

# コナギとミズアオイのALS遺伝子の特徴

京都大学農学研究科  
雑草学分野

岩上 哲史

## はじめに

80年代初頭、たった一度の除草剤散布で収穫までの雑草防除を保障する「一発処理剤」が誕生した。一発処理剤は除草剤作業の省力化に大きく貢献したものの、効果の低い雑草種（特に多年生雑草）も多く、これらの雑草の多発地域では利用が難しいなどの課題も多かった。そうした中、誕生したのが現在も広く使用されている除草剤ベンスルフロンメチルである。ベンスルフロンメチルは水田稲作用の初めてのスルホニルウレア骨格(SU)剤であり、多くの水田雑草に対し、極めて低薬量で高い殺草効果を示す革命的な除草剤だった。1987年に、ベンスルフロンメチルを一発剤の主要成分とする除草剤の利用が開始されると、これらの一発処理剤は爆発的な売上を誇った。その後、本研究でも供試しているイマズスルフロンなど稲作用のSU剤が多く、の農業会社から上市され、現在も水田雑草防除の基幹剤として広く使用されている。

しかし、SU剤への過剰な依存は雑草の進化を促すことになった。国内ではそれまで水田雑草の除草剤抵抗性は報告されていなかったが、1994年に北海道でミズアオイ (*Monochoria korsakowii* Regel et Maack) の大量の残草が認められ、1996年にその原因がSU剤抵抗性に由来することが発表された。これを契機に複数の雑草種でSU剤抵抗性が報告され、1998

年には同じくミズアオイ属のコナギ (*M. vaginalis* var. *vaginalis* (Burm. f.) Kunth) でも抵抗性が認められた。国内では現在までに20種(アメリカアゼナとタケトアゼナを別種として扱った場合)の水田雑草でSU剤抵抗性が報告されている。これらは除草剤抵抗性雑草研究会のホームページで確認できる (<http://www.wssj.jp/~hr/index.html>)。

雑草におけるSU剤抵抗性はイネ科などいくつかの分類群を除き、SU剤が結合するアセト乳酸合成酵素(ALS)をコードするALS遺伝子の一塩基非同義置換に由来することが多い。置換によりSU剤抵抗性を引き起こすアミノ酸残基は野外の雑草集団からは8残基(Ala122, Pro197, Ala205, Asp376, Arg377, Trp574, Ser653, Gly654)見出されている(Tranel *et al.* 2020)。これらの残基に変異があるかどうかは、ALS遺伝子をシーケンスすることにより2日程度で調べることができる。迅速に結果が得られるため、遺伝子診断はSU抵抗性雑草の防除対策を行なう上で非常に有用な解析法であるが、遺伝子診断を行なうためには対象雑草種におけるALS遺伝子の塩基配列や数(コピー数)が明らかとなっている必要がある。ミズアオイ属雑草のALS遺伝子についてはその数や配列が確定していなかったため、遺伝子診断の基盤となるこれらの情報の整備が望まれていた。

筆者らはミズアオイ属に属するコナギ、ミズアオイからALS遺伝子を単

離し、全長を決定した(Iwakami *et al.* 2020)。コナギからは新規遺伝子1種を含む計5種の配列が単離され、ミズアオイからは3種の配列が単離された。いずれも同数の染色体数を持つ異質4倍体であるのにも関わらず、ALS遺伝子数には違いがある点は、両種の進化の観点からも興味深い。本報では両種のALS遺伝子の特徴と、ALS遺伝子解析上の注意点ならびに今後の研究の展開について論じたい。

## コナギとミズアオイ

コナギもミズアオイも異質4倍体( $2n=4x=52$ )の単子葉植物である。コナギは全国の水田に分布し、SU剤抵抗性が多数報告されている。植物サイズが比較的小さいものの(10~50cm)、窒素吸収能が高いことが知られており、コナギの蔓延はイネの収量を著しく低下させる(Chisaka 1977)(図-1)。ミズアオイも水田雑草ではあるが、国内ではコナギと比べると分布域が限定されており、関東以南では河川や、水路、湖沼などにみられる程度である(古原ら 2011)。ミズアオイはコナギよりも大型であるため(40~90cm)、養分や受光においてイネとより強く競合し、蔓延した場合、イネの収量への影響はより深刻である。両種ともにアジアに分布しており、SU剤抵抗性は韓国と中国においても報告されている。

