

## 多剤抵抗性タイヌビエの除草剤抵抗性メカニズム

Bayer CropScience AG 岩上哲史

### 除草剤の選択性と選択性の崩壊

作物生産を維持し、増加し続けている食料需要に答えるためには、農耕地における雑草の制御が必要不可欠である。現代農業において雑草防除は除草剤に大きく依存しており、除草剤は効率的かつ省力的に雑草を防除する手段として広く使用されてきた。農耕地で使用される除草剤に望まれる大きな特徴の一つは、雑草のみを枯死させ作物の生育にはできるだけ影響を与えないことである。こうした、除草剤が作物には害を与えず雑草のみ枯死させる形質、すなわち「作物と雑草の(化学的)選択性」は、除草剤の開発においては極めて重要で、選択性の高い除草剤ほど高い防除効果を期待することができる。これまでに開発された除草剤の中には数千倍もの作物・雑草間の選択性を持つものがあるが、こうした高い選択性のある化合物の開発は容易なことではない。通常、除草剤の標的(ターゲットサイト)となる植物の酵素自体は作物、雑草を問わず存在していることが多く、それ自体に種間差のない場合が多いためである。多くの場合、選択性は除草剤の代謝速度の違いにあるとされており、選択性は植物種間の作用点以外の生理的な僅かな違いを巧妙に利用することで成り立っている(Owen 2000)。

選択性の基盤となる、作物における急速な除草剤の解毒代謝(不活化)にはシトクロム P450 (以下 P450) と呼ばれる一群のモノオキシゲナーゼの関与がよく知られている。植物ゲノムには P450 をコードする遺伝子が数百あり、各遺伝子にコードされる P450 はそれぞれ異なる酸化反応を触媒している。これらの中には植物の二次代謝物の生合成などに関与するものも多く、各植物種に固有の代謝物はそれらに固有の P450 に触媒さ

れることも多い(水谷 2005)。したがって作物に特異的な P450 アイソザイムも多数存在し、これらがうまく活用されることで除草剤の選択性が成立していると考えられる。しかし現状では、その分子レベルの理解はあまり進んでいない。

一方で雑草の側もこうした除草剤のストレスに対し黙っているわけではない。除草剤の強い選択圧が膨大な雑草集団に繰り返しさらされると、集団中に極めて低頻度で存在していた除草剤に抵抗性を持つ個体が選抜、拡散していくことになる。こうした除草剤抵抗性雑草は現在では 237 種も報告されており、世界各地の農耕地において深刻な問題となっている。

こうした除草剤抵抗性、すなわち「選択性の崩壊」がどのような分子メカニズムによって生じるのかを理解することは、除草剤抵抗性雑草の管理やその進化速度を制御する上で極めて重要な課題である。除草剤抵抗性のメカニズムは大きく target-site resistance (TSR) と non-target-site resistance (NTSR) の 2 つに分けられる(Powles and Yu 2010)。TSR は除草剤のターゲットサイト自体の変化によるものであり、その多くはターゲットサイトをコードする遺伝子に 1 塩基の置換が起こり、それに伴うターゲットサイトの構造変化により除草剤が結合できなくなるタイプである。一方 NTSR は TSR 以外のメカニズムの総称であり、除草剤の解毒代謝によるものが多いと考えられている。除草剤の代謝パターンが作物の場合と類似する場合も多く、こうした場合は作物における除草剤耐性に関与する遺伝子に類似する遺伝子が関与している可能性が考えられるが、その分子機構についてはこれまでほとんど分かっていなかった。

## 多剤抵抗性タイヌビエ

タイヌビエは異質4倍体 ( $2n=4x=36$ ) の自殖性イネ科植物である。水稻栽培における問題雑草であり、圃場に蔓延すると極めて大きな減収をもたらすことで知られている。タイヌビエの除草剤抵抗性は90年代後半に米国カリフォルニア州サクラメントの水稻栽培地域で初めて見つかった (Fischer *et al.* 2000)。この抵抗性 (R) 系統は7つの異なる化学骨格郡からなる9つの除草剤に抵抗性を示す多剤抵抗性型であり、ベンスルフロンメチル (BSM) およびペノキスラム (PX) などの除草剤に抵抗性を示す (図-1)。BSM と PX はともに水稻栽培で使用される選択性を有するアセト乳酸合成酵素 (ALS) 阻害剤である。この抵抗性タイヌビエの ALS 遺伝子には抵抗性を付与する塩基置換は存在せず、また ALS タンパク質のこれらの除草剤に対する感受性も感受性 (S) 系統・R 系統間で差がないことから、抵抗性は TSR ではないことが分かっていた (Iwakami *et al.* 2012; Osuna *et al.* 2002; Yasuor *et al.* 2009)。また除草剤処理時にシトクロム P450 (P450) 阻害剤を併用すると R 系統においても感受性が高まることなどから、この抵抗性には P450 が関与する NTSR であると考えられてきた。

