学会賞受賞論文

(奨励賞)

プロトックス阻害型除草剤耐性植物の作出に関する
基礎研究

堀 越 守

日本農薬株式会社総合研究所

Fundamental Studies on the Production of Plants Resistant to
Protox Inhibiting Herbicides

Mamoru HORIKOSHI

Research Center, Nihon Nohyaku Co., Ltd.,
345, Oyamada-cho, Kawachi-nagano, Osaka 586-0094, Japan

はじめに

今から10年ほど前、当社ではプロトックス阻害型除草剤に属するET系化合物を畑作用除草剤として開発中であった。1989年前後にはプロトックス阻害型除草剤の作用機作が明らかとなりつつあった。また、アミノ酸生合成阻害型除草剤耐性植物の作出が盛んに試みられていた。そこで、自社の除草剤候補であるET系化合物耐性植物を作出する事を最終目標として、本研究を開始した。当時はプロトックス阻害型除草剤の標的酵素であるプロトックスをコードする遺伝子は、植物のみならず、いずれの生物からも単離されていなかった。そこで、研究の方法としては、まず、植物組織培養技術を用いてプロトックス阻害型除草剤耐性細胞を選抜することを試みた。

プロトックス阻害型除草剤の作用機作

全ての生物にはテトラピロール合成系が普遍的に存在し、植物においてはミトコンドリアではヘムが、葉緑体ではヘム及びクロロフィルが、それぞれ最終的に合成される。プロトックス阻害型除草剤を処理するとProtoporphyrin IX (Proto IX) が蓄積することが明らかとされ¹⁾、その後の研究で、標的酵素はProtoporphyrinogen IX (Protogen) からProto IXへの酸化反応を触媒するProtoporphyrinogen oxidase (プロトックス) であることが明らかとなった^{2,3)}。プロトックス阻害型除草剤によってプロトックスが阻害されると基質のProtogenが蓄積し、このProtogenが細胞質に漏れ出し、細胞膜に結合した除草剤耐性の非特異的酸化

酵素によって酸化され、Proto IXが生成される。このProto IXに光が当たると一重項酸素(活性酸素の一種)が発生し、この働きで脂質の過酸化が起こり、細胞死に至る^{4,5)}。このような作用機作から、プロトックス阻害型除草剤は光要求型除草剤⁶⁾あるいはPeroxidizing除草剤⁷⁾とも呼ばれている。

プロトックス阻害型除草剤 ET-62311 及び ET-751 の性質

本研究におけるタバコ耐性株の選抜にはET-751類縁体のET-62311 (4-chloro-3-[2,4-dichloro-5-(2-propenyloxy)phenyl]-5-difluoromethoxy-1-methylpyrazole)を用い、その後の実験ではET-751⁸⁾(pyraflufen-ethyl, Fig. 1及びTable 1)を用いた。ET-751は現在エコバート[®]という商品名でムギ用除草剤として農薬登録されている。ET-751及びET-62311は共に3-フェニルピラゾール系化合物であり、両化合物とも処理細胞中におけるProto IXの蓄積及び*in vitro*におけるプロトックスの阻害を確認している⁹⁾。

タバコ耐性株の選抜¹⁰⁾

植物細胞は一細胞から植物体まで再生する能力、すなわち、全能性を持ち、また、植物の培養細胞は体細胞変異と呼ばれる遺伝的多様性の宝庫であるため、植物組織培養技術は除草剤耐性植物作出のための有用なツールとして利用されてきた¹¹⁾。植物組織培養技術によって様々な耐性株が得られ、スルホニルウレア耐性タバコ¹²⁾、グリホセート耐性タバコ¹³⁾及びイミダゾリノン耐性コムギ細胞¹⁴⁾等は植物体にまで再生されている。また、除草剤耐性細胞は、除草

Fig. 1 Chemical structure of ET-751.

Table 1 Properties of ET-751.

Code name	: ET-751
Common name	: pyraflufen-ethyl
Trade name	: Ecopart® 2% SC (in Japan)
Chemical name	: ethyl 2-chloro-5-(4-chloro-5-difluoromethoxy-1-methylpyrazol-3-yl)-4-fluorophenoxyacetate
Melting point	: 126.0–127.0°C
Molecular weight	: 413.18
Appearance	: pale brown, crystalline
Water solubility	: 0.05 ppm (25°C, pH 7.0)
Vapour pressure	: 1.6×10^{-8} mPa (25°C)
Acute oral toxicology	: > 5000 mg/kg (LD ₅₀ for rats)
Fish toxicology	: > 10 ppm (LC ₅₀ at 48 h for carps)
Skin irritation	: non-irritant (for rabbits)
Eye irritation	: slight irritant (for rabbits)
Mutagenicity	: negative (Ames test)
Uses	: selective post-emergence control of broad-leaved weeds, especially <i>Galium aparine</i> , <i>Matricaria inodora</i> , <i>Lamium purpureum</i> and <i>Stellaria media</i> , in cereals
Application rate	: 10–20 g a.i./ha

