

サイトカイニン合成遺伝子 *ipt* を用いたイネ種子シンク機能の強化

登熟種子でサイトカイニンレベルが上昇した遺伝子組み換えイネの解析

我彦広悦¹, 頼泰樹¹, 上田健治¹

¹ 秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科

植物ホルモンのサイトカインは根や種子における物質の貯蔵能力すなわちシンク機能を高める。本研究では遺伝子工学的手法によってイネ種子におけるサイトカイニンの蓄積量を高め、種子における多様な物質集積を目指す。イネ種子で特異的に発現される貯蔵タンパク・プロラミンおよびデンプンであるアミロース合成に関わる *waxy* 遺伝子のプロモーターの制御下にアグロバクテリウム由来のサイトカイニン合成遺伝子 *ipt* をつなげ、イネに導入し組換えイネを作製した。登熟種子を採取抽出し、カラム等を用いて部分精製した後サイトカイニンを LC/MS/MS を用いて解析・定量した。その結果活性型サイトカイニンである iP や tZ がそれぞれ 8 倍、3 倍と顕著に上昇していた系統が得られた。また生合成経路の上流にある物質ほど量が多い傾向にあった。種子あたりの重量、デンプンの鎖長分布は野生型種子と組換えイネで変わりが無かった。しかし、幼苗期の成長、分げつ形成速度が組換えイネの方が野生型よりも高かった。今後は種子における貯蔵タンパク、アミノ酸、糖などの蓄積量を明らかにする。

キーワード: サイトカイニン, プロラミン, Waxy, 遺伝子組み換えイネ, 成長

植物ホルモンの一種であるサイトカイニンには、細胞分裂の促進、シュート分化開始、老化の制御、栄養の転流調節などさまざまな生理作用がある。本研究ではこれらの生理機能のうち、栄養の転流調節に着目した。植物には、生育段階において必要なところに糖やアミノ酸などの栄養分を転流させる特徴をもつ。栄養分を送り出す組織をソース、栄養分を取り込む組織をシンクと呼び、種子はシンクであると言える。登熟種子において、サイトカイニン蓄積量は一過的に上昇する。このことから、サイトカイニンが持つ細胞分裂促進作用やシンク機能を強める作用が種子の成長に関係し、種子の収量へも影響を与えられられる。シンク機能の結果蓄積される生体物質は糖、デンプン、アミノ酸、タンパク質など多様である。サイトカイニン合成遺伝子を組み込んだタバコでバイオマスが 1.5 倍に増加したという報告 (Gan and Amashino, 1995) やサイトカイニンを分解できなくなった変異イネで種子の収量が増加したという報告もある (Ashikari et al. 2005)。これ

らのサイトカイニンの性質を踏まえ、イネの種子でサイトカイニン合成遺伝子を種子特異的に発現させ、蓄積量をさらに増加させることで、イネのシンクとしての機能を強化ができるのではないかと考えられる。サイトカイニン合成遺伝子 *ipt* はイソペンテニルトランスファーゼ (IPT) をコードし、ジメチルアリルピロリン酸 (DMAPP) と AMP からイソペンテニルアデニンリボシドリン酸 (iPRMP) を合成する。iPRMP は植物体が持つ代謝系によってイソペンテニルアデニンリボシド (iPR)、イソペンテニルアデニン (iP)、トランスゼアチンリボシドリン酸 (t-ZRMP)、トランスゼアチンリボシド (t-ZR)、トランスゼアチン (t-Z) に変換されていく (図 1)。t-Z および iP が活性型サイトカイニンとされるが IPT によるサイトカイニン合成反応が律即段階である。本研究では種子で特異的、優先的に合成される貯蔵タンパク質プロラミンやデンプン合成の遺伝子 *waxy* のプロモーターに制御されるサイトカイニン合成遺伝子 *ipt* を構築しイネに導入した系統を解析した。

