

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580011

研究課題名（和文） イネ科植物間に高い選択作用性をもたらすオーキシシン受容体の除草剤認識特性

研究課題名（英文） Recognition properties of auxin receptors underlying selective herbicidal actions among grass species

研究代表者

春原 由香里 (SUNOHARA YUKARI)

筑波大学・生命環境系・講師

研究者番号:00302539

研究成果の概要（和文）：イネ科植物間に高い選択作用性を持つキノリンカルボン酸系のオーキシシン型除草剤キンクロラックの植物体内での作用機構や感知のされ方について主に検討を行なった。これまで、本剤の植物体内での感知のされ方や作用機構は、フェノキシ酢酸系のオーキシシン型除草剤である 2,4-D と同じであると長年、考えられてきた。しかし、本研究から、2,4-D とは同一でない可能性が高く、少なくとも幾つかの感受性イネ科植物種での本剤の生育抑制作用の主因は、シアンではなく、活性酸素の過剰生成である可能性が高いことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Quinclorac is one of the auxinic herbicides belonging to the quinolinecarboxylic acid family, and the mode of action has been thought to be the same as with 2,4-D, an auxinic herbicide belonging to the phenoxyacetic acid family. Quinclorac exhibits high selectivity among grass species, and the primary mechanism underlying its selective action has been considered to be the selective induction of ethylene biosynthesis, which ultimately leads to cyanide accumulation in susceptible grasses. In this study, the mode of action of quinclorac and recognition properties of auxin receptors were investigated. Our results strongly suggest that quinclorac has a different action from 2,4-D in several susceptible grass species; quinclorac-induced growth reduction may be caused by ROS, but not by cyanide.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総 計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：植物成長制御学、植物生理学

科研費の分科・細目：農学、作物学・雑草学

キーワード：オーキシシン型除草剤、選択作用性、オーキシシン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

(1) オーキシシンは古くから非常に多くの研究がなされてきているにもかかわらず、その生理作用の多様さゆえに、シグナル伝達機構の詳細は、不明であった。しかし、近年、シロイヌナズナを用いて、ユビキチンリガーゼ複合体の構成成分である TIR1（輸送阻害剤応答タンパク質 1）がこれ

まで明らかにされていなかったオーキシシン受容体であることがつきとめられ、オーキシシンは TIR1 と結合することで転写抑制因子ファミリー（Aux/IAA）の分解を促進し、それにより標的遺伝子の転写を活性化することが示された。

これらの発見がきっかけとなり、オーキシシン型除草剤においても、除草作用とオーキシシン受容体

との関係が調べられるようになった。オーキシシン型除草剤の1つであるピクロラムでは、TIR1 類似のオーキシシン結合因子 (AFBs) の変異がピクロラムに対する感受性に与える影響が調べられ、シロイヌナズナではピクロラムの作用発現には、TIR1 ではなく、主に AFB4 や AFB5 が深く関連していることが報告された。オーキシシン型除草剤には化学構造により幾つかのグループが存在しており、化学構造に依存して植物の反応特性も異なることが知られている。したがって、オーキシシン型除草剤の化学構造に依存して受容体レベルでの感知機構も異なっている可能性がある。しかし、ピクロラム以外の多くのオーキシシン型除草剤がどのような受容体によって感知されているのかは未解明である。

(2) キンクロラックは、イネ科植物間 (特にイネ・ヒエ間) に非常に高い選択性を有する芝地・水稲用のオーキシシン型除草剤である。化学構造からキノリンカルボン酸系のオーキシシン型除草剤に分類されている。これまで、キノリンカルボン酸系のオーキシシン型除草剤の作用機構については、“植物体内でオーキシシンとして感知されることによってエチレン生合成系を活性化させ、その結果、副産物であるシアンが蓄積して生育抑制が起こる”と考えられてきた。しかし、私たちのこれまでの研究から、キンクロラックをトウモロコシ (感受性イネ科植物) に処理すると、2,4-D (フェノキシ酢酸系のオーキシシン型除草剤) のような代表的な合成オーキシシン剤とは異なる症状や生理作用が現れることや、トウモロコシの膜結合型オーキシシン結合蛋白質 (ABP1) への結合に関しては、2,4-D は結合するが、キンクロラックは結合しない、つまり、キンクロラックは ABP1 にはオーキシシンとして認識されていない可能性があることを見出した。しかしながら、高い選択作用性を示すキノリンカルボン酸系のオーキシシン型除草剤の植物体内での作用機構や選択作用機構の詳細は不明であった。

