

稲由来の除草剤抵抗性ALSを利用した選抜マーカー

クミアイ化学工業(株)生物科学研究所 清水 力

<はじめに>

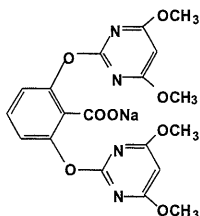
自社開発した除草剤(図-1)に対して抵抗性を付与する除草剤のターゲット遺伝子を植物の形質転換時に使用する選抜マーカー遺伝子として実用化する研究に取り組み、イネ及びシロイヌナズナ由来の変異型アセト乳酸合成酵素(acetolactate synthase: 以下ALSと略)の遺伝子を国産の選抜マーカー遺伝子として実用化した。本変異型ALS遺伝子はプラスミドベクターの形で薬剤と組み合わせて使用する。現在までのところ4種類のベクターを商品化し(図-2)¹⁾、今後さらに品揃えを増やす予定でいる。

本選抜マーカー遺伝子の研究を始めた当時は、植物の遺伝子組換えに多用されている選抜マーカー遺伝子は微生物由来の抗生物質耐性遺伝子であり、実用化を目指す組換え植物に本抗生物質耐性遺伝子を使用するためには特許権を持つ国外メーカーから特許の使用許諾を受ける必要

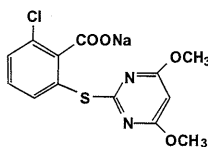
があった。また抗生物質耐性遺伝子は水平伝播することで抗生物質耐性能を獲得したバクテリアの出現が懸念されることから世界的に使用が制限される方向にあった。このような背景のもと、植物由来でかつ自然変異により得られた遺伝子であれば、国内で開発される実用的組換え植物に安心して使用してもらえと考え、ALS遺伝子の研究開発に取り組んだ。

変異型ALS遺伝子と組み合わせて使用する除草剤はALS阻害型除草剤と呼ばれているもので、分岐鎖アミノ酸(ロシン、バリン、イソロイシン)生合成経路上の調節酵素であるALS(図-3)を極めて低濃度で阻害することで植物を枯死させる。分岐鎖アミノ酸生合成経路は動物には存在しないので、ALS阻害型除草剤は安全性の高い薬剤である。筆者は本選抜マーカー遺伝子の研究開発に取り組む前に、合成化合物とALSの相互作用に関する研究に長く携わってい

