

# グリホサート抵抗性オオホナガアオゲイトウが日本の穀物輸入港で定着

東邦大学理学部  
生物学科  
下野 綾子

## はじめに

グリホサート剤は2000年代に世界で最も使用された除草剤とされている (Bonny 2016)。グリホサート剤は植物の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) の阻害剤で、EPSPSは芳香族アミノ酸 (トリプトファン, フェニルアラニン, チロシン) の生合成を担うシキミ酸経路の6番目の反応を触媒する酵素である。グリホサート剤の使用量増加の背景には、除草剤抵抗性を導入した遺伝子組換え作物の普及がある。

世界で商業栽培される遺伝子組換え作物の面積は増加を続け、2019年には約1億9040万ha (日本の国土面積の約5倍) に達した (ISAAA 2019)。主要な導入形質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。

グリホサート剤使用量の増大に伴い、抵抗性雑草の進化が深刻な問題となっている。現在までに53種のグリホサート抵抗性雑草が報告されており (Heap 2021)、中でもグリホサート抵抗性のヒユ科ヒユ属オオホナガアオゲイトウ (*Amaranthus palmeri*, 以降GRオオホナガ) は、2005年に米国のジョージア州で発見されて以降 (Culpepper et al. 2006)、米国で急速に蔓延し、難防除雑草となった。米国において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、現在、最も有害な雑草としてリストアップされている (Van Wychen 2019, 2020)。

米国は日本の主要な穀物輸入相手国であり、米国で問題となっているGRオオホナガは、輸入穀物への混入を通じて日本に移入してくる可能性が高い。これまでに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いることが報告されている (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)。また穀物輸入港湾では遺伝子組換えのダイズやナタネが生育していることが報告されている (Aono et al. 2006; 農林水産省 2021)。日本は遺伝子組換え作物の商業栽培は行われていないため、野外における遺伝子組換え作物の生育は、輸入穀物のこぼれ落ちが生じている証拠と言える。

オオホナガアオゲイトウは北アメリカ原産の1年草で、日本での初確認は1936年とされている (長田 1972)。その後、1960年代までには本州から九州に広がったとされている

が、現状の分布は稀で、日本で問題雑草として報告はされていない。しかし、米国で有害雑草として急速に蔓延した事実や、グリホサート剤は日本の農耕地だけでなく非農耕地においても汎用されていることを考慮すると、今後分布を拡大し難防除雑草となる可能性が高い。そのため、本研究では日本の主要な穀物輸入港湾において、オオホナガアオゲイトウの分布状況について調査した。

## オオホナガアオゲイトウの抵抗性メカニズム

オオホナガアオゲイトウの主要なグリホサート抵抗性メカニズムは、標的タンパク質の過剰生産による (図-1)。つまりグリホサート剤が阻害する以上のEPSPSが生産されることで、植物は生存できる。これはEPSPS遺伝子の増幅によるもので、EPSPS遺伝子の転写量およびタンパク質量は、EPSPS遺伝子の数と正の相関を示す。時に100倍にも及ぶ増幅が見られる場合もある (Gaines et al. 2010)。

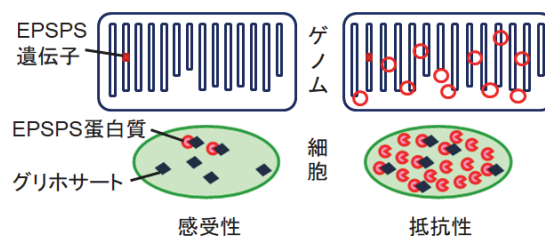


図-1 オオホナガアオゲイトウの遺伝子増幅による抵抗性メカニズム  
感受性個体では、グリホサートがEPSPS蛋白質の活性を阻害する。抵抗性個体では、EPSPS遺伝子が増幅し、グリホサートが阻害する以上のEPSPS蛋白質を生産する。増幅領域は染色体外環状DNAとして存在する。

