

# 植物ホルモンブラシノステロイド様活性化合物の探索研究

2023

瀧本征佑



## 目次

第1章 緒論	1
第2章 インシリコでの化合物探索および分子設計手法	
2-1 緒言	7
2-2 SBDDのためのソフトウェア	9
第3章 ブラシノステロイド受容体結合性化合物のインシリコスクリーニング	
3-1 緒言	37
3-2 方法	37
3-3 結果および考察	45
3-4 まとめ	50
第4章 新規ブラシノステロイドアゴニスト(NSBR1)の発見	
4-1 緒言	51
4-2 方法	51
4-3 結果および考察	60
4-4 まとめ	62
第5章 NSBR1の構造活性相関研究	
5-1 緒言	63
5-2 方法	63

5-3	結果および考察	81
5-4	まとめ	84
第6章 イネ発芽種子を用いたブラシノステロイド類の定量的活性評価		
6-1	緒言	87
6-2	方法	87
6-3	結果および考察	90
6-4	まとめ	95
第7章 総括		97
謝辞		
引用文献		
本研究に関する原著論文		
関係論文		

## 第1章 緒論

Mitchellらによってセイヨウアブラナ(*Brassica napus* L.)花粉からインゲンマメの胚軸の伸長を促進する物質が1970年に発見された(Mitchell *et al.*, 1970). Mitchellらは活性物質の本体を同定するには至らなかったが, その物質が新しい植物ホルモンではないかと考えて, Brassinと名付けた. その後, 活性本体の単離と同定がGroveらによってなされ, 1979年にその化学構造がX線結晶構造解析によって解明されてブラシノライド (Brassinolide; BL)と名付けられた(Grove *et al.*, 1979). 1982年には横田らによってクリ(*Castanea crenata*)の虫癭からカスターステロン(Castasterone; CS)が(Yokota *et al.*, 1982), また同年にフジマメ(*Delichos lablab*)からdolicholideが発見された(Baba *et al.*, 1983). CSはB環部が6員環のケトン構造でBLの7員環 (e-オキサラクトン) とは異なっている. 現在では70種類以上のBL様活性化合物が同定されていて, これらBL様活性を示す化合物は総称してブラシノステロイド(Brassinosteroid, BR)と呼ばれている(Bajgus *et al.*, 2007; Fujioka *et al.*, 1999). (図1.1).

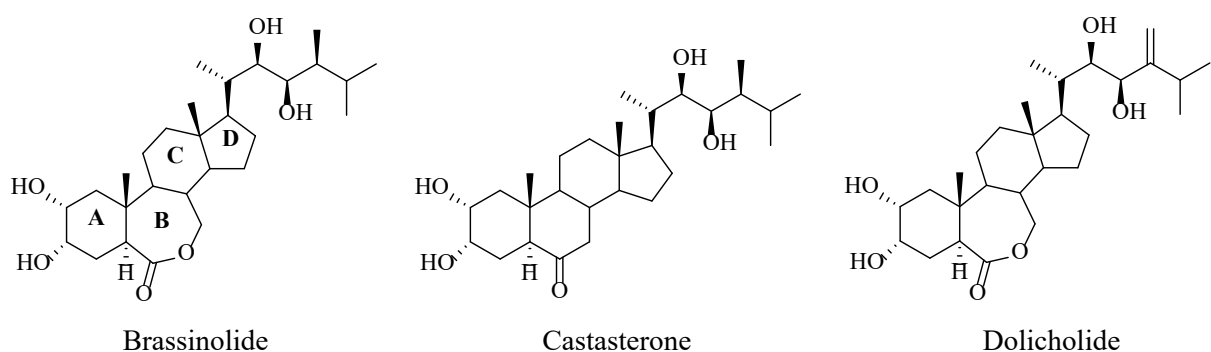


図1.1 天然に存在する代表的なBRの構造

BRは植物界に普遍的に存在し, 極微量で細胞生長促進, 細胞分裂促進, 維管束分化の促進, ストレス耐性の向上などの活性を示すが(Kamuro and Takatsuto, 1999),

その働きの多くが他の植物ホルモンと類似しているために、長年植物ホルモンとは認められてこなかった。その論争に決着をつけたのが、ChoryらのグループによるBR生合成欠損変異株*det2*の発見である(Li *et al.*, 1996, Li *et al.*, 1997)。*det2*変異体は著しい矮化や脱黄化など異常な形質を示すが、BRを処理することによりこれらの異常から復帰することが報告された。このことによって、BRが植物の生育に必須な植物ホルモンであると認められることになった(Fujioka *et al.*, 1997)。その後、BRの生合成(Sakurai, 1999)、代謝(Adam and Schneider, 1999)、シグナル伝達(Friedrichsen *et al.*, 2001)などに関して盛んな研究が行われた。21世紀に入ると、受容体の解明に向けた研究が進み(Wang *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2002, Nam *et al.*, 2002)、2005年にKinoshitaらによって、BRの結合部位が明らかにされた(Kinoshita *et al.*, 2005)。2011年7月にはBR受容体Brassinosteroid Insensitive1 (BRI1)とBLの複合体X線結晶構造が解明された(Hothorn *et al.*, 2011; She *et al.*, 2011)。さらに2013年には、SERKファミリータンパクであるBrassinolide associate kinase-1 (BAK1)がBRI1に結合したBRを認識するco-receptorであることが報告され(Sun *et al.*, 2013)、同年、Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase1 (SERK1=BAK3)とBRIがBLを介して相互作用していることが、BRI1-SERK1-BL複合体構造によって明らかとなった(Santiago *et al.*, 2013)。

先に述べたように、BRはBR生合成欠損変異株の発見によって植物ホルモンであると正式に認められ、その後のホルモン基礎研究においても矮性変異株は欠くことのできないものとなった。その後、BR生合成阻害剤が浅見らによって発見されると、人工的に矮性を誘導することが可能となり、基礎研究がさらに発展し、BR生合成阻害剤の応用研究への可能性が広がった。最初に発見されたBR生合成阻害剤はBrassinazole (Brz)で、シトクロームP450を阻害するジベレリン生合成阻害剤

Uniconazole(Yokota *et al.*, 1991)をリード化合物とした構造活性相関研究の結果として見出された(Asami *et al.*, 1999; Asami *et al.*, 2000). その後, Brzをリード化合物とした合成展開が行われ, さらに高活性・高特異性な化合物としてBrz2001が開発された(Sekimata *et al.*, 2001)(図1-2).

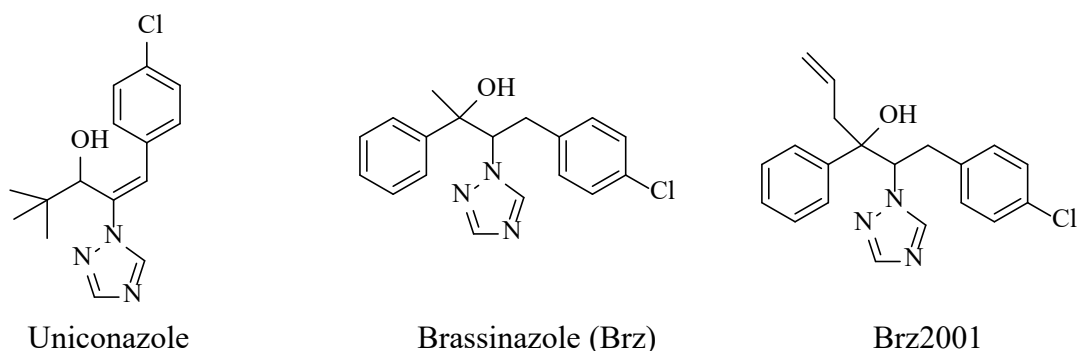


図1-2 ジベレリン生合成阻害剤Uniconazole, BR生合成阻害剤Brzの構造

BR活性の代表的な評価系としてイネ葉身屈曲試験(ラミナジョイント法)が挙げられる(Takeno *et al.*, 1982; Fujioka *et al.*, 1998). この試験は, イネの実生の第二葉身基部にBRを投与すると, 特異的な葉身の屈曲がみられることを利用したもので, 葉身の屈曲角度と濃度との相関からBR活性を測定する. その他のBR活性の評価方法としては, Brzで処理することにより矮化を誘導した植物に対するBR活性を調べる実験系がある.

BRが様々な植物生理活性を持つことから, 植物の生理機能解明のためのツールや農薬への応用などが考えられ, 様々な生化学的, 分子生物学的, 有機化学的研究がおこなわれてきた(Kamuro and Takatsuto, 1999). しかし, BRの植物含有量が非常に低く, また合成も高価であることが研究の障害となってきた. そのような中で, 20世紀後半から21世紀の初頭にかけてBRの合成研究が積極的に行われたが (McMorris, 1999; Watanabe *et al.*, 2003; Watanabe *et al.* 2004a; Watanabe *et al.*, 2004b; Uesusuki *et al.*,

2004; Yamamoto *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2017), 合成には時間がかかった。植物中での存在量が少ない, 合成にコストがかかるといった点は農薬としての実用を考えただけでも大きな問題となるため, 合成の容易なBR様活性化化合物が求められている。BR合成が高価である原因の一つは, BRがステロイド骨格を持つことによる。したがって, 非ステロイド型の活性化化合物を探索することが, 合成の容易な活性化化合物を開発する上で一つの鍵となる。一般的にホルモン様活性化化合物やそのアンタゴニスト, 生合成阻害剤の応用研究は古くから行われており, 農薬の分野では, オーキシンの活性を持った2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)が除草剤として利用されている。また, 20世紀の終わりには, 昆虫幼若ホルモン活性を示すフェノキシカルブ (Grenier *et al.*, 1993)やピリプロキシフェン(Kawada *et al.*, 1989)などが, さらにその後には昆虫の脱皮ホルモン様活性を示すジアシルヒドラジン類が農業用殺虫剤として登場した(Wing, 1988; Wing *et al.*, 1988; Hsu, 1991)。特にジアシルヒドラジン類は, 脱皮ホルモンの基本構造であるステロイド骨格を持たない非ステロイド型の化合物である。医薬の分野においても女性ホルモンであるエストラジオールの作用をもつ非ステロイド化合物であるジエチルスチルベストロールが実用化された(Dodds *et al.*, 1938)。

従来, そのような新規構造の発見を目指した研究はランダム合成や類縁体合成に頼っていたが, 21世紀に入り, コンピュータの計算能力向上, 酵素や受容体などのタンパク質立体構造データの充実などによって, コンピュータ内(インシリコ)でのスクリーニングや分子設計が容易に行えるようになってきた。例えば, 新規構造をもつ化合物の代表的な探索方法としてハイスループットスクリーニング(HTS)があるが, 機械化可能な活性試験法の確立, 専用機械の開発, さらに探索対象となる大規



模化合物ライブラリなどそのハードルは高い。一方で、既存の活性化合物(リガンド)の構造や標的タンパク質の構造から新規化合物の探索を行うインシリコスクリーニングは、設備や化合物のライブラリを必要としないためHTSに比べて実施が容易である。かつてはコンピュータの性能や検索対象になる化合物構造データベースの規模による制限があり、創薬の現場では実用に耐えないとされてきたが、計算技術の進歩、アルゴリズムの高度化、タンパク質立体構造や化合物構造のデータベースの充実などが急速になされており、現在では標的化合物への親和性の高い化合物を選抜することが可能となっている。インシリコでのスクリーニングや分子設計の手法は既に医薬品開発では積極的に利用されており、インフルエンザ治療薬オセルタミビル(商品名タミフル)など、実用化に至った化合物もある(Lew *et al.*, 2000)。しかし、農薬開発における応用例は未だ少ない。

BLをはじめとするBRは、ステロイド骨格を持たない新規構造アゴニストが求められていること、受容体への結合様式が詳細に解明されてきたことから、インシリコの手法を用いたスクリーニングを行う対象として適していると考えた。インシリコスクリーニングには大きく分けて2つのアプローチ、すなわちタンパク質構造に注目するSBDD (Structure-based Drug DesignあるいはDiscovery)と、既知のリガンドの構造に注目するLBDD (Ligand-based Drug DesignあるいはDiscovery)がある(中川, 赤松, 2018)。SBDDは標的タンパク質の構造とフィットする構造の化合物を探索する方法であり、LBDDは既存の活性化合物と類似した構造の化合物を探索する方法である。前者は既存の活性化合物と異なる結合様式を持つ化合物も探索対象にできるというメリットがあり、後者には標的タンパク質の構造が不明でも探索を行えるというメリットがある。

本研究は、インシリコの手法を用いたBLアゴニストの創出を目的としており、SBDDとLBDDを組み合わせたPharmacophore-based screeningの手法を用いた化合物探索を行った。探索で得られた化合物の構造変換により非ステロイドの新規BLアゴニストを創出し、その構造活性相関について解明を試みた。

## 第2章 インシリコでの化合物探索および分子設計手法

### 2-1 諸言

前述のように、BRは細胞膜上に存在するレセプターキナーゼBRI1によって認識される。BRI1は結晶構造解析が難しいとされる膜貫通型のタンパク質で、1997年にChoryらによって同定されて以来、長らく立体構造が不明であった。しかし、2011年にHothornら、SheらによってBRI1-BL複合体の結晶構造が解明されたことで(Hothorn *et al.*, 2011; She *et al.*, 2011), SBDDの手法を用いたBLアゴニスト探索が可能となった。また、2013年にSantiagoらによりBRI1-SERK1-BL複合体構造が解明され(Santiago *et al.*, 2013), アゴニスト分子が機能する分子生物学的機構が明らかになったことも、アゴニスト探索および分子設計を行うための重要な進歩となった。

本研究で用いた計算科学技術としては計算コストが軽い順にファーマフォアベーススクリーニング、ベースドッキングシミュレーション、MM-PBSA/GBSAによるエネルギー計算、MDシミュレーションがある。ファーマフォアベーススクリーニングでは、リガンド-タンパク相互作用に必要な官能基群(ファーマコフォア)を定義し、同様のファーマコフォアを持つ化合物をデータベースから選抜する。ドッキングシミュレーションではタンパク構造に対して化合物をドッキングし、結合配座を予測する。また、ドッキング時にはスコア関数に基づいたドッキングスコアが算出され、結合配座の確からしさの指標となる。MM-PBSA(Kollman *et al.*, 2000; Horoiwa *et al.*, 2019)およびMM-GBSA(Genheden and U. Ryde, 2011; Genheden and U. Ryde, 2015)計算では、力場パラメータに基づいてリガンド-タンパク質の結合エネルギーを算出する。MDシミュレーションでは、インシリコでリ

ガンドタンパク複合体を運動させることで多様な結合配座およびその存在比率を予測する。

本研究は、インシリコの手法を用いたBLアゴニストの探索を目的としており、化合物データベースからファーマコフォアベーススクリーニング及びドッキングシミュレーションによって化合物を選抜した。また、リガンドおよびタンパク質のFlexibilityを加味することを目的として、MD (Molecular Dynamics)シミュレーションも適宜実施した。得られたドッキングポーズからMMPBSA/MMGBSAの手法により結合自由エネルギーを算出し、活性値との間に相関があるか調べることで、SBDDの応用の可能性を検討した。なお、MDシミュレーションから得られたドッキングポーズのアンサンブルからエネルギー計算を実施した場合には、得られた結合自由エネルギーを平均してその化合物の結合自由エネルギーとした。

インシリコでの化合物探索を行うに当たり、以下のアプリケーションを利用した。

- ・ Ligandscout (ファーマコフォアベーススクリーニングソフトウェア, Inte:Ligand社)
- ・ OEDocking (MAKE\_RECEPTORおよびFREDを含むドッキングシミュレーションパッケージ, Openeye社)
- ・ OMEGA (構造発生アプリケーションOpeneye社)
- ・ Schrödinger tools (ドッキング及びMMGBSA計算)
- ・ AMBER16 (MDシミュレーション及びMMPBSA計算)

## 2-2 SBDDのためのソフトウェア

### 2-2-1 LigandScout

LigandScout(Wolber *et al.*, 2005)はオーストリアに本拠を置くInte:Ligand社によって開発された、ファーマコフォアモデリング/スクリーニングを行うソフトウェアである。LigandScoutはリガンド単体、あるいはタンパク質-リガンド複合体からファーマコフォアモデルを構築し、それを鋳型として、化合物構造データベースから鋳型に適合した化合物を探索する。LigandScoutでは、タンパク質-リガンド相互作用は水素結合ドナー/アクセプター、疎水性相互作用、正/負極性相互作用部位、芳香環相互作用部位、金属相互作用部位、の5種に分類される。それぞれの相互作用を示す部位はスフィア、あるいはスフィアと矢印の組み合わせによって表現される。ファーマコフォア以外に、タンパク質構造もリガンド排除領域としてスフィアで表現される。ファーマコフォアに基づくスクリーニングでは、モデル構築の際に一般性の高い性質のみを用いるとスクリーニングの精度が下がるという問題がある。そこで、LigandScoutでは一部スフィアの特異性を高める(水素結合、極性相互作用へ方向性を加味するなど)ことによってモデルの一般性と特異性のバランスをとり、スクリーニング結果の多様性と信頼性を確保している。

#### 2-2-1-1 化合物三次元構造データベースの作成

LigandScoutによるインシリコスクリーニングでは、探索対象となるデータベースに収録されている化合物構造の配座発生をあらかじめ行っておく必要がある。

LigandScoutには、そのために必要なソフトウェアidbgenが付属しており、化合物二次元構造データベースを三次元構造データベースに変換することが可能である。

idbgenはOpenEye社の配座発生ソフトウェアOMEGAを内蔵しており、配座発生の方

法は後述のOMEGAによる方法と同じである。

### 2-2-1-2 ファーマコフォアモデルの構築

スクリーニングの鋳型となるファーマコフォアモデルの構築は、言うまでもなくスクリーニング結果に決定的な影響を及ぼす。スクリーニングの精度の面では鋳型に含まれるスフィアは多いほど良いが、モデルを複雑にすることは、当然ヒット化合物が減少することを意味する。ファーマコフォアモデルの構築においては、自動で構築されたモデルに含まれる相互作用スフィアをよく吟味し、活性発現に必要な十分な相互作用スフィアを選択することが重要である。

LigandScoutでは、リガンド単体からファーマコフォアモデルを構築することが可能だが、本研究で用いたモデルはすべてタンパク質-リガンド複合体構造から構築したもので、以下にそれぞれのスフィアの構築について述べる。

### 2-2-1-3 水素結合ドナー/アクセプター

水素結合は、弱い負電荷をもつ原子の間にその片に共有結合している水素が存在するときに形成される。それらの原子の3次元上の位置は、図2.1で示すように、直線状に存在するのが最も望ましい。しか

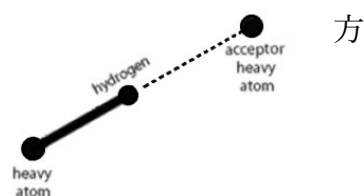


図2.1 水素結合を形成する原

し、LigandScoutではアクセプターの重原子が理想的な位置から水素に対して $34^\circ$ のずれ、すなわち2つの重原子と水素原子の間の角が $146^\circ$ になる位置までの範囲にある場合は、水素結合が成立すると考える。また、2つの重原子間の距離は $2.3\sim 3.8\text{ \AA}$ である必要がある。ドナーの重原子が $sp^2$ 混成軌道を持つ場合、水素の位置は一か所に定まるため、この条件を図示することは容易である

(図2.2). 図2.2のグリッド内にアクセプターの重原子が存在するとき, LigandScoutは水素結合が成立したと判断する.

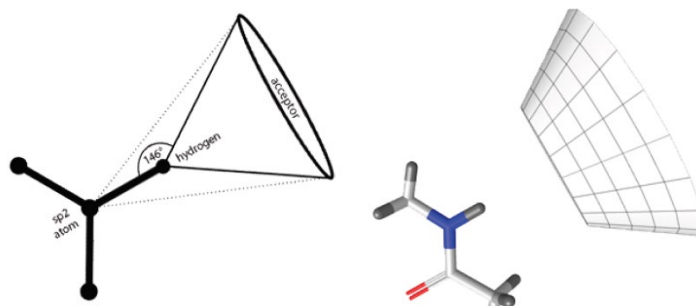


図2.2  $sp^2$ 混成軌道を持つドナーと水素結合を形成するアクセプターの位置

ドナーの重原子が $sp^3$ 混成軌道を取る場合, 水素の位置は, 水素-重原子-隣接原子のなす角が $109.5^\circ$ となる円状のいずれかの点である. したがって, 水素結合が成立する場合のアクセプター重原子の存在範囲は, 図2.3のようなドーナツ状となる.

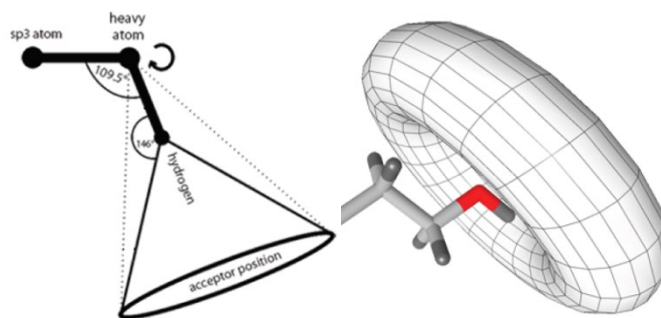


図2.3  $sp^3$ 混成軌道を持つドナーと水素結合を形成するアクセプターの位置

ドナー/アクセプター重原子と判定されるのは, 非酸性のヒドロキシ(OH)基, チオール(SH)基, エチニル基, アミノ( $NH_2$ )基(ただし, テトラゾールと trifluoromethyl sulfonamideを除く)のいずれかを構成する重原子である. ただし, F原子はアクセプター原子にのみなり得る.

また、アクセプター重原子については、隣接原子へのベクトルが計算され、その合成ベクトルの逆ベクトルと、アクセプター重原子からドナー重原子へのベクトルのなす角が $85^\circ$ 以下であることも条件となる。これは、アクセプター重原子とドナー重原子の間がアクセプター重原子の隣接原子によって遮蔽されていない必要があることを示している。水素結合が成立したと判断されたとき、ドナー原子とアクセプター原子の座標に、方向を示す矢印と半径 $1.5\text{ \AA}$ の水素結合スフィアが構築される。

#### 2-2-1-4 疎水性相互作用

まず、原子ごとの疎水性 $h$ を $h=ts$ と定義する。 $s$ とは原子の溶媒露出表面積で、 $s=4\pi r^2 f$ と定義される。ただし $r$ は原子のVdW半径、 $f$ は溶媒に露出されている原子表面上の格子点の割合である。 $f$ 値は、原子上に一様に格子点を置き、全格子点のうち他の原子とVdW半径以内に存在しない格子点の割合として求められる。 $t$ とは原子のカテゴリごとに定められた定数で、表2.1にまとめられている。



表2.1 原子カテゴリ表

カテゴリ	t	定義
1	0	N, O, H
2	0	SH中のS
3	0	電荷をもつ原子から2結合以内の原子
4	0	電子が非局在化されていないOH, NHから2結合以内の原子
5	0	電子が非局在化されていないSHから1結合以内の原子
6	0	二重結合性のOから2結合以内の原子
7	0	原子価が2以上のSから1結合以内の原子
8	0	二重結合性のS
9	0.6	二重結合性のOから3結合の原子
10	0.6	原子価が2以上のSから2結合の原子
11	0.6	二重結合性のSから1結合の原子
12	0	9-12のうち2つ以上の条件を満たす原子
13	0.25	電子が非局在化されていないO, Nに隣接する原子
14	0	電子が非局在化されていないO, Nから2結合以上離れた原子
15	1	上記のいずれの条件にも当てはまらない原子

次に、リガンドの構造を以下の(1)~(3)のタイプの部分構造に分類し、それぞれの部分構造のh値の和が規定の値を超えたとき、その部位を疎水性部位と定義する。タンパク質とリガンドの疎水性部位同士が1~5 Å以内に存在するとき、リガンド側の疎水性部位に半径1.5 Åの疎水性相互作用スフィアを構築する。スフィアの中心座標は

部分構造のタイプによって以下のように個別に定められる。

(1) 7員環以下の環構造について、 $h$  値の合計が 0.60 以上で、全ての置換基が環の同じ側にある、あるいは最低 2 つの隣接環の原子が 0 より大きい  $h$  値を持ち、隣接環には 2 原子以上の置換基がないものを疎水性部位とする。原子の  $h$  値に応じて重みづけを行った重心を、その疎水性部位の座標とする。

(2) ある原子が、3 本以上の結合を持つ、それらの先の原子が他の原子との結合を持たない、それら隣接原子との  $h$  値の合計が 0.47 以上であるという 3 点を満たすとき、その原子とその隣接原子の集団を疎水性部位とする。原子の  $h$  値に応じて重みづけを行った重心を、その疎水性部位の座標とする。

(3) リガンドの全構造のうち、(1)、(2)を満たさない部位について、 $h=0$ の原子を除去する、環構造は任意の結合で開環させる、ことによって直鎖に分解する。分解された直鎖のうち、 $h$  値の合計が 1 以上の部位を疎水性部位とする。1 本しか結合を持たない原子が直鎖内に 1 個だけある場合、その原子の座標を疎水性部位の座標とする。それ以外の場合は原子の  $h$  値に応じて重みづけを行った重心を、その疎水性部位の座標とする。

#### 2-2-1-5 正/負極性相互作用

塩基性アミン、塩基性の 1 級および 2 級アミン、塩基性グアニジン、負電荷と隣接していない正電荷などが正極性部位と定義される。一方で、スルホン酸、スルフィン酸、ホスホン酸、ホスフィン酸、カルボン酸、テトラゾール、正電荷と隣接して

いない負電荷などは負極性部位と定義される。リガンド側の正/負極性部位から1.5~5.6 Å以内のタンパク質側に相補的な極性部位が存在するとき、リガンド上に正/負極性相互作用部位が定義され、半径1.5 Åのスフィアが構築される。

#### 2-2-1-6 芳香環相互作用

芳香環相互作用には、 $\pi$ - $\pi$ 平行相互作用、 $\pi$ - $\pi$ 直交相互作用、 $\pi$ -cation相互作用がある(Castellano *et al.*, 2003)。 $\pi$ - $\pi$ 相互作用については、リガンド側芳香環から2.8~4.5 Å以内にタンパク質側の芳香環が存在し、かつ2つの芳香環が平行から誤差20°以内、あるいは直交から誤差20°以内のとき、半径2.0 Åの芳香環相互作用スフィアが構築される。また、リガンド側芳香環から3.5~5.5 Å以内にタンパク質の正極性部位が存在し、芳香環中心から正極性部位のベクトルと芳香環の法線ベクトルのなす角が60°以内のとき、 $\pi$ -cation相互作用が成立し、半径2.0 Åのスフィアが構築される。逆にリガンドの正極性部位から1.0~10.0 Å以内にタンパク質側の芳香環が存在するときも、 $\pi$ -cation相互作用が成立する。この際の角度条件は変わらない。

#### 2-2-1-7 金属相互作用

キレート部位など、あらかじめ定義された構造とZn, Mg, Fe原子がそれぞれ1.0~4.0 Å以内、1.5~3.8 Å以内、1.3~3.5 Å以内に存在するとき、金属相互作用部位スフィアが構築される。

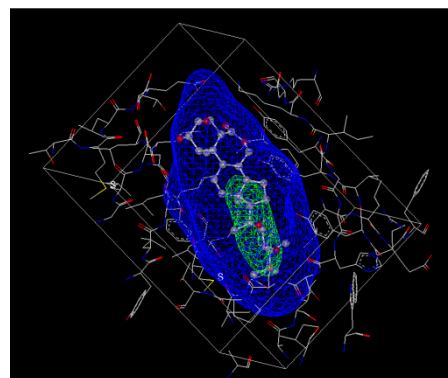
#### 2-2-1-8 リガンド排除領域

タンパク質主鎖の $\alpha$ 炭素のうち、リガンド原子から2.0~4.0 Åの距離にあり、かつその $\alpha$ 炭素よりもリガンドに近い $\alpha$ 炭素が存在しないとき、半径1.0 Åのリガンド排

除領域スフィアが構築される。

## 2-2-2 MAKE\_RECEPTOR

MAKE\_RECEPTORは、FREDで用いるレセプターファイルを作成するGUI(Graphic User Interface)ソフトウェアである。本ソフトウェアを用いて、結晶構造解析やタンパク質モデリングによって得られたPDBファイルを元に、レセプターファイルを構築



