

Application Note



ライフサイエンス

農薬によるトウモロコシ・ダイズ種子処理時の iMScope[™] QTを用いた薬効成分動態解析

新間 秀一1,2.3、齋藤 裕美1、山本 卓志4、中川 薫4、井上 拓也5、岩橋 福松5



■要旨

農薬による種子処理は、播種初期に効率的な作物保護を 提供し、後に使用する殺菌剤の量を減らすことを可能にし ます。そのため、トウモロコシ、ダイズ、小麦、綿花など の主要作物分野において実用化されている手法です。農薬 で処理された種子上の薬効成分は、種子の構造や化合物の 物理的性質によって異なる分布を示す可能性がありますが、 これまで十分に研究されてはきませんでした。本アプリ ケーションノートでは、iMScope QTを用いた質量分析イ メージングにより殺菌剤(エタボキサム)をコーティング したトウモロコシとダイズ種子内における分布を可視化し ました。播種前の段階では、ダイズとトウモロコシで対照 的な分布パターンが認められましたが、これは種子の構造 に依存していると考えられました。また、播種後のエタボ キサム分布に関する情報も得ることにより、植物体内にお ける殺菌剤送達経路のより深い理解に貢献するデータを提 供することが期待されます。この新しい分析法を用いるこ とで、これまで得られなかった殺菌剤の時間依存的で動的 な情報を得ることが可能となり、今後の農薬の開発と使用 において、広く応用できる有用なツールになると考えられ ます1)。

1 大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻
2 大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所
3 大阪大学先導的学際研究機構
4 島津製作所分析計測事業部 Solutions COE
5 住友化学株式会社 健康・農業関連事業研究所

画像はAdobe Fireflyを用いて生成しました。

1.はじめに

マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング(MALDI-MSI)は、ラベルフリーなイメージング法 として様々な分野で利用されています。これまで、MALDI-MSIを利用した研究の多くは、医学・薬学分野で行われて きました^{2、3)}。しかし近年では、二次代謝産物分布の可視 化⁴⁻⁸⁾や農薬の動態評価⁹など、植物における研究分野にも 応用されています。この技術の有用性は、これまで¹⁴C標 識農薬の使用によるオートラジオグラフィという制約のあ る方法に頼っていた農薬分布の可視化や、現在のところ限 られた情報しかない植物体内での農薬の時間依存的な動的 移動に関して、大きな関心を集めていると言えます^{10、11)}。

1970年代に米国で初めて種子処理用の浸透性殺菌剤が導入されて以来、種子コーティング、フィルムコーティング、ペレット処理などの種子処理は、播種初期の効率的な作物 保護作用を発揮し、作物への農薬散布量の削減を可能にしてきました。この種子処理技術は、トウモロコシ、ダイズ、小麦、綿花などの主要作物で実用化されてきました¹²⁻¹⁴⁾。 農薬による種子処理手法はこれまでに多く検討されており、 作物ごとに最適化されています。種子にコーティングされた農薬は、直接植物体内へ移行するか、土壌へ一過的に移行するか、もしくは土壌への移行後の再吸収によって、最終的に標的植物組織に移行すると考えられています¹⁵⁾。しかし、現在のところ、種子処理に使用された薬効成分が植物組織内で移行するメカニズムに関する情報は限定的です。 この薬効成分の移行メカニズムに関する情報は、植物に おける実際の効果をより良く理解するのに貢献できると考 えられます。

本研究では、MALDI-MSIを用いて、種子処理に使用され る薬効成分の分布に関する知見を得ることを試みました。 この目的のために、我々はトウモロコシとダイズの乾燥種 子を殺菌剤エタボキサム¹⁶⁻¹⁸⁾でコーティングし、播種前後 の種子内の分布を可視化しました。なお、エタボキサムは、 特に卵菌類に有効であり、散布や種子処理に使用されてい る農薬です。本実験において、種子をMALDI-MSIの試料と するにあたり、クライオテープを用いた切片作製を試みる と同時に、マトリックスについても検討しました。これら の方法を用いることにより、種子処理後の種子での薬効成 分分布評価において、MALDI-MSIが有用なツールであるこ とを実証しました。

2.方法

2-1. 試薬

a-cyano-4-hydroxycinnamic acid (*a*-CHCA) および 9aminoacridine (9-AA) は、それぞれ Merck (メリーランド、 米国) および東京化成工業 (東京、日本) から購入しまし た。メタノール、アセトニトリル、ギ酸、2-プロパノール、 超純水は富士フイルム和光純薬工業 (大阪、日本) から購 入しました。すべての試薬はLC-MSグレードとしました。

