

ミニレビュー

VLCFAE 阻害型除草剤の標的酵素阻害に関する新しい知見[#]

種谷良貴*, 藤岡智則, 角 康一郎, 清水 力

クミアイ化学工業(株) 生物科学研究所

(2011年8月16日受理)

Keywords: VLCFA, VLCFAE, fenoxasulfone, pyroxasulfone, inhibition manner, inhibition mechanism.

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, VLCFAE) は植物クチクラのワックス層や細胞膜のフィンゴ脂質の主成分である超長鎖脂肪酸 (VLCFA) 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。すなわち VLCFAE は C16 または C18 の脂肪酸の炭素を 2 つずつ伸長する酵素である (Fig. 1)。この VLCFA の生合成反応には 4 つの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 (Fig. 2)²⁾。VLCFAE が触媒する反応が VLCFA 合成の律速段階となっており、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。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り、少なくとも 6 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⁾。1993 年から 2000 年頃までの研究により、クロロアセトアミド系除草剤の作用点が VLCFAE であることが証明され⁴⁻⁸⁾、その後作用点が未知であった水田用除草剤の多くが、後になって VLCFAE を作用点とすることがわかってきた。

2. VLCFAE 阻害型除草剤

メトラクロール^{2,6,8-10)} やメタザクロール^{1,4,6-8,10,11)} のようなクロロアセトアミド系、メフェナセット^{2,6,8)} のようなオキシアセトアミド系、フェントラザミド^{2,3)} のようなテトラゾリノン系、カフェンストロール^{2,3,6,8)} のようなトリアゾー

ル系、インダノファン^{12,13)} 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スルホニルイソキサゾリン系 (Fig. 3)¹⁴⁻¹⁶⁾ など異なったタイプの除草剤が VLCFAE を主作用点としている。クロロアセトアミド系化合物はアメリカにおいてトウモロコシ用の土壌処理型除草剤として 1950 年代から使用されている。1956 年にアリドクロール³⁾、1964 年にプロパクロール、1969 年にアラクロール^{2,5,6,8)} が畑作用除草剤として開発され、これらに続いて、1974 年にブタクロール^{6,8)} が最初の水稲用除草剤として、1976 年にメトラクロールが畑作用除草剤として登録された。そして 1980 年以降も本タイプの薬剤が多く開発されてきた^{2,9)}。一方、1980 年代後半にはクロロアセトアミド系以外のタイプに属する水稲用の VLCFAE 阻害型除草剤が開発された。1987 年にメフェナセット、1996 年にカフェンストロール、1999 年にインダノファン、2000 年にフェントラザミドが開発されており、処理薬量もブタクロールに比べてかなり低くなった。また、この間にクロロアセトアミド系化合物のプレチラクロール²⁾ が 1988 年に水稲用除草剤として開発され、現在水稲用除草剤としてフェノキサスルホンの開発が進められている。一方、畑作用の VLCFAE 阻害型除草剤の低薬量化は難しかったが、現在開発が進められているピロキサスルホンは 100-250 g a.i./ha の低薬量で優れた除草効果を示す^{17,18)}。

3. スルホニルイソキサゾリン系タイプの VLCFAE 阻害型除草剤

スルホニルイソキサゾリン系タイプのフェノキサスルホンは、タイヌビエやコナギ、アゼナ類ならびにタマガヤツリなどの一年生雑草に効果が高い。また、葉齢の進んだ生育期雑草にも効果を有している¹⁹⁾。本剤はこれら主要雑草に対する効果持続性に優れるが、その理由は低い水溶解度にあると考えられ、薬剤処理後に未溶解で存在していた有効成分の一部が、水変動などで田面水中の成分濃度が下

