

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292059

研究課題名(和文)天然物をモデルとしたストレス応答性「花芽誘導低分子」の構造展開と分子機構解明

研究課題名(英文)Development of new molecules based on the structure-activity relationship of naturally occurring flower-inducing compound

研究代表者

渡辺 修治 (Watanabe, Naoharu)

静岡大学・創造科学技術大学院・特任教授

研究者番号：90230979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：アオウキクサに対する花芽誘導分子として単離されたLDS1に関し、全合成を達成した。また、脂溶性尺度と構造活性相関、構造要求性を明らかにする目的で、LDS1の炭素鎖長、水酸基の数、位置異性体、カルボニル基の還元体、二重結合の有無、位置異性体の合成を達成した。全合成によって得られたLDS1を用いてアオウキクサにおけるLDS1の代謝により、二重結合還元体の生成が示唆されるなど、経路の一部を明らかにした。その研究の過程で、高密度条件下での培養により変異したアオウキクサが多量のLDS1を生産することを見出した。

研究成果の概要(英文)：We have isolated a flower-inducing compound, LDS1, from a free-floating aquatic plant, *Lemna paucicostata*. To afford the sufficient amounts of LDS1, we successfully synthesized LDS1. We also synthesized LDS1 analogs by modifying carbon-chain length, number of hydroxyl groups, kept-reduction, position of double bonds to investigate structure-activity relationships. By using the LDS1 chemically synthesized, we have analyzed metabolic pathways for LDS1 in *Lemna* plants. One of the metabolites was tentatively identified as a reduction product of LDS1 in its double bond. Substantial amounts of LDS1 was produced in *Lemna* plants grown in the high-density stress conditions.

研究分野：生物有機化学

キーワード：花芽誘導 オキシリピン レムナ 構造活性相関 構造要求性 代謝経路 アオウキクサ 全合成

1. 研究開始当初の背景

(1) 内生花芽誘導関連分子：花成は、植物が栄養成長から生殖成長へ転換する現象のことであり、植物にとって次世代に子孫を残すための重要なイベントである。花成を制御することは農業、園芸の分野において大変重要かつ有益な技術である。そのため花成を容易に制御する手法の開発が求められている。分子生物学的手法により解明された日長応答性花成制御物質フロリゲン FT^①、Hd3a^②は高分子タンパク質であり人為的に植物に投与しても花芽を誘導できない。そのため、花芽形成に参与する遺伝子に影響を与える低分子化合物の開発が期待されている。

(2) 花芽誘導低分子：花芽誘導のモデル植物アオウキクサ(レムナ) *Lemna paucicostata* P151 に対して花芽を誘導する低分子としてサリチル酸、安息香酸、ニコチン酸、ピペコリン酸が単離された^③がアオウキクサの生理的応答との関連が明らかになっていなかった。また、アオウキクサの摩砕抽出物中に存在するノルエピネフリン NE および α -リノレン酸由来のオキシリピン KODA が共存することで花芽が誘導されること、それぞれ単独では花芽誘導活性を示さなかった^④。その後、NE とオキシリピン類との弱塩基性下での反応生成物の化学構造、花芽誘導活性も明らかにされてきた。研究代表者らも上記の研究者らと共同で構造-活性相関研究を深化させた^⑤。一方、研究代表者らは、アオウキクサに乾燥処理を与えた際にその抽出物が同種のアオウキクサに花芽誘導活性を示すことを見出し、10 nM という低濃度で花芽誘導活性を示す LDS1 (図 1) を単離・構造決定した^⑥。LDS1 は乾燥処理時に特異的に KODA から誘導された植物オキシリピンである。

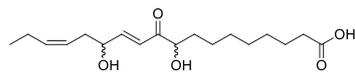


図 1 LDS1

2. 研究の目的

(1) LDS1 の全合成：天然物として単離された LDS1 は 1 mg 程度と極めて微量であったため、アオウキクサに対する LDS1 の花芽誘導活性確認、代謝物の同定を目的として科学的に合成し、以下 (2)、(3)、(4) の実験に供する。

(2) 構造活性相関：LDS1 をモデルとして炭素鎖長、水酸基、二重結合、カルボニル基の有無、位置等を変化させたアナログを合成し、構造と活性の相関を精査する。

(3) LDS1 の代謝経路の解明：予備的検討の結果、LDS1 は 2 個の水酸基の立体には無関係に活性を示すとの知見が得られたため、活性発現においては共通の代謝物が重要な役割を果たしているとの仮説に基づき、アオウ

