解 説

除草剤の作用機構研究における生理生化学的技法

松 中 昭 一

神戸大学農学部植物防疫学科農薬学講座

(昭和 54 年 9 月 17 日受理)

Physiological and Biochemical Techniques in Research on Mode of Action of Herbicides

Shooichi MATSUNAKA

*Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture,
Kobe University, Nada-ku, Kobe 657, Japan*

は じ め に

このシリーズの解説は、農薬研究における生理生化学的な手法をテーマにしており、筆者への割当はその除草剤分野である。除草剤研究の生理生化学的な手法といっても、これはかなり広範囲なもので、その作用機構・選択性機構・代謝（分解や抱合）など、限られた紙数で全部を紹介することは困難である。したがって、ここでは除草剤の作用機構に関する手法を主体にしたいと思う。

除草剤の作用機構に関する手法に限定しても、これまた、より限定する必要がでてくる。数多くの研究者の採用している手法を網羅的に記述することは無理であるし、またこれらの手法を相互に実証的に比較して一番良いものを紹介すれば良いのであるが、これも筆者には任が重すぎる。丁度幸い、アメリカの EPA の林文彦博士がプロジェクトオフィサーになって、ミシガン大学の研究者グループの協力を得て従来の方法に検討を加え、新しい方法の開発をもふくめて総合的な研究成果として提出させた部厚い報告書（林博士のご厚意でいただいた）が手許にあるので、これを中心にして書いていくことにする。

この報告書は EPA Project No. 68-01-1907 および 2482 による Rapid Screening Technique (Biochemical Method for Phytotoxicity): Modes-of-Action of Herbicides と題され Part-I (208 頁) および Part-II (125 頁) より成り立っている。そもそもは、EPA の the Sub-

stitute Chemical Program (SCP)¹⁾ によって、問題のある農薬に代替すべき新農薬を速やかに実用化するための対策（その作用機構を知ることも必要）のひとつとして計画されたものである。除草剤の作用機構を調べる目的で開発されたもの、従来の手法を比較して改良が加えられていること、作用機構全体を包含するよう（実際は無理であるが）計画されていることなどを特徴とするが、アメリカの話であるので使用する器具や薬品等がやや高級であるという難点はみられる。同時に、関連する手法は国内で実施されたものについてその文献を紹介しておくので、実行にあたっては十分に比較検討されたい。

上記の報告書には、植物ミトコンドリア呼吸、葉緑体光合成、クロロフィル蛍光、根端切片の呼吸と葉片光合成、タンパク質および核酸生成、電子顕微鏡像などへの除草剤の影響を調べる手法および検討結果が記述されている。ここでは、ミトコンドリアの呼吸、葉緑体の光化学系、タンパク質および核酸生成の3点をとりあげ、そのほかに、もうひとつの除草剤のグループであるいわゆるホルモン型除草剤の作用機構としてのオーキシン作用の検討手法を別の資料よりとって付記することにする。

呼吸の電子伝達系および酸化的リン酸化への影響

除草剤の対象となる高等植物も、一部はシアン耐性の呼吸など特殊な面もあるが、本質的な呼吸は動物のそれと同じでミトコンドリアにおけるチトクローム系に依存している。呼吸基質から酸素にいたる電子伝達を完成す

る途中で、その電位差に応じたエネルギー生成をいわゆる酸化リン酸化機構を通じて化学エネルギーであるATPに変換している。

この系の阻害剤は、(a) 電子伝達系の阻害、(b) 除共役(uncoupling)、(c) リン酸化の阻害の三つのタイプに分けられる。実際には、まず植物ミトコンドリアをとり出し、これに呼吸基質やADP等を与えて呼吸(電子伝達)を行なわせるとともにリン酸化の程度を測定する。この際、除草剤の共存が、酸素摂取・酸化還元色素の変化・チトクローム酸化還元スペクトラム・リン酸化の能力等にどのような影響を与えるかが検討される。

1. 植物ミトコンドリアの調製法

植物ミトコンドリアの調製法については、名和と旭²⁾の詳細な解説があるし、またミトコンドリア自身からの膜成分や酵素の調製についても旭と岩槻³⁾の解説がある。ここでは、上記報告書から二つの方法の紹介にとどめる。

