

9720 ナトリウム排出機能の増強による耐塩性植物の作出

助成研究者：坂本 敦 (岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所)
共同研究者：村田 紀夫 (岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所)

多くの陸生植物は塩類集積土壌に生育できない。したがって土壌の塩濃度は植物を取り巻くさまざまな環境因子のなかでも、その生存にかかわる最も基本的な因子の1つである。高塩環境に強い植物の適応機構として主に、(1)細胞内に適合溶質を多量に蓄積し外部環境との浸透圧のバランスを保つことで塩の流入や水分の流出を抑え、その生理機能を保護する機構や、(2)細胞内に流入した塩を積極的に細胞外あるいは液胞に汲み出すことで、塩ストレスを回避する機構などが知られている。これまでのところ適合溶質に関する研究とは対照的に、塩(Na^+)排出に関する生化学的・分子生物学的知見は植物では少なく、耐塩性の遺伝子工学のターゲットとしてもその研究はかなりたち遅れているのが現状である。本研究の目的は遺伝子操作による Na^+ 排出機能の増強により植物が耐塩性を獲得する可能性を探ることである。植物細胞において塩の細胞基質からの排出を担うおもな因子の1つは、 Na^+/H^+ アンチポーターであると推定されている。そこで分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)起源の Na^+/H^+ アンチポーター遺伝子を、塩感受性の高等植物アラビドプシスに導入し、 Na^+ 排出機能が向上したトランスジェニック植物を作出することを試みた。

分裂酵母の Na^+/H^+ アンチポーター(*sod2*)遺伝子を強力で構成的なプロモーターの発現制御下においてTiバイナリープラスミドに組み込み、アグロバクテリウムを介してアラビドプシスに遺伝子導入した。遺伝子導入処理後、ベクターが持つ薬剤耐性遺伝子の発現を指標にハイグロマイシンに耐性なトランスジェニック植物(T_0)を選抜した。さらに得られた個体を自家受粉し、トランスジェニック後代(T_1)を得た。トランスジェニック植物ゲノムへの*sod2*遺伝子の統合をPCR法により確認した。またトランスジェニック植物における*sod2*遺伝子の転写産物の存在を、*sod2*遺伝子に特異的なプライマーとポリ(A)鎖に相補的なプライマーを用いた逆転写PCR法により確認した。しかしノーザンブロット法では*sod2*遺伝子の転写産物を検出することができなかった。これらの結果は、トランスジェニック植物組織において*sod2*遺伝子は転写されているが、その転写産物は不安定かきわめて低いレベルでしか存在していないことを示している。現在、*sod2*遺伝子を構成的ではなく塩誘導性プロモーターの発現制御のもとでアラビドプシスに導入している。

9720 ナトリウム排出機能の増強による耐塩性植物の作出

助成研究者：坂本 敦 (岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所)
共同研究者：村田 紀夫 (岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所)

1. 研究目的

多くの陸生植物は塩類集積土壌に生育できない。したがって土壌の塩濃度は植物を取り巻くさまざまな環境因子のなかでも、その生存にかかわる最も基本的な因子の1つである。高塩環境に強い植物の適応機構として主に、細胞内に適合溶質を多量に蓄積し外部環境との浸透圧のバランスを保つことで塩の流入や水分の流出を抑え、その生理機能を保護する機構や、細胞内に流入した塩を積極的に細胞外あるいは液胞に汲み出すことで、塩ストレスを回避する機構などが知られている。これらの機構にあずかる因子は、植物の耐塩性向上をめざす遺伝子工学のターゲットである。実際適合溶質については、その生合成経路の解明やそれに関わる酵素のクローニングが進み、すでに適合溶質の合成能を増強したトランスジェニック植物の作出が精力的に行われている。私たちの研究グループも耐塩性植物で顕著に蓄積される適合溶質の1種、グリシンベタインを標的とした遺伝子工学によりアラビドプシスおよびイネの耐塩性を増強することに成功している [1-4]。しかし適合溶質に関する研究とは対照的に、植物における塩 (Na^+) 排出に関する生化学的・分子生物学的知見は少なく、耐塩性の遺伝子工学のターゲットとしてのその研究もかなりたち遅れているのが現状である。本研究の目的は遺伝子操作による Na^+ の細胞基質からの排出機能の増強により植物が耐塩性を獲得する可能性を探ることである。植物細胞において塩の細胞基質からの排出を担うおもな因子の1つは、 Na^+/H^+ アンチポーターであると推定されている。 Na^+/H^+ アンチポーターは細胞内外 (原形質膜局在型) あるいは液胞内外 (液胞膜局在型) の $[\text{Na}^+]$ および $[\text{H}^+]$ に依存してそれらの対向輸送を行う膜タンパク質である。これまでのところ細菌、酵母、哺乳類などからクローニングされているが、植物起源の遺伝子・cDNA については未だ報告例はない。そこで分裂酵母起源の Na^+/H^+ アンチポーターの遺伝子 (*sod2*) を、塩感受性の高等植物アラビドプシスに導入し、 Na^+ 排出機能が向上したトランスジェニック植物を作出することを試みた。

