

除草剤プロピザミドがクラミドモナスに与える影響

木下 典子*, 神谷 律**, 細谷 夏実*

要 約

ゴルフ場や畑で広く使用されている除草剤プロピザミドが、単細胞生物のクラミドモナスに与える影響を調べた。プロピザミドは、代表的な微小管重合阻害剤であるコルヒチンと同様に、微小管重合阻害能をもつことが報告されている。クラミドモナスでは、微小管のサブユニットである β チューブリンが変異しコルヒチンに耐性を示す突然変異株が単離されている。

本研究では、まず、濃度の異なるプロピザミドを含む培地で、クラミドモナス野生株とコルヒチン耐性株の増殖を比較し、検鏡により細胞分裂の進行状態の比較を行った。その結果、コルヒチン耐性株は、プロピザミドの細胞分裂抑制作用に耐性を示すことが明らかになった。さらに、プロピザミド耐性株の単離を試みたところ、4株の耐性株が得られた。得られたプロピザミド耐性株の性質を検討するために、検鏡により細胞分裂の進行状態を比較すると共に、プロピザミド耐性株とコルヒチン耐性株の交配実験を行った。その結果、一つの耐性株について、プロピザミド作用部位が β チューブリン上のコルヒチン耐性株と同一である可能性が示唆された。

1. はじめに

農薬や化学肥料は農業の分野に飛躍的な進歩をもたらしたが、一方でそれらによる土壌や水の汚染は深刻な問題となっている。戦後、農薬使用の増加に伴い、DDTやディルドリン等による人や家畜、環境への悪影響が社会問題となった。昭和46年の「農薬取締法」の改正等をきっかけとして、毒性の高い農薬や残留性の高い農薬の問題は減少したが、やがてバブル景気を背景にゴルフ場

建設ラッシュが始まり、散布される農薬による水質汚濁問題が社会問題となった。そのため、ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の未然防止を図ることが緊急の課題となり、平成2年に「ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係わる暫定指導指針」が定められた。この指導指針によりゴルフ場で使用される主要な農薬44種類が選定されている。

このように我々の周囲では様々な農薬が使用されているが、そうした農薬が生物体へ与える影響

*大妻女子大学 社会情報学部

**東京大学大学院 理学系研究科

についても様々な研究が行われている。本研究では、「ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係わる暫定指導指針」における対象農薬の一つである除草剤プロピザミドを用い、単細胞藻類のクラミドモナスに与える影響を生理学的側面から検討した。

クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) は、植物学では緑藻類、動物学では原生動物の植物性鞭毛虫類として分類されている体長約 $10\ \mu\text{m}$ 程の微細な単細胞生物である。独立栄養生物であるため、単純な組成の培地で培養・増殖させることができる。また、ライフサイクルが短く、通常ハプロイド (単相) として存在するため、突然変異が直ちに表現型に現れ、変異株を得ることが容易である。さらに異なる接合型の株 (+, -) 同士で有性生殖も行うので、遺伝解析も行うことが出来る。以上のような特徴から、クラミドモナスは、遺伝学、細胞生物学をはじめとする広い分野で実験材料として用いられてきた。

除草剤プロピザミド (propyzamide) は、プロナミド (pronamide) と呼ばれることもあり、化学名は 3, 5-dichloro-N-(1, 1-dimethylpropynyl) benzamide である。プロピザミドはゴルフ場の他、果樹園、レタス・チコリー・アブラナ科等の畑や、飼料畑、休耕地、森林地において、一年生及び多年生のイネ科雑草、広葉雑草を対象に広く用いられている除草剤である¹⁾。

生理学的研究では、微小管重合阻害剤であるコルヒチンと同様に、微小管の重合を阻害する作用を持つと考えられている²⁾。クラミドモナスにおいては、 β チューブリンに変異を持つコルヒチン耐性株³⁾を用いて、プロピザミドをはじめとする除草剤の増殖阻害作用が比較されている⁴⁾。コルヒチン耐性株のひとつである *col^{R4}* は β チューブリン上に変異があることがわかっている³⁾。今回、プロピザミド耐性がコルヒチン耐性と同じ β チューブリン上の変異によって生じるのか否かを明らかにするために、様々な濃度のプロピザミド入り培地中でクラミドモナスの野生株とコルヒチン耐性株 *col^{R4}* の増殖阻害を比較した。さらに、プロピザミド耐性株の単離を試み、得られた耐性

