

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292035

研究課題名(和文) サリチル酸配糖化酵素を分子標的とした新規プラントアクチベーターの探索

研究課題名(英文) Screening of novel plant defense activators targeting salicylic acid glucosyltransferase

研究代表者

能年 義輝 (NOUTOSHI, Yoshiteru)

岡山大学・環境生命科学研究科・准教授

研究者番号：70332278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：抵抗性誘導剤(プラントアクチベーター)は植物の免疫力を活性化することで病害防除効果を発揮する薬剤である。植物免疫を司るホルモンであるサリチル酸(SA)に糖を付加して不活性化するサリチル酸配糖化酵素(SAGT)を阻害すると免疫応答を増強できる。そこで本研究ではシロイヌナズナのSAGTを用いたSAGT阻害剤の標的ベース探索を行った。東京大学創薬機構が保有する約21万個の化合物から、SAGT阻害剤12個の同定に成功した。それらはシロイヌナズナ培養細胞の免疫応答を活性化した。現在、植物体への抵抗性誘導能と阻害定数の同定を進めている。植物における機能が証明されたものを特許化し、実用化の可能性を検証する。

研究成果の概要(英文)：Plant defense activator confers disease resistance in plants by activating immune response. A phytohormone salicylic acid (SA) controls defense response and it is inactivated by glucosylation by an enzyme glucosyltransferase (SAGT). Since inhibition of SAGT enhanced plant immune response, we look for novel SAGT inhibitors as a lead compound for practical agrochemical. From the screening of over 200,000 diverse organic molecules supplied by Drug Discovery Initiative of University of Tokyo, we successfully identified 12 compounds which strongly inhibited Arabidopsis SAGT. They actually upregulated immune response of Arabidopsis suspension culture. Their activities on plants and inhibition constants are being analyzed. Their potentials as agrochemical will be evaluated in the crop field in collaboration with companies.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物 酵素 生理活性 環境調和型農林水産 プラントアクチベーター

1. 研究開始当初の背景

作物生産において病害の発生は避けて通れず、それらは時として生産者と消費者に大きな被害をもたらす。また作物病害は世界規模で見ると食糧安全保障を脅かすほどのインパクトを持つ。圃場において作物病害は主として殺菌性農薬によって制御されている。しかし薬剤耐性菌の出現や新規抗生物質の枯渇などから現場で利用可能な剤が減少している。また、環境微生物への負荷を低減した環境調和型農業の確立も望まれている。このような背景から新たな病害防除法の開発が期待されている。

抵抗性誘導剤は植物が本来もっている免疫力を活性化することで病害防除効果を発揮する薬剤である。イネいもち病の防除剤探索過程において偶然発見されたプロベナゾールに端を発する日本発祥の技術であり、水稻栽培において40年以上利用されてきた。病原体に対する殺菌性が無く、植物体側に作用することから薬剤耐性菌が発生しない持続性を持ち、環境負荷が低い。その後、類似の活性を持つチアジニルやイソチアニルも開発されてきたが、実はこれら薬剤の作用点の詳細は未だ解明されていない。その有用性から、イネ以外の作物への適用拡大も図られているものの、散布での使用が困難であり実用利用は進んでいない。

新剤の探索には既存の剤とは異なる骨格や作用を持つリード化合物が必要となる。医薬創薬では、様々な基本骨格を有する化合物を集めた化合物ライブラリーを用いた網羅的探索が行われてきた。申請者もこれまでの研究において、特に双子葉作物にも適用可能な抵抗性誘導剤の新剤獲得を目指し、シロイヌナズナの培養細胞を用いた独自のアッセイ系を確立して化合物ライブラリーの探索を進めてきた。その結果、植物免疫応答を活性化する薬剤を複数単離同定することに成功した。そして作用機序の解析から、それらの一部のうち、インプリマチンAおよびBと名付けた化合物群は、植物免疫をコントロールする植物ホルモンの一つであるサリチル酸(SA)に糖を配位することで不活性化する配糖化酵素(SAGT)を阻害し、その作用によってサリチル酸の蓄積を早めて抵抗性誘導効果を発揮することを突き止めた。