2. 研究方法

2.1. 研究材料

アラビドプシス (*Arabidopsis thaliana* ecotype Wassilewskija) を形質転換の宿主植物に使用した。アグロバクテリウムによる遺伝子導入に使用した菌株と Ti バイナリープラスミドはそれぞれ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 と pIG121Hm で、ともに名古屋大学農学部・中村研三先生より分譲していただいた。*sod2* 遺伝子の cDNA クローニングに用いた分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) は東京学芸大学教育学部・飯田秀利先生から供与していただいた。

2.2. *sod2* 発現ベクターの構築

sod2 cDNA は *S. pombe* の全 RNA を鋳型とした逆転写 PCR により得た。逆転写反応は oligo(dT)₁₂₋₁₈ をプライマーとして TimeServer cDNA Synthesis Kit (Pharmacia Biotech) により行った。PCR に用いたプライマーは既報 [5] により設計したが、Ti プラスミドへの組込みのため *Xba*I あるいは *Sac*I サイトを導入した (下線は制限酵素部位を示す)。

SOD1 (sense): 5'-aatctagaaaacattctctgtgga-3'

SOD2 (antisense): 5'-gggagctcctaaacgtaatcttctcg-3'

PCR の条件は以下の通り: denaturation, 95°C/1 min; annealing, 50°C/1.5 min; polymerization, 72°C/2 min。増幅した cDNA (約 1.45 kbp) は *Xba*I/*Sac*I 切断後、pIG121Hm の同制限部位に β -glucuronidase 遺伝子と置換する形で挿入した (pIGsod2 と命名)。 *sod2* 遺伝子の領域はその塩基配列を決定し、PCR による変異の導入のないことを確認した。pIGsod2 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 (Fig. 1)。

2.3. トランスジェニック・アラビドプシスの作出

pIGsod2 をアグロバクテリウムに導入し、アラビドプシスの胚軸を形質転換に使用した。寒天培地上でハイグロマイシン耐性カルスをトランスジェニック細胞として選抜し、これらを植物体に再分化させた。自家交配後 T1 種子を得た。実験には T1 世代を用いた。

2.4. トランスジェニック・アラビドプシスの分子生物学的解析

導入した *sod2* 遺伝子が自家交配を経て T1 世代に受け継がれているかどうかを調べるために、T1 トランスジェニック体の葉から DNA を単離し、35S プロモーターの配列を基にしたプライマー (35S: 5'-tcggtgagatgcctctgccga-3') と SOD2 プライマーを用いて PCR を行った。ついで *sod2* 遺伝子の発現を調べるため T1 トランスジェニック体から

全 RNA を抽出し、これを逆転写 PCR に使用した。逆転写反応は oligo(dT) 配列を含むプライマー (dT_M4) で行い、PCR は SOD3 および M4プライマーで上記と同様の条件で行った。

dT_M4: 5'-gttttcccagtcacgactttttttttttttt-3'

SOD3 (sense): 5'-agttagacacctgttgatgt-3'

M4: 5'-gttttcccagtcacgac-3'

PCR により増幅された DNA 断片はプラスミドベクター pT7Blue(R) (Novagen) にサブクローニングし、その塩基配列をサイクルシークエンシング法により決定した。同じ RNA 調製品をノーザンプロット分析にも使用した。ハイブリダイゼーションプローブとして *sod2* 遺伝子および *hph* 遺伝子のコード領域をランダムプライム法によりを ³²P で標識した。

