

葉緑体の機能と除草剤の作用

理化学研究所・薬剤作用研究室 吉田 茂 男

はじめに

緑やグリーンという言葉は植物をイメージさせ、何か我々を安心させる響きを持っているらしい。植物は葉緑素を大量に含むので緑色をしていることは誰にでも答えられる。しかし、植物が何のために葉緑素を使っているのかという問いについては、正確な答えを用意できる人は少ない。葉緑素は植物細胞にある微小器官の葉緑体内に組み込まれており、光を受けとめるアンテナの役割を果たしている。植物と動物の基本的な違いは、前者が有機養分を光合成により自給できる独立栄養体であるのに対して、後者は他の生物から有機養分を補給しなければ存続できない従属栄養体であるという点にある。光合成が営まれる葉緑体は、光という物理エネルギーを生体エネルギーに変換する精緻な工場のような器官である。従って葉緑体の機能が損傷を受けると植物は存続できなくなる。はからずも我々は植物のこのような特徴を捉え、化学物質を除草剤として利用している訳である。

ところで、進化論をはじめ近代生物学の原点を築いた Darwin は、生体の外界刺激に対する応答を便宜的に考察する手段としてブラックボックスという概念を唱えた¹⁾。この考え方は、「ある生体反応を解析するときに、それが進行する過程の内容は問題にしないで、原因(入力)と結果(出力)の関係だけ注目すること」であ

る。まさしく、約半世紀に近い除草剤の開発研究は、植物に対してこの考え方を適用して発展してきた。近年の環境問題に対する意識の高まりは、生態系に放出される化学物質の問題に集中しているように思える²⁾。つまり、開放系で不特定の生物と接触せざるをえない除草剤の開発は、今後ますます厳しい制約を受けることが予想される。いいかえれば将来の除草剤は、単に農業の生産性向上だけでなく、周辺の自然生態や環境に対しても十分な安全性を保証できるものに限られるようになるであろう。

今世紀後半に急速な発達を遂げた生命科学は、除草剤の投与から活性の発現に至るまでのブラックボックスの内容を解析し、論理的に理解することを求めている。幸いなことに、大部分の除草剤が攻撃部位とする葉緑体機能は、葉緑体遺伝子の全塩基配列解析研究^{3,4)}や、光合成反応中心タンパク質の構造解析⁵⁾などの植物分子生物学研究成果を利用して、新しい研究体系が適用できるようになっている。

葉緑体機能と除草剤

今日用いられている除草剤の大半は、葉緑体の機能を阻害することによって植物を枯らす。ここで問題となる葉緑体機能とは、光合成電子伝達(明反応)、クロロフィル生合成、カロチノイド生合成、アミノ酸生合成、脂肪酸生合成

などを意味する^{6, 7)}。筆者はこの度、除草剤に関する国際シンポジウムを日本で主催する機会を得た。そこで、このシンポジウムでは、葉緑体の中に作用点を有する植物制御物質を中心話題として、広い領域の最新研究の交流を目的とするために、「葉緑体機能の分子調節：Molecular Regulation of Chloroplast Functions」という標題を定めた。このシンポジウムのプログラムは、(1)除草剤結合に関連する光合成機構(P S II)の構造と機能、(2)P S II阻害剤の活性構造相関研究、(3)葉緑体色素の生合成を阻害する除草剤の研究、(4)アミノ酸や脂肪酸の生合成を阻害する除草剤の研究、(5)除草剤抵抗性に関する研究の5テーマを中心に編成されている。このシンポジウムに世界一流の除草剤研究者が多数参加したことは、前記の葉緑体機能についての考え方が妥当であることを物語っている。そこで葉緑体機能と各除草剤の作用機作の関係について、以下簡単に解説する。

1) 光合成電子伝達阻害剤

薬剤の第一次作用点として植物の光合成機構の阻害をねらうと、光合成をしない他の生物に対しては無害な除草剤となり得るという発想には説得力がある。実際に、ジウロンやアトラジンなどの初期に開発された著名な除草剤は、光合成電子伝達系を選択的に阻害するものである。これらの除草剤は、葉緑体のチラコイド膜上にある光化学系(P S II)のプラストキノン受容部(D 1タンパク質⁸⁾)に結合して電子の伝達を阻害する。その結果、光エネルギーがP S IIの内部に滞積し、周囲の酸素が活性化されて生体膜の酸化的破壊が起るために、植物は致死の損傷を蒙ると考えられている⁹⁾。ところが、D 1タンパク質は宿命的に光の損傷を受けるた

