

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06066

研究課題名（和文）水田雑草ヒメタイヌビエの多剤抵抗性機構の解明

研究課題名（英文）Status and mechanisms of the multiple herbicide resistance occurring in *Echinochloa crus-galli* var. *formosensis* in the paddy fields of Japan

研究代表者

内野 彰 (Uchino, Akira)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中日本農業研究センター・グループ長補佐

研究者番号：20355316

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）：日本のヒエ属水田雑草における除草剤抵抗性の状況と抵抗性機構を調べ、以下のことを明らかにした。（1）12地域から収集したヒエ属水田雑草31系統を解析し、21系統において新たにシハロホップブチル抵抗性が確認された。そのうちヒメタイヌビエ1系統およびタイヌビエ4系統は多剤抵抗性を示した。（2）抵抗性ヒメタイヌビエEcf108とEcf27では、除草剤作用点に差異が無く、ともにシハロホップブチルの解毒代謝が向上していた。（3）Ecf108では、形質転換体にシハロホップブチル抵抗性を付与する新たな抵抗性遺伝子CBR1の過剰発現を認めた。（4）Ecf27では、解毒代謝酵素P450の過剰発現を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

除草剤抵抗性の機構は大別して、除草剤の作用点変異に起因する「作用点抵抗性」と、それ以外に起因する「非作用点抵抗性」の2種類に分けられるが、近年は非作用点抵抗性による多剤抵抗性が海外で増加し、持続的農業を阻害する要因として強く懸念されている。日本の水稲作ではヒエ属水田雑草が最も広く発生する強害雑草であり、この雑草で多剤抵抗性が拡がると水稲作に及ぼす被害が甚大なものとなる。本成果は多剤抵抗性を含むヒエ属水田雑草の抵抗性機構の一端を解き明かしたものとなる。現場では対症療法的な対策を行っているのが現状だが、本研究の進展により、多剤抵抗性が全国に拡がる前に持続的で有効な対策を立てることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated the status and mechanisms of herbicide resistance occurring in *Echinochloa* spp. in the paddy fields of Japan. On the survey of 31 lines collected from 12 areas across Japan, 21 lines showed cyhalofop-butyl resistance. Multiple herbicide resistance was shown in 5 lines among them. Two resistant lines (Ecf108 and Ecf27) of *Echinochloa crus-galli* var. *formosensis* did not show significant difference in target site feature from susceptible lines but showed increment in detoxification of cyhalofop-butyl. In Ecf108, we found a new resistant gene that confer cyhalofop-butyl resistance in transgenic plants and highly expressed in the resistant line. In Ecf27, some cytochrome P450s were highly expressed.

研究分野：雑草学

キーワード：除草剤抵抗性 ヒエ属水田雑草 解毒代謝 多剤抵抗性 シハロホップブチル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

除草剤抵抗性の機構は大別して、除草剤の作用点(除草剤の標的となる酵素など)の変異に起因する「作用点抵抗性」と、それ以外の機構に起因する「非作用点抵抗性」の2種類に分けられる。近年は、非作用点抵抗性による多剤抵抗性が海外で増加し、今後の持続的農業を阻害する要因として強く懸念されている。日本の水田雑草では、2010年に採取された岡山県のヒメタイヌビエ(Ecf27系統)で多剤抵抗性が確認され、非作用点抵抗性によるものと推定された。さらに2018年以降、別の県の移植栽培でも新たに多剤抵抗性のヒメタイヌビエが確認されている。今後、さらに広い地域で多剤抵抗性ヒメタイヌビエが顕在化するのが懸念されるため、抵抗性機構の解明に基づき、有効かつ適切な防除体系を確立することが急務となっている。ヒエ属水田雑草の多剤抵抗性は、米国の多剤抵抗性タイヌビエにおいて、2種類のシトクロムP450オキシゲナーゼ(P450)が同調して高発現し、多くの除草剤に対する解毒代謝機能が向上していることが明らかになっている。日本のヒメタイヌビエは未解析であるが、同様に解毒代謝機能の向上による非作用点抵抗性である可能性が高い。

2. 研究の目的

「日本のヒメタイヌビエでも、解毒代謝機能の向上による非作用点抵抗性が広く認められるのか、解毒代謝機能向上による抵抗性に関与する遺伝子は何か」を"核心をなす学術的「問い」"とし、この検証および抵抗性の分子機構の解明を目的として、日本で確認された複数の多剤抵抗性系統を比較・解析する。具体的には

