

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4091429号
(P4091429)

(45) 発行日 平成20年5月28日 (2008. 5. 28)

(24) 登録日 平成20年3月7日 (2008. 3. 7)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A O 1 H 5/00 (2006. 01)

A O 1 H 5/00 A

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 9 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-546733 (P2002-546733)
 (86) (22) 出願日 平成13年11月16日 (2001. 11. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2001/010014
 (87) 国際公開番号 W02002/044385
 (87) 国際公開日 平成14年6月6日 (2002. 6. 6)
 審査請求日 平成16年11月15日 (2004. 11. 15)
 (31) 優先権主張番号 特願2000-362630 (P2000-362630)
 (32) 優先日 平成12年11月29日 (2000. 11. 29)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000000169
 クミアイ化学工業株式会社
 東京都台東区池之端 1 丁目 4 番 2 6 号
 (73) 特許権者 501167644
 独立行政法人農業生物資源研究所
 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 - 2
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (72) 発明者 清水 力
 静岡県小笠郡菊川町平尾 1 1 4
 (72) 発明者 中山 礎
 静岡県藤枝市前島 2 - 1 - 3 3 - 4 0 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アセト乳酸シンターゼ遺伝子をコードする遺伝子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列を含む野生型イネアセト乳酸シンターゼにおける 6 2 7 番目のセリンに相当するセリンをイソロイシンに変異させてなり、ピリミジニルカルボキシ除草剤に対して耐性を有するアセト乳酸シンターゼをコードする遺伝子。

【請求項 2】

配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列を含む野生型イネアセト乳酸シンターゼにおける 5 4 8 番目のトリプトファンに相当するトリプトファンをロイシンに変異させてなることを特徴とする請求項 1 記載の遺伝子。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 記載の遺伝子によりコードされるアセト乳酸シンターゼタンパク質。

【請求項 4】

請求項 1 又は 2 記載の遺伝子を有する組換えベクター。

【請求項 5】

請求項 4 記載の組換えベクターを有する形質転換体。

【請求項 6】

請求項 1 又は 2 記載の遺伝子を有し、ピリミジニルカルボキシ除草剤に対する抵抗性を有する植物。

【請求項 7】

請求項 6 記載の植物を、ピリミジニルカルボキシ除草剤存在下で育成することを特徴と

する植物育成方法。

【請求項 8】

請求項 1 又は 2 記載の遺伝子を選択マーカーとして使用し、該遺伝子を有する形質転換細胞を選択する方法。

【請求項 9】

請求項 6 記載の植物を栽培するため、同植物を生育させた圃場にピリミジニルカルボキシ除草剤を処理して、雑草を枯殺又は雑草の生育を抑制する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

[技術分野]

本発明は、分岐鎖アミノ酸生合成経路における律速酵素であるアセト乳酸シンターゼをコードする遺伝子に関する。

【0002】

[背景技術]

アセト乳酸シンターゼ（以下、「ALS」という。）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生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として知られている。ALSは、高等植物全体に渡って広く存在していることが知られており、種々の微生物、例えば酵母菌（*Saccharomyces cerevisiae*）、大腸菌（*Escherichia coli*）、ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）等においても見い出されている。

【0003】

大腸菌及びネズミチフス菌には、ALSのイソ酵素が3種存在していることが知られている。これら各々のイソ酵素は、酵素の触媒活性を司る分子量の大きい触媒サブユニットと分岐鎖アミノ酸が結合することによりフィードバック阻害剤として機能する分子量の小さい制御サブユニットとからなるヘテロオリゴマーである（Chipman et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1385, 401-419, 1998）。触媒サブユニットは、それぞれIlv IH、Ilv GM、Ilv BNオペロンに位置している。一方、酵母菌の場合、ALSは、単一の酵素であるが、細菌と同様に触媒サブユニットと制御サブユニットとからなり（Panget al., *Biochemistry*, 38, 5222-5231, 1999）、触媒蛋白質サブユニットはILV2座位に位置している。

【0004】

一方、植物におけるALSの場合も、上述した微生物と同じように触媒サブユニットと制御サブユニットとからなることが知られている（Hershey et al., *Plant Molecular Biology*. 40, 795-806, 1999.）。例えば、双子葉植物のタバコの場合、ALSの触媒サブユニットは、SuRA及びSuRBの2つの遺伝子座位によってコードされ（Lee et al., *EMBO J.* 7, 1241-1248, 1988）、トウモロコシの場合、ALSの触媒サブユニットは、als 1及びals 2の2つの遺伝子座位にコードされている（Burr et al., *Trends in Genetics* 7, 55-61, 1991; Lawrence et al., *Plant Mol. Biol.* 18, 1185-1187, 1992）。触媒サブユニットをコードする遺伝子に関しては、双子葉植物の場合、タバコだけでなくアラビドプシス（*Arabidopsis*）、ナタネ、ワタ、オナモミ（*Xanthium*）、アマランサス（*Amaranthus*）及びホウキギ（*Kochia*）について完全に塩基配列が決定されている（Chipman et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1385, 401-419, 1998及び再公表特許 W097/08327参照）。しかしながら、単子葉植物で塩基配列が完全に決定されているのはトウモロコシだけである。

【0005】

一方、スルホニルウレア系除草剤、イミダゾリノン系除草剤、トリアゾロピリミジン系除草剤並びにピリミジニルカルボキシ系除草剤（以下、「PC系除草剤」という。）等の除草剤は、このALSを阻害することによって植物の成長を抑制することが知られている（Ray, *Plant Physiol.* 75, 827-831, 1984; Shaner et al., *Plant Physiol.* 76, 545-546, 1984; Subramanian et al., *Plant Physiol.* 96, 310-313, 1991; Shimizu et al., *J. Pestic. Sci.* 19, 59-67, 1994）。

【0006】

これら除草剤に対して抵抗性を有する植物としては、ALSをコードする遺伝子において、種を越えて保存されている保存領域中の1個又は2個のアミノ酸置換を引き起こす1個又は2個の塩基置換を有しているものが知られている。例えば、スルホニルウレア系除草剤に対して特異的な抵抗性を有するALSをコードするもの（Kathleen et al., EMBO J. 7, 1241-1248, 1988; Mourad et al., Planta, 188, 491-497, 1992; Guttieri et al., Weed Sci. 43, 175-178, 1995; Bernasconi et al., J. Biol. Chem. 270, 17381-17385, 1995及び特開昭63-71184号公報参照）、イミダゾリノン系除草剤に対して特異的な抵抗性を有するALSをコードするもの（Mourad et al., Planta, 188, 491-497, 1992; Lee et al., FEBS Lett. 452, 341-345, 1999及び特開平5-227964号公報参照）、或いはスルホニルウレア系除草剤とイミダゾリノン系除草剤の両方に対して抵抗性を有するALSをコードするもの（Kathleen et al., EMBO J. 7, 1241-1248, 1988; Bernasconi et al., J. Biol. Chem. 270, 17381-17385, 1995; Hattori et al., Mol. Gen. Genet. 246, 419-425, 1995; Alison et al., Plant Physiol. 111, 1353, 1996; Rajasekarau et al., Plant Sci. 119, 115-124, 1996、特開昭63-71184号公報、特開平4-311392号公報及び Bernasconi et al., U S Patent 5633437, 1997参照）が挙げられる。スルホニルウレア系除草剤とイミダゾリノン系除草剤の両方に対して抵抗性を示すALSは、PC除草剤やトリアゾロピリミジン系除草剤に対しても交差抵抗性を示すことがわかっている（Bernasconi et al., J. Biol. Chem. 270, 17381-17385, 1995）。また、スルホニルウレア系除草剤に特異的に抵抗性を示すALSを有する個体とイミダゾリノン系除草剤に特異的に抵抗性を示すALSを有する個体とを掛け合わせて、両方に抵抗性を示す植物体を作る試みもなされている（Mourad et al., Mol. Gen. Genet. 243, 178-184, 1994）。さらに、ALSをコードする遺伝子を人為的に除草剤抵抗性遺伝子へ変えることも行われており（Ott et al., J. Mol. Biol. 263, 359-368, 1996、特開昭63-71184号公報、特開平5-227964号公報、特表平11-504213号公報参照）、1個のアミノ酸の欠失がスルホニルウレア系除草剤とイミダゾリノン系除草剤の両方に抵抗性を示すことが明かにされている（特開平5-227964号公報参照）。

【0007】

上述のように除草剤に対する抵抗性を有するALS及びALSをコードする遺伝子について精力的に研究されてきた経緯があるが、PC系除草剤抵抗性を指標とし、PC系除草剤に対して特異的な抵抗性を有する変異ALS遺伝子については現在までに報告が無かった。

【0008】

そこで、本発明は、PC系除草剤に対して極めて高度な抵抗性を示すALSタンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子によりコードされるALSタンパク質、該遺伝子を有する組換えベクター、該組換えベクターを有する形質転換体、該遺伝子を有する植物、該植物の育成方法及び、該遺伝子を選択マーカーとして使用する形質転換細胞を選択する方法を提供することを目的とする。

【0009】

[発明の開示]

上述した目的を達成するため、本発明者が鋭意検討した結果、野生型ALSにおける所定のアミノ酸残基を、所定のアミノ酸で置換してなる変異ALSがPC系除草剤に対して極めて高度な抵抗性を示すことを見出し本発明を完成するに至った。

【0010】

(1) すなわち、本発明は、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子である。

(a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号1に記載のアミノ酸配列における少なくとも1以上のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、ピリミジニルカルボキシ除草剤に対する抵抗性を有し、アセト乳酸シンターゼ活性を有するタンパク質。

(2) また、本発明は、(1) 記載の遺伝子によりコードされるアセト乳酸シンターゼタンパク質である。

(3) さらに、本発明は、(1) 記載の遺伝子を有する組換えベクターである。

(4) さらにまた、本発明は、(3) 記載の組換えベクターを有する形質転換体である。

(5) さらにまた、本発明は、(1) 記載の遺伝子を有し、ピリミジニルカルボキシ除草剤に対する抵抗性を有する植物である。

(6) さらにまた、本発明は、(5) 記載の植物を、ピリミジニルカルボキシ除草剤存在下で育成することを特徴とする植物育成方法である。

(7) さらにまた、本発明は、(1) 記載の遺伝子を選択マーカーとして使用し、該遺伝子を有する形質転換細胞を選択する方法である。

【0011】

[発明を実施するための最良の形態]

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のアセト乳酸シンターゼタンパク質（以下、「変異型ALSタンパク質」という。）は、イネで発現している野生型ALSタンパク質における所定の部位を変異させることによって得ることができる。本発明の変異型ALSタンパク質のアミノ酸配列を配列番号1に示す。また、本発明のALSタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号2に示す。

【0012】

変異型ALSタンパク質は、野生型ALSタンパク質における548番目のトリプトファンがロイシンに置換されるとともに、野生型ALSタンパク質における627番目のセリンがイソロイシンに置換されたものである。図1に、変異型ALSタンパク質のアミノ酸配列と野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列とを比較した結果を示す。なお、図1において、一列目のアミノ酸配列は変異型ALSタンパク質を示し、二列目のアミノ酸配列は野生型ALSタンパク質を示している。

【0013】

変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子（配列番号2）は、野生型ALSタンパク質をコードする遺伝子と比較して、野生型ALSタンパク質における548番目のトリプトファンをコードするコドンがロイシンをコードするコドンに置換されるとともに、野生型ALSタンパク質における627番目のセリンをコードするコドンがイソロイシンをコードするコドンに置換されたものである。図2に、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列と野生型ALSタンパク質をコードする塩基配列とを比較した結果を示す。なお、図2において、一列目の塩基配列は変異型ALSタンパク質を示し、二列目の塩基配列は野生型ALSタンパク質を示している。

【0014】

この変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子は、日本型イネ品種である金南風のゲノムDNAに存在する野生型ALSタンパク質をコードする遺伝子に対して、上述したような変異を導入することによって得ることができる。変異を導入する手法としては、従来より公知の手法を使用することができ、例えば、部位特異的変異導入法を用いることができる。部位特異的変異導入法は、市販のキット、例えばMutan-K（宝酒造株式会社製）、GeneEditor（プロメガ社製）、ExSite（ストラタジーン社製）等を使用して行うことができる。

【0015】

また、変異ALSタンパク質をコードする遺伝子は、PC系除草剤感受性の野生株培養細胞をPC系除草剤の存在下で培養し、その後、出現したPC系除草剤に対する抵抗性を示す変異株培養細胞から得ることができる。

【0016】

具体的には、まず、PC系除草剤抵抗性の変異型培養細胞からmRNAを調製し、cDNAを合成後、λgt11ファージのcDNAライブラリーを作出する（抵抗性特徴に関してヘテロ接合性と考えられるライブラリー）。これを、野生型ALSタンパク質をコードする遺伝子の一部を含んでいる核酸プローブ（例えば、日本型イネ品種である日本晴から得られたEST（Expression Sequence Tag、Genbank、DDBJ及びEMBLアクセス番号：C72411））を用いてスクリーニングし、得られる陽性クローンのインサートDNAをpBluescript II SK+にサブク

10

20

30

40

50

ローニングし塩基配列を決定する。その結果、配列番号1に示すアミノ酸配列をコードするインサートDNAを有するクローンを選択することによって、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を得ることができる。なお、上述のようにして得られた変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子をpBluescript II SK+に組み込んだプラスミドは、Mutant ALS cDNA in pBluescript II SK+(FERM BP-7348)として工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成12年11月2日付けでブタペスト条約に基づき国際寄託されている。

【0017】

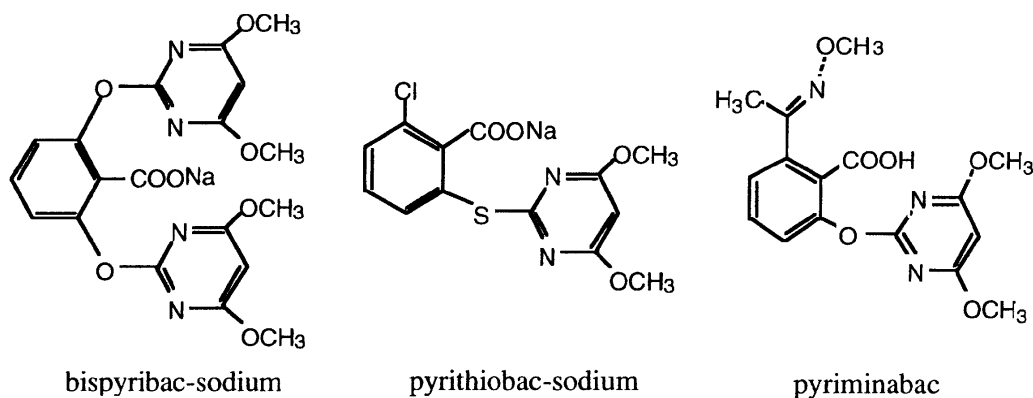
変異型ALSタンパク質は、野生型ALSタンパク質と比較して、PC系除草剤に対する優れた抵抗性を有するばかりでなく、スルホニルウレア系除草剤及びイミダゾリノン系除草剤に対しても抵抗性を有する。特に、変異型ALSタンパク質は、PC系除草剤に対する抵抗性が高度である。このことは、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子が大腸菌等の発現ベクターに組み込み、当該発現ベクターで形質転換された大腸菌等の除草剤感受性を調べることにより判断することができる。

【0018】

ここで、PC系除草剤としては、化1に示すように、bispyribac-sodium, pyriithiobac-sodium, pyriminobacを例示することができる。

【0019】

【化1】

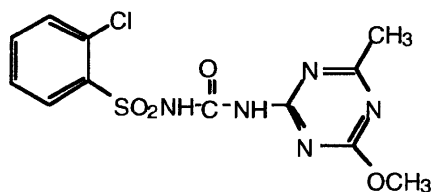


【0020】

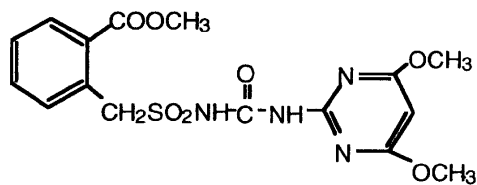
スルホニルウレア系除草剤としては、化2に示すように、chlorsulfuron, bensulfuron-methyl, pyrazosulfuron-ethyl, imazosulfuronを例示することができる。

