

第 3 章 脂質生合成およびアセチル-CoA カルボキシラーゼの活性に対する影響

3.1 序論

植物の脂質は、すべての細胞膜の構成や膜機能の発揮に重要な役割を果たしている。また、植物の脂質は、ワックスのような組織の重要な組成要素や、エネルギーの重要な貯蔵形態としてもよく知られている (Murphy, 1999)。一般に、植物の膜を構成する主な脂質は、リン脂質とステロールである。これらの脂質で膜の二層構造を形成し、膜特有の生理機能を維持しているのである。一方、各種の脂質を構成する脂肪酸の生合成は、植物では色素体 (光合成組織では葉緑体) で行われている。脂肪酸の中に飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の二種類があるが、合成経路は共通であり、共に acetyl-CoA からスタートする (Murphy, 1999)。また、葉緑体の CO₂ 同化により固定された炭素は炭水化物やアミノ酸合成の出発物質となるばかりではなく、脂肪酸合成のための出発物質でもある (Heldt, 2000)。脂肪酸生合成では、最初に acetyl-CoA carboxylase (ACCase) により ATP を消費して acetyl-CoA がカルボキシル化されて malonyl-CoA になる (Heldt, 2000; Ohlrogge and Browse, 1995; Fig. 3-1)。それに続く反応で CoA がアシルキャリアタンパク質 (ACP) と交換して、malonyl-ACP を生成する。そして、この malonyl-ACP と acetyl-CoA が縮合して、生成した産物が NADPH により還元された後、脱水反応を起こし、アシル ACP になる。この産物は炭素原子が 2 個長くなった脂肪酸である。その後はさらに 2 個の炭素を増やし続けていくと、様々な脂肪酸が合成される。

ACCase は脂肪酸生合成の律速酵素であり、重要な役割を果たしている (Heldt, 2000)。その基本構造として、ピオチンカルボキシラーゼ、ピオチンカルボキシルトランスフェラーゼおよびピオチンカルボキシルキャリアタンパク質の三つの部分からなっている (Fig. 3-2)。そしてこの三つの部分が、それぞれのサブユニットとして構成された多酵素複合体が原核型 ACCase であり、三つの部分が一緒になって出来上がった、多機能な酵素活性をもつ単一のタンパク質が真核型 ACCase である (Fig. 3-3; Heldt, 2000)。この酵素が除草剤により阻害されると、

脂肪酸の生合成ができなくなり、膜を構成するリン脂質の補給が停止し、膜の完全性が壊れることにより、結果として植物が枯死する。

緒論で述べたように、イネ科植物の ACCase が、AOPP 系および、CHD 系除草剤の作用点であると、多くの報告により示唆されている。一方、前章から、アンチオーキシン作用は fluazifop-butyl と sethoxydim の第一次作用である可能性が低いこと、また、両剤の作用が共に細胞膜の破壊に関与していることが示唆されている。

そこで、本章では感受性植物であるエンバクと *A. hispidum* および耐性植物であるエンドウの脂質生合成および ACCase の活性に対する両剤の影響を調べ、これらの細胞膜破壊への関与を検討することを目的とした。

3. 2 アセチル-CoA カルボキシラーゼの活性に対する fluazifop と sethoxydim の影響

3. 2. 1 目的

ACCase がイネ科植物における fluazifop-butyl と sethoxydim の作用点であると考えられている。そこで、本実験では、第 1 章の結果から確認された感受性の異なる植物を用いて、ACCase に対する両剤の影響を調べることにより、作用メカニズムと酵素阻害との関連性を検討することを目的とした。

