

イネ由来の新規除草剤抵抗性 遺伝子 *HIS1* の作用機構解明 による品種開発と新剤創製

HIS1 共同研究グループ
(農研機構, 富山県, (株) エス・ディー・
エス バイオテック, 埼玉大学)

1. 研究の背景・目的

水稲用除草剤ベンゾピシクロン (BBC) はトリケトン系除草剤の一つであり、雑草のプラストキノン生合成系の酵素 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ (4-HPPD) を阻害することにより白化・枯死させる。従来広く使われてきたスルホニルウレア系除草剤に対する抵抗性雑草が増加している状況に対処するため、BBC を含む 4-HPPD 阻害型水稲用除草剤のシェアは増加している。BBC は水稲には影響を与えず、水田雑草のみを枯死させるが、その選択性くなぜ水稲が影響を受けないのか? の理由は不明だった。一方、最近育成された多収性水稲品種の一部が BBC による影響を受けてしまうことが判明し、分析の結果から BBC に対する抵抗性/感受性が水稲の持つ単一の遺伝子によって支配されるのではないかと、この可能性が出てきた。我々はこれを立証するため、BBC 感受性と抵抗性をもたらすゲノム領域を DNA マーカーにより絞り込み (図-1 上)、候補領域内に存在する

遺伝子 (図-1 の白抜き矢印) の構造的な検討と、候補遺伝子 (図-1 の青矢印) の BBC 感受性品種への導入によって、これまで機能が未知であった遺伝子 (*Os02g0280700*) が BBC 抵抗性を担うことを証明し、この遺伝子を *4-HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE INHIBITOR SENSITIVE1 (HIS1)* と命名した。

HIS1 は水稲の第 2 染色体の短腕に座乗し、351 個のアミノ酸から構成されるタンパク質をコードしている。*HIS1* タンパク質は構造的に <2 オキソグルタル酸依存型酸化酵素> に分類されるものであり、「ハバタキ」等、BBC 感受性の品種では 4 番目のエクソンに塩基の欠失が認められ、機能を失っていることが判明した (図-1)。

多くの水稲品種では *HIS1* タンパク質が活性のある形で存在しており、その結果として BBC による影響を受けないが、最近育成されたインド型品種の系譜に連なる多収性品種の一部 (「ハバタキ」「タカナリ」「モミロマン」等) ではこの遺伝子の変異のため機能が欠損し、BBC による影響を受けてしまうことが判明した。*HIS1* の発見によって多くのイネ品種が BBC による影響

を受けない理由が明らかになった。

我々 *HIS1* 共同研究グループは *HIS1* 遺伝子の発見をスタートラインとし、農食事業によるご支援を頂いて、*HIS1* の作用機構や様々なイネ品種での *HIS1* 遺伝子の存在状態の解明等の基礎的な情報を明らかにするとともに、それらを活用して、新たな品種の作出や新剤の創製に向けた研究の展開から、更には栽培現場で活用可能な漏生制御モデルの構築など、様々な方向へ研究を展開してきた。本稿ではこれまでに得ることが出来た知見について紹介させていただくとともに今後の展開方向についても紹介させていただきたい。

2. 研究の内容・主要な成果

(1) *HIS1* はどうやって BBC に対する抵抗性をもたらすのか? <作用機構の解明>

前述のように、*HIS1* タンパク質は構造的に <2 オキソグルタル酸依存型酸化酵素> に分類されるものであり、BBC を何らかの形で不活性化修飾し、その影響を無くすと予想された。ただし、実際に詳細な解析を行うためには活性のある *HIS1* タンパク質を取得する必要がある。イネから *HIS1* タンパク質を精製することは極めて困難であると予想されたことから、最初に大腸菌による生産系の構築を検討したが、様々な努力にも係ら