キクサによる代謝物の同定と代謝経路を追究する。

(4) LDS1 の分子機構解明：LDS1 の全合成が達成された後、アオウキクサの花芽誘導遺伝子 *FT* アナログの発現調節を確認する。

3. 研究の方法

(1) LDS1 の全合成：LDS1 の逆合成解析 (図 2) を基に、glycidol, 1-butyne, dihydroxyacetone および 1,8-octanediol を出発物質として全 17step の合成スキームを作成した。

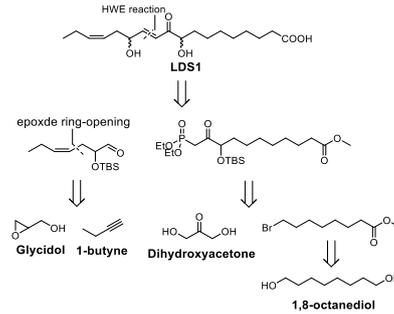


図 2 LDS1 の逆合成解析

(2) 構造活性相関：LDS1 の受容体および新規高花芽誘導活性物質をデザインしていくための知見を得ることを目的に LDS1 のアナログ (図 3) を合成した。

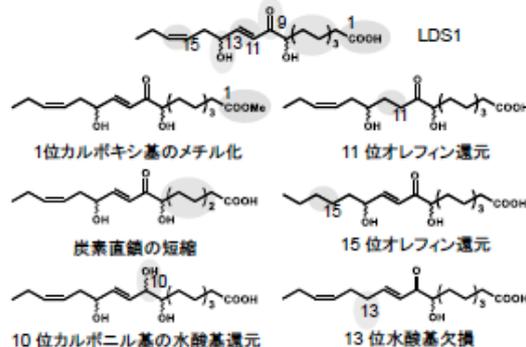


図 3 構造活性相関アナログ

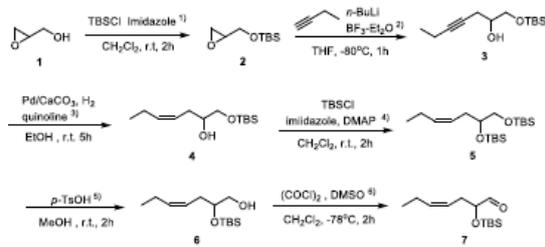
(3) LDS1 の代謝経路の解明：LDS1 の全合成を達成し、十分量が供給された時点で、アオウキクサ培養培地に LDS1 を添加投与後、LC-MS/MS によって LDS1 およびその代謝物を経時的に探索する。

(4) LDS1 の分子機構解明：LDS1 存在下、非存在下でのアオウキクサの花芽誘導遺伝子 *FT* アナログの発現を経時的に検証する。発現レベルの差が検証できた場合は、*FT* の機能が解明されているシロイヌナズナを用いて検証する。

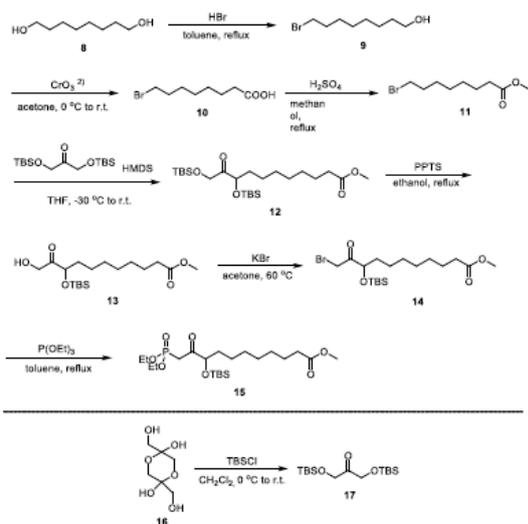
4. 研究成果

(1) LDS1 の全合成：

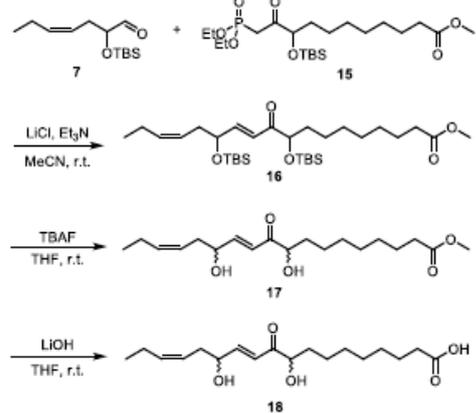
① Glycidol, 1-butyne, dihydroxyacetone および 1,8-octanediol からの合成: Schemes 1-3 を立案した。



