

サトイモのプロトプラストの単離と培養

佐藤 賢一

Isolation and culture of *Colocasia antiquorum* protoplasts : Kenichi SATO (Tokyowoman's College of Physical Education, Fujimidai, Kunitachi, 4-30-1, Tokyo, Japan)

Abstract : The present study was carried out to establish the isolation and culture of protoplasts as a fundamental research of mass production in *Colocasia antiquorum*. The osmotic pressure of isolation medium was thoroughly examined. After treated plant materials for 4 hrs with an enzyme solution adjusted osmotic pressure with 0.5M mannitol, protoplasts were cultured under the optimum condition in a medium containing 0.48M mannitol. During culture, the tendency of protoplast dedifferentiation was observed, an increase of RNase activity, a fall of chlorophyll content, an accumulation of starch grain in chloroplasts, and a reduction of chloroplast size. To retard of protoplast dedifferentiation, several kinds of culture medium were examined. Consequently, a medium containing 2.4-D 1mg/l and kinetin 1mg/l brought about the most excellent result, and a culture medium 8P was effective to maintain the cellular activity, especially an addition of an antioxidant, α -tocopherol, into a culture medium.

Key words : pretreat, culture mediums, hormones, cellular activity, α -tocopherol,

要旨 : 本研究は、サトイモの大量増殖法の基礎研究として、プロトプラストの単離法と培養法を確立するために行なったものである。単離については、浸透圧の影響を検討した。その結果、0.5Mのマンニトールで浸透圧を調整した酵素液で、4時間処理をした後、得られたプロトプラストを0.48Mのマンニトールの培地で培養するのが最適条件であることが分かった。次に、得られたプロトプラストを用いて諸条件を変え、培養細胞を制御することを試みた。その結果、培養中のプロトプラストでは、RNaseの活性の上昇、クロロフィル含有量の低下、葉緑体でのんぶん粒の蓄積、及び最小化等の脱分化の徴候がみられた。なお、培地に添加するホルモン濃度を検討したところ、2.4-D 1mg/l とカイネチン1mg/l を含む培地のプロトプラストが、最も脱分化が遅れていた。また、MS, NT, B5, B5-N2の各培地における細胞活性は異なっており、8P培地でのプロトプラストでは、かなり高い細胞活性を維持した。さらに、培地に α -トコフェロールを添加すると、溶媒となるエタノールの悪影響を打ち消す以上の効果がみられた。

キーワード 前処理、培地、ホルモン、細胞活性、 α -トコフェロール

プロトプラストの培養技術は材料となる植物によって差異がみられる。タバコでは、ほぼ単離・培養、再分化の技術は確立しているものの、食料資源として重要な単子葉植物のイネやムギなどの研究は未だ十分とはいえない。近年、極めて困難であるとされているイネのプロトプラストからの植物体再生が成功したとの報告がなされているところである。

本研究の材料であるサトイモは、イネやムギと同様の有用作物であるが、栄養繁殖植物であり、交雑が困難なため、組織培養を駆使した育種の開発が望

まれている。大澤ら、(1983)¹⁾²⁾³⁾ は、そのプロトプラストの分裂を報告しているが、まだカルス化や植物体再生の成功例はない。そこで、そのプロトプラストの単離と培養についての条件を明らかにすることを目的として研究を行った。

材料と方法

材料としてはサトイモの“土垂” (*Colocasia antiquorum*) の塊茎を用い、畑の土とパーミキュライトを2対1の割合で混合して植木鉢に植え、気象

器の中心部で 30℃, 800W/m, 日長14時間の条件において培養した。また高柳ら, (1983)⁴⁾の方法により塊茎の茎頂培養により得た無菌植物体の葉も用いた。すなわち, 塊茎の茎頂、及び茎頂付近の組織を 0.5~1mm程度に摘出し, Murashige & Skoog の培地に 1%サッカロースと, BA 2mg/l 並びに NAA 0.2 mg/l の植物ホルモンを添加したもの, 又はホルモンを加えないものにとり置床した。その培養は 23℃と 30℃, 日長14時間の条件で行なった。なお, ホルモンを加えた培地の組織は, 置床後3ヶ月に, BA 1 mg/l のみを添加した培地に移して分化させた。さらに, 置床後約5ヶ月~1年を経て完全な植物体に生長したものの葉を用いた。

プロトプラストの単離過程については, 展開後2~5日の葉の主葉脈を避けた葉肉を, カミソリで 2mm角程度に細断して酵素処理を行なった。酵素液の組成は, 1%Cellulase OnozukaR10, 0.2%Macerozyme R10 (以上近畿ヤクルト), 及0.05%Pectolyase Y23(キッコーマン醤油)で, 0.2%のBSAを加え pH5.6に調節した。

