

## 植物由来の遺伝子を活用した新規形質転換技術の開発

クミアイ化学工業(株)

角 康一郎, 河合 清, 藤岡 智則, 堀田 順子, 清水 力

### ＜はじめに＞

イネおよびシロイヌナズナ由来の除草剤抵抗性アセト乳酸合成酵素 (acetolactate synthase : 以下ALSと略) を使用した選抜マーカー遺伝子について紹介してからほぼ5年が経過した<sup>1)</sup>。この間、ベクターの改良を加え、新たな知見も得られているので拙文ながら紹介したい。

1995年に米国で商用化された遺伝子組換え作物は、ナタネから始まりダイズ、トウモロコシ、ワタ、サトウキビへと対象作物の種類を増やし、2008年には米国のダイズ、トウモロコシ、ワタ、ナタネ耕作地の88-95.5%で除草剤耐性(HT, herbicide tolerant)品種、害虫抵抗性(IR, insect resistant)品種もしくは複数の形質を併せ持つ(stacked trait)品種が栽培されるに至っている。この間、米国以外の地域にも栽培が広がり、その結果、米国での遺伝子組換え作物の作付け割合が2002年に全世界の70%だったのが、2008年には55%まで低下しており、グローバル化が進んでいる<sup>2)</sup>。2008年の遺伝子組換え作物の耕作面積は1億2500万haで、実に日本の農地面積463万haの27倍もの耕作地で栽培されている。

日本においては、近年、非食用の遺伝子組換えバラの栽培が始まったが、食用の遺伝子組換え作物の栽培は行われていない。しかしながら遺伝子組換え作物の商業栽培に対する認可(第一種使用等に関する承認)数は世界でもトップクラ

スである。これは栽培を前提としたものではなく、むしろ日本に輸出する際の安全性を保障するために取得されている。日本はダイズの約8割、トウモロコシの約9割をアメリカから、ナタネの約8割をカナダから輸入している。輸入元であるアメリカにおけるダイズの約9割、トウモロコシの約7割およびカナダにおけるナタネの約8割が遺伝子組換え作物である<sup>3)</sup>ので、これらが日本国内へ輸入されていることは疑いようもない。輸入されたダイズ、ナタネは食用油の原料として使用される。トウモロコシは主として家畜のえさとして使用されるが、異性化液糖にも加工され、清涼飲料水など加工食品に大量に使用されている。このように、遺伝子組換え作物はわれわれの生活に大きく関与しているにもかかわらず、国民が遺伝子組換え作物を消費しているという意識は皆無に等しく、いまだ受け入れることに大多数の人が感情的に抵抗感を感じ、実態との大きな隔たりがあるのが現状である。

その要因の一つに挙げられるのは、形質転換植物を作出する際に必要な選抜マーカー遺伝子としてカナマイシン耐性遺伝子(neomycin phosphotransferase II(npt II)遺伝子)やハイグロマイシン耐性遺伝子(hygromycin B phosphotransferase (hpt) 遺伝子)に代表される抗生物質耐性遺伝子が用いられていることで

あり、これらが残存することに対して懸念がある。

・当社ではこうした社会情勢を踏まえて、安全性の面から社会的に受け入れられる実用的な遺伝子組換え作物を効率的に作出することを目的とし、自社の水稲用除草剤であるビスピリバックナトリウム塩(BS, 図-1)に対して抵抗性を与える新規なイネ変異型ALS遺伝子を取得することに取り組んだ。その結果、548番目のアミノ酸がトリプトファン(Trp)からロイシン(Leu)に、627番目のアミノ酸がセリン(Ser)からイソロイシン(Ile)に自然変異したイネALS遺伝子の単離に成功し、この2点変異型ALS遺伝子がBSに対して強い抵抗性を付与することを明らかにした。またS627I 1点変異型ALSはピリチオバックナトリウム塩(PS)とピリミノバック(PM)に対して抵抗性を示すことを見いだした。これらの知見から、自然変異ALS遺伝子とピリミジ

ニルカルボキシ除草剤<sup>4,6)</sup>を組み合わせる微生物由来の抗生物質耐性遺伝子に代わる選抜マーカーシステムを開発した<sup>7-10)</sup>。これらの経緯については5年前にも述べさせていただいた<sup>1)</sup>。

