

新しいブラシノステロイド生合成阻害剤 (ブラシナゾール)

理化学研究所・植物機能研究室 浅見忠男, 関亦克彦, 吉田茂男

ブラシノステロイド研究は化学から生物にまたがる広領域の研究分野を含むが、それを分野別、年代別、地域別（日本とその他）に簡単にまとめたのが図-1である。ブラシノステロイドの活性発見から類縁体の発見と全合成、生合成経路の解明という化学的な領域の発展は、大部分が日本人研究者の貢献によるものであることが御理解いただけると思う[Yokota, 1997]。

一方、分子遺伝学の分野では、ブラシノステロイドの化学的研究の協力なしには進展が見込めないものの、米国やヨーロッパと比較して日本での研究は大きく立ち遅れているのが現状である。事実、ブラシノステロイドが植物ホルモであると広く認められるようになったブラシノステロイド生合成欠損株の発見やブラシノステロイド受容体変異体の解析研究も米国ソーグ研

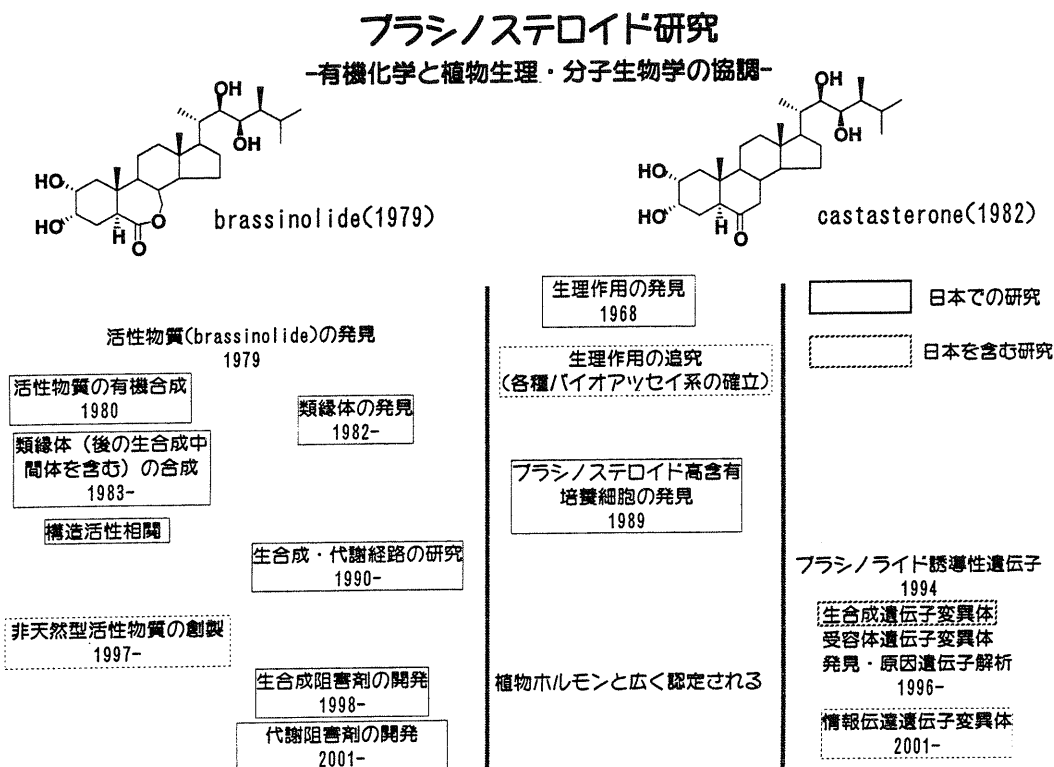


図-1 ブラシノステロイド研究の概要
左側は化学的研究、真ん中は生理的研究、右側は分子生物・分子遺伝学的研究の流れを示す。

研究所のグループによりなされている。通常一つの有力な変異体の発見は、それを背景とする新しい変異体の発見につながることから、最初に発見した研究グループがその分野の研究競争においては有利になる。我々は独自に開発したブラシノステロイド生合成阻害剤を用いることにより、この分野へ競争力を持った状態での参入を試みている。以上、我々の変異体探索という新たな試み以外に、植物生理現象や実用面への応用も含めた形でブラシノステロイド生合成阻害剤を用いた研究の可能性について概説してみたい。