[#] 第 36 回大会シンポジウムを取りまとめた解説

* 〒436-0011 静岡県掛川市満水 276

E-mail: y-tanetani@kumiai-chem.co.jp

©Pesticide Science Society of Japan

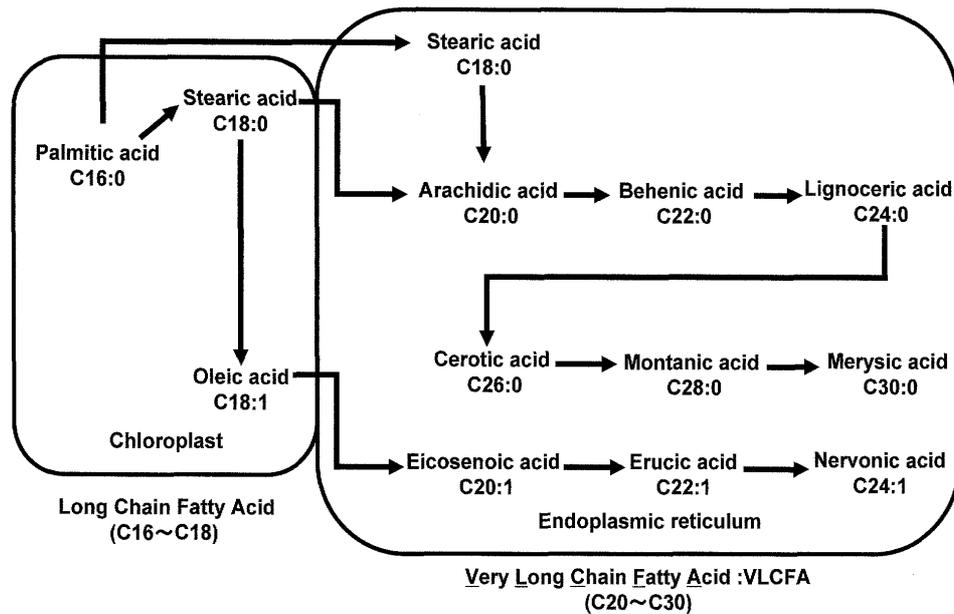


Fig. 1. Biosynthetic pathway of very-long-chain fatty acids in plants.

がった場合に溶解することで、有効成分濃度の減衰を緩やかにするものと考えられる。この特性は、水田系外への薬剤流亡を抑え、環境負荷を低減させる点で注目される。また同タイプのピロキサスルホンはトウモロコシ、ダイズ用の土壌処理剤であるが、ムギ類にも選択性を有しており、幅広い作物適用性を持っている。本剤はエノコログサやメヒシバ、ヒエ、ナルコビエ、セイバンモロコシなど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、イチビなど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 である^{17,18)}。ムギ栽培においては、ACCase 阻害型除草剤やジニトロアニリン系除草剤に抵抗性

を獲得しているブラックグラスやライグラス類といった草種に効果が高い。次章より、フェノキサスルホンとピロキサスルホンの作用機構研究の結果について説明する。

4. フェノキサスルホンおよびピロキサスルホンの VLCFA 生合成阻害

食用ヒエ培養細胞の増殖に及ぼすフェノキサスルホンの影響を食用ヒエ茎葉部の生育に及ぼす影響と比較したところ、培養細胞の増殖に及ぼす影響は茎葉部への影響に比べて弱いことが判明した。ワックス層が発達していない培養細胞の場合には、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て、VLCFA の

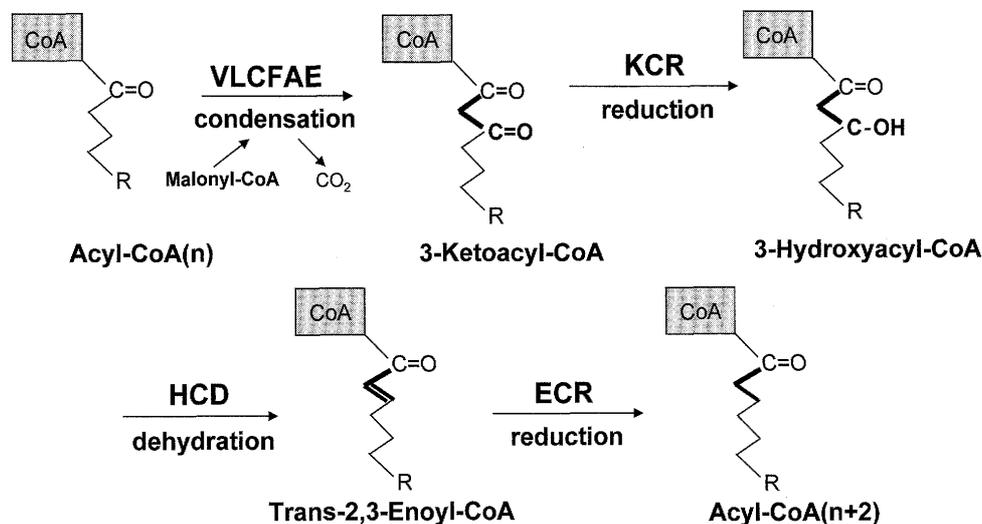


Fig. 2. Reaction mechanisms of very-long-chain fatty acid biosynthesis. KCR: 3-Ketoacyl-CoA-Reductase. HCD: 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratase. ECR: Trans-2,3-Enoyl-CoA-Reductase.

