

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02955

研究課題名(和文) タイヌビエ多剤抵抗性の鍵となるシトクロムP450遺伝子の協調的発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of coordinated regulation mechanism of cytochrome P450 genes: key genes for multiple-herbicide resistance in Echinochloa phyllopogon

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：除草剤を解毒代謝する酵素を一斉に過剰発現することで、多様な除草剤に抵抗性を獲得した水田雑草タイヌビエについて、抵抗性機構を解析し、以下について明らかにした。(1)多剤抵抗性システムについてゲノム解読し、連続性の高い配列を得た。この配列を用いた遺伝学的解析から、多剤抵抗性はゲノムの1領域に起因することが明らかになった。(2)培養特性の優れたカルスを作るタイヌビエシステムを選抜した。本システムはタイヌビエ形質転換系の確立に向けて貴重な材料となると考えられる。(3)VLCFAE阻害剤チオベンカーブの抵抗性は、その他の多くの除草剤に対する抵抗性とは独立だった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

雑草の除草剤抵抗性の中でも解毒代謝型の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、その被害が世界的に強く懸念されている。これらの抵抗性雑草の防除や、抵抗性の進化を抑制するためには、抵抗性機構の解明が求められているが、詳細についてはあらゆる雑草で明らかにされていない。本研究では、メカニズム解析が他の雑草に比べて先行している水田の大型雑草タイヌビエの多剤抵抗性を材料に、多剤抵抗性が1つの変異によって生じた可能性を示すとともに、抵抗性機構解明にむけた実験系の構築を進めた。本研究の進展により、抵抗性機構が解明されれば、抵抗性雑草の防除において重要な知見がもたらされると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the resistance mechanism of Echinochloa phyllopogon, a paddy field weed that has acquired resistance to various herbicides by simultaneously overexpressing enzymes that detoxify herbicides, and clarified the followings: (1) The genome of the multiple-herbicide resistant line was sequenced and highly contiguous genome was obtained. Genetic analysis using the genome revealed that the multiple-herbicide resistance was caused by a single region of the genome. (2) We have selected one E. phyllopogon line that produces callus with excellent culture characteristics. This line will be a valuable resource for the establishment of E. phyllopogon transformation system. (3) Resistance to the VLCFAE inhibitor thiobencarb was independent of resistance to many other herbicides.

研究分野：分子雑草学

キーワード：P450 除草剤 雑草 タイヌビエ 抵抗性 ゲノム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

今日の食糧生産を脅かす大きな問題の1つに除草剤抵抗性雑草がある。除草剤抵抗性は同一の作用機作をもつ除草剤が継続使用される中で、同一防除圧への適応進化として顕在化する。このため、異なる作用機作の除草剤であれば有効であることが多い。しかし除草剤を解毒代謝する能力の向上による抵抗性(代謝型抵抗性)では、未使用かつ化学骨格や作用機作の異なる除草剤に対しても抵抗性を示すことがしばしば報告されている。このため代謝型抵抗性に対しては有効除草剤の予測ができず、その被害の拡大が世界的な脅威となっている。

有効除草剤の予測には、抵抗性機構の解明が必須であるが、これまで解毒代謝酵素が同定されたことはなく、その分子機構も長らく不明であった。こうした中、研究代表者らは米国カリフォルニアで発見された稲作障害雑草タイヌビエの多剤除草剤抵抗性を研究し、2種のシトクロムP450(CYP81A12およびCYP81A21)の高発現が多剤抵抗性の主要因であることを明らかにした。このP450はともに、多剤抵抗性タイヌビエが抵抗性を示す9種類の化学骨格の除草剤のうち、少なくとも7種の骨格群(4作用機作)の除草剤を代謝する“スーパーP450”であることが分かっている。また2つの遺伝子は独立の染色体に座乗するにも関わらず、交雑後代におけるそれらの発現の強弱は常に連鎖することから、1つのトランス因子がこれらの遺伝子の発現を制御する可能性が強く示唆されている。

一方、除草剤ジクロホップに対するタイヌビエの著しい抵抗性は2種のP450の高発現だけでは説明できなかった。そこでRNA-seq解析および交雑後代での抵抗性と発現量を解析し、ジクロホップを代謝する新規P450遺伝子(CYP709C69)を発見した。また以上3種のP450遺伝子の高発現は、交雑後代や除草剤処理時においてプロモーターなどシス因子に関係なく常に同調していた。このことから多剤抵抗性タイヌビエでは、多くの除草剤を代謝する複数のスーパーP450と限られた除草剤を代謝するP450が、1つの制御因子により同時に活性化されることにより、多様な除草剤に対する抵抗性を獲得したと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、タイヌビエの多剤抵抗性における除草剤代謝P450遺伝子の活性化機構を明らかにするため、トランスクリプトーム解析およびゲノム解析の両面から、タイヌビエの抵抗性機構を解析する。

3. 研究の方法

- A) 抵抗性系統と感受性系統の交雑後代F6世代を育成し、遺伝子型と除草剤感受性を調べ、抵抗性の原因遺伝子座を明らかにする。遺伝子型の解析にはddRAD-seq法を用いる。加えて、ロングリードシーケンサーSequel IIによるhifiリードを用いて、多剤抵抗性系統のゲノムを新規解読し、参照配列として使用する。
- B) 抵抗性機構の解明には、タイヌビエにおける形質転換系の確立が必要である。プロトプラストを用いた一過的発現法と、タイヌビエカルスを用いた核ゲノムへの安定的形質転換法について検討する。タイヌビエのカルスについては、複数系統供試し、培養特性を比較する。
- C) 除草剤解毒P450遺伝子の発現制御を担う因子の同定に向け、共発現ネットワーク解析を行う。除草剤・塩・アブシジン酸などの各ストレス処理を行った抵抗性および感受性系統(カリフォルニア由来)、これらの交雑後代、遺伝背景の異なる系統(日本由来)について、それぞれ地上部、地下部組織など30種のRNAを調整する。
- D) 多剤抵抗性発現についてさらに知見を得るため、タイヌビエは抵抗性を示すものの、3種のP450が代謝しないチオベンカーブについて、他の除草剤抵抗性との遺伝的連鎖について評価する。

