



Biological and biochemical studies on mode of action of the herbicide imazosulfuron for use in rice paddy field

田中, 易

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2002-09-20

(Date of Publication)

2010-08-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2639

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002639>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 3 1 7 】

氏 名 ・ (本 籍) 田 中 易 (大 阪 府)

博士の専攻分野の名称 博士 (農学)

学 位 記 番 号 博ろ第55号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の 日 付 平成14年9月20日

【 学位論文題目 】

BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDIES ON
MODE OF ACTION OF THE HERBICIDE
IMAZOSULFURON FOR USE IN RICE PADDY FIELD
(水稲用除草剤イマゾスルフロンの作用機構に関する
生物学および生物化学的研究)

審 査 委 員

主 査 教 授 大 川 秀 郎

教 授 竹 田 真 木 生

教 授 佐 々 木 満

論文内容の要旨

氏名 田中 易

論文題目 (外国語の場合は, その和訳を併記すること。)

BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDIES ON MODE OF ACTION OF THE HERBICIDE IMAZOSULFURON FOR USE IN RICE PADDY FIELD
(水稲用除草剤イマゾスルフロンの作用機構に関する生物学および生物化学的研究)

Imazosulfuron, which is a sulfonylurea herbicide synthesized and developed by Takeda Chemical Industries, Ltd. for use in paddy rice, was studied for biological activity, factors affecting biological activity, selectivity and mode of action.

Imazosulfuron controlled 12 paddy weeds including annual and perennial broadleaf and sedge weeds on pre- and post-emergence application of 90 g a.i./ha with sufficient residual activity for 42 days. Bioassay method showed that relative movement of the herbicide in paddy soil was limited to within 2 cm of the soil layer under the soil surface. Herbicidal activity was roughly proportional to the exposure period of between 1 and 7 days with different sensitivity of paddy weeds. Post-emergence application of the herbicide results in the stable activity on a paddy weed irrespective of flooding water depth, temperature, water leaching, planting depth and tuber size. Water leaching and planting depth

significantly reduced the herbicidal activity with pre-emergence application. Water leaching and planting depth with pre-emergence treatment suggest to be important factors influencing the herbicidal efficacy of imazosulfuron.

Selectivity between paddy weeds and rice plants on imazosulfuron was investigated. I_{50} value of *Cyperus serotinus* (CYPSE), *Sagittaria pygmaea* (SAGPY), *Scirpus juncooides* var. *ohwianus* (SCPJO) and *Echinochloa oryzicola* (ECHOR) was approximately from 500 to 2200 times lower than that of rice plants treated 7 days after transplanting. This result suggests that imazosulfuron has sufficient safety to rice plants (*Oryza sativa* cv. Nipponbare, ORYSA) at a dosage of 90 g a.i./ha for practical use.

Absorption site of imazosulfuron in CYPSE and rice plants was estimated by using three application methods. CYPSE treated with soil application of the herbicide suffered the most growth suppression, that with soil incorporation application the next, that with flooding water application the least. On the other hand, the growth inhibition of rice plants with soil application was similar to that with soil incorporation application, and both inhibitions were higher than that with flooding water application. In CYPSE imazosulfuron seems to be mostly absorbed by root and partly by shoot, while in rice plants by both root and basal leaf sheaths.

The growth reduction of rice plants, when transplanted at a depth of 2 cm or more, was rarely indicated by treatment of imazosulfuron irrespective of water leaching and differences in application timing, flooding water depth and temperature. Shallowly transplanted rice, however, suffered significant growth reduction by treatment of imazosulfuron. Transplanting depth seems to be the

most important factor affecting the phytotoxicity on rice plants by imazosulfuron. The growth reduction was intensified by water leaching, early application timing and higher temperature after application when rice plants were transplanted shallowly. These suggest to be also very important factors influencing the phytotoxicity on the plants by the herbicide in shallowly transplanted depth.

Addition of valine, isoleucine and leucine reversed growth inhibition of rice plants induced with imazosulfuron. I_{50} for acetolactate synthase from both sensitive and tolerant plants was 14 to 58 nM. These results strongly support that imazosulfuron acts on plant tissue by directly inhibiting the enzyme ALS. Taking the contrast between I_{50} values for the intact plants and for ALS into consideration, the selectivity of imazosulfuron does not seem to be due to the difference in the enzyme level reaction with ALS. The ALS activity which chloroplast development of rice plants enhances did not overcome the inhibition induced by imazosulfuron. The insensitivity of rice plants to imazosulfuron is probably also not due to the enhancement of ALS activity relative to age and chloroplast development.

