

修士論文

FOX ハンテイングによるタバコ培養細胞 BY-2 における 薬剤感受性形質転換体のスクリーニング

平成 15 年度入学

学籍番号 36509 大塚 康伸

植物全能性制御システム解析学分野

指導教官 馳澤 盛一郎

目次

| | |
|---|----|
| 略称 | 1 |
| 序文 | 2 |
| 材料と方法 | |
| ・ BY-2 細胞の培養 | 6 |
| ・ BY-2 細胞のアグロバクテリウムによる形質転換 | 6 |
| ・ オーキシシン (NAA) とサイトカイニン (BA) のクロスチェック | 7 |
| ・ オーキシシン要求性が低下した形質転換体の選抜条件の検討 | 7 |
| ・ カルスからのゲノム DNA の抽出および PCR による形質転換遺 伝子の確認 | 7 |
| 結果 | |
| ・ アグロバクテリウム FOX ライブラリーの確認 | 9 |
| ・ アグロバクテリウムによるタバコ BY-2 細胞の形質転換の確認 | 9 |
| ・ BY-2 細胞のカルス形成におけるオーキシシン依存性の確認 | 10 |
| ・ アグロバクテリウムの洗浄条件の検討 | 10 |
| ・ オーキシシン要求性が低下した形質転換体の選抜条件の検討 | 11 |
| ・ pBigS および iaaM で形質転換した BY-2 細胞から形成されたカ ルスからのゲノム DNA の抽出および PCR による形質転換遺伝 子の確認 | 12 |
| ・ FOX ハンティングを用いたオーキシシン要求性が低下した形質転換 体のスクリーニング | 12 |
| ・ シロイヌナズナで単離されたオーキシシン要求性が低下した遺伝子 の BY-2 の生育への影響 | 13 |
| ・ 様々な選抜条件でのスクリーニング | 14 |

| | |
|------------|----|
| 考察 | 15 |
| 謝辞 | 20 |
| 参考文献 | 21 |
| 図表 | 25 |

略称

| | |
|-------------|---|
| 2,4-D | : 2,4-dichlorophenoxyacetic acid |
| BA | : 6-benzyladenine |
| BY-GT16 | : BY-2 cells stably expressing a GFP-tubulin fusion protein |
| BY-GV7 | : BY-2 cells stably expressing a GFP-AtVam3p fusion protein |
| CaMV | : Cauliflower mosaic virus |
| DBN | : 2,6-dichlorobenzonitrile |
| FOX hunting | : full-length cDNA over-expressor gene hunting |
| GFP | : green fluorescent protein |
| NAA | : 1-naphthalenacetic acid |

序文

これまでに植物細胞の成長や分裂に関する様々な研究が成されてきたが、一方で、未解明の部分も数多くある。その理由の一つとして、植物の成長に必須な成分に関する研究では、通常行われている遺伝子機能を破壊した変異体 (loss-of-function mutant) の探索において、その合成経路や伝達経路に変異が挿入された個体が致死の表現型を示すために単離できない可能性が考えられる。また、ゲノムが解読された高等生物の中で遺伝子重複が少ないとされるシロイヌナズナのゲノムでも、半分以上の遺伝子がゲノム上に相同遺伝子を持っており (Arabidopsis Genome Initiative 2000)、一遺伝子破壊による表現型が現れない可能性も考えられる。

これらの問題の解決のために、アクティベーションタギング法などの機能獲得 (gain-of-function) 型の形質変異体を単離する方法が開発されてきた (Tani et al. 2004)。従来のアクティベーションタギング法では、植物細胞内で恒常的に発現するカリフラワーモザイクウイルス 35S (CaMV 35S) プロモーターがアグロバクテリウムを介して植物ゲノム中にランダムに挿入され、挿入位置に近い遺伝子が過剰発現される (Fig. 1a)。その結果、遺伝子破壊により致死になる遺伝子についても変異体の単離が期待できるようになった。また、遺伝子ファミリーを形成して機能が重複している遺伝子群の場合にも、表現型の確認が容易になる可能性がある。さらに、通常の遺伝子破壊型の突然変異体は劣性となることが多いため、表現型を確認するには T2 世代まで待たなければならないが、形質転換体の表現型は基本的に優性となるため、スクリーニングが T1 世代で行え、実験操作期間の短縮が可能となった。この手法により、オーキシンの生合成において律速段階となるトリプタミンの N 末端の酸素化を触媒する酵素の欠損した *yucca* (Zhao et al.

2001) などが単離された。Yucca タンパク質は 9 種類の類似した配列からなるファミリーを形成しているため、機能の重複が起こり、遺伝子機能を破壊した変異体 (loss-of-function mutant) の探索では形質の差が明らかにならなかったと考えられる。しかし、従来のアクティベーションタギング法を用いた場合、発現増幅はプロモーター挿入位置の近傍のどの遺伝子で起こるかは分からず、TAIL-PCR やプラスミドレスキュー法などを用いてその遺伝子の同定を行わなければならない (Liu et al. 1995, Grant et al. 2003) など、時間と労力が要求される。そこで、最近、従来のアクティベーションタギングを応用した新たな手法が開発されつつある。理化学研究所の植物変異探索研究チームは、CaMV 35S プロモーターの下流にシロイヌナズナの完全長 cDNA を連結したライブラリーを作製し、このライブラリーを用いて機能獲得型形質転換体を単離する方法を開発中である。このシステムは FOX Hunting System (full-length cDNA over-expressor gene hunting system: FOXハンティング) と名づけられており (Fig. 1b)、この方法では従来のアクティベーションタギング法とは異なり、一つのタグに対して一つの遺伝子が対応しているために、発現した形質に対して導入された原因遺伝子の同定が容易となることが期待される (Ichikawa et al. 2004)。また、作製された full-length cDNA ライブラリーはシロイヌナズナの推定全遺伝子数の約 70%超であり、網羅的解析も期待される (Ichikawa et al. 2004)。

タバコ培養細胞 BY-2 は植物の培養細胞の中で最も増殖が速いことで知られており、また、高度な細胞周期の同調が可能なことから細胞周期進行の解析をはじめ、高等植物のモデル細胞として細胞学、生理学、生化学、分子生物学的解析に用いられており、アグロバクテリアを用いた形質転換が容易に行えるという利点もある (Geelen and Inzé 2001)。タバコ細胞は複二倍体であるために、シロイヌナズナなどで用いられている機能欠損型突然変異

体の解析には不向きであるが、FOX ハンティングのような機能獲得型の形質転換体の単離には有用な材料であると考えられる。また、微小管を可視化した BY-GT16 細胞 (Kumagai et al. 2001) や液胞膜を可視化した BY-GV7 細胞 (Kutsuna and Hasezawa 2002) などの形質転換体を用いることで、細胞内構造に関わる遺伝子の機能についても解析を行える可能性を持つ。

まず最初に BY-2 の増殖に必須であるオーキシンに着目した。オーキシンは植物の「成長物質」として最初に発見された植物ホルモンであり (小柴、森 2004)、組織・器官レベルでは、器官の伸長成長だけでなく、胚発生におけるパターン形成、維管束の分化、側根形成の促進、頂芽優勢の維持、根や茎が示す屈性反応など様々な現象に関与している (Friml 2003)。また、細胞レベルでは、細胞分裂、細胞周期の進行、細胞伸長、細胞分化の制御などに関与している (Chen et al. 2001, Zazimalova and Napier 2003)。これまでオーキシンの植物成長における作用機構を解明するためには、主に 2 つの研究アプローチがとられてきた。ひとつはオーキシンにより発現が制御される遺伝子やオーキシンと結合するタンパク質を直接同定する分子生物学的・生化学的アプローチであり (Berleth et al. 2004, Napier 2002)、もうひとつはモデル植物を用いてオーキシン応答に異常を示す突然変異体を単離、解析し、それらの原因遺伝子を同定するといった分子遺伝学的アプローチである (Dharmasiri and Estelle 2004, Vogler and Kuhlemeier 2003)。これらの研究により、オーキシンの生合成、輸送、分解、そしてシグナル伝達に関する数多くの知見がもたらされた。しかしながら、オーキシンの生合成経路や作用機構に関してはいまだ未解明の部分も多い。その理由として、前述のように、遺伝子機能を破壊した変異体 (loss-of-function mutant) の探索においては、生合成経路やシグナル伝達経路に変異が挿入された個体は致死の表現型を示す可能性が考えられる。また、相同遺伝子の存在により、一遺伝子

