

除草剤の化学構造と 標的酵素の阻害

筑波大学応用生物化学系 松本 宏

はじめに

除草剤の植物枯殺作用は、それ自身が植物代謝系との作用により毒物の生産に直接関与するパラコートのようなケースを除いて、剤が植物代謝系の特定の酵素、または、ある機能をもったタンパクに結合してそれらの働きを停止させてしまうことに端を発して現れる。除草剤との分子的相互作用の場となる酵素あるいはタンパクは、剤の標的 (target), もしくは作用点 (action site) といわれる。近年, 各種植物から標的酵素を単離した, いわゆる *in vitro* 系を用いて, 除草剤の結合性やその様式, 結合と酵素活性の阻害との関係, さらに, 化学構造と活性の関係などを明らかにしようとする研究が盛んに行われるようになり, それらは剤と標的酵素の性質や作用機構の解明に大きく貢献している。また, その知見は新規化合物をデザインする上で有力な情報ともなっている。

ここでは, ある除草剤群の酵素への結合とその反応阻害様式の解析を通して, 剤の化学構造と作用の関係を調べてゆく際のプロセスについて解説し, さらに, それらにおいて最近得られた成果のいくつかについて述べてみたい。

1. 標的酵素の性質と阻害様式の解析

除草剤の標的酵素が明らかにされてくる前段階として, まず, 剤の処理によってその標的を

含む代謝系の活性が抑制されることが示される場合が多い。これらは外部から与えた代謝系に特定の前駆物質, 例えば, タンパク合成におけるアミノ酸, 核酸合成におけるヌクレオチド, 脂質合成における酢酸などの各々の合成系への取り組みや, 光合成, 色素の生合成などの速度の抑制で捉えられる。これがいわゆる標的を明らかにしてゆくための生理学的研究である。次の段階においては各々の代謝系を構築する酵素に対する影響が, それが単離された条件下で調べられる (生化学的研究)。その結果として具体的な標的酵素, 例えば, アミノ酸生合成系のアセト乳酸合成酵素 (acetolactate synthase, ALS), クロロフィル合成系のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (Protox), カロチノイド合成系のフィトエンデサチュラーゼ, 脂質合成系のアセチル-CoA カルボキシラーゼなどが最近, 次々と明らかになってきている。

標的酵素が特定されると, 前述のように, その酵素そのものの構造と機能, さらに, 除草剤の化学構造と作用との関係を調べる研究が行われるようになる。まず, 酵素分子の性質の基礎的解析においては, 活性の測定, 生体からの抽出と各種クロマトグラフィーなどによる精製, そして, 物理化学的分析が行われる。一方, 阻害の解析からは, 酵素反応のしくみや基質特異

性,さらには,酵素レベルでの選択性の有無などに関する情報が得られる。除草剤はその代謝阻害剤としての性質から,酵素との関係は阻害機構を中心に研究される場合が多い。

2. 酵素反応の阻害 速度反応論的取り扱い

除草剤も含めて生理活性物質による酵素の阻害は“可逆的阻害”と“不可逆的阻害”に大別される。前者は,物質の結合により酵素が一旦阻害を受けても阻害剤が離れさえすれば活性が回復する場合を,後者は,一旦阻害されるともとは戻らない場合をいう。“不可逆的阻害”は,酵素分子が阻害剤により化学的修飾(変化)を受けてしまっている場合が多く,阻害度は時間依存型となる。しかし,多くの物質による生体内酵素の調節反応は,阻害度が剤の濃度に比例する“可逆阻害”によって行われており,この場合には阻害剤の濃度と反応速度はミカエリス-メンテン(Michaelis-Menten)式で解析できる。

(1) ミカエリス-メンテン式と阻害様式

どのような除草剤が酵素の触媒機能にどの程度,また,どのような様式で阻害するかを解析するにはミカエリス定数(K_m)や最大反応速度(V)などの反応速度論上の指標が用いられる。

