

949 紫外線パルスレーザー技術の植物細胞への応用 (I) — 植物細胞微細加工と適用例 —

○吉川宜宏¹, 庄司 猛¹, 梶山慎一郎², 福崎英一郎², 小林昭雄² (¹ 生研機構小林プロジェクト, ² 阪大院・工・応生工)

【結論】植物細胞は、セルロースやペクチンなどで構成される硬い細胞壁に覆われており、特定細胞への外来物質の導入や細胞内容物のサンプリングを困難にしている。当研究室ではエキシマレーザー加工技術を用いて目的植物細胞の細胞壁の一部を取り除き、物質の出し入れが容易にできるように加工することを検討している。これまでに加工の大きさと照射強度を調節することにより、植物の生細胞にダメージを与えずに、加工部位の細胞壁の一部を除去することが可能であること、更に、加工4日目のサンプルと加工直後のサンプルを SEM 観察によって比較すると、加工部位において細胞壁の一部修復していることを確認した。¹⁾ 今回、エキシマレーザーを用いて外来物質を導入する方法の検討を行ったので報告する。

【方法・結果】外来物質の細胞内導入は、1) レーザ (ArF エキシマレーザー 193nm, パルス長 5ns) により細胞壁の一部 (25 ~ 100 μ m²) を取り除いた加工部位からマイクロインジェクションにより導入する方法、2) 導入物質をコーティングした金粒子を加工部位に塗布し、再度レーザーアブレーションによって金粒子を細胞内に押し込む方法の2つの方法を検討した。まず方法1では、タマネギ及び、トレンニアにおいて、CaMV35S-GFP キメラ遺伝子を導入することにより、高効率 (約 10-30%) で一過性発現することを確認した。一方、方法2では、被験植物 (タバコ、トレンニア、タマネギ、ペゴニア) すべてにおいて、金粒子そのものの細胞内導入は確認されたが、遺伝子の発現には至っていない。現在方法2によって遺伝子を導入する方法を検討している。

1) 農芸化学会 2002 年度大会 講演要旨集 pp. 274

Application of UV pulsed laser microbeam technique to plant cells (I) - Laser microprocessing and its application -

○ Norihiro Yoshikawa¹, Takeshi Shoji¹, Shinichiro Kajiyama², Eiichiro Fukusaki², Akio Kobayashi² (¹BRAIN Kobayashi Project, ²Dept. Biotech. Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words 細胞壁, レーザ加工, 形質転換, マイクロインジェクション, 外来物質導入

951 紫外線パルスレーザー技術の植物細胞への応用 (III) — レーザによる傷害応答の解析 —

○庄司 猛¹, 梶山慎一郎², 河岡明義³, 吉田和哉⁴, 新名惇彦⁴, 山口 夕⁵, 佐野 浩⁵, 福崎英一郎², 小林昭雄² (¹ 生研機構小林プロジェクト, ² 阪大院・工・応生工, ³ 日本製紙・技研, ⁴ 奈良先端大・バイオ, ⁵ 奈良先端大・遺伝子)

【結論】ArF エキシマレーザーは、半導体や IC 基盤などの微細加工に用いられている波長 193 nm の紫外線パルスレーザーである。YAG など、他の長波長レーザーとは異なり、レーザー照射時に熱を発生しないことから、生体試料への応用が有効であると考えられている。レーザー照射によるミクロンオーダーでの微細加工技術を植物細胞に適用すれば、これまでの組織レベルから、細胞レベルでの解析を可能にする有効な方法になると考えられる。さらに、細胞へのレーザー照射により、局所的な遺伝子発現の誘導が可能になれば、新たな実験ツールとしての利用も期待できる。本研究では、植物の外部環境ストレス応答の一つとしてよく研究されている傷害応答を解析のモデル系に用いて、エキシマレーザー照射植物細胞での傷害応答状況を観察し、レーザー照射により傷害ストレスを引き起こすかどうかを検討することを目的とした。

【方法・結果】既知の傷害応答性遺伝子であるタバコの WIPK 遺伝子, prxC2 遺伝子, それぞれのプロモーター領域と β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を連結したキメラ遺伝子を導入した形質転換タバコ植物体の葉からリーフディスクを調整し、レーザー照射に反応した誘導遺伝子発現をレポーター遺伝子産物 GUS を用いた組織染色により検討した。レーザー照射部位の周辺細胞において GUS 染色を観察した。C2 系統では、レーザー照射部位の周辺部に GUS 染色を観察した。一方、wipk 系統では、リーフディスク作製時に引き起こされる傷害応答により、リーフディスク全体が GUS 染色され、レーザー照射による特異的な染色を観察できなかった。WIPK-GUS 形質転換タバコにおいて、レーザー照射による GUS 活性の変化が観察された。現在、prxC2-GUS 形質転換タバコに関しても、レーザー照射による GUS 活性への影響を調べている。

Application of UV pulsed laser microbeam technique to plant cells (III) - Analysis of plant wounding responses to pulsed UV laser -

○ Takeshi Shoji¹, Shinichiro Kajiyama², Akiyoshi Kawaoka³, Kazuya Yoshida⁴, Atsuhiko Shimmyo⁴, Yube Yamaguchi⁵, Hiroshi Sano⁶, Eiichiro Fukusaki², Akio Kobayashi² (¹BRAIN Kobayashi Project, ²Dept. Biotech. Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ³Cen. Res. Lab., Nippon Paper Indus., ⁴Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, ⁵Cen. Gen. Info., NAIST, ⁶Cen. Gen.)

