

9 6 2 1 コリンオキシダーゼ遺伝子を導入した耐塩性イネの研究

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 基礎生物学研究所)

土壤に含まれる過剰な塩分は、水分や温度などの環境因子と並び世界の農業生産を著しく制限しているストレス要因である。したがって塩ストレスに耐性な農作物の育成、特に遺伝子操作による耐塩性を強化した形質転換農作物の開発は、植物バイオテクノロジーの重要な課題である。高塩環境に強い植物や微生物の多くは塩ストレスに適応する手段の1つとして、適合溶質であるグリシンベタイン(以下ベタインと省略)を細胞内に高濃度に蓄積することで耐塩性を発現すると考えられる。ベタインは塩ストレス下での浸透圧調節に働くのみならず、タンパク質の高次構造の保持にも効果を持つ。特に葉緑体内では高度なタンパク質複合体からなる光合成の酸素発生系の塩失活を防ぐ。したがってベタイン生合成系の導入は、農作物の塩耐性向上のための最も有効な遺伝子工学的手法の1つと期待されている。

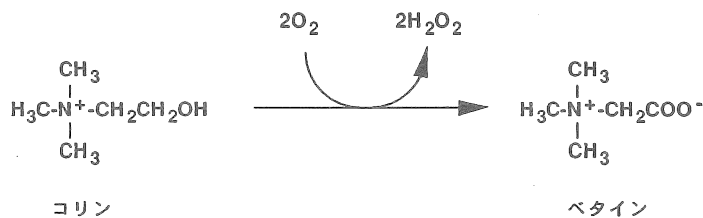
主要作物であるイネはベタインをつくれず、また塩環境に弱い。私たちは、既知の最も単純なベタイン合成系を持つ土壤細菌 *Arthrobacter globiformis* からベタイン合成酵素であるコリンオキシダーゼの遺伝子(*codA*)を単離し、これをアグロバクテリウムを介した形質転換によりイネカルスに導入した。得られた形質転換イネは *codA* 遺伝子を発現しベタインを蓄積した。*codA* 遺伝子は形質転換次世代においても安定に引き継がれ mRNA、タンパク質のレベルでその発現を確認した。これらの形質転換体は、コリンオキシダーゼを葉緑体あるいは細胞質に持ち、新鮮葉グラム当り前者は 1 μmol 、後者は 5 μmol のベタインを蓄積した。このように、コリンオキシダーゼを細胞質に持つ形質転換体のほうがベタインの生成レベルは高かったが、光合成活性を指標にした塩ストレスおよび低温光阻害に対する耐性は、ベタインを葉緑体に蓄積する形質転換体のほうが優れていた。このことは、ベタイン生合成能付与の遺伝子操作によるストレス耐性能の向上には、その生合成の細胞内局在部位が重要な因子であることを示している。これらの研究成果は、遺伝子操作により *codA* 遺伝子を導入し、葉緑体でベタインを生合成させることによって様々な有用農作物に対して塩ストレスや低温ストレスに対する耐性を付与できる可能性を示唆している。

9621 コリンオキシダーゼ遺伝子を導入した耐塩性イネの研究

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 基礎生物学研究所)

1. 研究目的

土壤に含まれる過剰な塩分は、水分や温度などの環境因子と並び世界の農業生産を著しく制限しているストレス要因である。したがって植物バイオテクノロジーにおいて、塩ストレスに耐性な農作物の育成、特に遺伝子操作による耐塩性を強化した形質転換農作物の開発は重要な課題である。高塩環境に強い植物の多くは塩ストレスに適応する手段の一つとして、適合溶質であるグリシンベタイン（以下ベタインと省略）を細胞内に高濃度に蓄積することで耐塩性を発現すると考えられる。ベタインは塩ストレス下での浸透圧調節に働くのみならず、タンパク質の高次構造の保持にも効果を持つ。特に葉緑体内では高度なタンパク質複合体からなる光合成の酸素発生系の塩失活を防ぐ [1]。既知のベタイン生合成系で最も単純な系は土壤細菌 *Arthrobacter globiformis* が産出するコリンオキシダーゼの系で、本酵素はコリンを基質として下に示す反応を触媒しベタインを生成する。



