

日本農薬学会  
農薬科学研究成果報告書  
(令和 6 年度研究奨励金交付課題)

研究課題

オーキシシン型除草剤ナプロアニリド処理後の植物体内での代謝物の量的・質的な解析

筆頭研究者氏名 亀山 郁

所属 筑波大学生命科学研究群生命農学学位プログラム博士後期課程三年

共同研究者名 (所属)

- ・ 春原由香里 (筑波大学生命環境系)
- ・ Rémy CORDAZZO, ( Univ. Bordeaux, INRAE, Biologie du Fruit et Pathologie, UMR 1332, 33882 Villenave d'Ornon, France, Bordeaux Metabolome, MetaboHUB, PHENOME-EMPHASIS, 33140 Villenave d'Ornon, France)
- ・ Claudia ROUVEYROL, ( Univ. Bordeaux, INRAE, Biologie du Fruit et Pathologie, UMR 1332, 33882 Villenave d'Ornon, France, Bordeaux Metabolome, MetaboHUB, PHENOME-EMPHASIS, 33140 Villenave d'Ornon, France)
- ・ Yves GIBON, ( Univ. Bordeaux, INRAE, Biologie du Fruit et Pathologie, UMR 1332, 33882 Villenave d'Ornon, France, Bordeaux Metabolome, MetaboHUB, PHENOME-EMPHASIS, 33140 Villenave d'Ornon, France)
- ・ Pierre PÉTRIACQ ( Univ. Bordeaux, INRAE, Biologie du Fruit et Pathologie, UMR 1332, 33882 Villenave d'Ornon, France, Bordeaux Metabolome, MetaboHUB, PHENOME-EMPHASIS, 33140 Villenave d'Ornon, France)

研究成果 (目的・方法・成果の順に概要を記載してください)

<目的>

ナプロアニリド(2-naphthalen-2-yloxy-N-phenylpropanamide)は、アセトアミド系の水稲用除草剤であり、作用機構未解明除草剤として分類されている(除草剤抵抗性対策委員会(HRAC), 2024年)。ナプロアニリドは、オーキシシン剤である可能性が示唆されているものの(田中ら, 1991年)、作用機構の詳細は完全には解明されていない。先行研究によると、ナプロアニリドは植物体内酵素アリアルシルアミダーゼによって加水分解代謝産物NOP(2-(2-naphthylloxy)propanoic acid)に分解されることが報告されており(Oyamada, 1986a)、NOPの化学構造の合成オーキシシン剤2,4-Dへの類似性から、ナプロアニリドがアリアルシルアミダーゼによってNOPに代謝されることで殺草活性を示す可能性が示唆されているが(Oyamada et al., 1986b)詳細はわかっていない。

これまでの報告者らの先行研究の結果から、NOPはオーキシシン核受容体TIR1によって植物体内に受容され、オーキシシン作用を誘導することで根部生育抑制作用が発現している可能性が高いと考えている(亀山ら, 2022年)。しかしながら、ナプロアニリド処理後の植物体内でのNOPを含めた代謝産物の質的、量的な変化を解析できていなかった。さらに、オーキシシン型除草剤の殺草活性にはアブジン酸、エチレン、エチレンの副産物であるシアン化合物が関与している可能性が示唆されているものの(Grossmann, 2009)、オーキシシン剤の化学骨格ごとに作用製に違いあることを示す結果も得られている(駒井ら2018年、小松ら2020年)。

そこで、本研究では、ナプロアニリドやさまざまなオーキシシン型除草剤処理後のシロイヌナズナを用いてメタボローム解析を行うことによって、1)ナプロアニリドは植物体内でNOPへ代謝されるのか、そして、2)化学骨格の異なるオーキシシン剤のいずれの薬剤群と代謝物の特徴が類似しているのかにつ

いて解析することで、ナプロアニリドの作用の詳細を理解することを目的とした。

#### <方法>

##### オーキシシン型除草剤処理によるシロイヌナズナ新鮮重量抑制活性試験

シロイヌナズナ種子を70%エタノール、続いて0.5%Tween20を含有した10%塩素系消毒液(含10%市販塩素系消毒液(Concentré de javel 9.6%, Nectra社製)、0.5% Tween 20)で滅菌した後、高圧滅菌したMilli-Q水で洗浄し、Murashige-Skoog(MS)培地に播種した。これらの種子を播種した培地を四日間冷蔵庫内に保存し、2日間、16時間明期及び8時間暗期(23℃、光強度100-120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )でグロースチャンバー内に静置し発芽させた。発芽種子を各除草剤を一定濃度含有するMS培地に移植し、7日間16時間明期及び8時間暗期でグロースチャンバー内に静置し生育させた。その後、幼植物体全体を液体窒素で凍結し、新鮮重量を測定した。供試した除草剤はナプロアニリド、ナプロアニリド加水分解体のNOP、比較薬剤としてオーキシシン系除草剤のフルロキシピル、トリクロピル、クロピラリド、アミノピラリド、ピクロラム、2,4-D、キンクロラックとした。新鮮重量の測定結果から、各除草剤ごとに、対数ロジスティックモデルによって、薬量反応曲線を作成し、 $EC_{50}$ 値を算出した。