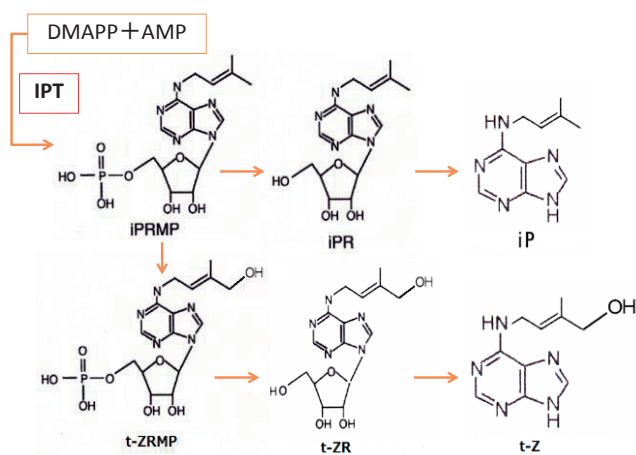


図1 IPT を介したサイトカイン合成経路

アグロバクテリウム由来の *ipt* およびイネ由来の *ipt3* 遺伝子を用いた。 *ipt*, *ipt3* によって iPRMP が作られる。それ以降は植物の代謝系が使われる。

材料と方法

遺伝子組換え植物

プロラミン遺伝子プロモーター: *ipt* 遺伝子 (アグロバクテリウム), 弱い *waxy* 遺伝子プロモーター WB: *ipt*, 強い *waxy* 遺伝子プロモーター WA: *ipt3* 遺伝子 (イネ) の 3 種類のコンストラクトを用いた。前者 2 種はベクター pIG121Hm に, 後者は pCAMBIA1300 にクローニングされている。イネ品種日本晴あるいは金南風を用いた。得られた組換え植物を表 1 に示す。

サイトカインの抽出

Kojima らの方法 (2009) に従った。開花後 12 日目の穂を採取し液体窒素で凍らせた。紙の上から木槌で叩き, 粗く破碎した。約 100 mg 量ジルコニアビーズ 8 秒間ボルテックスし, すぐに液体窒素で冷やした。この作業を約 5 回繰り返した。内生のサイトカイン量を算出するために, 重水素ラベルされたサイトカイン (d-CK) を内部標準として添加した。内部標準は 5 ないし 6 か所の水素が重水素で置き換わっている iP, iPR, iPRMP, t-Z, t-ZR, t-ZRMP である。各内部標準 d-CK が 0.5 ng ずつ含まれる 80% アセトニトリル/1% 酢酸 4 ml を加え, 4°C で 1 時間静置した。

ジルコニアビーズを取り除き, 3,000g, 4°C で 10 分間遠心した。上清を回収し, 沈殿に 80% アセトニトリル/1% 酢酸 1 ml を加えてボルテックスし, 4°C で 10 分間静置した後同様に遠心して, 上清に加えた。さらに 1% 酢酸 700 μ l を加え, アルミホイルを被せて -30°C で保存した。

カラムクロマトグラフィーによるサイトカインの部分精製と LC/MS/MS による測定

遠心エバポレーターで 1 ml まで溶液を遠心乾燥し, 予め 100% アセトニトリル 1 ml で平衡化した HLB カラムにアプライした。1% 酢酸 1 ml で洗浄し, 80% アセトニトリル/1% 酢酸 1 ml \times 2 回で溶出し, 1% 酢酸 500 μ l を加えた。100% アセトニトリル 1 ml をとり, MCX カラムにアプライし, 液面が完全に樹脂レベルになるまで自然落下させ表面洗浄した。予め 100% メタノール 1 ml/0.1M HCl 1 ml/1% 酢酸 1 ml で平衡化した MCX カラムにアプライし, 80% アセトニトリル/1% 酢酸 1 ml \times 2 回で溶出した。iPRMP および t-ZRMP が回収される。同じカラムに 5% NH_3 /40% アセトニトリル 1 ml \times 2 回で溶出した。iPR, iP, t-ZR, t-Z が回収される。iPRMP および t-ZRMP を含む分画を Alkaline Phosphatase (54000 U/ml, 0.32 μ l) 37°C で 1 時間処理をした。10 \times TBS 93 μ l, 1M HCl 46 μ l を加えた後, HLB カラムクロマトグラフィーを上記と同様に行って, iPRMP および t-ZRMP はリン酸基が外れた iPR および t-ZR として測定されることになる。サンプルはいずれも遠心エバポレーターで乾固させた。LC/MS/MS 解析として以下のように Agilent 6410 トリプル四重極 LC/MS/MS を用いた。