イネ用除草剤及び抑草剤の
ビスピリバックナトリウム塩
bispyribac-sodium



ワタ用除草剤の
ピリチオバックナトリウム塩
pyrithiobac-sodium



イネ用除草剤の
ピリミノバックメチルの
活性本体ピリミノバック
pyriminobac

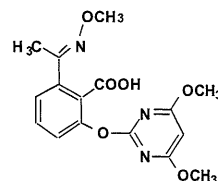


図-1 ALS阻害型PC除草剤

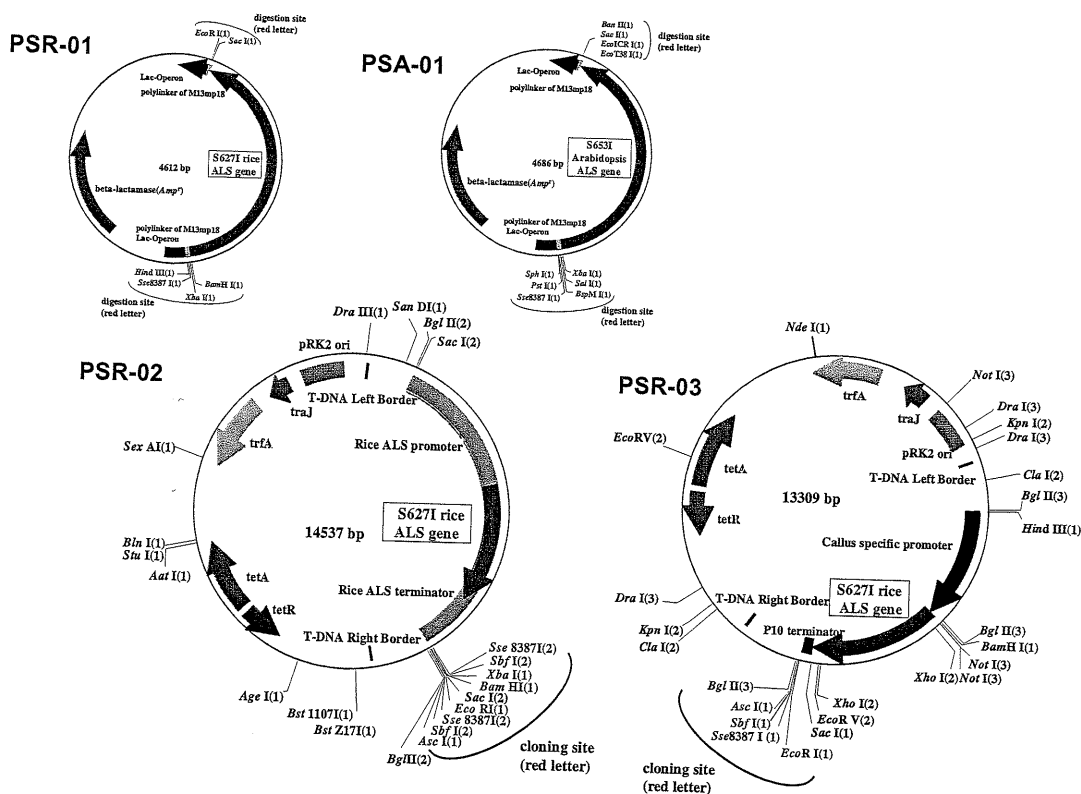


図-2 実用化したベクターのコンストラクト

上段はpUCベクター、下段はpPALsベクターと命名した新規バイナリーベクターであり、薬剤とのセットで Pal Select として販売

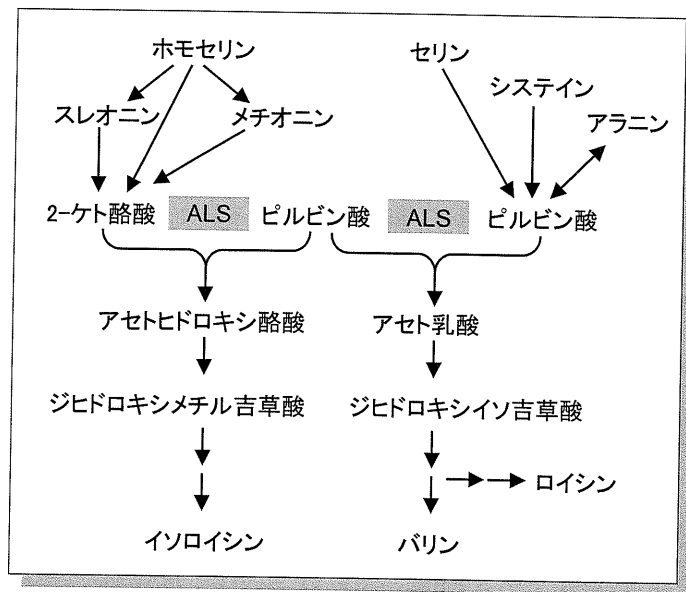


図-3 分岐鎖アミノ酸合成経路

ALS阻害型除草剤は図中でALSと表示したアセト乳酸合成酵素 (acetylactate synthase) を阻害する

た²⁾。ALS阻害型除草剤の多くは国外のメーカーにより開発されてきた経緯があり、またこれらの除草剤に対して抵抗性を示す雑草や作物に関しても多くの研究報告が出されている。そこで、ALSに関するこれらの研究内容を概括した後で、拙稿の目的である選抜マーカー遺伝子とこれに関する周辺技術を紹介する。

<ALSとALS阻害型除草剤>

コムギ用の除草剤であるスルホニルウレアタイプのALS阻害

型除草剤のchlorsulfuronが1982年からアメリカで販売が開始され、その2年後にはスルホニルウレア系およびイミダゾリノン系除草剤のターゲットが分岐鎖アミノ酸生合成経路上のALSであることが明らかにされた。それ以来、ALSとALS阻害剤に関する多面的な研究が生物サイドから活発に行われて来た。ALSとALS阻害型除草剤に関する研究は、ALS酵素タンパク質及び遺伝子の基礎研究、薬剤の作用メカニズム研究、薬剤の作物-雑草間の選択性メカニズム研究、薬剤の薬害を軽減するセイフナーに関する研究、そして薬剤抵抗性植物に関する研究に分類できる。筆者のグループも1984年の後半よりPC除草剤と呼ぶ自社除草剤の作用メカニズム研究を開始し、早期に本除草剤のターゲットがALSであることを明らかにした。

成業ではALSを含めた分岐鎖アミノ酸生合成系の酵素はクロロプラストに局在していることが知られている。植物体からの酵素の完全精製が成功していないために植物体中でのALSの多量体構造は現在でも未解明であるが、酵素の触媒活性を司るタンパク質（触媒サブユニット）と最終生産物である分岐鎖アミノ酸によるフィードバック制御を受けるタンパク質（制御サブユニット）の複合体の形で植物体中に存在していることは確かである。通常は酵素反応の酸化還元に関わっているコファクターのフラビンアデニンジヌクレオチドがタンパク質の多量体構造の安定化に役立っていると考えられている。なお、筆者らが実用化した遺伝子は触媒サブユニットをコードする遺伝子である。多種類の植物のALS遺伝子が解明されたこと及び抗体アフィニティークロマトグラフィーで精製された触媒サブユニットの解析から、植物の触媒サブユニットの分子量は6万5千前後であると考えられて

いる。しかしながら、葉緑体へ局在化するためのシグナルペプチド部分がどの位置で切断されるかが明確にされておらず、それぞれの植物の触媒サブユニットの分子量はあくまでも推定値である。この植物ALSをスルホニルウレア系除草剤とPC除草剤は基質であるピルビン酸に対して拮抗と非拮抗の中間型の混合型で、イミダゾリノン系除草剤は不拮抗型で阻害する。またコファクターのチアミンピロリン酸に対する阻害形式に関しては報告されている結果が一致していないが、少なくともこれらの薬剤とチアミンピロリン酸は拮抗することはないものと結論されている。これらの結果は薬剤のALS上の結合部位が基質やコファクターが結合する触媒部位とは違うことを示唆している。