ブラシノライドは1979年に構造が確定されて以来、植物で初めてのステロイドホルモンである可能性が提示されてきた。ブラシノライドが植物ホルモンであると広く認知されるきっかけはシロイヌナズナにおけるブラシノステロイド生合成系遺伝子欠損株 $det2$ の発見であった[Li et al., 1996]。 $det2$ は他の植物ホルモンに対しては反応しないがブラシノステロイドによって成長が回復することから、ブラシノステロイド生合成突然変異体であり、その突然変異部位も明らかにされた[Fujioka et al., 1997]。これらの発見を契機としてその後これら以外にも数多くのブラシノステロイド生合成変異体が報告されその変異部位が確定されている(図-2)。これまでに得られている知見を総合すると、ブラシノステロイド生合成突然変異体は次の様な形態的特徴を示す。シロイヌナズナの場合には、明所では矮性を示し、葉は暗緑色で、縦方向の細胞長の短縮が著しく、頂芽優勢の減少、雄性不稔等も認められる。また、葉は小さくカールしている。また、暗所でも、明所で育てた場合とよく似た特徴を示し、一般に、短い胚軸長、子葉の展開、第1葉の発生だけでなく、アント

シアニンの蓄積や光で誘導される遺伝子の発現等、いわゆる脱黄化現象が認められる[Clouse and Sasse, 1997]。実際に $det2$ はもともと光形態形成に関与する突然変異体として見出されていたことを付記しておく。ブラシノステロイド生合成変異体の発見以来、ブラシノステロイド類の生理的意義についてはアラビドプシスの変異体を中心として用いることにより行われてきたが、変異体を有する植物種以外に応用することは容易ではない。簡便にブラシノステロイド欠損状態の植物を得ることは、ブラシノステロイドの生理的意義を明らかにすることを容易にする。そのための手段としブラシノステロイド生合成阻害剤を想定し、特異的生合成阻害剤開発研究を行った。

ブラシノステロイド生合成阻害剤の設計

阻害剤の研究を始める以前にジベレリン生合成阻害剤であるウニコナゾールが副作用としてブラシノステロイドの生合成阻害活性を有している可能性が示唆されていた[Iwasaki and Shibaoka, 1991; Yokota et al., 1991]。ウニコナゾールはトリアゾール環を有するチトクロームP450阻害剤であり、ブラシノステロイド生合成経路にはチトクロームP450が関与するいくつかの反応が予想されていた。そこで我々は多様なトリアゾール誘導体を合成し、それらのブラシノステロイド生合成阻害活性を調べることにした。スクリーニングはトリアゾール誘導体の中から、アラビドプシスへの処理によりブラシノステロイド生合成変異体と同様の形態を誘導する物質を見出すことにより行った。また候補化合物を処理した植物については、変化した形態からのブラシノライド投与による回復を調べることで阻害剤としての特異性を調

