

9427 耐塩性植物の遺伝子工学

助成研究者：村田 紀夫（岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所）

共同研究者：林 秀則（愛媛大学 理学部）

陸生植物の多くは塩や乾燥条件に弱く、塩濃度が 200 mM を越えると生育できなくなったり器官に損傷を生じたりする。しかし、海浜植物や乾燥地の植物には塩条件に対する耐性を備えているものも多く、これらの植物は糖類やアミノ酸等を蓄積したり、グリシンベタイン（以下ベタインと略記）を蓄積したりする。ベタインを蓄積する植物では、ベタインは葉緑体内に蓄積され、しかも光合成を高塩濃度下における失活から保護する作用を持っている。ベタインの生合成に関与する酵素系は生物によって単純なものから複雑なものまで種々知られている。本研究ではこの中で最も単純な系である土壌菌 *Arthrobacter globiformis* のコリンオキシダーゼの系を用いる。本研究では、このコリンオキシダーゼの遺伝子を塩に弱いラン藻（シアノバクテリア）*Synechococcus* と高等植物のシロイヌナズナに導入し、細胞質内あるいは葉緑体内に多量のベタインを合成させることによって植物が耐塩性を獲得する可能性を探ることを目的とする。

まず、土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* のコリンオキシダーゼのアミノ酸末端のアミノ酸配列を決定し、これをプライマーとし、*A. globiformis* のゲノム DNA を鋳型として 50 nt のポリヌクレオチドを作成した。これをプローブとして *A. globiformis* のゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングして、コリンオキシダーゼの遺伝子 (*codA*) をクローニングし、その塩基配列と推定アミノ酸配列を決定した。次に *codA* 遺伝子をベクタープラスミド pAM1044 に組み込み、これを用いてラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 を形質転換した。この際、*codA* 遺伝子はクロモソームの所定の位置に安定に組み込まれた。この形質転換株ではコリンオキシダーゼが生合成されるようになり、さらに 60~80 mM のベタインが蓄積することを観察した。形質転換株の耐塩性を、増殖速度、クロロフィルの蓄積、光合成活性で評価したところ、著しい増強が観察された。次に *codA* 遺伝子をベクタープラスミド pGAH に組み込み、アグロバクテリウムを介してシロイヌナズナを形質転換した。形質転換株の中に *codA* 遺伝子が発現し、コリンオキシダーゼを生合成し、ベタインを蓄積する系統株を得ることができた。この形質転換株を野生株と比較したところ、発芽および生長速度において、著しい耐塩性の増強が見られた。

本研究では、コリンオキシダーゼをシロイヌナズナとラン藻に導入し、耐塩性を増強することに成功した。今後は、重要な農作物であるイネやトウモロコシにコリンオキシダーゼ遺伝子を導入し、耐塩性を増強することを計画している。これらの農作物の耐塩性を増強することができれば、世界中の食料供給に大いに貢献することができる。

ナ (*Arabidopsis thaliana* WS 株) は基礎生物学研究所岡田清孝博士（現、京都大学理学部）より入手し、ムラシゲ&スクーグ植物培地用混合塩を含むゲランガム（和光純薬）のプレート上あるいはハイボネックスを含む水溶液またはバーミュキュライト中で、22℃、24時間明条件下、または16時間明/8時間暗条件下で生育させた。

2.2. コリンオキシダーゼ遺伝子の単離

シグマケミカル社より購入したコリンオキシダーゼ (*A. globiformis* より精製) のアミノ末端の21残基の部分アミノ配列を決定した。この配列をもとにプライマーを作成し、*A. globiformis*より抽出したDNAを鋳型として、PCR（ポリメラーゼ・チェイン反応）により50bpのポリヌクレオチドを作成した。得られたポリヌクレオチドの配列を決定したところ、コリンオキシダーゼの部分アミノ酸配列に対応するヌクレオチド配列であった。このポリヌクレオチドからプローブを作成し、*A. globiformis*のゲノムDNAライブラリーをスクリーニングして、コリンオキシダーゼ遺伝子 (*codA*) を単離した。

