

特異的標的酵素を阻害する除草剤  
および農業用殺菌剤の作用機構研究

清水 力



報告番号	乙第・ 4818 号
------	------------



①

特異的標的酵素を阻害する除草剤

および

農業用殺菌剤の作用機構研究

1995年

清水 力



## 目次

緒論	1
第1章 PC除草剤の作用機構	
緒言	8
第1節 PC除草剤のターゲットの特定	
1. 序	23
2. 実験材料および方法	24
3. 実験結果	28
4. 考察	30
第2節 PC除草剤の各種植物およびバクテリアアセト乳酸合成酵素阻害	
1. 序	38
2. 実験材料および方法	39
3. 実験結果	41
4. 考察	44
第3節 エンドウ黄化幼植物アセト乳酸合成酵素の部分精製と性質検討ならびにバクテリアアセト乳酸合成酵素との性質比較	
1. 序	52
2. 実験材料および方法	54
3. 実験結果	57
4. 考察	61
第4節 PC除草剤のアセト乳酸合成酵素阻害の動的解析	
1. 序	90
2. 実験材料および方法	92
3. 実験結果	95
4. 考察	98



第5節	P C 除草剤とアセト乳酸合成酵素の相互作用	
1. 序		114
2. 実験材料および方法		115
3. 実験結果		117
4. 考察		118
第6節	P C 除草剤の活性本体の解析	
1. 序		121
2. 実験材料および方法		122
3. 実験結果		124
4. 考察		125
第7節	P C 除草剤の作物雑草間選択性解析のための各種植物複合酸化酵素系の性質検討	
1. 序		132
2. 実験材料および方法		133
3. 実験結果		136
4. 考察		138
第2章	殺菌剤mepronilの作用機構	
緒言		147
1. 実験材料および方法		148
2. 実験結果		151
3. 考察		154
要約と総合考察		169
引用文献		173
謝辞		181



## 略語

- P C 除草剤, ピリミジニルカルボキシ除草剤 (Pyrimidinyl Carboxy Herbicide)
- S D H, コハク酸脱水素酵素 (succinate dehydrogenase)
- T T A, テノイルトリフルオロアセトン (thenoyltrifluoroacetone)
- B S A, ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin)
- D C P I P, ジクロロフェノールインドフェノール  
(dichlorophenolindophenol)
- P M S, フェナジンメトサルフェート (phenazinemethosulfate)
- N A D H / N A D, ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (還元型/酸化型)  
(nicotine amide adenine dinucleotide (reduced/oxidized))
- I 50, 阻害 50% 濃度 (the concentration required for 50 % inhibition)
- S U, スルホニルウレア (sulfonyleurea)
- I M I, イミダゾリノン (imidazolinone)
- A L S, アセト乳酸合成酵素 (acetolactate synthase)
- T P, トリアゾロピリミジン (triazolopyrimidine)
- T P P, チアミンピロリン酸 (thiamine pyrophosphate)
- F A D, フラビンアデニンジヌクレオチド (flavin adenine dinucleotide)
- K A R I, ケトール酸レダクトイソメラーゼ (ketol-acid reductoisomerase)
- P E T, 光合成電子伝達系 (photosynthetic electron transport system)
- P r o t o x, プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protoporphyrinogen oxidase)
- D T T, ジチオスレイトール (dithiothreitol)
- E D T A, エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetate)
- P V P P, ポリビニルポリピロリドン (polyvinylpolypyrrolidone)
- D E A E, ジエチルアミノエチル (diethylaminoethyl)
- N A D P H / N A D P, ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸  
(酸化型/還元型) (nicotine amide adenine dinucleotide phosphate  
(reduced/oxidized))



## 緒論

現在販売されている農薬は、種々な安全性評価試験に耐えてきたものであり、その安全性は極めて高いとの農薬関係者からの反論にもかかわらず、世間一般の農薬に対する不信感はまだに払拭されていない。それどころか年々強くなっているように感じられる。1960年代に端を発するこの農薬に対する不信感、飽食時代の熟成とともに今後も減速するとは考えにくい状況にある。1962年に発表されたカーソン博士の「Silent Spring (沈黙の春)」(1)はこの農薬不信の出発点となった書物であるが、これを受けて記された水野肇氏の「農薬亡国論」(2)や有吉佐和子氏の「複合汚染」(3)は、国民の不信感を客観的にあるいは主観的に代弁する書物となっている。1971年には農薬取締法が改正され、安全性を追求する厳しい法規に従い、問題農薬が除々に排除されてきた結果、現在ではこれらの著作の大部分が妥当性を欠くようになっている。しかしながら、著作の底流を流れる批判精神は、現在でも十分なインパクトを有している。また、河野修一氏の指摘(4)のように、たとえ法規をクリアーした農薬であっても、誤った方法で使用されていれば安全性が保証されない場合があるというのは、医薬の場合と同様に否定できない事実である。これは、換言すれば、作物残留の観点からは安全であったとしても、農薬を大量に使用する農作物の生産者にとっては、依然として農薬は危険な場合があることを意味している。例えば、この観点から問題となる薬剤の一例としては、paraquatという除草剤成分が挙げられる。この薬剤は毒物相当の化合物であるが、優れた殺草効果を有するが故に、他剤との混合剤という形で未だに市販されている(事故防止として従来品よりも希釈されている)。また、除草剤といえども、ガンのような晩発的な影響が危惧される薬剤も存在する。最近のものでは水田で使用するchlornitrofen (CNP)がその代表例であり、確定的とは言えないが、一部の地域で多発している胆嚢ガンの原因物質となっている可能性が疫学調査により指摘されている(5)。従って、国民の農薬不信は、マスコミがデマゴーグとなって作り上げた農薬に対する感情的な無理解から形成されたと言って簡単に片づけることができない要素を含んでいるものと考えられる。これらの点に関しては、農薬関係者も冷静に受け止める必要があるように思われる。

翻って、農薬の農業資材としての有効性も正当に評価すべきであることは大いに主張されるべきである。日本植物防疫協会による「農薬を使用しないで栽培した場合の病虫害の被害に関する調査報告」(6)によると、農薬を使用しないで栽培した場合には、水稻、小麦、大豆で約30%、キャベツやきゅうりで約60%、りんごやももに至ってはほぼ100%の収穫減が認められており、無農薬栽培が如何に甚大な被害をもたらすかが明確になっている。除草剤について述べれば、この薬剤が収穫維持に必須である過酷で非生産的な除草作業から農作物生産者を解放し、農作業の効率化に役だっていることもまぎれもない事実である(7)。即



ち、農薬にとって代わることでできる作物保護の有効な方法が開発されない限り、今後も農薬は農業技術にとって必要不可欠な資材であり続けることに疑いの余地はないものと考えられる。飽食の時代は農薬に代表される農業技術によって支えられていることを、毒性問題と環境問題を見据えながらも、十分に認識する必要があるように思われる。

では、このような農薬の善悪の両面を認めた上で、理想とされる農薬とはどのようなものであろうか。それは、手短かに表現すれば、既存の薬剤より選択毒性が高く、低濃度で持続的な効果を発揮して、その後、速やかに分解される薬剤である。さらに突き詰めれば、作物残留や土壌残留をクリアするにとどまらず、農薬の生産者と使用者が万が一に大量に摂取しても十分な安全性が保証される薬剤ということになる。より安全な農薬の開発という発想は、農薬批判だけがクローズアップされた「Silent Spring」においても将来の方向性の一つとして既に指摘されているところである。医薬は薬であるが、農薬は毒であるという短絡的な思考からすれば、安全な農薬の創製は夢物語であるが、農薬関連科学の発展はこれを現実のものとするところまで進歩してきている。医薬は人間に対して生理活性を有するものであるから、使用方法を誤れば毒に変わるとの認識は世間一般に受け入れられているように見えるが、一方、毒としてしか認識されていない農薬が人間や環境に対して無害な植物薬に変貌しつつある現状はほとんど受け入れられていないように思われる。人間とは生理的に大きく異なる雑草および植物病原菌ならびに害虫に対する生理活性物質である農薬が、人間を含めたほ乳動物との間に、医薬よりも高い選択毒性を有する可能性があることは科学的根拠に支えられた真理であろう。

それでは、このような背景を踏まえて、現在までに明らかにされた除草剤と農業用殺菌剤のターゲットに関して簡単に説明し、その後、本論文が研究対象とした除草剤と殺菌剤のプロフィールと本論文の目的を述べたい。

除草剤のターゲットとそれを阻害する薬剤は次のようにまとめられる。

(1) 植物ホルモン作用攪乱：2,4-DやMCPA等のアリルオキシ脂肪酸系薬剤が代表化合物である。これらの化合物は薬剤自体がオーキシシン活性を有しており、アゴニストとして作用することでオーキシシンの作用を攪乱する。一方、オーキシシンのアンタゴニストとして作用するものとしてはchlorflurenol等のモルファクチン類がある。また除草剤としても使用できる植物生育調節剤のmefluidideやpaclobutrazoleはジベレリンの生合成阻害剤であることが明らかにされている(8)。

(2) 光合成電子伝達系阻害：このタイプの代表的なものとしてはatrazineに代表されるトリアジン系薬剤やdiuron (DCMU)に代表されるフェニルウレア系薬剤ならびにdinosebに代表されるフェノール系薬剤を挙げることができる。これらの薬剤は光化学系IIの第1の電子受容体プラストキノンQAから第2の受容体QBへの電子の流れを特異的に阻害する。これらは分子量32 k dのD1タンパク質に結合し、QBと拮抗することで電子の流れを遮断することが明らかにされてい



る。薬剤結合部位に関しても光合成細菌の反応中心の構造データを利用することでその詳細が明らかにされており、また抵抗性植物の薬剤感受性の相違から、3タイプの薬剤の結合部位が微妙に異なることも示唆されている(9)。(3) 微小管重合阻害(有糸分裂阻害)：これを主作用とする薬剤としては、ジニトロアニリン系薬剤のtrifluralinやカーバメート系除草剤のprophamが挙げられる。これらの薬剤はbenomyl等の殺菌剤と同様に微小管の重合および微小管の正常な配列を妨げることが知られている(10)。(4) 脂質合成阻害：脂質生合成阻害剤としては脂肪酸生合成経路上のアセチルCoAカルボキシラーゼ(ACCase)を標的酵素とするアリルオキシフェノキシプロピオン酸系薬剤とシクロヘキサジオン系薬剤がある(11)。前者の代表はdichlorofop-methyl、後者の代表はalloxydimである。これらの薬剤はイネ科植物のACCaseを特異的に阻害するが、その理由はイネ科植物のクロロプラストに局在するACCaseが広葉植物とは相違していることで説明できる(12)。(5) クロロフィル生合成阻害：これをターゲットする薬剤の代表は、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(Protox)阻害剤のacifluorfen等のジフェニルエーテル系薬剤やS-23142等の環状イミド系薬剤である(13)。これらの薬剤は、作用発現には光が必要であることから、光要求型除草剤とも呼ばれている。なお、筆者はダイズに選択性を示す除草剤のfluthiacet-methyl(環状イミド型薬剤のアナログ)が強力なProtox阻害剤であることを明らかにした(14)。(6) カロチノイド生合成阻害：このタイプの薬剤の代表はnorflurazonであり、カロテノイド生合成経路上のフィトエンデサチュラーゼをターゲットとする(15)。(7) アミノ酸生合成阻害：この系統の除草剤は3つのタイプに分類することができる。一つは、分岐鎖アミノ酸(ロイシン、バリン、イソロイシン)生合成経路上のアセト乳酸合成酵素(acetolactate synthase、以下ALSと略記)をターゲットするスルホニルウレア系やイミダゾリノン系の除草剤(16)、他はグルタミン合成酵素をターゲットとするglufosinateやbialaphosならびに芳香族アミノ酸生合成経路上の5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素をターゲットするglyphosateである(17)。(8) ラジカル生成：このタイプの代表的除草剤はビピリジウム系薬剤のparaquatである(18)。この薬剤は光合成電子伝達系から電子を奪い、自らが還元されることで脂質を過酸化する能力を獲得する。

次に、殺菌剤のターゲットと、それを阻害する薬剤は次のようにまとめられる。

(1) SH基阻害：captan、TPN、fluoroimide等の脱離基を有したアルキル化剤が代表的薬剤である(19-21)。非特異的阻害剤であるため、防除対象の植物病原菌がこれらの薬剤に対して抵抗性を獲得しにくいというメリットを有している。なお、筆者は、市販には至らなかった薬剤であるが、リンゴ斑点落葉病菌に高い効果を示す殺菌剤KIA-6842(22)のSH基阻害を中心とした作用機構について報告した(23)。(2) コハク酸脱水素酵素阻害：これをターゲットとすることが最初に証明されたのはcarboxin等のオキサチン系薬剤であり(24)、担子菌類に対し



て高い効果を有する。種間により酵素の薬剤感受性が相違することが明らかになっている。(3) 脱共役剤: fluazinamが代表的薬剤である。脱共役剤は生物全般に高い毒性を有すると考えられるが、fluazinamの場合には速やかに分解される(グルタチオン等のSH化合物との反応)ことが、ほ乳動物に対する低毒性の要因となっていることが明らかにされている(25)。(4) チトクロムbc<sub>1</sub>複合体阻害剤: ICIA-5504等の $\beta$ -メトキシアクリル酸系殺菌剤が呼吸鎖電子伝達系のチトクロムbからc<sub>1</sub>への電子の流れを阻害することが明らかにされている(26)。

(5) タンパク質生合成阻害: これは比較的早くから解明されたターゲットであり、農業用殺菌剤として使用されているのはmildiomycineやblasticidin等の微生物生産物である(27,28)。(6) RNA生合成阻害: metaraxyl等のフェニルアミド系薬剤はリボゾームRNAの生合成を特異的に阻害する(29)。(7) リン脂質生合成阻害: IBPやEDDP等の有機リン系殺菌剤が代表である。ターゲットはフォスファチジルコリン生合成に関与するホスホリピッドN-メチルトランスフェラーゼと考えられているが(30,31)、細胞壁成分であるキチンの生合成にも直接的に作用することが示されている(32)。(8) エルゴステロール生合成阻害: このタイプの阻害剤で実用化されているものは、24-メチレンジヒドロラノステロールの14位炭素の酸化的脱メチル化阻害剤(DM剤)であるアゾール系化合物とステロールの異性化(8位から7位への2重結合の移動)および14位炭素の還元反応を阻害するモルホリンおよびピペリジンタイプの薬剤である(33)。前者の脱メチル化反応はmixed function oxidase(以下mfoと略記)により触媒されており、DM剤は、薬剤が有する窒素原子の孤立電子対がP-450中のヘムと結合することによりmfoを阻害することが明らかにされている。(9) キチン生合成阻害: 微生物生産物のpolyoxinがこのタイプの薬剤の代表的なものである(34)。(10) メラニン生合成阻害: tricyclazoleやpyroquilonが代表的薬剤であり、これらの薬剤は植物病原菌に特有のメラニン生合成を阻害する(35)。ターゲット酵素は1,3,8-THN酸化還元酵素であり、この酵素はヒトのメラニン生合成経路上には存在しない。(11) 微小管重合阻害: benomyl等のベンズイミダゾール系薬剤やdiethofencarb代表的なものであり、 $\beta$ -チューブリンに結合して微小管の重合を阻害することで、有糸分裂を停止させる(36)。(12) トレハラーゼ阻害: イネ紋枯病菌に卓効を示す微生物生産物のvalidamycinが代表的な薬剤である(37)。イネ紋枯病菌はトレハロースをトレハラーゼで分解することで、エネルギー源のグルコースを得ているため、トレハラーゼ阻害が致死的效果につながる考えられている。(13) 分泌酵素の分泌阻害: ターゲットとしてはさらに研究の余地が残されているが、最近になってmepanipyrumに代表されるピリミジンタイプの薬剤が、植物病原菌の分泌酵素の分泌を特異的に阻害することが明らかにされている(38,39)。(14) 植物の抵抗性誘導: このタイプの薬剤の代表はprobenazoleであり、植物病原菌には作用せず、対象とする植物の病原菌抵抗性を高めると考えられている(40)。(15) その他: 以上の他に植物病原菌の細胞膜に作用する



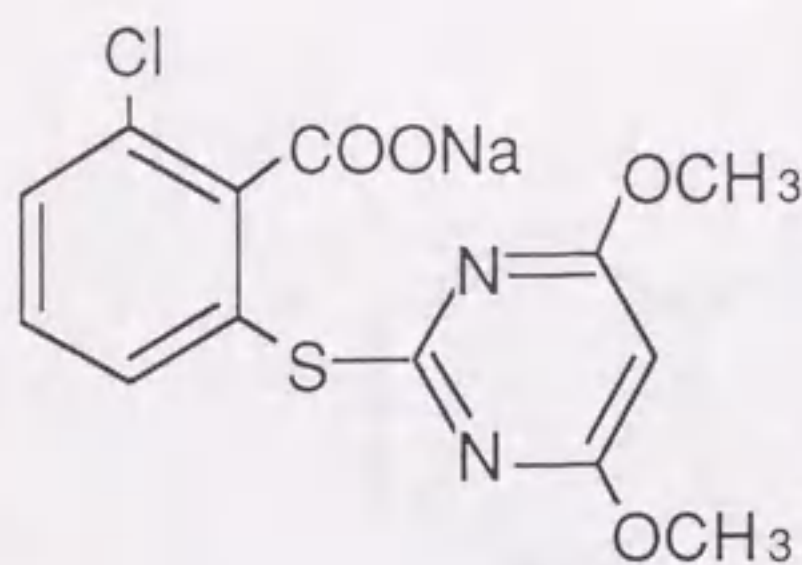
薬剤として、iminotadine-triacetate(41)やferimzone(42)ならびにジカルボキシイミド系(43)のprosimidone等が知られている。これらの薬剤は直接あるいは間接的に細胞膜に作用すると考えられているが、未だに決定的なターゲットは明らかとなっていない(iminotadine-triacetateは細胞膜の単純脂質の生合成を阻害し、ferimzoneは細胞膜の透過性を変化させる。ジカルボキシイミド系のターゲットの候補としてはNADPH-cytochrome c reductaseが挙げられている)。

以上のように様々なターゲットを阻害する除草剤および殺菌剤が開発されているが、大別すると、(I) 植物あるいは植物病原菌にのみ存在するターゲットを阻害することで選択毒性を獲得するもの、(II) 人間を含めたほ乳動物にも同じターゲットが存在するが、ターゲットの薬剤感受性の違いから選択毒性を獲得しているもの、(III) ターゲットの感受性は同じであるが、薬剤の吸収移行や代謝分解の種間差から選択毒性を獲得しているもの、の3つのタイプに分類できる。

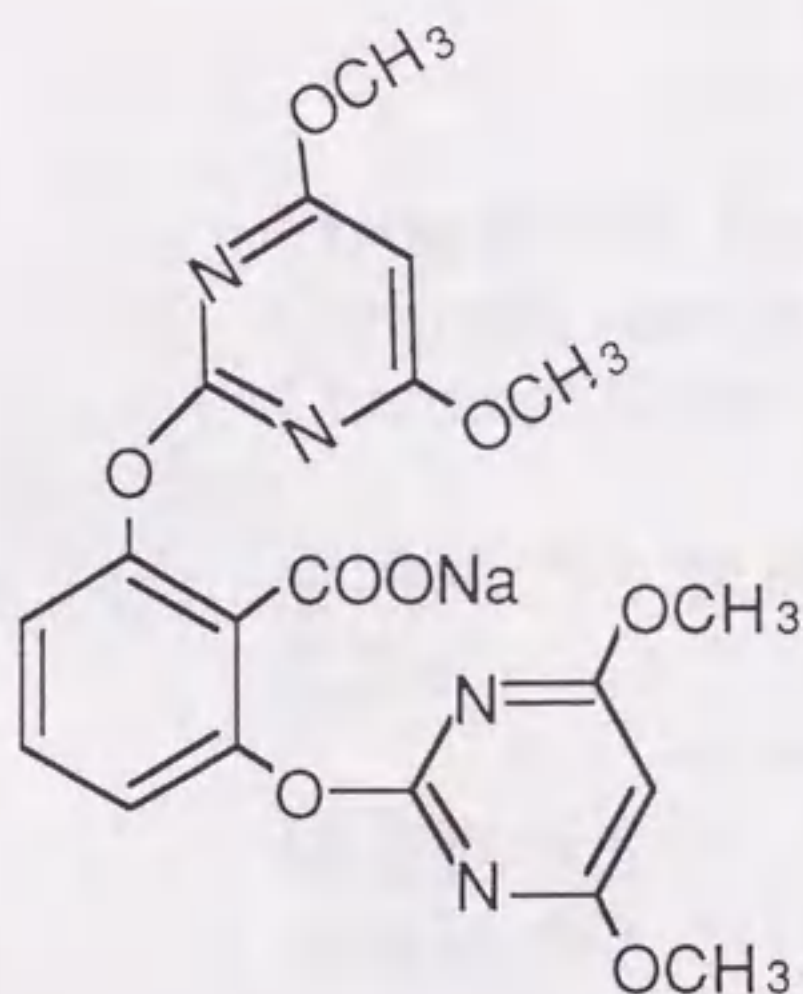
(株) ケイアイ研究所およびクミアイ化学工業(株)ならびにイハラケミカル工業(株)は上記の作用機構の中で(I)のグループに属し、分岐鎖アミノ酸生合成阻害剤に分類されるピリミジニルカルボキシ除草剤(以下PC除草剤と略記; Fig. 1)と呼ばれる複数の薬剤を現在開発中であり(44-46)、また、(II)のグループに属し、コハク酸脱水素酵素阻害剤に分類されるmepronil(商品名Basitac; Fig. 2)という殺菌剤の開発に1981年に成功した(47)。PC除草剤として開発中のワタ用除草剤のpyrithiobac-sodium(商品名Staple)と2つのイネ用除草剤のbispribac-sodiumおよびpyriminobac-methylは各作物に対して極めて高い安全性を有し、随伴雑草との間に高度な選択性を示す(48-50)。一方、mepronilは糸状菌の中でも特に担子菌類に対して優れた効果を示す薬剤であり、比較的高い選択毒性を有している(51, 52)。PC除草剤に関しては研究初期の段階で、mepronilに関しては市販後、作用点の特定に成功し、前者については除草効果試験と平行した酵素阻害試験が行なわれる中から有望薬剤が選別された。

研究開発に携わっている多くの研究者(合成研究者、生物研究者、生化学研究者、製剤研究者、安全性研究者等)の中で生化学研究を担当している筆者は、これらの薬剤の作用機構研究とターゲット酵素を利用した薬剤スクリーニングを行ってきた。本論文はその作用機構研究について記したものである。

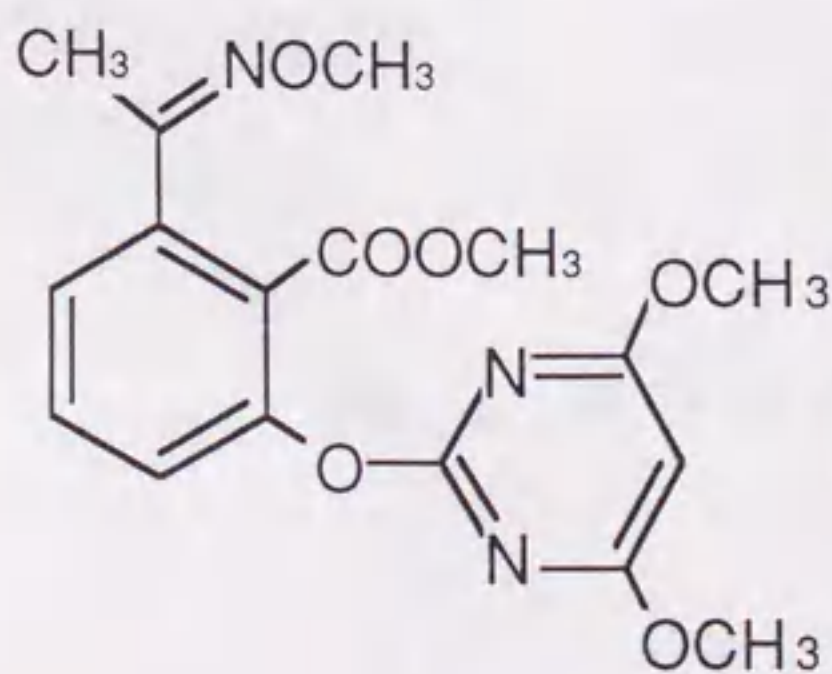




商品名 : Staple  
 一般名 : pyrithiobac-sodium  
 試験番号 : KIH-2031  
 化学名 : Sodium-2-chloro-6-(4,6-dimethoxypyrimidine-2-ylthio)benzoate  
 対象作物 : 棉  
 急性毒性 : 普通物  
 (LD50) : ラット経口 1-5 g/kg  
 ラット経皮 2 g/kg 以上



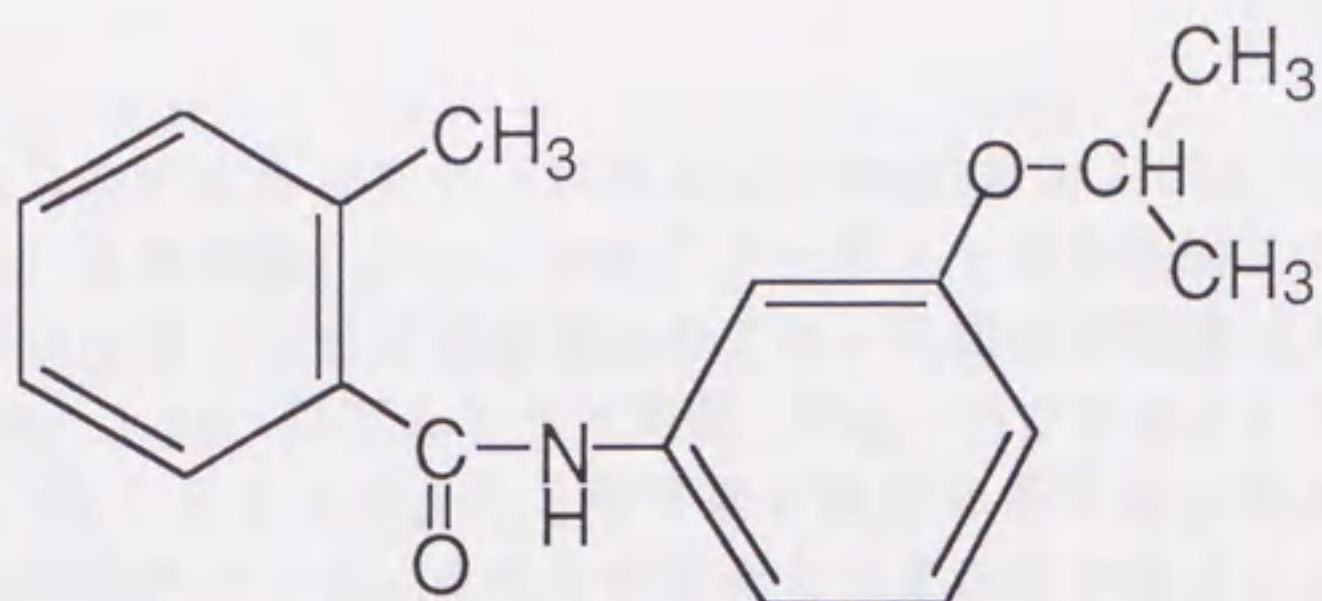
一般名 : bispyribac-sodium  
 試験番号 : KIH-2023  
 化学名 : Sodium 2,6-bis [(4,6-dimethoxypyrimidine-2-yl)oxy]benzoate  
 対象作物 : 稲  
 急性毒性 : 普通物  
 (LD50) : ラット経口 2.6-4.1 g/kg  
 ラット経皮 2 g/kg 以上  
 催奇形性 : なし  
 変異原性 : なし (陰性)  
 魚毒性 : A ランク  
 (LD50) : >100 ppm (ブルーギル)  
 >100 ppm (ニジマス)



一般名 : pyriminobac-methyl  
 試験番号 : KIH-6127  
 化学名 : Methyl 2-[(4,6-dimethoxypyrimidine-2-yl)oxy]-6-[1-(methoxyimino)ethyl]benzoate  
 対象作物 : 稲  
 急性毒性 : 普通物  
 (LD50) : ラット経口 5 g/kg 以上  
 ラット経皮 2 g/kg 以上  
 催奇形性 : なし  
 変異原性 : なし (陰性)  
 魚毒性 : A ランク  
 (LD50) : >10 ppm (コイ)

Fig. 1. 代表的PC除草剤の構造と毒性上の特性.





Trade Name: Basitac

Common Name: mepronil

Chemical Name: 3'-Isopropoxy-2-methylbenzanilide

急性毒性：普通物

(LD50) : ラット経口 10 g/kg 以上

ラット経皮 10 g/kg 以上

催奇形性：なし

催腫瘍性：なし

変異原性：なし（陰性）

魚毒性 : B ランク

(LD50) : コイ, 4.2 ppm; メダカ, 10 ppm

Fig. 2. メプロニルの構造と毒性上の特性.



## 第1章 PC除草剤の作用機構

### 緒言

1984年にスルホニルウレア（以下SUと略記）系およびイミダゾリノン（以下IMIと略記）系除草剤（Figs. 3-6）のターゲットが分岐鎖アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン）生合成経路上のアセト乳酸合成酵素（ALSあるいはAHAS、EC.4.1.3.18、以下ALSと略記、Fig. 7）であることが明らかにされて以来(53,54)、ALSおよびALS阻害剤に関する多方面に渡る研究が生物サイドから活発に行われている。それらの研究を大まかに分類すると、ALSの基礎、作用機構、選択性、抵抗性、セイフナー（除草剤の薬害を軽減する薬剤）のようになる。この間、SU系およびIMI系除草剤に次ぐ3番手のALS阻害剤としてトリアゾロピリミジン（以下TPと略記）に代表されるスルホンアミド系除草剤(55)（Fig. 6）が注目されるようになっていく。

一方、著者も1984年の後半よりPC除草剤の作用機構研究を開始し、その初期の段階でPC除草剤のターゲットがALSであることを明らかにした。そこで、まずはじめに、現在までに報告されているALSとALS阻害剤に関連した主要な研究を簡潔にまとめた後、本論に入りたいと思う。

#### (I)植物ALSの性質とALS阻害のメカニズム

成葉ではALSを含めた分岐鎖アミノ酸生合成酵素系はクロロプラストに局在していることが知られており(56)、ALSに関しては、植物種により分子量が異なることが明かとなっている（Table 1）。ALSはチアミンピロリン酸（以下TPPと略記）とフラビンアデニンジヌクレオチド（以下FADと略記）をコファクターとして要求するが、溶液中にFADが存在しないと、大きな分子種から小さなものへ変化すると考えられている(57,58)。現在までに従来の方法で植物からの完全精製に成功したのは大麦だけである(58,59)が、他の植物ではALS遺伝子の解析および合成ペプチドを抗原として作成されたモノクローナル抗体を使ったaffinityクロマトグラフィーによりプロトマータンパク質の分子量が明らかにされている（Table 1）。単子葉と双子葉では若干プロトマーが異なっている傾向が示唆されている(60)。また、ALS遺伝子は複数存在することが報告されている(61,62)が、複数の遺伝子が機能的に異なるアイソザイムをコードしているのか、あるいはオリゴメリックなALSのそれぞれのプロトマーをコードしているのかについては、制御中心を有するプロトマーの存在(63)を含めて、現時点では明確とはなっていない。

このような植物ALSをSU系およびTP除草剤はピルビン酸に対して拮抗と非拮抗の混合型、IMI系除草剤は不拮抗型で阻害する(54,64,65)。またコファクターのTPPに対する阻害形式に関しては結果が一致していないが、少なくとも



も、これらの薬剤とTPPは拮抗することはないものと判断されている (Table 2)。さらにこれらの薬剤は、slow-binding阻害剤というカテゴリーに属す薬剤であり、可逆的にも関わらず、不可逆的阻害剤のように徐々に阻害が強くなるという現象を示す(66,67)。

## (II)微生物ALSの性質とバクテリアALS阻害のメカニズム

SU系除草剤のALS阻害が最初に証明されたのはサルモネラ菌を材料とした研究であり(66)、ALS阻害機構の研究はバクテリアの方が進んでいる。またバクテリアおよび酵母のALSは詳しく研究されている (Table 3)。大腸菌やサルモネラ菌等の腸内細菌科は3種のアイソザイム(I,II,III)を有しており、各々が良く似た大きさの活性中心を有するプロトマーからなっている。植物の場合とは異なり、この場合には制御中心が存在するプロトマーも明らかにされている。活性中心が存在するプロトマーのアミノ酸配列のホモロジーはIとIIが高く(68)、IIとIIIは50-60%程度となっている(69)。IとIIIはバリンによるフィードバック阻害に感受性だが、IIは非感受性である。サルモネラ菌アイソザイムIIの場合には、その存在形態は活性中心が存在するプロトマー2分子と制御中心が存在するプロトマー2分子が合わさった4量体である(70)。これらのアイソザイムの中では、IIが最も植物に近い活性部位を有したALSであると考えられている(71)。一方、サッカロミセスのALSは2量体であり(72)、植物と同様に、制御中心だけを有するプロトマーの存在は明らかにされていない。これらの微生物ALSはIIを除いて、バリン単独による強いフィードバック阻害を受け(73-75)、ロイシンとバリンが相乗的な阻害(concerted inhibition)を示す植物ALS(76,77)とはかなり様相を異にしている。

以上のように微生物ALSは植物ALSとは異なっている面が多く、その結果、ALS阻害剤の阻害強度および阻害形式も植物ALSの場合とは微妙に相違している。特にサルモネラ菌アイソザイムIIに対する阻害形式は植物ALSの場合とはかなり異なったものとなっている(66,78) (Table 4)。

## (III)SU系およびIMI系ならびにTP除草剤のALS上での結合部位

SU系およびIMI系ならびにTP除草剤の結合部位の異同については、バインディングアッセイにより解析されている。SU系除草剤を放射性リガンドとし、サルモネラALSとの結合が調べられた結果、IMI系およびTP除草剤はこのバインディングを阻害する(78)。つまりSU系およびTP除草剤のALS結合部位は少なくともIMIとオーバーラップしていると考えられる。この結果と上記のALS阻害のKineticsを総合すると、SU系およびTP除草剤はALS上のほぼ同じ場所に結合し、IMI系除草剤もこれらとオーバーラップする場所に結合するが、その位置は若干ずれていると判断される。そしてこの部位は、以下2点から、ユビキノン結合部位と考えられている。(a)ALSとホモロジーの高い酵素として、ピルビン酸オキシダーゼが知られており(79)、この酵素はALSおよびピルビン酸デカルボキシラーゼ(これもALSとのホモロジーが高い)の先祖



と推定されている。本酵素はコファクターとしてユビキノンを要求する。このビルビン酸オキシダーゼから進化したALSは機能的に無用となった過去の遺物であるユビキノン結合部位を未だに有している可能性が高い。(b)ユビキノン-0はバクテリアのALS活性を阻害するとともにSU系除草剤とALSのバインディングを阻害する(78)。

#### (IV) ALS阻害剤の作物雑草間選択性と抵抗性植物

選択性と抵抗性(耐性)は、一方に効くが他方に効かないという観点から捉えると同一の現象であると考えることができる。ALS阻害剤の選択性のほとんどすべてが植物種間の薬剤解毒代謝能の相違で説明されている。選択性の要因となっている主要な解毒代謝反応は次のようになっている。(a)水酸化および脱メチル化等の酸化反応。(b)グルタチオン抱合。(c)加水分解。(a)の酸化反応はP-450が中心構成成分であるmfoにより触媒されると考えられており、この結果形成される水酸基はグルコースにより抱合される場合が多い。選択性に関与する解毒代謝反応としては最も重要な反応である。この反応が作物と雑草間の選択性の主要因となっているALS阻害剤としては、SU系除草剤のchlorsulfuron (80,81)、metsulfuron-methyl (82)、bensulfuron-methyl (83)、nicosulfuron (84)、primisulfuron (85,86)、ethametsulfuron (87)、imazasulfuron (88)ならびにIMI系除草剤のimazamethabenz-methyl (89)等を挙げることができる。(b)の抱合反応は(ホモ)グルタチオンS-トランスフェラーゼにより触媒され、この反応が選択性の要因となっているALS阻害剤としてはSU系除草剤のchlorimuron-ethylが挙げられる(90)。(c)の反応はエステラーゼに触媒されるカルボン酸エステルの脱エステル化や、スルホンアミド結合やウレア結合の開裂である。これらの反応が選択性の要因となっているALS阻害剤としてはSU系除草剤のthifensulfuron-methyl (91,92)、chlorimuron-ethyl (90)ならびにIMI系除草剤のimazamethabenz-methyl (89)を挙げることができる。また、チオールカーバメート系やクロロアセトアミド系除草剤等に対して開発されたセイフナーの多くが、mfoの活性を増大させることで、ALS阻害剤の選択性を高めることが報告されている(93-96)。

一方、ALS阻害剤に対する抵抗性に関しては、多くの人為的抵抗性植物ならびに抵抗性雑草が報告されているが、そのほとんどがALSの薬剤抵抗性獲得で説明されている(Tables 5,6)。人為的抵抗性植物の抵抗性ALSは感受性ALSのsingle mutationかdouble mutationで説明できる場合多い。表中の6種のSU耐性雑草のうち4雑草はALSの耐性獲得で説明される。これらの耐性雑草は他のSU系およびIMI系除草剤に対しても交差耐性を示すが、概してIMI系除草剤との交差程度は低い。他の1雑草はアセチルCoAカルボキシラーゼ阻害型除草剤のdichlorofop-methylと、SU系除草剤のchlorsulfuronの両者に耐性を示す雑草であるが、この場合のchlorsulfuron耐性は小麦選択性の要因となっているベンゼン環5位水酸化に続くグルコース抱合で説明されている(97,98)。以上をまと



めると、選択性は解毒代謝、抵抗性は主としてALSの抵抗性獲得に依存していると考えられる。一方、ALS阻害剤に対する人為的抵抗性植物の、他のALS阻害剤に対する交差抵抗性は、抵抗性植物ごとに異なっており、SU系とIMI系除草剤では交差するものとしなないものが存在するだけでなく、同じSU系除草剤間でも交差を示さない場合がある。TP除草剤に対して抵抗性となったタバコとワタのSU系およびIMI系除草剤に対する交差抵抗性は抵抗性株によっても薬剤によっても異なっており、同じALS阻害剤だからといって、すべてが同じような交差抵抗性を示すとは限らないことが示唆されている(99)。

以上のように、ALSおよびALS阻害剤に関しては、様々な観点から研究がなされているが、これらと並行したPC除草剤の作用機構研究により、本系統の除草剤はSU系とIMI系除草剤のハイブリッドとでも言うべき除草剤であることを著者は明らかにした。また、その過程で、ALSの新しい酵素的性質やslow-binding阻害に関する新規な知見を見い出している。そこで、PC除草剤に関する著者の研究を次の7つの観点から以下順に記載する。

- (a) PC除草剤のターゲットの特定
- (b) PC除草剤の各種植物およびバクテリアALS阻害
- (c) エンドウ黄化幼植物ALSの部分精製と性質検討ならびにバクテリアALSとの性質比較
- (d) PC除草剤のALS阻害の動的解析
- (e) PC除草剤とALSの相互作用
- (f) PC除草剤の活性本体
- (g) PC除草剤の作物雑草間選択性解析のための各種植物m f oの性質検討



Table 1. 植物ALSの分子種および分子量.

植物	プロトマーの分子量	ALS分子種
<i>Arabidopsis thaliana</i>	72593	
Tabacco	( 72877 ) 65000	
Sugarbeet	65000	
Soybean	65000	
Limabean	65000	
Spinach	65000	
Oilseed rape	約70000 (637アミノ酸)	
Corn	65000	55000, 193000, 150000, 300000, 440000
Barley	( 58000 ) 65000	200000, 220000, 440000
Wheat	65000	
Rice	65000	
Sorghum	65000	

## 文献:

- Plant. Physiol., 86, 23-27 (1988). J. Chromatography, 444, 251-261 (1988).  
 Z. Naturforsch., 43c, 850-856 (1988). FEBS, 258, 113-115 (1989).  
 Plant Physiol., 93, 1027-1031 (1990). Plant Physiol., 85, 1110-1117 (1987).  
 Mol. Gen. Genet., 219, 413-420 (1989). Proc. Natl. Acad. Sci., 88, 4572-4576 (1991).  
 Plant Physiol., 97, 657-662 (1991).



Table 2. 各種ALS阻害剤の植物ALS阻害形式.

薬剤	植物	阻害形式	
		ピルビン酸	TPP
Sulfometuron-methyl	エンドウ	混合型	
Chlorsulfuron	大麦	混合型	
	タバコ	非拮抗型	不拮抗
Triazolopyrimidine	大麦	混合型	混合型
Imazapyr	大麦	不拮抗型	
	エンドウ	不拮抗型	
	トウモロコシ	不拮抗型	不拮抗
N-naphtyl-valine-anilide	エンドウ	非拮抗型	
<hr/>			
バリリン	エンドウ	拮抗型	
バリリン+ロイシン	大麦	拮抗型～混合型	

## 文献:

- BCPC, Weed, 139-145 (1985). J. Pestic. Sci., 16, 583-590 (1991).  
 Plant. Physiol., 76, 545-546 (1984). Plant Physiol., 95, 1144-1149 (1991).  
 Plant Physiol., 39, 53-59 (1964). Phytochem., 8, 2271-2276 (1969).  
 BCPC Monograph, 42, 87-95 (1989).  
 ibid., 97-100 (1989).  
 ibid., 131-138 (1989).  
 ibid., 85-86 (1989).



Table 3. 微生物ALSの分子種および分子量.

微生物	遺伝子	プロトマーの分子量	分子種
<i>Escherichia coli</i>			
isozyme I	ilvBN	60400, 11100 (60000, 11200) (60000, 9500)	200000
isozyme II	ilvGM	59200, 9700 (565a.a, 160a.a)	
isozyme III	ilvIH	61800, 17500	
<i>Salmonella typhimurium</i>			
isozyme II	ilvGM	59300, 9700	140000 ( $\alpha 2 \beta 2$ )
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		60000, 15000	600000 ( $\alpha 8 \beta 8$ )
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
	ILV2	約75000 (687a.a)	150000 (dimer)
<i>Neurospora crassa</i>			
	ILV3		51000, 68000 140000, 500000

## 文献:

- Biochim. Biophys. Acta., 321, 356-360 (1973).  
 Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 922-925 (1981).  
 Nucleic Acids Res., 11, 5299-5313 (1983).  
 J. Bacteriol., 157, 184-189 (1984).  
 Nucleic Acids Res., 13, 3995-4010 (1985).  
 Biochemistry, 24, 4952-4959 (1985).  
 Biochem. Biophys. Res. Comm., 123, 418-423 (1984).  
 Eur. J. Biochem., 185, 433-439 (1989).



Table 4. 各種ALS阻害剤の細菌ALS阻害形式.

薬剤	ALS起源	ピルビン酸に対する 阻害形式
Sulfometuron- methyl	サルモネラ菌ALS I II III	混合型 拮抗型～混合型 非拮抗型
Chlorsulfuron	サルモネラ菌ALS I II III	混合型 拮抗型 混合型
Triazolopyrimidine	サルモネラ菌ALS I II III	非拮抗型 混合型 非拮抗型
Imazapyr	サルモネラ菌 ALS I II III	非拮抗型～不拮抗型 混合型～非拮抗型 非拮抗型～不拮抗型
<hr/>		
バリン	大腸菌ALS I サルモネラ菌ALS II	拮抗型 非拮抗型

文献:

- J. Biol. Chem., 259, 8753-8757(1984). Nature, 331, 360-362 (1988).  
 BCPC Monograph, 42, 147-152 (1989). Pestic. Sci., 29, 283-292 (1990).  
 J. Biol. Chem., 233, 1156-1160 (1958).  
 Biochim. Biophys. Acta., 92, 142-149 (1964).



Table 5. ALSを標的とする除草剤に対して人為的に作成された抵抗性植物.

植物	除草剤 <sup>a)</sup>	抵抗性機構	交差抵抗性その他	文献
タバコ	SM,CS,TP	抵抗性ALS	CS耐性のものはTS以外のスルホニルウレア(SU)と交差したが、イミダゾリノン(IM)とは交差せず。TP耐性株はSU,IM両者と交差。耐性はpoint mutationで説明できる。	(1-8)
シロイヌナズナ	CS,IP	抵抗性ALS	CS耐性株はSMと交差するが、IPとは交差せず。CS耐性とIP耐性ではpoint mutationの場所が違う。	(2,3,5 9-13)
アサガオ	CS,IP,IQ	抵抗性ALS ALS重複	CS耐性株はイミダゾリノンと交差するものとしなないものが存在IP,IQ耐性株はスルホニルウレアと交差しない。フィードバック阻害の感受性が低下。	(14-18)
ダイズ	CS	抵抗性ALS 抵抗性ALSではない		(19,20)
ナタネ	CS	抵抗性ALS	多くのスルホニルウレアと交差するが、ethametsulfuron及びイミダゾリノンとは交差せず。シロイヌナズナ耐性ALS遺伝子が導入された。	(21)
ワタ	TP	抵抗性ALS	スルホニルウレア、イミダゾリノン、ピリミジニルサリチル酸と交差するが、交差の程度は株間で異なる。	(7)
アマ	CS	抵抗性ALS	シロイヌナズナの耐性ALS遺伝子が導入された。	(10)
トウモロコシ	IZP	抵抗性ALS	IQと交差しない株が存在。スルホニルウレアとは交差するものとしなないものがある。	(22)
ニンジン	BM	抵抗性ALS	ALS量は変化していない。	(23)
イネ	BM	抵抗性ALS	耐性株は安定に維持される。	(24)
コムギ	IZP	抵抗性ALS	耐性植物は感受性植物と同じ表現形を示す。	(25)

a) SM, sulfometuron-methyl; CS, chlorsulfuron; TP, triazopyrimidine; IP, imazapyr; IQ, imazaquin; IZP, imazethapyr; BM, bensulfuron-methyl; TS, triasulfuron  
文献: (1) Science, 223 (4641), 1148-1151 (1984) (2) NATO ASI SER., SER.A, 140, 339-349 (1987) (3) Mol. Gen. Genet., 211, 266-271 (1988)  
(4) The EMBO Journal, 7, 1241-1248 (1988) (5) Plant Physiol., 91, 574-580 (1989) (6) Plant Physiol., 94, 1647-1654 (1990)  
(7) Plant Physiol., 94, 239-244 (1990) (8) Plant Cell Reports, 8, 643-646 (1990) (9) Mol. Gen. Genet., 204, 430-434 (1986)  
(10) Plant Cell Reports, 8, 445-449 (1989) (11) Nucleic Acids Res., 18, 2118-1190 (1990) (12) Plant Physiol., 92, 1081-1085 (1990)  
(13) Theor. Appl. Genet., 80, 449-458 (1990) (14) Theor. Appl. Genet., 74, 417-422 (1987) (15) Plant Physiol., 86, 863-867 (1988)  
(16) Plant Science, 67, 1-6 (1990) (17) Plant Physiol., 94, 1111-1115 (1990) (18) Plant Physiol., 96, 255-261 (1991)  
(19) Crop Sci., 27, 948-952 (1987) (20) Crop Sci., 29, 1403-1408 (1989) (21) Plant Science, 69, 231-237 (1990)  
(22) "Biosynthesis of Branched Chain Amino Acids" ed. by Z.Barak, D.M.Chipman, J.V.Schloss, Balaban Publishers, pp.357-371 (1990)  
(23) Weed Res., Japan, 33, 285-292 (1988) (24) Weed Res., Japan, 37, 232-238 (1992) (25) Plant Physiol., 100, 882-886 (1992).



Table 6. ALSを標的とする除草剤に対して耐性を示す雑草.

( )内はALS耐性の度合

雑草名	除草剤	国名	耐性機構	交差耐性	その他	文献
<i>Lactuca serriola</i> (prickly lettuce) (キク科ワイルドレタス)	chlorsulfuron metsulfuron- methyl	USA		sulfonylureasと交差, imazapyr, imazethapyrと少し交差, imazaquinと交差しない		(1)
<i>Kochia scoparia</i> (Kochia) (アカザ科ホウキギ)	chlorsulfuron (X18)	USA	耐性ALS	sulfonylureas(5-28) imidazolinines(2-6) triazolopyrimidine(20)	ALSのK <sub>m</sub> 値変化なし	(2,3)
<i>Salsola iberica</i> (Russian thistle) (アカザ科アザミの類い)	sulfometuron- methyl(X16)	USA	耐性ALS	sulfonylureas(3.8-8.9) imidazolinone(3.5) triazolopyrimidine(7.9)	K <sub>m</sub> 、比活性 薬剤代謝速度 変化なし	(4)
<i>Stellaria media</i> (Common chickweed) (ナデシコ科ハコベ)	chlorsulfuron (X13->X180)	Canada	耐性ALS	sulfonylureas(6.3-130) imidazolinone(2.5-6.6) triazolopyrimidine(8.9->330)	同上	(4,5,6)
<i>Lolium perenne</i> (Perennial ryegrass) (イネ科ペレニアラライグラス)	sulfometuron- methyl(X16)	USA	耐性ALS	sulfonylureas(13-35) imidazolinone(6.7) triazolopyrimidine (>24)	同上	(4)
<i>Lolium rigidum</i> (Annual ryegrass) (イネ科アニュアルライグラス)	diclofop-methyl chlorsulfuron (ca.X1)	Australia	薬剤分解能 獲得		ALS感受性、 吸収移行 変化なし	(7,8)

文献: (1) Weed Technology, 4, 163-168 (1990) (2) Weed Technology, 4, 169-172 (1990)  
 (3) Plant Physiol., 93, 55-61 (1990) (4) Pestic. Biochem. Physiol., 42, 110-118 (1992)  
 (5) Plant Physiol., 93, 962-966 (1990) (6) Pestic. Sci., 31, 273-280 (1991)  
 (7) Plant Physiol., 94, 1180-1186 (1990) (8) Pestic. Biochem. Physiol., 43, 182-192 (1992).



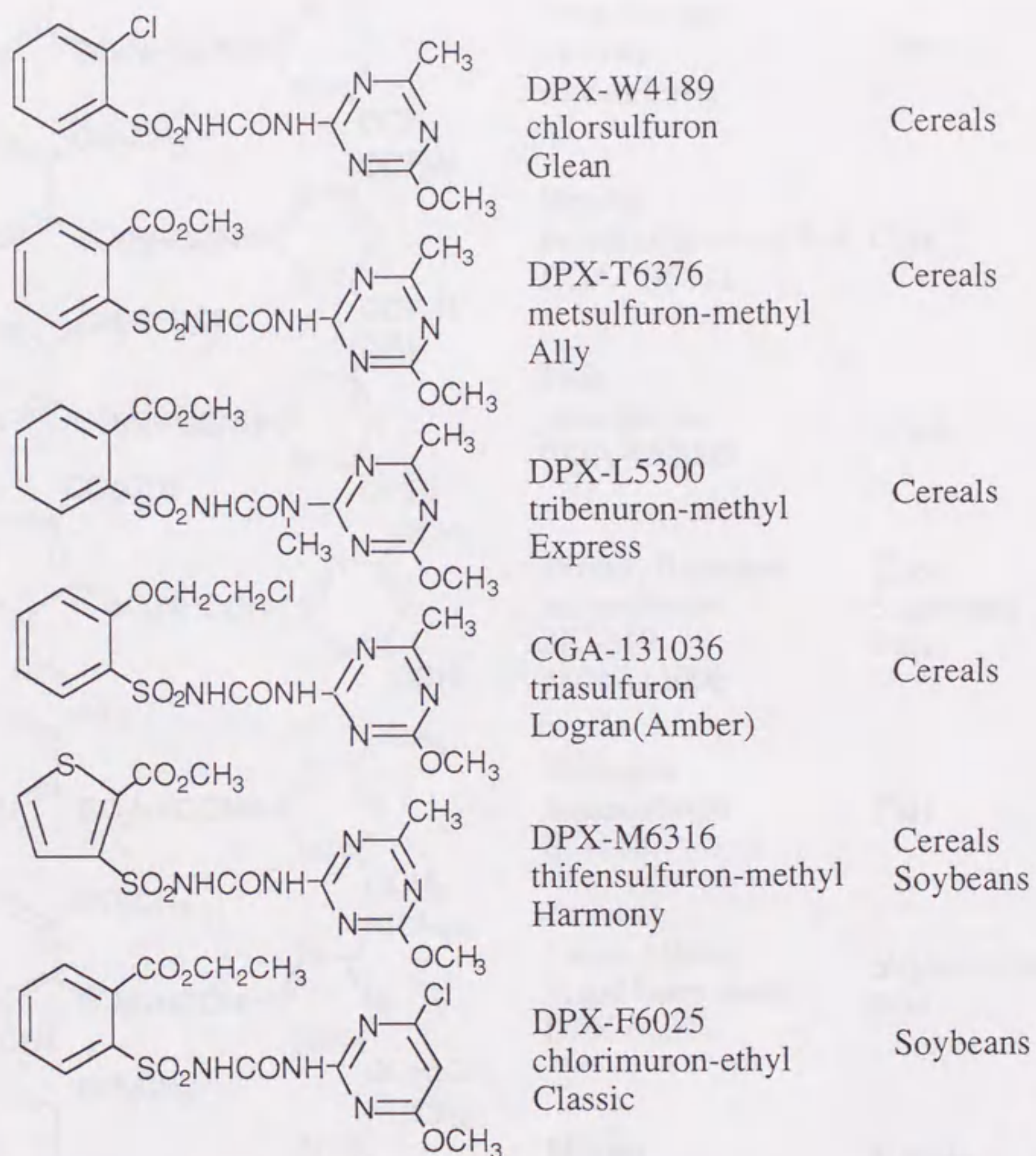


Fig. 3. Sulfonylurea Herbicides (1).



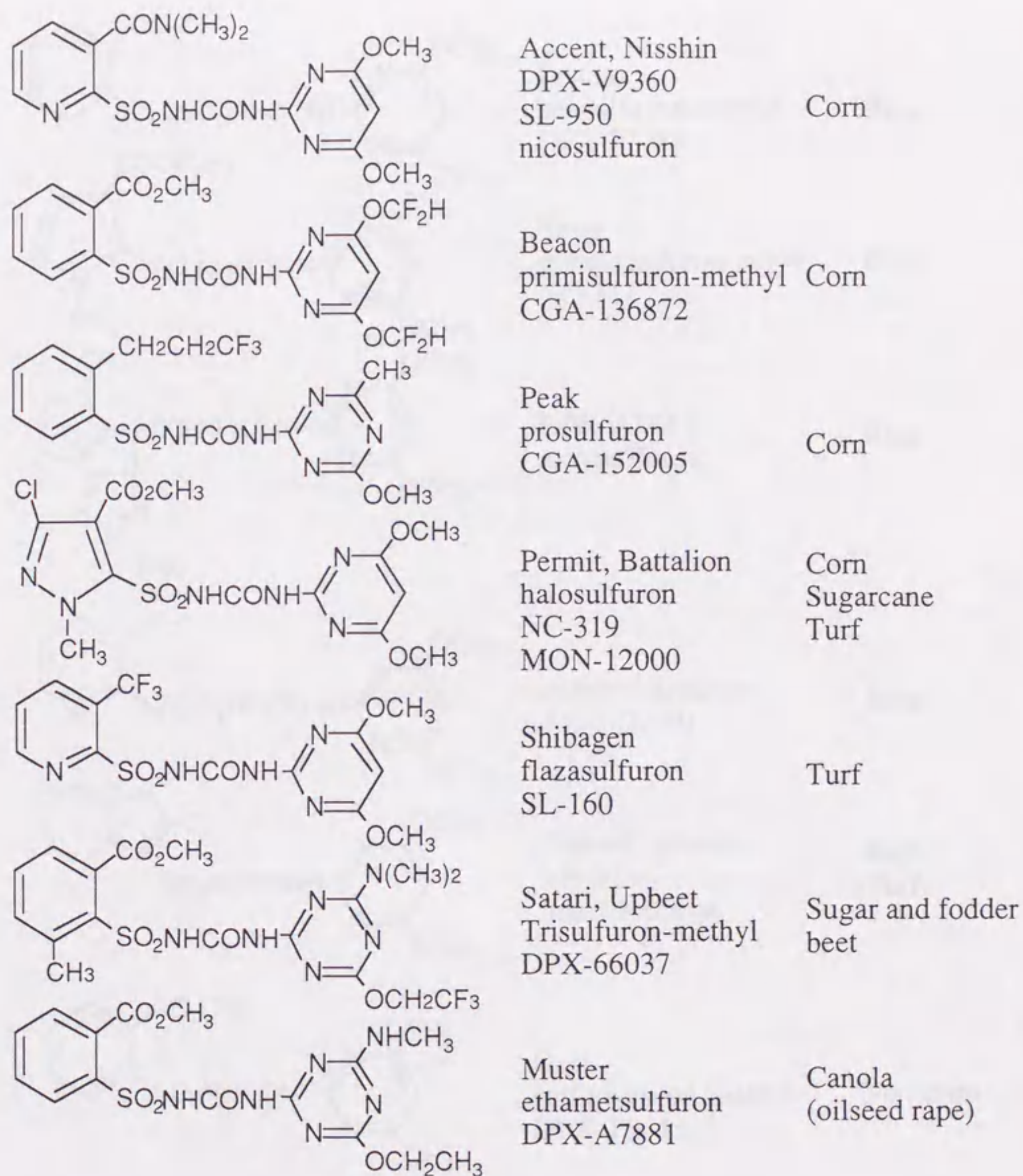


Fig. 4. Sulfonylurea Herbicides (2).



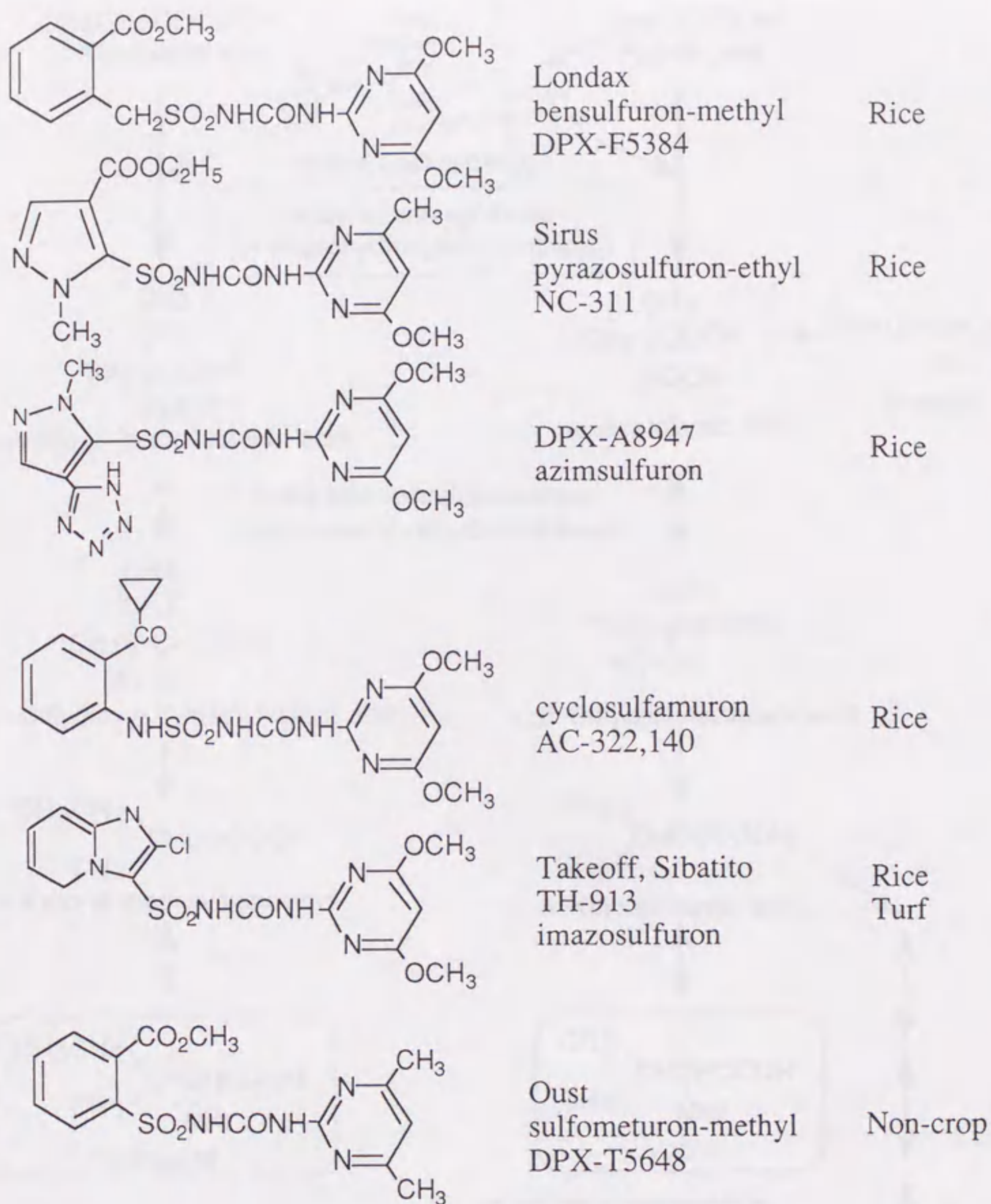


Fig. 5. Sulfonylurea Herbicides (3).



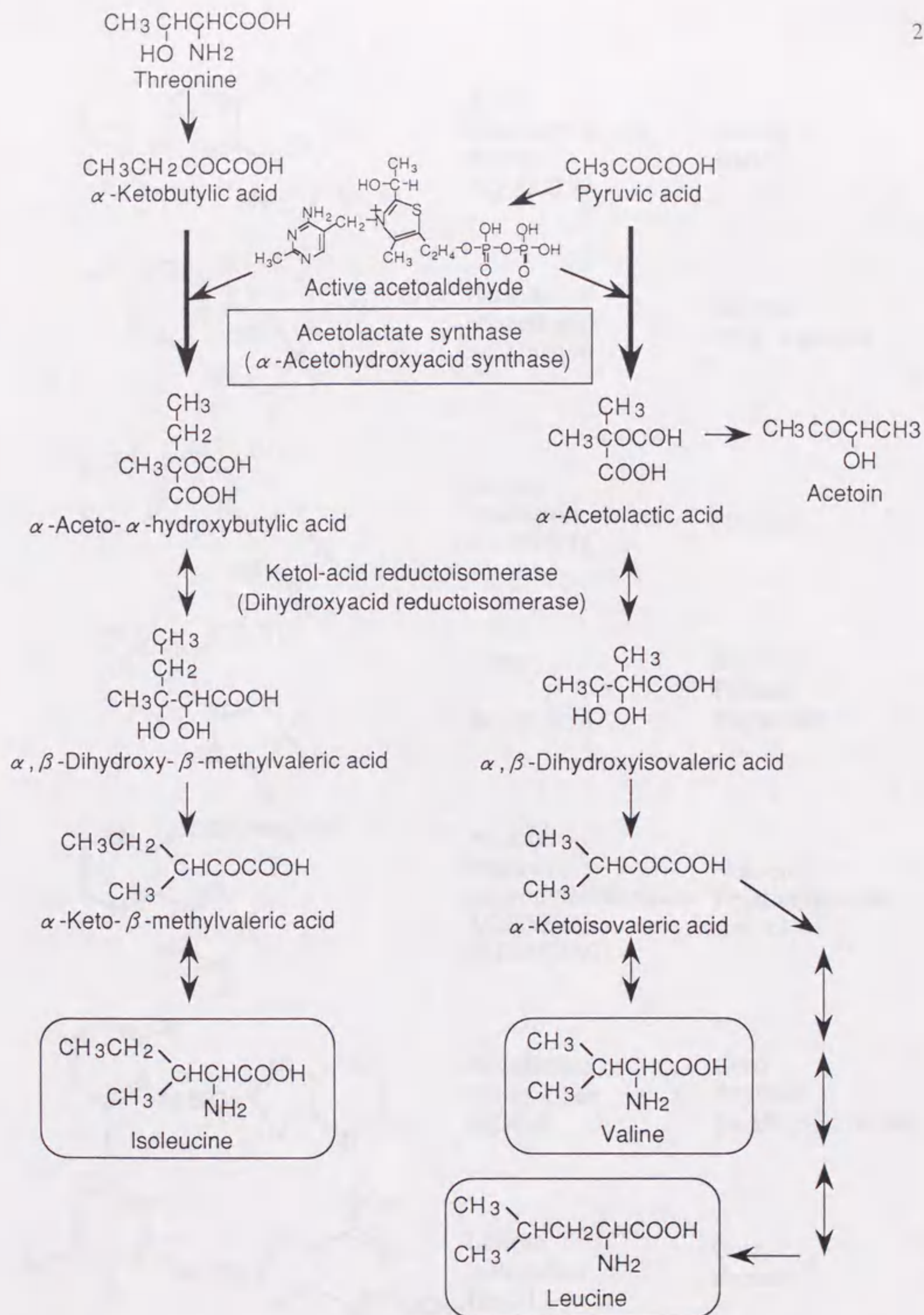


Fig. 7. The biosynthetic pathway of branched-chain amino acids.



