

Duboisia 属植物培養細胞のプロトプラストの培養と再分化

北村美江・森川 隆・梅野尚生・三浦博史

長崎大学薬学部

(〒852 長崎市文教町 1-14)

(1989年6月26日受付)

(1989年8月7日受理)

オーストラリア原産の本木である *Duboisia* 属植物には, *D. myoporoides* (Dm), *D. leichhardtii* (Dl), *D. hopwoodii* (Dh) の三種が存在する。このうち, トロパノアルカロイドの原料植物として用いられている Dm と Dl は, 東海岸の比較的雨量の多く, 暖かな所に生育している¹⁾。一方, Dh は西部および中央部の砂漠地帯に自生しており¹⁾, その生育環境からみて耐塩性, 耐干性等の形質を持つ貴重な資源植物と考えられる。

これら *Duboisia* 属植物の細胞育種を目指す場合, プロトプラストの培養法の確立が必要となる。Dh 培養細胞のプロトプラストの培養についてはすでに遠藤らによって検討され²⁾, われわれも Dm について報告した³⁾。本報では, *Duboisia* 種間でのプロトプラストの特性を比較するため, Dm と Dh に加えて, これまで報告のない Dl 培養細胞のプロトプラストの培養についても検討した。その結果, Dm のプロトプラストの培養には組成の明らかでない coconut water や conditioned medium の培養液への添加を必要としたのに対し, Dl や Dh のプロトプラストではこれらを含まない完全合成培地で培養が可能であることを示した。また, 培養時に必要なプロトプラストの密度, コロニー形成までに要する期間および再分化能について, これら三種間での相違を明かにしたので以下に報告する。

1. 材料および方法**(1) 懸濁培養細胞系の確立**

Dm と Dl は発芽後 2~3 カ月の実生苗の茎の切片を 2,4-D 1 mg/l と kinetin 0.01 mg/l を含む Murashige-Skoog (MS)⁴⁾ 固形培地 (寒天 0.8% または Gellan Gum 0.2% 含有) に置床し, 25°C, 暗所で培養してカルスを誘導した。以後, 同組成の培地で 1 カ月ごとに継代した。Dh は培養根より NAA 3.8 mg/l と BA 0.4

mg/l を含む Gamborg B5 (B5)⁵⁾ 培地で誘導, 継代したカルス (Dh-1S) を京都大学農学部生物細胞生産制御実験センターより入手し, 当研究室では 2,4-D 1 mg/l を含む MS 固形培地で継代培養したものをを用いた。

これら三種のカルスをそれぞれ 2,4-D 1 mg/l を含む MS 液体培地に移し, 25°C, 散光下 ($2.0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), 100 rpm で振とう培養した。得られた懸濁培養細胞は培養開始当初は 7~10 日後に, その後は 5 日ごとに同一組成の培地で継代した。

(2) プロトプラストの分離

継代後 4 日目の懸濁培養細胞を次のプロトプラスト分離液 (PI 液) に浸し, 振とう器で 40 rpm, 20 min 振とう後, 25°C, 暗所で 20 hr 処理して分離した。PI 液: Cellulase Onozuka R-10 1~1.5%, Dricelase 1~1.5%, Pectolyase Y-23 0.2~0.3%, glucose 9%, CaCl₂ 3.4 mM, NaH₂PO₄ 0.35 mM, DTT 2 mM, プロトプラストの分離に用いた培養 4 日目の培養細胞を除いて得られた conditioned medium 50% (Dm, Dl および Dh の培養細胞には, それぞれに対応する conditioned medium を用いた), pH 5.5。

(3) プロトプラストの培養

プロトプラストを含む PI 液はガーゼ 3 枚で濾過し, 140×g, 2 min 遠心分離して PI 液を除去した。その後, プロトプラスト培養液 (PC 液) (Table 1) を加え, 遠心分離して 2 回洗浄した。さらに, CaCl₂ 3.4 mM, NaH₂PO₄ 0.35 mM を含む 20% sucrose 溶液上にプロトプラスト懸濁液を加え, 560×g, 5 min 遠心分離した。その後, 界面に存在するプロトプラストを集め, PC 液で 1 回洗浄した。プロトプラスト数は血球計算盤で計数し, 10⁴~5×10⁵ 個/ml の密度で培養した。培養は, 60×15 mm のシャーレの中央に約 0.05 ml のプロ

Table 1. Components of culture media for protoplast, colony and callus of *Duboisia* species (1,000 ml).