さて,酵素反応の基質をS,生成物をPとして,Sの初濃度 $[S_0]$ をいろいろ変化させ,それぞれの濃度における反応速度(P生成またはSの減少速度)を調べ,その初速度(v_0)を求めて $[S_0]$ との関係をグラフにすると図1のようになる。このように酵素が関わる反応系では通常の化学反応とは異なり, $[S_0]$ の小さい領域では v_0 は $[S_0]$ に比例するが, $[S_0]$ が増

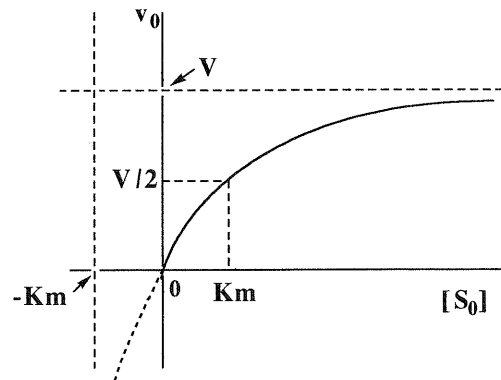
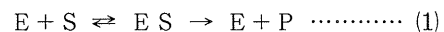


図1. 酵素反応における基質濃度 $[S_0]$ と反応の初速度(v_0)の関係

(V は最大速度, K_m はミカエリス定数)

加すると v_0 は頭打ちとなってある値に漸近してゆく。この漸近値が最大速度(V)である。この現象はMichaelisとMentenによって,酵素(E)と基質(S)が反応時に「酵素-基質複合体」(ES)を形成して,それが生成物(P)と,もとの酵素に解離するという反応概念が導入されることによって理解されるようになった。すなわち,



という模式で示される反応が起こることが酵素反応の特徴である。この式においてEが働ける最大量を超えるSがある場合には,Eが律速となってPの量の増加がおこらない。そこで,それぞれの濃度と, $E + S$ と ES の間, ES と $E + P$ の間の反応速度定数との関係から反応が定常状態,すなわち, $[ES]$ が一定の時について反応速度(v)と, V および S_0 の関係を導いたのがミカエリス-メンテン式(2)である。

$$v = \frac{V [S_0]}{K_m + [S_0]} \dots\dots\dots (2)$$

この式を得る詳しい過程は他の成書^(1,2)を参考にしていただきたい。(2)式において, K_m はミカエリス定数とよばれ,最大速度(V)の $1/2$ で酵素が働く基質濃度である。したがっ

て、 K_m は濃度の次元をもち通常モル濃度(M)で示され、酵素と基質の組合わせに固有の定数ということになる。Sの濃度が K_m に等しい時には、酵素が1回反応を行うとそれと同じ時間だけ休んでいることになる。また、 K_m が小さいということはSが少ししかなくても最大の働きをすることになり、その基質はその酵素によく適合していることを示し、反対に K_m がより大きい場合はそれらの組合わせがあまりよくないことを示している。

(2) 酵素の阻害

除草剤などの阻害剤による酵素の“可逆的阻害”にもいくつかの様式があり、それを調べることで酵素と阻害剤の相互関係に関する情報が得られる。

前述のミカエリスメンテンの模式(1)では、酵素分子の形態は単独(E)の場合と複合体の場合(ES)の2つだけである。したがって阻害物質が酵素と結合する様式はEにのみ結合するか、ESにのみ結合するか、もしくは、それらの双方に結合するかのいずれかということになる。

(a) 拮抗阻害

酵素の活性部位(基質が特異的に結合し、触媒作用を受ける部位)に阻害剤が結合してしまい、真の基質が結合することを妨げることによっておこる。基質と阻害剤が1つの活性部位への結合を競い合うので「競合阻害」ともいう。拮抗阻害剤が存在するとVは変化しないが K_m が増大する。

