ミニレビュー

4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼの特徴に 注目した阻害剤の構造と簡易的阻害活性試験法

池田 佑美¹, 佐藤 幸治^{1,2,*}

¹ 玉川大学学術研究所生物機能開発研究センター

² 玉川大学大学院農学研究科

(2013年12月3日受理)

The structural evolution of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors and its convenient assay method based on the structure of the active site in enzyme

Yumi IKEDA¹ and Yukiharu SATO^{1,2,*}

¹ Biosystems & Biofunctions Research Center, Tamagawa University Research Institute,
6-1-1 Tamagawagakuen, Machida-shi, Tokyo 194-8610, Japan

² Graduateschool of Agriculture, Tamagawa University,
6-1-1 Tamagawagakuen, Machida-shi, Tokyo 194-8610, Japan

Keywords: 4-HPPD inhibitor, chelation with Fe²⁺.

はじめに

4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ (4-HPPD, EC 1.13.11.27) を作用点とした除草剤の精力的な開発が始まったのは1990年代のことであり, そろそろ20年が経過しようとしている. 除草剤の中で植物体に白化症状を引き起こす白化型と呼ばれるものにはクロロフィル生合成阻害剤 (プロトポルフィリノーゲン IX オキシダーゼ阻害剤) やカロテノイド生合成阻害剤 (フィトエンデサチュラーゼ阻害剤, ζ-カロテンデサチュラーゼ阻害剤) などがある. 4-HPPD 阻害剤も間接的にカロテノイド生合成経路を遮断し, 白化症状を示すことから広義にはカロテノイド生合成阻害剤に分類されている. しかし, 除草剤作用点としての特徴

的な魅力が4-HPPDには多い. そもそも1980年代に除草剤を目指して研究された2-(2-ニトロ-4-トリフルオロメチルベンゾイル)-シクロヘキサン-1,3-ジオン (NTBC) はラットの眼に対する毒性が高く開発が中止された¹⁾. しかし, この化合物はフマリルアセト酢酸ヒドラーゼ (FAH) の欠損で起きる遺伝性疾患の高チロシン血症1型の有効な治療薬であり, NTBCがFAHより上流に位置する4-HPPDを阻害する事により, チロシン代謝が阻害されFAHの基質であるフマリルアセト酢酸の産生を抑制し, 治療効果を示す. このように4-HPPDは除草剤のターゲットとしても, 医学的な見地からも興味深い.

本稿では, 4-HPPD阻害剤について作用と近年発表された4-HPPD阻害剤の構造的な傾向, さらに私たちのグループで取り組んでいる簡易的な4-HPPD阻害活性検定法の一部を紹介したい.

* 〒194-8610 東京都町田市玉川学園6-1-1

E-mail: ymsato@agr.tamagawa.ac.jp

© 日本農薬学会

1. 除草剤作用点としての4-HPPDの特徴

4-HPPDはチロシン代謝に関わる酵素であり、動物、微生物など多くの生物がもつ酵素であることはよく知られている。植物体中ではプラストキノン合成の前駆体である4-ヒドロキシフェニルピルビン酸(4-HPPA)からホモゲンチジン酸(HGA)への酸化反応を触媒している。生成物であるプラストキノンはカロテノイド合成経路中のPDSによる不飽和化反応において放出された電子および H^+ を受け取った補酵素(FADやNAD/NADP)の電子受容体として作用しているため、4-HPPDの阻害によるプラストキノンの欠乏は間接的にカロテノイド合成を阻害し、その結果、植物は明瞭な白化症状を伴いながら枯死に至る(図1)²⁾。

また、この酵素に関しては構造的にも詳細な情報が明らかとなっている。三次元的な解析に関しては、まず細菌*Pseudomonas fluorescens*の4-HPPD単独結晶構造の解明により活性中心に非ヘム鉄が結合しており³⁾、4-HPPDの触媒作用には Fe^{2+} が必須であることも報告され⁴⁾、その後、*Streptomyces avermitilis*⁵⁾、ラット⁶⁾およびシロイヌナズナ由来など様々な生物種の4-HPPD結晶構造が報告されている。特に、シロイヌナズナから単離された4-HPPDでは阻害剤との複合体結晶構造も報告されており⁶⁾、阻害剤の活性中心での動きに関する多くの情報が得られている。

