

アゼトウガラシ属水田雑草におけるスルホニルウレア系除草剤抵抗性バイオタイプとそのアセト乳酸合成酵素遺伝子の変異部位

東北農業研究センター水田利用部 雑草制御研究室 内野 彰

1. はじめに

スルホニルウレア系除草剤 (SU剤) は水稲用一発処理型除草剤の主成分として水田に広く使用される除草剤である。近年, この除草剤に対して抵抗性を持つ雑草のバイオタイプが数多く報告されている^{8,9)}。SU剤は海外でも畑作を中心に広く使用されており, 雑草の抵抗性バイオタイプの解析も進んでいる¹⁴⁾。SU剤はアセト乳酸合成酵素 (ALS) の活性を阻害する除草剤であり, 海外で報告されている抵抗性バイオタイプでは, このALSの変異によって抵抗性となっている場合が多い。SU剤抵抗性を引き起こすALS変異で最も多く報告されているのは, ALSのドメインAのプロリン部位における変異である^{1,3,5,6,19)}。このプロリンが別のアミノ酸に変わるとALSのSU剤に対する感受性が大きく低下し, SU剤に対して抵抗性を引き起こす^{7,13)}。この部位以外でも, 除草剤感受性を低下させる部位は幾つも報告されているが, SU剤抵抗性に関してはこのプロリン置換に関する報告が最も多くなっている。

日本でこれまでに見つかったSU剤抵抗性バイオタイプは, ミズアオイやイヌホタルイ, コナギなどで報告されているが⁹⁾, 中でもアゼトウガラシ (*Lindernia micrantha*), アゼナ (*L. procumbens*), アメリカアゼナ (*L. dubia* var. *major*), タケトアゼナ (*L. dubia* var. *dubia*) といったアゼトウガラシ属水田雑草は北日本を

中心に非常に広く見られている。これらのアゼトウガラシ属水田雑草の抵抗性バイオタイプでは, SU剤に対する感受性が数十分の1から数千分の1に低下しており, 非常に高いSU剤抵抗性がみられる^{10,17)}。また, これらのアゼトウガラシ属水田雑草からALSの遺伝子を部分的に単離し, ドメインAのプロリン部位を抵抗性バイオタイプと従来の感受性バイオタイプの間で比較したところ, 抵抗性バイオタイプでプロリン置換が起こっていることも判明した¹⁸⁾。本報告では, これらアゼトウガラシ属水田雑草のSU剤抵抗性バイオタイプの研究について紹介したい。