私たちはこのベタイン生合成経路に着目し、これまでにコリンオキシダーゼをコードする *codA* 遺伝子を単離し、これをベタインをつくることができず塩感受性のラン藻や高等植物シロイヌナズナに導入し、その塩耐性と低温耐性の強化に非常に有効であることを明らかにしてきた [2-4]。本研究では塩感受性の代表的農作物であるイネに *codA* 遺伝子を導入し、ベタイン合成能を獲得した形質転換イネについて、その形質転換次世代へのベタイン合成能の遺伝とその耐塩性について調べた。

2. 研究方法

2.1. 研究材料

ジャポニカ型イネ (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) をアグロバクテリウム感染法による形質転換に用いた。アグロバクテリウムと Ti バイナリープラスミドにはそれぞれ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 と pIG121Hm を使用した（ともに名古屋大学農学部・中村研三先生より供与）。

2.2. コリンオキシダーゼ発現ベクターの構築

コリンオキシダーゼを葉緑体または細胞質で発現するような 2 種類のバイナリープラスミドベクター pChICOD および pCytCOD を作製した (Fig. 1)。土壤細菌 *Arthrobacter globiformis* から単離したコリンオキシダーゼ (*codA*) 遺伝子を pIG121Hm 上の β -glucuronidase 遺伝子と置換することにより *codA* 遺伝子を cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter の転写調節下においた。また pChICOD にはコリンオキシダーゼを葉緑体に局在させるため、トランジットペプチドをコードする DNA 配列 (イネ ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase [*RbcS*] 遺伝子由来) を *codA* 遺伝子の5' 上流に接続した。さらに単子葉植物であるイネでの遺伝子発現量を高めるために、それぞれのコリンオキシダーゼ発現ベクターの CaMV 35S promoter の下流にイネ copper/zinc-superoxide dismutase (*SodCc2*) 遺伝子の第 1 イントロンを配した。母体となった pIG121Hm はその T-DNA 領域にハイグロマイシン抵抗性遺伝子 (*hph*) を持つのでこれを形質転換マーカーに利用した。

2.3. 形質転換イネの作出

上述の 2 種類の Ti バイナリープラスミドをアグロバクテリウムを介してイネ種子胚盤由来のカルスに導入した。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。ゲノミックサザン、ノーザンおよびウェスタン分析により *codA* 遺伝子を発現する植物個体を選抜し、自家交配後 T1 種子を得た。実験には T1 世代を用いた。以降、pChICOD および pCytCOD に対する形質転換植物を ChICOD イネおよび CytCOD イネと呼ぶ (Figure legend では ChICOD plant および CytCOD plant)。

2.4. 形質転換イネの分子生物学的・生化学的解析

導入した *codA* 遺伝子が自家交配を経て T1 世代に受け継がれ発現しているかどうかを知るために、T1 形質転換体の葉について、*codA* 遺伝子の発現を RNA (ノーザン分析) およびタンパク質 (ウェスタン分析および酵素活性) のレベルで調べた。また形質転

換体におけるベタインおよびコリンの含量は、葉から第4級アンモニウム塩を調製し、これを $^1\text{H-NMR}$ に供じることで定量した。

2.5. 形質転換イネの塩耐性および低温耐性

発芽後3週間水耕栽培した T1 幼植物体および野生株を 0.15 M NaCl 下におくことにより1週間塩ストレスにさらした。NaCl を除去後さらに3週間水耕栽培を続け両者の生育の差を観察した。また塩により容易に失活する光合成(光化学系II)活性を、0.1 M NaCl に浸した葉について経時的に測定した。光合成活性はクロロフィル蛍光分析法により調べた。また低温光阻害下 (5°C , $1300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) でのベタインの保護効果を同様に光合成活性により評価した。

