

プロトプラストの単離と融合

大浦 楠井 石戸 森田 吉岡 若林

はじめに

遺伝子組換え食品をはじめ、バイオテクノロジーは今最も注目されている分野の一つである。今回は、その基本的実験であるプロトプラストの単離と融合を通し、バイオ技術の一端に触れてみたい。

プロトプラストとは

「プロト」は“最初の 原始の”，「プラスト」は“形成されたもの”という意味で、あわせて“生命活動の本体”をあらわす。プロトプラストは原形質体とも呼ばれ、細胞壁のない植物などの細胞を指す。

プロトプラストは外部のものを取り込みやすいため、DNA の操作や細胞融合に適している。実際に細胞融合により、ポマト（ポテト + トマト）、オレタチ（オレンジ + カラタチ）、ヒネ（ヒエ + イネ）などの新しい作物が作られている。



プロトプラスト 利用の利点

以前までは、新しい品種を作ろうとする場合、交配による方法しかなかったため、近類種でしか作れなかった。

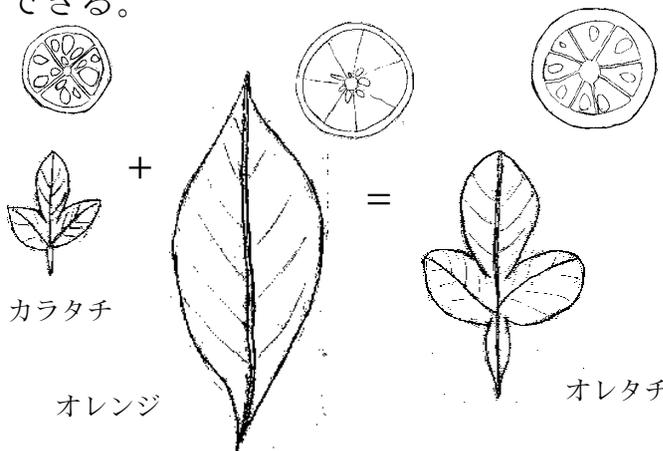
しかしプロトプラストを利用すると、そのような問題は解決し、新種を育てる時間も短縮できる。

そのことから、違う品種の長所を得るために利用されるが、成例はまだ少ない。

オレタチ～世界初^{*1}の融合果樹～

オレタチの葉は、カラタチの葉の形とオレンジの葉の大きさと丸み、オレタチの実は、カラタチの実の強い香り、オレンジの実の大きさを受け継いでいる。

ポマトは一代限りだったのだが、オレタチは、種を作り、種を維持することができる。



*1 1985年、キッコーマン

プロトプラストの単離

材料	ニンジン，ピーマン，赤パプリカ，黄パプリカ，カボチャ，ミカン，コマツナ，大根の葉，赤カブの葉
器具	試験管，ビーカー，ツンベルク管，メスフラスコ，遠心分離器，沈殿管，電子天秤，pH 測定器，ホールスライドガラス，顕微鏡
薬品	細胞単離酵素（マセロザイム R-10）0.20 g 細胞壁溶解酵素（セルラーゼオノヅカ R-10）0.80 g D-マンニトール 0.75mol/l(13.663 g) 塩酸・水酸化ナトリウム水溶液 0.1mol/l

浸透圧の測定

原形質分離の状態であればプロトプラストが単離しやすい。そこで、D-マンニトールを使用し、酵素液を高張とする。

はじめ、昨年度の研究^{*1}と同様 0.60mol/l としていたが、プロトプラストはほとんど観察できなかった。そこで、各材料が原形質分離する濃度^{*2}を測定することとした。

材料	ニンジン，ピーマン，赤パプリカ
器具	試験管，スライドガラス，顕微鏡
試薬	シヨ糖溶液 (0.65mol/l, 0.75mol/l, 0.85mol/l)

①	材料を薄く切る。		0.65	0.75	0.85
②	シヨ糖溶液に入れ，10分ほどおく。	ニンジン	△	○	○
		ピーマン	×	○	○
		赤パプリカ	×	○	○
③	顕微鏡で観察し，原形質分離しているか調べる。				

