

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06072

研究課題名（和文）多除草剤抵抗性雑草における急速な除草剤解毒代謝メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of rapid herbicides detoxification in multiple-herbicide resistant weed species

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） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：作用機構の異なる複数の除草剤に抵抗性を示す多剤抵抗性雑草は作物栽培において大きな問題となる。除草剤の解毒代謝（分解）機能が向上した場合、同時に複数の除草剤に抵抗性を獲得することが可能であると考えられていたが、その詳細なメカニズムはあらゆる雑草種において不明であった。本研究では水田雑草タイヌビエにおける多剤抵抗性について詳細な解析を行い、多剤抵抗性現象に関与することが強く示唆される遺伝子を同定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Weed resistance to multiple herbicides with multiple modes of action pose a great threat to crop cultivation. Molecular mechanism of multiple-herbicide resistance has been unknown in all resistant weed species although enhanced herbicide metabolism has been suggested as one of the mechanisms of multiple-herbicide resistance. In this study, we investigated multiple-herbicide resistance in a paddy weed *Echinochloa phyllopogon* and identified genes that are likely involved in the multiple-herbicide resistance.

研究分野：除草剤抵抗性

キーワード：多剤抵抗性 タイヌビエ シトクロムP450 グルタチオン転移酵素 非作用点抵抗性

## 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に関わる遺伝子はこれまでほとんど明らかにされてこなかった。

我々は水田雑草タイヌビエで発見された多剤抵抗性型における抵抗性機構の解析を行ってきた。本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ことが知られていた。ALS 阻害剤抵抗性に絞って解析したところ、抵抗性型では ALS 阻害剤を解毒代謝する cytochrome P450 (*CYP81A12* および *CYP81A21*) が過剰発現しており、この過剰発現が抵抗性型と感受性型の交雑後代において共分離することから、これが抵抗性の主要因であると考えられた (Iwakami et al. 2014 *Plant Physiology*)。しかし ACCCase 阻害剤などその他の除草剤抵抗性のメカニズムは不明であった。

## 2. 研究の目的

多剤抵抗性タイヌビエが抵抗性を示す ACCCase 阻害剤として、FOP 系骨格を有するフェノキサプロップエチルやシハロホップブチルが知られていた。その抵抗性機構は ALS 阻害剤同様に解毒代謝によることが明らかにされていたが、関わる解毒代謝酵素は P450 ではなく、グルタチオン転移酵素 (GST) が有力と推定されていた (Ruiz-Santaella et al. 2006, Bakkalie et al. 2007)。一方で、少なくともフェノキサプロップエチルの抵抗性には P450 の関与を示唆する報告もあり (Tsuji et al. 2013)、分子レベルで詳細に検討する必要があった。

本研究では、抵抗性の獲得が明らかにされている FOP 系除草剤フェノキサプロップエチルに加え、DIM および DEN 骨格型の ACCCase 阻害剤の反応を解析し、抵抗性型タイヌビエの ACCCase 阻害剤抵抗性機構の理解をより深めるとともに、ALS 阻害剤抵抗性機構との同一性を検証することにした。

## 3. 研究の方法

### (1) ACCCase 阻害剤感受性試験

多剤抵抗性型、感受性型のタイヌビエを水耕法により栽培し、各除草剤を処理した。除草剤処理は、茎葉部を除草剤溶液に 30 分間浸漬することで行った。除草剤処理後 9 日目に茎葉部新鮮重を測定した。新鮮重を対無処理区に変換後、log-logistic 式により回帰し、

50%生育阻害薬量 (GR<sub>50</sub>) を推定した。除草剤には FOP 骨格型としてフェノキサプロップエチル、ジクロホップメチル、DIM 骨格型としてトラルコキシジム、DEN 骨格型としてピノキサデンの 4 種類を供試した。

### (2) ALS 阻害剤抵抗性機構と ACCCase 阻害剤抵抗性機構の同一性の検証

抵抗性型と感受性型の交雑後代 (F6 世代) 40 系統について、フェノキサプロップエチル、ジクロホップメチル、トラルコキシジム、ピノキサデン感受性を上記の方法によって評価した。なお供試系統について ALS 阻害剤感受性は既に明らかになっていた。

