

除草剤の作用と活性酸素

筑波大学応用生物化学系 松本 宏

1. はじめに

酸素は好気生物にとって不可欠なものであると同時に、それらに障害を与える可能性を持つ有害分子でもある。大気中の通常の酸素分子の危険性は小さいが、この酸素分子に由来する酸化活性の大きい分子種（活性酸素といわれる）が毒性を示す。活性酸素は環境中や生体内のさまざまな反応で常時生成されており、また、抗癌剤などの薬物や、殺虫剤、除草剤などの農薬の作用が活性酸素の発生を通して発現する場合

御応答誘導のシグナルとしても利用されている。

このうち本説では除草剤の作用における活性酸素の関与という点に焦点を絞り、活性酸素の性質、除草剤による発生機序、そしてそれらの植物細胞への作用と細胞における防御機構について解説する。

2. 活性酸素とは

分子または原子における一つの電子軌道には、逆向きのスピンをもった電子が2個までしか入れない、これは Pauliの禁律とよばれ、一つの軌道でペアになった電子を対電子（共有電子）という。これに対し、一つの軌道に単独の電子（不対電子）をもつ場合があり、このような分子や原子はラジカルまたはフリーラジカルと呼ばれる。ラジカルは一般的には不安定であり、電子のペアになろうとする性質のため反応性も大きい。

大気中の通常の酸素分子（三重項酸素： $^3\text{O}_2$ と呼ばれる）の電子配置をみると（図-1）、最外殻の別々の電子軌道にペアになっていない電子が1個ずつ入っており、ピラジカルという非常に特異的な形態をとっている。化学反応は最外殻電子のやりとりで進行するが、この電子のスピンが逆方向（反平行）である場合を一重項、不対電子のスピンの方向が同じ（平行）である場合を三重項状態という（図-1）。しかし、三

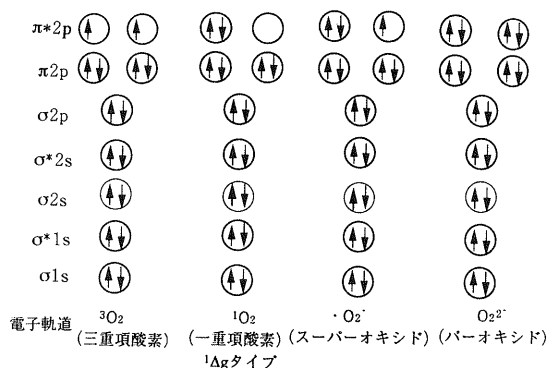


図-1 基底状態の酸素分子およびその還元分子種の電子配置

○は一つの電子軌道を、矢印は電子とそのスピン方向を示す

もある。一方で、血中や組織中の食細胞では活性酸素を生成し、細菌やウイルスなどの侵入に対する防御のために働いたり、植物細胞では微生物感染、機械的損傷、高・低温、乾燥、塩類、大気汚染物質などのストレスに対する種々の防

重項酸素分子の場合は、ラジカルではあっても例外的に安定で、このままの状態では生体成分との反応性は低い。それは、三重項酸素分子が2電子を受取って相手を酸化する場合には、相手側は酸素分子の空軌道を埋めるため平行スピンを持っていなければならないが、生体成分を含む多くの化合物の分子は通常の状態（基底状態）では一重項状態をとっているため、酸素分子との間にはスピン禁制があり反応がおこらないことによる。このことにより、生物は構成成分が急激な酸化をうけることなく、酸素分子を利用しながら生存できるわけである。

ところが、環境中や生体内でさまざまな要因により三重項酸素分子より反応性が大きく酸化活性に富む分子種が形成される。これらは活性酸素と呼ばれ、これには酸素の還元分子種であるスーパーオキシド（スーパーオキシドアニオンラジカルともいう）($\cdot O_2^-$)、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル($\cdot OH$)、および、励起分子種である一重項酸素(1O_2)、が含まれる。これらの電子配置については図-2に、生成経路については図-3にまとめた。この他 $\cdot O_2$ から派生するヒドロペルオキシラジカル($\cdot OOH$)、活性酸素による脂質の過酸化の過程で生成する脂質アルコキシルラジカル($LO\cdot$)や脂質ペルオキシラジカル($LOO\cdot$)、さらには一酸化窒素($NO\cdot$)やオゾン(O_3)などを含める場合もある。