表 原形質分離の状況

結果として，0.75～0.80mol/l が適当と考えられる。そこで，すべての使用材料で，濃度は 0.75mol/l に設定することにした。

*1 平成 12 年度理数科課題研究『プロトプラストの単離と融合』，富山県立富山中部高等学校

*2 浸透圧はモル濃度に比例する。

酵素液の準備とプロトプラストの単離

- ① 蒸留水 60ml に D-マンニトールを 13.66 g (0.75mol/l) 溶かす。
- ② マセロザイム (ペクチナーゼ) とセルラーゼを加え、さらに蒸留水を加えて全液量を 100ml とし、よく混ぜて酵素を全て溶かす。
- ③ pH 測定器で調べながら、塩酸と水酸化ナトリウムを使って pH 5.6 に調整する。
- ④ 試料を細かく切り、酵素液 10ml 当たり 2.0 g ずつツンベルク管に入れる。
- ⑤ アスピレーターで空気を抜き、酵素液を細胞間にしみ込ませる。
- ⑥ そのまま 24 時間放置する。
- ⑦ ツンベルク管下部の液を取り、沈殿管に入れて遠心分離器に 5 分間かける。

※高張液を作るときに、ショ糖ではなく、D-マンニトールを使うのはなぜか

細胞内に取り込まれる量が、ショ糖より D-マンニトールの方が比較的少なく、実験にあまり影響がないから。

D-マンニトール

D-Mannitol $C_6H_{14}O_6$

CH₂OH • 融点 162~168°C

| • 分子量 182.17

HO—C—H

| • 白色無臭の結晶性粉末

HO—C—H

| • 甘く (ショ糖の 50~60% の甘味), 冷感がある

H—C—OH

H—C—OH

| • 水に溶けやすい

CH₂OH • 6価の糖アルコール

プロトプラストの観察

- ① 沈殿管の下部の液をピペットでホールスライドガラス (一つ穴) に取り出す。
- ② 顕微鏡で観察する。
- ③ プロトプラストであることを確認するため、蒸留水を流し込む。プロトプラストであれば細胞壁が無いいため、破裂する。

多量のプロトプラストが観察できたもの:

ニンジン, 赤パプリカ, 黄パプリカ, ミカン

プロトプラストが観察できたもの:

ピーマン, カボチャ

プロトプラストが観察できなかったもの*1:

コマツナ, 大根の葉, 赤カブの葉

*1 色素により濁り、観察できなかった。

プロトプラストの融合

器具 顕微鏡，ホールスライドガラス（一つ穴），
柄つき針，スポイト

薬品 PEG（ポリエチレングリコール）4000 溶液（40%）

- ① ホールスライドガラスにプロトプラストを採取する。
- ② スポイトにより周囲に PEG 溶液を滴下し，柄つき針で静かにかき混ぜる。
- ③ 雪だるまのようにくっついているプロトプラストを探す。

くっついているプロトプラストはやがて融合する。

結局，同種（ニンジン・ピーマン同士）での融合は観察できたが，異種での融合は観察できなかった。

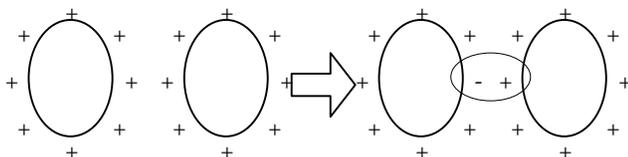
※細胞融合の方法には，PEG などを使う化学的方法と，電気パルスによる物理的方法がある。

PEG（ポリエチレングリコール）

Polyethylene-glycol $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$

PEG は，水溶性高分子で刺激が無く，保湿剤・界面活性剤として化粧品や口腔品に用いられる薬品である。平均分子量 200～20,000 程度が凡用である。

この薬品が植物細胞のプロトプラストの融合に用いられるのは，「+」に帯電している細胞膜を部分的に「-」に帯電させることができるからである。



※細胞質の融合後，核も融合する。また，細胞壁も再生される。

融合したプロトプラストの培養

融合した細胞を無菌培養することで，はじめに挙げたような新たな植物を作ることができる。

しかし，たとえそこまで成功したとしても，種子が採取できなければその世代限りで終わってしまうなど，決して容易でない作業である。

酵素液などの条件

今回の実験では、プロトプラストを安定供給できる酵素液などの条件を探り、また融合を成功させるために、ウェブなどの文献を参考にしつつ実験を繰り返したが、うまくいかなかった。