一方、スルホニルウレア系除草剤のALS阻害が最初に証明されたのは細菌のサルモネラ菌を材料とした研究であり、ALS阻害メカニズムの研究は研究初期の段階ではバクテリアの方が進んでいた。大腸菌やサルモネラ菌等の腸内細菌科は3種のアイソザイム（I, II, III）を有しており、各々が良く似た大きさの触媒サブユニットから成っている。植物の場合とは異なりサルモネラ菌アイソザイムIIの場合には2つの触媒サブユニットと2つの制御サブユニットからなる4量体として菌体内に存在していることが証明されている。このバクテリアの酵素を材料として、極めて重要なことが明らかにされた。それは、ALS阻害型除草剤のALS上の結合部位は長い進化の過程で機能を失ったユビキノン結合部位であるというものである³⁾。ALSとアミノ酸の配列が似ている酵素としてピルビン酸オキシダーゼが知られており、本酵素はALSの先祖的な酵素だと考えられている。本酵素はコファクターとして酸化還元を司るユビキノンを必要とする。

このピルビン酸オキシダーゼから分子進化したと考えられるALSは機能的に無用で過去の遺物となったユビキノン結合部位を未だに持っていることが、ユビキノン自体がALS活性を阻害するだけでなくALS阻害型除草剤とALSの結合を妨げることから明らかにされた。

<ALS阻害型除草剤抵抗性雑草>

ALS阻害型除草剤が世界規模で多用されるようになったため、本タイプの薬剤に対して抵抗性を示す雑草の出現が1990年代から多数報告されるようになった。ACCase阻害型除草剤抵抗性雑草を含めて全世界で250種類以上にのぼる除草剤抵抗性雑草が報告されているが、その内ALS阻害型除草剤抵抗性雑草種の報告は100種近くにのぼる。国内においても少なくとも12種類のALS阻害型除草剤抵抗性雑草が報告されている。これらに関する情報は、アメリカのHerbicide Resistance Action Committeeとアメリカ雑草学会 (Weed Science Society of America) が

中心となって立ち上げたWebサイト⁴⁾及び日本除草剤抵抗性ワーキンググループのWebサイト⁵⁾を参照して頂きたい。

最初のALS阻害型除草剤はアメリカで開発されアメリカで使用され始めたことから、抵抗性雑草の出現はアメリカ国内で初めに確認された。このため、抵抗性雑草遺伝子の解析についても同国が先行した。ターゲットであるALSの遺伝子が解析された結果、光合成電子伝達系阻害型除草剤の場合と同じように、遺伝子が抵抗性型へと変異していることが明らかにされた。その後、日本を含む他の国でも抵抗性雑草の遺伝子変異が解明され、現在ではALSタンパク質中で保存されているアミノ酸のそれぞれ別の場所の少なくとも5つの変異がALS阻害型除草剤抵抗性を付与することがわかっている (表-1)。それぞれ別の5箇所もの変異が除草剤抵抗性を付与することには少し驚きを感じるが、これにはそれなりの理由がある。ALSタンパク質上の除草剤が結合する部位は上述したように酵素の

表-1 ALS阻害型除草剤抵抗性を付与する雑草のALSタンパク質の変異

植物種	変異場所	イネの位置	変異後アミノ酸	抵抗性
<i>Amaranthus sp.</i>	Pro	171	Leu	
	Trp569	548	Leu	
	Ser	627	Asn, Thr	IM
<i>Ambrosia sp.</i>	Trp574	548	Leu	
<i>Brassica tournefortii</i>	Pro	171	Ala	SU
<i>Lactuca serriola</i>	Pro197	171	His	SU
<i>Kochia scoparia</i>	Pro189	171	Thr, Ser, Arg, Leu, Gln, Ala	SU
	Trp570	548	Leu	
<i>Sisymbrium orientale</i>	Pro	171	Ile	SU
	Trp	548	Leu	(SU)
<i>Xanthium strumarium</i>	Ala100	96	Thr	IM
	Ala183	179	Val	(IM)
	Trp552	548	Leu	IM
<i>Lindernia dubia</i>	Pro	171	Ala	SU
<i>Lindernia dubia</i> subsp. major	Pro	171	Ser	SU
<i>Lindernia micrantha</i>	Pro179	171	Ala, Gln, Ser, Lys	SU
<i>Lindernia procumbens</i>	Pro	171	Gln, Ser	SU
<i>Scirpus juncoides</i>	Pro	171	Leu	SU

