ビスピリバックナトリウム塩を選抜用試薬とする 新規植物形質転換技術の開発

角 康一郎*・河合 清*・井沢 典彦*・清水 力*

キーワード：アセト乳酸合成酵素, AHAS, bispyribac-sodium, pPALS, pSTARA

Keywords：ALS, AHAS, bispyribac-sodium, pPALS, pSTARA

1. 研究の背景

分岐鎖アミノ酸生合成経路上のアセト乳酸合成酵素 (ALS, Fig. 1) を阻害する ALS 阻害型除草剤は、殺草スペクトラムが広いこと、また低薬量化が図られたことから、水稻、畑作場面においては基幹的な除草剤として重要な位置を占めている。しかしながら、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, LaRossa and Schloss 1984) 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 (HRAC 2010, Uchino and Watanabe 2002, Uchino *et al.* 2007)。これらの原因の大部分は標的酵素である ALS をコードする遺伝子に点突然変異が生じることによると考えられている (Merotto *et al.* 2009)。一方、除草剤抵抗性 (耐性) 遺伝子、例えばグルホシネート耐性 *bar* 遺伝子やグリホセート耐性 EPSPS 遺伝子は、遺伝子組換えの際の選抜マーカー遺伝子や除草剤耐性の形質遺伝子として、基礎的研究や実用化研究で利用されている。著者らは 1997 年から 2002 年に亘って農水省の「植物の代謝系遺伝子を活用した新雑草防除技術の開発」(雑草防除プロジェクト) に参画し、自社の水稻用除草剤であるビスピリバックナトリウム塩 (BS, Fig. 2, 和田ら 1996) に対

Fig. 1 Biosynthetic pathway of branched-chain amino acids.

Fig. 2 Chemical structure of bispyribac-sodium (BS).

して抵抗性を与える新規な変異型 ALS 遺伝子を取得することに取り組んだ。その結果、イネ ALS の 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 ALS 遺伝子の単離に成功し (Fig. 3)、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。以下に、本変異型 ALS 遺伝子取得までの経緯およびこの遺伝子を用いた新規植物形質転換技術の構築について説明する。

*クミアイ化学工業 (株) 生物科学研究所
〒436-0011 静岡県掛川市満水 276
k-kaku@kumiai-chem.co.jp
Koichiro Kaku, Kiyoshi Kawai, Norihiko Izawa and Tsutomu Shimizu : The development of a novel plant genetic transformation technology using bispyribac-sodium as a selectable reagent. Kumiai Chemical Industry Co., Ltd., 276 Tamari, Kakegawa, Shizuoka, 436-0011, Japan (2010 年 5 月 7 日受付, 2010 年 5 月 10 日受理)

Fig. 3 Schematic representation of amino acid mutation conferring ALS-inhibiting herbicide resistance. Amino acid numbers are shown by rice numbering system and Arabidopsis numbering system in parenthesis.

2. 変異型 ALS の BS に対する感受性

BS は、化学構造上 SU 剤とは異なるピリミジニルカルボキシル系 ALS 阻害型除草剤 (PC 剤) に属する (Shimizu *et al.* 1994a, b)。1990 年半ば米国で出現した SU 剤抵抗性ホウキギ (*Kochia scoparia*, Guttieri *et al.* 1995) の ALS 遺伝子を解析した結果、供試個体はイネの 171 番目のプロリンに対応するアミノ酸がセリンに変異していた。この個体から調製した ALS の SU 剤のクロルスルフロンの (CS) に対する 50% 阻害濃度での RS 比が 50 倍強であったのに対し、BS では 3 倍程度であり、交差抵抗性の度合いが小さいことが判明した (Fig. 4, 清水ら 2001)。この結果から、BS と SU 剤では ALS 上の結合部位が異なると考えられたので、「BS による選択圧によって SU 剤抵抗性とは異なる変異を持つ ALS 遺伝子が得られる」との作業仮説を立てた。なお、話は前後するが、次項の方法で単離したイネの ALS 遺伝子をモデルとして 171 番目のプロリンをコードする塩基を既知の SU 剤抵抗性遺伝

子に対応する塩基に変換し、これらの変異型 ALS 遺伝子から発現した変異型 ALS の BS やその他の ALS 阻害型除草剤に対する感受性を調べた。その結果、作製した変異型 ALS は、BS だけではなくピリミノバック (PM, 田丸ら 1997) やピリチオバックナトリウム塩 (PS, 斎藤ら 1996) 等の PC 剤に対して SU 剤とは異なる感受性を示すことが明らかとなった (Table 1, 角ら 2006)。

