

氏名(本籍)	なが お あき こ 長尾明子(東京都)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第1,826号		
学位授与年月日	平成10年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	除草剤 pretilachlorによる植物 glutathione S-transferase の誘導機構に関する研究		
主査	筑波大学教授	農学博士	臼井健二
副査	筑波大学教授	農学博士	神山由
副査	筑波大学助教授	農学博士	松本宏
副査	筑波大学教授	農学博士	正野俊夫

### 論文の内容の要旨

植物は、環境に適応し、変化に対応する能力を獲得してきた。外来の異物に対しても、それを確認し無毒化する機構を有しており、ストレス対応、生体防御反応の一つと考えられている。その中に、グルタチオン抱合解毒があり、glutathione S-transferase (GST) は広範な親電子化合物と還元型グルタチオン (GSH) との抱合を触媒し、これら異物の侵入により活性が増加誘導され解毒反応が促進され、植物はこれら異物に抵抗性を示す。除草剤は、雑草を防除し競合による生育抑制から作物を保護し、食糧の安定供給と省力化に貢献してきた。除草剤は通常選択性を有するものが用いられ、作物による解毒活性が選択性の大きな要因の一つになっていて、解毒活性の大きな作物が耐性を示す。 $\alpha$ -クロロアセトアミド系除草剤の pretilachlor は、稲作において選択的除草剤としてヒエ等の除草防除に用いられているが、時として薬害を生じることがあり、フェンクロリム等が薬害軽減剤として用いられており、これらに GST が関与していることが知られている。

本論文は、薬剤処理による GST 活性の増加・誘導の機構を、pretilachlor の作物雑草間の選択性あるいは薬害軽減効果と GST 活性との関連性、基質および活性酸素による誘導、アイソザイムの分離を通して追究したものである。

まず、pretilachlor とフェンクロリムあるいは1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (CDNB) を $10^{-7}$ ~ $10^{-5}$ M で単独あるいは混合して水耕法でイネおよびタイヌビエ幼植物に処理し、生育抑制と薬害軽減効果について pretilachlor および CDNB を基質とした GST 活性を調べ、GST 活性およびその誘導(約1.5倍)と耐性・薬害の軽減との関連性、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによるアイソザイムパターンから部分的ながら処理化合物に特異的な誘導およびアイソザイムの基質特異性を見いだした。また、GST の基質が活性誘導と関連性が高いと想定し、イネ科のイネ、トウモロコシ、タイヌビエ、メヒシバの4種植物で活性誘導と基質親和性等より調べたところ、概ね処理化合物を基質とした特に活性が大きく誘導され、基質特異性とも関連することが見いだされたが、植物種による違い・特異性も大きかった。次いで、薬剤処理等のストレス時に発生すると考えられている活性酸素が GST 活性誘導に関連しているかをイネにおいて pretilachlor あるいは活性酸素発生剤(メチルピオローゲン) および活性酸素捕捉剤処理したときの GST 活性および GSH 含量の変化を調べて検討した。両処理により GST (pretilachlor) 活性の増大と GSH 含量の低下が見られ、活性酸素捕捉剤特にタイロン処理ではその程度は小さくなり、外からの GSH 添加により GST 活性増は減少し、スーパーオキシドの GST 活性誘導への関与が強く

示唆された。一方、同様にフェンクロリム処理して調べると、GST 活性増加は pretilachlor 処理と同様だったが、GSH 含量の低下は少なかったことより、活性酸素の関与は部分的であると考えられた。さらに、pretilachlor あるいはメチルピオローゲン処理して GST アイソザイムを分離すると、溶出順に A~G の主な7つのピークが認められ、そのうちほぼ5個の活性が両処理に共通して増加し、特に D, F が pretilachlor により、A, B がメチルピオローゲンにより大きく増加し、特異的なアイソザイムの誘導も見られた。

以上により、pretilachlor の選択作用性と薬害軽減作用に GST 特に pretilachlor を基質とする GST 活性およびその薬剤による誘導が大きく関与すること、その誘導は、植物種による違いがあるものの、処理した化合物を基質とする GST 活性に比較的特異的であり、薬剤ストレス・薬剤のグルタチオン抱合による GSH 含量の減少に伴う活性酸素の増加が関与している可能性が示唆され、GST が薬剤・活性酸素ストレスに対する防御的反応に関与していることが推察された。

本研究における植物の薬剤による GST の誘導機構の解明は、植物の異物からの防御・環境適応ばかりでなく、除草剤の適切な使用・開発研究に有用な知見を与えるものである。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

Glutathione S-transferase (GST) は植物においても異物代謝に関連し様々な化学物質により活性が誘導されることが知られているが、その機構は十分明らかとされていない。

本論文は、水稲用選択性除草剤でクロロアセトアミド系の pretilachlor のグルタチオン抱合代謝を触媒する GST の誘導の機構を生化学的に追究したものであり、数種のイネ科植物を用いて GST の基質となるフェンクロリム、CDNB 処理と、それらに対する活性および活性増加、基質特異性と親和性などを比較検討し、また、活性酸素発生剤とその捕捉剤を用いて、GST 誘導に基質のほか活性酸素特にスーパーオキシドの関与の可能性を見いだしたことは高く評価される。

イネ科植物における pretilachlor の選択性や薬害軽減作用のグルタチオン抱合代謝・GST 活性との関連性を確認すると共に、選択性は pretilachlor を基質とする GST の  $V_{max}/K_m$  で良く示されることを見いだした。また、GST の基質となる化合物処理によりそれに特異的な GST 活性が比較的良く誘導されるが、植物種による特異性も示された。薬剤による GST 活性誘導の機構について、グルタチオン抱合により減少すると想定される GSH とそれに由来する活性酸素の増加の面より追究し、イネ幼植物で pretilachlor とフェンクロリムの他活性酸素発生剤と捕捉剤、GSH 処理し、GSH の減少と活性酸素の増加の GST (pretilachlor) 活性誘導への関与を推測した。そして、カラムクロマトグラフィで GST アイソザイムを分離し、pretilachlor と活性酸素発生剤処理に共通して増加する GST アイソザイムの存在から証明した。一方、より特異的に誘導されるアイソザイムも存在し、フェンクロリムによる誘導は GSH の減少が少ないにも拘らず高かったことから、活性酸素の関与が小さく薬剤に特異的な誘導も示唆している。

これらの研究の進め方および結果は独創性を示すものであり、GST の異物に対する対応・防御反応についても優れた考察がなされている。今後、更なる GST 誘導の機構、活性酸素と基質との関係、遺伝子レベルでの追究が期待される。

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。