

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年4月26日(26.04.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/074554 A1

- (51) 国際特許分類:
A01N 43/56 (2006.01) *A01N 43/90* (2006.01)
A01G 7/00 (2006.01) *A01P 21/00* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/037870
- (22) 国際出願日: 2017年10月19日(19.10.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-205506 2016年10月19日(19.10.2016) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人理化学研究所(RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP). ユニバーシティ・サインス・マレーシア (UNIVERSITI SAINS MALAYSIA) [MY/MY]; 11800 ペナン ユニバーシティ サイン ス マレーシア ユーエスエム Penang (MY).
- (72) 発明者: 松井 南(MATSUI Minami); 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 栗原 志夫(KURIHARA Yukio); 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 栗原 恵美子(KURIHARA Emiko); 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). オン ウェンディ(ONG WenDee); 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 川島 美香(KAWASHIMA Mika); 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 蒔田 由布子(MAKITA Yuko); 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). クマール スーディッシュ(KUMAR Sudesh); 11800 ペナン ユニバーシティ サイン ス マレーシア ユーエスエム Penang (MY).
- (74) 代理人: 特許業務法人セントクレスト国際特許事務所 (CENTCREST IP ATTORNEYS); 〒1040031 東京都中央区京橋 2 - 8 - 2 1 喜久家ビル 9 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: COMPOSITION FOR INHIBITING FUNCTION OF CRYPTOCHROME

(54) 発明の名称: クリプトクロムの機能を抑制するための組成物

(57) Abstract: The present inventors have made it clear that a nine-membered nitrogenous fused aromatic heterocyclic compound having two nitrogen atoms and having, added thereto, a hydrogen or halogen atom and a nitro group combines with cryptochrome, which is a blue-light photoreceptor protein, to inhibit the functions of the protein. It has also been found that the compound accelerates the growth of plants when irradiated with blue light.

(57) 要約: 2 個の窒素原子を含有し、水素原子又はハロゲン原子とニトロ基とが付加されている 9 員含窒素縮合芳香族複素環式化合物は、青色光受容体タンパク質であるクリプトクロムに結合し、該タンパク質の機能を抑制することを明らかにした。また、当該化合物は、青色光照射下で植物の生長を促進することも見出した。



WO 2018/074554 A1

明 細 書

発明の名称： クリプトクロムの機能を抑制するための組成物

技術分野

[0001] 本発明は、9員含窒素縮合芳香族複素環式化合物を有効成分として含有する、クリプトクロムの機能を抑制するための組成物に関する。また本発明は、該化合物を有効成分として含有する、青色光を含む光の照射下で植物の生長を促進するための組成物に関する。

背景技術

[0002] 植物の生長にとって、光は非常に重要な環境刺激であり、その様々な波長の光に応じ、発芽、避陰反応、気孔開口、屈光性、脱黄化（緑化）、概日時計の調整及び開花期等の制御（光形態形成）がなされている。

[0003] また、植物は、様々な波長の光を感知するため、異なるグループに属する光受容体、すなわち、青色光を感知する光受容体タンパク質であるクリプトクロムと赤色光を感知する光受容体タンパク質であるフィトクロムとを有している。クリプトクロム（CRYs：CRY1及びCRY2）は、波長350～500nmにおける青色光及びUV-Aに反応し、フィトクロム（phyA～phyE）は、波長650～750nmにおける赤色光及び遠赤色光を吸収するために機能する。

[0004] そして、これら受容体は、光子を吸収することにより活性化され、下流のタンパク質等の発現及びそれらの相互作用を引き起こし、周囲の光環境に適応した生育及び生理学的反応に至る代謝を制御する機能を担っている。

[0005] 例えば、苗の初期発達において、シロイヌナズナにおける脱黄化等の光形態形成と、光受容体 クリプトクロム及びフィトクロムとは、密接に関連していることは知られている（非特許文献1）。

[0006] また、青色光照射下ではシロイヌナズナ等の植物の胚軸伸長は抑制されることが知られているが、CRY1の機能欠損は、青色光によるこの抑制を解消し、胚軸の伸長（植物の生長）を促すことが明らかになっている（非特許

文献1)。さらに、胚軸伸長の他、クリプトクロムは気孔開口、色素（アントシアニン）合成、及び開花期の制御を含む、生長発達過程におけるかなりの現象に関与することも報告されている（非特許文献2及び3）。

[0007] また、青色光シグナル伝達の分子機構に関し、開花期の制御においては、クリプトクロム結合ベーシックヘリックスループヘリックス1（CIB1）依存的なCRY2による制御が関与しており、CIB1がフラワリングローカスT（FT）遺伝子のプロモーター領域に結合することによって、その発現を活性化することが明らかになっている（非特許文献4、図1 参照）。

[0008] さらに、苗の発達段階を決定する上で、クリプトクロムはSuppressor Of PhyA 1（SPA1）/Constitutive Of Photomorphogenic 1（COP1）を制御することも明らかになっている。より具体的には、図1に示す通り、クリプトクロムは、SPA1/COP1による様々な転写因子（HY5、HYH、CO）の分解を抑制することによって、青色光制御遺伝子の発現プロファイルに変化をもたらし、苗の発達段階を決定することが明らかになっている（非特許文献5～8）。

[0009] このように、クリプトクロムが関与する青色光シグナル伝達は、植物の生長に大きく関与しているため、そのシグナル伝達を制御することにより、植物のサイズを大きくすることが期待できる。

先行技術文献

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Ahmad, M、Cashmore, A. R.、Plant J.、1997年、11巻、421～427ページ

非特許文献2：Lin, C.、The Plant Cell、2002年、5：S207-S225

非特許文献3：Giliberto, L. ら、Plant Physiol.、2005年、137巻、199～208ページ

非特許文献4：Liu, Y. PLOS Genetics.、2013年、9

: e 1 0 0 3 8 6 1 .

非特許文献5: F a n k h a u s e r , C . , U l m , R . , G e n e D e v . , 2 0 1 1 年、2 5 巻、1 0 0 4 ~ 1 0 0 9 ページ

非特許文献6: H o n g , S . H . ら、P l a n t J . , 2 0 0 8 年、5 5 巻、3 6 1 ~ 3 7 1 ページ

非特許文献7: L i , Q . H . , Y a n g , H . Q . , P h o t o c h e m P h o t o b i o l . , 2 0 0 7 年、8 3 巻、9 4 ~ 1 0 1 ページ

非特許文献8: L i u , H . , ら、T r e n d s P l a n t S c i . , 2 0 1 1 年、1 6 巻、6 8 4 ~ 6 9 1 ページ

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は、前記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、その目的は、クリプトクロムが関与する青色光シグナル伝達を抑制することを可能とする低分子化合物を提供することにある。特に、本発明は、青色光を含む光の照射下で植物の生長を促進することを可能とする低分子化合物を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、まず、植物の生長を促進するための低分子化合物をスクリーニングするため、化学物質（3680種）にて各々処理したシロイヌナズナ（野生型）の苗を、青色光照射下で生長させた。その結果、青色光照射下における胚軸伸長の阻害を解消し、植物の生長を促進することができる化合物として、3-ブロモ-7-ニトロインダゾール（3B7N）を選抜することができた。さらに、バイオマスの原料として注目されているソルガムを、3B7Nにより処理し、青色光照射下にて生長させても、シロイヌナズナ同様に、該生長は促進されることを確認した。

[0013] 次に、本発明者らは、3B7Nのアナログを用い、それら低分子化合物の構造と前記植物の生長促進との関係を分析した。その結果、2個の窒素原子を含有する9員含窒素縮合芳香族複素環をコア構造とし、このコア構造に、

水素原子又はハロゲン原子とニトロ基とが任意の位置に付加されていれば、青色光による胚軸伸長の阻害に対して抑制効果を発揮できることを見出した。

[0014] 青色光照射下にて育てた野生型の苗は、双葉のサイズが大きくなること（拡張）も知られている。そこで、本発明者らは、さらに 3 B 7 N による双葉のサイズへの影響を分析した。その結果、当該化合物は、青色光が調節する胚軸伸長の阻害のみならず、双葉の拡張をも抑制できることが明らかになった。

[0015] 次に、本発明者らは、3 B 7 N による胚軸伸長等に関与する光受容体を同定するため、様々なシロイヌナズナ光受容体変異体株を 3 B 7 N にて処理して青色光照射下で生長させた。その結果、CRY 1 及び／又はCRY 2 の機能欠損株においては、3 B 7 N による植物の生長促進が抑制されたことから、クリプトクロム（CRY 1、CRY 2）が調節する青色光シグナル伝達に 3 B 7 N が関与していることも明らかになった。さらに、マイクロアレイによる分析の結果、cry 1 cry 2 二重変異体（CRY 1 及びCRY 2 の機能欠損株）と、3 B 7 N にて処理した野生型とは、同じクラスターに分類され、それらの遺伝子発現プロファイルは近似していることが明らかになった。さらにまた、CRY によって制御される遺伝子発現の約半分が、3 B 7 N 処理によって阻害され、及び青色光制御遺伝子の多くは、3 B 7 N 処理によって青色光による制御とは逆にそれらの発現が制御されることが明らかになった。

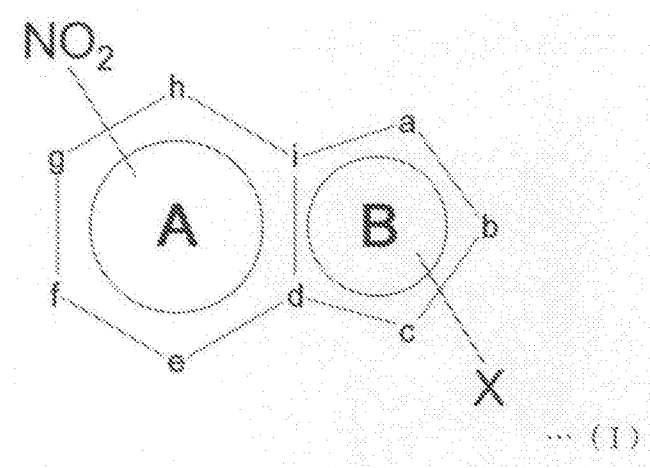
[0016] 次に、本発明者らは、3 B 7 N の標的分子がクリプトクロム自体であると想定し、それらの相互作用について分析した。その結果、3 B 7 N は、実際に、CRY 1 と結合することが明らかになった。

[0017] 以上から、本発明者らは、3 B 7 N がクリプトクロムに結合してその機能を抑制することにより、当該光受容体タンパク質が調節する青色光シグナル伝達を抑制し、上述の植物の生長を促進していることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0018] したがって、本発明は以下を提供するものである。

< 1 > 下記一般式 (1) で表される含窒素縮合芳香族複素環式化合物を有効成分として含有する、クリプトクロムの機能を抑制するための組成物

[0019] [化1]



[0020] [前記式 (1) 中、A環とB環とは一緒になって、2個の窒素原子を含有する、9員含窒素縮合芳香族複素環式化合物であり、A環は6員芳香族炭化水素環又は6員芳香族複素環を示し、B環は5員芳香族炭化水素環又は5員芳香族複素環を示す。また、Xは水素原子又はハロゲン原子を示す]。

< 2 > 前記含窒素縮合芳香族複素環式化合物が3-ブロモ-7-ニトロインダゾールである、< 1 >に記載の組成物。

< 3 > 青色光を含む光の照射下で植物の生長を促進するための組成物である、< 1 >又は< 2 >に記載の組成物。

発明の効果

[0021] 本発明によれば、クリプトクロムの機能を抑制することができる。また当該機能抑制により、青色光を含む光の照射下で植物の生長を促進させることが可能となる。特に、近年、化石エネルギー資源の枯渇が刻々と進行すると共に、地球温暖化が深刻な問題となっている。そのため、植物の生長を促進することのできる本発明は、石油等の化石燃料に代替するバイオマス植物の増産にも貢献するものである。また、本発明によれば、青色LED等の人工環境下でも植物の生長を促進することができるため、不安定な自然環境の影

響を受けない安定した増産も可能となる。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]クリプトクロム (CRY) が調節する青色光シグナル伝達の概要を示す図である。青色光を受けるとCRYはリン酸化され、COP1ユビキチンリガーゼ及びSPA1からなる複合体に結合する。この結合により、該複合体は不活化されるため、HY5等の転写因子が安定化される。そして、安定化したこれら転写因子によって光形態形成に関与する遺伝子の発現が活性化され、胚軸伸長の阻害、脱黄化等の光形態形成が促進されることになる。一方、暗所では、前記複合体はCRYと結合することなく活性化状態にあるため、HY5等の光形態形成を正に制御する転写因子は分解されることになる。また、青色光に応答して、CRY2がCIB1と結合し、CIB1がFT遺伝子のプロモーターに結合することによって該遺伝子の発現が誘導され、これが開花につながる。

[図2] 3B7Nにて処理した野生型苗の胚軸における単色光照射に対する反応を解析した結果を、示す図である。図中Aは、3B7N添加又は非添加にて、 $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 青色光を照射して生長させた6日目の苗を観察した結果を示す写真である。図中Bは、 $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 青色光、 $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 赤色光若しくは $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 遠赤色光を連続的に照射して生長させた、又は暗所にて生長させた、6日目の野生型の苗の胚軸の長さを示すグラフである。データは、各バッチにおける平均値±標準偏差を示す (n数は25以上, * $P < 0.05$)。スケールバーは1mmを表す。

[図3] 3B7N添加及び連続的な青色光照射下における野生型苗の胚軸の長さを示すグラフである。測定値は、6日目の苗の平均値±標準偏差 (n数は25以上) を示す。

[図4] 3B7N又はその他のNO消去剤 (L-NAME、CPTIO、DEA-NONOate) にて処理し、連続的な青色光照射下で生長させた野生型苗の胚軸の長さを示すグラフである。測定値は、6日目の苗の平均値±標準偏差 (n数は25以上) を示す。

[図5] 3 B 7 N 及びそのアナログによる、連続的な青色光照射下における苗の胚軸伸長の制御について解析した結果を示すグラフである。図中、3 B 7 N は 3-ブロモ-7-ニトロインダゾールを示し、A 1 は 3-ブロモインダゾールを示し、A 2 は 7-ニトロインダゾールを示し、A 3 : 1-[2-(トリフルオロメチル)フェニル]イミダゾールを示し、A 4 は 3-ブロモ-1 H-インダゾール-7-カルボニトリルを示し、A 5 は 3-ヨード-7-ニトロインダゾールを示し、A 6 は 3-ブロモ-6-ニトロイミダゾ [1, 2-a] ピリジンを示す。また、6 日目の苗の胚軸の長さは平均値±標準偏差 (n 数は 25 以上, *P<0.05) にて示す。スケールバーは 1 mm を表す。

[図6] $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 青色光照射下にて生長させた光受容体変異体 (phyA phyB、cry1 cry2、cry1、cry2) 及び過剰発現体 (CRY1-OX、CRY2-OX) の胚軸の長さを示すグラフである。測定値は、3 B 7 N で処理した苗及びコントロールとしてジメチルスルホキシド (DMSO) にて処理したその平均値±標準偏差 (n 数は 25 以上, *P<0.05) を示す。

[図7] $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 青色光照射下にて生長させたクリプトクロムシグナル伝達関連変異体 (cop1-4、cop1-6、hy5、hy5 hyh) の胚軸の長さを示すグラフである。測定値は、3 B 7 N で処理した苗及びコントロールとして DMSO にて処理したその平均値±標準偏差 (n 数は 25 以上, *P<0.05) を示す。

[図8] $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 青色光照射下にて生長させた既知の光シグナル伝達転写因子変異体の胚軸の長さを示すグラフである。測定値は、3 B 7 N で処理した苗及びコントロールとして DMSO にて処理したその平均値±標準偏差 (n 数は 25 以上, *P<0.05) を示す。なお、hfr1 (Int) は、HFR1 (LONG HYPOCOTYL in FAR-RED) のイントロン部分が欠損している変異体であり、hfr1 (Pro) は、HFR1 のプロモーター領域が欠損している変異体であり、laf1 は、LA

F1 (LONG AFTER FAR-RED LIGHT 1) の変異体である。

[図9] 3B7N 又はそのコントロールとして DMSO にて処理した 6 日目の野生型苗の双葉を示す写真である。図中 A においては、 $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の青色光を連続的に照射して生長させた苗を示し、B においては、 $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の青色光を連続的に照射して生長させた苗を示す。各パネル左上の数値は、各プレートへの 3B7N の最終添加濃度を示す。各パネル左下には、モニターした苗の子葉形態の代表的な例を示す。また、スケールバーは 1 mm を表す。

[図10] 野生型 (DMSO 処理、コントロール)、A1 (3-ブロモインダゾール) 処理、A2 (7-ニトロインダゾール) 処理及び 3B7N (3-ブロモ-7-ニトロインダゾール) 処理における遺伝子発現プロファイルをクラスタリングした結果を示す、図である。なお、遺伝子発現プロファイルは、青色光 ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 照射下、最終濃度が $2.5 \mu\text{M}$ になるように各化学物質を添加した寒天培地にて 4 日間生長させた苗に関する。また、各遺伝子発現レベルはヒートマップにて示す。

[図11] 遺伝子発現プロファイルにおいて、野生型 (DMSO 処理) と A1 処理とを比較した結果を示す、ボルカノプロットである。横軸の -1 及び 1 に直交する 2 本のラインは、倍変化のカットオフ ($\log 2 = 1$) を示す。

[図12] 遺伝子発現プロファイルにおいて、野生型 (DMSO 処理) と A2 処理とを比較した結果を示す、ボルカノプロットである。楕円で囲んだ黒のドットは、倍の変化を示した有意な発現を示す。縦軸の $1.0 \sim 1.5$ の間にあるラインは、 $p = 0.05$ を示すラインである。横軸の $-2 \sim 0$ 及び $0 \sim 2$ にある 2 本のラインは、倍変化のカットオフ ($\log 2 = 1$) を示す。