3. 2. 2 材料と方法

<材料>

供試植物： 感受性： *A. hispidum*； エンバク（前進）；

耐性： エンドウ（早生赤花蔓無豌豆）

供試薬剤： Fluazifop； Sethoxydim

Fluazifop (acid) の純度は 98.6%であった。

<方法>

エンバク（一葉期、発芽後 3 日目）、エンドウ（二葉期、発芽後 3 日目）、および *A. hispidum*（2~4 葉期、発芽後約 20 日間目）の茎葉組織を 5g 切り取り、液体窒素で冷凍後、低温下で磨砕した。30ml の抽出バッファー（100mM

tricine-KOH, pH8.3, 3% (v/v) glycerol, 2mM EDTA-2Na, 5mM DTT) を添加し、さらに磨砕し、4層のガーゼで濾過した。濾液を、30,000×g、4°Cで30分間遠心し、上清液を2層のミラクロス(miracloth)で濾過した。濾液を45%の飽和度で硫酸沈殿した後、更に30分間攪拌した。その後、再び12,000×gで30分間遠心し、上清液を除去して得られた沈殿物質に2.5mlの再懸濁バッファー(100mM tricine-KOH, pH8.3, 3% (v/v) glycerol, 5mM DTT) を添加し再懸濁させた。さらに、再懸濁バッファーで平衡化した脱塩カラム(Sephadex G-25M PD-10 Columns)で脱塩した後、Bradford法により蛋白質の濃度を測定した。抽出液は分析まで、-80°Cで保存した。本実験のすべての操作は4°C、または氷上で行った。

ACCaseの活性は、acetyl-CoAに $[^{14}\text{C}]\text{NaHCO}_3$ が取り込まれて生成する酸および熱安定性画分の放射活性を測定することにより定量化した。反応は反応液を1.5mlのチューブに入れ、30°C、15分間ドラフト内で反応させた。反応液は、5mM MgCl_2 、2.5mM ATP、10mM NaHCO_3 、18.5kBq $[^{14}\text{C}]\text{NaHCO}_3$ 、20 μl 抽出液、78 μl 再懸濁バッファー、300 μM acetyl-CoA および20 μl の除草剤溶液(コントロールは蒸留水)を含み、総量が0.2mlになるように調整した。反応液を30°Cで、3分間前処理した後、acetyl-CoAの添加により反応を開始、20 μl の12N HClの添加により反応を停止した。各サンプルを80°Cにて乾燥後、0.5mlの60%エタノールに再溶解し、20mlのバイアル瓶に移した。それに、各反応チューブを1mlのエタノールで2回洗浄した溶液を加え、7mlのシンチレーション溶液を添加し、LSSで放射活性を測定した。

3.2.3 結果と考察

両除草剤に感受性を示すエンバクのACCase活性は、両剤によって濃度依存的に抑制されたのに対し、耐性を示すエンドウの場合、比較的高い濃度である100 μM の処理でも抑制効果は見られなかった(Fig. 3-4)。酵素阻害の指標値である I_{50} 値は、エンバクでは両剤共に20~30 μM 程度であったのに対し、エンドウでは供試された濃度で抑制効果が見られなかったため求めることができなかった。本研究から得られたエンバクに対する両剤の I_{50} 値は、報告されたその他の植物におけるAOPP系およびCHD系除草剤の I_{50} 値より若干大きい値であるが、感受性と耐性植物間での差が非常に大きいことは、一致している(Burton et

al., 1987, 1989; Cho et al., 1986; Focke and Lichtenthaler, 1987; Hoppe, 1985; Hoppe and Zacher, 1982, 1985; Hosaka and Takagi, 1987; Kobek et al., 1988a,b; Rendina and Felts, 1988; Secor et al., 1989; Walker et al., 1988b)。つまり、エンバクにおいては、両剤に感受性のある ACCase があるのに対し、エンドウに含まれている同酵素は耐性であることが示唆された。これらの結果はイネ科植物と広葉植物における ACCase アイソザイムの研究報告 (Konishi et al., 1996) とよく一致していた。彼らの研究によると、イネ科植物には、葉緑体に感受性の真核型 ACCase が存在しているのに対し、広葉植物には耐性の原核型 ACCase が存在している。これを併せて考えると、エンバクにおける fluazifop-butyl および sethoxydim の第一次作用点は ACCase であると判断された。一方、*A. hispidum* の場合、2~4 葉期の幼苗や、最も酵素活性の高いと考えられる黄化苗を用い、様々な抽出緩衝液を用いて実験を行ったが、活性のある ACCase を抽出することができず、同酵素に対する両剤の影響を調べることができなかった。これに関しては、さらに今後検討する必要があると考えられる。