2-2. エタボキサムによるダイズおよびトウモロコシの種子 処理

エタボキサム34.2%(w/v)液剤(INTEGO solo fungicide、 Nufarm、カルガリー、カナダ)を水で希釈し、種子処理用 試験溶液を調製しました。ダイズ(品種:ハタユタカ)の 種子には、エタボキサムの終濃度として投与量 75.0 g a.i. (a.i.: active ingredient) /100 kg種子で処理しました。一 方、トウモロコシ(品種:P1547)の種子には、エタボキ サムの終濃度として投与量 37.5 g a.i./100 kg種子で処理しま した。種子処理方法は、ダイズ種子およびトウモロコシ種 子それぞれ50 gを、それぞれ260 µL、490 µLの試験溶液入 りの0.5 Lビニール袋中で混和して種子をコーティングしま した。

また、ネガティブコントロールとして空製剤で処理をした種子を準備しました。

2-3.種子の発芽

底に穴のあいたプラスチックカップ(容量 0.75 oz)に土 壌を約80%まで満たし、コーティングしたダイズまたはト ウモロコシの種子を土壌表面から約1 cmの深さに播種しま した。播種後、カップは約2 cmの深さの水を入れたトレー に入れ、25℃の室内で5日間生育させました。

2-4.種子切片の作成

播種前後の種子については、液体窒素で瞬間凍結した後、 クライオミクロトーム (CM1950; Leica、ヌスロッホ、ドイ ツ)を用いて-20℃で切片を作成しました。凍結切片作成は、 4%カルボキシメチルセルロース (SECTION-LAB、横浜、日 本)で包埋をして行いました。切片の採取にはクライオ フィルム (SECTION-LAB、横浜、日本)を用いました。す べての凍結組織は15 μmの厚さで切片化し、切片を回収し たクライオフィルムは導電性両面テープ(導電性不織布 テープ; 3M社、ミネソタ、米国)を用いて、酸化インジウ ムスズ (ITO) コートスライドグラス (100 Ω/m² 剥離防止 コートなし; 松浪硝子、大阪、日本)に貼り付けました。

2-5.マトリックス供給

マトリックス蒸着装置(図1A, iMLayer[™];島津製作所、 京都、日本)を用いて、α-CHCAを250℃で0.7 µmの膜厚に なるよう、種子切片を載せたITOガラスに蒸着しました。

2-6. MALDI-MSI分析

MALDI-MSI分析は大気圧マトリックス支援レーザー脱離 イオン化四重極飛行時間型質量分析計iMScope QT(島津製 作所、京都、日本)を用いて行いました(図1B)。マスス ペクトルは正イオンおよび負イオンモードにて*m/2*300-330 の範囲で取得しました。またプロダクトイオンスペクトル は、正イオン検出モードにて*m/2*100-330の範囲で取得しま した。測定時のレーザー強度は65、レーザー照射径設定値 は2(いずれも任意単位)としました。これら、分析条件を 表1にまとめました。

分析後、データ解析ソフトウェアのIMAGEREVEAL™ MS (島津製作所、京都、日本)を用いて画像再構成とピーク 強度抽出を行いました(図1C)。



	表1 MSI分析パラメータ
MS分析条件	
イオン種	正イオンモード
m/z測定範囲	300-330 (MS) 、100-330 (MS/MS)
積算回数	10
DL温度	250℃
ヒートブロック温度	450℃
サンプル電圧	4.50 kV
検出器電圧 ※	2.10 kV(標準品分析)、2.30 kV(切片分析)
MS段数	1および2
CIDガス	150 kPa(MS1)、230 kPa(MS/MS)
レーザー照射条件	
照射回数	80回
繰り返し周波数	1000 Hz
照射径設定値	2
レーザー強度	65

※:参考値

最適な検出器電圧は、検出器の劣化具合とサンプルのイオン化のしやすさにより異なります。

検出器電圧の設定によっては検出器の劣化を早める可能性があります。

詳しくは取扱説明書をご参照ください。

3. 結果

3-1. エタボキサム標準品を用いたイオン化の確認

図2は、エタボキサムの化学構造式とα-CHCAを用いた正 イオンモードで得られたマススペクトルおよびプロダクト イオンスペクトルです。図2(A)に示すように、正イオン で検出されることが期待される[M+H]+は*m/z*321.08で、図 2(B左)のα-CHCAをマトリックスとしたエタボキサム標 準品のマススペクトルにおいてもこのイオンが検出されま した。その一方、9-AAを用いた負イオンモードの場合には ピークは検出されませんでした(data not shown)。 さらに、正イオンで検出された*m/z* 321.08からプロダク トイオンが検出されるかどうかを確認しました。その結果、 図2(B右)に示す通り*m/z* 183.05、200.07および237.08に プロダクトイオンが検出されました。それぞれのプロダク トイオンの解離部分を図2(A)に示します。以上より、以 降の実験では*a*-CHCAを用いた正イオン検出モードを用い ることにしました。また、イメージング結果の作成には *m/z* 321.08のピークまたはプロダクトイオンスペクトルで ベースピークとなった*m/z* 183.05を用いることにしました。



