

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292013

研究課題名(和文) 雑草に除草剤抵抗性を付与する一塩基多型の維持機構に関する雑草防除学的研究

研究課題名(英文) Mechanism of the maintenance of single nucleotide polymorphism endowing resistance to herbicide in weeds

研究代表者

富永 達 (TOMINAGA, Tohru)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10135551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,700,000円

研究成果の概要(和文)：雑草の除草剤抵抗性獲得機構の一つに、当該除草剤のターゲット酵素におけるアミノ酸置換に因るものがある。本研究では、麦作雑草のスズメノテッポウにおけるSU剤抵抗性の一塩基置換の多型を明らかにした。調査対象の北九州集団では、Pro197部位あるいはTrp574部位に抵抗性を付与するとみられる8種類の一塩基置換が認められた。抵抗性の程度は、ALS1Thr197およびALS1Leu574型が最も高く、ALS1Ser197、ALS2Ser197、ALS1Ala197およびALS1His197型は中程度で、ALS1Leu197およびALS2Leu197型は最も低かった。

研究成果の概要(英文)：Herbicide resistance in weeds is due to changes in target enzyme. In this research, single nucleotide polymorphisms in sulfonylurea herbicide resistant *Alopecurus aequalis* populations in north Kyushu, Japan were clarified. Eight single nucleotide substitutions were found in Pro197 and Trp574 in the ALS enzyme. The level of resistance to SU herbicide was the highest in ALS1Thr197 and ALS1Leu574 biotypes, middle in ALS1Ser197, ALS2Ser197, ALS1Ala197 and ALS1His197 biotypes, and the lowest in ALS1Leu197 and ALS2Leu197 biotypes.

研究分野：雑草生態学

キーワード：除草剤抵抗性 一塩基多型

1. 研究開始当初の背景

作物の栽培において雑草防除は重要な位置を占めている。除草剤の使用によって除草に要する労力や経費が大幅に削減されたが、同一系統の除草剤の連用によって、各地で除草剤抵抗性雑草の顕在化が報告され、持続的・安定的な作物生産にとって除草剤抵抗性雑草への対策が喫緊の課題となっている。

アセト乳酸合成酵素 (ALS) 阻害剤の一種スルホニルウレア系除草剤 (SU 剤) は、哺乳動物に対する安全性が高く、少量で多くの雑草に有効であるなどの優れた特性をもつため、日本の水田や畑地で広く使用されている。しかし、九州北部の麦作地帯では、2000 年代初め頃からこの SU 剤に対して抵抗性を示すスズメノテッポウ (イネ科越年草、*Alopecurus aequalis* Sobol. var. *amurensis* (Kom.) Ohwi) が顕在化し、コムギやオオムギと競合するため大きな問題となっている (大段ら 2014)。2012 年には九州沖縄農業研究センターを中心として、この SU 剤抵抗性スズメノテッポウに対する総合防除マニュアルが公表され (九州沖縄農業研究センター 2012)、その成果が期待されているが、この抵抗性スズメノテッポウの発生圃場は拡大の一途をたどっている。

雑草の除草剤抵抗性は、除草剤の標的酵素の立体構造の変化や吸収・移行阻害、解毒など様々な機構で獲得される。雑草の SU 剤抵抗性では、ALS の立体構造の変化をもたらすアミノ酸変異 (一塩基置換) により獲得されるケースが多い。さらに、一塩基置換の部位あるいは置換塩基の種類によって抵抗性の程度が数倍~60 倍程度にまで著しく異なること (Saari et al. 1994) やそれらが複数の除草剤に抵抗性を示す交叉抵抗性の有無に参与していることが報告されている (Tranel and Wright 2002, Yu et al. 2008)。また、一塩基置換の部位あるいは置換塩基の種類によって次世代に残す子孫の数で評価される適応度が大きく異なることが報告されている (Tranel and Wright 2002)。除草剤による防除に直接かかわる当該除草剤に対する抵抗性の程度や交叉抵抗性の有無を明らかにすることおよび翌年度の発生数に直接かかわる適応度を明らかにすることは除草剤抵抗性雑草の防除対策を講じる際に必須の情報であり、これらを規定する塩基置換の種類を特定することは防除上極めて重要である。

2. 研究の目的

上述の九州北部の麦作地帯で顕在化した抵抗性スズメノテッポウの ALS における塩基置換の有無と置換塩基の種類を一部の個体を用いて予備的に調査した結果、ALS に塩基置換が存在し、その塩基置換が同一パターンではなく複数パターン存在することが明らかになった。一般に、除草剤の使用によって 90~95% の個体が枯死し、ボトルネックと遺