2.3. コリンオキシダーゼ遺伝子 (*codA*) のラン藻細胞への導入

遺伝子 *codA* を Texas A&M 大学の S. Goldon 博士より提供されたプラスミド pAM1044 に組み込み、プラスミド pAM1044/*codA* を作成した。これを *Synechococcus* に感染させ、*codA* 遺伝子を *Synechococcus* のクロモゾームに組み込んだ。*codA* 遺伝子がクロモゾームに組み込まれたことは、PCR分析により確認した。またその発現はコリンオキシダーゼに対して作成した抗体との反応により確認した。このようにして作成した形質転換株の細胞内におけるベタイン量は、プロトン-NMR法により定量した。

2.4. コリンオキシダーゼ遺伝子 (*codA*) のシロイヌナズナへの導入

遺伝子 *codA* にタバコの Rubisco 小サブユニットのトランジットペプチドをコードする約200bpのDNA断片を接続し、さらにバイナリーベクタープラスミド pBI 221 (Clonetech社) に由来するカリフラワーモザイクウィルスの35SプロモーターとNOSターミネーターを接続した。これを名古屋大学理学部の町田泰則博士から提供されたバイナリープラスミドベクター pGAH (カナマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子を含む) に挿入し (Figure 1)、凍結融解法によってTiプラスミドを保有するアグロバクテリウム (*A. tumefaciens* EHA101) に導入した。これをシロイヌナズナの胚軸切片から誘導したカルスに感染させ、除菌後、25mg/lのカナマイシン (Sigma Chemical社) と15mg/lのハイグロマイシン (和光純薬) を含むプレート上で生育させた。この条件下で形成される緑色のシュートを選別し、得られた形質転換体を発根させ、生長させ、その種子 (T2 個体) を得た。この種子から生育させた個体の種子 (T3 個体) の中から導入遺伝子に関してホモ接合体となっているものを選別した。形質転換体における *codA*

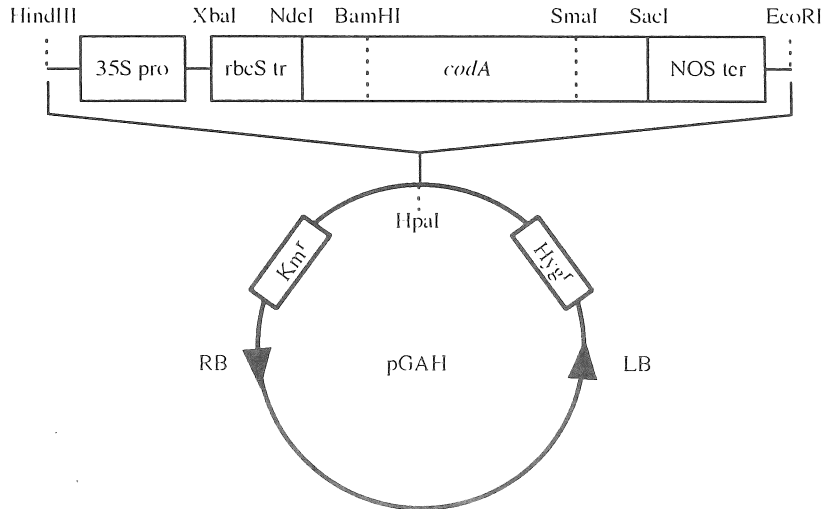


Figure 1. Construct of the binary vector plasmid, pGAH/codA, used for transformation of *Arabidopsis thaliana*

The gene encoding choline oxidase of *Arthrobacter globiformis* was ligated with the cDNA encoding the transit peptide of the Rubisco small subunit of *Nicotiana tabacum* and with cauliflower mosaic virus 35S promoter and nopaline synthase terminator both of which originate from a binary vector plasmid, pBI221. This construct was inserted into the HpaI site of another binary vector plasmid, pGAH, which contains two antibiotic-resistance genes, Km^r and Hyg^r. The resultant binary vector plasmid was designated pGAH/codA. *Agrobacterium* carrying the Ti plasmid was transformed with pGAH/codA and used for transformation of *Arabidopsis thaliana*.

