学会賞受賞論文

(論文賞)

平成 20 年度論文賞対象論文の概要とその研究背景

河 合 清, 角 康 一 郎, 井 沢 典 彦, 清 水 力*

クミアイ化学工業 (株)

(平成 20 年 5 月 20 日受理)

対象論文

巻号・ページ: Vol. 32, No. 2, 89-98 (2007)

題 目: A novel mutant acetolactate synthase gene from rice cells, which confers resistance to ALS-inhibiting herbicides

著 者: Kiyoshi KAWAI, Koichiro KAKU, Norihiko IZAWA, Tsutomu SHIMIZU, Atsunori FUKUDA and Yoshiyuki TANAKA

Keywords: acetolactate synthase, acetohydroxyacid synthase, ALS, AHAS, pyrimidinylcarboxylates, bispyribac-sodium.

は じ め に

アセト乳酸合成酵素 (以下, ALS) は, ロイシンおよびバリンならびにイソロイシン等の分岐鎖アミノ酸生成経路上の律速酵素である. 植物の ALS はピリミジニルカルボキシ系除草剤 (以下 PC 系除草剤), スルホニルウレア系除草剤 (以下 SU 系除草剤), イミダゾリノン系除草剤 (以下 IM 系除草剤), トリアゾピリミジンスルホンアミド系除草剤ならびにスルホニルアミノカルボニルトリアゾリノン系除草剤の少なくとも 5 種類の構造の異なる除草剤の標的酵素である¹⁾. ALS は触媒サブユニットと制御サブユニットの複合体の形で植物体中に存在しており, 制御サブユニットは分岐鎖アミノ酸によるフィードバック制御を受ける. 植物 ALS の触媒サブユニットの遺伝子は酵母の ALS 遺伝子をプローブとしてシロイヌナズナ及びタバコから単離された²⁾. その後, 多くの植物から ALS の触媒サブユニットをコードする遺伝子がクローニングされその配列が決定されている^{3,11,12,24)}. また, 制御サブユニット遺伝子もクローニングされている⁴⁾. SU 系除草剤および IM 系除草剤に抵抗性を示す植物や培養細胞が作出され, それらの植物から薬剤抵抗性を示す触媒サブユニットの遺伝子が単離された. 単離された遺伝子には, 1 つあるいは 2 つのアミノ酸変異を引き起こす塩基置換が見つかり, この変異に

よって ALS が除草剤抵抗性を示すことが明らかにされた¹⁾.

本研究を始める段階で単子葉植物において ALS 遺伝子の塩基配列が完全に決定されていたのは, トウモロコシだけであり⁹⁾, イネの ALS 遺伝子の配列は明らかではなかった. また, PC 系除草剤に対して特異的に強い抵抗性を示す ALS の変異は知られていなかった. 薬剤抵抗性を付与する ALS 遺伝子はその薬剤に対して抵抗性を示す作物を育成するための遺伝子材料となるだけでなく, 薬剤との組み合わせで選抜マーカー遺伝子として利用できる⁵⁾. そこで, 報告者らは PC 剤の 1 つのビスピリバックナトリウム塩 (BS) に抵抗性を獲得したイネ培養細胞から BS に対して抵抗性を示す新規変異型 ALS 遺伝子を単離して, 遺伝子の性状および発現タンパク質の性質を調べた.

1. BS 抵抗性を付与する 2 点変異型 ALS 遺伝子およびそれがコードする ALS タンパク質

1.1. BS 抵抗性イネ培養細胞の作出および培養細胞から部分精製した ALS の性質

イネ培養細胞を $1\mu\text{M}$ の BS を含む液体培地中⁶⁾ で約 2 週間毎に継代しながら培養を行った. その結果, 2 ヶ月後には茶色に変色して枯死している培養細胞集団の中に, 変色せずに細胞分裂を行っている細胞塊が複数個得られた. これらの細胞塊を分離して培養を継続した結果, $2\mu\text{M}$ の BS 存在下でも増殖する複数の細胞株を得た. その後, BS 濃度を上げてこれらの細胞株を培養した結果, $100\mu\text{M}$ の BS 存在下で増殖できる細胞株が得られた. そこで, この BS 抵

* 〒 436-0011 静岡県掛川市満水 276 クミアイ化学工業 (株)

