

イソキサゾリン骨格を有する除草剤の可逆的 VLCFAE 阻害

クミアイ化学工業(株)種谷良貴, 藤岡智則, 角康一郎, 清水力

1. 超長鎖脂肪酸伸長酵素

超長鎖脂肪酸伸長酵素 (Very-Long-Chain Fatty Acid Elongase, 以下 VLCFAE と略す) は植物クチクラのワックス層や細胞膜のスフィンゴ脂質の主成分である超長鎖脂肪酸 (Very-Long-Chain Fatty Acid, 以下 VLCFA と略す) を合成する酵素である^{1,2)}。VLCFA は炭素鎖が 20 ~ 30 以上の飽和脂肪酸や不飽和脂肪酸から成り、葉緑体で生合成された C16 または C18 のアシル CoA にマロニル CoA から 2 つの炭素が移ることで生成する。即ち VLCFAE

は C16 または C18 の脂肪酸の炭素数を順に 2 つ伸長する酵素である (図-1)。パルミチン酸 (C16) からステアリン酸 (C18) の反応は基本的には脂肪酸生合成酵素である FAS (Fatty Acid Synthase) によって触媒されるが、VLCFAE は本生合成反応を触媒する活性も有している。詳しく見ると、この VLCFA の生合成反応には 4 つの酵素 (縮合酵素, 2 つの還元酵素, 脱水酵素) が関与しており、最初の縮合反応を触媒しているのが VLCFAE である²⁾。VLCFAE が触媒する反応が VLCFA 合成の律速段階と

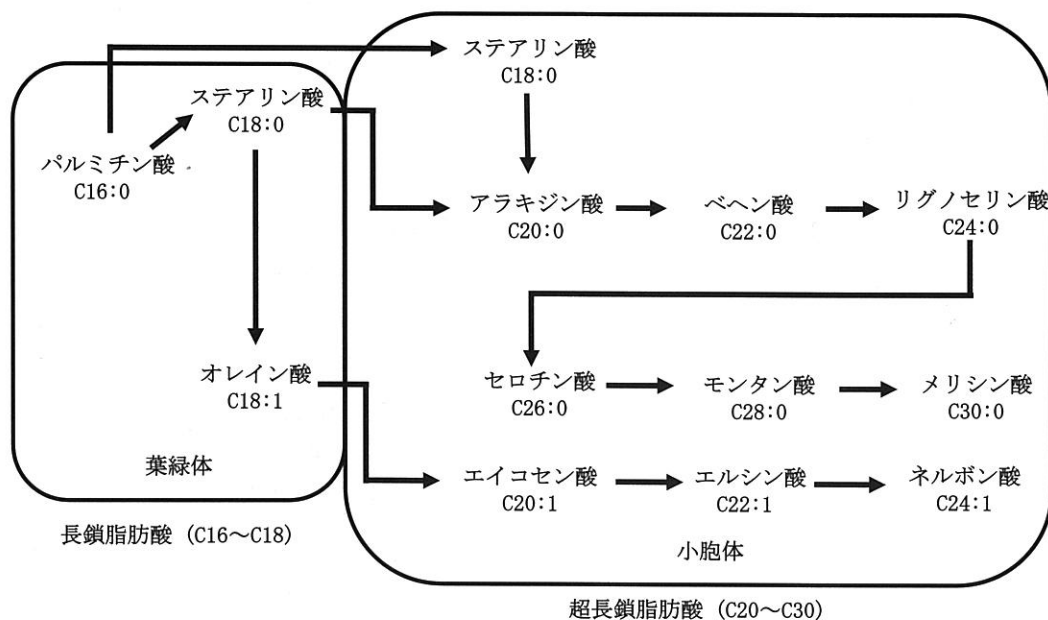


図-1 植物の VLCFA 生合成経路

*本図は日本農業学会誌, 第 37 巻, P269-274 の Fig. 2 より転載した。

なっており、どのような VLCFA ができるかは、VLCFAE のアシル CoA に対する親和性に依存している。なお、VLCFAE の酵素的性質が最も良く調べられている植物はシロイヌナズナである。シロイヌナズナでは少なくとも 7 種類の VLCFAE が存在し、単一の VLCFAE が複数の炭素鎖伸長反応を触媒することが明らかとなっている^{3,4)}。以下、脂肪酸を $C\alpha:\beta$ (α が炭素数、 β が二重結合の数) と表して記載する。