3.3 脂肪酸生合成に対する fluazifop-butyl と sethoxydim の影響

3.3.1 目的

前節で fluazifop-butyl と sethoxydim によるエンバクの ACCase 活性阻害が確認され、同酵素は両剤の第一次作用点であることが示唆された。ACCase 活性の阻害は、直接的に脂肪酸生合成を抑制する。そこで、この推論を更に証明する証拠を得るために、 ^{14}C で標識された前駆体を用いて、脂肪酸への取り込みを測定することにより、両薬剤の脂肪酸生合成系への影響を検討することを目的とした。

3.3.2 材料と方法

<材料>

供試植物： *A. hispidum* ; エンバク (前進); エンドウ (早生赤花蔓無豌豆)

供試薬剤： Fluazifop-butyl ; Sethoxydim

<方法>

各植物は生物試験と同様に生育させた。エンバクは一葉期、エンドウ、*A. hispidum* は6~8葉期の新葉から、直径4mmのリーフディスクを採取し、100 μ M CaCl₂溶液に葉の表を上にして浸し、10分間減圧浸透した。さらに5mlの除草剤溶液(0.5% acetone と 100 μ M CaCl₂を含む)に浸し、2時間薬剤を吸収させた。各処理溶液に0.05mlの[U-¹⁴C]acetate溶液(18.5kBq)を添加し、28 $^{\circ}$ Cで4時間振蕩後、蒸留水で洗浄し、3mlのクロロフォルム：メタロール(1:2, v/v)溶液に浸して、70 $^{\circ}$ Cで10分間抽出した。冷却後、抽出液を採取し、さらに残渣に3.8mlのクロロフォルム：メタロール：水(1:2:0.8, v/v/v)溶液を添加し、25 $^{\circ}$ Cで2時間振蕩した。得られた溶液を一回目の抽出液と混合し、1.5mlのクロロフォルムおよび2.5mlの1% NaCl溶液を添加し、3分間振動した。4 $^{\circ}$ Cで一晩中放置し、分離させた後、クロロフォルム層中の放射活性をLSSで測定した。各処理は30ディスクで3反復を行った。

3.3.3 結果と考察

Fig. 3-5に示すように、fluzifop-butyl と sethoxydim は共に、エンバクのリーフディスクにおける脂質生合成を抑制したが、エンドウでは顕著な影響は見られなかった。これは、以前に報告されたAOPPおよびCHD系除草剤の脂質生合成への影響と同様な結果であり(Burton et al., 1987, 1989; Cho et al., 1986; Focke and Lichtenthaler, 1987; Hoppe, 1981, 1985; Hoppe and Zacher, 1982, 1985; Hosaka and Takagi, 1987; Kobek et al., 1988a,b; Rendina and Felts, 1988; Sceor et al., 1989; Walker et al., 1988a)、2.4.3で論述した電解質漏出や、3.2.3で述べたACCaseの抑制実験の結果と一致しており、エンバクではACCaseが阻害により起こる現象であると考えられる。

一方、*A. hispidum*の場合、図で示したようにsethoxydimで抑制しなかったのに対し、fluzifop-butylである程度濃度依存的に抑制された。しかし、エンバクの場合と比べると、抑制程度が小さく、特に低濃度の1 μ Mでは大きな違いが見られた。生物試験の症状の発現、および*A. hispidum*の生育がfluzifop-butyl以外のACCase阻害剤で抑制されないことから考察すると、両植物に対するfluzifop-butylの作用メカニズムが異なる可能性が示唆された。エンバクにおいては、電解質の漏出や脂質生合成は、ACCaseが阻害された結果であり、ACCase