株の性質について検討を行った。

2. 材料と方法

2.1 クラミドモナスの培養

実験には、クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) 野性株137C, 変異株 *col^{R4}*³⁾を用いた。これらの株は *Chlamydomonas Genetics Center* (アメリカ・Duke 大学) から入手した。液体培養には Tris-acetate-phosphate (TAP) 培地⁵⁾を用い、12時間ずつの明暗周期で通気培養した。固形培地には1.5%の寒天を含む TAP 培地を用い、12時間の明暗周期で培養した。接合を行わせる (細胞を配偶子に分化させる) には無窒素培地⁶⁾で4~6時間培養した。

2.2 プロピザミドの調製

プロピザミド (Propyzamide : 3, 5-dichloro-N-(1, 1-dimethylpropynyl) benzamide, 和光純薬製) をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶かし、1ml の TAP 培養液に、それぞれ $0\ \mu\text{M}$, $5\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{M}$, $20\ \mu\text{M}$, $100\ \mu\text{M}$, $300\ \mu\text{M}$ の濃度となるように加えた (これらの溶液を、以下、プロピザミド溶液と呼ぶ)。

2.3 プロピザミド溶液中の野性株 (wt) と *col^{R4}* の細胞数の変化

各濃度のプロピザミド溶液 1 ml に、あらかじめ3日間 TAP 培地中で液体培養した野性株 (以下 wt と呼ぶ) と変異株 *col^{R4}* をそれぞれ約 10^4 cells ずつ入れ、明暗12時間周期、室温25°Cの培養室で4日間液体培養し、細胞数を調べた。また、微分干渉顕微鏡により、細胞形態を観察した。

2.4 プロピザミド耐性株の単離

$20\ \mu\text{M}$ プロピザミドを含む固形培地に wt を培養し、自然発生したシングルコロニーをランダムに単離した。単離した株について $20\ \mu\text{M}$ プロピザミドを含む TAP 溶液中で4日間培養し、微分干渉顕微鏡を用いて検鏡した。

3. 結果と考察

3.1 プロピザミド溶液中の野性株(wt)と col^R4 の増殖阻害の比較

クラミドモナスをプロピザミドを含まない培地で4日間培養した時の細胞数を100%とし、プロピザミド ($5 \mu\text{M} \sim 300 \mu\text{M}$) を添加した場合の割合を求めた (図1)。その結果、wt より col^R4 の方がプロピザミド存在下での生存率が高く、コルヒチン耐性株はプロピザミドにも耐性を示すことが明らかになった。この結果は、Schibler ら⁴⁾の実験結果と一致し、また Akashi ら²⁾の「プロピザミドはコルヒチン様作用を持つ」という結果とも矛盾しない。

今回の結果では、プロピザミドは $5 \mu\text{M}$ ですでに wt に与える影響が現れ、細胞の増殖が阻害されることが明らかになった。通常プロピザミドが農薬として使用される際は、 $5 \mu\text{M}$ を超える濃度で散布されることはない。しかし、プロピザミドの土壤中の半減期は、気温や湿度に依存して23日から120日までと幅広く、また、有機物の多い土壤に比べ、少ない土壤では半減期が長くなると

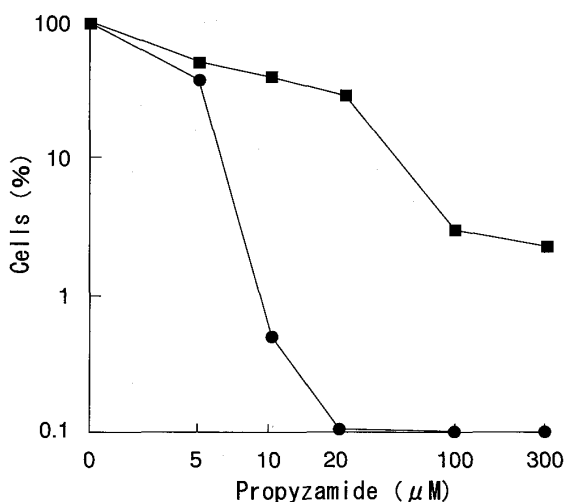


図1. プロピザミドによるクラミドモナスの増殖阻害
各種濃度のプロピザミドを含む TAP 培地中でクラミドモナスの wt (●) と col^R4 (■) を 25°C で4日間培養した。プロピザミドを含まない場合の wt の細胞数を100%とし、 $5 \mu\text{M} \sim 300 \mu\text{M}$ プロピザミドを添加した場合の細胞数の割合を求めた。

