

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580118

研究課題名（和文）植物 P450 の個別選択的制御—植物の成長と甘味物質生産を調節する小分子の創出

研究課題名（英文）Selective control of plant P450 enzymes: Development of small molecules regulating plant growth and production of sweet substances

研究代表者

轟 泰司 (TODOROKI YASUSHI)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：30324338

研究成果の概要（和文）：植物の種子発芽や成長を促進するホルモン・ジベレリンの生合成を制御する P450 (CYP701A) を阻害する物質，ジベレリンに拮抗して種子発芽や成長を抑制し，環境ストレス耐性を付与するホルモン・アブシジン酸の代謝不活性化を制御する P450 (CYP707A) を阻害する物質，そしてステビアの甘味物質の生合成を制御する P450 (CYP714) を阻害する物質をそれぞれ創出し，植物の成長と甘味物質の生産を制御する技術の物質的基盤を確立した。

研究成果の概要（英文）：This study has developed the three-types of selective inhibitors of cytochrome P450 enzymes involved in biosynthesis of gibberellin that promotes seed germination and stem elongation, catabolic inactivation of abscisic acid that antagonizes gibberellin-promoted seed germination and plays an essential role in adaptive stress responses, and biosynthesis of stevioside, a sweet substance of Stevia. These inhibitors are expected to be a useful tool to control plant growth and production of sweet substances.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,450,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：植物成長調節物質

1. 研究開始当初の背景

植物 P450 は，植物に 200 分子種以上存在し，植物ホルモンや，香気，色素，アルカロイド等の 2 次代謝産物の合成に関わっている。P450 の活性を阻害剤によって選択的且つ可逆的に制御できれば，種々の植物に対して様々な期間・強度で，ホルモンや代謝産物の内生量を調節することが可能となり，生長分化やストレス応答，有用物質の生産等の制御

を行うことができる。しかしながら，既存の阻害剤は，合成は容易だが酵素選択性が低くなりやすいアゾール系化合物であるにも関わらず，作用機構に関する分子レベルの研究がほとんどない上，副作用の詳細な研究や，選択性向上を意図した研究も少ない。また，そもそもアゾール系植物 P450 阻害剤開発の研究例が極めて少なく，矮化や抗菌活性以外の機能をもつ阻害剤もほとんど報告されて

いないなど、研究ツールとしても、実用用途としても極めて貧弱な状況にある。

2. 研究の目的

合成展開が容易なアゾール系 P450 阻害剤に的を絞る、どの P450 に対しても適用可能な汎用的な方法で、その弱点である低選択性を低減することができないか検討を進めた結果、アゾール系阻害剤の選択性が低い要因は、アゾール基が主因となる阻害機構—アゾール環窒素が P450 に共通の補因子ヘム鉄に結合する、およびアゾール基以外の分子構造特性—小さくて柔軟な構造により、様々な基質ポケットに容易に侵入し、それぞれの形状に合わせて自身を柔軟に適合させることができる、の2点に集約されることを見出した。前者は低選択性の要因である一方、P450 との結合活性を保証して阻害剤開発を容易にするという点では長所でもあるため、アゾール基はそのままで構造全体を拡張して大きく、あるいは配座を固定して硬くすれば、活性を保持させたまま高い選択性を付与できると考え、この仮説に基づいた設計により、植物ホルモンの生合成と代謝、および甘味物質の生合成を制御する P450 に対する高選択性阻害剤を創出し、それらを活用して生合成調節機構の解明を試み、植物調節剤としての実用化可能性を検討する。これにより、植物の全 P450 を個別選択的に制御する阻害剤の創出手法を確立し、今後の P450 阻害剤開発研究への試金石とする。

3. 研究の方法

(1) 各種 P450 組換え酵素の作成

シロイヌナズナ由来の酵素を、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系または大腸菌発現系を用いて発現し、可溶性・精製後に、分光学的な性質を調べる。

(2) 阻害剤の活性評価系の確立

発現した組換え酵素を用いて、阻害剤の活性評価系を確立する。この系を用いて酵素阻害試験を行い、阻害定数を測定することで、阻害剤の活性評価を厳密に行う。

(3) 阻害剤リード化合物の探索—既知化合物ライブラリーからのスクリーニング

申請者らの所有するアゾール系 P450 阻害剤ライブラリーと市販のアゾール系 P450 阻害剤を評価系によってスクリーニングし、リード化合物候補を見出す。アゾール系化合物の性質上、この段階でリード候補を見出せない確率は低いと考えられるが、万が一見出せなかった場合には、アゾール基を有する単純な構造の低分子量化合物を購入または合成し、それらから、できるだけ活性の高い化合物を選抜する。

(4) 分子拡張と配座固定によるリード化合物の最適化—酵素選択性の付与

各リード化合物に分子拡張と配座固定を施して構造改変し、今回作成した各酵素に対する阻害活性、および他の植物 P450 酵素に対する活性を測定するとともに、各種植物ホルモンの活性評価系を中心に生物アッセイを行い、酵素選択性について総合的に評価する。