が fluazifop-butyl および sethoxydim の第一次作用点であると考えられる。しかし、*A. hispidum* においては、エンバクの場合と異なる作用メカニズムで膜の破壊をもたらし、電解質の漏出を促進される可能性が考えられた。

3.4 要約

Fluazifop-butyl および sethoxydim を処理すると、エンバクでは両剤によって、*A. hispidum* では fluazifop-butyl のみによって、電解質漏出が誘導され、これらの剤は感受性植物の膜に影響することが示唆された。本章では、膜の影響に脂質生合成およびそのキー酵素である ACCase の阻害が関与しているのかどうかを検討した。

(1) Fluazifop-butyl と sethoxydim に感受性を示すエンバクでは、ACCase の活性が両除草剤に濃度依存的に抑制されたのに対し、耐性を示すエンドウの場合は、比較的高い濃度である 100 μ M の処理でも抑制効果は見られなかった。一方、*A. hispidum* は活性のある ACCase が得られなかったため、測定が出来なかった。

(2) Fluazifop-butyl と sethoxydim が共に、エンバクのリーフディスクにおける脂質生合成を抑制したのに対し、エンドウでは顕著な影響は見られなかった。一方、*A. hispidum* の場合、sethoxydim で抑制しなかったのに対し、fluazifop-butyl である程度濃度依存的に抑制された。しかし、エンバクの場合と比べると、抑制程度が小さく、特に低濃度の 1 μ M では抑制効果に大きな違いが見られた。

これまでの結果より、エンバクにおける両剤の第一次作用点は ACCase であり、膜への影響は脂肪酸生合成の抑制により起こること、また、アンチオーキシン作用は両剤の殺草作用に直接には関係していないものと考えられる。しかし、*A. hispidum* の場合、エンバクと比較すると症状が異なること、fluazifop-butyl 以外の阻害剤では生育抑制がされないこと、また、電解質漏出の起こるまでの時間が短い。さらに、脂質生合成抑制に見られた違いなどから考えると、fluazifop-butyl は *A. hispidum* において、ACCase 阻害以外のより早く症状が発現するメカニズムで殺草作用を果たすものと考えられた。

