

平成 2 8 年 6 月 2 2 日現在

機関番号：1 2 1 0 2

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013 ~ 2015

課題番号：2 5 4 5 0 0 6 8

研究課題名 (和文) 次世代の新規除草剤候補物質の探索と作用機構の解明

研究課題名 (英文) Screening of novel candidate compounds for next-generation herbicides and an investigation of their modes of action

研究代表者

春原 由香里 (SUNOHARA, Yukari)

筑波大学・生命環境系・講師

研究者番号：0 0 3 0 2 5 3 9

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 4,000,000 円

研究成果の概要 (和文) : 次世代の除草剤の開発に繋がる知見を得ることを目的として、薬用植物や熱帯、亜熱帯性の植物種から高い植物生育抑制活性を有する新規の生理活性物質の探索を行った。その結果、植物に対して非常に高い生育抑制活性を有する化合物類を見出した。それらやその類縁化合物について植物体内での作用機構の検討を行った。オイカルボン、ヒノキチオール、クミンアルデヒド、オクチルアセートの4つの化合物については、植物体内で活性酸素の過剰生成を誘発し、酸化障害を引き起こすことが植物の生育抑制に繋がっているものと推察された。しかしながら、活性酸素の過剰生成のメカニズムは、それぞれの化合物で異なることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Various medicinal, tropical, and subtropical plant species were screened for phytotoxic volatile compounds in order to find novel candidate compounds for next-generation herbicides, and the characterization of several promising compounds including eucarvone, hinokitiol, cuminaldehyde, and octyl acetate was investigated to understand their modes of action. Eucarvone, hinokitiol, cuminaldehyde, and octyl acetate, which have carbonyl function, induced overproduction of reactive oxygen species (ROS) and oxidative damage in the susceptible plant species. However, it was proposed that the effects of these compounds were brought about by different mechanisms.

研究分野：農学

キーワード：アレロケミカル 天然生理活性物質 植物成長抑制作用 除草剤

1. 研究開始当初の背景

近年、単一の除草剤や同じ作用機構を持つ除草剤を長年、連用し続けることにより、除草剤に対して抵抗性を持つ雑草種の発生が増加し、問題となっている。抵抗性雑草の発生の増加に対する対応策の1つとして、同じ作用機構を持つ薬剤の連用を避けることが重要であり、その観点からも新規の作用点を持つ薬剤の開発が期待されている。新規の作用点を持つ除草剤の開発に繋がる1つの可能性として、植物の成育抑制活性を有する天然物があり、実際に天然物から除草剤の開発に繋がった例もある。また、天然物は易分解性であることから、環境に負荷がかからない次世代の新規薬剤開発に利用できる可能性がある。そのため、天然物から次世代の新規の農薬開発に応用可能な新しい生理活性物質を探索し、その利用の可能性を検討したいと着想するに至った。

2. 研究の目的

熱帯や亜熱帯原産の野生植物や薬用植物種は二次代謝産物を多く含むため、新規の除草剤や植物成長調節剤の有効成分となる新たな生理活性物質を見出せる可能性がある。本研究課題では、これらの植物種から、植物成育抑制活性あるいは促進活性を有する新規の生理活性物質を見出し、その中から有望な候補物質を選抜し、作用性や作用機構を解析することで、環境負荷が低く、非標的生物への安全性が高い次世代の除草剤や植物成長調節剤の開発に繋がる知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 薬用植物種と熱帯や亜熱帯原産の植物種の採集

筑波大学農林技術センターにて採集、さらに購入可能な薬用植物種は薬局から購入した。

(2) 植物成育抑制活性あるいは促進活性を持つ生理活性物質を生産する植物種のスクリーニング

ディッシュパック法 (Sekine *et al.*, *Journal of Chemical Ecology* 33:2123-2132, 2007) を用いて、植物成育抑制活性あるいは促進活性がある揮発性の生理活性物質を生産する植物種のスクリーニングを行った。

(3) 植物成育抑制活性あるいは促進活性を持つ生理活性物質の同定

植物体各部位を磨砕し、バイアル瓶中で密封させ、その気層中の揮発性物質をガスクロマトグラフ質量分析計 (GS/MS) にて同定した。また、ガスクロマトグラフィー (GC) を用いた濃度分析や植物成長抑制活性等の解析から、活性化化合物の決定を行った。