2. VLCFAE 阻害型除草剤

VLCFAE 阻害型除草剤は Herbicide Resistance Action Committee(HRAC)⁵⁾において K3 に分類されており、メトラクロールやメタザクロールのようなクロロアセトアミド系、フルフェナセットのようなオキシアセトアミド系、フェントラザミドのようなテトラゾリノン系、カフェンストールのようなトリアゾール系、インダノファンのようなオキシラン系、そしてフェノキサスルホンやピロキサスルホンのようなイソキサゾリン系など異なる基本骨格を有する多くのタイプから構成される。

3. VLCFAE 阻害型除草剤の VLCFAE 阻害機構

クロロアセトアミド系除草剤は分子内に求電子性の高い炭素原子、すなわち求核試薬の攻撃対象となる炭素原子を有していることから、これらの薬剤は VLCFAE の活性中心に存在するシステインの SH 基と不可逆的に反応して酵素を失活させると考えられている^{2,6-8)}。薬剤がターゲット酵素と共有結合を形成して酵素を阻害する場合、即ち不可逆的阻害の場合には、酵素と薬剤のプレインキュベーション時間に比例して酵素阻害活性が強くなる。メタザクロールの場合には、西洋ネギの VLCFAE

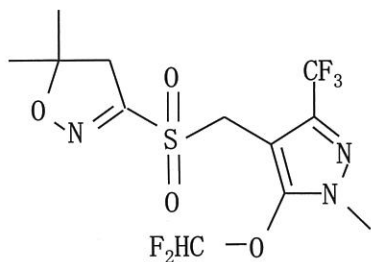
(C20:0 → C22:0 の伸長反応) 阻害活性は、薬剤と酵素のプレインキュベーション時間が長くなるにつれて強くなることが示されている^{2,6,7)}。したがって、クロロアセトアミド系除草剤は不可逆的に VLCFAE を阻害すると考えられており、この概念が他のタイプの VLCFAE 阻害型除草剤にも適用されている。

4. イソキサゾリン系除草剤

クミアイ化学工業株式会社、株式会社ケイ・アイ研究所およびイハラケミカル工業株式会社が共同で開発したイソキサゾリン系除草剤のピロキサスルホン(図-2A)はトウモロコシ、ムギ類、ダイズ等の幅広い作物に適用性を持つ土壌処理剤であり、オーストラリア、アメリカ、南アフリカでコムギ用除草剤として、アメリカ、カナダでトウモロコシ用除草剤として、アメリカでダイズ及びワタ用除草剤としての登録を取得している。本剤はエノコログサやメヒシバ、ヒエ、ナルコビエ、セイバンモロコシ等のトウモロコシ栽培における主要イネ科雑草に加え、ヒユ類やシロザ、イチビ等の広葉雑草にも広いスペクトラムを有している。投下薬量は 100 ~ 250 g a.i./ha と土壌処理剤としては低く、先行剤の数分の 1 であり^{9,10)}、残効性にも優れている。ムギ類においては、ブラックグラスやライグラス類といった ACCase 阻害型除草剤やジニトロアニリン系除草剤に抵抗性を獲得している草種に効果が高い。

一方、同タイプのフェノキサスルホン(図-2B)は、クミアイ化学工業が開発を進めている水稲用除草剤で、タイヌビエやコナギ、アゼナ類およびタマガヤツリ等の一年生雑草に効果が大きい。また、葉齢の進んだ生育期のノビエ等にも効果を有している^{11,12)}。ピロキサスルホン