1) リョクトウ下胚軸からのミトコンドリア調製法

暗黒下で4~5日栽培したリョクトウ(ヤエナリ、*Phaseolus aureus* L.)から下胚軸部分(子葉+上胚軸と根との間)を鋏で切りとり、少なくとも2回蒸留水で洗う。要すれば、冷蒸留水中、一晚低温で保存する。以下の操作はすべて0°Cに近い低温で実施する。1.5kgの下胚軸を蒸留水で洗ったあと、約2cmに切り、磨砕用液に入れる。その組成は、0.5M マンニット、10mM リン酸カリウム、1mM EDTA、0.2% ウシ血清アルブミン、5mM システインで、システインは磨砕直前に加え、pHは10N KOHを用いて8とする。切片と磨砕液との容積比は1:1とし、これらを大型乳鉢に入れ、切片の2/3がこわれる程度にまで乳鉢を用いて磨砕する。この過程で、10N KOHを滴下しつつ磨砕液のpHを7.2ないし7.4に保持する。この磨砕物をすくなくとも8枚のカーゼを通して濾過し、残渣は上述の磨砕用液の1/3量で再抽出する。両濾液を合わせて分別遠心分離を行なう。粗ミトコンドリア分画は、500×g 10分と12,000×g 15分の間を集め、これを洗浄液(0.5M マンニット、10mM リン酸カリウム緩衝液 pH 7.4、0.2% ウシ血清アルブミン) 30mlに懸濁し、500×g 15分の遠心上清を6,000×g 15分の遠心分離で沈降させ、その沈澱を30mlの洗浄液に再懸濁し、これを5,500×gで遠心分離する。この沈澱は以下洗浄ミトコンドリア(Mw)と呼ばれるが、ml当たり約40mgのタンパク質量となるように少量の洗浄液に懸濁して実験に用いられる。

2) トウモロコシ幼根からのミトコンドリアの調製

トウモロコシ種子(*Zea mays* L., 品種 Michigan Hybrid 200)を次亜塩素酸ナトリウム液で滅菌後、よく水洗し、一晚吸水させたあと、孔をあけたアルミニウム板の上で暗黒下2~3日かけて発芽させる。その後2~3日ガラス室においてその根を集め、よく水洗する。500gの根を磨砕用液(マンニットの代わりに0.7M ソルビットを用いる以外はリョクトウの場合と同じ組成)とともに大型乳鉢に入れ、鋏でよく切断する。これを、乳鉢で、ほとんどの根がこわれる程度に磨砕する(破砕しすぎないように留意すること)。pH低下はリョクトウの場合よりすくないが、やはりpH 7.4となるよう5N KOHで調整しながら磨砕する。以下の操作は(1)の場合とほぼ同様に行なうが、残渣の再抽出と低速遠心(500×g, 10分)とは省略したほうがよい。

トウモロコシ幼根からのミトコンドリア調製は、収率の低いこと、根の細胞壁が固いこと、単離したミトコンドリアがこわれやすいことなどの理由で問題が多い。

以上の2例でもわかるように、植物体からのミトコンドリアの調製は、固い細胞壁が存在するため動物組織でのそれよりむずかしく、磨砕が足りないことと収率が悪く、磨砕しすぎるとミトコンドリア自身をもこわしてしまうというジレンマを内包している。したがって、成熟したイネの地上部などのより固い材料からの調製は大へんむずかしいことである。

一般的注意としては、低温で行なうこと、磨砕程度に留意すること、磨砕液のpHを7.4程度に保持し続けること、ポリフェノール酸化物からミトコンドリアを保護することなどをあげることができる。

その完全な機能が必要で、intactなミトコンドリアを使いたい時には、上述の分画遠心分離法にのみ留めるが(この場合、 α -ケトグルタル酸やADPを共有させておくと保存性がよい)、この方法ではミクロゾームやその他の画分もかなり混在する。したがって、ある酵素や反応がミトコンドリアに偏在することを主張するためには、ショ糖濃度勾配遠心法⁴⁾で分画したものを使用する必要がある。

2. ミトコンドリアの呼吸測定法

かつては、呼吸(酸素摂取)はウィンクラウ法⁵⁾やワールブルグ検圧法^{6,7)}で測定するのが常法であったが、現在ではむしろ酸素電極法を用いるのが常法となっている。酸素電極法そのものについては成書⁸⁾が出版されているのでこれを参照されたい。筆者等はイギリスのRank Brother's社製のものを使用している(株式会社三啓(Tel. 03-834-7331)が輸入してくれる。記録計別で一式約7万円)。

上記 EPA の報告書で Ikuma らが使用しているのは Yellow Springs Instrument 社製の電極で、電気回路は Estabrook の方法⁹⁾による自家製である。反応容器の容積は 3ml で 25°C にして使用している。標準反応液の組成は、0.5M マンニット(リョクトウ用)、または 0.7M ソルビット(トウモロコシ用)、10mM リン酸緩衝液 pH 7.2, 10mM KCl, 5mM MgCl₂ である。反応途中での添加物の量は 5~60 μ l にとどめている。また、除草剤は水に不溶性・難溶性のものが多く、ジメチルスルホキシド(DMSO)とともに使用されるが、反応容器内での DMSO 最終濃度が 1% 以下であればミトコンドリア活性に影響はない。

