

## ミニレビュー

## 形質転換植物を用いた抵抗性誘導剤の作用機作解析

渡壁 百合子<sup>†</sup>, 小野 祥子<sup>††</sup>, 平塚 和之<sup>†,††,\*</sup><sup>†</sup> 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科<sup>††</sup> 横浜国立大学大学院環境情報研究院

## Characterization of Agents That Induce Acquired Resistance by Transgenic Plants

Yuriko WATAKABE,<sup>†</sup> Sachiko ONO<sup>††</sup> and Kazuyuki HIRATSUKA<sup>†,††</sup><sup>†</sup> Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, Takayama 8916-5, Ikoma, Nara 630-0101, Japan<sup>††</sup> Graduate School of Environment and Information Sciences, Yokohama National University, Tokiwadai 79-7, Hodogaya-ku, Yokohama 240-8501, Japan

## 1. はじめに

形質転換植物の作出は比較的容易であり、今日では様々な遺伝子を導入された多種多様な形質転換植物が実用化され、栽培されている。それらの多くはストレス耐性付与あるいは保存性の向上のような形質が付与されたものである。しかし、形質転換植物の利用はそのような形質の計画的改変のみにとどまらない。本稿では、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして導入した形質転換植物について解説し、高等植物の抵抗性誘導剤による遺伝子発現誘導解析について応用した具体例に関して述べ、その可能性について論じる。

植物の全身獲得抵抗性 (Systemic Acquired Resistance; SAR) の誘導は病害応答遺伝子群の発現を指標とすることができる。例えば、抵抗性誘導活性があるサリチル酸 (salicylic acid; SA) 等の化合物を植物体に処理した場合、病害応答遺伝子群の強い発現誘導が起こり、続いてそれらがコードするタンパク質の蓄積に至る。従って、これらの遺伝子発現あるいはタンパク質の蓄積を検出することにより、植物の病害抵抗性の発現の指標とすることが出来る<sup>1,2)</sup>。しかし、遺伝子発現やタンパク質の量的変動を観察する手段として用いられる様々な手法は通常、生体組織からの核酸・タンパク質の抽出あるいは組織固定が必要であり、それらの時間的・空間的变化を追跡するためには、多くの試料を犠牲にする必要がある。また、信頼性の高いデー

タを得るためにはより多くの試料を用いなければならず、そのための労力は膨大なものとなる。

レポーター遺伝子を導入した形質転換植物を用いる非破壊的測定は、それらの煩雑な過程を省き、簡便にデータを得るための手法として有効であると思われる。筆者らはレポーター遺伝子を用いた病害応答遺伝子の発現制御解析系の開発を試みてきた。ここでは、その一例としてタバコ *PR1a* 遺伝子プロモーターの発現解析系について、ルシフェラーゼ (luciferase; LUC) をレポーターとして用いた、病害応答遺伝子発現の観察例を紹介する。LUC はホタルの発光遺伝子でありレポーター遺伝子としては 1986 年に応用が開始された<sup>3)</sup>。そのアッセイ系は遺伝子発現を経時的に観察する実験系として、現時点では、高等植物に於いて遺伝子発現の非破壊的連続観察が可能な唯一の系であると思われる。LUC 遺伝子産物は、他のレポーター遺伝子産物と比較して植物体内での半減期が短い。特に、基質となるルシフェリンの存在下では LUC 活性が不安定であるため、転写量の変動が LUC 活性に反映されやすいという特徴を持つ<sup>4)</sup>。LUC の発光基質であるルシフェリンは植物細胞・組織への浸透性が優れ、細胞毒性も認められない。この利点を活かし、微弱な生物発光を検出可能な高感度 CCD カメラ等を用いた *in vivo* での遺伝子発現測定法が開発され、実際に変異体の選抜などに利用されている。特に、光応答性遺伝子やストレス応答性遺伝子のプロモーターと LUC の融合遺伝子を導入したシロイヌナズナを用いた研究が行われている。

