

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 88-2311-B-002-015-B30

執行期限：87年8月1日至88年7月31

主持人：劉麗飛 教授 國立台灣大學農藝系

一、中文摘要

本計畫利用農桿菌轉殖法，將大腸桿菌及牛瘤胃細菌來源的*phytase* 基因，導入水稻染色體組中。在轉殖的 8 種不同基因構築中，共獲得 120 株不同的轉殖系，南方氏墨點分析顯示，插入染色體組中的轉殖基因多介於 1 到 4 個拷貝數之間；北方墨點分析的結果顯示，發芽後 4-5 天的種子有最多量的 *phytase* RNA 表現，其中的數個轉殖系有大量的 RNA 累積；酵素活性分析的結果亦證實，這些 RNA 表現量高的轉殖系，酵素活性較未經轉殖的種子高出數百倍；目前第二代 (T1) 轉殖水稻正在結實中，有待進一步的農藝性狀分析。

關鍵詞：phytase，轉殖水稻。

Abstract

This project was conducted to overexpress *E.coli* and ruminal *phytase* genes in rice plants by using *Agrobacterium*-mediated transformation approach. We get 120 independent

putative transgenic rice plants (T_0) from 8 different plasmid constructions. Southern blot analysis showed that most of the transformants harboring 1 to 4 copies of transgene in rice genome. Northern blot analysis revealed that maximum *phytase* RNA expression can be obtained in seeds after 4-5 days germination. Besides, enzyme activity assay confirm that higher RNA expression also possess higher *phytase* activity. Moreover, *phytase* activity of transgenic plants is hundred folds than that of nontransformed one. Agronomic characteristics of T1 plants will be analyzed further.

Keywords：phytase, transgenic rice.

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）(Laboure et al., 1993)，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。因此若能利用生物技術方法，將 phytase 基因轉殖到作物來大量生產 phytase，將是一個可行的降低生產成本方法。

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豐富的 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。

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。由於菸草葉片及種子並非飼料來源，因此 *PhyA* 基因進一步被轉殖到油菜中 (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%。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 (Beuduker et al., 1996)。本計劃預計以轉殖水稻生產含 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。

此外，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 (Yanke et al., 1998)。如果將此 phytase 作商業化，將極具競爭力，我們取得此一 phytase 的基因，將利用水稻來生產此一高效的基因。

三、結果與討論

本計畫之目的在利用轉殖水稻大量生產高效的 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肽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。

經轉殖 8 種不同基因構築到水稻細胞後，共得到 120 株不同的轉殖系，南方氏墨點分析顯示，插入染色體組中的轉殖基因多介於 1 到 4 個拷貝數之間；北方墨點分析的結果顯示，發芽後 4-5 天的種子有最多量的 phytase RNA 表現，其中的數個轉殖系有大量的 RNA 累積；酵素活性分析的結果亦證實，這些 RNA 表現量高的轉殖系，酵素活性較未經轉殖的種子高出數百倍，可能為具有商業化生產潛力之轉殖系；目前共有將近 2000 株第二代 (T1) 轉殖水稻栽培中，未來將進行遺傳分析，針對具有高酵素活性之轉殖系篩選出同型結合體，並進行農藝性狀分析，以檢視轉殖後代表現之穩定性。

四、計畫結果自評

本計畫已執行二年，目前進度與預期大致符合，已順利得到大量表現 phytase 之轉殖植株，未來將進行之工作包括轉殖後代具有高酵素活性的同型結合體之篩選，以及其農藝性狀之分析，同時大量栽培這些轉殖系進行動物試驗，以評估轉殖植株的效能。

五、參考文獻

Beudeker, R.F. (1996) Commercialization of phytase - containing seeds. In: Transgenic plant: A production system for industrial and pharmaceutical proteins. (ed. M.R.L. Owen and J. Pen) John Wiley &

- Sons Ltd.
- Ehrlich, K. C. et al.(1993)Identification and cloning of a second phytase gene (*phy B*) from *Aspergillus niger* (ficcum). Biochem. Biophys. Res. Commun. 195: 53-57.
- Graf,E.(ed.) (1986) Phytic acid, chemistry and applications. Pilatus Press. Minneapolis, MN.344pp.
- Laboure,A.-M. et al. (1993) Purification and characterization of a phytase(myo-inositol-hexakisphosphatephosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination. Biochem. J. 295:413-419.
- Van Hartingsveldt, W. et al. (1993) Cloning , characterization and over-expression of the phytase-encoding gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*. Gene 127:87-94.
- 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. et al.(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.
- Yanke, L. J. et al.(1998)Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. Microbiology 144 : 1565-1573.