2. SU剤に対する感受性

一発処理型除草剤処理を行った後の水田でアゼトウガラシ属水田雑草が特異的に残るとい

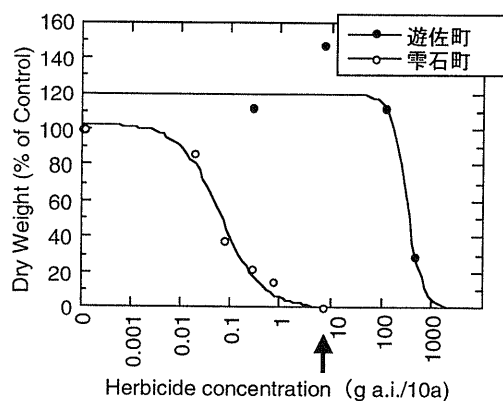


図-1 タケトアゼナのベンスルフロンメチルに対する反応 (ワグネルポット試験)¹⁷⁾
矢印は寒冷地での標準処理濃度を示す。

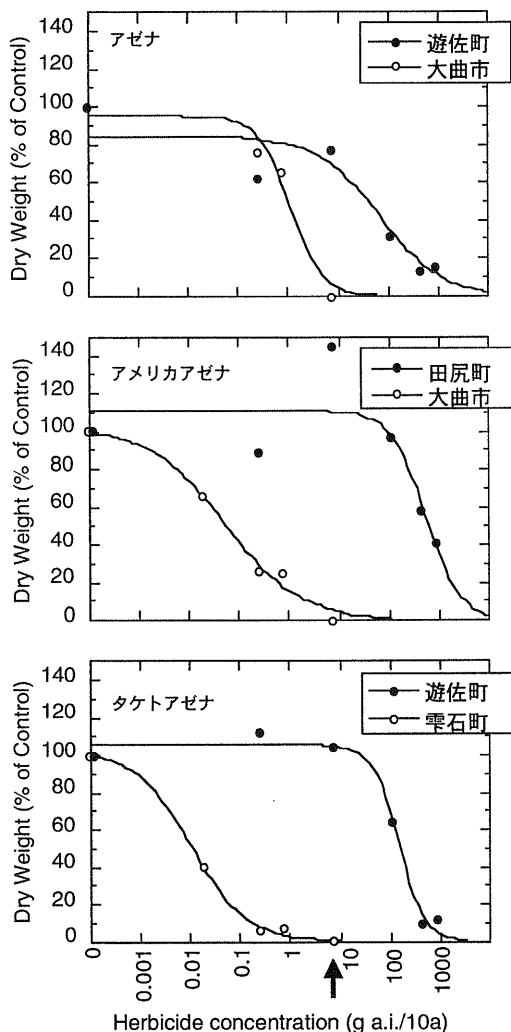


図-2 アゼトウガラシ属水田雑草のベンスルフロンメチルに対する反応 (9cm深型シャーレ試験)¹⁾
矢印は寒冷地での標準処理濃度を示す。

現象は、1995年頃から見られた。1996年の6月に山形県遊佐町で行った調査では、671筆(約250ha)の調査水田中で229筆(34%)にタケトアゼナなどのアゼナ類が残っているのが見受けられた¹⁾。これらのアゼナ類を持ち帰り、1/5000aワグネルポット試験や9cm深型シャーレを使用した試験で植物体のSU剤に対する感受性を調査したのが図-1、2¹⁾である。比較対照として使用した岩手県雫石町のタケトアゼナ(図-

1、2) および秋田県大曲市のアゼナ(図-2)では、通常の除草剤処理量(図中に矢印で指示)で全ての植物体が枯死に至るのに対し、遊佐町のタケトアゼナ(図-1、2)及びアゼナ(図-2)では通常量の処理では除草効果がほとんど見られず、数十倍の処理でやっと枯死に至るような結果であった。アメリカアゼナでも、残草が問題となっていた宮城県田尻町のを大曲市のものと比較すると同様の結果であった(図-2)。生育量を50%阻害する除草剤濃度(I_{50})で比較すると、その差の最も少なかったアゼナで60.7倍、最も大きかったタケトアゼナでは14,100倍もの大きな差異が認められた(表-1)。アゼトウガラシについても、山形県川西町で残草していたものについて、やはり数十倍から数百倍の差が認められている¹⁰⁾。

これらのアゼトウガラシ属水田雑草についてALS活性を測定したところ、植物体がSU剤抵抗性を示したパイオタイプではすべて、ALS活性でもSU剤抵抗性を示していた(図-3、表-2)¹⁶⁾。このことから、これらの抵抗性パイオタイプではALSの変異によって抵抗性を発現させていると考えられた。