Abbreviations; *codA*, the gene for choline oxidase of *A. globiformis*; *rbcS tr*, the transit signal of the tobacco Rubisco small subunit; 35S pro, cauliflower mosaic virus 35S promoter; NOS ter, nopaline synthase terminator; Km^r, kanamycin-resistance gene cartridge; Hyg^r, hygromycin-resistance gene cartridge; LB left border; RB right border.

遺伝子の発現は抗体との反応により検定した。また形質転換体の生葉に含まれるベタインはプロトン NMR によって検出した。

2.5. 耐塩性の評価

Synechococcus の形質転換株の耐塩性は、400 mM NaCl を含む培地中における生育速度、クロロフィルの生合成速度、光合成活性の増加により評価した。シロイヌナズナの形質転換体の耐塩性は 0~100 mM の NaCl を含むゲランガムのプレート上での種子の発芽と生育、および 0~200 mM の NaCl 中での水耕における生育によって評価した。

3. 研究結果

3.1. コリンオキシダーゼ遺伝子 (*codA*) のクローニング [2]

Arthrobacter globiformis のゲノム DNA を鋳型とし、コリンオキシダーゼのアミノ酸配列を基にして作成したオリゴヌクレオチドをプライマーとして、PCR により 50 bp よりなるポリヌクレオチドを取得した。これをプローブとして用いて *A. globiformis* ゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングして、プローブとハイブリダイズするプラスミドクローンを得た。これを制限酵素処理して、3.6 kbp の DNA 断片を得た。この中の 2.5 kbp について塩基配列を決定したところ、この中に 1,641 個の塩基配列よりなるコリンオキシダーゼの構造遺伝子が見つかった。このことからコリンオキシダーゼ（またはその前駆体）は 547 アミノ酸残基から構成されていることおよび推定分子量は 58,000 であることがわかった。Figure 2 に、コリンオキシダーゼの塩基配列と推定アミノ酸配列を示す。この推定アミノ酸配列のアミノ末端領域には、FAD-結合領域が存在することもわかった。

3.2. コリンオキシダーゼ遺伝子 (*codA*) によるラン藻の形質転換 [2]

遺伝子 *codA* を組み込んだプラスミド pAM1044/*codA* をラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 に導入し、生じた形質転換株を PAMCOD 株と命名した。これに対して *codA* 遺伝子を組み込んでいないプラスミド pAM1044 を導入した株（コントロール）を PAM 株と命名した。PCR により検定したところ、PAMCOD 株および PAM 株において、これらのプラスミド上の遺伝子が *Synechococcus* のクロモゾームの所定の位置に組み込まれていることを確認した。また、抗体反応によって、コリンオキシダーゼが PAMCOD 株では発現しているが、PAM では発現していないことを確認した。

ベタインは PAM 株では検出されなかったが、PAMCOD 株ではベタイン濃度は 60~80 mM であった。また、NaCl 濃度を 0~400 mM まで変化させても PAMCOD 株のベタイン濃度はほとんど変化しなかった。

-360 GGGAAATATCCGTCGTCGTAGACGACGCCCTTCGGCCCGTGTAAAGGTGGAGACCTTCCACACCGAGGACGAGGCCGTCCGGACCGCCAACG
 -270 ACACCAACTACGGGCTGTCCGGCGCGTCTGGACCCAGGACGCCGGCAAGACGCAGCGCTGGCCGGCCGGCTGCGACACGGCACCCGTC
 -180 TGGATCAACGACTTCCACCCCTACTCTCCACAGACCGAGTGGGGCGCTTCGGCCAGTCCGGCGTCCGGCCGAACTCGGCCCGACCCGGC
 -90 CTGGCCGAGTACCAGGAGCCAAAGCACATCTACCAGAACCACGCCCGCAGGTCCCGGCTGGTTCGCTGACCACGGCAAGGAACTAG

1 ATGCACATCGACCAACATCGAGAACTGAGCGACAGGGAGTTCGACTACATCGTTCGCGCGCGGGTCCGCCGGGGCCCGCTCGCCCGC
 1 M H I D N I E N L S D R E F D Y I V V G G S A G A A V A A