(4) 同定された生理活性物質の作物や雑草種の成長への影響と種間選択作用性の検討

同定された生理活性物質について、作物種や雑草種の成育に対する影響や種間選択性等

を調べることで、より有望な新規薬剤開発の候補物質の検討を行った。

(5) 生理活性物質の作用機構の解析

① プロテオーム解析を用いた変動タンパク質の検討

選抜した生理活性物質をイネ幼植物体に処理した。一定時間経過後、根部から総タンパク質を抽出し、ゲルフリープロテオミクス手法にてタンパク質の増減を解析した。

② 作用との関連が推察される酵素の活性測定

植物体根部に生理活性物質を処理した後、根部から粗酵素液を抽出し、ペルオキシダーゼ (POD)、スーパーオキシジスムターゼ (SOD)、カタラーゼ (CAT)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX)、グルタチオンレダクターゼ (GR)、シュウ酸オキシダーゼ (OXO) の活性測定を行った。

③ 活性酸素発生による酸化障害と成育抑制作用の検討

③-1. 死細胞誘導の検討

生理活性物質を処理後にフルオロセインジアセテートとプロピジウムイオダイド (FDA/PI) の二重染色、さらにエバンスブルー染色を行い、蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡で観察することにより、根部における死細胞の変動を調べた。

③-2. プログラム細胞死 (PCD) 誘導作用の検討

生理活性物質を処理した植物体根部とタバコ培養細胞に対して、TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) 染色や FITC-Annexin V 染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡によって観察することで、PCD が誘導されている細胞を検出した。

③-3. 活性酸素発生誘導の検討

根部に生理活性物質を処理した後、蛍光プローブであるジヒドロエチジウム (DHE) で染色後、共焦点レーザー顕微鏡で観察することで、スーパーオキシドアニオンラジカル (O_2^-) の発生の有無を調べた。また塩化チタンを用いた定量法により過酸化水素 (H_2O_2) の発生量も調べた。

③-4. 脂質過酸化の検討

根部に生理活性物質を処理した後、シッフ試薬にて染色後、脂質の過酸化の程度を明視野観察により検討した。またチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) を指標とした定量も行った。

④ 細胞周期停止作用の検討

生理活性物質を処理した後、根部細胞の明視野観察を行い、1000 個の細胞における分裂細胞の割合を算出した。また、フローサイトメトリーを用いて DNA 量を測定し、生理活性物質を処理された細胞が細胞分裂プロセスのいずれの

段階に分布するかを検討を行った。

4. 研究成果

(1) 植物生育抑制活性あるいは促進活性を持つ生理活性物質を生産する植物種のスクリーニング

161 種の植物種を用いてディッシュパック法によるスクリーニングを実施したところ、以下の植物体の各部位から生産される揮発性物質の中に、レタス幼植物体に対して高い生育抑制効果を持つ化合物が含まれていることが明らかとなった。

①ウスバサイシ (*Asarum sieboldii* Miq.) の根部、②ケイガイ (*Schizonepeta tenuifolia* Briquet) の花穂、③カッコウ (*Agastache rugosa* O. Kuntze) の葉部、④カルダモン (*Elettaria cardamomum* (L.) Maton) の種子、⑤キョウニン (*Prunus armeniaca* L. var. *anus* Maxim.) の種子、⑥クミン (*Cuminum cyminum* L.) の種子、⑦シオン (*Aster tataricus* L.) の根部、⑧シュクシヤ (*Hedychium coronarium* Koen.) の種子、⑨ニクジュヨウ (*Cistanche salsa* (C.A. Meyer) G. Beck) の全草、⑩リュウタン (*Gentiana scabra* Bunge var. *buergeri* (Miq.) Maxim.) の根部と根茎、⑪カヤツリグサ (*Cyperus microiria*) の茎葉、⑫キャッサバ (*Manihot esculenta* Crantz.) の茎葉、⑬コノテガシワ (*Platycladus orientalis* (L.f.) Franco) の葉部、⑭食用カンナ (*Canna edulis* Ker-Gawl.) の葉部、⑮ニウコウジュ (*Boswellia* sp.) の樹脂、⑯ハス (*Numbo nucifera* Gaertn.) の葉部、⑰ウイキョウ (*Foeniculum vulgare* Mill.) の果実、⑱トウシキミ (*Illicium verum* Hook.f.) の果実、⑲ラベンダー (*Lavandula angustifolia*) の花、⑳ノイバラ (*Rosa multiflora* Thunb.) の果実、㉑カノコソウ (*Valeriana fauriei* Briq.) の根部、㉒チョウジ (*Syzygium aromaticum* Merr. et Perry) の花

