

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01936

研究課題名(和文) エチレンの「三重反応」を誘導する新規物質EH-1の作用機構解明と実用化研究

研究課題名(英文) A survey of the action mechanism of new compound EH-1 that induces triple response in plants

研究代表者

王 敬銘 (Oh, Keimei)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：20300858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：エチレンは、植物の老化促進やストレス応答において中心的な役割を担う植物ホルモンである。本研究は、エチレン活性を示す合成生理活性物質EH-1の作用機構解明を目的に、エチレン情報伝達機構やエチレンと植物ホルモン間のクローストック分子機構の解明を目指した。エチレン情報伝達系およびオーキシン情報伝達系の遺伝子変異体や組み換え植物を利用して研究を進めた結果、EH-1は直接エチレンの情報伝達系に作用するのではなく、オーキシンの情報伝達系を介して活性を示すことが明らかにされた。本研究で得られた成果は、エチレン情報伝達系の解明に新たな知見として利用でき、植物の老化促進技術の開発に利用されることを期待したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エチレンの植物老化促進機能に基づく果実の追熟技術は広く利用されている。しかし、エチレンは極めて可燃性の高いガスであるゆえ、畑には直接使用することは困難である。本研究で開発したエチレン活性を示す化合物は、水に溶かして使用することができる。化合物の実用化研究により畑などで利用されることを期待したい。また、本研究で得られた成果は、エチレンとオーキシンのクローストック解析に利用できる。

研究成果の概要(英文)： Plant hormones are important signal mediators that involve in plant growth and stress responses. In the present study, we aimed at identification of the action mechanism of a new chemical EH-1 which displays ethylene like activity.

To determine the action mechanism of EH-1, we used mutants of ethylene signaling transduction pathways together with mutants of auxin transduction pathways and chemicals that involves in auxin biosynthesis and auxin transport. Data obtained indicated that the biological activity of EH-1 that induces triple response in Arabidopsis is not due to the direct effect on the ethylene signaling. We found that the triple response of in plants induced by EH-1 is due to the effect of EH-1 on auxin biosynthesis and auxin signaling.

研究分野：生物有機化学

キーワード：植物ホルモン エチレン 三重反応

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンであるエチレンは、植物の形態形成、果実の熟成、葉の老化、環境ストレス応答・防御など様々な生理プロセスにおいて中心的な役割を担う植物ホルモンである。

シロイヌナズナを用いた遺伝学的な解析によりエチレン情報伝達機構の研究が進められ、エチレン非感受性変異体として *etr1*、*etr2*、*ein2*、*ein4* などが同定された。遺伝子突然変異の間の優位性解析研究により、エチレン情報伝達経路における突然変異遺伝子の産物がどのような順序で働いているかが推測され、最近の研究進展によりエチレン情報伝達経路は非常に複雑で、例をみない錯綜した様相を呈してきた。

シロイヌナズナにおけるエチレンの受容は、ETR1、ETR2、ERS1、ERS2 および EIN4 を含む複数の受容体で構成される複雑な受容機構により制御される。従って、エチレン情報伝達経路を解明するには、新しいアプローチが必要であり、現状をブレイクスルーする技術の創出が望まれている。我々は、エチレン活性を示す化合物を探索する過程で、10000 化合物を対象とした化合物ライブラリーをスクリーニングの結果、活性化化合物 EH-1 を発見した。(特許第 6618384、エチレン活性物質を用いた植物成長調節剤)。植物の「三重反応」形態を誘導する EH-1 を発見したことを受けて、エチレン情報伝達経路を標的とする新規活性化化合物の開発、そして活性化化合物の利用に基づくエチレン情報伝達機構の解明、さらにはエチレン情報伝達経路の活性化による植物の老化促進を焦点に、活性化化合物の実用化研究を通じてエチレン活性の利用を特徴とする技術を創出する機運が高まった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、EH-1 をリード化合物とする化合物群の開発をはじめ、化学合成研究を通じて EH-1 の誘導体合成を行い、構造活性相関 (SAR) 解析研究により低濃度でシロイヌナズナの「三重反応」を誘導する化合物を創出する。蛍光標識 EH-1 を含む活性化化合物の利用により、EH-1 のエチレン情報伝達経路における作用機構を分子レベルで明らかにする。さらに、エチレン情報伝達系の活性化による植物の落葉作用を焦点に EH-1 の実用化を図ることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) EH-1 およびその誘導体の合成研究

