

マイクロインジェクション法によるトマトカルス多細胞へのタバコモザイクウイルスの接種とその増殖・移行

豊田秀吉・松田克礼・平井篤造

近畿大学農学部

(〒577 東大阪市小若江3-4-1)

(1986年1月6日 受付)

(1986年1月25日 受理)

トマトカルスから分離した4細胞以下の細胞からなる小集塊にマイクロインジェクション法を用いてタバコモザイクウイルス (TMV) を注入し、多細胞系における TMV の増殖とその細胞間移行について検討した。カルス小集塊に TMV をインジェクトする場合、集塊構成細胞の最端の細胞にのみ TMV を注入するが、いずれの集塊においても TMV 濃度が $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の接種液を10秒間注入したときに、接種48時間後で集塊構成細胞のすべてがもっとも効率よく染色された。この接種条件下で、集塊構成細胞のうち TMV をインジェクトした細胞とその隣接細胞がそれぞれ染色される割合を経時的に調べたところ、両者において TMV は同調的に増殖していることが明らかとなった。このようなことから、カルスの多細胞系に TMV を注入した場合、TMV はすみやかに隣接細胞に移行し、それぞれの細胞で同調的に増殖する様式が考えられた。

1. 緒言

外来の遺伝子を直接細胞内へ導入する技術、すなわちマイクロインジェクション技術は、おもに動物細胞の系を中心に急速に発展してきたものであるが^{1,2)}、植物の分野においては細胞壁を酵素的に分解したプロトプラストが使用され、インジェクションの技術や実験装置あるいはインジェクション後の培養法などが改良され、現在では多くの研究者によってこの方法が利用されるようになってきている³⁻⁶⁾。

一方、植物のカルス細胞へのマイクロインジェクション法の適用は、最初 Nims ら^{7,8)}によってなされたが、彼らは単一の細胞にタバコモザイクウイルス (TMV) を注入し、同一細胞における形態的变化を連続的に観察したものであった。しかしながら、一般的には堅固な細胞壁をもつカルス細胞などへのマイクロインジェクションは比較的困難であると考えられており、その後の報告はほとんどみうけられなかった。そこで筆者らは、friable なカルス組織を用いれば簡単に単細胞が得られることを利用し⁹⁾、マイクロインジェクション法を用いて多くのカルス単細胞に効率よく TMV を注入できること、およびその細胞内において TMV が良好に増殖することなどをさきの報告¹⁰⁾で示した。本論文ではさらに、トマトカルスより分離した細胞小集塊に TMV を接種し、

多細胞系での TMV の増殖や細胞間移行などについて検討し、それらについて若干の結果を得たので報告する。

2. 材料および方法

TMV の普通系統に対して罹病性を示すトマト (*Lycopersicon esculentum* Mill) 品種・福寿2号の発芽種子から前報⁹⁾に従って friable なカルスを誘導した。それを Murashige-Skoog (MS)¹¹⁾ の液体培地 ($0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 2,4-D の Na 塩と $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$ カイネチン添加, pH 5.6 に調製) で5~7日間振とう培養 (110往復振とう/分, 26°C , 3,000~4,000lux の全日長) し、対数増殖期のカルス組織を得た。そのようなカルスをスチール製のメッシュ (孔径 $250 \mu\text{m}$) で濾別し、単細胞および数個の細胞から構成される細胞集塊 (CA) を分離した。このような CA は、たとえば2細胞から構成されるものを CA_2 、4細胞のものを CA_4 というように表記することとした。

上記で分離した CA に TMV を接種し、さらにその後の培養を継続するため、筆者らの考案した "Plate-Culture System"¹⁰⁾を用いた。すなわち、ペトリ皿内に、まず2%寒天を含む MS 培地でリング状の周縁ベッドを作製し、その中央には CA をけん濁した MS 培地 (0.8%寒天) を厚さが 3 mm 以下になるようにプレートした。中央プレートおよび周縁ベッドの上には MS の液体