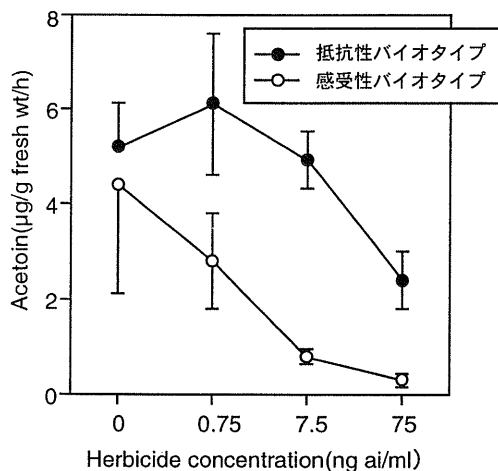


図-3 タケトアゼナのALS活性のチフェンスルフロンに対する反応¹⁶⁾

表-1 アゼトウガラシ属水田雑草のベンスルフロンメチルに対する反応¹⁷⁾

	採取地	I ₅₀ *(g a.i./10a)	バイオタイプ**	R/S I ₅₀ 比
-----1/5000a ワグネルポット試験-----				
タケトアゼナ	山形県遊佐町	314	R	5,110
	岩手県雫石町	0.0614	S	-
-----9cm 深型シャーレ試験-----				
アゼナ	山形県遊佐町	67.4	R	60.7
	秋田県大曲市	1.11	S	-
アメリカアゼナ	宮城県田尻町	532	R	10,200
	秋田県大曲市	0.0524	S	-
タケトアゼナ	山形県遊佐町	147	R	14,100
	岩手県雫石町	0.0104	S	-

*I₅₀, 50%の生育阻害を引き起こすベンスルフロンメチル濃度。

**R, 抵抗性バイオタイプ; S, 感受性バイオタイプ。

表-2 アゼトウガラシ属水田雑草のALS活性に及ぼすチフェンスルフロンメチルの影響¹⁸⁾

	バイオタイプ*	除草剤濃度 (ng ai/ml)	ALS 活性 (μg/g fresh wt/h)
アゼナ	R	7.5	2.3 ± 0.1
		75	2.8 ± 0.6
	S	7.5	0.8 ± 0.1
		75	0.3 ± 0.1
アメリカアゼナ	R	7.5	3.6 ± 0.7
		75	1.6 ± 0.2
	S	7.5	0.2 ± 0.1
		75	0.2 ± 0.2
アゼトウガラシ	R	7.5	2.6 ± 0.5
		75	2.2 ± 0.5
	S	7.5	0.6 ± 0.1
		75	0.5 ± 0.2

*R, 抵抗性バイオタイプ; S, 感受性バイオタイプ。

3. ALS遺伝子の変異部位

ALS遺伝子はタバコやシロイヌナズナを始め既に数多くの植物で単離され、塩基配列およびアミノ酸配列が報告されている。判明しているアミノ酸配列を植物間で比較すると非常に相同

性の高い保存領域が幾つかある。アゼトウガラシ属水田雑草のALS遺伝子は、この保存領域をもとにディジェネレートPCRという手法を用いて単離した¹⁸⁾。単離された遺伝子は図-4に示すように各植物で2種類あり、それぞれ便宜的

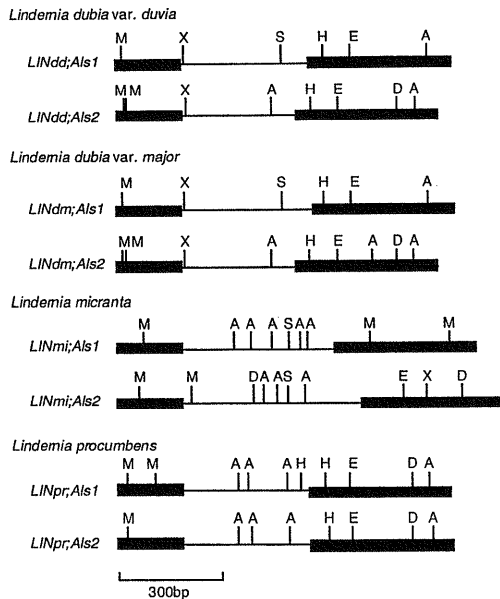


図-4 アゼトウガラシ属水田雑草から単離した核DNA由来のクローンの制限酵素地図¹⁰⁾

太線は他の植物ALSのアミノ酸配列との相同性から予想される構造領域を示し、細線は予想されるイントロンを示す。A, *AluI*; D, *DraI*; E, *EcoRV*; H, *HincII*; M, *MspI*; S, *SphI*; X, *XbaI*.

