

令和元年6月22日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04884

研究課題名(和文)グリホサート・グルホシネート複合抵抗性雑草の抵抗性機構に関する雑草防除学的研究

研究課題名(英文) Mechanism of resistance to glyphosate and glufosinate in weeds

研究代表者

富永 達 (Tohru, TOMINAGA)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：10135551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：グリホサート及びグルホシネートは世界で広く使用されている非選択性除草剤である。国内のグリホサート抵抗性ネズミムギ、オヒシバ、ヒメムカシヨモギ及びオオアレチノギクに対するグルホシネート抵抗性の有無を検定した結果、静岡産ネズミムギにおいてグルホシネート抵抗性が確認された。上記草種のグリホサート抵抗性機構を解明した結果、静岡産ネズミムギでは非作用点抵抗性、奈良及び三重産オヒシバは作用点抵抗性、岡山産及び沖縄産オヒシバは非作用点抵抗性、京都産ヒメムカシヨモギ及び岐阜産オオアレチノギクは非作用点抵抗性であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

雑草の除草剤抵抗性機構は、作用点抵抗性と非作用点抵抗性に大別される。抵抗性機構によって抵抗性の程度や多剤抵抗性の有無が異なるため、抵抗性機構を明らかにすることは、除草剤抵抗性雑草の合理的な防除計画策定に極めて重要である。本研究では、ネズミムギ、オヒシバ、ヒメムカシヨモギ及びオオアレチノギクのグリホサート抵抗性機構を解析した。静岡産ネズミムギの非作用点抵抗性機構に関して、液胞隔離が関与している可能性を示した。オヒシバの抵抗性に関しては、集団によって抵抗性機構が異なることを示した。

研究成果の概要(英文)：Both glyphosate and glufosinate are non-selective herbicide widely used in the world. Glyphosate resistant *Lolium multiflorum*, *Eleusine indica*, *Conyza canadensis* and *C. sumatrensis* are reported in Japan. Among them, *L. multiflorum* from Shizuoka was also resistant to glufosinate. The glyphosate resistance of *L. multiflorum* from Shizuoka, *E. indica* from Okayama and Okinawa, *C. canadensis* from Kyoto and *C. sumatrensis* from Gifu was endowed by non-target site mechanisms. The resistance of *E. indica* from Nara and Mie was endowed by target site mechanisms.

研究分野：雑草生態学

キーワード：除草剤抵抗性 グリホサート ネズミムギ オヒシバ ヒメムカシヨモギ オオアレチノギク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 作物生産において、雑草防除は病害虫防除とともに極めて重要な管理作業で、水田あるいは畑地内の除草だけでなく、畦畔の雑草管理にも多大な労力と経費が費やされている。除草剤の使用は、除草に要する労力や経費を大幅に削減し、除草剤の合理的な使用は、持続的・安定的な作物生産に大きな貢献をしてきた。しかし、同一系統の除草剤の連用によって、世界的に除草剤抵抗性雑草が顕在化している。除草剤抵抗性雑草の顕在化は、作物生産に大きな負の影響をもたらし、これへの対応が喫緊の世界的課題となっている。

(2) グリホサートは、移行性の非選択性除草剤で、地下に形成される栄養繁殖器官にも移行するため、多年生雑草にも極めて有効である。申請者らは、静岡県内でグリホサートに対して抵抗性を有するネズミムギ (*Lolium multiflorum* Lam.) が畦畔を中心に分布拡大し、一部が農耕地に侵入していることを日本で最初に報告したが (Niinomi et al., 2013)、その抵抗性機構は未解明のままである。抵抗性の程度や多剤抵抗性の有無は、抵抗性の機構により異なるため、総合的雑草防除体系確立のために抵抗性機構の解明が急がれる。さらに、筆者らは、オヒシバ (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.)、ヒメムカシヨモギ (*Conyza canadensis* L.) 及びオオアレチノギク (*C. sumatrensis* Walker) においてもグリホサート抵抗性個体が日本国内で出現したことを確認している (富永, 2015)。これらのグリホサート抵抗性雑草の防除には、グルホシネートがグリホサートの代替除草剤としてもっぱら使用されている。

(3) グリホサートの代替除草剤としてグルホシネートを連用すると、グリホサートとグルホシネートに対し、1 個体が同時に抵抗性を示す多剤抵抗性が出現することが危惧される。