\*〒 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-7

## 2. 形質転換培養細胞 (BY-2) を用いた解析

タバコ培養細胞として普及している BY-2 は増殖が速く、取り扱いが容易であり、アグロバクテリウム法による形質転換効率が極めて高く、多くの形質転換システムを作製することが可能であることなどから植物分子生物学実験に頻繁に用いられる<sup>5)</sup>。そこで、これらの特徴を活かした実験系の開発を試みた。タバコのゲノム DNA から増幅した *PR1a* 遺伝子プロモーター領域を LUC 遺伝子と融合させ、

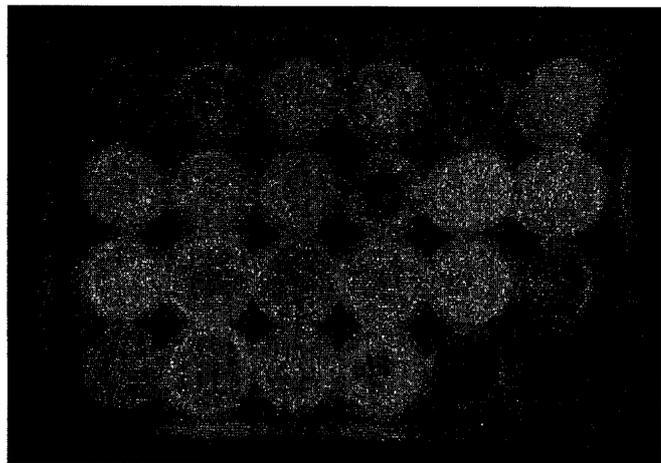


図1 ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして用いた、タバコ BY-2 形質転換細胞の発現解析  
24穴マルチウェルプレートに形質転換細胞を液体培養し、1mM ルシフェリン水溶液を1/5容加えたのち、高感度 CCD カメラを用いて発光状況を観察した。各ウェルの明るさは発光量、即ちルシフェラーゼ遺伝子の発現レベルを示している。

pBII121 由来のプラスミドベクターに挿入後アグロバクテリウム法により BY-2 細胞を形質転換した。得られた形質転換体をコロニーごとに分離し、マルチウェルプレートに移して液体培養し、斉一な細胞株を確立させた(図1)。それらの中から、生育が良好な細胞株を選抜し、サリチル酸による *PR1a* 遺伝子の発現誘導実験を試みた。LUC 活性の測定は、BY-2 懸濁細胞に直接ルシフェリン水溶液を加え、細胞からの発光量をフォトンカウンターあるいは高感度 CCD カメラで検出することにより行った。その結果、細胞株間の LUC 活性には大きな差異が認められ、非誘導時においても高い LUC 活性が検出される細胞株が多かった。また、内在性 *PR1a* 遺伝子の RNA ゲルブロット解析の結果とは異なり、SA 処理による発現誘導レベルの上昇は殆ど観察されなかった。しかし、ルシフェリンの前処理を行うことで、非誘導時の LUC 活性を低く抑えることが可能で、細胞株によっては明瞭な発現誘導が観察可能であった(図2)。

## 3. 形質転換タバコを用いた解析

微弱な生物発光を検出可能な高感度 CCD カメラを用いることにより、リアルタイムで植物体からの微弱発光を視覚化し、LUC 活性の検出、定量が可能である。そこで、前述の *PR1a* と LUC の融合遺伝子を導入した形質転換タバコを用いて、*PR1a* 遺伝子プロモーター活性の観察を試みた。タバコの本葉を用いた場合、BY-2 細胞と比較して、非誘導時の活性が低く、SA 処理による明瞭な発現誘導を観察することができ、発現部位をリアルタイムに可視化することが可能であった(図3)。その発現誘導パターンは内在