91 CGGCTGAGCGAGGATCCCGCAGTGAAGCTGGCGCTGGTGGAGCCCGCCGGATGACCCGCGCGTCCCGAGGTGCTGACAGTGGACCGC
 31 R L S E D P A V S V A L V E A G P D D R G V P E V L Q L D R

181 TGGATGGAGCTGCTGGAATCGGGCTACGACTGGGACTACCCGATCGAGCCGAGGAAACGGCAACTCTTCATGCGCCATGCCCCGTGCC
 61 W M E L L E S G Y D W D Y P I E P Q E N G N S F M R H A R A

271 AAGGTCATGGCGGCTGCTCCAGCCCAACTCTGCATCGCCTTCTGGGCCCGCGCGAGGACCTGGACGAGTGGGAGGCCAAGTACGGC
 91 K V M G G C S S H N S C I A F W A P R E D L D E W E A K Y G

361 GCCACCGGCTGGAAACCGCGAGCCCGCCTGGCCGCTGTACAAGCGGTGAAACCAACGAGGACCGCGGCCCGGACCGCCGACCCAGGG
 121 A T G W N A E A A W P L Y K R L E T N E D A G P D A P H H G

451 GACTCCGGCCCCGTGCACCTGATGAACGTGCCCCGGAAGACCCGACCCGGCGTCCGCTGCGCTGACGAGCAGGCGCCGACCCCGC
 151 D S G P H L M N V P K D P T G V A L L D A C E Q A G I P

541 CGCGCAAGTTCAACACCCGACCCCGTGGTCAACCGCGCCAACTTCTCCAGATCAACCGGCGCGGACCGGCACCCCGCTCTCCAGC
 181 R A K F N T T V V N G A N F F Q I N R R A D G C T T R S S S

631 TCGGTCTCTACATCCACCCGATCGTCGAGCAGGAGAACTTCACCCTGCTAACCCGCTGCGCGCCCGCAGCTGGTGTTCGACGGGAC
 211 S V S Y I H P I V E Q E N F T L L T G L R A R Q L V F D A D

721 AGGCGCTGACCCGGCTGCACATCGTGGACTCCGCTTTCGGCCGACCCATCGGCTGACGGCGCAATGAAGTCTGCTCTCCACCCGC
 241 R R C T G V D I V D S A F G R T H R L T A R N E V V L S T G

811 GCGATCGATACCCGAAGCTGTGTAGTCTCCGGAATCGGCCCGCCCGCCACTCGCCGAGCAGCGCATCGAGGTCTTGGTGGACTC
 271 A I D T P K L L M L S G I G P A A H L A E H G I E V L G G L

901 CCCCAGCTGGGCGAGCCTGCAGGACCAACCGGAAGCGTGGTGCAGTTCGAGGCCAAGCAGCCATGGTCCCGAGTCCACCGCAGTG
 301 P R R G R A P A G P P G R R G A V R G Q A A H G R R V H A V

991 GTGGGAGATCGGCATCTTACCCCCACCGAGGACGGCCTGGACCCCGCCGACCTGATGATGACTACGGCTCCGTGCGCTTCGACATGAA
 331 V G D R H L H P H R G R P G P P R P D D A L R L R A V R H E

1081 CACCTGCGGCACGGTACCCACACCGGAGAACGGGCTTCAGCCTCACCCGAACGTCACGCAACCGCCGCTCCCGCGGCACTGTCCGGC
 361 H P A A R L P H H G E R A S A S P R T S R T P A P A A L S G

1171 TGGCAGCCGCGACTTCCGCGATAAGCCCATGGTCCGACCCGCGTACTTACCCGACCCAGAAGGGCCATGACATGCGCGTATGGTCCGC
 391 C A A A T S A I S P W S T R A T S P T Q K G H D M R V M V A

1261 GGCATCCGCAAGGCCCGGAAATCGCCGCCAGCCCGCCATGGCGGAATGGACCGGCCGCGAGCTCTCCCCCGCGTCCGAGGCGCAGCC
 421 G I R K A R E I A A Q P A M A E W T G R E L S P G V E A Q T

1351 GACGAGGAGTGCAGGACTACATCCGCAAGACGCACAACCCGCTTACCACCCCGTGGGCACCGTCCGATGGGCGCGTCCGAGGACGAG
 451 D E E L Q D Y I R K T H N T V Y H P V G T V R M G A V E D E

