

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15234

研究課題名（和文）水田雑草タイヌビエにおける多剤抵抗性成立要因の解明

研究課題名（英文）Mechanism of multiple-herbicide resistance in paddy weed, Echinochloa phyllpogon

研究代表者

岩上 哲史 (Iwakami, Satoshi)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：00761107

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：数多くの除草剤に抵抗性を示す水田雑草タイヌビエについて、主にアセチルCoAカルボキシラーゼ阻害型除草剤抵抗性機構の解析を行った。本研究からこれらの除草剤抵抗性は主に、このタイヌビエにおいて以前同定されたアセト乳酸合成酵素阻害型除草剤抵抗性に関わる除草剤代謝酵素によってもたらされていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

除草剤の解毒代謝による抵抗性を獲得した雑草は多様な除草剤に抵抗性を示すことが多く、作物生産上の大きな脅威とされている。しかしそのメカニズムについてはあらゆる雑草において分かっていなかった。本研究では多剤抵抗性に関わる遺伝子を明らかにすることに成功した。本研究は抵抗性雑草の防除において有意義な知見となる。

研究成果の概要（英文）：Mechanism of resistance to acetyl-CoA carboxylase inhibiting herbicides in multiple-herbicide resistant paddy weed, Echinochloa phyllpogon, were investigated. Our research revealed that the resistance is mainly caused by the identical herbicide metabolizing enzymes that had previously been identified to cause resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides.

研究分野：分子雑草学

キーワード：除草剤抵抗性 除草剤代謝 P450 タイヌビエ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

雑草の除草剤抵抗性で未だにほとんど解明されていないものに除草剤解毒代謝能向上に基づく抵抗性がある。解毒代謝型の抵抗性雑草は、異なる化学骨格や異なる作用機構を有する除草剤に抵抗性を示す場合も多く、他の抵抗性機構の場合以上に大きな問題となる。しかし、解毒代謝型の抵抗性の詳細なメカニズムはあらゆる雑草において不明であり、この解明が強く求められている。

米国カリフォルニアで発見された除草剤抵抗性タイヌビエはアセト乳酸合成酵素 (ALS) 阻害剤やアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACCCase) 阻害剤など、少なくとも 5 種類の作用機構の異なる除草剤に抵抗性を示す。ALS 阻害剤抵抗性についてはこれらを解毒代謝する シトクロム P450 (*CYP81A12* および *CYP81A21*) の過剰発現によることが明らかになっていた。一方で ACCCase 阻害剤抵抗性の詳細なメカニズム不明であったが、これまでの解析から、ジクロホップ、トラルコキシジム、ピノキサデンについては ALS 阻害剤抵抗性と同様のメカニズムを強く示唆する結果が得られていた。一方で、フェノキサプロップ抵抗性についてはこれらとは異なり、グルタチオン転移酵素 (GST) の関与が疑われていた。

2. 研究の目的

本研究では、ジクロホップ、トラルコキシジム、ピノキサデン抵抗性の ALS 阻害剤抵抗性と同一性を検証するとともに、フェノキサプロップ抵抗性に関わる GST 遺伝子を同定する。また *CYP81A* 遺伝子の除草剤代謝機能を評価する。

3. 研究の方法

(1) タイヌビエにおける除草剤代謝分析

ジクロホップ、トラルコキシジム、ピノキサデンをタイヌビエ抵抗性および感受性系統に処理した。処理後 24 時間までの除草剤量の推移を LCMSMS により解析した。

(2) タイヌビエの交雑後代の解析：除草剤抵抗性と候補遺伝子の転写量の関連

ALS 阻害剤抵抗性機構との同一性を検証するため、タイヌビエ抵抗性系統および感受性系統の交雑後代において、ACCCase 阻害剤の感受性を評価した。また *CYP81A12* および *CYP81A21* の転写レベルをリアルタイム PCR により解析した。さらに RNA-seq 解析で抵抗性系統において高発現が認められた P450 遺伝子および GST 遺伝子について、交雑後代においてその転写レベルと抵抗性との連鎖関係を評価した。

(3) 候補遺伝子の除草剤代謝機能解析

(2) において連鎖関係が認められた遺伝子については、イネに形質転換し、除草剤抵抗性の有無を評価した。また、P450 については酵母や大腸菌において組換えタンパク質を発現させ、除草剤代謝機能を評価した。

(4) *CYP81A* P450 の除草剤代謝機能の評価

タイヌビエの *CYP81A* 遺伝子 9 種をシロイヌナズナに形質転換し、様々な除草剤に対する感受性を評価した。

4. 研究成果

(1) タイヌビエにおける除草剤代謝

ジクロホップ、トラルコキシジム、ピノキサデンは抵抗性系統において速やかに代謝された。

(2) タイヌビエ交雑後代における除草剤抵抗性と候補遺伝子の転写レベル

ジクロホップ、トラルコキシジム、ピノキサデンおよびフェノキサプロップ抵抗性は交雑後代において連鎖が認められた。また F2 世代において抵抗性は 3:1 に分離し、1 遺伝子座支配が示唆された。また *CYP81A12* および *CYP81A21* に加え、複数の GST 遺伝子および P450 遺伝子についても、転写レベルと抵抗性とに連鎖が認められた。

