

機関番号：83804

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780018

研究課題名（和文） 除草剤抵抗性メカニズムとバイオフィトンとの関係解析

研究課題名（英文） Analysis of the relationship between herbicide resistance mechanism and biophoton generation

研究代表者

貫井 秀樹 (NUKUI HIDEKI)

静岡県農林技術研究所・花き科・主任研究員

研究者番号：10426463

研究成果の概要（和文）：

イネ培養細胞の除草剤応答発光検出系を用いて、除草剤応答発光の発生メカニズムを解析した。10日ごとに継代したイネ培養細胞に50-100 ppmのベンスルフロンメチル（BSM）を処理することにより、BSM応答発光が検出できた。BSMを含む18剤の除草剤応答発光を調べた結果、薬剤により応答発光の発生パターンは異なった。イネでベンスルフロンメチルの解毒代謝への関与が報告されているチトクローム P450 遺伝子 *CYP81A6* をクローニングし、RNAiにより遺伝子発現抑制株を作出した。発現抑制株のBSMおよび分岐鎖アミノ酸への応答から、BSM応答発光には、P450によるBSMの解毒代謝反応が関与していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The generating mechanism of herbicide responsive photon emission from cultured rice cells was analyzed. 50-100 ppm bensulfuronmethyl (BSM) treatment induced an increment of photon emission from rice cells. Emission patterns of 18 tested herbicides were different from each other. *CYP81A6*, a cytochrome P450 gene reported to be responsible for BSM tolerance in rice, was isolated from the rice cells, and was silenced by RNAi. Responses of *CYP81A6*-silenced cell line to BSM and branched chain amino acids revealed that the BSM detoxifying reaction by cytochrome P450 is involved in BSM responsive photon emission from rice cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学 作物学・雑草学

キーワード：除草剤抵抗性、バイオフィトン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 既存の除草剤に抵抗性を持つ除草剤抵抗性雑草の発生が、世界規模で問題となっている。除草剤抵抗性雑草の効果的・効率的な

防除には、除草剤抵抗性の有無の判別技術の確立が重要であるが、簡便性、迅速性及び正確性を持つ判別技術で、抵抗性メカニズムが異なる全ての抵抗性雑草に共通して使用で

きるものは、現在のところ存在しない。

(2) 雑草の除草剤抵抗性メカニズムは、除草剤の標的酵素等の変異(ターゲットサイト変異)と除草剤の標的酵素以外の変異(非ターゲットサイト変異)に大別される。非ターゲットサイト変異のメカニズムとしては、細胞内への除草剤成分の浸透性低下や解毒代謝酵素等による除草剤成分の解毒代謝が含まれる。

(3) 研究代表者らは、各種のストレスにตอบสนองして生物から発生する極微弱発光(バイオフィトン)の利用技術について研究を行っており、主要な水田雑草であるイヌホタルイのスルホニルウレア(SU)系除草剤抵抗性系統と感受性系統の間で、SU剤処理後のバイオフィトン(SU剤応答発光)に明確な差異があることを明らかにした。また、阻害剤試験の結果から、SU剤応答発光の発生に除草剤の解毒代謝反応が関与している可能性が示唆されている。バイオフィトンによる除草剤抵抗性の判別法は、広範囲な、もしくはあらゆる除草剤抵抗性雑草に適用可能で、かつ抵抗性を迅速・簡便・正確に判別できる画期的な技術になりうる。

## 2. 研究の目的

バイオフィTONを指標とした除草剤抵抗性雑草の判別技術の確立を最終目的とし、研究期間内には、非ターゲットサイト変異とバイオフィTONとの関係解明を目指す。具体的には、イネ培養細胞を材料とし、除草剤解毒代謝能の変化とバイオフィTON発生との関係を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) イネ(品種; 金南風、日本晴)の培養細胞に、SU系除草剤を含む各種の除草剤成分を処理し、発生する微弱発光をフォトンカウンターで測定した。

(2) イネ培養細胞から、代表的なSU剤であるベンスルフロンメチル(BSM)の解毒代謝に関与する酵素チトクロームP450の遺伝子断片を、RT-PCRによりクローニングした。クローニングした断片を組み込んだRNAiベクターを作成、アグロバクテリウム法によりイネ培養細胞に導入し、P450遺伝子発現を抑制した細胞株を作出した。遺伝子発現の抑制はRT-qPCRで確認した。BSM代謝能は各濃度のBSMで20時間処理した後に、BSMフリーの培地に植え継ぎ培養した細胞の培養12日後の増殖量から評価した。作成したP450発現抑制株のBSM応答発光をフォトンカウンターで測定し、BSM代謝能の低下とBSM応答発光の関係について解析した。

