ミズガヤツリの塊茎形成に対するナプロアニリドの作用に関する研究

小林勝一郎 理化学研究所

Katsuichiro KOBAYASHI*: Studies on Mode of Action of Naproanilide
on Tuberization of *Cyperus serotinus*.

多年生雑草が塊茎などの栄養器官によって繁殖することは、一年生雑草と著しく異なる点である。従って、除草剤によって多年生雑草を防除するためにはすでに発生した植物体の生長を阻害するだけでは、不十分であり、繁殖源となる塊茎などの栄養器官の形成、生長を阻害、制御する必要がある。

一年生雑草に対する除草剤については殺草機構の解明されたものも多いが、多年生雑草の生育、特に、栄養繁殖器官に対する除草剤の作用機構が明らかにされたものはきわめて少ない。これは、そのような作用をもつ除草剤が少ないことが主因であろうが、栄養繁殖器官の形成、機能に関する生理生化学的特性が明らかにされていないことも一因と思われる。

本研究は、このような観点から多年生雑草の栄養繁殖器官の形成、増殖能などを阻害、制御する薬剤を検索し、その作用を薬理学的に解析することにより薬剤による多年生雑草の生長制御機構を解明するとともに多年生雑草の生理生化学的特性を明らかにすることを目的とした研究の一環として実施したものである。

1. 人工環境下におけるミズガヤツリの栽培と生育

自然環境下における多年生雑草は、多数の分株を形成し植物体が大きく、塊茎などの栄養繁殖器官の形成までに長期間を要するものや栄養繁殖器官を地下部に形成するものなどが多く、生理学、生化学的な実験材料としては取り扱いに困難な点が多い。そこで、適切な栽培法の確立と、対象雑草を選定すべく、主要な多年生雑草を供試し、人工環境下で種々の方法による栽培を試みた。地下部の掘り出しを容易にする砂耕法による栽培が可能で、日長の調節によって植物体が小型のままで短期間で塊茎を形成すること、ならびに、節ごとに切断した塊茎の置床によりかなり均一な個体を得ることができるなどを考慮し対象雑草としてミズガヤツリを選定した^{1,2)}。また、ミズガヤツリを長日条件(16時間日長)で栽培する

と塊茎形成までに10週間程度を要したが、置床後、直ちに短日条件(8時間日長)で栽培すると4週間後に、また、長日条件での数週間の栽培後に短日条件に移すと2週間後に、それぞれ塊茎が形成されることが明らかになった。なお、このような栽培法によって得たミズガヤツリの利用は研究遂行上、非常に有益であった。

2. ミズガヤツリの塊茎形成を阻害する薬剤の検索

パレイショなどの塊茎形成には植物ホルモンが関与していることや、いわゆるホルモン作用を持つ除草剤を施用した場合には次年度の多年生雑草の発生が少なくなることが知られていたため、このような点に着目し、ホルモン作用を持つ数種の薬剤についてミズガヤツリの塊茎形成に対する作用を調べた。供試薬剤の中でナプロアニリド[2-(2-naphthoxy) propionanilide] (Fig. 1)が塊

Fig. 1. Naproanilide and its metabolites.

* The Institute of Physical and Chemical Research

Tabel 1. Effects of naproanilide treated at the five different growth stages on the growth and tuberization of *C. serotinus*¹⁰⁾.

