

タイトル	北海道の外来植物ブタクサ (<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.) におけるアトラジン耐性変異の解析
著者	山崎, 愛実; 小澤, 辰哉; 新沼, 協; YAMAZAKI, Ami; OZAWA, Tatsuya; NIINUMA, Kanae
引用	北海学園大学工学部研究報告(52): 55-62
発行日	2025-01-10

北海道の外来植物ブタクサ (*Ambrosia artemisiifolia* L.) におけるアトラジン耐性変異の解析

山 崎 愛 実*・小 澤 辰 哉*・新 沼 協*

Investigation of Atrazine-Resistant Ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) in Hokkaido

Ami YAMAZAKI, Tatsuya OZAWA and Kanae NIINUMA

要 旨

ブタクサ (*Ambrosia artemisiifolia* L.) は北米原産のキク科ブタクサ属の一年草である。花粉症の原因となり、日本を含む世界の広範な地域に移入しているため、その防除は世界的に重要な課題となっている。除草剤アトラジンはブタクサを含むキク科雑草に効果があるが、耐性を持つ変異体が存在することが報告されている。これまでに、北海道を含む日本国内ではアトラジン耐性変異をもつブタクサに関する報告はないことから、本研究では、北海道の各地でブタクサを採取しDNA解析を行って、アトラジン耐性変異体の侵入について調査を行った。

1. はじめに

ブタクサ *Ambrosia artemisiifolia* L. は、北米原産のキク科ブタクサ属の一年草である。この植物は種子寿命が長く、種子生産量が高い上に成長が速いという特徴をもち、アレロパシー作用による強い繁殖力がある¹⁾。さらに人為的な影響も重なり、現在ではアジアやヨーロッパなど世界中で生息域を拡大している²⁾ (図1)。

ブタクサは、農業への被害だけでなく、開花期にその花粉によってアレルギーを引き起こす。日本国内で最初に花粉症アレルゲンとして報告された植物でもあり³⁾、現在は沖縄や北海道を含む全国にその生息域を広げている。ブタクサはスギ、イネ科植物と並び、日本の3大花粉症原因植物の1つと言われている。北海道は、道内に生息する外来生物の対策を優先度でカテゴリー分別した外来種リスト (北海道ブルーリスト) を作成しているが⁴⁾、その中でブタク

* 北海学園大学工学部生命工学科

* Department of Life Science and technology, Faculty of Engineering, Hokkai-Gakuen University

サは「A2（本道の生態系等へ大きな影響を及ぼしており、防除対策の必要性について検討する外来種）」に指定されており、本道においてもブタクサの効果的な防除方法や分布拡大の抑制策の検討は重要な課題となっている。

ブタクサの防除は困難とされており、アメリカ合衆国やカナダでは研究や防除のために国家的規模の研究資金が投じられている。雑草の防除方法としては抜き取りや刈り取りなどの物理的防除や、除草剤を使用した化学的防除など挙げられるが、ブタクサでは、攪乱された土地は、翌年、さらに多くの個体が繁殖する温床となる⁵⁾。ブタクサの原産地であるアメリカでは、防除方法の1つとして、除草剤アトラジン

が使用されている。アトラジンは光合成阻害除草剤であり、光合成に関与するD1タンパク質に接着して電子伝達反応を阻害することにより、植物を枯死させる。一方で、アトラジンに耐性をもつ変異体の存在が報告されている⁶⁾。野生型ブタクサにおけるD1タンパク質をコードするpsbA遺伝子の、「TAG」(789–791bpの位置)のAが、耐性変異体ではGに置き換わってセリンがグリシンに変化しており⁷⁾、この変異によりD1タンパク質へのアトラジンの接着が阻害されてアトラジンへの耐性が生じる。Mátyásら（2011）はブタクサの上述のpsbA遺伝子のA/G塩基変化を検出するBi-PASAのプライマーセットを確立した⁸⁾。この手法は点変異を明らかにしうる他の手法、たとえばリアルタイムPCRや制限酵素処理による手法よりも、迅速かつシンプルであり、コストの面からも優れている。

