

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-14152

(P2017-14152A)

(43) 公開日 平成29年1月19日(2017.1.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07D 407/12 (2006.01)	C07D 407/12	CSP 2G045
C09K 11/06 (2006.01)	C09K 11/06	ZNA 4C063
C07D 493/10 (2006.01)	C07D 493/10	E 4C071
GO1N 33/15 (2006.01)	GO1N 33/15	Z 4H045
GO1N 33/50 (2006.01)	GO1N 33/50	Z

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-132707 (P2015-132707)	(71) 出願人	504139662 国立大学法人名古屋大学 愛知県名古屋市千種区不老町1番
(22) 出願日	平成27年7月1日(2015.7.1)	(74) 代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
(出願人による申告)平成24~26年度 国立研究開発法人科学技術振興機構「先端的低炭素化技術開発 Advanced Low Carbon Technology R&D Program (ALCA)」委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願		(72) 発明者	萩原 伸也 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内
		(72) 発明者	土屋 雄一朗 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内
		(72) 発明者	吉村 柁彦 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光プローブ、及びそれを用いたストライガ発芽調節物質のスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】ストライガ発芽調節物質をより簡便且つより効率的にスクリーニングする方法を提供すること。

【解決手段】一般式(1)又は(2)で示される化合物を蛍光プローブとして用いたスクリーニング方法。

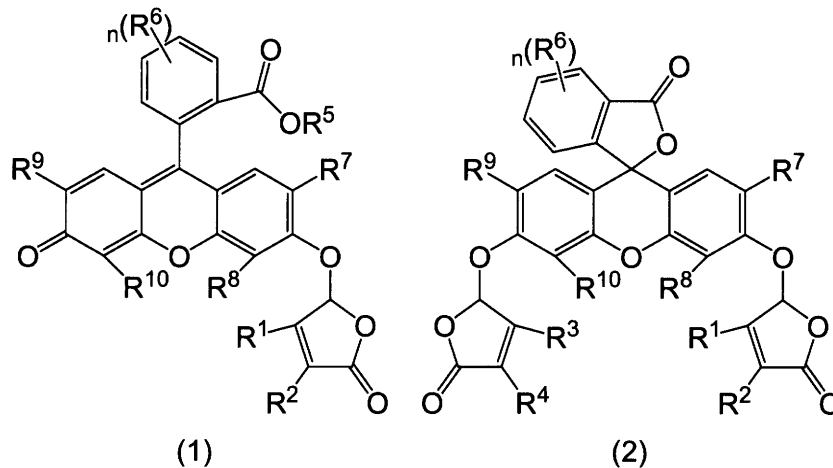
【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 (1) 又は (2) :

【化 1】



10

[式中、

R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は、同一又は異なって水素原子又はアルキル基であり、

R^1 及び R^2 が、互いに結合して隣接する炭素原子と共に、アルキル基で置換されていてもよいベンゼン環を形成していてもよく、

R^3 及び R^4 が、互いに結合して隣接する炭素原子と共に、アルキル基で置換されていてもよいベンゼン環を形成していてもよく、

R^5 は、水素原子又はアルキル基であり、

R^6 は、保護されていてもよい水酸基、アルコキシ基、ハロゲン原子、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、イソシアネート基、イソチオシアネート基、スルホ基、又は活性エステル基であり、

R^7 、 R^8 、 R^9 及び R^{10} は、同一又は異なって水素原子、ハロゲン原子、又はアルキル基であり、

n は、0 又は 1 ~ 3 の整数である。]

で表わされる化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

【請求項 2】

R^1 及び R^2 の一方が水素原子であり他方がアルキル基であり、且つ R^3 及び R^4 の一方が水素原子であり他方がアルキル基である、請求項 1 に記載の化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

【請求項 3】

R^7 、 R^8 、 R^9 及び R^{10} が水素原子である、請求項 1 又は 2 に記載の化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

【請求項 4】

n が 0 である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物を含有する、蛍光プローブ。

【請求項 6】

ストリゴラクトン受容体活性測定用である、請求項 5 に記載の蛍光プローブ。

【請求項 7】

工程 (a) ~ (c) を含むストライガ発芽調節物質のスクリーニング方法 :

(a) 被検物質の存在下で、ストリゴラクトン受容体と請求項 5 又は 6 に記載の蛍光プローブとを接触させる工程、

50

(b) 工程 (a) の後、前記蛍光プローブの分解物の蛍光強度を測定し、該蛍光強度 (被検蛍光強度) を、被検物質を接触させない場合の蛍光強度 (対照蛍光強度) と比較する工程、

(c) 被検蛍光強度と対照蛍光強度とが有意に相違している場合に、被検物質を、ストライガ発芽調節物質として選択する工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ストリゴラクトン受容体活性を簡便且つ効率的に測定できる蛍光プローブ、及びそれを用いたストライガ発芽調節物質のスクリーニング方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

ストライガ属に属する植物 (本明細書において、「ストライガ」と略記することもある) は、トウモロコシ、コメ、マメ類等の主要作物に寄生し、生育不良を引き起こす。その被害は、アフリカ、アジア、オーストラリア、アメリカ等に及んでおり、特にアフリカにおいては、被害額は年間100億USドルに上るといわれている。

【0003】

ストライガの種子は、土壤中で長期間に亘って生存することができ、周辺の宿主作物の根から分泌されるストリゴラクトンを感知し、これにより発芽し、宿主作物の根に寄生する。そして、地上に現れたストライガの植物体により生成される種子が、周辺の土壌をまた汚染する。このため、一旦土壌がストライガの種子に汚染されてしまうと、何も対策をしなければ、その土壌ではストライガ被害が続くこととなり、また種子で汚染された土壌範囲も徐々に広がっていくこととなる。

20

【0004】

ストライガの対策としては、ストライガの種子に汚染された土壌に、ストライガ発芽を誘導又は抑制する物質 (ストライガ発芽調節物質) を施用することが有効であるといわれている。例えば、宿主植物がない環境下でストライガの発芽を誘導する物質を施用すれば、発芽したストライガは寄生できずに枯死することとなり、これにより土壌を浄化することができる。また、ストライガの発芽を抑制する物質を施用すれば、ストライガに寄生されることなく宿主植物を栽培することが可能となる。そこで、ストライガの発芽をより効率的に誘導又は抑制する物質の開発が求められている。

30

【0005】

ストライガ発芽調節物質を開発する場合は、通常、ストライガの種子に候補物質を作用させ、その発芽誘導率の変化を指標とすることにより、ストライガ発芽調節物質としての有効性を試験する (非特許文献1)。ただ、このような試験は、1つの候補物質の有効性を試験するにも、種子の準備、発芽数の測定等、多くの手間を要し、多数の候補物質をハイスループット処理することが困難である。また、ストライガ種子を使用する場合、該種子を植物防疫所の許可を経て輸入する必要があり、また許可を受けた実験スペースでしか使用できないという問題がある。さらに、発芽を指標に化合物を同定できたとしても、標的タンパク質が明らかでない場合、合理的な設計を通して改良していくことは困難である。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Tsuchiya et al., Nature Chemical Biology 6 741-749 (2010)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、ストライガ種子を用いることなく、ストライガ発芽調節物質をより簡便且つより効率的にスクリーニングする方法を提供することを課題とする。

50

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者等は鋭意研究を進めた結果、一般式(1)又は(2)で表わされる化合物を蛍光プローブとして用いることにより、上記課題を解決できることを見出した。本発明はこの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、完成されたものである。即ち、本発明は、下記の態様を包含する。

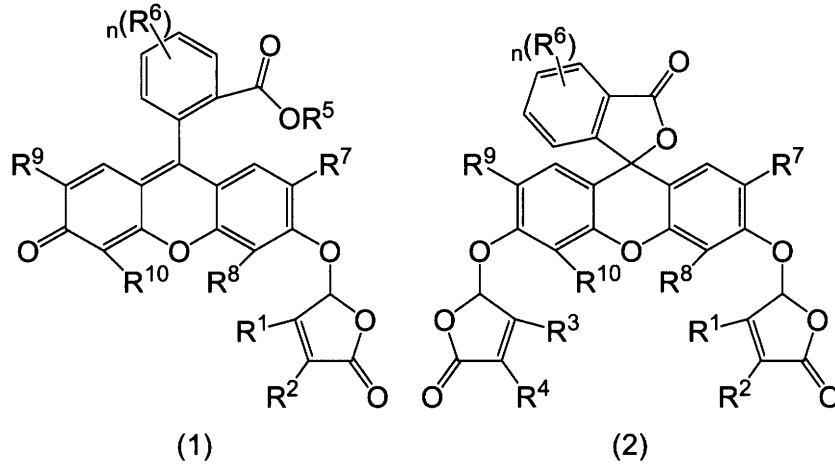
【0009】

項1.