この際の酵素液の浸透圧調整物質の適否をマンニトール, 塩化カルシウム, 及び塩化ナトリウムを用い, 0.1~0.7Mの範囲で検討した。また, この実験の結果から妥当とみられた 0.6%マンニトール液を用いて, 0, 1.2, 3時間と変えた前処理の適否を検討した。

酵素処理4時間後得られたプロトプラストは, ナイロン製の 200メッシュに通し, 酵素液と浸透圧・浸透圧調整物質の溶液で2度遠心 (100g 2分間)して洗い集めた。また, プロトプラストの収量は, Thoma の血球計算盤を用いて, 生重量1g当たりの数に換算した。

プロトプラストの培養法としては, 塊茎由来の植物体の葉切片を70%エタノールで30秒, 次いで1%次亜塩素酸ナトリウム液で10分間殺菌して, 無菌条件下で前処理や酵素処理を行なった。そして, これによって得られたプロトプラストを培養液で1回洗い, 約 $1\sim 2 \times 10^5$ 個/mlの密度で培地に懸濁し, 23℃で3日間を暗所に, その後は日長14時間, 115W/mの弱光下で静置培養を行なった。なお, プ

ロトプラストの単離と培養に及ぼす浸透圧の影響を検討する際は Murashige & Skoog の培地⁵⁾に 3%サッカロースを加え, マンニトールで浸透圧を 0.42M, 0.48Mに調節したものをを用いた。

また, ホルモンの検討の際は, Murashige & Skoogの培地に3%サッカロースを加え, マンニトールで0.48Mの浸透圧に調節し, オーキシン系では 2.4-DとNAAを, サイトカイニン系ではカイネチンと 6BAを用い, 2.4-Dとカイネチン, NAAと 6BAの組み合わせで添加した。なお, その際の各ホルモン濃度は, 0 0.1 0.3 1.0 2.0 10.0 mg/lとした。

培地を検討する際は, Murashige & Skoog培地の他, Nagata & Takebeの培地⁶⁾B5培地⁷⁾及びB5培地のN, K源を2倍濃度にした培地 (B5-N2培地と呼ぶことにする)をプロトプラストの培養に用いた。

また, それらの培地には, 3%サッカロース, 2.4-Dとカイネチン各mg/lを添加した。さらに, 単子葉植物のプロトプラストの培養に有効とされている 8P培地(Kao & Michayluk, 1975)⁸⁾を無菌植物体由来のプロトプラストの培養に用い, 2.4-Dとカイネチンの組み合わせでホルモン検定を行なった。

培地に α -トコフェノール (ビタミンE) を添加してプロトプラストに与える影響を検討する際は, Murashige & Skoogの培地に 2.4-Dとカイネチン各1 mg/lと3%サッカロースを加えたものを基本培地とし, FBS (ユニコーン社) を10%, α -トコフェノールを最終濃度が10mg/lとなるように添加した。

なお, プロトプラストの単離と培養中の観察では, 細胞の大きさ (直径, 培養後は長・単径) と, 葉緑体の大きさ (長径) は, 顕微鏡写真で各50個当たりの平均値を求めた。

さらに, 細胞の活性を測定する際は, 次の方法を用いた。①培養中の生死を判定するためにはFDA生体染色法 (fluorescein diacetate)を用いた。②細胞の総タンパク量は Lowryら(1951)の方法⁹⁾を基に, BSAを標準にとり, 750 μ mの吸光度を測定した。③細胞のRNase活性の測定については, Altmanら(1977)の方法¹⁰⁾に基づいた。④細胞のクロロフィル含有量は, Vervon(1960)の方法に従って, 665と

649 μ mの吸光度を測定した。

結果

浸透圧調整物質の違いについては、塩化ナトリウム溶液で前処理なく酵素処理をした時には、プロトプラストの収量は三者のうち最高の値を示した。しかし、葉切片の表皮はほとんど剥がれており、細胞が褐色化したり、葉緑体などのオルガネラが細胞中の一端に凝縮したりするものが数多くみられた。

また、塩化カルシウム溶液処理で得られたものは、形が歪んでいたりと、突出したりするものがみられた。さらに、塩化ナトリウム溶液の場合と同様にオルガネラが細胞の一端に偏ったものがみられ、前処理の有無にかかわらず、その収量は三者中最低を示していた。

マンニトール溶液で前処理なく酵素処理を行なった時には、収量は塩化ナトリウム溶液の場合と比べ半減していたが、細胞内の異常は三者の中で最も少なく、前処理をした場合には、塩化ナトリウムの場合よりも8倍以上の収量が得られ、細胞内の異常も最小であった。(Fig 1)(Fig 2)

