

ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L.) における細胞分裂 促進のためのプロトプラスト単離および培養条件

後藤 隆子, 奥 正和, 高橋 徹, 故 吉本 周

Isolation and Culture Condition of Protoplasts for Increasing Cell Division in Spinach (*Spinacia oleracea* L.)

Takako Goto, Masakazu Oku,
Toru Takahashi and the late Itaru Yoshimoto

For developing the effective procedure of protoplast division, isolation of spinach mesophyll tissues and culture condition were examined.

In the case of protoplasts isolated from the spinach mesophyll tissues cut into small pieces before the enzyme treatment (enzyme solution: 0.1% pectolyase Y-23, 0.3% cellulase Onozuka RS, CPW9M, pH 5.6), most of them were broken after a day of culture. However by incubating intact plant leaves in enzyme solution and then releasing protoplasts in CPW21S, many intact and viable protoplasts were obtained. The novel method gave a large yield (9.48×10^5 protoplasts/g FW) of highly viable protoplasts (98%).

The pH in the protoplast culture medium affected protoplast division and the highest division of cells were obtained in the medium adjusted at pH 5.8. Although the yield of protoplasts increased with the growth period of donor plants up to 25-day-old, the protoplasts from 10-day-old seedling had a maximum plating efficiency. Plating densities lower than 0.7×10^5 protoplasts/ml were less effective for cell division and those of more than 2.0×10^5 protoplasts/ml caused cell aggregation. The best culture density was 1.0×10^5 protoplasts/ml.

Key words : biotechnology, protoplast, isolation, cell division, *Spinacia oleracea* L.

ホウレンソウはカロテンやアスコルビン酸等のビタミンや鉄, カリウム, マグネシウムおよび亜鉛等のミネラルを多く含み, 栄養的に優れた葉菜である. しかし, 他の野菜と比較すると酸性土壌に極めて弱い上に, シュウ酸を多量に含むなど大きな問題を抱えている. これらの問題を解決するために品種改良が進められているが, 交配を含む従来育種法では限界があり, 目的とする品種の育成は困難と考えられる.

植物細胞から細胞壁を取り除いたプロトプラストは, 薬剤や電氣的刺激を与えると容易に異種のプロトプラストと融合したり, 外来遺伝子を取り込む. この手法をホウレンソウの育種に利用すれば, 従来の交配範囲を超えた新たな遺伝子を栽培種に導入できると考えられる. また, プロトプラストは厳密な意味で単細胞であるため, プロトプラスト培養中に生じた有用な変異は単細胞の個体再生によって得ることができる. しかし, これらの手法の利用にあたっては, まず植物組織からプロトプラストを単離, 培養し, 植物体を再生させる一連の培養系を確立する必要がある. ホウレンソウの組織培養に関しては, 以前より多くの報告がみられ¹⁻⁶⁾, 効率的な植物体

再生条件も確立されている。しかし、ホウレンソウのプロトプラスト培養は比較的困難であり、ホウレンソウ懸濁培養細胞からプロトプラストを単離し、カルスの形成に成功した Nakagawa ら⁷⁾の報告が初めてで、彼らも再生個体を得るにはいたっていない。我々はホウレンソウの葉肉細胞由来プロトプラストの培養を検討し、プロトプラスト由来植物体の再生に初めて成功した⁸⁾が十分満足できる結果ではなく、より効率の高い培養法の開発が望まれる。そこで本研究では、プロトプラストの分裂を促進する単離および培養条件について検討した。

材料および方法

1. プロトプラスト単離方法

ホウレンソウ品種「次郎丸」の種子をエタノールで30秒間浸漬したあと、次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素5%）で約10分間殺菌した。殺菌後、滅菌水で十分洗浄を行ってからMS固形培地⁹⁾に播種した。25℃、2,000 lx、16時間日照で育苗した無菌苗を試験に用いた。

