

オーキシン型除草剤clomepropの作用機構に関する研究

春原由香里
(農場研究室)

A Study of The Mode of Action of The Auxin-Type Herbicide Clomeprop

Yukari Sunohara
(University Farm)

Summary

The herbicide clomeprop [2-(2,4-dichloro-*m*-tolylloxy) propionanilide] selectivity controls many species of annual broad-leaf and certain perennial weeds such as *Eleocharis acicularis* (L.) Roem. et Schult. var. *longiseta* Sven. and *Scirpus hotarui* Ohwi in rice paddies. Clomeprop exhibits phytotoxicity through auxin-like effects similar to other auxin-type herbicides. In plant cells, clomeprop is hydrolyzed at the acylamide bond by arylacylamidase to form its acid metabolite DMPA [2-(2,4-dichloro-*m*-tolylloxy) propionic acid]. DMPA has stronger auxinic activity than clomeprop. However, detailed mechanisms for clomeprop-induced injury are not understood. The objectives of this study were to clarify the detailed mode of action of clomeprop and to contribute to the development of new herbicide.

1. Auxinic Activity of Clomeprop and Its Hydrolytic Metabolite and Their Binding to Maize Auxin-Binding Protein

Clomeprop is classified as an auxin-type herbicide and was reported to be hydrolyzed to DMPA in plants. The auxinic activity of clomeprop was compared with DMPA and several plant hormones to investigate whether clomeprop itself exhibited auxinic activity. The results were as follows: (1) In all the auxinic activity tests performed - maize coleoptile elongation, mung bean slit and ethylene production- clomeprop exhibited lower auxinic activity than its metabolite DMPA. (2) DMPA showed higher inhibitory activity on maize and mung bean growth than clomeprop. (3) DMPA bound with the putative maize membrane-bound auxin receptor, while clomeprop did not. It can thus be concluded that clomeprop has no auxinic activity and that the metabolite DMPA is the active compound in auxinic action.

2. Involvement of Ethylene in Clomeprop-Induced Action in Radish Seedlings

Whether ethylene is involved in morphological changes due to clomeprop was examined. Aminoxyacetic acid (AOA), a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase inhibitor, arrested clomeprop- or DMPA-induced morphological changes in radish seedlings, such as leaf curling and epinasty, to some extent. These morphological changes were considerably reduced when 2,5-norbornadiene (NBD), a competitive ethylene binding inhibitor, was applied after clomeprop or DMPA treatment. Ethephon (2-chloroethylphosphonic acid), an ethylene releasing agent, inhibited elongation of the first leaves. The enhancement of ethylene evolution by clomeprop occurred later than that by DMPA. ACC synthase, which converts *S*-adenosylmethionine (SAM)

* 本論文は筑波大学審査学位論文である。

to the ethylene precursor ACC, was activated by clomeprop and DMPA; however, ACC oxidase, the enzyme that converts ACC to ethylene, was not activated by either substance. These results suggest that clomeprop is hydrolyzed to DMPA and then promotes ethylene production by activating ACC synthase. Accumulated ethylene might be responsible for clomeprop induced morphological changes in radish seedlings.

3. Mechanism of Hormonal Actions Induced by Clomeprop Applied to Roots of Radish Seedlings

Morphological changes, ethylene production, and activation of ACC synthase and ACC oxidase in the leaves of radish seedlings by clomeprop and DMPA applied to the roots were investigated. The results were compared with data from the application to shoots. In root application, clomeprop induced less leaf angle increase than in shoot application. Root-applied clomeprop stimulated ACC synthase activity and ethylene production; however, they were much lower than in shoot application. In contrast, root-applied DMPA, which is assumed to be an auxinic active compound, induced marked leaf curling and leaf angle increase. Furthermore, root-applied DMPA rapidly activated ACC synthase and ethylene production. The amount of ethylene production was closely related to the degree of morphological change. Therefore, the morphological changes induced by root-applied clomeprop or DMPA are believed to be caused by ethylene; which is increased by DMPA-induced ACC synthase in shoots.

4. Ethylene Action Inhibitors Suppressed DMPA-Induced Electrolyte Leakage from Radish Roots

The involvement of ethylene was investigated in the physiological mechanism of clomeprop- or DMPA-induced electrolyte leakage from radish roots. The application of DMPA to radish roots caused an increase in electrolyte leakage from the roots, suppression of root growth and stimulation of ethylene production. Although ethylene action inhibitors 2,5-norbornadiene (NBD) and *cis*-propenylphosphonic acid (PPOH) did not suppress ethylene evolution from the DMPA-treated radish roots during the first 24hrs, these compounds suppressed electrolyte leakage and to some extent restored the growth of lateral roots. Evan's blue dye test revealed that death of root cells occurred 12hr after DMPA treatment. This indicated that the increase in electrolyte leakage preceded the death of the root cells. These results suggest that the ethylene induced by DMPA is attributable to the leakage of electrolyte from the radish roots.

5. Involvement of Active Oxygen in DMPA-Induced Electrolyte Leakage from Radish Roots

The involvement of active oxygen was investigated in DMPA-induced electrolyte leakage from radish roots. The treatment of radish roots with DMPA caused an increase in electrolyte leakage from the roots and suppression of root growth. Some scavengers of active oxygen reduced the DMPA-induced ion leakage. In particular, singlet oxygen quenchers 1,4-diazabicyclo-[2,2,2] octane (dabco) and *L*-histidine significantly suppressed the leakage and restored the growth of lateral roots. Pre-treatment of roots with free radical quenchers or singlet oxygen scavengers had no effect on DMPA-induced ethylene production. The application of free radical quenchers or singlet oxygen scavengers suppressed the DMPA-enhanced peroxidation of lipids in radish roots to some extent. These results suggest that the presence of active oxygen species is also attributable to DMPA-induced electrolyte leakage.

Based on the above results, I propose the following mechanism for clomeprop-induced injury: At first, clomeprop is hydrolyzed to DMPA in plants which then binds to auxin-binding proteins. Clomeprop itself may not be an auxinic active compound. Some auxin receptors may recognize clomeprop as an auxin only after it is hydrolyzed to DMPA. DMPA stimulates ethylene biosynthesis by inducing ACC synthase synthesis. The accumulated ethylene causes clomeprop-induced morphological changes, such as leaf curling and epinasty, and electrolyte leakage from radish roots. The destruction of membrane permeability in radish roots may result in inhibition of the

growth of lateral roots. Furthermore, active oxygen species, particularly singlet oxygen, may be involved in DMPA-induced electrolyte leakage from radish roots. Independent of the ethylene biosynthesis pathway, active oxygen species may be directly involved in the electrolyte leakage.

目 次

略語	244
第1章 緒 言	245
第2章 オーキシシン型除草剤clomepropとその加水分解代謝物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	248
2.1 序 論	248
2.2 材料及び方法	249
2.3 結 果	250
2.4 考 察	254
2.5 要 旨	255
図	
第3章 Clomepropによるダイコン芽生えの形態異常へのエチレンの関与	256
3.1 序 論	256
3.2 材料及び方法	257
3.3 結果と考察	259
3.4 要 旨	263
表と図	
第4章 Clomepropを根部処理した後のダイコン芽生えでの形態異常の発現機構	263
4.1 序 論	263
4.2 材料及び方法	263
4.3 結 果	264
4.4 考 察	266
4.5 要 旨	267
表と図	
第5章 DMPA処理後に引き起こされる電解質漏出へのエチレンの関与	268
5.1 序 論	268
5.2 材料及び方法	268
5.3 結 果	269
5.4 考 察	273
5.5 要 旨	274
図	
第6章 DMPA処理後に引き起こされる電解質漏出への活性酸素の関与	275
6.1 序 論	275
6.2 材料及び方法	275
6.3 結果と考察	276
6.4 要 旨	279
図	
第7章 総合考察	279
摘 要	283
謝 辞	284
引用文献	285

略 語

ABA	Abscisic acid
ABP	Auxin-binding protein
ACC	1-Aminocyclopropane-1-carboxylate
AOA	Aminooxyacetic acid
AVG	Amino ethoxyvinyl glycine
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
Dabco	1,4-Diazabicyclo-[2,2,2]-octane
DMPA	2-(2,4-Dichloro- <i>m</i> -tolxyloxy) propionic acid
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dNTP	Deoxy (A, G, T, C)-5'-phosphate
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt
EtBr	Ethidium bromide
ETH (Ethephon)	2-Chloroethyl-phosphonic acid
FW	Fresh weight
FID-GC	Flame ionization detector gas chromatography
Hepes	<i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazine- <i>N'</i> -2-ethanesulfonic acid
HO·	Hydroxyl radical
IAA	Indole-3-acetic acid
MCPA	(4-Chloro- <i>o</i> -tolxyloxy) acetic acid
MCPP	2-(4-Chloro- <i>o</i> -tolxyloxy) propionic acid
MDA	Malondialdehyde
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NAA	α -Naphthylacetic acid
NBD	2,5-Norbornadiene
Oligo (dT)	Oligo deoxy (thymidilate)
¹ O ₂	Singlet oxygen
PCIB	<i>p</i> -Chlorophenoxyisobutyric acid
PLP	Pyridoxal-5'-phosphate
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PPOH	<i>cis</i> -Propenylphosphonic acid
SAM	<i>S</i> -Adenosyl- <i>L</i> -methionine
SDS	Sodium dodesylsulfate
Spermine	<i>N, N'</i> -Bis(3-aminopropyl)-1,4-butanediamine
SSC	Standard saline citrate
STS	Na-Silversulfate
TCA	Trichloroacetic acid
TBA	Thiobarbituric acid
Tiron	1,2-Dihydroxybenzene-3,5-disulfonate
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane

第1章 緒 言

今なお世界人口の過半数を占める発展途上国では、慢性的な食糧不足で飢餓状態にあるところが少なくない。人口の自然増加率は、先進諸国ではかなり低い、発展途上国では著しく高い。さらに、発展途上国の農業は技術水準が低いこと、開発可能な耕地が劣悪な自然環境下にあること、工業化に伴う耕地の減少、また、洪水、干ばつといった自然災害を受けやすいこと等の問題があり、将来的にも食糧自給は容易に達成できそうもないことが予測される。これらのことから、開発途上国では今後さらに、先進国への食糧依存度が高まっていくことだろう。しかしながら、日本、イギリス、イタリアなどの先進諸国でも年々、食糧自給率が低下しているという現状にある。したがって、将来的に世界の食糧を確保するためには、各国の食糧生産量を少しでも増加させることや、発展途上国に対し食糧生産に役立つ技術協力をしていくこと等が必要であると思われる。

1940年代以降の除草剤の開発は食糧の増産に大きく貢献してきた。しかしながら、現在なお世界の農産物生産量は、雑草害によって10%以上も減収していると言われている。特に、熱帯や亜熱帯の発展途上国においては、雑草による直接的な被害が大きく、特に畑地の場合は放置すれば収穫が皆無に等しいこともある[123]。したがって、現在の除草剤の性能をさらに向上させることは、農作物生産量の増加につながり、結果的には世界の食糧確保に貢献することになると思われる。そして、今後の除草剤性能のさらなる向上にあたっては、効力のみならず、過去における環境汚染等の社会問題をも考慮した、より安全性の高い剤についての研究開発が必要となってくるだろう。より低毒性で非残留性、そして、より低薬量の処理で済む除草剤の出現がますます要求される。現在そのような除草剤がさかんに研究開発されつつあるが、更なる除草剤の安全性向上や低減量化のためにも、今後ますます厳密な選択性が除草剤に要求されてくることは明らかである。このようなより望ましい除草剤開発のためには、剤の性質のみならず、その受取り手である植物の情報も非常に重要なものとなることから、薬剤の植物体内での挙動や植物への生理、生化学的影響、作用機構を詳細に調べることは不可欠となる。より安全性の高い除草剤に求められる性能として、まず重要なものとして哺乳類を始めとする動物への低毒性が挙げられるが、そのためには動物には存在しない植物固有の代謝系、つまり、植物ホルモン系、アミノ酸生合成系、光合成、光合成色素系などを攪乱することが望ましいと考えられる。こう

いった諸点を考慮すると、今後、さらに安全性の高い剤を作出できる可能性をもつ、植物ホルモン系に着目して、その作用機構を詳細に調べていくことは意義のあることであると思われる。

オーキシ型除草剤の作用機構研究の経緯

植物の生活環における種子形成、休眠、発芽、生長、分化、老化は光や温度、栄養などの環境要因の影響を受けて、植物の持つ遺伝情報にしたがって秩序正しく進められている。これらの過程は微量の植物ホルモンによって制御されている。植物ホルモンは多様な生理作用を示すが、これはホルモンが作用する細胞の状態（組織、器官の違いなど）、各ホルモンの濃度の違い、他のホルモンとの相互作用等によって、作用の現れ方が異なるためであると考えられている。現在、植物ではオーキシ、ジベレリン、サイトカイニン、エチレン、アブシジン酸、ブラシノステロイドの6つの植物ホルモンが知られている。オーキシは主に茎の伸長生長促進作用、細胞分裂の促進作用、不定根形成促進作用などに関与しているホルモンとして知られている。また、ジベレリンは茎の伸長生長促進作用や発芽促進作用を、サイトカイニンは細胞分裂促進作用や葉の老化阻止作用を、ブラシノステロイドは主に生長促進や細胞分裂促進作用を、さらにアブシジン酸は生長阻害や蒸散抑制の諸作用を示すことが知られ、そしてエチレンは果実の成熟促進、落葉の促進などの多くの生理現象に関与している気体状ホルモンとして知られている。

オーキシは、最初に植物ホルモンとして認識された物質で、屈性の現象において、刺激を伝える物質としてその存在が推定され、後に実際に植物から単離された。現在知られている主な天然オーキシはindole-3-acetic acid (IAA)である。その後、合成化合物のなかにもIAAと類似の生長促進活性を持つ、合成オーキシ類が見いだされた。2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)は世界で初めて使用された有機系除草剤で、IAAと類似の作用を持つ合成オーキシの1つである。それ以降、2,4-Dと化学的にも作用的にも類似した合成化合物がスクリーニングされ、種々の化合物が除草剤として開発された。このような化合物群がホルモン型除草剤（オーキシ型除草剤）と呼ばれている。

植物本来のオーキシであるIAAの量は、その生合成と共にアミノ酸やグルコースとの抱合体形成や酸化酵素による酸化不活性化反応等により、常に生理濃度を越えないように調整されている。しかし、オーキシ型除草剤が処理されると、植物が必要とするオーキシ量をはるかに越えた量が使用されるため、また化学的に安定であるため容易に代謝できなくなり、高濃度で長期間作用

することになる。上記のように、オーキシンはとりわけ植物の生長分化の調節に特に重要な役割を担っている [11] ため、オーキシンのように調節される代謝系を攪乱することは、植物に対し多大なダメージを与えることになる。オーキシン型除草剤に対して感受性の高い植物では、茎葉処理後に組織のカルス化、器官の奇形化、エチレンの過剰生成が起こる。また、柔組織においては分裂を開始してカルス状組織を作り、根源体を形成することが知られている。さらに、根では根端が膨化し、伸長を停止し、水や栄養分を吸収する能力が失われる。そして節部は栓をしたようにふさがり、光合成も阻害されることが認められている [5]。このようなオーキシン作用を攪乱した結果引き起こされる組織の破壊が、次第に植物体を枯死に導くと考えられてきた [17] が、オーキシン型除草剤は非常に多くの生理作用を持っており、その中でいずれの作用が直接的に殺草効果に関与しているのかについては、未だに完全に解明されるまでには至っていない。

オーキシン型除草剤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、この作用が除草剤としての殺草効果に直接的に関与しているかどうかについては疑問の余地がある。また、その他の主要な生理作用に、1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase の誘導によるエチレン生合成の促進がある。近年になって、この生理作用とオーキシ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た。GrossmannとKwiatkowski [29] は、2,4-D や quinclorac (3,7-dichloro-8-quinolinecarboxylic acid) のようなオーキシ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 ($r=0.92$ (quinclorac), $r=0.93$ (2,4-D)) があることを示した。また、HeapとMorrison (1992) そして Peniukら [89] は picloram (4-amino-3,5,6-trichloropyridine-2-carboxylic acid), dicamba (3,6-dichloro-*o*-anisic acid), 2,4-D, MCPP [2-(4-chloro-*o*-tolylxy) propionic acid], MCPA [(4-chloro-*o*-tolylxy) acetic acid] などのオーキシン型除草剤に対して抵抗性を持つ wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) のバイオタイプを見だし、抵抗性と感受性のバイオタイプ間で 2,4-D, dicamba, picloram の吸収、移行、代謝には大きな差異は認められないが、感受性のものでは除草剤処理後に抵抗性のものよりも多量のエチレンを発生していることを示した。さらに、2,4-D や dicamba, picloram 等の代表的なオーキシン型除草剤が誘導するエチレンがこの除草剤に対して感受性の大きい植物に見られる形態異常や生理学的変化を引き起こしているのではないかとする報告も多く出されている [1,

33, 34, 35, 43, 76, 79]。しかしながら、もし、本当にエチレンが殺草活性の要因となっているとしても、エチレン自体も非常に多くの生理作用を有しており、その中どの作用が直接的に殺草作用に関与しているのかについて今後解明していかなければ、オーキシン型除草剤の作用機構を完全に理解したことにはならないだろう。また、最近になってオーキシン型除草剤の殺草活性の本体はエチレンではなく、ACCの分解によりエチレンと等量生成されるHCNではないかとする説も報告されている [29, 30, 126]。Tittleら [126] は、HCNの作用標的はミトコンドリア内のチトクロームCオキシダーゼや細胞質に存在する硝酸還元酵素である可能性を考えている。しかしながら、植物種によってHCNの解毒酵素 (β -cyanoalanine synthase (β -CAS)) 活性やHCNに対する感受性に差があることから、オーキシン型除草剤に感受性の植物種すべてにおいて、HCNが植物体枯死の直接的な原因となっているのかどうかについてはさらに調査されなければならないと思われる。また、オーキシン型除草剤 quinmerac (7-chloro-3-methylquinoline-8-carboxylic acid) によるACC生成促進の結果として蓄積するアブシジン酸 (ABA) が、生育抑制効果に深く関与していることを示唆する報告もある [102]。これに関してもACC生合成の後、どのような経路でABAが蓄積しているのかといった問題等も含めてさらに検討していく必要があるだろう。したがって、今後のオーキシン型除草剤の作用機構研究では、除草剤処理後に生成されるエチレン、HCN、さらにABAの役割を特に詳細に解明していく必要があると考えられる。

以上のことをふまえて、本研究ではオーキシン型除草剤に分類されている clomeprop [(2-(2,4-dichloro-*m*-tolylxy) propionanilide)] を取り上げ、特にその作用機構におけるエチレンの役割に焦点を当てて研究を行った。

Clomepropに関する研究の経緯

本研究に用いた clomeprop (Fig. 1-1) は三菱油化(株) (現ローヌプーラン油化アグロ(株)) によって開発された商品名「ユカホープ」という薬剤である。この除草剤はノビエを除く一年生雑草およびマツバイ、ホタルイ等の一部の多年生雑草に極めて低用量で効果を発揮するフェノキシ系の薬剤で、水田用除草剤として使用されている。本剤は感受性植物に対して、いわゆるオーキシン型除草剤と同様な症状を示すことが知られている [114]。そして植物体中(イネ)に吸収された clomeprop は、次の主代謝経路で代謝されるものと推定されている [50]。

- (1) Clomeprop のアミド結合部位の加水分解により 2-(2,4-dichloro-*m*-tolylxy) propionic acid (DMPA) とアニリンが生成。

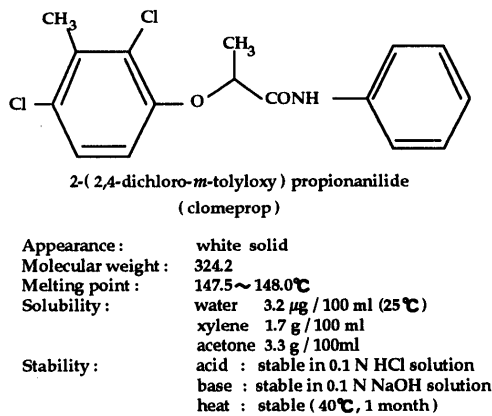


Fig. 1-1 Chemical structure and physical and chemical properties of clomeprop.

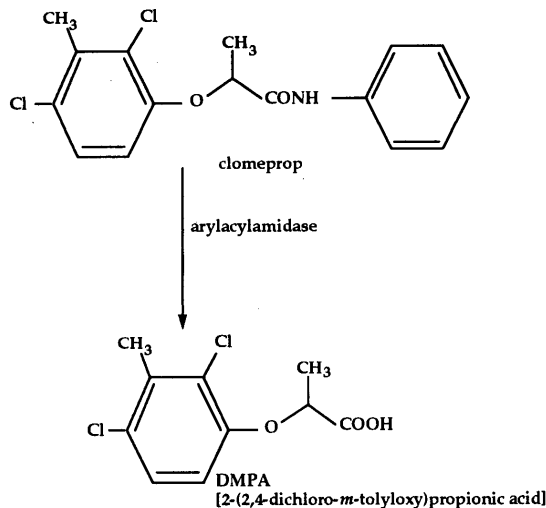


Fig. 1-2 Metabolism from clomeprop to DMPA in some plants.

- (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となる。
- (4) さらに一部は非抽出性代謝物となる。

また、その他にclomeprop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、clomepropは植物体内でアシルアミダゼを介してアシルアミドの加水分解から生じた代謝物DMPAに変化することにより(Fig. 1-2)、もっとも強いオーキシシン活性を有すようになると報告されている[118, 142]。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[114]。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っ

て選択性が示されるのではないかと推定されている[142]。実際、clomepropに抵抗性であるイネでは、活性本体と考えられている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、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によって、選択性が発現していると考えられる[141]。

Suwunnamekら[118]はダイコンでのオーキシシン活性は、clomepropではなくDMPAの茎葉中存在量と高い相関関係があると報告している。このことから、clomeprop自身は活性を持たず、その活性本体はDMPAである可能性が示唆されている。しかしながら、clomeprop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[110, 114]。したがって、clomepropの作用機構を解明するためには、まずはじめに、clomeprop自身がオーキシシン活性を有するののかについて検討していく必要があると思われる。さらに、clomeprop, DMPAの殺草活性の本質に関する研究は現在まで行われていないことから、これらの薬剤の作用機構の研究は、他のオーキシシン型除草剤の作用機構の理解に対しても新情報を与えることになるだろう。

以上のことをふまえて、本研究ではclomepropの作用機構を解明することを目的とし、特にclomeprop処理後のエチレンの作用に焦点を当てて研究を行った。第2章では、clomepropがオーキシシン活性を持つのかについて検討した結果について述べる。第3章では、clomepropやDMPA処理後の形態異常とエチレンとの関連について述べる。また、ここではエチレン生合成の律速酵素である1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase活性とACCからエチレンへの変換反応を触媒する酵素であるACC oxidase活性の変化についても検討した。第4章では、処理器官(根、茎葉)毎に、形態異常の差異の発現要因をエチレン生合成系を軸として検討した結果について述べる。第5章では、clomeprop, DMPA処理後に起こるダイコン幼根での電解質漏出や側根の発生阻害におけるエチレンの役割について検討した結果について述べる。そして第6章では、薬剤処理後のダイコン幼根での電解質漏出にエチレンの他に活性酸素が関与しているのかについて検討し、さらに、エチレンと活性酸素との関わりについて調べた結果について述べる。そして、第7章では、本研究で得られた結果を基に現時点で考えられるclomepropの作用機構について考察を加えた。

第2章 オーキシシン型除草剤clomepropとその加水分解代謝物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

2-1 序 論

Clomeprop (2-(2,4-dichloro-*m*-tolylloxy) propionanilide) は、水稲用選択性除草剤で、一年生雑草およびマツバイ、ホタルイ等の一部の多年生雑草を制御する。本剤を処理した感受性植物は、いわゆるオーキシシン型除草剤と類似の症状を示すことが知られている [114]。また、水田中のミズガヤツリに対しては、根茎のRNA生合成系を攪乱し、塊茎形成に伴う根茎の内部形態の変化を阻害することにより塊茎の生長抑制を起しているものと想定されている [58]。

Clomepropは植物体内でアリルアシルアミダーゼを介して2-(2,4-dichloro-*m*-tolylloxy) propionic acid (DMPA) に加水分解されるが、DMPAはclomepropよりも強いオーキシシン活性と生育抑制作用を示すことから、clomepropのホルモン作用は主にDMPAに起因するのではないかと推定されている [64, 114, 118, 140, 141, 142]。Suwunnamekら [118] はダイコンでのオーキシシン活性は、clomepropではなくDMPAの茎葉中存在量と高い相関関係があると報告している。また、Wongwattanaら [142] は、ダイコン、キュウリを供試植物として分子内アシルアミド結合の酵素的加水分解反応を阻害する作用のあるNAC (1-naphthylmethyl carbamate) をclomepropと同時に処理すると、clomepropはほとんど殺草活性およびオーキシシン活性を示さなくなることから、clomepropの活性本体はDMPAである可能性をさらに高めている。しかしながら、clomeprop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 [110, 114]。そこで本章ではclomepropの作用機構解明の第一歩として、clomeprop自体がオーキシシン活性を有するのかどうかを確かめることを目的とし、トウモロコシ膜結合型オーキシシン結合蛋白質 (推定上のオーキシシン受容体) との結合活性を調べた。

オーキシシン結合蛋白質研究の経緯

1930年代から1940年代にかけてオーキシシンの構造と活性との関連が調べられ、何らかの特異的受容体が植物体内に存在することが予想された。しかしオーキシシン受容体に関する研究が本格的に始められたのは1970年代に入ってからで、まず受容体として細胞内に存在しオーキシシンと特異的に結合する蛋白質や、膜系に存在するオーキシシン結合部位の検索が行われた。放射性標識オーキシシンを用いたホルモン結合蛋白質の検索実験などから、

オーキシシンと特異的に結合する蛋白質は分子量や細胞内局在性に違いがみられ、1種類ではなく多種類存在することが明らかにされてきた。しかし、これらの蛋白質の機能に関しては不明な点が多く、ホルモン受容体として働くのか、ホルモン合成、分解またはホルモン輸送に関与する蛋白質であるのかについては明らかにされていない。現在オーキシシン受容体として機能する可能性があると考えられている、可溶性および、膜結合型オーキシシン結合蛋白質 [26] をFig. 2-14に示した。

1972年、Hertelらはトウモロコシ子葉鞘を材料に、細胞膜にオーキシシンと特異的に結合する部位が存在することを明らかにした [37]。1978年にはDohrmannらがトウモロコシ子葉鞘の膜画分に存在するオーキシシン結合部位を詳しく調べ、site I (小胞体膜)、site II (液胞膜)、site III (原形質膜) の3つの結合部位を見いだした [21]。1985年になって初めて、オーキシシン結合蛋白質 (ABP 1) がトウモロコシの小胞体から同定され [70]、このABP 1の90%が小胞体内腔か小胞体膜に局在していることが示された [51, 105]。その後ABP 1をコードするcDNAが単離され、その塩基配列が報告された [48, 125]。その報告によるとABP 1の前駆体は201個のアミノ酸より成る分子量が22kDaの蛋白質として合成され、前駆体N末端の38残基は小胞体に入るためのシグナルペプチドとして働くと推定された。一方、成熟蛋白質は163個のアミノ酸残基より成り分子量は18kDaであった。また、C末端には、可溶性分泌蛋白質を小胞体にとどめておくためのシグナルである共通配列 (KDEL) が存在していることが明らかとなった。

トウモロコシ小胞体のオーキシシン親和部位の消長と組織のオーキシシンに対応した伸長生長能との間に相関性があること [136]、また、細胞の伸長生長促進作用におけるオーキシシン特異性とこの親和部位のオーキシシン特異性との間にも相関性がみられること [93] などから、トウモロコシ小胞体ABPがオーキシシン受容体として機能している可能性が考えられはじめ、これを証明するために現在までに様々な実験が行われてきた [9, 10, 70, 82]。Barbier-Brygooら [9] は消化酵素で細胞壁を除去して得られたタバコ葉肉プロトプラストを用いて、細胞のオーキシシン応答反応として細胞内外の膜電位差を測定した。その測定でトウモロコシ小胞体ABP 1抗体の添加効果について調べたところ、オーキシシン応答反応がABP 1抗体により特異的に阻害されることを見いだした。しかしながら、この結果は、抗体が細胞内に取り込まれた後、小胞体に移行して作用するとは考えにくいことから、その時点まで示されてきたABP 1の細胞内局在性と矛盾することとなり、この結果についてはしばらくの間、

疑問視されていた。その後、トウモロコシABP 1は小胞体からゴルジ体を経て原形質膜や細胞壁内に分泌していることが示された [54] ことから、この小胞体ABP 1がオーキシシン原形質膜受容体として機能している可能性がさらに強められている。また、さらにタバコ細胞の原形質膜にはトウモロコシの小胞体ABP 1に対する抗体で検出される、分子量が22kDaの蛋白質が存在することも示されている [106, 107]。しかし、もし本当にこのABP 1が小胞体から原形質膜や細胞壁内に分泌しているのであれば、なぜ小胞体滞留シグナルを保持しているのか、またどのような機構で小胞体滞留シグナルの指示を解除しているのが今後明らかにされなければならない課題であろう。

本章では、オーキシシン作用の発現には、まず第一にオーキシシン受容体への結合が引き金になることに着目し、clomeprop自身のオーキシシン作用の有無を、オーキシシン結合蛋白質への結合活性を測定することにより調べた。これまでの様々な報告から、オーキシシン受容体は複数存在する可能性がある。したがって、clomepropのオーキシシン作用の有無を調べるにはいくつかのオーキシシン結合蛋白質への結合を調べることが重要であることは言うまでもない。しかしながら、前述のようにオーキシシン受容体としての機能が確認されているABPは限られている。こうした理由から、本章では現在、オーキシシン受容体であると推定されているトウモロコシ膜結合型ABP 1とclomepropの結合に限って調べた。

2-2 材料および方法

供試植物：

トウモロコシ (*Zea mays* L. cv. Honey Bantam)
ヤエナリ (*Phaseolus aureus*)

供試化合物：

IAA (indole-3-acetic acid)
NAA (α -naphthylacetic acid)
2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)
clomeprop [2-(2,4-dichloro-*m*-tolylloxy) propionanilide]
DMPA [2-(2,4-dichloro-*m*-tolylloxy) propionic acid]
PCIB (*p*-chlorophenoxyisobutyric acid)

供試化合物の純度：

IAA (98.0%), NAA (97.0%), 2,4-D (95.0%), clomeprop (98.0%).