剤耐性遺伝子の遺伝子源としても有用である。スルホニルウレア耐性タバコ細胞から耐性型 acetolactate synthase (ALS) 遺伝子が¹⁵⁾、アトラジン耐性タバコ細胞から耐性型 *psbA* 遺伝子が¹⁶⁾、それぞれ単離されている。このような観点から、我々はプロトックス阻害型除草剤耐性植物の作出を最終目標とし、まず、耐性細胞を選抜することを試みた。

タバコ葉からプロトプラストを分離し、カルスに再生させた。再生させたカルスを ET-62311 存在下で培養し、耐性カルスを選抜した。すなわち、 1×10^{10} 個のプロトプラストから 50%以上の効率でカルスを再分化させ、ET-62311 の MIC が 10 nMであったため、その 2 倍濃度の 20 nMで選抜を開始した (Table 2)。およそ 1 か月ごとに、より高濃度の ET-62311 を含む培地に移植して選抜を継続し、最終的に 2400 nMの ET-62311 存在下でも生育可能なカルスが 36 株得られた。これら 36 株の中から生育速度等を考慮し、最終的に ETR-056, 245 及び 253 の 3 株を選抜した。この選抜には計 16 か月を要した。これら耐性株を植物体に再生させることを試みたが、再生は不可能であった。選抜期間中におけるトランスポゾンの転移等による培養変異¹⁷⁾がその原

Table 2 Selection process for resistant cell lines of tobacco callus against ET-62311.

ET-62311(nM) ^{a)}	No. of resistant cell lines ^{b)}
20	100,000
30	50,000
50	40,000
75	7,200
150	254
300	120
600	66
1200	46
2400	36
5000	0

^{a)} Concentrations of ET-62311 used for the selection. ^{b)} Tobacco calli regenerated from 1×10^{10} protoplasts were applied.

Fig. 2 Time course of Proto IX accumulation after ET-62311 treatment (1200 nM) in normal tobacco cells (○), ETR-056 (◇), ETR-245 (△) and ETR-253 (□) in liquid medium.

因であると考えられた。

耐性機構の解析

選抜された 3 株における耐性機構を生化学的に解析することを試みた。まず、ET-62311 処理細胞中における Proto IX の蓄積量を測定した。ET-62311 を含まない培地で前培養したカルスを ET-62311 を含む培地に移植し、暗所で培養後、経時的にサンプリングし、Proto IX 量を測定した (Fig. 2)。感受性株では当然 Proto IX の蓄積が認められ、また、ETR-056 株では感受性株以上の Proto IX の蓄積が認められた。一方、ETR-245 及び 253 株では Proto IX の蓄積は全く認められなかった。

次に、各耐性株の様々な作用機作の除草剤に対する交差耐性を比較することを試みた。除草剤としてはプロトックス阻害型除草剤の ET-751, fomesafen 及び oxadiazon, 脂質合成阻害剤の butachlor¹⁸⁾, クロロフィル合成阻害剤の

Table 3 Cross-resistance of ET-62311 resistant cell lines to various herbicides in MS agar.

Herbicide	MIC (nM) ^{a)}			
	Normal	ETR-056	ETR-245	ETR-253
ET-751	5	>2400	>2400	>2400
Fomesafen	1	10	10	10
Oxadiazon	3	3000	3000	3000
Butachlor	300	300	300	300
Pyrazoxyfen	250	250	250	500
Propanil	450	450	450	450
Bensulfuron-methyl	0.025	0.025	0.025	0.25
Glyphosate	1000	1000	1000	4000
Paraquat	50	500	50	50

a) MIC denotes minimum inhibitory concentration of herbicides.

