

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	定 由直
論文題目	Genetic studies on the target-site resistance to sulfonylurea herbicides in <i>Schoenoplectus juncooides</i> (イヌホタルイのスルホニルウレア系除草剤に対する作用点変異による抵抗性に関する遺伝学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>アセト乳酸合成酵素 (ALS) 阻害剤の一種であるスルホニルウレア系除草剤 (SU 剤) は、低薬量で幅広い殺草スペクトルを有し、動物への安全性が高いことから日本の水稲作においても1980年代後半から広く使用されてきた。その結果、水稲作の強害雑草であるイヌホタルイ (<i>Schoenoplectus juncooides</i> (Roxb.) Palla) においてSU剤抵抗性が1990年代後半から顕在化し、水稲生産上大きな問題となっている。その防除のためには、抵抗性の機構や交差抵抗性の有無を明らかにする必要がある。本論文は、SU剤抵抗性イヌホタルイの防除計画策定のために、日本におけるSU剤抵抗性イヌホタルイの作用点変異を明らかにし、様々な変異が抵抗性プロファイル (交差抵抗性の有無と抵抗性の程度) に与える影響を明らかにすることを目的とした。</p> <p>1. 日本における多様なSU剤抵抗性イヌホタルイの発生状況を明らかにするために、北海道から中四国に至る24地点から採集したSU剤抵抗性イヌホタルイ135個体についてALS遺伝子の塩基配列を解析した。その結果、P197S変異とP197L変異が高い頻度で見出されること、ふたつのALS遺伝子 (ALS1およびALS2) のいずれか一方だけに一塩基置換が認められ、両遺伝子における変異の出現頻度は均等であること、すべてのALS阻害剤に抵抗性を与えると他種において報告されているW574L変異が低頻度ではあるが各地から見出されることを明らかにした。また、半径約500mの範囲からは特定の変異だけが見出されることから、1個体由来の子孫が分布している可能性が示された。さらに、イヌホタルイにSU剤抵抗性を付与する変異であるP197R、P197TおよびD376Eを新たに見出した。</p> <p>2. 先に明らかにしたALS遺伝子における様々な変異が植物体レベルでの抵抗性プロファイルに与える影響を明らかにするために、異なる変異をもつ個体ごとに各種SU剤への薬量応答を栽培試験によって調査した。その結果、異なる変異をもつ個体は交差抵抗性の有無および抵抗性の程度も異なること、同一変異をもつALS1変異体とALS2変異体は抵抗性プロファイルもほぼ同様であること、SU剤の一種であるメトスルフロメチルはすべてのP197変異体に有効であることを示した。</p> <p>3. イヌホタルイ植物体から抽出した粗酵素ALSの<i>in vitro</i>でのSU剤への薬量応答を様々な変異体とイマゾスルフロンの組み合わせで調査した。その結果、応答曲線が二重S字型となり、その平坦域の位置からALS1とALS2の粗酵素中の存在比を推定した。また、粗酵素中における変異酵素の抵抗性程度を回帰により推定すると、前述の栽培試験における植物体レベルでのイマゾスルフロンのに対する抵抗性程度と順位相関があった。したがって、SU剤に対する植物体レベルでの抵抗性程度は、酵素レベルでの抵抗性によって説明可能であった。</p> <p>4. 交差抵抗性をもつD376E変異体が、水田雑草を含む様々な雑草で新たに報告されているため、ALS2にD376E変異を有するイヌホタルイ抵抗性個体を用いて、各種ALS阻害剤に対する薬量応答を植物体レベル (栽培試験) および酵素レベル (大腸菌によ</p>			

り発現させたALS2による*in vitro* 試験)で調査した。その結果、D376E変異はイミダゾリノン系除草剤を除くALS阻害剤に広く抵抗性を与えた。R/S比(I₅₀またはED₅₀の抵抗性/感受性比)で評価した抵抗性の程度には、植物体レベルと酵素レベルで高い相関が認められた。P197変異体における実験結果と合わせ、植物体R/S比は定量的に概ね酵素R/S比の平方根となり、作用点での抵抗性程度が植物体に寄与する際に著しく小さくなることが判明した。この結果にもとづき、ALS阻害剤曝露下でのALS1およびALS2の発現量を推定した。

5. イヌホタルイにSU剤抵抗性を付与する作用点変異は多様であり、その抵抗性プロファイルも多様であるため、容易で迅速な作用点変異検出法が求められる。P197変異、D376E変異およびW574L変異をPCR-RFLPによって検出する方法とALS1とALS2が混在する中から一方だけを選択的にダイレクトシーケンスし、P197領域を解読する方法を提示した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

除草剤抵抗性雑草の蔓延は、持続的、安定的に作物を生産していく上で大きな問題となっている。雑草が除草剤抵抗性を獲得する機構は多様で、抵抗性の機構が異なれば交差抵抗性の有無や抵抗性の程度が異なることから、抵抗性の機構解明は除草剤抵抗性雑草の防除手段策定に極めて重要である。アセト乳酸合成酵素 (ALS) 阻害剤の一種であるスルホニルウレア系除草剤 (SU剤) は、日本の水稻作で最も広く使用されている除草剤で、この除草剤に対する抵抗性が強害雑草であるイヌホタルイで出現したことから、その防除計画を迅速に策定する必要がある。

本論文では、日本国内で出現したSU剤抵抗性イヌホタルイの作用点変異を明らかにし、それぞれの変異が交差抵抗性の有無や抵抗性の程度に与える影響を論じるとともに、迅速な作用点変異検出法を提示した。評価すべき点は以下のとおりである。

1. 日本国内で出現したSU剤抵抗性イヌホタルイの作用点変異を網羅的に明らかにするとともに、今まで報告がなかった変異型を報告した。
2. 異なる作用点変異を有するイヌホタルイのSU剤抵抗性個体について、交差抵抗性の有無と抵抗性の程度を明らかにし、P197変異個体にはSU剤の一種であるメトスルフロンメチルが有効であることを示した。
3. 植物体レベルおよび酵素レベルでの各種ALS阻害剤に対する薬量応答から、ALS阻害剤曝露下でのALS1およびALS2の発現量を推定した。
4. イヌホタルイにSU剤抵抗性を付与する多様な作用点変異をPCR-RFLPを用いて迅速に検出する方法を提示した。

以上のように、本論文は、水稻作の強害雑草であるイヌホタルイの様々な作用点変異個体ごとに交差抵抗性の有無と抵抗性の程度を明らかにするとともに、SU剤抵抗性を付与する多様な作用点変異を迅速に検出する方法を提示した。これらは、水稻作における除草剤抵抗性雑草の防除体系の改善に貢献するものであり、雑草学、栽培学、農薬科学およびそれらの応用分野の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成26年10月23日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)