[図13] 遺伝子発現プロファイルにおいて、野生型 (DMSO 処理) と 3B7N 処理とを比較した結果を示す、ボルカノプロットである。楕円で囲んだ黒のドットは、倍の変化を示した有意な発現を示す。縦軸の $1.0 \sim 1.5$ の間にあるラインは、 $p = 0.05$ を示すラインである。横軸の $-2 \sim 0$ 及び

0～2にある2本のラインは、倍変化のカットオフ ($\log 2 = 1$) を示す。

[図14] $15 \mu\text{M}$ 3 B 7 N 処理及び $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 青色光照射下にて生長させた野生型苗と *c r y 1 c r y 2* 変異体苗とにおける、遺伝子発現プロファイルをクラスタリングした結果を示す、図である。各遺伝子の発現はヒートマップで示す。

[図15] DMSOにて処理した野生型及び3 B 7 Nにて処理した野生型において、有意に発現が異なった遺伝子の分布を示すグラフである。グラフの縦軸及びその数値は、遺伝子数を示す。横軸は2つの植物間での倍の変化を示す。

[図16] DMSOにて処理した *c r y 1 c r y 2* 変異体及び3 B 7 Nにて処理した *c r y 1 c r y 2* 変異体において、有意に発現が異なった遺伝子の分布を示すグラフである。グラフの縦軸及びその数値は、遺伝子数を示す。横軸は2つの植物間での倍の変化を示す。

[図17] DMSOにて処理した野生型及びDMSOにて処理した *c r y 1 c r y 2* 変異体において、有意に発現が異なった遺伝子の分布を示すグラフである。グラフの縦軸及びその数値は、遺伝子数を示す。横軸は2つの植物間での倍の変化を示す。

[図18] 3 B 7 Nにて処理した野生型及びDMSOにて処理した *c r y 1 c r y 2* 変異体において、有意に発現が異なった遺伝子の分布を示すグラフである。グラフの縦軸及びその数値は、遺伝子数を示す。横軸は2つの植物間での倍の変化を示す。

[図19] 3 B 7 N ($0 \mu\text{M}$ 又は $2.5 \mu\text{M}$) 処理及び $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 青色光照射下にて生長させたソルガムの子葉鞘の長さ (平均値) を各々示すグラフである。

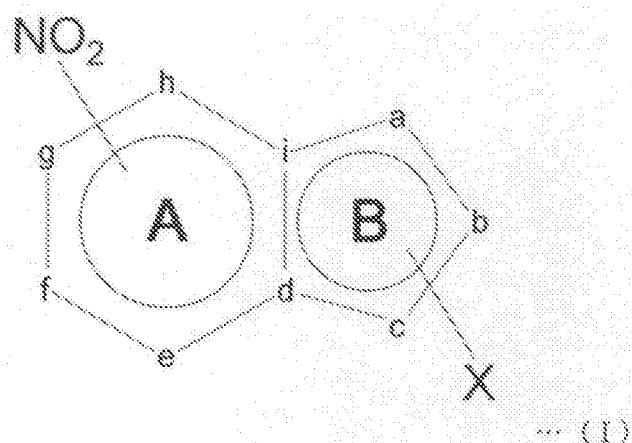
[図20] 3 B 7 と C R Y 1 との結合をビーズ結合実験及びウェスタンブロッティングにて解析した結果を示す写真である。

発明を実施するための形態

[0023] 後述の実施例において示す通り、本発明において、水素原子又はハロゲン原子とニトロ基とが任意の位置に付加されている、2個の窒素原子を含有する9員含窒素縮合芳香族複素環式化合物は、青色光受容体タンパク質であるクリプトクロム（CRY1、CRY2）に結合し、それらの機能を抑制することが明らかになった。

[0024] したがって、本発明は、下記一般式（I）で表される含窒素縮合芳香族複素環式化合物を有効成分として含有する、クリプトクロムの機能を抑制するための組成物を提供する。

[0025] [化2]



[0026] 本発明の組成物において有効成分として含有される、前記「含窒素縮合芳香族複素環式化合物」は、前記式（I）中、A環とB環とは一緒になって、2個の窒素原子を含有する、9員含窒素縮合芳香族複素環式化合物である。なお、A環は6員芳香族炭化水素環又は6員芳香族複素環を示し、B環は5員芳香族炭化水素環又は5員芳香族複素環を示す。

[0027] 前記式（I）において、2個の窒素原子の9員環上の位置としては特に制限はないが、クリプトクロムの機能をより強く抑制するという観点から、好ましくはa位とb位又はd位とであり、より好ましくはa位とb位とである。また、ニトロ基が付加される9員環上の原子としては特に制限はないが、同観点から、好ましくはf位又はh位の原子であり、より好ましくはh位の原子である。さらに、前記式（I）においては、水素原子又はハロゲン原子

(塩素原子、フッ素原子、臭素原子又はヨウ素原子)が付加されるが、同観点から、好ましくはハロゲン原子であり、より好ましくは臭素原子又はヨウ素原子であり、さらに好ましくは臭素原子である。また、前記式(1)において、水素原子又はハロゲン原子が付加される9員環上の原子としては特に制限はないが、同観点から、好ましくはb位又はc位の原子であり、より好ましくはc位である。

[0028] 本発明の組成物において有効成分として含有される「含窒素縮合芳香族複素環式化合物」は、より具体的に、クリプトクロムの機能をより強く抑制するという観点から、好ましくは、3-ブロモ-7-ニトロインダゾール、3-ヨード-7-ニトロインダゾール、3-ブロモ-6-ニトロイミダゾ[1, 2-a]ピリジン、7-ニトロインダゾールであり、より好ましくは、3-ブロモ-7-ニトロインダゾール、3-ヨード-7-ニトロインダゾールであり、さらに好ましくは、3-ブロモ-7-ニトロインダゾールである。

[0029] また、本発明にかかる「含窒素縮合芳香族複素環式化合物」には、薬理学上許容される塩、水和物又は溶媒和物も含まれる。このような薬理学上許容される塩としては、特に制限はなく、当該化合物の構造等に応じて適宜選択することができ、例えば、酸付加塩(塩酸塩、硫酸塩、臭化水素塩、硝酸塩、硫酸水素酸塩、リン酸塩、酢酸塩等)、塩基付加塩(ナトリウム塩、カリウム塩、亜鉛塩、カルシウム塩等)が挙げられる。また、水和物又は溶媒和物としては、特に制限はなく、例えば、含窒素縮合芳香族複素環式化合物又はその塩1分子に対し、0.1~10分子の水又は溶媒が付加したものが挙げられる。

[0030] さらに、本発明にかかる含窒素縮合芳香族複素環式化合物には、互変異性体、幾何異性体、不斉炭素に基づく光学異性体、立体異性体等の総ての異性体及び異性体混合物が含まれる。さらに、本発明にかかる含窒素縮合芳香族複素環式化合物が生体内で酸化、還元、加水分解、アミノ化、脱アミノ化、水酸化、リン酸化、脱水酸化、アルキル化、脱アルキル化、抱合等の代謝を受けてなお所望の活性を示す化合物をも包含し、また本発明は生体内で酸化

、還元、加水分解等の代謝を受けて本発明にかかる含窒素縮合芳香族複素環式化合物を生成する化合物をも包含する。

[0031] 上述の通り、本発明において好適に用いられる含窒素縮合芳香族複素環式化合物（３－ブロモ－７－ニトロインダゾール等）は、いずれもそれら自体既知であり、市販されている。これらの化合物以外の本発明で用いられる化合物は、既知化合物として存在する場合は、それらを入手し、またそうでない場合には、それらが類似する既知化合物に準じて、当業者であれば適宜製造することができる。

[0032] 本発明において、「クリプトクロム」とは、青色光を吸収する青色光受容体タンパク質を意味し、例えば、CRY1タンパク質、CRY2タンパク質が挙げられる。また、その由来としては特に制限はないが、植物由来のものが好適に用いられ、典型的に、シロイヌナズナCRY1タンパク質は、NCBI Reference Sequence: NP_567341で特定されるアミノ酸配列からなるタンパク質（NCBI Reference Sequence: NM_116961で特定されるヌクレオチド酸配列がコードするタンパク質）であり、またシロイヌナズナCRY2タンパク質は、NCBI Reference Sequence: NP_171935で特定されるアミノ酸配列からなるタンパク質（NCBI Reference Sequence: NM_100320で特定されるヌクレオチド酸配列がコードするタンパク質）である。

[0033] 本発明における「クリプトクロムの機能の抑制」には、機能の完全な抑制（阻害）及び部分的な抑制の双方が含まれる。また、本発明において抑制される「クリプトクロムの機能」としては、例えば、クリプトクロムが関与する青色光シグナル伝達、及び、植物においては、該シグナル伝達によって誘導される光形態形成が挙げられる。クリプトクロムが関与する青色光シグナル伝達としては、例えば、クリプトクロムにおける青色光の受光、該受光によって生じるクリプトクロムのリン酸化、該リン酸化によって誘導されるクリプトクロムの核から細胞質への移行、該リン酸化によって誘導されるクリ

プトクロムと、SPA1及びCOP1からなる複合体、CIB1又はMYBLとの結合、前記他のタンパク質とクリプトクロムとの結合によって生じる転写因子（HY5、CO等）の発現安定化、青色光制御遺伝子の発現制御（例えば、後記表1に示す遺伝子の発現制御）が挙げられる。また、植物における光形態形成としては、例えば、胚軸伸長阻害、双葉の拡張（展開）、双葉（子葉）の開閉、気孔開口、色素（アントシアニン）合成、脱黄化、開花期の制御、及び、単子葉植物における子葉鞘等の実生の伸長阻害が挙げられる。

[0034] <農業用組成物、植物の生長促進方法>

上述の本発明にかかる含窒素縮合芳香族複素環式化合物は、後述の実施例において示す通り、青色光による胚軸伸長阻害を抑制し、該伸長を促進し、ひいては植物の生長を促進する作用を有する。

[0035] したがって、本発明は、本発明にかかる含窒素縮合芳香族複素環式化合物を有効成分として含有する、青色光を含む光の照射下で植物の生長を促進するための組成物（農業用組成物）、並びに植物の生長を促進させるための方法であって、本発明にかかる含窒素縮合芳香族複素環式化合物によって植物を処理し、青色光を含む光の照射下で該植物を生育させる方法（植物生長促進方法）を提供するものである。

[0036] 本発明において生長促進の対象となる「植物」は特に制限はなく、例えば、双子葉植物（シロイヌナズナ、ダイズ等）及び単子葉植物（ソルガム、イネ、トウモロコシ、コムギ等）を含む被子植物、裸子植物、コケ植物、シダ植物、草本植物、並びに木本植物が挙げられる。これら植物の遺伝子組み換え体やゲノム編集体（例えば、除草剤耐性作物、害虫耐性作物、病害耐性作物、食味向上作物、保存性向上作物、収量向上作物）であっても良い。

[0037] また、本発明で利用される「青色光」の波長は、350nm～500nm、好ましくは450nm～500nmである。また本発明で利用される「青色光」の光量子束密度（フルエンスレート）は特に制限はなく、照射する植物の種類や状態などによって適宜調整し得るが、好ましくは、1～500μ

$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ であり、より好ましくは $1\sim100\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、さらに好ましくは $1\sim50\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ であり、より好ましくは $1\sim15\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ であり、さらに好ましくは $5\sim10\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ である。

[0038] また、本発明において「青色光を含む光」とは青色光のみであってもよいが、青色光に加えて、さらに波長が $650\text{nm}\sim700\text{nm}$ の赤色光、波長が $700\text{nm}\sim770\text{nm}$ の遠赤色光等が混合した光であってもよく、いわゆる白色光であってもよい。

[0039] 本発明において、前記光の照射を行うために用いる光源としては、特に制限はなく、発光ダイオード（LED）、レーザー光源、蛍光灯（直管形、コンパクト形）、電球形蛍光灯、高圧放電ランプ、メタルハライドランプ等が利用できる。また、かかる人工光源に限らず、本発明においては太陽光も利用することができる。さらに、所望により所定波長域の光を選択的に利用するために光フィルタを、これら光源に組み合わせて植物に照射することもできる。また、本発明にかかる光源としては、波長選択が容易で、有効波長域の光エネルギーの占める割合が大きく、またコスト、長寿命性等の観点から、LEDを利用することが好ましい。

[0040] 本発明の農業用組成物には、上述の含窒素縮合芳香族複素環式化合物以外にも、農薬等において通常用いられている担体、乳化剤、分散剤、展着剤、湿展剤、固着剤、崩壊剤等の補助剤を含有させることができる。

[0041] 担体としては、例えば、水、エタノール、メタノール、イソプロパノール、ブタノール、エチレングリコール、プロピレングリコール等のアルコール類、アセトン、メチルエチルケトン、シクロヘキサノン等のケトン類、酢酸エチル等のエステル類、並びに、固体担体、例えば、タルク、ベントナイト、クレー、カオリン、ケイソウ土、ホワイトカーボン、バーミキュライト、消石灰、ケイ砂、硫安、尿素等が例示される。

[0042] 担体以外の補助剤としては、通常、界面活性剤が用いられ、例えば、陰イオン系界面活性剤、陽イオン系界面活性剤、非イオン系界面活性剤又は両性

イオン系界面活性剤が挙げられ、これらは単独又は2種以上を混合して使用することができる。

[0043] 本発明の農業用組成物の剤形は特に限定されず、乳剤、懸濁剤、粉剤、水和剤、水溶剤、粒剤、ペースト剤、エアゾール剤等が挙げられる。

[0044] 本発明の農業用組成物中の含窒素縮合芳香族複素環式化合物の含有量は、対象植物の種類、対象植物の生育状況、天候、環境条件、剤形、使用方法（散布処理、土壌処理、種子処理、水耕処理等）、使用場所、使用時期等によって異なるが、当業者であればこれらの条件に合わせて適宜調整することができる。

[0045] また、本発明の植物生長促進方法においては、本発明にかかる含窒素縮合芳香族複素環式化合物をそのまま、又は水等で適宜希釈し、若しくは懸濁させた形で植物生長促進効果発現に有効な量を対象植物に散布（茎葉散布等）、塗布又は注入処理、対象植物の周辺土壌への散布又は灌注処理、対象植物の種子に種子処理（粉衣又は浸漬処理等）等を行うことにより、所望の植物の生長を促進させることができる。

[0046] なお、本発明にかかる含窒素縮合芳香族複素環式化合物にて植物を処理する時期（使用時期）としては特に制限はなく、対象の植物に合わせて適宜調整すればよいが、好ましくは、種子、苗の段階である。また、種又は苗を浸漬処理する際の含窒素縮合芳香族複素環式化合物の濃度としても特に制限なく、対象の植物に合わせて適宜調整すればよいが、好ましくは0.1～10 μM であり、より好ましくは0.25～7.5 μM であり、さらに好ましくは2.5～5 μM である。

[0047] さらに、本発明の植物生長促進方法における、青色光を含む光の照射時間は特に制限はなく、対象植物の種類、対象植物の生育状況等に合わせて適宜調整することができるが、好ましくは12～24時間／日であり、より好ましくは24時間／日である。

[0048] 本発明の農業用組成物の使用においては、病虫害及び雑草等の防除、効果の増強、植物の薬害軽減等の目的で、農園芸用殺菌剤、農園芸用殺虫剤、農

園芸用除草剤、共力剤及び薬害軽減剤等を同時に使用することができる。

[0049] <オプトジェネティクス用組成物>

本発明の組成物は、上記農業目的に限らず、研究目的（例えば、インビトロやインビボの実験）に用いられる試薬等の形態でもあり得、例えば、オプトジェネティクス（光遺伝学）においても好適に用いることができる。

[0050] オプトジェネティクスとは、クリプトクロム等の特定波長の光によって活性化されるタンパク質（光活性化タンパク質）を標的細胞に導入し又は発現させ、当該細胞の機能を前記特定波長の光を照射することによって制御する技術である。その一方、後述の実施例において示す通り、本発明にかかる含窒素縮合芳香族複素環式化合物は、クリプトクロムに結合し、該光活性化タンパク質の青色光照射による活性化を抑制する作用を有する。したがって、クリプトクロムを用いたオプトジェネティクスにおいて制御される標的細胞の機能を、本発明にかかる含窒素縮合芳香族複素環式化合物によって更に制御することが可能となる。

[0051] すなわち、本発明は、本発明にかかる含窒素縮合芳香族複素環式化合物を有効成分として含有する、青色光を含む光の照射によって活性化される細胞の機能を抑制するための組成物であって、前記細胞は、クリプトクロム又は該タンパク質を含む融合タンパク質を含む細胞であり、かつ前記機能は、青色光を含む光の照射による前記タンパク質の活性化に伴って活性化される機能である、組成物を提供するものである。

[0052] また、本発明は、青色光を含む光の照射によって活性化される細胞の機能を抑制するための方法であって、本発明にかかる含窒素縮合芳香族複素環式化合物を前記細胞に導入する工程を含み、前記細胞は、クリプトクロム又は該タンパク質を含む融合タンパク質を含む細胞であり、かつ前記機能は、青色光を含む光の照射による前記タンパク質の活性化に伴って活性化される機能である、方法を提供するものである。

[0053] 上記細胞の機能を抑制するための組成物、並びに方法において、「本発明にかかる含窒素縮合芳香族複素環式化合物」、「クリプトクロム」及び「青

色光を含む光の照射」については上記の通りである。

[0054] 本発明にかかる含窒素縮合芳香族複素環式化合物によって、青色光を含む光の照射によって活性化される機能が抑制される「細胞」としては、その種類（例えば、神経細胞）、その由来（例えば、ヒト由来、非ヒト哺乳動物由来）については特に制限はなく、また細胞のみならず、その集合体（例えば、組織、臓器、個体）も本発明にかかる「細胞」には含まれる。

