

プロトプラスト —単離と融合—

理数科課題研究 生物班

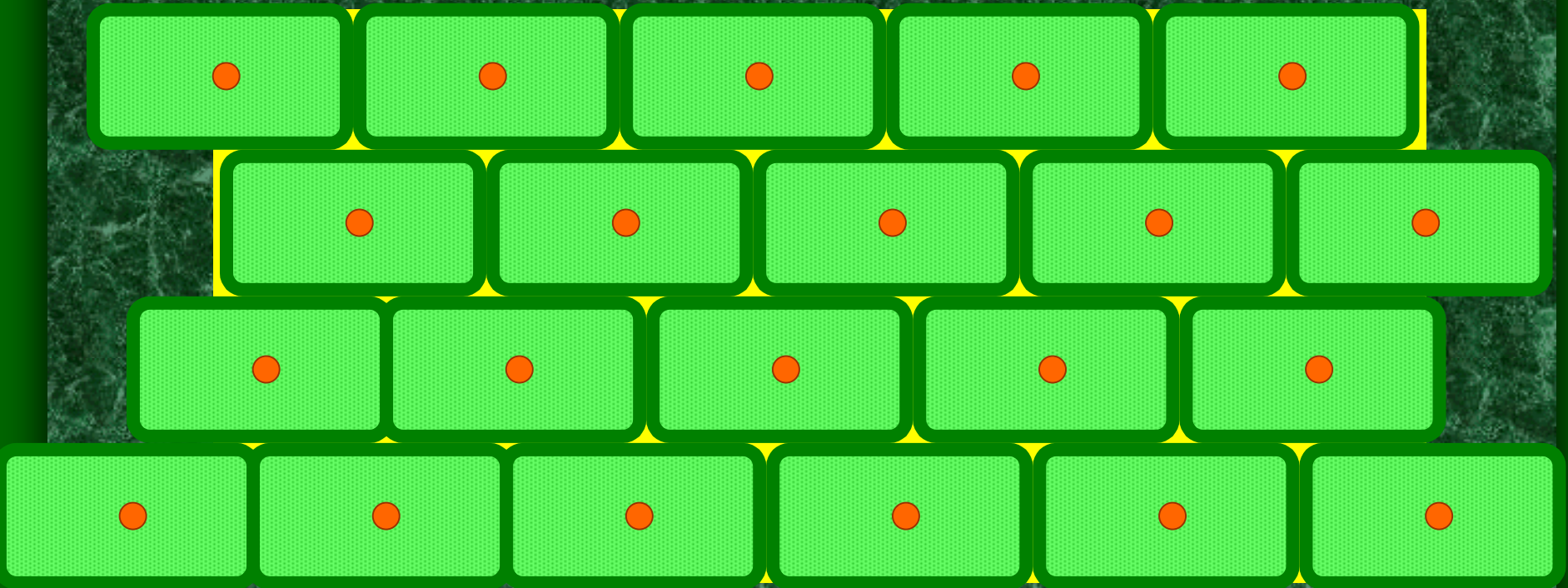
大浦 冬樹 楠井 悠平 石戸 克尚
森田 紘一郎 吉岡 昌樹 若林 未来

プロトプラストとは？

- 細胞壁のない植物などの細胞
- 原形質体 (ヌード細胞) ともいう
- 細胞融合や遺伝子の操作が容易
- 突然変異しやすい (ex.日本人好みの米)
- ポマト・オレタチ・ヒネなどの作物のもと
- 丸くてかわいい (by 大浦)