## 2. 研究の目的

高い選択作用性を有するキノリンカルボン酸系のオーキシシン型除草剤の植物体内での感知のされ方や作用機序、さらにイネ科植物間での選択作用機構を解明することで、将来的にさらに高度な選択作用性を有する低環境負荷型の新規の除草剤開発に向けての基礎的知見を提供することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 供試植物

トウモロコシ (*Zea mays* L. cv. Honey Bantam)  
シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh.)  
オヒシバ (*Eleusine indica* (L.) Gaerth.)  
メシバ (*Digitaria adscendens* (H.B.K) Henr.)

### (2) 供試薬剤

キンクロラック (3,7-dichloro-8-quinolinecarboxylic acid)

2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)

ピクロラム (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid)

### (3) 薬剤処理による植物生育、水分含量、クロロフィル含量への影響

0~100  $\mu$  M に調整した各薬剤溶液を植物体に処理し、一定時間経過後に植物体の新鮮重、水分含量、クロロフィル含量を測定した。

### (4) エチレン発生量

薬剤処理後の植物体全体または根部切片をバイアル瓶に詰めて密封し、バイアル瓶中のエチレン量をガスクロマトグラフ (FID) を用いて測定した。

### (5) シアン含量の測定

薬剤処理後に植物体を磨砕し、酸性条件下にてシアンを気化させた。気化させたシアンはアルカリ性の濾紙にトラップした後、溶出、酸化後、ピリジンとバルビツール酸によりカップリングさせて、溶液中の吸光度 (580 nm) を測定した。

### (6) 細胞生死判定試験

Evans blue 染色法、fluorescein diacetate (FDA) と propidium iodide (PI) によるダブル染色法により、薬剤処理後の根部での生細胞と死細胞の判定を行なった。

### (7) 過酸化脂質量の測定

#### ① エタン発生量

薬剤処理後の根部切片をバイアル瓶に詰めて密封し、根部切片から発生するエタン量をガスクロマトグラフ (FDI) を用いて測定した。

#### ② チオバルビツール酸量

薬剤処理後に根部または茎葉部を採取後、磨砕し、チオバルビツール酸法により根部と茎葉部中の過酸化脂質量を測定した。

### (8) 活性酸素の検出

活性酸素検出の蛍光プローブである dihydroethidium (DHE) で薬剤処理後の根部を染色後、共焦点レーザー走査顕微鏡 (Zeiss LSM510) により、 $O_2^-$  発生を検出した。

### (9) スーパーオキシドアニオンラジカル ( $O_2^-$ ) 消去能

キサンチン-キサンチンオキシダーゼ経路によって生成させた  $O_2^-$  をスピントラップ剤である DMPO と反応させ、形成される DMPO-OOH 量を electron spin resonance (ESR) 法により測定することによって、 $O_2^-$  量を測定した。また、植物体から得た粗酵素抽出液を添加することで消去される  $O_2^-$  量を調べ、各植物体の  $O_2^-$  消去活性 (superoxide anion scavenging activity : SOSA) を

算出した。

#### (10) 抗酸化酵素活性

植物体から粗酵素液を調整し、粗酵素液中のカタラーゼ(CAT)、グルタチオンリダクターゼ(GR)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APx)の活性を測定した。