[0055] 前記「機能」としては特に制限はなく、例えば、転写開始、遺伝子組み換え、ゲノム編集、ヒストンのアセチル化、ヌクレオチドの生合成、遺伝子発現、シグナル伝達、アクチンの重合促進、タンパク質分解、タンパク質輸送、タンパク質分泌、神経の活性化又は抑制が挙げられる。また、当業者であれば公知のオプトジェネティクス（例えば、Kennedy MJ. ら、Nat Methods.、2010年12月、7巻、12号、973～975ページ、Koner mann S. ら、Nature、2013年8月22日、500巻、7463号、472～476ページ、Nihongaki Y. ら、Chem Biol.、2015年2月19日、22巻、2号、169～174ページ、Kyung T. ら、Nat Biotechnol.、2015年10月、33巻、10号、1092～1096ページ、特開2011-142828号公報、Gautier A. ら、Nat Chem Biol.、2014年7月、10巻、7号、533～541ページ）を適宜参照して、所望の機能が、前記細胞において青色光を含む光の照射によって活性化されるよう調製することができる。

[0056] 青色光を含む光の照射によって前記機能が活性化されるために、前記細胞に含まれるタンパク質としては、クリプトクロム自体であってもよく、クリプトクロムを含む融合タンパク質であってもよい。なお、かかるタンパク質を含む細胞の調製としては、特に制限はなく、前記タンパク質をコードするDNA（例えば、ウィルスベクター）を前記細胞に導入することにより調製してもよく、また前記タンパク質を直接細胞内に導入（例えば、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション）することにより調製することが

できる。

[0057] 「クリプトクロムを含む融合タンパク質」としては、クリプトクロムの全部を含む融合タンパク質であってもよく、またその一部（例えば、光感受性領域）を含む融合タンパク質であってもよい。さらに融合タンパク質に含まれるクリプトクロム以外のペプチドとしては特に制限はなく、上記所望の機能に応じて適宜選択されるものであり、例えば、DNA結合ドメイン（例えば、T A L E、Z i n cフィンガードメイン、C R I S P E R－C a s、G a l 4結合ドメイン）、DNA組換え酵素（例えば、C r e、F o k I）、転写活性化因子（例えば、V P 1 6、V P 6 4）、転写抑制因子（例えば、K R A B）、ヒストン修飾酵素、チャネルタンパク質、チャネル制御因子（例えば、S T I M 1）、G T P a s e（例えば、R a c 1）が挙げられる。

[0058] 本発明にかかる含窒素縮合芳香族複素環式化合物の細胞への導入は、通常、当該化合物の溶液（溶媒としては、水、生理食塩水、又は該細胞の培地）を前記細胞に接触（塗布、浸漬）することによって達成することができるが、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション等を用いて、前記細胞に強制的に導入することもできる。

実施例

[0059] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。また、本実施例は、以下に示す材料及び方法を用いて行った。

[0060] <植物材料及び生長条件>

シロイヌナズナの変異体は、C o l u m b i a（C o l－0）又はW a s s i l e w s k i j a（W s）をバックグラウンドとするものを用いた。シロイヌナズナの光形態形成変異体の種のストック（p h y A p h y B、c r y 1 c r y 2、c r y 1、c r y 2、h y 5、c o p 1－4、c o p 1－6、h f r 1及びl a f 1）は、シロイヌナズナバイオリソースセンター（オハイオ州立大学、コロンバス）より入手した。過剰発現株C R Y 1－O X及びC R Y 2－O Xの種（L i n，C．ら、P l a n t J．、1996年、1

0巻、893～902ページ、Lin, C. ら、Proc. Natl. Acad. Sci.、1998年、95巻、2686～2690ページ)は、Dr. Chentao Linより譲り受けた。また、hy5hyhの種は、Dr. Xing-Wang Dengより譲り受けた(Holm, M. ら、Gene Dev.、2002年、16巻、1247～1259ページ)。

[0061] そして、このようにして調製した種は、消毒し、1/2xムラシゲスクーグ培地、ガンボーグビタミン培地(MS; JRH Biosciences, Lenexa, KS)及び2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)、pH 5.7を組成とする液体培養アッセイ又は1%アガーの寒天培地に植えた。そして、プレートは4℃の暗室にて、発芽する迄の3日間維持した。

[0062] <光源及び強度>

シロイヌナズナの苗には、単色光LEDにて、青色光、赤色光又は遠赤色光を照射した。胚軸伸長における異なる青色光の強度の影響を試験するため、光量子密度1、5、10又は15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の青色光(波長: 450 nm)を用いた。赤色光(波長: 660 nm)及び遠赤色光(波長: 730 nm)に関しては、光量子密度を各々10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 及び1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ にして用いた。

[0063] <化合物ライブラリー、及び液体培養アッセイによるスクリーニング>

スクリーニングには、計3760の化学物質からなるライブラリー(The Library of Active Compounds on Arabidopsis (LATCA))を用いた。このライブラリーには、シロイヌナズナの形態を指標とするスクリーニングにおいて活性が認められた化合物、酵母における生長阻害活性が認められた化合物、除草剤、一般的な阻害剤、植物ホルモン、及びその他の生理活性化合物が含まれている。

[0064] そして、1/2xムラシゲスクーグ培地、ガンボーグビタミン培地(MS; JRH Biosciences, Lenexa, KS)及びMES、pH 5.7を組成とする液体培地50 μL にて、野生型Col-0の種を4～6個生長させ、LACTA化学物質を対象とする大規模スクリーニングを行

った。

[0065] より具体的には、全ての化学物質を対象とする第一スクリーニングは、液体培地を添加した96ウェルプレートを用いて行った。また、各プレートにおいて、第1カラムは1:100になるよう希釈したジメチルスルホキシド(DMSO)にて処理した。さらに、化学物質を最終濃度 $2.5\mu\text{M}$ になるよう、種を種いた培地に添加し、プレートに青色光を連続的に6日間照射した。そして、苗の画像は、オリンパス社製IX-91カメラにて取得した。

[0066] <胚軸の長さを指標とする化学物質の評価>

3B7N及びそのアナログ、並びにNO消去剤をDMSOにて溶解し、 50°C 以下の温度の寒天培地に添加し、混合して 4°C にて保持した上で、苗の生長に供した。

[0067] <胚軸の長さの測定>

胚軸の画像は、各単色光を6日間照射した後に、AF-S DX Zoom-Nikkor 18-70mm f/3.5-4.5G IF-EDレンズを備えたニコン社製のカメラにて取得した。全ての測定値は、ImageJソフトウェアを用いて算出した。定量的データは、少なくとも25の苗に対して、各条件を計3回繰り返して処理した結果の平均値として示す。

[0068] 異なる光源間の胚軸測定を同期させるため、苗は赤色光($10\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)に3時間曝露させた後に、6時間暗下に置き、その後異なる光源下にて6日間、連続的な光に曝露させた。

[0069] 統計解析は、胚軸測定結果についてはone-way ANOVAを用いて行った。また、3B7N化合物処理とDMSO処理とにおける、胚軸の長さの変化の有意性についてはスチューデントt検定($P<0.05$)にて判定した。

[0070] <遺伝子発現プロファイリング>

青色光($10\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)照射下、最終濃度が $2.5\mu\text{M}$ になるように化学物質を添加した寒天培地にて4日間生長させた苗を回収して用いた。なお、野生型Col-0バックグラウンド及びcry1cry2変異体につ

いて、化学物質処理又は非処理を3回繰り返して（生物学的反復）、発現プロファイリングを行った。

[0071] 回収した苗から、トータルRNAは、RNeasy Plant Mini RNAキット（Qiagen社製）を用い、その添付の説明書に従って抽出した。トータルRNAの純度及び完全性については、Nanodrop ND-1000スペクトロメーターversion 3.1.0（NanoDrop Technologies社製）及びRNA 6000 Nano Chip on a Bioanalyzer（Agilent Technologies社製）を用い、モニターした。

[0072] 次に、約1 μ gのトータルRNAを、Agilent Quick Ampラベリングキットを用いてCy3にて標識し、各600ngをマイクロアレイハイブリダイゼーションに供した。そして、Agilent スキャナーG2505C US45103077を用いてイメージをスキャンし、得られたスキャンイメージからFeature Extractionソフトウェアを用いて全てのデータを取得した。

[0073] rawファイルは、GeneSpring version 12.1-GX（Agilent Technologies社製）を用い、75パーセントイルにてシグナル強度を正規化し、シグナルをlog2変換することにより、精査した。

[0074] 統計解析においては、Benjamini and Hochberg FDRにて補正したt検定のP値が0.05以下となるエンティティを、有意な発現変化が生じているものとして更に同定した。

[0075] 2倍以上の発現変化を示した遺伝子を、野生型バックグラウンドにおいて同定し、またcry1cry2変異体における発現にフィルタをかけるため、更に比較した。

[0076] なお、この研究のマイクロアレイデータは、NCBIの遺伝子発現オムニバスに提出してある。

[0077] <遺伝子アノテーション>

用いた主な化学物質の性質は、ヒト及びマウスにおいて知られた機能を有する。そのため、進化上関連するタンパク質のファミリー及び同じ機能を有するタンパク質のサブファミリーに基づきハイスループット解析を促進するため、タンパク質（遺伝子）を分類するように設計されている PANTHER Classification システムを用いて、遺伝子を注釈付けした。

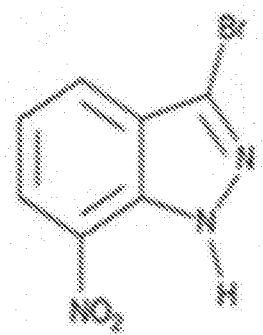
[0078] （実施例 1）

＜シロイヌナズナの生長を促進するための低分子化合物のスクリーニング＞

シロイヌナズナの苗の早期発育を促進するための低分子化合物を同定するため、ケミカルライブラリー中の各化学物質（3680種）の存在下、野生型（WT）（Col-0）の苗を生長させた。すなわち、各化学物質 2.5 μ M の濃度にて苗を処理し、連続的な青色光照射下、96 ウェルマイクロタイタープレートに添加した液体培地の中で生長させた。そして、化学物質処理してから 6 日後の苗を、DMSO 処理したコントロールの苗と比較し、82 種の化合物を胚軸伸長を引き起こす化合物として選抜した。

[0079] 次に、2 回目のスクリーニングにおいては、更に様々な波長の光（青色光、赤色光、又は遠赤色光）の照射下にて、野生型の種を候補化合物と共に培養した。そして、異なる光照射における苗の形状を比較した結果、青色光照射下でのみ胚軸伸長を促進させる特異的な化合物として、3-ブロモ-7-ニトロインダゾール（3B7N、下記化学式で表される化合物）を同定した（図 2 の A 参照のこと）。

[0080] [化3]



[0081] また、上記液体培養アッセイにおける結果を確認するため、野生型の種を 2.5 μM 3 B 7 N 含有寒天培地にて育てた。得られた結果を図 2 の B に示す。

[0082] 図 2 に示した結果から明らかな通り、3 B 7 N は青色光照射下のみにおいて胚軸生長を促進させ、暗、赤色光、遠赤色光では促進させることはできなかった。

[0083] したがって、これらの結果から、3 B 7 N による胚軸伸長の制御は、青色光特異的な事象であることが示された。

[0084] (実施例 2)

＜苗の発育阻害における、化合物の濃度及び光強度の依存性についての検証＞

3 B 7 N を異なる量、苗の培地に添加することによって、当該苗の生理学的変化の程度も異なる可能性がある。そこで、シロイヌナズナの野生型の苗を、3 B 7 N の濃度希釈系列にて処理し、連続的な青色光照射下（光量子密度：1～15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）にて育てた。得られた結果を図 3 に示す。

[0085] 図 3 に示した結果から明らかな通り、照射する青色光の光強度増大に応じて胚軸伸長は比例的に阻害された。すなわち、3 B 7 N で処理しなかった苗（DMSO で処理したコントロール）において、1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の青色光照射下における胚軸が最長であり、青色光の光強度の増大に伴って短くなっていった。また、0.5 μM 3 B 7 N で処理した苗は、いずれの光強度の条件下においても、コントロールより胚軸は長くなった。この結果から、3 B 7 N は少なくとも 0.5 μM あれば、胚軸の伸長を促進できることが示された。

[0086] さらに、光強度の増大に応じて胚軸伸長は低減する傾向にあるにも関わらず、図 3 に示す通り、2.5 μM 以上の濃度の 3 B 7 N にて処理した苗の長さは、様々な光強度の青色光照射下で概ね同じであった。これらの結果から、青色光照射下、胚軸伸長に阻害的効果を示す 3 B 7 N の飽和濃度は、2.5 μM であることが示された。

[0087] (実施例3)

＜3 B 7 Nアナログによる胚軸伸長への影響についての検証＞

3 B 7 Nは、哺乳類における神経型一酸化窒素（NO）合成酵素の阻害剤として知られている（Bedrosian, T. A. ら、Horm Behav.、2012年、61巻、176～180ページ）。そこで、青色光照射への胚軸の反応における、NO阻害効果について調べた。

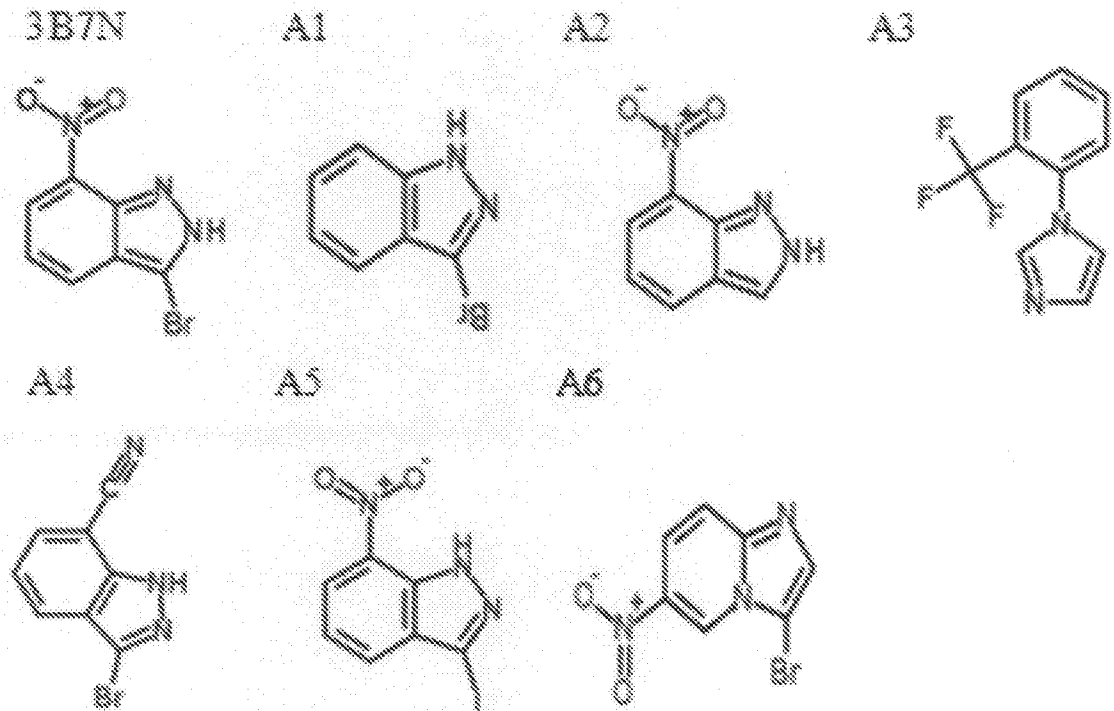
[0088] すなわち、3 B 7 Nの代わりに、NO消去剤として知られる、N ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME)、diethylamine NONOate sodium (DEA-NONOate) 又は2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (C-PTIO) にて、シロイヌナズナの種を処理し、上記同様に青色光照射下にて生長させた。得られた結果を図4に示す。

[0089] 図4に示した結果から明らかなように、添加濃度を5 μ Mとする3 B 7 Nで処理した苗のみにおいて、青色光照射下、胚軸伸長が認められた。一方、L-NAME、C-PTIO又はDEA-NONOateで処理した苗の胚軸の長さが、コントロールとしてDMSOで処理したそれと同様であった。したがって、NO制御は、3 B 7 Nによるシロイヌナズナ野生型苗における表現型の変化に寄与するものでないことが示唆される。

[0090] 次に、3 B 7 Nの構造とそれによって誘導される表現型との関係を分析するため、3 B 7 Nの6つのアナログを、ナカライテスク、和光純薬工業株式会社及びシグマアルドリッチから購入した。なお、下記化学式にて示す通り、それらアナログは全て、2つの主たるコア構造としてジアゾールとベンゼンとを有する。しかし、これらコア構造に付加する官能基の有無、又は位置において異なる。

[0091]

[化4]



[0092] そして、最終濃度 $2.5 \mu\text{M}$ にて調整したこれらアナログにてシロイヌナズナの種を処理し、上記同様、青色光照射下にて生長させた。得られた結果を図5に示す。

[0093] 図5に示した結果から明らかなように、3種のアナログ（A2、A5、A6）は、DMSOにて処理したコントロールと比較して、青色光による胚軸伸長の阻害に対して効果を発揮することで、胚軸をより長くした。特に、3B7NのBr基がI基に置換されているA6が、それら陽性アナログの中において、青色光による胚軸伸長の阻害に対して最も強い効果を発揮した。一方、NO₂基を除去したもの（A1）又はNO₂基をニトリル部分に置換したもの（A4）においては、ベンゼンとジアゾールとを組み合わせたもの（A3）同様に、完全に前記効果が消失した。