(b) 非拮抗阻害

このタイプの場合は、阻害剤はEおよびESに結合し、酵素との結合にあたって阻害剤と基質は競合しない。すなわち、阻害剤は活性部位以外のところに結合して、酵素の機能を抑制す

る。したがって、Vが減少して K_m の値は変化しない。「非競合阻害」ともいわれる。

(c) 不拮抗阻害

阻害剤が酵素自身には働かず、ES複合体のみに結合する。「反競合阻害」ともいわれる。この場合は阻害剤が存在するとV、 K_m の値とも低下する。

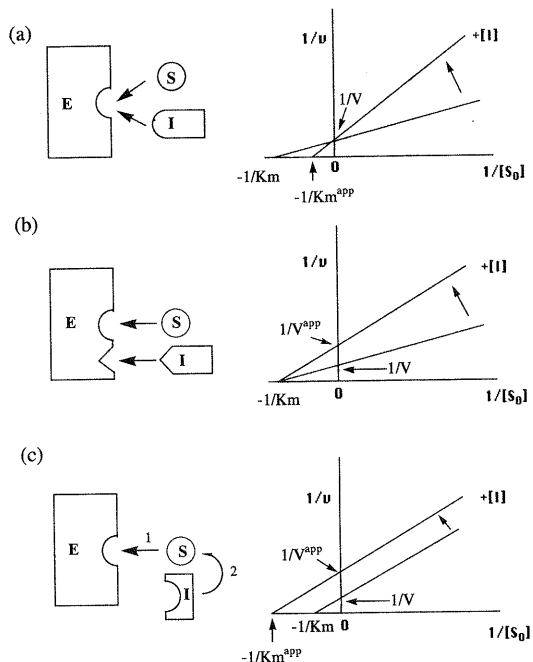


図2. 酵素阻害の結合様式とLineweaver-Burkプロットの形状

a: 拮抗阻害, b: 非拮抗阻害, c: 不拮抗阻害 (阻害剤はE単独では結合せずES複合体にのみ結合する)を示す。(E: 酵素, S: 基質, I: 阻害剤の各分子を示す)

このように阻害の様式は阻害剤が酵素分子のどのような状態と相互作用するかで決まり、また、それによってVや K_m に与える影響も決まってくる。図2にそれぞれの阻害様式における酵素と阻害剤の結合モデルと、様式を解析する時によく用いられるLineweaver-Burkプロット(1/s~1/vプロット)への阻害剤の影響を、表1には様式別にVや K_m への影響をまとめた。

表 1. 酵素の阻害様式と反応速度論上の指標への影響

阻害様式	阻害剤が結合する時の形態	Kmへの影響	Vへの影響	1/v~1/s/pロットの形状
拮抗	E	増大	なし	y軸上で交差
非拮抗	EおよびES	なし	減少	x軸上で交差
不拮抗	ES	減少	減少	平行線

3. 酵素の拮抗剤の構造とデザイン

外来の阻害剤が生体内の受容体としての酵素と反応性（結合性）をもつためには、その化学構造や立体的要素が、酵素の基質や他の調節因子と類似していることが要求される。特に、基質と競合して酵素の活性部位にのみ結合する拮抗阻害剤の場合は、基質と類似した部分を有することが必要とされる。拮抗阻害剤は阻害度が剤の濃度に依存し、かつ、高活性なものが容易にデザインできる可能性がある点から新規剤の開発上特に注目される。

上述したような酵素レベルでの解析の結果、ある阻害剤が標的酵素を拮抗的に阻害することが明らかになった場合には、この阻害剤をリード化合物として化学構造の展開が行われて構造類縁体が多数合成され、より高活性なものをスクリーニングしようとする試みがなされる。この際、標的酵素への影響を簡便に測定するためのアッセイ系が出来ていると、スクリーニングはより効率的に行われる。一方で、合成された物質のうち、化学構造を系統的に変化させた一群のものについて構造と阻害活性の関係を調べる、いわゆる、構造-活性相関（Structure-Activity Relationship）の研究を行うことによって、酵素の活性部位の性質や立体構造に関する知見がもたらされる。さらに、蓄積されたこれらのデータを統計的に取り扱い、よ