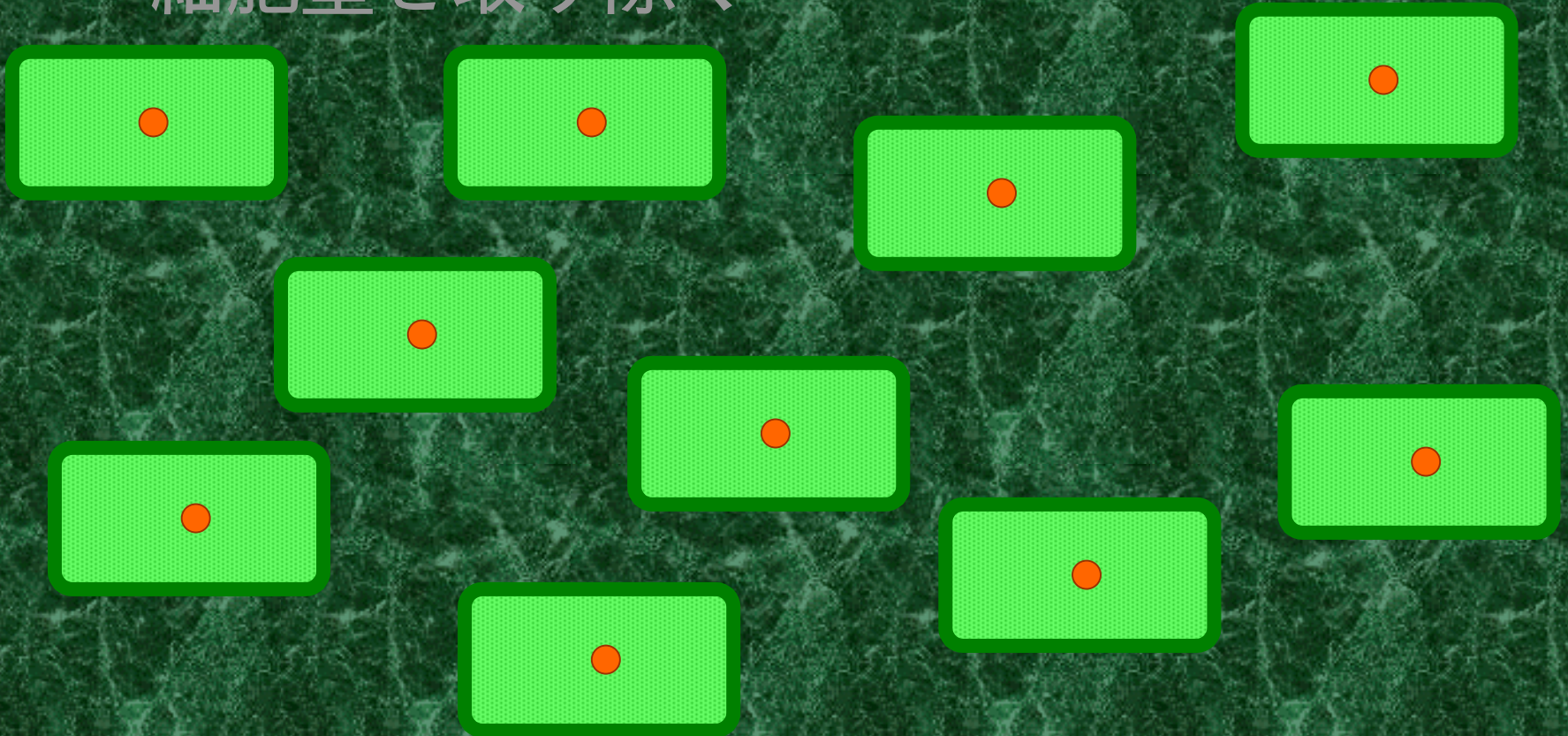
プロトプラストの単離

- 細胞を一つ一つばらばらにする
- 細胞壁を取り除く



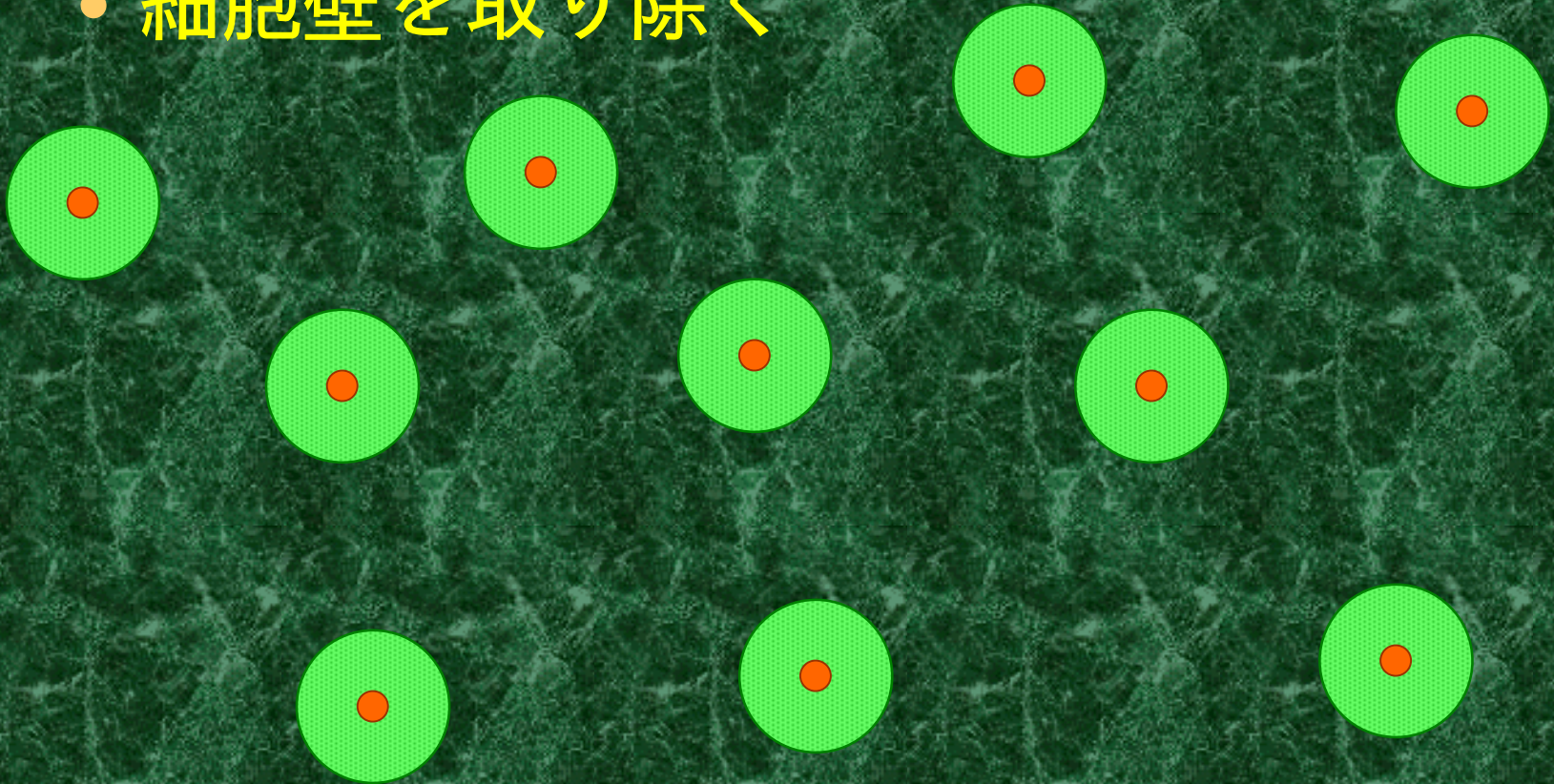
プロトプラストの単離

- 細胞を一つ一つばらばらにする
- 細胞壁を取り除く



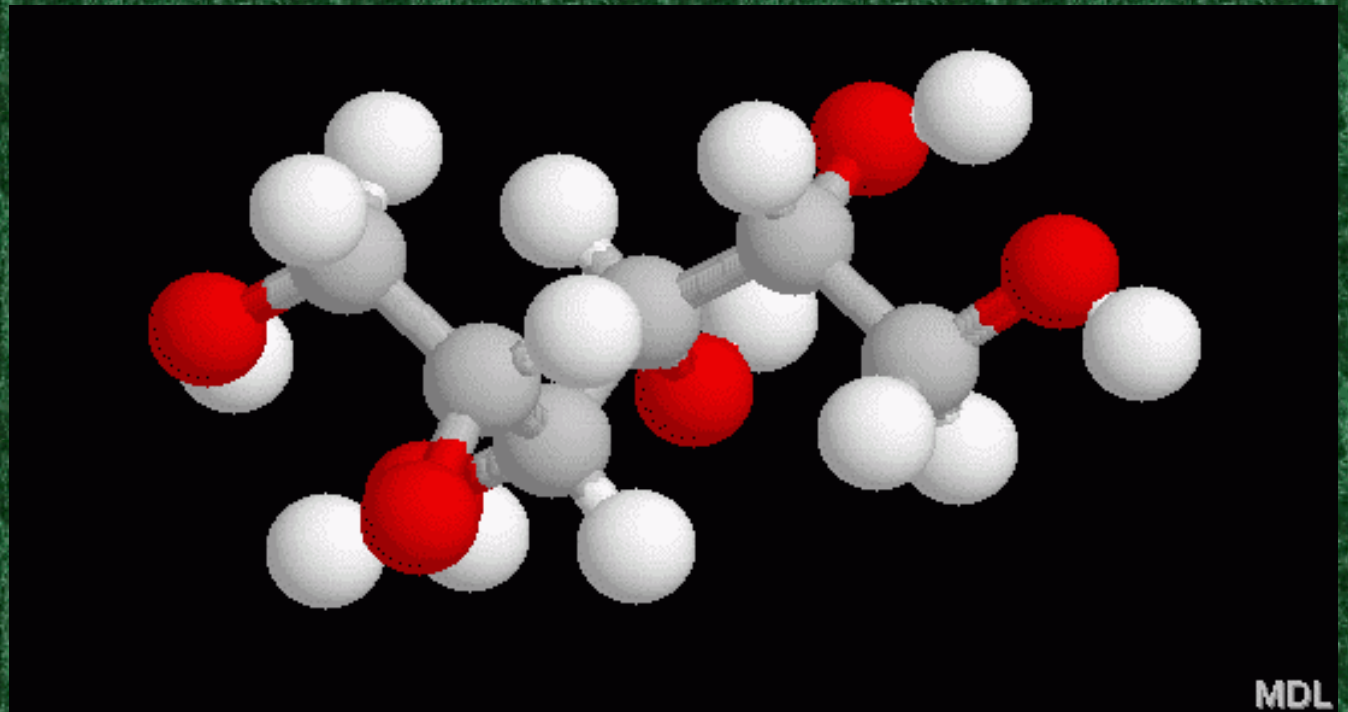
プロトプラストの単離

- 細胞を一つ一つばらばらにする
- 細胞壁を取り除く



プロトプラストの単離 ——使用薬品——

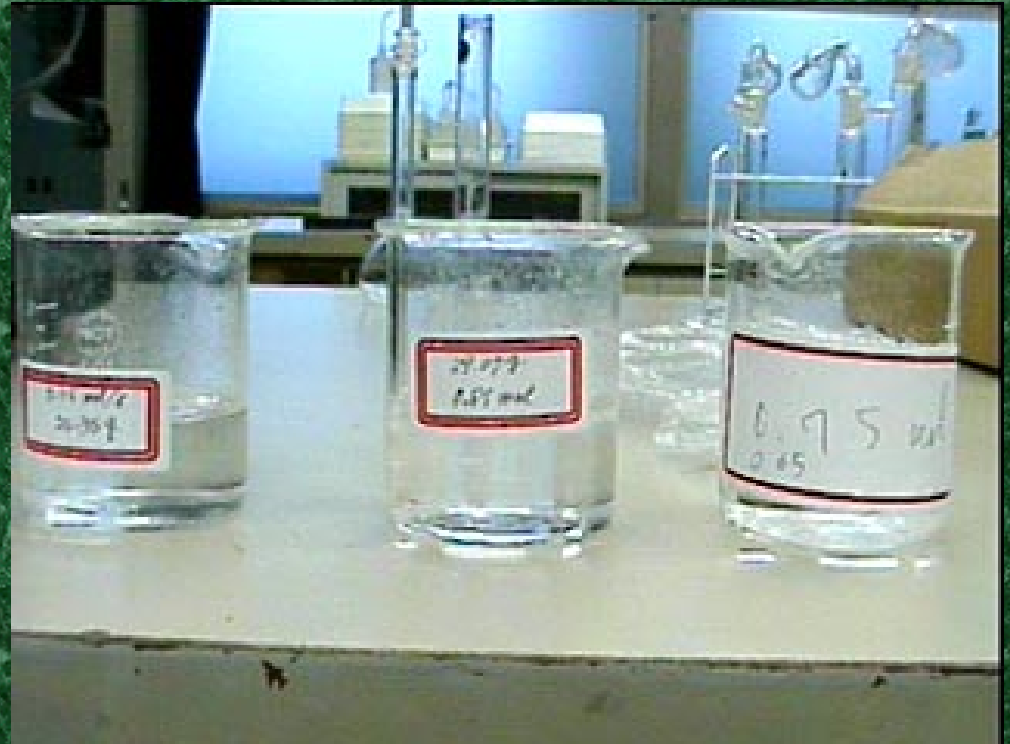
