

造礁サンゴ由来蛍光タンパク質の植物バイオテクノロジーへの応用

Allan R. Wenck

BASF Plant Sciences LLC Research Triangle Park, NC 27709-3528, USA

造礁サンゴ由来の蛍光タンパク質や他の蛍光タンパク質が最近導入されたことにより、バイオテクノロジー研究のさまざまな面でそれらを利用できるようになった。これらの非破壊的マーカーは、特定範囲の蛍光を利用して形質転換組織を同定するのに有用である。多種類の色が揃ったこれらの蛍光タンパク質は単子葉植物や双子葉植物で利用されている。

背景

オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) 由来の緑色蛍光タンパク質 (AvGFP) が線虫 (*Caenorhabditis elegans*) でマーカーとして利用されたことが初めて報告されて以来 (1)、蛍光タンパク質はここ十年以上にわたり植物研究に不可欠なツールのひとつとなっている。この遺伝子を初めて植物で用いた実験はうまくいかなかった。Haseloffら (2) は、シロイヌナズナで発現させるとスプライシングによって除去される“隠れたイントロン” (cryptic intron) が天然のAvGFP配列の中に含まれていることを突き止めた。そのタンパク質を変えずに塩基配列を変え、小胞体に局在するようにしたところ、植物でAvGFPが高発現した。その後、種々の改変に伴ってAvGFPは植物研究で非常によく使われるようになった (3, 4)。これらのマーカーは、形質転換や、遺伝子発現、タンパク質の局在化の研究 (4, 5) で以前に使われていたマーカーよりもいくつかの点で優れている。AvGFPに加えて多数の蛍光タンパク質が造礁サンゴから単離され (6, 7, 8, 9)、また非生物発光性のクラゲ (*Aequorea coerulescens*) からGFP (AcGFP; 10) が単離された。

造礁サンゴ由来の蛍光タンパク質のうち、植物内でマーカーとして初めて発現され特性が解析されたものは、造礁サンゴ *Discosoma* sp. から単離されたDsRed (11) である。この報告の後にWenckら (5) は、AsRed、AmCyan、ZsYellow、ZsGreenおよびDsRedが、一過性および安定形質転換されたいくつかの単子葉および双子葉植物内で発現され、可視化されることを実証した (Wenckらの文献5の図1-3を参照されたい。この図3はSpringer Science and Business Mediaの許可を得て本稿の図1として転載されている)。

