

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

京都大学大学院
生命科学研究所
中野 雄司

はじめに

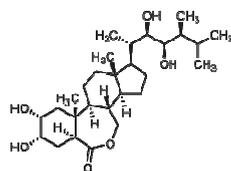
植物生理学の観点からの定義において、植物ホルモンは、「多くの種類の植物種において広く生産され、低濃度において植物の生理過程を明瞭に調節する化合物」とされている（高橋・増田 1994, など）。21 世紀に入っても、新しくストリゴラクトンや多種類のペプチドホルモンがこの定義に一致する化合物と認定され、植物ホルモンに仲間入りしている。さらに、化学分析機器の感度や精度の向上、オミクス解析技術の進化、構造生物学や情報科学の発展、なども背景に、現在も様々な天然の植物生理活性化合物の探索や機能解析が進められている。このように新しい植物ホルモンの単離・同定に始まる生理活性、生合成から受容体・シグ

ナル伝達機構の解明研究は、植物の成長や環境応答機構、病害抵抗性などにおける未解明の領域を明らかにし、また、植物ホルモンの持つ強い生理活性は、人工合成植物ホルモン類や植物化学調節剤の創製研究にも広がりつつ、農業などへの実用化展開も広く試みられてきている。このような基礎研究と応用研究の両方における研究の歴史と現在の活況状況は、植物ホルモン研究の未来が明るい展望に満ちていることを示している。

この植物ホルモンの中で、研究歴が比較的新しい部類となるブラシノステロイドは、1977 年にアメリカ農務省における発見と構造決定の第 1 報告がなされている。1980 年代になると東京大学農学部においてカスタステロンをはじめとして多くの類縁体が報告されるようになり、その後の研究に

よって、植物の多岐に渡る成長ステップにおいて、総じて促進的な機能を持つことが明らかとなった。具体的には、植物の発芽促進、葉・茎・根の成長促進、果実形成の促進、植物病害抵抗性の向上、植物の環境ストレス耐性の向上、などである（Nakano and Asami 2014）（図 -1）。これらの複数の有用活性をみると農業現場への展開に興味を持たれるが、残念ながら、現時点ではまだ実用化には至っていない。その原因としては、天然のブラシノステロイドが植物中に非常に微量でしか内生しないこと、人工合成反応に複雑なステップが多数存在することが挙げられる。また、天然型ブラシノステロイドは、野外試験では、安定性が低いという研究報告もあり、コストのみでなく、化学構造の検討も課題であると考えられる。筆者らは、基礎研究

器官伸長促進
葉緑体制御
環境ストレス耐性向上
病害抵抗性向上



ブラシノステロイド (BR)

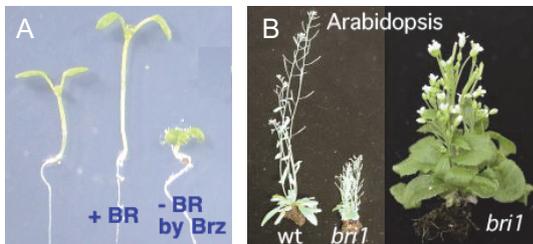


図 -1 ブラシノステロイドの生理活性は総じて促進的である
A: アラビドプシス明所発芽時のブラシノステロイド処理 (+BR) は胚軸伸長を促進し、ブラシノステロイド生合成阻害剤処理 (+Brz) は抑制する。
B: ブラシノステロイド受容体欠損突然変異体 *bri1* は矮性形態を示す

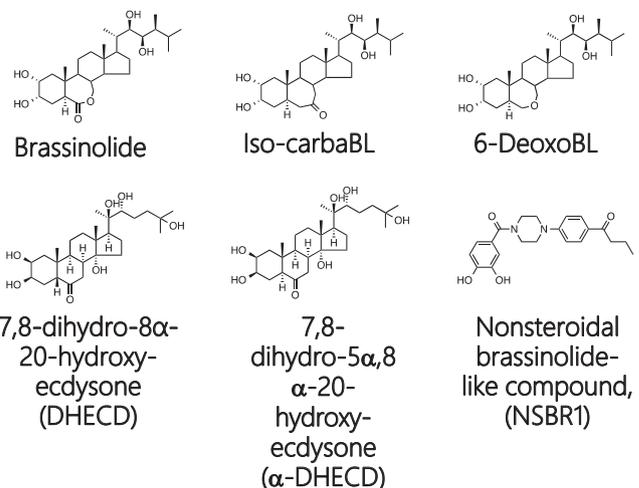


図 -2 ブラシノステロイド活性を持つ化合物

と実用研究の双方での活用へ向けて、ブラシノステロイド活性を持つ合成化合物、ブラシノステロイドの生合成阻害化合物、またこれらの化合物を活用するケミカルバイオロジー研究によるブラシノステロイドのシグナル伝達機構の研究を進めている。