めに、明所下では非常に早い修復代謝が存在していることが判明した¹⁰⁾。D 1タンパク質と結合する除草剤の作用が、何らかの形でこの光損傷修復機能に関係していることは充分に考えられることである。実際、ウレア型の除草剤を作らせたD 1タンパク質は光照射条件で無処理のものよりも安定化しており、Tyr-237がその鍵を握る部位であると考えられている¹¹⁾。この新しい知見は、従来の光合成阻害除草剤の作用機作理論を根底から変え得ることを予感させる。

D 1タンパク質と結合する除草剤の化学構造は多様であるが、それらを作様式に従ってウレア/トリアジン型とフェノール型に分類することができる¹²⁾。しかし、除草剤とD 1タンパク質の結合原理をさらに究めるためには、D 1タンパク質の三次元構造を解明することが必要である。D 1タンパク質は、葉緑体ゲノムの光発現遺伝子*psbA*によって支配されている¹³⁾。ところが、植物の光合成光反応系は多くの膜タンパク質の集合体であるため、現在の技術では結晶化して直接構造を解析することは困難である。一般的に、生物のエネルギー代謝系の機能変異は生命の存続に直接かかわるので、進化過程で大きな変化を受けることは少ない。このため、同じ機能を示すタンパク質については、進化系統樹が著しく異なる生物種の間にも高い相同性が認められる。たとえば、D 1タンパク質と光合成細菌の光反応中心にあるL-サブユニットのアミノ酸配列には高い相同性が認められる^{14, 15, 16)}。この観点に立つと、光合成バクテリア(*Rhodospseudomonas*)の光反応中心構造がX線結晶解析研究によって解明されたことが、光合成研究者に大きなインパクトを与え、同時にノーベル賞に値したことが理解でき

る⁵⁾。この成果を踏まえて、除草剤研究にもコンピュータによる立体分子モデリングが応用されるようになった^{17, 18, 19)}。

アメリカで広く普及したアトラジンは、1970年代後半になって抵抗性雑草の問題に遭遇したが、この現象が光合成電子伝達機構の変異に起因²⁰⁾していることが示されてから、植物分子生物学のハイライトとなった。葉緑体ゲノム上にある *psbA* 遺伝子が光合成反応中心の D1 タンパク質の形成を支配するが、これらのアトラジン抵抗性雑草では全て Ser-264 から Gly への変異が認められた^{21~24)}。このような事実により、除草剤の結合部位は D1 タンパク質の Ser-264 付近にあることが確定的となった。その後、ラン藻やクラミドモナスなどの単純な植物系を用いて、人為的に種々の除草剤抵抗性変異 D1 タンパク質を作ることが可能となった^{25~28)}。このような状況の下で、現在では薬剤と D1 タンパク質の結合原理を分子レベルで解析する研究が活発に行われている。

2) クロロフィル生合成阻害剤

ジフェニルエーテル類や環状イミド類は、クロロフィル生合成系にあるプロトポルフィリノーゲン (Protogen) 酸化酵素を阻害し、生合成系から外れた Protogen が非酵素的に酸化されて生ずるプロトポルフィリン IX (Proto) の急激な植物体内蓄積を促し、Proto の光増感作用によって発生したラジカル酸素が生体膜機構を破壊するために植物を白化し枯死させると考えられている²⁹⁾。現在は、これら薬剤の第一次作用点である Protogen 酸化酵素が葉緑体中にあることが判明し、分子生物学的な解析が急がれている段階に至っている^{30~33)}。近い将来には、これらの成果を利用した新しい薬剤の開発も期待される。

3) カロチノイド生合成阻害剤

植物を白化させる除草剤の中には、フルリドン (EL-171) やノルフルラゾン (SAN-9789) などのように、カロチノイドの生合成を阻害するものもある。カロチノイドは光合成機構が光照射によって損傷を受けないように保護する機能を果たしているので、カロチノイドを欠損した植物では次第に葉緑体が破壊される。カロチノイド生合成系には薬剤感受性の酵素に支配される数個のステップがあり⁶⁾、各酵素と除草剤の作用点の対応を解析する研究は現在も進行中である。