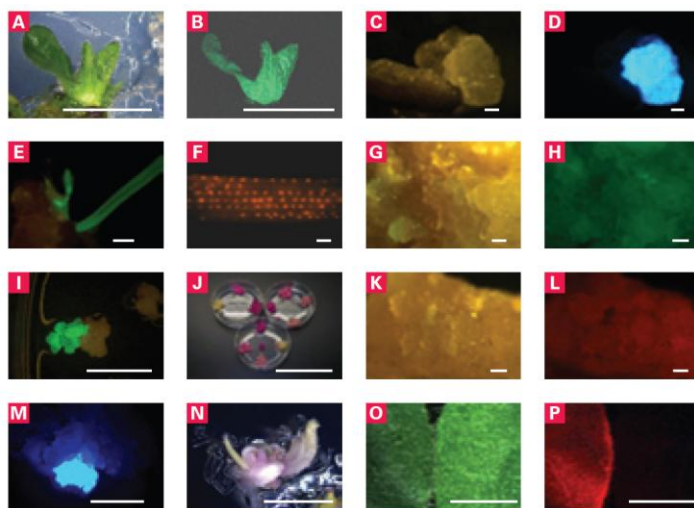


図1. 形質転換された植物組織における種々の造礁サンゴ蛍光タンパク質の発現
パネルA. 白色光下の大豆 (スケールバー=1 cm)。 **パネルB.** 蛍光下の大豆 [ZsGreen (スケールバー=1 cm)]。 **パネルC.** 白色光下の綿カラス (スケールバー=1 cm)。 **パネルD.** 蛍光下の綿カラス [AmCyan (スケールバー=1 cm)]。 **パネルE.** 蛍光下の大麦シュート [AmCyan, ただし緑色フィルターセットを使用 (スケールバー=2 mm)]。 **パネルF.** 蛍光下の小麦の葉 [DsRed (スケールバー=2 mm)]。 **パネルG.** 白色光下の綿カラス (スケールバー=1 mm)。 **パネルH.** 蛍光下の綿カラス [ZsGreen (スケールバー=1 mm)]。 **パネルI.** 蛍光下の稲カラス [ZsGreen (スケールバー=0.5 cm)]。 **パネルJ.** 白色光下の稲カラス [AsRed (スケールバー=10 cm)]。 **パネルK.** 白色光下の綿カラス (スケールバー=1 mm)。 **パネルL.** 蛍光下の綿カラス [AsRed (スケールバー=1 mm)]。 **パネルM.** 蛍光下のトウモロコシ・カラス [AmCyan (スケールバー=0.5 cm)]。 **パネルN.** 白色光下のトウモロコシ・カラス [AsRed (スケールバー=1 cm)]。 **パネルO.** 白色光下のDsRed形質転換タバコ (左) と形質転換していないタバコ (右) (スケールバー=1 cm)。 **パネルP.** 蛍光下のDsRed形質転換タバコ (左) と形質転換していないタバコ (右) (スケールバー=1 cm)。この図は、Springer Science and Business Mediaの許可を得てWenck, A. *et al.* (2003) *Plant Cell Rep.* **22**(4):244-251のFigure 3を引用したものである。

ある植物（トウモロコシとイネ）の組織培養で、いくつかの蛍光タンパク質（AsRed、ZsYellow、mCyan）の発現を白色光下で見ることができるとは興味深い。現在の研究では、トウモロコシのカルス（図2A）と再生したトウモロコシの穂軸の成熟中の穀粒（図2F）で、DsRedの発現を白色光下で見ることができるとは興味深い。これらの再生植物の生長組織や成熟した種子におけるDsRedタンパク質の発現を、蛍光検出光学装置を備えた解剖顕微鏡で観察することができた（図2C-E）。DsRedのほかに、AcGFPの発現もトウモロコシ形質転換体で検出された（図3）。我々は、どのようなプロモーターでもこれらの蛍光タンパク質を同様に発現できるわけではないことを認めている。例えば、丁子（cestrum）ウイルスプロモーターを用いた場合はZsYellowもZsGreenも発現されたが（5）、サトウキビ桿状型ウイルス（sugarcane bacilliform virus）プロモーターを用いた場合はいずれもトウモロコシで発現されなかった（12、データ非掲載）。この違いの理由はまだわかっていない。

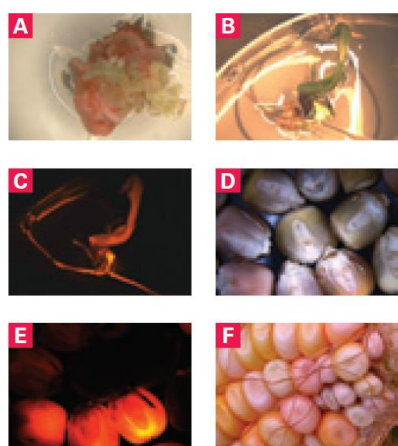


図2. トウモロコシの組織および植物体におけるDsRed（赤色蛍光タンパク質）の発現

パネルA. 白色光下で見ることができ、DsRed形質転換カルスにおけるDsRedの発現。**パネルB.** 再生中のDsRed形質転換植物体の白色光下での写真。**パネルC.** 再生中のDsRed形質転換植物体の蛍光画像。**パネルD.** DsRed形質転換体株から採取した穀粒の白色光下での写真。**パネルE.** DsRed形質転換体株から採取した穀粒の蛍光画像[Zeiss Sv-11解剖顕微鏡、HB100光源、およびローダミン・キューブ（励起D540/25, dichroic 565LP、蛍光D605/55 BP)]。**パネルF.** DsRed形質転換体株の穂軸上の穀粒の白色光下での写真。