1% 酢酸 50 μ l を加え LC-MS/MS 用のガラスチューブに全量入れ, 測定本機器に分離カラムとして Zorbax SB-C18 column [2.1 mm id \times 50 mm, (1.8 μ m), Agilent Technologies] を装着し, 10 μ l のサンプルを注入, 解析した。流した Buffer は,
A: 0.1% Formic Acid in milliQ 水
B: 0.1% Formic Acid in Acetonitrile
である。時間を追って A と B の比率を以下のように変えて流した。

時間 (分) / B (%) グラジエント 0/15, 4.5/98, 12/98, 12.1/15, 18/15 であり, 流速は一定の 0.4 mL/min と

した。

RNA 抽出と RT-PCR

登熟種子 100mg を粗ごとビーズショッカーで 2000 rpm, 30 秒間破碎した。RNA を 1 mM aurintricarboxylic acid 存在下で抽出し 2.5 M LiCl で沈殿させた (Galis et al. 2004)。RQ1 DNase で処理した後 *ipt* 特異的なプライマーで PCR を行った。

ipt プライマー

IptUp :

GAAGAATCGAAAGGAACGAGCCGTCTA

IptLow :

ATCAACTTATCCTCCATATCTGCGTCAAGC

反応条件は 95°C 3 分, 1 回, 55°C 1 分/72°C 3 分/95°C 1 分が 30 回である。458bp が増幅される。

結果

ipt-イネにおけるサイトカイニンレベルの上昇

ipt 遺伝子が導入されている形質転換体におけるサイトカイニンレベルの変化を調査するため、表 1. に示した系統を用いて、一系統一個体の穂を 3 つ個別に集めた。それぞれの登熟種子から「材料と方法」に従って粗ごと抽出、部分精製を行い、LC/MS/MS で同定、定量を行った。その 1 g 新鮮重あたりのサイトカイニン量の平均値を図 2 に示す。サイトカイニン合成中間体等の分子種別に比較すると最終産物である活性型サイトカイニン *iP* や *t-Z* と比較して、*iPRMP* *t-ZRMP* などのように *IPT* によって生成される生合成経路の上流にある物質ほど量が多い傾向にあった。*IPT* 酵素反応の直接の産物の蓄積量が多いという予想を裏付けるものである。次に、形質転換体の系統と野生型あるいはベクターのみの対照と比較すると、Pr::*ipt* の最高は #7 (N5-2-5) で、*iP* は約 5.4 倍、*t-Z* は約 2.7 倍、*iPRMP* は約 5.0 倍、*iPR* は約 3.6 倍、*t-ZRMP* は約 5.9 倍、*t-ZR* は約 4.8 倍多く検出された。また、WB::*ipt* の最高は #10 (WB1-⑤-7) で、*iP* は約 8.3 倍、*t-Z* は約 3.0 倍、*iPRMP* は 6.9 倍、*iPR* は 7.4 倍、*t-ZRMP* は約 8.7 倍、*t-ZR* は約 7.8 倍であった。#6 (N17-5-1) や #8 (WB1-16-1-5) などほどの物質のレベルも野生型と変わらなかった。さらに有意水準 5% の *t*