Clomeprop, DMPAは三菱油化(株) (現 ローヌプーラン油化アグロ(株)) より譲渡を受けた。

実験方法：

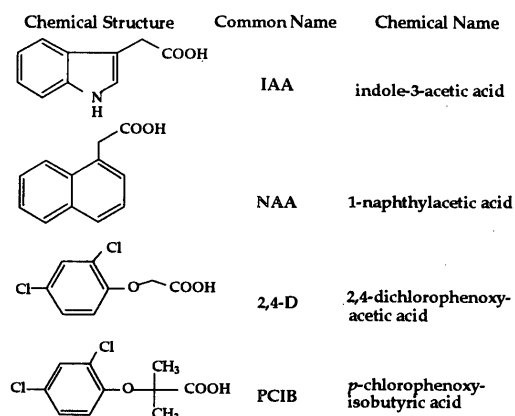


Fig. 2-1 Chemical structures of auxins and their related compounds.

<1> 生育阻害試験

緩衝液 (1mM potassium phosphate, pH6.7) で 1×10^{-4} M, 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M に調整した各薬剤の水溶液にトウモロコシ種子、ヤエナリ種子を一晩浸漬後、各薬剤を含んだペーパータオル上に播種した。5日間暗所で生育させた後、胚軸の長さを測定した。また、緩衝液を用いて測定したものを対照区とした。

<2> オーキシシン活性試験

(トウモロコシ子葉鞘伸長試験)

トウモロコシ種子を一晩水道水に浸漬後、吸水種子を精製水で湿らせたペーパータオル上に播種して、暗所で5日間生育した。子葉鞘の徒長を防ぐため、播種後2, 3日は、2時間ずつ赤色光を照射した。子葉鞘の先端5mmを除去した後、5mmの切片を調整した。各々 1×10^{-4} M, 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M に調整した各薬剤の水溶液、または緩衝液 (対照区) が3ml入った直径3cmのガラスシャーレに、子葉鞘切片を10本ずつ入れ、暗所で27°C, 24時間生育させた。子葉鞘切片の長さは、拡大鏡を用いて測定した。

(ヤエナリスリット試験)

ヤエナリ種子を一晩水道水に浸漬後、吸水種子を精製水で湿らせたペーパータオル上に播種した。その後暗所で3日間生育させ、フックの下3mmから、20mmの胚軸切片を調整し、子葉側から縦に15mmの切れ目を入れた。V字型をした下胚軸切片10本ずつを各々 1×10^{-4} M, 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M に調整した各薬剤、または緩衝液 (対照区) 中で20時間、暗所、27°Cで放置し、胚軸の屈曲角を測定した。

<3> エチレン生成量

(トウモロコシでのエチレン生成量)

上記のように準備した、播種後5日目のトウモロコシから5mmの子葉鞘切片を調製した。各々 1×10^{-4} M, $1 \times$

10⁻⁵M, 1 × 10⁻⁶Mに調整した薬剤, または緩衝液(対照区)0.5mlが入っている20mlのバイアル瓶中に下胚軸切片を10本ずつ浸し, パラフィルムで密封した。30°C, 暗所で保温した後に, 2時間おきに6時間, バイアルの中からシリンジで1mlのガスを抜き取り, ガスクロマトグラフ(Shimadzu, GC-7A, FID検出器)を用いて発生したエチレン量を測定した。測定の際には, 標準ガス(99.5%エチレン, GL Science Co.)を使用した。

分析用カラムとしてUnipak S (GL Science Co.)を充填した3mm × 2mのガラスカラムを用いた。ガスクロマトグラフは以下のような条件に設定した。

オープン温度: 60°C

キャリアーガス (N₂) 流速: 50ml/min

H₂ガスの圧力: 0.5kg/cm²

注入温度: 120°C

(ヤエナリでのエチレン生成量)

上記のように準備したヤエナリを用いて, フックの下3mmから, 5mmのヤエナリ下胚軸切片を調整した。各々1 × 10⁻⁴M, 1 × 10⁻⁵M, 1 × 10⁻⁶Mに調整した薬剤, または緩衝液(対照区)0.5mlが入っている5mlバイアル瓶中に下胚軸切片を10本ずつ入れ, パラフィルムで蓋をした。30°C, 暗所で保温した後に, 2時間おきに6時間, 5mlバイアルの中から1mlのガスを抜き取り, 上記のガスクロマトグラフを使用し, 発生したエチレン量を測定した。

<4> オーキシン結合蛋白質(ABP)への結合活性

① (ミクロソーム膜画分の単離)

上記のようにトウモロコシ種子を暗所, 30°Cで5日間生育させた(播種後2, 3日は, 2時間ずつ赤色光を照射した)。トウモロコシ膜結合型ABPの単離は, 下村らの方法[104]にしたがって行った。トウモロコシ葉鞘および中胚軸300gを等量の抽出Buffer (50mM Tris-citrate pH8.0, 0.1mM MgCl₂, 1mM EDTA, 0.1mM PMSF)で磨砕し, 4層のガーゼで濾過した。その濾液を5,000×gで10分間遠心分離し, 上清にCaCl₂を最終濃度が100mMとなるように添加し, 4°Cで10分間攪拌した後, 再度10,000×gで20分間, 遠心分離した。その沈殿に冷アセトン300mlを加え, 激しく攪拌した。それをさらに10,000×gで20分間, 遠心分離し, 得られた沈殿を凍結乾燥器で1時間乾燥した後, 乳鉢で粉末状にして4°Cで保存した。

② (ABPの可溶化)

粉末状の膜画分を可溶化Buffer (10mM Na citrate-citric acid, 5mM MgCl₂, 0.2mM PMSF, pH5.7)で懸濁し, テフロンホモジナイザーで30分間, 磨砕した後, 10,000×gで20分間, 遠心分離した。その上清をあらかじめ

めPMSFを含まない可溶化Bufferで平衡化したPD-10カラム (Pharmacia LKB) に通して低分子物質を除き, 蛋白質画分を得, これを可溶化ABPとした。

③ (³H-NAA結合活性の測定)

最終濃度が1 × 10⁻⁴M, 1 × 10⁻⁵M, 1 × 10⁻⁶Mとなるように, 試験管に各薬剤を加え, さらに可溶化したABP0.5mlと5 × 10⁻⁸Mの³H-NAA (1.8TBq/mmol)を加えた後, 4°Cで5分間静置した。次に飽和硫酸を加えた後に15,000×gで30分間遠心分離し, 沈殿を得た。上清を除いてから, 沈殿を0.1%SDSに溶かし, 放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。解離定数(Kd)は以下の数式より求めた。

$$B/F = (B_{max} - B) / Kd$$

$$B/F = Cb / (Ct - Cb), B = Cb \cdot Ht / Ct$$

B: 特異的に結合したホルモン濃度

B_{max}: 結合部位の濃度

F: 遊離ホルモン濃度

Ht: ホルモン濃度

Ct: 試料中の全放射活性量 (dpm)

Cb: 特異的に結合した放射活性量 (dpm)

2-3 結果

Fig. 2-2からFig. 2-17に示した実験は, すべて3連制で行い, 値はそれらの平均値で示してある。実験は同じものを少なくとも2度繰り返して行ったが, 繰り返し実験ではすべて同じ傾向を示した。

<1> 生長阻害試験

Clomeprop, DMPAの生長抑制効果の指標とするために, トウモロコシ, ヤエナリを供試植物として種子処理5日後の胚軸長の測定を行った。トウモロコシでは, 1 × 10⁻⁶Mではいずれの効果も見られなかったが, 1 × 10⁻⁵Mにまで濃度を上げると, DMPAでは無処理の約70%の

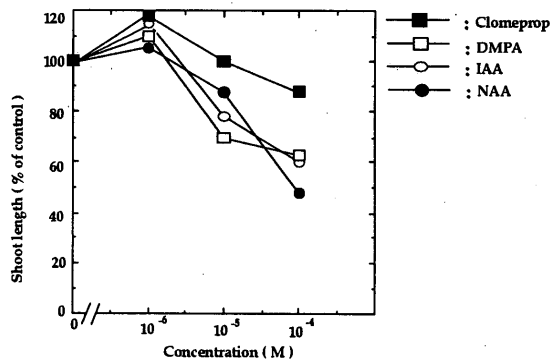


Fig. 2-2 Inhibition of maize shoot growth by clomeprop, DMPA and auxins. The length of non-treated shoot (control) was 4.1 cm.

長さとなり、さらに $1 \times 10^{-4} \text{M}$ では約60%となった (Fig. 2-2)。このDMPAの抑制効果は、天然オーキシシンである IAA や代表的な合成オーキシシンである NAA と同程度であった。Clomeprop を種子処理すると $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ では生長抑制効果は現れなかったが、 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ にまで濃度を上げると、無処理の約90%となり、わずかに胚軸の生長を抑制した。

ヤエナリでは、 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ でも clomeprop, DMPA 処理により無処理の約60~70%程度となり、トウモロコシよりも感受性が高いことが示された (Fig. 2-3)。 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ にまで濃度を上げると、IAA, NAA, DMPA 処理では無処理の20%以下にまで伸長が抑制された。ヤエナリでもやはり、DMPAの方がclomepropよりも生長抑制効果が高かった。

<2> オーキシシン活性試験

Clomeprop, DMPA による生長抑制効果がオーキシシン活性に起因しているのかどうかを調べるため、オーキシシン活性測定を行った。オーキシシン活性の指標として、ト

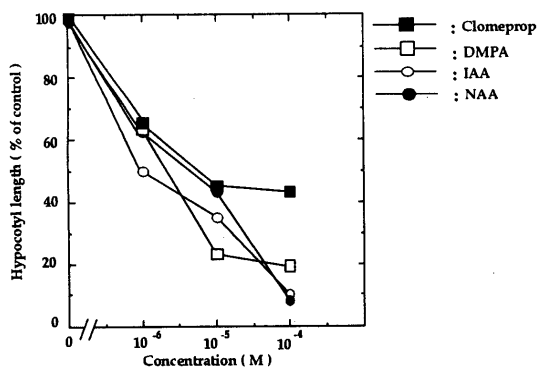


Fig. 2-3 Growth inhibition of mung bean seedling by clomeprop, DMPA and auxins. The length of non-treated seedlings (control) was 5.8cm.

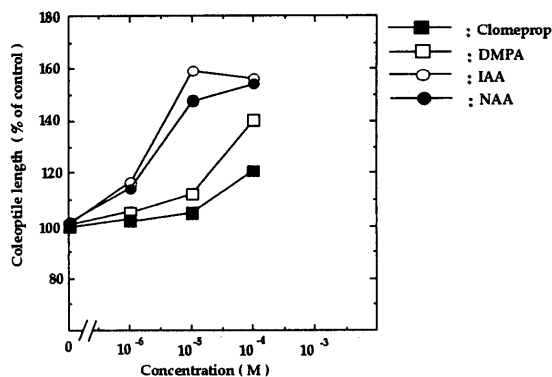


Fig. 2-4 Effect of clomeprop, DMPA and auxins on maize coleoptile growth. The length of non-treated coleoptile (control) was 7.54 cm.

ウモロコシ子葉鞘伸長試験、ヤエナリスリット試験を行った。トウモロコシ子葉鞘伸長試験では、DMPA は IAA や NAA ほどの強いオーキシシン活性を示さなかったものの、 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ にまで濃度を上げると、無処理の約140%にまで伸長させ、強いオーキシシン活性を示した (Fig. 2-4)。Clomeprop 処理では、やはり DMPA ほどの強い伸長促進効果を示さず、 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ でも、無処理の約120%程度であった。

ヤエナリスリット試験でも、 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4} \text{M}$ の濃度範囲において DMPA は clomeprop よりも強いオーキシシン活性を示した (Fig. 2-5)。

<3> エチレン生成量

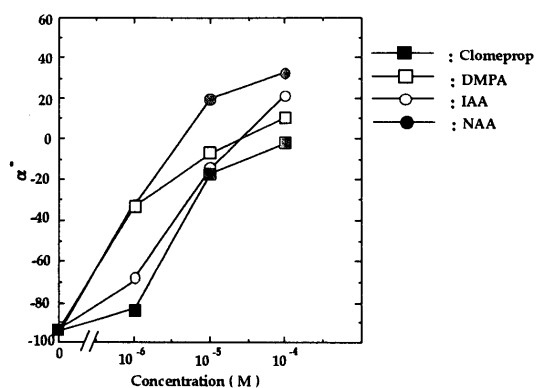


Fig. 2-5 Effect of clomeprop, DMPA and auxins on curving angle of mung bean hypocotyl sections.

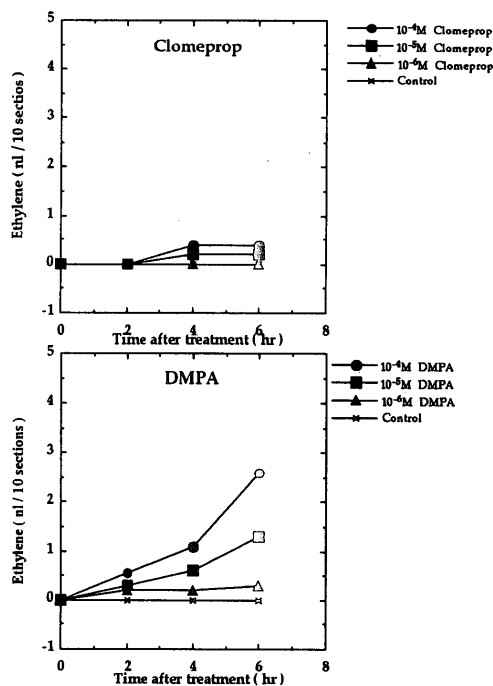


Fig. 2-6 Effect of clomeprop or DMPA on ethylene production by maize coleoptile sections.

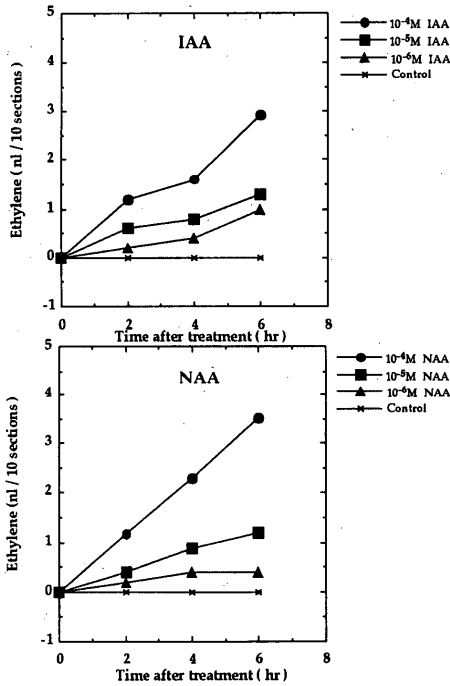


Fig. 2-7 Effect of IAA or NAA on ethylene production by maize coleoptile sections.

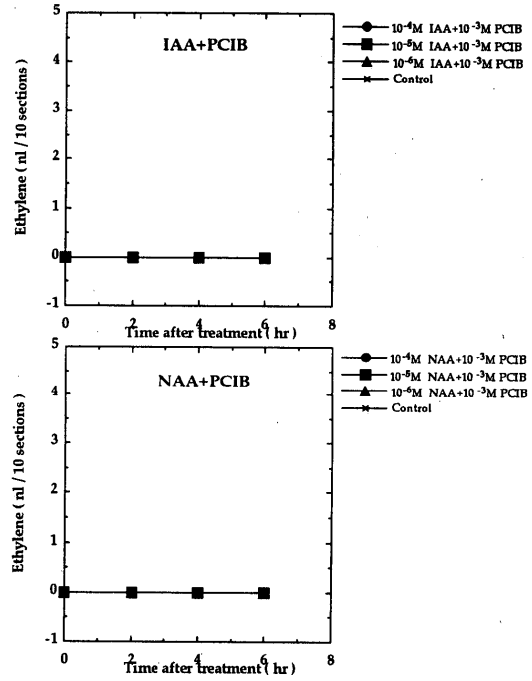


Fig. 2-9 Effect of PCIB on IAA- or NAA-induced ethylene production by maize coleoptile sections.

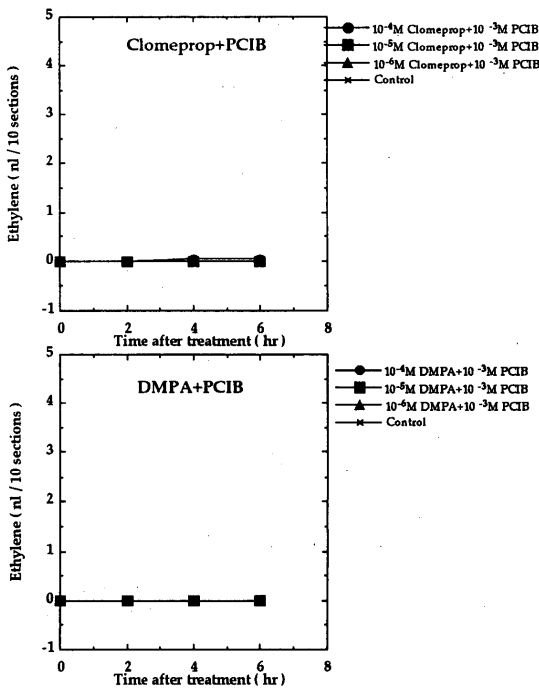


Fig. 2-8 Effect of PCIB on clomeprop- or DMPA-induced ethylene production by maize coleoptile sections.

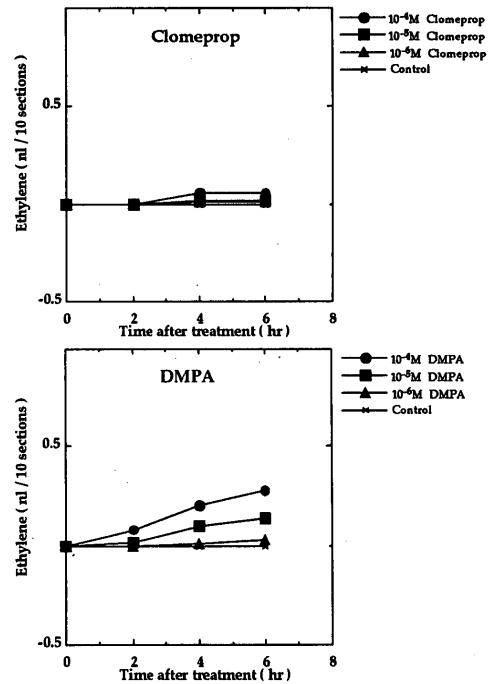


Fig. 2-10 Effect of clomeprop or DMPA on ethylene production by mung bean hypocotyl sections.

Fig. 2-6~Fig. 2-7はトウモロコシ子葉鞘に薬剤処理した後のエチレン放出量を測定した結果である。1×10⁻⁴M DMPA処理では処理6時間後にバイアル内のエ

チレン含量は約3nl/10sectionsとなり、これは1×10⁻⁴M IAA, NAAとほぼ等しい活性を示した。Clomeprop処理では1×10⁻⁴Mの濃度でさえも、最大約0.5nl/10sec

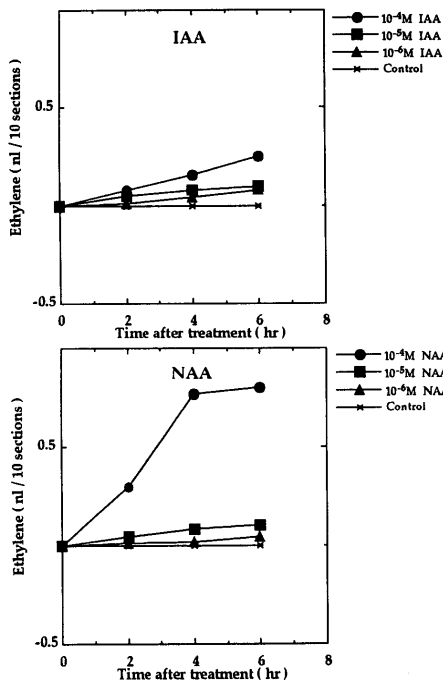


Fig. 2-11 Effect of IAA or NAA on ethylene production by mung bean hypocotyl sections.

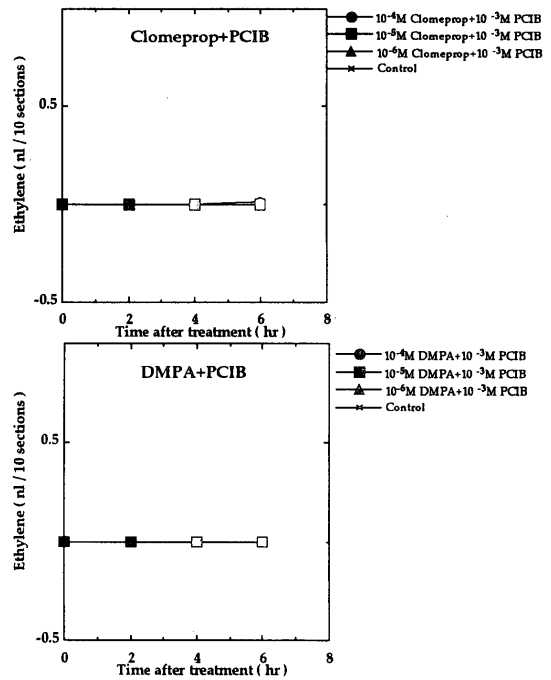


Fig. 2-12 Effect of PCIB on clomeprop- or DMPA-induced ethylene production by mung bean hypocotyl sections.

tionsであり、やはりDMPAよりも活性は弱かった。また、アンチオーキシンであるPCIB ($1 \times 10^{-3}M$)を各薬剤と一緒に加えると、いずれの薬剤処理においてもエチレン放出量がほぼ完全に抑制された (Fig. 2-8~Fig. 2-9)。

Fig. 2-10~Fig. 2-11はヤエナリ下胚軸に薬剤処理した後に発生するエチレン量を測定した結果である。トウモロコシと比較するといずれの薬剤でもエチレン放出量は少なかったが、 $1 \times 10^{-4}M$ DMPA処理では処理直後から徐々にエチレンが発生し始め、それは量的にIAAと同程度であった。Clomeprop処理では $1 \times 10^{-4}M$ でも、ほとんどエチレンを生成しなかった。また、PCIBを同時処理すると、トウモロコシの場合と同様に、すべての薬剤処理においてほぼ完全にエチレンの発生が抑えられた (Fig. 2-12~Fig. 2-13)。これらの結果は、clomeprop, DMPAによって発生するエチレンは、傷害誘導型のエチレン生合成によるものではなく、ほぼすべてがオーキシン誘導型のエチレン生成であることを示唆している。

〈4〉 オーキシン結合蛋白質(ABP)への結合活性

結合活性の測定には、アセトン処理法により膜小胞から得られた膜画分を可溶化したABPを用いた。トウモロコシ胚軸を磨砕し、遠心分離して得た膜小胞をアセトン処理した後、乾燥し、粉末状の膜標品を得たが、この膜標品は $4^{\circ}C$ 保存下では、およそ3週間はオーキシン結合活性が失活せず安定であった。結合活性測定は、NAAが最もトウモロコシABPに対し親和性が高かったため、

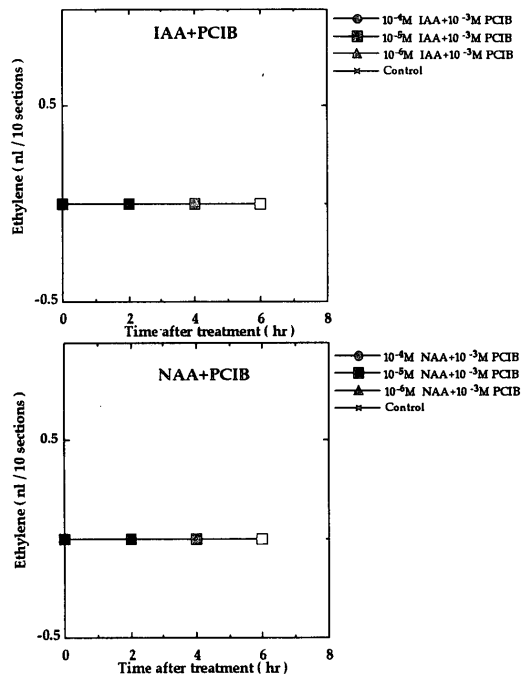


Fig. 2-13 Effect of PCIB on IAA- or NAA-induced ethylene production by mung bean hypocotyl sections.

3H -NAAを用いて行った。各薬剤がどの程度、 3H -NAAとABPの結合を競合的に阻害するのかを調べることに、各薬剤とABPとの結合活性を調べた。また、通常、ホルモン結合活性測定には、フィルター吸着法、ゲ

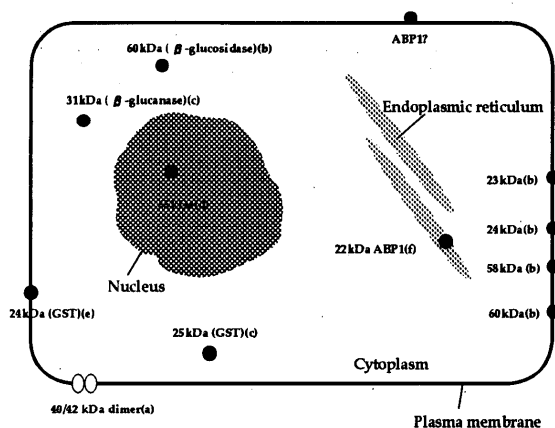


Fig. 2-14 Location, size and function of auxin-binding proteins (ABPs) identified in various plants.

(Garbers and Simmons, 1994)

The letters in parenthesis correspond to the plant in which the protein was identified.

- (a) zucchini and tomato
- (b) maize
- (c) *Hyoscyamus muticus*
- (d) various plants
- (e) *Arabidopsis*
- (f) maize and *Arabidopsis*

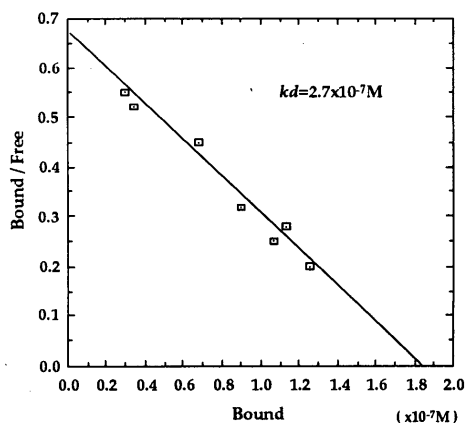


Fig. 2-15 Scatchard plot of the binding data of ³H-NAA to auxin-binding proteins (ABP1).

ろ過法, 平衡透析法, 硫酸沈殿法が用いられているが, トウモロコシABPはリガンドとの解離速度が速いため, 平衡透析法, 硫酸沈殿法が結合活性測定に適しているとされている [18, 134]. 今回はこのうち硫酸沈殿法を用いた.

Fig. 2-15はScatchard解析によりトウモロコシ膜結合型ABP1のNAAに対する解離定数を調べたものである. 解離定数は $2.7 \times 10^{-7} \text{M}$ となり, Hesseら [38] の報告 ($2.3 \times 10^{-7} \text{M}$) やMitoら [81] の報告 ($2.2 \times 10^{-7} \text{M}$) とほぼ一致していた.

Fig. 2-16はトウモロコシ膜結合型ABP1に対する各

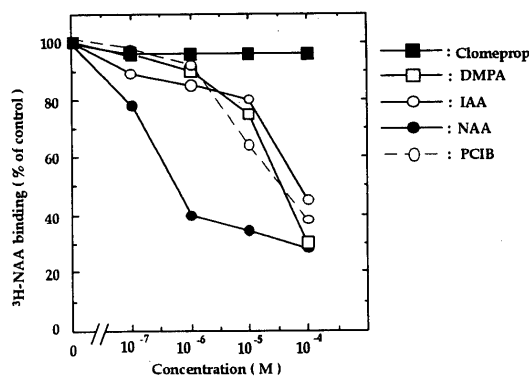


Fig. 2-16 Competition by clomeprop, DMPA, PCIB and auxins for ³H-NAA binding to maize auxin-binding proteins.

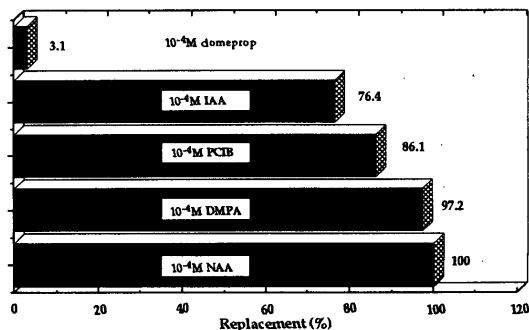


Fig. 2-17 Replacement of ³H-NAA bound to auxin-binding proteins by clomeprop and related compounds.

薬剤の結合活性を, ³H-NAAとABP1との結合阻害により調べたものである. また, Fig. 2-17は各薬剤 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 処理時での³H-NAAとの置換割合を $1 \times 10^{-4} \text{M}$ NAA 処理時における置換を100%として示した. ³H-NAAのABP1への結合は $1 \times 10^{-4} \text{M}$ IAA, PCIB, DMPAによって非常に強く阻害された. 特に $1 \times 10^{-4} \text{M}$ DMPAでは $1 \times 10^{-4} \text{M}$ NAAとほぼ等しい結合阻害を示した. 一方, clomepropは $1 \times 10^{-4} \text{M}$ にまで濃度を上げて, ほとんど結合を阻害しなかった.