3. イネ培養細胞からの BS 抵抗性変異型 ALS 遺伝子の単離および本遺伝子を利用した植物形質転換技術の開発

イネ培養細胞を、1 μ M BS を含む液体培地中でおよそ 2 週間に 1 回継代しながら培養を行った。その結果、2 週間～6 週間程度で培養細胞が枯死し始め、約 2 ヶ月後にほとんどが枯死して茶色に変色している培養細胞集団の中に、変色が無く細胞分裂を行っていると考えられる細胞塊が複数個得られた。これら細胞塊を単離し、培養を行った結果、2 μ M の BS 存在

Fig. 4 Comparison of sensitivities of proline-to-serine mutated ALS on the domain A, which was prepared from *Kochia scoparia* resistant to chlorsulfuron, against imidazolinones (IMIs), pyrimidinylcarboxylates (PCs) and sulfonylureas (SUs).

Table 1 RS ratios of recombinant ALSs of rice to ALS-inhibiting herbicides.

Chemical Compound ^{a)}	RS ratio ^{b)}								
	P171A	P171H	P171I	P171K	P171L	P171Q	P171R	P171S	P171T
CS	2000	85	350	1400	85	1200	>7700	7000	2200
BM	>11000	>11000	3200	3300	3100	>11000	>11000	8300	3800
IQ	3.0	1.5	>45	45	10	3.4	29	1.0	4.2
IP	-	>10	>10	-	>10	-	-	-	>10
BS	3.7	8.7	7.3	140	22	6.5	680	5.7	4.1
PS	68	3.4	35	20	11	-	110	69	59
PM	14	4.5	59	-	36	-	450	-	110

^{a)} CS, chlorsulfuron ; BM, bensulfuron-methyl ; IQ, imazaquin ; IP, imazapyr ; PM, pyriminobac ; PS, pyriithiobac-sodium ; BS, bispyribac-sodium

^{b)} -, not determined

Fig. 5 Sensitivities of rice cells to bispyribac-sodium and chlorsulfuron. A and C : wild-type ; B and D : mutant.

下でも増殖する複数の細胞株を得ることができた。その後、得られた細胞株をBSの添加濃度を順次上げて培養した結果、100 μMのBS共存下でも増殖できる細胞株が得られた。この得られた細胞株のALS阻害型除草剤に対する感受性を野生株と比較した。そ

の結果、野生株では、10 nM以上のBS添加区で増殖が阻害された (Fig. 5A) が、抵抗性変異株では、10 μMのBS添加区においてもほとんど増殖に影響を受けないことが明らかとなった (Fig. 5B)。SU剤のCSに対しては、野生株はBSと同程度の感受性を示