する。具体的には、まず、タンパク質内部にある空隙を探索し、1個あるいは2個以上の空隙を含むような

図2.4 緑：内部輪郭

“BOX”をユーザーが指定する。ただし、元のファイルにリガンドが含まれている場合は、リガンドを含むBOXが自動的に設定される。空隙の探索方法には、炭素原子をプローブとして、炭素原子がタンパク質原子と重複しない空間を探索する原子探索法と、複数の分子をプローブとして、多くの分子がドッキング可能である領域を空隙と定義し、探索を行う分子探索法の2通りがある。分子探索法では、原子探索法に比べて計算時間が長い代わりに空隙探索の精度が高い。次に、BOX内に含まれる空隙について、薬剤分子の構造に類似したより多くの分子プローブをドッキングし、リガンド分子に含まれるすべての重原子がその内部に位置しなければならない“外部輪郭”と、その内部に少なくとも1個の重原子が存在しなければならない“内部輪郭”が設定される(図2.4)。ユーザーは外部輪郭及び内部輪郭の設定を、任意に変更することができる。ドッキングの際に重原子が外部・内部輪郭のどちら側にあるかは、重原子の中心の座標によって判断される。その他、特定残基との水素結合形成

やタンパク質側金属原子との距離制限など、ドッキング結果が必ず満たさなければならぬ拘束条件を任意に設定できる。

### 2-2-3 OMEGA

OMEGAは低分子化合物の二次元、または三次元構造から安定配座を発生させるソフトウェアである。化合物の三次元配座発生はFREDへの入力構造構築に必要となる。OMEGAの特徴は、化合物の構造全体に対して配座計算を行うのではなく、化合物をフラグメントに分割し、それぞれのフラグメントの配座を計算してからそれらを統合することによって全体の配座を構築する点である。OMEGAによる配座発生のプロセスは以下の2つに分割される。

#### (1) フラグメントの配座発生

配座発生させる化合物の構造式を環に結合している $\sigma$ 結合、炭素-ヘテロ原子間の $\sigma$ 結合で切断し、フラグメントに分割する。入力情報が二次元構造の場合、各フラグメントのテンプレートをつなげることにより初期配座を構築する。三次元構造を入力している場合、この作業は省略される。続いて、各フラグメントの配座発生が行われる。環構造フラグメントについては、配座テンプレートを当てはめることで配座発生が行われる。また、反転可能な窒素原子については、2種の配座が発生される。残ったフラグメントについて、2回点対照や3回点対照な部分を除き、回転可能な結合を回転させることによって配座を発生させる。フラグメントごとに、発生した配座はエネルギー順にランキングされる。

## (2) 全体構造の構築

フラグメントごとに、エネルギーの和が小さくなる順に繋ぎ合わせたものが、全体構造の候補群となる。全体構造の候補配座について、改めて分子エネルギーが計算される。フラグメントの統合は、ユーザーが指定した構造数制限を超えるか、すべてのフラグメントの組み合わせが終わるか、フラグメントのエネルギーの和が、既に計算された全体構造配座のエネルギーを超えるかのいずれかの条件で終了する。各全体配座はエネルギーが小さい順にランキングされ、上位からユーザー指定数分(デフォルトは200)の配座が予測安定配座となる。

## (3) 低分子化合物の配座発生

OMEGAはコマンドラインによって操作される。特に生成配座数の制限は設けず、200(デフォルト)とした。\*.mol2という三次元構造ファイルから\*\_list.oebという配座リストファイルを作る場合のコマンド例は以下の通りである。

```
omega2 -in *.mol2 -out *_list.oeb
```

### 2-2-4 FRED

#### 2-2-4-1 ワークフロー

FRED (MacGann *et al.*, 2011)は、化合物がリガンド結合部位内で取り得る配座と立体位置の組み合わせ(ポーズ)とタンパク質の親和性を網羅的に計算し、結合様式を予測する。親和性はChemgauss3あるいはChemgauss4という関数でスコア化した値として表現される。ドッキング中はタンパク質分子、リガンド分子ともに剛体として扱われる。ドッキングはドッキングポーズのスクリーニングと有望ドッキング

ポーズの最適化の2ステップに分けられ、その流れは図2.5の通りである。

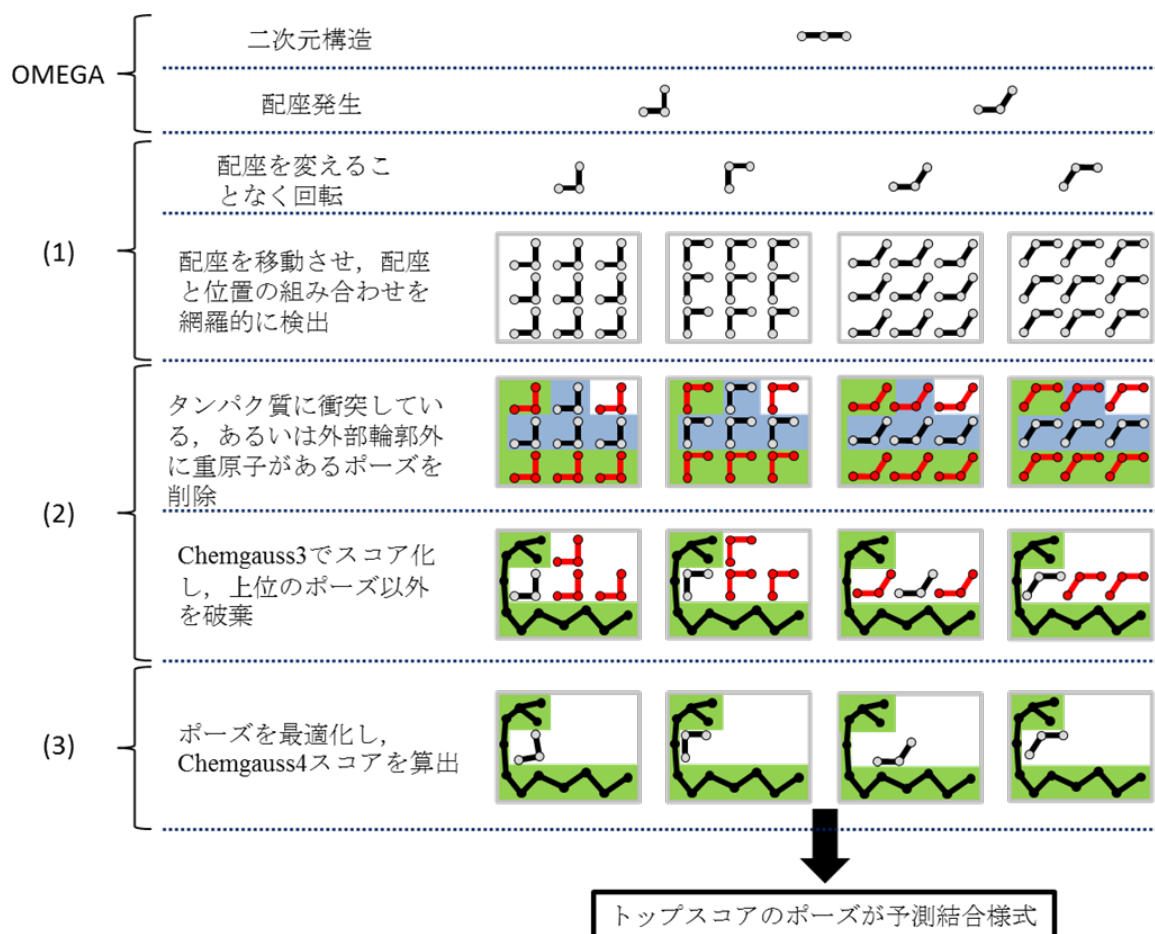


図2.5 FREDによるドッキングの概略

### (1) ドッキングポーズのスクリーニング

レセプターファイルの“BOX”内で、化合物配座データベースに含まれる各配座について、取り得るポーズをスクリーニングする。その際、配座そのものに変更が加えられることはなく、ポーズを1Åずつ移動させる、あるいは全ての原子の移動距離が1.5Åなるようにポーズを回転させる(すなわち移動の直線距離は1.5Å以下となる)ことにより、BOX内に収まるポーズを網羅的に検出する。この段階で検出されるポーズ数はおよそ10万~1億ポーズである。続いて、検出されたすべてのポーズについて、Chemgauss3スコアが計算される。

## (2) 有望ドッキングポーズの選抜

検出されたドッキングポーズのうち、重原子がリガンド結合サイトの外部輪郭外に存在するポーズ、内部輪郭内に重原子が1個も存在しないポーズ、ユーザーが指定した拘束条件を満たさないポーズは排除される。ユーザーによる拘束条件が設定されていない場合、この段階で残るのはおよそ1万~1000万ポーズである。残ったポーズのうち、Chemgauss3スコア値が上位100のポーズが構造最適化のステップに進む。

## (3) ドッキングポーズの最適化

有望ドッキングポーズについて、ドッキングポーズのスクリーニング時の倍の分解能、すなわち0.5 Å ずつの移動と0.75 Å ずつの回転によりポーズを再発生させる。この際、各ポーズは並進移動の3

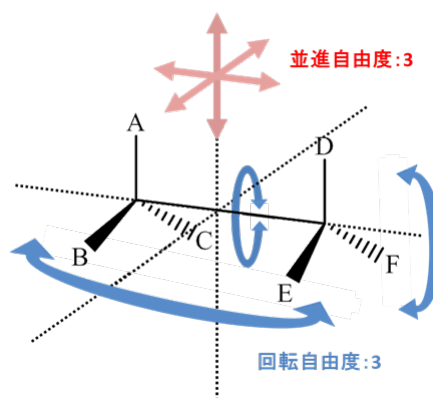


図2.6 自由度6の内訳

自由度と回転3自由度について、移動なし、あるいは

前後移動するため、初期配座1個当たり $3^6 = 729$ 配

座が発生することになる(図2.6)。それらのポーズすべてについてChemgauss4によるスコアリングが行われ、上位からユーザーが指定した数のポーズのみが保持され、残りのポーズは破棄される。最終的に保持されていたポーズが予測結合様式となる。

### 2-2-4-2 スコア関数

ドッキングポーズのタンパク質親和性はChemgauss3あるいはChemgauss4という



関数でスコア化される。いずれもスコア値は負の値で、絶対値が大きいほど良いドッキングポーズであることを示す。Chemgauss関数は(1)形状項、(2)タンパク質リガンド水素結合項、(3)脱水和による水素結合喪失項、(4)金属-キレーター相互作用項、の4項から構成され、Chemgauss3とChemgauss4ではタンパク質リガンド水素結合項と金属-キレーター相互作用項において差がある。各項の詳細は以下の通りである。

### (1) 形状項

計算には、 $\text{CH}_n$  ( $n=1\sim 3$ )を1個の炭素原子として扱うunited atom modelが用いられ、水素原子は構造として認識されない。形状項において正の値を持つのはファンデルワールス(VW)相互作用による安定化エネルギースコアであり、VW半径の和の1.25倍、2.5倍以内の距離にあるタンパク質の重原子とリガンドの重原子の組数に応じてスコアが与えられる。その際、VW半径の和の1.25倍以内にある重原子の組に与えられるスコアは、2.5倍以内にあるものに与えられるスコアの10倍である。次に、形状項において負の値を持つのは、重原子同士の距離がVW半径の和以内である場合に与えられる衝突ペナルティと、脱水和により失われる溶媒分子とタンパク質間のVW相互作用による安定化エネルギーのスコアである。前述のように、重原子の中心がタンパク質表面を示す“外部輪郭”外にある場合、そのポーズはスコアリングを行う前に排除される。一方で、タンパク質とリガンドの重原子同士がVW半径の和より内側に存在する(原子同士が衝突している)場合、スコアにペナルティが与えられるのみであるのは、一見矛盾しているように思われる。しかし、これはタンパク質を剛体として扱うFREDドッキングにおいて、タンパク質がリガンド分子を収容するように構造変化する可能性を考慮するためである。

## (2) タンパク質-リガンド水素結合項

タンパク質-リガンド水素結合項と後述の金属-キレーター相互作用項については算出方法がChemgauss3とChemgauss4で異なる。

### (i) Chemgauss3

Chemgauss3におけるタンパク質-リガンド水素結合項においては、水素結合1個当たりの定数に、水素結合数をかけたものがその値となる。水素結合が成立すると認識される条件は、 $1.0 \text{ \AA}$ 以内にタンパク質分子上の水素結合ドナー、アクセプターとそれに相補的なリガンド上のアクセプター、ドナーが存在することである。したがって、Chemgauss3におけるタンパク質リガンド水素結合項の値は連続的に変化するのではなく、階段関数となる。

### (ii) Chemgauss4

Chemgauss4では、水素結合項を算出するため、まずはタンパク質分子上に存在する水素結合ドナーとリガンド分子上に存在するアクセプター、あるいはその逆の組み合わせの水素結合スコア(HBスコア)を計算する。

1組の水素結合のHBスコアを計算するには、以下の2種類のタンパク質リガンド間距離が必要となる。2種類の距離とは、アクセプターとなる官能基の重原子の実際の位置と“ドナー原子から見て理想的なアクセプター重原子の位置”の間の距離(a;図2.7)、水素結合ドナー

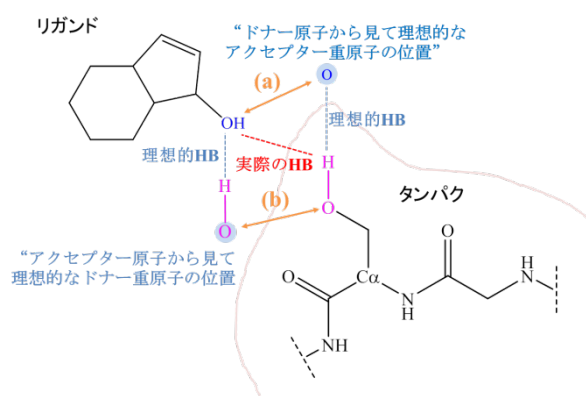


図2.7 距離(a)と距離(b)

の重原子の実際の位置と“アクセプター原子から見て理想的なドナー重原子の位置”

の間の距離( $b$ ;図2.7), である. HBスコアは, 次式で示すように, 距離 $a$ ,  $b$ の値をガウス関数で平滑化した値 $G_{(a)}$ ,  $G_{(b)}$ の積に, 水素結合に関わる官能基種によって定められるHB強度定数をかけたものとなる.

$$\text{HBスコア} = \text{HB強度定数} \times G_{(a)} \times G_{(b)}$$

ここで用いているガウス関数は $x=0$ の時最大となり,  $x$ の値が0から離れていくほど全体としては小さくなっていく.

水素結合を形成し得るすべてのドナー, アクセプターの組み合わせについてHBスコアを計算されると, それぞれのドナー, アクセプターについて水素結合の組み合わせがHBスコアでランキングされ, 実際に形成される水素結合の選別が行われる. 各ドナー, アクセプターには形成可能な水素結合数が決まっているため, HBスコアランクトップから形成可能な水素結合数の組み合わせだけが残され, それ以外の組み合わせは破棄される(例えば, ある水酸基の水素原子について3個の酸素原子 $O_a$ ,  $O_b$ ,  $O_c$ とのHBスコアが計算された場合, 水酸基の水素は一組の水素結合しか形成できないため, もっともHBスコアの高い組み合わせ以外のHBスコアは破棄される). 残ったすべてのHBスコアを合計したものが分子全体のHBスコアとなる. このように, Chemgauss3におけるタンパク質リガンド水素結合項の計算と異なり, Chemgauss4ではタンパク質リガンド水素結合項は水素結合ドナー, アクセプターの位置により連続的に変化する関数として表現されている.

### (3) 脱水和による水素結合喪失項

脱水和による水素結合喪失項は、ドッキングによって追い出される水分子とタンパク質あるいはリガンド間に働く水素結合エネルギーを表す項で、負の値を与える。水分子-タンパク質間の水素結合喪失分は、ドッキングしたリガンド分子の重原子の位置に、水分子が存在した場合に形成される水素結合数に応じた負の値が与えられる。水分子-リガンド間については、ドッキングの結果リガンドに配位できなくなる水分子の数に応じた負の値が与えられる。リガンドの水素結合性官能基の周辺で水分子が水素結合により配位し得る位置を計算し、それらの位置のうちドッキングの結果タンパク質分子と重なるものの数を、喪失する水分子数と考える。このように、脱水和による水素結合喪失分のスコアは、Chemgauss3における水素結合スコアと同様に、既定の数の倍数という形で表現される階段関数である。

### (4) 金属-キレーター相互作用項

金属-キレーター相互作用は(2)-(i), (ii)の水素結合相互作用と同様の方法で求められる。すなわち(2)-(i), (ii)における水素結合ドナー、アクセプターはそれぞれ金属、キレーターに対応し、Chemgauss3では階段関数で、Chemgauss4では連続的な関数として表現される。ただし、(2)-(i), (ii)では水素結合ドナー、アクセプターがタンパク質分子上、リガンド分子上のどちらにある場合も考慮されたが、金属-キレーター相互作用においてはタンパク質分子上に金属、リガンド分子上にキレーターが存在するケースしか考慮されない。

### 2-2-4-3 レセプターファイルの作成

最初は、BRI1-BL複合体のPDB:3RGZとPDB:3RJ0を鋳型にレセプターファイルを作成した。BRI1-SERK1-BL複合体の構造が解明された後、PDB:4LSXを鋳型としたレセプターファイルを追加した。鋳型となるタンパク質構造を変更しても、レセプターファイル作成の手順はほぼ同一であった。

#### (1) タンパク質，リガンド分子の指定

それぞれのPDBファイルに含まれる分子のうち、タンパク質分子とリガンド分子を指定した。この際、水分子との水素結合形成もドッキング結果に反映されることを意図し、リガンド周辺の水分子もタンパク質分子として指定した。

#### (2) BOXの設定

今回はリガンドを指定しているため、BOXは自動的に作成された。前述の分子探索法によりリガンド周辺の空隙を探索し、リガンドを含む空隙がすべて収まるように適宜BOXを拡大した。

#### (3) 外部輪郭の設定

外部輪郭については計算されたタンパク質表面をそのまま用いた。内部輪郭は設定しなかった。

### 2-2-4-5 FREDによるドッキング

最終的に提示されるポーズ数を最大200(デフォルトは1)に指定し、ドッキングを行なった。下記は、レセプターファイルreceptor.oebに対して配座リスト\*\_list.oebを

上限200ポーズでドッキングさせるコマンドである。

```
fred -rec receptor.oeb -in *_list.oeb -out *_docked.sdf -numposes 200
```

#### 2-2-4-6 一括ドッキングプログラムの作成

ドッキングの手順を簡略化するため、配座発生およびドッキングを自動化するbatchプログラムを作成した。このプログラムでは、ドラッグ&ドロップしたフォルダに含まれる化合物三次元構造ファイルについて、OMEGAによる配座発生と、あらかじめ入力したレセプターファイルへのFREDドッキングを連続的に行う。化合物ごとに異なるフォルダに分ける必要があるが、同時にドラッグ&ドロップするフォルダ数に制限はない。

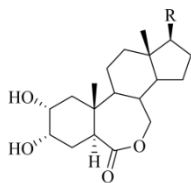
```
set protein=receptor.oeb

:LOOP
if "%1"="" goto EOF
cd %1
omega2 -in %~n1.mol2 -out %~n1_list.oeb
fred -rec %protein% -in %~n1_list.oeb -out %~n1_docked.sdf -numposes 200 | cd..
shift
goto LOOP
```

#### 2-2-4-7 結果と考察

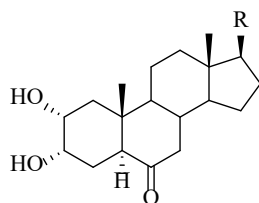
BL, CSなどを含む26種のBRsについて、BRI1-BL複合体 (PDB:3RGZ, 3RJ0), およびBRI1-SERK1-BL複合体(PDB:4LSX)の3種類から作成したレセプターファイルに対するドッキングを行なった。ドッキングスコアについては、スコア上位10個のポーズのスコアの平均を最終的なスコアとした。イネラミナジョイント法において、葉身の最大屈曲角の半分の大きさの屈曲を与える薬量の逆対数として定義されたBLアゴニスト活性(pED<sub>50</sub>)とドッキングスコアの絶対値(|DS|)の関係を表2.2, 表2.3, 図2.8, 図2.9, 図2.10に示す。

表2.2 BL類縁体の活性と三種のモデルへの|DS|



R	pED <sub>50</sub>	DS for 3RGZ	DS for 3RJ0	DS for 4LSX
	13.6	12.6	13.7	18.8
	<8.0	11.6	10.8	17.7
	<8.0	11.7	11.8	16.7
	<8.0	12.6	12.1	15.2
	<8.0	12.9	11.8	15.1
	8.6	11.2	12.5	17.2
	9.6	11.4	10.9	17
	9.3	11.6	12.8	17.9
	10.5	10.9	11.5	17
	10.1	11.7	11.5	18.2
	8.3	11	10.5	16.9
	<8.7	12.9	12.5	17.6
	9.1	11.6	10.6	17.4

表2.3 CS類縁体の活性と三種のモデルへの|DS|



R	pED <sub>50</sub>	DS for 3RGZ	DS for 3RJ0	DS for 4LSX
	12.3	12.6	13.5	16.6
	10.7	12.5	12.9	15.5
	8.7	11.1	11.8	17.5
	8.5	10	8.0	17.6
	8.5	11.4	10.5	16.7
	<9.0	11.8	12.7	14.9
	9.2	12.5	12.1	15
	<10.0	12.9	13.1	15.6
	10.7	12.8	13.2	15.1
	11.3	13.6	14.0	15.5
	<9.3	13.3	12.2	15.4
	9.5	12.3	12.9	17.1
	10	12.3	12.6	15.6



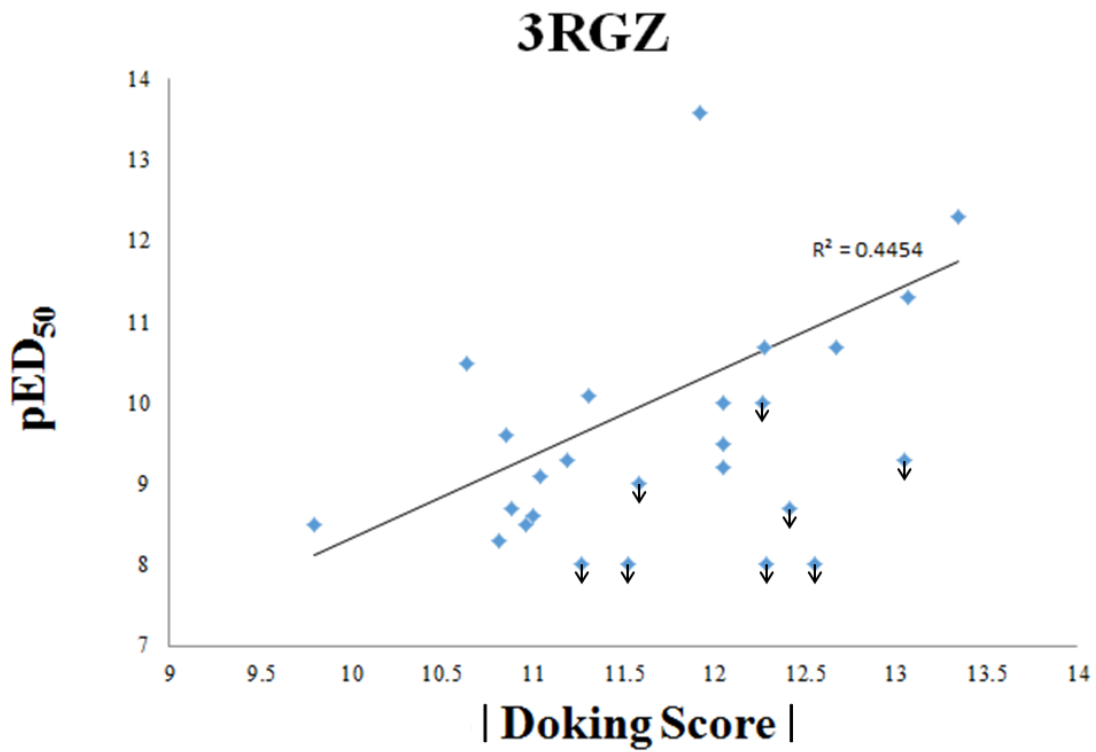


図2.8 生理活性と3RGZ由来モデルへの|DS|の相関

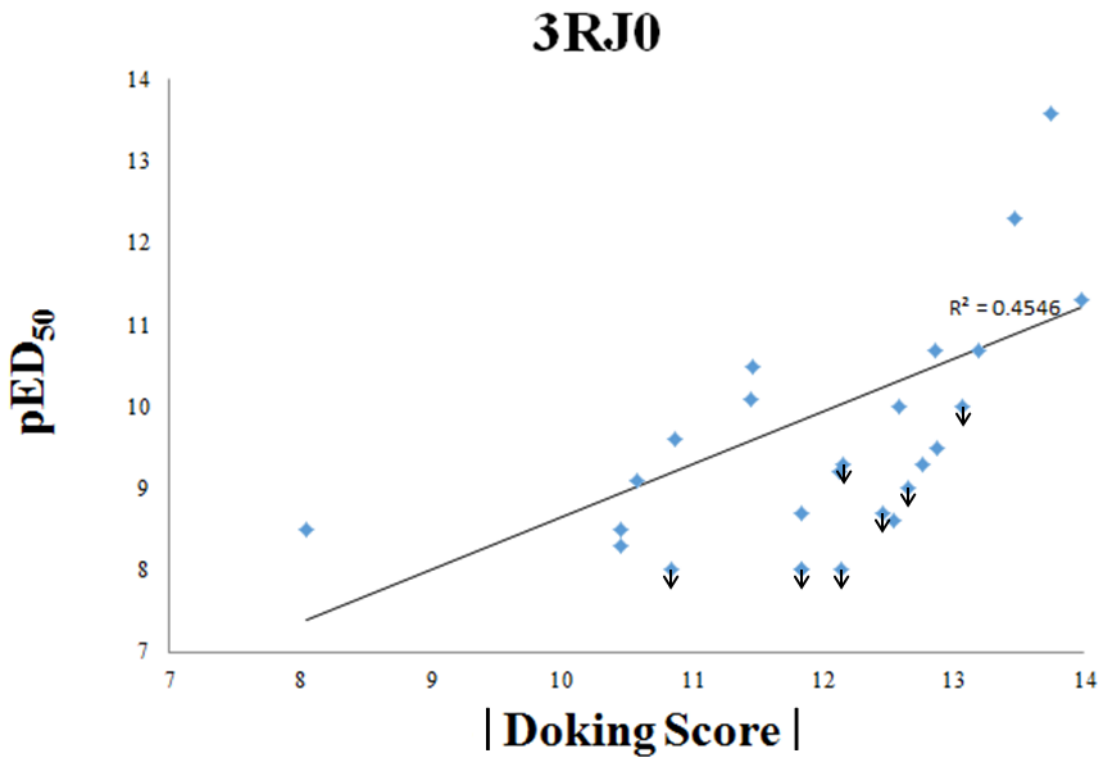


図2.9 生理活性と3RJ0由来モデルへの|DS|の相関

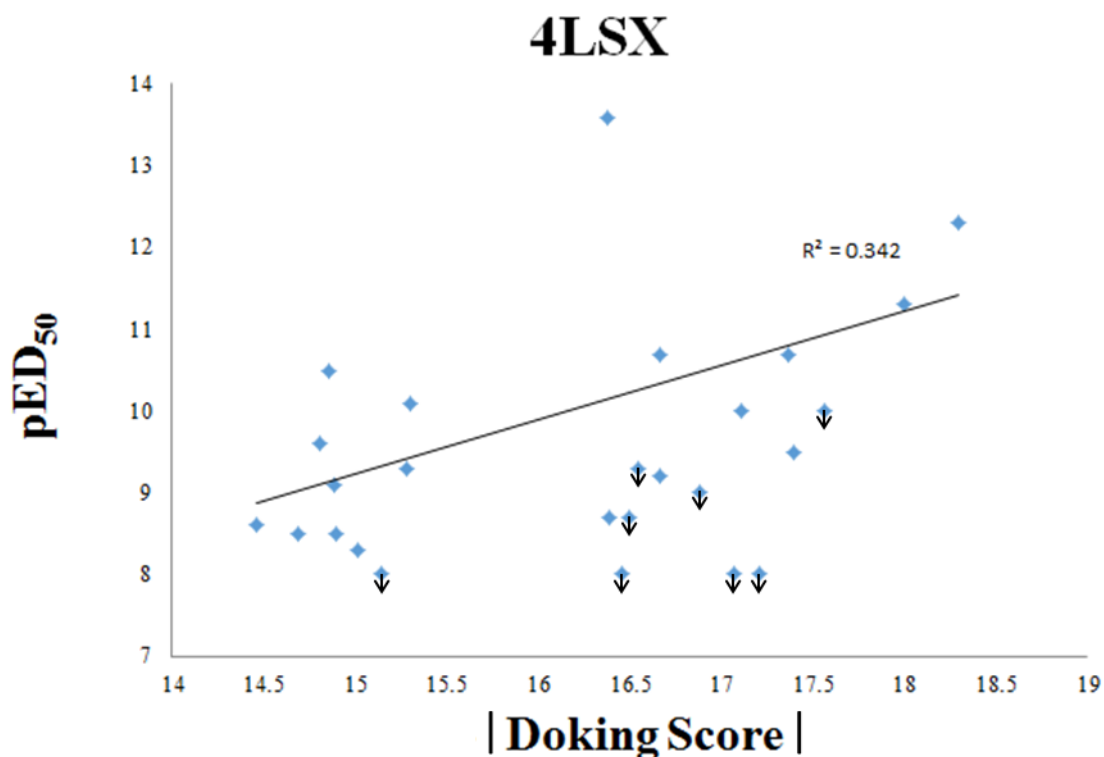


図2.10 生理活性と4LSX由来モデルへの|DS|の相関

いずれの場合においても相関係数は $R^2=0.34\sim0.45$ 程度であったが、ドッキングスコアが高い化合物の方が高活性である傾向にある。しかし、ドッキングスコアのみによって類縁体間の活性差を明確に説明することはできなかった。その原因として、まず、FREDによるスコアリングでは考慮されていないタンパク質-リガンド相互作用があることが挙げられる。FREDでは静電相互作用の一部や疎水性相互作用などが考慮されておらず、受容体での基質認識にこれらの相互作用が大きな影響を与える場合、リガンドの結合親和性を正しく予測できないと考えられる。確かに、BRI1のリガンド結合領域には、IleやPheなどの疎水性アミノ酸によって構成される疎水性領域があり、この部分とBRのステロイド骨格の間に強い疎水性相互作用が働いている可能性がある。もう一つの原因として、ドッキングスコアは一つの化合物の異なるポーズ間の尤度の指標になるが、複数の化合物のポーズ間で比較できると