##### オーキシシン型除草剤処理後のシロイヌナズナからの代謝産物抽出

播種後四日間春化処理、二日間グロースチャンバーにて生育した発芽種子を、 $EC_{50}$ 値の濃度の除草剤(ナプロアニリド、NOP、比較薬剤としてオーキシシン系除草剤のフルロキシピル、トリクロピル、クロピラリド、アミノピラリド、ピクロラム、2,4-D、キンクロラック)を含有したMS培地に移植し、7日間明条件でグロースチャンバーにて生育した。無処理及び除草剤処理シロイヌナズナを液体窒素で凍結し、凍結乾燥機にて乾燥した。これらの凍結乾燥植物体を粉碎した粉末を、抽出溶媒300  $\mu\text{L}$ (含80%エタノール、0.1%ギ酸、250  $\mu\text{g/ml}$ バニリン酸メチル)に混合した。15分間氷水上に容器を浸けて超音波洗浄機で溶解させたのち、14800 gで3分間遠心分離して上清を回収した。沈殿に対し同様の手順で抽出溶媒への溶解、超音波洗浄機処理、遠心分離を繰り返した後最初に抽出した溶液と混合し、0.45  $\mu\text{m}$ フィルターで濾過し、固形夾雑物を除去した。これらの代謝産物抽出溶液は-80℃冷蔵庫で冷凍保存した。

##### シロイヌナズナオーキシシン受容体変異株を用いたオーキシシン型除草剤による根部伸長抑制活性の再試験

シロイヌナズナ種子をMS培地に播種したのちに3日間冷蔵庫(4~8℃)に静置して春化処理をし、2日間グロースチャンバー(25℃、光強度100-120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )に静置して発芽させた。これらの発芽種子を、ナプロアニリド及びNOP含有MS培地に移植し、移植直後に写真を撮影してImageJで根長測定をおこなった。その後これらの発芽種子をグロースチャンバーに5日間静置して生育し、根部の写真を撮影してImageJで根長測定をおこなった。5日間生育した根長から、ナプロアニリド及びNOP含有MS培地に移植した直後の根部長を差し引いて、ナプロアニリド及びNOP処理シロイヌナズナの根部長成長を線形混合モデルによって評価した。

#### <成果>

まず初めに、除草剤単剤処理によるシロイヌナズナ新鮮重量の薬量反応曲線を作成し、 $EC_{50}$ 値を算出した。その結果、ナプロアニリド、NOP、オーキシシン関連除草剤の $EC_{50}$ 値は、ナプロアニリド5.71  $\mu\text{M}$ 、NOP1.22  $\mu\text{M}$ 、2,4-D 0.30  $\mu\text{M}$ 、トリクロピル0.33  $\mu\text{M}$ 、フルロキシピル0.56  $\mu\text{M}$ 、キンクロラック10.88  $\mu\text{M}$ 、アミノピラリド10.99  $\mu\text{M}$ 、ピクロラム11.01  $\mu\text{M}$ 、クロピラリド98.27  $\mu\text{M}$ となった。

次に、メタボローム解析用に、これらの $EC_{50}$ 値濃度の除草剤をシロイヌナズナに単剤処理して生育し、代謝産物の抽出をおこなった。代謝産物抽出サンプルは、UHPLC-MS/MSによるメタボローム解析に供試し、オーキシシン型除草剤の殺草活性への関与が示唆されている、アブシジン酸、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、エチレンの副産物であるシアン化合物、活性酸素やその代謝物等について、現在、網羅的解析を実施中である。

次に、除草剤単剤処理によるシロイヌナズナオーキシシン核受容体根部伸長抑制活性試験の再試験を実施した。その結果、野生株と比較して、ナプロアニリドで *tir1-1*, *afb2-3*, *tir1/afb2*, NOPで *tir1-1*, *tir1/afb2* で有意な根部長の回復が見られた。ナプロアニリドと加水分解体のNOPでTIR1の変異株に有意な回復が見られることが共通していた。ナプロアニリド自身がTIR1に受容されるかについては、

さらなる解析が必要であるが、少なくとも加水分解体の NOP によるシロイヌナズナの根部伸長抑制作用には、NOP の TIR1 への受容が関与していると考えられた。

<引用文献>

- ・田中ら、1991 年、ナプロアニリド光学異性体の植物生理活性ならびに光および土壤微生物分解、雑草研究、36 巻 1 号、50- 57.
- ・Oyamada et al., 1986, Metabolic fate of the herbicide Naproanilide in rice plants (*Oryza sativa* L.) and *Sagittaria pygmaea* MIQ., Japan Pesticide Science, 11, 197- 203
- ・Oyamada et al., 1986, Enzyme hydrolysis of Naproanilide in leaf discs of rice plants and *sagittaria pygmaea* Miq., Weed research Japan, 31-2, 130- 135
- ・亀山ら、2022 年、ナプロアニリドや加水分解代謝物による根部生育抑制作用におけるオーキシンの関与、日本雑草学会第 61 回大会講演要旨集
- ・Grossmann, 2009, Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action, Pest Management Science, 66-2, 113-120.
- ・駒井ら、2018 年、オーキシン型除草剤による根部生育抑制とエチレン生成促進作用における異なるオーキシン受容体の関与、日本雑草学会第 58 回大会講演要旨集 p. 93
- ・小松ら、2020 年、ピコリネート系オーキシン型除草剤アミノピラリドの根部生育抑制作用に関する受容体とエチレン生成促進活性、日本雑草学会第 59 回大会講演要旨集 p. 104