

## 研究ノート

## タバコプロトプラストの電気融合について

三浦靖高\*・十川好志\*\*・山田康之\*\*\*

## 1. はじめに

近年ポリエチレングリコール (PEG) 法に変わる手法として注目されている細胞の電気融合法は, 1979年, Senda らにより微小電極を用いて初めて報告された<sup>1)</sup>. 1981年, Zimmermann らは Dielectrophoresis 法<sup>2)</sup>と電気パルス法とを組み合わせた新しい融合方法を開発し<sup>3)</sup>, 1984年, Watts らは Zimmermann らの方法を改良した均一電界による方法を提唱した<sup>4)</sup>. 1985年, Kohn らは電気融合法により得た雑種細胞からシュートの分化を報告し<sup>5)</sup>, 1986年, Morikawa らは従来の PEG 法に比べ 10 倍以上高い頻度で雑種細胞を得ることに成功している<sup>6)</sup>.

電気融合により高い頻度で雑種細胞を得るためには, viability の高いプロトプラストを得ることは言うまでもなく, 使用するプロトプラストの種類に応じて, 高周波電界や高電圧パルスの電気条件を最適化する必要がある. 筆者らはこれまでタバコ葉肉プロトプラストを用いて高周波電界のパールチェーン形成への影響, および高電圧パルスの雑種コロニー形成への影響について検討をおこなってきたが<sup>7)</sup>, 若干の知見を得たのでここに報告する.

## 2. 材料と方法

播種後, 温室内 (約 28°C) で 40~60 日間栽培した *Nicotiana glauca* および *Nicotiana langsdorffii* の完全展開葉を用いてプロトプラストを単離した. まず 70% エタノールと 1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で表面殺菌した葉の裏面の表皮をピンセットを用いて剝し, メスでその部分を切り取った. 浸透圧調節剤として 0.225 M Sorbitol と 0.225 M Mannitol を含む To 基本培地<sup>8)</sup>に溶解した酵素液 (0.1% Cellulase Onozuka R-10, 0.05% Driselase, 0.02% Macerozyme, pH 5.8) をシャーレに入れ, 上記の葉片の皮を剝した方を下にして酵素液に浸した. シャーレはパラフィルムで封止し, 27°C, 暗黒下で約 15 時間静置してプロトプラストの単離を行った (*N. langsdorffii* 葉からのプロトプラストの単離は, 上記酵素液の 2 倍濃度のものを用いた). 未消化の組織や維管束の断片をこしとるため, 酵素液を 62  $\mu\text{m}$  のナイロンメッシュを通して濾過した. 酵素液を取り除くため, 濾過した酵素液を遠心管に分注し, 45 $\times$ g, 3 分間遠心の後, 上清を捨てた. 次に, 洗浄液 (2.5 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.225 M Sorbitol, 0.225 M Mannitol を含む) を加え, 静かに傾けてプロトプラストを懸濁し, 再び同じ条件の遠心をかけた後に上清を捨てた. プロトプラストを精製するため, あらかじめ遠心管に 2.5 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  を含む 20% ショ糖溶液を用意し, 少量の洗浄液に懸濁したプロトプラストをショ糖溶液上に重層し, 180 $\times$ g, 3 分間遠心した. 境界面上に緑色の帯となったプロトプラストを液面を乱さないように取り, 洗浄液中に静かに入れた. さらに 45 $\times$ g, 3 分間遠心後上清を捨て, プロトプラストの密度を血球計算盤を用いて  $2.5 \times 10^4$  個/ml に調整した後, 使用時まで 4°C で保存した.

## (1) 高周波電界のパールチェーン形成への影響

以下の実験はすべて島津細胞融合装置 SSH-1<sup>7)</sup> を用いて室温で行った.