一般式(1)又は(2)：

【0010】

【化1】



(1)

(2)

【0011】

[式中、

R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は、同一又は異なって水素原子又はアルキル基であり、

R^1 及び R^2 が、互いに結合して隣接する炭素原子と共に、アルキル基で置換されていてもよいベンゼン環を形成していてもよく、

R^3 及び R^4 が、互いに結合して隣接する炭素原子と共に、アルキル基で置換されていてもよいベンゼン環を形成していてもよく、

R^5 は、水素原子又はアルキル基であり、

R^6 は、保護されていてもよい水酸基、アルコキシ基、ハロゲン原子、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、イソシアネート基、イソチオシアネート基、スルホ基、又は活性エステル基であり、

R^7 、 R^8 、 R^9 及び R^{10} は、同一又は異なって水素原子、ハロゲン原子、又はアルキル基であり、

n は、0 又は 1 ~ 3 の整数である。]

で表わされる化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

項2.

R^1 及び R^2 の一方が水素原子であり他方がアルキル基であり、且つ R^3 及び R^4 の一方が水素原子であり他方がアルキル基である、項1に記載の化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

項3.

R^7 、 R^8 、 R^9 及び R^{10} が水素原子である、項1又は2に記載の化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

項4.

n が0である、項1~3のいずれかに記載の化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

項5.

10

20

30

40

50

項 1 ~ 4 のいずれかに記載の化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物を含有する、蛍光プローブ。

項 6。

ストリゴラクトン受容体活性測定用である、項 5 に記載の蛍光プローブ。

項 7。

工程 (a) ~ (c) を含むストライガ発芽調節物質のスクリーニング方法：

(a) 被検物質の存在下で、ストリゴラクトン受容体と項 5 又は 6 に記載の蛍光プローブとを接触させる工程、

(b) 工程 (a) の後、前記蛍光プローブの分解物の蛍光強度を測定し、該蛍光強度 (被検蛍光強度) を、被検物質を接触させない場合の蛍光強度 (対照蛍光強度) と比較する工程、

(c) 被検蛍光強度と対照蛍光強度とが有意に相違している場合に、被検物質を、ストライガ発芽調節物質として選択する工程。

【発明の効果】

【 0 0 1 2 】

本発明によれば、一般式 (1) 又は (2) で表わされる化合物を蛍光プローブとして用いることにより、発芽試験を行う従来の方法に比べて遥かに簡便且つ効率的に、ストライガ発芽調節物質をスクリーニングすることができる。また、発芽試験は許可を受けた実験スペースでしか行うことができないところ、本発明のスクリーニング方法はこのような制約無く実施することができる。さらに、得られたストライガ発芽調節物質について、本発明で初めて見出されたストリゴラクトン受容体との相互作用等の解析、最適化合物の予測等を通じて、より合理的にストライガ発芽調節物質を改良することも可能である。

【 0 0 1 3 】

一般式 (1) 又は (2) で表わされる化合物は、ストリゴラクトン受容体による加水分解を受け、ストリゴラクトンと同様の生理活性を発揮する。そして、該化合物は、この加水分解により特定の蛍光物質を生成する。よって、該化合物を蛍光プローブとして用いることにより、上記スクリーニングのみならず、ストリゴラクトン受容体活性の測定や、該受容体が関連する種々の生命現象の解析 (例えば、ストライガ発芽過程におけるストリゴラクトン受容体活性の変化の、時間的、空間的な解析等) が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 4 】

【図 1】In vitro 蛍光発光試験 (実施例 1-1) における蛍光強度の測定結果を示す。横軸は、反応開始後の時間を示し、縦軸は蛍光強度の相対値を示す。黒丸はシロイヌナズナストリゴラクトン受容体 (AtD14) を反応系に加えた場合の結果を示し、黒△は AtD14 を加えなかった場合の結果を示す。

【図 2】In vitro 蛍光発光試験 (実施例 1-1) の蛍光強度の測定結果に基づいて作成された Lineweaver-Burk プロット、及び K_m 値を示す。

【図 3】In vitro 蛍光発光試験の反応溶液中の成分を LC-MS で解析 (実施例 1-2) した結果を示す。上段は AtD14 を反応系に加えなかった場合の結果を示し、下段は AtD14 を反応系に加えた場合の結果を示す。Fluorescein 及び D-ring (3-メチル-5-ヒドロキシフラン-2 (5H) -オン) は YLG のエーテル結合部分の加水分解により生じる分解物を示す。各ピークの横の数字は、Retention time (分) を示す。

【図 4】競合試験 (実施例 1-3) における蛍光強度の測定結果、及び IC_{50} 値を示す。横軸は、競合物質 (GR24、carba-GR24、5DS、又は 4D0) の反応溶液中の濃度を示し、縦軸は蛍光強度の相対値を示す。

【図 5】In vivo 蛍光発光試験 (実施例 1-4) における蛍光観察像 (上段) 及び明視野像 (下段) を示す。

【図 6】ストライガ発芽試験 (実施例 2) の発芽率の測定結果を示す。横軸は、種子を含む溶液中の GR24 又は YLG の濃度を示し、縦軸は発芽率を示す。

【図 7】ストライガ発芽試験 (実施例 2) で発芽した種子の明視野像 (上段) 及び蛍光観

10

20

30

40

50

察像（下段）を示す。

【発明を実施するための形態】

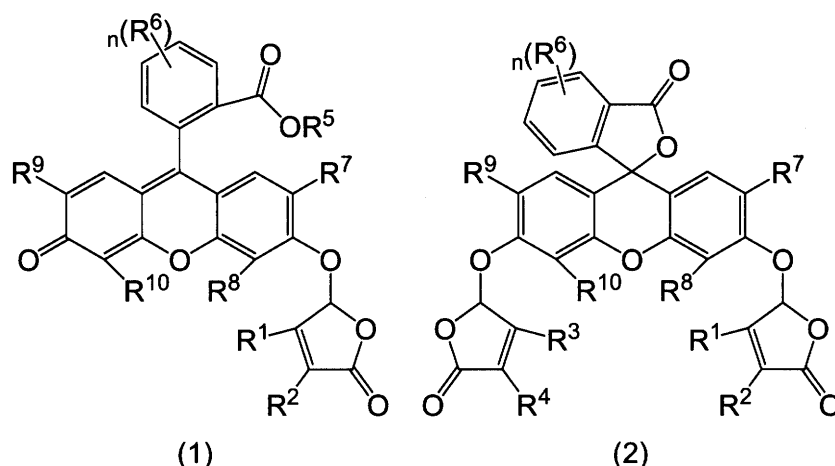
【0015】

1. 化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物

一般式（1）又は（2）：

【0016】

【化2】



10

20

【0017】

[式中、

R¹、R²、R³及びR⁴は、同一又は異なって水素原子又はアルキル基であり、

R¹及びR²が、互いに結合して隣接する炭素原子と共に、アルキル基で置換されていてもよいベンゼン環を形成していてもよく、

R³及びR⁴が、互いに結合して隣接する炭素原子と共に、アルキル基で置換されていてもよいベンゼン環を形成していてもよく、

R⁵は、水素原子又はアルキル基であり、

R⁶は、保護されていてもよい水酸基、アルコキシ基、ハロゲン原子、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、イソシアネート基、イソチオシアネート基、スルホ基、又は活性エステル基であり、

R⁷、R⁸、R⁹及びR¹⁰は、同一又は異なって水素原子、ハロゲン原子、又はアルキル基であり、

nは、0又は1～3の整数である。]

で表わされる化合物（本明細書において、「本発明の化合物」と示すこともある。）、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物について説明する。

【0018】

R¹、R²、R³及びR⁴は、同一又は異なって水素原子又はアルキル基であり、R¹及びR²は、互いに結合して隣接する炭素原子と共に、アルキル基で置換されていてもよいベンゼン環を形成していてもよく、R³及びR⁴は、互いに結合して隣接する炭素原子と共に、アルキル基で置換されていてもよいベンゼン環を形成していてもよい。

【0019】

R¹、R²、R³及びR⁴で示されるアルキル基は、直鎖状又は分枝状のいずれでもよいが、直鎖状のものが好ましい。該アルキル基の炭素数は、例えば1～6、好ましくは1～4、より好ましくは1～3、さらに好ましくは1～2である。該アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、sec-ブチル基、n-ペンチル基、ネオペンチル基、n-ヘキシル基、3-メチルペンチル基等が挙げられる。