Imazosulfuron inhibited ALS activity in the noncompetitive with respect to pyruvate and uncompetitive with respect to thiamine pyrophosphate (TPP). Inhibition of ALS activity by the continuous presence of imazosulfuron was time dependent and biphasic. Therefore, imazosulfuron does not suggest to overlap with the binding site on ALS where pyruvate or TPP have overlapped but to inhibit the enzyme activity by binding the complexes of the enzyme, cofactor and substrate, and to be a slow-binding inhibitor.

Various physiological responses following treatment with imazosulfuron were

investigated using CYPSE. Imazosulfuron inhibited the proportion of thymidine incorporation into DNA within a few hours after treatment and inhibited to 51% of the control. This inhibition was largely alleviated within 2 hr with exogenously adding of branched-chain amino acids. The level of soluble protein decreased with time and concentration of imazosulfuron treatment, while increasing free amino acid levels were measured with higher concentration of the herbicide 11 days after treatment of the herbicide. Starvation of valine, isoleucine and leucine induced by imazosulfuron seem to cause the inhibition of DNA synthesis in a short period of treatment and lead to protein turnover and an increase in the level of amino acids in a longer period.

The technology in use of rice herbicide in Japan has been advanced through the development of new active ingredients, application methods, low application rate and formulation technology. The rational herbicide use technology will be more promoted by using information obtained here. These advancement will contribute to the weed control in rice cultivation system for development of labor-saving and lower cost technology, and the weed science for environmental compatibility and assessment in agricultural ecology system.

(和訳)

武田薬品工業株式会社で合成、開発された水稲用スルホニルウレア系除草剤イマゾスルフロン[®]の生物活性、その生物活性に影響を与える要因、選択性および作用機構について検討を行った。

イマゾスルフロンは一年生および多年生広葉雑草やカヤツリグサ科雑草を含む 12 草種に対し、90 g a.i./ha の薬量の出芽前、出芽後処理で極大の

効果と 42 日間の残効性を示した。生物検定を用いた結果、本薬剤の水田土壤中の移行は土壌表層から 2 cm 以内であることが明らかになった。雑草に対する効果はそれらの感受性により異なるが、本薬剤との接触期間が 1~7 日間においては、その期間に比例して高まった。出芽後処理では湛水深、温度、漏水、播種深度および塊茎の大きさに影響されず、水田雑草に安定した効果を示した。一方、出芽前処理では漏水および播種深度が効果に有意な減少を引き起こす影響を与え、両者は重要な効果の変動要因であると考えられた。

本薬剤のミズガヤツリ (CPYSE)、ウリカワ (SAGPY)、イヌホタルイ (SCPJO) およびタイヌビエ (ECHOR) と移植 5 日後処理のイネ間の選択性を 50% 生育阻害薬量で比較した結果、500~2200 倍の薬量差があった。この結果は本薬剤が 90 g a.i./ha の通常薬量でイネに十分安全性が高いことを示唆した。

ミズガヤツリとイネにおける本薬剤の吸収部位を異なる 3 処理方法により検討した。ミズガヤツリは土壌処理により最も生育抑制を受け、次いで土壌混和処理、湛水処理の順で低下した。一方、イネでは土壌処理と土壌混和処理による生育抑制が同程度で最も大きく、ついで湛水処理の順で低下した。以上より、本薬剤はミズガヤツリ、イネの根部、茎葉部基部、茎葉部から吸収されるが、根部からの吸収が生育抑制に大きく影響を与えていると思われた。

2 cm 以上の深さに移植されたイネに対し、本薬剤は漏水、処理時期、湛水深および温度の影響を受けず、薬害をほとんど示さなかった。しかしながら、浅植えのイネに対しては、有意に生育抑制を示した。また、イネが浅植え条件にある際には、本薬剤の薬害は漏水、早い処理時期および処理

直後の高温により助長された。これらのことから、イネの移植深度は本薬剤のイネに対する薬害の最も重要な変動要因であると考えられた。

本薬剤処理により生育抑制を受けたイネは、バリン、イソロイシンおよびロイシンの添加により回復した。本薬剤に感受性または耐性の植物から調製したアセト乳酸合成酵素 (ALS) に対し、その活性を 50% 阻害する本薬剤の濃度は 14~58 nM であった。これらの結果は、本薬剤が ALS 活性を直接阻害することにより、作用が発現することを強力に指示するものである。また、植物体および ALS に対する 50% 阻害薬量を考え合わせると、選択性は本薬剤に対する ALS の感受性の差によるものではないと考えられた。イネにおいて ALS 活性の増大と関係なく ALS 活性は阻害されたことから、イネの本薬剤に対する耐性は、葉令や葉緑体の発達による ALS 活性の増大と関係がないことが明らかになった。

