

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07322

研究課題名(和文) ヒユ属の種間交雑を介したグリホサート抵抗性形質の拡散リスク評価

研究課題名(英文) Diffusion risk of glyphosate resistant trait of *Amaranthus palmeri* through interspecific hybridizations

研究代表者

下野 綾子 (SHIMONO, Ayako)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：30401194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年グリホサート剤使用量の増大に伴い、グリホサート抵抗性(GR)雑草の進化が深刻な問題となっている。日本の主要な穀物輸入相手国であるUSAではGRオオホナガアオゲイトウが蔓延し問題になっていることから、本種が輸入穀物への混入を通じて日本に移入し拡散する可能性が考えられる。そこで本研究では以下を明らかにした。1)日本の主要港湾において14港中3港でGRオオホナガアオゲイトウの定着を確認した。2)ヒユ属は種間交雑を行う可能性があることから、港湾周辺で生育しているヒユ属雑草の遺伝解析を行ったが、交雑は検出されなかった。3)GR個体の拡散可能性を評価するために、抵抗性形質の後代への遺伝を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The intensive use of herbicide glyphosate has resulted in the evolution of herbicide-resistance in several problematic weeds. One of the most problematic weeds is *Amaranthus palmeri*, which occurs in several states of USA. The USA is the largest import counterpart of crops in Japan and *A. palmeri* would be inevitably introduced to Japan as contaminants in imported grain commodity. This study were to elucidate (i) glyphosate resistant *A. palmeri* was established in three major grain-importing ports, (ii) interspecific hybridizations between *A. palmeri* and other congeneric species were not detected in this study, and (iii) glyphosate resistant trait was inherited to progeny.

研究分野：植物生態学

キーワード：除草剤抵抗性 グリホサート オオホナガアオゲイトウ 外来種 非意図的導入

## 1. 研究開始当初の背景

世界で商業栽培される遺伝子組換え作物の面積は増加の一途をたどっており、2016年には約1億8500万ha(日本の国土面積の約4.5倍)に達した(James, 2016)。主要な導入形質の1つは除草剤耐性であり、最も普及している除草剤耐性が、非選択性茎葉処理除草剤グリホサートに対する耐性である。

近年、このグリホサート剤使用量の増大に伴い、グリホサート抵抗性雑草の進化が深刻な問題となっている。世界一の遺伝子組換え作物栽培国であるUSAでは、グリホサート耐性オオホナガアオゲイトウ(*Amaranthus palmeri*: ヒユ科ヒユ属)の蔓延が、作物の収量低下を引き起こし、農家に大きな損失を与えている(Thompson 2012)。特にUSA南部では、オオホナガアオゲイトウは1990年代まで問題雑草として取り上げられることは無かったが、2016年にはダイズやワタ畑などの有害雑草ワースト1にリストアップされた(Van Wychen 2016)。

雑草種子の主要な侵入ルートとして、海外からの輸入穀物への混入による非意図的輸入がある。これまでも海外から日本に輸入される穀物には、多くの雑草種子が混入しており(浅井ら 2007)、その中には除草剤抵抗性個体も含まれていることが報告されている(Shimono et al. 2010)。さらに申請者らは日本の主要穀物輸入港湾において、輸送中のこぼれ種由来と考えられる抵抗性雑草が生育していることを明らかにした(Shimono et al. 2014)。USAは日本の主要な穀物輸入相手国であり、現在USAで問題となっているグリホサート耐性オオホナガアオゲイトウは、輸入穀物への混入を通じて日本に移入している可能性が高い。

