

研究ノート

ルシフェラーゼ遺伝子導入タバコにおける
発光の観察と写真撮影

鳥山欽哉*, 土屋 亨*

ホタルのルシフェラーゼ遺伝子をタバコに導入したところ、光るカルスと植物体が得られ、暗闇に十分目を馴らせばその発光が肉眼で観察できることに気がついた。さらに、インスタントフィルムを用いたカラー写真撮影法について紹介する。

1. はじめに

ホタルのルシフェラーゼ遺伝子を植物に導入し、基質としてルシフェリンを与えると植物が発光する。このようにして得られた光るタバコのカラー写真が1986年のScienceに掲載されている¹⁾。その写真はカラーフィルムに24時間露光して撮影されたものである。また、従来、この発光は肉眼では見えないとされており²⁾、その後同様なカラー写真が日本に紹介されたことはほとんどないであろう。

ところが、筆者らは暗闇に5分以上目を馴らせば、ルシフェラーゼによる発光が肉眼で観察できることに気がついた。また、簡便なカラー写真撮影法を検討したのでここに報告する。なお、撮影法はX線フィルムを用いたHowellら³⁾の方法を応用したものである。

2. 材料および方法

(1) ベクターの構築とタバコへの導入

ルシフェラーゼの構造遺伝子 (*luc*) はクローンテック社発売の pT3/T7-*luc* プラスミド (Cat. No. CL6170-1) から 1.9 bp の BamHI フラグメントとして切り出した。このフラグメントを、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーターを持つプラスミドに挿入して 35S-*luc* ベクターを構築した (Fig. 1)。このベクターを常法に従い、アグロバクテリウムを用いてタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana) に導入した。なお、共存培養とその後のカルス培養には、0.1 mg/l のナフトレン酢酸と 1 mg/l のペンシルアミノプリンを含

む Murashige & Skoog (MS)⁴⁾を用い、この培地で形成された不定芽をホルモンを含まない MS 培地に移植して植物体を再分化させた。

(2) ルシフェラーゼアッセイ

基質溶液としてルシフェリンナトリウム (シグマ L6682) を 10 mM になるように滅菌水に溶解して貯蔵液とした (4°C 保存)。使用時に 0.4 mM になるように水で希釈して用いた。

カルスに対しては、直径 1 cm 程度のカルスを 0.4 mM のルシフェリン水溶液 0.5 ml に浸し、30 分室温で放置した後に暗室で発光を観察した。

植物体に対しては、寒天培地中で発根している幼植物体を取り出してアッセイに供試した。はじめに根についた寒天を洗い流し、キムワイプで水分を吸い取った。次に、0.4 mM のルシフェリン水溶液 1 ml に根を浸して室内で 2 時間吸収させた後、発光を観察した。

カラー写真を撮影するためには、フジインスタントカラーフィルム FP-100C, ISO100 (富士写真フィルム) を用いた。

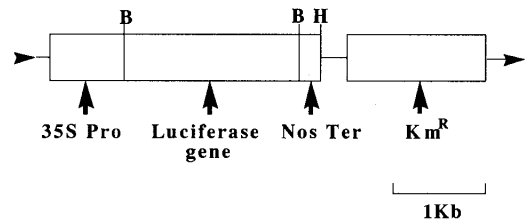


Fig. 1 Structure of T-DNA of newly constructed transformation vector (35S-*luc*) derived from pBIN19. Km^R: the kanamycin-resistance gene of pBIN19; 35S Pro: the 35S promoter from Cauliflower Mosaic Virus; Nos Ter: the polyadenylation signal from nopaline synthase gene; B: BamHI; H: HindIII. ▶: T-DNA border sequences.

*岩手大学農学部附属細胞育種実験施設
(〒020 盛岡市上田 3-18-8)

3. 結 果

(1) カルスの発光

ルシフェリンに浸したトランスジェニックカルスを、暗闇に5分間ほど目を馴らした後に観察すると、黄緑色に発光しているのが肉眼で確認できた。発光は一晩持続した。形質転換していないカルスは発光しなかった。独立に得られた23個のカルスに対してルシフェラーゼアッセイを行ったところ、20個のカルスで発光が得られ、その中の5個の発光が特に強かった。

カラー写真を撮影する条件を検討したところ、インスタントフィルムのフィルム面にサララップを敷き、その上にカルスをのせて10分間露光することによってカラー写真を撮影することができた⁴⁾。白黒ポラロイドフィルム667(ISO 3000)の場合は30秒の露光で撮影できた。カメラのレンズ($f=4.5$)を通した場合、4時間露光しても写らなかった。

(2) 植物体の発光

植物体の場合も暗闇に目を馴らしてから観察すると発光しているのが肉眼で観察できた。ルシフェリン水溶液に根を浸して数十分すると根が発光しているのが観察でき、2時間後に観察すると、茎や葉脈でも発光しているのが見えた。発光は一晩持続するが、基質を与えてから2~3時間後が最も強かった。

異なるカルスから再分化した5個体の植物についてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、特に2個体の発光が強かった。これらの植物体についてサザンブロット分析を行い、*luc* 遺伝子のコピー数を推定したところ、1ないし2コピーの遺伝子が挿入されたと考えられた。発光の強さとコピー数の間に相関は見られなかった。

写真を撮影するためには、フィルム面に植物体を密着させることが必要であった。そのため、植物体を平に押し広げてプラスチックのフィルムと板でサンドイッチにした(Fig. 2)。この時植物体がつぶれてしまわないよ