### 多剤抵抗性タイヌビエ の ALS 阻害剤抵抗性メカニズム

我々が研究を始めた当時はまだ日本で除草剤抵抗性のヒエ属水田雑草は見つかっていなかった。

しかしタイヌビエは日本でも重要な水田雑草であることから、我々はカリフォルニアの多剤抵抗性タイヌビエを材料にその除草剤抵抗性機構の解明に向けて研究を進めてきた。その中で、我々は雑草では同定されたことのなかった除草剤抵抗性に関与する P450 を同定することに成功した (Iwakami *et al.* 2014a)。以下その研究を紹介したい。

#### タイヌビエにおける BSM の代謝

多剤抵抗性機構の解明に向け、BSM 抵抗性機構に注目した。主な理由は、① BSM は多剤抵抗性タイヌビエが抵抗性を示す除草剤の中で最も抵抗性レベルが高い除草剤であったこと (50% 生育阻害薬量で系統間の感受性を比較すると数百倍以上、図-1)、また②イネにおいて BSM の解毒代謝メカニズムも明らかにされており、抵抗性機構の解析において扱いやすい除草剤であると考えられたためである。イネは野生型が BSM に耐性のある植物である。イネに BSM が吸収されると、ピリミジン環4位のメトキシ基の O-脱メチル反応が急速に起こる (図-2)。この O-脱メチル体は ALS 阻害活性がほとんどないことが分かっており、この O-脱メチル反応がイネにおける BSM 耐性の主要なメカニズムであり、ヒエ属雑草を含めたその他の植物との感受性の差の要因であることが知られていた (Takeda *et al.* 1986; 武田 1987)。

我々は多剤抵抗性タイヌビエでも同じメカニズムによって抵抗性になっているのではないかと考え、これを検証することにした。2葉期のタイヌビエの根部に BSM を 24 時間処理した後、地上

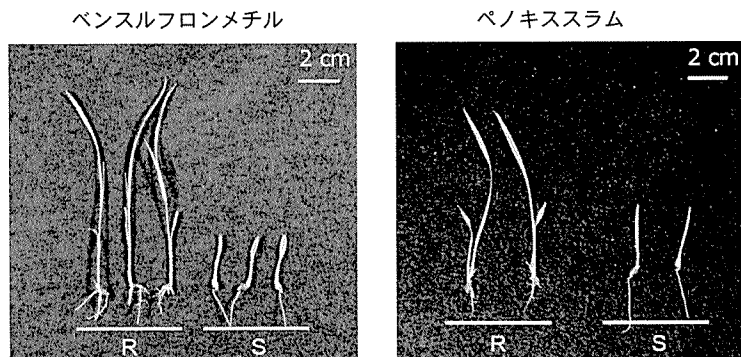


図-1 タイヌビエ感受性 (S) および抵抗性 (R) 系統におけるベンスルフロンメチルおよびペノキスラムに対する反応 (Iwakami *et al.* 2014a を改変)  
左、ベンスルフロンメチル  $10 \mu\text{M}$  に対する反応。右、ペノキスラム  $0.3 \mu\text{M}$  に対する反応。

部および地下部の BSM 量および O- 脱メチル体量を LC-MS/MS を用いて、S 系統・R 系統間で比較した。両系統ともに BSM および O- 脱メチル体は主に地下部で検出され、地上部では極めて低い濃度であった。地上部の親化合物および代謝物の量は、R 系統では S 系統に比較し BSM 量は 1/2、また O- 脱メチル体は 2 倍となっていた。したがってタイヌビエの R 系統ではイネと同様に BSM の O- 脱メチル化による急速な解毒代謝反応が起こっていることが明らかになった (図 -2)。