検定で比較したところ、レベルが上昇した系統は、*iP* では #1 (K14-2-2), #2 (K17-1-3), #10 (WB1-⑤-7) の 3 系統、*iPR* では #2 (K17-1-3), #4 (K20-1-2), #7 (N5-2-5), #10 (WB1-⑤-7) の 4 系統、*iPRMP* では #2 (K17-1-3), #3 (K17-4-1), #7 (N5-2-5), #10 (WB1-⑤-7) の 4 系統、*t-Z* では #10 (WB1-⑤-7) の 1 系統、*t-ZR* では #1 (K14-2-2), #2 (K17-1-3), #4 (K20-1-2), #10 (WB1-⑤-7) の 4 系統、*t-ZRMP* では #2 (K17-1-3), #7 (N5-2-5), #10 (WB1-⑤-7) の 3 系統に野生型と比較して有意な差があることがわかった。減少した系統は *t-ZR* では #8 (WB1-16-1-5) であった。有意差検定の結果、導入した *ipt* 遺伝子を持つ 10 系統のうち少なくともひとつのサイトカイニン代謝物質が上昇していたのは 6 系統であった。以上のことから、*ipt* 遺伝子を導入したことによって、イネの種子におけるサイトカイニンレベルは上昇したといえる。

ipt-イネの性質

完熟種子の粗付きの種子の重量を測定したところ、最大 #4 (K20-1-2) の 26.7mg/粒から # (N15-3-11) の 20.4mg/粒まで分布しており、サイトカイニンレベルとの相関は見られなかった。

表 1 サイトカイニン量測定を行った系統

系統番号	系統名	品種	プロモーター	遺伝子
1	K14-2-2	金南風	prolamin	<i>ipt</i>
2	K17-1-3	金南風	prolamin	<i>ipt</i>
3	K17-4-1	金南風	prolamin	<i>ipt</i>
4	K20-1-2	金南風	prolamin	<i>ipt</i>
5	N15-3-11	日本晴	prolamin	<i>ipt</i>
6	N17-5-1	日本晴	prolamin	<i>ipt</i>
7	N5-2-5	日本晴	prolamin	<i>ipt</i>
8	WB1-16-1-5	日本晴	waxy	<i>ipt</i>
9	WB1-19-5-1	日本晴	waxy	<i>ipt</i>
10	WB1-⑤-7	金南風	waxy	<i>ipt</i>
11	N1-4-10	日本晴	none	分離個体
12	WB1-10-2-3	日本晴	none	分離個体
13	Kinmaze	金南風	none	WT
14	Nipponbare	日本晴	none	WT
15	IG3-34	日本晴	none	ベクター
16	IG3-29	日本晴	none	ベクター

系統#1-#7 は Pr::*ipt*, 系統#8-#10 は WB::*ipt*, 系統#11, #12 は形質転換後導入した遺伝子が分離してなくなった系統, 系統#13 は野生型の金南風, 系統#14 は野生型の日本晴, 系統#15-#16 はベクターコントロールである。

またサイトカインレベルが顕著に上昇した系統 #7(N5-2-5)および#10(WB1-⑤-7)の完熟種子についてデンブンの鎖長分布を調べたが、いずれも野生型イネ、ベクターコントロールとの違いは見られなかった。次に、#7(N5-2-5)および#10(WB1-⑤-7)の播種後の成長を観察したところ、それぞれ野生型の日本晴や金南風より分けつが早かった(図3)。種子特異的なプロモーターにつながった *ipt* 遺伝子が幼苗期に僅かに発現した可能性が考えられる。この点を調査中である。

ipt 遺伝子の発現

サイトカインを測定したと同時期の登熟種子(開花後12日目)から全RNAを抽出し、*ipt* 特異的なプライマーを用いてRT-PCRを行い、転写レベルでの発現を調べた。蓄積量の少なかった#6(N17-5-1)を除いて、得られた形質転換植物の全てに発現が見られた(図4)。

