葉緑体機能の分子機構を探る除草剤†

吉 田 茂 男

(理化学研究所)

はじめに

合成除草活性物質と植物細胞生理学の接点は、意外と古くまで遡ることができる。1920 年に Warburg⁽¹⁾ は、緑藻クロレラに対するエチルフェニルカーバメイトの効果調べて有名な Warburg 効果を発見した。また、最初の合成除草剤が 1940 年代後半に商品化されて間もなく Wessels ら⁽²⁾によって、ウレア型除草剤が光合成明反応（ヒル反応）を阻害することが確認されている。さらに Duysens ら⁽³⁾は、DCMU などの除草剤が光合成電子伝達機構の系Ⅱを攻撃して阻害する結果、光合成反応中心の蛍光収率が著しく上昇するという現象を発見し、現在の光合成生理学の道を拓いた。これらの先駆的実験は、除草剤が植物機能を解明するための重要な道具となりえることを暗示していた。それから約 30 年を経過した現在、まさしく除草剤科学は植物分子生物学とリンクして、葉緑体機能を探るための最もダイナミックな研究領域を形成しているといえる。本稿においては、光合成電子伝達阻害剤とクロロフィル生合成阻害剤を例として、除草剤にかかわる最近の研究成果を紹介する。

1. 光合成電子伝達の分子機構と除草剤

最も植物的な生理機構である光合成系に対して特異的に作用する化合物は、植物以外の生物には無害な除草剤として利用できるはずである。実際に、初期の除草剤は光合成電子伝達系を選択的に阻害するものが大部分であった。現在までに知られている光合成電子伝達阻害型除草剤の構造はさまざまであるが、現在ではそれらを作用様式に従って、ウレア/トリアジン型とフェノール型に大別される⁽⁴⁾。これらの除草剤は、葉緑体のチラコイド膜上にある光化学系Ⅱにおいて、プラストキノンを受容する D1 タンパク質と結合することによって光合成電

子伝達を阻害する⁽⁵⁾。D1 タンパク質の実体が不明であった時期には、除草剤の定量的構造活性相関研究（QSAR）によって阻害剤受容部位の分子機構を探る試みが精力的に行われた。1964 年に Fujita-Hansch の式⁽⁶⁾として提唱された有名な構造活性相関研究法は、さまざまな分子軌道計算法の導入改善を加えながら、ヒル反応における除草剤の作用原理を説明するために広く用いられた⁽⁷⁾。

アメリカで広く普及したアトラジンは、1970 年代後半になって抵抗性雑草の問題に遭遇したが、この現象が光合成電子伝達機構の変異に起因⁽⁸⁾していることが示されてから、植物分子生物学のハイライトとなった。葉緑体ゲノム上にある *psbA* 遺伝子が光合成反応中心の D1 タンパク質の形成を支配するが、これらのアトラジン抵抗性雑草ではすべて Ser-264 から Gly への変異が認められた⁽⁹⁾。このような事実により、除草剤の結合部位は D1 タンパク質の Ser-264 付近にあることが確定的となった。その後、ラン藻やクラミドモナスなどの単純な植物系を用いて、表に掲げたような除草剤抵抗性を示す種々の D1 タンパク質変異が作り出された⁽⁴⁾。これは、われわれが生体高分子と生理活性低分子の両側面から光合成電子伝達機構を探るためのプローブを入手できることを意味する。

除草剤と D1 タンパク質の結合原理をさらに究めるためには、光反応中心の三次元構造を解明することが必要である。ところが植物の光合成光反応系は多くの膜タンパク質の集合体であるため、現在の技術では結晶化して直接構造を解析することは困難である。一般に、光合成電子伝達機構などのエネルギー代謝系は、生命維持に直結しているために進化の過程で大きな変化を受け難い。このため、同じ機能を有するタンパク質については進化系統樹が著しく異なる生物種間に高い相同性が認められる。この観点に立つと、Deisenhofer ら⁽¹⁰⁾が行った光合成バクテリア（*Rhodospseudomonas*）の光反応中心

† Herbicides as the Molecular Probes for Chloroplast Functions.

