

[J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 28, 45~51 1993]

懸濁培養におけるフロック形成現象より判断するぶどうベリーアリカント A種由来プロトプラストの静置培養条件

小楨陽介、増田 博、関 宏夫*、宇井定春
(山梨大学工学部化学生物工学科、*山梨県総合農業試験場生物工学部)

Static Culture Conditions of Bailey Alicant A Protoplasts Judged by the Phenomenon of Cell Coagulation in Suspension Cultures of Grape Protoplasts

YOSUKE KOMAKI, HIROSHI MASUDA, HIROOSEKI* and SADAHARU UI

Department of Applied Chemistry & Biotechnology, Faculty of Engineering,
Yamanashi University, Kofu, Yamanashi 400, Japan

*Yamanashi-Agriculture Experimental Station, Futaba, Yamanashi 407-01, Japan

Using the phenomenon of cell coagulation, that is flock formation, in a suspension culture, the condition of static culture for protoplasts prepared from Bailey Alicant A callus was examined. The resulting information obtained from various examinations of the flock formation was found to be very useful for the determination of static culture conditions for the grape protoplasts.

緒 言

植物細胞工学的手法を育種等へ応用する場合、プロトプラストの培養がそのファーストステップとして重要である。しかし、特に木本植物の場合、その培養は非常に困難であり、多くの試行錯誤的検討が必要である。著者らの検討対象であるぶどうもこの例にもれない。ぶどうのプロトプラスト培養はこれまでも報告されているが^(1, 2)、品種ごとにあるいは同一個体内でさえも由来する組織部位ごとに、基本無機塩培地を始めとする種々の点において異なる条件が要求される。また、特に育種等への応用の場合には、細胞が完全に単離状態にある培養、即ち、ゲルに包埋された静置培養が望ましい。しかし、新たな試料に対し、再現性の高い静置培養条件を設定するためには、通常膨大な実験量及び日数が必要になる。なぜなら、これには培地組成等化学的因子の他にゲル化剤の種類、それに伴う包埋操作、

及び添加吸着剤等の物理的影響も加わり、これら全てがプロトプラスト自身の生命活性に対しクリティカルに相互に絡み合ってくるからである。そのため、培養の適否に利用できる何らかの簡便な条件判定因子の存在が望まれるが、そのような利用例は、これまで他の植物を含めほとんど見当たらない。ところが、著者等は先に甲州種由来プロトプラストの懸濁培養における細胞凝集体（フロック）形成現象が実際のプロトプラストの生命活性と関連していることを見だし、更に培養条件の検索にも応用が可能である知見を得た⁽³⁾。そこで、この結果を未だ低分裂率しか得られていないベリーアリカントA種カルス由来プロトプラストの静置培養条件の検索へ応用することを試みた。その結果、新たに高分裂率を与える条件を得ることができたのでここに報告する。

実験方法

1. プロトプラストの調製 プロトプラスト由来材料として供試したカルスは、既報に従い⁽¹⁾ベリ-アリカントA種ぶどう茎組織より誘導し、その後、液体培養(懸濁培養)中で継代されたものである。液体培養はB5培地⁽⁴⁾(カイネチン0.6mg/l, 2,4-D 0.01mg/l, pH5.8)を使用し、培養は接種量5%PCV(V/V)、旋回振盪100rpm、暗所下27℃で行った。但し、PCVは培養液10mlを遠心(150×g, 5min)した後の沈殿カルス細胞の体積(ml)とした。また、微量成分については本報で使用した全培地においてMS⁽⁵⁾のものを使用した。プロトプラスト調製材料としては、特に断らない限り、継代後約2週間の液体培養細胞を150×gで5分間遠心して得た沈殿カルス細胞を使用した。プロトプラストの単離は、0.55Mマンニトールを含むpH5.5, 0.1MMES緩衝液に1.5%セルラーゼオノズカRS(近畿ヤクルト)、0.1%ペクトリアーゼY-23(盛進製薬)を含む酵素液10ml(0.20μmの濾過除菌)を50ml容三角フラスコ中に調製し、これに材料カルス細胞2mlを加え、30℃、2時間の旋回振盪(60rpm)反応により行った。その後、ミラクロスで細胞残渣を除去後、洗浄のため10%マンニトールを加え、150×gで5分間遠心しプロトプラストを沈降させた。次に、10%フィコールを含む20%ショ糖溶液で浮上させることにより精製を行った。

