

光要求型除草剤の作用機構

住友化学工業株式会社宝塚総合研究所 佐藤 良

まえがき

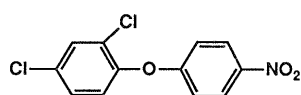
殺草活性の発現に光が関与する除草剤、言い換えれば、処理した植物を暗所に置いた場合、殺草活性を示さない除草剤は数多く、その作用機構も多様である。本稿では、diphenylether

(DPE)除草剤、及びDPEと共通の作用機構を有すると考えられている一群の除草剤(図1)を「光要求型除草剤」と総称し、その作用機構研究の道筋を振り返り、今後の課題と展望を明らかにしたい。光要求型除草剤の外に、

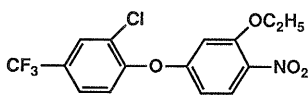
atrazine, DCMU等の光合成阻害型除草剤, norflurazon, fluridone等の白化型除草剤, paraquat等の作用機構においても、光は重要な役割を果たしているが、それらについては、他の文献を参照されたい。

1. 光要求性の発見

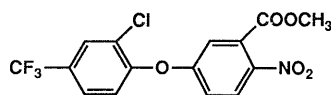
光要求型除草剤は日本の水田用除草剤としてまず実用化され、現在も chlor-nitrofen, chlomethoxy-nil, oxadiazonが広く使われている。このため、これらの化合物の光要求性は日本の研究者によって発見され、初期の研究が進められた。Matsunaka(1969)は¹⁾、イネの色素欠損突然



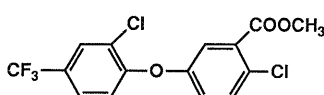
nitrofen



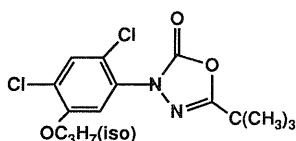
oxyfluorfen



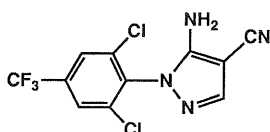
acifluorfen-methyl



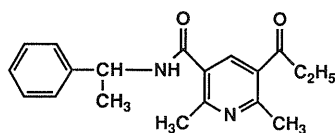
MC-15608



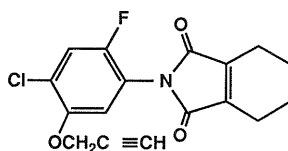
oxadiazon



M&B 39279



LS 82-556



S-23142

図1. 主な光要求型除草剤

変異株を用いて、nitrofenの活性を調べ、黄色株は野生株（緑色株）と同様に枯死するが、白色株は耐性を示すことを発見し、黄色色素がDPEの活性発現に関与することを報告した。この報告は、nitrofen等が緑化の起こっていない発芽初期の雑草に殺草活性を示すことと一致し、クロロフィル以外の色素が光要求性に関与することを示した点で重要である。イネの色素欠損変異株を用いた実験は、他の光要求型除草剤についても行われ、同様な結果が得られている。

また、ダイズ、トウモロコシの色素欠損株を用いて同様な実験も報告されている²⁾。このように、光要求型除草剤の作用機構に関する研究は、松中の報告を端緒に光要求性の解析から始まったといえる。

2. 膜脂質の過酸化による生体膜の損傷

1970～1980年にかけて欧米で畑作用にDPEが使用されるようになると、欧米の研究者も活発に光要求型除草剤の作用機構研究を行うようになった。畑作用のDPEはacifluorfenに代表されるように、茎葉処理型除草剤が多く、緑化した組織において活性を発現する。このためか、単離した葉緑体、単細胞緑藻、切除した葉等を用いた作用機構研究が多く見られる。単離葉緑体を用いて、光要求型除草剤の光合成電子伝達阻害活性を調べた報告は数多い。DPEの中には、DCMU等の光合成系II阻害剤より高い濃度で阻害活性を示す化合物があり、DCMUとは異なる電子伝達系の部位を阻害する。しかしながら、電子伝達阻害活性は、以下に述べる光要求型除草剤に特徴的な活性より高い濃度で認められ、殺草活性との相関が見られないことから、殺草活性の主因ではないと考え

られる。

光要求型除草剤に特徴的な活性は、生体膜を構成する不飽和脂肪酸の過酸化を増大させる活性である。KunertとBöger (1981)³⁾は単細胞緑藻 *Scenedesmus* を用いて、OrrとHess (1982)⁴⁾はキュウリ子葉を用いて、DPEを処理すると不飽和脂肪酸の過酸化分解物であるエタンやTBARM（チオバルビツール酸反応性物質、主として malondialdehyde）の生成量が顕著に増大することを報告した。