これらの活性酸素は、後述する生体における消去機能を越えて生成された場合に、脂質の過酸化、タンパク質の修飾による酵素の不活性化、核酸の損傷などを通して組織障害を引き起こす。植物において枯死につながる最も重要な活性酸素障害は、脂質の過酸化による膜系の破壊であると考えられる。

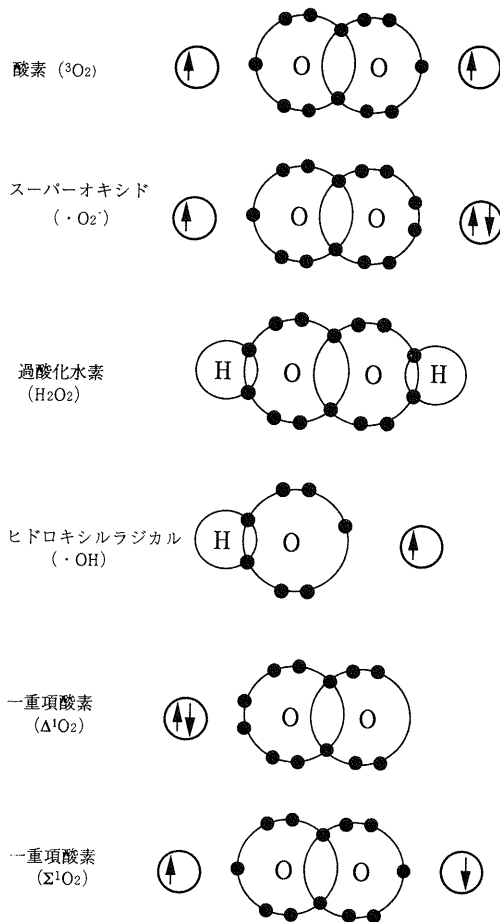


図-2 酸素および活性酸素分子種の電子配置のモデル (酸素の1sは除く)

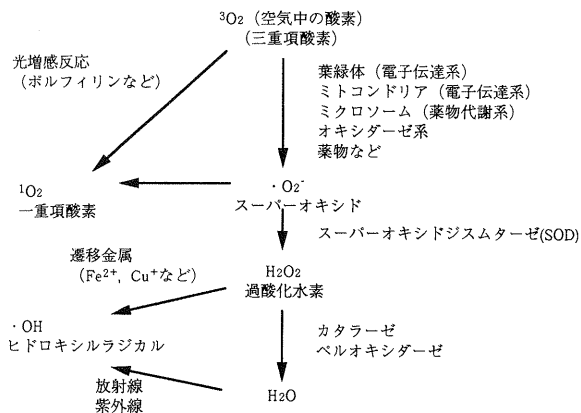


図-3 活性酸素の生成反応

3. 葉緑体における酸化ストレスと防御

活性酸素はあらゆる好気生物の多くの器官で絶えず生成されているが、生物のもつ消去系により処理され、通常生成される量での障害発生は抑制されている。植物における活性酸素生成は主に光に依存して起こるプロセスによってもたらされるが、この光依存の活性酸素生成は光酸化ストレス(photooxidative stress)と呼ばれる。光照射下での活性酸素生成の要因は、(a) 光合成反応による酸素分子への電子またはエネルギーの直接の付与、(b) 植物細胞への紫外線照射、である。特に葉緑体では、色素が光エネルギーを吸収し、水を分解して酸素を発生させる反応を行っているため内部の酸素濃度が高くなる。実際、光合成の電子伝達鎖は植物組織での活性酸素の主要な発生源となっている。このため葉緑体は常に酸素毒性にさらされた状態となっており、障害からの防御のための種々の機能が備わっている。

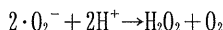
活性酸素分種の中で最も生体にとって有害な(酸化活性が強い)のは、ヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)であり、次いで一重項酸素($^1\text{O}_2$)の活性が大きい。一方、スーパーオキシド($\cdot\text{O}_2^-$)や過酸化水素(H_2O_2)の場合は、これら自体の活性は小さいが、活性の大きい他の分子種に転換されることによって害をもたらす。ヒドロキシルラジカルによる生体構成成分の酸化は速すぎるため、生物はこの分子種を直接除去することができず、より活性の小さい分子種を除去することで障害発生を防いでいる。

活性酸素に対する防御は、抗酸化系とよばれる抗酸化酵素と抗酸化物質からなるシステムで行われているが、その概略は以下になる。

(1) 抗酸化酵素

- ・スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)

