近畿大農総研報　8：89～94（2000）
Bull. Inst. Compr. Agr. Sci. Kinki Univ. 8：89～94（2000）

パーティクルガン法を利用したオオムギ子葉鞘細胞およびオオムギうどんこ病菌への外来遺伝子の導入

松田克礼**・豊田秀吉*・倉田浩子*・瀧川義浩*・野々村照雄*・大内成志*,**

Transformation of Barley Coleoptile Cells and Powdery Mildew by Microprojectile Bombardment

Yoshinori MATSUDA**, Hideyoshi TOYODA*, Hiroko KURATA*,
Yoshihiro TAKIKAWA* , Teruo NONOMURA* and Seiji OUCHI*,**

Synopsis

In this study, we established a gene delivery system for *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* by microprojectile bombardment. Tungsten particles were coated with the plasmid pBI/s-GFP which had been constructed from pBI121 by replacing the GUS gene with s-GFP. The coated plasmid was introduced into barley coleoptile epidermal cells or conidiospores of *B. graminis* f. sp. *hordei* by microprojectile bombardment. The expression of s-GFP gene in transformed coleoptile cells and conidiospores were detected by green fluorescence of GFP under the fluorescent microscope. The fluorescent condiospores were transferred by micromanipulation to non-inoculated coleoptile tissues to differentiated from non-transformed conidiospores. The transferred conidiospores germinated, invaded after appressorium formation, formed haustria and secondary hyphae, indicating that the gene delivery system established in this study is useful for introducing foreign genes not only into barley coleoptile epidermal cells and *B. graminis* f. sp. *hordei*, but also other obligately parasitic disease complexes, because easy detection of introduced gene expression in the transformed cells.

緒　言

植物病原性糸状菌は、宿主植物への侵入前行動として付着器を形成することが多く、それらが宿主細胞へ侵入するにあたっては植物細胞壁を貫通するために、クチナーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼなどの加水分解酵素を生産する。また、ある種の菌類では病原性の決定因子として宿主特異的毒素（host-specifictoxin；HST）を生産する[6,7,11,13]。このように、菌類の病原性発現には多様な形態的、生化学的機構が働いているが、近年、分子生物学分野の発展により、これら糸状菌の病原性に関与する遺伝子がクローニングされるようになった。例えば、いもち病菌（*Magnaporthe grisea*）や炭そ病菌（*Colletotrichum*属菌）などではそれらの付着器の分化や成熟に関与する遺伝子がクローニングされており、前者では、付着器形成誘導に関わる情報伝達系の遺伝子と考えられる２種のタンパク質キナーゼが単離された。すなわち、阻害剤の添加実験などから、いもち病菌の付着器形成にはcAMP依存の情報伝達系が関与することが示されていたが、保存領域配列合成プライマ

* 農学部農学科(Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kinki University, Nara 631, Japan)
** 農学総合研究所 (Institute for Comprehensive Agricultural Sciences, Kinki University, Nara 631, Japan)
** 近畿大学農学総合研究所 (Institute for Comprehensive Agricultural Science, Kiki University, 3327-204 Nakamachi, Nara 631, Japan
Present address; Mcgill University, Quebec H9X 3V9, Canada.)

ーを用いたPCR法によってそのcAMP依存タンパク質キナーゼcpkAがクローニングされ、遺伝子置換法によってそれが付着器形成に関与することが実証された。

一方、宿主細胞の応答についても分子生物学的に解析が試みられており、特に抵抗反応に伴った遺伝子発現の解析には顕著な進展が認められる。 筆者らの研究室においてもオオムギうどんこ病菌（*Blumeria gramis* f. sp. *hordei*）および感染宿主細胞における遺伝子発現を解析しており、Microinjection *in situ* PCR法を用いた遺伝子クローニングシステムの開発にも成公している[9]。そこで、本研究では、オオムギうどんこ病菌（*B. gramis* f. sp. *hordei*. race1）及びオオムギ（*Hordeum vulgare* 品種五畝四石）への外来遺伝子導入システムを確立することにした。遺伝子導入法としては、アグロインフェクション法[5]のような生物的手法や、エレクトロポーレーション法[12]、マイクロインジェクション法[2]及びパーティクルガン法[1,3]などの物理的手法が挙げられるが、これらの方法は高等植物を対象として開発されたものであって、植物病原菌に直接適用することは必ずしも容易ではない。パーティクルガン法は、供試組織に関わらず、すべての細胞へ直接遺伝子導入することができることから、本研究では遺伝子導入法としてパーティクルガン法を適用した。さらに、本実験に供試したオオムギうどんこ病菌は、絶対寄生菌であり、培地上での増殖・継代が不可能であることから、マイクロマニピュレーション法による形質転換体選抜によって、効率的な外来遺伝子導入システムの確立を試みた。