## コナギのALS遺伝子

コナギの蔓延した水田



ミズアオイの蔓延した水田



図-1 コナギおよびミズアオイの蔓延した水田  
コナギに比べミズアオイは直立型で、葉のサイズや草丈が大きい。

コナギでは少なくとも4種の *ALS* 遺伝子 (*MvALS1* ~ *MvALS4*) が存在することが明らかにされていた (Ohsako & Tominaga 2007)。しかし、未単離の *ALS* 遺伝子が存在する可能性が指摘されており、さらにいずれの遺伝子も塩基配列未決定の領域があった。そこで、筆者らは新規遺伝子の同定に加え、既知遺伝子の全長配列も決定することにした。

まずは *ALS* 遺伝子の部分配列を単離し、コナギに存在する *ALS* 遺伝子の種類を明らかにすることから開始した。既報のコナギ *ALS* 遺伝子の保存領域に2種類のプライマーセットを作成し、ゲノムDNAおよびcDNAを鋳型にしてPCRを行った。

ゲノムDNA、cDNAどちらを鋳型に用いたPCRにおいても、PCR産物を直接シーケンスするダイレクトシーケンスでは、シーケンスした全領域に渡り、複数の塩基が重なるクロマトグラムを示し、配列の解読は不可能であった。これはPCR産物中に多数の異なる *ALS* 遺伝子コピーが混在するためだと考えられた。そこでPCR産物をプラスミドにクローニングし、各クローンの塩基配列を決定した。その結果、多くのクローンは既報の *ALS* 遺伝子と一致したが、いずれとも一致しない配列がゲノムDNAか

らもcDNAからも発見された。これを *MvALS5* と命名した。3'末端および5'末端配列をRACEまたはTAIL PCRにより増幅し、5種の *ALS* 遺伝子の全長配列を決定した。

各遺伝子 (*MvALS1*, *MvALS2*, *MvALS3* および *MvALS5*) がコードするアミノ酸配列の長さは、それぞれ658, 655, 655および658と推定された(図-2)。*MvALS4* 遺伝子は、既報と同じく、*MvALS1* 遺伝子におけるTの繰り返し領域(+974~976)にTが挿入された偽遺伝子であった (Ohsako & Tominaga 2007)。興味深いことに *MvALS2* 遺伝子では3'非翻訳領域にイントロンが認められた。植物の *ALS* 遺伝子はイントロンを持たないケースがほとんどであり、例外的にアゼナ科やカヤツリグサ科で認められている (Uchino & Watanabe 2002; Uchino *et al.* 2007)。*MvALS2* におけるイントロンの意義については不明だが、遺伝子診断に影響を与える可能性があるので注意する(後述)。幼植物において *MvALS1* ~ *MvALS4* 遺伝子の転写が認められ点は先行研究と一致し、今回新たに単離された *MvALS5* 遺伝子も他の *ALS* 遺伝子と同様、幼植物での転写が確認された。

### ミズアオイの *ALS* 遺伝子

ミズアオイについても同様に *ALS* 遺伝子単離を行った。PCR産物のダイレクトシーケンスでは、異なる塩基の重複(ダブルピーク)が複数箇所で見られたものの、コナギの場合と異なり多くの配列は解読可能であった。ゲノムDNAを鋳型に用いたPCR産物には、cDNAを鋳型にしたPCR産物には存在しない配列が認められ、遺伝子としては存在するが、転写されない *ALS* 遺伝子があることが示唆された。PCR産物をプラスミドにクローニングし、個々の配列を解析したところ、cDNAを鋳型に用いたPCR産物からは2種の配列が、ゲノムDNAを鋳型に用いたPCR産物からは、これらに加えもう一つの配列が得られ、順に *MkALS1*, *MkALS2*, *MkALS3* 遺伝子と命名した。後述するが、ゲノムからしか発見されなかった *MkALS3* 遺伝子は抵抗性診断においては厄介な存在であり、解析時には注意が必要である。