1441 ATGTCCCGCTCGACCCGAGCTGCGGGTCAAGGGCGTCCCGGCTTCGCGGTCGGCGAGCCCTCGGTATGCCCGAGCAGTGCACCGTC
 481 M S P L D P E L R V K G V T G L R V G D A S V M P E H V T V

1531 AACCCCAACATCACCGTATGATGATCGGCGAGCGCTGCGCGGACCTTATCCGCTCCGCCCGCGCGGTGAACCAACGACGGCGGACGCC
 511 N P N I T V M M I G E R C A D L I R S A R A G E T T T A D A

1621 GAGCTGAGCGCGCCCTCGCCTAAGCGGAGCGGCCAGCCGCGGGCCTGTCCGGAACCACTGGCGGGCCCGCATGGGCGGACACA
 541 E L S A A L A *

1711 ATGCCGTAACCTAAGGTGCGGAAGCAGTCTGCTTCCACACCCGCTTTTGACGCGCGGGCCGCAACTGGCCCGCGCGTAAAGCCG
 1801 AAGGTCCTCCGGGGCGGGCCGATCGTGGCGGAGTCCGTCGGCCAGCCGCTGCAGCGTCCCGCGGTAATGGCGGTAGGACAGGA
 1891 TCGCTCGGGTATGATGACTCGTTGCGGGCGTGCAGCCGCTCGCCACCGCGCCAGGCGCAAGGACCCGGATCCGAGGCGCGGAG
 1981 CGAAGTTGGCGTCCGTCGCCCGCCACCGAGGCGGTTCCAGCTCCCGCCCTGCTCCA

Figure 2. The nucleotide sequence of the *codA* gene for choline oxidase of *Arthrobacter globiformis* and its deduced amino acid sequence. The shaded amino acid sequence indicates the putative FAD-binding site.

3.3. 形質転換 *Synechococcus* の耐塩性 [2]

形質転換 *Synechococcus* の PAMCOD 株の耐塩性を PAM 株の耐塩性と比較した (Figure 3)。400 mM NaCl を含む培地中においては、OD₇₃₀ を指標とする生長は PAM 株では全く停止してしまうのに対し、PAMCOD 株では最初の4日間は停止しているが、その後急速に回復した (Figure 3A)。400 mM NaCl を含む培地中においては、クロロフィル量 (Figure 3B) は PAM 株では徐々に減少するのに対し、PAMCOD 株では、2日間の停滞の後急速に増加した。同様の塩条件下における光合成活性 (Figure 3C) は、PAM 株では低下してしまうのに対して、PAMCOD 株では、最初の2日間は PAM 株と同様に低下するが、その後急速な増加が見られることがわかった (Figure 3C)。

3.4. コリンオキシダーゼ遺伝子 (*codA*) によるシロイヌナズナの形質転換 [3]

遺伝子 *codA* を組み込んだベクタープラスミド pGAH/*codA* (Figure 1) をアグロバクテリウムを介してシロイヌナズナに導入し、6 個体の形質転換シロイヌナズナを取得した。これらの中で、カナマイシンとハイグロマイシンを含むプレート上での T2 種子の発芽率が 75% となる形質転換体 (一つの染色体にのみ導入遺伝子が取り込まれたと判断される) が 3 個体得られた。これらの T2 個体から、導入遺伝子に関してホモ接合体となった T3 種子を得た。この T3 種子から生育した個体において、*codA* 遺伝子が存在すること、および *codA* 遺伝子が発現してコリンオキシダーゼ (ゲル電気泳動による推定分子量 60,000) が生成されていることを確認した。また野性株にはコリンのみが存在するのに対し、形質転換体にはコリンとベタインの両者が存在することを確認した。

3.5. 形質転換シロイヌナズナの耐塩性 [3]