本研究では、EH-1 の生物活性を向上させるため、EH-1 の化学構造を改変させ、様々な誘導体を合成し、合成した化合物の生物活性を調べることにより、構造活性相関解析研究を進める。

#### (2) 蛍光標識 EH-1 の合成

EH-1 の化学構造には、ナフタリン部分構造が有している。本研究では、蛍光発色団として頻繁に利用されるダンシル部分構造を EH-1 に導入し、EH-1 の蛍光プローブ EH-DF を合成する。

#### (3) EH-1 蛍光プローブの利用による植物組織における EH-1 作用部位の解析

EH-DF 明瞭な「三重反応」の形態を誘導することが明らかにされたことから、本研究では、経葉散布や根より吸収させるなど様々な薬剤処理方法を検討し、蛍光顕微鏡を用いて、植物組織における EH-DF 受容体の存在部位を植物組織レベルと細胞レベルで追究する。

#### (4) エチレン情報伝達機構遺伝子突然変異体を利用した EH-1 作用機構の解析

エチレン受容体 ETR1、ETR2、およびエチレンジグナル伝達機構遺伝子突然変異体、ERS1、ERS2 および EIN4 を用いて、EH-1 の生物活性を調べ、エチレンジグナル伝達機構における EH-1 の作用部位を解析する。

#### (5) オーキシシン生合成阻害剤や輸送阻害剤の利用に基づく EH-1 作用機構の解析

オーキシシン生合成阻害剤 (kyn, TAA1 阻害剤と PPBo, YUC 阻害剤) とオーキシシン輸送阻害剤 (NPA と 2-NOA) を使って EH-1 処理により誘導される植物三重反応形態を調べる。

#### 4．研究成果

本研究では、活性の強い化合物を見出すため、52種類のEH-1誘導体を合成し、合成化合物の構造と活性の相関を解析した結果、活性の強い化合物EH-28を発見した。さらにピラゾール環に様々な化学構造を導入した化合物合成し、生物活性を検討の結果、EH-51は、農薬として市販されているエテホンと同程度の植物三重反応誘導活性を示した。EH-51の生物活性は、実用化に必要とされる強い活性を満たしていることから。本研究では、綿の落葉誘導活性について検討を行ったが、明瞭な活性が認められなかった。今後切り花に対する老化誘導活性を焦点に、化合物の活性を検討する予定である。

植物組織におけるEH-1受容体の存在部位を調べるため、本研究では蛍光標識EH-1であるEH-DFを用いて研究を行った結果、EHDFの蛍光シグナルが細胞壁に集積することが明らかになった。特にオーキシンの輸送に機能する細胞に集積することが明らかとなった。この結果は、EH-1がオーキシンの輸送に関与している可能性が示唆された。

EH-1の作用機構を解析するため、本研究では、エチレン受容体を含む4種類のエチレン情報伝達機構遺伝子突然変異体を用いて研究した。エチレン比較区と異なり、EH-1は、これらエチレン非感受型遺伝子突然変異体に対して三重反応を誘導した。このことから、現在入手可能なエチレン遺伝子突然変異体に対して直接作用しないことが明らかになった。すなわち、EH-1は天然エチレンと異なる分子機構により植物の三重反応を誘導することが示された。