Fig. 3 The inhibitory effect of ET-751 on the Protocx activities extracted from normal tobacco cells (○) and ETR-245 (●) in liquid medium.

pyrazoxyfen, 光化学系II阻害剤の propanil, ALS 阻害剤の bensulfuron-methyl, 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) 阻害剤の glyphosate 及び光化学系 I 阻害剤の paraquat を用いた。その結果 (Table 3), いずれの耐性株も, いずれのプロトックス阻害型除草剤に対しても交差耐性を示し, それに加え, ETR-056 株は paraquat に対し, ETR-253 株は pyrazoxyfen, bensulfuron-methyl 及び glyphosate に対し交差耐性を示した。したがって, ETR-245 株では Proto IX の蓄積が認められ, また, 光化学系 I 阻害剤で活性酸素を生成させる paraquat に対して交差耐性を示すことから, 活性酸素分解酵素の過剰生産¹⁹⁾が耐性に関与していることが示唆された。一方, ETR-253 株は異なる作用機作の複数の除草剤に対し交差耐性を示したことから, 薬剤の取り込みの低下あるいは代謝活性の増強による多剤耐性^{13,20)}が関与していることが示唆された。一方, ETR-245 株においては様々な構造のプロトックス阻害型

除草剤に特異的に交差耐性を示したため, 標的酵素であるプロトックスの耐性型への変異あるいはプロトックスの過剰生産が耐性に関与していることが示唆された。

さらに, ETR-245 株における耐性機構を明らかにするため, 感受性株及び ETR-245 株から粗プロトックス画分を抽出し, タンパク質量あたりのプロトックス活性を *in vitro* において測定することを試みた。その結果, 感受性株では 2.24 nM Proto IX/min/mg タンパク質, ETR-245 株では 2.93 nM Proto IX/min/mg タンパク質となり, タンパク質量あたりのプロトックス活性に大きな違いは認められなかった。そこで, 両株由来のプロトックス活性の ET-751 に対する感受性を比較することを試みた。その結果 (Fig. 3), 感受性株由来のプロトックス活性に対する ET-751 の I_{50} 値は 48 nM であったのに対し, ETR-245 株由来のプロトックス活性に対する ET-751 の I_{50} 値は 5000 nM 以上となり, R/S 比は 100 倍以上となった。したがって, ETR-245 株においては標的酵素であるプロトックスの耐性型への変異が耐性に関与していることが示唆された。

タバコ耐性株の分子生物学的解析²¹⁾

本研究の最終目標はプロトックス阻害型除草剤耐性植物の作出であるが, 前述のように, 得られた耐性株を植物体に再生することは不可能であった。そこで, 耐性株から何らかのプロトックス阻害型除草剤耐性遺伝子を単離後, 得られた耐性遺伝子を用いて植物体を形質転換し, 植物体レベルで耐性を発現させるという方向に研究を転換した。そのための遺伝子源としては, 耐性型プロトックスを持つということから, ETR-245 株を選んだ。耐性型プロトックス遺伝子を単離するため, まず, 基本である野生型プロトックス cDNA の塩基配列を解明し, その塩基配列情報を利用して PCR を行うというストラテジーを立てた。

遺伝的相補法

プロトックス cDNA の単離を目指した 1994 年には真核生物のプロトックス cDNA は単離されておらず, 大腸菌²²⁾と枯草菌²³⁾でのみプロトックス cDNA が単離されていた。これら cDNA をプローブとしたハイブリダイゼーションによってタバコのプロトックス cDNA を単離する事を試みたが, 単離は不可能であった。1995 年になって大腸菌のプロトックス遺伝子欠損変異株を用いた遺伝的相補法によってヒトのプロトックス cDNA を単離することに成功したという研究が報告された²⁴⁾。そこで大腸菌のプロトックス遺伝子欠損変異株を入手し (VSR800 株及び SASX38 株), 遺伝的相補法によって独自にタバコのプロトックス cDNA を単離することを試みた。遺伝的相補法の原理を以下に示す。大腸菌ではプロトックス遺伝子は *hemG* という遺伝子によってコードされているが, 野生株では *hemG* 遺

伝子から HemG タンパク質 (プロトックス) が発現され、この働きによってヘムが合成され、正常に生育する。一方、*hemG* 遺伝子欠損変異株では HemG が発現されず、ほとんど生育することができない。それに対し、*hemG* 遺伝子欠損変異株に植物の cDNA ライブラリーを加え、その中に植物のプロトックス cDNA が存在すれば、植物のプロトックス cDNA から植物のプロトックスが発現され、その働きによってヘムが合成され、生育が回復する。

野生型プロトックス cDNA の性質

遺伝的相補法によってタバコ栽培品種 SR-1 から配列の大きく異なった 2 種の野生型プロトックス cDNA を単離し、全塩基配列を解明した。これらを NtPX-1 及び NtPX-2 と名付けた。これら配列を公表するより先に、Lermontova らによってタバコ栽培品種サムソン NN から単離した 2 種類のプロトックス cDNA の塩基配列が報告され²⁵⁾、これら遺伝子産物の細胞内における局在性も解明された。そこで、得られた配列を Lermontova らの配列と比較した結果、NtPX-1 は葉緑体型のプロトックス、NtPX-2 はミトコンドリア型のプロトックスであることが明らかとなったが、塩基配列に数カ所の変異が認められた。