50 mM 以下の NaCl を含むプレート上における種子の発芽と生育には野性株と形質転換体において大きな差異は認められなかった。しかし 80 mM NaCl を含むプレート上においては、野性株の種子は発芽はするものの本葉がほとんど生育しなかった。これに対して、形質転換体の種子の多くは発芽した後、さらに本葉が生育した。また水耕によって約 1 ヶ月生育した個体を 200 mM NaCl を含む溶液に移した場合、約 2 週間後に野性株は全て枯死したのに対し、形質転換体の中にはさらに生育を続けたものがあつた。これらの事実は、形質転換体では生合成されたベタインによって耐塩性が増強されたことを示している。

4. 考察

4.1. 耐塩性の機構としては、ポリオールやベタイン等の低分子物質を細胞内あるいは細胞内器官に蓄積する方法と、Na⁺ポンプを活性化する方法とが知られている。本研究では、

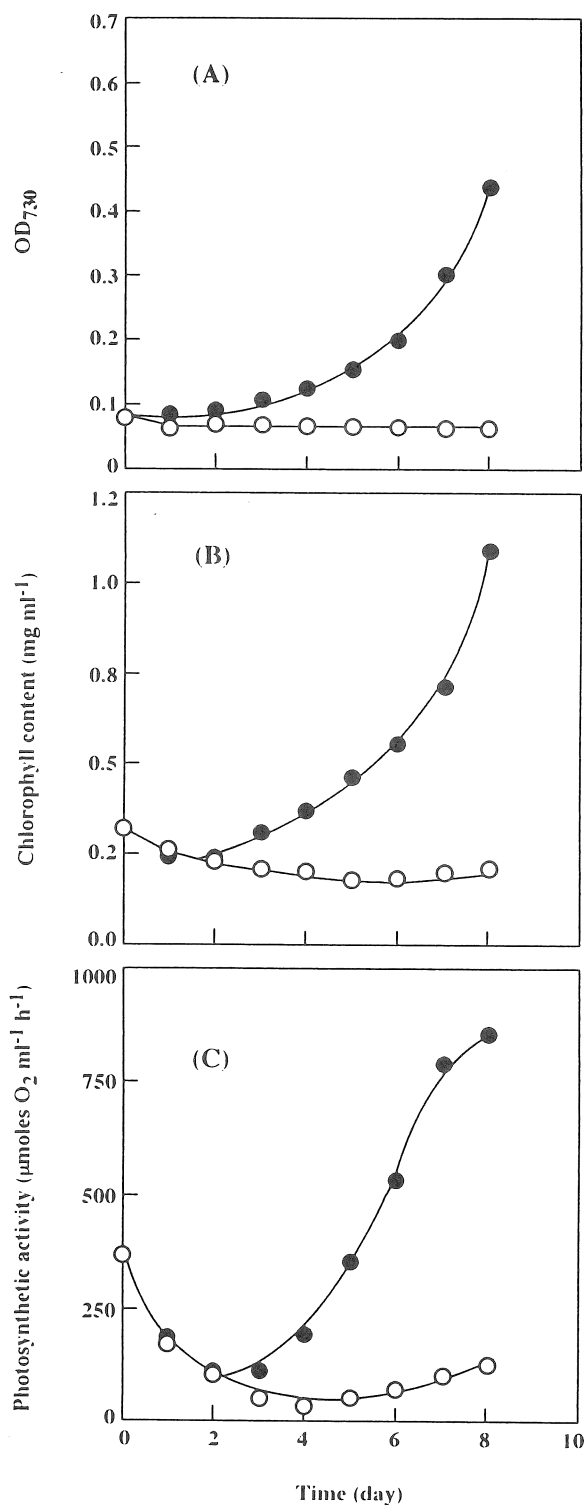


Figure 3. Salt tolerance of the transformed strains of *Synechocystis* sp. PCC 7942. Cells were first cultivated at 30°C for 3 days in the light at 70 μ E/m²/sec in the presence of 1 mM choline chloride. Then the cells were transferred, at time zero, to a medium containing 400 mM NaCl and 1 mM choline chloride, and growth was allowed to continue under the same conditions.
 ○—○, strain PAM (control); ●—●, strain PAMCOD. (A) Growth of cells. (B) Changes in chlorophyll content during growth. (C) Changes in photosynthetic activity during growth.