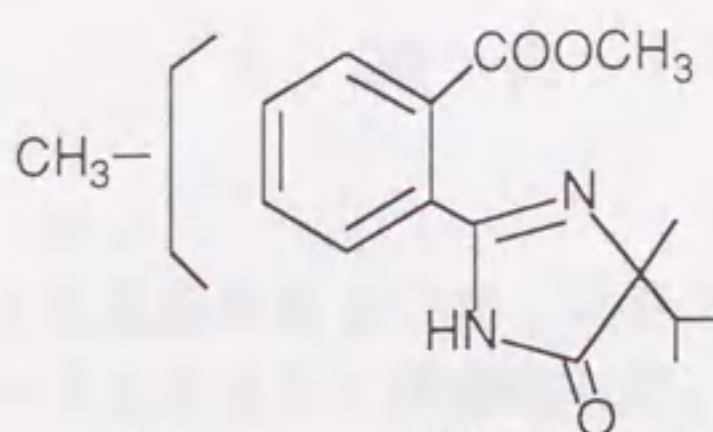
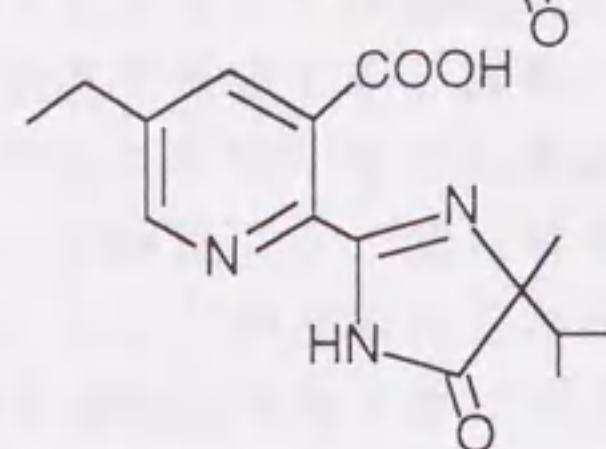
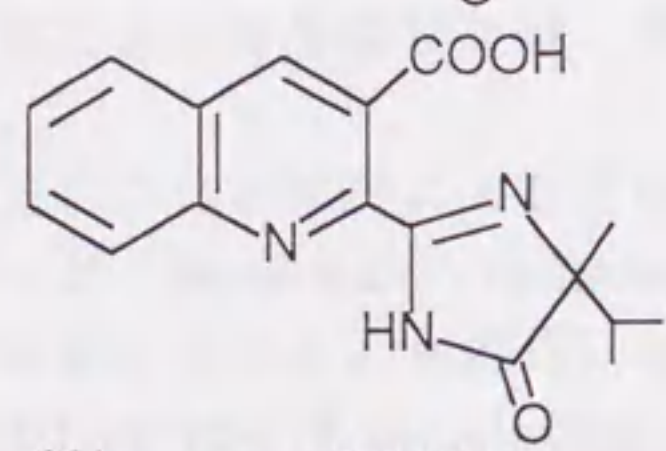
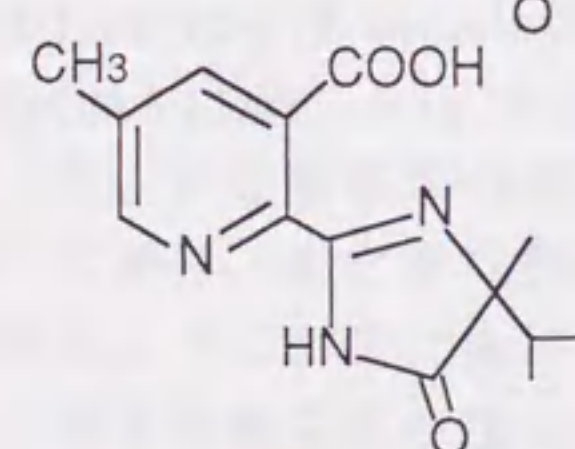
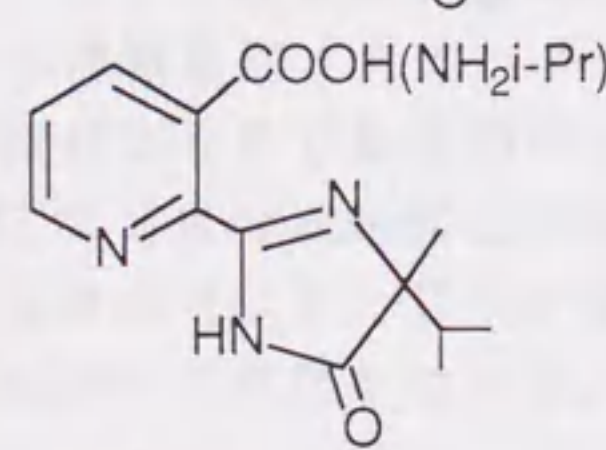
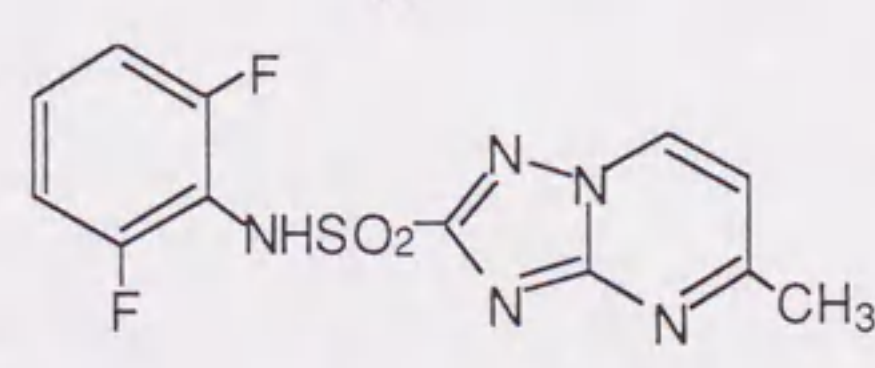
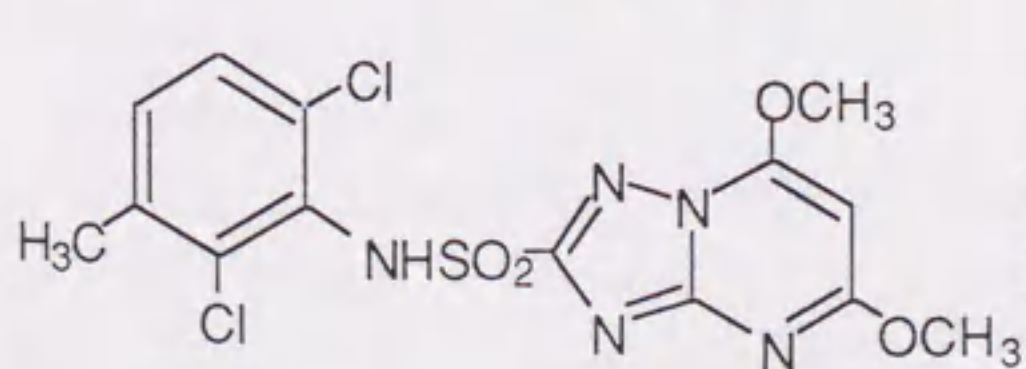
	Assert imazamethabenz- methyl AC-222293	Wheat Barley
	Pursuit imazethapyr AC-263499	Soybean Other legumes
	Scepter imazaquin AC-252214	Soybean
	Cadre  AC-263222	Soybean Peanuts Sugarcane
	Arsenal imazapyr- isopropylammonium AC-252925 (AC-243997)	Non-crop Total vegetation control
	Broadstrike flumetsulam DE-498	Corn Soybean Small grain cereals
	Eclipse metosulam DE-511	Corn Cereals

Fig. 6. Imidazolinone and triazolosulfonamide herbicides.



## 第1節 PC除草剤のターゲットの特定

### 1. 序

SU系除草剤とIMI系除草剤が分岐鎖アミノ酸生合成経路上のALSをターゲットとすることは前述した。これらの除草剤の殺草効果は、効果が完結するまでに数週間を要する。薬剤が処理された植物体は成長点の伸長が停止し、軽度なクロロシスを伴いながら最終的にはネクロシスを起こす。これらの生理変化は、3種の分岐鎖アミノ酸（ロイシン、バリン、イソロイシン）の同時添加で完全に回復することが示されており(53,100,101)、また、ALS阻害剤処理により植物体内の分岐鎖アミノ酸が減少すること(101-103)から判断して、薬剤処理により引き起こされる生理変化は、分岐鎖アミノ酸の欠乏に由来するものと考えられている。

一方、これとは別にALSの次のステップを触媒するケトール酸レダクトイソメラーゼ (ketol-acid reductoisomerase、以下KARIと略称) を阻害する薬剤も報告されている。実用化には至っていないが、KARI阻害剤としてはヘキスト社のHoe-704 (2-dimethylphosphinoyl-2-hydroxy acetic acid) (104)とデュポン社のIpOHA (105) (Fig. 8)が著名である。

翻って、PC除草剤の殺草作用の特性はいわゆるALS阻害型除草剤の作用に類似しており、またその殺草効果は光合成電子伝達系（以下PETと略記）阻害剤と同じように、弱光条件下で低下する（強光条件下と比して最終的な効果は同じだが除草効果発現が遅くなる）ことが、研究途上で指摘されていた。そこでこれらの情報を踏まえて、PC除草剤の標的酵素を特定するために、(I)分岐鎖アミノ酸によるPC除草剤の植物生育抑制およびクロレラ増殖阻害の解除、(II)分岐鎖アミノ酸生合成経路上の酵素（ALSとKARI）に対する影響、(III)光合成電子伝達系（以下PETと略記）およびクロロフィル生合成系に及ぼす影響の3項目について検討を加えた。



## 2. 実験材料および方法

### (1) 供試薬剤

P C 除草剤として、pyrithiobac、compound 1、compound 2ならびにcompound 3 (Fig. 9)、比較薬剤としてS U系除草剤のchlorsulfuron、metsulfuron-methyl、sulfometuron-methyl (Figs. 3,5)とI M I系除草剤のimazapyr (Fig. 6)、K A R I 阻害剤のHoe-704、P E T阻害型除草剤のpropanilならびにプロトボルフィリノーゲンオキシダーゼ（以下Protoxと略記）阻害型除草剤のnitrofenとoxadiazon (Fig. 8)を使用した。なお、P C 除草剤、S U系除草剤、I M I系除草剤ならびにHoe-704は（株）ケイアイ研究所からの提供を受け、他の薬剤は市販品を購入した。

### (2) 供試生物材料

ジャポニカ種のイネ (*Oryza sativa* L. var. Kinmaze)、エンドウ (*Pisum sativum* L. var. Akabanatsurunashi)、ワタ (*Gossypium hirsutum* L. var. Cocher)、マメアサガオ (*Ipomoea lacnosa* L.)ならびにクロレラ (*Chlorella pyrenoidosa* IAM C-212)を使用した。なお、イネはクミアイ化学工業（株）生物科学研究所で採取したもの、ワタおよびマメアサガオは市販のものを使用し、クロレラは東京大学応用微生物研究所より購入した。

### (3) P C 除草剤による植物生育抑制に対する分岐鎖アミノ酸の影響

所定濃度の化合物  $100 \mu\text{l}$  と約  $42^\circ\text{C}$  に保温した  $0.4\%$  の半流寒天  $10\text{ ml}$  を試験管に入れ、ミキサーで攪拌後、室温に放置することで寒天を固化させた。この化合物含有寒天培地を殺菌処理後、イネの催芽種子（イネ種子を  $1\%$  アンチホルミンで滅菌後、水洗し、 $27^\circ\text{C}$  で2日間吸水させた）を植え、陽光培養装置 (Tomy CU-351) 中  $27^\circ\text{C}$  で10日間莖葉部を伸長させた。回復試験に添加する分岐鎖アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン）は各々  $1\text{ mM}$  とした。

### (4) P C 除草剤によるクロレラ増殖阻害に対する分岐鎖アミノ酸の影響

Modified Bristol (MBM-R) 液体培地(106)で前培養したクロレラを遠心分離により収集し、洗浄後、MBM-R液体培地で希釈して、波長  $650\text{ nm}$  における吸光度が約  $0.5$  になるように調整した。これらを試験管に  $5\text{ ml}$  ずつ分注し、アセトンに溶かした化合物溶液およびアミノ酸水溶液を  $50 \mu\text{l}$  加えた。 $25^\circ\text{C}$ 、 $8000\text{ lux}$  で、明期16時間、暗期8時間の光周期で3日間振とう培養した。培養終了後波長  $650\text{ nm}$  で吸光度を測定し（分光光度計 Hitachi 220A）、対照区との吸光度の比較で阻害率を算出した。なお、 $100\%$  阻害区(negative control)には、 $200 \mu\text{M}$  のdiuron (Fig. 19)処理区を用いた。



### (5) アセト乳酸合成酵素の調製とアセト乳酸合成酵素活性の測定

マメアサガオ種子を1晩室温下で吸水させた後、水分を与えたバーミキュライト上に播種し、暗下27℃で5～7日間生育させた（4日目以降はホーグランド水耕液を与えた）。地上部（茎葉部）をハサミで切断し、組織重の5倍量の10% (v/v) グリセロール、0.5 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM DTT、1 mM EDTA (KOHで中和)、0.02 % NaN<sub>3</sub>、ならびに組織重の4分の1量のポリビニルポリピロリドン（以下PVPと略記）を含んだ100 mMリン酸緩衝液 pH7.5（緩衝液1）で、氷冷下、ヒスコトロンを用いてホモジナイズした。これをナイロンガーゼでろ過し、ろ液を15,000×gで20分間遠心し、その上澄に50%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、氷冷しながら約1時間放置した。これを、再度15,000×gで20分間遠心し、生じた沈澱を、組織重の5分の1量の10% (v/v) グリセロールと0.5 mM MgCl<sub>2</sub>を含んだ100 mMリン酸緩衝液 pH7.5（緩衝液2）に溶かした。この溶液をさらに15,000×gで遠心し、不溶物質を除去した後、上澄を、緩衝液2で事前に平衡化したセファデックスG-25にのせ、素通り画分を集めた。これをALS粗酵素として-80℃に保存した。

一方、ALS活性はRay(53)の方法に従い測定した。反応液量は1 ml、反応液組成を、20 mM ピルビン酸ナトリウム、0.5 mM TPP、0.5 mM MgCl<sub>2</sub>、10 μM FAD、酵素溶液、20 mM リン酸カリウム緩衝液 pH7.5とした。酵素無添加の状態では5分間プレインキュベートした後、酵素を添加し30℃で反応させた。30分後、反応を0.1 mlの6 N塩酸で停止させ、60℃で10分間インキュベートとすることで生成したアセト乳酸をアセトインに変化させた。次に、0.5% (w/v) のクレアチンを1 ml、さらに2.5 Nの水酸化ナトリウムに溶かした5% (w/v) のα-ナフトールを1 ml添加し、60℃で10分間インキュベートし、この吸光度525 nmを比色することでアセトインを定量した。なお、アセトイン標準品を用いて調べたアセトインの濃度と吸光度の関係は次の式となった。

$$OD_{525} = 7.55 \times \text{アセトイン濃度 (mol/ml)}$$

なお、酵素活性を50%阻害する薬剤濃度（以下I<sub>50</sub>値と略記）はプロビット法で算出した(107)。

### (6) KAR Iの調製およびKAR I活性測定

イネ催芽種子をバーミキュライト上に播種して、ホーグランド水耕液を添加しながら約1週間暗室下で生育させた。この黄化幼植物の茎葉を10培量の10 mM MgCl<sub>2</sub>、2 mM DTT、1 mM EDTAを含む50 mM Tris-HCl 緩衝液 pH7.8（緩衝液1）でヒスコトロンを用いてホモジナイズした後、ナイロンガーゼで濾過した。濾液を15,000×gで20分間遠心し、遠心上澄を35～60%の硫酸アンモニウムで分画した。これを緩衝液1に溶解させた後セファデックスG-25で脱塩し粗酵素として-80℃に保存した。エンドウ黄化幼植物の場合には、



緩衝液1のトリス濃度を10 mMとした(緩衝液2)後、セファデックスG-25で脱塩し、DEAE-トヨパール650 Mにアプライした。吸着した活性画分は緩衝液2の0から0.5 MまでのKCl直線グラジエントで溶出したのち、限外濾過で濃縮し-80℃に保存した。

KARI活性測定法は反応溶液量を3 ml、反応液組成を、16.7 mM アセト乳酸、0.3 mM NADPH、酵素、33 mM リン酸カリウム緩衝液 pH7.5、として30℃で反応を行なった(108)。酵素無添加で5分間ブレインキュベートし、酵素を添加した後NADPHの340 nmの吸光度減少をレートアッセイした。なお、アセト乳酸は市販のethylacetoxymethylacetolactateを2当量の水酸化ナトリウムで加水分解したのち中和することで調製した(109)。

#### (7) クロロプラストの調製とPET活性測定

吸水させたエンドウ種子をバーミュキュライト上に播種し、陽光培養装置中、18, 200 luxで、ホーランド溶液を与えながら、28℃で約2週間栽培し、その葉部を材料とした。葉部を4倍量の0.4 M シュークロース、10 mM KClならびに10% PVP Pを含んだ50 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 7.8で10秒間ホモジナイズした。このホモジネートをナイロンガーゼでろ過した後、500×gで5分間遠心し、PVP P等を除去した。上澄をさらに2,000×gで8分間遠心することでクロロプラストが沈澱として得られたので、これを組織重と同倍量のPVP Pを含まない上記緩衝液で洗浄し、500×gで5分間さらに2,000×gで8分間遠心した。こうして得られた沈澱を組織重の5分の1量の緩衝液に懸濁させ、小分けした後-80℃に保存した。

PET活性は電子受容体としてDCPIPを用い(110)、臨床酵素反応測定装置(Hitachi 105-50/SP)を使用して測定した。日立105-50/SPは反应用のターンテーブルと分光光度計からなっており37サンプルの自動分析が可能となっている。3種の溶液を自動的に吸引添加し、反応終了後自動的に吸光度測定を行うように設計されている。そこでNH<sub>4</sub>Cl、DCPIPならびにクロロプラストを自動添加し、その他の組成物は事前に反応カップに添加しておくことにした。また失活を防止するためにクロロプラストは氷冷した状態でセットした。反応に必要な光の供給には写真撮影用のレフランプ(500 W)を用い、反応カップの上方約35 cmの位置から均等に光を照射した(約20,000 lux)。反応液量は1 ml、反応液組成を10 mM NaCl、1 mM NH<sub>4</sub>Cl、0.045 mM DCPIP、クロロプラスト(最終総クロロフィル濃度=19.6 μg/ml)、50 mM Tri-HCl pH 7.4として、30℃で5分間反応させたのち波長600 nmの吸光度を測定した。なお、調製したクロロプラストの0.5 mlに80% (v/v) アセトン水20 mlを添加し、遠心後、上澄に回収されたクロロフィルの649 nmと665 nmの吸光度を測定することでクロロフィル含量を定量した(111)。

総クロロフィル量(μg/ml)=6.45×OD<sub>665</sub>+17.72×OD<sub>649</sub>



### (7) クロロフィル生合成活性の測定

クロロフィル生合成活性は、ワタ黄化子葉の緑化を指標とした。ワタ種子を吸水させたバーミュキュライト上に播種し、27℃、暗下で5～6日間生育させた。この黄化幼植物体の子葉を切り取った後、その1gを25mlの蒸留水中に浸漬させ、18200 luxの照明下で24時間インキュベートした。この子葉から30mlの80% (v/v) アセトンでクロロフィルを抽出し、上記の波長を測定することで、クロロフィルの総含量を定量した。



### 3. 実験結果

#### (1) イネ生育抑制の分岐鎖アミノ酸による解除

Pyrithiobacによるイネの生育阻害はロイシン、バリン、イソロイシンの3種の分岐鎖アミノ酸の同時添加によりほぼ完全に回復した。また2種の分岐鎖アミノ酸の同時添加でも、若干の回復が認められ、回復程度を順位づけると、バリン・イソロイシンのペア>ロイシン・イソロイシンのペア>ロイシン・バリンのペアの順番となった。一方、単一の分岐鎖アミノ酸の添加ではほとんど回復が認められなかった (Photo., Fig. 10A)。なお、薬剤無処理区での、分岐鎖アミノ酸の影響としては、3種の分岐鎖アミノ酸の同時添加は無添加区よりも成長を促進する、単独ではバリンが最も強い生育阻害を示す、ロイシン・バリンのペアの生育阻害が最も強い等の、他の植物での報告(112)と類似した現象が認められた (Photo., Fig. 10A)。

#### (2) クロレラ増殖阻害の分岐鎖アミノ酸による回復

Compound 1のクロレラ増殖阻害は3種の分岐鎖アミノ酸の同時添加ならびにバリン・イソロイシンペアの同時添加でほぼ完全に回復した。一方、バリン、イソロイシンの単独添加では顕著な回復は認められなかった (Fig. 10B)。

#### (3) PC除草剤のマメアサガオALS活性に対する影響

Pyrithiobacは棉畑の難防除雑草であるマメアサガオのALSを低濃度で阻害した (Fig. 11)。I<sub>50</sub>値は19 nMであり、この阻害効果は対照薬剤のchlorsulfuronと同程度で、imazapyrよりは数段強いものであった。

#### (4) PC除草剤のエンドウならびにイネ黄化幼植物KARI活性に対する影響

Hoe-704はイネ黄化幼植物から調製したKARIを100 μMでほぼ完全に阻害したが (Table 7)、エンドウ黄化幼植物から調製したKARIにはほとんど阻害効果を示さなかった (Table 8)。一方、pyrithiobacおよびcompound 1ならびにcompound 2は100 μMの濃度でも両酵素に対して阻害効果を示さなかった (Table 12)。

#### (5) PC除草剤のワタクロロフィル生合成活性に対する影響

Protox阻害型除草剤のnitrofenとoxadiazonの両薬剤が低濃度で阻害効果を示した条件下で、PC除草剤のcompound 1およびcompound 2ならびにcompound 3は、SU系除草剤のmetsulfuron-methylやsulfometuron-methylと同様に弱い阻害効果を示した (10 μMで20~30%程度の阻害) (Table 9)。

#### (6) PC除草剤のエンドウPET活性に対する影響



対照薬剤のpropanilは低濃度でP E T活性を阻害したが、 $100\ \mu\text{M}$ という高濃度でも、pyrithiobacおよびcompound 1ならびにcompound 3は、chlorsulfuronやimazapyrと同様にP E T活性を阻害しなかった (Table 10)。



#### 4. 考察

P C 除草剤により阻害されたイネの生育とクロレラの増殖は3種の分岐鎖アミノ酸の同時添加によりドラスティックに回復した。この結果は、本系統除草剤のターゲットが分岐鎖アミノ酸生合成経路上の酵素であることを示唆した。そこで、この経路上の酵素であるA L SとK A R Iに対する影響を検討したところ、P C 除草剤はA L Sを低濃度で阻害するが、K A R Iには阻害効果を示さないことが明らかとなった。P C 除草剤の1つであるpyrithiobacのA L S阻害効果は、S U 系A L S阻害型除草剤であるchlorsulfuronとほぼ同程度であったことから、本系統除草剤のターゲットはA L Sであると判断された。

一方、前述したようにP C 除草剤は他のA L S除草剤と同様に植物体に軽度のクロロシスを起こすことから、クロロフィル生合成に対する影響を調べた。その結果、 $10\ \mu\text{M}$ の濃度で20～30%程度の阻害効果が認められたが、これは、よく知られているクロロフィル生合成阻害剤のnitrofenやoxadiazonよりも弱いものであった。推論ではあるが、この弱いクロロフィル生合成阻害は、分岐鎖アミノ酸の枯渇のため、グリーニングに参与する酵素の*de novo*合成が円滑に行なわれず、酵素が不足するために引き起こされる現象だと考えられる。

また、S U 系除草剤のA L S結合部位は進化の過程で不用となったユビキノン結合部位と推定されており(78)、これが正しいとすると、キノンと拮抗するという点ではA L S阻害剤はP E T阻害剤と共通点を持っていることになる(P E T阻害剤はD1タンパク質のプラストキノン部位に結合する)。さらに、前述したように、P C 除草剤の殺草効果はP E T阻害剤と同様に、弱光条件下で弱まる傾向があることから、P C 除草剤のP E T活性に及ぼす影響を検討した。しかしながら、P C 除草剤は $100\ \mu\text{M}$ という高濃度でもP E T活性にはまったく影響を与えなかった。そこで以下は推論であるが、P C 除草剤の殺草効果が光強度により変動する理由としては次の2点が考えられる。(I)一定強度の光までは(光飽和点)、光合成活性は光強度に比例し、これに伴って植物体の物質代謝や物質転流は活発化する。このため薬剤が活発化した物質転流の流れに乗ると、作用点である成長点に到達する量が多くなり、この結果、強光下では除草活性が速やかに発現し、弱光下では効果発現が遅くなる。(II)光により物質代謝全体が活性化される中で分岐鎖アミノ酸生合成だけが特異的に阻害されると、成長のバランスを極端に崩れてしまい、弱光時より強光下の除草活性が高まる。A L S及び分岐鎖アミノ酸生合成経路はクロロプラストに局在していることから、分岐鎖アミノ酸生合成系は光合成系を介して、光により間接的に調節を受けている可能性が考えられる。なお、K A R I阻害剤と言われているHoe-702はイネのK A R I粗酵素を強く阻害したが、エンドウのK A R Iに対してはほとんど影響を与えなかったことから、K A R Iの薬剤の対する感受性は植物間でかなり相違しているものと考えられる。



Table 7. Effect of PC herbicides on ketol-acid reductoisomerase of rice etiolated seedlings.

Compound <sup>a)</sup>	Inhibition (%)
Pyrithiobac	0.7
Compound 1	5.9
Compound 2	0
CS	0
IP	3.1
HOE-702	95

a) Chlorsulfuron (CS), imazapyr (IP) and HOE-702 were used as reference compounds. All compounds were tested at 100  $\mu$ M.

Table 8. Effect of HOE-702 on the activity of ketol-acid reductoisomerase from etiolated pea seedlings.

Reaction Time (min)	Absorbance changes at 340 nm				
	No enzyme	Boiled enzyme	No acetolactate	Complete	Complete+1 mM HOE-702
5	0.007	0.048	0.020	0.160	0.140
10	0.010	0.062	0.042	0.267	0.239
15	0.015	0.096	0.057	0.347	0.312
20	0.023	0.1	0.079	0.414	0.375
25	0.025	0.129	0.095	0.469	0.423



Table 9. Effects of PC and sulfonylurea herbicides on chlorophyll biosynthesis of etiolated cotton cotyledons<sup>a)</sup>.

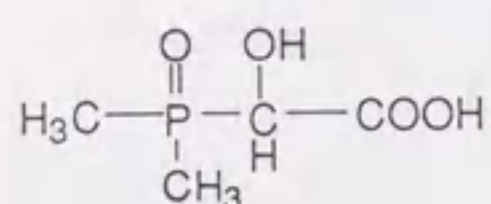
Compound	Concentration tested ( $\mu$ M)	Inhibition (%)
Compound 1	10	28
Compound 2	10	26
Compound 3	10	17
Metsulfuron-methyl	10	28
Sulfometuron-methyl	10	22
Nitrofen	1	0
	10	74
	100	100
Oxadiazone	0.1	0
	1	79
	10	100
	100	100

a) Chlorophyll content of the control sample was 330  $\mu$ g/g tissue.

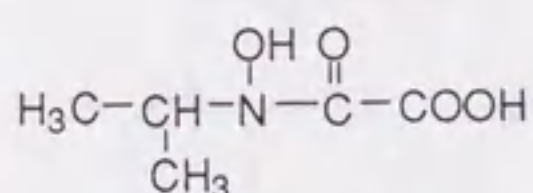
Table 10. Effects of PC herbicides, chlorsulfuron and imazapyr on the photosynthetic electron transport system in pea leaf.

Compound	Concentration tested ( $\mu$ M)	Inhibition (%)
Pyrithiobac	100	0.5
Compound 1	100	0
Compound 3	100	0
Chlorsulfuron	100	0.9
Imazapyr	100	0
Propanil	0.001	0
	0.01	2.4
	0.1	13
	1	74
	10	98
	100	100

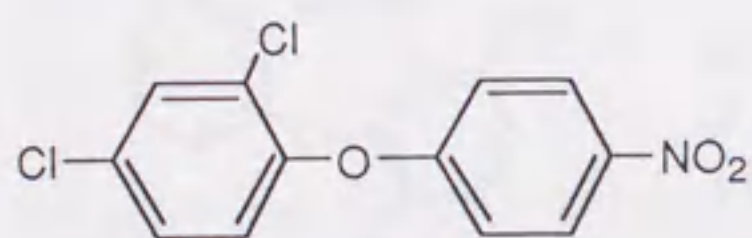




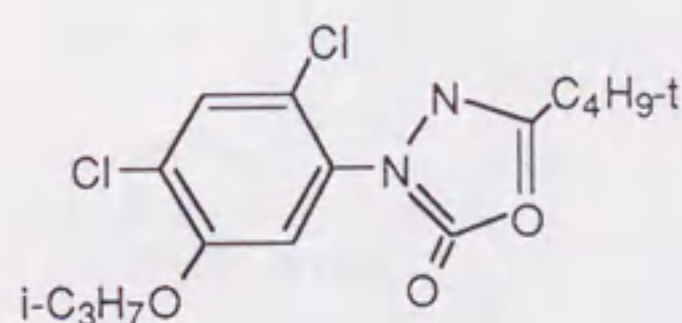
HOE-702  
2-Methylphosphinoyl-2-hydroxyacetic acid



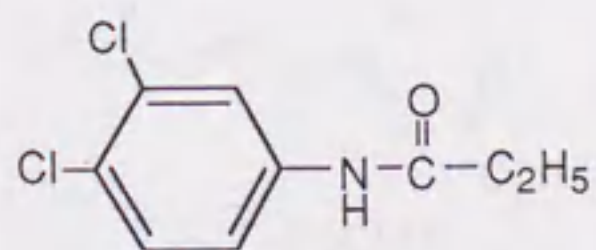
IpOHA  
*N*-Hydroxy-*N*-isopropylxamate



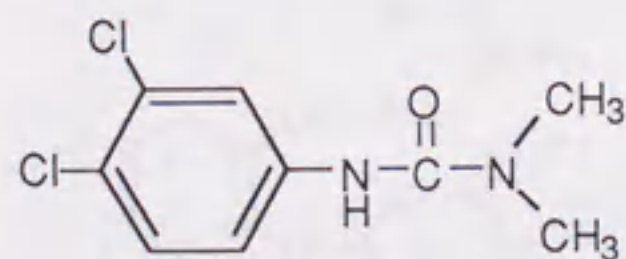
nitrofen (NIP)  
2,4-Dichlorophenyl 4-nitrophenyl ether



oxadiazon  
5-*tert*-Butyl-3-(2,4-dichloro-5-isopropoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazolin-2-one



propanil (DCPA)  
3,4-Dichloropropione anilide



diuron (DCMU)  
3-(3,4-Dichloro)-1,1-dimethylurea

Fig. 8. ケトール酸レダクトイソメラーゼ、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼならびに光合成電子伝達系を阻害する除草剤.



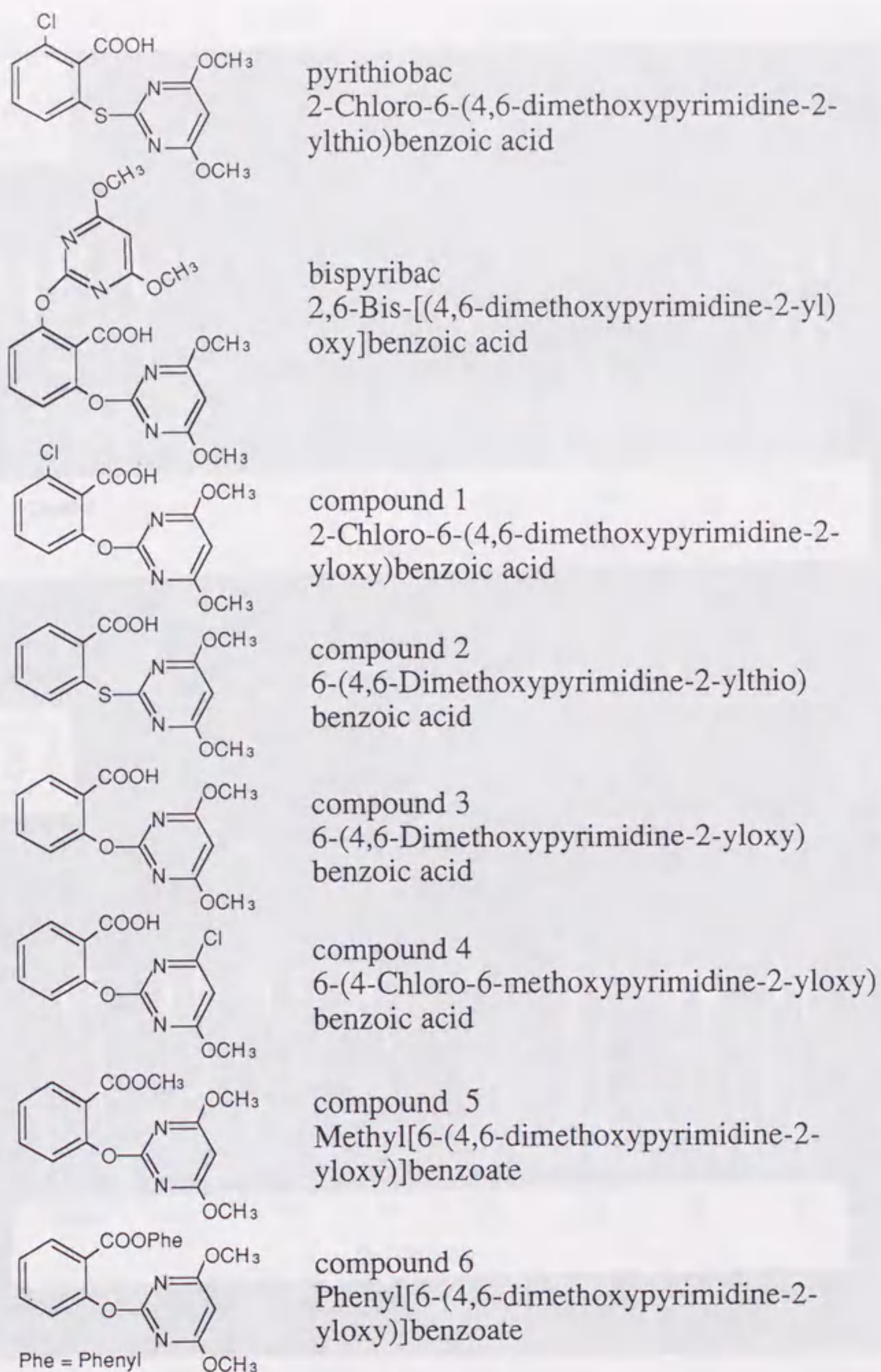


Fig. 9. 実験に使用したPC除草剤.





Photo. Effects of branched-chain amino acids (1 mM each) on the growth of rice seedlings in the presence (A) and absence (B) of 20  $\mu$ M of pyriithiobac.

Control, no amino acid; Leu, L-leucine; Val, L-valine; Ile, L-isoleucine; Leu+Val, L-leucine plus L-valine; Leu+Ile, L-leucine plus L-isoleucine; Val+Ile, L-valine plus L-isoleucine; BAA, L-leucine plus L-valine plus L-isoleucine.



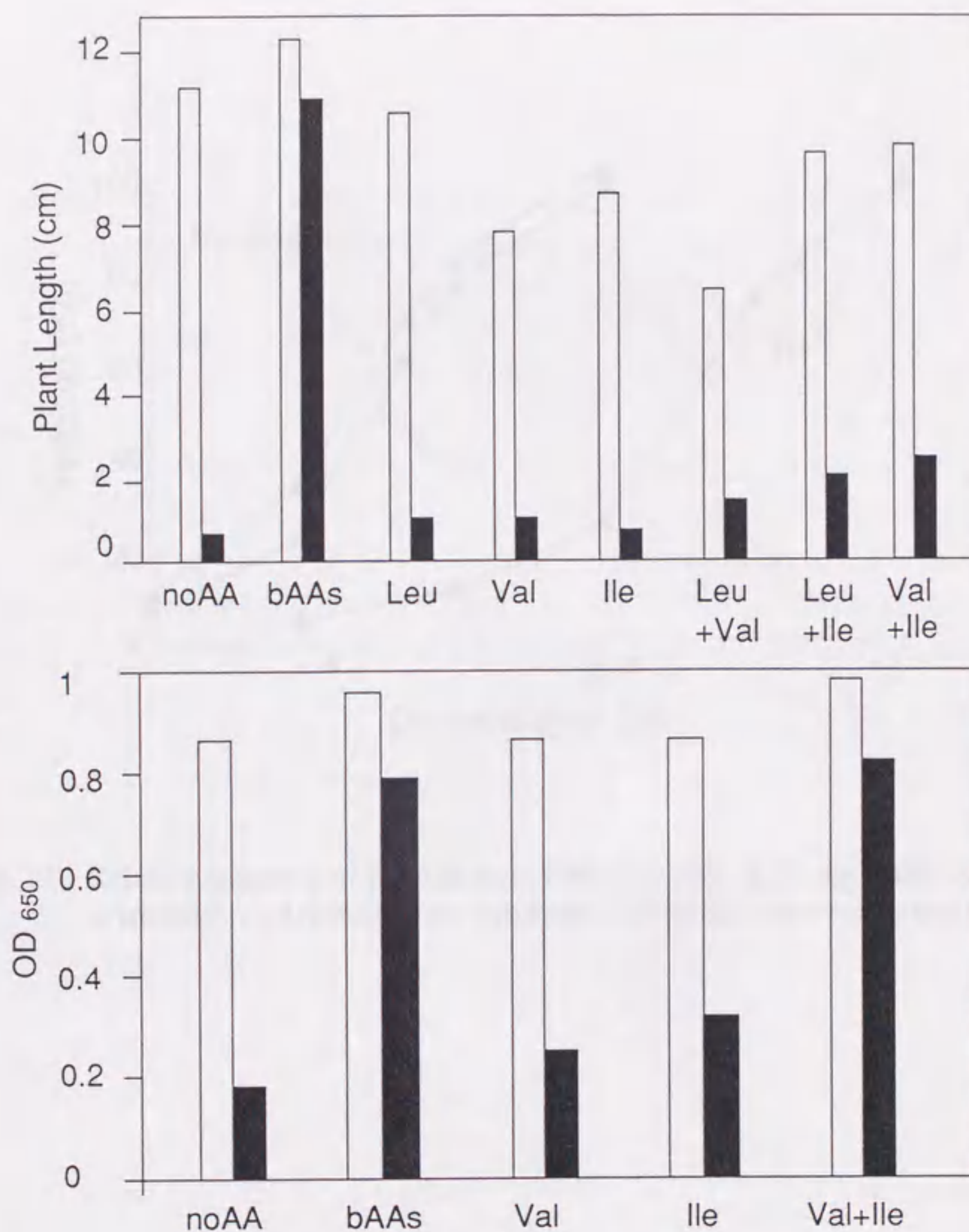


Fig. 10. Effects of branched-chain amino acids (1 mM each) on the growth of rice seedlings (A) and chlorella (B) in the presence and absence of pyrithiobac or compound 1.

Black bars in the upper figure and the lower figure contained 20  $\mu$ M of pyrithiobac and 100  $\mu$ M of compound 1, respectively. White bars contained no chemical compounds.

noAA, no amino acid; bAAs, L-leucine plus L-valine plus L-isoleucine; Leu, L-leucine; Val, L-valine; Ile, L-isoleucine; Leu+Val, L-leucine plus L-valine; Leu+Ile, L-leucine plus L-isoleucine; Val+Ile, L-valine plus L-isoleucine.



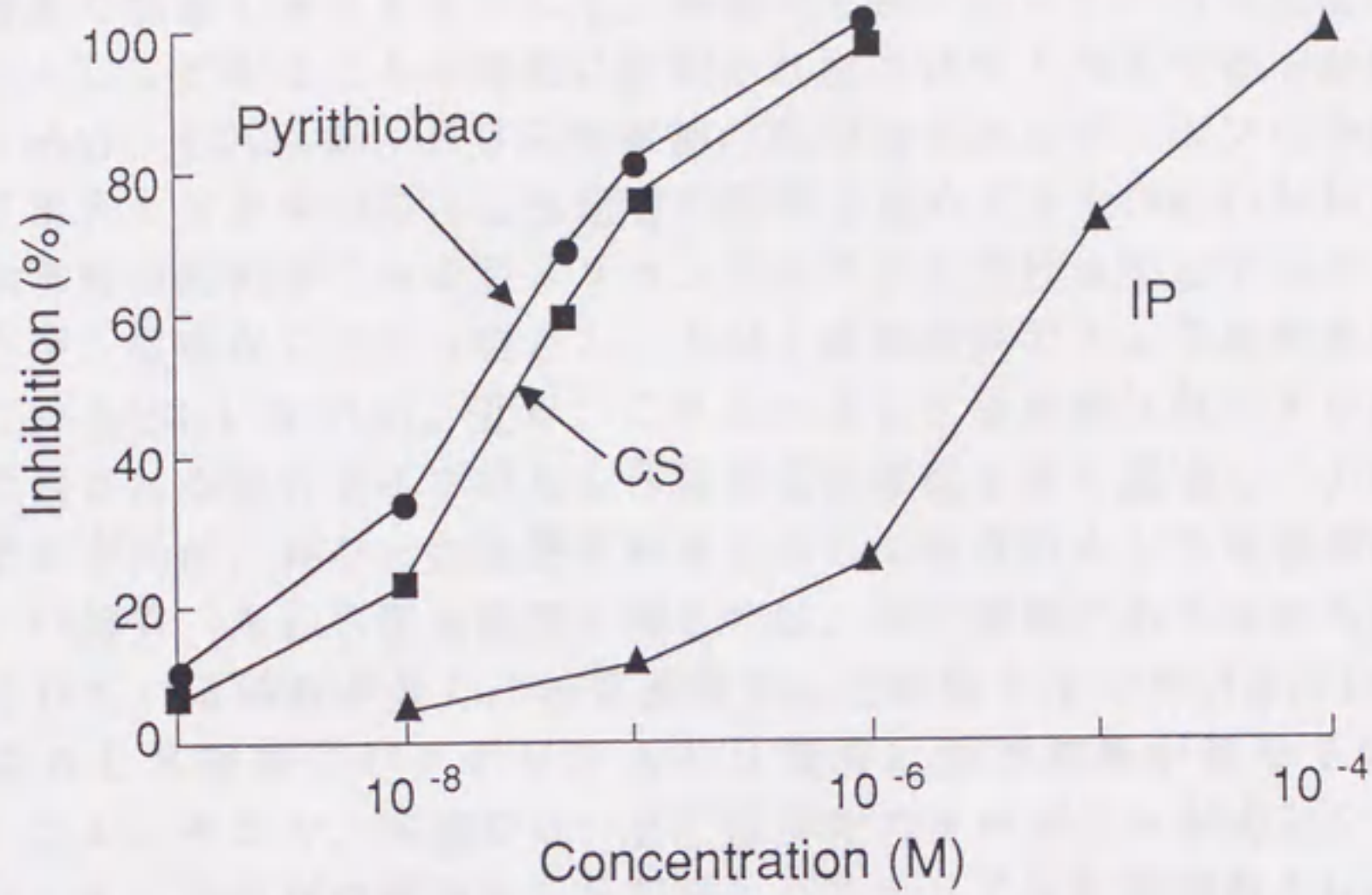


Fig. 11. Relative potency of pyriithiobac, chlorsulfuron (CS) and imazapyr (IP) as inhibitors of acetolactate synthase (ALS) of *Ipomoea lacunosa* L.



## 第2節 PC除草剤の各種植物およびバクテリアALS阻害

### 1. 序

第1節で、PC除草剤はマメアサガオから調製したALSをSU系除草剤と同様に低濃度で阻害することを示した。緒言でも述べたようにSU系除草剤のターゲットがALSであることが最初に証明されたのはサルモネラ菌を材料とした試験であり(66)、それ以来、SU系除草剤の発明者であるデュポン社の研究員はサルモネラ菌ALSを中心にALS阻害の解析を進めてきた(78,113-115)。一方、IMI除草剤の発明者であるアメリカンサイアナミド社は当初デュポン社に遅れをとったが、植物ALSを材料とし、IMI系除草剤のALS阻害解析を独自に展開している(54,116-118)。近年、これらのALS阻害剤以外にダウ社のTP除草剤に代表される他のタイプのALS阻害型除草剤も多く登場し、公的機関も含めて、それぞれが、異なった生物材料を使用して独自のALS阻害解析を行っている。この結果、ALS阻害機構に関しては、同じ薬剤でありながら異なった結果が得られている場合が多く、一見混頓とした状態となっている(119,120)。特に、植物ALS阻害とバクテリアALS阻害は解析結果が異なる場合が多い(Tables 2,4)。そこで、本節では、PC除草剤のターゲットがALSであることの確認と、PC除草剤の植物ALS阻害とバクテリアALS阻害を比較することを目的に次の4項目に関して検討を加えた。

(I) PC除草剤の各種植物ALS阻害

(II) PC除草剤の植物ALS阻害と除草効果の相関

(III) 各種農薬の植物ALSに対する影響

(IV) PC除草剤のバクテリアALS阻害



## 2. 実験材料および方法

### (1) 供試薬剤

P C 除草剤としては、pyrithiobac、bispribac、compound 1、compound 2、compound 3、compound 4 (Fig. 9)ならびにTable 12に示した化合物を使用した。比較薬剤としてはS U系除草剤のchlorsulfuron、metsulfuron-methyl、sulfometuron-methyl、bensulfuron-methyl (Figs. 3,5)、I M I系除草剤としてimazapyrとimazabenz (Fig. 6)ならびに他の農薬としてはTable 13に記載したものを使用した。P C 除草剤および他のA L S 阻害型除草剤は(株) ケイアイ研究所からの提供を受け、他の農薬は原体の市販品を購入した。

### (2) A L S 調製に使用した植物と細菌

植物材料としてジャポニカ種のイネ (*Oryza sativa* L. var. Kinmaze)、インデカ種のイネ (*O. sativa* L. var. La-Belle)、コムギ (*Triticum aestivum* L. var. Nohrin 61)、トウモロコシ (*Zea mays* L. var. Pioneer 3352)、ソルガム (*Sorghum vulgare* L. var. Texas)、エンドウ (*Pisum sativum* L. var. Akabanatsurunashi)、ワタ (*Gossypium hirsutum* L. var. Cocher)、ダイズ (*Glycine max* Merr. var. Deltapine 506)、マメアサガオ (*Ipomoea lacunosa* L.)、イチビ (*Abutilon theophrasti* Medic.)、タイヌビエ (*Echinochloa oryzicola* Vasing.) を使用した。供試植物は暗下 27℃ でバーミキュライト上で5~8日間栽培した後、実験に供試した。イネ、トウモロコシ、コムギ、ソルガム、エンドウならびにイチビの場合には茎葉全体からA L S を抽出し、ダイズおよびワタならびにマメアサガオの場合には、子葉を除いた下はい軸から調製した(子葉には多量のポリフェノールが含まれ抽出時にA L S が失活しやすい)。なお、イネ (var. Kinmaze) 以外は市販の種子を購入した。

一方、細菌としては、腸内細菌科の大腸菌 (*Escherichia coli* K-12 IFO3301) とサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium* ATCC25566) ならびにシュードモナス科のシュードモナス菌 (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC7700 (IFO3899)) を材料とし、これらはストックカルチャーを東京大学応用微生物研究所より購入した。

### (3) 植物 A L S の調製

基本的には第1節に記載した方法で粗A L S を調製したが、ホモジナイズによる褐変の小さなイネ、トウモロコシ、コムギ、ソルガムならびにエンドウの場合には、抽出用緩衝液として10% グリセロールと0.5 mM MgCl<sub>2</sub>を含んだ100 mM リン緩衝液 pH7.5を使用し、僅かに褐変を示すダイズの場合にはこの緩衝液中に1 mMのD T Tを添加した。一方、褐変の激しいワタ、マメアサガオ、イチビならびにタイヌビエからの調製方法は第1節に記載した方法に従った。



#### (4) 細菌の培養とA L Sの調製

大腸菌とシュードモナス菌の前培養と本培養は、Davisの最小培地 ( $K_2HPO_4$  7 g、 $KH_2PO_4$  2 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g、 $(NH_4)_2SO_4$  1 g、クエン酸ナトリウム・ $2H_2O$  0.5 g、グルコース 2 g、蒸留水 1000 ml) で行なった。一方、今回材料としたサルモネラ菌はトリプトファン要求性変異株であることから、前培養はトリプトファンを添加する場合としない場合の2通りで培養し、本培養はトリプトファンを添加して培養した。トリプトファンの添加量は0.1 g/1000 mlとした。なお、培養は振とう培養で、温度を37℃、時間を、前培養20時間、本培養18時間とした。培養終了後、遠心分離により菌体を集め、蒸留水で洗浄した。再度の遠心で集菌し、これを30% クリセロールと0.5 mM  $MgCl_2$ を含む100 mM リン酸カリウム緩衝液pH7.5に懸濁させた。この懸濁液を超音波処理し (Sonicator W-225R, Heat System Ultrasonic Inc. フラットチップ1/2を使い、20 kHz、100 W 2/1秒インターバルで5分間)、その遠心 (15,000×g、20分) 上澄をA L S粗酵素源とした。

#### (5) A L S活性の測定

P C除草剤の、植物および大腸菌ならびにシュードモナス菌A L Sに対する阻害効果を調べるためのA L S活性測定は第1節に記載した方法に従った。一方、サルモネラ菌の場合にはアイソザイムIの活性測定には100  $\mu$ Mの sulfometuron-methylを添加し、アイソザイムIIの活性測定には10 mMのバリンを添加した。また薬剤溶液はアセトン溶液を調製した後所定濃度となるように蒸留水で希釈して反応液に添加し、アミノ酸溶液は水溶液として添加した。なお、バクテリアA L Sの反応温度と反応時間は各々37℃、30分間とし、I50値はプロビットから算出した。

#### (6) A L S阻害と除草効果の相関

除草効果は横山らのデータ(48,49)を引用し、P C除草剤16化合物のエンドウ黄化幼植物A L S阻害とヒエに対する除草効果の相関をSpermanの順位相関(121)により調べた。A L S阻害効果と除草効果は各々I50値とEC90 (90%殺草効果を示すために必要な薬剤処理量 (g/ha)) で比較した。



### 3. 実験結果

#### (1) PC除草剤の各種植物ALS阻害

供試化合物のALS阻害の強さを草種別に眺めると次のようになった(Table 11)。イネの場合、ジャポニカ種、インディカ種の間には感受性差はほとんど認められず(La-BellaとKinmazeのI50の比が1~1.29の間に納まった)、阻害効果の強い順に並べると次のようになった。Bispyribac>pyrithiobac=compound 1 $\geq$ chlorsulfuron>compound 2>compound 3>compound 4>imazapyr。トウモロコシの場合の阻害強度もイネの場合とほぼ同じでbispyribac>pyrithiobac=compound 1 $\geq$ chlorsulfuron>compound 2>compound 3>compound 4>imazapyrとなった。コムギの場合はイネとまったく同じ順序となった。ソルガムの場合はbispyribac=compound 1 $\geq$ pyrithiobac>chlorsulfuron>compound 2>compound 3>compound 4>imazaapyrの順となった。ダイズとワタはまったく同じ順序でbispyribac>pyrithiobac=compound 1>chlorsulfuron>compound 2 $\geq$ compound 3>compound 4=imazapyrとなった。マメアサガオの場合はbispyribac>pyrithiobac=compound 1 $\geq$ chlorsulfuron>compound 2>compound 3>compound 4=imazapyrとなり、イチビの場合はbispyribac>compound 1 $\geq$ pyrithiobac=chlorsulfuron>compound 1>compound 2>imazapyr $\geq$ compound 4の順序となった。以上、草種間で若干の相違が認められたが、全草種に渡り、bispyribacがもっとも強い阻害効果を示し、次いでpyrithiobac、compound 1ならびにchlorsulfuronの4化合物がほぼ同じ強さで阻害し、compound 2とcompound 3はこれらには劣るがcompound 4やimazapyrよりは強い阻害効果を示すという傾向であった。また、イネに対して選択性を示すbispyribac(49)とワタに対して選択性を示すpyrithiobac(48)ならびにムギに対して選択性を示すchlorsulfuron(122)は、各々、イネ、ワタ、ムギのALSを強く阻害した。

#### (2) PC除草剤の植物ALS阻害と除草効果の相関

供試16化合物のエンドウALS阻害とヒエに対する除草効果 (Table 12)のSpermanの順位相関係数は $r_s = 0.613$ となり、この値は両側 $P < 0.05$ の有意水準 $0.503$ よりも大きく、両側 $P < 0.01$ の有意水準 $0.635$ よりも小さいものであった。従って、5%の危険率で両者の相関関係は有意であると判断された。

#### (3) 各種農薬の植物ALSに対する影響

既存除草剤および殺菌剤ならびに殺虫剤のエンドウALS粗酵素に対する影響を調べたところ、供試薬剤の中には $0.1 \text{ mM}$ の濃度でALSを阻害する薬剤は見当たらなかった (Table 13)。



#### (4) PC除草剤のバクテリアALS阻害

大腸菌は通常アイソザイムIとIIIを発現することが知られており、両者は至適pHおよびFAD依存性の違い等で区別できる(123,124)。今回使用した大腸菌は、上記培養条件ではアイソザイムIしか発現してないことが、至適pHより確認された (Fig. 12)。そこでこのアイソザイムIに対する各種ALS阻害剤の影響を調べたところ、IMI系除草剤は阻害効果を示さなかったが、PC除草剤およびSU系除草剤の一部には弱いながらも阻害効果が認められた (Table 14)。PC除草剤の中で阻害が認められたのはブリッジ元素がイオウのpyrithionbacとcompound 2であり、compound 2による阻害効果がpyrithionbacよりも強かった。また、SU系除草剤の中で阻害効果を示したのはchlorsulfuronとmetsulfuron-methylで、この両薬剤は他の2化合物とは異なりトリアゾール環を有していた。

一方、サルモネラ菌はアイソザイムIだけではなくアイソザイムIIを有していることが知られており、このアイソザイムIIはIやIIIとは異なり、バリンによる阻害に非感受性である。そしてIとIIの比率は培地組成や培養条件により変化することが知られている(125,126)。そこで、アイソザイムIIを多く作らせることを目的として、前培養にトリプトファンを添加せずに培養した後、トリプトファンを添加した培地で培養したところ、前培養にトリプトファンを添加した場合よりバリンによる阻害が弱くなり、この場合にはアイソザイムIIが発現していることが明かとなった (Fig. 13)。このIIが多く含まれる粗酵素液を用いて、各種ALS阻害剤の影響を調べたところ、PC除草剤およびSU系除草剤はIMI系除草剤とは異なり、アイソザイムIIを強く阻害することが明らかとなった (Table 14)。PC除草剤の中ではpyrithionbacとcompound 2が強い阻害を示したが、植物ALS阻害の強いcompound 1の阻害効果はcompound 2よりも弱いものであった。一方、これらとは対照的に供試したSU系除草剤はすべて強い阻害効果を示した。そこで、植物ALSに対して同程度の阻害活性を示すpyrithionbac、compound 1、chlorsulfuronならびにsulfometuron-methylの4薬剤について、化合物濃度を変化させて阻害強度を比較したところ、chlorsulfuron>sulfometuron-methyl>pyrithionbac>compound 1の順序となり (Fig. 14)、PC除草剤のアイソザイムIIに対する阻害効果はスルホニルウレアよりは弱いことが示唆された。また、前培養にトリプトファンを添加した場合にはアイソザイムIが主要なALSであったが、このアイソザイムIの薬剤感受性は大腸菌のアイソザイムIとまったく同じであった (Table 14)。

一方、供試化合物のほとんどすべてがシェードモナスのALSを、サルモネラ菌ALSアイソザイムIIよりも強く阻害した (Table 14)。特に注目されたのは、大腸菌とサルモネラ菌のALSを100  $\mu$ Mの濃度では阻害しなかったIMI系除草剤のimazabenzとimazapyrがシェードモナスALSを低濃度で阻害したことであり、この結果はシェードモナスALSの阻害剤に対する感受性が植物ALS



に類似していることを示唆した。そこで、濃度を変化させてシェードモナス A L S 阻害を詳しく調べたところ、阻害活性の強さは  $\text{bispyribac} > \text{sulfometuron-methyl} = \text{chlorsulfuron} > \text{pyrithiobac} > \text{compound 1} = \text{compound 2} > \text{imazabenz} > \text{imazapyr} > \text{compound 4}$  の順番となり (Fig. 15)、強度および順番ともに植物 A L S に類似することが確認された。



#### 4. 考察

第1節ではP C除草剤の代表化合物であるpyrithiobacがマメアサガオのA L Sを低濃度で阻害することを明らかにしたが、本節においてpyrithiobacだけでなく他の化合物を含めて、P C除草剤は各種植物A L Sを低濃度で阻害することが明らかとなった。また、A L Sの薬剤感受性は植物間で大きな差異は認められなかったことから、種子が入手しやすいエンドウを材料として、A L S阻害効果と除草効果の相関を調べたところ、両者には低いながらも相関関係が認められた。一方、既存の除草剤および殺菌剤ならびに殺虫剤のA L Sに対する影響を調べた結果、供試化合物の中にはA L Sを阻害する薬剤は見当たらなかった。従って、P C除草剤のターゲットはA L Sであることは確実であり、本系統除草剤は特異的にA L Sを阻害することで、殺草作用を発現するものと考えられる。また、pyrithiobacはワタに対して安全性が高く(48)、bispyribacはイネに対して安全性の高い薬剤である(49)が、この両薬剤は、雑草を含めた他の植物A L Sに対するのと同じ程度に、ワタとイネのA L Sを低濃度で阻害したことから、両剤の作物雑草間の選択性は、薬剤の吸収移行性や解毒代謝等のA L Sの感受性以外の要因に依存していることが示唆された。

一方、緒言でも述べたように、S U系除草剤のA L S阻害はバクテリアA L Sを材料として精力的になされてきたという経緯があるため、P C除草剤のA L S阻害の特徴をS U系やI M I系除草剤と比較することを目的に、P C除草剤のバクテリアA L Sに対する阻害効果を調べた。その結果、P C除草剤はS U系除草剤に比べると、大腸菌やサルモネラ菌のA L S阻害は弱い傾向にあるが、シェードモナスA L S菌に対しては同等の強い阻害効果を示し、その阻害効果はI M I系除草剤よりも強いことが明らかとなった。この結果は、A L S阻害の強さという観点からは、P C除草剤はI M I系除草剤とS U系除草剤の中間の性質を有することを示唆した。

さらに、この研究過程で、植物A L Sと類似していると言われていたA L SアイソザイムIIは植物A L Sとは相違しており、それとは対照的にシェードモナスA L Sが植物に類似した性質を有していることが明らかとなった。従来、基質特異性の類似性から、A L SアイソザイムIIは植物A L Sに最も良く似た細菌A L Sであると考えられてきたが(70)、上記の結果は、A L S阻害剤の結合部位に関しては、むしろアイソザイムIに類似したシェードモナスA L S（バリンによりフィードバック阻害を受ける）が植物に近いことを示唆した。アイソザイムIIはフィードバック阻害に非感受的であるという面で植物A L Sとは異なっていることを含めて判断すると、アイソザイムIIは活性部位以外は植物A L Sとは相違しているものと考えられる。一方、アイソザイムIは、アイソザイムIIとは対照的に活性部位が植物A L Sと異なっていることが明らかにされており(70)、今回、A L S阻害剤に対する感受性の面でも植物A L Sとは異なることが明確となった。従って、A L S阻害剤の結合部位に関しては、バクテリアのA L Sアイソザイム



IとIIは植物ALSとかなり異なっているものと判断される。これが序でも述べたようなALS阻害剤の植物ALS阻害と細菌ALSアイソザイムI、II阻害を同一に論じることができない主な原因であるものと考えられる。



Table 11.

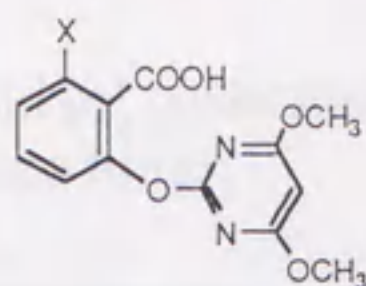
Inhibition of ALS from crops and weeds by PC herbicides, chlorsulfuron (CS) and imazapyr (IP).

Enzyme Source	Concentration required for 50% inhibition (nM)							
	Pyriithiobac	Bispyribac	Com 1 <sup>a)</sup>	Com 2 <sup>a)</sup>	Com 3 <sup>a)</sup>	Com 4 <sup>a)</sup>	CS	IP
Cotton	20	9.1	18	460	560	15000	44	11000
Soybean	42	13	28	200	470	10000	56	20000
Pea	20	8.3	23	160	390	4600	27	37000
Rice (cv.Kinmaze)	15	12	15	60	300	4500	28	9100
Rice (cv.La-Belle)	17	12	16	66	340	5800	31	10000
Wheat	21	12	18	93	390	8500	33	17000
Corn	20	12	18	99	380	5200	36	11000
Sorghum	15	10	11	95	320	5400	36	10000
Morning glory	19	7.1	17	160	790	5500	28	3300
Velvetleaf	70	16	46	290	1100	16000	64	9100
Barnyard grass	<sup>b)</sup>	11	-	-	-	-	-	-

a) Com means Compound. b) Not tested.



Table 12. Herbicidal and ALS Inhibitory activities of PC herbicides.



X	Herbicidal Activity for barnyard grass, ED <sub>90</sub> (g/10a) <sup>a)</sup>	ALS inhibition I <sub>50</sub> (nM) <sup>b)</sup>
H	12	250
Cl	1.5	24
Br	3	16
CH <sub>3</sub>	3	130
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	3	270
OCH <sub>3</sub>	3	45
OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	6	90
	100	22
	>100	264
	100	827
	6	14
	0.4	7.0
	25	1600
	6	46
	0.4	9.1
	1.5	26

a) The data were cited from the papers by Yokoyama *et al.*

b) ALS from etiolated pea seedlings were used in the experiments.



Table 13. Effects of standard pesticides on the activity of ALS from etiolated pea seedlings.

Compound <sup>a)</sup>	Inhibition (%)	Compound <sup>a)</sup>	Inhibition (%)
Atrazine	0.7	Isoxathion/Karphos	0.8
Simetryne	0.7	Trycyclozol/Beam	-0.6
Propanil	0.8	Acephate	1.1
Trifluralin/Treflan	-2.3	Methidathion	5.5
Swep/MCC	0.6	DCMU/Diuron	0.0
Sevin/NAC	0.3	Fenthion/MPP	-0.7
Bassa/BPMC	0.8	Chlorpyrifos	0.2
Tsumacide/MTMC	0.4	Benthiocard	1.8
2,4-D	1.9	Benomyl/Benlate	1.5
Colchicine	0.7	Molinate	1.8
Prophenphos	1.1	Eptam/EPTC	-0.2
Allethrin	4.3	Methylbencard	-2.6
MSO	2.3	Malathion	5.1
Glyphosine	0.0	IBP	2.1
CIPC	0.8	Diazinon	-0.6
Alloxidim-sodium	2.5	Chloropyriphos-methyl	-0.4
Orbencard	0.6	Fenitrothion/MEP	0.5
Butachlor	2.7	Edifenphos/EDDP	0.5
Propaphos/Kayaphos	2.0	Linuron	0.4
Sumioxin	2.6	Phthalide/Rabicide	0.8
Cypermethrin	0.6	TPN/Daconil	-1.2
Permethrin	-1.3	PCP	7.8
Sulfabenzamide	-6.7	Oxycarboxin	-0.3
Sulfadiazine	1.3	Mepronil	-0.5
Sulfaguanidine	0.9	CNP/Chlornitrofen	-4.3
Sulfamethizole	1.7	Nitrofen/NIP	-3.1
Sulfapyridine	2.7	Amitrole/ATA	2.1
Sulfathiazole	1.8	Isoprothiolan	-0.4
DDT	-0.1	DEP/Depterex	0.7
Defenopenten/KK-80	0.2	Captan	16.5
Nereistoxin	4.1	Rotenone	6.0

a) Concentration of each chemical compound was 0.1 mM.



Table 14.

Inhibition of ALS isozymes from bacteria by PC, sulfonylurea<sup>a)</sup> and imidazolinone<sup>b)</sup> herbicides, and L-valine.

Compound <sup>c)</sup>	Inhibition (%)			
	<i>E. coli</i> <sup>d)</sup>	<i>S. typ</i> <sup>e)</sup>		<i>P. aer</i> <sup>f)</sup>
	ALS I	ALS I	ALS II	ALS
Pyriithiobac	17	12	77	98
Bispyribac	4.1	3.0	76	97
Compound 1	4.8	3.2	56	97
Compound 2	39	38	71	96
Compound 3	0	0.1	48	68
Compound 4	4.3	3.1	64	24
CS	69	68	97	98
SM	6.4	2.8	87	97
MM	23	21	91	99
BM	3.4	2.2	88	99
IP	0	-	3.9	79
IB	0.4	0.2	0.2	95
L-Valine (1mM)	94	89	0	85

a) Sulfonylurea herbicides tested were chlorsulfuron (CS), sulfometuron-methyl (SM), metsulfuron-methyl (MM) and bensulfuron-methyl (BM).

b) Imidazolinone herbicides tested were imazapyr (IP) and imazabenz (IB).

c) Concentration of each chemical compound except for L-valine was 100  $\mu$ M.

d) *Escherichia coli* K-12 IFO3301.

e) *Salmonella typhimurium* ATCC25566.

f) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC7700 (IFO3899). g) Not tested.



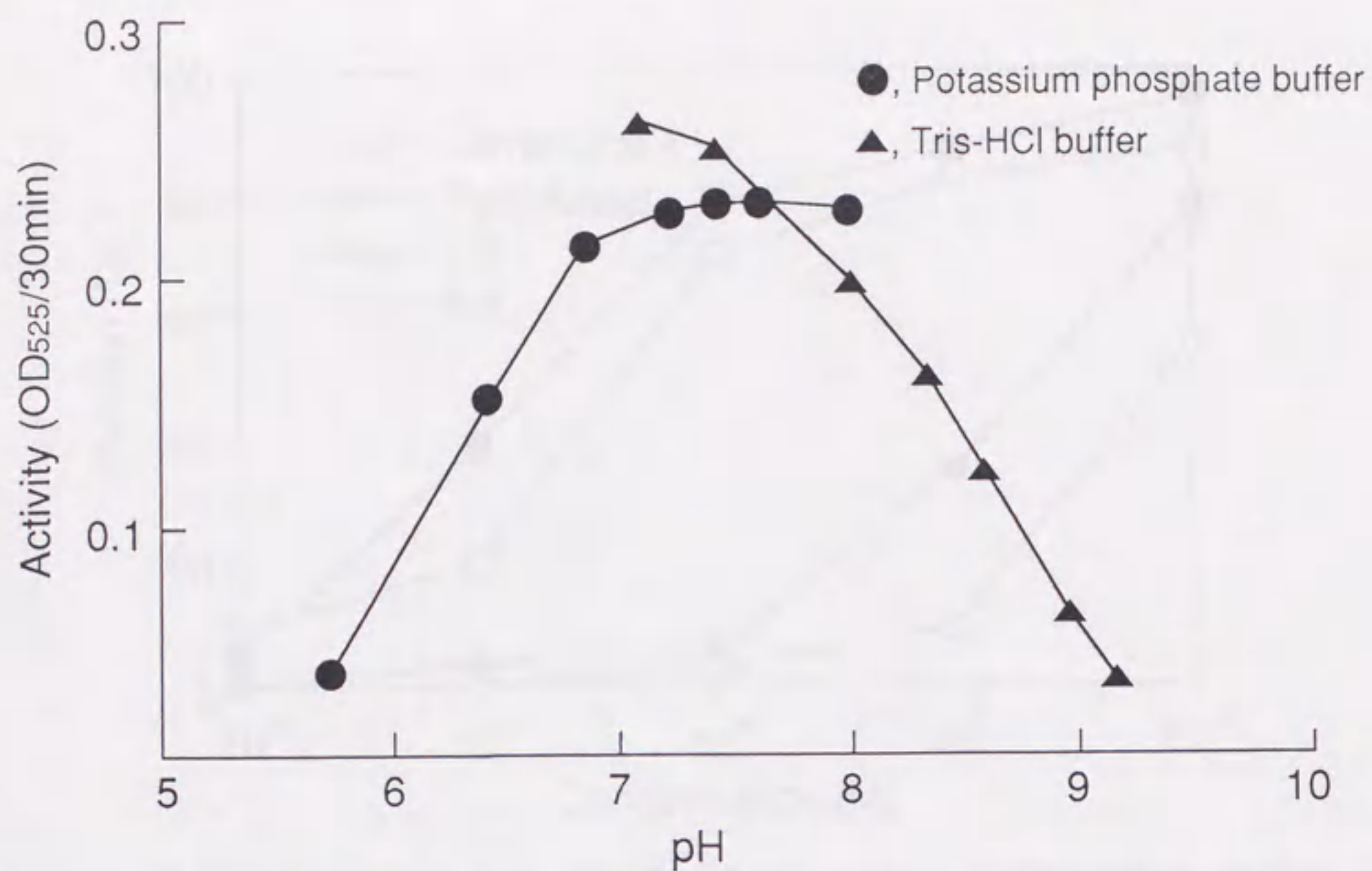


Fig. 12. pH Dependency of ALS of *Escherichia coli* K-12 IFO3301.