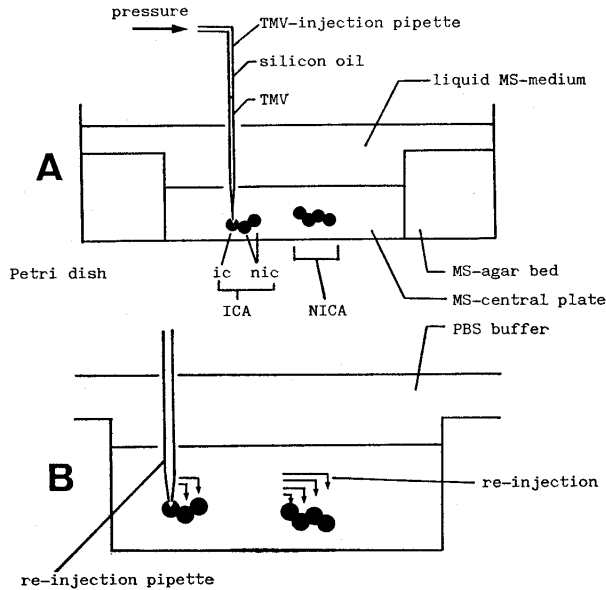


Fig. 1. Methods for microinjection of tobacco mosaic virus (TMV) into cell-aggregates of tomato callus and re-injection of fluorescent antibody for staining.

A) Cell-aggregates prepared from friable tomato callus were pre-cultured for 2 days before the injection, by using "Plate-Culture system," where the aggregates were embedded into Murashige-Skoog (MS) central plate which was surrounded with MS-agar bed and covered with liquid MS-medium. A cell (ic) positioned at the outside of the aggregate was injected with TMV by means of Olympus Injectoscope IMT-YF. Other cells (nic) of the same aggregate were not injected. ICA and NICA represent injected and non-injected aggregates, respectively. B) For staining cell-aggregates with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated antibody, the plate was covered with PBS buffer containing FITC-antibody after acetone fixation and PBS washing. All constituent cells of both ICA and NICA were pierced by a glass pipette (re-injection pipette with larger tip-diameter) containing antibody solution.

培地を重層し、この状態で2日間予備培養してつぎのインジェクション実験に供した。このようにして調製したCAにTMVを接種する場合、先端口径が $0.1\sim 0.3\mu\text{m}$ のガラス針内にあらかじめ無菌濾過したTMV接種液(50または $100\mu\text{g/ml}$ のTMVを 0.01M リン酸緩衝液、 $\text{pH}5.8$ に溶解)を入れ、常に集塊構成細胞の最端に位置する細胞にのみTMVをインジェクトした。また、接種液を細胞質内へ注入する時間は5または10秒とした。この場合、インジェクションに用いたCAをICAとし、ICAの構成細胞のうちで直接TMVをインジェクトした細胞をic、インジェクトしていない隣接の細胞をnicとした(Fig. 1-A)。その他のインジェクション法については先の報告¹⁰⁾のとおりである。

ICAにおけるTMVの増殖は、接種0、24および48時間後に蛍光抗体染色法によって検出した。アセトン固定、PBS(0.85% NaClを含む 0.01M リン酸緩衝液、 $\text{pH}7.0$)洗浄などの方法は前回の報告¹⁰⁾と同様である

が、FITCを結合させた抗TMV抗体液の処理法については以下のように行った。すなわち、PBS洗浄後、抗体液を中央プレートおよび周縁ベッド上に重層し、先端口径が $1.5\sim 2.0\mu\text{m}$ のガラス針(re-injection pipette)にも同抗体液を入れて、ICAだけでなくNICA(インジェクションに供していないCA)のすべての構成細胞に注入した(Fig. 1-B)。この操作は、細胞内への抗体液の直接注入と"ブリッキング法"による細胞外抗体液の導入の両方を兼ねたもので、抗体液の染色効率だけでなく、その後のPBS洗浄の効果も高めるために行った。蛍光抗体液を細胞内に注入したあとは、 36°C の湿室で6時間インキュベートし、PBSで十分洗浄したのちオリンパス蛍光顕微鏡(B-excitation, B-absorptionおよび0-515 barrierの各フィルター使用)を使用して蛍光抗体染色された細胞の観察を行った。