3. 研究結果

S. pombe の Na⁺/H⁺ アンチポーター遺伝子 *sod2* はそのコード領域内に1個のイントロンを持つので、その cDNA を逆転写 PCR で取得後、双子葉植物で強力かつ構造的な転写能を有するカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの制御下においてアグロバクテリウム感染法を用いてアラビドプシスに導入した。遺伝子導入処理後、ベクターが持つ薬剤耐性遺伝子の発現を指標にハイグロマイシンに耐性なトランスジェニック植物 (T0) を選抜した。さらに得られた個体を自家受粉し、トランスジェニック次世代 (T1) を得た。

T1 植物ゲノムへの *sod2* 遺伝子の統合を確認するためにゲノム DNA を調製後、35S-*sod2* 遺伝子を増幅する PCR を行った (Fig. 2)。その結果、ハイグロマイシン耐性を示す植物については全て予想されるサイズ (1.7 kbp) の DNA が増幅され、トランスジェニック次世代においても *sod2* 遺伝子が安定に保持されていることが明らかとなった。

次いで T1 植物において *sod2* 遺伝子が転写されているかどうかを知るために、トランスジェニック植物から抽出した RNA に対する cDNA を鋳型として *sod2* 転写産物について逆転写 PCR を行った。Figure 3 に示したように、この場合もトランスジェニック植物に関してのみほぼ予想された分子サイズ (0.7 kbp) を持つ cDNA が増幅された。この cDNA 断片をプラスミドベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定した。増幅された配列はその 3' 末端にポリ (A) 鎖を含んでおり、したがってこの cDNA が確かに *sod2* 遺伝子の転写産物に由来することを確認した。以上の結果は、導入された *sod2* 遺伝子は T1 植物において転写されていることを示している。

さらに *sod2* 遺伝子の転写レベルを調べるためにノーザンプロット分析を行ったが、予想に反して *sod2* 遺伝子の転写産物を検出することができなかった (Fig. 4)。対照実験として *sod2* 遺伝子に隣接し、同じ 35S プロモーターの転写制御下にあるハイグロマイシン耐性遺伝子について同様

に転写産物のレベルを調べたところ、この遺伝子についてはシグナルが検出された。これらの結果は、トランスジェニック植物組織において *sod2* 遺伝子は転写されているが、その転写産物は不安定かきわめて低いレベルでしか存在していないことを示している。

4. 考察

植物、特に農作物のストレス耐性の強化は現代植物科学の重要な課題の1つである。本研究では耐塩性の強化を目的に、 Na^+ の細胞基質からの排出能力を増強したトランスジェニック植物の作出を試みた。これまでは、植物への耐塩性の付与の遺伝子工学的手法として適合溶質生合成系の遺伝子導入というアプローチが取られてきたが、耐塩性の強化により効果があると考えられる Na^+ 排出機能の強化を試みた例は植物ではない。植物では主にその機能を担うと考えられる Na^+/H^+ アンチポーターはクローニングされていないので、植物に近い真核細胞である酵母の遺伝子 *sod2* を利用した。酵母において *sod2* 遺伝子産物は原形質膜に局在している。アラビドプシスに導入した *sod2* 遺伝子は次世代に安定に保持されていたが、得られた全てのトランスジェニック体についてその発現レベルがきわめて低いことが明らかとなった。この理由として以下の事由が推察される。

(i) 強力で構成的なプロモーターを用いた *sod2* 遺伝子の発現はアラビドプシスの細胞生理や生育に不利なため、結果として発現量の低い個体しか得られなかった。

(ii) Gene silencing による導入遺伝子の不活性化。

(iii) *sod2* 転写産物がアラビドプシス組織においてきわめて不安定である。

これらのうち (i) については大腸菌や酵母では Na^+/H^+ アンチポーター遺伝子の高発現は耐塩性をもたらすものの、そのレベルによってはこれらの細胞の増殖を著しく阻害することが報告されている [5]。また (iii) についても heterologous な遺伝子、特に原核起源の遺伝子の場合、導入した遺伝子のコード領域内にスプライシングや転写終結・ポリ(A)化等の RNA のプロセッシングに関与するシス因子として誤認識される配列を含んでいることがあり、転写産物がノーザン分析等で検出されない例がある [6]。トランスジェニック・アラビドプシスにおけるきわめて低い *sod2* 遺伝子の発現について、私たちはこのうち (i) の可能性が一番高いと考えている。それは本研究では真核細胞で比較的植物細胞に近い酵母の遺伝子を用いていること、また得られた独立したトランスジェニック個体について一様にノーザン分析で転写産物が検出されないことから、(ii) と (iii) の可能性は低いと考えられるからである。これらの問題を回避するためには (i) については必要な時だけ導入遺伝子を発現させる転写制御系の適用 (この場合、塩誘導性プロモーターの利用)、(ii) についてはできるだけ多くの導入遺伝子に関して低コピー数のトランスジェニック個