#### (11) ミトコンドリア電子伝達系における呼吸阻害

根部からミトコンドリアを抽出し、酸素電極を用いて酸素消費速度を測定することで、薬剤処理によるミトコンドリア電子伝達系への影響を調べた。

#### (12) ATP含量

薬剤処理後に根部を磨碎し、遠心分離にて上清を得た。上清にATP反応試薬を添加し、化学発光測定装置にて発光量を測定した。

#### (13) マイクロアレイによる遺伝子発現変動の網羅的解析

全ての供試薬剤で同程度の生育抑制効果が誘導される濃度を決定後、シロイヌナズナの茎葉部に薬剤を処理した。薬剤処理 20、40 分後に葉部から totalRNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。また、薬剤処理 20 と 40 分処理区のそれぞれにおいて、薬剤処理により発現変動がみられた遺伝子についての階層的クラスタリング解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) キンクロラックと 2,4-D のイネ科植物での反応性差異

オヒシバとメヒシバは耕地や非農耕地に広く発生する1年生のイネ科雑草である。両種は、匍匐性を有し、分けつして株となる等、類似点も多い。しかし、キノリンカルボン酸系の除草剤を処理した後に現れる症状が、両種で大きく異なることが野外試験で知られていたため、本研究では、まず始めに、この2種を用いて、主にキンクロラック(キノリンカルボン酸系)と 2,4-D(フェノキシ酢酸系)の反応性差異を調べた。

その結果、キノリンカルボン酸系のキンクロラックとキンメラクの2剤を各々根部に12時間処理をすると、オヒシバでは生育抑制作用は見られなかったが、メヒシバでは両薬剤、特にキンクロラックで強い生育抑制作用が見られた。キンクロラック処理によるメヒシバでの 50%生育阻害濃度は  $3.2 \mu\text{M}$  となり、オヒシバはメヒシバよりもキンクロラックに対して、少なくとも 30 倍以上の耐性を有していた(図1)。一方で、キンクロラックとは異なる母核構造を持つフェノキシ酢酸系の 2,4-D では、メヒシバだけでなくオヒシバでも生育抑制作用が見られた。さらに、キンクロラック処理によって、メヒシバではクロロフィル含量が顕著に減少するのに対し、2,4-D 処理ではあまり減少しなかった。これらのことから、オヒシバはキノ

リンカルボン酸構造を持つ化合物に対して、特異的に強い耐性を示し、キンクロラックと 2,4-D では作用、症状が異なることが示された。

次に、キンクロラック処理後のエチレン生成量を測定したところ、オヒシバでは無処理区と同等のエチレン量しか検出されなかったが(図 2)、メ

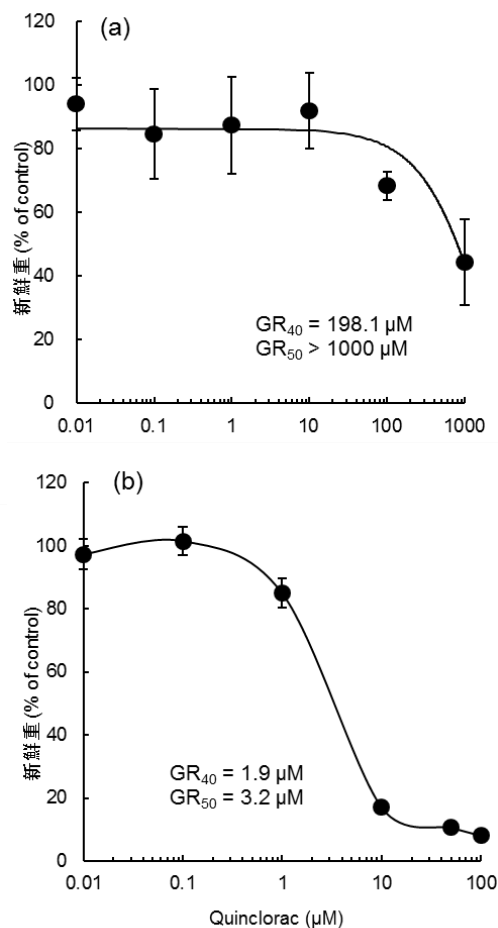


図1 キンクロラック処理6日後のオヒシバ(a)とメヒシバ(b)の幼植物全体の生体重(新鮮重)