3. 結 果

トマトカルスから分離したCAにどのような条件で

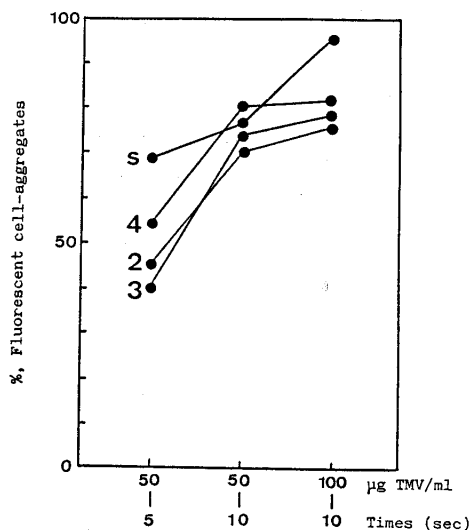


Fig. 2. Effects of TMV-concentrations in an inoculum solution and injection times on efficient multiplication of TMV in cell-aggregates of tomato callus.

S and the numbers in the figure represent single cells and the numbers of constituent cells of the aggregates injected with TMV, respectively. The rates of fluorescent cell-aggregates, where all constituent cells were stained with FITC-antibody, were estimated 48 hr after the injection.

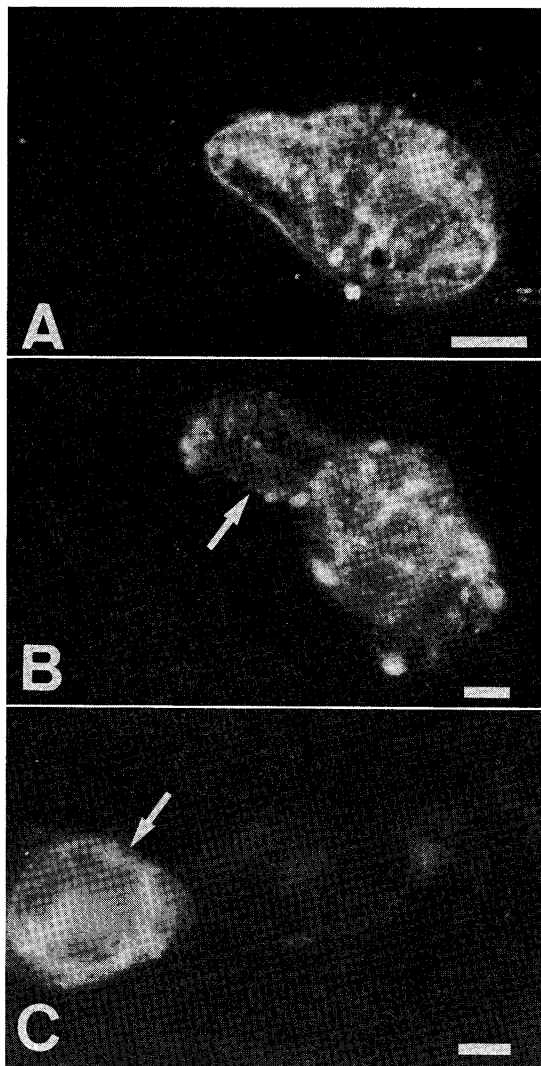


Fig. 3. TMV-injected single cell (A) and 3 cells-aggregates (B, C) of tomato callus stained with FITC-antibody, 48 hr after the injection. Arrows in the figures show the TMV-injected cells in the aggregates. Bars represent 10 µm.

TMV を接種すれば、TMV の増殖にもっとも効率がよいかを検討するため、まず接種液の TMV 濃度とその注入時間について調べた。接種後の培養時間は48時間とし、CA₄ 以下の集塊について蛍光抗体染色される ICA の頻度を調べた。筆者らの使用した“Plate-Culture System”では、ペトリ皿の底面に刻入した格子線との位置関係によってそれぞれの細胞を特定できるが、今回抗 TMV 抗体によって特異的に染色されたのは ICA のみで NICA ではまったく蛍光化は認められなかった。Fig. 2 には ICA のうちで、その構成細胞のすべてが蛍光抗体染色されたものの割合を示してある。いずれの ICA においても、蛍光抗体染色された ICA の割合は、100 µg TMV/ml の TMV 濃度の接種液を10秒間注入した場合にもっとも高く、その値は単細胞に TMV を接種した場合の割合とほぼ同程度の結果を示した。Fig. 3 の A と B には、それぞれ単細胞および CA₃ に TMV を接種し、接種48時間後に蛍光抗体染色したものの蛍光顕微鏡写真を示す。また、Fig. 3-C には ICA₃ のうち ic のみが蛍光抗体染色されたものを示す。