A



B

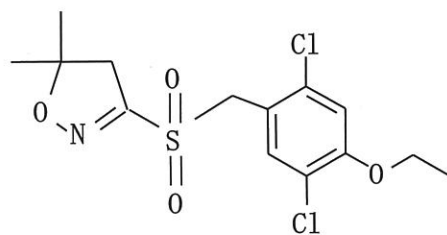


図-2 イソキサゾリン系除草剤

(A) ピロキサスルホン (B) フェノキサスルホン

* 本図は日本農薬学会誌, 第37巻, P269-274のFig. 1より転載した。

とフェノキサスルホンの作用機構研究を進めた結果、両剤ともに VLCFA 生合成系を阻害し、その主作用点は VLCFAE であることが明らかとなっている。しかしながら、VLCFAE 阻害機構に関しては、上述した従来の概念とは異なる結果が得られている。そこで、以下の項でピロキサスルホン及びフェノキサスルホンの植物生育阻害及び VLCFA 生合成阻害に触れた後、主題の VLCFAE 阻害について述べる。

5. イソキサゾリン系除草剤の植物生育阻害及び VLCFA 生合成阻害

ピロキサスルホンは対象雑草のネズミムギ及び食用ヒエ植物体の生育を低濃度で阻害したのに対して、対象作物のコムギ及びトウモロコシに対する生育阻害は対象雑草に比べて弱いことから、ピロキサスルホンは高い生育阻害活性だけでなく、作物雑草間で優れた選択性を有することが明らかになった¹³⁾。なお、この選択性には VLCFAE の感受性の違い及びグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) による薬剤代謝活性の違いが関与していることが明らかになっている^{14,15)}。また、本剤に対するイネの感受性は対象雑草と同等であったことから、作用

機構研究にはモデル植物であるイネを感受性植物として用いることができると考えられた。一方、イネ用除草剤であるフェノキサスルホンは対象雑草のタイヌビエ及び食用ヒエ植物体の生育を低濃度で阻害したことから、比較的取り扱いの容易な食用ヒエを作用機構研究の際の感受性植物とした¹⁶⁾。

ピロキサスルホンのイネ培養細胞及びフェノキサスルホンの食用ヒエ培養細胞に対する増殖阻害を各々の植物体に対する生育阻害と比較したところ、前者は後者に比べて極めて弱いことが分かった^{13,16)}。ワックス層が発達していない培養細胞では、仮に VLCFAE が阻害されると、細胞膜に存在するスフィンゴ脂質の生合成が阻害され、VLCFA の前駆体が蓄積してくると考えられることから、植物体の生育を強く阻害し、かつ培養細胞の増殖阻害に影響を及ぼさない濃度で試験をすれば、*de novo* 合成される VLCFA への薬剤の影響を調べることが可能であると考えられた。即ち、培養細胞を用いれば、放射性標識化合物を用いることなく VLCFA の *de novo* 合成に及ぼす両剤の影響を解析できると考えられた。