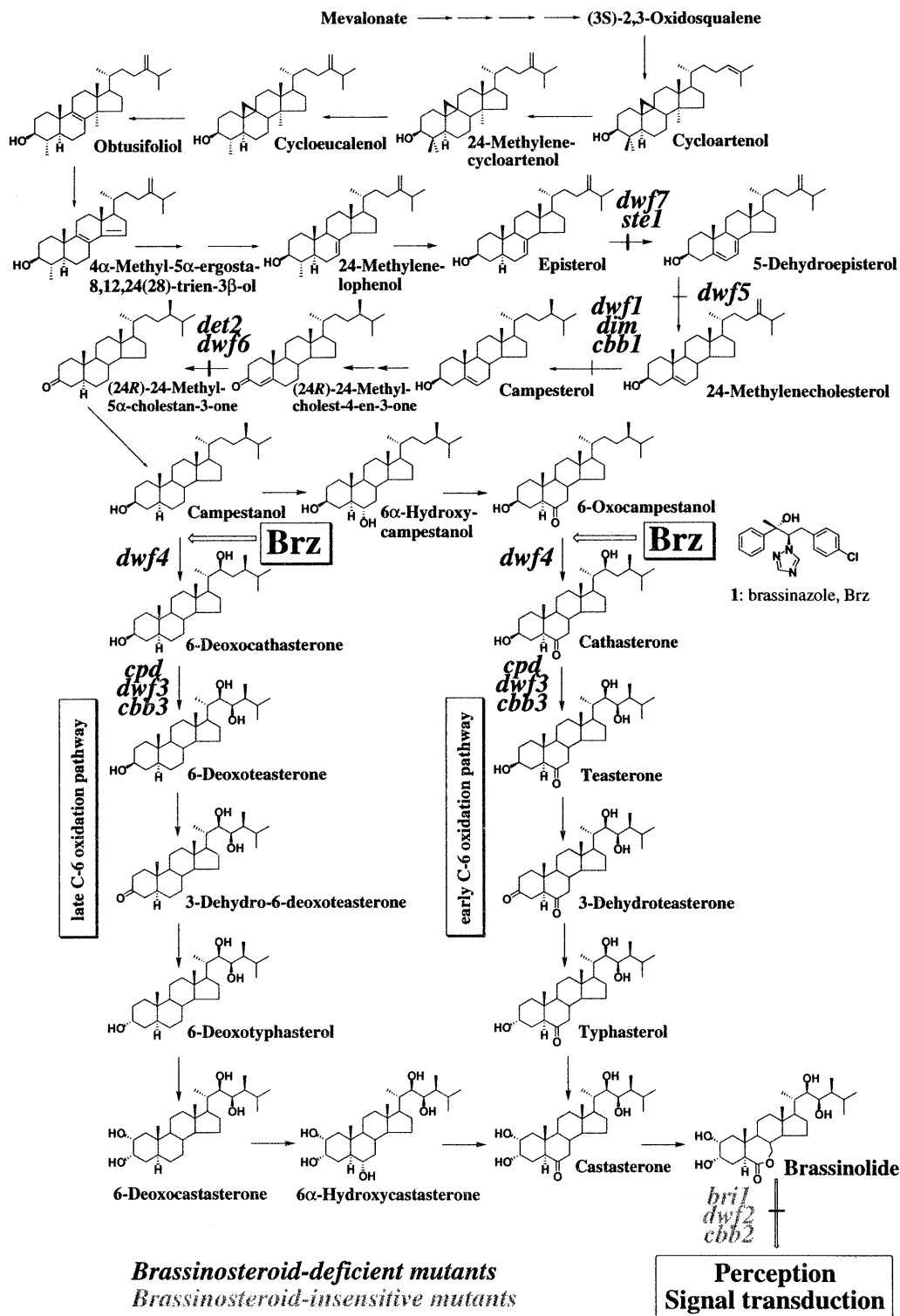


図-2 ブラシノステロイド生成経路と生成変異体遺伝子がコードする反応部位及び生成阻害剤の標的部位

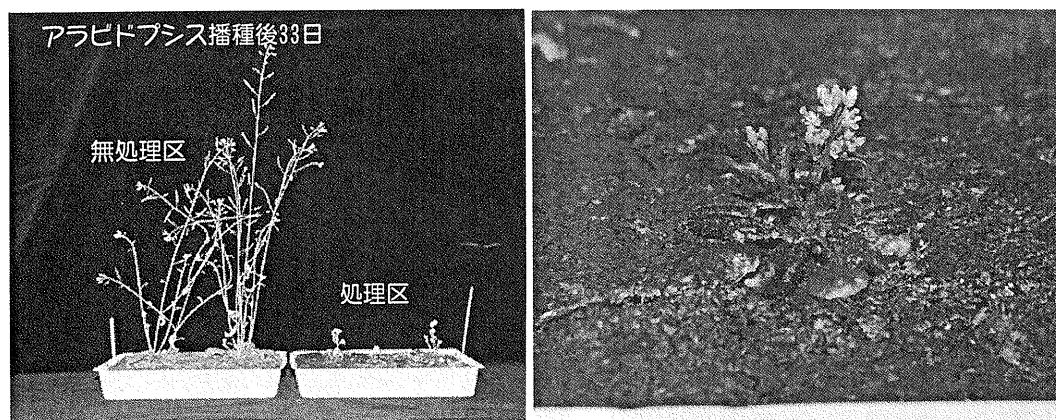


図-3 アラビドプシスへのブラシナゾール (Brz) の効果
左側は無処理の植物との比較。右側は処理した植物の拡大図

べた。その結果、初めての特異的ブラシノステロイド生合成阻害剤ブラシナゾール (Brz:1, 図-2 真ん中左側) を見い出すことができた [Min et al., 1999; Asami et al., 2000]。この化合物は図-3に示すように植物に対して著し矮化作用を有している。その後、1をリード化合物として、より高い選択性と活性を有する化合物を見いだした [Sekimata et al., 2001] だけでなく、多様な構造を有する阻害剤も見いだしつつある [Wang et al., 2001; Asami et al., 2001a]。

