ホルモン型除草剤クロメプロップの 殺草作用発現機構の研究

春原由香里*

キーワード: ホルモン型除草剤, クロメプロップ,
オーキシシン結合蛋白質, エチレン

Key Words: auxin-type herbicide, clomeprop,
auxin-binding proteins, ethylene

クロメプロップ (2-(2,4-dichloro-*m*-tolylloxy) propionanilide) は、フェノキシ系の水稲用選択性除草剤で、ノピエを除く一年生雑草およびマツバイ、ホタルイ、ミズガヤツリ等の一部の多年生雑草を制御する。本剤は感受性植物に対して、いわゆる、オーキシシン剤と同様な症状を示すことが知られているが、除草剤としての詳細な作用機構は明らかにされていない。

本剤は、植物体中（イネ）に吸収された後、次の主代謝経路で代謝されるものと推定されている²⁾。①クロメプロップのアミド結合部位の加水分解により 2-(2,4-dichloro-*m*-tolylloxy) propionic acid (DMPA) とアニリンが生成。② DMPA はフェニル環メチル側鎖の水酸化を受けて 3-CH₂OH-DMPA を生成。③ 3-CH₂OH-DMPA は抱合化（グルコース）を受けて水溶性代謝物へと変化。④ さらに一部は非抽出性代謝物へと変化。また、その他にクロメプロップが直接水酸化された後、加水分解する副経路の存在も推定されている。上記①のように、クロメプロップは植物体内でアリルアシルアミダーゼを介し、アシルアミドの加水分解から生じた代謝物 DMPA へと変化し、その結果、より強いオーキシシン活性を有することが報告されている^{9,11)}。また、上記②のように

フェニル環の3-位におけるメチル基の位置が転移したり、水酸化されることによって不活性化することが知られている。そして、DMPA の体内保存量および 3-CH₂OH-DMPA とそのグルコース抱合体になる解毒代謝速度の差異により選択性が示されるとされている¹¹⁾。実際、クロメプロップに抵抗性であるイネでは、活性本体であると考えられている DMPA から殺草活性のない化合物 (3-CH₂OH-DMPA) への代謝速度が早く、感受性広葉植物では、その変換速度が遅いことが示されており¹⁰⁾、その解毒代謝速度の差異により DMPA の体内濃度に差が生じることで、選択性が発現していると考えられる。さらに、ダイコン幼植物を用いた試験では、クロメプロップ処理後のオーキシシン活性は、クロメプロップ自身ではなく、DMPA の茎葉中存在量と高い相関関係があることが示されている⁹⁾。このことから、クロメプロップ自身は活性を持たず、活性本体は DMPA である可能性が示唆されている。しかし、クロメプロップ自身もオーキシシン活性を示すのではないかとする報告もある。

本研究では、クロメプロップの作用機構解明に向けての端緒として、まず、クロメプロップ自身のオーキシシン活性の有無についての検討を行うこととした。次に、クロメプロップあるいは DMPA の持つ多様な生理作用のうち、いずれの作用が直接的に殺草活性の発現に関与しているのかについて検討した。オーキシシンの主要な生理作用の1つに、細胞壁の伸長促進作用があるが、殺草活性への直接的な関与については疑問視する声がある。また、その他の主要な生理作用としては、1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase の誘導によるエチレン合成の促進がある。近年、この生理作用とホルモン型除草剤の殺草活性との関与を示唆する報告がなされており、数種のホルモン型除草剤に対して抵抗性を持つ wild mustard のパイオタイプを用いた試験では、抵抗性、感受性のパイオタイプ間で、薬剤の吸

* 千葉大学園芸学部

〒271-8510 千葉県松戸市松戸648

Yukari Sunohara: Study of Mode of Action of Clomeprop.

Faculty of Horticulture, Chiba University, 648 Matsudo, Matsudo, Chiba 271-8510, Japan

(2000年5月29日受理)

収, 移行, 代謝には差が認められないものの, エチレン生成量には大きな差があることが示された³⁾。また, 数種のホルモン型除草剤の生育抑制効果とエチレン生成量との間には, 非常に高い正の相関関係があることも報告されている¹⁾。これらを踏まえ, 本研究ではクロメプロップの殺草作用発現機構を解明することを目的とし, 特にクロメプロップ処理後のエチレンの作用に焦点を当てて研究を行った。ここでは, 研究結果を以下のように要約する。なお, 紙面の都合により, 研究内容の詳細については, 引用文献を参照していただきたい。

