

9819  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ アンチポーター遺伝子を導入した形質転換植物の耐塩性

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)

土壌の塩類集積化や植生地の砂漠化等による緑の消失は、地球の生態系に極めて大きな影響を与えつつある。陸生植物生育圏の拡大はこれに対する現実的方策の1つであり、塩や乾燥等の環境ストレスに耐性な植物の育成、特に遺伝子操作による分子育種は現代植物科学に課せられた重要なテーマである。多くの陸生植物は塩類集積土壌に生育できないが、高塩濃度環境に耐性な植物種は、その適応機構として適合溶質を生合成したり、細胞内に流入した塩を積極的に細胞外や液胞に分配したりして細胞機能を維持し、塩ストレスを回避する。これらの適応機構にあずかる因子は、植物の耐塩性化を目指す遺伝子工学の標的である。植物では塩 ( $\text{Na}^+$ ) 排出の細胞機能に関する生化学・分子生物学的知見は乏しいが、その役割を果たしているおもな因子の1つは  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  アンチポーターであると推定されている。本研究では遺伝子操作による  $\text{Na}^+$  排出機能の強化により植物が耐塩性を獲得する可能性を探ることを目的とした。

$\text{Na}^+$  の液胞への分配機能が塩ストレス存在下で増強される形質転換植物を作出するため、液胞膜で機能すると考えられる酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  アンチポーターをコードする遺伝子 *nhx1* を、塩ストレスにより転写誘導されるシロイヌナズナのプロモーターの発現制御下に置いたキメラ遺伝子を構築した。これ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た。形質転換植物において導入した *nhx1* 遺伝子の発現は、予想通り非ストレス条件下では抑制されているが、塩ストレスにより転写レベルで誘導された。*nhx1* 遺伝子の導入により形質転換植物において耐塩性が向上しているかどうかを調べるために、野生型および形質転換植物の種子を 100 mM および 200 mM NaCl を含む MS 培地上に無菌的に播種し、その発芽率および幼植物体の生育を比較したが、野生型植物と形質転換植物の間での耐塩性について有意な差は観察されなかった。形質転換植物のより詳細な耐塩性の評価は今後の課題であるが、 $\text{Na}^+$  の排出機構の強化による植物の耐塩性の遺伝子工学的増強の可能性を追求するうえで、有用な研究材料を作出できた考える。



9819  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ アンチポーター遺伝子を導入した形質転換植物の耐塩性

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

土壌の塩類集積化や植生地の砂漠化等による緑の消失は、地球の生態系に極めて大きな影響を与えつつある。陸上植物生育圏の拡大はこれに対する現実的方策の1つであり、塩や乾燥等の環境ストレスに耐性な植物の育成、特に遺伝子操作による分子育種は現代植物科学に課せられた重要なテーマである。植物に塩害をもたらすイオンのなかで最も重要視されているのはナトリウムイオン ( $\text{Na}^+$ ) である。多くの陸生植物は  $\text{Na}^+$  類集積土壌に生育できないが、高塩濃度環境に耐性のある植物種は、その適応機構としてベタインや糖アルコールなどの低分子性有機化合物 (適合溶質) を生合成したり、また細胞内に流入した塩を積極的に細胞外や液胞に分配したりして細胞機能を維持し、塩ストレスを回避していると考えられる。これらの適応機構にあずかる因子は、植物の耐塩性化を目指す遺伝子工学の標的であり、実際適合溶質に関する遺伝子工学の成果として私たちの研究グループはベタイン合成系の遺伝子導入により、ラン藻、シロイヌナズナおよびイネの耐塩性の増強に成功している (Deshnium *et al.*, 1995; Hayashi *et al.*, 1997; 1998; Sakamoto *et al.*, 1998)。

