

スルホニルウレア抵抗性イヌホタルイの ALS における作用点変異の多様性と交差抵抗性

住友化学株式会社 定 由直

はじめに

日本の水稲作においてスルホニルウレア系除草剤 (SU) 抵抗性雑草が問題となって久しい。1996 年のミズアオイでの報告以降、現在まで 19 種の水田雑草において SU 抵抗性が報告されている (内野 2014)。その中でも、重要雑草であるイヌホタルイ (*Schoenoplectus juncooides*) は、SU 抵抗性について遺伝子レベルの理解が進んでいる数少ない水田雑草の一つである。

特に近年の SU 抵抗性イヌホタルイに関する遺伝子研究から、SU 抵抗性イヌホタルイはアセト乳酸合成酵素 (acetolactate synthase: ALS) をコードする遺伝子において抵抗性を付与する突然変異 (作用点変異) をほぼ例外なく有すること、その作用点変異は多様であり発生頻度や付与する抵抗性プロファイル (交差抵抗性や抵抗性程度) が異なること、がわかってきた。

ここでは、SU 抵抗性イヌホタルイの ALS に見られる作用点変異の多様性とその発見頻度、および、変異が与える抵抗性プロファイルについて、筆者らのグループがこれまでに明らかにした知見を、他の研究事例も引用しつつ紹介したい。

ALS 阻害剤と日本の水稲作におけるイヌホタルイ防除

アセト乳酸合成酵素 (ALS) は、バリン、ロイシン、イソロイシンといった分岐鎖アミノ酸の生合成経路における第 1 段階を阻害する。ALS が阻害されると植物がこれらアミノ酸を生合成できず枯死に至る。ALS を阻害する除草剤 (ALS 阻害剤) として、化学種ごとに分類した、スルホニルウレア系除草剤 (SU)、イミダゾリノン系除草剤 (IMI)、ピリミジニル (チオ) ベンゾエー

ト系除草剤 (PTB)、トリアゾロピリミジン系除草剤 (TP) などが知られる (Tranel and Wright 2002)。

日本の水稲作では、1987 年のベンスルフロンメチルの登録以降、一発処理剤が普及し、その後ピラゾスルフロンエチルやイマゾスルフロンなども投入され、これらを含む SU の処理面積の合計は水稲の作付面積にほぼ匹敵するまでとなった (竹下 2004)。日本の水稲作では IMI は使用されない。また一発処理剤の成分として PTB に属するヒエ剤が複数あるが、イヌホタルイ防除用とは見なされない。それとは別に PTB に属する茎葉処理剤があり、主として直播水稲用で使用されイヌホタルイも防除対象としているが、直播水稲の作付面積が小さいこともあり広く使用されるに至っていない。TP に属する中後期処理剤がありイヌホタルイ防除を対象としているが、比較的近年 (2005 年以降) の登録であり、また一発処理剤としては使用されていない。

以上のような状況下、広く一発処理剤として用いられる成分でイヌホタルイに有効な ALS 阻害剤は当初 SU のみであり、かつ一発処理剤中の ALS 阻害剤でない成分がイヌホタルイに有効でなかったことから、SU 抵抗性イヌホタルイが全国的に発生することとなったと想像される (内野 2006)。なお、プロモブチドやベンゾピシクロンといった、SU 抵抗性イヌホタルイにも効力を示す ALS 阻害剤ではない有効成分と、SU を混合した一発処理剤によって、近年急速に対策が取られている (内野 2006 ; Ikeda et al. 2011)。

イヌホタルイにおける ALS 遺伝子とその変異

イヌホタルイには、ゲノム中に ALS 遺伝子が二つ見出され (*ALS1* と *ALS2*)、SU 抵抗性イヌ

ホタルイからは、ALS1 または ALS2 のいずれか一方にアミノ酸変異が見出される (Uchino *et al.* 2007)。実際に、筆者らの検討においても、全国から採集した SU 抵抗性イヌホタルイにおいて、ALS1 または ALS2 の Pro₁₉₇ (アミノ酸番号はシロイヌナズナの ALS で標準化)、Asp₃₇₆、または Trp₅₇₄ 部位が、別のアミノ酸に変異している SU 抵抗性イヌホタルイを全国から多数発見している (Sada *et al.* 2012)。