【0020】

R¹及びR² 或いはR³及びR⁴が形成するベンゼン環を置換していてもよいアルキル

50

基は、上記「 R^1 、 R^2 、 R^3 又は R^4 で示されるアルキル基」と同様である。該ベンゼン環の置換数は、特に制限されないが、例えば0～3個、好ましくは0～1個である。

【0021】

R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 の態様としては、ストリゴラクトンの構造により近い（すなわちストリゴラクトン受容体に対してより受容され易い）という観点から、好ましくは R^1 及び R^2 並びに R^3 及び R^4 がアルキル基で置換されていてもよいベンゼン環を形成しておらず、より好ましくは R^1 及び R^2 の一方が水素原子であり他方がアルキル基であり、且つ R^3 及び R^4 の一方が水素原子であり他方がアルキル基であり、さらに好ましくは R^1 及び R^3 が水素原子であり、且つ R^2 及び R^4 がアルキル基である。

【0022】

R^5 は、水素原子又はアルキル基である。

10

【0023】

R^5 で示されるアルキル基は、直鎖状又は分枝状のいずれでもよいが、直鎖状のものが好ましい。該アルキル基の炭素数は、例えば1～6、好ましくは1～4、より好ましくは1～3である。該アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*tert*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*n*-ペンチル基、ネオペンチル基、*n*-ヘキシル基、3-メチルペンチル基等が挙げられる。

【0024】

R^5 は、本発明の化合物の合成がより容易であるという観点から、アルキル基であることが好ましい。

20

【0025】

R^6 は、保護されていてもよい水酸基、アルコキシ基、ハロゲン原子、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、イソシアネート基、イソチオシアネート基、スルホ基、又は活性エステル基である。

【0026】

R^6 で示される保護されていてもよい水酸基における保護基としては、例えば、メトキシメチル基(MOM)等のアルコキシアルキル基、2-テトラヒドロピラニル(THP)基、アセチル基(Ac)等のアルカノイル基等が挙げられる。

【0027】

R^6 で示されるアルコキシ基としては、例えば、直鎖又は分枝鎖のC1～6(特に1～3)アルコキシ基が挙げられ、具体的には、メトキシ基、エトキシ基、*n*-プロピルオキシ基、イソプロピルオキシ基等が挙げられる。

30

【0028】

R^6 で示されるハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子が挙げられる。

【0029】

R^6 で示されるアルコキシカルボニル基としては、例えば、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、*n*-プロピルオキシカルボニル基、イソプロピルオキシカルボニル基、*tert*-ブチルオキシカルボニル基等の直鎖又は分枝鎖の(C1～6アルコキシ基)カルボニル基が挙げられる。

40

【0030】

R^6 で示される活性エステル基としては、カルボキシル基(-COOH)が反応性の高い活性エステルに変換された基であり、例えば、*N*-ヒドロキシコハク酸イミドを用いた活性エステル基(例えば、-C(=O)OSu: Suはコハク酸イミド基)、カルボン酸を混合酸無水物にした基(例えば、-C(=O)OC(=O)R: RはC1～C6アルキル基)、カルボニルイミダゾール(CDI)を用いたイミダゾライド基(例えば、-C(=O)-Im: Imは1-イミダゾリル基)等が挙げられる。

【0031】

*n*は、特に制限されるものではないが、例えば0又は1～3の整数、好ましくは0又は

50

1、より好ましくは0である。

【0032】

R⁷、R⁸、R⁹及びR¹⁰は、同一又は異なって水素原子、ハロゲン原子、又はアルキル基である。

【0033】

R⁷、R⁸、R⁹及びR¹⁰で示されるハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子が挙げられ、好ましくはフッ素原子が挙げられる。

【0034】

R⁷、R⁸、R⁹及びR¹⁰で示されるアルキル基は、直鎖状又は分枝状のいずれでもよいが、直鎖状のものが好ましい。該アルキル基の炭素数は、例えば1~6、好ましくは1~4、より好ましくは1~3、さらに好ましくは1~2である。該アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、sec-ブチル基、n-ペンチル基、ネオペンチル基、n-ヘキシル基、3-メチルペンチル基等が挙げられる。

【0035】

R⁷、R⁸、R⁹及びR¹⁰の態様としては、よりストリゴラクトン受容体に受容され易いという観点から、好ましくはR⁷及びR⁹が同一又は異なって水素原子、ハロゲン原子、又はアルキル基であり、且つR⁸及びR¹⁰が水素原子であり、より好ましくはR⁷、R⁸、R⁹及びR¹⁰が全て水素である。

【0036】

本発明の化合物としては、安定性等の観点からは、一般式(2)で表わされる化合物が好ましい。

【0037】

本発明の化合物の塩としては、特に制限されるものではなく、酸性塩、塩基性塩のいずれも採用することができる。酸性塩の例としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩、クエン酸塩、メタンスルホン酸塩、パラトルエンスルホン酸塩等が挙げられ、塩基性塩の例としては、ナトリウム、及びカリウムなどのアルカリ金属塩、並びにカルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩等が挙げられる。

【0038】

本発明の化合物の溶媒和物としては、一般式(1)又は(2)で表される化合物又はその塩と、溶媒との溶媒和物である限り特に限定されない。溶媒としては、例えばエタノール、グリセロール、酢酸等が挙げられる。

【0039】

一般式(1)又は(2)で表わされる化合物は、公知の合成法、例えばウィリアムソンのエーテル合成法やウルマンのエーテル合成法に従って又は準じて製造することができる。一例として、以下のスキームで合成することができる。

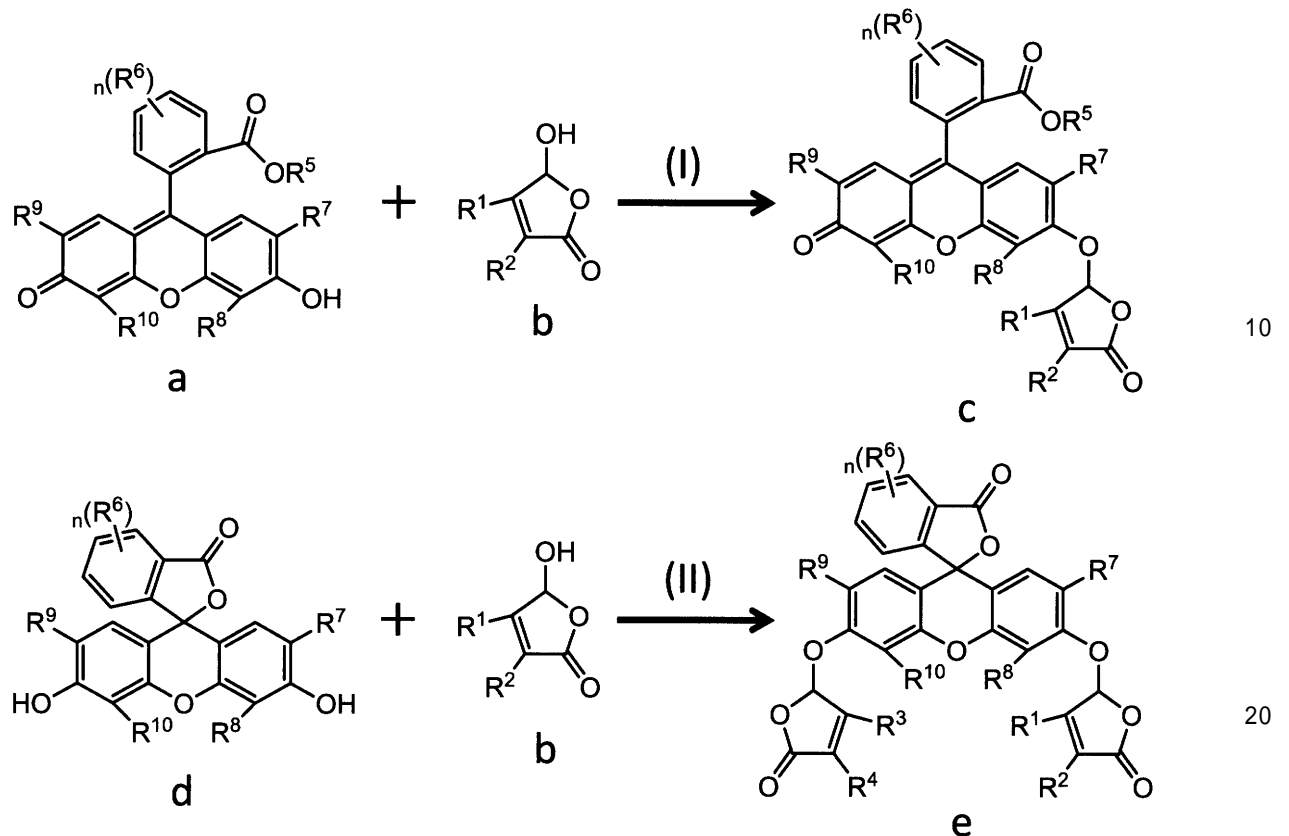
【0040】

10

20

30

【化 3】



【0041】

[式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、及び n は、前記に同じである。]