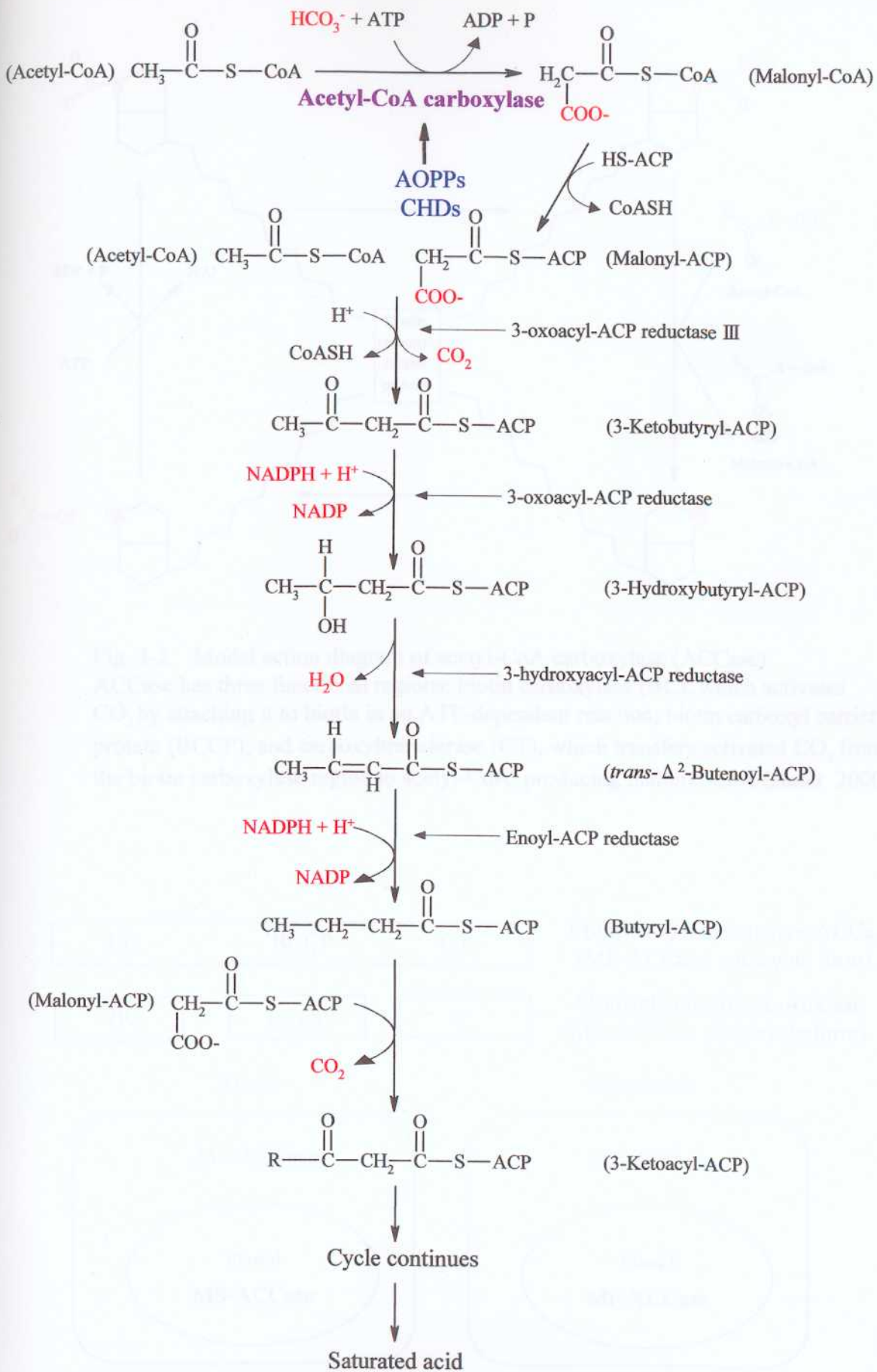


Fig. 3-1 The reaction of saturated fatty acid biosynthesis (Heldt 2000; Ohlrogge and Browse 1995).

