

セイヨウハコヤナギの器官培養による植物体再生と葉肉プロトプラストの培養

細井佳久・伊ヶ崎知弘・二村典宏・丸山 E. 毅 (森林総合研究所)

要旨: 人工気象室内で育成したセイヨウハコヤナギの苗木の葉軸切片を培養し、多芽体を形成させた。多芽を切り出し、発根培地に移すことで植物体を再生させた。再生個体は同一組成の培地でシュートカルチャーすることで増殖させ、プロトプラスト単離に用いた。単離は約5 mm 角に細断した葉片を5時間酵素処理して行った。酵素液には0.6M マンニトールに1%セルラーゼオノズカ RS, 0.1%ペクトリアーゼ Y-23, 0.5%マセロザイム R-10 を添加したものを用いた。プロトプラストは96 ウェルプレートを用い、0.6M マンニトールを含む液体培地で培養した。培地条件や培養密度により、コロニー形成率は大きく異なった。オーキシンとして2,4-D と NAA を添加して比較したが、コロニー形成には2,4-D が適していた。得られたコロニーは、マンニトール濃度を0.4M に下げた同一組成の培地で培養することで増殖が可能であった。1/2MS 培地を用い、培養密度 10^3 プロトプラスト/ml で培養した場合、ウェルに置床したプロトプラストの55%でコロニーが形成され、今回の実験では最高の形成効率となった。また、培養密度 30 プロトプラスト/ml で培養した場合でもコロニー形成が見られ、単一のプロトプラストにおいても培養が可能であることが示唆された。

キーワード: セイヨウハコヤナギ, 器官培養, プロトプラスト

Abstract: Multiple shoots were formed from excised leaf axis of young *Populus nigra* var. *italica* plants grown in a phytotron. Plantlets were regenerated by cutting out the multiple shoots and transferred to a rooting medium. Obtained plants cultured on proliferation medium composed of same components of a rooting medium were used as a material for protoplast isolation. For protoplast isolation leaflets were cut into 5mm squares and immersed in an enzyme solution for 5hours. Enzyme solution containing 0.6M mannitol, 1% Cellulase "ONOUZUKA" RS, 0.1% Pectolyase Y-23 and 0.5% Macerozyme R-10 was used. Protoplasts were cultured in 96 well plates containing liquid media supplemented with 0.6M mannitol. Colony formation rate was significantly different according to culture conditions and protoplast density. For colony formation addition of 2,4-D into media was better than addition of NAA. Obtained colonies were cultured in a medium of the same composition except that mannitol concentration was reduced to 0.4M. The best colony formation rate of 55% of protoplasts was achieved in 1/2MS medium at a density of 10^3 protoplasts/ml. Further, colony formation was observed even in culture at a density of 30 protoplasts/ml. This result suggests the possibility of culture even in a single protoplast.

Keywords: *Populus nigra* var. *italica*, organ culture, protoplast

I はじめに

我々は現在、高バイオマス生産性樹木の作出を目指し、遺伝子組換えセイヨウハコヤナギを作成して特性の解析を行っている。組換え体の作成法としてアグロバクテリウム法を用いているが、植物ではいくつかの組換え手法があり、他の手法により作出された組換え個体は、組換え効率をはじめ、アグロバクテリウム法により作出される個体とは異なった特徴を持つことが予想される。そこで、プロトプラストを用いたエレクトロポレーション法やマイクロインジェクション法などによる組換え体作出に向けて、セイヨウハコヤナギの器官培養による植物体の再生と、その葉肉を使ったプロトプラスト培養を試

みた。

II 実験方法

1. 器官培養によるフラスコ苗の作成 フラスコ苗を作出するために、森林総合研究所内の人工気象室で約1年育成した挿し木苗を用いた。苗木の葉、葉柄、葉軸切片を滅菌して培養材料とした。表面の殺菌は、99.5%エタノールに30秒間浸した後、1%アンチホルミン溶液に15分浸漬・攪拌し、滅菌水で洗浄して行った。その後、葉は約5 mm 角に細断し、葉柄は5 mm 程度に切り揃え、葉軸は1 cm 程度に切断して多芽体誘導用の寒天培地に置床した。培地には、硝酸アンモニウム濃度を1/4とし、他の無機塩濃度を1/2に下げたMS培地を用い、 $3 \mu\text{M}$

Yoshihisa Hosoi, Tomohiro Igasaki, Norihiro Futamura, and Tsuyoshi E. Maruyama (Forestry and Forest Products Research Institute, Matsunosato 1, Tsukuba, Ibaraki, 305-8687, Japan) Plantlet regeneration via organ culture and mesophyll protoplast culture in *Populus nigra* var. *italica*.

