

ミニレビュー

除草剤標的としての植物特異的代謝経路

太田 大策*

大阪府立大学大学院農学生命科学研究科

Exploring Plant Specific Metabolic Pathways Aiming at Discovery of Novel Herbicide Targets

Daisaku OHTA

Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Sakai 599-8531, Japan

1. はじめに

植物体を供試したランダムスクリーニングは、これまで新規除草剤の発見において中心的役割を果たしてきたし、今後も欠くことのできない方法である。ここで注目したい点は、ランダムスクリーニングによって発見された優秀な除草剤作用機作が十数種程度しかないことである。2000年12月にはシロイヌナズナの全ゲノム解読が発表されたが、産業的成功を収めた除草剤ターゲットサイトをコードする遺伝子数は全遺伝子数の0.1%にも満たない。それではランダムスクリーニングで発見しうる除草剤ターゲットサイトの数にはおのずと限界があるのだろうか？ランダムスクリーニングと異なる方法では除草剤リード化合物は発見できないのであろうか？

これまで医薬品開発において成果をあげているバイオラショナル法は、農薬開発では有効な手段とはなっていない。農薬であれ医薬品であれ、特定の生化学反応に影響を及ぼす有機化合物であることに違いはなく、その意味ではバイオラショナル法は農薬リード化合物の発見においても有力な手段である。しかし、農薬は害虫、雑草、病原微生物に対して農業生産の現場で施用しなければならない点において、医薬品とは決定的に異なる。たとえば、生化学反応を促進したり阻害する活性に必要な化合物の構造と、その生化学反応が起こっている生体内に、農業生産現場において、速やかに到達するのに必要とされる化学構造とは関係がない。バイオラショナル法において、あらかじめターゲットサイトを設定するということは、活性阻害に必要な新規リード化合物の構造を規定するとともに、物理化学的性質なども運命付けることにもなる。いいかえらるなら、ターゲッ

トサイトを設定した段階ですでに農薬としての成否が決まっているともいえる。そこで、分子生物学的・分子遺伝学的なアプローチによって、2万数千以上にのぼる植物遺伝子産物のなかから、できる限り多くの潜在的除草剤ターゲットサイトを同定すれば、それはバイオラショナル法とインビトロスクリーニングによる除草剤開発への入り口を広げることになると考えられる。

2. アンチセンス RNA 発現による遺伝子機能の解析

シロイヌナズナとイネでは全ゲノム解読が終了した。たとえば、シロイヌナズナゲノムには約26,000の遺伝子が見つかったが、そのうち実際の研究対象となっているのは全遺伝子の10%程度であり、新たに発見された遺伝子の機能と相互作用を解明することがこれからの主要課題である。その意味において、ゲノム解析時代における除草剤ターゲットサイトの同定は、機能未知遺伝子の生理的役割解明を目的とした基礎研究過程とオーバーラップしている。機能未知遺伝子の解析において、もっとも直接的な方法は遺伝子破壊であるが、微生物やマウスなどで一般的に用いられる相同組換えによる遺伝子破壊は、植物においては実現していない。植物研究に利用される相同組換え以外の遺伝子破壊や機能攪乱の方法については後述し、ここでは簡便なアンチセンス RNA による遺伝子発現攪乱を利用した除草剤ターゲットサイトの探索について紹介する。

理想的な除草剤ターゲットサイトの特徴とは、例えば、(1) 植物生育に必須であること、(2) 他の遺伝子産物と機能重複が無いこと、(3) 植物に特異的な機能を担うことなどである。たとえば必須アミノ酸合成は有望なターゲットサイトとして多くの研究がある^{2,3)}。実際には、これらの特徴を備えた植物特異的な代謝経路のいずれかに焦点をあて、上述のようにアンチセンス RNA 発現を利用して遺伝

*〒599-8531 堺市学園町1-1

子機能を攪乱し、その代謝経路に関与するタンパク量を低下させる。そのようなアンチセンス発現植物の生育を観察し、そのタンパクを標的とした低分子有機化合物の発見が植物生育制御に結びつくかどうかを判断する。