したのに対して (Fig. 5C), 抵抗性変異株では 1 μ M CS の存在下で強く増殖が阻害された (Fig. 5D)。従って, 得られた変異株が ALS 阻害型除草剤の中でも特に強く BS に対して抵抗性を示すことが明らかとなった。当時はイネ ALS 遺伝子の全長配列は同定されていなかったため, BS 抵抗性カルスの ALS 遺伝子の変異点の同定と共に, 野生型 ALS 遺伝子配列の決定も行った。イネ DNA データバンク (MAFF DNA bank) から入手したイネ ALS 遺伝子の部分配列を含むと推定されたクローン (アクセッション番号: C72411) をプローブとして, 野生型イネ培養細胞の cDNA フェージライブラリーからスクリーニングを行なった結果, 開始コドンより 3 塩基長い ALS cDNA が単離できた。一方, BS 抵抗性培養細胞の cDNA ライブラリーから開始コドンよりそれぞれ 47 塩基, 31 塩基長い ALS cDNA (アクセッション番号: AB049822 と AB049823) が単離できた。このうち AB049822 は野生型イネ培養細胞から単離された ALS cDNA の塩基配列と一致したことから野生型 ALS をコードする配列であると考えられた。この cDNA から翻訳される ALS のアミノ酸配列はとうもろこし (アクセッション番号: X63553 と X63554) および大麦 (アクセッション番号: AF059600 (部分配列)) の ALS アミノ酸配列と高い相同性を示した。一方, AB049823 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と共に, 627 番目のセリンがイソロイシンに置換されていた。W548L/S627I 2 点変異型 ALS は BS に対して非常に強い抵抗性を示した。また, 別途作成した S627I 1 点変異型 ALS は 2 点変異型より BS に対する抵抗性が弱まるが, PM や PS に対して強い抵抗性を付与した (Fig. 6, Kawai *et al.* 2007a)。この結果は, 2 点変異型 ALS と BS 及び 1 点変異型 ALS と PM あるいは PS の組み合わせがイネ形質転換の選抜マーカーとして利用できることを示唆した。一方, イネにおける変異に相当するシロイヌナズナ由来の変異型 ALS 遺伝子を作製し, 本変異型 ALS 遺伝子がシロイヌナズナ形質転換の選抜マーカーとして機能することを明らかにした (Table 2, Kawai *et al.* 2008)。また, それぞれの 2 点変異型 ALS 遺伝子 (W548L/S627I OsALS, W574L/S653I AtALS) を強発現ベクター (pMLH7133) を介してイネおよびシロイヌナズナに導入した結果, BS に耐性な植物体が作出できることを確認した (Fig. 7, Fig. 8, Kawai *et al.* 2007b, Kawai *et al.* 2010)。そこで, イネ由来及びシロイヌナズナ由来変異型 ALS 遺伝子を選抜マーカー遺伝子とする新規バイナリーベクタープラスミドの開発を進め, 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[®]: pPALS シリーズ, pSTARA シリーズ) を商品化した

Fig. 6 Comparison of sensitivities of recombinant ALSs to bispyribac-sodium and chlorsulfuron.

Table 2 RS ratios of recombinant ALSs to ALS-inhibiting herbicides.

Type	Chemical Compound ^{a)}	RS ratio			
		Rice ALS(OsALS) mutation		Arabidopsis ALS(AtALS) mutation	
		W548L/S627I	S627I	W574L/S653I	S653I
PC	BS	>16000	41	>17000	83
	PS	>9100	200	>2900	350
	PM	>13000	2500	>8300	3300
SU	CS	200	2.4	4400	4.2
	BM	>14000	73	>9100	43
IM	IQ	>45	6.8	>56	21
	IP	>10	>10	>14	>14

^{a)} CS, chlorsulfuron ; BM, bensulfuron-methyl ; IQ, imazaquin ; IP, imazapyr ; PM, pyriminobac ; PS, pyriithiobac-sodium ; BS, bispyribac-sodium

W548L/S627I ALS transformed rice (T₁ homozygote)

Wild-type rice

Application rate of BS (g a.i. / ha) and layout of pots.

Fig. 7 Sensitivities of the transformed rice with W548L/S627I mutated rice-ALS to foliar application of BS. Plant growth was observed 40 days after application of BS.

Below figure shows T-DNA region of binary vector pMLH7133-mALS used for this transformation. RB, right border ; LB, left border; Pnos, nopaline synthase promoter ; NPTII, neomycin phosphotransferase gene ; Tnos, nopaline synthase terminator ; E7, seven replicated enhancers of CaMV 35S promoter ; P35S, CaMV 35S promoter ; Ω, tobacco mosaic virus omega sequence ; I, first intron of phaseolin gene ; mALS, W548L/S627I mutated ALS gene of rice ; E35S, enhancer region of CaMV 35S promoter ; HPT, hygromycin B phosphotransferase gene ; T35S, CaMV 35S terminator.

(Fig. 9, Fig. 10, クミアイ化学 2010)。

この内、pSTARA ベクターの特徴は、1) 安全性に配慮した植物由来遺伝子のマーカー遺伝子を持っていること、2) BS 選抜によりエスケープが少ないクリアな選抜が可能であること、3) アグロバクテリウム菌を介した植物形質転換に必要最小限の領域で構成されたミ

ニバイナリーベクターであること、4) 目的遺伝子導入のためマルチクローニングサイトタイプと Gateway タイプがあること、5) 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 (Heeb *et al.* 2000) を持つため、シングルコピーが導入された形質転換植物の取得が容易である、ことが挙げられ、使用

Fig. 8 Sensitivities of the transformed Arabidopsis with W548L/S627I rice-ALS (OsALS) gene and W574L/S653I Arabidopsis-ALS (AtALS) gene to BS. Various concentrations of BS were sprayed over the leaves. Photograph was taken 2 weeks after spraying.