ピロキサスルホン処理したイネ培養細胞及び

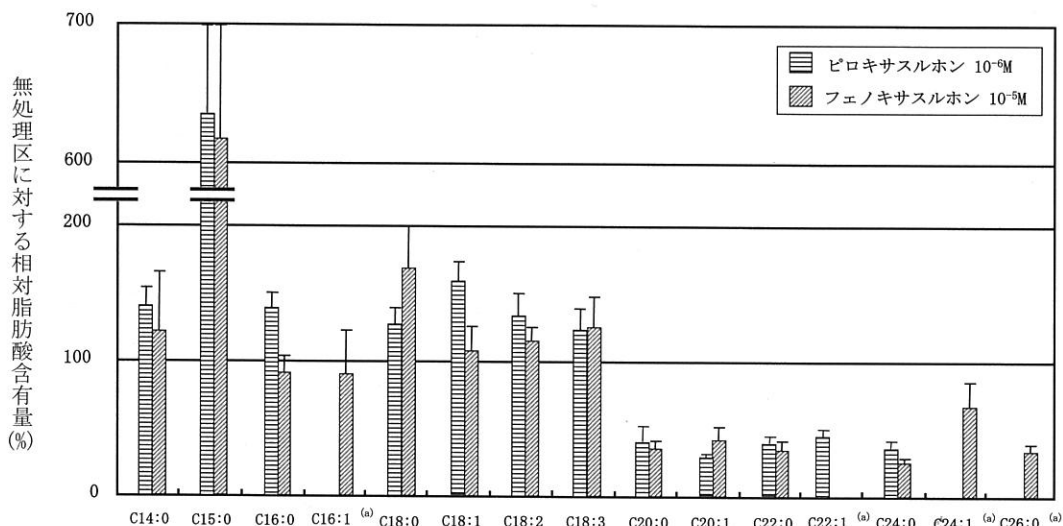


図-3 イソキサゾリン系除草剤処理した植物培養細胞中の脂肪酸含有量の変動

(a) ピロキサスルホン処理したイネ培養細胞中の脂肪酸 (C16:1、C24:1、C26:0) は未定量であり、フェノキサスルホン処理した食用ヒエ培養細胞中の脂肪酸 (C22:1) は検出限界以下であった。

* 本図は日本農業学会誌, 第37巻, P269-274のFig. 3より転載した。

フェノキサスルホン処理した食用ヒエ培養細胞では、炭素数20以上のVLCFAが大幅に減少していたのに対して、炭素数18以下の脂肪酸が蓄積しており、特に炭素数15のペンタデカン酸 (C15:0) の蓄積が最も顕著であった (図-3)。これらの結果から、両剤は VLCFA 生合成経路を阻害していることが示唆された。なお、VLCFAE はパルミチン酸 (C16:0) からステアリン酸 (C18:0) の伸長反応を触媒する活性も有しており、両剤によって本伸長反応も阻害されていると考えられた。

6. イソキサゾリン系除草剤の VLCFAE 阻害

イネ及びネズミムギから調製したマイクロソーム画分に存在する VLCFAE に対するピロキサスルホンの阻害活性を調べたところ、C18:0 → C20:0、C20:0 → C22:0、C22:0 → C24:0、C24:0 → C26:0 ならびに C26:0 → C28:0 の各伸長反応がピロキサスルホ

ンにより低濃度で阻害されることが判明した (表-1)。一方、食用ヒエから調製したマイクロソーム画分に存在する VLCFAE に対するフェノキサスルホンの阻害活性を調べたところ、C22:0 → C24:0 及び C24:0 → C26:0 の各伸長反応がフェノキサスルホンにより低濃度で阻害されることが判った (表-2)。

両剤の VLCFAE に対する阻害様式を調べるために、VLCFAE 阻害活性と酵素と薬剤

表-1 ピロキサスルホンの感受性植物 VLCFAE 阻害

伸長反応	阻害50%濃度 (M) ^(a)	
	イネ	ネズミムギ
C18:0→C20:0	0.12×10^{-6}	0.57×10^{-6}
C20:0→C22:0	0.07×10^{-6}	0.39×10^{-6}
C22:0→C24:0	0.56×10^{-6}	0.31×10^{-6}
C24:0→C26:0	0.13×10^{-6}	0.31×10^{-6}
C26:0→C28:0	0.11×10^{-6}	0.07×10^{-6}

(a) ミクロソーム画分とピロキサスルホンを10分間ブレインキュベートした場合の各VLCFAEに対する50%阻害濃度はプロビット法により求めた。
*本表は日本農業学会誌, 第37巻, P269-274のTable 1より転載した。

表-2 フェノキサスルホンの食用ヒエ VLCFAE 阻害

伸長反応	阻害50%濃度 (M) ^(a)
C22:0→C24:0	0.27×10 ⁻⁶
C24:0→C26:0	0.30×10 ⁻⁶

(a) ミクロソーム画分とフェノキサスルホンを10分間ブレインキュベートした場合の食用ヒエVLCFAEに対する50%阻害濃度はプロビット法により求めた。

*本表は日本農薬学会誌, 第37巻, P269-274のTable 2より転載した。

のブレインキュベーション時間の関係を解析した。その結果、ピロキサスルホンの対象作物(コムギ, トウモロコシ, ダイズ)と感受性植物(イネ, ネズミムギ, 食用ヒエ)のVLCFAE(C24:0 → C26:0)に対する阻害活性は、酵素と薬剤のブレインキュベーション時間には依存しないことが明らかとなった(図-4A)¹⁴⁾。また、フェノキサスルホンの食用ヒエのVLCFAE(C24:0 → C26:0)についても同様の結果が得られた(図-4B)¹⁶⁾。従って、ピロキサスルホン及びフェノキサスルホンはVLCFAEを可逆的に阻害すると判断され、これらの結果は西洋ネギを材料とした試験で報告されているクロロアセトアミド系除草剤の結果²⁾とは大きく異なるものであった。