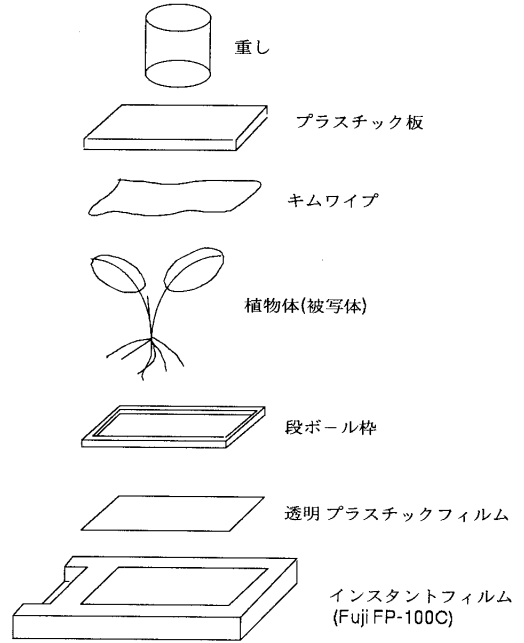


Fig. 2 Preparation of materials for taking a picture of the light emission from the transgenic tobacco bearing the firefly luciferase gene.

うに、インスタントフィルムカセットの窓の大きさにダンボール紙で四角い枠を作り、一方の面を薄い透明なプラスチックフィルムでふさいだ。その中に余分なルシフェリン水溶液を吸い取った植物体を入れ、葉を広げて背中側からキムワイブとプラスチック板で押し広げた。このようにプラスチックでサンドイッチにした植物体をインスタントフィルム面に押しあて、200~300gのおもしをのせてからダークバックに入れて15分から90分露光した。15分で根、茎、葉脈の発光が撮影できた。90分露光したところ、Fig. 3に示したように葉全体の発光が撮影できた。

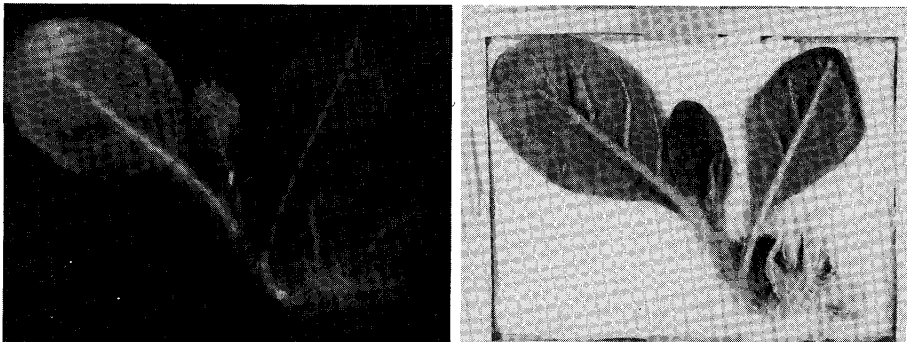


Fig. 3 Photographs of a transgenic tobacco plant in the dark (left) and in the light (right). In the dark, the plant was exposed to instant color film for 90 min.

今回用いた 35S プロモーターは根や茎の維管束で強く働くことが知られており⁵⁾、また、基質を根から吸収させたため、これらの器官で発光が強かったものと思われる。発光の色合いは根と地上部で異なり、根が黄色であるのに対して地上部の方がより緑色であった。

写真撮影後、植物体の根を洗ってから土に植えると正常に生育した。このことは、植物体を生かしたままでルシフェラーゼアッセイができることを示している。

4. 考 察

今回用いたプロモーターとルシフェラーゼ遺伝子の組み合わせは以前 Science に報告されたもの¹⁾と同じであり、特別な遺伝子を用いたわけではない。しかし、観察法にちょっとした工夫をすれば、肉眼による観察や写真撮影が簡単にできることがわかった。「まさか肉眼で見えるとは思わなかった」というのが実状である。暗闇に目が馴れるに従い、ぼんやりと淡黄緑色の光が浮かび上がる

さまは、植物細胞工学に対する興味と関心を大いに喚起するものである。

なお、本研究の一部は平成3年度文部省科学研究費 (No. 02304016) の助成を受けて行われたものである。(1992年5月11日受理)

文 献

- 1) Ow, D. W., K. V. Wood, M. DeLuca, J. R. deWet, D. R. Helinski, S. H. Howell, 1986. Science, **234**: 856-859.
- 2) Howell, S. H., D. W. Ow, M. Schneider, 1989. In "Plant Molecular Biology Manual" (eds. Gelvin, S. B., R. A. Schilperoort), p. B8/1-11, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 3) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., **15**: 473-497.
- 4) 鳥山欽哉, 1991. 岩手大学農学部附属細胞育種実験施設フォーラム, **2**: 43-45.
- 5) Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, M. W. Bevan, 1987. EMBO J., **6**: 3901-3907.

Summary

Observation and Photography of the Light Emission from Transgenic Tobacco Transformed with Luciferase Gene

Kinya TORIYAMA and Tohru TSUCHIYA

*Institute for Cell Biology and Genetics,
Faculty of Agriculture, Iwate University,
Ueda 3-18-8, Morioka 020, Japan*

Tobacco was transformed with the firefly luciferase gene. Once the naked eye became accustomed to the dark, light emission could be seen from the transgenic callus and the regenerated plants. A simple method for taking a picture of the light emission using instant film is described.