*N. glauca* プロトプラスト懸濁液 40  $\mu\text{l}$  を融合チャージャー (SSH-C 13, 電極間隔 2 mm) 内へ入れ, 3 分間

\* Yasukata MIURA, \*\*Yoshiyuki TOGAWA and \*\*\*Yasuyuki YAMADA: Electrofusion of *Nicotiana* Protoplasts

\* (株)島津製作所中央研究所 (〒604 京都市中京区西ノ京桑原町 1)  
Central Research Laboratory, Shimadzu Corporation  
(1 Nishinokyo-Kuwabaracho, Nakagyo-ku, Kyoto 604)

\*\* (株)島津製作所バイオ機器部 (〒604 京都市中京区西ノ京桑原町 1)  
Biotechnology Instruments Department, Shimadzu Corporation  
(1 Nishinokyo-Kuwabaracho, Nakagyo-ku, Kyoto 604)

\*\*\* 京都大学農学部生物細胞生産制御実験センター (〒606 京都市左京区北白川追分町)  
Research Center for Cell and Tissue Culture,  
Faculty of Agriculture, Kyoto University (Oiwakecho, Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto 606)

静置した。次に電界強度を 100 V/cm に固定し、周波数を 0.25 MHz, 1 MHz, 2 MHz に変化させた高周波電界、あるいは周波数を 1 MHz とし、電界強度を 25 V/cm, 50 V/cm, 75 V/cm, 100 V/cm に変化させた高周波電界をそれぞれ 10 秒間プロトプラスト懸濁液に印加し、形成されたパールチェーンを倒立顕微鏡を用いて観察した。

### (2) 高電圧パルスの雑種コロニー形成への影響

*N. glauca* と *N. langsdorffii* プロトプラスト懸濁液 (2.5 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.225 M Sorbitol, 0.225 M Mannitol を含む) を遠心管に同量ずつ混合し、遠心管を静かに傾けてプロトプラストを分散させた後、混合液 1 ml を融合チャンバー (SSH-C 04, 電極間隔 4 mm) 内に入れ、3 分間静置した。次に周波数 1 MHz, 電界強度 50 V/cm に設定した高周波電界をプロトプラスト懸濁液に 10~30 秒間印加してパールチェーンを形成させた後 (すべてのプロトプラストがパールチェーンの形成に関与するように電界印加時間を調節する), 特定の電界強度 (0.2 kV/cm~1 kV/cm) とパルス幅 (30 μsec~200 μsec) を持つ高電圧パルスを懸濁液に 1 回印加した。パルス印加後 20 分間チャンバーを静置した後、プロトプラスト懸濁液を静かに吸い取り、直径 35 mm のプラスチックシャーレに移植した。0.225 M Sorbitol, 0.225 M Mannitol, 4% ショ糖, 6 mg/l NAA (ナフタレン酢酸), 2 mg/l BA (ベンジルアデニン) を含む 2 倍濃度の To 液体培地 (pH 5.8) 1 ml でチャンバー内に残ったプロトプラストをシャーレ内に回収した後、27°C, 4,500 lux (12 hr/day) で静置培養を行った。なお、酵素液、洗浄液および培地はすべて濾過滅菌したのを用いた。

培養後 1 週間目に 3% ショ糖, 3 mg/l NAA, 1 mg/l BA を含む To 液体培地 500~600 μl をシャーレ内に添加した。さらに 1 週間後、直径 1~2 mm に成長した緑色コロニーをホルモン無添加の To 液体培地 (3% ショ糖を含む) に移植し、選択培養を行った (*N. glauca* と *N. langsdorffii* の融合細胞は植物ホルモンを含まない培地でも生育が可能である<sup>9)</sup>)。選択培地に移植後 1 週間目に 500~600 μl のホルモン無添加の培地を添加し、さらに 1 週間後、コロニーを同様の組成の寒天培地に移植した。寒天培地に移植して 2 週間後に緑色で旺盛に成長しているコロニー数を計数し、全プロトプラスト数に対するコロニー形成率を求めた。

