

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 5月31日現在

機関番号：32658
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23880006
 研究課題名（和文） ストリゴラクトン生合成阻害剤を用いたストリゴラクトン生合成経路の解明
 研究課題名（英文） Analysis of strigolactone biosynthetic pathway by using strigolactone biosynthesis inhibitor
 研究代表者
 伊藤 晋作 (ITO SINSAKU)
 東京農業大学・応用生物科学部・助教
 研究者番号：70608950

研究成果の概要（和文）：ストリゴラクトンは根寄生植物の発芽刺激物質、共生菌であるアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導物質、枝分かれを抑制する植物ホルモンとして働くことが知られている。今回、ストリゴラクトンの生合成を制御するためにストリゴラクトン生合成阻害剤の創製とそれを用いたストリゴラクトン生合成経路の推定を行うこととした。その結果、様々な植物に効果的に作用するストリゴラクトン生合成阻害剤として TIS108 を、新規ストリゴラクトン生合成阻害剤としてテブコナゾール誘導体を得ることが出来た。TIS108 の標的分子の探索を行ったところ TIS108 は MAX1 を阻害していない可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Strigolactones are terpenoid lactones produced in many plant species and have various functions: germination stimulants of root parasitic weeds, root-derived signals that induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi, and a plant hormone that inhibits shoot branching and regulates root morphology. In this study, we developed two strigolactone biosynthesis inhibitors, TIS108 and tebuconazole derivative. By using the MAX1 overexpression lines, we suggested the possibility that TIS108 does not inhibit the MAX1 protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：ストリゴラクトン、生合成阻害剤

1. 研究開始当初の背景

ストリゴラクトン類は根から分泌され、根に寄生し、栄養を植物より収奪する根寄生植物の発芽刺激物質として、また植物と共生し、リン等の栄養分を与えるアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導物質として知られる根圏情報物質である。一方、2008年にストリゴラクトン類、又はその代謝物が植物の枝分かれを抑制する植物ホルモンであることを

示した。ストリゴラクトン類はABC環と呼ばれる3つの環構造とフラノン骨格を持つD環がエノールエーテル結合で結ばれる構造を持つ、非常にユニークな構造を持っている。ストリゴラクトン類の生合成については枝分かれ過剰変異体の原因遺伝子を同定することにより、2種類のカロテノイド酸化開裂酵素 (CCD) によるカロテノイドの開裂反応と、その後のチトクロム P450 酸化酵素を含む2種類の酸化酵素による酸化反応が関わ

っていることが明らかにされている。しかし、これらの酵素以外に未知酵素が存在するのか？ストリゴラクトンのユニークな構造がどのように生合成されるのか？枝分かれ抑制ホルモンの活性本体は何か？という疑問は未解明のままであった。

植物生理活性物質の生合成阻害剤はどのような植物種にも、どのような生育段階でも、どのような器官でも処理するだけでその内生量を減少させることができる。また、処理量を調節することで、内生量を調節することもできることから、生合成阻害剤はその生理活性物質の機能解明や生合成経路の解明に大いに役立つと考えられる。我々の研究グループでは最近ストリゴラクトンの生合成阻害剤をスクリーニングし、リード化合物として TIS13 を見いだすことが出来た (Ito et al., Plant Cell Physiol 2010)。しかし、その化合物はストリゴラクトン生合成阻害作用の他にいくつかの副作用があり、より特異的な生合成阻害剤の創製が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、ストリゴラクトン生合成経路の推定の為に、ストリゴラクトン生合成特異的阻害剤の創製と、阻害剤を用いたストリゴラクトン生合成経路の解明を目指すことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) ストリゴラクトン生合成阻害剤の合成

TIS13 誘導体の合成についてはピナコリンもしくはアセトフェノンを出発原料として臭素を用いて臭素化後、炭酸カリウム存在下でトリアゾールと反応させた。その後塩基として水酸化ナトリウムを用い対応するハロゲン化フェノキシアルキルと反応させ誘導体を調製した。いくつかの化合物についてはその後水酸化ホウ素ナトリウムでケトン還元し、対応するアルコールを得た。テブコナゾール誘導体に関しては置換アセトフェノンを出発物質とし、同様に臭素化後、トリアゾールと反応させた。その後、(4-chlorophenethyl)magnesium bromide を用いグリニャール反応を行うことでテブコナゾール誘導体を得た。

