

プロトプラストの作成と細胞融合

4年B組 東 美弦
4年B組 藤岡 侑里
4年B組 細井 映美
4年B組 増田 奈津実
指導教諭 矢野 幸洋

1. 要約

さまざまな植物の細胞を、細胞壁を分解して薬品を用いて融合させることに成功した。その結果、植物の種類によってプロトプラストのできやすさや細胞融合のしやすさに差があることがわかった。

キーワード プロトプラスト、酵素液、細胞融合、細胞融合液、遠心分離

2. 研究の背景と目的

酵素液によって細胞壁を分解した状態の細胞を「プロトプラスト」という。異種の植物のプロトプラストを混ぜ合わせて薬品で処理すると、プロトプラスト同士がくっついて細胞融合が起こり、雑種細胞が作られる。これまでも、細胞融合によって、ジャガイモとトマトの雑種である「ポマト」やオレンジとカラタチの雑種である「オレタチ」、ハクサイとキャベツの雑種である「バイオハ克蘭」などが作られている。これらの同じ科の植物同士による細胞融合による新植物の開発は既に行われていたが、今回私たちは様々な違う科同士の植物を用いて細胞融合を行い、新種の植物の雑種細胞の作成を試みた。

3. 研究内容

<プロトプラストの作成手順>

セルラーゼ 1 g、ペクチナーゼ 0.4 g、マ

ンニトール 13.2 g をメスフラスコに入れ、蒸留水を加えて酵素液 100 ml を作る。ビーカーに細かく刻んだ試料、酵素液を入れて 25℃ に設定したインキュベータに入れ、一晚放置後おだやかに攪拌する。液をホールスライドガラスにとって顕微鏡で観察する。

<細胞融合液の作成手順>

ポリエチレングリコール 33 g、グルコース 3.6 g、塩化カルシウム 0.05 g、リン酸二水素カリウム 0.01 g に蒸留水を加え、100 ml にする。これを「細胞融合液」とよぶ。

