

## 緒 言

病虫害や雑草が作物の収量減をもたらす作用は驚くほど大きく、特に雑草の場合、もし除草作業を全く行わなかったとすると、30~100%の減収となることから、作物生産上最も深刻な問題となっている（高橋, 1996）。雑草による主な被害としては、生産物の収穫量の減少の他に品質の低下、耕地利用率の減少などもあげられる。雑草の防除法として、従来は殆どが人力に頼ったものであったが、除草剤の使用が普及するようになり、その簡易性、有効性から、現在では作物生産上必須の手段となっている。

近年、地球上の人口は60億人に達し、21世紀の半ばにはその2倍に達することも推定されている。よって、地球上の限られた耕地から、人口を維持する十分な食糧を生産してゆくためには、雑草防除手段として除草剤が今後も大きな役割を果たすことが予想される。しかし、環境汚染や生物に対する安全性などの観点から、より低薬量、低残留、高度選択性の除草剤の開発が望まれている。よって、薬剤の有効性だけでなく、植物体内における挙動や、生理生化学的な影響、および選択作用機構を詳細に研究することが必要となってくる。現在の除草剤には、動植物に共通する代謝系をターゲットにするものも存在する。これらの除草剤の生物への安全性を確認するため、またその毒性を十分に把握するために、作用メカニズムを研究することが必要とされる。それによって、環境に対してより安全性の高い薬剤の作出に関する知見も集積されてくることになる。

これらの視点から、本研究では動植物に共通する脂肪酸生合成に影響を与えるアリールオキシフェノキシプロピオン酸（AOPP）系除草剤の一つである fluazifop-butyl（Walker et al., 1988; Hoppe and Zacher, 1985）に着目し、同様の作用性を有するシクロヘキサンジオン（CHD）系除草剤である sethoxydim（Golz et al., 1994）と比較しながら、感受性および耐性植物における作用特性や生理生化学反応の違いについて検討することで、fluazifop-butyl の選択作用のメカニズムを詳細に明らかにすることにした。

## ＜アリールオキシフェノキシプロピオン酸系およびシクロヘキサンジオン系除草剤の作用機構に関する今までの知見＞

Fluazifop-butyl および sethoxydim の作用機構に関する研究の経緯をさかのぼる前に、まず、AOPP および CHD 系除草剤の開発経緯と特徴について述べる。

両系の除草剤はそれぞれ 1970 年代に開発されたものである。これらに対し、広葉植物は耐性を示し、イネ科植物は感受性であるため、広葉作物畑中のイネ科雑草を防除するために、現在、世界中で広く使われている (Devine and Shimabukuro, 1994; Shukla et al., 1997b)。

AOPP 系化合物の基本骨格は、二つのアリール基で構成される。また、一方のアリール基の 1 位が一つのキラル中心と二つの可能な異性体  $R(+)$ 、および  $S(-)$  を持つイソプロピル基で置換されている。多くの研究により、 $R(+)$  異性体のみが除草活性を持っていることが解明されている (Hoppe and Zacher, 1985; Nakahira, 1998; Ratterman and Balke, 1989; Rendina et al., 1988)。また、第二のアリール基の構造を変化させることにより、いろいろな除草剤が開発された。実際に除草剤として開発されたものは、それぞれのプロピオン酸部分のエステル型であるが、茎葉処理により植物に吸収されると速やかに酸型に加水分解されて、活性を示す (Buhler et al., 1985; Hendley et al., 1985)。Fluazifop-butyl, haloxyfop-methyl, diclofop-methyl, fenoxaprop-ethyl, quizalofop-ethyl, cyhalofop-butyl, clodinafop-propargyl, clofop, trifop などはこの系の除草剤の代表的な種類であるが、fenoxaprop-ethyl 以外のものでは、名前に“fop”がついているため、この系の除草剤は“fops”剤とも呼ばれている (Devine et al., 1993a; Fig. A)。一方、CHD 系除草剤はその基本構造の cyclohexeneone 環の 2 と 5 位に異なる置換基が導入されることにより、各種の除草剤が開発された。Sethoxydim, alloxydim, tralkoxydim, clethodim および cycloxydim はその代表的なもので、“dims”剤とも呼ばれている (Devine et al., 1993a; Fig. B)。