【0021】

【化2】

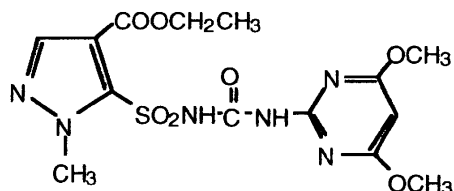


chlorsulfuron

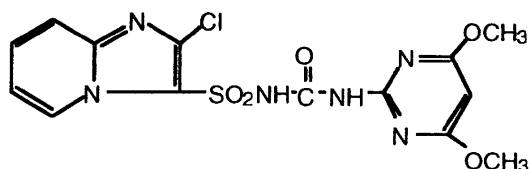


bensulfuron-methyl

10



pyrazosulfuron-ethyl



imazosulfuron

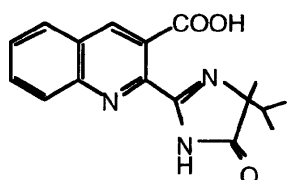
【0022】

イミダゾリノン系除草剤としては、化3に示すように、imazaquin, imazapyrを例示することができる。

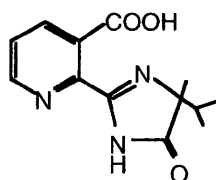
20

【0023】

【化3】



imazaquin



imazapyr

30

【0024】

一方、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を、標的とする植物に形質転換することによって、当該植物に対してPC除草剤抵抗性を与えることができる。植物に形質転換する手法としては、従来より公知の手法を使用することができる。例えば、アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) を用いて外来遺伝子を標的植物細胞に導入する手法を例示することができる。

【0025】

具体的には、アグロバクテリウムのTiプラスミドのT-DNA配列を含んでいるバイナリーベクターに変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を挿入する。このTiプラスミドを大腸菌等に形質転換する。次に、大腸菌等で増殖させた変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を保持するバイナリーベクターを、ヘルパープラスミドを含んでいるアグロバクテリウム菌に形質転換する。そして、このアグロバクテリウム菌を、標的とする植物に感染させた後、形質転換植物を同定する。同定された形質転換植物が培養細胞の場合には、従来より公知の手法により、その植物細胞を完全な植物に再生させることができる。

40

【0026】

また、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を標的とする植物に形質転換する場合、従来より公知の手法を用いて直接的に植物体に導入してもよい。さらに、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を有する発現ベクターを形質転換する方法としては、ポリエ

50

チレングリコール法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法等を使用することができる。

【0027】

一方、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子は、単子葉植物及び双子葉植物等のいかなる種類の植物に形質転換してもよい。変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を形質転換する対象の作物としては、例えば、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、大豆、棉、アブラナ、サトウダイコン及びタバコ等を挙げることができる。さらに、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を導入することによって、芝草や樹木等を形質転換してもよい。

【0028】

いずれの場合であっても、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を植物に形質転換することによって、当該植物に対して、PC系除草剤、スルホニルウレア系除草剤及びイミダゾリノン系除草剤に対する抵抗性を付与することができる。

【0029】

ところで、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子は、植物形質転換実験における選択性マーカーとしても使用することができる。例えば、目的遺伝子を用いて植物細胞を形質転換する場合、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子と目的遺伝子とを有するベクターを植物細胞内に導入した後、当該植物細胞をPC系除草剤の存在下で培養する。その結果、PC系除草剤の存在下で生存する植物細胞には、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子と共に目的遺伝子が導入されたことが判る。また、目的遺伝子及び変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子が植物細胞の染色体に組み込まれたかどうかは、その植物の表現型を観察した後、ゲノムサザーンハイブリダイゼーション或いはPCRによって、これらの遺伝子のゲノム上の存在を調べることで確認することができる。

【0030】

〔実施例〕

以下、本発明を実施例を用いて更に詳細に説明する。ただし、本発明の技術範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

【0031】

〔実施例1〕PC除草剤抵抗性のイネ（金南風）培養細胞の作出

イネの種子（品種；金南風、学名：Oryza sativa var. Kinmaze）の籾を除いた後、当該種子を70%のエタノール中に5分間浸漬し、その後、約5%のアンチホルミン中に20分間浸漬し、その後、滅菌蒸留水で数回洗浄した。次に、この種子を表1に示す組成の培地上で静置培養した。

【0032】

【表1】

無機塩（ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類）	1 袋
チアミン・HCl (0.1 g/l)	1 ml
ニコチン酸 (0.5 g/l)	1 ml
ピリドキシン・HCl (0.5 g/l)	1 ml
グリシン (2 g/l)	1 ml
myo-イノシトール (50 g/l)	2 ml
2,4-D (200 ppm)	10 ml
ショ糖	30 g

【0033】

なお、上記培地組成中、2,4-Dは合成オーキシシンである。培地を作製する際には、先ず、上記培地組成を1リッターのビーカーに入れ、蒸留水で1000mlにする。次に、これをpH5.7に調製し、3gのゲルライトを添加する。次に、電子レンジを用いて加熱してゲルライトを解かした状態とし、分注機を用いて30mlずつ培養フラスコに分注す

る。次に、培養フラスコに3重のアルミ箔をかぶせ、オートクレーブ装置内で121℃で15～20分間加熱滅菌する。その後、室温にまで冷却することによって、上記種子を静置培養するための培地を作製した。

【0034】

続いて、この培地上で誘導されたカルスから胚乳の部分を除き継代培養を行った。そして、得られたカルスの一部を、PC系除草剤の1つあるbispyribac-sodiumを1μM添加した液体培地（表1の培地組成と同様であり、ゲルライトを添加しないもの）中でおおよそ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ヵ月後では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、2μMの bispyribac-sodium存在下でも増殖する複数の細胞株を得ることができた。

10

【0035】

その後、得られた複数の細胞株をbispyribac-sodiumの添加濃度を順次上げて培養した結果、100μMのbispyribac-sodium共存下でも増殖できる細胞株が得られた。このbispyribac-sodium抵抗性培養細胞（以下、抵抗性変異株）を100μMのbispyribac-sodiumを添加したMS-2,4-D固体培地で継代培養した。継代培養した抵抗性変異株の一部を採取し、bispyribac-sodium無添加のMS-2,4-D液体培地に添加して、8日～10日間のサイクルで懸濁培養した。

【0036】

20

そして、この抵抗性変異株約1.5 g（湿重量）を、MS-2,4-D液体培地50 mlと所定の濃度のbispyribac-sodiumとを入れておいた200mlの三角フラスコに移植し、約27℃で所定期間培養した。経時的にカルスの湿重量を測定し、移植した抵抗性変異株の湿重量を基準にして相対的な増殖量を求めた。なお、試験は、bispyribac-sodium濃度を変化させたものを3連で行ない、標準誤差（standard error）を算出した。抵抗性変異株におけるbispyribac-sodium濃度変化と8日目の相対重量との関係を図3に示す。また対照として、金南風の野生株を用いて同様な実験を行い、bispyribac-sodium濃度と8日目の相対重量との関係を測定した結果を図4に示す。

【0037】

図4から判るように、野生株では、1 nMのbispyribac-sodium添加区で増殖阻害されなかったが、10 nM以上のbispyribac-sodium添加区で増殖阻害されていることが判る。一方、図3から判るように、抵抗性変異株では、10μMのbispyribac-sodium添加区においてもほとんど増殖に影響を受けていないことが判る。

30

【0038】

一方、bispyribac-sodiumに代えてchlorsulfuronを用いた以外は、上述したように野生株及び抵抗性変異株の増殖率を測定した。野生株におけるchlorsulfuron濃度変化と9日目の相対重量との関係を図5に示す。また、抵抗性変異株におけるchlorsulfuron濃度変化と9日目の相対重量との関係を図6に示す。

【0039】

図5から判るように、野生株では、1 nMのchlorsulfuron添加で増殖阻害を受けており、bispyribac-sodiumの場合よりも高い感受性を示した。一方、図6から判るように、抵抗性変異株では、1μMのchlorsulfuron添加により増殖が強く阻害されている。なお、bispyribac-sodium及びchlorsulfuronに対する感受性は、野生株及び抵抗性変異株において、培養時間が長くても共に大きく変化することはなかった。また、増殖速度は、抵抗性変異株及び野生株において、ともにほぼ同じであった。

40

【0040】

これらの結果から、抵抗性変異株は、bispyribac-sodiumに対して特異的に抵抗性を有するものであることが明らかとなった。また、抵抗性変異株は、野生株と比較してchlorsulfuronに対する抵抗性が向上していることも明らかとなった。

【0041】

50

〔実施例2〕 抵抗性変異株から部分精製したALS酵素の薬剤感受性

本例では、実施例1で得られた抵抗性変異株から変異型ALSタンパク質を部分精製し、得られた変異型ALSタンパク質における薬剤感受性を検討した。変異型ALSタンパク質は以下のようにして部分精製した。

【0042】

まず、表1のうちゲルライトを除いた組成で液体培養法 (bispyribac-sodium無添加) により抵抗性変異株を200g以上調製した。次に、これらの約150gを組織重量の3倍量の緩衝液-1 (20%(v/v)のグリセロール、0.5mMのチアミンピロリン酸 (TPP)、10 μ Mのフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD)、0.5mMのMgCl₂、組織重量の1/10量のポリビニルポリピロリドンを含む100mMのリン酸カリウム緩衝液pH7.5) でヒスコトロンを用いてホモジナイズした。ホモジネートをナイロンガーゼでろ過した後、15000×gで20分間遠心した。遠心上澄に、50%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加し、水中に約1時間放置した。これを再度、15000×gで20分間遠心し、その沈澱画分を約30 mlの緩衝液-2 (20%(v/v)のグリセロール、0.5mMのTPP、0.5mMのMgCl₂を含む10mMのトリス塩酸緩衝液緩衝液pH7.5) に溶解した。これを再度、15000×gで20分間遠心し、その上澄画分をセファデックスG-25 (アマシヤム ファルマシア バイオテック社製) にアプライして素通り画分を約40ml採取した。そして、採取した液を「粗酵素液」とした。

【0043】

次に、粗酵素液のタンパク質の濃度を、Bio-Rad Protein Assayのマニュアルに従ってBradford法で測定した。その後、粗酵素液をワットマンフィルター (ワットマン社製) でろ過し、タンパク質量として適正な量の粗酵素液 (10~15 ml) をFPLC装置 (アマシヤム ファルマシア バイオテック社製) を使用して、3本連結したHiTrap Q (アマシヤム ファルマシア バイオテック社製) にアプライした。HiTrap Qを用いてタンパク質成分を吸着させた後、ベッドボリュームの3~5倍量の緩衝液-2で非吸着画分を流し出した。その後、吸着したタンパク質成分を、ベッドボリュームの10倍量 (150 ml) の溶出液を用いて溶出した。ここで、溶出液は、0~0.4 Mの直線濃度勾配で緩衝液-2にKClを溶解させたものである。タンパク質成分を溶出した溶出液は、複数の分取用試験管に5mlずつ分取した。なお、溶出したタンパク質成分に含まれるALS酵素を安定化するために、20 mMのピルビン酸ナトリウムを含む緩衝液-2 (0.5 ml) を事前に分取用試験管の中へ添加しておいた。

【0044】

次に、複数の分取用試験管に分取された溶出画分に含まれる変異型ALSタンパク質に由来するALS活性を、以下のように測定した。測定反応に使用する反応溶液は、20mMのピルビン酸ナトリウム、0.5mMのTPP、0.5mMのMgCl₂、10 μ MのFAD及び20mMのリン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) からなる溶液に、測定対象の溶出画分を混合したものである。この反応溶液を1ml使用した。測定反応は、測定対象の溶出画分を添加した後、30℃で40分~60分間行った。また、測定反応は、0.1mlの6N硫酸 (あるいは0.25Nの水酸化ナトリウム) を添加することにより停止させた。

【0045】

次に、反応が終了した反応溶液を60℃で10分間インキュベートした。これにより、反応溶液中に含まれるアセト乳酸をアセトインに変化させた。

次に、反応溶液中に含まれるアセトインを定量するため、0.5%(w/v)のクレアチン1mlと2.5Nの水酸化ナトリウムに溶かした5%(w/v)の α -ナフトール1mlとを添加し、37℃で10分間インキュベートした。その後、反応溶液における吸光度525 nmを比色することでアセトインを定量し、ALS活性を評価した。なお、反応溶液中には、少量のピルビン酸ナトリウムが含まれるため、反応0時間をコントロールとした。

【0046】

その結果、OD525nmにおける吸光度が反応溶液0.2 ml当たりで約7という高い値となった。しかしながら、上述した測定反応を水酸化ナトリウムで停止させ、ALS活性以外によるアセトイン生成活性を調べた結果、この見掛け上のALS活性の80%近くが変異型ALSタンパク質以外の直接的なアセトイン生成活性であることが判った。そこで、変異型ALSタンパ

10

20

30

40

50

ク質と変異型ALSタンパク質以外のアセトイン生成活性を、陰イオン交換樹脂を使用したFPLCで分離した。その結果、図7に示すように、2つの活性ピークが検出された。

【0047】

これら2つの活性ピークのうち、どちらに変異型ALSタンパク質が含まれているのを判定するために、両ピークのアセトイン生成活性を調べた。その結果、変異型ALSタンパク質は、先に溶出したピークで示される画分に含まれていることがわかった。

【0048】

そして、変異型ALSタンパク質を含む酵素溶液を用いて、当該変異型ALSタンパク質のbispyribac-sodium、chlorsulfuron及びimazaquinに対する感受性を調べた。各除草剤に対する感受性は、酵素溶液を添加する前に除草剤を所定の濃度となるように反応液中に添加した以外は、上述した測定反応と同様にしてALS活性を測定することによって評価した。また、比較のために、野生型ALSタンパク質を同様にして分離精製し、実験に供した。なお、bispyribac-sodiumは水溶液とし、chlorsulfuron及びimazaquinはアセトン溶液とした。アセトン溶液は最終濃度1%とした。

【0049】

ALS活性阻害率とbispyribac-sodium濃度との関係を図8に示す。ALS活性阻害率とchlorsulfuron濃度との関係を図9に示す。ALS活性阻害率とimazaquin濃度との関係を図10に示す。なお、これら図8～図10において、白抜きの四角を結んだグラフは野生型ALSタンパク質を示し、塗りつぶしの四角を結んだグラフは変異型ALSタンパク質を示している。

【0050】

また、上述した実験から、ALS活性を50%阻害する除草剤濃度（I50値）をプロビット法に準じて算出し、変異ALSタンパク質におけるI50値と野生型ALSタンパク質におけるI50値との比を算出した。結果を表2に示す。

【0051】

【表2】

Chemical Compounds	I50 (nM) ^{a)}		RS 比 ^{b)}
	野生株	抵抗性変異株	抵抗性変異株
Bispyribac-sodium	5.63	421	74.8
Chlorsulfuron	17.3	92.8	5.36
Imazaquin	1480	16700	11.3

a) 阻害50%濃度

b) 表1の阻害活性から算出した：I50（抵抗性変異株）/I50（野生株）

【0052】

これら図8～図10及び表2に示すように、変異型ALSタンパク質は、野生型ALSタンパク質と比較して除草剤存在下でも比較的高いALS活性を示した。特に、変異型ALSタンパク質と野生型ALSタンパク質とでは、bispyribac-sodium除草剤に対する感受性が最も顕著な差が見られた。すなわち、変異型ALSタンパク質は、特にbispyribac-sodiumに対する抵抗性に優れたものであることが判った。

【0053】

〔実施例3〕変異型ALS遺伝子のクローニング

抵抗性変異株から変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子（変異型ALS遺伝子）をクローニングする際に使用するプローブを以下のようにして調製した。本例においてプローブとしては、トウモロコシのALS遺伝子と高い相同性を示したイネ（日本晴）由来部分cDNA

を使用した。

【0054】

(1) トウモロコシのALS遺伝子と高い相同性を示したイネ（日本晴）由来部分cDNAの塩基配列の決定

(社)農林水産先端技術産業振興センター及び農林水産省農業生物資源研究所が行っているイネゲノムプロジェクトの一環でイネ（日本晴）のcDNAの部分塩基配列の決定が行われており、cDNAの部分塩基配列データベースが構築されている。このデータベースに含まれる約350bpの塩基配列として既に知られているcDNAクローン（アクセッション番号：C72411）がトウモロコシにおけるALS遺伝子と高い相同性を示した。なお、トウモロコシにおけるALS遺伝子は完全に塩基配列が決定されている。

10

【0055】

そして、このcDNAクローン（アクセッション番号：C72411）を農業生物資源研究所から入手し、以下のように塩基配列を決定した。なお、このcDNAクローンは、ALSホモログ遺伝子がpBluescript II SK+中に挿入されており、大腸菌内で自律複製を行うことができる形であった。

