

N₂ レーザーマイクロビームによる植物細胞への直接遺伝子導入

尾崎武司・清水正興・脇塚 巧*・山口俊彦

大阪府立大学農学部

(〒593 堺市学園町1-1)

* 大阪府教育センター

(〒558 大阪市住吉区苅田4-13)

(1994年 7月 29日 受付)

(1994年 10月 22日 受理)

N₂ レーザーマイクロビーム(波長 337.1 nm, パルス幅 3 ns)を各パルスエネルギーでタバコ葉およびメロン培養細胞へ照射したところ 1.5~6 μJ/spot のエネルギーレベルで, 細胞を死滅させることなく, 細胞壁および細胞膜への 0.5 μm 前後の穿孔が可能であった。供与 DNA として pBI121(GUS, NPT II)を用い, 0.3 M の浸透圧でレーザー法によるハウセンカ (*Impatiens balsamina* L., *I. walleriana* Hook.) とシロバナヒガンバナ (*Lycoris albiflora* Koidzumi) 花粉への直接遺伝子導入を試みたところ, 3 μJ/spot のエネルギーレベルで照射した時に, 一過的な GUS 遺伝子の発現率は最高 24% に達した。また, タバコ葉へのキウウリモザイクウイルス(CMV)遺伝子(CMV-RNA)の導入実験では, 導入 24 時間後には表皮細胞とその周辺細胞で CMV の増殖が確かめられた。これらの結果より, N₂ レーザーマイクロビームは植物細胞への効率的な遺伝子導入に適していると考えられた。

1. 結 言

レーザーは生物学・医学・農学等の分野においても細胞の構造解析, 細胞内分子種の同定等の細胞診断, および細胞の一部破壊, 切断等の細胞加工面での利用が急速に拡がりつつある。これらの中で Tsukakosi ら¹⁾により開発された, 紫外レーザーのマイクロビームを用いた細胞内への遺伝子移入装置は, 新しい遺伝子の直接導入技術として注目されている。この装置(日立製作所より発売)は Nd-YAG(ネオジウム-イットリウム, アルミニウム, ガーネット)レーザーの 3 倍波(波長 355 nm, パルス幅 5 ns)を用いたもので, これを用いてオオムギ^{2,3)}, ペチュニアおよびタバコ培養細胞⁴⁻⁶⁾等への外来遺伝子の導入が試みられている。

一方, Kagawa ら⁷⁾および香川ら⁸⁾は窒素レーザーマイクロビーム(波長 337.1 nm, パルス幅 3 ns)の照射装置を開発し, タバコ葉細胞の核への照射実験を行った結果, 窒素レーザー光の波長(337.1 nm)はレーザー光照射により核内に生じた DNA の損傷を光回復させる領域にあることを見出した。その後, 本装置は大阪府高槻市

「せっしん異業種交流会・ソフトプラザ」で遺伝子導入にも使用できるように改良された(細胞レーザーメス MSL-1000)。Nd-YAG レーザーの 3 倍波の代わりに窒素レーザーを用いることの利点は, 装置がより安価でコンパクトである他に, レーザー波長がより短波長であることから, より小さい穿孔が可能であることが挙げられている⁸⁾。しかし, 本装置を用いた遺伝子や外来物質の導入例は無い。

筆者らは組換え DNA 技術を応用した育種法の確立を目的として, 各種植物細胞への遺伝子導入方法を比較検討しているが, 本論文では窒素レーザーマイクロビームによる植物細胞への外来物質ならびに遺伝子の直接導入について, その可能性を示す基礎的な結果が得られたので報告する。

2. 材料および方法

(1) レーザー照射装置

外来物質の導入に用いた細胞レーザーメス(MSL-1000, せっしん異業種交流会・ソフトプラザ製)は窒素レーザー(337.1 nm)の発振, 増幅部, レーザーを取り