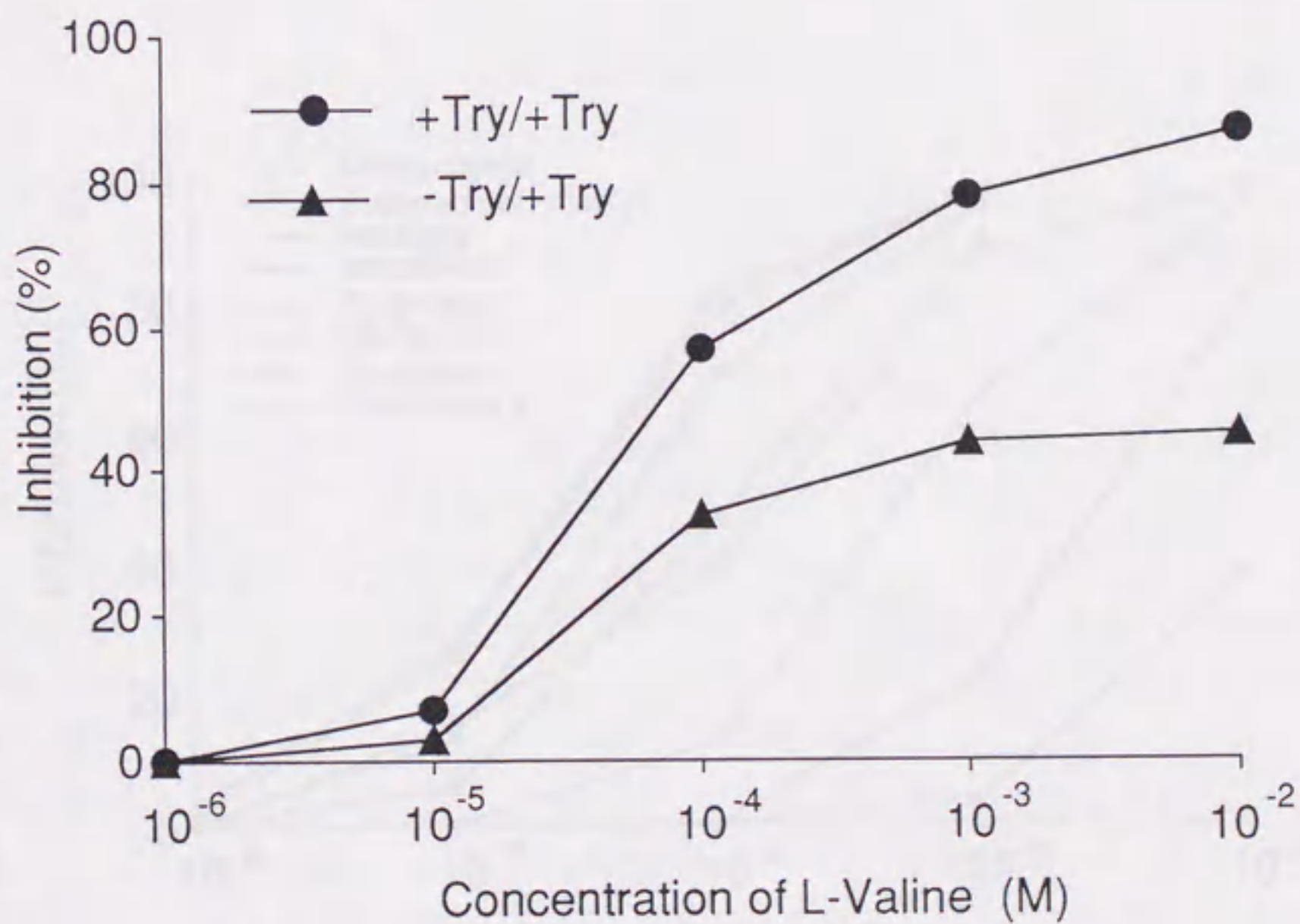


Fig. 13. Inhibition of ALS of *Salmonella typhimurium* ATCC25566 by L-valine.

- , Tryptophan was added in both pre-culture and main-culture media.
- ▲, Tryptophan was added only in a main-culture medium.



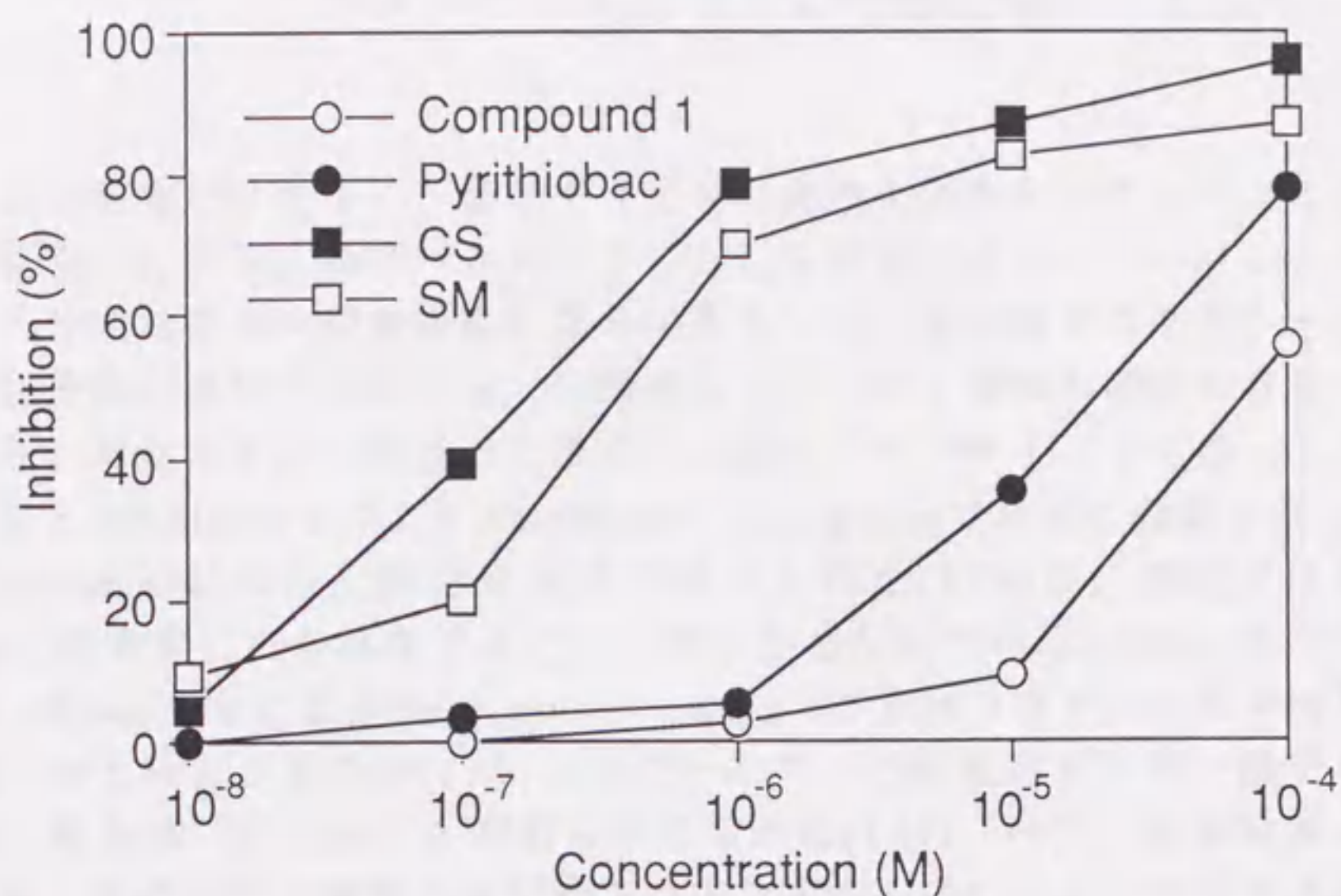


Fig. 14. Relative potency of pyrithiobac, Compound 1, sulfometuron-methyl (SM) and chlorsulfuron (CS) as inhibitors of ALS isozyme II of *Salmonella typhimurium* ATCC25566.

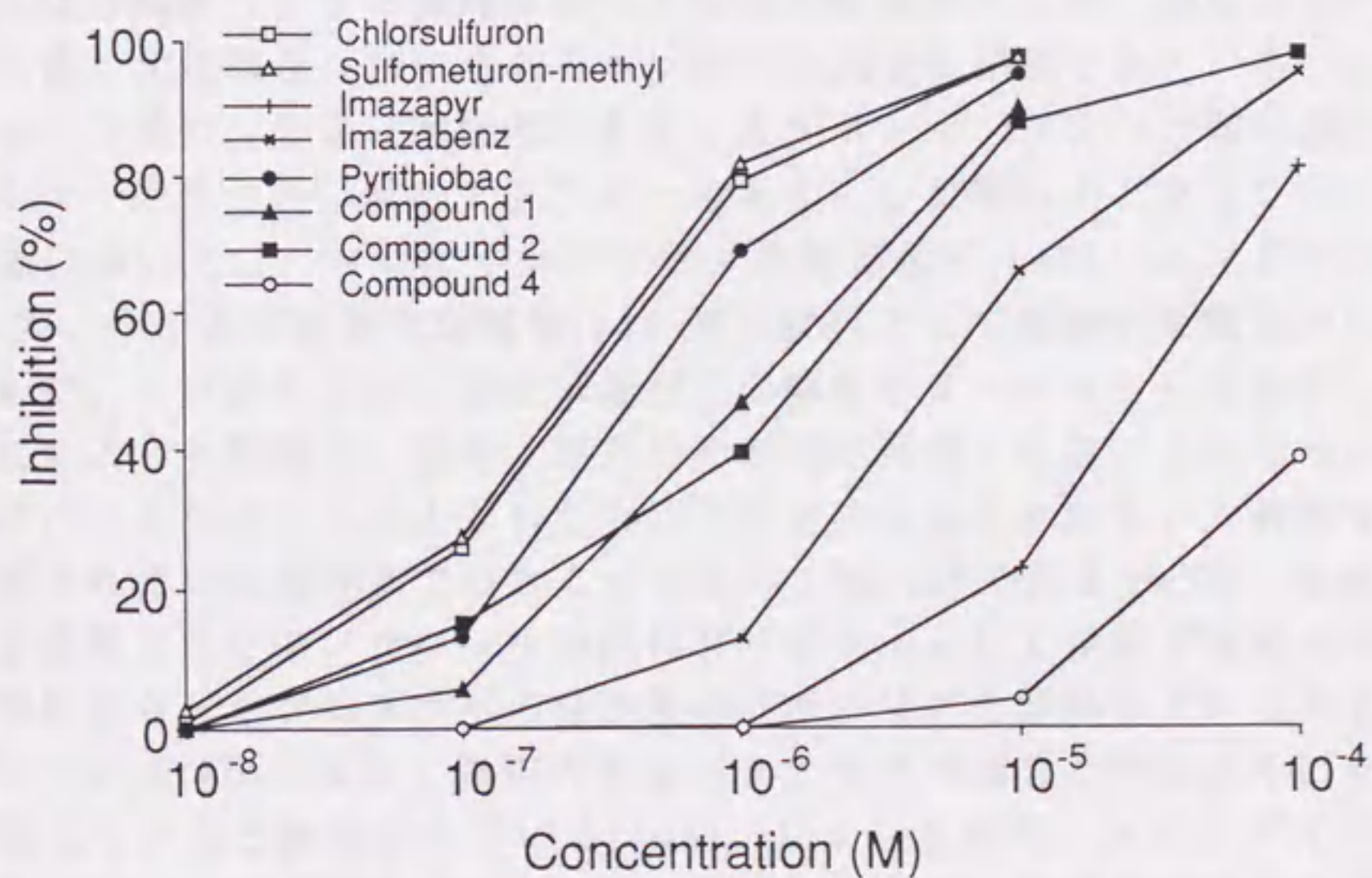


Fig. 15. Inhibition of ALS of *Pseudomonas aeruginosa* by PC, sulfonylurea and imidazolinone herbicides.



### 第3節 エンドウ黄化幼植物 A L S の部分精製と性質検討ならびに バクテリア A L S との性質比較

#### 1. 序

A L S は植物だけでなく、酵母やカビ等の真核生物からバクテリアに至る広い範囲に存在している。特にバクテリアの A L S にはロイシン、バリン、イソロイシン等の分岐鎖アミノ酸生合成に関与する A L S (生合成系 A L S) とピルビン酸の異化分解に関与する A L S (分解系 A L S) の2種類の酵素の存在が報告されており、前者はさらに前述したように3種のアイソザイムから成っている。分解系 A L S は Halpern らにより *Aerobacter aerogenes* で最初に発見され(127)、その後、Störmer によって詳細な性質が調べられた(128)が、現在では *Bacillus subtilis* (枯草菌) にも存在することが明らかとなっている(129)。また、真核生物では、Kuwana らにより *Neurospora crassa* (アカパンカビ) にも分解系 A L S が存在すると報告されたが(130)、後になってこの酵素はピルビン酸デヒドロゲナーゼ(複合体)であることが明らかにされた(131)。一方、生合成系 A L S に関しては、前述した大腸菌およびサルモネラ菌ならびにシュードモナス菌を代表として、その他に *Mycobacterium pellegrino* (132)、*Streptomyces rimosus* (133)、*Bacillus subtilis* (134)、*Aerobacter aerogenes* (135)等のバクテリアや放線菌、ならびに *Neurospora crassa* (アカパンカビ) (136)、*Saccharomyces cerevisiae* (酵母) (137)、*Euglena gracilis* (ミドリムシ) (138)、*Chlorella emersonii* (クロレラ) (139)等の真核微生物で検討が加えられている。生合成系 A L S は分解系 A L S とは対照的に不安定な酵素であるが、現在までにシュードモナス菌と大腸菌ならびにサルモネラ菌から完全に精製されている(70, 140, 141)。サルモネラ菌の A L S は触媒部位を有するプロトマーが2つと調節部位を有するプロトマーの2つから成るテトラマーであることが明らかとなっている(70)。

植物においては、古くはインゲンマメの発芽種子(142)、エンドウの未成熟種子(143)、オオムギの黄化幼植物(144)等を材料として基礎的な側面から研究がなされたが、S U 系や I M I 系除草剤がこの酵素をターゲットにすることが明らかにされたことを契機に、近年、精力的な研究が再開されるようになった。植物 A L S はバクテリア A L S よりもさらに不安定であることから、一般的な方法で完全精製されたのは現在までのところ大麦の1例だけであるが(59)、合成したペプチドを抗原としたモノクローナル抗体をリガンドとして精製が進められた結果、触媒部位を有したプロトマーの分子量はバクテリアと類似していることが明らかになっている(60)。また、細胞内ではバクテリアの場合と同じようにテトラマーで存在していると推測されている(145)。しかしながら、アイソザイムの有無や制御中心を有するプロトマーの存在ならびにバクテリアで見い出されている分解系 A L S に関しては現在までのところ明確な解答が得られていない。

翻って、第2節で明らかにしたように、P C 除草剤は極めて強い植物 A L S の



阻害剤であり、かつSU系除草剤と同様にバクテリアのALSにも比較的強い阻害効果を示す。そこで、PC除草剤によるALS阻害機構の詳細を調べる前に、ALSの性質を明確にしておくことは必須であるとの観点から、次の4項目に関して検討を加えた。

(I)植物ALSの部分精製

(II)植物ALSの諸性質検討

(III)ALS活性を妨害する他酵素の活性測定

(IV)バクテリアALSの性質



## 2. 実験材料および方法

### (1) 供試薬剤

PC除草剤としてcompound 3 (Fig. 9)、ALSのフィードバック阻害剤として、ロイシンおよびバリンならびにイソロイシンを使用した。

### (2) 供試生物材料

植物材料としてはエンドウ、バクテリアとして大腸菌およびサルモネラ菌を使用した。

### (3) ALS粗酵素の調製

第2節に記載した方法に従い、エンドウ黄化幼植物茎葉および大腸菌ならびにサルモネラ菌からALS粗酵素を調製した。

### (4) ALSの部分精製

粗酵素を使用し、安定性を調べた上で、エンドウから次の方法でALSを部分精製した。吸水後、27℃の暗下、パーミュキュライト上で6日間生育させたエンドウ黄化幼植物茎葉を組織重の2倍量の20% (v/v) グリセロール、0.5 mM TPP、10  $\mu$ M FAD、0.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM DTTを含んだ100 mM リン酸カリウム緩衝液pH7.5 (緩衝液1) でヒスコトロンを使用し、ホモジナイズした。ホモジネートをナイロンガーゼでろ過した後、15,000×gで20分間遠心した。遠心上澄に25%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加し、氷冷しながら約1時間放置した。これを再度15,000×gで遠心し、その遠心上澄に50%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加した。再度氷冷しながら約1時間放置した後15,000×gで20分間遠心した。沈澱を20% (v/v) グリセロール、0.5 mM TPP、0.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM DTT含んだ10 mM Tris-HCl緩衝液pH7.8 (緩衝液2) に溶解させ、緩衝液2で平衡化したセファデックスG-25にアプライした。素通り画分を緩衝液2で平衡化したDEAE-トヨパール650 Mカラムにアプライし、ALSをカラムに吸着させた。このカラムを緩衝液2、つづいて0.1 M KClを含んだ緩衝液2でカラムを洗浄することにより不要なタンパク質を洗い流した。その後、0.1~0.3 MのKClグラジエントの緩衝液2でALSを溶出した。活性画分を集めた後、緩衝液1と同じ添加物を加えた10 mM リン酸カリウム緩衝液pH7.2 (緩衝液3) で平衡化したセファデックスG-25にアプライし、緩衝液交換を行なった。これを緩衝液3で平衡化したBio-Gel HTPハイドロキシアパタイトカラムにアプライし、緩衝液3で洗浄後、緩衝液3の10 mM~200 mMのリン酸カリウム緩衝液グラジエントでALSを溶出した。活性画分を集めた後、限外ろ過で濃縮し、これを緩衝液1で平衡化したセルロファインGCL-2000 sfカラムにアプライし、緩衝液1でALS



を溶出し、これを部分精製標品とした。なお、これとは別に、次の方法で Leucine-Sepharose 4B を使用したアフィニティークロマトグラフィーを行なった。D E A E-トヨパール後の活性画分に、最終濃度が 0.9 M となるように硫酸アンモニウムを添加した。これを 20 % (v/v) グリセロール、0.5 mM TPP、10  $\mu$  M FAD、0.5 mM MgCl<sub>2</sub> ならびに 0.8 M 硫酸アンモニウムを含んだ 20 mM リン酸緩衝液 pH7.5 で平衡化した Leucine-Sepharose 4B カラムにアプライし、同緩衝液で洗浄後、緩衝液 1 と同じ添加物を含んだ 10 mM Tris-HCl 緩衝液 pH7.8 で溶出した。

#### (5) A L S 活性測定

基本的には第 1 節に記載した方法で測定し、酵素の諸性質を検討する場合には、反応 pH、ピルビン酸濃度、T P P 濃度等を変化させた。

#### (6) タンパク質定量

標準物質として B S A を用い、Bradford の方法(146)で行った。

#### (7) A L S の分子量測定

分子量マーカーとして、DNP-Alanine (MW 255)、cytochrome c (MW 12300)、albumin (bovine serum; MW 67000)、aldolase (rabbit muscle; MW 160000)、catalase (bovine; MW 240000)、ferritin (horse spleen; MW 450000)、thyroglobulin (bovine; MW 660000) を使用し、セルロファイン G C L-200 0sf によるゲルろ過により測定した。なお thyroglobulin は S I G M A 製、他は生化学工業(株)より入手した S E R V A 製の分子量測定キットを使用した。ボイドボリューム測定にはファルマシアのブルーデキストラン 2000 を使用した。

#### (8) ピルビン酸デカルボキシラーゼ、アセト乳酸デカルボキシラーゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼならびにピルビン酸からのアセトイン生成酵素の調製と活性測定

ピルビン酸デカルボキシラーゼはエンドウ黄化幼植物茎葉とエンドウ発芽種子(1 晩常温で吸水させたエンドウの種子をさらに一晩、28℃のインキュベーター中で発芽させた)から、A L S 粗酵素の方法に従い調製した。活性測定は Ohba らの方法(147)に従い次の方法で行なった。反応液量を 3.2 ml、反応液組成を、0.35 mM TPP、0.12 mg Alcohol dehydrogenase、0.35 mM MgCl<sub>2</sub>、33.5 mM Na-pyruvate、0.168 mM NADH、酵素、50 mM Mes-NaOH buffer pH 6.5 とし、30℃で酵素反応により生成するアセトアルデヒドを市販のアルコールデヒドロゲナーゼ(イースト由来)でエタノールに変化させ、そのときの N A D H の消費量を波長 340 nm でレートアッセイした。N A D H のモル吸光係数は  $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  を用いた。



アセト乳酸デカルボキシラーゼはピルビン酸デカルボキシラーゼと同様の方法で、エンドウ黄化幼植物茎葉と発芽種子から調製し、次の方法で活性を測定した。反応液量を1 ml、反応液組成を、0.112 mM アセト乳酸、酵素、20 mM リン酸カリウム緩衝液pH7.5とし、所定時間反応後、0.1 mlの2.5 N水酸化ナトリウムで反応を停止させ、生成したアセトインをWesterfeldの方法(148)で定量した。

ピルビン酸デヒドロゲナーゼはエンドウ黄化幼植物茎葉からA L S粗酵素の方法に従い調製し、基質としてフェリシアン化カリウムを用いる方法(149)で測定した。反応液量を1.4 ml、反応液組成を、0.14 mM TPP、0.21 mM  $MgCl_2$ 、36 mM Na-pyruvate、17.9 mM K-ferricianide、酵素、107 mM K-phosphate buffer pH6とし、30℃で60分間インキュベートした後、反応を1 mlの10%トリクロル酢酸を加えることにより停止させた。遠心によって変性したタンパク質を除去し、この上澄の0.2 mlに10%トリクロル酢酸を1 ml、さらに0.25 Mのフェリシアン化カリウムを0.1 ml加えた後、蒸留水で2.4 mlにした。この溶液に4%ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)を1 mlさらに硫酸鉄アンモニウム試薬(硫酸鉄(III)アンモニウム 1.7 gを10 mlの蒸留水に溶かし、ろ過した後、1.5 gのSDSを20 mlの蒸留水に溶かした溶液と混合する。これに27 mlの85%リン酸を加え、蒸留水で140 mlに定容する)を0.5 ml加え、室温で30分間放置した後、波長540 nmで比色定量した。検量線はフェロシアン化カリウムを標準物質として作成した。

ピルビン酸からアセトインを生成する酵素に関しては、ピルビン酸デカルボキシラーゼと同じ酵素標品を使用し、反応を0.1 mlの水酸化ナトリウムで停止させる以外はアセト乳酸合成酵素と同じ方法で活性を測定した。



### 3. 実験結果

#### (1) エンドウ黄化幼植物茎葉 A L S の部分精製

A L S の精製にとりかかる前に安定性について粗酵素を用いて調べたところ、0.5 mM の  $MgCl_2$  だけを含むリン酸緩衝液中では、非常に不安定なことが判った (4℃で48時間経過後には残存活性が5.7%となった)。そこで基質およびコファクターならびにグリセロール等の安定化効果を調べた結果、ピルビン酸と T P P およびグリセロールが効果を有することが示唆された (Table 15)。特にグリセロールは高濃度になるほど高い安定化効果を示した (データ示さず)。そこで、精製時の扱いを考慮して、精製中には常時 0.5 mM の T P P と 20% のグリセロールを添加することにした。

Fig. 16 は D E A E-トヨパールの代表的な溶出プロフィールを示したもので、A L S 活性は単一でシャープなピークとして溶出された。そこでアイソザイムの存在の有無を調べるため、基質濃度と p H を変化させてアッセイした場合の活性ピークの変動について検討したところ、いずれの場合にも活性ピークの位置が変わることはなく、1つのピークしか検出されなかった (Fig. 17)。なお、Fig. 17 のプロフィールは各々別々に行った実験で、Fig. 16 の 0.1 M の K C l で洗浄するという操作を省略した。一方、Bio-Gel HTP を用いたハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーではブロードな1つのピークとして溶出され、ピークの前半部分は、後半部分と比較して、ロイシンとバリンの阻害に対する感受性が低下していた (Fig. 18)。次にこの活性ピーク全体を分取し、セルロファイン G C L-2000 sf のゲルろ過にかけたところ、分子量約 12 万と 32 万の2種の分子種に分離された (Fig. 19)。そこでこの両分子種のロイシンとバリンに対する感受性を調べたところ、12 万の分子種はほとんど感受性を喪失しており、32 万の分子種は粗酵素と同様に感受性を保持していることが判明した (Fig. 20)。また 12 万の分子種と 32 万の分子種の活性比を比較したところ約 4 対 1 となっておりトータルな活性の 2 割しかロイシン、バリン阻害に対する感受性を保持していないという結果となった。これらの結果より、精製操作中に経時的に 32 万の分子種が変性し、分岐鎖アミノ酸に非感受性の 12 万の分子種が増加することが考えられたため、各精製画分のロイシン・バリンペアーによる阻害の最大阻害率および  $I_{50}$  値ならびに  $M_{50}$  値 (最大阻害の 50% 阻害を達成するのに必要な濃度) について調べることで、この点について検討を加えた。その結果、精製が進むとともに、最大阻害率は小さくなり、 $I_{50}$  値は大きくなったが、 $M_{50}$  値は大きく変化せず、経時的に分岐鎖アミノ酸非感受性の分子種が増加していることが明らかとなった (Table 16)。さらに、ゲルろ過により 12 万の分子種から分離した 32 万の分子種を、再度ゲルろ過したところ、12 万の分子種が出現し (Fig. 21)、この 12 万の分子種は精製中に 32 万の分子種から生成している可能性が濃厚となった。また、32 万の分子種と 12 万の分子種の最終的な精製倍率は、それぞれ



れ26と103倍となった (Table 17)。なお、Leucine-Sepharose 4B affinityクロマトグラフィーでも、2つの分子種が検出され、カラムに吸着した分子種は分岐鎖アミノ酸に対して感受性で、吸着しなかった分子種は非感受性であった (Fig. 22)。

## (2) エンドウ黄化幼植物茎葉 A L S の酵素的性質

前述したようにエンドウ黄化幼植物茎葉中には32万の分子種が存在し、精製操作によりアーティファクトに12万の分子種が生成するものと考えられた。そこで、この両分子種の性質を粗酵素の性質と比較することで、酵素的性質の検討には、どのA L S画分が適しているかを判断した。上述したように12万の分子種は分岐鎖アミノ酸によるフィードバック阻害に対して非感受性であったが、32万の分子種は感受性であった。しかしながら、32万の分子種も粗酵素に比べると感受性は低下していた。一方、ピルビン酸に対する $K_m$ 値に関しては、12万の分子種のそれは粗酵素に比べて大きくなっており、32万の分子種の値が粗酵素の値に近いものであった。しかしながら、この場合にも若干の相違が認められ、32万の分子種の値は粗酵素に比べると12万の分子種の値に近い傾向が認められた (Table 18)。これらの結果から、粗酵素がインタクトなA L Sを最も多く含み、部分精製した32万の分子種中には、それが変成して生成した12万の分子種が混在している可能性が示唆された。なお、A L S阻害型除草剤に対する感受性は、32万の分子種と12万の分子種はほぼ同じであった (Fig. 23)。

以上の結果より、粗酵素を用いて酵素的性質を調べるのが好ましいと判断された。そこで、粗酵素を使用し、基質と反応速度の関係およびピルビン酸濃度と至適pHの関係ならびに分岐鎖アミノ酸によるフィードバック阻害について検討を加えた。以下、順に結果を記載する。

基質と反応速度の関係：pH 7.5でアッセイした場合、高濃度領域では基質促進、さらに200 mM以上になると基質阻害が認められた (Fig. 24)。ピルビン酸濃度を2～10 mMで変化させた場合、pH 7.5における $K_m$ 値は1.5 mM、pH 6では5.7 mM、pH 9では2.0 mMという値が得られた。また、ピルビン酸濃度を2～10 mMの間で変化させた場合のHill係数は、pH変化により変動せず約1となった (Fig. 25A)。さらに、この値はピルビン酸低濃度領域でも変化しなかった (Fig. 25B)。

至適pH：ピルビン酸濃度が高い場合には至適pHは6.5近辺であったが、低くなるにつれて、アルカリサイドにシフトした。特にピルビン酸濃度が20 mMのときにはpH 6からアルカリサイドにかけてブロードな活性を示した (Fig. 26)。分岐鎖アミノ酸による阻害：ピルビン酸濃度を2～10 mMの間で変化させた場合のロイシン、バリン、イソロイシンのピルビン酸に対する阻害形式はすべて拮抗型となった (Fig. 27)。また、阻害の強さはロイシン>バリン>イソロイシンで、各々の $K_i$ 値は、0.58 mM、1.34 mM、1.64 mMとなった。し



かしながら、ピルビン酸が2 mMという低濃度ではロイシンおよびバリンならびにロイシン・バリンペアーの最大阻害率は、各々80%、83%、92~93%の阻害率が得られたにもかかわらず、ピルビン酸濃度が高くなると、最大阻害率は小さくなったことから(Table 19)、これらの分岐鎖アミノ酸のA L S阻害は部分型であることが示唆された。また、ロイシン・バリンペアーのピルビン酸に対する阻害形式は、ピルビン酸濃度が2~10 mMの領域では拮抗型となったが(Fig. 28A)、ピルビン酸濃度が0.2~2 mMの低濃度領域では非拮抗型となった(Fig. 28B)。さらに、単純な拮抗阻害の場合には拮抗型となるはずの、分岐鎖アミノ酸濃度と阻害率のラインウェーバーバークプロットも混合型となり(Fig. 29)、これらの分岐鎖アミノ酸による阻害は単純な拮抗阻害ではないことが示唆された。一方、これらの分岐鎖アミノ酸のA L S阻害のHill係数は0.63~0.64となった(Fig. 30)。また、分岐鎖アミノ酸間の相乗阻害効果と拮抗阻害効果について検討した結果、ロイシンとバリンおよびロイシンとイソロイシンの間には相乗阻害効果が認められたが、ロイシンとバリンの阻害は互いに拮抗することが明かとなった(Fig. 31)。なお、分岐鎖アミノ酸によるA L S阻害はアルカリ側で弱くなり、A T Pや水銀等のS H基阻害剤の添加では回復しなかった(Table 20)。

### (3) A L S活性を妨害する他酵素について

ピルビン酸デカルボキシラーゼ活性はエンドウ黄化幼植物から調製した粗酵素には僅かしか検出されなかったが発芽種子の粗酵素液中にはかなり高い活性が検出された(各々の活性は、 $0.31 \mu\text{mol NADH oxidized hr}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$ 、 $2.2 \mu\text{mol NADH oxidized hr}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$ )。アセト乳酸デカルボキシラーゼについては、酵素無添加区と酵素添加区のアセトイン生成速度が同じであった(30℃における酵素無添加区の擬一次反応速度定数が $4.3 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ 、エンドウ黄化幼植物茎葉の酵素添加区が $4.5 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ 、エンドウ発芽種子の酵素添加区が $4.2 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ )ことから、エンドウ黄化幼植物中にもエンドウ発芽種子中にも存在しないと考えられた。ピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性も両粗酵素液中には検出されなかった。ピルビン酸からのアセトイン生成はエンドウ黄化幼植物にも発芽種子にも認められたが(A L S活性を含めたトータルなアセトイン生成活性の各々25%と72%が直接的なアセトイン活性)、黄化幼植物のそれは非酵素的(化学的)なもので(Fig. 32)、発芽種子のそれは酵素的であると考えられた。また発芽種子のこの活性の至適pHはピルビン酸デカルボキシラーゼの至適pHとまったく同じであった(Fig. 33)。

### (4) バクテリアA L Sの性質

大腸菌およびサルモネラ菌のアイソザイムIのピルビン酸に対するKm値と分岐鎖アミノ酸による阻害について検討を加えた。



ピルビン酸濃度を2～10 mMの領域で変化させた場合の $K_m$ 値は、エンドウALSの場合とほぼ同じで、大腸菌アイソザイムIが1.5 mM、サルモネラ菌アイソザイムIは1.7 mMであった。また、エンドウALSと同様に高濃度領域では基質促進が認められた（データ示さず）。分岐鎖アミノ酸の大腸菌アイソザイムI阻害の強さはエンドウALSとは対照的に、バリン>イソロイシン>ロイシンの順となり、これらの阻害は部分型ではなく、単純飽和であった（Fig. 34）。分岐鎖アミノ酸のピルビン酸に対する阻害形式は、大腸菌アイソザイムIの場合もサルモネラ菌アイソザイムIの場合も、混合型であった（Fig. 35）。一方、バリンによるALS阻害のpH変動については、大腸菌アイソザイムIはエンドウALSの場合と同様にアルカリ側で弱くなり、サルモネラ菌アイソザイムIは酸性側で弱くなるという対照的な結果となった（Fig. 36）。



#### 4. 考察

エンドウ黄化幼植物莖葉からA L Sを部分精製したところ、分子量が32万の分子種と12万の分子種の2種のA L Sが検出された。12万の分子種は32万の分子種とは対照的に分岐鎖アミノ酸阻害に対して非感受性であったが、精製中に12万の分子種が32万の分子種から生成していることが示唆されたことから、12万の分子種は32万の分子種から、制御中心がはずれたものと判断した。従って、エンドウ黄化幼植物莖葉中のA L Sは1種でありアイソザイムは存在しないものと考えられる。従来、エンドウ未熟種子中にはK<sub>m</sub>値および至適pHの相違する2種のA L Sが存在すると推定されてきたが(143)、今回、A L Sが1種しか存在しないと考えられるエンドウ黄化幼植物莖葉のA L S粗酵素も、エンドウ未熟種子の粗酵素で報告されている酵素の性質とほぼ同じ性質（ピルビン酸濃度によりK<sub>m</sub>値や至適pHが変化する）を示したことから、エンドウ未熟種子中のA L Sも1種であると推測される。ピルビン酸濃度によりK<sub>m</sub>値や至適pHが変化するという現象は、分岐鎖アミノ酸合成系を調節しているオリゴメリックな律速酵素の性質として説明できるものと思われる。また、A L Sが精製中に別の分子種に変化するという現象は、最初、GlatzerらによりアカパンカビのA L Sに関して報告され(136)、植物A L Sに関して単子葉植物のトウモロコシやオオムギで報告されている(57, 58, 150, 151)。双子葉植物での報告は今回のエンドウが初めてであるが、インタクトな分子種から生成する分子種が分岐鎖アミノ酸に非感受性であるという点では、エンドウA L Sの結果はトウモロコシA L Sの場合(151)に類似しているものと考えられる。

このエンドウA L Sは、植物A L Sに関してこれまでに報告されていないか、あるいはこれまでの報告とは対照的な次のような性質を示した。(I)基質である2分子のピルビン酸の間には協同性が認められない（Hill係数が1）、(II)分岐鎖アミノ酸によるフィードバック阻害は負の協同性を示す、(III)バリンによる阻害とイソロイシンによる阻害は拮抗的である、(IV)分岐鎖アミノ酸による阻害の阻害形式はピルビン酸濃度に依存して変化する、(V)分岐鎖アミノ酸によるフィードバック阻害はSH基阻害剤やATPにより脱感作されない。

ピルビン酸と分岐鎖アミノ酸の協同性に関しては、植物ではオオムギを材料として研究がなされており(144)、両者のHill係数はともに約2であることからホモトロピックなアロステリック効果（正の協同性）が存在すると考えられてきた。しかし、エンドウの結果はこれとは大きく異なるもので、特に分岐鎖アミノ酸による阻害はホモトロピックなアロステリック効果でも負の協同性であり、オオムギとは対照的な結果であった。ロイシンとバリンおよびロイシンとイソロイシンの間には相乗的阻害作用が認められるが、バリンとイソロイシンの阻害作用は拮抗的であること、および分岐鎖アミノ酸はピルビン酸とは単純に拮抗していないことを併せて考慮すると、この結果は、分岐鎖アミノ酸はA L S上のアロステリック部位の2箇所と結合し、1つは、ロイシンとイソロイシンが結合する部位で



他方はバリンが結合する部位であることを示唆するものと考えられる。そして、その片方に1つの分岐鎖アミノ酸が結合すると、もう片方には同じ分岐鎖アミノ酸は結合し難くなるものと推測される。また、オオムギALSの分岐鎖アミノ酸による阻害はSH基阻害剤より脱感作されることが報告されている(144)が、エンドウALSは脱感作されなかった。これらの結果より、エンドウALSの酵素的性質はオオムギALSとかなり相違しているものと判断される。

一方、バクテリアALSの代表として大腸菌アイソザイムIとサルモネラ菌アイソザイムIの酵素的性質を調べた結果、両者のピルビン酸に対する $K_m$ 値はエンドウALSの $K_m$ と同様であったが、分岐鎖アミノ酸による阻害には大きな違いが認められた。エンドウALSの場合の分岐鎖アミノ酸による阻害は部分拮抗型のいわゆる協奏阻害 (concerted inhibition) であったが、大腸菌アイソザイムIとサルモネラ菌アイソザイムIの分岐鎖アミノ酸による阻害は混合型の単純飽和阻害 (simple saturation kinetic) であった。また、バリンによる阻害のpH変動を調べたところ、大腸菌アイソザイムIとサルモネラ菌アイソザイムIは異なった挙動を示し、両酵素のフィードバック阻害部位は異なっていることが示唆された。エンドウALSの分岐鎖アミノ酸による阻害は、アカパンカビの報告(152)とは異なりATPでは回復しなかったことを含めて判断すると、これらの結果はALSの酵素的性質は種間で大きく異なっていることを示唆するものと考えられる。

一方、ALS活性測定は、酵素反応で生成するアセト乳酸を酸性下でアセトインに変化させ、そのアセトインを定量するという方法であるが、アセト乳酸およびアセトインを生成する別の酵素として、ピルビン酸デカルボキシラーゼ(143)およびピルビン酸デヒドロゲナーゼ(131)ならびにアセト乳酸デカルボキシラーゼ(143)が知られている。ピルビン酸デカルボキシラーゼは副反応としてピルビン酸から直接アセトインを生成し、ピルビン酸デヒドロゲナーゼは副反応としてアセト乳酸とアセトインの両方を生成する。アセト乳酸デカルボキシラーゼはアセト乳酸を脱炭酸させることでアセトインを生成する (Fig. 37)。そこで、PC除草剤のALS阻害の詳細な解析に粗酵素を使用することを考慮して、粗酵素中のこれらの酵素活性について検討を加えた。その結果、ピルビン酸デカルボキシラーゼはエンドウ発芽種子粗酵素中に強い活性が検出されたが、黄化幼植物粗酵素中の活性は低く、またピルビン酸デヒドロゲナーゼおよびアセト乳酸デカルボキシラーゼは黄化幼植物粗酵素中には検出されなかった。さらに、発芽種子中に検出されたピルビン酸デカルボキシラーゼの至適pHはピルビン酸からアセトインを生成する酵素活性とまったく同じであったことから、このアセトイン生成活性はピルビン酸デカルボキシラーゼの副反応であることが示唆された。そこで、この観点から、エンドウ黄化幼植物中のアセトイン生成活性を調べたところ、アセト乳酸合成酵素活性を妨害するような量は含まれていないことが明らかとなった。以上の結果より、エンドウ黄化幼植物茎葉の粗酵素はPC除草剤のALS阻害の詳細な解析や薬剤のスクリーニングに使用できるものと判断される。なお、発芽



種子中にはピルビン酸デカルボキシラーゼだけでなくアルコールデヒドロゲナーゼおよびラクテートデヒドロゲナーゼの高い活性が検出されており、発芽時には、種子中に貯蔵された糖類を分解し、発芽に必要なエネルギーと炭素骨格を得るために、このような解糖系酵素の活性が高いことは妥当なものと考えられる。一方、ミトコンドリアに局在しているピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性がエンドウ黄化幼植物茎葉 A L S 粗酵素中に検出されなかったのは、粗酵素中へのミトコンドリア由来の酵素の混入が少なかったためであり、これはミトコンドリアのマーカー酵素であるフマラーゼ活性の測定によっても確認された（データ示さず）。



Table 15. Stabilization of ALS from pea etiolated seedlings.

Addition	Relative Activity (%)	
	24hr	48hr
None <sup>a)</sup>	23.5	5.7
0.5mM TPP	34.6	11.3
10 $\mu$ M FAD	19.7	8.5
40mM Pyruvate	39.6	14.9
0.1mM Leucine	20.9	6.1
0.5mM TPP + 10 $\mu$ M FAD	38.5	15.6
20%(v/v) Glycerol	39.6	17.8
20% Glycerol + 0.5mM TPP	54.0	41.5
20% Glycerol + 0.5mM TPP + 0.5mM DTT	59.5	47.8
20% Glycerol + 0.5mM TPP + 0.4mM Leu, 0.4mM Val	51.7	47.2
20% Glycerol + 0.5mM TPP + 10 $\mu$ M FAD	68.5	45.2

a) ALS was dissolved in 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.5 containing 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>.



Table 16. The changes in the level of maximum inhibition (M.I)<sup>a)</sup>, I<sub>50</sub><sup>b)</sup>, and M<sub>50</sub><sup>c)</sup> during purification.

Fraction	Leu <sup>d)</sup>			Val <sup>e)</sup>			Leu+Val (1:1)		
	M.I (%)	I <sub>50</sub> (mM)	M <sub>50</sub> (mM)	M.I (%)	I <sub>50</sub> (mM)	M <sub>50</sub> (mM)	M.I (%)	I <sub>50</sub> (mM)	M <sub>50</sub> (mM)
AmS (25-55%) <sup>f)</sup>	79	0.16	0.10	83	0.30	0.25	92	0.025	0.014
DEAE-Toyopearl	69	0.73	0.23	64	2.75	0.24	80	0.035	0.020
Bio-Gel HTP	54	1.6	0.18	59	6.9	0.55	69	0.056	0.020

a) Maximum inhibition obtained at 2 mM of pyruvate concentration.

b) The concentration required for 50 % inhibition of ALS activity at 2 mM of pyruvate concentration.

c) The concentration required for 50 % of maximum inhibition of ALS activity at 2 mM of pyruvate concentration.

d) L-Leucine. e) L-Valine. f) Ammonium sulfate.



Table 17. Purification of ALS from pea etiolated seedlings<sup>a)</sup>.

Step	Protein (mg)	Total Activity (unit) <sup>b)</sup>	Specific Activity (unit/mg)	Yield (%)	Fold
Crude Extract	6653	303	0.046	-	-
AmS (25-55%) <sup>c)</sup>	3266	189	0.058	62	1.3
DEAE-Toyopearl	134	64.5	0.481	21	11
Bio-Gel HTP	10.8	13.5	1.25	4.5	27
Cellulofine GCL-2000 sf					
Large ALS	0.54	0.65	1.20	0.21	26
Small ALS	0.24	1.14	4.75	0.38	103

a) Seven hundred and thirty grams of seedlings were used for the experiment.

b) Unit is defined as  $\mu\text{mol}$  of acetoin produced per hour at 30 °C.

c) Ammonium sulfate fractionation.



Table 18. Properties of ALS from pea etiolated seedlings.

Enzyme Form	Km at pH 7.5		Inhibition (%) <sup>c)</sup>
	Pyr (mM) <sup>a)</sup>	TPP (μM) <sup>b)</sup>	
Crude ALS	1.5±0.1	9.6±2.1	60
Large ALS	1.6±0.2	-	47
Small ALS	3.0±0.6	-	5

a) Km value for pyruvate.

b) Km value for thiamine pyrophosphate.

c) ALS Inhibition percentage by L-leucine and L-valine pair (2 mM each) at 20 mM of pyruvate concentration.



Table 19.

The effect of pyruvate concentration on the level of maximum inhibition and the concentration of L-leucine, L-valine, and L-leucine plus L-valine required to give 50% inhibition ( $I_{50}$ ) and to give half the maximum inhibition ( $M_{50}$ ).

Pyruvate Concentration (mM)	Leucine			Valine			Leucine + Valine ( 1:1 )		
	Maximal Inhibition(%)	$I_{50}$ (mM)	$M_{50}$ (mM)	Maximal Inhibition(%)	$I_{50}$ (mM)	$M_{50}$ (mM)	Maximal Inhibition(%)	$I_{50}$ (mM)	$M_{50}$ (mM)
2	80	0.141	0.104	83	0.295	0.245	92	0.030	0.014
2.5	-	-	-	-	-	-	93	0.040	0.018
3.3	-	-	-	-	-	-	93	0.046	0.020
5	70	0.578	0.190	75	2.55	0.539	91	0.057	0.024
10	60	2.68	0.401	69	10.6	2.33	86	0.095	0.033
20	48	-	0.567	55	26.6	2.15	66	0.213	0.045



Table 20.

Effect of assay pH, ATP and SH-inhibitors on the inhibition of ALS from etiolated pea seedlings by branched-chain amino acids.

Assay pH and Additives		Relative Activity (%)	Inhibition (%)	
			Leu <sup>a)</sup>	Leu+Val <sup>b)</sup>
pH <sup>c)</sup>	6.0	100	53	
	6.5	108	44	
	7.0	102	39	
	7.5	98	25	
	8.0	97	24	
<hr/>				
ATP (mM)	0	100		42
	0.01	100		42
	0.1	100		38
	1	100		40
	2	95		40
<hr/>				
HgCl <sub>2</sub> (mM)	0	100	41	
	0.03125	95	42	
	0.0625	88	48	
	0.125	71	50	
	0.25	66	47	
	0.5	35	53	
<hr/>				
CuSO <sub>4</sub> (mM)	0	100	42	
	0.0625	93	42	
	0.125	88	42	
	0.25	71	37	
	0.5	50	45	

a) L-Leucine (0.5 mM).

b) L-Leucine plus L-valine pair (0.1 mM each).

c) Assayed with 20 mM of pyruvate.



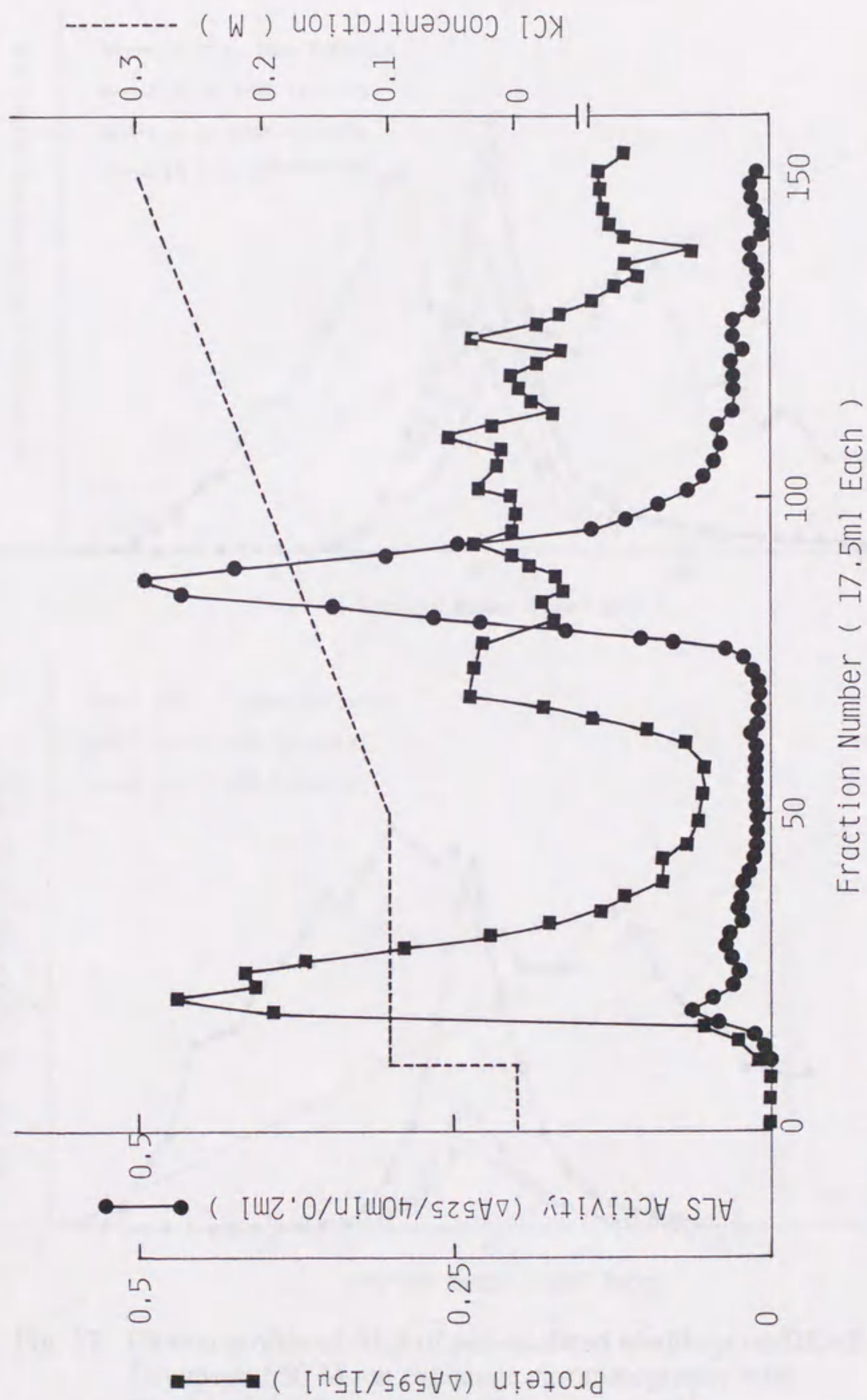


Fig. 16. Elution profile of ALS of pea etiolated seedlings on DEAE-Toyopearl 650 M ion exchange chromatography.



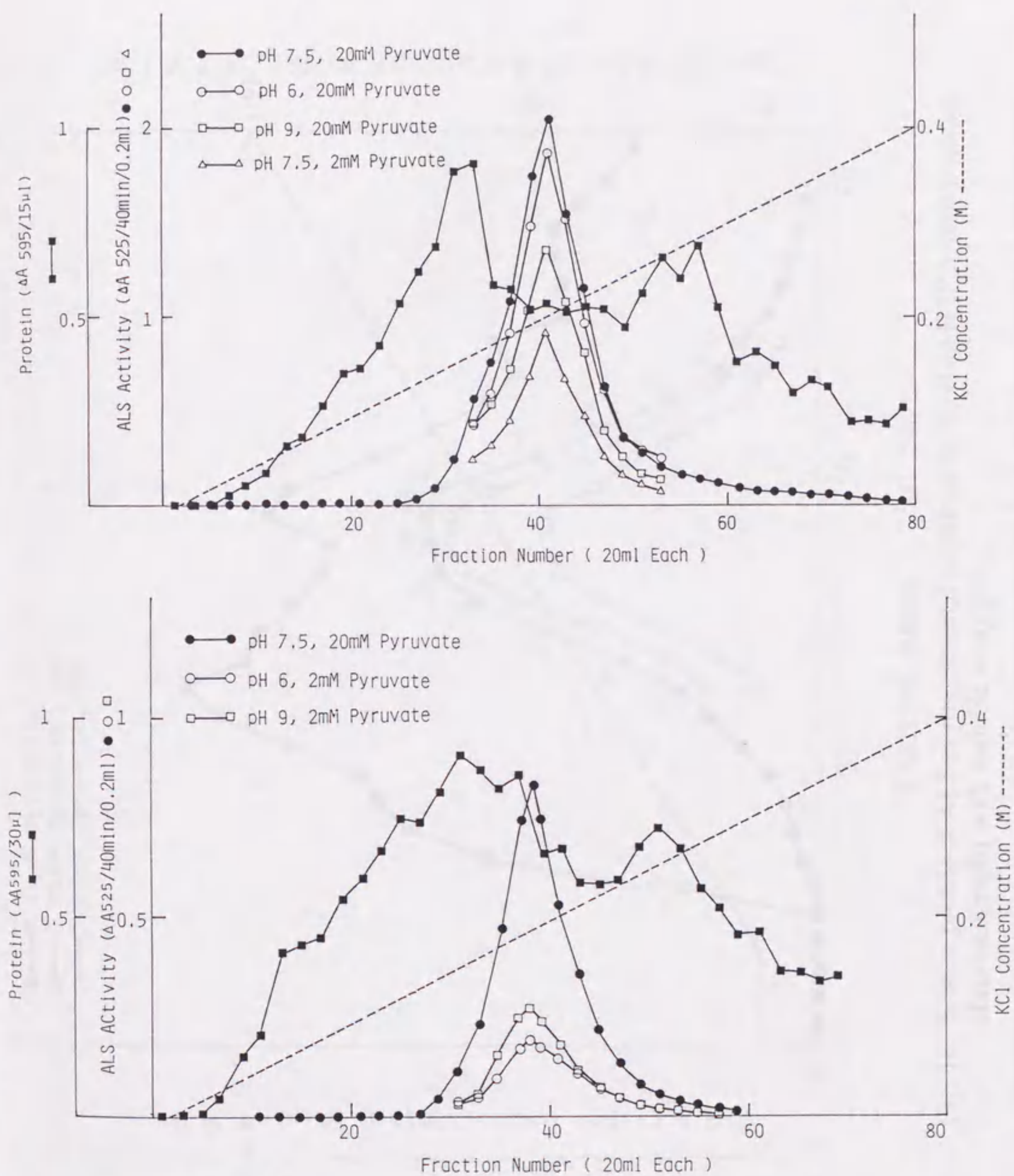


Fig. 17. Elution profile of ALS of pea etiolated seedlings on DEAE-Toyopearl 650 M ion exchange chromatography with variable pyruvate concentration and assay pH.







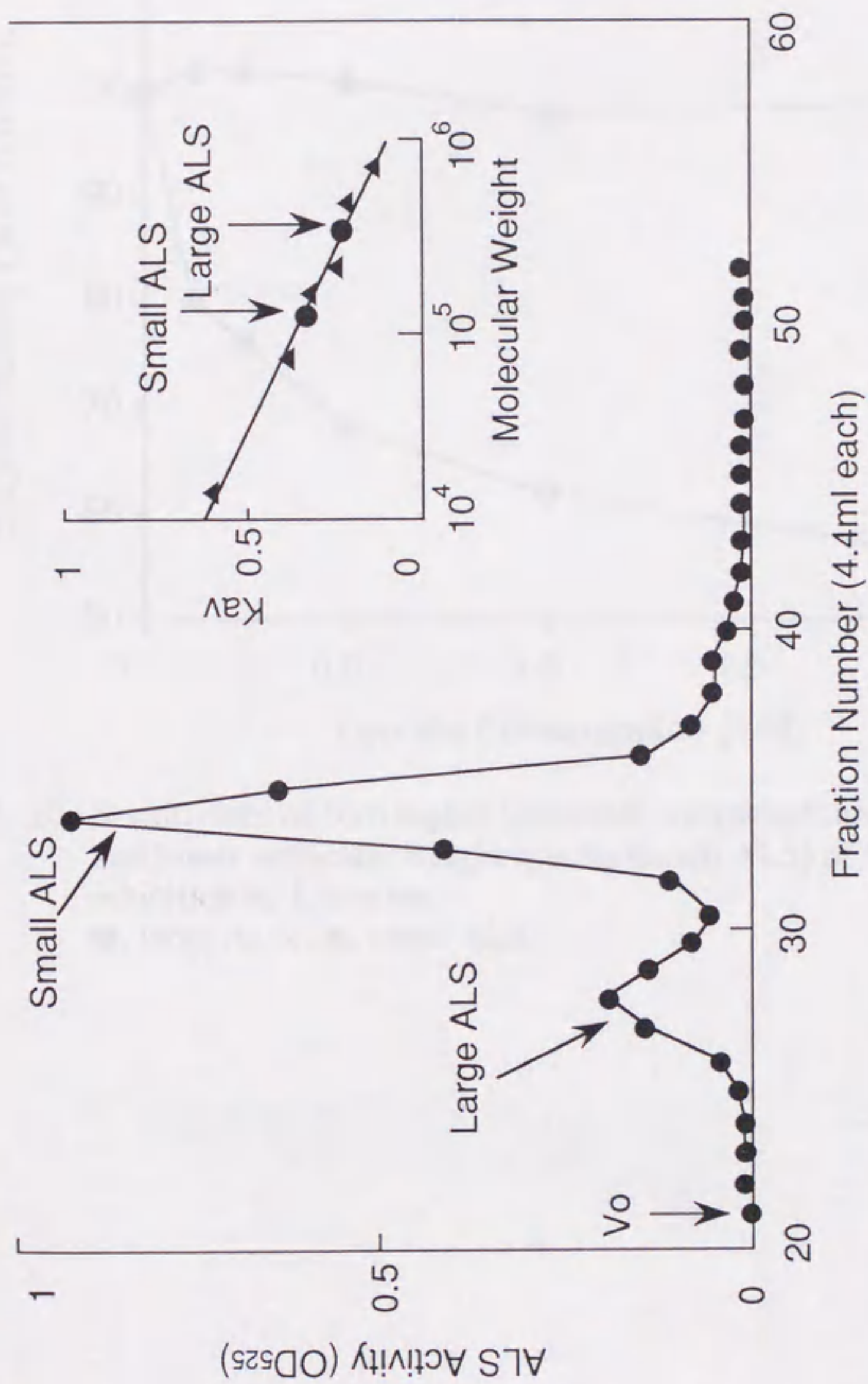


Fig. 19. Elution profile of ALS of pea etiolated seedlings on Cellulofine GCL-2000 sf gel filtration chromatography and molecular weight determination of two molecular species of ALS.



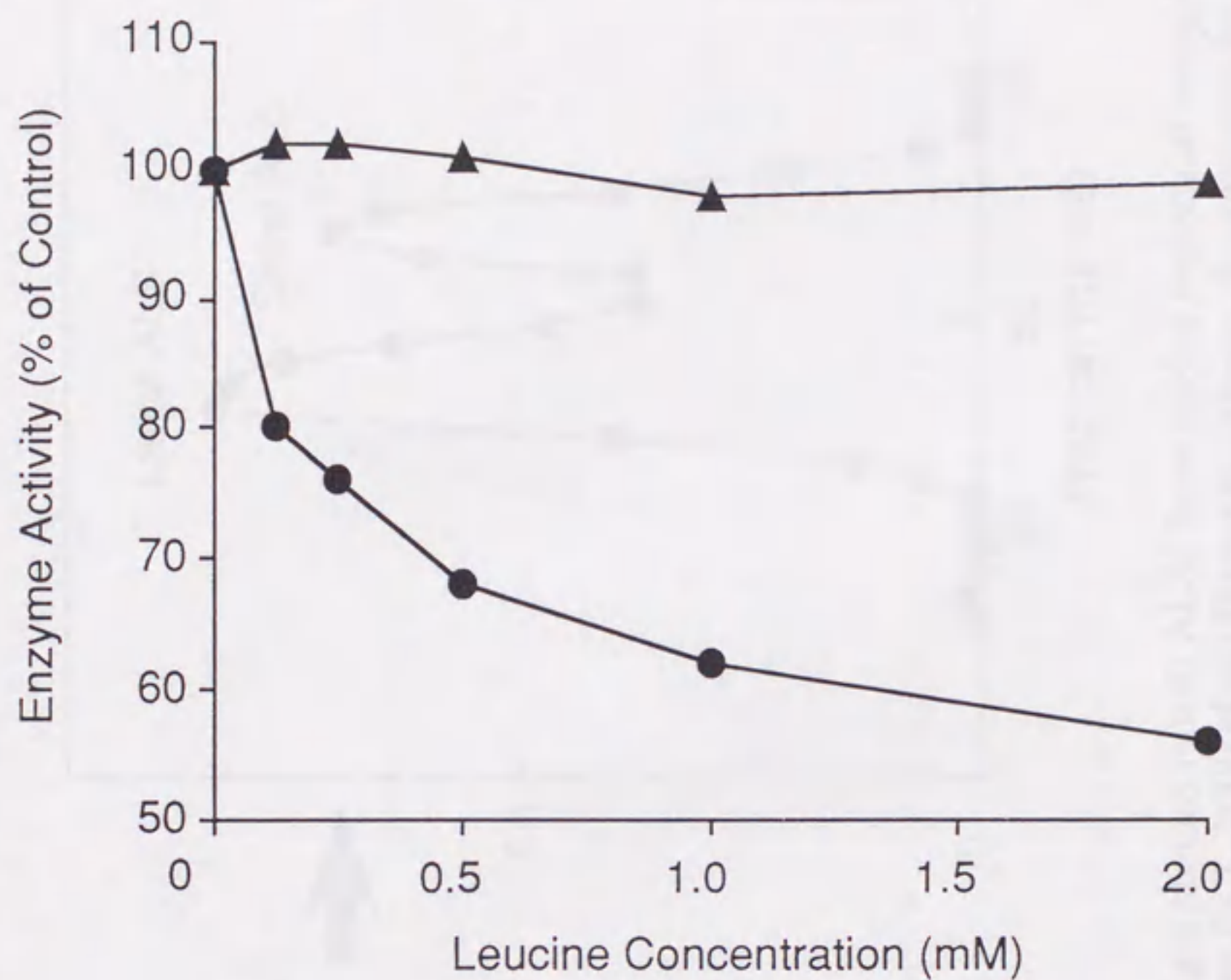


Fig. 20. Sensitivities of both higher molecular weight species (large ALS) and lower molecular weight species (small ALS) of ALS to the inhibition by L-leucine.  
●, large ALS; ▲, small ALS.



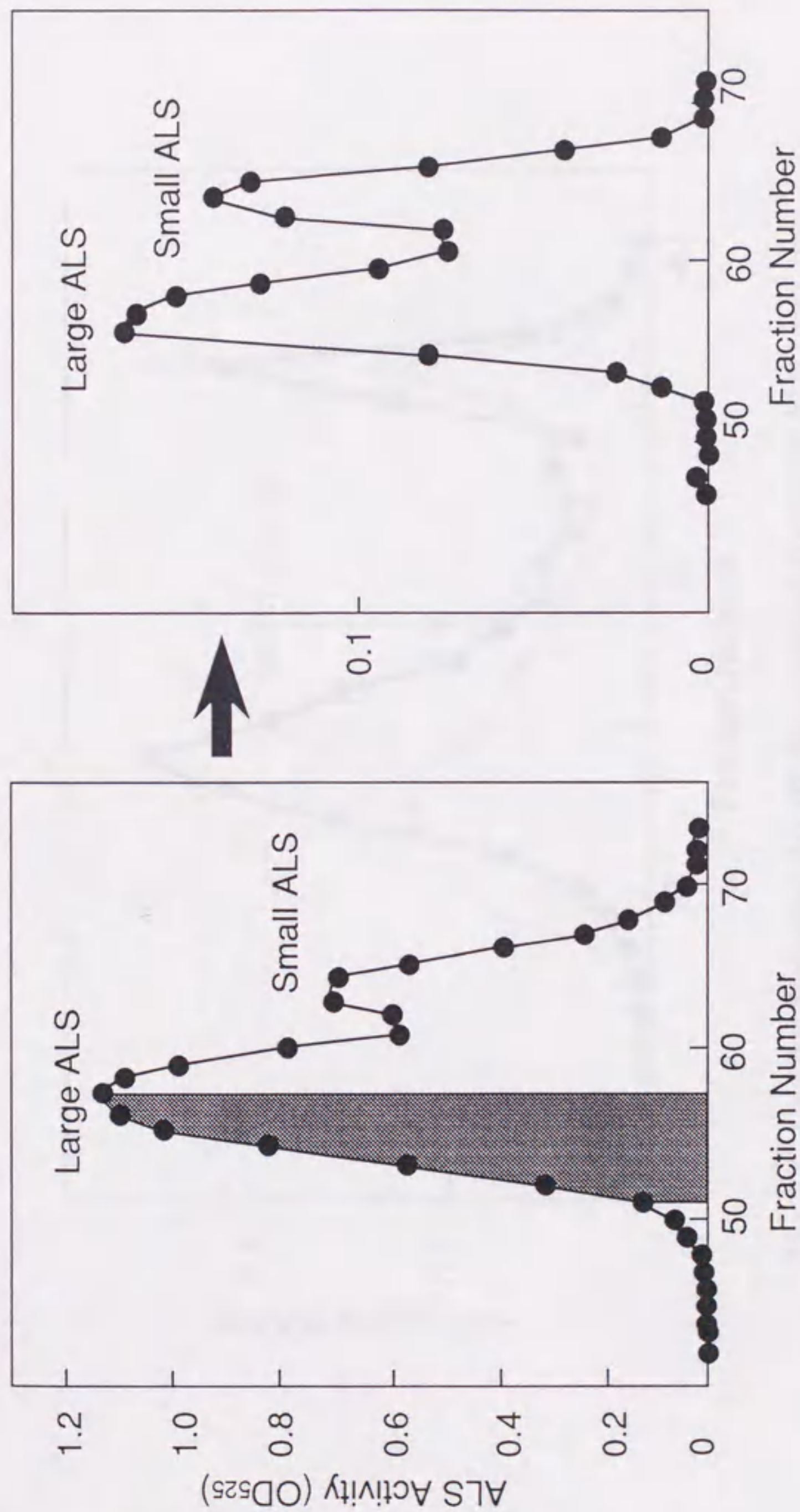


Fig. 21. Regeneration of lower molecular weight species (small ALS) from higher molecular weight species (large ALS) during Cellulofine GCL-2000 sf gel filtration column chromatography. Large ALS obtained by the first chromatography (the shaded portion of the left figure) was re-chromatographed.



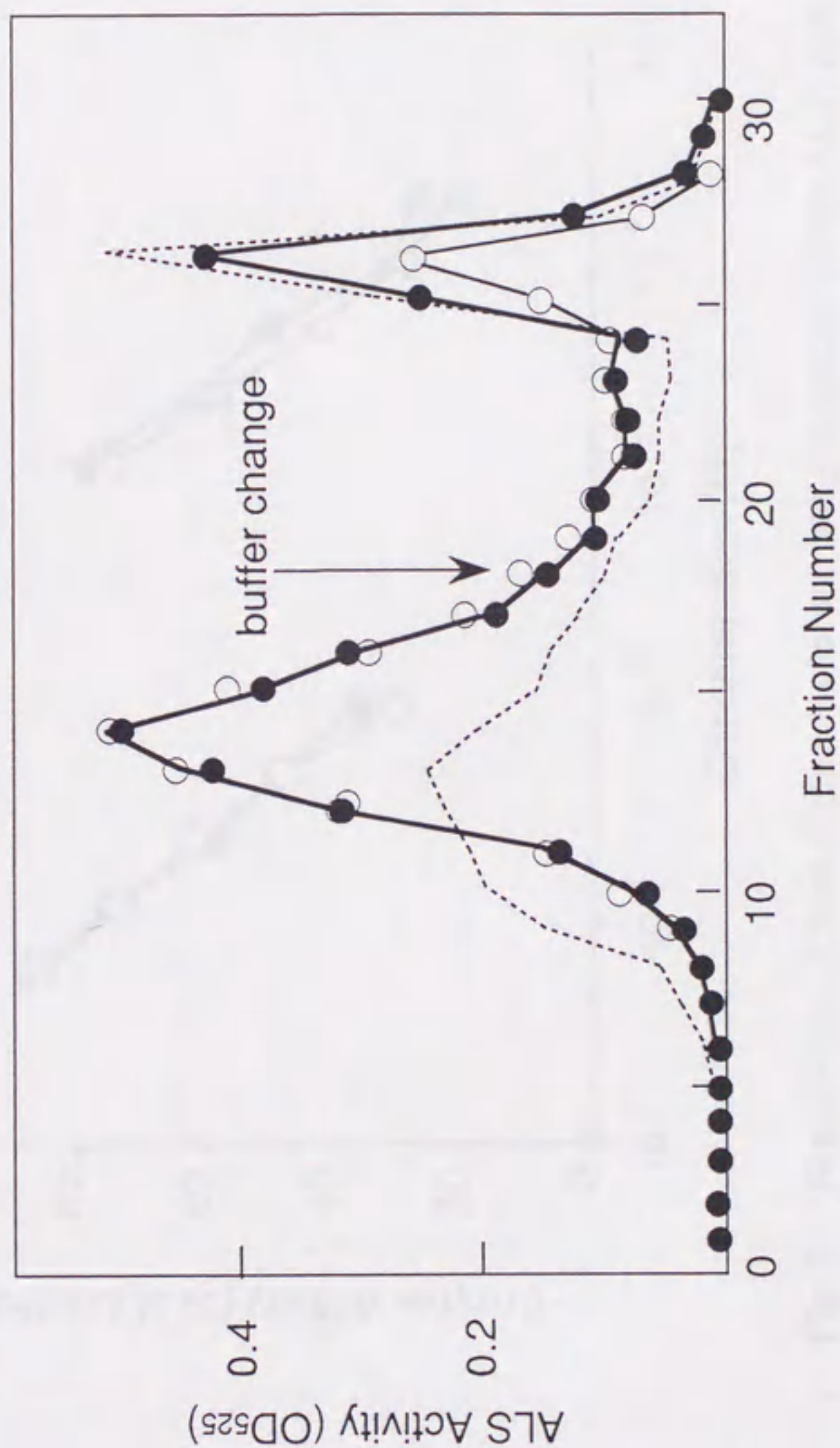


Fig. 22. Leucine-Sepharose 4B affinity chromatography of ALS from pea etiolated seedlings.