CYP81A 遺伝子の機能解析

イネではマイクロソームから精製された SDS PAGE で単一のバンドを示すタンパク質が BSM の O- 脱メチル反応を引き起こし、さらにこの反応は P450 阻害剤の添加により抑制されることから、BSM の O- 脱メチル反応は P450 によると推定されていた (Deng and Hatzios 2002)。またイネの P450 遺伝子の 1 つである CYP81A6 遺伝子のノックアウト変異体は BSM に感受性を示すことも報告されており (Pan *et al.* 2006)、直接的な証拠は報告されていないものの CYP81A6 が BSM の O- 脱メチル反応を引き起こしていると考えられた。CYP81A6 は CYP81A サブファミリーに属す P450 であるが、本サブファミリーはイネ

科のみで報告されており、イネ科であるタイヌビエにも本サブファミリーの存在が期待された。

タイヌビエから CYP81A サブファミリーの遺伝子を単離するにあたっては縮重 PCR および RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) を行った。12 種の CYP81A 遺伝子が単離され (Iwakami *et al.* 2014a)、そのうちフレームシフトを含む 3 種の遺伝子を除いた 9 つについて、BSM 無処理、処理時の地上部および根部における転写量を real-time PCR 法により比較した。その結果 CYP81A12 および CYP81A21 遺伝子の転写量が処理、無処理に関わらず地上部・根部ともに数倍から 10 倍程度 R 系統で高いことが明らかになった。分子系統解析を行うと CYP81A12 および CYP81A21 の進化距離は極めて近く、各遺伝子はタイヌビエ (異質 4 倍体) の 2 倍体祖先種 2 種のゲノムにそれぞれ由来し、両遺伝子はホメオログの関係にあると考えられた。実際に、これらの遺伝子における系統間の塩基多型にもとづいて連鎖解析を行うと、これらの遺伝子間に連鎖関係は認められず、これらは異なる染色体に座乗すると推定された。

これらの遺伝子を BMS 感受性が著しく高いことで知られるシロイヌナズナにそれぞれ導入した

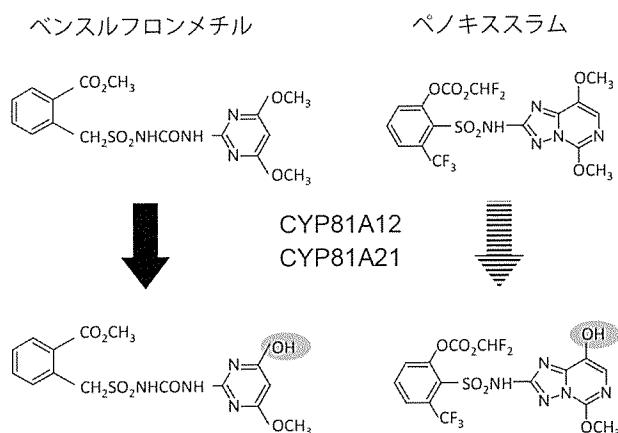


図 -2 ベンスルフロンメチルおよびペノキスラムの植物における代謝

タイヌビエの抵抗性系統で高発現していた 2 つの P450 (CYP81A12 および CYP81A21) はベンスルフロンメチルをピリミジン環 4 位メトキシ基における O- 脱メチル反応により不活化させる。ペノキスラムはイネにおいて脱メチルされることが知られており、CYP81A12 および CYP81A21 はこの反応を触媒する可能性がある。

ところ、どちらの遺伝子を導入した形質転換体も BSM に顕著な抵抗性を示した。転写レベルが高いラインでは、野生型のシロイヌナズナに比較して数千倍もの著しい抵抗性レベルを示し、タイヌビエの S 系統とほぼ同レベル感受性を示すまでになった。

次にこれらの P450 の BSM の O- 脱メチル反応について検証することにした。これらの遺伝子をそれぞれ酵母で発現させ、培養液に BSM を添加し培養を続けたところ、これらの遺伝子を導入した酵母の培養液中からは O- 脱メチル体が検出されたが、空ベクターを導入した酵母の培養液からは検出されなかった。以上のことから R 系統で過剰発現していた 2 つの *CYP81A* 遺伝子は BSM を解毒することにより植物に BSM 抵抗性を付与しうることが明らかになった。