内野ら (2006) も同様の調査をしており、表 -1 は、内野らと筆者らの報告を合計し、前記のような変異を有する ALS が、どのような頻度で発見されたかを、地点数によって示した。例えば、表 -1 では Pro₁₉₇Ser (197 番目のプロリンがセリンに置換しているという意味) を有する ALS1 が、全国の 16 地点から発見されたことを意味する。

ここで、イヌホタルイ以外の ALS 阻害剤抵抗性雑草において抵抗性変異が知られる ALS 上の箇所を図 -1 に簡単に示す。このように抵抗性雑草の ALS における変異箇所は 8 箇所知られるが、そのうち、Ala₁₂₂、Pro₁₉₇、Ala₂₀₅、Asp₃₇₆、

Trp₅₇₄、および Ser₆₅₃ の六つが、複数の雑草種でアミノ酸変異が報告されている主要な変異箇所である。その中で、一般に Ala₁₂₂、Ala₂₀₅、および Ser₆₅₃ におけるアミノ酸変異は IMI への抵抗性を与えるが SU 抵抗性を与えないか与えても弱く、一般に Pro₁₉₇ におけるアミノ酸変異は SU への抵抗性を与えるが IMI 抵抗性を与えないか与えても弱い。また、Asp₃₇₆ と Trp₅₇₄ におけるアミノ酸変異は SU と IMI を含む、ほぼすべての ALS 阻害剤に抵抗性を与える。また、これらのアミノ酸変異はわずかな例外を除いて 1 塩基置換によって得られている (Tranel and Wright 2002 ; Heap 2014)。

このようにしてみると (表 -1)、イヌホタルイにおいては SU 抵抗性を与える主要な三つの変異箇所のすべてにおいてアミノ酸変異が見出されている。加えて、Pro₁₉₇ においては SU 感受性系統の塩基配列 (ALS1 と ALS2 に共通し CCT) から 1 塩基置換で発生しうる 6 種すべてのアミノ酸変異が発見されている。さらに Asp₃₇₆ においては他の雑草種を通じて Asp₃₇₆Glu しか発見されておらず、Trp₅₇₄ においては Trp₅₇₄Leu が他

表 -1 SU 抵抗性イヌホタルイの ALS から発見されたアミノ酸変異と発見地点数 (内野ら (2006) および Sada *et al.* (2012) より作成)

アミノ酸変異	ALS1	ALS2	合計
Pro ₁₉₇ Ser	16	15	31
Pro ₁₉₇ Leu	7	6	13
Pro ₁₉₇ Thr	1	1	2
Pro ₁₉₇ Arg	2	1	3
Pro ₁₉₇ His	5	2	7
Pro ₁₉₇ Ala	3	2	5
Asp ₃₇₆ Glu	0	1	1
Trp ₅₇₄ Leu	0	4	4
合計	34	32	66

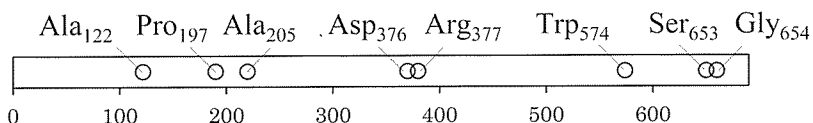


図 -1 ALS において ALS 阻害剤抵抗性変異が知られるアミノ酸部位 (Heap (2014) より作成) 数字はシロイヌナズナにおける N 末端からのアミノ酸数

の雑草種でも圧倒的に高頻度であること (Heap 2014) を踏まえれば、イヌホタルイで発見された ALS の変異は、様々な雑草種を総合して SU 抵抗性変異として知られる主要なものを、一つの雑草種ですべて網羅し、かつ、その一揃いが、ALS1 変異体と ALS2 変異体としてそれぞれ発見されていることになる (Asp₃₇₆Glu や Trp₅₇₄Leu を有する ALS1 は表 -1 のソースでは発見されていないが、近年報告事例がある (北川・大川 2014))。なお、前記のように日本の水稻作においては IMI が使用されないがために、Ala₁₂₂ や Ser₆₅₃ におけるアミノ酸変異が見出されないと考えらえる。