上述の研究で、サトイモの場合の浸透圧調整物質はマンニトールが三者中で最も適しているとみて、それによる前処理の適否を検討した。葉切片を0.6Mマンニトール溶液で前処理をした時の方がプロトプラストの収量が高く、2時間の前処理を行なった時に最大の値が得られた。また、マンニトールの0.1~0.7Mの7段階の各溶液で2時間前処理をした場合と、前処理をしない場合の収量を検討した。その結果、等張の0.42Mでは、前処理の有無にかかわらず同等の収量が得られ、それ以上の浸透圧の場合は、前処理をした時の方が高収量が得られた。なお、低張の0.2Mや0.3Mの溶液で単離した場合には、破裂したプロトプラストの破片が多く、高張の0.6Mや0.7Mの場合は、細胞が小さくなっていた。(Fig 3)

オーキシンの2,4-Dとサイトカイニン系のカイネチンを、それぞれ0, 0.1, 0.3, 1.0, 2.0, 10.0 mg/lの濃度による36通りの組み合わせをもって、無菌植物体の葉肉組織由来のプロトプラストを培養し、10日目の細胞生存率を調べた。その結果、2,4-Dやカ

Fig.1 Unpretreated protoplasts
0.5M mannitol with enzymes x368

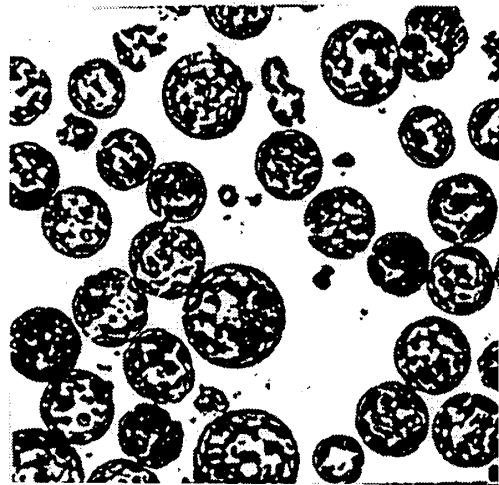


Fig.2 Effects of osmotic pressure on protoplasts yield

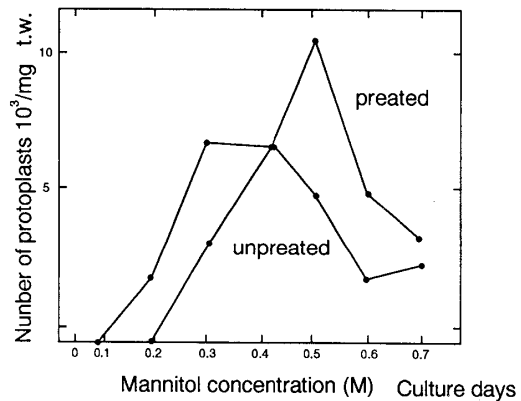


Fig.3 Effects of osmotic substances on protoplasts yield

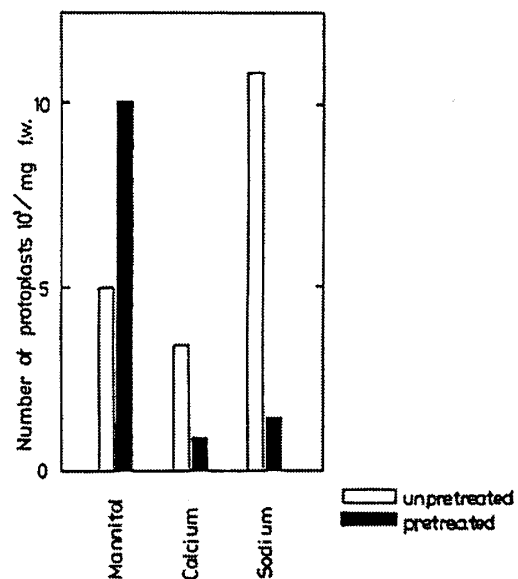


Table 1
viability of protoplasts cultured with different hormone concentration

2,4-D (mg/l)	Kinetin (mg/l)					
	0	0.1	0.3	1.0	2.0	10
0	41	43	39	47	48	26
0.1	49	48	45	46	44	33
0.3	41	53	50	52	41	32
1.0	50	36	42	55	53	32
2.0	48	44	54	39	36	32
10	13	21	18	15	23	13

イネチンの単独よりも、双方を加えた方が生存率が高かった。特に、2,4-D 1mg/l とカイネチン1mg/l を含む培地では、ホルモンを全く含まない場合に比べ、1.3倍以上の生存率を示した。また、この濃度の組み合わせ付近では、buddingする細胞の割合も低かった。さらに、一方が10mg/l という高濃度の場合には生存率が低かった。(Table 1) 他方、NAAと6BAを組み合わせた培地では、プロトプラストの生存率に関しては有効な結果が認められなかった。