材料と方法

供試植物および病原菌

本実験には、オオムギうどんこ病菌（*B. graminis* f. sp. *hordei*）のrace1と本菌に罹病性であるオオムギ（*Hordeum vulgare*品種ゴセシコク）を用いた。オオムギ種子を流水中で発芽させた後、バーミキュライトに播種し、20℃、6,000～8,000luxの連続照明下で7～10日間育苗した。第一葉が展開した時点で苗を採取し、カミソリで切り離した子葉鞘の内表皮を剥離して以後の実験に供した。 また、うどんこ病菌接種源には、7～10日間育成したオオムギの第一葉に分生胞子を接種し、20℃、6,000～8,000luxの連続照明下で7～10日間培養した後に、新たに形成された分生胞子を用いた。

パーティクルガン法による遺伝子導入

パーティクルガン法による遺伝子導入には、ショットガンプレートを用いた。プレートは、濾紙枠をスライドグラス上に置き、枠内に50mM$CaCl_2$を含む2％アガロースゲルを滴下し、その上からもう1枚スライドグラスを重ね、薄いアガロースゲルのプレートを作製した。

遺伝子導入装置としては、タナカ社製遺伝子導入装置GIE-III を用いた。本装置は、加圧ヘリウムガスを媒体とし、DNAをコーティングした金属粒子を噴射して、標的細胞内に直接外来遺伝子を導入する。まず、オオムギから剥離した子葉鞘内表皮を、ショットガンプレート上に置床した後、うどんこ病菌分生胞子を接種し、プレートを粒子導入チャンバー内の中央に置いた。一方、タングステン粒子（直径1μm）は 100％エタノールで13 mg/mlとなるよう懸鐸し、その懸鐸液（10μm）をメッシュ上に滴下し、風乾した。次に、メッシュを射出孔に装着し、加圧ヘリウムガスを噴射して、洗浄粒子を標的細胞内に導入した。導入条件は、減圧を60.0mmHg、粒子射出孔から試料までの距離を12.0 cm、ヘリウムのガス圧を 3.0 kg f / cm^2とした。粒子導入した子葉鞘内表皮並びにうどんこ病菌分生胞子は、20℃、 6,000～8,000 lux の連続照明下で24時間培養した後、顕尾鏡下で原形質流動および発芽の有無によってそれぞれの生存率を検定した。

導入遺伝子には、アルカリ迅速法によって調整したプラスミドp35S-GFPを使用した。まず、p35S-GFP/JM-109株をL-broth（1％のバクトトリプトン、0.5%のイーストエキストラクトおよび、1％の$NaCl_2$を加えた培地）で24時間震盪培養し、遠心分離 (10,000×g、5分間) によって得られた菌体を5 mlのGET-

buffer（50mMのglucoseと10mMのEDTAを含む25mMのTris-HClでpHを8.0に調整したもの）に懸濁し、10ml のSDS溶液（1％ドデシル硫酸ナトリウムと0.2M NaOHの混合液）を加え、さらに氷中に30分間静置した。その後、3M酢酸カリウム溶液（7.5ml）を加え、さらに氷中に30分間放置後、遠心分離し、その上清に等量の2-プロパノールを混合し、15～20分間放置した。遠心分離（10,000×ｇ、15分）によって得た沈殿をエタノールで洗浄し、減圧乾燥させた後、３MのTE-buffer（1mMのEDTAを含む10mM Tris-HClでpHを 8.0に調整したもの)に溶解してプラスミドDNA溶液とした[8,10,12]。

