

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450069

研究課題名(和文) オーキシン主要生合成酵素YUCCAに特異的に作用する発展型阻害の追求

研究課題名(英文) Search for advanced inhibitors of YUCCA, a key enzyme in auxin biosynthesis

研究代表者

石井 貴広 (ISHII, Takahiro)

琉球大学・農学部・助教

研究者番号：70450393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： 独自に保有する化合物・抽出物ライブラリー約200種より、YUCCA酵素阻害試験(in vitro)およびシロイヌナズナ初期生育試験(in vivo)を用いてスクリーニングした結果、紅藻ソゾやアメフラシ類の抽出物ならびにTRPチャネル阻害剤の2-APBに強い阻害効果が認められた。上記の抽出物より、既知のYUCCA阻害物質とは異なる化学構造を有する天然物として、laurane型の含ハロゲンセスキテルペン3種を取得することに成功した。その内、laurinterolと2-APBは、in vivo試験において既知の阻害物質よりも強い阻害効果を示すことが確認できた。

研究成果の概要(英文)： From the results of screening of own chemical library (including about 200 samples) using both YUCCA enzyme inhibition test (in vitro) and plant growth test with Arabidopsis seeds (in vivo), it was found that several extracts from the red algal genus Laurencia and sea hares, together with 2-APB known as a TRP channel inhibitor, exhibited strong inhibitory effects. Bioassay-guided fractionation of these active extracts resulted in the isolation of three halogenated laurane-type sesquiterpenes with different chemical structures from known YUCCA inhibitors. Among these active compounds, laurinterol and 2-APB showed stronger inhibitory activity than known inhibitors in the plant growth inhibition assay.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：オーキシン 生合成阻害剤 YUCCA ローリンテロール 紅藻ソゾ ハロゲン化合物

### 1. 研究開始当初の背景

ジベレリンやエチレンなど他の植物ホルモンの生合成を制御する技術は、品質向上、結実促進、収穫期調整などの様々な栽培技術の進展に寄与してきた。一方、オーキシン (IAA) は古くから国内外問わずに精力的に研究されているが、IAA の作用および生合成を制御する有効な技術は開発されていない。その理由は、多数の経路が提唱されるほど IAA の生合成が複雑であり、生合成経路の全貌が未だに解明されていないことによるものである。他の植物ホルモンに比べて生合成阻害剤の発見も遅れていたが、本研究の従事者らは、マイクロアレイ解析などによるゲノム科学的手法に基づいた新たな阻害剤探索を試み、世界で初めて IAA の生合成を阻害する物質の発見に成功した (Soeno et al. Plant Cell Physiol. 2010)。

また、近年になって、IPyA から IAA の合成経路の反応を触媒する YUCCA 酵素が特定され、モデル植物のシロイヌナズナにおいて、L-Trp → IPyA (インドールピルビン酸)

IAA 経路が主要な生合成経路のひとつであることがようやく明らかとなった (Mashiguchi et al. PNAS 2011)。その後、kynurenine や yucasin およびアミノオキシ化合物やボロン酸類などの IAA 生合成阻害剤が発見されてきたが (He et al. Plant Cell 2011; Nishimura et al. Plant J. 2014)、イネなどの実用植物に低濃度で処理しても、十分な効果が得られていないのが現状である。オーキシン生合成阻害剤の開発を進めるためには、既知の阻害物質よりも低濃度かつ高選択的に有望な効果を示すシード化合物の取得が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究は、オーキシンの生合成を制御するという利点を活かした、過去に例のない除草剤や植物成長調節剤の開発につながる研究の一つである。オーキシンは、植物の成長制御において必須な植物ホルモンであり、その生合成を制御することができれば、除草剤等の開発だけでなく、農業分野全般の技術開発の推進にも大きな影響を及ぼすと考えられる。また、主要な市販除草剤は、L-Trp よりも上流側のアミノ酸生合成を阻害するため、植物種に対する選択性が十分とは言えない。本研究では、IAA 生合成経路の下流に位置する IPyA 経路を標的にしており、既存の薬剤よりも作用点がかかなり絞られている。そのため、本研究を通して得られる阻害剤は、IPyA 経路を主要とする植物種に対して、より低濃度で選択的に IAA の生合成を阻害するという大きな利点を有していると考えられる。

