

9522 遺伝子工学で耐塩性イネをつくる研究

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：坂本 敦 (岡崎国立共同研究機構)

陸生植物の成長は土壌の条件に大きく依存している。特に土壌の塩濃度は、植物を取り巻くさまざまな環境因子の中でも、その生存に関わる最も重要な因子の1つであり、したがって耐塩性の強化は農作物の遺伝子操作における最重要課題の1つである。多くの陸生植物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環境に対する耐性を備えているものも多く、これらの植物は適合溶質と呼ばれる一連の化合物、すなわちプロリンに代表される特定のアミノ酸やポリオール、そしてグリシンベタイン（以下ベタインと略記）を蓄積したりする。特にベタインは葉緑体内に蓄積され、しかも光合成を塩による失活から保護する作用を持っている。

既知のベタイン生合成系の中で最も単純な系は土壤菌 *Arthrobacter globiformis* が持つコリンオキシダーゼの系である。これまでにコリンオキシダーゼの遺伝子導入が塩に弱いラン藻や高等植物（シロイヌナズナ）の耐塩性の増強に非常に有効であることを明らかにした。本研究では、遺伝子工学的手法によるイネの耐塩性強化を目指した。イネはベタインを蓄積せず高塩環境条件下では生育できないので、コリンオキシダーゼの遺伝子を導入し、形質転換イネの細胞質あるいは葉緑体内に多量のベタインを生合成させることによって耐塩性イネを作出することを試みた。

すでにクローニングした *A. globiformis* のコリンオキシダーゼ遺伝子 (*codA*) を、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターとイネ由来のイントロンの発現制御下に組み込み、翻訳後に細胞質あるいはプラスチドで発現するようなキメラ *codA* 遺伝子を構築した。これをパーティクルガンを用いてハイグロマイシン耐性遺伝子とともにイネ培養細胞に導入した。ハイグロマイシン耐性を指標に形質転換細胞をスクリーニングしたのち植物体に再分化させた。さらに DNA ゲルブロット、RNA ゲルブロット、およびウエスタンブロットにより、*codA* 遺伝子を核ゲノムに統合しコリンオキシダーゼを発現する形質転換イネを選抜した。これらの形質転換体はベタインを蓄積することができた。これは遺伝子工学的手法によりイネがベタイン合成能を獲得した初めての例である。また非形質転換体と比較したところ、形質転換体では塩ストレス下における光合成活性に耐塩性の増強が観察された。

今後はベタインを蓄積する形質転換体の耐塩性に関して詳細に調査する予定である。本研究でイネの耐塩性を強化することができれば、世界中の食糧供給に大いに貢献することができるものと期待している。

9522 遺伝子工学で耐塩性イネをつくる研究

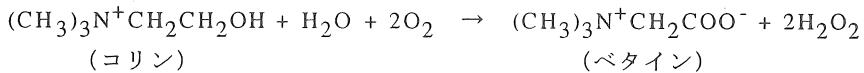
助成研究者：村田 紀夫 (岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所)

共同研究者：坂本 敦 (岡崎国立共同研究機構)

1. 研究目的

陸生植物の成長は土壌の条件に大きく依存している。特に土壌の塩濃度は、植物を取り巻くさまざまな環境因子の中でも、その生存に関わる最も重要な因子の1つである。多くの陸生植物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環境に対する耐性を備えているものも多く、これらの植物は適合溶質と呼ばれる一連の化合物、すなわちプロリンに代表される特定のアミノ酸やポリオール、そしてグリシンベタイン (以下ベタインと略記) を蓄積したりする。特にベタインは葉緑体内に蓄積され、しかも光合成を塩による失活から保護する作用を持っている [1]。

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細菌 *Arthrobacter globiformis* が産出するコリンオキシダーゼの系を用いる。コリンオキシダーゼは次の反応を触媒しベタインを生成する。



これまでに、塩に弱いタイプのラン藻や高等植物 (シロイヌナズナ) をモデルとして用い、コリンオキシダーゼの遺伝子導入がその耐塩性の増強に非常に有効であることを明らかにしてきた [2, 3]。これらの研究をもとに本研究では、遺伝子工学的手法によるイネの耐塩性強化を目指した。イネはベタインを蓄積せず高塩環境条件では生育できないので、コリンオキシダーゼの遺伝子を導入し、形質転換イネの細胞質あるいは葉緑体内に多量のベタインを生合成させることによって耐塩性イネを作出することを試みた。