●, ALS activity without L-leucine; ○, ALS activity with 2 mM L-leucine; Dotted line, elution profile of protein.



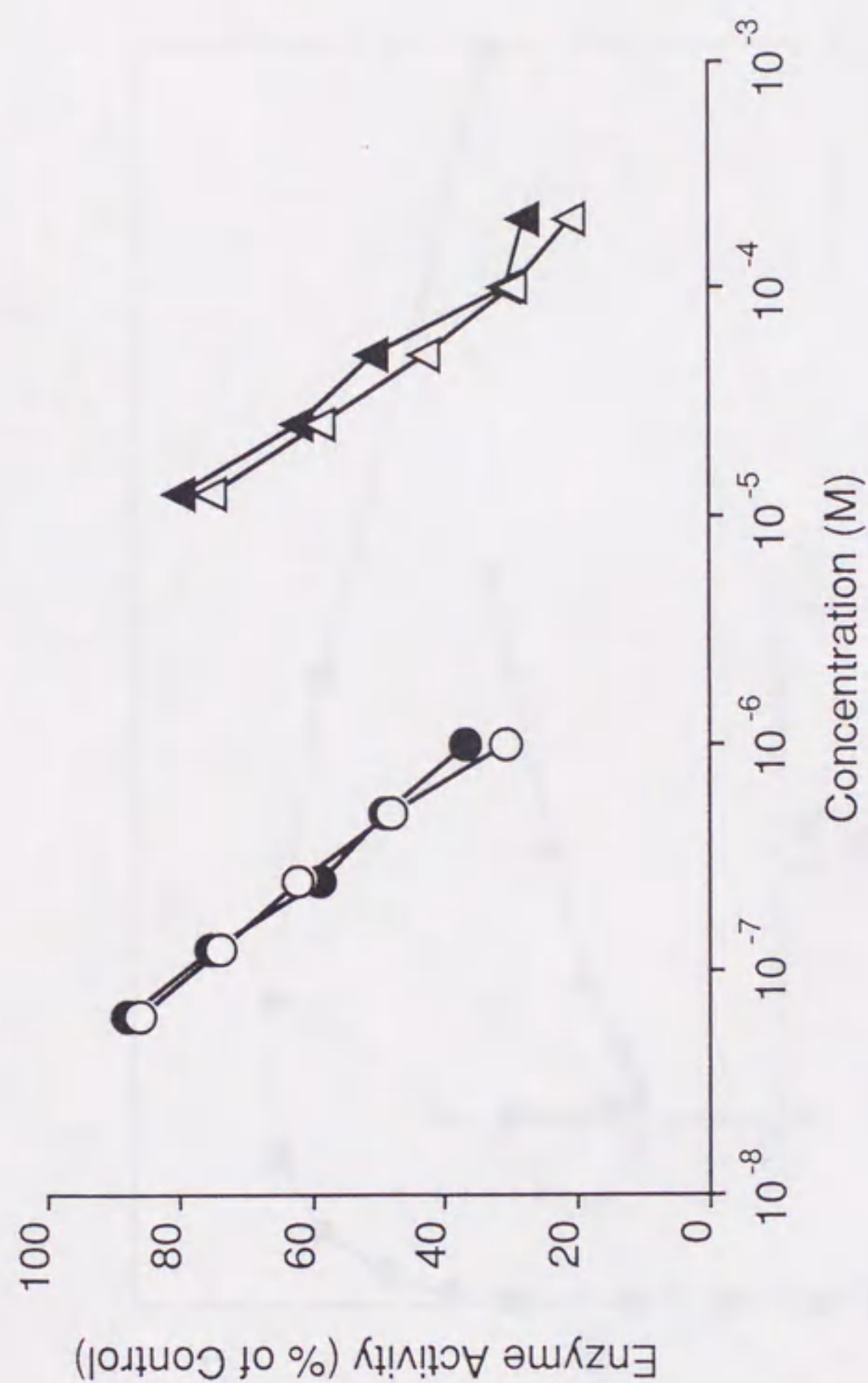


Fig. 23. Sensitivities of both higher molecular weight species (large ALS) and lower molecular weight species (small ALS) of ALS to the inhibition by ALS-inhibiting herbicides (compound 3 and imazapyr).

●, large ALS with compound 3; ○, small ALS with compound 3;  
 ▲, large ALS with imazapyr; △, small ALS with imazapyr.



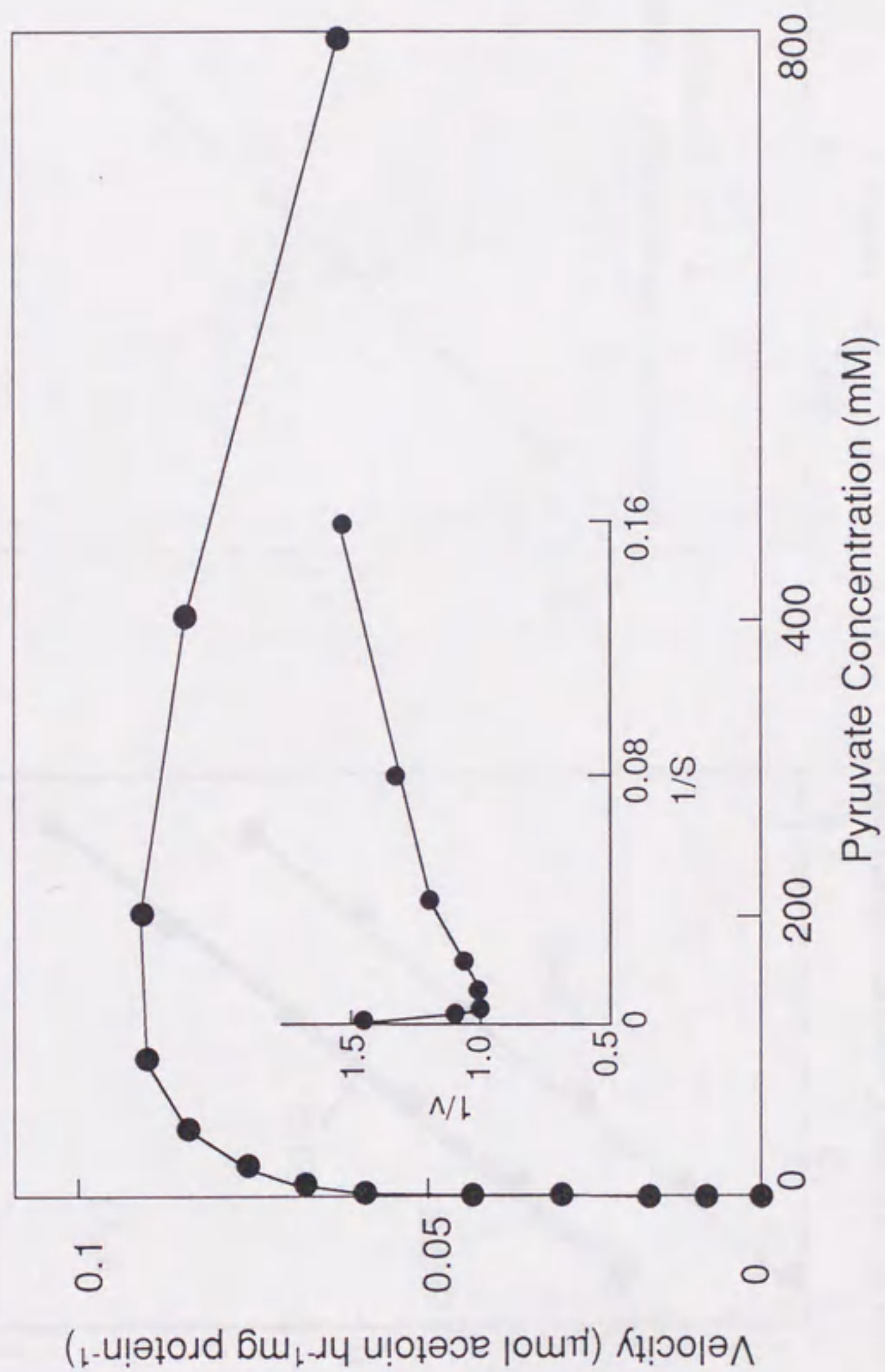


Fig. 24. Effect of pyruvate concentration on the rate of acetolactate production by ALS of pea etiolated seedlings.



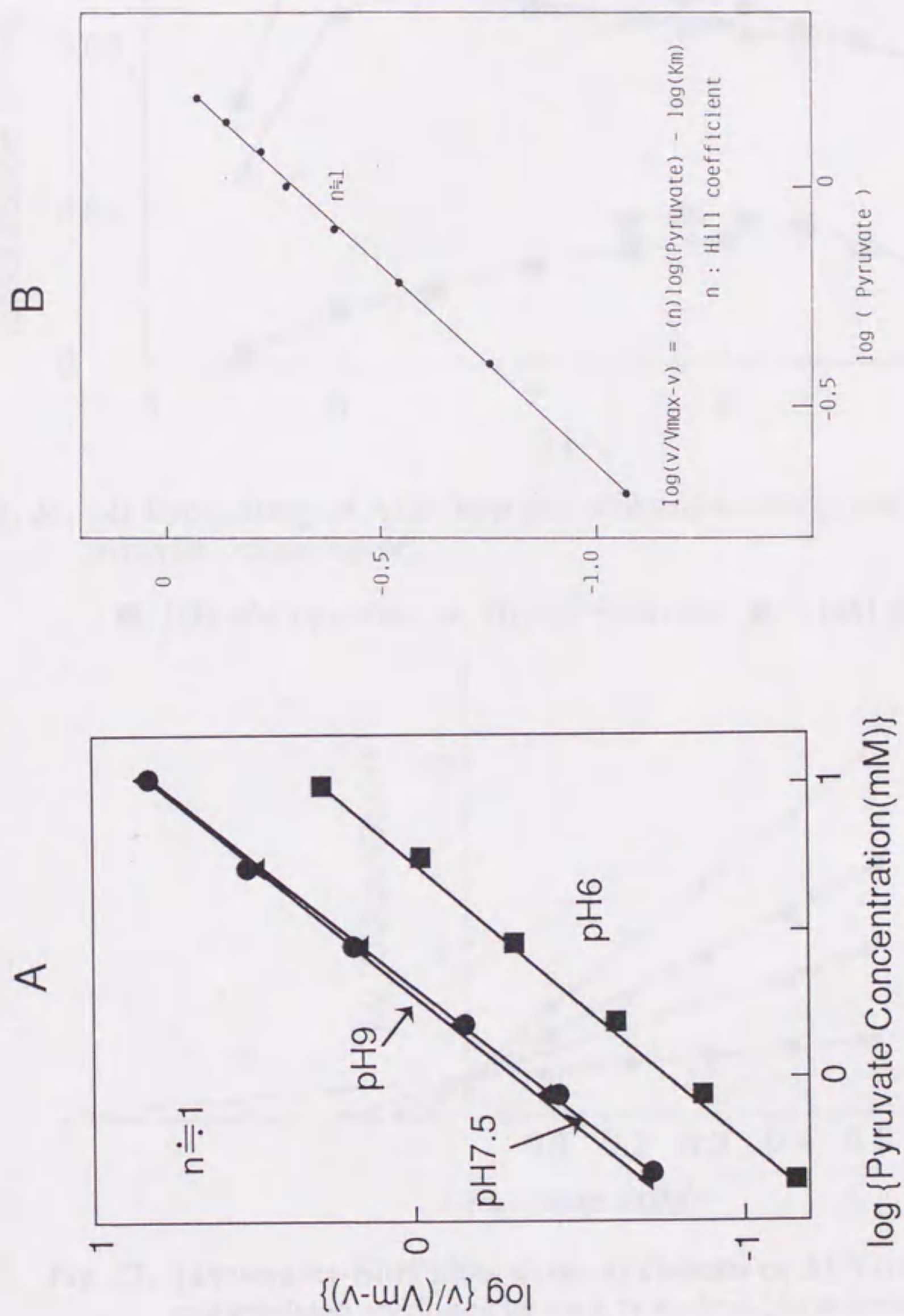


Fig. 25. Hill plots of the rate of acetolactate production vs high concentration (A) and low concentration (B) of pyruvate.



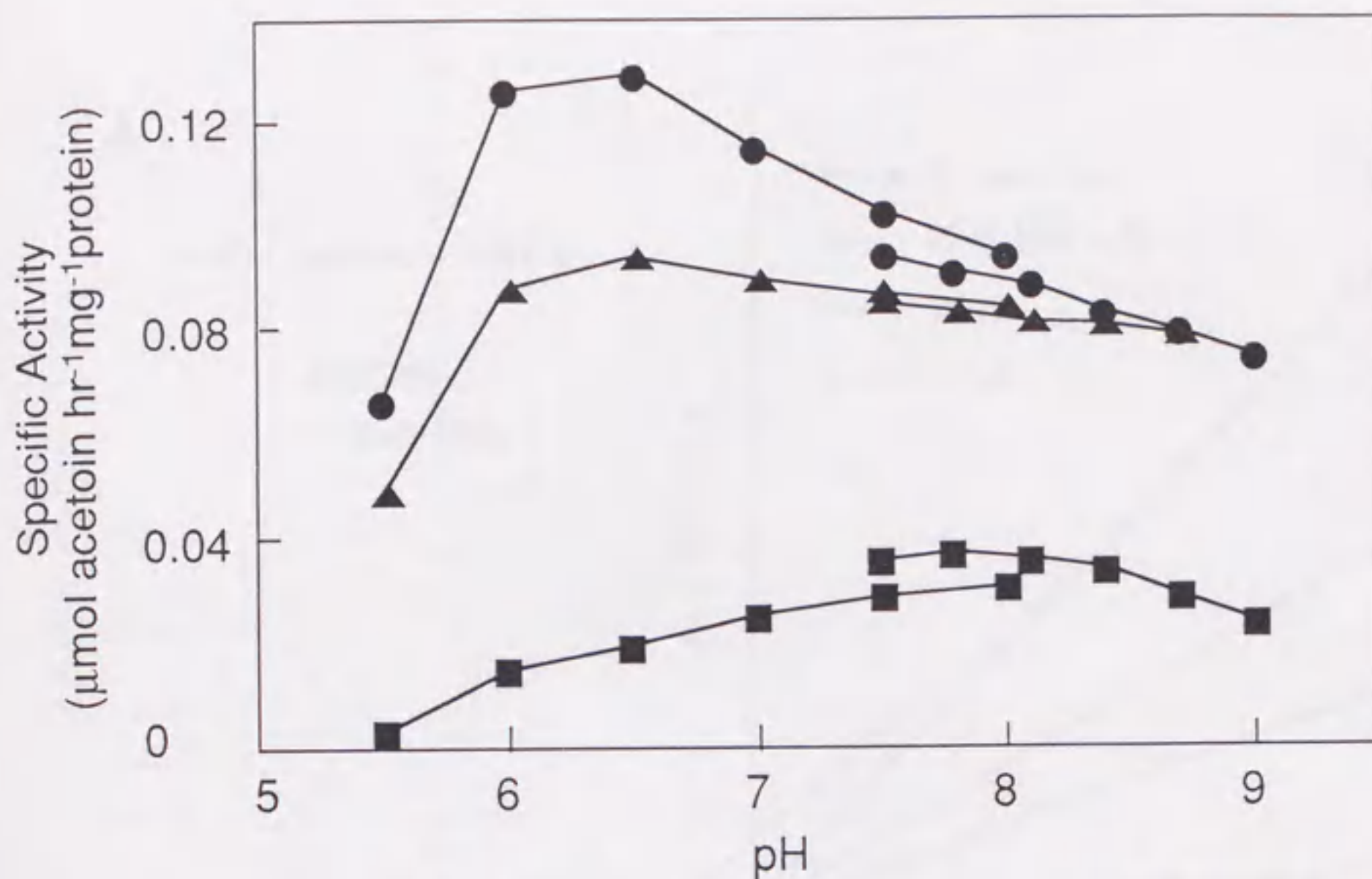


Fig. 26. pH Dependency of ALS from pea etiolated seedlings with variable pyruvate concentration.

●, 100 mM pyruvate; ▲, 20 mM pyruvate; ■, 1 mM pyruvate.

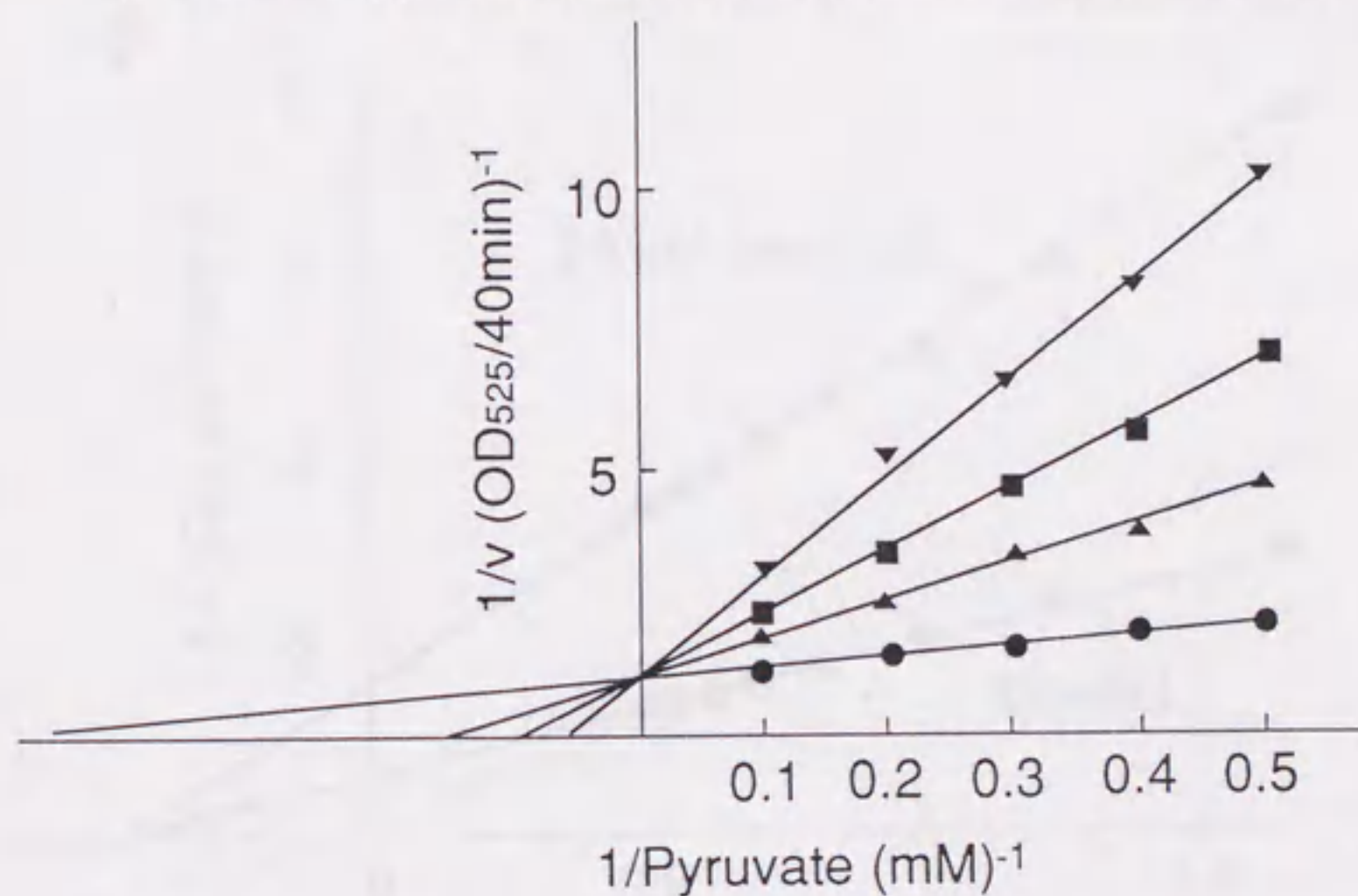


Fig. 27. Lineweaver-Burk plots of the inhibitions of ALS from pea etiolated seedlings by each branched-chain amino acid with pyruvate concentration varying between 2 and 10 mM.

●, Control; ▲, 5 mM L-isoleucine; ■, 5 mM L-valine; ▼, 5 mM L-leucine.



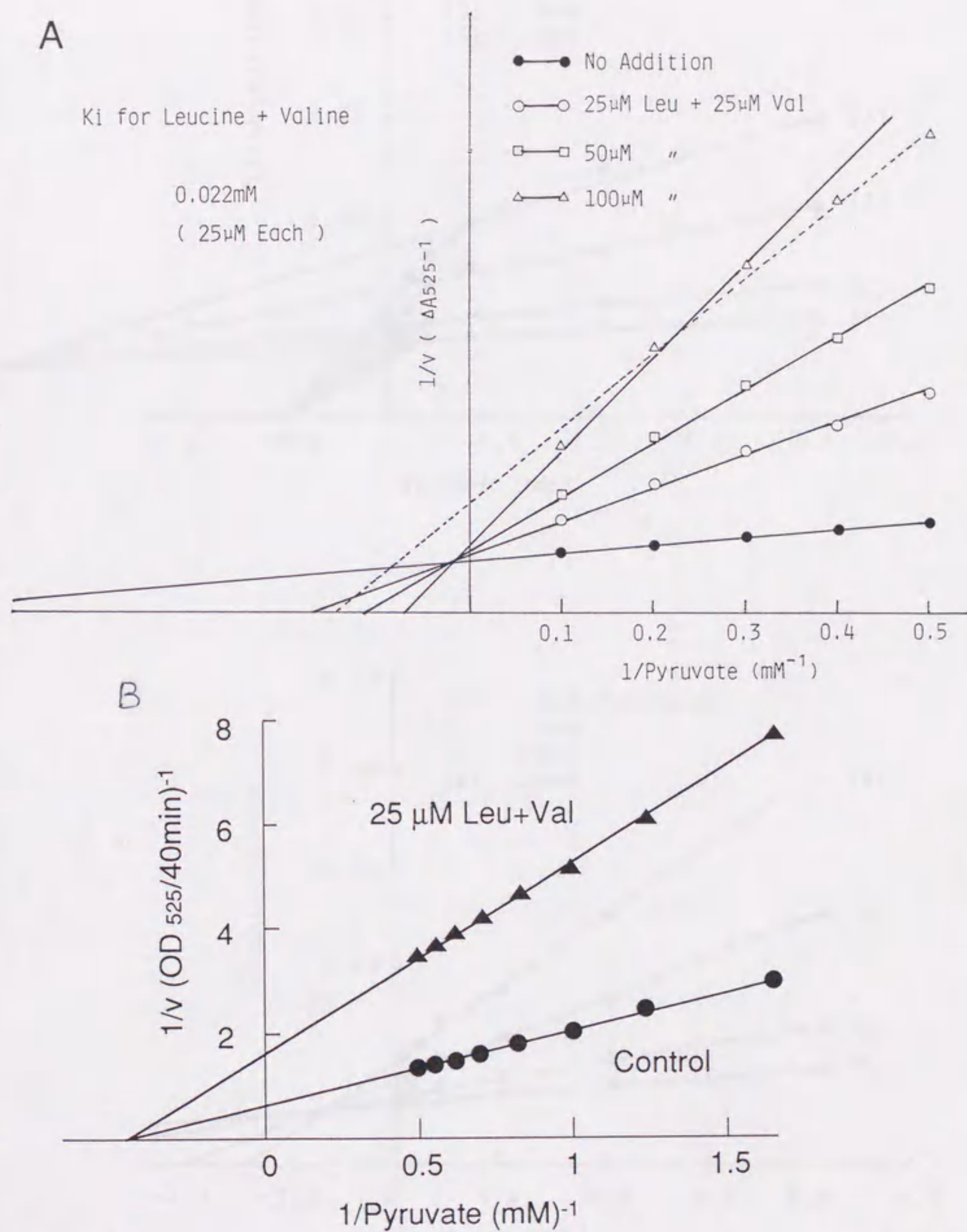


Fig. 28. Lineweaver-Burk plots of the inhibition of ALS from pea etiolated seedlings by L-leucine plus L-valine pair with high pyruvate concentration (2-10 mM)(A) and low pyruvate concentration (0.6-2 mM)(B) of pyruvate.



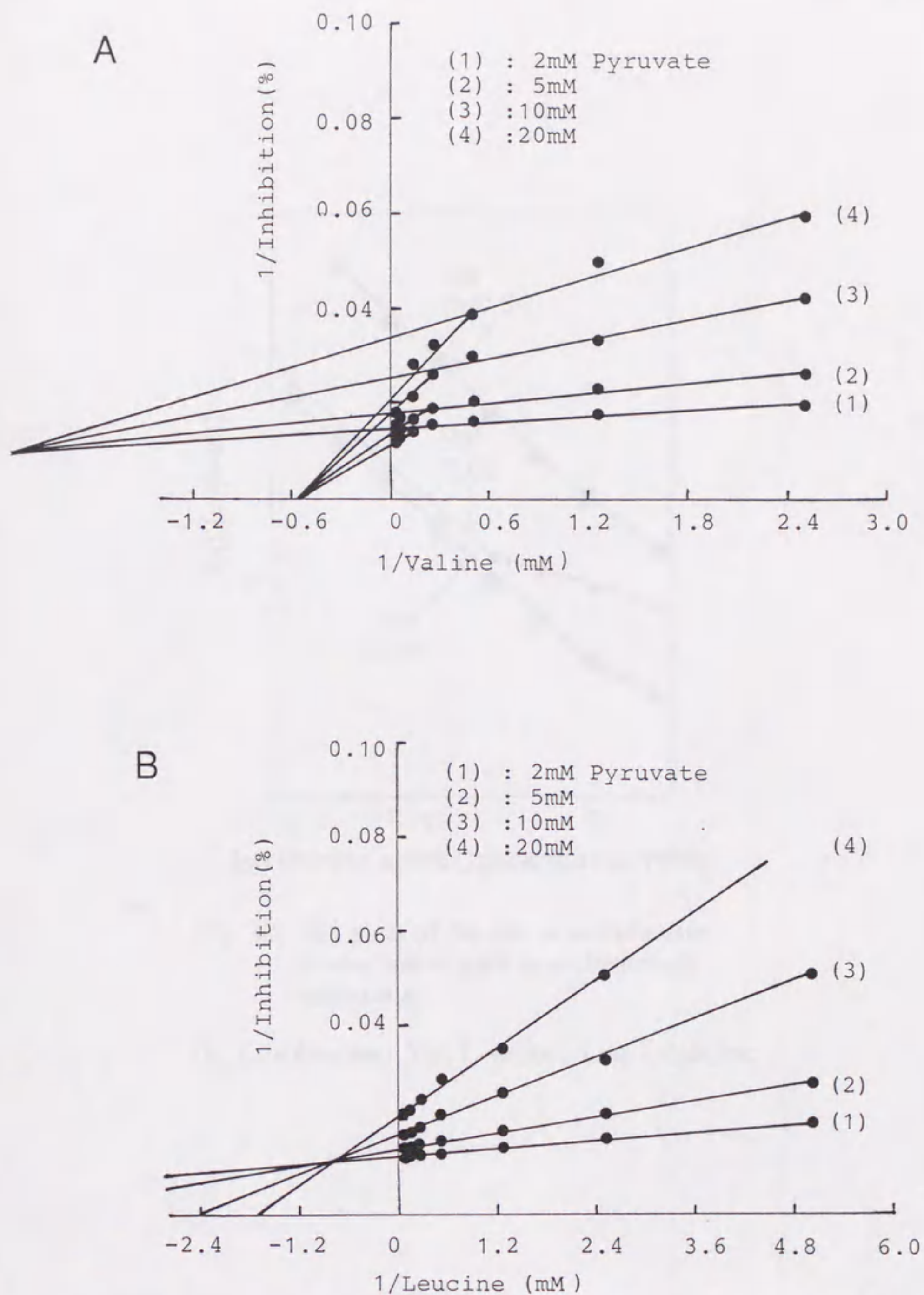


Fig. 29. Lineweaver-Burk plots of the inhibition of ALS from pea etiolated seedlings by L-valine (A) and L-leucine (B). Double reciprocal of L-valine and the inhibition percentages were plotted.



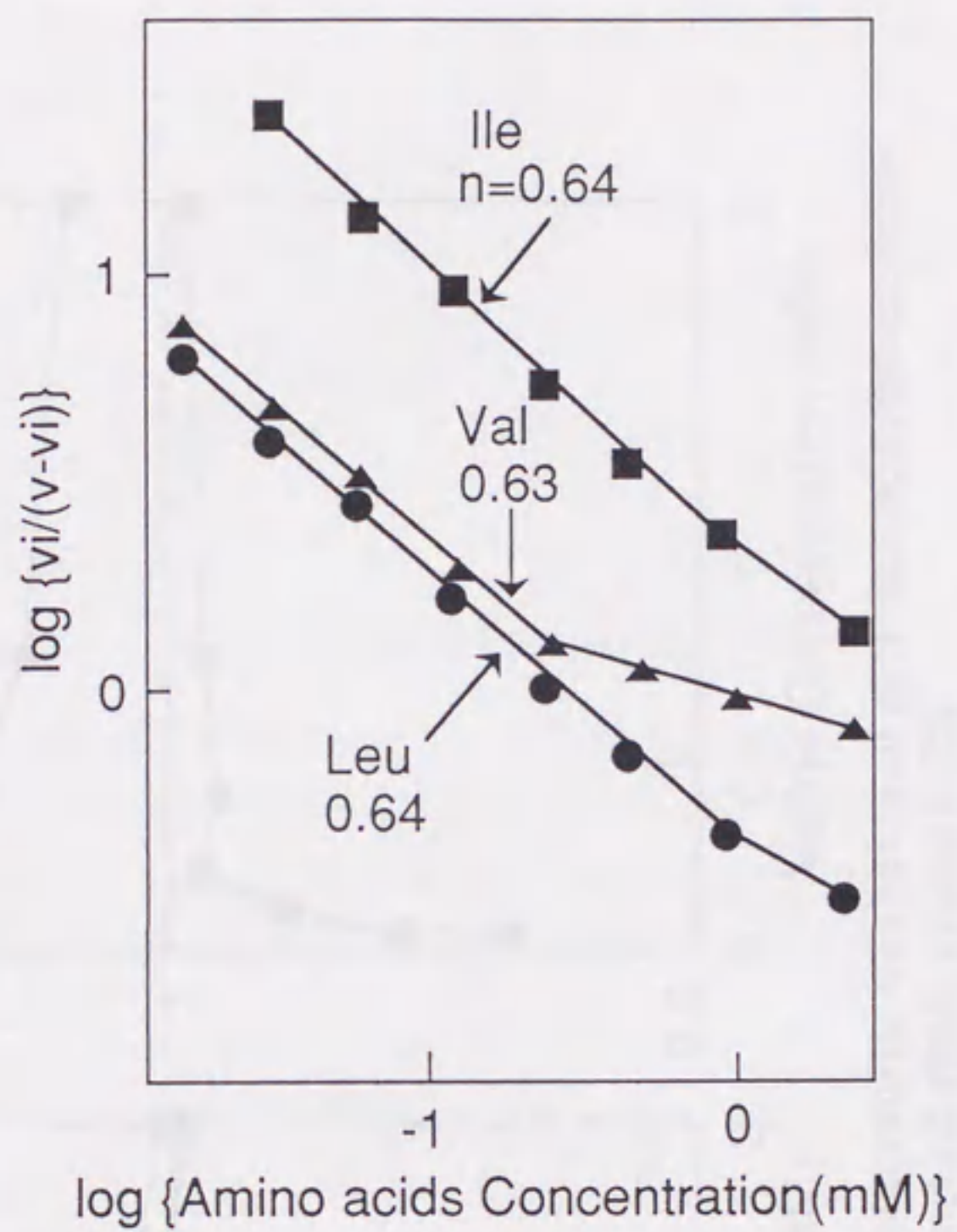


Fig. 30. Hill plots of the rate of acetolactate production vs each branched-chain amino acid.

Ile, L-isoleucine; Val, L-valine; Leu, L-leucine.



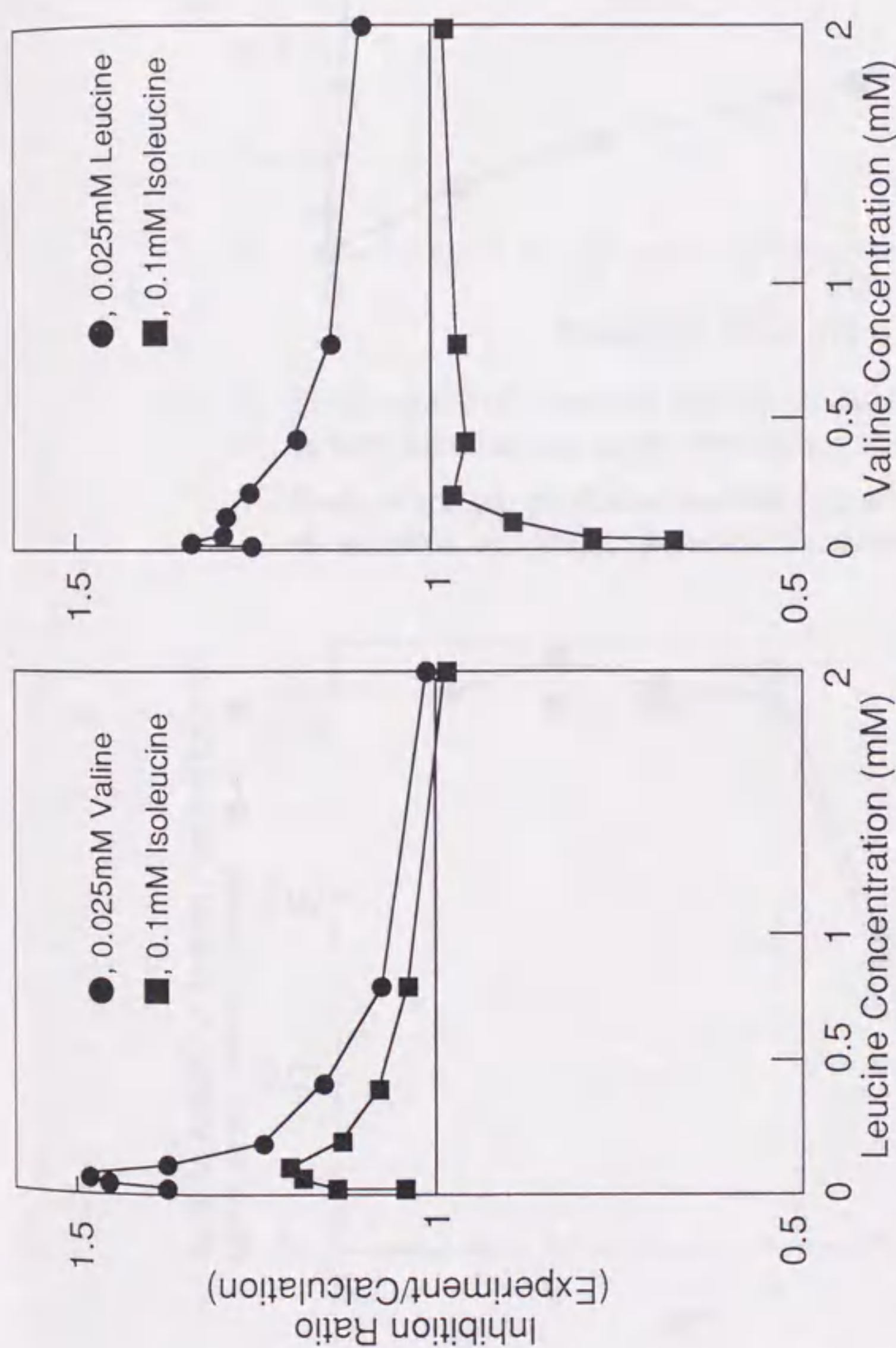


Fig. 31. Variation of synergistic and antagonistic inhibition of acetolactate synthase from pea etiolated seedlings by branched-chain amino acids.

Inhibition ratio was expressed as the ratio of the inhibition percentage which was obtained experimentally by paired amino acids (Experiment) vs. that calculated from below the Gowing's equation.

$$\text{Calculation} = I_A + I_B (1 - I_A/100)$$

where  $I_A$  is the inhibition percentage given by one of paired amino acids, and  $I_B$  is that by the other of paired amino acids.

In the case of synergistic inhibition the inhibition ratios in the figures become over 1, while in the case of antagonistic inhibition they become below 1.



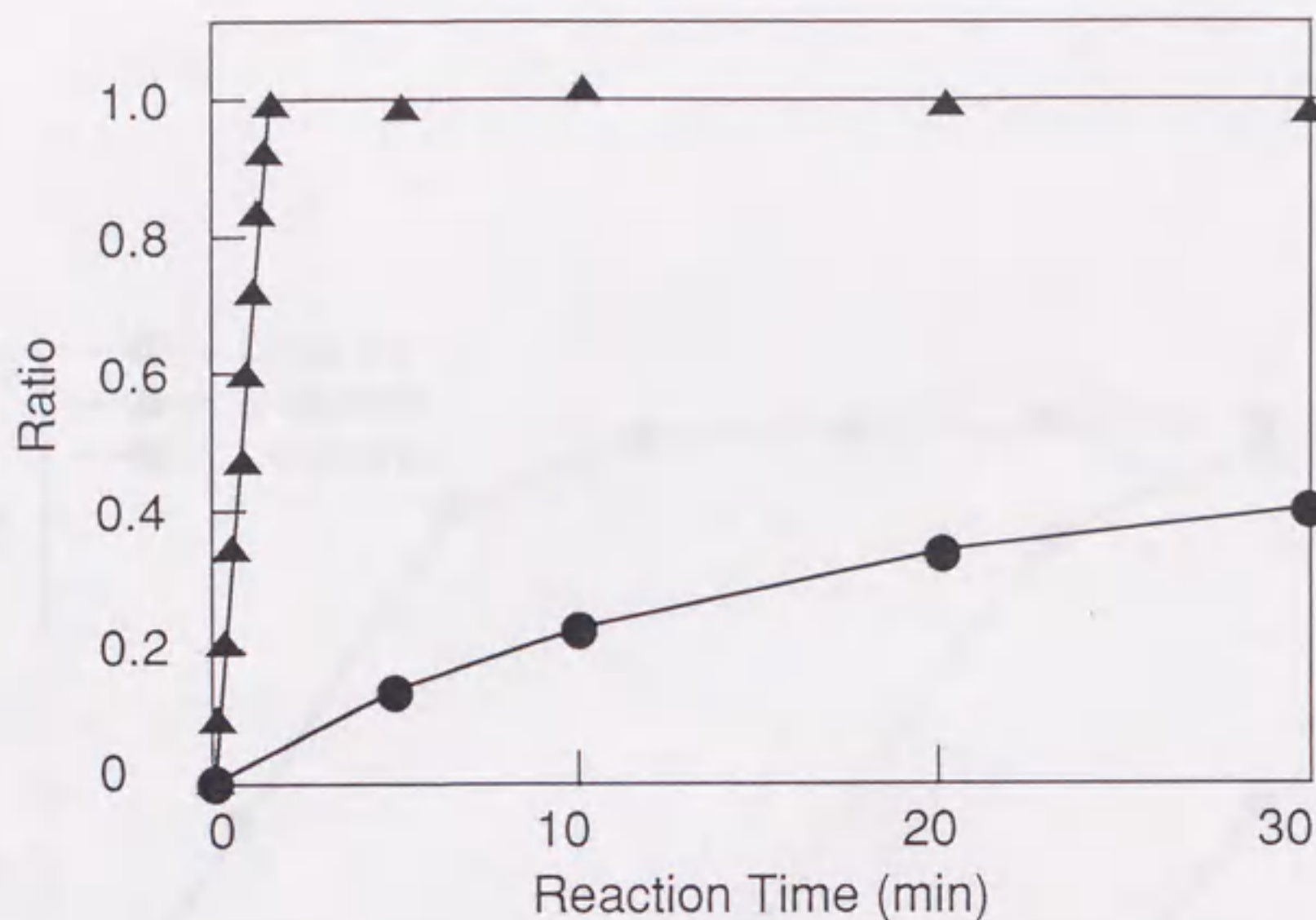


Fig. 32. Time-course of chemical acetoin production from acetolactate in both alkaline and acidic conditions at 60 °C.

Ratio = acetoin produced/acetolactate added.

●, alkaline condition; ▲, acidic condition.

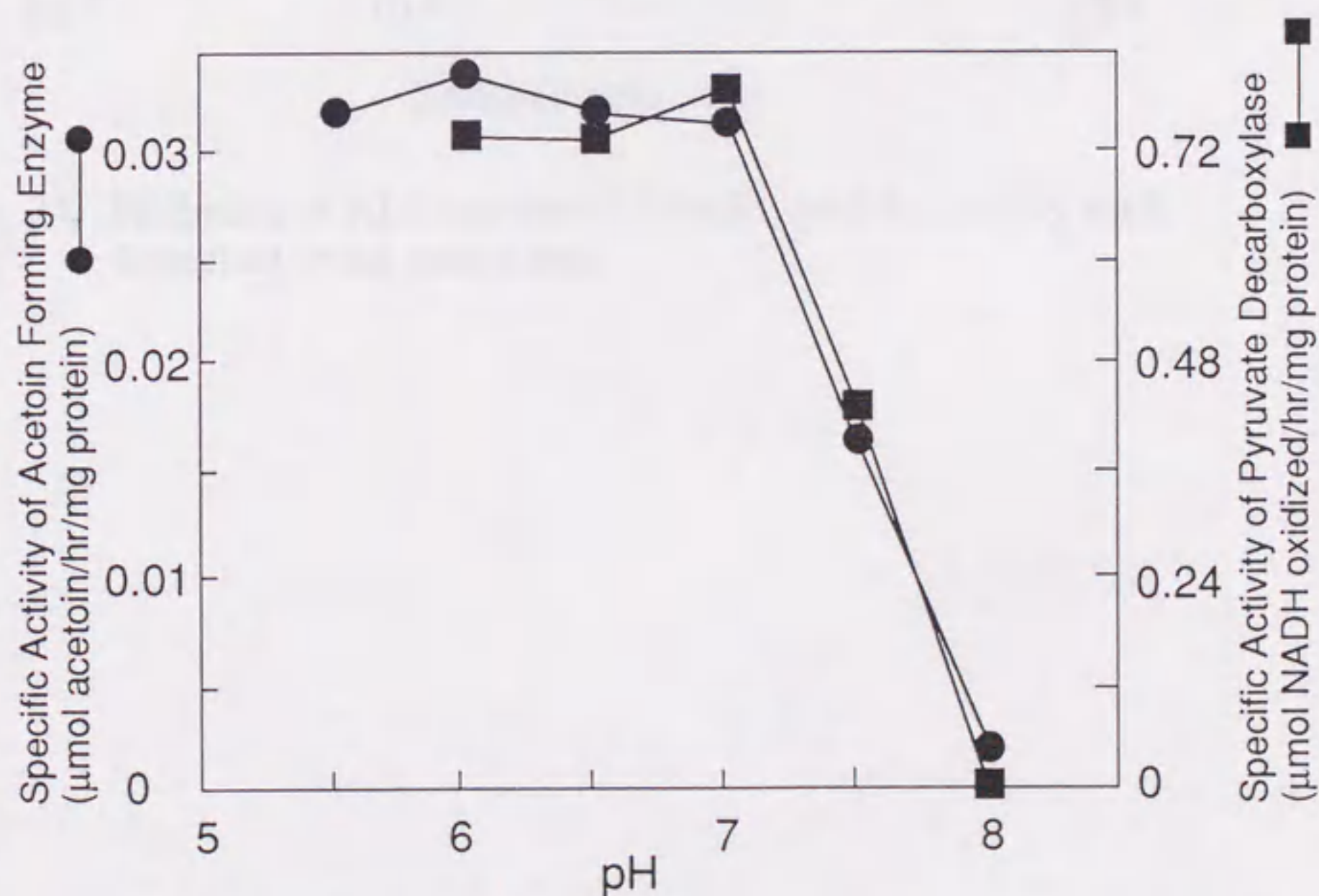


Fig. 33. pH Dependency of the acetoin forming enzyme and pyruvate decarboxylase from pea germinated seeds.



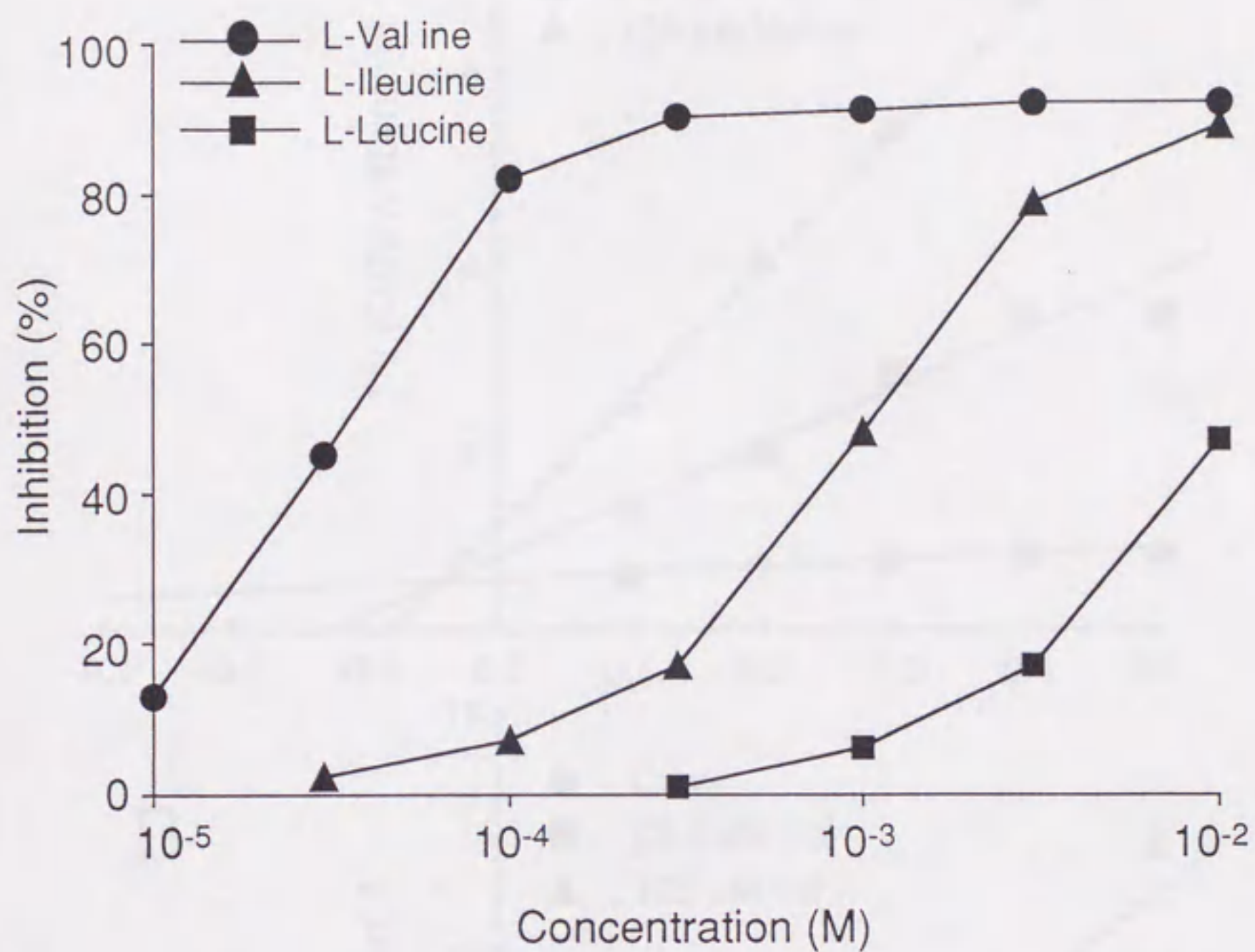


Fig. 34. Inhibition of ALS isozyme I from *Escherichia coli* by each branched chain amino acid.



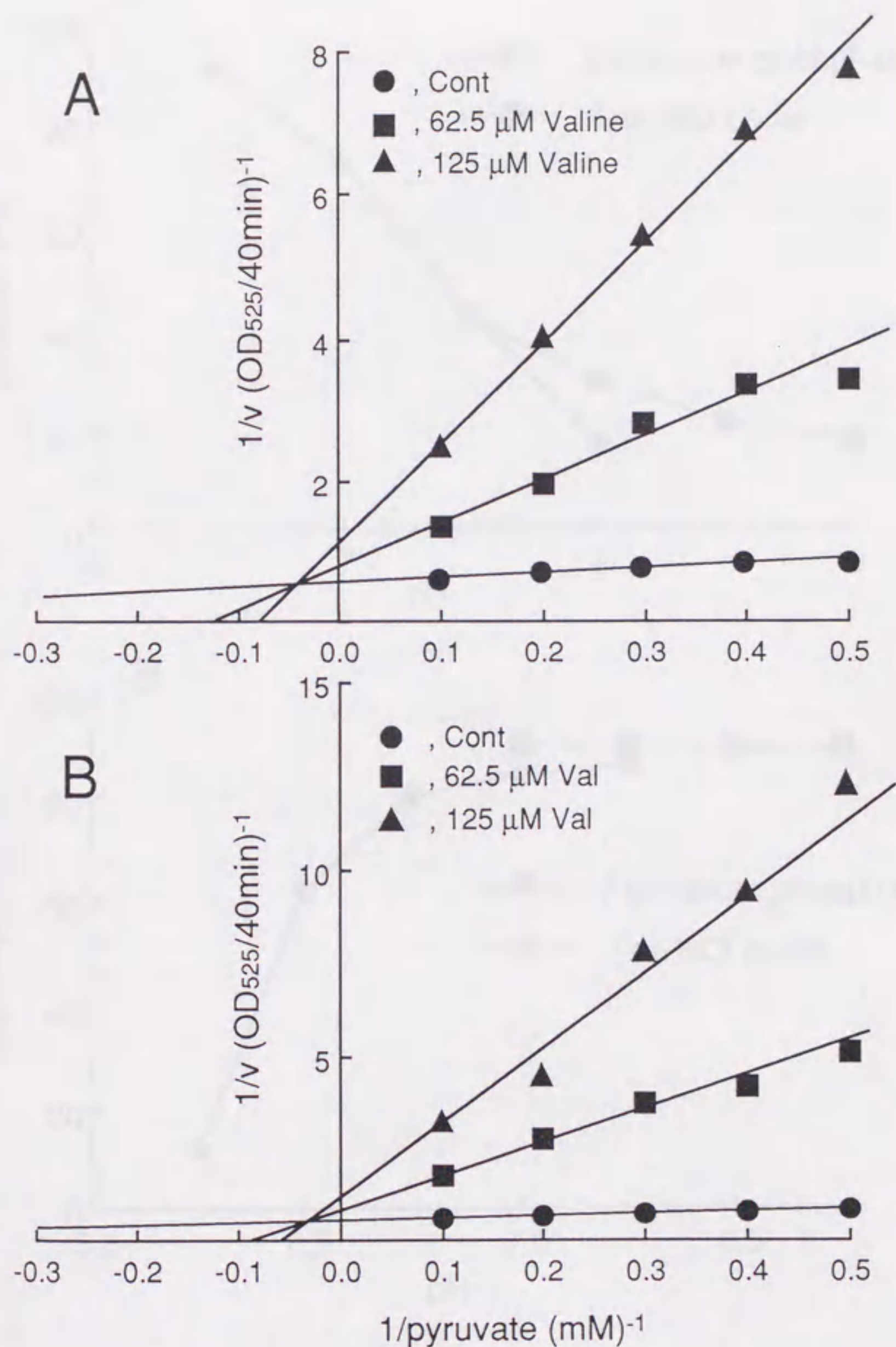


Fig. 35. Lineweaver-Burk plots of the inhibition of ALS isozyme I from *Salmonella typhimurium* (A) and *Escherichia coli* (B) by L-valine with pyruvate concentration varying between 2 and 10 mM.



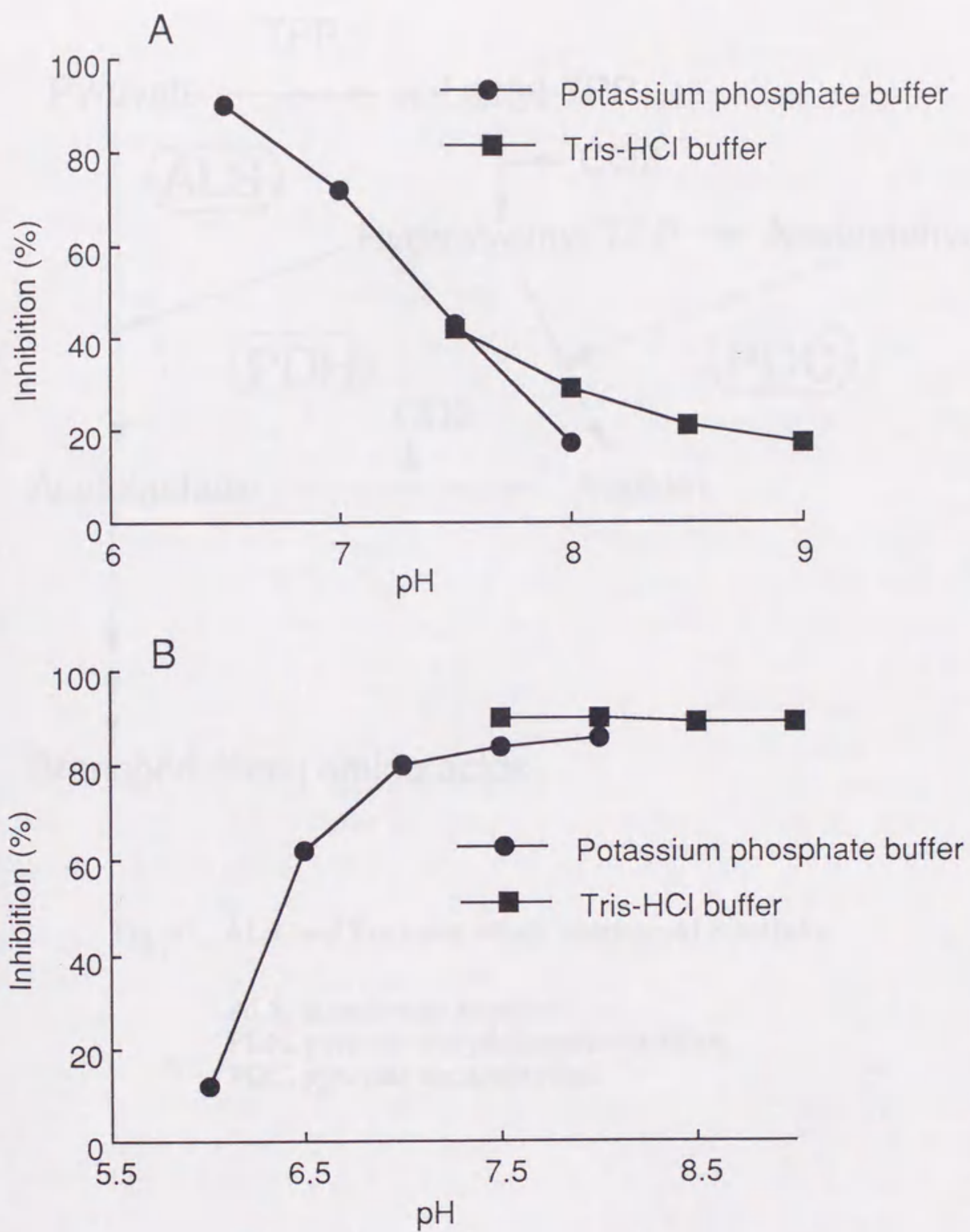


Fig. 36. Effects of pH on the inhibition of ALS isozyme I from *Escherichia coli* (A) and *Salmonella typhimurium* by L-valine (1 mM).



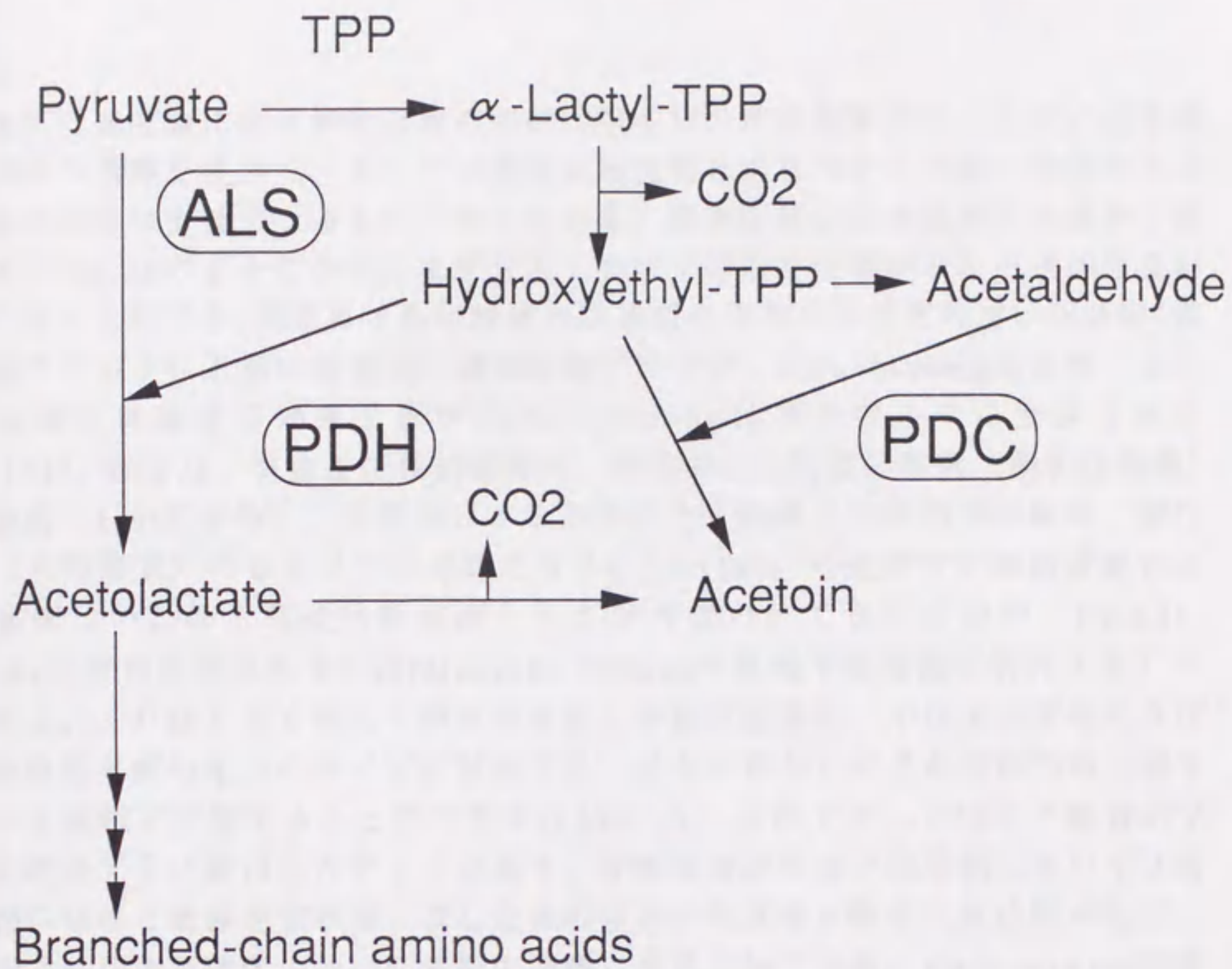


Fig. 37. ALS, and Enzymes which interfere ALS activity

ALS, acetolactate synthase;  
 PDH, pyruvate dehydrogenase complex;  
 PDC, pyruvate decarboxylase.



