

令和元年 7 月 26 日

日本型イネ由来の新規除草剤抵抗性遺伝子 *HIS1* の発見

— 複数の除草剤を不活性化する仕組みを解明 —

概要

埼玉大学大学院理工学研究科の戸澤譲教授、農研機構、株式会社エス・ディー・エス バイオテックらの共同研究グループは、「コシヒカリ」などの日本型イネが有する除草剤抵抗性遺伝子を発見し、そこにコードされるタンパク質が複数の除草剤を不活性化する仕組みを分子レベルで解明しました。

飼料用イネなど一部の稲品種が、トリケトン系除草剤処理により苗が枯死することが問題になりました。これを契機として、本研究グループは、日本型イネからトリケトン系除草剤を不活性化する酵素をコードする *HIS1* 遺伝子を発見しました。試験管内および植物体での実験により、この遺伝子が作り出す *HIS1* タンパク質がトリケトン系除草剤を水酸化し、除草剤としての機能を失わせることにより日本型イネは除草剤で枯れなくなることを明らかにしました。一方、除草剤に弱い飼料イネなどの一部の稲品種では、*HIS1* 遺伝子が機能を失っていること、さらにはこの機能欠損型 *HIS1* 遺伝子が東南アジアの稲品種に由来することを突き止めました。

単一の除草剤とその抵抗性遺伝子の組合せに依存する作物栽培は、その除草剤に抵抗性を持つ雑草の繁茂につながりますが、除草剤と抵抗性遺伝子の組合せを増やすことで、より多種類の雑草を対象に、水田での繁茂を有効に抑制できます。本研究グループが見出した遺伝子 *HIS1* は、交配育種により、抵抗性のないイネ品種に導入することが可能です。さらに、各々の作物に固有な *HIS1* に類似の *HIS1-LIKE (HSL)* 遺伝子の情報を利用し、幅広い作物への展開も期待されます。

この研究成果は、世界中に存在する膨大な数のイネ系統の中に、今後の育種に有用な遺伝子資源がまだまだ多く眠っていることも示唆しています。今後、本研究で明らかになった知見を活用して、より有効な雑草管理が可能になると期待されます。

本成果は、2019 年 7 月 26 日に、米国科学雑誌『Science』に公開されました。

【ポイント】

- 飼料用イネなどの一部の品種が、トリケトン系除草剤ベンゾピシクロン(BBC)に感受性を示すことが判明しました。感受性品種を用いた遺伝子解析の結果、抵抗性と感受性を決定する単一遺伝子 *HIS1 (HPPD INHIBITOR SENSITIVE 1)* を発見しました。
- 除草剤感受性品種では、*HIS1* 遺伝子に 28 塩基対(bp)の欠失が見られました。感受性品種で正常な *HIS1* を発現させると、BBC およびその他4種類のトリケトン系除草剤への抵抗性が付与できたことから、*HIS1* 遺伝子が日本型イネの除草剤抵抗性遺伝子であることが証明されました。
- 双子葉の実験モデル植物であるシロイヌナズナで *HIS1* 遺伝子を発現させると、トリケトン系除草剤全てに抵抗性を獲得しました。これにより、*HIS1* 遺伝子の働くしくみはイネ以外の植物でも共通であることが分かりました。
- 生物のゲノムデータベースを探索したところ、*HIS1* に類似する *HIS1-LIKE (HSL)* 遺伝子群がイネ科作物に共通して見出され、イネには *HIS1* に 86%という高い相同性を持つ *OsHSL1* 遺伝子が存在することも分かりました。*OsHSL1* をシロイヌナズナに発現させたところ、テフリルトリオンという1種類のトリケトン系除草剤のみに抵抗性を与えることが確認され、新たな除草剤抵抗性遺伝子をも一つ発見することに成功しました。
- この研究成果は、世界中の膨大な数のイネ系統の中に、今後の育種に有用な遺伝子資源がまだまだ多く眠っていることも示唆しています。今後、本研究で明らかになった知見を活用して、より有効な雑草管理が可能になると期待されます。