新たな形質転換体の作製

新たな試みとしてイネ本来の遺伝子 *ipt3* を強い *Waxy* 遺伝子プロモーターWAに繋ぎ、金南風に導入した後世代からホモ系統を選抜した。現在WA3, 5, 6, 11, 12, 14, 15, 16の8系統を育成中である。WBプロモーターよりも発現が強いことがわかっているため、サイトカインの更なる蓄積が期待される。

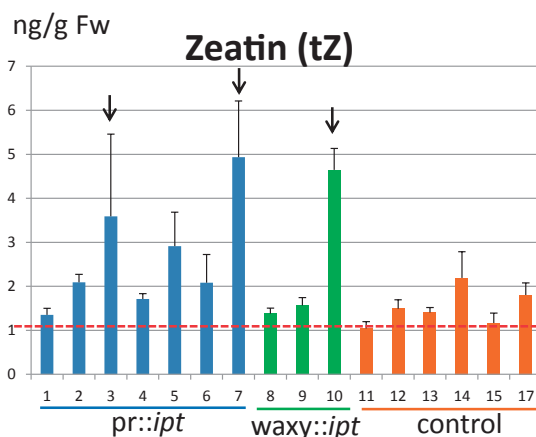
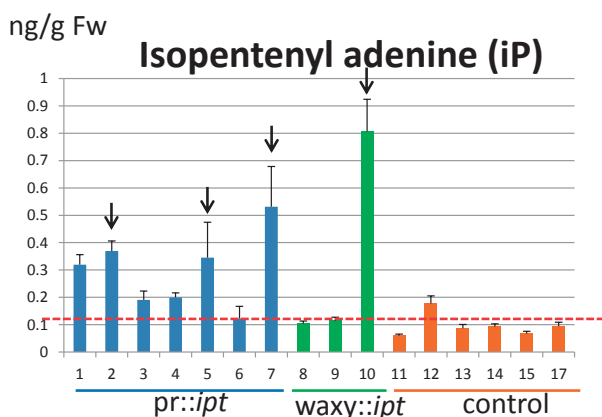