4-HPPD阻害剤は植物と動物いずれの4-HPPDにも阻害活

性を有するものが多いが、除草剤作用点としてはこの選択性が高い方が望ましい事はいうまでもない。Yangらは化合物コレクションから、植物(シロイヌナズナ)と動物(ラット)の間の阻害剤選択性を有する化合物([2-クロロ-4-(メチルスルホニル)フェニル][1-*tert*-ブチル-3-(2,4-ジクロロフェニル)-5-ヒドロキシ-1*H*-ピラゾール-4-イル]ケトン:DAS645)と動物・植物どちらにも高い効果をもつ非選択性阻害剤(1-*tert*-ブチル-5-ヒドロキシ-1*H*-ピラゾール-4-イル6-(メチルスルホニル)-2-メチル-4'-メトキシ-3-ビフェニルケトン:DAS869)を用いて詳細な解析を行った。その結果、DAS645の活性部位における結合残基は非選択性のDAS869と大部分において一致していた。また、DAS869の場合にはベンゾイル基に、活性部位周辺の2つのPhe(シロイヌナズナ:Phe360, Phe403, ラット:Phe336, Phe364)が両側から π -スタッキングしていることが確認された。一方、DAS645の場合にはピラゾール環に結合した2,4-ジクロロフェニル基の嵩高さが影響し、シロイヌナズナ4-HPPDではベンゾイル基と π -スタッキングしているPheの一方(Phe403)が回転し、阻害剤の結合が可能であるが、ラットの4-HPPDでは構造上、Phe364が自由な回転がとれずに阻害剤の結合が弱まり選択性が発現することが報告されている⁷⁾。

このように受容体の構造が比較的早く解明されたことにより、計算化学的手法を利用した分子モデリングが可能にな

図1. 4-HPPD阻害剤の作用機構と阻害剤によるアオウキササの白化の様子

り, さらに高機能な化合物の分子設計が期待できる点も魅力的である。

2. 4-HPPD阻害剤の構造展開

これまでに市販されている4-HPPD阻害剤を構造的に分類すると1) トリケトン系(スルコトリオン, メソトリオン), 2) ピラゾール系(トプラメゾン, ピラゾキシフェン), 3) イソキサゾール系(イソキサフルトール), および4) ジケトニトリル系の4群に大別することができる。

スルコトリオンなど初期の4-HPPD阻害剤の特徴的骨格であるトリケトン構造の基礎となったのはレプトスペルモンという天然化合物であろう。この物質はブラシノキ(*Calistemon citrinus*)という樹木の周りには草が生えないという現象に注目して単離されており, 植物に生育抑制を示すことはわかっていたが⁸⁾, 作用点について報告されたのは随分と後である⁹⁾。また, 地衣類の代謝産物であるウスニン酸も植物に対して同様の生育阻害を示していたが, この物質はクロロフィルやカロテノイド含量に与える影響よりも強く4-HPPDを阻害することが報告されたのは2000年になってからであった¹⁰⁾。 β -トリケトン系天然化合物の詳細な作用機構については報告が極めて少なかったものの, その明らかな構造的特徴は参考にされており, 様々な4-HPPD阻害剤の開発に取り入れられた。4-HPPD阻害剤の活性発現のためには1) 活性中心に存在する Fe^{2+} と配位する構造, 2) ベンゼン環2位への置換基導入が必須とされており, 初期の4-HPPD阻害剤はいずれもこの2点を含む化合物となっている。