## 3. 結果および考察

### (1) 高周波電界のパールチェーン形成への影響

周波数が 0.25 MHz の時、プロトプラストはほとん

ど泳動を行わず、パールチェーンを形成しなかった。0.5 MHz の時、プロトプラストは低速の回転運動を呈しながら泳動し、パールチェーンを形成した。1 MHz, 2 MHz の時はプロトプラストは回転することなく泳動し、良好にチェーンを形成した。しかしながら 0.5 MHz から 2 MHz の周波数の間ではパールチェーンの形成への影響にはほとんど差が認められず、全プロトプラストの約 50% がパールチェーン形成に関与した。Bates らの報告<sup>10)</sup>によると、プロトプラストの回転現象は、0.1 MHz 以下の周波数で多く観察され、プロトプラスト間の接着を弱めて融合を阻害する。植物プロトプラストを用いた実験では、0.5 MHz から 3 MHz の間の周波数がよく利用されている<sup>3,4,10,11,13)</sup>。

高周波電界強度の影響をみると、25 V/cm ではプロトプラストの泳動は認められなかった。50 V/cm の時では全プロトプラストの約 25% しかパールチェーンを形成しなかったのに対し、75 V/cm, 100 V/cm では約 50% のプロトプラストがパールチェーンの形成に関与しており、2 個以上のプロトプラストからなる長いパールチェーンの形成する頻度も高くなった。すなわち、電界強度が高いほどプロトプラストは泳動しやすかった。しかしながら、電界強度が高すぎるとプロトプラストの形状がくずれて細胞破壊が発生しやすくなる<sup>5)</sup>、さらにはプロトプラストの泳動をコントロールすることが難しくなる。またプロトプラストの泳動は懸濁液中の塩濃度によって大きく左右され、5 mM 以上の CaCl<sub>2</sub> を添加した場合には無添加時にくらべてパールチェーンの形成が著しく阻害された (懸濁液導電率の上昇による細胞膜表面の分極能力の低下<sup>12)</sup>およびジュール熱による熱対流のためによると考えられる)。通常 50 V/cm 以上の電界強度が用いられる<sup>3,4,10,11,13)</sup>。

### (2) 高電圧パルスの雑種コロニー形成への影響

Fig. 1 に高電圧パルス (方形波) 電界強度とパルス幅の変化に伴う雑種コロニー形成率の変動を示す。雑種コロニー形成率は、電界強度が 0.8 kV/cm, パルス幅が 50 μsec の高電圧パルスを印加した時が最も高く、0.28% であった (プロトプラスト融合率は約 10%)。この雑種コロニー形成率は、同じ植物材料を用いた PEG 法による値 ( $5 \times 10^{-5}$ )<sup>8)</sup>、減衰波パルス (電界強度 1 kV/cm, 時定数 100~200 μsec) による値 (0.1%)<sup>6)</sup> に比べて高い値である。電界強度が 0.4 kV/cm 以下ではプロトプラストはほとんど融合せず、1 kV/cm ではプロトプラストの融合率は高いが、雑種コロニー形成率は低かった。パルス幅は 30 μsec, 50 μsec が適当で、100 μsec, 200 μsec では雑種コロニー形成率が低かった。