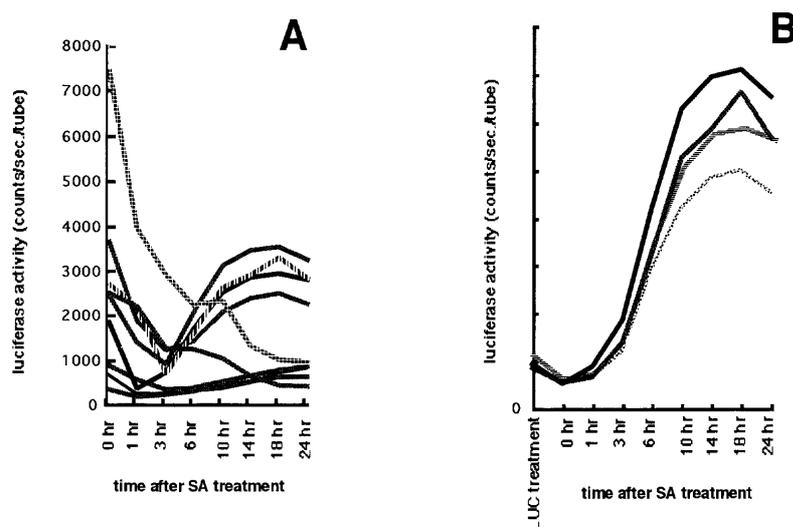


図2 タバコ BY-2 培養細胞における *PR1a* 遺伝子プロモーターのサリチル酸による発現誘導をルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして経時的に定量した実験例  
ルミノメーターの測定用試験管に形質転換 BY-2 を分注し、さらに 1mM ルシフェリンを加えた後、経時的に発光量を測定した。ルシフェリンとサリチル酸を同時に加えた場合、蓄積した LUC タンパク質に由来するバックグラウンドが非常に高く、SA 処理による発現誘導は観察しがたいが(A)、ルシフェリンの前処理によりバックグラウンドは低減し、明瞭な発現誘導が観察可能となる(B)。

性 *PR1a* 遺伝子の発現パターンとほぼ一致していた。この実験系を用いることにより *PR1a* 遺伝子発現の時間的、空間的な観察が可能であることが示された。また、この実験系では、CCD カメラを設置した暗箱の大きさによる制約があるのみで、実際にいかなる形状のサンプルであっても観察が可能であり、鉢植えのタバコを暗箱内に持ち込んで観察を行うことも可能であった (図4)。

#### 4. 形質転換シロイヌナズナを用いた解析

シロイヌナズナにおいてもタバコと類似したサリチル酸処理による *PR1* 遺伝子の誘導が観察される<sup>9)</sup>。また、それらの情報伝達系の変異体も数多く取得されている。しかし、前述のタバコを用いた系では分子遺伝学的解析等を十分に実施することが出来ない。そこで、シロイヌナズナを用い