AOPP 系除草剤は茎葉処理除草剤としてダイズ、ワタ、テンサイ、アマ、アルファルファ、アブラナ、ラッカセイ、バレイショ、トマトなどの広葉作物畑中のイネ科雑草 (カラスムギ、エノコログサ、キンエノコロ、イヌビエなど) の防除によく利用されている。多くの研究から、AOPP および CHD 系除草剤がイネ科植物に速やかに吸収され、茎および根の先端部にある分裂組織まで移行し

て作用することが報告されている (Brezeanu et al., 1976; Gronwald, 1986; Hoppe, 1981; Hosaka et al., 1984; Lichtenthaler and Meier, 1984; Lichtenthaler et al., 1987)。

これまで、両系の除草剤に共通の作用点が脂肪酸生合成のキー酵素であるアセチル-CoA カルボキシラーゼ (ACCase) である可能性が示唆されている。この酵素は脂肪酸生合成の最初の段階である acetyl-CoA から malonyl-CoA に転化する反応を触媒する役割を担っている。1981年に Hoppe は、脂肪酸生合成の基質である [ $^{14}\text{C}$ ]acetate の脂質への取り込みが diclofop で大きく抑制されたことから、diclofop が脂質生合成を抑制することを、トウモロコシの幼根を用いて初めて証明した (Hoppe, 1981)。その後多くの研究者が数多くのイネ科植物および他の AOPP 剤を用いて更にこれを確認した (Burton et al., 1987, 1989; Cho et al., 1986; Hoppe, 1985; Hoppe and Zacher, 1982, 1985; Kobek et al., 1988a,b; Secor et al., 1989; Walker et al., 1988a)。しかし、双子葉植物においてはこのような抑制作用は見られなかった。一方、sethoxydim および他の CHD 系除草剤もまた、感受性を示すイネ科植物の脂質生合成を顕著に抑制した (Burton et al., 1987, 1989; Focke and Lichtenthaler, 1987; Hosaka and Takagi, 1987; Kobek et al., 1988b; Rendina and Felts, 1988; Secor et al., 1989)。これらの結果から、両系の除草剤はイネ科植物中の *de novo* 脂肪酸生合成の選択的な抑制剤であることが証明された。

1987年に Burton らにより、両系除草剤の作用点に関する知見が報告された (Burton et al., 1987)。彼らは sethoxydim と haloxyfop を用いた実験の結果、感受性のトウモロコシ葉緑体中の ACCase 活性が阻害されたのに対し、耐性であるエンドウの同酵素活性は阻害されなかったことを示した。その後、様々なイネ科植物において同様な AOPP および CHD 系除草剤の ACCase 阻害効果が報告された (Burton et al., 1989, 1991; Focke and Lichtenthaler, 1987; Hatzios, 1991; Hosaka and Takagi, 1987; Kobek et al., 1988a,b; Rendina and Felts, 1988; Secor and Cséke, 1988; Walker et al., 1988b)。両系の除草剤の連用による抵抗性種雑草の出現メカニズムについても、抵抗性 ACCase アイソザイムへの転換 (Parker et al., 1990; Secor et al., 1989)、或いは ACCase の過剰生産 (Paker et al., 1990) がその主な原因であることもわかった。一方、遺伝子レベルでの研究から、多くの高等植物の葉緑体に両系の除草剤に耐性を示す原核型の ACCase が存在することが確認されているが、例外としてイネ科植物だけには、感受性を示す真核型が存在する

ことが明らかとなっている (Konishi et al., 1996; 佐々木・小西, 1994; 佐々木, 1996)。このことがイネ科植物と広葉植物に選択性が発現する原因だと推測されている。

