

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	NIÑA GRACEL BAYLA DIMAANO
論文題目	STUDY ON THE METABOLISM-BASED RESISTANCE IN A MULTIPLE HERBICIDE RESISTANT LINE OF <i>Echinochloa phyllopogon</i> (Stapf) Koss. (タイヌビエの多剤抵抗性系統における代謝による抵抗性機構に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>Metabolism-based herbicide resistance is a major threat to agriculture, as it is unpredictable and could extend resistance to different chemical groups and modes of action, encompassing existing, novel and to-be-discovered herbicides. Limited information on the enzymes involved in herbicide metabolism has hindered the prediction of cross-resistance in weeds. A multiple herbicide resistant (MHR) line of <i>Echinochloa phyllopogon</i> from Sacramento Valley, California has been found to be resistant to at least 12 herbicides from nine different chemical groups, including acetyl-CoA carboxylase inhibitor, fenoxaprop-<i>P</i>-ethyl (FE) and very long chain fatty acid elongase inhibitor, thiobencarb (TB). Recently, two cytochrome P450 genes (<i>CYP81A12</i> and <i>CYP81A21</i>) belonging to CYP81A subfamily were identified to be involved in concomitant cross-resistance to six unrelated herbicide classes in MHR <i>E. phyllopogon</i>. This suggests a critical role of CYP81As in endowing unpredictable cross-resistances; thus, elucidation of the metabolizing functions of CYP81As to a larger group of herbicides needs to be realized. Further, the mechanisms of FE and TB resistance in MHR <i>E. phyllopogon</i> remain unknown. To further understand the mechanisms involved in metabolism-based herbicide resistance in <i>E. phyllopogon</i>, three studies were conducted as follows:</p> <ol style="list-style-type: none">1. The metabolism functions of all nine putative functional <i>CYP81A</i> genes of <i>E. phyllopogon</i> to 33 herbicides from 24 distinct chemical groups were characterized via ectopic expression in <i>Arabidopsis thaliana</i> and <i>Escherichia coli</i>. <i>CYP81A12</i>, <i>CYP81A15</i>, <i>CYP81A18</i>, <i>CYP81A21</i> and <i>CYP81A24</i> exhibited wide and distinct substrate specificity when expressed in <i>A. thaliana</i>; and produced either hydroxylated, <i>N</i>-<i>O</i>-demethylated or both metabolites when expressed in <i>E. coli</i>. The pattern of resistance conferred by these CYP81As is geared towards all chemical groups of acetolactate synthase inhibitors and is expanded to herbicides inhibiting photosystem II, phytoene desaturase, protoporphyrinogen oxidase, 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. Based on the metabolism profile, cross-resistance in MHR <i>E. phyllopogon</i> to novel herbicides pyrimisulfan and propyrisulfuron, and to mesotrione was predicted and confirmed.2. When the involvement of CYP81As was tested for FE resistance, no difference in sensitivity was observed between wild type and rice calli expressing the P450s. A previous report which revealed an enhanced accumulation of glutathione-conjugated FE in MHR <i>E. phyllopogon</i> suggests the involvement of glutathione S-transferases (GSTs) in FE resistance. GST contigs that were constitutively highly expressed in the MHR line were analyzed by real-time qPCR for association of higher transcript levels with the resistance in the F₆ progenies of MHR and sensitive line. Next, the candidate GSTs were isolated, cloned and expressed in rice calli, followed by FE sensitivity assay. One GST gene was identified to confer slight resistance to FE when expressed in rice calli, thus suggesting its involvement in FE resistance in MHR <i>E. phyllopogon</i>.3. To elucidate the genetic control and inheritance of TB resistance, field-dose sensitivity assay in F₂ progenies from a cross between MHR and sensitive line was performed. Result suggests that the mechanism			

of TB resistance is under the control of a major locus. Progeny testing in the F₆ lines revealed that TB resistance is not perfectly associated with the other herbicides in which the resistance mechanism is due to the overexpression of *CYP81A12* and *CYP81A21*. This result implies that the mechanism of TB resistance in MHR *E. phyllopogon* is distinct from that of other herbicides metabolized by P450s.

In this research, a molecular basis to predict cross-resistance pattern for CYP81A-mediated herbicide resistance in *E. phyllopogon* was established. Further, a GST gene was identified to confer slight resistance to FE; while inheritance study suggests that another mechanism is controlling TB resistance in MHR *E. phyllopogon*. Inevitably, the identification of the key players involved in FE and TB resistance will be the future direction of this research.

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。
論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

除草剤の解毒代謝機能の向上により除草剤抵抗性を獲得した雑草は、未使用かつ化学骨格や作用機作が異なる複数の除草剤に対しても同時に抵抗性を示すことが多い。この除草剤代謝型抵抗性雑草の出現は、これらに対して有効な除草剤が限定され、さらに、抵抗性の分子機構に関する知見が乏しいことから効果が見込まれる除草剤の予測ができず、化学的雑草防除における最大の脅威となっている。

イネ科一年生雑草タイヌビエ (*Echinochloa phyllopogon*) は、水稻作の代表的な害草である。アメリカカリフォルニア州で出現した多剤抵抗性タイヌビエは、除草剤を代謝する酵素 CYP81A サブファミリーのシトクロームP450 (CYP81A12およびCYP81A21) の過剰発現により複数の除草剤に交差抵抗性を示すことが知られていた。本研究では、多剤抵抗性タイヌビエの CYP81A の除草剤代謝機能を解析し、交差抵抗性を予測する基盤を構築した。さらに、これらのシトクロームP450では説明できない除草剤抵抗性の新たな機構についても解析し、多剤抵抗性獲得機構について考察した。評価すべき点は以下のように要約される。

1. タイヌビエの9種の CYP81A 遺伝子を解析し、5種の CYP81A に除草剤代謝機能があること、それらのうち、CYP81A12、CYP81A15、CYP81A21およびCYP81A24は多様な除草剤を代謝し、それぞれ基質特異性が異なることを明らかにした。これらから、CYP81Aによる交差抵抗性を予測する基盤を構築した。
2. 多剤抵抗性タイヌビエの Fenoxaprop-*P*-ethyl (アセチルCoAカルボキシラーゼ阻害剤) 抵抗性への関与が示唆される GST 遺伝子を同定した。また、多剤抵抗性タイヌビエにおいて、本 GST 遺伝子と CYP81A12 および CYP81A21 の高発現をともに制御する1因子が存在する可能性を示した。
3. Thiobencarb (超長鎖脂肪酸伸長酵素阻害剤) に対する抵抗性は、上述の遺伝子群の制御とは独立の機構によることを示し、本タイヌビエにおける多剤抵抗性には未知の機構も関わっていることを明らかにした。

以上のように、本論文は、世界的にその蔓延が問題となり、有効な除草剤が限定される除草剤代謝型抵抗性雑草の抵抗性獲得機構について新たな知見を提示したものであり、雑草学、植物保護学、栽培学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和元年7月18日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)