入れ細胞に照射する顕微鏡部(倒立)およびモニター部から構成されている。レーザー部分の概略は香川ら⁷⁸⁾の報告したとおりで、ガス圧110 Torrの時の出力は14 kWでパルス幅3 nsとなっている。顕微鏡部の集光レンズにはZeiss, Ultraflurの10×または32×が採用されており、倍率を変えることによりスポットの大きさが変えられるようになっている。レーザー光の光路に減衰器としてガラス板(5 mm厚)を挿入してレーザー光強度(0.8~50 $\mu\text{J}/\text{spot}$)を調節して照射条件を検討した。なお、レーザーの照射用の容器には、底面に円形カバーガラス(直径6 mm, 厚さ0.12~0.17 mm)を張った特殊円形ガラス容器(内径6 mm, 高さ15 mm, 蓋付)を用いた。

(2) 供試植物

植物細胞への照射はタバコ(*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi nc)葉肉細胞、メロン(*Cucumis melo* L. cv. Earl's Favourite)の培養細胞と子葉、および各種植物花粉細胞に対して行った。メロン培養細胞は完熟種子の下胚軸をMS(3%蔗糖, 1 mg/l 2, 4-D, 2 mg/l NAA, 0.1 mg/l BAを含む)液体培地で培養した対数増殖期のものを用いた。

(3) 走査電顕による観察

タバコ葉およびメロン培養細胞を6%グルタルアルデヒドと1%四酸化オスミウムで固定、洗浄後、特殊ガラス容器に入れ各出力でレーザーを照射した後、常法により脱水し、臨界点乾燥、Pt-Pd蒸着後、走査電子顕微鏡(日立, S-800)で観察した。なお、前固定を施さずにレーザー照射を行った生細胞についても、常法により試料作成後走査電子顕微鏡で観察した。

(4) 外来物質の移入

外来物質としてFITC標識アルブミン(Sigma, 分子量67,000)とエバンスブルーを供試し、ホウセンカ(*Impatiens balsamina* L., *I. walleriana* Hook.)の花粉とメロン培養細胞への移入を試みた。FITC標識アルブミンの花粉細胞への取り込みに対する浸透圧の影響は次のとおり調べた。0.2~0.6 M マニトールまたは10%蔗糖と100 mg/l ほう酸を含む0.8%寒天をスライドガラス上に薄く敷き、その上に成熟花粉を散布した。ガラス製リング(6 mm ϕ)を寒天内に埋め込み、リング内に5 mg/ml FITC標識アルブミンを花粉が浸る程度に注入し、3 $\mu\text{J}/\text{spot}$ の出力で1花粉あたり2~5か所に照射した。照射後蛍光顕微鏡で蛍光を発する花粉数を計数した。

(5) 花粉細胞への遺伝子導入

供与DNAとしてpBI121(GUS, NPT II, Clontech, Palo Alto, Ca)を用い、ホウセンカ、シロバナヒガンバナ、ユリ(*Lilium longiflorum* Thunb.), ツバメスイ

セン(*Sprekelia formosissima* Herb.)およびインドハマユウ(*Crinum latifolium* L.)の花粉への直接導入を試みた。DNAは75 mM KCl, 25 mM CaCl₂, 100 mg/l ほう酸および10%蔗糖を添加した溶液に50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で溶解した。この溶液をレーザー照射用特殊容器に底が浸る程度入れ(約50 μl)、供試花粉を加えて十分に溶液に馴染ませた後、レーザーの出力を3 $\mu\text{J}/\text{spot}$ として照射した。遺伝子導入処理後24時間培養し、一過的なGUS遺伝子の発現を組織化学的に解析した。解析にはX-Gluc(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid)を用いJeffersonらの方法⁹⁾に準じて行った。

(6) CMV-RNAの導入

キユウリモザイクウイルス遺伝子(CMV-RNA)の導入実験にはタバコ葉肉細胞を供試した。CMV-RNAは純化ウイルスからフェノール法により抽出したものを供試し、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように照射溶液(75 mM KCl, 25 mM CaCl₂, 0.4 M マニトール)に溶解し、レーザー照射用特殊容器に分注した。5~6葉期のタバコ葉から取り出した約5 mm角の葉片を特殊容器中のCMV-RNA溶液に浸し十分に馴染ませた後、3~6 $\mu\text{J}/\text{spot}$ の出力で表皮細胞全面に連続照射した。照射処理後、24時間植物育成装置内(25°C, 1,500 lux, 12時間日長)に保った。なお、CMV-RNA無添加の溶液中で照射したものを対照とした。これらの葉片はそのままオートマテックプラントミクロトーム(日本医化, MT-2)を用いて30 μm 厚の切片を作成した。PBS(0.01 M りん酸緩衝生理食塩水, pH 7.2)で洗浄後、FITC標識CMV抗体で蛍光抗体染色を施した後、落射蛍光顕微鏡で観察した。