体の獲得することが挙げられる。(iii)については植物起源の遺伝子配列の報告のない現段階では有効な手段はないが、できるだけ植物に近縁な真核起源のものを導入することが望ましいといえる。

5. 今後の課題

導入した *sod2* 遺伝子により Na^+/H^+ アンチポート活性の向上が表現型として認められるトランスジェニック植物の作出が急務である。現在、導入遺伝子の発現の side effect を回避することを目的に、アラビドプシス起源の塩誘導性プロモーターを利用したキメラ *sod2* 遺伝子をアラビドプシスに導入している。また、導入遺伝子の細胞内局在ならびに組織特異性発現についても今後検討する必要があると考えられる。最近、出芽酵母から液胞膜に局在すると推定される新規の Na^+/H^+ アンチポーターが報告されたので [7]、この遺伝子の植物細胞への導入も考えている。

6. 文献

- [1] H. Hayashi, Alia, L. Mustardy, P. Deshnum, M. Ida, 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.* **12**: 133-142.
- [2] Alia, H. Hayashi, T. Chen, N. Murata (1998) Transformation with a gene for choline oxidase enhances the cold tolerance of *Arabidopsis* during germination and early growth. *Plant Cell Environ.* **21**: 232-239.
- [3] H. Hayashi, Alia, A. Sakamoto, H. Nonaka, T.H.H. Chen, N. Murata (1998) Enhanced germination under high-salt conditions of seeds of transgenic *Arabidopsis* with a bacterial gene (*codA*) for choline oxidase. *J. Plant Res.*, in press.
- [4] A. Sakamoto, Alia, N. Murata (1998) Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant Mol. Biol.*, in press.
- [5] Z.-P. Jia, N. McCullough, R. Martel, S. Hemmingsen, P.G. Paul (1992) Gene amplification at a locus encoding a putative Na^+/H^+ antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast. *EMBO J.* **11**: 1631-1640.
- [6] F.J. Perlak, R.L. Fuchs, D.A. Dean, S.L. McPherson, D.A. Fischhoff (1991) Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 3324-3328.
- [7] R. Nass, K.W. Cunningham, R. Rao (1997) Intracellular sequestration of sodium by a novel Na^+/H^+ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H^+ -ATPase: insights into mechanisms of sodium tolerance. *J. Biol. Chem.* **272**: 26145-26152.

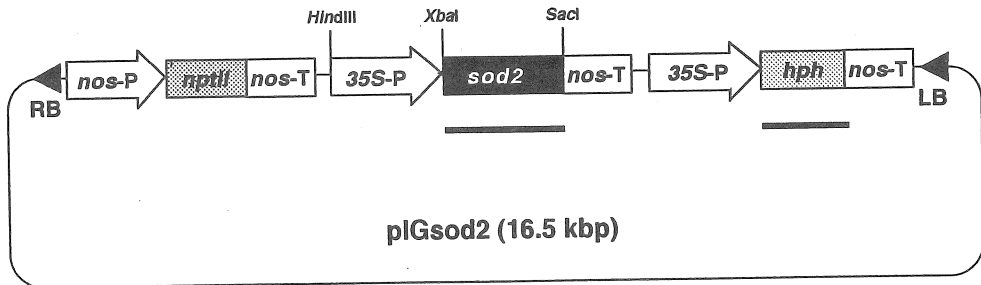
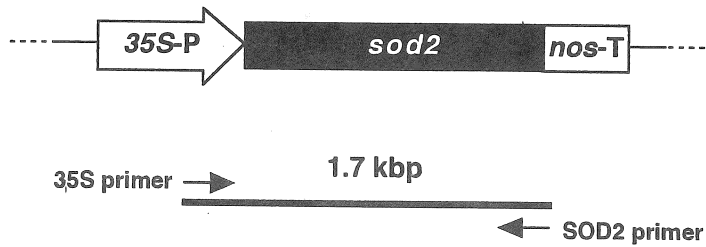