E-mail: t-shimizu@kumiai-chem.co.jp

© Pesticide Science Society of Japan

抗性細胞株の ALS 阻害型除草剤に対する感受性を野生株と比較した結果、野生株の増殖は 10nM 以上の BS で阻害されたが、抵抗性株の増殖は 10 μ M の BS でも阻害されなかった。一方、SU 系除草剤のクロルスルフロン (CS) に対する本株の抵抗性は BS に対する抵抗性よりも弱かった。したがって、本株は BS に対して特異的に強い抵抗性を示すことが明らかとなった。この BS 抵抗性培養細胞及び野生型培養細胞から陰イオン交換樹脂カラムで部分精製した ALS タンパク質の、BS, CS, ならびに IM 系除草剤のイマザキンに対する感受性を調べた結果、BS 抵抗性培養細胞から調製した ALS はいずれの薬剤に対しても抵抗性を示し、中でも BS に対する抵抗性が特異的に強かった。

1.2. 野生型および変異型 ALS cDNA のクローニング および遺伝子から発現させた ALS の薬剤感受性

イネ DNA データバンク (MAFF DNA bank) から入手したイネ ALS 遺伝子の部分配列と推定された EST クローン (アクセッション番号: C72411) から得た DNA 断片をプローブとして、野生型イネ培養細胞の cDNA ライブラリーから開始コドンより 3 塩基長い ALS cDNA を単離した。一方、BS 抵抗性培養細胞の cDNA ライブラリーからは、開始コドンよりそれぞれ 47 塩基および 31 塩基長い ALS cDNA (アクセッション番号: AB049822 と AB049823) を単離した。このうち AB049822 は野生型イネ培養細胞から単離した ALS cDNA の塩基配列と一致したことから野生型 ALS をコードする遺伝子であると考えられた。一方、AB049823 には野生型 ALS の 548 番目のトリプトファンがロイシンに置換される変異及び 627 番目のセリンがイソロイシンに置換される変異が見出され、この 2 点変異が BS に対する抵抗性を付与していると考えられた。

GST 融合野生型および 2 点変異型 ALS 遺伝子を発現させた大腸菌から調製した粗酵素は、プラスミドを有さない対照区と比較して 3~4 倍程度の高い比活性を示した。この粗酵素から GST アフィニティカラムクロマトグラフィーによって、GST 融合 ALS を精製した。さらに、この GST 融合 ALS をプロテアーゼ処理することによって GST フリー ALS を調製した。GST フリー ALS の純度および分子量は電気泳動で確認した。GST 融合野生型 ALS は野生型イネから調製した ALS と同程度の薬剤感受性¹⁰⁾を ALS 阻害型除草剤に対して示した。一方、GST 融合変異型 ALS は異なるタイプの ALS 阻害型除草剤に抵抗性を示したが、BS に対する抵抗性が特異的に強かった。変異型 ALS は野生型 ALS の阻害 50% 濃度の約 1 万倍に相当する 100 μ M の BS に対して抵抗性を示した。なお、大腸菌由来の ALS 活性を阻害するために酵素反応液の中にはバリンを添加した⁷⁾。

2. 人為的に作製した 1 点変異型 ALS 遺伝子から 発現させた ALS の薬剤感受性

W548L および S627I 点変異型 ALS の除草剤に対する感受性を確認するため、野生型および 2 点変異型 ALS cDNA を鋳型として PCR によってそれぞれの 1 点変異型 ALS cDNA を作製し、大腸菌内で GST 融合 ALS として発現させた。W548L 1 点変異型及び S627I 1 点変異型 ALS の両方が BS に対して抵抗性を示したが、W548L 1 点変異型の方が抵抗性は強かった。しかしながら、これらの 1 点変異型 ALS の抵抗性の度合いは、2 点変異型の場合よりも数段階弱いことがわかった。すなわち、W548L 変異および S627L 変異を併せ持つ場合には、W548L 変異又は S627L 変異いずれかを有する場合から予測できない程、BS に対する抵抗性が強くなった。一方、CS の場合には、W548L 1 点変異型 ALS は CS に対して抵抗性を示したが、S627I 1 点変異型 ALS は明確な抵抗性を示さなかった。また、W548L 1 点変異型と W548L/S627I 2 点変異型 ALS の CS に対する感受性は同程度であった。以上の結果、S627I 変異は W548L 変異がもたらす BS 抵抗性を高めることが判明した。従って W548L 変異および S627I 変異を有する ALS 遺伝子は、BS に特異的に高い抵抗性を与える遺伝子であると結論された。