一方、AOPP 系除草剤の作用機構として、ACCCase 説のほかに、アンチオーキシン説も提出されている (Barnwell and Cobb, 1993; Qureshi and Born, 1979; Shimabukuro and Hoffer, 1996; Shimabukuro et al., 1978, 1982; Snipes et al., 1987)。しかし、この二つの作用メカニズムの関連性はまだ不明なことから、AOPP 系除草剤の殺草作用の全体像はまだ明らかではない。

### <Fluazifop-butyl の作用機構に関する今までの知見>

Fluazifop-butyl は代表的な AOPP 系除草剤であり、1977 年に日本の石原産業株式会社によって開発された (芳賀ら, 1987; Fig. C)。現在多くの広葉作物畑における、一年生および多年生イネ科雑草の防除に使われている。本剤の作用機構に関しては、同系の diclofop-methyl ほどは研究されていないが、diclofop-methyl と同様に ACCCase 阻害が示唆されている (Burton et al., 1989)。開発者の芳賀ら (1987) により、この剤の作用特性および作用機構が最初に報告された。イネ科植物に fluazifop を茎葉処理した場合、まず茎葉部の生長停止が処理後 2~3 日目から肉眼で観察される。展開の止まった新葉は退色し、続いて茎葉基部の壊死や、新葉・古葉の壊死を経て植物全体が枯死に至る。完全に枯死するまで必要な日数は 2~4 週間ぐらいであり、作用が遅効性であることが分かった。また、感受性植物であるトウモロコシの細胞分裂阻害や、エンバク子葉鞘切片の伸長阻害作用も明らかになったが、非感受性のダイズやエンドウにはこのような作用は見られなかった。また、細胞内代謝における研究から、クロロフィル生合成の阻害、可溶性糖質含量の増加、遊離アミノ酸含量の異常な蓄積など、代謝物の生合成や含量に大きな変動があることも明らかとなったが、いずれも植物体の損傷に伴った遅効的な作用であるため、二次的な効果と考察された。そして、基本的な代謝である蛋白質、脂質、DNA の生合成は、感受性植物において、いずれも 24 時間後には見かけ上大きく阻害されたが、DNA、蛋白質に関しては生合成前駆体の取り込み阻害と平行した減少であったため、前駆体に対する細胞膜の膜透過活性の低下により阻害されていることが推測された (芳賀ら,

1987)。しかし、脂質生合成に関しては、その阻害が処理4時間後という短時間内に認められ、また前駆体の膜透過活性の低下よりも大きな阻害を示したことより、脂質生合成系が fluazifop の主要な作用点の一つであると考えられた (芳賀ら, 1987)。つまり、脂質生合成が阻害されることにより、膜の構造と機能が損われ、まず細胞の分裂と生長が阻害されて生育が停止する。続いて二次的に代謝異常を起こし、徐々に枯死に至るのではないかと推測された (芳賀ら, 1987)。

一方、脂質生合成阻害に関するその後の報告によると、fluazifop-butyl およびその活性体である fluazifop が、他の AOPP 系除草剤と同様に、ACCase 活性を阻害することが明らかとなった (Burton et al., 1989; Gronwald, 1991; Herbert et al., 1996, 1997; Kobek et al., 1988a; Lichtenthaler, 1990; Walker et al., 1988a,b)。抵抗性機構の研究においても、ACCase 感受性の変化により抵抗性バイオタイプが生じることが報告されたため、ACCase は fluazifop などの AOPP 系除草剤の作用点である可能性が示唆された (Catanzaro et al., 1993; Preston et al., 1996)。しかし前述のように、fluazifop-butyl のような AOPP 系除草剤にはアンチオーキシン作用があると報告されているため、枯殺作用の発現メカニズムはまだ明らかとなっていない。