ゼアチン, 1 μ M ベンジルアミノプリン(BAP), 6 μ M ジベレリン A3(GA3)を添加し, 2%ショ糖, 0.7%寒天を加えた固形培地を用いた。多芽体から切り出した多芽を発根させるための培地として, MS 培地に2%ショ糖, 0.7%寒天, 3-インドール酪酸 (IBA)を1 μ M, あるいは3 μ M 加えた2つの培地を比較した。多芽体誘導用, 発根用の培養実験は, 26°C, 16時間蛍光灯照明下で行った。

2. プロトプラストの単離 まず, 単離のための酵素条件を決める実験を行った。浸透圧調節剤として0.6M マンニトールを含み, 1%セルラーゼオノズカ RS (Yakult), 0.1%ベクトリアーゼ Y-23 (Kikkoman), 0.5%マセロザイム R-10(Yakult)を組み合わせた4種の酵素液を, 15ml ずつ90mm プラスチックシャーレに注ぎ, プロトプラストの単離効率を比較した。材料として, 各酵素液に生重量500mgの葉切片を5時間浸漬した後, プロトプラストを回収した。回収方法は, まずプロトプラストを含む酵素液に30mlの0.6M マンニトール液を注ぎ, 40 μ m ナイロンメッシュで濾して未消化組織を除去し, 遠心機にかけた。50mlの遠心管を用い, 40 \times gの遠心力で3分間, 遠心・洗浄し, 沈殿物を回収して行った。収量は血球計算盤を用い, 生存率はFDA染色法により測定した(2)。

培養時の単離は, 100ml 広口培養フラスコを用い, 40mlの酵素液に細断した葉を約5g 浸漬して行った。回収方法は, 酵素条件決定時に行った手順にならって行った。

3. プロトプラストの培養方法 培養は, 96 ウェルプレートを用いて, 25°C, 暗黒下で静置培養した。培地として, 1ウェルあたり60 μ lの液体培地を分注して用いた。基本培地として, 無機塩濃度を1/2にしたMS培地(1/2MS), 無機塩濃度を1/2にし, 10mM グルタミンを加えたMS培地(1/2MS+G), DCR培地に10mM グルタミンを添加した培地(DCR+G)の3種を用いた(1, 3)。各培地とも浸透圧調節のため, 0.6M マンニトールを加え, ショ糖濃度は3%とした。植物生長調節物質としては, オーキシンとして2,4-DとNAAを1, 10, 30, 60, 90 μ M, サイトカイニンとしてBAPを1, 10 μ Mの範囲で組み合わせて添加した。培養密度は, プロトプラストを10³個, 10²個, 30個/mlの3通りの密度で培養した。これは, ウェルあたりの置床プロトプラスト数としては, それぞれ60, 6, 1.8個である。培養により, プロトプラストが細胞壁を再生させ, 細胞分裂を行った場合, 5分裂以上した分裂細胞をコロニーとして計数した。コロニーの計数は, プロトプラスト培養開始1ヶ月後に行った。繰り返しは培養条件毎に4回行った。

III 結果と考察

1. 各器官からの多芽体形成効率と多芽の発根・植物体再生 葉片と葉柄を培養した場合, 低頻度で芽の分化が見られた。葉柄では, 切断面に根の分化が観察されることもあった。3種の外植体のうち, 芽の形成効率が良いのは葉軸であったため, 発根実験には葉軸由来の多芽を用いた(図-1)。多芽の発根では, 地上部の伸長は両IBA濃度でも同様に観察されたが, 3 μ M 添加した場合, 発根はするものの, カルス化が著しいため, 再生植物体の維持・増殖には1 μ M 添加した培地を用いることとした(図-2, 3)。