図2 活性型サイトカインの蓄積レベル

活性型サイトカイン iP および tZ 蓄積量は野生型イネに比べ有意に上昇していた(矢印)。とりわけ#10(WB1-⑤-7)の内生レベルが顕著に高かった。

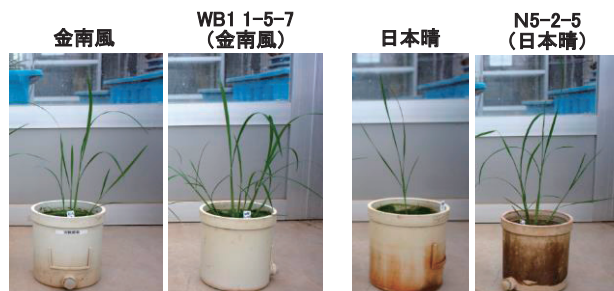


図3 サイトカインレベルの高いイネの成長

ホモ接合体を種子から育成した。播種後1ヶ月目の成長。

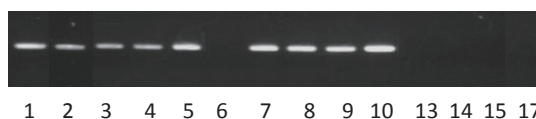


図4 *ipt*-イネ登熟種子のRT-PCRによる発現解析 およそ0.05 μgRNA由来のcDNAについてPCRを行った。番号は表1における系統番号を示す。

考察

イネ登熟種子でサイトカインの蓄積が上昇している *ipt*-遺伝子組換え植物を作製することができた。

IPT の反応産物はいくつかの中間体を経て活性ある iP や tZ へと変換される。iP や tZ に至る中間体は上流に属するものほど蓄積量が多く、*ipt* が蓄積量の増加の要因であることを裏付ける。また RT-PCR によって転写レベルも確認できたが転写物の量とサイトカイニンの蓄積量には必ずしも相関がなかった。*ipt*-系統は野生型に比べ、幼苗期の成長および分蘖が多いという特徴があった。プロラミンや *waxy* のプロモーターはいずれも種子で活性が高いが、栄養成長期でも僅かな活性が有るとすれば、僅かなサイトカイニンの蓄積がある可能性がある。そのため成熟時には穂の数が増え、多収性が検証できるかもしれない。さらに粒あたりの重量では顕著な差を認めるには至っていないが、今後施肥など栽培条件を検討していく必要がある。*ipt*-イネと野生型との登熟種子における遺伝子発現のプロフィールをマイクロアレイ法で調べたがサンプル間におけるばらつきが大きいこと、顕著に発現レベルの変化した遺伝子が見出されていないことなどのため新たな遺伝子同定することが出来ていない。組換え植物間の生理状態を揃える必要がある。

今後の展望

1. 新たに WA:*ipt3* 系統を育成中であり、サイトカイニンレベルを測定する。
2. サイトカイニンの蓄積量が上昇した系統について完熟種子の貯蔵タンパク、遊離の糖、デンプン、アミノ酸蓄積などシンク機能の結果蓄積される物質を調べていく。
3. 施肥を多くするなど栽培条件を最適化し、多収性の可能性について更なる検証を行う。
4. サイトカイニンの量を増やすとともにその情報を受け取る細胞の情報伝達系の強化も必要なのかもしれない。そこでサイトカイニンの情報伝達系を伝える転写因子 OsRR 遺伝子についてやはりプロラミン、*waxy* プロモーターを繋げてイネに導入する試みも行う。

謝辞

本研究は学長プロジェクト「創造的研究」の支援を受けて行われた。

文献

- Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, Yamamoto T, Takashi T, Nishimura A, Angeles ER, Qian Q, Kitano H, Matsuoka M. (2005). Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* 29: 741-745
- Galis I, Kakiuchi Y, Simek P, Wabiko H (2004). *Agrobacterium tumefaciens* AK-6*b* gene modulates phenolic compound metabolism in tobacco. *Phytochemistry* 65: 169-179
- Gan S, Amasino RM (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270:1986-1988
- Kojima, M., Kamada-Nobusada, T., Komatsu, H., Takei, K., Kuroha, T., Mizutani M., Ashikari, M., Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka M., Suzuki, K., Sakakibara, H. (2009). Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using MS-probe modification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: an application for hormone profiling in *Oryza sativa*. *Plant & Cell Physiol.* 50: 1201-1214

〔平成 27 年 6 月 30 日受付〕
〔平成 27 年 7 月 31 日受理〕

Aiming at the promotion of the sink function of rice seeds by introducing cytokinin biosynthesis gene

Analysis of the transgenic rice plants with increased cytokinin levels as a result of *ipt* transgene over-expression in seeds

Hiroetsu Wabiko¹, Hiroki Rai¹, Kenji Ueda¹

¹ Department of Biological Production, Faculty of Bioresource sciences, Akita Prefectural University

A plant hormone cytokinin promotes sink function of the storage organs such as seeds and roots. To enhance sink activity, we reasoned that seed-specific increment of accumulation of active cytokinin may result in increased sink activity. Here we generated the transgenic rice plants expressing cytokinin biosynthesis genes, *ipt* (from *Agrobacterium*) and *ipt3* (from rice) under the control of the promoters of seed storage protein prolamin gene and amylose synthesis *waxy* genes. Developing seeds were extracted, and cytokinin was partially purified by HLB and MLB column chromatography, and finally analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectroscopy; LC/MS/MS. Several transgenic lines showed accumulation of active cytokinins, iP and tZ at 8 fold and 3 fold higher levels than those in wild-type plants. Matured seed weight of these lines was comparable to those of wild-type. However, the growth enhancement was recognized at early stages of seedlings of the transgenic plants compared to wild-type plants. Further investigation is necessary for determination of quality and quantity of sink materials, such as proteins, amino acids, and sugars.

Keywords: cytokinin, prolamin, Waxy, transgenic rice, growth