タイヌビエにおける *CYP81A12* および *CYP81A21* の転写量と BSM 抵抗性形質との関連

ここまで *CYP81A12* および *CYP81A21* が BSM を O- 脱メチル化すること、これらの高発現により植物が BSM 抵抗性を示しうることが明らかになったが、タイヌビエにおける BSM 抵抗性への関与についてはさらなる検証が必要である。そこでタイヌビエの抵抗性の遺伝解析を行い、これら遺伝子の発現と抵抗性形質との連鎖関係を調

べることとした。まず S 系統と R 系統の交雑後代 F2 を作出し、F2 54 個体における抵抗性の分離を検証した。発芽種子を 10  $\mu$  M の BSM 培地に置床し、7 日後の草丈を調べた。草丈の生育抑制程度によって F2 各個体を R 親、S 親、その中間で分類したところ、その分離比は R 親型：中間型：S 親型 = 1:2:1 となり、1 遺伝子支配のモデルに適合した。さらに F6 世代 40 系統を用いて、各系統の表現型と発現量を調べたところ、両遺伝子の mRNA 蓄積量と BSM 抵抗性との間には強い正の相関が認められた (図-3)。興味深いことに、F6 系統における 2 つの遺伝子の転写量はともに高いか、ともに低いかのいずれかであった。したがって、1 遺伝子支配を想定して考えると、異なる染色体に座乗する 2 つの P450 遺伝子の高発現は 1 つの因子によりトランスに制御されていると推定された。これを支持するように、R 系統における高発現が遺伝子増幅 (gene amplification) やプロモーター領域の多型によらないことが、それぞれサザンブロットングおよび交雑後代における多型と転写量の関連の検証によって明らかになっている。

PX 抵抗性への *CYP81A12* および *CYP81A21* の関与  
R 系統の PX 抵抗性機構については  $^{14}$ C ラベルされた PX を用いた解析から、R 系統で PX 解毒代

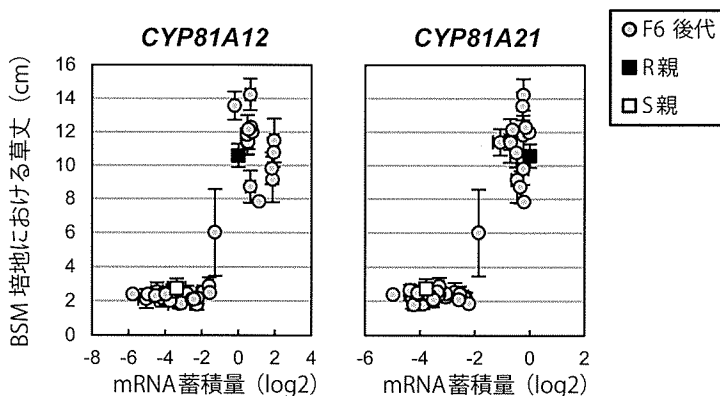


図-3 タイヌビエ交雑後代 (F6) における *CYP81A12* および *CYP81A21* の転写レベルとベンシルフロンメチル感受性 (Iwakami *et al.* 2014a を改変)

*CYP81A12* および *CYP81A21* の転写レベルは real-time PCR により解析した。バーは SD (n=3)。BSM の感受性は 10  $\mu$  M の BSM を添加した MS 培地上での草丈で評価した。バーは SD (n=9)。

謝が早いこと、さらに P450 阻害剤を併用した場合には S 系統と同レベルの代謝速度に落ちることが明らかになっていた (Yasuor *et al.* 2009)。このことから PX 抵抗性に P450 が関与すると考えられており、我々は単離した 2 つの P450 が PX 抵抗性に関与しているかを検証することにした。

