

# 非ステロイド型ブラシノライド様 活性化化合物の発見と新しい活性 評価系の構築

京都大学大学院農学研究科  
中川 好秋

## はじめに

動物学において、ホルモンは特定の器官(腺)で生産され血流によって標的に運ばれて微量で作用する物質と定義される。たとえば、昆虫における脱皮ホルモン(ステロイド)は前胸腺、幼若ホルモン(セスキテルペン)はアラタ体で合成されて分泌される。一方、植物においてホルモンの生合成器官はない。植物ホルモンとして最初に発見されたのはオーキシンで、1930年代中頃に Kögl と Thimann によって、人尿、酵母、カビなどから単離され、ホルモン活性はアベナ屈曲試験法によって評価された。その後、1938年には藪田貞治郎によってジベレリン A の結晶化が行われた。それ以外に、エチレン、サイトカイニン、アブシジン酸、ブラシノステロイド、ジャスモン酸、ストリゴラクトン、ペプチドホルモンなどが植物ホルモンとして登場している。植物ホルモンの研究は、わが国における農芸化学研究の始まりで(中川ら 2022)、植物ホルモンは農業における利用価値が高い。例えば合成オーキシンである 2,4-D は除草剤として、ジベレリンは種なしブドウの生産に、それ以外にもサイトカイニンが着果促進や肥大促進、エチレンは果実の成熟促進に実用されている。しかしながら、ブラシノステロイド様活性物質は未だに実用には至っていない。

ブラシノステロイドの研究は 1970 年代にアメリカ農務省の Michell と

Mandava らのグループによって精力的に行われ、セイヨウアブラナの花粉から、インゲン豆の第 2 節間の伸長を促進する物質としてブラッシンが発見された (Michell ら 1970)。さらにそれから約 10 年後の 1979 年にブラッシンの化学構造が Grove らによって明らかにされ、ブラシノライド (Brassinolide; BL) と命名された (Grove ら 1979)。ブラッシンが発見される前、わが国においても丸茂らがイネの葉を屈曲させる活性物質を分離し *Distylium factor* と命名した (Marumo ら 1968)。残念ながら当時のわが国の分析技術ではその構造決定には至らなかったが、BL の化学構造が決定されると、丸茂は東大の森謙治 (Mori 1980)、東工大の池川信夫ら (Ishiguro ら 1980) に合成を依頼した。そして、BL とその類縁体が化学合成され、それらが低薬量で活性を示すことが示され、*Distylium factor* は BL 同族体であることが明らかにされた。BL の発見の後、カスターステロン (castasterone: CS; Yokota ら 1982) をはじめ様々な BL 様活性化化合物が単離構造決定 (Fujioka 1999)、あるいは化学合成され (McMorris 1999)、これら BL 様活性を示す化合物はブラシノステロイドと総称されるようになった。1992 年に出版された“植物ホルモン入門”(増田芳雄 1992) では、ブラシノステロイドは第 6 番目の植物ホルモンであると記載されているが、BL が発見されてしばらくブラシノステロイドは植物の 2 次代謝物

で、植物ホルモンではないという意見もあった。しかし、1996 年に、矮性形態を示すブラシノステロイド添加で形態回復を示す *det2* 変異体の原因遺伝子が、ブラシノステロイド生合成酵素であることが Chory らによって示された (Li ら 1996)。また、同時期に、矮性形態を示しながらブラシノステロイド添加で形態回復しない *bril* 変異体が Clouse, Chory によって発見され、その原因遺伝子が 1 回膜貫通型の Ser/Thr キナーゼであることが Chory によって示された (Clouse ら 1996; Li and Chory 1997)。これらの結果から、ブラシノステロイドは欠損すると植物に異常な矮性形態を示す物質であり、植物成長に不可欠な役割を果たしていることが示され、植物ホルモンとしての地位を獲得した。

ブラシノステロイドの作用としては、発芽促進、葉・茎・根の成長、果実形成の促進、植物の病害抵抗性の向上や環境ストレス耐性の向上などが知られていて、農業資材としての応用にも期待がかけられている。2021 年、本誌において中野が『ブラシノステロイドのケミカルバイオロジー研究の農業への応用展開へ向けて』という解説記事を執筆し (中野 2021)、そこにおいて紹介されているが、筆者らは、ブラシノステロイドのステロイド骨格を簡単な構造で置き換えることに成功し NSBR1 と命名した (Sugiura ら 2017, 2018a, 2018b)。本稿では、NSBR1 発見に至る経緯を簡単に紹介し、最近筆者らが考案した新しい活性

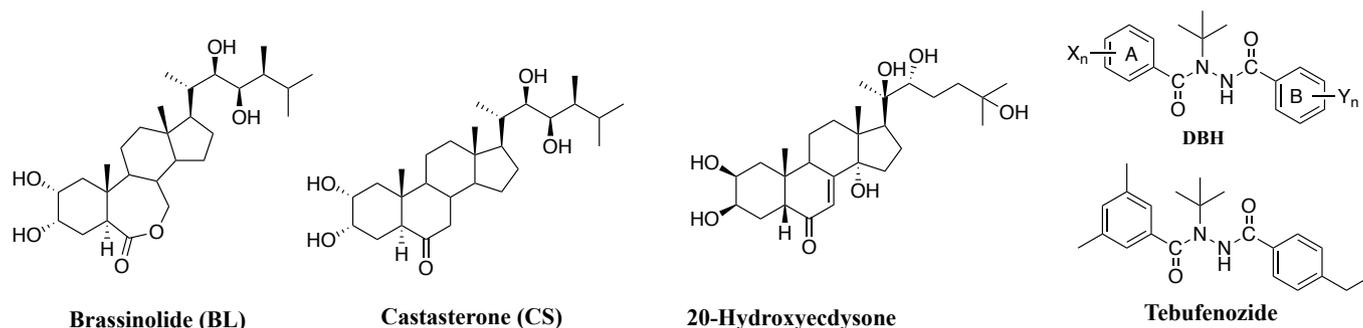


図-1 ブラシノステロイド、脱皮ホルモン、および脱皮ホルモン様活性化化合物の化学構造

評価系について解説する。20世紀にはランダムスクリーニングによって新規な化合物が発見されていたが、最近の新薬開発においては、計算化学の利用は必須で、医薬開発ではインシリコで候補化合物が選抜され、農業開発にもその技術の導入は始まっている。しかし、インシリコ技術がどれだけ進歩しても、選抜された化合物は合成され、その活性は評価されなくてはならず、できるだけ簡便で再現性よく活性を求めることのできる活性評価系はなくてはならない。特に、分子設計において計算化学的な手法が使われることから、活性が定量的に求められることが重要である。筆者らが新たに考案した活性評価系 (Nakagawa ら 2021) は簡便な方法で、定量的に活性を求めることのできる方法であることを合わせて紹介する。