OrrとHessは、不飽和脂肪酸の過酸化に伴って、細胞内の膜構造が破壊されていくことを電子顕微鏡で観察し、同時に膜の機能も損なわれて細胞内の物質が漏出することを示した。DPEを処理した組織から電解質等の漏出が見られることはすでに知られていたが、不飽和脂肪酸の過酸化による膜系の破壊が、細胞死に直結する生理・生化学的作用であることを示した点で、この報告は重要である。膜系に起こる構造上の変化は、Kenyonら (1985)⁵⁾、Derrickら (1988)⁶⁾ によって更に詳しく調べられ、葉緑体の膨潤と包膜の異常がまず起こり（キュウリ子葉の場合、原形質膜と液胞膜の構造異常もほぼ同じ時期に起こる）、その後膜構造全般に異常が見られるようになり、細胞死にいたることがわかっている。この結果は、光要求型除草剤の作用点が葉緑体の近傍に存在することを示唆している。OrrとHessはさらに、不飽和脂肪酸の過酸化は、酸素のない条件下では起こらず、ラジカルの消去剤である α -トコフェロールを処理しておくで軽減されることを示し、DPEの作用により親油性のフリーラジカル（脂質ラジカル）が生成し、脂質ラジカルは連鎖反応により増加し、脂質ラジカルに分子状の酸素が反応して過酸化が起こると説明した。こ

ここで問題となるのは、D P Eがいかんして脂質ラジカルの生成を起こすのかという点であり、その後の反応は不飽和脂肪酸の過酸化の過程においてよく知られている。彼らは、D P Eの作用において活性酸素の生成が認められないことから、“活性化”したD P E分子が脂質ラジカルの生成を開始させるとしているが、 O_2^- の消去剤で paraquat の活性を低減させる働きをもつ銅ペニシラミン錯体等によって、D P Eの活性が部分的にはあるが低減される¹⁰⁾ことから、活性酸素の生成を介して脂質ラジカルの生成が起こる可能性もあるといえる。Orr と Hess の報告の後、D P E分子が光照射下でラジカル化（活性化）することを証明しようとする試みが活発に行われた。しかしながら、いくつかのモデル系において oxyfluorfen, acifluorfen-methyl のようにニトロ基を持つD P Eはラジカル化するものの、MC-15608のようにクロル基を持つD P Eは、同様な殺草作用を有するにも拘らずラジカル化せず⁷⁾、脂質ラジカルの生成が起こる機構は、最近まで全く解明されていなかった。

3. 光受容体の性質

光要求型除草剤の活性発現に關与する色素（光受容体）は、色素欠損変異株を用いた実験では、カロチノイドであると推定された。光要求型除草剤に耐性の白色株にはカロチノイドがほとんどなかったためである。これに続いて、カロチノイド合成阻害剤で処理し白化させた植物組織において^{4, 8)}、光要求型除草剤は活性を示さないこと、黄色組織^{4, 9)}やクロロフィル合成阻害剤で処理して得た黄色組織¹⁰⁾において、光要求型除草剤は強い活性を示すことが相次いで報告され、光受容体は長い間カロチノイドで

あると考えられていた。しかしながら、この仮説は近年次の実験事実から否定された。まず、カロチノイド合成阻害剤で白化した植物では、カロチノイド以外の色素も光分解し様々な生理機能が欠落しており、光受容体がカロチノイドであるという証拠にかならずしもなり得ない。実際、カロチノイド合成阻害剤を処理し、クロロフィルの光分解（白化）が起こらない微弱白色光下で育成した組織は、カロチノイド含量が検出限界以下に減少しているにも拘らず、光要求型除草剤に感受性を示す¹¹⁾。また、高活性な光要求型除草剤は、強光下でイネの白色株をも枯殺する。更に、キュウリ子葉におけるS-23142の殺草活性の発現に有効な光の波長（図2、これを作用スペクトルと呼ぶ）も、カロチノイドの関与を否定している。単細胞緑藻の*Chlamydomonas*¹²⁾やキュウリの緑色子葉¹³⁾における作用スペクトルは、カロチノイドが吸