3. 酸素電極による測定結果の考察

酸素電極を用いてミトコンドリアによる酸素摂取のトレースをみると、Fig. 1 に示すように、Mw のみの添加ではその速度はほとんど増加しない。呼吸基質(リンゴ酸やコハク酸)を加えるとすこし増加する(この状態を State 4 の呼ぶ¹⁰⁾。これに ADP を加えるとリン酸化反応を伴って呼吸速度が激増する(これが State 3)。そして State 3/State 4 の呼吸能の比を呼吸調節比とよぶが、intact なミトコンドリアほどこの比の値は大きい。さて、与えた ADP が全部 ATP に変えられると呼吸速度はまた低下して State 4 に戻るが、ここで供試除草剤を加えてみる(最終濃度で 10^{-4} ~ 10^{-2} M 程度)。

この除草剤が呼吸系に無影響のものであれば、トレース ① のように速度は変わらず、これに再度 ADP を加えると呼吸速度を増し State 3 の状態を再現し、ADP→

ATP の反応が終るとまた State 4 になり、3 度目の ADP 添加でまた State 3 となる。

もし供試除草剤に除共役作用があれば、添加後ただちに呼吸速度が増加し、State 3 同様の状態を招来する(トレース ②、ただし ATP の生合成は行なわれていない)。

また、抗生物質オリゴマイシンのようなリン酸化の阻害剤であれば、添加後の呼吸速度は変わらないが、再度の ADP 添加でも呼吸増加はなく、除共役剤(uncoupler)であるカルボニルシアナイド *m*-クロロフェニルヒドラゾン(*m*-Cl-CCP)の添加ではじめてトレース ④ のように増加し State 3 の状態となる。

除草剤が単なる電子伝達系の阻害剤であれば、ふつう添加後急に変化することはない(強力であればすぐ水平になってしまう)が、ADP 添加でも除共役剤(*m*-Cl-CCP)添加でも呼吸上昇を示すことなく、そのままの呼吸速度を示し漸次弱くなっていく(トレース ③)。

以上のような経過で本項の最初に述べた阻害の三つのタイプ(電子伝達阻害、除共役、リン酸化阻害)を区別判定することができよう。また、リン酸化阻害剤については ATP アーゼへの影響、電子伝達系阻害であれば系のどこで阻害をおこすかなどが調べられる。後者については、別の呼吸基質を用いて回復があるかどうか(酸素電極法)、チトクローム酸化酵素系に影響があるかどうか(酸素電極法または分光光度計利用)、あるいは各チトクローム成分の酸化還元像をシアン化物や抗生物質アンチマイシン A などとの組合せで追求する(自記式分光光度計)などして検討する。

上記の酸素電極法を用いて Ikuma らが 17 種の除草剤を検討した結果では、リョクトウとトウモロコシとの間で大きな差はなく、またその結果は他の研究者の得た結果ともよく一致している。このことから、ミトコンドリアレベルでは、呼吸系の阻害剤は種間差をこえて同様に作用しているといえる。そして、intact なミトコンドリアの得られる植物材料であれば、リョクトウなどでなくて身近のものでも使用できるという反面、植物種間のいわゆる選択性については、逆にミトコンドリアの実験では何もいえないともいえる。また、ミトコンドリアはより intact であれば物質の透過性がより低下する場合もあるので、阻害がみられない場合にはその物質の不透過性についても考慮する必要がある。

筆者はかつて、ワールブルグ検圧計および無機リンの定量という古典的方法で PCP の作用機構が除共役剤としての作用であることを報告している¹¹⁾。

Fig. 1 Effect of herbicide on oxygen electrode trace by plant mitochondria.

① no effect, ② uncoupling, ③ inhibition of electron transfer, ④ inhibition of phosphorylation, Mw: washed mitochondria

葉緑体の光化学系への影響

光合成阻害は除草剤作用機構中最重要なものであり、多くの除草剤がこの作用点をもつのみでなく、低濃度で有効なことおよびこの作用機構をもつ除草剤は一般に動物に対して低毒性であることなどの点からも注目される。

ここ20年来の生化学の示すところによれば、光合成の本質は二酸化炭素の固定よりも光エネルギーの化学エネルギーへの変換（還元力 NADPH の形成をもふくめて）にあるようで、除草剤の作用点もこの明反応系、すなわち光化学系に見いだされることが多い。光化学系の阻害は、丁度呼吸の電子伝達系におけるように、(a) 電子伝達系の阻害（いわゆる Hill 反応阻害としてとらえられる）、(b) 除共役、(c) リン酸化の阻害の三つに分けうる。Moreland らはさらにもう二つのグループを追加しているが、詳細は筆者の紹介¹²⁾を参照されたい。