日本国内ではアトラジン耐性ブタクサの増加が懸念されているが、その存在は報告されていない。本研究では、北海道内のブタクサ防除方法の検討に役立てることを目的とし、道内各地でブタクサの採取を行うとともに、その一部についてMátyásら（2011）の手法によりアトラジン耐性変異の検出を行ったので報告する。

2. 材料および方法

2.1 ブタクサの採取

本研究では、2017年度、2019年度、2021年度の3つの期間にわたり、北海道内45地点より計212個体のブタクサを採取した（表1）。そのうちの31地点計117個体について、アトラジン耐性変異の検出を行った。



図1 道路脇に生育するブタクサ
中央に生えている植物がブタクサである。このように畑周辺や道路脇に生育している様子がよく観察された。

表1 本実験で採取したブタクサの概要と変異体解析の結果

採取				Bi-PASA解析		
地点	年度	個体数	新たに確認された地点	解析した個体数	解析した個体番号	変異型DNAをもつ個体数
石狩市 新港南2丁目 (コストコ付近)	2021	8		8	C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8	0
石狩市 新港中央1丁目 (花畝幹線沿い)	2021	7		7	S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7	0
岩見沢	2019	2		2	IW1, IW2	0
岩見沢	2017	5		3	BI3, BI4, BI5	0
恵庭(2017)	2019	1	-	-	-	-
江別	2019	2	-	-	-	-
小樽市 港町	2019	3		2	OM2, OM3	0
小樽市 手宮	2019	2		1	OT2	1
小樽市 蘭島	2019	3		2	OR1, OR3	0
北広島大曲	2021	6		6	O1, O2, O3, O4, O5, O6	-
千歳市	2019	1		1	CT1	1
苫小牧市	2021	6		6	T1, T2, T3, T4, T5, T6	-
苫小牧市	2019	3		2	TM1, TM2	0
苫小牧市	2017	7		3	BT4, BT5, BT6	0
余市長浜中町	2019	3	○	3	YH1, YH2, YH3	0
余市町梅川町	2019	3	○	-	-	-
余市町富沢町	2019	4	○	2	YT3, YT4	0
札幌市手稲区手稲前田	2021	20		20	Re1, Re2, Re3, Re4, Re5, Re6, Rn1, Rn2, Rn3, Rn4, Rn5, Rn6, Rd1, Rd2, Rd3, Rd4, Rd5, Rd6, Rd7, Rd8	0
札幌市南区八剣山	2021	1		1	HK	0
札幌市南区藤野	2021	2		2	F1, F2	0
札幌市南区百松橋付近	2021	6		6	H1, H2, H3, H4, H5, H6	0
札幌市 (地点不明)	2019	3		-	-	-
帯広市	2019	5		4	OB2, OB3, OB4, OB5	0
鹿追町	2019	3	○	3	SH1, SH2, SH3	0
鹿追町	2019	1		1	SB1	0
新得 国道38号線沿い	2019	5	○	-	-	-
新得町 屈足	2019	3	○	-	-	-
清水町 熊牛	2019	3	○	-	-	-
清水町 御影	2019	4	○	-	-	-
清水町 南8条	2019	2	○	-	-	-
芽室	2019	5	○	4	MM1, MM2, MM3, MM4	0
留寿都町	2017	5	○	-	-	-
留寿都町	2019	4		4	RS1, RS2, RS3, RS4	1
喜茂別町	2017	5	○	1	BK2	1
喜茂別町	2019	2	○	-	-	-
七飯町	2019	3		2	NE1, NE2	0
森町	2019	3		2	MO2, MO3	0
洞爺湖	2019	3		2	TO1, TO3	0
函館市	2019	3		2	HD1, HD3	0
八雲町	2019	5		4	YK1, YK2, YK3, YK5	1
豊浦町	2019	4	○	4	TU1, TU2, TU3, TU4	0
旭川	2019	5		2	AS2, AS3	0
三笠市	2019	2		1	MK1	0
三笠市	2017	6		-	-	-
上富良野町	2019	5	○	-	-	-
西神楽	2019	2	○	-	-	-
積丹町	2019	3	○	2	ST1, ST3	0
中富良野町	2019	6	○	1	NF1	0
東神楽町	2019	1	○	-	-	-
東川町	2019	1	○	-	-	-
南富良野町	2019	4	○	-	-	-
美瑛町	2019	5	○	-	-	-
富良野市	2019	6	○	1	FR5	1
合計		212	23	117		6

