

ブラシノステロイド生合成阻害剤の実用化検討

植物雄性不稔誘導活性の検証

王敬銘, 星智樹, 山田和弘

秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科

植物ホルモンは、植物の生育・成長において中心的な役割を担う生理活性物質である。筆者らは、植物ホルモンの機能解明を目的に、植物ホルモンの生合成を抑制したり、そのシグナル伝達機構を活性化させたりする機能物質を研究している。本研究では、ブラシノステロイド (BR) が植物の雄性不稔に関与していることに着目し、筆者らが創製した BR 生合成阻害剤 YCZ-18 について、植物雄性不稔の誘導活性を検証した。様々な薬剤処理条件を検討の結果、YCZ-18 が BR 生合成遺伝子突然変異体と同じ形態を誘導するには、10 nmol/plant の薬量が必要であることを明らかにした。さらに、YCZ-18 の植物雄性不稔誘導活性を検証するため、シロイヌナズナの種子形成率と花粉の発芽率を指標に YCZ-18 の生物活性を検討した。YCZ-18 は部分的にシロイヌナズナの種子形成を抑制し、花粉の発芽を阻害した。花粉発芽を 100%抑制させるには、100 μ M 濃度の YCZ-18 が必要である。また、本研究を通じて、YCZ-18 を利用した植物雄性不稔誘導技術の開発において新たな研究課題を発見した。

キーワード： 1 植物ホルモン 2, ユカイゾール 3, ブラシノステロイド生合成阻害剤 4, 雄性不稔 5, シロイヌナズナ

植物は、光、温度、水分、病原菌など様々な環境因子に対して、高度なシグナル伝達機構を介して、的確な遺伝子発現制御機構により、巧みに受容・応答する機能を備えている。植物ホルモンは、これらシグナル伝達機構において中心的な役割を担うシグナル伝達物質である (Lau et al., 2010)。これまでの研究から、オーキシンをはじめとする 8 種類の植物ホルモンが明らかにされているが、多様な環境要因に対して、植物は、各植物ホルモンのシグナル伝達機構を作動させるとともにクロストークを通じて、最適な遺伝子発現制御や代謝調節などを行っていると考えられている (Durbak et al., 2012)。

植物ホルモンの遺伝子発現制御機能を解明するには、ホルモン間のクロストークを解明する必要がある。そのため、各植物ホルモンの生合成を制御する技術が不可欠である。すなわち、植物ホルモンの生合成を必要に応じて遮断したり、促進したりする技術は、植物ホルモンのクロストーク分子機構の解明に必要とされている。

植物ホルモン生合成遺伝子突然変異体が植物ホルモンの生合成を遮断できることから、植物ホルモン機能解析やホルモン間のクロストーク研究に利用されてきた。しかし、遺伝子突然変異体を用いた研究手法では、変異した遺伝子が種子に組み込まれているため、植物ホルモンの生合成が発芽の時点で遮断されることが多い。近年、植物の各生育ステージに適用でき、また、植物種や組織に限定することなく、より柔軟な植物ホルモン生合成を遮断する技術の開発が望まれる (Blackwell et al., 2003)。

植物ホルモン生合成阻害剤は、植物ホルモン生合成を有効に遮断できる。また、阻害剤は植物種や組織に限定することなく、植物に与えることで、植物の各生育ステージにおいて、植物ホルモンの生合成を柔軟に欠損させることができる。また、阻害剤の影響を取り除く方法も簡便であるため、植物ホルモン生合成阻害剤は、植物ホルモンのクロストークの分子機構解明において極めて有効なツールとして利用されている (Blackwell et al., 2003)。

筆者らは、植物ホルモンであるブラシノステロイド (BR) 生合成阻害剤の開発研究を行ってきた。シロイヌナズナ、トマトおよびイネの BR 欠損遺伝子突然変異植物の解析から、数多くの P450 酵素が BR 生合成酵素として同定されている (Sakurai et al., 1997)。ゆえに、BR 生合成阻害剤を開発するには、P450 阻害剤開発モデルに基づく探索が有効である。

筆者らは、様々な P450 に阻害活性を示すケトコナゾールを土台分子として、新規 BR 生合成阻害剤を鋭意探索した結果、強い活性を示す新規阻害剤を発見した (Oh et al., 2012; Yamada et al., 2012)。さらに構造活性相関解析研究を進めた結果、世界で最も強い活性を示す YCZ-18 を見出した (Yamada et al., 2013; Oh et al., 2013)。YCZ-18 は植物細胞内の BRs レベルを低下させるとともに、BR 生合成遺伝子欠損植物と同じ形態を誘導する (Oh et al., 2015)。

本研究では、YCZ-18 の実用化を念頭に、BR が植物の雄性不稔を制御する知見に基づき (Ye et al., 2010, Choe et al., 1998, Ohnishi, et al., 2012), YCZ-18 の植物雄性不稔誘導活性の検証を研究目的とした。

材料および方法

シロイヌナズナの栽培

パーミキュライトとプロミック PGX を 1 : 1 で混合し、1,000 倍希釈したハイポネックス水を適量添加して混ぜ合わせたのち、オートクレーブで滅菌する。室温まで冷やしてから栽培用ポットに土を詰め、1,000 倍希釈したハイポネックス水を底面より吸水させる。種子 (Colombia ecotype) をピンセットで拾い上げ、吸水した土上に置く。ポットを栽培棚に移し 22 度~23 度 (湿度 50~60%) で明期 16 時間と暗期 8 時間で栽培する。3 日に一度、1,000 倍希釈したハイポネックス水を底面吸水させる。

シロイヌナズナの薬剤処理と形態観察

植物の雄性不稔を調べるには、種子の形成率と種子の形態観察に基づく方法が知られている。本研究では、YCZ-18 処理区と無処理区を設け、YCZ-18 処理区の種子形成率を指標に検討することにした。薬剤の処理法は、筆者らが発表した方法に基づいて、

様々な YCZ-18 濃度の水和液を調製して植物に与え、検討を行った (Oh et al., 2015)。

花粉の培養と発芽率の検測

植物の雄性不稔を検証するには、花粉の発芽機能を調べることは有効である。本研究では、YCZ-18 の植物花粉発芽阻害活性を調べることにした。花粉発芽固形培地は、Fan らの方法に従い作成した (Fan et al., 2001)。有機溶媒 (DMSO) を 0.1% 以下なるように無処理区と所定濃度の YCZ-18 を培地に添加して薬剤処理区を作成した。

200 から 300 のシロイヌナズナ花から花粉を集め、上記固形培地に散布し、20 度で (湿度 100%) 12 時間培養後、花粉の発芽を顕微鏡で観察した。

結果

YCZ-18 で処理したシロイヌナズナの形態

筆者らは既に YCZ-18 の作用機構を明らかにした (Oh et al., 2015)。本研究では、シロイヌナズナに対して YCZ-18 の雄性不稔誘導活性を検討するため、植物の矮化誘導活性を指標に、様々な YCZ-18 処理条件を検討し、BR 欠損させる有効な YCZ-18 の処理方法を検討することにした。様々な YCZ-18 濃度で処理したシロイヌナズナは、無処理区に比べ、異なる矮化形態を示したが、10 nmol/plant の薬量で処理したシロイヌナズナは、無処理区に比べ、顕著な矮化形態を示した (図 1 参照)。図に示されたように、

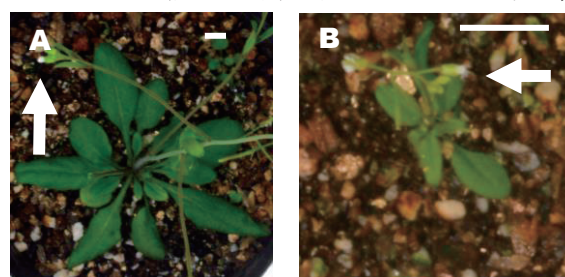


図 1 シロイヌナズナの形態

無処理区と YCZ-18 を 10 nmol/plant の薬量でシロイヌナズナに与え、16hr-light/8hr-dark の明暗周期で 4 週間生育した植物を示した。A: 無処理区; B: YCZ-18 処理区。スケールバー: 0.5 mm。本実験は三回行い、再現性を確認した。

YCZ-18 処理区のロゼットの直径は約 0.8 ± 0.2 cm に対し、無処理区ではロゼットの直径が約 9.2 ± 1.2 cm

であった。また、両処理区では、花の咲く時期がほぼ同じであることから（矢印で示した）。YCZ-18 はシロイヌナズナの矮化形態を誘導し、BR 生合成を有効に阻害した（Oh et al., 2015）。

YCZ-18 で処理したシロイヌナズナの種子形成率

以上の検討を踏まえ、本研究では、YCZ-18 の植物雄性不稔誘導活性を検討するため、種子の形成率と種子の形態を計測した。その結果を表 1 にまとめた。無処理区の種子形成率が 100% に対し、YCZ-18 処理区では種子の形成率が $36 \pm 5\%$ であることが示された。このことから、YCZ-18 処理により、シロイヌナズナの種子形成率が著しく低下することが明らかとなった。また、種子の形成に重要な要因である鞘の発達を計測した結果、無処理区の 1.4 ± 0.2 cm に対し、YCZ-18 処理区では 0.5 ± 0.1 cm であることが明らかになった。これは、薬剤処理による矮化形態に起因する現象かどうかをより詳細に検討するため、本研究では薬剤処理した花粉の機能発現を検討することにした。