【研究内容】

研究背景

水田雑草の防除は、除草剤の開発により飛躍的に効率が高まりました。しかし、単一の除草剤成分を長年用いることにより、特定の抵抗性雑草の繁茂を促す結果も招き、抵抗性雑草対策のため各種の有効成分の開発と普及が進んでいます。近年、飼料用イネを栽培する一部の多収品種が新たに開発されたトリケトン系除草剤に感受性を示し、白化して枯死する事例が報告されました。感受性品種が作付けされる現場では、トリケトン系除草剤が使用できないため、この原因遺伝子の特定が開始されました。

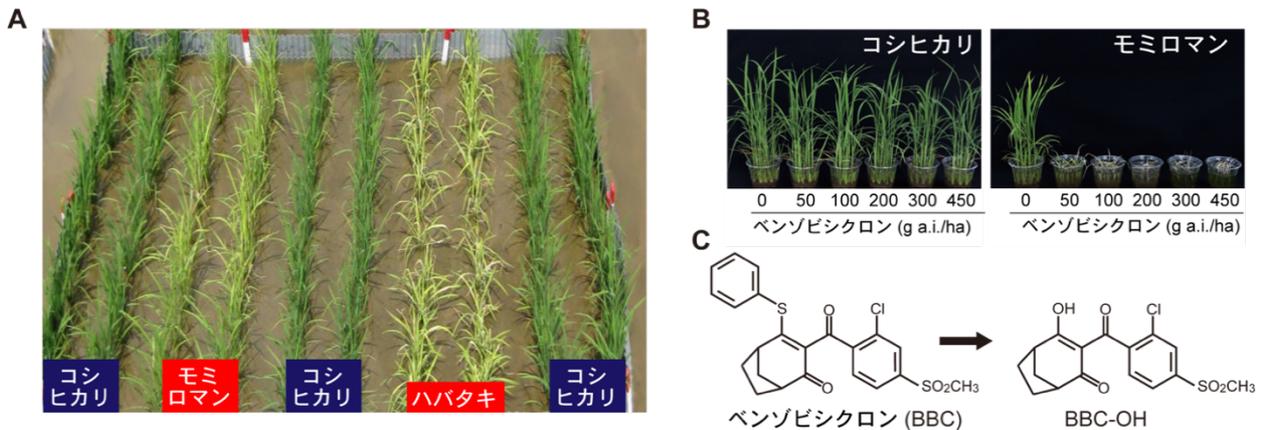


図1. ベンゾピシクロン感受性品種の出現.

A. ベンゾピシクロン(BBC)感受性品種(モミロマン、ハバタキ)の圃場での白化現象。B. コシヒカリ(BBC 抵抗性品種)とモミロマン(BBC 感受性品種)の異なるベンゾピシクロン濃度での感受性の比較実験。C. BBC は植物体内にBBC-OHの加水分解体として取り込まれて除草活性を發揮する。

研究結果:原因遺伝子の特定

研究グループでは、遺伝子解析を通じ、除草剤感受性が第2染色体の短腕に座乗している一つの遺伝子に支配されていることを明らかにしました。これらの解析結果を基に、原因遺伝子の座乗領域を狭め、11個の候補遺伝子の中から一つの遺伝子 *HIS1* を見いだしました。「コシヒカリ」などの抵抗性品種では、*HIS1* 遺伝子から機能するタンパク質が作られているのに対し、除草剤感受性品種では、*HIS1* 遺伝子に28bpの欠失が見られ、遺伝子の機能が失われていました(図2)。

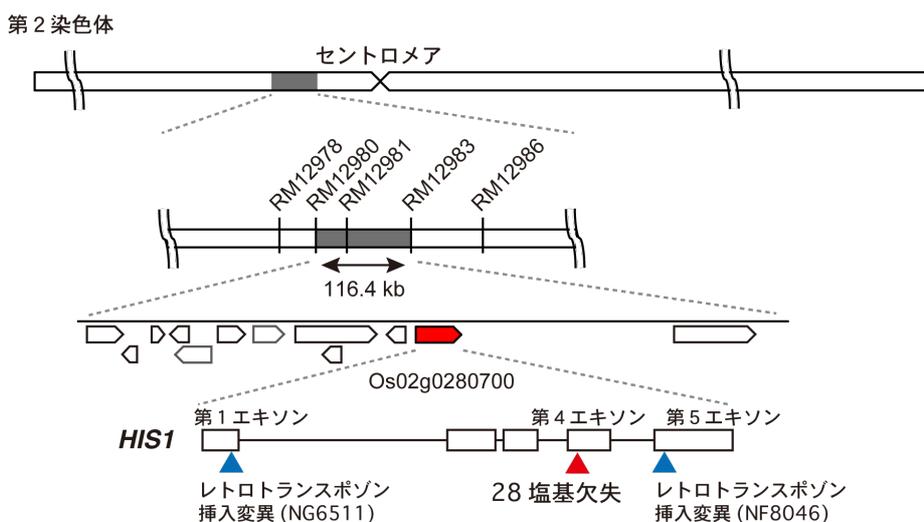


図2. ベンゾピシクロン(BBC)の感受性・抵抗性を決める原因遺伝子の同定.