2. 研究の目的

(1) グリホサートは非選択性の除草剤であり、グリホサート抵抗性雑草の防除には、パラコートが毒物であるため、グルホシネートがグリホサートの代替除草剤として使用されることが多い。グリホサートの代替除草剤としてグルホシネートを連用すると、グリホサートとグルホシネートに対し、1 個体が同時に抵抗性を示す多剤抵抗性個体が出現することが危惧される。グリホサート抵抗性雑草の防除に使用されているグルホシネートに対しても抵抗性を示す個体の出現は、パラコートが毒物であることから代替除草剤の選択肢が少なくなり、除草剤による防除が極めて困難になる。抵抗性雑草の防除は、労力不足、高齢化、コスト面、大規模化などの理由から、機械的防除や手取り除草では現実問題として困難であるため、抵抗性雑草を早期に防除することが必須である。

(2) 除草剤抵抗性の機構は、作用点抵抗性と非作用点抵抗性に大別され、抵抗性機構が異なれば、抵抗性の程度や多剤抵抗性の有無が異なる。このため、除草剤抵抗性の機構を解明することは、除草剤抵抗性雑草の合理的な防除計画策定のために必須の課題である。本研究では、グリホサート・グルホシネート抵抗性出現の有無、グリホサート抵抗性の機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抵抗性の程度

グリホサート抵抗性ネズミムギ、オヒシバ、ヒメムカシヨモギ及びオオアレチノギクについて、グリホサート及びグルホシネートを標準量及び標準量以上の複数濃度を処理し、グリホサート抵抗性の程度、グルホシネート抵抗性の有無、グルホシネート抵抗性を有していればその程度を、感受性個体と比較した。

(2) 作用点抵抗性

グリホサート感受性及び抵抗性個体の葉から DNA を抽出し、抵抗性を付与することが報告されている EPSPS の変異に関わる第 102 及び第 106 コドンを含む PCR 産物について CAPS 法により塩基置換の有無を確認した。塩基置換が認められた場合はシーケンスして、感受性個体と抵抗性個体の塩基配列を比較し、抵抗性を付与する一塩基置換を特定した。

EPSPS 及び内部標準遺伝子を単一増幅させるプライマーを設計し、リアルタイム PCR を行い、内部標準遺伝子あたりの EPSPS 遺伝子の相対コピー数を求めた。なお、内部標準遺伝子として、ゲノム内に 1 コピーだけが存在していることが報告されている 18Sr 遺伝子 (Cha et al. 2014) や ALS 遺伝子 (Zheng et al. 2011) を用いた。

(3) 非作用点抵抗性

グリホサート感受性個体及び抵抗性個体の葉にグリホサートを標準量処理し、処理 4 日後に液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC-MS/MS) を用い、植物体の処理葉、未処理葉及び根のグリホサート及びグリホサートの代謝産物である AMPA を定量した。

グリホサート抵抗性に関与する遺伝子を特定するため、感受性個体及び抵抗性個体から RNA を抽出後、HiSeq4000 にてシーケンスを行った。RNA-Seq により感受性個体及び抵抗性個体間で発現遺伝子のプロファイルを比較し、遺伝子の塩基配列を網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1) 抵抗性の程度

ネズミムギ（静岡集団）、オヒシバ（岡山集団）、ヒメムカシヨモギ（京都集団）及びオオアレチノギク（岐阜集団）のグリホサートに対する抵抗性の程度を、感受性個体としてネズミムギは栽培品種、オヒシバ、ヒメムカシヨモギ及びオオアレチノギクは京都市左京区産自生個体を供試し、生存率で評価した結果、感受性個体と比較した抵抗性の程度は、ネズミムギで 5.4 倍、オヒシバで 12.0 倍、ヒメムカシヨモギで 11.2 倍、オオアレチノギクで 10.6 倍であった（図 1）。

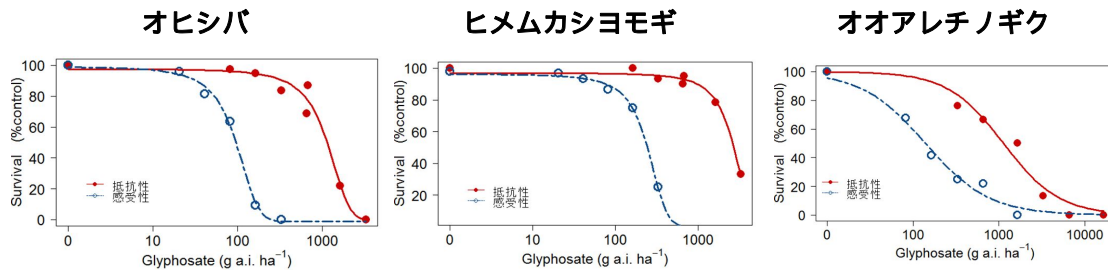


図 1 各草種の抵抗性の程度

グリホサートに対する抵抗性は、ネズミムギ（静岡集団）で認められたが、他の 3 草種では認められなかった。ネズミムギ（静岡集団）では、両剤に対し感受性、グリホサートにだけ抵抗性、グルホシネートにだけ抵抗性、両剤に対し抵抗性、の 4 タイプの個体が確認された（図 2）。両剤のうち一方にだけ抵抗性を示す個体が認められたことから、グリホサート抵抗性機構とグルホシネート抵抗性機構は異なる遺伝子に支配されている可能性が高い。

