

## 濾紙電気泳動法によるオパインの検出法

田中伸和\*

## 1. はじめに

*Agrobacterium rhizogenes* 感染によって誘発された毛状根は、有用二次代謝産物の生産や再生植物の特徴(矮化、開花期の変化など)を利用した育種といった実用性が期待されている<sup>1,2)</sup>。たとえば、A4株(15834株と同じ菌株であると報告されている<sup>3)</sup>)は、病原性が強いいため最もよく用いられている菌株で、アグロピンおよびマンノピンという非タンパク性アミノ酸誘導体(オパイン)を形質転換した細胞に生産させる<sup>3)</sup>。しかし、わが国で利用されてきた *A. rhizogenes* はもっぱら外国産の輸入菌株であり、植物防疫上の問題から国内産の *A. rhizogenes* の発見が期待されてきた。1985年に千葉県のメロン温室内で発見されたメロン毛根病菌<sup>4)</sup>は、その期待を満足する菌として最近利用されつつある。なお、本菌株は、新規オパイン、ミキモピン<sup>5)</sup>を形質転換細胞に生産させる。

さて、*A. rhizogenes* の感染により誘発された毛状根が、本当に Ri プラスミドの T-DNA 領域の導入によって形質転換された植物細胞由来であるかの判定には、1) オパイン産生の確認、2) T-DNA の検出という二つの方法が用いられる。とくに、1) の方法は 2) に比較して簡単なため、形質転換の確認方法として有用である。しかし、いざオパイン検出のために濾紙電気泳動を行うとなると、装置の準備、緩衝液の選択、オパインの抽出、オパイン標品の調製等、いささかの面倒さを感じさせる。とくに、1,000 V 以上の高電圧をかける電気泳動法が紹介されている<sup>6)</sup> ため、特別な電気泳動槽やパワー・サプライが必要とされると思われるがちである。そこで、本稿では筆者が行っているアグロピン、マンノピン、ミキモピン検出のための比較的簡単な濾紙電気泳動

法を紹介する。

## 2. 濾紙電気泳動の実際

## 2.1 濾紙電気泳動槽とパワー・サプライ

高圧濾紙電気泳動槽があれば理想的であるが、一般的に用いられる濾紙電気泳動槽(たとえば、東洋科学の C-II など)で十分である。パワー・サプライは 1,000 V 程度の出力のものでよい。

## 2.2 電気泳動用濾紙

Whatman 3 MMChr (40 cm×40 cm) が東洋科学の C-II 泳動槽の緊張枠にちょうどよい。サンプルの数に合わせて、適当な幅に切る。東洋濾紙の No. 514 A (40 cm×40 cm) でもよい。

## 2.3 泳動用緩衝液

第1表参照。とくに、ミキモピンは pH 2 以下の強酸性緩衝液で電気泳動すると、一部はラクタム化し<sup>7)</sup> 泳動距離が異なってくるため、スポットが二つ検出される。速く移動するのがラクタム化したミキモピン、遅く移動するのがミキモピンである。筆者がいくつかの緩衝液を検討した結果、炭酸アンモニウム緩衝液(pH 9.8)を用いれば、ミキモピンがラクタム化せず、単一のスポットで検出でき、泳動時間も短い。

## 2.4 サンプルのアプライ法

数 10 mg の毛状根があれば、オパイン検出が十分可能である。新鮮な毛状根切片(たとえば、30 mg)を 1.5 ml エッペンドルフ遠心管内で、等量の蒸溜水(30  $\mu$ l)を加えて、ガラス棒で十分に摩砕する。10,000 rpm で5分間遠心し、5~10  $\mu$ l の上清をドライヤーで乾かしながらアプライする。このアプライ法は結構時間を要するから、短時間でアプライしたい場合は、ガラス板に乗せた 5 mm 程度の濾紙ディスク(パンチなどで切り出すとよい)に 10  $\mu$ l の摩砕液を吸わせ 1~2 分自然風乾し、後述の緩衝液で湿らせ緊張枠に張った濾紙のアプライ部位に乗せる。オパインの有無だけが知りたい方には次の方法をお勧めする。すなわち、毛状根を 5 mm 程度切り取り、濾紙のアプライ位置に乗せ、直径約 5 mm のガラス棒で押し潰すことによりアプライする。この方法を用