図2 エタボキサムの化学構造式とエタボキサム標準品のマススペクトルおよびMS/MSスペクトル
(A) エタボキサムの化学構造式と検出時に期待される*m/z* (B) iMScope QTで得られたエタボキサム標準品のマススペクトルとプロダクトイオンスペクトル



図3 エタボキサム処理の有無で得られたトウモロコシ種子切片のイメー ジング結果 スケールバー:250 μm(エタボキサム処理)、500 μm(エタボキサ ム表処理)

3-2. マススペクトルによるイメージング結果とプロダクト イオンスペクトルによるイメージング結果の比較

図3には、トウモロコシ種子におけるマススペクトルによるイメージング結果と、プロダクトイオンスペクトルによるイメージング結果を示しました。いずれの場合においても、エタボキサムは種子の表面に蓄積している様子がわかります。また、エタボキサム処理の代わりに超純水で処理を行った、ネガティブコントロールであるEthaboxam(-)ではマススペクトルを用いたイメージング結果で、微弱ながらシグナルが分布している様子が得られました(矢頭)。これは、エタボキサム由来ピーク近傍の夾雑ピークによるバックグラウンドノイズであることがわかりました。

その一方、プロダクトイオンスペクトルによるイメージ ング結果では、ネガティブコントロールにおいても生体由 来のバックグラウンドノイズは検出されることなく、浸漬 したエタボキサムの分布画像を得ることができました。以 上より、以降の実験ではプロダクトイオンスペクトルを用 いたMALDI-MSIを行うこととしました。

3-3. 播種前の種子におけるMALDI-MSI

図4に土壌に播種する前の種子におけるエタボキサムのイ メージング結果を示しました。図4(A)はダイズ、図4 (B)はトウモロコシを表しています。ネガティブコント ロールではエタボキサム由来ピークの分布は得られず、エ タボキサムコート処理を行った種子では、両種子でエタポ キサム由来ピークが主に種子表面に確認できます。さらに トウモロコシでは種子表面だけでなく、エタポキサムの胚 芽先端への蓄積と胚乳内部への浸透も確認されました(図 4B矢頭)。この結果より、同様のコーティング処理をして もダイズ種子とトウモロコシ種子ではエタポキサムの分布 が異なることから、播種後の農薬動態も異なることが予想 されます。



図4 土壌への播種前のダイズ種子とトウモロコシ種子におけるエタボキサム分布 (A)ダイズ種子 (B)トウモロコシ種子 上段:光学画像、中央:光学画像とMSイメージの重ね合わせ、下段:エタボキサム分布 スケールバー:750 μm

3-4. 播種後の種子におけるMALDI-MSI

図5は土壌への播種後5日目における種子切片でのエタボ キサム分布を示しています。図5(A)はダイズ種子であり 図5(B)はトウモロコシ種子です。ダイズ種子においては、 分布が認められるものの図4の播種前に比べるとイオン強度 は非常に弱くなっており、ダイズ表皮に蓄積していたエタ ボキサムは主に土壌に移行した可能性が考えられます。一 方、図5(B)のトウモロコシ種子では表皮への蓄積が5日目 にも認められると同時に、胚芽部分でエタボキサム由来の イオン強度が増加している様子がわかります(図5B矢頭)。 このことから、胚芽先端に蓄積していたエタボキサムは、 土壌へ移行するとともに種子内部にも移行していると考え られます。

以上より、播種前の種子の時点で異なる分布を示したダ イズとトウモロコシでは、播種後に異なる農薬動態を示す と考えられます。

3-5. MALDI-MSI結果から得られたイオン強度比較

MALDI-MSIの結果より得られたイオン強度の比較を図6

と図7に示しました。図6はダイズ種子であり、図7はトウモ ロコシ種子を表しています。

このグラフでは播種前、播種後1日目および5日目で表皮 と内部に分けて強度抽出を行いました(ダイズ、トウモロ コシそれぞれ3粒ずつで検証を行いました)。図6よりダイ ズ種子では播種後1日目から5日目にかけて急激に表皮にお けるイオン強度が減少していることがわかります。また、 内部におけるイオン強度の増加はごくわずかでした。この ことから、ダイズでは、エタボキサムは種子内部への移行 は少なく、土壌への移行が主な経路であると考えられます。 その一方、図7に示すトウモロコシでは、播種後、表皮への 蓄積が保たれると同時に内部への移行が5日目で大きく増加 することがわかります。これは、ダイズ種子と異なりトウ モロコシ種子では、土壌への移行のみならず、種子内部へ の移行も顕著に起こることを示していると考えられます。