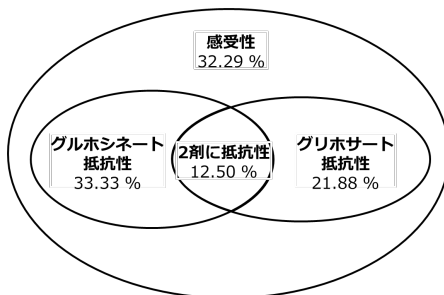


図 2 ネズミムギ静岡集団におけるグリホサート及びグルホシネート抵抗性個体の割合

ネズミムギは、自家不和合で他殖するため、抵抗性集団には感受性個体も含まれている。また、抵抗性の遺伝様式は現時点では明らかでないが、感受性/抵抗性ヘテロ個体も含まれていると推定され、ネズミムギの抵抗性レベルは過小評価されていると考えられる。

(2) 作用点抵抗性

<ネズミムギ> グリホサート抵抗性を付与する EPSPS の変異に関わる第 102 及び第 106 コドンにおける塩基置換は認められなかった。また、EPSPS の増幅も認められなかった。

<オヒシバ> 抵抗性の程度を評価した前述の岡山集団に加え、沖縄県、奈良県及び三重県由来の合計 4 集団について調査した。奈良および三重集団では、グリホサート抵抗性を付与する EPSPS の第 106 コドンにおいて Pro (CCA) が Ser (TCA) に変異していることが明らかになった（図 3）。

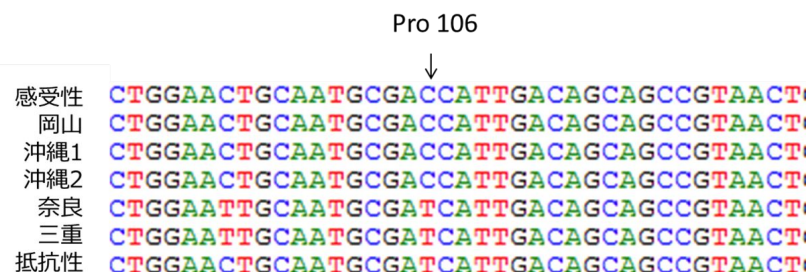


図 3 オヒシバ EPSPS 遺伝子の Pro106 部位における変異の有無

岡山集団及び沖縄集団では、グリホサート抵抗性を付与する報告がある変異は認められず、EPSPS の増幅も認められなかった。

<ヒメムカシヨモギ> EPSPS1 及び EPSPS 2 にグリホサート抵抗性を付与する報告がある変異は認められず、EPSPS の増幅も認められなかった。

<オオアレチノギク> EPSPS のコピー数が不明であったため、クローニングにより遺伝子を単離し、EPSPS 遺伝子が少なくとも 5 コピー存在することを明らかにした。複数存在する EPSPS 遺伝子のうち 1 コピーで、感受性個体及び抵抗性個体ともに Pro106 部位の塩基配列が Thr (ACA) に変異していた (図 4)。感受性個体及び抵抗性個体いずれにおいても同じ変異が認められたため、この変異は抵抗性に関与していないと考えられた。

Pro106

```

EPSPS_A-1 GGAACTGCTATGCGTCCATTGACTGCCGCAGTTACTGCT
EPSPS_A-2 GGAACTGCTATGCGTCCATTGACTGCCGCAGTTACTGCT
EPSPS_C   GGAACTGCTATGCGTCCATTGACTGCCGCAGTTACTGCT
EPSPS_B-2 GGAA CAGCTATGCGTCCATTGACTGCTGCCGTTACTGCT
EPSPS_B-1 GGAA CAGCTATGCGTACATTGACTGCTGCCATTACTGCT
  