Fig. 9 Plasmid constructs of R-3 of pPALS vecor (A) and A-2, A-3, R-4, R-5 of pSTARA vectors (B).

しやすいベクターとなっている。

4. PalSelect ベクターを使用した CoQ₁₀ 蓄積イネの作出

商品化したベクターの実用性を評価するために、コエンザイム Q₁₀ (CoQ₁₀) を蓄積する組換えイネの作出に

取組んだ。イネは9 単位のイソプレノイド側鎖を持つ CoQ₉ を生合成するが、CoQ₁₀ はほとんど合成できない。そこで 10 単位のイソプレノイド合成を行うグルコン酸菌由来のデカプレニル 2 リン酸合成酵素遺伝子 (ddsA, Okada *et al.* 1998) をミトコンドリア局在化シグナルペプチド (S14 signal, Kubo *et al.* 1999) のリーダーシーケンスと

Fig. 10 The commercialized products of pSTARA vectors and BS.

融合したカセット (ALS promoter :: S14 :: ddsA :: P10 terminator) を pPALS ベクターを介してイネに導入した (Fig. 11)。その結果、遺伝子導入に成功した組換え体のホモ系統の内、系統 ALSCoQ-6-4 と系統 ALSCoQ-28-5 ではイネ種子 1 g 中に約 10 μ g の CoQ₁₀ が蓄積されることが明らかとなった (Fig. 12)。

以上、新規変異型 ALS 遺伝子の単離から、植物形質転換体マーカー遺伝子としての利用について概述した。本変異型 ALS 遺伝子は実用的遺伝子組換え体作出の選抜マーカー遺伝子として利用されているだけでなく、抗生物質耐性遺伝子と併用できる選抜マーカー遺伝子として研究レベルでの使用も徐々に増えている。除草剤を基盤とした本植物形質転換技術は、国内の植物遺伝子組換え研究及び組換え体開発に

Transformant (T ₂)	CoQ ₁₀ content (μ g/g dry weight, means $\pm$ standard deviation)	number of seeds analysed
ALSCoQ-6-4	9.9 $\pm$ 2.0	8
ALSCoQ-28-5	9.5 $\pm$ 1.8	8

Fig. 12 CoQ₁₀ content in T₂ transgenic rice seeds. Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation.

において有用な技術となっており、今後本遺伝子が導入された作物の商品化が期待される。

謝 辞

本研究は、(独) 農業生物資源研究所の田中喜之博士、土岐精一博士、市川裕章博士、小野和子氏、門脇光一博士、高橋咲子氏、(独) 農研機構・作物

Fig. 11 Chemical structure of coenzyme Q (CoQ) and biosynthetic pathway of isoprenoid. *Gluconobacter suboxydans* synthesizes ten units of IPP, while rice mainly synthesizes nine units of IPP. ddsA, decaprenyl diphosphate synthase; SPS, solanesyl diphosphate synthase. Below figure shows T-DNA region of binary vector R-3-ddsA used for the transformation. LB, left border; RB, right border; callus sp pro, callus specific promoter; S627IOsALS, S627I mutated ALS gene of rice; P10T, 10Kda prolamin polypeptide terminator; ALSpro, rice ALS promoter; S14, mitochondria-targeting signal of rice rps14 gene; ddsA, decaprenyl diphosphate synthase gene.

研究所の大島正弘博士らの御協力により成就したものです。これらの方々に深く感謝申し上げます。また雑草防除プロジェクトにおいて、種々のアドバイスを頂きました（独）農業環境技術研究所の奥語靖洋博士にお礼申し上げます。さらにベクター作成や CoQ₁₀ 分析等で協力して下さいました藤岡智則博士、種谷良貴氏らクミアイ化学工業（株）生物科学研究所の皆様に感謝致します。