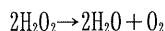
SODは次式のようにスーパーオキシドを過酸化水素と酸素に変化させる。



この酵素はすべての好気生物において、 $\cdot\text{O}_2^-$ が生成されやすい細胞内部に存在する。これはスーパーオキシドが寿命が短く、拡散距離が短く、かつ、生体膜を透過できないため、効果的に消去するには生成する場に共存することが必要なことを反映しているためと考えられる。

・カタラーゼ

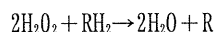
カタラーゼは以下のように過酸化水素を水に分解する。



この酵素も好気性生物すべてに分布するが、細胞内顆粒のペルオキシゾームに局在している。

・ペルオキシダーゼ

多種のペルオキシダーゼが植物に存在し、過酸化水素の分解を行っている。これらのペルオキシダーゼはカタラーゼとは異なり、過酸化水素の他に水素の供与体となるもう一つの基質(R)を必要とする。



葉緑体ではアスコルビン酸(ビタミンC)を水素供与体とするアスコルビン酸ペルオキシダーゼが働いている。

(2) 抗酸化物質

・ α -トコロフェロール(ビタミンE)

α -トコロフェロールは活性酸素による膜脂質の過酸化反応を止める作用を有する。脂溶性であるため、膜などの疎水性部分における抗酸化作用に重要な役割を果たしている。葉緑体ではチラコイド膜に多く含まれる。

・カロチノイド

カロチノイドも脂溶性の抗酸化剤で、特に β -カロテンは一重項酸素と励起状態の三重項ク

ロロフィル分子を消去し、それらに起因する酸化障害を防止する。

・アスコルビン酸（ビタミンC）

アスコルビン酸は水溶性の抗酸化剤で、細胞質や葉緑体ストロマ中に存在し、 $\cdot O_2^-$ を始めとする活性酸素種の消去に有効である。特にストロマ中ではmMオーダーという高濃度になる。また、膜の過酸化の停止反応で生成するビタミンEラジカルを膜の外側からビタミンEとして再生させる役割や、アスコルビン酸ペルオキシダーゼの基質としての役割も持っている。

・フラボノイド

フラボノイドは高等植物に広く分布しているフラボノール、アントシアンなどの天然色素群で、 $\cdot O_2^-$ や 1O_2 の消去能があり、紫外線による活性酸素障害の防止に働いていると考えられている。

4. 除草剤による活性酸素生成とその殺草作用への関与

いくつかの除草剤は活性酸素を生成し、その作用を通して植物組織に障害を起こすことが知られている。活性酸素生成には除草剤がラジカルとして直接係わる場合と、除草剤による植物の代謝系の障害が原因となる場合がある。

(1) ビピリジウム系除草剤

パラコート、ジクワットといったビピリジウム系剤が、植物体内で $\cdot O_2^-$ を発生させることはよく知られている(図-4)。これらの分子は2つの陽イオンをもった状態をとっており、光合成電子伝達系の光化学系Iの還元末端から電子を奪う働きをする。パラコートが電子を受け取って生成するパラコート陽イオンラジカルは、酸素分子があるとそれに電子を渡して $\cdot O_2^-$ を作り、自らはもとのパラコートに戻る。また、過酸化水素がある場合にはこれと反応して $\cdot OH$ を

生じる。パラコートの植物毒性は光の存在下でより強く発揮されるが、これはパラコートラジカル生成に光合成電子伝達反応からの電子供与が必要なためである。

また、動物体内では肺に特異的に蓄積し、NADPHなどから電子を受け取って上記のように活性酸素を作り、組織障害(パラコート中毒)を起こすことが知られている¹⁾。

(2) 光合成電子伝達阻害剤

光合成阻害剤による殺草作用は、電子伝達の阻害に端を発する炭酸固定の化学エネルギーお

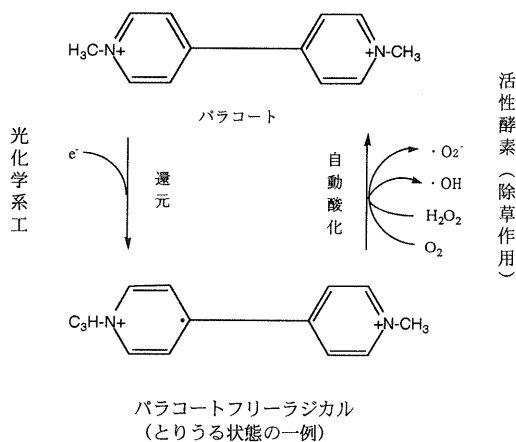


図-4 パラコートによる光化学系からの電子の奪取と活性酸素の生成

よび還元力の生成阻害による光合成産物の生成抑制によるものと考えられてきた。しかし、最近では活性酸素障害が植物を枯死させる主要因となっているものと考えられるようになっている。