Scheme 1. 中間体 7 の合成



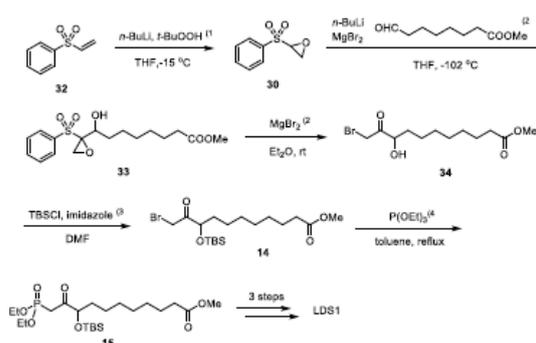
Scheme 2. 中間体 15 の合成



Scheme 3. 中間体 7 と 15 のカップリングによる LDS1 合成

中間体 15 の収率が低い点、中間体 7 と中間体 15 を反応させたが反応が進行しなかったことから Scheme の変更を検討した。

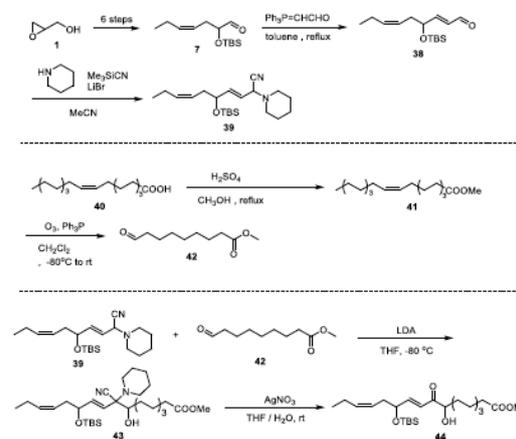
②スルホンを経由する中間体 15 の合成計画 出発物質としてビニルスルホン 32 を選択し、続いて化合物 14 の合成を試みた。



Scheme 4. ビニルスルホンからの合成

エポキシド中間体の開環を伴う求核付加が立体障害の小さい向きに起こったことから再度 Scheme の見直しを図った。

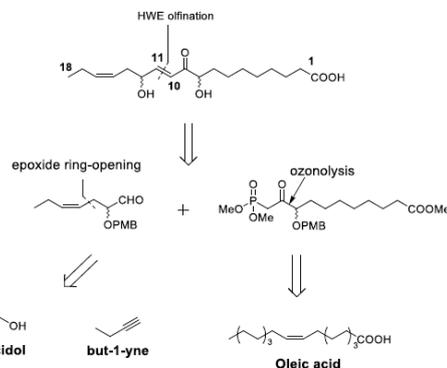
③アミノニトリルを中間体とする合成計画



Scheme 5. アミノニトリル中間体経路

ニトリル 39 のアルデヒド 42 への求核反応において LDA によりプロトン引き抜き反応が進行した結果、TBS の脱離反応おこり目的とする 43 を得ることができなかった。

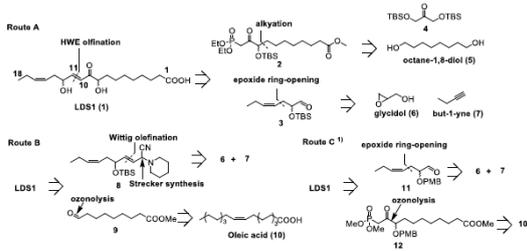
④HWE 反応を用いた合成 (東北大十和田らの合成法⁷参考)