## 1. 非ステロイド型 BL 様活性化化合物 NSBRI 発見までの経緯

筆者らは 1997 年にブラシノステロイドを非ステロイド構造で置き換える研究を始めた。そのきっかけとなったのは、昆虫のステロイドホルモン (脱皮ホルモン) がジベンゾイルヒドラジン (DBH) (図-1) という簡単な構造で置き換えられることが報告され (Wing 1988; Wing ら 1988), DBH 類の一つである tebufenozide が農業として実用化に至ったことで

ある。その頃は農業開発ではまだまだインシリコ技術は普及しておらず、どちらかというランダムスクリーニングであった。脱皮ホルモン (20-hydroxyecdysone) と BL の構造が平面的に似ていることから、筆者らはイネ葉身屈曲試験 (rice lamina inclination assay: RLIA) 法 (Wada ら 1981) を用いてジベンゾイルヒドラジンの活性を調べることから研究を始めたが、DBH 類にブラシノライド様活性は見い出されなかった (野津 1998)。その頃、すでにコンピュータ化学を使った合理的な分子設計が登場してきていたが、農業開発ではまだまだ一般的ではなく、新規な化合物を設計することはそれほど容易ではなく、筆者らはとりあえず研究室所蔵の化合物の活性評価を行った。しかし、このようなランダムスクリーニングで BL 様化合物を見つけることは容易ではないと考え、ブラシノステロイド類の合成と構造活性相関研究を始めた。

その頃の筆者のメインテーマは昆虫のステロイドホルモンである脱皮ホルモンの活性化化合物の構造活性相関研究で、脱皮ホルモン活性発現にとってエクダイソンの側鎖構造が重要で、非ステロイド型脱皮ホルモンである DBH 類の一方のベンゾイル部が脱皮ホルモン類の側鎖構造に対応していることを報告していた (Nakagawa ら 1995)。脱皮ホルモン類では、側鎖構造が変化すると活性が大きく変わることから、

ブラシノステロイド類の構造活性相関研究においても、側鎖部分に着目した。側鎖部分の構造を容易に変換するため、植薄らはまずステロイド環と側鎖をエステル結合で連結した化合物を合成した (Uesusuki ら 2004)。しかし、合成したエステル誘導体の中で最も活性の高かった化合物でも BL の 1/1000 程度で、活性をそれ以上に高めることができなかった。そのような中、渡辺が博士論文研究で carbonylene 反応を使って castasterone 類を合成する方法を開発し (渡辺 2004, Watanabe ら 2004a), その頃大学院生であった山本は、その方法を使って 26,27-bisnorcastasterone 誘導体 (20S), その epimer (20R) と、さらに CH<sub>3</sub> 基のない (21,26,27-trisnorCS) を合成した (Yamamoto ら 2006)。さらに渡辺と山本は、様々な側鎖構造をもった castasterone 誘導体の合成を行った (Watanabe ら 2017)。このようにして合成された様々なステロイド化合物の活性は RLIA 法で定量的に求められた。

上述したように、筆者らはそれまで脱皮ホルモン類の構造活性相関研究を行っていたことから、ブラシノステロイドと脱皮ホルモンのハイブリッド構造について興味をもった。まず、castasterone の側鎖構造を脱皮ホルモン活性の高い ponasterone (PonA) の側鎖構造に置き換えた化合物 (CS/PonA) が合成され、顕著な脱皮ホル