工程 (I) では、化合物 a と化合物 b とを触媒の存在下で反応させる工程により、化合物 c (一般式 (1) で表わされる化合物) を合成する。工程 (II) では、化合物 d と化合物 b とを触媒の存在下で反応させる工程により、化合物 e (一般式 (2) で表わされる化合物) を合成する。

30

【0042】

工程 (I) において、化合物 b の使用量は、選択率及び収率の観点から、化合物 a 1 モルに対して、通常、0.2 ~ 2 モルが好ましく、0.5 ~ 1.5 モルがより好ましい。工程 (II) において、化合物 b の使用量は、選択率及び収率の観点から、化合物 d 1 モルに対して、通常、2 ~ 5 モルが好ましく、2.5 ~ 4 モルがより好ましい。

【0043】

工程 (I) 及び (II) で使用する触媒としては、特に限定されるものではないが、選択率、収率及び安全性の観点から、例えば炭酸カリウム、酸化銀 (I)、ピリジン、銅、酸化銅 (II)、水素化ナトリウム等が挙げられ、好ましくは塩基触媒が挙げられ、より好ましくは炭酸カリウム、酸化銀 (I)、ピリジン等が挙げられる。これらは単独で使用してもよく、また、複数併用してもよい。これらの中でも、工程 (I) で使用する触媒としては炭酸カリウムが好ましく、工程 (II) で使用する触媒としては酸化銀 (I) 及びピリジンの組み合わせが好ましい。

40

【0044】

工程 (I) 及び (II) において、触媒の使用量は、目的化合物が得られる限りにおいて特に限定されず、工程別、触媒の種類別に適宜設定することができる。例えば、工程 (I) において触媒として炭酸カリウムを用いる場合は、選択率及び収率の観点から、化合物 a 1 モルに対して、通常、0.2 ~ 2 モルが好ましく、0.5 ~ 1.5 モルがより好ましい。別の例として、工程 (II) において酸化銀を用いる場合は、選択率及び収率の観点から、化合物 d 1 モルに対して、通常、2 ~ 5 モルが好ましく、2.5 ~ 4 モルが

50

より好ましい。

【0045】

工程(I)及び(II)は、通常、反応溶媒下で行われる。使用できる反応溶媒としては、例えばN,N-ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、アセトン、トルエン等が挙げられ、好ましくはN,N-ジメチルホルムアミド、アセトニトリル等が挙げられる。これらは単独で使用してもよく、また、複数併用してもよい。

【0046】

これらの反応溶媒(有機溶媒)の使用量は、反応が進行すれば特に限定されるものではないが、通常、化合物a又はdの濃度が0.01~1mol/L、好ましくは0.05~0.5mol/Lとなるように調整することが好ましい。

10

【0047】

工程(I)及び(II)の反応温度は、加熱下、室温下、冷却下のいずれでも行うことができ、通常10~50程度が好ましい。また、反応は、常圧で実施してもよく、また、必要に応じて、減圧又は加圧条件下で実施することも可能であるが、常圧下で実施することが好ましい。反応時間は、特に制限はなく、反応が十分に進行する時間とすればよい。

【0048】

反応の進行は、クロマトグラフィーのような通常の方法で追跡することができる。反応終了後、溶媒を留去し、生成物はクロマトグラフィー法、再結晶法等の通常の方法で単離精製することができる。また、生成物の構造は、元素分析、MS(FD-MS)分析、IR分析、¹H-NMR、¹³C-NMR等により同定することができる。

20

【0049】

また、工程(I)及び(II)で合成される化合物c及びeは、必要に応じて、活性炭処理、再結晶、カラムクロマトグラフィー等の通常の方法により精製することも可能である。

【0050】

なお、化合物a又はdが、キサンテン骨格上の水酸基以外の他の水酸基を有する場合、必要に応じてこの他の水酸基を適当な保護基で保護してから、工程(I)及び(II)に供し、反応終了後、該保護基を除去することによって、化合物c又はeを合成することもできる。

30

【0051】

2. 蛍光プローブ

本発明の化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物を含有する、蛍光プローブ(本明細書において、「本発明の蛍光プローブ」と示す場合もある。)について説明する。

【0052】

本発明の化合物は、ストリゴラクトン受容体による加水分解を受け、ストリゴラクトンと同様の生理活性を発揮する。そして、本発明の化合物は、この加水分解により特定の蛍光物質を生成する。よって、本発明の化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物を蛍光プローブとして用いることにより、ストリゴラクトン受容体活性の測定、該受容体が関連する種々の生命現象の解析(例えば、ストライガ発芽過程におけるストリゴラクトン受容体活性の変化の、時間的、空間的な解析等)等が可能となる。さらには、ストリゴラクトン受容体活性の変化を指標とすることにより、ストリゴラクトン受容体によるストリゴラクトンの加水分解を経て起こる生命現象の調節物質のスクリーニングも可能である。このような生命現象としては、後述のストライガ種子の発芽の他にも、ストリゴラクトンを生成する植物における茎の分枝、根の伸長、発芽等が知られている。

40

【0053】

蛍光プローブは、本発明の化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物のみからなるものであってもよいが、蛍光プローブとしての活性を損なわない限りにおいて、緩衝剤、溶媒等の他の成分を含有していてもよい。この場合、本発明の化合物、又はその塩、水和

50

物若しくは溶媒和物の濃度は、使用目的によって適宜調節することができ、特に制限されるものではないが、植物体に作用させる場合であれば例えば $1 \times 10^{-10} \text{ m l / L} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ m l / L}$ 、好ましくは $1 \times 10^{-8} \text{ m l / L} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ m l / L}$ が挙げられ、*in vitro* でストリゴラクトン受容体に作用させる場合であれば例えば $1 \times 10^{-9} \text{ m l / L} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ m l / L}$ 、好ましくは $1 \times 10^{-7} \text{ m l / L} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ m l / L}$ が挙げられる。

【0054】

溶媒としては、特に制限はなく、極性溶媒及び非極性溶媒のいずれも使用できる。

【0055】

極性溶媒としては、例えば、エーテル化合物（テトラヒドロフラン、アニソール、1,4-ジオキサン、シクロペンチルメチルエーテル等）、アルコール（メタノール、エタノール、アリルアルコール等）、エステル化合物（酢酸エチル等）、ケトン（アセトン等）、ハロゲン化炭化水素（ジクロロメタン、クロロホルム）、ジメチルスルホキシド、アミド系溶媒（N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン、N-メチルピロリドン等）等が挙げられる。

10

【0056】

非極性溶媒としては、例えば、ペンタン、ヘキサン、シクロヘキサン、ヘプタン等の脂肪族有機溶媒；ベンゼン、トルエン、キシレン、メシチレン等の芳香族溶媒等が挙げられる。

【0057】

緩衝剤としては、特に制限はなく、例えばヘPes緩衝剤、トリス緩衝剤、トリシン-水酸化ナトリウム緩衝剤、リン酸系緩衝剤、リン酸緩衝生理食塩水等が挙げられる。

20

【0058】

3. ストライガ発芽調節物質のスクリーニング方法

下記の工程(a)～(c)を含むストライガ発芽調節物質のスクリーニング方法（本明細書において、「本発明のスクリーニング方法」と示す場合もある。）について説明する：

(a) 被検物質の存在下で、ストリゴラクトン受容体と請求項5又は6に記載の蛍光プローブとを接触させる工程、

(b) 工程(a)の後、前記蛍光プローブの分解物の蛍光強度を測定し、該蛍光強度（被検蛍光強度）を、被検物質を接触させない場合の蛍光強度（対照蛍光強度）と比較する工程、

30

(c) 被検蛍光強度と対照蛍光強度とが有意に相違している場合に、被検物質を、ストライガ発芽調節物質として選択する工程。

【0059】

ストライガ発芽調節物質とは、ストライガの種子に作用し、該種子の発芽を調節（誘導又は抑制）する物質である。発芽誘導物質は、宿主植物がない環境下で施用することにより、発芽したストライガは寄生できずに枯死（いわゆる自殺発芽）することとなるので、土壌を浄化することができる。一方、発芽抑制物質を施用すれば、ストライガに寄生されることなく宿主植物を栽培することが可能となる。

