

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	瀧 本 征 佑
論文題目	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		
(論文内容の要旨)			
<p>ブラシノライド (BL) は植物の生長を制御するホルモンの1つで、ステロイド構造をもっている。天然から様々な類縁体が単離されており、ステロイド環部のB環が6員環であるカステロン (CS) も含めBL様の活性を示す一連の化合物はブラシステロイド (BR) と総称されている。BRは、植物の成長を促進し、特に低温などストレス条件のもとでその効果が顕著に表れることから農業への応用が期待されてきた。しかし、植物中の含有量が少ないことに加え、複雑な構造をもつBRの化学合成にはコストがかかることから実用化に至っていない。そこで本研究は、コンピュータ化学の手法を用いて、インシリコで非ステロイド型のBL様活性化合物を探索することを目的とし、あわせて探索に欠かせないより効率的な活性評価法の確立をめざした。</p> <p>研究の背景を述べた緒論第1章と、本研究で用いた手法を解説した第2章に続き、第3章では、ソフトウェアLigandScoutを用いて、化学構造データベースから活性が期待できる化合物のスクリーニングを行った。LigandScoutは受容体とリガンドの複合体構造から活性発現に重要な役割を果たす原子団 (ファーマコフォア) の空間配置モデルを仮定し、それにフィットする構造を持った化合物を探索するソフトウェアである。探索にあたってはまず500万化合物についてそれぞれ最大200個の立体構造 (コンフォーマー) を発生させ、ファーマコフォアにフィットする22個の化合物を選抜した。次にその中から15個の化合物を入手し、BRの活性評価系として確立されているイネ葉身屈曲試験法を用いて活性評価を行った。その結果、ホルモン様活性を示す化合物は見出されなかったものの、アンタゴニスト活性を示すものが3つ見出された。そのうちの2つはフラン環をもち、もう一つはそれらとは構造の異なるジエステル化合物で、後者は前者に比べ約10倍高いアンタゴニスト活性を示した。またシロイヌナズナを被験植物として活性を調べたところ、イネでアンタゴニスト活性が見出された化合物とは異なる2つのピペラジン誘導体にアンタゴニスト活性が見出された。</p> <p>第4章では、受容体に対するドッキングモデルをもとに結合の際の相互作用エネルギーを計算して、アゴニスト活性を持つ化合物の設計を行った。第2章でアンタゴニスト活性が認められたピペラジン誘導体の置換基を変換し、受容体と水素結合できる部分を新たに加えたところ弱いながらシロイヌナズナに対してBR様活を示した。BRに应答する遺伝子の発現にも変動が確認されたことから、この化合物を新規なBR様活性化合物NSBR1と命名した。さらにイネ葉身屈曲試験法を用いてNSBR1の活性を調べたところ、イネに対しても有意な活性を示した。濃度应答曲線から50%効果薬量 (ED<sub>50</sub>) を求めたところ、BLの約1/30000であった。NSBR1について受容体に対するドッキングモデルを作成し、結合自由エネルギー変化を計算したところ、これまでに見いだされている様々なBRの活性 (pED<sub>50</sub>) と結合自由エネルギー変化 (<math>\Delta G_{bind}</math>) との間の相関関係と矛盾せず、NSBR1がBRと同じ受容体に結合していることが示された。</p> <p>第5章では、NSBR1がも2つのベンゼン環およびピペラジン環に置換基を導入し、構造と活性の関係を調べた。一方のベンゼン環の置換基3,4-OHを3-NO<sub>2</sub>、4-NO<sub>2</sub>、3-OHあるいは4-OHに変換するとシロイヌナズナに対するホルモン活性は失われた。これに対してもう一方のベンゼン環の置換基FをH、Cl、CH<sub>3</sub>、OHあるいはOCH<sub>3</sub>に置換したとこ</p>			

る、C1体以外で活性が認められた。さらに同じベンゼン環のbutyryl基 [C(=O)C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>] についてそのアルキル鎖を種々変化させた化合物やピペラジン環にCH<sub>3</sub>基を導入した化合物を合成したところすべてに活性が見出され、構造自由度のある部分とそうでない部分を示すことができた。ホルモン活性の認められた誘導体についてBR応答遺伝子の発現に及ぼす影響を調べたところ顕著な変動が認められた。