ETR-245 株からのプロトックス cDNA の単離

ETR-245 株及び感受性株から mRNA を抽出し、タバコ野生型プロトックス cDNA の塩基配列情報からデザインしたオープンリーディングフレーム増幅用プライマーによって RT-PCR を行い、プロトックス cDNA を増幅した。増幅した cDNA を TA-クローニング法によって発現ベクター pCR2.1 に *lacZ* 遺伝子と読み枠が合致するようにサブクローニングした。得られたプラスミドを、感受性株由来のミトコンドリア型プロトックス cDNA を保持するものを pCR-HM、ETR-245 株由来のミトコンドリア型プロトックス cDNA を保持するものを pCR-RM、感受性株由来の葉緑体型プロトックス cDNA を保持するものを pCR-HC 及び ETR-245 株由来の葉緑体型プロトックス cDNA を保持するものを pCR-RC とそれぞれ名付けた。これらプラスミドを大腸菌のプロトックス遺伝子欠損変異株に導入したところ、*lacZ* 遺伝子の発現を誘導しなくとも (リーキーに)、生育が回復した。

各プロトックス遺伝子産物の ET-751 感受性

これらプロトックス遺伝子産物の ET-751 に対する感受性を比較する方法として、当初は、大腸菌内で cDNA から発現されたプロトックスを抽出し酵素活性を測定することを試みたが、活性を保持する酵素を抽出することは困難であった。そこで、各プロトックス cDNA によって生育を相補された大腸菌のプロトックス遺伝子欠損変異株の生育に

Table 4 Sensitivity of the Protox gene products to ET-751 measured as the inhibitory effect on the growth of the *E. coli* complemented with the Protox cDNAs.

<i>E. coli</i>	I ₅₀ of ET-751 (nM)	R/S ratio
SASX38(pCR-HM ^{a)})	70	1.3 ^{e)}
SASX38(pCR-RM ^{b)})	90	
SASX38(pCR-HC ^{c)})	2.5	>4000 ^{d)}
SASX38(pCR-RC ^{d)})	>10,000	

^{a)} The plasmid with mitochondrial Protox cDNA from normal cells. ^{b)} The plasmid with mitochondrial Protox cDNA from ETR-245 cells. ^{c)} The plasmid with chloroplastic Protox cDNA from normal cells. ^{d)} The plasmid with chloroplastic Protox cDNA from ETR-245 cells. ^{e)} b)/a). ^{f)} d) / c).

対する ET-751 の阻害効果を測定することを試みた。大腸菌としては、プロトックス遺伝子欠損変異株 SASX38 株に植物のプロトックス cDNA を含む 4 種のプラスミド (pCR-HM, pCR-RM, pCR-HC 及び pCR-RC) のいずれかを導入したものをを用いた。このような大腸菌はプロトックスに関しては植物であると考えられる。これら大腸菌の懸濁液を 0 から高濃度の ET-751 を含む液体培地に接種し、28°C、30 時間前後、振とう培養した。遺伝子産物が ET-751 に対して感受性が高い場合、高濃度の ET-751 を含む培地では大腸菌の生育が抑制された。そこで、培養した大腸菌の吸光度を測定し、大腸菌の生育に対する ET-751 の I₅₀ 値を測定した。

その結果 (Table 4)、ミトコンドリア型プロトックス cDNA の遺伝子産物に関しては、感受性株由来のもので ET-751 に対する I₅₀ 値が 70 nM、ETR-245 株由来のもので 90 nM となり、感受性に大きな違いは認められなかった。一方、葉緑体型プロトックス cDNA の遺伝子産物に関しては、感受性株由来のもので I₅₀ 値が 2.5 nM であったが、ETR-245 株由来のものでは 10,000 nM 以上となり、R/S 比は 4000 以上となった。したがって、ETR-245 株における耐性はミトコンドリア型ではなく葉緑体型プロトックスの耐性型への変異に起因することが明らかとなった。また、従来は、葉緑体型及びミトコンドリア型の両者がプロトックス阻害型除草剤の標的酵素と考えられていたが²⁶⁾、ETR-245 株が葉緑体型プロトックスのみの耐性型への変異で耐性を獲得していることから、ミトコンドリア型プロトックスは無関係であり、葉緑体型プロトックスのみが標的酵素であることが明らかとなった。

耐性型プロトックス遺伝子産物の交差耐性

様々な構造のプロトックス阻害型除草剤に対する ETR-245 株由来の耐性型遺伝子産物の交差耐性についても検討

Table 5 Sensitivity of chloroplastic Protox gene products to several Protox inhibiting herbicides measured as the inhibitory effect on the growth of *E. coli* complemented with each Protox cDNA.