2-4 考 察

序論でも述べたように, ダイコン, キュウリを用いた試験で, clomepropの加水分解代謝物であるDMPAは, clomeprop自身よりも生長抑制効果やオーキシン活性が高いことが報告されている [142] が, トウモロコシ, ヤエナリを用いた本章の研究でも同様に, DMPAの方がclomepropよりもオーキシン活性が高く, 生長抑制効果も大きかった. トウモロコシ, ヤエナリの種子に両薬剤を処理すると, DMPAは天然オーキシンであるIAAや合

成オーキシシンであるNAAとほぼ等しい生長抑制を示したのに対し、clomepropはわずかな抑制効果しか持たないことが確認された (Fig. 2-2~Fig. 2-3)。また、代表的なオーキシシン活性試験である、トウモロコシ子葉鞘伸長試験とヤエナリでのスリット試験、そしてエチレン生成促進実験を行った結果、DMPAは高いオーキシシン活性を示したのに対して、clomepropはわずかな活性しか持たなかった (Fig. 2-4~2-7, Fig. 2-10~2-11)。そして、これら4種の薬剤の生長抑制活性とオーキシシン活性との間には正の相関性 ($r=0.79$ (トウモロコシの生長抑制試験と子葉鞘伸長試験), $r=0.80$ (ヤエナリの生長抑制試験とスリット試験)) が認められた。これらの結果から、clomepropやDMPAによる生長抑制作用にはオーキシシン作用が密接に関与していることが示唆された。

Barbier-Brygooら [9] の実験から、トウモロコシ小胞体より精製したABP 1 が原形質膜表面で受容体機能を果たすことが示され、さらにABP 1 は小胞体からゴルジ体を経て原形質膜や細胞壁内に分泌していることが示された [54] ことから、小胞体ABPがオーキシシン原形質膜受容体として機能している可能性が高まっている。しかしながら、現時点ではこのトウモロコシABP 1 がオーキシシン受容体であることの確証は得られていない。しかし、少なくともこの蛋白質はオーキシシン構造を特異的に認識することは明らかであり、しかもオーキシシンの生理発現に関与している結合蛋白質であることも示唆されている。Fig. 2-16で、clomepropは $^3\text{H-NAA}$ とABP 1 との結合を阻害しなかったことから、 $1 \times 10^{-4}\text{M}$ から $1 \times 10^{-6}\text{M}$ の範囲では本研究で用いたトウモロコシABP 1 にオーキシシンとして認識されていないと考えられる。また、DMPA, NAA, IAA, PCIBは $1 \times 10^{-4}\text{M}$ で強い結合阻害を示したことから、このABP 1 は特異的にこれらをオーキシシンとして認識したと考えられる。

Clomepropは植物体内でアリルアシルアミダーゼを介して酸アミド加水分解代謝物である、DMPAに変化することが知られているが、またそれ自身 (clomeprop) も生理活性を持つとされている [64, 65, 110, 114]。しかし本章の研究の結果から、clomepropは植物体内で加水分解されてDMPAとなった後、初めてオーキシシンとして認識され、オーキシシン活性を示している可能性が高いと思われる。また、エチレン生成促進試験で、DMPAは処理直後からエチレンを生成し始めたが、clomepropは処理2時間以降からエチレンを生成し始めた (Fig. 2-6, 2-10)。エチレン生成促進作用は、膜結合型のABPではなく、可溶性のABPへの結合が引き金となっている可能性が高いと考えられている (筑波大学生物科学系教授、酒井慎吾博士、私信)。もし、clomeprop自身が本当にエチ

レン生成促進作用を示すのであれば、脂溶性であるclomepropはDMPAよりも容易に植物細胞内に取り込まれるため、より早く可溶性ABPと結合しやすくなり、DMPAよりも短時間にエチレン生成を促進し始めるものと考えられる。しかしながら、実際には、DMPA処理の方がclomepropよりも短時間にエチレン生成を促進した。このエチレン生成開始までの時間差も、上記の“clomepropは植物体内で加水分解されてDMPAとなった後、初めてオーキシシンとして認識され、オーキシシン活性を示している可能性が高い”という仮説を支持するものである。しかしながら、本研究で行った放射性標識化合物を用いた結合実験だけでは、このABPが本当にオーキシシン受容体であったとしても、薬剤が受容体と結合した後に実際に受容体を活性化しているかを確かめることができないため、今後の課題として、受容体の活性化を確認する必要があると思われる。受容体の活性化を測定する方法としては、1986年に下村らが行った、ABPにオーキシシンが結合した後のコンフォメーション変化を円二色性スペクトルで調べる等の方法がある [104]。

2-5 要 旨

Clomepropは植物体内でアリルアシルアミダーゼにより加水分解されDMPAとなり、より強いオーキシシン活性を示すことが示唆されている。しかしながら、clomeprop自身がオーキシシン活性を示すかについての検討は十分にはなされていない。そこで、clomeprop自身がオーキシシン作用を示すかどうかを調べるために、除草剤活性試験、種々のオーキシシン活性試験、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、加水分解代謝物であるDMPA、オーキシシン活性の指標とした、IAAとNAA、アンチオーキシシンであるPCIBとの比較を行った。

- (1) トウモロコシ、ヤエナリでの生長阻害試験においてclomepropはDMPA, IAA, NAAより低い生長阻害活性を示した。
- (2) 代表的な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においてDMPAはIAAやNAAよりもやや低いが、clomepropよりも高い活性を示した。
- (3) Clomepropは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にオーキシシンとして認識されなかったが、DMPA, IAA, NAA, PCIBは認識された。

以上の結果より、clomeprop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ン結合蛋白質に主にオーキシンとして認識され、オーキシン活性を示している可能性が高い。

第3章 Clomepropによるダイコン芽生えの形態異常へのエチレンの関与

3-1 序 論

除草剤処理により多くの植物からエチレン生成が促進されることが、以前から報告されている [1, 4, 31, 33, 34, 35, 43, 66, 76, 77, 79, 88, 113]. その中でも2,4-D, 2,4,5-T, picloram, dicamba等のいわゆるオーキシン型除草剤は、エチレン生成を顕著に促進する [1, 5, 33, 34, 35, 74, 76, 77, 78, 79]. オーキシン型除草剤が誘導するエチレンについては長年研究が進められ、エチレンが形態異常や生理学的変化を引き起こしているのではないかとする報告も多く出されているが [1, 33, 34, 35, 43, 76, 79], 未だにオーキシン型除草剤の正確な作用点は明らかにされていない。近年になって、HeapとMorrison [36] そしてPeniukら [89] はpicloram, dicamba, 2,4-D, MCPP, MCPAなどのオーキシン型除草剤に対して抵抗性を持つ wild mustard (*Sinapis arvensis* L.)のバイオタイプを見だし、抵抗性と感受性のバイオタイプ間で2,4-D, dicamba, picloramの吸収, 移行, 代謝には大きな差は認められないが、感受性のもは除草剤処理後に抵抗性のもよりも多くのエチレンを生成することを示した。またGrossmann and Kwiatkowski [29] は、2,4-Dやquinclorac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 ($r = 0.92$ (quinclorac), $r = 0.93$ (2,4-D))があることを示している。したがって、今後はさらにオーキシン型除草剤の作用とエチレンとの関係を詳細に調べていく必要があると思われる。

通常、エチレンは果実の成熟、茎葉の老化、種子の発芽等、高等植物の生長と分化の過程を調節するホルモンとして生成されるが、物理的傷害、重金属イオンや化学薬剤による傷害、植物病原菌やウイルスの感染、乾燥や湛水、低温暴露などの様々なストレス、そしてさらに別のホルモンであるオーキシンやサイトカイニンとCa²⁺の同時処理によっても生成が促進されることが知られている [3, 149].

Fig. 3-1は現在推定されている、エチレン生合成経路とメチオニン回路である。高等植物では、エチレンはL-methionine → S-adenosylmethionine (AdoMet) → 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) → ethyleneの経路で生合成される [147]. AdoMet → ACCへの反応はACC synthaseによって触媒され、ACC → エチレ

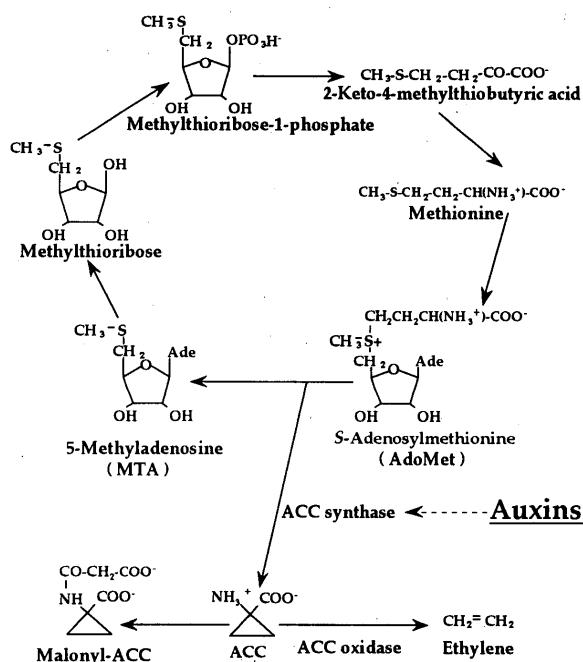


Fig. 3-1 Methionine cycle and ethylene biosynthetic pathway.

(Imaseki, 1989; Shimokawa, 1991; Sato, 1993)

ンへの反応はACC oxidaseによって触媒される。AdoMetからACCへの変換時に、もう一つの生成物として5-methyladenosine (MTA)が生じる。MTAは分解され、中間体を経て再びmethionineに変換される。methionineはATPと反応してAdoMetを再生するため、この回路が作動するとATPの供給が続く限りAdoMetが供給されて高いエチレン生成活性が保たれることになる。植物組織中ではACCはエチレンに代謝されるばかりでなく、N-malonyl-ACC (MACC)にも代謝される。MACCの形成は、エチレン生合成過程から過剰のACCを取り除く働きをしており、エチレン生成の調節に関与していると考えられていて、生成したMACCは生理作用を持たない最終代謝産物であると見なされている [99].

オーキシン作用はACC synthase活性を増大することによってAdoMetからACCの反応を促進し、結果としてエチレン生成量を増加させることが知られており、また、ACCからエチレンへの変換には関与しないことが今関ら [46]の研究から示唆されている。

傷害誘導によるエチレンの生成の場合もオーキシン誘導と同じく、ACC synthaseが律速酵素となっている。1989年にImasekiらによって傷害刺激がACC synthase遺伝子の発現を活性化することが証明された。さらに同年、Imasekiらはオーキシン誘導によるACC synthaseと傷害誘導によるACC synthaseとは酵素化学的性質からほとんど区別できないが、一種のポリクローナル抗体に

対して異なった反応性を示すことや両型の酵素はクロマトグラフ的にも分離できることから、両蛋白質の一次構造が異なる、つまり異なった遺伝子産物であることを明らかにした。現在では、ACC synthaseの遺伝子がマルチジーンファミリーを構成していることが明らかとなっていて、刺激の種類により発現誘導される遺伝子が異なることが示されている [20, 47, 67, 68, 84, 95, 154]。

上述のように、2,4-Dやdicamba, picloramなどの代表的なオーキシシン型除草剤による形態異常はエチレンによって引き起こされることが示されているが、clomepropによる形態異常にエチレンが関与しているかどうかは明らかではない。そこで本章では、clomepropによる形態異常とエチレンとの関与を明らかにし、さらにclomeprop処理から形態異常発現までのメカニズムを解明することを目的とした。

3-2 材料および方法

植物材料：ダイコン (*Raphanus sativus* L. var. *hortensis* cv. Shogoin) 種子を精製水で湿らせたパーミキュライト上に播種し、グロースチャンバー (25°C/20°C, 昼間 (12hr)/夜間) 内で7日間生育させた。

<1> 形態異常とエチレンの関連

ダイコン茎葉部を1% (v/v) Tween 20溶液中に10秒間浸漬した後、緩衝液 (5mM potassium phosphate, pH5.5) で 1×10^{-4} M に調整したclomeprop, DMPA溶液 (1%DMSO, 0.1% Tween 20を含む) に1時間浸漬処理した。茎葉部を精製水で洗った後、植物体を1強度の修正春日井水耕液の入ったプラスチックポットに移してグロースチャンバー内で生育させ、形態変化の観察と葉柄間角度の測定を行った。そして、エチレン生成抑制剤 (AOA) の前処理とエチレン作用阻害剤 (NBD) の後処理との比較を行った。また対照区では、上記の緩衝液 (1%DMSO, 0.1% Tween 20を含む) 中で浸漬処理し、他はすべて薬剤処理区と同一条件下で生育させたものを測定に用いた。

[エチレン生成抑制剤 (AOA) の前処理]

茎葉部を1% (v/v) Tween 20に10秒間浸漬した後、1mM AOA溶液に1時間浸漬処理した。その後さらに、緩衝液 (対照区)、または 1×10^{-4} M clomeprop, DMPA溶液に1時間浸漬した。

[エチレン作用阻害剤 (NBD) の後処理]

茎葉部を1% (v/v) Tween 20に10秒間浸漬した後、緩衝液 (対照区)、または 1×10^{-4} M clomeprop, DMPA溶液に1時間浸漬処理した。茎葉部を精製水で洗った後、3本ずつ、水耕液100mlの入っているビーカーに移した。それを2つずつ1000mlビーカーに移してからパラフィル

ムで密封した後、パラフィルムを通してシリンジで0.1mlのNBD (液体) をビーカーの壁面に沿って注入した。注入したNBDは速やかに揮発した。

<2> エチレン放出量

上記のように薬剤処理したダイコンを水耕液50mlの入った、100mlトールビーカーに移した。そのビーカーをパラフィルムで密封し、グロースチャンバー内で生育させ、1mlシリンジを用いて所定時間毎にビーカー内の気層から1mlのガスを採取した。エチレン含量はガスクロマトグラフにより測定した。

[エチレン生成促進剤 (ETH) の効果]

1mM ethephon (ETH) をダイコン茎葉部にスプレーし、5本ずつ、水耕液50mlの入った100mlトールビーカーに移した。そのビーカーをパラフィルムで密封後、グロースチャンバー内で生育させ、所定時間毎にビーカー内のエチレン含量をガスクロマトグラフにより測定した。

<3> ACC synthase活性

ACC synthase活性の測定はTsaiら [128] の方法で測定した。薬剤処理したダイコン子葉から、直径10mmのコルクボーラーを用いてリーフディスクを14枚打ち抜いた。それを1mlの抽出緩衝液 (100mM potassium phosphate, pH8.0, 4mM DTT, 0.4 μ M PLP, 1mM EDTA) とともに磨砕し、磨砕液を20,000 \times gで20分間遠心分離した。上清を緩衝液 (20mM potassium phosphate, pH8.0, 3 μ M pyridoxal-5'-phosphate (PLP), 0.4mM DTT) であらかじめ平衡化しておいたSephadex G-25カラムで脱塩し、溶出液を1.5ml集めた。この溶出酵素液のうち400 μ lをACC synthaseの活性測定に用いた。

酵素反応で生じたACCを化学的に酸化分解し、生じたエチレンをLizadaとYang [69] の変法で定量することにより、ACC synthaseの活性を測定した。400 μ lの溶出酵素液を5mlバイアル瓶に移し、30°Cで5分間保温したのち、基質液 (500 μ M SAM) 100 μ lと緩衝液 (100mM phosphate buffer, pH8.0, 4mM PLP) 500 μ lを加えて反応を開始した。1時間後、10mM HgCl₂を300 μ l加えて反応を止めた。そのバイアル瓶をパラフィルムで密封し、水冷下でNaOCl液 (5% NaOClと飽和NaOHを2:1 (v/v) で混合したもの) を0.2mlシリンジで注入し、10秒間よく攪拌してから30°Cで10分間保温した。バイアル中の気層1mlをシリンジで採取し、ガスクロマトグラフでエチレン含量を定量した。

<4> ACC oxidase活性

ACC oxidase活性測定はHallら [35] の方法で行った。薬剤処理したダイコンからコルクボーラー (直径5mm) を用いてリーフディスクを50枚打ち抜き、1mM

AOA 1mlが入っている20mlバイアル瓶に移した。バイアル瓶をシリコン栓で密閉し、暗所で4時間、30°Cで保温した。ガスクロマトグラフを用いて、バイアル中のエチレン増加量がゼロになったのを確認してから、バイアル瓶に栓をしたまま、シリンジで1mM ACCを0.5ml注入した。そのバイアル瓶を一定時間、30°Cで保温したのち、バイアル内のエチレン含量を測定した。

〈5〉 DMPAによるオーキシン誘導蛋白質遺伝子の発現

① Total RNAの調製

ダイコン茎葉部を 5×10^{-5} M DMPAに90分間浸漬処理したのち、水耕液の入ったプラスチックポットに移して、グロースチャンバー内で12時間生育させた。このダイコンの茎葉部をサンプリングし、RNA抽出直前まで -80°C で保存した。乳鉢に液体 N_2 を加えてから茎葉部5.0gを磨砕し、12mlのSSフェノール（水飽和フェノール、pH8.0, 0.1%8-quinolinol, 0.2%メルカプトエタノール）を加え、よく攪拌した後、 65°C で1~2分間保温した。さらにクロロホルムを9ml加え、攪拌した後、再び 65°C で1~2分間保温した。滅菌水13.5ml, 2M酢酸ナトリウム(NaOAc) (pH5.2)を1.5ml, 10%SDS 3mlをさらに加え、激しく混ぜた後、3,500rpmで30分間遠心分離して上層を採取した。等量のクロロホルムを加え、よく攪拌した後、3,500rpmで30分間遠心分離して得た上層を、さらに等量のクロロホルムとともによく攪拌し、再び3,500rpmで15分間遠心分離した。上層を採取し、LiClを2Mとなるように加え、ゆっくりと10回上下させた後、 4°C で一晩放置してRNAを沈殿させた。生じた沈殿を5,000rpmで40分間遠心分離してRNAを集めた。この沈殿に冷70%エタノールを2ml加えて洗ってから上清を取り除き、再び冷70%エタノールを加え、洗浄した後、上清を除いた。10分間、減圧乾燥させてから、滅菌水300 μl に溶かした。これに3M NaOAc (pH5.2)を30 μl 加え、さらに100%エタノールを750 μl 加えてからゆっくり攪拌させ、10分間、室温で放置した。生じた沈殿を15,000rpmで10分間遠心分離することで集め、沈殿に冷70%エタノールを1ml加えて洗浄した。上清を捨ててから再び冷70%エタノールを1ml加えて洗浄した後、さらに上清を取り除いた。そして10分間、減圧乾燥させてから、滅菌水に溶かし、濃度を測定した。

② Poly (A)⁺ RNAの調製

Total RNA 200 μl を 65°C で10分間熱処理し、結合緩衝液 (10mM Tris-HCl pH7.5, 5mM EDTA, 0.5 M NaCl) 780 μl と5M NaCl 20 μl を加えて攪拌した。これをあらかじめ結合緩衝液で平衡化しておいたOligo (dT) celluloseカラムにかけ、溶出液を再度、同じカラムにかけた。次に洗浄緩衝液 (10mM Tris-HCl pH7.5, 5mM

EDTA, 0.15M NaCl) をカラムの最上部まで加え、全て流出後再度、洗浄緩衝液を流した。次に溶出緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH7.5, 5mM EDTA) を10ml流してカラムに結合したPoly (A)⁺ RNAを溶出させ、Ethidium Bromide (EtBr)で染色する画分を集めた。この画分に1/10容の3M NaOAcおよび1.5倍量のイソプロパノールを加えてよく攪拌し、 -80°C で15分間放置した。生じたPoly (A)⁺ RNAの沈殿を15,000rpmで5分間遠心分離して集め、滅菌水50 μl に溶かした。濃度は分光光度計 (BECKMAN, DU 640) を用いて230nm, 260nm, 280 nmの吸光度を測定することにより求めた。

③ RNAの電気泳動

Poly (A)⁺RNAに1/10容の3M NaOAcと1.5倍量のイソプロパノールを加えてよく攪拌した後、 -80°C で15分間放置した。生じたPoly (A)⁺RNAの沈殿を15000rpmで15分間遠心分離して集め、滅菌水5 μl , RNA試料緩衝液16 μl を加えてよく混ぜてから 65°C で10分間保温したのち、アガロース電気泳動を行った。アガロースは、1.23%のものを使用した。

④ ノーザンプロット

③で電気泳動したゲルをプロットング台にのせ、ナイロン膜フィルター (Hybond N⁺, Amersham社)、濾紙 (3MM Chr, Whatman)、ペーパータオル、ガラス板、1kgの重しの順にのせて12時間放置することにより、ゲル中のRNAを $\times 20$ SSC (3M NaCl, 0.3Mクエン酸ナトリウム, pH7.0)でナイロン膜フィルターに転移させた。転移したナイロン膜フィルター上のRNAは紫外線照射によって固定させた。

⑤ ノーザンハイブリダイゼーション

ナイロン膜フィルターをハイブリダイゼーション溶液 (25% (v/v) ホルムアミド, $\times 6$ SSC, $\times 5$ Denhardt's solution^{*}, 0.1mg/ml変性サケ精子DNA, 0.5% (w/v) SDS) の入ったハイブリバックに移し、 37°C で4時間以上保温してプレハイブリダイゼーションを行った。プローブとして、オーキシンによって10分以内で発現誘導されることが明らかにされているRs-SAUR遺伝子 (筑波大学 応用生物化学系 穴井豊昭博士から恵与された) のcDNA部分をBca BESTTM Labeling Kit (Takara)を用いて α - ^{32}P -dCTPで標識したものを使用した。ハイブリダイゼーションは上記のハイブリダイゼーション溶液にプローブを加えて 37°C で一晩行った。ハイブリダイゼーション後のナイロン膜フィルターは $\times 1$ SSC/0.1%SDS中、 55°C で5分間、3回洗浄後、 $\times 0.2$ SSC/0.1%SDS中、 65°C で1時間洗浄した。洗浄後のナイロン膜フィルターは、イメージングプレート (富士写真フィルム) 上にのせ、カセットに挟んで室温で一晩保存し、

BAS 2000 (富士写真フィルム) で放射活性を測定した。

※1 ×5 Denhardt's solution: フィコール, ポリビニルピロリドン, BSAを各0.1% (w/v)

3-3 結果と考察

〈1〉 形態異常とエチレンの関連

Clomeprop, DMPA茎葉処理後にカーリング, 第1葉の伸長阻害, 葉柄間角度の増大が起こるが, それは発生したエチレンによって起こる現象なのかどうかを調べるため, エチレン生成抑制剤であるAOAの前処理を行った。

エチレン生合成の律速酵素であるACC synthaseは補

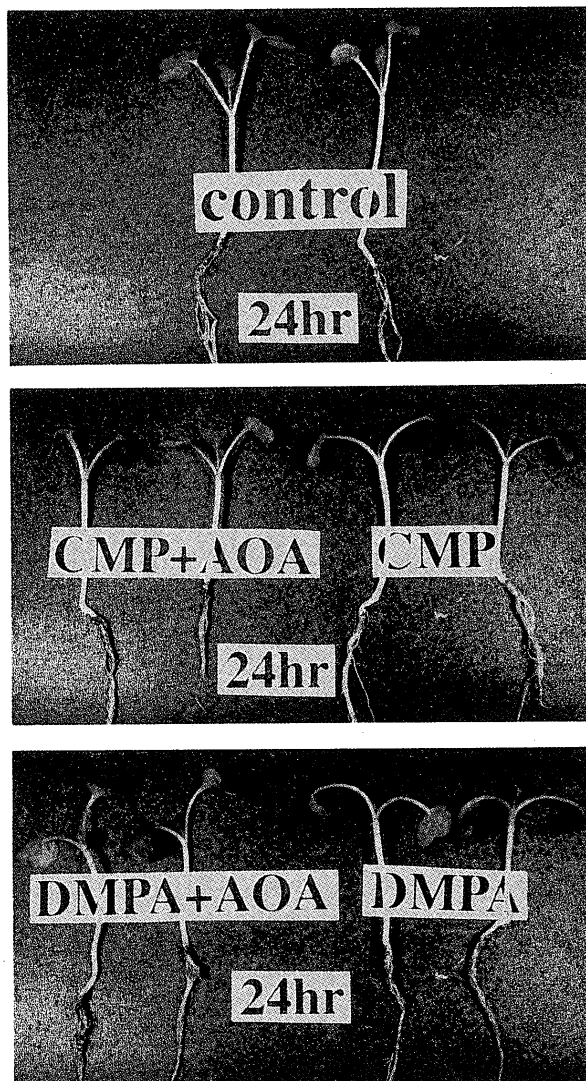


Fig. 3-2 Effect of pretreated AOA on morphological changes in radish seedlings at 24 hr after shoot application of 1×10^{-4} M clomeprop (CMP) or DMPA.

Radish shoots were pretreated with (1 mM) AOA and then treated with 1×10^{-4} M clomeprop or DMPA.

酵素としてピリドキサルリン酸 (PLP) を必要とするが, AOAはこのピリドキサルリン酸-ACC synthase複合体の形成を阻害することによりSAMからACCへの変換を阻害し, その結果としてエチレンの生成を抑えることが知られている [7, 25, 35, 46, 100, 150]. Fig. 3-2は薬剤処理後の形態変化の様子を写真撮影したものである。また, Table 3-1はその形態異常の程度を葉柄間角度を測定することにより数値化したものである。無処理のダイコン子葉では処理48時間後に約60°であったのに対し, 10^{-4} M clomeprop処理では120.5°, DMPA処理では152.7°にまで増大した。第1葉でも同様に, clomeprop処理では無処理の約4倍, DMPA処理では約5倍にまで増大した。これらの葉柄間角度の増大はAOAを前処理することにより, 完全ではないが抑えられる傾向にあった。

また, この葉柄間角度の増大に対するエチレン作用阻害剤 (NBD) の影響を調べた。NBDはエチレン受容体に結合することで, エチレンのエチレン受容体への結合を拮抗的に阻害する剤である [13, 72, 100, 111, 112, 132, 133, 145]。 10^{-4} M clomeprop, DMPA処理後にNBDを後処理すると, これらの薬剤による葉柄間角度の増大はほぼ完全に抑えられた (Fig. 3-3)。これらの結果は, 薬剤処理によって発生したエチレンが葉柄間角度の増大を引き起こしている可能性が高いことを示唆している。

〈2〉 エチレン放出量

Clomeprop, DMPA処理により, 実際にどれだけのエチレンが生成しているのかを調べた。無処理の植物体からは測定時間中, ほとんどエチレンが生成せず, また clomeprop処理でも, 処理12時間まではエチレン量の増

Table 3-1 Effect of pretreated AOA on clomeprop- or DMPA-induced leaf angle change in radish seedlings.

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

The test compounds: Radish shoots were treated with 1×10^{-4} M clomeprop or DMPA.

The test compounds+AOA: Radish shoots were pretreated with 1 mM AOA and then treated with 1×10^{-4} M clomeprop or DMPA. Data represent means ± SE.

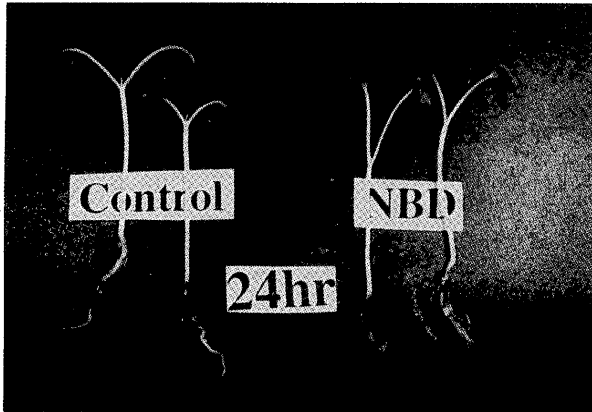


Fig. 3-3 Effect of NBD on morphological change in radish seedlings at 24 hr after shoot application of 1×10^{-4} M DMPA.

Plants were treated with 1×10^{-4} M DMPA and then transferred into 1000 ml beakers containing 0.1 ml liquid NBD or no NBD (control).

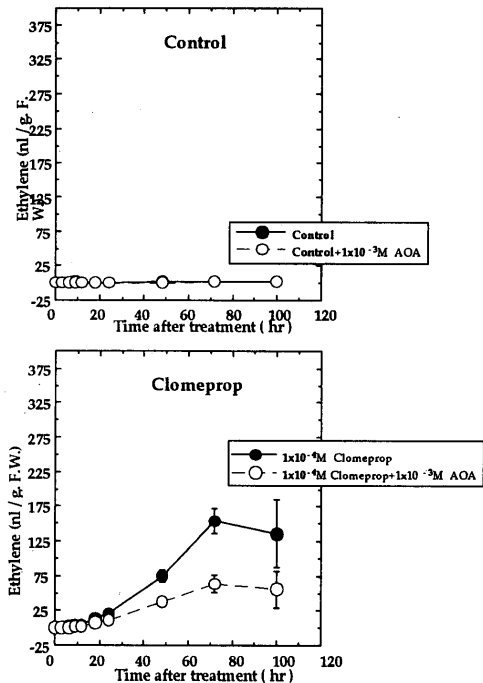


Fig. 3-4 Effect of pretreated AOA on clomeprop-induced ethylene accumulation in radish seedlings.

Radish shoots were pretreated with (1 mM) AOA and then treated with 1×10^{-4} M clomeprop. Data represent means \pm SE.

加はほとんどみられなかったが、12時間以降は徐々に増加し始め、72時間後に最大となりその後減少した (Fig. 3-4)。最大時でのエチレン量は約150nl/g F.W.であった。それに対し、DMPA (10^{-4} M) 処理では処理直後からエチレン生成量が増加し始め、処理後100時間では、約300nl/g F.W.にまで達した (Fig. 3-5)。DMPAと clome-

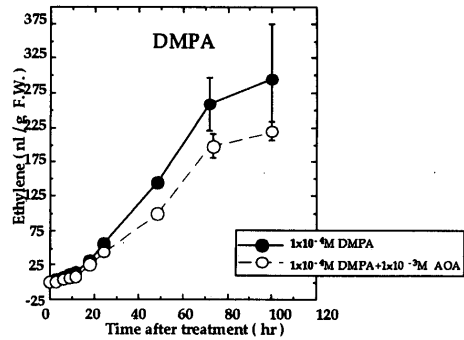


Fig. 3-5 Effect of pretreated AOA on DMPA-induced ethylene accumulation in radish seedlings.