### (3) *CYP81A12*、*CYP81A21* 形質転換カルスの作出および除草剤感受性試験

バイナリーベクター pCAMBIA1390 におけるカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター下流に *CYP81A12* および *CYP81A21*、またネガティブコントロールとして *GFP* をそれぞれ挿入し、発現ベクターを構築した。アグロバクテリウムを介して、イネ完熟種子から誘導したカルスに形質転換した。形質転換体カルスを選抜した後、除草剤を添加した培地に独立の形質転換カルス 9 個を置床した。3 週間後のカルスの増殖量に基づき、除草剤感受性を評価した。

### (4) イネ形質転換植物体の除草剤感受性試験

形質転換カルスから植物体を再分化させた。サザンブロッティングでシングルコピー系統を選抜し、栽培・次世代種子を採取した。除草剤感受性は、除草剤を添加した MS 培地に発芽種子を置床し、その後の生育で評価した。

### (5) mRNA-Seq 解析によるフェノキサプロップエチル代謝候補遺伝子の同定

抵抗性型および感受性型それぞれ 4 個体から抽出した RNA を用いて、HiSeq2500 によって mRNA-Seq 解析を行った。Trinity を用いたアセンブルにより Reference Transcriptome を作出後、bowtie2 を用いてマッピングし、TCC を用いて DEG を抽出した。

## 4. 研究成果

### (1) 各種 ACCCase 阻害剤感受性

多剤抵抗性型は供試したいずれの除草剤に対しても顕著な抵抗性を示した。GR<sub>50</sub> 値の比 (R/S) は フェノキサプロップエチルで 13.3 (図 1)、ジクロホップメチルでは 66 倍以上 (図 2)、トラルコキシジムでは 19 (図 3)、ピノキサデンは 27 となった (図 4)。したがって、多剤抵抗性型は化学骨格の異なる ACC