- D-マンニトール



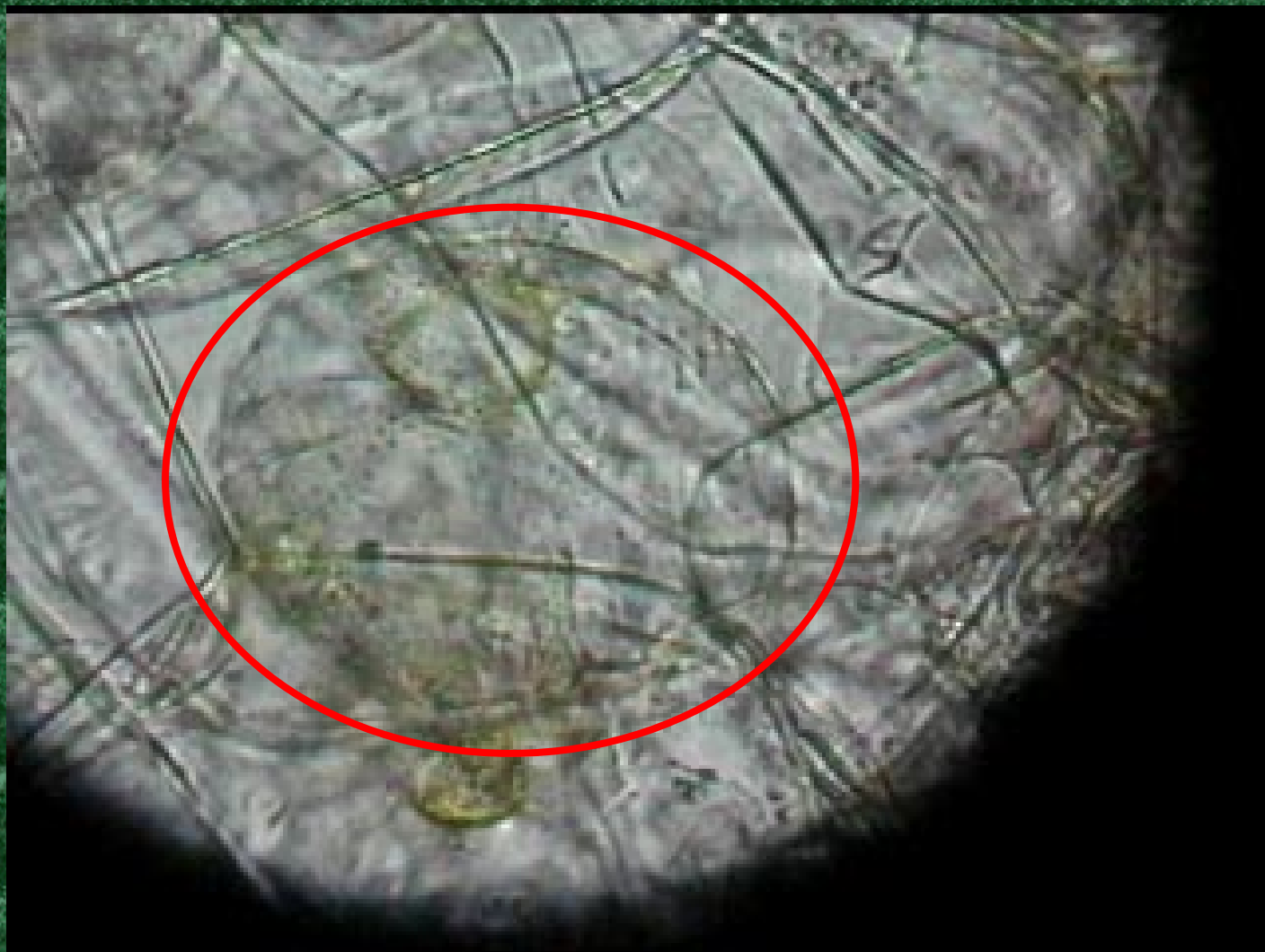
浸透圧の測定

— 実験器具と薬品 —

- 試験管
- ショ糖
 - 0.65mol/l
 - 0.75mol/l
 - 0.85mol/l
- 顕微鏡

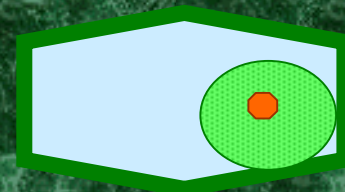
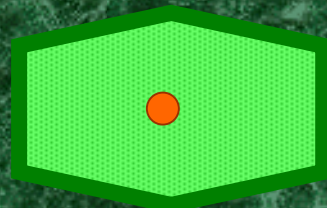


浸透圧の測定



浸透圧の測定

(mol/l)	0.65	0.75	0.85
ニンジン	▲	●	●
ピーマン	×	●	●