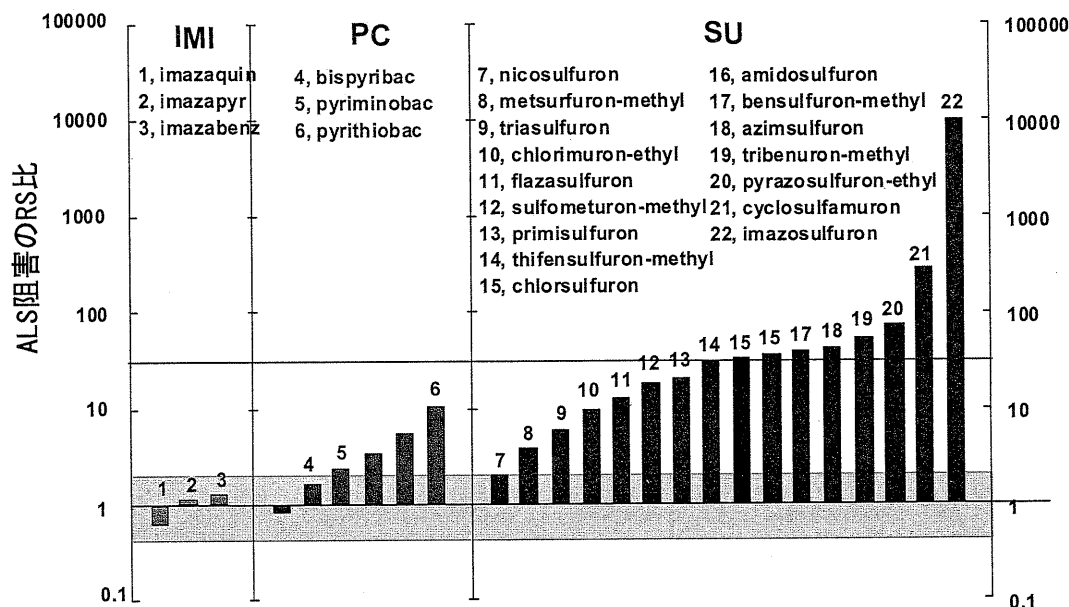


図-4 ALS阻害型SU除草剤抵抗性コチアから調製したALSの各種ALS阻害型除草剤に対するRS比
 RS比= (SU除草剤抵抗性コチアALSに対する薬剤の50%阻害濃度) ÷ (野生型コチアALSに対する薬剤の50%阻害濃度)

触媒部位ではなく、それから少し離れた触媒活性に直接関与しない今では機能を失ったユビキノ結合部位である。さらにALS阻害型除草剤には化学構造が異なる少なくとも3種のタイプの除草剤が存在し、これらの薬剤のALSタンパク質上の結合部位は薬剤間で少しずつ異なっている。したがって、触媒活性を大きく低下させることなく除草剤結合部位が自然変異(種内変異)する確率が高く、またその変異部位は薬剤に対応して違ってくると思われる。これは言い換えれば、変異を持つALSの各種ALS阻害型除草剤に対する交差抵抗性の強さは変異の場所によって異なるということである。実際、スルホニルウレアタイプやイミダゾリノンタイプのALS阻害型除草剤に対して抵抗性を示す雑草由来の一部の変異型ALSは、筆者の会社が開発したALS阻害型除草剤であるPC除草剤に対しては抵抗性を示さないことが明らかになっている⁶⁾。図-4にスルホニルウレアタイプの除草剤に抵抗性

を示すアメリカのホウキギ(*Kochia scoparia*)から調製したALS酵素の他の薬剤に対する交差抵抗性の結果を示した。このホウキギはスルホニルウレア系除草剤のchlorsulfuronが多用されたコムギの圃場に出現したスルホニルウレア系除草剤抵抗性の雑草であり、スルホニルウレア系除草剤全般に対して抵抗性を付与するがイミダゾリノン系薬剤には抵抗性を付与しないプロリンのセリンへの変異を持っている。この変異型酵素は、PC除草剤のbispyribac-sodiumやpyriminobacに対して交差抵抗性を示さなかった⁷⁾。

＜作物及び実験植物由来のALS阻害型除草剤抵抗性ALS遺伝子＞

スルホニルウレア系除草剤を開発したアメリカの化学会社では、ターゲットを明らかにする以前から、本除草剤抵抗性を付与した作物を育成することを目的に本除草剤抵抗性植物や微生物

物の作出を始めていたと考えられる。ターゲットが明らかにされた2年後の1986年には、スルホニルウレアタイプのALS阻害型除草剤に対して抵抗性を示すタバコ及び酵母菌並びに大腸菌のALS遺伝子の複数の変異がスルホニルウレア系除草剤抵抗性を付与することが示され、この変異に関する膨大なデータ有する特許が出願された⁸⁾。一方では、別の研究グループがイミダゾリノンタイプのALS阻害剤に対して抵抗性を示す変異についても研究を進め、スルホニルウレア系除草剤の開発会社とは異なる変異を見出した。その後、公的研究機関を含めて多くの研究者が試験的に或いは実用化を目指してALS阻害型除草剤抵抗性植物を作出して、ターゲット遺伝子の変異を解析した。筆者らのグループも薬剤との共存培養によりPC除草剤のbispribac-sodiumに抵抗性を示すイネ培養細胞を作出して、農業生物資源研究所の協力を得てその培養細胞から新規なTry548Leu/Ser627Ile 2点変異型ALS

遺伝子 (DDBJ accession number : AB049823) を単離した⁹⁾。そこで現在までに報告されている作物及び実験植物由来のALSの変異をまとめると表-2のようになる。これらの変異は抵抗性雑草で報告されている変異と酷似している。

筆者らがイネ培養細胞からの変異型ALS遺伝子の単離を計画した時点で既に多くの変異が公表されており、新規な変異を見出すのは困難ではないかと危惧する声もあったが、単離できるのを信じて研究を進めた。というのは上述した酵素阻害反応の動的解析やALS阻害型除草剤抵抗性雑草の交差抵抗性の試験結果から、PC除草剤のALSタンパク質上の結合部位が他のALS阻害型除草剤とは若干異なっていることが示唆されていたからである。結合部位が違っていれば、その薬剤で人為選択を行えば、新規な変異が得られるとの期待を持っていた。こうして単離した変異型遺伝子から大腸菌で発現させた変異型ALSタンパク質は、bispribac-sodiumに対して

表-2 ALS阻害型除草剤抵抗性を付与する作物及び実験植物のALSタンパク質の変異

植物種	変異場所 イネの位置		変異後のアミノ酸		
			変異育種	細胞変異	部位特異的変異
<i>Nicotiana tabacum</i>	Ala121	96			Thr
	Pro196	171		Gln, Ala, Ser	
	Trp537	548		Leu	Phe
	Ser652	627			Asn, Thr
<i>Beta vulgaris</i>	Ala113	96		Thr	
	Pro188	171			Ser
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ala122	96			Val
	Met124	98			Glu, Ile, His
	Pro197	171	Ser		deletion
	Arg199	173			Ala, Glu
	Phe206	180			Arg
	Trp574	548			deletion, Leu, Ser
	Ser653	627		Asn	deletion, Thr, Phe
<i>Brassica napus</i>	Pro173	171			Ser
	Trp557	548		Leu	
<i>Gossypium hirsutum</i>	Trp563	548		Ser, Cys	
<i>Zea mays</i>	Ala90	96	Thr		
	Trp552	548	Leu		
	Ser621	627	Asp	Asn	
<i>Oryza sativa</i>	Trp548	548		Leu	
	Ser627	627		Ile, Asn	

