

DXS 阻害剤クロマゾンのイネにおける品種間感受性差

京都大学大学院農学研究科
雑草学研究室
岩上 哲史

戦後、農業に除草剤が取り入れられたことにより、農作業において非常に大きな負担となっていた雑草防除は極めて省力的なものになった。その一方で、除草剤の継続的な利用は抵抗性雑草の出現という新たな問題を生み出すことになった。除草剤によって雑草が除去された農耕地は、作物にとって好適な生育環境である一方で、除草剤に抵抗性を獲得した雑草にとっても作物以外に競争者のいない絶好の生育環境である。そのため雑草種によっては作物を凌駕する速度で生育し、作物の収量に甚大な被害を与える。しかし、このようなデメリットはあるものの、増加の一途を辿る世界人口を支えていくためには除草剤なしに雑草防除を行うことは現実的ではなく、除草剤使用に伴う抵抗性雑草問題と向き合っていく必要がある。

除草剤抵抗性の多くは連続使用されていた特定の除草剤に対するものであり、作用機構の異なる除草剤を使用することにより防除できる場合も多い。日本の水田稲作では、アセト乳酸合成酵素 (ALS) 阻害剤を主要成分として含む除草剤が多用されており (一時期水稲作付面積の 80% 近くに達した)、90 年代には ALS 阻害剤抵抗性雑草が続出した。現在では ALS 阻害剤を含まない除草剤も増えてきているものの ALS 阻害剤への依存度は高く、日本の水田雑草における除草剤抵抗性のほとんどは ALS 阻害剤に対するものである。そしてこれらの抵抗性雑草はごく一部の例外を除き、ALS 以外を

阻害する除草剤で防除できる。この状況は多様な抵抗性雑草が多発している欧豪米などと大きく異なっており、日本において抵抗性問題がさほど取り上げられない理由にもなっている。しかし、異なる除草剤を連続使用する状態が続けば、ALS 阻害剤と同様に抵抗性が出現する可能性は高い。除草剤抵抗性の進化をできるだけ抑制するためには、作用機構の異なる除草剤の混合やローテーションにより異なる選択圧をかけることが重要である。このためには、作用機構の異なる代替除草剤を数多く準備することが必要となる。

殺虫剤・殺菌剤では続々と新規作用機構剤が発表される一方で、除草剤については 80 年代後半に上市されたクロマゾン以降、新規作用機構の除草剤は発表されておらず、農業業界における大きな課題となっていた。そうした中、ごく最近になって新規作用機構を持つ除草剤 (HST 阻害剤シクロピリモレートや DHODH 阻害剤テトフルピロリメット) が発表され始め、新規作用点剤開発の機運が高まっている。また従来作用機構不明だった複数の除草剤 (シンメチリン、アクロニフェン、エンドタールなど) についても作用点が解明され、これらの作用点を阻害する新規化合物の探索が加速することが期待されている。従来の除草剤とは異なる作用点を阻害する除草剤は、雑草管理に多様性をもたらすことにつながり、抵抗性進化の抑制や抵抗性雑草の防除に大きく貢献すると考えられる。しかしこうした新たな化合物の発見に

は莫大な費用と労力、時間を要する。したがって、代替除草剤の選択肢を増やすための異なるアプローチも重要だと考えられる。

本稿では、日本の稲作においては未利用となっている除草剤、クロマゾンの活用を目指して、イネ長粒種と短・中粒種のクロマゾン感受性差の原因解明に向けた取り組み (Guo *et al.* 2020) を紹介する。クロマゾンは、デオキシキシロース 5 リン酸合成酵素 (DXS) を阻害する選択性除草剤で、複数の作物栽培で使用されている。本研究に着手した時点では、クロマゾンは DXS を標的とする唯一の除草剤だった (ごく最近になってビキスロゾンが 2 つ目の DXS 阻害剤としてオーストラリアで上市された)。稲作ではアメリカなどで利用されているものの、イネの短・中粒種では薬害が強く出るため、その使用は長粒種に限られている (Scherder *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2004)。また日本では、短粒種の栽培が中心であることもあり、クロマゾンは利用可能な除草剤として登録されていない。クロマゾンに耐性を持つ短粒種イネが作出されれば、ユニークな作用機構を持つクロマゾンを新しい雑草管理の手段として活用することが可能になると考えられる。そこで我々は、長粒型イネと日本の主要栽培短粒種間のクロマゾン感受性差の原因を明らかにしたいと考えた。