Radish shoots were pretreated with (1 mM) AOA and then treated with 1×10^{-4} M DMPA. Data represent means \pm SE.

propとのエチレン生成開始時間のずれは、clomepropがDMPAに加水分解した後に活性化するという、著者らの仮説を支持するものであると思われる。そして、各薬剤を処理する前にAOAを処理すると、エチレン生成量が減少することが確認された。このことから、clomepropやDMPA処理により生成したエチレンが形態異常に関与している可能性が一層高まったと言える。

Fig. 3-6はダイコン幼植物にエチレン生成促進剤であるETHのみを処理し、48時間後に起こる形態変化を写真撮影したものである。ETHは主にそれ自身の分解 (増田, 1992) とACC oxidase活性の増大 [44] によってエチレン生成を促進するものと考えられている。ETHを処理したダイコンは第一葉の伸長が著しく抑制されていた。同時にエチレン生成量の測定も行ったが、この時点での無処理とETH処理のエチレン量は各々、3.19, 33.72nl/g F.W.であった (データには示していない)。これは、DMPA処理15時間後のエチレン量に相当する値であるが、この結果はごく少量のエチレンでさえも第1葉の伸長阻害を引き起こすことを示している。また、このETH処理では、葉のカーリングなどの形態異常は見られなかったことから、それらの形態異常はETH処理で生成されるエチレンよりも多量のエチレンで引き起こされるものと推察された。また、エチレン受容体は小胞体やプロテインポディーの膜系に埋め込まれている可能性が示唆されている [49]。上述のようにETHは主にETH自身の分解によってエチレンを発生させることから (主に外生エチレン)、DMPA処理によって生成される内生エチレンとは異なり、エチレン受容体に結合しにくいことも考えられる。したがって、それがカーリング等の形態異常が見られない原因になっているのかもしれない。しかし、本研究では1mM ETH処理での効果しか検討し

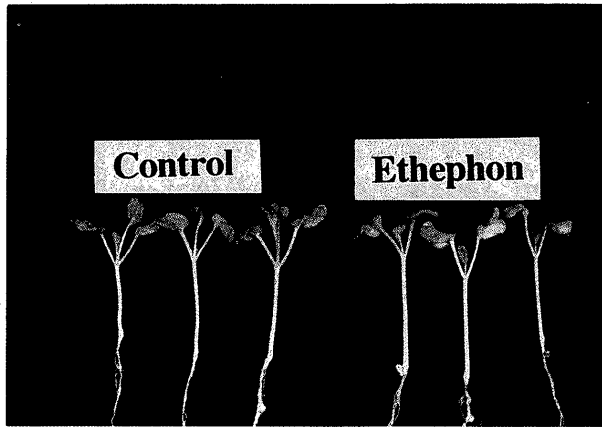


Fig. 3-6 Morphological changes in radish seedlings after 48 hr of treatment with Ethephon (1 mM).

ておらず、さらにETHの処理濃度を上げるとカーリング等の形態異常が現れる可能性も考えられる。したがって、今後は実験条件等を変えて形態変化を確認する必要があるだろう。

また、DMPA処理後のエチレンが形態異常や殺草活性の原因物質になっているならば、ETHのようなエチレン発生剤を処理すればDMPAと同様の効果を生むのではないか、という疑問も生じてくる。しかし、上述のようにエチレンの作用は非常に低濃度で現れるものの、外来的にエチレンを発生させるような薬剤では、植物体に害を及ぼすようなエチレン量を発生させるためには、非常に高濃度の薬剤を必要とする。それに対しclomeprop処理では、より低薬量で多量のエチレンが発生する。これはDMPAがエチレン生成系に直接的に作用し、内生的にエチレンが生成されるためであると考えられる。さらに、clomepropは、他のエチレン発生剤と異なり、イネ感受性広葉雑草間に選択性を持つという点で、除草剤として使用することができる。Clomepropは、イネにおいて活性本体であると考えられているDMPAから殺草活性の無い化合物へ速やかに代謝され、感受性広葉植物では、その解毒代謝速度が遅いことが示されている [141]。つまり、clomepropからDMPAへの代謝と、DMPAから解毒代謝産物への変換速度に植物種間差があり、その結果としてDMPAの体内濃度に差異が引き起こされることで、選択性が発現される。したがって、clomepropは単なるエチレン発生剤として作用するだけでなく、“選択性を持つ”という、除草剤としての重要な要素を兼ね備えた薬剤であるということができる。

〈3〉 ACC synthase活性

オーキシシン類はSAMからACCへの反応を触媒する酵

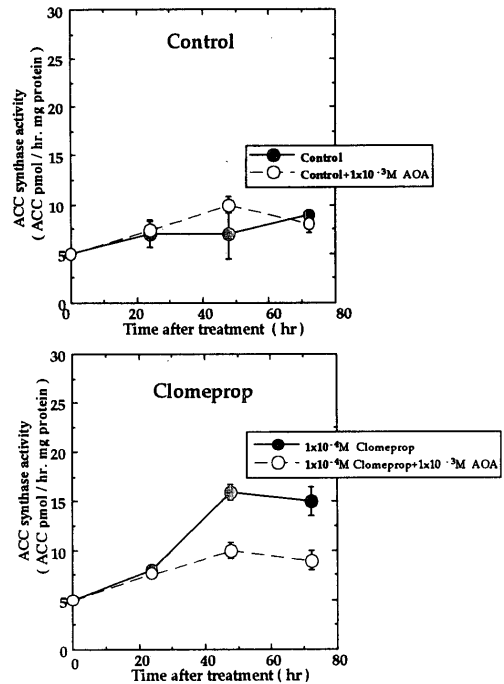


Fig. 3-7 Effect of pretreated AOA on clomeprop-induced ACC synthase activity in radish leaves.

Radish shoots were pretreated with (1 mM) AOA and then treated with 1×10^{-4} M clomeprop. ACC synthase activity is shown as pmol ACC produced per milligram of protein per hour. Data represent means \pm SE.

素 (ACC synthase) 活性を増大させることにより、エチレンの生成を促進させることが知られている [1, 33, 76, 126, 147]。ここでは、clomepropやDMPAによるエチレン生合成の増大もACC synthase活性の増大に起因するものなのかを調べるため、実際に酵素活性の測定を行った。無処理のダイコンでも徐々に活性が増大し続け、72時間後には約10pmol ACC/hr·mg proteinの活性を示した (Fig. 3-7)。 10^{-4} M clomeprop処理では、茎葉処理24時間までは無処理と同程度の増加であったが、24時間後からは急激な増加がみられ、48時間後に最大となりその後はわずかに減少した。また、clomeprop処理前にAOAを処理すると、24時間以降の急激な増大は抑制された。 10^{-4} M DMPA処理では、処理直後から急激な増大が見られ、24時間後に最大となったが72時間後まで高い活性を維持していた (Fig. 3-8)。また、DMPA処理前にAOAを処理するとACC synthase活性の増大はかなり抑制されており、本実験条件で実際にACC synthaseの阻害剤として作用していることが確認された。

また、オーキシシン類はACC synthaseの遺伝子の特異的に発現することが報告されている [154] ことから、DMPAはACC synthaseの遺伝子の特異的に発現誘導す

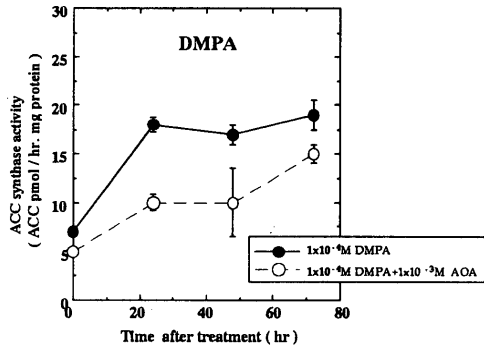


Fig. 3-8 Effect of pretreated AOA on DMPA-induced ACC synthase activity in radish leaves.

Radish shoots were pretreated with (1mM) AOA and then treated with 1×10^{-4} M DMPA. ACC synthase activity is shown as pmol ACC produced per milligram of protein per hour. Data represent means \pm SE.

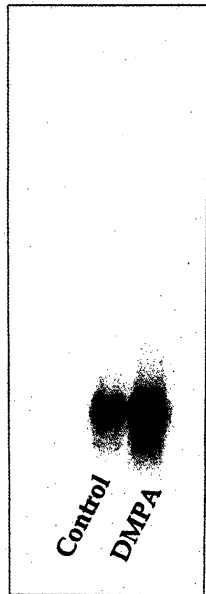


Fig. 3-9 Northern blot of poly (A)⁺ RNA isolated from control and 5×10^{-5} M DMPA-treated radish.

Lanes were loaded with 2 μ g of poly (A)⁺ RNA. Final washes were carried out 0.2 \times SSC, 0.1% SDS at 65 $^{\circ}$ C

ることにより、ACC synthase活性を増大させている可能性が高いと思われる。

そこで、実際にDMPAはダイコン中でオーキシシンとして作用しているのかどうかを分子レベルで確認することにした。オーキシシンによって10分以内で発現誘導されることが明らかにされているRs-SAUR遺伝子をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、そのmRNAレベルを約4倍程度増加させていることが明らかとなった(Fig. 3-9)。つまり、DMPAはダイコン

Table 3-2 ACC oxidase activity in clomeprop- or DMPA-treated radish leaves.

Treatment	Time (hr)	Ethylene (nl / 50 leaf discs)		
		Time after ACC addition (hr)		
		0hr	1hr	3hr
Control	24	0.36 \pm 0.03	2.63 \pm 0.09 (+2.27)	6.52 \pm 0.05 (+6.16)
1x10 ⁻⁴ M Clomeprop	24	0.47 \pm 0.04	1.93 \pm 0.48 (+1.46)	6.57 \pm 0.86 (+6.10)
1x10 ⁻⁴ M DMPA	24	1.00 \pm 0.13	2.43 \pm 0.09 (+1.43)	4.56 \pm 0.16 (+3.56)
Control	48	0.42 \pm 0.09	1.90 \pm 0.05 (+1.48)	6.40 \pm 0.68 (+5.98)
1x10 ⁻⁴ M Clomeprop	48	0.50 \pm 0.13	1.93 \pm 0.22 (+1.43)	4.33 \pm 0.26 (+3.83)
1x10 ⁻⁴ M DMPA	48	0.90 \pm 0.30	2.52 \pm 0.14 (+1.62)	5.06 \pm 1.03 (+4.16)

The numbers in brackets indicate the amount of ethylene increased after 0 hr. Data represent means \pm SE.

中でオーキシシンとして作用していることが分子レベルでも確認された。

<4> ACC oxidase活性

エチレン生成は、ACCからエチレンへの反応を触媒する酵素 (ACC oxidase) によっても調整されることが知られている [55]。果熟や老化過程にACC oxidase活性が増大すること [138] や酸性雨やSO₂によりACCレベルが増加すると共に、ACC oxidaseが促進され、その結果エチレンが増加すること [57]、さらにはオゾンによるエチレン生成の促進にもACC oxidase活性の増大が密接に関係していることが報告されている [63, 94]。

そこで、次にclomepropやDMPAによって発生するエチレンは、ACC synthase活性の増大だけでなく、ACC oxidase活性の増大も関与しているのかについて調べた。ACC oxidase活性はACCが所定時間後にどれだけエチレンに変換されるのかを測定することにより求めた。処理24時間後の葉を使用した時、無処理ではACC添加1時間後に2.27nl/50 leaf discsのエチレンが発生した (Table 3-2)。10⁻⁴Mでのclomeprop, DMPA処理では、各々1.46, 1.43nl/50 leaf discsの増大となり、ACCからエチレンへの反応増大は起こらず、むしろ減少した。処理48時間後の葉を使用しても同様の結果で、エチレン発生量の増大は起こらなかった。つまり、clomepropやDMPA処理によってACC oxidase活性は増大していない可能性が高い。一般的にエチレン生成系へのオーキシシン作用はACC合成を誘導することにより、ACCからエチレンへの変換には関係ないとされている [46]が、オーキシシン (NAA) 処理によりACC oxidase mRNAの増大が確認された [85] という報告もあることから、今後の課題として、ACC oxidaseのcDNAを単離し、この酵素の遺伝子がDMPAにより特異的に誘導されるかどうかを検討する必要があると思われる。

3-4 要 旨

Clomepropを処理すると、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。本章では、それらの形態異常にエチレンが関与しているかどうかの検討をダイコン幼植物を供試植物として行った。

- (1) ClomepropまたはDMPA処理後に現れる、葉のカーリングや葉柄間角度の増大はエチレン生成阻害剤 (AOA) を前処理することにより軽減した。
- (2) ClomepropまたはDMPA処理後の上記の作用は、エチレン作用阻害剤 (NBD) を後処理することによりほぼ完全に抑えられた。
- (3) エチレン生成促進剤 (ETH) 処理により、第1葉の著しい伸長阻害が起こった。
- (4) エチレン生成量は、clomepropの場合、茎葉処理12時間後までは殆ど生成されずcontrolと同程度であったが、24時間後からはエチレン量の増加が見られた。DMPAの場合は茎葉処理3時間後から徐々に増加し始め、12時間後から生成速度が増加した。
- (5) Clomeprop, DMPA処理により、ACC synthase活性が増加し、AOAの前処理によりその増加が抑制されることが確認された。
- (6) Clomeprop, DMPA処理では、ACCからエチレンへの反応を触媒する酵素 (ACC oxidase) 活性の増大は起こらなかった。
- (7) ノーザンハイブリダイゼーションの結果、ダイコン幼植物においてDMPAはオーキシシン誘導型の *Rs-SAUR* 遺伝子を発現していた。つまり、ダイコン幼植物体中でオーキシシンとして作用していることが確認された。

以上の結果より、clomepropは植物体内でDMPAへと変化し、DMPAがACC synthaseの遺伝子発現を誘導させることによりACC synthase活性を増大させ、結果としてエチレン生成量の増加を引き起こしている可能性が高い。そして、この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。

第4章 Clomepropを根部処理した後のダイコン芽生えでのホルモン作用の発現機構

4-1 序 論

Clomeprop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 [110, 118, 140, 141]。Wongwattana and Ishizuka [140, 141] は、clomepropは茎葉処理の場合、高い生育抑制作用を示すが、根部処理を行うとその

効果が減少し、DMPAでは逆に根部処理でより高い効果を示すことを報告している。そして彼らは、茎葉部におけるDMPA濃度の差が植物体への影響力に差をもたらしていると推定している。また、白倉ら [110] はclomepropで茎葉部処理において根部処理より影響が強いのは、茎葉部での吸収力が大きく、根部への移行が少ないため、一方、DMPAで逆の結果なのは、根部での吸収が大きく、茎葉部への移行が多いためであるとし、茎葉部におけるclomepropまたはDMPAの濃度が植物体への影響力と強く関連していると推測している。また、Suwunnamekら [118] もラファヌステストを行うことにより形態異常の程度を測定し、clomepropとDMPAでの処理部位の差は、上記のWongwattana and Ishizuka [140, 141] の報告と同様な形態異常の程度差異を引き起こすことを示しており、その生理活性の発現度はclomeprop自体ではなくDMPAの茎葉中存在量と関連していることを報告している。

そこで、本章では、まず初めにclomeprop, DMPA根部処理後の形態異常におけるエチレンの役割について明らかにし、さらに第3章での茎葉処理の結果と比較することにより、両剤処理後の形態異常の差異へのエチレン生合成系の係わりについて知見を得ることを目的とした。

4-2 材料および方法

植物材料：ダイコン (*Raphanus sativus* L. var. *hortensis* cv. Shogoin) 種子を精製水で湿らせたバーミキュライト上に播種し、グロースチャンパー (25°C/20°C, 昼間 (12hr)/夜間) 内で7日間生育させた。

<1> 形態異常におけるエチレンの役割

ダイコン根部を緩衝液 (5mM potassium phosphate, pH5.5) で 1×10^{-4} M に調製したclomeprop, DMPA溶液 (1%DMSO, 0.1% Tween 20を含む) に12時間浸漬した後、根部を精製水で洗い、植物体を水耕液の入ったプラスチックポットに移してグロースチャンパー内で生育させ、形態変化の観察と葉柄間角度の測定を行った。そして、エチレン生成抑制剤 (AOA) の前処理とエチレン作用阻害剤 (NBD) の後処理の結果との比較を行った。また対照区では、上記の緩衝液 (1%DMSO, 0.1% Tween 20を含む) を用いて浸漬処理し、他はすべて薬剤処理区と同一条件下で生育させたものを測定に用いた。

[AOAの前処理]

ダイコン茎葉部を1% (v/v) Tween 20溶液に10秒間浸漬した後、1mM AOA溶液中に1時間浸漬処理した。その後、根部を緩衝液 (対照区)、または 1×10^{-4} M clomeprop, DMPA溶液に12時間浸漬した。

[NBDの後処理]

ダイコン根部を 1×10^{-4} M clomeprop, DMPA溶液に12時間浸漬処理した後、精製水で洗い、水耕液の入ったプラスチックポットに移した。それを1000mlビーカーに移し、パラフィルムで密封した後、シリンジで0.1ml NBD (液体) を注入した。

〈2〉 エチレン放出量

上記のように薬剤を根部処理した後、ダイコン幼植物を水耕液50mlの入ったトールビーカーに移し、パラフィルムで密封した。それぞれのビーカーからシリンジで気層1mlを採取し、ビーカー内のエチレン含量をガスクロマトグラフにより測定した。

〈3〉 ACC synthase活性

薬剤を根部処理した後、3章に記載した実験方法でACC synthase活性の測定を行った。薬剤処理したダイコンから直径10mmのリーフディスクを14枚打ち抜き、それを抽出緩衝液 (100mM potassium phosphate, pH8.0, 4mM DTT, 0.4 μ M PLP, 1mM EDTA) とともに磨砕し、磨砕液を20,000 \times gで20分間遠心分離した。上清をSephadex G-25カラムで脱塩し、溶出酵素液をACC synthaseの活性測定に用いた。溶出酵素液をバイアル瓶に移し、酵素液 (500 μ M SAM) を加えて反応を開始した。1時間後、10mM HgCl₂を加えて反応を止めた。そのバイアル瓶をパラフィルムで密封し、氷冷下でNaOCl液 (5% NaOClと飽和NaOHを2:1 (v/v) で混合したもの) をシリンジで注入し、よく攪拌してから30°Cで10分間保温した。バイアル中の気層1mlをシリンジで採取し、エチレン含量をガスクロマトグラフで定量した。

〈4〉 ACC oxidase活性

薬剤を根部処理した後、ACC oxidase活性の測定を3章に記載した実験方法で行った。薬剤処理したダイコンから直径5mmのリーフディスクを50枚作成し、1mM AOAが入っているバイアル瓶に移した。バイアル瓶をシリコン栓で密閉し、暗所で4時間、30°Cで保温した。エチレン増加量がゼロになったのを確認してから、シリンジで1mM ACCを注入した。そのバイアル瓶を一定時間、30°Cで保温したのち、バイアル内のエチレン含量をガスクロマトグラフで測定した。

4-3 結果

〈1〉 形態異常におけるエチレンの役割

Clomeprop, DMPAを根部処理した後に引き起こされる、ダイコン葉柄間角度の増大をエチレン生成抑制剤 (AOA) を前処理した結果と比較した。無処理のダイコンの葉柄間角度は、処理後24, 48時間とも約60°であった (Table 4-1)。 10^{-4} Mのclomepropを処理した場合の葉柄間角度は処理後24時間で69.5°、48時間で72.5°となり、

Table 4-1 Effect of AOA on leaf angle of radish seedlings following root application of clomeprop or DMPA.

Treatment	Time after treatment (hr)	Leaf angle (°)	
		Cotyledon	
Control	24	58.1	± 6.3
Control+AOA	24	59.3	± 4.1
Clomeprop	24	69.5	± 6.9
Clomeprop+AOA	24	61.8	± 7.7
DMPA	24	151.7	± 6.5
DMPA+AOA	24	135.6	± 6.4
Control	48	60.6	± 5.5
Control+AOA	48	63.8	± 4.1
Clomeprop	48	72.5	± 3.7
Clomeprop+AOA	48	67.3	± 8.8
DMPA	48	180.5	± 4.5
DMPA+AOA	48	175.5	± 3.6

The test compounds: Radish shoots were treated with 1×10^{-4} M clomeprop or DMPA. The test compounds+AOA: Radish shoots were pretreated with 1 mM AOA and then treated with 1×10^{-4} M clomeprop or DMPA. Data represent means \pm SE.

Table 4-2 Effect of NBD on leaf angle of radish seedlings following root application of clomeprop or DMPA.

Treatment	Time after treatment (hr)	Leaf angle (°)	
		Cotyledon	
1x10 ⁻⁴ M DMPA	24	155.2	± 6.9
1x10 ⁻⁴ M DMPA+NBD	24	59.4	± 7.5
1x10 ⁻⁴ M DMPA	48	186.0	± 9.9
1x10 ⁻⁴ M DMPA+NBD	48	62.5	± 3.7

Plants were treated with 1×10^{-4} M DMPA and then transferred to 1000 ml beakers containing 0.1 ml liquid NBD (DMPA+NBD) or no NBD (DMPA only). Data represent means \pm SE.

わずかな増大が確認された。しかし、clomeprop処理前にAOAを処理すると、処理後24時間で61.8°、48時間で67.3°となりその増大がわずかではあるが、抑制される傾向が見られた。 10^{-4} MのDMPAを根部処理すると、処理後24時間で151.7°、48時間で180.5°となり、無処理のダイコンと比較すると著しい葉柄間角度の増大が見られた。DMPA処理前にAOAを処理すると、処理後24時間で135.6°、48時間で175.5°となり、やはりDMPAによって引き起こされる葉柄間角度の増大がやや抑制される傾向が見られた。これらの結果は、clomeprop, DMPA処理後に葉柄間角度の増大が起こるが、それはエチレンの生合成を抑えることにより抑制されることを示しており、このことから、これらの薬剤によって誘導されるエチレンが根部処理後の葉柄間角度の増大に関与している可能性が高いことが示唆される。

これらの薬剤が誘導するエチレンによって葉柄間角度

の増大が起こっているかどうかをさらに確認するため、エチレン作用阻害剤 (NBD) の後処理を行った。無処理のダイコンでは、処理後24時間、48時間とも約60°であったが、 10^{-4} MのDMPA処理24時間後で155.2°、48時間後で186.0°にまで増加した (Table 4-2)。しかし、DMPA根部処理後にNBDを処理すると、処理後24時間、48時間とも約60°にまで抑えられた。このことは、DMPA根部処理によって発生するエチレンがエチレン受容体に結合出来なくなると、葉柄間角度の増大は起こらないことを示している。

〈2〉 エチレン放出量

Clomeprop, DMPA根部処理後に生成するエチレン放出量の測定を行った。

10^{-4} Mのclomeprop処理において12時間後までは無処理のものと同量であったが、処理24時間後からわずかに増加し始めた (Figure 4-1)。また、clomeprop処理前にAOAを処理することにより、エチレン量の増加は抑えられた。DMPAを処理すると、処理直後から急激なエチレン量の増加がみられ、48時間後に最大値に達した (Fig. 4-2)。DMPA処理前にAOAを処理すると、エチレン量の増加が抑制され、AOAがエチレン生成抑制剤として実際に作用していることが確認された。

〈3〉 ACC synthase活性

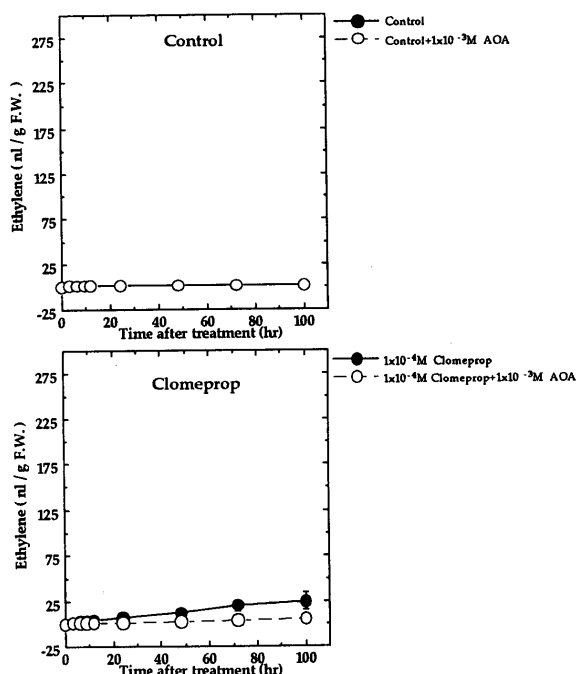


Fig. 4-1 Ethylene evolution from radish seedlings following root application of clomeprop. Radish shoots were pre-treated with 1 mM AOA and then treated with 1×10^{-4} M clomeprop. Data represent means \pm SE.

エチレン生合成の律速酵素であるACC synthase活性を測定した。無処理のダイコン茎葉部でのACC synthase活性の増大は見られなかったのに対し、clomeprop処理 (10^{-4} M) 後にはわずかな増大が確認された (Fig. 4-3)。また、AOA処理により、その酵素活性増大がやや

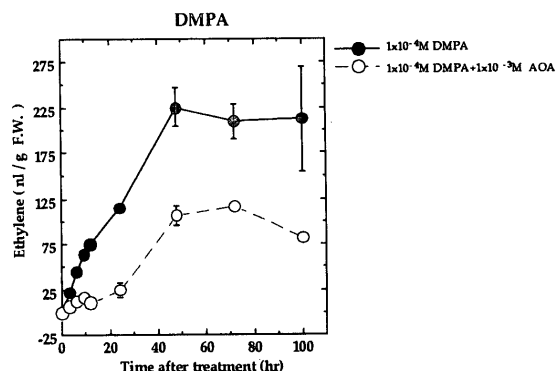


Fig. 4-2 Ethylene evolution from radish seedlings following root application of DMPA. Radish shoots were pre-treated with 1 mM AOA and then treated with 1×10^{-4} M DMPA. Data represent means \pm SE.

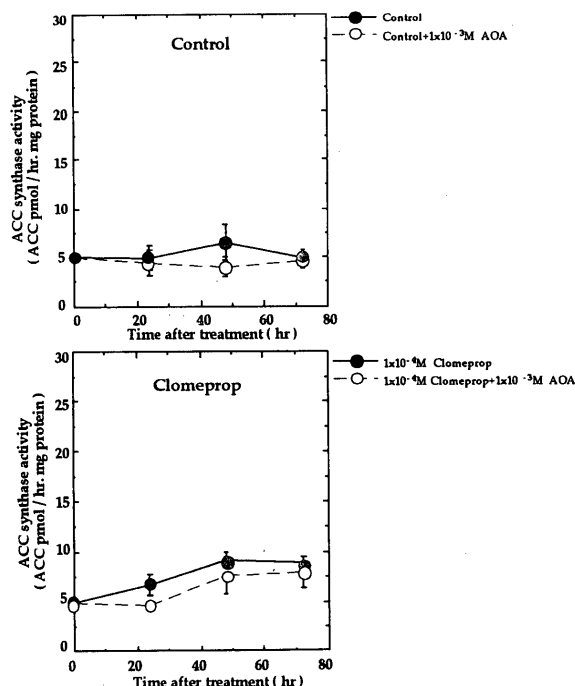


Fig. 4-3 ACC synthase activity in radish seedlings following root application of clomeprop. Radish shoots were pre-treated with 1 mM AOA and then treated with 1×10^{-4} M clomeprop. ACC synthase activity is shown as pmol ACC produced per milligram of protein per hour. Data represent means \pm SE.

抑えられる傾向にあった。DMPA ($10^{-4}M$) を処理すると、処理直後から急激な活性増大がみられ、48時間後に最大値に達した (Fig. 4-4)。やはり、AOAを処理することによりその活性増大は抑制されたことから、本実験条件下で、AOAはACC synthase活性を抑制することでS-adenosyl-L-methionine (SAM) からACCの反応を阻害し、その結果としてエチレン生成を抑えていることが確認された。

〈4〉 ACC oxidase活性

Clomeprop ($10^{-4}M$)、DMPA ($10^{-4}M$) 根部処理によりACC oxidase活性が増大するのかどうかを調べた (Table 4-3)。ACC oxidase活性はACCが所定時間後にどれだけエチレンに変換されるのかを測定することにより求めた。薬剤処理24時間後の無処理のダイコン茎葉部にACCを添加すると、1時間後には2.07nl/50 leaf discs

のエチレン量増加が認められたが、clomeprop, DMPA 処理後には各々、1.96, 1.89nl/50 leaf discsの増大となり、無処理とほぼ同程度の増加であった。また、ACC添加3時間後では、無処理, clomeprop, DMPA処理におけるエチレン量の増大は各々、7.50, 6.60, 4.24nl/50 leaf discsとなり、エチレン量の増加は見られず、むしろ阻害されていた。薬剤処理48時間でも同様に、clomeprop, DMPA処理によるACC oxidase活性の増加は認められなかった。

4-4 考 察

Clomepropは茎葉処理と根部処理とで生育抑制効果の程度がかなり異なることが知られている [118, 140, 141]。序論でも述べたように、茎葉処理ではかなり高い生育抑制効果を示すが、根部処理するとその効果が減少する。また反対に、DMPAは根部処理でより高い効果を表すと報告されている [140, 141]。そして本研究でも同様の傾向が見られた。本章では、茎葉処理、根部処理間での差異の要因をエチレン生成系を軸として探るべく、clomeprop, DMPA根部処理による葉柄間角度の増大、エチレン放出量、ACC synthase活性、ACC oxidase活性を測定し、3章での茎葉処理の結果との比較を行った。

薬剤処理による葉柄間角度の増大については、clomepropは茎葉処理でより大きな効果を現したが、根部処理では無処理とほぼ同程度であった (Table 3-1, Table 4-1)。DMPAでは茎葉処理でも根部処理でもclomepropの茎葉処理よりも高い効果がみられたが、根部処理でより強い活性を示した。処理部位とそれぞれの化合物の活性の強さの関係は以下のような順となった。

(DMPA根部処理 > DMPA茎葉処理 > clomeprop茎葉処理 > clomeprop根部処理 = 無処理)

また、エチレン生成活性でも上記のような順序となり、葉柄間角度の増大の程度とエチレン生成量とは、密接に関連していることが推察された (Table 3-1, Table 4-1, Fig. 3-4~3-5, Fig. 4-1~4-2)。根部処理後のエチレン生成では、DMPAは処理直後から急激に、しかも多量にエチレンを生成していたが、clomeprop処理では処理後12時間まではほとんどエチレンを生成しなかった。それ以降は徐々にエチレンを生成したが量的には少なかった。Wongwattana and Ishizuka [141] は、ダイコンにclomepropを24時間根部浸漬処理すると、処理終了直後 (浸漬開始から24時間後) の茎葉部中にすでにDMPAが存在していることを確認している。本実験ではclomepropを12時間根部処理しているが、Wongwattana and Ishizuka [141] の実験を考慮すると、エチレン量が増加し始めた、処理後12時間 (浸漬開始から24時間後) では茎葉部

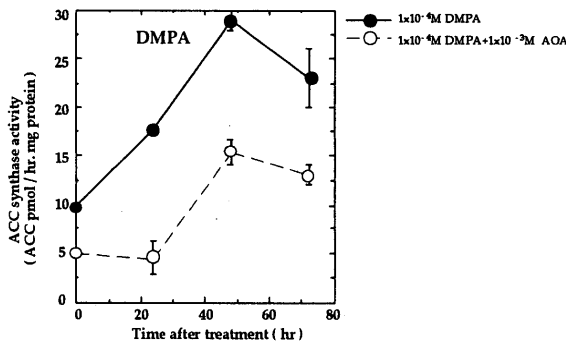


Fig. 4-4 ACC synthase activity in radish seedlings following root application of DMPA. Radish shoots were pre-treated with 1 mM AOA and then treated with $1 \times 10^{-4}M$ DMPA. ACC synthase activity is shown as pmol ACC produced per milligram of protein per hour. Data represent means \pm SE.

Table 4-3 ACC oxidase activity in radish leaves following root application of clomeprop or DMPA.