L. S. ^{a)}	Dosage (kg/ha)	Shoot			Root			Rhizome			Tuber			Whole
		No.	D. W. ^{b)} (mg)	Ab- nor- mal- ity ^{c)}	D. W. (mg)	Ab- nor- mal- ity	No.	D. W. (mg)	Ab- nor- mal- ity	No.	D. W. (mg)	Ab- nor- mal- ity	D. W. (mg)	
2	0	100% (3.3)	100% (2,001)		100% (117)		100% (21.7)	100% (1,336)		100% (35.0)	100% (1,222)		100% (4,676)	
	0.7	294	58	**	101	*	115	87	***	0	0		52	
	1.5	52	17	**	91	**	22	30	***	0	0		16	
	3.0	0	4	***	11	**	6	1	***	0	0		2	
	At treatment	(1.0)	(39)		(10)		(0)	(0)		(0)	(0)		(49)	
3	0	100 (3.3)	100 (1,961)		100 (116)		100 (20.4)	100 (1,334)		100 (35.0)	100 (1,222)		100 (4,633)	
	0.7	312	34	*	83	*	92	67	***	0	0		49	
	1.5	112	28	**	35	**	36	35	***	0	0		23	
	3.0	70	15	**	18	**	12	7	***	0	0		9	
	At treatment	(1.0)	(79)		(11)		(1.3)	(2)		(0)	(0)		(92)	
4	0	100 (2.3)	100 (1,806)		100 (104)		100 (17.7)	100 (1,312)		100 (35.0)	100 (1,222)		100 (4,444)	
	0.7	317	93	*	87	*	126	96	***	0	0		68	
	1.5	291	68	*	62	*	92	57	***	0	0		46	
	3.0	334	34	**	27	**	69	26	***	0	0		22	
	At treatment	(2.0)	(234)		(23)		(4.0)	(24)		(0)	(0)		(281)	
5	0	100 (1.3)	100 (1,611)		100 (95)		100 (12.8)	100 (1,236)		100 (35.0)	100 (1,222)		100 (4,164)	
	0.7	385	70	*	81	*	116	127	***	17	21		73	
	1.5	977	93	*	155	*	113	77	***	9	6		64	
	3.0	1,077	75	**	58	*	63	55	***	3	3		48	
	At treatment	(3.0)	(429)		(32)		(8.9)	(100)		(0)	(0)		(561)	
6	0	100 (0.3)	100 (470)		100 (3)		100 (4.3)	100 (450)		100 (60.7)	100 (2,182)		100 (3,105)	
	0.7	4,667	169	*	2,600	*	193	167	***	52	47		85	
	1.5	4,667	205	*	2,000	*	193	245	***	38	40		96	
	3.0	3,667	68	*	267	*	116	96	***	24	39		52	
	At treatment	(2.7)	(1,214)		(58)		(13.0)	(727)		(17.3)	(475)		(2,474)	

* Data are presented as percents of the control except for values in parentheses indicating one per pot. Each value at harvest indicates the net growth after treatment.
a) L. S.: leaf stage at naproanilide-treated time.
b) D. W.: dry weight.
c) The number of asterisks (*) indicates the degree of abnormality observed at harvest, and none indicates no abnormality.

茎形成を最も顕著に阻害することが判明したので、本剤を研究対象薬剤に選定した。

3. ナプロアニリドの作用性

ナプロアニリドの水田除草剤としての作用特性は明らかにされていたが、殺草機構については不明であった。そこで、塊茎形成阻害機構の解明に先き立って、本剤の作用および挙動に関する基本的性質を解明すべく、イネ

およびタマガヤツリを供試し、選択殺草機構を解析した。殺草性は、比較薬剤とした 2, 4-D に類似しており、RNA 生合成系に対する攪乱作用によって発現すること、選択性は、植物体内での本剤の代謝産物である 2-(2-naphthoxy) propionic acid (M-1) および methyl 2-(2-naphthoxy) propionate (M-2) (Fig. 1) の生成能が植物間で異なることを主因としていることが判明し、M-1およびM-2がナプロアニリドの活性体であると想定

Table 2. Effect of naproanilide (3kg/ha) applied at the four different growth stages on RNA synthesis in shoot, rhizome and tuber of *C. serotinus* at various intervals after treatment¹⁰⁾.

L. S. a)	Days after treatment	Shoot		Root		Rhizome		Tuber	
		dpm/mg	dpm/OD ^{b)}	dpm/mg	dpm/OD	dpm/mg	dpm/OD	dpm/mg	dpm/OD
2	1	%	%	%	%	— ^{c)}	—	—	—
	3	103	98	123	103	—	—	—	—
	7	128	138	98	88	—	—	—	—
4	1	320	404	115	85	—	—	—	—
	3	111	116	110	96	100	105	—	—
	7	151	148	82	84	133	105	—	—
5	1	280	185	122	121	258	122	—	—
	3	92	94	128	122	130	118	—	—
	7	132	101	96	93	178	112	—	—
6	1	116	85	99	125	345	128	—	—
	3	96	79	119	129	112	97	73	91
	7	142	120	90	84	149	80	100	88
		112	111	105	90	211	169	196	164

* Data are presented as percents of the control.

a) L. S. indicates leaf stage at time of treatment.

b) Absorbance at 260nm.

c) Bar (—) indicates that the organ did not exist at time of treatment.