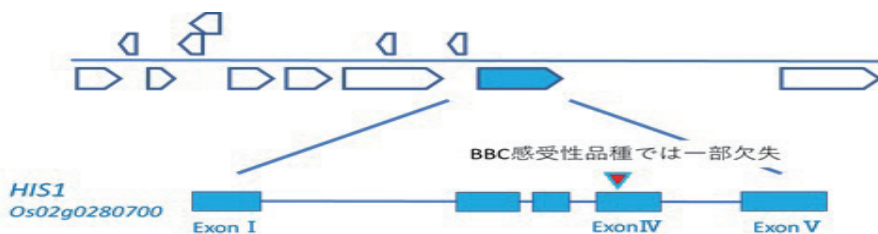


図-1 *HIS1* 遺伝子の発見の経緯とその構造
上の図の白抜き矢印は推定された遺伝子、青矢印は *HIS1* として特定された遺伝子を示す。

ず、活性のある HIS1 タンパク質を取得することは出来なかった。そこで、小麦胚芽抽出液を利用する無細胞タンパク質合成系の構築を検討したところ、幸いなことに活性のある HIS1 タンパク質を取得することに成功した。得られた HIS1 タンパク質を BBC の活性形である BBC-OH, 2 価鉄イオン及び 2 オキソグルタル酸と共に反応させると、BBC-OH が速やかに消失することが示された (図-2)。この反応の初発段階の産物を集め、その構造を解析したところ、図-3 に示すように BBC のビスクロオクタンジオン環の 8 位に水酸基が付加されていることが明らかになった。この初発産物は 4-HPPD 阻害活性を失っていた。すなわち HIS1 活性を持つイネ品種は BBC を直接不活化し、その影響を排除できるが、HIS1 活性を持たない雑草 (並びに一部の BBC 感受性イネ品種) は BBC の影響によりプラストキノン合成系が停止し、枯死に至ることが判明した。更にこの研究の過程で HIS1 の機能を阻害する化合物を見出した。

我々は次に HIS1 タンパク質の詳細な作用機構を解明し、それを機能の高度化並びに新剤創製に活用することを目指し、HIS1 タンパク質の高次構造と活性に関与する部位の構造の解明、活性に関与するアミノ酸の特定を進めた。高次構造を明らかにするためにはタンパク質の結晶化と X 線による解析が行われることが多いが、HIS1 タンパク質の結晶化は極めて困難で様々

な検討を行ったが成功には至らなかった。そこで我々は、HIS1 と類似のアミノ酸配列を持ち、既に高次構造が解明されているシロイヌナズナの Anthocyanidin 合成酵素の構造を参照すると共に、HIS1 と同じくイネに存在し、HIS1 と極めて高い相同性を有するものの、BBC を不活化する機能が無い HIS1-LIKE1 (HSL1) タンパク質と HIS1 の構造上の類似性とその中での差異に着目して研究を進めた。様々な解析の結果、HIS1 による BBC の不活化に関与する構造を構成するいくつかのアミノ酸を特定することに成功した。