3. 研究結果

3.1. 形質転換イネ(T1)での *codA* 遺伝子の遺伝と発現

ChICOD イネと CytCOD イネの T1 世代から各3個体について *codA* 遺伝子の RNA およびタンパク質レベルでの発現をノーザンブロット法およびウェスタンブロット法で調べた (Fig. 2)。ノーザンブロットでは全ての T1 植物で *codA* プローブに特異的にハイブリダイズする約 2 kb のシグナルが検出された (Fig. 2A)。これは予想される *codA* RNA の分子サイズに相当する。ChICOD イネで検出されるシグナルの分子サイズが、CytCOD イネのそれに比較して少し大きいのは、分子内にトランジットペプチドをコードする配列を持つためと考えられる。抗コリンオキシダーゼ抗体を用いたウェスタンブロットでは全ての T1 植物で約 60 kDa のポリペプチドが検出され (Fig. 2C)、同時にコリンオキシダーゼ活性も測定された。ChICOD イネではトランジットペプチドを持つ前駆体の分子サイズ (Fig. 2C, lane Pr) ではなく、それがプロセスされたサイズにシグナルが検出された (Fig. 2C, lane 1-3)。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。以上の結果は、導入した *codA* 遺伝子が次世代に安定して受け継がれ発現していることを示している。

3.2. 形質転換イネのベタインおよびコリンの含量

緑葉から四級アンモニウム塩を調製後、 $^1\text{H-NMR}$ を用いてベタインおよびコリンを定量した (Table 1)。野生型イネにはコリンのみ検出されたが、形質転換イネはベタインを生成・蓄積していることが明らかとなった。その蓄積量は、ChICOD イネおよび CytCOD イネで新鮮グラム重当りそれぞれ約 $1 \mu\text{mol}$ および $5 \mu\text{mol}$ であった。一方、ベタイン生成の基質となるコリンの含量は野生型イネと形質転換イネでほとんど差がみら

Table 1. Levels of glycinebetaine and choline in leaves of wild-type and transgenic rice*.

Line	Glycinebetaine	Choline
Wild-type plant	ND	0.8±0.2
ChICOD plant		
#1	0.8±0.3	0.8±0.2
#2	1.1±0.3	0.7±0.2
#5	0.7±0.2	0.8±0.3
CytCOD plant		
#8	3.9±0.2	0.8±0.2
#27	5.3±0.4	0.7±0.3
#83	4.7±0.3	0.8±0.3

*The results are the averages with standard errors obtained from three independent experiments, and are expressed in $\mu\text{mol g}^{-1}$ fresh weight. ND: not detected.

れなかった。

3.3. 形質転換イネの塩耐性および低温耐性

塩ストレス (0.15 M NaCl) 下での野生型および形質転換イネの生育を比較したところ、ストレス処理の間では両者とも生育阻害および可視傷害を呈し顕著な差がみられなかった。しかし、ストレス条件を除去しさらに両者を生育させたところ、形質転換イネの生育は野生型イネのそれに対してより早く回復した (Fig. 3)。ChICOD イネと CytCOD イネでは生育にほとんど差がなかった。

ついで塩により容易に失活する光合成活性を細胞の生理活性の損傷の指標とすることで、塩ストレスに対する耐性を評価した。野生型イネおよび各形質転換イネの葉を 0.1 M NaCl 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 (Fig. 4)。ChICOD イネと CytCOD イネとでは、前者でより光合成活性の失活からのベタインによる保護効果が観察された。さらに低温光阻害条件下での光合成活性の阻害を調べたところ、ChICOD イネでのみ保護効果がみられた (Fig. 5)。

4. 考察

導入した *codA* 遺伝子は形質転換イネで安定に次世代に遺伝し、同時にベタインを合成する形質も保持されていることを示した。これらの形質転換イネは塩ストレスに対して耐性を示し、特にコリンオキシダーゼを葉緑体にターゲットさせた ChICOD イネは低温に対しても耐性を獲得していた。これらの研究結果は、遺伝子操作により *codA* 遺伝子