シロイヌナズナのSAGTであるUGT74F1とUGT76B1は、病害感染後に細胞内に蓄積する大量のSAを代謝する為の酵素であり、基質であるSAに対する K_m 値がそれぞれ280, 170 μ Mと高い。一方、恒常的に産生される微量なSAの代謝はアミノ酸付加やメチル化で行われるが、それら代謝酵素のSAに対する K_m 値は15 μ M程度と低く、使い分けが成立している(Dempsey et al., *ArabidopsisBook* (2011) 9:e0156)。これまでに我々が単離した

SAGT阻害剤であるインプリマチンA,B群はSAと競合する形でSAGTの活性を阻害したが、植物体に投与して免疫活性化効果を発揮させるには K_m 値に匹敵する薬量が必要であった。

2. 研究の目的

上記の研究により、SAGT阻害剤が抵抗性誘導剤になりうることを示された。そこで本研究ではSAGTを分子標的とした化合物ライブラリーの標的ベース探索を実施し、抵抗性誘導剤の新規リード化合物の獲得を目指こととした。これまでに得られた化合物とは異なる作用機序によって比較的low濃度でも活性を示す薬剤が単離され、実用化につながるリード化合物の同定を期待した。

3. 研究の方法

大腸菌発現系で調製したシロイヌナズナのSAGT(UGT76B1)に基質となるSAおよびUDP-glucoseを混合し、2時間後に生成するSA配糖体(SAG)の量をHPLCで定量検出するin vitro酵素反応定量検出法をベースとし、この反応系に市販の低分子有機化合物ライブラリー(14,400個)を順次添加して酵素反応阻害活性を測定する計画を当初立てた。

しかし採択後に、医薬創薬の化合物探索支援を行う機関である東京大学創薬機構と議論した結果、極めて効率的に配糖化酵素阻害活性を検出しうる方法論が開発された直後であることがわかった。そこで、その方法を採用させてもらうことにした(Kumagai et al, *Analytical Biochemistry* (2014) 447:146-155)。これは上記の酵素反応終了後にSAGと等モル生成するUDPを様々な酵素反応を利用して蛍光物質に等量変換することにより、HPLCではなくマイクロプレートリーダーによって活性を評価できるものである。各反応系を極めて少量にできることから、384穴プレートでの網羅的探索が短時間で実施可能となり、さらに化合物の使用量も抑えられて低コスト化できる。化合物については東京大学創薬機構が保有する多様性低分子化合物ライブラリー(21万個)を利用することとし、同機構に設置されたロボット化された分注作業に加え、様々な探索実験のためのファシリティーを利用することによって飛躍的に探索時間を短縮することができた。

4. 研究成果

まずはじめにシロイヌナズナのSAGTであるUGT76B1を用い、その配糖化反応を蛍光基質により間接的に定量検出するアッセイ系を確立した。具体的には、384プレートをを用いた酵素反応におけるコントロール値から算出されるS/B比、CV値、Z'値が基準をクリアするように、緩衝液組成、酵素量、反応

時間、温度等を最適化した。

次にこの方法を用い、東京大学創薬機構が保有する化合物群の中から選抜されたパイロットライブラリー（9,600 個）の探索を実施した。終濃度 10 μM になるように各化合物を反応系に投入して反応させたところ、63 個の 1 次ヒットが得られた。本アッセイ法を用いた場合、UDP を蛍光物質へと変換する工程を阻害する薬剤も得られることから、それらの偽陽性と再現性を目的として、HPLC を用いた SAG 生成量の直接定量を行った。その結果、E3, C9, D9 と名付けた 3 個の化合物が陽性を示すことがわかった。

これらの化合物はもう一つの SAGT である UGT74F1 の活性も阻害することを確認した。またシロイヌナズナ培養細胞が非親和性の斑葉細菌病菌に対して示す抵抗性反応である過敏細胞死に対する影響を調べたところ、E3 および C9 がその応答を増強することを明らかにした。しかし C9 は他の様々なスクリーニングにおいても活性を示す非特異性を示す物質であったため、最終候補は E3 のみに絞り込まれた。最後に、これらのシロイヌナズナ植物体における抵抗性誘導活性を検証した。葉身に対し、親和性または非親和性の斑葉細菌病菌を接種し、その時に薬剤を終濃度 10 μM になるように同時に添加した。その結果、E3 は非親和性菌に対する抵抗性を高め、また親和性菌に対しても抵抗性を誘導することが確認できた。