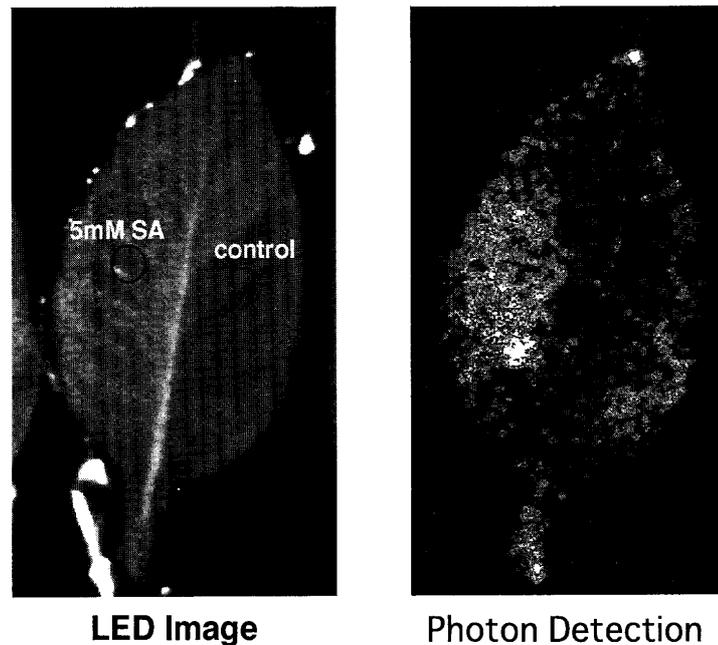


図3 タバコ形質転換植物葉における *PR1a* 遺伝子プロモーターのサリチル酸による発現誘導をルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして高感度 CCD カメラを用いて観察した例  
切り取ったタバコ葉に対し 5 mM SA を図中に示した部位に処理し、24 時間後にルシフェリンを葉面全体に噴霧した後、図1と同様なシステムを用いて発光状況を観察した。左図は LED 光源による反射光像、右図は同一画面の発光像。

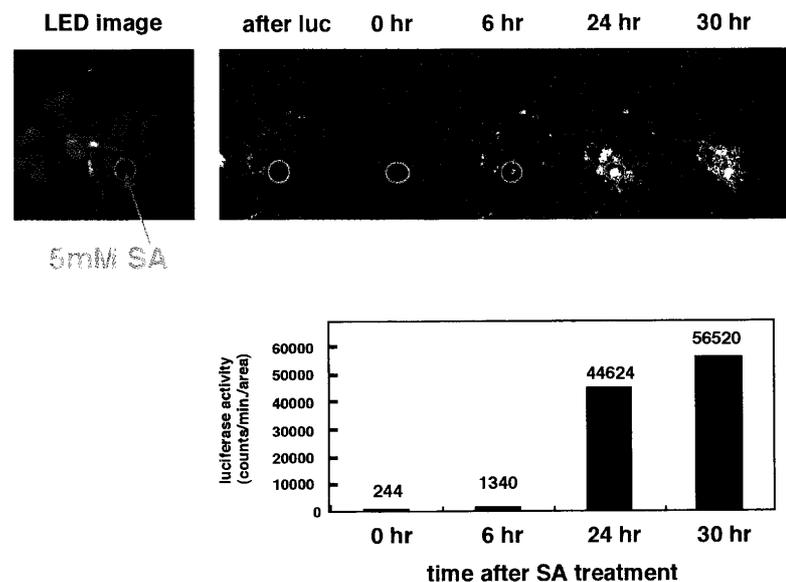


図4 *PR1a* 遺伝子プロモーターのサリチル酸による発現誘導をルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして連続観察した例  
図中に示した部位に SA を処理し、発現状況を高感度 CCD カメラで観察した。SA を処理した部位における発光量を定量した結果が上のグラフ。

た実験系の開発を試みた。第一段階として、タバコの系で用いたプラスミドコンストラクトをシロイヌナズナに導入し、その発現動態を観察した。その結果、タバコと同様に、SA 処理によって明瞭な発現誘導が観察された(渡壁ら、未発表)。この結果は、タバコとシロイヌナズナは類似した SAR による転写活性化機構を持つことを示唆している。この発現誘導は芽生えを用いた場合でも観察可能であることから、LUC 活性を指標とした、新規な変異体の選抜や、SAR 誘導能を示す化合物のスクリーニングなどに活用できるものと考えられた。

### 5. SAR 誘導薬剤の作用機作解析

本稿で紹介した、LUC をレポーターとして用いた遺伝子発現検出系は非破壊的で、極めて高感度であることから、時間的・空間的な定量解析に適している。従って、薬剤の作用機作解析に必要な SAR 誘導マーカーの発現状況を比較検討するためには好適な実験系であると考えられる。実際に、作用点が異なるとされている SAR 誘導薬剤を用いた場合、それらの濃度依存的な *PR1a* 遺伝子発現誘導能の比較、発現誘導の時間的な差異に関する情報を比較的簡単に得ることが可能であった(渡壁ら、未発表)。