を導入し、葉緑体でベタインを合成させることによって様々な有用農作物に対して塩ストレスや低温ストレスに対する耐性を付与できる可能性を示唆している。

コリンオキシダーゼの細胞内局在部位を異とする2種類の形質転換イネではベタインの蓄積量に本質的な差がみられた (Table 1)。これには *codA* 遺伝子の RNA およびタンパク質レベルでの発現量、コリンオキシダーゼの細胞内局在化および基質となるコリンの細胞内の量的分布などが影響を与えていると考えられる。ChICOD イネのベタイン蓄積量は同じ葉緑体にコリンオキシダーゼをターゲットした形質転換シロイヌナズナの場合とほぼ同じであった ($\sim 1 \mu\text{mol g}^{-1}$ fresh weight) [4]。このレベルのベタイン蓄積量で野生株と比較して形質転換体のストレス耐性の向上が観察されたが、ハウレンソウのような耐塩性植物はストレス下でこれより10倍量以上のベタインを蓄積する。したがってさらに形質転換植物において *codA* 遺伝子の発現量を上げベタイン蓄積量を高めることにより、より強力な耐性を植物に付与できる可能性がある。興味深いことに野生型イネと形質転換イネとではコリンの量には差がなかった。このことは形質転換植物におけるベタイン生合成では基質コリンの供給系は律速とならないこと示している。

ベタイン生合成の場が細胞内で異なる場合、ベタインのストレスに対する保護効果に差がでてくるかどうかを知るため、コリンオキシダーゼの細胞内局在が異なる2種類の形質転換イネを作出した。ベタイン合成能の付与は形質転換イネのストレス耐性の強化に有効であったが、それは細胞質よりも葉緑体にベタイン合成系を導入したときにより効果的であった (Fig. 4, 5)。このことはベタイン生合成能付与の遺伝子操作による植物のストレス耐性能の向上には、その生合成の細胞内局在部位が重要であることを示唆している。すなわち葉緑体をターゲットとし光合成機能を保護することが形質転換植物のストレス耐性に有効と考えられる。

5. 今後の課題

今後はより実用化に向けた形質転換イネの開発とそのストレス耐性の評価が必要と考える。前者については、現在 *codA* 遺伝子の発現に用いている構成的プロモーター (CaMV 35S promoter) に代えてストレス環境においてのみベタインを大量に生合成するような強力なストレス誘導性プロモーターの検索あるいは開発が必要であろう。また後者については安全性試験を経たのち、一定の環境に制御された現在の閉鎖実験系から現実に即した非閉鎖系で耐性試験を行うことが、今後の重要なステップとなるであろう。

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] P. Deshnum, Gombos, Z., Nishiyama, Y. and N. Murata (1997) The action *in vivo* of glycine betaine in enhancement of tolerance of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 to low temperature. *J. Bacteriol.* **179**: 339-344.
- [4] H. Hayashi, Alia, L. Mustardy, P. Deshnum, M. Ida and N. Murata (1997) Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J.*, in press.

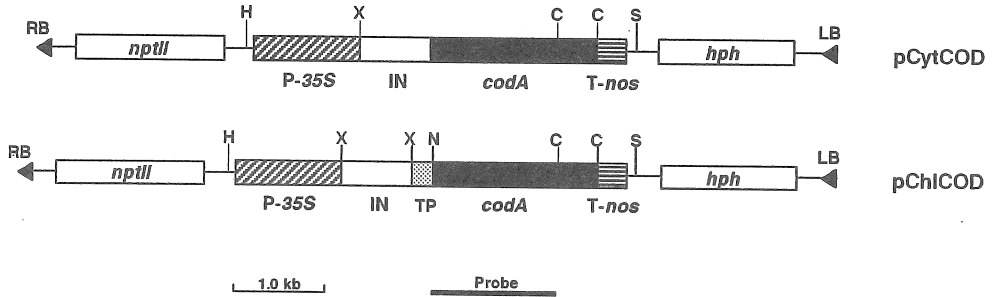


Figure 1. Schematic representation of T-DNA regions of pCytCOD and pChlCOD.
 Abbreviations: *codA*, choline oxidase gene; *hph*, hygromycin phosphotransferase gene; IN, first intron from the rice *SodCc2* gene; LB, light border; *nptII*, neomycin phosphotransferase gene; P-35S, the CaMV 35S promoter; RB, right border; T-*nos*, terminator element of the nopaline synthase gene; TP, coding sequence for the transit peptide from a rice *RbcS* gene. Abbreviations for restriction sites: C, *Sac*I; H, *Hind*III; N, *Nde*I; S, *Sal*I; X, *Xba*I. The horizontal bar refers to the *codA*-coding region used as the probe in Northern blot analysis.