く異なるものであった。

イネや食用ヒエのミクロソーム画分には、シロイヌナズナと同様に複数のVLCFAEが存在していると考えられるので、上述したVLCFAE阻害はそれらの酵素活性の総和に対する阻害を調べていたことになる。そこで、単一のVLCFAEに対する阻害を以下に述べる方法により調べた。まず、シロイヌナズナVLCFAEのアミノ酸配列を用いた相同性検索によりイネのVLCFAEを検索したところ、Uniplot IDで表される14個のタンパク質がヒットした(図-5)。これらの中でQ6F365タンパク質をコードする遺伝子はイネの根部では強く発現しているが培養細胞での発現は弱いことがマイクロアレイ解析により明らかとなったことから、当社が構築した植物形質転換技術であるPalSelectベクターシステム¹⁷⁻²⁰⁾を利用して、Q6F365タンパク質をコードする遺伝子を過剰発現させたイネ培養細胞を作成した。具体的な手法としては、変異型ALS遺伝子を薬剤選抜マーカーとして持つpSTARA R4ベクター¹⁷⁾にカルスト特異的プロモーター²¹⁾でドライ

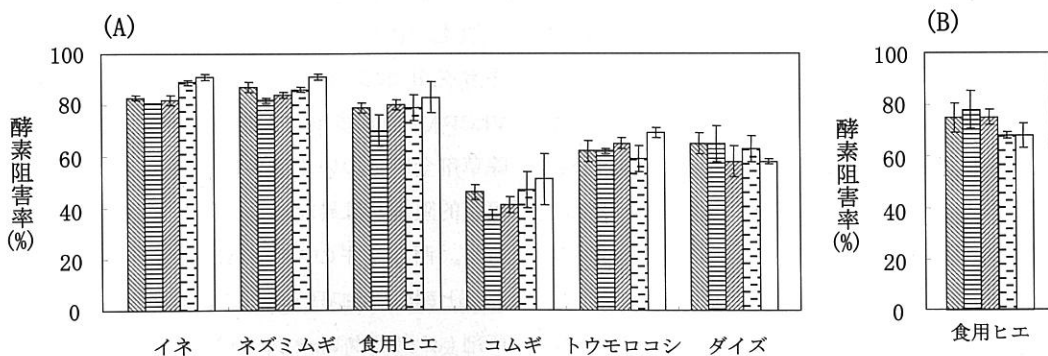


図-4 イソキサゾリン系除草剤の植物 VLCFAE(C24:0 → C26:0) 阻害活性と酵素と薬剤のブレインキュベーション時間との関係

▨, 0分; ▤, 5分; ▧, 10分; ▩, 20分; □, 30分

(A) 10⁻⁶M ピロキサスルホン (B) 10⁻⁶M フェノキサスルホン

*本図は日本農薬学会誌, 第37巻, P269-274のFig. 4より転載した。

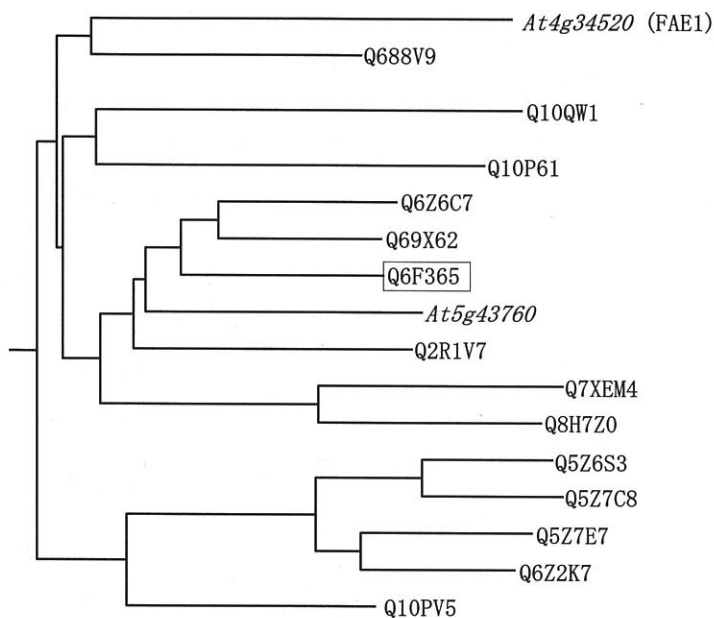


図-5 イネ VLCFAE の系統樹
At4g34520(FAE1) 及び *At5g43760* はシロイヌナズナ VLCFAE である。
 *本図は日本農業学会誌, 第37巻, P269-274 の Fig. 5 より転載した。