Component	Protoplast culture med.	Colony culture med.	Callus culture med.
Basal medium ^{a)}	B 5 ^{b)}	B 5 ^{b)}	MS ^{d)}
NH ₄ NO ₃	250 mg	250 mg	—
CaCl ₂ ·2H ₂ O	630 mg	630 mg	—
L-Glutamine	580 mg	580 mg	—
Casamino acids	250 mg	250 mg	—
D-Ribose	250 mg	250 mg	—
Ascorbic acids	1 mg	1 mg	—
Ca-pantothenate	1 mg	1 mg	—
2,4-D	1 mg	1 mg	1 mg
Zeatin	1 mg	1 mg	—
Glucose	72 g	36 g	—
Sucrose	—	—	30 g
Coconut water ^{b)}	0~20%	—	—
Conditioned medium ^{c)}	0~50%	—	—

^{a)} Mineral salts and vitamins are not modified.

^{b)} It is collected from fresh ripe coconuts by drilling a hole through one of the germination pores; the liquid is heated to 80°C and then filtered.

^{c)} Conditioned media isolated from Dm, Dl and Dh cell suspension cultures are used for culture of Dm, Dl and Dh protoplasts, respectively.

プロトプラスト懸濁液を置き、乾燥を防ぐために周囲に PC 液を置く液滴法を用い、25°C、暗所でおこなった。

得られたコロニー（直径 1 mm 以下）は、コロニー培養培地（Table 1）に移すか、この培地で希釈して直径 3~5 mm にまで生長させた。その後、カルス培養用固形培地（Table 1）に移し、カルスを形成させた。

(4) カルスからの植物体再生

プロトプラスト由来カルスの一部を BA 5 mg/l を含む MS 固形培地に置床し、25°C、明所 (15.6 μmol m⁻²s⁻¹) で培養し、8 週間ごとに継代してシュートを形成させた。得られたシュートは IBA 5 mg/l を含む MS 固形培地に移して 2 週間培養後、ホルモン抜き MS 固形培地に移植して発根させた。

2. 結 果

(1) プロトプラストの分離と培養

Dm, Dl, Dh のいずれのカルスからも、増殖が早く、均質で小さい細胞塊よりなる懸濁培養細胞系を確立した。継代 5 代未満の培養細胞より分離したプロトプラストは比重が軽く遠心操作によって回収できず、また、継代 30 代以降のものは次第に細胞塊の大きさが不均一

Table 2. Requirements of conditioned medium (CM) and coconut water (CW) in PC medium, protoplast density in culture and culture periods for colony formation of *Duboisia* species.

Spp.	Components of PC medium		Protoplast density (/ml)	Culture periods (week)
	CM	CW		
Dm	10 ≤	5~10	2.5 × 10 ⁵ ≤	4 ≤
Dl	—	—	2.5 × 10 ⁵ ≤	4 ≤
Dh	—	—	5.0 × 10 ⁴ ≤	2 ≤

Dm, *D. myoporoides*; Dl, *D. leichhardtii*; Dh, *D. hopwoodii*.

となり、収量が低下する傾向がみられた。継代 5~30 代の Dm と Dl の懸濁培養細胞からは 1~2 × 10⁶ 個/g fresh weight の、Dh からは 2~5 × 10⁵ 個/g fresh weight のプロトプラストが得られた。

プロトプラストを PC 液 (Table 1) で培養すると、Dm と Dl は同様な培養経過を示し、2~3 日目に細胞壁の再生が、3~6 日目に第一分裂が観察された。7~10 日目に第二分裂が、2 週間後には多分裂が見られ、その後も分裂、増殖を続けて 4~6 週間後に肉眼で確認できるコロニー（直径 1 mm 以下）を形成した。Dh は、Dm や Dl より早い増殖を示し、2 週間でコロニーが得られた。