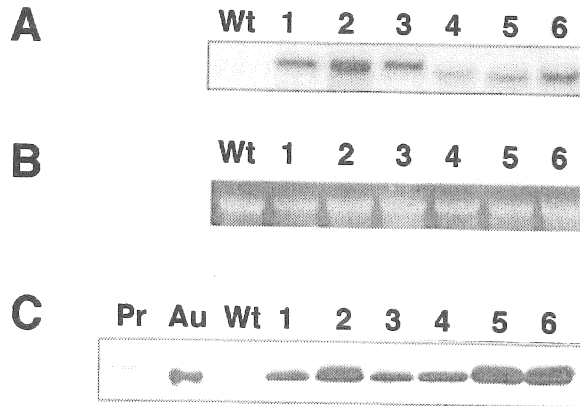


Figure 2. Expression of the *codA* gene in leaves of transgenic rice.
 A. Northern blot analysis. Total RNA (15 μ g) was loaded and hybridized with the 32 P-labelled *codA* probe prepared from the 1.4 kb *Nde*I-*Sac*I fragment from pChlCOD. Wt, wild-type plant; lanes 1 to 3, three independent ChlCOD plants (line #: 1, 2 and 5); lanes 4 to 6, three independent CytCOD plants (line #: 8, 27 and 83). B. 28S rRNA as an internal standard. C. Western blot analysis. Soluble protein (10 μ g) was used for immunological detection using the anti-choline oxidase antibodies. Pr, *in vitro* synthesized choline oxidase precursor with the transit peptide; Au, authentic choline oxidase; Wt and lanes 1 to 6, same as in Figure 2A.

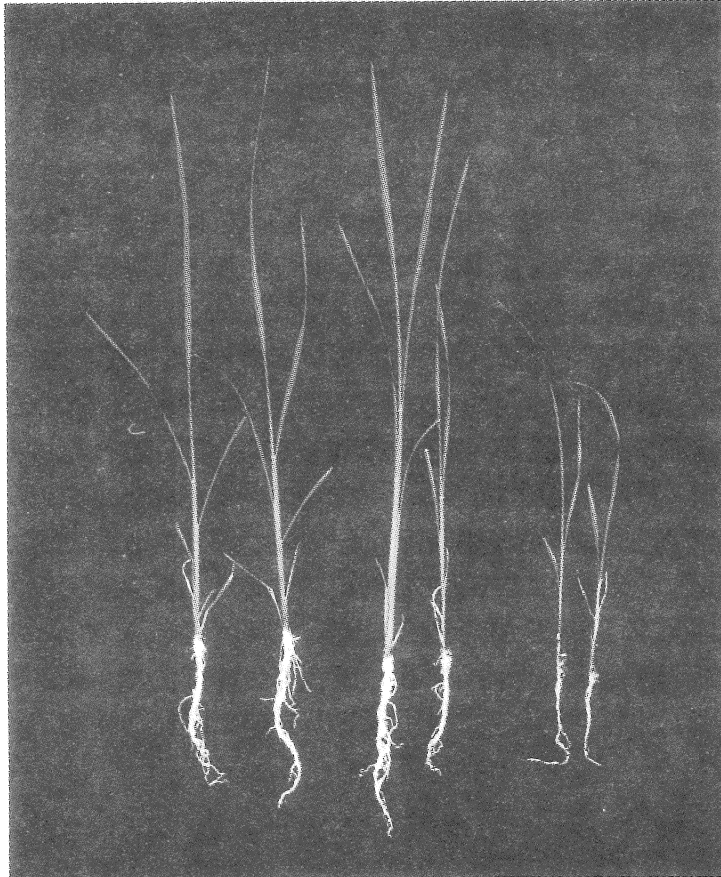


Figure 3. Growth of wild-type and transgenic rice under salt stress. The 3-week old plants were subjected to salt stress in 0.15 M NaCl for a week, and then plants were allowed to grow under non-stress condition for additional 3 weeks. Left two plants, ChlCOD plants; middle two, CytCOD plants; right two, wild-type plants.