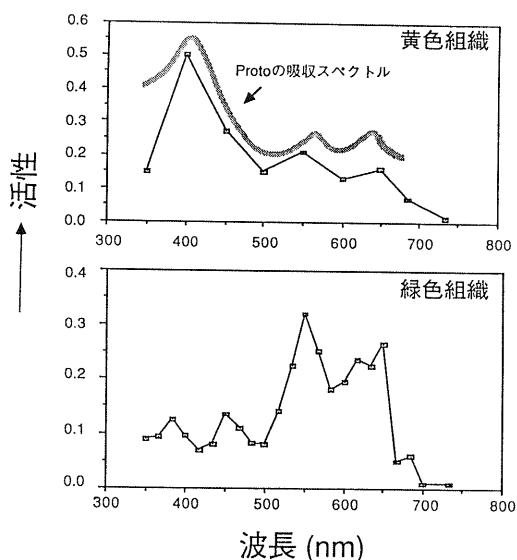


図2. S-23142の殺草活性の発現に有効な光の作用スペクトル

網線は Protoporphyrin IX の吸収スペクトル、黄色組織はテントキシン処理により得た。

収できない赤色光域にピークを示す。また、キュウリの黄化子葉¹³⁾、テントキシン処理により得た黄色子葉¹¹⁾、ダイズ培養細胞¹⁹⁾等のクロロフィルを持たない材料における作用スペクトルは、カロチノイドの吸収スペクトルと全く一致せず、カロチノイド以外の色素が活性発現に参与することを示唆している。図2に示すように、黄色組織における作用スペクトルはポルフィリンの吸収スペクトルとよく一致しており、ポルフィリンの生合成阻害剤である gabaculine や 2,4-dioxoheptanoic acid を処理した組織では、光要求型除草剤は活性を示さない¹⁴⁾。これらの結果から、黄色組織における光受容体はポルフィリン系色素であると考えられる。

Sato ら (1987, 1988)^{11, 13)} は、緑色組織、黄化組織、テントキシン処理組織、微弱光下で育成したフルリドン処理組織を用いて、光要求型除草剤の活性発現に有効な光の波長と強度を比較し、赤色光、青色光はクロロフィル含量の高い緑色組織においてのみ有効で、ポルフィリンの吸収ピークに相当する400nmの光は、各組織において同様に有効であることを報告した。この結果から緑色組織においては、複数の光受容体が活性発現に参与していると考えられる。青、赤色光の効果はクロロフィル含量とよく相関するので、クロロフィル関連色素が光受容体であると推定される。クロロフィルが介在する主な光反応は光合成であるので、光合成電子伝達が活性発現に参与するか否かという点が問題になる。光合成電子伝達阻害剤の存在下で光要求型除草剤の活性を調べた実験は、膜脂質の過酸化が起こる機構を解明する目的で数多く報告されているが、結果が二分されている。単細胞緑藻の *Scenedesmus* では顕著な活性の低減が認められる³⁾ が、キュウリの子葉⁹⁾ や *Chlamy-*

*domonas*¹⁵⁾ では活性の低減は認められず、活性発現に有効な光の波長も変化しない¹³⁾。光合成阻害剤による活性の低減は、酸素の供給を高めたり、ショ糖を与えたりすると認められなくなる実験例が報告されているので、特定の実験条件で認められる効果であると思われる。これに加えて、光合成系を欠損するオオムギの変異株に対して、光要求型除草剤は、野生株の場合と同様に活性を示す¹⁶⁾ ことから、光合成電子伝達は活性発現に参与していないと考えられる。従って、青、赤色光がいかんして膜破壊を起こすのかという問題は、現在も解明されていない。

4. ポルフィリンの細胞内蓄積

光要求型除草剤がクロロフィルの生合成を阻害することは、*Scenedesmus* を用いて Sandmann ら (1984) により見出された¹⁷⁾。光要求型除草剤は、キュウリ黄化子葉の緑化も阻害し、緑化の進行中に処理された場合に最も高い活性を示す¹⁸⁾。Matringe と Scalla (1988)¹⁹⁾ はこれらの報告に続いて、光要求型除草剤を処理したダイズ培養細胞にクロロフィル合成の中間体である Protoporphyrin IX (Proto) が大量に異常蓄積することを見出し、光要求型除草剤の殺草作用は、蓄積するポルフィリンの光増感作用により発現するという仮説を提出した。この報告を皮切りに、キュウリの子葉^{20, 21)}、*Scenedesmus*、黄緑藻 *Bumilleriopsis*²²⁾ を用いて、種々の光要求型除草剤がポルフィリンの蓄積を起こすという報告が相次ぎ、ポルフィリンの細胞内蓄積は光要求型除草剤に特徴的な作用であり、他のいずれの現象よりも早く起こることが示された。Proto の吸収スペクトルは、黄色組織における活性発現に有効な光の作用スペクトルとよく一致する^{11, 19)}。Proto