に *Als1* と *Als2* とした。遺伝子から翻訳されるアミノ酸配列の他の植物との比較から、両方のALS遺伝子にイントロンの存在が予想され (図-4, 5), 他の植物のALSとアミノ酸配列で80%以上の非常に高い相同性がみられた (図-6)。予想されるイントロンの挿入位置には、GT-AG ruleと呼ばれるイントロンの挿入位置に非常に広く見られる塩基配列²⁾も認められた (図-5)。これまで、他の高等植物のALS遺伝子ではイントロンが見つかっておらず^{4, 15)}、イントロンの存在を証明するためにはDNA転写産物の解析等も必要であるが、アゼトウガラシ属水田雑草のALS遺伝子にイントロンが存在する可能性は高い。

アゼトウガラシ属水田雑草で単離された2種類のALS遺伝子でドメインAの

TGCCGAGGGATAGCGCGCGCTCCGGTAAACAGGCGTGTCGATGCCAGTGGGACC 60
A E G Y A R A S G K P G V C I A T S G P
TGGAGCCACCAATTTGGTGTGCGGCTCTGCCGATGCAATGCTGATGTTGCTGCTGT 120
G A T N L V S G L A D A M L D S V P L V
GGCGATTACGGTTCAGGTCAGCGTAGGATGTTGCAACCGATGCGTTTCAGGAGACGCC 180
A I T G Q V P R R M I G T D A F Q E T P
GATCGTAGAGGTAATGCTTTCTAGAAATATTTTTTTTTCGTATGTAGAAAGAGATTGAGT 240
I V E
TTTGTCTGTGGGTTGATGTAAGTCTTTATTTTGTCTCTGCGCCATGTTCTTTT 300
ATGGGTAATGGAGGTTGATGAGTCTTAATTTTTTTTCTCAAGTCCAACTCTCTAAT 360
AAGATTAAATCAAGCCCTCTGTGTGTACITTTGCGAAGTTGAGAGTTAGGTGACT 420
TGTATAGTCAITAGACGAGTCAAAATGTGTCITGCTTCTTCAAAACGGGTCAAGCA 480
TGGGTATAAATTTTTTTTGTGTGTGTGCTGATTTGGGTATAATTTGTGGAGGTATA 540
TATAATCTGTCTACTAACAGGTTACAGGCTCTACAGGACCAATTAAGTCTGTGTTGA 600
V T R S I T K H N Y L V L D
TGTTGACGACATCCCTAGGTTGTGAAGAGGCTCTTTATGCGCAATCAGGTAGGCC 660
V D D I P R V V K E A F F I A T S G R P
TGGACCTGTCTGTATGATATCCCAAGGACATTCAGCAGCAGATGTTGTTGCTTAATG 720
G P V L I D I P K D I Q Q Q M V V P N W
GAATCAGGAGATGAGATTAGTGGGTTTGTCAAGATTACCTCAACCAACAGCATATC 780
N Q E M R L G G Y L S R L P Q P P S I S
AGCCTAGAACAGGTTGATGAGTTGATCTCTGAGGCAAAAGGCCCTGCTTTACGTGG 840
A L E Q V I R L I S E A K R P V L Y V G
AGCTGGGTTTGAACCTGAGGAGAGTTAGAGAGTTGCTGGAATGACTGTTATTC 900
G G C L N S S E E L R K F V E L T G I P
CGTAGCTAGACATTTAATGGTTTGGCTCTATTCATCCAGCTCAGACGAGGATATGCAIT 960
V A S T L M G L G S Y P C S D E E Y A L
GCA
Q

図-5 タケトアゼナの感受性バイオタイプ¹⁰⁾のALS遺伝子 (LINdd;Als1) の単離された領域のDNA配列¹⁰⁾ DNA配列から導かれるアミノ酸配列は各コドンの下に示した。下線部は予想されるイントロンの両端でGT-AG rule²⁾に合致した配列となっている。