オオホナガアオゲイトウは北アメリカ原産の1年草で、日本には1930年代に渡来し本州から九州に広がったとされている。現状の分布は他のヒユ属外来種と比較してやや稀で、国内のオオホナガアオゲイトウの研究例は皆無である。しかし、USAで近年有害雑草として急速に蔓延した事実を考慮すると、今後輸入穀物への混入を通じて日本への移入量が増え、分布を拡大する可能性が高い。また、港湾周辺ですでに繁茂しているヒユ属雑草との交雑を介し、除草剤抵抗性遺伝子が拡散する可能性が考えられる。実際にオオホナガアオゲイトウのグリホサート抵抗性形質が、種間交雑によって雑種後代に遺伝することが実験的に確認されている(Gaines et al. 2012)。日本では港湾に限らず路傍や畑地の至る所に多くのヒユ属雑草が繁茂していることから、早急にオオホナガアオゲイトウの定着状況を把握し、種間交雑を介した除草剤抵抗性形質の拡散可能性を明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究ではオオホナガアオゲイトウのグ

リホサート剤抵抗性形質の拡散リスクを評価することを目的とし、以下を明らかにする。

1) 日本の主要港湾におけるヒユ属雑草およびグリホサート耐性オオホナガアオゲイトウの定着状況を明らかにする。

2) 交雑を介した拡散可能性を評価するために、港湾周辺で生育しているヒユ属雑草(主にホナガイヌビユ、ホソアオゲイトウ、ハリビユ)との交雑可能性を明らかにする。

3) 抵抗性個体の拡散可能性を評価するために、抵抗性個体の種子の発芽率や抵抗性形質の後代への遺伝を明らかにする。

## 3. 研究の方法

1) 日本の主要港湾におけるオオホナガアオゲイトウのグリホサート抵抗性個体の分布状況を調査した。グリホサートが阻害するのはアミノ酸合成に関わる5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)である。オオホナガアオゲイトウのグリホサート抵抗性獲得は、EPSPS遺伝子の増幅によることが知られている(Gaines et al. 2010)。従ってEPSPS遺伝子のコピー数をリアルタイムPCRで解析した。コントロールは既往研究(Gaines et al. 2010)に倣ってALS遺伝子を用いた。加えて、2017年度に抵抗性個体の増幅領域は300Kbに及び、EPSPS遺伝子以外にも様々な遺伝子が含まれていること、染色体外DNAとして存在していることが報告された(Molin et al. 2017, Dal-Hoe et al. 2018)。従ってEPSPS遺伝子以外の増幅領域の有無をPCRによって評価した。

2) 港湾に分布するヒユ属植物を調査し、葉緑体および核の遺伝マーカーを用いて遺伝解析を行い、オオホナガアオゲイトウとの交配が生じている可能性を評価した。葉緑体DNA(trnT(UGU)~trnL(UAA))をシーケンスシフトプロタイプを決定した。マイクロサテライトマーカー4座(Mallory et al. 2008)の遺伝子型を決定し、Structure解析(連鎖不平衡およびHardy-Weinberg不平衡が最小となるようにベイズ推定によりクラスターに分割)を行った。

3) 温室において交雑後代の適応度(生残および種子生産)を明らかにし、交雑によるEPSPS遺伝子の拡散可能性を検討した。抵抗性個体および感受性個体それぞれ7個体の種子50種子を20-30℃の12時間交代温度で培養し、発芽種子数を計測した。育成した後代からRNAを抽出し、EPSPS遺伝子の発現量をリアルタイムPCRで解析した。