植物では  $\text{Na}^+$  排出の細胞機能に関する生化学・分子生物学的知見は乏しいが、その役割を果たしている主な因子の1つは  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  アンチポーターであると推定されている。膜内外の  $\text{Na}^+$  濃度とプロトン濃度 (pH) に依存してこの2種の陽イオンの対向輸送を行うこの膜タンパク質は、高等植物では原形質膜および液胞膜において機能していると推定されている。本研究では遺伝子操作による  $\text{Na}^+$  排出機能の強化により植物が耐塩性を獲得する可能性を探ることを目的に、(1) 塩誘導性プロモーターの発現制御下にある酵母由来の液胞膜型  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  アンチポーター遺伝子を塩感受性の高等植物に導入し、塩ストレス下においてのみ高い  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  アンチポート活性を発現する形質転換植物を作成する；(2) 塩条件下での  $\text{Na}^+$  の細胞基質からの排出機能の強化が、植物の耐塩性化に有効かどうかを調査する。

## 2. 研究方法

### 2.1. 研究材料および植物の生育条件

液胞膜型  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  アンチポーター遺伝子のクローニングのために出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* RAY3AD) を材料とした。遺伝子導入の宿主植物としてはシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* ecotype Wassilewskija) を用いた。シロイヌナズナへの遺伝子導入の際にはアグロバクテリウム *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 を用いた。コントロール (野生型) 植物および形質転換植物は  $22^\circ\text{C}$ , 16時間光照射 ( $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 条件下で栽培した。種子は滅菌処理後, この条件に移す前に 2 日間  $4^\circ\text{C}$  にさらし休眠を打破した。

### 2.2. *S. cerevisiae* $\text{Na}^+/\text{H}^+$ アンチポーター遺伝子のクローニングとその発現ベクターの構築

*S. cerevisiae* の液胞膜型  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  アンチポーター遺伝子 (*nhx1*) はイントロンを含まないので, 酵母細胞よりグラスビーズ法により全 DNA を抽出し, これを鋳型とした PCR により約 1.9 kbp の構造遺伝子部分のみを取得した。PCR に用いたプライマー (YDR456W3, YDR456W2) の配列は既報 (Nass et al., 1997) の塩基配列を元に決定したが, 植物細胞発現ベクターの構築を容易にするためその 5' および 3' 末端にはそれぞれ *NcoI*, *SacI* 認識配列を導入した (下線参照)。

YDR456W3: 5'-atccatggtatccaaggtattgctgaat-3' (sense)

YDR456W2: 5'-atgagctcctagtggtttgggaagagaaatc-3' (antisense)

PCR には LA Taq polymerase (ver. 2, Takara Shuzo) を使用し, 以下の反応条件で行った: denaturation,  $98^\circ\text{C}/20 \text{ sec.}$ ; annealing and extension,  $66^\circ\text{C}/3 \text{ min.}$  (30 cycles)。増幅した DNA 断片は一旦 TA ベクター (pT7Blue(R), Novagen) にクローニングし, その塩基配列を決定して PCR による塩基置換のないことを確認した。このプラスミドを *NcoI/SacI* 切断し *nhx1* 遺伝子を回収したのち, 塩誘導性プロモーターを持つ Ti バイナリープラスミド pRDsod2 (未発表) の当該制限酵素部位に挿入した (pRDnhx1; Fig. 1)。

### 2.3. 形質転換シロイヌナズナの作出

pRDnhx1 を凍結融解法によりアグロバクテリウムに導入し, これを常法によりシロイヌナズナの胚軸に対して感染させた。ハイグロマイシンおよびカナマイシン抵抗性を指標に遺伝子導入細胞を選抜し, 植物体まで再分化させた。得られた形質転換植物を自家交配

させ、T1 種子を取得しこれを実験に用いた。

#### 2.4. 形質転換シロイヌナズナの分子生物学的解析

導入した *nhx1* 遺伝子が T1 世代に受け継がれているかを調べるために T1 形質転換植物から DNA を調製し上記プライマーを用いた PCR を行ったのち、Southern hybridization に供じた。また常法に従い形質転換植物から全 RNA を抽出し、Northern hybridization を行った。プローブとして pRDnhx1 の *NcoI/SacI* 切断により回収した *nhx1* 遺伝子断片をランダムプライム法により<sup>32</sup>P で標識した。塩ストレスによる遺伝子発現の誘導は植物体を 200 mM NaCl に 3 時間さらすことにより行った。