本研究の従事者らは、世界初のオーキシン生合成阻害剤の発見に成功して以来、より高い阻害効果をもつ物質を追求してきた。本研究では、将来的に応用開発研究に展開させるためにも、今までに集積した成果や知見を最

大限に活かして、より高い選択性と阻害効果を兼ね備えた発展型阻害剤の取得を目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、阻害剤の探索源として、独自に整備した化合物ライブラリーおよび抽出物ライブラリーを活用した。また、スクリーニングおよび活性評価には、YUCCA 酵素阻害試験 (*in vitro*) ならびにシロイヌナズナ種子を用いた初期生育試験 (*in vivo*) を導入した。活性物質の単離および構造解析には、天然物有機化学による手法を用いた。

#### (1) 活性評価試験

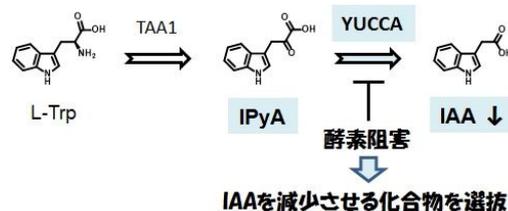
*in vitro* 試験: 発現・精製したリコンビナントの YUCCA 酵素を用いた。蛍光検出器を備えた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 装置を用いて、生成された微量な IAA を測定して阻害活性評価を行った。*in vivo* 試験: シロイヌナズナやコマツナの種子を用いて、発芽および初期生育に対する阻害効果を調べた。

#### (2) スクリーニング用ライブラリーの作製

化合物 (低分子有機化合物) ライブラリーの作製: 亜熱帯沖縄産の生物資源より単離した天然物、インドール・トリプトファン系合成化合物 (IAA や IPyA の類縁体) ならびに各種機能性を有する生化学的な試薬類から構成された 130 種類近くの化合物について、アッセイ用のサンプル (DMSO 溶液) を調製した。抽出物ライブラリーの作製: 沖縄産海洋生物から得られた抽出物 (約 70 種) について、アッセイ用のサンプル (DMSO 溶液) を調製した。

#### (3) 候補物質のスクリーニング

独自に作製したライブラリー (約 200 種) より、候補物質の探索を行った。まず始めに、*in vitro* 試験により一次スクリーニングを実施した。さらに、YUCCA 酵素に対して高い阻害活性を示したサンプルについて、植物を用いた *in vivo* 試験による二次スクリーニングを行った。



#### (4) 活性物質の単離・精製

両評価試験 (*in vitro* および *in vivo* 試験) において高い効果が認められた抽出物サンプルに関しては、より多くのサンプル量を確保するために MeOH による抽出作業を再度行った。回収した抽出物より各種クロマトグ

ラフィー法を用いて、活性物質を単離・精製した。

#### (5) 活性物質の構造解析・同定

取得した化合物については、各種機器分析装置（主に NMR および LCMS）を用いて、化学構造を明らかにし、活性物質の同定を行った。

### 4. 研究成果

平成 26 年度から平成 28 年度を通して以下の成果が得られた。

#### (1) 評価系の確立

より活性の高い YUCCA 酵素の発現・精製に成功するだけでなく、酵素反応条件を改良することによって、IAA の生成能を高めることに成功した。さらに、蛍光検出器を備えた HPLC 装置を導入することによって、微量な IAA を検出することも可能となり、新たな阻害剤スクリーニング評価系を構築することができた。

#### (2) 化合物ライブラリーからの探索

沖縄県内の生物資源より単離した天然物、インドール・トリプトファン系の合成物質ならびに各種機能性を有する試薬類から構成された約 130 種類の化合物から探索を行った。それらについて *in vitro* および *in vivo* 試験を用いてスクリーニングした結果、天然物の中では唯一、紅藻ソゾ属 (*Laurencia*) の海藻由来の cupalaurenol が強い活性を示し、数少ない YUCCA 酵素阻害剤の一つである yucasin と同等の阻害効果を有することが確認された。