一方、ブラジルにおいて、これまで耐性であると考えられてきた広葉植物の中で、キク科雑草である *Acanthospermum hispidum* が fluazifop-butyl で枯殺されるという圃場レベルでの観察があった。この雑草は熱帯から亜熱帯および一部の温帯にかけて広範に分布している深刻な畑地雑草であり、穀物、野菜、果樹などあらゆる畑作物に対して被害を及ぼす (Miller and Schultz, 1991; Nanjappa and Hosmani, 1985; Panizzi and Rossi, 1991; Walker et al., 1989)。この雑草の防除には、一般的に metolachlor (Adejonwo et al., 1990; Rout and Satapathy, 1996)、acetochlor (Hawf and Frost, 1985)、bentazon、imazethapyr (Grey et al., 1995; Wilcut et al., 1994) などが用いられているが、広葉雑草に殺草活性を持たない fluazifop-butyl で防除できるのは非常に興味深いことである。しかし、この植物に対する作用特性や作用機構に関する情報は現在のところ全くない。

### < Sethoxydim の作用機構に関する今までの知見 >

Sethoxydim は日本の日本曹達株式会社により開発され、1978年には NABU,

FERVINAL, POAST などの商品名で登録された (石川ら, 1985; Fig. D)。この剤は主にダイズ、ワタ、タマネギなどの畑中の各種一年生、及びセイバンモロコシなどの多年生イネ科雑草の防除に世界中で用いられている。

石川ら (1985) によると、sethoxydim はメヒシバ、エノコログサ、ヒエなどのイネ科雑草およびコムギ、オオムギ、トウモロコシ、イネなどのイネ科作物に強い活性をもっているが、カヤツリグサ、アカザ、イヌビユなどの広葉雑草およびダイズ、トマト、テンサイ、ワタ、キャベツなどの広葉作物は耐性である。これらの植物種間における高度選択性は sethoxydim の吸収、移行、および代謝の違いによるものではなく、それ以外の性質の差異に基づくことと推測された (Hosaka and Takagi, 1987; 石川ら, 1985)。その後、Focke and Lichtenthaler (1987) は、高等植物の葉緑体における *de novo* 脂肪酸生合成が本剤をはじめとする CHD 系除草剤のターゲットになる可能性に注目し、オオムギにおける *de novo* 脂肪酸生合成に対する sethoxydim の影響を調べた。その結果、acetate や acetyl-CoA の脂肪酸への取り込みは抑制されたが、malonate 及び malonyl-CoA の取り込みは抑制されなかった。このことから、sethoxydim の作用点が脂肪酸生合成の初期段階にあることが示唆された (Focke and Lichtenthaler, 1987)。さらに、オオムギ、トウモロコシのような感受性植物、及びハウレンソウ、インゲンマメのような耐性植物を用いて行われた研究から、ACCase の感受性の違いが当除草剤の選択作用発現機構の要因であると考えられた (Rendina and Felts, 1988)。その後、トウモロコシの懸濁培養細胞を用いて行われた研究からは、このような ACCase 阻害説を更に支持するような結果が得られた (Burton et al., 1991)。さらに、幾つかの抵抗性雑草タイプにおける非感受性 ACCase 型に関する研究からも、この酵素が作用点であることを支持する結果が得られた (Herbert et al. 1996; Marles et al. 1993; Matthews et al. 1990; Shukla et al. 1997a,b)。その他にも、多くの研究者により、ACCase 阻害説を支持する報告がなされた (Bjelk et al., 1991; Burton et al., 1987; Devine, 1997; Hatzios, 1991; Inledon and Hall, 1997; Maier et al., 1994; Rendina et al., 1990; Stoltenberg et al., 1989)。一方、AOPP 系除草剤ではアンチオキシン作用を持っていることが報告されている (Barnwell and Cobb, 1993; Qureshi and Born, 1979; Shimabukuro and Hoffer, 1996; Shimabukuro et al., 1978, 1982; Snipes et al., 1987) が、sethoxydim のような CHD 系除草剤では、これまで