は限らないということがある。これは、同じ化合物のポーズ間では概ね類似した結合様式を取っており、スコアへの各相互作用項の関与の内訳は同じだが、異なる化合物では全く異なる相互作用項の寄与により全体として同様のスコアを与えうるからである。すなわち、タンパク質-リガンド相互作用には鍵となる相互作用があるため、同じスコアを持つポーズでも、鍵となる相互作用を含むかどうかでそのスコアが実際の活性を説明できるかが大きく変わり得る。したがって、BLアゴニストを探索する上では、タンパク質構造のみを考慮するのではなく、疎水性相互作用や静電的相互作用を考慮すること、実際にBLが受容体と結合する上で寄与している相互作用を重視することが重要であると考えた。

## 2-2-5 AMBER

### 2-2-5-1 MDシミュレーション

MDシミュレーションは水溶液中で各原子にかかる力を非常に短い時間間隔（1 fs程度）で計算し、実際に分子が取りうる構造変化を再現することで、より正確に受容体とリガンドの相互作用を予測することを志向した手法である。しかし、非常に長い計算時間を要するため、研究室の計算機では短いタイムスケールのシミュレーションを行うのが限界である。ゆえにMDシミュレーション結果は初期構造に大きく依存することとなり、適切な初期構造を準備することが不可欠である。

MDシミュレーションでは、与えられた初期構造に対して運動エネルギーを与え、その後は設定した力場パラメータに基づいて分子が運動する。シミュレーション中の各瞬間の構造を抽出することで、リガンドおよびタンパク質のFlexibilityに応じて多様な複合体構造を得ることが可能である。それぞれの複合体構造のエネルギー

ーを計算することで、リガンドおよびタンパク質の歪エネルギーやエンタルピーを結合自由エネルギー計算に取り込むことができる。一方で、MDシミュレーションの実施により初期構造由来のエネルギー計算に比較して正確な(実測活性値と相関の良い)予測エネルギー値が得られるとは限らず、初期構造やMDシミュレーション時間に依存する。そのため、本研究では初期構造でのエネルギー計算とMDシミュレーション後の計算を実施し、より精度が高い方を適宜利用した。

#### 2-2-5-2 MM-PBSA法による結合自由エネルギー計算

MM-PBSA (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area) 法は水溶液中におけるタンパク質とリガンド分子の結合自由エネルギーを近似的に求める計算手法の一つである。水溶液中のタンパク質-リガンド間のエネルギーを正しく求めようとすると、各原子と水分子との間に生じるエネルギー変化も考慮しなければならないため、膨大な計算量が必要となる。そこでMM-PBSA法ではタンパク質とリガンド分子の結合が水中ではなく気相中で起こる場合を仮定し、気相中での結合自由エネルギー、溶媒和エネルギーおよび脱溶媒和エネルギーの和から、より少ない計算量で結合自由エネルギーの近似値を得る (図2.11)。

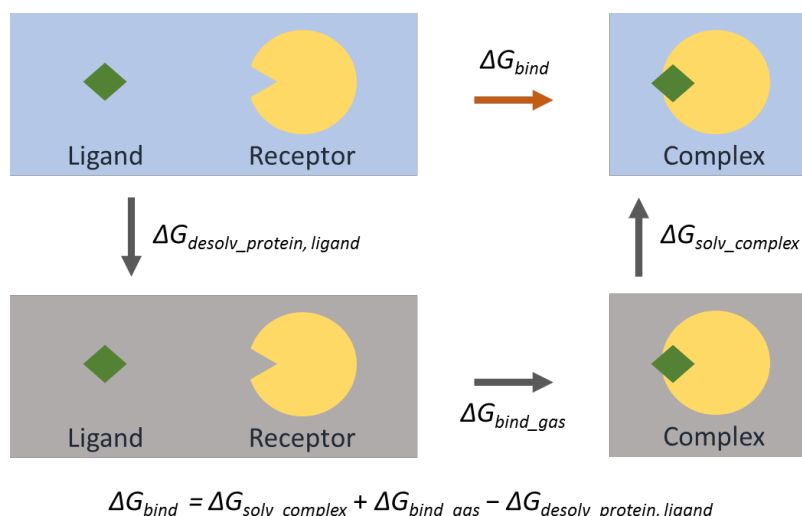


図2.11 MM-PBSA法を用いた結合自由エネルギー計算の概念

計算式を詳細に分解すると，式 (1) のようになる．

$$\Delta G_{calc} = E_{bnd} + E_{ele} + E_{vdw} + G_{pol} + G_{npol} - T\Delta S \quad (1)$$

$\Delta E_{bnd}$ : 結合ポテンシャルのうち，ねじれ角や二面角によるエネルギー

$\Delta E_{ele}$ : 静電的な非結合ポテンシャルによるエネルギー

$\Delta E_{vdw}$ : 非結合ポテンシャルのうち，VdW相互作用によるエネルギー

$\Delta G_{pol}$ : 溶媒和エネルギーのうち，静電相互作用によるエネルギー

$\Delta G_{npol}$ : 溶媒和エネルギーのうち，拡散や斥力などの非静電相互作用による  
エネルギー

$T\Delta S$ : 分子のエントロピー項

このうち  $E_{bnd}$ ,  $E_{ele}$ ,  $E_{vdw}$  は，Molecular mechanics と呼ばれる経験的な関数を用いて求められる． $G_{pol}$  および  $G_{npol}$  は，溶媒が均一なものと近似して Poisson-Boltzmann 方程式を解くことによって求められる．また，これらに加え結合することによる分子の表面積の変化から計算される寄与 (Surface Area) を考慮することから，この手

法はMM-PBSA(Kollmn *et al.*, 2000)と呼ばれる。エントロピー項は基準振動解析によって近似的に求めるか、またはリガンドが変わることによるエントロピー変化は系全体のエネルギー変化に比べ十分に小さいとして無視する場合が多い。

本実験では当研究室で利用されているOpenEye Scientific SoftwareのFreeformを用いて、エントロピーを計算する代わりにリガンドのコンフォーマー自由エネルギーを算出した。このエネルギーはリガンドが水中で取りうるあらゆるコンホメーションの中から、特定のコンホメーションをとってタンパク質と結合するために必要となるエネルギーを表す。MM-PBSAにこのエネルギー項を加えることで、リガンドが不利なポーズで結合した場合のエネルギー的な不安定さを加味することが期待できる。以上を踏まえ、本実験ではMDシミュレーションによって得られた構造アンサンブルに対してMM-PBSA計算とFreeformによるコンフォーマー自由エネルギー計算を行い、それらの和を結合自由エネルギー ( $\Delta G_{\text{calc}}$ ) として算出した (図 2.12)。

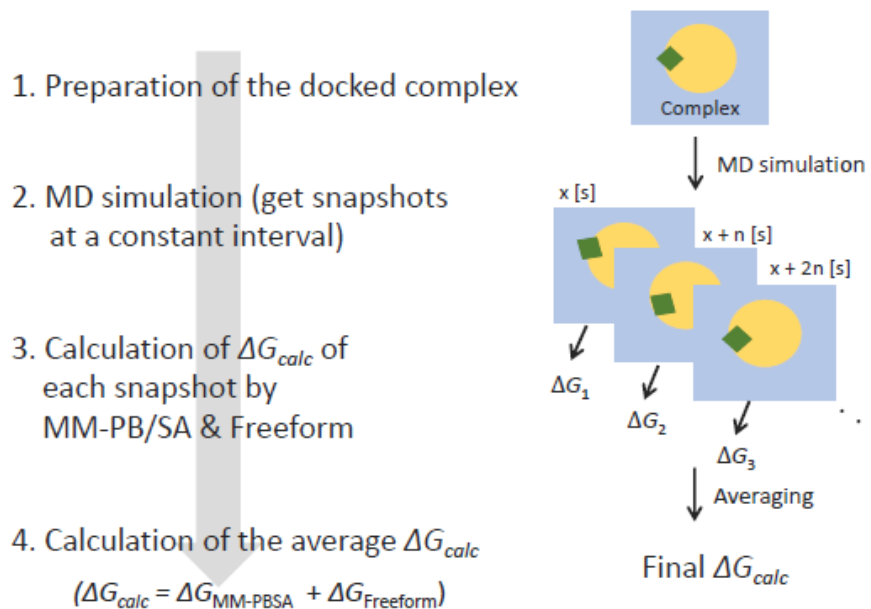


図2.12 計算方法の概略

### 2-2-5-3 MDシミュレーション及び相互エネルギー計算の実施

MDシミュレーションとMM-PBSA法による結合自由エネルギー ( $\Delta G_{calc}$ ) の計算はAMBER16ソフトウェアパッケージに含まれる一連のプログラムによって行った (Case *et al.*, 2017). 力場はAMBER force fieldを使用し, タンパク質に対してはff14SB, リガンド分子に対してはGAFF2をパラメータセットとして適用した (Ponder *et al.*, 2003, Maier *et al.*, 2015). 各原子の部分電荷の計算はAM1-BCCによって行い, タンパク質-リガンド複合体の電荷を中和するためにNa<sup>+</sup>原子9原子を配置した後, TIP3P水モデルによって複合体の周囲10 Åに水分子を配置した (Jakalian *et al.*, 2002).

実際のシミュレーションはpmemdのGPU処理用モジュールであるpmemd.cudaによって行った. シミュレーション中の境界条件は周期境界条件を適用し, 長距離原子間の静電相互作用計算にはParticle mesh Ewald (PME) 法を用いた. この際カッ

トオフ距離は12Åに設定した。シミュレーションを行う前に最急降下法と共役勾配法によって系のエネルギー極小化を行った。シミュレーションのタイムステップは1.0 fsとし、はじめに20 psかけて系を100 Kから 300 Kまで昇温するシミュレーションをNVTアンサンブル（物質量，体積，温度一定条件）で行い，続いて180 psのシミュレーションをNPTアンサンブル（物質量，圧力，温度一定条件）で行うことで系を平衡化した。次に150 psのシミュレーションをNPTアンサンブルで行った。この際1 psごとに系のスナップショットをとり，それぞれの構造についてMM-PBSAとFreeformによる計算を行った。なお，受容体の外部誘電率は80.0に，内部誘電率は1.0から4.0まで設定できる中で2.0に設定した。同様の操作を3回行い，全てのスナップショットの平均値を最終的な結合自由エネルギー（ $\Delta G_{\text{calc}}$ ）として算出した。



## 第3章 ブラシノステロイド受容体結合性化合物のインシリコスクリーニング

### 3-1 緒言

BR の受容体 BL-BRI1/SERK1(4LSX)の結晶構造をもとに，BL 結合部位に結合可能な化合物を Langer らによって開発された LigandScout(Wolber and Langer, 2005) を使って，インシリコで探索した．すなわち，コンピューターを使ってリガンド結合部位に結合可能な化合物の探索（ファーマコフォアスクリーニング）を行った．ファーマコフォアの作成にあたっては，BR の構造活性相関の情報を取り入れた．スクリーニングで得られた化合物から，入手可能な化合物を選抜し，イネおよびシロイヌナズナの活性評価系をもちいて，活性の評価を行った．

### 3-2 方法

#### 3-2-1 インシリコスクリーニング

##### 3-2-1-1 化合物三次元構造データベースの作成

スクリーニングの対象となるデータベースとして，Namiki商事が提供している，購入可能な500万化合物を収録した化学構造データベースを採用した．その理由は，スクリーニングの結果得られたヒット化合物が購入可能な化合物でない場合，自分でその化合物を合成する必要があり，迅速に活性評価を行うことができないからである．新規骨格を持つ化合物を探索する場合，スクリーニングの結果得られた化合物の活性情報をスクリーニングの条件にフィードバックすることが非常に重要であるため，購入可能な化合物群からスクリーニングを行う必要があると考えた．データベースに含まれる化合物構造の配座発生は，一構造あたりの最大発生配座数を200として行った．こうして作成した10億配座を含む三次元構造データベースを

Namiki\_3Dデータベースとする。

### 3-2-1-2 ファーマコフォアモデルの構築

結晶構造4LSXでは、BRI1-BL-SERK1複合体はさらにホモ2量体を形成した4次構造を取っており、BL結合サイトも2個存在する。それぞれの結合サイトから構築されたモデルと、そこに含まれる相互作用スフィアを以下に示す(図3.1, 図3.2, 表3.1, 表3.2)。

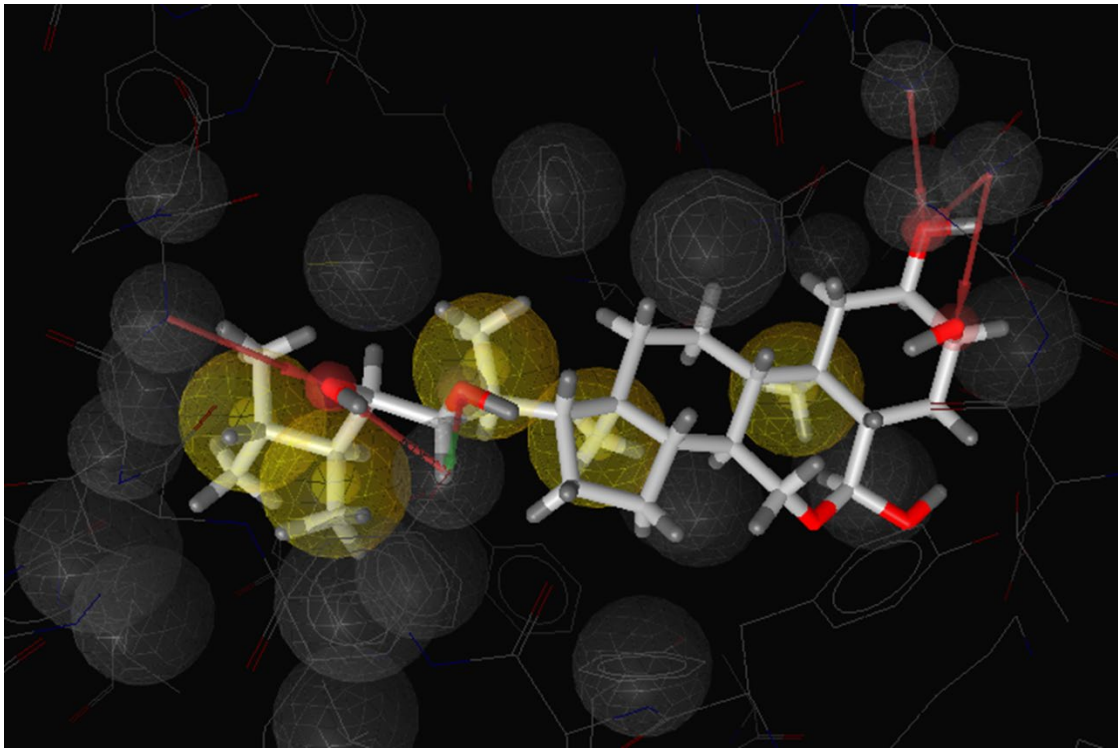


図3.1 結合サイト1から構築されたモデル

表3.1 結合サイト1由来のモデルに含まれる相互作用スフィア

相互作用の種類	スフィア位置	相互作用の対象となる残基
疎水性相互作用	18-C	Trp564, Tyr599, Ile682, Phe681
	19-C	Ile682, Ile706, Tyr729
	20,21-C	Met657, Phe61, Phe681
	24,28-C	Tyr597, Leu615, Thr646, Trp564, Met657
	25,26,27-C	Thr646, Ile540, Met657, Ile563, Try564
水素結合ドナー アクセプター	22-OH	Tyr597
	2-OH	His62(側鎖), His62(アミド基)
	3-OH	His62
	22-OH	Tyr597
	23-OH	Ser647, Typ597

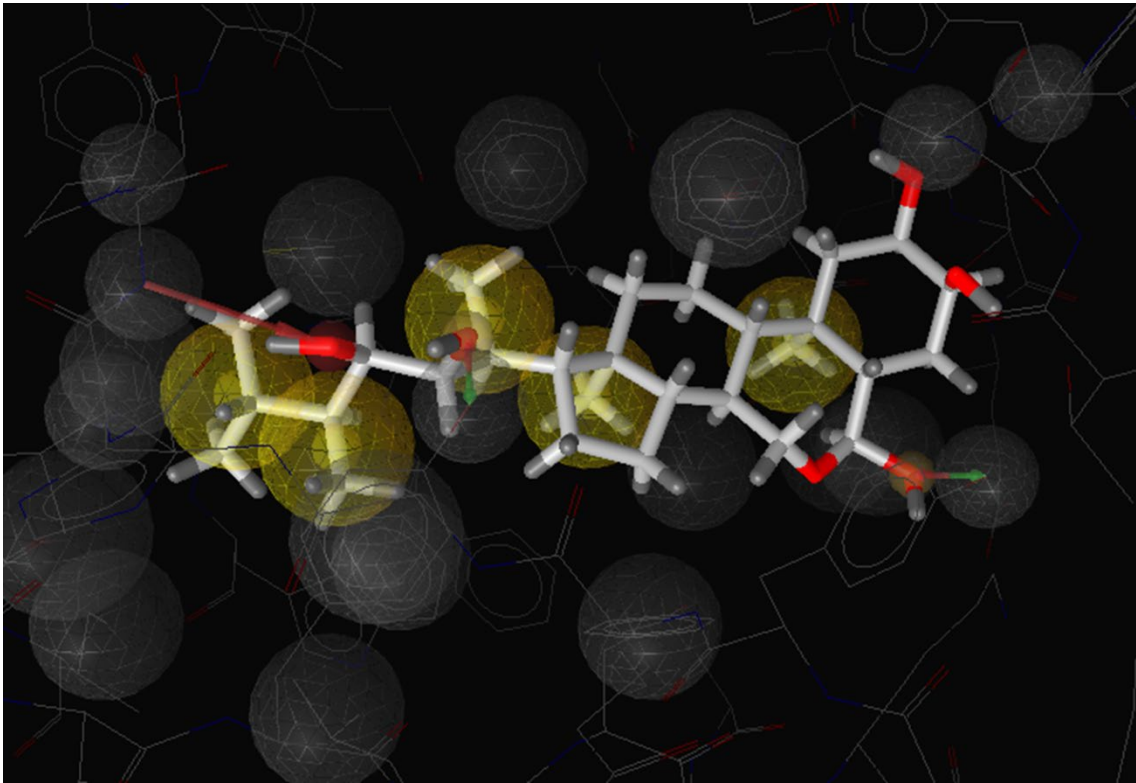


図3.2 結合サイト2から構築されたモデル

表3.2 結合サイト2由来のモデルに含まれる相互作用スフィア

相互作用の種類	スフィア位置	相互作用の対象となる残基
疎水性相互作用	18-C	Trp564, Tyr599, Ile682, Phe681
	19-C	Ile682, Ile706
	20,21-C	Met657, Phe61, Phe681
	24,28-C	Tyr597, Leu615, Thr646, Trp564, Met657
	25,26,27-C	Thr646, Ile540, Met657, Ile563, Trp564
水素結合ドナー	22-OH	Tyr597
	6-OH (本来は6-(=O))	Tyr642
アクセプター	6-OH (本来は6-(=O))	Tyr642
	22-OH	Tyr597
	23-OH	Ser647

いずれのモデルにおいても、BLの6位のカルボニル基がヒドロキシ基に誤認識されている。

それぞれのモデルに含まれるスフィアに注目すると、疎水性相互作用スフィアは位置、対象となるアミノ酸残基ともに完全に一致している。一方で、水素結合ドナー/アクセプタースフィアについては、大きな違いがある。まず、結合サイト1由来のモデルでは2-OH、3-OHとSERK1の62Hisの間に水素結合が形成されているが、結合サイト2由来のモデルではそれがない。BLとSERK1の間の水素結合はBRI1-BL-SERK1複合体形成において非常に重要であり、スクリーニングの際には必ず考慮する必要がある。次に、結合サイト2由来のモデルでは6-OHとTyr642の間にドナースフィア、アクセプタースフィアが構築されている。この6-OHは本来カルボニル基であり、カルボニル基は水素結合ドナーにはなりえないので、ドナースフィアについては考慮する必要はない。しかし、アクセプタースフィアについては、3RGZ由来、3RJ0由来のモデルでも、タンパク質のアミノ酸残基との間に形成されると考えられており、活性発現に重要であると考えられる。

以上の考察を踏まえ、2-OH、3-OHとSERK1の62Hisの間に水素結合スフィアをもつ結合サイト1由来のモデルを元に修正を施し、スクリーニングの鑄型となるモデルを構築することとした。

22-Oとタンパク質の間に形成される水素結合は、BRI1-BLの相互作用に寄与している。しかし、BRI1-BL間にはそれ以外にも、ステロイド骨格及び側鎖炭素鎖による強い疎水性相互作用が働いていると考えられる。また、23-OはBRI1の結合ポケットの深くに位置しており22-Oより強い水素結合をBRI1との間で形成していると考えられるため、22-OとBRI1の水素結合は活性発現に必須ではないと考え、22-OとTyr592

間の水素結合アクセプタースフィアを排除した。5つの疎水性相互作用スフィアのうち、2つの同種スフィアに近接しており、相互作用の相手側のアミノ酸残基が一部重複している、側鎖24,28-C上のスフィアと、相互作用するアミノ酸残基の少ないC-19上のスフィアを排除した。

BRの構造活性相関から活性発現上重要であると考えられる6位のカルボニル酸素(モデル上は6-OH)上に水素結合スフィアを構築した。上記の修正を施し、構築したモデルと含まれる相互作用スフィアを図3.3、表3.3に示す。

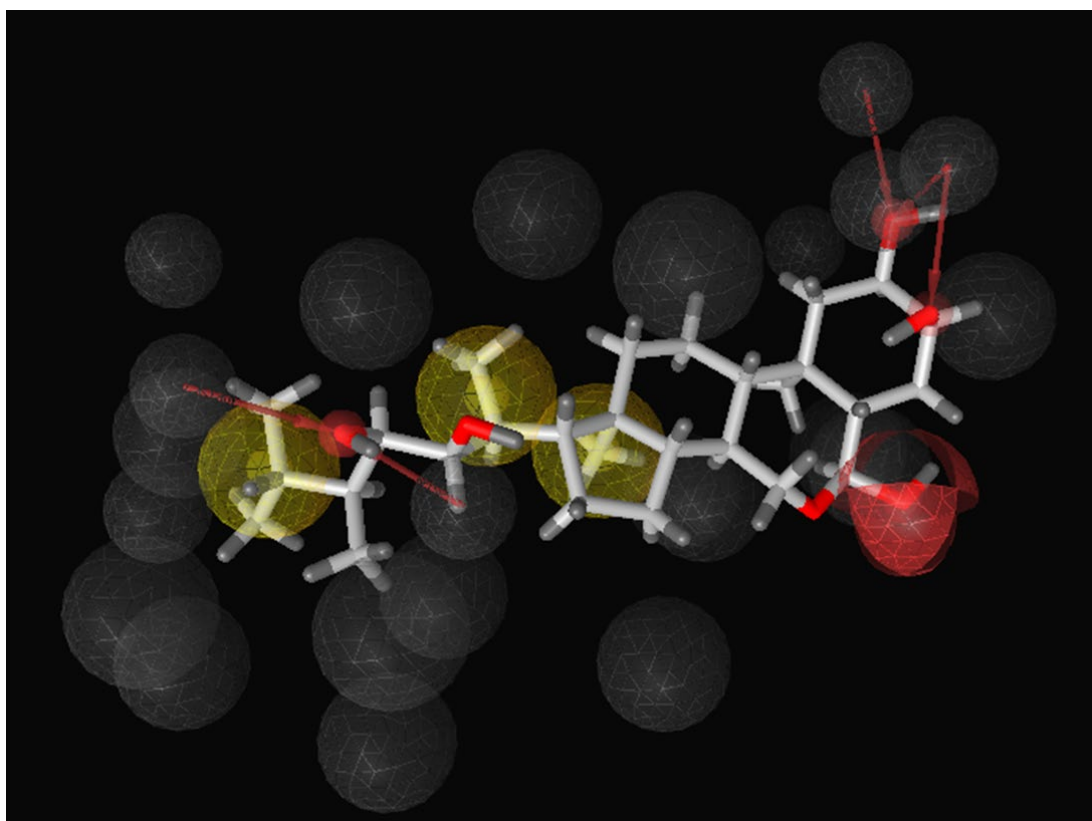


図3.3 鋳型として用いたモデル

表3-3 モデルに含まれる相互作用スフィア

相互作用の種類	スフィア位置	相互作用の対象となる残基
疎水性相互作用	18-C	Trp564, Tyr599, Ile682, Phe681
	19-C	Ile682, Ile706, Tyr729
	20,21-C	Met657, Phe61, Phe681
	24,28-C	Tyr597, Leu615, Thr646, Trp564, Met657
	25,26,27-C	Thr646, Ile540, Met657, Ile563, Try564
水素結合ドナー	22-OH	Tyr597
アクセプター	2-OH	His62(側鎖), His62(アミド基)
	3-OH	His62
	22-OH	Tyr597
	23-OH	Ser647, Typ597

### 3-2-2 活性評価

#### 3-2-2-1 イネ葉身屈曲試験法

イネ葉身屈曲試験法(Lamina Inclination Assay, LIA)は、BL 様活性化化合物をイネの第二葉身基部に投与した場合に、第二葉身が大きく屈曲する特異的な反応を利用しBL 様活性を評価する方法である。活性試験には矮性イネ品種短銀坊主を使用した。種子を2%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に1分間浸し、滅菌水で3回洗浄した。これを滅菌水に浸して28°Cで2日間静置し、発芽した種子を1%アガロース培地に移した。4日後に育ったイネの第二葉身基部に25 mM IAA と各種濃度の候補化合物のエタノール溶液を1 µL ずつ投与し、28°Cで2日間静置した。BL 活性を有する場合は葉身が大きく屈曲することから、imageJ を用いてこの角度を測定した。なお、ポジティブコントロールとしては1 mM BL/エタノール溶液、ネガティブコントロール

ールとしてはエタノールを 1  $\mu\text{L}$  ずつ第二葉身基部に投与した. 評価系の概要を図 3.4 に示す.