このように、多様な ALS 変異が網羅的に発見された雑草種は世界的にもほとんど類例がない。その点で、イヌホタルイは、SU 抵抗性雑草の様々な生理・生態的な特性を、アミノ酸変異間で、あるいは ALS1 変異体と ALS2 変異体の間で、網羅的に比較することができる稀有な実験材料と言える。例えば、アミノ酸変異の発見頻度と、それが与える抵抗性プロファイルについて SU 抵抗性イヌホタルイを用いて筆者らがなした考察を、以下に紹介する。

アミノ酸変異別の発見頻度

表 -1 に見るように、イヌホタルイの ALS に見られるアミノ酸変異は、いずれも 1 塩基置換で発生するにも関わらず、その発見頻度には大きな偏りが認められる。例えば、Pro₁₉₇Ser の頻度が最も高く、次いで Pro₁₉₇Leu の頻度が高い。この観察は、ALS にこれらを有すると報告された雑草種の数、Pro₁₉₇Ser において最多 (20 種) で次に Pro₁₉₇Leu が多い (11 種) 事実 (Heap 2014) とも相関して見える。なぜこのような偏りが発生するかは興味深いところであるが、要因を研究した事例が乏しく決まった説はない。

しかしながら、Pro₁₉₇Ser と Pro₁₉₇Leu は、すべての雑草種に共通し Pro₁₉₇ をコードする塩基配列 CCN が、それぞれ TCN と CTN へ変化しており (N は任意の塩基)、いずれも C が T へ変化する点で

共通である。塩基置換においては、トランジション置換 (C ⇄ T 置換と A ⇄ G 置換; Pro₁₉₇ であろうと前記二つのアミノ酸変異が相当) が、トランスバージョン置換 (C/T ⇄ A/G 置換; Pro₁₉₇ であろうと残る四つのアミノ酸変異が相当) よりも発生しやすいとされるため、これら二つのアミノ酸変異の高頻度は、そういった分子的易変性で部分的には説明がつくように思われる。ちなみに、すべての雑草種に共通し、Asp₃₇₆Glu と Trp₅₇₄Leu は、いずれも塩基のトランスバージョン置換を要するアミノ酸変異である。

一方、ALS1 と ALS2 には発見頻度に違いが認められない。ALS1 変異が発見された合計地点数と ALS2 変異が発見された合計地点数はほとんど同じであり、また、上記二つの高頻度変異と比較しても ALS1 と ALS2 における発見頻度は驚くほど似通っている。ALS1 と ALS2 の機能分化については研究事例がほとんどないが、このように発見頻度が均等であることと、次に見るように抵抗性プロファイルへの寄与においても明確な差異がないことは、ALS1 と ALS2 には機能面で大きな相違がないことを示唆するものであろう。

以上のような発見頻度は 2006 年までに採集されたイヌホタルイについてのまとめである。近年イヌホタルイを防除対象として、SU でない ALS 阻害剤が一発処理剤として投入され (Asakura *et al.* 2012)、今後頻度がどのように変化するのが注目される。

Pro₁₉₇ 変異体の抵抗性プロファイル

Pro₁₉₇ におけるアミノ酸変異が SU に抵抗性を付与するが IMI には抵抗性を付与しない (または弱い抵抗性を付与する) 事例をすでに述べた。しかしながら、Pro₁₉₇ 変異体に対して一部の SU が効果を示す事例に限られた雑草種で報告されている (Roux *et al.* 2005; Yu *et al.* 2003)。そこで筆者らは、以上に述べた様々な Pro₁₉₇ 変異型 SU 抵抗性イヌホタルイのコレクションを用いて、三つの SU (イマゾスルフロン、ベンズスルフロンメチル、メトスルフロンメチル) および一つの IMI

(イマザキン) について交差抵抗性を検討した (Sada *et al.* 2013a)。

表-2は、その結果を要約したものである。ここでは温室ポット試験で得られるED₉₀ (地上部乾物重で90%の生育抑制を得る薬量) に基づくR/S比において交差抵抗性を議論する。まずALS阻害剤の比較としては、すべての系統がイマゾスルフロンとベンスルフロンメチルに約20~約2000という大きなR/S比を示すのに対し、メトスルフロンメチルには3~16と格段に低いR/S比を示した。また、イマザキンに対するR/S比はすべての系統において0.6~2の範囲にあり、抵抗性はほとんど検出されなかった。メトスルフロンメチルとイマザキンに見られる現象は他の雑草種で断片的には知られていたことであるが、Pro₁₉₇部位に発生しうる6種のアミノ酸変異を網羅する形で一つの雑草種で定量的に示したのは、おそらくはイヌホタルイが初めてである。特に、メトスルフロンメチルの事例は、これらの「SU抵抗性」雑草がなおSUで防除できることを示唆するものである。