(2) SL 分析

SL 分析は根及び根滲出液に関して行った。水耕栽培した植物 (イネ、ミヤコグサ、ソルガム) の水耕液はまず酢酸エチルで溶媒分画を行い、酢酸エチル層を回収、濃縮後、Waters Sep-Pak vac silica (1mL) カートリッジで精製した。根はアセトン中で破碎し、上清を濾過後濃縮し、Waters HLB (3mL) カートリ

ッジ及び Waters Sep-Pak vac silica (1mL) カートリッジで精製した。各分析サンプルは質量分析装置 (LC/MS-MS) を用い、内部標準として d_1-2' -*epi*-5-deoxystrigol (d_1-epi -5DS) もしくは d_1 -orobanchol を用いて定量分析を行った。

(3) シロイヌナズナにおける TIS108 の効果解析

TIS108、及び GR24 はアセトンで希釈した。コントロールとしてはアセトンを用いた。

枝分かれ数の測定は播種後 2 週間のシロイヌナズナをアセトン、TIS108 もしくは GR24 入りの水耕液に移し、4 日毎に水耕液を交換し、三週間生育させ、枝分かれの数を測定した。

シロイヌナズナ根毛長の測定はアセトン、TIS108 もしくは GR24 入りの 1/2MS 寒天培地に WT 及び *max1* mutant を播種し、播種後 10 日目の根先端部 5 mm の根毛長を測定した。

遺伝子発現量の定量は、播種後 2 週間の植物体をアセトンもしくは TIS108 で 1 日間処理したシロイヌナズナの根をサンプルとして使用し、Plant RNA Isolation Reagent (Invitrogen) を用いて RNA を抽出後、1 μ M total RNA をテンプレートとして用い、PrimeScript RT reagent kit (TaKaRa) により cDNA 合成を行い、TaKaRa 社の SYBR Premix ExTaq を用いて PCR 反応を行った。内部標準として UBC 遺伝子を用いた。

4. 研究成果

(1) ストリゴラクトン生合成特異的阻害剤の創製

TIS13 をリード化合物として複数の誘導体を合成した。合成した誘導体に関してはイネ根滲出液中の $2'$ -*epi*-5-deoxystrigol (*epi*-5DS) 量の測定を行うことでストリゴラクトン生合成阻害活性を評価した。また、TIS13 の副作用として矮化作用が観察されていたので、イネの矮化作用も第二葉鞘長を測定することで評価した。その結果、TIS13 のテブチル基をフェノキシ基に置換し、水酸基をケトンに、炭素鎖を伸ばした化合物である TIS108 が TIS13 に比べ 10 倍以上高活性であり、10 μ M の TIS108 を処理しても矮化を観察されず、その他の副作用もほとんど観察されなかった。

(2) 新規ストリゴラクトン生合成阻害剤の探索

新たなストリゴラクトン生合成阻害剤を取得するために既知の P450 阻害剤を用いてイネの *epi*-5DS 分泌量を指標として TIS13 よりも強力な阻害剤の探索を行った。その結果、テブコナゾール及 bitertanol が TIS13 より

も強い *epi*-5DS 分泌抑制活性を有していることを明らかにした。テブコナゾールをリード化合物として構造展開を行った結果、テブコナゾールより活性の強い化合物として **4e** を取得することが出来た。