プラスミドDNAは塩化セシウム臭化エチジウム密度勾配遠心法[9]によって精製した。すなわち、塩化セシウムは最終濃度が1.55 g/m l に、また、臭化エチジウムは最終濃度が820μg/m l となるようにDNA溶液に溶解し、遠心分離（22,1900×ｇ、16時間、20℃）を行った。紫外線照射下でDNA画分のみを採取し、水飽和イソアミルアルコールで臭化エチジウムを除去した後、TE-bufferに透析して得た試料を精製プラスミドDNAとし、以後の実験に供した。

遺伝子導入には、直径１μmのタングステン粒子を用いた。まず、100%エタノールで３回、滅菌水で３回洗浄した1.3μgのタングステン粒子を250μlの滅菌水に懸濁し、25μlのDNA溶液（1μg/μl）、250μlの2.5M塩化カルシウム及び50μlの0.1Mスペルミジンを加えて混合した。氷中に５～10分間放置した後、遠心分離(15,000×ｇ、5分）でタングステン粒子を集め、100%エタノールで洗浄した後、遠心分離操作を繰り返し、得られた粒子を100μlのエタノールに懸濁して、DNA被覆粒子とした。このコーティングしたタングステン粒子を上述のうどんこ病菌接種子葉鞘内表皮に導入した。粒子導入後20℃、6,000～8,000luxの連続照明下で培養し、sGFP遺伝子の発現を確認した。また、オオムギ子葉鞘内表皮については、ショットガンプレート上に播種後7～10日目のオオムギから剥離した子葉鞘内表皮を置床し、上記と同様の方法でsGFP遺伝子を細胞内に導入した。

オオムギうどんこ病菌及びオオムギ子葉鞘内表皮におけるsGFP遺伝子の発現検定

sGFP[4,14,15]は、野性型GFPの65番目のアミノ酸であるセリンをスレオニンに置換した励起波長は490nmの合成GFPであって、発色団形成が野性型に比べ、４倍速く、輝度も６倍に増加している。sGFP（Synthetic Green Fluorescent Protein ）生産遺伝子を導入した細胞の遺伝子発現についてはオリンパス社製の蛍光顕尾鏡BX-60 下で、sGFP特有の緑色蛍光を確認することによって判定した。なお、蛍光顕尾鏡観察にあたっては、励起フィルター（Blue）及び吸収フィルター（515nm）を用いた。

マイクロマニピュレーション法によるオオムギうどんこ病菌の選抜

マイクロマニピュレーション法による粒子導入胞子の転移には、外径 1.0mmのガラス管の先端を細くしたニードルを用いた。すなわち、インジェクトスコープ下でタングステン粒子が確認された胞子を同じプレート上の生存オオムギ子葉鞘内表皮細胞上に移植した。その後、20℃、6,000～8,000 luxの連続照明下で培養し、付着器形成及び吸器形成を確認した。

結果および考察

オオムギうどんこ病菌は、絶対寄生菌であるため、宿主植物であるオオムギ葉または子葉鞘組織上でのみ増殖することができる。本菌の分生胞子は、宿主植物表皮上で発芽して付着し、付着器を形成し、角皮侵入したのち表皮細胞内に吸器を形成する。さらに、表皮上に第二次菌糸を伸展して、最終的に分生胞子を形成する。このようなうどんこ病菌を形質転換するためには、外来遺伝子の導入時期や方法、あるいはその検出が重要であって、標的とする器官をいずれに設定するかによって、適用する検出システムは異なることになる。特に、遺伝子の導入にあたっては、本菌が常に宿主植物上で生活することを考慮に入れた方法を用いなければならない。したがって、本実験では、標的組織に関わらず、すべての細胞へ遺伝子を直接導入することができ

るパーティクルガン法を適用した。さらに、蛍光顕尾鏡下で形質転換体を選抜し、マイクロマニピュレーション法によって生きている宿主植物細胞上へ移動させ、効率的に形質転換体を増殖・継代するシステムの確立を試みた。

パーティクルガン法によるオオムギうどんこ病菌分生胞子へのDNA被服粒子の導入

まず、パーティクルガン法による粒子の導入条件を、減圧を60.0mmHg、粒子射出孔から試料までの距離を12.0cm、射出ヘリウムガス圧を3.0kgf/cm²とした場合の、オオムギうどんこ病菌分生胞子生存率への影響について検討した。その結果、本条件下では粒子導入によって死滅した分生胞子（Fig. 1-A)と導入粒子を保持した状態で発芽する分生胞子(Fig. 1-B)が確認され、分生胞子の生存率は約２０％であった。本実験では、このように粒子を保持して発芽した分生胞子を有効導入細胞として選抜し、マイクロマニピュレーション法による表皮組織上への転移に供した。

