

# 植物形質転換細胞の選抜機能を有する化合物

河津一儀・神崎 浩<sup>a)</sup>・川井 悟・小林昭雄

(生物資源開発学講座)

Received June 15, 1992

## A Compound Which Can Be Used for Selecting Transformed Plant Cells

Kazuyoshi KAWAZU, Hiroshi KANZAKI<sup>a)</sup>, Satoru KAWAI  
and Akio KOBAYASHI

(Department of Bioresources Chemistry)

Oxazolomycin, an antibiotic selectively active against *Agrobacterium tumefaciens* produced by *Streptomyces* sp. KBFP-2025, had no inhibitory activity to the growth of potato crown gall cells, despite its strong phytotoxicity to potato tuber cells. This character of the compound is very useful for the selection of transformed cells.

### 緒 言

高等植物に外来の遺伝子を導入し形質転換をさせる試みは、過去十数年の間いろいろな方法で検討されてきた。それらのなかで、高等植物に感染しクラウンゴールという王冠状の腫瘍を形成させる土壌細菌 *Agrobacterium tumefaciens* を宿主とする Ti (Tumor inducing) プラスミドと、植物に感染し毛状根を形成させる土壌細菌 *Agrobacterium rhizogenes* を宿主とする Ri (Root inducing) プラスミドは近年特に開発が進み、現実にこれらのプラスミドを用いて外来の遺伝子を高等植物の核 DNA 内に導入し形質転換させることが可能となってきた。これらの土壌細菌は多くの高等植物の傷口等から感染し腫瘍や毛状根の生成を引き起こす。このようにして生成した腫瘍組織や毛状根は、もはやこれらの細菌が存在しなくなった後も、増殖を続けることができる。

*Agrobacterium* を用いる植物の形質転換に関する研究は、その複雑で合目的な機構の分子レベルでの研究と、この系を利用することによる新しい性質を有する植物の作出や物質生産などの応用研究との2つに分けられる。また、多くの生化学分野の研究において、化学プローブが種々の生物現象の機構解明に重要な役割を果たしているように、植物形質転換研究にも化学プローブが必須と考えられる。我々はクラウンゴール形成機構解明に有効な化学プローブの探索を行い、既にジャガイモ塊茎のクラウンゴール形成制御物質2種を微生物代謝産物から得ている<sup>1,2)</sup>。その1つは土壌から分離した *Xanthobacter* sp. KB-3001が生産する細胞外酸性多糖、PS-1であり<sup>1)</sup>、この化合物は *A. tumefaciens* を凝集させる活性を有し、その結果、同菌の植物細胞への付着を助長し、植物の形質転換効率を高める。また、*Streptomyces* sp. KBFP-2025が生産する Oxazolomycin (Fig. 1) は、*A. tumefaciens* に対して特異性の高い抗菌活性を示す<sup>2)</sup>。従って Oxazolomycin は形質転換細胞から *A. tumefaciens* を特異

a) 岡山大学大学院 自然科学研究科 生物資源科学専攻 (Division of Bioresources Science, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University)

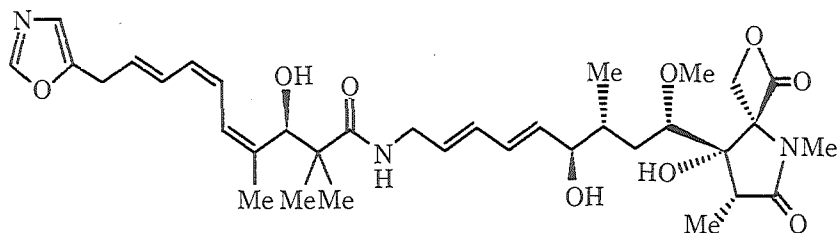


Fig. 1 Structure of oxazolomycin.

的に除去するために利用できる。

今回、Oxazolomycin の植物に対する毒性を検討した結果、本化合物が形質転換細胞と非形質転換細胞に対して異なる毒性を有することが明らかとなったので報告する。この性質を利用することにより、本化合物は植物形質転換細胞の効果的な選抜に有効と考えられる。

## 材 料 と 方 法

### 材 料

Oxazolomycin は前報<sup>2)</sup>に従い、*Streptomyces* sp. KBFP-2025株の培養液から溶媒分画と各種クロマトグラフィーにより、単離精製した。<sup>1</sup>H-NMR, IR, UV の各スペクトル測定はそれぞれ、Varian VXR-500, Hitachi EPI-G 3, Shimadzu UV-3000を用いて行い、精製化合物が Oxazolomycin であることを確認した。