細胞活性に関わる植物ホルモンの影響を、収量の多い塊茎由来の植物体の葉肉組織から得た培養7日目のプロトプラストにより、4つの視点から調べた。その結果、細胞生存率は2,4-D 1mg/l とカイネチン2mg/l の濃度の組み合わせ付近で最も高く、無菌植物体由来の実験結果と同様な傾向がみられた。

細胞のクロロフィル含有量については、2,4-D を含まない培地では細胞生存率が低いにもかかわらず

Table 2
Relative chlorophyll content of protoplasts cultured with different hormone concentration

2,4-D (mg/l)	Kinetin (mg/l)					
	0	0.1	0.3	1.0	2.0	10
0	100	120	121	189	183	195
0.1	65	45	59	36	73	147
0.3	57	62	88	47	77	88
1.0	63	82	102	151	126	—
2.0	28	76	56	107	67	—
10	—	—	—	—	—	—

Table 3
Total protein content of protoplast cultured with different hormone concentration

2,4-D (mg/l)	Kinetin (mg/l)			
	0	0.3	1.0	2.0
0	100	65	50	103
0.3	101	29	62	81
1.0	87	32	37	79
2.0	33	68	83	92

ず、カイネチンの濃度が上がるにつれて高くなった。また、生存率の高かった2,4-D 1mg/l, カイネチン1mg/l の濃度の組み合わせで培養したプロトプラストでも比較的高いクロロフィル含有量がみられた。なお、カイネチンを全く含まない2,4-Dのみを添加した場合のクロロフィル含有量は、他と比べ相対的に低かった。(Table 2)

全く植物ホルモンを含まない培地の場合には、細胞の生存率は低かったにもかかわらず、細胞のもつ総タンパク含有量は、ホルモンを加えた場合よりも高

Table 4
RNase activity of protoplasts cultured with different hormone concentration

2,4-D (mg/l)	Kinetin (mg/l)			
	0	0.3	1.0	2.0
0	100	35	59	85
0.3	65	24	57	129
1.0	43	13	39	112
2.0	133	60	20	147

かった。(Table 3)

RNase活性については、2,4-D 1mg/l, カイネチン0.3mg/l の濃度の培地で培養した場合が最も低く、細胞生存率とRNase活性との反比例する結果が得られた。しかし、カイネチン2mg/l の濃度の場合には、他と比べ、やや高いRNase活性がみられた。(Table 4)

同一の材料由来のプロトプラストをMS, NT, B5, B5-N2の各培地で培養した際の細胞の活性を、ホルモンの場合と同様に、4つの視点から比較検討した結果は次のようになった。

Table 5 Viability, chlorophyll content, RNase activity, and total protein content of protoplasts cultured in different medium

	Viability	Chlorophyll content ($\mu\text{g} / 10^6 \text{pr.pt.}$)	RNase activity	Total protein content ($\mu\text{g} / 10^6 \text{pr.pt.}$)
MS	66	0.74	100	13.5
NT	67	0.68	102	41.7
B5	52	1.60	216	23.8
B5-N2	58	0.97	276	54.3

細胞の生存率については、MSとNT培地が他よりもやや高かった。また、クロロフィル含有量では、B5、次いでB5-N2培地の細胞が比較的高かった。

RNase活性では、MSとNT培地とが同程度で、他と比べ半分以下の数値を示した。総タンパク含有量については、MS培地が最も低く、B5-N2培地の含有量は、B5のそれと比べて2倍以上であった。(Table 5)

また、MSと8P培地を2.4-D 1mg/lとカイネチン 1mg/lの条件で、同一の材料由来のプロトプラストを培養して7日目の細胞活性を調べた。その結果、

8P培地の方が、クロロフィル含有量がやや高く、RNase活性は著しく低かった。(Table 6)

次に、MS培地に2.4-D mg/lとカイネチン 1mg/lを加えた培地を対照として、その培地に10%FBSを加えたもの10%FBSとエタノールを加えたもの、及び10%FBSとエタノールに溶かした α -トコフェロール10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えたものの4種の培地でプロトプラストを培養し、 α -トコフェロールの細胞活性に及ぼす影響を検討した。その結果、MS培地単独の場合よりも、10%FBSと α -トコフェロールを添加した方がRNase活性が低く、またクロロフィル含有量も比較的高く、より高い細胞

Table 6 Viability, RNase activity and chlorophyll content of protoplasts cultured in MS or 8P medium