(3) 候補遺伝子の除草剤代謝機能

CYP81A12 および *CYP81A21* を形質転換したイネを作出し、ジクロホップ、トラルコキシジム、ピノキサデン感受性を評価したところ、顕著な抵抗性を示した。またこれらの組換えタンパク質発現を酵母で発現させ、これらの除草剤代謝について *in vivo* で検討したところ、これらの除草剤の水酸化体が検出された。

(4) *CYP81A* P450 の除草剤代謝機能

タイヌビエの *CYP81A* 遺伝子を導入したシロイヌナズナの除草剤感受性を評価したところ、複数の *CYP81A* が多くの除草剤に抵抗性を付与することが明らかになった。一方で、抵抗性が限定される遺伝子や抵抗性を付与しない遺伝子も存在し、タイヌビエ *CYP81A* には機能分化があることが明らかになった。また本解析の一貫から、タイヌビエ抵抗性系統におけるクロマゾ

ン抵抗性にも CYP81A12 および CYP81A21 が関与することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. 岩上哲史. 2018 米国産タイヌビエにおける多剤抵抗性機構の解明に向けて. 日本農薬学会 43: 40-45
2. 岩上哲史. 2018 雑草の除草剤抵抗性メカニズム -除草剤の解毒代謝による抵抗性-. 九州の雑草 47 30-32
3. Iwakami S, Kamidate Y, Yamaguchi T, Ishizaka M, Endo M, Suda H, Nagai K, Sunohara Y, Toki S, Uchino A, Tominaga T, Matsumoto H. 2019. CYP81A P450s are involved in concomitant cross-resistance to acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase herbicides in *Echinochloa phyllopogon*. *New Phytologist* 221(4): 2112-2122.
4. Guo F, Iwakami S, Yamaguchi T, Uchino A, Sunohara Y, Matsumoto H. 2019. Role of CYP81A cytochrome P450s in clomazone metabolism in *Echinochloa phyllopogon*. *Plant Science* 283: 321-328.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 岩上哲史. 2017 雑草の除草剤抵抗性メカニズム-除草剤の解毒代謝による抵抗性-. 九州雑草防除研究会
2. Iwakami S, Kamidate Y, Sunohara Y, Endo M, Toki S, Uchino A, Matsumoto H. 2017 Investigation of the resistance mechanisms to several ACCase inhibitors in a multiple-herbicide resistant line of *Echinochloa phyllopogon*. 2nd Global Herbicide Resistance Challenge
3. Kamidate Y, Iwakami S, Sunohara Y, Endo M, Toki S, Uchino A, Matsumoto H. 2017 Investigation of the resistance mechanisms to several ACCase inhibitors in multiple-herbicide resistant *Echinochloa phyllopogon*. The 26th Asian Pacific Weed Science Society Conference
4. Yamaguchi T, Iwakami S, Sunohara Y, Matsumoto H. 2017 Heterologous production and characterization of CYP81A enzymes from a multiple herbicide-resistant weed, *Echinochloa phyllopogon*. The 26th Asian Pacific Weed Science Society Conference
5. Iwakami S. 2018 Mechanism of Multiple-Herbicide Resistance in *Echinochloa phyllopogon*. Annual Meeting of Weed Science Society of America
6. Iwakami S. 2018 Mechanism of multiple-herbicide resistance in *Echinochloa phyllopogon*. American Chemistry Society
7. Iwakami S. 2018 Role of cytochrome P450s in multiple-herbicide resistance in *Echinochloa phyllopogon*. International Joint Conference on Plant Protection 2018
8. 須田宏栄, 岩上哲史, 倉田康平, 上館巧嵩, 田中啓介, 田中聡, 松本宏, 富永達. 2018 多剤抵抗性タイヌビエにおけるジクロホップメチル抵抗性に関する新規 P450 遺伝子の探索. 日本雑草学会
9. 須田宏栄, 岩上哲史, 倉田康平, 上館巧嵩, 田中啓介, 田中聡, 松本宏, 富永達. 2018 多剤抵抗性タイヌビエにおけるジクロホップメチル抵抗性に関する新規 P450 遺伝子の探索. 日本農薬学会

〔図書〕(計 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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

京都大学農学研究科 雑草学研究室

<http://www.weed.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：石坂真澄

ローマ字氏名：Masumi Ishizaka

研究協力者氏名：山口拓也

ローマ字氏名：Takuya Yamaguchi

研究協力者氏名：遠藤真咲

ローマ字氏名：Masaki Endo

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。