1) 様々な品種での HIS1 の広がり <イネ及び近縁種でのアリル解析>

言うまでもなく、HIS1 タンパク質のイネでの本来の生理機能は BBC-OH の分解ではありえない。HIS1 の本来の機能を明らかにすることは大変

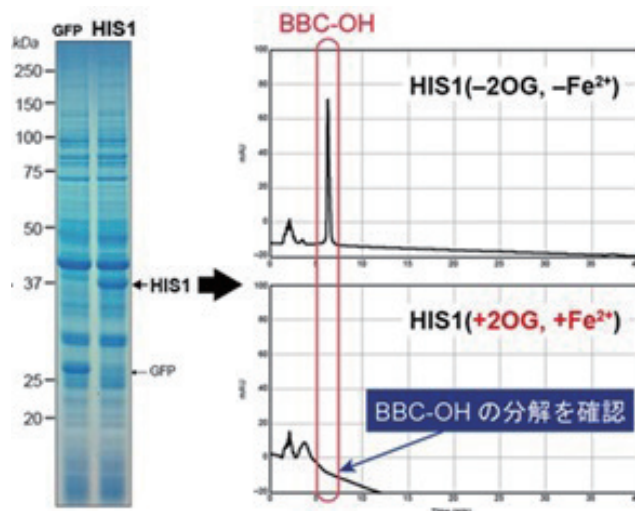


図-2 小麦胚芽によるタンパク質生産系で作られた HIS1 タンパク質による BBC-OH の分解

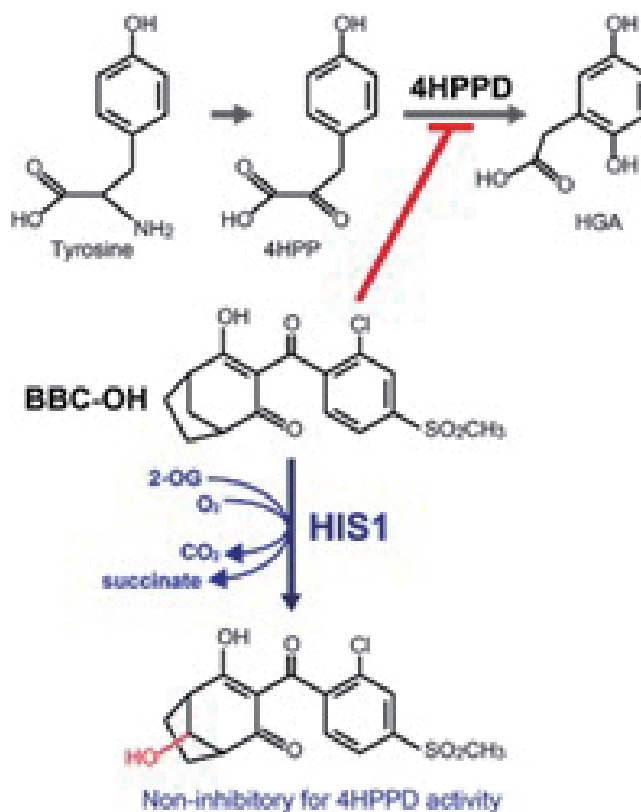


図-3 HIS1 による BBC-OH 不活化のメカニズム

重要であるが、いまだに明確な回答は得られておらず、研究を進めているところである。一方、日本型、インド型を含めて様々なイネ品種の中で HIS1 遺伝子の構造がどうなっているのか? を明らかにすることはその本来の機能の解明にも関連するだけでなく品種



図-4 HIS1 遺伝子の網羅的なアレル解析により見出された変異



図-5 BBC 抵抗性を導入した IR64
(左: IR64, 右: BBC 抵抗性 IR64)

開発でも重要な知見となる。そこで、我々は、近縁野生種も含めて 200 以上の品種・系統の解析を行った。その結果、日本型のイネではほぼ例外なく機能のある *HIS1* 遺伝子が見出されたのに対し、インド型イネ品種では、何らかの形で *HIS1* 遺伝子に異常があり、その結果 BBC 感受性になっているものが多数見出された。網羅的アレル解析の結果から BBC 感受性のイネの持つ機能欠損型遺伝子 (*his1*) は今のところ 4 群に分類できる (図-4)。この内、「ハバタキ」「モミロマン」の親と考えられる品種を含め、前記のように第 4 エクソン内に欠失があり、タンパク質としての構造検討の結果からも、完全に機能を失っていると考えられる *HIS1* 遺伝子を持つ品種が存在した。その他にも 3 つのタイプの変異が見出された。これらは程度の差はあるが BBC 感受性を示すものであった。この様に多くのインド型品種では機能の問題がある *HIS1* 遺伝子を保持していたことから、なぜ従来の主食用のイネでは BBC が問題なく使用できたのに対し、インド型イネの系譜に連なる最近育成された多収イネ品種の一部で BBC による薬害が生じたのか? の理由も、それらの育種経過も含めて理解できるようになった。さらにこの知見を基に BBC 感受性程度の事前予測を可能とするマーカーも開発している。このマーカーは抵抗性/感受性の識別に利用可能である。日本型イネ品種の多くで機能型 *HIS1* 遺伝子が保持されているにも係らず、インド型イネでは