赤パプリカ	×	●	●



プロトプラストの単離 ——使用薬品——

- D-マンニトール 13.663g (0.75mol/l)
- セルラーゼ 0.80g
- ペクチナーゼ 0.20g
- 0.1mol/l 塩酸
- 0.1mol/l 水酸化ナトリウム

プロトプラストの単離 ——酵素液作成——

1. D-マンニトール・セルラーゼ・ペクチナーゼをそれぞれ電子天秤で量る
2. メスフラスコに入れる
3. 蒸留水を入れて全体の体積を 100ml にしてよくかき混ぜる

プロトプラストの単離

——使用材料の処理①——

1. 材料を細かく切り、2gずつに分ける
2. 材料と酵素液をツンベルク管に入れる
3. アスピレーターで空気を抜き、酵素液を細胞間に染み込ませる
4. 24時間放置



プロトプラストの単離 ——使用材料の処理②——

4. 下部の溶液をピペットで取り出す
5. 沈殿管に入れ、遠心分離器にかける



プロトプラストの単離 ——観察——

1. 溶液をホールスライドガラスに取り出す
2. 顕微鏡で観察



プロトプラストの単離 ——赤パブリカー——



プロトプラストの単離 ——黄パプリカー——

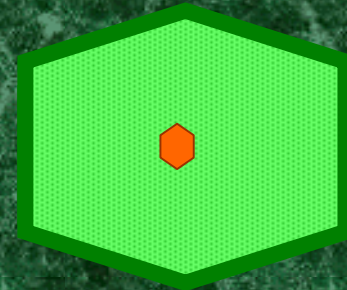
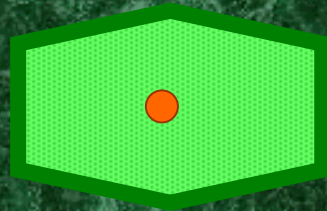


プロトプラストの単離 ——ニンジン——

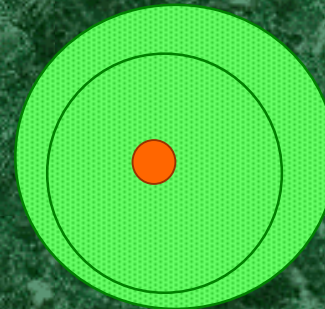
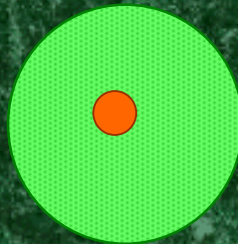


プロトプラストの単離 ——確認——

- 細胞壁がある



- 細胞壁がない



プロトプラストの単離 ——確認——



プロトプラストの単離 ——結果——

- 多量のプロトプラストが確認できたもの
 - 赤パプリカ
 - ニンジン
- ある程度のプロトプラストが確認できたもの
 - ピーマン
 - ミカン
- プロトプラストが観察できなかったもの
 - コマツナ
 - 大根の葉