	Domain A
A. thaliana	AEGLARSSGKRGICATISGFGATNLWSGLADALLDSVPLVATIGVPRRMIGTDAFQETP 60
LINdd;Als1	...AT.F.V...I...
LINdd;Als2	...A.V...M...
LINdm;Als1	...A.V...M...
LINdm;Als2	...A.V...M...
LINmi;Als1	...A.V...M...
LINmi;Als2	...A.V...M...
LINpr;Als1	...A.V...M...
LINpr;Als2	...A.V...M...

A. thaliana	IVSVIRSIITKHNYLMDVEDIPRIIEEAFPLATSGRFGVPLVDPKDIQQQLAIPLWQEA 120
LINdd;Als1	...VVR...R...I.I...V.D.D.P...
LINdd;Als2	...L.D...VVK...I...I.I...MVV...N.E...
LINdm;Als1	...L.D...VVK...I...I.I...MVV...N.E...
LINdm;Als2	...L.D...VVK...I...I.I...MVV...N.E...
LINmi;Als1	...L.D...VVK...I...I.I...MVV...N.E...
LINmi;Als2	...L.D...VVK...I...I.I...MVV...N.E...
LINpr;Als1	...L.D...VVK...I...I.I...MVV...N.E...
LINpr;Als2	...L.D...VVK...I...I.I...MVV...N.E...

A. thaliana	MRLFGYMSRMKPPEDSHLEQIVRLISESKVPLVVGCGCLNSDELGRFVELIGIPVAS 180
LINdd;Als1	...L.L.NEML...SQ...ED.R...
LINdd;Als2	...G.L.L.Q.SI.A.VI...A.R...E.RK...
LINdm;Als1	...G.L.L.Q.SI.A.VI...A.R...E.RK...
LINdm;Als2	...G.L.L.Q.SI.A.VI...A.R...E.RK...
LINmi;Als1	...G.L.L.R.SEPV...VI...R...E.KK...I...
LINmi;Als2	...G.L.L.H.SK.S...I...A.R...A.E.RK...
LINpr;Als1	...G.L.L.Q.SV.A.VI...A.R...E.R...
LINpr;Als2	...G.L.L.Q.SV.A.VI...A.R...E.R...

A. thaliana	TIMELGSYPOD-ELSH 197
LINdd;Als1	...AF.TG...S
LINdd;Als2	...S.E.YA.Q
LINdm;Als1	...S.E.YA.Q
LINdm;Als2	...S.E.YA.Q
LINmi;Als1	...S.D.F.Q
LINmi;Als2	...GS.E.FA.Q
LINpr;Als1	...S.E.YA.Q
LINpr;Als2	...S.E.YA.Q

図-6 アゼトウガラシ属水田雑草の感受性バイオタイプにおけるALSのシロイヌナズナ¹⁰⁾及びタバコALS¹⁰⁾との比較¹⁰⁾ 点はシロイヌナズナと同じアミノ酸配列であることを示し、ハイフンは相同性が高くなるように挿入した部位を示す。矢印はアゼトウガラシ属水田雑草で予想されるイントロン挿入部位。ドメインAは下線で示し、プロリン部位は太字で示した。

