

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22658006

研究課題名（和文） 雑草の除草剤抵抗性獲得は遺伝子重複で促進されるか

研究課題名（英文） Does gene duplication enhance the evolution of herbicide resistance in weeds?

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：10135551

研究成果の概要（和文）：異質 4 倍体である水田一年生雑草のコナギとミズアオイにおけるアセト乳酸合成酵素阻害剤の一種であるスルホニルウレア系除草剤に対する抵抗性生物型をモデルとして、除草剤抵抗性の進化と遺伝子重複の関係を解き明かそうとした。コナギとミズアオイには、ともに複数コピーのアセト乳酸合成酵素遺伝子が存在し、抵抗性獲得にはこのうち少なくとも 2 遺伝子で抵抗性を付与する一塩基置換が同時に生じることが必要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The relationship between gene duplication and evolution of herbicide resistance in weeds was investigated using sulfonylurea herbicide, one of acetolactate synthase inhibiting herbicides, resistant *Monochoria vaginalis* and *M. korsakowii*. These two paddy weeds are allotetraploid. Both *M. vaginalis* and *M. korsakowii* have multiple acetolactate synthase genes and single nucleotide substitution at least two acetolactate synthase genes was necessary to confer sulfonylurea herbicide resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	510,000	3,710,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学、作物学・雑草学

キーワード：雑草科学、除草剤抵抗性、遺伝子重複

1. 研究開始当初の背景

雑草の除草剤抵抗性生物型の顕在化は、農業生産に重大な損失を与えている。農耕地には多くの雑草が生育しているが、すべての雑

草で抵抗性生物型が顕在化しているわけではない。

雑草の除草剤抵抗性の獲得には、当該除草剤が標的とする酵素の立体構造の変化をも

たらずアミノ酸置換、当該除草剤の解毒・代謝機能の向上あるいは当該除草剤の吸収・移行阻害などが関与していることが報告されている。このうち、アミノ酸置換による抵抗性獲得の報告がもっとも多い。

他方、雑草の除草剤抵抗性生物型は、感受性型と比較して種子生産量で評価される適応度が劣っていることが報告されている事例と適応度に差異がない事例が混在している。差異がない事例では、適応度の低下が遺伝子重複によって補償されている可能性も考えられる。

当該除草剤が標的とする酵素の立体構造の変化をもたらすアミノ酸置換による除草剤抵抗性の獲得は、当該遺伝子の一塩基置換によって生ずることから除草剤抵抗性の進化と遺伝子重複の関わりを考察するモデルとなると考えられる。

除草剤抵抗性の進化を予測できれば、抵抗性生物型が顕在化する前に予防的措置を講ずることが可能になるため、農業生産上意義があると考えられる。

2. 研究の目的

雑草には倍数性の種が多く存在することから、遺伝子重複も一般に認められると考えられる。農業生産に負の影響を与えている雑草の除草剤抵抗性生物型の防除法の確立や出現予測は重要である。このために、ともに異質4倍体である水田一年生雑草のコナギとミズアオイの、アセト乳酸合成酵素阻害剤の一種であるスルホニルウレア系除草剤に対する抵抗性生物型をモデルとして、除草剤抵抗性の進化と遺伝子重複の関係を解き明かそうとした。コナギは日本の水稲作における最重要害草であり、ミズアオイはコナギと同じ属に属する雑草である。また、スルホニルウレア剤は日本の水稲作において最も広く使用されている除草剤である。

3. 研究の方法

(1) 材料

京都府京丹後市由来のスルホニルウレア系除草剤抵抗性および精華町由来の感受性コナギを供試した。ミズアオイについては、宮城県石巻市および亘理町由来の抵抗性生物型ならびに福井市および静岡市由来の感受性生物型を供試した。

(2) スルホニルウレア系除草剤抵抗性検定試験

京都大学農学研究科附属農場において水田土壌を詰めた直径10 cmのプラスチックポットでコナギおよびミズアオイのそれぞれの系統を1ポットあたり10個体ずつ育成し、

標準施用量のスルホニルウレア系除草剤を処理し、抵抗性の有無を確認した。反復は3とした。

(3) アセト乳酸合成酵素遺伝子配列の解析
被子植物の公表されているアセト乳酸合成酵素遺伝子の塩基配列を参考にプライマーを設計し、PCRを行い、シーケンサーによって配列を解読した。