破壊による表現型が現れない可能性も考えられる。

以上のことから本研究では、タバコ培養細胞 BY-2 を FOX ハンティングを用いた遺伝子機能解析に応用するため、BY-2 細胞での実験系の確立を目指して様々な条件検討を行った。FOX ハンティングはシロイヌナズナの植物体を実験材料と想定して開発されているものである。形質転換に用いられる遺伝子はシロイヌナズナの cDNA であり、形質転換体のスクリーニングは形態形成や色素合成などの肉眼で容易に確認できる形質から行っている。そのため、タバコの培養細胞系である BY-2 細胞にそのまま適用することはできない。また、シロイヌナズナにおいて FOX ハンティングによるオーキシン要求性が低下した形質転換体から単離され、解析の進みつつある 6 種の cDNA を用いて、タバコ BY-2 細胞においてもオーキシン要求性が低下した形質を示すか否かを調べることで、シロイヌナズナを材料として確立されたこの手法が BY-2 細胞でも有効であるか否かのコントロール実験とした。そして、FOX ハンティングをタバコ培養細胞 BY-2 に応用することで、オーキシンの生合成やシグナル伝達に関わる遺伝子の単離を目指し、スクリーニングなどの条件を検討した。さらに、これと平行して、やはり植物細胞の成長・分裂に必須である微小管や細胞板形成、小胞輸送などに関連する遺伝子を解析するべく、微小管重合阻害剤や細胞壁合成阻害剤などのストレスに耐性を示す形質転換体の単離を試みた。

材料と方法

BY-2 細胞の培養

タバコ懸濁培養細胞 BY-2 は *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 の芽生えに由来する培養細胞で、7 日毎に 1 mL の細胞培養液を、改変した Linsmaier and Skoog 液体培地 (Linsmaier and Skoog 1965) 95 mL に植え継ぎ、暗黒下で 27 °C、130 rpm のロータリーシェイカー上で振とう培養して維持している (Nagata et al. 1992)。この培地は Murashige and Skoog Plant Salt Mixture (Wako Pure Chemical Ind. Ltd., Osaka, Japan) に KH_2PO_4 370 mg/L、ショ糖 3 %、塩酸チアミン 1 mg/L、ミオイノシトール 100 mg/L、オーキシシンとして 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) 0.2 mg/L (いずれも最終濃度) を加え、pH 5.8 に合わせてオートクレーヴを行ったものである。

BY-2 細胞のアグロバクテリウムによる形質転換

シロイヌナズナ完全長 cDNA ライブラリーを含むアグロバクテリウム (*Agrobacterium* FOX ライブラリー、理化学研究所、市川尚斉博士より分与) のグリセロールストックをカナマイシン 50 mg/L を含んだ LB 培地 1 mL に懸濁し、29 °C で一晩振とう培養した。この培養液 100 μL と、10 mg/mL のアセトシリンゴン 10 μL を、植え継ぎ後 2 日目の BY-2 細胞培養液 5 mL に懸濁し、27 °C、暗黒下で 2 晩培養した。これを改変 Linsmaier and Skoog 液体培地で 5 回洗浄し、アグロバクテリウムを除去した。この BY-2 細胞液を選抜 (寒天) プレート培地上に撒き、約 4 週間、27 °C、暗黒下で培養した。カルスが生育して直径 1 cm 程度になったら、新しい選抜プレート培地上に移植して二次選抜を行った。

オーキシシン (NAA) とサイトカイニン (BA) のクロスチェック

通常の BY-2 細胞培養液である改変 Linsmaier and Skoog 液体培地中の 2,4-D を添加していない液体培地を作成し、ナフトレン酢酸 (NAA) とベンジルアデニン (BA) を以下の濃度でそれぞれ加えた合計 36 種類のプレート培地を作成した。NAA : 0 mg/L、 10 mg/L、 30 mg/L、 100 mg/L、 300 mg/L、 1 g/L、 BA : 0 mg/L、 5 mg/L、 15 mg/L、 50 mg/L、 150 mg/L、 500 mg/L。FOX ライブラリーにより形質転換された BY-2 細胞をこれらの培地上に撒き、約 4 週間、27 °C、暗黒下で培養し、継続観察を行った。

オーキシシン要求性が低下した形質転換体の選抜条件の検討

改変 Linsmaier and Skoog プレート培地中の 2,4-D の濃度を 0.2 mg/L、0.05 mg/L、 0.02 mg/L、 0.01 mg/L (いずれも最終濃度) にしたプレート培地を作成した。FOX ライブラリー、オーキシシン合成関連遺伝子 *iaaM*、ベクター pBigS でそれぞれアグロバクテリウムにより形質転換した BY-2 細胞を作成し、これらを選抜培地上に撒き、約 4 週間後に形成されたカルスの観察を行った。

カルスからのゲノム DNA の抽出と PCR による導入遺伝子の確認

直径 1 cm 程度にカルスが生育したら、カルス約 200 mg をエッペンドルフチューブに分取し、ゲノム DNA 抽出キット (E.Z.N.A. Plant DNA Miniprep Kit, Omega Bio-tek, Inc, GA, USA) に付属している Buffer 1 を 600 μ L 加え、液体窒素で直ちに凍結し、-80 °C で保存した。これにジルコニアビーズ (2 mm, Tomy Seiko Co. Ltd., Tokyo, Japan) 5 個を加え、ビーズ式細胞破碎装置 (MS-100, Tomy Seiko) により細胞を破碎し、続いて、

ゲノム DNA 抽出キットのプロトコルに従って DNA を抽出した。PCR 反応はこの DNA を鋳型にして行った。一回目の PCR 反応にはプライマーとして FOX ライブラリーの cDNA 挿入位置の両端にデザインされた GS17 (5'-GTA CGT ATT TTT ACA ACA ATT ACC AAC-3')、GS18 (5'-CGA TTC AAT CTT AAG AAA CTT TAT TGC-3') を用い、95 °C、1 分、(94 °C、30 秒、58 °C、30 秒、68 °C、3 分) を 40 サイクル、72 °C、4 分で反応を行った。さらに、一回目の PCR の反応液の一部を、プライマー GS17 および GS18 の内側にデザインされた GT15 (5'-ATT ACA TTT TAC ATT CTA CAA CTA CAT CT-3')、GT16 (5'-CAA ATG TTT GAA CGA TCG GGG AAA T-3') を用いて、一回目と同条件で Nested PCR を行った。この反応液を電気泳動して、PCR 産物を確認した。

結果

アグロバクテリウム FOX ライブラリーの確認

タバコ培養細胞 BY-2 への FOX ハンティングの導入に先立って、まず、アグロバクテリウムの FOX ライブラリーの cDNA 保持率を確認した。アグロバクテリウム FOX ライブラリーのグリセロールストック、および、BY-2 細胞への感染を行う際と同様に一晩振とう培養した培養液、それぞれを LB プレート培地上に広げて一晩培養した。得られたシングルコロニーを 1 mL の LB 液体培地中で一晩培養し、そこからプラスミドを抽出して FOX ライブラリーを構成するベクター pBigS 上にデザインしたプライマー、GS17 および GS18 を用いて PCR を行った。その結果、グリセロールストック内のアグロバクテリウムでは調べた 8 コロニー中 6 個のコロニーから、約 1 kb から 1.5 kb の PCR 産物が検出された (Fig. 2a)。一方、感染時に用いるのと同様の処理を行った後のアグロバクテリウムでは、8 コロニー中 4 個のコロニーでのみ PCR 産物が確認できた (Fig. 2b)。アグロバクテリウムの培養により、cDNA を保持していない空のベクターを持つアグロバクテリウムが増えることが分かったが、半数のバクテリアが cDNA を保持していたことから、今後はこの条件で実験作業を続けることにした。