ヒシバでは無処理区と比較して10倍以上のエチレン量が検出された。さらに、オヒシバが潜在的にエチレン誘導性が低い可能性を調べるためにエチレン誘導活性の高い 2,4-D処理を行い、オ

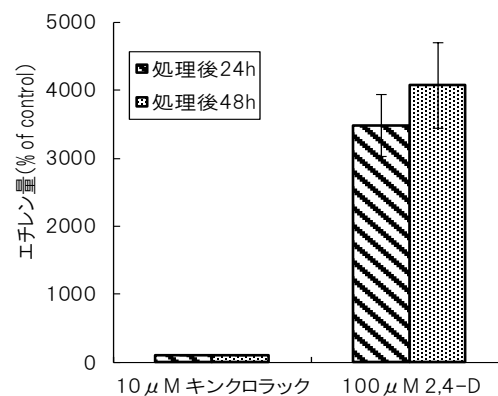


図2 キンクロラックまたは2,4-D処理後のオヒシバ幼植物体からのエチレン発生量

ヒシバでのエチレン生成量をメヒシバと比較した。その結果、2,4-D処理を行うと、無処理区と比較して、オヒシバでは約 40 倍(図 2)、メヒシバでは約 20 倍のエチレン量が検出された。このことから、オヒシバは潜在的にエチレン生合成系の誘導性が低いわけではなく、むしろメヒシバよりも誘導性が高く、キンクロラックに対して特異的にエチレン生合成系が働かない、もしくは働いてもその活性が非常に低いことが明らかとなった。また、エチレンの前駆体である 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)を添加すると、オヒシバにおいても根部長の抑制が見られていること、100  $\mu$ M の 2,4-D 処理後 4 日目において、オヒシバでも 20% 程度の生育抑制と多量のエチレン生成が見られたことから、実際にエチレン生合成系が活性化している状態ではオヒシバにおいても生育抑制が見られることが示された。つまり、オヒシバは、キンクロラック処理によりエチレン生合成系が活性化されないことが耐性を示す 1 要因となっていると考えられる。また、キンクロラックは、オヒシバの生体内において、受容体レベルでの感知のされ方が 2,4-D とは異なる可能性が高いことが考えられた。キンクロラックは 2,4-D とは異なり、オーキシンとして同一の受容体に感知されていないか、あるいは感知のされ方が非常に弱い可能性がある。

## (2)キンクロラック耐性イネ科植物種での耐性機構の検討

10  $\mu$ M のキンクロラック処理後のメヒシバでの生育抑制は 80% 程度だったのに対し、それよりエチレン生成量の多い 100  $\mu$ M の 2,4-D 処理後 4 日目におけるメヒシバでの生育抑制は 20% 程度であったことから、キンクロラックの生育抑制作用にはエチレン生合成系以外での作用の違いも深く関わっている可能性が示された。さらにキンクロラック処理後の植物体では、2,4-D 処理個体とは異なり、部分的に白化症状が観察されたことから、キンクロラック処理後に活性酸素の過剰生成やそれに伴う酸化障害が引き起こされている可能性について検討することにした。

茎葉部ではチオバルビツール酸(TBA)法を用いて生体膜の構成成分である脂質の過酸化を測定し、根部ではジヒドロエチジウム(DHE)染色法を用いて $O_2^-$ の発生の検討を行なった。キンクロラック処理後、オヒシバでは根部で $O_2^-$ は検出されなかったが、メヒシバでは $O_2^-$ は検出された(図 3)。一方、2,4-D 処理では、メヒシバでも $O_2^-$ はほとんど検出されなかった。また、キンクロラック処理後にオヒシバにおいて過酸化脂質量は変化しなかったが、メヒシバにおいては経時的に過酸化脂質量が増加した。これらの結果から、オヒシバではキンクロラックを処理しても活性酸素種は発生していない、あるいは発生してもすぐに抗酸化酵素や抗酸化物質によって消去されることが推察された。また、メヒシバではキンクロラック処理後に活性酸素種が過剰生成され、