4) アミノ酸生合成阻害型除草剤

植物のアミノ酸生合成系は、スルホニルウレア類、イミダゾリノン類、含燐アミノ酸類などの除草剤により特異的に阻害される⁶⁾。この生合成機構も葉緑体中に存在する。きわめて低薬量ですぐれた効果を示すスルホニルウレア系除草剤は分枝アミノ酸生合成系にあるアセト酪酸合成酵素 (ALS) を特異的に阻害する。また、イミダゾリノン系除草剤も同じ作用点を攻撃する。これらの薬剤は土壌処理により選択性を発揮するが、このメカニズムは主として作物体内の解毒代謝機構の差に起因している。

茎葉処理型の除草剤である含燐アミノ酸系化合物には、芳香族アミノ酸生合成経路にあるエノールピルビン酸化酵素 (EPSPS) を阻害するグリホサートや、グルタミン酸合成酵素 (GS) を阻害するグルホシネートがある。これらのアミノ酸生合成阻害型除草剤についても、酵素レベルでの詳細な研究が精力的に行われているので、受容機構解明研究の進展とともに除草剤分子設計の新しい展開が期待できる。

5) 脂肪酸生合成系を阻害する除草剤

セトキシジムのようなシクロヘキサジオン類除草剤は、植物の脂肪酸生合成経路にあるア

セチルー CoA カルボキシラーゼを低濃度で阻害する⁶⁾。脂肪酸生合成の阻害は、燐脂質で作られる生体膜の構築を妨げることにつながるため、植物体は生命を維持できなくなる。これらの酵素が機能する場所は葉緑体中にもあり、今後は研究の中心が分子生物学的な方向へ傾斜するものと思われる。

6) 除草剤抵抗性変異

葉緑体で作用する除草剤は、茎葉処理で選択性を引き出せるだろうか。葉緑体が保有している生理機能は、植物の生命維持に必須であるために、進化の過程において多様性を獲得(変異)する機会が少なかったものと考えられる。したがって、葉緑体機能を阻害点とする除草剤は、本質的に選択性が低くなるはずである。これに対して、土壌処理を施した場合には、薬剤が根部で吸収されてから作用点へ移行する過程で、いろいろな要因による選択性の発現が可能となる。しかし、土壌処理剤は、残留・分解・水質汚染等の環境問題に関して多くの配慮が必要となる。このような問題を解決する一つの可能性として、薬剤耐性遺伝子を作物に組み込む研究が各国で活発に行われている³⁷⁻⁴⁰⁾。

おわりに

今世紀の最大発明品ともいえる除草剤などの農業薬剤は、環境や自然生態に与える影響へも配慮を必要とする大きな転換期に差しかかっている。このため、今後の薬剤開発研究には従来にもまして学際領域を広げなければならない。本文中に述べた国際除草剤シンポジウムは、このような新しい幕開けを感じさせるものであった。そこで討議された内容は、独誌 *Z. Naturforsch.* の特集号として1993年5月に発行される予定になっている。

参 考 文 献

1. 古谷雅樹, 1990. 植物的生命像. 講談社.
2. 石 弘之, 1990. 地球破壊 七つの現場から. 朝日新聞社.
3. K. Ohyama, H. Fukuzawa, T. Kohchi, H. Shirai, T. Sano, S. Sano, K. Umesono, Y. Shiki, M. Takeuchi, G. Chang, S. Aota, H. Inokuchi and H. Ozeki, 1986. *Nature*. **322**, 572-574.
4. K. Shinozaki, M. Ohme, M. Tanaka, T. Wakasugi, N. Hayashida, T. Matsubayashi, N. Zaita, J. Chunwongse, J. Obokata, K. Yamaguchi-Shinozaki, C. Ohto, K. Torazawa, B. Y. Meng, M. Sugita, H. Deno, T. Kamogashira, K. Yamada, J. Kusuda, F. Takiwawa, A. Kato, N. Tohdoh, H. Shimada and M. Sugiura, 1986. *EMBO J.*, **5**, 2043-2049.
5. J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber and H. Michel, 1985. *Nature*. **318**, 618-624.
6. P. Böger and G. Sandmann, 1989. *Target Sites of Herbicide Action*. CRC Press.
7. N. R. Baker and M. P. Percival, 1991. *Herbicides*. Elsevier.
8. P. K. Wolber, M. Eilmann and K. E. Steinback, 1986. *Arch. Biochem. Biophys.* **248**, 224-233.
9. B. Halliwell, 1991. *Herbicides*. Elsevier. pp. 87-129.
10. J. Barber and B. Andersson, 1992. *TIBS* **17**, 61-66.
11. A. Trebst, J. Kluth, J. Tietjen, and W. Draber, 1991. *Pesticide Chemistry*, edited by H. Frehse, VCH, Weinheim, 112-120.
12. W. Draber and C. Fedtke, 1978.