1. ブラシノステロイド様活性化合物

6-Deoxo-6a-oxo-6a-carba BL (Iso-carba BL) および 6-deoxobrassinolide (6-Deoxo BL) は、ブラシノステロイドのB環(ステロイド骨格を形成する4つの環状構造の下段右側の環)の化学構造について、ラクトン体(Brassinolide)、ケトン体(Iso-carba BL)、デオキソ体(6-Deoxo BL)の構造活性相関研究を行うことを一つの目的として、合成した化合物である(図-2)(Nakamura *et al.* 2017)。双子葉植物は、ブラシノステロイド生合成酵素を欠損した場合、胚軸や葉、花茎が矮化した形態を示すが、この矮性形態へのブラシノステロイド類縁化合物の投与による回復性を元にした活性測定が用いられている。筆者らは、この系を用いてアラビドプシスの生合成遺伝子欠損変異体 *det2* (*de-etiolation2*) とにおける形態回復活性と、下流のブラシノステロイド応答性遺伝子の発現解析を行い、Iso-carba BL と 6-Deoxo BL が、共に Brassinolide と同等の活性を示すことを明らかにした。一方、単子葉植物

においては、葉の基部にブラシノステロイド類縁化合物を投与し、葉が外側に曲がる性質を利用したラミナジョイントアッセイによる活性測定が用いられ、単子葉のモデル実験植物でもあるイネにおいても多く用いられる。このイネのラミナジョイントアッセイと下流の応答性遺伝子発現を用いた解析では、6-DeoxoBL は BL と同等の活性を示したが、Iso-carba BL は活性を示さなかった。この結果について、ブラシノステロイド受容体であるアラビドプシス AtBRI1 とイネ OsBRI1 について、*in silico* において作成した両受容体の3次元立体構造モデルとのドッキングシミュレーションを行ったところ、6-DeoxoBL は、AtBRI1 および OsBRI1 の双方と密接な相互作用を示すことが予測されたが、Iso-carba BL の場合は AtBRI1 との間では相互作用が予測されるアミノ酸が、OsBRI1 との間においては相互作用性が若干低くなる可能性が予測された。このような精密な受容体と化合物の親和性の相違が、積み重なって生理活性の違いとなっている可能性が考察されている。このような双子葉植物と単子葉植物との間の異なる生理活性は、将来的に、除草剤や植物成長調節剤を開発する際の手掛かりになると期待される。

Ecdysteroid (エクダステロイド) は、ステロイド骨格を持つ化合物であり、主に、昆虫の脱皮を誘発する脱皮ホルモンである。熱帯地域のタイ国などに生育するシソ科植物 *Vitex glabrata* は、興味深いことに、この昆

虫エクダステロイドの類縁化合物を生合成する。進化的見地からは、昆虫によって捕食されにくくするための防虫効果によって特殊な植物に獲得された化合物ではないかと考えられる。この植物性のエクダステロイドは、4 kg の植物から約 60g の化合物を精製によって得ることが可能であり、40kg のアブラナの花から 4mg しか得られない植物ブラシノステロイドと比較して、非常に多量に植物体中に生合成される。このような生産量の多さに由来する実用化展開への期待と、植物における昆虫ステロイドホルモンの進化的保存性への興味から、これらの化合物の植物における生理活性の解析を行った。東京大学の浅見と筆者らは、天然に存在する Ecdyson (ECD), と、ECD を化学的に変換させた 7,8-dihydro-8 α -20-hydroxyecdysone (DHECD), 7,8-dihydro-5 α ,8 α -20-hydroxyecdysone (α -DHECD) (図-2) を比較解析した結果、イネのラミナジョイントアッセイ、実験植物アラビドプシスのブラシノステロイド阻害剤 Brz による胚軸の矮性形態からの回復活性を示すことが明らかとなった。さらに、ブラシノステロイド応答性遺伝子の発現解析において、少なくとも DHECD と α -DHECD は、若干弱いながらも確かなブラシノステロイド様の生理活性を示すことも確認された(Thussagunpanit *et al.* 2017)。上述した通り、ECD は *Vitex glabrata* から大量に入手が可能であり、ECD から DHECD と α -DHECD への合成