変異を含むものが多く認められている事実は何を物語るのか? は *HIS1* 遺伝子の本来の機能の解明とも関連して大変興味深い。なお、後述のように変異型の *HIS1* 遺伝子を持つインド型品種に対し、交配によって *HIS1* を導入した系統が作出されており、農業形質に関する詳細な検討を行っているが、*HIS1* 遺伝子の有無による何らかの形質上の差異はこれまで認められていない。

「ハバタキ」「モミロマン」等では第 4 エクソン内に欠失があり機能を失っている (図の▼) BBC 感受性を示すインド型品種では図の星で示す場所に 1~2 塩基の置換が存在し、その位置から 3 つのパターンに分類できる。

2) *HIS1* 遺伝子を用いた品種開発と漏生制御モデルの開発

上述のように多くのインド型品種は BBC 感受性を示す。それらの品種には除草剤として BBC 及び同系統のトリケトン系除草剤を用いることは出来ない。しかし、インド型イネの栽培地域でもイネの安定生産に資するものとして除草剤の活用は望まれている。*HIS1* は元タイネの遺伝子であり、交配によってインド型の BBC 感受性の品種に導入し、我々が開発したマーカーを活用して選抜する事は十分可能である。我々は既に実用多収品種である「タカナリ」や世界的メガ品種である「IR64」に交配育種の方法で *HIS1* を導入し、選抜を重ねることで BBC 抵抗性とした系統を開発している。図

-5 に BBC 抵抗性 IR64 を示す。開発した系統は原品種と比較して BBC 抵抗性となっているが、収量性も含めて農業形質の点でほぼ同じとして差し支えないものである。この様に既存品種に対し、BBC 感受性/抵抗性を制御するデザイン育種が可能になったことで、国内および海外のイネ基幹品種に *HIS1* 導入して BBC 抵抗性系統を育成し、除草剤感受性の多用途利用米品種等に対する除草剤適用範囲の拡大を図ると共に東南アジア等を対象にした国際的な育種も視野に入りつつある。

これとは正反対の方向として、従来からの BBC 抵抗性の品種に変異型の *his1* を交配により導入し、感受性にすることも可能であり、研究を進めている。除草剤感受性は決してネガティブなだけの特性ではなく、そのような感受性を活用することにより、これまで例えば飼料用品種の栽培に際して大きな問題になっていた「漏生による混種問題の解決」も期待される。飼料用品種を BBC 感受性としておけば、飼料用品種の栽培後に主食用品種に戻す際に前作の種子が水田に残存する、または、飼料用品種作付け近隣田から主食用品種作付け田に種子が混入する、農器具の使いまわし等、耕作者を介して種子が混入する、といった様々な問題に対して、BBC による漏生品種の駆除が期待できるわけである。我々は感受性品種の開発と並行して、その使用を前提とした「制御モデル」の開発を進めた。BBC を含む除草剤を様々

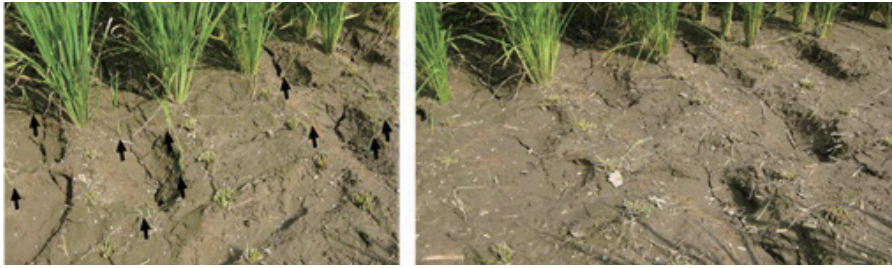


図-6 BBCを用いた漏生籾の制御
(左) 除草剤無施用, (右) BBC 初期剤を移植 5 日後 +BBC 一発剤を 15 日後に施用, 矢印は感受性品種の漏生籾を示す。