### 6. 問題点と今後の展望

筆者らのこれまでの経験から、得られた実験結果は供試植物の状態によりかなりの変動を示すことが判明している。特に *in vivo* での LUC 活性測定実験では、植物や培養細胞の育成環境のコントロールが重要である。また、*PR1a* 遺伝子は老化により誘導されるので、植物体を用いた場合では、老化し始めた成葉でのアッセイは *PR1a* 遺伝子の発現レベルが高く、薬剤処理による誘導は殆ど観察できない。一方、様々な環境、薬剤処理によるルシフェラーゼ活性そのものへの影響も十分に考慮する必要がある。さらに、LUC による発光には、基質の他に酸素と ATP が必要で、これらが細胞内にある程度存在しないと LUC 活性が得られない。今までに具体的な例は知られていないが、LUC の発現量が極めて高い場合、発光にともなう酸素と ATP の消費が細胞の活性に影響する可能性がある。それらを考慮して、適切な対照実験区を設定し、実験結果を解釈する必要がある。

組織・器官レベルでの発現誘導状況の観察には超高感度 CCD カメラ (VIM カメラあるいは冷却 CCD カメラ) システムが必要であるが、微細部分の観察は困難であり、その解像力は GUS 染色や *in situ* ハイブリダイゼーションには及ばない。また、発光検出のための備品、消耗品ともに比較的高価であることは LUC アッセイの系が普及しない要因のひとつであるとも考えられる。

一方、LUC の性能向上のための研究も行われており、これまでにアッセイ試薬の改良のほか、LUC 遺伝子の発現効率を向上させるために塩基置換の導入による改良などが試みられている。野性型の LUC タンパク質はペルオキシゾーム移行配列、グリコシル化部位を有しており、その cDNA 配列にはパリンドローム配列などが存在するが、それらを除き、コドン使用頻度を改良したものが既に市販されている。今後は、異なる発光波長の LUC も使用可能となることが期待される。さらに、それらの検出・定量が可能で、安価な測定機器の開発が望まれる。

本稿で紹介した LUC レポーター遺伝子を導入した形質転換植物・培養細胞は高感度なバイオセンサーの一種として考えることが出来る。それらを利用した実験系は、大規模な大量解析実験にも適しており、ハイスループットスクリーニングへの応用が可能である。今後は、培養細胞、タバコ植物体、シロイヌナズナそれぞれの系の利点を活かした新たな実験系を構築し、新規な化合物あるいは遺伝子の探索・単離、それらの特徴付けなどに利用されることが期待される。

### 引用文献

- 1) M. Ohshima, H. Itoh, M. Matsuoka, T. Murakami & Y. Ohashi: *Plant Cell* **2**, 95-106 (1990)
- 2) S. Uknes, S. Dincher, L. Friedrich, D. Negrotto, S. Williams, H. Taylor, S. Potter, E. Ward & J. Ryals: *Plant Cell* **5**, 159-169 (1993)
- 3) D. W. Ow, K. V. Wood, M. DeLuca, J. R. de Wet, D. R. Helinski & S. H. Howell: *Science* **234**, 856-859 (1986)
- 4) A. J. Millar, S. R. Short, K. Hiratsuka, N.-H. Chua & S. A. Kay: *Plant Mol. Biol. Repr.* **10**, 324-337 (1992)
- 5) T. Nagata, Y. Nemoto & S. Hasezawa: *Int. Rev. Cytol.* **132**, 1-30 (1992)
- 6) E. Lebel, P. Heifetz, L. Thorne, S. Uknes, J. Ryals & E. Ward: *Plant J.* **16**, 223-233 (1998)

### 略歴

渡壁百合子

生年月日：1969年7月9日

最終学歴：奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科博士前期課程修了

趣味：ペット（熱帯魚）

小野祥子

生年月日：1976年7月22日

最終学歴：奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科博士前期課程修了

趣味：絵画、ダンス、編み物、裁縫、読書

平塚和之

生年月日：1960年7月26日

最終学歴：東京大学大学院農学系研究科博士課程修了

趣味：サッカー、書籍とレコードの収集