(2) 植物生育抑制活性あるいは促進活性を持つ生理活性物質の同定

上記(1)で高い植物生育抑制効果を有することが明らかとなった植物体の各部位を用いて、発生する揮発性物質を GC/MS によって同定した。同定された各化合物を用いて、レタス幼植物体に対する植物生育への影響を調べた結果、オイカルボン、ピュレゴン、メントン、(±)-カンファー、クミナルデヒド、酢酸ボルニル、ボルネオール、アネトール、オクチルアセテート、1,8-シネオール等が植物に対して高い生育抑制作用を有することが明らかとなった。

次にこれらの化合物とその構造類縁体について、植物体内での作用メカニズムの検討を実施した。以下に、オイカルボン、ヒノキチオール、クミナルデヒド、オクチルアセテートの植物体内での作用メカニズムについての検討結果を示す。

(3) オイカルボンの植物生育抑制メカニズムの検討

これまでの先行研究から、ピュレゴンは最も活性の高いアレロケミカルの1つであることが知ら

れており、ダイコンの種子発芽に対する抑制効果は HCN の約 4 倍程度強いことが報告されている。上記(2)において、レタス幼植物体の初期生育への影響を検討した結果、オイカルボンは、ピュレゴンと同程度の非常に高い生育抑制活性を持つことが明らかとなった。

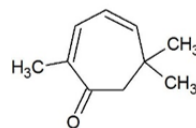


図1 オイカルボン

また、これまでオイカルボンの植物生育への影響や作用メカニズムに関する知見がほとんどないことから、本研究では、まずはじめにオイカルボンに着目し、植物体内での高い生育抑制作用のメカニズムの検討を実施し、以下の結果を得た。

オイカルボンは、供試した 11 の植物種中、9 種で高い生育抑制活性を示した。根部において高い生育抑制を示したのは、アオビユとオヒシバであり、茎葉部ではエノコログサ、オヒシバ、シコクビエであった。一方、トウモロコシは茎葉部、根部のいずれにおいても、ほとんど生育抑制を受けなかった。オイカルボンに感受性を示した植物種では、高濃度になるほど死細胞数の増大とともに、活性酸素種である O_2^- や H_2O_2 の過剰発生が誘発され、さらに脂質の過酸化が増大することがわかった。また、感受性を示したイネを用いてプロテオーム解析により、オイカルボン処理後に変動するタンパク質を調べたところ、主にフラボノイド合成に関わるタンパク質が減少し、ストレス応答性タンパク質が増加していた。また、増加したタンパク質の1つに、 H_2O_2 の生産に関与する酵素の1つである OXO が見出された。そこで、オイカルボン処理後の OXO 活性の変動と H_2O_2 発生について検討した。その結果、オイカルボン処理したイネ根部では、OXO 活性と H_2O_2 量が増大することが示された。OXO は、細胞壁に局在し、シュウ酸を加水分解して H_2O_2 を生産する。このことから、オイカルボン処理による H_2O_2 の発生増大の1要因として、OXO が関与している可能性があるものと考えられた。これまでの先行研究から、OXO の活性増大による H_2O_2 量の増加は、さらにリグニン化を引き起こし、細胞の伸長を抑制する可能性があることが報告されている。そのため、さらに、オイカルボン処理後のリグニン含量の変化も測定した。しかしながら、今回の実験条件下では、オイカルボン処理によるリグニン含量の増大は確認されなかったことから、オイカルボンの生育抑制作用と H_2O_2 量の増加によるリグニン化の関係は現時点では明らかになっていない。