【0056】

まず、このALSホモログ保持プラスミドベクターを大腸菌（DH5α）へ形質転換した。プレートより得られた白色のコロニーを液体培養し、菌体より常法に従いプラスミドを抽出した。インサートDNAはプラスミドベクター中のマルチクローニングサイトの制限酵素、Sal IとNot Iの間に挿入されていたのでこの2つの酵素でベクターを消化し、アガロース電気泳動でインサートの確認を行った。この後、得られたALSホモログ保持プラスミドベクターをRNaseA、PEG、LiCl等を使用する常法に従って精製し、プライマー及びABI BigDye Terminator Cycle Sequencing kitを用いシーケンス反応を行った。PCR反応の条件はプロトコールに従った。またプライマーはM13プライマー及び決定した塩基配列から設計した合成プライマーを用いた。得られたPCR産物をエタノール沈殿で精製し、ABI PRISM 310 シーケンサーで塩基配列を決定した。

20

【0057】

このALSホモログ保持プラスミドベクターには、1.6 kbpのインサートDNAが入っているという情報であった。得られたALSホモログ保持プラスミドベクターをSal IとNot Iの制限酵素で消化し、電気泳動を行ったところ、pBluescript II SK+も相当する約3 kbpのバンドとインサートDNA断片に相当する1.6 kbpのバンドが検出された（図示せず）。インサートDNA部分についての全塩基配列を決定し、トウモロコシの塩基配列の相同性検索を行った結果、図11に示すように、84.7%の相同性を示した。したがって、このALSホモログは日本晴におけるALS遺伝子の部分cDNAであると判断されたので、Sal I及びNot Iで消化して切り出したインサートDNAをプローブとした。なお、図11において、一列目は日本晴におけるALS遺伝子のcDNAの塩基配列であり、二列目はトウモロコシにおけるALS遺伝子の塩基配列である。

30

【0058】

(2) 抵抗性変異株からのmRNAの調製

まず、液体窒素で凍結した抵抗性変異株を、乳鉢と乳棒を用いて摩砕した後、ミキサーにより30秒間細かく粉砕した。粉砕後の粉末を抽出緩衝液〔(100 mM Tris-HCl pH 9.0, 100 mM NaCl, 1重量% SDS, 5mM EDTA) : (β-mercaptoethanol) : (Tris飽和フェノール) = 15 : 3 : 20〕中に懸濁し、その後よく攪拌した。この溶液を12000×gで15分間遠心し上澄を回収し、200 mlのPCI〔(Tris飽和フェノール) : (chloroform) : (isoamylalcohol) = 25 : 24 : 1〕を加え、4℃で10分間振とうした後、12000×gで15分間遠心し上澄を回収した。この操作を2回繰り返した。得られた上澄に1/20量の5MのNaCl、2.2倍量のエタノールを加え、-80℃で30分間静置した後、12000×gで5分間遠心することで沈殿を回収した。沈殿を70%エタノールで洗浄し、乾燥させた後に10mMのβ-メルカプトエタノール溶液に溶かし、この溶液を27000×gで10分間遠心して不溶性画分を除いた後、10MのLiClを1/4量加えて氷上で1時間静置した。これをさらに 27000×gで10分間遠心して沈殿を回収し

40

50

、4 mlのH₂Oに溶かした後、260nmの吸光度を測定してRNAの濃度を求めた。これに1/20量の5M NaClと2.2倍量のエタノールを加えて、-80℃で30分間静置した後、27000×gで10分間遠心して沈殿を回収し、70%エタノールで洗浄後乾燥させた。これを適量のH₂Oに溶かしトータルRNA溶液とした。なお、遠心操作は4℃で行った。

【0059】

このトータルRNAから次の方法でmRNAの分離精製した。抽出したトータルRNA溶液の液量に対して等量の2×結合バッファー（20 mM Tris-HCl pH7.5, 10mM EDTA, 1M NaCl）を加えた。0.1 gのoligo dT cellulose(アマシャム ファルマシア バイオテック社製)を詰めたカラムを1×結合バッファーで洗浄した後、このトータルRNA溶液をカラムにかけた。1×結合バッファーで洗浄した後、溶出バッファー（10mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA）をアプライし、溶出液を0.5 mlずつ回収した。なお、カラムを素通りした画分については、別のoligo dT cellulose（アマシャム ファルマシア バイオテック社製）カラムにかけ、同様の操作を行った。各画分の吸光度から溶出されたmRNAの濃度を計算した後、1/10量の10M LiClと2.5倍量のエタノールを加えて-80℃で30分間静置した。これを遠心して沈澱画分を乾燥した後100 μlのH₂Oに溶かした。こうして得られたmRNAをショ糖密度勾配遠心法によりサイズ分画した。

【0060】

分離精製したmRNAを、25% ショ糖溶液及び5% ショ糖溶液を用いて密度勾配をつけた遠心管にアプライし、スウィングローターを用いて4℃、27000rpmで15時間超遠心を行った。遠心後、密度勾配の順に各0.5 mlずつ分画回収した。それぞれの画分の吸光度を測定し、回収されたmRNAの濃度を計算するとともにECLキット（ECL direct nucleic acid labeling and detection system, AmershamPharmacia Biotec社）によるハイブリダイゼーションによりALS mRNAの存在を確認した。ハイブリダイゼーションは、上記（1）で調製したプローブを用いて42℃で16時間行った。また、ハイブリダイゼーション後の洗浄は、キット添付の1次洗浄バッファーを用いて42℃で5分間を2回、その後、2× SSC溶液を用いて42℃で5分間を1回行った。洗浄後の膜は、透明のプラスチックフィルムで包みキット付属の発光試薬に浸し多状態を維持し、その後、X線フィルムに感光させた。

【0061】

これらの操作により、抵抗性変異株からは、約35mgのトータルRNAを抽出するとともに、約4 mgのmRNAを抽出することができた。また、ショ糖密度勾配遠心法では、予想される画分にハイブリダイゼーション陽性のスポットが認められた。

【0062】

一方、野生株を用いたところ、約95mgのトータルRNAを抽出するとともに、約7mgのmRNAを抽出することができた。野生株からmRNAを抽出する際には、抵抗性変異株に代えて野生株を使用した以外は、上述した方法を適用した。

【0063】

（3）抵抗性変異株由来のcDNAライブラリの作製

上記（2）で精製したmRNA2 μg及びcDNA合成キット（Amersham Pharmacia Biotec社）を用いてcDNAの合成を行い、抵抗性変異株由来のcDNAライブラリの作製した。

【0064】

まず、逆転写反応にはキット添付のRTaseを使用し、その後の相補鎖伸長反応にはキットに添付のT4 DNAPolymeraseを使用した。相補鎖伸長反応の際には、cDNA合成の収率を計算するために³²P-dCTPを加えた。合成したcDNAは、アダプターを付加した後、in vitroパッケージング方により入ファージへ組み込んだ。

【0065】

cDNAに付加するアダプターとしては、宝酒造株式会社製のEcoRI-NotI-Bam HIアダプターを使用した。cDNAを含む溶液にcDNAに対してモル濃度で50倍のアダプターを加え、この混合溶液にT4 DNA Ligase（Pharmacia社製）を加えてライゲーション反応を4℃で一晩行った。この反応溶液をAsahiPak GS 710カラム（旭化成工業株式会社製）を用いてHPCLにアプライし、溶出液を波長260nmの紫外線でモニターした。溶出液を0.5 ml程度ずつ25本

に分画し、各フラクションをCerenkovカウンターで測定し、カウントの高いフラクションを3~4本回収した。このフラクションをT4 polynucleotide kinase（宝酒造株式会社製）を用いてアダプターの5'末端をリン酸化した後、 λ gt 11 Eco RIアームを加えてライゲーションした。ライゲーション反応は、溶液にGigaPack Gold III（Stratagene社製）を加えて室温で2時間行った。反応終了後、200 μ lのSMバッファーと8 μ lのクロロホルムを加えてファージ溶液とした。このファージ溶液を10倍希釈し、これの1 μ lを大腸菌（Y-1088）に感染させた後、0.7% トッパアガーを加え、LBプレートに蒔き、4時間から8時間後にプレートに現れたプラークの数を数えることでタイターを測定した。

【0066】

DE 81ペーパーとCerenkovカウンティングの結果から抵抗性変異株由来のcDNAが約74 ng合成されたことが判った。アダプターを付加したベクターのライゲーション後のCerenkovカウンティングの結果から抵抗性変異株について約22 ngのインサートが挿入された λ DNAが得られた。この λ DNAをファージヘパッケージングし、これを抵抗性変異株細胞由来のcDNAライブラリとした。このライブラリ溶液のタイターは、16600pfu/ μ lであった。

【0067】

一方、野生株から抽出したmRNAを用いて、上述した方法に準じてcDNAライブラリを調製したところ、野生株由来のcDNAが約38 ng合成されたことが判った。また、野生株についてインサートが挿入された λ DNAが約5 ng得られた。さらに、野生株由来のcDNAライブラリ溶液のタイターは18160 pfu/ μ lであった。

【0068】

（4）ALS遺伝子を含むcDNAのスクリーニング

プレートに20000個程度のプラークが出るように、上記（3）で調製したライブラリ溶液を希釈した後、野生株由来及び抵抗性変異株由来のファージをそれぞれ10枚ずつ蒔いた。プラークをニトロセルロースメンブレン（Schleicher & Schnell社製，PROTORAN BA85，ポアサイズ0.45 μ m）へ転写し、転写したニトロセルロースメンブレンを変性溶液（0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl）、続いて中和溶液（1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH7.5, 1 mM EDTA）に約20秒浸した。濾紙を用いてニトロセルロースメンブレンから余分な水分を除去した後、ニトロセルロースメンブレンを80℃で2時間ベーキングした。なお、ニトロセルロースメンブレンに代えてHybond-N+（アマシャム ファルマシア バイオテック社製）を用いた際には、ベーキング操作は省略し、0.4 M NaOHにて20分間固定した。

【0069】

上記（1）で調製したインサートDNAを、RI及び非RIの2種類の方法でラベル化しプローブDNAとして使用した。RIラベル化とハイブリダイゼーションは次の方法で行った。まず、約200~500ngのプローブDNAを熱変性させた。BcaBEST DNA labelling kit（宝酒造株式会社製）を用いてラベルを行った。このラベル化反応に際して、キットに添付のバッファー、ランダムプライマー及び ^{32} P-dCTPを加えた。BcaBESTを加え、65℃で30分間インキュベートした。その後、EDTAを加えて反応を停止させた。ニトロセルロースメンブレン8枚程度にプローブがおおよそ100 ng程度含まれる容量を加え、42℃、一晚、微振とうでハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、2 $\times$ SSC, 0.1% SDS溶液で3回洗浄した後、BAS 2000イメージングアナライザー（富士フイルム株式会社製）のイメージングプレートに約1時間露光させた。露光後イメージングアナライザーを用いて陽性クローンを検出した。

【0070】

一方、非RIラベル化は次の方法で行った。約200~500ngのプローブDNAを熱変性させた後、ECLダイレクトDNA/RNAラベリング・検出システム（Amersham Pharmacia Biotech社）添付のDNA標識試薬（ペルオキシダーゼ）及びグルタルアルデヒドを加えて37℃でインキュベートした。この場合、ニトロセルロースメンブレン膜8枚程度におおよそ100 ng程度のラベル化プローブDNAが含まれるように添加した後、42℃、一晚、微振とうでハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、primary washing bufferを室温、10分間、3回、その後2 $\times$ SSCで室温、10分間、1回で膜の洗浄を行った。膜をECLキット

添付の発光液に浸し、30分から3時間でX線フィルムに露光した。

【0071】

ハイブリダイゼーション（1次スクリーニング）の結果得られた陽性ファージを滅菌した爪楊枝でトップアガーごと掻き取り、200 μ lのSMバッファーに懸濁し、ファージ溶液を得た。このファージ溶液を各クローンごと適宜希釈を行い、大腸菌Y-1088株に感染させ、LBプレートに蒔いた。この新たに作製したプレートを用いて、同様にハイブリダイゼーション（2次スクリーニング）を行い、陽性ファージを200 μ lのSMバッファーに懸濁し、シングルファージとした。なお、2次スクリーニングでシングルファージとして単離できなかった場合、もう一度希釈してLBプレートに蒔き、ハイブリダイゼーション（3次スクリーニング）を行ってシングルファージにした。

10

【0072】

このシングルファージから次の方法で λ DNAを調製した。竹串又は爪楊枝を使って陽性クローンのプラークから集めた λ ファージを、新鮮な宿主大腸菌（Y1088）懸濁液を5 μ l含む200 μ lの2xYT培地（10 mM $MgCl_2$ と0.2%マルトースを含む）にイノキュレートした。静置状態42℃で一晩インキュベートした後、再度宿主大腸菌（Y1088）懸濁液を25 μ l含む1 mlの2xYT培地（10 mM $MgCl_2$ と0.2%マルトースを含む）にイノキュレートし一晩振とう培養した（以上が前培養）。前培養した溶液（10～50 μ l）を10 mMの $MgCl_2$ と0.5mlの大腸菌Y1088懸濁液とを含む12 mlの2xYT培地にイノキュレートし、比較的強く振とうしながら溶菌後濁度が増すまで42℃で一晩インキュベートした。培養終了後、50 μ lのクロロホルムと1.2 mlの5 M NaClを加え、振とうしながら42℃で10分間インキュベートした。これを27000 $\times$ gで10分間遠心した後、新たに遠心管に移した上澄に5 mlの50 % PEGを加え、氷上で1時間以上インキュベートした。これを27000 $\times$ gで10分間遠心し上澄を捨てた後、再度7000 $\times$ gで遠心して液体部分を捨てた。沈澱画分を4 μ gのDNase I、20 μ gのRNase Aならびに10mMの $MgCl_2$ を含む30mMのトリス塩酸緩衝液pH7.5の300 μ lに懸濁させ、1.5 mlチューブへ移した。この懸濁液を37℃で30分間インキュベートした後、7.5 μ lの20%SDS、3 μ lのproteinase K（10 mg/ml）、12 μ lの0.5M EDTAを加え、さらに55℃で15分間インキュベートした。これに150 μ lのフェノールを加えて激しく攪拌した後、トミーマイクロ遠心機MR-150（トミー精工社製）を用いて15000 rpmで3分間遠心し、水層を回収した。集めた水層に800 μ lのエチルエーテル（蒸留水を加えて過酸化物を除いておく）を加え激しく攪拌した後、15000rpmで10秒間遠心しエーテル層を捨てた。このエーテル抽出操作を繰り返した後、水層に残存するエーテルを窒素ガスで除去した。水層に30 μ lの5M NaCl、875 μ lのエタノールを加えることで沈澱してきた λ DNAを速やかに回収し、 λ DNAを1 ml程度の70%エタノールでリンスした後、約1分間減圧下で乾燥させてエタノールを除いた。これを20 μ l～50 μ lのTE 緩衝液（pH8.0）に溶かして λ DNA溶液とした。

20

30

【0073】

得られた λ DNA中のインサートDNAのサブクローニング及び塩基配列決定は次の方法で行った。得られた λ DNA溶液（1 μ l）をNot Iで消化し、インサートDNAを切り出した。切り出し反応の反応液組成は制限酵素添付の説明書に従い、37℃で約2時間反応させた後、1%アガロースゲルを使用した電気泳動でインサートサイズの確認を行った。インサートDNAを持つ λ DNA（10 μ l～20 μ l）をNot Iで消化し、インサートDNAを切り出した。これを分取用のアガロースゲルで分離した後、相当するバンドをゲルから切り出し、常法によりインサートDNAを精製した。このインサートDNAとBAP処理（エビのアルカリフォスファターゼを用いた脱リン酸化処理）したベクターとをモル比で1：1の割合で混合し、T4 DNAリガーゼで16℃、2時間以上ライゲーション反応を行った。なお、インサートDNAはNot Iで切り出したものを材料としたので、BAP処理についてもNot Iで切断したベクターについて行った。ライゲーション終了後、その溶液の一部をコンピテントセル（DH5 α ）と混合し、氷上に30分間放置した。これを42℃で30秒間ヒートショックを行い、さらに氷上に2分間放置した。続いてSOCを添加し37℃で1時間インキュベートした後、2 $\times$ YT（50 μ g/mlのアンピシリン入り）の100 μ l及び3 %X-Gal 30 μ lならびに1 M IPTG 3 μ lを混合したものを事前に均一になるようにまいておいたLB培地上プレートにまき、37℃で10時間以上培養した