ブタクサの採取地点、年度、個体数、新たにブタクサの生息が確認された地点、さらに、Bi-PASA法により解析した個体数、解析した個体番号、変異個体数を示している。個体番号のうち、変異型DNAを持つことが確認されたものには太字下線でマークした。

2.2 DNA抽出

新鮮葉はCTAB法、押花はDNeasy Plant Mini Kit（日本ジェネティクス株式会社）を用い、それぞれ標準プロトコールに従って、DNAの抽出を行った。

2.3 Bi-PASA法

ブタクサ個体のアトラジン耐性変異の有無について、Mátyásら（2011）の手法により解析を行った⁸⁾。このBi-PASA（bidirectional PCR amplification of specific alleles）法を用いた解析では、外側のプライマーセットは増幅領域の両端の配列に相補的、内側のセットであるプライマーはそれぞれ点突然変異と野生型の配列に相補的になっており、

野生型では278bpと208bp、変異型では278bpと109bpの増幅産物が期待される（図2、表2）。PCRにはKAPA Taq Extra（KAPKBIOSYSTEMS）を用い、反応液の組成は標準プロトコールに従った。具体的には、5 × KAPATaq Extra Buffer（without Mg^{2+} ）10 μ l, $MgCl_2$ 3.5 μ l, dNTPs（10mM each dNTP）1.5 μ l, psbAFプライマー（10 μ M）2.5 μ l, psbARプライマー（10 μ M）2.5 μ l, BP1Fプライマー（10 μ M）2.5 μ l, BP1Rプライマー（10 μ M）2.5 μ l, テンプレートDNA 0.5 μ l, KAPATaq Extra DNA Polymerase（5 U/ μ l）0.25 μ l, DDW 24.25 μ lとした。PCRの反応条件は、初期変性94℃ 2分の後、変性94℃ 15秒、アニーリング54℃ 15秒、伸長反応72℃ 30秒を35サイクルとした。PCR産物の電気泳動には4%アガロースゲルを用いた。

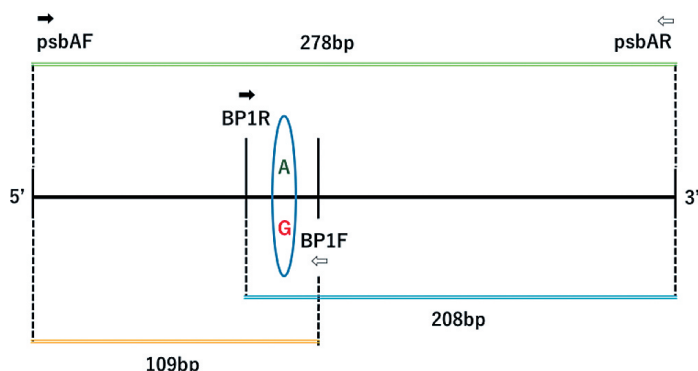


図2 本研究で用いたMátyásら（2011）によるBi-PASAの模式図：Mátyásら（2011）を一部改変
プライマーpsbAF/psbARは、ブタクサのアトラジン耐性の原因となる点突然変異をもつpsbA遺伝子の断片を増幅する。プライマーBP1Fは変異点にAを持つ野生型配列を特異的に、BP1RはGに置換された変異型配列を特異的に増幅するように設計されている。

表2 Bi-PASA法に用いたプライマーの配列

	Primer name	(5' → 3')
external primers	psbAF	ATGAAGGTTACAGATTCGGTC
	psbAR	TATCATTAACCGTGCTAACCTT
internal primers	BP1F	GAACGAGAGTTGTTGAAACC
	BP1R	TAGCATATTGGAAGATCAAT