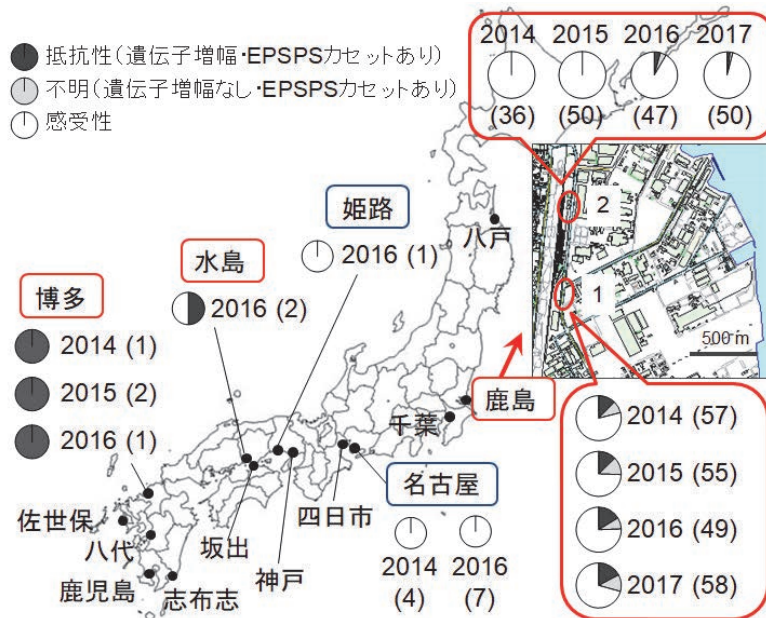


図-2 港湾におけるオオホナガアオゲイトウの分布状況と抵抗性個体の頻度 (Shimono *et al.* 2020 を改変)  
 数字は調査した年、() の数字は解析個体数を示す。50 個体以上生育している場合は約 50 個体を、50 個体未満の場合は全ての生育個体を解析。

こうした遺伝子増幅による除草剤抵抗性メカニズムは本種で初めて報告されたが、その後、ヒユモドキ、ハリビユ、ホウキギ、オヒシバ、ネズミムギ、ヒゲナガスズメノチャヒキ、チャボヒゲシバなどでも報告されている。ただし、増幅メカニズムは種によって異なり、ハリビユについてはオオホナガアオゲイトウとの交雑によるものとされている (Nandula *et al.* 2014)。

興味深いことに、オオホナガアオゲイトウの EPSPS 遺伝子は 10 kb ほどにも関わらず、増幅領域は約 399 kb におよび EPSPS 以外にも様々な遺伝子や転移要素が含まれる (Molin *et al.* 2017, 2020)。以降、この領域を EPSPS カセットと呼ぶ (Molin *et al.* 2017)。EPSPS カセットは構造タンパク質によって染色体に結合しているものの、染色体内に組み込まれてはならず、染色体外環状 DNA として存在している (Koo *et al.* 2018)。そのため、後代に遺伝するが、メンデル遺伝には従わない。遺伝子増幅にはトランスポゾンが関与していると考えられている

ものの、その増幅メカニズムは明らかにはされていない。

米国では地理的に離れた地域の GR オオホナガの EPSPS カセットが、ほぼ同じ塩基配列を有していたことから、GR オオホナガは複数地域で進化したというより、1 地域で進化した個体が急速に分布拡大したと考えられている (Gaines *et al.* 2019; Molin *et al.* 2018)。一方、ゲノム全体を対象にした塩基配列の多型を調べた研究では、地理的に離れた地域の集団間に、遺伝的分化が生じている傾向を見出し、抵抗性個体の進化は複数回生じたと考察している (Küpper *et al.* 2018)。しかし、EPSPS カセットは染色体外環状 DNA として存在していることから、その挙動は核ゲノムのものとは異なる可能性が指摘されている (Gaines *et al.* 2019)。また、ほぼ同じ塩基配列を有する 399 kb におよび EPSPS カセットが、複数回独立に進化する可能性は低いと考えられている (Gaines *et al.* 2019)。



図-3 鹿島港におけるオオホナガアオゲイトウの生育状況

## 港湾における GR オオホナガの分布調査

2014～2017 年の 8～9 月に日本全国の主要穀物輸入港湾 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 (図-2)。穀物の積上げ地の飼料工場・製粉工場周辺を踏査し、本種が分布していた場合には、遺伝解析を行うため全個体から葉を採集した。

採取した葉から DNA を抽出し、遺伝子増幅が起きているか確認するために、EPSPS 遺伝子のコピー数をリアルタイム PCR で解析した。また、EPSPS カセットは先述したように 399 kb に及ぶため、カセット上の EPSPS 遺伝子以外の 8 領域の配列の有無を、既往研究のプライマー (Molin *et al.* 2018) を用いて PCR によって確認した。

その結果、5 港でオオホナガアオゲイトウの生育が確認され、そのうち鹿島港、水島港、博多港の 3 港で GR オオホナガが検出された (図-2)。鹿島港以外の港では、本種の生育は 1～7 個体であり、こぼれ落ちた種子が偶発的に生育していると考えられた。一方、鹿島港においては数万個体の生育が確認され、一部の区画では一面に繁茂していた (図-3)。鹿島港では全個体の解析は不可能だったため、500～600m 離れた 2 地点から 40～60 個

