

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

水稻與甘藷組織培養，*phytase* 基因轉殖及性狀分析

Tissue Culture, *phytase* Gene Transformation and Characters Analysis
of Rice and Sweet Potato

計畫編號：NSC 87-2611-B-002-005-B30

執行期限：86年10月1日至89年9月30

主持人：劉麗飛 教授 國立台灣大學農藝系

一、中文摘要

本試驗以農桿菌法轉殖水稻，基因的構築係以水稻 *Amy7*及 *Amy8*基因的啟動子接上訊號勝太鏈來驅動牛瘤胃細菌及大腸桿菌來源的*phytase* 基因表現，再分別以 *Nopaline synthase* (NOS)、*Amy7*及 *Amy8*基因的 3'UTR 作為終結子 (terminator)，並以hygromycin作為篩選用標誌。目前在8種不同的基因構築中，共得到超過400個以上的抗hygromycin癒合組織，並已經獲致108個可能的轉殖植株；以北方墨點法分析懸浮細胞系結果顯示，缺糖處理後可誘導大量*phytase*表現，酵素活性分析的結果亦顯示，缺糖處理的細胞可大量分泌具有酵素活性的*phytase*到培養基中。此外，文獻報導指出甘藷的基因轉殖效率不高，我們設計不同的培養基與培養方法，以尋找出適合不同品種甘藷再生的條件。

關鍵詞：phytase，轉殖水稻，轉殖甘藷

Abstract

This project uses *Agrobacterium*-mediated transformation approach to overexpress *E. coli* and ruminal *phytase* genes in rice plants. The gene constructs are composed of γ *Amy7* or γ *Amy8* promoters, 3'UTR of γ *Amy7*, γ *Amy8*, or *nopaline synthase* genes, and hygromycin phosphotransferase resistant (Hyg^R) selection marker. Among 8 different constructions, we obtained more than 400 Hyg^R calli and 108 putative transformants. Northern blot analysis revealed that sucrose starvation could induce *phytase* expression in transformed rice cells. The enzyme activity assays showed that sucrose-starved cells could secrete large amounts of *phytase* into culture medium. According to literatures, sweet potato is a recalcitrant species for transformation, therefore, we designed various compositions of culture conditions to overcome the barriers.

Keywords : *phytase*, transgenic rice, transgenic sweet potato

二、緣由與目的

近年來家畜及家禽飼養業普遍在飼料中添加酵素，以增進飼料中養分在動物消化道中的分解及利用，達到促進動物快速生長的目的。其中一個重要的酵素是 phytase，可以使飼料中所含大量的 phytate 轉換成 myo-inositol 及無機磷而加以利用。在穀類、豆類及油菜種子中，phytate 以複合物形式存在，由鈣、鎂、鉀及蛋白質組成，佔種子總重量的 1-3%，並且含有大量的磷，可達到種子中所有磷的 60-90%(Graf, 1986)。雖然飼料中的種子含有大量的磷，但單胃型的動物（如豬，家禽及魚類等）卻無法分解 phytate，因為牠們的胃腸消化道中缺乏分解 phytate 的酵素-phytase。因此 phytate 在這些動物的消化道中完整通過，甚至吸收掉一些重要礦物元素（例如鐵、鈣及鋅等）結合氨基酸及蛋白質、及抑制一些酵素活性，最後隨著排泄物排出動物體外，造成土地、河川及湖泊的污染及優氧化。而為補充動物生長所需的磷，尚需在飼料中添加無機磷。如果在動物飼料中添加 phytase，即可以使 phytate 在動物的消化道中分解，然後由小腸吸收，因此減少無機磷被排出動物體外造成環境污染的機會。同樣重要的是飼料中不需要再添加無機磷，而且在動物消化道中 phytate 所造成的礦物元素及養分流失的作用大為減少，對動物的生長有益處。

動物、植物（主要是種子），及許多微生物都能合成 phytase，而目前商業化的 phytase 主要來自土壤真菌 *Aspergillus niger* 或 *A. ficuum*。這種 phytase 的活性在偏酸性的環境中較高，因此在單胃動物的胃（pH 2-3）及小腸（pH 4-7）中適於分解 phytate。雖然在動物飼料中添加 phytase 有許多益處，但是目前添加 phytase 的成本比

