

ポプラ培養苗の葉肉細胞と遊離細胞の培養

Culture of poplar cells derived from mesophyll tissue and suspensions

細井佳久^{*1}・伊ヶ崎知弘^{*1}・二村典宏^{*1}・西口満^{*1}・丸山 E. 毅^{*1}Yoshihisa Hosoi^{*1}, Tomohiro IGASAKI^{*1}, Norihiro FUTAMURA^{*1}, Mitsuru NISHIGUCHI^{*1} and Tsuyoshi E. MARUYAMA^{*1}

*1 森林総合研究所

Forestry and Forest Products Research Institute, Tsukuba 305-8687

要旨: ゲノム編集や遺伝子組換えを行うことを目的とした細胞培養系開発のため、クロポプラとギンドロについてシュートカルチャーの葉から単離したプロトプラストの培養を行った。また、シュートカルチャーの葉、葉柄、葉軸の各切片について液体振とう培養により遊離細胞の誘導を行い、部位別の細胞の形態を比較した。その結果、葉切片から誘導した細胞では、培養開始2,3週間程度では、遊離して肥大しただけで分裂していない細胞が多く観察された。増殖させた培養細胞から酵素処理により単離したプロトプラストの培養を行い、コロニーを得た。さらに遊離細胞については分裂前の単一細胞を96ウェル培養プレートで1細胞ずつ液体培養し、分裂細胞が得られることを確認した。単一細胞から細胞壁のみを酵素により取り除いた状態のプロトプラストや、遊離細胞の分裂前の単一細胞からの植物体再生が可能となれば、顕微鏡下での遺伝子導入に関わるマイクロマニピュレーション後の細胞培養が、キメラ化を回避して可能となる。

キーワード: ギンドロ、クロポプラ、プロトプラスト、細胞培養

Abstract: For the purpose of genome editing and genetically modifying about black poplar and white poplar, the isolated protoplasts from leaves of the shoot culture were cultured. In addition, suspension cells were derived from fine section of leaves, stems and petioles of the shoot culture by liquid shaking culture. During and after culture, the form of cells according to the part was compared by observation using a microscope. After two or three weeks of culture, many cells which were not divided only by enlargement were obtained from fine section of leaves. Protoplasts isolated from suspension cells were cultured and formed colonies. Furthermore, single cell before the division were cultured by 1 cell per 1 well in 96 well culture plates and confirmed cell division and colony formation. If the plant regeneration from a single cell before the division or a protoplast without the cell wall is enabled, a cell culture avoiding chimerization will be enabled after the micromanipulation to be concerned with the gene introduction.

Keywords: *Populus alba*, *Populus nigra*, protoplast, cell culture

I はじめに

筆者らは、内閣府の「SIP 次世代農林水産業創造技術」のプロジェクトにおいて、「CRISPR / Cas9 を用いたポプラのゲノム編集技術の開発」という課題で研究を進めている。本課題においては、ポプラやスギについて様々な遺伝子導入法によりゲノム編集を行い、植物体再生させることを目的としている。その際、ゲノム編集後の細胞を、キメラ化を回避して個々の細胞ごとに植物体を作成することは重要である。筆者らは、これまで針葉樹の細胞についてマイクロマニピュレーターを介して単一細胞からの再分化系の開発を行ってきた(1, 2)。今回は、ポプラについて分裂面を持たない単一の細胞と、葉肉や培養細胞から単離したプロトプラストについて分裂細胞を得るための培養条件を検討した。実験材料には、ギンドロ(*Populus alba*)

とクロポプラ(*Populus nigra*)を用い、組織培養と、プロトプラストを含めた細胞培養を行った。

II 方法

1. 実験材料 ギンドロについては、2014年10月に茨城県つくば市内の森林総合研究所構内に生育する成木個体から誘導したフラスコ苗を用いた。クロポプラについては、森林総合研究所の人工気象室内で育成中のポット苗から、2014年1月に誘導したフラスコ苗を用いた。フラスコ苗は、培地条件についてはギンドロの場合、6 μ M IBAを添加し、硝酸アンモニウム濃度を1/4に下げ、他の無機塩濃度を1/2に下げたMS寒天培地を用いた。クロポプラは1 μ M IBAと5 μ M GA3を添加したMS寒天培地を用いた。培養は、2種とも16時間蛍光灯照明下、25 $^{\circ}$ C、湿度55%に保った培