Scheme 6. HWE 反応を用いた逆合成解析提案

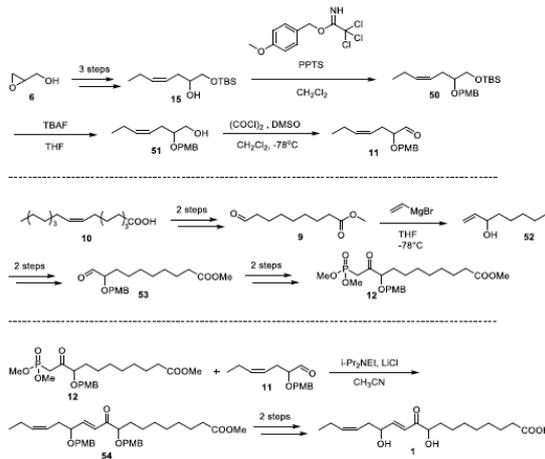
2016 年十和田らが別途 LDS1 の創製を達成した。これまでの検討結果と構造活性相関への発展が可能な合成スキームを考案した。これによれば 18 位側オレフィン部位、1 位側炭素

鎖を容易に構築できる。



Scheme 7. 検討した逆合成解析一覧

Route C による合成経路を検討した結果、目的とする LDS1 の合成を達成することができた。この反応における鍵は 2 級水酸基の保護基を TBS から PMB に変更した点にある。



Scheme 8. HWE 反応を LDS1 新合成経路

得られた LDS1 の ^1H -, ^{13}C -NMR, HRMS, LC-MS は天然物 (ジアステレオマー混合物) のそれとよく一致した。

(2) 構造活性相関: 極性、特に、脂溶性 ClogP と花芽誘導活性に着目して LDS1 類縁体を合成した。

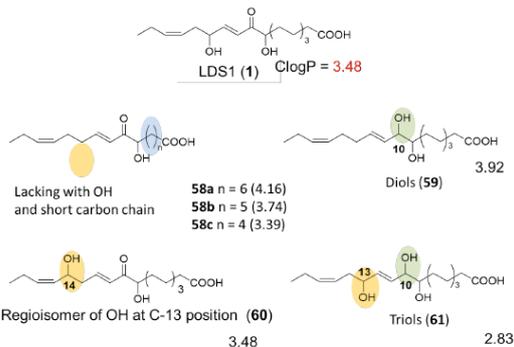


図 4 合成アナログと脂溶性尺度

各化合物の合成を達成し、脂溶性尺度 ClogP を算出した (図 4)。特に ClogP が LDS1 とほぼ同一値となる C-13 水酸基の C-14 位置異性体には LDS1 と同等あるいはそれ以上の活性

が期待された。

(3) でも言及するが、花芽誘導活性評価に用いてきた *L. pausicostata* P151 株は、正常な培養条件下では LDS1 を全く生産しない。ところが実験環境の変化 (代表研究者の静岡から浜松への異動に伴い、植物培養装置を変更した) ことが引き金となり、*L. pausicostata* P151 株が LDS1 を多量に生産するようになった。LDS1 高生産株に対して LDS1 およびそのアナログを投与しても、花芽誘導活性は全く期待されない。事実、合成した LDS1 に対して、LDS1 高生産株は花芽しなかった。現在、*L. pausicostata* P151 株の培養条件を詳細に検討し、培養を繰り返すと共に、LDS1 生産量を LC-HRMS/MS によって解析を継続し、正常株への変異条件を追究している。

(3) LDS1 の代謝経路の解明:

2- (3) で言及したとおり、LDS1 の水酸基の立体配置が花芽誘導活性に影響しないことから、代謝物が活性本体である可能性も視野に入れてアオウキクサにおける LDS1 の代謝を検討した。LDS1 の代謝経路を検討するにあたり、LDS1 の前駆体オキシリピンである KODA の代謝経路⁶⁾を参考にした。

この経路に従えば、カルボニル基の還元、1 位側炭素鎖の β 酸化が優先して起こり、その後、配糖体へと変換される。この経路は KODA の不活性化経路であるため、LDS1 においてはこれらとは異なる可能性、例えば二重結合の還元、異性化、環化など (図 5) が期待された。