### *Agrobacterium tumefaciens* の培養

*A. tumefaciens* の培養は NBSY 培地 (Nutrient broth [日水製薬製] 0.8%, Sucrose 0.5%, Yeast extract 0.1%, pH 7.0) 10ml (Ø25mm試験管), 27°C, 48時間, 往復振盪培養で行った。

### クラウンゴール形成試験 (Fig. 2)

本研究では Anand らによって報告されたポテトディスク法<sup>3)</sup>を応用した。クラウンゴール形成阻害活性を的確かつ定量的に評価するために最も重要なことは適切な条件で植物に *A. tumefaciens* を感染させ高い確率でクラウンゴールを形成させることである。また一般的に植物の形質転換研究において、転換形質が確認できるようになるまでに長期間を要することは研究遂行にあたって大きな障害であり、可能な限り短時間でクラウンゴールを形成させる必要がある。ポテトディスク法を採用した理由として、1) 高頻度でクラウンゴールが形成されること、2) 短期間 (約2週間) でクラウンゴールを形成すること、3) 均一な試験用植物体組織を大量に供給できること、4) 一年を通してジャガイモは入手しやすいこと等が挙げられる。

#### 1. ポテトディスクの調製法

- ① ジャガイモを1%次亜塩素酸ナトリウムで約20分間表面殺菌する。
- ② 残存する次亜塩素酸ナトリウムを流水でよく洗う。
- ③ クリーンベンチ内でコルクボーラー (Ø10mm) とメスでØ10×10mmのディスクを調製する。
- ④ 2%寒天20mlを分注固化させたØ90mmシャーレにポテトディスクを9個ずつ置く。

#### 2. 試料溶液の調製法と接種法

- ① M1試験管に試料溶液を400µg相当入れる。アルミキャップを付けて減圧乾燥により、溶媒を完全に留去する。

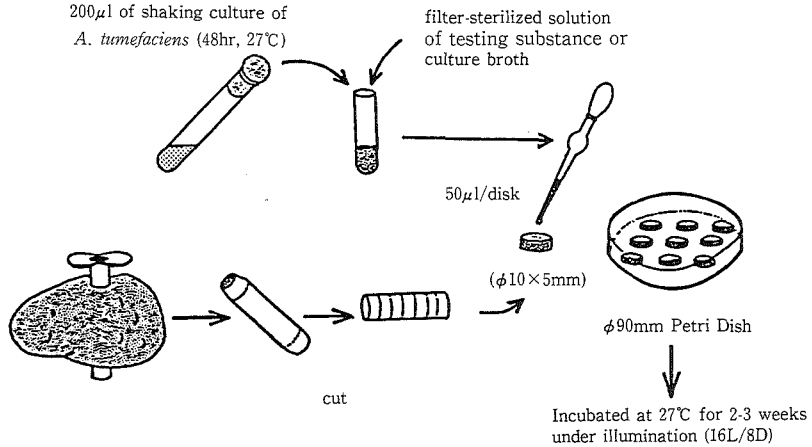


Fig. 2 Potato tuber crown gall assay.

- ② 試料が非水溶性のときは、10 $\mu$ lのメタノールまたはアセトンに溶かした後、滅菌水190 $\mu$ lを入れて懸濁する。
- ③ M1試験管7本に100 $\mu$ lずつ滅菌水を入れ、試料を公比2で希釈していく。
- ④ 8本の試験管全部に *A. tumefaciens* 培養液を100 $\mu$ lずつ入れる。
- ⑤ 対照区用に *A. tumefaciens* 培養液を2倍希釈したものを必要量調製し、ポテトディスク1つに50 $\mu$ l接種する。
- ⑥ 試料溶液を試料濃度の低い方から50 $\mu$ lずつ接種する。
- ⑦ 水分蒸散を防ぐためシャーレをパラフィルムで巻き、16時間照明/8時間暗黒、25 $^{\circ}$ Cで約2週間培養し、クラウンゴールの形成頻度を観察する。

#### 発芽阻害試験

本試験にはアルファルファ (*Medicago sativa*) の種子を用いた。24穴アッセイプレートに $\phi$ 15mmの皮革加工用パンチで打ち抜いた濾紙を入れ、そこに試料溶液を吸収させる。減圧デシケーター中で溶媒を留去した後、蒸留水を100 $\mu$ l入れる。12時間、27 $^{\circ}$ C、暗黒下で培養した発芽寸前のアルファルファ種子を4個ずつ入れる。パラフィルムで蓋を密閉し、水分が蒸散しないようにして24時間、27 $^{\circ}$ C、暗黒下で培養した後、活性を判定する。