3. モデル実験

モデル実験として、アンチセンス RNA 発現によるシロイヌナズナの EPSPS (5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase) と ALS (acetolactate synthase) 活性の抑制を試みた。EPSPS はシキミ酸経路の 6 番目の反応を触媒する酵素であり、除草剤 glyphosate のターゲットである。すなわち、EPSPS 活性は芳香族アミノ酸合成の前駆体を与えるため、その阻害は微生物や植物の生育に著しい影響を及ぼす。一方、ALS は分枝アミノ酸合成阻害型除草剤のターゲットサイトである。これらのターゲットに対するアンチセンス発現にはカリフラワーモザイクウイルス 35S (以下、35S と略す) プロモーターによる恒常発現系を用いた。シロイ

ヌナズナは減圧浸潤法によって形質転換し、形質転換体の選抜はカナマイシン耐性を指標とした。アンチセンス発現カセットを Fig. 1 に示す。この実験で用いた減圧浸潤法によるシロイヌナズナ形質転換法の詳細については他の総説を参照されたい。

得られた形質転換シロイヌナズナにおいては、生育阻害とアンチセンス RNA の発現量には概ね相関があるが (Fig. 2), 内生 EPSPS 発現レベルと比較してアンチセンス RNA 発現量が過剰であるにもかかわらず、形質転換植物は生育を続け、開花し、種子をつけた。同様の結果が、ALS アンチセンス発現においても見られた。実際には EPSPS や ALS 活性阻害は重要な除草剤作用機作であるが、この実験結果からは EPSPS も ALS も除草剤ターゲットサイトとしては適していないと判断される。すなわち、35S プロモーターによるアンチセンス RNA 発現と減圧浸潤法による形質転換の組み合わせでは、EPSPS も ALS も除草剤ターゲットサイトとして同定しえない。

減圧浸潤法によるシロイヌナズナ形質転換では、開花前の花芽にバイナリーベクターを導入したアグロバクテリウムを感染させることによって、雌性配偶体への T-DNA 挿入・形質転換が起こる⁴⁾。配偶体組織においては 35S プロモーターの発現はほとんど見られないので⁴⁾、形質転換直後の細胞でアンチセンス RNA が発現して、その効果を発揮することはないと考えられるが、受粉後の種子成熟過程、胚発生段階においては致死的效果を發揮する可能性を否定できない。

すなわち、真に重要な機能を担う遺伝子のアンチセンス RNA 発現は発生の初期段階において致死的效果を發揮してしまうため、発芽可能な形質転換種子の中にはアンチセンスを高いレベルで発現しうるものは残っていないのかもしれない。また、Fig. 2 に示した形質転換体は、理由は不明

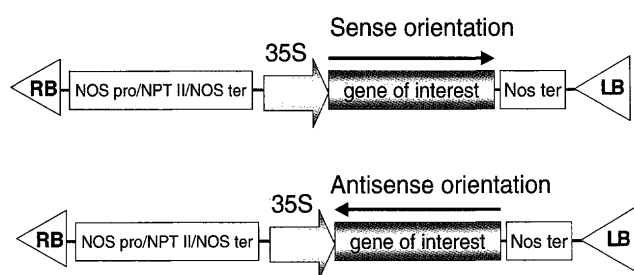


Fig. 1 T-DNA regions of the constructs for the expression of antisense RNA under the control of CaMV 35S promoter against either EPSP synthase or acetolactate synthase. LB, left T-DNA border; R, right T-DNA border; NPTII, neomycin phosphotransferase II gene; Nos pro; nopaline synthase promoter, Nos ter; nopaline synthase terminator; 35S, cauliflower mosaic virus 35S promoter.

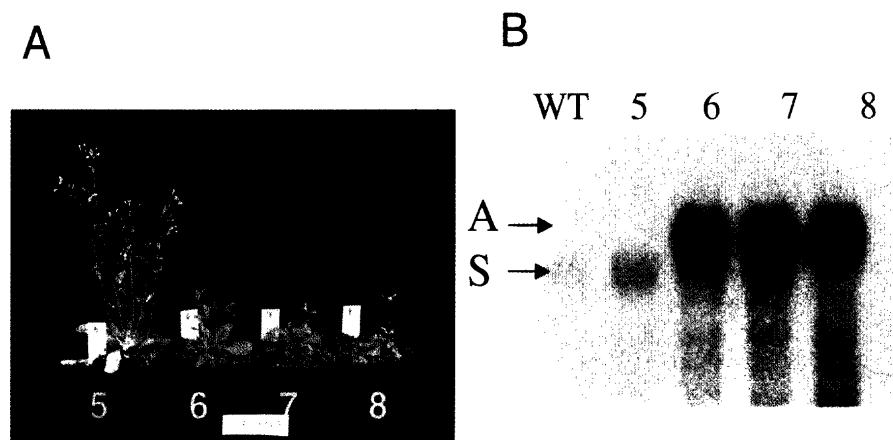


Fig. 2 Expression of antisense RNA towards EPSP synthase in *Arabidopsis thaliana*.