(2) 種間でのプロトプラスト培養条件の相違

Dm では、コロニー形成にプロトプラスト培養液への conditioned medium と coconut water の添加が不可欠であった³⁾。そこで、Dl や Dh のこれらの要求性を調べるために、conditioned medium 0~50%、coconut water 0~20% を組み合わせ PC 液に添加して培養を行ったところ、Dl と Dh のいずれも両者がなくてもコロニーを形成した (Table 2)。ただし、これらを添加して培養したときのほうがコロニーの形成は旺盛だった。

コロニー形成には培養時のプロトプラストの密度が重要な役割を果たすと考えられる。そこで、コロニー形成に必要な最低培養密度を調べるために 10⁴、5 × 10⁴、10⁵、2.5 × 10⁵、5 × 10⁵ 個/ml の密度でプロトプラストの培養を行った。その結果、Dm と Dl はコロニー形成に 2.5 × 10⁵ 個/ml 以上の密度を必要としたのに対し、Dh は 5 × 10⁴ 個/ml でもコロニーを形成した (Table 2)。

(3) カルスの形成と植物体再生

三種のプロトプラスト由来コロニー（直径 1 mm 以下）はそのまま PC 液で培養すると褐変をおこし増殖しなかった。そこで培養液の組成を段階的に変えることでコロニーからカルスを形成させた。PC 液の condi-

tioned medium と coconut water を除き、浸透圧剤の濃度を 0.4 M から 0.2 M に減らして調整したものをコロニー培養液 (Table 1) として用いた。この液にコロニーを移植するか、またはこの液を加えてコロニーを希釈培養すると、コロニーは増殖し直径 3~5 mm 程度の大きさに生長した。この後、2,4-D 1 mg/l を含む MS 固形培地 (Table 1) に移すと 1 カ月以内にカルスを形成した。このようにして、それぞれ 100 個のプロトプラスト由来カルスを得た。

三種のプロトプラスト由来カルスを BA 5 mg/l を含む MS 固形培地に移植し、明所で 8 週間ごとに継代すると、早いものでは 2 カ月以内にシュートを形成した。6 カ月後のシュート形成率は、Dm と D1 がそれぞれ 91%、100% であったのに対し、Dh はこの条件では分化能を示さなかった。

Dm と D1 のシュートはさらに発根処理したところ、いずれも発根し植物体を再生した。

3. 結 論

Duboisia 属植物三種 (Dm, D1, Dh) のすべてについて、培養細胞由来のプロトプラストからコロニーを形成させることができた。ただし、コロニー形成に必要な培養時のプロトプラストの密度や、培養液への conditioned medium や coconut water の添加の要求性に種

間で差異が認められた。得られたコロニーは段階的に培養することでカルスに増殖した。このカルスから Dm と D1 は植物体を再生したが Dh は再分化能を示さなかった。

以上、細胞融合や遺伝子導入といったプロトプラストを用いる実験系にいずれの *Duboisia* 属植物も使用できることを示した。また、種間でのプロトプラストの培養条件や分化能の相違は、*Duboisia* の種間雑種の選抜に利用できる可能性を示した。

Dh のカルスを分与していただきました京都大学農学部生物細胞生産制御実験センターの山田康之教授、遠藤剛博士に深謝致します。

文 献

- 1) Barnard, C., 1952. *Econ. Bot.*, **6**: 3-17.
- 2) Endo, T., T. Komiya, Y. Masumitsu, H. Morikawa, Y. Yamada, 1987. *J. Plant Physiol.*, **129**: 453-459.
- 3) Kitamura, Y., T. Morikawa, H. Miura, 1989. *Plant Sci.*, **60**: 245-250.
- 4) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- 5) Gamborg, O. L., R. A. Miller, K. Ojima, 1968. *Exp. Cell Res.*, **50**: 151-158.

Summary

Culture and Regeneration of Protoplasts from Suspension Cells of *Duboisia* Species

Yoshie KITAMURA, Takashi MORIKAWA, Hisao UMEMO and Hiroshi MIURA

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University
Bunkyo-machi, 1-14, Nagasaki 852, Japan*

Protoplasts isolated from suspension cells of *D. myoporoides*, *D. leichhardtii* and *D. hopwoodii* were divided and formed colonies in the modified B5 medium, though there were differences among species with respect to culture conditions required for colony formation. Colonies developed into calli by the two-step culture methods. The calli of *D. myoporoides* and *D. leichhardtii*, but not of *D. hopwoodii*, regenerated shoots which gave rise to plants.