第6章では、近年新しく見いだされたBRがもたらすイネの根の形態変化（螺旋形誘導）について、この変化の誘導がNSBR1を含めた種々BRの定量的な活性評価法として利用できるかを検討した。まずイネ葉身屈曲試験法で活性評価が行われたBL誘導体（14化合物）とCS誘導体（10化合物）の合計24化合物について根の形態変化誘導活性を評価し、両活性間の関係を調べた。発芽種子の根に螺旋形を誘導する水溶液の最小濃度（MEC）を求めその逆対数值pMECを活性の指標としたところ、イネ葉身屈曲試験法で得られたpEC<sub>50</sub>との間に良好な相関関係が認められた。NSBR1もMEC 250 μMで螺旋形を誘導し、BLとの活性差（約1/30000）はイネ葉身屈曲試験法で得られた両者の活性差と同様であった。さらに、BRsおよびNSBR1のシロイヌナズナの受容体に対する結合自由エネルギーを計算し、螺旋形誘導活性との関係を調べたところ、両者の間に良好な正の相関関係が認められた。以上から、この根の形態変化を指標とすることでBRの活性を定量的に評価できることが示され、操作が簡便で被験薬液の濃度を高くできる螺旋形誘導試験の方が、活性の低いものから高いものまでより多様な化合物の活性を検定できる点で従来のイネ葉身屈曲試験よりも優れていることを示した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

新規医農薬の開発は年々難しくなっており、10~20万化合物を合成しても実用化に至るものは一つ程度と言われている。そのような中で、医薬品開発に関してはインシリコスクリーニング(バーチャルスクリーニング)の手法が取り入れられ、実用化に至ったものがあるのに対して、農薬開発における利用例はまだない。本論文は、植物ステロイドホルモンブラシノステロイド(BR)と同等の活性をもつ非ステロイド化合物を、受容体の構造情報をもとにインシリコスクリーニングの手法を用いて探索し新規活性化化合物を得るとともに、当該化合物のホルモン活性がBR受容体との結合によることを計算化学の手法で示した研究をまとめたものである。評価できる点として以下の3点が挙げられる。

1) BRと受容体の複合体モデルに基づいて受容体結合にとって重要な役割を果たすと考えられる原子団の空間配置(ファーマコフォアモデル)を設定し、500万化合物の立体構造データの中からファーマコフォアモデルにフィットする化合物を探索した結果、受容体との相互作用によってホルモンの受容体結合を阻害すると考えられるアンタゴニストを見出した。さらにこのアンタゴニストと受容体との相互作用に関与する化合物各部分の寄与を考察した結果に基づいて構造を変換し、ホルモン活性を示すアゴニストNSBR1の分子設計に成功した。

2) ホルモン受容体との分子間相互作用を解析するために、分子動力学(Molecular dynamics: MD)を利用し、既知BR類およびNSBR1の受容体結合自由エネルギー計算を行った。その結果、生物活性と結合自由エネルギー変化との間に相関関係を見出し、NSBR1とBRが受容体結合部位を共有していることを示した。

3) 近年新たに見出されたBR処理による発芽イネの根の形態変化(螺旋形誘導)について、様々な構造を持ったBR類の活性を評価し、従来用いられてきたイネ葉身屈曲試験の結果との比較により両者の間の良好な相関関係を示した。また、NSBR1とBRの1種ブラシノライドの活性値の差が、根の形態変化と葉身屈曲試験でほぼ同じであったことから、この形態変化を指標とする評価法が定量性に優れており、さらにその操作の簡便性と化合物の適用範囲の広さから、今後の新規化合物の効率的なスクリーニングにおいて活用が期待できることを示した。

以上のように本論文は、インシリコスクリーニングの手法を用いて新規BR活性化化合物を見出すとともに、今後の探索研究において活用が期待できる新しい活性評価法を確立した。この成果は、生物有機化学、農薬化学、コンピュータ化学の発展に寄与するところが大きい。

よって本論文は博士(農学)の学位論文として価値があるものと認める。なお令和5年2月14日論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに

掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）