(4) スルホニルウレア系除草剤抵抗性をもたらす塩基置換の特定

アセト乳酸合成酵素遺伝子の Pro197 部位における塩基置換の有無を CAPS 法により確認した。さらに、塩基置換が確認されたアセト乳酸合成酵素遺伝子の置換塩基をシーケンサーを用いて明らかにした。

(5) アセト乳酸合成酵素遺伝子の発現量の解析

葉から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。また、標準施用量のスルホニルウレア系除草剤処理前、処理 3、6、12、24 時間後の発現量を RT-PCR によって調査した。

4. 研究成果

(1) スルホニルウレア系除草剤抵抗性検定試験

供試したコナギおよびミズアオイの感受性集団由来個体はすべて、標準施用量のスルホニルウレア系除草剤処理後、枯死した。一方、抵抗性集団由来個体はすべて、標準施用量のスルホニルウレア系除草剤処理後も枯死しなかった (図1)。

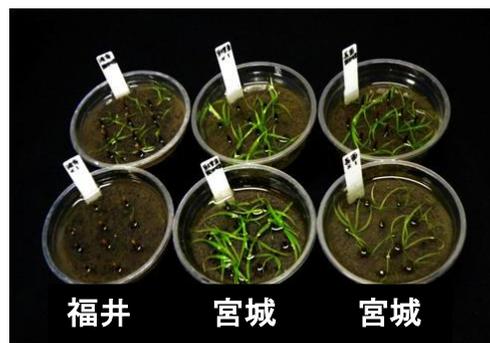


図1 スルホニルウレア系除草剤抵抗性検定試験の結果の一例

上段は無処理、下段はスルホニルウレア系除草剤処理、福井は感受性個体、宮城は抵抗性個体

(2) アセト乳酸合成酵素遺伝子配列の解析
被子植物の公表されているアセト乳酸合

成酵素遺伝子の塩基配列を参考にプライマーを設計し、PCRを行い、シーケンサーによって配列を解読した結果、コナギおよびミズアオイとも5つのアセト乳酸合成酵素遺伝子様配列を得た。

コナギでは、これらをそれぞれ *ALS1*、*ALS2*、*ALS3*、*ALS4* および *ALS5* とした。全長約 2kbp と推定される塩基配列のうち、約 1.7kbp を解読した。

ミズアオイでは、得られた5種類のアセト乳酸合成酵素遺伝子様配列のうち、2つでは、終止コドンの挿入があり、偽遺伝子であると推定された (図2)。

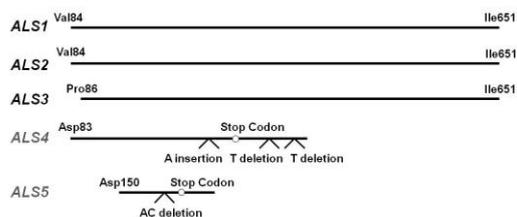


図2 ミズアオイのアセト乳酸合成酵素遺伝子解析結果

(3) スルホニルウレア系除草剤抵抗性をもたらす塩基置換の特定

アセト乳酸合成酵素遺伝子の Pro197 部位における塩基置換の有無を CAPS 法により確認し、塩基置換が確認されたアセト乳酸合成酵素遺伝子の置換塩基をシーケンサーを用いて明らかにしたところ、コナギについては、精華町由来の感受性個体では、Pro197 部位における塩基置換が認められなかったのに対し、京丹後市由来の抵抗性個体では、*ALS1* の Pro197 部位において CCT が TCT (Ser) に変異するとともに、*ALS5* の Pro197 部位においても CCT が CTT (Leu) に変異していた。