2. 研究方法

2.1. 研究材料

遺伝子導入するイネとして形質転換系の確立しているジャポニカ型 (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) を使用した。標的遺伝子であるコリンオキシダーゼ (*codA*) 遺伝子は、すでに土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* から単離した [2]。 *codA* 遺伝子をカリフラワームザイクウイルス 35S プロモーターの転写制御下で、翻訳後にコリンオキシダーゼを細胞質あるいは葉緑体に局在させるような4種類のキメラ *codA* 遺伝子をプラスミド pUC19 上に作製した (Fig. 1)。葉緑体局在型コンストラクト (35STP*codA*) には、遺伝子産物の葉緑体への輸送に必要なトランジットペプチドをコードするDNA配列 (タバコ・リブローズ-1, 5-ビスリン酸カルボキシラーゼ遺伝子由来) を *codA* 遺伝子の5' 上流にインフレームに融合した。細胞質局在型コンストラクト (35S*codA*) はこの配列を持たない。さらに単子葉植物であるイネでの発現量を高めるために、それぞれのコンストラクトの35S プロモーター下流にイネ・Cu/Zn型スーパーオキシドディスムターゼ遺伝子の第1イントロンを挿入したキメラ遺伝子 (35SINTP*codA* および 35SIN*codA*) も作製した。

2.2. イネ細胞への遺伝子導入

上述の4種類のキメラ *codA* コンストラクトをそれぞれ選抜マーカーであるハイグロマイシン耐性遺伝子とともに、パーティクルガン装置を用いてイネ種子胚盤カルス由来の培養細胞に導入した。寒天培地上でハイグロマイシン耐性カルスとして形質転換細胞を選抜したのち、これらを植物体に再分化させた。ポリメラーゼチェーン反応 (PCR) により *codA* 遺伝子を核ゲノムに統合したハイグロマイシン耐性イネをさらに選抜した。

2.3. 形質転換イネの分子生物学的・生化学的解析

PCRにより選抜した形質転換体について、導入遺伝子の核ゲノム中のコピー数を知るためにDNAゲルプロット分析を行った。*codA* 遺伝子の発現は、転写産物 (RNAゲルプロット法) およびタンパク質 (ウェスタンブロットおよび酵素活性) のレベルで検定した。また、*codA* 遺伝子から正しくイントロンが除去されているかどうかを知るために、イントロンを挟むエクソン配列に基づくプライマーを用いて逆転写PCRを行った。形質転換体組織 (成熟葉) におけるベタインの蓄積はプロトン核磁気共鳴装置を用いて検出した。

2.4. 形質転換イネの耐塩性の評価

タンパク質、酵素活性およびベタイン生成のレベルで *codA* 遺伝子の発現を確認できた形質転換体についてNaClを含む水耕栽培を行った。塩ストレスで損傷を受け易い光合成活性への影響をクロロフィル蛍光分析法により調べ、非形質転換体の場合と比較するこ

とにより耐塩性を評価した。

3. 研究結果

3.1. *codA* 遺伝子のイネへの導入

ハイグロマイシン耐性を示す形質転換再分化個体について *codA* 遺伝子を増幅する PCR を行い各キメラ *codA* 遺伝子について 80 から 100 の形質転換体を選抜した。上記の形質転換体について、実際にコリンオキシダーゼを発現するものをウェスタンブロット法によりスクリーニングしたが、イントロンを持たないコンストラクト (35STP*codA* および 35ScodA) を導入したイネについては 1 個体も得られなかった。一方、イントロンを持つコンストラクトを導入したイネについては目的の形質転換個体を葉緑体局在型遺伝子 (35SINTP*codA*)、細胞質局在型遺伝子 (35SIN*codA*) とともに得ることができた。これらの形質転換体の葉あるいは根から調製した可溶性画分はコリンオキシダーゼ活性を示した (植物は内因性のコリンオキシダーゼ活性を持たない)。これ以降の実験は、これらの 2 つのコンストラクトを導入した形質転換植物について行った。

DNA ゲルブロット法により、導入された *codA* 遺伝子のコピー数をそれぞれのコンストラクトについて任意の 2 つの形質転換体で調べたところ、形質転換イネゲノム (当代) には 2 から 4 コピーの *codA* 遺伝子が存在していた (Fig. 2)。いずれの場合も 4 kbp 以上のバンドが検出されていることから、個々のバンドに対応する *codA* 遺伝子は完全な形で導入されているものと考えられた。