3. 結 果

(1) 植物細胞の穿孔

まず、レーザーの出力を検討するためにレーザー光の光路に0(50 $\mu\text{J}/\text{spot}$)~6枚(0.8 $\mu\text{J}/\text{spot}$)のガラス板を挿入して、カバーガラス上に真空蒸着装置(日立, HUS-5)を用いて蒸着したカーボン膜に対するレーザーの効果进行调查した。蒸着膜に照射されたレーザーのエネルギーは熱エネルギーとなり蒸着膜の剝離を引き起こすが、供試したレーザー出力の範囲内では、出力と蒸着膜の剝離との間に一定の相関関係が認められ(Fig. 1), Nd-YAGレーザーを用いた場合と同様な結果⁹⁾が得られた。レーザー照射前に固定した細胞の走査電顕による観察では、タバコ、メロン両細胞とも1.5 $\mu\text{J}/\text{spot}$ 以下のエネルギーレベルでは細胞膜・壁にはほとんど異常は認められなかった。また、12 $\mu\text{J}/\text{spot}$ 以上では細胞の破裂等の現象が認められた。集光レンズに10×を用いた場合、1.5

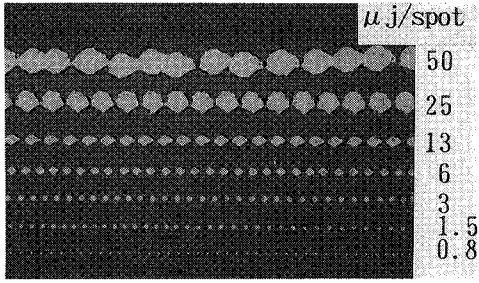


Fig. 1 A carbon film irradiated by single shots of the N_2 -laser microbeam, the power of which was 0.8 to 50 $\mu\text{J}/\text{spot}$. Carbon film was made by evaporating the carbon as a thin layer onto cover-glasses.

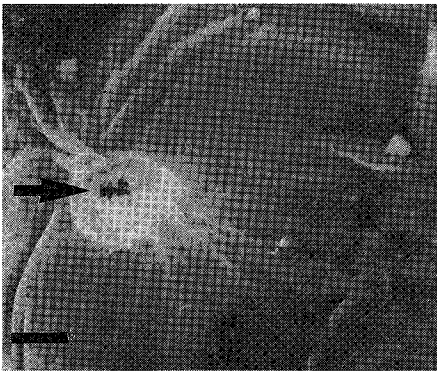


Fig. 2 Scanning electron micrograph of a cultured melon cell irradiated by a single shot of the N_2 -laser microbeam. Arrow indicates spot which formed after irradiation. Bar represents 500 nm.

~6 $\mu\text{J}/\text{spot}$ の範囲で細胞壁や細胞膜に微小穿孔が誘発され、1.5 $\mu\text{J}/\text{spot}$ のエネルギーレベルで約 0.5 $\mu\text{m}\phi$ の穿孔が可能であった (Fig. 2)。なお、未固定の生細胞の観察では 1.5~6 $\mu\text{J}/\text{spot}$ の範囲の照射区の細胞表面には、ほとんど照射跡は認められず、細胞膜の修復が起こっていることが推測された。また、タバコおよびメロンの未固定の細胞では、レーザー照射後 90% 以上の細胞で原形質流動が確認され細胞の生存が確かめられた。なお、未固定のシロバナヒガンバナ (*Lycoris albiflora* Koidzumi) の花粉へ 3 $\mu\text{J}/\text{spot}$ の出力で照射し、直ちに微分干渉顕微鏡で観察したところ、1 μm 前後の穿孔跡が認められた (Fig. 3)。これらの結果より、植物細胞への照射条件としては 1.5~6 $\mu\text{J}/\text{spot}$ の範囲が適当であると考えられた。