3. 2 点変異型 ALS 遺伝子を導入した組換えイネ の薬剤感受性

2 点変異型 ALS 遺伝子を導入した高発現型バイナリーベクター (pMLH-7133)⁸⁾を用いて、種子法によるイネの形質転換を行った。本バイナリーベクターを持つアグロバクテリウム (EHA105 株) を種子から誘導したカルスに感染させた後、50mg/l のハイグロマイシンを含む N6D 培地で形質転換カルスの選抜を行った。その結果、約 1 ヶ月の選抜でハイグロマイシンと BS の両方に抵抗性を示すカルスが得られた。選抜されたカルス中には 2 点変異型イネ ALS 遺伝子が導入されていることが PCR で確認された。カルスから再分化し正常に生育した 27 の植物体から 4 個体を無差別に選び、5 葉期の時点で実用薬量の約 50 倍に当たる 1000 g a.i./ha の BS を散布した結果、2 点変異型 ALS 遺伝子を持つ組換え体は明瞭な BS 抵抗性を示した。

お わ り に

イネ培養細胞から PC 系除草剤の一つである BS に対して特異的に強い抵抗性を付与する W548L/S627I 2 点変異型 ALS 遺伝子を単離した。W548L に相当する変異は既知であったが^{2,11-14)}、S627I 変異はこれまでに報告例のない新規な変異であった¹⁵⁻¹⁹⁾。また、2 点の変異の組み合わせも新規であった^{2,20-23)}。2 点変異の組み合わせにより BS 抵抗性が相乗的に高まった。この新規 2 点変異型 ALS 遺伝子は

BSを選抜用試薬に用いることで、植物形質転換のための選抜マーカー遺伝子として使用できると考えられた。ヨーロッパ食品安全局（EFSA）のGMOに関する科学委員会は、抗生物質耐性遺伝子を3つのグループに分類している²⁶⁾。カナマイシン耐性遺伝子（neomycin phosphotransferase II (NPT II) 遺伝子²⁷⁾）やイネ形質転換で汎用的に使用されているハイグロマイシン耐性遺伝子（hygromycin B phosphotransferase (hpt) 遺伝子²⁸⁾）が含まれるグループに属する抗生物質耐性遺伝子は、野外での試験栽培及び商業栽培目的での使用が禁止されていないが、他の2つのグループに属する抗生物質耐性遺伝子（アンピシリン、スペクチノマイシン、テトラサイクリン耐性遺伝子等）は商業栽培目的の使用が禁止されている。さらに、Codex委員会のガイドラインでは抗生物質耐性遺伝子を使用しない組換え作物の開発が推奨されている^{25,29)}。したがって、イネ由来のW548L/S627I 2点変異型ALS遺伝子は、実用的な遺伝子組換え作物の作出に有効利用できるだけでなく、遺伝子組換え作物に対する消費者の受容促進に役立つものと考えられる。