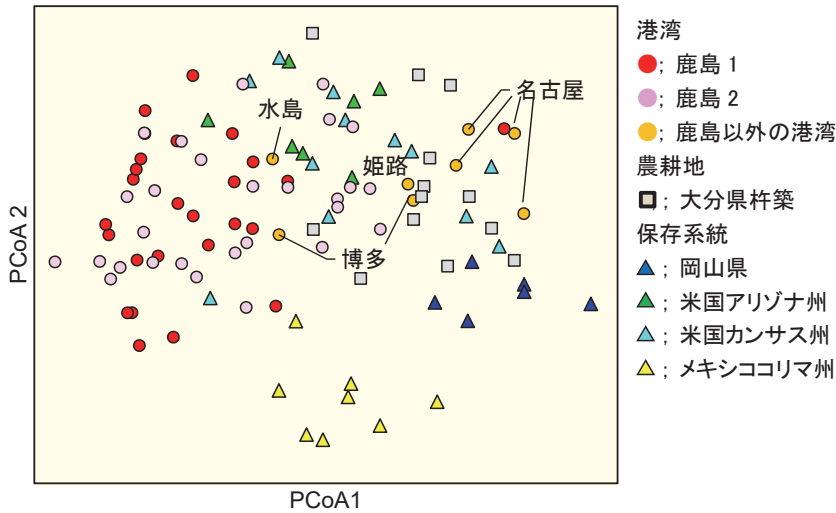


図-4 マイクロサテライトマーカー 10 座の遺伝距離に基づく主座標分析 (Shimono *et al.* 2020) を改変)

体の葉を採集し、抵抗性個体の頻度を評価した。その結果、地点 1 では抵抗性個体の頻度は 12 ~ 17%，地点 2 では 0 ~ 2% であった(図-2)。4 年間、抵抗性個体が安定して検出されたことから、抵抗性個体が定着に成功した結果と考えられた。

EPSPS 遺伝子のコピー数の増加が検出されなくても、EPSPS カセットの 8 領域を有する個体も存在した(図-2)。これらの個体は EPSPS カセットを有するもののコピー数が少なく抵抗性個体とみなされなかった。ただし、先述したように EPSPS カセットは染色体外環状 DNA として存在し、体細胞分裂によっても娘細胞に不均一に分配される。従って同一個体でも EPSPS カセットのコピー数は組織によって異なることが報告されている (Giacomini *et al.* 2019)。そのため解析に使用した葉では EPSPS カセットのコピー数が少なくても、他の組織では多い可能性も考えられる。EPSPS カセットを有する個体を抵抗性とみなす場合、地点 1 の抵抗性個体の頻度は 24 ~ 29% となる。

## オオホナガアオゲイトウの遺伝構造

EPSPS カセット以外にも、オオホナガアオゲイトウの核ゲノムの遺伝変異を解析するためにマイクロサテライトマーカーを開発した。DNA の中には、マイクロサテライトと呼ばれる 2 ~ 4 塩基程度の短い配列が複数回反復した構造が含まれる。このマイクロサテライトの反復数は、同じ遺伝子座でも個体間によって異なるため、個体識別や集団間の遺伝的分化の程度を評価するうえで有効なマーカーとされている。

日本の港湾と、その他の地域の集団とで遺伝構造を比較するために、以下に示す 5 系統のサンプルを入手した。なお、これらのサンプルは抵抗性を付与する遺伝変異は検出されなかった。

- ・農耕地のサンプルとして大分県農林水産研究指導センターより提供いただいた 2018 年に大分県杵築市に生育していた個体。
- ・日本の種子保存系統として、岡山大学資源植物科学研究所より提供いただいた 1989 年に岡山県で採集された系統。

- ・原産地の種子保存系統として、アメリカ農務省より提供いただいた米国アリゾナ州およびカンサス州由来の 2 系統およびメキシコのコリマ州由来の 1 系統。

10 座のマイクロサテライトマーカーの遺伝子型を決定し、遺伝距離に基づく主座標分析を行った。この分析で得られる散布図では遺伝的に似た個体が近くにプロットされる。その結果、メキシコの系統は遺伝的に異なる一方、米国の系統と日本の港湾の個体は、遺伝的によく似ていることが示された(図-4)。また港湾の個体は 1989 年に採集された岡山の集団より、米国の系統と遺伝的に近い傾向が見られた(図-4)。これらの結果は、グリホサート抵抗性の進化は日本の港湾で生じたのではなく、輸入穀物を介した移入に由来することを支持するものである。

## さいごに

米国で 2005 年に見つかった GR オオホナガが、10 年もたたずに日本に移入し定着していることが明らかとなった (Shimono *et al.* 2020)。グリホサート剤を使用しない場合、抵抗性個体が存続し続けるかどうかは、抵抗性個体の適応度によるだろう。遺伝子増幅による抵抗性個体は EPSPS タンパク質を過剰生産しており、感受性個体に比べて何らかのコストがかかっていると考えるのが妥当である。しかし予想に反して、栽培条件上では、抵抗性個体と感受性個体で成長や繁殖に有

意差は見られなかった (Giacomini *et al.* 2014; Vila-Aiub *et al.* 2014)。

これまで外来雑草の対策の多くは問題が顕在化した後に講じられてきた。しかし蔓延後の対策はコストも時間もかかる。著者らは現在も港湾におけるGR オオホナガの分布調査を継続しており、その動向を評価するとともに、除草剤に依存しない防除対策を検討しているところである。

## 引用文献

- Aono, M. *et al.* 2006. Detection of feral transgenic oilseed rape with multiple herbicide resistance in Japan. *Environmental Biosafety Research* 5, 77-87.
- 浅井元朗ら 2007. 1990 年代の輸入冬作物中の混入雑草種子とその種組成. *雑草研究* 52, 1-10.
- Bonny, S. 2016. Genetically modified herbicide-tolerant crops, weeds, and herbicides, overview and impact. *Environmental Management* 57, 31-48.
- Culpepper, AS. *et al.* 2006. Glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia. *Weed Science* 54, 620-626.
- Gaines TA, *et al.* 2010. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 1029-1034.
- Gaines TA, *et al.* 2019. Molecular mechanisms of adaptive evolution revealed by global selection for glyphosate resistance. *New Phytologist* 223, 1770-1775.
- Giacomini DA, *et al.* 2014. Impact of genetic background in fitness cost studies: an example from glyphosate-resistant Palmer amaranth. *Weed Science* 62, 29-37.
- Giacomini DA, *et al.* 2019. Variable Inheritance of Amplified EPSPS Gene Copies in Glyphosate-Resistant Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Weed Science* 67, 176-182.
- Heap, I. 2021. The international survey of herbicide resistant weeds. Available: [www.weedscience.org](http://www.weedscience.org). (Accessed: October 10, 2021).
- ISAAA. 2019. Global status of commercialized biotech/GM crops in 2019. Ithaca, NY.: ISAAA.
- Küpper, A. *et al.* 2018. Population genetic structure in glyphosate-resistant and-susceptible Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) populations using genotyping-by-sequencing (GBS). *Frontiers in Plant Science* 9.
- Koo, DH. *et al.* 2018. Extrachromosomal circular DNA-based amplification and transmission of herbicide resistance in crop weed *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, 3332-3337.
- Molin, WT. *et al.* 2020. The EccDNA Replicon: A Heritable, Extranuclear Vehicle That Enables Gene Amplification and Glyphosate Resistance in *Amaranthus palmeri*. *Plant Cell* 32, 2132-2140.
- Molin, WT. *et al.* 2017. The unique genomic landscape surrounding the EPSPS gene in glyphosate resistant *Amaranthus palmeri*: a repetitive path to resistance. *BMC Genomics* 18, 91.
- Molin, WT. *et al.* 2018. Survey of the genomic landscape surrounding the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) gene in glyphosate-resistant *Amaranthus palmeri* from geographically distant populations in the USA. *Pest Management Science* 74, 1109-1117.
- Nandula, VK. *et al.* 2014. EPSPS amplification in glyphosate-resistant spiny amaranth (*Amaranthus spinosus*): a case of gene transfer via interspecific hybridization from glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Pest Management Science* 70, 1902-1909.
- 農林水産省 2021. 令和元年度遺伝子組換え植物実態調査. Available at <https://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/210108.html>. Accessed: October 10, 2021.
- 長田武正 1972. 日本帰化植物図鑑. 北隆館, 東京.
- Shimono, A. *et al.* 2020. Initial invasion of glyphosate-resistant *Amaranthus palmeri* around grain-import ports in Japan. *Plant, people, planet*, 2, 640-648
- Shimono, Y. *et al.* 2010. Contamination of internationally traded wheat by herbicide-resistant *Lolium rigidum*. *Weed Biology and Management* 10, 219-228.
- Van Wychen, L. 2019. Survey of the most common and troublesome weeds in broadleaf crops, fruits & vegetables in the United States and Canada. *Weed Science Society of America National Weed Survey Dataset*. Available: [https://wssa.net/wp-content/uploads/2019-Weed-Survey\\_broadleaf-crops.xlsx](https://wssa.net/wp-content/uploads/2019-Weed-Survey_broadleaf-crops.xlsx) (Accessed: October 10, 2021).
- Van Wychen, L. 2020. Survey of the most common and troublesome weeds in grass crops, pasture, and turf in the United States and Canada. *Weed Science Society of America National Weed Survey Dataset*. Available: [https://wssa.net/wp-content/uploads/2020-Weed-Survey\\_grass-crops.xlsx](https://wssa.net/wp-content/uploads/2020-Weed-Survey_grass-crops.xlsx) (Accessed: October 10, 2021).
- Vila-Aiub, MM. *et al.* 2014. No fitness cost of glyphosate resistance endowed by massive EPSPS gene amplification in *Amaranthus palmeri*. *Planta*, 239, 793-801.