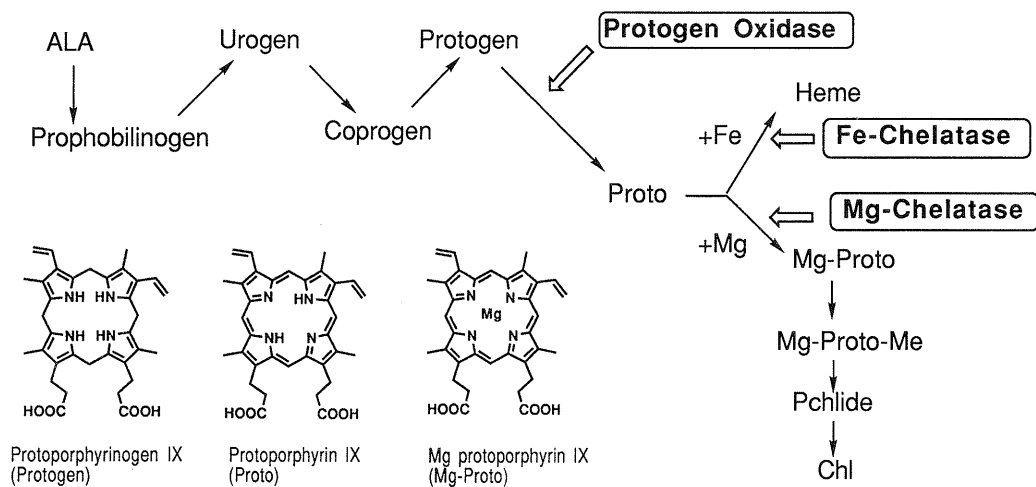


図3. クロロフィル合成経路と主なポルフィリンの化学構造式

ALA: δ -aminolevulinic acid, Urogen: uroporphyrinogen
 Coprogen: coproporphyrinogen, Pchlide: protochlorophyllide
 Chl: chlorophyll

は光増感作用を有し、吸収した光エネルギーにより反応性の高い一重項酸素(活性酸素の一種)を生成し、種々の酸化反応を起こす。DPEを処理した植物中のProtoのレベルは、殺草活性とよく相関する²¹⁾、Protoを植物に散布すると植物は枯死する¹⁴⁾。これらの事実から、蓄積したポルフィリンは、黄色組織においては殺草活性の主因になっていると考えられる。

Witkowsky と Halling (1988)²⁰⁾ は、ポルフィリン合成の前駆体である5-アミノレブリン酸と光要求型除草剤をキュウリ子葉に同時に与え、子葉中のProtoの増加に伴って、Protochlorophyllideが減少することを報告し、Mg-protoporphyrin IXの蓄積が起こらないことから、光要求型除草剤はMg-chelatase (図3)の活性を阻害すると推定した。しかしながら、光要求型除草剤は単離したMg-chelataseの活性を阻害しない²³⁾ため、Protoの蓄積機構は現在もわかっていない。Matringe ら (1989)^{23,24)} は、光要求型除草剤

がProtoporphyrinogen (Proto) からProtoを生成するProtoxidaseの活性を阻害することを見出し、Protoが自動酸化されてProtoになり、自動酸化により生成したProtoはMg-chelatase, Fe-chelataseの基質になり得ず、蓄積すると説明している。しかし、細胞内で本当にこの酵素の阻害が起こること、蓄積したProtoが自動酸化によって生成したものであること等は証明されておらず、この酵素の阻害によってProtoの蓄積を説明するには更に慎重な検討が必要である。

5. 化学構造の多様性

DPEと全く異なる化学構造を有するoxadiazon等が、DPEと同様な光要求性を示すことは、古くから知られていた。最近になって、その作用機構が共通であることが多方面から検討され、多様な構造を持つ化合物群が同一の作用点に作用することが明らかになってきている。