イネゲノムのマッピングによる遺伝子同定の概略を示す。28塩基対の欠失が確認された遺伝子の機能を確認するために、レトロトランスポゾンが挿入した突然変異株 NG6511 および NF8046 も新たに選抜した。28塩基対欠失は第4エクソン、NG6511は第1エクソン、NF8046は第5エクソンにそれぞれ認められることから、コシヒカリや日本晴の *HIS1* 遺伝子がコードする *HIS1* タンパク質は、これらの *HIS1* 変異遺伝子からは合成できない。

HIS1 遺伝子領域へレトロトランスポゾンが挿入した2種類の変異株(図2)についても、除草剤感受性試験を行ったところ、それぞれ、BBC への感受性を示すことが確認され(図3A)、確かに *HIS1* 遺伝子の機能不全が BBC 感受性の原因であることが決定づけられました。さらに、これらの変異株は、他のトリケトン系除草剤(スルコトリオンおよびメソトリオン)へも感受性を示すことを確認しました(図3B および C)。

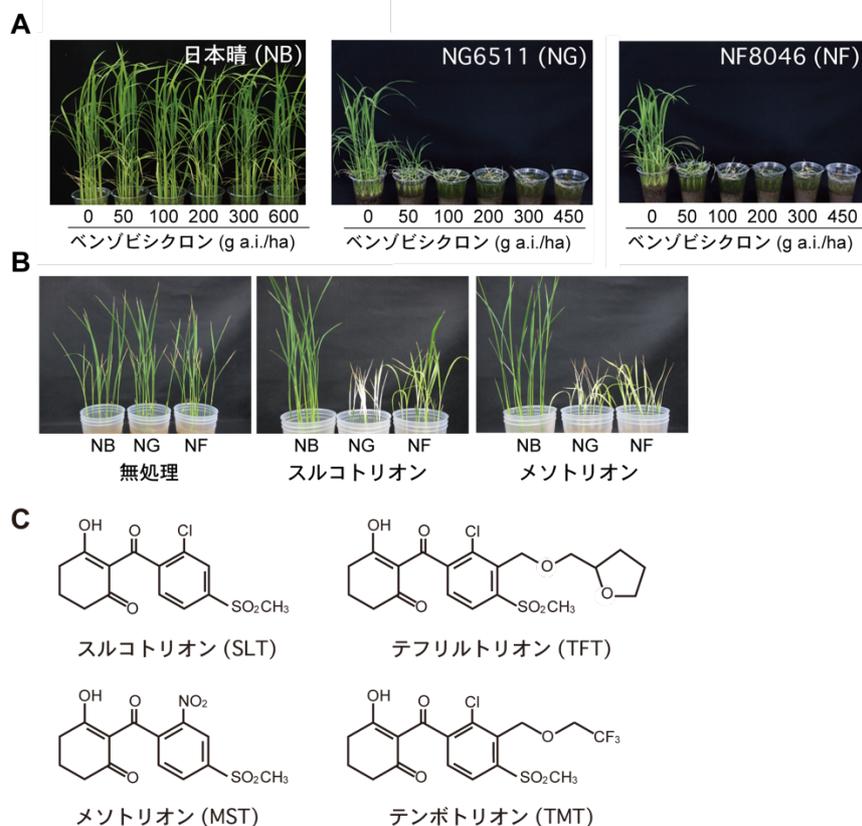


図3. *HIS1* 変異イネのトリケトン系除草剤に対する感受性試験。

A. *HIS1* 遺伝子機能を失っている変異株 NG および NF は、ベンゾビシクロン感受性となる。NG および NF の親品種である日本晴(NB)は抵抗性を示す。B. 変異株 NG および NF は、スルコトリオンおよびメソトリオンに対しても感受性を示す。C. ベンゾビシクロン以外の市販トリケトン系除草剤の構造。