Herbicide	I ₅₀ (nM)		R/S ratio ^{c)}
	SASX38(pCR-HC ^{a)})	SASX38(pCR-RC ^{b)})	
Oxadiazon	550	>100,000	>180
S-23142 ^{d)}	2.5	1,400	560
Acifluorfen	1800	17,000	9.4

^{a)} The plasmid with chloroplastic Protox cDNA from normal cells. ^{b)} The plasmid with chloroplastic Protox cDNA from ETR-245 cells. ^{c)} b)/a). ^{d)} See the text.

した。除草剤としてはオキサジアゾール系の oxadiazon, フタルイミド系の S-23142 (*N*-[4-chloro-2-fluoro-5-propagyl-oxy]-phenyl-3,4,5,6-tetrahydrophthalimide) 及びジフェニルエーテル系の acifluorfen を用いた。その結果 (Table 5), いずれの除草剤に対しても高い交差耐性を示したが, ET-751 に対する耐性が最も高く, acifluorfen に対しては比較的耐性が低いことが明らかとなった。

耐性型プロトックス cDNA の塩基配列解析

ETR-245 株由来の耐性型プロトックス cDNA における変異部位を解明するため, 感受性株由来の pCR-HC 及び ETR-245 株由来の pCR-RC 中におけるプロトックス cDNA の塩基配列を解明することを試みた。その結果, pCR-HC における塩基配列はタバコ野生型プロトックス cDNA (NtPX-1) と全く同一の配列であったが, pCR-RC には一塩基のみが変異した点突然変異が 1 か所認められた (Fig. 4)。塩基番号 717 に相当する塩基 C (シトシン) が T (チミン) に変異し, その結果, 231 番目のコドンが GCT から GTT に変異し, 最終的に 231 番目のアミノ酸が Ala (アラニン) から Val (バリン) に変異していた。部位特異的突然変異法によって pCR-HC に同様の突然変異を導入したところ感受性型から耐性型に変化したことから (データ未掲載), この変異が ETR-245 株における耐性の原因である

ことが明らかとなった。また, プロトックス阻害型除草剤はプロトックスにおけるこの部位, あるいは近傍に結合することも示唆された。さらに, プロトックス阻害型除草剤はプロトックスの競合的阻害剤であるため^{27,28)}, プロトックスの基質である Protogen もこの部位, あるいは近傍に結合することが示唆された。ダイズ²⁹⁾ やタバコ³⁰⁾ でも耐性型プロトックスが知られており, これらにおける変異部位を同定することによって, プロトックス阻害型除草剤及び基質の結合部位, 両者の相互作用を分子レベルで解明することが可能であろう。また, プロトックス遺伝子に部位特異的突然変異を導入し, プロトックス阻害型除草剤に対する感受性を検討することによっても, 同様の解析が可能となろう。

耐性型プロトックス cDNA の植物体における発現³¹⁾

ETR-245 株由来の耐性型プロトックス cDNA を pBI 系のバイナリーベクター中における CaMV 35S プロモーターの下流に挿入し, アグロバクテリウム法によってタバコ野生株に導入した。得られた形質転換植物から調製したリーフディスクを薬液に浸漬し, ET-751 に対し高い耐性を示す系統を選抜した。選抜された T1-7 系統を用いて whole plant に対する薬剤散布試験を行ったところ, 対照の非形質転換植物が完全に枯死する 20 g a.i./ha の ET-751 を散布しても, 薬害はほとんど認められなかった (Fig. 5)。したがって, 本耐性遺伝子を植物に導入することによってプロトックス阻害型除草剤耐性植物を作出する事が可能であることが明らかとなった。

おわりに

本研究の結果, ETR-245 株由来の耐性型プロトックス遺伝子産物がいずれのプロトックス阻害型除草剤に対しても高い耐性を示し, かつ, ET-751 に対して最も高い耐性を示すことが明らかとなった。さらに, 本耐性遺伝子を植物体で発現させたところ植物体レベルでも高い耐性を示したことから, 本耐性遺伝子はプロトックス阻害型除草剤耐性植物の作出に有用であると考えられた。今後は, 形質転換植

Fig. 4 Sequence analysis of resistant Protox cDNA in pCR-RC from ETR-245.

Fig. 5 Resistance in transformed tobacco plant sprayed with ET-751 (2% SC) at the dose rate of 20 g a.i./ha. The photograph was taken at 10 days after treatment. Left: T1-7 line transformed with the resistant Protox cDNA from ETR-245. Right: non-transformed plant.