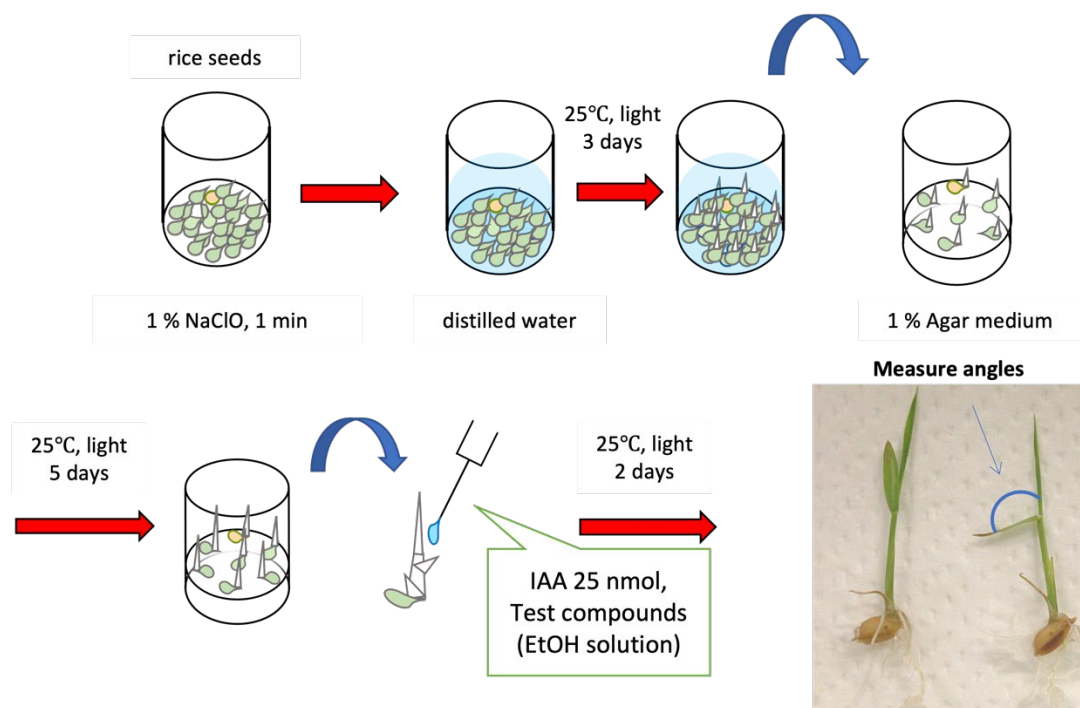


図 3.4 イネ葉身屈曲試験法

### 3-2-2-2 シロイヌナズナ胚軸伸長試験

双子葉類植物を明所で育成した場合は, 胚軸が伸びずに子葉が展開する光形態形成を示す. また暗所で育成した場合, 胚軸が伸長して子葉が展開しない「もやし」状の形態を示す. さらに暗所で BL 生合成阻害剤 brassinazole (Brz) を添加した条件で生育した双子葉植物は, 胚軸が短くなり子葉が開く「暗所光形態形成」を示す. この特徴から, 化合物投与による暗所光形態形成誘導をアンタゴニスト活性の指標, Brz との共投与時の脱暗所形態形成(もやし状形態)誘導をアゴニスト活性の指標と考えることができる. 候補化合物と Brz を共投与, または化合物を単独で投与して 7 日間生育させたシロイヌナズナの胚軸の長さを測定することにより, BL アゴニスト/アンタゴニスト活性の有無を確認した. 評価系の概要を図 3.5 に示す.



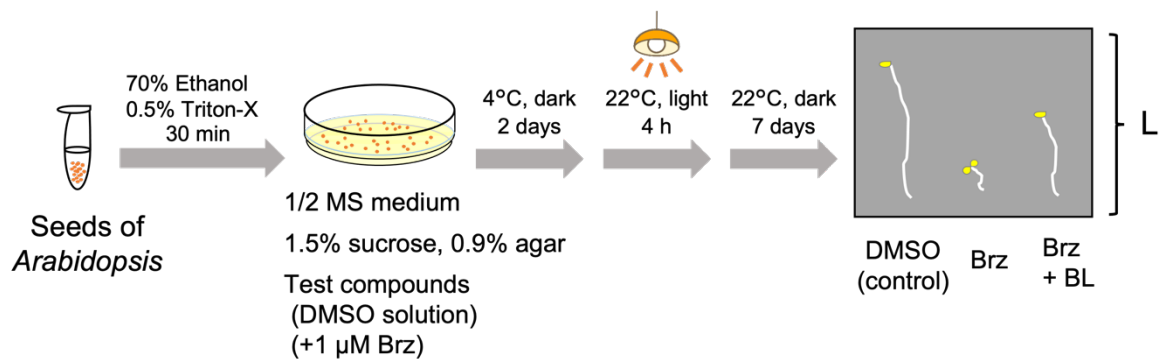


図 3.5 シロイヌナズナの胚軸伸長試験法

活性試験には野生型のシロイヌナズナ種子 Col-0 を使用した。種子を 0.5% Triton を含む 70%エタノール溶液に浸し、転倒混和後 30 分間静置した。溶液を捨てて 99%エタノールを加え、1 分間静置した後、滅菌ろ紙上に移して乾燥させた。各種濃度の候補化合物を含む 1/2 MS 培地 15 mL に乾燥種子を 25 粒ずつ播種し、4°C で 2 日間春化処理を行った。その後、明所条件下 22°C で 4 日、暗所条件下 22°C で 7 日間培養した。成長した胚軸を並べて画像処理し、ImageJ を用いて測定した。

### 3.3 結果および考察

#### 3-3-1 インシリコスクリーニング

上述の通り構築した 10 億配座を含む Namiki\_3D データベースに対して、鑄型ファーマコフォアモデルと同様のファーマコフォアを持つ化合物のスクリーニングを実施した。その結果、21 個の化合物が得られ、そのうち 15 個の化合物を購入した (図 3.6)。

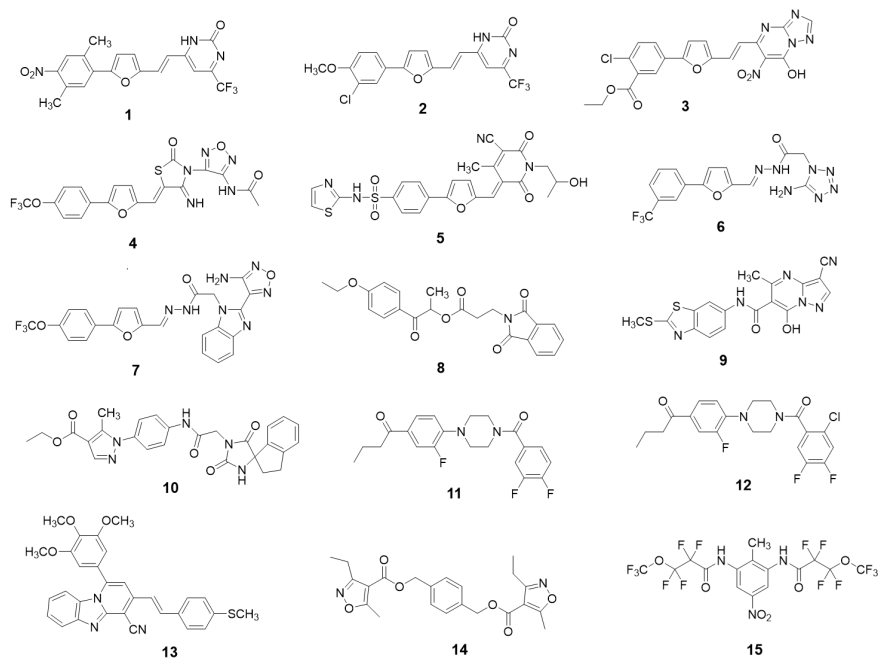


図 3.6. 購入した化合物の化学構造式

### 3-3-2 イネにおけるブラシノステロイドアンタゴニストの発見

イネ葉身屈曲試験法はBL様活性評価系として古くから用いられており、有力な活性評価系の一つとされている。そこで、イネ葉身屈曲試験法を用いて購入した15個の化合物の活性を評価したところ、図3.7に示すように、すべての化合物にホルモン活性は存在しなかった。しかし、受容体のリガンド結合部位に結合可能な化合物を探索していることから、BLの結合を阻害するアンタゴニストである可能性は排除できなかった。

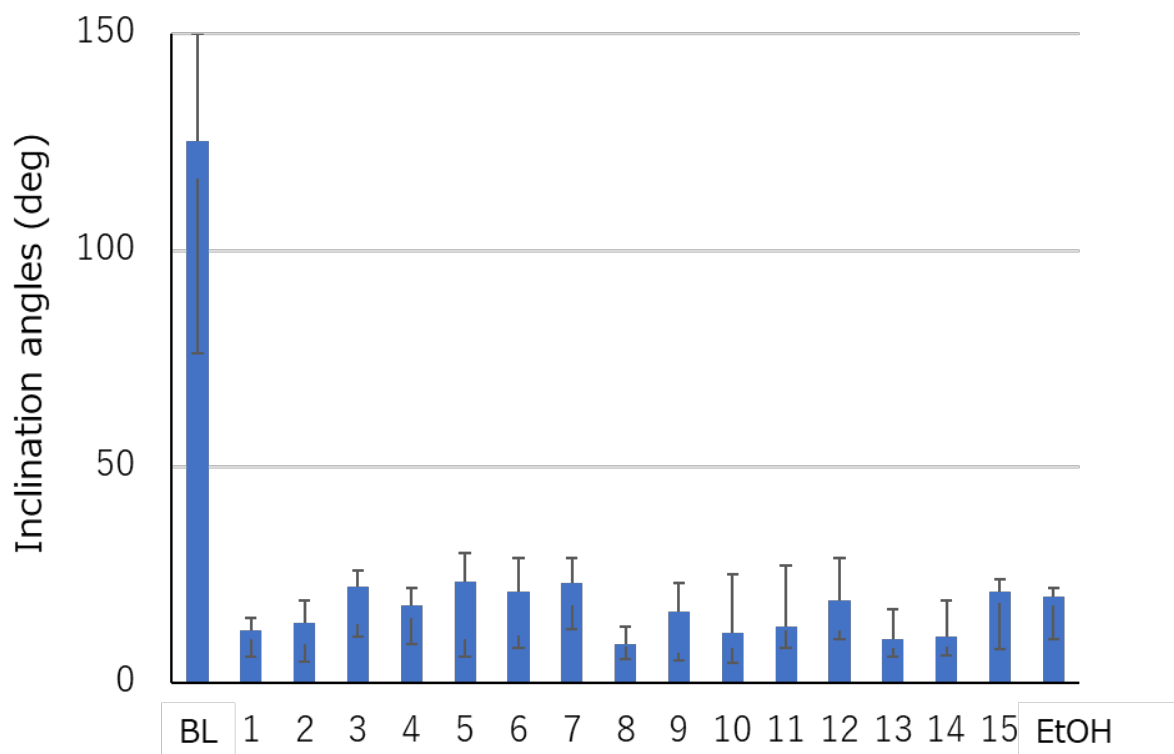


図3.7 イネ葉身屈曲試験法におけるアゴニスト活性

そこで、アンタゴニスト活性を調べることにした。すなわち、BLと供試化合物を共処理して、BLの活性を抑えることができるかを調べた。その結果、図3.8に示すように3つの化合物(1, 2, 14)がBLの効果を顕著に抑えることがわかった。

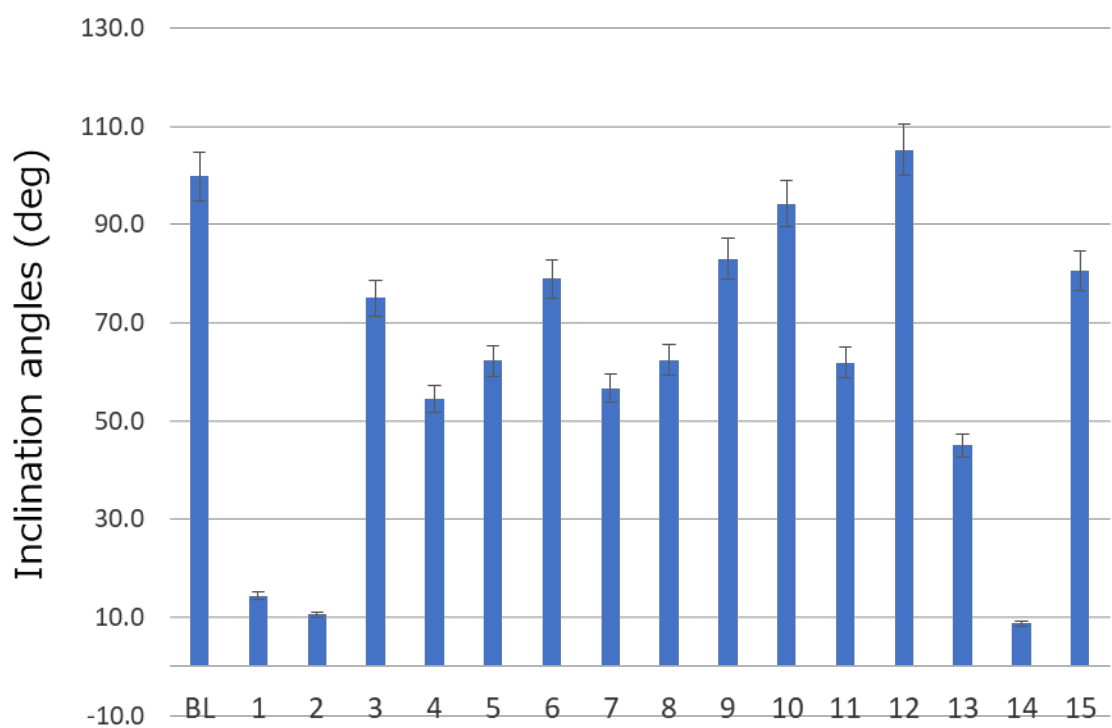
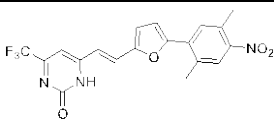
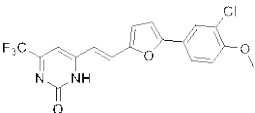
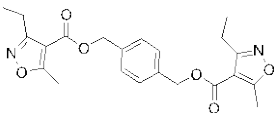


図3.8 アンタゴニスト活性

そこで、1, 2, 14について、濃度応答曲線を描いて50%阻害濃度を決定したところ、表3.4の結果が得られた。1, 2はベンゼン環の置換基が異なるだけで、基本構造は同じであった。14は、p-phenethylalcoholとisoxazole-4-carboxylic acidがエステル結合した化合物である。

表 3.4 イネ葉身屈曲試験においてアンタゴニスト活性を示した化合物の 50%阻害濃度

No.	構造式	IC <sub>50</sub> (nmol)
1		5.0
2		3.2
14		0.63

### 3-3-3 シロイヌナズナにおけるブラシノステロイドアンタゴニストの発見

今回のインシリコスクリーニングでは、シロイヌナズナ由来のタンパクを利用したことから、化合物の活性評価はシロイヌナズナでも行うべきと考えた。そこで、イネ葉身屈曲試験法を用いて活性評価を行った化合物（一つを除く）をシロイヌナズナの胚軸伸長評価系を用いて活性測定を行ったところ、**11,12**の化合物がBLの生合成阻害剤である Brz と同じように、100 μM の濃度で胚軸伸長を阻害した(図 3.9)。両化合物の基本骨格は同じ (*N*-benzoyl-*N*-phenylpiperazine: NBNPP) でベンゾイル部の置換基が異なるだけのものであった。イネ葉身屈曲試験においてアンタゴニスト活性が見出された化合物 **1, 2, 14** はシロイヌナズナに対しては活性を示さなかった。

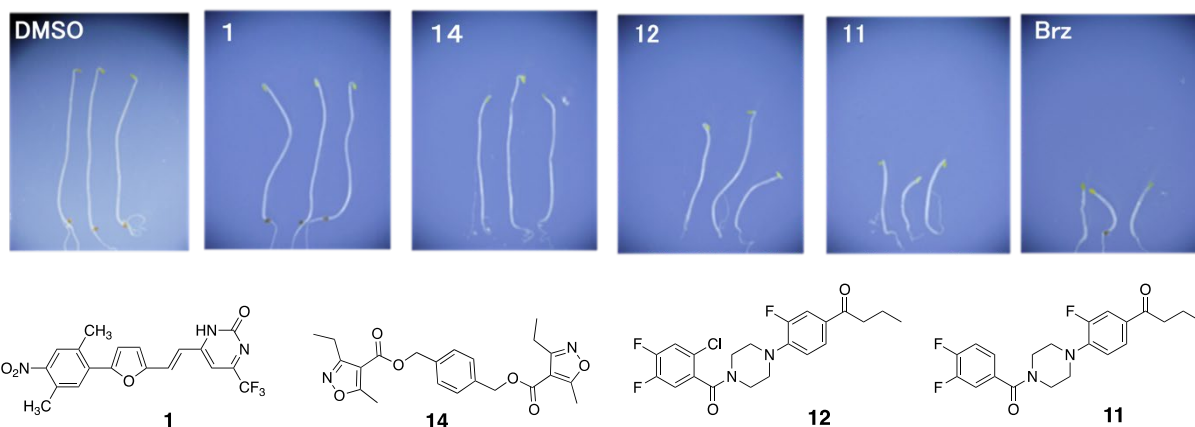


図 3.9 シロイヌナズナの胚軸伸長阻害

シロイヌナズナの活性評価系においては活性を定量的に求めていないために、化合物 11 と 12 の活性の強度差はわからないが、100  $\mu$ M の濃度では 11 の方が若干強い阻害効果を示した。

### 3-4 まとめ

インシリコスクリーニングによって 500 万化合物から 22 個の化合物を見出した、今後の構造展開を考えてその中から 15 個の化合物を入手し、イネ葉身屈曲試験法および、シロイヌナズナ胚軸伸長試験法を用いて活性評価を行った。それぞれの系で、3つのアンタゴニストと2つのアンタゴニストが見出されたが、アゴニストは見出されなかった。シロイヌナズナ対して見出された化合物の基本構造はどちらも *N*-benzoyl-*N*-phenylpiperazine という比較的構造展開が容易であったこと、受容体の結晶構造がシロイヌナズナのものであったことから、この構造を変換してアゴニストへ導くことを考えた。

## 第4章 新規ブラシノステロイドアゴニスト(NSBR1)の発見

### 4-1 緒言

シロイヌナズナでアンタゴニスト活性が見出された化合物の構造とBLの構造を重ね合わせて、アゴニスト活性に必要と考えられる構造への変換を行った。その際に、化合物の受容体へのドッキングと、受容体への結合自由エネルギーの計算を行った。また、BLに応答する遺伝子の発現量についても調べた。

### 4-2 方法

#### 4-2-1 分子設計

BRのシグナル伝達については近年研究が進み、シグナル伝達の分子生物学的機構が明らかとなっている(Clouse *et al.*, 2011)。BLの受容体であるBRI1は共受容体(BAK1, SERK1等のSERKファミリータンパク)とヘテロダイマーを形成し、相互リン酸化を通じて活性化されることでシグナル伝達を開始する。ただし、BRI1はBR非存在下ではネガティブレギュレーターであるBRI1 KINASE INHIBITOR1(BKI1)によって不活化されており、SERKsとのヘテロダイマーは形成されない。BR存在下では、BRがBRI1, SERKsの両方と結合することで、分子糊として働き、BK11の不活化及びSERKsとのヘテロダイマー形成を誘発する。このようなBRシグナル伝達機構を考慮すると、アンタゴニストである化合物**11** (あるいは**12**) は、受容体ポケット表面の大半を占めるBRI1とのみ相互作用し、SERKsとの相互作用が不十分である可能性が考えられた。

インシリコスクリーニングにおいて用いたファーマコフォアに基づいて、BLと化合物**11**を重ね合わせると、化合物**11**のA環の3,4-F<sub>2</sub>がBLのステロール骨格A環の3,4-(OH)<sub>2</sub>に相当することがわかった(図4.1)。

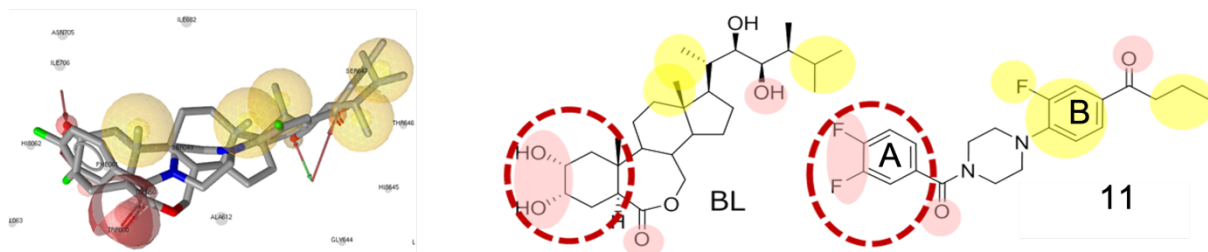


図4.1 BLの化合物11を重ね合わせ

BL-BRI1/SERK1 複合体結晶構造より A 環の 3,4-(OH)<sub>2</sub> は SERKs と相互作用を形成する部分構造であることから、この部分の変換がアゴニスト創出に重要であると考え、化合物 11 の A 環部置換基を 3,4-(OH)<sub>2</sub> に変換した化合物 16(図 4.3)を設計した。BL, 化合物 11, 化合物 16 を受容体にドッキングした結果、アンタゴニストである化合物 11 では A 環部に水素結合が認められなかったが、化合物 16 では OH と受容体との間に水素結合が形成されることがわかった(図 4.2)。しかし、BL は Val, His において SERK1 と相互作用していたのに対して、化合物 16 は Val, Phe で相互作用していた。SERK1 との相互作用が確認されたことから、化合物 16 を合成して活性を確認することとした。

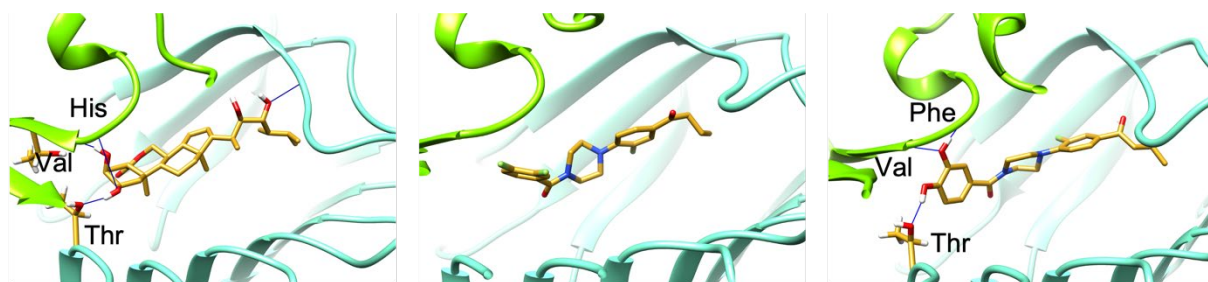


図4.2 BL, 化合物11, 化合物16のドッキングポーズ



#### 4-2-2 化合物の合成

化合物16は図4.3の方法によって合成した。

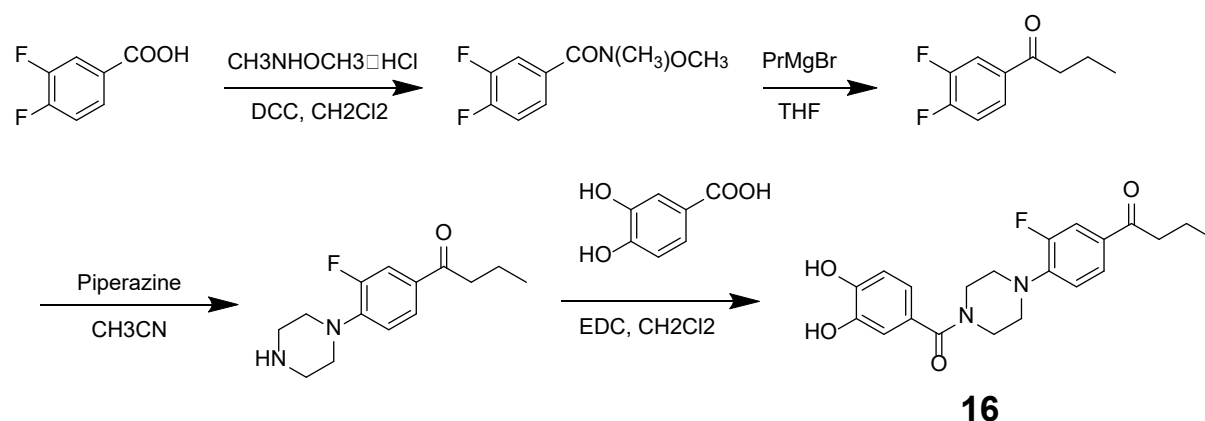


図4.3 化合物16の合成スキーム

化合物の合成に用いた試薬は、特に断りのない限り市販品をそのまま用いた。無水溶媒は富士フィルム和光純薬およびナカライテスクより購入し、活性化したモレキュラーシーブスを入れて保存した。トリエチルアミンは粉碎した水素化カルシウム上で数時間還流した後、常圧蒸留により精製し、水酸化ナトリウムを入れて保存した。水分や酸素を嫌う反応は、あらかじめ恒温乾燥機 (120°C) で乾燥したガラス器具を用いてアルゴン雰囲気下で行った。反応の進行や化合物の純度検定には、シリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck) を用いて254 nmの紫外線照射によって検出した。紫外線吸収を持たない化合物は、モリブデン酸アンモニウムセリウム溶液を噴霧し、加熱乾燥することにより、呈色するスポットとして検出した。シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーには、Biotage Isolera OneおよびSNAP Ultraカートリッジ (球状シリカゲル, 粒径25 μm) を用いた。化合物の融点は、柳本製作所MP型微量融点測定装置を用いて測定した。測定値は未補正である。核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは、Bruker AVANCE III 400および500を用いて測定した。内部

標準として、 $^1\text{H}$  NMRにはtetramethylsilane (0 ppm) を、 $^{13}\text{C}$  NMRには測定溶媒のシグナル [ $\text{CDCl}_3$  (77.00 ppm)] を使用した。シグナルの結合様式は、s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), quin (quintet), sext (sextet), sep (septet), m (multiplet), br (broad) およびこれら記号の組み合わせにより表現した。高分解能質量析スペクトル (HRMS) は京都大学工学研究科合成・生物化学専攻の技術室に依頼し、Thermo Fisher Scientific EXACTIVEを用いて測定した。

### 3,4-Difluoro-*N*-methoxy-*N*-methylbenzamide

3,4-ジフルオロ安息香酸 (2.5 g, 15.8 mmol) と *N,O*-ジメチルヒドロキシルアミン塩酸塩 (2.3 g, 22.8 mmol) を無水ジクロロメタン (100 mL) に溶解し、DCC (3.2 g, 16.1 mmol) を添加した。室温で5時間攪拌した後、水 (40 mL) およびクロロホルム (40 mL) を加えた。固形物を濾過により除去した。水層をクロロホルム(40 mL)で3回抽出した。クロロホルム層を合わせ、飽和NaCl溶液50mLで洗浄した。クロロホルム層を無水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥し、蒸発させて、黄色がかった油状物質(5.82 g)を得た。NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 7.53 (m, 1H), 7.51 (m, 1H), 7.21 (m, 1H), 3.55 (s, 3H), 3.37 (m, 2H).

### 1-(3,4-Difluorophenyl)butan-1-one

3,4-Difluoro-*N*-methoxy-*N*-methylbenzamide (1.0 g, 6.3 mmol) をAr気流下で10 mLの無水THFに溶解させた。THFに溶解した2 M  $\text{PrMgBr}$  (2 mL) を滴下して加え、室温で2時間攪拌した。飽和 $\text{NH}_4\text{Cl}$  水溶液 (10 mL) を加えて反応をクエンチし、30 分間攪拌した。混合物に水 (40 mL) およびクロロホルム (20 mL) を加えた。水層をクロロホルム(30 mL)で3回抽出した。合わせたクロロホルム層を飽和NaCl (30 mL)で洗浄し、無水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥させた。濾過により $\text{Na}_2\text{SO}_4$ を除去した後、蒸発させて粗淡黄

色がかった油状物質を得た。このオイルをクロマトグラフィーで分離した (0.87g, 収率79%)。 NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.74 (m, 1H), 7.72 (m, 1H), 7.25 (m, 1H), 2.90 (t, 2H), 1.75 (sextet, 2H), 1.00 (t, 3H).