3.2. 形質転換イネでの *codA* 遺伝子の発現

任意の 35SINTP*codA* および 35SIN*codA* の形質転換体 (それぞれ 5 個体および 3 個体) について *codA* 遺伝子の発現を RNA ゲルブロット法で調べたところ、すべての個体について *codA* 遺伝子に特異的な転写産物が検出された (Fig. 3A)。そのレベルは、35SINTP*codA* については形質転換個体によって差がみられたが、35SIN*codA* については個体間に有意な相違は認められなかった。

ついでタンパク質レベルでの *codA* 遺伝子の発現をウェスタンブロット法で再度調べたところ、予想通りすべての形質転換体でコリンオキシダーゼが検出された (Fig. 3C)。葉緑体局在型の 35SINTP*codA* を導入したものについては (Fig. 3C, lanes 1 to 5)、トランジトペプチドを持つ前駆体の分子サイズではなくそれがプロセスされたサイズにバンドが検出された (Fig. 3C)。このことは、これらの形質転換体ではコリンオキシダーゼは葉緑体に局在していることを示唆している。ただし、葉緑体局在型形質転換体のコリンオキシダーゼタンパク質量は、細胞質局在型のそれに比べて一様に低かった。この現象は転写量の多い個体についてもみられたので (Fig. 3A, lanes 2 and 3)、逆転写 PCR を行い

イントロンのプロセッシングについて調べたところ、葉緑体局在型遺伝子から転写されたmRNAから 3'-acceptor site が異なり正常なタンパク質への翻訳が起こりえない複数の splicing variant が検出された。一方、細胞質局在型遺伝子については正常なプロセッシングに由来する PCR 産物のみ検出された (data not shown)。このことから葉緑体局在型遺伝子を導入した形質転換体における低レベルなタンパク質発現量は、少なくとも mRNA 前駆体の異常なプロセッシングが関係していると考えられた。

3.3. 形質転換イネでのベタイン生合成

イネ成熟葉から四級アンモニウム塩を調製後、プロトン核磁気共鳴装置を用いてベタインを定量した (Fig. 4)。葉緑体局在型 (Fig. 4B)、細胞質局在型 (Fig. 4C) とともに形質転換体はベタインを生合成・蓄積していることが明らかとなった。その蓄積量は、高度に *codA* 遺伝子を発現する個体 (Fig. 4C) で新鮮グラム重当り 4 μ mole であった。

3.4. 形質転換イネの耐塩性評価

codA 遺伝子を発現する形質転換イネは外観上何の異常もなく非形質転換体と同様に土耕・水耕の両条件で良く生育した。耐塩性の評価実験に水耕系を適用し、各形質転換イネおよび非形質転換体を 100 mM NaCl を含む 0.05% ハイポネックス水溶液に置き、経時的にクロロフィルの蛍光を測定したところ、形質転換体の光合成活性は非形質転換体に比べて阻害を受けにくいことが観察された (data not shown)。

4. 考察

耐塩性の強化は農作物の遺伝子操作における最重要課題の1つである。本研究では、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イネに導入し、ベタインを生合成・蓄積させることに成功した。これは遺伝子工学的手法によりイネがベタイン合成能を獲得した初めての例である。本研究で用いた手法が、主要作物の多くを含むイネ科植物にベタイン合成能を付与することに有効であることを示した点でも意義深い。

4.1. 形質転換イネにおける *codA* 遺伝子の発現

前年度にカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターを用いて *codA* 遺伝子を双子葉植物であるシロイヌナズナで発現させたことを報告した [3]。しかし本プロモーターはイネにおいて *codA* 遺伝子を発現させるのには十分ではなかった。このことはイネ由来のイントロンを 35S プロモーターと組み合わせることにより解決でき、ウェスタンブロットで検出可能なレベルまで *codA* 遺伝子の発現を増強することに成功した。しかし一方で、イントロンの葉緑体局在型コンストラクトへの付加は、その mRNA 前駆体の異常なスプ

ライシングとそれに伴うタンパク質レベルの低下を引き起こした。このことはコリンオキシダーゼの葉緑体への局在化に、双子葉由来のトランジットペプチドをコードするDNA配列を用いたためと推定される。この配列を単子葉起源のものとの交換することにより、ベタインを葉緑体にもっと高レベルに蓄積させることができると期待される。