養室で行った。

2. 葉肉細胞からのプロトプラストの単離・培養 ギンドロについて、酵素液の組成を 0.6M マンニトール、1% セルラーゼオノズカ RS、0.25%ペクトリアーゼ Y-23 とし、100ml 広口培養フラスコに酵素液 30ml を入れ、細断した葉を入れて約 4 時間静置して処理した。プロトプラストの回収は、40 μ m のナイロンメッシュで濾過して未消化な組織を除去し、80rpm. で 3 分間遠心分離した後、沈殿した部分を 0.6M マンニトール中に移して洗浄し、再度 80rpm. で 3 分間遠心分離することにより行った。クロポプラについても手順は同様であるが、遠心を 50rpm. で行った。培養については、ギンドロの場合、浸透圧を 0.6M マンニトールで調整し、1/2MS、硝酸アンモニウム無添加の MS、MS の 3 つの基本の液体培地に 2,4-D と、サイトカイニンとして BAP と Zeatin のどちらかを組み合わせて添加し、細胞の分裂条件を比較した。培養密度は 2×10^3 プロトプラスト/ml とした。培養は 96 ウェル培養プレートを用い、暗黒下、28°C で行った。1 ウェルの培地量は 50 μ l とした。クロポプラの場合、10 μ M 2,4-D に、3 μ M BAP あるいは 3 μ M Zeatin を添加した硝酸アンモニウム無添加の MS、硝酸アンモニウム濃度を 1/8 濃度に下げた MS の 2 つの基本培地で培養した。培養密度は 5×10^2 プロトプラスト/ml とした。培養は 24 ウェル培養プレートを用い、暗黒下、28°C で行った。1 ウェルの培地量は 500 μ l とした。2 種のポプラともコロニーについては、培養開始 1 ヶ月後に 5 分裂以上細胞分裂を繰り返しているものをカウントした。

3. フラスコ苗からの培養細胞の誘導 ギンドロ、クロポプラともに葉、葉柄、葉軸について、葉は 4mm 角程度、葉柄や葉軸については長さ 8mm 程度に細断し、10 μ M 2,4-D を添加した 20ml の MS 液体培地で 100ml 広口培養フラスコを用いて培養した。培養は、25°C、暗黒下、60rpm. で振とう培養した。

4. 培養細胞の単一細胞培養 クロポプラの葉切片から誘導した培養細胞について、10 μ M 2,4-D と 3 μ M BAP を添加した MS 液体培地を用い、96 ウェル培養プレートでウェルあたり 1 細胞になるよう調整し、培養した。培養は暗黒下、25°C で行った。

5. 培養細胞から単離したプロトプラストの培養 ギンドロ、クロポプラともにプロトプラスト単離と培養方法は、葉肉細胞の場合と同様の手順で行った。ギンドロの葉柄由来の培養細胞について、0.6M マンニトールを含む MS 液体培地に 10 μ M 2,4-D と、サイトカイニンとして 3 μ M BAP あるいは 3 μ M Zeatin のどちらかを組み合わせて添加し、細胞の分裂効率を比較した。クロポプラの葉柄由来の培養細胞については、0.6M マンニトールを含む MS 液体培地に

10 μ M 2,4-D と、0.1 μ M あるいは 1 μ M BAP を添加して培養した。培養密度は、2 種とも 10^4 プロトプラスト/ml とし、24 ウェル培養プレートで暗黒下、28°C で培養した。

III 結果と考察

1. 葉肉細胞から単離したプロトプラストの培養 ギンドロについて、培養開始 1 ヶ月後の結果を表-1 に、単離直後のプロトプラストと細胞壁を再生した細胞を図-1 に示した。30 μ M 2,4-D と 3 μ M Zeatin を添加し、無機塩を 1/2 濃度に下げた MS 培地で培養した場合に最もコロニー形成数が多くなり、15 個のコロニーが得られ、培養効率は 15% であった。クロポプラのプロトプラストと増殖中のコロニーを図-2 に示した。コロニー形成数については、表-2 に示した。培地としては、硝酸アンモニウム無添加の MS 培地で、サイトカイニンとして Zeatin を用いた場合にコロニー形成が多く見られ、最高 32% の培養効率であった。2 種のポプラともサイトカイニンとして用いる場合、Zeatin の有効性が認められた。また、クロポプラの方が低密度で培養しているにもかかわらず、培養効率ではギンドロの倍以上であり、少数細胞の培養に向いているようである。マイクロインジェクション等の遺伝子導入処理後には少数の細胞を低密度で培養できた方が都合がよいため、クロポプラの方がより実験材料として適しているようである。