本薬剤は ALS に対し、基質のピルビン酸との間には非拮抗阻害を、コファクターのチアミンピロフォスフェート (TPP) との間には不拮抗阻害を示した。ALS 活性阻害は経時的にゆっくりと増大し、2 相性を示した。すなわち、本薬剤の ALS 結合部位はピルビン酸および TPP の結合部位とは異なり、酵素、コファクターおよび基質の複合体に結合し、Slow-binding な特徴により酵素活性を阻害すると考えられた。

本薬剤処理後のさまざまな生理学的反応について、ミズガヤツリを供試植物として検討した。処理後数時間でチミジンの DNA 分画への取り込みが無処理の 51% に阻害された。この阻害は分岐鎖アミノ酸の添加により 2 時間以内にほぼ回復した。可溶性タンパク質量は本薬剤との処理期間および薬量の増大とともに減少した。一方、遊離アミノ酸量は処理 11 日後に処理薬量の増大とともに増加した。以上より、本薬剤によるバリン、イソ

田中 易, 7

ロイシンおよびロイシンの欠乏により、短時間の処理でDNA合成が阻害され、長時間の処理でタンパク質の代謝回転およびアミノ酸の増加が2次的に引き起こされたと考えられた。

日本における水稲用除草剤の使用技術は、新規活性化合物、施用方法、施用量、および製剤化技術の発達により進歩してきている。本知見を利用することにより、除草剤使用技術のより一層の進展のみならず、省力かつ低コスト稲作における雑草防除技術の開発、および除草剤の生態系や環境に対する安全性との関連から、より科学的な除草剤使用技術として確立できる。

| | | | |
|---|---|----|--------|
| 氏名 | 田中 易 | | |
| 論文題目 | Biological and Biochemical Studies on Modes of Action of the Herbicide Imazosulfuron for Use in Rice Paddy Field (水稲用除草剤イマゾスルフロンの作用機構に関する生物学および生化学的研究) | | |
| 審査委員 | 区分 | 職名 | 氏名 |
| | 主査 | 教授 | 大川 秀郎 |
| | 副査 | 教授 | 竹田 真木生 |
| | 副査 | 教授 | 佐々木 満 |
| | 副査 | | |
| 要 旨 | | | |
| <p>水田雑草の防除技術は、除草剤による化学的防除を中心に、高活性除草剤の開発、その製剤技術、施用技術を含めていっそうの省力化、低コスト化を目指した技術開発が求められている。それと共に、環境問題に対する関心が高まり、除草剤の生態系や環境に対する影響についてより高い安全性が求められるようになった。</p> <p>本研究は水稲用除草剤イマゾスルフロンの除草効果と葉害およびそれらの変動要因、土壌中の移動、植物における吸収、作用機構、および、植物が枯殺するに至るまでの生理的変化について生物学及び生化学的検討を行った。それに基づき、除草剤イマゾスルフロンの作用特性を評価し、製剤施用技術を開発し実用化に到った。</p> <p>第1章では、日本の水田における雑草防除、特に、雑草と除草剤との関係、除草剤作用特性に関する知見をまとめた。さらに、水田除草剤の主剤であるスルフォニルウレア系除草剤の特性とそれらを活かした雑草防除技術開発の意義と重要性について述べた。</p> <p>第2章ではスルフォニルウレア系除草剤イマゾスルフロンの除草効果、残効性およびそれらの変動要因、土壌での移動について述べた。イマゾスルフロンは一年生および多年生雑草やカヤツリグサ科雑草を含む12草種に対し、90g a.i./haの低薬量で、出芽前及び出芽後処理で除草効果を示し、42日間の残効性が認められた。イマゾスルフロンの水田土壌中での移行は土壌表層から2cm以内であった。雑草に対する除草効果は、イマゾスルフロンとの接触期間が1~7日間においては、その期間に比例して高かった。出芽後処理では、湛水深、温度、漏水、播種深度および塊基の大きさに影響されず、水田雑草に安定した除草効果を示した。一方、出芽前処理では漏水及び播種深度が効果に有意な低下を引き起こし、効果の変動要因となっていることが明らかになった。</p> <p>第3章では、イマゾスルフロンの水田雑草とイネの間の選択性、および吸収について述べた。水田雑草ミズカヤツリ、ウリカワ、イヌホタルイ、およびタイヌビエと移植7日後のイネとの選択性を50%生育抑制薬量で比較した。その結果、これら雑草とイネの間には500~2200倍の薬量差があった。即ち、イマゾスルフロンは90g a.i./haの薬量でイネに対して十分安全性の高い選択性を示した。また、ミズカヤツリとイネにおけるイマゾスルフロンの吸収部位を活性炭を用いた異なる3処理方法により検討した。その結果、ミズカヤツリは土壌処理により最も強い生育抑制を受け、次いで土壌混和処理、湛水処理の順であった。一方、イネでは土壌処理と土壌混和処理による生育抑制が同程度に認められ、次いで湛水処理の順であった。以上より、イマゾスルフロンは、ミズカヤツリおよびイネの根部、茎葉基部、茎葉部から吸収されるが、根部からの吸収が生育抑制に大きく影響していることが明らかになった。</p> <p>第4章では、イマゾスルフロンのイネに対する葉害およびその変動要因について述べた。2cm以上の深さに移植されたイネに対し、イマゾスルフロンは漏水、処理時期、湛水深および温度の影響を受けず、葉害をほとんど示さなかった。しかしながら、それより浅植えのイネに対しては、有意に生育抑制を示した。また、イネが浅植え条件の場合には、イマゾスルフロンの葉害は漏水、早い処理時期および処理直後の温度により助長された。以上の結果、イネの移植深度はイマゾスルフロンのイネに対する葉害の最も重要な変動要因であることが明らかになった。</p> <p>第5章では、イマゾスルフロンの作用機構について述べた。イマゾスルフロンにより生育抑制を受けたイネは、アミノ酸であるバリン、イソロイシンおよびロイシンの添加により回復した。イマゾスルフロンに感受性または耐性の植物から調製したアミノ酸合成に係わるアセト乳酸合成酵素(ALS)に対し、その活性を50%阻害する</p> | | | |