酵素の立体構造の解明により, 阻害剤の構造展開にも変化が見られた。これまで活性発現に必須とされた構造に加え,

ベンゼン環3位方向には広い空間の存在が明らかになり, この位置に比較的嵩高い置換基を有する化合物が数多く開示されている。また, それまでの4-HPPD阻害剤はベンゾイル基が基本構造となっており, その置換基変換が精力的に行われて来た。近年, ベンゾイル基の3位と4位, あるいは2位と3位で様々な複素環と縮環した化学構造を有する化合物の開示がなされており, 興味深い。4-HPPD阻害剤の4群のうち, トリケトン系およびピラゾール系化合物の開発が特に活発な印象を受ける。縮環化合物と併せて初期の構造と近年開示された化合物を図2に示した。当然のことながら, 一次世代の化合物群より, 有用植物(作物)に対して薬害がなく, 畑地, 果樹園, 水田, 非農耕地に発生する種々の雑草を低薬量で長期間防除できる, 高い安全性を有する除草活性を示す化合物の創製が求められる。作用点における効果は同じでも母核構造が種々異なることで植物体へ異なる影響を与えることになるだろう。

3. 4-HPPD阻害活性検定法

ここでは当グループで進めてきた4-HPPD阻害化合物の簡易的なスクリーニング法についてその一部を紹介したい。

4-HPPD阻害化合物の活性検定法については, すでにいくつかの方法が報告されている。私たちもいくつかの方法を考えたが, 酵素反応に伴い発生する CO_2 を捕集し測定する方法ではラジオアイソトープで標識された化合物の取り扱いが必要となり制限があったため, 主流である生成物であるホモゲンチジン酸をHPLC分析によって定量する方法で生物試験を行ってきた。しかし, この方法ではある程度阻害活性が見込まれる化合物や, 詳細な活性強度の測定には適しているが, まだ何も情報がないようなものを含めた多検体の処理に

図2. 4-HPPD阻害剤の構造の展開

は限界があると考え、もっと別の簡易な方法はないかと検討を始めた。

4-HPPD阻害化合物の活性発現のためには活性中心の Fe^{2+} との配位が必須であり、候補化合物が Fe^{2+} と配位しうるか否かを簡易的に探索することが可能であれば、膨大な候補化合物群の絞り込みが可能となる。そこで Fe^{2+} との配位能を指標とした酵素試験前の簡易スクリーニング法の確立を目指した。目的とするスクリーニング法には多検体を迅速に処理することが望まれるため、測定手法は一般的な機器による平易な操作であることが重要となる。そこで金属イオンと化合物の配位能測定法としてUV分光分析法を採用した。

既存4-HPPD阻害剤ピラゾレートの活性本体として知られる4-(2,4-ジクロロベンゾイル)-1,3-ジメチル-5-ヒドロキシピラゾール（デストシルピラゾレート：DTP）を用いて Fe^{2+} 存在下UV吸収スペクトルを測定したところ、 Fe^{2+} 濃度依存的に吸収強度が上昇することが明らかとなった。この吸収強度の上昇はDTPと Fe^{2+} とのキレート錯体形成に起因するものと考えられた。一方、DTPのピラゾール環上の水酸基をメトキシ基に変換した4-HPPD阻害活性を示さない化合物では、そのUVスペクトルに変化が認められなかった。これは水酸基が保護されたことによりキレート錯体形成のために必要な1,3-ジケトン構造をとることができず、 Fe^{2+} と配位しないことが原因であると考えられた。以上の結果から、4-HPPD阻害活性の有無とUV吸収スペクトル変化との間に関連があることが示唆された。また、DTPと Fe^{2+} とのキレート錯体形成時における化学量論比を求めたところ1:1錯体を形成することが明らかとなったことから、配位能を定量的に評価することが可能であることがわかった。ベンゾイル基上に種々の置換基を導入した化合物を合成し、 Fe^{2+} 存在下でのUV吸収スペクトル測定により配位能を求め、4-HPPD阻害活性測定結果と比較した。その結果、高い酵素阻害活性を示す化合物は結合定数の値も大きいという傾向が認められた。その要因としては、ベンゾイル基に導入された置換基の電子的影響のうち誘起効果と共鳴効果のバランスが Fe^{2+} とのキレートに関与し、結果的に4-HPPD阻害活性に影響すると考えられた。また、置換基の立体効果も大きな要因と考えられた。