添加無機磷還高。不過由於 phytase 的使用可以使 phytate 影響動物胃腸中礦物元素及養分流失的作用降低，減少必須添加礦物元素及養分的成本，以及減少磷對環境的污染，符合社會大眾對環保的要求。因此 phytase 在許多歐美先進國家及亞洲的韓國及中華民國等國家的豬及家禽的飼養業中的重要性，預期將與日俱增。

降低 phytase 的價格可以有效地鼓勵動物飼養業者普遍使用 phytase，而這可以透過降低生產成本及增加 phytase 的活性兩方面著手。過去數年，已有數家生物科技公司將 *Aspergillus* 的 phytase 基因分離出來，然後轉殖到更適合大量繁殖的微生物寄主內大量生產，使 phytase 的生產成本降低。雖然如此，在台灣 phytase（主要由德國 BASF 公司生產，商品名為 Natuphos）的價格仍然高達 NT\$900/kg。而每公噸飼料約需 0.2kg 或 NT\$180 的 phytase，以台糖公司每年養豬所需的飼料約 30 萬公噸計算，phytase 年需量的價格約為 5 千 4 百萬元。推估全國養豬所需飼料約 400-500 萬公噸，phytase 的年需量價格約為 7-9 億元（以上資料由糖試所楊博文博士提供）。如果能以其他方式來生產價格較低的 phytase，將可使台灣的飼養業者更樂於在飼料中添加 phytase。

利用生物科技將 phytase 基因轉殖到農作物來大量生產 phytase，是一個很可行的降低生產成本的方法，因此我們積極尋求此一可行性。以微生物製造 phytase 的方法已被國外生物科技公司的專利所涵蓋，台灣如果希望將 phytase 的生產及銷售作商業化，必須發展出獨特而低成本的製造方法申請專利，方足以與進口的 phytase 在價格上競爭，並且拓展海外市場。phytase 的用途，尚可做家禽及魚的飼料添加物，以及製造人類營養食品。據保守

估計，全世界上 phytase 的年需量價格約為美金 7 億 5 仟萬元以上（鄭國展博士資料提供），因此 phytase 的生產可以成為一個極重要的產業。我們相信利用農作物生產 phytase 可以達到此一目的。

本研究室目前已發展出利用水稻種子生產基因工程蛋白質的方法，由於水稻種子本身即含有大量的 phytate，因此如果利用生物科技將 phytase 基因轉殖到水稻，使水稻種子含有大量 phytase，再將這種種子添加到豬、家禽或家畜的飼料中，使飼養動物同時獲得種子中的各種養分、礦物元素及磷。此外由於甘藷是過去中國人飼養豬常用的養分來源，而甘藷耕種成本有可能比水稻低，我們計劃同時將 phytase 基因轉殖到甘藷中，再將含大量 phytase 的甘藷添加到以大豆或玉米種子為主的飼料當中，達到提供額外養分及同時分解 phytate 的功效。

至目前為止，已發表的 phytase 基因有兩個，都是分離自 *Aspergillus niger*，一個是 *PhyA* (Van Hartingsveldt et al., 1993)，其酵素活性的最適合 pH 值是 5.0；另一個是 *PhyB* (Ehrlich et al., 1993)，其酵素活性的最適合 pH 值是 2.5。另外，鄭國展博士自牛胃的細菌 *Selenomonas ruminantium* 亦分離出一個 phytase 基因，此基因的核酸序列接近 *PhyA*，其酵素活性的合適 pH 值在 3-6 之間，合適溫度約為 20-55°C（鄭國展專刊說明書）。

A. niger 的 *PhyA* 基因曾被接合到 CaMV35S 的啟動子及 PR-S 的訊號生太鏈下游，然後轉殖到菸草 (Pen et al., 1993; Verwoerd, 1995) phytase 在轉殖菸草葉片產生的部位是細胞間隙。在三個星期大的植株，平均產量是全部葉片可溶性蛋白質的 0.2%，最高產量可達 1.7%。在菸草葉片開始老化後，