プロトプラストの融合

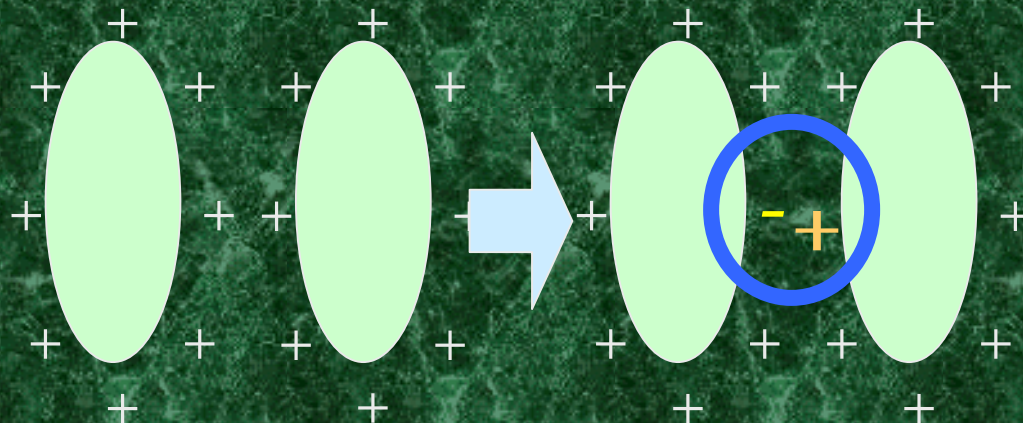
- 単離した細胞をくっつける
- PEG 溶液による化学的融合と電気パルスによる物理的融合がある
- 交配できない遠縁の種の間でも融合可能

プロトプラストの融合 ——薬品と器具——

- PEG 溶液
- 柄つき針
- 駒込ピペット
- 顕微鏡
- ホールスライドガラス (一つ穴)

PEG—ポリエチレングリコール

- 酸化エチレンの重合体 (polymer)
- 平均分子量 200 ~ 20000 程度が汎用
- 分子量の低いものには毒性
- 保湿剤・粘度調整剤に用いられる



プロトプラストの融合 ——結果——

- ニンジン同士やピーマン同士ではわずかに融合
- 異種間ではまったく融合せず



実験方法への疑問

- 酵素の最適温度を考慮せず
- 空気を抜く必要はあるのか
- 24 時間も放置する必要はあるのか

実験方法の見直し ①

- 富山大学理学部生物学科を訪問



増田恭次郎講師

実験方法の見直し ②

- 酵素液の温度 25～30℃
- 空気は抜かない
 - 空気を抜くと当然、細胞は死滅
 - より空気と触れ合うよう、三角フラスコを使用
- 待ち時間は 3,4 時間程度
- その他、酵素の量を調整

融合細胞の培養

1. 核が融合する

- ◆ 近種ならスムーズに融合
- ◆ 遠種なら染色体が淘汰、強いものが残る

2. 細胞壁が復元される

◇ 無菌培養

- ◆ カビなどの増殖を防ぐ

融合成功した植物 ——オレタチ——

- オレンジ + カラタチ
 - オレンジの葉の大きさ、丸み、実の大きさ
 - カラタチの葉の形、実の強い香り
- 世界で初めて融合成功した果樹 (1985年)
- 種子を作ることに成功
- 果樹試験場とキッコーマンの共同研究

融合成功した植物

——ポマト——

- ジャガイモ (ポテト) + トマト
- 耐寒性のあるトマトが目的
- 実用にはならず
 - ポテトの芽の毒 (ソラニン)
 - 小指くらいの太さの芋
 - ミニトマトより小さな実

融合成功した植物 ——その他の例——

- バイオハクラン (ハクサイ + 赤キャベツ)
- ヒネ (ヒエ + イネ)
- 先宝菜 (キャベツ + コマツナ)
- メロチャ (メロン + カボチャ)
- トマピーノ (トマト + ペピーノ)
- ネギタマ (タマネギ + ネギ)

プロトプラストと遺伝子技術

- 米の新品種開発によく使われる
- 植物は生育に時間がかかる
- 融合結果が意図どおりとは限らない
- 融合ではなく、遺伝子を直接操作（組換えなど）する方法が主流へ

おわりに

- プロトプラストはバイオ技術の先駆け
- 実験方法の誤りを正すことができた
- 継続して更に研究したい
 - 融合植物のカルス形成——大きな目標
 - 背景知識を更に深める

プロトプラスト —単離と融合—

理数科課題研究 生物班

大浦 冬樹 楠井 悠平 石戸 克尚
森田 紘一郎 吉岡 昌樹 若林 未来