2. フラスコ苗から誘導した培養細胞の形状 ギンドロ、クロポプラともに葉切片を培養した場合、2、3 週間後までは切片から肥大しながら遊離してくる細胞がほとんどで、分裂面がなく、単一の細胞の状態であった (図-3)。このような細胞は、遺伝子導入処理後にキメラ化を回避しながら培養するのに非常に都合がよい。ただし、細胞によっては遊離後に増殖しない場合もあるため、その後の細胞の顕微鏡観察を行った。その結果、問題なく分裂増殖可能であることを確認した。葉柄や葉軸切片から遊離した細胞は、培養初期から葉切片よりも旺盛に分裂を繰り返しながら増殖した (図-4)。

3. 葉切片由来の単一細胞の培養 クロポプラの葉切片由来の単一細胞について培養したところ、15% の効率 (9 細胞/60 ウェル) でコロニーが得られた (図-5)。今回の実験で、遺伝子導入処理用の材料としての有用性が確認できたが、細胞分裂を開始する 2、3 週間目までに使用しなければならず、遺伝子導入実験ごとに遊離細胞を誘導し直す必要がある。

4. 葉柄由来の培養細胞から単離したプロトプラストの培養 培養結果を表-3、4 に示した。ギンドロの場合、サイトカイニンとして BAP を添加した場合、コロニーはま

まったく観察されず、コロニー形成には Zeatin が必要であることがわかった。クロポプラについては、オーキシシンとして加えた 2,4-D 濃度により、コロニー形成数に大きな差がみられた。今回は Zeatin との組合せは調べていないが、BAP 添加よりもコロニー形成数の向上がみられるかもしれない。

IV まとめ

今回の実験では、クロポプラについて単一細胞の培養により分裂が確認できたが、今後実際に遺伝子導入を行う場合には細胞へのダメージが加わるため、さらに安定した効率の良い培養条件を見つける必要があると思われる。また、形態形成させるための培養条件の検討を行う事も重要である。

謝辞

今回の報告は、27 年度 SIP プロジェクト内の国立開発研究法人農業・食品産業技術総合研究機構、戦略的イノベーション創造プログラム委託研究の成果によるものであり、関係各位の多大なご協力に感謝いたします。

引用文献

(1) MARUYAMA, E., TANAKA, T., HOSOI, Y., ISHII, K. and MOROHOSHI, N. (2000) Embryogenic cell culture, protoplast regeneration, cryopreservation, biolistic gene transfer and plant regeneration in Japanese cedar. *Plant Biotechnol.* **17**: 281-296

(2) 細井佳久・丸山エミリオ・石井克明・長谷純宏・田中淳 (2007) γ 線照射したヒノキ培養細胞からの分化. *関東森林研究* **58**: 91-94

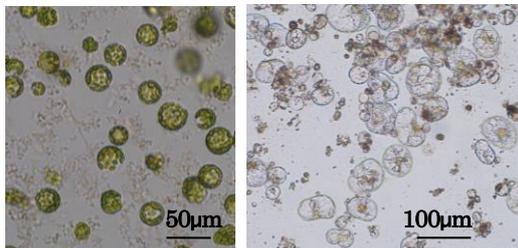


図-1. ギンドロ葉肉細胞由来のプロトプラストと細胞壁を再生した細胞
Fig.1 Protoplasts and cultured cells regenerated the cell wall of white poplar

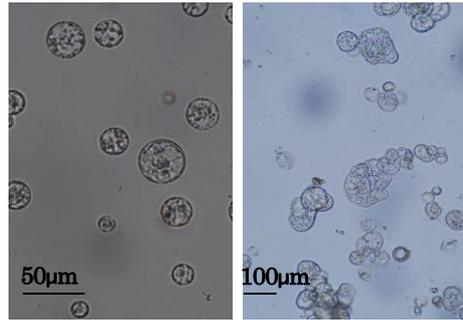


図-2. クロポプラ葉柄由来細胞から単離したプロトプラストと分裂増殖中のコロニー
Fig.2 Protoplasts isolated from cells derived from petiole tissues and proliferating colonies

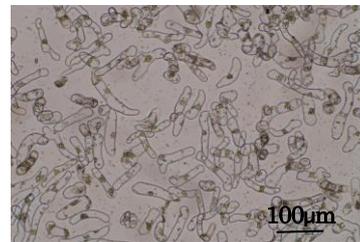


図-3. クロポプラ葉片由来の単一細胞
Fig.3 Single cells derived from leaflets of black poplar

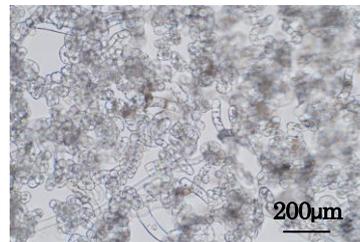


図-4. クロポプラ葉柄切片由来の培養細胞
Fig.4 Suspension culture derived from excised petiole tissues of black poplar

