

氏名(本籍)	貴志淳郎(神奈川県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第1074号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	非選択的除草剤グルホシネートの作用機構に関する研究
主査	筑波大学教授 農学博士 石塚皓造
副査	筑波大学教授 農学博士 日下部功
副査	筑波大学助教授 農学博士 臼井健二
副査	筑波大学教授 農学博士 上田堯夫

論文の要旨

本研究において対象となったグルホシネートは放線菌の代謝産物の活性成分で、am-monium (3-amino-3-carboxypropyl)-methylphosphinateという化学名で表わされるグルタミン酸と類似した化学構造を持つ物質である。非選択的な除草剤として広く使用されているが、本研究は植物のアミノ酸代謝をはじめとする生理代謝に対する影響を調べて、それらの特徴を明らかにしようとした研究である。

最近、グルホシネートと構造の類似した除草剤であるピアラホスは、グルタミン合成酵素(GS)を阻害しアンモニアの異常蓄積を引き起こして殺草効果を示すと報告している。また、蓄積したアンモニアは、尿素肥料など外部から与えたアンモニアにより由来し、その蓄積アンモニアが毒性発現を示すものを報告している。

しかしながら、グルホシネートの殺草メカニズムもピアラホスと同様かどうかは明らかではない。特に、グルホシネートがGSを第一次作用点として阻害するのか、グルホシネートの殺草効果が、アンモニアの異常蓄積により効果発現するのか、また、蓄積したアンモニアは、外部から添加した尿素肥料などにより蓄積するのか、そして、グルホシネートは、アンモニアの異常蓄積以外の効果により作用が発現するのかどうかは明らかでない。

そこで、本研究では、グルホシネートの作用点がGSの阻害であるのか、グルホシネートの殺草効果がGSの阻害により蓄積したアンモニアだけで現れるのか、グルホシネートは、アミノ酸量などの変動を引き起こすのかどうか、またその変動と殺草効果との間で相関関係が認められるのかどうか、そしてグルホシネートは選択作用性がなく効果を発現するのかどうかについて明らかにし、グルホ

シネートの作用機構を明らかにしようとした。

(1) 各種植物に対するグルホシネートの効果 グルホシネートの効果が、植物種間で異なるのかどうか、またグルホシネートの効果が発現する濃度範囲を明らかにするために行った。今回供試したキュウリ、イネ、そしてトウモロコシのすべての植物種間で、グルホシネートの生育抑制効果が見られ、その抑制度の程度も同様だった。そして、2.0mM以上の濃度で全ての植物に対して抑制効果が認められ、また可視的薬害としては、茎葉部にクロロシスが観察された。

(2) アンモニアの蓄積量と殺草効果との関係 まず、無窒素条件、硝酸態窒素、アンモニア態窒素供給条件下で生育させた植物の生育に対するグルホシネートの効果について検討を行った。グルホシネート添加によるアンモニアの蓄積は添加された窒素源の有無および種類にかかわらず全ての植物体で認められた。薬剤処理後2日以内にクロロシスも3種の被検植物体で観察された。また、アンモニアの部位別蓄積量は植物種間で異なることが明らかにされた。キュウリ、トウモロコシは茎葉部と根部の双方で蓄積し、経時的にその量が増加した。イネでは根部における蓄積が顕著であった。蓄積したアンモニアの生成経路は、外部から吸収されたものの他に、生体内代謝（光呼吸系からの生成や硝酸の還元による生成など）により生成されたものが存在し、むしろ、生体内代謝からの生成の方が多い可能性が考えられた。

(3) GS活性に対するグルホシネートの影響 植物によりアンモニアの蓄積部位や蓄積量が異なっていたので、グルホシネートによるGS阻害がどの様に認められるのか検討した。キュウリ、イネの酵素活性は、茎葉部および根部の双方で薬剤処理後経時的に低下し、著しい阻害が認められた。しかしながら、トウモロコシおよびタイヌビエの茎葉部では薬剤処理後活性の低下があまり起こらなかった。しかし、根部は早くから阻害が現われ活性が低下していた。GSに対するグルホシネートの影響は植物種により異なることが示された。そこで、さらにGSアイソザイムの組成とアイソザイムごとの阻害の程度について詳細に検討した。

(4) GSアイソザイムに対するグルホシネートの阻害効果 まず陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによりアイソザイムの分離を行った。供試植物の茎葉部の酵素は、2つのアイソザイム(最初のピークをGS₁もう1つをGS₂とした)に分離された。しかしながら、植物種間でそのピークの高さに違いが認められた。キュウリ、イネはGS₂の方が高く、トウモロコシではGS₁の方が高く、また、タイヌビエでは、双方がほぼ同じであった。一方、根部では単一のピーク(GS_r)が検出された。次にこれらのアイソザイムに対するグルホシネートの阻害効果を明らかにした。アイソザイムの活性を50%阻害する薬剤濃度(I₅₀)を求めたところ、GS₁はGS₂よりも低濃度に阻害され、またGS₁とGS_rとはほぼ類似した値が得られた。