1. クロメプロップと DMPA のオーキシシン活性とオーキシシン結合蛋白質 (ABP) への結合⁴⁾

上述のように, クロメプロップは植物体内で加水分解され DMPA となり, より強いオーキシシン活性を示すとされている。しかしながら, クロメプロップ自身がオーキシシン活性を示すかについての十分な検討はなされていない。そこで, クロメプロップ自身のオーキシシン作用の有無を検討するため, 数種のオーキシシン活性試験や原形質膜上のオーキシシン作用の

受容体と推定されているオーキシシン結合蛋白質との結合活性試験を行い, DMPA やオーキシシン類との比較を行った。

トウモロコシ (*Zea mays* L. cv. Honey Bantam), ヤエナリ (*Phaseolus aureus*) を供試植物として, 各薬剤による生長阻害試験を行った結果, クロメプロップは DMPA, indole-3-acetic acid (IAA), 1-naphthylacetic acid (NAA) よりも低い阻害活性を示した。次に, オーキシシン活性試験である, トウモロコシ子葉鞘伸長促進活性試験, ヤエナリ下胚軸屈曲試験, エチレン生成促進試験を行った結果, DMPA は IAA や NAA よりも活性がやや低いものの, クロメプロップとの比較においては, いずれも高い活性を示していた。また, クロメプロップはオーキシシン結合蛋白質に結合せず, つまりオーキシシンとして認識されなかったが, DMPA, IAA, NAA は認識された (Fig. 2)。

このことは, クロメプロップ自身はオーキシシン活性を示さず, もしくは示しているとしても非常に弱く, 植物体内で DMPA に加水分解された後にオーキシシン結合蛋白質に主にオーキシシンとして認識され,

Fig. 1. Chemical structures of clomeprop and DMPA

Fig. 2. Competition by clomeprop, DMPA, PCIB and auxins for ³H-NAA binding to maize auxin-binding proteins.

Symbol: ■; clomeprop, □; DMPA, ○; IAA, ●; NAA, ▲; PCIB

Table 1. Effect of pretreated AOA on clomeprop- or DMPA-induced leaf angle change in radish seedlings.

Treatment	Hours after treatment	Leaf angle (α°)	
		Cotyledon	First leaf
control	24	60.3 $\pm$ 3.6	10.1 $\pm$ 2.2
control+AOA	24	59.3 $\pm$ 4.2	9.0 $\pm$ 3.1
clomeprop	24	82.5 $\pm$ 4.5	14.5 $\pm$ 2.8
clomeprop+AOA	24	65.5 $\pm$ 5.2	14.0 $\pm$ 3.4
DMPA	24	137.7 $\pm$ 7.9	24.5 $\pm$ 6.7
DMPA+AOA	24	106.0 $\pm$ 12.9	21.0 $\pm$ 4.6
control	48	61.3 $\pm$ 4.2	11.2 $\pm$ 2.7
control+AOA	48	61.0 $\pm$ 3.9	10.5 $\pm$ 2.8
clomeprop	48	120.5 $\pm$ 5.8	37.3 $\pm$ 7.6
clomeprop+AOA	48	93.2 $\pm$ 5.3	30.9 $\pm$ 10.4
DMPA	48	152.7 $\pm$ 6.3	50.9 $\pm$ 10.5
DMPA+AOA	48	121.0 $\pm$ 10.1	45.0 $\pm$ 9.3

The test compounds: Radish shoots were treated with clomeprop or DMPA.

The test compounds+AOA: Radish shoots were pretreated with AOA and then treated with clomeprop or DMPA.

オーキシン活性を示している可能性が高いことを示唆している。

2. クロメプロップ, DMPA 処理後の形態異常へのエチレンの関与⁵⁾

クロメプロップ処理後に、葉のカーリング、葉柄間角度の増大、伸長阻害といった形態異常が引き起こされるが、それらの形態異常にエチレンが関与している可能性について検討し、次の結果を得た。

