

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21312

研究課題名（和文）作物に除草剤抵抗性を付与するセーフナーの作用機構の解明

研究課題名（英文）Elucidating the mechanism of action of a safener that confers herbicide resistance in crops

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：水稲作におけるほぼ唯一のセーフナー・ダイムロンがイネにもたらず多剤抵抗性誘導機構について解析した。得られた成果は以下の3点である。（1）ダイムロンは少なくとも3種の作用機構の除草剤の薬害を軽減することを明らかにした。（2）遺伝子発現解析および遺伝子機能解析を行い、ALS阻害型除草剤抵抗性に関わる可能性が高い2つのシトクロムP450遺伝子を同定した。（3）（2）のシトクロムP450遺伝子はALS阻害型除草剤抵抗以外の解毒には関わらないことを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セーフナーは作物の除草剤耐性を強化する化合物の総称であり、除草剤と同時にまたは事前に処理することにより、作物と雑草の薬害の差を増強できる点において、農業上非常に有用である。しかし、セーフナーの作用機構については、これまで分子レベルの知見はほとんどなく、効果の高い化合物の合理的なデザインや除草剤活性成分との組み合わせの予測は困難であった。セーフナーの作用機構の一端を明らかにした本研究成果は、既存のセーフナーの有効な活用方法の探索や、新規セーフナーの開発に繋がる可能性があり、除草剤の利用場面が多様化し、抵抗性雑草の防除に多様な除草剤が求められる現代農業において重要な研究成果といえる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the mechanism of multiple-herbicide resistance induction in rice by Daimuron, which is almost the sole safener in paddy rice. The following three results are the major results. (1) Daimuron mitigates the injuries from the herbicides with at least three different modes of action. (2) Gene expression and gene functional analyses identified two cytochrome P450 genes that are likely to be involved in ALS-inhibiting herbicide resistance. (3) Results suggest that the P450 genes in (2) are not involved in detoxification except for ALS-inhibiting herbicide resistance.

研究分野：雑草学

キーワード：セーフナー P450 除草剤 薬害

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

農耕地で使用される「除草剤」は、幅広い雑草種を枯死させる一方で、作物の生育は阻害しない特性(選択性)を持つように開発され、これにより農耕地での効率的な雑草防除が可能になっている。作物に除草剤の害(薬害)を与えない技術の1つに補助化合物セーフナーの添加がある。セーフナーは作物の除草剤解毒代謝機能を強化する一方で、雑草に対する効果は乏しく、除草剤の作物と雑草の選択性を支える基幹技術であり、セーフナーなしに現代農業は成立しない。この分子基盤の解明に向けて、様々なセーフナーについて複数の作物でトランスクリプトームやプロテオーム解析が行われ、多数の酵素タンパク質の発現誘導が報告されてきた。しかし、これらの酵素の除草剤代謝機能は未検証で、それらの遺伝子発現制御機構なども含めセーフナーによる薬害軽減作用発現の分子機構は全く分かっていない。

### 2. 研究の目的

本研究ではセーフナー・ダイムロンの作用機構の謎に挑む。ダイムロンは水稲用のほぼ唯一のセーフナーであり、国内の60種以上もの除草剤に添加されている。ダイムロンはイネの複数の酵素群(シトクロム P450 やグルタチオン転移酵素(GST)など)を活性化することにより、多様な除草剤の薬害を軽減すると考えられており、その他多くのセーフナーと異なり汎用性の高い優れた特性を持つ。本研究はダイムロンによるイネの“多剤耐性化”の謎に挑むべく、イネにおけるダイムロン応答性の除草剤代謝遺伝子を同定し、セーフナーの受容から薬害軽減作用発現に至る作用機序の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

#### ダイムロンによる薬害軽減作用評価

供試除草剤は、ダイムロンによる薬害軽減効果が高いとされ、作用機構および骨格の大きく異なるものにした。水耕栽培でイネ日本晴を2.1葉期まで育成し、地下部に各除草剤を処理した。処理10日後に新鮮重および第4葉長を測定した。

#### CYP81A6の各除草剤代謝並びに薬害軽減作用への関与の検討

CYP81A6の各除草剤代謝機能を評価するため、CYP81A6を形質転換したシロイヌナズナを作出し、形質転換体の除草剤感受性を評価した。ダイムロン処理後のCYP81A6の転写変動をリアルタイムPCRにより評価した。CYP81A6ノックアウト体をCRISPR/Cas9システムを利用して作出した。導入した変異をホモ接合型で固定し、種子を増産した後、各種除草剤感受性並びにダイムロンによる薬害軽減について評価した。

#### RNA-seq解析

RNA-seqライブラリを構築し、HiSeq 2500でシーケンスした。リードの前処理には、FASTP、マッピングにはSTAR、リードカウントにはRSEM、発現変動遺伝子(FDR<0.05、|log(fold-change)|>1)の同定にはedgeRを用いた。クラスタリングはk-meansを用い、GOエンリッチメント解析を実施した。

## 候補遺伝子の機能解析

RNA-seq 解析で候補となった遺伝子を単離し、シロイヌナズナに形質転換した。T2 以上の世代において、各種除草剤感受性を評価した。

## 4. 研究成果

### ダイムロンによる薬害軽減作用評価

アセト乳酸合成酵素 (ALS) 阻害剤 (メタゾスルフロロン)、超長鎖脂肪酸合成酵素 (VLCFAE) 阻害剤 (カフェンストロール、フェノキサスルホン、テニルクロール)、脂肪酸合成 (FAT) 阻害剤 (オキサジクロメホン) の除草剤を供試した。供試したすべての除草剤でダイムロンによる顕著な薬害軽減効果が認められた。

### CYP81A6 の各除草剤代謝並びに薬害軽減作用への関与の検討

*CYP81A6* を形質転換したシロイヌナズナはメタゾスルフロロンに対する感受性が顕著に低くなった。*CYP81A6* はダイムロン処理により一過的な誘導が認められた。さらに、*CYP81A6* 欠損変異体ではダイムロンによる薬害軽減の程度が小さくなる傾向があったが、これについては追試が必要である。また薬害軽減が完全には消失することはなく、他の遺伝子も関与すると考えられた。

### メタゾスルフロロン抵抗性誘導に関わる除草剤代謝遺伝子の探索

ダイムロンの薬害軽減効果に関わる遺伝子を探索するためにトランスクリプトーム解析を行った。その結果、ダイムロンにより誘導された P450 遺伝子は *CYP81A6* を含めて 11 個見つかった。このうち誘導が顕著な遺伝子についてシロイヌナズナに形質転換したところ、形質転換体はメタゾスルフロロンに抵抗性を示した。このことから、ダイムロンのメタゾスルフロロンの薬害軽減には本遺伝子が関わる可能性が考えられた。今後、欠損変異体を作成し、その寄与について検討していく必要がある。

発現変動パターンに基づき遺伝子をクラスタリングしたところ、新規遺伝子を含むダイムロン誘導遺伝子が多数含まれるクラスターでは、アブシジン酸応答に関わる遺伝子がエンリッチしていることが明らかになった。このことからダイムロンのシグナル伝達にはアブシジン酸シグナル伝達経路が関わっている可能性が示唆された。

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 1件）

1. 発表者名 Morimoto Y, Kurata K, Iwakami S
2. 発表標題 Analysis of mechanism of Daimuron in rice to reduce herbicide injury from various herbicides
3. 学会等名 国際雑草学会（国際学会）
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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