2. プロトプラスト単離条件 酵素の組み合わせによる単離効率の違いを表-1に示した。生存率については各酵素液とも約90%であり, 大きな差は見られなかった。収量については, 酵素液Aで8.3 \times 10⁶個/gFWとなり最高であったため, 以降の実験は, この酵素組成を用いることとした(図-4)。酵素組成により収量に違いがみられたものの, どの酵素液でも生重1gあたりの収量が10⁶個のオーダーであり, 他の植物で報告されている収量と同程度であった。

3. オーキシンの種類と培養密度によるコロニー形成率の違い 結果を表-2に示した。NAAでは10 μ M以上添加した場合には, まったくコロニー形成が見られなかった。他の植物での培養実験の経験上, NAAは低濃度で2,4-Dと同様な効果がみられる場合が多いため, 今回の実験では設定濃度が高過ぎた可能性もある。また, 培養密度の変化に対する反応についても, NAA添加による効果的な結果は得られなかった。NAAについては, 今回の実験より低濃度での培養実験を行う必要がある。得られたコロニーは, マンニトール濃度を0.4Mに下げた同一組成の培地で培養すると, 分裂増殖した(図-5)。増殖細胞は, 今後分化培地に移し, 植物体再生実験を行う予定である。

4. ウェルに置床したプロトプラスト数に対するコロニー形成効率について 表-2に示したように, 置床個数ではウェルあたり60個, 培養密度では10³個/mlの場合, 1 μ M 2,4-Dと10 μ M BAPを添加した1/2MSにおいて33個のコロニーが形成され, 形成率では最高の55%であった。また, 少数ではあるが, ウェルあたり1.8個を置床した場合でもコロニー形成が観察された。筆者は以前ギンドロ(*Populus alba*)やヤマナラシ(*Populus sieboldii*)のプロトプラスト培養を行ったことがあるが, ウェルあたり最低でも100個程度のプロトプラストが置床されていないとコロニー形成はみられなかった。セイヨウハコヤナギでは, はるかに少数での培養が可能であり, エレクトロポレーションやマイクロインジェクション

ヨンによって生じた細胞,あるいは融合細胞のような,少数しか目的細胞を作成できない場合や,それら細胞をキメラ化を避けて培養することが必要な場合に,少数細胞での培養が可能な本種はよい実験植物になる可能性がある。

引用文献

- (1) GUPTA PK, DURZAN DJ (1985) Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Rep: 4, pp.177-179
- (2) 平井篤志・内宮博文・杉浦昌弘 (1982) 生物化学実験法 16 植物細胞培養育種入門. 学会出版センター, 東京, 38pp.
- (3) MURASHIGE T, SKOOG F (1962) A revised medium and for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant: 15, pp.473-479

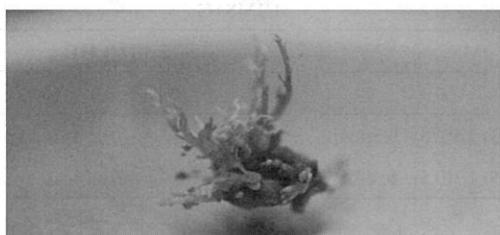


図-1. 葉軸から誘導された多芽体
Fig. 1. Multiple bud formation on excised rachises

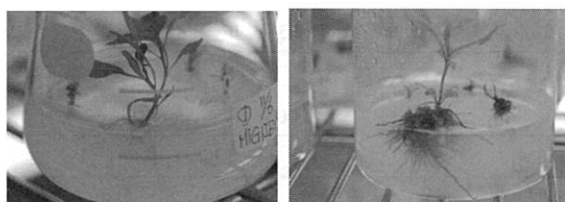


図-2. IBA 濃度による発根の違い
Fig. 2. Difference of rooting between 2 concentrations of IBA