40

50

。形質転換された白色コロニーをアンピシリン入りのLB培地あるいは2×YT培地の2 mlに1つのコロニーを接種した後37℃で一晩培養した。この培養液から常法によりプラスミドを調製しH₂Oに溶かしDNA濃度を定量した後シーケンス用PCR反応に供した。PCR反応及び塩基配列決定は上述した方法で行った。

【0074】

以上の実験により、約2.2 kbの不完全長のALS cDNAが得られた。このDNAの5'側から約250 bpの位置にSma Iサイトが存在したので。さらに次の方法で新たなプローブを作製した。約2.2 kbpを保持するpBluescript II SK+を宿主大腸菌のJM109で増やした後、プラスミドを自動分離装置 (KURABO PI-100) で抽出した。このプラスミドを直接Sma Iで消化し、生成した約250 bp の断片を1%のアガロース電気泳動で分離精製し濃度を算出後プローブとした。このプローブを用いて上述のRIを使用した方法で再度ライブラリをスクリーニングした。その結果得られたシングファージからλ DNAを調製し、そのλ DNA溶液 (1 μl) をEco RIで消化し、電気泳動でサイズを確認した後、ニトロセルロースメンブランに固定した。電気泳動後のゲルを1.5 M NaClを含む0.5 M NaOH 溶液中に浸し15分間程度軽く振とうした。この後ゲルを水洗し、3 MのNaClを含む0.5 M Tris-HCl pH7.5に浸し15分程度振とうしながらゲルを中和した。ステンレスバットに20×SSCを張り、その中に工業用の厚手のろ紙を5枚程度重ねた台座を置いた。その上に中和後のゲル、メンブラン (所定の大きさに切断したニトロセルロースメンブランを蒸留水になじませた後、20×SSCでさらに10分間なじませた)、2枚重ねのろ紙を順番に乗せた後、さらにその上に3cm~4cm厚のペーパータオルを重ねた。この上にガラス板を乗せ、その上に軽い重しを乗せた後、約5分間ブロッティングを行った。この後、ゲルとメンブランの間に気泡が入っていないことを確かめた上で10分間程度ブロッティングを行った。ブロッティング終了後、メンブランをトランスイルミネーターでUV処理し、15分から30分程度80℃でベーキングした。ベーキング終了後、³²Pでラベルした上述の250 bpプローブDNAによるハイブリダイゼーション (ハイブリダイゼーション緩衝液組成: 5×SSPE, 0.5% SDS, 5×Denharlts, solum sperm DNA, 50 %formamide) を行い、結合したバンドの放射能をイメージングプレートへ写し取り、BAS-2000でその結果を解析した。このハイブリダイゼーションで陽性を示したインサートの中で比較的大きなサイズを示したものを大量に調製し、上述した方法でEco RI消化後BAP処理したpBluescript IISK+にサブクローニングした (FERM BP-7348)。これを大腸菌 (JM 105) に形質転換し、得られた形質転換体を液体培養後、常法によりプラスミドを調製し、上述の方法で塩基配列を決定した。

【0075】

その結果、完全長の変異ALS遺伝子を含む cDNAを取得することができた。このcDNAの塩基配列を配列番号2に示す。また、野生株由来のcDNAライブラリからは、完全長ALS遺伝子を含む cDNAを一種類を取得することができた。これら変異型ALS遺伝子と野生型のALS遺伝子との相同性を比較した結果を図1に示した。

【0076】

〔実施例4〕 変異型ALSタンパク質の発現

実施例3 (4) で得られたプラスミドをEco RIで消化して、野生型のALS遺伝子を含むcDNA及び変異型ALS遺伝子を含むcDNAを切り出した後、pGEX発現ベクターにそれぞれ組み込んだ。野生型ALS遺伝子を含むcDNAは、開始コドンよりも47塩基長い5'非翻訳領域を有しており、pGEX-2TのEco RIサイトに組み込んだ。また、変異型ALS遺伝子を含むcDNAは、開始コドンよりも31塩基長い5'非翻訳領域を有しており、pGEX-4T-3のEco RIサイトに組み込んだ。

【0077】

これら大腸菌 (JM 105) にそれぞれ形質転換し、形質転換により得られたコロニーを液体培養してプラスミドを抽出し、制限酵素切断パターン及びシーケンスによりインサートDNAの挿入方向を確認した。インサートDNAの方向が正しいクローンを1つずつ選び、これを2 mlのアンピシリンを含有するLB培地中27℃で振とう培養した。この前培養液1 mlを用いて50 mlあるいは250 mlのアンピシリン含有LB培地で本培養を行った。一晩培養後

、1mM IPTGを加えて3時間～4時間、GST融合タンパク質の発現誘導を行った。

【0078】

ここで、IPTGを添加してから3～4時間培養した後のALS活性を測定した結果を表3に示す。

【0079】

【表3】

サンプル	ALS活性 (OD525/40 min/0.05 ml)	タンパク質量 (mg/ml)	比活性 (OD525/40 min/mg protein)
対照区 (プラスミド無し)	1.41	17.6	1.60
野生株	4.10	18.2	4.5
抵抗性変異株	3.62	12.8	5.66

10

【0080】

この表3から判るように、プラスミドを有さない対照区と比較して、野生株ALS遺伝子を有する大腸菌及び変異型ALS遺伝子を有する大腸菌では、3倍～4倍程度高い比活性を示した。したがって、IPTGを添加してから3～4時間培養した後、形質転換大腸菌を-80℃に保存し、これを用いてGST融合ALSタンパク質を精製した。

20

【0081】

大腸菌からのALSの調製と精製は次の方法で行った。まず、-80℃に保存しておいた形質転換大腸菌のペレットをALS抽出緩衝液（30%グリセロールと0.5 mM MgCl₂を含んだリン酸カリウム緩衝液pH7.5）に懸濁した（培養液50 mlから得られたペレットに対して2.5 mlの緩衝液を添加）。この懸濁液を超音波処理（Heat Systems-Ultrasonics社製、Sonicator W-225R、マイクロチップ、アウトプットコントロール8、約1秒インターバル、40秒2回）した後、4℃、15000×gで20分間遠心し、その上澄を粗酵素溶液とした。

【0082】

粗酵素溶液からのGST融合ALSタンパク質（以下GST-ALS）の精製は次の方法で行った。培養液250 ml分のペレットから調製した粗酵素溶液（12.5 ml）をグルタチオンセファロース4Bアフィニティークラム（アマシャム ファルマシア バイオテック社製、ベッドボリュームは約1 mlで事前に10 mlの1×PBS（0.14 M NaCl, 2.7mM KCl, 10.1 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH7.3）で平衡化しておいた）にアプライした後、10 mlの1×PBSで当該カラムを洗浄し、吸着したGST-ALSを2 mlの10 mMグルタチオン溶液で溶出（4回）した。各々の画分のGST活性及びALS活性を測定し、高活性画分を集めた。なお、ALS抽出緩衝液を使った場合には、上記カラムへの吸着率が悪かったため、1×PBSで酵素を抽出した後に上記カラムに吸着させる実験も併せて行った。ALS活性測定及びタンパク質量定量は上述の方法に従い、GST活性測定は、1-chloro-2,4-dinitrobenzene(別名2,4-dichloronitrobenzen (CDNB)と略記)を基質とする方法で行った。反応液量を3 ml、反応液組成を1 mM CDNB、1 mMグルタチオン（還元型）、酵素溶液、100 mMリン酸カリウム緩衝液pH 6.5とした。酵素溶液を添加後30℃で340 nmの吸光度増加をレートアッセイした。なお、CDNBは100倍濃度のエタノール溶液を調製して反応液に添加した。

30

40

【0083】

上記アフィニティークラムに吸着しない活性（ALS活性及びGST活性）も多く検出されたが、アフィニティークラムに吸着した分についてはその大部分の活性が初めと2回目のグルタチオン溶出画分に検出されたのでこれを合わせて精製GST-ALSとした。

【0084】

このGST-ALSをトロンビンプロテアーゼ（25 unit）で4℃、一晚消化したものをGSTから遊離したALSとした。表4に、粗酵素溶液、上記アフィニティークラムを用いたクロマトグラフィ後及びトロンビンプロテアーゼ処理後の、ALS活性、タンパク質量及び比活性を

50

示す。

【0085】

【表4】

サンプル	ALS活性 (OD525/40 min/0.05 ml)	タンパク質量 (mg/ml)	比活性 (OD525/40 min/mg protein)
野生型粗酵素	4.6105	9.6	9.61
クロマト後	0.6083	0.189	64.4
トロンビン処理後	0.1089	0.189	11.5
抵抗性変異型粗酵素	3.1493	12	5.25
クロマト後	0.6025	0.045	268
トロンビン処理後	0.1203	0.045	53.5

10

【0086】

また、調製したALS酵素の中には、大腸菌由来のALS活性が含まれる。しかしながら、表5に示すように、大腸菌由来のALS活性は、ALSアイソザイムIによるもので1 mMのバリン添加によりほぼ完全に阻害できる。

【0087】

【表5】

サンプル*	ALS活性 (OD525/40 min/0.05 ml)	阻害率 (%)
CK1 (プラスミド無し)	1.2725	
CK1+1 mM Valine	0.1768	86
CK2 (プラスミド無し)	1.5508	
CK2+1 mM Valine	0.1831	88

*2連で実験を行った

20

【0088】

〔実施例5〕変異型ALSタンパク質の薬剤感受性

実施例4で得られた粗酵素溶液を用いて、変異型ALSタンパク質の薬剤感受性を調べた。薬剤感受性試験は、実施例2と同様な手順に従って行った。この薬剤感受性試験には、PC除草剤としてbispyribac-sodium, pyriithiobac-sodium, pyriminobacの3薬剤、スルホニルウレア系除草剤としてchlorsulfuron, bensulfuron-methyl, pyrazosulfuron-ethyl, imazosulfuronの4薬剤、イミダゾリノン系除草剤としてimazaquin, imazapyrの2薬剤を使用した。

【0089】

これら薬剤は、変異型ALSタンパク質を添加する前に、これらの薬剤の所定の濃度の溶液 (bispyribac-sodiumとpyriithiobac-sodiumは水溶液、その他はアセトン溶液) を反応液中に添加した。アセトンの最終濃度は1 %とした。なお、大腸菌内で発現するイネcDNAからのALSタンパク質はバリン非感受性である (Kil et al., J. Biochem. Mol. Biol. 31 287-295, 1998) ので、大腸菌由来のALS活性をバリンで阻害した条件下で薬剤感受性試験を行った。

【0090】

bispyribac-sodiumを用いた場合の感受性を示す結果を図12に示す。また、chlorsulfuronを用いた場合の感受性を示す結果を図13に示す。図12から判るように、bispyribac-sodiumにより野生型ALSの活性が阻害されたのに対して、変異型ALSの活性は完全に阻害されなかった。また、図13から判るように、chlorsulfuronについては、変異型ALSタンパク質は、野生型ALSタンパク質と比較して所定の濃度まで高い活性を維持したが、bis

30

40

50

pyribac-sodiumの場合と比較すると抵抗性は中程度であった。

【0091】

また、薬剤としてpyrithiobac-sodiumを用いた場合の感受性を示す結果を図14に示し、薬剤としてpyriminobacを用いた場合の感受性を示す結果を図15に示し、薬剤としてbensulfuron-methylを用いた場合の感受性を示す結果を図16に示し、薬剤としてpyrazosulfuron-ethylを用いた場合の感受性を示す結果を図17に示し、薬剤としてimazosulfuronを用いた場合の感受性を示す結果を図18に示し、薬剤としてimazaquinを用いた場合の感受性を示す結果を図19に示し、薬剤としてimazapyrを用いた場合の感受性を示す結果を図20に示す。なお、図12～図20において、塗りつぶしの三角を結んだグラフが野生型ALSタンパク質を含む粗酵素溶液を示し、塗りつぶしの四角を結んだグラフが変異型ALSタンパク質を含む粗酵素溶液を示している。

10

【0092】

これら図14～図20に示すように、変異型ALSタンパク質は、野生型ALSタンパク質と比較して各薬剤に対して優れた抵抗性を有しており、特に、PC系除草剤に対して優れた抵抗性を有していることが判る。また、図12、図14及び図15を比較すると、変異型ALSタンパク質は、PC系除草剤のうちbispyribac-sodiumに対する抵抗性が最も優れていることが判る。

【0093】

これらの結果は、実施例2の結果と相関すると判断できるため、実施例2においてPC系除草剤に対する抵抗性を向上させた要因が変異型ALS遺伝子であることを示している。

20

【0094】

一方、実施例4で調製した精製GST-ALS及び遊離ALSを用いて薬剤感受性試験を行った。野生型ALSタンパク質のbispyribac-sodiumに対する抵抗性を示す結果を図21に示し、変異型ALSタンパク質のbispyribac-sodiumに対する抵抗性を示す結果を図22に示す。また、変異型ALSタンパク質のchlorsulfuronに対する抵抗性を示す結果を図23に示し、変異型ALSタンパク質のimazaquinに対する抵抗性を示す結果を図24に示す。なお、図21～図24に結果を示す薬剤感受性試験においては、バリン非添加で行った。また、図21において、塗りつぶしの三角を結んだグラフが野生型ALSタンパク質を含む粗酵素溶液を示し、塗りつぶしの四角を結んだグラフが野生型GST-ALSを示し、塗りつぶしの円を結んだグラフが遊離したALSタンパク質を示している。図22～図24において、塗りつぶしの三角を結んだグラフが変異型ALSタンパク質を含む粗酵素溶液を示し、塗りつぶしの四角を結んだグラフが変異型GST-ALSを示している。

30

【0095】

これら図21～図24に示すように、精製GST-ALSにおいても、粗酵素溶液を用いた場合と同様な薬剤感受性を示した。

【0096】

〔実施例6〕変異型ALS遺伝子における変異箇所と薬剤感受性との関係

実施例3(4)で決定した変異型ALS遺伝子における変異箇所は、図1に示したように、野生型における548番目のトリプトファン(W)がロイシン(L)に変異したW548L変異と、野生型における627番目のセリン(S)がイソロイシン(I)に変異したS627I変異とであった。そこで、これらの変異による薬剤感受性に対する影響を検討するため、これらW548L変異及びS627I変異のいずれかの変異のみを有する変異型ALS遺伝子を調製し、いずれか一方の変異のみを有するALSタンパク質の薬剤感受性を調べた。

40

【0097】

(1) 変異遺伝子の調製

具体的に、W548L変異のみを有する変異型ALS遺伝子(以下、「W548L変異型ALS遺伝子」と呼ぶ)は、図25及び図26に示すようにして調製した。まず、ALS-Rsp6と命名したセンスプライマー(5'-CATCACAACACCTCTT-3':配列番号3)とALS-RspFと命名したアンチセンスプライマー(5'-ACACGGACTGCAGGAATA-3':配列番号4)とを用いて、2点変異型ALS遺伝子を保持するpBluescript II SK+(FERM BP-7348)を鋳型としてPCRを行い、W548L変異

50

を有し、S627I変異を有さないDNA断片を増幅させた（図25）。一方、ALS-RspEと命名したセンスプライマー（5'-TTACAAGGCGAATAGGGC-3'；配列番号5）とM13Rのアンチセンスプライマー（5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'；配列番号6）を用いて、野性型ALS遺伝子を保持するpBluescript II SK+を鋳型として、627番目のセリンをコードする領域を含むDNA断片を増幅させた（図25）。

【0098】

次に、これらの2つのDNA断片を元にしてSPR法（1本鎖のDNA同士を配列が対応する末端部分で結合させ、互いを鋳型としてDNA polymeraseで複製させて2本鎖DNAとする遺伝子作製法：Self Polymerase Reaction）により2つのDNA断片が連結したサイズの大きいDNA断片を得た（図26）。得られたDNA断片をAcc I及びEco RIで消化しAcc I-Eco RI断片を得た。また、野性型のALS遺伝子を組み込んだpGEX-2Tプラスミド（pGEX-2T-wALS）をAcc Iサイトで消化した後さらにEcoRIで37℃1分の部分消化を行い、pGEX-2Tプラスミド部分断片を得た（図26）。そして、Acc I-Eco RI断片とpGEX-2Tプラスミド部分断片とをライゲーションすることによって、W548L変異型ALS遺伝子を有するプラスミドを得た。

【0099】

なお、S627I変異のみを有する変異型ALS遺伝子（以下、「S627I変異型ALS遺伝子」と呼ぶ）は、上述したW548L変異型ALS遺伝子を調製した方法に準じて得ることができた。すなわち、pBluescript II SK+(FERM BP-7348)を鋳型としたPCRでALS-RspE及びM13Rをプライマーとして用い、野性型ALS遺伝子を保持するpBluescript II SK+を鋳型としたPCRでALS-Rsp6及びALS-RspFをプライマーとして用いた以外は同様に行った。