氏名 田中 易

イマゾスルフロンの濃度は14~58nMであった。これらの結果は、イマゾスルフロンのALS活性を直接阻害することにより、除草作用を現わすことを示すものである。また、植物体における除草効果およびALSに対する50%阻害薬量を考え合わせると、イネと雑草の間の選択性はイネと雑草の生態的要因に基づいており、イマゾスルフロンのALSに対する両ALSの感受性の差によるものでなく、また、イネのイマゾスルフロンの耐性は葉令や葉緑体の発達によるALS活性の増大とは関係しないことが明らかになった。ALSに対し、イマゾスルフロンは基質のピルビン酸との間に非拮抗阻害を、コファクターのチアミンピロフォスフェート(TTP)との間に拮抗阻害を示した。ALS阻害は経時的にゆっくりと増大し、2相性を示した。すなわち、ALSにおけるイマゾスルフロンの結合は、酵素、コファクターおよび基質の複合体に対するものであり徐々に酵素活性が阻害されることが明らかになった。

第6章では、イマゾスルフロンの引き起こされる生育阻害に対する分岐鎖アミノ酸の影響について述べた。ミズカヤツリはイマゾスルフロンの処理後数時間でチミジンのDNA分画への取り込みが無処理の51%に阻害され、この阻害は分岐鎖アミノ酸の添加により2時間以内には回復した。可溶性タンパク質量はイマゾスルフロンの処理時間、および薬量の増加とともに減少し、一方、遊離アミノ酸量は処理時間、および処理薬量の増加とともに増大した。以上により、イマゾスルフロンの引き起こされたバリン、イソロイシンおよびロイシンの欠乏により、短時間の処理ではDNA生合成が阻害され、長時間処理ではタンパク質の代謝回転およびアミノ酸の増加が二次的に引き起こされていることが明らかになった。

第7章では、本研究の結果をまとめてイマゾスルフロンの作用特性と適用性について議論した。イマゾスルフロンは低薬量で水田における難防除雑草を含む多年生雑草に対する高い除草効果と残効性に優れ、イネに対する安全性が高い。また、従来のスルホニルウレア系除草剤の構造の2位に塩素を含む複素環を導入したことにより、イネと雑草の間の選択性の幅が飛躍的に拡大し、適用幅が広がった。さらに、この特性は省力かつ低コストでの雑草防除を目指した新製剤技術および新除草剤施用技術の開発に発展し、実用化に到った。

本研究は水稲用除草剤イマゾスルフロンの作用特性を生物学および生化学的に研究したものであり、省力かつ低コストでの雑草防除技術を開発する上で重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者田中 易は、博士(農学)の学位を得る資格があると認める。