

植物細胞融合と培養

5年B組 浦 大貴

指導教諭 櫻井 昭

1. 要約

植物細胞から、セルラーゼなどの酵素液を用いて、プロトプラストを作成することができた。そして、細胞融合技術（PEG法）を用いて、ブロッコリースプラウトのプロトプラストとカボチャやニンジンなどのプロトプラストを融合させることができた。この融合細胞を培養することでカルスの形成を目指した。

キーワード：細胞融合、プロトプラスト、カルス

2. 実験背景・目的

植物の論文について調べているとポマトという植物を見つけた。ポマトとはポテトとトマトの細胞を融合することで開発された。ポマトは、一つの植物体から両方の実を収穫できる上にジャガイモの耐寒性を備えている。そのため、より広い地域での栽培が可能になると考えられている。そこで、成長の遅い野菜に成長の早い植物の細胞を融合することで、短期間で収穫できる野菜を開発したいと考えた。植物細胞から細胞壁を取り除いたプロトプラストは、細胞膜のみで包まれているため、細胞膜が融合して1つの細胞になる「細胞融合」が生じやすいといわれている。この細胞融合技術を用いて新しい植物を作成したいと考えた。

本研究は、短期間で大量生産できるようにすることで、飢餓に苦しむ地域の改善が期待される。

3. 材料と方法

種子

成長の早い植物(ブロッコリースプラウト、シロイヌナズナ)の細胞と、成長を早めたい野菜(カボチャやニンジン、キュウリ、ピーマン)の種子を購入し発芽させた。

種子の滅菌と無菌操作

種子を 100 ppm のジベレリン溶液に 5 分間浸した。その後種子を 70%エタノール溶液に移して 30 秒浸して 3% (v/v) アンチホルミン溶液 (10 倍液) に 20 分浸した。これ以降はクリーンベンチで行ったため、使用した用具はすべて滅菌処理を行った。シャーレに脱脂綿を入れ蒸留水(8 mL)で湿らし、種子を等間隔に配置した。アルミ箔に包んで 25℃、暗黒条件化の恒温室で 15 日間育成した。

プロトプラストの作成

発芽した種子の胚軸を 3mm角にカミソリで切り取り、酵素液(表 1)の入ったマイクロチューブに浸けて 1 日置いた。

試薬名	重量
マンニトール	4.6g
セルラーゼ・オノズカ	0.5g
マセロザイム	0.1g
ペクトリアーゼ	5mg
KCl	1.75g
CaCl ₂	0.25g
H ₂ O	約100ml
計	100ml

表 1：酵素液の組成

細胞融合(PEG 法)

マイクロチューブからマイクロピペットで 10 μ L 取り出し、血球計算盤でプロトプラストの数を測定した。測定では、双眼実体顕微鏡を用いて、プレートの四隅を観察し、観察された個数 $\div 4 \times 2 \times 10^4$ 個を液中に存在する細胞数とした。細胞数を約 1.5×10^5 cells/mL に調整し、 2×2 mm のナイロンメッシュ (70 μ L) に通して別のマイクロチューブに移した。そして 600 rpm で 2 分間遠心した。チューブを傾けてプロトプラストがあると思われる底以外の酵素液を、マイクロピペットを使って取り除いた。洗浄液(w-5)を 800 μ L チューブに入れ、600 rpm で 2 分間遠心を 3 回行った。

チューブを傾けてプロトプラストがあると思われる底以外の洗浄液をマイクロピペットを使って取り除いた。残ったプロトプラスト溶液から 20 μ L、PEG(200)液を 10 μ L ずつ取り出しホールスライドガラスの上でガラス棒を使って混濁させ細胞融合を行った。ホールスライドガラスの上で混濁させた溶液を吸い取り、マイクロウェルプレート (96 穴) に 1/2 濃度の MS 液体培地 (I 液 20 mL, II 液 2 mL, III 液 2 mL, IV 液 0.2 mL, 2,4-D 1 mg/L, NAA(オーキシン) 1 mg/L, カイネチン 1 mg/L, 1 % ショ糖

2 g, 0.4M マニトール 14.57g, NH₄NO₃ 200 mg/L) を入れ、そこに溶液を入れ、ラップに包んで 25°C の恒温震とう機に入れて培養を行った。

I 液 (10倍)	
NH ₄ NO ₃	16.5g
KNO ₃	19.0g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	4.4g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3.7g
KH ₂ PO ₄	1.7g
II 液 (100倍)	
MnSO ₄ · 4H ₂ O	446mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	172mg
H ₃ BO ₃	124mg
KI	489mg/30ml
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	150mg/30ml
CuSO ₄ · 5H ₂ O	15mg/30ml
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	15mg/30ml
III 液(100倍)	
Na ₂ - EDTA	412.95mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	278mg
IV 液 (1000倍)	
ミオイノシトール	5g
グリシン	100mg
塩酸ピリドキシン	25mg
ニコチン酸	25mg
塩酸チアミン	5mg

表 2：MS 培地の材料

細胞の培養(プロトプラストの培養)

培養開始から 7 日後に 2,4-D 0.8 mg/L, NAA(オーキシン)0.8 mg/L, マニトール 10.93 g を含む 1/2 濃度の MS 液体培地を 1 mL 追加した。一週間後 2,4-D, 0.4 mg/L NAA(オーキシン)0.4 mg/L, マニトール 10.93 g を含む 1/2 濃度の MS 液体培地を 1 mL 追加した。

さらにその一週間後 2,4-D 0.1 mg/L, NAA(オーキシン)0.1 mg/L, マニトール

7.28 g を含む 1/2 濃度の MS 液体培地を 1 mL 足した。

細胞の再分化

2~3 mm に成長したカルスを、ゼアチン 4 mg/L, IAA 0.1 mg/L を含む再分化培地 (ショ糖 3% を含む 1/2MS 寒天培地) に移植した。

4. 実験結果

種子のカルス誘導で行ったジベレリン処理によって発芽を促進することができた。さらに酵素液を使ったことでプロトプラストを得て、細胞融合を行うことができた。今回この実験を三回程行った。一回目は細胞が見えずカビが生えてしまった。二回目は細胞を見られたがカルスらしきものは無かった。そして三回目の今現在は培養から 20 日程経過し、カルスと思われる細胞が顕微鏡で発見できた(図 1)。



図 1: カルスの形成

5. 考察

1 回目の実験は初回だったこともあり色々と試行錯誤したため、ジベレリン処理時に菌が入ってしまった可能性がある。2 回目は酵素液でプロトプラストを取り出したとき必要な量の細胞数に達していなかったため、細胞分裂が起きずカルスを形成することが不可能だったと考えられる。そし

て 3 回目の現在は、2 回目に比べ必要な細胞数に十分達していたため細胞分裂が起こり、カルスを形成できたと思われる。

6. 今後の展望

今現在培養から 20 日程経過し、カルスと思われる細胞が顕微鏡で見つかったため、この細胞を上記で示した通りに培養していきより大きなカルスを育て再分化させたい。

7. 参考文献

太田次郎, 本川達雄(2004 年). 高等学校生物 II
稲葉幸司(1988 年). 「植物組織培養—培地の調整法」・化学と生物 Vol.26, No.6
稲葉幸司, 「細胞融合・細胞培養による特産ナスの品種改良」・京都府農業総合研究所

8. 謝辞

科学探求の活動において、奈良女子大学理学部奈良久美準教授に、シロイヌナズナの栽培方法を教えていただきました。櫻井先生には多大なご指導を賜りました。この場で深く感謝申し上げます。