図-3. 再分化した植物体
Fig. 3. Regenerated plant

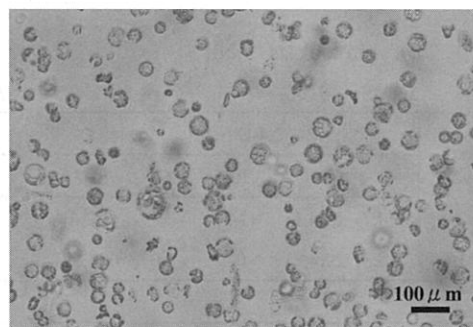


図-4. 単離されたプロトプラスト
Fig. 4. Freshly isolated protoplasts

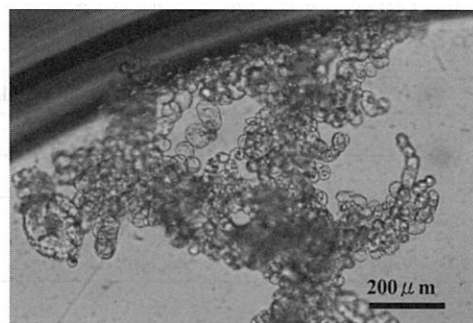


図-5. 分裂して形成されたコロニー
Fig. 5. Regenerated colonies from protoplasts

表-1. プロトプラスト単離効率
Table 1. Isolation rate of protoplasts

酵素液	添加酵素			収量 [個/gFW]	生存率 [%]
	C.R.S [%]	P.Y-23 [%]	M.R-10 [%]		
A	1	0.1	0.5	8.3×10^6	94
B	1	0.1		3.6×10^6	94
C	1		0.5	1.5×10^6	92
D	1		1	1.3×10^6	88

表-2. ウェルに置床したプロトプラスト数に対するコロニー形成数

Table 2. Number of colonies derived from protoplasts [protoplasts / well]

60 [protoplasts / well]						6 [protoplasts / well]					1.8 [protoplasts / well]				
1/2MS						1/2MS					1/2MS				
BAP	2,4-D [μ M]					2,4-D [μ M]					2,4-D [μ M]				
[μ M]	1	10	30	60	90	1	10	30	60	90	1	10	30	60	90
1	33(4.7)	27(4.1)	1(1.4)	0	2(2.4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	33(8.3)	29(4.5)	0	0	0.5(.58)	0	0	0	0	0	0	0.3(0.5)	0	0	0
NAA [μM]						NAA [μM]					NAA [μM]				
[μ M]	1	10	30	60	90	1	10	30	60	90	1	10	30	60	90
1	7(0)	0	0	0	0	0.3(0.5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	7(1.6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1/2MS+G						1/2MS+G					1/2MS+G				
BAP	2,4-D [μ M]					2,4-D [μ M]					2,4-D [μ M]				
[μ M]	1	10	30	60	90	1	10	30	60	90	1	10	30	60	90
1	0.8(1.0)	9.8(3.9)	27.5(4.2)	21.3(6.8)	5.8(0.5)	0	0.3(0.5)	2.8(1.3)	2.5(2.6)	0.5(0.6)	0	0	0	0.3(0.5)	0
10	0.3(0.5)	6.5(5.3)	22(1.7)	22(9.9)	7.5(3.0)	0	0	2.3(1.5)	1.3(0.5)	0.3(0.5)	0	0	0	0.3(0.5)	0
NAA [μM]						NAA [μM]					NAA [μM]				
[μ M]	1	10	30	60	90	1	10	30	60	90	1	10	30	60	90
1	5.5(1.3)	0	0	0	0	0.8(2.6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	4(1.4)	0	0	0	0	2.3(0.5)	0	0	0	0	0.3(0.5)	0	0	0	0
DCR+G						DCR+G					DCR+G				
BAP	2,4-D [μ M]					2,4-D [μ M]					2,4-D [μ M]				
[μ M]	1	10	30	60	90	1	10	30	60	90	1	10	30	60	90
1	0	0.3(0.5)	11(3.0)	18(5.3)	24(1.9)	0	0	0.3(0.5)	1(1.2)	0.75(0.96)	0	0	0	0	0
10	0	0.3(0.5)	11(6.4)	20(7.9)	22(3.4)	0	0	1(0.8)	0.3(0.5)	0.8(1.5)	0	0	0	0	0
NAA [μM]						NAA [μM]					NAA [μM]				
[μ M]	1	10	30	60	90	1	10	30	60	90	1	10	30	60	90
1	4.3(1.0)	0	0	0	0	0.8(1.5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	3.3(1.0)	0	0	0	0	1(1.4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* 各数値は4回繰り返しの平均、括弧内の数値は標準偏差。培地には0.6M マンニトールを含む。