2. プロトプラストの培養 目的濃度の4倍にした基本培地に3%ショ糖と7%マンニトールを加えオートクレーブ(115℃, 15min)したものを準備培地とした。ホルモンは濾過除菌したNAAとゼアチンをそれぞれ目的の4倍濃度(それぞれ40mg/lと0.04mg/l)になるように調製した濾過除菌液を準備した。そこで、液体培養については目的の4倍密度のプロトプラスト懸濁液250μl、4倍濃度培地250μl、希釈液(3%ショ糖、7%マンニトール)500μlを3cmガラスシャーレに静かに入れシャーレの蓋の隙間をパラフィルムで二重にシールし、暗所27℃で培養した。静置培養(包埋培養)については目的の4倍密度にしたプロトプラスト懸濁液250μl、4倍濃度の基本培地250μlを径3cmガラスシャーレに静かに入れた。それに溶解した2倍の濃度のゲル化剤溶液(0.6%ジェランガム、3%ショ糖溶液、7%マンニトール、0.1%活性炭を含む)を500μl入れ、ゆるやかに攪拌し混ぜ合わせた。ゲル化後、乾燥を防ぐために、シャーレの蓋の隙間をパラフィルムで二重にシール後、暗所27℃で培養した。両培養ともにpH5.8で行った。プロトプラスト数の測定はフックスローゼンタール白血球計算盤を

用いて、100個前後のプロトプラストを計測できるように希釈率を調製し、1mlあたりのプロトプラスト数(個/ml)を算出した。静置培養における分裂率の測定は培地中のプロトプラストの分裂を顕微鏡により計測し次式から算出した。分裂率(%)=分裂した個数/計測した個数×100

3. フロックの定義 フロックとは細胞4個以上からなる最大径90μm以上の細胞凝集体と定義した。フロック数の測定もプロトプラスト数の場合と同様にフックスローゼンタール白血球計算盤を用いて行い、1ml当たりの形成数を算出した。

実験結果及び考察

1. 諸条件のフロック形成に及ぼす影響 著者等は先の報告⁽³⁾において懸濁培養時のフロック形成に伴う以下の4現象が、静置培養において高分裂率が得られるための必要条件となり得ることを示した。即ち、1)フロックの形成があること。2)細胞数10個以下から構成される小フロックの割合が高く、且つ、変形遊離細胞の出現も見られること。3)フロック構成細胞に肥大化が生じないこと。4)フロックに褐変が生じないこと。である。そこで、これらの点を指標にしてベリ-アリカントA種プロトプラスト培養に関わる諸因子を検討した。

(1) 由来カルスの培養ステージ プロトプラストが由来する供試カルスの培養ステージが懸濁培養におけるプロトプラストのフロック形成へ与える影響を検討した。結果をFig. 1.に示したが、甲州種プロトプラストと同様⁽³⁾、材料カルスの培養ステージによりフロックの形成率が異なり、対数期後期から定常期初期のカルスに由来するプロトプラストは、高いフロック形成を示した。しかし、形成率は最大でも甲州種の場合の1/2程度であった。

(2) 基本無機塩培地と活性炭⁽⁶⁾ 検討した無機塩培地中では、Table 1.に示した様に1/2MS, MS, N'69⁽⁷⁾, B5で同様のフロック形成率が得られた。しかし、フロックの大きさを考慮するとFig. 2.に示した様にB5の活性炭の区分が最も細かいフロックの割合が高く、且つ変形遊離細胞も含まれることから最も培養に適している培地であると推定された。甲州種由来のプロトプラストも静置培養の場合には活性炭の添加が必須であったが⁽¹⁾、ベリ-アリカントA種でも同様の結果が得られた。また、White⁽⁸⁾やN'67⁽⁹⁾ではフロックの褐変化が見られるので不適な培地であると推察された。