## 4. 研究成果

1) 日本の主要港湾14港においてオオホナガアオゲイトウの分布調査を行ったところ、5状港で生育が確認され、そのうち3港で抵抗性個体が検出された(図1)。

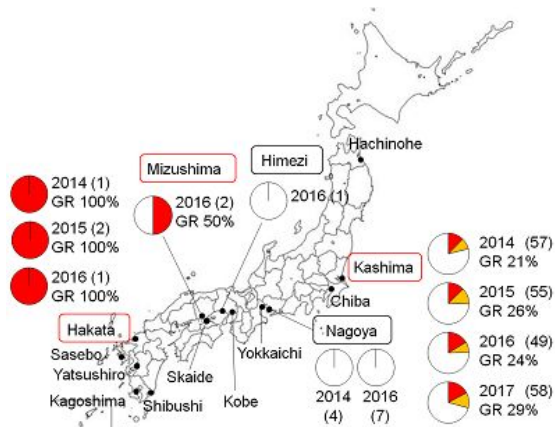


図 1. オオホナガアオゲイトウのグリホサート抵抗性個体の定着状況。( )の数字は解析個体数を示す。

- EPSPS 増幅が検出され増幅領域を保有
- EPSPS 増幅が検出されず増幅領域を保有

EPSPS 遺伝子の増幅による抵抗性の判定 (12~17%) に比べて、増幅領域の有無による判定では、抵抗性個体の割合は 21~29% と高く推定された。この領域には転移因子が数多く含まれていることから、EPSPS 遺伝子の増幅数が少ないとしてもこの領域を有する個体は、何等かのストレスにより迅速にコピー数が増加する可能性がある。抵抗性個体が数多く確認されている鹿島港においては、わずかであるが増加傾向が認められた。

2) 調査した港湾において、オオホナガアオゲイトウと同所的に生育していたのはホソアオゲイトウ (*A. hybridus*)、ホナガイヌビユ (*A. viridis*) であった。その他のオオホナガが見られなかった場所に、ハリビユ (*A. spinosus*)、イガホビユ (*A. powellii*)、アオゲイトウ (*A. retroflexus*)、イヌビユ (*A. blitum*) が生育していた。これらのヒユ属の葉緑体 DNA (tmT(UGU)~tmL(UAA)) の配列を解析したところ、11 パフトタイプが検出され、ハリビユとホソアオゲイトウで同じハプロタイプを有する個体が検出されたが、オオホナガアオゲイトウと同じハプロタイプを有する他種は検出されなかった (図 2)。

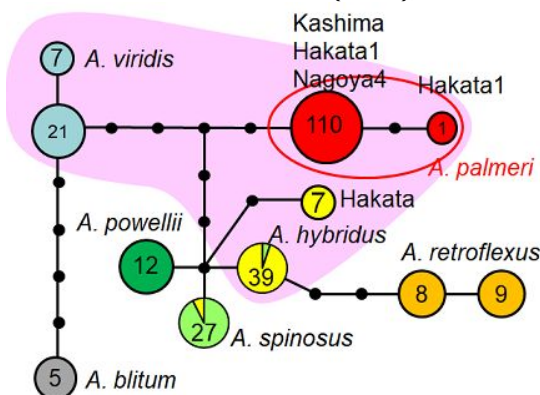


図 2. 港周辺に生育しているヒユ属の葉緑体 DNA のハプロタイプネットワーク図。円内の数字は解析個体数を示す。

オオホナガアオゲイトウとの交雑報告のあるハリビユおよびホソアオゲイトウを対象としマイクロサテライトマーカーを用いて Structure 解析を行った。基準クラスター数は K=2 が最適となり、オオホナガアオゲイトウはハリビユと同じクラスターに、ホソアオゲイトウは異なるクラスターに分類された。既往研究でもオオホナガアオゲイトウはホソアオゲイトウよりハリビユとの交雑親和性が高いことが報告されており (Gaines et al. 2012)、その結果を指示するものであった。現時点ではオオホナガアオゲイトウがハリビユと同所的に生育する地点は見られなかったが、今後オオホナガアオゲイトウがハリビユの生育地に拡大していかないか監視が必要であると考えられる。

3) 発芽実験を行ったところ、発芽率は抵抗性個体が 62%、感受性個体が 89% と抵抗性個体で低い傾向がみられたものの、個体によるバラつきが大きく有意な違いではなかった (図 3)。また抵抗性個体の後代はほとんどの個体で EPSPS 発現量が増加しており、抵抗性形質は後代に遺伝することが確認された。既往研究では遺伝子増幅が適応度に影響を与えないとする例、与えるとする例が報告されている。今後、抵抗性個体の存続性を考えるうえで遺伝子増幅が適応度に及ぼす影響をより詳細に明らかにしていく必要がある。

