

除草剤多剤抵抗性タイヌビエにおける ACCase 阻害剤抵抗性機構の解明

上館 巧嵩 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 松本 宏 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

除草剤は現代農業の雑草防除において必要不可欠なツールとなっているが、同じ除草剤が繰り返し使用されることにより、除草剤に抵抗性を持つ雑草個体が出現し、作物生産上大きな問題となっている。タイヌビエ (*Echinochloa phyllopogon*) は自殖性のイネ科植物であり、水稻栽培における強害雑草である。90年代後半、米国カリフォルニアで、アセト乳酸合成酵素 (ALS) 阻害剤や FOP 骨格型のアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACCase) 阻害剤などの除草剤に抵抗性を示す多剤抵抗性型が発見された。これらの除草剤に対する抵抗性は、除草剤の急速な解毒代謝によることが明らかにされている。ALS 阻害剤抵抗性については、除草剤を解毒代謝する2つのシトクロム P450 遺伝子 (*CYP81A12* および *CYP81A21*) の高発現に由来することが明らかにされており、これらの遺伝子の高発現は単一の遺伝因子によって支配されていると推定されている。一方、ACCase 阻害剤抵抗性の分子機構については全く分かっていない。

本研究では、除草剤多剤抵抗性タイヌビエを用いて、抵抗性の獲得が明らかにされている FOP 系除草剤フェノキサプロップ・P-エチルに加え、DIM および DEN 骨格型の ACCase 阻害剤の反応を解析するとともに、これらの除草剤抵抗性の遺伝様式を推定する。また、ALS 阻害剤抵抗性に関連する2つの P450 の ACCase 阻害剤抵抗性への関与について、イネの形質転換体を用いて検証する。

【材料および方法】

タイヌビエは、カリフォルニアにて採取後、3世代自殖を繰り返した感受性 (S) 系統および抵抗性 (R) 系統、およびこれらの交雑後代 F2 集団 (S×R) を供試した。

1. タイヌビエの薬量反応試験

S 系統および R 系統を春日井氏水耕法により14日間栽培し、約2.5葉期に各除草剤6–8濃度の除草剤処理を行った。除草剤処理は、茎葉部を0.01% Tween20 を添加した除草剤溶液に30分間浸漬することで行った。除草剤処理後9日目に茎葉部新鮮重を測定した。新鮮重を対無処理区に変換後、log-logistic 式により回帰し、50%生育阻害薬量 (GR50) を推定した。除草剤には FOP 骨格型としてフェノキサプロップ・P-エチル、ジクロフオップメチル、DIM 骨格型としてトラルコキシジム、DEN 骨格型としてピノキサデンの4種類をそれぞれ実験に使用した。

2. タイヌビエ F2 集団における ACCase 阻害剤抵抗性の分離

S 系統および R 系統それぞれ16個体ならびに F2 160 個体について、除草剤感受性試験を行った。栽培方法及び除草剤処理は1と同様に行った。

3. 形質転換イネカルスの感受性試験

バイナリーベクター pCAMBIA1390 におけるカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター下流に *CYP81A12* および *CYP81A21*、またネガティブコントロールとして *GFP* をそれぞれ挿入し、発現ベクターを構築した。アグロバクテリウムを介して、イネ完熟種子 (品種: 日本晴) から誘導したカルスに形質転換した。選抜薬剤であるハイグロマイシンにより形質転換体カルスを選抜した後、除草剤を添加した培地に独立の形質転換カルス9個を置床した。3週間後のカルスの増殖量に基づき、除草剤感受性を評価した。

【結果・考察】

1. タイヌビエ薬量反応試験

フェノキサプロップ・P-エチル処理では、S 系統および R 系統の GR50 値の比 (R/S) は13.3 となり、先行研究とほぼ一致した。トラルコキシジム、ピノキサデン処理では、GR50 値の比 (R/S) はそれぞれ19、27 となり、ともにフェノキサプロップ・P-エチルの場合よりも高い値となった。ジクロフオップメチルでは、S 系統の GR50 は4.55 μM と推定されたが、R 系統は最大処理薬量300 μM でもほとんど生育阻害を受けず80%程度の生育量を示した。ジクロフオップメチルの GR50 値の比 (R/S) は少なくとも66倍以上となり、極めて強い抵抗性を示した。以上の結果から、R 系統は化学骨格の異なる ACC 阻害剤に幅広く抵抗性を示すことが明らかになった。

2. タイヌビエ F2 集団における ACCase 阻害剤抵抗性の分離

フェノキサプロップ・P-エチル処理に対する F2 集団の反応は、R 系統型が31個体、S 系統型+中間型が129個体となった。X² 検定の結果、1 遺伝子支配の分離比に適合した (X² 値は2.7、*P*=0.1003)。F2 集団のその他3つの除草剤反応については現在解析中である。

3. 形質転換イネカルス除草剤感受性試験

選抜薬剤ハイグロマイシンに耐性を持つカルスが選抜された。形質転換カルスの ACCase 阻害剤感受性については、現在解析中である。

【今後の展望・予定】

次世代シーケンサー Illumina HiSeq 2500 を用いて RNA-Seq 解析を行い、抵抗性系統において高発現している遺伝子を同定するとともに、それらの ACCase 阻害剤抵抗性への関与を検証する。