そこで、蛍光標識EH-DFを用いる研究に示された結果に基づいて、EH-1の三重反応誘導活性がオーキシンの関連を検討した。オーキシン生合成と輸送阻害剤を利用した解析研究において、オーキシンの特異的に応答する遺伝子組み換え植物DR5:5×Venusを用いた実験では、エチレン生合成前駆体であるACCとEH-1を比較したところ、EH-1の植物「三重反応誘導活性は、オーキシンの情報伝達系を介して発現することを示唆する結果が得られた。この結果は、エチレンとオーキシンの関連に関する新しい結果であり、エチレンとオーキシンのクロストーク解析に新たな展開をもたされることを期待したい。

本研究で得られた成果は、エチレン情報伝達系の解明に新たな知見として利用でき、EH-51を含む活性化合物は、植物の老化促進技術の開発に利用されることを期待したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Oh Keimei, Hoshi Tomoki	4. 巻 44
2. 論文標題 Synthesis and structure-activity relationships of new pyrazole derivatives that induce triple response in <i>Arabidopsis</i> seedlings	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pesticide Science	6. 最初と最後の頁 233 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1584/jpestics.D19-037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 王 敬銘, 山形 敦子	4. 巻 6
2. 論文標題 植物ホルモン関連物質の利用に基づくダリア切り花品質保持技術の開発 - 植物ホルモン生合成阻害剤の検討.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 秋田県立大学ウェブジャーナルB	6. 最初と最後の頁 101-106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 王敬銘	4. 巻 3
2. 論文標題 植物の「三重反応」形態を誘導する新規化合物の探索・作用機構解析研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 40-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Keimei Oh Kenji Ueda Kojiro Hara	4. 巻 8
2. 論文標題 Analysis the action mechanism of pyrazole derivatives EH-1 that induces triple response in <i>Arabidopsis</i> seedlings by using RNA-sequencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Pharm. Med. Biol. Sci.	6. 最初と最後の頁 45-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.18178/ijpmbs.8.2.45-48	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Keimei Oh, Tomoki Hoshi, Sumiya Tomio, Kenji Ueda and Kojiro Hara	4. 巻 22
2. 論文標題 A Chemical Genetics Strategy That Identifies Small Molecules Which Induce the Triple Response in Arabidopsis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2270 (1-14)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.3390/molecules22122270	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sumiya Tomio, Mai Ishigaki Oh K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Synthesis of imidazole and indole hybrid molecules and antifungal activity against rice blast.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int. J. Chem. Eng. & Appl.	6. 最初と最後の頁 233-236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.18178/ijcea.2017.8.3.662	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Keimei Oh, Kenji Ueda and Kojiro Hara
2. 発表標題 Survey the action mechanism of pyrazole derivatives that induce triple response in Arabidopsis seedlings by using RNA-seq.
3. 学会等名 The 2nd International Conference on Soil Remediation and Plant Protection (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keimei Oh, Tomoki Hoshi
2. 発表標題 Discovery, SAR and action mechanism of new compounds that induce triple response in Arabidopsis seedlings.
3. 学会等名 IUPAC international symposium on bioorganic chemistry. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keimei OH
2. 発表標題 Synthesis and structure-activity relationships of new pyrazole derivatives that induce triple response in Arabidopsis seedlings.
3. 学会等名 11th International Conference of Chemistry and Chemical Process. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 王敬銘、星智樹
2. 発表標題 植物の「三重反応」を誘導する化合物のライブラリースクリーニング
3. 学会等名 第14回ケミカルバイオロジー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 王敬銘、星智樹
2. 発表標題 植物の「三重反応」を誘導する新規ピラゾール系化合物の構造活性相関研究