ブラシナゾール (Brz) の標的部位

Brzを処理したニチニチソウ培養細胞内の内生ブラシノステロイド量を測定した結果、Brzはチトクローム P 450であるDWF4が触媒する側鎖22位の水酸化反応を阻害することが強く示唆された。続いて大腸菌に発現させたDWF4タンパク質へのBrzおよびその誘導体の親和性を調べた結果 [Asami et al., 2001b], BrzはDWF4タンパク質と高い親和性 ($K_s=1\text{mM}$) を有しているだけでなく、桂皮酸4-水酸化酵素に対しては全く結合活性を有していないことが明らかとなった。以上の結果に併せて、種々のBrz誘導体の構造

活性相関の結果とDWF4タンパク質への親和性の間に非常に良い相関が観察されたことから、Brzは22位水酸化酵素を阻害していると結論した (図-2)。

ブラシナゾールの無傷植物への効果

1) 植物の形態に対する効果

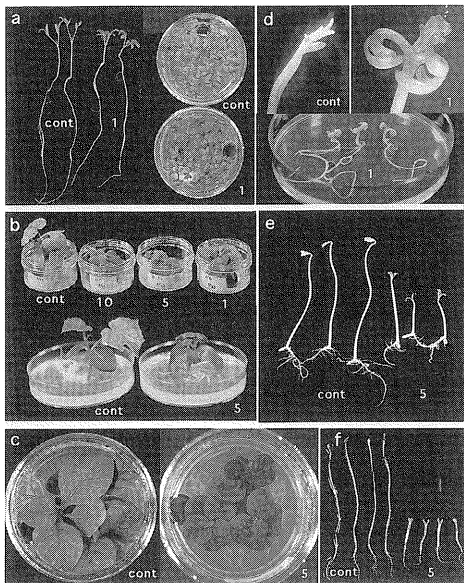
植物におけるブラシノステロイドの生理的意義についての追究が、阻害剤の利用によりブラシノステロイド生合成変異体を用いた場合より以下の点で容易になった。

- 多様な植物体への応用
- 多様な生育段階への応用
- 組織や細胞への応用
- 多様な生化学反応への応用

そこで以下ブラシノステロイドをモデル植物であるアラビドプシス以外の植物に処理した場合の形態変化やその他の性質の変化について述べる [Asami and Yoshida, 1999] (図-4)。

クレスは比較的大きく長い胚軸を有しているので形態変化が観察しやすいこと、阻害状態からのブラシノリド添加による回復が観察しやすいことから現在はアラビドプシスに代わって阻害剤のスクリーニングに用いている。クレスにおいてもアラビドプシスと同様に暗条件下で

A



B

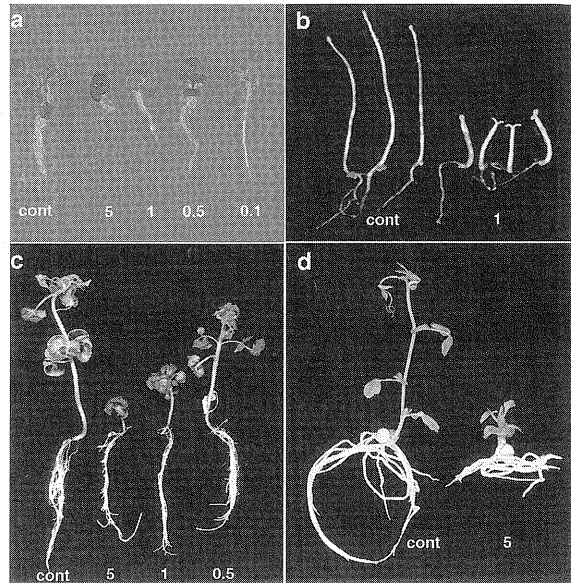


図-4A 無処理およびBrz処理した植物の形態

植物の下のアラビア数字は植物に処理したBrzの濃度 (μM) を意味しており cont は無処理の植物を示している。a: 明所下で育成した播種後7日目のクレス。b: 明所下で育成した播種後30日目のキュウリ。c: 明所下で育成した播種後30日目のタバコ。d: 暗所下で育成した播種後21日目のクレス。e: 暗所下で育成した播種後6日目のキュウリ。f: 暗所下で育成した播種後13日目のタバコ。植物はショ糖 (1.5%) を含む $1/2$ MS 寒天培地で 25°C で生育させた。