A; Phenotypic changes of the transgenic *Arabidopsis* lines of antisense RNA expression obtained through the transformation method of vacuum infiltration.

B; RNA-gel blot analysis demonstrating antisense RNA accumulation in the transformants shown in A. Arrows indicate the sense (S) and antisense (A) RNA signals. Numbers correspond to the plants shown in A.

であるが大過剰のアンチセンス RNA を蓄積していても生育可能な系統であったことを示唆しており、むやみにアンチセンス RNA 発現量だけを増大させても遺伝子発現の効率的な抑制はできないと考えられる。

そこで、配偶体形質転換ではなく、培養細胞を経由した形質転換によってアンチセンス発現植物体を得ることを試みた。この方法では、形質転換操作と個体再分化の過程で、その標的遺伝子が関与する生合成経路の最終産物を添加しておくことによってアンチセンス発現形質転換体をレスキューできるはずである。そこで先の実験と同様の発現プラスミド (35S プロモーターによる EPSPS アンチセンス発現) を持つアグロバクテリウムを根由来カルスに感染させて形質転換植物を得た。また、任意の時期にアンチセンスを発現させる目的で、シロイヌナズナ由来の PR1a プロモーターによる EPSPS アンチセンス発現も試みた。PR1a タンパクは、植物が病原体の侵入に対して全身獲得抵抗性 (SAR) を誘導する際のマーカーのひとつであり、その遺伝子発現はサリチル酸や benzothiadiazole で発現が誘導される⁵⁾。この実験では形質転換体が得られるまでの間、培地にはアミノ酸源としてカザミノ酸を添加しておいた。35S プロモーターを用いた場合は、減圧浸潤法による形質転換実験と同様にアンチセンス発現システムの生育阻害がみられた。一方、PR1a プロモーターの場合は、サリチル酸あるいは benzothiadiazole 処理しても、アンチセンス発現レベルも 35S プロモーターの場合 (Fig. 2) ほどには達せず、黄化や生育阻害の症状は観察されなかった。Fig. 2 に示したように、35S プロモーターによるアンチセンス恒常的過剰発現によってさえも内生遺伝子のサブプレッションは十分には起こらなかったことから、PR1a プロモーターではなんらかの表現型を観察しうるに十分なアンチセンス RNA 発現は得られないと考えられる。アンチセンスによる遺伝子機能抑制のメカニズム自体に不明な点が多く、結果の解釈を曖昧にしているのは事実であるが、これまでの結果を総合すると、以下のいくつかの点に集約される。(1) アンチセンス発現が有効に機能し必須遺伝子発現を完全に抑制するならば、形質転換体は得られない。(2) 内生遺伝子発現量に比べて大過剰のアンチセンス RNA が蓄積していても、完全な遺伝子機能抑制は見られない。(3) 発現の時期、あるいは特異性 (組織、細胞?) の制御が必要である。

4. 人工ハイブリッド転写調節因子によるアンチセンス発現系

このように、アンチセンス RNA 発現は、ある代謝系の特定の反応を抑制し、生理・生化学的な解析を行うには適していると考えられるが、既存の恒常発現系や発現誘導型システムを利用した場合には、除草剤ターゲットサイトの同定に利用することは難しいことがわかった。一方、次に述

べるハイブリッド転写調節因子を利用したアンチセンス発現系は、植物の必須遺伝子探索においてある程度の成功を収めた⁶⁾。ハイブリッド型の転写調節因子の作出は約 20 年前から行われている。たとえば、酵母の GAL4 転写調節因子の N-末端側に存在する Zn フィンガーを含んだ DNA 結合ドメイン (DBD) と異種生物由来の転写活性化ドメイ

