的阻害剤の開発

副作用(ジベレリン生合成阻害)のない、ABA 8'位水酸化酵素特異的なウニコナゾール-P誘導体開発の手がかりを得るために、ウニコナゾール-Pの親水性部位である水酸基とアゾール環に特化して構造活性相関研究を行った。これにより、3位置換基の水素結合受容能およびトリアゾール環の回転に関連した立体配座がウニコナゾール-Pの活性に重要な役割を果たしていることが明らかになった。ウニコナゾール-Pは小さくて非常に柔軟な、配座自由度の大きな分子である。この構造特性が様々な酵素の基質ポケットへの適合を可能にするため、酵素選択性が低いと考えられる。そこで、分子の大きさと柔軟性に着目して新たなウニコナゾール-P誘導体の設計を行った。

ウニコナゾール-Pをリード化合物とし、アゾール環部分の自由回転を制限した配座固定アナログ8種、アゾール環に水酸化メチル基を導入したアゾール環修飾アナログ3種、クリック反応によりベンゼン環の4位を修飾したアナログ15種の計26化合物を合成した。このうち、配座固定アナログとベンゼン環4位修飾アナログのいくつかは、イネ芽生えの生育をほとんど阻害しないにも関わらず、ABA 8'位水酸化酵素に対してウニコナゾール-

-Pに匹敵する高い阻害活性を示した。さらに、シロイヌナズナ芽生えやリンゴ芽生えに対して、ウニコナゾール-Pに匹敵する高い乾燥耐性付与効果を示した。ウニコナゾール-Pと配座固定アナログは100 μMの高濃度においてリンゴ芽生えに褐変を誘導する副作用が見られたが、ベンゼン環4位修飾アナログにはこのような副作用は全く見られなかった。以上より、今回開発したウニコナゾール-P誘導体、特にベンゼン環4位修飾体は、ジベレリンやブラシノステロイドの生合成に関わるP450を含めた他のP450をほとんど阻害しない、ABA 8'位水酸化酵素に特異的なP450阻害剤である可能性が高いと考えられる。

7) ファゼイン酸4'位還元酵素

シロイヌナズナを用いてファゼイン酸4'位還元酵素をコードしている遺伝子の系統的探索を行い、有望と思われる遺伝子を大腸菌で発現させ、酵素活性を測定したが、活性は認められなかった。シロイヌナズナゲノム中にはshort-chainアルコールデヒドロゲナーゼ(SDH)が約90遺伝子存在するので、SDHファミリーを候補としてファゼイン酸4'位還元酵素をスクリーニングすることとし、約60個のSDHの全長cDNAをデータベースあるいはRT-PCRにより取得し、組換え酵素発現系を構築した。これにより、ファゼイン酸4'位還元活性を示すクローンの同定が可能となった。

一方、実際に植物抽出液を用いて酵素活性を指標とした酵素タンパクの精製も試みた。数種類の植物をスクリーニングした結果、キヌサヤエンドウの未熟豆果の抽出液にファゼイン酸4'位還元酵素活性を検出した。反応生成物はジヒドロファゼイン酸であり、そのエピ体は検出されなかった。実際にキヌサヤエンドウ未熟豆果に含まれるABA代謝物質

を検出定量した結果、ジヒドロファゼイン酸だけが検出され、そのエピ体は検出されなかった。このことはファゼイン酸 4' 位還元酵素の反応性と一致していた。ファゼイン酸還元酵素の至適 pH は 8.0 であり、補酵素として NADPH を要求した。したがってファゼイン酸 4' 位還元酵素は NADPH 依存的ジヒドロゲナーゼであると予想される。キヌサヤエンドウ未熟豆果の粗抽出液を陰イオン交換樹脂ならびに NADP アフィニティ樹脂、限外ろ過膜を用いて分画し、同酵素を比活性で粗抽出液の 130 倍以上に精製することができた。この試料の SDS 電気泳動によると、分子量約 3 万付近に複数のバンドが検出された。今後、ゲル中のタンパク質を回収し、部分的にアミノ酸配列を決定すれば酵素遺伝子の同定に到達できるものと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Saito, S., Okamoto, M., Shinoda, S., Kushiro, T., Koshihara, T., Kamiya, Y., Hirai, N., Todoroki, Y., Sakata, K., Nambara E. and Mizutani, M. A potent growth retardant, Uniconazole is a potent inhibitor of ABA catabolism in *Arabidopsis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70, 1731-1739 (2006). 査読有り
 2. Araki, Y., Miyawaki, A., Miyashita, T., Mizutani, M., Hirai, N. and Todoroki, Y. A new non-azole inhibitor of ABA 8'-hydroxylase: effect of the hydroxyl group substituted for geminal methyl groups in the six-membered ring. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 16, 3302-3305 (2006). 査読有り
 3. Okamoto, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kushiro, T., Asami, T., Hirai, N., Kamiya, Y., Koshihara, T., and Nambara, E. CYP707A1 and CYP707A2, which encode ABA 8'-hydroxylase, are indispensable for a proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 141, 97-107 (2006). 査読有り
4. Shimomura, H., Etoh, H., Mizutani, M., Hirai, N., and Todoroki, Y. Effect of the minor ABA metabolite 7'-hydroxy-ABA on *Arabidopsis* ABA 8'-hydroxylase CYP707A3. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17, 4977-4981 (2007). 査読有り
 5. 水谷正治. アブシジン酸および植物ステロイドの代謝系に関わるシトクロム P450 の酵素化学的研究. *植物の生長調節*. 42, 260-268 (2007). 査読有り
 6. 水谷正治. シトクロム P450 の分子進化と植物の化学的多様性の獲得. *蛋白質・核酸・酵素*. 52, 1454-1464 (2007). 査読有り
 7. Todoroki, Y., Kobayashi, K., Yoneyama, H., Hiramatsu, S., Jin, M.-H., Watanabe, B., Mizutani, M. and Hirai, N. Structure-activity relationship of uniconazole, a potent inhibitor of ABA 8'-hydroxylase, with a focus on hydrophilic functional groups and conformation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 16, 3141-3152 (2008). 査読有り