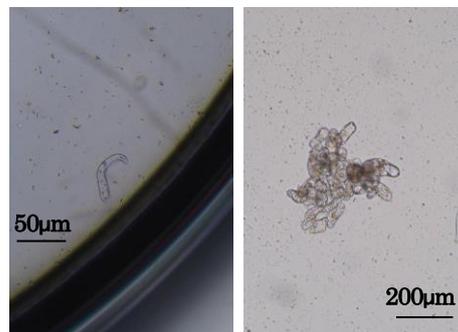


図-5. 96 ウェルプレートで分裂する単一細胞
Fig.5 A single cell cultured in a 96well plate and the dividing cells

表-1. ギンドロ葉肉由来プロトプラスト培養により得られたコロニー数

Table 1 Number of colonies proliferated from mesophyll protoplasts of white poplar

1/2MS							1/2MS						
BAP [μM]	2,4-D [μM]						Zeatin [μM]	2,4-D [μM]					
	0.3	1	3	10	30	100		0.3	1	3	10	30	100
0	0	1(2)	3.8(6.2)	8.3(5.4)	6(5.6)	8.3(5.4)	0	0	1.5(1.9)	5.3(5.2)	12.8(11.1)	10.8(5.7)	
3	0	0	0.25(0.5)	3(2)	4.3(0.96)	5.3(4.6)	3	0	2.5(3.7)	6.3(4.3)	12.5(10.5)	15(4.3)	9.5(7.3)
10	0	0	0	0.25(0)	0.5(0.58)	0.5(0.58)	10	0	0.25(0.5)	5.5(6.6)	13(10.2)	13(11.5)	4.3(2.9)
30	0	0	0	0	0	0	30	0	1.5(1.3)	3(1.4)	6(4.8)	10(7.3)	0.75(0.5)

MS(-NH ₄ NO ₃)							MS(-NH ₄ NO ₃)						
BAP [μM]	2,4-D [μM]						Zeatin [μM]	2,4-D [μM]					
	0.3	1	3	10	30	100		0.3	1	3	10	30	100
0	0	0	0.5(1)	1(2)	0.25(0.5)	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0

MS							MS						
BAP [μM]	2,4-D [μM]						Zeatin [μM]	2,4-D [μM]					
	0.3	1	3	10	30	100		0.3	1	3	10	30	100
0	0	0	0	0	0.75(0.96)	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0.25(0.5)	0.25(0.5)	0	3	0	0.25(0.5)	1(2)	0.75(0.5)	2(1.6)	0.25(0.5)
10	0	0	0	0	0	0	10	0	0.75(0.96)	1.3(1.5)	2.8(1.9)	3.8(1.7)	1(1.2)
30	0	0	0	0	0	0	30	0	0.25(0.5)	1(0.82)	1(0.82)	1(1.4)	0

*数値は4ウェルの平均コロニー形成数, 括弧内は標準偏差

表-2. クロポブラ葉肉由来プロトプラスト培養により得られたコロニー数

Table 2 Number of colonies proliferated from mesophyll protoplasts of black poplar

MS(1/8NH ₄ NO ₃) + 10 μM 2,4-D		MS(-NH ₄ NO ₃) + 10 μM 2,4-D	
3 μM BAP	3 μM Zeatin	3 μM BAP	3 μM Zeatin
20(7.7)	25.5(4.1)	40(2.8)	80.5(2.4)

*数値は4ウェルの平均コロニー形成数, 括弧内は標準偏差

表-3. ギンドロ葉柄由来培養細胞から単離したプロトプラストから生じたコロニー数

Table 3 Number of colonies proliferated from protoplasts isolated from petiole-derived suspensions of white poplar

BAP [3 μM]	Zeatin [3 μM]
0	1405 (5.1)

*共通培地組成: MS + 0.6M マンニトール + 10 μM 2, 4-D コロニー数は6ウェルの平均, 括弧内は標準偏差

表-4. クロポブラ葉柄由来培養細胞から単離したプロトプラストから生じたコロニー数

Table 4 Number of colonies proliferated from protoplasts isolated from petiole-derived suspensions of black poplar

BAP [μM]	0.1	1
コロニー形成数	2 (0.75)	27.5 (7.3)

*共通培地組成: MS + 0.6M マンニトール + 10 μM 2, 4-D コロニー数は6ウェルの平均, 括弧内は標準偏差