[0094] したがって、ジアゾール部分はハロゲン原子又は水素原子によって置換されており、さらにベンゼン部分においてはNO₂基によって置換されていることが、青色光による胚軸伸長の阻害に対して効果を発揮する上で必要であることが明らかになった。

[0095] なお、図には示していないが、前記3種の陽性アナログは、赤色光又は遠赤色光の照射下における胚軸反応において、わずかな変化しか生じさせず、これら陽性アナログにおいて、コントロールよりも胚軸の長さが長くなるものはなかった。

[0096] また、図5に示す通り、これら3種のアナログは、青色光シグナル伝達において異なるレベルの阻害効果を発揮する。かかるレベルを、3 B 7 N処理における生長を基準として評価した。その結果、A 5のスコアは0.7であり、次いで、A 6のスコアは0.3であり、A 2のスコアは0.23であった。

[0097] (実施例4)

＜クリプトクロムが調節する青色光シグナル伝達と3 B 7 Nによる胚軸伸長促進との関連性についての検証＞

3 B 7 Nによる胚軸変化に関与する光受容体を同定するため、光受容体の変異体の種を3 B 7 Nに処理し、上記同様に青色光照射下にて生長させた。得られた結果を図6に示す。

[0098] 図6に示す通り、2重変異体`phyA phyB`及び`cry1 cry2`は、それら各コントロール処理と比較して、3 B 7 Nに対する胚軸の反応において異なるものであった。すなわち、3 B 7 N処理によって、`phyA phyB`は、連続的な青色光照射下で、胚軸の長さが長くなった。一方、`cry1 cry2`に関しては、胚軸伸長において有意な変化が認められなかった。したがって、クリプトクロム(CRY1、CRY2)が調節する青色光シグナル伝達が、3 B 7 Nによる胚軸伸長の促進において必要であることが示唆された。

[0099] そこで、3 B 7 N処理における胚軸伸長の制御において、各クリプトクロムの役割を更に理解するため、単独変異体、CRY1遺伝子又はCRY2遺伝子の過剰発現体(CRY1-OX及びCRY2-OX)について評価した。得られた結果を図6に示す。

[0100] 図6に示した結果から明らかなように、`cry2`変異体は3 B 7 N添加に

より胚軸の長さが2倍になった一方で、*cry1* 変異体においては有意な変化は認められなかった。また、過剰発現体 *CRY1-OX* 及び *CRY2-OX* においては、胚軸の長さにおいていくらかの変化が認められ、コントロールと比較した場合、*CRY2-OX* は、*CRY1-OX* よりも、3B7N処理によって胚軸の長さがより長くなった。

[0101] したがって、*CRY1* 及び *CRY2* が共に調節する青色光シグナル伝達に3B7Nは関与すること、並びに3B7Nによって影響を受ける主な光受容体は *CRY1* であることが示された。

[0102] (実施例5)

<3B7Nによるクリプトクロムシグナル伝達の阻害機構についての解析>

クリプトクロム (*CRYs*) 等の光受容体は光を受ける。そして、活性型の光受容体は、他の構成分子と相互作用し、結果として転写因子 (*TFs*) の安定又は分解が生じ、光調節遺伝子の発現における組織的な変化が引き起こされることになる (Zhang, H., Plant J., 2011年、65巻、346~358ページ)。例えば、図1に示す通り、クリプトクロムシグナル伝達を介した光形態形成の引き金となる、*Elongated Hypocotyl 5* (*HY5*) タンパク質の安定性を決定することに、*CRYs* と *COP1* との相互作用が関与することが知られている (Li, Q., Hand Yang, H. Q., Photochem Photobiol., 2007年、83巻、94~101ページ)。

[0103] そこで、クリプトクロムが関与するシグナル伝達における3B7Nによる阻害機構を解析するため、*COP1* の劣性対立遺伝子を有する2種のシロイヌナズナを用いて、上記同様3B7Nの胚軸伸長への影響を評価した。得られた結果を図7に示す。

[0104] 図7に示した結果から明らかなように、3B7N処理後、青色光照射下、*cop1-4* 及び *cop1-6* においては共に、胚軸伸長における有意な変化が認められなかった。しかしながら、*hy5* 変異体においては、3B7N

処理によって胚軸の伸長が認められた。これらの結果から、3 B 7 Nによるクリプトクロムシグナル伝達の阻害は、C O P 1の上流において生じていることが示唆される。

[0105] H Y 5 のホモログ (H Y H) タンパク質は、部分的にH Y 5 と重複する機能を有しているということが報告されている (H o l m, M. ら、G e n e D e v.、2002年、16巻、1247~1259ページ)。そこで、2重変異体h y 5 h y hを用いて更なる解析を行った結果、3 B 7 N処理による胚軸伸長において、僅かな増加が認められた。

[0106] また、H Y 5 及びH Y Hの他にも、H F R 1 及びL A F 1 は、シロイヌナズナの光形態形成に関与することが報告されている (Y a n g, J. ら、P l a n t C e l l.、2005年、17巻、804~821ページ、J a n g, I - C. ら、G e n e s D e v.、2007年、21巻、2100~2111ページ)。そこで、これらタンパク質についても上記同様に分析した。得られた結果を図8に示す。

[0107] 以上の結果から、これら下流の制御因子は、3 B 7 N処理によるh y 5 h y hの胚軸の長さを僅かに増加させることに貢献していることが想定される。

[0108] (実施例6)

＜3 B 7 Nによる双葉の拡張への影響についての解析＞

黄化したシロイヌナズナの苗の形態として、胚軸の伸長と、頂端フック (a p i c a l h o o k) の屈曲の強まり (茎の頂端分裂組織がフックを形成し、双葉が小さく閉じたままの状態にあること) とが挙げられる (J o s s e, E - M. a n d H a l l i d a y, K. J.、C u r r e n t B i o l o g y、2008年、18: R1144-1146)。

[0109] そこで、上述の胚軸伸長に加え、3 B 7 Nの濃度及び青色光の強度という2つの異なるパラメーター下において、双葉の拡張について観察した。得られた結果を図9に示す。

[0110] 図9に示した結果から明らかなように、2.5 μ M 3 B 7 Nにて処理し

、連続的な青色光 ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 照射下にて6日育てた苗において、双葉は小さくまた開いたものであった。

[0111] また、3 B 7 Nにて処理せず、青色光 ($5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 照射下にて育てた野生型の苗において、双葉は拡張され、また開いたものであったが、 $2.5 \mu\text{M}$ 又は $15 \mu\text{M}$ 3 B 7 Nにて処理した苗は小さい双葉を有していた。また $15 \mu\text{M}$ の3 B 7 Nにて処理した苗においては、しばし閉じた双葉が観察された。

[0112] 以上の結果から、青色光が調節する胚軸伸長の抑制のみならず、双葉の拡張をも、3 B 7 Nは阻害することが示された。

[0113] (実施例7)

＜3 B 7 Nによって制御された胚軸伸長における、転写プロファイル＞

青色光による胚軸伸長の抑制及び双葉の拡張に対する、3 B 7 Nの阻害効果について理解すべく、2つの独立したマイクロアレイ実験を行った。

[0114] 第一に、青色光 ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 照射下における苗の発現プロファイルに関し、3 B 7 Nにて処理したものと、その派生物 (A 1 又は A 2) にて処理したものとで比較した。なお、生物学的反復として、各化合物による処理は3回ずつ行った。また、各一対比較 (A 1 / DMSO, A 2 / DMSO 及び 3 B 7 N / DMSO) においては、全ての遺伝子の発現をモデレートスチューデントt検定 (moderated Student's t-test) を用いて算出し、さらに有意性はP値として定量化した。また、P値が偽陽性率0.05より低い遺伝子については更なる評価を行った。それらの発現は、各遺伝子の発現誘導又は発現抑制における平均フォールドチェンジ (mean fold change) にて定量化した。そして、フォールドチェンジが2倍以上であったもの全てを候補として考慮した。得られた結果を図10～13に示す。

[0115] 図10に示す通り、3化合物又はDMSOにて処理したサンプルのクラスタリングに関する総合的な結果として、A 1、A 2 及び DMSO は同一のクラスターに属する一方で、3 B 7 N は別のクラスターに属した。

- [0116] また、A 1 と D M S O との間における発現変化を比較した結果を示すボルカノプロットから明らかな通り、スクリーニングした 4 4 K プローブにおいて、遺伝子発現の有意な変化は認められなかった（図 1 1 参照のこと）。
- [0117] しかしながら、図 1 2 に示す通り、A 2 と D M S O とを比較した結果、発現が抑制されている少数の遺伝子が検出された（図 1 2 において楕円にて囲った箇所 参照のこと）。また、それら変化のあった全ての遺伝子については、分子機能の点において、結合、触媒活性及び酵素制御活性というオントロジーカテゴリーに分類されるものと注釈が付けられていた。
- [0118] 一方、図 1 3 に示す通り、2. 5 μ M 3 B 7 N 処理した野生型の苗に関しては、青色光照射下で発現が亢進する遺伝子又は抑制される遺伝子は、計 1 4 0 6 遺伝子あった（図 1 3 において楕円にて囲った箇所 参照のこと）。また、3 B 7 N によって有意に発現が制御された遺伝子のうちの 4 9 % （1 0 5 6 の遺伝子）は、遺伝子オントロジー（GO）において、生物学的プロセスのカテゴリーに分類された。さらに、8 0 6 遺伝子は分子機能のカテゴリーに分類された一方で、1 3 % パーセントの遺伝子（2 7 0 の遺伝子）は細胞の構成要素のカテゴリーに分類された。
- [0119] また、3 B 7 N によって発現制御される遺伝子は、約 9 5 0 のタンパク質をコードしており、それらタンパク質は主に 2 5 のクラスに分類された。図には示さないが、属するタンパク質の数が多いクラスは、酸化還元酵素、トランスフェラーゼ、加水分解酵素、核酸結合及びトランスポーターであった。さらに有意に発現制御されている少数の遺伝子において、カルシウム結合又はシグナル伝達に関与する転写因子又はタンパク質をコードするものもあった。
- [0120] 次に、第 2 のマイクロアレイの実験においては、1 5 μ M 3 N 7 N にて処理し、4 日間連続的に青色光照射（5 μ m o L m⁻² s⁻¹）下で生長させた苗に関する、野生型と c r y 1 c r y 2 変異体との発現変化を評価した。得られた結果を図 1 4 ～ 1 8 に示す。
- [0121] 図 1 4 に示した結果から明らかなように、3 B 7 N による処理又は非処理

(DMSOによる処理)の、野生型とcry1cry2とにおいて、遺伝子発現のクラスタリングは、苗の形態的プロファイルに応じたものになった。すなわち、DMSOにて処理したcry1cry2と3B7Nにて処理したcry1cry2とは同じクラスターに分類された。また、3B7Nにて処理した野生型は、DMSOにて処理した野生型よりも、cry1cry2が属するクラスターに近い関係に分類された。この結果は、図5に示した、3B7Nによる胚軸伸長への影響は野生型と比較してcry1cry2においては殆ど認められなかったという結果と一致している。

[0122] また、2.5 μ M 3B7Nにて処理した野生型の苗において1406遺伝子の発現制御が認められた(図13 参照のこと)。また、15 μ M 3B7Nにて処理した野生型の苗において2537遺伝子の有意な発現が認められた(図15 参照のこと)。

[0123] しかしながら、3B7Nにて処理したcry1cry2の苗において、有意な発現の変化が検出された遺伝子は487個であった(図16 参照のこと)。前記野生型の苗における2537遺伝子に比べれば、cry1cry2の苗におけるそれは極一部に過ぎず、3B7Nによる遺伝子発現への影響は、cry1cry2変異によって解消されたことが示唆される。一方、cry1cry2において3B7Nによって影響を受ける遺伝子のサブセットが検出されたことは、当該化合物のクリプトクロム又は青色光シグナルとは関連性のない機能を示唆しているかもしれない。

[0124] 次に、3B7Nによるクリプトクロム機能への生理的な阻害効果についてより評価するため、DMSO又は3B7Nによって処理した野生型の発現プロファイルと、DMSOにて処理したcry1cry2のそれとを比較した。その結果、CRYによって発現制御される遺伝子の約半分のサブセットが、3B7N処理によって阻害されることが明らかになった。

[0125] (実施例8)

<3B7Nによる、既知の青色光制御遺伝子の発現への影響>

3B7Nによって制御される生理学的変化を理解するため、青色光によっ

て発現が制御される遺伝子 (Ma, L.、Plant Cell.、2001年、13巻、2589～2607ページ、Jiao, Y.、Plant Physiol.、2003年、133巻、1480～1493ページ) について更に評価した。その結果、下記表1に示す通り、青色光制御遺伝子の多くは、3B7N処理によって青色光による制御とは逆に制御されることが明らかになった。

[0126]

[表1]

TAIR ID	遺伝子名	青色光	387N		
		発現制御	発現制御	フォールド チェンジ値	P値
AT4G22320	システインリッチプロテインキ ナーゼ 14 (CRK14)	UP	UP	2.97	0.047
AT3G15510	NACドメイン含有タンパク質 2 (NAC2)	UP	UP	2.11	0.021
AT4G29930	転写因子 bHLH27	UP	UP	3.1	0.006
AT1G04240	オーキシン反応タンパク質 IAA3 (SHY2)	DOWN	UP	2	0.029
AT1G10480	ジंकフィンガータンパク質 3 (ZFP5)	DOWN	UP	3.9	0.006
AT5G43940	熱ストレス転写因子 A-6a (HSFA6A)	DOWN	UP		
AT3G28470	グリンリッチタンパク質 3 (GRP5)	DOWN	UP	2.89	0.026
AT1G48130	B-ボックスドメインタンパク質 17 (BBX17)	DOWN	UP	3.88	0.013
AT4G36900	Dreh and Ear モチーフタンパ ク質 4 (DEAR4)	DOWN	UP	2.17	0.018
AT3G02920	Mybドメインタンパク質 98 (MYB98)	DOWN	UP	2.11	0.018
AT5G51790	転写因子 bHLH68 (bHLH68)	DOWN	UP	2.91	0.008
AT3G17050	Unknown	DOWN	UP	3.94	0.008
AT1G08570	フィットクロム A (PHYA)	DOWN	UP	5.79	0.026
AT5G13830	カルコンノターゼ (TT4)	UP	DOWN	3.58	0.008
AT2G39730	ルビスコアクチベース (RCA)	UP	DOWN	2.74	0.011
AT3G29650	グリセルアルデヒド-3-リン酸 デヒドロゲナーゼAサブユニット (GAPA)	UP	DOWN	2.08	0.02
AT2G37040	フェニルアラニン/アノモニアリ アーゼ 1 (PAL1)	UP	DOWN	2.91	0.019
AT5G53200	転写因子 TRY	UP	DOWN	6.45	0.014

[0127] なお、表1において、「青色光」の項目は、青色光照射下にて6日間生長

させた苗の発現プロファイルを、暗所にて生長させたそれと比較した結果を示す。すなわち、「UP」は暗所で生長させた苗よりも発現が亢進した遺伝子であることを示し、「DOWN」は暗所で生長させた苗よりも発現が低減した遺伝子であることを示す。また、発現制御は、Ma, L.、Plant Cell.、2001年、13巻、2589～2607ページ、Jiao, Y.、Plant Physiol.、2003年、133巻、1480～1493ページの記載を参照にした。「3B7N」の項目は、3B7Nにて処理して $10\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 青色光照射下にて4日間生長させた苗の発現プロファイルを、3B7Nの代わりにDMSOにて処理したそれと比較した結果を示す。すなわち、「UP」はDMSOにて処理した苗よりも発現が亢進した遺伝子であることを示し、「DOWN」はDMSOにて処理した苗よりも発現が低減した遺伝子であることを示す。

[0128] (実施例9)

＜3B7Nによる、ソルガムの発育への影響＞

上述の通り、3B7Nによって、青色光照射下におけるシロイヌナズナの生長は促進される。これが他の植物でも同じであることを確認すべく、3B7Nによって処理したソルガムを青色光照射下で生長させ、その影響を分析した。なお、ソルガム（別名：モロコシ）はバイオマスの原料として注目されているイネ科の植物である。

[0129] より具体的には、ソルガム（Bt x 623）の苗を、3B7Nを $2.5\mu\text{M}$ 加えた又は加えないMS培地（スクロースを含まない）にて、 $10\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 青色光照射下にて、生長させ、青色光の照射を開始してから6日目の子葉鞘の長さを記録した。得られた結果を図19に示す。

[0130] 図19に示した結果から明らかなように、上述のシロイヌナズナ同様に、ソルガムも、3B7Nにて処理することにより、青色光照射下でその生長は促進されることが確認された。

[0131] (実施例10)

＜3B7Nの標的タンパク質の同定＞

クリプトクロムシグナル伝達における3B7Nの標的を同定すべく、上述のマイクロアレイ等の実験結果に基づき、3B7Nの標的分子をCRY1と想定して、以下に示すビーズ結合実験を行った。また、コントロールとして、CRY1の代わりにFLB2を用いて、同様の結合実験を行った。なお、FLB2は、cry1同様に変異によって、青色光特異的に胚軸の伸長を促進させる遺伝子がコードするタンパク質（FOX long under Blue light 2、別名BLC2）である。