コナギ同様にRACEまたはTAIL PCRにより、3'末端および5'末端配列を決定したところ、*MkALS1* および *MkALS2* 遺伝子は、それぞれ662および659アミノ酸をコードすると推定された(図-2)。これに対して、*MkALS3* 遺伝子は、*MkALS1* 遺伝子の+150~153にCの繰り返し領域に対応する領域に1塩基の欠失があった。したがって、*MkALS3* 遺伝子は、コナギにおける *MvALS4* 遺伝子と同様、フレームシフト変異によって形成された偽遺伝子だと考えられた。*MkALS1* と *MkALS2* 遺伝子は幼植物で

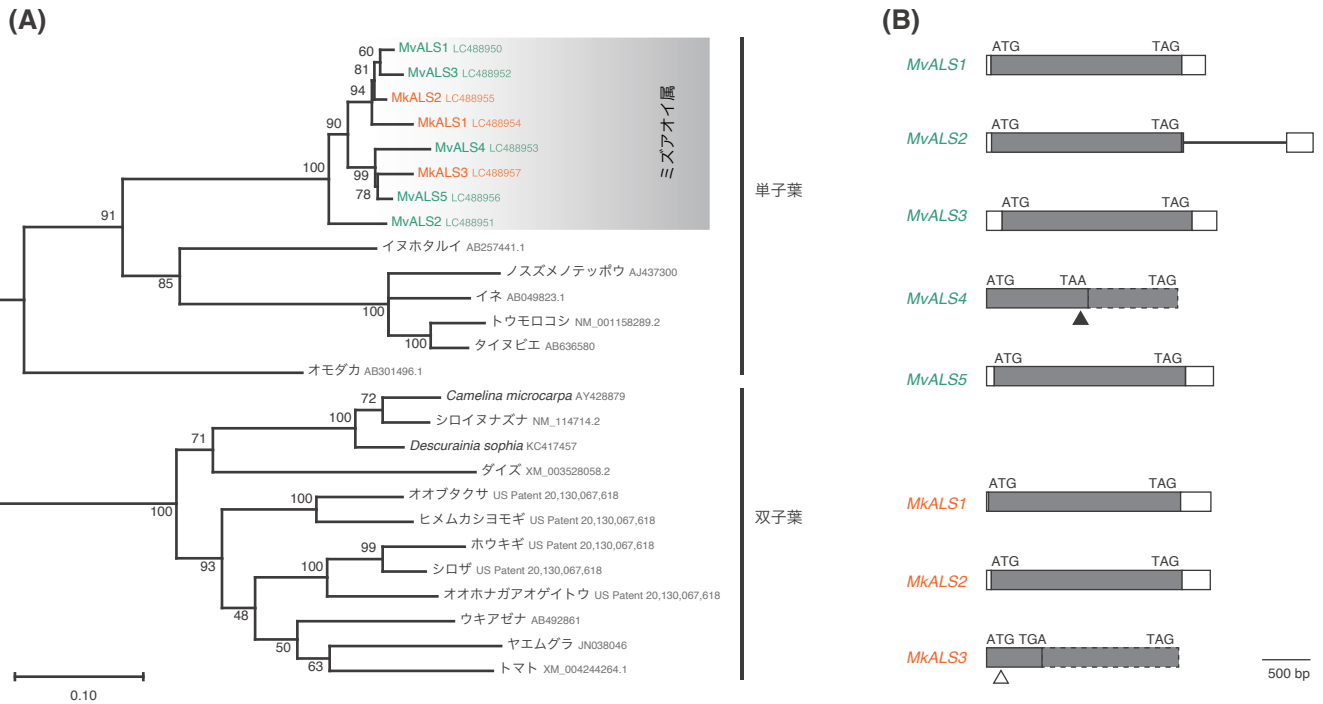


図-2 コナギとミズアオイのALS遺伝子

(A) アミノ酸配列に基づく植物のALSの系統解析。MvALS4とMkALS3遺伝子はフレームシフト型の偽遺伝子だが、解析ではフレームシフトを引き起こす挿入欠失を取り除いた。(B) コナギとミズアオイのALS遺伝子の略図。MvALS4とMkALS3遺伝子の非翻訳領域は未同定。白のボックスは非翻訳領域、実線で囲んだ灰のボックスはコード領域、直線はイントロン、黒の三角は1塩基の挿入、白の三角は1塩基の欠失を意味する。フレームシフトが起こらなかった場合には、コード領域は点線で囲んだ灰のボックスまで延長する。(Iwakami *et al.* 2020 を改変)