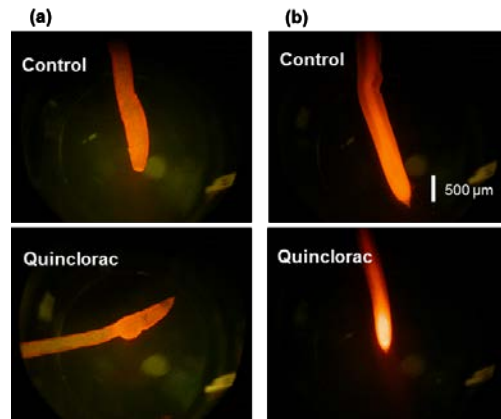


図3 キンクロラック処理後のオヒシバ(a)とメヒシバ(b)の根部先端での活性酸素発生の検討 強い橙色の蛍光は活性酸素発生を示す

それによって生体膜の脂質が過酸化されているものと推察された。

オヒシバの生体内ではキンクロラックを処理しても過剰な活性酸素種の発生が検出されなかったことから、活性酸素種が発生しても抗酸化物質、抗酸化酵素などによって即座に消去できる可能性がある。そこで次に、オヒシバとメヒシバ間での活性酸素消去能、抗酸化酵素活性の差を比較した。本研究では両植物における活性酸素消去能を比較するため、ESRを用いた $O_2^-$ 消去能、抗酸化酵素(CAT、GR、APx)活性測定、過酸化水素添加による酸化傷害の観察を行った。キンクロラック処理後、オヒシバでは $O_2^-$ 消去活性(SOSA)は変化しなかった(図4)。一方、メヒシバでは、キンクロラック処理後にSOSA値が顕著に増加していることから(図4)、活性酸素種が発生し、それがシグナルとなり抗酸化酵素、抗酸化物質の活性を増大させたと考えられる。また、オヒシバのSOSA値はメヒシバよりも数倍高い値を示していたことから(図4)、オヒシバはメヒシバよりも潜在的に高い $O_2^-$ 消去能を有しており、多少の $O_2^-$ が発生しても、その高い $O_2^-$ 消去能によって即座に消去できると考えられる。

次に両植物における抗酸化酵素活性を調べた。 $H_2O_2$ を消去するカタラーゼ(CAT)、酸化型グルタチオンを還元型グルタチオンに変化させるグルタチオンリダクターゼ(GR)、そして $H_2O_2$ を消去するアスコルビン酸リダクターゼ(APx)の3つの抗酸化酵素活性を測定したところ、オヒシバがメヒシバに比べ3つの酵素全てにおいて潜在的に活性が高いことが明らかとなった。

さらに、オヒシバは活性酸素に対して本当に高い処理能力を有するかどうかを確認するため、オヒシバとメヒシバのリーフディスクを用いて、外来的に $H_2O_2$ を投与した後のクロロフィル含量の変化を調べた。その結果、100-1000mM処理区において、オヒシバはメヒシバに比べて全体的な白化、クロロフィル含量の減少の程度が低かったことから(図5)、実際にオヒシバはメヒシバよりも活性酸素に対して強いことが示された。