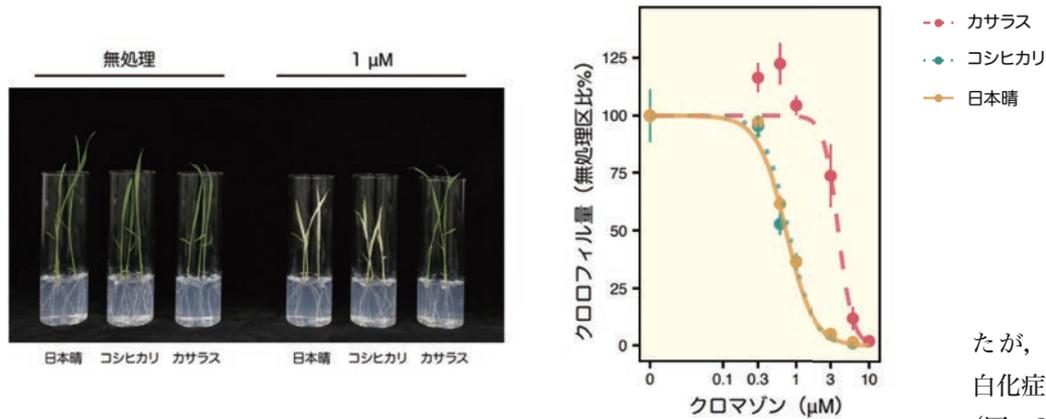


図-1 イネ長粒種（カサラス）と短粒種（日本晴およびコシヒカリ）のクロマゾン感受性パーは標準誤差（n=4）。

長粒種と短粒種におけるクロマゾン感受性の差異

本研究では日本のイネ研究において長粒種の代表品種として使用され、短粒種との交配集団の整備されているカサラスを長粒種として使用した。短粒種には日本晴およびコシヒカリを供試した。それぞれインディカ型とジャポニカ型と遺伝背景を元にした分類の方がより適切だと思われるが、本稿では先行研究における分類を受け、粒径での分類を用いることにする。

品種のクロマゾン感受性について比較するため、発芽種子をクロマゾン添加培地に置床し、その後の生育の様子を観察した。感受性の違いは白化の程度に強く現れたため、地上部におけるクロロフィル量で感受性差を評価することにした（図-1）。耐性の程度をI₅₀値（クロロフィル量を50%低下させる薬量）で比較すると、長粒種であるカサラスは短粒種である日本晴やコシヒカリに対し、約5倍高い耐性を示すことが分かった。

カサラスのクロマゾン耐性へのCYP81A P450の関与の検証

カサラスのクロマゾン耐性機構について、まずP450遺伝子に着目し

た。クロマゾンはイネにおいて多様な酸化反応を受け、複雑な経路で代謝されることが知られている（TenBrook and Tjeerdema 2006）。我々はクロマゾン抵抗性雑草の解析から、その酸化反応の一部を担う遺伝子群として、CYP81A P450を同定している（Guo *et al.* 2019）。イネにはCYP81A遺伝子が4種あり、いずれも3番染色体に座乗する。中でもCYP81A6は稲作で利用される多様なALS阻害剤（ベンスルフロンメチル、ペノキスラム、ピリミスルファンなど）やHPPD阻害剤（フェンキノトリオン）など、極めて幅広い骨格の除草剤を代謝し、イネのこれらの除草剤に対する著しい耐性に大きく関与することが明らかにされている。イネのCYP81Aのクロマゾン代謝機能については不明だったため、本研究ではカサラスが有するCYP81A遺伝子を高発現するシロイヌナズナを作出し、これらのクロマゾン感受性を評価することで、各CYP81Aのクロマゾン代謝能を検証した。なお、カサラスが有する4種のCYP81A遺伝子のうちCYP81A8は開始コドンの直後に終止コドンが認められたため、本遺伝子は解析対象から除外した（日本晴のCYP81A8は機能型の配列を有している）。