また異なる病害に対する影響を調べる目的で、単子葉植物のモデルであるミナトカモジグサと紋枯病を用いた感染系を確立した。E3 はこのモデル感染系においても抵抗性を誘導することが確認された。

感染規模の拡大や投与法の検討を行うため、E3 を別途合成したところ、その合成品には活性が無いことが明らかになった。標品と合成品の NMR スペクトルは一致したが、色の違いが認められたため、当初の標品に含まれる何らかの不純物が活性本体であることが示唆された。しかしその標品は既に追加入手が不可能な状況で活性本体を同定することができないことが判明した。極めて残念な結果となったが、化合物ライブラリーの一部として収集された化学物質はどこでどのように合成されたのかが不明なものが多いためこのようなケースも存在しうる。

またさらに我々は、創薬機構が保有する全化合物（210,560 個）のスクリーニングも実施した。シロイヌナズナ UGT76B1 の活性を 35 %以上阻害する 1 次ヒットとして 302 化合物を同定した。次に検出系を阻害する薬剤の排除を目的とした 2 次スクリーニングを行った結果、候補は 125 個に絞られた。さらにもう一つの SAGT である UGT74F1 への阻害活性を検証し、ヒットは両酵素を阻害する薬剤 28 個と UGT76B1 のみを阻害する薬剤 4 個に

分類された。次に、それらについて SA 以外を基質とするシロイヌナズナの配糖化酵素である UGT72B1 と UGT84B1 を用いた特異性検証を行い、その他の酵素を阻害しない薬剤として、候補はそれぞれ 11 個、2 個に絞り込まれた。さらにシロイヌナズナ培養細胞における免疫活性化能を検証し、植物細胞に対しても機能しうる候補として各 10 個、2 個を特定した。これらの候補について、5 濃度系列でこれらの阻害活性を調べ、両酵素に対する 50 %阻害濃度を決定した。その結果、これらの UGT76B1 に対する IC_{50} 値は 250 nM~14 μM の範囲になることを明らかにした。E3 の IC_{50} 値が 22 μM であることを考慮すると極めて強力な活性を有する新規候補薬剤が得られたことになる。最終的に合成品が再入手可能な最終候補として各 5 個、2 個を選抜した。現在これらの酵素反応速度論解析による K_i 値と阻害様式の決定、ならびにシロイヌナズナおよびミナトカモジグサにおける抵抗性誘導活性の検証を行っている。

今回、優れた探索手法を利用できたことから、当初の計画を超える化合物数を探索することができた。その結果、期待通りの強力な活性を有する有望な候補を特定することができた。多くの化合物を扱うことになったため時間を要し、期間内に終了しきれなかった部分があるが、これらの候補については特許出願を行い、企業との共同研究を通じて実用化を検討する予定である。

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 11 件)

(1) 能年義輝, プラントアクティベーターの探索研究の動向. 植物防疫 (2017) 71(2):69-73. 査読無

(2) 能年義輝, 植物科学におけるハイスループットケミカルスクリーニングとその利用, 植物の生長調節 (2016) 51(2):138-143. 査読無

(3) 一瀬勇規, 澤田貴博, 高田基弘, 山本悟, 藤山友里, 中津有紀子, 田阪洋昌, 下村洪祐, 田口富美子, 松井英譲, 山本幹博, 能年義輝, 豊田和弘, *Pseudomonas syringae* の菌体密度感知機構と多剤排出ポンプの病原力における役割. 植物細菌病談話会論文集 (2016) 27:77-88. 査読無

(4) Yusuke Kouzai, Mamiko Kimura, Yurie Yamanaka, Megumi Watanabe, Hidenori Matsui, Mikihiko Yamamoto, Yuki Ichinose, Kazuhiro Toyoda, Yoshihiro Onda, Keiichi Mochida and Yoshiteru Noutoshi, Expression profiling of marker genes responsive to the

defence-associated phytohormones salicylic acid, jasmonic acid and ethylene in *Brachypodium distachyon*. BMC Plant Biology (2016) 16:59. 査読有