次に、上記の接種条件(接種液の TMV 濃度を 100 µg/

ml, 10 秒間注入)で CA に TMV を注入した場合に蛍光抗体染色される ICA の割合を経時的に調べた。Fig. 4-A には、構成細胞のすべてが染色された ICA の割合を示してある。TMV をインジェクトした直後に固定・染色したもの(接種後0時間とする)では、単細胞や細胞集塊の区別なくどちらの細胞においても蛍光抗体染色されるものは観察されなかった。しかしながら、接種 24 時間後では、TMV をインジェクトした単細胞の約半数において蛍光化が認められ、さらに接種 48 時間後では

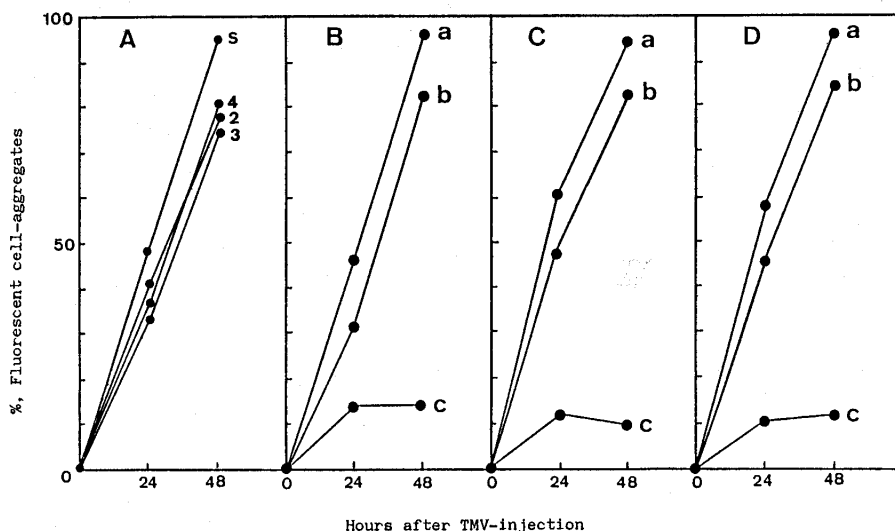


Fig. 4. Changes in the rates of fluorescent cell-aggregates of tomato callus injected with TMV. A) Fluorescent appearance in single and 2, 3 and 4 cells-aggregates. The rates of cell-aggregates, which all constituent cells showed fluorescence, were estimated. B-D) The rates of fluorescent cell-aggregates consisting of 2 (B), 3 (C) and 4 (D) cells. The rates were separately estimated; a) total rates of ICA showing fluorescence in ic, b) ICA showing fluorescence in ic+nic and c) ICA showing fluorescence only in ic.

ほとんどすべての単細胞が染色された。また、ICA₄ 以下の細胞集塊についても単細胞の場合とほぼ同様の増加傾向を示し、接種48時間後では75%以上のICAにおいて構成細胞のすべてに蛍光化が観察された。次のFig. 4のB~Dでは、それぞれICA₂~ICA₄の細胞集塊において、それらの構成細胞がどのような割合で染色されていたかを以下に述べる項目別に示した。すなわち、(a) nic染色の有無にかかわらず、icが染色された全ICAの割合、(b) icだけでなくnicのいずれかの細胞に蛍光化の認められたICAの割合、および(c) icのみに蛍光化の認められたICAの割合(a=b+cとなる)をそれぞれ経時的に示した。まず(a)の割合はicすなわちTMVをインジェクトした細胞が蛍光化していたかどうかに限定したもので、いずれの細胞集塊の場合も、単細胞にTMVをインジェクトした時の結果とまったく同様の結果を示した。(b)に関しては、nicのいずれか1つにでも蛍光化が認められれば、この項に加えられている。しかしながら、Fig. 4-Aと比較すれば明らかのように、nicの一部の細胞にしか蛍光化の認められないICAは、ICA₂~ICA₄のいずれの集塊においても約5%程度であった。(b)の割合は(a)項の値よりも若干低い値を示したが、その増加パターンについては(a)項の場合と非常に類似した傾向が認められた。一方、(c)については接種24時間後と48時間後で