4. 研究成果

- A) タイヌビエ交雑後代(F5)約120集団について、ddRAD-seqライブラリを構築し、Hiseq4000でシーケンスした。当時公開されていたタイヌビエのコンティグベースのドラフトゲノム(Ye et al. 2020)にマッピングし、遺伝子型を決定した。F5世代の除草剤感受性について、F6世代の感受性を評価することにより推定した。遺伝子型と表現型の情報からゲノムワイド関連解析(GWAS)を行ったところ、抵抗性と関連する2つのコンティグが同定された。これらのコンティグを染色体レベルのアセンブルが行われているヒエ属2倍体種のゲノム

と比較すると、単一のゲノム領域に対応することが明らかになった。そこで F5 世代の遺伝子型から連鎖地図を構築し QTL 解析を行ったところ、1つの領域が検出された。

タイヌビエ抵抗性系統から高分子 DNA を抽出し、hifi リードを用いてゲノムをシーケンスした。新規にアセンブルしたゲノムに ddRAD-seq のリードをマッピングし、再度 GWAS を行った。従来のドラフトゲノムでは候補領域が2つのコンティグにまたがる形になったが、本ゲノムでは1領域が検出され、抵抗性が1遺伝子支配であることを支持するものとなった。

- B) 候補遺伝子の機能解析に向け、タイヌビエにおけるプロトプラスト形質転換系の構築を試みた。イネ科植物に幅広く適用可能と報告された緑葉からのプロトプラスト単離法に従って実験を行ったものの、状態の良いプロトプラストは単離できなかった。そこで、核ゲノムへの形質転換を試みることにした。産地や形態的特性の異なるタイヌビエ7系統についてカルスを誘導し、その培養特性や再分化能を評価したところ、いずれについても良好な系統が1つ見つかった。本系統由来のカルスについて、ハイグロマイシンとグルホシネートの感受性を評価したところ、グルホシネートに高い感受性を示したため、選抜薬剤にはグルホシネートが有効であると考えられた。GUS や GFP のレポーター遺伝子を利用し、アグロバクテリウム法で形質転換を試みたが、形質転換体は得られなかった。パーティクルガン法などの検討が必要だと考えられた。
- C) 抵抗性発現の鍵となる3種のシトクロム P450 遺伝子の過剰発現を制御する因子の同定に向け、共発現ネットワーク解析を行った。解析には、植物ホルモンなどの処理を行った抵抗性および感受性系統、これらの交雑後代について、それぞれ地上部、地下部組織など約30種のサンプルの用いた。RNA を抽出後、RNA-seq ライブラリを作成した。HiSeq4000 によりシーケンスし、共発現解析には WGCNA パッケージを用いた。共発現解析によりトランスクリプトームは8種のモジュールに分類された。3種の P450 遺伝子を含むモジュールには薬物代謝関連遺伝子が多く含まれ、抵抗性系統で高発現する転写因子が3種存在した。3種の P450 遺伝子のプロモーターにはこれら転写因子の cis 配列が存在した。また3種の P450 遺伝子は除草剤ジクロホップメチルにより発現誘導されることが知られるが、これらの転写因子についても誘導性が認められた。したがって、これらの遺伝子が抵抗性発現に関わる可能性が示唆された。
- D) 多剤抵抗性発現機構について知見を得るため、VLCAE 阻害剤チオベンカーブの抵抗性について検討した。これまでに評価した除草剤については抵抗性形質が交雑後代で連鎖したが、チオベンカーブについては連鎖が認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Dimaano Nina Gracel, Iwakami Satoshi	4. 巻 77
2. 論文標題 Cytochrome <i>CYP450</i> -mediated herbicide metabolism in plants: current understanding and prospects	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pest Management Science	6. 最初と最後の頁 22 ~ 32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ps.6040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Dimaano Nina Gracel, Tominaga Tohru, Iwakami Satoshi	4. 巻 70
2. 論文標題 Thiobencarb resistance mechanism is distinct from CYP81A-based cross-resistance in late watergrass (<i>Echinochloa phyllopogon</i>)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Weed Science	6. 最初と最後の頁 160 ~ 166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/wsc.2022.4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福西詩奏・赤木剛士・保田謙太郎・富永達・岩上哲史
2. 発表標題 共発現解析による水田雑草タイヌビエにおける除草剤解毒代謝シクロムP450の発現制御因子の探索
3. 学会等名 第二回植物インフォマティクス 研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉浦快・福西詩奏・富永達・岩上哲史
2. 発表標題 タイヌビエにおいて多剤抵抗性発現をもたらすゲノム領域の探索
3. 学会等名 日本雑草学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須田宏栄・義本裕介・久保朋美・田中啓介・田中聡・山口拓也・宮下正弘・富永達・岩上哲史
2. 発表標題 タイヌビエにおける複数の除草剤代謝遺伝子の同時過剰発現による広域な抵抗性の獲得
3. 学会等名 日本農薬学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	赤木 剛士 (Akagi Takashi) (50611919)	岡山大学・環境生命科学学域・准教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------