アグロバクテリウムによるタバコ BY-2 細胞の形質転換の確認

アグロバクテリウム FOX ライブラリーによって BY-2 細胞の形質転換体を得られるかを調べるために、FOX ハンティングに用いているハイグロマイシン耐性のみを持つ空ベクター pBigS を持つアグロバクテリウムを BY-2 細胞に感染させた。これらの細胞をハイグロマイシンを添加したプレート培地上に撒いたところ、プレート培地一面にカルスが形成された (Fig. 3a)。

抗生物質を含まないプレート培地上では非感染 BY-2 細胞からプレート培地一面にカルスが形成されたが (Fig. 3b)、ハイグロマイシンを含むプレート培地上では非感染 BY-2 細胞からのカルス形成は見られなかった (Fig. 3c)。その結果、このアグロバクテリウムの培養条件・感染条件で形質転換体が得られることが確認された。

BY-2 細胞のカルス形成におけるオーキシン依存性の確認

次に、FOX ハンティングを用いてオーキシン要求性が低下した形質転換体のスクリーニングを行うために、BY-2 細胞のカルス形成に必要な培地中のオーキシン濃度について検討した。また、植物の形態形成にはオーキシンとともに植物ホルモンであるサイトカイニンも重要な役割を担っていることから、オーキシンとしてナフタレン酢酸 (NAA)、およびサイトカイニンとしてベンジルアデニン (BA) を様々な濃度で含むプレート培地上に BY-2 細胞を撒き、カルス形成能を調べた (Fig. 4)。その結果、NAA の濃度が 30 mg/L 以下では、BA の濃度に関わらず、BY-2 細胞のカルスが形成されなかった。一方、NAA 100 mg/L 以上の条件ではカルス形成が見られたが、この場合も同一のオーキシン濃度では BA の濃度の違いによるカルス形成の差は見られなかった。このことから BY-2 細胞からのカルス形成では、BA 濃度への依存性はほとんどなく、NAA の濃度によるのみ依存することが確認された。

アグロバクテリウムの洗浄条件の検討

オーキシン要求性が低下した形質転換体の選抜を行うにあたって、BY-2 細胞をプレート培地上に撒く直前のアグロバクテリウム洗浄用の培地中に含まれるオーキシンが、BY-2 細胞からのカルス形成に与える影響を検討し

た (Fig. 5)。通常の BY-2 細胞の培養にはオーキシシンとして 2,4-D を用いているが、この 2,4-D を含まない培地でアグロバクテリウムを洗浄し、2,4-D を含まない培地上に BY-2 細胞を撒いた場合には、カルス形成は見られなかった (Fig. 5a)。一方、2,4-D を通常培養濃度である 0.2 mg/L 含んだ培地で洗浄した場合は、2,4-D を全く含まない選抜培地上でもカルス形成が見られた (Fig. 5b)。これは洗浄用培地に含まれていた 2,4-D の残留が無視できないことを示している。このことから、今後は、プレート培地の選抜条件をより正確に反映するため、アグロバクテリウムの洗浄には 2,4-D を含まない培地を使用することとした。

オーキシシン要求性が低下した形質転換体の選抜条件の検討

オーキシシン要求性が低下した形質転換体を得るために、選抜培地中の 2,4-D 濃度の検討を行った。ネガティブコントロールとしてベクターのみで cDNA を持たない pBigS、ポジティブコントロールとしてアグロバクテリウムのオーキシシン合成酵素である *iaaM* がベクターに組み込まれたアグロバクテリウムをそれぞれ感染させた BY-2 細胞を様々な 2,4-D 濃度の選抜培地上に撒き、カルス形成能を評価した。選抜培地中の 2,4-D 濃度は、通常の培養濃度である 0.2 mg/L とそれ以下の 0.05 mg/L、0.04 mg/L、0.03 mg/L、0.02 mg/L で行った (Fig. 6)。その結果、ハイグロマイシンの濃度が 20 mg/L の場合、通常の培養濃度である 0.2 mg/L の 2,4-D を含む培地上では pBigS、*iaaM* とともに同程度に多数のカルスが形成されたが、通常培養濃度の 1/10 の 0.02 mg/L の 2,4-D を含む培地上では、pBigS、*iaaM* で形質転換した BY-2 細胞からはともにカルスは全く形成されなかった。一方、0.05 mg/L の 2,4-D を含む培地上ではともにカルス形成が見られたが、pBigS に比べて *iaaM* で形質転換した BY-2 細胞からの方が、より多数のカルスが生育して

いた。0.04 mg/L、 0.03 mg/L の 2,4-D を含む培地上では *iaaM* で形質転換した BY-2 細胞からは約 3~5 mm の小さなカルスが 1~10 個形成されたが、*pBigS* で形質転換した BY-2 細胞からはカルス形成は 0~5 個と *iaaM* より少なく、カルスの大きさも小さいものが多かった。ハイグロマイシンの濃度を 25 mg/L にした場合も、カルス形成能は若干低下したものの、カルス形成の傾向は同じであった。

pBigS および *iaaM* で形質転換した BY-2 細胞から形成されたカルスからのゲノム DNA の抽出と PCR による導入遺伝子の確認

低濃度オーキシン選抜培地上でのカルス形成が *iaaM* 遺伝子産物の効果によるものかどうかを調べるために、*iaaM* で形質転換した BY-2 から形成されたカルスのゲノム DNA を抽出し、*iaaM* 遺伝子の PCR による増幅を行った。まず、ゲノム DNA の単離および PCR の条件が適切か否かを確認するために、BY-2 細胞のゲノム DNA 中に存在することが確認されているリン酸誘導遺伝子 *phi-1* (Sano et al. 1999) のプライマーを用いて PCR を行った。その結果、約 0.9 kbp の PCR 産物が得られたことから、ゲノム DNA の単離および PCR は適切に行われていることを確認した (Fig. 7a)。次に、FOX ライブラリーを構成するベクター *pBigS* 上にデザインしたプライマー、GS17 および GS18 を用いて PCR を行ったところ、*iaaM* で形質転換した細胞からは約 2 kbp の PCR 産物が増幅された。*iaaM* 遺伝子は約 1.7 kbp、ベクター *pBigS* は約 0.4 kbp であることから、低濃度オーキシン選抜培地上で生育したカルスが *iaaM* 遺伝子で形質転換されていることがこの結果から確認された (Fig. 7b)。

FOX ハンティングを用いたオーキシン要求性が低下した形質転換体のスク

リーニング

これまでの条件検討の結果をもとに、FOX ハンティングを用いてオーキシン要求性が低下した形質転換体のスクリーニングを行った。FOX ライブラリーで形質転換した BY-2 細胞をオーキシン濃度 0.02 mg/L、ハイグロマイシン濃度 20mg/L の選抜培地上に撒いたところ、1 プレートあたり、0 個から 10 個のカルスが生育した (Fig. 8a)。また、ベクター pBigS で形質転換した BY-2 細胞をオーキシン濃度 0.02 mg/L の選抜培地上に撒いたところ、カルスは生育しなかった (Fig. 8)。そこで、オーキシン濃度 0.02 mg/L の選抜培地上で生育したカルスの中には FOX ライブラリーでの形質転換によりオーキシン要求性が低下したものが含まれていると判断し、これらのカルスを再度新鮮な選抜培地上に移植して二次スクリーニングを行った。この培地上でも生育したカルスについて、今後ゲノムを抽出し、PCR で遺伝子を増幅し、シーケンスを行い、遺伝子の解析を行う予定である。

シロイヌナズナで単離されたオーキシン要求性が低下した遺伝子の BY-2 の生育への影響

ネガティブコントロールとしてベクターのみで cDNA を持たない pBigS、シロイヌナズナでオーキシン要求性が低下した形質転換体から単離された遺伝子 A1、A2、A3、A4、A5、A6 が各々組み込まれたアグロバクテリウムをそれぞれ感染させた BY-2 細胞を様々な 2,4-D 濃度の選抜培地上に撒き、カルス形成能を評価した (Fig. 9)。pBigS の形質転換体と比較して、明らかにカルス形成能に優れたものは無かった。しかし、オーキシン濃度が 0.04 mg/L の 2,4-D を含む培地上では、A1 と A6 の形質転換体では pBigS の形質転換体に比べてより多くのカルスが生育しており、A2 と A5 の形質転換体では pBigS の形質転換体に比べてより大きいサイズのカルスが形成され