[0132] ビーズ結合実験に際して先ず、セルフリーアッセイシステムを用いて、Hisタグを融合させた標的候補タンパク質（CRY1-HA tag、FLB2-HA tag）を調製した。調製したタンパク質は下記バッファー2にて置換し、ほぼタンパク質濃度が150 mg/mLになるように調整した（CRY1-HA tag：143 mg/mL、FLB2-HA tag：152 mg/mL）。また、3B7N又はA1（3-ブロモインダゾール）を常法に従って、セファロースビーズに結合させ、化合物結合ビーズ（beads（3B7N）、beads（A1））を調製した。またネガティブコントロールとして化合物を結合させていないセファロースビーズ（beads（-））も以下の実験に供した。

[0133] 次に、化合物結合ビーズ20 µLをチューブに分注し、下記バッファー1を1 mL加えて洗浄した。洗浄後、上清を除去し、下記バッファー1を250 µL加え、上記置換したタンパク質を1000倍希釈したもの0.2 µL加え、4℃にて一晩振盪させた。そのインキュベーション後、バッファー1を1 mL加えてボルテックスミキサーにて攪拌した。上清を除去して、新しいバッファー1を加えた、新しいチューブに移し、更にボルテックスミキサーにて攪拌した。この攪拌作業を4回繰り返した後、上清を除去し、1 mLのバッファー2を加え、手で転倒混和した後、上清を除去した。このバッファー2による洗浄作業をもう一度繰り返した後、上清を完全に除去し、ビーズに等量のサンプルバッファーを加えて95度で5分煮沸し、その5 µLをSDS-PAGE（10～20%アクリルアミドゲル）に供した。次いで、

検出抗体としてHRP標識抗HA抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。得られた結果を図20に示す。

[0134] バッファー1の組成…10mM Tris-HCl pH7.5、50mM KCl、5mM MgCl₂、1mM EDTA

バッファー2の組成…バッファー1に10%グリセロールを最終濃度10%になるよう、TritonX100を最終濃度0.025%になるよう加えた。

[0135] 図20に示す通り、3B7NはCRY1と結合することが明らかになった。なお、A1も僅かではあるがCRY1との結合性が認められた。このことから、3B7Nがクリプトクロムの機能を抑制するには、CRY1との強い結合が必要であることが示唆される。

産業上の利用可能性

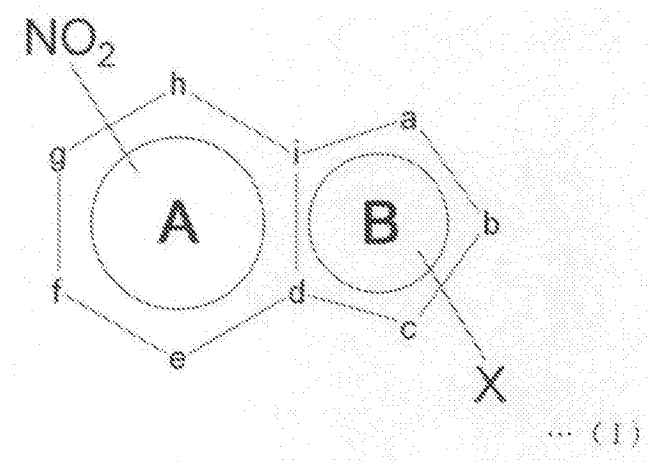
[0136] 以上説明したように、本発明によれば、クリプトクロムの機能を抑制することができる。また当該機能抑制により、青色光を含む光の照射下で植物の生長を促進させること等が可能となる。

[0137] したがって、本発明は、農業分野（例えば、バイオマスの製造）における植物生長促進剤、研究開発分野におけるクリプトクロムを用いたオプトジェネティクスにおける細胞機能を制御するための試薬等として有用である。

請求の範囲

〔請求項1〕 下記一般式（1）で表される含窒素縮合芳香族複素環式化合物を有効成分として含有する、クリプトクロムの機能を抑制するための組成物

〔化1〕

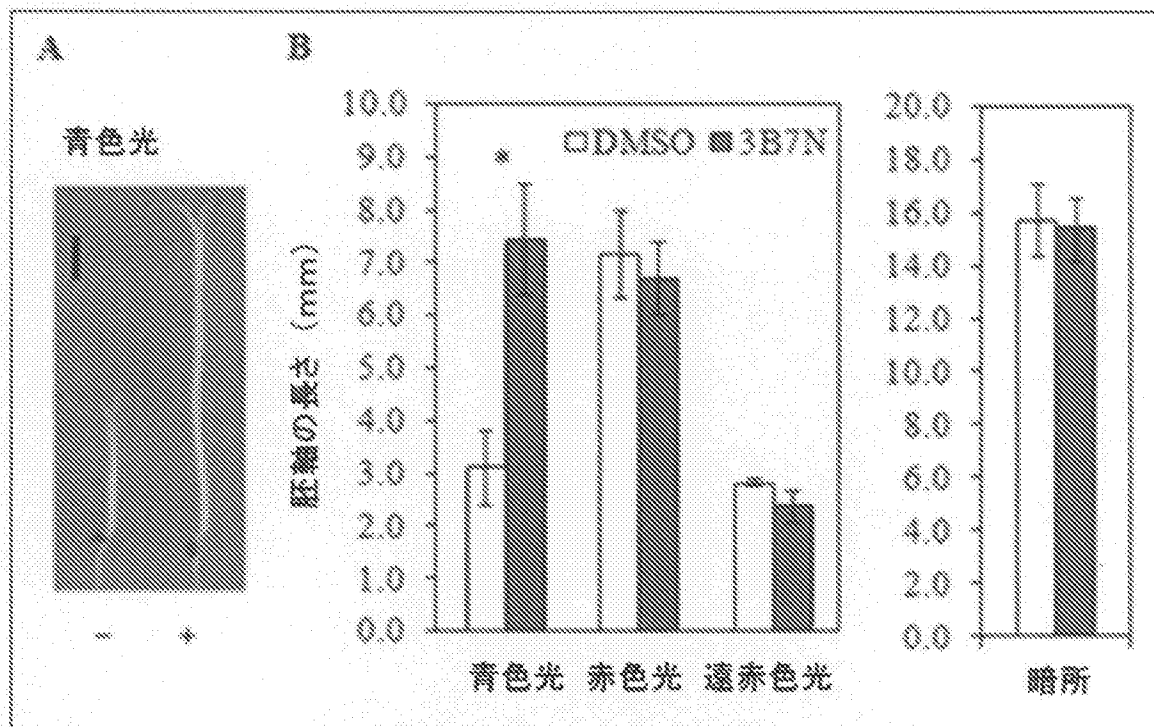


〔前記式（1）中、A環とB環とは一緒になって、2個の窒素原子を含有する、9員含窒素縮合芳香族複素環式化合物であり、A環は6員芳香族炭化水素環又は6員芳香族複素環を示し、B環は5員芳香族炭化水素環又は5員芳香族複素環を示す。また、Xは水素原子又はハロゲン原子を示す〕。

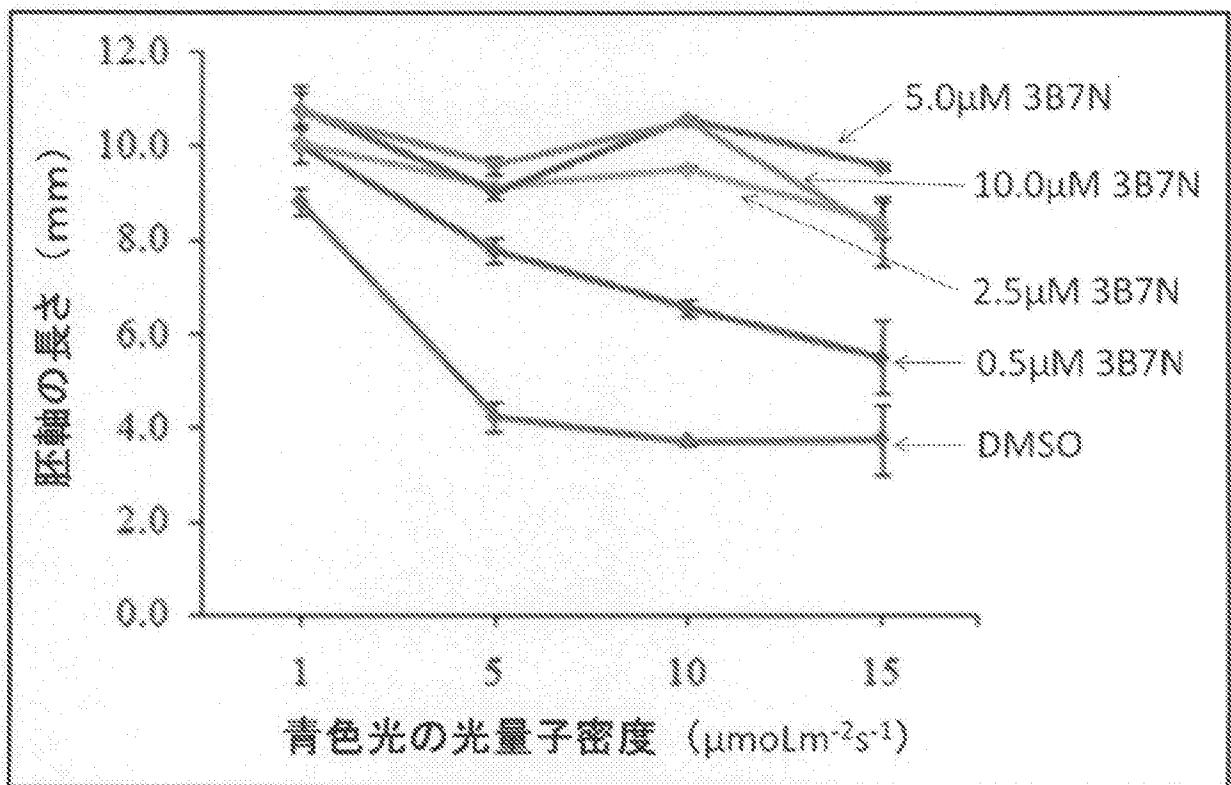
〔請求項2〕 前記含窒素縮合芳香族複素環式化合物が3-ブロモ-7-ニトロインダゾールである、請求項1に記載の組成物。

〔請求項3〕 青色光を含む光の照射下で植物の生長を促進するための組成物である、請求項1又は2に記載の組成物。

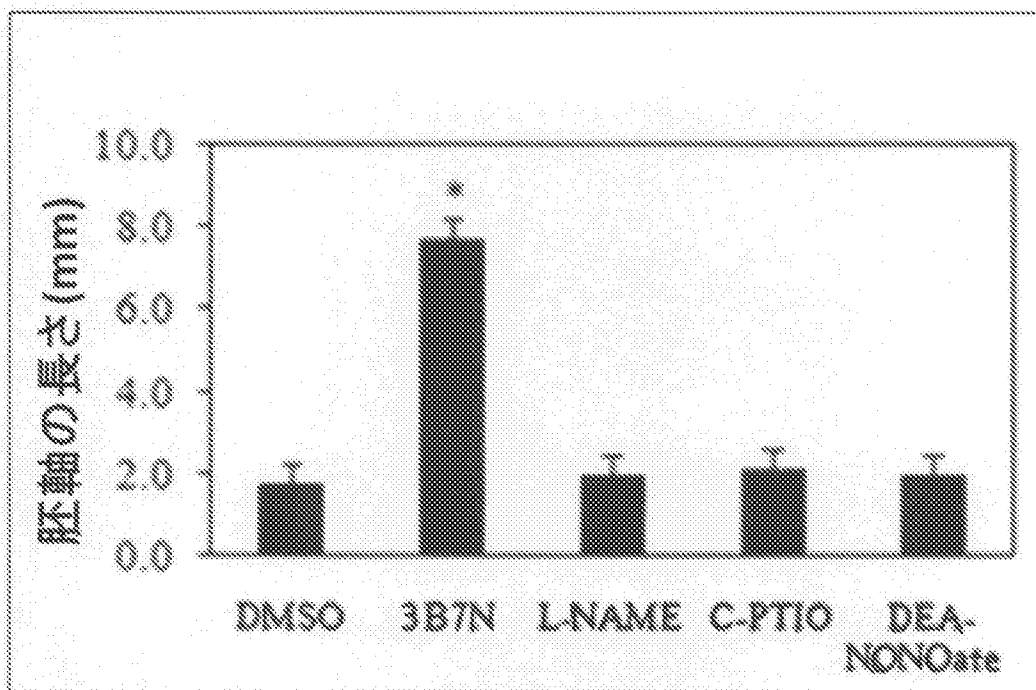
青色光シグナル伝達



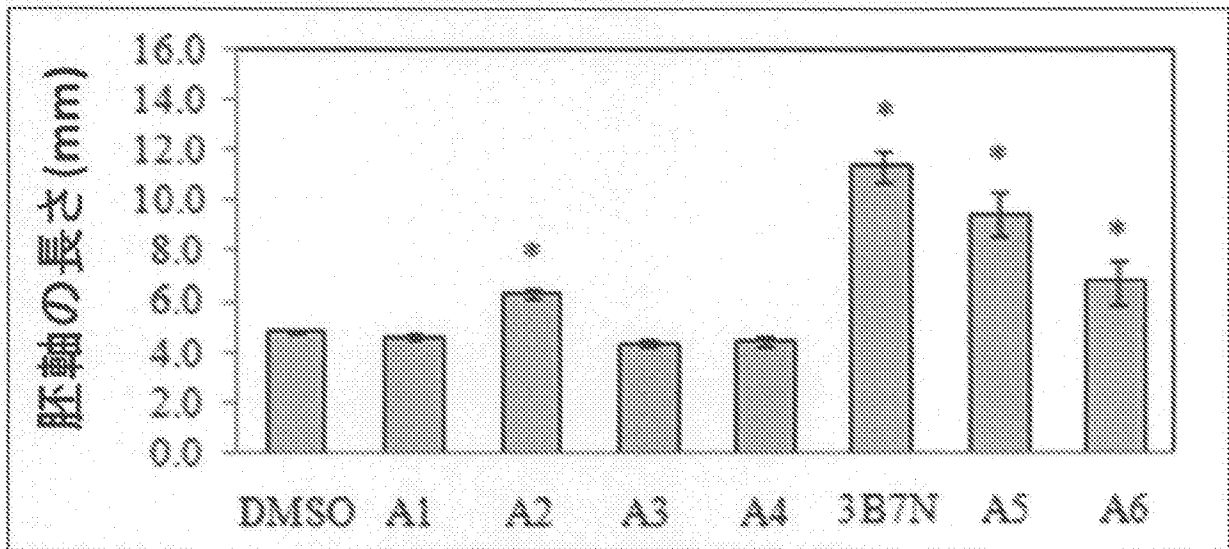
[図3]



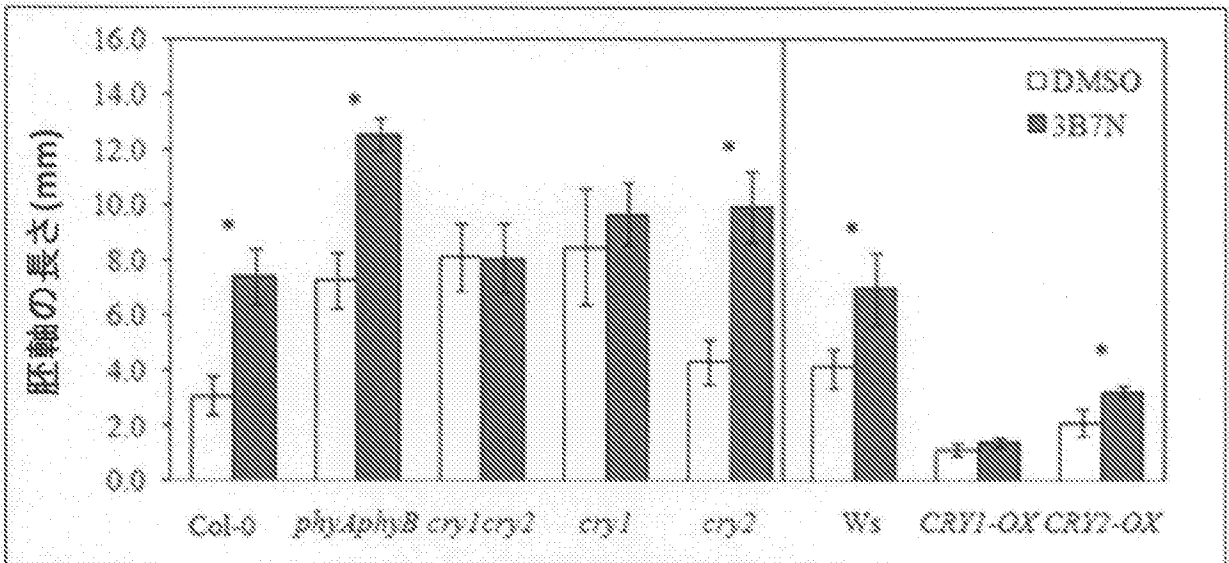
[図4]