*CYP81A12* および *CYP81A21* を導入したシロイヌナズナ形質転換体は BSM の場合と同様に PX に顕著な抵抗性を示した。BSM に数千倍の抵抗性レベルを示した系統は PX に対し 10 倍程度の抵抗性レベルであった。次にタイヌビエ S、R 系統の交雑後代 (F2) を用い PX 抵抗性形質の分離を調べた。交雑親の S 系統・R 系統間の感受性差は比較的小さいため (7 倍程度、図 -1)、その分離パターンは BSM 処理時ほど明瞭ではなかったが、生育が停止した個体を S、それ以外を R とすると R:S=3:1 の分離比に適合した。次に、F6 系統におけるこれらの P450 遺伝子の転写レベルと PX 感受性との関連を調べると、BSM の場合と同様に正の相関が見られた。このことから *CYP81A12* および *CYP81A21* は PX 抵抗性とも強く連鎖することが明らかとなった。BSM に著しい抵抗性を示したシロイヌナズナが PX に 10 倍程度の抵抗性を示したことは、タイヌビエ R 系統が BSM に強い抵抗性を示すが PX には弱い抵抗性を示すことと一致しており、これらの P450 遺伝子のタイヌビエの抵抗性への関与を支持するものである。

PX に耐性のイネでは PX の急速な脱メチル化が起こることが知られており (Johnson *et al.* 2012) (図 -2)、*CYP81A12* および *CYP81A21* による BSM の脱メチル反応と類似している。我々の研究では、PX 代謝物の入手が困難であったために PX 代謝物の同定までは行うことができなかったが、CYP81A の P450 がこの反応を引き起こす可能性が高いと考えている。

### おわりに

我々のこれまでの研究により、カリフォルニアで発見された多剤抵抗性タイヌビエの BSM およ

び PX 抵抗性の原因は、CYP81A サブファミリーに属する 2 つの P450 の高発現にあり、それらの P450 の高発現は 1 つのトランス因子に制御されている可能性が高いことが明らかになった。

CYP81A サブファミリーの P450 はイネ科植物以外では報告されておらず、ゲノム解読が行われているいくつかのイネ科以外の単子葉植物においても本サブファミリーの P450 は見つかっていない。BSM や PX の感受性がイネにおいて著しく低いのは前述のとおりだが、一般的な傾向としてこれらの除草剤の感受性はイネ科植物全般で低いことが知られている。これはイネ科植物が独自に有する CYP81A サブファミリーが、これらの除草剤の代謝能を有していることを示唆しているのかもしれない。今後さらに植物種を広げて CYP81A サブファミリーやその近縁の P450 の解析を進めることで、BSM や PX の選択性の分子メカニズムが見えてくるだろう。一方、CYP81A 遺伝子が存在しないと考えられる原始的単子葉植物オモダカにおいても P450 の解毒代謝による BSM 抵抗性の獲得が報告されている (Iwakami *et al.* 2014b; 三浦ら 2012)。これは同じ化合物であっても異なるメカニズムにより代謝されうること示唆しており、その解明は大変興味深いテーマである。

選択的除草剤は作物と雑草の解毒代謝能の違いを利用しているものが多いが、我々の研究で示されたように近縁雑草では活性は低いものの類似する解毒代謝機構 (例えば、同じサブファミリーの P450) を有している可能性は高い。突然変異などにより雑草における解毒代謝酵素が活性化すると、作物の耐性メカニズムと同様のメカニズムで除草剤選択性の崩壊が起こると予想される。一方で同じサブファミリーの中にも機能分化があることも知られている。最近、イネにおける ALS 阻害剤耐性に関与する CYP72A サブファミリーの P450 (*CYP72A31*) が同定された (Saika *et al.* 2014)。本 P450 遺伝子はシロイヌナズナに ALS 阻害剤に抵抗性を付与するが、そのパラログであるイネの *CYP72A32* や *CYP72A33* は抵抗性を

付与しない。また、我々は *CYP72A31* に相同性の高いタイヌビエの複数の *CYP72A* 遺伝子をそれぞれシロイヌナズナに導入したが、これらも抵抗性を付与しなかった（未発表）。このように同じサブファミリーの P450 でも、アイソザイムごとに大きな基質特異性の違いがある場合もある。農耕地で問題となるような雑草種ではゲノム情報がほとんどないため、作物雑草間の P450 の組成の違いや活性の違いを明らかにしていくことは容易ではないが、これらを理解することは近縁植物においても高い選択性を有する除草剤開発へとつながる可能性がある。近年目覚ましい発展をみせている次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析やゲノム解析などの技術を用いることで、選択性や抵抗性の分子レベルでの理解が加速されることが期待される。

## 謝 辞

本研究の一部は日本農薬学会より「農薬科学研究補助金」、また（公財）日本植物調節剤研究協会より「雑草防除及び植物生育調節に関わる研究調査啓発事業」の支援を受けました。本原稿の執筆にあたりご助言を頂いた中央農業総合研究センターの内野彰博士をはじめ、本研究に関わっていただいた多くの共同研究者の方々に深く感謝致します。

## 参考文献

- Deng, F. and K.K. Hatzios 2002. Characterization of cytochrome P450-mediated bensulfuron-methyl O-demethylation in rice. *Pestic Biochem Physiol* 74, 102-115.
- Fischer, A.J., C.M. Ateh, D.E. Bayer and J.E. Hill 2000. Herbicide-resistant *Echinochloa oryzoides* and *E. phyllopogon* in California *Oryza sativa* fields. *Weed Sci* 48, 225-230.
- Iwakami, S., A. Uchino, H. Watanabe, Y. Yamasue and T. Inamura 2012. Isolation and expression of genes for acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase in *Echinochloa phyllopogon*, a polyploid weed species. *Pest Manag. Sci.* 68, 1098-1106.
- Iwakami, S., M. Endo, H. Saika, J. Okuno, N. Nakamura, M. Yokoyama, H. Watanabe, S. Toki, A. Uchino and I. Tatsuya 2014a. Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. *Plant Physiol.* 165, 618-629.
- Iwakami, S., H. Watanabe, T. Miura, H. Matsumoto and A. Uchino 2014b. Occurrence of sulfonyleurea resistance in *Sagittaria trifolia* L., a basal monocot species, based on target-site and non-target-site resistance. *Weed Biol. Manag.* 14, 43-49.
- Johnson, T.C., R.K. Mann, P.R. Schmitzer, R.E. Gast and G.J. de Boer 2012. Triazolopyrimidines. In: *Modern Crop Protection Compounds*, Second, Revised and Enlarged Edition (ed. by Krämer W., U. Schirmer, P. Jeschke and W. Matthias). Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 99-117.
- 三浦斗夢・春原由香里・内野彰・松本宏 2012. アセト乳酸合成酵素遺伝子に変異を持たないオモダカにおけるベンスルフロンメチル抵抗性機構. *雑草研究* 57(別), 128.
- 水谷正治 2005. シトクロム P450 の多様性と植物の化学進化. *植物の生長調節* 40, 67-82.
- Osuna, M.D., F. Vidotto, A.J. Fischer, D.E. Bayer, R. De Prado and A. Ferrero 2002. Cross-resistance to bispyribac-sodium and bensulfuron-methyl in *Echinochloa phyllopogon* and *Cyperus difformis*. *Pestic Biochem. Physiol.* 73, 9-17.
- Owen, W.J. 2000. Herbicide metabolism as a basis for selectivity. In: *Metabolism of Agrichemicals in Plants* (ed. by Roberts T.). John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 211-258.
- Pan, G., X. Zhang, K. Liu, J. Zhang, X. Wu, J. Zhu and J. Tu 2006. Map-based cloning of a novel rice cytochrome P450 gene *CYP81A6* that confers resistance to two different classes of herbicides. *Plant Mol. Biol.* 61, 933-943.
- Powles, S.B. and Yu Q. 2010. Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 317-47.
- Saika, H., J. Horita, F. Taguchi-Shiobara, S. Nonaka, A. Nishizawa-Yokoi, S. Iwakami, K. Hori, T. Matsumoto, T. Tanaka, T. Itoh, M. Yano, K. Kaku, T. Shimizu and S. Toki 2014. A novel rice cytochrome P450 gene, *CYP72A31*, confers tolerance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in rice and Arabidopsis. *Plant Physiol* 116, 1232-1240.
- Takeda, S., D.L. Erbes, P.B. Sweetser, J.V. Hay and T. Yuyama 1986. Mode of Herbicidal and Selective Action of DPX-F5384 between Rice and Weeds. *J. Weed Sci. Tech.* 31, 157-163.
- 武田俊司 1987. DPX-F5384 の除草特性, 作用機構および選択性機構. *植物の化学調節* 22, 37-46.
- Yasuor, H., M.D. Osuna, A. Ortiz, N.E. Saldain, J.W. Eckert and A.J. Fischer 2009. Mechanism of resistance to penoxsulam in late watergrass [*Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koss.]. *J. Agric. Food Chem.* 57, 3653-3660.