た。A3 の形質転換体では 0.05 mg/L の 2,4-D を含む培地上では pBigS の形質転換体に比べて多くのカルスが生育したが、0.04 mg/L では pBigS の形質転換体との差は見られなかった。

様々な選抜条件でのスクリーニング

選抜条件を工夫することによって、オーキシン関連遺伝子に限らず様々な遺伝子の単離に FOX ハンティングを応用できる可能性がある。そこで、BY-2 細胞の増殖を阻害することが知られている薬剤として、プロピザミド、ジクロロベンゾニトリル (DBN)、カフェインをそれぞれ添加した選抜培地上でスクリーニングを行った。プロピザミドは微小管の重合阻害剤である。また、DBN は細胞壁を構成するセルロースの合成阻害剤で、カフェインは一般的に細胞内の膜小胞の融合を阻害する。まず、空ベクターである pBigS で形質転換した BY-2 細胞からはカルスが形成されない培地中の薬剤の最低濃度を検討したところ、プロピザミド 2.7 μ M、DBN 2.7 μ M、カフェイン 2.5 mM を含む選抜培地上ではカルスが形成されなかった。そこで、これらの濃度の薬剤を含む培地上に FOX ライブラリーで形質転換した BY-2 細胞を撒き、カルスが形成されるかどうかを調べたところ、いずれの条件でも 1 プレートあたり 1 個から数個のカルスが形成された (Fig. 10)。これらのカルスを再び薬剤を含む培地上に移植したところ、プロピザミド耐性、DBN 耐性、カフェイン耐性のカルスをそれぞれ、31 個、9 個、13 個得た。現在、原因遺伝子の同定のためにカルスの培養を続けている。今後は、カルスからゲノム DNA を抽出して PCR を用いて原因遺伝子を増幅し、DNA シークエンスを行うことで原因遺伝子の同定を行う予定である。

考察

タバコ培養細胞 BY-2 は、増殖に植物ホルモンの一つであるオーキシンが必須であることから、オーキシンの生理作用に関する研究に用いられてきた。また、BY-2 細胞は、培養細胞の中で最も増殖が速く、細胞集団が均一であるという特徴から、植物科学の多くの分野で解析に用いられている培養細胞系である。その一方で、タバコ植物は複二倍体であるため、従来のシロイヌナズナなどで用いられているような遺伝子機能を破壊した変異体 (loss-of-function mutant) の表現型を解析する方法の応用は難しく、近年の遺伝学、分子生物学的手法を用いた解析はシロイヌナズナを用いて盛んに行われてきた。そこで、現在、理化学研究所の植物変異探索研究チームにより開発中の機能獲得 (gain-of-function) 型の形質転換体を単離する方法である FOX ハンティングを BY-2 細胞に応用し、機能獲得型突然変異体の選抜系の確立を目指した。この手法では一つのタグに対して一つの遺伝子が対応しているために、発現した形質に対して導入された原因遺伝子の同定が容易になることが期待される。

まず、BY-2 細胞への感染を行うときのアグロバクテリウムが FOX ライブラリーをどの程度保持しているかを調べた結果、一晚培養後のバクテリアの約半数がライブラリーを保持していることを確認できた (Fig. 2)。グリセロールストックから直接起こしたバクテリアでは約 75 %がライブラリーを保持していたことと比較すると、一晚の培養によってライブラリーを保持しているバクテリアの割合が低下したが、この培養したアグロバクテリウムを感染させることによる BY-2 細胞への FOX ライブラリーの導入は行えると考えられる。アグロバクテリウム FOX ライブラリーには 1/20~1/40 の割合で cDNA を含まない空のベクターも混ざっており、空ベクターを持つアグ

ロバクテリウムの方が成長が速いと考えられ、植え継ぎや培養を重ねることで空ベクターを持つアグロバクテリウムの比率が上がってしまったと考えられる。

植物ホルモンであるオーキシシンとサイトカイニンは植物の形態形成に重要な役割を担っており、組織培養時には相対的にオーキシシンを増やすと根の発達が促進され、サイトカイニンの場合には茎頂、そして両者を増やした場合には未分化な細胞の塊であるカルスが形成されることが知られている (Skoog and Muller 1957)。そこで BY-2 細胞のカルス形成におけるオーキシシンとサイトカイニンの関与を調べるために、オーキシシンであるナフタレン酢酸 (NAA) とサイトカイニンであるベンジルアデニン (BA) の濃度を様々に変えた培地上でのカルス形成の様子を観察したところ、BY-2 細胞のカルス形成にはオーキシシンが必須であり、サイトカイニンの濃度への依存性はほとんどないことが確認できた (Fig. 4)。この結果は、BY-2 細胞の増殖にはオーキシシンが必須であり、培地中からオーキシシンを除去すると細胞分裂が停止し、そこへオーキシシンを再添加すると細胞分裂が再開する (Ishida et al. 1993) というこれまでの知見と一致する。また、サイトカイニンは細胞周期の G₂/M 期の進行に必要であることが示唆されているが (Laureys et al. 1998)、BY-2 細胞は必要なサイトカイニンを自身で生合成する (Redig et al. 1996) ことから細胞増殖への依存性がないという知見とも一致する。この結果から、オーキシシンが低濃度あるいは無添加の培地上でカルスを選抜することで、オーキシシン要求性が低下した形質転換体の選抜が可能であることが示唆された。

iaaM で形質転換した BY-2 細胞と空ベクター pBigS で形質転換した BY-2 細胞をそれぞれオーキシシンが低濃度の選抜培地上に撒いたところ、iaaM で形質転換した BY-2 細胞の方からより多くのカルスが形成された

(Fig.6)。このカルスからゲノム DNA を抽出し *iaaM* 遺伝子の PCR による増幅を行ったところ、約 2 kbp の PCR 産物が増幅された (Fig. 7)。*iaaM* 遺伝子がコードしているトリプトファンオキシゲナーゼ酵素は細胞内のトリプトファンをインドール-3-アセトアミドへ変換する経路を触媒している。このインドール-3-アセトアミドは植物細胞内で非酵素的にオーキシニンであるインドール-3-酢酸 (IAA) へ変換されると考えられている。このことから、オーキシニン生合成系に関与する *iaaM* 遺伝子の発現によってオーキシニン含量が増えた結果、*iaaM* による形質転換体からより多くのカルスが形成された可能性がある。この結果もオーキシニンが低濃度の培地上でカルスを選抜することで、オーキシニン要求性が低下した形質転換体の選抜が可能であることを支持している。

空ベクター pBigS の形質転換体ではカルスが生育できない条件である 0.02 mg/L の 2,4-D を含む培地上に FOX ライブラリーで形質転換した BY-2 細胞を撒き、オーキシニン要求性が低下した形質転換体のスクリーニングを行ってカルスを得た (Fig. 8)。さらにこれらのカルスを新しい選抜培地上で二次スクリーニングして得られたカルスについては、今後ゲノム DNA を抽出し、PCR で遺伝子を増幅し、形質転換されているかを確認した後、DNA シークエンスを行って原因遺伝子の解析を進めていく予定である。

この作業と平行して、シロイヌナズナにおいて FOX ハンティングを用いてオーキシニン要求性が低下した形質転換体から単離された 6 種の cDNA が、BY-2 細胞においても表現型を示すか否かを調べた (Fig. 9)。0.04 mg/L の 2,4-D を含む培地上では、A1 と A6 の形質転換体で pBigS の形質転換体に比べてより多くのカルスが生育した。この結果から、A1 と A6 は BY-2 細胞内で分裂の開始を促進するなどの機能を示している可能性が示唆される。一方、A2 と A5 の形質転換体では pBigS の形質転換体に比べてより大きいサ