(5) アミノ酸およびタンパク質量に対するグルホシネートの効果 GSは植物体内でのアンモニアの同化とグルタミン(Gln)の生成を行っている。従って、GSの阻害は、アンモニアの蓄積以外にGln量の減少や、そのほかのアミノ酸・アミドまたタンパク質量にも何等かの影響を与えているものと考えられる。そこで、薬剤処理後のアミノ酸・アミドおよびタンパク質量の変動について明らかにした。薬剤処理後のアミノ酸・アミドの変動は、大きく減少するもの〔グルタミン酸(Glu)、

グルタミン (Gln), アスパラギン酸 (Asp), アスパラギン (Asn) そしてグリシン (Gly)] と著しく増加するもの [ロイシン (Leu), チロシンなど] の2通りに分類できた。また, 茎葉部のアミノ酸の変動は, 根部に比べて著しいことが明らかとなった。次にタンパク質量を測定すると, 茎葉部では, 薬剤処理により減少が認められたものの根部ではその様な減少が起こらなかった。これらの結果から, 茎葉部で蓄積したアミノ酸・アミドは, タンパク質の分解によるものも含まれることが明らかとなった。

(6) 光合成活性に対するグルホシネートの効果 グルホシネートはクロロシスを引き起こすので光合成活性に対しても何等かの影響を示すものと考えられる。そこで, グルホシネート処理後の光合成活性の変化について検討を行った。キュウリの子葉を葉柄部分で切断し, その切口から薬剤 (10^{-3} Mグルホシネートと, 対照として 10^{-2} M NH_4Cl) を吸収させ光合成活性の変化とアンモニア蓄積量を測定した。グルホシネート処理区は処理後1時間目から活性が低下し, その後持続した。しかしながら, NH_4Cl 処理区は, 無処理区と同様の活性を示した。アンモニア蓄積量は, グルホシネート処理区と NH_4Cl 処理区との間で大きな違いが認められず, グルホシネートによる光合成活性の低下は, アンモニアの蓄積ではなくアミノ酸の変動であると考えられた。

(7) 光合成活性に対するアミノ酸によるグルホシネートの薬害軽減効果 グルホシネートによる光合成活性の低下はアミノ酸の変動と考えられた。そこで, 薬剤と共に, Glu, Gln, Asp, Asn, Gly またはLeuを添加したところ, グルホシネート単独処理では光合成活性の迅速な低下が認められたが, 薬剤と共にGlu, Gln, Asp, Asn, Glyを添加すると光合成活性の阻害が軽減された。また, Leuを添加した場合には活性の阻害が軽減されなかった。これらの結果は, グルホシネートによる光合成活性の低下は, グルタミン合成酵素の阻害によるGlu, Gln, Asp, Asn, Glyの減少による可能性が示唆された。

これらの結果から, グルホシネートの作用機構について検討を行った。

(1) グルホシネートは, 薬剤処理後迅速にGSを阻害した。また, GSアイソザイムを単離して, その阻害度を明らかにしたところ, 比較的低い濃度で I_{50} 値が得られ, グルホシネートはGSを阻害して殺草効果を示すものと考えられた。

(2) グルホシネートは, 植物体内に迅速にアンモニアの蓄積を引き起こしたが, 蓄積したアンモニアは外部から吸収したものだけではなく, 生体内代謝により蓄積したものも存在することが示された。

(3) グルホシネートの殺草効果は, 蓄積したアンモニアによる毒性だけで効果が現れるのではなく, GluやGlnの減少によることも考えられ, アンモニアの毒性効果が唯一の原因で現れるのではないことが示された。

(4) グルホシネートは光合成活性を低下させた, またGluやGlnなども減少させた。しかしながら, 薬剤とGlu, Gln, Asp, Asn, またはGlyを含んだ溶液で処理を行うと光合成活性の阻害の軽減が認められた。このことは, グルホシネートによる殺草効果の発現は, GSを阻害しアミノ酸量にも変動を起こし, その変動により現れるものと考えられた。

(5) グルホシネートは今回供試した植物種間で選択作用性は認められなかった。

審 査 の 要 旨

従来グルホシネートの作用機構としてはグルタミン合成酵素の阻害によるアンモニアの異常蓄積が提案されていた。アンモニアの由来についても単にその有機化の第一歩が阻害された為と推定されていたに過ぎない。その点本研究はグルホシネート処理の結果体内に蓄積されるアンモニアは体外から由来したものでは必ずしもないこと、またアンモニア毒性が殺草作用の直接原因ではないこと、アミノ酸代謝の攪乱が作用機構であることなどを明らかにし、グルホシネートの作用機構として新しい見方を提案している点に大きな独創性が認められる。なお、標的酵素のアイソザイムにグルホシネート感受性の違いを見出し、同時にアイソザイム組成に植物種間差を見出した点は、今後の薬剤-植物相互関係を解明する上で重要な示唆を与えるものと判断する。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。