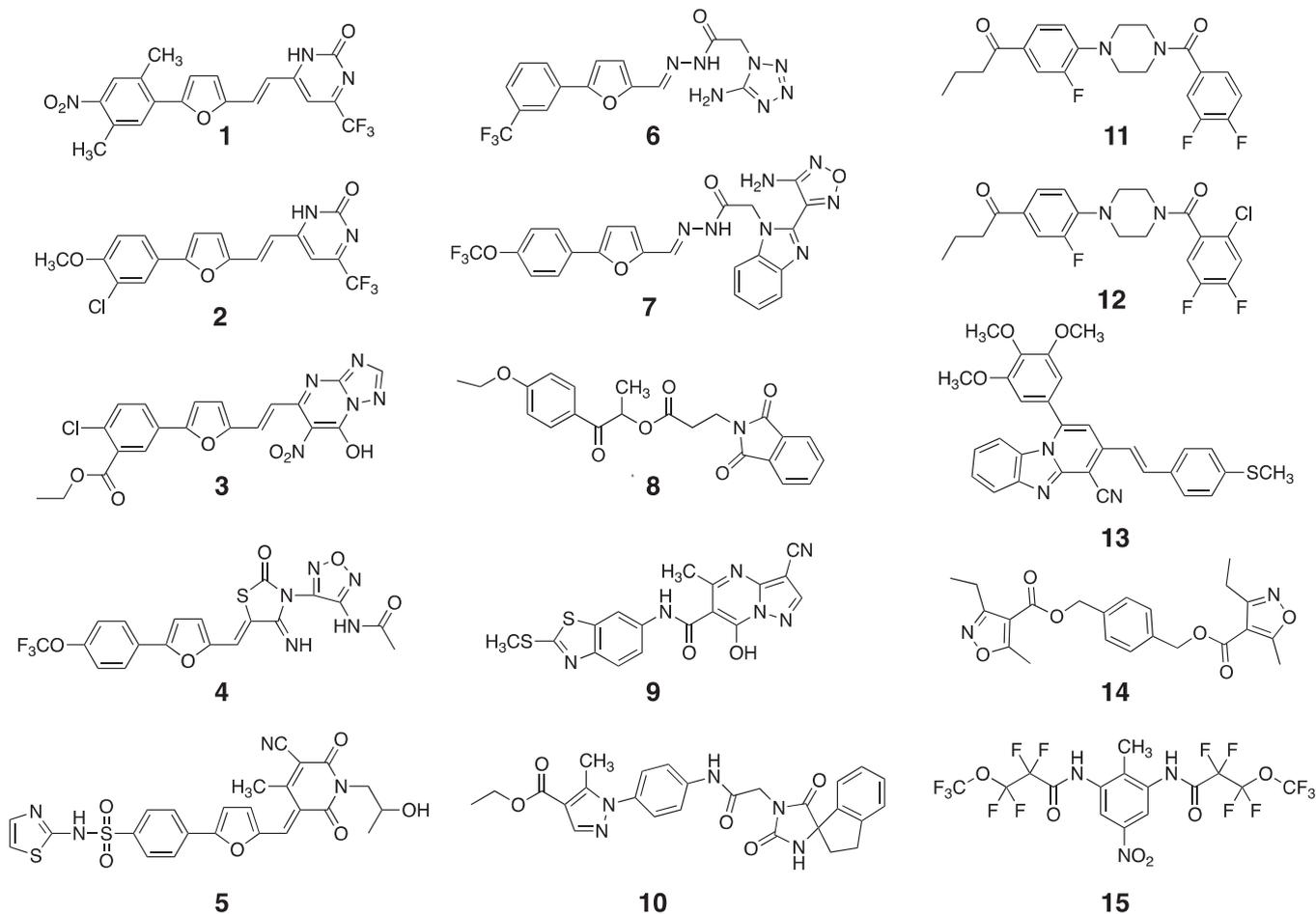


図-2 インシリコスクリーニングで選抜され、活性評価を行った化合物

モン様活性が認められた。(Watanabeら 2003; 2004b)。CS/PonAにおいて側鎖構造の立体化学が脱皮ホルモン活性にとって重要であることも示されたが、ブラシノライド様活性は認められなかった。さらに、このCS/PonAのステロール骨格部分についての構造活性相関を調べたところ、A/B環縮合が*trans*(ブラシノステロイド型)から*cis*(脱皮ホルモン型)に変わると、脱皮ホルモン活性が250倍上昇することが明らかになった(Araiら 2008)。

筆者らがブラシノステロイドの非ステロイド化を目指した研究を行っている頃、Andersenらが非ステロイド型BL様化合物を発表した(Andersenら 2001)。しかし、Andersenらによって合成された化合物は混合物であったことや生理活性評価に少し問題点

があった。その後、この化合物に関しては、立体選択的合成が行われたが(Backら 2004)、それらの生理活性に関する記載はなく、その後もこれらの化合物についての報告は行われなかった。筆者らの研究グループの瀧本は卒業研究でAndersenらの発表した化合物(ラセミ混合物)の合成を行い(瀧本 2012)、Cressを使った活性評価系(Sekimataら 2001, Nagataら 2001)で活性を調べたが、活性を見出すことはできなかった。その頃、BLの受容体BRIIの立体構造が(Sheら 2011; Hothornら 2011)、さらに2013年にBRIIと補助受容体SERK1との複合体の結晶構造が明らかにされた(Santiagoら 2013)。また、ちょうどその頃、インシリコスクリーニングのソフトウェアLigandScout

(Wolber and Langer 2005)の開発者であるLanger博士が、筆者らにLigandScoutを紹介してくれた。筆者らはLigandScoutを用いて、BRII/SERK1複合体の立体構造に対して、約500万化合物の化合物ライブラリーからスクリーニングを行って22個の化合物を選抜し、そのうちの15化合物(図-2)を購入しRLIA法を用いて活性評価を行った(Takimotoら 2016)。

残念ながら、購入した15個すべての化合物においてBL様活性は見出されなかったが、3つの化合物(1, 2, 14)がイネにおいてBLのアンタゴニスト活性を示した(Takimotoら 2016)。次に、同じ化合物セットについて、シロイヌナズナを使ってBL様活性を調べたところ、ホルモン活性は

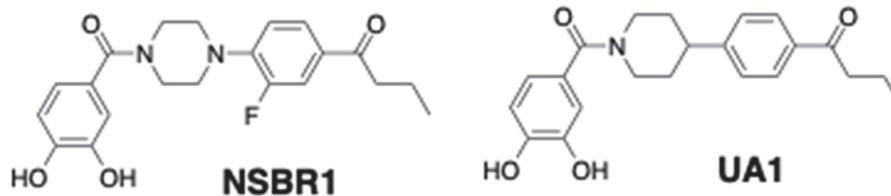


図-3 BL 様活性を持つ非ステロイド化合物

見出されなかったが、イネにおいて見つかったBLのアンタゴニストとは異なる化合物(11, 12)にアンタゴニスト活性が見いだされた(Sugiuraら2017)。化合物11と12の基本構造は同じで、ベンゼン環の置換基のみが異なるだけであった。BLに対して化合物11および12を重ね合わせると、ベンゾイル部の置換基3,4-F<sub>2</sub>がBLのステロールA環の2,3-(OH)<sub>2</sub>に対応していた。そこでベンゾイル部の置換基を3,4-(OH)<sub>2</sub>に置換した化合物を合成し、シロイヌナズナで活性評価を行ったところ弱いがBL様活性が認められた。さらに、ブラシノステロイド応答遺伝子に関しても、BL処理と同じように応答し、アゴニストであることが証明され、非ステロイド型BL様活性物質をNSBR1(図-3)と

命名した(Sugiuraら2017, 2018a, 2018b; Nakagawaら2018)。NSBR1についてRLIA法を用いてイネに対してもBL様活性を調べたところ、薬量-応答がみられ、ED<sub>50</sub>を790 pmol/plantと決定することができた(Sugiuraら2017)。しかしBLのED<sub>50</sub>は0.025 pmol/plantで、NSBR1の活性の強さはBLの1/30000以下と弱いものであった。NSBR1の発見のあと、伊丹らは、NSBR1の基本骨格であるピペラジン環の一つのNをCに置換したUA1(図-3)にepiBLと同程度の活性を報告している(Itamiら2024)。

NSBR1発見後、筆者らのグループはNSBR1の類縁体を合成し、シロイヌナズナを使って活性評価を行った(Takimotoら2022)。図-4に示した

ように、最大濃度(10 μM)においてNSBR1処理区よりも胚軸が有意に伸長したのもあったが、BL(1 μM)処理で見られるような顕著な促進効果は確認できず、化合物間での活性差を定量的に議論することはできなかった。また、RLIAにおいてこれらの化合物のED<sub>50</sub>値を求めることはできなかった。実験者が変わったことによつてNSBR1類縁化合物に活性が得られなかったのは技術的な問題があったかも知れないが、NSBR1のホルモン活性は弱く、再現性よくED<sub>50</sub>値を求めることができなかったと思われる。インシリコスクリーニングで見つかる化合物、いわゆる”ヒット”は活性が低いことが多く、そのような活性の低いヒットでも見落とすことのない簡便で再現性のある活性評価系は重要である。

