

タイヌビエ CYP81A 遺伝子の除草剤代謝機能の解析

永井 輝一 (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

現代農業における作物栽培では、雑草防除を除草剤に大きく依存している。しかしその結果、除草剤に抵抗性を持つ雑草が出現し、世界的に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。米国カリフォルニアで発見されたタイヌビエは、アセト乳酸合成酵素 (ALS) 阻害剤やアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACCase) 阻害剤など複数の除草剤に抵抗性を示す。これまでの研究において、ALS 阻害剤や一部の ACCase 阻害剤に対する抵抗性については、除草剤を解毒代謝する CYP81A サブファミリーの 2 つのシトクロム P450 (CYP81A12 および CYP81A21) の高発現によると考えられている (Iwakami et al. 2014 *Plant Physiol*; 上館ら 未発表)。一方で、タイヌビエにはこれらの他に少なくとも 10 種の CYP81A P450 が存在し、このうち 3 種の偽遺伝子を除く 7 種については機能型と推定される配列を有している。

本研究では、CYP81A12 および CYP81A21 を形質転換したシロイヌナズナおよびイネと、その他 7 種の CYP81A 遺伝子を導入したシロイヌナズナおよびイネとの除草剤感受性を比較し、各 P450 の除草剤代謝機能を評価するとともに、除草剤の認識に重要なアミノ酸残基を推定する。

材料・方法

1. シロイヌナズナ形質転換体の作出

機能型と推定されるタイヌビエの 7 種の CYP81A 遺伝子 (CYP81A14, CYP81A15, CYP81A18, CYP81A22, CYP81A23, CYP81A24, CYP81A26) がそれぞれ挿入されたバイナリーベクター pB2GW7 をアグロバクテリウム EHA105 株に形質転換し、これらのアグロバクテリウムを用いて floral dip 法によりシロイヌナズナ (Col-0) に形質転換した。pB2GW7 の T-DNA 上には bar 遺伝子が存在するので、薬剤選抜 (グルホシネート、2.5 mg/L) を用いて形質転換体 (T1 世代) を 20-40 個体選抜し、その自殖後代 (T2 世代) を得た。T2 世代においてグルホシネート抵抗性個体と感受性個体の比が約 3:1 となった系統を外来遺伝子のシングルコピー系統とした。シングルコピー系統について、複数の抵抗性個体を自殖させ、次世代 (T3) において全個体がグルホシネート抵抗性を示した系統を外来遺伝子ホモ固定系統とした。作出された T3 ホモ固定系統について発現量の高い 2 系統を、ALS 阻害剤ベンシルフロメチルへの抵抗性程度または導入 P450 遺伝子についての半定量 PCR により選抜し供試した。

2. シロイヌナズナ形質転換体の ALS 阻害剤感受性試験

ALS 阻害剤感受性試験には、本研究で作出した 7 種類のタイヌビエ CYP81A 遺伝子のホモ固定系統に加え、CYP81A12 または CYP81A21 を導入したシロイヌナズナ (Iwakami et al. 2014) をそれぞれ供試した。異なる濃度の ALS 阻害剤 (ベンシルフロメチルまたはクロルスルフロ) を含む MS 培地に野生型 (Col-0) および

CYP81A 遺伝子を導入した系統を播種した。人工気象器で 10 日間生育させた後、シロイヌナズナの除草剤感受性を評価した。

3. イネ形質転換体の作出

タイヌビエの 7 種の CYP81A 遺伝子 (CYP81A14, CYP81A15, CYP81A18, CYP81A22, CYP81A23, CYP81A24, CYP81A26) をそれぞれバイナリーベクター pCambia1390 に挿入後、アグロバクテリウム EHA105 株に形質転換した。イネ (日本晴) 完熟種子から N6D 培地を用いてカルスを誘導後、カルスにアグロバクテリウムを接種し形質転換した。イネの形質転換には上記 7 遺伝子に加え、*Green fluorescent protein (GFP)* および CYP81A12 を導入したアグロバクテリウムを用いた。形質転換カルスの選抜には選抜薬剤ハイグロマイシン 50 mg/L を用いた。

4. イネカルスを用いた除草剤感受性試験

ACCase 阻害剤 (フェノキサプロップエチル、ジクロホップメチル、トラルコキシジム、ピノキサデン) および ALS 阻害剤 (クロルスルフロ) を含む N6D 培地をそれぞれ調整し、独立の形質転換カルスを 9 個体ずつ置床した。3 週間生育させた後、カルスの生育量から各除草剤への感受性を評価した。

結果・考察

シロイヌナズナの CYP81A22 ホモ固定系統はベンシルフロメチルへの抵抗性を持たなかったため半定量 PCR を行ったところ、CYP81A22 の高発現はベンシルフロメチルへの抵抗性に関与しないということがわかった。

CYP81A12 導入イネカルスはジクロホップメチル、トラルコキシジム、ピノキサデンへの有意な抵抗性を示したが、フェノキサプロップエチルに対しては GFP や他の CYP81A 遺伝子を導入したカルスと同程度の感受性を示し、先行研究に一致した。CYP81A12 および CYP81A21 はジクロホップメチル、トラルコキシジム、ピノキサデンの代謝には関与しているがフェノキサプロップエチルの代謝には関与しておらず、他の遺伝子が代謝に関与していることが示唆されている (上館 2016 卒業研究)。

発表では、タイヌビエの P450 遺伝子を導入したシロイヌナズナおよびイネの ALS 阻害剤や ACCase 阻害剤に対する反応を示す。各遺伝子を導入した形質転換体の除草剤反応の差異と、各遺伝子にコードされるタンパク質のアミノ酸配列を比較し、除草剤代謝に重要であるアミノ酸残基を推定する。