(4) ヒノキチオールの植物生育抑制メカニズムの検討

ヒノキチオールは、オイカルボンの構造類縁体であり、植物抑制作用を持つことが知られているが、その作用メカニズムは解明されていない。そのため、オイカルボンとの比較として、ヒノキチオールの植物生育抑制メカニズムの検討も行い、以下の結果を得た。

作物と雑草を含む 13 の植物種を用いて、ヒノキチオール植物生育抑制作用の比較を行った結果、植物生育抑制効果には植物種間で差があり、ヒノキチオール 3 日間処理後のイネとトウモロコシの根伸長における GR_{50} 値 (50%生育を抑制する濃度) は、それぞれ 31 μ M、342 μ M であり、約 10 倍の差があった。また、イネ (感受性) では、ヒノキチオール処理により、オイカルボンと同様に濃度依存的に死細胞数の増加、活性酸素種 (O_2^- や H_2O_2) の過剰発生や過酸化脂質の増大が認められた。イネ幼植物体を用いたプロテオーム解析によって、ヒノキチオール処理後のタンパク質の変動を調べたところ、タンパク質合成や解毒代謝に関わるタンパク質が減少し、特に活性酸素の解毒酵素である POX や SOD が減少することが明らかとなった。ヒノキチオール処理により、特に活性酸素の解毒酵素系の減少が認められたことから、ヒノキチオールの植物生育抑制作用における活性酸素の関与について、さらに検討を実施した。その結果、ヒノキチオール処理によりイネ根部で濃度依存的に H_2O_2 が増加し、また H_2O_2 のスカベンジャーである KI の同時添加によって根部の成育が回復し、脂質過酸化が減少することが確認された。また、ヒノキチオール処理したイネ根部で、活性酸素の解毒酵素である POD や SOD の減少が認められた処理濃度において、PCD を示す蛍光が確認された。さらに、その濃度域で、イネ根部における抗酸化酵素活性を測定したところ、POD、SOD、CAT、GR、APX で濃度依存的な酵素活性の減少が確認された。このうち SOD を除く 4 種はいずれも H_2O_2 の分解に関与する酵素である。

これらの結果から、ヒノキチオール処理によるイネ根部の成育抑制作用は、活性酸素の増加により細胞膜の脂質過酸化や DNA 傷害による PCD が引き起こされることによると推測され、さらに活性酸素の増加の原因として抗酸化酵素活性の減少によるそれらの消去能の低下が示唆された。

(5) クミンアルデヒドの植物生育抑制メカニズムの検討

クミン種子から生成されるクミンアルデヒドに高い植物生育抑制作用を見出したため、クミンアルデヒドの植物生育抑制メカニズムの検討を実施し、以下の結果を得た。

作物 8 種、雑草 6 種を対象に生物試験を行った結果、最も感受性の高かった植物種は雑草種である、メヒシバ、オヒシバ、アオビユの 3 種であった。トウモロコシ、インゲンの 2 種では比較的影響を受けにくく、クミンアルデヒドの植

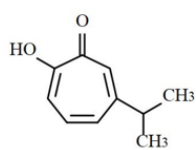


図2 ヒノキチオール

物生育抑制活性には植物種間差があることが明らかとなった。タマネギもクミンアルデヒドに対して、感受性を示したため、作用メカニズムの検討では、タマネギを用いて実験を実施した。その結果、クミンアルデヒドは、タマネギの根部において、死細胞の増加、活性酸素 (O_2^-) の過剰発生、酸化傷害を誘発することが示された。共焦点レーザー走査型顕微鏡による詳細な検討により、クミンアルデヒドを処理後、死細胞数が増大し始める低濃度域から、活性酸素が増大していることが明らかとなった。また同じ濃度域から細胞分裂指数の低下も認められた。さらに、活性酸素発生が認められた濃度以上になると、PCD による DNA の断片化やホスファチジルセリン (PS) の細胞膜表面への露出も確認された。これらのことから、クミンアルデヒドのタマネギ根部での植物生育抑制作用には活性酸素が関与しており、活性酸素を発生させ、脂質過酸化や DNA にダメージを与え、細胞分裂の停止、または PCD へ誘導し死細胞を増加させることが推定された。