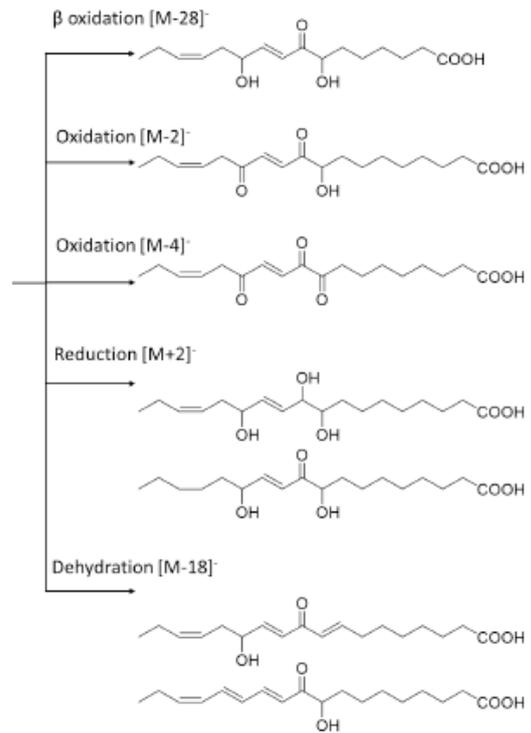


図 5 LDS1 の想定代謝物

LC-HRMS/MS での検討においてはそれぞれの代謝物の分子量に相当するイオンピークに

ついて、MSCRO による検出も試みた。その結果 (図 6)、還元体に相当する m/z 327.2166 のイオンピークが代謝実験開始 1 時間後には検出され、24 時間目に最大値に達した。その後 24 時間以内 (48 時間) に急減した。

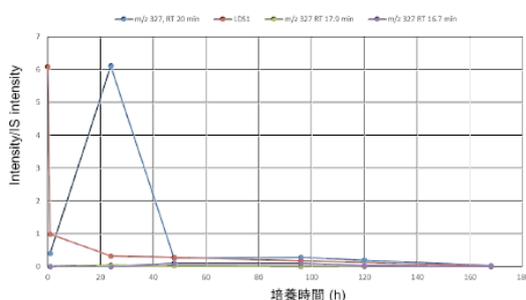


図 6 LDS1 および代謝物の消長

しかし、48 時間目に増加する新たなイオンピークは TIC によっても確認できなかった。代謝物の保持時間は LDS1 のそれとほとんど変化しないことから還元は 2 重結合部位で起こっているものと考えられた。さらなる代謝物として、FT との相互作用分子としてリン脂質とのアダクト等も想定したが想定イオンピークでのトレースでも検出はできなかった。一方 168 時間のイオントレースによれば LDS1 に相当するイオンピークが増加したため、LC-HRMS/MS により標品 LDS1 との比較をしたところ、本ピークが LDS1 に由来することを確認した。

また、LDS1 を投与していないアオウキクサ培養液にも相当量の LDS1 が検出された。すなわち、培養条件を変更することで花芽誘導分子を効率良く生産 (33 mg/5L) できる可能性を示したものである。

代謝物に LDS1 と同等以上の活性分子の存在を想定して、LC により LDS1 の前後を分離し、各画分の花芽誘導活性を検討しようとした。しかしながら、アオウキクサが LDS1 高生産株に変異したことから本実験は、正常なアオウキクサが得られるまで延期している。

今後、正常株での代謝経路を検討し、代謝物の構造を決定する。

<引用文献>

- ①Corbesier ら, *Science*, 336, 2007.
- ②Amaki ら, *Science*, 336, 2007.
- ③Fujioka ら, *Plant Cell Physiol.*, 24, 1983.
- ④Yokoyama ら, *Plant Cell Physiol.* 41, 2000.
- ⑤Kai ら, *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 2008.
- ⑥Murata ら, *Tetrahedron*, 70, 2014.
- ⑦Takayasu ら, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1, 2016.
- ⑧Murata ら, *Tetrahedron*, 68, 2012.

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 18 件) 全て査読有

①Fu, Watanabe (7 番/8 名), Analytical method for metabolites involved in biosynthesis of plant volatile compounds. *RSC Advances*. 2017, 31, 19363-19372, DOI10.1039/C7RA00766C.

②Dong, Watanabe (5 番/6 名), Optimization of the production of l-phenylethanol using enzymes from flowers of tea (*Camellia sinensis*) plants. *Molecules*, 2017, 22, 131, DOI10.3390/molecules220101.

③Dong, Watanabe (7 番/8 名), Elucidation of differential accumulation of l-phenylethanol in flowers and leaves of tea (*Camellia sinensis*) plants. *Molecules*, 2016, 21, 1106, DOI10.3390/molecules21091106.