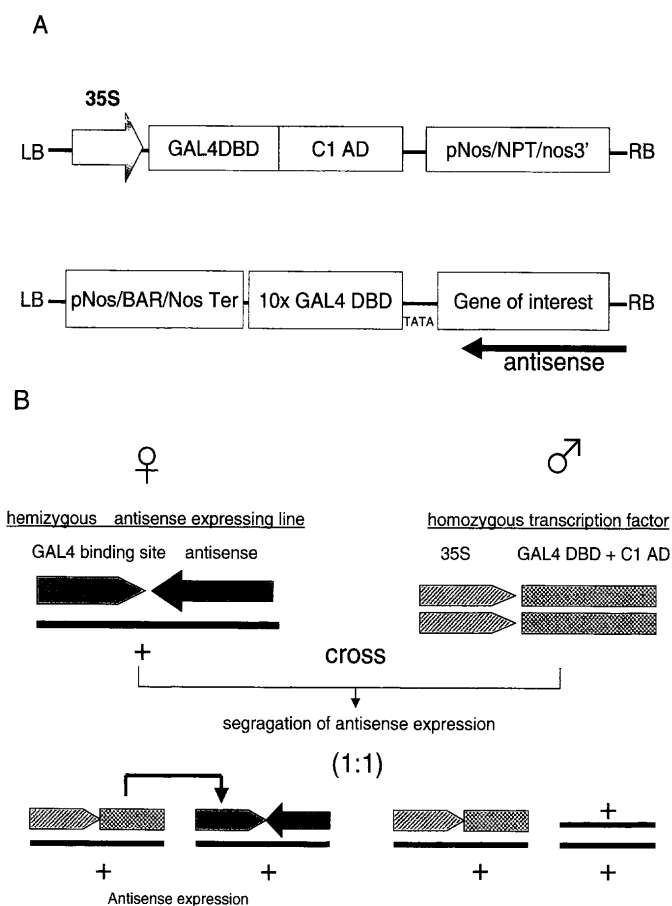


Fig. 3 A. T-DNA regions used for the expression of a hybrid transcription factor consisting of a portion of DNA binding domain from yeast GAL4 protein and a part of transcription activation domain from maize C1 protein. The construct for the expression of antisense RNA towards a gene of interest under the control of the hybrid transcription factor is also shown.

B. Schematic representation of the antisense expression through the crossing between the pollen donor of the plants expressing the hybrid transactivator and the hemizygous line containing the antisense expression cassette. In the F1, antisense expression cassette should segregate 1:1 against a background that always contains the transactivator in the hemizygous state. Thus, successful antisense expression should occur in 50% F1 progeny, leading to sick phenotype. LB, left T-DNA border; R, right T-DNA border; NPTII, neomycin phosphotransferase II gene; Nos pro; nopaline synthase promoter, Nos ter; nopaline synthase terminator; 35S, cauliflower mosaic virus 35S promoter; DBD, DNA binding domain; AD, activation domain; BAR, phosphinothricin acetyltransferase gene. The figures were modified (by courtesy of David Guyer) from the paper of Guyer *et al.* (*Genetics* **149**, 633-639).

ン (AD) の融合タンパクは酵母, 動物, 植物, 昆虫など多様な生物種で機能しうることが知られている⁷⁻⁹⁾. このような融合型転写調節因子はタバコやシロイヌナズナでも機能する¹⁰⁾. 重要な点は, 異種生物由来の転写調節因子は内生の遺伝子発現システムを駆動する可能性が低いので, アンチセンス RNA や発現した遺伝子が細胞毒性を持つ場合に有効なことである.

Fig. 3 に GAL4 の DBD (N-末端 147 アミノ酸) とトウモロコシの転写調節因子である CI タンパクの AD (C-末端の 101 アミノ酸) の融合タンパクをハイブリッド型の転写調節因子として機能させ, アンチセンス RNA を発現させるシステムを示す. このシステムではまず, GAL4 の DBD と CI の AD から成るハイブリッド転写調節因子をコードする融合遺伝子についてのシロイヌナズナ・ホモ接合体を得る. このハイブリッド転写因子は 35S プロモーターによって発現させる. 一方, GAL4 結合部位と 35S プロモーター由来の TATA 最小エレメントからなる転写調節領域下流に目的遺伝子をアンチセンス発現する方向に挿入した発現カセットについてのヘミ接合体を得る. ハイブリッド転写調節因子を発現する形質転換植物由来の花粉をアンチセンス発現用のヘミ接合体に受粉させることによって得られる種子は, アンチセンス発現に関して 1:1 に分離するはずである. 実際に, この方法で除草剤ターゲットサイト遺伝子の同定・確認が可能であった⁶⁾.