阻害剤に幅広く抵抗性を示すことが明らかになった。

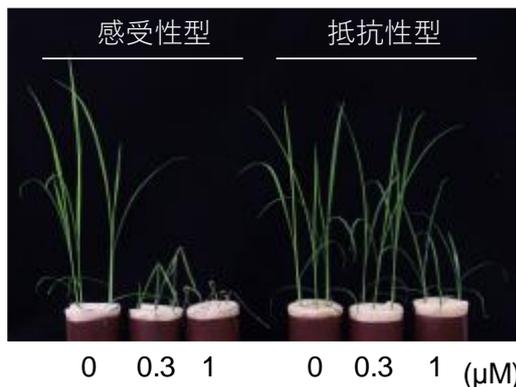


図1 タイヌビエのフェノキサプロップエチル感受性

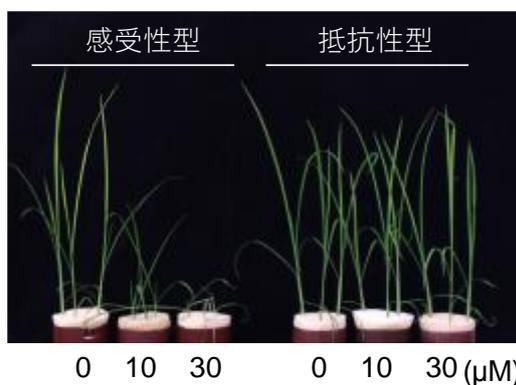


図2 タイヌビエのジクロホップメチル感受性

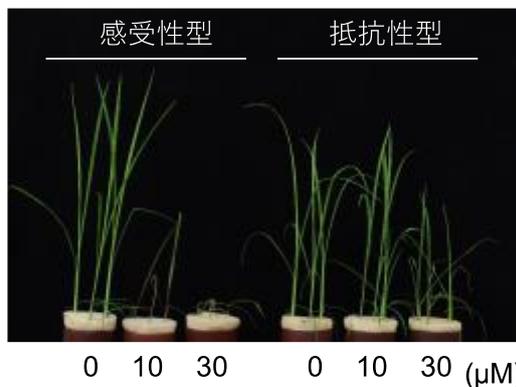


図3 タイヌビエのトラルコキシジム感受性

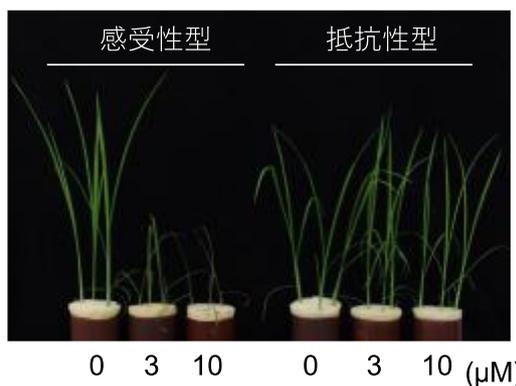


図4 タイヌビエのピノキサデン感受性

## 2) ALS 阻害剤抵抗性機構と ACCase 阻害剤抵抗性機構の同一性

交雑後代 F6 世代 40 系統について、4 種の ACCase 阻害剤感受性を評価した。ALS 阻害剤に感受性の系統はいずれの ACCase 阻害剤に対しても感受性を示し、ALS 阻害剤に抵抗性の系統はいずれの ACCase 阻害剤に抵抗性を示した。したがって、ALS 阻害剤抵抗性と ACCase 阻害剤抵抗性には連鎖関係があることが明らかになった。

## (3) *CYP81A12*、*CYP81A21* 形質転換カルス除草剤感受性

*CYP81A12* および *CYP81A21* を導入したイネカルスは、*GFP* を導入したカルスと比べ、ジクロホップメチル、トラルコキシジム、ピノキサデン感受性が著しく低下した。一方でフェノキサプロップエチル感受性については、顕著な違いは認められなかった。

## (4) イネ形質転換植物体の感受性

導入遺伝子をプローブとしてサザンブロットティングを行い、期待サイズの単一のバンドが認められた形質転換体を、シングルコピー系統とした。これらについて次世代種子を採取し、選抜薬剤ハイグロマイシンで抵抗性の分離を評価したところ、概ね 3:1 に分離し、サザンブロットティングによって推定した導入遺伝子のコピー数の結果を支持するものとなった。これらについて、野生型のイネと 4 種 ACCase 阻害剤の感受性を比較したところ、カルスでの試験同様にフェノキサプロップエチル以外については抵抗性が認められた。

## (5) フェノキサプロップエチル代謝候補遺伝子の同定

以上の結果から、フェノキサプロップエチル抵抗性には、*CYP81A12*、*CYP81A21* とは異なる因子が関与すると考えられた。そこでタイヌビエで *de novo* mRNA-Seq 解析を行った。総コンティグ 86200 種のうち、抵抗性で有意に高発現するコンティグとして 970 種が同定された。これらのうち、P450 および GST をコードするコンティグはそれぞれ 22 種、15 種となった。フェノキサプロップエチル抵抗性にはこれらの遺伝子の関与が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

## 1. Satoshi Iwakami, Masaki Endo, Hiroaki

Saika, Junichi Okuno, Naoki Nakamura, Masao Yokoyama, Hiroaki Watanabe, Seiichi Toki, Akira Uchino, Tatsuya Inamura (2015) “Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*” 25th Asian-Pacific Weed Science Society Conference

2. 上舘巧嵩・岩上哲史・春原由香里・松本宏 (2015) “多剤抵抗性タイヌビエにおける複数の ACCase 阻害剤に対する反応” 第 55 回日本雑草学会大会
3. 岩上哲史 (2016) “米国産タイヌビエにおける抵抗性機構の解析-ALS 阻害剤および ACCase 阻害剤の解毒代謝機構-” 除草剤抵抗性研究会 (招待講演)
4. 岩上哲史 (2017) “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” 第 42 回日本農薬学会大会 (招待講演)
5. Feng Guo, Satoshi Iwakami, Kiichi Nagai, Akira Uchino, Yukari Sunohara, Hiroshi Matsumoto (2017) “Investigation of clomazone resistance mechanism in multiple-herbicide resistant *Echinochloa phyllopogon*” 第 56 回日本雑草学会大会
6. Pattarasuda Chayapakdee, Satoshi Iwakami, Akira Uchino, Yukari Sunohara, Hiroshi Matsumoto (2017) “Investigation of a role of  $\beta$ -cyanoalanine synthase in quinclorac resistance in multiple-herbicide resistant *Echinochloa phyllopogon*” 第 56 回日本雑草学会大会

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページなど

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

<https://www.facebook.com/kyotoweed/>

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

上舘 巧嵩 (KAMIDATE, Yoshitaka)

CHAYAPAKDEE, Pattarasuda

GUO, Feng

内野 彰 (UCHINO, Akira)

遠藤 真咲 (ENDO, Masaki)

土岐 精一 (TOKI, Seiichi)

春原 由香里 (SUNOHARA, Yukari)

松本 宏 (MATSUMOTO, Hiroshi)