Figure 1. Schematic representation of pIGsod2. Abbreviations used are: 35S-P, promoter of the 35S RNA gene from cauliflower mosaic virus; *hph*, gene conferring hygromycin resistance; LB, left border of the T-DNA; *nos-P*, promoter of the gene for nopaline synthase; *nos-T*, transcriptional terminator of the gene encoding nopaline synthase; *nptII*, gene conferring kanamycin resistance; RB, right border of the T-DNA; *sod2*, gene encoding Na⁺/H⁺ antiporter from *S. pombe*. Horizontal bars refer to the regions that were used for synthesis of the probes for Northern blot analysis.

A



B

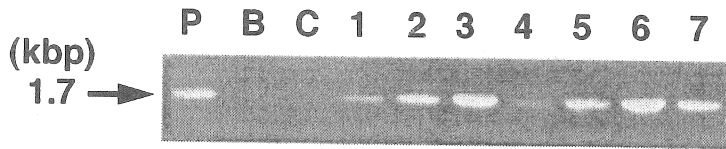
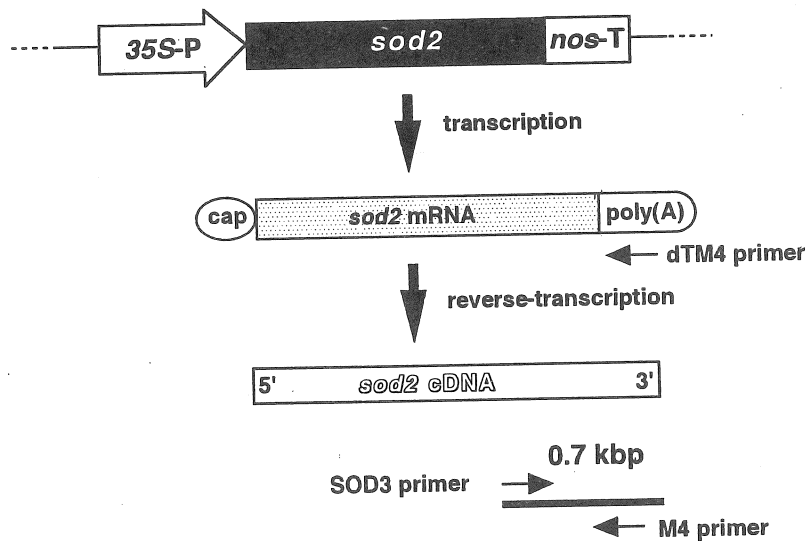


Figure 2. PCR analysis to confirm the presence of the *sod2* gene in transgenic *Arabidopsis*. **A.** Genomic DNA from a T1 transgenic plant was amplified by PCR with 35S and SOD2 primers. A 1.7-kbp fragment is expected to be amplified. See the legend of Figure 1 for abbreviations. **B.** PCR products were resolved on a 0.8% agarose gel and visualized by the staining with ethidium bromide. Templates used for PCR are: P, plasmid pIGsod2; B, blank (no DNA added); C, wild-type plants as control; 1-7, independent transgenic plants.

