

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05534

研究課題名（和文）遺伝的多様性とゲノム編集技術の利用による新たな除草剤抵抗性様式を有するイネの作出

研究課題名（英文）Creation of Novel Herbicide Resistance in Rice Through Phylogenetic Analysis and Genome Editing

研究代表者

黒羽 剛（Kuroha, Takeshi）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：50415155

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：作物における除草剤抵抗性は、農作業の軽労化と低コスト化を介した安定生産につながる最重要形質の一つである。除草剤抵抗性に関与するHIS1遺伝子がイネから同定され、その類似遺伝子HIS1-Like (HSL)を含む遺伝子ファミリーの存在が明らかになっているが、それらの除草剤抵抗性様式の詳細や植物体での本来の機能については依然不明であった。本課題において、除草剤抵抗性に関与するHIS1/HSLs 遺伝子群の進化的起源について理解を深めるとともに、除草剤抵抗性の様式変化を引き起こすと予想されるアミノ酸を検出した。さらに、植物体内でHIS1/HSLs が関与する代謝系の有力候補を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネにおいて除草剤抵抗性に関わる遺伝子として同定されたHIS1/HSLsが植物体内で関与する代謝系について、重要な知見をもたらした。今後の研究推進により、HIS1/HSLsを用いた除草剤抵抗性作物の特性を的確に評価することが可能となる。また、植物体自身の成長には影響を与えず除草剤抵抗性のみを付加させるような有用変異の利用にもつながる。さらに、HIS1/HSLsに極めて類似性の高い遺伝子群がイネ科植物に普遍的に存在することから、ゲノム編集技術を用いたイネ以外のイネ科作物への応用展開を通じて、将来の農業生産向上への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：Herbicide resistance is one of the most important traits for stable crop production, to save labor and maintain low costs in farming. HIS1 has been identified as a gene contributing to herbicide resistance in rice. HIS1 and HIS1-LIKE (HSL) proteins are conserved in other grasses. We classified grass genes encoding HIS1/HSLs family into several subgroups, one of which is novel. We also found amino acid variations in wild rice HIS1 and HSLs that can potentially affect substrate specificity and lead to a diverse spectrum of herbicide resistance. Furthermore, we also identified a candidate metabolic pathway mediated by HIS1/HSLs in plants.

研究分野：植物育種学

キーワード：除草剤抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

作物における除草剤抵抗性は、農作業の軽労化と低コスト化を介した安定生産につながる最重要形質の一つである。2019年に、トリケトン系除草剤「ベンゾピシクロン(BBC)」に対する抵抗性に関与するイネ遺伝子 *HIS1* (*HPPD INHIBITOR SENSITIVE 1*)が同定された。*HIS1* 遺伝子とその類似遺伝子 *HIS1-Like* (*HSL*)の一部で除草剤抵抗性の様式が異なることが明らかになったが、その詳細や植物体での本来の機能については依然不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、*HIS1*/*HSLs* についてその進化的起源と多様性を理解すると共に、イネ遺伝資源、ゲノム情報、およびゲノム編集技術を活用することで、新たなタイプの除草剤抵抗性を持つイネの作出を目指す。また、*HIS1*/*HSLs* の植物体内での本来の機能を解明し、植物成長における有用性を評価することを目指す。本研究では以下の3つのアプローチにより新たなタイプの除草剤抵抗性を持つイネ作出のための基盤技術を確立する。

- 1 イネ科植物における *HIS1* と類似遺伝子群 *HSLs* の配列情報をもとに進化的解析を行う。
- 2 新たな除草剤抵抗性スペクトラムを持つイネ作成に有望な *HIS1*/*HSLs* 変異を探索する。
- 3 イネ植物体における *HIS1*/*HSLs* の植物体内での本来の機能を解明する。

## 3. 研究の方法

### 1 *HIS1*/*HSLs* 遺伝子群の進化的解析

イネ科植物の *HSL* クラスターの構成遺伝子及びその近傍の塩基配列をデータベースから取得し比較することで、*HSL* 遺伝子群の起源と多様性を解析する。

### 2 除草剤抵抗性に関わる新規変異の探索

*HIS1*/*HSLs* 遺伝子群の進化的解析によって得られた結果から、除草剤抵抗性の様式変化を引き起こすと予想されるアミノ酸を探索し検証する。

### 3. *HIS1*/*HSLs* の植物体内での機能解明

*HIS1* の機能が欠損したイネ系統を用いて、ゲノム編集(CRISPR/Cas9を使用)により全ての *HSLs* の機能が欠損したイネを作成する。作成したゲノム編集系統の形態を詳細に調査するとともに、RNAseq 解析により発現が変化している遺伝子を調査する。

