

## 除草剤オキサジクロメホンによるイネ茎葉部伸長抑制時の遊離アミノ酸と脂肪酸の変動

今矢 智彬 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 松本 宏 (筑波大学 生命環境系)

## 背景・目的

農業は、雑草や病害虫の防除のために利用され、作物の増産や生産の効率化に寄与してきた。しかし、近年除草剤に対しても抵抗性雑草の出現・増加が問題となっており、新規作用点を持つ除草剤の開発が望まれ、天然の生理活性物質の探索やゲノムマイニングなど様々な手法を用いた研究開発が進められている。そこで、私は有用な除草剤として利用されているが作用機序が解明されていない除草剤の作用機序を解析し、除草剤の標的となりうる代謝経路を明らかにすることを通してその代謝経路を標的とした新規除草剤の開発に知見を提供できるのではないかと考えた。

オキサジクロメホン (3-[2-(3,5-dichlorophenyl)propan-2-yl]-6-methyl-5-phenyl-2H-1,3-oxazin-4-one) は2000年に農薬登録された水稻および芝用の除草剤である。特に、ノビエに対し低用量で優れた除草効果を持ち処理適期も2.5葉期まで幅広く、移植水稻に高い安全性を示す。また、農薬の化学構造として新規の1,3-オキサジン-4-オン環を骨格とした非ホルモン系吸収移行型の土壌処理剤である。主に植物の根部から吸収され、新根や新葉の伸長を停止させ、茎葉部の黄化を伴い植物を枯死させることが知られている。

しかし、オキサジクロメホンの詳細な作用機序は、未だに解明されておらず、呼吸阻害や光合成阻害、DNA 生合成阻害、RNA 生合成阻害、タンパク質生合成阻害、脂質生合成阻害、脂肪酸生合成阻害、アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACCase) 阻害、アミノ酸生合成阻害、有糸分裂阻害、アスパラギン酸生合成阻害などの既知の作用機序とは異なる新規の作用機序を有していることが示唆されている。さらに、細胞伸長の抑制に着目し、トウモロコシ培養細胞を用いて細胞の浸透圧や水輸送、酸成長、ペルオキシダーゼやキシログルカンエンドトランスグルコシラーゼ (XET) による細胞壁のゆるみ、細胞壁の多糖構成についても研究されたが細胞の拡張を阻害する要因も明らかになっていない。

そこで、オキサジクロメホンの作用機序を明らかにすることを最終目的とし、本研究では、オキサジクロメホンの作用性の解析や、処理後の症状が類似している既知の除草剤との作用性の比較を行った。

## 実験方法

## 1. タイヌビエ・イネに対する成長抑制活性の評価

25°C, 明期 12 時間: 暗期 12 時間で 12 日間生育した 2 葉期のタイヌビエ (*Echinochloa phyllopogon*) とイネ (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) に 0, 0.001~5  $\mu$ M オキサジクロメホンを 3 日間根部処理し、薬剤による症状および 3 葉の長さ・茎葉部新鮮重・根部新鮮重を測定した。

## 2. オキサジクロメホンによる膜破壊活性の評価

25°C, 明期 14 時間: 暗期 10 時間で 10 日間生育したキュウリ (*Cucumis sativus* L. cv. Shimoshirazu-jibai) の子葉を切り取り、リーフディスクを作成した。リーフディスクを 100 mM

オキサジクロメホンを含む 2% sucrose/1 mM MES buffer (pH 6.5) に浮かべ、暗期で 16 時間、明期で 16 時間インキュベートした。インキュベート開始後 0, 8, 16, 24, 32 時間における電気伝導度を電気伝導時計で測定した。

## 3. オキサジクロメホンと可視症状が類似している剤の活性比較

1. と同様に生育した 2 葉期のイネに標的タンパク質が判明している薬剤 (アジメスルフロム, グリホサート, フェノキサプロップエチル, シンメチリン, プレチラクロール) を 3 日間根部処理し、3 葉の長さが未処理区の 50% となる濃度 (GR<sub>50</sub> 値) を算出した。

## 4. 遊離アミノ酸分析によるオキサジクロメホンと比較除草剤の作用性比較

1. と同様に生育した 2 葉期のイネにオキサジクロメホンと 3. で用いた 5 種類の薬剤を GR<sub>50</sub> 値の濃度で根部処理し、3 日間生育させた。生育後、茎葉部を採取し液体窒素で磨砕し 15 mM HCl を加えホモジナイズした。破砕液を 2,000 g, 4°C, 2min で遠心し、上清に 10% 5-スルホサリチル酸を加え氷上放置し 2,000 g, 4°C, 15min 遠心した。除タンパクした上清に 1N NaOH を加え pH 2.2 に調整し 0.45  $\mu$ m の滅菌フィルターでろ過し測定サンプルとした。測定サンプルを筑波大学分析センターに、自動アミノ酸分析装置での分析を委託した。

## 5. オキサジクロメホンによる脂肪酸量の変動

4. と同様に 6 種類の薬剤を GR<sub>50</sub> 値の濃度で 3 日間処理したイネの茎葉部を切り取り、2.5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を含むメタノール 1.5 mL で 80°C, 2 時間加熱し、含まれる脂肪酸を抽出・メチルエステル化した。加熱後、0.9% NaCl とヘキサンを加えヘキサン層に回収し窒素ガスで乾燥させた。再度、ヘキサンに融解し、GC-MS で分析を行った。

## 結果・考察

タイヌビエとイネの両方で、新たに展開した第 3 葉の成長がオキサジクロメホンによって著しく阻害された。また、オキサジクロメホンの処理後に顕著な葉の黄化や白化が見られず、活性酸素腫 (ROS) などの酸化ストレスによる酸化傷害や色素合成系の阻害が主要因ではないと考えられた。さらに、オキサジクロメホンによる電解質漏出も確認できなかったため、膜の完全性の破壊を誘導する剤ではないと考えられた。

次に、オキサジクロメホンと同様に新たに展開される葉の伸長を抑制するアミノ酸や脂肪酸の生合成を阻害する除草剤についてオキサジクロメホンと遊離アミノ酸と脂肪酸量について比較検討した。結果については、口頭発表にて説明する。