言われている¹⁾。さらに、散布されたプロピザミドが雨水に溶け、地下水等を通して一ヶ所に溜まる可能性なども考えられる。こうしたことから、土壤中で局所的にプロピザミドの濃度が $5 \mu\text{M}$ に達する可能性も否定できない。また、最近では、プロピザミドには内分泌攪乱作用があるのではないかという研究報告もある⁷⁾。したがって $5 \mu\text{M}$ よりも低い濃度でも、長期に渡る暴露により、細胞分裂には影響しなくても形態変化をひき起こしたり、接合に影響を及ぼしたりする可能性もあり得る。クラミドモナスを含む原生動物は生態系ピラミッドの下層に位置する生物であるため、プロピザミドが原生動物の増殖や生存に影響を及ぼす可能性があることは、結果として生態系全体へ影響が及ぶ可能性を示していると言えよう。

3.2 プロピザミド溶液中の野性株(wt)と col^R4 の細胞形態の比較

微分干渉顕微鏡により TAP 中の wt と col^R4 、 $20 \mu\text{M}$ プロピザミド溶液中の wt と col^R4 の形態をそれぞれ観察した (図2)。TAP 中の wt

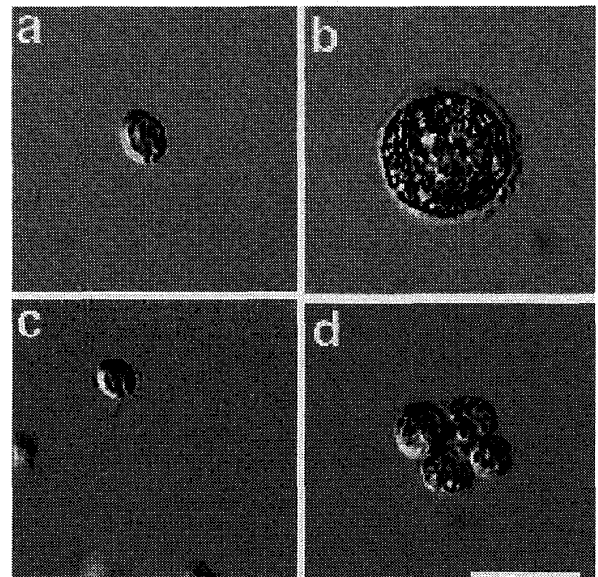


図2. プロピザミド存在下で培養したクラミドモナスの細胞形態

プロピザミドの非存在下 (a, c) 及び $20 \mu\text{M}$ 存在下 (b, d) で培養した wt (a, b) と col^R4 (c, d) の細胞の様子を微分干渉顕微鏡で観察した。Bar = $20 \mu\text{M}$ 。

(図2-a)と20 μ Mプロピザミド溶液中のwt(図2-b)で細胞の大きさを比較すると、プロピザミド溶液中の細胞の方が4倍程度大きくなっており、細胞分裂がうまく進行していないことが明らかになった。一方、TAP中の col^{R4} (図2-c)と20 μ Mプロピザミド溶液中の col^{R4} (図2-d)では細胞一つ一つの大きさは変わっておらず、このことから、 col^{R4} では20 μ Mプロピザミド溶液中でも細胞分裂が進行することが明らかになった。

3.3 プロピザミド耐性株の単離

これまでの結果から、プロピザミドの作用部位が β チューブリン上でのコルヒチンの作用部位と同一である可能性が強く示唆された。そこで、プロピザミドの作用部位が β チューブリン上でのコルヒチンの作用部位と同一であるか否かを明らかにするため、プロピザミド耐性株の単離を試みた。具体的には、プロピザミド20 μ Mを含むTAP固形培地でwtの培養を行った。その結果、一週間後に分裂を続けていた株を4株単離することができ、これらのプロピザミド耐性株をPPM^{R1}、PPM^{R3}、PPM^{R4}、PPM^{R5}と名付けた。