DTPと阻害活性の認められなかった4-(4-クロロベンゾイル)-5-ヒドロキシピラゾール誘導体のX線結晶解析を行ったところ、DTPはベンゾイル基のカルボニル基とピラゾール環の水酸基は立体的に同一方向を向いており、 Fe^{2+} と容易にキレートすることが判った。一方、4-クロロ体のピラゾール環上の水酸基はDTPの水酸基とは 180° 反対の方向に位置しているために Fe^{2+} とキレート錯体を形成し得ないということが明らかとなった（図3）。これはベンゾイル基上の置換基の種類や置換位置がピラゾール環の自由回転に影響を与え、 Fe^{2+} とのキレート形成が困難な立体配置となるためであると考えられる。この結果は4-クロロ体が Fe^{2+} 存在下でのUV吸収スペクトル測定の結果、変化が認められなかったことと一致した。

さらに、ヒドロキシピラゾール誘導体以外に、代表的4-HPPD阻害剤であるスルコトリオンのような1,3-シクロヘキサジオン誘導体や、イソキサフルトールの活性本体に見られるジケトニトリル誘導体についても同様に Fe^{2+} 存在下でのUV吸収スペクトル変化から結合定数を求めたところ、酵素阻害活性と関連した結果を得ることができた。以上のように、4-HPPD阻害候補化合物の酵素阻害活性と Fe^{2+} との配位能に平行な傾向が認められており、 Fe^{2+} との配位能をUV分析によって検出するという簡便な手法は一次スクリーニング法として有用であると考えられる。この方法は特殊な機器や複雑な操作を必要としないため、多種のサンプルをふるいにかけることが可能であり、評価試験者の負担は軽減できると考えられる。

4. 4-HPPD阻害剤抵抗性植物

除草剤に限らず農薬全般にいえることであるが、特定の農薬の連用による抵抗性種の出現数の急激な増加、これに伴う使用可能な登録農薬数の減少は非常に切迫した問題になっている¹¹⁾。4-HPPD阻害剤に関していえば、シロイヌナズナ種子を用いて抵抗性出現頻度を調べた研究からは、他の除草剤、たとえばALS阻害剤などと比べるとその頻度は低いという報告がある¹²⁾。実際、20年近く使用しながら抵抗性種の報告はなかったが、2009年についてトウモロコシ、ダイズ、およびソルガムの収量に多大な影響を与える *Amaran-*

図3. ヒドロキシピラゾール誘導体のX線結晶構造と4-HPPD阻害活性

*thus tuberculatus*の中で抵抗性種が7年にわたる4-HPPD阻害剤の使用によりイリノイ州の圃場で見つかった¹³⁾。同年にはこのほかアイオワ州でも同様の抵抗性種が発見され、カンザス州でも抵抗性 *Amaranthus palmeri* が報告されている。その後、2011年にもそれぞれの植物種で抵抗性種の発見が報告されており現在では2生物種、6つのバイオタイプが報告されている¹⁴⁾。作用点としては比較的新しいため、他の除草剤と比べて抵抗性雑草の問題が表立っていないだけで、出現速度は遅くとも確実に広がると思われる。

一方では、抵抗性植物の作出も進められている。これまでの報告では *Pseudomonas* の4-HPPDを組み込み、4-HPPDを過剰発現させることによる耐性獲得、*Pseudomonas*と *Arthrobacter* から単離した合計3種類の遺伝子を組み込む事による基質(4-HPPA)から生成物(HGA)へのバイパスの形成、さらにはチロシン生合成系において、生成物によって制御を受ける過程の回避を目的とした酵母由来の酵素を導入した4-HPPAの増産と4-HPPDの過剰発現によるものなどが挙げられる¹⁵⁾。また、一部の飼料用イネが4-HPPD阻害剤の中でも1,3-シクロヘキサジオン系の化合物に対して高感受性であるという報告もされている。このことをマーカー的に応用し、育種研究の過程で感受性/抵抗性の指標として利用するという技術も開発されており¹⁶⁾、これらの技術の実用化によって、より安定した食糧増産が可能となることが期待される。

おわりに

私たちのグループでは前任の若林教授の在職中から、白化型除草剤の作用機構の研究やアンモニア酸化細菌についての研究を行ってきた。近年は糸状菌の代謝産物からリード化合物の探索、および除草剤の作用機構解明と合成研究を行っている。4-HPPD阻害剤の作用機構についてはかなり解明されてきたように見受けられるが、これらの化合物は白化症状の出現の様子など興味深い生理現象も引き起こす。また、本文中でも述べたとおり抵抗性種の広がりも懸念されはじめており、興味は尽きず、合成関連の原稿からはいくらか脱線した話も多くなった。

個人的には農薬研究室という講座名が多くの大学から姿を消してからかなりの年数が経過しており、農薬研究の醍醐味・魅力が学生だけでなく、若い研究者世代にも伝わりづらくなっているように感じている。この現状を回復させ、若い人たちの新しい、新鮮な考え方を農薬研究に取り入れ、さらに発展することを切に願っている。

最後に、本稿を執筆する貴重な機会を与えて頂きました編集委員会の皆様に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) <http://www.ema.europa.eu/ema/> (Accessed 29 Oct., 2013)
- 2) K. Hirai, A. Uchida and R. Ohno: "Herbicide Classes in Development," eds. by P. Böger, K. Wakabayashi and K. Hirai, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 179–289, 2002.
- 3) L. Serre, A. Sailland, D. Sy, P. Boudec, A. Rolland, E. Pebay-Peyroula and C. Cohen-Addad: *Structure* **7**, 977–988 (1999).
- 4) I. Garcia, D. Job and M. Matringe: *Biochemistry* **39**, 7501–7507 (2000).
- 5) J. Brownlee, K. Johnson-Winters, D. H. T. Harrison and G. R. Moran: *Biochemistry* **43**, 6370–6377 (2004).
- 6) C. Yang, J. W. Pflugrath, D. L. Camper, M. L. Foster, D. J. Pernich and T. A. Walsh: *Biochemistry* **43**, 10414–10423 (2004).
- 7) D. L. Camper and M. H. Parker: "Synthesis and Chemistry of Agrochemicals VII," eds. by J. W. Lyga and G. Theodoridis, American Chemical Society, Chap. 9, pp. 105–117, 2007.
- 8) R. A. Gray, R. J. Rusay and C. K. Cheng (Stauffer Chemical Co.): US4202840 (1980).
- 9) G. Meazza, B. E. Scheffler, M. R. Tellez, A. M. Rimando, S. O. Duke, D. Nanyarkkara, I. A. Khan, E. A. Abourashed and F. E. Dayan: *Phytochemistry* **60**, 281–288 (2002).
- 10) J. G. Romagni, G. Meazza, N. P. D. Nanayakkara and F. E. Dayan: *FEBS Lett.* **480**, 301–305 (2000).
- 11) Herbicide Resistance Action Committee: <http://www.hracglobal.com> (Accessed 29 Sep., 2011)
- 12) B. M. Luscombe and K. E. Pallett: *Pestic. Outlook* **7**, 29–32 (1996).
- 13) N. E. Hausman, S. Singh, P. J. Tranel, D. E. Riechers, S. S. Kaundun, N. D. Polge, D. A. Thomas and A. G. Hager: *Pest Manag. Sci.* **67**, 258–261 (2011).
- 14) <http://www.weedscience.org/> (Accessed 30 Oct., 2013)
- 15) M. Matringe, A. Sailland, B. Pellissier, A. Rolland and O. Zink: *Pest Manag. Sci.* **61**, 269–276 (2005).
- 16) H. Kato, H. Maeda, Y. Sunohara, I. Ando, M. Oshima, M. Kawata, H. Yoshida, S. Hirose, M. Kawagishi, Y. Tanigishi, K. Murata, H. Maeda, Y. Yamada, K. Sekino and A. Yamazaki: WO2012090950 (2012).

略歴

池田佑美 (いけだ ゆみ)

生年月日: 1977年12月15日

最終学歴: 玉川大学大学院農学研究科博士後期課程

研究テーマ: 除草活性物質の作用機構

趣味: 読書

佐藤幸治 (さとう ゆきはる)

生年月日: 1949年6月4日

最終学歴: 東京大学大学院農学系研究科博士課程

研究テーマ: 微生物が産生する生理活性物質の研究

趣味: 山野草およびメダカの飼育