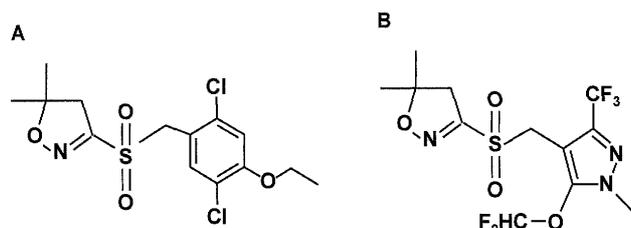


Fig. 3. Chemical structures of fenoxasulfone and pyroxasulfone. A, fenoxasulfone (code name, KIH-1419). B, pyroxasulfone (code name, KIH-485).

前駆体が蓄積してくると考えられることから、莖葉部の伸長を強く阻害するが、培養細胞の増殖阻害は弱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。すなわち、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* 合成に及ぼすフェノキサスルホンの影響を解析できると考えられた。そこで、フェノキサスルホンを含む液体培地で培養した食用ヒエ培養細胞中の脂肪酸含有量を調べた。その結果、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 が減少しているのに対して、炭素数 18 以下の VLCFA 前駆体が蓄積していることが示され、本剤は VLCFA の生合成を阻害することが明らかとなった (Table 1)¹⁴⁾。VLCFA 前駆体の中では、炭素数

が 15 のペンタデカン酸の蓄積が顕著であった。同様にピロキサスルホンを処理したイネ培養細胞でも炭素数 20 以上の VLCFA が顕著に減少したのに対して、炭素数 18 以下の VLCFA 前駆体が蓄積した¹⁶⁾。

5. フェノキサスルホンおよびピロキサスルホンの VLCFAE 阻害

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 活性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 および 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明した (Fig. 4A)。また、C24:0→C26:0 の伸長反応に対するフェノキサスルホンの阻害活性を、酵素と薬剤のプレインキュベーション時間を変えて調べた結果、VLCFAE 阻害活性は、薬剤と酵素のプ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 (Fig. 4B)¹⁶⁾。一方、イネおよびネズミギから調製したマイクロソーム画分に存在する VLCFAE 活性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 並びに 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。また、各種植物から調製した植物 VLCFAE の C24:0→C26:0 の伸長反応に対するピロキサスルホンの阻害活性を、酵素と薬剤のプレインキュベーション時間を変えて調べた結果、いずれの植物においても、VLCFAE 阻害活性は、薬剤と酵素のプ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^{14,15)}。したがって、フェノキサスルホンおよびピロキサスルホンは可逆的に VLCFAE を阻害すると判断された。

ところで、酵素として用いた食用ヒエやイネのマイクロソーム画分の中には、シロイヌナズナの場合と同様に多種類の VLCFAE が存在していると考えられるので、マイクロソーム画分を用いた VLCFAE の阻害試験では、複数の分子種の VLCFAE 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、以下に述べる方法によって、単一の VLCFAE に対する阻害を調べた。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 候補タンパク質を検索したところ、Uniplot ID で表される 14 個のタンパク質がヒットした。これらの中で Q6F365 タンパク質の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、当社のイネの形質転換技術を利用して、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もつ pSTARA R-4 ベクターにカルス特定のプロモーター²⁰⁾ でドライブした Q6F365 タンパク質をコードする遺伝子を組み込み、本ベク

Table 1. Fatty acid contents in barnyard millet cultured cells

Fatty acid	Content ($\mu\text{g/g}$ fresh weight) ^{a)}			
	Fenoxasulfone			
	0	10^{-7}M	10^{-6}M	10^{-5}M
C14:0	24.6±2.58	25.2±6.15	23.4±4.28	30.3±10.8
C15:0	9.35±1.41	12.6±2.85	32.1±4.59	57.6±9.05
C16:0	810±84.8	765±63.6	820±42.2	743±98.8
C16:1	28.4±4.95	33.0±10.3	32.1±10.3	25.7±9.24
C18:0	17.0±1.75	15.2±2.49	18.5±4.17	29.0±5.21
C18:1	267±35.0	256±29.1	300±28.7	292±46.0
C18:2	1490±138	1470±118	1570±180	1720±157
C18:3	104±9.24	109±12.3	131±12.7	132±23.7
C20:0	43.3±2.28	40.0±3.46	35.8±4.72	15.2±2.36
C20:1	3.75±0.97	2.70±0.86	1.98±0.30	1.58±0.36
C22:0	27.1±3.77	24.4±3.43	20.8±3.19	9.14±1.78
C22:1	n.d. ^{b)}	n.d.	n.d.	n.d.
C24:0	75.8±9.31	52.5±9.91	32.8±5.79	18.9±3.06
C24:1	14.3±2.79	15.6±2.30	11.8±3.32	9.51±2.62
C26:0	22.0±3.52	15.4±4.34	7.55±1.06	7.30±1.03