ダイコン (*Raphanus sativus* L. var. *hortensis* cv. Shogoin) 幼植物にクロメプロップまたは DMPA を茎葉処理すると、上記のような形態異常 (葉のカーリングや葉柄間角度の増大、伸長阻害) が現れたが、エチレン生成阻害剤である AOA (aminooxyacetic acid) を前処理することで、それらの形態異常は軽減した (Table 1)。また、クロメプロップや DMPA 処理後の上記の作用は、エチレン作用阻害剤である NBD (2,5-norbornadiene) を後処理することで、ほぼ完全に抑えられた。また、実際に、クロメプロップあるいは DMPA を茎葉処理すると、エチレン生成量が増大することが確認されたが、その増大は DMPA 処理で、より早く引き起こされた。(Fig. 3A)。つまり、両薬剤間には、エチレン生成開始時間にずれがあることが示された。次に、クロメプロップ, DMPA 処理後のエチレン生成の誘導メカニズムについての検討を行った。クロメプロップまたは、DMPA 処理後

に ACC oxidase 活性は増大しなかったが、両薬剤ともにエチレン生成の律速酵素である ACC synthase 活性は増大させた。また、その活性増大の開始時間にも両薬剤間で、エチレン生成と同様なずれが確認された。、ノーザンハイブリダイゼーションの結果、DMPA はオーキシン誘導型の *Rs-SAUR* 遺伝子を発現していた。つまり、ダイコン中では、DMPA はオーキシンとして作用したいることが確認された。

このことより、クロメプロップは植物体内で DMPA へと変換し、DMPA がオーキシンとして作用することで、ACC synthase の遺伝子発現を誘導させ、結果として ACC synthase 活性を増大させることで大量のエチレン生成を引き起こしている可能性が高いものと考えられた。そして、このように生成されたエチレンが、ダイコンの形態的变化を引き起こしているものと推察された。

3. 茎葉処理と根部処理での形態異常の程度差の発現要因⁶⁾

クロメプロップや DMPA が引き起こす生育抑制効果や形態異常の程度は茎葉処理後と根部処理後で大きく異なることが知られている。ここでは、クロメプロップ, DMPA の根部処理による形態異常へのエチレンの関与について調査し、さらに上記2.の茎葉処理での結果と比較することにより、エチレン生成成系を軸とした両剤処理後の形態異常の差異の発現

要因について検討した。

クロメプロップをダイコンに茎葉処理すると、葉のカーリングや葉柄間角度の増大が現れたが、根部処理した場合、それらの作用は非常にわずかであった。一方、ダイコンに DMPA を根部処理すると、茎葉処理よりも顕著な葉のカーリングや葉柄間角度の増大が見られたが、それらは AOA や NBD を処理することで抑えられた。また、クロメプロップ根部処理後のエチレン生成量は、茎葉処理と比較すると非常に少量であった (Fig. 3B)。そして、茎葉処理の場合には、クロメプロップと DMPA 間で、エチレン生成の量的、時間的な差がわずかであったのに対し、根部処理ではその差が大きく、つまり、DMPA の方がより早くエチレン生成を誘導し、その生成量も著しく多かった。また、両薬剤間での処理部位による ACC synthase 活性の量的、時間的な差は、エチレン生成での結果とほぼ同一の傾向が見られた。

これらのことから、根部処理でも主に DMPA が

Fig. 3. Ethylene evolution from clomeprop- or DMPA-treated radish seedlings.

(A): shoot application, (B): root application
Radish shoots were pretreated with AOA and then treated with clomeprop or DMPA.

Data represent means $\pm$ SE.

ACC synthase 活性を増大させ、その結果、植物体内にエチレンが蓄積することで形態異常を引き起こしているものと推察された。上記の結果と先行研究等から、茎葉と根部処理間で異なる形態異常の程度の差は、茎葉、根部でのクロメプロップと DMPA の吸収、移行、代謝の差により生じた、茎葉部中の DMPA 量の差が大きく関与しているものと推察された。そして、その茎葉部中の DMPA 量の差がエチレン生成の量的、時間的な差を生み、その結果として形態異常の程度差を引き起こしている可能性が示唆された。

4. クロメプロップ、DMPA 処理後の幼根からの電解質漏出へのエチレンの関与⁷⁾

クロメプロップ根部処理後の傷害の一つに電解質の漏出がある。植物ホルモンとしてのエチレンの生理作用研究においては、エチレンが膜の透過性を増大させること等が報告されているが、ホルモン型除草剤処理から電解質漏出までのメカニズムに関しての研究は、現在までに殆ど行われていない。ここでは、特にクロメプロップ処理後の電解質漏出におけるエチレンの関与について検討し、以下の結果を得た。