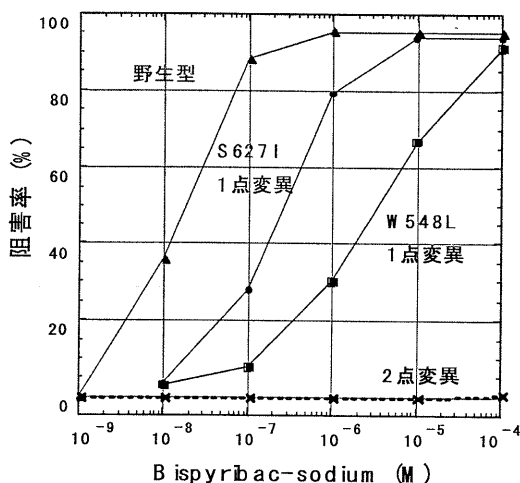


図-5 大腸菌で発現させたALSタンパク質の薬剤感受性

Try548Leu/Ser627Ile 2点変異型ALS遺伝子から発現したALSタンパク質は100 μ Mのbispyribac-sodiumに対してほぼ完全に抵抗性を示した

特異的に強い抵抗性を示した (図-5)。そしてこの結果に勇気付けられて、単離した2点変異型ALS遺伝子の2つの変異と他のbispyribac-sodium抵抗性培養細胞から見つかったさらに2つの変異を併せて全部で14種類 (1点変異型ALS遺伝子を4種類, 2点変異型ALS遺伝子を5種類, 3点変異型ALS遺伝子を4種類, 4点変異型ALS遺伝子を1種類) の変異型ALS遺伝子的人為的に合成してこれらの遺伝子からできる変異型ALSタンパク質の薬剤感受性を詳細に検討した。その結果, 単離した2点変異型ALS遺伝子よりもさらに特異的にPC除草剤に抵抗性を示す変異型ALSやスルホニルウレア系除草剤に特異的にかつ従来の変異型よりもさらに強い抵抗性を示す変異型ALS等を見出した^{10, 11)}。

<ALS阻害型除草剤抵抗性ALS遺伝子の遺伝子組換え技術への利用>

除草剤に抵抗性を付与する遺伝子は除草剤抵抗性作物を分子育種するための遺伝子素材とし

て使用できるだけでなく, 除草剤と組み合わせて使用することで植物遺伝子組換え操作の選抜マーカー遺伝子として利用できる。そこで, 遺伝子組換え植物を作出する技術の歴史的な流れを単子葉植物を例にあげて概括した後に, 筆者らが単離合成した除草剤抵抗性遺伝子の選抜マーカー遺伝子としての利用について紹介する。

植物の遺伝子を改変する方法は, 目的遺伝子をベクターに乗せて, その遺伝子を植物ゲノム中に導入する方法及び所望の塩基配列を持つオリゴヌクレオチドを物理的に細胞内へ導入して植物が元来持つ遺伝子の修復機構を利用して狙った遺伝子を変化させる方法の2つに大別される。前者の方法において, 目的遺伝子を植物へ導入する技術としては, エレクトロポレーション法, ポリエチレングリコール (PEG) 法, パーティクルガン法 (遺伝子法) 等の物理的導入方法及びアグロバクテリウム形質転換法と呼ばれる生物学的な方法を挙げることができる。アグロバクテリウム形質転換法は, 植物病原細菌の一種であるアグロバクテリウム菌が植物に感染すると, 自らが持つTiプラスミドやRiプラスミド上に存在するT-DNA領域を, 植物のゲノム中へ組み込む性質を利用している。

イネやトウモロコシ等の単子葉植物では, エレクトロポレーション法とパーティクルガン法が比較的効率良く目的遺伝子をゲノム中へ導入できる方法として使用されていた。一方, アグロバクテリウム形質転換法は, 双子葉植物で多くの形質転換植物が作出されたにも関わらず, 単子葉植物に適用することは難しいと言われていた。その理由は, アグロバクテリウム菌が元来双子葉植物に感染する植物病原細菌であり, 単子葉植物への感染率が低いことに起因した。しかし, その後, アグロバクテリウムを感染させ

る植物の状態やアグロバクテリウムと植物の共存培養に添加する培地成分が改良され、本法で単子葉植物を形質転換することが可能となってきた。アグロバクテリウム形質転換法は三系交雑法を利用する中間ベクター法とTiプラスミドを2つのプラスミドに分割して利用するバイナリーベクター法の2種に分けられる。この内バイナリーベクター法と呼ばれる方法による単子葉植物の形質転換方法は、T-DNAからホルモン合成遺伝子が除去されたディスアーム型Tiプラスミドを有する強病原性アグロバクテリウム菌(EHA101, 105等)とpBI121等のバイナリーベクターの組み合わせを利用する方法及びディスアーム型Tiプラスミドを有する中程度病原性アグロバクテリウム菌(LBA4404, GV311等)とpTOK233等のスーパーバイナリーベクターの組み合わせを利用する方法の2つに分けられる。前者の方法はバイナリーベクターを持たせる宿主の方に工