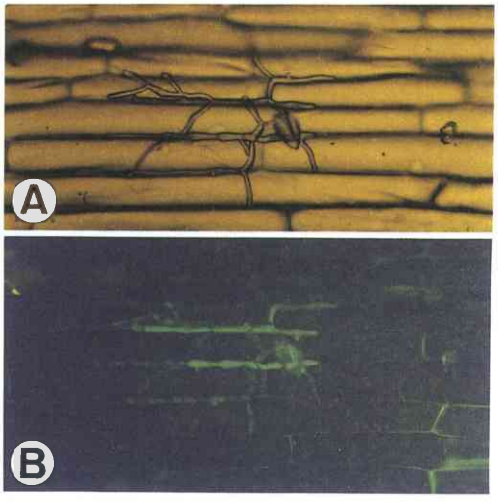


Fig. 1 Tungsten particles introduced into conidiospores of *B. graminis* f. sp. *hordei* by microprojectile bombardment A: Conidiospore burst after tungsten particle bombardment, B: Germination of tungsten particle harboring conidiospore. Arrows show tungsten particles.

粒子導入オオムギうどんこ病菌およびオオムギ子葉鞘内表皮におけるsGFP遺伝子の発現

外来遺伝子の導入にあたっては、sGFP (Synthetic Green Fruorescent Protein)生産遺伝子をレポーターとして用いた。 オオムギうどんこ病菌においては、CaMVの35Sプローモーターが有効に機能するので、その下流にsGFP生産遺伝子を連結し、パーティクルガン法によって導入した。なお、sGFPは、野生型GFPの65番目のセリンをスレオニンに置換した励起波長は490nmの合成GFPであって、野生型より発光団形成が４倍速く、蛍光強度も６倍に増大している。さらに、高等植物やヒトの最適コドンを使用、クリプティックイントロン部位の改変、主要制限酵素部位の削除などの特徴をもっている。そこで、本実験では、遺伝子導入されたオオムギうどんこ病菌分生胞子及びオオムギ子葉鞘内表皮細胞の蛍光を観察した。パーティクルガン法により、オオムギうどんこ病菌及びオオムギ子葉鞘内表皮細胞に遺伝子導入を行うにあたっては、まず、ショットガンプレート上に子葉鞘内表皮を置床し、その上にオオムギうどんこ病菌分生胞子を接種した後、前述の方法で粒子噴射を行った。すなわち、タングステン粒子にはp35S-sGFPをコーティングし、前項と同様の条件で粒子を導入した。導入試料を24時間培養した後、蛍光顕尾鏡下で観察を行った結果、蛍光を発する分生胞子およびび子葉鞘細胞（Fig. 2） が観察された。蛍光を発するうどんこ病菌分生胞子については、発芽後インジェクトスコープ下において、外径1.0mmのガラス管の先端を細くした先端直径10μmのニードルを使用して、子葉鞘内表皮細胞上に移植した。24～48時間培養した後、顕尾鏡下で付着器及び吸器形成を確認し、その生存と導入遺伝子の発現を検討した。その結果、48時間後には付着器や吸器、二次菌糸の分化が観察され、それぞれの器官においてsGFPの発現が認められた(Fig. 3)。 以上の結果から、マイクロマニピュレーション法によるオオムギうどんこ病菌の形質転換体の選抜が可能であると考えられた。今後は、遺伝子導入されたうどんこ病菌を単離し、分生胞子を形成させることによって本法を絶対寄生菌形質転換体選抜

法として発展させたい。

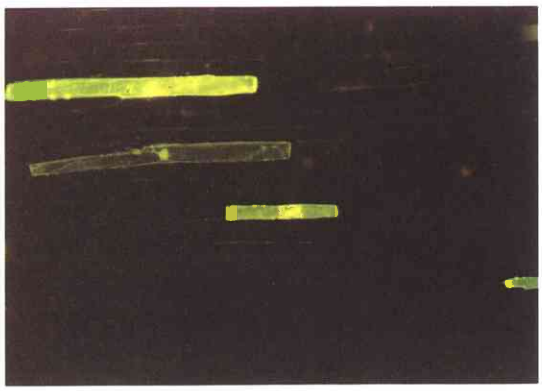


Fig. 2 Fluorescence of Green fluorescent protein translated in sGFP gene-introduced barley coleoptile cells.