引用文献

- Guttieri M., C.V. Eberlein and D. Thill 1995. Diverse mutations in the acetolactate synthase gene confer chlorsulfuron resistance in *Kochia* (*Kochia scoparia*) biotypes. *Weed Sci.* 43, 175-178.
- Heeb S., Y. Itoh, T. Nishiyo, U. Schnider, C. Keel, J. Wade, U. Walsh, F. O'Gara and D. Haas 2000. Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 232-237.
- HRAC home page, 2010. <http://www.weedscience.org/Summary/UspeciesMOA.asp?lstMOAID=3&FmHRACGroup=Go>.
- 角康一郎・大野修二・小川安則・清水力 2006. ALS ドメイン A のプロリン変異と薬剤抵抗性の関係及び SU 抵抗性雑草の ALS 遺伝子解析. *雑草研究* 51(別), 140-141.
- Kawai K., K. Kaku, N. Izawa, T. Shimizu, A. Fukuda and Y. Tanaka 2007a. A novel mutant acetolactate synthase gene from rice cells, which confers resistance to ALS-inhibiting herbicides. *J. Pestic. Sci.* 32, 89-98.
- Kawai K., K. Kaku, N. Izawa, A. Fukuda, Y. Tanaka and T. Shimizu 2007b. Functional analysis of transgenic rice plants expressing a novel mutated ALS gene of rice. *J. Pestic. Sci.* 32, 385-392.
- Kawai K., K. Kaku, N. Izawa, M. Shimizu, H. Kobayashi and T. Shimizu 2008. Herbicide sensitivities of mutated enzymes expressed from artificially generated genes of acetolactate synthase. *J. Pestic. Sci.* 33, 128-137.
- Kawai K., K. Kaku, N. Izawa, M. Shimizu, H. Kobayashi and T. Shimizu 2010. Transformation of *Arabidopsis* by mutated acetolactate synthase genes from rice and *Arabidopsis* that confer specific resistance to pyrimidinylcarboxylate-type ALS inhibitors. *Plant Biotechnol.* 27, 75-84.
- Kubo N., K. Harada, A. Hirai and K. Kadowaki 1999. A single nuclear transcript encoding mitochondrial RPS14 and SDHB of rice is processed by alternative splicing: Common use of the same mitochondrial targeting signal for different proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9207-9211.
- クミアイ化学 home page, 2010. <http://www.kumiai-chem.co.jp/palselect/>.
- LaRossa, R.A. and J.V. Schloss 1984. The sulfonylurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 259, 8753-8757.
- Merotto JR. A., M. Jasieniuk, M. D. Osuna, F. Vidotto, A. Ferrero and A.J. Fischer 2009. Cross-resistance to herbicides of five ALS-Inhibiting groups and sequencing of the ALS gene in *Cyperus difformis* L. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1389-1398.
- Okada K., T. Kainou, K. Tanaka, T. Nakagawa, H. Matsuda and M. Kawamukai 1998. Molecular cloning and mutational analysis of the *ddsA* gene encoding decaprenyl diphosphate synthase from *Gluconobacter suboxydans*. *Eur. J. Biochem.* 255, 52-59.
- 斎藤芳宏・和田信英・草野章次・豊川泰文・宮沢武重・梶原郁夫・高橋智 1996. ピリミジン誘導体及び除草剤. 特許第 2561524 号.
- Shimizu, T., I. Nakayama, T. Nakao, Y. Nezu and H. Abe 1994a. Inhibition of plant acetolactate synthase by herbicides, pyrimidinylsalicylic acids. *J. Pestic. Sci.* 19, 59-67.
- Shimizu, T., I. Nakayama, N. Wada, T. Nakao and H. Abe 1994b. Kinetic studies on the inhibition of acetolactate synthase by pyrimidinylsalicylic acids. *J. Pestic. Sci.* 19, 257-266.
- 清水力・角康一郎・高橋智・永山孝三 2001. SU 及び IMI 除草剤抵抗性雑草から調製した ALS の PC 除草剤感受性. *雑草研究* 46(別), 32-33.
- 田丸雅俊・河村典広・佐藤政宏・高部文明・立川重彦・吉田涼 1997. ピリミジンまたはトリアジン誘導体及び除草剤. 特許第 2603557 号.
- Uchino A. and H. Watanabe 2002. Mutations in the acetolactate synthase genes of sulfonylurea-resistant biotypes of *Lindernia* spp. *Weed Biol. Manag.* 2, 104-109.
- Uchino A., S. Ogata, H. Kohara, S. Yoshida, T. Yoshioka and H. Watanabe 2007. Molecular basis of diverse responses to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in sulfonylurea-resistant biotypes of *Schoenoplectus juncoideus*. *Weed Biol. Manag.* 7, 89-96.
- 和田信英・草野章次・豊川泰文 1996. ピリミジン誘導体及び除草剤. 特許第 2558516 号.