イズのカルスが形成された。この結果から A2 と A5 は、BY-2 細胞内で細胞分裂の促進を行うなどの機能を示している可能性が示唆される。そこで、これら 4 種類の形質転換体については今後さらに解析を進めて行くことにした。また、A3 の形質転換体では 0.05 mg/L の 2,4-D を含む培地上で pBigS の形質転換体に比べて多くのカルスが生育したが、一方で 0.04 mg/L の培地上では pBigS の形質転換体との差は見られなかった。0.05 mg/L の 2,4-D を含む培地は低濃度であるとはいえ、ベクターのみで形質転換した pBigS でも十分生育可能な濃度であるので、この濃度でのみ pBigS の形質転換体との生育の差が見られただけでは、この生育の差が 必ずしも A3 遺伝子の影響によるものだとは言えないと考え、これについては今後の解析を行わないことにした。しかし、BY-2 細胞における A3 遺伝子のカルス形成能への影響については今後も再度調べていく予定である。

また、FOX ハンティングは、選抜条件を工夫することによって、様々な遺伝子の単離に応用できる可能性を持っている。BY-2 細胞の増殖を阻害する薬剤を pBigS の形質転換体ではカルスが生育せずかつ FOX ではカルスが生育する濃度になるように添加した培地上で選抜することで、それぞれの薬剤への耐性を持つ形質転換体の選抜が期待できる。プロピザミドは微小管の重合阻害剤であり、紡錘体微小管の形成を阻害することで、細胞周期を分裂期で停止させて BY-2 細胞の増殖を抑制する。この薬剤の添加培地上での選抜により、微小管制御因子などが単離できる可能性がある。また、DBN は細胞壁を構成するセルロースの合成阻害剤であるが、この薬剤の添加培地上での選抜では、セルロース合成因子やその伝達に関わる因子などが単離できる可能性がある。また、カフェインは細胞内の膜小胞の融合を阻害し、植物細胞では細胞分裂時の細胞版の形成を阻害することで細胞の増殖を抑制する。この薬剤の添加培地上での選抜では、小胞融合に関する因子が単離で

きる可能性がある。実際、FOX ライブラリーで形質転換した BY-2 細胞からは、これらの薬剤を含む培地上でも生育するカルスが得られている (Fig. 10)。現在、原因遺伝子同定のためにカルスの培養を続けている。今後、これらのカルスについてもゲノム DNA を抽出し、PCR を用いて原因遺伝子を増幅し、DNA シークエンスを行うことで原因遺伝子の特定を行う予定である。

タバコ BY-2 細胞を使った FOX ハンティングの応用としては以下のようなことも考えられる。BY-2 細胞は細胞のサイズが大きく、細胞塊を形成する細胞数が少なくて単細胞状態に近いので、顕微鏡観察に向いていることから、細胞の形態の違いやタンパク質の局在が変化した形質転換体の単離にも FOX ハンティングを応用できる可能性がある。さらに、GFP を用いて微小管を可視化した BY-GT16 細胞や液胞膜を可視化した BY-GV7 細胞などの形質転換体も使用可能であるので、微小管や液胞の構造について形態異常のある形質転換体の単離にも利用できると考えられる。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、大変お世話になった以下の方々にこの場を借りて御礼を申し上げます。

はじめに、アグロバクテリウム FOX ライブラリーを分けていただき、実験を進める上で様々なアドバイスも下さった理化学研究所の市川尚斉博士に厚く御礼を申し上げます。

セミナーなどにおいて研究の進め方に関して様々なアドバイスをしていただきました帝京科学大学の近藤矩朗教授、ありがとうございました。基本的な実験の指導や日頃の様々な相談などいつも親身になってお世話してくださった植物全能性制御システム解析学の米田新氏、本当にありがとうございました。実験においてだけでなく研究室での日常生活においてもお世話になり、研究室を活気付けてくれた植物全能性制御システム解析学分野の田中洋子氏、五百城幹英氏、朽名夏麿氏、小田祥久氏、金澤祐子氏、三井友梨氏、桧垣匠氏、理学系研究科の吉良恵利佳博士、姜熙炅氏、ありがとうございました。また、研究室の事務関係でお世話になりました光岡泉氏にも御礼申し上げます。

また、大学院に進むことを快く承知していただき、精神的にも経済的にも助けていただき温かく見守って下さいました家族全員に深く感謝します。そして、精神的な助けとなりましたすべての先輩方、友人の皆様にも感謝します。

最後になりましたが、お忙しいにも関わらず、基本的な実験の技術からご教授くださり、修士論文作成にあたって最後まで見捨てずに丁寧に指導してくださいました植物全能性制御システム解析学分野の佐野俊夫助手、そして指導教官である馳澤盛一郎教授には言葉では表現できないほどに心から感謝しています。本当にありがとうございました。

参考文献

Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815

Berleth T, Krogan NT, Scarpella E (2004) Auxin signals - turning genes on and turning cells around. *Curr Opin Plant Biol* 7:553-563

Chen JG, Ullah H, Young JC, Sussman MR, Jones AM (2001) ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev* 15:902-911

Dharmasiri N, Estelle M (2004) Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends Plant Sci* 9:302-308

Friml J (2003) Auxin transport - shaping the plant. *Curr Opin Plant Biol* 6:7-12

Geelen DN, Inzé DG (2001) A bright future for the bright yellow-2 cell culture. *Plant Physiol* 127:1375-1379

Grant JJ, Chini A, Basu D, Loake GJ (2003) Targeted activation tagging of ADR1, a NBS-LRR gene, conveys resistance to virulent pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* 16:669-680

Ichikawa T, Nakazawa M, Kawashima M, Iizumi H, Seki M, Fujita M, Shinozaki K, Matsui M (2004) FOX Hunting System: A next generation technology for an activation tagging. *Plant Cell Physiol Suppl* 45:s38

Ishida S, Takahashi Y, Nagata T (1993) Isolation of cDNA of an auxin-regulated gene encoding a G protein beta subunit-like protein from tobacco BY-2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11152-11156

Kumagai F, Yoneda A, Tomida T, Sano T, Nagata T, Hasezawa S (2001) Fate of nascent microtubules organized at the M/G₁ interface, as visualized by synchronized tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-tubulin: time-sequence observations of the reorganization of cortical microtubules in living plant cells. *Plant Cell Physiol* 42:723-732

Kutsuna N, Hasezawa S (2002) Dynamic organization of vacuolar and microtubule structures during cell cycle progression in synchronized tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* 43:965-973

Laureys F, Dewitte W, Witters E, Van Montagu M, Inzé D, Van Onckelen H (1998) Zeatin is indispensable for the G₂-M transition in tobacco BY-2 cells. *FEBS Lett* 426:29-32

Linsmaier EM and Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 18:100-127

Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J* 8:457–463

Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa S (1992) Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. *Int Rev Cytol* 132:1–30

Napier RM, David KM, Perrot-Rechenmann C (2002) A short history of auxin-binding proteins. *Plant Mol Biol* 49:339-348

Redig P, Schmulling T, Van Onckelen H (1996) Analysis of cytokinin metabolism in ipt transgenic tobacco by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Plant Physiol* 112:141-148

Sano T, Kuraya Y, Amino S, Nagata T (1999) Phosphate as a limiting factor for the cell division of tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* 40:1-8

Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol* 54:118-130

Tani H, Chen X, Nurmberg P, Grant JJ, SantaMaria M, Chini A, Gilroy E, Birch PR, Loake GJ (2004) Activation tagging in plants: a tool for gene

discovery. *Funct Integr Genomics* 4:258-266

Vogler H, Kuhlemeier C (2003) Simple hormones but complex signalling. *Curr Opin Plant Biol* 6:51-56

Zazimalova E, Napier RM (2003) Points of regulation for auxin action. *Plant Cell Rep* 21:625-634

Zhao Y, Christensen SK, Fankhauser C, Cashman JR, Cohen JD, Weigel D, Chory J (2001) A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* 291:306-309

小柴恭一、森由紀子 (2004) オーキシンの生合成 秀潤社 細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ 20:30-38