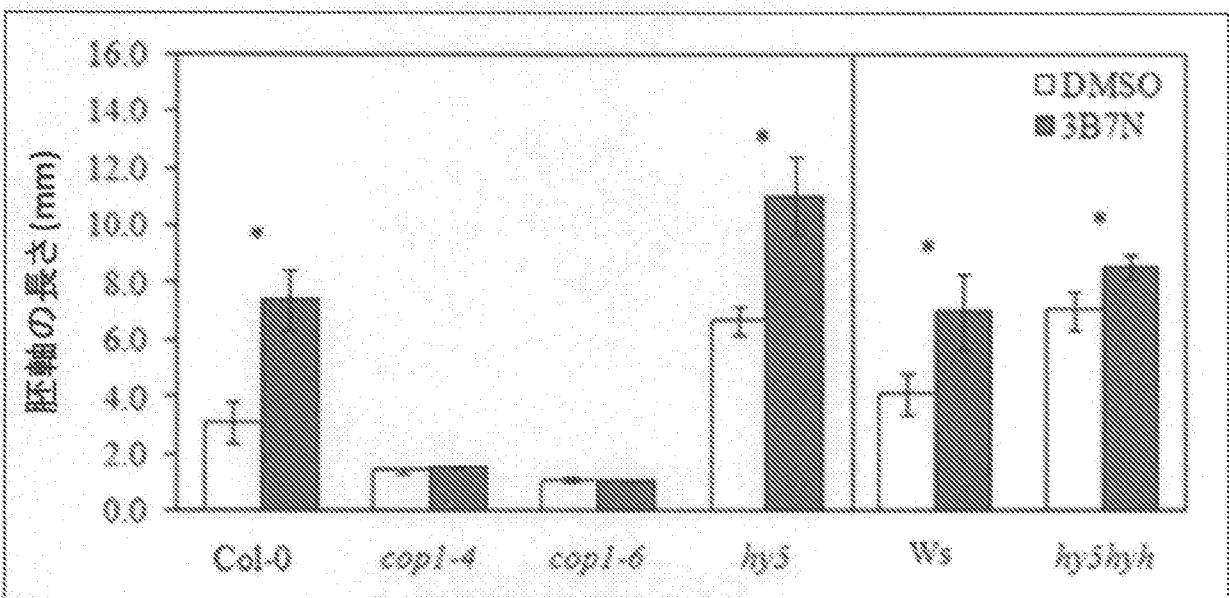
[図5]



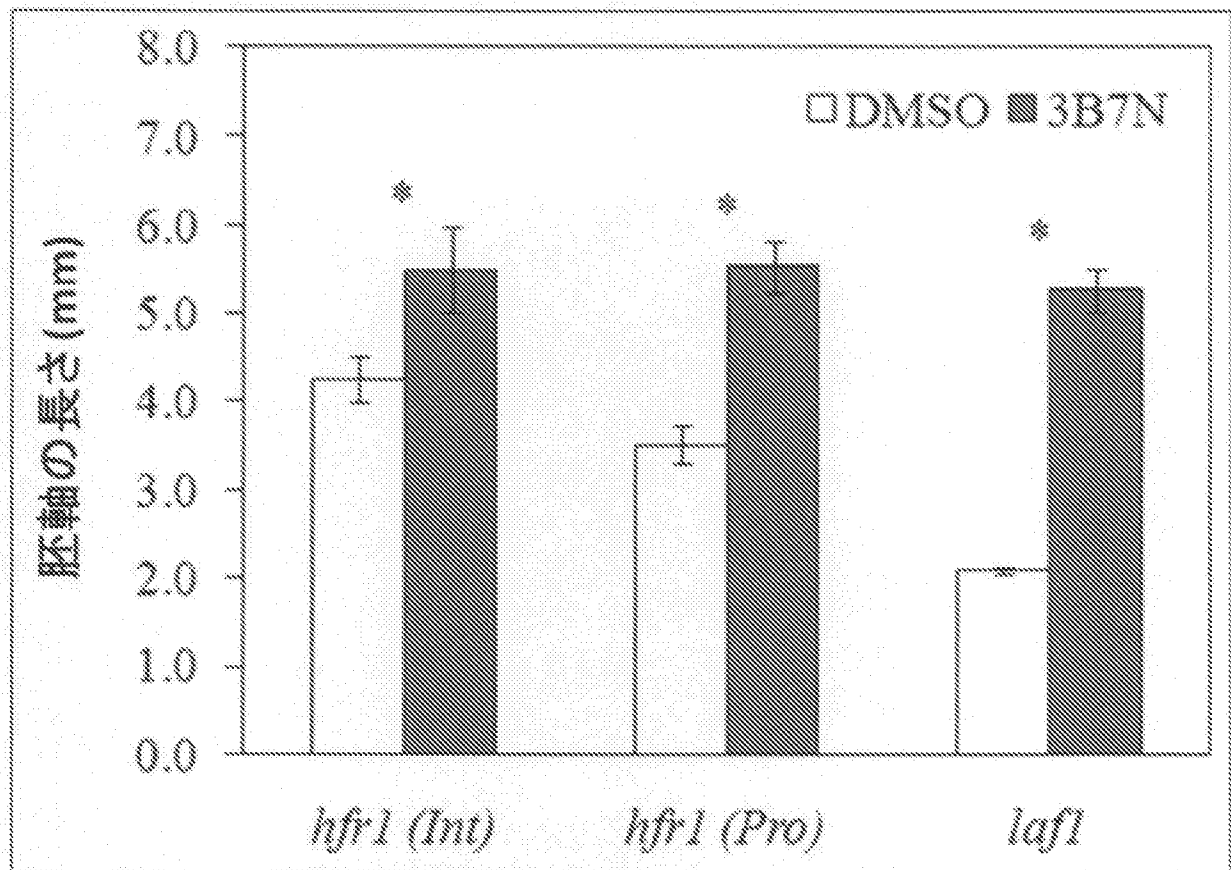
[図6]



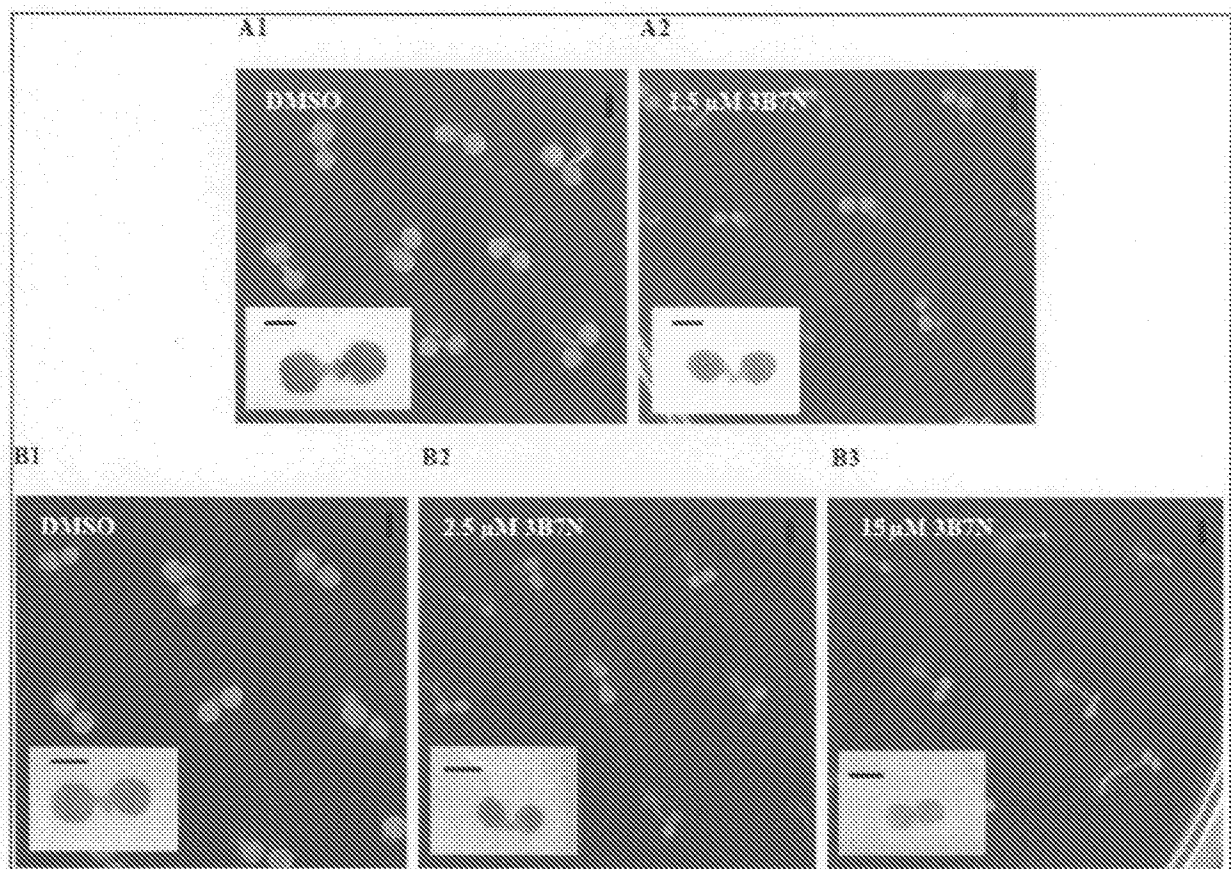
[図7]



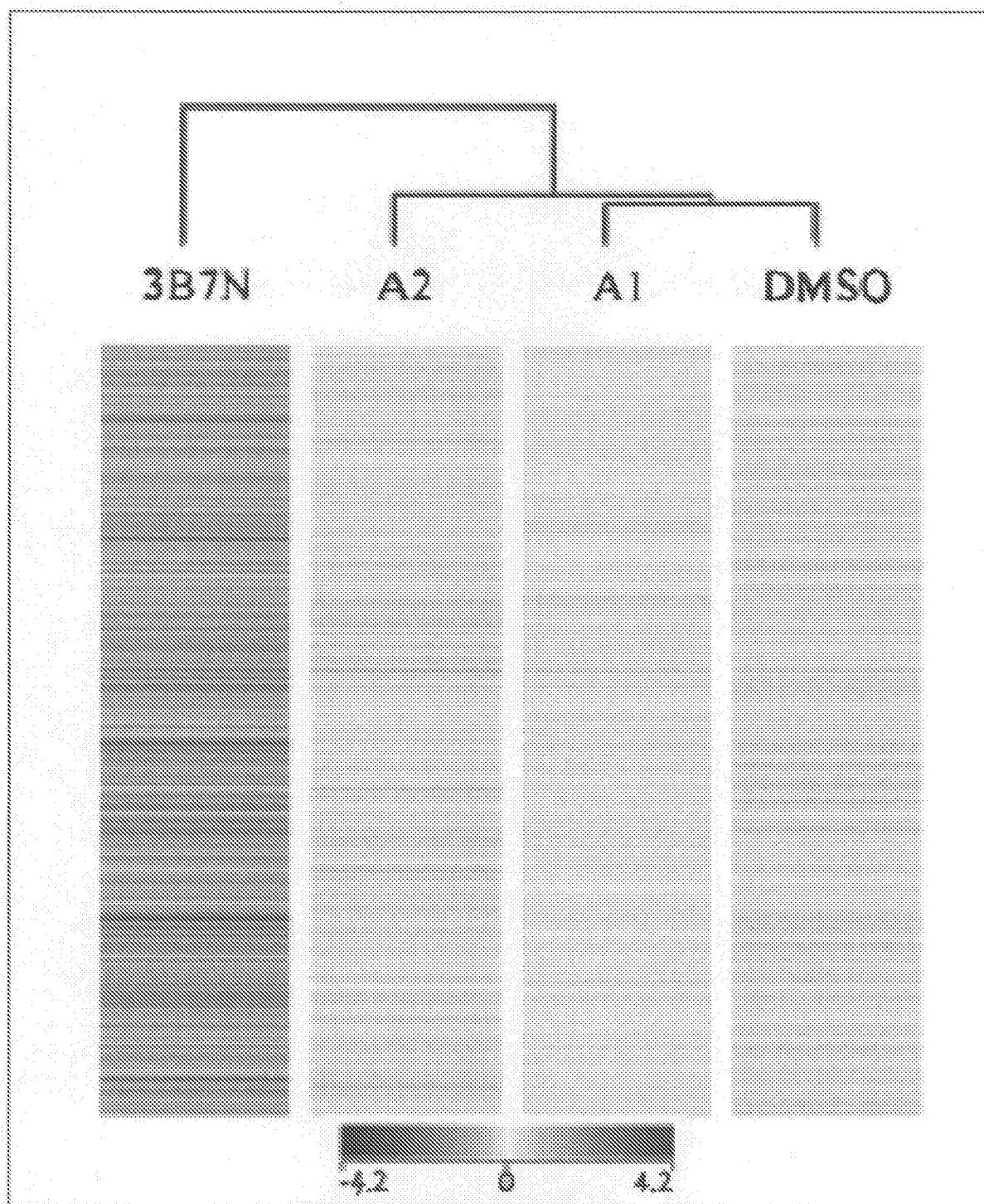
[図8]



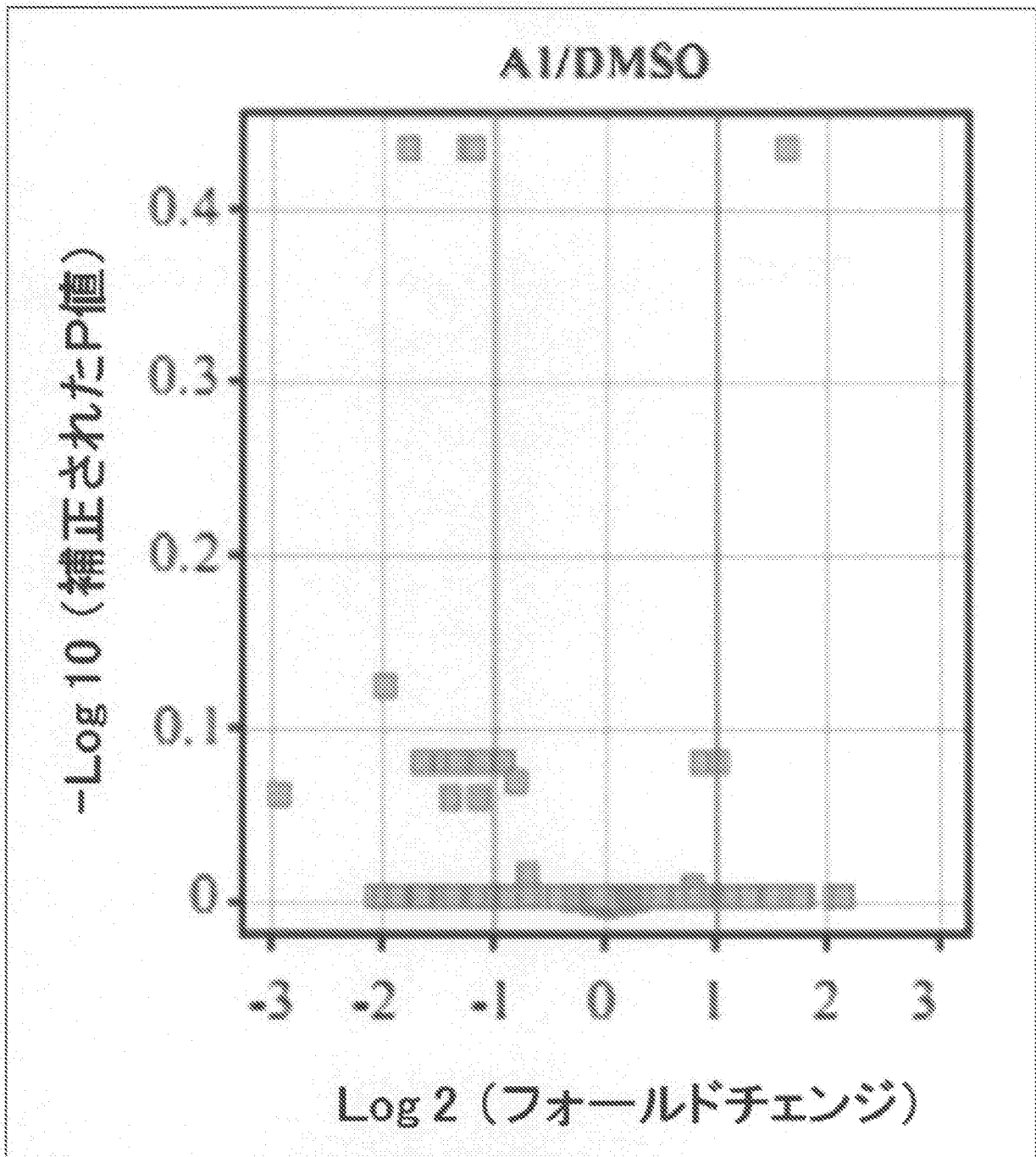
[図9]