以上の結果から、1)キンクロラックは、植物体



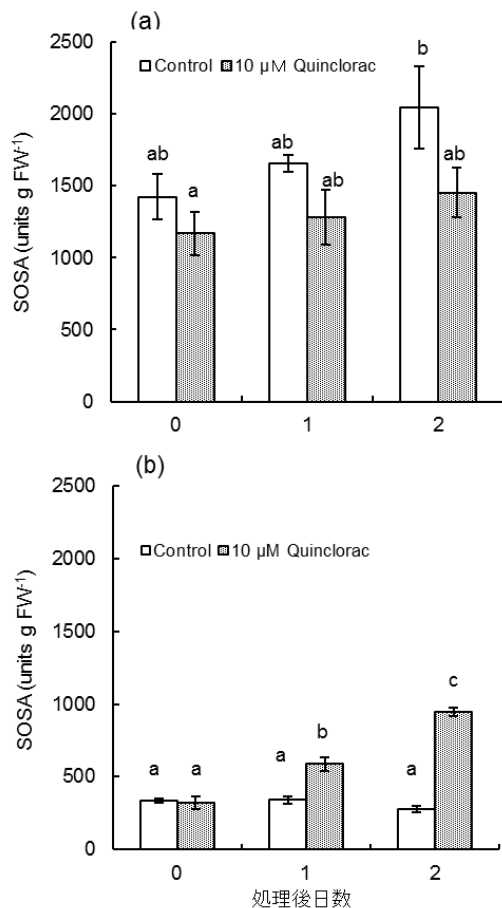


図4 キンクロラク処理後のオヒシバ(a)とメヒシバ(b)の茎葉部でのO<sub>2</sub><sup>-</sup>消去活性 (SOSA)

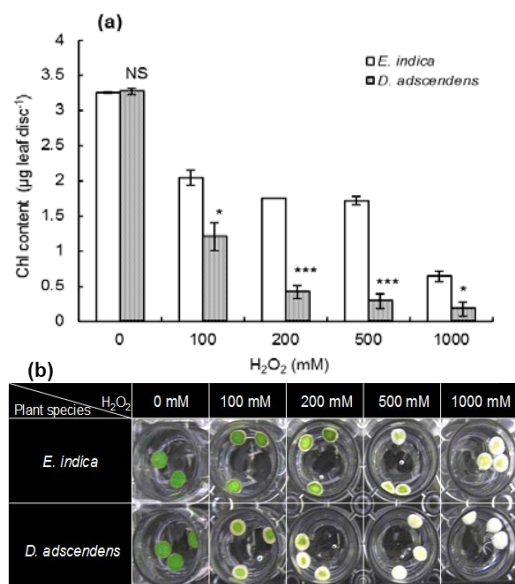


図5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理1時間後のオヒシバ(*E. indica*)とメヒシバ(*D. adscendens*)の葉部切片でのクロロフィル含量

内で、活性酸素の過剰発生を誘導し、さらに脂質の過酸化を引き起こす、そして、2) 耐性種であるオヒシバは、高い活性酸素消去能を有しているため、植物体内でキンクロラク処理後に活性酸素が発生しても、それらを消去することで酸

化傷害を軽症ですませている可能性が高いことが明らかとなった。また、さらに(1)の結果より、オヒシバはキンクロラクを処理してもエチレン合成系が誘導されない(あるいは非常に誘導されにくい)ため、エチレンとシアンが蓄積しにくいこと等、複数の要因が重なり、キンクロラクに対して高い耐性を有している可能性が高いことが明らかとなった。

### (3)キンクロラクの作用機構の検討

(1) と(2)の結果から、キンクロラクは活性酸素発生を引き起こすことが明らかとなったが、これまで長い間、キンクロラクの生育抑制作用の原因物質は、シアンであると考えられてきたため、活性酸素とシアンのいずれがキンクロラクの生育抑制作用の真の原因物質であるのかを検討することにした。この研究では、キンクロラク感受性イネ科植物種であるトウモロコシを用いて実験を行なった。

まず、トウモロコシ根部に2,4-Dを処理したところ、エチレン量とシアン蓄積量が急増したが、顕著なO<sub>2</sub><sup>-</sup>発生は検出できなかった。一方、キンクロラク処理ではエチレン量とシアン蓄積量は増大したものの、2,4-D処理ほどの急激な増大は認められなかったが、顕著なO<sub>2</sub><sup>-</sup>発生が検出された。

さらに細胞死、エタン量、エチレン量との関係を詳細に解析するため、同一個体を用いて同時にそれらの測定を行なった。その結果、同一個体では、キンクロラク処理後に過酸化脂質量の増加に伴い死細胞数が増大していた。また、2,4-D 処理区では、キンクロラク処理区よりも多量のエチレンが発生し、その副産物であるシアンもより多く蓄積している条件下でも、死細胞数や過酸化脂質量の増大は認められなかった。これらの結果から、キンクロラクが誘導するトウモロコシ根部での細胞死は、これまで考えられてきたような、エチレン生合成経路中で副産物として蓄積するシアンによって引き起こされるのではなく、キンクロラク処理後に発生する活性酸素によって主に引き起こされている可能性が高いことが、本研究から初めて明らかとなった。