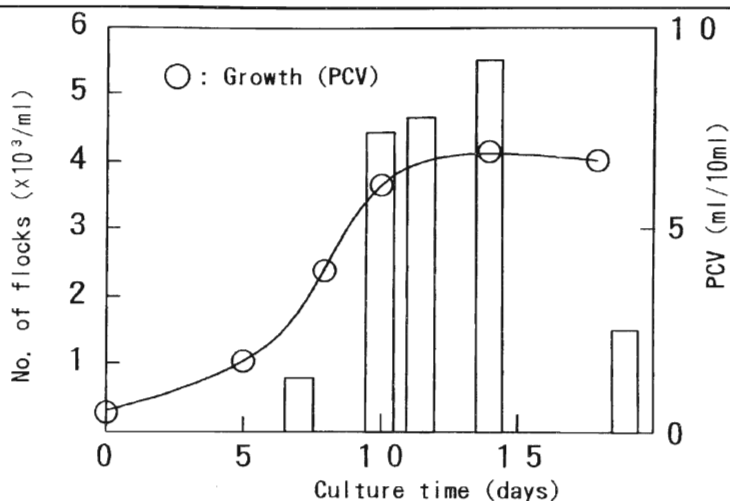


Fig. 1. Effects of culture stages as a source protoplasts on flock formation in suspension culture.

Culture time for protoplasts: 4 days for suspension cultures. The number of protoplasts was adjusted to an initial concentration of about 2×10^5 cells/ml. The growth of callus used as protoplast sources was estimated by PCV.

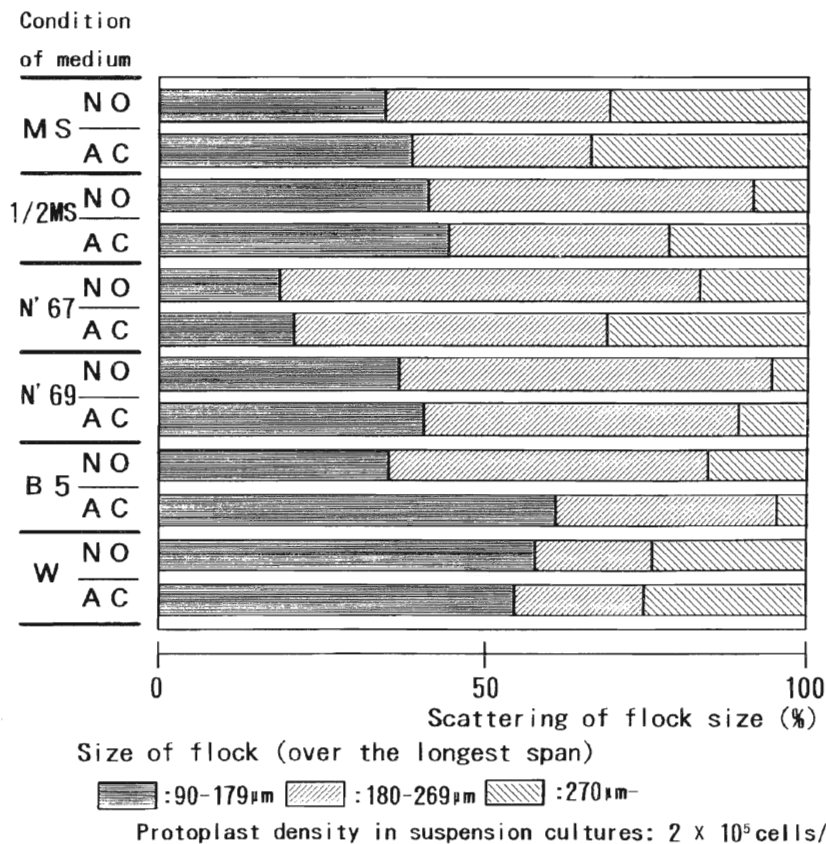


Fig. 2. The size scattering of flocks formed in the suspension culture under various conditions for the protoplasts.

Abbreviations used and other conditions are given in Table. 1.

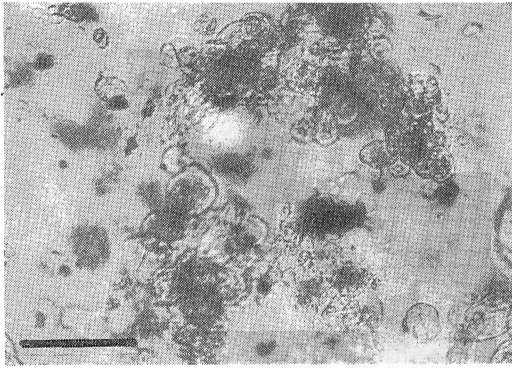


Fig. 3. Cell division of protoplasts derived from the grape callus of "Baillly Alicant A." in static culture.

The static culture was formed using the optimum results obtained in the text as shown in Table 5.

Bar=100 μ m.