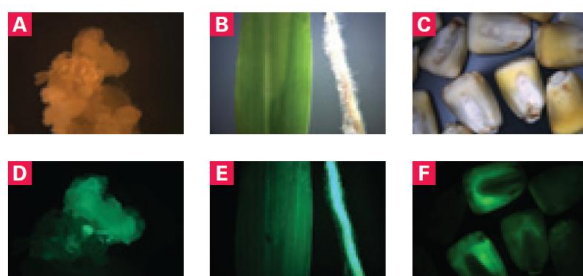


図3. トウモロコシの組織および植物体におけるAcGFP（緑色蛍光タンパク質）の発現

パネルA. 白色光下のトウモロコシのカルス。**パネルB.** 白色光下のAcGFP形質転換トウモロコシの葉と根。**パネルC.** AcGFP形質転換トウモロコシから採取した穀粒の白色光下での写真。**パネルD.** トウモロコシのカルスの蛍光画像[Zeiss Sv-11解剖顕微鏡、HB100光源、およびGFP・キューブ（励起HQ470/40, dichroic 495LP、蛍光D525/50 BP)]。**パネルE.** AcGFP形質転換トウモロコシの葉と根の蛍光画像。**パネルF.** AcGFP形質転換トウモロコシから採取した穀粒の蛍光画像。

これらのタンパク質を使用することにより、使用可能な色のスペクトルが増加するだけでなく、同じ組織内での二重標識が可能になる。Wenckら（5）は、AmCyanですでに形質転換した組織内でAsRedの発現を容易に可視化できることを示した。さらに、ZsYellowとZsGreenはそれぞれAmCyanとDsRedと識別可能であった。Stuitjeら（13）は、シロイヌナズナと同じバッチの種子や個々の種子でもDsRedと2種類の改変型AvGFP（CyanとYellow）の発現の可視化が可能であることを実証した。このことは、3種類までのコンストラクトによる同時形質転換で起こる事象を観察できることを示している。

先に述べたように、タンパク質の可視化に特別な装置を必要としないケースがいくつかある。しかし一般的には、（参考文献5や図2、3に記載されているように）蛍光検出装置を備えた解剖顕微鏡が必要である。種々の他の検出法も開発されている（3）。LED光の使用は植物（蛍光タンパク質を発現する植物）の迅速なスクリーニングに有用であるかもしれない（14, 15）。また、定量が可能な携帯型の蛍光測定装置も開発されており、植物内で発現しているAvGFPのレベルをそれで測定できることが報告されている（16）。この装置の利点は定量が可能なことである。

我々はDsRedの発現を可視化するために（図4A）、定量可能な他の装置Typhoon™ 9400 phosphorimaging machine（GE Healthcare社）を最近用いている。定量の利点は接合子の状態（zygosity）を決定できることである（17）。2種類のDsRed形質転換トウモロコシ株について分析ところ、ホモ接合の葉サンプルと接合なし（null）の葉サンプルをノーマライズしてヘミ接合（1コピー）の葉とした場合、それらの相対蛍光は2：1：0 および1.8：1：0であった（図4B）。

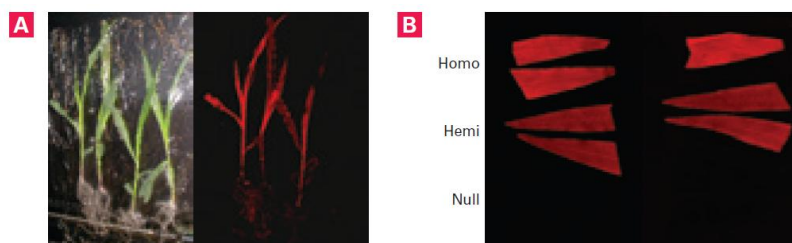


図4. Typhoon 9400 phosphorimagerを用いたDsRed形質転換トウモロコシのイメージング

DsRedセッティング（励起532、蛍光580 BP 30）で蛍光検出を行った。**パネルA**、DsRed形質転換株に由来する4つの幼苗（1 ホモ接合体、2 ヘミ接合体、1 無接合体；左から右の順）を白色光下（左）あるいはphosphorimager（右）で可視化した。**パネルB**、2種類のDsRed形質転換株の幼苗の葉サンプルをphosphorimagerで可視化した。