表-3 アゼトウガラシ属水田雑草のALS遺伝子におけるドメインAのプロリン部位のDNA配列とミノ酸配列¹³⁾

	遺伝子	採取地	バイオタイプ*	ドメインAのプロリン部位	
				DNA配列	アミノ酸残基
タケトアゼナ	<i>LINdd;Als1</i>	雫石町	S	CCA	Pro
		遊佐町	R	GCA	<u>Ala</u>
	<i>LINdd;Als2</i>	雫石町	S	CCA	Pro
		遊佐町	R	CCA	Pro
アメリカアゼナ	<i>LINdm;Als1</i>	大曲市	S	CCA	Pro
		田尻町	R	TCA	<u>Ser</u>
	<i>LINdm;Als2</i>	大曲市	S	CCA	Pro
		田尻町	R	CCA	Pro
アゼトウガラシ	<i>LINmi;Als1</i>	大曲市	S	CCA	Pro
		川西町	R	CAA	<u>Gln</u>
	<i>LINmi;Als2</i>	大曲市	S	CCA	Pro
		川西町	R	CCA	Pro
アゼナ	<i>LINpr;Als1</i>	大曲市	S	CCA	Pro
		遊佐町	R	TCA	<u>Ser</u>
	<i>LINpr;Als2</i>	大曲市	S	CCA	Pro
		遊佐町	R	CCA	Pro

*R, 抵抗性バイオタイプ; S, 感受性バイオタイプ。

プロリンと異なるアミノ酸を下線で示した。

プロリン部位を比較したところ、*Als1*では全ての感受性バイオタイプがプロリンであるのに対し抵抗性バイオタイプでは全てプロリンが他のアミノ酸に置換されていた(表-3)¹³⁾。上述したようにALSのドメインAのプロリンが他のアミノ酸に置換すると、ALSのSU剤感受性が大きく低下する^{7,13)}。アゼトウガラシ属水田雑草でもこの*Als1*の変異によってALSのSU剤感受性が低下し、抵抗性バイオタイプが出現した可能性が高い。

4. おわりに

上述のようにSU剤抵抗性のバイオタイプは遺

伝子の塩基配列が一つ変わっただけで発生する。通常、遺伝子の変異は自然状態でも連続的に起こっており、自然に起こる変異の確率は $1/10^6$ 程度とされている。仮にこのような自然状態の変異だけが起こったとしても、単純計算で 10^6 個体があれば1個体はSU剤抵抗性に変異したバイオタイプがあらわれることとなる。アゼトウガラシ属水田雑草はもともと水田畦畔際で中干し後に多数発生する雑草で、種子の生産数も非常に多い。数多くの種子から発生する個体をSU剤によって選択圧をかけたことが、アゼトウガラシ属水田雑草において他の草種よりも早く、かつ広い範囲の水田でSU剤抵抗性バイオタ

イブがあらわれた理由ではないだろうか。

SU剤抵抗性のバイオタイプの出現は確率の問題であり、ある意味では、SU剤だけに依存した除草を続けなければいつかは必ず出現するともいえる。アゼトウガラシ属雑草を始めイヌホタルイやコナギなどの土中での種子の寿命は非常に長く、抵抗性バイオタイプが一旦水田に入るとそれに対応した防除体系を長期間に渡って行う必要が生ずる。SU剤抵抗性バイオタイプは、SU剤と異なる作用機作をもつ除草剤で防除できるが、その一方でSU剤による防除が必要な水田も数多くあり、そうした水田では長期間に渡って多種類の除草剤を散布する必要が生ずる。その場合除草コストが上昇し、減農薬栽培なども困難となる。従って、SU剤抵抗性のバイオタイプに対しては、その出現を未然に防ぐような管理が重要となる。未だ出現の見られない水田でも、作用機作の異なる除草剤をローテーションで使用するなど、出現を未然に防ぐ防除対策を行っていくことが重要であろう。