40

【0060】

被検物質は、ストライガ発芽調節物質か否かをスクリーニングする対象物質である。被検物質としては、天然に存在する化合物又は人工に作られた化合物を問わず広く使用することができる。また、精製された化合物に限らず、多種の化合物を混合した組成物や、動植物の抽出液も使用することができる。

【0061】

ストリゴラクトン受容体は、ストリゴラクトンを受容し、そのエーテル結合部分を加水分解する活性を有する受容体である限り特に限定されない。ストリゴラクトン受容体としては、例えば、シロイヌナズナのストリゴラクトン受容体であるAtD14、ストライガ由来ストリゴラクトン受容体等が挙げられる、好ましくはストライガ由来ストリゴラクト

50

ン受容体が挙げられる。ストライガ由来ストリゴラクトン受容体は、本発明において初めて見出されたものであり、例えば配列番号2～11、好ましくは配列番号2、4～8、10、及び10、より好ましくは5、6、及び8で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられる。

【0062】

被検物質の存在下で、ストリゴラクトン受容体と本発明の蛍光プローブとを接触させる態様は、これら3成分が接触することができる限り特に限定されない。例えば、これら3成分を適当な溶媒中で混合することが挙げられる。

【0063】

接触時間は、ストリゴラクトン受容体により本発明の化合物の加水分解が起こる限りにおいて、特に限定されない。接触時間としては、加水分解により生じる特定の蛍光物質が蛍光検出可能な程度に蓄積される程度の時間が好ましく、例えば5分間～3時間、好ましくは30～90分間程度が挙げられる。

10

【0064】

蛍光強度の測定は、公知の方法に従って又は準じて行うことができる。より簡便且つ効率的に実施するという観点からは、上記接触をマイクロプレートのウェル内で行い、蛍光強度の測定を蛍光マイクロプレートリーダーで行うというシステムが好ましい。

【0065】

被検物質と接触させない場合とは、工程(a)において被検物質と接触させていない以外は、同じ又は同等の処理をした場合である。この場合の蛍光強度も、上記した被検物質と接触させた場合の蛍光強度と同様に測定することができる。

20

【0066】

被検蛍光強度と対照蛍光強度とが有意に相違しているか否かの判断は、一定の基準、例えば統計学的基準に基づき判断すればよい。具体的には、複数回測定してP値を求め、P値が一定値以下、例えば0.05以下である場合に有意に相違すると判断する方法等が挙げられる。

【0067】

判断の結果、有意に相違している場合は、ストリゴラクトン受容体活性が被検物質により調節(活性化又は抑制)されていること、例えば被検物質が、ストリゴラクトン受容体のアゴニスト又はアンタゴニストとして機能していることを意味する。ストライガの発芽はストリゴラクトンによって制御されていることから、この場合は、被検物質を、ストライガ発芽調節物質として選択することができる。このように選択されたストライガ発芽調節物質は、ヒト造血幹細胞増殖調節物質の候補物質として、2次スクリーニングの被検物質として使用してもよい。

30

【実施例】

【0068】

以下に、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0069】

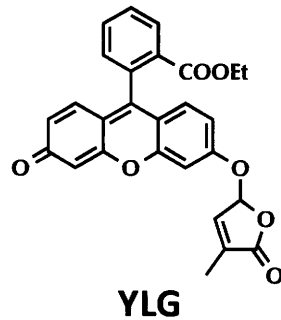
合成例1

エチル 2-(6-(4-メチル-5-オキソ-2,5-ジヒドロフラン-2-イル)オキシ)-3-オキソ-3H-キサンテン-9-イル)ベンゾエート(YLG)を合成した。

40

【0070】

【化4】



10

【0071】

エチル 2-(6-ヒドロキシ-3-オキソ-3H-キサンテン-9-イル)ベンゾエート (227.0 mg, 0.63 mmol, 1.00 equiv) 及び K_2CO_3 (152 mg, 0.69 mmol, 1.10 equiv) を *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) (2.0 mL) に加え、室温で10分間攪拌した。ここに5-プロモ-3-メチルフラン-2(5H)-オン (136.1 mg, 0.63 mmol, 1.00 equiv) を加え、室温で30分間攪拌した。ここに水を加え、水層を酢酸エチルで抽出した。混ぜ合わせた有機層を、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄後、無水 Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧下で濃縮した。得られた混合物を、分取薄層クロマトグラフィー (PTLC) (溶媒は、 $CHCl_3$ / メタノール (MeOH) = 20 : 1 の混合溶媒) で精製し、ジエステロマーの混合物として黄色固体の目的物 (YLG) を得た (140 mg、収率51%)。

20

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 0.96-1.26 (m, 6H), 2.04 (s, 6H), 3.98-4.11 (m, 4H), 6.40 (s, 2H), 6.44 (s, 2H), 6.54 (dd, $J = 10.0, 2.0$ Hz, 2H), 6.87-6.97 (m, 6H), 7.04 (brs, 2H), 7.24 (dd, $J = 5.2, 2.4$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.69 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.75 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 8.27 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) 185.8, 170.8, 165.32, 165.27, 160.06, 158.8, 153.5, 149.7, 149.6, 141.8, 134.9, 134.05, 133.97, 132.8, 131.4, 130.73, 130.66, 130.46, 130.35, 129.9, 129.36, 118.7, 117.0, 113.99, 113.86, 106.0, 104.07, 103.96, 97.9, 61.4, 13.74, 13.71, 10.75. HRMS (ESI(+)) $m/z = 457.1282$ calcd for $C_{27}H_{21}O_7$ $[M+H]^+$, found: .457.1268.

【0072】

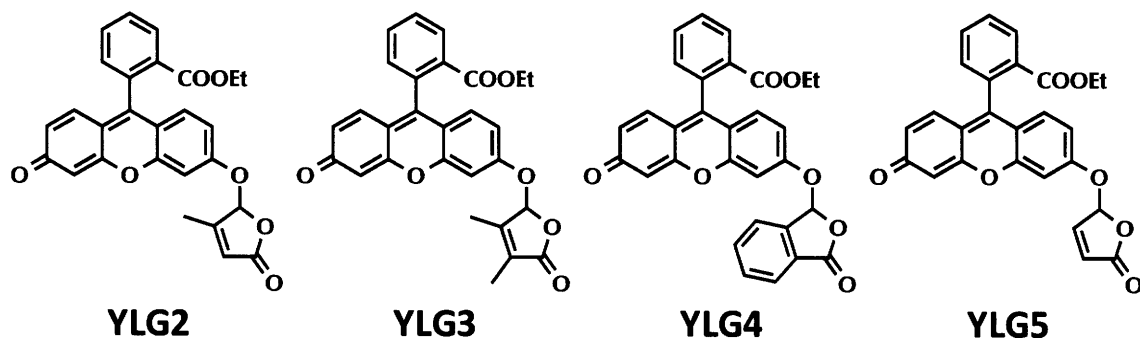
合成例 2 ~ 5

エチル 2-(6-(3-メチル-5-オキソ-2,5-ジヒドロフラン-2-イル)オキシ)-3-オキソ-3H-キサンテン-9-イル)ベンゾエート (YLG2)、エチル 2-(6-(3,4-ジメチル-5-オキソ-2,5-ジヒドロフラン-2-イル)オキシ)-3-オキソ-3H-キサンテン-9-イル)ベンゾエート (YLG3)、エチル 2-(3-オキソ-6-(3-オキソ-1,3-ジヒドロイソベンゾフラン-1-イル)オキシ)-3H-キサンテン-9-イル)ベンゾエート (YLG4)、及びエチル 2-(3-オキソ-6-(5-オキソ-2,5-ジヒドロフラン-2-イル)オキシ)-3H-キサンテン-9-イル)ベンゾエート (YLG5) を合成した。合成は、5-プロモ-3-メチルフラン-2(5H)-オンに代えて適当な材料化合物を用いる以外は、合成例 1 と同様に行った。

30

【0073】

【化5】



50

【 0 0 7 4 】

< YLG2 > 得られた混合物を、PTLC (溶媒は、 $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} = 20 : 1$ の混合溶媒) で精製し、ラセミ体として黄色固体の目的物 (YLG2) を得た (収率70%)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 0.97-1.04 (m, 3H), 2.23 (s, 3H), 4.03-4.08 (m, 2H), 6.05 (s, 1H), 6.26 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 6.55 (dd, $J = 5.6, 2.0$ Hz, 1H), 6.86-6.98 (m, 3H), 7.25 (d, $J = 5.2, 2.0$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.71 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.76 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 8.28 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H)。