以上より、ダイズ種子とトウモロコシ種子では、同じ種 子コートであっても農薬動態が異なることを示していると 考えられます。



図5 土壌への播種後5日目のダイズ種子とトウモロコシ種子におけるエタボキサム分布 (A) ダイズ種子 (B) トウモロコシ種子 ダイズ種子ではエタポキサム由来イオンが観察されるが、強度が弱い。

一方で、トウモロコシ種子においてはエタポキサムの表皮への蓄積と共に胚芽部分にも蓄積している。



2×10⁴ Surface Inside Surface Inside Surface S

図6 ダイズ種子におけるイオン強度比較 イメージング結果からわかる通り、表皮への蓄積が主であり、5日目で 強度が大きく減少していることから種子表面への蓄積や内部への移行は 少ないと考えられます。



図7 トウモロコシ種子におけるイオン強度比較 イメージング結果からわかる通り、表皮への蓄積とともに、種子内部へ の移行が見られました(内部への移行は5日目に表皮と比較して1/10程 度でした)。

4.考察

エタボキサムで農薬種子処理されたトウモロコシ種子が 発芽すると、種子内部からもエタポキサム由来イオンが検 出され、エタボキサムの蓄積は胚軸や胚乳周囲でも観察さ れました。一方、ダイズ種子の場合、イオン強度は種皮上 で最も強く、種皮表面から種子内部に向かって減少してい ました。また、イオン強度は5日目で劇的に減少しました。

これらのことから、エタボキサムをコーティングしたダ イズ種子では、農薬は主に種皮の表面に留まり、時間の経 過とともに土壌中に放出されることが示唆されました。播 種後に観察されたエタボキサムの分布の違いは、種子の構 造の違い、特に胚乳の有無に関連していると推測されます。 胚乳種子であるトウモロコシ種子では、種子を薬剤でコー ティングした後、胚にエタボキサムの蓄積が検出されまし た。したがって、播種前の段階で農薬の分布が大きく異な れば、農薬の移動もこの違いに大きく影響すると予想され ました。実際、播種後のトウモロコシ種子の表面および胚 におけるエタボキサムの強度グラフは、ダイズ種子と比べ ると1日目から5日目にかけて分布パターンが顕著に変化し ており、胚から胚乳へのシフトが顕著でした。すなわち、 種子に処理されたエタボキサムが種子内部へ移動し始めた と結論づけられると考えられます。一方、ダイズ種子の場 合、播種後1日目にはエタボキサムは種子表面で検出されま したが、種子内で検出された量は少なくなりました。この 傾向は播種後5日目に顕著になり、エタボキサムが種子被膜 から種子内部へ直接移行することはほとんどなかったこと が示されていると考えられます。

5.まとめ

種子処理剤は、植物病原体から保護するために、植物へ の直接移行または土壌を介した間接移行によって植物組織 に移行します。種子の部分構造とともに化合物の局在を可 視化することにより、種子の種類や構造によって化合物の 移動に関与する比率が異なることを示唆するデータを提供 できました。種子処理された化合物のこのような挙動は、 それぞれの化学物質の物理的性質と種固有の種子構造に依 存すると考えられます。したがって、今後、iMScope QTを 用いたMALDI-MSIにより、対象種子中の薬効成分の分布を 把握することで、製剤の最適化など、種子処理手法の開発 の一助になることが期待されます。

<参考文献>

- Shimma, S., Saito, H., Inoue, T., and Iwahashi, F., Using mass 1) spectrometry imaging to visualize pesticide accumulation and time-dependent distribution in fungicide-coated seeds, Mass Spectrom (available online).
- Shimma, S., Kumada, H. O., Taniguchi, H., Konno, A., Yao, I., 2) Furuta, K., Matsuda, T., and Ito, S.: Microscopic visualization of testosterone in mouse testis by use of imaging mass spectrometry, Anal Bioanal Chem, 408, 7607-7615 (2016).