#### 1-(3-Fluoro-4-piperazin-1-yl)phenylbutan-1-one

1-(3,4-Difluorophenyl)butan-1-one (0.62 g, 3.4 mmol) およびpiperazine (1.0 g, 11.6 mmol) をアセトニトリル(2 mL)に溶解し、一晩還流させた。反応混合物に水(30 mL) および酢酸エチル(20 mL)を加え、水層を酢酸エチル(20 mL)で3回抽出した。有機層を合わせ、飽和NaCl (30 mL)で洗浄し、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させた。Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を除去した後、濾液を減圧下で濃縮し、淡黄色がかった油状物質を得た (0.64 g, yield 76%)。 NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.66 (dd, 1H), 7.61 (dd, 1H), 6.91 (t, 1H), 3.18 (m, 4H), 3.04 (m, 4H), 2.86 (t, 2H), 1.74 (sextet, 2H), 1.66 (bs, 2H), 0.99 (t, 3H).

#### N-(3,4-dihydroxybenzoyl)-N'-(4-butanoyl-2-fluorophenyl)pyrazine (化合物16)

3,4-dihydroxybenzoic acid (0.1 g, 0.64 mmol) と1-(3,4-difluorophenyl)butan-1-one (0.1 g, 0.40 mmol) を無水ジクロロメタン5 mLに溶解し、WSC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride; 0.2 g, 0.8 mmol) を添加した。室温で2時間攪拌した後、水 (10 mL) およびクロロホルム (40 mL) を加え、水層をクロロホルム (5 mL) で3回抽出した。クロロホルム層を飽和NaClで洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥した。溶媒を蒸発させた後、残渣をヘキサン/クロロホルムから結晶化して無色固体を得た (14 mg, yield 9%)。 NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.71 (dd, 1H), 7.67 (dd, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.91 (t, 1H), 3.85 (bs, 4H), 3.23 (bs, 4H), 2.88 (t, 2H), 1.76 (q, 2H), 1.72 (bs, 2H), 0.99 (t, 3H). m.p.147 – 148 °C. HRMS m/z calculated for C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M-H]<sup>-</sup>: Calcd: 385.1564. Found 385.1563.

#### 4-2-3 シロイヌナズナの遺伝子応答解析

シロイヌナズナBRによって発現が調節される数千もの遺伝子の中から、BRの有無による感受性が高いとされている8遺伝子を選出し、これらの発現量の増減をリアルタイムPCRによって比較した（表4.1）。

表4.1 BR感受性の高い遺伝子とその機能

##### (A) BRによって発現が促進される遺伝子

遺伝子	遺伝子産物
TCH4	キシログルカンエンドトランスグリコシラーゼ
SAUR-AC1	カルモジュリン結合タンパク質 (低分子量オーキシン応答性タンパク質)
BAS1	BR C-26位 水酸化酵素 CYP734A1 (BRの分解による不活性化)
IAA19	オーキシン初期応答性核タンパク質

##### (B) BRによって発現が抑制される遺伝子

遺伝子	遺伝子産物
DWF4	BR C-22位 水酸化酵素 CYP90A1
BR-6-ox2	BR C-6位 水酸化酵素 CYP85A2
ROT3	BR C-23位 水酸化酵素 CYP90C1
CPD	BR C-3位 水酸化酵素 CYP90B1

#### サンプル準備

遺伝子解析においても第三章に記載のシロイヌナズナ胚軸伸長試験と同様の操作で種子の滅菌および、各種濃度の候補化合物を含む培地の作成を行った。続いて、明所条件の場合は培地25 mLに乾燥種子を50粒ずつ播種し、4°Cで2日間春化処理を行った。その後、長日条件下（16時間日長）22°Cで7日間培養した。また、暗所条件の場合は100粒を播種し、春化処理後に暗所22°Cで7日間培養した。

シロイヌナズナを約60 mg量り取り，ビーズ（大2，小2）とともにテストチューブに入れて $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結させた．また，15 mL遠沈管に1%  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) / Buffer RLT溶液を調製し，凍結させた．

## RNA抽出

凍結させたサンプルをビーズクラッシャー  $\mu\text{T-01}$  (TAITEC, 3,600rpm, 10 sec) により破碎し，vortexによりビーズを取り出した．サンプルに1%  $\beta$ -ME / Buffer RLT溶液を500  $\mu\text{L}$ 加え，室温で遠心分離 (8,000rpm, 15 min) を行った．上清450  $\mu\text{L}$ を2 mLサンプルチューブに移してQIAcube (Qiagen) によりtotal RNAを抽出した．25倍希釈したRNAの260 nmにおける吸光度をRNAの濃度 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) とみなし，吸光度を測定して抽出したRNAの濃度を算出した．さらにアガロース電気泳動を行い，RNAが分解されていないこととバンドの濃さが揃っていることを確認した．

## cDNA合成

### ・ 操作手順

抽出したtotal RNA (0.45  $\mu\text{g}$ ) をRNase Free  $\text{dH}_2\text{O}$ で6.5  $\mu\text{L}$ に希釈し，1.5 mLマイクロチューブに分注した．PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa) を用いて反応液を作製し，先ほどのチューブに表4.2の組成となるように分注した．反応液を $37^{\circ}\text{C}$ で15分間， $85^{\circ}\text{C}$ で5秒間インキュベートして逆転写反応を行い，滅菌水40  $\mu\text{L}$ を添加した．

表4.2 cDNA反応液の組成

試薬	量 (μL)
Total RNA in RNase Free dH <sub>2</sub> O	6.5
5× PrimeScript Buffer (for Real Time)	2
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5
Oligo dT Primer (50 μM)	0.5
Random 6 mers (100 μM)	0.5

### Real-Time PCRによる遺伝子発現解析

Real-Time PCRは、PCR産物をリアルタイムでモニタリングするため、指数関数的増幅領域でDNAの正確な定量を行うことができる。PCRでは、DNAは指数関数的に増幅し、最後には定常状態に達する。本実験では検出方法として、インターカレーター法を用いた。インターカレーター法では、PCR反応によって合成された二本鎖DNAにインターカレーターが結合し、励起光の照射により蛍光を発するので、この蛍光強度を検出することで増幅産物を定量することができる。PCR増幅産物が蛍光検出できる濃度になると、増幅曲線は立ち上がり始める。そのため、最初に存在しているDNAが多いものほど、立ち上がり始めも早くなる。適当な蛍光強度で閾値 (Threshold Cycle, Ct値) を設定すると、そのCt値に達するまでのサイクル数は、最初に存在しているDNAの量に比例する。本実験では、解析方法として $\Delta\Delta Ct$ 法を用いた。これは、検量線を用いずにキャリブレーターとのCt値の差を相対量に換算する方法である。本実験においては恒常的に発現していると考えられるアクチン (ACT2) をキャリブレーターとして使い、ACT2の発現量を基準とした相対定量を行った。遺伝子特異的プライマーを表4.3に示す。

表4.3 RT-PCRに利用したBR応答遺伝子のプライマー

Genes	Forward primer	Reverse primer
<i>ACT2</i> (At3g18780)	CGCCATCCAAGCTGTTCTC	TCACGTCCAGCAAGGTCAAG
<i>SAUR-AC1</i> (At4g38850)	GAGATATGTGGTGCCGGTTT	GTATTGTTAAGCCGCCATT
<i>TCH4</i> (At5g57560)	CGAGTCTTTGGAACGCTGAT	CTTCTTGTTGAAAGCCACGG
<i>IAA19</i> (At3g15540)	GAAGGACTCGGGCTTGAGAT	GACGCCGCTTTCACATTG
<i>DWF4</i> (At3g50660)	CATAAAGCTCTCTTCAGTCACGA	CGTCTGTTCTTTGTTTCCTAA
<i>BR6ox2</i> (At3g30180)	GGAGGTGGAGTTAGGCTTTGCC	TCTTCTCCATTCTCTCCCATCTAT
<i>BASI</i> (At2g26710)	GCCAAATTGACACTCGCTGTAA	GACGGTAGGTGCATGCTGATAA
<i>CPD</i> (At5g05690)	CACTCAAAGATGCTCGCACTT	CAGCTCGTAACCGGGACATAG

試薬はSYBR® *Premix Ex Taq*<sup>TM</sup> II (Tli RNaseH Plus, TaKaRa) を用い、表4.4に示す組成でマイクロチューブに反応液を調製した。

表4.4 リアルタイムPCR反応液の組成

試薬	量 (μL)
SYBR® <i>Premix Ex Taq</i> <sup>TM</sup> II	6.25
滅菌水	3.65
Forward primer (100 μM)	0.05
Reverse primer (100 μM)	0.05
cDNA	2.5

8連チューブに反応液を入れてふたを閉め、Thermal cycler Dice® Real Time System (TaKaRa) を用いてPCR増幅量をリアルタイムでモニターし解析した。

### 4-3 結果および考察

#### シロイヌナズナにおけるアゴニスト活性

化合物16の活性をシロイヌナズナ胚軸伸長試験において評価したところ、10  $\mu\text{M}$ の濃度で、BLと同様に胚軸の伸長を促進した(図4.4).

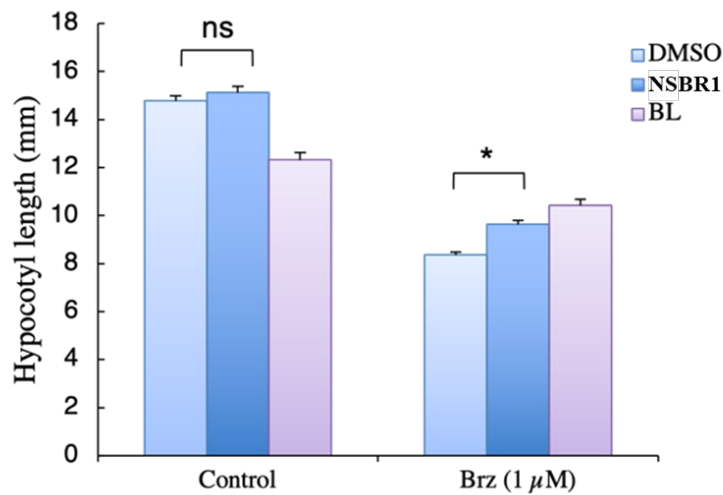


図4.4 シロイヌナズナの胚軸伸長

BLと同じ作用を示したことから、BLに応答する遺伝子発現をRT-PCRによって調べた。その結果、CPD、BR6ox2遺伝子がBLと同様にダウンレギュレートされた(図4.5).

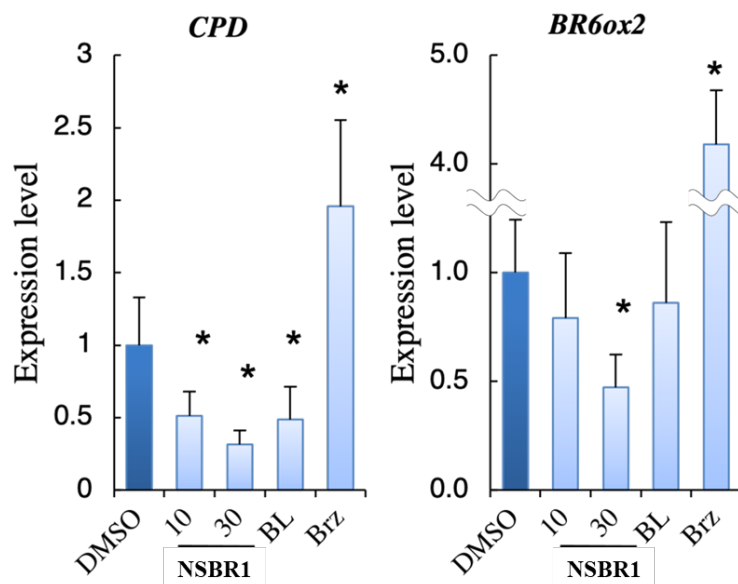


図4.5 RT-PCRによる遺伝子発現解析



シロイヌナズナ胚軸伸長試験および遺伝子発現解析の結果より、化合物**16**がBLアゴニスト活性を持つことが示された。そこで、化合物**16**を新規BLアゴニストNSBR1と命名した。

#### イネにおけるアゴニスト活性

NSBR1をイネ葉身屈曲試験法によって評価したところ、アゴニスト活性が確認された。薬量応答曲線（図4.6）からEC<sub>50</sub>値を0.79 nmol (pED<sub>50</sub>=9.1)と決定した。

NSBR1の活性は、BL (pED<sub>50</sub>=13.6) に比べると1/30000と非常に低いものであったが、渡辺らによって合成されたBRsの中で弱い活性を示した21-epiCS (pED<sub>50</sub>=8.5), 21-norCS (pED<sub>50</sub>=8.7)よりも若干高く、23-methoxyCS (pED<sub>50</sub>=9.2)と同程度であった。

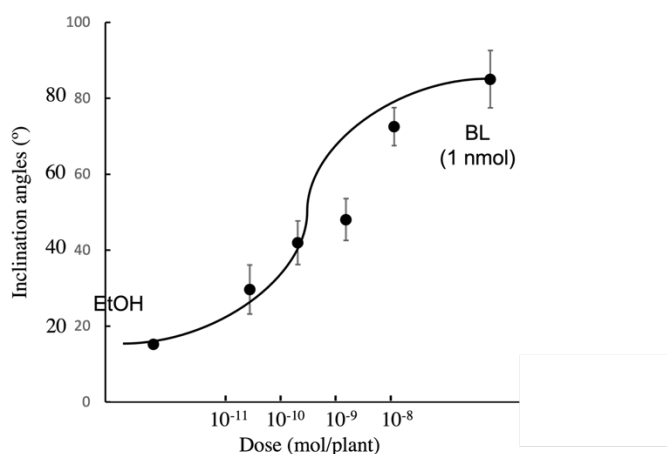


図4.6 NSBR1の濃度応答曲線

葉身屈曲試験法によってNSBR1のpEC<sub>50</sub>値は9.1と定量的に求めることができたことから、受容体への結合エネルギーとの関係を調べることにした。

渡辺らは、MM/PBSAによってBRsの受容体への結合自由エネルギー変化 $\Delta G_{bind}$ を計算し、 $\Delta G_{bind}$ と活性pED<sub>50</sub>との間に相関関係を見出している (Watanabe *et al.*,

2017). そこで、NSBR1についても同様に結合自由エネルギーを計算したところ、BRsで得られた相関関係で表すことができた(図4.7). このことから、NSBR1がBRsと同じくBRI1およびSERK1と結合していることがエネルギー計算からも支持された.

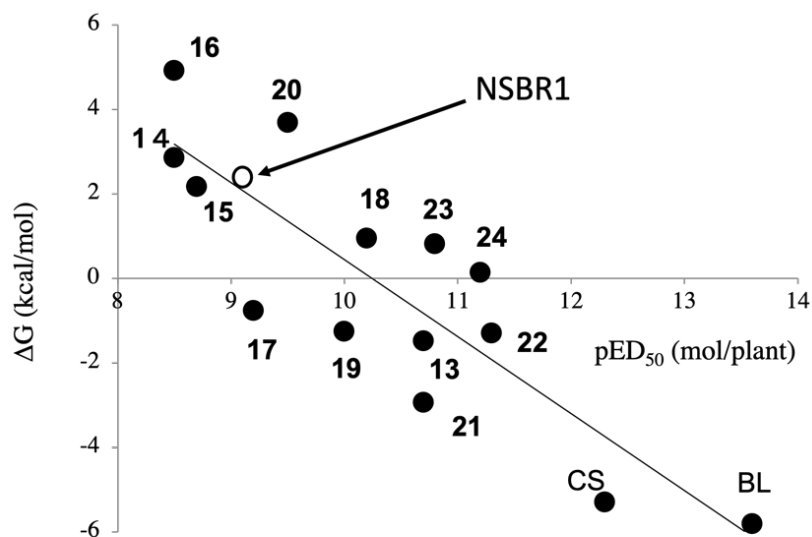


図4.7 BRsおよびNSBR1の結合自由エネルギーと活性の関係

#### 4-4 まとめ

インシリコスクリーニングにより得られた化合物11から、BLの作用機序及び化合物11の結合配座よりジフルオロベンゼン部をカテコール構造に変換した化合物16を設計した。化合物16の合成及び活性評価を実施したところ、化合物16はシロイヌナズナ胚軸伸長試験及びイネ葉身屈曲試験においてアゴニスト活性を示した。また、化合物16投与時のシロイヌナズナ遺伝子発現を解析した結果、BR応答遺伝子がBLと同様の挙動を示した。以上の結果から、化合物16を新規BLアゴニストNSBR1と命名した。NSBR1の結合自由エネルギーを計算し活性値との相関を解析した結果、BRsと同様の関係を示した。

## 第5章 NSBR1の構造活性相関研究

### 5-1 緒言

ハイスループットスクリーニングのようなWetでの実験であれ、本研究のようなインシリコ手法であれ、スクリーニングのヒット化合物はしばしばヒット化合物のみが活性を示すシングルトンである。NSBR1が新規非ステロイド型BLアゴニストであることは第4章で述べた通り確認されているものの、その生物活性はBLの約3万分の1と非常に弱く、構造活性相関情報も不明である。NSBR1を起点として農薬として必要な実用レベルの活性を持つ化合物を創出するためには、*N*-benzoyl-*N*-phenyl-piperazine(NBNPP)構造がアゴニスト骨格として確かであることを確認するとともに、活性向上のヒントとなる構造活性相関情報を得ることが必要である。そこで、NSBR1の構造活性相関の把握及び、より強度の高いアゴニスト創出を目的としてNSBR1の各部分構造を変換した類縁体を設計・合成し、活性評価を実施した。

### 5-2 方法

#### 5-2-1 NSBR1類縁体の分子設計

類縁体設計を実施する際には、結合様式や官能基の役割を考えることが必須であるのは当然であるが、比較的合成容易な類縁体をターゲットとすることも重要である。そこで、図4.3に示した合成ルートを考慮しNSBR1を図5.1に示す4つの部位に分けて類縁体設計を実施した。

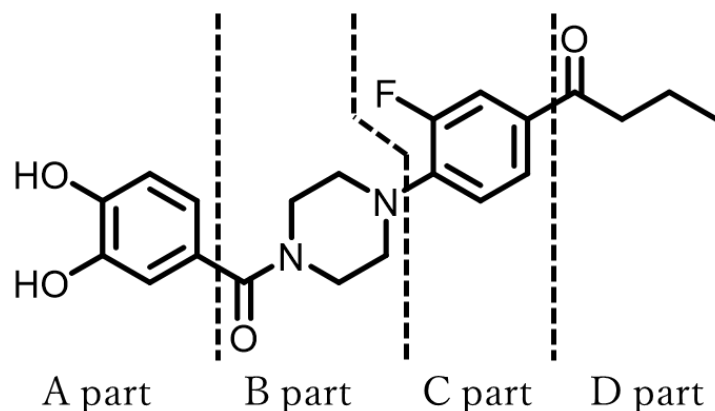


図5.1 NSBR1の構造

また、それぞれの部分構造がBLのどの部分に対応するかをドッキングポーズの重ね合わせから整理した(図5.2).

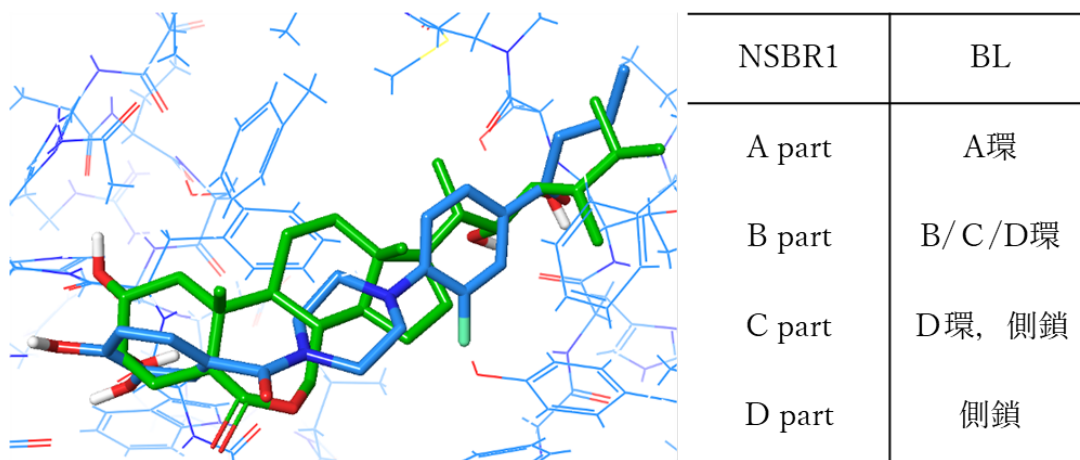


図5.2 BL(緑)とNSBR1(青)の重ね合わせおよび部分構造の対応関係

NSBR1のドッキングポーズ及びBLとの重ね合わせから、以下の方針で各部分構造を変換した類縁体を設計した。

#### A部分の類縁体設計

A部分はアンタゴニストである化合物11の置換基(3,4-F<sub>2</sub>)を3,4-(OH)<sub>2</sub>に変換する

ことによって NSBR1に誘導した，アゴニスト活性発現に重要な部分構造である．ただし，4-2-1で述べた通り，相互作用様式はBLとNSBR1で異なっており，いずれかの水酸基はアゴニスト活性に重要でない可能性がある(図5.3)．

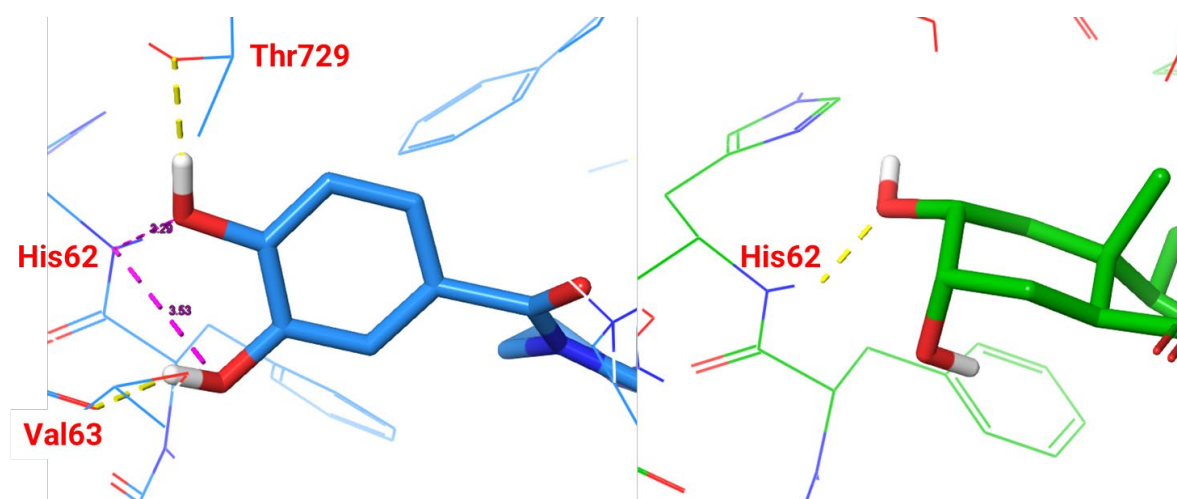


図5.3 Aパート部分の相互作用様式(BL：緑，NSBR1：青)

具体的には，水酸基の持つ水素結合ドナー/アクセプターのいずれの機能も必要でない，または水素結合アクセプター機能のみが活性発現に重要である可能性が考えられた．そこで，まず，Aパートの置換基を3-OH，4-OHまたは3-NO<sub>2</sub>基，4-NO<sub>2</sub>基に変換して，活性の変化を調べることにした．

### Bパートの類縁体設計

BパートはBLのB/C/D環部に相当し，BLでは脂溶性の高い部分となっている．一方で，NSBR1はBパートにピペラジン構造という極性の高い部分構造を有するとともに，分子が占有している体積も小さい(図5.4)．

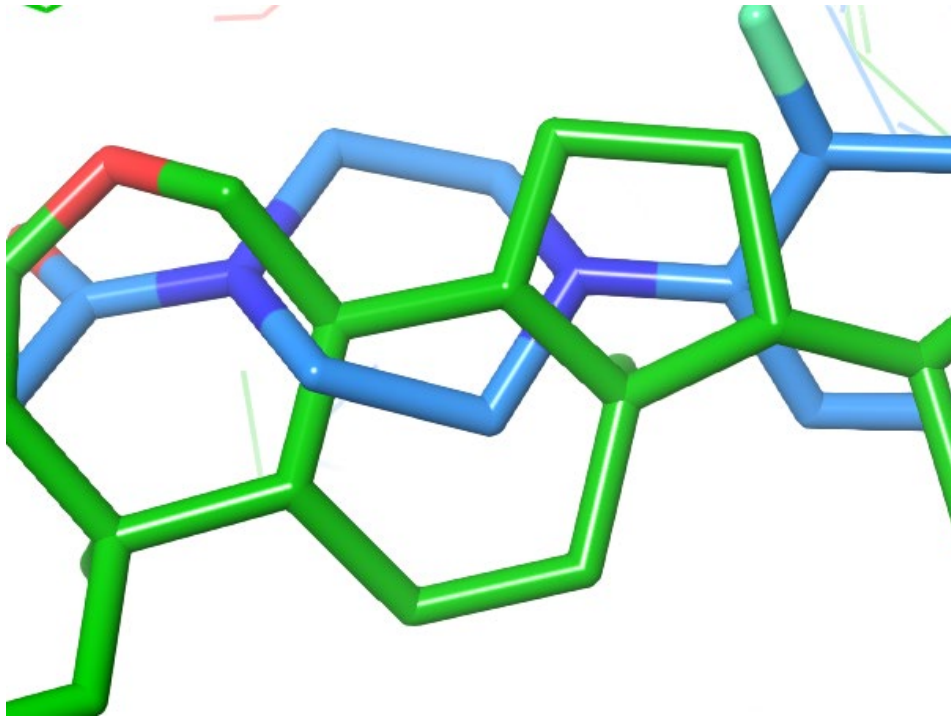


図5.4 Bパート部分の相互作用様式(BL：緑，NSBR1：青)

活性の高いBLと大きく異なる性質を持つ部分構造であるため、Bパートの脂溶性を向上するとともに分子の占有領域を拡大することで活性向上する期待があると考えた。そこで、脂溶性置換基であるCH<sub>3</sub>基の付与または極性の原因であるN原子をC原子への変換を施した類縁体を設計した。

#### Cパートの類縁体設計

Cパートの近傍にはF原子の先に脂溶性残基に囲まれた空間が存在し、Y597残基が水素結合形成可能な距離に位置している(図5.5)。そこで、CパートではF原子を脂溶性置換基(CH<sub>3</sub>基、OCH<sub>3</sub>基)または水素結合形成可能な置換基(OH基、Cl基、OCH<sub>3</sub>基)に変換した類縁体を設計した。同時に、F原子を削減することで活性が減弱するか確認することを目標としてH原子へ変換した化合物も設計した。

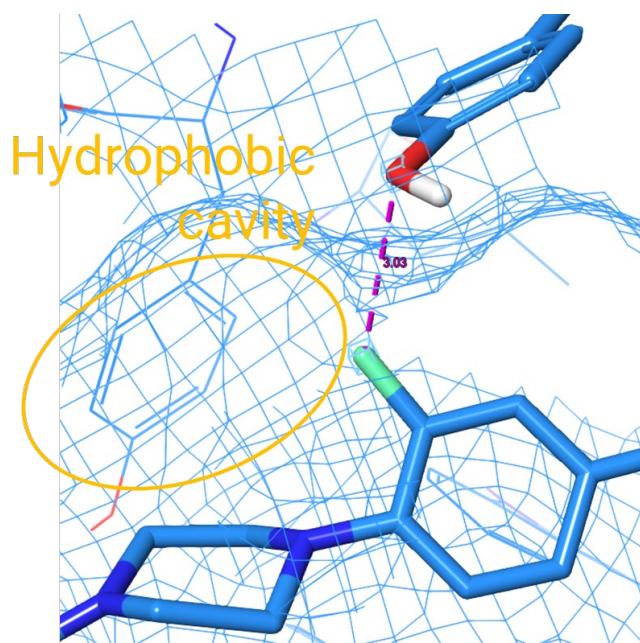


図5.5 Cパート部分の相互作用様式

### Dパートの類縁体設計

DパートはBL, NSBR1ともに脂溶性側鎖が位置しており、性質としては類似している。一方で、NSBR1はBLに比べて側鎖の分岐がなく脂溶性基の形状およびサイズが異なる。脂溶性置換基のサイズにより活性が向上する可能性があると考え、炭素数、分岐パターンの異なる種々の脂溶性置換基を設計した。

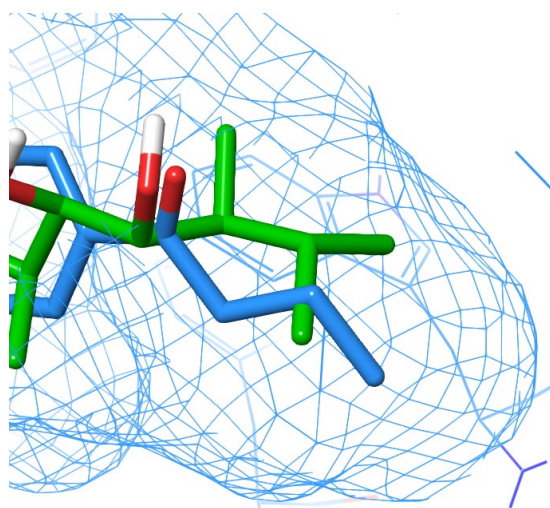
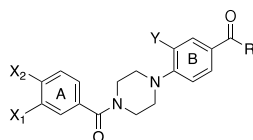


図5.6 Dパート部分の相互作用様式(BL：緑, NSBR1：青)

今回設計した化合物を表5.1に示す.