④Zeng, Watanabe (10 番/11 名), Formation of characteristic aroma compound indole during the oolong tea manufacturing process, *J. Agric. Food Chem.*, 2016, 64, 5011-5019, DOI10.1021/acs.jafc.6b01742.

⑤Cheng, Watanabe (6 番/7 名), Regulation of biosynthesis and emission of volatile phenylpropanoids/benzenoids in *Petunia x hybrida* flowers by multi-factors of circadian clock, light, and temperature. *Plant Physiol. Biochem.*, 2016, 107, 1-8, DOI10.1016/j.plaphy.2016.05.026.

⑥Soti, Narumi (4 番/8 名), Watanabe (6 番/8 名), Mase (6 番/8 名), Synthesis of a self-assembling gold nanoparticle-supported organocatalyst for enamine-based asymmetric aldol reactions. *Tetrahedron*, 2016, 72, 1984-1990. DOI10.1016/j.tet.2016.02.065.

⑦Dong, Watanabe (4 番/5 名), Recent advances in the emission and functions of plant vegetative volatiles. *Molecules*, 2016, 21, DOI10.3390/molecules21020124.

⑧Hirata, Ohnishi (2 番/11 名), Watanabe (11 番/11 名), Seasonal induction of alternative principal pathway for rose flower scent. *Sci. Rep.*, 2016, 6, DOI10.1038/srep20234.

⑨Cui, Ohnishi (4 番/14 名), Mase (6 番/14 名), Narumi (8 番/14 名), Watanabe (13 番/14 名), Characteristic fluctuations in glycosidically bound volatiles during tea processing and identification of their unstable derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 2016, 64, 1151-1157, DOI10.1021/cs.jafc.5b05072.

⑩Gui, Watanabe (10 番/11 名), Does enzymatic hydrolysis of glycosidically bound volatile compounds really contribute to the formation of volatile compounds during the oolong tea manufacturing process? *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 6905-6914, DOI10.1021/acs.jafc.5b02741.

⑪Diomande, Watanabe (7 番/11 名), Position-specific isotope analysis of xanthines: a ^{13}C nuclear magnetic resonance method to determine the ^{13}C intramolecular compositions at natural abundance. *Anal. Chem.* 2015, 87, 6600-6606, DOI10.1021/acs.analchem.5b00559.

⑫Ohgami, Watanabe (12 番/13 名), Ohnishi (13 番/13 名), Volatile glycosylation in tea plants: Sequential glycosylations for the biosynthesis of aroma β -primeverosides are catalyzed by two *Camellia sinensis*

glycosyltransferases. *Plant Physiol.*, 2015, 464-477, DOI10.1104/pp.15.00403.

⑬ Zhou, Watanabe(11 番/12 名), Molecular cloning and characterization of a short chain dehydrogenase showing activity with volatile compounds isolated from *Camellia sinensis*. *Plant Mole. Biol. Report.* 2015, 33, 253-263, DOI10.1007/s11105-014.0571-z.

⑭ Chen, Watanabe(7 番/7 名), Developmental patterns of emission of scent compounds and related gene expression in roses of cultivar *Rosa x hybrida* cv. 'Yves Piaget'. *Plant Physiol. Biochem.*, 2015, 87, 109-114. DOI10.1016/j.plaphy.2014.12.016.

⑮ Murata, Ohnishi(7 番/12 名), Mase(9 番/12 名) Watanabe(12 番/12 名), Characterization of flower-inducing compound in *Lemna paucicostata* exposed to drought stress. *Tetrahedron*, 2014, 70, 4969-4976, DOI10.1016/j.tet.2014.03.099.

⑯ Zhou, Watanabe(11 番/12 名), Occurrence of glycosidically-conjugated 1-phenylethanol and their hydrolase β -primeverosidase in tea (*Camellia sinensis*) flowers. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 8042-8050, DOI10.1021/jf5022658.

⑰ Tu, Watanabe(4 番/9 名), Narumi(5 番/9 名), Mase(9 番/9 名), Synthesis and characterization of quantum dot nanoparticles bound to plant volatile precursor of hydroxyl-apo-10'-carotenal. *J. Org. Chem.*, 2014, 79, 6808-6815, DOI10.1021/jo500605c.