Shigeo YOSHIDA (The Institute of Physical and Chemical Research, Saitama 351-01)

表 1 光反応系Ⅱの除草剤抵抗性発現にかかわる D1 タンパク質の変異の例

抵抗型	植物種	変異アミノ酸残基
ウレア/トリアジン類	<i>Amaranthus hybridus</i>	Ser-264 が Gly に変異
ウレア/トリアジン類	<i>Nicotiana tabacum</i> (培養細胞)	Ser-264 が Thr に
ウレア/トリアジン類	<i>Nicotiana pulmbaginifolia</i>	Ser-264 が Asn に
ウレア/トリアジン類	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Ser-264 が Ala に
ウレア/トリアジン類	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Ala-251 が Val に
ウレア/トリアジン類	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Leu-275 が Phe に
ウレア/トリアジン類	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	Val-219 が Ile に
フェノール類	<i>Synechococcus</i> sp. PCC6714	Asn-266 が Thr に
フェノール類	<i>Synechococcus</i> sp. PCC6714	Asn-266 が Asn に
ウレア類	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7942	Phe-255 が Tyr に
		Ser-264 が Ala に (二重変異)

のX線結晶構造解析研究が、光合成研究者に大きなインパクトを与え、同時にノーベル賞に値したことが理解できる。この結果を踏まえて、今日の除草剤作用機構研究はコンピュータモデリングを駆使しながら行われるようになってきた⁽¹¹⁾。

ところで、除草剤が光合成電子伝達を阻害すると本当に植物は枯れるのだろうか。つい最近までは、除草剤が光反応中心からプラストキノンへの電子伝達を止めることにより、溢れた過剰エネルギーが周辺分子のラジカル化を促して膜破壊を引き起こすと説明されていた⁽¹²⁾。ところが、D1 タンパク質は宿命的に光の損傷を受けるために、明所下では非常に早い修復代謝が存在していることが判明した⁽¹³⁾。D1 タンパク質と結合する除草剤の作用が、何らかの形でこの光損傷修復機能に関係していることは十分に考えられることである。実際、ウレア型の除草剤を作用させた D1 タンパク質は光照射条件下で無処理のものよりも安定化しており、Tyr-237 がその鍵を握る部位であるといわれている⁽¹⁴⁾。また、実用化されたフェノール型除草剤は、必ずしも高水準の高合成電子伝達阻害を示さない。このような除草剤作用の新しい理解は、乾燥地に自生するユーカリ植物から発見されたフェノール型光合成電子伝達阻害物質（グランジノール）⁽¹⁵⁾は除草活性を示さない事実を矛盾なく説明しており、植物自身が光合成を停止して水を節約するための調節物質を生産することを暗示していて興味深い。

2. クロロフィル合成の分子機構と除草剤

前節で述べたような光合成電子伝達阻害剤の研究手法は、他の作用機作を有する除草剤の研究を組み立てる際の参考になる。とくに、光の照射を除草効果の発現に必要とするジフェニルエーテル類や環状フタルイミド類に

光合成電子伝達を阻害する除草剤の例

Proton 酸化酵素を阻害する除草剤の例

図 1

代表される光要求型除草剤については、葉緑体機能と密接なかわりが見られる。これらの薬剤の作用機構は諸説入り乱れていたが、最近になってクロロフィル合成系におけるプロトボルフィリン IX (Proto) の生成異常が殺草要因であることが判明した。すなわち、これらの薬剤は植物体内でクロロフィルの合成前駆体である Proto を急激に蓄積させる⁽¹⁶⁾。Proto には強力な光増感

作用があり周囲の酸素をラジカル化するので、Proto が蓄積した植物においては葉緑体の生理機能がたちまち破壊される。この作用機構の解明は、つぎの研究目標が薬剤の第一次作用点に向けられることを示唆していた。その後の研究により、薬剤は Proto の代謝を阻害するのではなく、その前駆体であるプロトポルフィリノーゲン IX (Protogen) の酸化を阻害することが判明した⁽¹⁷⁾。したがって植物体内に蓄積する Proto は、クロロフィル生合成系から外れて蓄積した Protogen から自動酸化により生成するものと考えられている。現在、薬剤の作用点である Protogen 酸化酵素の精製が関連研究者間の最大関心事となっており、きわめて近い将来にはこの酵素の遺伝子やアミノ酸配列が決定されるであろう。また、筆者ら⁽¹⁸⁾はタバコ緑色培養細胞を用いて光要求性除草剤に対して特異的な抵抗性を示す変異株を確立した。さらに、種々の阻害剤による交差活性の検定により、この変異は薬剤作用点に生じていることが示唆されている。このことは、光合成電子伝達阻害剤に対する抵抗性変異種の存在が光反応中心と薬剤の結合機構を解明してきたように、光要求性除草剤に対する抵抗性変異を上手に使うことによってクロロフィル生合成系の分子機構を探る道も用意されたことになる。