な条件で組み合わせて使用することにより、実用的に満足できるレベルで、BBC 感受性とした品種の次年度の残存を抑制できる条件の設定に成功している。その例を図-6 に示す。

3. 今後の展開方向について

我々 HIS1 研究グループは独法機関、公設試、企業及び大学といった異業種から構成されている。それぞれの組織の目指すものは異なるが、「HIS1 という一つの遺伝子」を軸にそれぞれの得意とする技術・知見を持ち寄り、連携して研究を進めたことで、構造生

物学から品種開発・栽培体系の構築に至る広範な分野で成果を残すことが出来た。今後もこの枠組みで研究を進め、

- ① HIS1 機能に必要な分子構造の解明をさらに進め、これを基盤として、基質認識性や酵素性能を改善した新規遺伝子・酵素の創製を進める。
- ② HIS1 機能阻害剤等の開発を進め、最小の薬剤施用で最大の抑草効果を狙う環境に優しい除草体系の構築を目指す。
- ③ BBC 抵抗性或いは感受性を付与した新品種群の開発を進めると共に、異品種混入リスクを回避できる耕種体系を構築し、他用途利用米の

導入を促す技術システムを提供する。

などの方向で研究を展開していきたい。我々が発見した HIS1 は従来全く知られていなかったもので、いまだにその本来の機能は謎であるが、今後もその解明に関連した基礎研究と農業現場で使える技術の構築を共に進めていく予定である。末尾であるが本稿執筆の機会を頂いたことについて (公財) 日本植物調節剤研究協会様に深く感謝申し上げたい。

(代表執筆・農研機構 大島正弘)

統計データから

平成 28 年度食料自給率 38%に低下

我が国の食料自給率 (カロリーベース) は、自給率の高い米の消費が減少し、飼料や原料を海外に依存している畜産物や油脂類の消費量が増えてきたことから、自給率の統計を取り始めた 1960 年の 79% を最高値とし、長期的に低下してきている。

2016 年度 (平成 28 年度) の食料自給率 (カロリーベース) は 38% で、ここ 6 年間横ばいで推移してきた 39% から 1% 低下し、1993 年の 37% に次ぐ低水準となった。小数点以下まで示すと、昨年度の 39.49% が本年度には 37.58% と、実際には 1.9% 低下している。なお、1993 年 (平成 5 年) は米の全国作況が 74 と大冷害で 200 万 t 程度の米を緊急輸入した年である。

引き下げ要因となった主な品目は、寄与度で小麦▲0.6 ポイント、てんさい▲0.4 ポイント、米▲0.2 ポイントとなっている。小麦、てんさいの作付面積は拡大したものの、天候不順により単収が落ち込み生産量が 20% 減少したことが要因となっている。米は食料供給全体に占める割合が減少し続けており、一人あたり年間消費量は昨年度の 54.6kg から 54.4kg と減少し、50

年前の半分以下になった。そこで、ごはんを 1 日にもう一口 (17g) 食べると 1% 向上すると呼びかけている。

農産物輸出国でないドイツ 95%、イギリス 63%、イタリア 60% と比べて、日本は先進国最低水準の自給率である。自給率の向上の目標である 45% (平成 35 年) に向けて改めて政策を考える必要がある。

(K.O)

1965年度以降のカロリーベース食料自給率の推移

年度	食料自給率 (%)
1965	73
1966~1970	68~60
1971~1988	58~50
1989~1992	49~46
1993	37
1994~2005	46~40
2006	39
2007~2009	41~40
2010~2015	39
2016	38

我が国と先進国の食料自給率の比較

国	カロリーベース	生産額ベース
カナダ	264	121
オーストラリア	223	128
アメリカ	130	92
フランス	127	83
ドイツ	95	70
イギリス	63	58
イタリア	60	80
スイス	50	70
日本	38	68

諸外国の数値：カロリーベースは2013年、生産額ベースは2009年。