⑱ Baldermann, Mase(5 番/7 名), Watanabe(7 番/7 名), Discrimination of green, oolong, and black teas by GC-MS analysis of characteristic volatile flavor compounds. *Amer. J. Anal. Chem.*, 2014, 5, 620-632, DOI10.4236/ajac.2014.

[学会発表] (計 10 件)

① 山田(5 番/7 名), 鳴海(6 番/10 名), 大西(8 番/10 名), 間瀬(9 番/10 名), 渡辺(10 番/10 名), アオウキクサ起源花芽誘導分子 LDS1 の合成と代謝物の探索, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017.3.19, 京都女子大学・京都市・京都府.

② Yamada, Narumi(3 番/7 名), Ohnishi(5 番/7 名), Mase(6 番/7 名), Watanabe(5 番/7 名), Synthesis of LDS1 and its structurally related compounds with flower inducing activity toward *Lemna* plant. 6th Shizuoka University International Symposium 2016. 国際学会, 2016.12.1. 静岡大学・浜松市・静岡県.

③ 山田, 鳴海(5 番/9 名), 大西(7 番/9 名), 間瀬(8 番/9 名), 渡辺(9 番/9 名), 花芽誘導物質 LDS1 構造要求性の解明, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016.3.30., 札幌コンベンションセンター・札幌市・北海道

④ 岡村, 鳴海(4 番/6 名), 渡辺(5 番/6 名), 間瀬(6 番/6 名), 化学選択的誘導体化によるイオン強度増大を指向したイメージング質量分析におけるラベル化剤の開発, 日本化学会第 96 春季年会, 2016.3.25., 同志社大学・京都市・京都府.

⑤ 土屋, 間瀬(4 番/8 名), 鳴海(5 番/8 名), 渡辺(8 番/8 名), アオウキクサ花芽誘導物質 LDS1 およびその誘導体の合成, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015.3.28. 岡山大学津島キャンパス・岡山市・岡山県.

⑥ 大西(1 番/4 名), 渡辺(3 番/4 名), チャ香氣に関

与するテルペン生合成酵素の機能解明, 植物化学調節学会第 50 回大会, 2015.10.1. 東京大学農学部・文京区・東京都.

⑦ 山田, 鳴海(5 番/9 名), 大西(7 番/9 名), 間瀬(8 番/9 名), 渡辺(9 番/9 名), 花芽誘導物質 LDS1 および構造改変体の合成, 2015 年度日本農芸化学会中部・関西支部合同大会, 2015.9.30. 富山県立大学・射水市・富山県.

⑧ Watanabe(1 番/6 名), Ohnishi(4 番/6 名), Mase(5 番/6 名), Metabolic analyses of volatile compounds and their precursors during the withering process of tea leaves. International Tea Symposium 2014-Innovation and Development (招待講演), 2014.11.12. Hanzhou Hotel, Hanzhou, China.

⑨ 渡辺, 花も進化する一花は分子によって環境に適応している一, 第 3 回浜松発!未来の社会, 静岡大学-中日新聞連携講座 2014 (招待講演), 2014.12.13., 静岡大学浜松キャンパス・浜松市・静岡県.

⑩ 渡辺, 乾燥ストレスによって生成するアオウキクサ花芽誘導性オキシリピン, 第 27 回植物脂質シンポジウム, 日本植物脂質科学研究会 (招待講演), 2014.11.28. 静岡市産学交流センター・静岡市・静岡県.

[図書] (計 1 件)

① 渡辺(2 番/16 名), 間瀬(3 番/16 名)分担執筆, 第 2 章分子でみる、花が咲き、香る仕組み, ナノバイオ・テクノロジー, 2016, p.29-56, 全 268 ページ, 編者: 静岡大学ナノバイオ科学研究分野, 発行所: 株 ITSC 静岡学術出版事業部.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 修治 (WATABABE, Naoharu)

静岡大学・創造科学技術大学院・特任教授
研究者番号: 90230979

(3) 連携研究者

間瀬 暢之 (MASE, Nobuyuki)

静岡大学・工学部・教授
研究者番号: 40313936

大西 利幸 (OHNISHI, Toshiyuki)

静岡大学・農学部・准教授
研究者番号: 60542165

鳴海 哲夫 (NARUMI, Tetsuo)

静岡大学・工学部・准教授
研究者番号: 50547867