產量更可高達 14.4%，顯示 phytase 甚為穩定。在轉殖菸草中，phytase 被 glycosylate，在葉片與種子的分子量分別為 70 與 68 kDa，而 *Aspergillus* 的 phytase 分子量為 80 kDa。雖然分子量不同，但是在模仿家禽消化道的環境中的活性類似。將含 phytase 的菸草種子加入飼料中餵食小雞，4 個星期後與對照組（飼料未加無機磷或轉殖菸草種子）比較，增加約 1/3 的重量，效果與飼料中直接添加無機磷或 *Aspergillus* 的 phytase 類似。

由於菸草葉片及種子並非飼料來源，因此油菜種子進一步被考慮。*PhyA* 基因被接合到十字花科植物 *Brassica napus* 的 cruciferin A 基因的啟動子及訊號生太鏈下游，然後轉殖到油菜 (canola) (Verwoerd et al., 1995)。轉殖油菜種子 phytase 的平均產量是種子所有可溶性蛋白質的 0.85%，最高的可達 9.3%。以最高產量來看，含 phytase 的油菜種子既可當養分來源，又有分解 phytate 的效用。

上述之轉殖菸草或油菜皆由荷蘭的一家生物科技公司 MOGEN 所培育出來的，已經被申請專利。本計劃預計以轉殖水稻或甘藷生產含 phytase 的種子及塊根，所用基因啟動子與 MOGEN 所用的皆不相同，因此如果試驗成功，應該可以申請新的專利。

牛羊等反芻類動物的胃腸消化能力極強，也可以分解 phytase，主要原因是因其胃內含有許多微生物產生各種對飼料養分分解能力極強的酵素，其中包括 phytase、xylanase、 β -glucanase、cellulase 等。加拿大農部鄭國展博士的研究室在過去多年致力於牛胃微生物的篩選，已分離出數個分解力極高的酵素的基因，其中包括 *Selenomonas ruminantium* 的 *phyA* 基因。這個 phytase 的作用 pH 值在 3.0 到 6.0 之間，溫度在 20 到 55°C 之間，

這些範圍皆比 *A. niger* 的 phytase 廣，並且活性高了 10 倍（鄭國展專利申請書）。如果將此 phytase 作商業化，將極具競爭力，我們目前已取得此一 phytase 的基因。

三、結果與討論

本子計畫之目的在利用轉殖水稻大量生產高效能的 phytase，以作為動物飼料添加物。試驗中以水稻台農 67 號未成熟胚所衍生之癒合組織為材料，利用農桿菌法進行轉殖，所使用的基因構築係以水稻 Amy7 及 Amy8 基因的啟動子接上訊號生太鏈來驅動牛瘤胃細菌及大腸桿菌來源的 phytase 基因表現，並分別以 Nopaline synthase (NOS) Amy7 及 Amy8 基因的 3'UTR 作為終結子 (terminator)，另外並以 hygromycin 作為篩選用標誌；其中 Amy7 及 Amy8 啟動子已經證實在水稻發芽時會受誘導而大量表現；牛瘤胃及大腸桿菌 phytase 基因則是由鄭國展博士所提供，其中牛瘤胃來源的 phytase 基因係選殖自 *Selenomonas ruminantium* 細菌，此基因所生產的酵素活性較真菌來源的 *PhyA* 基因至少高出 10 倍，其合適的 pH 值在 3-6 之間，亦較其他已知的基因適應範圍廣。

目前整段啟動子-基因本體-終結子已接到到攜帶有抗 hygromycin 基因的雙偶型載體 pPZP200 中，並進行了農桿菌轉殖。在 8 種不同的基因構築中，共得到超過 400 個以上的抗 hygromycin 癒合組織，並已經獲致 108 個可能的轉殖植株；以北方墨點分析 8 個轉殖有 Amy8/phytase 的

懸浮細胞系結果顯示，不論所銜接的終結子是 NOS 或 Amy8 基因的 3'UTR，在缺糖處理的細胞中都能誘導 phytase 基因表現；在酵素活性分析的結果則顯示，缺糖處理的細胞萃取液中有酵素活性的表現，同時亦有大量具酵素活性的 phytase 分泌到培養基中，以上結果顯示外來的 phytase 基因已成功的導入水稻細胞之中，並可正常的表現。