(6) オクチルアセテートの植物生育抑制メカニズムの検討

ニューコウジュの樹脂から発生するオクチルアセテートにレタス幼植物体に対する高い生育抑制作用を見出したため、オクチルアセテートの植物生育抑制メカニズムの検討を実施し、以下の結果を得た。

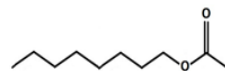


図4 オクチルアセテート

オクチルアセテートによる植物生育抑制作用に、種間選択性があるか検討するため、作物種、雑草種を含む 9 種の植物に対する生育抑制活性を調べた結果、最も感受性の高い植物種は、オヒシバであり、比較的感受性の低かった植物種はアルファルファとキュウリであった。しかし、アルファルファとキュウリにおける GR_{50} 値は、最も生育が抑制されていたオヒシバの約 2~4 倍程度の差のみであり、この 9 種の植物種の中では、オクチルアセテートは、いずれの植物種に対しても高い生育抑制作用を持つことが明らかとなった。作用メカニズムの検討では、感受性を示したイネとタマネギの幼植物体、さらにダイズの培養細胞を用いて実験を実施した。イネ根部では、における GR_{50} 値の濃度処理によって、活性酸素 (O_2^-)、PCD、ネクローシスの増加が示唆され、 GR_{80} 値の処理では、脂質の過酸化も誘導されていた。さらに、タバコ培養細胞においては、300 μ mol/l 以上の処理によって、有意な生育の抑制減少がみられた。300 μ mol/l の処理では、活性酸素、ネクローシスの増加が確認され、400 μ mol/l 処理では、さらに PCD の誘導も確認された。また、タマネギ根部では、濃度依存的に細胞分裂指数の減少が見られ、オクチルアセテート処理によってすべての有糸分裂期の細胞が減少することが明らかとなった。これらの結果から、オクチルアセテートは活性酸素の過剰発生を誘導し、それによって引き起こされる PCD や細胞分裂の停止および膜脂質の過酸化

が植物根部の生育抑制に繋がっていると考えられる。

本研究課題では、探索した生理活性物質の中から、高い植物生育抑制活性を有することが明らかとなった化合物やそれらの類縁化合物について植物体内での作用メカニズムの検討を実施した。オイカルボン、ヒノキチオール、クミンアルデヒド、オクチルアセテートの4つの化合物については、活性酸素の過剰生成を誘発するという共通点が見出されたが、これらの化合物は、それぞれ異なるメカニズムによって活性酸素の過剰生成を引き起こす可能性が示唆された。また、これら4つの化合物は、いずれも化学構造の中に電子求引性の高いカルボニル基を有しており、これらの化学構造が活性酸素の過剰発生の誘発に関連している可能性もあり、この点においては更なる検討が必要である。これらの化学構造と植物体内での作用メカニズムにおける知見は、新たな除草剤開発の際の有用な知見になりうるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

① Sunohara, Y., Y. Baba, S. Matsuyama, K. Fujimura and H. Matsumoto (2015) Screening and identification of phytotoxic volatile compounds in medicinal plants, and characterizations of a selected compound, eucarvone, *Protoplasma* 252, 1047-1059. (refereed)
DOI: 10.1007/s00709-014-0739-4

② Yonezawa, T., Y. Sunohara and H. Matsumoto (2015) Involvement of heme synthesis in growth stimulation of maize seedlings by 5-aminolevulinic acid, *Weed Biology and Management* 15, 53-60. (refereed)
DOI: 10.1111/wbm.12064

③ Mushtaq, M. N., Y. Sunohara and H. Matsumoto (2013) Allelochemical L-DOPA induces quinoprotein adducts and inhibits NADH dehydrogenase activity and root growth of cucumber, *Plant Physiology and Biochemistry*, 70, 374-378. (refereed)
DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.06.003

④ Mushtaq, M. N., Y. Sunohara and H. Matsumoto (2013) L-DOPA inhibited the root growth of lettuce by inducing reactive oxygen species generation, *Weed Biology and Management* 13, 129-134. (refereed)
DOI: 10.1111/wbm.12019