図-4B 無処理およびBrz処理した植物の明所または暗所における形態

植物の下のアラビア数字は植物に処理したBrzの濃度 (μM) を意味しており cont は無処理の植物を示している。a: 明所下で育成した播種後12日目のクレス。b: 暗所下で育成した播種後10日目のクレス。c: 明所下で育成した播種後33日目のトマト。d: 明所下で育成した播種後10日目のエンドウ。植物はショ糖 (1.5%) を含む $1/2$ MS 寒天培地で 25°C で生育させた。

の光形態形成である本葉の発達が明瞭に観察された。本葉への分化はブラシノライドの添加により抑制されることから、この現象と内生ブラシノステロイドの欠乏は密接な関連があるものと思われる。Brz処理したキュウリ芽生えにおいてはアラビドプシスの場合と同様な光形態形成が確認され、短い胚軸と開いた子葉を有していた。キュウリの場合に特徴的であったのは暗条件下から明条件下に移して3時間置いた場合に著しい緑化の促進が観察されたことである。Brz処理して光形態形成が誘導されたアラビドプシスでは、核およびプラスチド由来の光誘導遺伝子の発現とその産物であるタンパク質の生成が観察されるが、おそらくキュウリの場合で

も同様の現象が起きており、これが素早い光応答性緑化現象の理由であろう。エンドウ[Nomura et al., 1997a; Nomura et al., 1997b] とトマト[Bishop et al., 1999]ではブラシノステロイド生合成欠損株が報告されているが、これら植物にBrzを処理した場合もそれら変異体と同じ形態を示すことが確認できた。特にトマトの場合、図に示すように矮化するだけでなく葉の著しい萎凋が観察され、ブラシノステロイドの葉の形態に及ぼす重要性について推測することができた。タバコでは葉の大きさが小さくなるが形はあまり変化しなかった。また暗条件においても矮化するもののアラビドプシスで観察されたような明瞭な光形態形成は示さなかった。

この事実はタバコとこれまでの植物においてはブラシノステロイドの果たす機能が若干異なることを示唆するものであると考えている。しかしながら、双子葉類と単子葉類に対するBrzの効果の差と比較するとこの双子葉類内での差は非常に小さいものであることがわかった。単子葉類であるイネにBrzを処理しても双子葉類で観察されたような大きな形態の差は観察されなかった。ブラシノステロイドが単子葉類の伸長成長に関与しているとしても、双子葉類の場合と比較するとその程度ははるかに小さいものと考えている。また単子葉類は暗条件下で育成させても白くなる以外はその形態に関する差は明条件下で育成させた場合と異り非常に小さい。このこともまた単子葉類でのブラシノステロイドの機能と関係しているであろう。

2) ブラシノステロイド生合成阻害剤の葉緑体機能に対する効果

このような形態の違いと関連して、植物体内のブラシノステロイドの欠損は特に暗条件下において光誘導性遺伝子の発現を促進することが

変異体の場合に報告されている。阻害剤処理した場合においても、光誘導性であるcabやrbcS, psbAが核コード、葉緑体コードの違いにかかわらず高発現してくることが明らかとなった[Asamiet al., 2000]。また遺伝子の発現だけでなく核様体の形態も光照射条件と同様な形態を示す(図-5)。色素体DNAをDAPIで染色した図であるが、コントロールの暗所では色素体中に一様に広がっているのに対し、光照射条件や阻害剤を処理した条件に置いた色素体ではDNAが顆粒状になっているのが分かる[Nagata et al., 2001]。

3) 花芽形成に対する影響

アメリカンブルーは夏季に可憐な青い花をつける植物であり、その生育には高温を必要とする。このアメリカンブルーを発芽後、4週間してから生育には適さない22℃の温室へと移して育てた場合、図-6に示すように開花してこない。しかしながら、この状態でブラシノステロイド生合成阻害剤を1 kg/haで2週間に3回処理すると開花が観察される。約一ヶ月後には処