無菌苗の根部以外の部分を用い、葉を約10mm幅に細断した細断区と非細断区とを設け、それぞれ約30分間 CPW9M¹⁰⁾（CPW塩を含む9.0%マンニトール液）に浸漬させた。それらに0.1%ペクトリアーゼ Y-23 および0.3%セルラーゼオノズカRSを含む酵素液を加え、約5分間真空ポンプで脱気後、4~5時間酵素処理を行った。酵素液を除いた後、非細断区は Fig. 1 に示すとおり CPW21S（CPW塩を含む21%スクロース液）を加え、ルーツェを用いて葉をつぶす方法でプロトプラストを遊離させた。その後、60 μ mのメッシュでプロトプラスト懸濁液を濾過した。濾液に遠心分離（100 \times g、3分）を行って表層に集まった健全なプロトプラストをパスツールピペットで採取し、CPW9Mで洗浄した。プロトプラスト数は血球計測計を用いて測定した。プロトプラストの生存率は Widholm ら¹¹⁾の方法により、プロトプラスト懸濁液に FDA (fluorescein diacetate) 液を加え、蛍光顕微鏡で生存プロトプラスト数を測定して求めた。

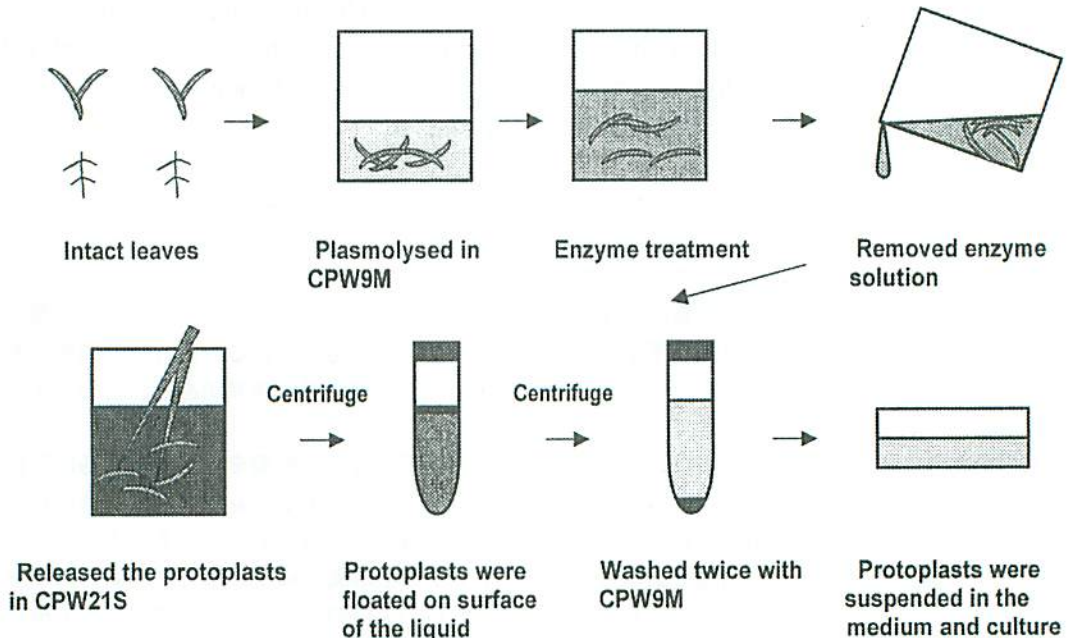


Fig.1 Isolation of protoplasts from mesophyll tissues of spinach.

2. プロトプラスト培養

KM8p ビタミン¹²⁾, 1.0mg/ℓ BA, 1.0mg/ℓ 2,4-D および 0.5M グルコースを加えた 1/2MS 培地を基本培地とした。培地の pH がプロトプラスト分裂率に及ぼす影響を調べるため、基本培地を pH 3.8, 4.8, 5.3, 5.8, 6.3 および 6.8 に調整し、播種後10~15日の材料から単離したプロトプラストを 1.0×10^5 protoplasts/ml の密度で培養した。次に、培養密度を 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 および 2.0×10^5 protoplasts/ml に調整し、基本培地 (pH 5.8) で培養した。また、播種後 5, 10, 15, 20, 25, 30日の無菌苗から単離したプロトプラストの収量を調査し、密度 1.0×10^5 protoplasts/ml に調整後、基本培地 (pH 5.8) で培養し、プロトプラスト分裂率を測定した。