表 5.1 合成した化合物と HRMS



化合物					HRMS	
	Piperazine	A-ring		B-ring		Negative or positive mode
No.		X1	X2	Y	R	Calcd./Found
<b>NSBR1</b>		OH	OH	F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-
<b>17</b>		OH	H	F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	371.17710 371.1766
<b>18</b>		H	OH	F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	371.17710 371.1769
<b>19</b>		NO <sub>2</sub>	H	F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	400.16726 400.1669
<b>20</b>		H	NO <sub>2</sub>	F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	400.16726 400.1669
<b>21</b>		OH	OH	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	367.16578 367.1661
<b>22</b>		OH	OH	OH	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	383.1607 383.1612
<b>23</b>		OH	OH	Cl	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	401.12681 401.1272
<b>24</b>		OH	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	381.18143 381.1819
<b>25</b>		OH	OH	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	397.17635 397.1770
<b>26</b>		OH	OH	F	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	371.14071 371.1421
<b>27</b>		OH	OH	F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	399.17201 399.1723
<b>28</b>		OH	OH	F	CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	399.17201 399.1724
<b>29</b>		OH	OH	F	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	399.17201 399.1726
<b>30</b>	OH	OH	F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -cycPentyl	439.20331 439.2038	



31		OH	OH	F	CH <sub>2</sub> -cycPentyl	425.18766 425.1882
32		OH	OH	F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-
33		OH	OH	F	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	413.18766 413.1884
34		OH	OH	F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	423.16960 423.1690
35		OH	OH	F	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	413.18766 413.1884
36		OH	OH	F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	399.17201 399.1724
37		OH	OH	F	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	413.18766 423.1883
38		OH	OH	F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	399.17201 399.1724
39		OH	OH	F	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	413.18766 413.1881
40		OH	OH	F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	384.16111 384.1618

### 5-2-2 NSBR1類縁体の合成

合成の基本ルートは図5.7に示したとおりである.

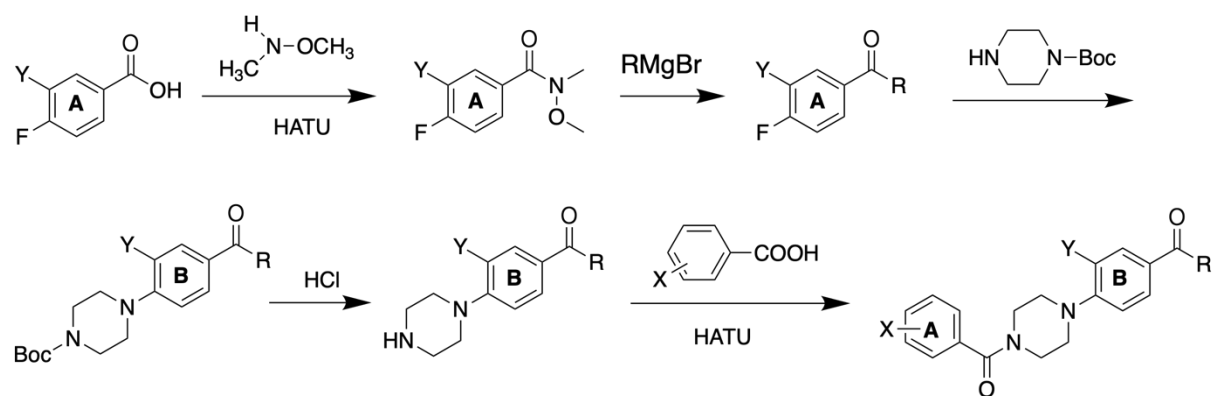


図5.7 合成スキーム

## A-パートの類縁体

化合物 17 (3-OH)

### 3-Acetoxybenzoic acid

NaOH (0.68 g) を氷水で冷却しながら50 ml容ナスフラスコ内で蒸留水8 mL に溶かし、そこに3-hydroxybenzoic acid (1.00 mg, 7.24 mmol) を加えてコルク栓でふたをした。溶液の温度が下がってからacetic anhydride (1.6 mL) を加えて一晩(19時間)攪拌し、生じた3-(chlorocarbonyl) phenyl acetateの白色沈殿を吸引ろ過した後、減圧乾燥させた。(0.75 g, 収率57.5%)

NMR (400MHz,CDCl<sub>3</sub>) 7.99 (dt,1H) , 7.84 (t,1H) , 7.50 (t,1H) , 7.36 (dm,1H) , 2.37 (s,3H)

### 3-Acetoxybenzoyl chloride

乾燥させておいた20 ml容ナスフラスコに 3-acetoxybenzoic acid (0.75 g, 4.16 mmol) を入れ、無水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6.47 mL) に溶かし、DMFを触媒量 (3滴) 加えた。そこに塩化オキサリル (535.4 μL, 1.48 kg/m<sup>3</sup>, 6.24 mmol) を滴下し、50°Cで一晩加熱還流した。得られた白色溶液をTLC展開して目的物の酸クロライドが得られたことを確認し、エバポレーターで減圧濃縮した。トルエン(10 mL×3)を加えて共沸させ、茶褐色の油状物質を得た (粗収量0.97 g)。

### N-3-Acetoxybenzoyl-N-2-fluoro-4-butyrylphenylpiperazine

乾燥させた二頸フラスコをアルゴン置換し、そこにN-2-fluoro-4-butyrylphenylpiperazine (121mg, 0.48mmol) と無水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) およびtriethylamine (180μL)

を入れた。続いて3-acetoxybenzoyl chloride (0.97 g) が入っている20 ml容ナスフラスコに無水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.90 mL)を加えて攪拌した溶液(0.1 mL, 0.60 mmol相当)を、先ほどの二頸フラスコに攪拌しながらゆっくり加えた。さらにDMAPを触媒量加えて一晩(15時間)攪拌した。TLC展開したところ出発物質が残っていたため、先ほどの3-acetoxybenzoyl chlorideの無水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液(0.1 mL, 0.60 mmol相当)をさらに加えて4時間放置した。その後、少量のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で分液漏斗に洗い込み、蒸留水(20 mL)を加えた。水層をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL×2)で抽出し有機層を合わせ、飽和NaCl水溶液(10 mL, 20 mL)で洗浄し、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて30分間放置した。綿濾過によってNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を濾去し、濾液を減圧濃縮し黄色の油状物質を得た(粗収量0.28 g)。これをシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製し、得られた液体を減圧濃縮し白色結晶を得た。(0.12 g, 収率60.2%)

NMR (400MHz,CDCl<sub>3</sub>) 7.70 (dd,1H) , 7.65 (dd,1H) , 7.45 (td,1H) , 7.32 (dt,1H) , 7.20 (m,2H) , 6.92 (t,1H) , 3.58-4.04 (bd,4H) , 3.09-3.36 (bs,4H) , 2.87 (t,2H) , 2.32 (s,3H) , 1.75 (sextet,2H) , 1.00 (t,3H)

### *N*-3-Hydroxybenzoyl-*N*-2-fluoro-4-butyrylphenylpiperazine

*N*-3-Acetoxybenzoyl-*N*-2-fluoro-4-butyrylphenylpiperazine (0.12 g, 0.26 mmol) をナスフラスコに入れてアルゴン置換し、無水メタノール9.3 mLを加えて溶かした。その溶液を、アルゴン置換した二頸フラスコにシリンジを用いて入れた。同様に、酢酸アンモニウム (0.074 g, 0.77 mmol) を別のナスフラスコに入れてアルゴン置換し、無水メタノール2.5 mL加えて溶かした。その溶液を、先ほどの二頸フラスコに加えて一晩(16時間)攪拌した。反応が十分に進んでいなかったため、酢酸アンモニウム

(0.064 g) を加えてさらに3時間攪拌した。50 ml容ナスフラスコに移して減圧乾燥させ、黄色の油状物質を得た。これを酢酸エチル30 mLで100 ml容分液漏斗に洗い込み、蒸留水20 mL加えた。水層を酢酸エチル(20 mL×2)で抽出して有機層を合わせ、飽和NaCl水溶液(10 mL, 20 mL)で洗浄し、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて30分間放置した。綿濾過によってNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を濾去し、0.1 gのシリカゲルを加えて減圧濃縮したものをカラムの上部にのせて、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製した。得られた液体を減圧濾過し、最終生成物として白色結晶を得た。(0.08 g, 収率74.2%)

NMR (400MHz,CDCl<sub>3</sub>) 7.70 (dd,1H), 7.64 (dd,1H), 7.21 (t,1H), 6.97 (bs,1H), 6.90 (t,1H), 6.88 (m,2H), 3.58-4.04 (bd,4H), 3.09-3.36 (bs,4H), 2.87 (t,2H), 2.32 (s,3H), 1.75 (sextet,2H), 1.00 (t,3H)

## 化合物18 (4-OH体)

### 4-Acetoxybenzoic acid

NaOH (0.66 g) を氷水で冷却しながら50 ml容ナスフラスコ内で蒸留水8 mL に溶かし、そこに4-hydroxybenzoic acid (1.00 mg, 7.24 mmol) を加えてコルク栓でふたをした。溶液の温度が下がってからacetic anhydride (1.6 mL) を加えて6時間攪拌し、生じた白色沈殿を吸引ろ過し冷水で洗浄した後、減圧乾燥させた。(0.98 g, 収率75.1%)

NMR (400MHz,CDCl<sub>3</sub>) 8.13 (dd,2H), 7.21 (dd,2H), 2.34 (s,3H)

### 4-Acetoxybenzoyl chloride

乾燥させておいた30 ml容ナスフラスコに 4-acetoxybenzoic acid (0.98 g, 5.43 mmol) を入れ、無水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (11.33 mL) に溶かし、DMFを触媒量 (4滴) 加えた。そ

ここに塩化オキサリル (698.3  $\mu\text{L}$ , 1.48  $\text{kg}/\text{m}^3$ , 8.15mmol) を滴下し, 50°Cで一晩加熱還流した. 得られた白色溶液をTLC展開して目的物の酸クロライドが得られたことを確認し, エバポレーターで減圧濃縮した. トルエン(10 mL $\times$ 3)を加えて共沸させ, 茶褐色の油状物質を得た (粗収量0.98 g).

#### *N*-4-Acetoxybenzoyl-*N*-2-fluoro-4-butyrylphenylpiperazine

乾燥させた二頸フラスコをアルゴン置換し, そこに*N*-2-fluoro-4-butyrylphenylpiperazine (100mg, 0.40mmol) と無水 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) およびtriethylamine (150  $\mu\text{L}$ ) を入れた. 続いて4-acetoxybenzoyl chloride (0.98 g) が入っている30 ml容ナスフラスコに無水 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 mL)を加えて攪拌した溶液(0.1 mL, 0.49 mmol相当)を, 先ほどの二頸フラスコに攪拌しながらゆっくり加えた. さらにDMAPを触媒量加えて一晩(18時間) 攪拌した. TLC展開したところ出発物質が残っていたため, 先ほどの4-acetoxybenzoyl chlorideの 無水 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液(0.1 mL, 0.49 mmol相当)をさらに加えて4時間放置した. その後, 少量の $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ で100 ml容分液漏斗に洗い込み, 蒸留水(20 mL)を加えた. 水層を $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL $\times$ 2)で抽出し有機層を合わせ, 飽和NaCl水溶液(15 mL, 20 mL)で洗浄し, 無水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ を加えて30分間放置した. 綿濾過によって $\text{Na}_2\text{SO}_4$ を濾去し, 濾液を減圧濃縮し黄色の油状物質を得た(粗収量0.24 g). これをシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製し, 得られた液体を減圧濃縮し白色結晶を得た. (0.10 g, 収率60.7%)

NMR (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) 7.70 (dd,1H) , 7.65 (dd,1H) , 7.48 (dt,2H) , 7.17 (dt,2H) , 6.92 (t,1H) , 3.58-4.04 (bd,4H) , 3.09-3.36(bs,4H) , 2.87 (t,2H) , 2.33 (s,3H) , 1.75(sextet,2H) , 1.00 (t,3H)

### N-4-Hydroxybenzoyl-N-2-fluoro-4-butyrylphenylpiperazine

N-4-Acetoxybenzoyl-N-2-fluoro-4-butyrylphenylpiperazine (0.1 g, 0.24 mmol) をナスフラスコに入れてアルゴン置換し、無水メタノール8.8 mLを加えて溶かした。その溶液を、アルゴン置換した二頸フラスコにシリンジを用いて入れた。同様に、酢酸アンモニウム (0.107 g, 1.2 mmol) を別のナスフラスコに入れてアルゴン置換し、無水メタノール4.5 mLを加えて溶かした。その溶液を、先ほどの二頸フラスコに加えて一晩(17時間) 攪拌した。反応が十分に進んでいなかったため、酢酸アンモニウム (0.061 g) を加えてさらに8時間攪拌した。50 ml容ナスフラスコに移して減圧乾燥させ、黄色の油状物質を得た(粗収量0.27 g)。これを酢酸エチル30 mLで100 ml容分液漏斗に洗い込み、蒸留水20 mL加えた。水層を酢酸エチル(20 mL×2)で抽出して有機層を合わせ、飽和NaCl水溶液(10 mL, 20 mL)で洗浄し、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて30分間放置した。綿濾過によってNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を濾去し、0.1 gのシリカゲルを加えて減圧濃縮したものをカラムにつめて、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製した。得られた液体を減圧濾過し、最終生成物として白色結晶を得た。(39.6 mg, 収率44.1%)

NMR (400MHz,CDCl<sub>3</sub>) 7.70 (dd,1H) , 7.64 (dd,1H) , 7.33 (m,2H) , 6.92 (t,1H) , 6.82 (m,2H) , 3.82 (bd,4H) , 3.22 (bs,4H) , 2.87 (t,2H) , 1.75 (sextet,2H) , 1.00 (t,3H)

化合物19 (3-NO<sub>2</sub>体)

### 3-Nitrobenzoyl chloride

乾燥させておいた30 ml容ナスフラスコに 3-nitrobenzoic acid (1.04 g, 6.00 mmol) を入れ、無水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9.33 mL) に溶かし、DMFを触媒量 (5滴) 加えた。そこに塩化

オキサリル (772  $\mu\text{L}$ , 1.48  $\text{kg}/\text{m}^3$ , 9.00 mmol) を滴下し, 50°Cで一晩(19時間)加熱還流した. 得られた白色溶液をTLCによって目的物の酸クロライドが得られたことを確認し, エバポレーターで減圧濃縮した. トルエン(10 mL $\times$ 3)を加えて共沸させ, 茶褐色の結晶を得た (粗収量0.97 g).

#### *N*-3-Nitrobenzoyl-*N*-2-fluoro-4-butyrylphenylpiperazine

乾燥させた二頸フラスコをアルゴン置換し, そこに*N*-2-fluoro-4-butyrylphenylpiperazine (116.1mg, 0.46 mmol) と無水 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) およびtriethylamine (150  $\mu\text{L}$ )を入れた. 続いて3-nitrobenzoyl chloride (200  $\mu\text{L}$ )とDMAPを触媒量加えて一晩(23時間) 攪拌した. TLCによって出発物質が全て反応したことを確認した後, 少量の $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ で100 ml容分液漏斗に洗い込み, 蒸留水(20 mL)を加えた. 水層を $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL $\times$ 2)で抽出し有機層を合一し, 飽和NaCl水溶液(15 mL $\times$ 2)で洗浄し, 無水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ を加えて30分間放置した. 綿濾過によって $\text{Na}_2\text{SO}_4$ を濾去し, 濾液を減圧濃縮し黄色の油状物質を得た. これをシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製し, 得られた液体を減圧濃縮し白色結晶を得た (0.13 g, 収率70.2 %).

NMR (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) 8.33 (dm,1H) , 8.32 (t,1H) , 7.80 (dt,1H) , 7.71 (dd,1H) , 7.66 (dd,1H) , 7.65 (dd,1H) , 6.94 (t,1H) , 3.62-3.99 (bd,4H) , 3.29 (bd,4H) , 2.87 (t,2H) , 1.75 (sextet,2H) , 1.00 (t,3H)

化合物**20** (4- $\text{NO}_2$ )

#### 4-Nitrobenzoyl chloride

乾燥させておいた30 ml容ナスフラスコに 4-nitrobenzoic acid (0.50 g, 3.00 mmol)

を入れ、無水 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4.66 mL) に溶かし、DMFを触媒量 (4滴) 加えた。そこに塩化オキサリル (386  $\mu\text{L}$ , 1.48 kg/ $\text{m}^3$ , 4.5 mmol) を滴下し、 $50^\circ\text{C}$ で一晩(24時間)加熱還流した。得られた白色溶液をTLC展開して目的物の酸クロライドが得られたことを確認し、エバポレーターで減圧濃縮した。トルエン(10 mL $\times$ 3)を加えて共沸させ、黄色の油状物質を得た (粗収量1.32 g)。

#### *N*-4-Nitrobenzoyl-*N*-2-fluoro-4-butyrylphenylpiperazine

乾燥させた二頸フラスコをアルゴン置換し、そこに*N*-2-fluoro-4-butyrylphenylpiperazine (31mg, 0.12mmol) と無水 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2.5 mL) およびtriethylamine (150  $\mu\text{L}$ ) を入れた。続いて4-nitrobenzoyl chloride (1.32 g) が入っている30 ml容ナスフラスコに無水 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 mL)を加えて攪拌した溶液(0.1 mL)を、先ほどの二頸フラスコに攪拌しながらゆっくり加えた。さらにDMAPを触媒量加えて3日間攪拌した。TLCで確認したところ出発物質が残っていたため、先ほどの4-nitrobenzoyl chloride 無水 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液(0.1 mL)をさらに加えて19時間放置した。TLCによって出発物質が全て反応したことを確認した後、少量の $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ で100 ml容分液漏斗に洗い込み、蒸留水(20 mL)を加えた。水層を $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL $\times$ 2)で抽出し有機層を合わせ、飽和NaCl水溶液 (15 mL $\times$ 2)で洗浄し、無水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ を加えて30分間放置した。綿濾過によって $\text{Na}_2\text{SO}_4$ を濾去し、濾液を減圧濃縮し黄色の油状物質を得た。(粗収量0.22 g)これをシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製し、得られた液体を減圧濃縮し白色結晶を得た (0.02 g, 収率40.4 %)。

NMR (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) 8.31 (dt,2H) , 7.71 (dd,1H) , 7.66 (dd,1H) , 7.62 (dt,2H) , 6.93 (t,1H) , 4.00 (bs,2H) , 3.57 (bs,2H) , 3.24 (bd,4H) , 2.87 (t,2H) , 1.75(sextet,2H) ,



0.97(t,3H)

化合物**21**~**40**に関しては、NSBR1および**17**~**20**の化合物の合成方法に従った。

合成した化合物のNMRは下記の通りである。

<sup>1</sup>H NMRスペクトルデータ

化合物**17**

<sup>1</sup>H NMR (400MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.70 (1H, dd), 7.64 (1H, dd), 7.21 (1H, t), 6.97 (1H, bs), 6.90 (1H, t), 6.88 (2H, m), 3.58-4.04 (bd, 4H), 3.09-3.36 (bs, 4H), 2.87 (t, 2H), 1.75 (sextet, 2H), 1.00 (t, 3H)

化合物**18**

<sup>1</sup>H NMR (400MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.70 (1H, dd), 7.64 (1H, dd), 7.33 (2H, m), 6.92 (1H, t), 6.82 (2H, m), 3.82 (4H, bd), 3.22 (4H, bs), 2.87 (2H, t), 1.75 (2H, sextet), 1.00 (3H, t)

化合物**19**

<sup>1</sup>H NMR (400MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.33 (1H, dm), 8.32 (1H, t), 7.80 (1H, dt), 7.71 (1H, dd), 7.66 (1H, dd), 7.65 (1H, dd), 6.94 (1H, t), 3.62-3.99 (4H, bd), 3.29 (4H, bd), 2.87 (2H, t), 1.75 (2H, sextet), 1.00 (3H, t)

化合物**20**

<sup>1</sup>H NMR (400MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.31 (2H, dt), 7.71 (1H, dd), 7.66 (1H, dd), 7.62 (2H, dt), 6.93 (1H, t), 4.00 (2H, bs), 3.57 (2H, bs), 3.24 (4H, bd), 2.87 (2H, t), 1.75 (2H, sextet), 0.97 (3H, t)

化合物**21**

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.91 (2H, d), 7.03 (1H, s), 6.88 (2H, d), 6.82 (2H, s), 6.05

(2H, s) , 3.80 (4H, s br) , 3.37 (4H, s br) , 2.87 (2H, t) , 1.75 (2H, sextet) , 1.00 (3H, t)

#### 化合物22

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$ : 9.65 (1H, s) , 9.32 (1H, s) , 9.18 (1H, s) , 7.42 (1H, dd) , 7.37 (1H, d) , 6.89 (1H, d) , 6.83 (1H, d) , 6.76 (1H, d) , 6.74 (1H, dd) , 3.64 (4H, s br) , 3.08 (4H, s br) , 2.85 (2H, t) , 1.60 (2H, sextet) , 0.90 (3H, t)

#### 化合物23

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$ : 9.34 (1H, s) , 9.18 (1H, s) , 7.94 (1H, d) , 7.90 (1H, dd) , 7.23 (1H, d) , 6.84 (1H, d) , 6.76 (1H, d) , 6.75 (1H, dd) , 3.67 (4H, s br) , 3.10 (4H, s br) , 2.95 (2H, t) , 1.61 (2H, sextet) , 0.91 (3H, t)

#### 化合物24

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.82 (1H, s) , 7.79 (1H, dd) , 7.77 (1H, dd) , 7.04 (1H, s) , 6.98 (1H, d) , 6.81 (2H, s) , 6.10 (1H, s) , 3.62-3.97 (4H, br) , 2.98 (4H, s br) , 2.89 (2H, t) , 2.36 (3H, s) , 1.75 (2H, sextet) , 0.97 (3H, t)

#### 化合物25

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.55 (1H, dd) , 7.52 (1H, d) , 6.97 (1H, dd) , 6.95 (1H, d) , 6.89 (1H, d) , 6.83 (1H, d) , 6.01 (2H, s) , 3.93 (3H, s) , 3.80 (4H, s br) , 3.17 (4H, s br) , 2.90 (2H, t) , 1.76 (2H, sextet) , 1.00 (3H, t)

#### 化合物26

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$ : 9.34 (1H, s) , 9.19 (1H, s) , 7.74 (1H, dd) , 7.67 (1H, dd) , 7.11 (1H, t) , 6.84 (1H, d) , 6.77 (1H, d) , 6.74 (1H, dd) , 3.65 (4H, s br) , 3.18 (4H, s br) , 2.97 (2H, q) , 1.06 (3H, t).

#### 化合物27

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.70 (1H, dd) , 7.65 (1H, dd) , 7.05 (1H, s) , 6.92 (1H, t) , 6.82 (2H, s) , 3.73-3.87 (4H, br) , 2.89 (2H, t) , 1.70 (2H, quin) , 1.40 (2H, sext) , 0.95 (3H, t),

化合物28

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.93 (1H, s), 7.71 (1H, dd), 7.66 (1H, dd), 7.03 (1H, s), 6.93 (1H, t), 6.08 (1H, s), 3.72-3.93 (4H, br), 3.29 (1H, sext), 3.22 (4H, s br), 1.76-1.86 (1H, m), 1.43-1.54 (1H, m), 1.17 (3H, d), 0.91 (3H, t)

化合物29

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.51 (1H, s br), 7.69 (1H, dd), 7.64 (1H, dd), 6.95 (1H, s), 6.91 (1H, t), 6.76 (2H, s), 6.63 (1H, s br), 3.70-3.94 (4H, br), 3.18-3.24 (4H, br), 2.75 (2H, d), 2.26 (1H, septet), 0.98 (6H, d),

化合物30

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.98 (1H, s br), 7.70 (1H, dd), 7.70 (1H, dd), 7.65 (1H, dd), 6.92 (1H, t), 6.80 (2H, s), 6.08 (1H, s br), 3.75-3.91 (4H, br), 3.22 (4H, s br), 2.90 (2H, t), 1.50-1.87 (11H, m).

化合物31

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.69 (1H, dd), 7.65 (1H, dd), 7.03 (1H, s), 6.91 (1H, t), 6.81 (2H, s), 3.60-4.04 (4H, br), 3.03-3.39 (4H, br), 2.90 (2H, d), 2.36 (1H, sep), 1.79-1.95 (2H, br), 1.49-1.69 (4H, br), 1.07-1.25 (2H, br).

化合物32

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.69 (1H, dd), 7.63 (1H, dd), 6.94 (1H, s), 6.88 (1H, t), 6.75 (2H, br), 3.30-3.66 (3H, br), 2.97 (2H, t), 2.77-2.94 (4H, br), 1.75 (2H, sext), 1.47 (3H, d), 0.99 (3H, t)

化合物33

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$ : 9.52-9.98 (2H, br), 7.74 (1H, dd), 6.94-7.26 (4H, m), 7.65

(1H, dt) , 5.73-5.88 (2H, br) , 4.20-4.69 (3H, br) , 3.72-4.18 (3H, br) , 2.80 (2H, d) , 2.11 (1H, sep) , 1.30 (3H, d), 0.91 (6H, d)

#### 化合物34

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$ : 9.05-9.48 (2H, br), 7.74 (1H, dd), 7.66 (1H, dd), 7.08 (1H, t), 6.80 (1H, d), 6.77 (1H, d), 6.71 (1H, dd), 4.25-4.69 (2H, br), 3.80-4.16 (2H, br), 3.39-3.52 (2H, m), 2.91 (2H, t), 2.84 (1H, t), 1.60 (2H, sext), 1.31 (3H, d), 0.91 (3H, t).