転写が認められたが、MkALS3遺伝子については検出されなかった。また、他の器官（例えば、2葉期の植物全体、花、未熟果実）についても解析したが、これらの器官でもMvALS3の遺伝子の転写は検出できなかった。コナギとは対照的に、3つの遺伝子すべてにイントロンは認められなかった。

### SU剤抵抗性が疑われるミズアオイ、コナギから見出されたALS遺伝子の変異

単離したALS遺伝子情報を元に、SU剤抵抗性が疑われる系統のALS遺伝子の配列を決定し、感受性系統と比較した(表-1)。ミズアオイ、コナ

ギともに抵抗性が疑われる系統のALS遺伝子では、197番目のアミノ酸をコードするコドンにSU剤に抵抗性をもたらす非同義置換が認められた。

興味深いことに、ミズアオイでは感受性の系統においてもMkALS3遺伝子の197番目のアミノ酸をコードするコドンは、LeuをコードするCTTとなっていた。ALS遺伝子においてコドン197がLeuをコードする場合、ALSはSU剤に抵抗性となることが知られている。MkALS3は塩基の欠失があるフレームシフト型の偽遺伝子であり、この遺伝子座からは機能的なALSタンパク質が生成されないため、コドン197におけるCTTの配列はALS阻害剤抵抗性には関与しない。ミズアオイのALS阻害剤抵抗性の遺伝子診断において、遺伝子を区別することなくPro197領域のみ解析しようとする、感受性個体からも抵抗性型のコドンが検出されてしまう。偽陽性の抵抗

表-1 実験に供試したコナギとミズアオイ (Iwakami *et al.* 2020 を改変)

種	系統	採取地	採取年	抵抗性を付与することの知られるアミノ酸置換*	
				遺伝子	アミノ酸
コナギ	SMM13	千葉県山武市	2015	未検出	未検出
コナギ	SMM23	千葉県山武市	2015	MvALS3	Pro197→Ser
コナギ	TOT1	鳥取県鳥取市	2018	MvALS1	Pro197→Leu
ミズアオイ	NTR1	宮城県名取市	2012	MkALS3**	Pro197→Leu
ミズアオイ	NGN1	北海道長沼町	2013	MkALS1	Pro197→Ala
				MkALS3**	Pro197→Leu