	Viability	RNase activity	Chlorophyll content ($\mu\text{g} / 10^6 \text{pr.pt.}$)
MS	37	100	0.31
8P	32	12	0.46

Table 7 Effects of α -Tocopherol on viability, RNase activity, and chlorophyll content of protoplasts on different medium

	Viability	RNase activity	Chlorophyll content ($\mu\text{g} / 10^6 \text{pr.pt.}$)
MS	53	100	0.84
MS • FBS	52	40	1.71
MS • FBS • EtOH	27	47	2.47
MS • FBS • α -Toc.	50	35	2.02

Table 8 Changes of viability, total protein and RNase activity of protoplasts during culture

	0 day		7 days
Viability(%)	90	+	55
		-	41
Total protein ($\mu\text{g}/10^6$ protoplast)	674	+	335
		-	904
RNase activity	100	+	320
		-	593

活性を維持していた。(Table 7)

塊茎、並びに無菌由来の植物体のいずれの葉肉組織のプロトプラストでも、今回の研究で試みた種々の培地では、それらの培養中において細胞分裂はみられなかった。それらのプロトプラストは単離直後では球形で、葉緑体などのオルガネラは細胞質全体に分散していたが、培養4日目には葉緑体が細胞の片隅に集まるものがみられ、7日目には全細胞中の20%前後が Budding していた。このような傾向は、今回の研究で試みたどの培養条件においても同じであった。さらに、それらの細胞生存率は7日目で約半分に減少し、RNase活性は単離直後に比べて3~6倍程度高くなっていた。(Table 8)

なお、培養中に細胞は大きくなり、7日目では約1.5倍になっていた。また、クロロフィル含有量は減少して(Table 9)、光学顕微鏡下でも黄色化した葉緑体が観察された。培養14日目には、細胞はさらに大きくなり、葉緑体はでんぷん粒をかなり貯えて、凸凹の激しい大きくなった形のもの、小さくなった形のもが同一細胞内に存在しているのが観察された。(Fig 4)(Fig 5)

考 察

今回の研究では、塩化ナトリウムや塩化カルシウム、マンニトールを用いて比較検討したところ、培養後の細胞活性の面から見ると、マンニトールを浸透圧調整物質とすることが適当であるとの結論を得た。塩化ナトリウムや塩化カルシウムを用いると、歪んだ細胞がしばしば観察された。このうち、Naイオンは細胞質に浸潤して原形質を強く膨脹させ、凸形原形質分離を起こす作用をもち、Caイオンは原形質に対し凝縮させ、凹形原形質分離を起こす作用がある。観察された歪んだ細胞は、そのような現象が現れたものとみられ、培養には不適當であると考えられる。

マンニトールを浸透圧調整物質とした場合、等張の0.42M前後の溶液で処理するのが適当であるという結果が得られた。低張液ではプロトプラストが膨脹し、高張液では収縮して、細胞の安定状態を維持できなかった。

なお、0.6Mのマンニトール溶液で前処理した後、酵素処理を行なうと、前処理をしなかった場合と比

Table 9 Changes of cell size, chloroplast size and chlorophyll content of protoplasts during culture

	0day	7 days	
Cell size(μm)	51	+	78
		-	83
		long axis	68
		short axis	78
Chloroplast size (μm)	9.3		11.0
			11.4
Chlorophyll content ($\mu\text{g}/10^6$ protoplast)	1.32		0.48
			0.32

べ高いプロトプラストの収量が得られた。このように、植物組織を高張液に浸し、それらの細胞が十分に原形質分離を起こして細胞壁と細胞膜間の接着を無くしてから酵素処理を行なった方が物理的に単離しやすいものと考えられる。この前処理を行なう例はTakeuchiら, (1978)¹¹⁾, Luら, (1982)¹²⁾, Archerら, (1982)¹³⁾, などでもみられる。しかし、前処理をして得られたプロトプラストは、単離直後よりエステラーゼ活性を持つ生細胞の割合が低く、培養後も又引き続き低くなっていることから、前処理が細胞活性の低下を誘導しているものと考えられる。高張液中では、細胞壁からプロトプラストが離れる際に、物理的な力が働いて細胞膜に損傷を来すという。(Lee-Stadelmannら, 1979,1985)^{14) 15)} また、高張液に浸っている細胞が、細胞膜が陥入して vesicle をつくることや、細胞質内に脂性の顆粒がみられることが、プロトプラストを用いた研究 (C. Shinら, 1979)¹⁶⁾ や、凍結して原形質分離を起こした組織の細胞を用いた研究で報告されている (Singh 1982)¹⁷⁾。このような細胞の変化は高張でない液に戻しても残ると言われる。恐らく、前処理や単離中に高張な液に会って損傷を受け、活性の低下した細胞が、その後の培養において死細胞となるのではないかとと思われる。本研究では、前処理・酵素処理の溶液と共に、蒸留水に浸透圧物質を溶かした物であったが、細胞の損傷を減らすために、①溶液は培地やbufferを用いたり、ホルモン類やアミノ酸などのヌクレアーゼ活性など