### < ALS >

ALSはロイシン、パリンおよびイソロイシンの3種の分岐鎖アミノ酸生合成経路における律速酵素であり、ピルビン酸からアセト乳酸へ、また2-ケト酪酸・ピルビン酸からアセトヒドロキシ酪酸への反応を触媒している。ALSは植物の成長にとって必須であるが動物には存在しないため、本酵素を阻害するALS阻害型除草剤は安全性が高いと考えられる。また一般的に殺草スペクトラムが広いことから、水田や畑作でも多くの化合物が基幹剤として開発されている。実際に2009年版のSHIBUYA INDEXには上市された、もしくは研究・開発段階にある化合物として50

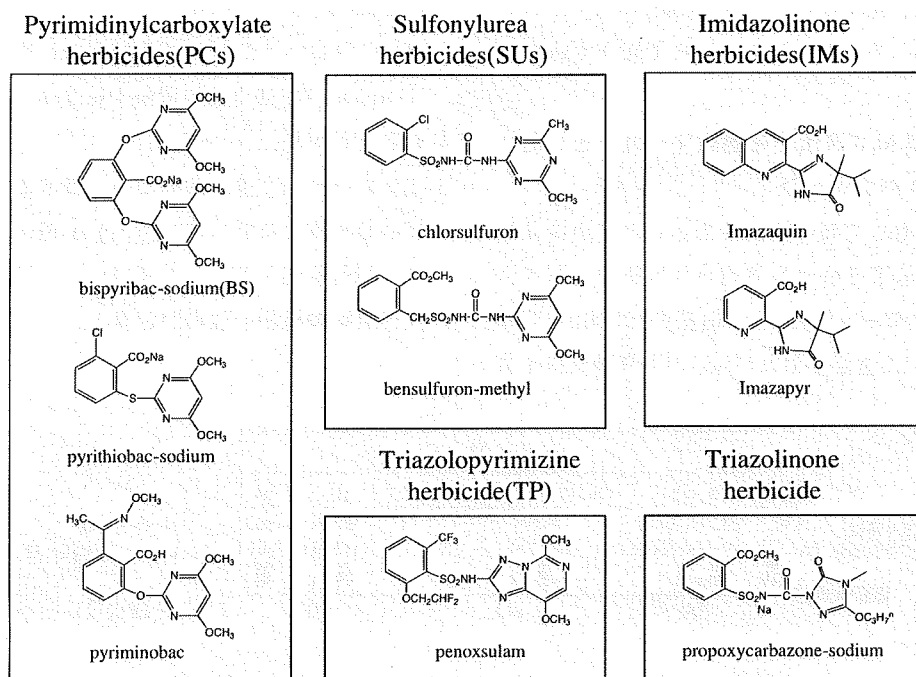


図-1 ALS阻害型除草剤

以上が記載されている。これらはその化学構造から主にピリミジニルカルボキシ系 (PC剤)<sup>11-12)</sup>、スルホニルウレア系 (SU 剤)<sup>13)</sup>、イミダゾリノン系 (IM 剤)<sup>14)</sup>、トリアゾロピリミジン系 (TP 剤)<sup>15)</sup> およびトリアゾリノン系<sup>16)</sup> の 5 つの系統の化合物群に分類される (図-1)。

一方、幅広い適応性および連続的な使用から ALS 阻害型除草剤に対する抵抗性雑草が出現してきた。特にスルホニルウレア系 ALS 阻害型除草剤 (SU 剤) に対する抵抗性雑草が、米国では 1980 年代後半から、また日本でも 1990 年後半から確認されはじめた<sup>17-19)</sup>。これらの原因の大部分は ALS アミノ酸配列上のいわゆるドメイン A-F と呼ばれる部分に対応する ALS 遺伝子に、点突然変異が生じるることによることが明らかになっている (図-2)<sup>20)</sup>。BS に対して抵抗性を示すイネ 2 点変異型 ALS では 548 番目のトリプトファン (Trp) からロイシン (Leu) への変異はドメイン B で、627 番目のセリン (Ser) からイソロイシン (Ile) への変異はドメイン E で起きている。

#### ＜変異型 ALS 遺伝子を選抜マーカーとした pSTARA ベクター＞

BS に対して高い抵抗性を示した 2 点変異型 ALS 遺伝子を使用して植物形質転換用バイナリーベクターを作製した。前報<sup>1)</sup>では S627I 変異型イネ ALS 遺伝子および S653I 変異型シロイヌ