【0100】

W548L変異型ALS遺伝子を有するプラスミド及びS627I変異型ALS遺伝子を有するプラスミドを用いて、それぞれ大腸菌（JM109株）に形質転換した。得られた大腸菌コロニーのALS遺伝子の全シーケンスを行ったところ、W548L変異及びS627I変異の1点変異を確認することができた

【0101】

（2）各変異タンパク質の薬剤感受性

W548L変異型ALS遺伝子を有するプラスミド又はS627I変異型ALS遺伝子を有するプラスミドを大腸菌（JM 109）に形質転換し、形質転換により得られたコロニーを液体培養し、実施例4及び5と同様にして、GST誘導タンパク質の発現誘導を行い、粗酵素液を調製し、1 mMのバリン存在下でALSの薬剤感受性を調べた。

【0102】

bispyribac-sodiumを用いた場合の結果を図27に示す。またchlorsulfuron及びimazaquinを用いた場合の結果を図28及び図29に示す。bispyribac-sodiumの図27から判るように、W548L変異及びS627I変異のそれぞれの1点変異はbispyribac-sodiumに対する抵抗性を与え、その度合いはW548L変異のみの1点変異の方がS627L変異のみの1点変異よりも高かった。

【0103】

しかしながら、これら1点変異の抵抗性の度合いは、いずれも実施例5で示した2点変異の場合よりも数段低いことが判った。すなわち、W548L変異及びS627L変異を併せ持つ場合には、W548L変異又はS627L変異いずれかを有する場合から予測できない程、bispyribac-sodiumに対する抵抗性が著しく強くなった。

【0104】

一方、chlorsulfuronの場合には（図28）、W548L変異のみの場合は、chlorsulfuronに対する抵抗性を与えたが、S627I変異のみの場合は明確な抵抗性を与えなかった。また、W548L変異のみの場合とW548L変異及びS627I変異の場合とを比較すると、chlorsulfuronに対する抵抗性の度合いは同程度であった。さらに、imazaquinの場合には（図29）、bispyribac-sodiumと同じような結果が得られたが、本例の濃度範囲では2点変異を併せ持つことによる相乗的な抵抗性の増大については確認できなかった。

【0105】

以上の結果、今回新たに見つかったS627I変異は、W548L変異によるbispyribac-sodium抵抗性を飛躍的に高めることが判明した。従ってW548L変異及びS627I変異を有するALS遺伝子は、bispyribac-sodiumに特異的に高い抵抗性を与える遺伝子であると結論できた。

【0106】

〔実施例7〕形質転換植物の作出

実施例3(4)で決定した変異型ALS遺伝子を用いて、イネ(日本晴)を形質転換し、形質転換イネのbispyribac-sodium抵抗性を調べた。

【0107】

(1) 変異ALS遺伝子を組み込んだバイナリーベクターの作製

イネの形質転換用に開発されたバイナリーベクターであるpMLH 7133 (Mitsuhara et al., Plant Cell Physiol. 37 49-59, 1996) に以下の方法により、実施例3(4)で得られた変異型ALS遺伝子を組み込んだ。

【0108】

すなわち、図30に示すように、まず、変異型ALS遺伝子を組み込んだpBluescript II SK+ (FERM BP-7348) から変異ALS遺伝子を、マルチクロニングサイトの制限酵素切断部位とアダプターの切断部位を利用して切り出した(Sac I消化及びBam HIによる部分消化)。また、pMLH 7133をSac I及びBam HIを用いて消化し、pMLH 7133におけるGUS領域を切り出して直鎖状にした。変異型ALS遺伝子を含むDNA断片と直鎖状のpMLH 7133とをライゲーションし、pMLH 7133-ALSを得た。

【0109】

得られたpMLH 7133-ALSを大腸菌(JM 105株)に形質転換し、得られたシングルコロニーを液体培養後プラスミドを調製した。調製したプラスミドをSac IとBam HIとで消化してインサートの有無を確認(図31)することで、変異ALS遺伝子を保持しているクローンを選別した。インサートが確認できたプラスミドを鋳型として変異ALS遺伝子の少なくとも一部を特異的に増幅させる2セットのプライマーを用いてPCRを行った。プライマーセットは、ALS-Rsp1センスプライマー(5'-GCTCTGCTACAACAGAGCACA-3'; 配列番号7)と4-83-3アンチセンスプライマー(5'-GCTTTGCCAACATACAG-3'; 配列番号8)とのセット、3-1-4センスプライマー(5'-AGGTGTCACAGTTGTTG-3'; 配列番号9)と3-1-1アンチセンスプライマー(5'-GCATCTTCTTGAATGGCG-3'; 配列番号10)とセットを用いた。その結果、特異的なフラグメントバンドが検出され(図32)、実施例3(4)で得られた変異型ALS遺伝子がpMLH7133ベクターへ組み込まれたと判断することができた。

【0110】

また、変異型ALS遺伝子が正常に組み込まれたか否かは、PCRによるインサートの挿入方向の確認及びシーケンスの決定により確認した。PCRによるインサートの挿入方向確認は次の方法で行った。pMLH7133-ALSをEco RIで完全消化することによりTNOS部分を取り除くとともに直鎖状とし、これを鋳型として上記ALS-Res1及び4-83-3のセットと3-1-4及び3-1-1のセットとを用いてPCRを行った。その結果(図33)、予想される位置にPCR産物のバンドが確認されたことから、変異型ALS遺伝子が順方向で挿入されていると判断された。なお、変異型ALS遺伝子が逆方向で挿入されている場合にはEco RI消化により当該変異型ALS遺伝子部分がpMLH7133-ALSから切り出されてしまうためDNA断片が増幅されず、PCR産物が検出されない。

【0111】

一方、シーケンスの決定は、pMLH7133-ALSを調製し、これを鋳型として変異ALS遺伝子の5'側とpMLH7133との接合領域について行った。なお、pMLH7133-ALSは、大腸菌内でのコピー数が少ないことから、従来の20倍量の培養液(2 mlの培養液20本分)からアルカリSDS法で調製した。その結果、変異ALS遺伝子は順方向で挿入されていると判断された。

【0112】

(2) アグロバクテリウム菌に対するバイナリーベクターの導入

上記(1)で得られたバイナリーベクター(pMLH 7133-ALS)を、以下のようにアグロバクテリウム菌に導入した。アグロバクテリウム菌としては、-80℃で保存しているAgrob

acterium tumefaciens EHA 105のコンピテントセルを氷中で溶かして使用した。Agrobacterium tumefaciens EHA 105のコンピテントセルを含む溶液に、pMLH 7133-ALSを加え、氷中で15分放置した後、37℃で5分間の熱ショックを加えた。その後、氷中に2分間放置し、続いて1 ml のSOC液体培地を加え、28℃で2～4時間ゆっくり振とうした。その後、遠心して上澄みの大部分を捨て、沈殿した菌体を、残った上澄みに懸濁させた。カナマイシンとハイグロマイシンとをそれぞれ50 ppm含有するLBプレート培地に、懸濁液を塗り広げ、28℃で2～3日インキュベートして、シングルコロニーを得た。

【0113】

(3) pMLH 7133-ALS導入アグロバクテリウム菌によるイネの形質転換

(2) で得られたアグロバクテリウム菌を、滅菌したミクロスパーテルで1/2さじ程度とり、表6に示したアセトシリンゴンを10 mg/lの濃度で加えた30 ml のAAM培地（ファルコンチューブ）によく懸濁した。

10

【0114】

【表6】

MgSO ₄ -7H ₂ O	250	CaCl ₂ -2H ₂ O	150	
NaH ₂ PO ₄ -2H ₂ O	150	KCl	3000	
Fe-EDTA	40	MnSO ₄ -6H ₂ O	10	20
ZnSO ₄ -7H ₂ O	2	CuSO ₄ -5H ₂ O	0.025	
CoCl ₂ -6H ₂ O	0.025	KI	0.75	
H ₃ BO	3	Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	0.25	
Myo-inositol	100	Nicotinic acid	1	
Pyridoxine-HCl	1	Thiamine-HCl	10	
Casamino acid	500	Glycine	7.5	
L-Arginine	176.7	L-Glutamine	900	30
L-Aspartic acid	300	Sucrose	68.5	
Glucose	36			
pH	5.2			

(数値はmg/l)

【0115】

このときアグロバクテリウム菌の塊が残らないようにパスツールピペットでよくピペッティングした。得られた懸濁液を9 cmシャーレに入れた。

40

【0116】

一方、日本晴の種子から誘導し、表7に示したN6D培地で前培養したカルスをステンレスメッシュ（あるいは茶こし）に入れ、メッシュごと1.5から2分間アグロバクテリウムの懸濁液につけた（このときカルス全体が菌液に浸るようにし、葉さじで穏やかにかき混ぜた）。その後、ステンレスメッシュを、滅菌したろ紙の上に置き、余分な菌液を除去した。このように処理されたカルスを、表8に示した2N6AS固形培地（アセトシリンゴン10 mg/l）に置床し（1シャーレに16カルス）、サージカルテープでシールして28℃、暗条件で2～3日間培養した（菌体がカルスをうっすら覆うように増殖するまで培養した）。

【0117】

50

【表 7】

CHUの粉	1袋	
Myo-inositol	100	
Nicotinic acid	0.5	
Pyridoxine-HCl	0.5	
Thiamine-HCl	1	10
2,4-D	2	
Casamino acid	300	
Glycine	2	
Proline	2827	
Sucrose	30000	
gelrite	4000	20
carbenicillin	500	
hygromycin	50	
pH	5.8	

(数値はmg/l)		

【0118】

30

【表 8】

CHUの粉	1袋	
Myoinositol	100	
Nicotinic Acid	0.5	
Pyridoxine-HCl	0.5	
Thiamine-HCl	1	10
2,4-D	2	
Casamino acid	300	
Glycine	2	
Sucrose	30g	
Glucose	10 g	
Gelrite	4000	
acetosyringone	10	20
pH	5.2	

(数値はmg/l)

【0119】

3日間の共存培養でカルスにうっすら菌体がかぶるくらいになった時点で、次の方法でカルスを洗浄し、アグロバクテリウム菌を除去した。上述のように処理されたカルスをステンレスメッシュ（あるいは茶こし）に入れ、メッシュごとN6D液体培地（カルベニシリンを500mg/lを含む）に浸し、当該培地が白濁しなくなるまでシャーレを交換した。この処理によって、カルスに付着したアグロバクテリウム菌を洗い流した。その後、メッシュを滅菌したろ紙の上に乗せて、余分な水分を除去した。このカルスをN6D固形培地（500mg/lのカルベニシリンと50mg/lのハイグロマイシンを含む）に置床して、28℃、明所で2～3週間培養した。なお、この操作の後、アグロバクテリウムが再び増殖する場合には、同様に再び洗浄して新しい培地に置床した。

【0120】

28℃、明所で2～3週間の培養により選抜した後、カルスを再分化培地（250mg/lのカルベニシリンと50mg/lのハイグロマイシンを含む）に1シャーレにつき9カルスずつ移植し、28℃、明条件で2～3週間培養した。カルスから茎葉部と根部がそれぞれ1cm以上分化した時点で、ホルモンフリー培地（50 mg/l のハイグロマイシンを含む）に1シャーレにつき2～3カルスとなるように移植した。この後、得られた植物体がシャーレいっぱい広がった時点で、培養土（ボンソル）に鉢上げし、馴化させた。なお、移植の時には、根に付着している培地は水中で完全に洗い落とした。以上の操作フローを図34に示した。

【0121】

一方、上述した鉢上げをする時点で、再分化していないカルスの一部（9株）（図35）を、実施例1で使用したbispyribac-sodium抵抗性カルス作出用の個体培地で継代培養した。なお、この個体培地には10 μMのbispyribac-sodiumを含有している。その結果、9株の内6つが正常に増殖した。そこで、正常に増殖したbispyribac-sodium抵抗性を示すカル

ス6株の1つについて、液体培養を行い、bispyribac-sodiumに対する薬剤感受性を詳しく調べた。その結果、図36に示すように、2点変異型遺伝子の由来株であるbispyribac-sodium抵抗性のSr系統株とほぼ同様に、bispyribac-sodium抵抗性を示した。なお、図37に示すように、野生型イネ（日本晴）のカルスにおいては、bispyribac-sodium感受性を示した。このことから、10 μ Mのbispyribac-sodium含有固体培地で生育した6株は総べて強いbispyribac-sodium抵抗性を有すると判断された。

【0122】

一方、これらのbispyribac-sodium抵抗性のカルスから、QIAGEN社のDNeasy Plant Kitを用いてゲノムDNAを調製して、これを鋳型として、2点変異部分を挟むセンスプライマー(3-1-4：配列番号9)とアンチセンスプライマー(4-83-3：配列番号8)のセットでPCRを行った。その結果、図38に示すように、予想されるDNA断片が増幅した。増幅したDNA断片を精製後、塩基配列を調べた（センス鎖を読むのにはプライマー（3-1-4：配列番号9）、アンチセンス鎖を読むのにはプライマー（ALS-Rsp2：5'-AGTCCTGCCATCACCATCCAG-3'：配列番号11）を用いた。

【0123】

ALSタンパク質における548番目のアミノ酸をコードする塩基配列周辺の解析結果を図39A及びBに示す。また、ALSタンパク質における627番目のアミノ酸をコードする塩基配列周辺の解析結果を図39C及びDに示す。これら図39A～Dに示すように、これらの株の2点変異部位には野生型と変異型のヘテロな配列が認められた。したがって、変異型ALS遺伝子がゲノム中に組み込まれていることが確認された。なお、9株の内3つにおいては10 μ M bispyribac-sodium存在下で生育が悪かったが、これは導入された2点変異型ALS遺伝子の発現量が低いためと考えられた。

【0124】

他方、鉢上げしたハイグロマイシン抵抗性の形質転換イネ約80株の中で5葉期の段階で正常に生育しているものは、変異型ALS遺伝子を導入したもので27個体、野生型ALS遺伝子を導入したもので46個体であった。野生型ALS遺伝子を導入したものの方が変異型ALS遺伝子を導入したものよりも健全に生育している傾向にあった。この時点で、変異型ALS遺伝子導入の4株及び野生型ALS遺伝子導入の5株を適当に選別して、1 kg a.i./haのbispyribac-sodium塩を、0.2%サーファクタントKを添加して茎葉部に散布した。その後、約40日後に生育調査を行った結果を図40に示す。なお、図40中、Aの草丈は約90 cmであった。

【0125】

図40より変異型ALS遺伝子を導入した1個体がほぼ正常に生育（A）し、この株がbispyribac-sodium抵抗性であることが判明した。このbispyribac-sodium抵抗性の形質転換イネからゲノムDNAをQIAGEN社のDNeasy Plant Kitにより調製し、2点変異部分を挟むセンスプライマー(3-1-4：配列番号9)とアンチセンスプライマー(4-83-3：配列番号8)のセットでPCRを行い得られたDNA断片の塩基配列を、上述したカルスの場合と同じ方法で調べた。その結果、この形質転換イネには2点変異が存在していることが確認された。

【0126】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書に取り入れるものとする。

【0127】

[産業上の利用の可能性]

以上、詳細に示したように、本発明よれば、あらゆる薬剤に対して優れた抵抗性を有するとともに、PC系除草剤に対して極めて高度な抵抗性を示すALS酵素をコードするALS遺伝子を提供することができる。

【0128】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KUMIAI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD

National Institute of Agrobiological Sciences

10

20

30

40

50

<120> A gene coding for aceto-lactate-synthetase

<130> P03-0026

<150> JP 2000-362630

<151> 2000-11-29

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 644

<212> PRT

<213> Oryza sativa var.Kinmaze

10

<400> 1

Met Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ser Ala Ala Ala
1 5 10 15

Thr Ala Lys Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Leu Pro
20 25 30

Ala Arg Gly Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser
35 40 45

Pro Val Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro
50 55 60

Trp Gly Pro Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala
65 70 75 80

Leu Glu Arg Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala
85 90 95

Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn
100 105 110

His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr
115 120 125

Ala Arg Ala Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro
130 135 140

Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser
145 150 155 160

Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly
165 170 175

Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile
180 185 190

Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val
195 200 205

Ile Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val
210 215 220

Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val
225 230 235 240

Trp Asp Thr Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys
245 250 255

Pro Pro Ala Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu
260 265 270

Ser Arg Arg Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly
275 280 285

Asp Glu Leu Arg Trp Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr
290 295 300

Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu

20

30

40

50

40

50

ccttcccgtc cgaggccggg tgggggcggc ggcggtcagg tgctcggcgg tgtccccggg 180
 caccgcccg tccccggcgc cgcggccac gccgtccgg ccgtgggggc cggccgagcc 240
 ccgcaagggc gcgacatcc tcgtggaggc gctggagcgg tgcggcgtca gcgacgtgtt 300
 cgcctacccg ggcggcgcgt ccatggagat ccaccaggcg ctgacgcgt ccccggtcat 360
 caccaaccac ctcttccgcc acgagcaggc cgaggcgttc gcggcgtccg ggtacgcgcg 420
 cgcgtccggc cgcgtcgggg tctgcgtcgc cacctccggc cccggggcaa ccaacctcgt 480
 gtccgcgtc gccgacgcgc tgctcgactc cgtcccgatg gtcgcatca cgggccagggt 540
 cccccggcgc atgatcggca ccgacgcctt ccaggagacg cccatagtcg aggtcacccg 600
 ctccatcacc aagcacaatt accttgcct tgatgtggag gacatcccc gcgtcataca 660
 ggaagccttc ttctcgcgt cctcgggcgc tctggcccgc gtgctggtcg acatcccaa 720
 ggacatccag cagcagatgg ccgtgccggc ctgggacacc tcgatgaatc taccagggtta 780
 catcgcacgc ctgcccgaag caccgcgac agaattgctt gagcaggctt tgcgtctggt 840
 tggcgagtca cggcgccccg ttctctatgt cgggtggtgc tgctctgcat ctggtgacga 900
 attgcgtggt tttgttgagc tgactggtat ccagttaca accactctga tgggcctcgg 960
 caatttcccc agtgacgacc cgttgcctt gcgcatgctt gggatgcatg gcacggtgta 1020
 cgcaattat gccgtggata aggtgacct gttgcttgcg tttggtgtgc ggtttgatga 1080
 tcgtgtgaca gggaaaattg aggttttgc aagcagggcc aagattgtgc acattgacat 1140
 tgatccagca gagattggaa agaacaagca accacatgtg tcaatttgcg cagatgttaa 1200
 gcttgcttta cagggttga atgctctgct acaacagagc acaacaaaga caagtctga 1260
 ttttagtgca tggcacaatg agttggacca gcagaaggagg gagtttctc tggggtacaa 1320
 aacttttggg gaagagatcc caccgcaata tgccattcag gtgctggatg agctgacgaa 1380
 aggtgaggca atcatcgcta ctggtgttgg gcagcaccag atgtgggcgg cacaatatta 1440
 cacctacaag cggccacggc agtggctgtc ttccgctggt ctgggcgcaa tgggatttgg 1500
 gctgcctgct gcagctggtg cttctgtggc taaccagggt gtcacagttg ttgatattga 1560
 tggggatggt agcttccctc tgaacattca ggagctggca ttgatccgca ttgagaacct 1620
 ccctgtgaag gtgatggtgt tgaacaacca acatttgggt atggtggtgc aattggagga 1680
 taggttttac aaggcgaata gggcgcatat atacttgggc aaccgggaat gtgagagcga 1740
 gatatacca gattttgtga ctattgctaa ggggttcaat attcctgcag tccgtgtaac 1800
 aaagaagagt gaagtccgtg ccgccatcaa gaagatgctc gagactccag ggccatactt 1860
 gttggatata atcgtccgc accaggagca tgtgctgcct atgatccaa tttggggcgc 1920
 attcaaggac atgacctgg atggtgatgg caggactgtg tattaatcta taatctgtat 1980
 gttggcaaaag caccagcccg gcctatgttt gacctgaatg acccataaag agtggatatgc 2040
 ctatgatgtt tgtatgtgct ctatcaataa ctaagggtgc aactatgaac catatgctct 2100
 tctgttttac ttgtttgatg tgcttggcat ggtaatccta attagcttcc tgctgtctag 2160
 gttttagtg tggtgttttc ttaggcata tgcatacaa gatatcatgt aagtttcttg 2220
 tctacatat caataataag agaataaagt acttctatgt aaaaaaaaa aaaaaaaaa 2279

10

20

30

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3

CATCACCAAC CACCTCTT

18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

50

<400> 4		
ACACGGACTG CAGGAATA	18	
<210> 5		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:primer		
<400> 5		
TTACAAGGCG AATAGGGC	18	10
<210> 6		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:primer		
<400> 6		
GGAAACAGCT ATGACCATG	19	
<210> 7		
<211> 21		20
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:primer		
<400> 7		
GCTCTGCTAC AACAGAGCAC A	21	
<210> 8		
<211> 17		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		30
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:primer		
<400> 8		
GCTTTGCCAA CATAAG	17	
<210> 9		
<211> 17		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:primer		40
<400> 9		
AGGTGTCACA GTTGTTG	17	
<210> 10		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:primer		
<400> 10		
GCATCTTCTT GAATGGCG	18	50

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer
 <400> 11
 AGTCCTGCCA TCACCATCCA G 21
 <210> 12
 <211> 644 10
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa
 <400> 12
 Met Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ser Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Thr Ala Lys Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Leu Pro
 20 25 30
 Ala Arg Gly Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser
 35 40 45
 Pro Val Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro 20
 50 55 60
 Trp Gly Pro Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala
 65 70 75 80
 Leu Glu Arg Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala
 85 90 95
 Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn
 100 105 110
 His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr
 115 120 125
 Ala Arg Ala Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro 30
 130 135 140
 Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser
 145 150 155 160
 Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly
 165 170 175
 Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile
 180 185 190
 Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val
 195 200 205
 Ile Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val 40
 210 215 220
 Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val
 225 230 235 240
 Trp Asp Thr Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys
 245 250 255
 Pro Pro Ala Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu
 260 265 270
 Ser Arg Arg Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly
 275 280 285
 Asp Glu Leu Arg Trp Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr 50

290 295 300
 Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu
 305 310 315 320
 Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp
 325 330 335
 Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val
 340 345 350
 Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile
 355 360 365
 Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser
 370 375 380
 Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu
 385 390 395 400
 Gln Gln Ser Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn
 405 410 415
 Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe
 420 425 430
 Gly Glu Glu Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu
 435 440 445
 Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met
 450 455 460
 Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser
 465 470 475 480
 Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly
 485 490 495
 Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp
 500 505 510
 Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu
 515 520 525
 Asn Leu Pro Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met
 530 535 540
 Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr
 545 550 555 560
 Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val
 565 570 575
 Thr Ile Ala Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys
 580 585 590
 Ser Glu Val Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro
 595 600 605
 Tyr Leu Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met
 610 615 620
 Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly
 625 630 635 640
 Arg Thr Val Tyr

10

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、変異型ALSタンパク質のアミノ酸配列及び野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列を比較した図である。

【図2】 図2は、変異型ALS遺伝子の塩基配列及び野生型ALS遺伝子の塩基配列を比較した図である。

【図3】 図3は、抵抗性変異株のbispyribac-sodiumに対する感受性を示す特性図であ

50

る。

【図 4】 図 4 は、野生株のbispyribac-sodiumに対する感受性を示す特性図である。

【図 5】 図 5 は、野生株のchlorsulfuronに対する感受性を示す特性図である。

【図 6】 図 6 は、抵抗性変異株のchlorsulfuronに対する感受性を示す特性図である。

【図 7】 図 7 は、野生株から抽出したALSタンパク質粗酵素の陰イオンクロマトグラムを示す特性図である。

【図 8】 図 8 は、野生型ALSタンパク質及び変異型タンパク質におけるbispyribac-sodiumに対する感受性を示す特性図である。

【図 9】 図 9 は、野生型ALSタンパク質及び変異型タンパク質におけるchlorsulfuronに対する感受性を示す特性図である。

10

【図 10】 図 10 は、野生型ALSタンパク質及び変異型タンパク質におけるimazaquinに対する感受性を示す特性図である。

【図 11】 図 11 は、日本晴ESTとトモロコシALS遺伝子の塩基配列を比較した図である

【図 12】 図 12 は、実施例 4 で得られた粗酵素溶液におけるbispyribac-sodiumに対する感受性を示す特性図である。

【図 13】 図 13 は、実施例 4 で得られた粗酵素溶液におけるchlorsulfuronに対する感受性を示す特性図である。

【図 14】 図 14 は、実施例 4 で得られた粗酵素溶液におけるpyrithiobac-sodiumに対する感受性を示す特性図である。

【図 15】 図 15 は、実施例 4 で得られた粗酵素溶液におけるpyriminobacに対する感受性を示す特性図である。

20

【図 16】 図 16 は、実施例 4 で得られた粗酵素溶液におけるbensulfuron-methylに対する感受性を示す特性図である。

【図 17】 図 17 は、実施例 4 で得られた粗酵素溶液におけるpyrazosulfuron-ethylに対する感受性を示す特性図である。

【図 18】 図 18 は、実施例 4 で得られた粗酵素溶液におけるimazosulfuronに対する感受性を示す特性図である。

【図 19】 図 19 は、実施例 4 で得られた粗酵素溶液におけるImazaquinに対する感受性を示す特性図である。

【図 20】 図 20 は、実施例 4 で得られた粗酵素溶液におけるImazapyrに対する感受性を示す特性図である。

30

【図 21】 図 21 は、実施例 4 で得られた野生型の粗酵素溶液、GST-ALS及びALSタンパク質のbispyribac-sodiumに対する感受性を示す特性図である。

【図 22】 図 22 は、実施例 4 で得られた変異型の粗酵素溶液及びGST-ALSのbispyribac-sodiumに対する感受性を示す特性図である。

【図 23】 図 23 は、実施例 4 で得られた変異型の粗酵素溶液及びGST-ALSのchlorsulfuronに対する感受性を示す特性図である。

【図 24】 図 24 は、実施例 4 で得られた変異型の粗酵素溶液及びGST-ALSのImazaquinに対する感受性を示す特性図である。

【図 25】 図 25 は、W548L変異のみを有するALS遺伝子の作製法を示す概念図である。

40

【図 26】 図 26 は、図 25 の続きであり、W548L変異のみを有するALS遺伝子の作製法を示す概念図である。

【図 27】 図 27 は、実施例 6 (2) で得られた粗酵素溶液におけるbispyribac-sodiumに対する感受性を示す特性図である。

【図 28】 図 28 は、実施例 6 (2) で得られた粗酵素溶液におけるchlorsulfuronに対する感受性を示す特性図である。

【図 29】 図 29 は、実施例 6 (2) で得られた粗酵素溶液におけるimazaquinに対する感受性を示す特性図である。

【図 30】 図 30 は、実施例 7 で作製したバイナリーベクターの作製法を示す概念図である。

50

【図 3 1】 図 3 1 は、大腸菌 (JM 109) のシングルコロニーから単離したプラスミド中のALS遺伝子インサートの確認した電気泳動写真であり、レーン1はλ Hind III/100 bp DNAマーカー、レーン2は変異型ALS遺伝子を保持するpMLH 7133で形質転換した大腸菌由来プラスミド、レーン3は野性型ALS遺伝子を保持するpMLH 7133で形質転換した大腸菌由来プラスミド、レーン4はGUS遺伝子 (対照区) を保持するpMLH 7133であり、矢印はインサートDNAを指し示している。

【図 3 2】 図 3 2 は、プラスミドDNAを鋳型としたPCRの結果を示す電気泳動写真であり、レーン1はλ Hind III/100 bp DNAマーカー、レーン2及び5は野性型ALS遺伝子を保持するpBI 121プラスミド (対照区)、レーン3及び6は変異型ALS遺伝子を保持すると考えられるpMLH 7133、レーン4及び7は野性型ALS遺伝子を保持すると考えられるpMLH 7133であり、矢印はPCR産物を指し示している。

10

【図 3 3】 図 3 3 は、ALS遺伝子のインサート方向を確認した結果を示す電気泳動写真であり、レーン1はλ Hind III/100 bp DNAマーカー、レーン2は変異型ALS遺伝子を保持するpMLH 7133、レーン3は野性型ALS遺伝子を保持するpMLH 7133、レーン4はGUS遺伝子を保持するpMLH 7133 (対照区) であり、矢印はPCR産物を指し示している。

【図 3 4】 図 3 4 は、アグロバクテリウム菌を用いたイネ (日本晴) の形質転換方法を示すフローチャートである。

【図 3 5】 図 3 5 は、カルスから再分化中にあるイネ (日本晴) の写真である。

【図 3 6】 図 3 6 は、変異型ALS遺伝子で形質転換したイネ (日本晴) カルスのbispyribac-sodium感受性を示す特性図である。

20

【図 3 7】 図 3 7 は、野性型イネ (日本晴) カルスのbispyribac-sodium感受性を示す特性図である。

【図 3 8】 図 3 8 は、形質転換カルスから調製したゲノムDNAを鋳型にして行ったPCRの結果を示す電気泳動写真であり、レーン1はλ Hind III/100 bp DNAマーカー、レーン2～7はそれぞれ異なるカルス由来のゲノムDNAを鋳型とした場合のPCR結果であり、矢印はPCR産物を指し示している。

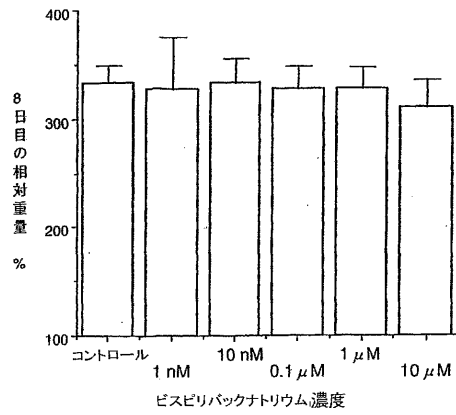
【図 3 9】 図 3 9 は、形質転換カルスから調製したゲノムDNAを鋳型にして行ったPCRの結果、得られたPCR産物のシークエンスを行った結果を示す特性図であり、Aはセンスプライマー (3-1-4) による548番目周辺の解析結果、Bはアンチセンスプライマー (ALS-Rsp2) による548番目周辺の解析結果、Cはセンスプライマー (3-1-4) による627番目周辺の解析結果、Dはアンチセンスプライマー (ALS-Rsp2) による627番目周辺の解析結果を示している。

30

【図 4 0】 図 4 0 は、変異型ALS遺伝子で形質転換したイネ (日本晴) のbispyribac-sodium感受性を測定した結果を示す写真であり、Aは変異型ALS遺伝子で形質転換したイネ、Bは野性型ALS遺伝子で形質転換したイネを示している。