0.1 μMのクロマゾンを添加した培地で野生型シロイヌナズナやCYP81A5、CYP81A7の形質転換体の葉は白化し

たが、CYP81A6を発現する系統では白化症状はほとんど認められなかった（図-2）。野生型とCYP81A6形質転換体のI₅₀値の比較から算出した抵抗性レベルはおよそ4となった。比較のため同じ系統についてベンスルフロンメチル感受性を調べると、CYP81A6を発現する系統は野生型に比べて1,000倍以上の抵抗性を示した。このことから、CYP81A6にはクロマゾン代謝能があるものの、その代謝活性はベンスルフロンメチルに比べて小さいものである可能性が考えられた。なお、シロイヌナズナにおけるCYP81Aのタンパク質量を比較していないため、CYP81A5やCYP81A7のクロマゾン代謝機能についてこの実験だけで否定することはできない。

CYP81A6がカサラスのクロマゾン耐性に関与する可能性が考えられたため、CRISPR/Cas9システムを用いてカサラスのCYP81A6破壊系統を作出した。遺伝子破壊の効果を確認するためベンスルフロンメチルに対する反応を調べてみると、先行研究で報告されている通り著しい感受性の上昇が認められた（図-3）。クロマゾンの感受性も上昇することを期待したが、予想に反し、野生型と全く変わらなかった。これらのことから、CYP81A6はベンスルフロンメチルとクロマゾン、両薬剤の代謝能を有するものの、長粒種と短粒種のクロマゾン感受性差の原因ではないと考えられた。

CYP81A6をノックアウトしたカサラスにおいてクロマゾン感受性に変化

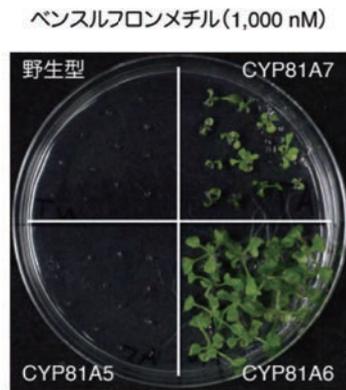
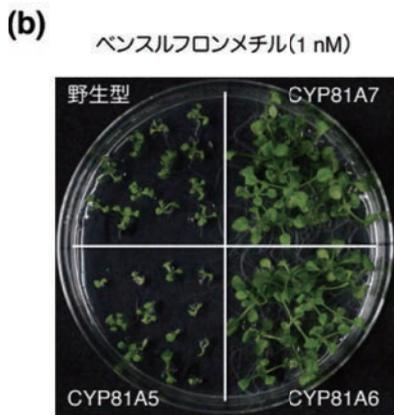
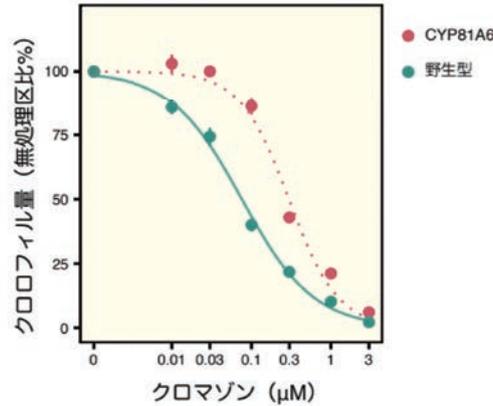
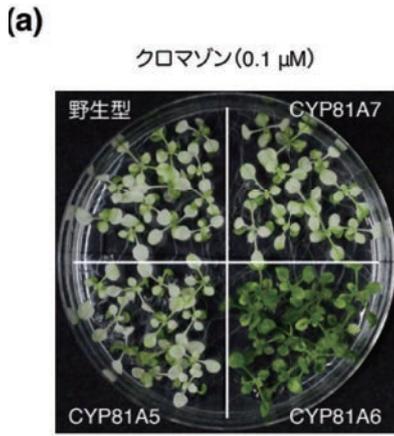