- (1) 抵抗性が疑われる抵抗性ノビエ系統を収集し、その交差抵抗性を明らかにする。
- (2) 作用点抵抗性を検証するため、作用点酵素の除草剤感受性を明らかにする。
- (3) 解毒代謝の検証と関連酵素の推定のため、解毒代謝阻害剤の影響を明らかにする。
- (4) 除草剤散布後の植物体内の除草剤代謝物を解析し、解毒代謝機能の向上を検証するとともに代謝経路を推定する。
- (5) 遺伝子発現解析や機能解析などを通じて関連遺伝子を同定し、抵抗性の分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 各地から収集したノビエ系統についてワグネルポット試験で除草剤反応を調べた。供試除草剤は、アセチル CoA カルボキシラーゼ(ACCase)を作用点とする除草剤(ACCase阻害剤)のシハ口ホップブチルおよびメタミホップと、アセト乳酸合成酵素(ALS)を作用点とする除草剤(ALS阻害剤)のペノキススラムおよびビスピリバックナトリウムとした。

(2) 作用点となるACCaseおよびALSの除草剤感受性について、それぞれマラカイトグリーンおよびアセトインを介した比色法を用いた活性測定を行った。

(3) 解毒代謝酵素として想定されるグルタチオントランスフェラーゼ(GST)とP450の阻害剤について、ワグネルポット試験の除草剤反応に対する影響を調べた。

(4) 除草剤散布後の植物体内の除草剤濃度推移をLC-MS/MSを用いて直接検出して系統間で比較し、代謝産物の候補も推定して同様に濃度推移を系統間で比較した。

(5) トランスクリプトーム解析により、系統間で解毒代謝遺伝子の発現量を比較し、抵抗性系統特異的に高発現する遺伝子を特定した。また解毒代謝産物の解析から代謝経路を推定し、代謝経路に関連する遺伝子の中から高発現する遺伝子を特定した。さらに作用点遺伝子についても抵抗性変異の有無を解析した。解毒代謝に関与すると推定された遺伝子については、イネカルスに形質転換して、解毒代謝機能の向上や抵抗性の付与を検証した。

4. 研究成果

(1) 12地域から収集したヒメタイヌビエ2系統、タイヌビエ12系統、イヌビエ17系統の除草剤反応から、それぞれ新たに1系統、7系統、13系統のシハ口ホップブチル抵抗性が確認された。そのうち、1系統のヒメタイヌビエおよび4系統のタイヌビエは多剤抵抗性であった。他はACCase阻害剤だけに抵抗性を示した(表1、未解析系統を除く)。

(2) 岡山県の抵抗性系統(Ecf27およびEcf108)では、ALS活性及びACCase活性ともに感受性系統と同様の阻害剤反応を示し、作用点の除草剤反応に差異が認められなかった。

(3) GST阻害剤(NBD-Cl)はEcf27およびEcf108のシハ口ホップブチル感受性に影響を与えず、P450阻害剤(ピペロニルプロトキシド、マラチオン、フェニトロチオン)もEcf27のシハ口ホップブチル感受性に影響を与えなかった。一方で3種のP450阻害剤はEcf27のペノキススラム感受性を高めた。このことから、シハ口ホップブチル代謝に関わる解毒酵素は推定できなかったが、Ecf27のペノキススラム抵抗性はP450による解毒代謝の可能性が示唆された。

(4) Ecf27およびEcf108のシハ口ホップブチルの代謝解析では、ともに感受性系統より活性本体となるシハ口ホップ酸の濃度が低く推移し、両系統ともに解毒代謝による抵抗性であることが示された。Ecf27のシハ口ホップブチル代謝経路は特定できなかったが、Ecf108の代謝経

路はイネと類似の経路であることが示唆された。

(5) Ecf108 および Ecf27 の RNA-seq 解析から、Ecf108 のシハ口ホップブチル抵抗性への関与が期待される代謝酵素(CBR1)遺伝子、Ecf27 における多剤抵抗性への関与が期待されるシトクロム P450 の過剰発現が認められた。CBR1 遺伝子をイネカルスに形質転換すると、カルスにシハ口ホップブチル抵抗性が付与された。

ACCase 阻害剤だけに抵抗性を示した 4 地域のイヌビエは、作用点の ACCase 遺伝子に互いに異なる既知の抵抗性変異を確認し、独立進化した作用点抵抗性系統であることが明らかとなった。ACCase 阻害剤だけに抵抗性を示した 2 地域のタイヌビエは、ACCase 遺伝子に共通の変異を確認したが、既知の抵抗性変異とは異なっていた。