物における耐性の遺伝様式、タバコ以外の植物における発現及び耐性、より強力なプロモーターによる発現、形質転換植物の生育ステージと耐性等を検討し、本耐性遺伝子による形質転換植物と ET-751 という組み合わせの実用化を目指し、さらに、研究を進めていきたい。

本研究を遂行するにあたり、日本農薬(株)の多くの方々にお世話になりました。この場を借りて、深く感謝の意を表します。また、大腸菌プロトックス遺伝子欠損変異株 VSR800 株を譲渡して頂いた京都大学の井口八郎博士、大腸菌プロトックス遺伝子欠損変異株 SASX38 株を譲渡して頂いたモントリオール大学の A. Sasarman 博士に深く感謝致します。

引用文献

- 1) M. Matringe & R. Scalla: *Plant Physiol.* **86**, 619 (1988)
- 2) M. Matringe, J. M. Camadro, P. Labbe & R. Scalla: *Biochem. J.* **260**, 231 (1989)
- 3) D. A. Witkowski & B. P. Halling: *Plant Physiol.* **90**, 1239 (1989)
- 4) J. M. Jacobs, J. M. Wehner & N. J. Jacobs: *Pestic. Biochem. Physiol.* **50**, 23 (1994)
- 5) H. J. Lee & S. O. Duke: *J. Agric. Food Chem.* **42**, 2610 (1994)
- 6) S. Matsunaka: *J. Agric. Food Chem.* **17**, 171 (1969)
- 7) P. Böger & K. Wakabayashi: *Z. Naturforsch.* **50**, 159 (1995)
- 8) Y. Miura, M. Ohnishi, T. Mabuchi & I. Yanai: "Proceedings 1993 Brighton Crop Protection Conference-Weeds," pp. 35-40, 1993
- 9) S. Murata, A. Yuda, A. Nakano, Y. Kimura, K. Motoba, T. Mabuchi, Y. Miura, H. Nishizawa & S. Funayama: "Proceedings 1995 Brighton Crop Protection Conference-Weeds," pp. 243-248, 1995
- 10) M. Horikoshi & T. Hirooka: *J. Pesticide Sci.* **24**, 13 (1999)
- 11) R. J. Smeda & S. C. Weller: *Weed Sci.* **39**, 497 (1991)
- 12) R. S. Chaleff & T. B. Ray: *Science* **223**, 1148 (1984)
- 13) S. R. Singer & C. N. McDaniel: *Plant Physiol.* **78**, 411 (1985)
- 14) D. L. Shaner & P. C. Anderson: "Biotechnology in Plant Science," ed. by M. Zaitlin, P. R. Ray & A. Hollander, Academic Press, New York, pp. 287-300, 1985
- 15) K. Y. Lee, J. Townsend, J. Tepperman, M. Black, C. F. Chui, B. Mazur, P. Dunsmuir & J. Bedbrook: *EMBO J.* **7**, 1241 (1988)
- 16) A. Pay, M. A. Smith, F. Nagy & L. Marton: *Nucleic Acids Res.* **16**, 8176 (1988)
- 17) H. Hirochika: *EMBO J.* **12**, 2521 (1993)
- 18) P. Böger: *J. Pesticide Sci.* **22**, 257 (1997)
- 19) I. Furusawa, K. Tanaka, P. Thanutong, A. Mizuguchi, M. Yazaki & K. Asada: *Plant Cell Physiol.* **25**, 1247 (1984)
- 20) C. Y. Yu & J. B. Masiunas: *Weed Sci.* **40**, 408 (1992)
- 21) M. Horikoshi, K. Mametsuka & T. Hirooka: *J. Pesticide Sci.* **24**, 17 (1999)
- 22) A. Sasarman, J. Letowski & G. Czaika: *Can. J. Microbiol.* **39**, 1155 (1993)
- 23) T. A. Dailey, P. Meissner & H. A. Dailey: *J. Biol. Chem.* **269**, 813 (1994)
- 24) K. Nishimura, S. Taketani & H. Inokuchi: *J. Biol. Chem.*