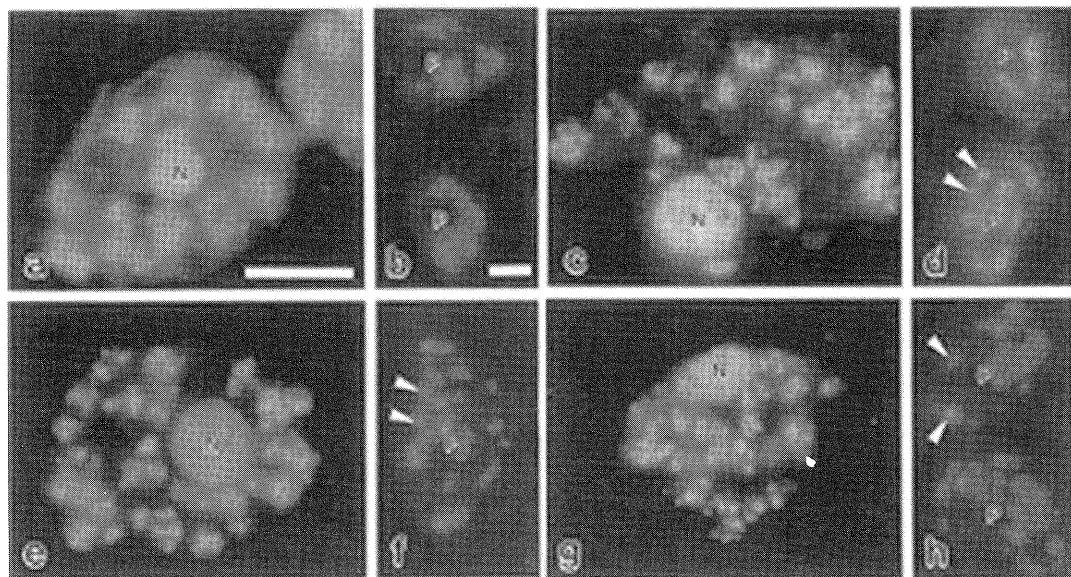


図-5 色素体中のDNAの形態変化 a,b:Dark grown cell; c,d:Five hr illuminated cell; e,f:Brz (1mM) treated cell in dark; g,h:det2 mutant cell in dark

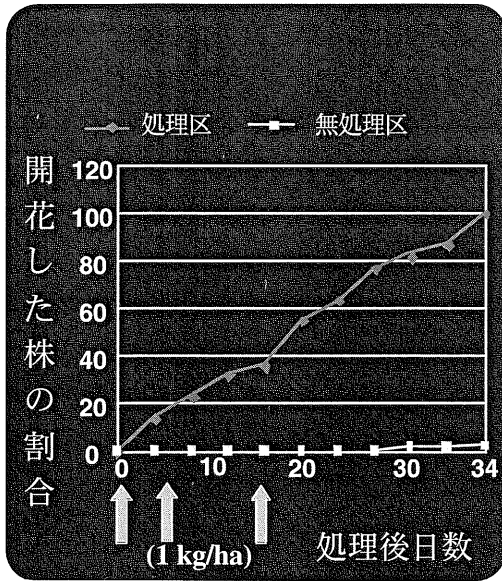


図-6 ブラシノステロイド生合成阻害剤のアメリカンブルーの開花に対する効果

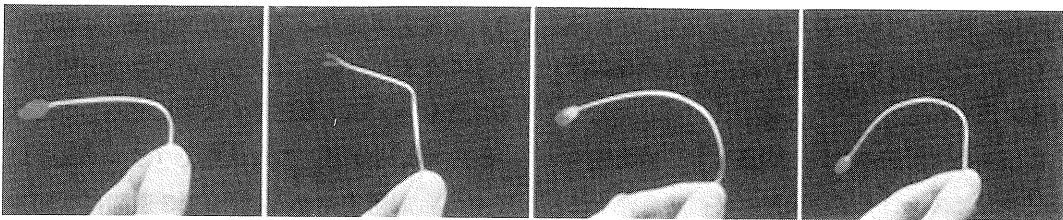


図-7 ブラシノステロイド生合成阻害剤の屈性に光屈性に対する影響

理したすべての株で開花が観察されたのに対し、無処理区で開花したのは1株だけであった。この原因は明らかでは無いが、処理した区の葉は健康的であったのに対し、無処理区では低温ストレスから葉が赤褐色を帯びていたことから、先に述べた阻害剤による葉緑体機能の昂進が関係している可能性があると考えている。