- 3) Sugiura, Y., Takeo, E., Shimma, S., Yokota, M., Higashi, T., Seki, T., Mizuno, Y., Oya, M., Kosaka, T., Omura, M., and other authors: Aldosterone and 18-Oxocortisol Coaccumulation in Aldosterone-Producing Lesions, Hypertension, 72, 1345-1354 (2018).
- 4) Dalisay, D. S., Kim, K. W., Lee, C., Yang, H., Rubel, O., Bowen, B. P., Davin, L. B., and Lewis, N. G.: Dirigent Protein-Mediated Lignan and Cyanogenic Glucoside Formation in Flax Seed: Integrated Omics and MALDI Mass Spectrometry Imaging, J. Nat. Prod., 78, 1231-1242 (2015). Crecelius, A. C., Holscher, D., Hoffmann, T., Schneider, B.,
- 5) Fischer, T. C., Hanke, M. V., Flachowsky, H., Schwab, W., and Schubert, U.S.: Spatial and Temporal Localization of Flavonoid Metabolites in Strawberry Fruit (Fragaria x ananassa), J Agric Food Chem, 65, 3559-3568 (2017). Nguyen, T. B., Kitani, S., Shimma, S., and Nihira, T.:
- 6) Butenolides from Streptomyces albus J1074 Act as External Signals To Stimulate Avermectin Production in Streptomyces avermitilis, Appl Environ Microbiol, 84 (2018).
- 7) Miyoshi, K., Enomoto, Y., Fukusaki, E., and Shimma, S.: Visualization of Asparaptine in Asparagus (Asparagus officinalis) Using MALDI-IMS, Anal. Sci., 34, 997-1001 (2018).
- 8) Dunham, S. J. B., Ellis, J. F., Li, B., and Sweedler, J. V.: Mass Spectrometry Imaging of Complex Microbial Communities, Acc. Chem. Res., 50, 96-104 (2017).
- 9) Ikuta S, Fukusaki E, Shimma S. Visualization of azoxystrobin penetration in wheat leaves using mass microscopy imaging. J. Pestic. Sci., 48, 29–34 (2023).
- Mullen, A. K., Clench, M. R., Crosland, S., and Sharples, K. R.: 10) Determination of agrochemical compounds in soya plants by imaging matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom., 19, 2507-2516 (2005).
- Fadel Sartori, F., Floriano Pimpinato, R., Tornisielo, V. L., 11)Dieminger Engroff, T., de Souza Jaccoud-Filho, D., Menten, J. O., Dorrance, A. E., and Dourado-Neto, D.: Soybean seed treatment: how do fungicides translocate in plants?, Pest Manag Sci, 76, 2355-2359 (2020).
- Sharma, K. K., Singh, U. S., Sharma, P., Kumar, A., and Sharma, 12) L.: Seed treatments for sustainable agriculture-A review, Journal of Applied and Natural Science, 7, 521-539 (2015).
- Dorrance, A. E. and McClure, S. A.: Beneficial Effects of 13) Fungicide Seed Treatments for Soybean Cultivars with Partial Resistance to Phytophthora sojae, Plant Dis., 85, 1063-1068 (2001).
- Ellis, M. L., Broders, K. D., Paul, P. A., and Dorrance, A. E.: 14) Infection of Soybean Seed by Fusarium graminearum and Effect of Seed Treatments on Disease Under Controlled Conditions, Plant Dis., 95, 401-407 (2011).
- Alford, A. and Krupke, C.H.: Translocation of the 15) neonicotinoid seed treatment clothianidin in maize, PLOS ONE, 12, e0186527 (2017).
- Kim, D. S., Chun, S. J., Jeon, J. J., Lee, S. W., and Joe, G. H.: 16) Synthesis and fungicidal activity of ethaboxam against Oomycetes, Pest Manag Sci, 60, 1007-1012 (2004).
- 17) Hao, W., Gray, M. A., Förster, H., and Adaskaveg, J. E.: Evaluation of New Oomycota Fungicides for Management of Phytophthora Root Rot of Citrus in California, Plant Dis., 103, 619-628 (2019).
- Scott, K., Eyre, M., McDuffee, D., and Dorrance, A. E.: The 18)Efficacy of Ethaboxam as a Soybean Seed Treatment Toward Phytophthora, Phytopythium, and Pythium in Ohio, Plant Dis., 104, 1421-1432 (2020).

iMLayer、iMScope、およびIMAGEREVEALは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部 https://www.an.shimadzu.co.jp/

初版発行:2024年3月

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器、体外診断用医薬品として 承認・認証等を受けておりません。本文書に記載されている分析手法を治療診断目的およびその 手続き上で使用することはできません。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。 本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および 登録商標です 本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著作者に帰属しており、権利者の事前の書面による 許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。 掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではあり ません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。