した^{3,4,6,12)}。

4. ミズガヤツリの塊茎形成および各器官の生育に及ぼすナプロアニリドの影響

ミズガヤツリの塊茎形成がナプロアニリドによって阻害されることが明らかにされたので、茎葉、根および根茎の生育に及ぼす作用と塊茎形成阻害作用との関連性について詳細に検討した。

茎葉、根には奇形が発現し、乾物生長が抑制されたが、このような作用は処理時期が遅くなるに伴って低下した。これに対し、根茎には、処理時期が遅くなくても著しい奇形が発現し、これと平行して塊茎形成は常に強く阻害され、根茎からの分株の発生が増加した (Table 1)。一方、5葉期、6葉期処理で明らかなように、外見的に塊茎の形成が見られなくても処理前にすでに根茎の内部で塊茎形成が開始していた場合には、ナプロアニリドの塊茎形成阻害能が低下することが判明した。また、処理前にすでに形成が開始していた塊茎の肥大ならびに萌芽能は影響を受けなかった。ここで示した結果は田面水処理によるものであるが茎葉のみに処理した場合にも同様な結果が得られた。

以上の結果から、ナプロアニリドはミズガヤツリの根茎に直接的に作用することにより塊茎形成の開始、すなわち、根茎の塊茎への分化能を阻害しているものと推定された^{2,5,8,10)}。

5. ナプロアニリドによるミズガヤツリの塊茎形成阻害機構

ミズガヤツリを含め、多年生雑草の塊茎形成の生理生化学的側面についてはほとんど明らかにされていないが、パレイショについては塊茎形成に先立ってストロンでの RNA 生合成能が高まることが報告されている。また、すでに述べたように、本剤は RNA 生合成系を攪乱することによって殺草性を示すことが明らかにされていたので、塊茎形成阻害能と各器官の RNA 生合成系に対する作用との関連性について検討した。

根茎では、処理時期にかかわらず 3 日目で見られた促進作用は 7 日目では一層顕著になった。これに対し、茎葉では、生育初期の処理にみられた RNA 生合成に対する促進作用は処理時期が遅くなるのに伴って低下し、また、根の RNA 生合成はほとんど影響を受けなかった (Table 2)。このような結果は、茎葉、根の生育が影響を受けない場合であっても根茎のみが影響を受けて奇形が発生し、塊茎形成の阻害、分株発生の増加が認められることと一致し、ナプロアニリドによる塊茎形成の阻害は根茎の RNA 生合成系に対する攪乱作用によって発現することを示唆した^{5,10)}。

ナプロアニリド処理によって根茎に奇形が観察されることに着目して、根茎の内部形態に対する作用についても検討した。短日処理によって根茎の髓上部では、細胞

Table 3. Distribution of ^{14}C -radioactivity from ^{14}C -naproanilide in shoot, root, rhizome and mother tuber of *C. serotinus*²⁰⁾.

hr in/after treatment	Shoot dpm/mg	Root dpm/mg	Rhizome dpm/mg	Mother tuber dpm/mg
1	2	103	145	49
3	4	207	202	95
6	9	298	399	164
24	3	53	134	25
72	4	28	68	29
168	3	26	54	11

The underground parts were treated with ^{14}C -naproanilide for the first 6hr.