Sato ら (1987)²⁵⁾ は、高活性な N-フェニルイミド系光要求型除草剤 S-23142 の生理、生化学的作用を広範に調べ、DPE の acifluorfen-ethyl (AFE) の作用と完全に一致することを明らかにした。この報告で S-23142 と AFE は、処理後数時間の lag-phase の後、全く同様に、光合成系の失活、物質の細胞外漏出、膜脂質の過酸化を起こし、更にエチレン発生、Phenylalanine-ammonia lyase (PAL) 活性の上昇等のいわゆる“stress response”を起こした。前述の通り、光要求型除草剤は、どのような構造のものでも共通して、ポルフィリンの蓄積を起こす作用を持つ。更に Sato らは¹³⁾、S-23142 と AFE の殺草活性の発現に有効な光の波長を比較し、これも同一であることを明らかにし、殺草活性を起こす光反応と殺草活性の結果として観察される種々の現象が、完全に一致したことから、S-23142 と AFE は共通の作用機構を有すると結論した。近年、LS 82-556²⁴⁾、M & B 39279⁶⁾ についても、DPE と同様な作用を有することが報告され、共通の作用を示す化学構造はますます多様なものになっている。片岡ら (1989)²⁶⁾ は、S-23142 に抵抗性を示す *Chlamydomonas reinhardtii* の変異株を単離し、この変異株が DPE や oxadiazon 等の他の光要求型除草剤に、特異的に抵抗性を示すことを報告した。この結果は、光要求型除草剤が共通の作用点を有する証拠であり、この変異株は、今後作用点の分子構造の研究に有用な材料になると思われる。

6. 緑色組織における活性発現機構

ポルフィリンの細胞内蓄積が発見されたことにより、光要求型除草剤の活性発現機構の一部

はかなり明らかになってきたが、蓄積するポルフィリンの光増感作用によって、膜脂質の過酸化をすべて説明することはできない。ポルフィリンの蓄積は処理後最も早く起こる現象であるが、これに続いて光合成系の失活が脂質過酸化物の生成に先行して起こる。光要求型除草剤は電子伝達阻害活性をほとんど持たないため、処理後数時間は光合成系は全く阻害されない。その後、ポルフィリンの蓄積と同程度の低い処理濃度で光合成系の失活が起こる。光要求型除草剤がいかにして光合成系を失活させるのかは、わかっていないが、光合成系に起こる異常は、現象的には光阻害（強光下で光合成系が失活する現象）と同じで、光合成系の反応中心に変性が起こることがわかっている。光要求型除草剤はクロロフィル合成を阻害して、ポルフィリンの蓄積を起こすため、反応中心を構成する色素が合成されず、正常な反応中心の構築が妨げられることが想像される。この状態で反応中心の代謝回転が起こると、反応中心は変性し光合成活性を失うのであろう。励起されたクロロフィル分子は光増感作用を持つため、変性した光合成系が集めた光エネルギーは、周辺の光合成系の変性を増大させ、最終的には、膜脂質の過酸化

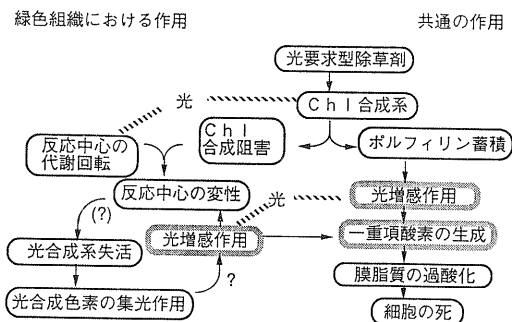


図4. 光要求型除草剤の推定作用機構

植物体内で起こることが確認されていない現象を、網線で囲って示した。

化を起こすようになると推定される。緑色組織においては、ポルフィリンの光増感作用と変性した光合成系の光増感作用が複合して、膜脂質の過酸化を起こすと考えると、図2の作用スペクトルは無理なく説明できる。以上の作業仮説を図4にまとめた。光は、光増感作用のエネルギー源になるとともに、クロロフィル合成系を駆動し、反応中心の代謝回転を起こす役割を持つと考えられる。この作業仮説には更に実証を要する現象や因果関係が含まれており、これらが今後の研究課題といえる。

7. 今後の研究課題と展望

ポルフィリンの細胞内蓄積が見出されたことにより、光要求型除草剤の作用機構研究は新たな局面を迎えている。阻害を受ける酵素も突き止められつつあり、第一次作用の解明は急速に進展する様相を示している。Protogen oxidase が光要求型除草剤の作用点であると結論するには検討の余地が残されているが、セルフリー系で光要求型除草剤に特異的な活性を捕らえた点で、Matringe らの発見は極めて重要であり、光要求型除草剤が直接に作用するタンパク分子(受容体)が同定される日も、遠くないように思える。多様な化学構造を有する化合物が、いかなる受容体といかなる相互作用をして共通の活性を発現するのか、その分子レベルにおける機構は極めて興味深い。