Fig 4 After isolation in 0.5M mannitol sol. with enzymes. 10 dys after cultivate in 0.8M mannitol MS medium

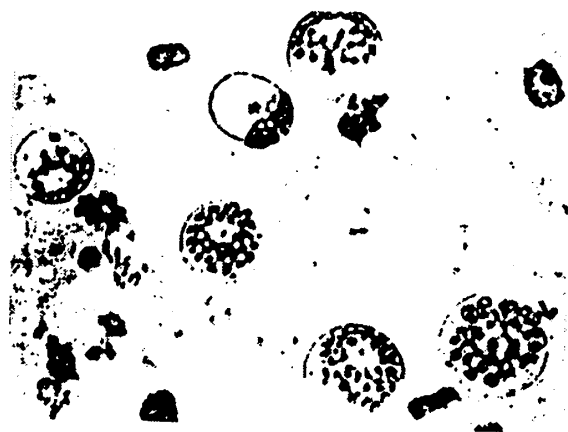
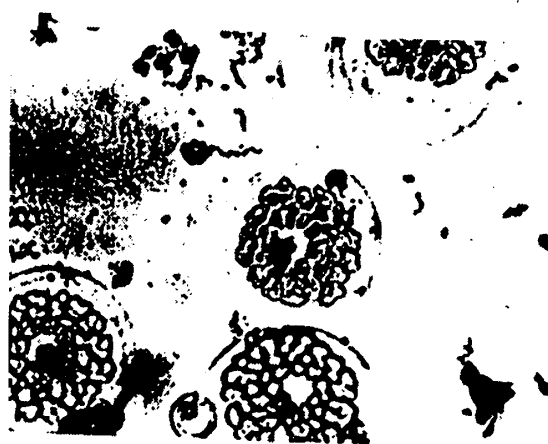


Fig 5 Focused on chloroplasts in the same method as Fig.4.



を抑える物質を加える。(Cohenら,1979)¹⁸⁾ ②原形質分離の時間を短縮させる物質、例えばオチルグアニジン (Lee-Stadelmanら, 1985)¹⁵⁾ を与えて前処理時間を短くする。③酵素処理を行なう際に、早く単離されたプロトプラストを集める。などの工夫が今後必要になると考える。

プロトプラストを細胞分裂させる試みには、現在のところオーキシシンとサイトカイニンは不可欠であり、それぞれ固有の濃度の調節が重要である。(Gnoら, 1983)¹⁹⁾ 本研究では、細胞分裂がみられなかったものの、2つのホルモンの濃度の調節により、細胞の生理状態や活性にかなりの違いがみられた。また、2,4-Dとカイネチンとの組み合わせの方がNAAと6BAのそれよりも培養に有効であったが、2,4-DやIAAよりも、NAAの方が強い影響があることをUchimiyara, (1976)²⁰⁾ は報告している。このことは、植物の種類や培養条件などによっても異なるものと考えられる。

本研究で、ホルモン濃度の調節により細胞の生理的状态は制御されたが、生存率・RNase活性・クロロフィル含有量・総タンパク含有量などの傾向は同一ではなかった。タンパク含有量・クロロフィル含有量・核酸の減少、並びにプロテアーゼ及びヌクレアーゼ活性の上昇などが、植物の老化に向かう著しい徴候であるということは、多数報告されている。(Machallら, 1967,²¹⁾ Chengら, 1984²²⁾; Weckmanら 1984²³⁾; Maeら, 1983,²⁴⁾ Thiman.1985²⁵⁾)