Treatment	Time (hr)	Ethylene (nl / 50 leaf discs)			
		Time after ACC addition (hr)			
		0hr	1hr	3hr	
Control	24	0.41 \pm 0.01	2.48 \pm 0.40 (+2.07)	7.91 \pm 1.07 (+7.50)	
1x10 ⁻⁴ M Clomeprop	24	0.48 \pm 0.01	2.44 \pm 0.47 (+1.96)	7.08 \pm 0.90 (+6.60)	
1x10 ⁻⁴ M DMPA	24	0.46 \pm 0.01	2.35 \pm 0.49 (+1.89)	4.70 \pm 0.91 (+4.24)	
Control	48	0.41 \pm 0.03	2.12 \pm 0.63 (+1.71)	7.59 \pm 0.05 (+7.18)	
1x10 ⁻⁴ M Clomeprop	48	0.48 \pm 0.09	2.03 \pm 0.29 (+1.55)	5.38 \pm 1.01 (+4.90)	
1x10 ⁻⁴ M DMPA	48	0.56 \pm 0.02	1.86 \pm 0.32 (+1.30)	4.83 \pm 0.49 (+4.27)	

The numbers in brackets indicate the amount of ethylene increased after 0 hr. Data represent means \pm SE.

中にDMPAが存在していることが予測される。したがって、ここでの試験で見いだされたclomepropとDMPAのエチレン生成開始時間のずれも、“clomeprop処理によるエチレン生成は主にDMPAに起因している”という仮説を支持するものである。処理後48時間でのエチレン生成量で比較すると、DMPA根部処理では226.3nl/g F.W., clomeprop根部処理では11.8nl/g F.W.となり、約20倍の差が見られた。Wongwattana and Ishizuka [140] は、clomepropは根部から茎葉部への移行が少ないと報告しているが、clomepropのこの低い移行性が根部処理後の2剤の活性の差を引き起こしているものと思われる。また、clomeprop茎葉処理72時間後のエチレン量は148.2nl/g F.W.であったが、根部処理72時間後では21.8nl/g F.W.となり、茎葉処理後の約1/7程度であった。Clomepropは茎葉部から素早く吸収されることが知られている [118, 140] ことから、この素早い吸収がclomeprop茎葉処理でのエチレン量の増大を引き起こしていると思われる。また、clomepropからDMPAへの分解が主に茎葉部で起こること [118] も主要な原因の一つであると考えられる。Wongwattana and Ishizuka [140] は植物に対する毒性と茎葉部中のDMPA含量との間には高い正の相関性があることを示しており、著者らもオーキシシン受容体に対する結合実験等から、DMPAがclomepropの活性本体である可能性を示している(第2章)。また、上述のように、clomeprop, DMPA処理によるエチレンの生成誘導と生成量における2剤の間の時間的な差は、根部処理でより顕著に現れたが、これはDMPAがclomepropよりも根部から多く吸収されること、そして素早く活性部位である茎葉部へ移行する [118, 140] ことも深く関与していると思われる。

また、ACC synthase活性の測定により、根部処理でもACC synthase活性の増大によってエチレン生合成が促進されることが示された。これらのことから、本実験で観察した根部処理後の形態異常も、DMPAがACC synthase活性を増大することによって生成するエチレンにより引き起こされているものと推察された。

そして、茎葉、根部処理間における形態異常の程度の差異には、茎葉、根部でのclomeprop, DMPAの吸収、移行、代謝の差に起因する茎葉部中のDMPA含量の差が大きく関与しているものと思われる。その茎葉部中でのDMPAの蓄積時間の差や量的な差が結果的にエチレン生合成の量的、時間的な差を導き、形態異常の程度差を生じさせているものと思われる。

4-5 要 旨

Clomeprop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。そしてその差は茎葉部、根部での両薬剤の吸収、移行、代謝の差異によって引き起こされる、茎葉部でのDMPA量の差に起因していると推定されている。本章では、clomeprop, 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明らかにし、さらに第3章の茎葉処理での結果と比較し、エチレン生合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の知見を得ることを目的とした。

- (1) Clomepropを茎葉処理すると、葉のカーリングや葉の葉柄間角度の増大が見られたが、根部処理の場合、それらの作用はわずかであった。一方、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。
- (2) DMPAを根部に処理した後に現れた上記の作用は、エチレン生成阻害剤(AOA)の前処理でわずかに、エチレン作用阻害剤(NBD)の後処理により顕著に抑えられた。
- (3) Clomeprop根部処理後のエチレン放出量はわずかに増大したが、茎葉処理の場合と比較して1/7ほどであった。また、茎葉処理の場合、クロメプロップとDMPAのエチレン生成誘導は量的、時間的な差がわずかであるのに対し、根部処理ではDMPAがより早くエチレン生成を誘導し、エチレン生成量も著しく多かった。
- (4) Clomeprop根部処理後のACC synthase活性はわずかに増大したが、茎葉処理後の活性より低かった。一方、DMPA処理後のACC synthase活性はclomepropと比較するとかなり高く、また茎葉処理よりも根部処理の方が高かった。
- (5) 根部処理でも茎葉処理同様、clomeprop, DMPAはACCからエチレンへの反応をわずかに阻害した。つまりACC oxidase活性の増大は引き起こさなかった。

これらのことから、根部処理でも主にDMPAが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。また、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clomeprop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。その茎葉部中のDMPA量の差がエチレン生合成の量的、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高い。

第5章 DMPA処理後に引き起こされる電解質漏出へのエチレンの関与

5-1 序 論

第2章から4章までの研究結果から clomeprop, DMPA処理により, 多量のエチレンが生成されることが明らかとなった。特にDMPAの場合は処理直後から, より大量のエチレン生成が起こった。また, オーキシシン型除草剤による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 ($r=0.92$ (quinclorac), $r=0.93$ (2,4-D)) があることが報告されている [29] ことから, clomeprop処理後の傷害について, これまで検討してきた地上部の形態異常以外の傷害へのエチレンの役割についても検討していく必要があると思われる。

Clomeprop根部処理後の傷害の一つに電解質の漏出がある。オーキシシ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報告は, 現在までにほとんどなされていないが, 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 [22, 23, 42, 116, 117]。Suttle and Kende [117] は, エチレンが膜のリン脂質レベルを減少させることにより膜の透過性を高めることを報告している。また, Farager and Mayak [22] は, バラの花びらが枯死する以前にイオンの漏出が起こることを見いだしたが, その現象はエチレン生成阻害剤 (AVG) やエチレン作用阻害剤 (STS) の処理により軽減したことを示している。さらに彼らはX線回析を行い, エチレン処理により膜脂質の物理的状態が変化することも明らかにし, 少なくともその変化が膜の透過性の増大に関与していると推察している [23]。また, エチレンが細胞膜を構成する脂肪などと結合することにより, 膜構造に変化をもたらす, 結果的に膜の透過性を増大させているのではないかとする仮説もある [103]。さらにTuckerらはエチレンの増加に伴って, セルラーゼ, あるいはポリガラクトクトロナーゼ活性が増大することを示している [129, 130, 131]が, これらの酵素活性の増大による細胞壁の崩壊もまた, 電解質の漏出に関与している可能性も考えられる。一方, Kooら [60] は, オーキシシン型除草剤である quinclorac処理後の電解質の漏出の程度をイネ (抵抗性種) とヒエ (感受性種) で比較し, 感受性のヒエで特に電解質漏出が増加したことを示したが, これは根部の生育が抑制された後の二次的な影響である可能性が高いことを示している。しかしながら, quincloracは広葉植物にはオーキシシン作用を示すが, イネ科植物ではオーキシシン類とは明らかに異なる作用機構を持つことが

知られている [61, 62] ことから, clomeprop処理後の広葉植物での電解質の漏出は単なる二次的な影響でない可能性もある。

そこで, 本章ではclomeprop処理後の傷害におけるエチレンの役割をさらに解明することを目的とし, 特にclomepropによる傷害の一つである根部からの電解質漏出に着目し, それへのエチレンの関与について調べた。

5-2 材料および方法

植物材料: ダイコン (*Raphanus sativus* L. var. *hortensis* cv. Shogoin) 種子を精製水で湿らせたパーミキュライト上に播種し, グロースチャンバー (30°C/25°C, 昼間 (500 μ E/m²/s, 12hr)/夜間) 内で3日間生育させた。

<1> 電解質漏出と側根の発生阻害

ダイコン根部を緩衝液 (5mM potassium phosphate, pH5.5) で 1×10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 1×10^{-5} M に調製した clomeprop, DMPA 溶液 (0.5% DMSO, 0.1% Tween 20 を含む) に 90 分間浸漬した後, 根部を精製水で洗い, 植物体 10 本ずつを精製水 15ml の入ったビーカーに移した。それをグロースチャンバー内で一定時間生育させた後, ビーカー内の電気伝導度を電気伝導度計 (電気化学工業, Model AOC-10) を用いて測定した。また, 同時に主根の基部下 2 cm までの部位に発生する側根の数も測定した。そして, DMPA 単独処理とエチレン作用阻害剤である NBD と PPOH の後処理の結果との比較を行った。また対照区では, ダイコン根部を上記の緩衝液 (0.5% DMSO, 0.1% Tween 20 を含む) 中に浸漬処理し, 他はすべて薬剤処理区と同一条件下で生育させたものを測定に用いた。

[NBDの後処理]

ダイコン根部を緩衝液 (対照区), または 1×10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 1×10^{-5} M の clomeprop, あるいは DMPA 溶液に 90 分間浸漬した後, 根部を精製水で洗い, 植物体を精製水の入ったビーカーに移した。それを 1000ml ビーカーに移してからパラフィルムで密封し, パラフィルムを通してシリンジで NBD (液体) を 20 μ l 注入した。

[PPOHの後処理]

ダイコン根部を緩衝液 (対照区), または 1×10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 1×10^{-5} M の clomeprop, あるいは DMPA 溶液に 90 分間浸漬した後, 根部を精製水で洗い, 植物体を 1×10^{-7} M の PPOH が 15ml 入ったビーカーに移し, 一定時間後に電気伝導度と側根数の測定を行った。

<2> 微量元素分析

ダイコン根部を緩衝液 (対照区), または 1×10^{-4} M の clomeprop, DMPA 溶液に 12 時間浸漬した後, 根部を精製水で洗い, 植物体 10 本ずつを精製水 50ml 入ったビーカーに移した。一定時間後, ビーカー内の精製水を 5 ml

ずつ採取し、湿式灰化法によって有機物の分解を行った。試料 5 ml を分解フラスコに移し、 HNO_3 1 ml と H_2SO_4 : HClO_4 (1 : 1) 1 ml を加え、よく混合してからゆっくり加熱した。白煙が出始めてからさらに 10 分間加熱し、最後に 5 分間強熱分解した。放冷後、それに精製水 4 ml を加えて微量分析用のサンプルとした。微量分析はプラズマ発光分光分析器 (Nippon Jarrell-Ash, ICAP-757 V) を用いて行った。分析条件は以下の通りであった。

高周波出力 : 1.2W
 クーラントガス : 16l/min
 プラズマガス : 0.6l/min
 キャリアーガス (アルゴン) :
 No. 1 1.5kg/cm², 0.9l/min
 No. 2 2.0kg/cm², 1.0l/min
 No. 3 3.0kg/cm², 1.1l/min

〈3〉 エチレン放出量

[植物体からのエチレン放出量]

〈1〉 と同一の実験条件で薬剤処理したダイコン幼植物 10 本ずつをビーカーに移し、2 ビーカーずつ 1000 ml ビーカーに移してパラフィルムで密封した。一定時間後にビーカー内の気層を 1 ml ずつ採取し、ガスクロマトグラフでエチレン含量を測定した。また、緩衝液で処理したものを対照区とした。

[切断根からのエチレン放出量]

上記のように DMPA 処理したダイコン幼植物の主根を基部と基部下 2 cm のところで切断した。その切断根 10 本ずつを精製水 1 ml の入った 20 ml バイアルに移してパラフィルムで密封し、バイアル中のエチレン含量をガスクロマトグラフで測定した。また、緩衝液で処理したものを対照区とした。

(NBDの後処理) : 上記のように DMPA 処理した切断根をバイアルに移してパラフィルムで密封した後、NBD (液体) を 1 μ l 注入し、一定時間後のエチレン含量を測定した。

(PPOHの後処理) : 上記のように DMPA 処理した切断根を 1 $\times 10^{-7}$ M の PPOH が 1 ml 入ったバイアル瓶に移して密封した後、エチレン量の測定を行った。

〈4〉 エバンスブルー染色

ダイコン根部を緩衝液 (対照区)、または 1 $\times 10^{-4}$ M, 5 $\times 10^{-5}$ M, 1 $\times 10^{-5}$ M に調製した clomeprop, あるいは DMPA 溶液に 90 分間浸漬した後、根部を精製水で洗浄してから植物体をプラスチックポットに移して生育させた。一定時間後に側根の先端 5 mm を切り取り、ピンセットでプレパラート上に乗せ、0.3% (w/v) エバンスブルー染色液を 1 滴落とし、カバーガラスをかぶせ、写真撮影装置付き生物顕微鏡 (Nikon, MICROFLEX AFX

-IIA) で検鏡してから写真撮影を行った。

5-3 結果

〈1〉 電解質漏出と側根の発生阻害

Fig. 5-1 は 1 $\times 10^{-4}$ M の clomeprop, あるいは DMPA を処理した後のダイコン幼根からの電解質の漏出を示したものである。DMPA 処理では、処理直後から急激な電解質の漏出がみられ、96 時間後には約 80 $\mu\text{S}/\text{cm}$ にまで達した。Clomeprop 処理では処理後 20 時間までは無処理とあまり変わらなかったが、それ以降はゆるやかに増加し始め、96 時間後には約 35 $\mu\text{S}/\text{cm}$ となった。

Fig. 5-2 には DMPA の濃度と電解質漏出との関係を示した。DMPA の濃度を 1 $\times 10^{-4}$, 5 $\times 10^{-5}$, 1 $\times 10^{-5}$ M の 3 段階に変化させると、濃度の増加に伴い電解質漏出の程度も増加していった。1 $\times 10^{-4}$, 5 $\times 10^{-5}$ M の DMPA では急激な電解質の漏出がみられたが、1 $\times 10^{-5}$ M の DMPA ではゆるやかに増加した。Fig. 5-3 は DMPA の濃度変化と側根の発生阻害との関連を調べたものである。

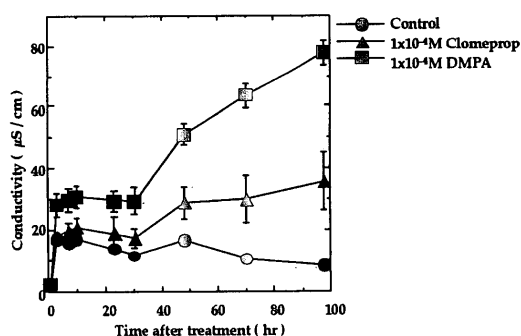


Fig. 5-1 Electrolyte leakage from clomeprop or DMPA-treated radish roots.

Radish roots were immersed with 1 $\times 10^{-4}$ M clomeprop or DMPA for 12 hr. Data represent means \pm SE.

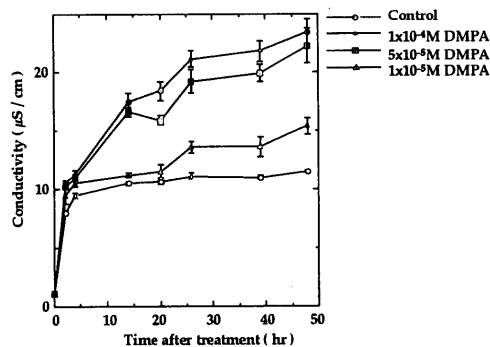


Fig. 5-2 Electrolyte leakage from DMPA-treated radish roots.

Radish roots were immersed with 1 $\times 10^{-4}$ M, 5 $\times 10^{-5}$ M or 1 $\times 10^{-5}$ M DMPA for 90 min. Data represent means \pm SE.

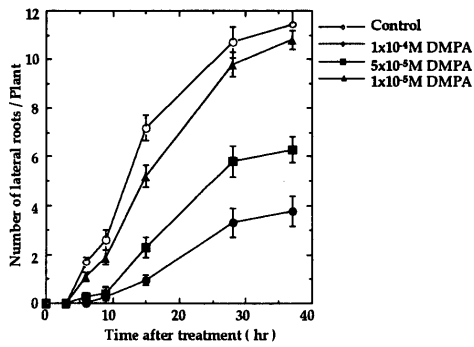


Fig. 5-3 DMPA-induced inhibition of emergence of lateral roots.

Radish roots were immersed with 1×10^{-4} M, 5×10^{-5} M or 1×10^{-5} M DMPA for 90 min. Data represent means \pm SE.

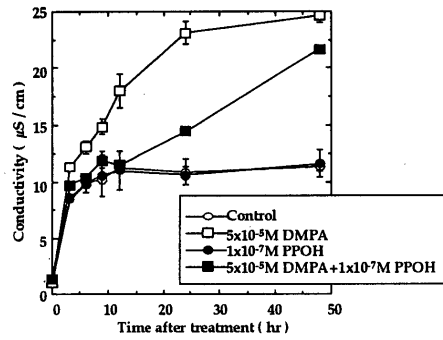


Fig. 5-5 Effect of PPOH on electrolyte leakage from DMPA-treated radish roots.

Radish roots were soaked with 5×10^{-5} M DMPA for 90 min and then treated with 1×10^{-7} M PPOH. Data represent means \pm SE.

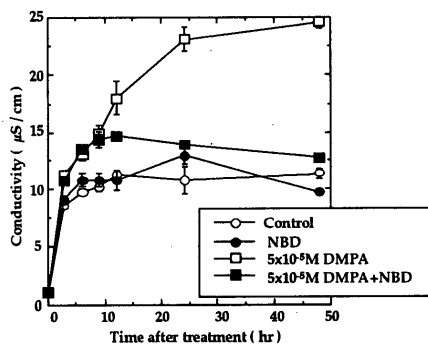


Fig. 5-4 Effect of NBD on electrolyte leakage from DMPA-treated radish roots.

Radish roots were soaked with 5×10^{-5} M DMPA for 90 min and then treated with NBD. Data represent means \pm SE.

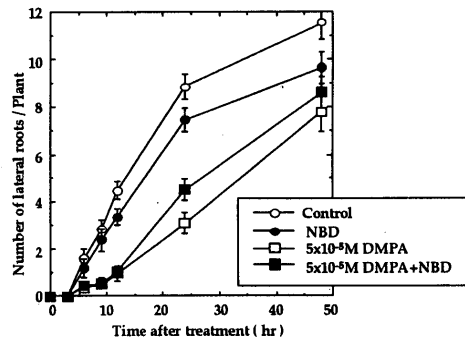


Fig. 5-6 Effect of NBD on DMPA-induced inhibition of emergence of lateral roots.

Radish roots were soaked with 5×10^{-5} M DMPA for 90 min and then treated with NBD. Data represent means \pm SE.

1×10^{-4} , 5×10^{-5} MのDMPA処理により、無処理に比べて著しく側根の発生が阻害されたが、 1×10^{-5} MのDMPA処理ではわずかに阻害されただけであった。また、この結果とFig. 5-2の結果から、電解質漏出の程度と側根の発生阻害との間には非常に高い正の相関関係 ($r=0.97$) が認められた。

次に、DMPA処理後におこる電解質漏出にエチレンが関与しているかどうかを調べるため、エチレン作用阻害剤であるNBDとPPOHの後処理を行った。PPOHはエチレン受容体に結合することにより、エチレンの受容体への結合を拮抗的に阻害すると推定されている [100, 145]。NBD単独処理では、ダイコン幼根からの電解質漏出には影響を与えないが、DMPA処理後にNBDを後処理すると、DMPA処理による電解質の漏出を大幅に減少させ (Fig. 5-4)、また、その減少は処理後9時間から起こった。PPOH処理でも同様で、PPOH単独処理では電解質の漏出に影響を与えなかったが、DMPA処理後にPPOHを処理すると処理直後から、電解質の漏出を減少

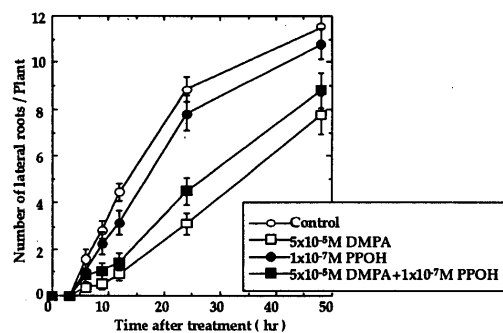


Fig. 5-7 Effect of PPOH on DMPA-induced inhibition of emergence of lateral roots.

Radish roots were soaked with 5×10^{-5} M DMPA for 90 min and then treated with 1×10^{-7} M PPOH. Data represent means \pm SE.

させた (Fig. 5-5)。この結果は、DMPA処理後の電解質漏出にエチレンが深く関与している可能性が高いことを示している。

Fig. 5-6, Fig. 5-7は各々、DMPA処理後の側根の発

生阻害に対するNBDとPPOHの後処理の効果をみたものである。NBDやPPOHを単独処理すると、無処理と比べて側根の発生がわずかに抑制されたにもかかわらず、DMPA処理後にNBDやPPOHを後処理すると、逆に

DMPA処理による側根の発生阻害は軽減される傾向がみられた。これらの結果は、DMPA処理後の側根の発生阻害と電解質漏出にエチレンが密接に関与していることを示唆している。

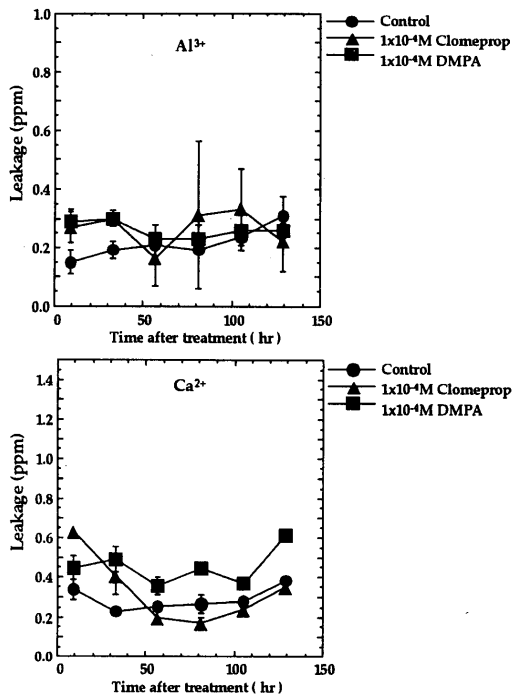


Fig. 5-8-1 Al^{3+} and Ca^{2+} leakage from clomeprop- or DMPA-treated radish roots. Data represent means \pm SE.

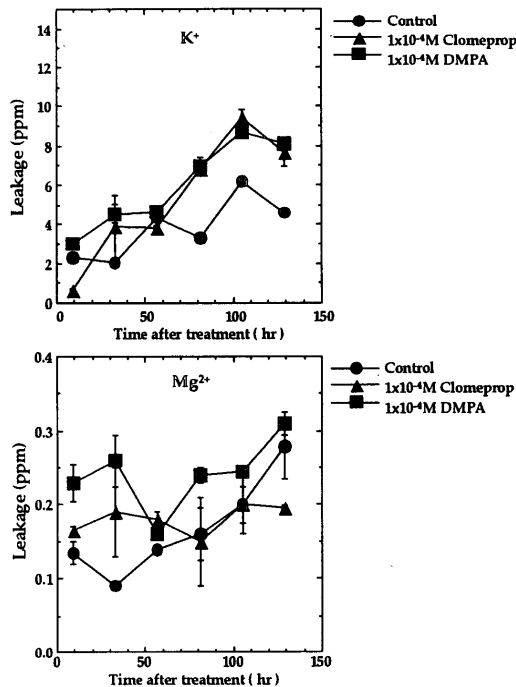


Fig. 5-8-3 K^{+} and Mg^{2+} leakage from clomeprop- or DMPA-treated radish roots. Data represent means \pm SE.

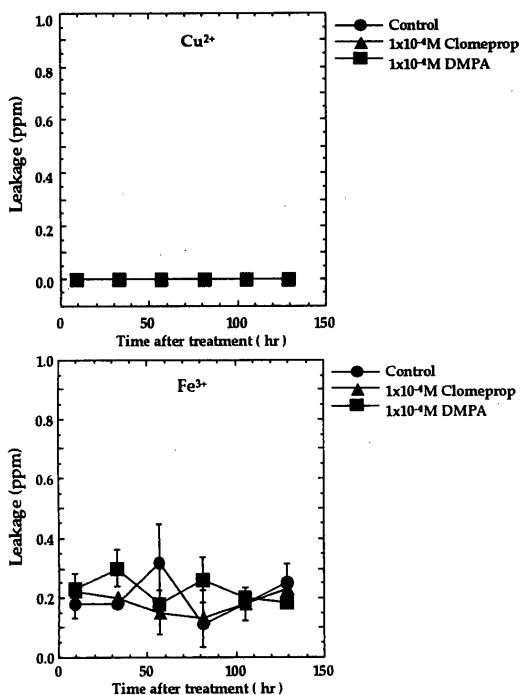


Fig. 5-8-2 Cu^{2+} and Fe^{3+} leakage from clomeprop- or DMPA-treated radish roots. Data represent means \pm SE.

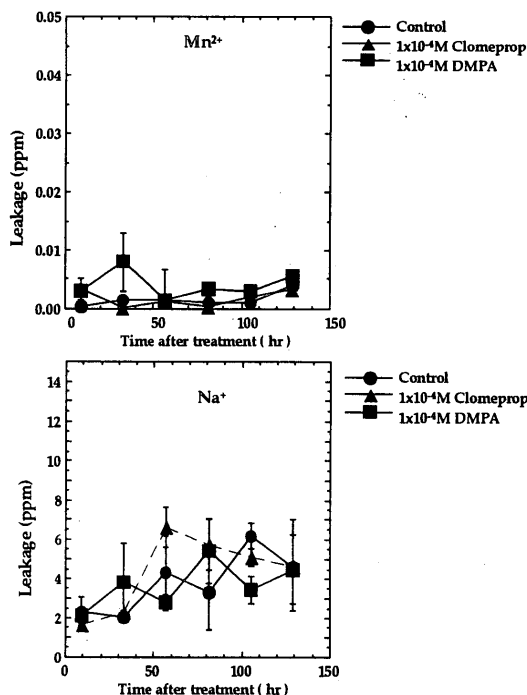


Fig. 5-8-4 Mn^{2+} and Na^{+} leakage from clomeprop- or DMPA-treated radish roots. Data represent means \pm SE.

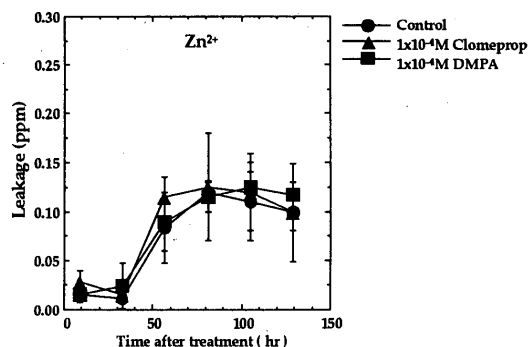


Fig. 5-8-5 Zn^{2+} leakage from clomeprop- or DMPA-treated radish roots. Data represent means \pm SE.

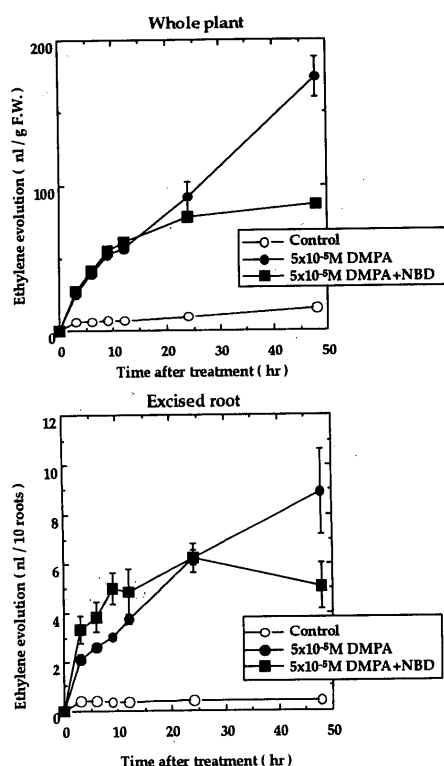


Fig. 5-9 Effect of NBD on DMPA-induced ethylene production.

Radish roots were immersed with $5 \times 10^{-5} M$ DMPA for 90 min and then treated with NBD. Data represent means \pm SE.

<2> 微量元素分析

Clomeprop, DMPA処理後の電解質漏出の際にどのような種類の元素が漏出するのか、また特定の元素の漏出に起因している場合があるのかどうかを調べるために、薬剤処理後に根部から漏出する微量元素量の測定を行った。薬剤処理後、所定時間毎にダイコン幼根が浸っている溶液を一定量採取し、 Al^{3+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} の量的変化を測定した (Fig. 5-8-1~Fig. 5-8-5)。Clomeprop, DMPA 処理後の

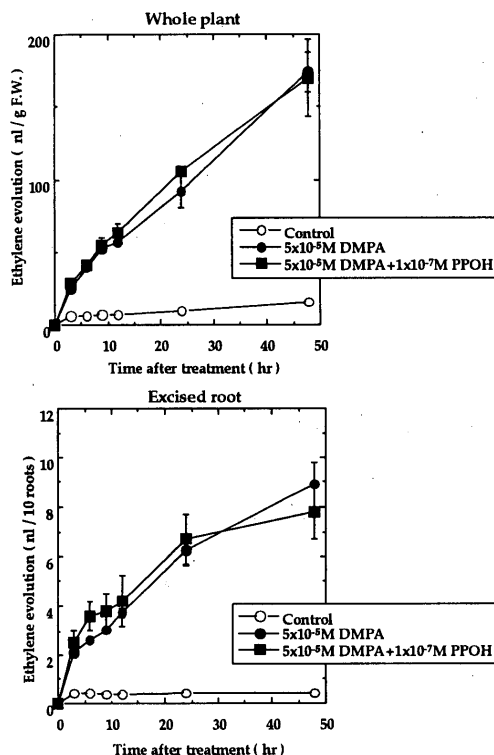


Fig. 5-10 Effect of NBD on DMPA-induced ethylene production.

Radish roots were immersed with $5 \times 10^{-5} M$ DMPA for 90 min and then treated with $1 \times 10^{-7} M$ PPOH. Data represent means \pm SE.