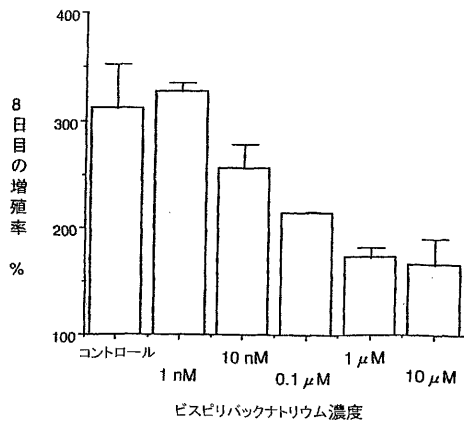
【図 3】

図 3



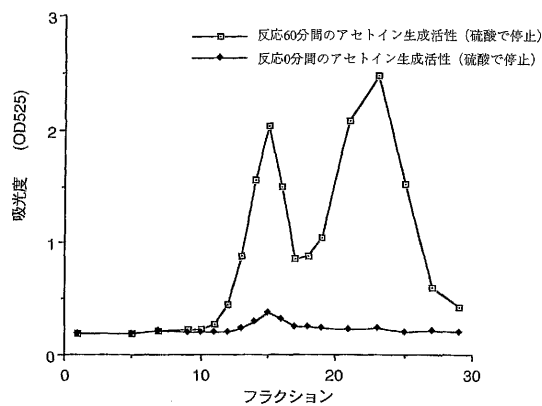
【図 4】

図 4



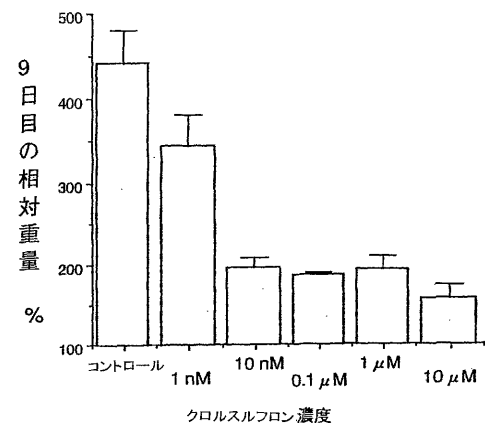
【図 7】

図 7



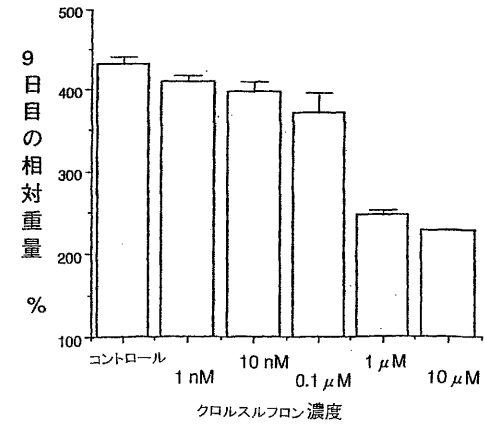
【図 5】

図 5



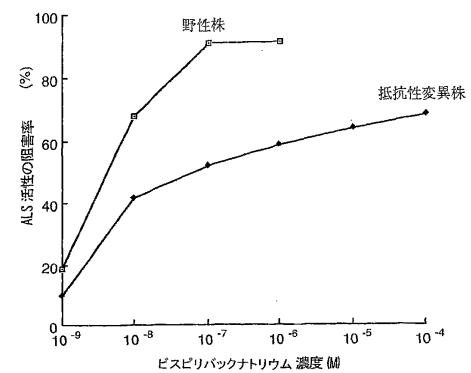
【図 6】

図 6



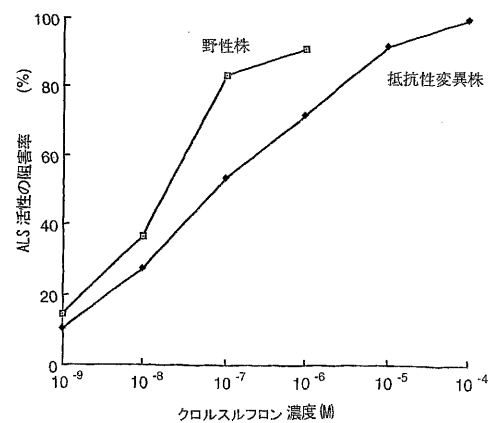
【図 8】

図 8



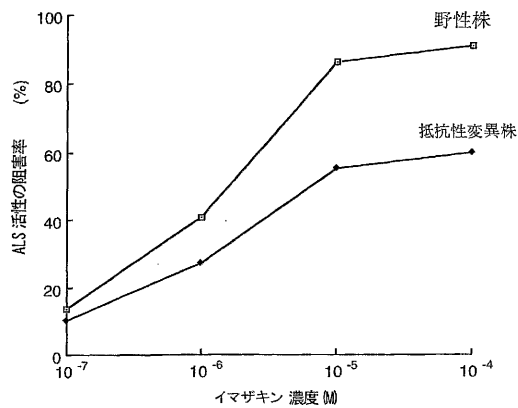
【図 9】

図 9



【図 10】

図 10



【図 11】

図 11

一列目塩基配列
ファイル名 : 日本晴 ALS 部分 cDNA
配列の長さ : 1505

二列目塩基配列
ファイル名 : X63554 トウモロコシ ALS 1
配列の長さ : 2544

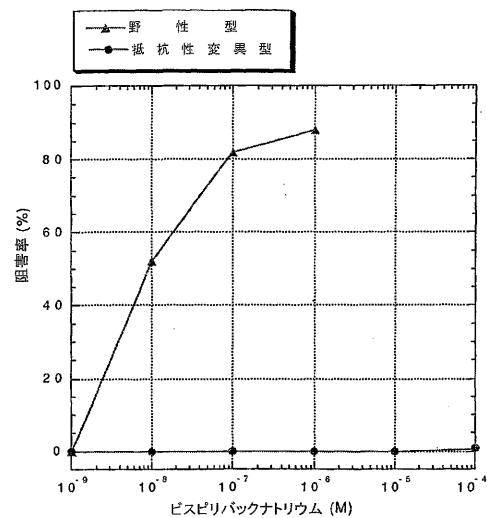
1' ACCCACGCTCGATGTGGAGGA
1141' CATCTGAGGTACCCGCTCATCACAAGCAACACTACCTGCTCTGAGCTGAGGA
24' CATCCCCGGGTATACAGGAAGCCTTCTTCTCGGCTCTGCGCCGCTCTGCGCCGCT
1201' CATCCCCGCGCTGTCAGAGAGCCTTCTTCTCGCATCTCTGCTGCGCCGCGCCGCT
84' GCTGCTGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGCGCGTCTGCGCCGCTCTGCGCCGCT
1261' GCTTGTGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGCGCGTCTGCGCCGCTCTGCGCCGCT
144' GATGAATCTACAGGGTACATGCGACGCTGCGCCAGCAGCAGCAGATGCTTGA
1321' CATGAGTCTGCTGCGTACATGCGCGCTTCCCAAGCCTCCGCGACTGAATTTCTGA
204' GCAGGTCTTGGCTCTGCTGCTGCGAGTACGCGCGCCGCTTCTCTATGCTGCGTGGCTG
1381' GCAGGTCTGCTGCTGCTGCTGCGAGTACGCGCGCCGCTTCTTATGCTGCGTGGCTG
264' CTCTGATCTGCTGACGAATTTGCGCTGCTTGTGAGCTGACTGATCTCCGATGACAAC
1441' TGCAGCATGAGTGGAGGTTGCTGCGCTTGTGGAGTGAATGGAATCCAGTCAACAAC
324' CACTCTGATGCGCTGCGCAATTTCCCAAGTACGAGCCGCTTGTCTGCGCATGCTTGG
1501' TACTCTTATGCGCTTGGCAACTTCCCAAGTACGAGCCGCTTGTCTGCGCATGCTTGG
384' GATGATGCGCAGTGTACGCAATTTAGCGCTGATGAGGCTGAGCTTGTCTGCGCTT
1561' TATGATGCGCAGTGTATGCAATTTAGCAGTGTATGAGGCTGATGCTGCTGCTGCTT
444' TGGTGTGCGGTTTGTATGCTGCTGACAGGGAATTTGAGGCTTTTGAAGCAGGCGCA
1621' TGGTGTGCGGTTTGTATGCTGCTGACAGGGAATTTGAGGCTTTTGAAGCAGGCGCA
504' GATTGTGACATTGACATTGATCCAGCAGAGATGGAAGAACAAGCAACCATGCTGTC
1681' GATTGTGACATTGATATTGATCTGCTGAGATTGCAAGAACAAGCAGCAGATGCTGTC
564' AATTTGCGCAGTGTAAAGCTTGTCTTACAGGCTTGAATGCTGCTGCAACAGAGCAC
1741' CATCTGTCAGATGTTAAGCTTGTCTTGCAGGCGATGAATCTCTGGAAGGAAGCAC

【図 11-1】

624' AACAAAGACAAGTTCTGATTTTGTGCTGCGCAATGAGTTGGACAGCAGAGAGGA
1801' ATCAAAGAAGAGCTTTGACTTGGCTCATGGCATGATGAATGGATCAGCAAGAGAGGA
684' GTTCTCTGCGGTACAAAACCTTTTGTGAAGAGATCCACCGCAATATGCCATTGAGT
1861' GTTCTCTGCGGTACAAAACCTTTTGTGAAGAGATCCACCGCAATATGCCATTGAGT
744' GCTGATGAGCTGACGAAAGGTGAGGCAATCATGCTACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
1921' TCTTGTGAGTTGACGAAAGGAGGAGGCAATCATGCTACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
804' GTGGGCGCACAATATTACACTTACAAGCGGCAAGGAGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
1981' GTGGGCGCACAATATTACACTTACAAGCGGCAAGGAGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
864' GGGGCAATGGGATTTGGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
2041' TGGGCTGATGGGATTTGGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
924' CACAGTTGTTGATTTGATGAGGAGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
2101' CACTGTTGTTGATCTGACGAGAGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
984' GATCGCAATTGAGAACCTCCCTGTGAAGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
2161' GATCGCAATTGAGAACCTCCCTGTGAAGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
1044' GGTGTCGAATGGGAGGATAGGTTTACAAGGCGAATAGGGGCGCATACATCTTGGGCA
2221' GGTGTCGAATGGGAGGATAGGTTTACAAGGCGAATAGGGGCGCATACATCTTGGGCA
1104' CCCGCAATGTGAGAGCGAGATATACAGATTTTGTGACCTATTGCTAAGGCGTTCAATA
2281' CCCAGAGAACGAAGTGAGATATACAGATTTTGTG-GCAATTGCTAAGGCGTTCAACA
1164' TTCCTGCAATGCTGTAACAAGAAGATGAAGTCCGTCGCGCATCAAGAAGATGCTCG
2340' TTCAGCAGTCCGTTGTGACAAGAAGAGCGAAGTCCATGACGCAATCAAGAAGATGCTTG
1224' AGACTCCAAGGCGCATACTTGTGATATCATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
2400' AGGCTCCAAGGCGCATACTTGTGATATCATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
1284' TGATCCCAAGTGGGCGCATCAAGGAGATGATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
2460' TGATCCCTAGTGGGCGCTTCAAGGATATGATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
1344' ATTAATCTATAATCTGTATGTTGGCAAGCAGGCGGCTATGTTGACCTGAATGA
2520' ATTGATCCGTTGACTGAGGCTGAC