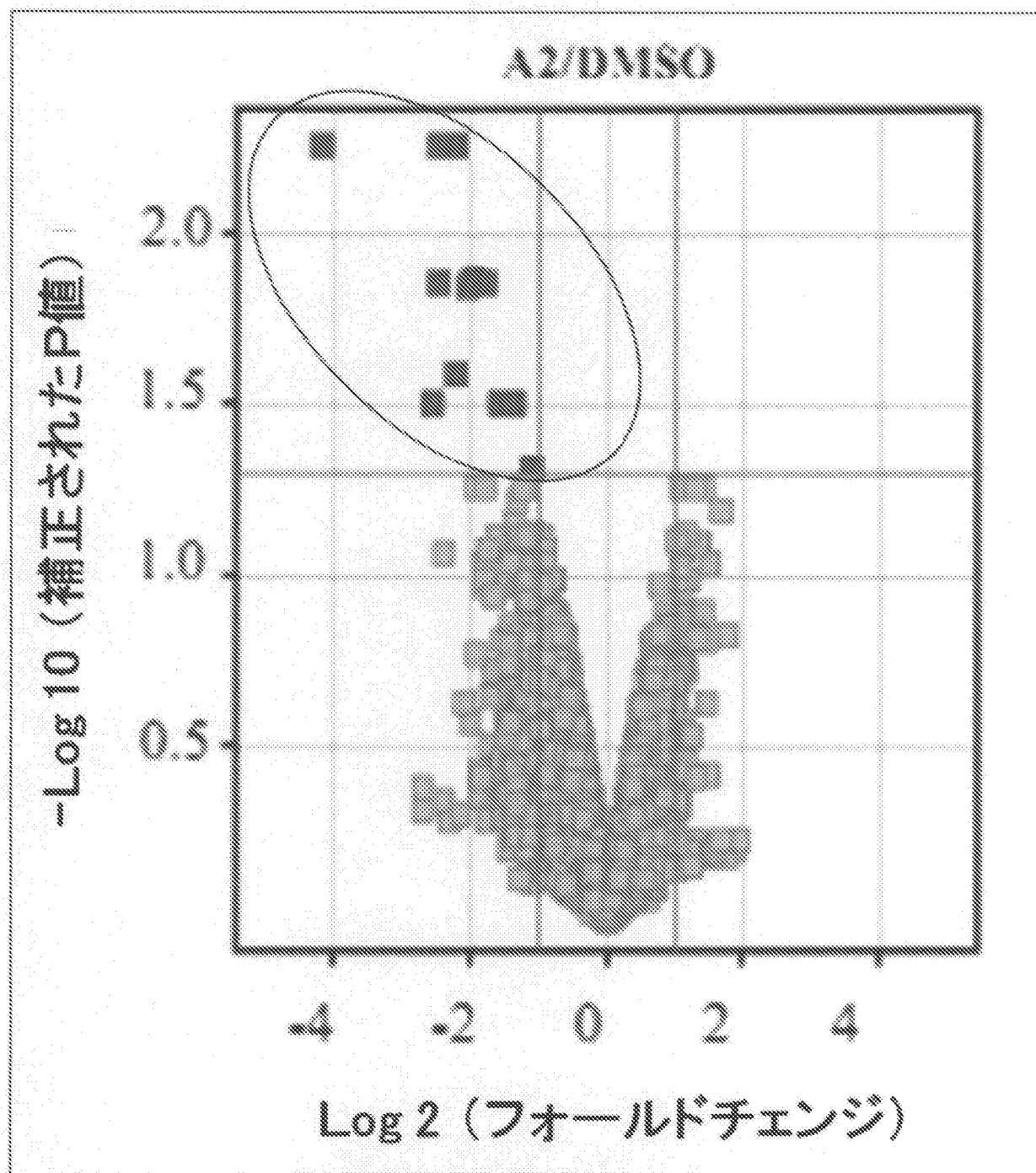
[図10]



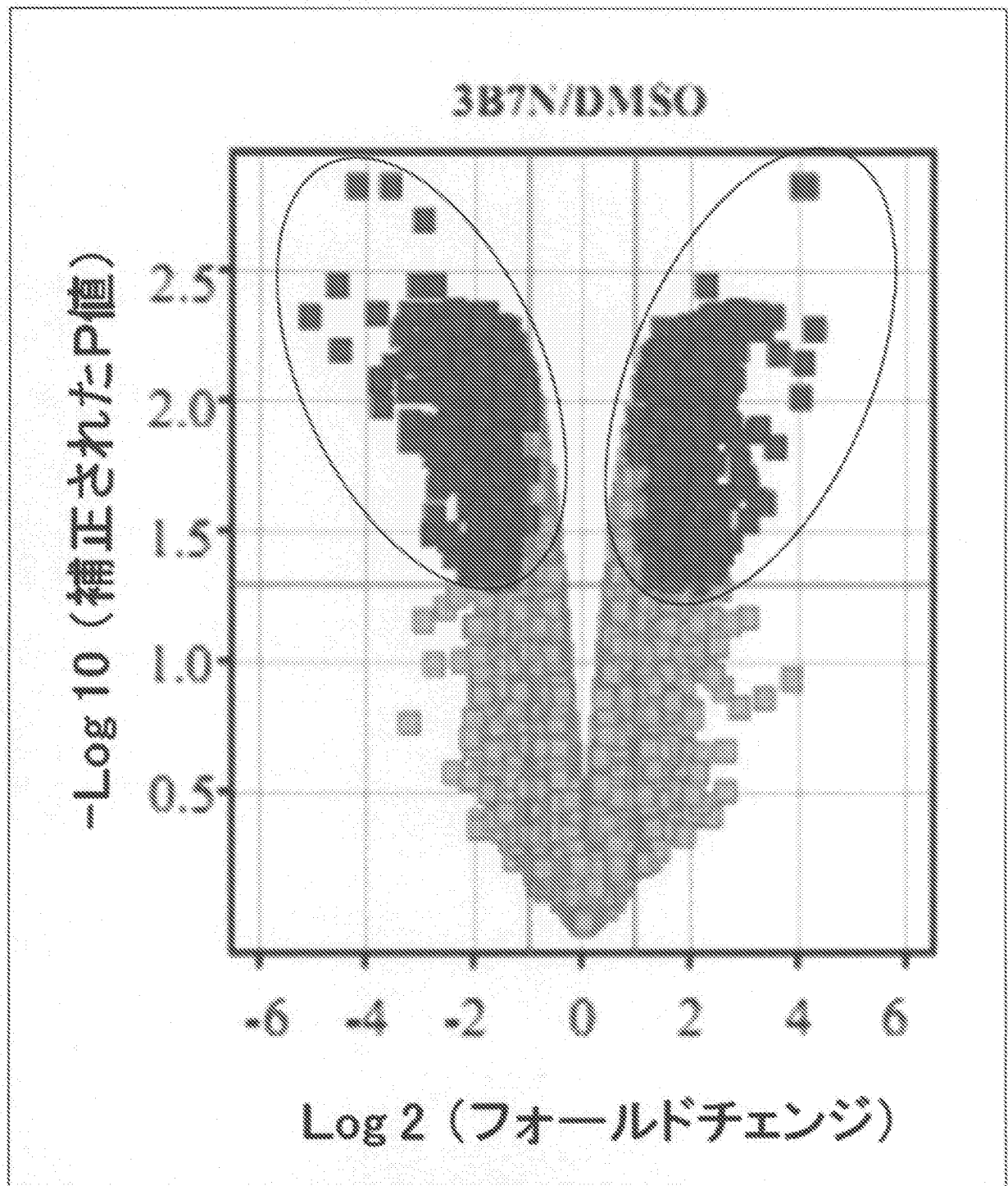
[図11]



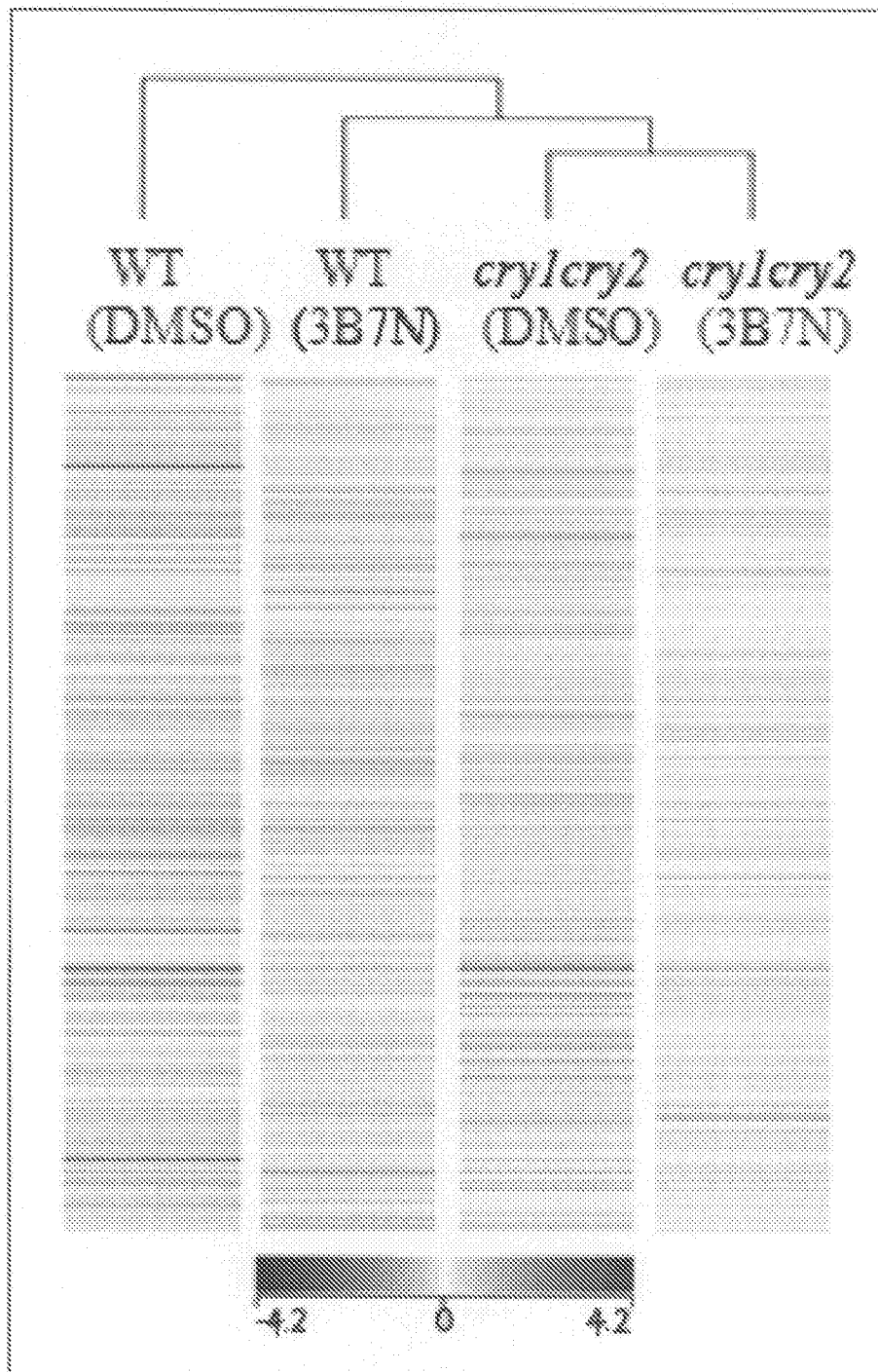
[図12]



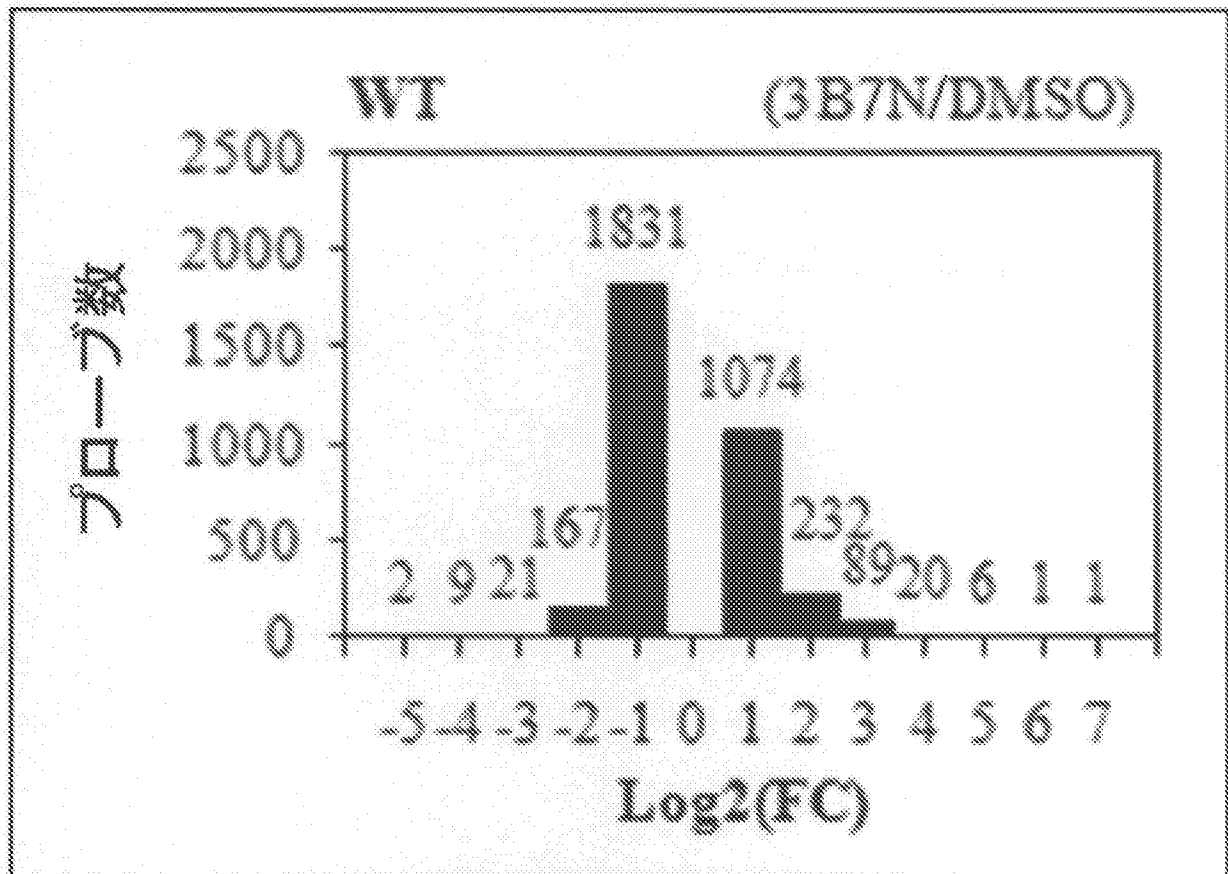
[図13]



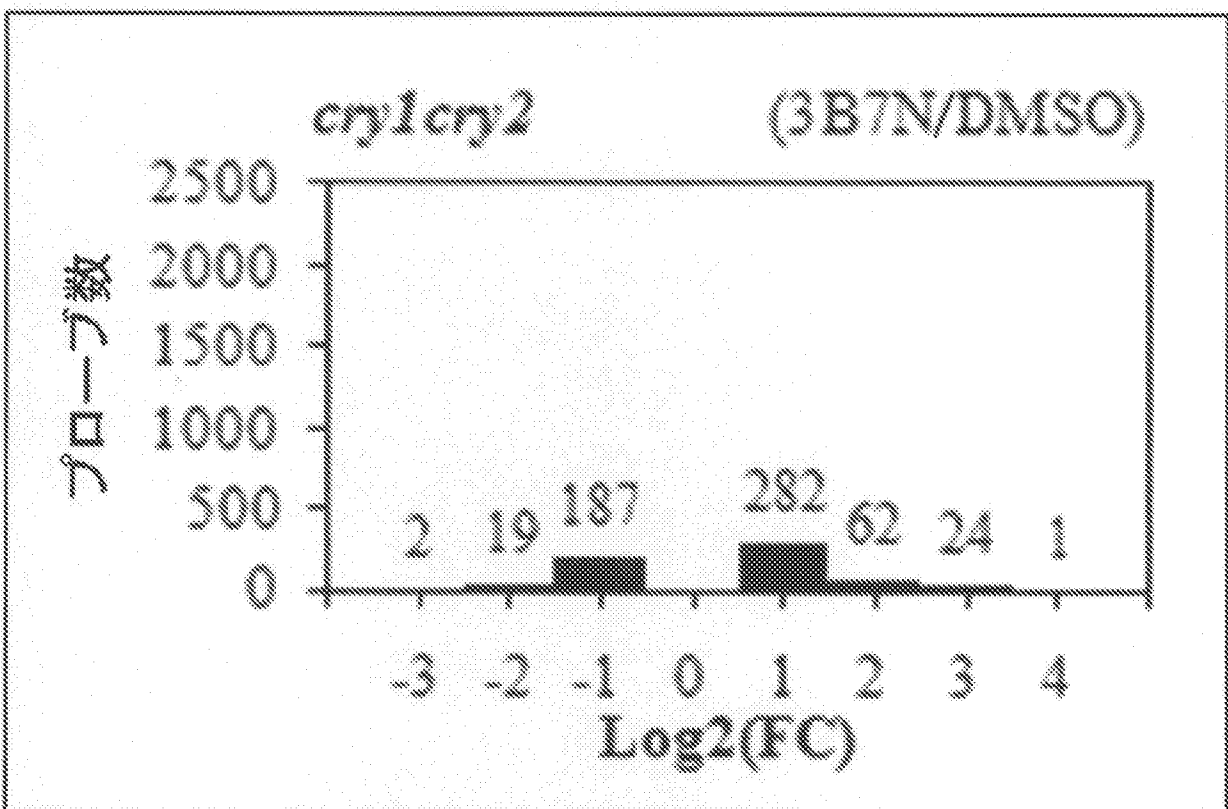
[図14]