(5) Kazuhiro Toyoda, Sachiyo Yao, Mai Takagi, Maki Uchioki, Momiji Miki, Kaori Tanaka, Tomoko Suzuki, Masashi Amano, Akinori Kiba, Toshiaki Kato, Hirotaka Takahashi, Yasuhiro Ishiga, Hidenori Matsui, Yoshiteru Noutoshi, Mikihiro Yamamoto, Yuki Ichinose and Tomonori Shiraiishi. The plant cell wall as a site for molecular contacts in fungal pathogenesis. Physiological and Molecular Plant Pathology (2016) 95:44–49. 査読有

(6) Yuki Ichinose, Takahiro Sawada, Hidenori Matsui, Mikihiro Yamamoto, Kazuhiro Toyoda and Yoshiteru Noutoshi. Motility-mediated regulation of virulence in *Pseudomonas syringae*. Physiological and Molecular Plant Pathology (2016) 95:50–54. 査読有

(7) 能年義輝, 植物免疫活性化剤とその農業利用. 日本応用酵素協会誌 (2015) 50:1–10. 査読無

(8) 能年義輝, 植物ケミカルバイオロジー研究と病害防除への多様な応用展開. 植物感染生理談話会論文集 (第 50 号) 感染と防御をめぐる新潮流 (2015) 73–82. 査読無

(9) Kayoko Fujioka, Haruko Gotoh, Taku Noumi, Yoshiteru Noutoshi, Yoshi-Shige, Inagaki, Mikihiro Yamamoto, Yuki Ichinose, Tomonori Shiraiishi and Kazuhiro Toyoda, Protection induced by volatile limonene against anthracnose disease in *Arabidopsis thaliana*. Journal of General Plant Pathology (2015) 81(6):415–419. 査読有

(10) Fumiko Taguchi, Yuko Inoue, Tomoko Suzuki, Yoshi-Shige Inagaki, Mikihiro Yamamoto, Kazuhiro Toyoda, Yoshiteru Noutoshi, Tomonori Shiraiishi and Yuki Ichinose, Characterization of quorum sensing-controlled transcriptional regulator MarR and Rieske (2Fe-2S) cluster-containing protein (Orf5) that are involved in resistance to environmental stresses in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605. Molecular Plant Pathology (2015) 16(4):376–387. 査読有

(11) 能年義輝, 植物免疫プライミング剤の単離と作用機序解明, 岡山大学農学部学術報告, (2014) 103:408–418. 査読無

〔学会発表〕(計 18 件)

(1) 香西雄介, 山中由利恵, 渡邊恵, 木村麻美

子, 松井英謙, 山本幹博, 一瀬勇規, 豊田和弘, 恩田義彦, 持田恵一, 能年義輝, ミナトカモジグサにおける植物ホルモン応答性マーカー遺伝子の同定と発現プロファイルの解析, 平成 28 年度日本植物病理学会関西支部会 (2016/09/29–30, 静岡県コンベンションアーツセンター グランシップ)

(2) Yoshiteru Noutoshi, Yusuke Kouzai Mamiko Kimura, Yurie Yamanaka, Megumi Watanabe, Hidenori Matsui, Mikihiro Yamamoto, Yuki Ichinose, Kazuhiro Toyoda, Yoshihiko Onda and Keiichi Mochida, Expression profiling of marker genes for salicylic acid, jasmonic acid and ethylene in *Brachypodium distachyon* highlights its similar defense mechanism to rice, 2016 IS-MPMI XVII Congress (2016/07/17–21, Oregon Convention Center, Portland, Oregon, USA)

(3) 楠和輝, 渡邊恵, 米須清明, 熊谷和夫, 香西雄介, 松井英謙, 山本幹博, 一瀬勇規, 豊田和弘, 能年義輝, 抵抗性誘導剤の同定を目的としたサリチル酸配糖化酵素阻害剤の標的ベース探索, 平成28年度日本植物病理学会大会 (2016/03/22, 岡山コンベンションセンター)