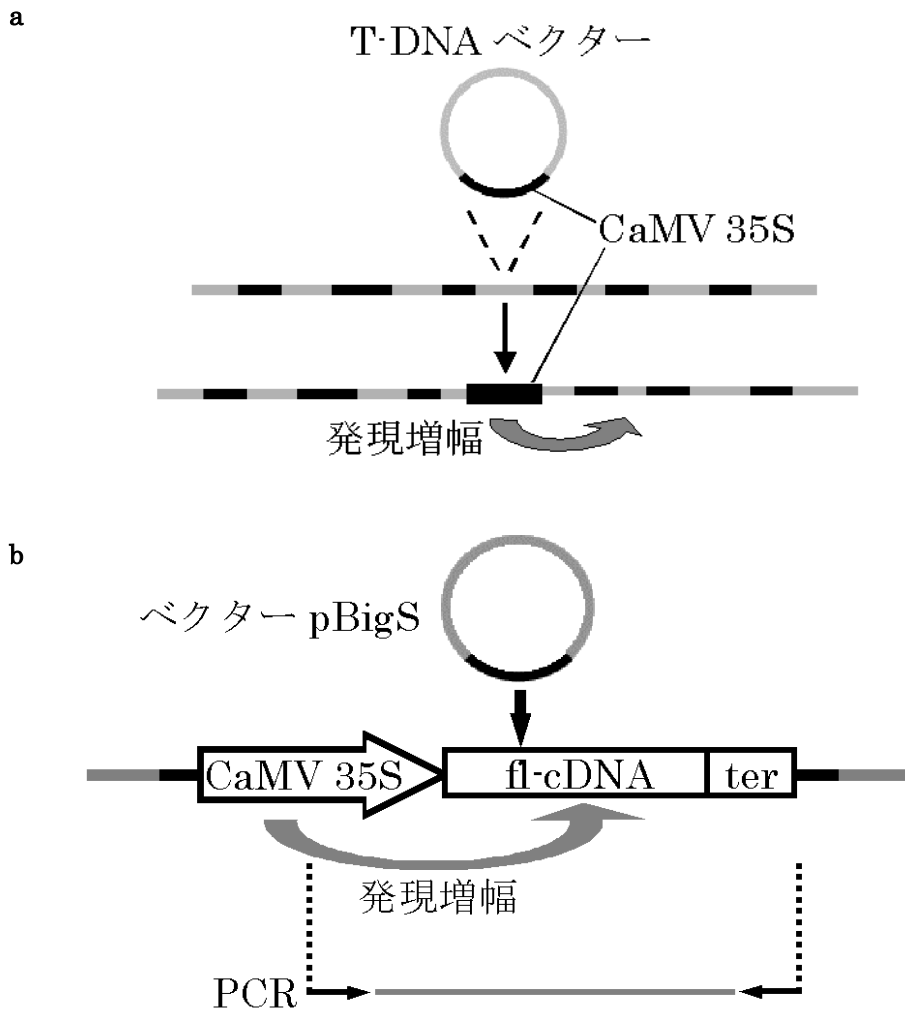


Figure 1 アクティベーションタギング法と FOXハンティングの原理
 (a) 従来のアクティベーションタギングの原理。(b) FOXハンティングの原理。

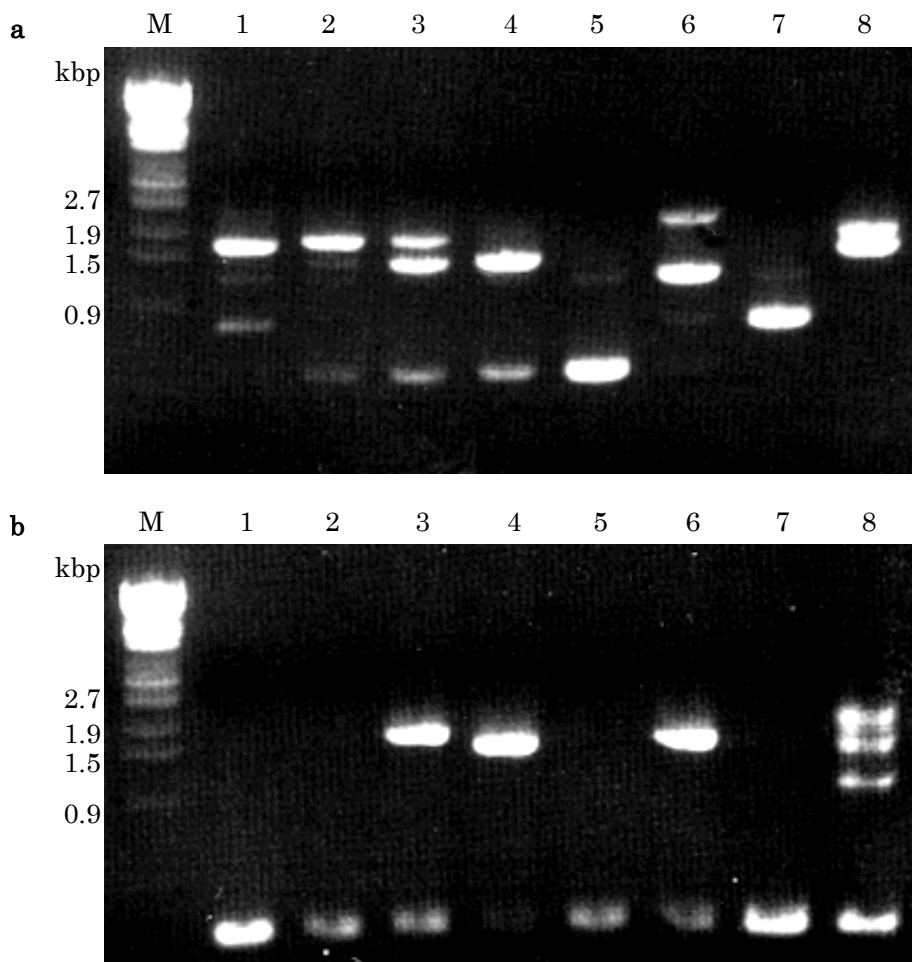


Figure 2 アグロバクテリウム FOXライブラリーの cDNA保持率の確認
 (a) アグロバクテリウム FOXライブラリーのグリセロールストック中の菌が保持しているcDNA。(b) グリセロールストックを液体 LB培地中で一晩振とう培養した培養液中の菌が保持している cDNA。それぞれ、LBプレート培地上に広げて一晩培養して得られたシングルコロニーを 1 mlの LB液体培地中で一晩培養し、そこからプラスミドを抽出して FOXライブラリーを構成するベクター pBigS上にデザインしたプライマー、GS17およびGS18を用いてPCRを行った。M: マーカー。レーン 1-8: アグロバクテリウム FOXライブラリー。写真の左の数字はマーカーのバンドのサイズを示す。

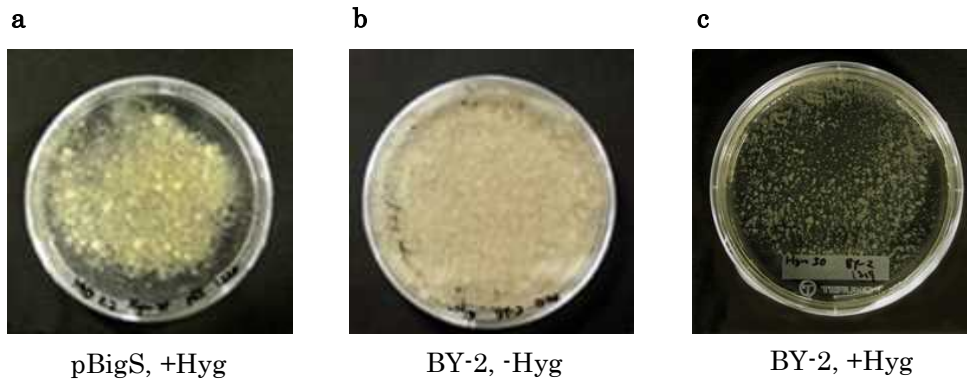


Figure 3 アグロバクテリウムによるタバコ BY-2細胞の形質転換の確認
(a) pBigSを持つアグロバクテリウムをタバコ BY-2細胞に感染させ、ハイグロマイシンを添加したプレート培地上に撒いてカルスを形成させた。(b) 非感染 BY-2細胞を抗生物質を含まないプレート培地上に撒き、ポジティブコントロールとした。(c) 非感染BY-2細胞を抗生物質を含むプレート培地上に撒き、ネガティブコントロールとした。(Hyg: ハイグロマイシン)

| | BA (mg/L) | | | | | |
|------|-----------|---|----|----|-----|-----|
| | 0 | 5 | 15 | 50 | 150 | 500 |
| 1000 | ◎ | ◎ | ◎ | ◎ | ◎ | ◎ |
| 300 | ◎ | ◎ | ◎ | ◎ | ◎ | ◎ |
| 100 | ◎ | ◎ | ○ | ○ | ◎ | ○ |
| 30 | × | × | × | × | × | × |
| 10 | × | × | × | × | × | × |
| 0 | × | × | × | × | × | × |