表 1 シロイヌナズナの種子形成率と形態

	無処理区	YCZ-18 処理区
種子の形成率	100 (%)	36 ± 5 (%)
鞘の長さ	1.4 ± 0.2 (cm)	0.5 ± 0.1 (cm)

YCZ-18 の花粉発芽阻害活性

花粉の発芽を検討するため、様々な濃度の YCZ-18 を含む花粉発芽固形培地を作成し、開花後 1 時間から 6 時間の花粉を集め、花粉発芽固形培地に散布し、YCZ-18 のシロイヌナズナ花粉発芽阻害活性を調べた。その結果を図 2 に示す。

図に示されたように、無処理区では（図 2 A）、花粉の発芽が示され、試験に用いた花粉の機能は健全であることが示された。他方、YCZ-18 処理区では（図 2 B～2 D）、 $1 \mu\text{M}$ 濃度の YCZ-18 を含む培地に発芽させた花粉は、無処理区（図 2 A）に比べ、明瞭な差が観察されなかった。このことから、有効に花粉の発芽を抑制するには、高濃度の YCZ-18 で

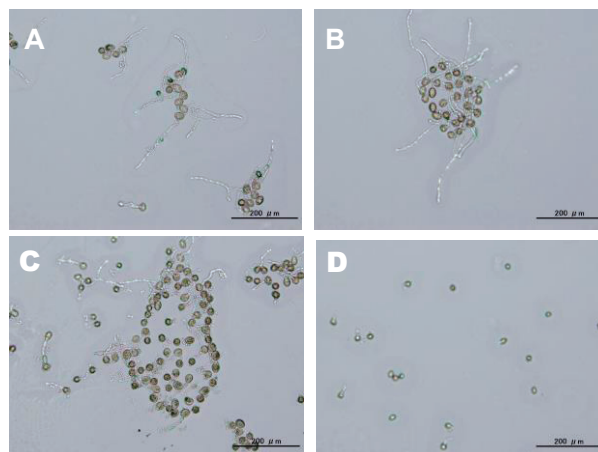


図 2 YCZ-18 の花粉発芽阻害活性

所定濃度の YCZ-18 をシロイヌナズナ花粉発芽固形培地に加え、20 度で（湿度 100%）12 時間培養後、花粉の発芽を顕微鏡で観察した。A：無処理区（YCZ-18 濃度=0）；B：YCZ-18 ($1 \mu\text{M}$)；C：YCZ-18 ($10 \mu\text{M}$)；D：YCZ-18 ($100 \mu\text{M}$)。本実験は三回行い、再現性を確認した。

処理が必要であることを示した。 $10 \mu\text{M}$ の YCZ-18 を含む培地では（図 2 C）、花粉の発芽が部分的にされたことが観測され、 $100 \mu\text{M}$ の YCZ-18 存在下では、花粉の発芽がほぼ完全に抑制された（図 2 D）。以上のことから、YCZ-18 は高濃度で花粉の発芽を有効に抑制する活性を示すことが明らかとなった。

考察

本研究では、三つのアプローチを通じて、BR 生合成阻害剤 YCZ-18 の植物雄性不稔誘導活性を検討した。すなわち、薬剤の処理法、シロイヌナズナ種子の形成率と花粉発芽率について検証した。その結果、無傷植物に対し、YCZ-18 は、部分的ではあるが、シロイヌナズナ種子の形成を抑制した。その原因を解明するため、花粉発芽試験を用いて追究したところ、YCZ-18 は高濃度でシロイヌナズナの花 pollen 発芽を抑制したことを明らかになった。

簡便な植物の雄性不稔誘導技術は、F1 植物の作成に不可欠な技術である。そのため、100% 雄性不稔の植物を如何に効率よく作成できるかはカギを握っている。YCZ-18 は部分的に植物の種子形成を抑制したが、植物雄性不稔誘導剤として実用化させるには、幾つかの問題点を克服する必要がある。まず、YCZ-18 の処理濃度をさらに向上させ、花粉発芽試

験で示されたように、100 μ M の YCZ-18 を開花期の植物に与えることで、植物の雄性不稔を誘導できると推測される。植物の生育与える影響を考慮すると、YCZ-18 の雄性不稔誘導と生育抑制の選択性について明らかにする必要がある。

以上を総括すると、BR 生合成阻害剤 YCZ-18 が植物の雄性不稔誘導活性を明らかにしたが、雄性不稔剤として実用化するには、薬剤の処理濃度と選択性に関する研究課題が残されている。