```

図 4 オオアレチノギク EPSPS 遺伝子の Pro106 部位における変異の有無

(3) 非作用点抵抗性

<ネズミムギ> 感受性及び抵抗性個体に標準量のグリホサートを塗布処理し、4 日後に植物体を処理葉、非処理茎葉部および根に分け、LC-MS/MS を用いて各部位におけるグリホサート及びその代謝産物である AMPA を定量した。その結果、感受性個体と抵抗性個体の間に、グリホサートの植物体内への吸収量に差異は認められなかった。しかし、抵抗性個体において処理葉から非処理茎葉部および根に移行するグリホサート量が有意に少ない傾向が認められた (図 5)。また、抵抗性個体においても、グリホサートの代謝産物である AMPA は認められなかった。これらの結果から、移行障害がグリホサート抵抗性に関与していることが示された。

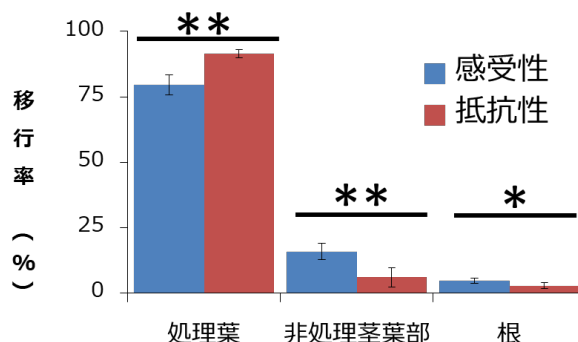


図 5 ネズミムギ感受性個体及び抵抗性個体のグリホサート移行量

感受性及び抵抗性個体から RNA を抽出後、HiSeq4000 にてシーケンスを行った。RNA-Seq により感受性個体及び抵抗性個体間で発現遺伝子のプロファイルと比較した結果、発現量が有意に異なっていた 2465 遺伝子のうち 2274 遺伝子が抵抗性個体で高発現しており、うち 4 種類は ABC トランスポーター遺伝子であった。この結果から、ネズミムギのグリホサート抵抗性静岡集団のグリホサート抵抗性には、液胞隔離が関与している可能性が示唆された。

<オヒシバ> 岡山集団、沖縄集団ともに、グリホサートの植物体内への吸収・移行量に差異が認められず、グリホサートの代謝産物である AMPA も認められなかった。これら 2 集団の抵抗性機構は、これまで報告されていない機構である可能性が考えられる。

<ヒメムカシヨモギ及びオオアレチノギク> 非作用点抵抗性の機構解明に至らなかった。

<引用文献>

Cha T. S., M. G. Najihah, I. B. Sahid and T. S. Chuah 2014. Molecular basis for resistance to ACCase-inhibiting fluzafop in *Eleusine indica* from Malaysia. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 111: 7-13.

Niinomi Y., M. Ikeda, M. Yamashita, Y. Ishida, M. Asai, Y. Shimono, T. Tominaga and H. Sawada 2014. Glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) on rice paddy levees in Japan. Weed Biology and Management 13: 31-38.

富永 達、2015、雑草の除草剤抵抗性-そのメカニズムと生活史特性-、日本農薬学会誌、40、240-242.

Zheng D., G. R. Kruger, S. Singh, V. M. Davis, P. J. Tranel, S. C. Weller and W. G. Johnson 2011. Cross-resistance of horseweed (*Conyza canadensis*) populations with three different ALS mutations. Pest Management Science 67: 1486-1492.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kohei Kurata, Yuki Niinomi, Yoshiko Shimono, Masahiro Miyashita and Tohru Tominaga, Non-target-site mechanism of glyphosate resistance in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). Weed Biology and Management, 査読あり, 18 巻, 2018, 127-135.

DOI:10.1111/wbm.12156.

Tohru Tominaga and Shunji Kurokawa, Research issues, challenges, and opportunities for weed management in Japan. Crop Protection, 査読あり, 2018.

DOI:10.1016/j.cropro.2018.02.002.

〔学会発表〕(計 4 件)

倉田康平、下野嘉子、岩上哲史、宮下正弘、富永達、グリホサート抵抗性ネズミムギの非作用点抵抗性機構、日本雑草学会、2018

Kohei Kurata, Yoshiko Shimono, Satoshi Iwakami, Masahiro Miyashita, Tohru Tominaga, Non-target site resistance to glyphosate in *Lolium multiflorum* in Japan, Asian-Pacific Weed Science Society, 2017

Kohei Kurata, Yuki Niinomi, Yoshiko Shimono, Masahiro Miyashita, Tohru Tominaga, Mechanism of glyphosate resistance of *Lolium multiflorum* in Japan. Global Herbicide Resistance Challenge, 2017

倉田康平、永井絵理、下野嘉子、岩上哲史、富永達、日本におけるグリホサート抵抗性雑草の出現とそれらの抵抗性機構、日本雑草学会、2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等 : <http://www.weed.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。