5. 今後の展望

遺伝子機能破壊は, 新しい遺伝子機能の解明と有用遺伝子の発見を目的とした研究において, きわめて重要な部分を占める. 従来より, アンチセンス発現や遺伝子過剰発現による偶発的コサプレッション, さらにリボザイムの利用などが遺伝子機能攪乱を目的として試みられてきている. しかし, ここまで述べてきたように, アンチセンス発現法は除草剤ターゲットサイトを同定するという目的に対しては, 最適の方法であるとは言いがたい. これに変わる方法として, T-DNA 挿入による遺伝子破壊システムの探索は, ゲノム機能解析に必須のアプローチであるとともに, 除草剤ターゲットサイトの発見にも有効な手段である. すなわち, 仮想除草剤標的遺伝子への T-DNA 挿入を持つヘミ接合体を発見し (必須遺伝子破壊についてのホモ接合体は存在しないはず), その自殖後代の表現型の分離を観察することによって, その遺伝子の必須性が判別できる. あらかじめ標

的遺伝子を設定する場合には, この他にも RNA interference¹¹⁻¹³⁾ やキメラ RNA/DNA オリゴヌクレオチドを用いた遺伝子機能攪乱^{14,15)} が可能であり, 遺伝子機能解析の強力な手段として注目されている.

引用文献

- 1) C. Dennis & C. Surridge: *Nature* **408**, 791 (2000)
- 2) D. Ohta, I. Mori & E. Ward: *Weed Sci.* **45**, 610-620 (1997)
- 3) E. Ward & D. Ohta: "Plant Amino Acids," ed. by B. J. Singh, Marcel Decker, New York, pp. 293-303, 1999
- 4) A. Bent: *Plant Physiol.* **124**, 1540-1547 (2000)
- 5) K. A. Lawton, L. Friedrich, M. Hunt, T. Delaney, H. Kessmann, T. Staub & J. Ryals: *Plant J.* **10**, 71-82 (1996)
- 6) D. Guyer, A. Tuttle, S. Rouse, S. Volrath, M. Johnson, S. Potter, J. Gorchach, S. Goff, L. Crossland & E. Ward: *Genetics* **149**, 633-639 (1998)
- 7) J. Ma, E. Prizibilla, J. Hu, L. Bogorad & M. Ptashne: *Nature*, **334**, 631-633 (1988)
- 8) L. C. Xu, W. Schaffner & D. Rungger: *Nucleic Acids Res.* **21**, 2775 (1993)
- 9) D. I. Chasman, J. Leatherwood, M. Carney, M. Ptashne & R. D. Kornberg: *Mol. Cell. Biol.* **9**, 4746-4749 (1989)
- 10) T. Aoyama & N.-H. Chua: *Plant J.* **11**, 605-612 (1997)
- 11) P. A. Sharp: *Genes & Dev.* **13**, 139-141 (1999)
- 12) C.-F. Chuang & E. M. Meyerowitz: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 4985-4990 (2000)
- 13) J. Z. Levin, A. J. de Framond, A. Tuttle, M. W. Bauer & P. B. Heifetz: *Plant Mol. Biol.* **44**, 759-775 (2000)
- 14) P. R. Beetham, P. B. Kipp, X. L. Sawycky, C. J. Arntzen & G. D. May: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 8774-8778 (1999)
- 15) T. Zhu, D. J. Peterson, L. Taglian, G. St. Clair, C. R. Baszczynski & B. Bowen: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 8768-8773 (1999)

略歴

太田大策

生年月日: 昭和 33 年 5 月 19 日

略歴: 昭和 58 年 京都大学農学部卒

昭和 63 年 京都大学大学院農学研究科博士課程修了

学位: 昭和 63 年 京都大学農学博士

昭和 63 年~平成 6 年 日本チバガイギー(株)

国際科学研究所

平成 6~8 年 米国チバガイギー農業生物工学研究所

平成 8~9 年 日本チバガイギー(株)国際科学研究所

平成 9~10 年 岡山県生物科学総合研究所

平成 10 年 9 月~現在 大阪府立大学大学院農学生命科学研究科 助教授

趣味: スポーツ