

論文の内容の要旨

論文題目 自然変異 ALS 遺伝子を利用した植物形質転換技術の確立
およびその応用に関する研究

氏 名 河合 清

アセト乳酸合成酵素(以下、ALS)は、ロイシン、バリン及びイソロイシン等の分岐鎖アミノ酸合成経路における律速酵素であり、植物の成長にとって必須な酵素である。また、ALSは哺乳類には存在しないため、この酵素を標的とする除草剤は安全性にも優れている。本研究では、きわめて高い安全性を有するALS阻害剤であるPC系除草剤に対して、抵抗性を獲得した植物由来の自然変異ALS遺伝子を利用して、社会的に受け入れられやすい実用的な遺伝子組換え作物を作出するための技術の確立およびその応用を試みた。

本研究を始める段階で単子葉植物において完全に ALS 遺伝子の塩基配列が決定されていたのは、トウモロコシのみであり、わが国の主食であるイネの ALS 遺伝子配列は明らかにされていなかった。そこで、第 1 章ではイネ ALS 遺伝子の単離を試みると同時に、イネ培養細胞の自然変異によってPC系除草剤に抵抗性を示す新規ALSの単離を試みた。その結果、PC系除草剤の一つであるビスピリバックナトリウム塩(BS)抵抗性となったイネ培養細胞から 548 番目のトリプトファンがロイシン(W548L)へ、627 番目のセリンがイソロイシン(S627I)へ変化する 2 つの塩基が変異した W548L/S627I O_sALS 遺伝子を単離した。本変異 ALS は野生型 ALS を 50%阻害する BS 濃度の 1000 倍濃度でも阻害されなかったことから PC 系除草剤との組み合わせでイネ遺伝子組換えの選抜マーカーとして利用できると考えられた。

第 2 章では、W548L/S627IO_sALS 遺伝子を導入したイネ培養細胞を実際に BS を含む選抜培地で選抜できるかどうかを調べた。その結果、本システムはイネ形質転換で汎用されているハイグロマイシン選抜システムと同等の形質転換効率を示した。従って、2 点変異イネ ALS 遺伝子が

PC 系除草剤との組み合わせによって選抜マーカーとして機能することが明らかとなった。この選抜マーカーシステムが実用的な組換え体を作成するために使用できるかどうかを確認するため、さらに形質転換体の機能解析を行った。その結果、導入された BS 抵抗性の形質は安定的に T₂ 世代まで遺伝することが確認された。また野生型と比較して、変異 ALS 遺伝子の導入による生育や稔性への悪影響は認められなかった。以上のことから自然変異によって単離されたイネ変異 ALS 遺伝子は実用的な形質転換体を作成するための選抜マーカー遺伝子として有用であることが示された。

第 3 章では、W548L/S627I OsALS の選抜マーカーとしての汎用性を確認するため、シロイヌナズナの形質転換を試みた。加えて、S627I 1 点変異および、これらに対応するシロイヌナズナ由来変異 ALS(W574L/S653I AtALS および S653I AtALS)を人工的に作成し、選抜マーカーとしての可能性について検討を行った。その結果、4 つの変異 ALS 遺伝子が PC 系除草剤との組み合わせでいずれもシロイヌナズナ形質転換体の選抜マーカーとして使用できることが明らかとなった。イネ由来の ALS 遺伝子がシロイヌナズナでも機能したことから ALS 遺伝子の配列情報が未知の植物にも幅広く本遺伝子が選抜マーカーとして利用できる可能性が示された。一方、選抜された形質転換植物はいずれもイネ由来の ALS よりもシロイヌナズナ由来の ALS が導入された個体が PC 系除草剤に対して強い抵抗性を示した。ALS は、葉緑体に移行するためのシグナルペプチド領域のみを比較した場合は相同性が低く、このことが PC 系除草剤に対する抵抗性の強さの違いに反映されている要因の一つと考えられた。植物 ALS アミノ酸配列の系統樹解析の結果と合わせて判断すると、ALS 遺伝子の配列情報が未知の植物においては、単子葉植物ではイネ由来の変異 ALS 遺伝子を使用し、双子葉植物ではシロイヌナズナ由来の変異 ALS 遺伝子を使用することによって、効果的に選抜ができると考えられた。また、イネ 2 点変異部位(W548 と S627)に対応する変異を導入したシロイヌナズナ由来 ALS 遺伝子が選抜マーカーとして機能することが明らかとなったことから、ALS 配列情報が既知の作物の場合は、植物自身の変異 ALS 遺伝子を選抜マーカーとできると考えられた。

第 4 章ではイネ変異 ALS 遺伝子をイネ由来の塩基配列のみで制御した選抜マーカーカセットを用いて形質転換体を作成する PalSelect 技術を確立した。PalSelect での形質転換効率はこれまで報告されているいくつかの選抜マーカーカセットでの形質転換効率と同等以上であり PalSelect 技術によって実用的な組換え作物を効率的に作成できる可能性が示された。

第 5 章では変異 ALS 遺伝子および PalSelect 技術の応用利用について検討した。第 1 節では ALS 阻害型除草剤抵抗性雑草から見出された変異 ALS 遺伝子を基に、イネおよびシロイヌナ

ズナのさまざまな変異 ALS 遺伝子を人工的に合成し、新規選抜マーカー遺伝子と使用できる可能性を検討した。その結果、これまでに報告されていない新規な 2 点変異 ALS (P171H/R172S OsALS、P171H/548L および P171H/627I) が ALS 阻害型除草剤に高い抵抗性を示し、選抜マーカー遺伝子として使用できると考えられた。特に P171H/R172S OsALS は SU 系除草剤には抵抗性を示すが PC 系除草剤に抵抗性を示さないため、PC 系除草剤に抵抗性を示すが SU 系除草剤には抵抗性を示さない S627I OsALS と組み合わせることによって多重遺伝子導入が可能となると考えられた。また、作出した変異 ALS 遺伝子から発現した酵素の各種 ALS 阻害型除草剤に対する感受性を系統的に調べることによって抵抗性雑草の管理にも応用できると考えられた。そこで、さまざまな雑草でいくつかの変異が確認されており、それぞれの変異で除草剤に対する感受性が異なっていることが知られている P171 の位置が変異した ALS 酵素を中心に異なるタイプの ALS 除草剤に対する感受性を検定した結果、各 ALS 除草剤に対するそれぞれの P171 変異 ALS の抵抗性の強さを関連付けることができた。本節で得られた結果をモデル系として今後開発される ALS 阻害型除草剤に対する雑草の変異 ALS の感受性を予測するための解析のひとつとして使用できると考えられた。

第 2 節では変異 ALS のタンパク質レベルでの発現を簡便に検定できる *in vivo* ALS 検定を發展させ、イネカルス内における ALS 酵素の活性を定量的に測定できる系を構築した。その結果、少なくともスクロースを含み、カルスの生育を促進する栄養素が添加された固体培地を用いて反応を行うことによりアセト乳酸を ALS 活性に依存してカルス組織内に蓄積できることが明らかとなった。カルスでの検定系を利用して、次に目的の遺伝子として GFP を使用して、変異 ALS の発現を定量化し、GFP の発光強度との相関を調べた。その結果、変異 ALS 遺伝子の発現が高い系統は GFP の発光強度も高い傾向が示された。すなわち、カルスの段階で目的のタンパク質の生産効率が良好な系統を絞り込める可能性が示された。

以上のように選抜マーカーとして導入した変異 ALS の発現を定量できることが示されたことから、本遺伝子を選抜マーカーと同時にレポーター遺伝子として応用できる可能性が考えられた。そこで、本遺伝子をレポーター遺伝子として plant activator の検定系の構築を試みた。その結果、サリチル酸経路に関与する薬剤が散布された場合のみ、PR-1 プロモーターに融合した変異 ALS の発現が認められ、その発現量は薬剤散布による PR-1 遺伝子の mRNA の発現と相関が認められた。このことにより ALS 活性が薬剤による PR-1 の誘導活性を反映していることが示され、ALS 遺伝子がレポーター遺伝子としての応用利用も可能であることが示された。

第 3 節では PalSelect 技術を使用して、実際に実用的な形質転換体の作出を試みた。具体的に

はカルス特異的プロモーターで変異 ALS 遺伝子をドライブした選抜マーカークセットを持つバイナリーベクターにコエンザイム Q10 を米に蓄積させるため、目的遺伝子である ddsA 遺伝子をすべてイネ由来の塩基配列で制御した発現カセットを導入したコンストラクトを作成してイネ形質転換を行った。その結果、選抜マーカークとしてハイグロマイシン耐性遺伝子を使用して、ddsA 遺伝子を 35S プロモーターでドライブしたカセットが導入された形質転換イネと同等のコエンザイム Q10 を種子に蓄積することに成功した。また、第 2 節で確立したカルスでの *in vivo* ALS 検定法を応用することで、1 コピーの遺伝子導入でコエンザイム Q10 を高生産している系統のホモ接合体を効率的に選抜できることが示された。

以上、本研究によって PC 系除草剤に対して抵抗性を示す新規変異 ALS 遺伝子が選抜マーカークとして利用できることが明らかとなった。また、選抜マーカークとしての ALS 遺伝子および目的遺伝子を植物由来の塩基配列のみで制御したカセットを使用して効率的に社会的に受け入れられやすい形質転換体を作出できることが示された。加えて変異 ALS 遺伝子がレポーター遺伝子や ALS 阻害型除草剤に対する抵抗性雑草の感受性を予測するために応用できる可能性が示された。