また、残念ながら、インドール・トリプトファン系の合成物質には活性が認められなかったが、TRP (Transient receptor potential) チャネル阻害剤として知られている 2-APB (2-aminoethyl diphenylborinate) が、既知の阻害物質よりも強い効果を示すことが判明した。両化合物は既に知られている物質であるが、植物の生育に関する報告例はなく、新たな機能性を見出すことができた。

#### (3) 抽出物ライブラリーからの探索

海藻由来の二次代謝産物に阻害効果が認められたことから、活性物質の探索源として有望なターゲットの一つになると考え、海洋生物由来の抽出物に着目した。70 種類を超える沖縄産海洋生物由来の抽出物サンプルについて、化合物ライブラリーと同様に両試験を用いてスクリーニングを実施した。まず *in vitro* 試験による一次スクリーニングを行ったところ、紅藻のコブソゾならびに緑藻のアオサ、タマバロニア、クロミルなどを含む約 20 種類のサンプルに YUCCA 阻害作用がみられた。さらに、*in vivo* 試験を用いて絞り込みをした結果、紅藻ミナミソゾおよび軟体動物アメフラシ由来の抽出物に強い阻害効

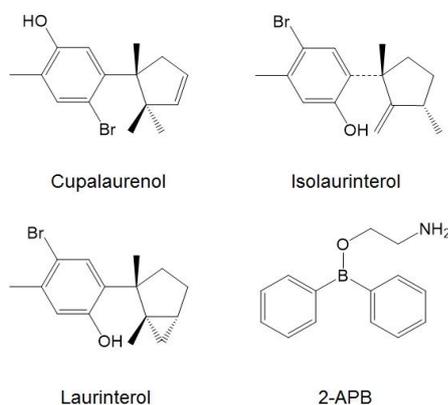
果を確認することができた。

また、最終年度において、沖縄土壌由来の各種糸状菌より作製した培養液サンプルの中には、上記の活性サンプルよりも更に強い阻害効果を示すものが見つかり、より有望な阻害剤候補の獲得が大いに期待できる知見を得た。

#### (4) 活性物質の取得

強い阻害効果を有した紅藻ミナミソゾおよび軟体動物アメフラシ類の抽出物に着目して、活性本体の探索を行った。活性を指標に各種クロマトグラフィー法を用いて分離し、目的化合物を単離・精製した。さらに、取得した活性物質については、NMR および LCMS を用いて構造解析を行った。その結果、紅藻ミナミソゾに含まれる活性物質として、含ハロゲンセスキテルペンの laurinterol および isolaurinterol を同定した。次に、アメフラシやジャノメアメフラシの抽出物からは、上記と同様に cupalaurenol、isolaurinterol および laurinterol が得られた。また、アマクサアメフラシの活性本体は脂肪酸系の物質であった。

本研究結果より、ハロゲンを含む laurane 型のセスキテルペン 3 種 (cupalaurenol、isolaurinterol および laurinterol) を取得することに成功した。中でも laurinterol が最も強い活性を示し、特に *in vivo* 試験においては既知の阻害物質よりも強い生育阻害効果を示すことが確認できた。Laurane 型の含ハロゲンセスキテルペン類に植物の生育阻害作用の報告はなく、新たな知見を得ることができた。また、天然物由来の YUCCA 阻害物質の報告は今までになく、2-APB も含め既知の阻害物質とは異なる化学構造を有する新たな阻害剤候補を取得することに成功した。



次の段階としては、取得した活性物質をシリイヌナズナに処理した後、高速液体クロマトグラフィー質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いて、微量な IAA 内生量を測定し、IAA 生合成に対する阻害効果をより正確に評価する必要がある。また、今後は、フィールド試験において有効性を発揮させるためにも、