1. 葉緑体の分離調製法

生葉から調製された葉緑体は、その完全性やこわれ具合からいくつかの名称で分類される¹³⁾が、除草剤の影響をみる場合には、完全葉緑体（タイプ A）、破壊葉緑体（タイプ C）、または葉緑体断片（タイプ E）等が重要と考えられる。タイプ A は、ほぼ完全な CO₂ 固定能と O₂ 発生能とをもつが、NADP やフェリシアナイド (Hill 反応に用いられる) の透過性はない。C または E は、NADP やフェリシアナイドなどの透過性が大きく、光リン酸化反応や Hill 反応活性の測定によく用いられる。タイプ E のほうは、電子伝達速度は大きい、光リン酸化能は低い。

以下に、タイプ A、C および E の調製法を述べたあと、上記 EPA の報告書に記載された調製法にもふれることにする。

1) 完全葉緑体（タイプ A）の調製法

Cockburn らの原法にしたがって宮地¹³⁾が紹介している方法を述べる。よく水洗して小さく切断したハウレンソウ葉 50g に磨砕液 (0.33M ソルビット, 5mM MgCl₂, 2mM イソアスコルビン酸*, 10mM Na₄P₂O₇・10H₂O**) とともにワーリングブレンダーに入れ、5 秒間磨砕し、8 層のガーゼで濾過し、濾液を 2,500×g 50 秒間遠心分離し、ただちに上清を吸引除去する。沈澱した葉緑体

は遠心管に入れたまま氷中に保存する。この状態では半日くらい活性を保つが、反応液に懸濁させると比較的にすみやかに CO₂ 固定能を失活する。

2) タイプ C および E の葉緑体調製法

宮地らの方法¹³⁾を紹介する。かたい葉脈を除いたハウレンソウの葉 40g (水洗, 冷却したもの) を低温下で 80ml の磨砕液 (0.8M ショ糖, 20mM トリシン, 10mM NaCl, 全体に HCl を加えて pH 7.9 とする) とともにワーリングブレンダーで 15 秒間磨砕する。これを 8 層のガーゼで濾過し、濾液を 1,000×g 1 分間遠心分離し、ただちに上清を 1,500×g で 7 分間遠心分離するとその沈澱がクラス C 葉緑体である。この沈澱を 10mM NaCl 液に懸垂すればクラス E 葉緑体となるので、約 20 分後 10,000×g 8 分間遠心分離して得た沈澱を 10mM NaCl 液に懸濁して使用する。

3) EPA 報告書の Yocum らの葉緑体調製法

100g の新鮮なハウレンソウまたはダイズの葉を、0.4M ショ糖, 15mM NaCl, 20mM トリシン緩衝液 pH 8.0 および 0.2% ウシ血清アルブミンを含む磨砕用液とともに、ワーリングブレンダーを用いて 4°C で 15 秒間磨砕する。これを 4 層のガーゼで濾過し、濾液を 1,000×g 1 分間遠心分離する。上清を 5,000×g 10 分間遠心分離した沈澱を上記磨砕用液に懸濁し、さらに 5,000×g で 10 分間再び遠心分離する。この沈澱を、クロロフィル濃度が 2mg/ml となるよう少量の磨砕用液に再懸濁する（この方法で 100g のハウレンソウの葉から約 30mg のクロロフィル相当の葉緑体が得られる）。再懸濁した葉緑体は使用前に -70°C で保蔵する。

4) クロロフィル定量法

葉緑体の光化学活性はクロロフィル単位で表現されるのでクロロフィルの定量は重要であり、普通 Arnon の方法¹⁴⁾が用いられるが、宮地¹³⁾は次のような方法を紹介している。50μl の葉緑体懸垂液を 20ml の 80% アセトンに加えてクロロフィルを抽出し、遠心分離あるいは暗所で濾過し、上清または濾液の 652nm での吸光度を 1cm のキューベットで測定する。得られた吸光度を 100/9 倍すれば、もとの葉緑体懸垂液 1μl 中に含まれるクロロフィル量が mg 単位で得られる。

