

氏名（本籍）	種谷 良貴 （ 静岡県 ）
学位の種類	博 士（ 農学 ）
学位記番号	博 甲 第6729号
学位授与年月日	平成25年11月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	イソキサゾリン系除草剤の作用機構及び選択性に関する研究

主 査	筑波大学教授	農学博士	松本 宏
副 査	筑波大学教授	博士（理学）	田中 俊之
副 査	筑波大学准教授	博士（農学）	臼井 健郎
副 査	筑波大学講師	博士（農学）	春原 由香里

## 論 文 の 要 旨

超長鎖脂肪酸伸長酵素 (VLCFAE) を作用点とする除草剤は 50 年以上前から使用されていたが、分子生物学的な手法による作用機序の解明は進んでいなかった。近年、本酵素をターゲットとする新規なイソキサゾリン骨格を持つ除草剤 (ピロキサスルホン及びフェノキサスルホン) がクミアイ化学により開発された。本研究は、これらの除草剤の選択性の要因と標的酵素である植物 VLCFAE の性質について、生化学及び分子生物学的手法を用いて解析したものである。

第 1 章では、両イソキサゾリン系除草剤の対象雑草に及ぼす作用や症状から VLCFAE を作用点とすることを推察し、超長鎖脂肪酸 (VLCFA) 生合成系への影響及び VLCFAE 活性阻害を解析した。両イソキサゾリン系除草剤は対象雑草の生育を低濃度で阻害し、ピロキサスルホンは作物-雑草間で生理的な選択性を有していた。一方、イネ及び食用ヒエ培養細胞の薬剤感受性は植物体に比べて低く、培養細胞を用いることで VLCFA 生合成系への両剤の影響を解析出来ると考えられた。両イソキサゾリン系除草剤を処理した植物培養細胞では VLCFA 含有量が大幅に減少したのに対して、その前駆体が蓄積していたこと及び両剤が黄化幼苗から調製した VLCFAE の活性を低濃度で阻害したことから、VLCFAE を主作用点とすることが示された。また、両イソキサゾリン系除草剤は黄化幼苗から調製した VLCFAE の活性を可逆的に阻害したことから、従来の知見とは異なる VLCFAE 阻害機構が明らかになった。ピロキサスルホンに関しては、VLCFAE の感受性の違いがその作物雑草間の選択性の一要因となっていることも示された。

第 2 章では、第 1 章で可逆的な阻害様式が示唆された VLCFAE 活性が複数の酵素活性の総和であることから、単一のシロイヌナズナ及びイネの VLCFAE に対する検定系を構築し、両剤の阻害を解析した。出芽酵母を宿主として構築したシロイヌナズナ FAE1 に対する検定系を用いて阻害を調べた結果、両剤とも低濃度で作用し、従来の知見と同様に不可逆的に阻害することを示した。シロイヌナズナ VLCFAE のアミノ酸配列を用いた相同性解析により、ピロキサスルホンの感受性モデル植物であるイネには少なくとも 14 個の VLCFAE があることが明らかとなった。それらの内、1 個のタンパク質に対して、イネ培養細胞を宿主とし

た検定系を構築することに成功し、Q6F365 タンパク質がイネの VLCFAE の 1 つであることを明らかにした。ピロキサスルホンはこのイネ Q6F365 の VLCFAE 活性を低濃度で阻害した。また、可逆的にイネ Q6F365 の活性を阻害したことから、単一の VLCFAE に対しても従来の知見とは異なる新しい VLCFAE 阻害機構が示唆された。ピロキサスルホンのイネ Q6F365 及びシロイヌナズナ FAE1 に対する阻害様式が異なっているのは、VLCFAE の酵素的性質の植物種間での違いによるものと推察された。また、両イソキサゾリン系除草剤及びメタザクロールのシロイヌナズナ FAE1 に対する阻害様式が同じであることを考慮すると、VLCFAE と薬剤との相互作用は薬剤の化学構造に因らず、VLCFAE の分子種に依存していると考えられた。そこで、従来の VLCFAE 阻害型除草剤のネズミムギ VLCFAE に対する阻害様式を調べた結果、何れの薬剤も可逆的に阻害することが分かった。従って、可逆的な VLCFAE 阻害様式はイソキサゾリン系除草剤に限られるものではなく、既存の VLCFAE 阻害型除草剤でも起こることが示されると共に、VLCFAE と薬剤との相互作用は薬剤の構造ではなく、VLCFAE の分子種に依存するという仮説を支持するものであった。

第 3 章では、第 1 章において、VLCFAE の感受性の違いがピロキサスルホンの作物雑草間の選択性の一要因であることを示したが、植物個体を考えた場合、この要因だけではピロキサスルホンの生理的な選択性を説明出来ないと考え、<sup>14</sup>C-ピロキサスルホンをを用いてコムギ及びリジッドライグラス幼苗中の代謝活性を解析した。両植物幼苗に吸収されたピロキサスルホンは分解され、イソキサゾリン環のグルタチオン抱合体を経て生成する主要代謝物が検出されたことから、ピロキサスルホンの主要な代謝経路はイソキサゾリン環のグルタチオン抱合によるメチレンスルフォニル結合の開裂であること、また、本剤の解毒代謝にはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) が重要な役割を担っていることが示された。

一方、コムギ中のピロキサスルホンの残存割合がリジッドライグラスに比べて低いのに対して、主要代謝物の割合が高いことから、GST による薬剤代謝活性の違いが本剤の作物雑草間の選択性の一要因であると推察された。

## 審 査 の 要 旨

本研究は近年開発されたイソキサゾリン系骨格を有する新規除草剤であるピロキサスルホンを対象に、標的酵素である超長鎖脂肪酸伸長酵素の性質と植物種間選択性の発現要因を、生化学及び分子生物学的手法を用いて検討したものである。

本研究では、イソキサゾリン系除草剤のピロキサスルホンが超長鎖脂肪酸伸長酵素を阻害すること及び本酵素の感受性の違いが作物雑草間の選択性の一要因となっていることを明らかにしている点、次に、イネ培養細胞を宿主として、イネの単一の超長鎖脂肪酸伸長酵素に対する検定系を作ることに成功している点が新しい進展として評価される。また、単一酵素レベルでの検討を行い、従来提唱されている不可的な阻害ではなく可逆的な阻害機構を初めて示し、超長鎖脂肪酸伸長酵素と薬剤との相互作用は薬剤の化学構造に因らず、酵素の分子種の性質に依存しているという新しい知見をもたらした点が、本酵素阻害剤の阻害機構の理解に資するものと高く評価される。また、本剤の選択性の発現にグルタチオン-S-トランスフェラーゼによる解毒分解が重要な役割をしていることも初めて明らかにした。これらを通して新規イソキサゾリン系除草剤の選択作用機構を詳細に示したことは、除草剤の安全性の向上、化学構造と活性との関係、新規剤の開発に極めて有用な知見をもたらしたと評価できる。

平成 25 年 9 月 18 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。