ナズナ ALS 遺伝子を利用した pPALS ベクターについて紹介したが、本報では W548L/S627I 2 点変異型イネ ALS 遺伝子および W574L/S653I 2 点変異型シロイヌナズナ ALS 遺伝子を利用したベクターについて紹介する。

これらの 2 点変異型 ALS 遺伝子を利用して、イネおよびシロイヌナズナだけでなく他の植物の形質転換にも利用できるベクタープラスミド (PalSelect®: pSTARA シリーズ) を商品化した (図-3)。本ベクターの特徴として、以下の点が挙げられる。

- ・安全性に配慮した植物由来遺伝子をマーカーとして使用。
- ・エスケープが少なくクリアな形質転換体選抜が可能。
- ・アグロバクテリウム菌を介した植物形質転換に必要な最小限の領域で構成された 8kb ほどのミニバイナリーベクター。
- ・マルチクローニングサイト配列もしくは Gateway® 配列で目的遺伝子を簡便に組み込むことが可能。
- ・アグロバクテリウム菌中でのプラスミドのコピー数を抑える低コピー型 *repA* 遺伝子を持つ。目的遺伝子がシングルコピーで導入された形質転換植物の取得が容易。

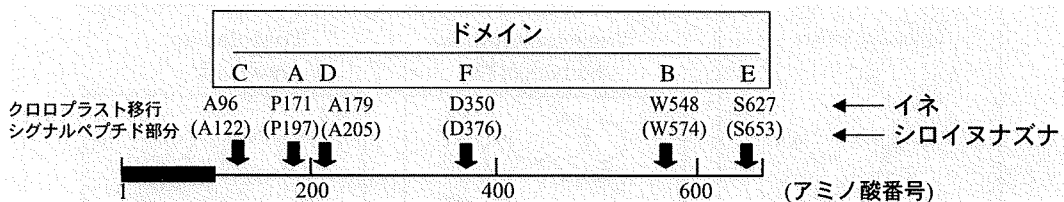


図-2 ALS 阻害型除草剤に対する抵抗性に関与する ALS タンパク質上のドメイン  
それぞれのドメインの代表的なアミノ酸残基の番号はイネとシロイヌナズナ (括弧内) の番号を示している