4.2. 形質転換イネでのベタイン生合成

コリンオキシダーゼの葉緑体局在型と細胞質局在型形質転換体の間ではベタイン蓄積量に大きな差がみられた。この原因として（1）コリンオキシダーゼタンパク質の発現量の差、（2）基質コリンの各細胞内区画における量的分布の差（コリンは細胞質で生合成される）、等が挙げられる。ただし、ベタインの塩ストレスに対する保護効果についてはその細胞内区画における濃度が重要であるので、2種類の形質転換体でみられる量差が耐塩性の程度にどれほど影響を与えるかは不明である。この点は今後の研究で明らかにしたい。またコリンオキシダーゼはベタイン生成の際に細胞にとって有害な過酸化水素も副産物として生産するが、形質転換体は正常に生育した。したがって過酸化水素は、細胞の持つ酵素的または非酵素的分解機構により速やかに消去されているものと考えられる。

4.3. 形質転換イネの耐塩性

光合成活性を指標とした耐塩性試験で、形質転換体においてベタインによる保護効果が観察されたことは、本研究による耐塩性イネの作出の可能性を支持するものと考えている。ただし、本試験では形質転換当代（T1）を用いており、これらは2から4コピーの*codA*遺伝子を持つことを明らかにしている。核ゲノム当り1コピーのみを持つホモ接合体で試験を繰り返す必要があるため、自家受粉によって形質転換次世代（T2）を得た。これらについては導入形質の安定な遺伝を確認しており、現在追試を行っている。

5. 今後の課題

形質転換体の耐塩性について T2、T3 世代を用いて形態学的、細胞生理学的観点からより詳細に解析していくことが必要である。ここで用いた手法により、イネに耐塩性をもたらすことができれば、遺伝子工学による有用作物の耐塩性強化に路を開くこととなり、世界的な食糧問題に対しても貢献することができると考えている。

6. 文献

- [1] G. C. Papageorgiou and N. Murata (1995) The unusually strong stabilizing effect of glycinebetaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosynth. Res.* 44: 243-252.
- [2] P. Deshnum, D. A. Los, H. Hayashi, L. Mustardy and N. Murata (1995) Transformation of *Synechococcus* with a gene for choline oxidase enhances tolerance to salt stress. *Plant Mol. Biol.* 29: 897-907.
- [3] H. Hayashi, Alia, L. Mustardy, P. Deshnum, M. Ida and N. Murata (1996) Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. Submitted for publication.

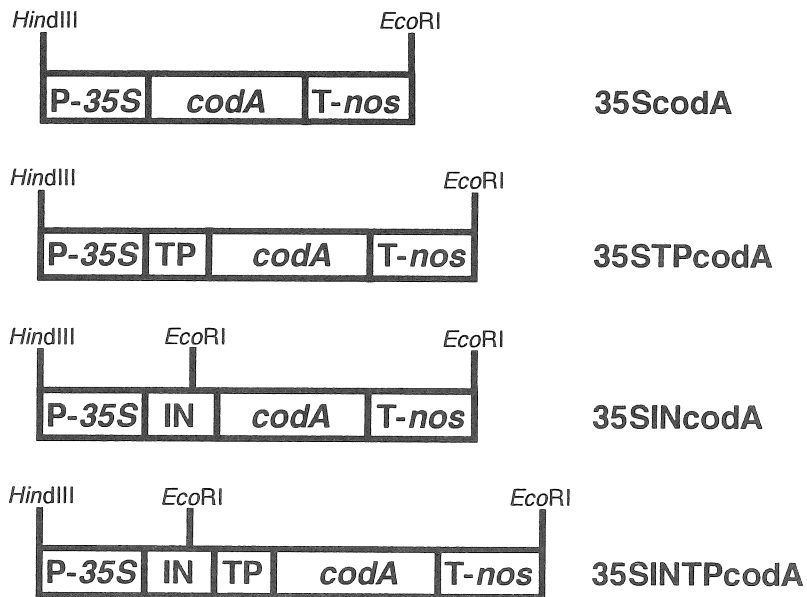


Figure 1. Schematic diagrams of the chimeric *codA* gene constructs used for transformation of rice.

The abbreviations are as follows: *P-35S*, cauliflower mosaic virus 35S promoter; *codA*, gene encoding choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*; *T-nos*, nopaline synthase gene terminator; TP, coding sequence for the transit peptide from the tobacco gene encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase; IN, first intron from the rice gene encoding copper/zinc-superoxide dismutase.