(2) 高分子たんぱく質と色素の移入

FITC 標識アルブミンのホウセンカ花粉細胞への取り込みに対する浸透圧の影響を調べたところ、10% 蔗糖

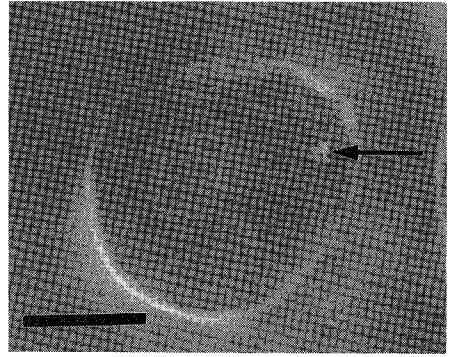


Fig. 3 Mature pollen of *Lycoris albiflora* irradiated by the N_2 -laser microbeam view with a differential interference contrast microscope. Note the N_2 -laser-induced spot (arrow) on the surface of the pollen. Bar represents 15 μ .

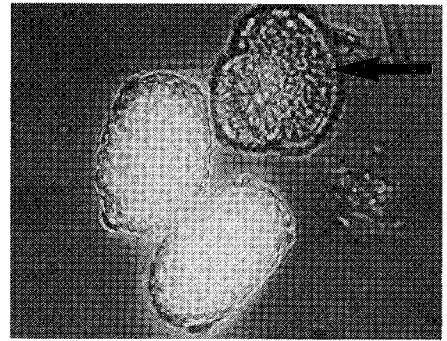


Fig. 4 Fluorescence micrograph of pollen of *Impatiens balsamina* incorporated with FITC-albumin using N_2 -laser microbeam. Non-irradiated pollen without fluorescence is shown by an arrow.

添加区 (浸透圧、約 0.29 M) での取り込み率が一番高く (Fig. 4)、66.3% に達した。また、マニトール添加区では 0.3 M 前後の濃度での取り込み率が高かった。なお、FITC 標識アルブミンを除いた 10% 蔗糖と 100 mg/l ほう酸を含む溶液中の花粉へ同様の条件で照射し、レーザー照射の花粉発芽に及ぼす影響を調べたところ、2,295 個のうち 86% の花粉が発芽し生存が確かめられた。未発芽花粉 316 個のうち破壊等の損傷を受けたものが 10% あったが、残りは外観正常であった。これらの結果より、3 $\mu\text{J}/\text{spot}$ の出力で細胞の活性を低下させることなく外来物質の取り込みが可能であること、ならびに取り込みには浸透圧が重要な要因となっていることが明らかになった。さらに、本条件下でのレーザー照射でメロン培養細胞へのエバンスブルーの取り込みが認められた (Fig. 5)。

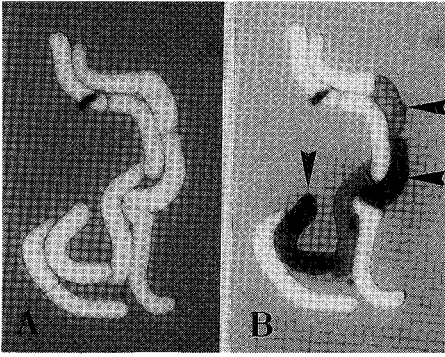


Fig. 5 The N_2 -laser-induced uptake of dye (Evance blue) by cultured melon cells. A; Before irradiation, B; Thirty seconds after irradiation. Arrowheads indicate the cells showing dye uptake.