## 第4節 PC除草剤のALS阻害の動的解析

### 1. 序

酵素反応速度論による酵素阻害の解析は阻害剤の酵素阻害部位ならびに阻害機構に関する情報を提供し、さらには阻害剤相互間の阻害作用の比較に役立つことで、薬剤設計の支援になるものと考えられる。酵素阻害を阻害機構の相違から類別するとFig.38のようになる。まず大きくわけて可逆的阻害剤と不可逆的阻害剤に分けることができ、前者はさらに酵素と阻害剤の平衡到達速度の速い阻害剤(基底状態アナログ)と遅い阻害剤(遷移状態アナログ、slow-binding阻害剤)ならびに極端に低濃度で効果を示すtight-binding阻害剤の3つに分類される(153,154)。後者は、官能基特異的修飾剤、活性中心指向型阻害剤(親和性標識)、自殺基質(kcat阻害剤)、分解物による不活性化、触媒反応同期化学修飾、逆性基質(麻醉基質)の6タイプに分類できる(154-156)。可逆的で平衡到達度の速い阻害剤はいわゆる可逆的阻害剤として取り扱われてきたもので、Briggs-Haldaneの定常状態法あるいはMichaelis-Mentenの単純平衡理論で解析することができる。これは大きく分けて拮抗阻害剤、非拮抗阻害剤、不拮抗阻害剤ならびに混合型阻害剤の4つのタイプに区別でき、さらに細かくはそれぞれの部分型を含めて8種類に分類することができる(153)。ALSのフィードバック阻害剤である分岐鎖アミノ酸はこのタイプに属す。平衡到達度の遅い阻害剤については初期状態の阻害と最終定常状態に達した後の阻害の両状態を解析する必要が生じ、阻害形式は平衡到達度の速い阻害剤と同様に多種多様となる。Tight-binding阻害剤は極めて低濃度で阻害を発現するために速度論の取り扱い上、酵素に結合していない遊離の阻害剤濃度を一定として取り扱うことができないもので、 $10^{-10}$  Mオーダー以上の阻害力価を示すような薬剤についてはこれを適用する必要が生じる。Coformycine等のアデノシンデアミナーゼ阻害剤がこれに属す(157)。不可逆的阻害剤の官能基特異的阻害剤とは酵素分子内の所定の官能基に対して、どのような酵素に対しても、非特異的に不可逆的に結合する阻害剤でその簡便な取扱いは酵素と阻害剤の擬一次反応となる(153)。緒論で述べたKIA-6842等のSH基阻害剤はこのタイプに属す(23)。活性中心指向型阻害剤は酵素分子を認識した後官能基に不可逆的に結合するもので、速度論的には基質と間違えられて酵素に結合した後不可逆的阻害剤に変化する自殺基質と同じ様な取り扱いとなる。有機リン殺虫剤のアセチルコリンエステラーゼ阻害剤は活性中心指向型阻害剤に属し(158)、チトクロムP-450の阻害剤である1-aminobenzotriazoleは自殺基質となる(159)。分解物による不活性化や触媒反応同期化学修飾は、詳細な面では異なるが、大まかには自殺基質のカテゴリーに含まれる(155)。逆性基質とは自殺基質のように基質と間違えられて酵素に結合し、一次的に酵素を失活させるがその後、酵素から遊離して活性を回復させるような阻害剤のことを意味する。トリプシンの阻害剤であるp-amidinophenol ester類がこれに属す(156)。



さてこのように酵素阻害剤といっても多種多様に分類できるが、A L S 阻害型除草剤の中で最初に A L S 阻害の Kinetics が明らかにされたのは I M I 系除草剤であり、これはピルビン酸に対する不拮抗阻害剤であると報告された(54)。しかしながら、この後、S U 系除草剤は単純な定常状態理論では取り扱うことのできない平衡到達度の遅い slow-binding 阻害剤であることが報告され(66)、これを受けて I M I 系除草剤も slow-binding 阻害剤であることが証明された(67)。この結果、現時点では T P 系除草剤も含めていわゆる A L S 阻害型除草剤は slow-binding 阻害剤であると考えられている(160,161)。そこで、P C 除草剤についても基本的には slow-binding 阻害剤であるとの観点から検討を行なうと同時に、従来の方法で得られる阻害形式の情報も酵素上の薬剤結合部位を速やかに推定する上で重要であるとの認識から、以下の4項目に関して検討を加えた。

- (I) P C 除草剤による植物 A L S の slow-binding 阻害
- (II) P C 除草剤の植物 A L S 阻害の定常状態解析
- (III) P C 除草剤のバクテリア A L S 阻害の定常状態解析
- (IV) P C 除草剤の A L S 阻害に対する p H および S H 阻害剤の影響



## 2. 実験材料および方法

### (1) 供試薬剤

P C系除草剤としてpyrithiobac、bispyribac、compound 1、compound 2、compound 3 (Fig. 9)、S U系除草剤としてchlorsulfuron、sulfometuron-methyl、metsulfuron-methyl (Figs. 3, 5)、I M I系除草剤としてimazapyr (Fig. 6)ならびにフィードバック阻害剤としてロイシンとバリンを使用した。

### (2) 供試生物材料

植物材料としてエンドウ、微生物材料として、大腸菌とサルモネラ菌を使用した。

### (3) A L S粗酵素の調製およびA L Sの部分精製ならびにA L S活性の測定

エンドウ黄化幼植物茎葉からのA L S粗酵素の調製は第2節に記載した方法に従った。一方、エンドウ黄化幼植物茎葉からのA L Sの部分精製は、基本的には第3節に記載した方法に従ったが、Bio-Gel HTPのヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを省略した。バクテリアA L Sの粗酵素は第2節に記載した方法に従い調製した。

A L S活性測定は基本的には第1節に記載した方法に従った。薬剤溶液はアセトン溶液を調製したのち所定濃度となるように蒸留水で希釈して反応液に添加し、アミノ酸溶液は水溶液として添加した。

### (4) 定常状態解析

反応時間を40分間として、Lineweaver-BurkプロットよりA L Sの阻害形式を調べ、その回帰直線と理論式を照らし合わせることで阻害定数を求めた。ピルビン酸濃度を変化させる場合にはT P Pの濃度を0.5 mMに固定し、T P P濃度を変化させる場合にはピルビン酸濃度を4.0 mMに固定した。また、I<sub>50</sub>値はプロビット法により求めた。

### (5) Slow-binding阻害の解析

反応時間と生成物量のプロットを解析するために非線形最小二乗法を必要とするために、B A S I Cの解析プログラムを文献より(162, 163)コピーした。データ解析はまずシンプレックス法で求めたい係数の概算値を算出したのち、これをダンピングガウスニュートン法に当てはめ正確な値を算出するという方法を採用した。

Slow-binding阻害剤の場合、薬剤を添加した場合の反応時間と生成物量の関係は次のような理論式からなる(164)。



$$p = v_f t - (v_f - v_i)(1 - e^{-kt})/k$$

p, 反応生成物量; t, 反応時間;  $v_f$ , 最終速度;  $v_i$ , 初速度; k, 初速度から最終速度への変化の反応速度定数

求めたい未知係数は $v_i$ ,  $v_f$ , kであるので、これを上記の非線形最小二乗法で算出し、得られた値を下記の式に代入することで、阻害定数ならびに酵素阻害剤複合体が初期状態から最終定状態に転移する速度定数 $k_1$ を求めた。得られた値をどの理論式に当てはめるかは、ピルビン酸濃度を変化させた場合の非線形最小二乗法より求まる速度と基質濃度のHanes-Woolfプロットにより決定した。なお $k_1$ の値は、その逆反応に比して十分に大きいと仮定（逆反応の速度定数がほぼ0）して、kを表す式の両辺逆数プロット（Lineweaver-Burk plot）のy軸切片より求めた。

#### 一段階型拮抗阻害

$$v_i = VS/(K_m + S) \quad v_f = VS/\{K_m(1 + I/K_i) + S\}$$

$$k = k_2 + k_1 I/(1 + S/K_m)$$

#### 一段階型不拮抗阻害

$$v_i = VS/(K_m + S) \quad v_f = VS/\{K_m + S(1 + I/K_i)\}$$

$$k = k_2 + k_1/(1 + K_m/S)$$

#### 一段階型非拮抗阻害

$$v_i = VS/(K_m + S) \quad v_f = VS/(K_m + S)(1 + I/K_i)$$

$$k = k_2 + k_1 I$$

#### 一段階混合型阻害

$$v_i = VS/(K_m + S)$$

$$v_f = VS/\{K_m(1 + I/K_{ii}) + S(1 + I/K_{is})\}$$

$$k = (k_1 K_m + k_1' S)/(K_m/K_{is} + S/K_{ii}) + (k_1 K_m + k_1' S)I/(K_m + S)$$

以上

V, 酵素反応(ALS)の最大速度定数 S, 基質(ピルビン酸)濃度

$K_m$ , ピルビン酸に対する $K_m$ 値 I, 阻害剤濃度  $K_i$ ,  $K_{is}$ ,  $K_{ii}$ , 阻害定数

$k_1$ ,  $k_1'$ , 酵素阻害剤複合体の生成速度定数

$k_2$ ,  $k_2'$ , 酵素阻害剤複合体の解離速度定数

#### 二段階拮抗阻害

$$v_i = VS/\{K_m(1 + I/K_i) + S\} \quad v_f = VS/\{K_m(1 + I/K_i^*) + S\}$$



$$K_{i^{**}} = 1 / \{ (K_i) - 1 + (K_i^*) - 1 \} \quad k = k_2 + k_1 I / (1 + I/K_i + S/K_m)$$

二段階不拮抗阻害

$$v_i = VS / \{ K_m + S(1 + I/K_i) \} \quad v_f = VS / \{ K_m + S(1 + I/K_i^*) \}$$

$$K_{i^{**}} = 1 / \{ (K_i) - 1 + (K_i^*) - 1 \}$$

$$k = k_2 + k_1 I / (1 + I/K_i + K_m/S)$$

二段階非拮抗阻害

$$v_i = VS / (K_m + S)(1 + I/K_i) \quad v_f = VS / (K_m + S)(1 + I/K_i^*)$$

$$K_{i^{**}} = 1 / \{ (K_i) - 1 + (K_i^*) - 1 \} \quad k = k_2 + k_1 I / (K_i + I)$$

二段階混合型阻害

$$v_i = VS / \{ K_m(1 + I/K_{is}) + S(1 + I/K_{ii}) \} \quad v_f = VS / \{ K_m(1 + I/K_{is}^*) + S(1 + I/K_{ii}^*) \}$$

$$K_{is^{**}} = 1 / \{ (K_{is}) - 1 + (K_{is}^*) - 1 \} \quad K_{ii^{**}} = 1 / \{ (K_{ii}) - 1 + (K_{ii}^*) - 1 \}$$

$$k = (k_1 K_m K_{ii} + k_1' K_{is} S) / \{ K_{ii} K_m (k_1/k_2) + K_{is} S (k_1'/k_2') \} \\ + (k_1 K_m K_{ii} + k_1' K_{is} S) I / \{ K_m K_{ii} (I + K_{is}) + K_{is} S (I + K_{ii}) \}$$

以上

$V$ , 酵素反応(ALS)の最大速度定数  $S$ , 基質(ピルビン酸)濃度

$K_m$ , ピルビン酸に対する $K_m$ 値  $I$ , 阻害剤濃度

$K_i$ ,  $K_{ii}$ ,  $K_{is}$ , 初期状態の阻害定数

$K_i^*$ ,  $K_{is}^*$ ,  $K_{ii}^*$ , みかけの最終定状状態の阻害定数

$K_{i^{**}}$ ,  $K_{is^{**}}$ ,  $K_{ii^{**}}$ , 最終定状状態の阻害定数

$k_1$ ,  $k_1'$ , 酵素阻害剤複合体の生成速度定数

$k_2$ ,  $k_2'$ , 酵素阻害剤複合体の解離速度定数



### 3. 実験結果

#### (1) PC除草剤による植物ALSのslow-binding阻害

高基質濃度での反応時間と生成物量の関係：エンドウ黄化幼植物茎葉ALSの粗酵素を使用して、ピルビン酸濃度を160 mM ( $K_m$ 値の約100倍量で、かつ基質阻害の起こらない量)とし、3時間以上の長い時間で反応を検討したところ、反応時間と生成物量の関係には直線性が成立することが明らかとなった。そこで、この条件下でPC除草剤の阻害効果を検討したところ、pyrithiobacおよびbispribacならびにcompound 3は反応の進行とともに阻害が強くなるslow-binding阻害剤であることが明らかとなった (Figs. 39, 40)。また初速度においても明確な阻害が認められたことから、これらの阻害剤はFig. 41で表わすことのできる二段階型の阻害剤に属することが示唆された。一方、比較に使用したフィードバック阻害剤のロイシン・バリンペアーの阻害は測定時間内では一定であり、これらは平衡到達速度の速い阻害剤と判断された (Fig. 39) (ロイシン、バリンは序で述べた分類からすると、拮抗阻害剤の部分型、即ち部分拮抗阻害剤である)。そこで、PC除草剤のslow-binding阻害を詳しく解析した。

低基質濃度での反応時間と生成物量の関係：上述のように供試したPC除草剤は二段階型のslow-binding阻害剤であることが明らかになったので、このslow-binding阻害が方法の頁で述べたどの二段階型の阻害形式に属するのかを基質(ピルビン酸)濃度を変化させ検討した。ピルビン酸濃度としては、反応速度が一次反応から0次反応に変化する濃度として2 mM、6 mM、10 mMを採用した。また事前に、ピルビン酸低濃度では反応時間と生成物量の関係に直線性が成立しないことが示唆されていたので、本実験にはいる前に、この点について検討した。まずピルビン酸濃度を2 mMとして3時間以上の反応時間で検討したところ、この濃度では反応時間と生成物量の間に直線性が成立しないことが確認された (Fig. 42A)。この原因として、基質飽和が破れていることと、反応中でのALSの失活が考えられたので、はじめに前者の可能性を基質の変化量を算出することで考察したが、反応3時間でもその変化量は添加基質量(2 mM)の10%足らずであり、基質飽和はほぼ保たれていることが明らかとなった。このため後者のALSの失活の可能性が大きくなり、得られたプロットを失活が伴う場合の反応時間と生成物量の理論曲線 ( $P = (VS/K_m + S)(1 - e^{-kt})/k$ ) に非線形最小二乗法で当てはめたところ、正確にフィットすることが明らかとなった。またこれを再確認するために経時的な反応速度をプロットの接線より求め、反応時間に対して片対数プロットしたところ、直線となり (Fig. 42B)、反応時間中にALSが失活していることが明確となった。ちなみに試験条件(30℃)での失活の一次反応速度定数 $k$ は  $0.00858 \text{ min}^{-1}$  (半減期81分) となった。またこの失活反応は先に述べたようにピルビン酸高濃度では認められなかったことから、高濃度のピルビン酸がALSの安定化に役立っているものと判断された。そこで反応時間40分まで



は近似的に反応時間と生成物量の間には直線性が成立しているとして、ピルビン酸 2 mM の場合には 40 分間で得られるデータをもとにして非線形最小二乗法による解析を行った。また同様にピルビン酸 6 mM、10 mM では 60 分まで直線性が確認されたので、この濃度については 60 分間で得られたデータを解析に利用した。このように直線性を確認した上で pyriithiobac の 10 nM を反応液に添加した場合の結果を非線形最小二乗法で解析し、3 濃度それぞれの初速度を得た。そこでこの速度と基質濃度の関係を Hanes-Woolf plot したところ、対照区に比較して  $K_m$  値の増加と最大反応速度  $V_{max}$  の増大が観察され、pyriithiobac は初期状態においては混合型阻害（基質酵素阻害剤複合体の阻害定数と基質阻害剤複合体の阻害定数の比 ( $K_{ii}/K_{is}$ ) が 2.9) を示すことが明らかとなった (Fig. 43)。しかしながら、検討した反応時間は実験上の制約から 40 ~ 60 分間と短いために、最終定常状態速度ならびに初期から最終速度への転移反応速度定数の解析結果は大きな誤差を生じ、この条件では求めることが不可能であった。

高基質濃度の試験結果の解析：以上のように pyriithiobac は、初速度においては混合型阻害を示し、さらに混合型阻害の 2 種の阻害定数の比 ( $K_{ii}/K_{is}=2.9$ ) も明らかになったのでこれをもとに前述の基質高濃度の場合のデータを解析した（方法の頁でのべた二段階混合型阻害の  $v_i$  の式と阻害定数の比の 2 式から算出）。その結果初期状態の阻害定数は  $K_{is}=28$  nM,  $K_{ii}=82$  nM となった。またこの場合には最終定常状態速度ならびに初期から最終への転移速度定数が算出されたので、最終定常状態でも同じ阻害定数比で混合型が成立と仮定して ( $K_{ii}/K_{is}=2.9$  二段階混合型阻害の式で  $k_1=k_1'$ ) 解析すると、その阻害定数は  $K_{is}^{**}=1.1$  nM,  $K_{ii}^{**}=3.1$  nM となった（初期状態の阻害定数と最終定常状態の阻害定数の比は  $K_{is}/K_{is}^{**}=K_{ii}/K_{ii}^{**}=26$  となった）。さらにこの仮定のもと初期状態の基質阻害剤複合体が最終的な定常状態複合体へ変化する転移反応速度 ( $k_1$ ) をその逆反応が無視できるものとして ( $k_2=0$ )、薬剤濃度を変化させた場合に得られた転移速度定数と薬剤濃度の Lineweaver-Burk plot より  $k_1$  を求めたところその値は  $0.069 \text{ min}^{-1}$ （半減期 10 分）となった (Fig. 44；二段階混合型阻害の場合 Lineweaver-Burk plot の y 軸切辺の値は  $1/k_1$  となる)。

同様にして、compound 3 と bispyribac の場合にも初期ならびに最終定常状態で混合型が成立する ( $K_{ii}/K_{is}=2.9$  とする) と仮定して、高基質濃度の結果を解析したところ compound 3 については初期の阻害定数として  $K_{is}=276$  nM,  $K_{ii}=810$  nM、最終定常状態の阻害定数として  $K_{is}^{**}=22$  nM,  $K_{ii}^{**}=63$  nM が得られた（初期状態の阻害定数と最終定常状態の阻害定数の比は 11）。また bispyribac については、初期阻害定数  $K_{is}=6.2$  nM,  $K_{ii}=18$  nM、最終定常状態阻害定数  $K_{is}^{**}=0.29$  nM,  $K_{ii}^{**}=0.85$  nM が得られた（初期状態の阻害定数と最終定常状態の阻害定数の比は 26）。

## (2) 40 分間反応の A L S 阻害形式



エンドウ粗酵素、エンドウの分子量32万の分子種と12万の分子種、大腸菌アイソザイムI粗酵素、サルモネラ菌アイソザイムIとIIの粗酵素ならびにシュードモナス菌粗酵素を使用して、40分間反応でのPC除草剤のALS阻害のKineticsについて検討を加えた。

エンドウ粗酵素の場合：pyrithiobac、bispribac、compound 1ならびにcompound 3は、SU系除草剤のchlorsulfuronと同様に、ピルビン酸に対して、拮抗と非拮抗の中間型である混合型阻害を示した。このときのIMI系除草剤の阻害形式は不拮抗型であり、分岐鎖アミノ酸の阻害形式は部分拮抗型であった(Figs. 45, 46, Table 21)。そこで、Lineweaver-Burkプロットの回帰直線を理論直線に照らし併せることで各々の阻害定数を求めたところTable 21のような結果となった。一方、pyrithiobac、compound 3、chlorsulfuron、ImazapyrならびにロイシンのTPPに対する阻害形式はすべて非拮抗型であった(Fig. 47, Table 21)。エンドウALSの32万の分子種と12万の分子種の場合：pyrithiobacは分岐鎖アミノ酸に感受性の32万の分子種と非感受性の12万の分子種を粗酵素の場合と同程度の強さで阻害した。このときのピルビン酸に対する阻害形式は粗酵素の場合と同じで、混合型であった。また、chlorsulfuronも同様な結果となった。一方、imazapyrも32万の分子種と12万の分子種を粗酵素の場合と同程度の強さで阻害した(Table 22)。

バクテリア粗酵素の場合：大腸菌アイソザイムIおよびサルモネラ菌アイソザイムIとIIならびにシュードモナス菌のALSに対する各薬剤の阻害形式および阻害定数を調べた。第3節でも述べたように、酵素間で阻害剤に対する感受性は異なっていたが、pyrithiobacおよびcompound 1ならびにcompound 2は大腸菌アイソザイムIおよびサルモネラ菌アイソザイムIならびにシュードモナス菌のALSをSU系除草剤と同様に、ピルビン酸に対して非拮抗型で阻害した(Table 23)。このときのIMI系除草剤のimazapyrのシュードモナス菌ALS阻害はエンドウの場合と同様に不拮抗型であり、分岐鎖アミノ酸の阻害形式は混合型であった。一方、サルモネラ菌アイソザイムIIの場合は、同タイプの薬剤が異なった阻害形式を示し、pyrithiobac および compound 2 ならびに chlorsulfuronは拮抗型、compound 1およびsulfometuron-methylならびにmetsulfuron-methylは混合型となった(Table 23)。なお、各々の阻害定数についてはTable 24に記載した。

### (3) PC除草剤のALS阻害に対するpHおよびSH阻害剤の影響

PC除草剤の1つであるcompound 3のエンドウALS阻害はpH変化により変動しなかったが、銅イオンや水銀イオン等のSH基阻害剤により回復した(Figs. 48, 49)。



#### 4. 考察

非線形最小二乗法を使用することにより、PC除草剤はSU系およびIMI系除草剤と同様なALSのslow-binding阻害剤であることが明らかとなった。そしてこのslow-binding阻害は少なくとも初期状態では混合型阻害を示すことから、二段階混合型阻害に位置づけることができた。しかしながら、ALSが不安定という実験上の制約から、最終定常状態における阻害形式を導くことができなかった。そこで初期に生成する酵素阻害剤複合体が最終定常状態の複合体に転移する速度と、酵素基質阻害剤複合体が最終状態へ転移する速度が等しいと仮定すると、最終定常状態でも混合型阻害が成立することから、この仮定のもとに最終定常状態の阻害定数を算出した。このため、最終定常状態の阻害定数についてはあくまでも仮の値となっている。基質が結合することにより酵素が安定化するために、最終状態への酵素基質阻害剤複合体の転移速度が酵素基質複合体の転移速度よりも遅くなったり、またその逆に速くなったりすることは十分想定されるところであるが、現状ではこの解析は難しいのではないかと思われる。この点についてはSU系除草剤の場合にもIMI系除草剤の場合にも未だに明確には解析されていない。また、PC除草剤の初期状態の阻害から最終定常状態への阻害への最大転移速度定数は、SU系除草剤で報告されている値(160)とほぼ同じ値( $0.069 \text{ min}^{-1}$ )となり、構造が異なる両薬剤が同じようなslow-bindingの性質を有していることが示唆された。

一方、PC除草剤のエンドウALSを使用した場合の40分間反応の阻害形式は、SU系除草剤と同様に、ピルビン酸に対して混合型で、不拮抗型のIMI系除草剤や部分拮抗型の分岐鎖アミノ酸とは異なった。また大腸菌とサルモネラ菌のアイソザイムIならびにシュードモナス菌ALSを使用した場合にも、PC除草剤はSU系除草剤と同じ阻害形式を示した。従って、PC除草剤は、阻害形式の観点からは、SU系タイプのALS阻害剤でありIMI系タイプの除草剤やフィードバック阻害剤とは区別できるものと考えられた。SU系、IMI系およびTP系除草剤ならびにN-フタルアニリド系ALS阻害剤のALS上の阻害部位は、分岐鎖アミノ酸が結合する調節部位かその近傍であるという報告も存在するが(119,120)、これらの結果は、PC除草剤だけでなくSU系除草剤とIMI系除草剤も、その阻害部位は調節部位ではなく、ピルビン酸結合部位近傍であることを示唆しているものと考えられる。この考えは、分岐鎖アミノ酸に対して非感受性となったエンドウALSの12万の分子種が感受性の32万の分子種と同程度にこれらのALS阻害剤により阻害されたこと、および分岐鎖アミノ酸によるALS阻害はslow-binding阻害ではなく平衡到達度の速い阻害であること、ならびに分岐鎖アミノ酸に非感受性のサルモネラ菌アイソザイムIIもこれらのALS阻害剤により低濃度で阻害されたこと、そしてPC除草剤によるALS阻害のpHとSH阻害剤による変動が分岐鎖アミノ酸による阻害とは対照的であったこと、等により支持されるものと思われる。以上の内容を、サルモネラ菌アイソザ



イムIIを使用した試験では、同タイプの薬剤でも薬剤間で阻害形式が異なること、および放射性のSU系除草剤をリガンドとしたALSとのバインディングをIMI系除草剤は阻害するという報告(78)を考慮して簡単にまとめると次のようになる。PC除草剤は、SU系除草剤と同様に触媒部位が存在するサブユニットの活性部位近傍（ピルビン酸やチアミンピロリン酸と拮抗する部位ではない）に結合する。一方、IMI系除草剤は、これらとオーバーラップする部位に結合するが、その位置は若干ずれている。そして同タイプの薬剤でも薬剤毎に少しずつ結合位置が異なるものと考えられる。

緒言で述べたように、人為的に作成された多くのSU系除草剤抵抗性植物が報告されており、抵抗性はその多くがALSの変異による薬剤抵抗性獲得に依存していることが明らかにされている。これらの抵抗性植物が他のALS阻害剤に対して交差抵抗性を示すかどうかはバイオタイプにより異なっている (Table 5)。例えば、あるSU系除草剤に抵抗性を示す植物が他のSU系除草剤には交差抵抗性を示さない場合も珍しくない。これは、同タイプのALS阻害剤であってもALS結合部位が薬剤毎に若干異なっていることで説明できるのではないかと考えられる。

なお、slow-binding解析で得られた混合型阻害という結果は40分間反応の定常状態解析結果と同じであることから ( $K_{ii}/K_{is}$ がslow-binding解析でも40分間定常状態解析でも同様な値となっている)、従来の40分反応の定常状態解析結果も定性的には誤りではないものと考えられる。



Table 21. Inhibition types and constants of the inhibition of ALS from pea etiolated seedlings by PC herbicides, chlorsulfuron, imazapyr and branched chain amino acids in the 40-min-assay-system.

Compound	For Pyruvate <sup>a)</sup>			For TPP <sup>b)</sup>	
	Type	Kis (nM) <sup>c)</sup>	Kii (nM)		Type <sup>d)</sup>
Pyriithiobac	Mixed	4.8	17	Non-competitive	
Compound 1	Mixed	5.8	18	- e)	
Compound 3	Mixed	124	440	Non-competitive	
Chlorsulfuron	Mixed	5.6	24	Non-competitive	
Imazapyr	Uncompetitive	$\infty$	34000	Non-competitive	
L-Leucine	Partially Competitive	-	-	Non-competitive	
L-Valine	Partially Competitive	270,000	2,300,000	-	
L-Isoleucine	Partially Competitive	1,200,000	14,000,000	-	

a) Pyruvate concentration was varied between 2mM and 10mM.

b) Thiamine pyrophosphate (TPP) concentration was varied between 0.0125 mM and 0.5 mM.

c) Substrate-dependent inhibition constant.

d) Substrate-independent inhibition constant. e) Not tested.



Table 22. Inhibition of different forms of ALS of pea etiolated seedling by PC herbicides, chlorsulfuron, imazapyr and branched chain amino acids.

Compound	Crude ALS <sup>a)</sup>				Large ALS <sup>b)</sup>				Small ALS <sup>c)</sup>			
	Type <sup>d)</sup>	Kis (nM)	Kii (nM)	I <sub>50</sub> (nM)	Type	Kis (nM)	Kii (nM)	I <sub>50</sub> (nM)	Type	Kis (nM)	Kii (nM)	I <sub>50</sub> (nM)
Pyriithiobac	Mix	4.8	17	20	Mix	5.0	22	- <sup>e)</sup>	Mix	8.0	21	-
Compound 2	Mix	124	440	390	-	-	-	-	-	-	-	440
Chlorsulfuron	Mix	5.6	24	27	Mix	4.2	18	-	Mix	6.2	26	-
Imazapyr	Un	∞	34000	37000	Un	∞	33000	-	-	-	-	40000
Leu+Val <sup>f)</sup>	pCo	-	-	60% <sup>g)</sup>	-	-	-	47% <sup>g)</sup>	-	-	-	5% <sup>g)</sup>

a) The fraction precipitated with ammonium sulfate (25-55 %).

b) The higher molecular weight species of ALS separated by Cellulofine GCL-2000 sf column chromatography.

c) The lower molecular weight species of ALS separated by Cellulofine GCL-2000 sf column chromatography.

d) Inhibition type: mixed (Mix), uncompetitive (Un), partially competitive (pCo).

f) L-leucine plus L-valine pair (2 mM each). e) Not tested. g) Inhibition percentage.



Table 23. Inhibition types of PC, sulfonylurea, imidazolinone herbicides, and L-valine for ALS from bacteria in the 40-min-assay-system.

Compound	Inhibition Type with respect to pyruvate		
	<i>S. typ</i> ATCC25566 Isozyme II	<i>E. coli</i> K-12 Isozyme I	<i>P. aeruginosa</i>
Pyriithiobac	Competitive	Non-competitive <sup>a)</sup>	Non-competitive
Compound 2	Competitive	Non-competitive	Non-competitive
Chlorsulfuron	Competitive	Non-competitive	Non-competitive
Compound 1	Mixed <sup>b)</sup>	-	Non-competitive
Sulfometuron-methyl	Mixed	-	Non-competitive
Metsulfuron-methyl	Mixed	nt	nt
Imazapyr	-	-	Uncompetitive
L-Valine	-	Mixed	Mixed

a) Not tested. b) Inhibition was not detected at 100  $\mu$ M of concentration.



Table 24. Inhibition constants of PC, sulfonyleurea, imidazolinone herbicides, and L-valine for ALS inhibition in the 40-min-assay-system.

Compound	Inhibition Constant ( $\mu\text{M}$ )		
	<i>S. typ</i> ATCC25566 Isozyme I	<i>E. coli</i> K-12 Isozyme II	<i>P. aeruginosa</i> ATCC7700
Pyriithiobac	Kis=0.95 Kii= $\infty$	Kis=597 Kii=506	Kis=0.212 Kii=0.231
Compound 1	Kis=7.37 Kii=61.7	- b)	Kis=0.797 Kii=0.359
Compound 2	Kis=2.80 Kii= $\infty$	Kis=124 Kii=88.0	Kis=0.260 Kii=0.419
Chlorsulfuron	Kis=0.0186 Kii= $\infty$	Kis=36.0 Kii=32.3	Kis=0.155 Kii=0.0985
Sulfometsuron-methyl	Kis=0.0304 Kii=0.208	-	Kis=0.144 Kii=0.114
Metsulsulfuron-methyl	Kis=0.00492 Kii=0.0481	nt	nt
Imazapyr	-	-	Kis=213 Kii=18.5
L-Valine	-	Kis=5.76 Kii=64.1	Kis=4.74 Kii=16.8

a) Not tested b) Inhibition was not detected at 100  $\mu\text{M}$  of concentration.



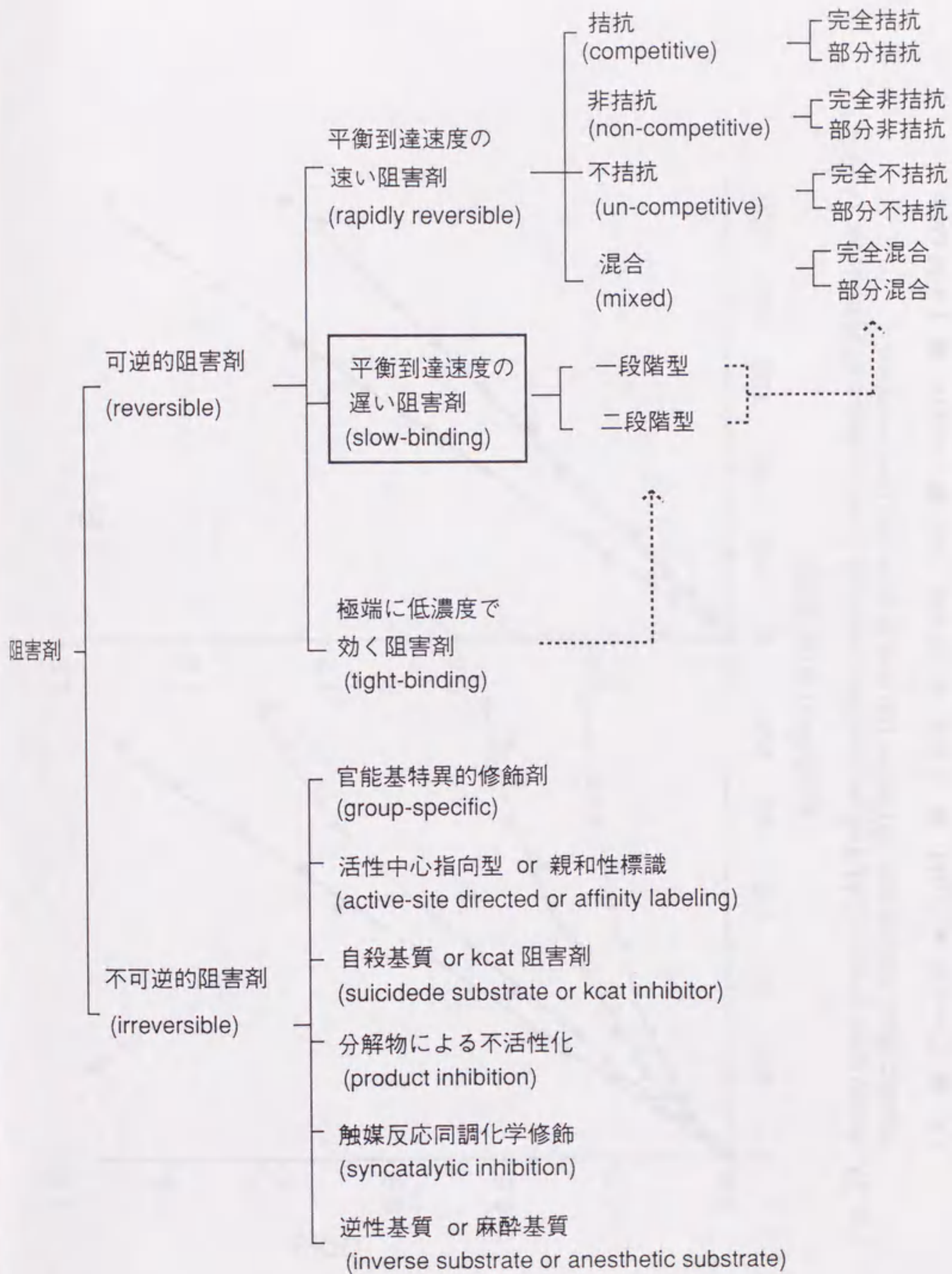


Fig. 38. 酵素阻害剤の分類.



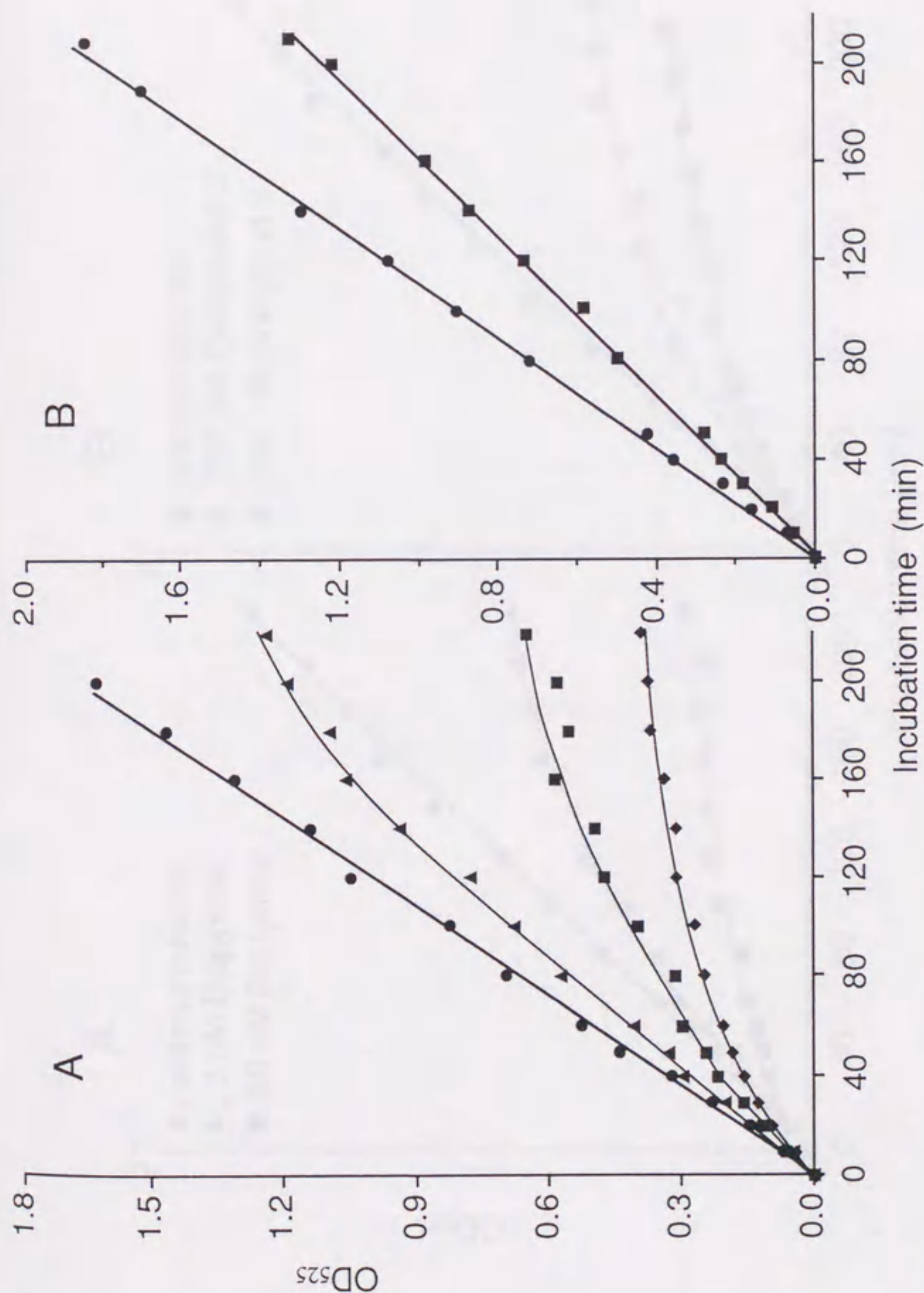


Fig. 39. Assay time-course of ALS of pea etiolated seedlings in the presence of pyrithiobac (A) and L-leucine plus L-valine pair (B) under 160 mM of pyruvate concentration.

(A): ●, Control; ▲, 2 nM; ■, 10 nM; ◆, 20 nM. (B): ●, Control; ■, 1 mM each.



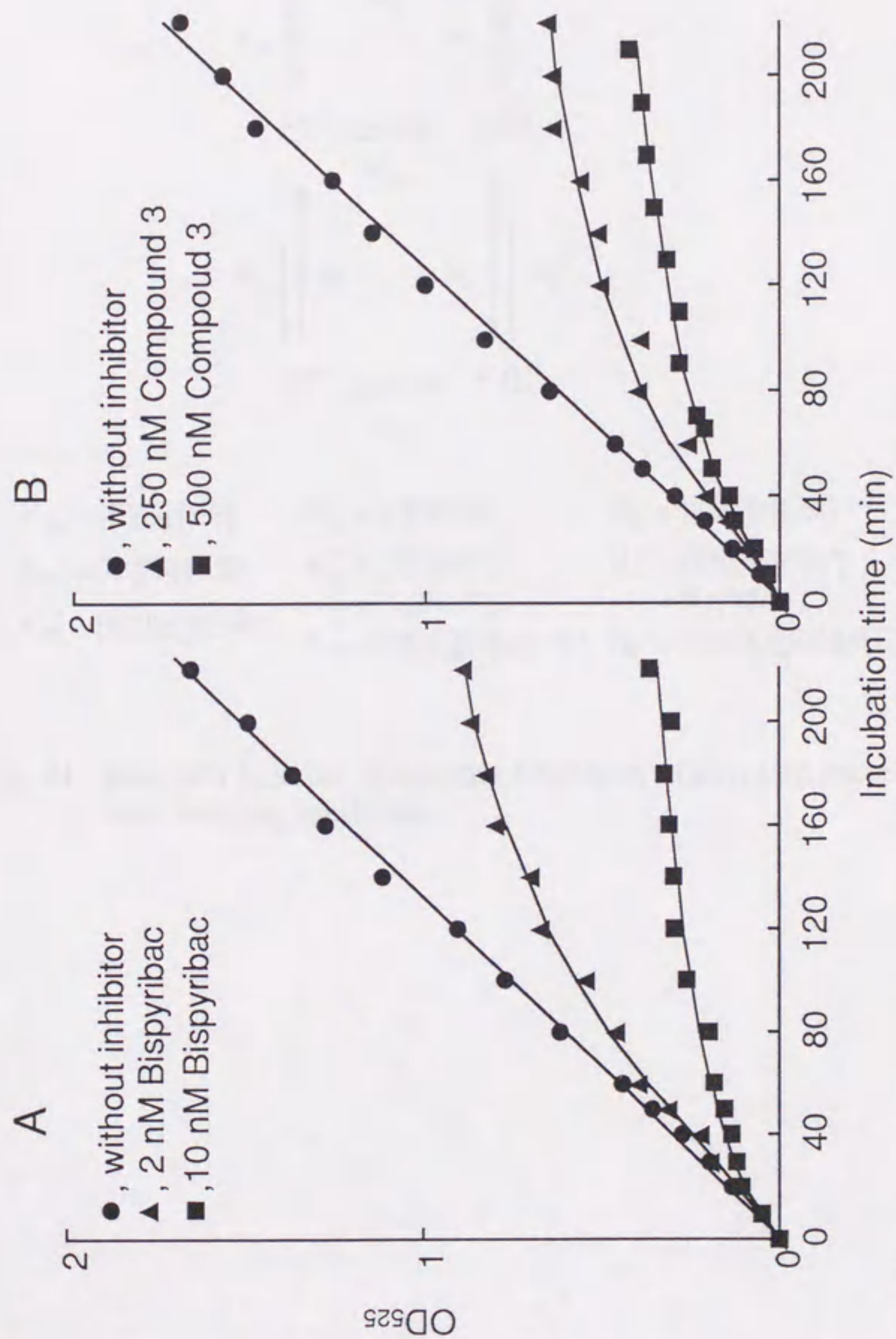
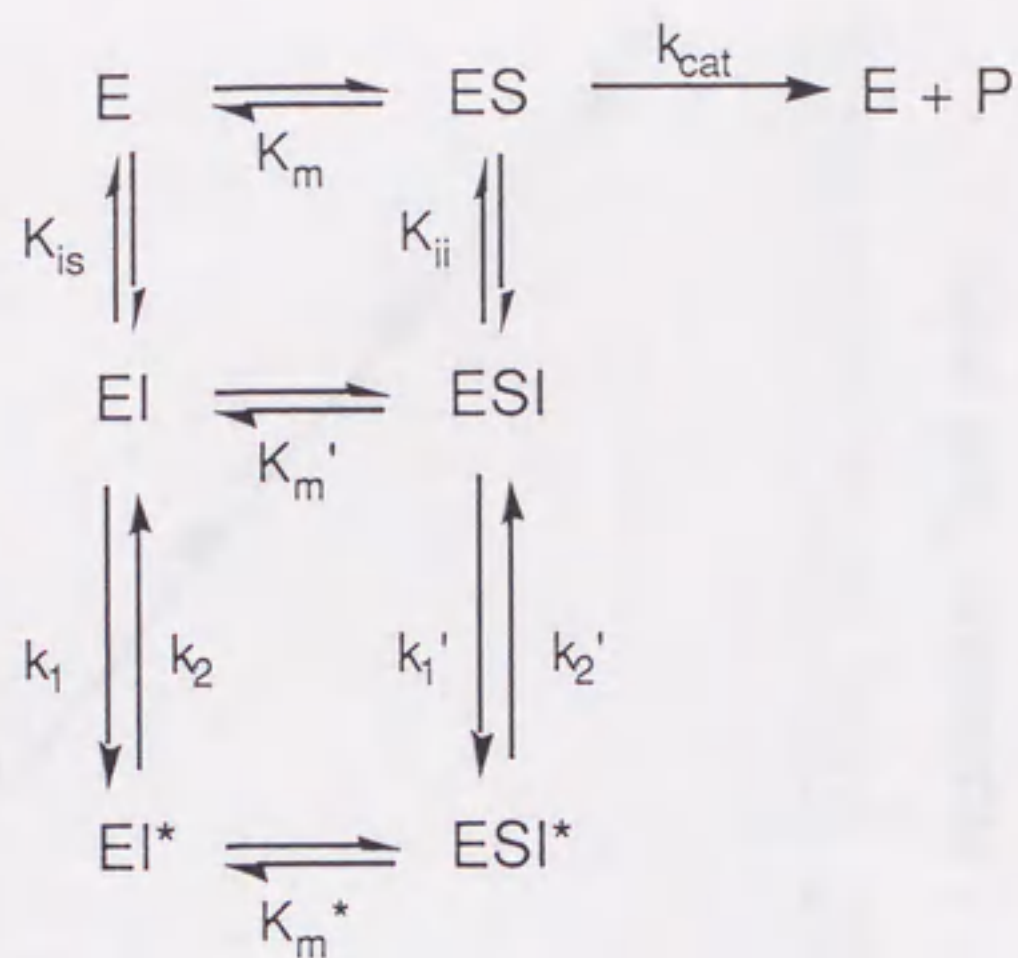


Fig. 40. Assay time-course of ALS of pea etiolated seedlings in the presence of bispyribac (A) and compound 3 (B) under 160 mM of pyruvate concentration.





$$\begin{array}{lll}
 K_m = [E][S]/[ES] & K_{is} = [E][I]/[EI] & K_{ii} = [ES][I]/[ESI] \\
 K_m' = [EI][S]/[ESI] & K_{is}^{**} = [E][I]/[EI^*] & K_{ii}^{**} = [ES][I]/[ESI^*] \\
 & = K_{is}(k_2/k_1) & = K_{ii}(k_2'/k_1') \\
 K_m^* = [EI^*][S]/[ESI^*] & K_{is}^* = [E][I]/\{[EI] + [EI^*]\} & K_{ii}^* = [ES][I]/\{[ESI] + [ESI^*]\}
 \end{array}$$

Fig. 41. Reaction Scheme of enzyme inhibition of two step mixed-type slow-binding inhibitors.



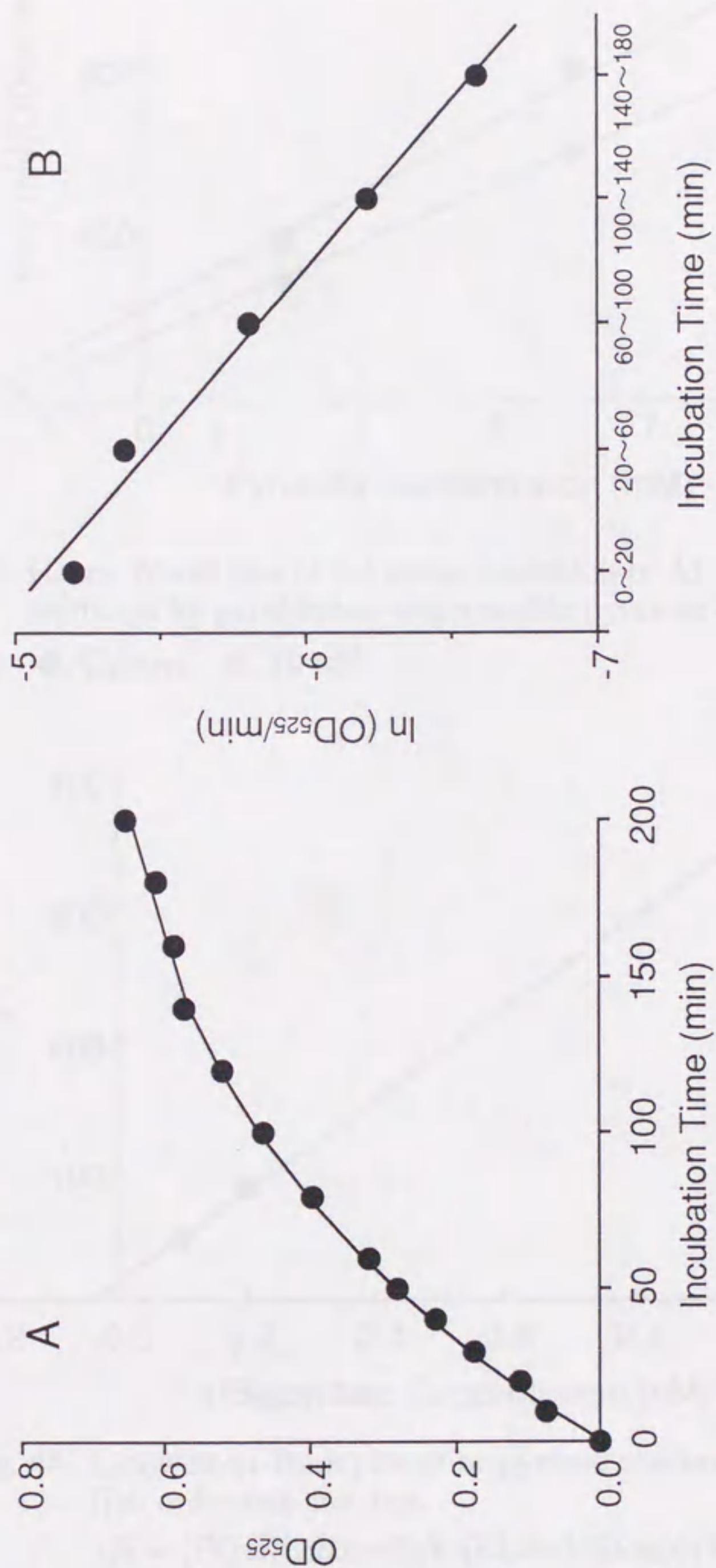


Fig. 42. Assay time-course of ALS of pea etiolated seedlings under 2 mM of pyruvate concentration (A) and the plots of the natural logarithm values of velocities at appropriate time points in (A) as a function of time (B).



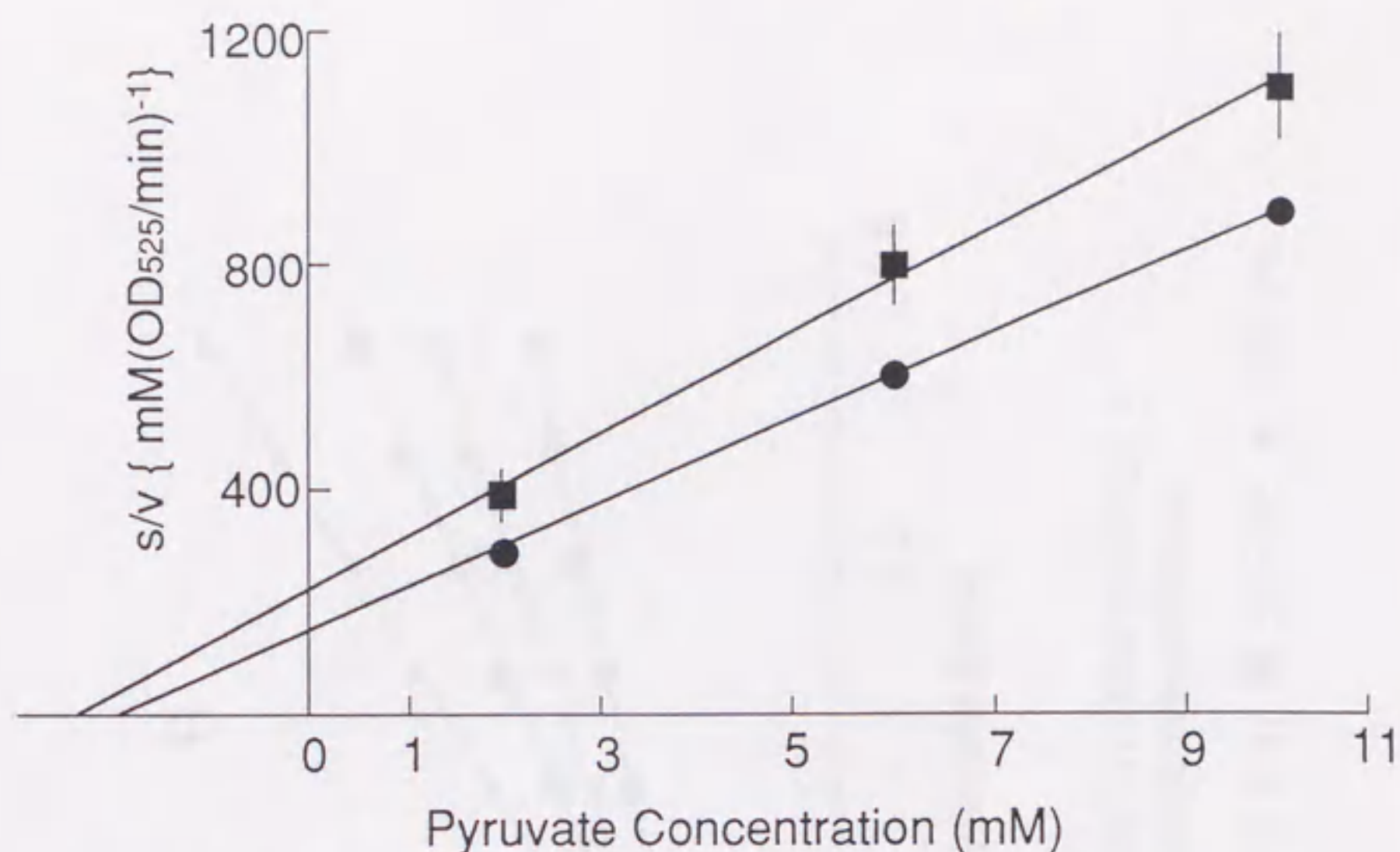


Fig. 43. Hanes-Woolf plot of the initial inhibition of ALS of pea etiolated seedlings by pyriithiobac with variable pyruvate concentration.

●, Control; ▲, 10 nM.

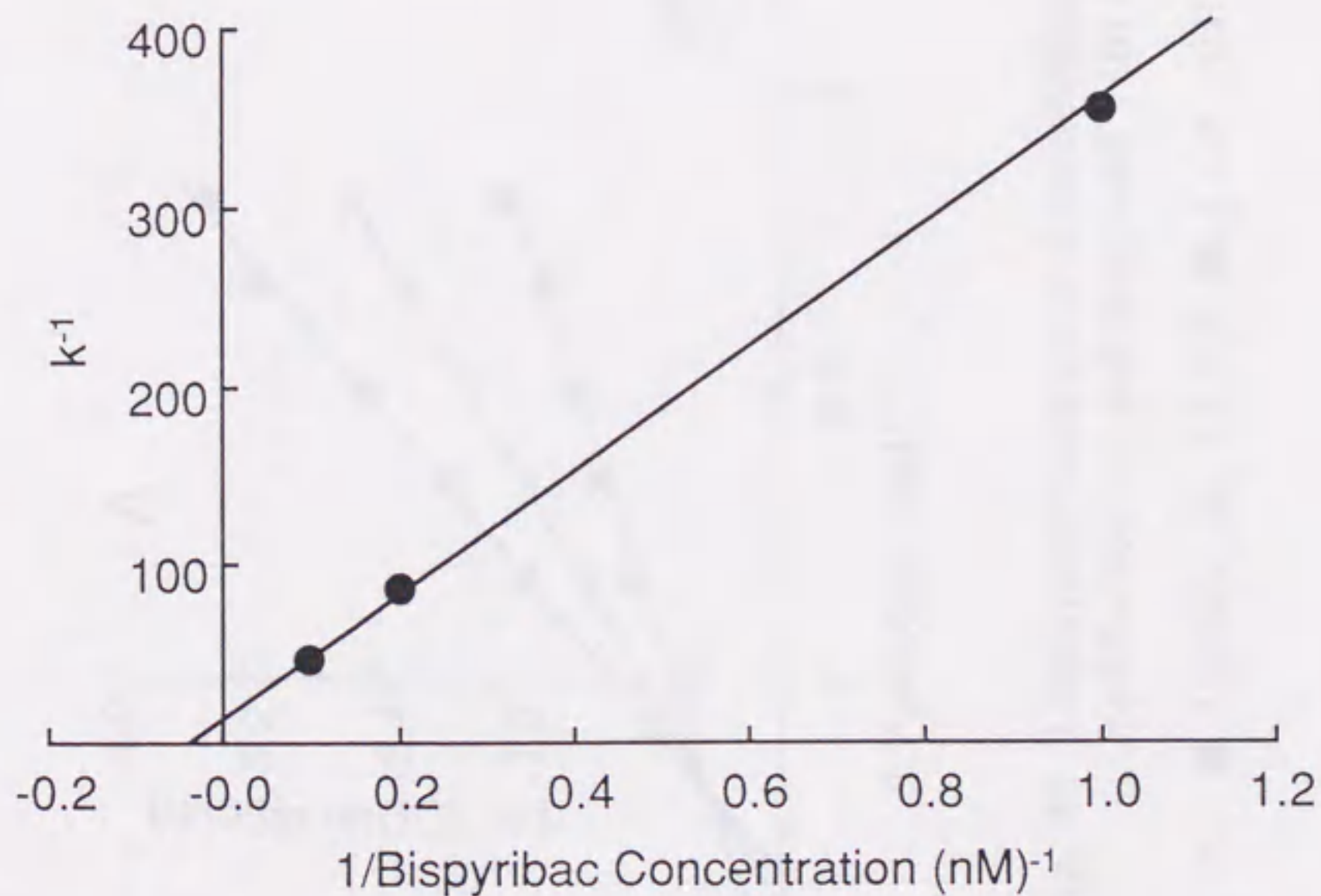


Fig. 44. Lineweaver-Burk plot of bispyribac concentration and the first order rate constant.

$$1/k = \{ (K_i K_{ii} (K_m + S) / k_1 (K_i S + K_{ii} K_m) \} (1/I) + 1/k_1$$

(under assumption of  $k_1 = k_3$ ,  $k_2 = k_4 = 0$ ).



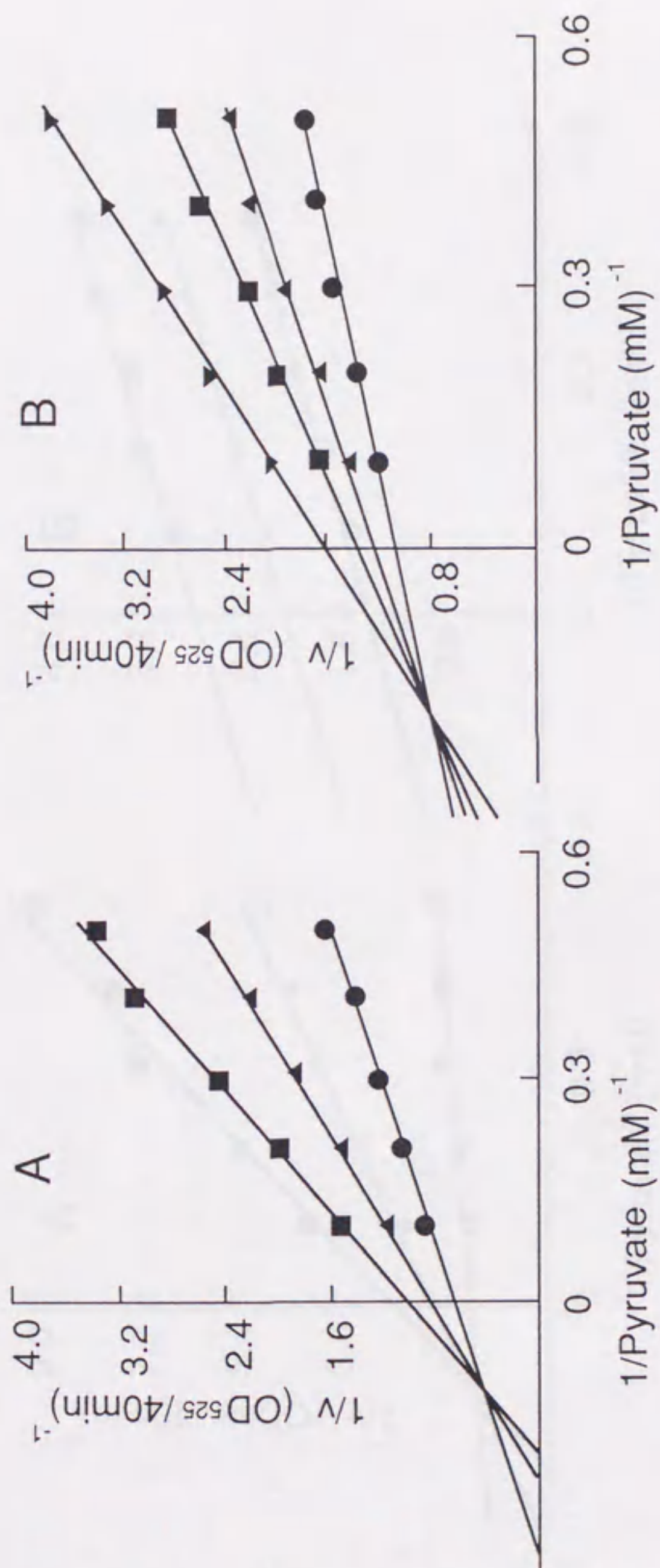


Fig. 45. Lineweaver-Burk plots of the inhibition of ALS from pea etiolated seedlings by pyriproxyfen (A) and compound 3 (B) with variable pyruvate concentration.

(A): ●, Control; ▲, 2.5 nM; ■, 5 nM. (B) ●, Control; ▲, 25 nM; ■, 50 nM; ▼, 100 nM.



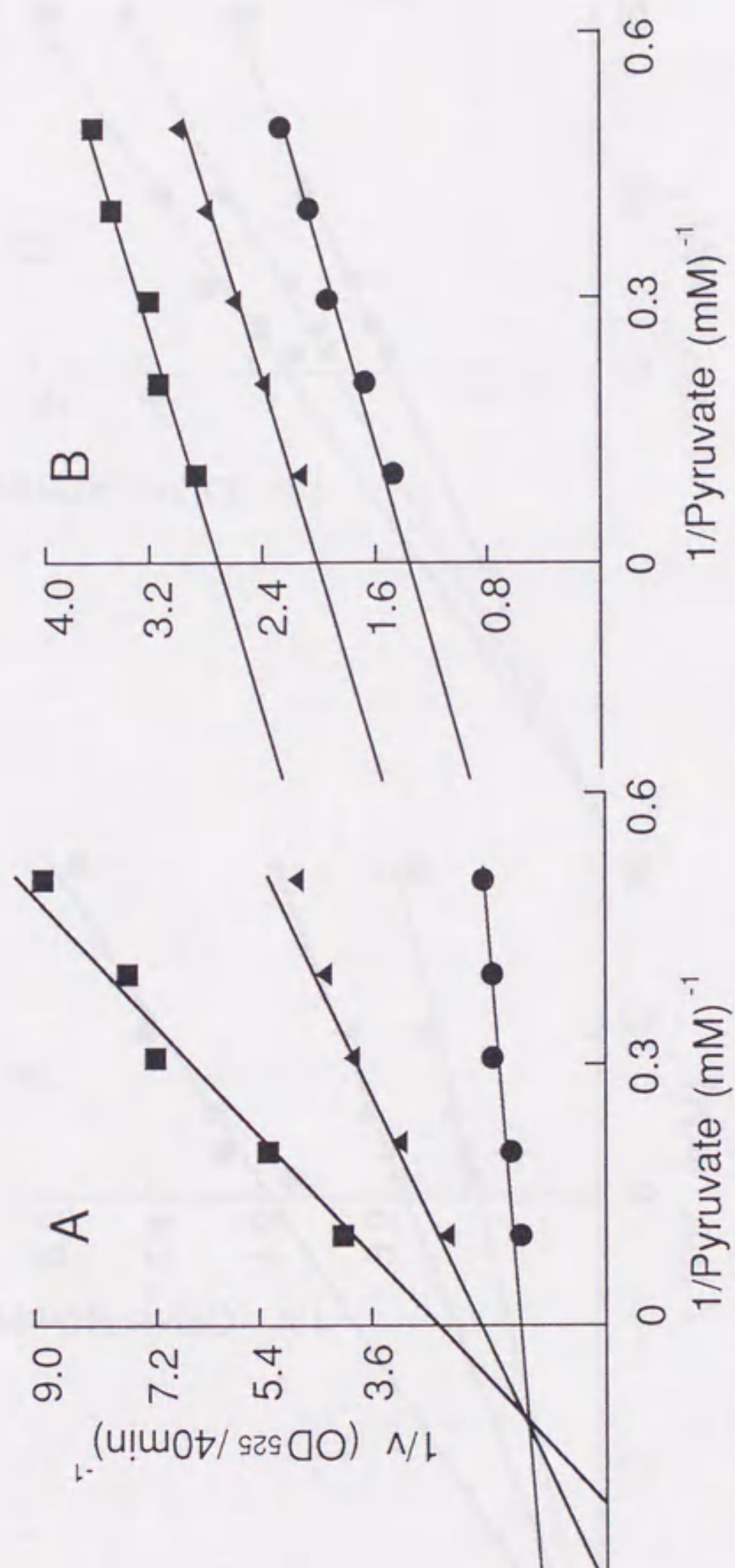


Fig. 46. Lineweaver-Burk plots of the inhibition of ALS from pea etiolated seedlings by chlorsulfuron (A) and imazapyr (B) with variable pyruvate concentration.

(A): ●, Control; ▲, 5 nM; ■, 10 nM. (B) ●, Control; ▲, 20 μM; ■, 40 μM.



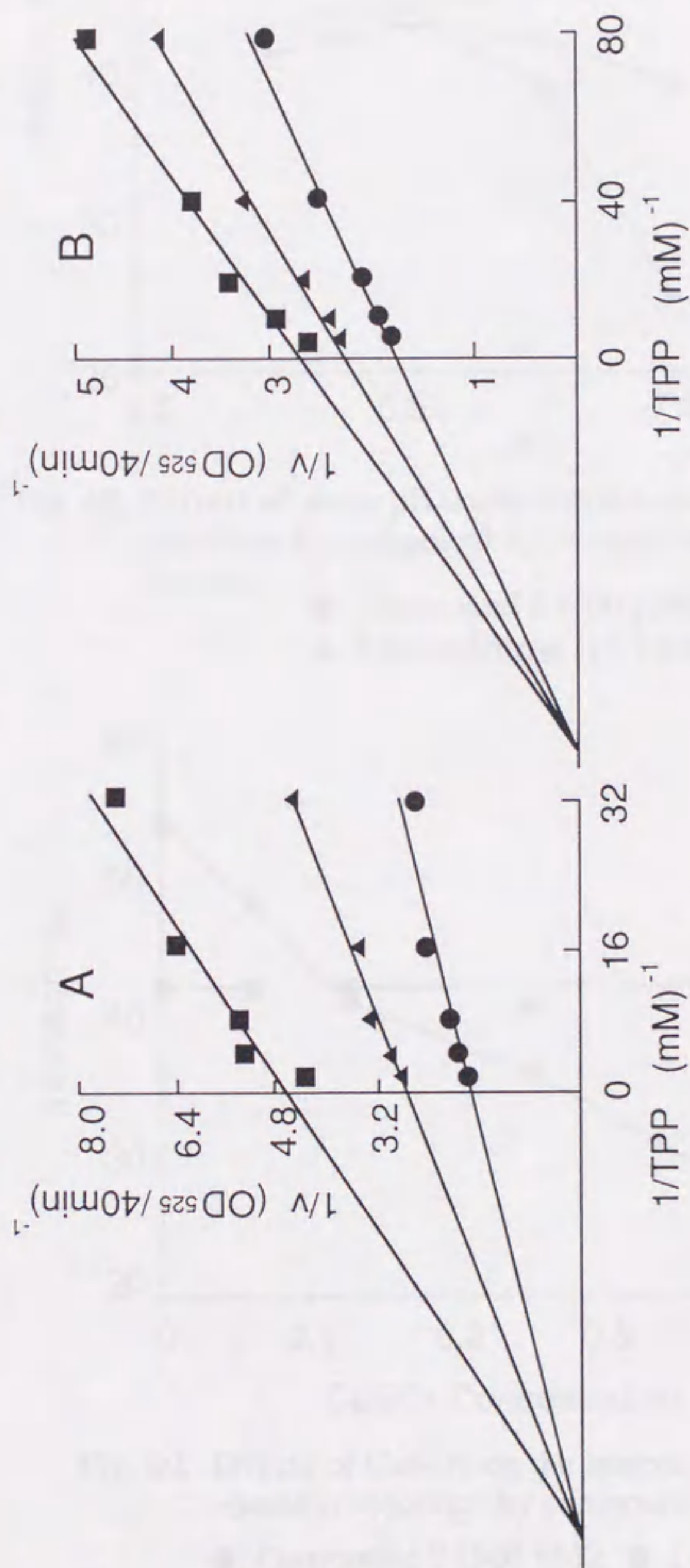


Fig. 47. Lineweaver-Burk plots of the inhibition of ALS from pea etiolated seedlings by pyriithiobac (A) and compound 3 (B) with variable concentration of thiamine pyrophosphate.

(A): ●, Control; ▲, 10 nM; ■, 20 nM. (B) ●, Control; ▲, 50 nM; ■, 10 nM.



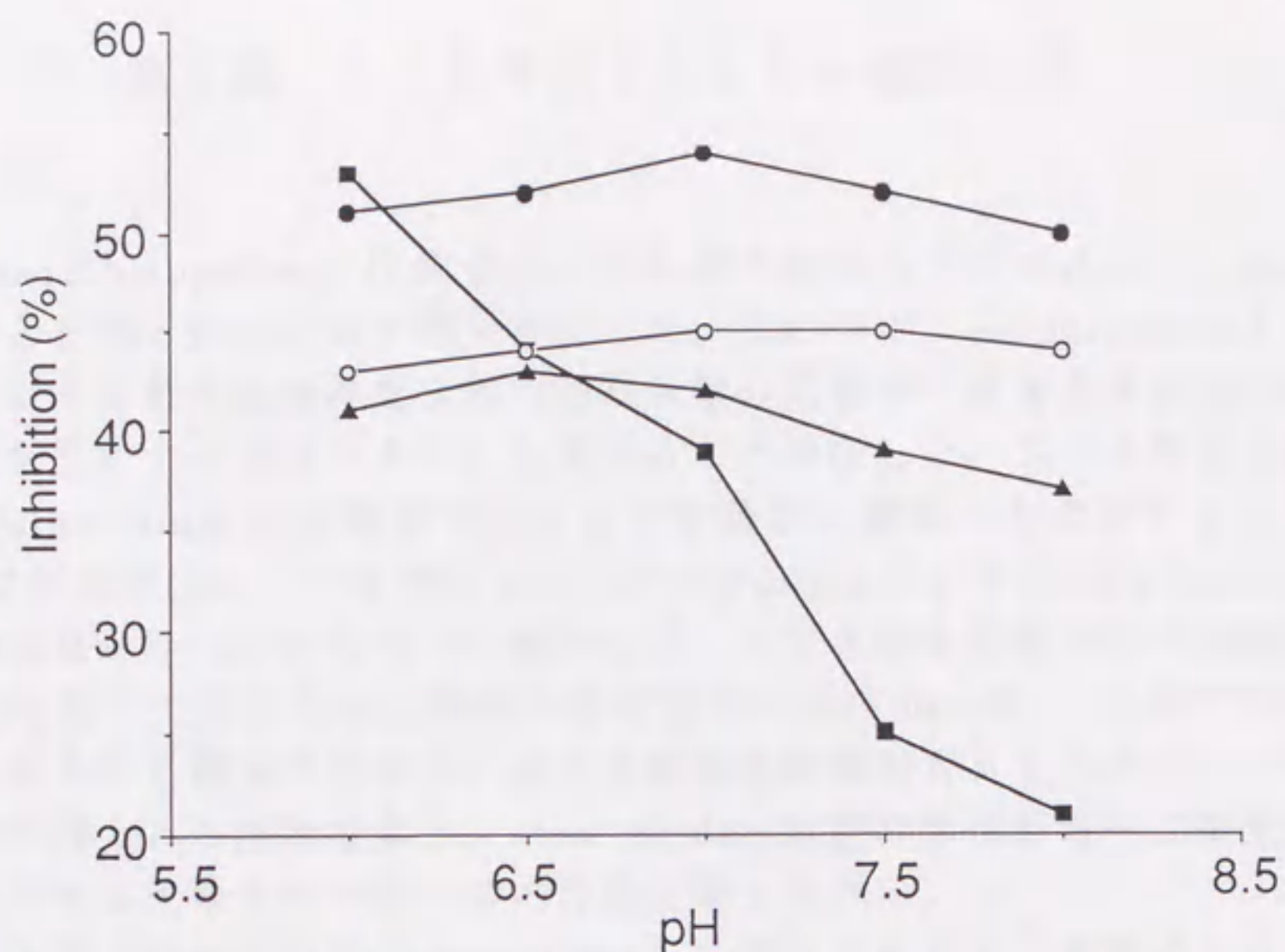


Fig. 48. Effects of assay pH on the inhibition of ALS of pea etiolated seedlings by compound 3, chlorsulfuron, imazapyr, and L-leucine.

●, Compound 3 (500 nM); ○, Imazapyr (40  $\mu$ M);  
▲, Chlorsulfuron (12.5 nM); ■, L-Leucine.

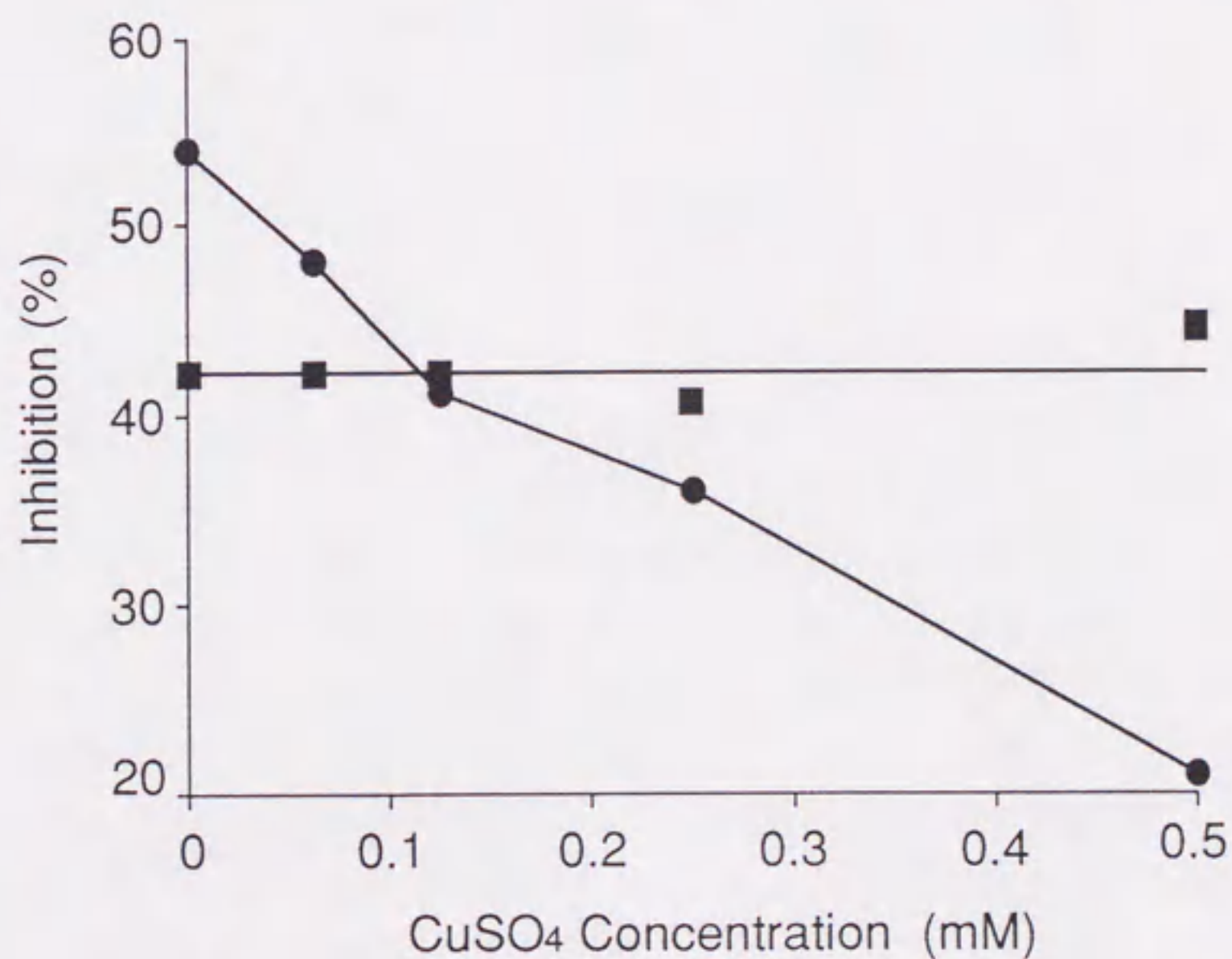


Fig. 49. Effects of CuSO<sub>4</sub> on the inhibition of ALS of pea etiolated seedlings by compound 2 and L-leucine.