ウレアやトリアジン系に代表される光合成電子伝達阻害剤は、チラコイド膜上にある光化学系IIの反応中心を構成するタンパクの一つであるD1タンパクに特異的に結合する。D1タンパクにはP₆₈₀と呼ばれる反応中心クロロフィルやフェオフィチンという色素分子、さらには、電子担体として働くプラストキノンの一種であるQ_B

などが結合している(図-5)。電子伝達阻害型除草剤は、D₁タンパクの還元(ストロマ)側にあるQ_Bの結合部位に、Q_Bよりも優先的に結合してしまう。その結果Q_B部位は除草剤で埋められてしまい、本来の電子の電子担体であるQ_Bはここに結合できなくなってしまう。また、除草剤には電子の受け渡し能はないため、光エネルギーを用いた水の分解で取り出された電子の流れは、このQ_Bで滞ってしまう。すなわち、光励起により形成されたエネルギー状態の高い電子が行き場を失ってしまうことになる。この電子により葉緑体内では異常に大量の活性酸素($\cdot O_2$)が生成される。

植物の側からは入射する光エネルギーをコントロールできないため、この電子過剰(還元力の過剰)の状態は、高温や乾燥ストレスなどで気孔を閉じた状態となり空気中からの炭酸の供給不足がおこるような場合でもおこる。そして、生成した活性酸素によりチラコイド膜などが損

生成はD₁タンパク内でおこるため、D₁タンパクは発生した活性酸素の標的となって分解されることで、活性酸素を消去する役割も果している³⁾。すなわちD₁タンパクは自らを犠牲にすることで光化学系を活性酸素障害から守っていることになる。そのかわり、このD₁タンパクの遺伝子は葉緑体DNAにコードされていて、強く発現し、絶えずこれを再合成している。D₁タンパクの代謝更新(turn-over)の半減期(半数の更新に必要な時間)は60分ほどといわれている。

ところがQ_B部位に除草剤が結合すると、D₁タンパクが安定化し活性酸素によって壊れにくくなってしまふ。これにより蓄積した活性酸素の処理ができなくなり、植物は $\cdot O_2$ から派生する組織障害で枯死してしまうことになる。

(3) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ阻害型除草剤

ジフェニルエーテルやフタルイミドなどの構造を有する除草剤群は、植物のもつクロロフィルやヘムを合成するテトラピロール生合成系の酵素の一つであるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(Protox)を標的として作用する。この酵素の阻害は低濃度の除草剤で処理後直ちに起こり、その結果生合成系が止まって、葉緑体内にこの酵素の基質であるプロトポルフィリノーゲン(Protopogen IX)が大量に蓄積する(図-6)。

植物では葉緑体内にテトラピロール合成の全過程が存在するが、ミトコンドリアでもヘム合成の最終プロセスが行われるため、プロトポルフィリノーゲンの段階で葉緑体から細胞質経由でのミトコンドリアへの輸送が通常からおこっているものと考えられる³⁾。薬剤がProtoxと結合してその作用を止めてしまうと、葉緑体内でクロロフィルやヘムの合成反応に使われなくなつて蓄積した大量のプロトポルフィリノーゲン

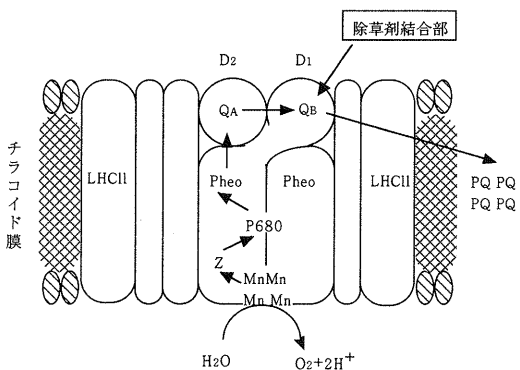


図-5 光化学系II複合体のモデル(矢印は電子の流れる方向を示す)