そして、老化の際に R u B P C a s e の活性や光合成活性が落ち、(Thomasら, 1983)²⁶⁾ また、葉緑体の個数も減少するという。(Wardleyら, 1983)²⁷⁾ さらに、Nishimuraら、(1974)²⁸⁾ や Schochら、(1983)²⁹⁾ は、培養細胞においても、老化の際にクロロフィル含有量や光合成活性の低下がみられると報告している。サイトカイニンは、このような老化現象を停止させるか、或いは遅延させる働きがある。すなわち、R N A ・タンパク質・クロロフィルなどの含有量を保持し、又はこれらの合成を誘導し、ヌクレアーゼやプロテアーゼの活性を抑制するという。(Wilkins, 1967³⁰⁾; Skoog, 1970³¹⁾; Hall, 1973³²⁾; Kaul, 1974³³⁾; Tetleyら, 1974³⁴⁾; Thinmanら, 1985²⁵⁾) なお、一方のオーキシンの老化への作用は明らかではないが、ヌクレアーゼ活性を制御するという報告もある。(Hall, 1973)³²⁾ 今回の研究では、2.4-D 1 mg/l, カイネチン 1 mg/l の濃度を含む培地のプロトプラストが最も生存率が高く、R N a s e 活性が低く老化が遅れていることが分かった。しかし、オーキシンの含まれない培地で培養した場合は生存率が低く、R N a s e 活性も比較的高く、細胞活性が低いとみられた。それにもかかわらず、それらの細胞はクロロフィルを相当高い値で含有しており、また、カイネチンの濃度が上がるほどクロロフィル含有量も上がっていている。このように、細胞質側の生理的状态・活性と葉緑体側の生理的状态には、ずれがあるように思われる。核の支配下から離れた葉緑体は、その半自律性により退化が遅れることがあるのかも知れない。(Yoshida, 1961,³⁵⁾ 1974,³⁶⁾; Choeら, 1971,³⁷⁾; Oshima, 1984,³⁸⁾) この細胞の活性状態と葉緑体の活性状態とが、密接な関係を持つか否かについては、構造と機能の両面からさらに詳しく研究する必要がある。

本研究で試みた M S , B 5 , B 5 - N 2 の 4 種の培地を比較検討した結果、サトイモのプロトプラストの培養に最適である培地を確定することはできなかった。生存率と R N a s e 活性という観点からは M S 培地が、クロロフィル含有量の保存という観点からは B 5 培地が、タンパク含有量という観点からは B 5 - N 2 培地が良好であるといえる。Ohiraら

(1973)³⁹⁾ は、B 5 培地の無機塩、特に N O , N H , K が培養に重要で、これらの濃度を 2 倍にすることで、イネの遊離細胞の生長増加の成功を報告している。この培地は R 2 培地といわれ、Fujimuraら、(1985)⁴⁰⁾ は、この培地によって、困難であったイネのプロトプラストの細胞分裂に成功している。今回用いた B 5 - N 2 培地は、R 2 培地と類似したものである。B 5 - N 2 培地で培養したプロトプラストは、他と比べて R N a s e 活性は最高であったが、かなり高いタンパク含有量と、やや高めクロロフィル含有量がみられた。与える窒素源の種類や量によって細胞の形態や生理的状态が異なってくることは鳥山ら、(1986)⁴¹⁾ もイネの遊離細胞やカルスで報告している。

先に試みた 4 種の培地は、プロトプラストから植物体再生への系が確立しているナス科などでは十分であると考えられるが、かなり限定された培地である。しかし、このような培地で培養の難しい単子葉植物は、他の豊富な培地とみられる 8 P 培地 (Kaoら, 1975),⁸⁾ や P 2 培地 (Portrykusら, 1977),⁴²⁾ が有効と考えられる。8 P 培地で Kaoら、(1980),⁴³⁾ はアルファルファで、Luら、(1981),⁴⁴⁾ と Heyserら、(1984),⁴⁵⁾ は各々キビで、プロトプラストの分裂像を観察している。また、大澤ら、も (1983),³⁾ サトイモのプロトプラストの分裂を報告している。今回の研究では、分裂像はみられなかったものの R N a s e 活性が M S 培地と比べて低く、クロロフィル含有量が高く維持されており、かなり活性の高い状態でプロトプラストが培養されたものとみられる。8 P 培地の無機塩類の組成は、先に試みた 4 種の培地と大差はないが、ビタミン類や有機物質の種類が豊富なおえにカゼインやココナッツミルクという天然の抽出物も又含んでいる。この天然の抽出物は、抽出された材料によって効果が異なり、さらに未知の要素をも含むため、8 P 培地の細胞活性の影響については十分に注意して検討する必要がある。

α -トコフェロールは、抗酸化作用や膜の安定作用があり、動物培養細胞の延命や環境毒性に対する細胞保護作用がある。(磯村, 1981,⁴⁶⁾; 平井, 1985)⁴⁷⁾ しかし、もともと植物体で生合成されるビタミン E

であるのかかわらず、植物培養細胞におけるその作用についての研究はまだなされていない。細胞の老化と膜の脂質の過酸化には密接な関係があり、 α -トコフェロールの培地への添加は、細胞老化に対する有力な阻止作用をもつものと予想される。なお、 α -トコフェロールは脂溶性のためエタノールを溶媒として用いた。また、 α -トコフェロールの担体タンパク質がリボタンパク質であるため、培地に牛胎児血清 (FBS) を添加する方法を採った。そして、エタノールの膜変性作用やFBSの影響が考えられるため、4つの条件下で実験を進めた。その結果、予想通りエタノールを加えた際には悪影響がみられたが、それを回復させる以上の効果がみられた。また、FBSのみを加えた時の細胞活性にもたらす良い影響も見逃すことができない。なお、本研究では α -トコフェロールの濃度を一定にしたが、さらに濃度や他の条件を変えて、詳細に研究する価値があると思われる。