【 0 0 7 5 】

< YLG3 > 得られた混合物を、PTLC (溶媒は、 $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} = 20 : 1$ の混合溶媒) で精製し、ラセミ体として黄色固体の目的物 (YLG3) を得た (収率52%)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 0.96-1.04 (m, 3H), 1.93 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 4.04-4.08 (m, 2H), 6.18 (s, 1H), 6.45 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.55 (dd, $J = 9.6, 2.0$ Hz, 1H), 6.86-6.95 (m, 3H), 7.24-7.32 (m, 2H), 7.69 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.73 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.27 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H)。

10

【 0 0 7 6 】

< YLG4 > 得られた混合物を、PTLC (溶媒は、 $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} = 20 : 1$ の混合溶媒) で精製し、ラセミ体として黄色固体の目的物 (YLG4) を得た (収率83%)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 0.98-1.05 (m, 3H), 4.04-4.11 (m, 2H), 6.45 (s, 1H), 6.55 (dd, $J = 9.2, 2.0$ Hz, 1H), 6.89 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 6.96-7.01 (m, 3H), 7.34 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.68-7.85 (m, 5H), 7.98 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.28 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H)。

20

【 0 0 7 7 】

< YLG5 > 得られた混合物を、PTLC (溶媒は、 $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} = 10 : 1$ の混合溶媒) で精製し、ラセミ体として黄色固体の目的物 (YLG5) を得た (収率56%)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 0.97-1.03 (m, 3H), 4.00-4.09 (m, 2H), 6.41 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 6.45 (s, 1H), 6.52-6.56 (m, 2H), 6.87-6.98 (m, 3H), 7.25 (dd, $J = 5.2, 2.4$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.69 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.75 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.27 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H)。

【 0 0 7 8 】

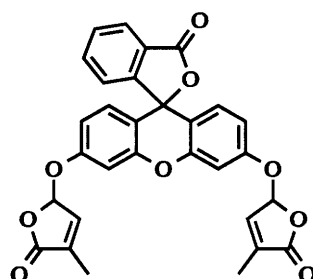
合成例 6

(1S) -3'- (((R) -4-メチル-5-オキソ-2,5-ジヒドロフラン-2-イル)オキシ) -6'- ((4-メチル-5-オキソ-2,5-ジヒドロフラン-2-イル)オキシ) -3H-スピロ [イソベンゾフラン-1,9'-キサンテン] -3-オン (YLGW) を合成した。

30

【 0 0 7 9 】

【 化 6 】



YLGW

40

【 0 0 8 0 】

2- (6-ヒドロキシ-3-オキソ-3H-キサンテン-9-イル) 安息香酸 (160 mg, 0.50 mmol)、 Ag_2O (348 mg, 1.50 mmol, 3.00 equiv)、及び触媒量のピリジンをアセトニトリル (3.0 mL) に加え、室温で10分間攪拌した。ここに5-プロモ-3-メチルフラン-2 (5H) -オン (281 mg, 1.50 mmol, 3.00 equiv) を加え、40 °C で10時間攪拌した。ここに水を加え、水層を酢酸エチルで抽出した。混ぜ合わせた有機層を、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄後、無水 Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧下で濃縮した。得られた混合物を、フラッシュカラ

50

ムクロマトグラフィー（溶媒は、 CHCl_3 ）で精製し、ジアステレオマーの混合物として黄色油状の目的物（YLGW）を得た（32.8 mg、収率13%）。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 2.04 (s, 12H), 6.34 (d, $J = 6.4$ Hz, 4H), 6.76-6.84 (m, 8H), 6.87-6.97 (m, 6H), 7.01-7.16 (m, 4H), 7.64 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.69 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 8.03 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) 171.0, 169.3, 158.0, 153.1, 152.2, 141.9, 135.3, 134.9, 130.1, 129.6, 126.4, 125.3, 124.0, 114.23, 114.10, 114.00, 113.90, 112.85, 112.75, 105.30, 105.08, 104.5, 104.2, 98.50, 98.43, 82.20, 10.76. HRMS (ESI(+)) $m/z = 525.1180$ calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{21}\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, found: 525.1162.

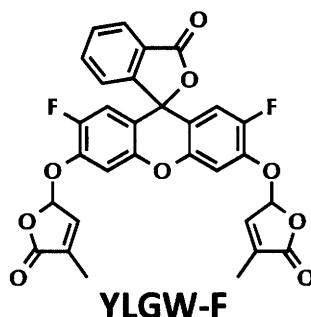
【0081】

合成例 7

5,5'-(2',7'-ジフルオロ-3-オキシ-3H-スピロ[イソベンゾフラン-1,9'-キサンテン]-3',6'-ジイル)ビス(オキシ)ビス(3-メチルフラン-2(5H)-オン)(YLGW-F)を合成した。

【0082】

【化7】



【0083】

2',7'-ジフルオロ-3',6'-ジヒドロキシ-3H-スピロ[イソベンゾフラン-1,9'-キサンテン]-3-オン (73.6 mg, 0.20 mmol)、 Ag_2O (139 mg, 0.60 mmol, 3.00 equiv)、及び触媒量のピリジンをDMF (3.0 mL) に加え、室温で10分間攪拌した。ここに5-プロモ-3-メチルフラン-2(5H)-オン (106 mg, 0.60 mmol, 3.00 equiv) を加え、室温で20分間攪拌した。ここに水を加え、水層を酢酸エチルで抽出した。混ぜ合わせた有機層を、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄後、無水 Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧下で濃縮した。得られた混合物を、フラッシュカラムクロマトグラフィー（溶媒は、 CHCl_3 ）で精製し、ジアステレオマーの混合物として黄色油状の目的物（YLGW-F）を得た（13.2 mg、収率12%）。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 2.03 (s, 12H), 6.36 (d, $J = 15.6$ Hz, 4H), 6.52-6.56 (m, 4H), 7.05 (d, $J = 14$ Hz, 4H), 7.14-7.20 (m, 2H), 7.26 (d, $J = 6.0$ Hz, 4H), 7.65-7.76 (m, 4H), 8.05 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H)。

【0084】

実施例 1 . シロイヌナズナストリゴラクトン受容体による加水分解及び蛍光発光

ストリゴラクトンは、シロイヌナズナ等の植物内において、ストリゴラクトン受容体により加水分解され、それにより植物の生命現象（枝分かれ抑制等）を制御していることが知られている。そこで、上記合成例で合成した化合物（被検化合物）でも、同様の現象が起こるかどうか調べた。被検化合物は、エーテル結合が加水分解されることにより蛍光物質（フルオレセイン誘導体）が生成するようにデザインされている。具体的には次のように行った。

【0085】

<1-1. In vitro 蛍光発光試験>

シロイヌナズナストリゴラクトン受容体を定法に従って製造した。具体的には、該受容体のcDNAをRT-PCRによって得て、大腸菌内で発現・精製することにより製造した。得られたシロイヌナズナストリゴラクトン受容体（リコンビナントAtD14、 $1\ \mu\text{g}$ ）及び被検化合

10

20

30

40

50

物 (YLG、YLG2、YLG3、YLG4、YLG5、YLGW、又はYLGW-F) (終濃度0.2 μ M、0.4 μ M、0.6 μ M、1 μ M、5 μ M、又は10 μ M) を含む反応溶液 (100 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.0、0.1 % DMSO) 100 μ Lを調製し、96ブラックウェルプレート (Greiner社製) 内で反応させた。反応開始後、90分後まで、10分毎に、蛍光検出器 (spectraMax i3、Molecular Devices社製) を用いて、励起波長480 nm、検出波長520 nmで蛍光を検出し、蛍光強度を測定した。被検化合物としてYLGを終濃度1 μ Mで用いた場合の蛍光強度の測定結果を図1に示す。さらに、反応開始後60分経過時の蛍光強度の測定結果に基づいて、Linewaver-Burkプロットを作成し、 K_m 値を算出した。被検化合物としてYLGを用いた場合の該プロット図及び K_m 値を図2に示す。

【0086】

10

図1及び2に代表的に示されるように、被検化合物と、シロイヌナズナストリゴラクトン受容体とが反応することにより、蛍光物質が生成した。このことから、被検化合物は、ストリゴラクトンと同様に、シロイヌナズナストリゴラクトン受容体により分解され、それにより蛍光物質を生成させていることが示唆された。また、被検化合物の中でもYLGWは安定性が高かった。