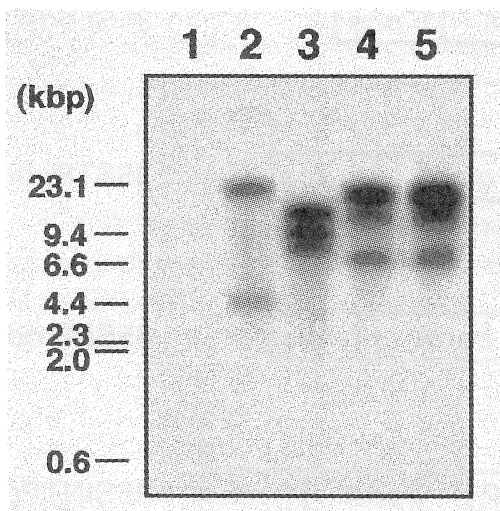


Figure 2. DNA gel blot analysis of the *codA* gene in transgenic rice plants.

Total DNA was prepared from leaves of wild type and transgenic plants by the cetyltrimethylammonium bromide method. The DNA (10 μ g) was digested with *Hind*III, sized-fractionated on a 0.7% agarose gel, and hybridized with a 32 P-labeled DNA probe derived from the *codA* gene. Lane 1, wild type; lanes 2 and 3, two independent 35SINTP*codA* transformants; lanes 4 and 5, two independent 35SIN*codA* transformants.

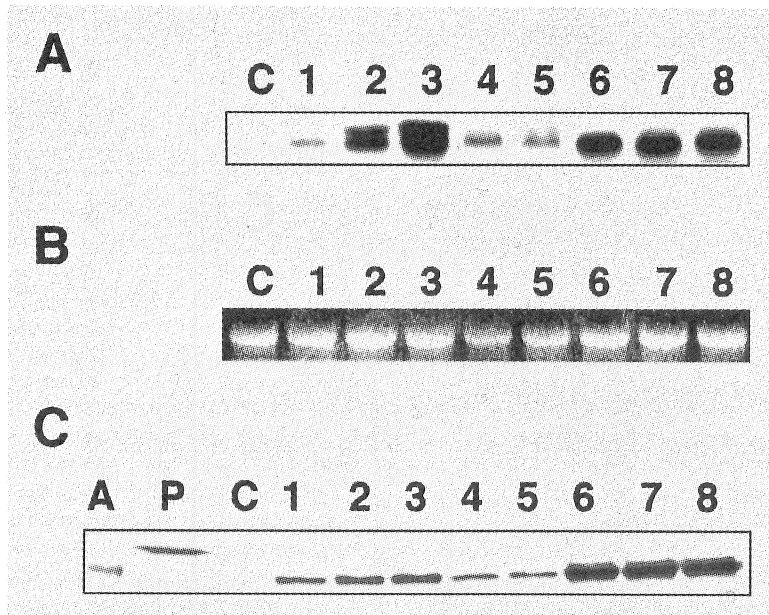


Figure 3. Expression of the *codA* gene in leaves of transgenic rice.

A. RNA gel blot for the detection of mRNAs specific to the *codA* sequence in transgenic rice leaves. Total RNA (15 μ g) was electrophoresed on a formaldehyde-containing agarose gel, blotted on a nylon membrane, and hybridized with the radiolabeled *codA* probe. Lane C, wild type; lanes 1 to 5, five independent 35SINTP*codA* transformants; lanes 6 to 8, three independent 35SIN*codA* transformants. **B.** Ethidium-bromide staining of the agarose gel visualizing 28S rRNA as an internal standard. **C.** Protein gel blot showing the appearance of choline oxidase in leaves of the above-mentioned transgenic plants. Soluble extracts (15 μ g) were separated by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and the choline oxidase protein level was detected in Western blotting with antibodies raised against choline oxidase. Lane A, authentic protein; lane P, *in vitro* synthesized choline oxidase precursor having a transit peptide; lanes 1 to 5, independent 35SINTP*codA* transformants; lanes 6 to 8, independent 35SIN*codA* transformants.