(3) 花粉細胞への遺伝子の導入

遺伝子 (pBI121) の導入実験に先立ち、供試花粉の内在性 GUS 様活性の有無を調べたところ、強い活性を有するもの (ユリ, シロバナヒガンバナ), レーザー照射処理により活性が発現するもの (ツバメスイセン) および活性の認められないもの (ホウセンカ) に分けられた。このような内在性 GUS 様活性はメタノールを添加した X-Gluc¹⁰⁾ を用いることにより抑制された。これらの花粉のうち、ホウセンカとシロバナヒガンバナへの遺伝子導入を試みた。GUS 遺伝子の発現状況は Fig. 6 に示すとおりであり、発芽管の伸長に伴い GUS 活性は発芽管内でも認められた。なお、導入率は前者で 18.5% (供試花粉数, 2, 372), 後者で 24% (同, 706) であった。

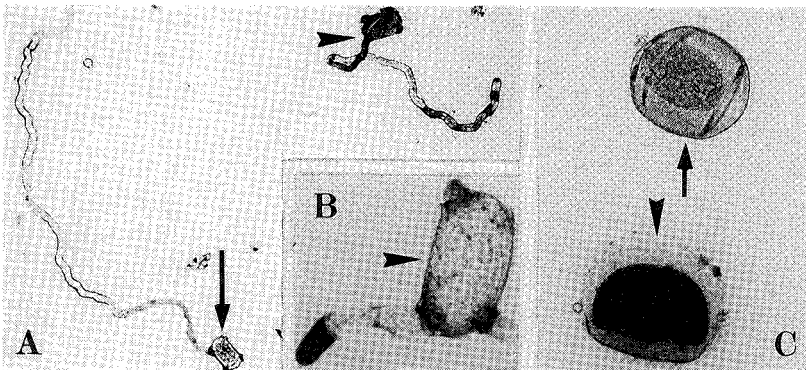


Fig. 6 Microphotographs showing GUS expression in the pollen of *Impatiens balsamina* and *Lycoris albiflora*. Mature pollen was cultured in a medium at 25°C for 24 hr after irradiation and incubated at 37°C for 10 hr in the X-Gluc solution. A, B: Gus expression in germinated pollen of *Impatiens balsamina*, Arrowheads; laser irradiated pollen expressing GUS activity, Arrow; non treated pollen. Pollen tube formation was apparently not affected by laser treatment. C: Laser irradiated (arrowhead) and no radiated (arrow) pollen of *Lycoris albiflora*.

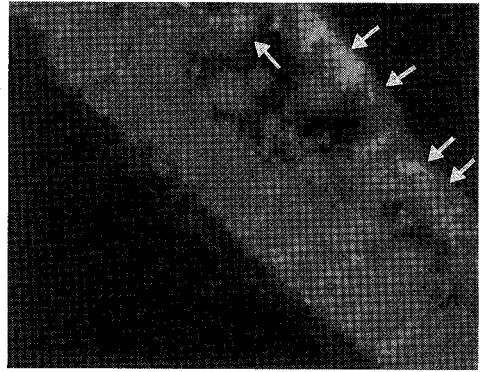


Fig. 7 Fluorescence micrograph of tobacco tissue which incorporated CMV-RNA using N_2 -laser microbeam. Areas containing virus antigens (arrows) show yellow green fluorescence. The tissue was stained with a fluorescein isothiocyanate-conjugated antibody then incubated for 24 hr after irradiation.

(4) 葉組織へのウイルス遺伝子の導入

タバコ葉組織を供試し、CMV-RNA の導入を試みた。導入処理 24 時間後の蛍光顕微鏡による観察結果は Fig. 7 に示すとおりであり、特異蛍光は主に表層第 2 層の細胞とその周辺細胞で認められ、CMV-RNA の導入とその増殖が確認された。

4. 考 察

紫外域に発振波長をもつレーザービームを細胞に照射すると、細胞は紫外光に強く爆らされる為致死作用を受けることが懸念される。しかし、細胞の致死作用スペクトルや、太陽光線による細胞核の DNA 損傷等の生物