(4) Yusuke Kouzai, Yurie Yamanaka, Megumi Watanabe, Mamiko Kimura, Yoshihiko Onda, Keiichi Mochida, Yoshiteru Noutoshi, Analysis of pathogenicity and resistance of *Rhizoctonia solani* in *Brachypodium distachyon*, The 11th US-Japan Scientific Seminar (2015/10/25–29, Kagawa International Conference Hall)

(5) 能年義輝, 植物免疫ケミカルバイオロジー研究と病害防除への多様な応用展開, 平成 27 年度感染生理談話会 (2015/08/25, 道後温泉 メルパルク松山)

(6) 能年義輝, 植物免疫の化学的制御による病害防除法の開発, 日本農芸化学会関西支部例会第 490 回講演会・ミニシンポジウム (2015/07/04, 大阪府立大学学術交流会館)

(7) 能年義輝, バイオマス増産に向けた持続的な植物病害防除技術の開発, 第32回関西バイオマス研究会 (2015/06/19, 大阪科学技術センター)

(8) 能年義輝, 谷川友里佳, 渡邊恵, 熊谷和夫, 香西雄介, 山中由利恵, 木村麻美子, 稲垣善茂, 山本幹博, 一瀬勇規, 豊田和弘, サリチル酸配糖化酵素を標的とする植物病害抵抗性誘導剤のスクリーニング, 日本ケミカルバイオロジー学会第10回年会 (2015/06/11, 東北大学川内キャンパス東北大学百周年記念会

館川内萩ホール)

(9) Yoshiteru Noutoshi, Chemical biology of immune priming in *Arabidopsis thaliana*, 第56回日本植物生理学会年会シンポジウム (2015/03/17, 東京農業大学世田谷キャンパス)

(10) 香西雄介, 山中由理恵, 渡邊恵, 木村麻美子, 能年義輝, 作物病害防除法開発のモデル系としてのブラキポディウムの利用, 第3回ブラキポディウムワークショップ (2015/03/05, 理化学研究所横浜研究所)

(11) 能年義輝, ケミカルバイオロジーによる植物免疫研究, 日本農薬学会農薬バイオサイエンス研究会第12回シンポジウム (2014/12/05, 神戸大学大学院農学研究科)

(12) 能年義輝, ケミカルバイオロジーによる植物免疫研究と抵抗性誘導剤への応用, 第10回関西創農薬研究会 (2014/10/24, 石原産業株式会社中央研究所)

(13) 谷川友里佳, 渡邊恵, 熊谷和夫, 香西雄介, 山中由利恵, 木村麻美子, 稲垣善茂, 山本幹博, 一瀬勇規, 豊田和弘, 能年義輝, サリチル酸配糖化酵素を用いた抵抗性誘導剤の標的ベース探索, 平成26年度日本植物病理学会関西西部会 (2014/09/27, 富山大学五福キャンパス)

(14) 能年義輝, 渡邊恵, 香西雄介, 山中由利恵, 木村麻美子, 熊谷和夫, サリチル酸配糖化酵素を用いた抵抗性誘導剤の標的ベース探索, 平成26年度日本植物病理学会関西西部会 (2014/06/04, 札幌コンベンションセンター)

(15) Yoshiteru Noutoshi, Isolation and characterization of plant immune-priming chemicals, Okayama University CAMPUS Asia Pilot Program, Winter Seminar (2014/01/23–24, Okayama University 50th Anniversary Hall)

(16) 能年義輝, ブラキポディウムを使った病害抵抗性誘導剤探索の可能性, 第2回ブラキポディウムワークショップ (2013/11/29, 岡山大学資源植物科学研究所)

(17) 能年義輝, 池田美香, 白須賢, 利尿剤はシロイヌナズナにおいて植物免疫プライミング剤として作用する, 平成25年度日本植物病理学会関西西部会 (2013/09/26–27, 岡山大学50周年記念館)

(18) Yoshiteru Noutoshi, A Chemical Biology Approach to Understanding Plant Immunity, Symposium on Plant Genetic Resources in East Asia (JSPS Asian CORE Program)

(2013/09/24–25, Okayama University 50th Anniversary Hall)

〔その他〕
ホームページ等
<http://noutoshi-lab.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
能年 義輝 (NOUTOSHI, Yoshiteru)
岡山大学大学院環境生命科学研究科・
准教授
研究者番号：70332278