夫が施されている。即ち、宿主範囲が広く、他のアグロバクテリウム菌よりも形質転換効率が高い強病原性アグロバクテリウムA281が持つTiプラスミドから作出されたディスアーム型Tiプラスミドを持つEHA系列の宿主菌(EHA101, EHA105)を利用することにより、バイナリーベクター側に手を加えなくても、イネに代表される単子葉植物の形質転換効率が高まった。後者ではバイナリーベクター側に工夫が施されている。バイナリーベクターにvirBやvirG等の病原性に関与する遺伝子を持たせることで、宿主菌が強病原性菌でなくとも単子葉植物の高効率での形質転換が可能となった。アグロバクテリウム菌の感染を受け、外来遺伝子が導入された細胞は、目的遺伝子と同時に導入される選抜マーカー遺伝子の機能により、未導入の細胞から選別される(図-6)。選抜マーカーによって選別された形質転換体には目的遺伝子が導入されている

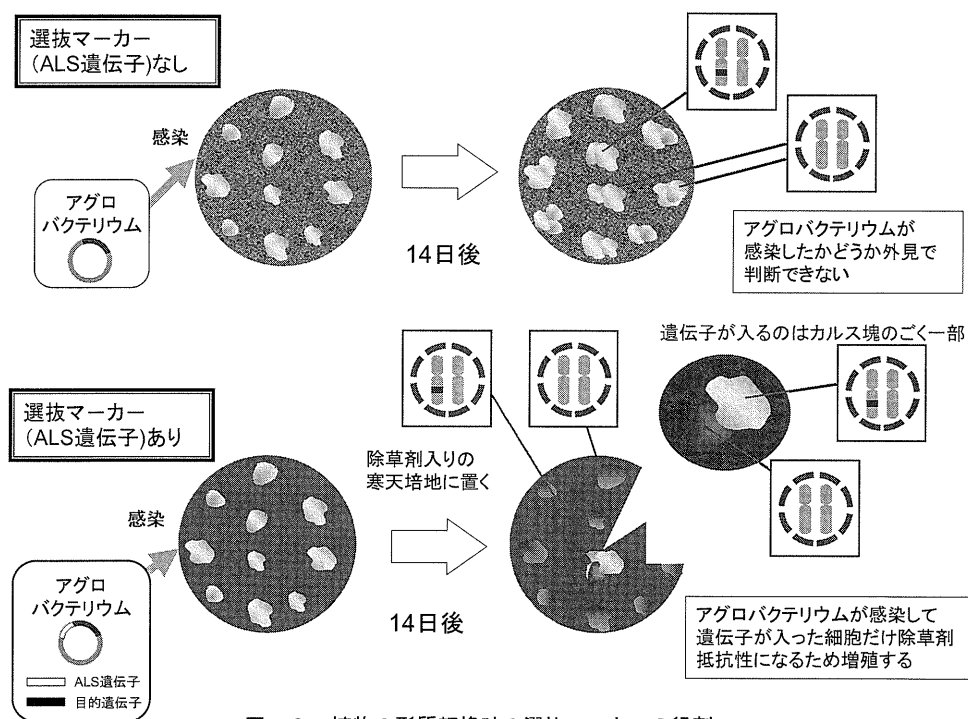


図-6 植物の形質転換時の選抜マーカーの役割

確率が極めて高いので、マーカー選抜の後で目的遺伝子の導入の確認や目的遺伝子が植物体で機能しているかどうかを調べる。ここで、選抜マーカー遺伝子としてよく使用されているのは抗生物質のカナマイシンやハイグロマイシン或いは除草剤のglufosinateを不活性化する酵素タンパク質をコードする遺伝子である。これらはすべてバクテリア由来の遺伝子である。初めに述べたように、抗生物質耐性遺伝子については、遺伝子の水平伝播による抗生物質耐性菌の出現が懸念されることから使用が制限される方向にある。また特に食品となる植物では食経験のないバクテリア由来の遺伝子を使用することに対して日本やヨーロッパでは消費者の厳しい目が注がれている。このようなことから、食用となる植物の遺伝子組換えを行う場合には、植物由来の遺伝子を利用するのが好ましいと考えられる。

筆者らは、この観点からバクテリア由来の抗生物質耐性遺伝子の代替として除草剤抵抗性を

付与するイネ由来の変異型ALS遺伝子を選抜マーカー遺伝子として利用することを始めた。先に述べたように、単離或いは合成したイネ由来の変異型ALS遺伝子から発現するALSタンパク質は、試験管の中で強い薬剤抵抗性を示すので、薬剤と組み合わせることで選抜マーカーとして利用できることが期待される。そこで、変異型ALS遺伝子を植物へ導入した時にこれらの遺伝子がほんとうに選抜マーカー遺伝子として機能するのかどうかまたこの遺伝子を導入した植物が正常に生育するかどうかについてイネとシロイヌナズナを材料にして検討を加えた。高発現プロモーターで制御した変異型ALS遺伝子をハイグロマイシン耐性遺伝子を選抜マーカーとするベクターを利用して上述した方法によりイネに導入してハイグロマイシンで選抜されたイネ培養細胞のbispyribac-sodium感受性を調べた。その結果、選抜された培養細胞は変異型ALS遺伝子の由来細胞と同様な薬剤抵抗性を示し、bispyribac-sodiumでも選抜することが可能である