図-2 カサラスの CYP81A 遺伝子を導入したシロイヌナズナの除草剤感受性 (a) クロマゾン感受性。パーは標準誤差 (n=4)。 (b) ベンスルフロンメチル感受性。

がなかった理由は不明だが、イネがクロマゾンを複雑な経路で代謝することによるのではないかと考えている。クロマゾンは、イネ生体内でそれ自体が極めて多様な酸化反応を受けることが知られており (TenBrook and Tjeerdema 2006), これは主要代謝経路としてシンプルな経路が想定されているベンスルフロンメチル (Deng and Tatzios 2002) と大きく異なるものである。イネ生体内では CYP81A が介するクロマゾン代謝反応はほとんど起こっていないか、あってもその寄与は他の経路に比べ著しく小さいものなのだろう。各代謝経路のクロマゾン不活化への寄与について評価するのは容易ではないが、クロマゾンは DXS を阻害する数少ない除草剤であることから今後の解明が期待される。

カサラスのクロマゾン耐性に関する遺伝学的解析

カサラスのクロマゾン耐性の遺伝的メカニズムを調べるために、日本晴とカサラスの交配から得られた F1 および F2 集団の感受性を解析した。日本晴の葉が白化する 1 μM において、F1 は日本晴と同様の白化症状を示し、本評価系においてクロマゾン耐性は潜性の表現型となった。同じ濃度で F2 集団の感受性を評価すると、そのクロロフィル含量は大きくばらつき、その分布は日本晴側に大きく偏ったものになった (図-4a)。分離のパターンは単一核遺伝子制御モデルとは大きな乖

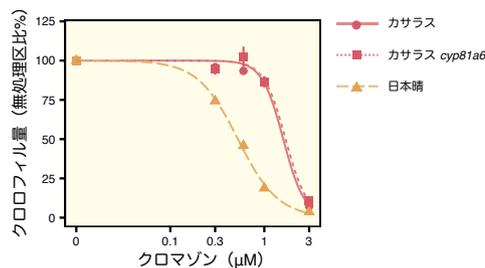
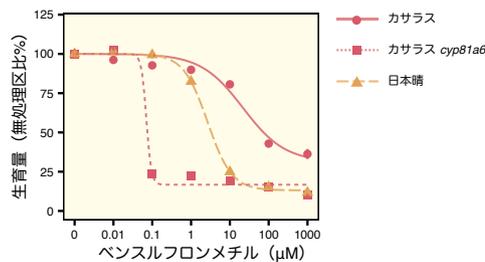
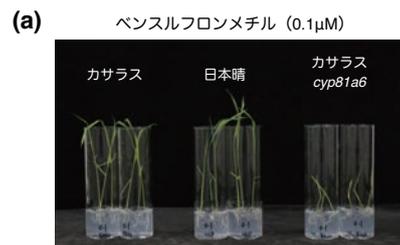


図-3 CYP81A6 をノックアウトしたカサラスの除草剤感受性 (a) ベンスルフロンメチル感受性。パーは標準誤差 (n=4)。 (b) クロマゾン感受性。パーは標準誤差 (n=4)。