り高活性の構造を予測する定量的構造-活性相関（QSAR）の手法も用いられる。これは一群の誘導体について、それぞれの構造上の特徴を疎水的性質、電子的性質、立体的性質、部分構造などの構造記述子（パラメータ）を用いて表現し、さらに、これと活性値との関係を示す重回帰式などの数学モデルを求めて、そこから望ましい化学構造を得ようとするものである。最近ではコンピューターを用いた分子軌道法や分子力場計算が進歩したことにより、さまざまな電子的、立体的特性のパラメータが使用されるようになり、数学モデルの精度も上がってきている。構造-活性相関に関するより具体的な解説は紙面の都合で別の機会にゆずることとする。

4. 除草剤と酵素との結合の様相 — 最近の スースタディーから —

最近になって作用点（標的酵素）が明らかにされた剤の中から、ここではProtoxとALSの阻害剤において行われた、阻害様式や構造-活性相関に関する研究について紹介する。

(1) Protoxの阻害様式と阻害剤の構造

ジフェニルエーテル、環状イミド、オキサジアゾールなどの基本構造を有する除草剤は、クロロフィルやヘムの合成を行うポルフィリン合成系の酵素であるProtoxに結合してこの働きを抑制する⁽³⁾。その結果、酵素に利用されなくなった基質のプロトポルフィリノーゲン（Protogen）が蓄積し、さらに、これが細胞内で酸化されプロトポルフィリン（Proto）となる。Protoは強い光増感作用を示す物質で、光と酸素の存在下で毒性の酸素分子（活性酸素）を生成し、膜を過酸化して細胞を死に至らしめる⁽⁴⁾。

上記の除草剤による Protox の阻害は可逆的であり、基質の Protogen に対して拮抗的であることが示されている⁽⁵⁾。このことからこれらの剤は Protogen と類似した構造を有するものと推定された。Dukeらのグループ⁽⁶⁾は、X線構造解析のデータからコンピューターを用いて推定した、ジフェニルエーテル系除草剤アシフルオルフェン (AF) の分子構造とコンホメーションを、Proto の X線構造解析のデータから推定した Protogen のコンホメーションと比較した。その結果、AF は Protogen 分子と同じ広がりや半分の幅を有しており、AF の酸素原子を介した2つのフェニル環のねじれ角は、Protogen の b, c 環間のメチレン架橋におけるそれと一致していることが明らかとなった。また、双方の静電ポテンシャルの分布パターンもよく似ていることが示された。このことからジフェニルエーテル系除草剤の立体構造は、その標的である Protox の基質である Protogen 分子の半分と非常に類似した性質を有しているものと考えられる (第3図)。さらに、彼らは24種のジフェニルエーテルを用いて構造-活性相関を調べ、剤の疎水性の程度と静電ポテンシャル、および置換基の部分

構造が Protox の阻害度の決定に重要な要因となっていることを明らかにした⁽⁶⁾。また最近では、分子軌道法を利用した解析もなされている⁽⁷⁾。

(2) ALS の阻害様式

スルフォニルウレア系、イミダゾリノン系、そして、より最近開発されたスルホンアミド系やピリミジニルサルチル酸系の除草剤は、いずれも分岐鎖アミノ酸合成経路の初期過程の酵素である ALS を標的とする。この合成系は葉緑体に存在し、ALS が阻害されるとバリン、ロイシン、イソロイシンの合成が停止し、ひいてはこれらを必要とする代謝系が抑制されて細胞死につながるものと推定される。ALS 阻害剤はイミダゾリノン系を除いて、本来の基質であるピルビン酸に対して拮抗と非拮抗の混合型の阻害様式を示す。これに対してイミダゾリノン系剤は不拮抗型を示し、上記の他の3つの系の剤とは少しずれた位置に結合しているものと推定される⁽⁸⁾。また、ALS 阻害時の結合位置は、活性部位でも、生成物である分岐鎖アミノ酸が結合してフィードバック調節を行う制御部位でもないと考えられている⁽⁹⁾。