#### クラウンゴール増殖試験

固体 Murashige-Skoog 培地 (0.2% gellan gum) 5mlを試験管 ( $\phi$ 2.5 $\times$ 12cm) に分注し、オートクレーブ滅菌する。培地が固化する直前に被検物質を滅菌的に50 $\mu$ l添加する。ポテトディスク上に形成された新鮮なクラウンゴール細胞 (直径約3mm) をこの培地上に移殖し植物用人工気象器内で、16時間照明/8時間暗黒、25 $^{\circ}$ Cで培養する。同じ濃度の被検物質を含む新鮮な固体培地上へ5日毎に継代培養し、その際クラウンゴールの重量を測定する。被検物質としては Oxazolomycin 100 $\mu$ g/ml、及び Carbenicillin 1000 $\mu$ g/mlを使用した。

## 結 果

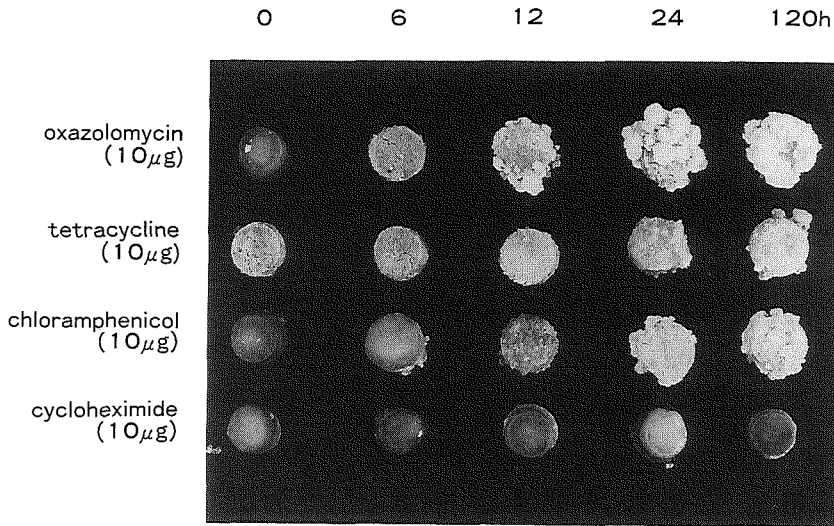
#### 発芽阻害活性

アルファルファ種子の発芽を指標として活性を調べたところ、Table 1に示すように、25.0 $\mu$ gの施用量で完全に発芽を阻害し、12.5 $\mu$ gの施用量では発芽はするが実生の生育を遅らせた。この植物毒性は Cycloheximide と同程度であった。

**Table 1** Inhibition of germination of alfalfa

Dose ( $\mu\text{g}$ )	100	50	25	12.5	6.3	3.1	1.6	0.8	0
Oxazolomycin <sup>a)</sup>	+++	++	+	±	-	-	-	-	-
Cycloheximide <sup>a)</sup>	N.T.	++	+	±	-	-	-	-	-

a) +++ : completely inhibited, ++ : strongly inhibited, + : inhibited, ± : slightly inhibited, - : not inhibited, N.T. : not tested.



**Fig. 3** Effect of antibiotics administered after inoculation with *A. tumefaciens* on crown gall formation.

### ジャガイモ細胞と形質転換ジャガイモ細胞への阻害活性

Oxazolomycin の精製過程において、本化合物が高濃度でポテトディスクの細胞を壊死させるという植物毒性を示すことを見だしていた<sup>2)</sup>ので、本活性がクラウンゴール生成過程において変化するかどうかを検討した。これまでの知見から<sup>2)</sup>、形質転換は *A. tumefaciens* 接種後およそ24時間で完了すると考えられるので、接種後種々の時間経過後に本化合物を投与し、上記の植物毒性に変化が現れるかを検討した。すなわち、接種後0、6、12、24、120時間後に10 $\mu\text{g}$ の各サンプルを投与し、2週間後に観察を行った。比較対照として、抗菌物質である Tetracycline, Chloramphenicol, 植物毒である Cycloheximide についても試験した。Fig. 3 に示すように、この投与濃度で Oxazolomycin はポテトディスク細胞を壊死させる植物毒性を示す。しかしながら、形質転換が終了し T-DNA が植物に組み込まれたと考えられる24時間以降に本化合物を接種しても、クラウンゴールの生育阻害あるいは細胞の壊死という現象は観察されなかった。Cycloheximide はどの時期に投与しても細胞の壊死を示したことから、この化合物は形質転換細胞の生育も阻害することが明らかである。Tetracycline, Chloramphenicol は本 *A. tumefaciens* に対し抗菌活性を示すことから形質転換を押さええるが、植物毒性は示さない。従って、Oxazolomycin は前回報告した<sup>2)</sup> *A. tumefaciens* への特異的な抗菌活性以外に、植物細胞に対して毒性を有するが、形質転換植物細胞には毒性を示さないことが推定できる。