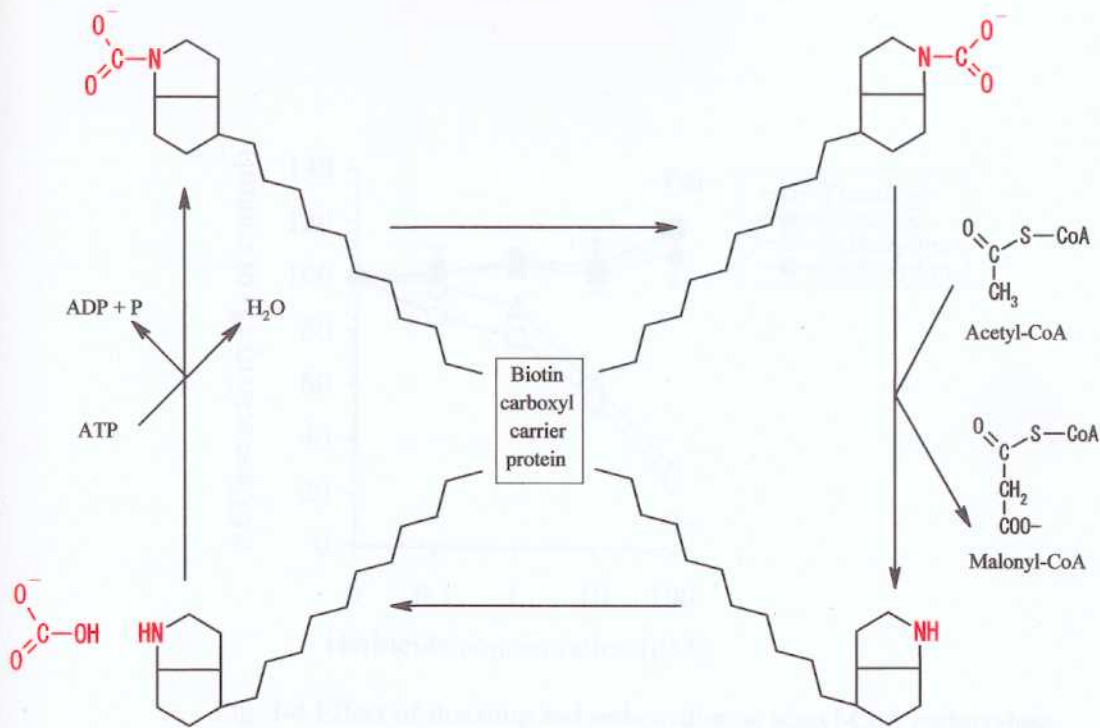


Fig. 3-2 Model action diagram of acetyl-CoA carboxylase (ACCase). ACCase has three functional regions: biotin carboxylase (BC), which activates CO_2 by attaching it to biotin in an ATP-dependent reaction; biotin carboxyl carrier protein (BCCP); and carboxyltransferase (CT), which transfers activated CO_2 from the biotin carboxylase region to acetyl-CoA, producing malonyl-CoA (Heldt 2000).

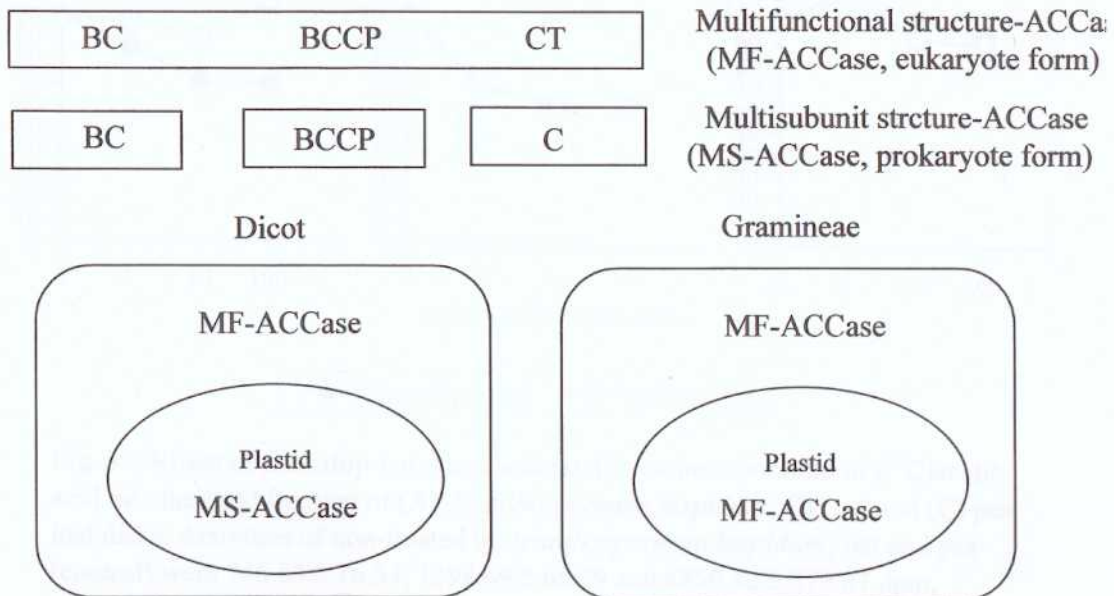


Fig. 3-3 Two forms of ACCase occur in plants (Ohlrogge and Browse 1995).