BS処理濃度
(gai/ha)

ポット 配置図

100	250
500	750
1000	

図-7 高発現型プロモーターでドライブしたTry548Leu/Ser627Ile 2点変異型ALS遺伝子を導入した形質転換イネの薬剤感受性

形質転換イネは高薬量のbispyribac-sodiumに対して抵抗性を示した

ことが示された。また、別途floral dipと呼ばれる方法でシロイヌナズナを形質転換して、直接bispyribac-sodiumで選抜したところ、約1%という高い効率で選抜できることがわかり、イネ由来の本遺伝子がシロイヌナズナという異種植物でも選抜マーカー遺伝子として利用できることが明らかとなった。イネについては遺伝子が導入された培養細胞から植物体を再分化させ、再分化した植物体から薬剤抵抗性形質に関してホモ接合体の株（孫の世代）の種子を採り、その種子が発芽成長した植物体の薬剤感受性を調べるとともに形態や種子数を原品種のイネと比較した。その結果、調べた株は明瞭な薬剤抵抗性を示し（図-7）、原品種と同様に生育して種子を稔らせ、導入遺伝子が高発現した場合でもイネは正常に育つことが明らかとなった¹²⁾。一方、植物体では働かずに培養細胞だけで働く

イネ由来のプロモーターで制御した変異型ALS遺伝子でイネを形質転換した場合にも本遺伝子が有効な選抜マーカーとなることが筆者らの共同研究先の北陸研究センターのグループにより明らかにされた。選抜マーカー遺伝子の下流にクラゲ由来の蛍光タンパク質（GFP）のカセットをつなげたベクターで形質転換されたイネはbispyribac-sodiumにより効率良く選抜され、選抜された細胞はGFPの蛍光を発した（図-8）¹³⁾。この培養細胞だけで働くプロモーターの活性はそれほど強くないことから、この結果は通常レベルの発現をもたらすプロモーターで制御した場合にも変異型ALS遺伝子は選抜マーカーとして有効であることが証明されただけでなくプロモーターに工夫を加えれば本遺伝子の可食部（種子）での発現を抑制できる可能性が示唆された。

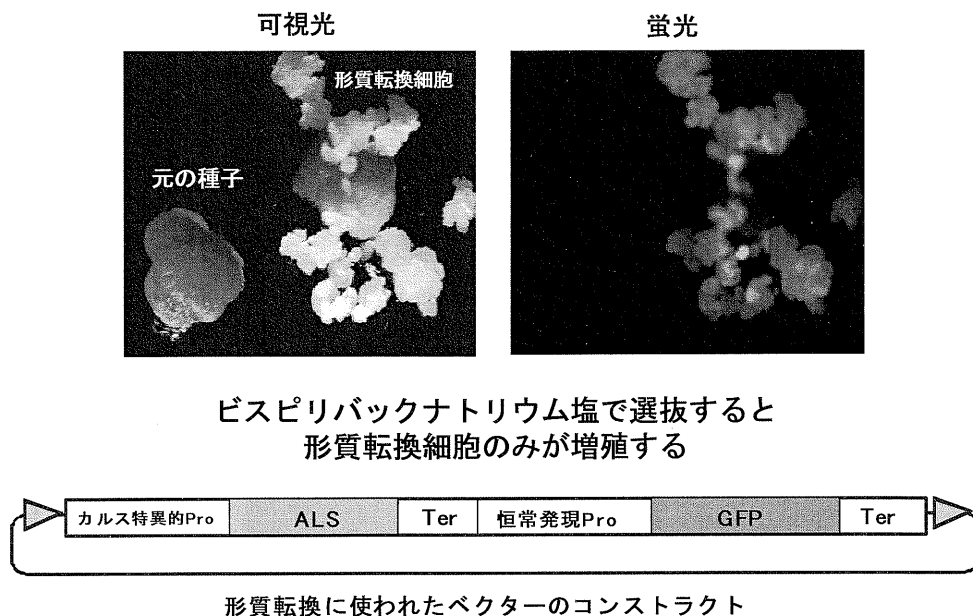


図-8 カルス特異的プロモータでドライブしたTry548Leu/Ser627Ile 2点変異型ALS遺伝子を導入した形質転換イネのGFP蛍光

カルス特異的プロモータでドライブしたTry548Leu/Ser627Ile 2点変異型ALS遺伝子を選抜マーカー、目的遺伝子をGFP遺伝子とするベクターで形質転換されたイネは、bispyribac-sodiumで効率良く選抜され、選抜された細胞はGFP蛍光を発した

以上の結果はイネ培養細胞から単離したTty548 Leu/Ser627Ile 2点変異型ALS遺伝子の選抜遺伝子利用に関するものであるが、商品化したベクターに使用したSer627Ile 1点変異型ALS遺伝子の場合にも同様な結果が得られている（薬剤はpyrithiobac-sodium或いはpyriminobac）。また、商品化したベクターの内、直接植物の形質転換に利用できるバイナリーベクター（イネ由来カルスト異質のプロモーターでドライブしたSer627Ile 1点変異型ALS遺伝子を持つベクター及びイネ由来ALSプロモーターでドライブしたSer627Ile 1点変異型ALS遺伝子を持つベクター）については、イネの形質転換に利用できることを確認済みであり、現在はその他に合成した変異型ALS遺伝子についても選抜マーカーとしての性能検証を急いでいる。これらの変異型ALS遺伝子は、先行特許との関係を考慮しながら、権利面で制約の無いものから選抜マーカーとしての実用化を図る予定である。