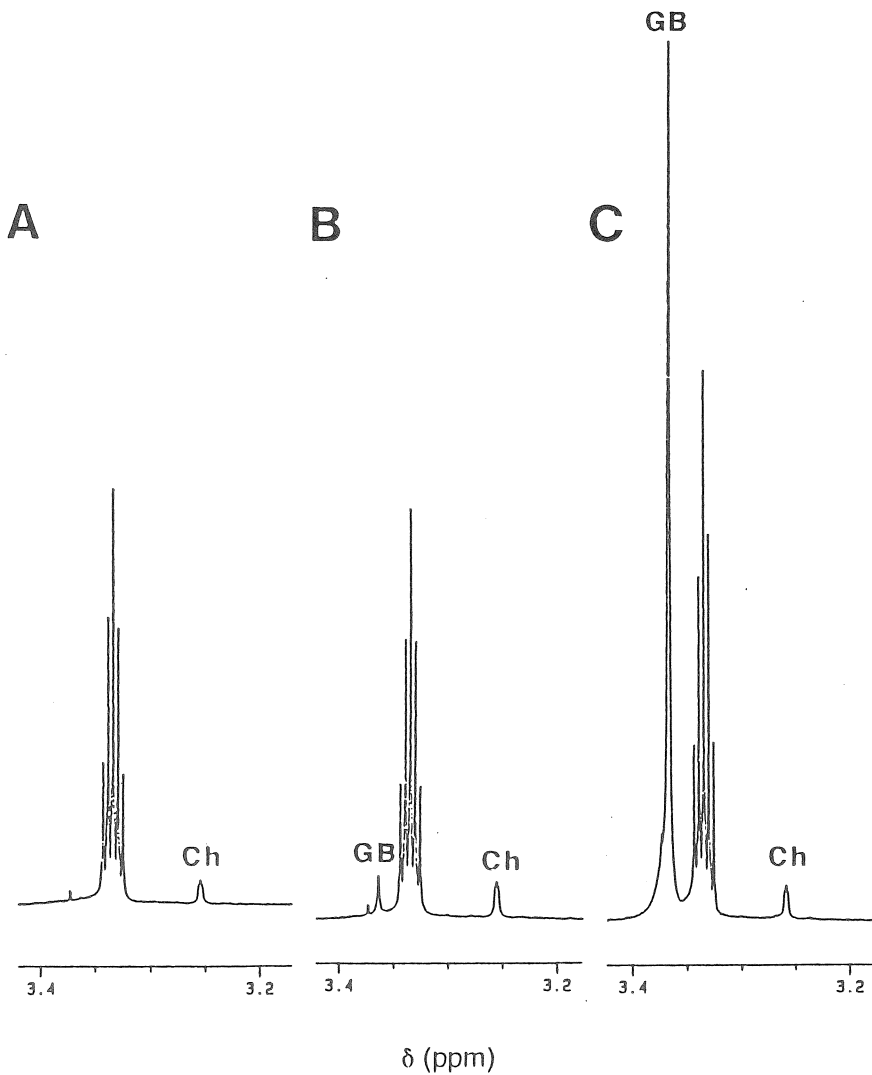


Figure 4. Accumulation of glycinebetaine in leaves of transgenic rice.

Quaternary nitrogen compounds prepared from leaves were subjected to ¹H-NMR. Peaks are marked GB (glycinebetaine) and Ch (choline). A, wild type; B, 35SINTPcodA; C, 35SINcodA.

Genetic Engineering of Salt Tolerance in Rice Plant

Norio MURATA and Atsushi SAKAMOTO

National Institute for Basic Biology

Summary

Improvement of salt tolerance is an important challenge in genetic engineering of agronomically valuable crops. Glycinebetaine (hereafter betaine), a quaternary nitrogen compound found in a number of halotolerant plants and bacteria, not only serves as an osmoregulatory substance, but also prevents proteins from salt-induced inactivation and denaturation. Therefore, this compound is considered one of the most critical factors for providing tolerance to salt stress with halotolerant organisms.

Rice (*Oryza sativa*) plants do not produce betaine and cannot grow in high salt environment. Aiming at the enhancement of salt tolerance in rice, the *codA* gene of *Arthrobacter globiformis* encoding choline oxidase, which converts choline into betaine through a single-step reaction, was introduced into rice plants by the microprojectile bombardment. Expression of the *codA* gene, which is driven under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in combination to the first intron of the rice *SodCc2* gene, was confirmed at levels of the mRNA, the protein and the enzyme activity in transgenic plants. Betaine was detected in these transformants, demonstrating the first successful production of transgenic rice that accumulates the compound through genetic engineering. Photosynthetic activities measured by chlorophyll fluorescence suggested that the betaine-accumulating transgenics are more tolerant than the wild-type plants to NaCl stress.