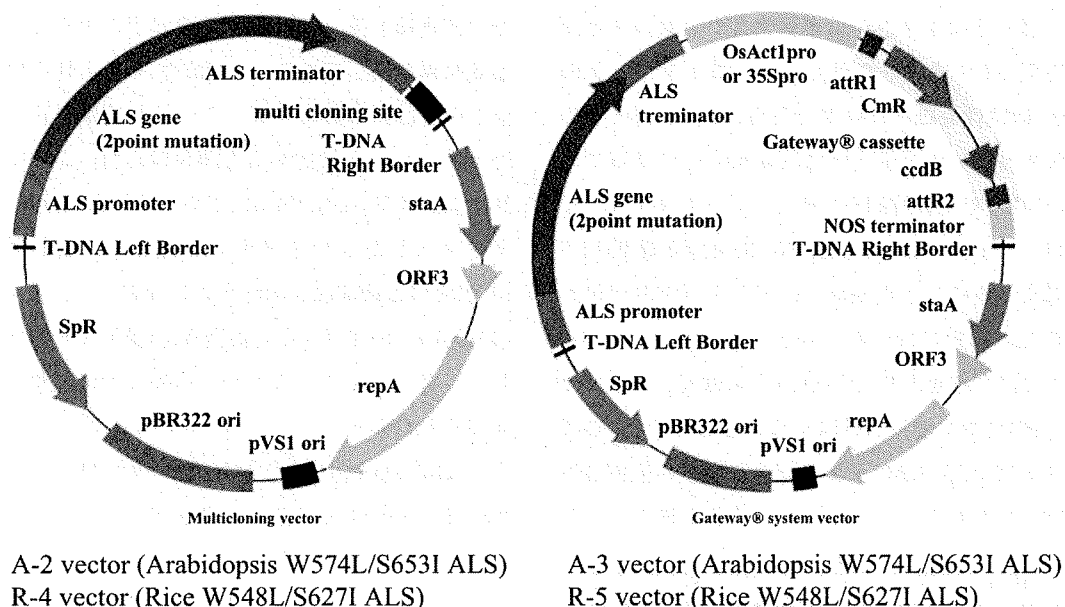


図-3 pSTARA ベクター (A-2, A-3, R-4, R-5) のプラスミドマップ

最後に述べた低コピー型の *repA* 遺伝子<sup>21)</sup>については、アグロバクテリウム菌中でのプラスミドのコピー数を抑え、結果的に植物にシングルコピーで有用遺伝子を導入できるシステムになっている。実際のイネ形質転換では、シングルコピーの植物体が50-60%の高頻度で作出できることを確認している。また形質転換効率の面でもイネカルスをアグロバクテリウム法で形質転換し0.25  $\mu$ MのBSで選抜した場合、50ppm ハイグロマイシンを選抜試薬として用いる一般的なpBI系ベクターと比較しても、薬剤耐性カルス出現率と再分化効率ともに遜色のない結果が得られることがわかっている。シロイヌナズナをフローラルディップ法で形質転換する際も0.1  $\mu$ M (0.04ppm) BSの選抜で、pBI系ベクターを用いて50ppmカナマイシンで選抜した場合と比べて低濃度でクリアな選抜ができる。

PC剤抵抗性ALS遺伝子を使用する際の利点として、ALSタンパク質の発現を *in vivo*

ALS検定での呈色反応により定量化できることも挙げられる<sup>10)</sup>。形質転換カルスもしくは植物の葉を用いて、選抜マーカーとして導入したALS遺伝子の発現量を知ることができ、形質転換の初期段階で優良系統の予測が可能であると考えられる。また変異型ALS遺伝子は選抜マーカーとしてだけでなく、レポーターアッセイにも応用できる。

#### <異種植物に導入された抵抗性ALS遺伝子の機能性について>

pSTARAベクターはイネとシロイヌナズナ由来のALS遺伝子を利用している。これらはそれぞれ単子葉植物および双子葉植物の形質転換に用いることが可能であると考えられる。それぞれ多種類の植物種に対して形質転換を行うのには限界があり、限られた実証例しかないが、異種植物の変異ALSを導入した際の薬剤抵抗性レソポンスにどのような違いがあるのか紹介したい。

図-4はイネとシロイヌナズナ由来の2点変異型ALS遺伝子を導入したシロイヌナズナのBS抵抗性を調べた結果である。コントロールの野生型シロイヌナズナは50g a.i./haの葉量でのBS散布で生育抑制を受けているのに対して、シロイヌナズナのW574L/S653I 2点変異型ALS遺伝子を導入した系統ではほとんど抑制が掛からない結果になった。他方、イネのW548L/S627I 2点変異型ALS遺伝子を導入した系統ではBSに対する抵抗性は見られるものの、シロイヌナズナALS遺伝子導入個体ほど強い抵抗性は認められなかった。すなわち形質転換を受ける

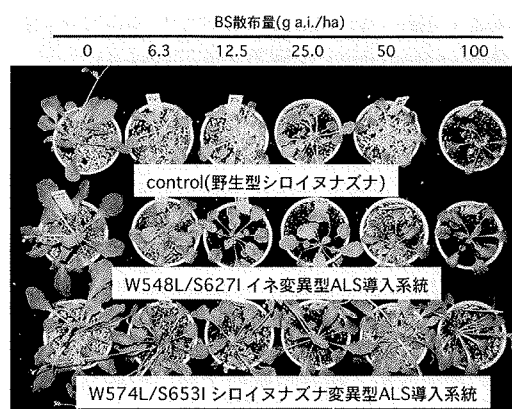


図-4 W548L/S627I イネ ALS および W574L/S653I シロイヌナズナ ALS を導入したシロイヌナズナのBSに対する感受性の比較 (BSを散布後、2週間後)

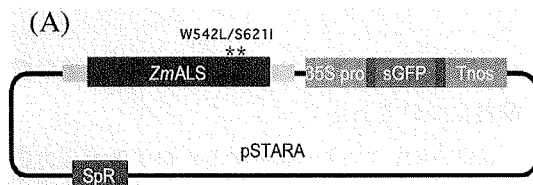


図-5

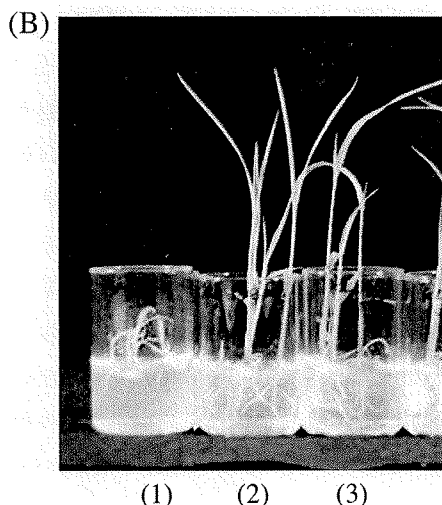
(A) トウモロコシ W542L/S621I 2点変異型ALS遺伝子をマーカー遺伝子としたpSTARAベクターコンストラクト