●, Compound 2 (500 nM); ■, L-Leucine (0.5 mM).



## 第5節 PC除草剤とALSの相互作用

### 1. 序

Pyrithiobacとbispyribacに代表されるPC除草剤はALSのslow-binding阻害剤であることを第4節において明らかにした。この中で、pyrithiobacはSU系除草剤と同じような最大転移速度定数（初期状態の阻害から最終定常状態の阻害への転移速度を表わすパラメーター）を有することを示した。SU系除草剤のALS阻害剤がslow-binding阻害剤であることを最初に報告したのはデュポン社のSchlossらであるが(66)、一方ではゼネカ社のHawkesのようにslow-binding阻害という現象は見かけだけのもので、実際には、ALS阻害型除草剤の結合によりALSは経時的に失活すると主張する研究者がいる(160,161)。このどちらの考えが正当であるかを推定するには、ALS阻害型除草剤とALSのバインディングアッセイから得られる解離定数を、slow-binding阻害の非線形最小二乗法から得られた阻害定数と比較するのが一つの方法と考えられる。

そこで、本節ではPyr-2[ $^{14}\text{C}$ ]-bispyribacをリガンドとして、薬剤とALSのバインディングを調べることでこの点について検討を加えた。



## 2. 実験材料および方法

### (1) 供試薬剤

平成1年11月15日に第一化学薬品(株)から入手したPyr-2-[ $^{14}\text{C}$ ]-bispyribac(比放射能1.55GBq/mmol)をリガンドに使用した。この化合物は入手後かなりの日数が経っていたことから、次の方法で精製を行った。

小瓶の中の原体粉末を3mlのメタノールに溶解した後、放射能を測定した。総放射能は11.077MBqとなった。これの1.077MBqを分取用TLC(Kieselgel 60 F-2541mm)にアプライし、ベンゼン:酢酸エチル:酢酸=65:35:1の溶媒で展開した。展開終了後、風乾し、UVランプおよびイメージングアナライザー(BAS-1000(富士写真フィルム))を使用し、bispyribacと目されるバンドを検出した(非放射性的のbispyribacを同時にスポットし、目印とした)。相当するバンドをかき取った後、200mlのエタノールで[ $^{14}\text{C}$ ]-bispyribacを溶出した。溶出液を0.22 $\mu$ のミリポアフィルターでろ過した後、エバポレーターで減圧乾固し、2mlのメタノールに溶解させた。これを、再度、分取用TLCにアプライし、クロロホルム:メタノール:水=78:42:3で展開した。展開終了後、1回目と同じ方法で[ $^{14}\text{C}$ ]-bispyribacを検出し、エタノール溶出液をろ過後減圧乾固した。これを6mlのメタノールに溶かし、リガンド原液とした。この溶液の総放射能は0.768MBqであり、[ $^{14}\text{C}$ ]-bispyribacの放射化学的純度はBAS-1000の結果から判断して98%以上であった。なおこのリガンド原液は、溶液状態でフリーザーに保存した。

### (2) 供試生物材料

エンドウを材料とした。

### (3) ALSの部分精製

第3節に記載した方法でエンドウ黄化幼植物茎葉から粗酵素を調製した後、DEAE-トヨパール650Mで部分精製した。アッセイ用反応液と同じ添加物をすべて加えた緩衝液(10mM Tris-HCl 緩衝液 pH7.8)を使用したところ、ALSはカラムに吸着しなかったため、20%グリセロール、0.5mM TPPおよび0.5mM MgCl<sub>2</sub>を添加したTris-HCl緩衝液 pH7.8でカラムに吸着させた。この後、FPLC(ファルマシアバイオテック)を用い、0~0.4MのKClの直線グラジエントで溶出し、最終濃度2mMのピルビン酸を添加した試験管に分画した。そしてこの活性画分を部分精製標品とした。この標品の比活性は10nmol acetoin/min/mg proteinであった。

### (4) バインディングアッセイ

Filtration assay法と呼ばれる次の方法で行った(165,166)。



市販の50%PEI（ポリエチレンジイミン）free baseを5倍に希釈して10%溶液を調製した。pHは約10となった。（PEIは発ガン性物質のethyleneimineを含んでいる可能性があるので注意すること、また、この溶液は凍結しておけば1ヶ月以上安定である）。凍結した溶液を溶解後、33倍に希釈して0.3%のPEI溶液をつくり、この溶液に1～24時間、Whatman GF/B glass-fiber filter を浸漬させた。このフィルターを洗浄せずにろ過鐘にセットし、減圧下で、酵素-リガンド溶液（1～3ml）を注いだ。氷冷した約8mlの10mM Tris-HCl塩酸緩衝液 pH7.6でフィルターを3回洗浄した。このフィルターをシンチレーションバイアルに移し、10mlのシンチレーター（PICO-FLUOR 40 (PACKARD)）を注ぎ、一晩放置した後、よく振り、液体シンチレーションカウンター（Beckman LS 6000TA）で放射能を測定した。なお、酵素-リガンド溶液の組成は、20 mM ピルビン酸ナトリウム、0.5 mM  $MgCl_2$ 、0.5 mM TPP、10  $\mu$ M FAD、 $[^{14}C]$ -bispyribac、酵素、20 mM Tris-HCl緩衝液 pH7.6とし、これを30℃で3時間インキュベート後、ろ過するという方法を採用した。特異的結合ならびに他の薬剤との拮抗を調べる試験の場合にはアッセイ溶液を1mlとし、0.6mgの部分精製酵素と823 nM（1280 Bq）の $[^{14}C]$ -bispyribacを添加した。一方、リガンド濃度を変化させて $K_d$ 値を求める試験では、アッセイ溶液の容量は3mlとし、1.8mgの部分精製酵素と濃度を変化させた $[^{14}C]$ -bispyribac（6.45、12.9、25.8、51.6、103.3、206.5 nM）を添加した。

#### （5）タンパク質定量

第3章に記載した方法に従った。



### 3. 実験結果

アッセイ溶液を1 mlとして、0.6 mgの部分精製酵素および823 nMの $[^{14}\text{C}]$ -bispyribacを添加した場合、ガラスフィルターにトラップされた総放射能（完全区の放射能から酵素無添加区の放射能を差し引いた値）は2.4 Bqで、特異的結合と考えられる放射能（完全区の放射能から非放射性bispyribacを100  $\mu\text{M}$ 添加した区の放射能を差し引いた値）は1.9 Bqとなった。この特異的結合量と添加したタンパク質量の関係から比結合量は2.1 pmol/mgタンパク質という値が得られた。また、リガンドと酵素が1:1で結合すると仮定した場合、反応液中の酵素濃度は1.2 nM（保存した酵素液の濃度は2.4 nMで、この溶液を0.2 ml添加したときのALS活性は、30℃、40分間で0.725 OD<sub>525</sub>であった）であることが示唆された。

一方、リガンド濃度と結合量の関係はハイパーボリック(hyperbolic)なプロットとなり (Fig. 50A)、このデータを基にしたHanes-Woolfプロットから、26 nMという解離定数 ( $K_d$ 値) が得られた (Fig. 50B)。また、この結合は非放射性のbispyribacにより阻害されただけでなく、同じPC除草剤のpyrithiobacおよびSU系除草剤のchlorsulfuronにより濃度依存的に阻害された (Fig. 51)。



#### 4. 考察

第4節で示したように、bispyribacのALS阻害はslow-bindingであり、初期状態の阻害定数は $K_{is}=6.2\text{ nM}$ 、 $K_{ii}=18\text{ nM}$ 、最終定常状態の阻害定数は $K_{is}^{**}=0.29\text{ nM}$ 、 $K_{ii}^{**}=0.85\text{ nM}$ の値が得られている。今回、酵素反応と同じ反応液で、インキュベーションを3時間（この時間は初期から最終定常状態への2分の1転移時間10分の1.8倍）として、 $[^{14}\text{C}]$ -bispyribacのALSへの結合を調べた結果、 $K_d$ 値は $26\text{ nM}$ となった。この $K_d$ 値は初期状態の阻害定数の $K_{ii}$ 値とほぼ同じであり、この結果は、酵素阻害試験からは経時的に変化するように見える阻害定数（解離定数）が、実際には3時間後においても初期状態とほぼ同じであることを示唆した。ALSは不安定な酵素でオリゴマーが解離して失活しやすいことを考慮すると、この結果は、ALS阻害型除草剤の真の阻害定数は初期状態時の阻害定数であり、異なったタイプの可逆的薬剤の結合により、ALSは触媒活性の低い型へと変化することを示しているものと考えられる。

一方、 $[^{14}\text{C}]$ -bispyribacとALSのバインディングはSU系除草剤のchlorsulfuronによって阻害されたことから、第4節のALS阻害のKineticsから導かれた結論と同様に、PC除草剤のALS上での結合部位はSU系除草剤の結合部位と同じであるものと考えられる。



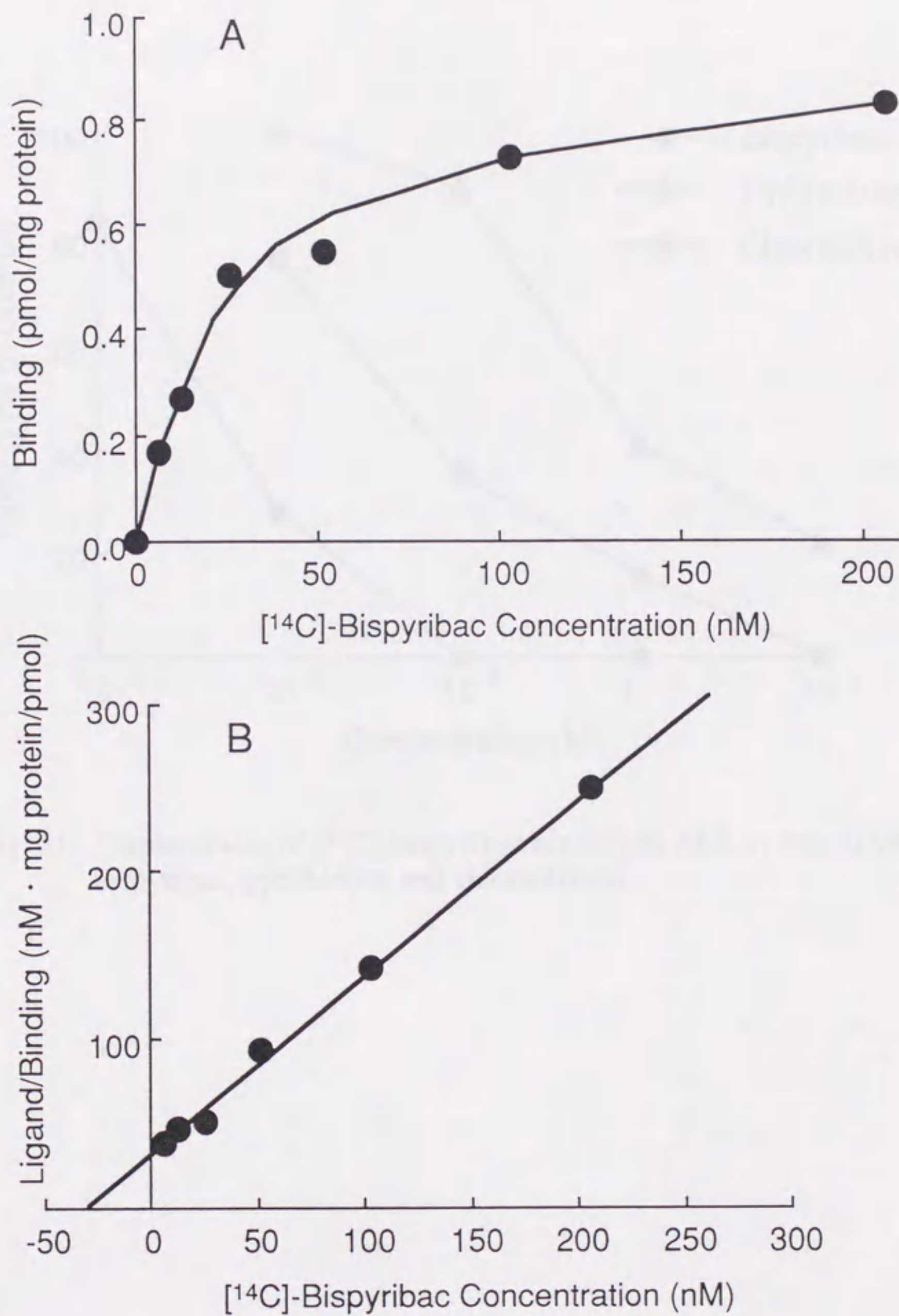


Fig. 50. Binding curve of  $[^{14}\text{C}]$ -bispyribac to ALS (A), and Hanes-Woolf plots of the data from binding curve (B).



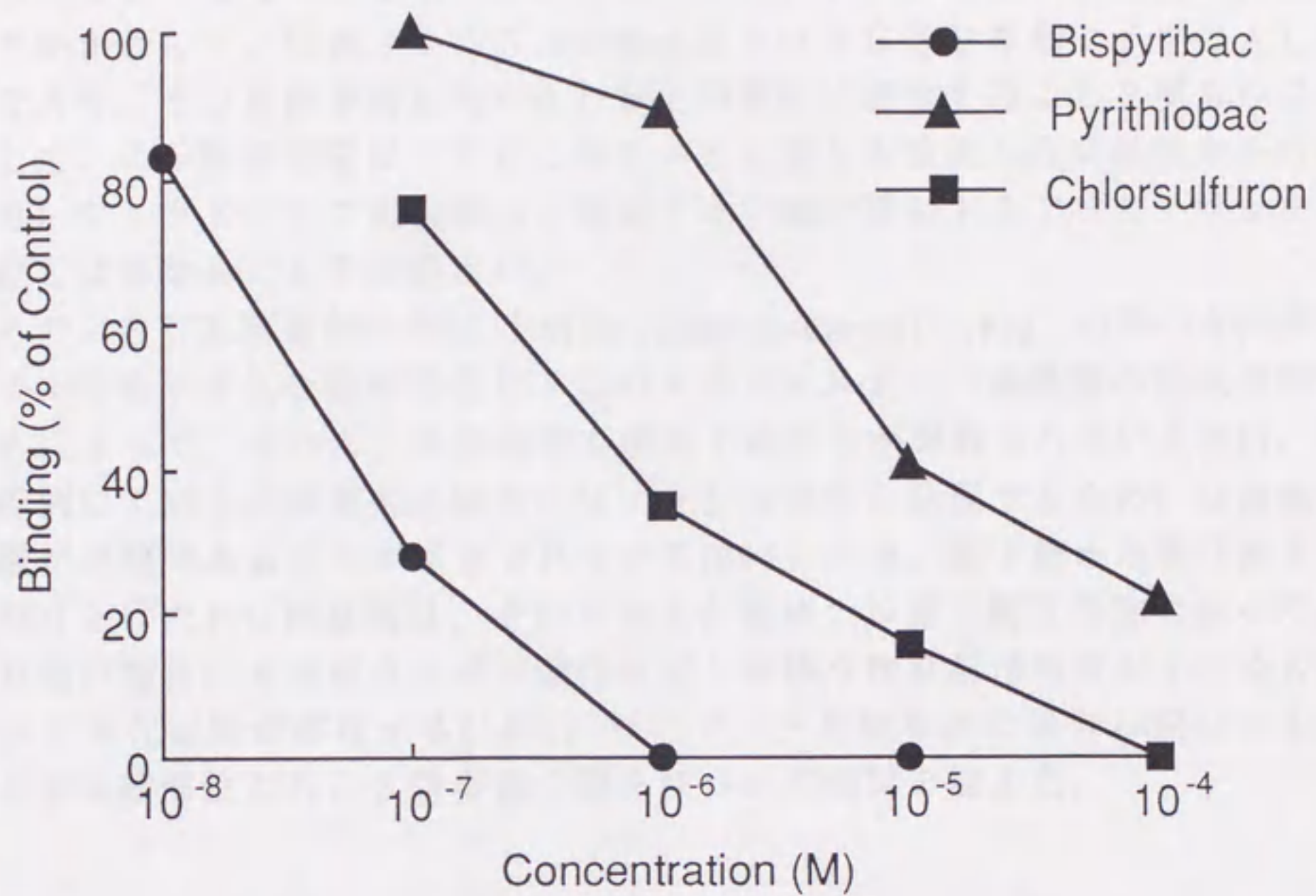


Fig. 51. Displacement of [ $^{14}\text{C}$ ]-bispyribac binding to ALS by non-labeled bispyribac, pyriothiac and chlorsulfuron.



## 第6節 PC除草剤の活性本体の解析

### 1. 序

第1節から第5節において、PC除草剤のターゲットは分岐鎖アミノ酸生合成経路上のALSであることを明らかにした。また、PC除草剤は、構造的に相違するにもかかわらず、阻害メカニズムの観点からはSU系除草剤タイプのALS阻害剤であり、SU系除草剤と同じALS上の部位に結合することを明らかにした。そして、この結合部位はTPPともピルビン酸とも拮抗しない活性中心の近傍であり、フィードバック阻害剤の分岐鎖アミノ酸が結合するアロステリックな調節部位とは異なることを示唆した。

ところで、SU系除草剤の中にはthifensulfuron-methyl (Fig. 4)等のカルボン酸エステルを有する化合物が存在し、このメチルエステルは遊離酸に加水分解されることによって、そのALS阻害能を消失することが報告されている(91)。また、対照的にIMI系除草剤の場合には、ALS阻害を発現するためには遊離カルボン酸が必須であることが報告されている(89)。一方、第1節から第5節までの中で取り上げたPC除草剤は、そのすべてが遊離カルボン酸化合物であったが、PC除草剤の場合にも遊離カルボン酸化合物と同様な除草剤活性を有するカルボン酸エステル化合物が存在する(167)。そこで、PC除草剤の場合に関しても、このカルボン酸部位とALS阻害能の関係について検討を加えた。



## 2. 実験材料および方法

### (1) 供試薬剤

Compound 5およびcompound 6 (Fig. 9)を使用した

### (2) 供試材料

エンドウおよびイネ (var. Kinmaze) ならびにヒエを材料とした。

### (3) 粗酵素の調製ならびにA L Sとエステラーゼの分離

エンドウ黄化幼植物茎葉から第3節の方法で粗酵素を調製した後、20 % グリセロール、0.5 mM TPP、0.5 mM  $MgCl_2$ を含む10 mM Tris-HCl pH7.8で平衡化したDEAE-トヨパール650 Mに粗酵素をのせ、同緩衝液で洗浄後、0.5 MのKClを含む同緩衝液で溶出した。A L S活性の高い画分を集め、60 % 硫酸アンモニウムで濃縮した後、20 % グリセロール、0.5 mM TPP、0.5 mM  $MgCl_2$ ならびに50 mM KClを含んだ100 mM リン酸カリウム緩衝液 pH7.5で平衡化したセルロファインGC-700 mカラムにのせ、同緩衝液で溶出した。この操作で溶出されたエステラーゼ活性の高い画分は80 % 硫酸アンモニウムで濃縮しエステラーゼ標品とし、A L S画分は60 % 硫酸アンモニウムで濃縮し、脱塩後、Bio-Gel HTPのハイドロキシアパタイトカラムにアプライした。ハイドロキシアパタイトカラムは20 % グリセロール、0.5 mM TPPならびに0.5 mM  $MgCl_2$ を含んだ10 mM リン酸緩衝液 pH7.2で平衡化させておき、A L Sは10 ~ 200 mMのリン酸カリウム緩衝液のグラジエントで溶出し、これをA L S標品とした。

イネおよびヒエからの粗酵素は第2節のA L S粗酵素調製法に従い調製した。

### (4) A L S活性測定

第1節に記載した方法で測定した。

### (5) エステラーゼ活性測定

基質として $\beta$ -ナフチル酢酸とp-ニトロフェニル酢酸を使用し、次の2通りの方法で行なった(168,169)。

$\beta$ -ナフチル酢酸を基質とする場合：反応液量を3 ml、反応液組成を、300  $\mu$ M  $\beta$ -ナフチル酢酸、0.013 % ファストブルーB、酵素、100 mM リン酸カリウム緩衝液pH7.2とした。ナフチル酢酸とリン酸カリウム緩衝液を30℃で5分間プレインキュベートした後、ファストブルーBと酵素を即座に添加し、生成する $\beta$ -ナフトールを波長600 nmでレートアッセイした。

p-ニトロフェニル酢酸を基質とする場合：反応液量を3 ml、反応液組成を、0.5 mM p-ニトロフェニル酢酸、酵素、100 mM リン酸カリウム緩衝液pH7.8と



し、生成する p-ニトロフェノールを波長 400 nm でレートアッセイした。

#### (6) エステラーゼによる薬剤の加水分解と薬剤の HPLC 分析

エンドウおよびイネならびにヒエ A L S の粗酵素と 100  $\mu$ M の薬剤 (compound 5 と compound 6) を 100 mM のリン酸緩衝液 pH 7.5 中、30℃ で 120 分間反応させた (反応液量 2 ml)。この後、0.1 ml の 6 N 塩酸で反応を停止させ、SEP-PAK C18 に通して生成物の compound 3 と未反応の compound 5 および compound 6 を吸着させた。これを酸性水で洗浄後、メタノールで溶出し、この溶出液を次の条件で HPLC (Waters HPLC System) を用いて分析した。

カラム NOVA PAK C18

展開溶媒 A: 0.05 N 酢酸水

B: 0.05 N 酢酸を含むメタノール

直線グラジエント

分	% A	% B
0	50	50
2	50	50
10	0	100
13	0	100
13.1	50	50
20	50	50

流速 1 ml/min

分析時間 20 分間

検出 254 nm



### 3. 実験結果

#### (1) 粗酵素のエステラーゼ比活性

p-ニトロフェニル酢酸を基質とした場合の、エンドウおよびヒエならびにイネ粗酵素の比活性をFig.52に示した。根部の活性が茎葉部よりも高い傾向にあった。

#### (2) エンドウ黄化幼植物からのALSとエステラーゼの分離

セルロファインGC-700mのゲルろ過クロマトグラフィーで、ALSとエステラーゼは効果的に分離された (Fig. 53)。ALSはブロードなピークとして溶出されたが、エステラーゼは分子量の異なる2本の明瞭なピークとして検出された。そこで、ALSから完全に分離された低分子量の分子種をALSフリーのエステラーゼ標品とした。一方、ALS画分の中には、分子量の大きなエステラーゼの混入が認められたので、さらにハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーで精製した。その結果、ALS活性画分中のエステラーゼ活性は低下したため、これをエステラーゼフリーのALS標品とした。このALSフリーのエステラーゼ標品とエステラーゼフリーのALS標品の $\beta$ -ナフチル酢酸を基質とした場合のエステラーゼ活性は各々0.181と0.018 (OD600/min/50 $\mu$ l)であった。

#### (3) エステルの酵素的加水分解

エンドウおよびヒエならびにイネの粗酵素は compound 5 と compound 6 の両化合物を加水分解し、フェニルエステルの compound 6 がメチルエステルよりも分解されやすい傾向にあった (Table 25)。なお、Compound 6 の HPLC クロマトグラムをFig. 54に示した。

#### (3) エステル体のALS阻害

Compound 5 と compound 6 のエンドウALS粗酵素に対する $I_{50}$ 値は各々、5.3 $\mu$ Mと0.56 $\mu$ Mであったが、両化合物は、エステラーゼフリーのALSを100 $\mu$ Mの濃度でもほとんど阻害しなかった。しかしながら、反応液中にALSフリーのエステラーゼを添加することで、阻害能が回復した (Fig. 55, Table 26)。



#### 4. 考察

P C 除草剤のカルボン酸エステル化合物は、エンドウおよびイネならびにヒエ幼植物茎葉 A L S の粗酵素により速やかに加水分解されたこと、ならびにエステラーゼフリーの A L S をほとんど阻害しないにもかかわらず、エステラーゼが添加されることにより阻害効果を回復したことから、エステル化合物の活性本体は遊離カルボン酸化合物であると考えられた。従って、P C 除草剤のカルボン酸は、I M I 系除草剤と同様に、活性発現に必須の置換基であると判断される。

A L S 阻害剤には、その構造中に弱酸性部位が必要であるとの考え方があり、S U 系除草剤の場合にはスルホンとカルボニルに挟まれたアミノ基が酸性基として働いている。一方、I M I 系除草剤の場合には、これに相当する酸性基はカルボキシ基であると考えられている。この観点から眺めると、第1節から本節までに供試した P C 除草剤 (Fig. 18) の中には S U 系除草剤のアミノ基に相当する酸性基は存在せず、カルボキシ基がその役割を果たしているものと考えられる。

P C 除草剤は、A L S 阻害のメカニズムからは、S U 系除草剤タイプの薬剤であると判断されるが、以上のように遊離のカルボキシ基が必須であるという構造的な面からは I M I 系除草剤に類似している薬剤と判断される。従って、P C 除草剤は S U 系除草剤と I M I 系除草剤のハイブリッドとでも言うべき性質を有する A L S 阻害剤だと考えられる。



Table 25. Hydrolysis of compound 5 and compound 6 by crude ALS preparations from pea, rice and barnyard grass (BG).

Enzyme Source	Volume (ml) <sup>a)</sup>	Activity (OD <sub>400</sub> /min) <sup>b)</sup>	Hydrolysis (%) <sup>c)</sup>
- Compound 5 -			
BG/shoot	0.472	2.33	2.2
Rice/shoot	0.400	2.33	36
BG/root	0.215	2.33	1.3
Rice/root	1.126	2.33	4.8
Pea/shoot	0.938	2.33	33
- Compound 6 -			
BG/shoot	0.472	2.33	32
Rice/shoot	0.400	2.33	80
BG/root	0.215	2.33	83
Rice/root	1.126	2.33	91
Pea/shoot	0.938	2.33	100
No enzyme	0	0	n.d. <sup>d)</sup>

a) Volume of enzyme solution added in the reaction mixture (2 ml).

b) Esterase activity for p-nitrophenylacetate.

c) Conversion of compound 5 and compound 6 to their free acid (compound 3).

d) Not detected.



Table 26. Potentiation of ALS inhibition of compound 6 by addition of esterase<sup>a</sup>).

Treatment	Inhibition (%)
Compound 6 <sup>b</sup> )	0
Compound 6 + Esterase	50
Compound 6 + Boiled esterase	0
Compound 3 <sup>b</sup> )	63
Compound 3 + Esterase	63
Compound 3 + Boiled esterase	63

a) Partially purified ALS and esterase from etiolated pea seedlings were used in this experiment.

b) Concentration of each chemical compound was 0.5  $\mu$ M.



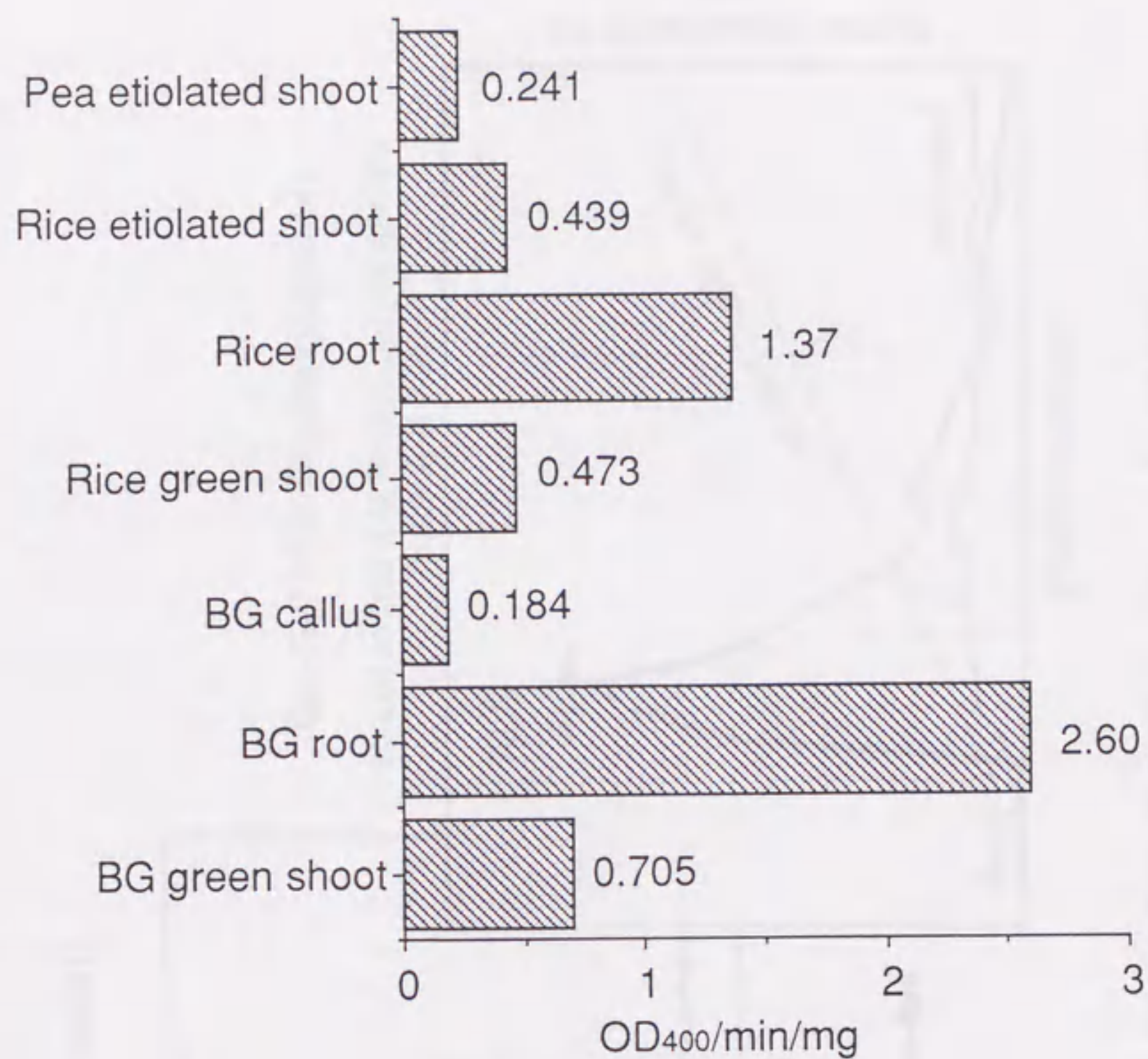


Fig. 52. Specific activities of esterase of pea, rice and barnyard grass (BG).  
p-Nitrophenylacetate was employed as the substrate for the esterase assay.



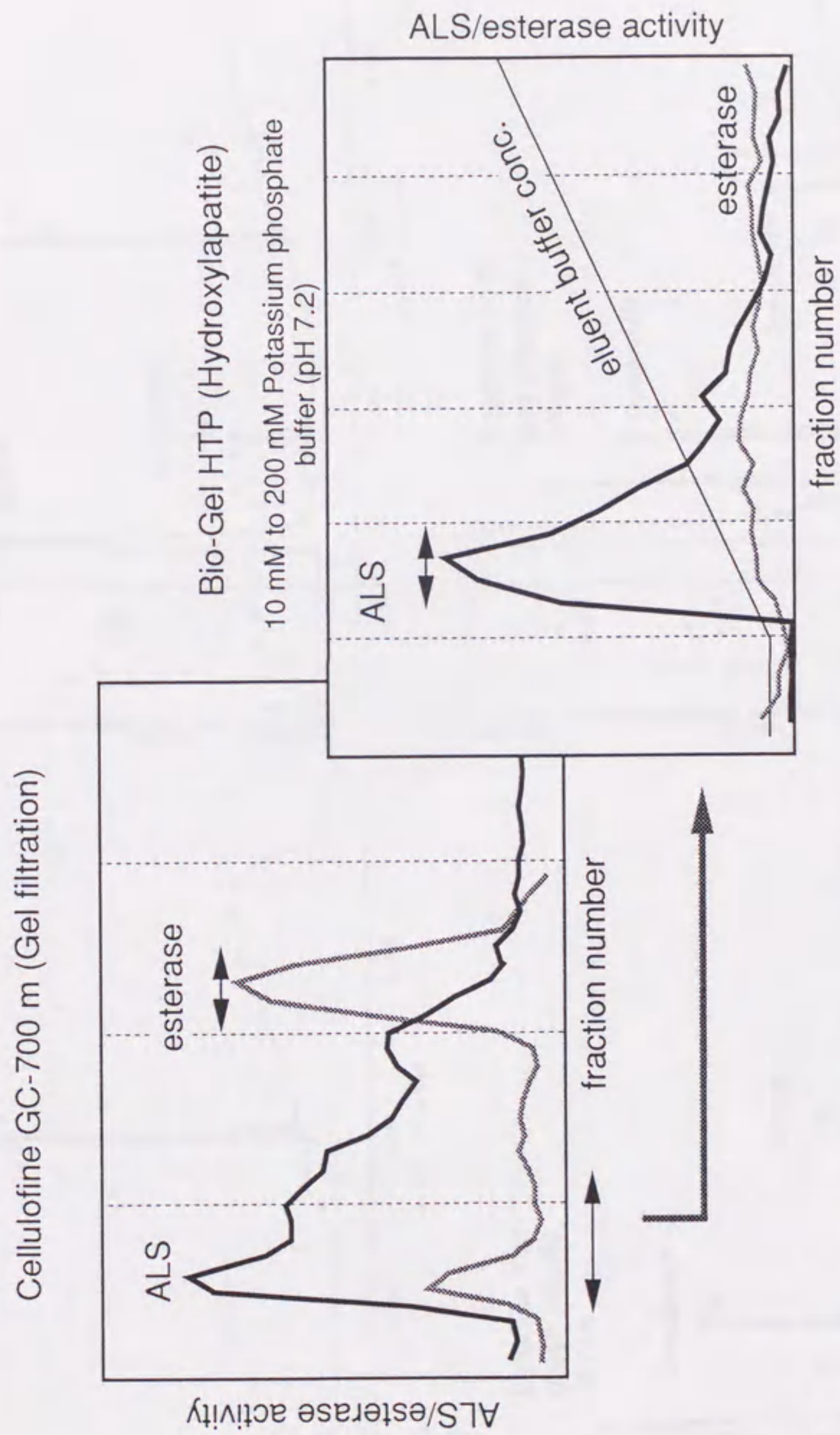


Fig. 53. Separation of ALS of pea etiolated seedlings from esterases by gel filtration and hydroxylapatite column chromatography.







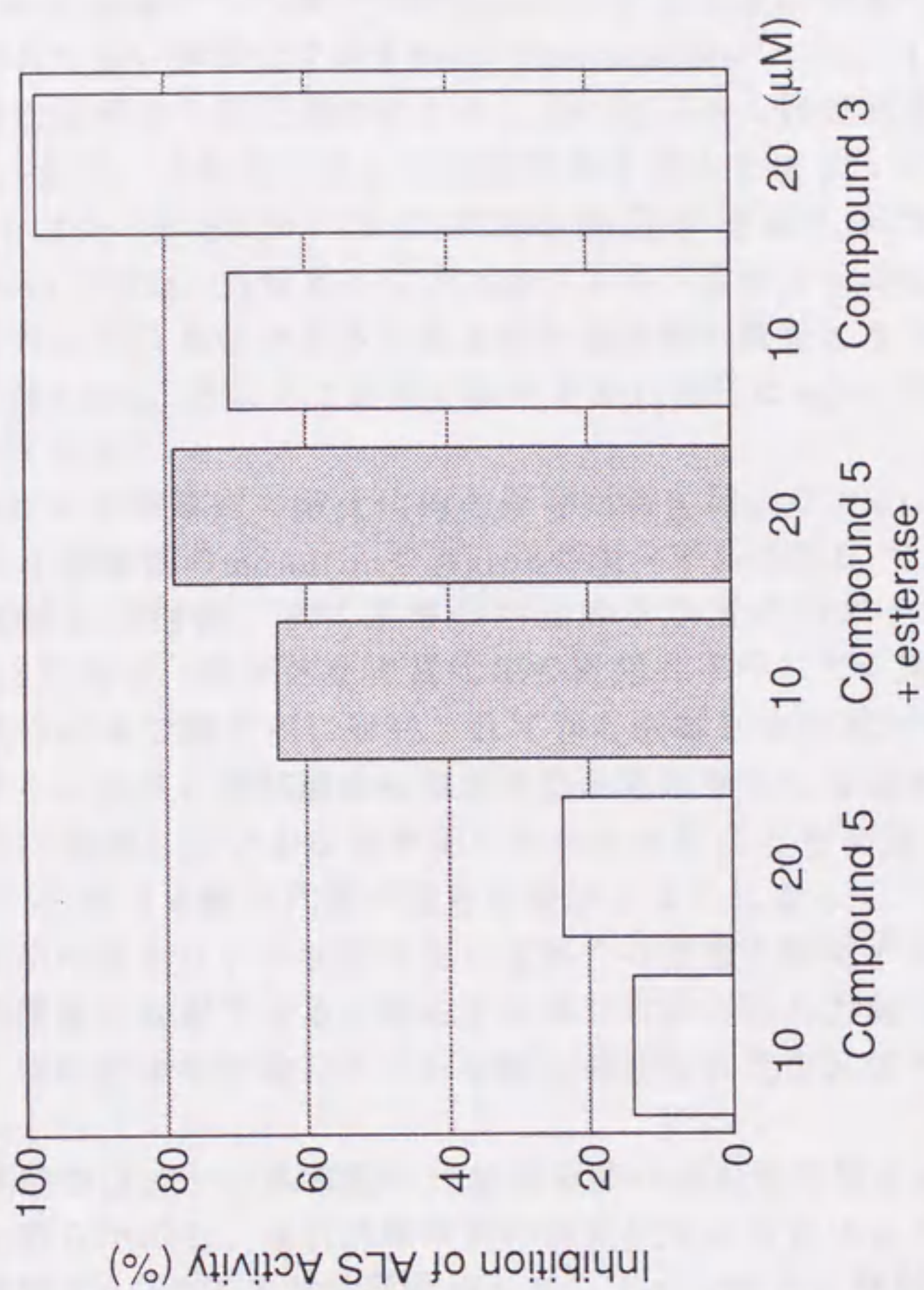


Fig. 55. Potentiation of the inhibition of ALS activity by addition of esterase. Compound 5 is the methyl ester form of compound 3. ALS and esterase from pea seedlings were separated each other by ion exchange, gel filtration and hydroxyapatite column chromatography.



## 第7節 P C 除草剤の作物雑草間選択性解析のための各種植物 m f o の諸性質検討

### 1. 序

第6節ではP C 除草剤の活性化反応について述べたが、これとは対照的に、薬剤の解毒反応は、A L S 阻害剤型除草剤が示す作物雑草間の選択性の主要因となっている。緒言でも触れたように、この解毒反応の中では、P-450を中心としたmfo (Fig. 56)が触媒する水酸化や酸化的脱メチル化反応が最も重要である。

イネに対して高い選択性を示すbispyribac-sodium (Fig. 1)のイネ体に於ける主要な代謝物はピリミジン環のメトキシ基の脱メチル体であることが証明されている(170)。また、イネ用のA L S 阻害剤型除草剤としてデュポン社により開発されたbensulfuron-methylおよび現在開発が進められている武田薬品のimazosulfuron (Fig. 5)もピリミジン環メトキシ基がイネ体において速やかに脱メチル化され、この反応がイネと雑草間の選択性の要因となっていることが報告されている(83,88)。そしてこれらの脱メチル化反応はmfoにより触媒されていると推定されている。

植物mfoによる除草剤の酸化代謝の最初の報告は、ワタmfoによるフェニルウレア系P E T 阻害剤のmonuronやdiuronの脱メチル化反応である(171)が、植物のmfo研究は主に植物二次代謝等の内生的な物質代謝に主眼が置かれてきた(172-178)。これは、内生的な物質代謝の研究と平行して、薬剤の酸化的な解毒代謝が酵素レベルで精力的に研究されてきた医薬とは対照的であった(179,180)。しかしながら、近年、脂肪酸生合成阻害剤やA L S 阻害剤型除草剤の選択性が酸化反応に依存していることが明らかにされたことを契機に(181,182)、除草剤の*in vitro*における酸化代謝が注目を浴びるようになっている(183-185)。現在では、この手の研究は、作物雑草間の選択性の要因を解明することで、選択性の高い除草剤開発に貢献できると期待されることから、共力剤（シナジスト）やセイフナーを含めた雑草防除システム全般に重要な知見を提供するものと認識されている。

そこで本節では、P C 除草剤の作物雑草間の選択性要因をmfoによる酸化代謝の側面から明らかにし、選択的除草剤の研究開発に役立てることを最終目標として、各種植物のmfoの基本的性質に関して以下の4項目に検討を加えた。

- (I) 各種植物のチトクロムP-450とb5の比含量
- (II) 各種植物のP-450レダクターゼとb5レダクターゼの活性
- (III) 各種植物のmfoの水酸化活性
- (IV) 各種植物mfoの酸化的脱メチル化活性



## 2. 実験材料および方法

### (1) 供試生物材料

単子葉植物としてイネ (var. Kinmaze)、トウモロコシ、ソルガム、コムギ、双子葉植物として、ワタ、ダイズ、エンドウ、マメアサガオを使用した。

### (2) ミクロソーム画分の調製

イネは黄化メソコチル、トウモロコシは黄化メソコチルと液体培養細胞、ソルガムとコムギはメソコチルと第1節間からなる地上部、ワタ、ダイズ、エンドウ、マメアサガオは黄化ヒポコチルから以下の方法でミクロソーム画分を調製した。

植物体を2倍量の0.5 M シュークロース、1 % (w/v) イソアスコルビン酸ナトリウム、1 mM EDTA、0.5 % (w/v) BSAならびに組織重の5分の1重量のPVPを含む50 mM Tris-HCl塩酸緩衝液pH7.8 (緩衝液1) で、乳鉢を用い、組織重と等重量の海砂とともに擦りつぶした。この摩砕液をナイロンガーゼでろ過した後、700×gで1回、15,000×gで1回遠心し、その遠心上澄を126,000×gで1時間遠心 (Beckman XL-80 Ultracentrifuge) することにより沈澱画分を得た。これを0.5 M シュークロース、30 % (v/v) グリセロール、ならびに0.3 mM DTTを含んだ50 mM リン酸カリウム緩衝液pH7.5 (緩衝液2) で洗浄し、再度同じ条件で超遠心した後、得られた沈澱を緩衝液2に懸濁させ、これをミクロソーム画分とした。トウモロコシ液体培養細胞からのミクロソームの調製は、緩衝液1の代わりに、0.25 M シュークロース、30 % (v/v) グリセロール、1 % (w/v) イソアスコルビン酸ナトリウム、1 mM EDTAおよび0.5 % (w/v) BSAを含む50 mM Tris-HCl緩衝液pH7.8を使用し、ガラスホモジナイザーで摩砕液を調製した。

なお、イネは空気をバブリングさせながら水中で生育させ、その他の植物はバーミキュライト上で生育させた。またトウモロコシ液体培養細胞は2 ppmの2,4-Dを含むMurashige-Skoog培地で、滅菌したメソコチル (殺菌した種子を滅菌した寒天上に播種し、無菌下で生育させた) から誘導したカルスを約1週間液体培養することで調製した。

### (3) チトクロムP-450とb5の定量

チトクロムP-450とP-420 (P-450の変成物) は分光光度系を使用した大村と佐藤の差スペクトル法(186)で定量した。上記の方法で調製したミクロソーム懸濁液 (1 mlに0.2~1 mgのタンパク質を含む) の1 mlを100 mMリン酸カリウムpH7.5を加えて2 mlにした。これを25℃で2分間インキュベートした後、さらに室温に1分間放置した。サンプルセルと対照セルに0.9 mlずつ分注し、500~400 nmの範囲でベースラインを記録した後、サンプルセルの懸濁液を試験管に戻して一酸化炭素のバブリングを20秒間行った。これ



をサンプルセルに再度戻した後、両方のセルに  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  をマイクロスポーテルで少量加えた。良く溶かし、2分間放置後、差スペクトルの測定を行った。P-450、P-420比含量は、それぞれモル吸光係数として、 $91 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  と  $111 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  を使用し、次の式から求めた。

P-450比含量 (n moles/mg protein)

$$= (\text{OD}_{450} - \text{OD}_{490}) \times 10^3 / (91 \times \text{タンパク質濃度})$$

P-420比含量 (n moles/mg protein)

$$= (\text{OD}_{420} - \text{OD}_{490}) \times 10^3 / (111 \times \text{タンパク質濃度})$$

なお、420 nm の吸光度は 450 nm の吸光度から推定されるベースラインを基準にして算出した(211)。

一方、チトクロム b5 は Klingenberg の差スペクトル法(187)で定量した。上記の方法に準じてサンプルセルと対照セルにミクロソーム懸濁液を分注した後、600 ~ 400 nm の範囲でベースラインを記録した。この後、サンプルセルに 25 mM の NADH を  $10 \mu\text{l}$ 、対照セルに蒸留水を  $10 \mu\text{l}$  添加し、約1分間放置後、差スペクトルの測定を行った。比含量は、 $\alpha$ -バンド(555 nm) のモル吸光係数  $20 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  を使用し次式から求めた。

b5比含量 (nmoles/mg protein)=

$$(\text{OD}_{555} - \text{OD}_{590}) \times 10^3 / (20 \times \text{タンパク質濃度})$$

#### (4) NADPH-チトクロム P-450 レダクターゼ活性と NADH-チトクロム b5 レダクターゼ活性の測定

NADPH-チトクロム P-450 レダクターゼ活性はアンチマイシン非感受性 NADPH-チトクロム c レダクターゼ活性を指標として、Masters の方法(188)に従い測定した。反応液量を 3 ml、反応液組成を、0.27 mM NADPH、0.033 % (w/v) チトクロム c、0.11 mM EDTA、 $3.3 \mu\text{M}$  アンチマイシン A、2 mM アジ化ナトリウム、酵素、50 mM リン酸カリウム緩衝液 pH7.6 とし、酵素無添加の状態では 5 分間プレインキュベートした。この後、酵素を添加することで反応を開始させ、30℃での波長 550 nm の吸光度増大をレートアッセイした。

NADH-チトクロム b5 レダクターゼ活性はアンチマイシン非感受性 NADH-チトクロム c レダクターゼ活性を指標として Mackler(189)の方法に従い、次の方法で測定した。反応液量を 3 ml、反応液組成を、0.27 mM NADH、0.033 % (w/v) チトクロム c、 $3.3 \mu\text{M}$  アンチマイシン A、2 mM アジ化ナトリウム、酵素、30 mM リン酸カリウム緩衝液 pH7.6 とし、酵素無添加の状態では 5 分間プレインキュベートした。その後、酵素を添加することで反応を開始させ、30℃での波長 550 nm の吸光度増大をレートアッセイした。

#### (5) パーオキシダーゼ活性の測定

反応液量を 3 ml、反応液組成を、0.055 % (w/v) o-フェニレンジアミン、



0.017 % (w/v) 過酸化水素、ミクロソーム懸濁液、100 mM リン酸カリウム緩衝液 pH7.2 とし、30 °C で波長 430 nm の吸光度変化をレートアッセイした(190)。

#### (6) t-桂皮酸4-ヒドロキシラーゼ活性の測定

反応液量を 2 ml、反応液組成を、90 mM KCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM グルコース-6-リン酸 (G-6-P)、0.5 mM NADP、0.3 unit G-6-P 脱水素酵素、0.1 mM EDTA、1 mM t-桂皮酸、ミクロソーム、25 mM リン酸カリウム緩衝液 pH7.5 とし、30 °C で30 分間、振とうしながら反応させた。この後、0.1 ml の 6 N 塩酸で反応を停止させ、SEP-PAK C18 に通して生成物の p-クマル酸と未反応の t-桂皮酸を吸着させた。これを酸性水で洗浄後、メタノールで溶出し、この溶出液を次の条件で HPLC 分析した。

カラム NOVA PAK C18

展開溶媒 A: 0.05 N 酢酸水

B: メタノール

グラジエント

分	% A	% B
0	80	20
15	0	100
18	0	100
18.1	80	20

流速 1 ml/min

検出 280 nm、0.2 AUFS

#### (7) N, N-ジメチルアニリン N-脱メチル化酵素活性の測定

反応液量を 1 ml、反応液組成を、90 mM KCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM グルコース-6-リン酸 (G-6-P)、0.5 mM NADP、0.3 ユニット G-6-P 脱水素酵素、0.1 mM EDTA、200 μM N, N-ジメチルアニリン、ミクロソーム、25 mM リン酸カリウム緩衝液 pH7.5 とし、30 °C で30 分間反応させた後、反応を 1 ml の TCA で停止させた。変成したタンパク質を遠心で除去した後、遊離したホルムアルデヒドを次の方法で定量した(191)。上澄 1.5 ml に 1 ml の DSNR 溶液 (30.8 g の酢酸アンモニウムおよび 0.6 ml の酢酸ならびに 0.4 ml のアセチルアセトン蒸留水を 100 ml に定容) を添加した。これを 37 °C で 60 分間インキュベートした後、波長 412 nm で比色定量した。生成したホルムアルデヒドの量は  $8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  のモル吸光係数を用いて算出した。



### 3. 実験結果

#### (1) 各種植物のチトクロムP-450とb5の比含量

代表的な結果として、黄化トウモロコシメソコチルとトウモロコシ液体培養細胞の一酸化炭素還元型差スペクトルをFig. 57Aに示した。メソコチルでは明瞭なチトクロムP-450スペクトルが得られたが、培養細胞の場合には大部分のP-450がP-420へ変成していた。なお、図中の数字は実験に使用したミクロソームのタンパク質量を示した。また、Fig. 57Bには黄化トウモロコシメソコチルとソルガム茎葉のチトクロムb5スペクトルを示した。555 nm近辺に $\alpha$ バンド、425 nm近辺にソーレーバンドが検出された。そこで、供試植物すべてのP-450および420ならびにb5の比含量をまとめてTable 27に示した。すべての植物にP-450は検出されたが、特にトウモロコシメソコチルの含量が高い値となった。b5についても未試験のワタを除いてすべての供試植物に検出された。一方、植物の場合ミクロソームに存在するパーオキシダーゼが一酸化炭素還元型差スペクトルにおいて420 nmに吸収を示すため、P-420の定量に影響を及ぼすことが知られている。そこでミクロソームのパーオキシダーゼ活性について調べたところ、ダイズの比活性が最高になり、トウモロコシではカルスの活性がメソコチルよりも少し高かった (Fig. 58)。これらの活性を市販の西洋ワサビのパーオキシダーゼ活性と比較し、含量を算出したところ、ダイズとコムギの場合には、上述したP-420含量の7%程度にパーオキシダーゼの影響があり、その他は5%以下であることが明らかとなった。即ち、P-420の定量にはパーオキシダーゼはほとんど影響を及ぼさないことが判明した。

#### (2) 各種植物のアンチマイシン非感受性NADPH-チトクロムcレダクターゼとアンチマイシン非感受性NADH-チトクロムb5レダクターゼ活性

Table 28にmfoの構成成分であるレダクターゼの活性を示した。アンチマイシン非感受性NADH-チトクロムcレダクターゼ活性は、ソルガムが最高値となり、トウモロコシはメソコチルとカルスがほぼ同じ値となった。アンチマイシン非感受性NADPH-チトクロムcレダクターゼ活性はダイズが最高で、トウモロコシの場合はカルスの活性がメソコチルよりも若干低い値となった。

#### (3) 各種植物のmfoの水酸化活性

*t*-桂皮酸4-ヒドロキシラーゼの活性測定は放射能でラベルした*t*-桂皮酸を用いる方法と非放射性的の*t*-桂皮酸を使用した分光学的な方法の2つの方法が報告されているが(173,192)、今回、HPLCを使用した方法でも生成物の*p*-クマル酸を容易に検出することが可能であった (Fig. 59)。そこで、この方法で調べた結果をまとめてTable 29に示した。左のカラムはタンパク質当りの活性を表し、右はチトクロムP-450当りの活性を表わした。従来ソルガムが高い活性を示すことが



報告されているが(173)、やはり、供試材料中では最高値を示した。トウモロコシに関しては、カルスの活性がメソコチルの9倍程度となった。一方、エンドウの活性が低く、マメアサガオ、ワタには活性が検出されなかった。ダイズは例外であったが、他はイネ科植物の活性が高い傾向であった。

#### (4) 各種植物mfoの酸化脱メチル化活性

Table 30にN, N-ジメチルアニリンN-脱メチル活性の結果を示した。桂皮酸の水酸化活性が低かったエンドウが最も高い活性を示した。また、桂皮酸水酸化活性がほとんど検出されなかったワタにもかなり高い活性が認められた。これらとは対照的に桂皮酸水酸化活性の高かったソルガムの活性は低い結果となり、トウモロコシではカルスの活性が2倍程度メソコチルよりも高くなっていた。また、単子葉植物の中では比較的イネの活性が高かった。全般的に、桂皮酸水酸化活性とは対照的に、広葉植物の活性が高い傾向が認められた。



#### 4. 考察

供試した植物からは、程度の差はあるがインタクトなmfoが調製できることが明らかとなった。また、供試植物の中では黄化トウモロコシメソコチルのP-450比含量が最も高いことが判明した。一方、水酸化反応として桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼおよび脱メチル化反応としてN, N-ジメチルアニリンのN-脱メチル活性を検討することで、これらの植物mfoの基質特異性を調べたところ、両活性は植物種によって相違し、mfoの基質特異性は植物間で大きく異なることが明らかとなった。P-450遺伝子はいわゆるスーパーファミリーを形成し、動物においてはステロール等の内生的な物質代謝を司るP-450と生体外異物を代謝するP-450は異なる分子種であることが明確になっている(193)。一方、植物の場合には桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼのような内生的な物質代謝を司るP-450の性質は遺伝子レベルで明らかにされているが(194)、生体外異物の代謝に関与するP-450については、タンパク質分子および遺伝子レベルでの詳細が明らかとはなっていない。ただ、安定性等の酵素的性質やセイフナーによる誘導パターンが相違することから両者は異なるP-450であると考えられている(184)。このような背景から判断すると、桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼ活性と除草剤の酸化代謝との関連性は薄い、生体外異物であるN, N-ジメチルアニリンのN-脱メチル化活性は除草剤の酸化代謝と密接に関連しているものと考えられる。例えば、ワタの脱メチル化活性が高いのは前述したPET阻害剤のmunuronやdiuronの脱メチル化活性が高いことと関係し、双子葉植物に比べて弱い傾向にある単子葉植物の中でもイネの活性は高いという結果はイネがALS阻害剤のbensulfuron-methylやimzasulfuronを脱メチル化しやすいことと関連しているもの推定される。

今後は、イネを代表とするこれらの植物P-450を使用して、PC除草剤の酸化代謝と選択性の関連を検討するとともに、生体外異物の代謝に関与する植物P-450を、この分子種を誘導するセイフナーをからめて解析する必要があるものと考えられる。この手の研究は、植物P-450の分子種を理解する上で有効な手段となり、しいては選択性の高い除草剤の生合理的(biorational)な研究開発に役立つものと思われる。

なお、作物を中心としたmfoの性質比較はこれが初めての試みであり、P-450が調製しやすい塊茎や塊根等を材料とした従来の基礎研究(195,196)とは違った意味で、本節に記載した手法と結果は、農薬関連の応用分野において有用であるものと考えられる。



Table 27.

Content of cytochrome P-450, 420 and b5 in a variety of plant tissues.

Etiolated Tissue	nmol/mg protein		
	Cyt P-450	Cyt P-420	Cyt b5
Soybean hypocotyl	0.082-0.110	0.076-0.120	0.190
Pea hypocotyl	0.073	0.061	0.167
Morning glory hypocotyl	0.137	0.107	0.192
Wheat shoot <sup>a)</sup>	0.062	0.041	0.093
Corn mesocotyl	0.207-0.388	0.121-0.245	0.154
Corn callus	0.050	0.158	0.218
Sorghum shoot <sup>a)</sup>	0.117-0.203	0.080-0.130	0.253
Rice mesocotyl <sup>b)</sup>	0.051	0.087	0.091
Cotton hypocotyl	0.078	0.119	n.t.

a) The shoots included mesocotyl and the first internode.

b) Mesocotyls were excised from the seedlings germinated in water.



Table 28.  
Reductase activities in the microsomes of various plant tissues.

Etiolated Tissue	$\mu\text{mol/min/mg protein}$	
	NADH-Cyt c Rd <sup>a)</sup>	NADPH-Cyt c Rd <sup>b)</sup>
Soybean hypocotyl	1.26	0.516
Pea hypocotyl	1.19	0.087
Morning glory hypocotyl	0.53	0.122
Wheat shoot	0.34	0.095
Corn mesocotyl	1.41	0.099
Corn callus	1.53	0.069
Sorghum shoot	3.73	0.247
Rice mesocotyl	0.72	0.073
Cotton hypocotyl	0.30	0.053

a) Antimycin A-insensitive NADH-cytochrome c reductase.

b) Antimycin A-insensitive NADPH-cytochrome c reductase.



Table 29.

Activities of t-cinnamic acid 4-hydroxylase  
in the microsomes of various plant tissues.

Etiolated Tissue	t-Cinnamic acid 4-hydroxylase	
	nmol/30min/mg	nmol/30min/nmol P-450
Soybean hypocotyl	23.5	286
Pea hypocotyl	2.08	28.5
Morning glory hypocotyl	n.d. <sup>a)</sup>	
Wheat shoot	18.2	294
Corn mesocotyl	11.3	51.0
Corn callus	22.6	451
Sorghum shoot	87.5	679
Rice mesocotyl	11.4	224
Cotton hypocotyl	n.d.	

a) Activities were not detected.



Table 30.

Activities of N,N-dimethylaniline N-demethylase  
in the microsomes of various plant tissues.

Etiolated Tissue	N,N-Dimethylaniline N-demethylase	
	nmol/30min/mg	nmol/30min/nmol P-450
Soybean hypocotyl	14.7	179
Pea hypocotyl	28.1	385
Morning glory hypocotyl	7.12	52.0
Wheat shoot	1.14	18.4
Corn mesocotyl	4.97	24.0
Corn callus	2.58	51.6
Sorghum shoot	4.02	31.9
Rice mesocotyl	5.40	106
Cotton hypocotyl	14.0	179







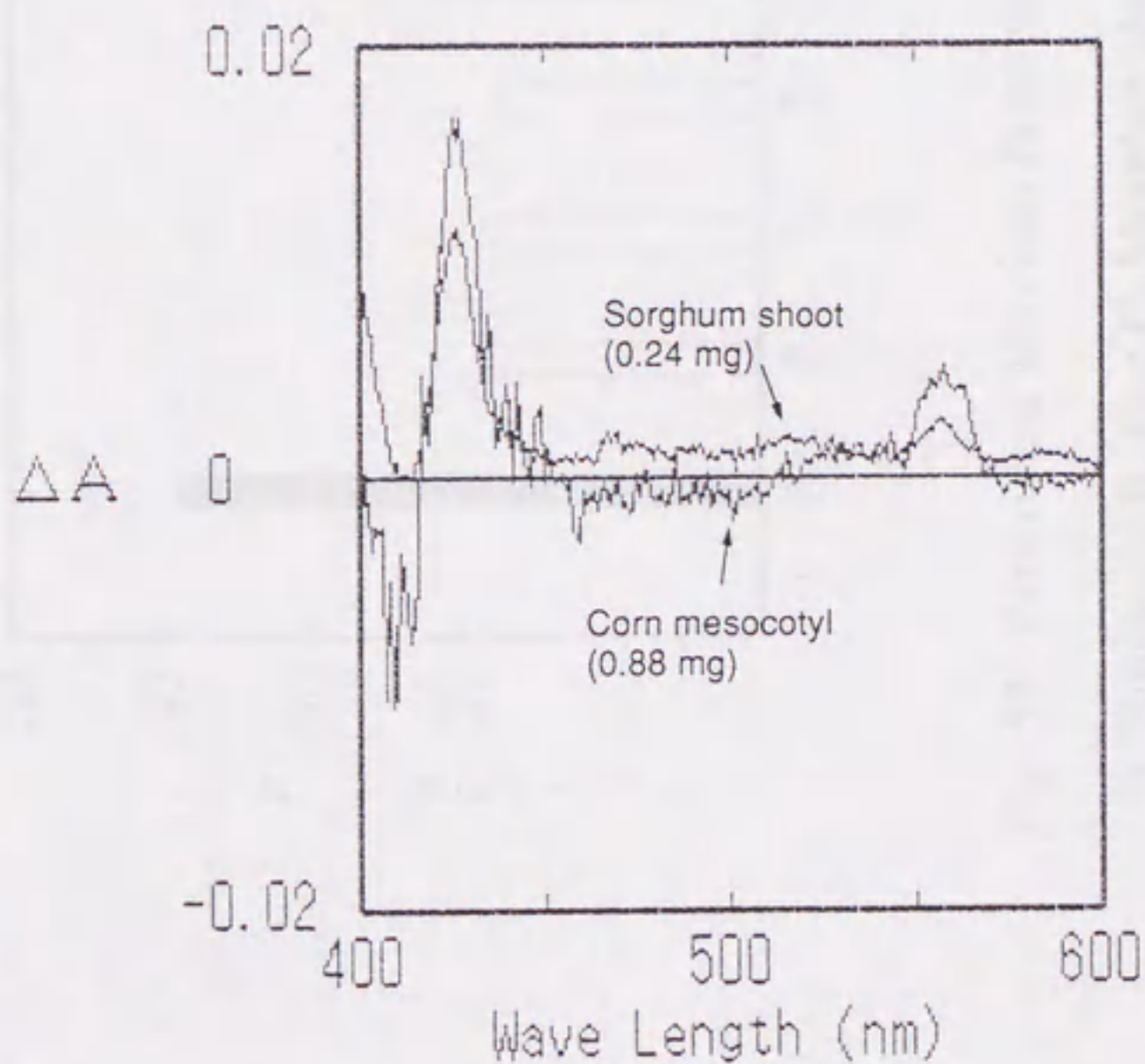
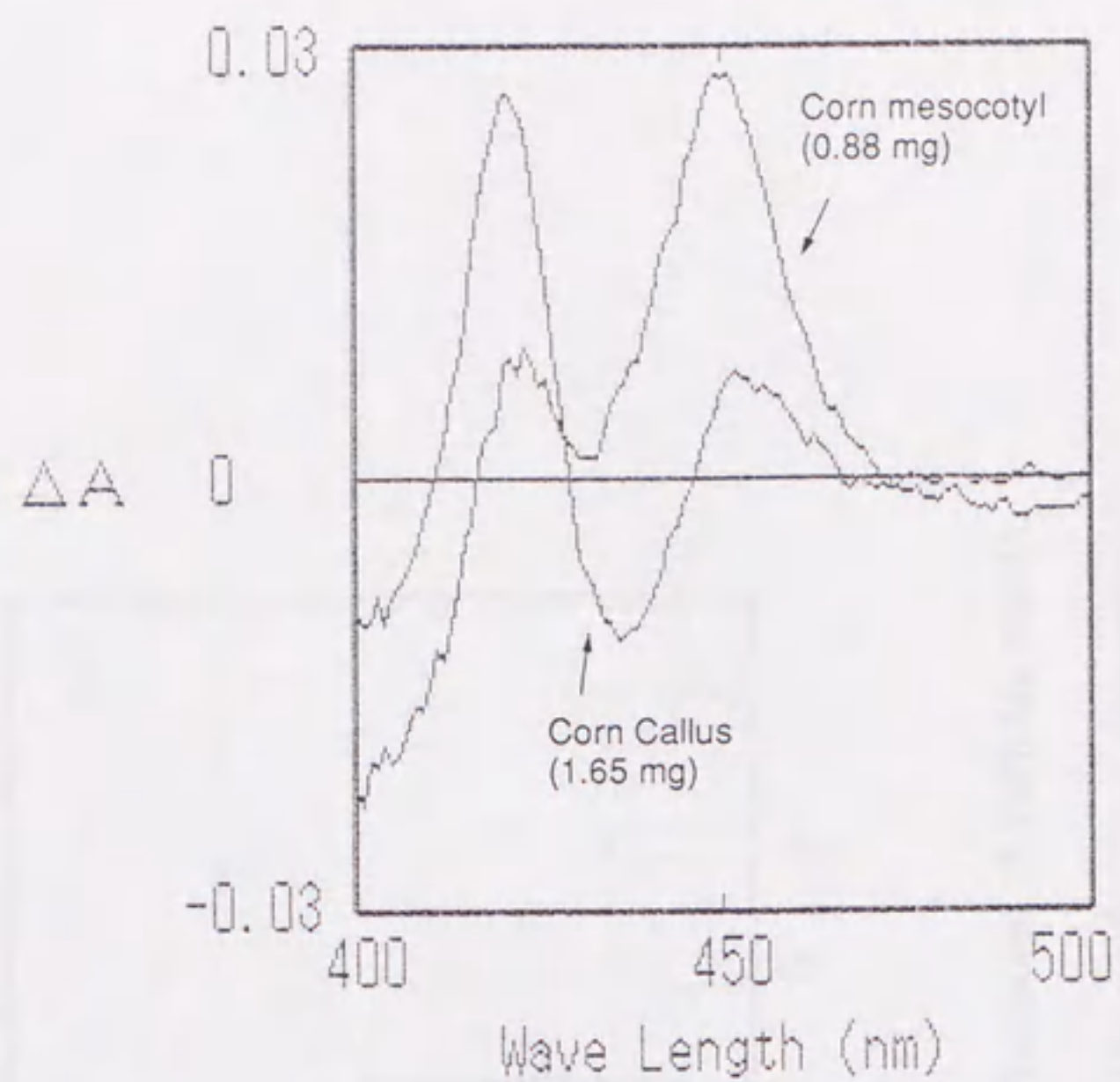


Fig. 57. Carbon monoxide difference spectra of dithionite-reduced cytochrome P-450 and NADH-reduced minus oxidized difference spectra (NADH, 0.275 mM).