図-3 ブラシノステロイド生合成阻害活性を持つ化合物

も高効率な反応系が見つけられている。今後、より活性の高い植物性エクダイスステロイドの開発と共に、非常に興味深い。

ブラシノステロイドのステロイド骨格は、土壌中では安定性が低い場合があり、農業利用においては、改良の余地があると考えられている。そのような背景を元に、非ステロイド型ながら、植物にブラシノステロイド様活性を持つ化合物の開発も試みられている。近年では、このような化合物の設計（ドラッグデザイン）に、既に報告されているブラシノステロイド受容体 BRII の3次元立体構造と候補化合物のドッキングシミュレーションやモレキュラーダイナミクス法（MD, 分子動力学法）が用いられている。これらの新しい手法を駆使して京都大学の中川らによって Nonsteroidal brassinolide-like compound (NSBR1) (図-2) が、設計・創製された。イネのラミナジョイントアッセイに加え、アラビドプシスの Brz と化合物の共処理による矮性形態からの回復実験、下流のブラシノステロイド応答性遺伝子発現解析によって、確かなブラシノステロイド様活性を示すことを明らかとなった (Sugiura *et al.* 2017)。このようなステロイド骨格とは異なる化学構造を母体としたブラシノステロイド化合物の創製が可能であることを示したことは、より安定性が高く、また、可能な限りコストも抑えた新しいタイプのブラシノステロイド化合物の創製が可能であることを示し得たと考えられ、その将来性が期待される。

2. ブラシノステロイド生合成阻害化合物

ブラシノステロイドの生合成阻害剤については、東京大学の浅見らを中心とする共同研究グループによる精力的な創製を始めとして、多くの開発が試みられている。図-3の化合物は全てアゾール型のブラシノステロイド生合成阻害剤であり、Brz91 から Triadimefon までの作用部位はブラシノステロイド側鎖 22 位水酸化に関わるチトクローム P450 酸化酵素 DWF4 であることが明らかにされている。Brz91, 2001, 220 はブラシノステロイド研究に広範囲に使われており、総称として Brz と呼称することが多い (Nakano *et al.* 2014)。

比較的近年になって、秋田県立大の王と筆者らは、DWF4/CYP90B1 の類縁酵素ながら特異的阻害剤が得られていなかった CYP90D1 酸化酵素の阻害剤として YCZ-18 を創製し、その生理活性を明らかにした (図-3) (Oh *et al.* 2015a)。また、微生物のエルゴステロール生合成阻害活性を持つ殺菌剤であり、農薬としても登録され使用されている Fenarimol が、植物においては CYP90D1 酸化酵素の阻害活性を持つことも明らかとした (図-3) (Oh *et al.* 2015b)。異なる化学構造や異なるターゲットに対する生合成阻害剤が今後も創製されることは、各生合成ステップの詳細な解明に役立つと共に、安価なブラシノステロイド生

成阻害剤開発への道筋にもなると期待される。

3. ブラシノステロイドのシグナル伝達機構

1990年代に入って広がったアラビドプシスをを用いた分子遺伝学は、遺伝子レベルのブラシノステロイド研究を加速度的に推進した。アメリカ・ソーク研究所のコーリー博士らによって、暗所においても胚軸が短く子葉が開く暗所下光形態形成を示し、ブラシノステロイド投与で形態が回復する突然変異体から、ブラシノステロイド生合成欠損変異体 *det2* が発見されたことを皮切りに、世界各地で同向の突然変異体の探索が進み、多くの生合成ステップが明らかにされた。さらに同グループによって、暗所下光形態形成を示しながらブラシノステロイド投与で形態が回復しない突然変異体から、ブラシノステロイド受容体として1回膜貫通型の Ser/Thr キナーゼ BRII (Brassinosteroid-insensitive1) も単離された。2つの論文は1997年のPNASとCellに立て続けに報告されている。ブラシノステロイドが発見された1970年後半からこの時期にかけて、ブラシノステロイドは植物ホルモンの分類には入り得ない、というのが国際的な植物生理学会の見解であったが、それはブラシノステロイドによる生理作用が、既知のオーキシンやサイトカイニンに比べると明瞭では無いと考察されていたことが主要な理由の一