\* シロイヌナズナのALSのアミノ酸番号に基づく

\*\*フレームシフトを持つ偽遺伝子であるため、197番目アミノ酸がLeuであっても、抵抗性を付与しない。

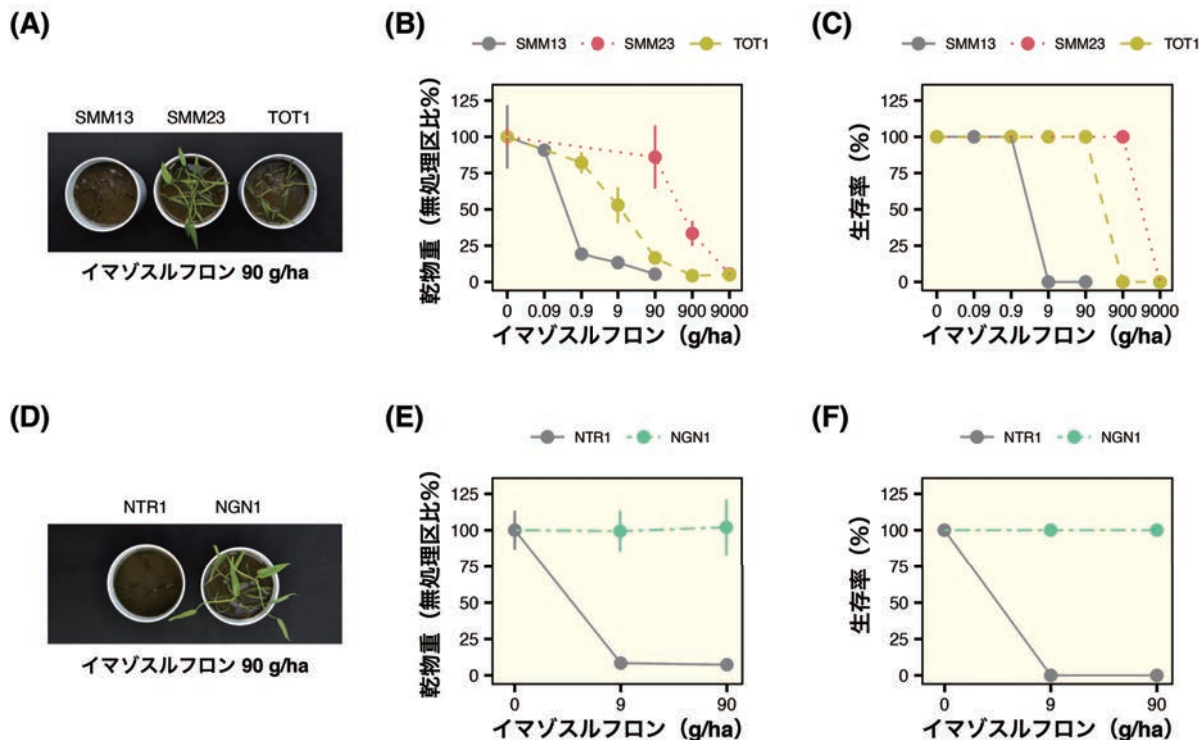


図-3 コナギおよびミズアオイのイマゾスルフロン感受性

(A) イマゾスルフロン処理後のコナギ。(B) イマゾスルフロン処理後のコナギの乾燥重。エラーバーは標準誤差 (n=3)。(C) イマゾスルフロン処理後のコナギの生存率。(D)イマゾスルフロン処理後のミズアオイ。(E)イマゾスルフロン処理後のミズアオイの乾燥重。エラーバーは標準誤差(n=3)。(F) イマゾスルフロン処理後のミズアオイの生存率。(Iwakami *et al.* 2020 を改変)

性判定結果につながるので解析時には注意する必要がある。

コナギ、ミズアオイともに、*ALS* 遺伝子を解析した系統についてイマゾスルフロンに対する感受性を評価した。遺伝子診断で抵抗性と判定された系統はいずれも標準量で生存し、イマゾスルフロン抵抗性であることが確認された (図-3)。

### コナギおよびミズアオイの *ALS* 遺伝子シーケンス解析の注意点

遺伝子診断は抵抗性検出において有力な手法である。遺伝子診断にはいくつかの方法があるが、得たい情報の程度 (置換された塩基の種類まで知りたいか、変異のある遺伝子コピーを特定したいか、など) や利用できる機器、解析に必要な費用を考慮した上で最適な方法を選択することになる。ここでは、最もオーソドックスと言える、遺伝子ごとにコード領域全長配列を決定する方法を紹介し、注意点を述べる。

コナギやミズアオイからの DNA の抽出は植物でよく用いられる CTAB 法や、DNA 抽出キット (Qiagen 社の DNeasy など) など問題ない。一方、RNA の抽出は組織によっては (特に地下部) やや難しい。幼植物の地上部であれば、RNeasy (Qiagen) などのキットで容易に抽出可能である。抽出した DNA を鋳型に PCR を行い、各 *ALS* 遺伝子の全長 (約 2,000 bp) を増幅する。SU 剤抵抗性に関わるアミノ酸 8 残基に対応するコドンは *ALS* 遺伝子のほぼ全領域に点在するため、遺伝子全長をシーケンスするとよい。シーケンスに用いるプライマーを工夫することで、3 回のシーケンスでコード領域全長 (開始コドンから終止コドンまで) の配列を決定することができる。