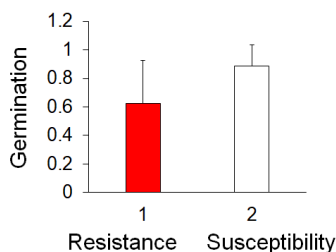


図 3. グリホサート抵抗性個体と感受性個体の種子の発芽率。

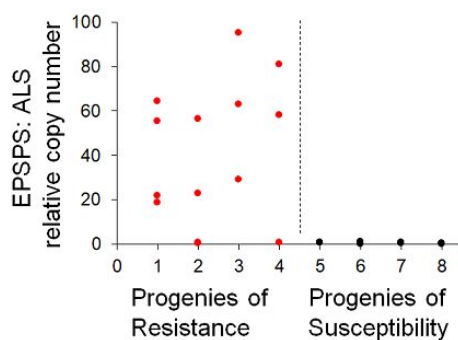


図 4. グリホサート抵抗性個体と感受性個体の後代の EPSPS 遺伝子発現量。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)  
〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Goto, H., Shimada, H., Horak, M., Ahmad, A., Baltazar, B., Perez, T., McPherson, M., Stojisin, D., Shimono, A. & Ohsawa, R. (2016) Characterization of natural and simulated herbivory on wild soybean (*Glycine soja* Seib. et Zucc.) for use in ecological risk assessment of insect protected soybean. PLOS ONE, journal.pone.0151237 (査読有)
2. Nakai, S., Hoshikawa, K., Shimono, A., & Ohsawa, R. (2015) Transportability of confined field trial data from cultivation to import countries for environmental risk assessment of genetically modified crops. *Transgenic Research*, DOI 10.1007/s11248-015-9892-6 (査読有)
3. Shimono Y., Shimono, A., Oguma, H., Konuma A., & Tominaga, T. (2015) Establishment of *Lolium* populations resistant to acetolactate synthase-inhibiting herbicide in and around grain-importation ports in Japan. *Weed research*, 55:101-111 (査読有)
4. 下野綾子 (2015) 遺伝子組換え植物の導入遺伝子の拡散リスクと多様性影響評価, 植調, 48 (12), 19-25 (査読無)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Shimono, A., Kanbe, H., Asai, M. Rapid establishment of *Amaranthus palmeri* resistant to glyphosate around grain-importation ports in Japan. The 8th EAFES (East Asian Federation of Ecological Societies) International Congress. Nagoya, Japan, April 2018
2. 下野綾子: 穀物とともに侵入する抵抗性雑草 - グリホサート抵抗性オオホナガアオゲイトウの拡散可能性 - . 日本雑草学会第 57 回大会, 東京農工大学府中キャンパス, 2018 年 4 月
3. 下野綾子, 神戸裕貴, 浅井元朗: 定着年代の異なるヒユ属外来雑草の遺伝変異の比較. 第 64 回日本生態学会大会, 早稲田大学早稲田キャンパス, 2017 年 3 月
4. 下野綾子・浅井元朗: グリホサート抵抗性ヒユ属外来雑草の侵入. 第 63 回日本生態学会, 仙台国際センター, 2016 年 3 月
5. Shimono, Y., Shimono, A., Oguma, H., Konuma, A. & Tominaga, T. Establishment of *Lolium* species resistant to acetolactate synthase-inhibiting herbicide at grain-importation ports in Japan. The 25th Asian Pacific Weed Science Society International Congress, PJTSAU/ANGRAU Auditorium, Hyderabad, India, October 2015

〔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:  
 出願年月日:  
 国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 取得年月日:  
 国内外の別:

〔その他〕  
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下野 綾子 (SHIMONO, Ayako)  
 東邦大学・理学部・講師  
 研究者番号: 30401194

(2) 研究分担者

浅井元朗 (ASAI, Motoaki)  
 農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター・グループ長  
 研究者番号: 40355524

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )