

植物培養細胞を利用した病害抵抗反応の解析

増田 税*

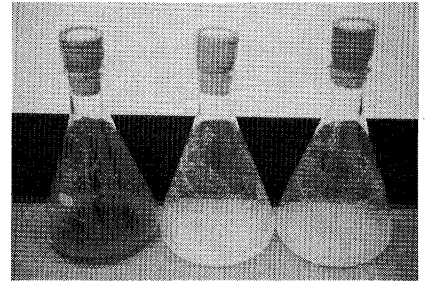
1. はじめに

植物が外界の様々な刺激(ストレス)に対してどのように反応するのか, 分子レベルで解明しようとする試みは我々にとって非常に興味あるテーマの一つである。近年における遺伝子操作およびタンパク質化学に関する実験技術の急速な発展によって, 遺伝子のクローニングは比較的容易なものになった。とくに, PCR 技術の導入によって, ターゲットの遺伝子を得るまでの期間が飛躍的に短縮された。これらのテクノロジーを背景に, ストレスによって植物に誘導されるタンパクとその遺伝子の解析は次々に新しい知見を積み重ね, 例えば heat shock protein や pathogenesis-related (PR) protein などのタンパクは, それらの機能の詳細についても判明しつつある¹⁻³⁾。そして最近では, ある特殊な刺激で誘導されるストレスタンパクがどのような分子シグナルの伝達結果であるのかという問題に研究者の関心が集まりつつあり, 動物細胞での先行した研究をまねて, GTP 結合タンパクや protein kinase などに関する研究が増加している⁴⁾。一方, 刺激に対する反応の最終産物を解析したり, シグナル伝達物質を直接捕らえようとする試みに関しては, 植物体のままで細胞内あるいは細胞間で起きている分子の伝達を解明することはきわめて困難であるため, extracellular 分子を容易に解析できる suspension culture やプロトプラスト系などを使用したモデルシステムが検討されている^{5,6)}。筆者らは今回, イネの suspension culture を使用してイネが病原菌(細菌)あるいはウイルスに感染した時にどのような反応をするのか理解するため, 'エリシター' で処理した後に, 培地中に放出されるタンパクを解析した。その結果, このよう

な単純化されたシステムで植物の病害抵抗反応を研究することが有効であると結論できたのでここにその一連の実験を紹介することにする。

2. イネのサスペンションカルチャーおよびエリシター処理

イネ細胞のサスペンションは Tompson ら⁷⁾の方法によりアミノ酸-ホルモン液体培地(AA-H)中, 28°C, 暗黒下で振盪培養された。植物の防衛反応を誘発するエリシターとして植物病原菌などの代わりにキトサンとサリチル酸を使用した。培養3日目のイネ細胞を回収し, 培地で洗った後, キトサン(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)またはサリチル酸(100 μM)で処理し2日間培養後, 細胞の形態的变化や分泌タンパクなどについて解析した。イネ細胞は, キトサン処理すると数時間で過敏反応を引き起こして褐変化する(第1図)。過敏反応は植物の重要な防御反応の一つと考えられている。また, アニリンブルー染色や電子顕微鏡観察によって, カロースの細胞壁沈着, 細胞壁の肥厚, 細胞膜の崩壊そして液胞の融合などが観察された。一方, タバコなどでPRタンパクを誘導することが知られているサリチル酸で処理した場合には, 過敏反応は観察されなかった。しかし細胞壁は無処理のものに比較して肥厚し, カロースの沈着も認められた。こ



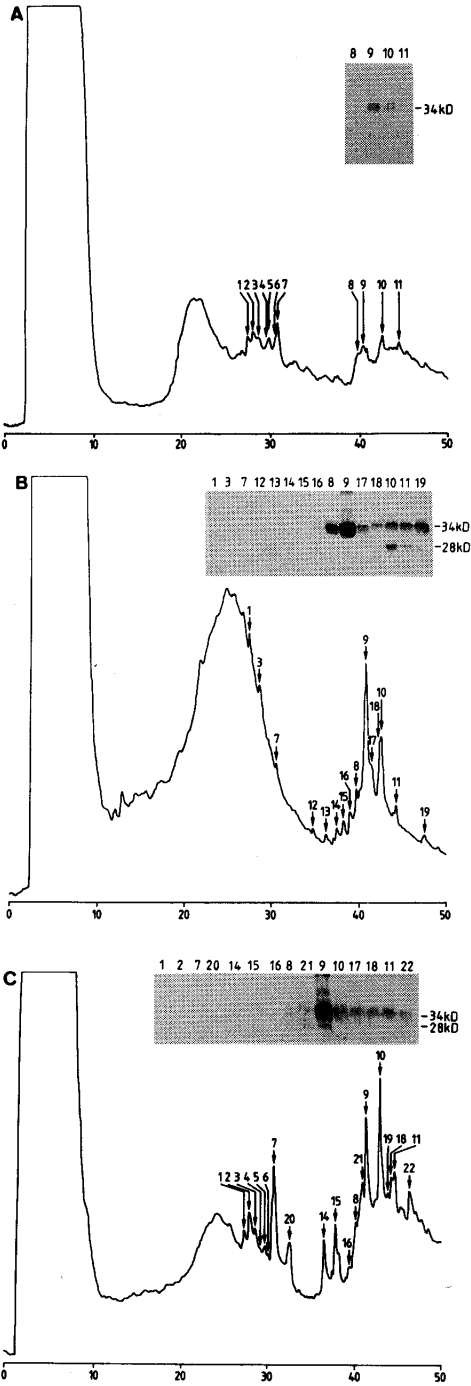
第1図 エリシター処理後のイネサスペンション細胞の反応

キトサン(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)で処理した細胞(左)は, 未処理(右)およびサリチル酸(100 μM)で処理した細胞(中央)と対照的に, 数時間で褐変(過敏反応死)する。

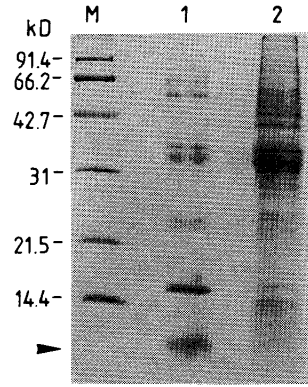
* Chikara MASUTA: Analytical Methods of Plant Response against Pathogens Using Suspension-Cultured Cells.

日本たばこ産業(株)生命科学研究所(〒227 横浜市緑区梅ヶ丘6-2)

Life Science Research Laboratory, Japan Tobacco Inc., 6-2 Umegaoka, Midori-ku, Yokohama 227



第2図 エリシター処理後、イネサスペンジョンカルチャー培地中に分泌されるタンパクの逆相 HPLC による解析 (A) 健全イネ培養細胞, (B) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ キトサン処理した細胞, (C) 100 μM サリチル酸処理した細胞. それぞれのタンパクピーク (矢印) は, タバコのキチナーゼ (PR タンパクの一つ) に対する抗体でイミュノプロット解析を行っている (挿入写真). イミュノプロットのレーン番号はピーク番号に相当する.



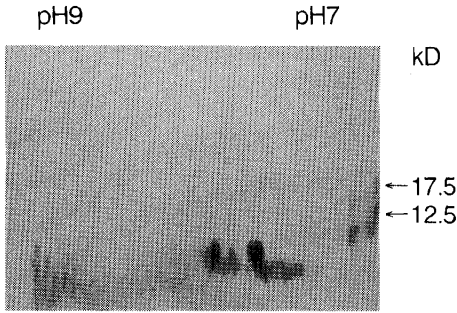
第3図 イネサスペンジョンカルチャー細胞外分泌タンパクの SDS-PAGE

全タンパクを硫酸で塩析した後, 17.5% ポリアクリルアミドゲルで分離した. レーン1: 未処理区 (15 μg タンパク), レーン2: キトサン処理区 (15 μg タンパク). 10 kD タンパク (矢印) はキトサン処理区で抑制されている.

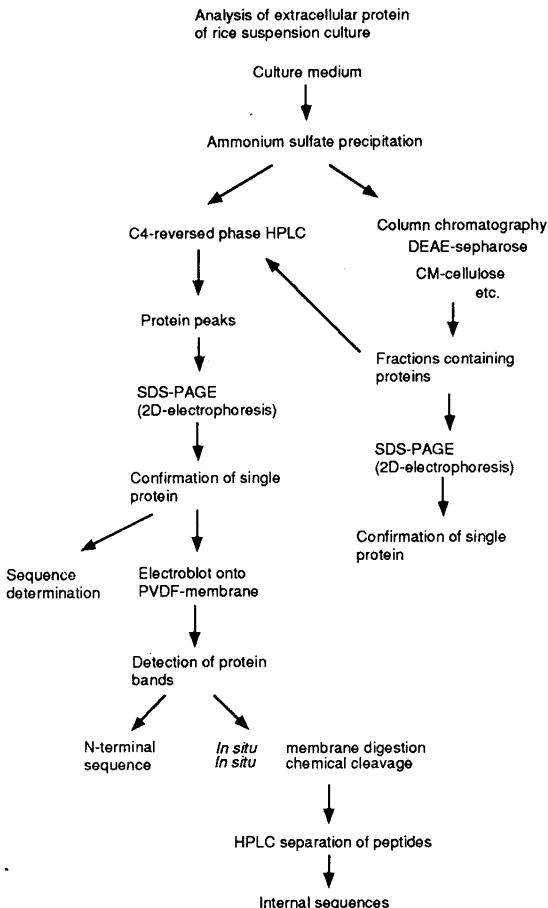
のようにサスペンジョン細胞のエリシター処理に対する生理, 形態的变化は, イネ植物体の病害抵抗反応の一部をよく反映しているものと考えられ, このサスペンジョンカルチャーを用いたシステムが病害抵抗性関連タンパクやシグナル伝達を分子レベルで研究することに役立つものと予想される.

3. 細胞外分泌タンパクの解析

エリシターで処理された培養細胞が分泌するタンパクについて, どのような質的そして量的変化が起きているか, HPLC を使用して比較的容易に調べることができる^{8,9)}. タンパクを濃縮せずに, 培養上清を直接, C4 逆相 HPLC によって分離して得られたクロマトグラムを第2図に示す. また硫酸沈澱によって得られた全タンパクを SDS-PAGE によって分離した例を比較のため第3図に示す. HPLC を使用すると, タンパク沈澱のステップが不要であるためサンプル中のタンパクのロスがない. しかも各タンパクのピークを回収して, 例えば SDS-PAGE やウエスタンブロット (図中の挿入写真) そしてアミノ酸のシーケンス決定と一連の実験が可能である. ただし HPLC で分画されたタンパクのピークには2種類以上のタンパクが含まれる場合があるので, SDS-PAGE やできれば2次元電気泳動などで, シーケンシングの前に1種類のタンパクであることを確認しておく必要がある. 筆者らの実験の中で, HPLC では1ピークとなり, SDS-PAGE では10 kD の1バンドとして検出されたタンパクであっても, 2次元電気泳動した結果では, 複数のアイソフォームである例があっ



第4図 HPLC分画タンパクの2次元電気泳動
イネ培養上清中のタンパクをC4逆相
HPLCで分画後、溶出時間32分で検出さ
れる10 kDタンパクを2次元電気泳動で
分離した。



第5図 イネサスペンションカルチャー細胞外分
泌タンパク解析のためのフローチャート

た(第4図)。タンパクのシーケンシングを目的として、我々が行った実験全体の流れ図を第5図に示す。

4. タンパクのPVDFメンブランへの転写 およびマイクロシーケンシング

タンパクのマイクロシーケンシングには、これまで様々な方法が開発されている。タンパクの質や量によっていずれの方法を選択するか検討するべきである。ここでは、取扱が比較的容易なPVDF (polyvinylidenedifluoride) メンブランに転写して行う方法¹⁰⁾について略記する。

(1) カラムクロマトグラフィーやHPLCで分取されたタンパクのピークは、溶媒を除去後にSDS-PAGEのサンプルバッファーに懸濁する

(2) SDS-PAGEによるタンパクの分離

(3) PVDFメンブランへのタンパクのエレクトロトランスファー

- 1) ゲルの大きさに切ったメンブランを最初にメタノールに約5分間浸せきした後、水で十分洗う
- 2) 湿ったメンブランは、0.1% SDSを含む50 mM ほう酸バッファー (pH 8.0) で平衡化されたゲルの上部にのせ、2枚ずつのワットマン3MMの紙でサンドイッチにする
- 3) エレクトロブロッカーのホルダーにセットした後、50 mM トリス+50 mM ほう酸バッファー中、電圧35 V/cmで約8時間の通電を行う
- 4) タンパクの転写が終了した後、メンブランをよく水洗する
- 5) メンブラン上の転写されたタンパクをアミドブラック液 (0.1% アミドブラック, 45% メタノール, 7% 酢酸) に約30秒間浸し、水洗後、自然乾燥する (ボンソーSなどで染色してもよい¹¹⁾)

(4) アミノ酸シーケンシング

N末端がブロックされていない場合は、メンブラン上のタンパクのバンドを切り出し、なるべく小さく刻んでからプロテインシーケンサー (ABIのモデル477Aなど) の反応チャンパー内に直接、アプライする。

N末端がブロックされている場合は、タンパクを酵素やシアノジェンプロマイドなどでペプチドに分解した後、それらのN末端からアミノ酸配列を決める。以下にトリプシン分解の例を示す。

- 1) 小さく刻んだメンブランをメタノールに溶かしたポリビニルピロリドン (0.2%) に浸せきし、15分間静置した後、等量の水を加えてさらに10分間静置する
- 2) メンブランを水洗した後、0.1 M トリスバッファー (pH 8.0) で洗う
- 3) メンブランを同じバッファー 100 μ l に浸し、1 μ l のトリプシン (1 mg/ml) を加え、37°Cで4時

間静置する

- 4) 上清を回収しメンブランを80% 蟻酸で洗った後、数回水洗する
- 5) 全ての液を混合し、HPLCでペプチドの分取を行う

(5) ペプチドの逆相 HPLC による分取

ペプチドは C4 か C18 逆相カラムで分取し、214 nm の UV 吸収で検出する。吸着タンパクは、例えば 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) 中でのアセトニトリル濃度 0% から 70% への 70 分間直線グラジエントで溶出する。諸条件については、使用する HPLC のメーカーのインストラクションに従って検討する。

5. おわりに

以上、培養細胞を用いた細胞外分泌タンパクの解析法の一例を述べてきた。今後、外界からのストレスに対する細胞の反応を分子レベルでとらえようとする試みは、植物の複雑な生理現象を理解するために多くの研究者の関心をひくものと思われる。実験の第1段階は、単純化したモデルシステムを各自が工夫することであり、本稿が、例えば‘植物細胞でのシグナル伝達’を解析しようとしている研究者にお役に立てれば幸いである。

(1990年12月14日受理)

文 献

- 1) Mauch, F., A. Staehelin, 1989. *The Plant Cell*, **1**: 447-457.
- 2) Ohshima, M., H. Itoh, M. Matsuoka, T. Murakami, Y. Ohashi, 1990. *The Plant Cell*, **2**: 95-106.
- 3) Harrington, H. M., D. M. Alm, 1988. *Plant Physiol.*, **88**: 618-625.
- 4) Dietrich, A., J. Mayer, K. Hahlbrock, 1990. *J. Biol. Chem.*, **265**: 6360-6368.
- 5) Köhle, H., W. Jeblick, F. Poten, W. Blaschek, H. Kauss, 1985. *Plant Physiol.*, **77**: 544-551.
- 6) Lesney, M. S., 1990. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **20**: 173-175.
- 7) Thompson, J. A., R. Abdullah, Cocking E. C., 1986. *Plant Sci.*, **47**: 123-134.
- 8) Van den Bulcke, M., G. Bauw, C. Castresana, M. Van Montagu, J. Vandekerckhove, 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 2673-2677.
- 9) Edelbaum, O., N. Ilan, G. Grafi, N. Sher, Y. Stram, D. Novick, N. Tal, I. Sela, M. Rubinstein, 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 588-592.
- 10) Bauw, G., M. Van den Blucke, J. Van Bamme, M. Puype, M. Van Montagu, J. Vandekerckhove, 1988. *J. Prot. Chem.*, **7**: 194-196.
- 11) Salvinovich, O., 1986. *Anal. Biochem.*, **156**: 341-347.