#### 2.5. 形質転換シロイヌナズナの耐塩性の検定

コントロール植物および形質転換植物由来の種子を 100 mM または 200 mM NaCl を含む MS 培地上で発芽・生育させ、播種 2 日後の発芽率および 7 日後の幼植物体の生育（新鮮重量）を比較した。

### 3. 研究結果

$\text{Na}^+$  の液胞への分配機能が塩ストレス存在下で増強される形質転換植物を作出することを目的に、液胞膜で機能すると考えられる *S. cerevisiae* の  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  アンチポーターをコードする遺伝子 *nhx1* を、塩ストレスに応答するシロイヌナズナのプロモーター (*rd29 A promoter*; Yanmaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994) の発現制御下に置いた Ti バイナリーベクターを構築した。このプラスミドを持つアグロバクテリウムによる遺伝子導入により抗生物質耐性を示す独立した 5 個体の形質転換シロイヌナズナを得た。これらの形質転換植物はコントロール植物と比較して生育や形態に相違は認められなかった。これらの形質転換当代を自家受粉して得られた T1 植物について *nhx1* 遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR/Southern hybridization を行い、当該遺伝子が形質転換体に導入されており、導入遺伝子が安定して次世代に受け継がれていることを確認した (Fig. 2)。

導入した *nhx1* 遺伝子は恒常的ではなく塩誘導性のプロモーターの発現制御下にあるので通常の生育条件では発現していないと考えられた。そこで非ストレス条件下で生育させ形質転換植物から全 RNA を抽出し、*nhx1* 遺伝子をプローブとして Northern hybridization を行ったところ、予想通りその発現は検出できなかった (data not shown)。ついで形質転換体および野生型植物を 200 mM NaCl の塩ストレス下で 3 時間処理したのち、全 RNA を抽出し再び Northern hybridization を行ったところ、5 系統ある形質転

換体のうちの2系統 (lines 2 and 5) で塩による *nhx1* 遺伝子の発現誘導がみられた (Fig. 3)。他の3系統については遺伝子は導入されているものの転写レベルでその発現は不活性化していた。また塩ストレスによる遺伝子発現誘導のポジティブコントロールである内因性の *rd29A* 遺伝子の発現は、この塩ストレス処理によりコントロール植物および全ての形質転換体において転写誘導を受けた (Fig. 3)。

*nhx1* 遺伝子の導入により形質転換植物において耐塩性が向上したかどうかを調べるために、コントロール植物および形質転換植物の種子を 100 mM および 200 mM NaCl を含む MS 培地上に無菌的に播種し、その発芽率および幼植物体の生育を比較した (Table 1)。これらの2つのパラメーターで見ると、発芽とその後の生育における野生型植物と形質転換植物の間での耐塩性について有意な差は観察されなかった。

#### 4. 考察・今後の課題

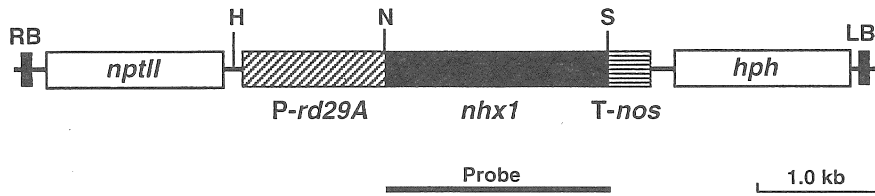
植物の耐塩性を強化する上で、 $\text{Na}^+$  の排出機構を付与することは有効な戦略と考えられる。この機構にあずかる因子の1つは  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  アンチポーターであるが、通常植物細胞において  $\text{Na}^+$  は生理的・代謝的に不活性な液胞に積極的に蓄積されるため、酵母由来の液胞膜型  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  アンチポーターを標的としてシロイヌナズナに遺伝子導入した。またこの外来遺伝子の発現による潜在的な形質転換植物への悪影響を回避するため、その発現をストレス誘導性プロモーターにより制御した。形質転換植物において導入した *nhx1* 遺伝子は、予想通り非ストレス条件下では発現しないが、塩ストレスにより転写レベルで誘導されることを確認した。ただし、*nhx1* 遺伝子のタンパク質およびその活性レベルの解析はまだ行っていない。これに関して本研究課題で現在おさえるべきポイントとして以下の2点を考えている。(1) *nhx1* 遺伝子のタンパク質レベルでの発現解析。(2) 形質転換植物細胞におけるこの遺伝子産物の液胞膜へのターゲティング。これらの点を明らかにするために現在、未分化細胞（カルスあるいは培養細胞）を実験系に用いることを検討している。