光要求型除草剤は経験的に高等緑色植物にの

み殺草活性を示し、温血動物等には安全であることが知られている。光要求型除草剤は、Matringe らによればマウスや酵母から得た Protogen oxidase も極めて低濃度で阻害するが、これらの材料に対しては毒性を示さない。単純な体制を持つ酵母において、化合物が高等植物や藻類と比べて、著しく作用点に到達しにくいとは考えにくい。Protogen oxidase が光要求型除草剤の作用点であると結論するには、選択的殺草活性の機構を同時に説明する必要があると思われる。光要求型除草剤が高等植物に対して特異的に活性を発現する機構はいかなるものか、この問題の解明は、第一次作用の解明と同様に重要な課題である。

緑色組織における殺草機構の解明は、前述の通り推定の部分が多い。この問題は、茎葉処理除草剤が緑色組織で活性を示すという基本的な事項と関連するので、重要な課題である。加えて、この問題は、光要求型除草剤がいかなる変化を光合成系にもたらすのか、という点で光合成の基礎的な問題と関わる興味深い問題である。

光要求型除草剤は多様な化学構造を有する。このため、共通の作用機構を有するが故に既存剤の長所を保持し、異なる化学構造を有するが故に既存剤の短所を克服した新しい光要求型除草剤を創出できる可能性が高い。今後の農業生産に貢献しうる新規光要求型除草剤を創出する上で、以上の問題の解明は極めて有効な知見となると思われ、今後の進展が期待される。

引用文献

- 1) Matsunaka S. 1969. J Agric Food Chem 17:171~175.
- 2) Fadayomi O and GF Warren. 1976. Weed Sci 24:598~600.
- 3) Kunert KJ and P Böger. 1981. Weed Sci 29:169~173.
- 4) Orr GL and FD Hess. 1982. Plant Physiol 69:502~507.

- 5) Kenyon WH, SO Duke and KC Vaughn. 1985. Pestic Biochem Physiol 24 : 240~250.
- 6) Derrick PM, AH Cobb and KE Pallett. 1988. Pestic Biochem Physiol 32 : 153~163.
- 7) Ensminger MP, FD Hess and JT Bahr. 1985. Pestic Biochem Physiol 23 : 160~170.
- 8) Devlin RM, SJ Karczmarczyk and II Zbiec. 1983. Weed Sci 31 : 109~112.
- 9) Duke SO and WH Kenyon. 1986. Plant Physiol 81 : 882~888.
- 10) Duke SO, KC Vaughn and RL Meeusen. 1984. Pestic Biochem Physiol 21 : 368~376.
- 11) Sato R, E Nagano, H Oshio and K Kamoshita. 1988. Pestic Biochem Physiol 31 : 213~220.
- 12) Ensminger MP and FD Hess. 1985. Plant Physiol 77 : 503~505.
- 13) Sato R, E Nagano, H Oshio, K Kamoshita and M Furuya. 1987. Plant Physiol 85 : 1146~1150.
- 14) Lydon J and SO Duke. 1988. Pestic Biochem Physiol 31 : 74~83.
- 15) Ensminger MP and FD Hess. 1985. Plant Physiol 78 : 46~50.
- 16) Bowyer JR, BJ Smith, P Camilleri and SA Lee. 1987. Plant Physiol 83 : 613~620.
- 17) Sandmann G, H Reck and P Böger. 1984. J Agric Food Chem 32 : 868~872.
- 18) Halling BP and GR Peters. 1987. Plant Physiol 84 : 1114~1120.
- 19) Matringe M and R Scalla. 1988. Plant Physiol 86 : 619~622.
- 20) Witkowsky DA and BP Halling. 1988. Plant Physiol 87 : 632~637.
- 21) Becerril JM and SO Duke. 1989. Plant Physiol 90 : 1175~1181.
- 22) Sandmann G and P Böger. 1988. Z Naturforsch 43c : 699~704.
- 23) Matringe M, JM Camadro, P Labbe and R Scalla. 1989. Biochem J 260 : 231~235.
- 24) Matringe M, JM Camadro, P Labbe and R Scalla. 1989. FEBS Lett 245 : 35~38.
- 25) Sato R, E Nagano, H Oshio and K Kamoshita. 1987. Pestic Biochem Physiol 28 : 194~200.
- 26) 片岡政子・佐藤 良・大塩裕陸. 1989. 日本農薬学会. 講演要旨集. p30.