- Advances in Pesticide Science, Part 3. Pergamon Press, 475-486.
13. K. E. Steinback, L. McIntosh, L. Bogorad and C. J. Arntzen, 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **78**, 7463-7467.
14. J. C. Williams, L. A. Steiner, G. Feher and M. I. Simon, 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **81**, 7303-7310.
15. H. Michel, K. A. Weyer, H. Gruenberg, I. Dunger, D. Oesterheld and F. Lottspeich, 1986. EMBO J. **5**, 1149-1158.
16. I. Sinning and H. Michel, 1987. Z. Naturforsch. **42c**, 751-754.
17. H. Michel, O. Epp and J. Deisenhofer, 1986b. EMBO J. **5**, 2445-2451.
18. A. Trebst, 1987. Z. Naturforsch. **42c**, 742-750.
19. J. R. Bowyer, M. Hilton, J. P. Whitelegge, P. Jewess, P. Camilleri, A. R. Crofts and H. Robinson, 1990. Z. Naturforsch., **45c**, 141-149.
20. K. Pfister and C. J. Arntzen, 1979. Z. Naturforsch. **34c**, 996-1009.
21. J. Hirschberg and L. McIntosh, 1983. Science, **222**, 1346-1349.
22. J. Hirschberg, A. Bleeker, D. J. Kyle, L. McIntosh and C. J. Arntzen, 1984. Z. Naturforsch. **39c**, 412-417.
23. P. Goloubinoff, M. Edelman and R. B. Hallick, 1984. Nucleic Acid Res., **12**, 9489-9492.
24. P. Bettini, S. McNally, M. Sevignac, H. Darmency, J. Gasquez and M. Dron, 1987. Plant Physiol., **84**, 1442-1445.
25. J. M. Erickson, M. Rahire, J. D. Rochaix and L. Mets, 1985. Science **88**, 204-207.
26. J. Hirschberg, N. Ohad, I. Pecker and A. Rahat, 1987. Z. Naturforsch. **42c**, 758-763.
27. F. Sato, Y. Shigematsu and Y. Yamada, 1988. Mol. Gen. Genet. **214**, 358-360.
28. A. Horovitz, N. Ohad and J. Hirschberg, 1989. FEBS Lett. **243**, 161-164.
29. M. Matringe, J. M. Camadro, P. Labbe and R. Scalla, 1989. Biochem. J., **260**, 231-235.
30. 一瀬勝紀・木村幸夫・松信敦子・劉 立秋・佐藤文彦・山田康之・吉田茂男, 1991. 日本農芸化学会誌, 65, 201.
31. 木村幸夫・一瀬勝紀・鈴木直子・阿部知子・蘇昌鎬・吉田茂男, 1991. 平成3年度植物化学調節学会研究発表記録集, 92.
32. M. Kataoka, R. Sato and H. Oshio, 1990. J. Pestic. Sci., 15, 449-451.
33. 蔡 晃植・鈴木直子・木村幸夫・一瀬勝紀・吉田茂男, 1992. 日本農薬学会第17回大会講演要旨集 64.
37. L. Comai, D. Faciotti, W. R. Hiatt, G. Thompson, R. E. Rose and D. M. Stalker, 1985. Nature, 317, 741-744.
38. P. C. Anderson and M. Georgeson, 1986. J. Cell. Biochem. 10C, 1116-1121.
39. G. W. Haughn and C. Somerville, 1986. Mol. Gen. Genet., 204, 430-433.
40. H. Anzai, K. Yoneyama and I. Yamaguchi, 1990. Mol. Gen. Genet., 219, 492-495.