した Q6F365 タンパク質をコードする遺伝子を組み込み、本ベクターで形質転換した培養細胞を ALS 阻害型除草剤のビスピリバックナトリウム塩¹⁸⁾で選抜した。得られた形質転換培養細胞において Q6F365 タンパク質をコードする遺伝子が高発現していること及び VLCFAE 活性が高まっていること、並びに VLCFA の含量が増えていることを確認した。これらの結果から、形質転換体の VLCFAE 活性と空ベクターを導入した形質転換体の VLCFAE 活性の差が Q6F365 に由来する VLCFAE 活性となると考えられた。そこで、この系を用いて Q6F365 の VLCFAE 活性 (C18:0 → C20:0 及び C20:0 → C22:0 伸長反応) に対するピロキサスルホンの阻害を調べた。その結果、ピロキサスルホンは Q6F365 に由来する VLCFAE 活性を比較的 low 濃度で阻害することが明らかとなった (図-6A)。また、酵素阻害活性に及ぼ

す薬剤と酵素のブレインキュベーション時間の影響を調べたところ、VLCFAE 阻害活性はブレインキュベーション時間に依存しないことが確認された (図-6B)。したがって、ピロキサスルホンは Q6F365 由来の VLCFAE 活性を可逆的に阻害することが明らかとなった¹⁴⁾。

以上、イソキサゾリン系除草剤であるピロキサスルホンおよびフェノキサスルホンの VLCFAE 阻害機構について、VLCFAE 阻害型除草剤全般について従来から提唱されている不可逆的阻害とは異なる可逆的阻害の結果が得られた。西洋ネギの VLCFAE 阻害が不可逆的であると報告されているクロロアセトアミド系除草剤 (メタザクロール, メトラクロール) を含む他のタイプの VLCFAE 阻害型除草剤 (カフェンストロール, フェントラザミド, フルフェナセツト, インダノファン, フェノキサスルホン) についても、ネズミムギを材料とした場合には、可逆

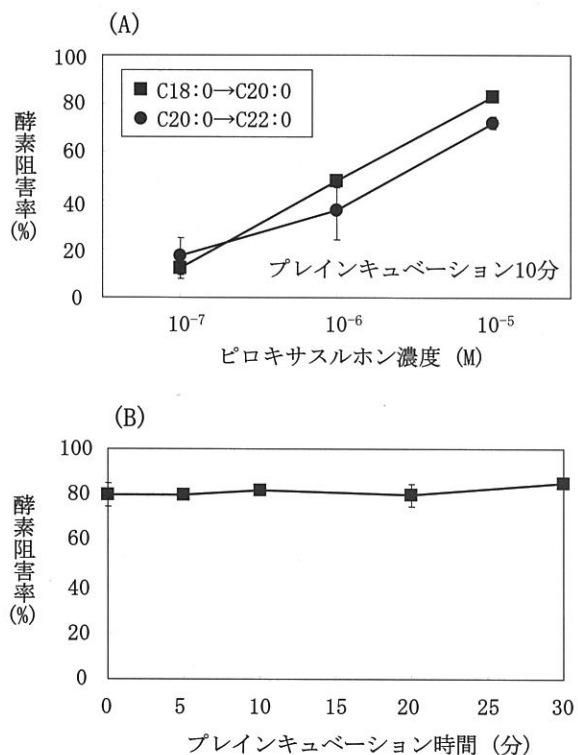


図-6 (A) ピロキサスルホンのイネ Q6F365 阻害
 (B) ピロキサスルホンのイネ Q6F365(C18:0 → C20:0) 阻害活性と酵素と薬剤のプレインキュベーション時間との関係
 * 本図は日本農業学会誌, 第 37 巻, P269-274 の Fig. 6 より転載した。