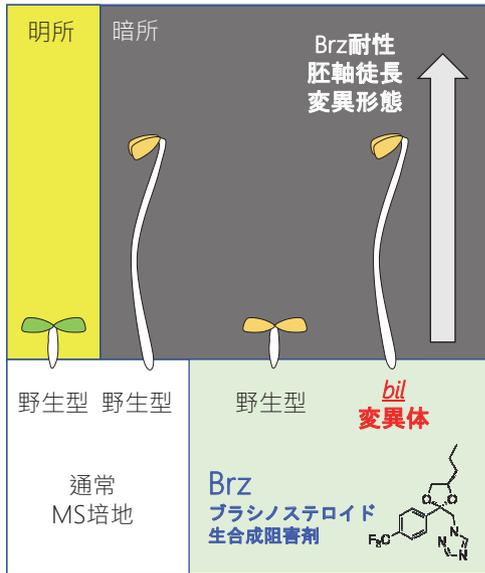


図-4 プラシノステロイド生合成阻害剤 Brz を用いたプラシノステロイドシグナル伝達結成型突然変異体の選抜戦略

つであった。その状況下において、このアラビドプシスにおけるブラシノステロイド生合成酵素遺伝子や受容体遺伝子欠損突然変異体が、野生型植物に比べて非常に強い矮性形態を示し、同時期に東京大学の横田らにより単離されたエンドウマメにおけるブラシノステロイド欠損変異体が同じ傾向の非常に強い矮性形態を示すことが明らかにされたことは、ブラシノステロイドが多種類の植物の形態形成において非常に重要な役割を果たしていることを示す、と認識されるようになった。その結果、ブラシノステロイドは植物ホルモンの分類内に入ると定義されることとなった。

天然化合物が持つ生理活性は植物が進化の過程で獲得した時点で既に植物によっては自明の生理現象であり、その化合物が植物ホルモンに分類されようがされまいが、植物自身の生活にとっては何も関係のない植物生理学者達の勝手な議論とも言える。しかし、この1996年頃からブラシノステロイドに関する学術論文は急激に増えてお

り、その生理活性発現機構の解明が劇的に進行した。研究成果の定義付け、格付け、が研究の発展には重要な時があるということ、基礎研究だけでなく応用研究にも当てはまることではないだろうか。

続いて、このBRI1の発見によりブラシノステロイドの受容が細胞表面で行われることが明らかになったため、受容体から細胞核まで情報を伝えるシグナル伝達機構の解明が期待された。そこで、筆者らは、上述のブラシノステロイド生合成阻害剤 Brz 存在下で暗所発芽したアラビドプシス野生型株がブラシノステロイド欠損突然変異体と同様に暗所光形態形成を示すことに注目し、この Brz 条件下においても胚軸徒長かつ子葉閉鎖の形態を示す耐性突然変異体が単離され得れば、その変異体はブラシノステロイドのシグナル伝達経路が活性化された突然変異体と位置付け得ると着想した。その考えに基づく探索の中で、最初の強い変異形質は、アラビドプシス遺伝学の初期から用いられてきた点突然変異

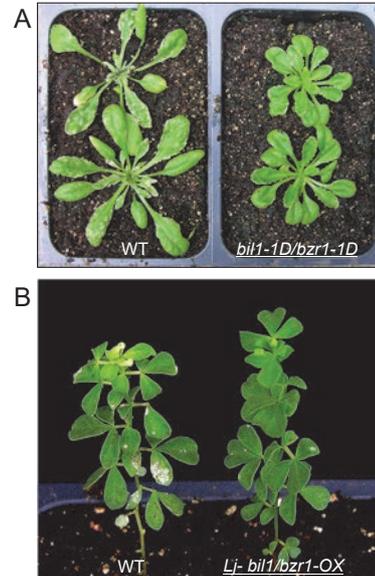


図-5 プラシノステロイドシグナル伝達のマスター転写因子 BIL1 の高発現化植物は難防除害虫アザミウマへの食害耐性を示す
A: アラビドプシス BIL1 活性型変異体 bil1-1D と野生型のアザミウマ食害試験
B: マメ科ミヤコグサ BIL1 高発現型形質転換体 Libil1-OX と野生型のアザミウマ食害試験

を誘発する EMS 処理によって作成された変異種子から得られ、*bill-1D* (*Brz-insensitive-long hypocotyl1-1D*) と命名した(図-4)。その後、上述のアメリカ・ソーグ研究所のコーリー博士の研究室に筆者が留学して研究を行い、原因遺伝子の単離に至った (Wang *et al.* 2002)。さらにその後の研究によって、BIL1/BZR1 および BES1 は、bHLH 型の転写因子として、各々約 3000 種の遺伝子の発現を制御する活性を持つことが明らかにされている。アラビドプシスの全ゲノム解析によって、推定される遺伝子数は約 26000 種であり、約 10% 強をこの遺伝子ファミリーが制御していることから、ブラシノステロイドのシグナル伝達のマスター転写因子として働いていると考えている (Nosaki *et al.* 2018)。