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keimei Oh, Kenji Ueda and Kojiro Hara
2. 発表標題 Survey the action mechanism of pyrazole derivatives that induce triple response in Arabidopsis seedlings by using RNA-seq.
3. 学会等名 第8回生命医薬情報学連合大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 王 敬銘、富尾 冨、渡辺 明夫
2. 発表標題 蛍光標識阻害剤YCZ-DFと遺伝子突然変異体を利用したブラシノステロイド生合成阻害剤の作用機構解析
3. 学会等名 第54回植物化学調節学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富尾 冨、渡辺 明夫、王 敬銘
2. 発表標題 ブラシノステロイド生合成阻害剤ユカイゾールの作用機構解析
3. 学会等名 第45回日本農業学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 王敬銘
2. 発表標題 「植物ホルモンの機能を制御する物質の開発」
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度東北支部シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keimei Oh
2. 発表標題 A Chemical Genetics Strategy That Identifies Small Molecules Which Induce the Triple Response in Arabidopsis.
3. 学会等名 9th International Conference on Biomedical Engineering and Technology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomio Sumiya Keimei Oh
2. 発表標題 Synthesis and Antimicrobial Activity of Functional Material with Imidazole and Indole Hybrid Structure
3. 学会等名 International conference on functional Material 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keimei Oh, Hirodai Fujita, Sumiya Tomio
2. 発表標題 Synthesis and Biological Evaluation the Fluorescent Probe of EH-1, a Pyrazole Derivative Displays Ethylene Activity that Induces Triple Response in Arabidopsis Seedlings
3. 学会等名 International Conference on Biomedical Signal and Image Processing (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 王敬銘、藤田寛大、江崎奨吾、富尾冴
2. 発表標題 植物の「三重反応」を誘導する蛍光プローブの合成と利用に関する研究
3. 学会等名 日本農薬学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 富尾 冴, 星 智樹, 渡辺明夫, 王敬銘
2. 発表標題 CYP90s 遺伝子突然変異体を用いた YCZ 蛍光プローブの作用機構解析
3. 学会等名 日本農薬学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 王 敬銘, 富尾 冴, 星智樹, 原光二郎, 上田健治, 吉澤結子
2. 発表標題 エチレン活性を示す新規化合物の発見と作用機構解析研究.
3. 学会等名 日本農薬学会第42回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 富尾 冴, 王 敬銘
2. 発表標題 エチレン活性を示す化合物の開発と作用機構解析
3. 学会等名 第52回大会植物化学調節学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Oh K
2. 発表標題 Chemical Genetics Strategy Identifies Small Molecules Induce Triple Response in Arabidopsis.
3. 学会等名 8th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 王敬銘, 藤田寛大, 江崎奨吾, 富尾冴
2. 発表標題 植物の「三重反応」を誘導する蛍光プローブの合成と利用に関する研究
3. 学会等名 日本農薬学会第43回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keimei Oh
2. 発表標題 Discovery of small molecules display ethylene activity through compound library screening
3. 学会等名 XIX International Botanical Congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 王敬銘, 原光二郎, 上田健治, 鈴木龍一郎, 星智樹, 冨尾冴, 吉澤結子
2. 発表標題 エチレン活性を示す新規化合物
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Keimei Oh
2. 発表標題 Discovery of Small Molecules Targeting Ethylene Signaling
3. 学会等名 International Conference on Ecological Pesticides for Industry, Agriculture and Hygiene (EPIAH2016) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 王敬銘, 冨尾冴, 星智樹, 原光二郎, 上田健治, 吉澤結子
2. 発表標題 エチレン活性を示す新規化合物の発見と作用機構解析研究
3. 学会等名 日本農業学会第42回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 エチレン活性物質を用いた植物成長調節剤	発明者 王敬銘	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6618384	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	原 光二郎  (Hara Kojiro)  (10325938)	秋田県立大学・生物資源科学部・准教授   (21401)	
研究分担者	鈴木 龍一郎  (Suzuki Ryuichro)  (70632397)	秋田県立大学・生物資源科学部・助教   (21401)	
研究分担者	上田 健治  (Ueda Kenji)  (80279504)	秋田県立大学・生物資源科学部・准教授   (21401)	