研究結果：原因遺伝子の由来

国内で幅広く利用される除草剤が重要な育成品種を枯死させてしまうという「Bad news」を契機に始まった本研究は、育種分野の研究者の努力により、まず除草剤感受性の原因遺伝子の特定に至りました。続いて、この除草剤に弱い性質を与える原因になる 28 塩基対欠失を持つ *HIS1* 遺伝子を簡単に調査できる DNA マーカーを開発し、この遺伝子がどこからやって来たのかを調査しました。我が国のイネ育種の歴史は長く、品種の系譜が、農林水産省のデータベースに綿密に記録・整理されています。感受性品種の系譜をたどり、遺伝子解析と除草剤抵抗性試験を進めたところ、この除草剤に弱い性質を与える原因遺伝子は、図4のように、東南アジアに由来する Peta という品種に由来することを突き止めました。この情報は、今後の稲品種の改良に役立つものとなります。さらに、フィリピンなどで育種母本として利用される稲品種についてもこの変異が発見されました。これらの *HIS1* 変異を持つ品種の情報と除草剤に強い弱いかを判別する DNA マーカーを組み合わせることで、今後のトリケトン系除草剤抵抗性品種の育成が期待されます。

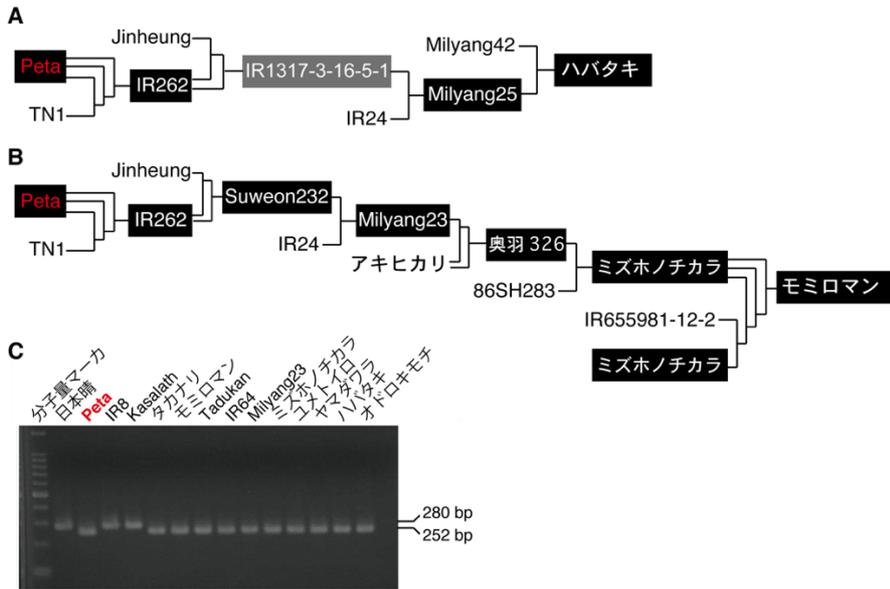


図4. 育種系譜の解析.

A. ハバタキの育種の系譜。白字の品種は BBC 感受性を示した。B. モミロマンの系譜。白字の品種は BBC 感受性を示した。C. DNA マーカー解析により Peta を祖先に持つ幾つかの品種に欠失変異を確認した。また、東南アジアの著名な品種 (Tadukan や IR64) にも 28 塩基欠失変異を見出した。

研究結果: 遺伝子資源としての有用性を検証

次に、我々は、感受性品種で正常な *HIS1* を発現させると、BBC およびその他4種類のトリケトン系除草剤への抵抗性が付与できたことから、*HIS1* 遺伝子が日本型イネの除草剤抵抗性遺伝子であることを証明するに至りました (図5A)。双子葉の実験モデル植物であるシロイヌナズナで *HIS1* 遺伝子を発現させると、トリケトン系除草剤全てに抵抗性を獲得しました。これにより、*HIS1* 遺伝子でイネ以外の双子葉作物にも除草剤抵抗性を付与できることが分かりました (図5B)。