\* Nobukazu TANAKA: Detection of Opines by Paper Electrophoresis

ダイセル化学工業株式会社総合研究所生物化学研究所  
(〒671-12 姫路市網干区新在家 1239)  
Biochemical Laboratory, Research Center, Daicel  
Chemical Industries, Ltd., 1239 Sinzaike, Abosiku,  
Himeji 671-12, Japan.

第1表 電気泳動用緩衝液

アグロピン・マンノピン用  
 ぎ酸：酢酸：水=30-60-910  
 ククモピン・ミキモピン用  
 炭酸アンモニウム溶液 (5g/l, pH 9.8 (アンモニア水で調整))

第2表 アグロピン・マンノピン用呈色液

アルカリ-硝酸銀試薬  
 試薬1：1 ml の飽和硝酸銀水溶液を 200 ml のアセトンで希釈し、5~10 ml の水を加えて沈殿を完全に溶解。  
 試薬2：20 g の水酸化ナトリウムを少量の水に溶解後、1 l のメタノールで一気に希釈。  
 試薬1、試薬2をスプレーし、ドライヤーで風乾。定着液に浸漬後水洗。

第3表 ククモピン・ミキモピン用呈色液

Pauly 試薬  
 試薬1：1 g ブロムアニリンを 10 ml 塩酸に溶解後、水で 100 ml まで希釈。  
 試薬2：5% 亜硝酸ナトリウム水溶液  
 試薬3：10% 炭酸ナトリウム水溶液  
 5 ml の試薬1と 5 ml の試薬2を1分間混合し、50 ml のアセトンを加えてさらに1分間混合。5分静置後、上層をスプレーし、風乾。試薬2をスプレーし、発色後アセトン洗浄。

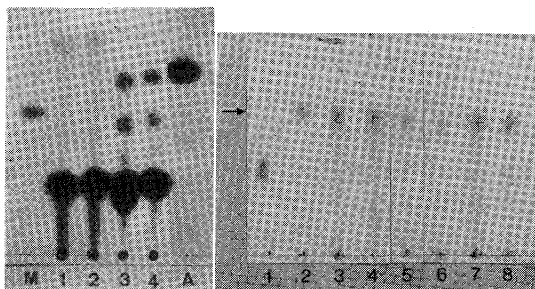
いれば、10 個以上のサンプルを3分以内でアプライでき、オバイン検出も十分可能である。

## 2.5 泳動槽へのセット

濾紙を泳動槽にセットするわけだが、その前に濾紙を緩衝液に浸せきし、通電可能にしておく必要がある。サンプルのアプライ位置を中心に片側ずつ、バットに入れた少量の緩衝液に浸す。サンプルのアプライ位置を中心に両側 5mm くらいまで緩衝液を吸わせたとこで止める。後は、自然に両側から緩衝液がアプライ部位の中心まで移動して行くから、アプライしたサンプルは移動したり、拡散したりしない。一連の手順のなかで一番失敗しやすいが、泳動結果を美しくしたいなら、この操作をあらかじめ十分に練習しておくことよい。次に、濾紙を泳動槽の緊張枠に張る。このとき、濾紙が破れ易いので注意する。

## 2.6 泳動条件

アグロピン、マンノピンの場合は、500 V で2時間、ミキモピンの場合は、500 V で30分間泳動する。ただし、第1表に示した緩衝液を用いると、アグロピン、マンノピンは+→-へ移動するから+側へ、ミキモピンは-→+へ移動するから-側へセットすること。なお、マ