数の増加, 細胞の縦, 横の伸長と細胞の肥大, ならびに, これに伴う細胞の形, 配列の変化と髄横径の肥大, デンプンの蓄積が認められた。これに対し, ナプロアニリド

は, このような塊茎化に伴う根茎の内部形態, 細胞の変化を抑制するとともに茎頂分裂組織, 葉原基に奇形を発現させた。

このように, ナプロアニリドによる根茎の RNA 攪乱作用は, 根茎の髄細胞, 内部形態に対する作用として反映されていることが判明した。また, 対照区で得られた結果から, 塊茎形成に伴う根茎の内部形態の変化が明らかになった¹⁹⁾。

これらの結果から, 処理時期にかかわらずナプロアニリドによってミズガヤツリの塊茎形成が特異的に阻害されるのは, 茎葉, 根と異なり根茎の RNA 生合成が常に顕著な攪乱作用を受けるためであり, これが根茎の内部形態, 特に, 塊茎化に伴って肥大する個所である髄の細胞を異常にすることによって発現するものと想定された。

さらに, ナプロアニリドのミズガヤツリによる吸収,

a) "Unknown" indicates the sum of other traceable unknown metabolites on TLC plate.

b) "Origin" indicates a fraction found at the original location on TLC plate.

Fig. 2. Metabolism of ^{14}C -naproanilide in shoot, root, rhizome and mother tuber of *C. serotinus*²⁰⁾.

* underground parts were treated with ^{14}C -naproanilide for the first 6hr.

Table 4. Effect of naproanilide, M-1 and M-2 on RNA synthesis in shoot, root and rhizome of *C. serotinus* at various intervals after treatment²⁰⁾

Days after treatment	Chemicals (10 mole/ha)	Shoot		Root		Rhizome	
		dpm/mg	dpm/OD	dpm/mg	dpm/OD	dpm/mg	dpm/OD
1	0	100% (667)	100% (2978)	100% (1576)	100% (11816)	100% (212)	100% (1270)
	Naproanilide	96	100	88	105	103	85
	M-1	101	86	90	81	102	121
	M-2	99	77	90	90	88	99
3	0	100% (750)	100% (2324)	100% (1490)	100% (10620)	100% (207)	100% (1514)
	Naproanilide	233	126	100	122	217	185
	M-1	263	229	88	106	144	175
	M-2	291	245	75	69	197	189
7	0	100% (443)	100% (2666)	100% (795)	100% (10289)	100% (140)	100% (2373)
	Naproanilide	196	126	94	114	602	378
	M-1	214	127	121	139	809	422
	M-2	362	223	78	85	433	278

Data are presented as percents of the control except for values in parenthese indicating dpm per dry weight and per absorbance at 260nm

移行および代謝を調べ、塊茎形成阻害作用との関連性を明らかにした^{2,10)}。根および根茎によるナプロアニリドの吸収は経時的に増加し、本剤および代謝産物は茎葉に移行したが、その量は少なく、根茎に多く存在し (Table 3)、しかも、先端に偏在する傾向を示した。また、ナプロアニリドは、比較的速やかに代謝され、M-1、M-2および生体成分との結合物と想定される代謝産物へと変化した。このような変化はいずれの器官でも認められたが、各代謝産物の割合は器官によって異なり、M-1、M-2の割合は根茎で最大であった (Fig. 2)。M-1、M-2がナプロアニリドの活性体と想定されることはイネ・タマガヤツリ間の選択殺草機構の解析によって示唆されていたが、両代謝産物は塊茎形成を特異的に阻害すること、RNA生合成に対する作用においても、根茎での促進が最も顕著であること等、ミズガヤツリの生育ならびにRNA生合成系に対する作用がいずれにおいてもナプロアニリドに類似した作用を示すことが判明した (Table 4)。このように、本剤の処理によって根茎のRNA生合成が最も顕著に促進されることと根茎にM-1、M-2が最も多く存在することとの間には密接な関連性が認められたのに対し、ナプロアニリドの存在量との間には関連性は認められなかった。

以上の結果から、ミズガヤツリの塊茎形成がナプロアニリド処理によって阻害されるのは、本剤のミズガヤツリ体内での代謝産物であるM-1、M-2が塊茎形成に関連

した根茎のRNA生合成系を攪乱し、これが根茎の細胞に対する作用として反映されて発現されるものと想定された。

このように、ミズガヤツリの根茎に対する直接的作用により塊茎の形成のみを特異的に阻害する薬剤が見い出され、その機構の概略が解明されたこと、ならびに、ナプロアニリドに対する感応性が各器官で異なること、特に、塊茎形成において重要な役割を果たしている根茎の感受性が常に高く保持されていることが明らかにされたことは、薬剤による多年生雑草の生長制御機構の解明だけでなく、栄養繁殖器官の生理生化学的特性を理解する上でも興味深いものである。