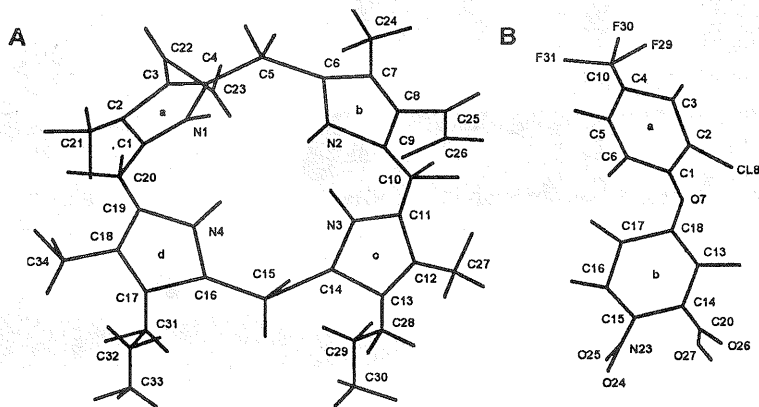


図3. Protogen (A) とアシフルオルフェン分子 (B) の立体構造

(Nandihalli, U. B. *et al.*: J. Agric. Food Chem. 40, 1193 (1992)より引用)

おわりに

本稿では剤の作用と化学構造の関係を調べるために行われる一連の研究の中から、標的酵素への結合様式の解析法と、そこから得られる情報について、要点のみをとりまとめた。この周辺の研究は日々進展していて、専門以外の方にはなじみにくい分野かもしれないが、本稿が読者の役に立つ場面があれば幸いである。

引用文献

- 1) 大西正健(1987) “酵素反応速度論実験入門”, 学会出版センター.
- 2) 杉山達夫(1981) “農薬実験法3. 除草剤編”, 深見, 上杉, 石塚, 富沢編, ソフトサイエンス, p. 398~411.
- 3) 松本 宏(1990) 雑草研究 35, 1~12.
- 4) 松本 宏, 臼井健二(1994) 化学と生物 32, 447~455.
- 5) Varsano, R., M. Matringe, N. Magnin, R. Mornet and R. Scalla (1990) FEBS Letters 272, 106~108.
- 6) Nandihalli, U. B., M. V. Duke and S. O. Duke (1992) Pestic. Biochem. Physiol. 43, 193~211.
- 7) Akagi, T. and N. Sakashita (1993) Z. Naturforsch. 48c, 345~349.
- 8) 清水 力(1993) 関東雑草研究会報 4, 11~27.
- 9) Schloss, J. V., L. M. Ciskanit and D. E. Van Dyk (1988) Nature 331, 360~362.

1キロ

軽量で省力 1キロ粒剤新発売!

水田雑草の除草に

ゴルボ1キロ粒剤 $\frac{51}{75}$

- 10アール当り1kgの散布で安定した除草効果を示します。
- 広範囲の雑草を同時に防除できる水田の総合除草剤です。
- 除草効果が強く、長期間雑草の発生を抑えます。
- 水稲に対する安全性の高い除草剤です。
- 環境に対する影響が少ない除草剤です。

1. 軽いので散布作業が楽になります。
2. 小さいので持ち運びもやすく、保管スペースの節約ができます。
3. 同じ薬量で従来の3倍の面積に散布できるため、詰め替え回数が少なくて済みます。
4. 少量化により資源の有効利用が可能になりました。



少量化で省力化。



農業は正しく使いましょう。

ゴルボ普及会

武田薬品工業株式会社・デュボン株式会社・日本チバガイギー株式会社