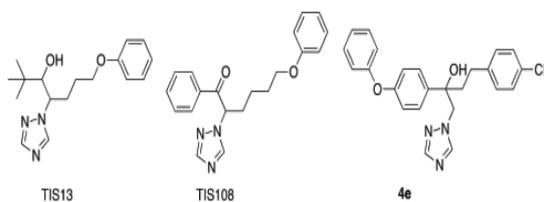


図 ストリゴラクトン生合成阻害剤

(3) TIS108 の効果検討

イネ以外の植物に対する TIS108 の効果の検討を行った。ミヤコグサ、ソルガムにおいて TIS108 のストリゴラクトン生合成阻害効果を検討した結果、ミヤコグサ、ソルガムにおいても TIS108 を処理することで 5DS の内生量が減少した。またイネにおいて orobanchol の定量も行ったところ orobanchol の内生量も減少していた。シロイヌナズナにおいては内生ストリゴラクトンを検出することは出来なかった。そこでシロイヌナズナにおける TIS108 の効果を枝分かれ数及び根毛伸長を指標として評価したところ、TIS108 を処理することで枝分かれ数の増加及び根毛伸長の抑制が観察された。また、TIS108 と合成ストリゴラクトンである GR24 を共処理した結果 TIS108 の効果がキャンセルされた。加えて、ストリゴラクトン生合成変異体である *max1-1* mutant においては TIS108 処理による根毛伸長の抑制が観察されなかったことから、TIS108 処理によって観察された枝分かれ数の増加と根毛伸長の抑制は、TIS108 がシロイヌナズナのストリゴラクトンの生合成を阻害した結果起こったと考えられた。

続いて TIS108 処理によるストリゴラクトン応答遺伝子の発現解析を行ったところ、ストリゴラクトンに応答して発現量の減少する *MAX3* 遺伝子及び *MAX4* 遺伝子の発現量が増加していた。一方、ストリゴラクトンに応答しない *MAX2* 遺伝子の発現量は変化しなかった。

以上の結果より、TIS108 はイネ以外にもシロイヌナズナやミヤコグサ、ソルガムにおいても効果的なストリゴラクトン生合成阻害剤であり、ストリゴラクトン生合成阻害剤として様々な植物に適応可能であることが示された。

(4) TIS108 の標的タンパク質の探索

TIS108 はトリアゾール基を有する化合物

であることから、P450 を阻害している可能性が高い。ストリゴラクトン生合成経路中にはこれまでに P450 が 1 つ同定されていること

(MAX1) から TIS108 が MAX1 を阻害しているかどうか検討を行った。*MAX1* 過剰発現シロイヌナズナを作製しこの植物体に TIS108 を処理した場合に、枝分かれ形態が観察されなくなるかどうかを評価した結果、*MAX1* 過剰発現体においても枝分かれ数の増加が観察され、野生型株、*MAX1* 過剰発現体において枝分かれ数に優位な差は観察されなかった。以上の結果より、TIS108 は MAX1 を阻害しておらず、ストリゴラクトン生合成経路中に未知の P450 タンパク質が存在する可能性が考えられた。

以上の結果から、本研究により特異的ストリゴラクトン生合成阻害剤を創製することができ、その標的タンパク質を検討することでストリゴラクトン生合成経路中に未知の生合成酵素が存在することを示唆することができた。

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 3 件)

1) Shinsaku Ito, Mikihiisa Umehara, Atsushi Hanada, Shinjiro Yamaguchi, Tadao Asami. Tebuconazole derivatives are potent inhibitors of strigolactone biosynthesis. *J. Pestic. Sci.*: accepted.

2) Shinsaku Ito, Mikihiisa Umehara, Atsushi Hanada, Shinjiro Yamaguchi, Tadao Asami. Effects of strigolactone-biosynthesis inhibitor TIS108 on Arabidopsis. *Plant Signal Behav.* **8**: e24193 (2013).

3) Shinsaku Ito, Mikihiisa Umehara, Atsushi Hanada, Nobutaka Kitahata, Hiroki Hayase, Shinjiro Yamaguchi, Tadao Asami. Effects of triazole derivatives on strigolactone levels and growth retardation in rice. *PLoS One* **6**: e21723 (2011).

[学会発表] (計 2 件)

1) 伊藤晋作, 戸塚直哉, 梅原三貴久, 花田篤志, 山口信次郎, 浅見忠男 ストリゴラクトン生合成阻害剤の植物に対する効果 日本農芸化学会 (2012)

2) Shinsaku Ito, Mikihiisa Umehara, Atsushi Hanada, Satoko Yoshida, Junko Kyojuka, Miyako Ueguchi-Tanaka, Makoto Matsuoka, Ken Shirasu, Shinjiro Yamaguchi, Tadao Asami. Gibberellin regulates strigolactone biosynthesis. 11th World Congress on Parasitic Plants (2011).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 晋作 (ITO SINSAKU)

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：70608950