HIS1 遺伝子の配列を生物のゲノムデータベースを探索したところ、*HIS1* に類似する *HIS1-LIKE* (*HSL*) 遺伝子群がイネ科作物に共通して見出され、イネには *HIS1* に 86% という高い相同性を持つ *OsHSL1* 遺伝子が存在していました。この *OsHSL1* をシロイヌナズナに発現させたところ、テフリルトリオン (TFT) (図3C) という1種類のトリケトン系除草剤のみに抵抗性を与えることが確認され、新たな除草剤抵抗性遺伝子をもう一つ発見することに成功しました (図5B)。

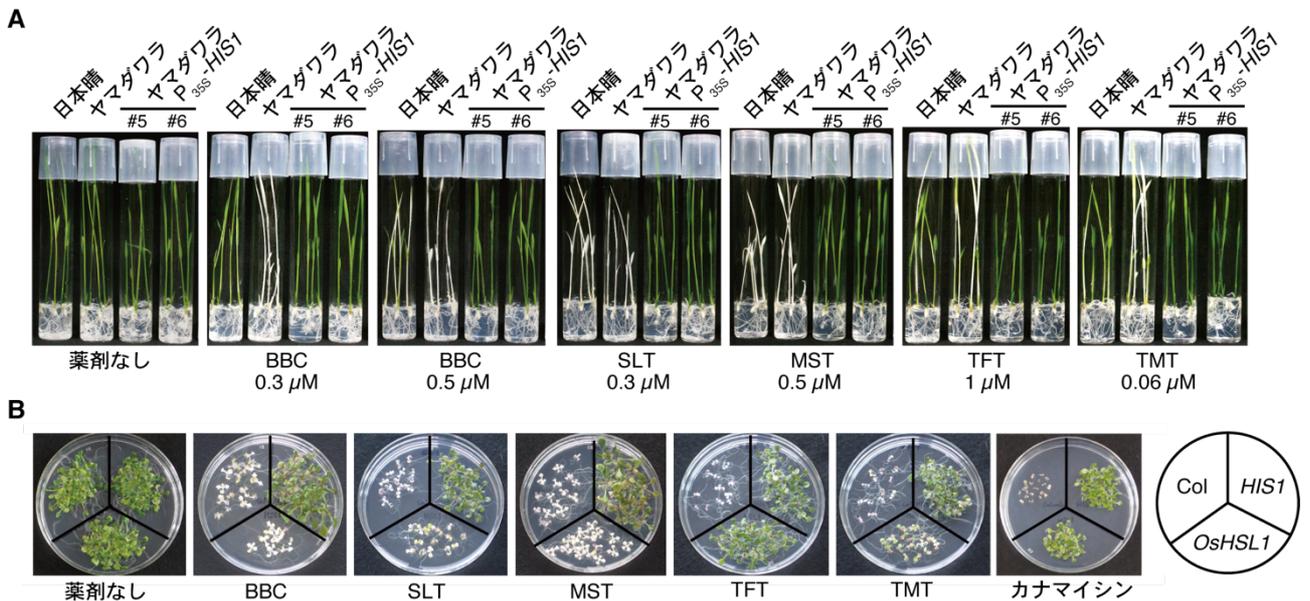


図5. 日本晴型 *HIS1* 遺伝子を発現させたイネ(A)およびシロイヌナズナ(B)の各種のトリケトン系除草剤への感受性試験の結果.

A. *HIS1* 遺伝子に 28 塩基欠失を持つやまだわらは、BBC をはじめとする5種のトリケトン系除草剤に試験した濃度条件で感受性を示すが、日本晴型 *HIS1* 遺伝子を強発現することにより(やまだわら P35S-*HIS1*)、5種全ての薬剤に抵抗性を獲得する。B. シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* Columbia) は、5種全てのトリケトン系除草剤に感受性であるが、日本晴型 *HIS1* 遺伝子を強発現することにより、5種全ての薬剤に抵抗性を獲得する。さらに、日本晴型 *OsHSL1* 遺伝子を強発現することにより、TFT にのみ抵抗性を獲得する。

研究結果: 遺伝子がコードするタンパク質の機能を解明

薬剤代謝物解析により、日本型 *HIS1* 遺伝子を発現するイネでは、根から吸収した BBC-OH (図1C) が、葉において完全に消失していることも確認しています(論文中に掲載)。一方、*HIS1* 遺伝子に欠失を持つ感受性品種においては、根から吸収した BBC-OH の葉での消長が大幅に遅れていることから、*HIS1* タンパク質が、除草剤の代謝に大きな役割を果たすことが確認されました。そこで、我々は、有機化学的な解析グループとタンパク質生化学解析グループと共同作業で、*HIS1* タンパク質を調製し、その酵素機能を試験管内で解析することとしました。