ダイコン幼植物に、クロメプロップまたは DMPA を根部処理すると、幼根から電解質の漏出が確認された。そして、クロメプロップまたは DMPA 処理後にエチレン作用の阻害剤である NBD や PPOH (*cis*-propenylphosphonic acid) を処理することで、その漏出は抑えられた (Fig. 4)。また、DMPA による側根の発生阻害も NBD や PPOH によって抑えられた。さらに、クロメプロップまたは DMPA 処理直後から、エチレン放出量の顕著な増大が確認された。そして、エバンス・ブルー染色の結果、DMPA 処理後の細胞は12時間以降に青色に染まり始めたことから、処理直後から12時間以内に引き起こされる電解質漏出は細胞死によって引き起こされたものではないことが推察された。

これらのことより、DMPA が ACC synthase を誘導することによって蓄積するエチレンがクロメプロップ、あるいは DMPA 処理後に引き起こされる電解質漏出に関与しており、根の細胞膜の完全性が失われた結果として側根の生育が阻害されている可能性が示唆された。

Fig. 4. Effect of PPOH on electrolyte leakage from DMPA-treated radish roots. Radish roots were soaked with DMPA and then treated with PPOH. Data represent means $\pm$ SE. Symbol: ○; control, □; DMPA, ●; PPOH, ■; DMPA + PPOH

5. クロメプロップ、DMPA 処理後の幼根からの電解質漏出への活性酸素の関与⁸⁾

上記4.でDMPA処理後の電解質漏出におけるエチレンの関与が示唆されたが、近年、エチレンと活性酸素との関連についての報告もあることから、ここでは、まずDMPA処理後の電解質漏出における活性酸素の関与について調べ、さらに、それに関与する活性酸素分子種の特定とエチレンとの関りについて検討した。

ダイコン幼植物にクロメプロップ、DMPAを根部処理すると、処理直後から、根部からの電解質漏出が確認されたが、その電解質漏出は、フリーラジカルの消去剤 (tiron, ascorbate), $^1\text{O}_2$ の消去剤 (L-histidine, dabco), $\cdot\text{OH}$ の消去剤 (formate)を前処理することで軽減した。そして、それは特に $^1\text{O}_2$ の消去剤の前処理で顕著に現れた。また、クロメプロップ、DMPA処理後の電解質漏出に伴う側根の発生阻害作用もフリーラジカルの消去剤、 $^1\text{O}_2$ の消去剤の前処理により軽減された。次に、フリーラジカルの

Fig. 5. Effect of dabco or tiron on MDA release from radish roots treated with DMPA. Symbol: ○; control, ●; DMPA, ■; Dabco + DMPA, ▲; Tiron + DMPA

消去剤、 $^1\text{O}_2$ の消去剤を前処理した後のエチレン発生量を測定したが、それらの活性酸素消去剤の処理はDMPA処理後のエチレン生成量に影響を及ぼさなかった。また、チオバルビツール酸法により過酸化脂質の測定を行った結果、フリーラジカルの消去剤や $^1\text{O}_2$ の消去剤の前処理によりDMPA処理後の過酸化脂質量の減少が認められた (Fig. 5)。

これらの結果より、クロメプロップやDMPA処理後における電解質漏出には、エチレン以外の要因として活性酸素 (特に $^1\text{O}_2$) による膜脂質の過酸化が関与している可能性があることが示唆された。そしてその活性酸素はエチレン生成量を増大させることによって二次的に電解質漏出を引き起こしているのではなく、膜の過酸化に直接的に作用している可能性があるものと推察された。

6. まとめ

以上、得られたすべての実験結果から、現時点で考えられるクロメプロップの作用機構についてまとめると次のようになる (Fig. 6)。クロメプロップは植物体内に吸収された後に、特に茎葉部でアリルアシルアミダーゼによって加水分解を受け、DMPAと

Fig. 6. Proposed mechanism of herbicidal action of clomeprop in susceptible plants.