培養は25℃で行い、培養開始後1時間は暗黒下で、その後は約2,000 ℓ x, 16時間日照で行った。また、分裂を促進するため、10日毎に新鮮な培地を加えた。培養10日後に、顕微鏡で分裂しているプロトプラストを計測し、培養開始時のプロトプラスト数に対する分裂プロトプラストの割合をプロトプラスト分裂率として表した。

結果および考察

1. プロトプラスト単離方法

葉部を細断後、酵素処理を行って単離したプロトプラストは、精製直後から損傷を受けて壊れるプロトプラストが多く、生存プロトプラストも細胞膜が不均一なものが多かった (Fig. 2-A)。葉部を細断をせずに酵素処理を行って得られたプロトプラストは、損傷を受けたプロトプラストが相対的に少なく、細胞膜もしっかりした健全な状態であった (Fig. 2-B)。それらのプロトプラストを FDA で染色し、蛍光顕微鏡で観察すると、細断処理によって単離したプロトプラストは、蛍光を発する細胞がほとんど観察できなかった (Fig. 2-C)。しかし、非細断処理法によって得られたプロトプラストのほとんどは、明るく蛍光する活性の高いプロトプラストであった (Fig. 2-D)。プロトプラストの収量は細断法では 1.44×10^6 protoplasts/g FW で、非細断法では 9.48×10^6 protoplasts/g FW となり、非細断処理法の方が6.5倍高かった (Table 1)。また、生存率も後者の方法で得られたプロトプラストの方が明らかに高く、1日後でもほとんどのプロトプラストが生存していた (88.7%)。反対に、細断処理で得られたプロトプラストは、単離直後で多くが壊れてしまい、1日後のプロトプラスト生存率は24.6%にまで低下した。

葉肉細胞からのプロトプラスト単離に関する報告はほとんどの場合、酵素処理が効率よく行われるように材料を細断する。しかし、ハウレンソウのようにプロトプラストが壊れやすい材料にこの方法を適応すると、細断によって機械的損傷を受けた組織や壊れたプロトプラストから漏出した内容成分などによってプロトプラストが障害を受けることが想定される。本研究で行った材料を細断せずにプロトプラストを単離する方法 (非細断処理) は、一度に多数のプロトプラストを遊離させ、その直後に精製を行うので、プロトプラストは酵素や漏出してくる内容成分の影響をほとんど受けず、多くの健全なプロトプラストを得ることができたと考えられる。同様の方法

Table 1 The yield and viability of protoplasts isolated from the leaves with or without cutting (segment or intact).

	Yield of protoplasts ($\times 10^6$ protoplasts/g FW)	Viability (%)	Viability after one day (%)
Segment	1.44	38.9	24.6
Intact	9.48	92.6	88.7

でプロトプラストの単離を行っている例は少ないが、本実験で行った Fig.1 に示す非細断法は他の植物種、特に有機酸や細胞に有害なフェノール系物質を多量に含む材料については非常に有効な方法であり、汎用性は高いと思われる。