この *HIS1* 遺伝子がコードするアミノ酸配列の解析より、*HIS1* タンパク質は、2 価鉄イオン・2-オキソグルタル酸依存型酸化酵素と呼ばれる 2 価の鉄イオン(Fe^{2+})および 2-オキソグルタル酸(2OG)を必要とする酸化酵素のファミリーに属することが示唆されました。ところが、通常の大腸菌を利用するタンパク質発現系では、このタンパク質の調製が不可能であったため、コムギ胚芽抽出液を用いる無細胞タンパク質合成系を利用してタンパク質機能解析を進めました。

その結果、*HIS1* は Fe^{2+} および 2OG 存在下で BBC-OH を代謝することを確認し、続いて代謝物を精製し、その構造解析により、*HIS1* が BBC-OH の特定の位置に1酸素原子付加することにより水酸化修飾することが確認されました(図6)。さらに、BBC 以外のトリケトン系除草剤についても同様の解析を進めたところ、何れの化合物も酸素原子ひとつ分の質量増加を確認し、同様な代謝により除草剤活性を不活性化していることが確認できました。詳細は論文に記載しています。

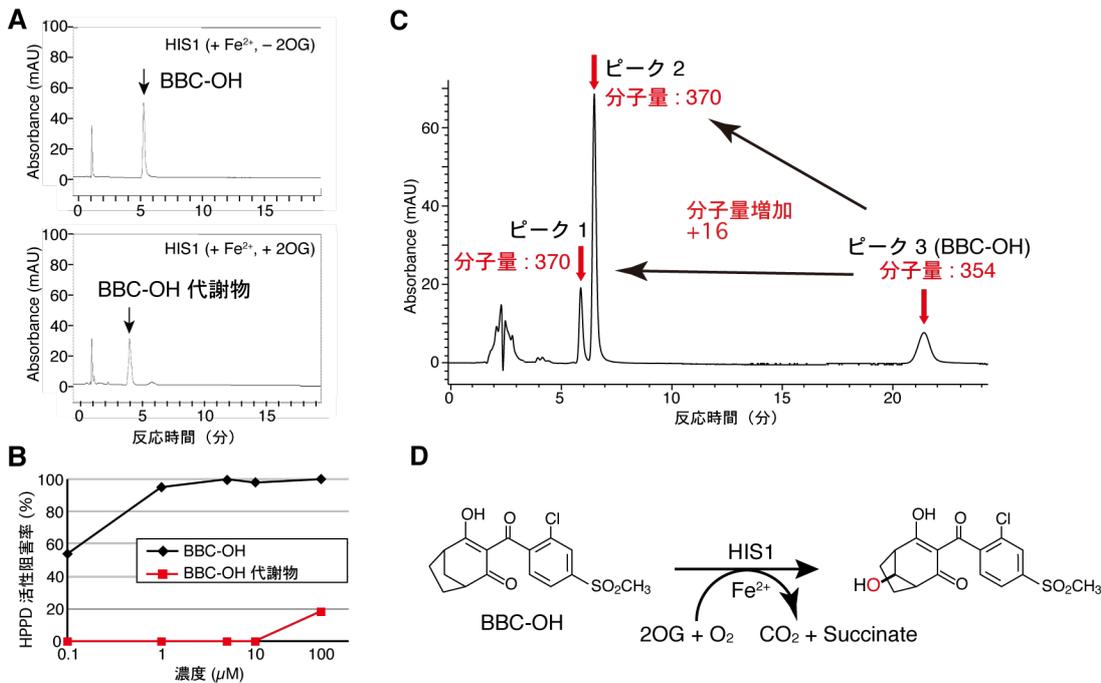


図6. *HIS1* タンパク質による BBC-OH の代謝.