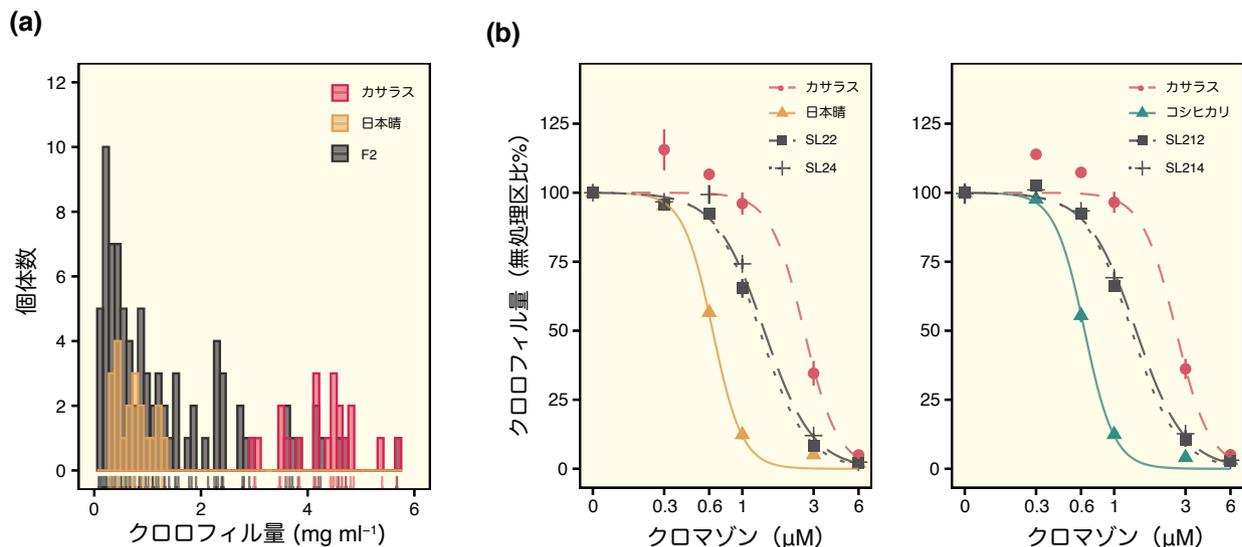


図-4 カサラスのクロマゾン感受性に関する遺伝解析

(a) カサラス x 日本晴 F2 集団におけるクロマゾン感受性の分離。1 μM に対する反応で評価した。(b) 染色体断片置換系統のクロマゾン感受性。

離があり、カサラスのクロマゾン耐性は複数の遺伝子座で制御されていることが示唆された。

次に、日本晴/カサラス (51 系統) およびコシヒカリ/カサラス (39 系統) の染色体断片置換系統群 (CSSL) を用いて、クロマゾン感受性を解析した。これらの CSSL は、日本晴またはコシヒカリの遺伝的背景にカサラスゲノム全体をカバーする部分断片を持ち、目的の表現型を支配するゲノム領域を同定するのに利用される。1 μM のクロマゾンを処理すると、ほとんどの系統が日本晴またはコシヒカリと同様に白化したが、日本晴/カサラスの 2 つの CSSL (SL22 および SL24) とコシヒカリ/カサラスの 2 つの CSSL (SL212 および SL214) は部分的な耐性を示した (図-4 b)。これらの 4 系統は、いずれも 5 番染色体上にカサラスの DNA 断片を有していた。耐性のある系統に共通する領域にはクロマゾンの作用点遺伝子の 1 つである *DXS1* も含まれており、これがクロマゾン耐性に関わる可能性もある。

おわりに

イネでは、除草剤感受性の品種間差が複数の除草剤で報告されており、比較的シンプルな遺伝機構によるものが多い。古くから知られている例として ALS 阻害剤の感受性差があり、長粒型のイネは日本晴などと比較し ALS 阻害剤により強い耐性を示すことが知られている。この違いは ALS 阻害剤を解毒する P450 遺伝子 *CYP72A31* の差異 (日本晴やコシヒカリでは非機能型) で説明される (Saika *et al.* 2014)。また、比較的最近明らかになった例として、ベンゾピシクロンなどのトリケトン系除草剤に対する感受性の品種間がある。トリケトン系除草剤については、ALS 阻害剤とは逆に長粒系のイネは感受性が高い。この違いには 2 番染色体に座乗する 2 価鉄イオン・2-オキソグルタル酸依存型酸化酵素 *HIS1* の差異 (長粒系イネで非機能型) による (Maeda *et al.* 2019)。

クロマゾン感受性差については、研究開始当初に予想したよりも複雑な遺伝的メカニズムがあることが明らかになった。耐性遺伝子の一つは 5 番染

色体に存在する可能性が高いが、その効果は大きくなく、当該遺伝子のみを長粒型に置き換えるだけでは短粒エリート品種に実用レベルのクロマゾン耐性を付与することは困難であろう。一方でクロマゾン耐性関連遺伝子の同定が進み、品種間差の詳細が解明されれば、クロマゾン耐性短粒品種の開発や、短粒種にも利用可能な除草剤の開発など、応用的な展開も期待できる。抵抗性が潜在遺伝するため遺伝学的アプローチのみによって原因遺伝子を明らかにすることは容易ではないが、ゲノム編集技術の活用や、ゲノムワイド関連解析などの手法を取り入れることにより、原因遺伝子の同定を加速できる可能性もある。