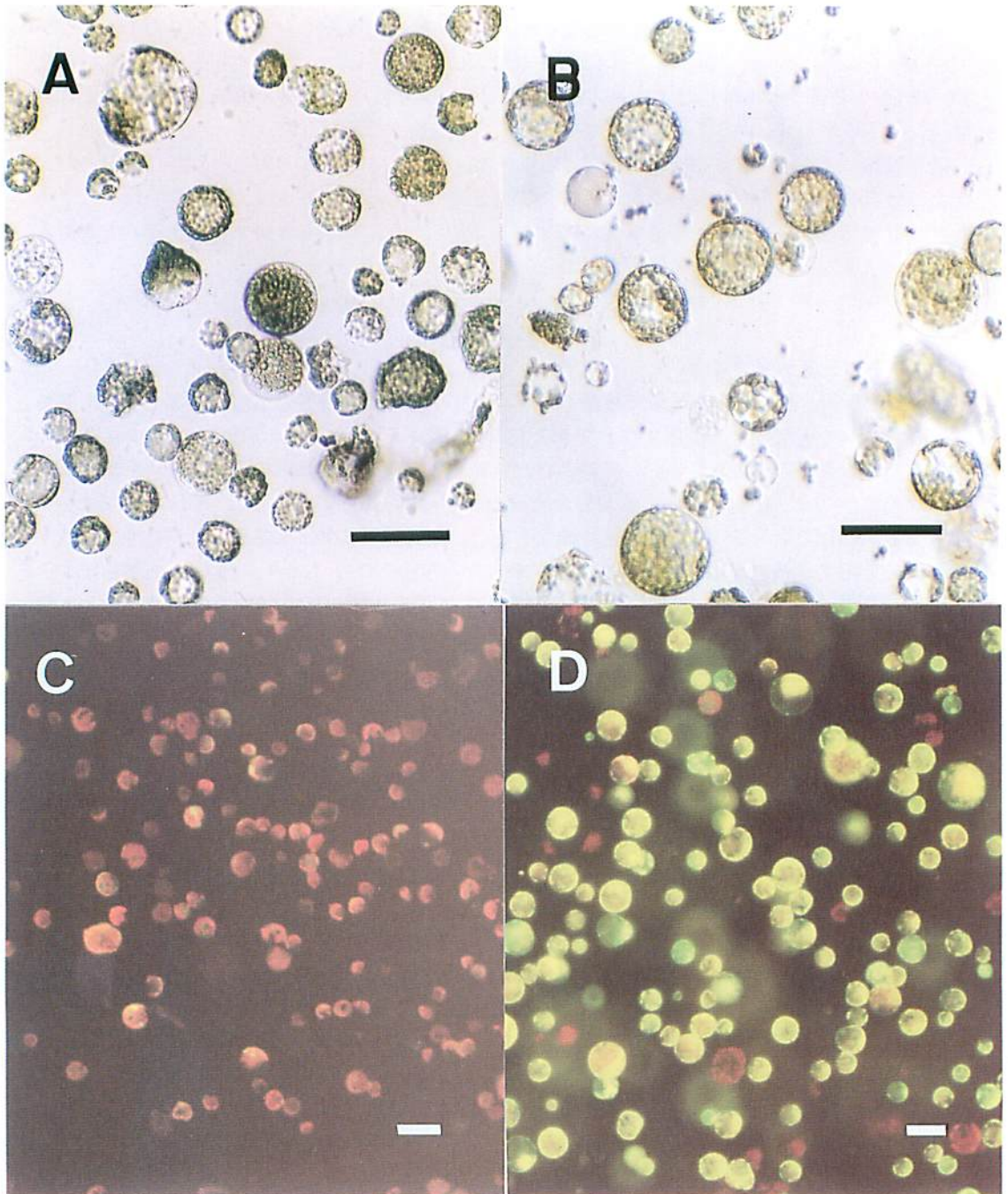


Fig. 2 Protoplasts isolated from leaf segments (A and C) or whole plant (B and D) of spinach. C and D are fluorescence microphotograph of protoplasts stained with FDA. Bars represent 50 μm .

2. プロトプラスト培養条件

1) 培地 pH

プロトプラスト分裂率は培地 pH の上昇に伴って増加し、pH 5.8 で最も高かったが、それ以上になると反対に分裂率は低下したことからハウレンソウプロトプラストの培養に最も適した培地 pH は pH 5.8 であると考えられた (Fig. 3). 培地 pH が 3.8 に低下するとプロトプラスト分裂率は顕著に減少したが、幾つかのプロトプラストは分裂し、コロニーを形成した. Satoh ら⁴⁾ はハウレンソウカルスを利用した酸性土壌耐性品種の育成を試みた結果、カルスの *in vitro* 選抜法による品種育成の可能性を示唆している. 本研究においても、低 pH 培地で分裂したカルスが酸性土壌耐性を保有する可能性がある. そこで、培養中の培地 pH の変化を知るため、培養10日後の培地の pH を測定した. 初期 pH に関わらず培地の pH はすべて 5.2 前後に変化していた (Table 2). 小島¹³⁾ はイネ懸濁培養細胞の培地 pH と NH₃ 代謝の関係を調べ、培養細胞は NH₃ と NO₃ の吸収バランスを利用して培地 pH を一定の値に調節していると述べている. ハウレンソウプロトプラストもこのような働きで、pH を一定の値に調節する作用を持っていると考えられる. 本研究においては、低 pH 条件で分裂した細胞が酸性土壌耐性を保有するとは限らず、この方法による酸性土壌耐性品種の育成は極めて効率が低いことを示唆している.