的阻害の結果が得られていること²²⁾を考慮すると、基本骨格の違いに関わらず、VLCFAE 阻害型除草剤の VLCFAE 阻害は基本的には可逆的であると考えられる。この知見は新規骨格を有する VLCFAE 阻害型除草剤の今後の研究開発に役立つものと考えられる。

7. 謝辞

フェノキサスルホンの作用機構解析の結果は、農水省の民間実用化研究促進事業「安全で環境負荷の少ない国産水稲用除草剤の開発・実用化」で得られた成果である。また、マイクロアレイ解析の際には、(独)農業生物資源研究所の土岐精一博士、長村吉晃博士には御助力を

賜りました。この場を借りましてお礼申し上げます。

- 1) Matthes B. and Böger P. (2002) Z. Naturforsch 57c: 843-852
- 2) Böger P. (2003) J. Pestic. Sci. 28: 324-329
- 3) Trenkamp S., Martin W. and Tietjen K. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 11903-11908
- 4) Tresch S., Heilmann M., Christiansen N., Looser R. and Grossmann K. (2012) Phytochemistry 76: 162-171
- 5) HRAC Home Page (URL:<http://www.weedscience.org/Summary/UspeciesMOA.asp?lstMOAID=3&FmHRACGroup=Go>)

- 6) Böger P., Matthes B. and Schmalfu β J. (2000) *Pest. Manag. Sci.* 56: 497-508
- 7) Schmalfu β J., Matthes B., Knuth K. and Böger P. (2000) *Pestic. Biochem. Physiol.* 67: 25-35
- 8) Eckermann C., Matthes B., Nimtz M., Reiser V., Lederer B., Böger P. and Schröder J. (2003) *Phytochemistry* 64: 1045-1054
- 9) Knezevic S., Datta A., Scott J. and Porpiglia P. (2009) *Weed Technol.* 23: 34-39
- 10) Walsh M., Fowler T., Crowe B., Ambe T. and Powles S. (2011) *Weed Technol.* 25: 30-37
- 11) 高橋優樹, 藤波周, 花井涼, 伊藤稔, 中谷昌央 (2010) 日本農薬学会第 35 回記念大会要旨集 p.52
- 12) 伊藤稔, 中谷昌央, 高橋優樹, 藤波周, 花井涼 (2010) 日本農薬学会第 35 回記念大会要旨集, p. 52
- 13) Tanetani Y., Kaku K., Kawai K., Fujioka T. and Shimizu T. (2009) *Pestic. Biochem. Physiol.* 95: 47-55
- 14) Tanetani Y., Fujioka T., Kaku K. and Shimizu T. (2011) *J. Pestic. Sci.* 36: 221-228
- 15) Tanetani Y., Ikeda M., Kaku K., Shimizu T. and Matsumoto H. (2013) *J. Pestic. Sci.* 38: 152-156
- 16) Tanetani Y., Fujioka T., Horita J., Kaku K. and Shimizu T. (2011) *J. Pestic. Sci.* 36: 357-362
- 17) R-4 ベクター Home Page (URL: http://www.kumiai-chem.co.jp/palselect/image/pstara_gazo06_1.gif)
- 18) PalSelect Home Page (URL: <http://www.kumiai-chem.co.jp/palselect/pstara.html>)
- 19) 藤岡智則, 角康一郎, 河合清, 種谷良貴, 西崎修代, 高根健一, 市川裕章, 清水力 (2008) 第 26 回日本植物細胞分子生物学会大会講演要旨集 p.91
- 20) 角康一郎, 河合清, 井澤典彦, 清水力 (2010) *雑草研究* 55: 74-81
- 21) Otsuki H. and Ohshima M. (2005) US Patent 0223438
- 22) 種谷良貴, 藤岡智則, 角康一郎, 清水力 (2012) *植物の生長調節* 47: 120-126