Mátyásら（2011）のプライマーを使用した。

2.4 シーケンス解析

Bi-PASA法での検出にあたり、コントロールとして野生型のブタクサおよびアトラジン耐性変異型のブタクサのDNAサンプルが必要となる。サンプリングしたブタクサの中からランダムに9個体 (HD2, MM5, OB1, SH1, AS1, HK1, FR6, OM1: 表1) を用い、シーケンス解析を行った。DNAの増幅にはPCR法を用い、NCBIに登録されているpsbA遺伝子のDNA配列 (AB427162) に基づいて設計したプライマー (表3) を用いた。増幅産物のサイズは541bpが予想された。PCRにはKAPA Taq Extra PCR kit (KAPA BIOSYSTEMS) を用い、反応液の組成は添付のプロトコルに従い、5 × KAPATaq Extra Buffer (without Mg²⁺) 10μl, MgCl 23.5 μl, dNTPs (10mM each dNTP) 1.5μl,

BKseqF primer (10μM) 2.5μl, BKseqR primer (10μM) 2.5μl, Template DNA 0.5 μl, KAPATaq Extra DNA Polymerase (5 U /μl) 0.25μl, DDW 29.25μl. とした。PCR 条件は、初期変性94℃で2分の後、変性94℃15秒、アニーリング55℃15秒、伸長反応72℃40秒を35サイクルとした。Fast-Gene™ゲル/PCR抽出キット (日本ジェネティクス社) を用いPCR産物の精製を行ったのち、シーケンス解析を行った。また、アトラジン耐性変異型psbAのDNA (図3) は、ユーロフィンジェノミクス株式会社に合成を委託した。

表3 シーケンス用プライマー

Primer name	(5' → 3')
BKseqF	AGGAAGCTTTTCTGATGGTATGC
BKseqR	TTCCCTCTAGACTTAGCTGCT

シーケンス反応にはBKseqFを用いた。

GAATTCATGAAGGTTACAGATTCGGTCAAGAAGA
AGAACTTATAATATCGTAGCCGCTCATGGTTAT
TTTGGCCGATTGATCTTCCAATATGCTGGTTTCA
ACAACTCTCGTTCTTTACATTTCTTCCTAGCTGC
TTGGCCTGTAGTAGGTATCTGGTTCACTGCTTTA
GGTATCAGTACTATGGCTTTCAACCTAAATGGTT
TCAATTTCAACCAATCAGTAGTTGATAGTCAAGG
CCGTGTTATTAACACTTGGGCTGATATCATTAAAC
CGTGCTAACCTTGAATTC

図3 合成したアトラジン耐性変異型psbAのDNA配列
図中の網掛け部分が、野生型ではAであるが、変異体ではGになっている。本研究のDNA解析ではこの合成DNAを変異型のコントロールとして用いた。

3. 結果および考察

3.1 ブタクサの採取

本研究ではまずブタクサの採取を行った。2017年度および2019年度は北海道内の32地点156個体、2021年度は札幌市近郊の8地点 (札幌市内4地点、石狩市2地点、苫小牧市1地点、北広島市1地点) で56個体を、それぞれ採取した (表1)。

合計45地点 (地点の詳細が不明なものは同一市町村で1地点とカウントした) のうち、富良野市、中富良野町、上富良野町、美瑛町、東川町、東神楽町、西神楽町、南富良野町、新得町、鹿追町、清水町、芽室町、余市町、積丹町、喜茂別町、留寿都村、豊浦町の17地点は、最新の北海道ブルーリスト (2010) では記載のない地域であった⁴⁾ (表1)。研究時に、ブタクサが畑のあぜ際など、比較的肥沃な土壌の場所などを好んで生育している様子が見られた。ま

た、北海道におけるブタクサ花粉症の被害データは本州と比べて少なく、北海道ブルーリスト(2010)で報告されている生息域は他の外来植物と比べても顕著に広くはなかった⁴⁾。このため、当初は生息域はそれほど拡大していないと予測していたが、本結果よりブタクサの生息域は拡大していることが明らかになった。