- 270, 8076 (1995)
- 25) I. Lermontova, E. Kuruse, H.-P. Mock & B. Grimm: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8895 (1997)
- 26) M. Matringe, J. M. Camadro & N. Brouillet: "Proceedings 1993 Brighton Crop Protection Conference-Weeds," pp. 703-712, 1993
- 27) M. Matringe, R. Mornet & R. Scalla: *Eur. J. Biochem.* **209**, 861 (1992)
- 28) R. Varsano, M. Matringe, N. Magnin, R. Mornet & R. Scalla: *FEBS Lett.* **272**, 106 (1990)
- 29) T. Pornprom, H. Matsumoto, K. Usui & K. Ishizuka: *Pestic. Biochem. Physiol.* **50**, 107 (1994)
- 30) K. Ichinose, F. S. Che, Y. Kimura, A. Matsunobu, F. Sato & S. Yoshida: *J. Plant Physiol.* **146**, 693 (1995)
- 31) 豆塚弘毅・堀越 守・大塚 隆・廣岡 卓: 日本農薬学会第24回大会講演要旨集, p. 58, 1999

Society Awards 1999

(on high prospectiveness)

Fundamental Studies on the Production of Plants Resistant to Protox Inhibiting Herbicides

In 1989, Nihon Nohyaku Co., Ltd. was in the process of developing the promising herbicide, ET-751, which belonged to Protox inhibiting herbicides. At that time, a resistant gene against the Protox inhibiting herbicides had not been isolated from plants. Therefore, the research target was focused on the selection of the resistant cell line to the herbicides as the first step for the production of plants resistant to the herbicides.

The application of Protox inhibiting herbicides to plant leads to the peroxidative destruction of cellular membrane and bleaching of tissues in the presence of light. In treated tissues, these herbicides cause the accumulation of protoporphyrin IX (Proto IX) known as a strong photosensitizer to generate singlet oxygen. Then, further research revealed that the target enzyme of Protox inhibiting herbicides was protoporphyrinogen oxidase (Protox), which catalyzes the oxidation of protoporphyrinogen IX (Proto IX) to Proto IX, the final common precursor in the heme and chlorophyll synthesis. From these characteristics, the herbicides are also designated as photobleaching or peroxidizing herbicides.

ET-62311 [4-chloro-3-[2,4-dichloro-5-(2-propenyloxy)phenyl]-5-difluoromethoxy-1-methylpyrazole], one of the 3-phenylpyrazole with a Protox inhibiting herbicidal activity synthesized in Nihon Nohyaku Co., Ltd. was used for the cell line selection. ET-751 (pyraflufen-ethyl, Fig. 1 and Table 1), a derivative of ET-62311 with the same activity was also used for later experiments. ET-751 is now registered as Ecopart® for the cereal market.

Plant cell and tissue culture techniques are useful tools to produce herbicide resistant plants, because, in general, a plant cell has the ability to regenerate a whole plant

and cultured plant cells are genetically variable. Various herbicide resistant cell lines were selected by the techniques and in some cases resistant plants were regenerated. Herbicide resistant cell lines are also useful as the genetic resources for the herbicide resistant genes. From these viewpoints, we tried to select tobacco cell lines resistant to Protox inhibiting herbicides.

Tobacco calli were regenerated from protoplasts and the selection was started using medium containing 20 nM ET-62311 (Table 2), twice as high as MIC (10 nM). The selection was further repeated by the stepwise increase of the concentration of ET-62311. Thirty-six cell lines could grow on the medium containing 2400 nM ET-62311 after selection for 16 months. Three cell lines of rapid growth were selected and designated as ETR-056, 245 and 253. Regeneration of these cell lines was unsuccessful.

The amount of Proto IX accumulated in normal cells, ETR-056, 245 and 253 were measured periodically after ET-62311 treatment (Fig. 2). The amount of Proto IX increased in normal cells and especially ETR-056. On the other hand, no Proto IX accumulation was observed for ETR-245 and 253.

Each resistant cell line was cross-resistant to three Protox inhibiting herbicides tested, including ET-751 (Table 3). In addition, ETR-056 was cross-resistant to paraquat. ETR-253 was cross-resistant to several herbicides with different modes of action. The resistance of ETR-245 was specific to Protox inhibiting herbicides. These results suggested the involvement of the overexpression of detoxifying enzymes for superoxide species in ETR-056 and the multiple resistance due to a reduced uptake and/or an enhanced metabolism of herbicides in

ETR-253. In ETR-245, the overexpression of Protox or the alteration of Protox to the resistant form might confer the resistance.

In order to analyze the resistant mechanism in ETR-245, crude Protox fractions were extracted from normal cells and ETR-245, and the Protox activity was measured *in vitro*. The specific activity in each fraction was almost equivalent, 2.24 and 2.93 nM Proto IX/min/mg protein for normal cells and ETR-245, respectively. The inhibitory effect of ET-751 on each Protox activity was also examined *in vitro* (Fig. 3). I_{50} values of ET-751 against Protox activity from normal cells and ETR-245 were 48 and more than 5000 nM, respectively. Thus, Protox enzyme from ETR-245 was more than 100-fold resistant than that from normal cells. These results suggested that the alteration of the Protox enzyme to the resistant form would be the cause for the resistance in ETR-245.