ほとんどその割合に変化は認められず、全体の約10%の集塊がこのようなICAであった。

4. 考 察

本研究で使用した抗TMV抗体(immunoglobulin G画分)は、Otsuki, Takebeの方法¹²⁾に従って調製したもので、トマトカルスから得たアセトンパウダーに対して非特異的に吸着する画分は除外してある¹³⁾。この抗体液を用いて蛍光抗体染色処理を施す場合、ICAだけでなくNICAについても抗体液を処理し、染色の特異性をチェックした。また、蛍光染色性はTMVを接種した細胞あるいは集塊を一定期間培養してはじめて陽性になることから、それらの細胞に認められる蛍光は、増殖したTMV(のタンパク質)と抗TMV抗体が特異的に反応した結果であると言える。

さきの報告¹⁰⁾では、TMVをインジェクトした単細胞での蛍光抗体染色率(接種48時間後)は70~80%であったが、今回は95%以上の単細胞に蛍光化を認めることができた。このことは、インジェクション前に2日間予備培養し、生存率の安定した細胞をインジェクションに用いたことによると思われる。筆者らのインジェクション法では、活発な原形質流動を示す細胞だけをインジェクションの標的細胞とし、インジェクション後もその原形質流動の保持されている細胞を有効接種細胞としている。今回のカルスのように対数増殖期にある細胞をイン

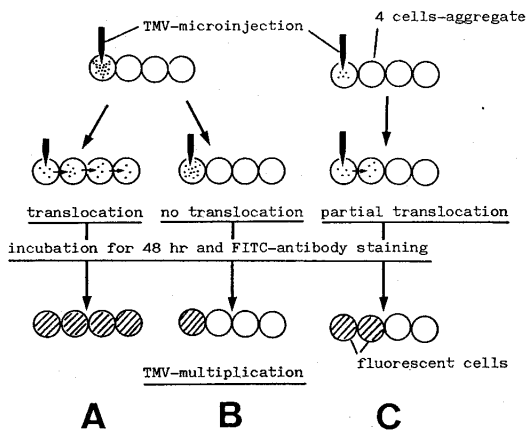


Fig. 5. Possible modes for multiplication and translocation of TMV injected into cell-aggregates of tomato callus.

A) TMV injected into only one cell of the aggregate might be rapidly translocated to non-injected, neighboring cells and simultaneously multiplied in these cells. B) Translocation of TMV from injected to non-injected cells or multiplication of TMV translocated to non-injected cells might be inhibited. This may be useful for selection of TMV-resistant mutants in tomato callus. C) When concentrations of TMV injected into cells are lowered, TMV might be partially translocated to non-injected cells of the aggregates.

ジェクションに使用した場合、ほとんど100%の単細胞あるいは細胞集塊において有効にインジェクトすることが可能であった。以上のことから、マイクロインジェクションに用いるカルス細胞には、上述のような細胞がもっとも適していると考えられた。

本研究では、トマトカルスの多細胞系を使用し、マイクロインジェクション法によって細胞内へ注入したTMVがどのように増殖した隣接細胞へ移行するのかを検討したものである。今回の実験で集塊構成細胞の1細胞にだけTMVを注入したのは、それ以外の細胞でTMVの増殖が観察された場合、TMVが細胞間移行した明確な証拠になると考えられたからである。今回の実験結果からは、インジェクトしたTMVの細胞間移行は明白であり、集塊構成細胞において、icとnicを区別しそれぞれが蛍光染色される割合を経時的に調べた結果では、両者に非常に類似した増加パターンが認められた。このことはicにおける蛍光化とnicにおける蛍光がほぼ同調的に進行したことを示すもので、筆者らはこのような結果をもとに、Fig. 5に示したようなウイルス