Figure 4 BY-2細胞のカルス形成におけるオーキシシンとサイトカイニンの関与
 オーキシシンとして NAA、およびサイトカイニンとして BA を様々な濃度で添加したプレート培地上に BY-2 細胞を撒き、カルス形成能を調べた。カルスの生育は4段階で評価し、比較した。×は全くカルスが生育していないもの、△はカルスが1つのプレート上に10個以内のもの、○は1つのプレート上に11個以上からプレートの半分を覆うまでのもの、◎はプレートの半分以上をカルスが覆っているものを示す。

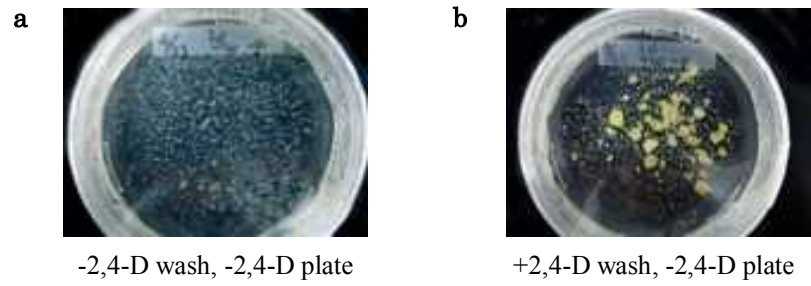
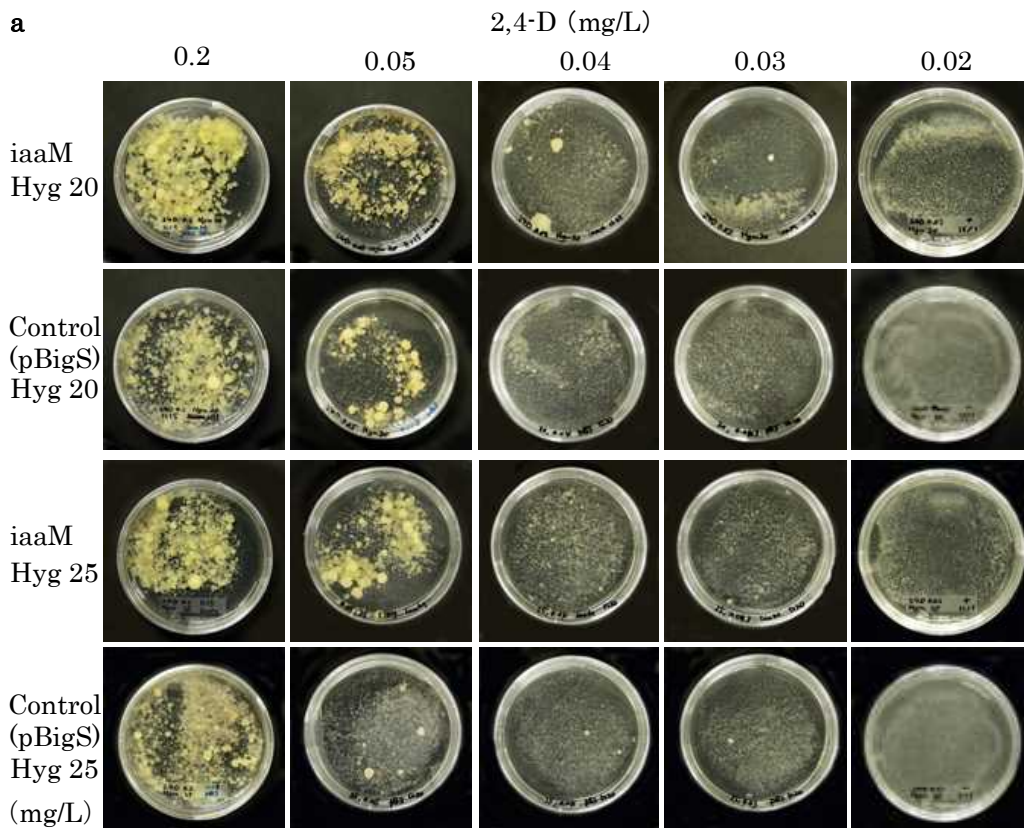


Figure 5 アグロバクテリウムの洗浄条件の検討

BY-2細胞をプレート培地に撒く直前のアグロバクテリウム洗浄用の培地中に含まれるオーキシシンが、BY-2細胞からのカルス形成に与える影響を検討した。(a) 2,4-Dを含まない培地でバクテリアを洗浄し、2,4-Dを含まない培地上にBY-2細胞を撒いた。(b) 2,4-Dを通常培養濃度である0.2 mg/L含んだ培地でバクテリアを洗浄し、2,4-Dを含まない培地上にBY-2細胞を撒いた。



b

2,4-D (mg/L)

| | 0.2 | 0.05 | 0.04 | 0.03 | 0.02 |
|---------------------------|-----|------|------|------|------|
| iaaM Hyg 20 | ◎ | ◎ | △ | ○ | × |
| pBigS Hyg 20 | ◎ | ○ | △ | △ | × |
| iaaM Hyg 25 | ◎ | ○ | ○ | △ | × |
| pBigS Hyg 25 (mg/L) | ◎ | △ | △ | △ | × |

Figure 6 オーキシシン要求性が低下した形質転換体の選抜条件の検討。
 オーキシシン要求性が低下した形質転換体を得るために、選抜培地中の2,4-D濃度の検討を行った。(a) ネガティブコントロールとしてベクターのみでcDNAを持たないpBigS、ポジティブコントロールとしてアグロバクテリウムのオーキシシン合成酵素であるiaaMが組み込まれたアグロバクテリウムをそれぞれ感染させたBY-2細胞を様々な2,4-D濃度の選抜培地上に撒き、カルスを形成させた。上の数字は2,4-D濃度を示す。(b) カルスの生育の状態を4段階で評価した。×は全くカルスが生育していないもの、△はカルスが1つのプレート上に10個以内のもの、○はカルスが1つのプレート上に11個以上からプレートの半分を覆うまでのもの、◎はカルスがプレートの半分以上を覆っているものを示す。(Hyg: ハイグロマイシン)

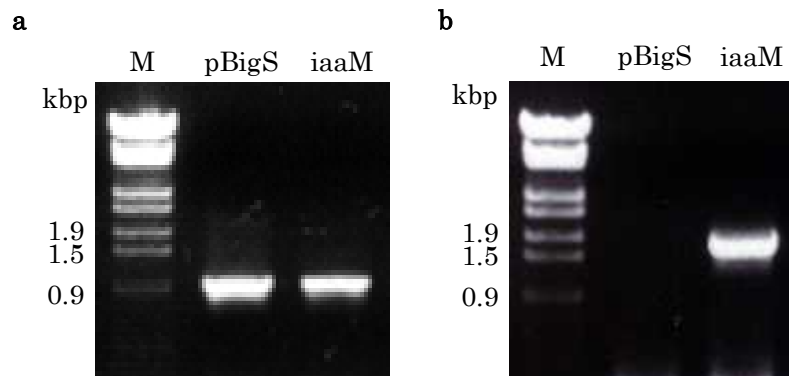


Figure 7 pBigSおよび iaaMで形質転換した BY-2細胞から形成されたカルスからのゲノム DNAの抽出と PCRによる導入遺伝子の確認
 (a) BY-2細胞のゲノム DNA中に存在することが確認されているリン酸誘導遺伝子 *phi-1* のプライマーを用いて PCRを行った。(b) FOXライブラリーを構成するベクター pBigS 上にデザインしたプライマーを用いて、*iaaM*遺伝子の PCRによる増幅を行った。
 M: マーカー。