作用は 320 nm より長波長側では起こらないことから、窒素レーザー(波長 337.1 nm)の 1 光子吸収によって DNA が直接励起されることはないと考えられる。香川ら⁸⁾は窒素レーザーマイクロビームを核にのみ照射した場合と細胞全体に照射した場合の効果を生細胞の生存比によって比較し、タバコ細胞の細胞壁を破壊するのに必要なマイクロビームのパルスエネルギーは約 10 μ J 程度であり、これだけのエネルギーを細胞全体に照射しても致死率は 1% 以下であるとしている。本研究では、メロン培養細胞や花粉細胞への外来物質導入の為に照射出力は 1.5~6 μ J/spot が最適であることが明らかになった。この条件下でのハウセンカ花粉への照射後の発芽率は 86% 以上で、レーザー照射により損傷を受けたと思われる花粉はわずか 1.3% であった。

Nd: YAG レーザーを用いた実験では、数十 μ J のショットによる膜損傷は 1 秒以内に修復すると言われている^{11,12)}。また、酵母や花粉の細胞壁は緩慢ではあるが修復可能であると報告されている¹²⁾。本実験でも、生細胞の走査電顕による観察から、1.5~6 μ J/spot の範囲内のエネルギー照射では細胞膜や壁にほとんど損傷を与えず修復することが確かめられた。これらのことから窒素レーザーは波長、パルス幅ともに生物への応用に適したものであると考えられた。

植物細胞への遺伝子導入には、従来いくつかの手法が用いられているが各手法には一長一短がある。たとえば化学的手法は多量の細胞処理が可能であるが、損傷が大きく、発現効率は通常 10^{-5} ~ 10^{-7} であり極めて低い。また、エレクトロポレーションやマイクロインジェクション等の物理的手法は、前者ではプロトプラストを用いる必要があり、後者では熟練と労力、時間を要し細胞の処理能力は低い。さらにパーティクルガン法によるトランジェントな形質転換効率は 10^{-3} ~ 10^{-2} であるが¹³⁾、目的とする細胞あるいは細胞内小器官のみを処理することはできない。レーザー法では特定の細胞あるいは核への処理が可能であり、動物細胞では核を狙った照射での遺伝子発現効率が 10% と言う高い値が得られている¹²⁾。

本研究での窒素レーザー光を用いた外来物質の移入試験では、ハウセンカ等の花粉での GUS 遺伝子の一過性発現率は 18.5~24% と、パーティクルガン法やエレクトロポレーション法に比べて非常に高かった。また、FITC 標識アルブミンの移入率は 66.3% と更に高率であった。このように、発現率が移入率より低かったのは、遺伝子の場合には細胞内に取り込まれても発現しないものがあつたためと考えられる。

遺伝子の発現効率はプラスミドに連結するプロモータ

の種類により異なることが知られている¹⁴⁻¹⁷⁾。Nishihara ら¹⁴⁾は花粉で発現する遺伝子のプロモーターには双子葉と単子葉間で発現制御に違いがあることを明らかにした。また、宇佐美ら¹⁵⁾はテッポウユリやスカシユリでの GUS 遺伝子の発現は、CaMV35S プロモーターを連結した pBI221 より、トウモロコシ花粉で特異的に発現する Zm13 プロモーターを連結した pZm13 の方が非常に高い活性を示すことを報告した。したがって、本研究で用いたプロモーターは CaMV35S であり、必ずしも供試花粉に最適のプロモーターとは言えないかも知れない。しかし、高発現率が得られたのは核への照射率が高かったためと考えられる。すなわち、本実験では特に核を狙った照射は行わなかったが、1 花粉あたり数カ所照射したため、核への照射率が高まったものと考えられる。また、本研究では一過性の遺伝子発現しか見えないが、移入された遺伝子が一旦発現しても、核内に組込まれないならば細胞分裂を数回繰り返すうちに失われることが知られている^{18,19)}。したがって、安定な細胞の形質転換率は低下するものと考えられる。レーザーによって移入された遺伝子の発現効率は供与遺伝子の濃度に依存することが知られている¹²⁾。今後は供与遺伝子の最適濃度やプロモーターの種類等を詳細に検討することにより、さらに遺伝子導入の効率を上げることが出来ると考えられる。また、葉組織への遺伝子移入も可能であることから、細胞照射の自動化などが実現出来れば、窒素レーザーマイクロビームを用いた遺伝子移入は十分実用性のある方法となるであろう。