传的浮動によって集団の遺伝的多様性は失われる。このため、過去に同一圃場内で一塩基多型が認められた雑草の例は、オーストラリアにおける自家不和合で完全他殖するポウムギ (イネ科、*Lolium rigidum* Gaud.) の例 (Yu et al. 2008) があるだけで、同一圃場内に一塩基多型が存在するのは極めて特異な例である。この結果から、抵抗性雑草に対する防除対策が、地域によって必ずしも有効に機能していない一因として、同一圃場内に一塩基多型が存在することによって抵抗性の程度が著しく異なる個体が混在していることが考えられる。それ故、一塩基多型の維持機構の解明が合理的な防除対策の策定に必須である。しかし、ポウムギの一塩基多型を報告した先述のオーストラリアの研究グループはこの観点に立った一塩基多型の維持機構に関する研究を現時点では行っておらず、本研究が最初の研究となる。

野生植物と異なり、雑草の一塩基多型の維持機構を明らかにするためには、集団遺伝学的手法だけでなく、栽培学的手法や雑草学的手法が不可欠である。本研究では、九州北部で顕在化した SU 剤抵抗性スズメノテッポウの同一圃場内に存在する一塩基多型の実態をまず明らかにし、それが維持されているメカニズムを、各変異型の抵抗性の程度や適応度などを明らかにすることによって抵抗性スズメノテッポウに対する防除案を提示する。

3. 研究の方法

(1) 現地麦畑における SU 剤抵抗性スズメノテッポウの出現状況実態調査と抵抗性個体の採集

SU 剤抵抗性スズメノテッポウが出現している九州北部の麦畑において、実態調査と除草剤の使用状況などに関する調査を行った。SU 剤抵抗性スズメノテッポウの地理的分布状況をもとに分布の中心部から周辺部に向かって、24 圃場において抵抗性個体を個体識別して 1 圃場あたり 30 個体採集した。

採集した個体は、1/5000 アールワグナーポットに移植し、京都大学農学研究科附属農場の実験圃場で育成し、下記 (2) の SU 剤抵抗性をもたらす一塩基置換の部位および置換塩基を特定する実験に用いた。なお、抵抗性遺伝子の周辺への拡散を防止するため、以降の実験に用いるための種子を確保するための穂だけを残し、不必要な穂はすべて出穂前に切除した。種子確保用の穂には袋掛けし、花粉の飛散を防いだ。

(2) SU 剤抵抗性をもたらしている一塩基置換の部位、置換塩基の特定

採集した個体から DNA を抽出し、特定の塩基配列を認識する制限酵素を用いた CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) 法によって ALS における塩基置換の有無と置換塩基の種類を特定した。特定

した生物型を(1)の現地調査で作成した出現状況地図に反映させ、この抵抗性の起源や分布拡大パターンを考察した。

(3) 異なる塩基置換をもつ SU 剤抵抗性個体の適応度の評価

適応度の評価

前述(1)の現地調査において個体識別して採集した個体を京都大学農学研究科附属農場でポット栽培し、出穂した個体から採種した。採種した種子を、畑土壌を詰めた1/5000 アールワグナーポットに播き、育成した。抵抗性個体には、予備実験の結果、複数の異なる一塩基置換のパターンが認められたため、育成した個体の葉の一部から DNA を抽出し、CAPS 法によって個体ごとに塩基置換部位と置換塩基の種類を特定した。種子が成熟した段階で、植物体を収穫し、草丈、分株数、穂数、種子生産量および乾物生産量を測定し、塩基置換が異なる生物型ごとに適応度を評価した。

(4) 抵抗性の程度の検定

一塩基置換の部位あるいは置換塩基が異なると SU 剤に対する抵抗性の程度が異なること (Saari et al. 1994) や交叉抵抗性の有無にかかわっていること (Tranel and Wright 2002, Yu et al. 2008) が他種で報告されている。防除計画の策定には、抵抗性の程度と交叉抵抗性の有無を確定することが不可欠であるため、前述(1)の現地調査で採集した個体から採種した。この種子を用いて SU 剤に対する抵抗性の程度を検定した。供試個体の一塩基置換の部位および置換塩基の種類は、葉の一部から DNA を抽出し、CAPS 法により確定した。異なる塩基置換をもつ個体ごとに、発根法によって SU 剤を標準濃度、2 倍濃度、3 倍濃度、5 倍濃度・・・で処理し、抵抗性の程度を検定した。対照として感受性個体を用いた。

4. 研究成果

(1) 一塩基置換多型

調査した 24 集団のうち、立野、大木町 B、吉野ヶ里、袋井、近江八幡、八幡の 6 集団では抵抗性を付与する塩基置換は確認されなかった。残りの 18 集団では Pro197 部位 (CCC) に抵抗性を付与する一塩基置換が確認された。また、Trp574 部位 (TGG) に塩基置換が確認されたのは大木町 A、三瀧 A、B、浮羽、本庄の 5 集団で、すべて ALS1 において Trp から Leu (TTG) への変異であった。集団内に 1 種類の塩基置換だけが確認された集団は、御船 (ALS1 の Pro197 部位において、Pro から Leu (CTC)) および鳥栖 A (Pro から His (CAC)) で、鳥栖 A の個体は Pro/His のヘテロであった。この 2 集団以外の 16 集団では集団内に複数の異なる塩基置換が確認された。また、鳥栖 B、千代田、七城および小山の 4 集団では、ALS1 の Pro197 部位において、