(B) トウモロコシおよびイネ2点変異型ALS遺伝子を導入したイネT1個体のBS(1  $\mu$ M)に対するゲランガム培地での発芽・生育試験; (1)非形質転換イネ種子, (2)トウモロコシ2点変異型ALS遺伝子導入イネT1種子, (3)イネ2点変異型ALS遺伝子導入イネT1種子

側の植物種と導入されるALS遺伝子の由来となる植物種が同じであると、抵抗性ALS活性の機能が強く維持されている。この結果は葉を用いた *in vivo* ALS 検定からも裏付けられ、シロイヌナズナのW574L/S653I 2点変異型ALS遺伝子を導入したシロイヌナズナはBSに対して58,000倍の抵抗性を示したのに比較して、イネのW548L/S627I 2点変異型ALS遺伝子を導入したシロイヌナズナでは880倍程度の抵抗性しか見られなかった。

これらのベクターとは別にトウモロコシのW542L/S621I 変異型ALS遺伝子をマーカー遺伝子として組み込んだpSTARAタイプのベクターを作製し、同じ単子葉植物のイネの形質転換を行った。0.25  $\mu$ M BSでの選抜を行った結果、17%の形質転換効率でイネ(日本晴)カルスが形質転換された。得られたT<sub>1</sub>種子を用いて1  $\mu$ M BS含有ゲランガム培地での発芽・生育試験を行った結果、W548L/S627I 2点変異イネALS遺伝子を導入したイネT<sub>1</sub>種子と同様に高い抵抗性を示した(図-5)。

これらの結果は、植物種が近縁なほど、異種植物のALSが機能しやすいことを示唆している



と考えられる。その要因として2つの理由が考えられる(図-6)。第一の要因は、ALSタンパク質のN末端シグナルペプチドの植物間での適合性である。ALSタンパク質は細胞質のリボソーム上で合成され、葉緑体(クロロプラスト)に移行して局在化する。クロロプラストへの移行の際に必要なシグナルペプチドは、移行後、切断されて成熟型のALSタンパク質となる。シグナルペプチドの正確なサイズは実験的に決定されていないが、いくつかの報告から70-85アミノ酸前後であると考えられている<sup>22-24)</sup>。仮に85番目のアミノ酸でシグナルが切断されると仮定すると、イネとシロイヌナズナのALSのシグナルペプチドの相同性はわずか23%にとどまるのに対して、イネとトウモロコシALS1との相同性は61%となる。全長アミノ酸配列ではそれぞれ71%、90%であることからシグナルペプチドの配列は種特異性が高いことが伺える。

第二の要因として考えられるのは、異種ALSタンパク質で形成されたALS複合体の比活性の

低下である。シグナルペプチドが切断されたALSタンパク質(触媒サブユニット)はクロロプラスト中で4量体を形成し、更に生合成経路の最終生成物である分岐鎖アミノ酸によるフィードバック阻害に関与するALS制御サブユニット4分子と結合して複合体を形成すると考えられている。導入した異種ALSタンパク質は本来のALSタンパク質とキメラ状態になり、ALS複合体形成が不完全になり十分なALS活性を呈さない可能性がある。

植物種が近縁なほど、異種植物のALSが機能しやすいことを説明したが、このことはALSアミノ酸配列の系統樹解析からも支持された。図-7にALSアミノ酸配列全長およびシグナル配列のみの配列で系統樹解析を行った結果を示すが、いずれの解析でも、イネのALSアミノ酸配列はシロイヌナズナの配列よりもトウモロコシの配列に類縁性があることが示された。これらことから、除草剤抵抗性ALS遺伝子をマーカー遺伝子として用いる場合には、遺伝子導入