## 4. 研究成果

公開されている複数のゲノムデータベースから、ゲノム配列が解読されている栽培イネ、野生イネ及び他のイネ科植物の *HIS1* あるいは *OsHSL1~6* 遺伝子に類似した full-length cDNA 配列を抽出した。データベース上の推定アミノ酸配列とイネ *HIS1*/*OsHSLs* のアミノ酸配列を比較することで、解析に用いる *HIS1*/*HSLs* のアミノ酸配列を決定した。栽培イネのゲノムにおいて、7つの *HIS1*/*HSLs* 遺伝子のうち5遺伝子が単一遺伝子座にクラスターとして存在している。このクラスターは、野生イネや他の多くのイネ科植物種においても共通して存在していることがわかった。その一方で、クラスターを構成する *HIS1*/*HSLs* 遺伝子の数や種類に多様性がみられた。また、一部野生イネおよびイネ科植物種において、栽培イネには存在しないサブグループに属する *HSLs* 遺伝子の存在が確認された。以上から、イネ科における *HIS1*/*HSLs* 遺伝子群は、進化の過

程で遺伝子重複や転座・変異によりその機能遺伝子数を増減させていることが考えられた。さらに、*HIS1/HSLs* 遺伝子群の進化的解析によって得られた結果から、除草剤抵抗性の様式変化を引き起こすと予想されるアミノ酸を複数得ることができた。

*HIS1/HSLs*の植物体における本来の機能の解明するために、CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を用いて*HIS1/HSLs* 全ての機能を欠損した系統の作成を行った。*HSLs*遺伝子のエキソン領域にガイドRNAを設計したベクターを作成し、*HIS1* 遺伝子に機能欠損変異を持つイネ系統へ形質転換により導入した。*HSLs*遺伝子の全てのターゲット領域にフレームシフトを引き起こした系統をシーケンシングにより選抜することで、*HIS1/HSLs* 全ての機能を欠損させた系統を作出した。

一方、本課題を遂行する過程で、*HIS1/HSLs* 遺伝子との関与が強く示唆される植物体内での代謝系の候補を見出した。その代謝系への関与を検証するために、*HIS1/HSLs* 全ての機能を欠損したゲノム編集系統における表現型の調査を行った。その結果、予想される表現型に異常がみられることを確認した。候補代謝物質の合成に関わる遺伝子の機能変異体においても、この器官において伸長異常が報告されていることから、*HIS1/HSLs* の少なくとも一部遺伝子は候補代謝系に関与することが予想された。また、*HIS1*および*HSLs* のそれぞれ単独の機能欠損変異では明確な表現型の異常が観察されなかったため、複数の遺伝子が同様の酵素活性を持ち機能的に重複している可能性がある。一方、*HIS1* および *HSL1* 遺伝子の過剰発現体は、明確な形態異常がみられなかった。そこで、遺伝子発現変動を調査するために、*HIS1/HSLs* 機能欠損ゲノム編集系統、*HIS1* 過剰発現体、*HSL1* 過剰発現体においてRNA-seq解析を行い発現変動遺伝子の比較を行った。

以上のように、本課題においては*HIS1/HSLs* 遺伝子群の進化的起源と多様性について考察を深めることができ、除草剤抵抗性の様式変化を引き起こすと予想されるアミノ酸を同定することができた。また、植物体内で*HIS1/HSLs*が関与する代謝系の有力候補を見出すことに成功した。今後は、*HIS1/HSLs* 機能欠損・過剰発現系統を用いて候補代謝系遺伝子の変動を調査するとともに、候補代謝物質の内生量の測定、酵素活性の測定を行うことで、植物体内での*HIS1/HSLs*の機能解明につながることを期待される。以上の成果は、ゲノム編集技術を用いた新たなタイプの除草剤抵抗性を持つイネおよびイネ科作物作出への足がかりとなるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

〔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	横井 彩子  (Nishizawa-Yokoi Ayako)  (10760019)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員    (82111)	
研究分担者	吉田 均  (Yoshida Hitoshi)  (30355565)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・研究領域長    (82111)	
研究分担者	川岸 万紀子  (Kawagishi Makiko)  (50355707)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員    (82111)	

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