⑤ Mushtaq, M. N., Y. Sunohara and H. Matsumoto (2013) Bioactive L-DOPA induced

quinoprotein formation to inhibit root growth of cucumber seedlings, *Journal of Pesticide Science*, 38(2), 68-73. (refereed)
DOI: 10.1584/jpestics.D13-005

[学会発表](計 11 件)

①伊藤瑞紀・春原由香里・岩上哲史・藤井義晴・松本 宏、ヒノキチオール処理によるイネ根部での H_2O_2 蓄積への抗酸化酵素活性の関与、日本雑草学会第 55 回大会、平成 28 年(2016 年)3 月 29-30 日、東京農業大学 (東京都世田谷区)

②西村彰紘・春原由香里・松山 茂・岩上哲史・松本 宏、オクチルアセテートによる根部生育抑制作用における活性酸素発生の関与、日本雑草学会第 55 回大会、平成 28 年(2016 年)3 月 29-30 日、東京農業大学(東京都世田谷区)

③Nishimura, A., Y. Sunohara, S. Matsuyama and H. Matsumoto, Determination and phytotoxic characterization of octyl acetate, The 25th Asian-Pacific Weed Science Society Conference, October 13-16, 2015, Hyderabad, India

④藤村香里・春原由香里・松本 宏、オイカルボン処理によるイネ根部でのシュウ酸酸化酵素活性、 H_2O_2 含量、リグニン含量への影響の検討、日本雑草学会第 54 回大会、平成 27 年(2015 年)4 月 18-19 日、秋田県立大学 (秋田県秋田市)

⑤春原由香里・中野 香・松本 宏、クミンアルデヒド処理によるタマネギ根部での細胞分裂とプログラム細胞死誘導の検討、日本雑草学会第 54 回大会、平成 27 年(2015 年)4 月 18-19 日、秋田県立大学 (秋田県秋田市)

⑥春原由香里・大西 薫・松山 茂・松本 宏、チヨウジとハナハッカから放出される揮発性物質の同定と植物生育促進活性、日本雑草学会第 54 回大会、平成 27 年(2015 年)4 月 18-19 日、秋田県立大学 (秋田県秋田市)

⑦伊藤瑞紀・春原由香里・小松節子・藤井義晴・松本 宏、ヒノキチオール処理によるイネ根部での変動タンパク質の解析と活性酸素発生誘導の検討、日本雑草学会第 54 回大会、平成 27 年 (2015 年)4 月 18-19 日、秋田県立大学 (秋田県秋田市)

⑧ Sunohara, Y., Determination and characterization of the phytotoxic activity of eucarvone, Research Seminar on "Oxidative stress in Plants", Feb. 9, 2015, Bangkok, Thailand

⑨中野 香・春原由香里・松山 茂・松本 宏、クミンから発生する揮発性物質クミンアルデヒドの

生育抑制活性と活性酸素発生の検討、日本雑草学会第53回大会、平成 26年(2014 年)3 月 29-30 日、法政大学(東京都小金井市)

⑩藤村香里・春原由香里・小松節子・藤井義晴・松本 宏、オイカルボンと類縁化合物の作用性比較とオイカルボン処理により変動するイネタンパク質の解析、日本雑草学会第53回大会、平成26年(2014年)3月29-30日、法政大学(東京都小金井市)

⑪福島悠介、春原由香里、松本 宏、オジギソウ属植物が生産するミモシンによる植物生育抑制機構、日本農薬学会第39回大会、平成 26年(2014年)3月13-15日、京都大学(京都府京都市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

春原由香里 (SUNOHARA, Yukari)

筑波大学・生命環境系・講師

研究者番号:00302539

(2)研究分担者

松本 宏 (MATSUMOTO, Hiroshi)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号: 10199888

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

馬場陽平 (BABA, Yohei)

藤村香里 (FUJIMURA, Kaori)

中野 香 (NAKANO, Kaori)

伊藤瑞紀 (ITOH, Mizuki)

西村彰紘 (NISHIMURA, Akihiro)