4) 屈性に対する影響

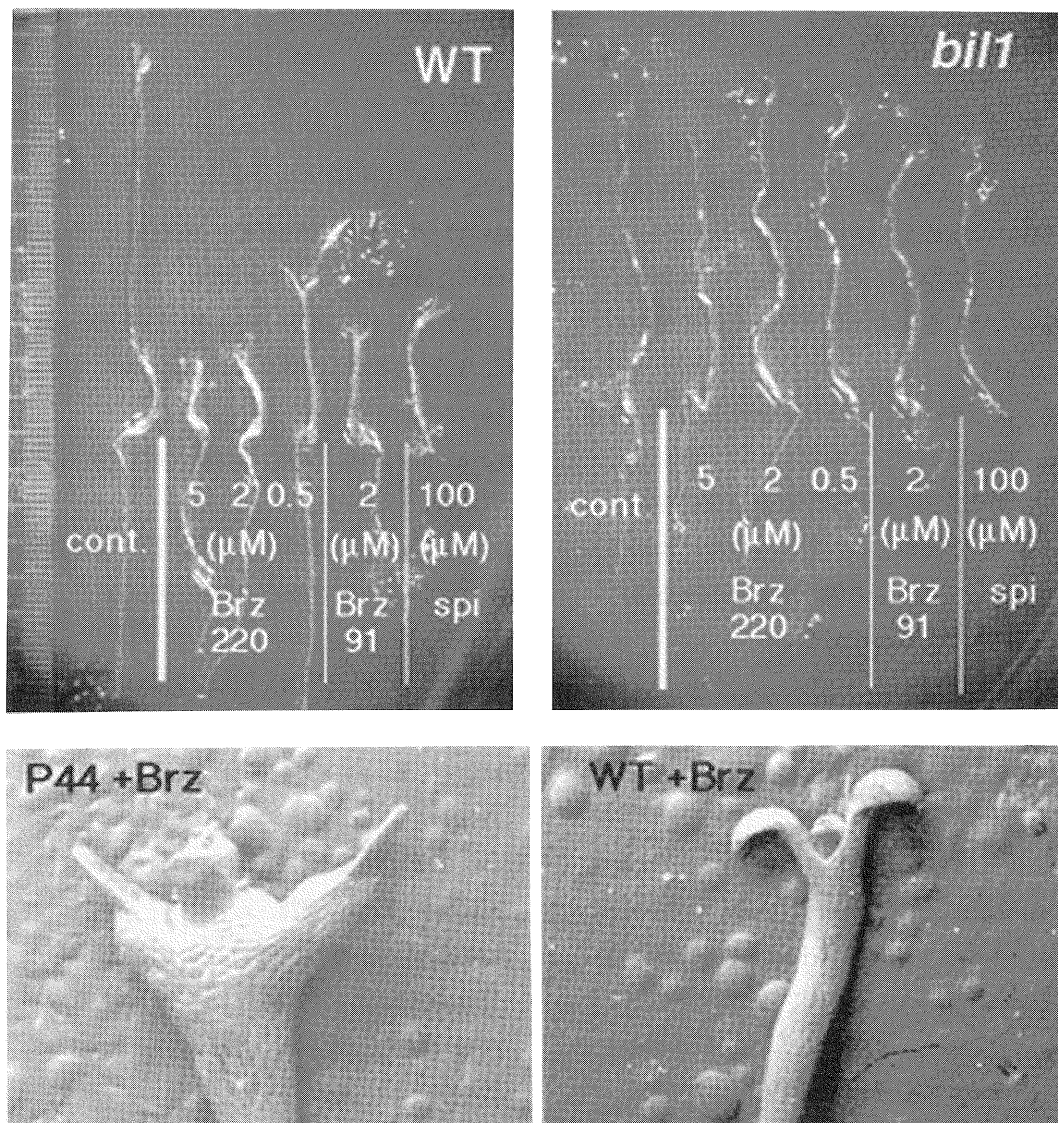
植物は重力や光に応答して根や茎などの伸長方向を変える。これは屈性と呼ばれる現象であり、茎においては主として植物ホルモンであるオーキシン濃度の勾配の差により細胞の伸長に差ができ、その結果伸長方向が決定されることが知られている。一方、ブラシノステロイドも細胞伸長に関わる植物ホルモンであり、この欠損は植物伸長に対し著しく阻害的となることから、

ブラシノステロイドの屈性に対する関与の可能性も考えられるがこの点についての報告はない。そこでまずブラシノステロイドの局在の植物屈性に対する効果について検討するために、ブラシノステロイド生合成阻害剤を用いて人為的な屈性現象の再現について検討した。キュウリを材料として、下胚軸の一部片側にブラシノステロイドをラノリンペーストとして塗布し、光を上部より照射した条件で実験を行った。その結果、キュウリは多様な屈性を示した(図-7)。中には下を向くものまで観察された。この結果は屈性におけるブラシノステロイドの関与の可能性を示すものであり、今後の追究により屈性