(3) 分岐鎖アミノ酸(Val、Leu、Ile)処理がP450発現抑制株の増殖、BSM応答発光に与える影響について検討した。BSMで20時間処

理したP450発現抑制株を、分岐鎖アミノ酸(Val、Leu、Ile各1mM)を含む培地で培養し、培養12日後の細胞増殖量を評価した。また、分岐鎖アミノ酸処理したP450発現抑制株のBSM応答発光をフォトンカウンターで測定した。

## 4. 研究成果

(1) 継代後11日前後のイネ培養細胞へのBSM処理により、葉切片への処理と同様に、バイオフィTONが増強した。バイオフィTON発生量は、BSM濃度依存的に増加し、50ppm以上で発生が顕著であり、2山のピークを示した(図1)。

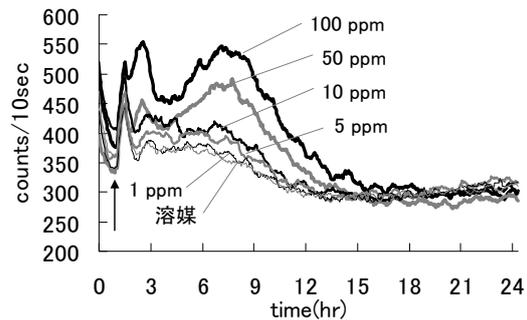


図1 イネ培養細胞のBSM応答発光

矢印で各濃度のBSM溶液を細胞に処理した。

培養細胞のBSM応答は、葉切片よりも早く、処理1時間後に第1ピークが、処理6時間後に第2ピークが現れた。明瞭な応答が見られ、除草剤応答発光の発生メカニズムの解析に適した実験系を確立できた。

(2) この実験系を用い、除草剤成分18剤について応答発光を調べた結果、対照の溶媒処理に比べバイオフィTONが増強するものは、イソキサベン、リニューロン等10剤、抑制するものは、グリホサート、アシラム等4剤あり、これらはバイオフィTONの変動により除草剤抵抗性の有無を判別できる可能性が示唆された(表1)。一方、バイオフィTONが対照処理と変わらないものが4剤あった。発光パターンには除草剤の作用機構による違いは見られなかった。

表1 各種除草剤処理によるイネ培養細胞のバイオフィTON発生

試薬	発光 <sup>a)</sup>	溶媒	作用機構
ベンスルフロンメチル	◎	DMF	アセトラクテート合成酵素(ALS)阻害
イソキサベン	◎	DMSO	細胞壁(セルロース)合成酵素阻害剤
ジネルブ	◎	DMF	膜孔径(膜破壊)
ジクロルフロップ	◎	DMSO	合成オーキニン
フロアム	◎	DMSO	有糸分裂/微小管重合阻害
アトラジン	◎	DMF	光化学系II阻害
リニューロン	◎	DMF	光化学系II阻害
オキサジアルギル	◎	DMSO	プロトポルフィリノゲン酸化酵素(PPO)阻害
シメトリン	◎	DMF	光化学系II阻害
オキサジアン	○	DMF	プロトポルフィリノゲン酸化酵素(PPO)阻害
グリホサート	▲	DW	EPSP合成酵素阻害
アシラム	▲	DW	カロチノイド合成阻害(ターゲット不明)
ジフルフェニカン	×	DMSO	カロチノイド合成阻害(フィトエンジサチュラーゼ)
アシラム	×	DMSO	ジヒドロプロテイン酸(DHP)合成酵素阻害
グルホシネートアンモニウム塩	△	DW	グルタミン合成酵素阻害
ジチオビル	△	DMF	微小管重合阻害
トリフルラリン	△	DMF	微小管重合阻害
ピリヂカルブ	△	DMF	未知

a) ◎、著しい増強(パターン変化を含む); ○、増強(パターン変化を含む); △、変化無し; ▲、抑制; ×、著しい抑制

(3) イネのペンスルフロンメチル耐性への関与が報告されているチトクローム P450 遺伝子 *CYP81A6* の発現抑制実験に先立ち、RT-qPCR によりイネ培養細胞における *CYP81A6* 遺伝子の発現解析を行った。*CYP81A6* 遺伝子発現は、100ppm BSM 処理に素早く応答し、処理 0.5 時間後には処理前の 10.6 倍になり、処理 1 時間後には 36 倍になった (図 2B)。