抵抗性プロファイルの比較の第1として、ALS1に同一のPro₁₉₇変異を有し産地の異なる2系統の比較を、四つのアミノ酸変異について実施

した。Pro₁₉₇Serでの比較(比較した二つの系統は約500km離れたところに産した)、Pro₁₉₇Leuでの比較(同約1,000km)、Pro₁₉₇Hisでの比較(同約2,000km)、およびPro₁₉₇Argでの比較(同約100km)をしたところ、各SUに対するR/S比は極めて近い値となり、それぞれのペアにおいて抵抗性プロファイルの差異がほとんど認められなかった(表-2)。すなわち、産地に関わらず(おそらくは別に起源を有するものであっても)、ALS遺伝子における変異のみによって、抵抗性プロファイルがほぼ決定されていることが示唆された。

次に、ALS1においてPro₁₉₇を置換するアミノ酸間でR/S比を比較したところ、アミノ酸が与えるR/S比の順位はSUごとにまったく相違することが判明した。例えば、イマゾスルフロンに対して最大と最小のR/S比を与えるのはそれぞれPro₁₉₇SerとPro₁₉₇Leu、ベンスルフロンメチルに対してはそれぞれPro₁₉₇AlaとPro₁₉₇Thr、メトスルフロンメチルに対してはそれぞれPro₁₉₇HisとPro₁₉₇Ser + Pro₁₉₇Leu + Pro₁₉₇Alaの群であった。このように「SUに対して高いR/S比を与える変異」というものは一般に存在せず、SUが違えば異なる(むしろ、あるSUには最大のR/S比

表-2 各種ALS阻害剤の各種SU抵抗性イヌホタルイに対するED90とそのR/S比 (Sada *et al.* 2013aより作成)

系統名	イヌホタルイ系統		イマゾスルフロン		ベンスルフロン メチル		メトスルフロン メチル		イマザキン	
	変異		ED ₉₀ (g AI ha ⁻¹)	R/S比	ED ₉₀ (g AI ha ⁻¹)	R/S比	ED ₉₀ (g AI ha ⁻¹)	R/S比	ED ₉₀ (g AI ha ⁻¹)	R/S比
	アミノ酸変異	場所								
<i>Kyo</i>	(感受性にて変異なし)		7.7	-	3.9	-	0.39	-	9.8	-
<i>Ich</i>	Pro ₁₉₇ Ser	ALS1	9545	1242	357	92	2.2	6	12.1	1.2
<i>Kiu</i>	Pro ₁₉₇ Ser	ALS1	13973	1818	331	86	1.8	5	10.8	1.1
<i>Mat</i>	Pro ₁₉₇ Leu	ALS1	239	31	191	49	1.8	5	7.5	0.8
<i>Tsu</i>	Pro ₁₉₇ Leu	ALS1	224	29	208	54	1.5	4	8.4	0.9
<i>Rit</i>	Pro ₁₉₇ Thr	ALS1	1050	137	<75	<19	2.6	7	6.3	0.6
<i>Ish</i>	Pro ₁₉₇ Arg	ALS1	4492	584	467	121	2.9	8	6.2	0.6
<i>Sug</i>	Pro ₁₉₇ Arg	ALS1	3224	419	397	103	4.9	13	19.5	2.0
<i>Iwa</i>	Pro ₁₉₇ His	ALS1	2961	385	330	85	5.3	14	10.0	1.0
<i>Aji</i>	Pro ₁₉₇ His	ALS1	3681	479	612	159	6.2	16	13.3	1.4
<i>Mit</i>	Pro ₁₉₇ Ala	ALS1	7817	1017	3502	908	1.7	4	13.8	1.4
<i>Sas</i>	Pro ₁₉₇ Ser	ALS2	4189	545	119	31	1.3	3	8.3	0.8
<i>Mih</i>	Pro ₁₉₇ Leu	ALS2	182	24	176	46	1.5	4	7.4	0.8
<i>Tok</i>	Pro ₁₉₇ Thr	ALS2	1907	248	130	34	4.5	11	9.7	1.0