形質転換植物の耐塩性を評価するうえでは予備的なものであると考えるが、種子を用いた耐塩性の検定実験の結果は、残念ながら形質転換植物の耐塩性の向上を示唆するものではなかった。この理由として生育の初期段階では導入遺伝子産物の機能発現部位である液胞が十分発達していないことが考えられる。形質転換植物のより詳細な耐塩性の評価は今後の課題である。形質転換体の耐塩性を厳密に評価するためには、様々な生育段階の植物体、さらに未分化の細胞についてその検定実験を行う必要がある。特に液胞の発達した組織・器官についてこれを行うことで、本研究課題で作出した形質転換植物の耐塩性に

いて明確に評価が行えることが期待される。

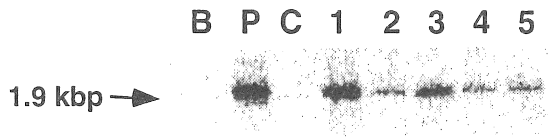
## 5. 文献

- Deshnium, P., Los D.A., Hayashi, H., Mustardy, L., Murata, N.** Transformation of *Synechococcus* with a gene for choline oxidase enhances tolerance to salt stress. *Plant Mol. Biol.* **29**: 897-907 (1995).
- Hayashi, H., Alia, Mustardy, L., Deshnum, P., Ida, M., Murata, N.** 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 (1997).
- Hayashi, H., Alia, Sakamoto, A., Nonaka, H., Chen, T.H.H., Murata, N.** Enhanced germination under high-salt conditions of seeds of transgenic *Arabidopsis* with a bacterial gene (*codA*) for choline oxidase. *J. Plant Res.* **111**: 357-362 (1998).
- Nass, R., Cunningham, K.W., Rao, R.** Intracellular sequestration of sodium by a novel  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase: Insights into mechanisms of sodium tolerance. *J. Biol. Chem.* **272**: 26145-26152 (1997).
- Sakamoto, A., Alia, Murata, N.** Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant Mol. Biol.* **38**: 1011-1019 (1998).
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.** A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* **6**: 251-264 (1994).



**Figure 1. Schematic representation of the T-DNA region of pRDnhx1.**

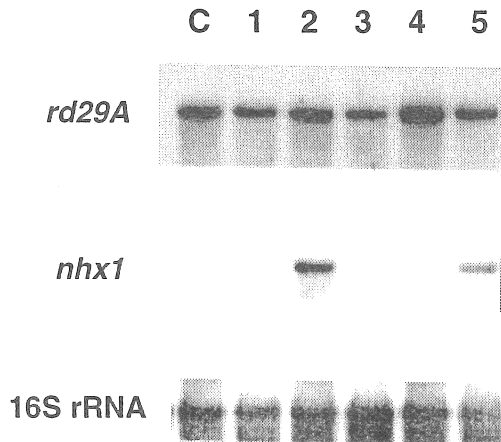
Abbreviations: *hph*, a gene conferring resistance to hygromycin under the control of the 35S promoter from cauliflower mosaic virus; LB, left border of T-DNA; *nhx1*, a gene encoding a putative vacuole-type  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter from *Saccharomyces cerevisiae*; *nptII*, a gene conferring resistance to kanamycin under the control of the promoter of the gene for nopaline synthase from the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTIT37; P-*rd29A*, the promoter for the *rd29A* gene from *Arabidopsis thaliana*; RB, right border of T-DNA; T-*nos*, the polyadenylation signal from the gene for nopaline synthase. Abbreviations for restriction sites: H, *Hind*III; N, *Nco*I; S, *Sac*I. A horizontal bar refers to the *nhx1*-coding region used as a probe for southern and northern blot analyses.