のところ報告されていない。

### ＜本研究の目的＞

以上述べたとおり、fluazifop-butyl に対してイネ科植物は感受性を示すが、耐性を示すと考えられていた広葉植物の中にも、キク科の *A. hispidum* のように、この剤によって影響を受け、枯死するという観察があった。しかし、*A. hispidum* の fluazifop-butyl に対する感受性、及びその作用メカニズムに関して検討した例はない。一方、イネ科植物の殺草作用メカニズムに関しても、ACCase 阻害説という生化学的な作用機構の他に、アンチオーキシシン作用という生理的な作用機構も報告されていることから、fluazifop-butyl および他の AOPP 剤の作用機構は完全に明らかではない。さらに、sethoxydim のような CHD 系除草剤もまた、AOPP 系除草剤と同様に、アンチオーキシシン活性を有するのかは不明のままである。

そこで、本研究では、イネ科植物であるエンバクとキク科雑草である *A. hispidum* を用いて、共に植物間で感受性である両植物に対する fluazifop-butyl の作用特性や生理生化学的な作用を比較しながら、主に *A. hispidum* に対する fluazifop-butyl の作用メカニズムを解析することにした。

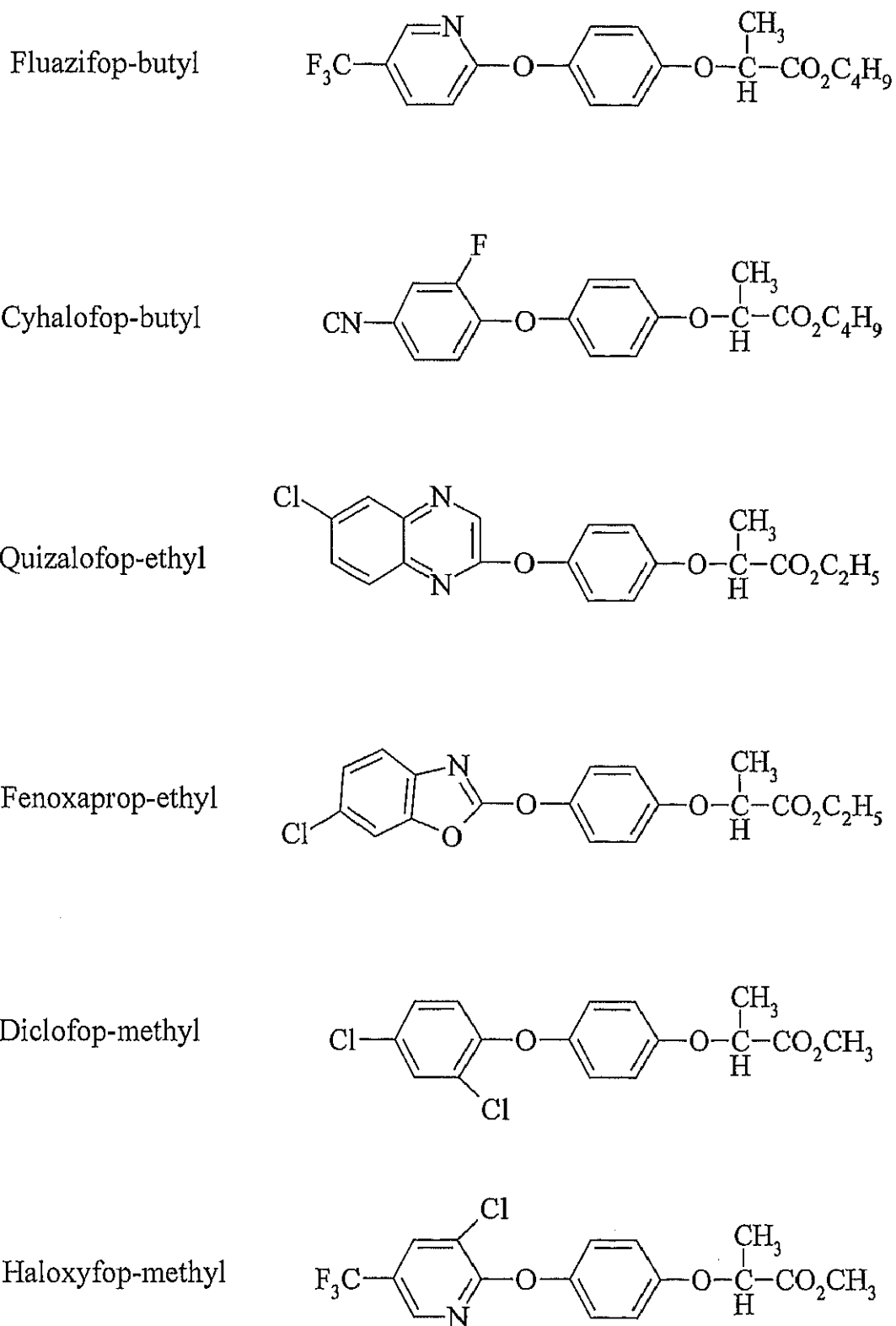


Fig. A. Chemical structures of aryloxyphenoxypropionate herbicides used in this study.



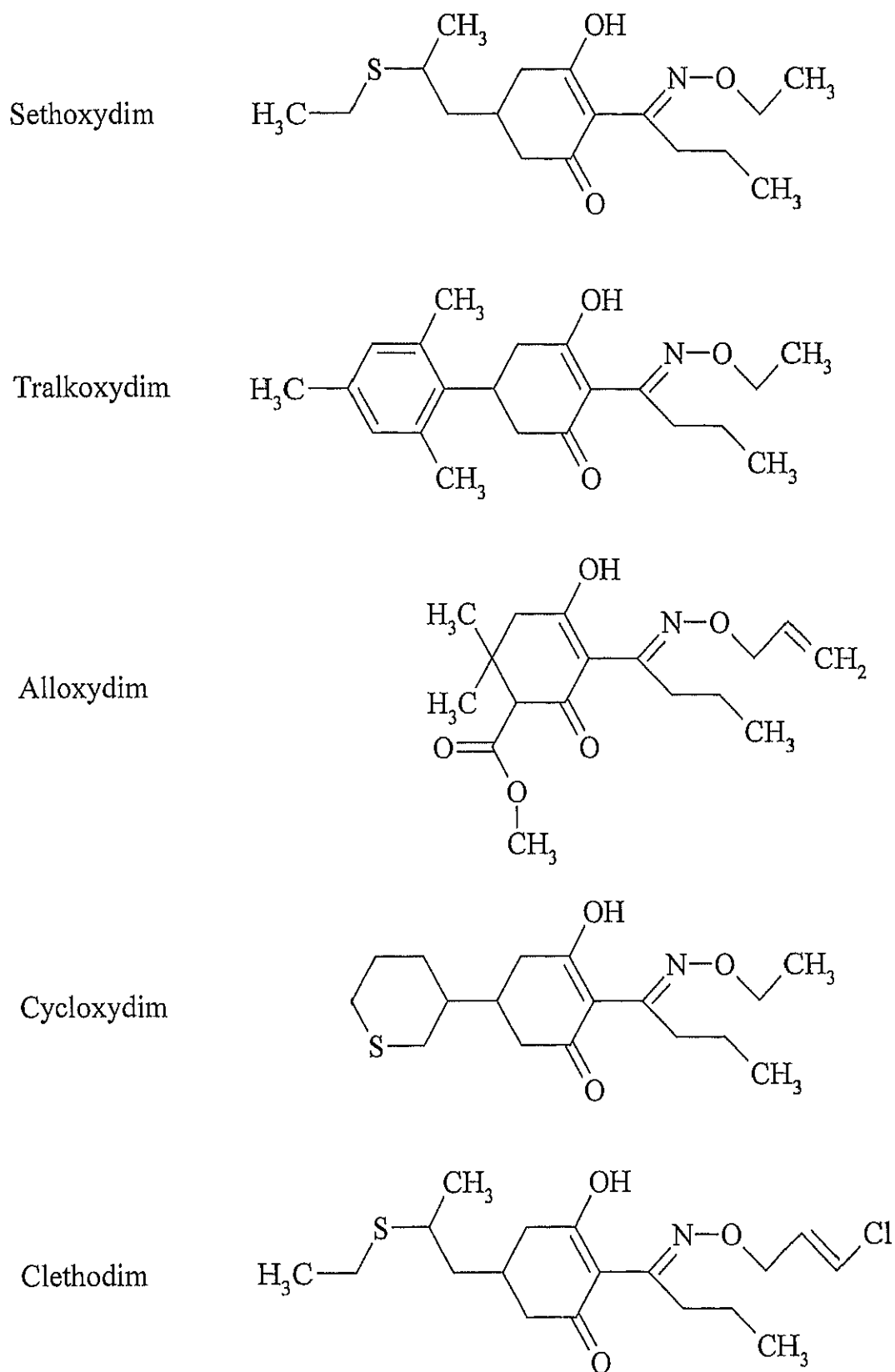
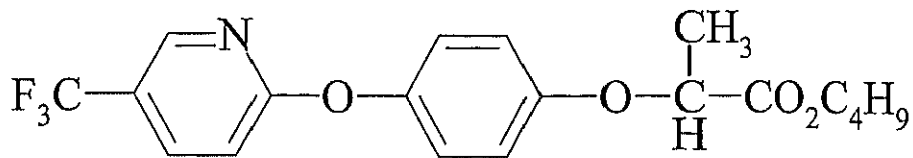
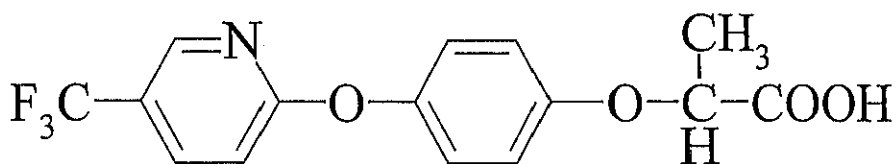