四、計畫成果自評

本子計畫執行已近二年，目前的進度大致與預期符合，未來將進行的工作包括轉殖植物分子層次上的分析，例如植物中外來基因的拷貝數 (copy number) 懸浮細胞與種子中的蛋白質表現量和酵素活性等，在得到後代之後並將進行轉殖植株的農藝性狀與遺傳分析。

五、參考文獻

- Dirk, K. et al. 1996. Crystal structure of phytase from *Aspergillus ficcum* at 2.5Å resolution. *Nature Structural Biologh.* 4:185-190.
- Gibson, D.M. and Ullah ,A.H.J. 1988. Purifucation and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. *Arch. Buichem. Bioph.* 260:503-513.
- Gooeddel, D.V. 1990. Gene expression technology. *Methods Enzymol.* 185:61-89.
- Graf,E.(ed.)1986. Phytic acid, chemistry and applications. Pilatus Press.

- Minneapolis, MN.344pp.
- Hattori, T. et al.1989. Structural relationship among the members of a multigene family coding for the sweet potato tuberous root storage protein. *Plant Mol. Biol.* 13:563-572.
- Hochuli,E.1990.In:Genetic Engineering, Principle and Methods(J.K.Setlow, ed.) Plenum Press, New York.
- Innis, M.S. et al.1990. PCR protocols. A guide to Methods and Applications.
- Ishiguro, S. and Nakamura, K. 1992. The nuclear factor SP8BF binds to the 5'-upstream regions of three different genes coding for major proteins of sweet potato tuberous roots. *Plant Mol. Biol.*18:97-108.
- Itoh, K. et al. 1995. Developmental and hormonal regulation of rice α -amylase (*RamyIA*)-*gusA* fusion genes in transgenic rice seeds. *Plant Physiol.* 107:25-31.
- Kirill.O.et al. 1992. Overexpression site-directed mutagenesis and mechanism of *Escherichia coli* acid phosphatase. *J. Biol. Chem.* 267:22830-22836.
- Laboure,A.-M. et al. 1993. Purification and chracterization of a phytase (myo-inositol-hexokisphosphate pho-sphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination. *Biochem. J.* 295:413-419.
- Laemmli. U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Leisy, D. J. 1989. Expression of a rice glutelin promoter in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 14:41-50.
- Langone, J.J. 1990. Molrcular design and modeling : concepts and application. *Methods Enzym.* 202:676-678.
- Ohta,S.et al.1991. High-level expression of a sweet potato sporamin gene promoter: β -glucuronidase (GUS) fusion gene in the stems of transgenic tobacco plants is conferred by multiple cell type-specific regulatory elements. *Mol. Gen. Genet.* 225:369-378.
- Porebski, S. et al. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high poly - saccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15:8-15.
- Sambrook, J. et al 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2 nd ed. Chapter 8.
- Takeda, S.et al. 1994. Inhibitors of protein phosphatase 1 and 2A block the sugar-inducible gene expression in plants. *Plant Physiol.* 106:567-574.
- Van Hartingsveldt, W. et al.1993. Cloning , characterization and over-expression of the phytase-encoding gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*. *Gene* 127:87-94.
- Ehrlich, K. C. et al .1993. Identification and cloning of a second phytase gene (*phyB*) from *Aspergillus niger* (*ficuum*). *Biochem. Bioph. Res. Co.*

195:53-57.

Pen, J. et al. 1993. Phytase-containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization. *Bio/Technology* 11: 811-814.

Verwoerd, T.C. 1995. Stable accumulation of *Aspergillus niger* phytase in tobacco leaves. *Plant Physiol.*

109:1199-1205.

Verwoerd, T.C. and Pen, J. 1996. Phytase produced in transgenic plants for use as a novel feed additive. In: *Transgenic Plants: A Production system for Industrial and Pharmaceutical Proteins.* (ed. M.R.L. Owen and J. Pen) John Wiley & Sons Ltd.