<むすび>

除草剤抵抗性を付与するイネ由来の変異型ALS遺伝子は除草剤との組み合わせで植物形質転換の選抜マーカー遺伝子として有用である。付与する薬剤抵抗性が異なる複数の変異型ALS遺伝子の提供が可能である。薬剤感受性の異なる複数の選抜マーカー遺伝子を利用すれば複数の目的遺伝子を植物へ導入できる。このマーカー遺伝子を複数揃えるという発想は、雑草や実験植物のALSがタイプの異なるALS阻害型除草剤による人為選択に対してそれぞれの薬剤に対応した変異を起こすという現象を逆手に取ったものである。イネ由来の変異型ALS遺伝子はシロイヌナズナでも機能するので、イネだけに限らずに植物全般に汎用的に利用できるマーカー遺伝子

として利用できる可能性が高い。同様にシロイヌナズナの遺伝子も多くの植物で使用されることが期待される。

先に述べた遺伝子導入方法をさらに発展させて、葉緑体ゲノムの相同組換えによる遺伝子組換えが植物バイオテクノロジー分野の先端研究として進められている。また、現時点では未完成である植物核ゲノムの相同組換えを成功させることも植物バイオテクノロジーに取り組んでいる研究者の目標の一つである。これらの技術が完成すれば遺伝子組換え作物の実用利用が一步前進すると考えられる。ALS遺伝子は核ゲノムにコードされているが、ALSタンパク質が機能する場所は葉緑体である。したがって、葉緑体遺伝子の相同組換え時の選抜マーカー遺伝子としても変異型ALS遺伝子は有望である。また、除草剤に抵抗性を示すという解析し易い表現型から、ALS遺伝子は核ゲノムの相同組換えや上述した修復機構を利用した遺伝子改変実験のターゲット遺伝子としても優れている。さらに新規な植物形質転換方法を構築する上でのマーカー遺伝子としての利用価値も高いと考えられる。

変異型ALS遺伝子の選抜マーカー利用は、新規除草剤の開発研究を礎にして始まり、除草剤抵抗性雑草の多様性に富む種内変異が開発のヒントになった。研究当初、筆者らは選抜マーカーの対象となる遺伝子に関連した仕事を行っていたに過ぎないが、本研究に対して他の研究者の方々に興味を持って頂いた結果、現在では植物バイオテクノロジーに関する多面的な研究に発展している。本遺伝子を選抜マーカーとする実用的な遺伝子組換えイネの作出も始まっている。変異型ALS遺伝子は選抜マーカー遺伝子としてだけでなくレポーター遺伝子としても使用できる¹⁴⁾ことから、今後は本遺伝子の利用技術をさ

らに改良して国内の植物バイオテクノロジーの進歩に役立て、翻ってそのバイオテクノロジーの技術を新しい農薬の研究開発に利用することが筆者及び筆者と共に働いているスタッフの願いである。最後に、イネ培養細胞からの遺伝子単離を共同して進めて下さった農業生物資源研究所植物科学研究所生理機能グループの田中喜之上席研究官に感謝申し上げる。

<引用>

- 1) <http://www.kumiai-chem.co.jp/palselect/index.html>
- 2) Shimizu, T. 1997. Action mechanism of pyrimidinyl carboxy herbicides. *Journal of Pesticides Science* 22:245-246.
- 3) Schloss, J. V., L. M. Ciskanik, & D. E. Van Dyk. 1988. Origin of herbicide binding site of acetolactate synthase. *Nature* 331:360-632.
- 4) <http://www.weedscience.org/in.asp>
- 5) <http://jhrwg.ac.affrc.go.jp/JHRWG.html>
- 6) <http://www.weedscience.org/mutations/MutDisplay.aspx>
- 7) 清水力ら. 2001. SU及びIMI抵抗性雑草から調製したALSのPC除草剤感受性. 雑草研究第46巻(別号):32-33.
- 8) 特許公報第2759135号
- 9) Shimizu, T., I. Nakayama, K. Nagayama, T. Miyazawa, & Y. Nezu. 2002. Acetolactate synthase inhibitors. *Herbicide Classes in Development* edited by P. Böger, K. Wakabayashi and K. Hirai, Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp.1-41.
- 10) 国際公開特許W002/044385
- 11) 国際公開特許W003/083118
- 12) 河合清ら. 2003. イネ由来ALS遺伝子の選抜マーカーとしての機能. 第21回日本植物細胞分子生物学会(香川大会)講演要旨集. p.78.
- 13) 大島正弘. 2003. 抗生物質耐性遺伝子を使わない新しい遺伝子組換えイネ選抜技術の開発. *ブレインテクノニュース*. 97:15-19.
- 14) 河合清ら. 2004. ALS遺伝子を選抜マーカーとする植物形質転換法の確立. 第22回植物細胞分子生物学会(秋田大会)講演要旨集. p.46.

写真で見る植物用語

岩瀬徹・大野啓一／著
A5判
定価(本体2,200円＋税)

図鑑にはさまざまな用語は使われていますが、読んでもよくわからない、といったことがあります。しかし、写真で見ると一目瞭然。本書は一つ一つの用語を実物の写真で表現した、見て分かる植物用語の図鑑です。好評発売中!

全国農村教育協会 〒110-0016 東京都台東区台東1-26-6 ホームページ: <http://www.zennokyo.co.jp>
Tel.03-3833-1821 Fax.03-3833-1665 (お問合せは出版部 03-3839-9160まで)