選択できる蛍光タンパク質の色はいくつかあるが、特定の目的にどの色が有効であるかを判断することは難しいかもしれない。植物サンプルの場合では、赤色の蛍光タンパク質を選ぶのが良いかもしれない。緑色蛍光タンパク質は現在広く使用されているが、たまに結果を誤判定しまう可能性がある。これは、短い励起波長で緑色から黄色の範囲の蛍光を発する内在性の化合物（例えばフェノール化合物）を含む植物が多いからである（3,18）。しかし、適切なコントロールを用いれば、内在性の蛍光は、通常、問題とならない。緑色のクロロフィルを含む組織は、（緑色蛍光タンパク質の励起の場合のように）短い励起波長の光を用いると明るい赤色の蛍光を発するが、（赤色蛍光タンパク質の励起の場合のように）長い励起波長の光を用いる場合では赤色の蛍光はめったに観察されない（3）。AsRed あるいはDsRedの場合で用いる長い励起波長では、クロロフィルは自家蛍光を発しない。したがって、植物バイオテクノロジーではAsRed あるいはDsRedを選択して使用するのが最も良いであろう。これらの蛍光タンパク質は、天然型では4量体として存在するため、局在性の研究でこれらをタグとして用いることには限界がある。しかし最近、単量体のDsRedが作られ（19）、現在市販されている。現在のところ、赤色蛍光タンパク質は植物バイオテクノロジーに最も理想的な蛍光タンパク質であるが（3）、多くの色の蛍光タンパク質をうまく利用することができる。適切なイメージング装置の有無や、内在性の蛍光が問題となるケースにおける適切なコントロールの有無によって、それらの蛍光タンパク質が使用できるかどうかが決まるであろう。

謝辞

図の作成に協力して頂いたPeifeng RenとKangfeng Mei、デザイン構成をして頂いたLuke Mankin、原稿を校閲して頂いたTodd JonesとPaula Olhoft、出版の許可を得て頂いたKlaus Daeschnerに感謝します。図1に記載されている研究はSyngenta Biotechnologyで行われ、Plant Cell Reportsで最初に発表され、Springer Science and Business Mediaの許可を得て本稿に転載したものである。図2～4に記載されている研究はBASF Plant Sciencesで行われたものである。サブクローニングと形質転換植物の作製に使用したベクターはクロンテック社から提供されたものである。

参考文献

1. Chalfi e, M. *et al.* (1994) *Science* **263**(5148):802–805.
2. Haseloff , J. *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**(6):2122–2127.
3. Stewart, N. (2006) *Trends Biotechnol.* in press.
4. Ehrhardt, D. (2003) *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**(6):622–628.
5. Wenck, A. *et al.* (2003) *Plant Cell Rep.* **22**(4):244–251.
6. Matz, M.V. *et al.* (1999) *Nature Biotechnol.* **17**(10): 969–973.
7. Lukyanov K.A. *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* **275**(34):25879–25882.
8. Verkhusha, V.V. & Lukyanov, K.A. (2004) *Nature Biotechnol.* **22**(3):289–296.
9. Matz, M.V. *et al.* (2002) *Bioessays* **24**(10):953–959.
10. Gurskaya, N.G. *et al.* (2003) *Biochem. J.* **373**(pt. 2):403–408.
11. Jach, G. *et al.* (2001) *Plant J.* **28**(4):483–491.
12. Tzafirir, I. *et al.* (1998) *Plant Mol. Biol.* **38**(3):347–356.
13. Stuitje, A.R. *et al.* (2003) *Plant Biotechnol. J.* **1**(4):301–309.
14. Yang, M. *et al.* (2005) *BioTechniques* **39**(2):170–172.
15. Tyas, D.A. *et al.* (2003) *BioTechniques* **34**(3):474–476.
16. Millwood, R.J. *et al.* (2003) *BioTechniques* **34**(3):638–643.
17. Halfhill, M.D. *et al.* (2003) *Theor. Appl. Genet.* **107**(8):1533–1540.
18. Lin, Y. *et al.* (2003) *BMC Plant Biol.* **3**:10–21.
19. Glick, B. *et al.* (2006) U.S. Patent Application No. 11/100,988.

製品ガイド

- ▶ pAcGFP1 Living Colors[®] 蛍光タンパク質ベクター
- ▶ AmCyan1 蛍光タンパク質ベクター
- ▶ AsRed2 蛍光タンパク質ベクター
- ▶ DsRed2 蛍光タンパク質ベクター
- ▶ DsRed-Express & DsRed-Express2 蛍光タンパク質ベクター
- ▶ pDsRed-Monomer Living Colors[®] 蛍光タンパク質ベクター
- ▶ HcRed1 蛍光タンパク質ベクター
- ▶ ZsGreen1 蛍光タンパク質ベクター
- ▶ ZsYellow1 蛍光タンパク質ベクター
- ▶ フルーツ蛍光タンパク質レポーターベクター
- ▶ GFP バリエーションベクター