2. EPA 報告書における光化学系への影響検定法

ミトコンドリアの呼吸への除草剤の影響を検定した方法と対をなす EPA 報告書の葉緑体光化学系への影響検定は、やはり酸素電極を用いた次の 3 段階がある。

(1) フェリシアナイドを用い水からの酸素の発生を調べることによる非環状電子伝達（二つの光化学系）への影響を検定する。

* 他の化合物をすべて溶かしたあと、pH を 6.5 に調節してから加える。

** 0°C で pH が下りすぎないように注意しながら HCl で pH 6.5 にしてから加える。

(2) 光化学系Ⅱへの影響のみを検定するため、電子受容体としてフェリシアナイドを加える以外にフェニレンジアミン (PD) またはジメチルキノン (DMQ) を加える場合

(3) 光化学系Ⅰへの影響のみを検定するため、電子供与体としてアスコルビン酸、電子伝達中間体としてジクロロフェノールインドフェノール (DPIP), 電子受容体としてメチルビオローゲン (MeV, パラコート) を用いる場合. この場合には酸素発生ではなくて酸素摂取を測定する (還元された MeV フリーラジカルの自動酸化による).

すべて基本的反応液は, 12 mM トリシン緩衝液 (pH 8.0), 60 mM NaCl, 2.4 mM フェリシアン化カリ, 10~20 μ g のクロロフィルを含む葉緑体懸垂液を含む. これを温度一定にした酸素電極用容器 (1.6 ml) の中で $10^6 \sim 10^8$ エルグ/cm²·sec の光で照射して酸素発生を追跡する. 光化学系Ⅱのみを調べる場合には, 上述のように 0.25 mM の PD または DMQ を加える. 光化学系Ⅰのみを調べる場合には, フェリシアン化カリ以外に 60 mM のアスコルビン酸, 6 μ M DPIP, 10 μ M MeV, 7 μ M の DCMU (光化学系Ⅱの電子伝達阻害の除草剤) を用い, 上述のように酸素摂取を調べる.

検定すべき除草剤は, 水, DMSO またはエタノールにとかし, μ l 単位で反応液に加える. 光リン酸化反応の除共役には 20 mM のメチルアミンを用いる.

Fig. 2 の A は, 光化学系Ⅰ→Ⅱを通じての検討であるが, 光照射がはじまると O₂ 放出が増加する. 除草剤が光化学系に無影響であればその速度は変わらず, 除共役剤であるメチルアミンの添加でその速度を増加し①のようなトレースとなる. 加えた除草剤が光化学系Ⅱ→Ⅰの間の電子伝達によるリン酸化を除共役する場合には, トレースは②のようになる. また, それが電子伝達の阻害を行なう場合には③のようなトレースとなり, メチルアミンの添加でもその速度を変えない. そして, 光リン酸化の阻害剤であればトレース④のような結果となる.

光化学系Ⅱのみへの影響をみる系では, PD や DMQ は普通トレース①の酸素放出速度を増加させるが, 光化学系Ⅱの電子伝達系阻害剤はおおむねトレース③のようになる.

光化学系Ⅰのみをみる場合には, Fig. 2 B のように, 光照射下でアスコルビン酸+DPIP からの電子が光化学系Ⅰによりメチルビオローゲンに伝達され, この際 MeV は一電子還元をうけてフリーラジカルとなり, これが普通の 3 重項の酸素と反応して酸化されると, もとの MeV に戻るので, ここに酸素摂取がみられるわけで

Fig. 2 Effect of herbicide on oxygen electrode trace by chloroplasts.

① no effect, ② uncoupling, ③ inhibition of electron transfer, ④ inhibition of phosphorylation.

ある. (この際, 光化学系Ⅱからの電子伝達は DCMU で阻害してある) Fig. 2 B においても, 供試除草剤が無影響であればトレース①, 除共役剤として作用すれば②, 電子伝達の阻害剤として作用すれば③のような結果が得られる.

除草剤がこの酸素電極法で光化学的リン酸化の阻害剤として作用する可能性が見いだされた時には, Avron の方法¹⁵⁾で次のようにこれを確認することができる. 上記の反応液に 10⁶ cpm の ³²P リン酸を加え, 1 分間照射し, 反応液をイソブタノール-ベンゼン-水で抽出したあと, 水層の放射能を測定し, この値を除草剤の有無と比較する.