参考文献

- 1) Boutsalis P., Karotam J. and Powles S. B. 1999. Molecular basis of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Sisymbrium orientale* and *Brassica tournefortii*. Pestic. Sci. 55: 507-516.
- 2) Breathnach R., Benoist C., O'Hare K., Gannon F. and Chambon P. 1978. Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 4853-4857.
- 3) Eberlein C. V., Guttieri M. J., Berger P. H., Fellman J. K., Mallory-Smith C. A., Thill D. C., Baerg R. J. and Belknap W. R. 1999. Physiological consequences of mutation for ALS-inhibitor resistance. Weed Sci. 47: 383-392.
- 4) Funke R. P., Kovar J. L., Logsdon Jr. J. M., Corrette-Bennet J. C., Straus D. R. and Weeks D. P. 1999. Nucleus-encoded, plastid-targeted acetolactate synthase genes in two closely related chlorophytes, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Volvox carterii*, phylogenetic origins and recent insertion of introns. Mol. Gen. Genet. 262: 12-21.
- 5) Guttieri M. J., Eberlein C. V., Mallory-Smith C. A., Thill D. C. and Hoffman D. L. 1992. DNA sequence variation in Domain A of the acetolactate synthase genes of herbicide-resistant and susceptible weed biotypes. Weed Sci. 40: 670-676.
- 6) Guttieri M. J., Eberlein C. V. and Thill D. C. 1995. Diverse mutations in the acetolactate synthase gene confer chlorsulfuron resistance in *Kochia* (*Kochia scoparia*) biotypes. Weed Sci. 43: 175-178.
- 7) Haughn G. W., Smith J., Mazur B. and Sormerville C. 1988. Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides. Mol. Gen. Genet. 211: 266-271.
- 8) Heap I. 2002. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. <http://www.weedscience.com/>.
- 9) Itoh K. and Uchino, A. 2002. Sulfonylurea herbicides.

- rea-resistant weeds in paddy rice fields of Japan. In: Agrochemical resistance: extent, mechanism, and detection. (eds. by Clark, M. J. and Yamaguchi, I) The American Chemical Society, Washington D.C., 168-180.
- 10) Itoh K., Wang G.-X. and Ohba S. 1999. Sulfonyleurea resistance in *Lindernia micrantha*, an annual paddy weed in Japan. *Weed Res.* 39: 413-423.
- 11) 伊藤一幸・汪光熙・内野彰・山河重弥 1997. 山形県遊佐町におけるスルホニルウレア系除草剤抵抗性アゼナ類の分布. *雑草研究*, 42(別): 22-23.
- 12) Mazur B.J., Chui C.-F. and Smith J.K. 1987. Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. *Plant Physiol.* 85:1110-1117.
- 13) Lee K. Y., Townsend J., Tepperman J., Black M., Chui C. F., Mazur B., Dunsmuir P. and Bedbrook J. 1988. The molecular basis of sulfonyleurea herbicide resistance in tobacco. *EMBO J.* 7: 1241-1248.
- 14) Saari L. L., Cotterman J. C. and Thill D.C. 1994. Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. In: *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry* (ed. by Powles S.B. and Holtum J.A.M.). Lewis Publishers, Boca Raton, 83-139.
- 15) Sweigard J. A., Chymley F. C., Carroll A.M., Farrall L. and Valent B. 1997. Sulfonyleurea resistant ALS. *Fungal Genet. Newsl.* 44: 52-53.
- 16) Uchino A., Watanabe H., Wang G.-X. and Itoh K. 1999. Light requirement in rapid diagnosis of sulfonyleurea-resistant weeds of *Lindernia* spp. (Scrophulariaceae). *Weed Technol.* 13: 680-684.
- 17) 内野彰・伊藤一幸・汪光熙・橘雅明 2000. 東北地方におけるスルホニルウレア除草剤抵抗性アゼナ類2種1変種の出現と各種除草剤に対する反応. *雑草研究* 45: 13-20.
- 18) Uchino A. and Watanabe H. 2002. Mutations in the acetolactate synthase genes of sulfonyleurea-resistant biotypes of *Lindernia* spp. *Weed Biology and Management* 3: (in printing).
- 19) Wright T.R., Bascomb N.F., Sturmer S. F. and Penner D. 1998. Biochemical mechanism and molecular basis for ALS-inhibiting herbicide resistance in sugarbeet (*Beta vulgaris*) somatic cell selections. *Weed Sci.* 46: 13-23.