第1図 オバインの濾紙電気泳動による解析例  
 (左)M：マンノピン，A：アグロピン，1，2：アジュガ培養根，3，4：15834 株で誘導したアジュガ毛状根，(右)1：ブロムフェノールブルー，2：ミキモピン，3~8：1724 株で誘導した毛状根，(3~5：カモミール，6：アジュガ，7：赤ビート，8：アサガオ，ただし，4：濾紙ディスク法，5~8：ガラス棒で押し潰した直接アプライ法)

ーカー色素としては、アグロピン、マンノピンの場合は 0.1% メチレングリーンを、ミキモピンの場合は 0.1% ブロムフェノールブルーをそれぞれ 5~10  $\mu$ l アプライするとよい。

## 2.7 呈色反応

泳動後の濾紙はドライヤーで風乾し、第2表あるいは第3表の呈色液をスプレーしてオバインのスポットを検出する。アルカリ-硝酸銀染色 (アグロピン、マンノピン) の場合は、スプレー後すぐ茶~黒色のスポットが出現するが、全体が黒っぽくなるので、X線フィルム定着液 (コダック社 AL4 等) に浸漬後水洗すると、スポットがきれいに出る。Pauly 試薬 (ククモピン、ミキモピン) では、スプレー後すぐピンク~赤色のスポットが出現するが、アセトンで洗浄し風乾すると、さらにきれいに仕上がる。なお、泳動結果を第1図 (左：アグロピン、マンノピン、右：ミキモピン) に示す。

## 3. オバイン標品と合成

### 3.1 オバインの標品

電気泳動の際、オバイン検出のための標品は必ず同時にアプライしておく必要がある。マンノピンは、すでにシグマ社から発売されているが、アグロピン、ミキモピンの標品は試薬として発売されていない。そこで、手軽な標品として、すでに形質転換していることが確認されている毛状根の抽出液をアプライするとよい。また、合成も可能であるから、次に紹介する。

### 3.2 アグロピンの合成

マンノピン (1g) をジメチルスルフォキシド (5ml) に溶解し 100°C で30分間反応させる。これを水で希釈

後、陽イオン交換樹脂で精製するが、単に希釈したものでも標品として使用できる。

### 3.3 ミキモピンの合成

ヒスチジン (1g) と  $\alpha$ -ケトグルタル酸 (1.25g) を 5ml の 2M NaOH 液に溶解し 80°C で 4 時間反応させればミキモピンとククモピンが生成する。これらを分離抽出することは困難であるが、pH 2 以上の緩衝液を用いて電気泳動すれば単一スポットで検出されるから問題はない。

### 4. おわりに

最近では、遺伝子操作によって作成されたオバイン以外の形質転換マーカー (カナマイシンフォスフトランスフェラーゼ活性、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ活性、 $\beta$ -グルクロニダーゼ活性など) が盛んに用いられるようになってきたが、有用物質生産のために誘導された毛状根の形質転換のマーカーは、やはりオバインが最も検出しやすいであろう。ご自分で誘導された毛状根のオバイン検出に本文がお役に立てば何よ

りである。

(1989年12月27日受理)

### 文 献

- 1) 鎌田 博, 大川博志, 下村講一郎, 1987. 発酵と工業, **45**: 865-872.
- 2) 真野佳博, 1989. 植物組織培養, **6**: 1-9.
- 3) White, F.F., V.P. Sinker, 1987. Molecular Analysis of Root Induction by *Agrobacterium rhizogenes*. In "Plant DNA Infection Agents" (ed. by Hohn, T., J. Schell), p. 149-177, Springer-Verlag, Wien, New York.
- 4) 塩見敏樹, 白川 隆, 竹内昭士郎, 大泉利勝, 植松清次, 1987. 日植病報, **53**: 454-459.
- 5) Isogai, A., N. Fukuchi, M. Hayashi, H. Kamada, H. Harada, A. Suzuki, 1988. Agric. Biol. Chem., **52**: 3235-3237.
- 6) Petit, A., C. David, G. A. Dahl, J. G. Ellis, P. Guyon, F. Casse-Delbart, J. Tempé, 1983. Mol. Gen. Genet., **190**: 204-214.