べ赤色細胞は非常に比重が高いことを示すものである。両者を同一条件で懸濁培養したところ、Fig. 4.に示すように無色細胞では通常通りのフロック形成がみられるのに対して、赤色細胞ではフロック形成は殆ど見られなかった。このことは、同一条件で培養されたカルス由来のプロトプラストでも赤色と無色の細胞ではかなり性質が異なっていることを示

すものである。また、ベリーアlicantプロトプラストの場合、甲州種由来のものに比べフロックが生じにくいということは、少なくとも赤色細胞の存在が関係すると推察される。そのため、特に、赤色細胞を融合対として使用する細胞融合の場合は、その培養条件について特に注意する必要がある。

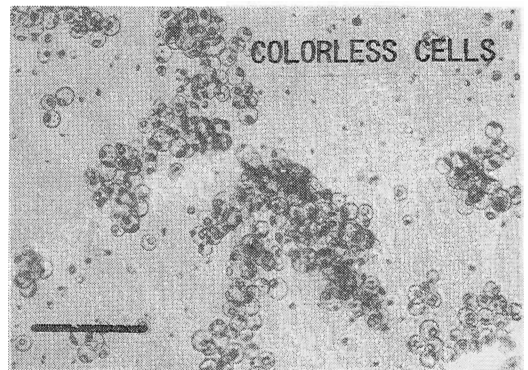
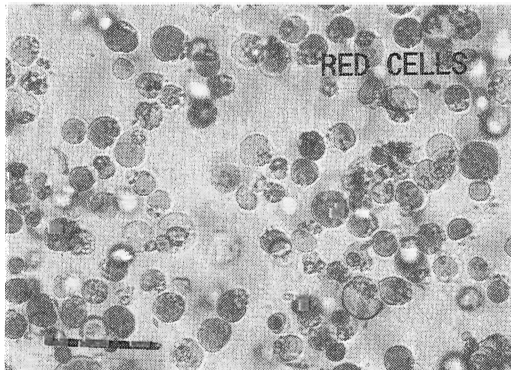


Fig. 4. Comparison with flock formation between the anthocyanin accumulating red cells and colorless cells in suspension culture.

The culture conditions were described in the Materials and Methods section.

Bar=100 μ m.

以上の結果、甲州種ぶどう由来プロトプラストで見いだされたフロック形成現象に関する知見が、他品種プロトプラストの場合にも応用が可能であることが示された。また、融合細胞の培養条件検索にも有用であろうと推察される。しかし、目下のところ草本植物であるニンジン懸濁培養では、同様な細胞凝集現象は認められていない。そこで、どのような植物に適応可能かについても、今後、更に検討しなければならない。

要 約

プロトプラストの懸濁培養における細胞凝集現象（フロック形成）からの知見を用いて、ベリーアlicant A種カルス由来プロトプラストの静置培養条件を検討した。その結果、フロック形成現象に関して得られた知見はブドウプロトプラストの静置培養条件の設定に非常に有用であることが判明した。

文 献

- (1) S. Ui, M. Suzuki, S. Kubota, H. Masuda, H. Muraki, Y. Yamakawa, and T. Sato: *Agric. Biol. Chem.*, 54, 207-209 (1990).
- (2) 秋山貴子, 高橋次郎: 「植物バイオテクノロジー」, 東京化学同人, 東京, 1991, pp.202-207.
- (3) Y. Komaki, S. Ui, and H. Seki: *Plant Tissue Cult. Lett.*, in press.
- (4) O. L. Gamborg, R. A. Miller, and K. Ojima: *Exp. Cell Res.*, 50, 151-158 (1968).
- (5) T. Murashige and F. Skoog: *Physiol. Plant.*, 15, 473-497 (1962).
- (6) S. Ui, K. Yamada, S. Hyuga, and H. Seki : *Plant Tissue Cult. Lett.*, 10, 172-175 (1993).
- (7) J. P. Nitsch and C. Nitsch: *Science*, 163, 85-87 (1969).
- (8) P. R. White: In "The Cultivation of Animal and Plant Cells" 2nded., Ronald Press Co., New York, 1963, p.59.
- (9) C. Nitsch and J. P. Nitsch: *Planta*, 72, 355-370 (1967).
- (10) M. Hirose, T. Yamakawa, T. Kodama and A. Komamine: *Plant Cell Physiol.*, 31, 267-271 (1990).