【0087】

<1-2. 分解物のLC-MS解析>

実施例1-1と同様に反応させた後、反応溶液中の成分を、定法に従ってLC-MS (Thermo社製) 解析した。被検化合物としてYLGを用いた場合の結果を図3に示す。

【0088】

20

図3に示されるように、YLGとシロイヌナズナストリゴラクトン受容体との反応後 (図3の下段) は、YLGのピーク (Retention time 16.78分) がほぼ消失しており、YLGのエーテル結合部分の加水分解によって生じるフルオレセイン誘導体 (図中、「Fluorescein」) のピーク (Retention time 15.75分)、及び3-メチル-5-ヒドロキシフラン-2 (5H) -オン (図中、「D-ring」) のピーク (Retention time 4.92分) が出現した。このことより、被検化合物は、ストリゴラクトンと同様に、シロイヌナズナストリゴラクトン受容体により分解され、それにより蛍光物質が生成することが明らかとなった。

【0089】

<1-3. ストリゴラクトンによる競合試験>

被検化合物としてYLGを終濃度1 μ Mで用い、競合化合物として既知の天然又は合成ストリゴラクトン (GR24、5DS、又は4DO) 又は活性を有しない既知のストリゴラクトン誘導体 (carba-GR24) を終濃度0.01 ~ 10 μ Mで用い、且つ反応開始後60分経過時の蛍光強度を測定する以外は、実施例1-1と同様に行った。さらに、蛍光強度の測定結果に基づいて、競合化合物である各ストリゴラクトンの IC_{50} 値を算出した。結果を図4に示す。

30

【0090】

図4に示されるように、既知の天然又は合成ストリゴラクトンを反応系に入れた場合、蛍光強度が減少した。このことから、これらのストリゴラクトンとYLGとは、シロイヌナズナストリゴラクトン受容体上の同一部位を認識していることが示唆された。また、ストリゴラクトン活性を有しないcarba-GR24がYLGと競合していなかったことから、この競合試験は、シロイヌナズナストリゴラクトン受容体の結合特異性を反映していることが示された。

40

【0091】

<1-4. In vivo 蛍光発光試験>

シロイヌナズナの野生株又はストリゴラクトン非感受性株 (Atd14-1) の根を、1 μ M YLG水溶液で30分間処理した後、根を蛍光顕微鏡 (LSM780-DUO-NLO; Zeiss, Gottingen, Germany) で観察 (励起波長480 nm、検出波長520 nm) した。蛍光観察像及び明視野像を図5に示す。

【0092】

図5に示されるように、野生株ではYLG処理により蛍光発光が起こったが、ストリゴラクトン非感受性株では蛍光発光は起こらなかった。また、蛍光発光部位は、ストリゴラク

50

トンが作用することが報告されている部位（側根）と同じであった。

【0093】

<1-5. シロイヌナズナの枝分かれに対する影響の解析>

0.2 mLチューブを液状のMS寒天で満たし、これを固めた後、チューブの底を除去した。この0.2 mLチューブに、シロイヌナズナの野生株又はストリゴラクトン生合成変異株（max4-1）の種子（滅菌済み）を入れ、4℃で2日間保存した。この0.2 mLチューブを、液体培地（4.3 g/L Murashige and Skoog基本塩、25 mg/L MES、pH5.8（KOH）、1× Gambourgal ビタミン）で満たされた15 mLコニカルチューブに入れ、16時間明暗周期下で栽培した。とう立ちし始めたところで、0.2 mLチューブを、YLG（終濃度5 μM）又はDMSOを含む液体培地で満たされた新しい15 mLコニカルチューブに移し、2週間栽培した。2 mm長以上の腋生の枝の数を測定し、その平均値及び標準偏差を求めた（n=3）。その結果、野生株をYLGで処理しない場合の該枝の数は 0.5 ± 0.6 であり、ストリゴラクトン生合成変異株をYLGで処理しない場合の該枝の数は 2.8 ± 0.5 であり、ストリゴラクトン生合成変異株をYLGで処理した場合の該枝の数は 1.3 ± 0.6 であった。このことから、YLGは、ストリゴラクトンの生合成変異による枝分かれ異常（枝分かれ数の増加）を正常に戻す機能を有すること、すなわちシロイヌナズナ内のストリゴラクトンと同様の機能を有することが示唆された。

10

【0094】

実施例2. ストライガ発芽試験

ストライガの種子は、周辺の植物から分泌されるストリゴラクトンを感じて分解し、それに伴い発芽することが知られている。そこで、上記合成例で合成した化合物（被検化合物）でも、同様の現象が起こるかどうかが調べた。

20

【0095】

定法に従って前処理したストライガの種子を蒸留水に懸濁し、96ウェルプレートに入れた。そこに、合成ストリゴラクトン（GR24）又は被検化合物（YLG又はYLGW）のDMSO溶液を、合成ストリゴラクトン又は被検化合物の終濃度0.0001 μM、0.001 μM、0.01 μM、0.1 μM、1 μM、又は10 μM、DMSO濃度が0.1%になるように加え、暗所で室温下、2日間保持した後、幼根が出た数を計測した。被検化合物としてYLGを用いた場合について、この計測値を種子数で除して得られた割合（発芽率を示す）を図6に示す。また、被検化合物としてYLGを用い、合成ストリゴラクトン又は被検化合物の終濃度が10 μMの場合の明視野像及び蛍光観察像（励起波長480 nm、検出波長520 nm）を図7に示す。

30

【0096】

図6及び7に示されるように、被検化合物は、合成ストリゴラクトンと同様に、ストライガ内で分解され、これに伴いストライガの発芽を誘導することが示された。

【0097】

実施例3. ストライガストリゴラクトン受容体の同定、及び該受容体による加水分解及び蛍光発光

<3-1. ストライガストリゴラクトン受容体の探索>

ストライガにおけるストリゴラクトン受容体は明らかとなっていない。そこで、ストリゴラクトン産生植物のストリゴラクトン受容体のアミノ酸配列に基づいて、ストライガにおけるストリゴラクトン受容体を探索した結果、12つの受容体候補が見つかった。これらの名称及びアミノ酸配列の配列番号を表1に示す。

40

【0098】

【表 1】

名称	アミノ酸配列
ShHTL1	配列番号1
ShHTL2	配列番号2
ShHTL3	配列番号3
ShHTL4	配列番号4
ShHTL5	配列番号5
ShHTL6	配列番号6
ShHTL7	配列番号7
ShHTL8	配列番号8
ShHTL9	配列番号9
ShHTL10	配列番号10
ShHTL11	配列番号11
ShD14	配列番号12

10

【0099】

<3-2. ストライガストリゴラクトン受容体候補タンパク質の調製>

20

ストライガ種子から調製したcDNAをテンプレートとして、PCRによりストライガストリゴラクトン受容体候補タンパク質のORFコードDNAを取得した。使用したプライマー名及び塩基配列の配列番号を表2に示す。

【0100】

【表2】

受容体候補名称	プライマー名	塩基配列
ShHTL1	ShHTL1-F	配列番号13
	ShHTL1-R	配列番号14
ShHTL2	ShHTL2-F Bam	配列番号15
	ShHTL2-R Xho	配列番号16
ShHTL3	ShHTL3-F Sal	配列番号17
	ShHTL3-R ERV	配列番号18
ShHTL4	ShHTL4-F Sal	配列番号19
	ShHTL4-R ERV	配列番号20
ShHTL5	ShHTL5-F Sal	配列番号21
	ShHTL5-R ERV	配列番号22
ShHTL6	ShHTL6-F Bam	配列番号23
	ShHTL6-R Xho	配列番号24
ShHTL7	ShHTL7-F Sal	配列番号25
	ShHTL7-R ERV	配列番号26
ShHTL8	ShHTL8-F Sal	配列番号27
	ShHTL8-R ERV	配列番号28
ShHTL9	ShHTL9-F Sal	配列番号29
	ShHTL9-R ERV	配列番号30
ShHTL10	ShHTL10-F Sal	配列番号31
	ShHTL10-R ERV	配列番号32
ShHTL11	ShHTL11-F Sal	配列番号33
	ShHTL11-R ERV	配列番号34
ShD14	ShD14-F Kpn	配列番号35
	ShD14-R ERV	配列番号36