おわりに

合成除草剤の開発研究が約半世紀の歴史の過程で拾い上げた除草活性化合物種はおそらく数十万にのぼるであろう。それらの作用点は多種多様であっても不思議はないが、現実には実用化されている除草剤の作用機作が 10 程度のタイプに集約され、さらにその大部分が葉緑体機能に関連していることはきわめて示唆的である。つまり、葉緑体こそが植物の弱点であり、その機能が停止することは植物に致命的な影響を与える。紙面の都合上、本稿においては 2 種の葉緑体機能の研究例に限って述べたが、アセトラクテート合成酵素 (ALS) やエノールピルベイトシキミ酸リン酸化酵素 (EPSP) およびグルタミン合成酵素などのアミノ酸生合成機構に特異的に作用する優れた除草剤や、カロチノイド生合成阻害剤や脂肪酸生合成阻害剤などの作用機構を追究することもすべて葉緑体機能を探ることにつながるのである。この点に関しては、平成 4 年 8 月に大宮で開催された国際シンポジウム「葉緑体機能の分子調節」に参加した世界の主導的研究者の総意であったことを書き添えたい。

(1) O. Warburg : *Biochem. Z.*, **103**, 188—217

(1920).

- (2) J. S. C. Wessels and R. Van der Veen : *Biochem. Biophys. Acta*, **19**, 548—549 (1956).
- (3) L. N. M. Duysens and H. E. Sweers : in "Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria, special issue of Plant Cell Physiology," University of Tokyo Press, 1963, pp. 353—372.
- (4) J. R. Bowyer, P. Camilleri, and W. F. J. Vermaas : in "Herbicides," ed. by N. R. Baker and M. P. Percival, Elsevier Science Publishers, 1991, pp. 27—85.
- (5) K. Pfister, K. E. Steinback, G. Gardner, and C. J. Arntzen : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 981—985 (1981).
- (6) T. Fujita, I. Junkichi, and C. Hansch : *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 5175—5180 (1964).
- (7) W. Draber, K. Dickore, K. H. Buchel, A. Trebst, and E. Pistorius : *Naturwissenschaften*, **55**, 446 (1968); I. Seewald, H. J. Michel, M. Klepel, P. Held, E. Ohmann, A. Barth, and U. Metzger : in "Quantitative Structure-Activity Analysis," Akademie-Verlag, Berlin, 1978, pp. 77—81; I. Take-moto, R. Yoshida, S. Sumida, and K. Kamoshita : *Pestic. Biochem. Physiol.*, **23**, 341—348 (1985); P. Camilleri, M. D. Baker, J. R. Bowyer, M. W. Kerr, and M. J. Whitehouse : *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1509—1513 (1989); J. L. Huppatz, H. G. McFadden, and L. F. McCaffery : *Z. Naturforsch.*, **45 c**, 336—342 (1990).
- (8) K. Pfister and C. J. Arntzen : *Z. Naturforsch.*, **34 c**, 996—1009 (1979).
- (9) J. Hirschberg and I. McIntosh : *Science*, **222**, 1346—1349 (1983).
- (10) J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber, and H. Michel : *Nature*, **318**, 618—624 (1985).
- (11) J. R. Bowyer, M. Hilton, J. P. Whitelegge, P. Jewess, P. Camilleri, A. R. Crofts, and H. Robinson : *Z. Naturforsch.*, **45 c**, 141—149 (1990).
- (12) C. Fedtke : in "Biochemistry and Physiology of Herbicide Action," Springer-Verlag, Berlin, 1982, pp. 64—69.
- (13) J. Barber and B. Andersson : *TIBS*, **17**, 61—66 (1992).
- (14) A. Trebst, J. Kluth, K. Tietjen, and W. Draber : in "Pesticide Chemistry," ed. by H. Frehse, VCH, Weinheim, 1991, pp. 112—120.
- (15) S. Yoshida, T. Asami, T. Kawano, K. Yoneyama, W. D. Crow, D. M. Paton, and N. Takahashi : *Phytochemistry*, **27**, 1943—1946 (1988).
- (16) M. Matringe and R. Scalla : *Pestic. Biochem. Physiol.*, **32**, 164—172 (1988).
- (17) M. Matringe, J. M. Camadro, P. Labbe, and R. Scalla : *Biochem. J.*, **260**, 231—235 (1989).
- (18) 蔡 晃植, 鈴木直子, 木村幸夫, 一瀬勝紀, 吉田茂男 : *農化*, **66**, 314 (1992).