LHC II:クロロフィル結合性集光タンパク, Z:D₁タンパクのチロシン残基, P₆₈₀:反応中心クロロフィル, Pheo:フェオフィチン, Q_A:一次電子受容体キノン, Q_B:二次電子受容体キノン, PQ:プラストキノン

傷を受け、いわゆる光合成の光障害(photoinhibition)といわれる光照射下での光合成速度の減少がみられることがある。この活性酸素の

が細胞質に輸送されることとなる。ミトコンドリアのProtoxも薬剤と同様に阻害されているため、プロトポルフィリノーゲンはまったく利用されず、細胞膜などに存在する酸化活性によりプロトポルフィリン(Proto IX)へと転換する。このポルフィリンはクロロフィルと同様に効率的な光増感性(光エネルギーを吸収して励起状態となりその励起エネルギー他の分子に移す)色素で、光があると励起状態の酸素分子(1O_2)を

胞質中でのプロトポルフィリンの光増感反応の動力源としての役割を果たしている。また、 1O_2 発生後の膜脂質の過酸化過程では他の活性酸素種も絡んだ複雑な反応がおきていると考えられる。

5. 除草剤抵抗性誘導における活性酸素のシグナルとしての役割

植物は自ら移動できないため、危険な外部環境に適応するためさまざまな防御応答をみせる。

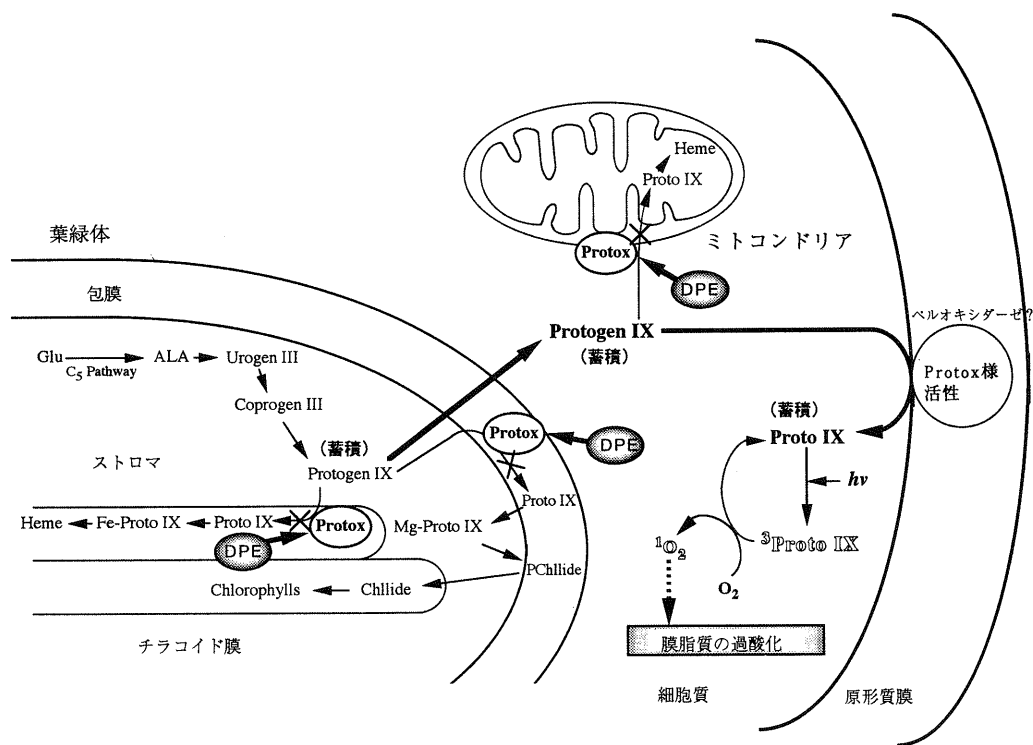


図-6 テトラピロール合成系の細胞内局在性とプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ阻害剤の作用機序
 Protogen IX:プロトポルフィリノーゲンIX, Proto IX:プロトポルフィリンIX, DPE:阻害剤