この *BIL1/BZR1* 遺伝子の周辺でさらに展開している農業利用も可能な形質についても紹介したい。筆者らが単離した *BIL1/BZR1* の機能獲得型アラビドプシス突然変異体 *bill-1D* および *BIL1/BZR1* を高発現させた遺伝子組換えミ

ヤコグサ（マメ科モデル植物）について、難防除害虫アザミウマの摂食試験を行ったところ、野生型植物と比べてアザミウマの摂食痕数が確かに減少する傾向を示すことが明らかとなった（図-5）。この耐性原理について解析を行ったところ、傷害応答の植物ホルモンであるジャスモン酸により誘導されるマーカー遺伝子として用いられる *VSP2* と *LOX2* 遺伝子の発現がアラビドプシス突然変異体 *bill-D* において、ミヤコグサの *LjVSP1b* 遺伝子発現も *BIL1/BZR1* 高発現型ミヤコグサにおいて、共に上昇していることが明らかとなった。これらのことより、*BIL1/BZR1* 遺伝子はブラシノステロイドのみでなく、ジャスモン酸のシグナル伝達経路ともクロストークし、植物にアザミウマの摂食耐性を誘導していると考えられている（Miyaji ら 2014）。

bill-ID 変異体と同様の Brz 耐性の胚軸徒長型変異体として単離した *bil2-ID* は、変性したタンパク質の修復を行うシャペロン因子 DnaJ/HSP40 と相同性の高い新規遺伝子が高発現したことによって変異形態を示すことが明らかにされている。この変異体は、胚軸伸長に代表される成長促進活性に加えて、環境ストレスに耐性を示す活性を持つことが明らかとなっている。すなわち、実験植物アラビドプシス野生型植物は、高塩濃度条件、強光条件、において、成長が阻害されることが知

られるが、この *BIL2* 遺伝子が高発現した *bil2-ID* 変異体は、この条件下において生育可能であり、確かなストレス耐性を示した。この生理活性の発現機構としては、ストレス環境下において変性したタンパク質の *BIL2* タンパク質による修復活性によるものではないかと考察している（Bekh-Ochir *et al.* 2013）。

おわりに

このようなブラシノステロイドのシグナル伝達遺伝子による植物の成長促進、害虫への摂食害耐性や環境ストレス耐性の向上化研究は、ブラシノステロイド類縁化合物や阻害剤、さらにシグナル伝達遺伝子の形質転換体やゲノム編集植物を用いることによって、植物成長を促進する技術開発が可能であることを示していると考えられる。今後、ケミカルと遺伝子を組み合わせた複合型ケミカルバイオロジー育種によって、農業生産量や緑地保全の促進に向けた技術開発に貢献したいと考えている。

文献

Bekh-Ochir, D. *et al.* 2013. A novel mitochondrial DnaJ/Hsp40 family protein BIL2 promotes plant growth and resistance against environmental stress in brassinosteroid signaling. *Planta* 237, 1509-1525.

Miyaji, T. *et al.* 2014. A master transcription factor BIL1/BZR1 in brassinosteroid signalling increases resistance against plant feeding by insect. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 960-8.

Nakamura, A. *et al.* 2017. Molecular actions of two synthetic brassinosteroids, iso-carbaBL and 6-deoxoBL, which cause altered physiological activities between Arabidopsis and rice. *PLoS One* 12, e0174015 .

Nakano, T. *et al.* 2014. Brassinosteroid signalin and biosynthesis'. *Plant Chemical Biology*, John Wiley & Sons Inc., pp.128-144.

Nosaki, S. *et al.* 2018. Structural basis for brassinosteroid response by BIL1/BZR1. *Nature Plants* 4, 771-776.

Oh, K. *et al.* 2015a. YCZ-18 is a new brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *PLoS One* 10, e0120812 (2015a).

Oh, K. *et al.* 2015b. Fenarimol, a pyrimidine-type fungicide, inhibits brassinosteroid biosynthesis. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 17273-17288.

Sugiura, A. *et al.* 2017. Discovery of a nonsteroidal brassinolide-like compound, NSBR1. *J. Pestic. Sci.* 42, 105-111.

高橋信孝・増田芳雄 1994. 植物ホルモンハンドブック. 東京都, 培風館.

Thussagunpanit, J. *et al.* 2017. Characterization of synthetic ecdysteroid analogues as functional mimics of brassinosteroids in plant growth. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 172, 1-8.

Wang, Z., Nakano, T. *et al.* 2002. BZR1 is a novel nuclear protein that mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Developmental Cell* 2, 505-513 (2002)