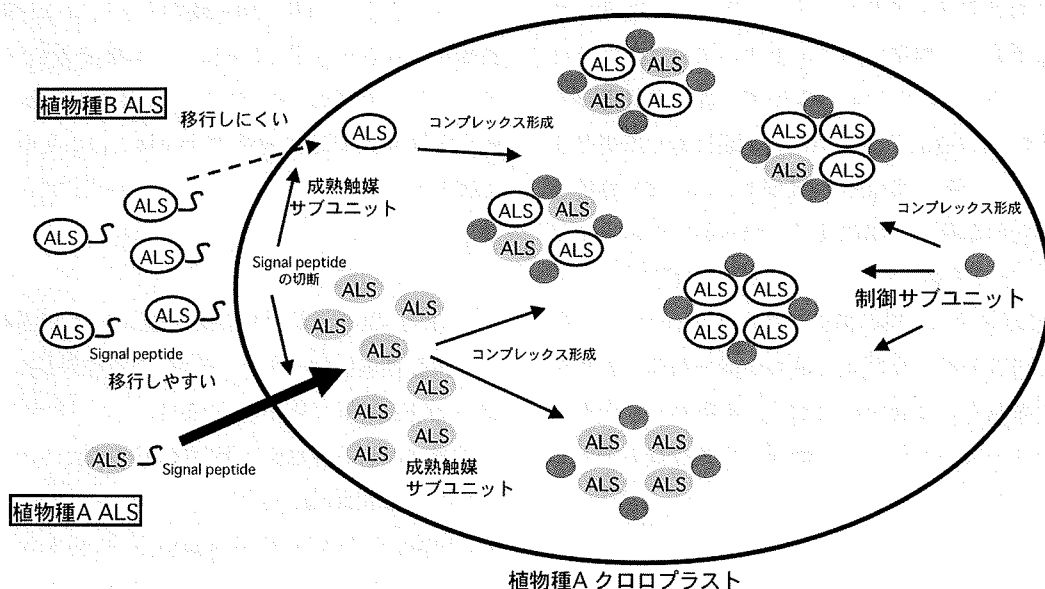


図-6 異種変異型 ALS 導入形質転換体における ALS コンプレックス形成の概念図

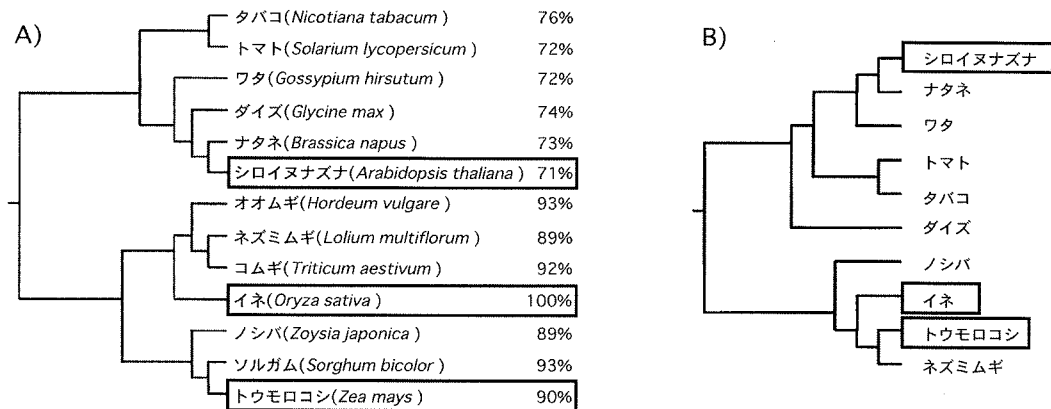


図-7 ALS アミノ酸配列のNJ法による系統樹解析

A) 全長 ALS アミノ酸配列による解析, 植物名の右側にイネを 100% としたときの相同性 (%) を示した

B) ALS シグナル配列部分による解析

を受ける植物種と同じ植物由来のALSを用いることが最良であるが、近縁種であれば互いの使用が可能であると考えられる。

#### <おわりに>

以上、現在弊社で販売しているpSTARAベクターの説明させていただいた。世界の農業生産における遺伝子組換え作物の実用化は急速に進んでおり、農業のハイテク化の流れは止まらないであろう。そのような中で、弊社の除草剤抵抗性ALS遺伝子技術が作物生産に対して寄与することを願っている。ALSタンパク質を標的とした除草剤は市場に受け入れられてからおよそ25年近く経った。しかしながら近年になってALSタンパク質の構造が決定される<sup>24)</sup>など、基礎研究の面でまだまだ進展が見られる。除草剤の普及という面だけでなく、植物バイオテクノロジーでの貢献という側面からも今後も努力していきたい。