(5) 化学ツールおよび新規植物調節剤としての可能性の評価

開発した高選択性阻害剤をモデル植物（野生株および変異株）に投与して、化学ツールおよび新規植物調節剤としての可能性を探る。

4. 研究成果

(1) 各種 P450 組換え酵素の作成

シロイヌナズナ由来の酵素として、CYP701A と CYP714A を異種発現した。

(2) 阻害剤の活性評価系の確立

発現した組換え酵素を用いて、阻害剤の活性評価系を確立した。

(3) 阻害剤リード化合物の探索—既知化合物ライブラリーからのスクリーニング

申請者らの所有するアゾール系 P450 阻害剤ライブラリーと市販のアゾール系 P450 阻害剤を上記評価系によってスクリーニングし、リード化合物候補を見出した。

(4) 分子拡張と配座固定によるリード化合物の最適化—酵素選択性の付与

各リード化合物に分子拡張と配座固定を施して構造改変した。これにより、CYP701A 選択的阻害剤の創出に初めて成功した。また、CYP714A に対する阻害物質を初めて見出すことができた。今後、構造展開による選択性の向上を検討したい。

以上の成果は、申請者らの開発した、植物の全 P450 を個別選択的に制御する阻害剤の汎用創出手法の有効性を改めて示すものであり、同様の手法を適用することにより、今後の P450 阻害剤開発研究の推進に大きく貢献できると考えている。

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 9 件)

① Todoroki, Y.; Naiki, K.; Muramatsu, T.; Ohnishi, T.; Ueno, K., Mizutani, M.; Hirai, N.: A

conformationally restricted uniconazole analogue as a specific inhibitor of rice *ent*-kaurene oxidase, CYP701A6, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 3240-3243. DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.03.028

② Okazaki, M.; Kittikorn, M.; Ueno, K.; Mizutani, M.; Hirai, N.; Kondo, S.; Ohnishi, T.; Todoroki, Y.: Abscinazole-E2B, a practical and selective inhibitor of ABA 8'-hydroxylase CYP707A, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 3162-3172. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.03.068

③ Okazaki, M.; Nimitkeatkai, H.; Muramatsu, T.; Aoyama, H.; Ueno, K.; Mizutani, M.; Hirai, N.; Kondo, S.; Ohnishi, T.; Todoroki, Y.: Abscinazole-E1, a novel chemical tool for exploring the role of ABA 8'-hydroxylase CYP707A, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 406-413. DOI: 10.1016/j.bmc.2010.11.011

〔学会発表〕(計 33 件)

① 新聞優子, 酒井杏奈, 内記久美, 水谷正治, 平井伸博, 大西利幸, 轟 泰司: ジベレリン代謝に関わる CYP714 ファミリーの阻害剤, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 大会プログラム集 p. 101, 京都, 平成 24 年 3 月 24 日.

② 岡崎真理子, Hataitip Nimitkeatkai, 近藤 悟, 水谷正治, 平井伸博, 大西利幸, 轟 泰司: ABA 8'-水酸化酵素選択的阻害剤 abscinazole-E2B の光学活性体, 植物化学調節学会第 46 回大会, 研究発表記録集 p. 21, 宇都宮, 平成 23 年 11 月 1 日.

③ 内記久美, 大西利幸, 水谷正治, 上野琴巳, 平井伸博, 轟 泰司: ジベレリン生合成酵素 CYP701A 選択的阻害剤, 植物化学調節学会第 46 回大会, 研究発表記録集 p. 19, 宇都宮, 平成 23 年 11 月 1 日.

④ 岡崎真理子, 村松 卓, 青山 光, 上野琴巳, 水谷正治, 平井伸博, Hataitip Nimitkeatkai, 近藤 悟, 大西利幸, 轟 泰司: アブシジン酸代謝不活性化酵素 CYP707A の選択的阻害剤アブシナゾール E2B, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 京都, 平成 23 年 3 月 26 日.

⑤ 内記 久美, 村松 卓, 大西利幸, 水谷正治, 上野琴巳, 平井伸博, 轟 泰司: ジベレリン生合成に関わる P450 酵素の選択的阻害剤, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 京都, 平成 23 年 3 月 26 日.

⑥ 村松 卓, 大西利幸, 水谷正治, 上野琴巳, 平井伸博, 轟 泰司: ジベレリン生合成酵素選択的 P450 阻害剤のスクリーニング, 植物

化学調節学会第 45 回大会, 神戸, 平成 22 年 11 月 2 日.

⑦ 岡崎真理子, 村松 卓, 青山 光, 上野琴巳, 水谷正治, 平井伸博, Hataitip Nimitkeatkai, 近藤 悟, 大西利幸, 轟 泰司: ABA 8'-水酸化酵素に対する実用性の高い選択的阻害剤アブシナゾール E2B, 植物化学調節学会第 45 回大会, 神戸, 平成 22 年 11 月 2 日.

⑧ 岡崎真理子, 青山 光, 内記久美, 村松 卓, 上野琴巳, 水谷正治, 平井伸博, 大西利幸, 轟 泰司: CYP707A 特異的阻害剤アブシナゾールの創出, 日本ケミカルバイオロジー学会第 5 回年会, 抄録集 p. 114, 横浜, 平成 22 年 5 月 19 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

轟 泰司 (TODOROKI YASUSHI)
静岡大学・大学院・農学研究科・教授
研究者番号: 30324338

(2) 研究分担者

大西 利幸 (OHNISHI TOSHIYUKI)
静岡大学・若手グローバル研究リーダー育成拠点・特任助教
研究者番号: 60542168

(3) 連携研究者

なし