^{a)} Each datum was expressed as the mean±SD of six independent experiments. ^{b)} Not detected.

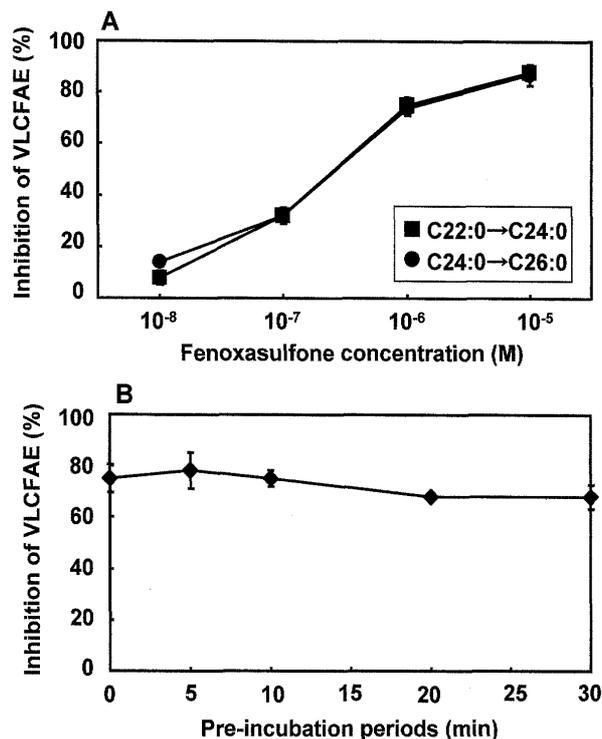


Fig. 4. Inhibitory effect of fenoxasulfone on VLCFAE activities in etiolated barnyard millet seedlings. A, Inhibitions of VLCFAEs in barnyard millet under the condition of 10 min pre-incubation of microsomal fractions with fenoxasulfone were shown. VLCFAE activities, which catalyze the elongation steps from C22:0 to C24:0 and C24:0 to C26:0, were 3.5 and 3.0 pmol/30 min/20 μ L suspensions, respectively. B, Inhibitions of VLCFAEs in barnyard millet by 10^{-6} M of fenoxasulfone were shown. The VLCFAE activity, which catalyzes the elongation step from C24:0 to C26:0, was 1.0 pmol/30 min/20 μ L suspensions. Each data set was expressed as the mean \pm SD for four independent experiments.

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および VLCFAE 活性が高まっていることならびに VLCFA の含量が増えていることを確認した。この結果から、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 活性になると判断されたことから、この系を用いて Q6F365 の VLCFAE 活性 (C18:0→C20:0 および C20:0→C22:0 の伸長反応) 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 活性を比較的低濃度で阻害することが明らかとなった。また、植物から直接調製した VLCFAE の場合と同様に、酵素阻害活性に及ぼす薬剤と酵素のプレインキュベーション時間の影響を調べたところ、酵素阻害活性はプ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。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していることが示唆された¹⁵⁾。

6. 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^{2,8,10,11)}。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、すなわ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^{2,8,10)}。したがって、クロロアセトアミド系除草剤は VLCFAE を不可逆的に阻害すると考えられているとともに、この考えが他のタイプの VLCFAE 阻害型除草剤にも適用されている。

しかしながら、西洋ネギを材料としたクロロアセトアミド系除草剤の場合とは異なり、フェノキサスルホンおよびピロキサスルホンは VLCFAE を可逆的に阻害することが上述のように明らかとなった。そして、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も、ほかの植物を使った場合には可逆的阻害の結果が得られること²¹⁾ を併せて考察すると、VLCFAE 阻害型除草剤の酵素阻害は基本的には可逆的であり、不可逆的に見える阻害はスローバインディング阻害である可能性が考えられる。今後、クロロアセトアミド系除草剤の VLCFAE 阻害をさらに詳しく調べるとともに、フェノキサスルホンやピロキサスルホンと VLCFAE の結合をバインディングアッセイ等で解析することにより、VLCFAE 阻害型除草剤の酵素阻害メカニズムがさらに明瞭になるものと考えられ、これらの知見は新規 VLCFAE 阻害型除草剤の研究開発に役立つものと考えられる。