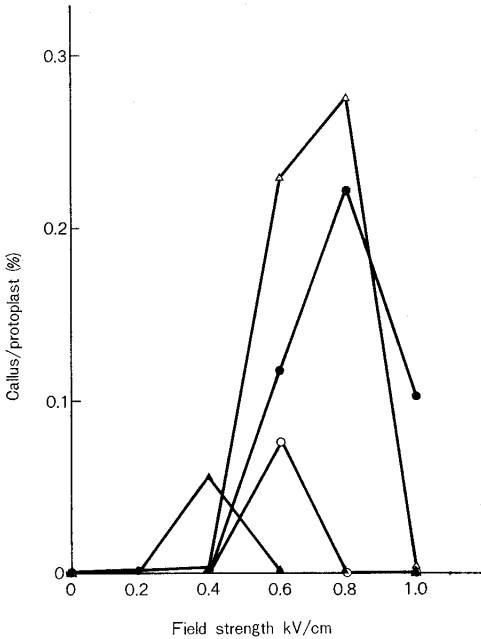


Fig. 1. Effect of DC square-wave pulse on formation of hybrid callus

● 30  $\mu$ sec,  $\Delta$  50  $\mu$ sec, ○ 100  $\mu$ sec,  
▲ 200  $\mu$ sec

融合に最適な高電圧パルスの電気条件はプロトプラストの由来により若干変化する。Kohnらの *N. tabacum* 培養細胞由来のプロトプラストを用いた実験<sup>5)</sup>では、電界強度 1.2 kV/cm~1.5 kV/cm, パルス幅 50  $\mu$ sec の方形波パルスを印加することで融合細胞が得られている。Bates らの *N. plumbaginifolia* 培養細胞由来のプロトプラストと *N. tabacum* 葉肉プロトプラストの融合では、電界強度 1 kV/cm, パルス幅 50  $\mu$ s の方形波パルスを印加することにより体細胞雑種が得られている<sup>12,13)</sup>。

融合には他に懸濁液中の組成 (特に浸透圧と塩濃度) や温度などの影響が考えられる。浸透圧を高くすると、融合率は低下した。CaCl<sub>2</sub> を添加すると、パルス印加時

に細胞破壊を防ぎ、融合率を上昇させることができたが、高濃度では細胞の泳動を阻害した。温度の影響をみると、高温 (30°C~35°C) ではパルス印加時に細胞破壊が起こりやすかった。

さらにはプロトプラストを単離後プロトプラストを室温で放置すると、時間の経過とともに融合率の低下が認められた。しかしながら、プロトプラスト単離後直ちに 4°C で保存すると少なくとも 3~4 時間は単離直後と同程度の融合率を維持することができた。

以上のようにして得られた融合細胞からは茎葉の分化も認められ、幼植物を得ることができた。

(1988年1月13日受理)

## 文 献

- 1) Senda M., J. Takeda, S. Abe, T. Nakamura, 1979. *Plant Cell Physiol.*, **20**: 1441.
- 2) Pohl, H. A., 1978. *Dielectrophoresis*, Cambridge University Press, Cambridge.
- 3) Zimmermann, U., P. Scheurich, 1981. *Planta*, **151**: 26.
- 4) Watts, J. W., J. M. King, 1984. *Biosci. Rep.*, **4**: 335
- 5) Kohn, H., R. Schieder, O. Schieder, 1985. *Plant Sci.*, **38**: 121.
- 6) Morikawa, H., K. Sugino, Y. Hayashi, J. Takeda, M. Senda, A. Hirai, Y. Yamada, 1986. *Bio/Technology*, **4**: 57.
- 7) 十川好志, 戸田健三, 高山慎一郎, 三浦靖高, 望月崇孝, 岩崎 功, 1987. *島津評論*, **44**: 17.
- 8) Chupeau, Y., C. Missonier, M.-C. Hommel, J. Goujaud, 1978. *Mol. Gen. Genet.*, **165**: 239.
- 9) Carlson, P. S., H. H. Smith, R. D. Dearing, 1972. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**: 2292.
- 10) Bates, G. W., J. J. Gaynor, N. S. Shekhawat, 1983. *Plant Physiol.*, **72**: 1110.
- 11) Zachrisson, A., C. H. Borman, 1984. *Physiol. Plant.*, **61**: 314.
- 12) Bates, G. W., 1985. *Planta*, **165**: 217.
- 13) Bates, G. W., C. A. Hasenkampf, 1985. *Theor. Appl. Genet.*, **70**: 227.