The isolation of a resistant gene from a resistant cell line and transformation of plants with the gene was necessary to express resistance in a whole plant, because the regeneration of resistant cell lines was unsuccessful. ETR-245 was used as the genetic resource for the resistant gene, because ETR-245 had the mutant Protox resistant to Protox inhibiting herbicides.

When we tried to isolate the resistant protox gene from ETR-245, no sequence information about eucaryotic Protox gene except procaryotic one was available. Although we tried hybridization using these procaryotic genes as probes, tobacco Protox cDNA could not be isolated. In 1995, the isolation of human Protox cDNA by genetic complementation using *E. coli* mutant defective in Protox was reported. Therefore, we obtained the *E. coli* mutant (VSR800 and SASX38) and isolated at first wild-type tobacco Protox cDNA from tobacco leaves by the method by ourselves. The sequences of wild-type Protox cDNAs thus derived were almost the same as the sequence of tobacco Protox cDNA recently reported, though some differences were observed.

Using the sequence information, Protox cDNAs were amplified from normal cells and ETR-245, and subcloned into pCRTM 2.1 in frame with *lacZ* gene. The plasmids with mitochondrial Protox cDNAs from normal cells and ETR-245 were designated as pCR-HM and pCR-RM, respectively. The plasmids with chloroplastic Protox cDNAs from normal cells and ETR-245 were designated as pCR-HC and pCR-RC, respectively. Each plasmid was introduced into *E. coli* SASX38 and confirmed to complement the poor growth of the *E. coli*.

The sensitivity of each Protox gene product to ET-751 was compared by measuring the inhibitory effect of ET-751 on the growth of *E. coli* SASX38 complemented with plant Protox cDNAs (Table 4), because the extraction of the active Protox enzyme expressed in *E. coli* was rather difficult. I_{50} values of ET-751 for *E. coli* SASX38

(pCR-HM and pCR-RM) were 70 and 90 nM, respectively, indicating that both gene products were similarly sensitive to ET-751. I_{50} values for *E. coli* SASX38 (pCR-HC and pCR-RC) were 2.5 and more than 10,000 nM, respectively, indicating that the gene product encoded by the Protox cDNA from ETR-245 was more than 4000-fold resistant than that from normal cells. It was clarified from these results that the resistance in ETR-245 was caused by the alteration of the chloroplastic Protox gene product from the sensitive form to the resistant one. As the alteration of the mitochondrial one was not necessary for the resistance, it was suggested that the target enzyme of the herbicides would not be both Protox but solely the chloroplastic one.

Cross-resistance of the resistant Protox gene product encoded by pCR-RC to other Protox inhibiting herbicides such as oxadiazon, S-23142 (*N*-[4-chloro-2-fluoro-5-propagylloxy]-phenyl-3,4,5,6-tetrahydrophthalimide) and acifluorfen was also evaluated (Table 5). The resistant gene product exhibited high resistance to all the herbicides tested. The resistance was highest for ET-751, whereas rather low for acifluorfen, the diphenyl ether herbicide.

Nucleotide sequences of sensitive and resistant chloroplastic Protox cDNAs in pCR-HC and pCR-RC, respectively, were compared. The cDNA in pCR-HC was identical to wild-type Protox cDNA from tobacco leaves. On the other hand, single-point mutation was observed for the cDNA in pCR-RC (Fig. 4). The codon corresponding to amino acid 231 was mutated from GCT to GTT, which resulted in the substitution of alanine for valine. When the same single-point mutation was introduced into pCR-HC, the gene product was converted from the sensitive form to the resistant one, reconfirming that this mutation was the cause for the resistance in ETR-245. From these results, it was suggested that Protox inhibiting herbicides would bind at or near this mutation site in Protox enzyme. Because the herbicides are competitive inhibitors of Protox, the substrate of Protox, *i.e.* Protogen, would also bind at or near this mutation site. Further study using other resistant Protox enzymes would reveal the binding site and interaction of the herbicides and the substrate.

The resistant Protox cDNA from ETR-245 was introduced into tobacco plants by *Agrobacterium*-mediated transformation and expressed under the control of CaMV 35S promoter. The transformed plants highly resistant to ET-751 were selected by the leaf disc assay. When the whole plant of T1-7 line thus selected was sprayed with ET-751 at the dose rate of 20 g a.i./ha, at which non-transformed plants were completely killed, no injury was observed (Fig. 5). Therefore, the resistant Protox gene from ETR-245 in this research would be valuable for the production of plants resistant to Protox inhibiting herbicides.