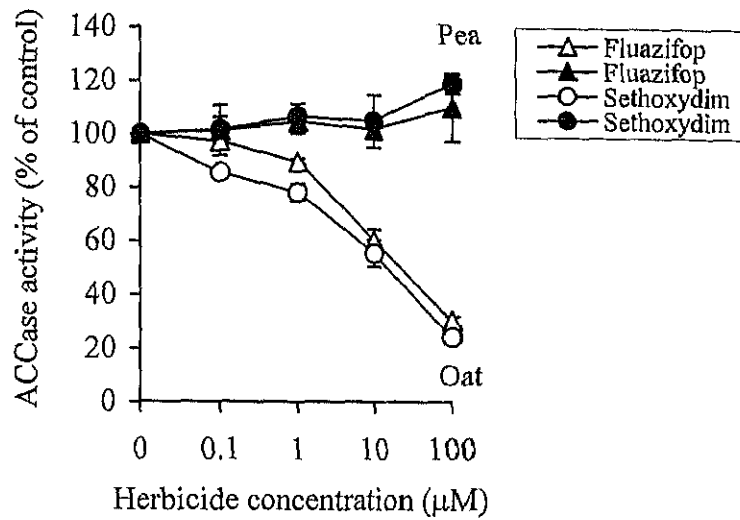


Fig. 3-4 Effect of fluazifop and sethoxydim on acetyl-CoA carboxylase activity extracted from oat and pea. Activities of non-treated oat and pea (control) were 10280 ± 354.45 and 4615.34 ± 322.15 dpm, respectively. Vertical bars represent mean \pm SE.

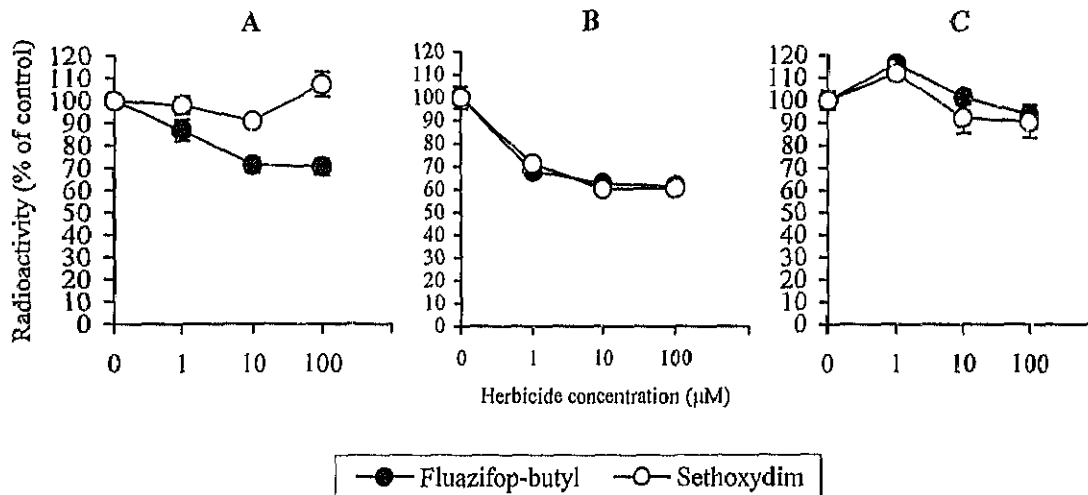


Fig. 3-5 Effect of fluazifop-butyl and sethoxydim on incorporation of [14 C]acetic acid into the lipid fraction of (A) *Acanthospermum hispidum*, (B) oat and (C) pea leaf disks. Activities of non-treated in *Acanthospermum hispidum*, oat and pea (control) were 746.83 ± 16.54 , 1398.69 ± 66.29 and 6850.42 ± 279.07 dpm, respectively. Vertical bars represent mean \pm SE.