活性物質の安定性および溶解性の改善・向上を目的とした構造の最適化を行い、更なる有望な発展型阻害剤の獲得を目指す。

#### 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 4 件)

Takato, S., Kakei, Y., Mitsui, M., Ishida, Y., Suzuki, M., Yamazaki, C., Hayashi, K., Ishii, T., Nakamura, A., Soeno, K., Shimada, Y. Auxin signaling through SCFTIR1/AFBs mediates feedback regulation of IAA biosynthesis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, **81**, 1320–1326, 2017.  
<http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2017.1313694>

Narukawa-Nara, M. Nakamura, A., Kikuzato, K., Kakei, Y., Sato, A., Mitani, Y., Yamasaki-Kokudo, Y., Ishii, T., Hayashi, K., Asami, T., Ogura, T., Yoshida, S., Fujioka, S., Kamakura, T., Kawatsu, T., Tachikawa, M., Soeno, K., Shimada, Y. Aminoxy-naphthylpropionic acid and its derivatives are inhibitors of auxin biosynthesis targeting L-tryptophan aminotransferase: structure–activity relationships. *The Plant Journal*, 査読有, **87**, 245–257, 2016. DOI: 10.1111/tpj.13197

Kakei Y., Yamazaki C., Suzuki, M., Nakamura, A., Sato, A., Ishida, Y., Kikuchi, R., Higashi, S., Kokudo, Y., Ishii, T., Soeno, K., Shimada, Y. Small-molecule auxin inhibitors that target YUCCA are powerful tools for studying auxin function. *The Plant Journal*, 査読有, **84**, 827–837, 2015. DOI: 10.1111/tpj.13032

Suzuki, M., Yamazaki, C., Mitsui, M., Kakei, Y., Mitani, Y., Nakamura, A., Ishii, T., Soeno, K., Shimada, Y. Transcriptional feedback regulation of YUCCA genes in response to auxin levels in Arabidopsis. *Plant Cell Reports*, 査読有, **34**, 1343–1352, 2015. DOI: 10.1007/s00299-015-1791-z

[学会発表](計 5 件)

渡部真由・中村郁子・佐藤明子・石井貴広・菊地理絵・箕雄介・添野和雄・嶋田幸久、「イネにおける YUCCA を標的としたオーキシン生合成阻害剤の作用解析」、日本植物学会第 80 回大会、沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) 2016 年 9 月 16 日

高藤晋・三井麻利江・石田遥介・鈴木優

志・箕雄介・山崎千秋・石井貴広・林謙一郎・藤岡昭三・中村郁子・持田恵一・添野和雄・嶋田幸久、「SCFTIR1 複合体を介したオーキシン生合成のフィードバック制御機構」、第 57 回日本植物生理学会年会、岩手大学上田キャンパス(岩手県盛岡市) 2016 年 3 月 18 日

高藤晋・三井麻利江・石田遥介・鈴木優志・箕雄介・山崎千秋・石井貴広・林謙一郎・藤岡昭三・中村郁子・持田恵一・添野和雄・嶋田幸久、「SCF TIR1/AFB を介したオーキシン生合成のフィードバック制御機構」、第 50 回植物化学調節学会、東京大学弥生講堂(東京都文京区) 2015 年 10 月 24 日

中村郁子・青山龍司・國土祐未子・石井貴広・佐藤明子・菊地理恵・箕雄介・添野和雄・嶋田幸久、「イネにおける新規オーキシン生合成阻害剤の作用機構」、第 56 回日本植物生理学会年会、東京農業大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区) 2015 年 3 月 18 日

添野和雄・國土祐未子・石井貴広・中村郁子・嶋田幸久、「イネにおけるオーキシン生合成経路の解析」、第 56 回日本植物生理学会年会、東京農業大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区) 2015 年 3 月 18 日

[図書]

なし

[産業財産権]

なし

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石井 貴広 (ISHII, Takahiro)  
琉球大学・農学部・助教  
研究者番号: 70450393

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

嶋田 幸久 (SHIMADA, Yukihiro)  
横浜市立大学・木原生物学研究所・教授  
研究者番号: 30300875

添野 和雄 (SOENO, Kazuo)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・近畿中国四国農業研究センター  
研究者番号: 50392006