3. タイプ A 葉緑体による CO₂ 固定能の測定¹⁸⁾

上述の完全葉緑体 (タイプ A) による CO₂ 固定をみるには, 反応液として, 0.33 M ソルビット, 20 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 50 mM HESPE- NaOH 緩衝液 (pH 7.6) の組成のものを用い, これにクロロフィル濃度が 100 μ g/ml となるよう上記葉緑体を懸垂させ, その 1.5 ml を用い, これに NaH¹⁴CO₃ 溶液 (最終濃度 10 mM) を加え, 22°C の恒温槽中 20.000 lux の白熱電球で照射する. 一定時間ごとに最終濃度 10% の酢酸を加えて反応を中止し, 一定量の酸性葉緑体懸垂液を試料皿にとり出し, 乾燥後 GM 管で固定された ¹⁴C の放射能を測定する. 上記の方法で調製された

葉緑体は $60\sim 70\ \mu\text{moles CO}_2/\text{mg}$ クロロフィル・hr 程度の活性を示す。

4. タイプ C またはタイプ E 葉緑体による Hill 反応測定とこれに共役した光リン酸化反応測定

宮地¹³⁾の方法を紹介する。反応液組成は、フェリシアニ化カリ $0.8\ \mu\text{mole}$, ATP $1.0\ \mu\text{mole}$, $\text{NaH}^{32}\text{PO}_4$ $30\ \mu\text{moles}$ (約 $10^6\ \text{cpm}$), MgCl_2 $2\ \mu\text{moles}$, グルコース $20\ \mu\text{moles}$, ショ糖 $300\ \mu\text{moles}$, トリシン-NaOH (pH 9.0) $100\ \mu\text{moles}$, ヘキソキナーゼ $1\ \text{mg}$, クラス C または E 葉緑体 (クロロフィル $40\ \mu\text{g}$) である。これを 20°C の恒温槽中で光を照射し ($20,000\ \text{lux}$), 12% トリクロル酢酸を加えて反応を停止させ、遠心分離して葉緑体を除き、上清の $420\ \text{nm}$ の吸光度 (黄色) の減少からフェリシアニド (Hill oxidant) の光還元量を計算する (その $420\ \text{nm}$ における分子吸光係数は $1.02 \times 10^3\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ である)。光リン酸化能は、未反応の無機 ^{32}P をリンモリブデン酸としてイソブタノールで抽出し、残った有機リン区分の放射能を測定して求める。

国内の研究で、除草剤の葉緑体光化学反応への影響を扱った研究例として、中村ら¹⁶⁾の酸アミド系除草剤、白川¹⁷⁾の CMMP, 百武ら¹⁸⁾の CNP, 嶺ら¹⁹⁾のペンタゾンなどをあげることができよう。また、クロロフィル生成阻害に関する実験のモデルとしては藤井²⁰⁾の報告を有効に利用することができよう。また、理学部系の DCMU を阻害剤として使用した数多くの基礎的研究 (おもに Plant and Cell Physiology に発表されている) にも注目する必要がある。

タンパク質および核酸合成への影響

DNA・RNA を通してのタンパク質合成の阻害も除草剤の重要な作用点である。これは未分明の部分も多いが、後述のオーキシン作用をもつ除草剤と同様に奇型を生ずるという外観でもある程度判定がつく作用点である。EPA の報告書では、トウモロコシ幼根の根端切片への放射性核酸塩基やアミノ酸のとりこみを調べ、これに対する除草剤の影響を判定している。

1. トウモロコシ幼根の根端切片による取込み実験

トウモロコシ種子を種子消毒したあと、よく水洗し、通気しながら $6\sim 8$ 時間大きい容器に浸漬し、孔をあけたアルミニウム板上に一層となるよう拡げる。水道水を種子のレベルにまで入れて暗所 20°C で3日間発芽させる。

トウモロコシ主根の先端 $3\ \text{mm}$ を切断し、5% (v/v) Clorox 液 (次亜塩素酸ソーダの水溶液製品) に5分間浸漬して表面殺菌する。これを滅菌水で数回洗浄する。

$10\sim 25$ 本の根端切片を $0.5\ \text{ml}$ の $50\ \text{mM}$ 滅菌グルコースおよび所定量の除草剤を含む反応液を含む小型フラスコまたはバイアルに入れる。30分間放置後、少量の ^{14}C -ロイシン+ ^3H -チミジン、または ^{14}C -ウリジンを加える。放射性物質はキャリアーなしで1または $2 \times 10^6\ \text{cpm}$ の活性をもつものとする。反応液は $25^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ で所定の時間 (ふつう2時間) 振盪して通気する。放射性添加後2時間で、根端切片を滅菌蒸留水ですばやく洗浄し、DNA, RNA およびタンパク質に分離する。

2. DNA, RNA およびタンパク質の分離

EPA 報告書において、Bowman らは過塩素酸を用いる方法よりここでの目的に適合するものとして酵素を用いる方法を提案している。第1法と第2法とがあるが、後者のほうでよりよい結果が得られているので、これを紹介しておく。