そこで、プロトプラストを使った研究を行っている富山大学理学部を訪問し、詳しい話をうかがった。それをもとに、実験の内容を根本から見直してみることになった。

左の表のとおり、D-マンニトールの濃度とペクチナーゼを除き、今までの実験の条件とプロトプラストに最適な条件にはかなりの違いがあることが判明した。

	これまで	見直し後
D-マンニトール	0.75mol/l	0.75mol/l
セルラーゼ	0.8 g	4.0 g
	そのまま	遠心分離 ^{*1}
ペクチナーゼ	0.2 g	0.2 g
pH	5.6	5.6
空気	抜く	抜かない
溶解時間	24時間	3時間程度
温度	室温	25°C~30°C

表 見直し前後の条件の変化

中でも一番の問題は、空気を抜いたことではないだろうか。植物も生物なので呼吸をするのだから、酸素を抜くということは、細胞の働きを阻害しているということである。単離だけの場合はこれでも成功となるのだが、融合するには生きの良いプロトプラストが必要である。そこで溶解時間を3時間にし、数は少なくとも融合に適した質のよいプロトプラストをつくることにした^{*2}。

材料については、果実よりも葉肉や花卉の方が適している。表皮を敢えて避ける必要はないが、表皮は酵素が入りにくいため、細かくするのがよい。その際、カッターなどではなく、両刃のかみそりなどを使用すべきである^{*3}。

*1 不純物を取り除くため。

*2 さらに、空気と触れる表面積を多くするため、三角フラスコなどを使うようにする。また、酵素と十分触れ合うよう、ゆっくりと振動させるのがよいようだ。

*3 切り口の鋭いもので切ることで、材料の組織の損傷を最小限に抑えるため。コマツナ等で色素により観察できなかったのは、葉緑体が壊れたためと思われる。

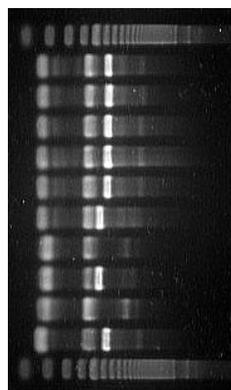
全体としては、自分たちで調べずに、昨年の課題研究のデータをそのまま利用したことがいけなかった。プロトプラストは生物なので、機械の測定のようにぴったりと値が出たり思い通りになるということは少ないだろうがもう少ししっかり自分たちで調べ、きちんとやっていき、あやふやな部分をなくしていきたい。

また、「温度」、「時間」などの要素についてまったく考えていなかったのも、今後これらの要素にも考慮してプロトプラストに適した条件での実験を進めていきたい。また融合しただけでは、プロトプラストを利用したことにはならないので、融合したプロトプラストの培養まで発展させたい。ただ、今回は使用した薬品が、どのようなものかを詳しく調べることができたし、融合失敗の理由も知ることができたのはよかった。

ニッポンジーン見学

最先端のバイオ技術の一端に触れようと、株式会社ニッポンジーン^{*1}を見学した。ニッポンジーンでは遺伝子操作に関連する製品や妊娠検査薬などが研究・製造されている。今回はその工場内を見学させていただいた。

中でも特に印象的であったのはアガロースゲル電気泳動で、アガロースゲルに電流を流し、染色体を移動させるというものである。核酸は、溶液中ではH⁺が電離し、染色体そのものはマイナスの電荷を帯びることになる。これに電流を流すと染色体は陽極に移動するが、アガロースゲルの小さな穴をくぐりぬけていく過程で、染色体は大きさ別に並ぶことになる。これに紫外線を当てることによって染色体を見ることができる。（遺伝子解析写真）



ところで、ニッポンジーンでは細菌などからDNAなどを取り出して利用しているとのことである。植物は培養に時間がかかるなど不便なことも多いため、大腸菌や納豆菌などの比較的安全な菌類が使われる。

なお、この研究にあたり、株式会社ニッポンジーン及び富山大学理学部生物学科^{*2}（増田，山田両先生）のご協力を賜った。この場を借りて感謝したい。

*1 <<http://www.kongo.co.jp/npgene/>>

*2 <<http://www.sci.toyama-u.ac.jp/bio/>>