引用文献

- 1) B. Matthes and P. Böger: *Z. Naturforsch.* **57c**, 843–852 (2002).
- 2) P. Böger: *J. Pestic. Sci.* **28**, 324–329 (2003).
- 3) S. Trenkamp, W. Martin and K. Tietjen: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 11903–11908 (2004).
- 4) M. Couderchet, J. Schmalfuß and P. Böger: *Pestic. Biochem. Physiol.* **55**, 189–199 (1996).
- 5) M. Couderchet, P. Bocion, R. Chollet, K. Seckinger and P. Böger: *Pestic. Sci.* **50**, 221–227 (1997).
- 6) M. Couderchet, J. Schmalfuß and P. Böger: *Pestic. Sci.* **52**, 381–387 (1998).
- 7) J. Schmalfuß, B. Matthes, P. Mayer and P. Böger: *Z. Naturforsch.* **53c**, 995–1003 (1998).
- 8) P. Böger, B. Matthes and J. Schmalfuß: *Pestic. Manage. Sci.* **56**, 497–508 (2000).
- 9) H. Takahashi, A. Ohki, S. Kato, A. Tanaka, Y. Sato, B. Matthes,

- P. Böger and K. Wakabayashi: *Pestic. Biochem. Physiol.* **71**, 140-146 (2001).
- 10) J. Schmalfuß, B. Matthes, K. Knuth and P. Böger: *Pestic. Biochem. Physiol.* **67**, 25-35 (2000).
- 11) C. Eckermann, B. Matthes, M. Nimtz, V. Reiser, B. Lederer, P. Böger and J. Schröder: *Phytochemistry* **64**, 1045-1054 (2003).
- 12) H. Takahashi, J. Schmalfuß, A. Ohki, A. Hosokawa, A. Tanaka, Y. Sato, B. Matthes, P. Böger and K. Wakabayashi: *Z. Naturforsch.* **57c**, 72-74 (2002).
- 13) S. Kato, A. Tanaka, H. Watanabe, Y. Sato, Y. Ikeda, P. Böger and K. Wakabayashi: *J. Pestic. Sci.*, **30**, 7-10 (2005).
- 14) Y. Tanetani, K. Kaku, K. Kawai, T. Fujioka and T. Shimizu: *Pestic. Biochem. Physiol.* **95**, 47-55 (2009).
- 15) Y. Tanetani, T. Fujioka, K. Kaku and T. Shimizu: *J. Pestic. Sci.* **36**, 221-228 (2011).
- 16) Y. Tanetani, T. Fujioka, J. Horita, K. Kaku and T. Shimizu: *J. Pestic. Sci.* **36**, 357-362 (2011).
- 17) S. Knezevic, A. Datta, J. Scott and P. Porpiglia: *Weed Technol.* **23**, 34-39 (2009).
- 18) M. Walsh, T. Fowler, B. Crowe, T. Ambe and S. Powles: *Weed Technol.* **25**, 30-37 (2011).
- 19) 高橋優樹, 藤波 周, 花井 涼, 伊藤 稔, 中谷昌央: 日本農薬学会第35回記念大会要旨集, p. 52, 2010.
- 20) H. Otsuki and M. Ohshima: (National Institute of Crop Science): US Patent 0223438 (2005).
- 21) 種谷良貴ら: 未発表データ.

略 歴

種谷良貴 (たねたに よしたか)

生年月日: 1979年8月13日

最終学歴: 東京工業大学大学院生命理工学研究科修士課程

趣 味: フットサル

藤岡智則 (ふじおか ともり)

生年月日: 1978年7月13日

最終学歴: 東北大学大学院農学研究科博士課程 (博士, 農学)

趣 味: 弓道

角 康一郎 (かく こういちろう)

生年月日: 1957年12月13日

最終学歴: 北海道大学大学院農学研究科修士課程

趣 味: 映画鑑賞

清水 力 (しみず つとむ)

生年月日: 1957年6月27日

最終学歴: 名古屋大学大学院農学研究科修士課程 (博士, 農学)

趣 味: テニス