#### 化合物35

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$ : 9.32 (1H, s), 9.19 (1H, s), 7.74 (1H, dd), 7.66 (1H, dd), 7.08 (1H, t), 6.80 (1H, d), 6.77 (1H, d), 6.71 (1H, dd), 4.28-4.57 (2H, br), 3.87-4.15 (2H, br), 2.93 (1H, dd), 2.85 (1H, dd), 2.80 (2H, d), 2.11 (1H, sep), 1.31 (3H, d), 0.91 (6H, d)

#### 化合物36

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.69 (1H, d) , 7.64 (1H, d) , 7.01 (1H, s) , 6.93 (1H, t) , 6.81 (2H, s) , 6.10 (2H, s br) , 3.87 (2H, s br) , 3.68 (1H, d br) , 3.48 (1H, t br) , 3.35 (1H, s br) , 3.10 (2H, s br) , 2.87 (2H, t) , 1.75 (2H, sextet) , 1.03 (3H, s br), 1.00 (3H, t)

#### 化合物37

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.68 (1H, dd), 7.63 (1H, dd), 7.02 (1H, s), 6.93 (1H, t), 6.79 (2H, s), 4.06-4.51 (2H, b), 3.75-4.00 (2H, b), 3.64-3.75 (1H, b), 3.64-3.43 (2H, b), 2.96-3.43 (3H, b), 2.76 (2H, d), 2.27 (1H, m), 0.99 (6H, d)

#### 化合物38

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$ : 9.33 (1H, s) , 9.19 (1H, s) , 7.74 (1H, dd) , 7.66 (1H, dd) , 7.11 (1H, t) , 6.83 (1H, s) , 6.76 (1H, d) , 6.73 (1H, dd) , 3.88 (2H, s br) , 3.48 (2H, s br) , 3.29 (1H, s br) , 3.27 (1H, s br) , 3.11 (1H, s br) , 2.92 (2H, t) , 1.60 (2H, sextet) , 0.94 (3H, s br),

0.91 (3H, t)

### 化合物39

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.68 (1H, dd), 7.63 (1H, d), 6.92 (2H, t), 6.77 (2H, s), 4.52-4.04 (2H, b), 3.84-4.03 (2H, b), 3.62-3.72 (1H, b), 3.62-3.44 (2H, b), 2.96-3.43 (3H, b), 2.76 (2H, b), 2.27 (1H, m), 0.98 (6H, d)

### 化合物40

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.69 (1H, dd), 7.63 (2H, dd), 7.52 (1H, dd), 6.92-7.01 (2H, m), 6.12-6.27 (1H, br), 5.90-6.03 (1H, s), 3.71 (2H, d), 3.39 (1H, sep), 2.96 (2H, t), 2.87 (2H, t), 1.93-2.08 (4H, m), 1.75 (2H, sext), 1.00 (3H, t)

## 5-3 結果および考察

シロイヌナズナの胚軸伸長におよぼす効果を、A-パートからD-パートにわけて図5.8から図5.11に示した。NSBR1を基準に他の誘導体の活性を比べた。

A-パートに関しては、4つの化合物、3-OH (17), 4-OH (18), 3- $\text{NO}_2$  (19), 4- $\text{NO}_2$  (20)の中で、3- $\text{NO}_2$ 体 (19) が有意に胚軸を伸長させたが、それほど顕著なものではなかった。他の化合物は、伸長を有意に抑制した。(図5.8)

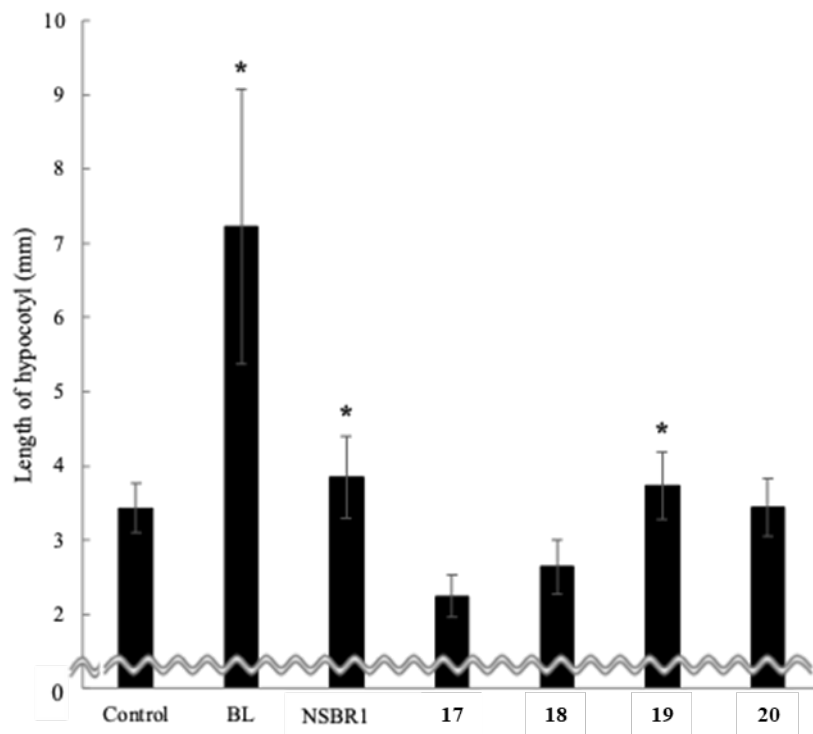


図5.8 NSBR1誘導体の合成 (Aパート)

B環のF原子をH (21), OH (22), Cl (23), CH<sub>3</sub> (24), OCH<sub>3</sub> (25)で置換したところ, Cl (23)以外は有意に胚軸伸長を促進した (図5.9).

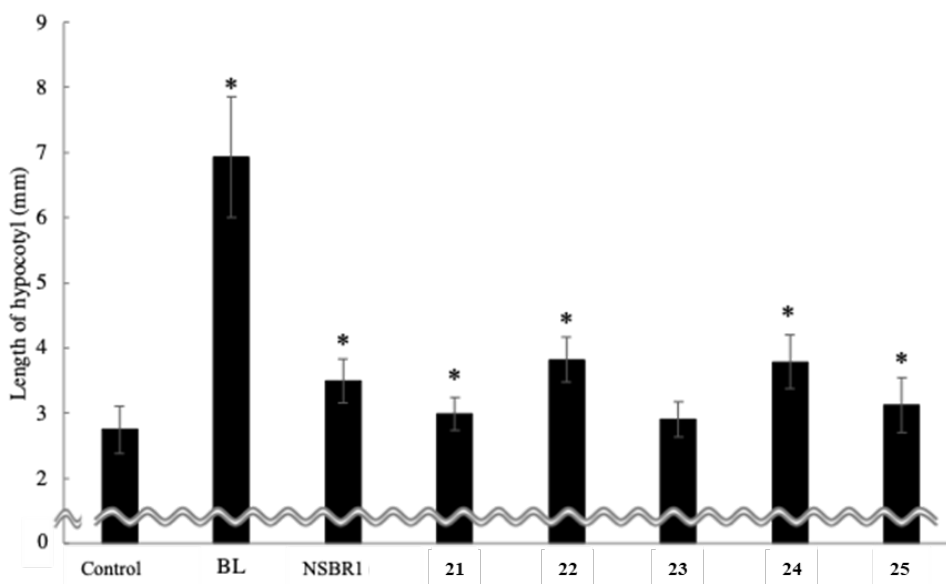


図5.9. NSBR1誘導体の合成 (Cパート)

B環部のアシル部分構造 (D-パート) を変化させたところ,  $C(=O)CH_2CH_3$  (**26**) と  $C(=O)CH_2CH(CH_3)_2$  (**29**)がNSBR1よりも胚軸伸長を促進したが, 定量的のこれらの活性差を議論することはできなかった.

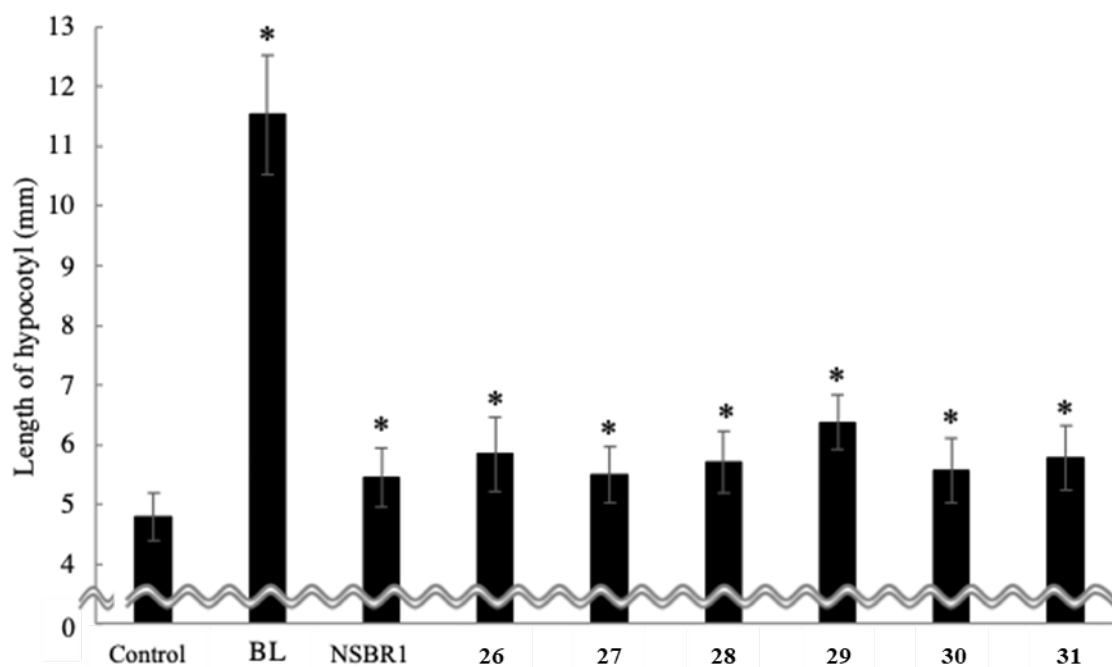


図5.10 NSBR1誘導体の合成 (Dパート)

ピペラジン環部はBRsの疎水的なB/C/D環縮合部の相当することから, ピペラジン環へ $CH_3$ 基を導入したところ. すべての化合物で, 胚軸伸長を促進した (図4-6). メチル基は不斉で導入されたが, 絶対配置の違いと活性の関係は認められなかった. ピペラジン環をピペリジン環 (**40**) に変換しても活性が維持された.

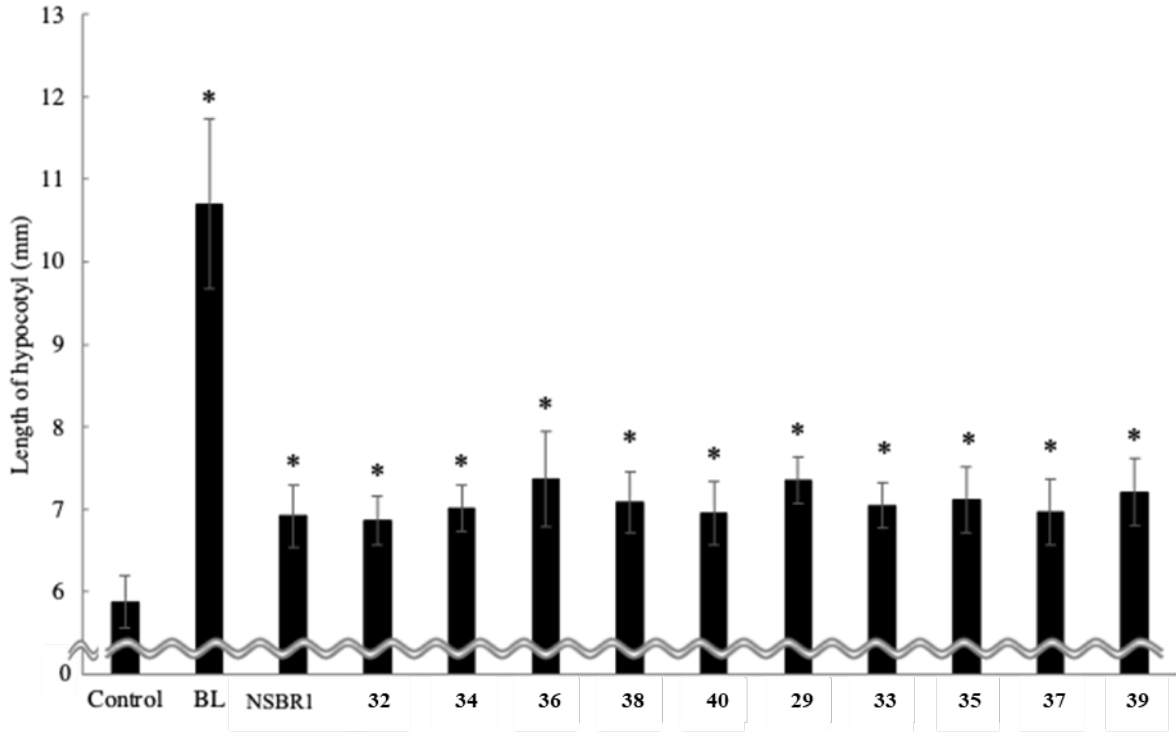


図5.11 NSBR1誘導体の合成 (Bパート)

#### 5-4 まとめ

NSBR1のドッキングモデルに基づき，20化合物のNSBR1類縁体を合成・評価した．合成した化合物及び活性の確認された化合物は図5.12の通りである．

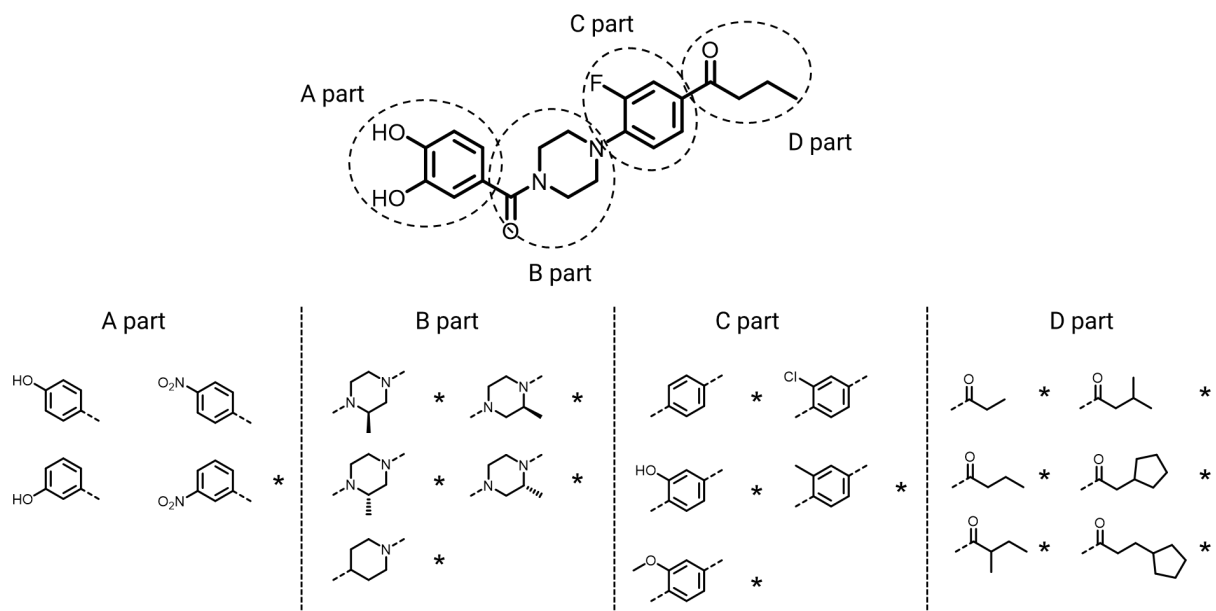


図5.12 化合物のデザイン．\*活性が認められた化合物



合成した類縁体の活性をシロイヌナズナ評価系で評価した結果、16化合物においてBR活性を確認した。このことから、NSBR1の *N*-benzoyl-*N*-phenylpiperazine (NBNPP)構造はBLアゴニストの骨格として確からしいことが確認された。一方で、類縁体の活性が総じて低かったことため、溶解度の制限から評価可能な濃度ではEC<sub>50</sub>を算出することができず、類縁体間の活性差を定量的に論ずることはできなかった。NSBR1の定量的な構造活性相関情報を得るためにはより感度が高く、溶解度の制限のない新たな活性評価系の構築が必要であると考えた。



## 第6章 イネ発芽種子を用いたブラシノステロイド類の定量的活性評価

### 6-1 緒言

BRの活性評価系としては、イネ葉身屈曲試験法、シロイヌナズナ胚軸伸長試験 (Brzで生合成を抑制) が一般的であるが、どちらも活性評価に時間がかかる。また、イネ葉身屈曲試験法では、薬液を第二葉身の根元にエタノール (あるいはメタノール) を滴下して、葉身の屈曲角度を測定するという方法で、熟練が必要である。活性が弱い化合物は高濃度のアルコール溶液必要となるエタノールに対する溶解度が低く濃厚な溶液を作成することができない、多くの活性評価系では溶媒として高濃度化合物溶液を調製可能なDMSOが用いるが、葉身屈曲試験においては、評価結果に影響を与えるためDMSOを用いることができない。従って、高濃度での化合物評価が行えず活性の弱い化合物を見落としてしまう。インシリコスクリーニングで見出されるヒット化合物は、一般的に活性は弱く、*in vivo*の活性評価では見落としてしまうという問題があるが、これはBLアゴニスト探索でも同様である。BRについては最近、イネの種子をBRで処理すると、根が螺旋形になることが報告された (Nakagawa *et al.*, 2021)。このイネ種子の根における螺旋形成誘導を、BRの定量的活性評価系として利用できるかどうかを検討した。

### 6-2 方法

#### 6-2-1 イネ根部螺旋形成誘導試験

イネの種子を流水に2日間浸漬し、発芽させる。発芽種子10個を50 ml容ビーカーに並べ、2 mlの水を加える。根の形状を観察し、螺旋を誘導する最小濃度を決定する。化合物溶液は、DMSO溶液を3倍希釈 (10 mM, 33 mM, 1 mM, 0.33 mM ……) で作成し、2 mLの蒸留水に10  $\mu$ LのDMSO溶液を加えて良く混合し試験溶液とした。試験

溶液を入れたビーカーに発芽種子10粒を並べ、2日間25°Cでインキュベートする。試験概要を図6.1に示す。

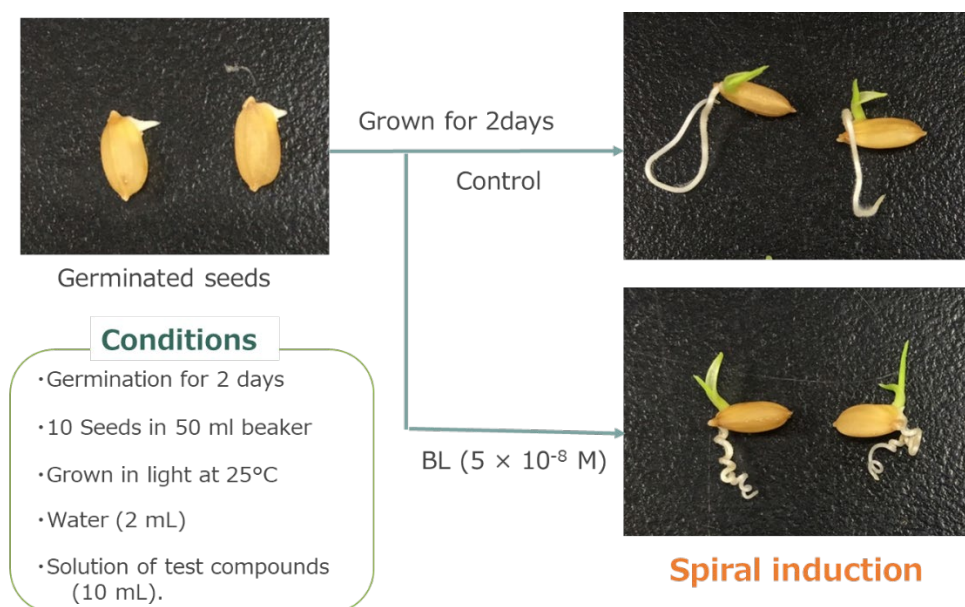


図6.1 イネ根部螺旋形成誘導試験の概要

BLの濃度応答を調べると、図6.2のようになることが報告されている。



図6.2 螺旋形性誘導活性の濃度応答(Nakagawa *et al.*, 2021)

図6.2の結果からは、最小効果濃度(MEC)は $5 \times 10^{-9}$  (pMEC=8.3)となるが、最小濃度かどうかを確認する為に $5 \times 10^{-10}$ と $5 \times 10^{-9}$ の間の濃度を作成し、最小濃度を決定する。

NSBR1に関しても、この評価系で活性を調べると、図6.3のようになることが報告されている(Nakagawa *et al.*, 2021)。すなわち、NSBR1のMECは $2.5 \times 10^{-4}$ で、pMEC=3.6となる。

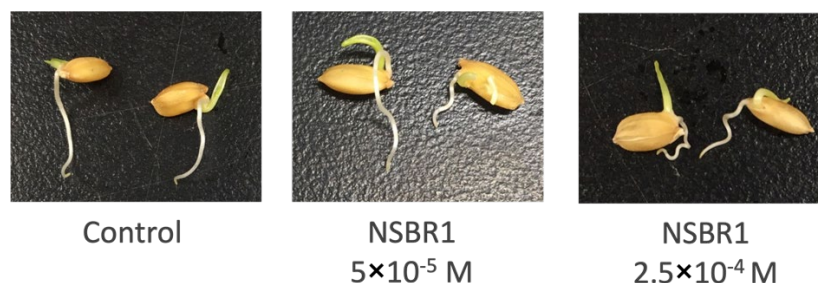


図6.3 NSBR1の濃度応答 (Nakagawa *et al.*, 2021)

この活性評価系を使って、様々なBRの活性を評価した (表5-1). 各化合物3連で実験を行い、平均pMECの平均を求めた.

#### 6-2-2 結合自由エネルギー計算

BL-BRI1-SERK1複合体結晶構造(4LSX)のタンパク構造に対して活性評価を実施した化合物をドッキングした. ドッキングにはSchrödinger社のGLIDEを用いた. 出力された複合体構造のリガンド周囲8ÅをMM-GBSA法に基づいて安定化し, 算出された $\Delta G_{\text{bind}}$ を化合物の結合自由エネルギーと定義した. その際の力場はOPLS4(Lu *et al.*, 2021)を利用した.

#### 6-2-3 イネBRI1/SERK1複合体ホモロジーモデルの構築

Schrödinger toolsに含まれるホモロジーモデル構築機能を利用してイネBRI1/SERK1複合体ホモロジーモデルを構築した. Schrödinger toolsではKnowledge-basedおよびEnergy-basedのホモロジーモデル構築手法を利用できるが, 本研究ではSchrödinger社推奨のKnowledge-basedを用いた. リファレンス構造としてはシロイヌナズナBL-BRI1/SERK1複合体(4LSX)を, イネの一次配列はUniprotで取得したものを利用した(Uniprot ID: Q6Z4U4およびQ942F3).

## 6-3 結果および考察

### 6-3-1 イネ根部螺旋形成誘導試験

CS誘導体(41-54)およびBL類縁体(55-64)の螺旋誘導活性(pMEC)を求めたところ、表6.1のようになった。また、イネ葉身屈曲試験法で求めたBL誘導体の活性(pEC<sub>50</sub>)と螺旋誘導活性と比較した結果、BLを除いて非常に良好な関係が得られ(図6.4)、新しく構築した螺旋形性誘導試験によりBLアゴニスト活性が定量的に評価可能であることが示された。イネ葉身屈曲試験法ではBLはCSの10倍高い活性を示したが、螺旋誘導活性においては、両者の間に差が認められなかった (pMEC=8.5)。

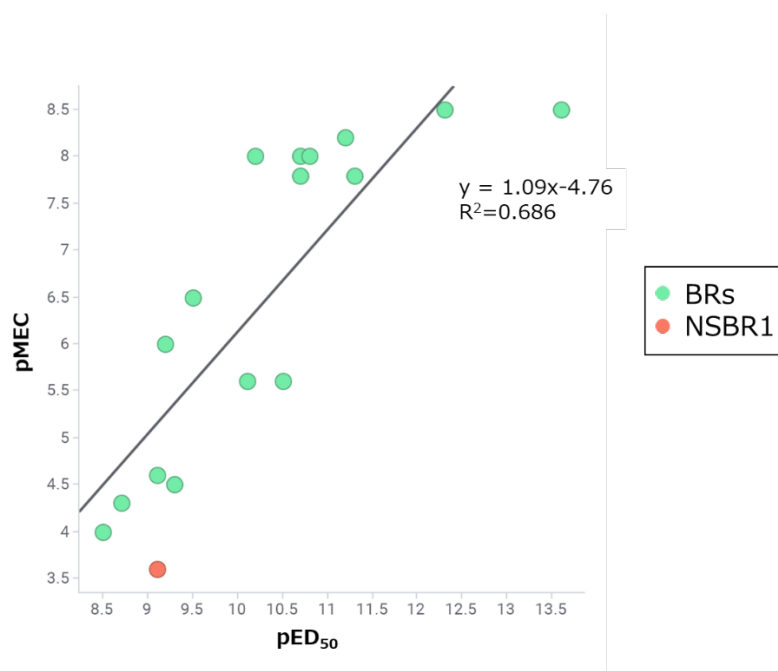
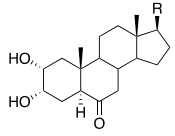
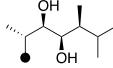
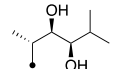
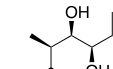
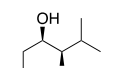
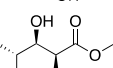
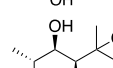
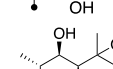
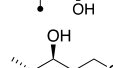
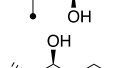
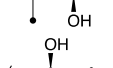
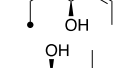
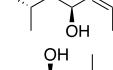
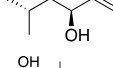
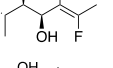


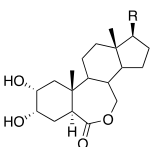
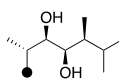

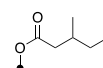
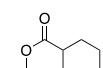
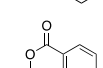
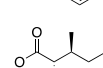
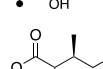
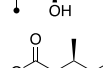
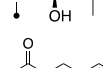
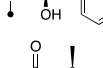
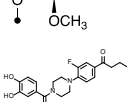
図6.4 螺旋誘導活性(pMEC)とイネ葉身屈曲活性(pED<sub>50</sub>)の関係

また、45~48, 56, 57, 63についてイネ葉身屈曲試験法では定量的に活性(pEC<sub>50</sub>)を求めることができなかったが、螺旋誘導活性ではpMECを算出することができた。これは、イネ根部螺旋形成誘導試験はイネ葉身屈曲試験に比べて溶解度の制限が小さく、より高い濃度まで評価が可能なためである。

表6.1 CSおよびBL類縁体の活性および受容体への結合自由エネルギー

No.	Structure R	pMEC				pEC <sub>50</sub> *	ΔG
		1st	2nd	3rd	Average		
							
41		8.5	8.5	8.5	8.5	12.3	-100
42		8.0	8.0	8.0	8.0	10.7	-92.3
43		4.3	4.0	4.0	4.1	8.5	-72.8
44		4.3	4.3	4.3	4.3	8.7	-86.8
45		6.1	6.1	6.1	6.1	<10.0	-91.4
46		6.3	6.6	6.3	6.4	<9.0	-93.4
47		6.1	5.8	6.1	6.0	<9.2	-92.0
48		5.8	6.1	5.8	5.9	<9.3	-87.9
49		8.1	8.1	7.8	8.0	10.2	-95.9
50		6.6	6.3	6.6	6.5	9.5	-91.0
51		7.8	7.8	7.8	7.8	10.7	-92.3
52		7.8	7.8	7.8	7.8	11.3	-93.5
53		8.1	7.8	8.1	8.0	10.8	-93.6
54		8.3	8.3	8.0	8.2	11.2	-91.4

(表6.1のつづき)

No.	Structure R	pMEC				pEC <sub>50</sub> *	ΔG
		1st	2nd	3rd	Average		
							
<b>55</b>		8.5	8.5	8.5	8.5	13.6	-99.1
<b>56</b>		4.3	4.0	<4.0	4.2	<8.0 (13%)	-66.4
<b>57</b>		4.0	4.0	4.0	4.0	<8.0 (41%)	-82.8
<b>58</b>		<4.3	<4.3		<4.3	<8.0 (48%)	-82.0
<b>59</b>		<4.3	<4.3		<4.3	<8.0 (44%)	-81.5
<b>60</b>		4.6	4.6	4.3	4.5	9.3	-73.3
<b>61</b>		5.6	5.6	5.6	5.6	10.5	-81.0
<b>62</b>		5.6	5.6	5.6	5.6	10.1	-87.8
<b>63</b>		5.1	5.1	5.1	5.1	<8.7 (16%)	-87.8
<b>64</b>		4.6	4.6	4.6	4.6	9.1	-82.0
<b>NSBR1</b>		3.6	3.6	3.6	3.6		-72.8

### 6-3-2 結合自由エネルギー計算との比較

シロイヌナズナのBR受容体BRI1/SERK1に対してドッキングを行い、得られたドッキングポーズに対して結合自由エネルギー計算を行った。結合自由エネルギーとpMEC及びpED<sub>50</sub>との相関を解析したところ、図6.5の結果が得られた。BRによるイネの根における螺旋誘導活性は、結合自由エネルギー $\Delta G_{\text{bind}}$ と良好に相関することが分