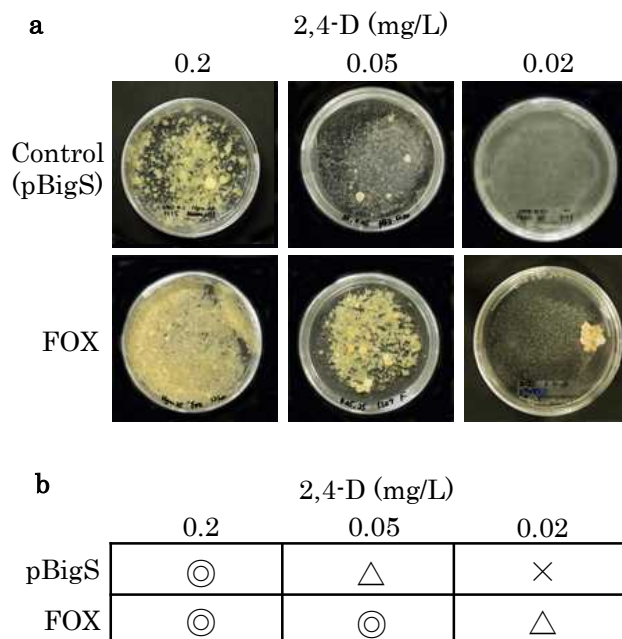


Figure 8 FOXハンティングを用いたオーキシン要求性が低下した形質転換体のスクリーニング

(a) FOXライブラリーで形質転換したBY-2細胞とベクター pBigSで形質転換したBY-2細胞をそれぞれオーキシン濃度 0.2 mg/L、0.05 mg/L、0.02 mg/Lの選抜培地上に撒いた。(b) カルスの生育の状態を4段階で評価した。×は全くカルスが生育していないもの、△はカルスが1つのプレート上に10個以内のもの、○はカルスが1つのプレート上に11個以上からプレートの半分を覆うまでのもの、◎はカルスがプレートの半分以上を覆っているものを示す。

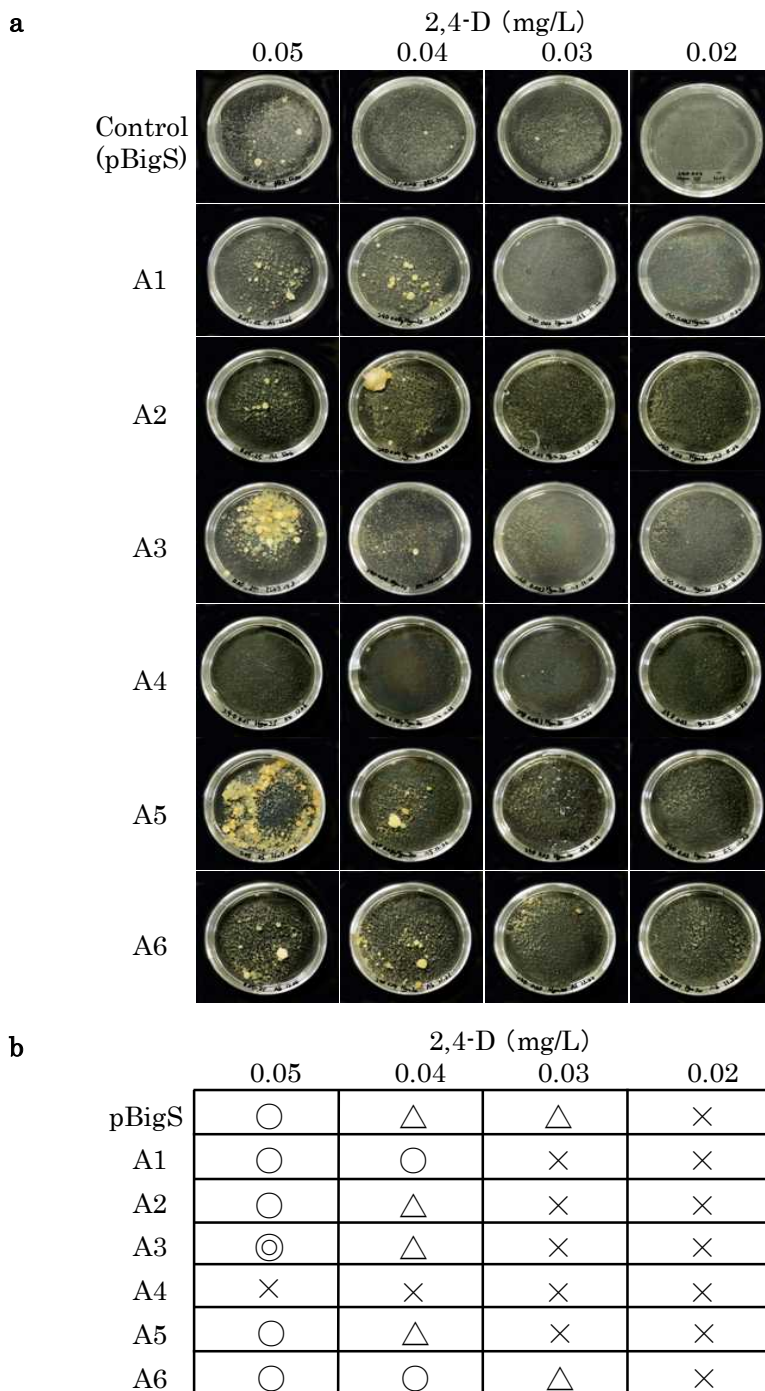


Figure 9 オーキシン要求性が低下した遺伝子の BY-2の生育への影響。
 (a) シロイヌナズナで単離されたオーキシン要求性が低下した遺伝子 A1、A2、A3、A4、A5、A6の BY-2細胞のカルス形成への影響を調べるため、それぞれの遺伝子で BY-2細胞を形質転換し、様々な 2,4-D濃度の選抜培地上に撒いた。(b) カルスの生育の状態を4段階で評価した。×は全くカルスが生育していないもの、△はカルスが1つのプレート上に10個以内のもの、○はカルスが1つのプレート上に11個以上からプレートの半分を覆うまでのもの、◎はカルスがプレートの半分以上を覆っているものを示す。

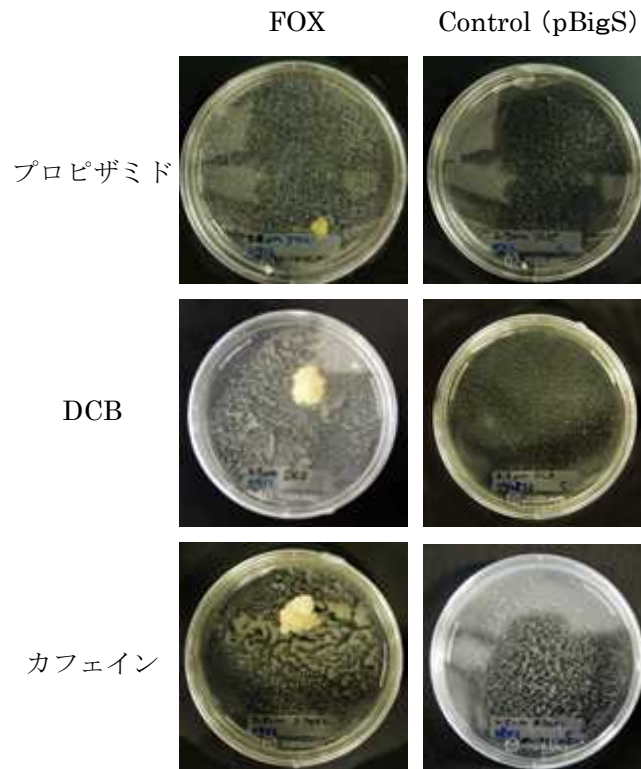


Figure 10 様々な選抜条件でのスクリーニング。
 BY-2細胞の増殖を阻害することが知られている薬剤として、プロピザミド、ジクロロベンズニトリル (DBN)、カフェインをそれぞれ添加した選抜培地上に FOXライブラリーで形質転換した BY-2細胞を撒き、カルスが形成されるか否かを調べた。いずれの場合にも、空ベクターである pBigSで形質転換した BY-2細胞からはカルスが形成されない培地中の薬剤の最低濃度を検討し、プロピザミド 2.7 μM 、DBN 2.7 μM 、カフェイン 2.5 mMを含む選抜培地上でスクリーニングを行った。