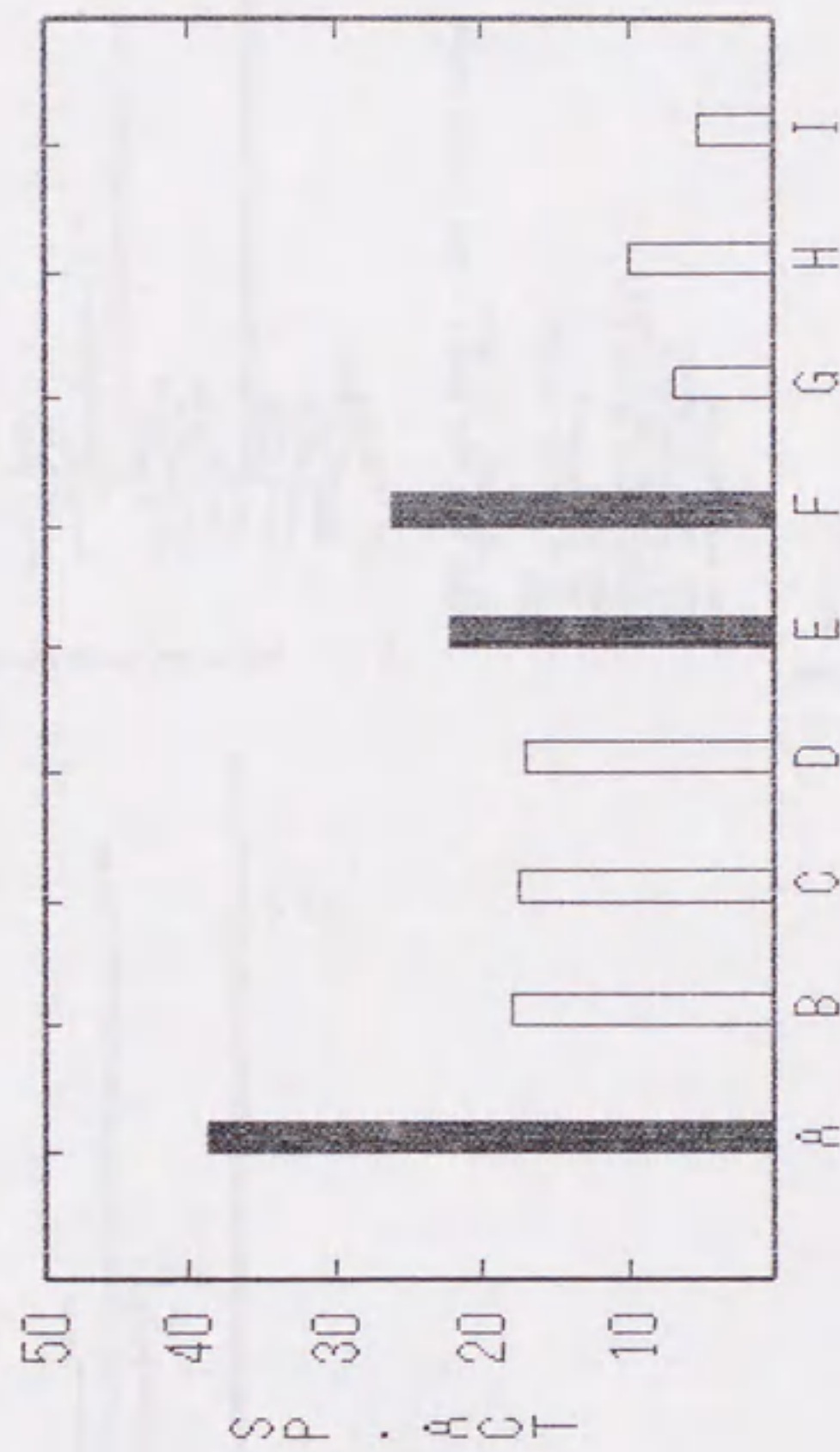
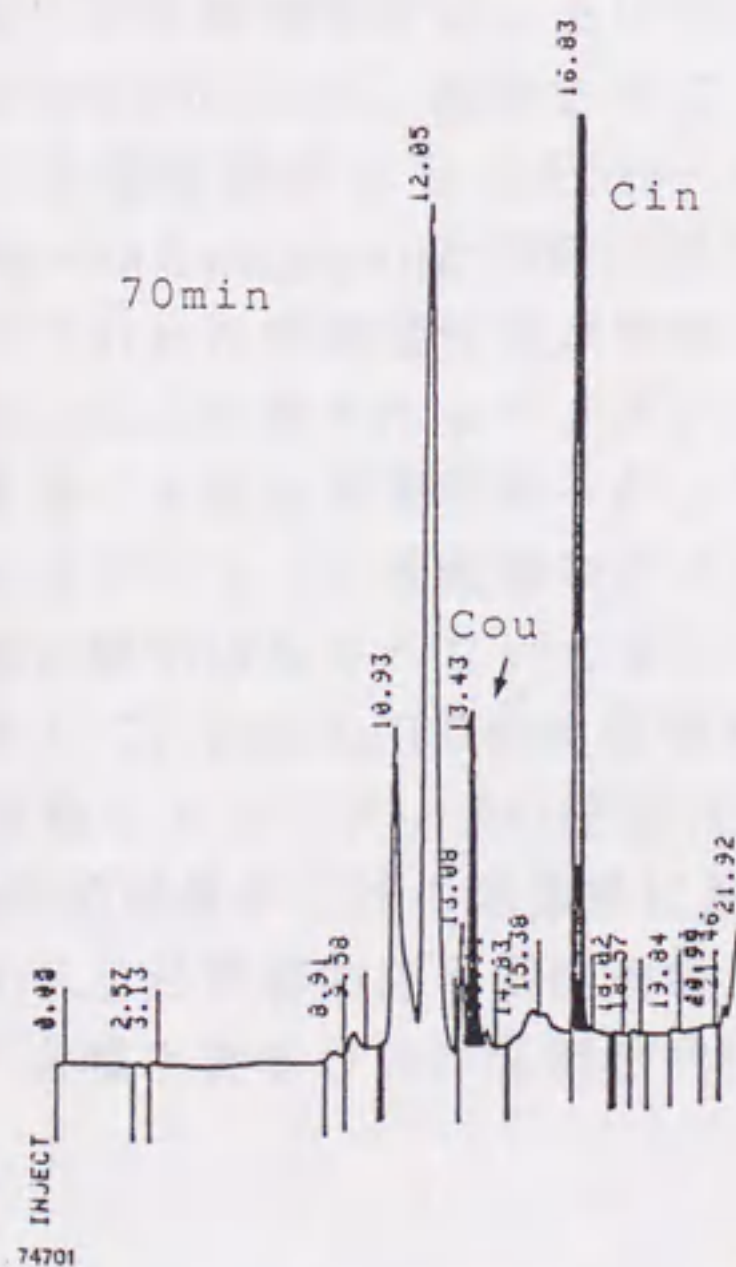
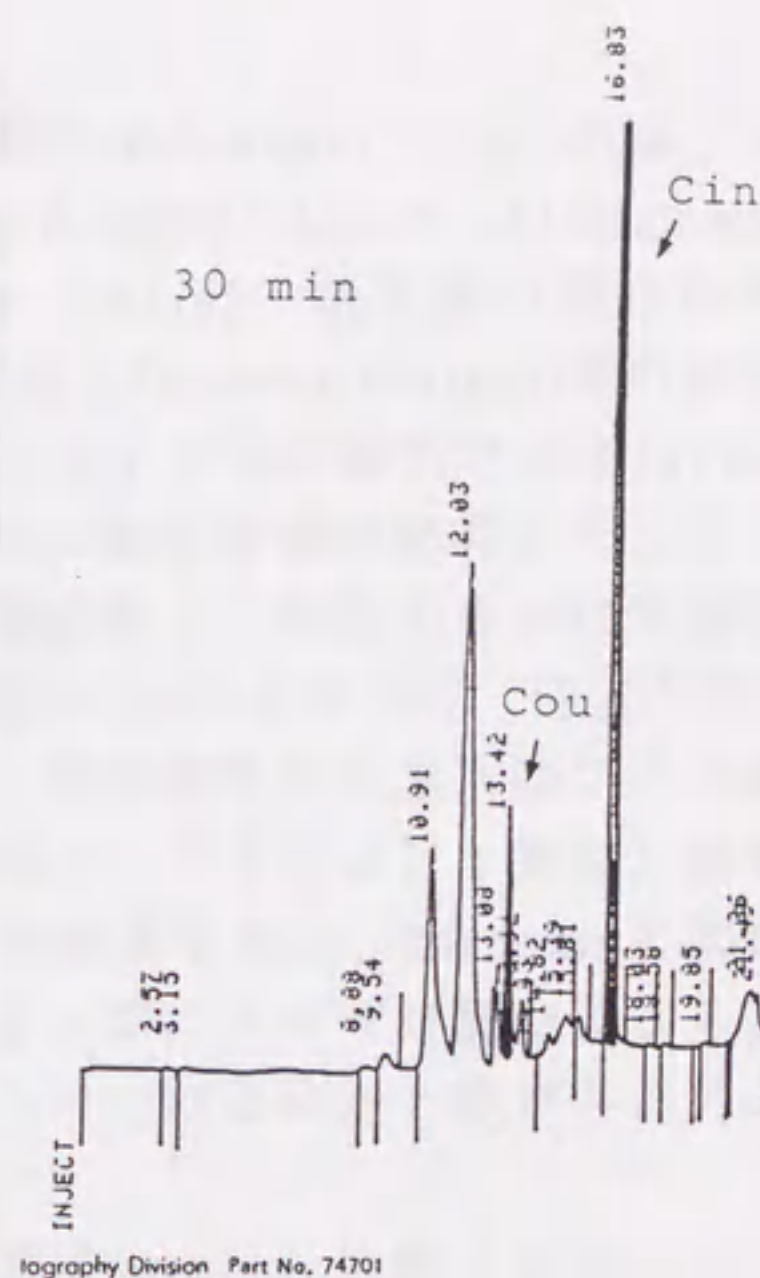
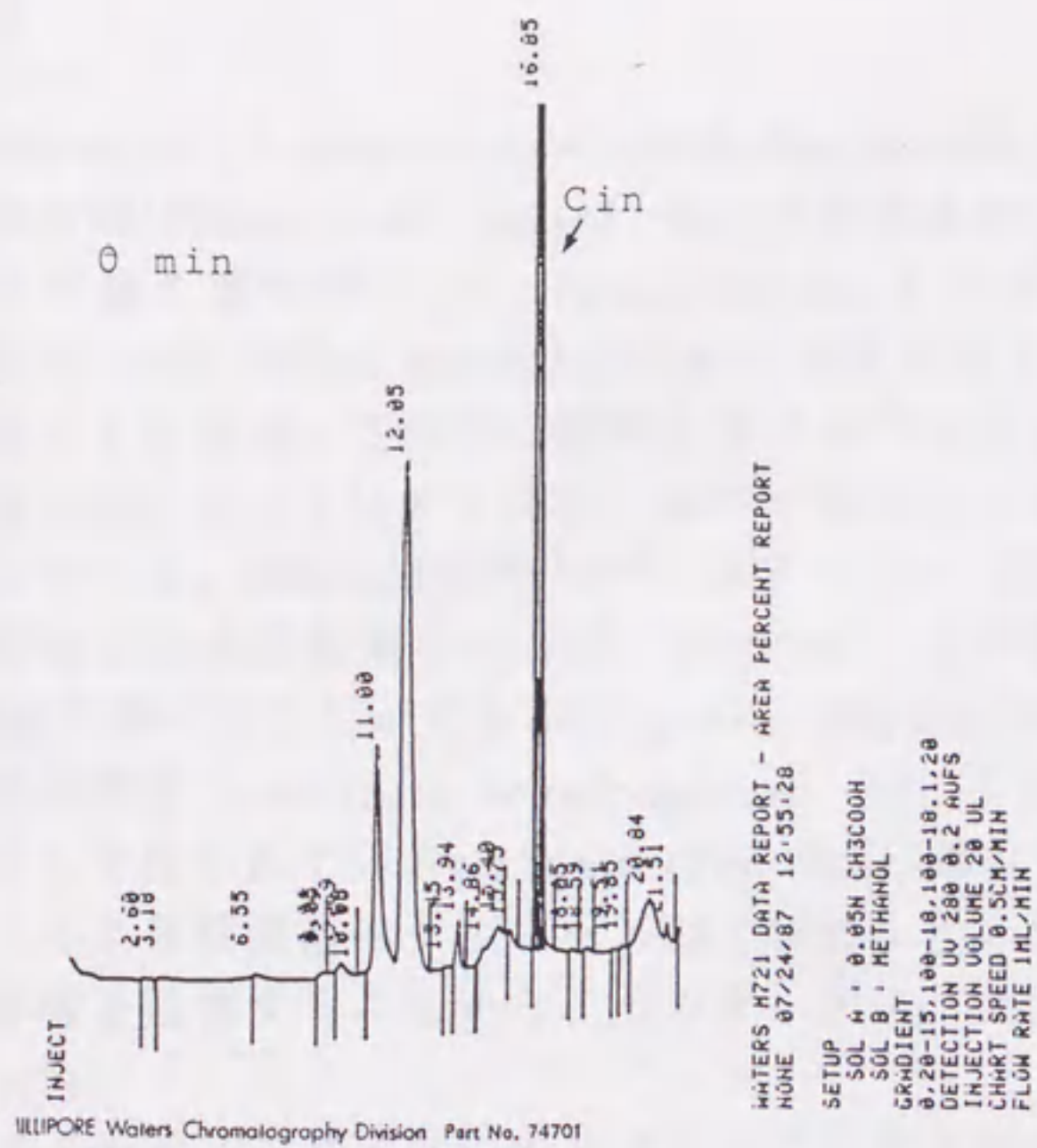


Fig. 58. Peroxidase activities in microsome fractions of various plants.

A, Soybean; B, Pea; C, Morning glory; D, Wheat; E, Corn (mesocotyl)  
 F, Corn (Callus); G, Sorghum; H, Rice; I, Cotton.  
 SP. ACT, Specific activity (OD<sub>430</sub>/min/mg protein).





049

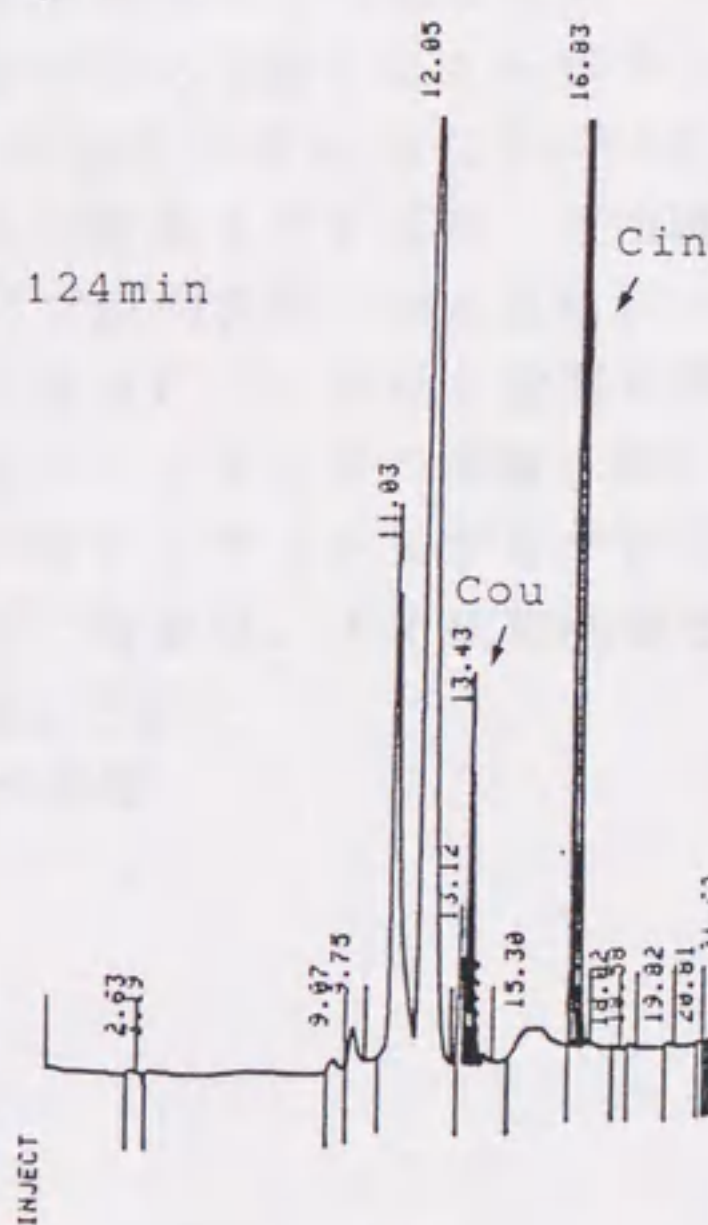


Fig. 59. Analysis of *t*-cinnamic acid (Cin) and *p*-coumaric acid (Cou) by HPLC.



## 第2章 殺菌剤mepronilの作用機構

### 緒言

Mepronil (3'-isopropoxy-2-methylbenzanilide, 商品名Basitac) (Fig. 2)は、イネ紋枯病(*Rhizoctonia solani* IA)、ナシ赤星病(*Gymnosporangium haraeum*)、麦の雪腐れ菌核病 (*Typhulaincarnata*, T.ishikariensis)、蔬菜類の苗立枯病 (*Rhizoctonia solani*, praticola type)、キクの白さび病 (*Puccinia horiana*)等の担子菌類による病害に特異的に効果を有するベンズアニライド系殺菌剤である(47)。本剤は国内では1981年に、海外では1984年に農薬登録が認可され上市に至っている。Mepronil以外のベンズアニライド系殺菌剤で、市販あるいは研究段階にある代表的薬剤としては、flutlanil (日本農薬) (197)とS-157 (住友化学) (198)を挙げることができる(Fig. 60)。Mepronilは、呼吸鎖電子伝達系のコハク酸脱水素酵素 (succinate dehydrogenase, EC. 1.3.99.1、以下SDHと略記) 阻害剤として知られているcarboxin (Fig. 60)に類似した構造を有し、carboxinと同様に、イネ紋枯病菌のグルコースおよびピルビン酸ならびにオギザロ酢酸による基質呼吸を阻害することから、そのターゲットはSDHではないかと推定されていた(47)。

オキサチンタイプのカルボキシアミド系殺菌剤のcarboxinに始まるSDH阻害剤の作用機構解析は、主にトウモロコシ黒穂病菌を材料として進められてきており(24, 199-202)、現在までにベンズアニライド系を含めた様々なカルボキシアミド系殺菌剤がSDHをターゲットにすることが知られている(203-210)。Carboxinもmepronilと同様に担子菌に対して特異的な効果を有するが、その特異性はSDHの薬剤感受性が種間により相違することで説明されている(24)。一方、mepronilに代表されるベンズアニライド系殺菌剤の国内における最も重要な防除対象はイネ紋枯病菌であるが、この病原菌からのミトコンドリアの調製は難しく、ベンズアニライド系殺菌剤がイネ紋枯病菌のSDHをターゲットにするか否かの直接的証明はなされないままとなっていた。そこで、著者は、イネ紋枯病菌を材料として、mepronilの作用機構を次の4点から検討した。

- (I) 単離ミトコンドリアの呼吸(酸素消費)に及ぼす影響
- (II) 呼吸鎖電子伝達の酵素系に及ぼす影響
- (III) SDH阻害の阻害機構解析
- (IV) 各種生物SDHの薬剤感受性の比較



## 1. 実験材料および方法

### (1) 供試薬剤

Mepronil (Fig. 2)、carboxin、oxycarboxin、thenoyltrifluoroacetone (ほ乳動物のSDH阻害剤、以下TTAと略記) (Fig. 60)ならびにオギザロ酢酸 (コハク酸の競争阻害剤) を使用した。

### (2) 供試生物材料

植物病原菌としてイネ紋枯病菌(*R. solani*)、イネいもち病菌(*Pyricularia oryzae*)、灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*)、ほ乳動物として、ラット (Wister系) およびマウス (SD系)、植物としてエンドウ (*Pisium sativum* L. var. Akabanatsurunashi) およびサツマイモ塊根 (*Ipomoea batatas* L. var. Beniazuma)を使用した。植物病原菌はクミアイ化学工業 (株) 生物科学研究所保存の菌株を使用し、他は市販品を購入した。

### (3) ミトコンドリアの調製

ラット肝臓、マウス肝臓、エンドウ黄化幼植物茎葉、サツマイモ塊根からのミトコンドリアの調製方法は常法に従った(211,212)。イネ紋枯病菌およびいもち病菌ならびに灰色かび病菌からは以下の方法で調製した。

イネ紋枯病菌はポテトシュークローズ寒天培地で継代培養したスラントから菌糸体の数片をとり、2 % グルコース、0.2 % (w/v) 硫酸アンモニウム、0.2 % (w/v) 硝酸ナトリウム、0.1 % (w/v) リン酸一カリウム、0.1 % (w/v) クエン酸ナトリウム、0.1 % (w/v) イーストエキストラクト、0.01 % (w/v) 塩化カルシウム、0.01 % (w/v) 硫酸マグネシウム (7水和)、0.0005 % (w/v) 硫酸鉄 (7水和) からなるCzapek-yeast extract液体培地 (CzYLM、500 mlの三角フラスコに200 ml) に植菌し、28℃、回転振とう機200 rpmで2日間前培養した。次に、この培養液を滅菌したワーキングブレンダーでホモジナイズした後、約10 mlをCzYLMに植菌し、前培養と同じ条件で38時間本培養した。こうして得られた菌糸体を吸引ろ過で集菌した後、菌体湿重量の3倍量の0.3 M マンニトール、0.1 % (w/v) 牛血清アルブミン (以下BSAと略記)、1 mM EDTA を含む20 mM Mops-KOH緩衝液pH 7.1 (緩衝液1) で2倍量の海砂とともに乳鉢中で摩砕した。この摩砕液をナイロンガーゼでろ過した後、2,000×gで10分間、2回遠心し(Tomy CX-250)上澄画分を得た。これを27,000×gで20分間遠心すると、遠心管の底にペレット状物質が懸濁状態で凝集したので、パスツールピペットで注意深く吸いとり、0.25 M シュークロースと1 mM EDTAを含む10 mM Mops-KOH緩衝液 pH 7.1 (緩衝液2) に懸濁させた。これをさらに27,000×gで遠心すると今度は完全に沈殿したので、上澄を捨てた後再度緩衝液2に懸濁させ27,000×gで遠心した。こうして得られた沈殿物をさらに緩



緩液2に懸濁させた後、 $15,000 \times g$  で20分間遠心し、この沈殿物をミトコンドリア画分とした（酵素活性測定の場合には10 gの湿重菌体から調製したミトコンドリアは約1.5 mlの緩液2に懸濁させた。また呼吸活性測定の場合には、緩液2を用いた操作はすべて0.25 Mシュクロースと0.2 % (w/v) BSAを含む10 mM HEPES-KOH緩液 pH7.0で代用し、100 gの湿重菌体から調製したミトコンドリアを1~2 mlに懸濁させた）。

いもち病菌および灰色かび病菌は、ポテトデキストロース寒天培地で新しく継代培養したスラントに滅菌水を加えて（10 mlのスラントに対して約20 mlの滅菌水）孢子懸濁液をつくり、この10 mlを2 % (w/v) グルコースと0.4 % (w/v) イーストエキストラクトからなるGlucose yeast extract培地（500 mlの三角フラスコに200 ml）に植菌し、イネ紋枯病菌の場合と同じ条件で3日間本培養した（灰色かび病菌の培養温度は22℃とした）。こうして得られた菌糸体を菌体湿重量の2倍量の緩液1で、2倍量の海砂とともに乳鉢中で摩砕した。次にこの摩砕液をナイロンガーゼでろ過した後、 $700 \times g$  で2回遠心し、その上清画分をさらに $15,000 \times g$  で20分間遠心することによって沈殿物を得た。そこでこの沈殿物を緩液2で洗浄、遠心（ $15,000 \times g$ 、20分間）した後、さらに緩液2に懸濁させ、これをミトコンドリア溶液とした。

#### （4）呼吸活性測定

酸素電極（Yellow Springs Instrument Co.）を使用した酸素消費測定を行った。反応溶液としては、0.3 M マンニトール、5 mM  $MgCl_2$ 、10 mM KCl、0.1 % (w/v) BSAを含む10 mM リン酸ナトリウム緩液 pH 7.0を用いた。ミトコンドリアは上記の方法で調製したものを使用し、薬剤はエタノール溶液としたものを最終エタノール濃度が1%以下となるように添加した。酸素消費量は反応液中の酸素の初期濃度を $240 \mu M$ として算出した(213)。

#### （5）酵素活性測定方法

呼吸鎖電子伝達系のSDH(208,214,215)およびチトクロムcレダクターゼ(216)ならびにコエンザイムQ10レダクターゼ(217)活性の測定を分光光度計(Hitachi 220A)を用いて行った。反応溶液組成をTable 31に示した。反応は全容3 mlで行い、すべての反応に緩液としてリン酸カリウム緩液を用い、チトクロムオキシダーゼの阻害剤としてシアン化カリウムを添加した。SDHの場合には反応溶液を等張にするためにシュクロースを添加し、基質としてコハク酸、直接の電子受容体として2,6-dichlorophenolindophenol（以下DCPIPと略記）を用いた。またphenazine methosulfate（以下PMSと略記）を中間電子受容体とする場合には、最終電子受容体としてDCPIP、あるいはチトクロムcを使用した。チトクロムcの場合には電子伝達系の複合体IIIの阻害剤であるアンチマイシンAを反応溶液中に添加した。DCPIPの還元速度は波長600 nmにおける吸光度減



少をレートアッセイし、チトクロムcは波長550 nmにおける吸光度増大をレートアッセイした。モル吸光係数はDCPIP,  $2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、チトクロムc,  $1.92 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いた。以下、DCPIPを直接の電子受容体とする場合のSDH活性をコハク酸-DCPIPレダクターゼ活性、PMSを中間電子受容体としてDCPIPを最終電子受容体とする活性をコハク酸-PMS-DCPIPレダクターゼ活性、さらにチトクロムcを最終電子受容体とする活性をコハク酸-PMS-チトクロムcレダクターゼ活性と呼ぶこととした。

次に、チトクロムcレダクターゼはコハク酸あるいはNADHを基質とし、チトクロムcを電子受容体として用いた。以下、各々コハク酸-チトクロムcレダクターゼ活性、NADH-チトクロムcレダクターゼ活性と呼ぶこととした。

コエンザイムQ10レダクターゼの場合にもコハク酸あるいはNADHを基質とし、コエンザイムQ10を電子受容体として用いた。さらにこの場合には、コエンザイムQ10のエマルジョンをつくるために、0.25 Mのシェークロースを反応溶液中に添加した。コエンザイムQ10の還元速度は、酵素反応を1 mlの0.2 N過塩素酸で停止した後、未反応のコエンザイムQ10と反応生成物のコエンザイムQ10キノールを3.5 mlのシクロヘキサンで抽出し、コエンザイムQ10の吸収波長295 nmの吸光度減少を測定することで算出した（生成物であるコエンザイムQ10キノールも弱いながら吸収をもつので、これを補正した後、反応した割合から還元されたモル数を計算した）。この場合もコハク酸を基質とする活性をコハク酸-コエンザイムQ10レダクターゼ活性、NADHを基質とする活性をNADH-コエンザイムQ10レダクターゼ活性と呼ぶこととした。薬剤はエタノール溶液とした後、最終エタノール濃度が1%となるように反応溶液中に添加した。また、すべての反応はミトコンドリア溶液を添加することで開始させ、28℃で行った。

なお、I50値はプロビット法で算出した。

#### (6) SDHの可溶化

ミトコンドリアを超音波処理(Sonicator W-225R, Heat System Ultrasonic Inc. フラットチップ1/2を使い、20 kHz、100 W 2/1秒インターバルで5分間)で可溶化した後、105,000×gで1時間遠心し、この上清画分のSDHを可溶化SDHとした。

#### (7) タンパク質定量

第1章第3節の方法に従い、可溶性タンパク質は直接発色溶液と反応させることで定量した。ミトコンドリアタンパク質は最終濃度9%のトリクロル酢酸で変性、沈殿させた後、60 μlの水酸化ナトリウムに溶解させ、3 mlの発色溶液と反応させることで定量した。



## 2. 実験結果

### (1) イネ紋枯病菌の呼吸に及ぼす影響

Mepronilはイネ紋枯病菌から調製したミトコンドリアによるコハク酸を基質とする呼吸を低濃度で阻害した ( $0.3 \mu\text{M}$  で40%程度)。しかしながらNADHを基質とする呼吸は  $100 \mu\text{M}$  という高濃度でも14%程度しか阻害されなかった (Fig. 61A)。図中のMtはミトコンドリアの添加時点を、Suc、NADHは各々コハク酸およびNADHの添加時点を示した。トレース上の数値は呼吸活性値を示したもので、単位はn moles  $\text{O}_2/\text{min}/\text{mg protein}$  となっている。またこの結果より阻害率を算出し、対照薬剤 (ロテノンとアンチマイシンA) の結果も含めてTable 32に示した。

### (2) ラット肝臓ミトコンドリアの呼吸に及ぼす影響

Mepronilはoxycarboxinと同程度にコハク酸を基質とする状態3呼吸を阻害したが、その程度は弱く  $100 \mu\text{M}$  で50%程度であった。このときcarboxinは同濃度で85%程度の阻害を示した (Fig. 61B)。図中のMtはミトコンドリア添加時点を、Sはコハク酸添加時点を、AはADP添加時点を示した。またこの場合にはミトコンドリア添加前に各薬剤を反応溶液に添加した。ちなみに対照区のADP/O比は1.6、呼吸調節率 (respiratory control ratio、RCR) は3.6であった。

### (3) MepronilのSDH阻害

詳細な阻害機構を検討するためには酵素の性質を調べておく必要があることから、まずイネ紋枯病菌SDHの諸性質を検討した。コハク酸-DCPIPレダクターゼ活性の最大反応速度は、タンパク質当りの比活性で表すと、 $0.214 \pm 0.042 \mu\text{mole DCPIP reduced}/\text{min}/\text{mg protein}$ 、コハク酸-PMS-DCPIPレダクターゼ活性は $0.519 \pm 0.098$ 、コハク酸-PMS-チトクロムcレダクターゼ活性は $0.497 \mu\text{moles cytochrome c reduced}/\text{min}/\text{mg}/\text{protein}$ となった。さらに、コハク酸-DCPIPレダクターゼアッセイから求めたコハク酸に対する $K_m$ 値は $84 \pm 16 \mu\text{M}$ 、DCPIPに対する $K_m$ 値は $53 \pm 23 \mu\text{M}$ となり、コハク酸-PMS-チトクロムcレダクターゼアッセイより求めたPMSに対する $K_m$ 値は $420 \pm 23 \mu\text{M}$ となった。コハク酸-PMS-チトクロムcレダクターゼ活性の最大反応速度以外は4連の平均値と標準偏差で示した。そこでこの酵素に対するmepronilの影響を調べたところ、本剤はコハク酸-DCPIPレダクターゼ活性を強く阻害することが判明した (Fig. 62)。Fig. 63はDixonプロットの結果であるが、コハク酸-DCPIPレダクターゼ活性の逆数とmepronil濃度とは直線関係にあり、この活性に対するmepronilの阻害は単純飽和阻害であることが判明した。しかし、コハク酸-PMS-チトクロムcレダクターゼ活性のDixonプロットは直線にはならず、PMS濃



度が0.54 mMでは約60%程度の阻害でプラトーに達する結果となった。Mepronilのコハク酸-DCPIPレダクターゼのI<sub>50</sub>値は0.24  $\mu$ Mではほぼcarboxinと同程度(carboxinのI<sub>50</sub>値は0.32  $\mu$ M)であった。

そこで、さらにこの点を明確にするためにコハク酸からチトクロムcへの電子の流れ(コハク酸→コエンザイムQ→チトクロムb→チトクロムc<sub>1</sub>→チトクロムc)であるチトクロムcレダクターゼ活性とコハク酸からコエンザイムQへの直接の電子の流れであるコハク酸-コエンザイムQレダクターゼ活性(アッセイにはコエンザイムQ<sub>10</sub>を使用)に対するmepronilの影響を調べた。また比較としてNADHからの電子の流れであるNADH-チトクロムcレダクターゼとNADH-コエンザイムQ<sub>10</sub>レダクターゼ活性(NADH脱水素酵素)についても調べた。

#### (4) チトクロムcレダクターゼ阻害とコエンザイムQ<sub>10</sub>レダクターゼ阻害

Mepronilはコハク酸-DCPIPレダクターゼアッセイでのSDH阻害とはほぼ同程度にコハク酸-チトクロムcレダクターゼを阻害した。しかし、NADH-チトクロムcレダクターゼ活性はほとんど阻害されなかった。同様に、コハク酸を基質とするコハク酸-コエンザイムQ<sub>10</sub>レダクターゼ活性はmepronilによって強く阻害されたが、NADH-コエンザイムQ<sub>10</sub>レダクターゼ活性は阻害されなかった(Table 33)。これらの結果から、mepronilの標的部位はやはりコハク酸からの電子伝達を触媒するSDHであり、NADHからのそれにはほとんど影響を与えないことが再確認された。

#### (5) MepronilのSDH阻害形式

次にmepronilとcarboxinを用いてSDH阻害形式の比較を行った。コハク酸-DCPIPレダクターゼアッセイでコハク酸濃度を変化させたときのLineweaver-Burk plotは両薬剤ともに混合型阻害(競争と非競争の混合型、阻害定数がK<sub>is</sub><K<sub>ii</sub>となる)となった(Figs. 64, 65)。このときのmepronilの阻害定数は、K<sub>is</sub>=0.082  $\mu$ M、K<sub>ii</sub>=0.23  $\mu$ Mであった。また、DCPIP濃度を変化させた場合はほぼ不競争阻害(厳密にはK<sub>is</sub>>K<sub>ii</sub>となる非競争と不競争の混合型)となった(Fig. 66)。さらにコハク酸-PMS-チトクロムcレダクターゼアッセイでPMS濃度を変化させた場合のmepronilとcarboxinのプロットは競争型となった(これは100%阻害が得られないので厳密には部分競争阻害であった)(Fig. 67)。

#### (6) SDHの可溶化とmepronilによる阻害

従来から、PMSはSDHと2つの部位で反応し、ミトコンドリア内膜から可溶化されることによってその一方は失活することが知られている(218)。そこで超音波処理でSDHを可溶化する前と、可溶化後のSDHのmepronilによる阻害について検討したところ、可溶化されたSDHはmepronilによって全く阻害されなかった(Table 34)。表中の上段にミトコンドリアを酵素源とした場合、下段に可



溶化 S D H の場合を示した。ミトコンドリアを酵素源とした場合には使用した PMS 濃度が 0.54 mM では約 60% の最大阻害が得られたが、可溶化 S D H はオギザロ酢酸以外には全く阻害されなくなっていた。この結果は mepronil は PMS の 2 つの反応部位の一方のみを阻害しており、その部位は可溶化されることによって完全に失活する部位であることを示唆した。

#### (7) Mepronil の選択的 S D H 阻害

Mepronil の選択毒性を調べるために、他の生物材料から調製した S D H に対する mepronil の影響を、コハク酸-DCPIP レダクターゼ阻害の面から検討した。Fig. 68 に、イネいもち病菌、ラット肝臓、マウス肝臓、エンドウ黄化幼植物茎葉ならびにサツマイモから調製した S D H に対する mepronil の影響を容量阻害曲線で表わし、それらの I 50 値を紋枯病菌の結果を含めて Table 35 に示した。この結果、mepronil は carboxin や carboxin よりもさらに選択的にイネ紋枯病菌の S D H を阻害することが判明した。ちなみに、ほ乳類の S D H の強い阻害剤である TTA は用いた材料の中ではラットとマウスの S D H を選択的に阻害したことから、同じ S D H といっても生物種によってかなり多様性に富んだ性質をもっていることが示唆された。



#### 4. 考察

イネ紋枯病菌は水稻の病害で殺菌剤の重要な防除対象であるにもかかわらず、この病原菌からのミトコンドリアの調製とSDH活性の測定は、著者が日本農薬学会に於て発表する時点(219)まで、報告例が見当たらなかった。しかしながら、上述したように、従来のミトコンドリア調製法を少し改良することにより、呼吸鎖電子伝達系活性を保持したミトコンドリアの調製が可能となった。そこで、このミトコンドリアを使ってイネ紋枯病菌SDHの酵素的諸性質を検討した結果、同じ担子菌類に属すトウモロコシ黒穂病菌SDHと極めて良く似た性質を有することが明らかとなった(201)。このように、基本的な酵素的性質を明らかにした上で、続いてmepiconilのイネ紋枯病菌単離ミトコンドリアの呼吸に及ぼす影響を検討したところ以下のことが明らかとなった。

Mepiconilは電子伝達系の中でもコハク酸を基質とする複合体IIを選択的に阻害し、複合体I、III、IVにはほとんど影響しなかった。Mepiconilがターゲットとする複合体IIの正体はSDHであり、イネ紋枯病菌のSDHに対する阻害効果はcarboxinよりも少し強いものであった。MepiconilのSDH阻害効果は、イネ紋枯病菌に対して選択的であり、ラットとマウスのSDHに対する阻害効果はcarboxinに比べてかなり弱いこと、さらに、carboxinはいもち病菌と灰色かび病菌の本酵素をある程度強く阻害したが、mepiconilはほとんど阻害効果を示さない等が特筆される点であった。即ち、これらの結果より、mepiconilは選択毒性の面でcarboxinよりもさらに優れた性質を有する薬剤であると結論された。

一方、SDH上のmepiconilの結合部位は、Kineticsの結果から判断すると、carboxinと同じ部位であり、コハク酸やDCPIPの結合部位とは異なり、PMSと競争する部位であると考えられた。また、PMSはSDH上の2つの部位から電子を受け取ることが知られているが、mepiconilはこの2つの部位の中でもミトコンドリアの可溶化により失活する部位に結合することが示唆された。PMSは実質的な電子受容体であるコエンザイムQの代替物であると考ええると、これらの結果はmepiconilのSDH上での結合部位がミトコンドリア内膜に組み込まれたSDHとコエンザイムQの接点部位近傍であることを示唆するものと考えられる。

では、どのような機構でmepiconilがSDHを阻害しているのかに興味を持たれるが、以下に呼吸鎖電子伝達系と、これに対する阻害剤の若干の説明を交えて、少し言及しておきたいと思う。まず電子伝達系と阻害剤をFig.69に示す。図中のFp1はNADH脱水素酵素、Fp2はSDHである。NADH脱水素酵素阻害剤としてはrotenoneやpiericidineが古くから知られており、最近になってベンズイミダゾール系殺虫剤や殺ダニ剤のfenpyroximateがこれをターゲットとすることが明らかにされている(220)。複合体IIIの阻害剤としてはantimycin Aや緒論で述べたメトキシアクリル酸系殺菌剤が著名である。チトクロムオキシダーゼ阻害剤としてはシアン、一酸化炭素、アジド、ならびにくん煙剤のホスフィン等を挙げることができる。チトクロム類はヘムを配合団として持ち、鉄原子の酸化還元を利用



して電子伝達を行っているが、阻害剤はこの反応を妨害する。一方、SDHとNADH脱水素酵素は酵素タンパク質に組み込まれたフラビンと非ヘム鉄の鉄原子を利用して酸化還元を行っている。TTAはほ乳類のコハク酸脱水素酵素の強い阻害剤であるが、その阻害作用は鉄原子とのキレートによる非ヘムの鉄-イオウ中心 (iron-sulfur centers) の破壊であるといわれている(203)。そこで、mepronilもキレート剤として作用するものと仮定すると(221)、本剤はイネ紋枯病菌のSDHタンパクの高次構造を特異的に認識して結合した後、その骨格中のアミド結合の窒素原子とイソプロポキシ基の酸素原子で鉄原子をキレートすることで酸化還元反応を阻害しているのではないかと推測される。

以上のように、単離ミトコンドリアを使用することで、mepronilの作用機構と選択毒性のメカニズムが明らかとなったが、ここで、SDH阻害剤の阻害効果の評価法という観点から、コハク酸-DCPIPレダクターゼアッセイ法とコハク酸-PMS-チトクロームc (あるいはDCPIP) レダクターゼアッセイ法のどちらが優れているか考えてみたい。これらのアッセイで使用しているDCPIPおよびPMSは生体内の電子受容体ではなく、合成化合物である。本来生体内におけるコハク酸からの電子受容体はコエンザイムQであり、さらにそれに続く複合体III (チトクロームb, c1) およびチトクロームcである。現在までのところ測定上の簡便性において勝れていることから、このような合成化合物が電子受容体として使用されている。このことから、チトクロームcあるいはコエンザイムQ<sub>10</sub> (ほ乳類ではQ<sub>10</sub> であるがイネ紋枯病菌においてもQ<sub>10</sub> であるという確証はない) を電子受容体とするコハク酸-チトクロームcレダクターゼ活性とコハク酸-コエンザイムQ<sub>10</sub>レダクターゼ活性に対する薬剤の影響を調べる必然性が生じてくる。この両者に対するmepronilの阻害活性について検討したところ、両者ともにほぼ完全に阻害されたことから、同じように完全な阻害が得られるコハク酸-DCPIPレダクターゼアッセイの方がより生体の実情に近いものと考えられる。しかしながら、PMS濃度が0.54 mMのときにコハク酸-PMS-チトクロームcレダクターゼアッセイで得られる約60%の最大阻害率を100%阻害に換算すれば、このアッセイ方法でもSDH阻害剤の本来の阻害効果を評価することは可能であろう。



Table 31. Reaction mixtures of succinate dehydrogenase (SDH), succinate-, NADH-cytochrome c reductase (Cyt c Red) and succinate-, NADH-CoQ<sub>10</sub> reductase (CoQ<sub>10</sub> Red).

SDH	Cyt c Red	CoQ <sub>10</sub> Red
50 mM K-Phosphate buffer pH 7.2	50 mM K-Phosphate buffer pH 7.2	33 mM K-phosphate buffer pH 7.2
1 mM KCN	1 mM KCN	1.5 mM KCN
0.25 M Sucrose	20 mM Na-succinate or	0.25 M Sucrose
16.7 mM Na-succinate	0.2 mM NADH	20 mM Na-succinate or
50 $\mu$ M DCPIP or	27 $\mu$ M Cyt c	1.5 mM NADH
54 $\mu$ M Cyt c, 0.54 mM PMS, 2.5 $\mu$ M Antimycin A		0.232 $\mu$ M CoQ <sub>10</sub>

Table 32. Effect of mepronil on the oxidation <sup>a)</sup> of succinate and NADH by mitochondria isolated from *Rhizoctonia solani* 1A.

Compound	Inhibition (%)	
	Succinate	NADH
Mepronil (mM)		
0.3	41	- (b)
3.3	57	0
33	86	4.1
100	-	14
Rotenone (mM)		
1.6	14	95
Antimycin A (mM)		
1.6	-	92

(a) The respiratory rates of succinate oxidation and NADH oxidation without inhibitors were 4.4 and 52 n moles O<sub>2</sub>/min/mg protein, respectively. (b) Not determined.



Table 33.

Effect of mepronil, carboxin and oxycarboxin on succinate-, NADH-cytochrome c reductase and succinate-, NADH-coenzyme Q<sub>10</sub> reductase from R.solani IA.

Reductase Reaction <sup>(a)</sup>	Compounds( $\mu$ M)	Inhibition(%)
Succinate-cytochrome c	Mepronil	
	0.10	32
	0.25	49
	0.50	67
	1.0	79
	10	99
	Carboxin	
	0.10	39
	0.30	53
	0.60	62
	1.0	69
	3.0	79
	Oxycarboxin	
	1.0	8.3
	5.0	29
NADH-cytochrome c	10	58
	25	83
	100	97
	Mepronil	
	10	9.7
	100	18
	Carboxin	
	10	5.8
	100	23
	Oxycarboxin	
Succinate-Coenzyme Q <sub>10</sub>	10	0
	100	0
	Mepronil	
NADH-coenzyme Q <sub>10</sub>	5.0	95
	Mepronil	
	5.0	4.5

(a) The activities of succinate- and NADH-cytochrome c reductases of control runs were 0.435 and 2.15  $\mu$ moles of cytochrome c reduced per minute per mg protein, respectively. The activities of succinate- and NADH-coenzyme Q<sub>10</sub> reductases in control runs were 0.604 and 0.578  $\mu$ moles of coenzyme Q<sub>10</sub> reduced per 25 minutes per mg protein.



Table 34.

Effect of mepronil, carboxin, oxycarboxin and oxalacetate on succinate dehydrogenase from *Rhizoctonia solani* 1A. The enzyme activity was assayed using phenazine methosulfate (0.54mM) as a intermediate electron acceptor. Each compound was tested at 100µM of concentration.

Enzyme Form	Enzyme Activity <sup>(a)</sup>	Inhibition(%)
Mitochondria		
control	0.311	-
Mepronil	0.126	60
Carboxin	0.129	59
Solubilized Succinate dehydrogenase		
control	0.488	-
Mepronil	0.472	3.3
Carboxin	0.484	0.8
Oxycarboxin	0.472	3.3
Oxalacetate	0.311	36

(a) Mitochondrial activity was expressed as umoles of cytochrome c reduced per minute per mg protein and that of solubilized succinate dehydrogenase was µmoles DCPIP reduced per minute per mg protein.

Table 35.

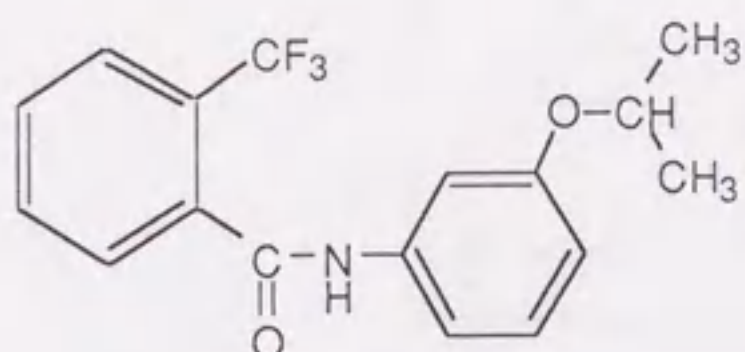
I<sub>50</sub>-values of various compounds for succinate-DCPIP reductase in mitochondria isolated from various sources.

Mitochondria isolated from	I <sub>50</sub> <sup>(a)</sup> ( x 10 <sup>-6</sup> M )				
	Mep	Car	Oxy	TTA	Oxa
<i>R.solani</i>	0.24	0.32	6.8	>1000	94
<i>P.oryzae</i>	>100	4.2	100	710	202
<i>B.cinerea</i>	86	1.4	-(b)	-	-
Rat liver	99	5.3	99	3.9	395
Mouse liver	61	4.6	51	4.6	-
Pea	>100	>100	>100	>1000	146
Sweet potato	>100	>100	>100	>1000	428

(a) Following compounds were tested: mepronil(mep), carboxin(car), oxycarboxin(oxy), thenoyltrifluoroacetone(TTA) and oxalacetate(oxa).

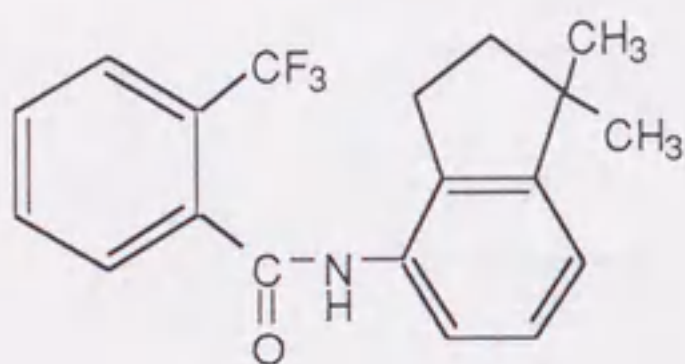
(b) Not determined.





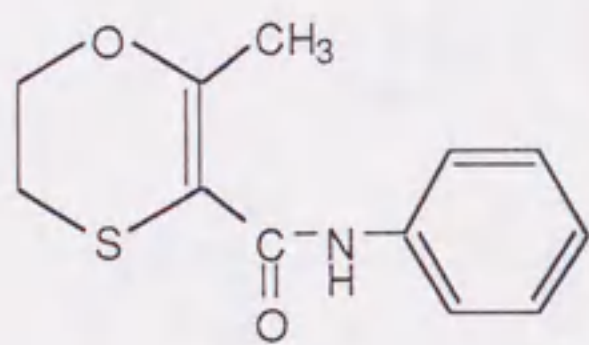
flutolanil

$\alpha, \alpha, \alpha$ -Trifluoro-3'-  
isopropoxy-o-toluanilide



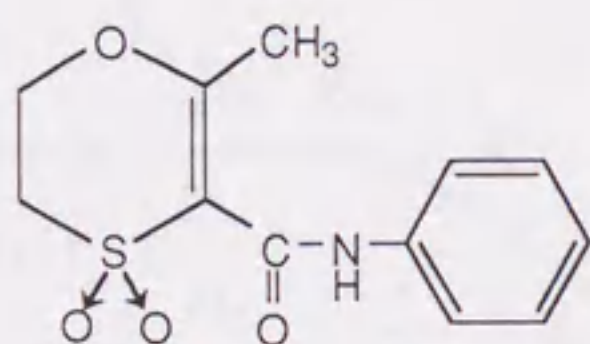
S-157

*N*-(1,1-Dimethyl-4-indanyl)-2-  
(trifluoromethyl)benzamide



carboxin

5,6-Dihydro-2-methyl-1,4-  
oxathiin-3-carboxanilide



oxycarboxin

5,6-Dihydro-2-methyl-1,4-  
oxathiin-3-carboxanilide-4,4-  
dioxide

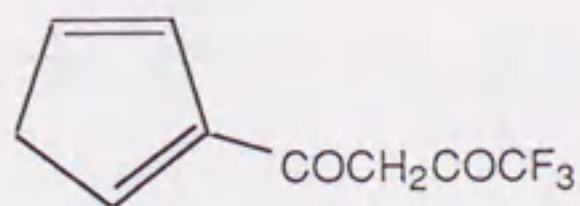
Thenoyltrifluoroacetone  
(TTA)

Fig. 60. Mepronilと構造が類似する殺菌剤および既知コハク酸脱水素酵素阻害剤.



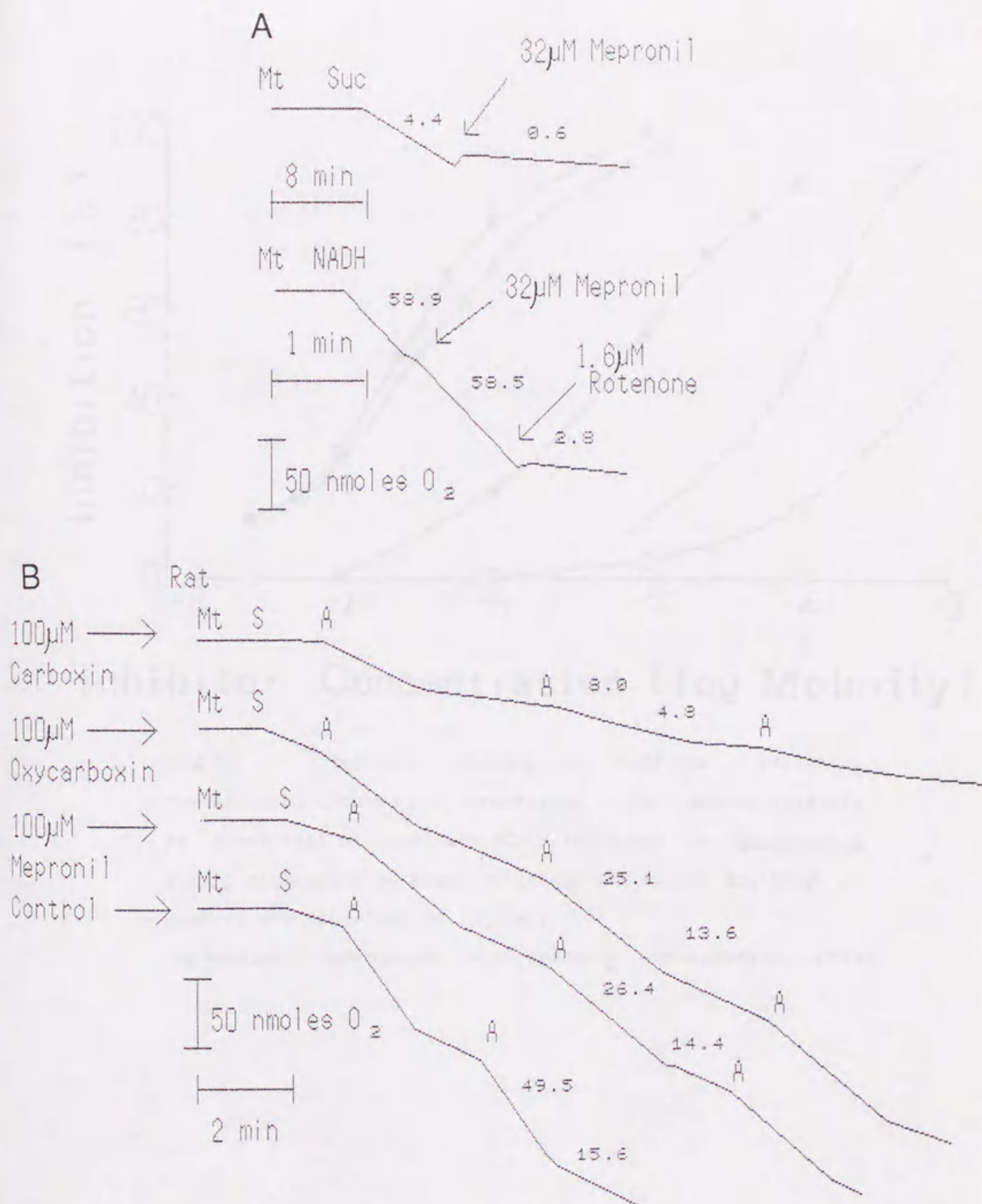


Fig. 61. Effects of mepronil on the oxidation of succinate and NADH in isolated mitochondria of *Rhizoctonia solani* (A) and rat liver (B).



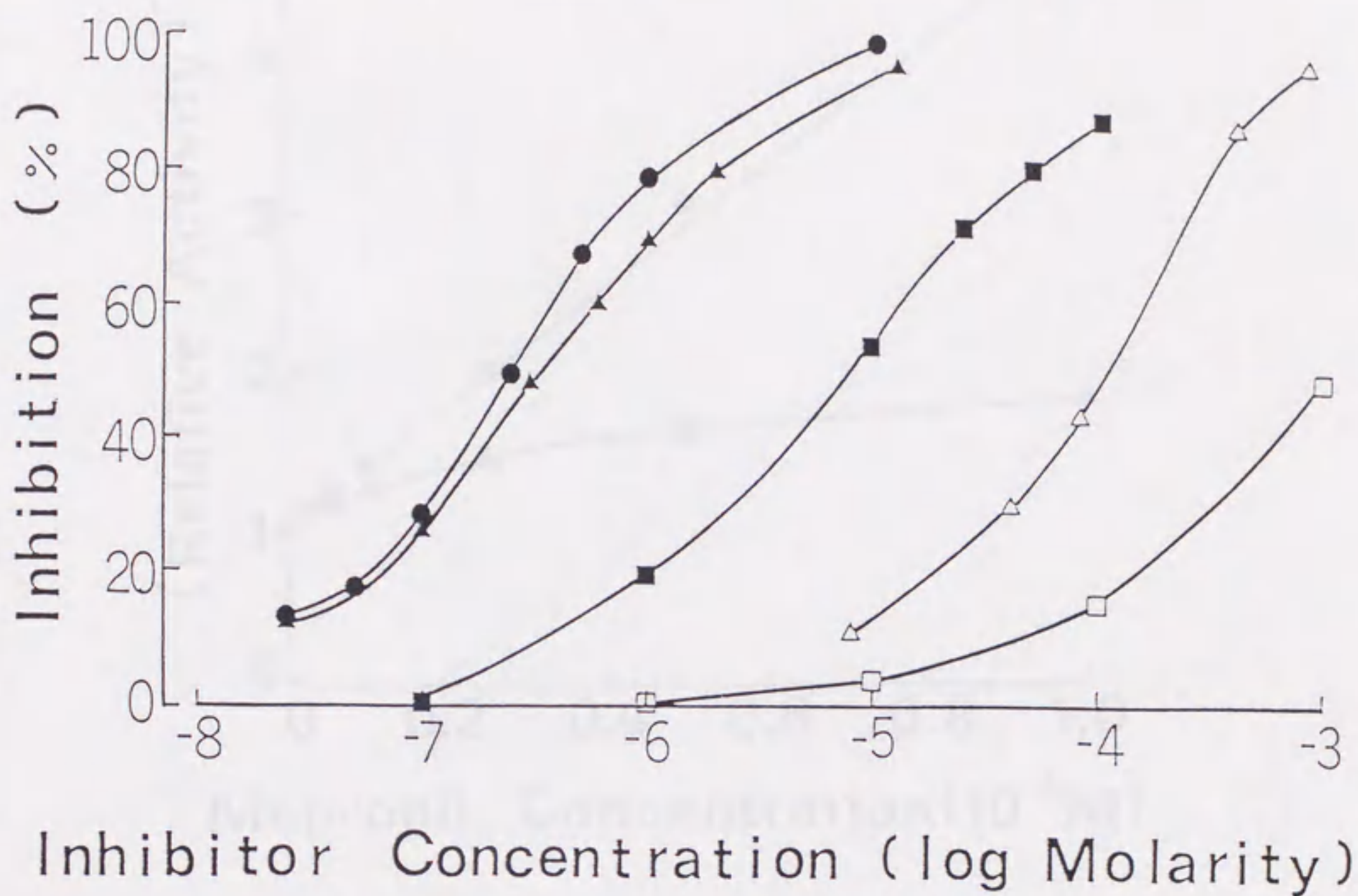


Fig. 62. Relative potency of mepronil, carboxin, oxycarboxin, thenoyltrifluoroacetone ( TTA ) and oxalacetate as inhibitors of succinate-DCPIP reductase of *Rhizoctonia solani* mitochondria. Assay condition and enzyme activity of control are described in the text.

●, Mepronil; ▲, Carboxin; ■, Oxycarboxin; △, Oxalacetate; □, TTA.



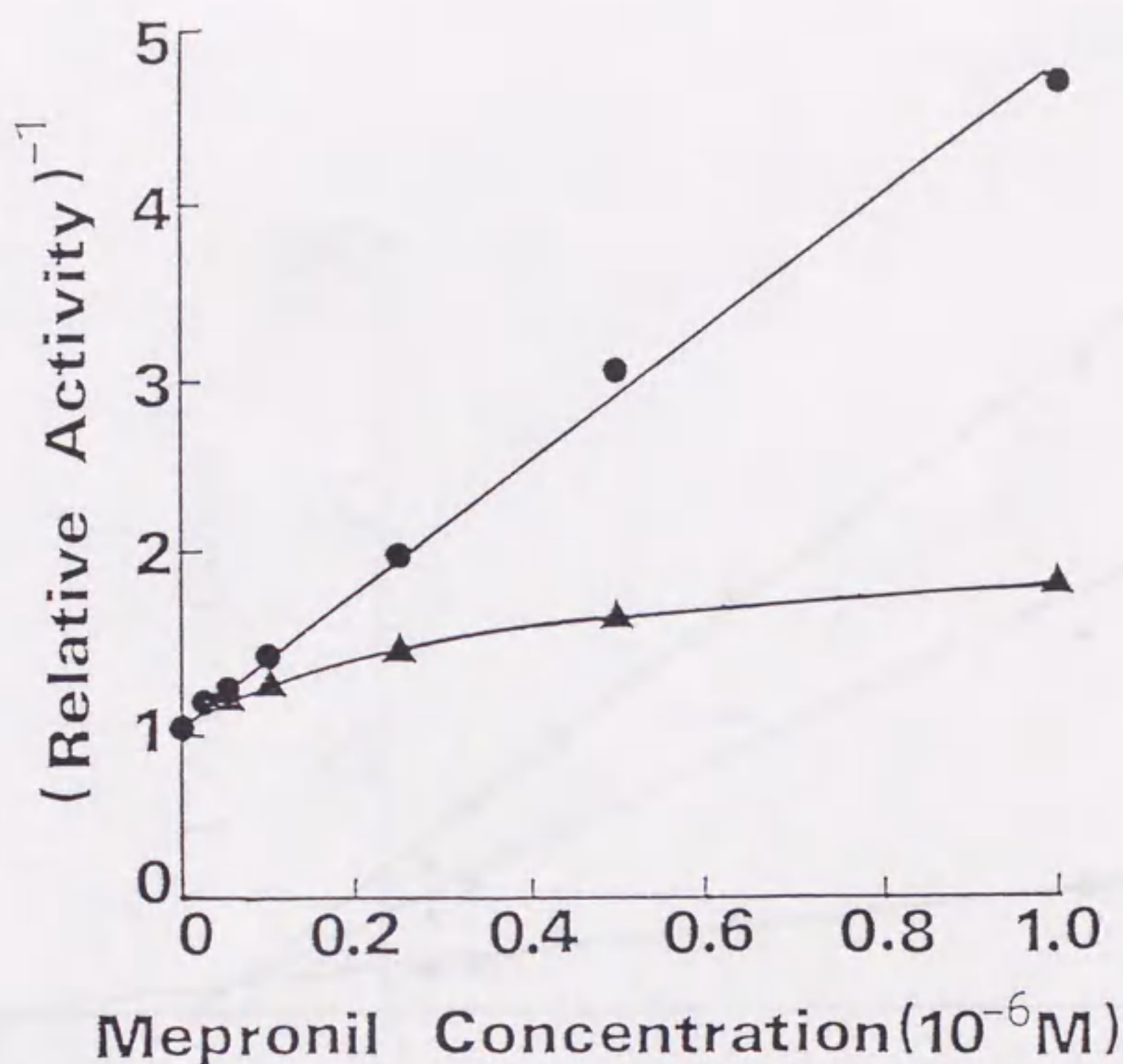


Fig. 63. Dixon plots of the inhibition of succinate-DCPIP reductase and succinate-PMS-cytochrome c reductase of *Rhizoctonia solani* mitochondria by mepronil. The concentration of DCPIP, PMS and cytochrome c employed in this assay were 50 $\mu$ M, 0.54mM and 54 $\mu$ M, respectively. The activities of succinate-PMS-cytochrome c reductase and succinate-DCPIP reductase without mepronil were 0.310 micro-moles of cytochrome c reduced per minute per mg protein and 0.214 micro-moles of DCPIP reduced per minute per mg protein, respectively under saturated condition of succinate.

●, Succinate-DCPIP reductase

▲, Succinate-PMS-cytochrome c reductase



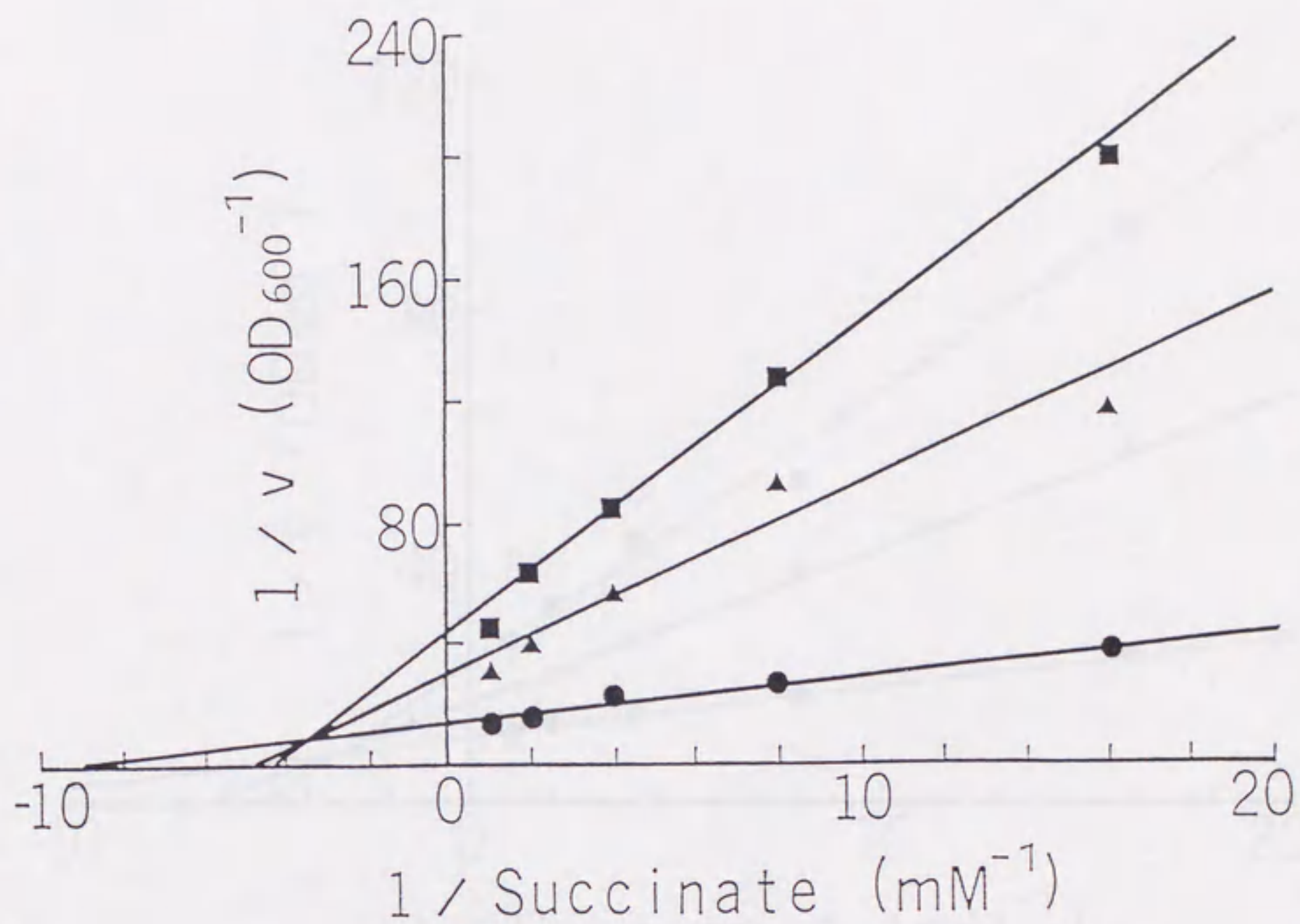


Fig. 64. Lineweaver-Burk plots of the inhibition of succinate-DCPIP reductase of *Rhizoctonia solani* mitochondria by mepronil with variable succinate concentration.

●, Control; ▲, 0.25  $\mu\text{M}$  Mepronil; ■, 0.5  $\mu\text{M}$  Mepronil.