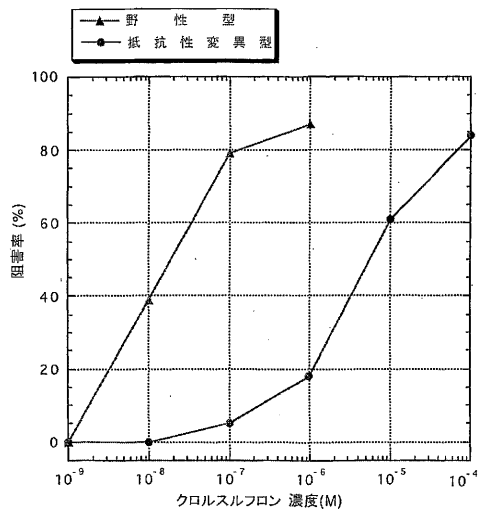
【図 12】

図 12



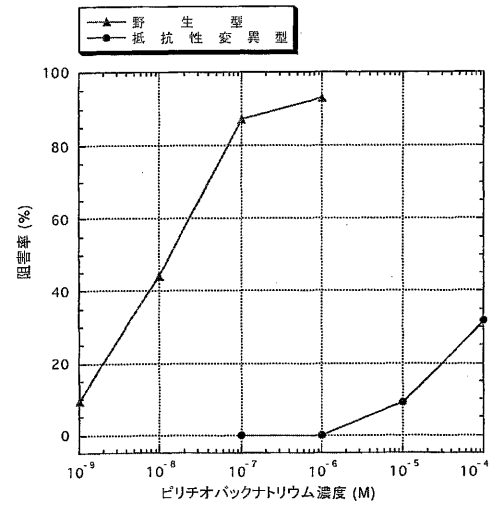
【図 13】

図 13



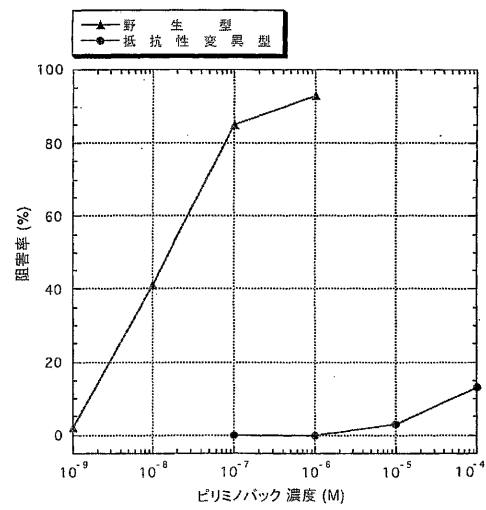
【図 14】

図 14



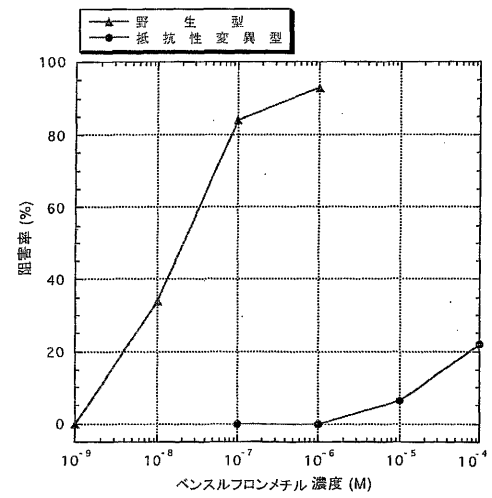
【図 15】

図 15



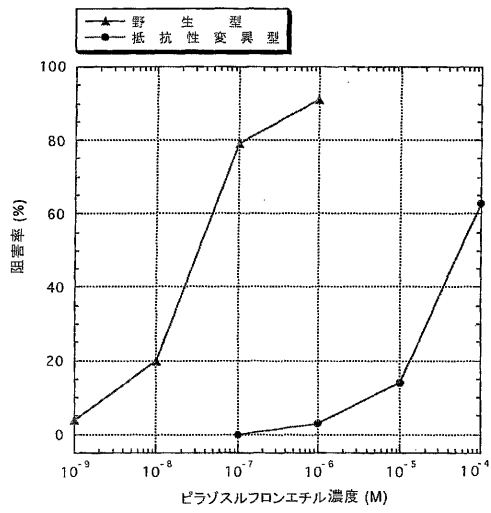
【図 16】

図 16



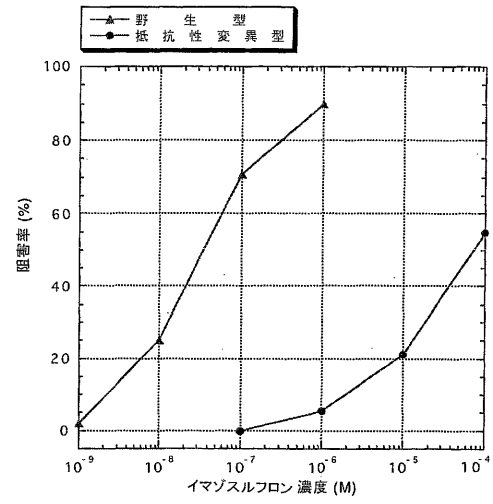
【図 17】

図 17



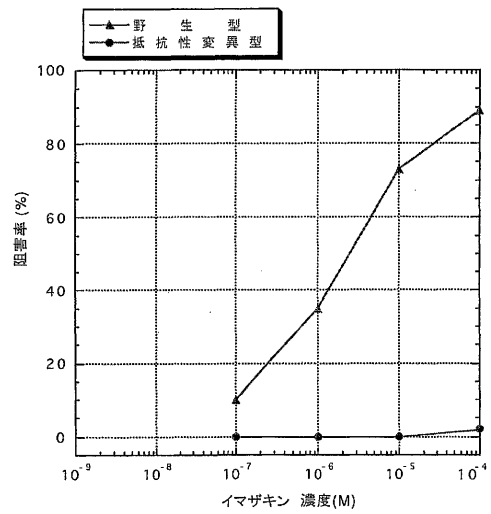
【図 18】

図 18



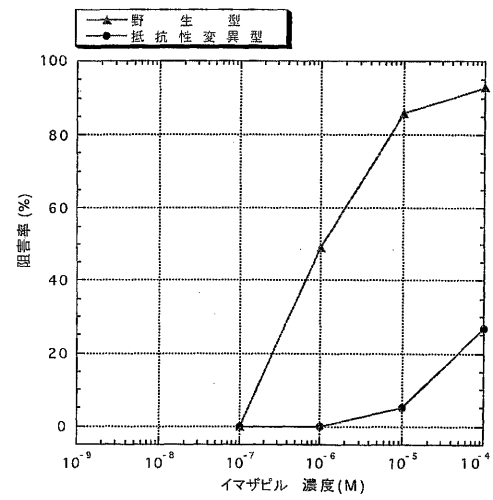
【図 19】

図 19



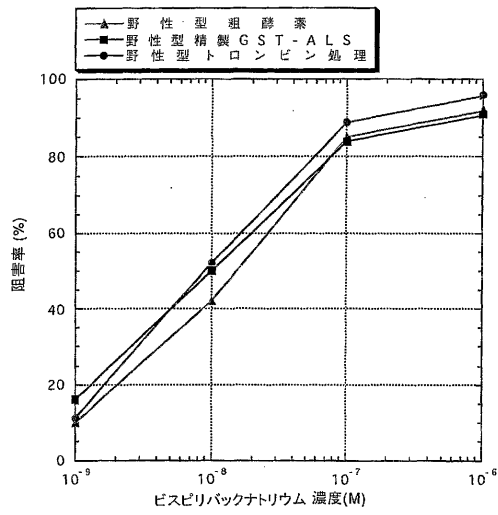
【図 20】

図 20



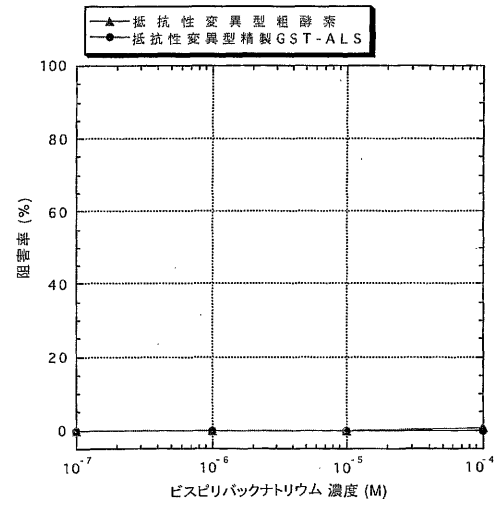
【図 2 1】

図 21



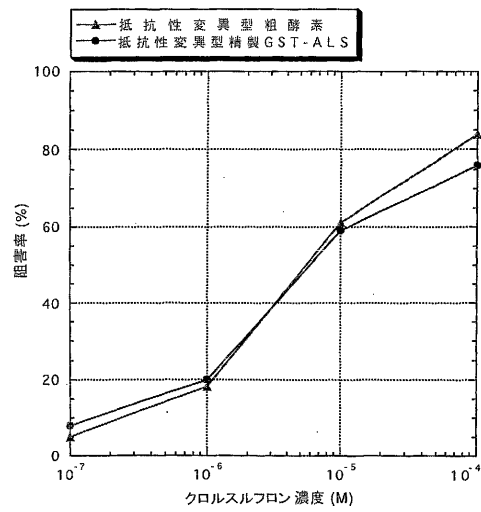
【図 2 2】

図 22



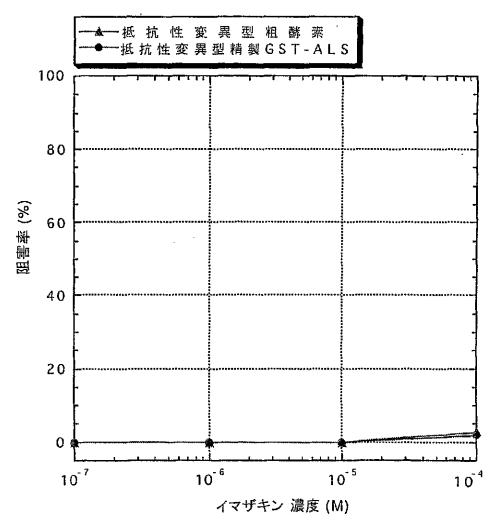
【図 2 3】

図 23



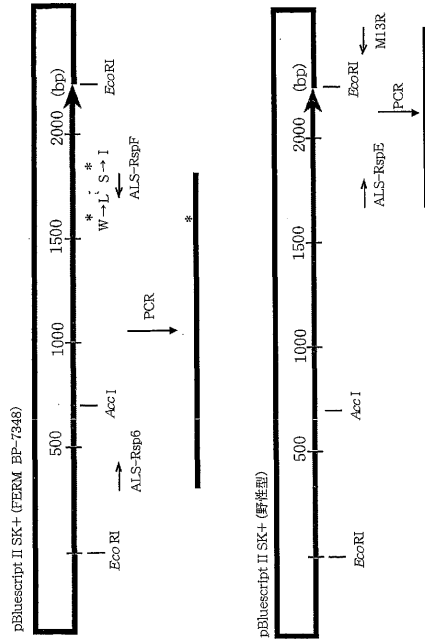
【図 2 4】

図 24



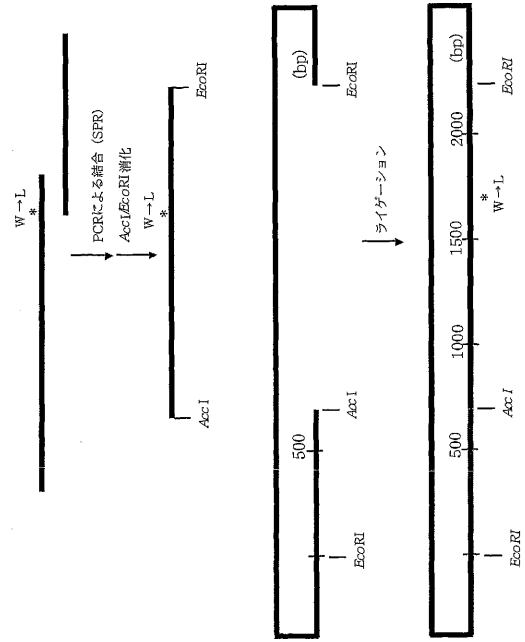
【図 25】

図 25



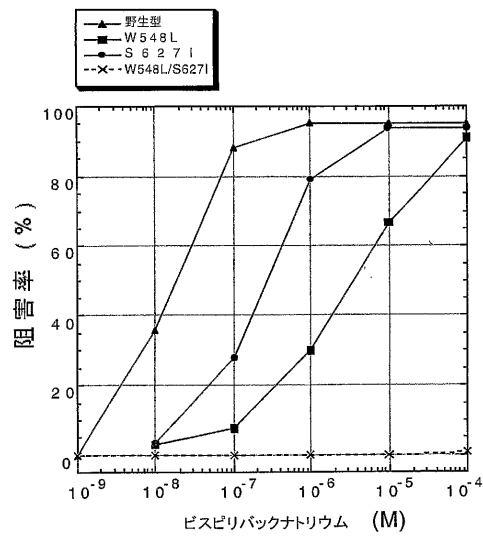
【図 26】

図 26



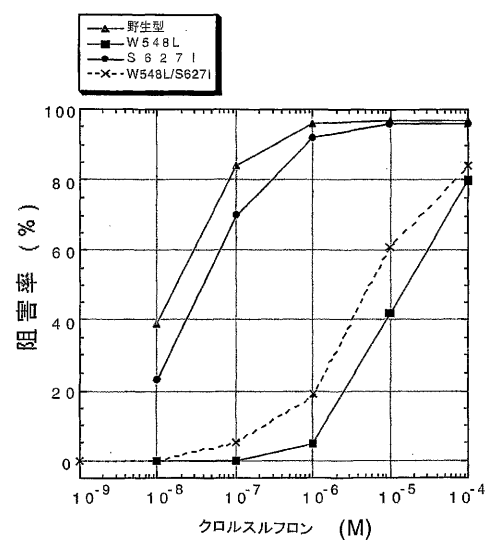
【図 27】

図 27



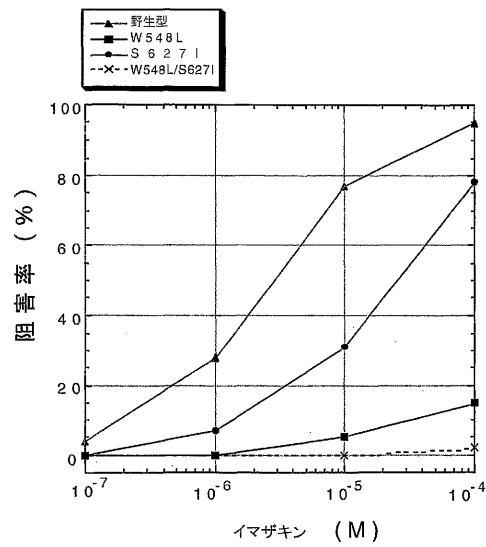
【図 28】

図 28

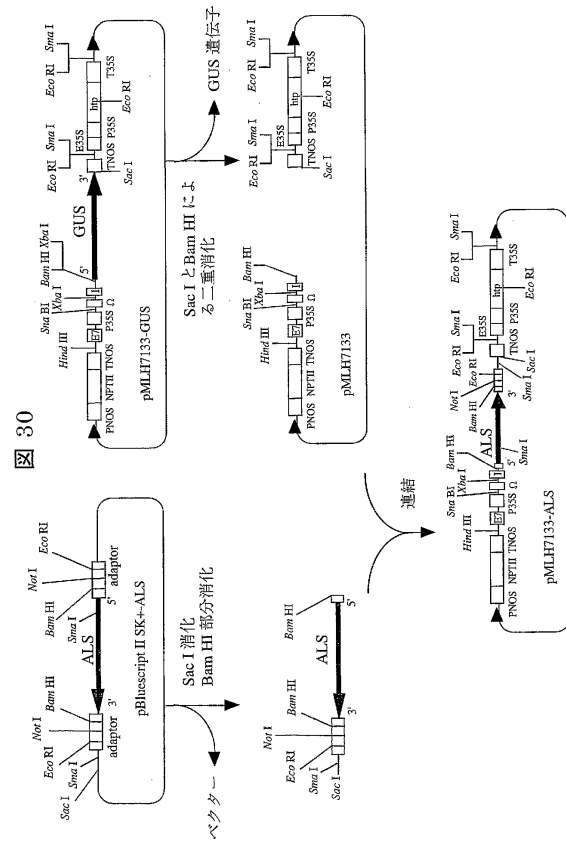


【図 29】

図 29

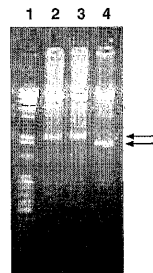


【図 30】



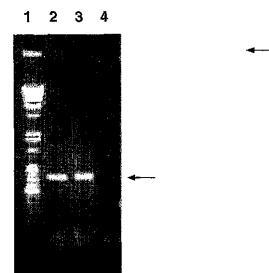
【図 31】

図 31



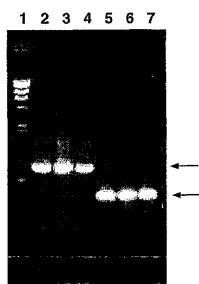
【図 33】

図 33



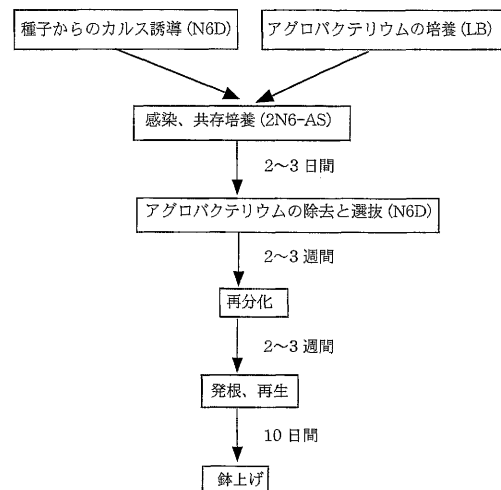
【図 32】

図 32



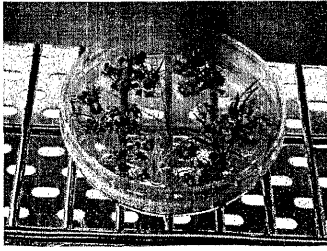
【図 34】

図 34



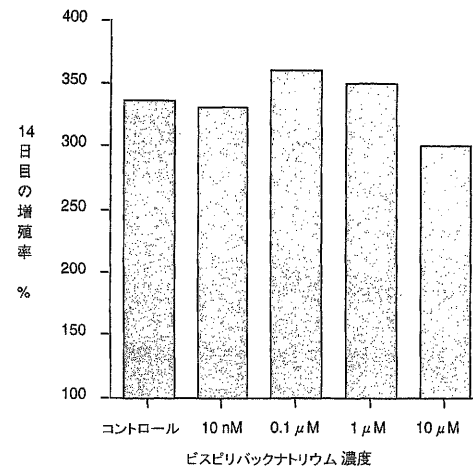
【図 3 5】

図 35



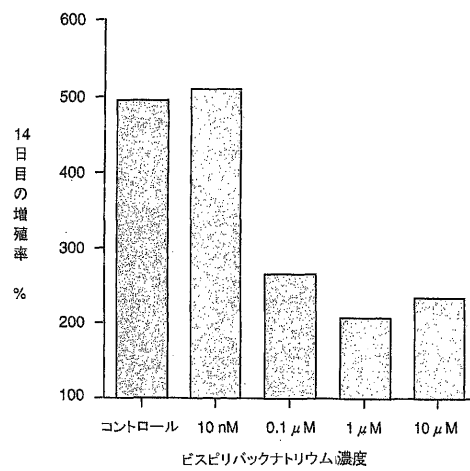
【図 3 6】

図 36



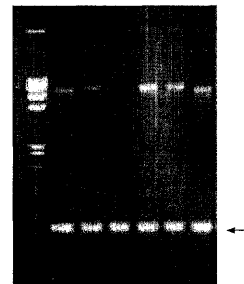
【図 3 7】

図 37

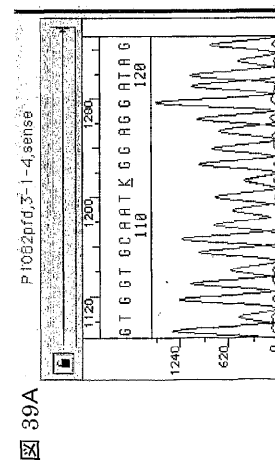


【図 3 8】

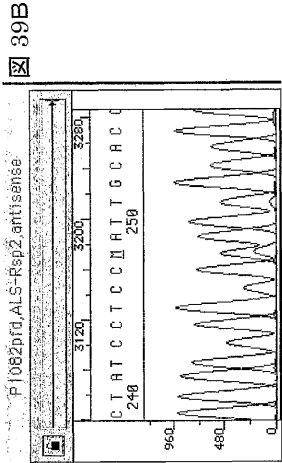
図 38



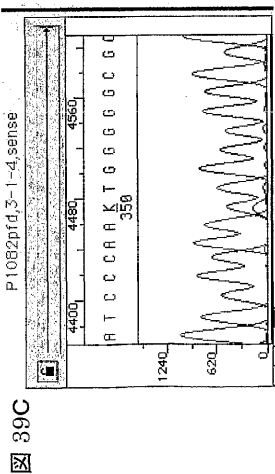
【図 3 9 A】



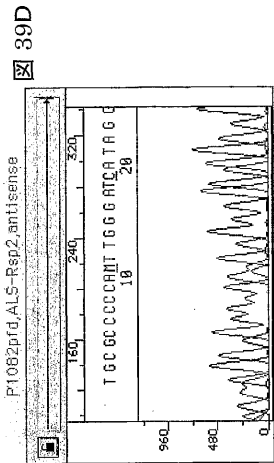
【図 39 B】



【図 39 C】

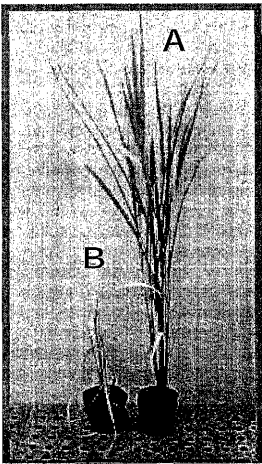


【図 39 D】



【図 40】

図 40



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 5/00 C
<i>C 1 2 N</i>	<i>9/88</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 9/88
<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/68</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 Q</i> 1/68 A

(72)発明者 永山 孝三
静岡県掛川市八坂 2 3 8 4 - 4

(72)発明者 福田 篤徳
茨城県つくば市吾妻 2 - 1 1 - 8 0 2 - 4 0 4

(72)発明者 田中 喜之
茨城県つくば市吾妻 2 - 3 - 2 - 7 0 8 - 3 0 5

(72)発明者 角 康一郎
静岡県磐田郡福田町蛭池 2 7 6 - 1

審査官 ▲高▼ 美葉子

(56)参考文献 国際公開第 0 0 / 0 2 7 1 8 2 (WO, A 1)
Journal of Biochemistry & Molecular Biology(2000 Jan.),Vol.33,No.1,p.1-36
Journal of Molecular Biology(1996),Vol.263,No.2,p.359-368
J. Biol. Chem.(1995)Vol.270,No.29,p.17381-17385
Mol. Gen. Genet.(1994),Vol.243,No.2,p.178-184

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
C12N 15/00
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq
BIOSIS/WPI(DIALOG)