ミズアオイについては、福江市および静岡市由来の感受性個体では、*ALS2* の Pro197 部位において CCT が CTT (Leu) に変異していたが、*ALS1* および *ALS3* では塩基置換が確認されなかった。石巻市由来の抵抗性個体では、*ALS1* の Pro197 部位において CCT が TCT (Ser) に変異するとともに、*ALS2* の Pro197 部位においても CCT が CTT (Leu) に変異していた。また、亶理町由来の抵抗性個体では、*ALS2* の Pro197 部位において CCT が CTT (Leu) に変異するとともに、*ALS3* の Pro197 部位において CCT が GCT (Ala) に変異していた。

コナギと異なり、ミズアオイでは *ALS2* の Pro197 部位における CTT (Leu) への変異が感受性あるいは抵抗性にかかわらず、一般

的に認められるようである。

コナギとミズアオイが、スルホニルウレア系除草剤に対する抵抗性を獲得するには、少なくとも2遺伝子で抵抗性を付与する一塩基置換が同時に生じることが必要であることが推定された (表1)。

表1 アセト乳酸合成酵素遺伝子の Pro197 部位における塩基置換

植物	由来	生物型	アセト乳酸合成酵素遺伝子Pro197部位				
			<i>ALS1</i>	<i>ALS2</i>	<i>ALS3</i>	<i>ALS4</i>	<i>ALS5</i>
コナギ	精華町	感受性	CCT	CCT	CCT	CCT	CCT
	京丹後市	抵抗性	TCT	CCT	CCT	CCT	CTT
ミズアオイ	福江市	感受性	CCT	CCT	CCT		
	静岡市	感受性	CCT	CCT	CCT		
	石巻市	抵抗性	TCT	CTT	CCT		
	亶理町	抵抗性	CCT	CTT	GCT		

(4) アセト乳酸合成酵素遺伝子の発現量の解析

前述(3)の研究結果から、ミズアオイがスルホニルウレア系除草剤に対する抵抗性を獲得するには、抵抗性を付与することが他種で報告されている一塩基置換が1遺伝子で生じるだけでは不十分であることが推定された。このため、ミズアオイの感受性および抵抗性個体の葉から RNA を抽出し、RT-PCR を行った結果、両者で *ALS2* の発現が認められた。また、標準施用量のスルホニルウレア系除草剤処理前、処理 3、6、12、24 時間後の発現量の推移を RT-PCR によって調査した結果、いずれのサンプリング時においても *ALS2* の発現が認められた (図3)。



図3 スルホニルウレア系除草剤処理後の *ALS2* 発現量の推移

これらの結果から、コナギとミズアオイには、ともに複数コピーのアセト乳酸合成酵素遺伝子が存在し、除草剤抵抗性獲得には少なくとも2遺伝子で抵抗性を付与する一塩基置換が必要であり、複数コピーがともに機能している可能性があることを明らかにした。

本研究の成果は、水田雑草において当該除草剤が標的とする酵素遺伝子について、抵抗性を付与する塩基置換が2遺伝子において同時に生じる必要性を示した最初の例で、除草剤抵抗性水田雑草の防除計画策定に寄与す

るものと考えられる。

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)

[学会発表] (計2件)

① Tohru Tominaga、Resistance to sulfonylurea herbicides in *Monochoria vaginalis*, a paddy weed、Global Herbicide Resistance Challenge、2013年2月18日～2013年2月22日、Esplanade Hotel, Perth, Australia

②伊藤達也、汪光熙、劉士平、小澤友理子、冨永達、ALS 遺伝子ファミリーの1遺伝子における変異でSU剤抵抗性が獲得されるか?、日本雑草学会第51回講演会、2012年4月5日、つくば市農林水産技術会議筑波事務所

[その他]

ホームページ等

①汪光熙、冨永達、スルホニルウレア系除草剤に対する抵抗性の獲得とALS 遺伝子ファミリー、日本学術会議・植物保護科学連合主催シンポジウム(招待講演)、2012年11月13日、東京都日本学術会議講堂

②冨永達、雑草の多様な繁殖戦略、日本雑草学会創立50周年記念シンポジウム(招待講演)、2011年9月4日、東京都浜離宮朝日ホール

6. 研究組織

(1) 研究代表者

冨永 達 (TOMINAGA TOHRU)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：10135551

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

汪 光熙 (Guang-Xi Wang)
名城大学・農学部・教授
研究者番号：30314248