謝辞

本研究は (公財) 加藤記念バイオサイエンス振興財団の支援を受けました。

引用文献

- Deng, F. and K.K. Hatzios 2002. Characterization of cytochrome P450-mediated bensulfuron-methyl O-demethylation in rice. *Pestic. Biochem. Physiol.* 74, 102-115.
- Guo, F. *et al.* 2019. Role of *CYP81A*

- cytochrome P450s in clomazone metabolism in *Echinochloa phyllopogon*. Plant Sci. 283, 321–328.
- Guo, F. *et al.* 2021. Investigation of clomazone-tolerance mechanism in a long-grain cultivar of rice. Pest Manag. Sci. 77(5), 2454–2461.
- Maeda, H., *et al.* 2019. A rice gene that confers broad-spectrum resistance to β -triketone herbicides. Science 365 (6451), 393–396.
- Saika, H., *et al.* 2014. A novel rice cytochrome P450 gene, *CYP72A31*, confers tolerance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in rice and Arabidopsis. Plant Physiol. 166(3), 1232–40.
- Scherder, E.F. *et al.* 2004. Rice (*Oryza sativa*) cultivar tolerance to clomazone. Weed Technol. 18, 140–144.
- TenBrook, P.L. and R.S. Tjeerdema 2006. Biotransformation of clomazone in rice (*Oryza sativa*) and early watergrass (*Echinochloa oryzoides*). Pestic. Biochem. Physiol. 85(1), 38–45.
- Zhang W. *et al.* 2004. Differential tolerance of rice (*Oryza sativa*) varieties to clomazone. Weed Technol. 18, 73–76.

田畑の草種 くさくさ 松葉海蘭 (マツバウンラン)

(公財)日本植物調節剤研究協会
兵庫試験地 須藤 健一

サクラの花が終わって、さあこれから春本番という時に、傷心の私は故郷へと、この小さな街に帰ってきた。街中のごんまりとした駅でローカル列車に乗り換えた。走り出した鈍行は駅を3つも過ぎると青々とした田園に行く。車内の向こうの席から高校生の男女が楽しそうに話している声が聞こえる。学年が新しくなって嬉しいのだろうか。

5つ目の無人駅で私は降りた。駅を出て左へ折れると2mほどの幅の道が続く。その線路際、高さ50cmほどのところが薄紫色の霞がかかったようにぼんやりとしている。その向こうを、今乗ってきた気動車が唸りながら走り、遠ざかっていく。一瞬、朱色の気動車の車体の下半分が薄紫に塗り分けられた。

霞の正体を確かめようと線路へと近づいてみた。高さ40～50cmほどのところで、1cmほどの青紫色の花がいっばいに咲いていた。膝を折って花に顔を近づける。小さな紫色の花は胸を反らせて両手を広げた人形ひとがたにも見えるし、大きく口を開けて「あかんべ」をしながら「白い」舌を突き出しているように

も見える。いや、白いふくらみを自らの鼻にあてるなら薄紫色の仮面にも見える。

その仮面が大笑して、しゃがみ込んだ私の膝小僧を見つめている。

遠藤由季の現代短歌にこんなのがあった。

オオバコ科マツバウンランむらさきの

小顔なる花わか膝を見つむ(短歌研究 2020年7月号)

マツバウンランはオオバコ科マツバウンラン属の越年草。関東以西から九州までの荒地、芝生、路肩、線路沿いの敷地、さらには駐車場のわずかな縁石の間などでみられる。茎は基部で数本に分かれ、走出枝を出し、先端に子株を作って広がっていく。花をつける茎は数本が束生し、高さ20cm～60cm。4月から5月頃、先端に、青紫色で大きさ1cmほどの仮面状の唇形花を穂状につける。北アメリカ原産とされ、日本では1941年に京都の伏見区で採集されたのが最初の記録とされているが、いつごろから帰化していたのかは定かではない。