謝辞

本研究は、秋田県立大学平成 26 年度産学連携・研究シーズ実用化促進事業の支援を受けて行った。また、花粉の発芽試験において、上田健治博士の助言を受けて行った。

文献

- Blackwell, H.E., & Zhao, Y. (2003). Chemical genetic approaches to plant biology. *Plant Physiol.* 133, 448-455.
- Choe, S., Dilkes, B.P., Fujioka, S., Takatsuto, S., Sakurai, A., & Feldmann, K.A. (1998). The DWF4 gene of Arabidopsis encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 α -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell.* 10, 231-243.
- Durbak, A., Yao, H., & McSteen, P. (2012). Hormone signaling in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 92-96.
- Fan, L.M., Wang, Y.F., Wang, H., & Wu, W.H. (2001). In vitro Arabidopsis pollen germination and characterization of the inward potassium currents in Arabidopsis pollen grain protoplasts. *J. Exp. Bot.* 52, 1603-1614.
- Lau, O.S., & Deng, X.W. (2010). Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Curr Opin Plant Biol.* 13, 571-577.
- Oh, K., Yamada, K., Asami, T., & Yoshizawa, Y. (2012). Synthesis of novel brassinosteroid biosynthesis inhibitors based on the ketoconazole scaffold. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 1625-1628.
- Oh, K., Yamada, K., & Yoshizawa, Y. (2013). Asymmetric synthesis and effect of absolute stereochemistry of YCZ-2013, a brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett.* 23, 6915-6919.
- Oh, K., Matsumoto, T., Yamagami, A., Ogawa, A., Yamada, K., Suzuki, R., Sawada, T., Fujioka, S., Yoshizawa, Y., & Nakano, T. (2015). YCZ-18 is a new brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *PLoS One.* 10, e0120812.
- Ohnishi, T., Godza, B., Watanabe, B., Fujioka, S., Hategan, L., Ide, K., Shibata, K., Yokota, T., Szekeres, M., & Mizutani, M. (2012). CYP90A1/CPD, a brassinosteroid biosynthetic cytochrome P450 of Arabidopsis, catalyzes C-3 oxidation. *J. Biol. Chem.* 287, 31551-31560.
- Sakurai, A., & Fujioka, S. (1997). Studies on biosynthesis of brassinosteroids. *Biosci Biotechnol Biochem.* 61, 757-762.
- Yamada, K., Yoshizawa, Y., & Oh, K. (2012). Synthesis of 2RS, 4RS-1-[2-phenyl-4-[2-(2-trifluoromethoxyphenoxy)-ethyl]-1,3-dioxolan-2-yl-methyl]-1H-1,2,4-triazole derivatives as potent inhibitors of brassinosteroid biosynthesis. *Molecules.* 17, 4460-4473.
- Yamada, K., Yajima, O., Yoshizawa, Y., & Oh, K. (2013). Synthesis and biological evaluation of novelazole derivatives as selective potent inhibitors of brassinosteroid biosynthesis. *Bioorg Med Chem.* 21, 2451-2461.
- Ye, Q., Zhu, W., Li, L., Zhang, S., Yin, Y., Ma, H., & Wang, X. (2010). Brassinosteroids control male fertility by regulating the expression of key genes involved in Arabidopsis anther and pollen development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 107, 6100-6105.

〔平成 27 年 6 月 30 日受付〕
〔平成 27 年 7 月 31 日受理〕

Survey of the Possibility of Brassinosteroid Biosynthesis Inhibitor as Male Fertility Inducer in *Arabidopsis*

Keimei Oh, Tomoki Hoshi, Kazuhiro Yamada

Department of Biotechnology, Faculty of Bio-resource Sciences, Akita Prefectural University

Plants responses to internal signals and environmental stimuli are regulated by a complex mechanism of signal transduction networks. Plant hormones are important signal mediators that play pivotal roles in signaling. Brassinosteroids (BRs) are steroidal plant hormones with potent growth promoting activity. Because BRs control several important agronomic traits such as flowering, plant architecture, seed yield, and stress tolerance, great efforts have been made to control BR levels in plant tissues using genetic approaches. An alternative and effective method to manipulate the BR levels in plant tissues is the use of specific inhibitors that target the enzymes of BR biosynthesis. The aim of this study is to determine the possibility of YCZ-18, a potent inhibitor of BR biosynthesis developed in our laboratory, on inducing the male fertility of *Arabidopsis*. Data obtained from present work indicated that YCZ-18 reduced the seed yield of *Arabidopsis*. Assessment the effect of YCZ-18 on pollen germination of *Arabidopsis* indicated that YCZ-18 displayed inhibitory activity.

Keywords: Plant hormone, Yucaizol, Brassinosteroid, Brassinosteroid biosynthesis inhibitor, Male fertility, *Arabidopsis*