ベタインをコリンから合成するコリンオキシダーゼの遺伝子を土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* から単離して、ベタインを生合成することのできない植物およびラン藻に導入し、ベタインを合成させることに成功した。その結果、これらの生物の耐塩性を増強することができた。これはコリンオキシダーゼの遺伝子工学を用いて、耐塩性を増強した世界で最初の成功例である。

4.2. 研究目的のところにも示したように、コリンオキシダーゼはコリンからベタインを合成する際に H_2O_2 を生産する。 H_2O_2 は細胞にとっては毒素であり、その除去が必須である。細胞内にはカタラーゼやアスコルビン酸ペルオキシダーゼ等の H_2O_2 を分解する酵素群が存在することが知られているが、これらの酵素の働きによって H_2O_2 は細胞内で迅速に除去されているものと推測される。

4.3. 高等植物はコリンを生合成する能力を備えているので、コリンオキシダーゼの導入のみによって、ベタインを生合成できるようになった。しかし、ラン藻はコリンを生合成できないため、1 mM コリンを培養液に添加することが必要であった。これによって、80 mM ベタインが細胞内に蓄積した。この事実は、*Synechococcus* sp. PCC 7942 にはコリンを細胞内に取り込む能動輸送系が存在する可能性を示唆している。

4.4. 形質転換シロイヌナズナにおいて生合成されたコリンオキシダーゼのゲル電気泳動法による推定分子量は約 60,000 であり、これはコリンオキシダーゼ遺伝子から推定された分子量約 58,000 とほぼ同じであった。この事実は、Rubisco 小サブユニットのトランジットペプチドがプロセッシングによって除かれていること、および遺伝子導入によって発現したコリンオキシダーゼが葉緑体に移行していることを示唆している。これらの事実はまた、形質転換体においては葉緑体内において内在性のコリンからベタインを生合成していること、および形質転換シロイヌナズナの耐塩性が葉緑体内に含まれるベタインによってもたらされていることを示唆している。

4.5. 形質転換シロイヌナズナの耐塩性が発芽時においても観察された。これは塩ストレスに最も敏感な発芽時における耐塩性の改善であり、実用化において最も重要な意味を持っていると推察される。本研究による耐塩性植物の遺伝子工学は将来の有用性植物の作出において重要な意義を持つことを示している。

5. 今後の課題

本研究では、コリンオキシダーゼをシロイヌナズナとラン藻に導入し、耐塩性を増強す

ることに成功した。今後は、重要な農作物であるイネやトウモロコシにコリンオキシダーゼ遺伝子を導入し、耐塩性を増強することを計画している。これらの農作物の耐塩性を増強することができれば、世界中の食料供給に大いに貢献することができると期待している。

6. 文献

- [1] G. C. Papageorgiou and N. Murata (1995) The unusually strong stabilizing effects of glycinebetaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosynth. Res.*, in press.
- [2] P. Deshnum, D. A. Los, H. Hayashi and N. Murata (1995) Transformation of *Synechococcus* with the gene for choline oxidase enhances tolerance to salt stress. (Submitted)
- [3] H. Hayashi, P. Deshnum and N. Murata (1995) Gene-technological modification of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. (In preparation)

Gene Technology of Salt-Tolerant Plants

MURATA, Norio and HAYASHI, Hidenori*

National Institute for Basic Biology, *Ehime University

Summary

Glycinebetaine (hereafter betaine) is accumulated in a number of halotolerant plants and bacteria as an acclimation response to saline and/or water-deficient environments. Betaine acts as an osmoregulative substance keeping the osmotic balance with the environments and also prevents the dissociation of various enzymes at high concentration of salt. Betaine protects the photosystem II complex of the thylakoid membranes against the high salt-induced dissociation of the extrinsic proteins.

Choline oxidase, which is isolated from the soil bacterium, *Arthrobacter globiformis*, converts choline to betaine via a one-step reaction. We cloned the *codA* gene for this enzyme and introduced it into the cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC 7942, and a higher plant, *Arabidopsis thaliana*. The *codA* gene was expressed in these organisms and the transformants accumulated betaine. Consequently the cyanobacterium acquired tolerance to salt stress, as evaluated by growth, chlorophyll accumulation and photosynthetic activity, and the plant did so as evaluated by germination and growth.