かった( $R^2=0.80$ ). 本研究で発見したNSBR 1 についても、この相関関係で説明できることが示された。

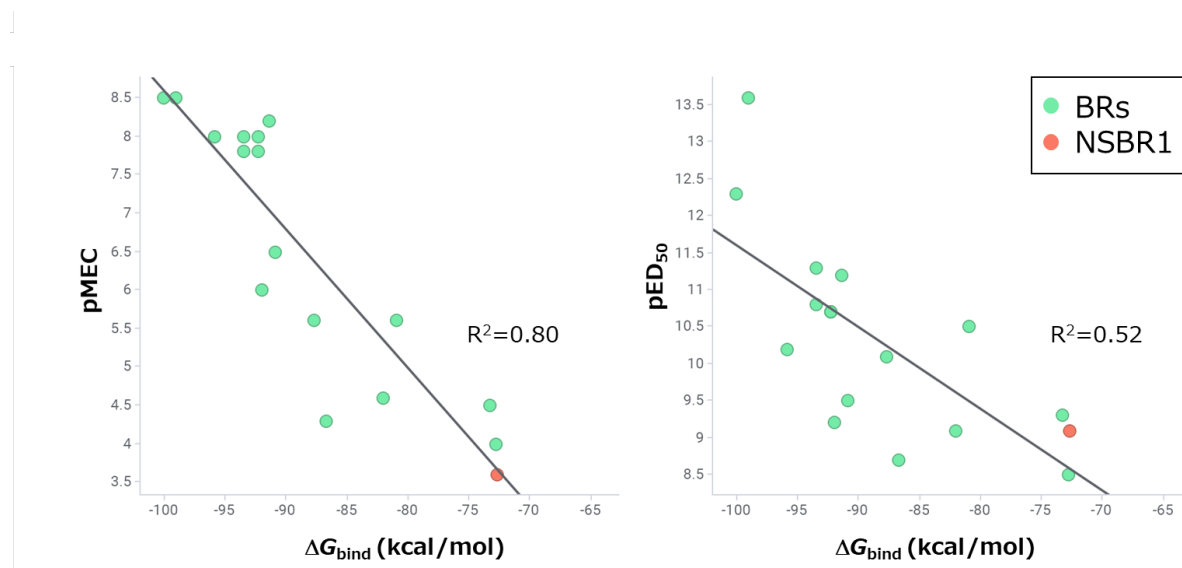


図6.5 pMECおよびpED<sub>50</sub>と結合自由エネルギーの関係

また、螺旋誘導活性の結合自由エネルギー計算値と相関は、イネ葉身屈曲活性と結合自由エネルギー計算値との相関( $R^2=0.52$ )よりも顕著に高かった。どちらの活性値も *in vivo* 試験での活性であり、最終的な活性にはリガンド-タンパクの相互作用以外にも膜透過や生体内の分布、代謝等様々な要素が含まれる。結合自由エネルギーとの相関が良好であることは、螺旋誘導活性は最終的な活性に対するリガンド-タンパク間相互作用の寄与が大きいことを示唆している。したがって、本研究と同様にSBDD手法を用いてリガンド-タンパク相互作用に着目した化合物探索および化合物設計を実施する場合、活性評価には本評価系を用いることが望ましい。

### 6-3-3 イネBRI1/SERK1複合体ホモロジーモデルの構築

シロイヌナズナの複合体構造を利用して算出した結合自由エネルギーは活性値と良好な相関を示したが、評価系にはイネを利用していることを考慮すると、イネの受

容体を利用することでより活性値との相関が良好な結合自由エネルギーを算出できると期待される。そこで、シロイヌナズナ受容体のX線結晶構造(4LSX)を鋳型として、イネBRI1/SERK1複合体ホモロジーモデルの構築を行った。その結果、三次構造および主鎖のレベルではよく一致するモデルが得られた(図6.6)。

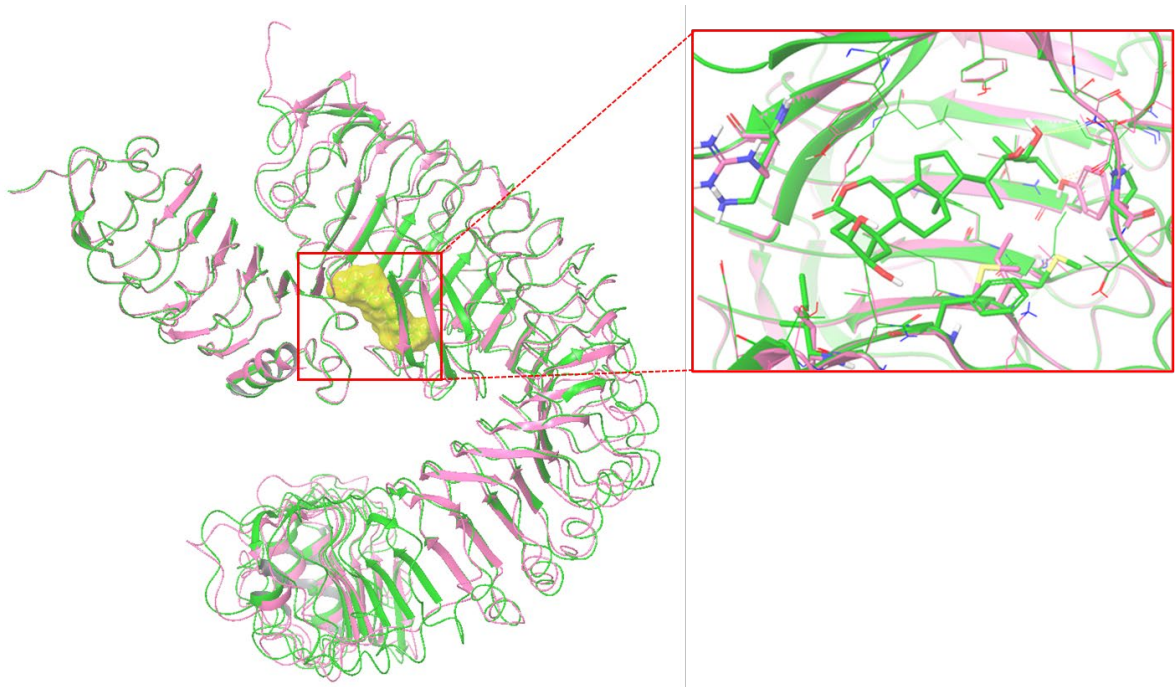


図6.6

シロイヌナズナX線結晶構造(緑)とイネホモロジーモデル(ピンク)の重ね合わせ

構築したホモロジーモデルを利用して算出した結合自由エネルギーとpMECの相関を解析した結果、一定の相関は見られたものの、シロイヌナズナX線結晶構造を利用した場合よりも相関係数は低かった(図6.7)。

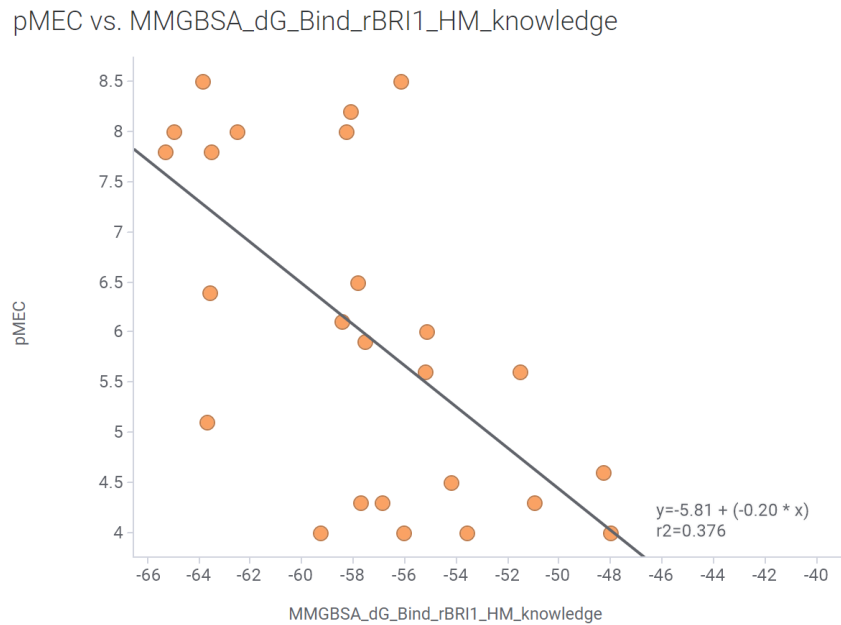


図6.7 イネホモロジーモデル由来結合自由エネルギーとpMECの相関

相関係数が改善しなかった理由としては、イネ受容体はBL結合時にシロイヌナズナ受容体と主鎖レベルで異なる構造をとっている可能性が考えられる。リファレンス構造と異なる残基側鎖はラマチャンドラプロットやPDB構造の統計値に基づいて構築されるものの、主鎖や三次構造はできる限りリファレンス構造と一致するように構築される。したがって、イネ受容体とシロイヌナズナ受容体が主鎖レベルで異なる構造をとっていた場合、イネ受容体の構造を再現するホモロジーモデルを構築することは難しく、イネにおける活性と相関がより良好な結合自由エネルギー計算にはイネ受容体の結晶構造解析が待たれる。

#### 6-4 まとめ

イネ根部螺旋形成誘導試験はイネ葉身屈曲試験法に比べて溶解度の制限が小さく、迅速に評価可能な新たな評価法であること、さらに、定量的に活性評価のでき

る評価方法であることを示した。種々のBRsの活性を本法で評価し、イネ葉身屈曲試験法での活性値と比較したところ、高い相関( $R=0.83$ )を示したことから、本法が定量的にBR活性を評価可能であることが示された。また、イネ葉身屈曲試験法および本法での活性値と $\Delta G_{\text{bind}}$ の相関を解析した結果、それぞれ $R=0.72/0.89$ であった。このことから本法はイネ葉身屈曲試験法よりも化合物の相互作用エネルギーを適切に評価でき、

SBDDによる化合物探索および類縁体設計における評価系として適していると考えられる。シロイヌナズナのX線結晶構造(4LSX)およびイネの一次配列情報に基づいて、BRI1-SERK1複合体のイネホモロジーモデルを構築した。構築したホモロジーモデルを用いて算出した $\Delta G_{\text{bind}}$ はpMECと相関関係を示した。

## 第7章 総括

1. インシリコスクリーニングの手法を用いて、500万化合物の構造から BR 受容体に結合可能な化合物を24個選抜し、イネ葉身屈曲試験を用いて活性を評価したところ、3つの化合物にアンタゴニスト活性が見出された。
2. 同じ化合物セットを、シロイヌナズナ胚軸伸長試験を用いて活性評価したところ、新たに2つの化合物にアンタゴニスト活性が見出された。
3. シロイヌナズナのアンタゴニストを置換基変換することにより、弱いながらアゴニスト活性を示す新規非ステロイド BL アゴニスト NSBR1が得られた。
4. NSBR 1 の誘導体を合成し、シロイヌナズナ使って活性を調べ、構造活性相関を検討した。
5. イネの根の変形を指標とする BL の新しい活性評価法(イネ根部螺旋形成誘導試験)を用いて、様々な BR の活性を定量的に測定したところ、イネ葉身屈曲試験で求めた活性との間に直線関係が認められ、新しい評価法の正当性が示された。また、イネ根部螺旋形成誘導試験はイネ葉身屈曲試験に比べて化合物の結合自由エネルギーをよく反映することが示唆された。
6. ホモロジーモデリングの手法を用いて、イネの BR 受容体の立体構造を構築し、BRs の受容体結合自由エネルギー変化  $\Delta G_{bind}$  を計算したところ、活性との間に一定の相関関係が見出された。



## 【謝辞】

本研究は、京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻生物調節化学分野において行われたものであります。本研究を始めるにあたり、すでに卒業していた私を社会人博士課程の学生として受け入れ、興味深いテーマを与えて下さった宮川恒先生（京都大学大学院農学研究科教授）、中川好秋先生（元京都大学大学院農学研究科准教授）、宮下正弘先生（京都大学大学院農学研究科准教授）に深く感謝致します。先生方は未熟な私に適切なアドバイスと叱咤激励を与え、同時に常に力強くサポートして下さいました。先生方の助けなしには社会人博士課程を全うすることはできませんでした。特に中川先生はご退職後も変わりなく、あるいはそれまで以上にご支援いただき、感謝してもしきれません。先生にいただいた温かい言葉は、私が少しでも前に進むための糧でした。

京都大学大学院生命科学研究科中野雄司教授は、シロイヌナズナを使った実験系について多大な支援をして下さっただけでなく、ふがない私を叱咤激励して下さいました。先生の諦めるなというお言葉は常に私の心の中にありました。心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり多大なご助力をいただいた学生の皆様、特に太田（杉浦）愛理、松尾美登理、日向栞、西川文太、久富太輝の各氏に心から御礼申し上げます。私が始めた研究を皆様が引き継ぎ大きく育てて下さったことが本研究につながりました。博士課程学生として皆様のお力になるべきところ、ほとんどご指導もできず申し訳ございませんでした。

インシリコスクリーニングのソフトウェアLigandScoutの開発者Thierry Langer博士には、ソフトウェアの無償提供と、利用に関して多くのご指導を頂きましたこと感謝致します。東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻浅見忠男教授にはBR生合成阻害剤Brzを恵与頂きありがとうございました。

社会人博士課程の研究に取り組むにあたり、計算機の利用許可や業務調整等多大なご支援をいただいた日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所の皆様には感謝申し上げます(特に井上GL, 大倉研究員, 大江調査役).

最後に、私の社会人博士課程期間を支えてくれた妻と二人の娘に感謝申し上げます。会社と大学の両立に追われ、家庭に時間を割けなかった私を責めることなく、常に生きる活力を下さいました。ありがとうございました。



## 主論文

1. Seisuke Takimoto, Airi Sugiura, Saki Minami, Tomohiko Tasaka, Yoshiaki Nakagawa, Hisashi Miyagawa. In silico exploration for agonists/antagonists of brassinolide. *Biorg. Med. Chem. Lett.*, **26**, 1709-1714 (2016).  
DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.02.054
2. Airi Sugiura, Shinri Horoiwa, Takanori Aoki, Seisuke Takimoto, Ayumi Yamagami, Takeshi Nakano, Yoshiaki Nakagawa, Hisashi Miyagawa. Discovery of a nonsteroidal brassinolide-like compound, NSBR1. *J. Pestic. Sci.*, **42**, 105-111 (2017).  
DOI: 10.1584/jpestics.D17-035
3. Seisuke Takimoto, Bunta Nishikawa, Midori Matsuo, Shiori Hinata, Taiki Hisatomi, Ayumi Yamagami, Takeshi Nakano, Yoshiaki Nakagawa, and Hisashi Miyagawa. Structure modification of nonsteroidal brassinolide-like compound, NSBR1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **86**, 1004-1012 (2022).  
DOI: 10.1093/bbb/zbac074
4. Bunta Nishikawa, Seisuke Takimoto, Yoshiaki Nakagawa, Hisashi Miyagawa. Quantitative measurement of various brassinosteroids against root spiral induction in the germinated seeds and the binding free energy against the modelled receptor of rice plant. in preparation

## 関連論文

杉浦愛理, 幌岩真理, 青木孝憲, 瀧本征佑, 山上あゆみ, 中野雄司, 中川好秋, 宮川恒. 平成31年度論文賞対象論文の概要とその研究背景. 日本農薬学会誌. **44**, 164-165 (2019).

国際特許出願 (PCT/JP2018 8083)

「植物ステロイドホルモン (ブラシノライド) 様活性をもつ非ステロイド化合物の創製」発明者 中川好秋, 杉浦愛理, 瀧本征佑, 幌岩真理, 宮川恒, 松尾美登理, 出願人: 国立大学法人京都大学 (出願日: 平成30年3月2日 受付番号 5180043895 国際公開番号 WO 2018/159827 A1)

China Morishita, Chieka Minakuchi, Taiyo Yokoi, Seisuke Takimoto, Akifumi Hosoda, Miki Akamatsu, Hiroto Tamura and Yoshiaki Nakagawa. cDNA cloning of ecdysone receptor (EcR) and ultraspiracle (USP) from *Harmonia axyridis* and *Epilachna vigintioctopunctata* and the evaluation of the binding affinity of ecdysone agonists to the in vitro translated EcR/USP heterodimer. *J. Pestic. Sci.*, **39**, 76-84 (2014).

## 引用論文

- 1) G. Adam and B. Schneider. Uptake, transport and metabolism. In  
*"Brassinosteroids"* (edited by A.Sakurai, T.Yokota, S.D.Clouse), Springer, Berlin,  
pp. 113.-136 (1999)
- 2) T. Asami, Y. K. Min, N. Nagata, K. Yamagishi, S. Takatsuto, S. Fujioka, N.  
Mufufushi, I. Yamaguchi, S. Yoshida. Characterization of Brassinazole, a Triazole-  
Type Brassinosteroid Biosynthesis Inhibitor, *Plant Physiology*, **123**, 93-100(2000)
- 3) T. Asami, S. Yoshida, Brassinosteroid biosynthesis inhibitors. *Trends Plant Sci.*, **4**,  
348–353(1999)
- 4) J. Baba, T. Yokota, N. Takahashi. Brassinolide-related New Bioactive Steroids  
from *Dolichos lablab* Seed, *Agricultural and Biological Chemistry*, **47**, 659-661,  
(1983).
- 5) A. Bajguz. Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiology and  
Biochemistry*, **45**, 95-107 (2007).
- 6) D. A. Case *et al.*. "AMBER 2017; University of California: San Francisco, CA,  
USA, 2017."
- 7) R. K. Castellano, F. Diederich and E. A. Meyer. Interactions with Aromatic Rings  
in Chemical and Biological Recognition. *Angew.Chem.Int.*, **42**, 1210-1250 (2003)
- 8) S.D. Clouse. Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation  
to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell*, **23**, 1219-  
1230(2011).
- 9) E. C. Dodds, L. Goldberg, W. Lawson, R. Robinson. OEstrogenic Activity of

- Certain Synthetic Compounds, *Nature*, **141**, 247-248 (1938)
- 10) D. Friedrichsen, J. Chory. Steroid signaling in plants: from the cell surface to the nucleus, *Bioessays*, **23**, 1028-1036(2001)
  - 11) S. Fujioka. Natural occurrence of brassinosteroids in the plant kingdom. In *"Brassinosteroids"* (edited by A.Sakurai, T.Yokota, S.D.Clouse), Springer, Berline, 21-45 (1999)
  - 12) S. Fujioka, T. Noguchi, S. Takatsuto, S. Yoshida. Activity of brassinosteroids in the dwarf rice lamina inclination bioassay, *Phytochemistry*, **49**, 1841-1848(1998)
  - 13) S. Fujioka, and A. Sakurai. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Physiologia Plantarum* **100**, 710-715(1997)
  - 14) S. Genheden and U. Ryde. Comparison of the Efficiency of the LIE and MM/GBSA Methods to Calculate Ligand-Binding Energies. *J. Chem. Theor. Comp.* **7**, 3768-3778 (2011).
  - 15) S. Genheden and U. Ryde. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* **10**, 449-461 (2015).
  - 16) S. Grenier and A.-M. Grenier. Fenoxycarb, a fairly new insect growth regulator: a review of its effects on insects. *Ann. Appl. Biol.* **122**, 369-403 (1993).
  - 17) M. Grove, G. F. Spencer, W. Rohwedder, N. Mandava, J. F. Worley, J. D. Warthen Jr., G. L. Steffens, J. L. Flippen-Anderson, J. C. Cook Jr.. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature*, **281**, 216–217 (1979).

- 18) S. Horoiwa, T. Yokoi, S. Masumoto, S. Minami, C. Ishizuka, H. Kishikawa, S. Ozaki, S. Kitsuda, Y. Nakagawa and H. Miyagawa. Structure-based virtual screening for insect ecdysone receptor ligands using MM/PBSA. *Bioorg. Med. Chem.*, **27**, 1065-1075 (2019).
- 19) A.C.-T. Hsu. 1,2-Diacyl-1-alkylhydrazines, a new class of insect growth regulators. In *"Synthesis and chemistry of agrochemicals II"*, Amer. Chem. Soc. Washington D. C., 478-490 (1991)
- 20) M. Hothorn, Y. Belkhadir, M. Dreux, T. Dabi, J. P. Noel, I. A. Wilson, J. Chory. Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1. *Nature*, **474**, 467-471(2011).
- 21) A. Jakalian, B. J. David, I. B. Christopher. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *Journal of Computational Chemistry*, **23**, 1623-1641(2002).
- 22) Y. Kamuro and S. Takatsuto. Practical application of brassinosteroids in agricultural field. In *"Brassinosteroids"* (edited by A.Sakurai, T.Yokota, S.D.Clouse), Springer, Berline, 223-241 (1999)
- 23) H. Kawada, I. Kojima, G. Shinjo. Laboratory evaluation of a new insect growth regulator pyriproxyfen, as a cockroach control agent. *Jpn J. Sanit. Zool.*, **40**, 195-201 (1989)
- 24) T. Kinoshita, A. Cano-Delgado, H. Seto, S. Hiranuma, S. Fujioka, S. Yoshida, J. Chory. Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature*, **433**, 167-171(2005).

- 25) P. A. Kollman, I. Massova, C. Reyes, B. Kuhn, S. Huo, L. Chong, M. Lee, T. Lee, Y. Duan, W. Wang, Q. Donini, P. Cieplak, J. Srinivasan, D. A. Case, T. E. Cheatham. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Acc. Chem. Res.*, **33**, 889-897 (2000).
- 26) W. Lew, X. Chen, C. U. Kim. Discovery and development of GS 4104 (oseltamivir): an orally active influenza neuraminidase inhibitor. *Curr Med Chem.*, **7**, 663-672 (2000)
- 27) J. Li, M. G. Biswas, A. Chao, D. W. Russell, J. Chory. Conservation of function between mammalian and plant steroid 5  $\alpha$  -reductases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3554-3559 (1997).
- 28) J. Li, P. Nagpal, V. Vitart, T. C. McMorris, J. Chory. A role for brassinosteroids in light-dependent development of Arabidopsis. *Science*, **272**, 398-401(1996).
- 29) J. Li, J. Wen, K. A. Lease, J. T. Doke, F. E. Tax, J. C. Walker. BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell*, **110**, 213-222(2002).
- 30) C. Lu, C. Wu, D. Ghoreishi, W. Chen, L. Wang, W. Damm, G. A. Ross, M. K. Dahlgren, E. Russell, C. D. V. Bargaen, R. Abel, R. A. Friesner, E. D. Harder. OPLS4: Improving Force Field Accuracy on Challenging Regimes of Chemical Space. *J. Chem. Theory Comput.*, **17**, 4291-4300 (2021)
- 31) T. C. McMorris. Chemical synthesis of brassinosteroid. In “*Brassinosteroids*”

- (edited by A.Sakurai, T.Yokota, S.D.Clouse), Springer, Berline, 69-90 (1999)
- 32) J. A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K. E. Hauser, C. Simmerling. ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *Journal of Chemical Theory and Computation*, **11**, 3696-3713(2015).
- 33) M. McGann. FRED pose prediction and virtual screening accuracy. *Journal of chemical information and modeling*, **51**, 578-596(2011).
- 34) J. W. Mitchell, N. Mandava, J. F. Worley, J. R. Plimmer, M. V. Smith. Brassins—a New Family of Plant Hormones from Rape Pollen. *Nature*, **225**, 1065–1066 (1970).
- 35) Y. Nakagawa, B. Nishikawa, H. Miyagawa. Effects of brassinolide on the growing of rice plants, *Journal of Pesticide Science*, Article ID D21-024(2021).
- 36) K. H. Nam, J. Li. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell*, **110**, 203-212(2002).
- 37) J. W. Ponder, A. C. David. Force fields for protein simulations. *Advances in Protein Chemistry.*, **66**, 27-85(2003).
- 38) A. Sakurai. Biosynthesis. In “*Brassinosteroids*” (edited by A.Sakurai, T.Yokota, S.D.Clouse), Springer, Berline, 91-111 (1999)
- 39) J. Santiago, C. Henzler, M. Hothorn. Molecular mechanism for plant steroid receptor activation by somatic embryogenesis co-receptor kinases. *Science*, **341**, 889-892(2013).
- 40) K. Sekimata, T. Kimura, I. Kaneko, T. Nakano, K. Yoneyama, Y. Takeuchi, S.

- Yoshida, T. Asami, A specific brassinosteroid biosynthesis inhibitor, Brz2001: evaluation of its effects on Arabidopsis, cress, tobacco, and rice, *Planta*, **213**, 716-721(2001)
- 41) J. She, Z. Han, T. W. Kim, J. Wang, W. Cheng, J. Chang, J. Chai. Structural insight into brassinosteroid perception by BRI1. *Nature*, **474**, 472-476 (2011).
- 42) Y. Sun, Z. Han, J. Tang, Z. Hu, C. Chai, B. Zhou, J. Chai. Structure reveals that BAK1 as a co-receptor recognizes the BRI1-bound brassinolide. *Cell research*, **23**, 1326-1329(2013).
- 43) K. Takeno, R. P. Pharis. Brassinosteroid-Induced Bending of the Leaf Lamina of Dwarf Rice Seedlings: An Auxin-Mediated Phenomenon, *Plant and Cell Physiol.*, **23**, 1275-1281(1982)
- 44) S. Uesusuki, B. Watanabe, S. Yamamoto, J. Otsuki, Y. Nakagawa and H. Miyagawa. Synthesis of Brassinosteroids of Varying Acyl Side Chains and Evaluation of Their Brassinolide-like Activity. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **68**, 1097-1105 (2004)
- 45) Z. Y. Wang, H. Seto, S. Fujioka, S. Yoshida, J. Chory. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature*, **410**, 380-383(2001)
- 46) B. Watanabe, Y. Nakagawa, and H. Miyagawa. Synthesis of a castasterone /ponasterone hybrid compound and evaluation of its molting hormone-like activity. *J. Pestic Sci.*, **28**, 188-193 (2003)
- 47) B. Watanabe, Y. Nakagawa, T. Ogura, H. Miyagawa. Stereoselective synthesis



- of (22R)- and (22S)-castasterone/ponasterone A hybrid compounds and evaluation of their molting hormone activity. *Steroids*, **69**, 483-493 (2004a)
- 48) B. Watanabe, S. Yamamoto, K. Sasaki, Y. Nakagawa, H. Miyagawa. A simple synthesis of 6-deoxoteasterone and its 20-epimer. *Tetrahedron Lett.*, **45**, 2767-2769 (2004b)
- 49) B. Watanabe, S. Yamamoto, T. Yokoi, A. Sugiura, S. Horoiwa, T. Aoki, H. Miyagawa, Y. Nakagawa. Brassinolide-like activity of castasterone analogs with varied side chains against rice lamina inclination, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **25**, 4566-4578(2017).
- 50) K.D. Wing, R. A. Slawewski, G. R. Carlson. RH5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: Effects on larval Lepidoptera. *Science*, **241**, 470-472 (1988)
- 51) G. Wolber, T. Langer. LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *J Chem Inf Model.* **45**, 160-169(2005)
- 52) S. Yamamoto, B. Watanabe, J. Otsuki, Y. Nakagawa, M. Akamatsu, and H. Miyagawa. Synthesis of 26,27-Bisnorcastasterone Analogs and Analysis of Conformation-activity Relationship for Brassinolide-like Activity. *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 1761-1770 (2006).
- 53) T. Yokota, M. Arima, N. Takahashi. Castasterone, a new phytosterol with plant-hormone potency, from chestnut insect gall, *Tetrahedron Letters*, **23**, 1275-1278(1982).
- 54) T. Yokota, Y. Nakamura, N. Takahashi, M. Nonaka, H. Sekimoto, H. Oshio, S.

Takatsuto. Inconsistency between growth and endogenous levels of gibberellins, brassinosteroids, and sterols in *Pisum sativum* treated with uniconazole antipodes. In: Takahashi N, Phinney BO, MacMillan J, editors. Gibberellins. New York: Springer-Verlag; 339–349(1991).

- 55) 中川好秋, 赤松美紀. 第 14 章 農薬の構造活性相関研究—新規農薬の創製を目指して. 農薬の創製研究の動向—安全で環境に優しい農薬開発の展開—. シーエムシー出版, 318-332 (2018)