移行に関する仮説を考えた。ただし、この仮説はあくまでも多細胞系の培養細胞にTMVをインジェクトした場合のもので、実際の植物がウイルスの感染を受けた際に同様の機構が存在するかどうかを言及するものではない。筆者らの仮説では、カルス集塊の1つの細胞にTMVをインジェクトした場合、インジェクトされたTMVはすみやかに隣接する細胞へ移行し、それらの細胞ではほぼ同調的に増殖する。さらに、TMVの移行できる細胞数についてもICA₄以下の集塊には差はなく、TMVはインジェクトした細胞から他端の細胞まで移行できるものと考えられる。ただ、細胞内へ注入するウイルス量を低くするような条件（接種液のTMV濃度を低くするか、注入時間を短くする）では、他端の細胞まで染色される細胞集塊は減少するので、ウイルスの移行可能な細胞数は、注入したウイルス濃度にも関係する可能性がある。

いずれのカルス集塊においても、TMVの増殖がicにしか認められず、隣接する細胞では蛍光化が観察されない集塊が約10%程度存在した。このようなカルスにおいては、隣接細胞へウイルスが移行しなかったのか、あるいは移行してもその細胞で増殖しえなかったのか今回の実験では明らかにすることはできなかった。ただ、ウイルス抵抗性変異の観点からは非常に興味のある問題で、現在さらに検討を加えている。

文 献

- 1) 長田嘉穂, 大石道夫, 1983. 蛋白質 核酸 酵素, 28: 1569-1581.
- 2) Graessmann, M., A. Graessmann, 1983. Meth. Enzymol., 101: 482-493.
- 3) Griesbach, R.J., 1983. Plant Mol. Biol. Rept., 1: 32-37.
- 4) Steinbiss, H.-H., P. Stable, 1983. Protoplasma, 116: 223-227.
- 5) Morikawa, H., Y. Yamada, 1985. Plant Cell Physiol., 26: 229-236.
- 6) Lawrence, W.A., D.R. Davies, 1985. Plant Cell Rept., 4: 33-35.
- 7) Nims, R.C., R.S. Halliwell, D.W. Rosberg, 1967. Protoplasma, 64: 305-314.
- 8) Nims, R.C., R.S. Halliwell, D.W. Rosberg, 1967. Cytologia, 32: 224-235.
- 9) Toyoda, H., N. Tanaka, T. Hirai, 1984. Ann. Phytopath. Soc. Jpn., 50: 53-62.
- 10) Toyoda, H., Y. Matsuda, T. Hirai, 1985. Ann. Phytopath. Soc. Jpn., 51: 32-38.
- 11) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- 12) Otsuki, Y., I. Takebe, 1969. Virology, 38: 497-499.

- 13) Toyoda, H., Y. Oishi, T. Hirai, 1983. Ann. Phytopath. Soc. Jpn., 49 : 488-494.
-

Summary

Multiplication and Translocation of Tobacco Mosaic Virus Microinjected into Cell-Aggregates of Tomato Callus

Hideyoshi TOYODA, Yoshinori MATSUDA and Tokuzo HIRAI

*Laboratory of Plant Pathology, Faculty, of Agriculture, Kinki University,
Kowakae 3-4-1, Higashiosaka 577, Japan*

Tobacco mosaic virus (TMV) was microinjected into cell-aggregates (2 to 4 cells-aggregates) prepared from friable tomato callus and multiplication and translocation of TMV in multi-cellular system were examined in the present study. Only a cell positioned at the outside of the aggregates was injected with TMV and other constituent cells of the same aggregates were not injected. Multiplication of TMV in the aggregates was detected by staining with fluorescent anti-TMV antibody. The rates of aggregates, where all constituent cells were stained with fluorescent antibody, were highest when an inoculum solution (concentrations of TMV, 100 $\mu\text{g/ml}$) was injected into cytoplasm for 10 sec. Multiplication of TMV simultaneously occurred in both TMV-injected and non-injected cells of the aggregates within 48 hr after the injection. These results suggest that TMV might be translocated to non-injected cells soon after the injection and simultaneously multiplied in both injected and non-injected cells.