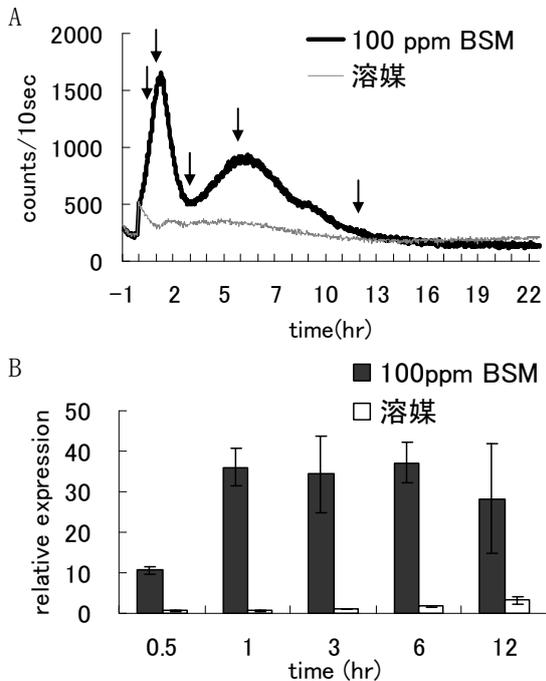


図2 BSM処理によるCYP81A6遺伝子の発現誘導

A イネ培養細胞のBSM応答発光。横軸0で100 ppm BSMを処理し、↓の時点で細胞をサンプリングし、RNAを抽出した。  
B 定量的PCRによるCYP81A6遺伝子の発現解析。内部標準としてUBQで補正し、処理前のCYP81A6遺伝子発現量を1とした時の相対発現量を示した。

バイオフィォンは処理 1 時間後から 3 時間後にかけて低下したが、*CYP81A6* 遺伝子の相対発現量は処理 1 時間後から 6 時間後までほぼ同程度で推移し、バイオフィォンの発生量と *CYP81A6* 遺伝子の相対発現量の間に関連はなかった。

(4) *CYP81A6* の 3' 非翻訳領域断片 (AK066760 の 1514~1867bp 部分) を pANDA ベクターに組み込み、発現抑制用 RNAi ベクターを作成した (図 3)。

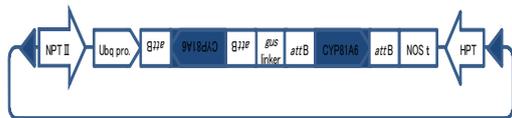


図3 作成したRNAiベクター

作成した RNAi ベクターをアグロバクテリウ

ム法によりイネ培養細胞に導入し、抗生物質で選抜した結果、抗生物質耐性を持つ細胞が得られた。RT-qPCR による遺伝子発現解析の結果、*CYP81A6* 遺伝子発現が抑制された株、遺伝子発現が抑制されていない株が得られ、それぞれ抑制株、対照株として以降の実験に用いた (図 4)。

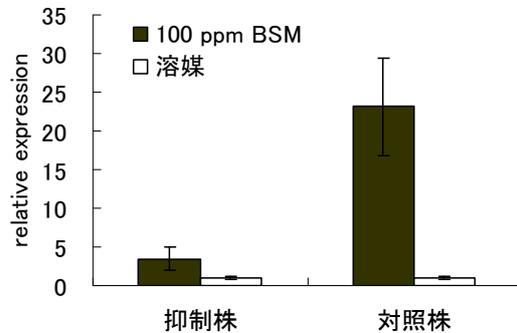


図4 RNAiによるCYP81A6遺伝子発現の抑制

抗生物質耐性で選抜した細胞からRNAを抽出し、定量的PCRで *CYP81A6* 遺伝子の発現解析を行った。内部標準としてUBQで補正し、処理前の *CYP81A6* 遺伝子発現量を1とした時の100ppm BSMあるいは溶媒処理1時間後の相対発現量を示した。

(5) 抑制株および対照株の BSM 処理後の細胞増殖を調査した結果、対照株では、非形質転換体と同様、1ppm BSM 処理後でも細胞増殖が阻害されなかったのに対し、抑制株では、0.1ppm BSM 処理でも細胞増殖が阻害され、BSM に対する感受性が高まっていることが確認できた (図 5)。

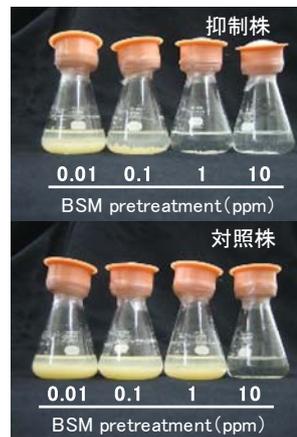


図5 P450発現抑制株のBSM感受性

各濃度のBSMで20時間処理した後に、BSMフリーの培地に植え替えた抑制株(上)と対照株(下)の、植え替え12日後の様子。

*CYP81A6* は BSM の解毒代謝に関与することから、抑制株では、BSM 解毒代謝能が低下したために、より低濃度の BSM で細胞増殖が阻害されたと考えられ、遺伝子発現の抑制とともに、代謝機能の低下も確認できた。これらの

細胞株を用いて、BSM 応答発光の変化を調べた結果、対照株の 100ppm BSM 応答発光は非形質転換体と同程度だったのに対し、発現抑制株では、BSM 応答発光の強度低下が確認された (図 6)。