1) ^{14}C -ウリジンの RNA へのとりこみ

$0.5\ \text{ml}$ の反応液中の根端切片を滅菌蒸留水でよく洗い、 $5\ \text{ml}$ の 75% エタノール ($0\sim 4^\circ\text{C}$) 中でテフロングラインダーを用いて磨砕する。DNA, RNA およびタンパク質を沈澱として遠心分離で集める (以下の遠心分離はすべて $10,000 \times g$ 15分, Sorvall 冷却遠心機 RC-5 で swinging bucket rotor を用いて行なった)。生じた沈澱を $0.1\ \text{M}$ 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) $1\ \text{ml}$ ($2\ \text{mg}$ の RNAase, シグマ社製タイプ XI-A を含む) に懸濁させ、 37°C で4時間処理する。処理後 DNA とタンパク質は $4\ \text{ml}$ の冷エタノールを加え、遠心分離する。この沈澱を $2\ \text{ml}$ の 75% エタノールで洗浄し、両方の上清液の放射能をカウントする。

2) ^3H -チミジン+ ^{14}C -ロイシンの、それぞれ DNA およびタンパク質へのとりこみ

1) の方法と同じように根端切片を水洗して磨砕し、冷エタノールで沈澱を得る。この沈澱を $0.4\ \text{mM}$ MgCl_2 および $2\ \text{mg}$ DNAase (クロマトグラフ調製デオキシリボニュークレアーゼ I, シグマ製) を含む $1\ \text{ml}$ の $0.1\ \text{M}$ トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に均一に懸濁し、 37°C で4時間処理する。反応後これに $1\ \text{ml}$ の $1\ \text{N}$ 過塩素酸を加え (最終濃度 $0.5\ \text{N}$)、タンパク質と RNA とを沈澱させる。混合物を遠心分離し、上清を DNA 分析のためシンチレーションカウンターで計測する。沈澱は 100% エタノールに懸濁し、Schleider & Schuell のフィルター (#595) で濾過し、タンパク質および RNA を含むフィルターを再びエタノールで洗い、シンチレーションカウンターでカウントする。

除草剤は、反応液へ DMSO (最終濃度で 1% 以下) 液に溶かして加えられた。

除草剤のタンパク質生成阻害剤としての特徴や作用機構については、小林と石塚の解説²¹⁾を参照されたい。また国内で行なわれたタンパク質生成阻害の除草剤研究としては、植木ら²²⁾、木村ら²³⁾、小林ら^{24,25)}の論文などがある。

オーキシン作用の検討

2,4-D等の示すいわゆるオーキシン作用も除草剤の作用としては重要なものである。したがって、ある除草剤の作用機構を判定するテストのひとつとして、オーキシン作用があるかどうかを検定しておく必要がある。除草剤として施用したとき、その外観変化から、いわゆる形成作用 (formative effect) を示す場合、あるいは上偏生長 (epinasty) をおこす場合などには、その作用機構をオーキシン作用と判定できる場合が多いが、詳細には、以下のような試験をし、2,4-D やインドール酢酸などとくらべてどのくらいの相対値を示すかを見ておく必要がある。

オーキシン作用は生物検定法で測定されるが、いくつかの方法がある²⁶⁾。

1. アベナ等の伸長試験

材料としてはエンバク (*Avena sativa* L., 品種ビクトリー) が用いられるが、黄化エンドウの第3節間、光の下で育てたエンドウの第5節間、あるいはコムギの子葉鞘を用いてもよい。エンバクの場合には、吸水させたバーミキュライトに播種し、27°C で弱い赤色光で64時間、さらに暗黒中に24時間おいて2~3 cm に生長したものを、赤色光下で、子葉鞘先端2 mm を切り除き、その下5 mm の切片をつくり、これを試験液の入ったシャーレに浮かべ、一定時間後 (10~18時間後) その長さを測定し、対照区との比率を求める。

屈地反応などで切片が曲がるのを防ぐため、子葉鞘中の第1葉を抜き、ガラス棒に切片を通すことも行なわれるが、伸長生長そのものは第1葉を抜かないもののほうが大きい。切片の曲がるのを防止するには、切片を浮かべた溶液をゆっくりと振盪または回転すればよい。また、試験液への添加物としては、 1×10^{-2} M リン酸緩衝液 (pH 6)、1% ショ糖、および $1 \times 10^{-3} \sim 5 \times 10^{-3}$ M 硫酸マンガンの組合せがよいとされている。

2. 根の伸長阻害試験

一般に植物の根はオーキシン類にたいして敏感で、かなりうすい濃度でその伸長阻害を示すため、これが生物検定として利用される。材料としては、セイヨウカラシナ (*Lepidium sativum*) やアマ (*Linum usitatissimum* L.) などが使用される。前者の場合、根長が1/2になる