2) 供試材料の齢

播種後25日までは生育日数が増すにつれプロトプラスト収量が多くなり、播種後30日になると収量が減少した (Table 3). しかし、プロトプラスト分裂率は播種後10日から15日の材料で顕著に高くなるため、収量と分裂率の結果から、播種後10日から15日の材料が最もプロトプラスト培養に適していると思われる. ハウレンソウは長日条件で花芽分化を起こす長日植物である¹⁴⁾. 特にこの試験で用いた '次郎丸' は抽台がやや早いため、今回用いた培養条件では播種後30日になると、幾つかの株で花柄が形成され、開花した. このような材料からはプロトプラストの採取は困難で、得られたプロトプラストの分裂能も極めて低かったことから、プロトプラスト培養の材料として利用できる限界は、播種後25日であると考えられた.

3) 培養密度

各培養密度における単位容量あたりのプロトプラスト分裂数を比較すると密度による影響がさらに明確にみられた. プロトプラスト分裂率は 0.1×10^5 protoplasts/ml では非常に低いが、

密度が高くなるにつれ漸増し、 1.0×10^5 protoplasts/ml で最も高い値を示した (Table 4). 藤田ら¹⁵⁾ はハウレンソウ葉肉組織からプロトプラストを単離し、異なる密度で培養

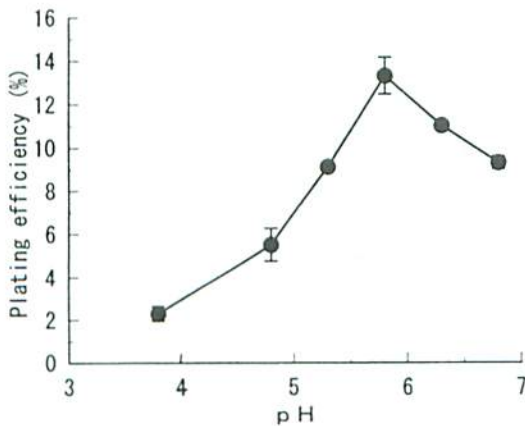


Fig. 3 Effect of pH in the medium on plating efficiency.

Vertical bars represent SD of means.

Table 2 pH in the protoplast culture media after 10 days of culture.

Initial pH	pH after 10 days of culture
3.8	5.3 ± 0.1
4.8	5.4 ± 0
5.3	5.3 ± 0.1
5.8	5.2 ± 0.2
6.3	5.2 ± 0.1
6.8	5.0 ± 0

Each value represents the mean ± SD.

Table 3 Effect of seedling age on the yield and the plating efficiency of protoplast.

Days after seeding	Yield of protoplasts ($\times 10^6$ protoplasts/g FW)	plating efficiency (%)
5	0.22 \pm 0.07	7.04 \pm 0.92
10	0.73 \pm 0.19	8.18 \pm 2.39
15	1.53 \pm 0.48	8.16 \pm 1.87
20	1.92 \pm 0.15	5.80 \pm 0.29
25	2.83 \pm 0.76	5.46 \pm 1.63
30	1.71 \pm 0.47	1.00 \pm 0.21

Plating efficiency was defined as the percentage of dividing protoplasts after 10 days of culture against originally plated protoplasts.

Each value represents the mean \pm SD.

Table 4 Effect of plating density on the plating efficiency of protoplast.

plating density ($\times 10^5$ protoplasts/ml)	plating efficiency (%)	Number of division protoplasts/ml ($\times 10^3$ protoplasts)
0.1	0.43 \pm 1.05	0.04
0.3	7.45 \pm 1.96	2.24
0.5	7.48 \pm 2.46	3.74
0.7	9.77 \pm 3.49	6.84
1.0	11.59 \pm 2.70	11.59
2.0	3.85 \pm 0.66	7.70

Plating efficiency was defined as the percentage of dividing protoplasts after 10 days of culture against originally plated protoplasts.