Al^{3+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} の漏出量は無処理と同程度であり、薬剤処理後の増大は見られなかった。 Ca^{2+} では、DMPA処理直後から無処理よりも多く検出されたが、clomeprop処理では無処理と同程度であった。また、 K^+ はclomeprop, DMPA処理後に漏出量の増大がみられた。無処理と薬剤処理間でのこれらの元素漏出量の差は、電解質漏出量での差より小さかったが、これは電解質漏出量に今回測定した以外の元素も関与しているか、あるいは他のイオン性物質の漏出量が関与しているためと考えられる。

<3> エチレン放出量

DMPA, DMPA+NBD, DMPA+PPOH 処理により、どの時間域でどれだけエチレンが生成されるのかを調べた。

植物体全体からのエチレン放出量は、DMPA処理直後から急激に増大し、処理48時間まで増加し続けた。DMPA処理後にNBDを後処理すると12時間まではDMPA処理によって生成するエチレン量には影響を与えなかった (Fig. 5-9)。しかし、12時間以降ではNBD処理により、エチレン放出量の増大が抑制され始め、48時間後では約半分まで減少した。切断根からのエチレン放出量でも、やはりDMPA処理直後から急激なエチレン

量の増大がみられ、処理48時間後まで増加し続けた。NBD処理により24時間までは、エチレン量の生成促進効果が見られたが、それ以降のエチレン生成は抑制された。

また、PPOHを後処理しても、DMPA処理によって生成するエチレン量（植物体全体からの発生量）に影響を与えなかった（Fig. 5-10）。切断根からのエチレン生成量でも、処理48時間まではほとんどDMPA単独処理と同量で、エチレン量には影響を与えなかったが、それ以降はDMPAによって発生するエチレン生成を抑制する傾向にあった（データには示していない）。

〈4〉エバンスブルー染色

薬剤処理後の電解質漏出は細胞死の結果として起こっているのではないことを確認するため、エバンスブルー染色を行い処理後いつから細胞死が起こるのかを調べた。Fig. 5-11は、薬剤処理後の側根の細胞を200倍で顕微鏡観察したものである。無処理の側根からは青色に染色された細胞は観察されなかった。一方、DMPA処理後の側根では、処理9時間後までは青く染色されている細胞は確認されなかったが、処理12時間後から染色されている細胞が観察され始めた。この結果は、DMPA根部処理12時間以前に引き起こされる電解質漏出は細胞死に起因するものではないことを示唆している。

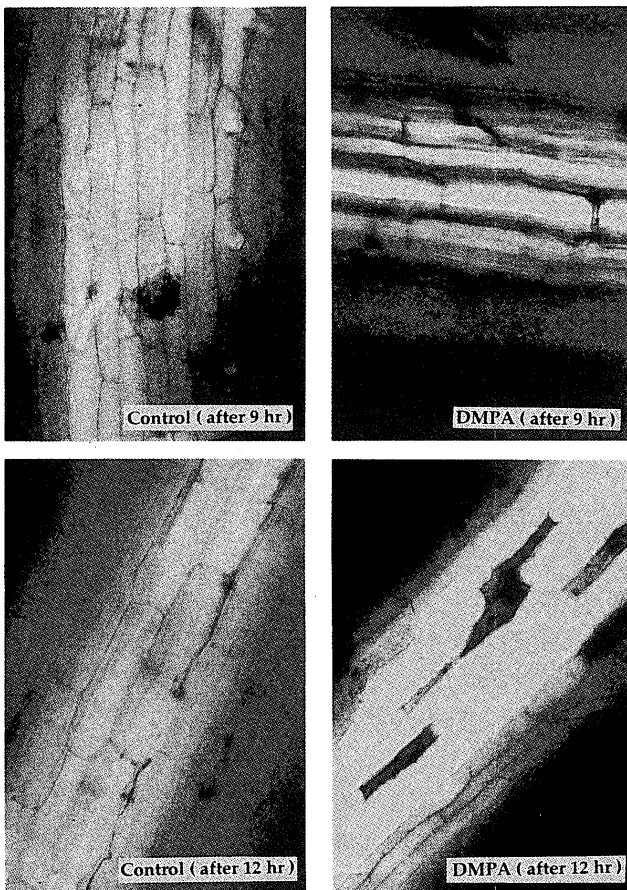


Fig. 5-11Evan's blue dye test.

5-4 考 察

Clomeprop, DMPA処理後に起こる電解質漏出にはどのような要因が絡んでいるのか調べるため、本章ではまず、電解質漏出とエチレンの関与について調べることにした。Clomeprop, DMPA処理によって発生するエチレンの作用を消去する手段として、エチレン作用阻害剤であるNBDとPPOHの後処理を行った。エチレン作用阻害剤は、一般的に切り花の鮮度保持剤として使用されている。NBDは揮発性物質であるため取り扱いが極めて難しいことや悪臭等の問題があることからNa-silversulfate (STS)が実用化されているが、STSは銀イオンによる環境汚染が懸念されており、新規のエチレン作用阻害剤が待望されている[100, 144]。PPOHは協和発酵工業(株)が見いだしたエチレン作用抑制効果を有する水溶性の高い剤である。cis-2-butene (CB)やNBDなどのシスオレフィン構造を有する化合物は、エチレン受容体には結合するもののエチレン作用は発揮しないため、結果としてエチレン作用を阻害することが知られている [112, 145]。CBやNBDと同じシスオレフィン構造を有するPPOHは同様にエチレン作用を拮抗的に阻害すると推定されている [145]。本章の実験遂行に際し、開発段階であるPPOHを特別に協和発酵工業(株)から供与していただいた。

DMPA処理後にNBDやPPOHを処理することにより、ダイコン幼根からの電解質漏出や側根の発生阻害が軽減されたことから、エチレンがこれらの作用に関与していることが示唆された (Fig. 5-4~5-7)。NBDとPPOHによる電解質漏出の軽減開始時間には差が認められたが、これは2剤の形状の差 (NBDは気体、PPOHは液体) に由来しているものと思われた。植物ホルモンとしてのエチレンの生理作用の研究において、エチレンは植物組織の膜透過性を増加することが報告されている [23, 42, 117]。しかし、植物体内において除草剤により過剰に生成されるエチレンが電解質漏出と生育抑制という除草剤の作用の直接的な要因となっているという報告は、本研究以外には発表されていない。Suttle and Kende [117] は、エチレンが膜のリン脂質レベルを減少させることにより、膜の透過性を増大させることを報告している。また、Faragherら [23] は、X線回析によってエチレンが膜脂質の物理的状態を変え、それによって膜の透過性が高まると報告している。したがって、DMPA処理後のエチレンと膜脂質との関連についてもさらに検討する必要があるものと思われる。また、エチレンはセルラーゼあるいはポリガラクトナーゼ活性を増大させることにより細胞壁を崩壊させるとの説もある [103, 129, 130, 131]ため、これと電解質漏出との関与についても検討し

てみる必要があるだろう。

DMPA処理後に電解質の漏出が起こるが、その時の実際のエチレン量を植物体全体および切断根について測定した。エチレンは物理的拡散によって植物体内を容易に移動することが知られている [103]。そのため、莖葉部で生成されているエチレンも根部に影響している可能性が考えられ、植物体全体からのエチレン生成量の測定も行った。

DMPA処理後にNBD, PPOHを処理しても、処理後24時間まではエチレン量の減少は見られなかった (Fig. 5-9~5-10) ことから、NBD, PPOHともこの時間域でのエチレン生成は阻害しないことが確認された。しかし、DMPA+NBD処理では24時間以降からエチレン量の減少がみられ、DMPA+PPOH処理では48時間以降からエチレン量が減少していく傾向が見られた (データには示していない)。外来的に処理したエチレンや生体内で増加したエチレンは、さらにエチレン生合成を促進する働き (エチレン自身の自己触媒作用) を有している [83, 103]。したがって、エチレン作用阻害剤 (NBD, PPOH) 処理によりそのエチレン自身の自己触媒作用が抑えられたのかもしれない。同様にNBDやPPOH処理によりエチレン量の減少が見られたとする報告も多い [137, 145]。つまり、この二次的なエチレン生成量の減少は、本実験条件下でNBDとPPOHがエチレン作用阻害剤として機能していることを示しているものと考えられる。

エバンスブルー染色の結果、DMPA処理12時間以降で細胞死が認められた (Fig. 5-11) が、電解質漏出はそれ以前でみられ、そしてそれはエチレン作用阻害剤によって軽減された。つまり、DMPA処理による電解質漏出は細胞死の結果として起こっているのではないと思われる。そしてNBDやPPOHによりエチレン作用を直接的に抑制すると、24時間以内という2次的なエチレン生成抑制が起こらない段階で、DMPA処理によって現れた電解質の漏出や側根の発生阻害が抑えられた。したがって、DMPA処理によって発生したエチレンそのものが植物の生育抑制に関与している可能性が強く示唆される。

エチレン生合成経路の最終段階では、ACCがACC oxidaseの作用によって分解してエチレンが生成するが、その時、同時に等量のHCNが生成される [100, 148]。HCNは植物体内に多量に存在する β -シアノアラニン合成酵素 (β -CAS) によって無毒化されるので、細胞の生理機能に作用を及ぼさないものと考えられてきた。しかし最近になって、オーキシシン型除草剤の除草活性の本体は、エチレン生成の亢進に伴って生成量が増加するHCNの毒性であるとする研究も報告されている [29, 30, 126]。Tittleら [126] は、HCNの作用標的がミトコンド

リア内のチトクロームCオキシダーゼや細胞質に存在する硝酸還元酵素である可能性を考えている。しかしながら、本章でのダイコンにおける結果は、この仮説を支持しない結果となった。切断根からのエチレン生成量についての結果を見ると、24時間以前ではDMPA<DMPA+NBD, DMPA+PPOHという関係がみられた (Fig. 5-4~5-5)。つまり、この時間域での根部でのHCN量も同様にDMPA<DMPA+NBD, DMPA+PPOHであることが予測される。しかし、この時間域内で既にDMPA処理による電解質の漏出は、NBD, PPOH処理によりエチレン作用のみを消去することで軽減され (Fig. 5-4~5-5)、同時に側根の発生阻害も軽減されていた (Fig. 5-6~5-7)。これらの結果は、“オーキシシン型除草剤の活性本体は、エチレンではなくHCNである”とする説に対して疑問を投げかけるものである。著者の結果は、DMPA処理による電解質漏出や側根の発生阻害には、少なくともHCNよりもエチレンが深く関与していることを示しているものと思われる。しかしながら、著者らの仮説を証明するためには、さらに組織中のHCN含量や β -CAS活性などの測定を行う必要があるだろう。

5-5 要 旨

本章では、clomepropのさらに詳しい作用メカニズムを調べることを目的とし、clomepropの活性本体であると考えられている、DMPA処理後に引き起こされるダイコン幼根からの電解質漏出と側根の発生阻害にエチレンが関与しているかについての検討を行った。

- (1) Clomeprop, DMPA処理により電解質漏出が見られた。しかし、エチレン作用の阻害剤であるNBDやPPOHの処理によりその漏出は抑えられた。また、DMPAによる側根の発生阻害もNBD, PPOHによって抑えられた。
- (2) 植物体全体からのエチレン放出量と切断根からのエチレン放出量はDMPA処理直後から顕著に増加した。また、切断根からのエチレン放出量では、処理24時間まではNBDやPPOHを後処理することによりわずかに増加し、減少は見られなかった。これらの結果は、NBDやPPOHにより、エチレン作用を直接的に抑制すると、2次的なエチレン生成抑制が起こらない段階で、DMPA処理により起こる電解質漏出や側根の発生阻害が抑えられたことを示している。
- (3) エバンス・ブルー染色を行った結果、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時間まで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。

いと推察される。

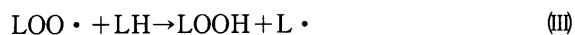
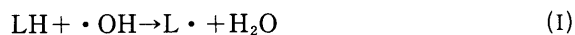
以上の結果より、DMPAがACC synthaseを誘導することによって蓄積するエチレンがclomeprop, あるいはDMPA処理後に引き起こされる電解質漏出に関与しており、根の細胞膜の完全性が失われた結果として側根の生育が阻害されている可能性が強く示唆された。

第6章 DMPA処理後に引き起こされる電解質漏出への活性酸素の関与

6-1 序 論

脂質は細胞膜や細胞内オルガネラ膜の重要な構成因子として生体にとって不可欠な膜機能の発現に関与する。しかし、膜脂質中に局在する高度不飽和脂肪酸は活性酸素によって攻撃されやすい [124]。脂質の過酸化反応は非ラジカルのにも起こるが、一般にラジカル連鎖反応によって進行し、過酸化脂質である脂質ヒドロペルオキシド (LOOH) を蓄積する。その結果として膜機能が直接的あるいは間接的に攪乱され、生体膜傷害が引き起こされると考えられている。

脂質のラジカル連鎖反応の機構は、以下のように考えられている。まず最初に水素が脂質 (LH) から引き抜かれて脂質ラジカル (L \cdot) が生成することにより開始される。この反応にはヒドロペルオキシラジカル (\cdot OOH), ヒドロキシルラジカル (\cdot OH) や鉄-酸素錯体が関与していると考えられている (I)。生じた脂質アルキルラジカル (L \cdot) は基底状態の分子酸素と反応し、脂質ペルオキシラジカル (LOO \cdot) を生成する (II)。さらに脂質ペルオキシラジカルが他の脂質から水素を引き抜いてLOOHとなると共に水素が引き抜かれた脂質は別の脂質ラジカルとなってラジカル連鎖反応が進み (III), 1次生成物としてLOOHが生成蓄積される。そして、2分子の脂質ペルオキシラジカルが反応し合うことにより連鎖反応は停止する (IV)。



一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) と脂質の直接反応でもLOOHが生成するが、この反応はラジカル反応ではなく、連鎖反応は起こらず一回反応で停止する。このような脂質過酸化反応で生成したLOOHはさらに酸化分解を起こし、短鎖のカルボニル化合物やカルボン酸に分解され、生体膜が破壊されていくものと考えられている [124]。

第5章では、DMPA処理後の電解質漏出とエチレンとが密接に関係していることを示したが、この電解質の漏

出は膜の半透性が壊された結果生ずると考えられる。また最近、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、エチレンと活性酸素と電解質漏出の3者間の関係について調べることは重要である。Reddyら [94]は、エチレン生合成経路中、フリーラジカルがACCからエチレンへの変換反応を触媒したと報告しており、Wenzelら [139]はフリーラジカルの消去物質であるアスコルビン酸処理によりエチレン生成量が減少することを示している。また、蓄積したエチレンが O_2 や $^1\text{O}_2$ 等の活性酸素の生成や代謝に関与している可能性も示唆されている [6]。

そこで、本章では、まずDMPA処理後の電解質漏出に活性酸素が関与しているかどうかを活性酸素消去剤を前処理することにより調べ、もし関与しているならば、それはどのような活性酸素種であるのか、そしてそれはエチレンとどのように関わっているのかについて調べることを目的とした。

6-2 材料および方法

植物材料：ダイコン (*Raphanus sativus* L. var. *hortensis* cv. Shogoin) 種子を精製水で湿らせたパーミキュライト上に播種し、グロースチャンパー (30°C/25°C, 昼間 (500 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{S}$, 12hr)/夜間) 内で3日間生育させた。

<1> 根部からの電解質漏出と側根の発生阻害

ダイコン根部を緩衝液 (5mM potassium phosphate, pH5.5) で $5 \times 10^{-5}\text{M}$ に調製したclomeprop, DMPA溶液 (0.5% DMSO, 0.1% Tween 20を含む) に120分間浸漬した後、根部を精製水で洗い、植物体10本ずつを精製水15mlの入ったビーカーに移した。それをグロースチャンパー内で一定時間生育させた後、ビーカー内の電気伝導度を測定した。また、同時に主根の基部下2cmまでの部位に発生する側根の数も測定した。そして、フリーラジカルの消去剤 (10 mM 1,2-dihydroxy benzene-3,5-disulfonate (tiron), 10mM ascorbate), $^1\text{O}_2$ の消去剤 (10mM *L*-histidine, 10mM 1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonate (dabco)), もしくは $\cdot\text{OH}$ の消去剤 (1 mM formate, 1mM benzoate), 0.1mM *N,N'*-bis (3-aminopropyl)-1,4-butane diamine (spermine) をDMPA処理前に10分間処理した結果との比較を行った。また対照区では、ダイコン根部を上記の緩衝液 (0.5% DMSO, 0.1% Tween 20を含む) 中で浸漬処理し、他はすべて薬剤処理区と同一条件下で生育させたものを測定に用いた。

<2> エチレン放出量

[植物体からのエチレン放出量]

上記のように薬剤処理したダイコン幼植物5本ずつを

緩衝液 (5mM potassium phosphate, pH5.5) 500 μ lの
 入ったバイアル瓶に移し, パラフィルムで密封した。一
 定時間後にビーカー内の気層を1 mlずつ採取し, ガスク
 ロマトグラフでエチレン含量を測定した。また, 緩衝液
 で処理したものを対照区とした。

〈3〉 過酸化脂質の測定

脂質の過酸化の測定はチオバルビツール酸法 [19] を
 用い, 過酸化脂質を加水分解させて生じたマロンジアル
 デヒド (MDA) を酸化条件下で2分子のチオバルビツール
 酸 (TBA) と縮合させ, その結果として生じる赤色物質
 を比色する方法で行った。ダイコン根部を緩衝液 (対
 照区), または 1×10^{-4} MのDMPA溶液に180分間浸漬し
 た後, 根部を精製水で洗い, 植物体10本ずつを精製水15
 mlの入ったビーカーに移してグロースチャンパー内で生
 育させた。所定時間毎にビーカー内の精製水を1 ml採取
 し, これと10%トリクロロ酢酸 1 ml, 0.67%TBA溶液 1
 mlを混ぜ合わせた。この混合液を100°Cで25分間加熱し
 た後, 水冷し, 1,300 \times gで10分間遠心分離し, 上清を得
 た。これを分光光度計 (Shimadzu, UV-2100) を用いて
 535nmの吸光度を測定した。MDA濃度は分子吸光係数
 156mM $^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ から算出した [59]。

6-3 結果と考察

〈1〉 根部からの電解質漏出および側根の発生阻害と
 活性酸素との関連

細胞膜の脂質中に局在する高度不飽和脂肪酸は活性酸
 素により攻撃され, その結果として植物内のイオンが膜
 を通して体外に放出されることが知られている [124]。
 そこで, 本章ではDMPAによる電解質の漏出の一要因と
 して活性酸素が関与している可能性について検討した。
 Fig. 6-1~Fig. 6-3はダイコン幼根を 1×10^{-4} Mの
 DMPA溶液に180分間浸漬処理した後の電解質漏出量と
 各活性酸素消去剤を前処理した場合の効果を示したもの
 である。まず, DMPA処理前にフリーラジカルの消去剤
 (10mM tiron, 10mM ascorbate) を処理すると, 処理
 24時間まではほとんど差がなかったが, それ以降では特
 にtironの前処理により電解質の漏出がやや軽減される
 傾向がみられた (Fig. 6-1)。次に一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) の
 消去剤 (10mM *L*-histidine, 10mM dabco) の前処理を
 行った。 $^1\text{O}_2$ は二重結合に対する付加反応であるエン反応
 [27] および環状付加反応 [101, 96] によって不飽和脂
 質を過酸化することが知られている。*L*-histidineや
 dabcoの前処理により, 処理直後からDMPAによる電
 解質の漏出量が大幅に減少した。その効果は特にdabcoの
 前処理で高く, 処理72時間までは無処理とほぼ等しい値
 を示した (Fig. 6-2)。さらにヒドロキシルラジカル (\cdot

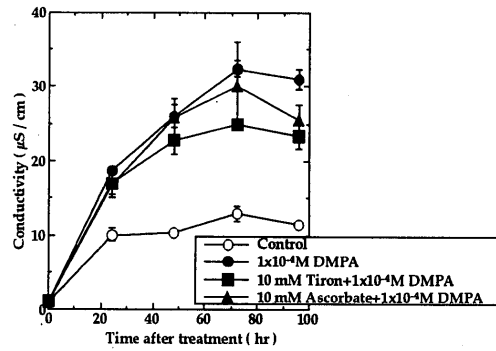


Fig. 6-1 Effect of tiron and ascorbate on electro-
 lyte leakage from DMPA-treated radish
 roots.

Radish roots were soaked with each free radical
 quencher for 10 min and then soaked with 1×10^{-4}
 M DMPA for 180 min. Data represent means \pm
 SE.

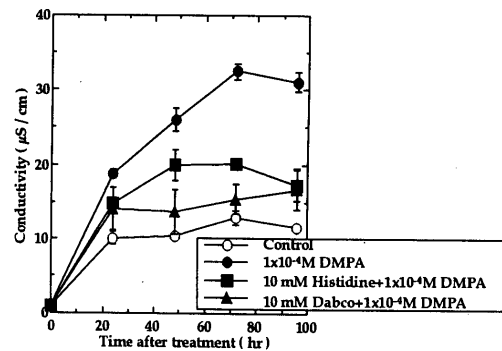


Fig. 6-2 Effect of histidine and dabco on electro-
 lyte leakage from DMPA-treated radish
 roots.

Radish roots were soaked with each singlet oxygen
 quencher for 10 min and then soaked with 1×10^{-4}
 M DMPA for 180 min. Data represent
 means \pm SE.

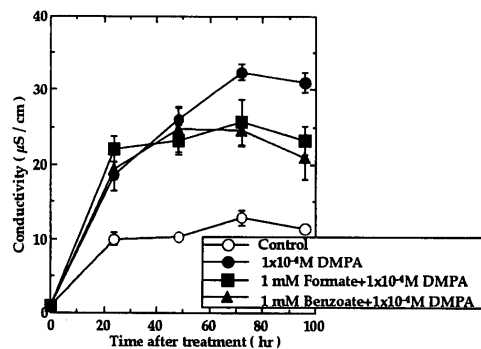


Fig. 6-3 Effect of formate and benzoate on electro-
 lyte leakage from DMPA-treated radish
 roots.

Radish roots were soaked with each hydroxy
 radical quencher for 10 min and then soaked with
 1×10^{-4} M DMPA for 180 min. Data represent
 means \pm SE.

OH) の消去剤 (1mM formate, 1mM benzoate) の前処理も行った。10mM formateと10mM benzoateでは、その薬剤自体の生育抑制効果が高く現れたため、両薬剤とも1mMで前処理を行った。・OHは水素の引き抜き反応により脂質過酸化を引き起こすとされている [12]。・OHの消去剤の前処理では $^1\text{O}_2$ の消去剤ほど高い軽減効果を示さなかったが、処理後72時間、96時間では、DMPA処理による電解質の漏出量をやや減少させた (Fig. 6-3)。これらの結果から、DMPA処理後の電解質の漏出には特に $^1\text{O}_2$ が密接に関与している可能性が示唆された。

抗酸化物質であるspermineの生成にはアミノプロピル構造の供給が必要になるが、この構造部分の供給はエチレン生合成と競合している [103]。したがって、DMPA処理によりエチレン生合成が進むと、spermineの生成量が減少することが予想される。そのため、抗酸化物質であるspermineの減少によって、活性酸素が増加し、電解質漏出を引き起こしている可能性についての検討も行った。0.1mM spermineの前処理を行ったが、DMPA処理後に増加する電解質漏出量の軽減はみられなかった (Fig. 6-4)。この結果は、抗酸化物質であるspermineの減少によって活性酸素の増大が引き起こされ、その結果として電解質の漏出量が増加しているのではないことを示唆している。しかしながら、濃度等の実験条件を変えてさらに検討してみる必要があると思われる。

Fig. 6-5~Fig. 6-6では、さらに細胞死と電解質漏出との因果関係を明確にするため、DMPA濃度を 5×10^{-5} Mにまで減少させ、さらに根部浸漬時間を120分間に短縮してより温和な処理条件下で、同様に電解質漏出量の測定を行った。DMPA処理により、細胞死が起こる処理後12時間 (5章でのデータ) 以前から電解質の漏出が起こっていたが、その電解質漏出はtironやascorbateの前処理により、やや抑制された (Fig. 6-5)。また、histidineやdabcoの前処理によっても同様に減少した (Fig. 6-6)。しかしながら、Fig. 6-2 のような $^1\text{O}_2$ の消去剤前処理による大幅な漏出量の減少は見られなかった。この原因についても今後検討する必要があるだろう。

また、DMPA処理による側根の発生阻害における活性酸素消去剤前処理の効果の測定も行った。tironやascorbateの前処理により、側根の発生阻害がやや軽減された (Fig. 6-7)。またhistidineやdabcoの前処理では、DMPA処理による側根の発生阻害が減少し (Fig. 6-8)、それは特に処理12時間以降で顕著であった。さらに電解質漏出と側根の発生阻害との間には非常に高い正の相関関係 ($r=0.94$) があったことから、DMPA処理による電解質漏出には、エチレンの他に何らかの形で活性酸素が関与しているものと考えられる。さらにはそれ

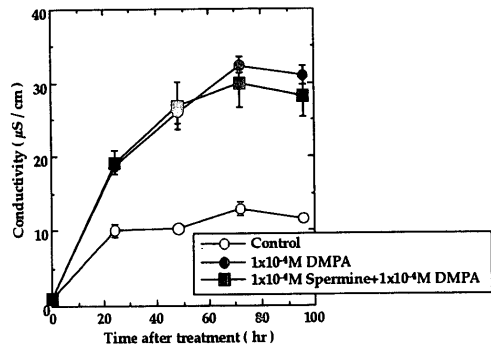


Fig. 6-4 Effect of spermine on electrolyte leakage from DMPA-treated radish roots.

Radish roots were soaked with 1×10^{-4} M spermine for 10 min and then soaked with 1×10^{-4} M DMPA for 180 min. Data represent means \pm SE.

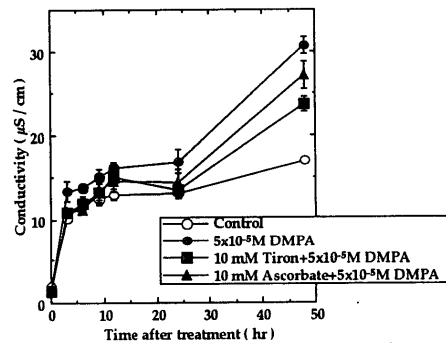


Fig. 6-5 Effect of tiron and ascorbate on electrolyte leakage from DMPA-treated radish roots.

Radish roots were soaked with each free radical quencher for 10 min and then soaked with 5×10^{-5} M DMPA for 120 min. Data represent means \pm SE.

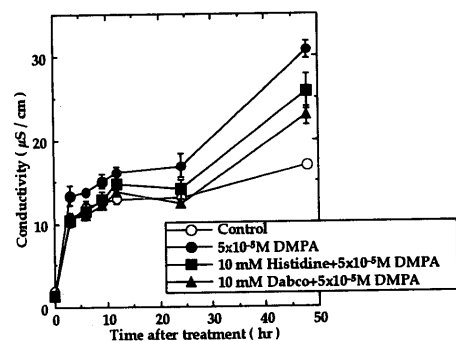


Fig. 6-6 Effect of dabco and histidine on electrolyte leakage from DMPA-treated radish roots.

Radish roots were soaked with each singlet oxygen quencher for 10 min and then soaked with 5×10^{-5} M DMPA for 120 min. Data represent means \pm SE.

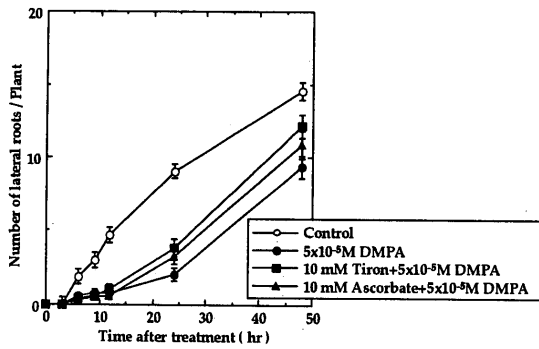


Fig. 6-7 Effect of tiron and ascorbate on DMPA-induced inhibition of emergence of lateral roots.

Radish roots were soaked with each free radical quencher for 10 min and then soaked with 5×10^{-5} M DMPA for 120 min. Data represent means \pm SE.

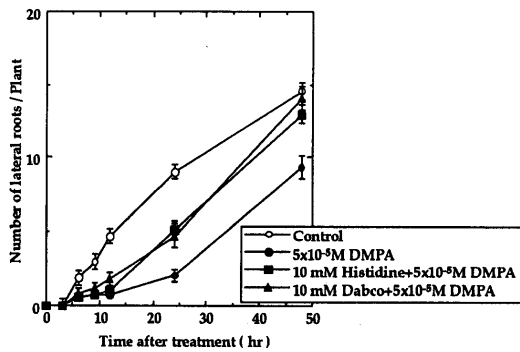


Fig. 6-8 Effect of dabco and histidine on DMPA-induced inhibition of emergence of lateral roots.

Radish roots were soaked with each singlet oxygen quencher for 10 min and then soaked with 5×10^{-5} M DMPA for 120 min. Data represent means \pm SE.

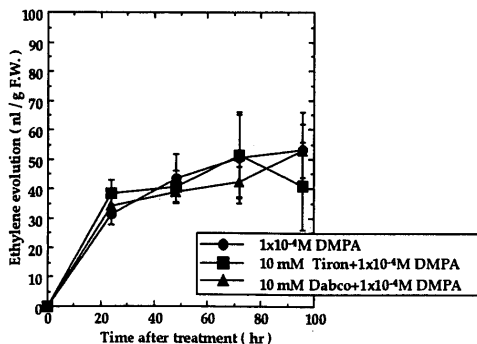


Fig. 6-9 Effect of tiron and dabco on DMPA-induced ethylene production.

Radish roots were soaked with each active oxygen quencher for 10 min and then soaked with 1×10^{-4} M DMPA for 180 min. Data represent means \pm SE.

