スルホニルウレア系除草剤抵抗性キカシグサのアセト乳酸合成酵素遺伝子の解析

エステラ A. ブランカベル (筑波大)・芝池博幸・伊藤一幸 (農環研)・
臼井健二 (筑波大)

スルホニルウレア系除草剤 (SU剤) 抵抗性 (R) キカシグサは秋田県と佐賀県のわずかな面積の水田で知られている。この除草剤の標的酵素であるアセト乳酸合成酵素 (ALS) の遺伝子解析は、日本においてはアゼトウガラシ (Shibaike et al. 1999)、イヌホタルイ (渋谷ら 1999)、アゼナ類 (内野・渡邊 1999) などで行われ、SU剤抵抗性の発現はALSのドメインAアミノ酸変異によることが報告されている。演者らはSU抵抗性キカシグサを用いて、SU剤に対する抵抗性発現機構を解明するためにALSの遺伝子解析をおこなった。

<材料及び方法>

供試したキカシグサはRが秋田県大曲市内小友の休耕田産、Sは茨城県つくば市小野川の水田産を戸外の 1/5000a ポットで栽培した。10cm ほどに生育した個体の上端から 2~3cm の展開直後のキカシグサ茎葉からDNAを抽出した。

SとRの識別はそれぞれの個体の分枝を、あらかじめ村岡ら(2000)の発根法による簡易検定により確認した。

シロイヌナズナ等のALS遺伝子の保存領域を参考にして degenerate PCR を行い、増幅したALS遺伝子についてドメインAの周辺領域の塩基配列を決定した。

<結果及び考察>

このキカシグサの3種のSU剤への抵抗性の程度についてはすでに報告済みである (Blancaver et al. 2001: WBM 1, 205-209)。5cm 程度の草高で、根を切断した幼植物を用いたベンスルフロンメチル剤による簡易検定法で、キカシグサでもRとSは容易に判定できた。

ALS遺伝子をクローニングして230塩基対を決定した(Figure 1)。それをもとにアミノ酸配列を比較したところ、抵抗性に関与しているといわれている2つの保存領域、シロイヌナズナのALSの197番目(タバコの196番目)のプロリンに相当する部分と205番目のアルギニン (Table 1, 2)はこのキカシグサのR、Sとも変異してなかった。しかし、その外側(3'側)の211番目のアミノ酸に新たな変異が認められ、感受性のスレオニン(ACC)はイソロイシン(ATC)になっていた。

この塩基配列の違いによりこのキカシグサがSU剤に抵抗性を示すか否かは不明で、ALSのさらに広い領域の差違を調べてみる必要がある。また、198番目以降にこのキカシグサ特有の新規の3アミノ酸配列(RRMがTKVに変異)が見出された(Table 1)。

Blancaver, M. E. A., H. Shibaike, K. Itoh and K. Usui: Analysis of acetolactate synthase genes of sulfonylurea-resistant and -susceptible biotypes in *Rotala indica* var *uliginosa* Koehne.

R. indica (R)	1	ACGAGCGGACCTGGTGGCAGCAATCTAGTGACCAGCATCGCGGACGCCAAGATGGATAGC	60
R. indica (S)	1	ACCAGCGGGCCAGGTGCCACGAATCTAGTGACCAGCATCGCGGACGCCAAGATGGATAGC	60

R. indica (R)	61	ATCCCGTTGATTGCCATCACCGGTCAGGTCCCAACCAAGTGATCGGTACCGATGCTTTC	120
R. indica (S)	61	ATCCCGTTGATTGCCATCACCGGTCAGGTCCCAACCAAGTGATCGGTACCGATGCTTTC	120

R. indica (R)	121	CAAGAAACTCCGATCGTTGAGATTGTGCGGGTATCACCAAGCATCATTACTTGGTCACC	180
R. indica (S)	121	CAAGAAACTCCGACCGTTGAGATTGTGCGGGTATCACCAAGCATCATTACTTGGTCACC	180

R. indica (R)	181	AATGTTAAGGACGTTCCGCGGGTGATGAAGGAGGCCTTCCATGTCGCAAC	230
R. indica (S)	181	AATGTTAAGGACGTTCCGCGGGTGATGAAGGAAGCCTTCCATGTCGCGAC	230

Figure 1. Partial nucleotide sequence in the Domain A of the resistant (R) and the susceptible (S) *R. indica* ALS showing the single codon (boxed) not common to both biotypes.

Table 1. Partial amino acid sequence (230bp) in the Domain A of the resistant and susceptible *Rotala indica* biotypes.

R-Type	T	S	G	P	G	A	T	N	L	V	T	S	I	A	D	A	K	M	D	S	I	P	L	I	A	I	T	G	Q	V
S-Type	T	S	G	P	G	A	T	N	L	V	T	S	I	A	D	A	K	M	D	S	I	P	L	I	A	T	T	G	Q	V
R-Type	¹⁹⁷ E	T	K	V	I	G	T	D	²⁰⁵ A	F	Q	E	T	P	²¹¹ I	V	E	I	C	R	G	I	T	K	H	H	Y	L	V	T
S-Type	P	T	K	V	I	G	T	D	A	F	Q	E	T	P	I	V	E	I	C	R	G	I	T	K	H	H	Y	L	V	T
R-Type	N	V	K	D	V	P	R	V	M	K	E	A	F	H	A															
S-Type	N	V	K	D	V	P	R	V	M	K	E	A	F	H	A															

NOTES: Amino acid sequences in bold letters are the conserved regions in Domain A.
The underscored amino acids are the mutation sites in the conserved region reported in other resistant species.
Boxed italicized amino acid(s) are unique in *R. indica*.
Amino acid position numbers are patterned from the sequence of *Arabidopsis thaliana* (Haughn, et al., 1986).

Table 2. Amino acid substitutions in two conserved regions within the ALS gene that confer resistance to ALS inhibitors in resistant weed species.

Species	Conserved Amino Acid Sequences														Reference					
	A	I	T	G	Q	V	P	R	R	M	I	G	T	A	F	Q	E	T	P	
<i>Arabidopsis thaliana</i>										S										Haughn et al., 1988
<i>Brassica tuornefortii</i>										A										Boutsalis et al., 1999
<i>Beta vulgaris</i>										S										Wright et al., 1998
<i>Kochia scoparia</i>										T										Gutteiri et al., 1992
										R										"
										L										"
										Q										"
										A										"
										S										"
<i>Lactuca serriola</i>										T										Gutteiri et al., 1995
										H										"
<i>Nicotiana tabacum</i>										Q (A)										Lee et al., 1988
<i>Salsola iberica</i>										L										cited in Devine& Eberlein,1997
<i>Sisymbrium orientale</i>										I										Boutsalis et al., 1999
<i>Xanthium strumarium</i>																V				Woodworth et al., 1996
<i>Scirpus juncoides subsp.</i>																				
<i>Juncoides</i>										L										Shibuya et al., 1999
<i>Lindernia micrantha</i>										Q										Uchino & Watanabe, 1999
<i>L. procumbens</i>										S										"
<i>L. dubia</i> var. <i>major</i>										S										"
<i>L. dubia</i> var. <i>dubia</i>										A										"