Each value represents the mean \pm SD.

した結果, 5.0×10^4 protoplasts/ml の時, プロトプラスト分裂率およびコロニー形成率が高かったと報告している. この結果は本研究結果とやや異なるが, 彼らは 5.0×10^4 protoplasts/ml 以上の培養密度については検討を加えていない. このことから, ホウレンソウプロトプラストの培養には 1.0×10^5 protoplasts/ml 密度が適していると思われた.

以上の結果より, ホウレンソウの葉肉組織を傷つけずに酵素処理を行い, 組織内でプロトプラスト化している細胞を遊離させる方法 (非細断法) によって, 活性が高いプロトプラストを多数単離することに成功した. この方法は細断の必要がなく, 損傷を受けやすい材料には有効な手段であることから汎用性が高いと考えられる. 次に培地 pH, 供試材料の齢および培養密度がホウレンソウプロトプラストの培養条件に及ぼす影響に関して検討したところ, 培地の pH は 5.8 が最も適しており, それより pH が低下すると分裂率も顕著に低くなることがわかった. 供試材料の齢は, 播種後 10~15 日の幼苗がプロトプラスト収量が比較的多く, 分裂率が高いため, プロトプラスト培養の材料として適していると考えられる. また, 培養密度は 1.0×10^5 protoplasts/ml が最も適していた. これらの条件が判明したことで, 再現性が高く, より安定したプロトプラスト培養系が確立できた.

要 約

より効果的なホウレンソウのプロトプラスト培養系を確立するため、プロトプラストの単離および培養条件について検討した。

葉を細断せずに酵素液（0.1%ペクトリアーゼ Y-23, 0.3%セルラーゼオノズカRSを含むCPW9M）で処理をすると、損傷が少なく活性の高いプロトプラストが多数得られた。プロトプラスト培養培地の pH は5.8が最も適していた。プロトプラスト収量は播種後25日の材料で最も多かったが、プロトプラスト分裂率は播種後10から15日の材料で高くなった。そのため、播種後10から15日の材料が最もプロトプラスト培養に適していると考えられた。培養密度は 1.0×10^5 protoplasts/ml が最も分裂率が高く、密度が低下すると分裂率が顕著に低下する傾向があった。

文 献

- 1) Sasaki, H. : *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **58**, 149-153 (1989).
- 2) 武藤正義 : バイオフォルティ, **5**, 24-25 (1990).
- 3) Al-khayri, J. M., Huang, F. H., Morelock, T. E. : *HortScience*, **26**, 913-914 (1991).
- 4) Satoh, T., Abe, T., Sasahara, T. : *Plant Tissue Culture Lett.*, **9**, 176-183 (1992).
- 5) Xiao, Xing-Guo, Branchard, M. : *Plant Cell Reports*, **13**, 69-71 (1993).
- 6) Komai, F., Okuse, I., Harada T. : *Plant Tissue Culture Lett.*, **12**, 313-315 (1995).
- 7) Nakagawa, H., Tanaka, H., Oda, T., Ogura, N., Iizuka, M. : *Plant Cell Reports*, **4**, 148-150 (1985).
- 8) Goto, T., Miyazaki, M. : *Plant Tissue Culture Lett.*, **9**, 15-21 (1992).
- 9) Murashige, T., Skoog, F. : *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497 (1962).
- 10) Frearson, E. M., Power, J. B., Coking, E. C. : *Dev. Biol.*, **33**, 130-137 (1973).
- 11) Widholm, J. M. : *Stain. Tech.*, **47**, 189-194 (1972) .
- 12) Kao, K. N. and Michayluk, M. K. : *Planta*, **126**, 105-110 (1975).
- 13) 小島邦彦 : 植物組織培養の栄養学, pp.62-65, 朝倉書店, 東京 (1993).
- 14) 香川 彰 : ホウレンソウ, 野菜園芸大百科 9, 農文協, pp.153-209, 東京 (1989).
- 15) 藤田 智・杉山信太郎・遠藤元庸・稲田委久子・山田 修 : 園学雑, **63** (別冊1), 228-229 (1994).