おわりに

本研究は薬剤による多年生雑草の生長制御機構の一例を提示したものである。すでに、ナプロアニリドがクログワイの塊茎形成をミズガヤツリの場合と同様な機構によって阻害すること^{8,12,13)}、また、クロメプロップ [(RS)-2-(2,4-dichloro-m-toloxo) propionanilide] がナプロアニリドに類似した機構によってミズガヤツリ、クログワイの塊茎形成を阻害することも明らかにした¹⁶⁻¹⁸⁾が、薬剤による多年生雑草の生長制御機構を統一的に理解するためには、分株間における薬剤の移行性^{14,17)}も含め、各側面からの解析とともに、さらに多くの事例を集積する必要がある、今後の課題である。一方、多

年生雑草の塊茎形成には、植物ホルモンが関与していること、ならびに、その役割が多年生雑草間で異なることも明らかになりつつあり^{9,11,15)}、また、同化産物の転流、蓄積の面^{1,9,11)}からも検討中であるが、塊茎形成機構の解明には多くの課題が残されている。

本研究を実施するにあたり、筑波大学の石塚皓造教授には絶大なる御指導とご鞭撻を、理化学研究所の百武博氏、一瀬勝紀氏には、貴重な御助言と多大なご協力をいただいた。また、多くの方々から有益な御助言とご協力を、三井東圧化学株式会社からは標識化合物の供与等のご協力をいただいた。ここに各位に対し心から感謝申し上げます。

発表論文

- 1) 小林勝一郎・百武 博・石塚皓造(1979): 雑草研究 **24** (別), 25~26.
- 2) 小林勝一郎・一瀬勝紀・百武 博・石塚皓造(1980): 雑草研究 **25** (別), 127~128.
- 3) 小林勝一郎・百武 博・石塚皓造(1980): 雑草研究 **25** (別), 129~130.
- 4) KOBAYASHI, K., H. HYAKUTAKE and K. ISHIZUKA (1981): Weed Res. Japan **26** (1), 30~36.
- 5) 一瀬勝紀・小林勝一郎・百武 博・石塚皓造(1982): 雑草研究 **27** (別), 45~46.
- 6) 小林勝一郎・一瀬勝紀(1982): 雑草研究 **27** (別), 47~48.
- 7) 小林勝一郎・一瀬勝紀(1982): 雑草研究 **27** (別), 49~50.
- 8) 一瀬勝紀・小林勝一郎(1983): 雑草研究 **28** (別), 97~98.
- 9) 小林勝一郎・一瀬勝紀(1983): 雑草研究 **28** (別), 99~100.
- 10) KOBAYASHI, K., K. ICHINOSE, H. HYAKUTAKE and K. ISHIZUKA: (1984): Weed Res. Japan **28** (1), 43~50.
- 11) 小林勝一郎・一瀬勝紀(1984): 雑草研究 **29** (別), 137~138.
- 12) KOBAYASHI, K. and K. ICHINOSE (1984): Weed Res. Japan **29** (1), 38~44.
- 13) 一瀬勝紀・小林勝一郎(1985): 雑草研究 **30** (別), 159~160.
- 14) 小林勝一郎・一瀬勝紀(1985): 雑草研究 **30** (別), 161~162.
- 15) KOBAYASHI, K. and K. ICHINOSE (1985): Proc. of 10th Conf. of Asian-Pacific Weed Soc. **1**, 49~54.
- 16) 小林勝一郎・一瀬勝紀(1986): 雑草研究 **31** (別), 153~154.
- 17) 小林勝一郎・一瀬勝紀(1986): 雑草研究 **31** (別), 155~156.
- 18) 一瀬勝紀・小林勝一郎(1987): 雑草研究 **32** (別), 49~50.
- 19) 一瀬勝紀・小林勝一郎(1987): 雑草研究 **32** (別), 51~52.
- 20) KOBAYASHI, K. and K. ICHINOSE (1987): Weed Res. Japan **32** (1), 46~53.

(1987年5月30日受理)