その集団にだけ特異的に存在する変異があり、それぞれ Pro から Leu、Phe、Arg および Asn への変異であった。このうち、鳥栖 B、千代田および小山の 3 集団における集団特異的な変異は 2 塩基の置換によるものであり、Pro から Leu (CTT)、Phe (TTC) および Asn (AAC) への塩基置換であった。それぞれで確認された個体数は 2、1、24 個体であった。

抵抗性を付与する塩基置換をホモでもつ個体が多かったが、ヘテロでもつ個体が存在する集団が田主丸 B、三瀧 E、御船、小山以外の 14 集団で認められ、その個体数はそれぞれの集団で 1~3 個体であった。このことから、スズメノテッポウは自殖だけでなく、一部個体は他殖も行っていることが推定される。また、地理的に近い圃場 (田主丸 A、B および三瀧 A~E) では一塩基置換のパターンが類似していたことから、近隣の圃場間で花粉や種子の移動により抵抗性遺伝子が拡散している可能性が示唆された。

(2) 抵抗性個体の適応度と抵抗性の程度

除草剤無処理下において適応度を評価した結果、感受性型と 3 抵抗性遺伝子型の間には有意な差異は認められなかった。この結果は、ALS 阻害剤抵抗性型の適応度に関する多くの報告と一致した。

ALS 遺伝子のダイレクトシーケンスにより、供試した抵抗性 5 集団から合計 8 種類の Pro197 部位あるいは Trp574 部位に抵抗性を付与するとみられる一塩基置換 (ALS1Thr197 (ALS1 の Pro197 部位が Thr に変異、以下同様)、ALS1Leu574、ALS1Ser197、ALS2Ser197、ALS1Ala197、ALS1His197、ALS1Leu197 および ALS2Leu197) が特定された。一般化線形モデルを用いた解析の結果、総根長、平均根長および最長根長について評価した抵抗性の程度は、ALS1Thr197 および ALS1Leu574 生物型が高程度の、ALS1Ser197、ALS2Ser197、ALS1Ala197 および ALS1His197 生物型が中程度の、ALS1Leu197 および ALS2Leu197 生物型が低程度の抵抗性で、アミノ酸置換の違いが SU 剤に対する抵抗性の程度に影響を与えていることが示された。また、ALS1 と 2 の間では、アミノ酸置換が同じであれば SU 剤に対する抵抗性は同程度であった。多型がみられた全ての集団において抵抗性の程度に差がある生物型が混在しており、集団内多型の維持には、抵抗性の程度の差異だけでなく、適応度およびそれぞれの変異の出現頻度など、複数の要因が関係していることが示唆された。

<引用文献>

大段 秀記・住吉 正・小荒井 晃、九州北部のムギ圃における除草剤抵抗性スズメノテッポウの発生実態と各種除草剤に対する反応、雑草研究、59 巻、2014、157-166

Saari, L. L., J. C. Cotterman, and D. C. Thill. Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. In *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*, (S. B. Powles and J. A. M. Holtum, Eds.). Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1994, pp. 83-139.

Tranel P. J. and T. R. Wright, Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Science* 50, 2002, 700-712

Yu Q., H. Han and S. B. Powles, Mutations of the ALS gene endowing resistance to ALS inhibiting herbicides in *Lolium rigidum* populations. *Pest management science* 64, 2008, 1229-1236

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

富永 達、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、査読無、40 巻、2015、240-242

富永 達、雑草における農業生態型の分化、植調、査読無、49 巻、2015、4-7

〔学会発表〕(計 3 件)

清久達裕・眞鍋陽平・大段秀記・下野嘉子・富永達、九州北部で出現したスルホニルウレア系除草剤抵抗性スズメノテッポウにおける ALS 遺伝子の集団内多型、日本雑草学会第 54 回大会、2015 年 4 月 18 日、秋田県立大学 (秋田県秋田市)

眞鍋陽平・大段秀記・下野嘉子・富永達、九州北部のスルホニルウレア系除草剤抵抗性スズメノテッポウの作用点変異と抵抗性の程度。日本雑草学会第 54 回大会、2015 年 4 月 18 日、秋田県立大学 (秋田県秋田市)

T. Kiyoku, Y. Shimono, H. Ohdan and T. Tominaga, Single nucleotide polymorphisms in sulfonylurea herbicide resistant *Alopecurus aequalis* populations in Japan. The 7th International Meeting on Pesticide Resistance. 16 September, 2015, Harpenden (UK)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.weed.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

富永 達 (TOMINAGA, Tohru)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：1 0 1 3 5 5 5 1

(2)研究分担者

大段 秀記 (OHDAN, Hideki)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター水田作・園芸研究領域・主任研究員
研究者番号：7 0 3 4 3 9 7 8

(3)連携研究者

下野 嘉子 (SHIMONO, Yoshiko)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：4 0 4 6 9 7 5 5