**Figure 2. PCR-Southern analysis to detect the *nhx1* transgene in transgenic *Arabidopsis*.**

Total DNA from a T1 transgenic plant was amplified by PCR with the primers YDR456W3 and YDR456W2. After resolving on a 0.8 % agarose gel, PCR products were transferred to a nylon membrane and hybridized to a  $^{32}\text{P}$ -labeled *nhx1* probe. Templates used for PCR were: B, blank (no DNA); P, pRDnhx1; C, wild-type plants, lanes 1 to 5, lines 1 to 5 of independent transgenic plants.





**Figure 3. Salt-induced expression of the *nhx1* transgene and endogenous *rd29A* gene in transgenic *Arabidopsis*.** Total RNA was isolated from wild-type and transgenic plants exposed to 300 mM NaCl for 3 hours at 22°C. An aliquot (10 µg) of the RNA was loaded on a 1.2% formaldehyde-agarose gel, transferred onto a nylon membrane, and hybridized to a <sup>32</sup>P-labeled probe derived from the *rd29A* gene (*top*), the *nhx1* gene (*middle*) or 16S rDNA (*bottom*). C, wild-type plants, lanes 1 to 5, lines 1 to 5 of independent transgenic plants.

**Table 1. Effect of salt stress on the frequency of germination of seeds from wild-type (WT) and transgenic plants (Lines 2 and 5) of *Arabidopsis*.**

NaCl (mM)	Germination frequency (%)		
	WT	Line-2	Line-5
0	100	100	100
100	63	66	60
200	0	0	0

Thirty seeds from wild-type and from each of the two lines of transgenic plants were imbibed at 22 °C for 2 hours and then placed on agar plates of MS medium containing 0, 100 or 200 mM NaCl. After incubation at 4 °C for 2 days, the seeds were transferred to 22 °C under 16-hour of light and 8-hour of dark daily. The frequency of germination was calculated 2 days after seeds were transferred to 22 °C.

**Table 2. Effect of salt stress on the growth of seedlings of wild-type (WT) and transgenic plants (Lines 2 and 5) of *Arabidopsis*.**

NaCl (mM)	Fresh weight (mg)		
	WT	Line-2	Line-5
0	31.2	32.1	31.2
100	10.1	10.7	9.4
200	1.3	1.2	1.0

Thirty seeds from wild-type and from each of the two lines of transgenic plants were imbibed at 22 °C for 2 hours and then placed on agar plates of MS medium containing 0, 100 or 200 mM NaCl. After incubation at 4 °C for 2 days, the seeds were transferred to 22 °C under 16-hour of light and 8-hour of dark daily. Fresh weight was measured 7 days after seeds were transferred to 22 °C. Average value from thirty seedlings is shown. The deviation of value was less than 5% in every case.

## Salt tolerance of plants transformed with a gene encoding an Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter

Atsushi Sakamoto and Norio Murata

*National Institute for Basic Biology, Okazaki 444-8585*

### Summary

Salinity and water deficit are two major constraints for the worldwide distribution and productivity of plants. Therefore, the development of genetically-engineered plants with enhanced tolerance to salt and drought is an important challenge in modern plant sciences. For the survival and growth, plants have evolved various protective mechanisms by which they manage to overcome unfavorable environments. Two of which that ubiquitously function in plants are the accumulation of compatible osmoprotectant and the active salt sequestration to intra- or extra-cellular compartment. Genes involved in these biochemical and physiological processes are the principle targets of genetic engineering for the improvement of salt tolerance. One of the staple factors in plants that is responsible for the salt sequestration is thought to be an Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter that is associated with plasma or tonoplast membrane.

In an attempt to test the possibility that engineering Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity result in enhanced salt tolerance in plants, *Arabidopsis thaliana* was transformed with a gene (*nhx1*) for vacuole-type Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from *Saccharomyces cerevisiae* under the transcriptional regulation of a salt-inducible promoter. In transgenic plants, expression of the *nhx1* gene was activated in response to salt whereas the mRNA was undetectable under normal growth conditions. When examined salt tolerance, however, transgenic plants did not significantly differ from wild-type plants with respect to the frequency of germination and the subsequent growth under salt conditions. Further physiological experiments are under progress for the precise evaluation of salt tolerance in transgenic plants expressing the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter.