

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 河合 清

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

本研究では、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。

1. イネからの変異型 ALS 遺伝子の単離および薬剤感受性の解明

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 2 点変異により 2 アミノ酸が置換した新たな変異である W548L/S627I 0sALS 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。

2. 変異型 ALS 遺伝子を選抜マーカーとするイネ形質転換および形質転換イネの機能解析

W548L/S627I 0sALS 遺伝子を導入したイネ培養細胞を実際に PC 系除草剤の一つである 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、本システムによって高い形質転換効率でイネ形質転換体が作出できることが示された。また、導入形質は安定的に次世代に遺伝子し、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。

3. シロイヌナズナにおける変異型 ALS 遺伝子の選抜マーカーとしての有用性の解析

W548L/S627I および S627I 0sALS とこれらに対応する変異を持つシロイヌナズナ由来変異 ALS (W574L/S653I および S653I AtALS) と 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。植物の感受性差に応じてこれらを使い分けることによってさまざまな植物の選抜に利用できる可能性が示された。また、イネ 2 点変異部位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ことが示された。

4. PC系除草剤抵抗性 ALS 遺伝子を選抜マーカーとして用いたイネ形質転換体の作出

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 技術によって消費者に安心感を与える実用的な組換え作物を効率的に作出できる可能性が示された。

5. 変異 ALS 遺伝子および PalSelect 技術の応用利用

この変異 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節では種々の変異 ALS を作成し、薬剤に対する感受性が異なる2つの変異 ALS をそれぞれ選抜マーカーとして多重形質転換に応用できる可能性が示された。また雑草で確認されている除草剤抵抗性を付与する変異に対応するイネ変異 ALS を作成し、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変異 ALS を持つ雑草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。カルスでの検定系を利用して、変異 ALS 遺伝子の発現を指標に選抜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。従って、本遺伝子をレポーター遺伝子として応用できる可能性が示された。

第3節では PalSelect 技術を使用して CoQ10 強化米の作出を行った。その結果、選抜マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子を使用して作出された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、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、本技術の有用性が検証された。

以上本論文は、自然変異によって新たに得られた変異 ALS 遺伝子がこれまでの変異 ALS とは ALS 阻害剤に対して異なる感受性を示し、PC 剤に対して高い抵抗性を示すことを明らかにするとともに、本遺伝子を制御する塩基配列も全て植物由来の選抜マーカーカセットを使用することで効率的に社会的に受け入れられやすい形質転換形質転換体を作成できることを示した。加えて変異 ALS のレポーターとしての機能や抵抗性雑草の除草剤感受性予測への利用等の新たな可能性が示され、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。