を与えるものが別の SU には最小の R/S 比を与えることもある)ということが判明した。これは、Pro₁₉₇ 変異型 ALS への SU の結合様式が、SU という化学種の内部においても微妙に異なることを示唆している。同時に、何らかの抵抗性系統を発見した際、一つの SU を供試して抵抗性程度を調査し「SU にこの程度に抵抗性である (抵抗性でない) 系統・変異」などと一般化して結論する事例 (Tranel and Wright 2002) が危険であることを示している。

さらに ALS1 と ALS2 を三つのアミノ酸変異について比較した。Pro₁₉₇Leu を ALS2 に有する系統は同じアミノ酸変異を ALS1 に有する 2 系統と極めて似た抵抗性プロファイルを示した。Pro₁₉₇Ser を ALS2 に有する系統は、同じアミノ酸変異を ALS1 に有する 2 系統に比してやや小さい R/S 比 (三つの SU に共通して約 1/2~1/3 倍) を、Pro₁₉₇Thr を ALS2 に有する系統は同じアミノ酸変異を ALS1 に有する 1 系統に比してやや大きい R/S 比 (三つの SU に共通して約 2 倍) を示した。このように同じアミノ酸変異を ALS1 と ALS2 で比較した場合、ALS1 のみで比較した事例ほど確定した抵抗性プロファイルが得られることはなかったものの、ALS2 変異体に決まった方向へのシフトは見られず、概ね ALS1 変異体と似通ったものとなった。例えばアミノ酸が違うものを比較すると R/S 比に 100 倍程度の相違があることもあり、かつ前記のように相違が 3 つの SU で平行ということはない。筆者らの別の報告 (Yamato *et al.* 2013) では、Pro₁₉₇Ser 変異を ALS1 に有する系統と ALS2 に有する系統で比較して抵抗性程度にほとんど差異がない事例もあり、やはり概ね同等と判断される。ALS2 の抵抗性程度がやや不安定である要因としては、ALS2 変異体での供試事例が少ないのが難点であるものの、抵抗性程度が ALS1 変異体からシフトする際は複数の SU で平行であることから、ALS2 の遺伝子発現が ALS1 ほどは安定でないという仮説が考えられる。両遺伝子の遺伝子発現を直接研究した事例はなく、さらなる研究が待たれる。

おわりに

日本に発生する SU 抵抗性イヌホタルイについて基礎的な研究事例をレビューした。その結果判明した、変異の発見頻度 (Pro₁₉₇ 変異が高頻度である事実) や、交差抵抗性の知見 (一部の SU や他の ALS 阻害剤による防除可能性の示唆) は、実用上も重要と考えられる。実際、そのような SU や ALS 阻害剤が SU 抵抗性イヌホタルイを防除するために日本で開発・上市されている (Ikeda *et al.* 2011; Asakura *et al.* 2012)。また、作用点変異により抵抗性プロファイルがほぼ決定されるという知見も防除の上で重要であり、例えば作用点変異を簡便な方法 (Sada *et al.* 2013b) でモニタリングすれば、SU 抵抗性イヌホタルイ防除 (特に前記 ALS 阻害剤による防除) のための確たる指針として活用できると考えられる。

日本で SU 抵抗性が問題となる水田雑草で遺伝子的な理解が進んでいるものには、他にコナギやミズアオイ、オモダカがある。コナギとミズアオイ (*Monochoria* sp.) には、三つ以上の ALS 遺伝子が存在しその変異が与える抵抗性プロファイルは非常に複雑である (Imaizumi *et al.* 2008; 汪・富永 2012)。オモダカでは、作用点変異によらない SU 抵抗性が発見されている (Iwakami *et al.* 2014)。このように、作用点変異を特定すれば抵抗性プロファイルがシンプルに高い確度で予測できるイヌホタルイは、水田雑草においても珍しい存在であると言える。そういったイヌホタルイの特徴を踏まえ、ここで紹介した基礎的知見が SU 抵抗性イヌホタルイの防除の一助となれば幸いである。