表1 日本国内で確認されたシハ口ホップブチル抵抗性ヒエ属水田雑草の除草剤反応¹⁾および抵抗性機構

系統名	採取年	草種	栽培 ²⁾	ACCase阻害剤 ³⁾		ALS阻害剤	抵抗性 タイプ ⁵⁾	抵抗性機構		
				CB ⁴⁾	メタホップ	ヘノキスラム		非作用点 抵抗性	解毒代謝向上 未解析	CBR1発現上昇 P450発現上昇
Ecf108	2010	ヒメタイヌビエ	乾直	抵抗性	感受性		III	非作用点 抵抗性	解毒代謝向上	CBR1発現上昇
Ecf27			抵抗性						P450発現上昇	
Ecf1805	2017	タイヌビエ	移植	抵抗性			I	作用点 抵抗性	未解析	
Eoz1814			湛直	抵抗性					P450発現上昇	
Eoz1813			移植	抵抗性		感受性				ACCase遺伝子 変異
Eoz1833	2018			抵抗性						
Ec1902	2019	イヌビエ	乾直	抵抗性		感受性	I	作用点 抵抗性	ACCase遺伝子 変異	
Ec1909				抵抗性						
Ec1914				抵抗性						
Ec1916				抵抗性						
Eoz212	2020	タイヌビエ	湛直	抵抗性			II	未解析		
Eoz217				抵抗性						
Eoz218				抵抗性						
Eoz214				抵抗性						

1) 各除草剤処理で枯死する場合を「感受性」、枯死せず生育する場合を「抵抗性」とした。

2) 採取水田の栽培様式。乾直：水稲乾田直播栽培、移植：水稲移植栽培、湛直：水稲湛水直播栽培。

3) ACCase阻害剤はアセチルCoAカルボキシルゼ阻害剤。ALS阻害剤はアミノ乳酸合成酵素阻害剤。

4) CB: シハ口ホップブチル。

5) 交差抵抗性の違いから分類した便宜的なタイプ名。

白抜き表示が本研究で新たに確認した抵抗性系統と解析結果。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩上哲史、関口麻人、石坂真澄、秋本千春、内野彰
2. 発表標題 広義イヌビエにおけるシハロホップチル抵抗性機構の解析
3. 学会等名 日本雑草学会第61回大会講演要旨集、57
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関口麻人、石坂真澄、秋本千春、富永達、黒川俊二、内野彰、岩上哲史
2. 発表標題 水田雑草ヒメタイヌビエにおける除草剤抵抗性機構の解析
3. 学会等名 第4回植物インフォマティクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保朋美、内野彰、富永達、黒川俊二、岩上哲史
2. 発表標題 タイヌビエにおけるシハロホップチル抵抗性機構の解析
3. 学会等名 第16回除草剤抵抗性雑草研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内野彰
2. 発表標題 日本国内に発生した3タイプの除草剤抵抗性ヒユ属水田雑草
3. 学会等名 第16回除草剤抵抗性雑草研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内野彰
2. 発表標題 日本国内における除草剤抵抗性ノビエの現状
3. 学会等名 2021年度年度 植調協会植調協会 関東関東支部支部 雑草研究雑草研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内野彰、吉田健吾、河合靖司、東聡志、服部誠、青木政晴、柏木啓佑、尾賀俊哉
2. 発表標題 日本国内に発生した除草剤抵抗性ノビエの交差抵抗性と有効除草剤
3. 学会等名 日本雑草学会第60回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保朋美、内野彰、富永達、岩上哲史
2. 発表標題 国内で発見された除草剤抵抗性タイヌビエにおける抵抗性機構の解析
3. 学会等名 日本雑草学会第60回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関口 麻人、内野 彰、富永 達、岩上 哲史
2. 発表標題 岡山県で発見された2タイプの除草剤抵抗性ヒメタイヌビエにおける抵抗性機構の解析
3. 学会等名 日本雑草学会第59回大会
4. 発表年 2020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	秋本 千春 (Akimoto-Tomiya Chiharu) (50414876)	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・グループ長補佐 (82111)	
研究 分担者	岩上 哲史 (Iwakami Satoshi) (00761107)	京都大学・農学研究科・助教 (14301)	

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
---------	---------