

エレクトロポレーションによるサツマイモプロトプラストへの TMV-RNAの感染

上原泰樹・小巻克巳・西口正通 (九州農業試験場)

Yasuki UEHARA, Katsumi KOMAKI and Masamichi NISHIGUCHI :
Infection of Sweet Potato Protoplasts with TMV-RNA by Electroporation

最近遺伝子を直接プロトプラストに導入する手法としてエレクトロポレーション (EP) が注目されているが、筆者らはサツマイモのプロトプラストへ外来遺伝子を導入する条件を検討する研究の一貫としてタバコモザイクウイルス (TMV) のRNAを用いた実験を試みた。この実験系の特徴は TMV-RNA をプロトプラストに導入後、24時間でプロトプラストを集め結果がでるので、導入条件を検定するのに短時間で、容易にできることである。

1. 試験方法

TMV-RNA の調製：トマト系TMV-Lを接種したタバコ (品種 Samsun) の感染葉を用いて常法により純化を行った。ウイルスRNAは純化ウイルスより、フェノール・SDS法により調製した。

プロトプラストの調製：サツマイモ (品種 中支8号) の懸濁培養細胞を1週間ごとに新鮮培地に移し、移植後4, 5日目の培養細胞を用いた。プロトプラスト分離用の酵素液は、0.1%ペクトリアーゼY-23, 2%セルラーゼオノズカRS, 5mMCaCl₂を含む0.5Mマニトール, pH5.8, を用いた¹⁾。酵素液に懸濁培養細胞を加え30℃で約4-5時間振盪し、出てきたプロトプラストを低速遠心 (700rpm) で集め調製した。

エレクトロポレーション：0.5Mマニトールまたはエレクトロポレーション用緩衝液 (70mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.1%MES, 0.5Mマニトール, pH5.6) にプロトプラストを懸濁させ (1-3×10⁵/ml), さらにTMV-RNAを10μg/mlになるよう加えた。EPには3種類の異なる波形を用いた。矩形波及び減衰波 (電気細胞融合装置, ハリオ CFP-1), パルス幅 (時間) を制御できる減衰波 (エレクトロポレーション装置, Promega X-cell 450)。2種類の減衰波の場合には緩衝液を, 矩形波にはマニトール液を用いた。逆に使用すると, プロトプラストが破裂する (減衰波) か, または指示通りの電圧が出力しない (矩形波)。上記のプロトプラスト溶液0.8mlをエレクトロポレーション用のキューベット (Biorad) (電極間隔は0.4cm) に移し, 水温下でエレクトロポレーションを行った。その後プロトプラスト溶液は2倍濃度の培地 (村田のA培地¹⁾) を等量加え, 28℃で培養した。

プロトプラストの生存率：プロトプラストの生存率は Evans blue 溶液によりプロトプラストを染色し, 染色されないものを生存プロトプラストとした。

TMV特異的蛍光抗体染色：約24時間培養したプロト

プラストを1.5mlのマイクロチューブに移し, 遠心を行い, さらに0.5Mマニトールを加え遠心を行いプロトプラストを集めた。プロトプラストはスライドガラスに滴下し, TMV-L特異的蛍光抗体で染色した。

TMVの感染性検定：TMV-RNAを導入したプロトプラストは遠心により集め, ガラス棒で磨砕後, 0.01Mのリン酸緩衝液, pH7, で適当に希釈したタバコ (品種 Xanthi nc) に接種し局部病斑検定を行った。

2. 結果及び考察

パルス時間を制御できる減衰波を用いたエレクトロポレーションについてコンデンサー容量をかってTMV-RNAの感染を調べた結果を第1表に示す。コンデンサー容量が大きくなるにしたがい生存率はわずかず減少したが, TMV-RNAの感染率は800μFで最も高く, 最高90% (第1表で示した試験例では77%) の感染率が得ら

第1表 TMV-RNA 感染に及ぼすコンデンサー容量の影響

μF	感染率 (%)	生存率 (%)
200	70	69
800	77	64
1000	60	61
1200	54	60
1400	31	59

注) 300V, 5msec.

れた。3種類のパルス波形を用いた結果, いずれのパルス波形でもTMV-RNAの感染は起こることが明らかになった。パルス時間の制御できる減衰波を用い (5msec, 300V), TMV粒子を用いたところ, 上記の条件では約10%の感染率であった。したがってここで得られた条件によるTMV粒子の感染効率は低い。

TMV-RNAに感染したプロトプラストの磨砕液をタバコに接種し感染性検定を行ったところ, プロトプラスト内でウイルスが感染し, 増殖していることが示された。

以上の結果, プロトプラストにTMV-RNAを感染させる条件が明らかになった。これは外来遺伝子DNAをプロトプラストに導入する際の参考データになる。また従来TMVはサツマイモには感染しないとされていたが, 本実験によりサツマイモのプロトプラストに感染することが明らかにされた。

引用文献

- 1) 村田達郎：学位論文 pp.156, 1989.