

氏名	CHAYAPAKDEE PATTARASUDA		
学位の種類	博士 (農学)		
学位記番号	博 甲 第 9329 号		
学位授与年月日	令和元年12月31日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Molecular Mechanism of Quinclorac Resistance in Multiple-Herbicide Resistant <i>Echinochloa phyllopogon</i> (多剤抵抗性タイヌビエにおけるキンクロラク抵抗性の分子機構)		
主査	筑波大学教授	農学博士	松本 宏
副査	筑波大学教授	博士 (農学)	臼井健郎
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	田中俊之
副査	筑波大学准教授	博士 (農学)	春原由香里

## 論 文 の 要 旨

カリフォルニアで見出された多剤抵抗性タイヌビエは、キンクロラク (3,7-ジクロロ-8-キノリンカルボン酸) を含む作用機作の異なるヒエ類防除に用いられる複数の除草剤に対して抵抗性を示す。オーキシシン型除草剤であるキンクロラクは、植物ホルモンであるエチレンの生産を誘導し、その生合成副産物として毒性の高いシアン化水素 (HCN) を植物体に蓄積させる。先行研究では抵抗性タイヌビエにおいてHCN解毒酵素である $\beta$ -シアノアラニン合成酵素 ( $\beta$ -CAS) 活性が大きくなっていることが確認され、 $\beta$ -CASが、抵抗性タイヌビエのキンクロラク抵抗性に関与することが示唆されてきた。本研究で著者は、まず、キンクロラク抵抗性に $\beta$ -CASが関与するかについて分子レベルで検討した。

抵抗性 (R) と感受性 (S) 系統から2種の $\beta$ -CAS遺伝子 ( $\beta$ -CAS1と $\beta$ -CAS2) を単離した。R系統において $\beta$ -CAS1 mRNAの蓄積量はS系統より大きかったが、 $\beta$ -CAS2では有意差は認められなかった。また、S系統では、選択的スプライシングによってイントロンを含んだ異常な転写産物が検出されたが、R系統では正常な $\beta$ -CAS1 mRNAだけが認められた。これは、エキソン-イントロン境界に存在する一塩基多型 (SNP) によると考えられた。このSNP、異常転写産物、発現量および $\beta$ -CAS活性がSとR系統の交雑後代F6系統を用いて共分離するかどうかを調査した。その結果、これら4つは共分離していることが明らかとなった。よって、R系統において選択的スプライシングが起こらない結果、 $\beta$ -CAS活性が高くなっていることが示唆された。しかし、 $\beta$ -CAS活性とキンクロラク抵抗性は共分離しなかったことから、R系統における高い $\beta$ -CAS活性はキンクロラク抵抗性に関与していないと考えられた。さらに、タイヌビエ由来 $\beta$ -CAS1を過剰発現した組換えシロイヌナズナもキンクロラクに対して抵抗性を示さなかった。 $\beta$ -CAS遺伝子をノックアウトしたイネも野生型と同様にキンクロラク感受性を示した。以上のことから、キンクロラク抵抗性に $\beta$ -CASは関与しないと結論づけた。

一方、キンクロラクで処理した際のエチレン生産量はS系統と比べR系統では少ない。F6系統において、エチレン生産量の低下と、キンクロラク抵抗性は共分離したことから、エチレン生産量の低下が、タイヌビエのキンクロラク抵抗性に関与していると考えられた。また、先行研究によって2種のシトクロムP450、CYP81A12とCYP81A21が多剤抵抗性タイヌビエにALS阻害など複数の作用機作の除草剤に対する

抵抗性を付与することが明らかにされている。したがってP450による除草剤の代謝能向上もキンクロラック抵抗性機構の1つである可能性が考えられ、実際にF6系統においては、*CYP81A12*と*CYP81A21*の高発現とキンクロラック抵抗性が共分離していた。また、両遺伝子を導入した組換えシロイヌナズナは、野生株と比較してキンクロラックを含むMS培地上で抵抗性を示し、エチレン発生量も少なかった。これは他のオーキシン型除草剤についても同様であることが明らかとなった。

## 審 査 の 要 旨

著者は多剤抵抗性タイヌビエのキンクロラックへの抵抗性機構を詳細に解析し、これまで考えられてきたHCN解毒酵素である $\beta$ -シアノアラニン合成酵素は抵抗性に関与せず、エチレン生産量の低下が抵抗性と関係することを示すとともに、これに加えてP450による除草剤の代謝能向上が、エチレン生成の低減に関与する可能性を示唆するに至っている。著者の研究は20年以上解明されてこなかった雑草のキンクロラック抵抗性機構を明らかにしており、この成果は雑草における除草剤抵抗性出現機構の理解を深めるとともに、将来の除草剤管理にも有効利用されると考えられる。一方、キンクロラック代謝におけるP450の役割についてはさらなる研究が必要である。P450は様々な除草剤を代謝することができることから、代謝機構をより理解することで将来P450の利用も可能になると思われ、その端緒となる研究としても評価される。

令和元年11月18日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。