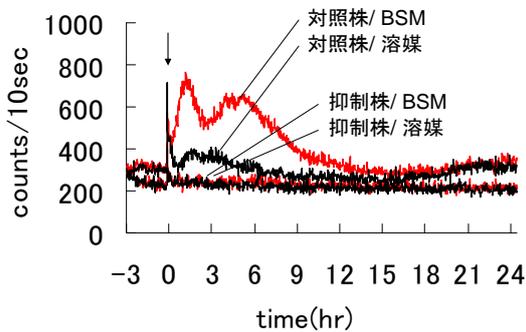


図6 P450発現抑制株のBSM応答発光

抑制株の100 ppm BSM応答発光。↓の時点で100 ppm BSMあるいは溶媒を添加した。

(6) 抑制株で BSM 応答発光強度が低下した原因としては、①CYP81A6 遺伝子産物 (チトクローム P450) による BSM の解毒代謝反応が発光に関与しており、それが RNAi により低下したため、②P450 の反応は発光には関与しないが、P450 の抑制により細胞の BSM 感受性が高まったため、100ppm BSM 処理で細胞が死んでしまい、発光反応を含む活動が低下したため、の二つが考えられた。そこで、後者の可能性について検討した。BSM の殺草作用は、アセト乳酸合成酵素の働きを阻害で、これにより、生育に必須な分岐鎖アミノ酸 (Val、Leu、Ile) の合成を阻害し、植物の生育が停止する。そこで、分岐鎖アミノ酸処理を行った。培地への分岐鎖アミノ酸添加 (Val、Leu、Ile 各 1mM) により、対照株、抑制株ともに BSM 処理後の細胞増殖は回復し、100ppm BSM 処理後でも、BSM フリーと同程度の増殖量を示した (図 7)。一方、BSM 応答発光は分岐鎖アミノ酸を処理しても回復しなかった (図 8)。

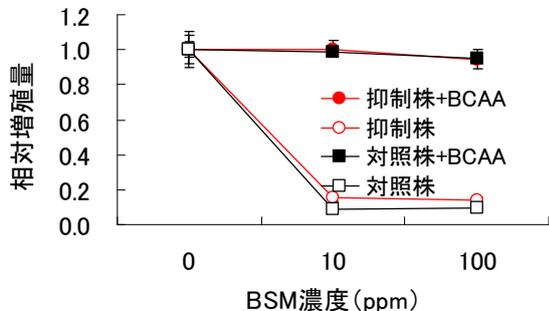


図7 分岐鎖アミノ酸処理がBSMによる細胞増殖阻害に与える影響

各濃度のBSMで20時間処理した細胞を、Val、Leu、Ile各1 mMを含む培地 (+BCAA) あるいは含まない培地に植え継ぎ12日培養した時の細胞増殖量。値は、0 ppm BSM処理時の増殖量を1とした時の相対値。

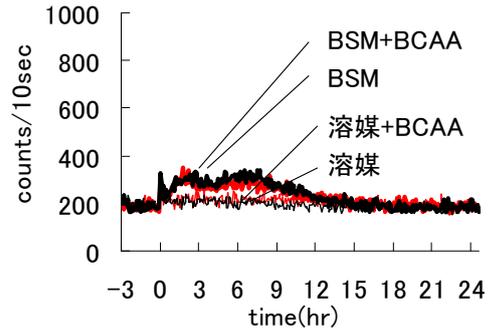


図8 抑制株のBSM応答発光の分岐鎖アミノ酸処理による回復

↓の時点で100 ppm BSMあるいは溶媒と同時にVal、Leu、Ile各1 mM(+BCAA)あるいは水を処理した。

(7) 以上の結果から、BSM 応答発光の発生には、P450 による BSM の解毒代謝反応が関与していることが明らかになった。P450 は多くの除草剤の解毒代謝に関与することが知られている。本研究の成果からバイオフォトンによる除草剤抵抗性雑草の判別技術は、BSM だけでなく、P450 が解毒代謝に関わるその他の除草剤の抵抗性についても判別できる可能性が示唆された。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

① 貫井秀樹、伊代住浩幸、加藤公彦、イネ培養細胞の除草剤応答発光、日本雑草学会、2010、AOSSA 福井市地域交流プラザ・福井県民ホール

② Nukui, H., Iyozumi, H., Kato, K., Kageyama, C., Involvement of cytochrome P450 in bensulfuronmethyl responsive photon emission from rice cells, 51<sup>st</sup> Annual Meeting of the Weed Science Society of America, 2011, Hilton Portland & Executive Tower, Portland, Oregon

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

貫井 秀樹 (NUKUI HIDEKI)  
静岡県農林技術研究所・花き科・主任研究  
員  
研究者番号：10426463

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：