A. *HIS1* タンパク質は、 Fe^{2+} および 2OG の存在下で、BBC-OH を代謝する活性を示す。B. *HIS1* による BBC-OH 代謝物はニンジン 4HPPD 酵素の阻害活性、つまり除草剤活性を失っている。C. BBC-OH の代謝物を A と異なる条件で分離し、質量分析を進めたところ、代謝物にはそれぞれ 16 の分子量増加が確認された。D. NMR による構造解析などにより、推定された BBC-OH 代謝物の構造と、*HIS1* による酵素反応式を示す。

今後の応用展開

雑草防除は、作物栽培において必要不可欠な作業です。しかしながら、近年、特定の除草剤を繰り返し使用することで除草剤に抵抗性を持つ雑草が出現しており、除草剤散布圃場でも優先的に増殖することが可能となるため、爆発的な広がりを見せています。特に大規模機械化農業を進めている諸外国では解決すべき喫緊の問題となっています。この人為的な特定雑草の繁茂を回避するには、機作の異なる複数の除草剤を交代で計画的に使用するなどの仕組みが求められているため、*HIS1* 遺伝子は、これら諸外国の作物育種にとっても極めて有用なツールとなります。

HIS1 に類似する *HIS1*-LIKE (*HSL*) 遺伝子群から新たな除草剤抵抗性遺伝子 *OsHSL1* が見いだされ、イネ以外のイネ科の作物にも *HSL* タンパク質をコードする遺伝子が広く存在することから、今後は様々な遺伝資源、作物ごとに遺伝子の機能解析と利用を図る研究が進むことが予想されます。

同時に、*HSL* 遺伝子のイネ科作物における高い保存性は、もともとこの遺伝子ファミリーが除草剤抵抗性以外の重要な役割を果たしていることを示唆しています(図7)。植物における *HSL* 遺伝子本来の機能を解明することにより、将来的に、新たな栽培技術の開発や、新たな農薬の開発につながる可能性もあるため、研究の発展が期待されています。

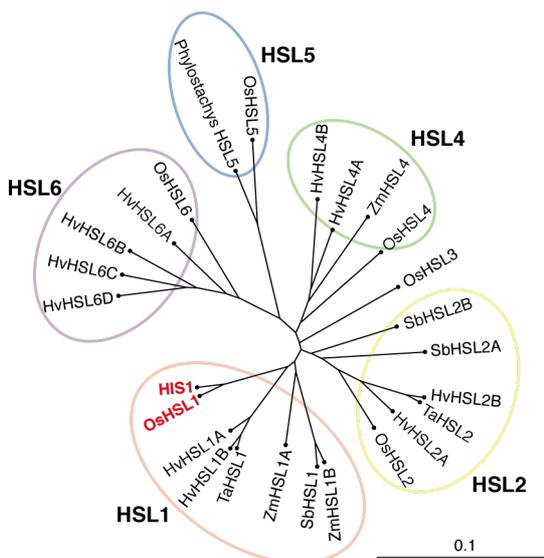


図7. イネ科作物に見出された *HIS1* 相同タンパク質の進化系統樹。

Os はイネ (*Oryza sativa*)、Zm はトウモロコシ (*Zea mays*)、Ta はコムギ (*Triticum aestivum*)、Hv はオオムギ (*Hordeum vulgare*)、Sb はソルガム (*Sorghum bicolor*) をそれぞれ示す。

用語解説

1. イネの品種

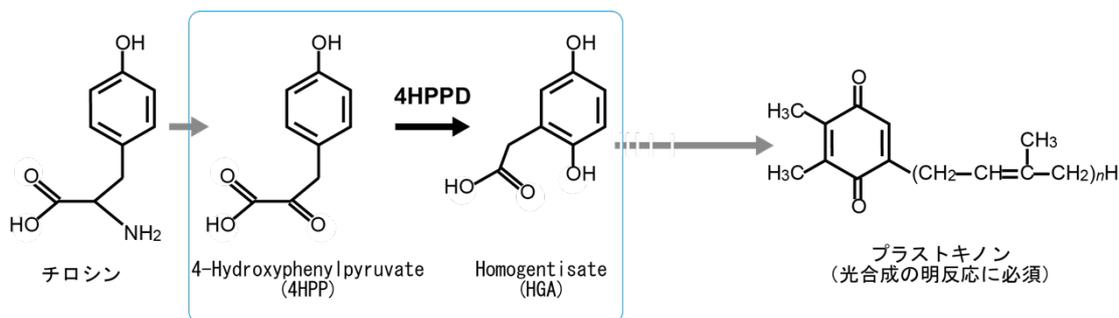
世界で栽培されているイネ品種は、日本型(ジャポニカ)イネとインド型(インディカ)に大きく2分されます。