耐性株4株を、20 μ Mプロピザミドの存在下及び非存在下で培養し、細胞の形態を微分干渉顕微鏡により観察した(図3)。その結果、プロピザミド耐性株は20 μ Mのプロピザミド存在下でも細胞分裂が進行していることが示された。しかし、鞭毛が3本以上あるクラミドモナスなども観察され、細胞分裂が完全には出来ないものも存在することが明らかになった。また、図3-fや図3-hなどに示したように、20 μ Mプロピザミド存在下では非存在下の株に比べて大きくて丸いクラミドモナスが観察された。

さらに、プロピザミド耐性株で起こっている変異がコルヒチン耐性株と同じ遺伝子座で起こっているかどうかを確認するために、単離したプロピザミド耐性株4株を、コルヒチン耐性株 col^{R4} と交配させた。クラミドモナスでは1回の交配につき4つの娘細胞が生じる。それら4つの娘細胞の組(4分子)を多数(>10)得て、20 μ Mプロピ

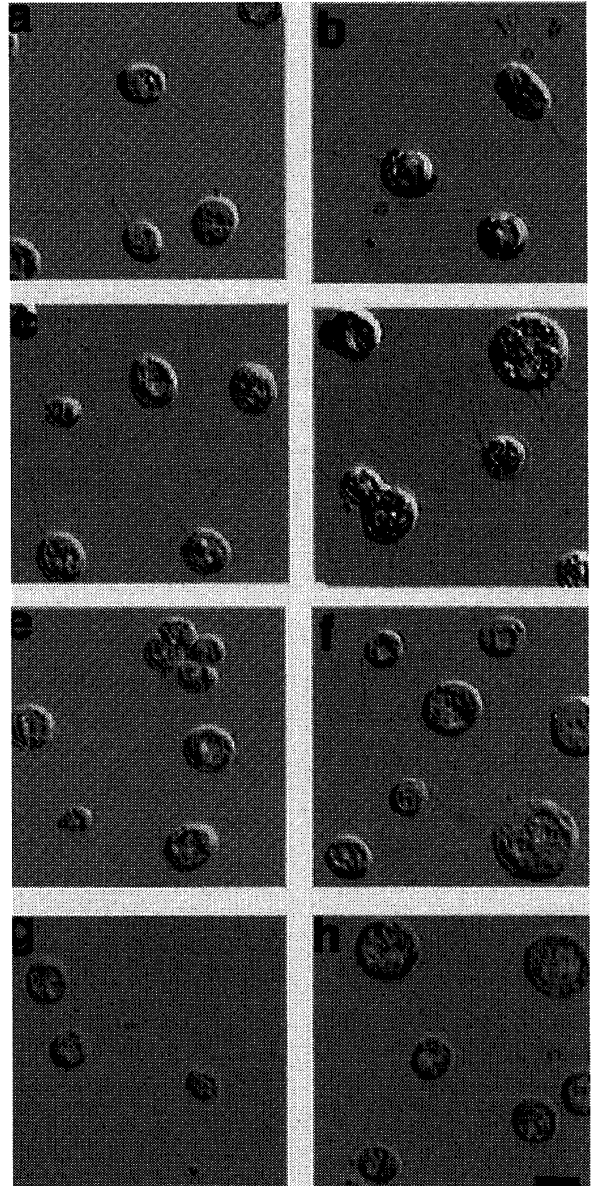


図3. プロピザミド存在下で培養したプロピザミド耐性株の細胞形態

プロピザミド耐性株 PPM^{R1} (a, b), PPM^{R3} (c, d), PPM^{R4} (e, f), PPM^{R5} (g, h) をプロピザミドの非存在下 (a, c, e, g) 及び20 μ M存在下 (b, d, f, h) で培養し、微分干渉顕微鏡で観察した。Bar=10 μ M。

ザミドを含む固形培地で培養し、プロピザミドに対する耐性の有無を検討した。

その結果、PPM^{R3}とコルヒチン耐性株 col^{R4} の交配については、生じた娘細胞が全て増殖した。このことは、PPM^{R3}が col^{R4} と同一の遺伝子座に変異を持つ可能性を示している。さらに、今回用いた col^{R4} は β チューブリンの遺伝子に変