#### <謝辞>

pSTARAベクターの開発については(独)農業生物資源研究所 市川裕章博士からご提供を受けたプラスミドをバックボーンにして上記のベクタープラスミドを作製しました。この場をお借りしてお礼申し上げます。またトウモロコシ変異ALSの研究は、農水省の新農業展開ゲノムプロジェクト「国産自殖系統のトウモロコシ形質転換プロジェクト」で実施した結果であり、そのリーダーである(独)農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 高溝正博士にお礼申し上げます。

- 1) 清水力. 2005. 稲由来の除草剤抵抗性ALSを利用した選抜マーカー. 植調. 39:129-140.
- 2) AgriFutura (2009) 112:1-4
- 3) 農林水産省農林水産技術会議 HP (URL: <http://www.saffrc.go.jp/>)
- 4) Saitoh, Y., Wada, N., Kusano, S., Toyokawa, Y. and Miyazawa, T. (1996) Japan Patent 2561524

- 5) Tamaru, M., Kawamura, N., Satoh, M., Takabe, F. and Tachikawa, S. (1997) Japan Patent 2603557
- 6) Wada, N., Kusano, S., Toyokawa, Y. (1996) Japan Patent 2558516
- 7) Kawai, K., Kaku, K., Izawa, N., Shimizu, T., Fukuda, A. and Tanaka, Y. (2007) *J. Pestic. Sci.* 32: 89-98
- 8) Kawai, K., Kaku, K., Izawa, N., Fukuda, A., Tanaka, Y. and Shimizu, T. (2007) *J. Pestic. Sci.* 32: 385-392
- 9) Kawai, K., Kaku, K., Izawa, N., Shimizu, M., Kobayashi, H. and Shimizu, T. (2008) *J. Pestic. Sci.* 33: 128-137
- 10) Kawai, K., Kaku, K., Izawa, N., Shimizu, M., Kobayashi, H. and Shimizu, T. (2010) *Plant Biotechnol.* 27: 75-84
- 11) Shimizu, T., Nakayama, I., Wada, N., Nakao, T. and Abe, H. (1994) *J. Pestic. Sci.* 19: 257-266
- 12) Shimizu, T., Nakayama, I., Nakao, T., Nezu, Y. and Abe, H. (1994) *J. Pestic. Sci.* 19: 59-67
- 13) LaRossa, R. A. and Schloss, J. V. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 8753-8757
- 14) Shaner, D. L., Anderson, P. C. and Stidham, M. A. (1984) *Plant Physiol.* 76: 545-546
- 15) Gerwick, B. C., Subramanian, M. V., Loney-Gallant, V. I. and Chandler, D. P. (1990) *Pest. Sci.* 29: 357-364
- 16) Santel, H. J., Bowden, B.A., Sorensen, V.M. and Mueller, K. H. (1999) Brighton Conference-Weeds 1: 23-28
- 17) HRAC Home Page (URL:<http://www.weedscience.org/Summary/UspeciesMOA.asp?lstMOAID=3&FmHRACGroup=Go>)
- 18) Uchino, A., Ogata, S., Kohara, H., Yoshida, S., Yoshioka, T. and Watanabe, H. (2007) *Weed Biol. Manag.* 7: 89-96
- 19) Uchino, A. and Watanabe, H. (2002) *Weed Biol. Manag.* 2: 104-109
- 20) Merotto, J. R. A., Jasieniuk, M., Osuna, M. D., Vidotto, F., Ferrero, A. and Fischer, A. J. (2009) *J. Agric. Food Chem.* 57: 1389-1398
- 21) Heeb, S., Itoh, Y., Nishiyo, T., Schnider, U., Keel, C., Wade, J., Walsh, U., O'Gara, F. and Haas, D. (2000) *Mol. Plant-Microb. Interact.* 13: 232-237
- 22) Wiersma, P., Hachey, J., Crosby, W. and Moloney, M. (1990) *Mol. Gen. Genet.* 244: 155-159
- 23) Rutledge, R. G., Quellet, T., Hattori, J. and Miki, B. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 229: 31-40
- 24) Chang, A. K. and Duggleby, R. G. (1997) *Biochem. J.* 327: 161-169
- 25) McCourt, J. A., Pang, S. S., King-Scott, J., Guddat, L. W. and Duggleby, R. G. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 569-573