引用文献

- Asakura S., M. Hiraoka, T. Sugimura, T. Yoshimura, M. Nakatani and R. Hanai 2012. Properties of controlled-release formulation of pyrimisulfan as a one-shot herbicide in a paddy field. *J. Pestic. Sci.* 37, 62-68.
- Heap, I. 2014. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. 2014.7.29 閲覧. <http://www.weedscience.org/Mutations/MutationDisplayAll.aspx>

- Ikeda H., S. Yamato, Y. Kajiwara, T. Nishiyama, T. Tabuchi and Y. Tanaka 2011. Evaluation of novel sulfonylurea derivatives with a fused heterocyclic moiety as paddy herbicides that control sulfonylurea-resistant weeds. *Weed Biol. Manag.* 11, 167-174.
- Imaizumi T., G-X. Wang and T. Tominaga 2008. Inheritance of sulfonylurea resistance in *Monochoria vaginalis*. *Weed Res.* 48, 448-454.
- Iwakami S., H. Watanabe, T. Miura, H. Matsumoto and A. Uchino 2014. Occurrence of sulfonylurea resistance in *Sagittaria trifolia*, a basal monocot species, based on target-site and non-target-site resistance. *Weed Biol. Manag.* 14, 43-49.
- 北川啓紘・大川茂範 2014. 宮城県の水稲作圃場における ALS 阻害剤差抵抗性イヌホタルイの発生実態. 雑草研究 59 (別), 39.
- Roux, F., A. Matejíček and X. Reboud 2005. Response of *Arabidopsis thaliana* to 22 ALS inhibitors: baseline toxicity and cross-resistance of *csr1-1* and *csr1-2* resistant mutants. *Weed Res.* 45, 220-227.
- Sada Y., S. Kizawa and H. Ikeda 2012. Varied occurrence of diverse sulfonylurea-resistant biotypes of *Schoenoplectus juncooides* (Roxb.) Palla in Japan, as classified by an acetolactate synthase gene mutation. *Weed Biol. Manag.* 12, 168-176.
- Sada Y., H. Ikeda and S. Kizawa 2013a. Resistance levels of sulfonylurea-resistant *Schoenoplectus juncooides* (Roxb.) Palla having various Pro197 mutations in acetolactate synthase to imazosulfuron, bensulfuron-methyl, metsulfuronmethyl and imazaquin-ammonium. *Weed Biol. Manag.* 13, 53-61.
- Sada Y., H. Ikeda and S. Kizawa 2013b. Rapid diagnosis of sulfonylurea-resistant *Schoenoplectus juncooides* (Roxb.) Palla using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and isogene-specific direct sequencing. *Weed Biol. Manag.* 13, 1-9.
- 竹下孝史 2004. わが国における除草剤使用の推移 1. 水稲用除草剤について. 雑草研究 49, 220-230.
- Tranel P.J. and T.R. Wright 2002. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: What have we learned? *Weed Sci.* 50, 700-712.
- 内野彰 2006. 日本の水田雑草における SU 抵抗性研究の現状について. 雑草と作物の制御 2, 2-14.
- 内野彰 2014. これまでに日本で除草剤抵抗性が報告されている雑草. 2014.7.29. 閲覧 <http://jhrwg.ac.affrc.go.jp/weeds.html>
- 内野彰・古原洋・吉田修一・大段秀記・芝池博幸 2006. イヌホタルイ集団におけるスルホニルウレア系除草剤抵抗性変異遺伝子頻度の推定. 雑草研究 51(別), 92-93.
- Uchino A., S. Ogata, H. Kohara, S. Yoshida, T. Yoshioka and H. Watanabe 2007. Molecular basis of diverse responses to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in sulfonylurea-resistant biotypes of *Schoenoplectus juncooides*. *Weed Biol. Manag.* 7, 89-96.
- Yu Q., X-Q. Zhang, A. Hashem, M.J. Walsh and S.B. Powles 2003. ALS gene proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. *Weed Sci.* 51, 831-838.
- Yamato S., Y. Sada and H. Ikeda 2013. Characterization of acetolactate synthase from sulfonylurea herbicide-resistant *Schoenoplectus juncooides*. *Weed Biol. Manag.* 13, 104-113.
- 汪光熙・富永達 2012. 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 —ミズアオイ属雑草を例に—. 日本学術会議公開シンポジウム「植物保護におけるゲノム科学の利用」資料, 11-14.