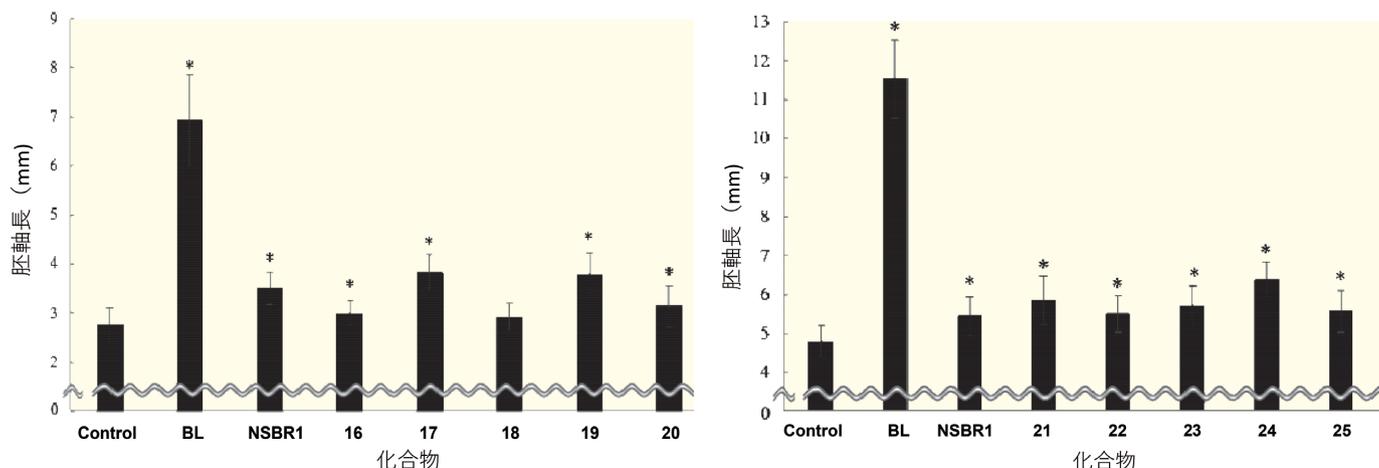
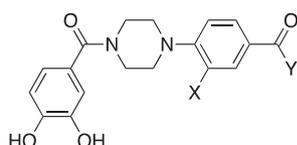


図-4 NSBR1 類縁体のシロイヌナズナ胚軸伸長活性 (Takimotoら2022に掲載されている図を修正)



16 - 20 Y=Pr; X=H, OH, Cl, CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>  
 21 - 25 X=F; Y=Bu, secBu, iBu, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-cPent

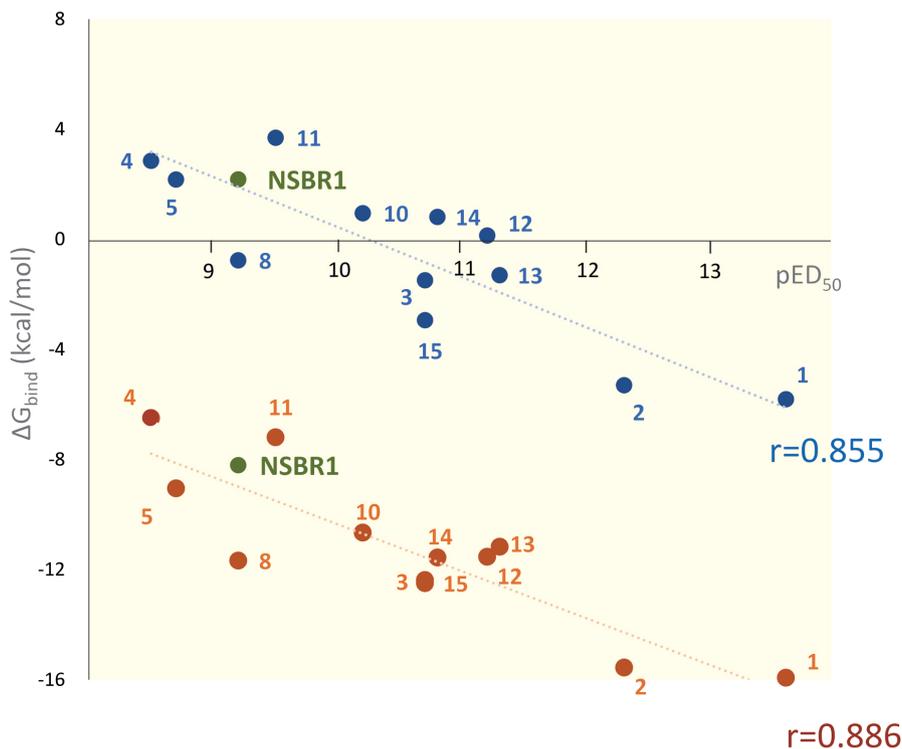


図-5 結合自由エネルギー差 ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) とホルモン活性の関係 (内部誘電率 1 (青) あるいは 2 (橙) を用いて  $\Delta G_{\text{bind}}$  を計算)

## 2. ブラシノステロイド類のインシリコ解析

インシリコスクリーニングを行うにあたり、ファーマコフォアの構築を行ったが、その際にブラシノステロイドの構造活性相関の結果を活用した。先に示したように、筆者らの研究グループでは BL や CS 類縁体を合成し活性を RLIA 法によって pED<sub>50</sub> 値として定量的に求めていた (Uesusuki ら 2004; Watanabe ら 2004b; 2017)。筆者らは、これらブラシノステロイド類の受容体に対する結合自由エネルギーを計算によって求め、pED<sub>50</sub> 値との関係を調べることにした。受容体に化合物をドッキングさせて、分子動力学 (Molecular Dynamics: MD) を行ったのち、結合自由エネルギー ( $G_{\text{bind}}$ ) を MMPBSA (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area) 法を用いて計算し、それぞれの化合物

についてリガンドが結合していない受容体とのエネルギー差 ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) を求めた。MMPBSA 法では、Poisson-Boltzmann 方程式で電荷分布が計算され、溶媒の影響が正確に得られ高精度の解析に適している。この方法は、一つのリガンド-タンパク質複合体の解析や水の影響が重要な場合に適していると言われている。

RLIA 法を用いて求めたブラシノステロイド類の pED<sub>50</sub> と  $\Delta G_{\text{bind}}$  との関係を調べたところ、図-5 に示したように両者の間に直線関係が得られた。この結果から明らかなように、 $\Delta G_{\text{bind}}$  が小さい (受容体結合が強くなる) ほど活性が高くなることが示された。また、今回発見した NSBR1 もブラシノステロイド類で得られた pED<sub>50</sub> と  $\Delta G_{\text{bind}}$  との関係で説明できることがわかり、BL 様化合物の分子設計に  $\Delta G_{\text{bind}}$  の計算が有用であることが示された (Watanabe ら 2017)。図-4 に 2 つの直線関係が示されているのは、内部誘

電率 internal dielectric constant ( $\epsilon_{\text{in}}$ ) の設定値の違いによる。MMPBSA による  $\Delta G_{\text{bind}}$  の計算において最初は  $\epsilon_{\text{in}}=1$  を用いたが、活性の弱い化合物に関して、 $\Delta G_{\text{bind}}$  の値が正となったことで、内部誘電率を 2 に変更して再計算を行った (Nishikawa ら 2023)。 $\epsilon_{\text{in}}=2$  を用いると、活性が得られたすべての化合物の  $\Delta G_{\text{bind}}$  は負の値となり、 $\epsilon_{\text{in}}=2$  を用いる方が妥当であると考えられた。

MMPBSA 計算には時間がかかることから、水分子の効果を近似的に取り入れる方法として MMGBSA (Molecular Mechanics - Generalized Born Surface Area) 法が考案されている。MMGBSA 計算における溶媒効果の精度は MMPBSA 計算に比べて若干劣るものの、計算が軽く迅速であるため、大規模な計算を行うインシリコスクリーニングには適していると考えられている。MMGBSA で計算した  $\Delta G_{\text{bind}}$  でも生理活性との間に直線関係にあ

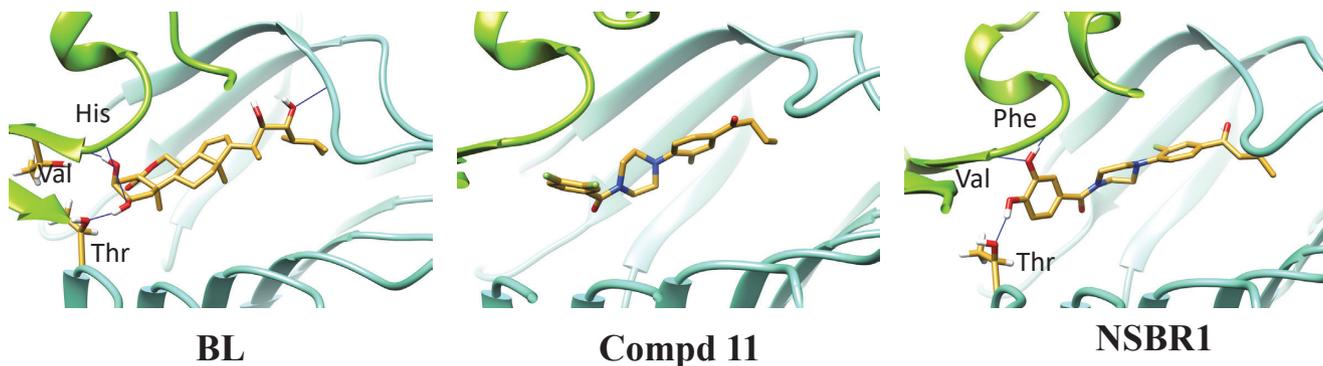


図-6 ブラシノステロイド受容体とリガンド分子の相互作用

ることがわかった (Nishikawa ら 2023)。また、筆者らはリガンド分子とブラシノステロイド受容体複合体 (BRI1/SERK1) との相互作用様式を調べた (図-6)。その結果、BLではステロール A 環部の 2,3-(OH)<sub>2</sub> が受容体のアミノ酸残基 (His, Val, Thr) と水素結合しているが、インシリコスクリーニングで見出された BL アンタゴニスト **11** では水素結合は認められなかった。しかし、化合物 **11** の 3,4-F<sub>2</sub> を 3,4-(OH)<sub>2</sub> に変換し BL 様活性をもつ NSBR1 においては、3,4-(OH)<sub>2</sub> 置換基と受容体の間に水素結合が観察された。

### 3. ブラシノステロイドの新しい活性評価系

筆者らが考案した新しい活性評価系を解説する前に、これまでに BL に特異的な評価系として用いられてきた手法について簡単に解説する。RLIA 法 (Maeda 1965; 前田・坂 1968) はもともとオーキシンの活性評価系として名古屋大学の前田によって考案されたものであるが、後に和田らがブラシノステロイドに特異的な評価法として発表した (Wada ら 1981)。和田の考案した RLIA 法は『7 日間暗所 30°C で生育させたイネ幼苗から弱赤色光下で第 2 葉身基部 (ラミナジョイント) を中心として葉身および葉鞘各 1cm を

含む切片を切り取り、同一温度暗室中で蒸留水に 24 時間浸漬する。そして一定量の試料を含む 2.5mM のマレイン酸カリウム水溶液 1mL を入れたサンプル瓶に幼苗切片を 10 本ずつ入れて 30°C 暗室に放置。48 時間後に切片を取り出して葉身と葉鞘の成す角度を分度器で測定する。』というものであった。和田らの方法を用いると、BL は 1ng/ml という極めて低い濃度においても、葉身を 150° まで屈曲させた。森らによって合成された homoBL (森ら 1981) も 5ng/ml で 150° の葉身傾斜角度を示した。一方、オーキシンであるインドール酢酸処理では、50 μg/ml という高い濃度においても屈曲角度は 124° にしか達せず、その活性は BL の 1/100,000 と評価された。ジベレリンは 100 μg/ml でも弱い活性しか示さなかった。また、和田らは小麦を使ってより簡単にブラシノステロイド類の活性評価を行える検定法も発表している (Wada ら 1985)。Mitchell らは、ブラッシンはインゲンの節間を伸長させるとともにその上部を著しく肥大させることを報告したが (Michell ら 1970)、顕微鏡観察において、節間基部の細胞が縦方向に約 2 倍伸長し、節間上部では細胞分裂が顕著に促進されていることを発見した。丸茂と和田は、総説において、『ジベレリンもインゲンのテストにおいて、節間伸長を著しく促進するが細胞分裂の促進はみ

られず、細胞伸長と分裂をともに促進する 2 重作用は BL の示す極めて特異的な生理作用と言えそうである』と言及している (丸茂・和田 1981)。この総説の最後に、『今後、オーキシン、ジベレリン、サイトカイニン、アブジジン酸、エチレンに次いで新 6 番目の植物ホルモンになり得るか大変興味深いところである』と締めくくられ、当時は植物ホルモンとしては認知されていなかったことがわかる。

BL 生合成阻害剤である brassinazole が浅見らによって発見され (Asami ら 2000; 2001)、人為的に矮性を誘導することが可能となった。筆者らはシロイヌナズナ、クレスに対して brassinazole 処理を行って矮化を誘導し BL の活性評価を行った。しかし、これらの活性評価系は、筆者らのインシリコスクリーニングで用いる生物検定系として適したものとは言えなかった。また、RLIA 法を用いて NSBR1 の活性を定量的に求めたが、活性を再現性よく求めることができず、NSBR1 を発表したことに不安がつきまとった。そのことがきっかけとなり、再現性よく誰でも簡単にブラシノステロイド類の活性を評価できる系はないかと考えて、以下に示すブラシノステロイドの新たな活性評価系の構築に行き着いた。

最初は、イネ発芽種子を用いて BL による胚軸伸長促進を調べて活性を



Control Brassinolide

図-7 イネの根における螺旋誘導

定量化することを考えた。すなわち、発芽種子を、BLを含む水溶液に入れて、暗所で48時間インキュベートすると、胚軸が伸長しBLの濃度上昇とともに胚軸伸長が促進されることがわかった (Nakagawaら 2021)。しかし、対照区との差はせいぜい数ミリ程度で、活性の定量化には煩雑さが残り、迅速な活性評価法ではないと判断した (Nakagawaら 2021)。ところが、実験中にブラシノライドで処理した発芽種子の根が螺旋を形成することに気がついて (図-7)、螺旋誘導を活性の指標に用いることができないかと考えた。螺旋の形状はBLの濃度とともに変化するため、50% 効果濃度 (EC<sub>50</sub>) として求めることは難しく、どのようにして定量化するかが問題となった。濃度を下げていくと、螺旋を形成しないが、かなり低い濃度においても根が

湾曲し、明らかにコントロールとは違うことがわかった。そこで、湾曲する最小効果濃度 (minimum effective concentration [M]: MEC) を求めることにした。50 mL 容ビーカーに2 mLの水を入れ、そこにBLのエタノール溶液 (200 nM, 2 nM) を5, 10, 20, 30  $\mu$ Lとピペットマンで加えて、様々な濃度のBL水溶液を作成して、発芽種子を入れた。MECをできるだけ精度良く決定するために、BLの処理濃度幅を狭く調整した。図-8に示したように  $3 \times 10^{-11}$  Mの処理濃度において用いた種子数の半分以上の種子の根に湾曲が認められたことから、それをMECとし、その逆対数 (pMEC=10.5) をBLの活性値とした。これを4回繰り返して平均値  $10.5 \pm 0.23$  (n=4) を求めた。

次に、様々なブラシノステロイド

についてpMECを求め、先にRLIA法で求めたpED<sub>50</sub>値との関係を調べたところ、図-9に示すように両者の間に良好な直線関係が認められた (Nishikawaら 2023)。

一方、オーキシンのインドール-3-酢酸 ( $5 \times 10^{-5}$  M) やジベレリン GA<sub>3</sub> ( $5 \times 10^{-6}$  M) 処理区においては、根に螺旋誘導は見られなかった (Nakagawaら 2021)。ジベレリンの濃度をさらに10倍高めた  $5 \times 10^{-5}$  M 処理区では根の伸長が阻害された。このように、根における螺旋誘導はブラシノステロイド特異的であった。また、図-7や図-8に示したように、対照区でも、根が若干湾曲していることが観察されることがあるため、必ず対照区を設置した。対照区における湾曲の原因は、ビーカーの壁に接して曲がる物理的なものと、内在のBLによることが考え

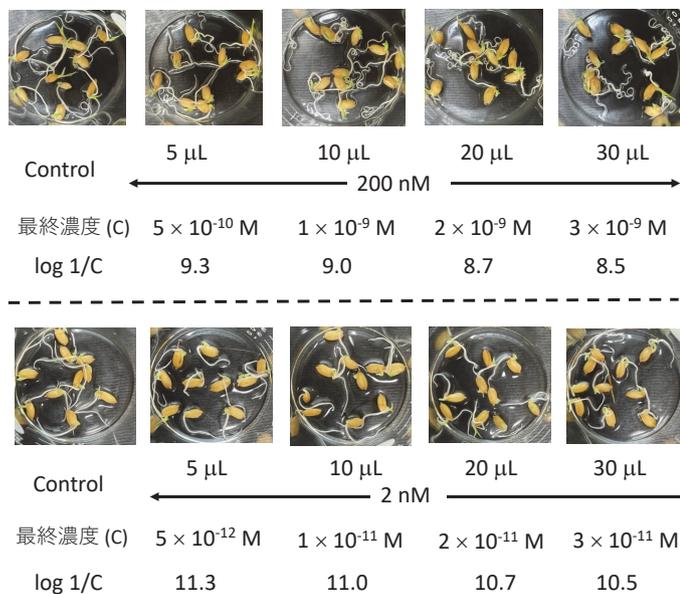


図-8 根に螺旋誘導を引き起こすBLの濃度応答

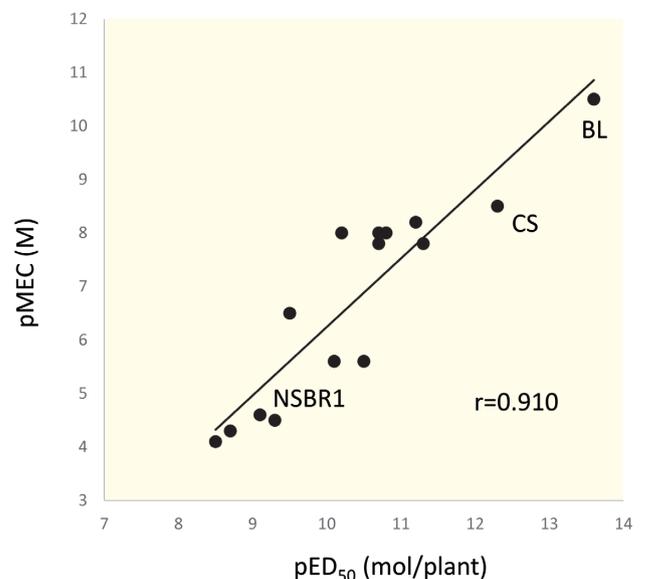


図-9 pMEC (螺旋誘導) と pED<sub>50</sub> (RLIA) の関係



Control BL ( $5 \times 10^{-11} \text{M}$ ) Brz (15 mM)

図-10 根に螺旋誘導を引き起こすBLの濃度応答

られた。内在のBLによるものかどうかは、発芽種子をブラシノライド生合成阻害剤 brassinazol で処理することで確かめた。図-10に示したように、brassinazol (Asamiら 2001) で処理すると根はまっすぐ伸長することが確認された。

発芽種子における螺旋誘導の観察は、非常に簡単で短時間で行うことができ、さらに活性を定量的に求めることが可能で、インシリコスクリーニングにおいて用いる活性評価系としてすぐれたものであることが示された。筆者らのグループが発見した NSBR1 は、 $2.5 \times 10^{-4} \text{M}$  の処理濃度において、半数以上の種子の根に螺旋誘導を引き起こした(図-11)。また、ブラシノステロイド類で得られた pMEC と pED<sub>50</sub> の直線関係で NSBR1 も関係づけることができた。活性が弱く RLIA で活性を求めることができなかったブラシノステロイド類 (Uesusukiら 2004) についても、確実に螺旋誘導が引き起こされ、BL 様活性化化合物であることが確認された。

## おわりに

筆者は、半世紀近く前に京都大学農学研究科農業化学講座で本格的に研究を始めた。修士論文のタイトルは『ニカメイチュウ (*Chilo suppressalis*) 皮膚組織培養系における昆虫成育阻害物質のクチクル形成阻害活性』(中川 1981) であった。すなわち、様々なキチン合成阻害剤の活性をニカメ



Control NSBR1  $5 \times 10^{-5} \text{M}$  NSBR1  $2.5 \times 10^{-4} \text{M}$

図-11 pMEC (螺旋誘導) と pED<sub>50</sub> (RLIA) の関係

イチユウの培養表皮を用いて定量的に測定することであった。筆者がブラシノステロイド研究を始めたのは、それから20年近く経った1997年であった。対象が昆虫から植物へ変わったが、どちらも分子設計に関連する研究であった。約半世紀に亘る分子設計の研究の軸は Hansch-Fujita によって考案された定量的構造活性相関 (Quantitative Structure-activity Relationship: QSAR) (Hansch and Fujita 1964; Fujitaら 1964) であった。研究を始めた頃”定量的”という言葉の重要性をあまり感じていなかったが、分子設計に計算化学的手法を導入していくにつれて、活性を”定量的”に扱うことの重要性を認識した。本稿で解説した新しいブラシノステロイドの活性評価系の構築においても、活性を定量的に求めることに拘った。最終的に活性を定量的に求めることができて、以前に RLIA 法で求めた活性と相関することを示すことができた。また、半世紀前に研究を始めた頃に関わったニカメイチュウの培養表皮系は、最初は顕微鏡で新しく形成されるクチクラの厚さを測定する方法であったが、活性を定量的に求めて QSAR 解析を行うことができた(中川 1981)。ただ、培養表皮系は、クリーンベンチ内でニカメイチュウの休眠幼虫を解剖して無菌培養するという非常に煩雑な方法で、その上、実験材料であるニカメイチュウを無菌的に飼育する必要があった。その後、この培養表皮を使って、脱皮ホルモン様活性測定にも利用した

が、実験材料の準備が大変で、つねに簡便な活性評価法を求め続け、昆虫培養細胞を使って簡単に脱皮ホルモン類の活性評価をできる系を構築した。実験対象が昆虫から植物へ変わったが、筆者が研究をはじめて半世紀後、簡便でその上再現性よく定量的に活性評価をできる系を構築することができた。ただ、昆虫のキチン合成阻害活性の測定には簡便な方法を見出すことができず、今でも従来の培養表皮系が必要である。最後に、ブラシノステロイドは、寒冷とか塩害などのストレス条件下で効果が認められるということで、期待されてきたが、他の植物ホルモンと同じようにブラシノステロイド様化合物が農業で実用化されることを期待している。

## 謝辞

植物化学調節の雑誌『植調』に執筆の機会を与えていただいた関係者の皆さまに感謝申し上げます。ブラシノステロイドの非ステロイド化を目指した研究を始めるにあたり貴重なご意見を頂き、またブラシノステロイド生合成阻害剤 brassinazol を恵与していただいた東京大学名誉教授の浅見忠男先生、共同研究でお世話になり、また本稿を精読していただきました京都大学生命科学研究科教授中野雄司先生に感謝申し上げます。また京都大学在職中、生物調節化学研究室の教授であった宮川恒先生およびブラシノステロイド研究に係わっていただいた学生の皆さまに心から御礼申し上げます。

## 文献

- Andersen, D. L. *et al.* 2001. Design, synthesis, and bioactivity of the first nonsteroidal mimetics of brassinolide. *J. Org. Chem.* 66, 7129-7141.
- Arai, H. *et al.* 2008. Synthesis of ponasterone A derivatives with various steroid skeleton moieties and evaluation of their binding to the ecdysone receptor of *Kc* cells. *Steroids* 73, 1452-1464.
- Asami, T. and Yoshida, S. 1999. Brassinosteroid biosynthesis inhibitors. *Trends Plant Sci.* 4, 348-353.
- Asami, T. *et al.* 2000. Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiol.* 123, 93-99.
- Back, T. G. *et al.* 2004. Enantioselective synthesis of the individual stereoisomers of a brassinolide mimetic. *Tetrahedron Asymm.* 15, 873-880.
- Clouse, S. D. *et al.* 1996. A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibit multiple defects in growth and development. *Plant Physiol.* 111, 671-678.
- Fujioka S. 1999. Natural occurrence of brassinosteroids in the plant kingdom in "Brassinosteroids" ed by Sakurai, S., Yokota, T., and Clouse, S. D. Brassinosteroids, Springer. pp. 21-45.
- Fujita, T. *et al.* 1964. A new substituent constant,  $\pi$ , derived from partition coefficients. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 5175-5180.
- Grove, M. D. *et al.* 1979. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* 281, 216-217.
- Hansch, C. and Fujita, T. 1964.  $\rho$ - $\sigma$ - $\pi$  analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1616-1626.
- Hothorn, M. 2011. Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1. *Nature* 474, 467-471.
- Ishiguro M. *et al.* 1980. Synthesis of brassinolide, a steroidal lactone with plant-growth promoting activity. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 962-964.
- Itami, K. *et al.* 2024. Compound having brassinosteroid-like activity. WO2024/172156 A1.
- Kenji M. 1980. Synthesis of a brassinolide analog with high plant growth promoting activity. *Agric. Biol. Chem.* 44, 1211-1212.
- Li, J. *et al.* 1996. A role for brassinosteroids in light-dependent of *Arabidopsis*. *Science* 272, 398-401.
- Li, J. and Chory, J. 1997. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in Brassinosteroid signal transduction. *Cell*, 90, 929-938.
- Maeda, E. 1965. Rate of lamina inclination in excised rice leaves. *Physiol. Plant.* 18, 813-827.
- 前田英三, 坂齊. 1968. イネ葉身傾斜速度の研究に関する新しい実験系の確立. 日本作物学会紀事. 37, 37-44.
- 丸茂晋吾, 和田弘次郎 1981. 新しい植物生長調節物質 Brassinolide. 植物の化学調節 16,1-10
- Marumo, S. *et al.* 1968. The presence of novel plant growth regulators in leaves of *Distylium racemosum* Sied. et Zucc. *Agric. Biol. Chem.* 32, 528-529.
- McMorris T. C. 1999. Chemical synthesis of brassinosteroids in "Brassinosteroids" ed by Sakurai, S, Yokota, T and Clouse S. D. (Springer), pp. 69-90.
- Mitchell, J. W. *et al.* 1970. Brassins - a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature* 225, 1065-1066.
- Mori, K. 1980. Synthesis of a brassinolide analog with high plant growth promoting activity. *Agric. Biol. Chem.* 44, 1211-1212.
- 増田芳雄 1992 植物ホルモン入門. 東京. オーム社.
- Nagata, N. *et al.* 2001. Brassinazole, an inhibitor of brassinosteroid biosynthesis, inhibits development of secondary xylem in cress plants (*Lepidium sativum*). *Plant Cell Physiol.* 42, 1006-1011.
- 中川好秋 1981. ニカメイチュウ (*Chilo suppressalis*) 皮膚組織培養系における昆虫成育阻害物質のクチクル形成阻害活性 (修士論文). 京都大学. 京都.
- 中川好秋ら 2022. 20世紀末までの医薬・農業に関わる日本の有機化学の研究史. その4: 20世紀の農学系分野における傑出した有機化学者. 薬史学雑誌 57, 79-92.
- Nakagawa Y. *et al.* 1995. Three-dimensional quantitative structure-activity analysis of steroidal and dibenzoylhydrazine-type ecdysone agonists in "Classical and Three-Dimensional QSAR in Agrochemistry" (ACS Symp. Ser., 606) ed. By Hansch, C. and Fujita, T. (American Chemical Society), pp. 288-301.
- Nakagawa, Y. *et al.* 2018. Production of non-steroid compound having plant steroid hormone (brassinolide)-like activity. WO 2018/159827 A1.
- Nakagawa, Y. *et al.* 2021. Effects of brassinolide on the growing of rice plants. *J. Pestic. Sci.* 46, 274-277.
- 中野雄司 2021. ブラシノステロイドのケミカルバイオロジー研究の農業への応用展開に向けて. 植調 55, 193-197.
- Nishikawa, B. *et al.* 2023. Quantitative evaluation of the biological activity of various brassinosteroids using spiral root induction in rice seeds. *J. Pestic. Sci.* 48, 218-224.
- 野津喬 1998. 植物生長物質ブラシノステロイド類の定量的活性評価系の確立および新規活性物質の探索 (卒業論文). 京都大学. 京都.
- Santiago, J. *et al.* 2013. Molecular mechanism for plant steroid receptor activation by somatic embryogenesis co-receptor kinases. *Science* 341, 889-892.
- Sekimata, K. *et al.* 2001. A specific brassinosteroid biosynthesis inhibitor, Brz2001: evaluation of its effects on *Arabidopsis*, cress, tobacco and rice. *Planta* 213, 716-721.
- She, J. *et al.* 2011. Structural insight into brassinosteroid perception by BRI1. *Nature*, 474, 472-476
- Sugiura, A. *et al.* 2017. Discovery of a nonsteroidal brassinolide-like compound, NSBR1. *J. Pestic. Sci.* 42, 105-111.
- Sugiura, A. *et al.*, 2018a. Erratum to "Discovery of a nonsteroidal brassinolide-like compound, NSBR1 [J. Pestic. Sci., 42, 105-111 (2017)]". *J. Pestic. Sci.* 43, 55
- Sugiura, A. *et al.*, 2018b. Errata to "Discovery of a nonsteroidal brassinolide-like compound, NSBR1 [J. Pestic. Sci., 42, 105-111 (2017)]". *J. Pestic. Sci.* 43, 224.
- 瀧本征佑 2012. 非ステロイド型ブラシノステロイド様活性化合物の合成とホルモン活性の評価 (卒業論文). 京都大学. 京都.
- Takimoto, S. *et al.* 2016. In silico exploration for agonists/antagonists of brassinolide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26, 1709-1714.
- Takimoto, S. *et al.* 2022. Structure modification of nonsteroidal brassinolide-like compound, NSBR1. *Biosci. Biotech. Biochem.* 86, 1004-1012.
- Uesusuki, S. *et al.* 2004. Synthesis of brassinosteroids of varying acyl side chains and evaluation of their brassinolide-like activity. *Biosci. Biotech. Biochem.* 68, 1097-1105.
- Wada, K. *et al.* 1981. Brassinolide and homobrassinolide promotion of lamina inclination of rice seedlings. *Plant and Cell Physiol.* 22, 323-325.
- Wada, K. *et al.* 1985. A simple bioassay for brassinosteroids: A wheat leaf-unrolling test. *Agric. Biol. Chem.* 49, 2249-2251.
- Watanabe, B. *et al.* 2003. Synthesis of a castasterone/ponasterone hybrid compound and evaluation of its molting hormone-like activity. *J. Pestic. Sci.* 28, 188-193.
- Watanabe, B. *et al.* 2004a. A simple synthesis of 6-deoxoteasterone and its 20-epimer. *Tetrahedron Lett.* 45, 2767-2769.
- Watanabe, B. *et al.* 2004b. Stereoselective synthesis of (22R)- and (22S)-castasterone/ponasterone A hybrid compounds and evaluation of their molting hormone activity. *Steroids*, 69, 483-493.
- Watanabe, B. *et al.* 2017. Brassinolide-like activity of castasterone analogs with varied side chains against rice lamina inclination. *Bioorg. Med. Chem.* 25, 4566-4578.
- 渡辺文太 2004. Castasterone 側鎖の立体選択的構築と構造変換に関する研究 (博士論文). 京都大学. 京都
- Wing, K. D. 1988. RH5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: Effects on *Drosophila* cell line. *Science* 241, 467-469.
- Wing, K. D. *et al.* 1988. RH5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: Effects on larval *Lepidoptera*. *Science* 241, 470-472.
- Wolber, G. and Langer, T. 2005. LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *J. Chem. Inf. Model.* 45, 160-169.
- Yamamoto, S. *et al.* 2006. Synthesis of 26,27-bisnorcastasterone analogs and analysis of conformation-activity relationship for brassinolide-like Activity. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 1761-1770.
- Yokota, T. *et al.* 1982. Castasterone, a new phytosterol with plant-hormone potency, from chestnut insect gall. *Tetrahedron Lett.* 23, 1275-1278.