<融合の手順>

プロトプラストが入った酵素液をろ過してから、遠心分離を行って、濃縮されたプロトプラストを含む液を作る。

ホールスライドガラスの二ヶ所にプロトプラストの入った液を 1 滴ずつ滴下した後、その間に細胞融合液を 1 滴滴下する。細胞

が崩れないように気をつけながらゆっくりと混ぜ合わせる。10分位放置した後、混ぜ合わせた液にカバーガラスをかけて顕微鏡で観察する。

<実験1>

材料に、ホウレンソウ、サツマイモ、ニンジンを用い、その結果を示す。数字は酵素液に入れてから経過した日数を表す。

表1 実験1の結果

	2日目	3日目	色
ホウレンソウ	○	△	緑
サツマイモ	×	×	—
ニンジン	×	○	橙

○…プロトプラストができた

△…プロトプラストが分解され過ぎていた

×…プロトプラストができなかった

—…不明

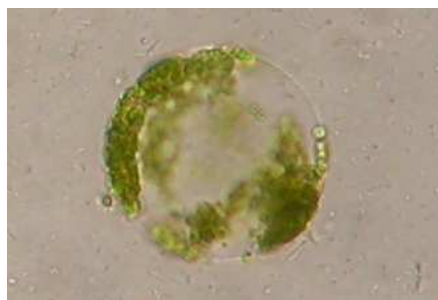


図1 ホウレンソウのプロトプラスト

<実験2>

材料にニンジン、ホウレンソウ、ジャガイモ、ダイコンを用いる。

実験1から、ニンジンはホウレンソウよりもプロトプラストができるのが遅かったので、同じ日にプロトプラストができて融合できるように酵素液に入れる日にちを1

日ずらした。その結果を次に示す。

表2 実験2の結果

	2日目	3日目	色
ニンジン	○	△	橙
ホウレンソウ	/	○	緑
ジャガイモ	/	×	—
ダイコン	/	×	—

1日目にニンジンだけを酵素液に入れ、2日目にホウレンソウ、ジャガイモ、ダイコンを酵素液に入れた。



図2 ニンジンのプロトプラスト



図3 ホウレンソウのプロトプラスト

ニンジンとホウレンソウのプロトプラストを細胞融合させたところ、うまく融合できなかった。

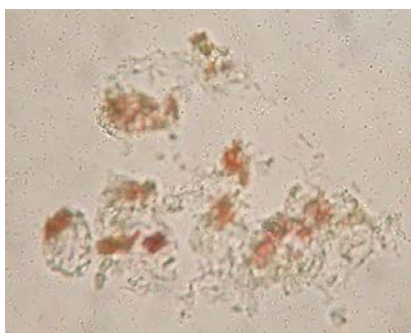


図4 分解されたニンジンの
プロトプラスト



図6 ブロッコリーのプロトプラスト

次に、以下の組み合わせで細胞融合を行った。その結果を示す。

<実験3>

実験2より、ニンジンのプロトプラストは酵素液に入れて2日目には分解されすぎてしまうことがわかったので、酵素液に入れる日は、ずらさないことにした。

材料にはニンジン、ホウレンソウ、ジャガイモ、ブロッコリースプラウト（ブロッコリーと表示）を用いた。その結果を次に示す。

表3 実験3の結果

ニンジン	○
ホウレンソウ	○
ジャガイモ	×
ブロッコリー	○

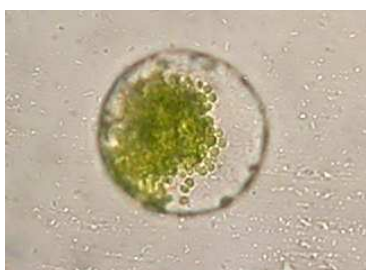


図5 ホウレンソウのプロトプラスト

表4 組み合わせと実験結果

ニンジンとホウレンソウ	○
ホウレンソウとブロッコリー	○
ニンジンとブロッコリー	×

○…細胞融合ができた、×…できなかった

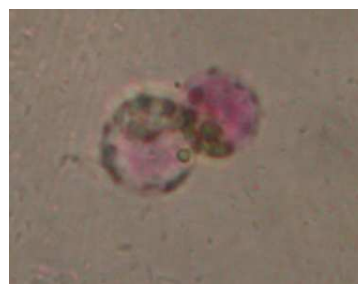


図7 ホウレンソウとブロッコリーの細胞融合

<実験4>

材料にサニーレタス、ニンジン、サザンカ、チンゲンサイ、ハクサイ、アスパラガス、ホウレンソウを用いた。その結果を次に示す。()内はプロトプラストの色を示す。

表5 実験4の結果

	プロトプラストの可否
ホウレンソウ	○
サニーレタス	○ (緑と赤)
サザンカ	○ (ピンク)
チンゲンサイ	○ (緑)
ニンジン	○
ハクサイ	×
アスパラガス	×

次に、以下の組み合わせで細胞融合を行った。その結果を示す。

表6 組み合わせと実験結果

チンゲンサイとサニーレタス	×
チンゲンサイとニンジン	○
チンゲンサイとサザンカ	◎
サニーレタスとニンジン	○
サニーレタスとサザンカ	◎
ニンジンとサザンカ	○

◎は特に明確に確認できたもの。

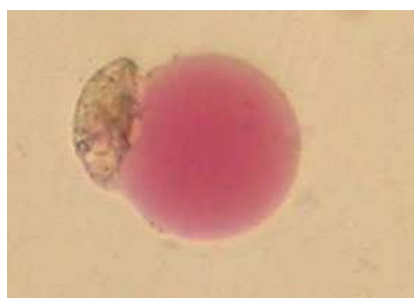


図8 チンゲンサイとサザンカ

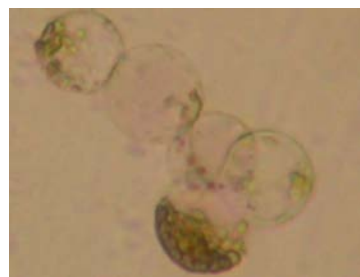


図9 サニーレタスとニンジン

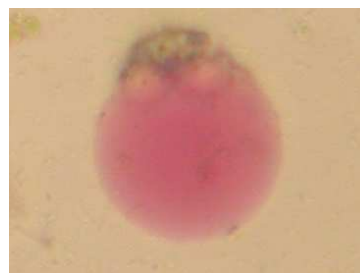


図10 サニーレタスとサザンカ①



図11 サニーレタスとサザンカ②

酵素液を入れて2日目に観察したものの中で、きれいに融合できたものを、翌日もう一度観察したところ、全体的にプロトプラストの数が減少していて、チンゲンサイとサザンカ、サニーレタスとニンジン、サニーレタスとニンジン、サニーレタスとサザンカは分解され過ぎていた。

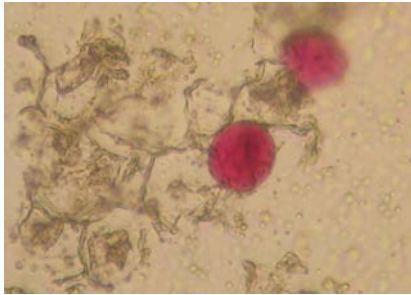


図 12 チンゲンサイとサザンカ

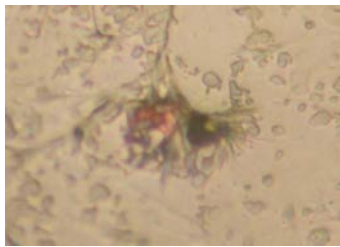


図 13 サニーレタスとニンジン

4. 考察

サツマイモ、ジャガイモ、ダイコン、ハクサイ、アスパラなどの硬くて色が薄い植物ではプロトプラストが確認できなかった。

植物の種類によって多少の差はあるが、酵素液に入れてからほぼ1日できれいなプロトプラストができる。また、硬い植物より柔らかい植物のほうが、プロトプラストができるまでの時間が短いことがわかった。

ツバキ科とアブラナ科、ツバキ科とキク科の植物同士で、特に明確に細胞融合が観察できた。他にも、違う科の植物同士で細胞融合が観察できたため、同じ科同士でなくても細胞融合は行えることがわかった。

5. 今後の課題

今回、細胞融合に成功したので、実際に雑种植物の栽培についての研究を進めたい。

6. 参考文献

[1]「高等学校生物Ⅱ」太田次郎、本川達雄

編、啓林館(2004)

[2]「わかりやすいバイオテクノロジー」三位正洋、評伝社(1985)

7. 謝辞

サイエンス研究会生物班の活動において、矢野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。