3.2 アトラジン耐性変異の検出

Bi-PASA法を行うにあたり、コントロールとして野生型 $psbA$ 遺伝子のDNAおよびアトラジン耐性変異型のDNAサンプルが必要となる。採取したブタクサ個体のうちランダムに9個体(HD2, MM5, OB1, SH1, AS1, HK1, FR6, OM1)を選び、シーケンス解析を行ったところいずれの個体も野生型であった(図4)。このため、あらかじめシーケンス解析を行い野生型の配列を持つことが確認できているAS1、および変異型 $psbA$ 配列のDNAを外部委託したものを、野生型および変異型の

```
GCTGAGCACAAACATCCTTATGCACCCATTTAC
ATGCTAGGCGTAGCTGGTGTTCGGCGGCTCC
CTATTTAGTGCTATGCATGGTTCCTTGGAACCT
CTAGTTTGATCAGGGAAACCACAGAAAATGAAT
CTGCTAATGAAGGTTACAGATTTCGGTCAAGAAG
AAGAACTTATAATATCGTAGCCGCTCATGGTTA
TTTTGGCCGATTGATCTTCCAATATGCTAGTTTC
AACAACTCTCGTTCCTTACATTTCTTCCTAGCTG
CTTGGCCTGTAGTAGGTATCTGGTTCAGTGCTTT
AGGTATCAGTACTATGGCTTTCAACCTAAATGGT
TTCAATTTCAACCAATCAGTAGTTGATAGTCAAG
GCCGTGTTATTAACACTTGGGCTGATATCATTAA
CCGTGCTAACCTTGGTATGGAAATTATGCATGA
ACGTAATGCTCATAATTTCCC
```

図4 野生型ブタクサ個体の $psbA$ 遺伝子配列

シーケンス解析により得られたブタクサの $psbA$ 遺伝子配列の一例。データはAS1のものである。グレーの網掛け部分の塩基がAであるため、この個体は野生型であることが確認できる。

コントロールとして用いることとした。これらのコントロールDNAとともに、本研究で採取したブタクサ31地点117個体を用いて、Mátyásら(2011)の手法によりアトラジン耐性変異の検出を行った。コントロールについては、それぞれ期待通りのサイズのDNA増幅が得られた(図5)。採取したブタクサのうち、小樽市手宮、千歳市、喜茂別町、留寿都町、富良野市、八

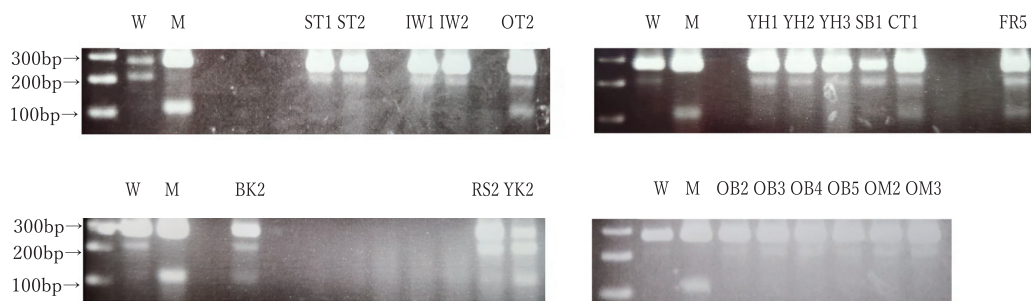


図5 北海道内で採取したブタクサ個体で得られた増幅パターン

本研究で得られたBi-PASA法による増幅パターンの一例を示した。コントロールとして、シーケンス解析により野生型であることが確認されたAS1(Wと示す)、変異型 $psbA$ 配列の合成DNA(Mと示す)を用いた。本手法では、野生型では278bpと208bp、変異型では278bpと109bpが期待される。ブタクサ個体OT2, CT1, FR5, BK2, RS2, YK2において、変異型 $psbA$ 配列の合成DNAと同様に、100bp付近にDNAの増幅が検出された。

雲町の各1個体、計6個体において変異型と同様のサイズのDNA増幅が確認された(図5)。

また、これらの6個体では、全て野生型と同様のサイズ(200bp付近)の増幅も見られた。これは、先行研究でも同様の結果が得られており、ヘテロプラズミーによるものであると考えられている⁸⁾。psbA遺伝子は葉緑体ゲノム上にコードされているが、葉緑体では変異型と正常型が1つの細胞内で混在する状態が知られており、これをヘテロプラズミーという⁹⁾。自然環境中に生育するブタクサのアトラジン耐性変異体ではこのヘテロプラズミーが起きていると考えられており⁸⁾、本研究において確認された変異型DNAの増幅パターンを示した6つのブタクサ個体においても、同様の現象が起きていると思われる。一般的に、ヘテロプラズミーは体細胞変異やモザイク現象などと同様に低頻度変異とよばれ、シーケンス解析による検出は困難を伴う。本研究により検出されたアトラジン耐性変異を持つブタクサ全6個体について、念の為、シーケンスによる塩基配列の確認も行ったが、やはりその波形は野生型のブタクサと同じものであった(data not shown)。このことから、本研究で得られたアトラジン耐性変異体はヘテロプラズミーであり、個体内の変異型DNAの割合は低頻度であると考えられた。

今回確認されたアトラジン耐性変異をもつ個体は、解析個体全体の約5.1%程度(6個体/117個体)であった。ただし、札幌市及びその近郊の8地点で採取した56個体は全て野生型であり、変異型は含まれなかった。一方で、各1個体の変異体が見つかった小樽市手宮、千歳市、喜茂別町、留寿都町、富良野市、八雲町のDNA解析個体合計数はそれぞれ2個体、1個体、5個体、5個体、4個体、6個体となっており、これらの地域では生息するブタクサの変異体の割合は高いかもしれない。地域によって変異型の含まれる割合が異なることを示すためには、今後十分な数のサンプルを用いて解析を行う必要がある。

4. まとめ

本研究により、北海道内でブタクサの生息域が拡大していること、さらに、その中にアトラジン耐性変異を持つブタクサが含まれていることが明らかとなった。北海道におけるアトラジン耐性変異ブタクサの侵入報告は本研究が初めてであり、この結果は今後のブタクサ防除計画の検討において重要な知見となる。地域ごとに耐性個体の割合を明らかにするためにはさらなる調査が必要であるが、この点が明確になれば、より効率的なブタクサ防除が可能になると考えられる。ブタクサは、気候変動、特に気温の上昇と大気中の人為的なCO₂の増加の影響により、今後も生息域の拡大が続く可能性が高いと考えられている²⁾。アトラジン耐性を持つブタクサの変異体を迅速かつ簡便に検出することは、今後ますます重要性を増すと考えられる。たとえばLAMP(Loop-mediated Isothermal Amplification)法のような、特殊な装置が不要で、幅広い実務者が効率的に検出を行える手法を用いたアトラジン耐性変異の検出方法が開発されれば、ブタクサの防除計画において重要な役割を果たすだろう。

謝辞

本研究にあたり，北海道各地のブタクサの収集にご協力いただきました生命工学科の皆様に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) W. Chengxu, M. Mingxing, C. Xuhui, Q. Bo : Review on Allelopathy of Exotic Invasive Plants., *Procedia Eng.*, 18, pp.240–246, 2011.
- 2) B. Knolmayer, I. Jócsák, J. Taller, S. Keszthelyi, G. Kazinczi. : Common Ragweed—*Ambrosia artemisiifolia* L. : A Review with Special Regards to the Latest Results in Biology and Ecology., *Agronomy*, 14(3), 497, 2024.
- 3) 関 眞規子 : 花粉症の背景. *順天堂医学*, 46 (1), pp22–26, 2000.
- 4) 北海道庁 : 北海道ブルーリスト2010 (2024年10月16日取得)
https://www.pref.hokkaido.lg.jp/ks/skn/alien/bluelist/bluelist_top.html
- 5) 小塩海平, ブタクサ花粉症小史, *職業・環境アレルギー誌*21巻 2 号2014.
- 6) Cseh, A. Cernák, J. Taller., Molecular characterization of atrazine resistance in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.). *J Appl Genet.*, 50(4), pp321–327, 2009.
- 7) W. Cheung, J. Cote, D. Benoit, B. Landry : A rapid assay for chloroplast–encoded triazine resistance, *Plant molecular biology reporter*, 11, pp142–155, 1993.
- 8) K. K. Mátyás, J. Taller, A. Cseh, P. Poczai, I. Cernák : Development of a simple PCR based assay for the identification of triazine resistance in the noxious plant common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) and its applicability in higher plants, *Biotechnology Letters*. 33(12), pp2509–2515, 2011.
- 9) A. J. Bendich : Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? *BioEssays*, 6, pp 279–282, 1987.