文 献

- 1) Tsukakoshi, M., S. Kurata, Y. Nomiya, Y. Ikawa, T. Kasuya, 1984. *Appl. Phys.*, **B35**: 135-140.
- 2) 金子隆史, 木村信夫, 伊藤一敏, 1991. *育種*, **41**(別 1): p. 129.
- 3) 中野隆盛, 金子隆史, 岸波 功, 伊藤一敏, 木村信夫, 1991. *育種*, **41**(別 1): p. 130.
- 4) 服部一三, 島野智之, 西村隆雄, 1992. *育種*, **42**(別 1): p. 274.
- 5) 服部一三, 西村隆雄, 内藤博務, 1991. *植物細胞工学*, **2**: p. 135-138.
- 6) 島野智之, 西村隆雄, 服部一三, 1993. *育種*, **43**(別 1): p. 250.
- 7) Kagawa, K., H. Kobayashi, S. Yokoi, 1985. *Jpn. J. Appl. Phys.*, **24**: L946-L947.
- 8) 香川喜一郎, 針原元美, 前田樹夫, 横井貞弘, 1987. *レーザー研究*, **15**: p. 789-794.
- 9) Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, M. W. Bevan, 1987. *EMBO J.*, **6**: 3901-3907.
- 10) Kosugi, S., Y. Ohashi, K. Nakajima, Y. Arai, 1990. *Plant Sci.*, **70**: 133-140.
- 11) 粕谷敬宏, 塚越幹郎, 1987. *レーザー研究*, **15**: p. 624-

- 635.
- 12) 粕谷敬宏, 塚越幹郎, 山田 豊, 1985. 生命工学レポート, **4**: p. 1-12.
- 13) 飯田朝子, 山田康之, 森川弘道, 1990. 植物細胞工学, **2**: p. 631-637.
- 14) Nishihara, M., M. Ito, I. Tanaka, M. Kyo, K. Ono, K. Irifune, H. Morikawa, 1993. *Plant Physiol.*, **102**: 357-361.
- 15) 宇佐美徹, 三好英明, 田中一郎, 1993. 日本花粉学会第34回大会講要, p. 49.
- 16) Hamilton, D. A., M. Roy, J. Rueda, R. K. Sindhu, J. Sanford, J. P. Mascarenhas, 1992. *Plant Mol. Biol.*, **18**: 211-218.
- 17) van der Leede-Plegt, L. M., B. C. E. van de Ven, R. J. Bino, T. P. M. van der Salm, A. J. van Tunen, 1992. *Plant Cell Rep.*, **11**: 20-24.
- 18) Loyter, A., G. Scangoo, F. H. Ruddll, 1982. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 422-426.
- 19) Capecchi, M. R., 1980. *Cell*, **22**: 479-483.

Summary

Direct Gene Introduction into Plant Cells Using an N₂-Laser Microbeam

Takeshi OSAKI*, Masaoki SHIMIZU*, Takumi WAKIZUKA** and Toshihiko YAMAGUCHI*

* *College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka 593, Japan*

** *Osaka Prefectural Education Centre, Karita, Sumiyoshi, Osaka 558, Japan*

An N₂-laser with a 337.1 nm wavelength and 3 ns pulse width burned a localized hole *ca.* 0.5 μm in diameter on the cell wall and cell membrane of cultured cells of melon under selected irradiation conditions (1.5-6 μJ/spot). No visible damage due to the irradiation was detected under these conditions. Efficiency of gene delivery into plant cells was then tested using this laser treatment. Mature pollen of *Impatiens balsamina*, *I. walleriana* and *Lycoris albiflora* was irradiated with a laser at 3 μJ/spot in medium containing 0.3 M mannitol and plasmid PBI221 harboring β-glucuronidase. The maximum frequency of transient gene expression was 24% in these treatments. When the melon cotyledons were treated with a laser in the presence of cucumber mosaic virus-RNA, virus multiplication was observed in the epidermal and around the cells 24 hr after irradiation. These results suggest that the present laser method is useful for the transformation of plant cells.