におけるブラシノステロイドの関与が明らかにできるものと考えている。

ブラシナゾールの変異体探索・同定への応用

ブラシノステロイド生合成欠損変異体、受容体変異体(bri1)とその原因遺伝子はすでに報告されている。次に期待されているのがブラシノステロイド情報伝達因子に関する変異体である。既にbri1をバックにして、通常は矮化するところを伸びてくる変異体とその原因遺伝子に関する報告が散見されるようになってきた。我々は、新しい変異体単離方法として阻害剤を処理しても矮化しない変異体の探索を進めている。図-8に示したのは、そのような変異体の代表

暗所で10日間育てたアラビドプシスの野生型(WT)と変異体(*bil1*)図-8 ブラシナゾール非感受性変異体*bil1*とブラシナゾール高感受性変異体*p44*

例である*bil1*である。この変異体は暗所下で生育させた場合、阻害剤の影響を全く受けずに阻害剤処理していない野生株と同様に胚軸が伸長し黄化する。この変異体は*det2*や*bri1*と掛け合わせてもそれらの働きを抑圧することから、原因遺伝子はブラシノステロイドの受容後の情報伝達系で作用していると考えている。しかしな

がら、明所下で生育させた場合は阻害剤感受性になることから、明暗両条件におけるブラシノステロイド情報伝達経路は異なることが予想された。現在、*bil1*以外にもいくつかの阻害剤非感受性変異体を単離してきており、今後はそれらの原因遺伝子について追究していく予定である。しかしながら、このような方法では*bri1*をバツ

クにした場合に得られる変異体と重なる可能性がある。そこで、ブラシナゾールを用いた新しい変異体の探索法として、阻害剤存在下、すなわちブラシノステロイド欠損状態時にのみ形質を発現する変異体の探索を行い、新しい変異体 p44 を見いだした (図-8)。この変異体は阻害剤が無い状態では、野生株と同様の形態を示す。この変異体の解析により、ブラシノステロイドの新しい機能を明らかにできる可能性があると考えている。

以上、ブラシノステロイド生合成阻害剤の多様な応用例を追究した結果について概説した。他にもブラシノステロイドは多様な機能を有していることが予想され、それら機能の解明やさらには新しい変異体の探索や実証的な応用においても利用できると考えている。

参考文献

- Asami, T. and Yoshida, S. (1999) Trends Plant Sci. 4:348-353.
- Asami, T. et al. (2001a) Biochem. Biophys. Res. Comm., in preparation.
- Asami, T. et al. (2000) Plant Physiol. 123: 93-100.
- Asami, T. et al. (2001b. J. Biol. Chem., J Biol Chem, 276:25687-25691. .
- Bishop, G.J. et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:1761-1766.
- Clouse, S.D. and Sasse, J.M. (1998) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 427-451.
- Fujioka, S. et al. (1997) Plant Cell 9:1951-1962.
- Grove, M.D. et al. (1979) Nature 281:216-217.
- Iwasaki, T. and Shibaoka, H. (1991) Plant Cell Physiol. 32:1007-1014.
- Li, J.M. et al. (1996) Science 272:398-401.
- Min, Y.K. et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:425-430.
- Nagata, N. et al. (2001) Plant Cell Physiol. 42:1017-1023.
- Nagata, N. et al. (2001) Planta 211:781-790.
- Nomura, T. et al. (1991) Plant Physiol. 119: 1517-1526.
- Nomura, T. et al. (1997) Plant Physiol 113:31-37.
- Sekimata, K. et al. (2001) Planta 213:716-721.
- Wang, J.M. et al. (2001) Biosci. Biotech. Biochem. 65:817-822.
- Yokota, T. et al. (1991) In Gibberellins (Takahashi N., Phinney, B. O. and McMillan J. eds.). pp.339-349, Springer-Verlag, New York.
- Yokota, T. (1997) Trends Plant Sci. 2:137-143.

最新 除草剤・生育調節剤解説1998年版

企画・編集／財団法人 日本植物調節剤研究協会
B5判 年度別・各5,000円 (本体・税別)

1998年版は水田除草剤16剤、畑地・非農耕地除草剤5剤、水稻倒伏軽減剤1剤。1999年版は水田除草剤16剤、畑地除草剤1剤、芝生除草剤9剤を掲載。

全国農村教育協会

〒110-0016 東京都台東区台東1-26-6
TEL03-3833-1821 FAX03-3833-1665