らの複合効果によって電解質漏出が起こっているのかもしれない。いずれにしても膜の完全性が損失した結果として側根の発生阻害が起こっているものと推察される。

<2> 植物体全体からのエチレン放出量

DMPA処理前に活性酸素消去剤を処理した時、エチレン生成量が変化するかどうかを調べた。tiron, dabcoを前処理しても、DMPA処理によって生成するエチレン量にはほとんど影響を与えなかった (Fig. 6-9)。フリーラジカルはACCからエチレンへの転換を触媒することが示唆されている [139, 147] が、本実験条件においてはフリーラジカルの消去剤であるtiron処理によるエチレン生成の抑制効果は見られなかった。つまり、フリーラジカルはACCからエチレンへの変換反応にはほとんど影響を及ぼしていないものと思われる。また、dabcoの前処理でもエチレン生成量の減少は見られなかったことから、 1O_2 もエチレン生合成系には関与していないものと推察された。DMPA処理による電解質漏出にはフリーラジカルや 1O_2 が密接に関与している可能性が示唆されたが、これらの結果から、フリーラジカルや 1O_2 はエチレン生合成量を増大させることによって電解質の漏出を引き起こしているのではなく、エチレン生合成系とは別に膜の過酸化に直接的に作用している可能性も考えられる。しかし、裴 [6] が示唆しているように、蓄積したエチレンが 1O_2 等の活性酸素の生成に関与しているのかもしれない。したがって、実験条件等を再検討しこれらの関係をさらに明確にしていく必要があるだろう。

<3> 過酸化脂質の測定

活性酸素は細胞膜の脂質中に局在する高度不飽和脂肪酸を攻撃し、脂質のラジカル連鎖反応により多量の過酸化脂質が生成することが知られている [124]。上述のようにダイコン幼根からの電解質の漏出に活性酸素が関与している可能性が示唆されたため、DMPA処理後の膜の過酸化脂質量の測定を行った。無処理の幼根では、少しずつMDA濃度が増加し、処理96時間後で $0.38 \mu\text{M}$ となった (Fig. 6-10)。DMPA処理後のMDA濃度は処理直後から急激に増大し、処理96時間後では $1.19 \mu\text{M}$ となった。しかしながら、DMPA処理前にdabco, tironを処理すると、処理直後からのDMPA処理によるMDA濃度の増大が軽減された。どちらかという、dabcoの方がtironよりも高い軽減効果を示した。これらのことからDMPA処理により膜の脂質が過酸化されている可能性が示唆された。そしてそのDMPA処理による膜脂質の過酸化には活性酸素 (特に一重項酸素) が密接に関与していると思われる。電解質漏出の程度と過酸化脂質量との間には高い正の相関関係 ($r=0.88$) が見られたこと等を考慮すると、DMPA処理により何らかの形で活性酸素が発生し、その

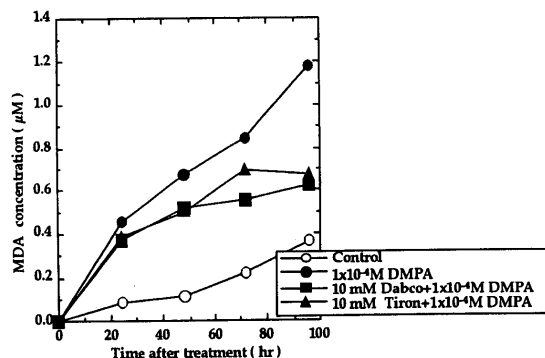


Fig. 6-10 Effect of dabco or tiron on MDA release from radish roots treated with 1×10^{-4} M DMPA.

活性酸素によって膜脂質が過酸化されることで膜機能および膜構造が破壊され、電解質漏出が起こっている可能性がある。しかしながら、5章ではDMPAによる電解質漏出はエチレンによって引き起こされることが示唆されているため、エチレンと活性酸素がどのように関連しているのか、つまり、生成したエチレンが $^1\text{O}_2$ 等の活性酸素の生成に関与しているのか、それとも活性酸素はエチレンとは全く無関係に生成され、各々が独立して電解質漏出の原因物質となっているのかについて、今後さらに明確にしていく必要があるだろう。

6-5 要 旨

5章ではDMPA処理後に起こるダイコン幼根からの電解質漏出は、エチレンによって引き起こされている可能性があることが示唆されたが、本章ではエチレンの他にさらに活性酸素が関与しているかどうかの検討を行った。

- (1) Clomeprop, DMPA処理により処理直後から電解質漏出が見られたが、フリーラジカルの消去剤 (10 mM tiron, 10mM ascorbate), $^1\text{O}_2$ の消去剤(10mM *L*-histidine, 10mM dabco), $\cdot\text{OH}$ の消去剤 (1mM formate)を前処理することにより軽減された。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。
- (2) Clomeprop, 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。
- (3) フリーラジカルの消去剤, $^1\text{O}_2$ の消去剤前処理後のエチレン量を測定したが、それらの活性酸素消去剤はDMPA処理後のエチレン生成量に影響を与えなかった。
- (4) 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

の前処理によってDMPA処理後の過酸化脂質量が減少した。

また、電解質漏出(a)や側根の発生阻害の程度(b)と過酸化脂質量(c)の間には高い正の相関関係 (aとb: $r=0.94$, bとc: $r=0.87$, aとc: $r=0.88$)が見られた。

以上の結果より、clomeprop, DMPA処理後に起こる電解質漏出には、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。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電解質の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。

第7章 総合考察

2,4-Dに代表されるフェノキシ酢酸系除草剤は、植物体内にオーキシシン作用を有する物質が過剰に存在する状態を引き起こし、これらを処理された植物では正常な生長制御が維持できなくなって枯死に至ると理解されている[90]。このような作用を有する除草剤は第二次世界大戦以降の長期にわたって広く使用され、収穫量の増大のみならず農作業の省力化と合理化に大きな役割を果たしてきた。そしてその普及に伴い、現在までにオーキシシン型除草剤に関する研究報告は多数発表されてきた。しかしながら、オーキシシン型除草剤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効果に関与しているのかに関しては完全に理解されるまでには至っていない。近年、オーキシシン型除草剤処理後に生成される多量のエチレンやHCNが、この除草剤に対して感受性の大きい植物に見られる形態異常や殺草作用の主因となっている可能性を示唆する報告も出されている [29, 30, 33, 34, 35, 36, 89, 126]。しかし、HCNの関与については、植物の持っている β -CAS (HCNの解毒酵素) 活性の差や、植物のHCNに対する感受性の差についてさらに検討していく必要があり、またエチレンに関しても、もし殺草活性の一要因であったとしても、どのような作用が直接的に関与しているのかについてさらに研究されなければならないと思われる。また、オーキシシン型除草剤quinmeracによるACC合成促進作用の結果として蓄積するアブシジン酸 (ABA) が、生育抑制効果に深く関与しているとした報告もなされている [102]。しかし、これに関してもACC合成の後、どのような経路でABAが蓄積するのかについては明らかにされておらず、今後さらに検討していかなければならないだろう。

本研究ではこれらの諸点を考慮し、オーキシシン型除草

剤clomepropの作用機構を解明するために、特にエチレンの作用に焦点を当てて検討した。

Clomepropの作用機構を調べるにあたり、まず初めにclomeprop自身がオーキシシン活性を有するかどうかの検討を行った。オーキシシン活性の有無は、トウモロコシ子葉鞘伸長試験、ヤエナリ下胚軸屈曲試験などのオーキシシンに特異的な生物検定、および推定上のオーキシシン受容体との結合活性を調べるにより行った。本研究で用いたオーキシシン結合蛋白質は、現時点でオーキシシン受容体であることの確証は得られていないが、少なくともオーキシシン構造を認識し、オーキシシンの生理反応の発現に関与している蛋白質であることが示唆されているものである。その結合試験の結果は、オーキシシン結合蛋白質に結合している³H-NAAとの置換を測定したものであるが、clomepropはこの結合を阻害しなかったが、DMPAは阻害することが示された。つまり、間接的ではあるがDMPAはオーキシシンとして認識されたが、clomepropは認識されなかったことが示された。また、トウモロコシ子葉鞘伸長試験、ヤエナリ下胚軸屈曲試験などのオーキシシンの生物検定においても、DMPAは非常に強いオーキシシン活性を示したのに対し、clomepropは弱い活性しか示さなかった。トウモロコシ、ヤエナリでのエチレン生成促進試験では、DMPAは処理直後からエチレンを生成し始めたが、clomepropは処理2時間以降からエチレンを生成し始めた (Fig. 2-6, 2-10)。エチレン生成促進作用は、膜結合型のABPではなく、可溶性のABPへの結合が引き金となっている可能性が高いと考えられている。ClomepropはDMPAよりも脂溶性であるため、容易に細胞内に取り込まれ、より早く可溶性ABPと結合して、DMPAよりも短時間にエチレン生成を促進し始める可能性も考えられるが、実際には、DMPA処理の方がclomepropよりも短時間にエチレン生成を促進した。これらの結果は、clomeprop自身はオーキシシン作用を持たず、植物体内でDMPAに代謝された後、そのDMPAの持つオーキシシン作用によって初めて殺草作用を発現するようになる可能性が強いことを示している。さらに、第3章や第4章で行ったエチレン合成やACC synthase活性の実験では、DMPAは処理直後からエチレン量の増大とACC synthase活性の増加を引き起こすことが確認されたが、clomepropでは処理後約10時間からそれらの増大がみられた。また、第5章で行った電解質漏出の結果でも、clomepropとDMPAの電解質漏出開始までの時間に、大幅なずれが見られた。これらの時間的なずれも、“clomeprop自身はオーキシシン活性を持たないか、あるいは持っていたとしても非常に弱い”という上記の仮説を支持するものであると思われる。

それでは、DMPAの持つような様な生理作用が直接的に殺草活性に関与しているのだろうか。本研究では、DMPA処理後に著しく増加するエチレンに着目し、DMPAによる殺草作用におけるエチレンの役割について検討した。DMPA処理により、ダイコン幼植物では葉柄間角度の増大、葉のカーリング、伸長生長の阻害等の形態異常が起こる。しかし、DMPA処理前にエチレン生成抑制剤 (AOA) を処理すると、それらの形態異常は軽減される傾向がみられた。そしてさらに、DMPA処理後にエチレン作用阻害剤 (NBD) を処理した場合、DMPA処理による形態異常はほぼ完全に抑えられた。NBD等のシスオレフィン構造を有する化合物はエチレン受容体には結合するものの、エチレン作用は発揮しないため、結果としてエチレン作用を阻害することが知られている [112, 145]。NBD処理により、エチレンの作用を阻害したことで形態異常はほぼ完全に抑制されたことから、DMPA処理によって増加するエチレンが、形態異常を引き起こしている可能性が極めて高いものと推察される。AOAはエチレン生成抑制効果が低いため、エチレン生成が完全には抑えられず、その結果、形態異常の抑制効果が小さかったものと思われる。また、clomepropやDMPAによって生成されたエチレン量と形態異常の度合いの間には強い正の相関性がみられた (Table 3-1, Fig. 3-4, Fig. 3-5)。

次にDMPAの有するどのような作用がエチレン合成の促進に結びついているのかについて検討した。エチレン合成の律速酵素であるACC synthaseはオーキシシン類によって活性が増加することが知られている [1, 33, 76, 126, 147]。そこで、まずclomeprop, DMPA処理後のACC synthase活性の変化を測定した。その結果、DMPAは処理直後からACC synthase活性を増加させることが示された。Clomepropは酵素活性を増大させるまでにより時間を要したものの、次第に酵素活性を増加させた。次にACCからエチレンの反応を触媒する酵素であるACC oxidase活性の変化について測定した。以前から、大気汚染物質等のストレスによってACC oxidaseが活性化され、それがエチレン量の増加に関与していることが報告されている [57, 63, 94]。しかし、clomepropやDMPA処理ではACC oxidase活性の増大は起こらなかった。つまり、DMPAによるエチレン量の増大は、ACC synthase活性の増大が主因となって引き起こされていると思われる。しかしながら、NAA処理によってACC oxidaseのmRNAが増大したという報告もある [85] ことから、今後の課題として、ACC oxidaseのcDNAを単離し、この酵素の遺伝子がDMPAによって特異的に誘導されるかどうかを検討する必要があるだろう。

ClomepropやDMPAは処理部位(茎葉, 根部)の違いにより生育抑制効果や形態異常の程度に大きな差があることが知られている [110, 118, 140, 141] が, これはエチレン量の差で説明することが可能であろうか. この疑問を解決するために, 茎葉処理と根部処理でのエチレン量, 形態異常の程度, ACC synthase活性の変化を量的, 時間的な面から検討した. まず, 葉柄間角度の増大の程度を順序化すると以下ようになった.

(DMPA根部処理>DMPA茎葉処理>clomeprop茎葉処理>clomeprop根部処理≒無処理)

また, これはエチレン生成量やACC synthase活性でも同じ順序となった. これらの結果と上記の, “NBD処理により, エチレンの作用を阻害したことで形態異常はほぼ完全に抑えられた” という結果等から, やはりこれらの薬剤による形態異常はエチレンによって引き起こされているものと思われる. また, 植物に対する毒性とDMPAの茎葉部中の存在量とは高い正の相関関係があることが示されている [140] ことから, 茎葉処理と根部処理間とで茎葉部中のDMPA量に差が生じ, その結果としてエチレン量に差が生じることで形態異常にも差が出ている可能性が極めて高いものと推測される. DMPAを根部処理すると, 処理直後から急激なエチレン量とACC synthase活性の増大がみられたが, clomepropの根部処理では, 処理後約12時間以降からエチレン量やACC synthase活性が増加し始め, 量的にも非常にわずかであった. Wongwattana and Ishizuka [141] は, ダイコンにclomepropを24時間根部浸漬処理すると, 処理終了直後(浸漬開始から24時間後)の茎葉部中に, DMPAが存在していることを確認している. 本実験ではclomepropを12時間根部処理しているが, Wongwattana and Ishizuka [141] の実験を考慮すると, エチレン量が増加し始めた, 処理後12時間(浸漬開始から24時間後)では茎葉部中にDMPAが存在していることが予測される. したがって, ここでの試験で見いだされたclomepropとDMPAのエチレン生成開始時間のずれも, “clomeprop処理によるエチレン生成は主にDMPAに起因している” という仮説を支持するものである. このときのエチレン量は植物体全体からのエチレン放出量を測定しているが, エチレンは特に茎葉部で多量に生成されることから, 本実験でのエチレン量は茎葉部でのエチレン放出量のある程度反映しているものと思われる. つまり, DMPAは根部処理しても素早く茎葉部に移行してエチレン生合成を促進するが, clomepropでは根部から茎葉部にあまり移行できず, したがってエチレンをわずかしか生成しなかったものと推測される. また, WongwattanaとIshizuka [140] もclomepropは根部から茎葉部への移行が少ないことを報告し

ていることからこの可能性が示唆される. さらにclomepropからDMPAへの分解は, 根部ではなく主に茎葉部で起こる [118] ことも, これら2剤によるエチレン発生量の差をさらに広げる要因となっていると思われる. Clomepropを茎葉処理した場合にも, エチレン量やACC synthase活性の増大が起こるが, やはりそれらの開始までには時間がかかった. しかし処理72時間後のエチレン量は, 根部処理と比較すると約7倍も多かった. Clomepropは茎葉部から素早く吸収されることが報告されている [118, 140] ことから, 茎葉処理されたclomepropはより速やかに吸収され, そこでDMPAへと代謝分解されるために多量のエチレンを放出したものと思われる. これらの結果から, 処理部位(茎葉, 根部)での形態異常の程度の差には, 茎葉部, 根部でのclomeprop, DMPAの吸収, 移行, 代謝の差に起因する茎葉部中のDMPA含量の差が大きく関与しているものと思われる. その茎葉部中でのDMPAの蓄積までの時間差や量的な差が結果的にエチレン生合成の量的, 時間的な差を導き, 形態異常の程度差を生じさせている可能性が高いと考えられる. しかし, 上述のようなメカニズムで生成した内生の(ACC synthase-ACC oxidase系の)エチレンの作用は外から与えたエチレンのそれとは異なる可能性もあり, この点については更なる検討が必要である.

DMPA処理によって増加するエチレンが実際に形態異常を引き起こしているとしても, それが殺草活性に直接的に結びついているのかについては疑問の余地がある. もしエチレンが殺草効果に直接的に関与しているとすれば, エチレンのどの様な作用によってであろうか. そこでDMPA処理によって起こる根部からの多量の電解質の漏出へのエチレンの関与について検討した. DMPAを根部処理するとダイコン幼根から電解質の漏出と側根の発生阻害が起こったが, これらの現象は, エチレン作用阻害剤であるNBDやPPOHを後処理することにより軽減された. この結果はエチレンが電解質の漏出に密接に関与している可能性があることを示唆している. また, エチレンは電解質漏出に先だって蓄積されていた. さらに, その電解質漏出は, DMPAによる細胞死以前に起こっていたことから, 電解質漏出は細胞死の結果として起こっているものではなく, エチレンによって起こっている可能性がある. 膜機能の変化に対するエチレンの効果については未だ明確になっていないが, 植物ホルモンとしてのエチレンの生理作用の研究において, エチレンは植物組織の膜透過性を増大させることが報告されている [23, 42, 117]. SuttleとKende [116] は, エチレンが膜のリン脂質レベルを減少させることを示しており, Faragherら [23] は, エチレンが膜脂質の物理的状態を

変化させることを示すことにより、エチレンによる膜の透過性増大を説明している。したがって、今後はDMPA処理後のエチレンと膜脂質との関連についてさらに検討していく必要があると思われる。

一方、上述したようにオーキシシ型除草剤の殺草活性の本体はHCNではないかとする説も報告されている [29, 30, 126]が、本研究ではDMPA処理後の電解質漏出にはHCNよりもエチレンがより重要な役割を果たしていることを示唆する結果が得られた。エチレン生合成経路で、エチレンとHCNは等量生成される [100, 148] ことから、薬剤処理後のエチレン量からHCN量を予想することが可能である。本研究では、エチレン作用の阻害剤 (NBD, PPOH) 処理を行ったとき、少なくとも処理24時間まではエチレンの生成は抑制されず、むしろより多くの生成が起こることが示された。この時HCN生成も同様に起こっていると考えられるが、DMPA処理による電解質の漏出や側根の発生阻害はNBD, PPOH処理によりエチレンの作用のみを抑えることで軽減されていた。このことは、DMPA処理による電解質漏出や側根の発生阻害には、少なくともHCNよりもエチレンが深く関与していることを示しているものと思われる。このように生育抑制効果とエチレンが密接に関与しているのであれば、ETHのようなエチレン発生剤を処理すればDMPAと同様の効果を生むのではないか、という疑問も生じてくる。しかし、ETHのように外来的にエチレンを発生させるような薬剤では、植物体に有害な作用を与えるようなエチレンを発生させるためには、非常に高濃度を必要とする。それに対しclomeprop処理では、より低薬量で多量のエチレンを発生する。これはDMPAがエチレン生成系に直接作用し内生的にエチレンが生成されるためであると考えられる。さらに、clomepropは他のエチレン発生剤と異なり、イネ—感受性広葉雑草間に選択性を持つという点で除草剤として使用することができる。Clomepropは、イネにおいてDMPAから3-メチル基の水酸化された3-CH₂OH-DMPAとそのglucose抱合体になる解毒代謝速度が著しく速いものに対し、感受性広葉植物では、その代謝速度が遅いことが示されている [141]。つまり、clomepropからDMPAへの代謝と、DMPAから解毒代謝産物への変換速度に植物種間差があり、その結果としてDMPAの体内濃度に差異が引き起こされることで、選択性が発現している。したがって、clomepropは単なるエチレン発生剤として作用するだけでなく、“選択性を持つ”という、除草剤としての重要な要素を兼ね備えた薬剤であるということが出来る。

DMPA処理による電解質漏出にはエチレンが深く関与していることを示してきたが、それでは、DMPA処理

による電解質漏出はエチレンのみによって起こるのであろうか。細胞膜の脂質中に局在する高度不飽和脂肪酸は各種活性酸素分子種によって攻撃される [124] ため、活性酸素は電解質漏出と深く関与していることが知られており、またエチレンの蓄積が活性酸素の生成に関与している可能性を示唆する報告もある [6]。このことから、DMPA処理による電解質漏出と活性酸素との関連についても調べることにした。その結果、DMPA処理後の電解質漏出は、フリーラジカルの消去剤 (tiron, ascorbate), 一重項酸素 (¹O₂) の消去剤 (histidine, dabco), およびヒドロキシルラジカル (\cdot OH) の消去剤 (formate, benzoate) の前処理によって軽減されたが、それは特に¹O₂の消去剤の前処理によって顕著であった。また、その消去剤の前処理はDMPAによる側根の発生阻害にも軽減効果が大きかった。これらのことから、DMPA処理後の電解質漏出や側根の発生阻害にはエチレンの他に活性酸素 (特に¹O₂) が密接に関わっている可能性がある。活性酸素による膜脂質の過酸化が電解質漏出の一因となっているならば、薬剤処理後に過酸化脂質量が増大しているはずである。そこで、DMPA処理後の過酸化脂質量の測定を行った。その結果、無処理ではわずかな増加しか見られなかったのに対し、DMPA処理では処理直後から急激な増大が見られた。そして、その増加はdabcoやtironを処理することにより軽減された。この結果もまた、DMPA処理により引き起こされる膜脂質の過酸化に活性酸素 (特に¹O₂) が密接に関与していることを示唆している。次にこの活性酸素とエチレンとの関係を調べるために活性酸素消去剤処理後のエチレン量を測定した。フリーラジカルはACCからエチレンへの転換を触媒することが示唆されている [139, 147] が、本実験条件下ではtironでもdabcoの前処理でもエチレン量の減少は見られなかった。つまり、フリーラジカルや¹O₂はエチレン生成量を増加させることによって電解質の漏出を引き起こしているのではなく、エチレン生合成系とは無関係に作用している可能性が考えられた。しかし、増大したエチレンが活性酸素の生成に関与していることも考えられる。したがって、エチレンと活性酸素との関わりについては今後さらに検討していく必要があると思われる。

これらの結果から、現時点で考えられる感受性植物でのclomepropの作用機構についてまとめると、Fig. 7-1のようになる。

Clomepropは植物体内に吸収された後、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となる。DMPAに変化したことによりオーキシシ結合蛋白質に結合することができ、オーキシシ活性を有

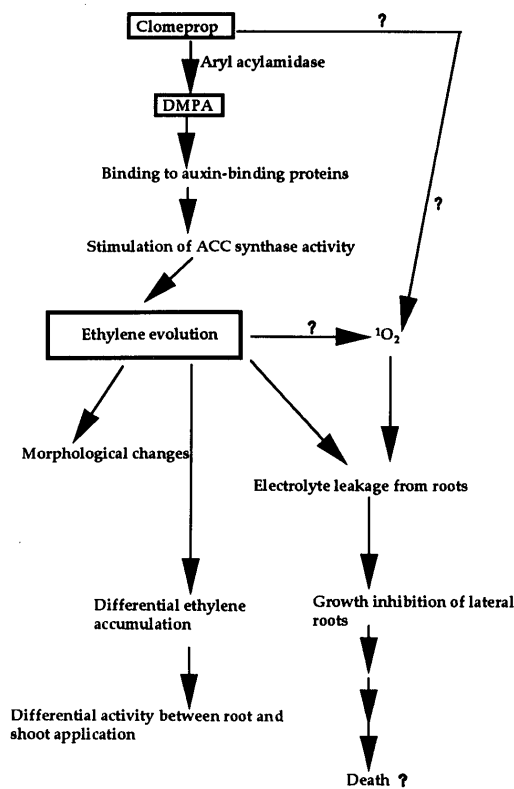


Fig. 7-1 Proposed mechanism for the involvement of ethylene in clomeprop-induced injury.

するようになる。そしてDMPAがACC synthase活性を増大させることにより、エチレンが大量に生成され、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が起こっている可能性がある。このエチレンの作用が、clomeprop処理から植物体枯死に至るメカニズムに大きく関与していると思われる。また、薬剤処理による電解質漏出にはエチレンの他に 1O_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、さらに検討していかなければならないだろう。さらに、エチレン作用の生化学的な機構、オーキシシン型除草剤の他のオーキシシン作用との関連についても詳しく追究する必要がある。

また、clomepropは生理生化学的に選択性を有する除草剤であるが、以上の結果から、clomeprop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、clomeprop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。また、本研究から、clomepropの生育抑制作用にはエチレン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, ACC oxidase)が欠損している場合やエチレン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。

上述してきたように、本研究においてオーキシシン型除草剤clomepropの作用機構について検討した結果、増加したエチレンが感受性植物でのclomepropによる形態異常や根部での電解質漏出と密接に関与していることが示唆された。このような植物ホルモン系(特にエチレン)の作用機構に関する研究は、今後の、高度安全性除草剤の開発や適用に向けての有益な情報を提供するものであると思われる。

摘 要

Clomeprop (2-(2,4-dichloro-*m*-tolylxy)propionanilide)は、水稲用選択性除草剤で、ノビエを除く一年生雑草およびマツパイ、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。本剤はオーキシシン活性を有し、感受性植物に対して、いわゆるオーキシシン型除草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。そこで本研究では、clomeprop処理から枯死までのメカニズムを解明することを目的とし、特にclomeprop処理によって促進されるエチレン生合成との関連を中心に作用メカニズムについての検討を行った。結果は、章別に以下のように要約される。

第2章では、まずclomeprop自体が本来オーキシシン作用を有するかどうかの検討を行った。その結果、clomepropは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にほとんど結合しなかったが、clomepropの加水分解代謝物(DMPA)は結合した。さらに、DMPAはclomepropよりもかなり高い生育阻害活性やオーキシシン活性を示したことから、clomeprop自身はオーキシシン活性をほとんど示さず、植物体内でDMPAに加水分解された後に初めてオーキシシン結合蛋白質にオーキシシンとして認識され、オーキシシン活性を示している可能性が高いことが示唆された。

第3章では、clomepropやDMPA処理後に起こる葉のカーリング、葉柄間角度の増大、伸長阻害といった形態異常にエチレンが関与しているかどうかの検討をダイコン幼植物を用いて行った。

Clomeprop, DMPA処理後に現れる、葉のカーリングや葉柄間角度の増大はエチレン生成阻害剤(AOA)やエチレン作用阻害剤(NBD)を処理することにより軽減された。また、エチレン生成促進剤ethephone(ETH)処理

により、著しく第1葉の伸長抑制が起こった。そして、clomeprop, DMPA処理によりエチレン量の増加, ACC synthase活性の増大が起こったが, ACC oxidase活性の増大は見られなかった。これらの結果から, clomepropは植物体内でDMPAへと変化し, DMPAがACC synthase活性を増大させることにより, エチレン生成量の増加を引き起こしている可能性が高いことが示された。そして, その結果として蓄積したエチレンが形態異常を引き起こしているものと推察された。

Clomeprop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。そこで第4章では, まずclomeprop, DMPAのダイコン根部処理後の形態異常におけるエチレンの関与について明らかにし, そしてさらに第3章の茎葉処理での結果と比較することにより, 両処理後における形態異常の差異の発現要因についての知見を得ることを目的とした。その結果, 根部処理でもDMPAがACC synthase活性を増大させ, 結果として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。また, 茎葉と根部処理間で形態異常の程度が異なるのは, 茎葉, 根部でのclomepropとDMPAの吸収, 移行, 代謝の差によって引き起こされる, 茎葉部中のDMPA量の差が大きく関与している可能性が高いことを示した。そしてその茎葉部中のDMPA量の差がエチレン生合成の量的, 時間的な差を導き, 結果的に両処理間での形態異常の程度の差を引き起こしているものと推察された。

第5章では, clomepropやDMPA処理後に起こるダイコン幼根からの電解質漏出や側根の発生阻害にエチレンが関与しているかについての検討を行った。その結果, clomepropやDMPA処理により電解質漏出に先立ってエチレン量の増加が見られた。また, エチレン作用阻害剤(NBDやPPOH)を処理することによってエチレン作用を直接的に抑制すると, これらによる2次的なエチレン生成抑制が起こらない段階で, DMPA処理により現れた電解質漏出や側根の発生阻害が抑えられた。また, clomepropやDMPAの処理後の電解質漏出は時間的に細胞死よりも前に起こっていた。これらのことから, DMPAがACC synthase活性を増大させることによって蓄積するエチレンが両薬剤処理後に引き起こされる電解質漏出に関与しており, その膜の完全性損失の結果として側根の生育が阻害されている可能性が強く示唆された。

第6章では, DMPA処理後に起こるダイコン幼根からの電解質漏出に, エチレンの他にさらに活性酸素が関与しているかどうかの検討を行った。その結果, clomeprop, DMPA処理後の電解質漏出や側根の発生阻害は,

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, benzoate)を前処理することにより軽減された。そしてそれは特に $^1\text{O}_2$ 消去剤の前処理により顕著に現れた。しかし, フリーラジカルの消去剤, $^1\text{O}_2$ の消去剤の前処理はDMPA処理後のエチレン生成量に影響を与えなかった。また, 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見られた。さらに電解質漏出や側根の発生阻害の程度と過酸化脂質量との間には高い正の相関関係があった。これらの結果から, clomeprop, DMPA処理後に起こる電解質漏出には, 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深く関与している可能性がある。そしてその活性酸素はエチレン生合成量を増大させることによって電解質の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ことも示唆された。

以上の結果から, 感受性植物におけるclomepropの作用機構は次のようになるものと推察された。Clomepropは植物体内でアリルアシルアミダーゼによってDMPAに加水分解される。そしてそのDMPAが, オーキシン結合蛋白質に結合することで初めてオーキシン作用を発現するようになる。その後, DMPAはACC synthase活性を増大させることにより, 多量のエチレンを生成させる。このエチレンが茎葉部での形態異常や根部での電解質漏出, 側根の発生阻害といった症状を引き起こす。このDMPAの作用が, clomeprop処理から植物体枯死に至るメカニズムに大きく関与しているものと思われる。また, DMPA処理後の電解質漏出には, 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, エチレンと $^1\text{O}_2$ がどの様に関わっているのかについては, 今後さらに検討する必要があるだろう。

謝 辞

本研究遂行にあたり御指導, 御教示を賜りました, 筑波大学応用生物化学系教授, 臼井健二博士に深く感謝申し上げます。

本実験遂行の全般に関しておよび本稿をまとめるにあたり, 常に多大なる御指導, 御鞭撻を賜りました, 筑波大学応用生物化学系助教授, 松本宏博士に深く感謝申し上げます。

また, 終始適切な御教示と貴重な御助言を賜りました, 筑波大学名誉教授, 石塚皓造博士に深く感謝申し上げます。

筑波大学農林学系教授, 岩堀修一博士, 筑波大学応用

生物化学系教授、長谷川宏司博士には、本稿の作成にあたり、大変貴重な御助言を頂きました。深く感謝申し上げます。

筑波大学応用生物化学系助教授、小林勝一郎博士、筑波大学応用生物化学系講師、沈利星博士、農林水産省農業研究センター、李度鎮博士には、本研究を進めるにあたり、終始御指導、御助言を頂きました。併せて、ここに深く感謝の意を表します。

筑波大学応用生物化学系助手、穴井豊昭博士にはノーザンハイブリダイゼーションを行うにあたり、御丁寧な実験指導、御助言を賜り、さらにはプローブまで恵与していただき、深く感謝申し上げます。