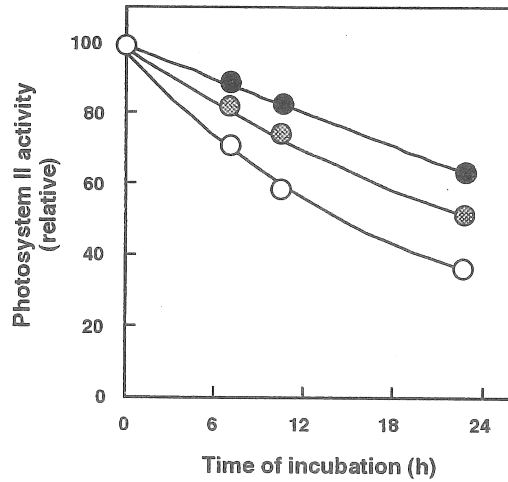


Figure 4. Photosystem II activity of wild-type and transgenic rice under salt stress. Leaves from wild-type and transgenic plants were inoculated in 0.1 M NaCl at 28°C under illumination ($300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). ○—○, wild-type plant; ●—●, ChICOD plant (line #2); ◐—◐, CytCOD plant (line #27).

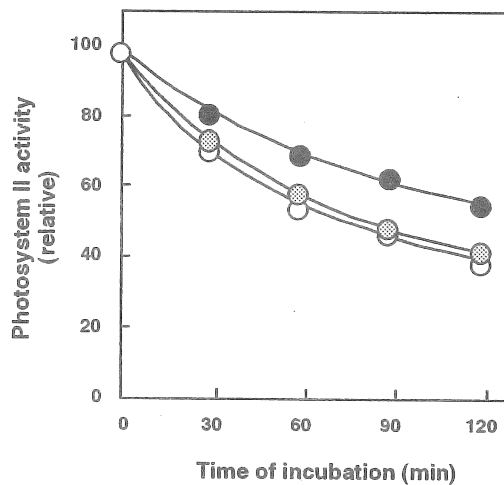


Figure 5. Photosystem II activity of wild-type and transgenic rice under low-temperature photoinhibition. Leaf disks from wild-type and transgenic plants were incubated at 5°C under high light ($1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). ○—○, wild-type plant; ●—●, ChICOD plant (line #2); ◐—◐, CytCOD plant (line #27).

Study on Salt tolerance in Transgenic Rice with the Gene for Choline Oxidase

Norio Murata and Atsushi Sakamoto
National Institute for Basic Biology

Summary

Development of genetically-engineered crops with enhanced stress tolerance is an important challenge in plant biotechnology. Glycinebetaine, an efficient compatible solute found in a number of halotolerant species of plants and bacteria, is implicated in playing a crucial role on the protection of cellular functions from salt and dehydration stresses.

Cereal crops with agronomical impacts such as rice do not accumulate glycinebetaine and cannot grow in high salt environments. In attempt to enhance salt tolerance in cereal crops, genetically-engineered rice (*Oryza sativa* L.) that acquires the ability to synthesize glycinebetaine has been established by introduction of the *codA* gene that encodes choline oxidase, a glycinebetaine-synthesizing enzyme, from the soil bacterium *Arthrobacter globiformis*. The *codA* gene was successfully inherited to the second generation of transgenic rice and its expression was stably maintained at levels of the mRNA, the protein and the enzyme activity. Levels of glycinebetaine accumulated in leaves were estimated as high as 1 and 5 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fresh weight of two types of transgenic plants that targeted choline oxidase into the chloroplasts (ChlCOD plants) and to the cytosol (CytCOD plants), respectively. Inactivation of photosynthesis as a measure of the cellular damage indicated that ChlCOD plants performed better than CytCOD plants against salt and low-temperature photoinhibition, despite the fact that higher accumulation of glycinebetaine was observed in CytCOD plants. These results indicated that subcellular compartmentation of glycinebetaine biosynthesis is a critical element to efficiently enhance stress tolerance of engineered plants.