Fig. B. Chemical structures of cyclohexanedione herbicides.



Fluazifop-butyl

Hydrolysis in plant



Fluazifop (acid)  
(Active form)

Appearance: light yellow liquid

Molecular formula:  $C_{19}H_{20}F_3NO_4$

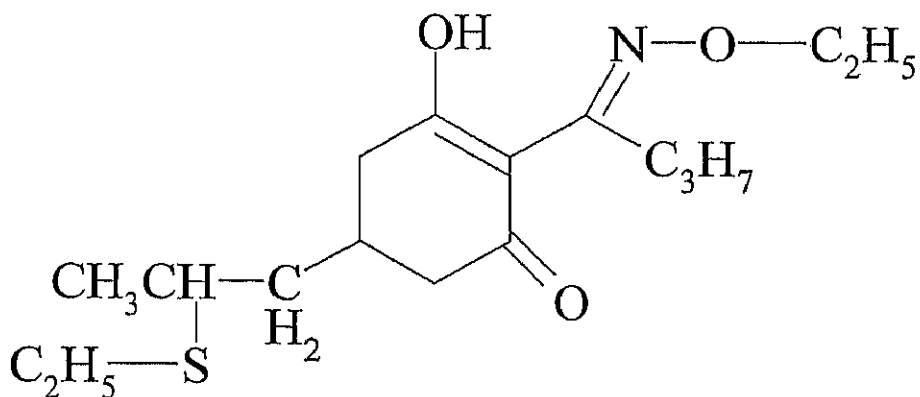
Molecular weight: 383.37

Melting point: 13 °C

Solubility: water: 1 mg/L; soluble in most organic solvents

Trade name: FUSILADE

Fig. C. Chemical structure and physical and chemical properties of fluazifop-butyl.



Appearance:	a colorless, transparent liquid
Molecular formula:	$C_{17}H_{29}O_3NS$
Molecular weight:	327.5
Melting point:	-
Boiling point:	$>90^{\circ}C/3 \times 10^{-5}$ mmHg
Vapor pressur:	$1.6 \times 10^{-7}$ mmHg at $25^{\circ}C$
Solubility:	water: 25-4700 mg/L, at $20^{\circ}C$ (pH4-7) soluble in most organic solvents
Trade name:	POAST

Fig. D. Chemical structure and physical and chemical properties of sethoxydim.