生じさせる。葉緑体に比較して抗酸化活性の弱い細胞質中で大量の活性酸素が発生することで、膜の過酸化障害を中心とした組織障害が急速に発現する。

これらの剤の作用発現には必ず光が必要であるが、光はテトラピロール合成系の活性化（プロトポルフィリン）の蓄積の増大、および、細

この防御応答は外部の環境認識、シグナルへの転換、必要な応答誘導といった段階からなる一連の反応である。植物は光エネルギーを化学エネルギーに転換する過程で水を分解して電子を引き抜き、酸素の発生を行っている。この反応過程で発生する活性酸素を処理する系を有することは上述の通りであるが、一方でこの危険分

子を、危険な環境をシグナル化する場面に利用していることが次第に明らかになりつつある。異物侵入、高温や低温、乾燥、塩類などの多くの種類の環境ストレス下で、植物の応答の最初の反応としての $\cdot O_2$ 生成が報告されている¹⁾。さらに、糸状菌などの微生物感染時には急激な $\cdot O_2$ 発生と、その後の防御的効果を持った適応応答との関連も明らかにされている。微生物感染以外のストレスの場合は、活性酸素発生とその後に起こる多様な防御反応との関係や、防御反応の適応的な意味についてはあまり明らかではない。しかし、植物への紫外線照射や大気汚染物質の暴露などで抗酸化活性が上昇する例は多数報告されている。したがって除草剤のような異物の侵入に対する応答の引き金としての活性酸素の役割は十分に考えられる。実際、活性酸素が先に述べた除草剤以外に、ホルモン剤の作用にも関与する可能性²⁾や、除草剤の解毒酵素であるグルタチオン-S-トランスフェラーゼの活性誘導に係わる可能性³⁾が示唆されている。これらのストレス下での活性酸素発生とその後の応答との関係、そして、その適応的価値を明らかにして行く研究が待たれるところで

ある。

引用文献

- 1) 大柳善彦(1989)“活性酸素と病気”，化学同人pp. 1-3.
- 2) Barber, J. and B. Andersson(1992): Too much of good thing: light can be bad for photosynthesis. TIBS 17, 61-66.
- 3) 松本 宏, 白井健二(1994): 除草剤はどのように作用し代謝されるか, 化学と生物 32, 447-455.
- 4) 道家紀志(1996): ストレスと活性酸素, “植物のシグナルトランスダクション, 現代化学増刊30” pp. 108-118.
- 5) Sunohara, Y., H. Matsumoto and K. Usui(1997): Possible involvement of active oxygen in clomeprop metabolite-induced electrolyte leakage from radish roots. J. Weed Sci. Tech. 42, 379-385.
- 6) Nagao A., K. Usui and H. Matsumoto(1997): Relationship between active oxygens and the induction of glutathione S-transferase by pretilachlor. J. Weed Sci. Tech. 42, 39-356.

日本雑草学会第14回シンポジウムの案内

標記シンポジウムを下記の日程で開催致します。多数の方々のご参加を期待します。

記

1. テーマ: 雑草制御剤の作用機構
2. 日時: 平成10年10月26日(月) 13:00~17:20
3. 会場: 筑波大学大会館ホール
(つくば市天王台1-1-1)
(JR土浦, 荒川沖, ひたち野牛久駅あるいは常盤高速バスつくばセンターより, バス筑波大学中央行大会館前下車)
4. プログラム:
 - 12:20 受付(大会館ホールホワイエ)
 - 13:00 主催者挨拶
 - 13:05 Peroxidizing herbicideの作用機構研究
-作用機構未解明部分及び作用点におけるQSA Rなど
若林 攻(玉川大学)
 - 13:55 モレキュラ・キラリティーは雑草科学研究に救いとなるか
-S-トリアジンとウレア化合物の光学活性と生物活性の多様性

- 14:45 休憩
- 15:05 ALS阻害除草剤の作用機構
-スルホニルウレア系除草剤の選択作用性
白倉 伸一(デュポン株式会社)
- 15:55 古くて新しいオーキシンの生理作用に関する研究
酒井 慎吾(筑波大学)
- 16:50 総合討論
- 17:30 懇親会
- 5. 会費
 - 参加費 会員1,000円, 非会員2,000円, 学生無料
 - 講演要旨 2,000円
 - 懇親会 4,000円
- 6. 連絡先: 参加希望の方は, なるべく10月19日(月)迄に下記宛お申し込み下さい。
〒305-8572 つくば市天王台1-1-1
筑波大学応用生物化学系
日本雑草学会第14回シンポジウム実行委員会(白井, 小林, 松本, 沈)
電話: 0298-53-4748, 4622, 6417, 7202
FAX: 0298-53-4605