引用文献

- 1) T. Shimizu, I. Nakayama, K. Nagayama, T. Miyazawa, Y. Nezu: "Herbicide Classes in Development: Mode of Action-Targets-Genetic Engineering-Chemistry" ed. by P. Böger, K. Wakabayashi and K. Hirai, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 1-41, 2002.
- 2) K. Y. Lee, J. Tepperman, M. Black, C. F. Chui, B. Mazur, P. Dunsmuir and J. Bedbrook: *EMBO J.* **7**, 1241-1248 (1988).
- 3) R. G. Duggleby and S. S. Pang: *J. Biochem. Mol. Biol.* **33**, 1-36 (2000).
- 4) H. P. Hershey, L. J. Schwartz, J. P. Gale and L. M. Abell: *Plant Mol. Biol.* **40**, 795-806 (1999).
- 5) Z. Li, A. Hayashimoto and N. Murai: *Plant Physiol.* **100**, 662-668 (1992).
- 6) H. Uchiyama and T. Murashige: *Plant Physiol.* **54**, 936-944 (1974).
- 7) M-W. Kil and S-I. Chang: *J. Biochem. Mol. Biol.* **31**, 287-295 (1998).
- 8) I. Mitsuhashi, M. Ugaki, H. Hirochika, M. Ohshima, T. Murakami, Y. Gotoh, Y. Katayose, S. Nakamura, R. Honkura, S. Nishiyama, K. Ueno, A. Mochizuki, H. Tanimoto, H. Tsugawa, Y. Otsuki and Y. Ohashi: *Plant Cell Physiol.* **37**, 49-59 (1996).
- 9) L. Y. Fang, P. R. Gross, C. H. Chen and M. Lillis: *Plant Mol. Biol.* **18**, 1185-1187 (1992).
- 10) T. Shimizu: *J. Pestic. Sci.* **22**, 245-256 (1997).
- 11) P. Bernasconi, A. R. Woodworth, B. A. Rosen, M. V. Subramanian and D. L. Siehl: *J. Biol. Chem.* **270**, 17381-17385 (1995); Correction, *J. Biol. Chem.* **271**, 13925-13926 (1996).
- 12) J. Hattori, D. Brown, G. Mourad, H. Labbe, T. Ouellet, G. Sunohara, R. Rutledge, J. King and B. Miki: *Mol. Gen. Genet.* **246**, 419-425 (1995).
- 13) J. M. Hand, B. K. Singh and R. S. Chaleff (American Cyanamid Company): *Eur. Pat. Appl. EP 492113* (1992).
- 14) K. Rajasekaran, J. W. Grula and D. M. Anderson: *Plant Sci.* **119**, 115-124 (1996).
- 15) G. W. Haughn and C. R. Somerville: *Plant Physiol.* **92**, 1081-1085 (1990).
- 16) G. Mourad and J. King: *Planta* **188**, 491-497 (1992).
- 17) S. Bright, J. William, M. T. Chang, I. J. Evans and M. J. Macdonald (Imperial Chemical Industries PLC): *PCT Int. Appl. WO 9208794* (1992).
- 18) G. E. Dietrich (American Cyanamid Company): *US Pat. Appl. US 5731180* (1998).
- 19) Y. T. Lee, L. A. Chang and R. G. Duggleby: *FEBS Lett.* **452**, 341-345 (1999).
- 20) J. Hattori, R. Rutledge, H. Labbe, D. Brown, G. Sunohara and B. Miki: *Mol. Gen. Genet.* **232**, 167-173 (1992).
- 21) G. Mourad, G. Haughn and J. King: *Mol. Gen. Genet.* **243**, 178-184 (1994).
- 22) T. R. Wright, N. F. Bascomb, D. Penner and S. F. Sturmer: *Weed Sci.* **46**, 13-23 (1998).
- 23) C. Chom-Kyu and C. Jung-Do: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 462-467 (2000).
- 24) L. L. Saari, J. C. Cotterman and D. C. Thill: "Herbicide Resistance in Plants Biology and Biochemistry" ed. by S. B. Powles and J. A. M. Haltum, CRC Press Boca Raton, FL, pp. 83-139, 1994.
- 25) http://www.who.int/foodsafety/biotech/who_study/en/index.html
- 26) <http://www.efsa.eu.int>
- 27) J. Velten, L. Velten, R. Hain and J. Schell: *EMBO J.* **3**, 2723-2730 (1984).
- 28) L. Gritz and J. Davies: *Gene* (Amsterdam), **25**, 179-188 (1983).
- 29) http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=en

略歴

河合 清

生年月日：1970年1月31日

最終学歴：静岡県立大学大学院薬学研究科修士課程修了

研究テーマ：農薬および植物バイオテク研究

趣味：読書、自然散策

角康一郎

生年月日：1957年12月13日

最終学歴：北海道大学大学院農学研究科修士課程修了

研究テーマ：農薬および植物バイオテク研究

趣味：映画鑑賞

井沢典彦

生年月日：1955年2月12日

最終学歴：高知大学大学院農学研究科修士課程修了，博士（東京大学）

研究テーマ：農薬および植物バイオテク研究

趣味：読書（グレッグ・イーガン，ジェームズ・P. ホーガンに代表されるハードSF）

清水 力

生年月日：1957年6月27日

最終学歴：名古屋大学大学院農学研究科修士課程修了，博士（名古屋大学）

研究テーマ：農薬および植物バイオテク研究

趣味：テニス