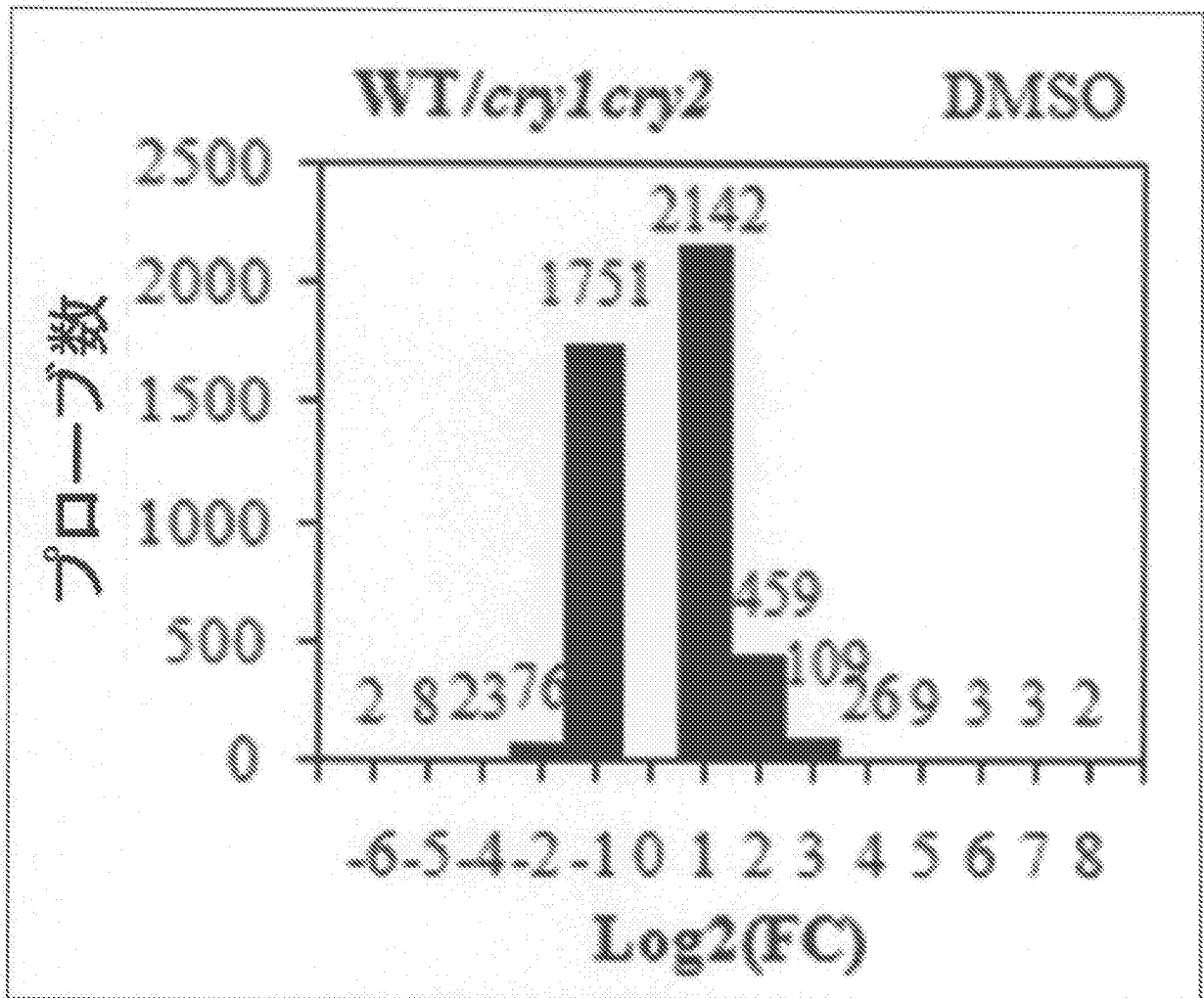
[図15]



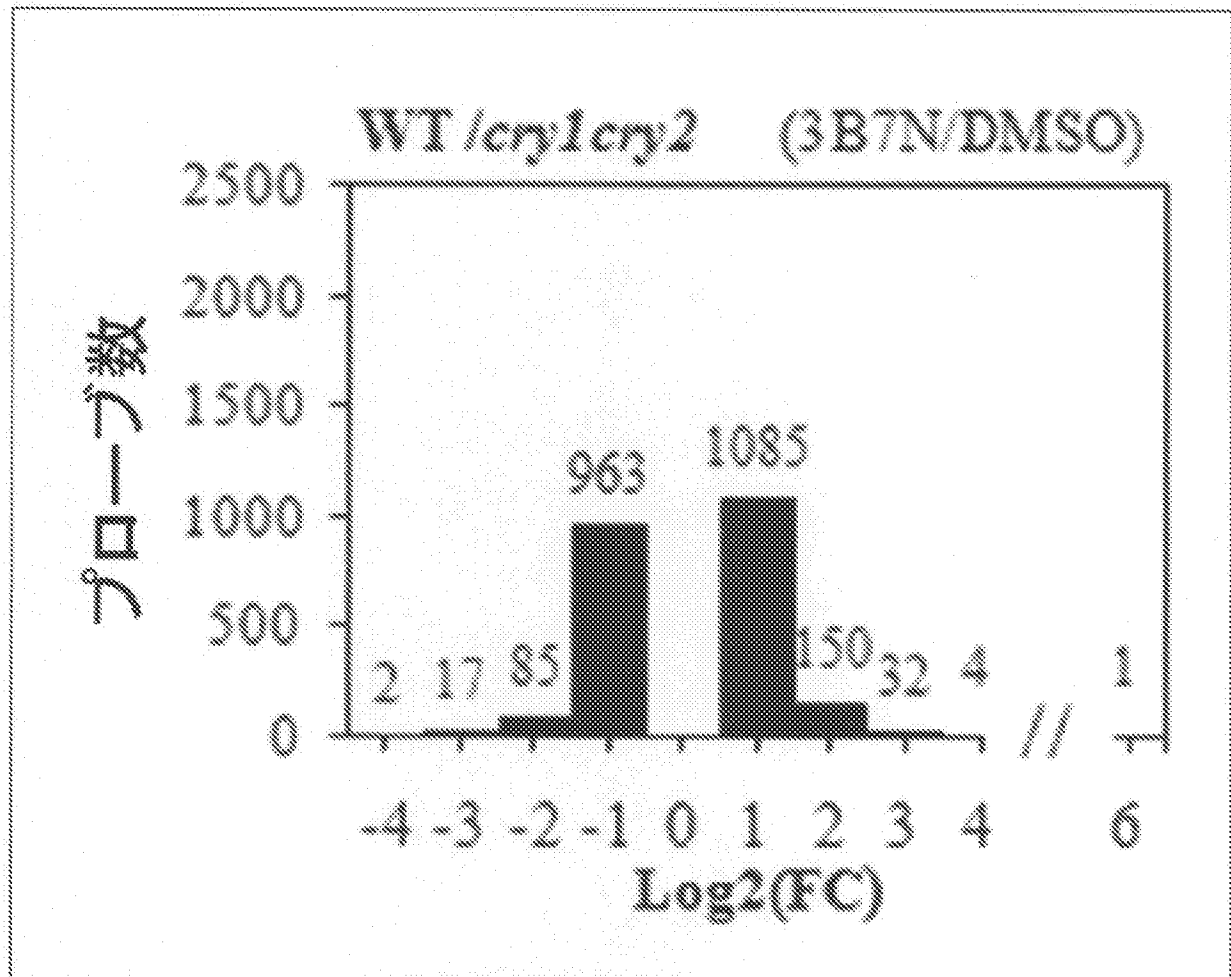
[図16]



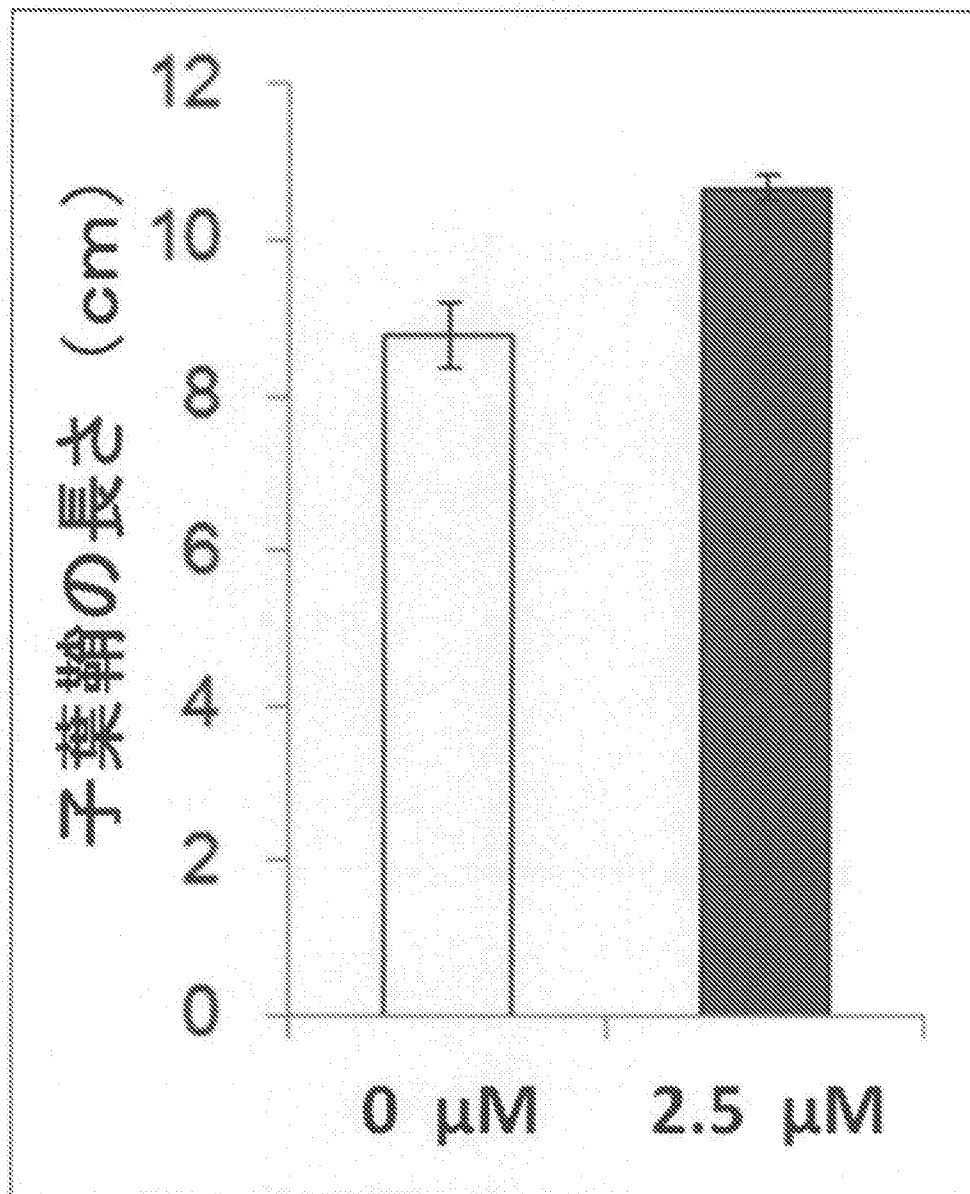
[図17]



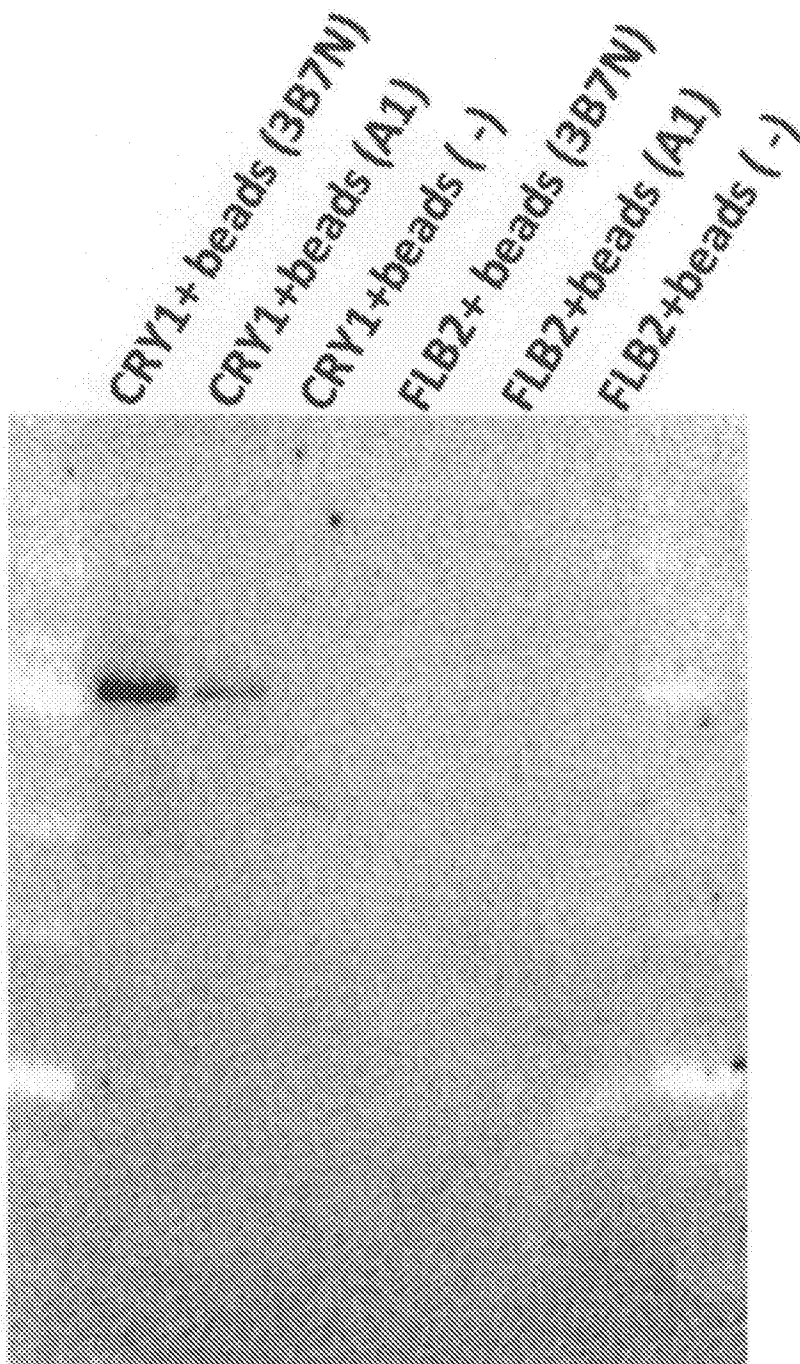
[図18]



[図19]



[図20]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/037870

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. A01N43/56 (2006.01) i, A01G7/00 (2006.01) i, A01N43/90 (2006.01) i, A01P21/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. A01N43/56, A01G7/00, A01N43/90, A01P21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2017
Registered utility model specifications of Japan	1996-2017
Published registered utility model applications of Japan	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/REGISTRY (STN), ScienceDirect, ACS PUBLICATIONS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CLARAMUNT, R. M. et al., Fluorinated indazoles as novel selective inhibitors of nitric oxide synthase (NOS): synthesis and biological evaluation, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009, 17(17), pp. 6180-6187	1-3
A	BEDROSIAN, T. A. et al., Photoperiod-dependent effects of neuronal nitric oxide synthase inhibition on aggression in Siberian hamsters, Hormones and Behavior, 2012, 61(2), pp. 176-180	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
19 December 2017

Date of mailing of the international search report
09 January 2018

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/037870

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CANAMERO, R. C. et al., Cryptochrome photoreceptors cry1 and cry2 antagonistically regulate primary root elongation in Arabidopsis thaliana, Planta, 2006, 224(5), pp. 995-1003	1-3
A	CHUN, S. K. et al., Identification and validation of cryptochrome inhibitors that modulate the molecular circadian clock, ACS Chemical Biology, 2014, 9(3), pp. 703-710	1-3
A	US 2015/0284362 A1 (RESET THERAPEUTICS, INC.) 08 October 2015, entire text & JP 2017-510611 A & WO 2015/157182 A1 & EP 3129366 A1 & TW 201605835 A & AU 2015244060 A & CA 2944074 A & KR 10-2016-0140909 A & CN 106458891 A & AR 99970 A & MX 2016013105 A	1-3
P, X	ONG, W. D. et al., Chemical-induced inhibition of blue light-mediated seedling development caused by disruption of upstream signal transduction involving cryptochromes in Arabidopsis thaliana, Plant & Cell Physiology, 2017, 58(1), pp. 95-105	1-3
P, X	ORTH, C. et al., Hyperactivity of the Arabidopsis cryptochrome(cry1) L407F mutant is caused by a structural alteration close to the cry1 ATP-binding site, Journal of Biological Chemistry, 20 June 2017, 292(31), pp. 12906-12920	1-3

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A01N43/56(2006.01)i, A01G7/00(2006.01)i, A01N43/90(2006.01)i, A01P21/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A01N43/56, A01G7/00, A01N43/90, A01P21/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/REGISTRY (STN), Science Direct, ACS PUBLICATIONS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	CLARAMUNT, R. M. et al., Fluorinated indazoles as novel selective inhibitors of nitric oxide synthase (NOS): Synthesis and biological evaluation, BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, 2009, 17(17), pp. 6180-6187	1-3
A	BEDROSIAN, T. A. et al., Photoperiod-dependent effects of neuronal nitric oxide synthase inhibition on aggression in Siberian hamsters, HORMONES AND BEHAVIOR, 2012, 61(2), pp. 176-180	1-3

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.12.2017

国際調査報告の発送日

09.01.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

早乙女 智美

4 P

3759

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	CANAMERO, R. C. et al., Cryptochrome photoreceptors cry1 and cry2 antagonistically regulate primary root elongation in <i>Arabidopsis thaliana</i> , PLANTA, 2006, 224(5), pp. 995-1003	1-3
A	CHUN, S. K. et al., Identification and Validation of Cryptochrome Inhibitors That Modulate the Molecular Circadian Clock, ACS CHEMICAL BIOLOGY, 2014, 9(3), pp. 703-710	1-3
A	US 2015/0284362 A1 (RESET THERAPEUTICS, INC.) 2015.10.08, 全文 & JP 2017-510611 A & WO 2015/157182 A1 & EP 3129366 A1 & TW 201605835 A & AU 2015244060 A & CA 2944074 A & KR 10-2016-0140909 A & CN 106458891 A & AR 99970 A & MX 2016013105 A	1-3
P, X	ONG, Wen-Dee et al., Chemical-Induced Inhibition of Blue Light-Mediated Seedling Development Caused by Disruption of Upstream Signal Transduction Involving Cryptochromes in <i>Arabidopsis thaliana</i> , PLANT & CELL PHYSIOLOGY, 2017, 58(1), pp. 95-105	1-3
P, X	ORTH, C. et al., Hyperactivity of the <i>Arabidopsis</i> cryptochrome (cry1) L407F mutant is caused by a structural alteration close to the cry1 ATP-binding site, JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2017.06.20, 292(31), pp. 12906-12920	1-3