異を持つことを考えると、プロピザミドもコルヒチンと同様に β チューブリンに結合して重合を阻害する効果を持つことが予想される。今後は生化学的な手法などにより、プロピザミドが微小管重合に及ぼす効果を詳しく解析する必要がある。

一方、PPM^R3 以外のプロピザミド耐性株と *col^R4* との組みあわせの交配では、プロピザミド存在下では増殖しない、すなわち薬剤非耐性の娘細胞が出現し、*col^R4* 変異とは異なる遺伝子座に変異が起こっていることがわかった。このことから、これら3つのプロピザミド耐性株は β チューブリン遺伝子以外の部位に変異を起こしている可能性が示唆された。微小管は、 α チューブリンと β チューブリンのサブユニットがつながった基本構造に、チューブリンの重合を調節する微小管結合蛋白質 (microtubule-associated proteins; MAPs) が結合して構成されていると考えられている。したがって、これら3つの耐性株の作用部位は、 α チューブリンの遺伝子、あるいはチューブリンの重合を調節する MAPs の遺伝子に変異が生じている可能性が考えられる。すなわち、プロピザミドの存在下では重合しにくいチューブリンが、サブユニットの変異あるいは重合調節作用を持つ MAPs の変異によりプロピザミドの作用を受けにくくなり、結果としてプロピザミドによる細胞分裂の進行阻害作用が抑えられるという可能性である。今後、これらのプロピザミド耐性株について、変異の起こっている遺伝子座の解析を行っていききたい。

参考文献

1) Roberts. R. R. (1998) *Herbicides and Plant*

Growth Regulators, 10–15, Cambridge (ed.)

- 2) Akashi, T., *et al.* (1988). Effects of propyzamide on tobacco cell microtubules *in vivo* and *in vitro*. *Plant and Cell Physiol.* 29: 1053–1062.
- 3) Bolduc, C., V. D. Lee, and B. Huang (1988) β -tubulin mutants of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 131–135.
- 4) Schibler, M.J. and B. Huang (1991) The *col^R4* and *col^R15* β -tubulin mutations in *Chlamydomonas reinhardtii* confer altered sensitivities to microtubule inhibitors and herbicides by enhancing microtubule stability. *J. Cell Biol.* 113: 605–614.
- 5) Gorman, D. S. and R. P. Levine (1965): Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 54: 1665–1669.
- 6) Sarris, E. H. (1989): *The Chlamydomonas Sourcebook*. Academic Press, San Diego.
- 7) Crisp, T. M., E. D. Eric, R. L. Cooper, W. P. Wood, D. G. Anderson, K. P. Baetcke, J. L. Hoffmann, M. S. Morrow, D. J. Rodier, J. E. Schaeffer, L. W. Touart, M. G. Zeeman, and Y. M. Patel (1998) *Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis*, *Environmental Health Perspectives*, 106, Suppl. 1, 11–56.

The Effects of Propyzamide on *Chlamydomonas reinhardtii*

NORIKO KINOSHITA*, RITSU KAMIYA**, NATSUMI HOSOYA*

*School of Social Information Studies, Otsuma Women's University

**Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo

Abstract

In order to examine the possibility that the resistance to colchicine and propyzamide is caused by the same mechanism, we compared the effects of propyzamide on cell proliferation of three *Chlamydomonas reinhardtii* strains: wild-type strain, colchicine-resistant strain and isolated propyzamide-resistant strain. Propyzamide is a herbicide for removing weeds from golf courses and crop fields, and acts as a colchicines-like substance which inhibits polymerization of microtubules. The colchicine-resistant strain mutated arrangement of amino acids on β -tubulin. Here, we first confirmed that propyzamide showed no inhibitory effects on cell proliferation of the colchicine-resistant strain. Microscopic comparisons of the morphology between wild-type and colchicine-resistant strains suggested that propyzamide inhibited cell division. Moreover, we succeeded in isolating four propyzamide-resistant strains. Microscopic observation showed that the propyzamide-resistant strains were similar in cell division to the wild-type strain. The cross examination between the propyzamide-resistant and colchicine-resistant strains revealed the possibility that resistance to propyzamide and colchicine resulted from the common mechanism that reduces the ability of those substances to inhibit β -tubulin polymerization.

Key Words (キーワード)

Chlamydomonas (クラミドモナス)・propyzamide (プロピザミド)・colchicine (コルヒチン)・herbicide (除草剤)