### クラウンゴール細胞への毒性試験

実際にクラウンゴール細胞に対して無毒であるかどうかを、クラウンゴール細胞の生育を指標として試験した。対照として全くクラウンゴールに影響を与えない Carbenicillin を用いた。Carbenicillin は1000 µg/ml, Oxazolomycin は100 µg/ml を MS 固体培地に添加した場合、クラウンゴールの生育は薬剤無添加培地上のものとはほとんど差が見られず、本化合物がこの薬量で形質転換細胞に対して毒性を示さないことが明らかとなった。

### 考 察

植物細胞を *A. tumefaciens* で形質転換させた後、形質転換細胞を選抜する方法には次のような方法がある<sup>4)</sup>。①形質転換細胞が特異的に生産するオパインを検出する。②植物染色体に組み込まれた T-DNA 由来の mRNA をノーザンハイブリダイゼーションで確認する。③植物ホルモンフリーの培地中で培養する。④特別なマーカー遺伝子を T-DNA に組み込んだ Ti-プラスミドを遺伝子工学技術により作成し、その遺伝子の発現を確認する。このうち①②の方法は細胞からオパインや RNA を抽出する操作が必要であり、そのために多くの細胞が必要となる。さらに①では感度がそれほど良くなく②ではラジオアイソトープによる標識化が必要で一般の実験室では行えない欠点がある。③は、選択性がそれほど高くはなく、必ずしも形質転換細胞のみを選択できるとは限らない。④のマーカー遺伝子としては主に抗生物質耐性遺伝子が使用されており、この遺伝子を遺伝子工学技術により *A. tumefaciens* の Ti-プラスミドの T-DNA 領域に組み込み、その菌を用いて形質転換を行った後、抗生物質を含む培地上で植物細胞を培養することにより、形質転換された細胞のみが簡単に選抜される。この方法の欠点は、野生株の *A. tumefaciens* による形質転換細胞の選抜ができないこと、及び組換え DNA 実験指針に従った管理区域内での実験となり大量培養や野外での実験に制限がでてくることである。

増殖が速く、生育に植物ホルモンを必要としないクラウンゴール細胞や毛状根細胞を利用する植物の生理活性二次代謝産物の生産研究が盛んに行われているが、これを工業的に実用化するには、遺伝子工学技術で外来遺伝子を導入した株を用いるより、野生株の方が、製品の安全性などの面から有利である。今回我々が見いだした Oxazolomycin の特異的な性質、すなわち、形質転換細胞には毒性を示さず母植物細胞に毒性を示す機能を利用することにより、野生株により形質転換された植物細胞を簡単に選抜できると考えられる。従って、この性質は、クラウンゴール細胞を用いる物質生産のために非常に有用である。

### 摘 要

*Streptomyces* sp. KBFP-2025株が生産する Oxazolomycin は、*Agrobacterium tumefaciens* に対する特異的な抗菌活性により、ジャガイモのクラウンゴール形成を阻害する。さらに、本化合物はアルファルファの発芽を強く阻害し、ジャガイモ塊茎細胞を壊死させたが、ジャガイモのクラウンゴール細胞に対する生育阻害を示さなかった。すなわち、本化合物は非形質転換植物細胞に対する選択毒性を有しており、形質転換細胞の選抜に有用である。

### 謝 辞

この研究は、平成元年度から3年度までの3年間に亘る岡山大学学内特定研究『生物生産のための細胞選抜と細胞育種』を分担して行ったものである。また、500-MHz <sup>1</sup>H-NMR 測定に際しては岡山大学 SC-NMR 室を利用させていただいた。ともに記して感謝の意を表する。

## 文 献

- 1) Kawai, S., A. Kobayashi and K. Kawazu : A bacterial extracellular polysaccharide which enhances the attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to the plant cell surface. *Experientia* **45**, 201—202 (1989)
- 2) Kawai, S., G. Kawabata, A. Kobayashi and K. Kawazu : Inhibitory effect of oxazolomycin on crown gall formation. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 1127—1133 (1989)
- 3) Anand, V. K. and G. T. Heberlein : Crown gall tumorigenesis in potato tuber tissue. *Am. J. Bot.* **64**, 153—158 (1977)
- 4) 町田泰則 : Ti プラスミド (最新植物工学要覧, 山口彦之ら編), 14—27, R&D プランニング, 東京 (1989)