PCR 酵素には KOD FX または KOD FX Neo (東洋紡) を用いると我々の報告したプライマーで全長配列

が単離できる。他の PCR 酵素については検討しておらず、増幅能が低い PCR 酵素では全長増幅できない場合もあるので注意する。なお KOD FX や KOD FX Neo を用いる場合、植物片を抽出バッファー中ですりつぶし、粗抽出液を PCR の鋳型に用いた場合であっても、期待通りの PCR 産物が得られることも多い。この方法でいくつかの水田雑草 (オモダカ、イヌホタルイ、ヒエ属など) については *ALS* 遺伝子全長を PCR 増幅することが可能だが、コナギやミズアオイの場合は PCR の成否が不安定となることも多く、確実性を期すのであれば DNA を精製することを推奨する。

全長増幅には Iwakami *et al.* (2020) で用いているプライマーを供試する。これらのプライマーは鋳型に cDNA を用いても増幅できるようにデザインされている。自らプライマーを設計する場合は、プライマーの 3' 側 (伸長

方向側)の数塩基が他のコピーと一致しないようにデザインし、遺伝子特異的にPCR増幅できるように注意する。また、コナギ *ALS2* 遺伝子の3'非翻訳領域にはイントロンが存在するため、cDNAを鋳型に用いて *ALS2* 遺伝子をPCR増幅させる場合には、プライマーはイントロン領域にかからないようにデザインする必要がある。アガロースゲル電気泳動でPCR産物の増幅を確認後、PCR反応液からプライマーなどを除去し、シーケンスに供試する。ミズアオイは他殖性が強いいため *ALS* 遺伝子座がヘテロ接合の場合もあり、ダイレクトシーケンスでは解読できないこともある。その場合にはPCR産物をクローニングしシーケンスする必要がある。

## 今後の展望—遺伝子重複の観点から—

本研究で同定された *ALS* 遺伝子は、コナギでは5コピー、ミズアオイでは3コピーと数が異なり、また分子系統解析ではこれらの *ALS* 遺伝子に明確な同祖性を見出すことができなかった(図-3)。これはコナギとミズアオイが単一起源であるとの提案(汪・草薙 1996)から考えると意外な結果である。両種の *ALS* 遺伝子の違いは、それぞれが由来する二倍体祖先種が異なることを意味しているかもしれない。コナギとミズアオイはともに強害水田雑草ではあるが、その分布や形態、繁殖特性などに大きな違いが見

いだされている。これらの違いが二倍体祖先種のゲノムに起因する可能性も考えられ、雑草の適応進化を考える上でも両種の進化のプロセスは興味深い課題である。

本研究で扱った限られた数の抵抗性集団の解析では、コナギでは *MvALS1* と *MvALS3* 遺伝子に、ミズアオイでは *MkALS1* 遺伝子に抵抗性をもたらす変異が認められた(表-1)。我々は機能型と推定されるその他の *ALS* 遺伝子(コナギでは *MvALS2* と *MvALS5*、ミズアオイでは *MkALS2*)に抵抗性を付与する変異を持つ集団が存在するかどうかに関心を持っている。特にコナギにおいては、国内の集団ではこれまで *MvALS1* と *MvALS3* 遺伝子でしか抵抗性変異の報告がなく(e.g. Ohsako & Tominaga 2007)(当時未発見だった *MvALS5* 遺伝子については検討されていない)、抵抗性はこれらの遺伝子のみで起こる可能性も考えられる。抵抗性変異の出現に遺伝子間の偏りがあることは、3つの機能型 *ALS* 遺伝子を持つヒメカンガレイ(*Schoenoplectus mucronatus*)においても報告されているが、そのメカニズムは明らかになっていない(Scarabel *et al.* 2010)。同じ *ALS* 遺伝子でも変異の生じやすさに差があるのか、または、同程度に変異が生じた場合でも、付与可能な抵抗性レベルに差があるのかなど、未解明な部分も多い。我々は全国から収集した60以上のSU剤抵抗性コナギ集団について解析を進めており、興味深い結果が得られはじめている。コナギは、雑草

種において最も多く機能的な *ALS* 遺伝子が報告されている種であり、その詳細な解析は雑草における作用点抵抗性の進化を理解する上で重要な知見をもたらすのではないかと期待している。

## 謝辞

本研究は汪光熙博士(名城大学)との共同研究として実施したものです。谷垣伸治氏(京都大)を始め、論文の共著者の皆様には研究実施にあたり大きくご協力いただきました。日本植物調節剤研究協会より「雑草防除及び植物生育調節に関わる研究調査啓発事業」の支援を受けました。