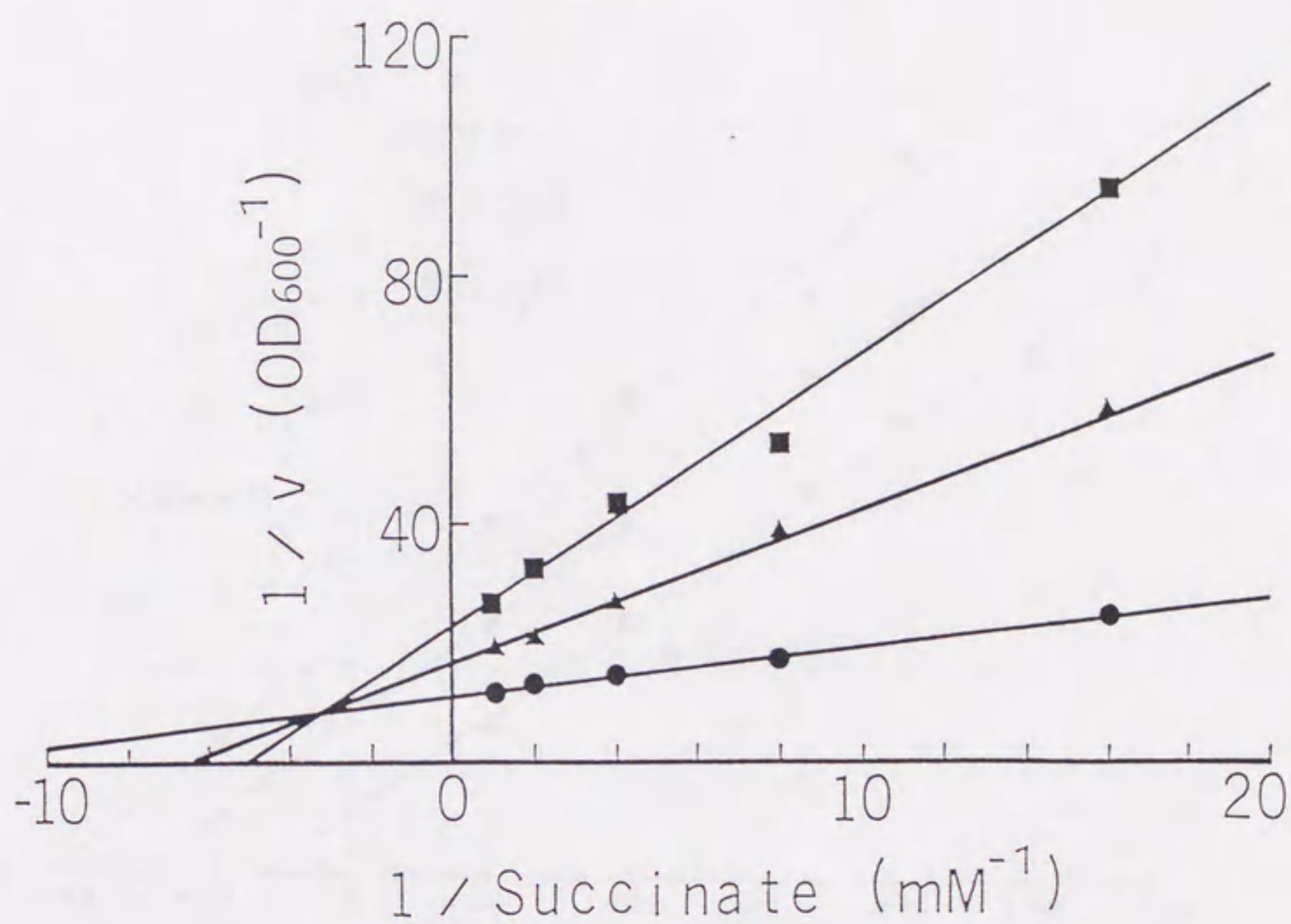


Fig. 65. Lineweaver-Burk plots of the inhibition of succinate-DCPIP reductase of *Rhizoctonia solani* mitochondria by carboxin with variable concentration of succinate.

●, Control; ▲, 0.3  $\mu\text{M}$  Carboxin; ■, 0.6  $\mu\text{M}$  Carboxin.



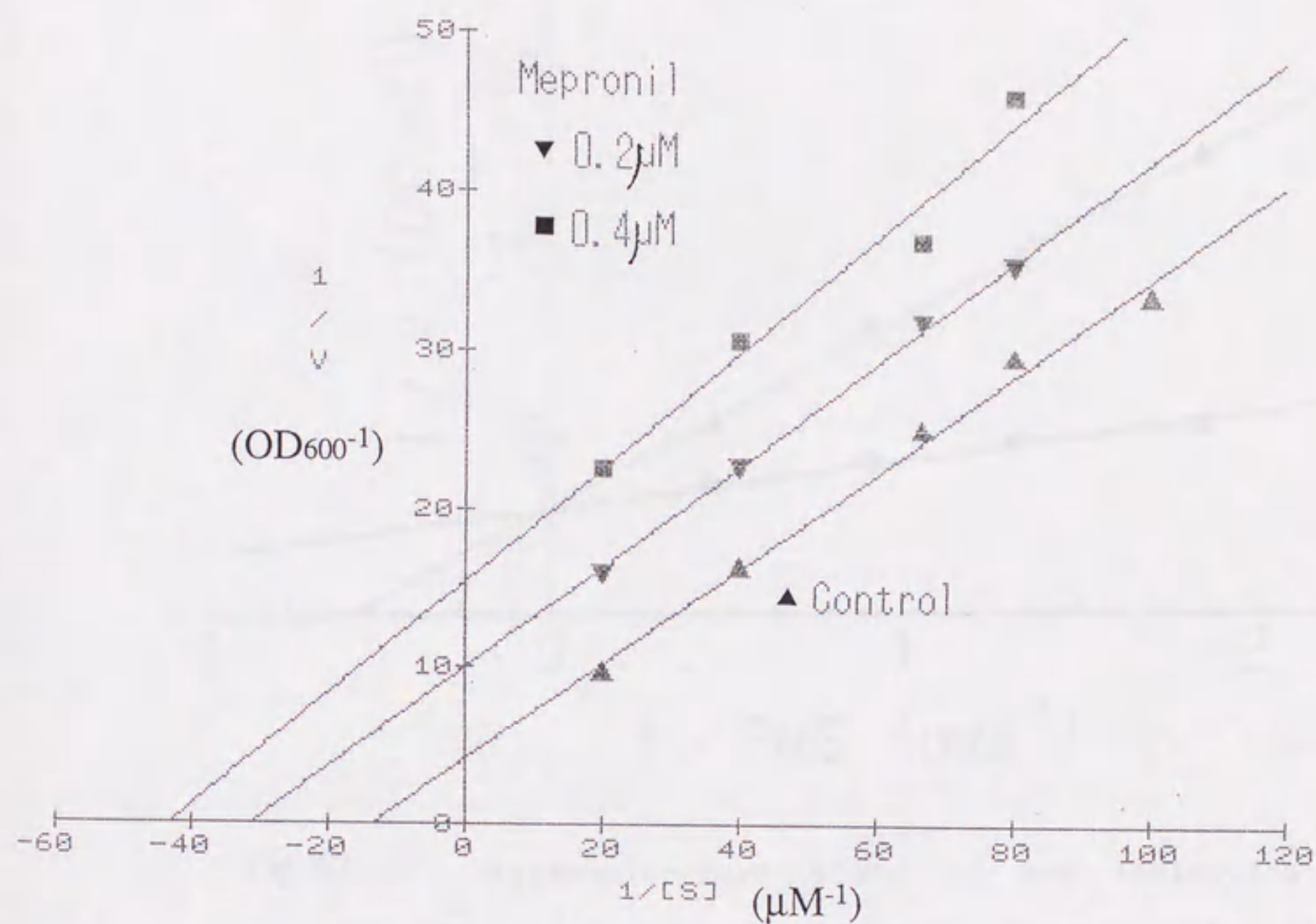


Fig. 66. Lineweaver-Burk plots of the inhibition of succinate-DCPIP reductase of *Rhizoctonia solani* mitochondria by mepronil with variable concentration of DCPIP.



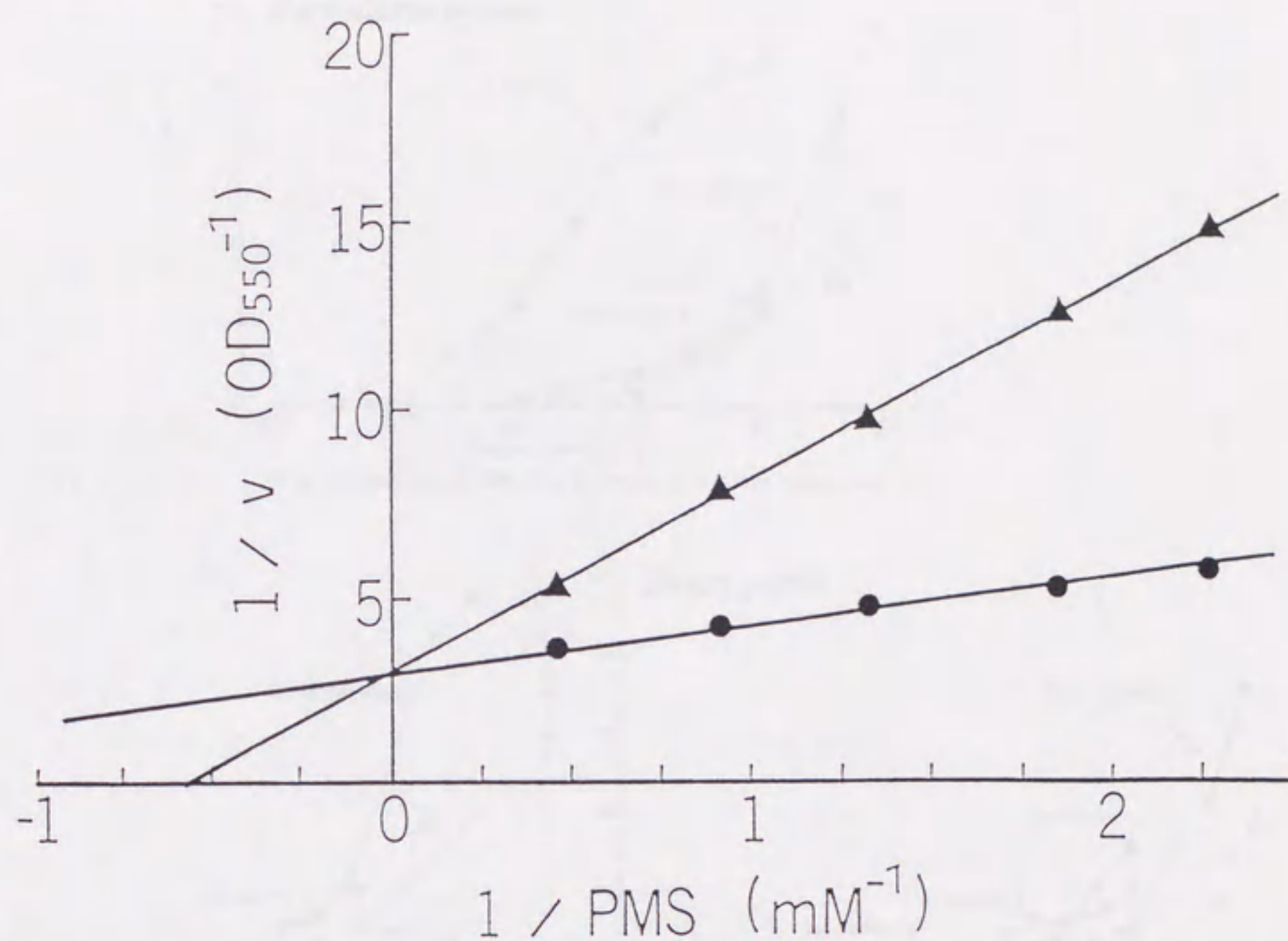


Fig. 67. Lineweaver-Burk plots of the inhibition of succinate-PMS-cytochrome c reductase by mepronil with respect to phenazine methosulfate.

●, Control; ▲, 100  $\mu\text{M}$  Mepronil.



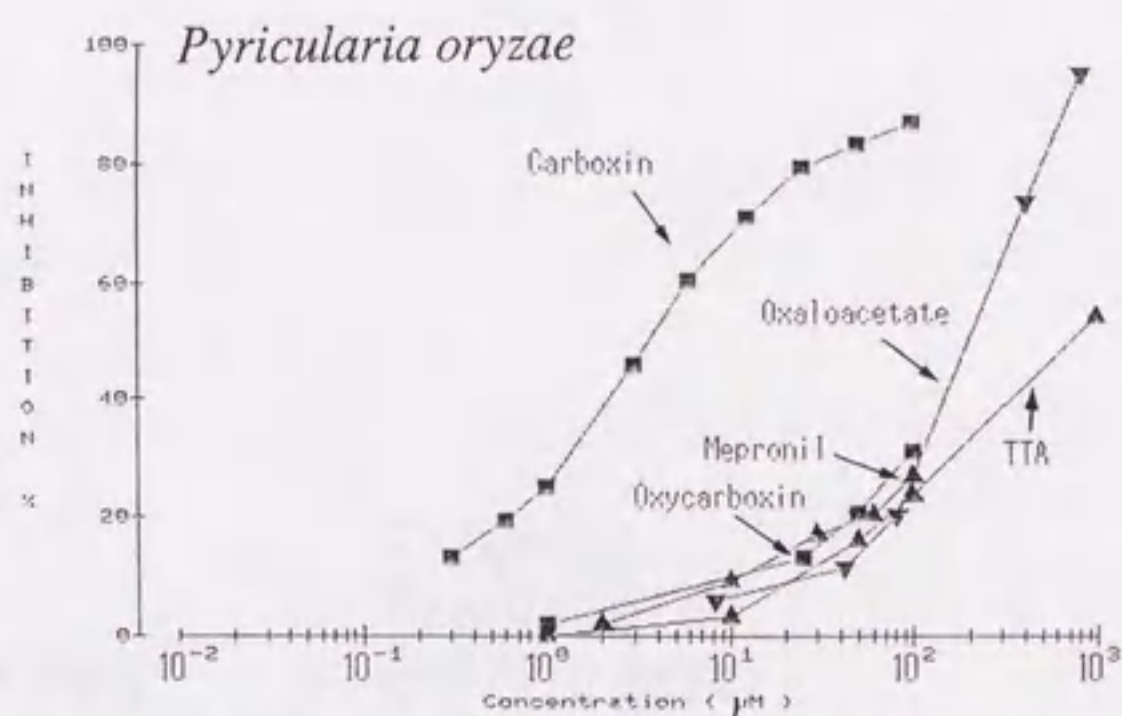
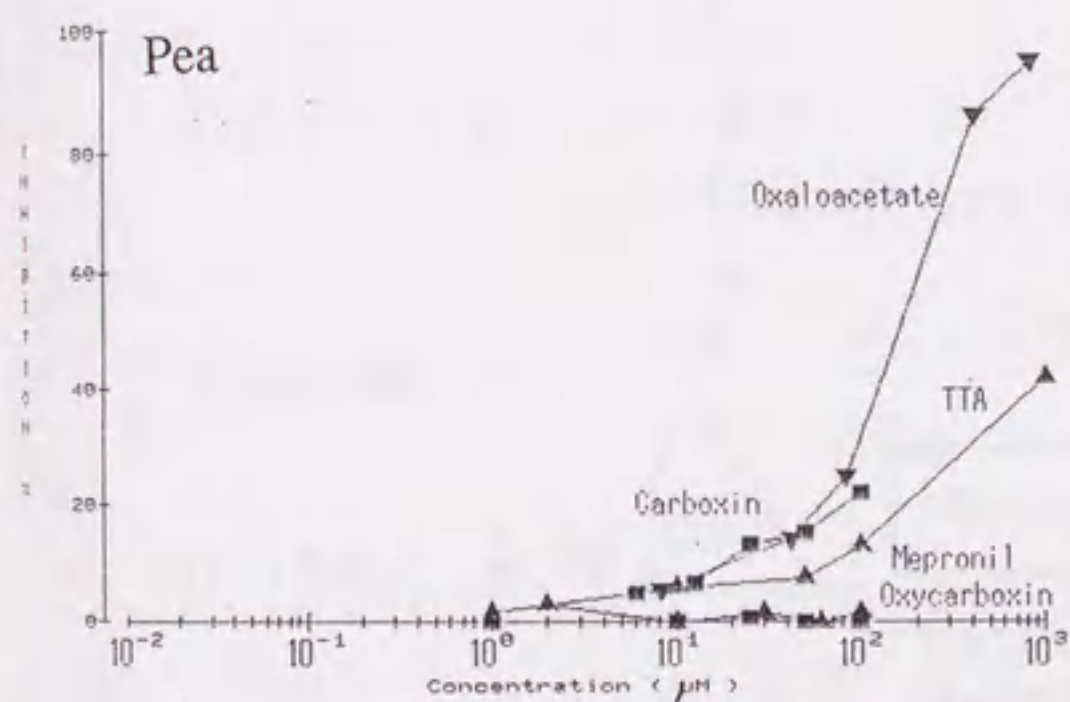
Fig. Inhibition of SDH from *P. oryzae* by various compounds

Fig. Inhibition of SDH from Pea by various compounds

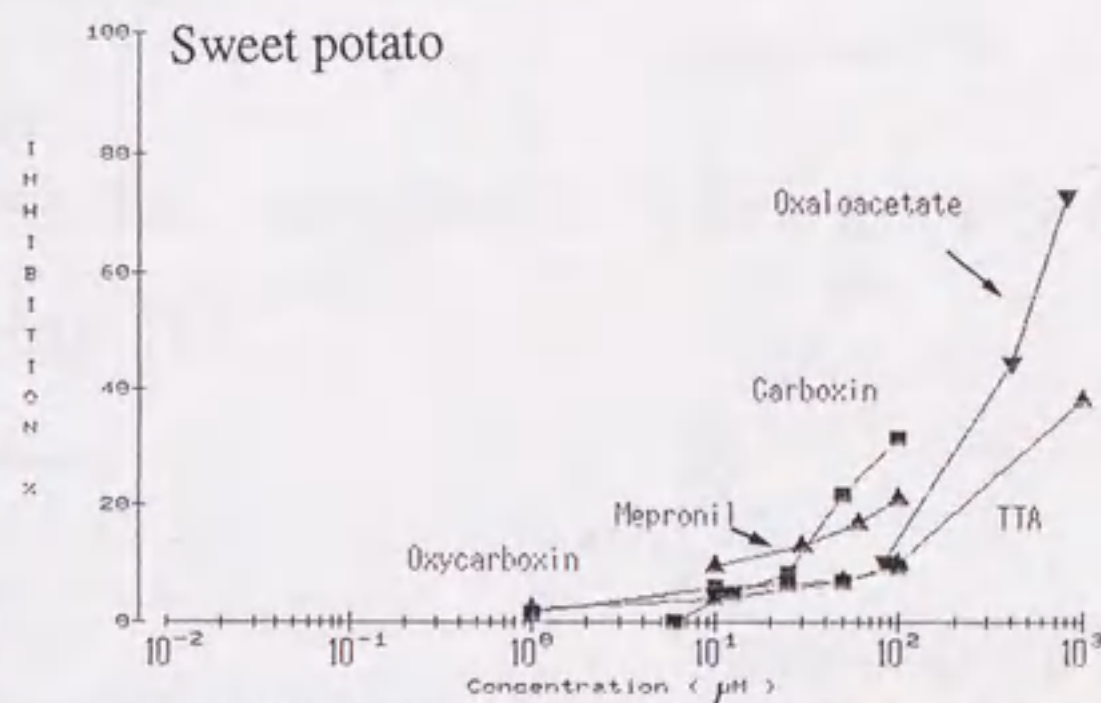


Fig. Inhibition of SDH from sweet potato by various compounds

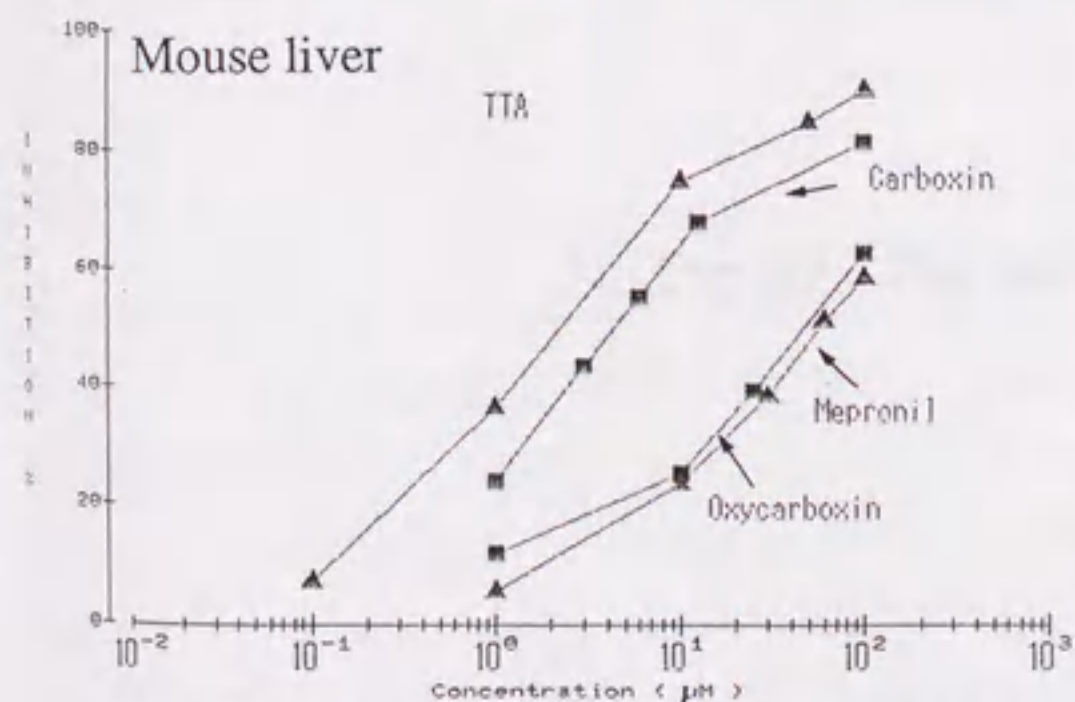


Fig. Inhibition of SDH from mouse liver by various compounds

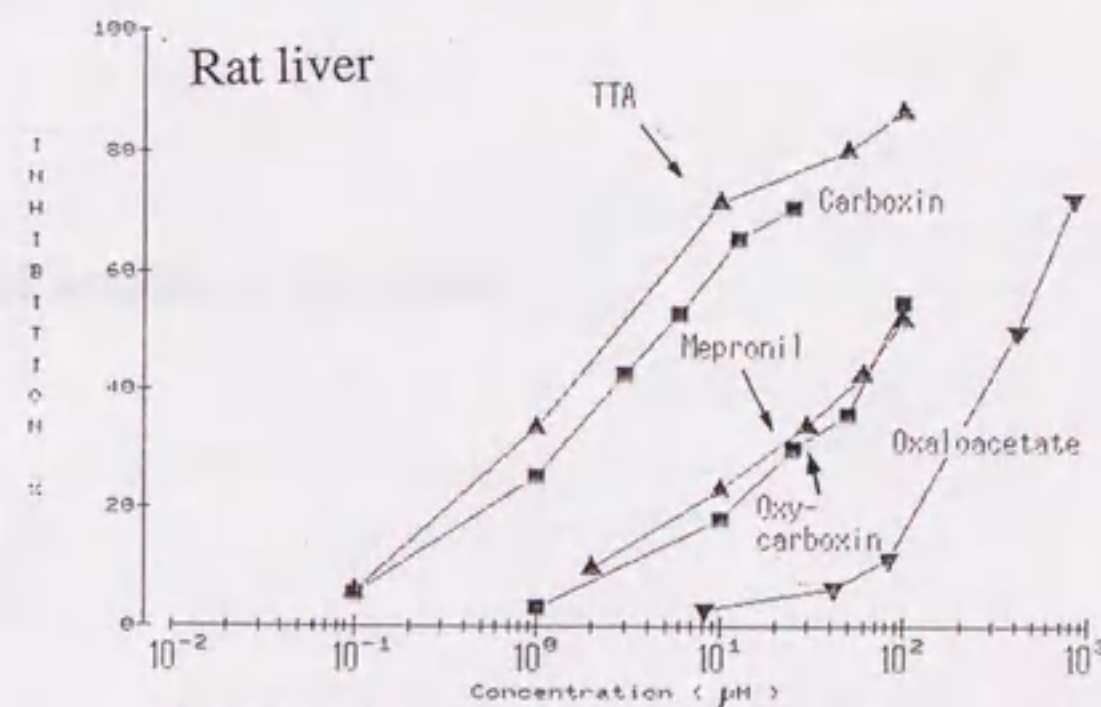


Fig. Inhibition of SDH from rat liver by various compounds

Fig. 68. Inhibitions of succinate-DCPIP reductase activities of fungi, plants and animals by various SDH inhibitors.



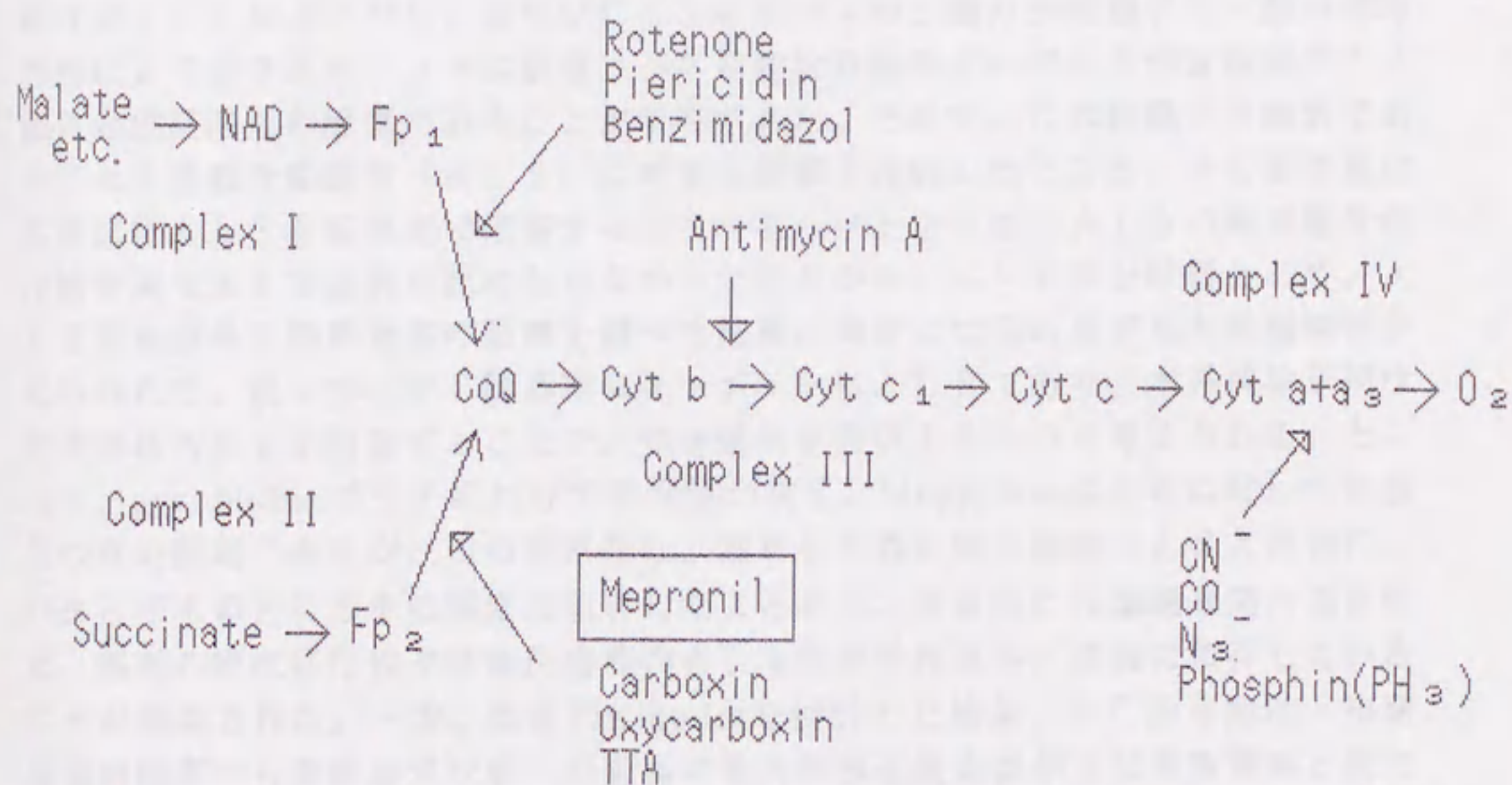


Fig. 69. The site of action of mepronil.



## 要約および総合考察

現在開発が進行しているピリミジニルカルボキシ (P C) 除草剤 (代表薬剤は棉用除草剤の pyriithiobac-sodium (商品名 Staple) およびイネ用除草剤の bispyribac-sodium ならびに pyriminobac-methyl) と上市に至った農業用殺菌剤の mepronil (商品名 Basitac) の作用機構を、主に酵素阻害の観点から検討した結果、ターゲット酵素の性質を含めて以下のような点が明らかとなった。

P C 除草剤の作用機構: P C 除草剤により阻害されたイネの生育とクロレラの増殖はロイシンおよびバリンならびにイソロイシンの3種の分岐鎖アミノ酸の同時添加によりドラスティックに回復し、本系統除草剤のターゲットが分岐鎖アミノ酸生合成経路上の酵素であることが示唆された。そこで、この経路上の酵素であるアセト乳酸合成酵素 (A L S) に対する影響を検討したところ、P C 除草剤は各種植物 A L S を低濃度で阻害することが明らかとなった。A L S の薬剤感受性は植物間で大きな差異は認められなかったことから、エンドウを材料として、A L S 阻害効果と除草効果の相関を調べた結果、両者には低いながらも相関関係が認められた。従って、P C 除草剤のターゲットは A L S であり、本系統除草剤は特異的に A L S を阻害することで、殺草効果を発現するものと考えられる。ところで、pyriithiobac はワタに対して安全性が高く、bispyribac はイネに対して安全性の高い薬剤であるが、この両薬剤は、雑草を含めた他の植物 A L S と同様に、ワタとイネの A L S を低濃度で阻害したことから、両薬剤の作物雑草間の選択性は、薬剤の吸収移行性や解毒代謝等の A L S の感受性以外の要因に依存していることが示唆された。一方、阻害の Kinetics を検討した結果、P C 除草剤は、初期状態の阻害から最終定常状態への阻害の最大転移速度定数が S U 系除草剤と同じような値 ( $0.069 \text{ min}^{-1}$ ) をとる A L S の slow-binding 阻害剤であり、40 分間反応での阻害形式は、スルホニルウレア (S U) 系除草剤と同様に、ピルビン酸に対して混合型で、不拮抗型のイミダゾリノン (I M I) 系除草剤や部分拮抗型の分岐鎖アミノ酸とは異なった。大腸菌とサルモネラ菌のアイソザイム I ならびにシュードモナス菌 A L S を使用した場合にも、P C 除草剤は S U 系除草剤と同じ阻害形式を示した。この結果、P C 除草剤は S U 系除草剤タイプの A L S 阻害剤であり I M I 系タイプの除草剤やフィードバック阻害剤とは区別できるものと考えられた。そこで、P C 除草剤 ( $[^{14}\text{C}]$ -pyriithiobac) と A L S とのバインディングに対する S U 系除草剤の影響を調べたところ、拮抗作用が認められ、両剤の A L S 上での結合部位は同一であることが判明した。一方、slow-binding 阻害をさらに詳しく解析するために、 $[^{14}\text{C}]$ -bispyribac と A L S のバインディングと slow-binding 阻害の関係を調べた結果、最終定常状態での解離定数 ( $K_d$  値) が初期状態の阻害定数 ( $K_{ii}$  値) とほぼ同じであったことから、P C 除草剤の真の阻害定数は初期状態時の阻害定数であり、slow-binding 阻害というのは見かけだけの現



象である可能性が強くなった。即ち、阻害剤とALSの結合は経時的には変化せず、阻害剤の結合により、ALSは触媒活性の低い型へと転移するものと考えられる。また、PC除草剤が有するカルボキシル基とALS阻害能の関係を調べたところ、遊離のカルボキシル基がALS阻害効果発現のためには必須であることが明らかとなり、PC除草剤は構造的な面からはIMI系除草剤に類似していることが示唆された。以上を、サルモネラアイソザイムIIを使用した試験では、同系統の薬剤であっても薬剤間で阻害形式が異なることを考慮すると次のようにまとめることができる。PC除草剤は、SU系除草剤と同様に、触媒部位が存在するサブユニットの活性部位近傍（ピルビン酸やチアミンピロリン酸と拮抗する部位ではない）に結合することで、ALSを経時的に触媒活性の低い型へと変化させる。この結合部位はIMI系除草剤とは少し異なっているだけでなく、同タイプの薬剤でも薬剤毎に少しずつ相違している。そして、PC除草剤がALS阻害能を発揮するためにはIMI系除草剤と同様に骨格中の遊離カルボン酸が必須である。即ち、PC除草剤はSU系除草剤とIMI系除草剤のハイブリッドとでも言うべきALS阻害剤だと結論される。

以上のように作用機構検討からPC除草剤のALS阻害剤としての特性が明瞭になったが、この過程で、植物ALSとバクテリアALSに関する性質に関して以下の新知見が明らかとなった。

植物ALS：エンドウ黄化幼植物茎葉からALSを部分精製したところ、分子量が32万の分子種と12万の分子種の2種のALSが検出された。12万の分子種は32万の分子種とは対照的に分岐鎖アミノ酸阻害に対して非感受性であったが、精製中に12万の分子種が32万の分子種から生成していることが示唆されたことから、12万の分子種は32万の分子種から、制御中心がはずれたものと判断された。従って、エンドウ黄化幼植物茎葉中のALSは1種でありアイソザイムは存在しないものと考えられる。このエンドウALSは、植物ALSに関してこれまでに報告されていないか、あるいはこれまでの報告とは対照的な次のような性質を示した。(I)基質である2分子のピルビン酸の間には協同性が認められない(Hill係数が1)、(II)分岐鎖アミノ酸によるフィードバック阻害は負の協同性を示す、(III)バリンによる阻害とイソロイシンによる阻害は拮抗的である、(IV)分岐鎖アミノ酸による阻害の阻害形式はピルビン酸濃度に依存して変化する、(V)分岐鎖アミノ酸によるフィードバック阻害はSH基阻害剤やATPにより脱感作されない。これらのエンドウALSの酵素的性質はオオムギALSで報告されている性質とはかなり相違しており、ALSの性質は植物間でかなり異なるものと考えられる。

バクテリアALS：従来、基質特異性の類似性から、サルモネラ菌のALSアイソザイムIIが植物ALSに最も良く似た細菌ALSであると考えられてきたが、ALS阻害剤の結合部位に関してはむしろシュードモナス菌ALSが植物に類似することが示唆された。アイソザイムIIはフィードバック阻害に非感受的である



という面で植物ALSとは異なっていることも併せて判断すると、アイソザイムIIは活性部位以外は植物ALSとは大きく相違しているものと考えられる。一方、アイソザイムIは、アイソザイムIIとは対照的に活性部位が植物ALSと異なっていることが明らかにされているが、本研究において、ALS阻害剤に対する感受性の面でも植物ALSとは異なることが明確となった。従って、ALS阻害剤の結合部位に関しては、バクテリアのALSアイソザイムIとIIは植物ALSとかなり異なっているものと判断される。

Mepronilの作用機構：Mepronilは電子伝達系の中でもコハク酸を基質とする複合体IIを選択的に阻害し、複合体I、III、IVにはほとんど影響を与えなかった。Mepronilがターゲットとする複合体IIの正体はコハク酸脱水素酵素（SDH）であり、イネ紋枯病菌のSDHに対する阻害効果はcarboxinよりも少し強いものであった。Mepronilのコハク酸脱水素阻害効果は、イネ紋枯病菌に対して選択的であり、ラットおよびマウスのSDHに対する阻害効果はcarboxinに比べてかなり弱いことが特筆された。即ち、mepronilは選択毒性の面でcarboxinよりもさらに優れた性質を有する薬剤であると考えられる。一方、SDH上のmepronilの結合部位は、Kineticsの結果から判断して、carboxinと同じ部位であり、コハク酸やDCPIPの結合部位とは異なり、PMSと競争する部位であると考えられた。また、PMSはSDH上の2つの部位から電子を受け取ることが知られているが、mepronilはこの2つの部位の中でもミトコンドリアからの可溶化により失活する部位に結合することが示唆された。PMSは実質的な電子受容体であるコエンザイムQの代替物であると考え、これらの結果はmepronilのSDH上での結合部位がミトコンドリア内膜に組み込まれたSDHとコエンザイムQの接点部位近傍であることを示唆するものであった。Mepronilはキレート剤として作用するものと仮定すると、本剤はイネ紋枯病菌のSDHタンパクの高次構造を特異的に認識して結合した後、その骨格中のアミド結合の窒素原子とイソプロポキシル基の酸素原子で鉄原子をキレートすることで酸化還元反応を阻害しているのではないかと推測される。

一方、標準的な調製法を少し改良することにより、従来、困難と考えられていたイネ紋枯病菌から、呼吸鎖電子伝達系活性を保持したミトコンドリアの調製が可能となった。そこで、mepronilの作用機構検討と並行してイネ紋枯病菌SDHの酵素的諸性質を検討した結果、同じ担子菌類に属すトウモロコシ黒穂病菌SDHと極めて良く似た性質を有することが明らかとなった。

以上、PC除草剤と殺菌剤mepronilの作用機構を明らかにしたが、mepronilに関しては、本剤が市販に至ってから作用機構解析に取り掛かったため、酵素阻害を指標にした *in vitro* の薬剤スクリーニングは本剤の研究開発には役立っていない。しかしながら、作用機構を詳しく解析することにより、本剤は既存のSDH



阻害剤よりも優れた選択性毒性を有する薬剤であることが明らかとなった。この結果は、植物病原菌のSDHが殺菌剤の選択的なターゲットとなり得ることを明示しただけでなく、この酵素を標的とする安全性の高い他の農薬の合成展開の可能性を示唆した。現在、mepiconilで得られた知見を基にして、呼吸鎖電子伝達系を利用した *in vitro* での薬剤スクリーニングを行なっているが、この中から mepiconil とは大きく構造の異なる殺菌活性化合物や殺虫活性化合物が見い出されつつある。また、このスクリーニング系を応用することで、諸論で述べた、メトキシアクリル酸系殺菌剤が、防除対象とする植物病原菌とは乳動物および魚の間のターゲット（チトクロムbc<sub>1</sub>複合体）の微妙な薬剤感受性の差を利用した薬剤であることも示唆できるようになった。即ち、mepiconilの作用機構を詳細に検討した本研究は、mepiconilの安全性を生化学的な面から科学的に証明したとともに、緒論で述べた理想とされる農薬の研究開発に対して有益な知見を提供したものだと考えられる。

一方、PC除草剤の作用機構に関しては、除草効果試験と並行して、研究段階から取り組み、そのターゲットが分岐鎖アミノ酸生合成経路上のALSであることを初期の段階で明らかにした。ロイシンおよびバリンならびにイソロイシン等の分岐鎖アミノ酸はいわゆる必須アミノ酸であり(222,223)、ほ乳動物には分岐鎖アミノ酸の生合成経路が存在しないことは、即ち、PC除草剤は人間に対して安全性の高い薬剤であることを確約した。この知見が、未だに高活性化合物が得られていなかった研究初期の段階で明らかになったことの意味は大きく、ALSが、当時では新しいターゲットであったことと並んで、合成研究の活性化に果たした役割は大きかったと考える。そして、この後、除草効果試験と並行して、3000以上の化合物の酵素阻害が検討される中から上記の有望化合物が選別された。また、さらにこれと併せて行なった酵素阻害のKinetics、ならびに薬剤と酵素との相互作用から、本系統除草剤がALS上の広義でのアロステリック部位に結合することでALSを触媒活性の低い型へと変化させることが明らかとなり、本系統除草剤は安全性の面で優れているだけでなく、酵素阻害のメカニズムの観点からも農薬として優れた薬剤であることが明らかとなった。除草剤の結合による酵素の自己分解という現象は、農薬の分野だけでなく、酵素阻害剤全般の中でも注目すべきものであると考えられる。このように、本研究は生化学的な側面からPC除草剤の安全性および高い除草効果の要因を科学的に解明したものであり、既存のALS阻害型除草剤の中に、これらとは異なった骨格を有するPC除草剤が仲間入りしたことは、新しい安全性の高い除草剤の今後の研究開発に強いインパクトを与えるものと考えられる。

なお、動物と植物の間の選択毒性だけでなく、作物と雑草間の選択毒性（選択性）は除草剤科学の中では重要事項の一つであり、第1章の第7節で述べた複合酸化酵素系に関する手法を援用して、この点を薬剤の酸化代謝の観点から解析していくことが今後の課題と考える。



## 引用文献

1. レイチェル・カーソン (青樹梁一訳), 「沈黙の春 (生と死の妙薬)」, 新潮文庫, 1974.
2. 水野肇, 「農薬亡国論 (一億人の人体実験)」, 講談社ブルーバックス, 1966.
3. 有吉佐和子, 「複合汚染 (上、下)」, 新潮社単行本, 1975.
4. 河野修一郎, 「日本農薬事情」, 岩波新書, 1993.
5. 朝日新聞社, 崩れる農薬の安全神話, 朝日新聞朝刊, 1994年3月13日.
6. 社団法人日本植物防疫協会, 「農薬を使用しないで栽培した場合の病害虫等の被害に関する調査報告」, 日本植物防疫協会, 1993.
7. S.Matsunaka, "Proc. 11th APWSS-Conf.", p.357, 1987.
8. 竹内安智, 日本農芸化学会誌, **63**, 1618 (1989).
9. 吉田茂男, 植物の化学調節, **29**, 15 (1994).
10. 岸田満浩, 日野智和, 日本農芸化学会誌, **63**, 1640 (1989).
11. J.D.Burton, J.W.Gronwald, D.A.Sömers, B.G.Gengenbach and D.L.Wyse, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **34**, 76 (1989).
12. 佐々木幸子, 小西智一, 化学と生物, **32**, 494 (1994).
13. 若林功, 植物防疫, **43**, 575 (1989).
14. T.Shimizu, N.Hashimoto, I.Nakayama, T.Nakao, H.Mizutani, T.Unai, M.Yamaguchi and H.Abe, *Plant Cell Physiol.*, **36** (4) in press (1995).
15. P.M.Bramley and K.E.Pallett, Brighton Crop Protection Conference -Weed, p.713, 1993.
16. 清水力, 関東雑草研究会会報, **4**, 11 (1993).
17. 馬場正紀, 縄巻勤, 日本農芸化学会誌, **63**, 1630 (1989).
18. K.J.Kunert and A.Dodge, "Target Sites of Herbicide Action", ed. by P.Böger and G.Sandman, p.45, 1989.
19. R.J.Rukens and H.D.Sisler, *Phytopathology*, **48**, 179 (1958).
20. P.G.Vincent and H.D.Sisler, *Physiologia Plantarum*, **21**, 1249 (1968).
21. M.Ruda, T.Nakajima, H.Kasugai, S.Kawada, I.Yamaguchi and T.Misato, *J. Pestic Sci.*, **1**, 101 (1976).
22. 徳永幸雄, 井上淳, 伊東茂寿, 境潤悦, 山路孝二, 日本農薬学会第18回大会講演要旨集, p.62, 1993.
23. 清水力, 橋本尚也, 中尾徹, 阿部洋, 徳永幸雄, 山路孝二, 林茂, 日本植物病理学会大会講演要旨集, p.147, 1991.
24. D.E.Mathre, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **1**, 216 (1971).
25. Z.Guo, H.Miyoshi, T.Komyoji, T.Haga and T.Fujita, *Biochim. Biophys. Acta*, **1056**, 89 (1991).
26. K.Beautement, J.M.Clough, P.J.de Fraine and C.R.A.Godfrey, *Pestic. Sci.*, **31**, 499 (1991).



28. 鈴木直治,「農薬の生理作用 (Action Mechanism of Pesticides)」, 南江堂, p.97, 1976.
29. D.J.Fisher and A.L.Hayes, *Pestic. Sci.*, **13**, 330 (1982).
30. O.Kodama, H.Yamada and T.Akatsuka, *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1719 (1979).
20. O.Kodama, K.Yamashita and T.Akatsuka, *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1015 (1980).
32. P.R.Binks, G.D.Robson, M.W.Goosey and A.P.J.Trinci, *J. General Microbiol.*, **139**, 1371 (1993).
33. 高野仁孝,加藤寿郎, 植物防疫, **42**, 408 (1988).
34. M.Hori and K.Kakiki, *J. Pestic. Sci.*, **2**, 345 (1977).
35. C.P.Woloshuk and H.D.Sisler, *J. Pestic. Sci.*, **7**, 161 (1982).
36. 藤村真, 植物防疫, **47**, 222 (1993).
37. N.Asano, T.Yamaguchi, Y.Kameda and K.Matsui, *J. Antibiotics*, **XL**, 526 (1987).
38. I.Miura, T.Kamakura, S.Maeno, S.Hayashi and I.Yamaguchi, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **48**, 222 (1994).
39. I.Miura, T.Kamakura, S.Maeno, T.Nagata, S.Hayashi and I.Yamaguchi, *J. Pestic. Sci.*, **19**, 103 (1994).
40. 山口勇,関沢泰治, 植物防疫, **47**, 218 (1993).
41. Y.Yagura, T.Kirinuki and S.Matsunaka, *J. Pestic. Sci.*, **9**, 425 (1984).
42. T.Okuno, I.Furusawa, K.Matsuura and J.Shishiyama, *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **55**, 281 (1989).
43. A.B.Orth, A.Sfarra, E.J.Pell and M.Tien, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **44**, 91 (1992).
44. S.Takahashi, S.Shigematsu, A.Morita, M.Nezu, J.S.Claus and C.S.Williams, Brighton Crop Protection Conference-Weeds, p.57, 1991.
45. R.Hanai, K.Kawano, S.Shigematsu and M.Tamaru, Brighton Crop Protection Conference-Weeds, p.47, 1993.
46. M.Yokoyama, O.Watanabe, K.Kawano, S.Shigematsu and N.Wada, Brighton Crop Protection Conference-Weeds, p.61, 1993.
47. S.Kawada, A.Sakamoto and I.Shimazaki, *J. Pestic. Sci.*, **10**, 315 (1985).
48. 横山優,高橋智,宮沢武重,重松昭二,斉藤芳宏,根津征夫, 雑草研究, **37** (別), 30 (1992).
49. 横山優,渡辺修,柳沢克忠,和田信英,重松昭二, 雑草研究, **39** (別), 30 (1994).
50. 花井涼,小川安則,田丸雅敏,重松昭二, 雑草研究, **39** (別), 34 (1994).
51. 安馬勝男, 農薬通信, **124**, 9 (1986).
52. 西岡康浩, 生態化学, **5**, 9 (1983).
53. T.B.Ray, *Plant Physiol.*, **75**, 827 (1984).
54. D.L.Shaner, P.C.Anderson and M.A.Stidham, *Plant Physiol.*, **76**, 545 (1984).
55. Gerwick,B.C., M.V.Subramanian and V.I.L.Gallant, *Pestic. Sci.* **29**, 257, 1990.
56. B.J.Mifflin, *Plant Physiol.*, **54**, 550 (1974)
57. B.K.Singh and G.K.Schmitt, *FEBS*, **258**, 113 (1989).
58. J.Durner and P.Böger, *Plant Physiol.*, **93**, 1027 (1990).



59. J.Durner and P.Böger, *Z. Naturforsch.*, **43c**, 850 (1988).
60. B.K.Singh, A.Lumanglas and B.S.Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 4572 (1991).
61. R.S.Shaleff and N.F.Bascomb, *Mol. Gen. Genet.*, **210**, 33 (1987).
62. P.A.Wiersma, M.G.Schmiemann, J.A.Condie, W.L.Crosby and M.M.Moloney, *Mol. Gen. Genet.*, **219**, 413 (1989).
63. B.K.Singh, I.Szamosi, J.M.Hand and R.Misra, *Plant Physiol.*, **99**, 812 (1992).
64. M.V.Subramanian and B.C.Gerwick, *ACS Symp. Ser.*, **389**, 277 (1989).
65. J.Durner, V.Gailus and P.Böger, *Plant Physiol.*, **95**, 1144 (1991).
66. R.A.Larossa and J.V.Schloss, *J. Biol. Chem.*, **259**, 8753 (1984).
67. M.J.Muhitch, D.L.Shaner and M.A.Stidham, *Plant Physiol.*, **83**, 451 (1987).
68. R.C.Wek, C.A.Hauser and G.W.Hatfield, *Nucleic Acids Res.*, **13**, 1995 (1985).
69. C.H.Squires, M.DeFelice, J.Derereux and J.M.Calvo, *ibid.*, **11**, 5299 (1983).
70. J.V.Schloss, D.E.Van Dyk, J.F.Vasta and R.M.Kutny, *Biochemistry*, **24**, 4952 (1985).
71. D.M.Chipman, N.Gollop, B.Damri and Z.Barak, "Biosynthesis of Branched Chain Amino Acids", ed. by Z.Barak, D.M.Chipman and J.V.Schloss, p.243, 1990.
72. C.Poulsen and P.Stougaard, *Eur. J. Biochem.*, **185**, 433 (1989).
73. H.Grimmiger and H.E.Umbarger, *J. Bacteriol.*, **137**, 846 (1979).
74. J.P.O'Neill and M.Freundlich, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **48**, 437 (1972).
75. P.T.Magee and H.D.R-Szulmajester, *Eur. J. Biochem.*, **3**, 507 (1968).
76. B.J.Mifflin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **146**, 542 (1971).
77. B.J.Mifflin and P.R.Cave, *J. Experimental Botany*, **23**, 511 (1972).
78. J.V.Schloss, L.M.Ciskanit and D.E.Van Dyk, *Nature*, **331**, 360 (1988).
79. C.Grabau and J.E.Cronan Jr, *Nucleic Acids Res.*, **14**, 5449 (1986).
80. P.B.Sweeter, G.S.Schow and J.H.Hutchison, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **17**, 18 (1982).
81. J.M.Hutchison, R.Shapiro and P.B.Sweeter, *ibid.*, **22**, 243 (1984).
82. J.J.Anderson, T.M.Priester and L.M.Shalaby, *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1429 (1989).
83. S.Takeda, D.L.Erebes, P.B.Sweeter, J.V.Ha and T.Yuyama, *Weed Res. Japan*, **32**, 157 (1986).
84. 吉井博, 坂下信幸, 木村史雄, *雑草研究*, **35** (別), 109 (1990).
85. S.Neighbors and L.S.Privalle, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **37**, 145 (1990).
86. R.F.Pfister, J.Gaudin, K.Kreuz, K.Ramsteiner and E.Ebert, *ibid.*, **37**, 165 (1990).
87. J.C.Hall, C.J.Swanton and M.D.Devine, *ibid.*, **42**, 188 (1992).
88. 神園博史, 坂本順子, 田代茂喜, 吉川治利, 日本農薬学会第19回大会講演要旨集, p.87, 1994.
89. M.A.Brown, T.Y.Chui and P.Miller, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **27**, 24 (1987).
90. H.M.Brown and S.M.Neighbors, *ibid.*, **29**, 112 (1987).
91. H.M.Brown, V.A.Wittenbach, D.R.Forney and S.D.Strachan, *ibid.*, **37**, 303 (1990).
92. H.M.Brown, *Pestic.Sci.*, **29**, 263 (1990).
93. M.Barrett, "Crop Safeners for Herbicides", ed. by K.K.Hatzios and R.E.Hoagland, p.195,



1989.

94. R.F.Pfister, J.Gaudin, K.Krenz, K.Ramsteiner and E.Ebert, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **37**, 165 (1990).
95. D.S.Frear, H.R.Swanson and F.W.Thalacher, *ibid.*, **41**, 274 (1991).
96. G.L.Lamoureux and D.G.Rusness, *ibid.*, **42**, 128 (1992).
97. J.M.Matthews, J.A.M.Holtum, D.R.Liljegren, B.Furness and S.B.Powles, *Plant Physiol.*, **94**, 1180 (1990).
98. J.C.Cotterman and L.L.Saari, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **43**, 182 (1992).
99. M.V.Subramanian, H.Y.Hung, J.M.Dias, V.W.Miner, J.H.Butler and J.J.Jachetta, *Plant Physiol.*, **94**, 139 (1990).
100. D.Scheel and J.E.Casida, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **23**, 398 (1985).
101. K.Usui, S.Suwanwong, H.Watanabe and K.Ishizuka, *Weed Res. Japan*, **36**, 126 (1991).
102. D.Scheel and J.E.Casida, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **23**, 398 (1985).
103. D.L.Shaner, M.Stidham, M.J.Muhitch, M.Reider and P.Robson, "Brighton Crop Protection Conference - Weed", p.147, 1985.
104. P.Spönnemann, H.Köcher and F.Wengenmayer, *FEBS Lett.*, **238**, 375 (1988).
105. A.Aulabaugh and J.V.Schloss, *Biochemistry*, **29**, 2824 (1990).
106. A.Watanabe, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **6**, 283 (1960).
107. C.I.Bliss, *Ann. Appl. Biol.*, **22**, 14 (1935).
108. T.Satyanarayana and A.N.Radhakrishnan, *Biochim. Biophys. Acta*, **110**, 380 (1965).
109. L.O.Krampits, "Methods in Enzymology", ed. by S.P.Colowick and N.O.Kaplan, Vol.3, Academic Press, New York, p.277, 1957.
110. T.Trebst, "Methods in Enzymology", ed. by A.S.Pietro, Vol.24, Academic Press, New York/London, p.146, 1972.
111. C.L.Comer and F.P.Zscheile, *Plant Physiol.*, **17**, 198 (1942).
112. J.J.Bäumer and H.Becher, *Z. Pflanzenphysiol.*, **110**, 107 (1983).
113. R.A.Larossa and D.R.Smulski, *J. Bacteriol.*, **160**, 391 (1984).
114. R.A.Larossa, T.K.V.Dyk and D.R.Smulski, *ibid.*, **169**, 1372 (1987).
115. J.V.Schloss, *Pestic. Sci.*, **29**, 283 (1990).
116. D.L.Shaner and M.L.Reider, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **25**, 248 (1986).
117. D.L.Shaner, B.K.Singh and M.A.Stidham, *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1279 (1990).
118. D.L.Shaner and B.K.Singh, *Plant Physiol.*, **97**, 1339 (1991).
119. J.L.Huppatz and J.E.Casida, *Z. Naturforsch.*, **40c**, 652 (1985).
120. M.V.Subramanian, V.L-Gallant, J.M.Dias and L.C.Mireles, *Plant Physiol.*, **96**, 310 (1991).
121. 市原清志,「統計集中講座」, (株)日本卒後教育センター, p.85, 1986.
122. 米山弘一,一前宣正,竹松哲夫,植物の化学調節, **19**, 110 (1984).
123. M.D.Felice, C.Squires and M.Levinthal, *Biochim. Biophys. Acta*, **541**, 9 (1978).



124. F.I.Cara and M.D.Felice, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **91**, 319 (1979).
125. M.D.Felice and M.Levinthal, *ibid.*, **79**, 82 (1977).
126. M.D.Felice, T.Newman and M.Levinthal, *Biochim. Biophys. Acta*, **541**, 1 (1978).
127. Y.S.Halpern and H.E.Umbarger, *J. Biol. Chem.*, **34**, 3067 (1959).
128. F.C.Stömer, *J. Biol. Chem.*, **243**, 3735 (1968).
129. W.D.Hotzclaw and L.F.Chapman, *J. Bacteriol.*, **121**, 917 (1975).
130. H.Kuwana, D.F.Caroline, R.W.Harding and R.P.Wagner, *Arch. Biochem. Biophys.*, **128**, 184 (1968).
131. R.W.Harding, D.F.Caroline and R.P.Wagner, *ibid.*, **138**, 653 (1970).
132. A.Szentirmai and I.Horva'th, *Acta microbiol. Acad. Sci. hung.*, **16**, 337 (1969).
133. A.Szentirmai, I.Horva'the and J.Zsada'nyi, *ibid.*, **17**, 105 (1970).
134. L.F.Chapman, *Mol. Gen. Genet.*, **117**, 14 (1972).
135. Y.Asada, Y.Okuzawa and K.Yamaguchi, *Biochim. Biophys. Acta*, **429**, 1029 (1976).
136. L.Glatzer, E.Eakin and R.P.Wagner, *J. Bacteriol.*, **112**, 453 (1972).
137. P.T.Magee and H.D.R.Szulmajester, *Eur. J. Biochem.*, **3**, 507 (1968).
138. Y.Oda, Y.Nakano and S.Kitaoka, *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 1211 (1982).
139. D.Landstein, D.M.Chipman, S.M.Arad and Z.Barak, *Plant Physiol.*, **94**, 614 (1990).
140. S.M.Arfin and D.A.Koziell, *Biochim. Biophys. Acta*, **321**, 356 (1973).
141. L.Eoyang and P.M.Silverman, *J. Bacteriol.*, **157**, 184 (1984).
142. T.Satyanarayana and A.N.Radhakrishanan, *Biochim. Biophys. Acta*, **56**, 197 (1962).
143. M.E.Davis, *Plant Physiol.*, **39**, 53 (1964).
144. B.J.Mifflin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **146**, 542 (1971).
145. M.A.Stidham, *Weed. Sci.*, **39**, 428 (1991).
146. M.Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
147. K.Ohba and I.Uritani, "Methods in Enzymology", ed. by W.A.Wood, Vol.90, Academic Press, New York/London, p.528, 1982.
148. W.W.Westerfeld, *J. Biol. Chem.*, **161**, 495 (1945).
149. L.J.Leed and C.R.Willms, "Methods in Enzymology", ed. by W.A.Wood, Vol.9, Academic Press, New York/London, p.247, 1966.
150. M.J.Muhitch, *Plant Physiol.*, **86**, 23 (1988).
151. B.K.Singh, M.A.Stidham and D.L.Shaner, *J. Chromatogr.*, **444**, 251 (1988).
152. S.Takenaka and H.Kuwana, *J. Biochem.*, **72**, 1139 (1972).
153. M.Dixon and E.C.Webb, "Enzymes (3rd ed.)", Longman Group Limited, London, p.332, 1979.
154. J.V.Schloss, "Target Sites of Herbicide Action", ed. by P.Böger and G.Sandmann, CRC Press, Inc., p.165, 1989.
155. 山口明人, 「パーソナルコンピュータによるLAプログラミング技法」, インフォメーションサイエンス, p.69, 1986.



156. 金岡祐一, 代謝, 21, 1005, (1984).
157. S.Cha, *Biochem. Pharmacol.*, 24, 2177 (1975).
158. 本山直樹, 「農薬実験法 (1. 殺虫剤編)」, 深見順一, 上杉康彦, 石塚 造, 長沢長次郎編, p.216, 1981.
159. J.M.Mathews and P.R.O.de Montellano, *Arch. Biochem. Biophys.*, 216, 522 (1982).
160. T.R.Hawkes, "Prospects for amino acid biosynthesis inhibitors in crop protection and pharmaceutical chemistry (BCPC Monograph No.44)", p.131, 1989.
161. T.R.Hawkes and S.E.Thomas, "Biosynthesis of Branched Chain Amino Acids", ed. by Z.Barak, D.M.Chipman and J.V.Schloss, p.373, 1990.
162. 山岡清, 鈴木敬子, *Information*, 5, 36 (1986).
163. K.Yamaoka and T.Nakagawa, *J. Pharm. Dyn.*, 6, 595 (1983).
164. J.W.Williams and J.F.Morrison, "Methods in Enzymology", ed. by D.L.Purich, Vol.63, Academic Press, New York/San Francisco/London, p.449, 1979.
165. N.Mito, R.Sato, M.Miyakoda, H.Oshio and S.Tanaka, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 40, 128 (1991).
166. R.F.Bruns, K.L.Wending and T.A.Pugsley, *Analytical Biochem.*, 132, 74 (1983).
167. 和田信英, 齊藤芳宏, 草野章次, 宮沢武重, 高橋智, 豊川泰文, 梶原郁夫 (クミアイ化学工業株式会社, イハラケミカル工業株式会社), 日本公開特許公報, JP63-115870 (1988).
168. N.Motoyama, G.C.Rock and W.C.Dauterman, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1, 205 (1971).
169. N.Motoyama, L.R.Kao, P.T.Lin and D.W.Dauterman, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 21, 139 (1984).
170. 松下博之, 深井祐司, 右内忠昭, 石川莞爾, 遊佐義男, 日本農薬学会第19回大会講演要旨集, p.127, 1994.
171. D.S.Frear, H.R.Swanson and F.S.Tanaka, *Phytochem.*, 8, 2157 (1969).
172. P.J.Murphy and C.A.West, *Arch. Biochem. Biophys.*, 133, 395 (1969).
173. J.R.M.Potts, R.Wechar and E.E.Conn, *J. Biol. Chem.*, 249, 5019 (1974).
174. C.J.Lamb and P.H.Rubery, *Anal. Biochem.*, 68, 554 (1975).
175. J.P.Salaun, I.Benveniste, D.Reichhart and F.Durst, *Eur. J. Biochem.*, 119, 651 (1981).
176. M.Fujita, K.Ohba and I.Uritani, *Plant Physiol.*, 70, 573 (1982).
177. A.Rahier and M.Taton, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 140, 1064 (1986).
178. R.L.Larson and J.M.Bussard, *Plant Physiol.*, 80, 483 (1986).
179. 今井嘉郎, 佐藤了, 代謝, 19, 1723 (1982).
180. 佐藤了, 「薬物代謝」, 講談社, 1973.
181. J.J.McFadden, D.S.Frear and E.R.Mansager, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 34, 92 (1989).
182. R.Fonne-Pfister, J.Gaudin, K.Kreuz, K.Ramsteiner and E.Ebert, *ibid.*, 37, 165 (1990).
183. A.Topal, N.Adams, W.C.Dauterman, E.Hodgson and S.L.Kelly, *Pestic. Sci.*, 38, 9 (1993).
184. D.E.Moreland, F.T.Corbin and J.E.McFarland, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 47, 206



- (1993).
185. F.W.Thalacker, H.R.Swanson and D.S.Frear, *ibid.*, **49**, 209 (1994).
  186. T.Omura and R.Sato, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370 (1964)
  187. M.Klingenberg, *Arch. Biochem. Biophys.*, **75**, 376 (1958).
  188. B.S.S.Masters, C.H.Williams,Jr and H.Kamin, "Methods in Enzymology", ed. by R.W.Estabrook and M.E.Pullman, Vol.10, Academic Press, New York/London, p.565, 1973.
  189. B.Macklers, *ibid.*, p.551, 1973.
  190. J.L.Vetter, M.P.Steinberg and A.I.Nelson, *Agric. Food. Chem.*, **6**, 39 (1958).
  191. J.Werringloer, "Methods in Enzymology", ed. by S.Fleischer and L.Pacher, Vol.LII, Academic Press, New York/San Francisco/London, p.297, 1978.
  192. C.J.Lamb and P.H.Rubery, *Anal. Biochem.*, **68**, 554 (1975).
  193. F.J.Gonzalez and D.W.Nebert, *Trends in Genet.*, **6**, 182 (1990).
  194. M.Mizutani, E.Ward, J.DiMaio, D.Ohta, J.Ryals and R.Sato, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **190**, 875 (1993).
  195. P.R.Rich and D.S.Bendall, *Eur. J. Biochem.*, **55**, 333 (1975).
  196. Y.Karasaki, K.Ikeuchi and K.Higashi, *J. UOEH (産業医大誌)*, **5**, 329 (1983).
  197. K.Motoba, M.Uchida and E.Tada, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1445 (1988).
  198. T.Ohsumi, K.Tsushima, K.Maeda, S.Inoue and N.Itaya, *J. Pestic. Sci.*, **14**, 229 (1989).
  199. D.E.Mathre, *Phytopath.*, **60**, 671 (1970).
  200. N.N.Ragsdale and H.D.Sisler, *ibid.*, **60**, 1422 (1970).
  201. G.A.White, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **44**, 1212 (1971).
  202. J.T.Ulrich and D.E.Mathre, *J. Bacteriol.*, **110**, 628 (1972).
  203. G.A.White and G.D.Thorn, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **5**, 380 (1975).
  204. P.C.Mowery, D.J.Steenkamp, B.A.C.Ackrell, T.P.Singer and G.A.White, *Arch. Biochem. Biophys.*, **178**, 495 (1977).
  205. G.A.White and G.D.Thorn, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **14**, 26 (1980).
  206. G.A.White, J.N.Phillips, J.L.Huppatz, B.Witizens and S.J.Grant, *ibid.*, **25**, 163 (1986).
  207. G.A.White and S.G.Georgopoulos, *ibid.*, **25**, 188 (1986).
  208. G.A.White, *ibid.*, **27**, 249 (1987).
  209. M.Oda, T.Sakaki, N.Sasaki, H.Nonaka, K.Yamagishi and H.Tomita, *J. Pestic. Sci.*, **18**, 245 (1993).
  210. W.G.Phillips and J.M.Rejda-Heath, *Pestic Sci.*, **38**, 1 (1993).
  211. D.Johnson and H.Lardy, "Methods in Enzymology", ed. by R.W.Estabrook and M.E.Pullman, Vol.X, Academic Press, New York and London, p.94, 1967.
  212. Y.Nawa and T.Asahi, *Plant Cell Physiol.*, **48**, 671 (1971).
  213. J.B.Chappell, *Biochem. J.*, **90**, 225 (1964).



214. T.E.King, "Methods in Enzymology", ed. by R.W.Estabrook and M.E.Pullman, Vol.X, Academic Press, New York and London, p.322, 1967.
215. H.Haraguchi, T.Tanaka, M.Taniguchi, S.Oi and K.Hashimoto, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1453 (1987).
216. T.E.King, "Methods in Enzymology", ed. by R.W.Estabrook and M.E.Pullman, Vol.X, Academic Press, New York/London, p.216, 1967.
217. T.Ramasarma and R.L.Lester, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3309 (1960).
218. A.Guiditta and T.P.Singer, *J. Biol. Chem.*, **234**, 666 (1959).
219. 清水力, 村松憲通, 中尾徹, 阿部洋, 川田晴郷, 日本農薬学会第12回大会講演要旨集, p.84, 1987.
220. R.M.Hollingworth, K.I.Ahammadsahib, G.Gadelhak and J.L.McLaughlin, *Biochem. Society Transaction*, **22**, 230 (1994).
221. 喜谷喜徳, 化学の領域増刊号, **79**, 124 (1967).
222. R.W.Wissler, C.H.Steffee, L.E.Frazier, R.L.Woolridge and E.P.Benditt, *J. Nutr.*, **36**, 245 (1948).
223. W.C.Rose, J.E.Johnson and W.J.Haines, *J. Biol. Chem.*, **182**, 541 (1950).



## 謝辞

本論文を作成するに当たりご尽力下さいました名古屋大学農学部教授 杉山達夫博士ならびにクミアイ化学工業（株）生物科学研究所 石川完爾博士に謹んで感謝の意を表します。また本研究を遂行するに当たり、実験およびデータ解析上でのご協力と貴重なご意見を頂きましたクミアイ化学工業（株）生物科学研究所 主席研究員 中山礎氏および（株）ケイアイ研究所主任研究員 和田信英氏に衷心よりお礼を申し上げます。さらに、研究の推進を常に暖かく見守ってくださったクミアイ化学工業（株）生物科学研究所次長 阿部洋氏および同取締役営業本部企画管理部長 石原英助博士に心よりお礼申し上げます。また、同研究開発部 中尾徹氏および井沢典彦博士には研究を進める上でいろいろとお世話になりました。さらに本研究は、（株）ケイアイ研究所所長 根津征夫氏、同研究員 杉山和彦氏、角康一郎氏およびクミアイ化学工業（株）生物科学研究所 齊藤芳宏氏からの薬剤提供、ならびに同生物科学研究所 笹野ひとみさんの技術的援助があって初めて成立し得たものです。最後に、本研究の端緒となった他社情報を提供下さいました同取締役研究開発本部副本部長 杉山弘成博士、ならびに本論文提出を快諾してくれました同常務取締役研究開発本部長 若森<sup>皇</sup>熙博士および同研究開発部部長松成健二氏ならびに同生物科学研究所所長 下村登志雄氏にお礼申し上げます。



## 報文目録

- 1) Shimizu, T., Nakao, T., Suda, Y. and Abe, H.  
Mechanism of action and selectivity of a fungicide, mepronil.  
*J. Pestic. Sci.* **17**, 39 (1992).
- 2) Shimizu, T., Nakayama, I., Nakao, T., Nezu, Y. and Abe, H.  
Action mechanism of herbicides, pyrimidinylsalicylic acids (Part I):  
Inhibition of plant acetolactate synthase by herbicides, pyrimidinylsalicylic  
acids.  
*J. Pestic. Sci.* **19**, 59 (1994).
- 3) Shimizu, T., Nakayama, I., Nakao, T. and Abe, H.  
Action mechanism of herbicides, pyrimidinylsalicylic acids (Part II): Partial  
purification and properties of acetolactate synthase of pea seedlings.  
*J. Pestic. Sci.* **19**, 185 (1994).
- 4) Shimizu, T., Nakayama, I., Wada, N., Nakao, T. and Abe, H.  
Action mechanism of herbicides, pyrimidinylsalicylic acids (Part III):  
Kinetic studies on the inhibition of acetolactate synthase by  
pyrimidinylsalicylic acids.  
*J. Pestic. Sci.* **19**, 257 (1994).