10

20

30

【0101】

該DNAを大腸菌発現ベクター（ShHTL2、3、及び5～11についてはp15TV-L、ShHTL1及び4についてはpDEST17）に組み込み、大腸菌（BL21-CodonPlus(DE3)、Agilent社製）に導入した。該大腸菌を培養し、目的タンパク質を定法に従ってHisタグ精製した。さらに、目的タンパク質を、AKTAシステムを用いたゲル濾過クロマトグラフィー（Superdex 200 increase（GEヘルスケア社製）、Running buffer組成：10 mM HEPES、150 mM NaCl、pH7.0）で精製した。得られたストリゴラクトン受容体候補タンパク質（ShHTL1～11及びShD14）を、以下の実施例3-3で用いた。

40

【0102】

<3-3. In vitro蛍光発光試験、及び競合試験>

受容体として実施例3-2で調製したストリゴラクトン受容体候補タンパク質を用い、且つ被検化合物としてYLGを用いる以外は実施例1-1及び1-3と同様にしてin vitro蛍光発光試験及び競合試験を行い、YLGの各ストリゴラクトン受容体候補タンパク質に対する K_m 値、及び各競合化合物であるストリゴラクトンの IC_{50} 値を算出した。

【0103】

in vitro蛍光発光試験の結果、ストリゴラクトン受容体候補タンパク質の内、ShHTL2～11を用いた場合について、蛍光が確認された。また、競合試験の結果、ShHTL2～11を用い

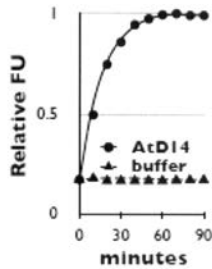
50

た場合について、ストリゴラクトンにより蛍光強度が減少することが確認された。各ストリゴラクトン受容体候補タンパク質に対するYLGの K_m 値は、ShHTL2 : $3.2 \pm 0.6 \mu\text{M}$ 、ShHTL3 : $8.3 \pm 2.7 \mu\text{M}$ 、ShHTL4 : $2.8 \pm 0.5 \mu\text{M}$ 、ShHTL5 : $1.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$ 、ShHTL6 : $0.35 \pm 0.02 \mu\text{M}$ 、ShHTL7 : $3.8 \pm 0.7 \mu\text{M}$ 、ShHTL8 : $1.9 \pm 1.2 \mu\text{M}$ 、ShHTL9 : $> 10 \mu\text{M}$ 、ShHTL10 : $3.0 \pm 0.3 \mu\text{M}$ 、ShHTL11 : $6.1 \pm 0.7 \mu\text{M}$ であった。各ストリゴラクトン受容体候補タンパク質に対するストリゴラクトン (5DS) の IC_{50} 値は、ShHTL2 : $8.9 \pm 1.5 \mu\text{M}$ 、ShHTL3 : $9.3 \pm 1.7 \mu\text{M}$ 、ShHTL4 : $0.30 \pm 0.04 \mu\text{M}$ 、ShHTL5 : $3.6 \pm 1.3 \mu\text{M}$ 、ShHTL6 : $0.19 \pm 0.02 \mu\text{M}$ 、ShHTL7 : $0.12 \pm 0.01 \mu\text{M}$ 、ShHTL8 : $0.36 \pm 0.17 \mu\text{M}$ 、ShHTL9 : $1.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$ 、ShHTL10 : $0.62 \pm 0.04 \mu\text{M}$ 、ShHTL11 : $1.6 \pm 0.04 \mu\text{M}$ であった。各ストリゴラクトン受容体候補タンパク質に対するストリゴラクトン (4DO) の IC_{50} 値は、ShHTL2 : $> 10 \mu\text{M}$ 、ShHTL3 : $5.1 \pm 1.2 \mu\text{M}$ 、ShHTL4 : $0.84 \pm 0.14 \mu\text{M}$ 、ShHTL5 : $5.6 \pm 1.5 \mu\text{M}$ 、ShHTL6 : $0.29 \pm 0.08 \mu\text{M}$ 、ShHTL7 : $0.11 \pm 0.02 \mu\text{M}$ 、ShHTL8 : $0.17 \pm 0.02 \mu\text{M}$ 、ShHTL9 : $1.0 \pm 0.2 \mu\text{M}$ 、ShHTL10 : $0.25 \pm 0.05 \mu\text{M}$ 、ShHTL11 : $4.3 \pm 0.7 \mu\text{M}$ であった。各ストリゴラクトン受容体候補タンパク質に対するストリゴラクトン (ORO) の IC_{50} 値は、ShHTL2 : $> 10 \mu\text{M}$ 、ShHTL3 : $> 10 \mu\text{M}$ 、ShHTL4 : $> 10 \mu\text{M}$ 、ShHTL5 : $> 10 \mu\text{M}$ 、ShHTL6 : $0.058 \pm 0.012 \mu\text{M}$ 、ShHTL7 : $1.1 \pm 1.4 \mu\text{M}$ 、ShHTL8 : $> 10 \mu\text{M}$ 、ShHTL9 : $1.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$ 、ShHTL10 : $0.39 \pm 0.11 \mu\text{M}$ 、ShHTL11 : $4.8 \pm 1.1 \mu\text{M}$ であった。各ストリゴラクトン受容体候補タンパク質に対するストリゴラクトン (STR) の IC_{50} 値は、ShHTL2 : $> 10 \mu\text{M}$ 、ShHTL3 : $> 10 \mu\text{M}$ 、ShHTL4 : $5.8 \pm 2.0 \mu\text{M}$ 、ShHTL5 : $> 10 \mu\text{M}$ 、ShHTL6 : $0.36 \pm 0.09 \mu\text{M}$ 、ShHTL7 : $0.12 \pm 0.03 \mu\text{M}$ 、ShHTL8 : $0.77 \pm 0.13 \mu\text{M}$ 、ShHTL9 : $> 10 \mu\text{M}$ 、ShHTL10 : $> 10 \mu\text{M}$ 、ShHTL11 : $2.0 \pm 0.1 \mu\text{M}$ であった。以上より、ShHTL2~11は、ストライガにおけるストリゴラクトン受容体として機能することが示唆された。

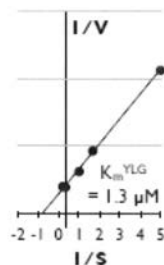
10

20

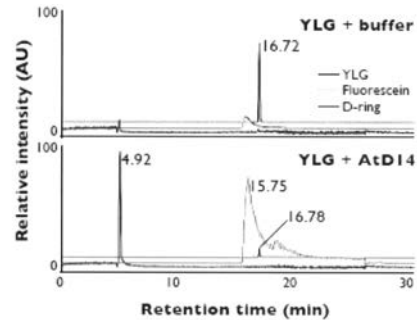
【 図 1 】



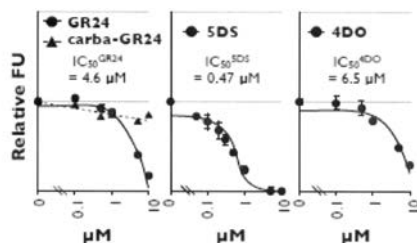
【 図 2 】



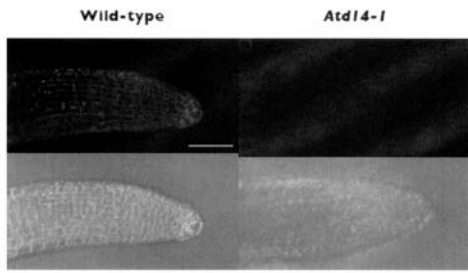
【 図 3 】



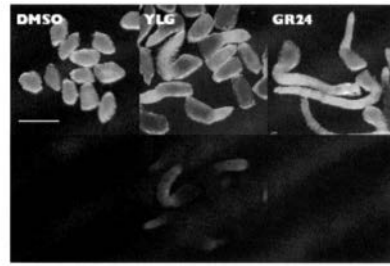
【 図 4 】



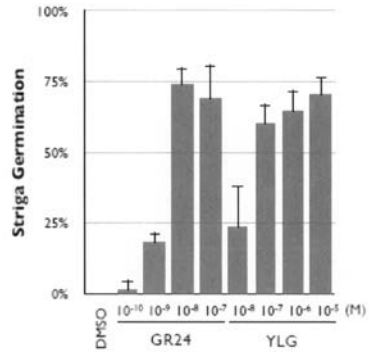
【 図 5 】



【 図 7 】



【 図 6 】



【 配列表 】

2017014152000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/415 (2006.01) C 0 7 K 14/415

(72)発明者 伊丹 健一郎
愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内

(72)発明者 木下 俊則
愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内

Fターム(参考) 2G045 AA31 FB12
4C063 AA01 BB08 CC79 DD75 DD76 EE10
4C071 AA04 AA07 BB01 BB07 CC12 DD19 EE05 FF17 HH01 HH05
HH09 JJ06 LL04
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA30 DA50 EA50 FA71