[学会発表] (計 15 件)

1. 上野 琴巳, 水谷正治, 平井伸博, 轟 泰司. アブシジン酸 8'-水酸化酵素の不斉認識. 日本農芸化学会 2007 年度大会. 2007. 3. 26. 東京農業大学 (東京都)
2. Todoroki, Y., Yoneyama, H., Kobayashi, K., Jin, M-H, Hirai, N. and Mizutani, M. Structure-activity studies of uniconazole derivatives as strong inhibitors against ABA 8'-hydroxylase. 19th International Conference of Plant Growth Substances. 2008. 7. 23. Puerto Vallarta, Mexico.
3. Ueno, K., Mizutani, M., Hirai, N., Todoroki, Y. Asymmetric ligand binding of ABA 8'-hydroxylase. 19th International Conference of Plant Growth Substances. 2008. 7. 23. Puerto Vallarta, Mexico.
4. 上野琴巳, 水谷正治, 平井伸博, 轟 泰司. アブシジン酸 8'-水酸化酵素リガンドの基本構造. 植物化学調節学会第 4 2 回大会. 2007. 10. 29. 静岡県男女共同参画センターあざれあ (静岡市)
5. 小林享太郎, 米山英高, 平松佐織, 金美紅, 渡辺文太, 水谷正治, 平井伸博, 轟 泰司. Uniconazole の立体配座と ABA 8'-hydroxylase 阻害活性の関係. 植物化学調節学会第 4 2 回大会. 2007. 10. 29.

静岡県男女共同参画センターあざれあ(静岡市)

6. 上野琴巳, 水谷正治, 平井伸博, 轟 泰司. アブシジン酸 8'-水酸化酵素による不斉リガンドの結合. 日本ケミカルバイオロジー研究会. 2007. 5. 9. 京都大学 (京都市)
7. 平松佐織, 上野琴巳, 水谷正治, 平井伸博, 轟 泰司. 部位特異的変異を用いたアブシジン酸代謝酵素基質認識メカニズムの解明. 日本農芸化学会 2008 年度大会. 2008. 3. 28. 名城大学 (名古屋市)
8. 須川 瞬, 大川克哉, 小原 均, 上野琴巳, 水谷正治, 轟 泰司, 平井伸博, 近藤 悟. 果樹におけるアブシジン酸 8' 水酸化酵素阻害による乾燥耐性付与. 日本園芸学会 2008 年度大会. 2008. 3. 29. 東京農業大学 (東京都)
9. 藤井佑典, 近藤 悟, 水谷正治, 轟 泰司, 平井伸博. ABA 代謝物質ファゼイン酸の還元酵素の性質. 植物化学調節学会第 43 回大会. 2008. 10. 30. つくばカピオ (つくば市)
10. 白倉美奈穂, 小林亨太郎, 青山 光, 平松佐織, 水谷正治, 平井伸博, 轟 泰司. 植物化学調節学会第 43 回大会. 2008. 10. 30. つくばカピオ (つくば市)
11. 平松佐織, 白倉美奈穂, 水谷正治, 平井伸博, 轟 泰司. クリック反応を利用した高選択性アゾール系 P450 阻害剤の創製と探索. 植物化学調節学会第 43 回大会. 2008. 10. 30. つくばカピオ (つくば市)
12. 須川 瞬, 大川克哉, 小原 均, 上野琴巳, 水谷正治, 轟 泰司, 平井伸博, 近藤 悟. アブシジン酸 8' 水酸化酵素制御とリンゴの乾燥耐性. 日本園芸学会 2009 年度春季大会. 2009. 3. 20. 明治大学 (東京都)
13. 藤井佑典, 近藤悟, 水谷正治, 轟 泰司, 平井伸博. ABA 代謝物質ファゼイン酸の還元酵素の性質. 日本農芸化学会 2009 年度大会. 2009. 3. 28. マリンメッセ福岡 (福岡市)
14. 轟 泰司, 平松佐織, 白倉美奈穂, 水谷正治, 平井伸博. アブシジン酸代謝不活性化酵素 CYP707A の特異的阻害剤アブシナゾール E. 日本農芸化学会 2009 年度大会. 2009. 3. 28. マリンメッセ福岡 (福岡市)
15. 青山 光, 小林 亨太郎, 白倉 美奈穂, 平松 佐織, 水谷 正治, 平井 伸博, 轟 泰司. アブシジン酸代謝不活性化酵素 CYP707A の特異的阻害剤アブシナゾール F. 日本農芸化学会 2009 年度大会. 2009. 3. 28. マリンメッセ福岡 (福岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 伸博 (HIRAI NOBUHIRO)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 00165151

(2) 研究分担者

水谷 正治 (MIZUTANI MASAHARU)
京都大学・化学研究所・助教
研究者番号: 60303898
轟 泰司 (TODOROKI YASUSHI)
静岡大学・農学部・准教授
研究者番号: 30324338

(3) 連携研究者

なし