インドール酢酸濃度は約 0.05 ppm である。この系で逆の作用を利用して抗オーキシン活性をもテストすることができる。

以上のほかに、繁殖ではあるが古典的標準法としてのアベナ屈曲テスト、エンドウ茎のわん曲状態をしらべるエンドウ屈曲試験 (スプリットピーテスト)、あるいはイネの葉身基部の角度がオーキシン投与で増大するのを利用したラミナジョイント試験²⁷⁾などが提案されている。ラミナジョイント試験は、オーキシン共存下ではタンパク質生成試験として取り扱うこともできる²⁸⁾。

おわりに

以上、紙数不足ながら、除草剤の作用機構研究における生理化学的手法の一部を紹介したが、本文中でもふれたように次のようなことに留意する必要がある。すなわち、ミトコンドリアや葉緑体を用いた生化学的な実験では、除草剤の最終作用点またはそれに近い部位におけるその作用力の比較は可能であるが、その結果をただちに実際に使用する条件における殺草力あるいは抵抗性・感受性の差 (選択性) と結びつけるのには問題がある。別の言葉では、*in vitro* の実験と *in vivo* の実験との間には差を意識する必要があるともいえる。この差には、除草剤の物理化学性、とくに透過性・移行性、あるいは環境での残効性・移動性等が関与していると考えられる。

また、除草剤の別の特性である選択性機構については、抵抗性植物におけるその除草剤の分解や抱合等の生化学反応による解毒反応などがかなり重要な位置を占めるので、生化学的手法による実験結果もまた重要性をもつことになる。

なお、除草剤の作用機構および選択作用性の生化学的側面については、それぞれ松中²⁸⁾ および石塚²⁹⁾ の解説を参照されたい。

末筆ながら、資料をいただいた林文彦博士に深謝します。

引用文献

- 1) 林 文彦: 農薬誌 1, 153 (1976)
- 2) 名和義彦・旭 正: 蛋白質 核酸 酵素別冊 生体膜実験法 上, 共立出版, p. 304, 1974
- 3) 旭 正・岩槻紀夫: 蛋白質 核酸 酵素別冊 植物酵素・蛋白質研究法, 共立出版, p. 91, 1976
- 4) N. E. Tolbert: *Methods Enzymol.* 31, 734 (1974)
- 5) 赤堀四郎編: 酵素研究法Ⅲ, 朝倉書店, p. 382,

- 1957
- 6) 吉川春寿ほか編：化学の領域増刊 13 ワールブルグ検圧計，南江堂，p. 180, 1954
- 7) 関根隆光ほか編：化学の領域増刊 20 続ワールブルグ検圧計，南江堂，p. 356, 1955
- 8) 萩原文二編：電極法による酸素測定，講談社，p. 126, 1977
- 9) R. W. Esterbrook: *Methods Enzymol.* **10**, 41 (1967)
- 10) 松中昭一：農薬—デザインと開発指針—(山本出・深見順一編)，ソフトサイエンス社，p. 401, 1979
- 11) 松中昭一：農化 **39**, 135 (1965)
- 12) 文献 10), p. 367
- 13) 宮地重達：蛋白質 核酸 酵素別冊 植物酵素・蛋白質研究法(森田雄平ほか編)，共立出版，p. 64, 1976
- 14) D. I. Arnon: *Plant Physiol.* **24**, 1 (1949)
- 15) M. Avron: *Biochim. Biophys. Acta* **40**, 257 (1960)
- 16) 中村 拓・松中昭一：雑草研究 **8**, 33 (1969)
- 17) 白川憲夫：雑草研究 **9**, 11 (1969)
- 18) 百武 博・石塚皓造：第 14 回日本雑草学会講演会講演要旨集 p. 127 (1975)
- 19) A. Mine & S. Mastunaka: *Pestic. Biochem. Physiol.* **5**, 444 (1975)
- 20) 藤井保男：農薬誌 **4**, 391 (1979)
- 21) 小林勝一郎・石塚皓造：農薬—デザインと開発指針—(山本 出・深見順一編)，ソフトサイエンス社，p. 415, 1979
- 22) 植木邦和・山末祐二・片子沢朋子：雑草研究 **10**, 36 (1970)
- 23) 木村一郎・一前宣正・松中昭一：雑草研究 **12**, 54 (1971)
- 24) K. Kobayashi & K. Ishizuka: *Weed Sci.* **22**, 131 (1974)
- 25) K. Kobayashi & K. Ishizuka: *J. Pesticide Sci.* **2**, 59 (1977)
- 26) 増田芳雄・勝見允行・今関英雅：植物ホルモン，朝倉書店，p. 32, 1971
- 27) 前田英三・河村雄司：日作紀 **31**, 61 (1962)
- 28) 松中昭一：文献 21), p. 329
- 29) 石塚皓造：文献 21), p. 752