## 文献

- Chisaka, H. 1977. Weed damage to crops: yield loss due to weed competition. In: Fryer JD, Matsunaka S eds. Integrated Control of Weeds. Tokyo: University of Tokyo Press, 1-16.
- Iwakami, S. *et al.* 2020. Characterization of the acetolactate synthase gene family in sensitive and resistant biotypes of two tetraploid *Monochoria* weeds, *M. vaginalis* and *M. korsakowii*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 165, 104506.
- Ohsako, T. and T. Tominaga 2007. Nucleotide substitutions in the acetolactate synthase genes of sulfonyleurea-resistant biotypes of *Monochoria vaginalis* (Pontederiaceae). Genes & Genetic Systems 82, 207-215.
- Scarabel, L. *et al.* 2010. Characterisation of *ALS* genes in the polyploid species *Schoenoplectus mucronatus* and implications for resistance management. Pest Management Science 66, 337-344.
- Tranel, P. *et al.* 2020. Mutations in

herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors. Online <http://www.weedscience.com>. 8/4/2020.

Uchino, A. *et al.* 2007. Molecular basis of diverse responses to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in sulfonylurea-resistant biotypes of

*Schoenoplectus juncooides*. Weed Biology and Management 7, 89-96.

Uchino, A. and H. Watanabe 2002. Mutations in the acetolactate synthase genes of sulfonylurea-resistant biotypes of *Lindernia* spp. Weed Biology and Management 2, 104-109.

古原洋ら 2011. 雑草モノグラフ 7. ミズアオイ (*Monochoria korsakowii* Regal et Maack) . 雑草研究 56, 166-181.

汪光熙・草薙得一 1996. アジア産ミズアオイ属植物の細胞分類学的解析. 植物分類, 地理 47, 105-111.

### 田畑の草種

## 水葵 (ミズアオイ)

(公財)日本植物調節剤研究協会  
兵庫試験地 須藤 健一

ミズアオイ科ミズアオイ属の抽水～湿生の一年草。池沼、河川、水路や水田などに生育する。かつては全国の低湿地に普通であったが、湿地開発や除草剤の使用などで激減し、最近では北日本で多く見かけるが西日本ではまれに。自治体によっては絶滅危惧種に指定されているところも。

背丈は 30cm から 70cm。イネが植えられた田では稲の丈を超えることもある。花期は 7 月から 10 月。花茎は立ち上がり葉より上に総状花序がつく。花色は青紫色。

日本在来で万葉の時代から利用されてきた。古事記や日本書紀、万葉集に「水葱」という野菜として食べられていたことが記されている。しかし味は良くはなく、低廉な野菜であったようである。万葉集に長意吉麻呂のこんな歌がある。

醬酢ひしほす ひろつに蒜搗にらきかてて鯛願なまぎふ 我れあつものにな見えそ水葱なまぎの羹あつもの

(巻 16)

自分は醬酢にニンニクを混ぜたタレで鯛を食べたいと思っ  
ているのにそんな美味しくないミズアオイの汁なんかを見せる  
んじやない、と。

美味しくはないというが、宇治拾遺物語 巻第 2 では、清徳という高僧が空腹のあまり道端の田んぼに植えられてあった 3 町歩の水葱の葉や茎をむさぼるようにすべて食べてしまうという話がある。当時は水葱が田で栽培されていたようであるが、水葱だけが植えられていたのかイネの間に水葱が植えられていたのか。

一方で、清少納言は水葱に神聖さをみていた。枕草子の第 272 段、「神は」の中で「行幸などに、水葱の花の御輿にたてまつるなど、いとめでたし」と、神輿に飾る神聖な植物であったとも記す。

花序が葉の上に出て丈の大きなものを「水葱」といい、花が葉の上に出ない小さなものを「小水葱」と言った。小水葱は今のコナギである。他方、長い間「菜葱」とか「水葱」とか呼ばれてきたおおきなものは、おそらく江戸時代に入って、葉が徳川家の紋の基になった「二葉葵」に似ていたことから「葱」が「葵」に変わって「水葵」となったと考えるのはいかがだろうか。