また、本実験遂行の為に、開発途中であるPPOHを特別に供与していただきました。協和発酵工業株式会社、そしてclomeprop、その加水分解体DMPAを提供していただきました三菱油化(株) (現 ローヌプーラン油化アグロ(株)) に深く感謝申し上げます。

最後になりましたが、終始暖かい励ましを頂き、様々な形でご支援していただきました。筑波大学植物栄養・生長制御学研究室の諸氏に深く感謝致します。

引用文献

- [1] Abeles, F.B. (1968): Herbicide-induced ethylene production: Role of the gas in sublethal doses of 2,4-D, *Weed Sci.*, 16, 498-500.
- [2] Abeles, F.B. (1973): Ethylene in Plant Biology, Academic Press, New York, p.p. 302.
- [3] Abeles, F.B., P.W. Morgan and M.S. Saltveit (1992): Ethylene in Plant Biology, 2nd ed., Academic Press, San Diego
- [4] Abu-Irmaileh, B.E., L.S. Jordan, H. Kumamoto (1979): Enhancement of CO₂ and ethylene production and cellulase activity by glyphosate in *Phaseolus vulgaris*, *Weed Sci.*, 27, 103-106.
- [5] Ashton, F.M. and A.S. Kraft (1981): Mode of Action of Herbicides, Wiley Interscience, New York, p.p. 272.
- [6] 裴 公英(1995): 大気汚染物質による植物障害におけるエチレン生成の関与—エチレン生成酵素の特異的な誘導—博士学位論文, 筑波大学 8-22.
- [7] Baker, J.E., C.Y. Wang, M. Lieberman and R. E. Hardenburg (1977): Delay of senescence in carnations by rhizobitoxine analogue and sodium benzoate, *Hort. Science*, 12, 38-39.
- [8] Bal, A.K., D.P.S. Verma, H. Byrne and G.A. Maclachlan (1976): Subcellular localization of cellulases in auxin-treated pea, *J. Cell Biol.*, 69, 97-105.
- [9] Barbier-Brygoo, H., G. Ephritikhine, D. Klambt, M. Ghislain and J. Guern (1989): Functional evidence for an auxin receptor at the plasmalemma of tobacco mesophyll protoplasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 891-895.
- [10] Barbier-Brygoo, H., G. Ephritikhine, W.H. Shen, A. Delbarre, D. Klambt and J. Guern (1990): In: Activation and Desensitization of Transducing Pathways (eds. by Konijn, T.M., M.D. Houslay, P.J.M. van Haaster), NATO ASI Series, Vol. H44, 231-234., Springer-Verlag, Berlin
- [11] Beader, J.R. (1980): Plant hormones and other growth substances—their background, structure and occurrence. In: Encyclopedia of Plant Physiology New Series Vol. 9 (ed. by Pirson, A. and M.H. Zimmermann) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p.p. 9-80.
- [12] Benedetti, A., M. Comporti and H. Esterbauer (1980): Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids, *Biochem. Biophys. Acta*, 620, 281-296.
- [13] Beyer, E.M., Jr. (1976): A potent inhibitor of ethylene action in plants, *Plant Physiol.*, 58, 268-271.
- [14] Bilanz, J., H. MacDonald, P.J. King and A. Sturm (1993): A soluble auxin-binding protein from *Hyoscyamus muticus* is a glutathione S-transferase, *Plant Physiol.*, 102, 29-34.
- [15] Blumenthal, S.G., H.R. Hendrickson, Y.P. Abrol and E.E. Conn (1968): Cyanide metabolism in higher plants. III. The biosynthesis of β-cyanoalanine, *J. Biol. Chem.*, 243, 5302-5307.
- [16] Cameron, A.C., C.A.L. Fenton, Y. Yu, D.O. Adams and S.F. Yang (1979): Increased production of ethylene by plant tissues treated with 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, *Hort. Science*, 14, 178-180.
- [17] Corbett, J.R., K. Wright and A.C. Baillie (1984): The biochemical mode of action of pesticide, Second Edition. Academic Press, London, p.p. 180-192.
- [18] Cross, J.W. and W.R. Briggs (1978): Properties of

- a solubilized microsomal auxin-binding protein from coleoptiles and primary leaves of *Zea mays*, *Plant Physiol.*, 62, 152-157.
- [19] Derrick, P.M., A.H. Cobb and K.E. Pallett (1988): Ultrastructural effect of the diphenyl ether herbicide acifluorfen and experimental herbicide, M & B 39279, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 32, 153-163.
- [20] Der Straeten, D., L. Van Wiemeersch, H.M. Goodman and M. Van Montagu (1990): Cloning and sequence of two different cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 4859-5863.
- [21] Dohrmann, U., R. Hertel and H. Kowalik (1978): Properties of auxin-binding sites in different subcellular fractions from maize coleoptiles, *Planta*, 140, 97-106.
- [22] Faragher, J.D. and S. Mayak (1984): Physiological responses of cut rose flowers to exposure to low temperature: Changes in membrane permeability and ethylene production, *J. Exp. Bot.*, 35, 956-974.
- [23] Faragher, J.D., E. Wachtel and S. Mayak (1987): Changes in the physical state of membrane lipids during senescence of rose petals, *Plant Physiol.*, 83, 1037-1042.
- [24] Feldwisch, J., R. Zettl, F. Hesse, J. Schell and K. Palme (1992): An auxin-binding protein is localized to the plasma membrane of maize coleoptile cells: Identification by photoaffinity labeling and purification of a 23-kDa polypeptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 475-479.
- [25] Fujino, D.W., M.S. Reid and S.F. Yang (1980): Effects of amino oxycetic acid on postharvest characteristics of carnation, *Acta Hort.*, 113, 59-64.
- [26] Garbers, C. and C. Simmons (1994): Approaches to understanding auxin action, *Trends in Cell Biology* 4, 245-250.
- [27] Gollnick, K., and H.J. Kuhn (1979): Ene-reaction with singlet oxygen, In: Singlet Oxygen, (eds. by Wasserman, H.H. and R.W. Murray), Academic Press, New York, p.p. 287-427.
- [28] Goudey, J.S., F.L. Tittle and M.S. Spencer (1989): A role for ethylene in the metabolism of cyanide by higher plants, *Plant Physiol.*, 89, 1306-1310.
- [29] 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.
- [30] Grossmann, K. and J. Kwiatkowski (1995): Evidence for causative role of cyanide, derived from ethylene biosynthesis, in the herbicidal mode of action of quinclorac in barnyard grass, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 51, 150-160.
- [31] Hageman, L.H. and R. Behrens (1984): Chlorsulfuron induction of leaf abscission in velvetleaf (*Abutilon theophrasti*), *Weed Sci.*, 32, 132-137.
- [32] Hager, A., H. Menzel and A. Krauss (1971): Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum, *Planta*, 100, 47-75.
- [33] Hall, J.C., P.K. Bassi, M.S. Spencer and W.H. V. Born (1985): An evaluation of the role of ethylene in herbicidal injury induced by picloram or clopyralid in rapeseed and sunflower plants, *Plant Physiol.*, 79, 18-23.
- [34] Hall, J.C. and M. Soni (1991): Antagonism by clopyralid or picloram-induced ethylene biosynthesis in rapeseed plants, *Z. Naturforsch.*, 46, 957-962.
- [35] Hall, J.C., S.M.M. Alam and D.P. Murr (1993): Ethylene biosynthesis following foliar application of picloram to biotypes of wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) susceptible or resistant to auxinic herbicides, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 47, 36-43.
- [36] Heap, I. and I.N. Morrison (1992): Resistance to auxin-type herbicides in wild-mustard (*Sinapis arvensis* L.) population in western Canada, *Weed Sci. Soc. Am.*, 32, 55. [Abstract 164]
- [37] Hertel, R., K. Thomson and V.E.A. Russo (1972): In vitro auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles, *Planta*, 107, 325-340.
- [38] Hesse, T., J. Feldwisch, D. Balshusenmann, G. Bauw, M. Puype, J. Vandekerckhove, M. Löbler, D. Klämbt, J. Schell and K. Palme (1989): Molecular cloning and structural analysis of a gene from *Zea mays* L. coding for a putative receptor for the plant hormone auxin, *EMBO J.*, 8, 2453-2461.
- [39] Hicks, G.R., D.L. Rayle, A.M. Jones and T.L. Lomax (1989): Specific photoaffinity labeling of

- two plasma membrane polypeptides with an azido auxin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 4948-4952.
- [40] Hicks, G.R., D.L. Rayle and T.L. Lomax (1989): The *Diageotropica* mutant of tomato lacks high specific activity auxin-binding sites, *Science*, 245, 52-55.
- [41] Hicks, G.R., M.S. Rice and T.L. Lomax (1993): Characterization of auxin-binding proteins from zucchini plasma membrane, *Planta*, 189, 83-90.
- [42] Hoekstra, F.A. and R. Weges (1986): Lack of control by early pistillate ethylene of the accelerated wilting of *Petunia hybrida* flowers, *Plant Physiol.*, 80, 403-408.
- [43] Holm, R.E. and F.B. Abeles (1968): The role of ethylene in 2,4-D-induced growth inhibition, *Planta*, 78, 293-304.
- [44] Ievinsh, G., V. Iljin, O. Kreicbergs and O. Romanovskaya (1990): Effect of ethephon on the activity of the ethylene-forming enzyme and the biosynthesis of ethylene in winter rye seedlings, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 186, 221-228.
- [45] Imaseki, H., N. Nakajima and N. Nakagawa (1989): In: Signals of Cell Separation in Plants, (eds. by Osborne, D.J. and M.B. Jackson) Springer-Verlag, Oxford
- [46] 今関 英雅 (1989)：植物におけるエチレンの生合成，植物の化学調節，24， 1-13.
- [47] 今関 英雅 (1992)：エチレン生合成の遺伝子とその発現，蛋白質 核酸 酵素，37， 1279-1286.
- [48] Inohara, N., S. Shimomura, T. Fukui and M. Fukui (1989): Auxin-binding protein located in the endoplasmic reticulum of maize shoots: molecular cloning and complete primary structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 3564-3568.
- [49] 石沢 公明 (1992)：植物ホルモンレセプター，エチレンレセプター研究の現状と問題点，植物細胞工学，秀潤社，東京， 4， 33-41.
- [50] 石塚 皓造 (1986)：MY-15の稲における代謝運命試験報告書， p.p. 1-25
- [51] Jonse, A.M., P.L. Lamerson and M.A. Venis (1989): Comparison of site I auxin-binding and a 22-kilodalton auxin-binding protein in maize, *Planta*, 179, 409-413.
- [52] Jones, A.M. and M.A. Venis (1989): Photoaffinity labeling of indole-3-acetic acid-binding proteins in maize, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6153-6156.
- [53] Jones, A.M. and P.V. Prasad (1992): Auxin-binding proteins and their possible roles in auxin-mediated plant cell growth, *Bioassays*, 14, 43-48.
- [54] Jones, A.M. and E.M. Herman (1993): KDEL-containing auxin-binding protein is secreted to the plasma membrane and cell wall, *Plant Physiol.*, 101, 595-606.
- [55] Kende, H. (1993): Ethylene biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44, 283-307.
- [56] Kikuchi, M., H. Imaseki and S. Sakai (1989): Modulation of gene expression in isolated nuclei by auxin-binding proteins, *Plant Cell Physiol.*, 30, 765-773.
- [57] Kimmer, T.W. and T.T. Kozlowski (1982): Ethylene, ethane, acetaldehyde and ethanol production by plants under stress, *Plant Physiol.*, 69, 840-847.
- [58] Kobayashi, K., K. Ichinose and H. Sugiyama (1993): Mode of inhibitory action of clomeprop on tuberization of *Cyperus serotinus*, *Weed Res., Japan*, 38, 30-35.
- [59] 小島 修一 (1990)：アオウキクサにおけるジフェニルエーテル系除草剤の生理作用機構，修士学位论文，筑波大学， 45-50.
- [60] Koo, S.J., J.C. Neal and J.M.D. Tosaso (1994): Quinclorac-induced electrolyte leakage in seedling grasses, *Weed Sci.*, 42, 1-7.
- [61] Koo, S.J., Y.W. Kwon and K.Y. Cho (1991): Differences in herbicidal activity, phytotoxic symptoms and auxin activity of quinclorac among plant species compared with 2,4-D, *Weed Res., Japan*, 36, 311-317.
- [62] Koo, S.J., Y.W. Kwon and K.Y. Cho (1991): Differences in selectivity and physiological effects of quinclorac between rice and barnyardgrass compared with 2,4-D, *Proc. 13th Asian Pacific Weed Sci. Soc. Conf.*, I, p.p. 103-111.
- [63] Langebartels, C., K. Kerner, S. Leonardi, M. Schraudner, M. Trost, W. Heller and H. Sandermann (1991): Biochemical plant responses to ozone. I. Differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco, *Plant Physiol.*, 95, 882-889.
- [64] 李 度鎮，白井 健二，石塚 皓造 (1993)：クロメプロップのオーキシシン活性に対するジメピペレートのみ合作用，雑草研究， 38， 112-114.
- [65] Lee, D.J., K. Usui, H. Matsumoto and K. Ishizuka (1993): Mechanism of safening action of dimepiperate on clomeprop injury in rice seedlings, *Weed Res., Japan*, 38, 294-299.

- [66] Lee, T.T. and T. Dumas (1983): Effect of glyphosate on ethylene production in tobacco callus, *Plant Physiol.*, 72, 855-857.
- [67] Li, N., Z. Wiesman, D. Liu and A.K. Mattoo (1994): Expression of an active tomato wound-inducible ACC synthase in *Escherichia coli* and retention of suicidal inactivation by its substrate S-adenosylmethionine, *J. Biol. Chem.*, 269, 6908-6917.
- [68] Lincoln, J.E., A.D. Campbell, J. Oetiker, W.H. Rottmann, P.W. Oeller, N.F. Shen and A. Theologis (1993): LE-ACS4, a fruit ripening and wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato (*Lycopersicon esculentum*), *J. Biol. Chem.*, 268, 19422-19430.
- [69] Lizada, M.C.C. and S.F. Yang (1979): A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, *Anal. Biochem.*, 100, 140-145.
- [70] Löbner, M. and D. Klämbt (1985): Auxin-binding proteins of corn (*Zea mays* L.). I. Purification by immunological methods and characterization, *J. Biol. Chem.*, 260, 9848-9853.
- [71] MacDonald, H., A.M. Jones and P.J. King (1991): Photoaffinity labeling of soluble auxin-binding proteins. *J. Biol. Chem.*, 266, 739-7399.
- [72] Marissen N. L.H.W. Plas, R. Maas and W.A. Kannevorff (1987): Inhibition of ethylene effects in iris bulbs by 2,5-norbornadiene, *Plant Sci.*, 51, 43-49.
- [73] 増田 芳雄(1992): 植物ホルモン入門, オーム社, 東京, p.p. 156-157.
- [74] Maxie, E.C. and J.C. Crane (1967): 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid; effect on ethylene production by fruits and leaves of fig tree, *Science*, 155, 1548-1550.
- [75] Miller, J.M and Conn, E.E. (1980): Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants, *Plant Physiol.*, 65, 1199-1202.
- [76] Morgan, P.W. (1976): Effect of ethylene physiology, In: *Herbicides (ed. L.J. Audus) Physiology, Biochemistry and Ecology*, 1, p.p. 255-280.
- [77] Morgan, P.W. and J.R. Baur (1970): Involvement of ethylene in picloram-induced leaf movement response, *Plant Physiol.*, 46, 655-659.
- [78] Morgan, P.W., R.E. Meyer and M.G. Merkle (1969): Chemical stimulation of ethylene evolution and bud growth, *Weed Sci.*, 17, 353-355.
- [79] Morgan, P.W. and W.C. Hall (1962): Effect of 2,4-dichloro phenoxyacetic acid on the production of ethylene by cotton and grain sorghum, *Physiol. Plant.*, 15, 420-427.
- [80] Mito, N., R. Yoshida and H. Oshio (1990): Effect of hormone-type herbicides on the ethylene production of mung bean hypocotyl sections; *Weed Res., Japan*, 35, 325-331.
- [81] Mito, N., I. Sori, M. Miyakado and S. Tanaka (1991): Competition by auxin-type herbicides for NAA binding to maize auxin binding protein: Comparison with *in vivo* auxin activity, *J. Pesticide Sci.*, 16, 435-439.
- [82] Napier, R.M and M.A. Venis (1990): Monoclonal antibodies detect an auxin-induced conformational change in the maize auxin-binding protein, *Planta*, 182, 313-318.
- [83] Nichols, R. (1968): The response of carnation (*Dianthus caryophyllus*) to ethylene, *J. Hort. Sci.*, 43, 335-349.
- [84] Olson, D.C., J.A. White, L. Edelman, R.N. Harkins and H. Kende (1991): Differential expression of two genes for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato fruits, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88, 5340-5344.
- [85] O'Neill, S.D., J.A. Nadeau, X.S. Zhang, A.Q. Bui and A.H. Halevy (1993): Interorgan regulation of ethylene biosynthetic genes by pollination, *Plant Cell*, 5, 419-432.
- [86] Oyamada, M., T. Tanaka, Y. Takasawa and T. Takematsu (1986): Metabolic fate of herbicide naproanilide in rice plants (*Oryza sativa* L.) and *Sagittaria pygmaea* MIQ, *J. Pestic. Sci.*, 11, 197-203.
- [87] Palme, K., T. Hesse, N. Campos, C. Garbers, M.F. Yanofsky and J. Schell (1992): Molecular analysis of an auxin-binding protein gene located on chromosome 4 of *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 4, 193-201.
- [88] Paradise, I., E. Ebert and E.F. Elstner (1981): Metolachlor (2-chloro-N-[2-ethyl-6-methylphenyl]-N-[2-methoxy-1-methylethyl]acetamide) and the metolachlor safener CGA 43089 [alpha-(cyano-methoximino) benzacetoneitrile] in sorghum seedlings: Correlations between morphological effects and ethylene formation, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 15, 209-212.

- [89] 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.
- [90] Pillmoor, J.B. and J.K. Gaunt (1981): The behaviour and mode of action of the phenoxyacetic acids in plants, In: *Progress in Pesticide Biochemistry* (eds. by Huston, D.H. and T.R. Roberts), p.p. 147-218.
- [91] Pirrung, M.C. and J.I. Brauman (1987): Involvement of cyanide in the regulation of ethylene biosynthesis, *Plant Physiol. Biochem.*, 25, 55-61.
- [92] Prasad, P.V. and A.M. Jones (1991): Anti-idiotypic antibodies to identify and characterize a putative receptor for the plant growth hormone, auxin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 5479-5483.
- [93] Ray, P.M., U. Dohrmann and R. Hertel (1977): Specificity of auxin-binding sites on maize coleoptile membranes as possible receptor site for auxin action, *Plant Physiol.*, 60, 585-591.
- [94] Reddy, G.N., R.N. Arteca, Y.R. Dai, H.E. Flores, F.B. Negm and E.J. Pell (1993): Changes in ethylene and polyamines in relation to mRNA levels of the large and small subunits of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in ozone-stressed potato foliage, *Plant Cell Environ.*, 16, 819-826.
- [95] Rottmann, W.R., G.F. Peter, P.W. Oeller, J.A. Keller, N.F. Shen, B.P. Nagy, L.P. Taylor, A. D. Campbell and A. Theologis (1991): 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence, *J. Mol. Biol.*, 222, 937-961.
- [96] Saito, I., and T. Matsuura (1979): The oxidations of electron-rich aromatic compounds, In: *Single Oxygen* (eds. by Wasserman, H.H. and R.W. Murray), Academic Press, New York, p.p. 511-574.
- [97] 酒井 慎吾 (1992): 植物ホルモンレセプター, 植物細胞工学, 秀潤社, 東京, 4, 151-152.
- [98] Sakai, S., J. Seki and H. Imaseki (1986): Stimulation of RNA synthesis in isolated nuclei by auxin-binding protein I and II, *Plant Cell Physiol.*, 27, 635-644.
- [99] 佐藤 茂 (1993): 高等植物におけるエチレン生成の生化学, 化学と生物 (日本農芸化学会編), 学会出版センター, 東京, 31, 431-438.
- [100] 佐藤 茂, 吉岡 俊人 (1995): エチレン合成の生化学と雑草学への応用, 日本雑草学会 第11回シンポジウム講演要旨, p.p. 57-72.
- [101] Schaap, A.P. and K.A. Zaklika (1979): 1,2-Cycloaddition reaction of singlet oxygen, In: *Singlet Oxygen* (eds. Wasserman, H.H. and R.W. Murray), Academic Press, New York, p.p. 173-286.
- [102] Scheltrup, F. and K. Grossmann (1995): Abscisic acid is a causative factor in the mode of action of the auxinic herbicide quinmerac in cleaver (*Galium aparine* L.), *J. Plant Physiol.*, 147, 118-126.
- [103] 下川 敬之 (1991): エチレン, 東京大学出版会, 東京, p.p. 64-68.
- [104] Shimomura, S., T. Sotobayashi, M. Futai and T. Fukui (1986): Purification and properties of an auxin-binding protein from maize shoot membranes, *J. Biochem.*, 99, 1513-1524.
- [105] Shimomura, S., N. Inohara, T. Fukui and M. Futai (1988): Different properties of two type of auxin-binding sites from maize coleoptiles, *Planta*, 174, 558-566.
- [106] 下村 正二 (1990): 細胞膜のオーキシン結合タンパク質の構造と機能, 植物の化学調節, 25, 28-39.
- [107] 下村 正二 (1990): 小胞体と原形質膜に存在するオーキシン結合蛋白質の比較, 日本植物生理学会 1990年度年会講演要旨集, p.p. 97.
- [108] 下村 正二, 渡辺 紳一郎 (1992): オーキシン受容体と情報伝達, 蛋白質, 核酸, 酵素, 共立出版, 東京, 37, 1266-1271.
- [109] 下村 正二 (1991): 植物ホルモン研究法 (増田芳雄編), 学会出版センター, 東京, p.p. 75-83.
- [110] 白倉 伸一, 石塚 皓造, 池田 芳, 紺野 和彦 (1986): クロメプロップの選択作用機構, 雑草研究, 31 (別), 151-152.
- [111] Sisler, E.C., R. Goren and M. Huberman (1985): Effect of 2,5-norbornadiene on abscission and ethylene production in citrus leaf explants, *Plant Physiol.*, 63, 114-120.
- [112] Sisler, E.C. and S.F. Yang (1984): Anti-ethylene effects of *cis*-2-butene and cyclic olefins, *Phytochemistry*, 23, 2765-2768.
- [113] Stacewicz-Sapuncahis, M., H.V. Marsh, J. Vengris, P.H. Jennings and T. Robinson (1973): Participation of ethylene in common purslane response to

- dicamba, *Plant Physiol.*, 52, 466-471.
- [114] 菅谷 清志, 池田 芳, 郷 敦, 紺野 和彦, 田中 盛久 (1986): 水田除草剤クロメプロップの作用性, 雑草研究, 31 (別), 149-150.
- [115] 菅谷 純子 (1992): オーキシン受容の分子機構, 植物細胞工学, 秀潤社, 東京, 4, 153-162.
- [116] Suttle, J.C and H. Kende (1978): Ethylene and senescence in petals of *Tradescantia*, *Plant Physiol.*, 62, 267-271.
- [117] Suttle, J.C and H. Kende (1980): Ethylene action and loss of membrane integrity during petal senescence in *Tradescantia*, *Plant Physiol.*, 65, 1067-1072.
- [118] Suwunnamek, U., C. Wongwattana and K. Ishizuka (1990): Hormonal activity of clomeprop in radish seedlings, *Weed Res., Japan*, 35, 129-136.
- [119] 高橋 信孝, 増田 芳雄 (1994): 植物ホルモンハンドブック (上), 培風館, p.p. 235-510.
- [120] Takasawa, Y., T. Tanaka, M. Oyamada, K. Igarashi and T. Yoshimoto (1982): Selective activity of 2-(2-naphthylxy) propionanilide (Naproanilide). *Proc. 5th Int. Congr. Pestic. Chem.*, IV d-10.
- [121] Takematsu, T. (1961): New method for the qualitative and quantitative assay of growth substance, College of Agriculture, Utsunomiya University, p. p. 49.
- [122] 竹内 安智 (1989): ホルモン作用攪乱型除草剤, 日本農芸化学会誌, 63, 1618-1621.
- [123] 竹内 安智, 竹松 哲夫 (1983): 世界の農耕地雑草とその制御, 全国農村教育協会, 東京, p.p. 9-18.
- [124] 寺尾 純二 (1988): 活性酸素の作用: 標的分子との反応性—脂質—, 蛋白質・核酸・酵素, 臨時増刊「活性酸素」, 共立出版, 東京, 33, 3060-3066.
- [125] Tillmann, U., G. Viola, B. Kayser, G. Siemeister, T. Hesse, K. Palme, M. Löbber and D. Klämbt (1989): cDNA clones of the auxin-binding protein from corn coleoptiles (*Zea mays* L.): Isolation and characterization by immunological methods, *EMBO J.*, 8, 2463-2467.
- [126] Tittle, F.L., Goudey, J.S. and Spencer, M.S. (1990): Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on endogenous cyanide, β -cyanoalanine synthase activity, and ethylene evolution in seedlings of soybean and barley, *Plant Physiol.*, 94, 1143-1148.
- [127] Tsai, D.S., R.N. Arteca, J.M. Arteca and A.T. Phillips (1991): Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase purified from mung bean hypocotyls, *J. Plant Physiol.*, 137, 301-306.
- [128] Tsai, D.S., R.N. Arteca, J.M. Bachman and A. T. Phillips (1988): Purification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from etiolated mung bean hypocotyls, *Arch. Biochem. Biophys.*, 264, 632-640.
- [129] Tucker, G.A, N.G. Robertson and D. Grierson (1980): Changes in polygalacturonase isozymes during the 'ripening' of normal and mutant tomato fruit, *J. Biochem.*, 112, 119-124.
- [130] Tucker, G.A. and D. Grierson (1982): Synthesis of polygalacturonase during tomato fruit ripening, *Planta*, 155, 64-67.
- [131] Tucker, M.L., R. Sexton, E.D. Campillo and L. N. Lewis (1988): Bean abscission cellulase: Characterization of a cDNA clone and regulation of gene expression by ethylene and auxin, *Plant Physiol.*, 88, 1257-1262.
- [132] Veen, H. (1985): Antagonistic effect of silver thiosulphate or 2,5-norbornadiene on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-stimulated growth of pistils in carnation buds, *Physiol. Plant.*, 65, 2-8.
- [133] Veen, H. and S.C. Geijn (1978): Mobility and ionic form of silver as related to longevity of cut carnations, *Planta*, 140, 93-96.
- [134] Venis, M.A. (1984): Hormone-binding studies and the misuse of precipitation assays, *Planta*, 162, 502-505.
- [135] Venis, M.A. (1985): Hormone-binding sites in plants. Longman, London
- [136] Walton, J.D. and P.M. Ray (1981): Evidence for receptor function of auxin-binding sites in maize, *Plant Physiol.*, 68, 1334-1338.
- [137] Wang, H. and W.R. Woodson (1989): Reversible inhibition of ethylene action and interruption of petal senescence in carnation flowers by norbornadiene, *Plant Physiol.*, 89, 434-438.
- [138] Wang, H. and W.R. Woodson (1991): A flower senescence-related mRNA from carnation shares sequence similarity with fruit ripening-related mRNAs involved in ethylene biosynthesis, *Plant Physiol.*, 96, 1000-1001.
- [139] Wenzel, A.A., H. Schlautmann, C.A. Jones, K. Koppers and H. Mehlhorn (1995): Aminoethoxyvinylglycine, cobalt and ascorbic acid all reduce

- ozone toxicity in mung beans by inhibition of ethylene biosynthesis, *Physiol. Plant.*, 93, 286-290.
- [140] Wongwattana, C. and K. Ishizuka (1988a): Herbicidal activity, absorption and translocation of clomeprop in plant seedlings, *Weed Res., Japan*, 33, 191-199.
- [141] Wongwattana, C. and K. Ishizuka (1988b): Metabolism of clomeprop in plant seedlings, *Weed Res., Japan*, 33, 200-208.
- [142] 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.
- [143] Wurtele, E.S., B.J. Nikolau and E.E. Conn (1985): Subcellular and developmental distribution of β -cyanoalanine synthase in barley leaves, *Plant Physiol.*, 78, 285-290.
- [144] 山元 一弘 (1992): 化学と生物 (日本農芸化学会編), 切り花の老化とその制御, 学会出版センター, 東京, 30, 770-772.
- [145] Yamamoto, K., C. Saitoh, Y. Yokoo, T. Furukawa and K. Oshima (1992): Inhibition of wilting and autocatalytic ethylene production in cut carnation flowers by *cis*-propenylphosphonic acid, *Plant Growth Regulation*, 11, 405-409.
- [147] Yang, S.F., and N.E. Hoffman (1984): Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35, 155-189.
- [148] Yang, S.F., W-K. Yip, S. Satoh, J.H. Miyazaki, X. Jiao, Y. Liu, L.Y. Su and G.D. Peiser (1990): Metabolic aspects of ethylene biosynthesis, In: *Plant Growth Substances* (eds. by Pharis, R.P. and S.B. Rood), p.p. 291-299., Springer Verlag, Berlin
- [149] Yang, C., W. Wilksch and A. Wild (1994): 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid, its malonyl conjugate and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase activity in needles damaged and undamaged Norway spruce trees, *J. Plant Physiol.*, 143, 389-395.
- [150] 楊 祥発(1994): 植物ホルモンハンドブック(下) (高橋 信孝, 増田芳雄共編), 培風館, p.p. 161-201.
- [151] Yoshii, H. and H. Imaseki (1981): Biosynthesis of auxin-induced ethylene. Effects of indole-3-acetic acid, benzyl adenine and abscisic acid on endogenous levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and ACC synthase, *Plant Cell Physiol.*, 22, 369-379.
- [152] Yoshii, H. and H. Imaseki (1982): Regulation of auxin-induced ethylene biosynthesis. Repression of inductive formation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by ethylene, *Plant Cell Physiol.*, 23, 639-649.
- [153] Yip, W.K. and S.F. Yang (1989): Cyanide metabolism in relation to ethylene production in plant tissues, *Plant Physiol.*, 88, 473-476.
- [154] Yip, W.K., T. Noore and S.F. Yang (1992): Differential accumulation of transcripts for four tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase homologs under various conditions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 2475-2479.
- [155] Zettl, R., J. Schell and K. Palme (1994): Photoaffinity labeling of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane vesicles by 5-azido-[7-³H] indole-3-acetic acid: Identification of a glutathione S-transferase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 689-693.