なる。DMPA は植物体内でオーキシシンとして振る舞い、オーキシシン結合蛋白質に結合し、オーキシシン活性を有するようになる。そして DMPA は ACC synthase 活性を増大させることにより、エチレンを大量に生成させ、葉柄間角度の増大、葉のカーリング、伸長阻害といった形態異常を引き起こす。エチレンはその他に、根部での電解質漏出を引き起こし、その膜の完全性を失わせる結果として側根の発生阻害を起こしている可能性がある。このような DMPA の作用が、クロメプロップ処理から植物体枯死に至るメカニズムに、深く関与している可能性が高いものと思われる。また、クロメプロップ処理による電解質漏出にはエチレンの他に $^1\text{O}_2$ が関与していることが示唆されたが、この2者間の関わりについては今後、さらに検討しなければならないと考えている。また、エチレン作用の生化学的な機構やホルモン型除草剤による他の生理作用との関連についても、今後さらに詳しく追究する必要があるだろう。

また、クロメプロップは生理生化学的に選択性を有する除草剤であるが、クロメプロップに対して感受性である植物と抵抗性である植物との差異は、吸収、移行性の差の他に、クロメプロップから DMPA への代謝の差、あるいは3-メチル基の水酸化された3- CH_2OH -DMPA とその glucose 抱合体になる解毒代謝速度の差、すなわち DMPA の体内存在量の差が深く関与しているものと推察された。さらに、本研究から、クロメプロップの殺草作用にはエチレン生合成系が密接に関与していることが示されたことから、その生合成に関与する酵素 (ACC synthase や ACC oxidase 等) が欠損している場合や生合成産物に対する感受性が異なる場合も選択性に大きく関わっているものと推察される。

本研究遂行にあたり、筑波大学応用生物化学系松本宏博士、同臼井健二博士、同大学名誉教授石塚皓造博士には、終始、懇切な御指導、御教示を賜った。また、同大学応用生物化学系小林勝一郎博士、同沈利星博士、順天大学校李度鎮博士には常に有益な御助言を頂いた。ここに、深甚なる感謝の意を表する。また、佐賀大学応用生物科学科穴井豊昭博士には、懇切な実験指導をいただき、さらにプローブを御恵与いただいた。また、本研究遂行の為に、三菱油化株式会社 (現 アベンティス クロップサイエンス ジャパン株式会社) より、クロメプロップと DMPA を御提供いただいた。さらに協和発酵工業株式会社からは、PPOH を御提供いただいた。心より感謝申し上げる。

発表論文および引用文献

- 1) Grossmann, K. and J. Kwiatkowski. 1993. Selective induction of ethylene and cyanide biosynthesis appears to be involved in the selectivity of the herbicide quinclorac between rice and barnyard grass. *J. Plant Physiol.* **142**, 457-466.
- 2) 石塚皓造. 1986. MY-15の稲における代謝運命試験報告書. pp.1-25.
- 3) Peniuk, M. G., M. L. Romano and J. C. Hall. 1994. Physiological investigations into the resistance of a wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) biotype to auxinic herbicides. *Weed Res.* **33**, 431-440.
- 4) Sunohara, Y., K. Usui, H. Matsumoto, M. Sakoda-Hoshi and K. Ishizuka. 1994. Auxinic activity of

- clomeprop and its hydrolytic metabolite and their binding to maize auxin-binding protein. Weed Res., Japan. **39**(4), 256-264.
- 5) Sunohara, Y., K. Usui, H. Matsumoto and K. Kobayashi. 1995. Involvement of ethylene in clomeprop-induced actions in radish seedlings. Weed Res., Japan. **40**(2), 95-103.
- 6) Sunohara, Y., K. Usui, H. Matsumoto and K. Ishizuka. 1996. Mechanism of hormonal actions induced by root-applied clomeprop in radish seedlings. Weed Res., Japan. **41**(2), 84-89.
- 7) Sunohara, Y., H. Matsumoto, K. Usui and K. Ishizuka. 1996. Ethylene action inhibitors suppressed clomeprop metabolite [2-(2,4-dichloro-*m*-tolylloxy) propionic acid]-induced electrolyte leakage from radish roots. Weed Res., Japan. **41**(3), 234-240.
- 8) Sunohara, Y., H. Matsumoto and K. Usui. 1997. Possible involvement of active oxygen in clomeprop hydrolytic metabolite-induced electrolyte leakage from radish roots. J. Weed. Sci. Tech. **42**(4), 379-385.
- 9) Suwunnamek, U., C. Wongwattana and K. Ishizuka. 1990. Hormonal activity of clomeprop in radish seedlings. Weed Res., Japan. **35**, 129-136.
- 10) Wongwattana, C. and K. Ishizuka. 1988. Metabolism of clomeprop in plant seedlings. Weed Res., Japan. **33**, 200-208.
- 11) Wongwattana, C., U. Suwunnamek and K. Ishizuka. 1990. Hormonal activity and metabolism of herbicide clomeprop as affected by carbamate insecticide NAC. Weed Res., Japan. **35**, 169-174.