Key words pulsed UV laser, wounding responses, signal transduction

950 紫外線パルスレーザー技術の植物細胞への応用 (II) — 1 細胞代謝産物分析のこころみ —

○梶山慎一郎¹, 吉川宜宏², 渡部達也¹, 庄司 猛², 福崎英一郎¹, 小林昭雄¹ (¹阪大院・工・応生工, ²生研機構小林プロジェクト)

【結論】近年、分子生物学の進歩により、様々な生理現象を分子レベルで論議することができるようになってきた。これに伴い遺伝物質を含めた代謝産物の動態解析も個体全体から、特定組織、特定器官あるいは特定細胞へと次第に分解能の高い分析手法が求められてきている。ところが特に植物細胞の場合、細胞の周りが硬い細胞壁で覆われているため、特定細胞からのサンプリングそのものが大変困難であり、さらに核酸以外の代謝産物を解析する場合、PCR 等の増幅手段が無いため検出感度が非常に高い分析手法が必要である。我々はこれまでに、熱の発生が少なく加工精度が高い 193nm ArF エキシマレーザーに着目し、細胞に致死的損傷を与えることなく細胞壁のみを除去することに成功している。¹⁾ 今回、初の試みとして、トレンニアの花弁 1 細胞より細胞内容物をサンプリングし、高感度分析が可能な MALDI-TOF-MS および、ナノフロー HPLC を用いて色素分析を行なったので報告する。

【方法・結果】193nm ArF エキシマレーザーを、内面をアルミニウムでコーティングした中空ファイバーにて導光し、反射集光によりトレンニア (*Torenia hybrida* cv. Summerwave Suntory Co.) 花弁の 1 細胞にターゲットングしてレーザー照射した。その結果、照射細胞のみバーストすることで顕微鏡下で確認できた。次に浸出した細胞内容物を別途用意したマイクロロマンビュレータのガラスキャピラリーにて回収し、MALDI-TOF-MS 分析を行なったところ、Malvidin-3-glucoside-5-(*p*-coumaroyl)-glucoside と考えられる分子量 801 の化合物の検出に成功した。現在ナノフロー HPLC による色素の分離を行い、細胞間での色素 (アントシアニン類) の量的あるいは質的な違いについて検討を行なっている。

1) 農芸化学会 2002 年度大会 講演要旨集 pp. 274

Application of UV pulsed laser microbeam technique to plant cells (II) - Sophisticated approach to one cell metabolites analysis -

○ Shinichiro Kajiyama¹, Norihiro Yoshikawa², Tatsuya Watabe¹, Takeshi Shoji³, Eiichiro Fukusaki¹, Akio Kobayashi¹ (¹Dept. Biotech. Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²BRAIN Kobayashi Project, ³BRAIN Kobayashi)

Key words Pulsed UV Laser, Plant cell, metabolites, ESI-MS, one cell sampling

952 DNA マイクロアレイを用いた親植物の組織細胞と培養細胞における遺伝子発現様式の比較解析

○岩瀬 哲¹, 石井秀樹¹, 松井恭子², 小山智嗣², 青柳秀紀¹, 高木 優², 田中秀夫¹ (¹筑波大・応生化, ²産総研・ジーンファンクション研究ラボ)

【目的】植物培養細胞を用いた有用物質生産の研究は、約 60 年間にわたり世界中で試みられてきたが成功例は僅かしかない。この最大の理由は、分化した組織細胞が有している有用物質の生産能を、脱分化した培養細胞が失うためと考えられるが、そのメカニズムは明らかになっていない。そこでモデル植物としてシロイヌナズナを用い、親植物の組織細胞とそこから誘導した培養細胞での遺伝子の発現をマイクロアレイを用いてマイクロアレイを用いて比較解析をおこない、問題の原因となる遺伝子の特定を試みた。

【方法および結果】実験には親植物の組織細胞としてシロイヌナズナの野生株 (Columbia) とそこから異なった条件で誘導した 3 種類の培養細胞を用いた (LI 株; 葉から誘導。RI 株; 根から誘導。T87 株; 芽生えから誘導され 10 日間継代培養されている)。それら 4 種類の細胞から mRNA を精製した後、シロイヌナズナ DNA マイクロアレイを用いて親植物の組織細胞と 3 種類の培養細胞間の遺伝子発現の違いを解析した。発現の促進あるいは抑制が 3 種類の培養細胞に共通に見られるものに注目し、親植物の組織細胞と各培養細胞での発現量の差が 4 倍以上の遺伝子をピックアップした。その結果、発現が促進された遺伝子は 17 個、抑制された遺伝子は 68 個であり、培養細胞では遺伝子の発現が抑制される傾向にあることが分かった。発現が促進される遺伝子には機能未知のものが多かった。一方、抑制される遺伝子には機能既知のものも多く、転写因子、細胞骨格および代謝系遺伝子が含まれていた。現在、個々の遺伝子に注目しながら、植物培養細胞における有用物質生産能低下の原因の解明とその克服に向けて検討中である。

Comparable analyses of gene expression profiles between plants and their cultured-cells by DNA microarray.

○ Akira Iwase¹, Hideki Ishii¹, kyoko Matsui², Tomotsugu Koyama², Hideki Aoyagi¹, Masaru Takagi², Hideo Tanaka¹ (¹Inst. Appl. Biochem., Univ. Tsukuba, ²Gene Function Res. Labo., Inst. AIST)

Key words DNA microarray, useful metabolites