2. ベンゾビシクロン(Benzobicyclon, BBC)

株式会社エス・ディー・エスバイオテックで創製された水稲用除草剤です。2001年に農薬登録を取得し、BBCを含む混合剤は、水田での抵抗性雑草対策剤としても40万ha近い水田で使用されています。水田での使用に適する分子構造を付加して作製された高機能型のトリケトン系の除草剤で、チオフェニル基が付加したプロドラッグ型の薬剤であり、水田中の植物の根系周辺で加水分解され保護基が外れて吸収されることにより4-HPPD阻害剤としての薬効を示します。日本型イネはBBCに対し抵抗性を持つために、イネ水田用の除草剤として広く普及しています。

3. 4-HPPD(4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase)

チロシンの異化代謝の第2工程に機能する酵素で4-hydroxyphenylpyruvate (HPP)を homogentisate (HGA)に変換する働きを持ちます。植物など光合成生物では同化作用も持ち、HGAは、プラストキノン合成系の必須な前駆体となっています。プラストキンはカロテノイド合成系における不飽和化反応の際に放出される水素の受容体としても作用しているため、プラストキノンの枯渇はカロテノイド合成を間接的に阻害し、白化症状を発現させます。



4. トリケトン系除草剤

酵素 4-HPPD を標的とする除草剤です。多くは水溶解度が高く畑作に有効ですが水田での使用には不向きでした。BBC は上述のように水田での使用が可能です。HIS1 導入植物は、BBC 以外のトリケトン系薬剤(図3Cをご参照ください)に対する抵抗性も示します。日本の水田においては、2001年に上市したBBCを始めとして、2010年に上市したバイエルクロップサイエンス社のテフリルトリオン(TFT)、2011年に上市したシンジェンタ社のメソトリオン(MST)の3剤があり、これらを含む水稲用除草剤は、2018農年度174剤が上市され、82万haの水田で使用されたと推測されます。

5. 2価鉄イオン・2-オキソグルタル酸依存型酸化酵素(Fe^{2+} -2OG oxygenase)

非ヘム型の2価鉄イオン、2-オキソグルタル酸(2OG)ならびに分子状酸素を必要とする酸化酵素。生成物に加え、多くの反応ではコハク酸と二酸化炭素を生じます。様々な基質に対し酸素付加型の酸化反応を触媒する酵素群で、植物ではフラボノイドやジベレリン、エチレンなどの植物ホルモンの生合成や代謝系にも機能していることが知られています。ヒトでも70種程度の酵素が知られていますが、ヘム鉄を利用するチトクロムP450と比較すると研究例がまだ少なく機能未知のものが多い状況です。機能型タンパク質の精製が困難な酵素が多いため、結晶構造解析例も限られています。

6. シロイヌナズナ

キャベツ等と同じアブラナ科の1年草。寿命が短く、栽培および遺伝子組換えが容易であること、ゲノムサイズが比較的小さいことから、世界中でモデル植物として研究されています。2000年に全ゲノムが解読されました。

7. DNA マーカー

DNA マーカーとは、病気や障害に対する耐性などをDNA配列の違いから見分けるために作られた目印(マーカー)のことを示します。弱い品種と強い品種を遺伝子の配列からすぐに判別することができます。

【論文情報】

掲載誌 Science

論文名 A rice gene that confers broad-spectrum resistance to β -triketone herbicides

(トリケトン系除草剤に広範な抵抗性を付与するイネ遺伝子)

著者名 Hideo Maeda, Kazumasa Murata, Nozomi Sakuma, Satomi Takei, Akihiko Yamazaki, Md. Rezaul Karim, Motoshige Kawata, Sakiko Hirose, Makiko Kawagishi-Kobayashi, Yojiro Taniguchi, Satoru Suzuki, Keisuke Sekino, Masahiro Ohshima, Hiroshi Kato, Hitoshi Yoshida, Yuzuru Tozawa

【研究支援】

農研機構 「除草剤抵抗性遺伝子 HIS1 ゲノム情報を使ったイネ育種・生産システムと新規創薬への展開」
イノベーション創出強化研究

研究推進事業

農研機構 「食用イネから発見した新規除草剤抵抗性遺伝子に関わる分子メカニズムを明らかにする」
先行的・試行的研究