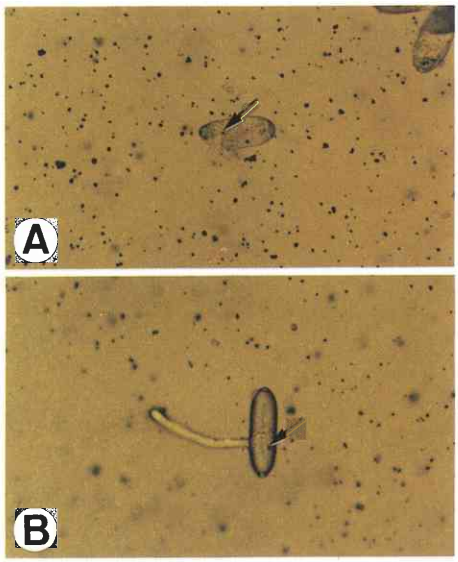


Fig. 3 *B. graminis* f. sp. hordei transformed with s-GFP gene by microprojectile bombardment.
A: light microscope image, B: fluorescence microscope image.

引用文献

1) Birnboim, H. C. and Doty, J. (1987). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic acid Res. 85 : 1513-1523.

2) Bolik, M. and Koop, U. H. (1991). Identification of embryogenic microspores of barly(*Hordem Valgare* L.) by individual selection and culture and their potential for transformation by microinjection. Protoplasma 162 : 61-68.

3) Bommineni, R. V., Chibbar, N. R., Datla, S. S. R. and Tsang, T. W. E. (1993). Transformation of white spruce (*Picea glauca*) somatic embroys by microprojectile bombardment. Plant Cell Rept. 13 : 17-23.

4) Chiu, W. I. and Niwa, Y. (1994). Engeneered GFP as a new vital reporter in plants. Current Biologu 6 : 325-330.

5) Godowin, I. D., Ford-Lloyd, B. V. and Newdury, H. J. (1992). In vitro approaches to extending the host-range of *Agrobacterium* for plant transformation. Aus. J. of Botany 40 : 751-763.

6) 児玉基一郎・尾谷浩・甲元啓介 (1997). 植物病害の化学.学会出版センター. pp. 32-38.

7) 児玉基一郎・伊藤靖夫・赤松 創ら (1997). 植物防疫. 51, 207-211.

8) Maniatis,T., F. and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning a Laboratory Manual. Cold Spring Harber Laboratory, New York. pp. 93-94.

9) Matsuda, Y., Toyoda, H., Kurita, A. and Ouchi, S. (1997) In situ PCR technique based on pricking microinjection for cDNA

cloning in single cells of barley coleopitile and powdery mildew pathogen. plant Cell Rept. 16 : 612- 618.

10) Mondel,M. and Higa,A. (1970). Calcium indepemdent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53 : 154.

11) 西村正陽・大内成志. (1990). 植物感染生理学. 文永堂出版、東京.

12) Salmenkallio, M., Hannus, R., Teeri, H. and Kauppinen, V. (1990) Regulation of amylase promoter by gibberllic acid and abscisic acid in barley protoplasts transformed by electoroporation. Plant Cell Rept. 9 : 352-355.

13) Shiraishi, T., Yamada, T., and Oku, H. (1991). In Molecular Strategies of Pathogens and Host Plants. Patil, S.S. et al. eds. Springer-Verlag. pp.151- 162.

14) 丹波康夫. (1997). GFPを用いたタンパク質輸送の観察法・組織を材料とする方法. 植物の細胞を観る実験プロトコール、遺伝子発現から細胞内構造・機能まで. 秀潤社. pp.116-124.

15) 渡辺雄一郎 (1996) 光るタバコモザイクウイルス. 蛋白質核酸酵素. 共立出版. 41: 786-792.

16) 山田哲治・島本功・渡辺雄一郎 (1997). 分子レベルから観た植物の耐病性. 植物と病原菌の相互作用に迫る.秀潤社. pp46-55.