A



B

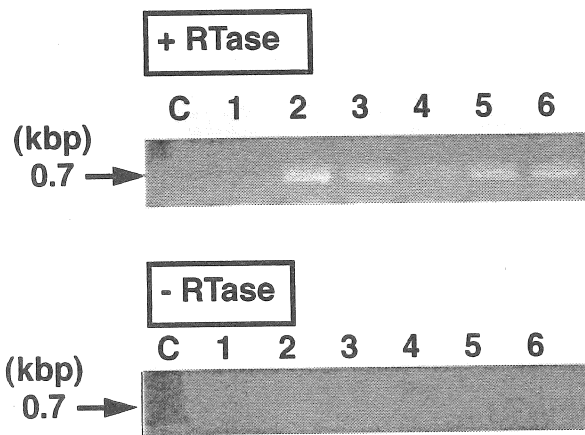


Figure 3. Reverse-transcription-PCR (RT-PCR) analysis to examine the occurrence of the *sod2* transcripts in transgenic *Arabidopsis*. A. Scheme for the analysis. Total RNA extracted from a whole shoot of a transgenic plant was reverse-transcribed with murine reverse transcriptase (RTase) with dTM4 primer that contained an oligo(dT) tail. After the reaction, cDNAs were subjected to PCR with SOD3 and M4 primers. cDNAs derived from the *sod2* gene would produce approximately a 0.7-kbp fragment in RT-PCR. See the legend of Figure 1 for abbreviations. B. Products of RT-PCR were analyzed on a 1.2% agarose gel and stained with ethidium bromide. +RTase, RTase was added in reverse-transcription reaction; -RTase, RTase was omitted in reverse-transcription reaction. Abbreviations used are: C, wild-type plants as control; 1-6, independent transgenic plants.

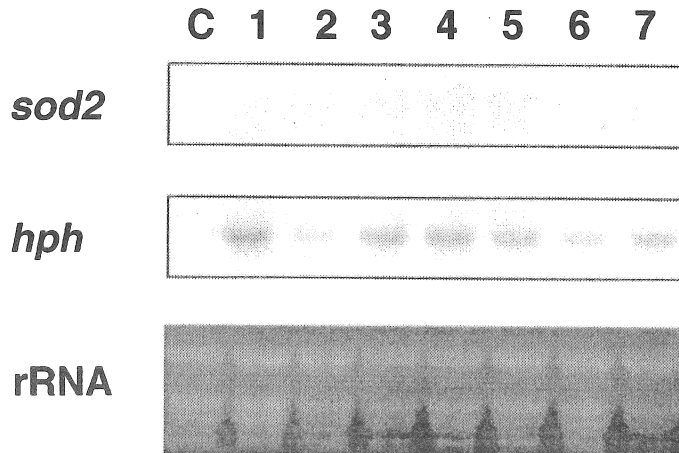


Figure 4. Steady-state levels of the transcripts for *sod2* and *hph* genes in transgenic *Arabidopsis*. Total RNA (10 μ g) was denatured, fractionated on a 1.2% agarose gel containing 0.66 M formaldehyde, and blotted on a nylon membrane. Membranes were hybridized with the 32 P-labeled probes derived from a coding region of *sod2* (top panel) or *hph* (middle panel) gene, as indicated in Figure. 1. As a loading control, rRNAs are visualized with ethidium bromide before blotting procedure (bottom panel). Abbreviations used are: C, wild-type plants as control; 1-7, independent transgenic plants.

Engineering Na⁺/H⁺ antiport in higher plants for salt tolerance

Atsushi Sakamoto and Norio Murata

National Institute for Basic Biology

Summary

Salinity is a critical factor that severely affects the growth and the productivity of a large proportion of land plants. Nevertheless, halophytic plants can survive and grow in high-salt environments by acclimatized processes that include biosynthesis and accumulation of compatible solutes, and intra- and extra- cellular sequestration or compartmentation of excess amounts of Na⁺. Recent progress in transgenic studies has demonstrated the possibility of metabolic engineering of compatible solutes as a strategy to confer salt protection to plants. On the contrary, little effort has been made with Na⁺ sequestration as the target for genetic engineering of salt tolerance. One of the staple elements in higher plants that is responsible for the sequestration of accumulated Na⁺ to vacuoles or extracellular spaces is regarded as an Na⁺/H⁺ antiporter. Thus far, however, no genes or cDNAs have been available of plant origin.

In an attempt to enhance salt tolerance of higher plants, *Arabidopsis thaliana*, a salt-sensitive species, was transformed *via* Agrobacterium-mediated method with a gene (*sod2*) encoding Na⁺/H⁺-antiporter from a fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* under a strong, constitutive promoter. Molecular analysis by polymerase chain reaction (PCR) with genomic DNA from transformed plants confirmed that the introduced gene was stably incorporated and was transmitted to the secondary generation. Reverse-transcription-PCR analysis using total RNA indicated that the *sod2* gene was actively transcribed in transformed plants. In order to examine the steady-state levels, Northern blot analysis was performed with the same RNA preparations but failed to detect the *sod2* transcripts. These results suggested that the *sod2* mRNA is unstable or the levels of the transcripts were extremely low in transformed plants. Currently, the *sod2* gene is being introduced into *Arabidopsis* plants under the transcriptional control of a salt-inducible promoter.