次に、キンクロラクによる活性酸素の発生経路について検討を行なった。まずはじめにミトコンドリアの電子伝達系が本剤による活性酸素発生に関与している可能性について検討した。その結果、トウモロコシ根部、そして抽出したミトコンドリア画分の両方において、キンクロラクは濃度依存的に呼吸速度を低下させることが分かった。一方、2,4-D では、濃度依存的な呼吸速度の低下は認められなかった。さらに、キンクロラク処理では、MTT還元能とATP含量が処理後に減少したが、2,4-D (≤ 50 μM) 処理では大きな減少は認められなかった。これらの結果から、トウモロコシでは、2,4-D は、ミトコンドリアに対して直接的な影響を持たないのに対し、キンクロラクは、ミトコンドリアの機能障害を誘発し、その結

果、電子伝達系から活性酸素が発生し、酸化障害が引き起こされる可能性があることが考えられた。しかしながら、キンクロラックによるミトコンドリア呼吸阻害は濃度依存的であるものの、根部において確認された呼吸阻害よりも弱いことから、ROS 発生経路は他にも存在する可能性もあり、さらなる検討が必要であると考えている。

次に、キノリンカルボン酸系のオーキシシン型除草剤の植物体内での感知機構の解明に向けての足掛かりを得るため、すでに除草作用とオーキシシン受容体との関係が調べられている、ピクロラム(ピコリネート系)と2,4-D(フェノキシ酢酸系)を比較薬剤としてマイクロアレイ解析を実施した。

シロイヌナズナにピクロラム、2,4-D、キンクロラックを処理し、処理後20分、40分で2倍以上の発現変動があった遺伝子を抽出し、階層的クラスター解析を行なった。その結果、処理後20分、40分のいずれでも、キンクロラックは、ピクロラムと同一のクラスターを形成し、2,4-Dは、それらとは遺伝子発現パターンがやや異なるグループに分類されることが分かった。フェノキシ酢酸系の2,4-Dの除草作用には、主にオーキシシン受容体であるTIR1が、そしてピコリネート系ピクロラムでは、TIR1ではなく、主にAFB4やAFB5が関与していることが報告されている。このことから、キンクロラックの植物体内での感知のされ方もピクロラムと同様に主にAFB4やAFB5によってなされる可能性があるか否かについて、今後さらに詳細に検討していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

①Sunohara, Y., S. Shirai, H. Yamazaki and H. Matsumoto (2011) Involvement of antioxidant capacity in quinclorac tolerance in *Eleusine indica*. *Environmental and Experimental Botany* **74**, 74-81. (referred)

②Sunohara, Y., S. Shirai, N. Wongkantrakorn and H. Matsumoto (2010) Sensitivity and physiological responses of *Eleusine indica* and *Digitaria adscendens* to herbicide quinclorac and 2,4-D. *Environmental and Experimental Botany* **68**, 157-164. (referred)

[学会発表](計 14 件)

①春原由香里、山崎博貴、木村謙太、松本宏、キンクロラックのトウモロコシでの成育抑制作用におけるシアン主因説の再検討、日本農薬学会第36回大会、平成23年(2011年)3月18日、神奈川

②山崎博貴、春原由香里、松本宏、キンクロラックによる活性酸素発生機構の検討: MTT還元能とATP含量への影響、日本雑草学会第49回大会、平成22年(2010年)4月11日、福

井

[図書](計 2 件)

①春原由香里、雑草学辞典 CD版(分担執筆)、日本雑草学会編、2011

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

春原 由香里(SUNOHARA YUKARI)

筑波大学・生命環境系・講師

研究者番号:00302539

### (2)研究分担者

松本 宏(MATSUMOTO HIROSHI)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号:10199888