培養中の細胞の葉緑体は、でんぷん粒を貯えて凹凸の激しいものと、極めて小さくなったものが観察された。このでんぷん粒の蓄積は、細胞の活性状態からみて、過剰な光合成産物と考えるより、むしろ培地のサッカロースが蓄積したものと考えられる。Mittelhanserら、(1971),^{48) 49)} は、老化中の葉緑体がでんぷん粒を蓄積することを観察している。本研究のサッカロース濃度は3%であり、細胞にとっては十分過ぎる値であったことも考えられる。サッカロースの濃度がプロトプラストの細胞分裂や budding と関係しているという報告 (Horine, 1972,⁵⁰⁾ ; Mayerら, 1975,⁵¹⁾) もあり、細胞分裂が目的ならば、その濃度を再検討する必要がある。

培養中のR Nase 活性の上昇は、分裂像のみられるハクサイの場合にもみられる (久留戸, 1986,⁵²⁾) が、サトイモの場合ではその上昇が高く、材料によるプロトプラストの活性の差がみられた。このような細胞活性の差がプロトプラストの脱分化の難易と関係があるのではないかと考えられる。

今回の研究でプロトプラストの培養中にホルモンを含まない培地でタンパク質が増加するという老化の徴候とは逆の傾向がみられた。これは、老化の多

くの研究が切り取った葉細胞を用いたのに対し、本研究が培養中のプロトプラストであるという細胞レベルの特殊な条件下であるのかも知れない。この点については、増加するタンパク質の極在性をプロテアーゼやRuBPCaseなどの酵素活性と共に、詳しく研究する必要がある。

謝辞；本研究を進めるに当たり、終始懇切な御指導及び御高配を賜った、お茶の水女子大学理学部遠山 益名誉教授に深謝し、細胞生物学研究室大学院生の方々の御助力に厚く御礼申し上げる。

参考文献

- 1) K.Toriyama and K.Hinata.鳥山欽哉、日向康吉. 1986. イネプロトプラストからの植物体再分化. 遺伝 40(6)
- 2) 林 泰行. 経塚淳子. 島本 功. 1986. イネ プロトプラストからの植物体再生. 育種 36別1:46-426
- 3) 大澤勝次. 高柳謙治. 岡山健夫. 1983. サトイモの組織培養による有用栄養系の大量増殖に関する研究 野菜試験場育種部研究年報
- 4) 大澤勝次. 高柳謙治. 大村修司. 勝谷範敏. 1984. サトイモ、ヤマイモの細胞融合による育種法の開発 野菜試験場育種部研究年報
- 5) T.Murashige and S.coog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with Tobaccotissue cultures Physiol. Plant. 15 : 473-497
- 6) T.Nagata and I. Takebe. 1971. Plating of isolated Tobacco mesophyll protoplasts on agrmedium. Planta. 99 : 12-20
- 7) O.L.Gamborg. R.A.Miller and K.Ojima 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cullus. Exp.cell.Res.50 : 151-158
- 8) K.N.Kao and M.R.Michayluk. 1975. Nutritional requirements for growth of *vinca hajastana* cell and prptoplasts at a very low population density in liquid media. Planta. 126 : 1105-1110
- 9) O.H.Lowry, N.J.Rowebronth, A.L.Farr and

- R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193 : 265-275
- 10) A. Altman, R. Kaur-Sawhney, and A. W. Galston. 1977. Stabilization of out leaf protoplasts through polyamine-mediated inhibition of senescence. *Plant Physiol.* 60 : 570-574.
- 11) Y. Takeuchi and A. Komamine. 1978. Composition of the cell wall formed by protoplasts isolated from cell suspension cultures of *Vinca rosea*. *Planta.* 140 : 227-232.
- 12) D. Y. Lu, D. Pental and E. C. Cocking 1982. Plant regeneration from seedling cotyledon protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* 107 : 59-63.
- 13) E. K. Archer. C. R. Landgren and H. T. Bonnet, 1982. Cytoplasm formation and enrichment from mesophyll tissues of *Nicotiana spp.* *Plant Science Letters.* 25 : 175-185
- 14) B. E. Gomez-Lepe, O. Y. Lee -Stadelman 1979: Effects of octylguanidine on cell permeability and other protoplasmic properties of *Allium cepa* epidermal cells. *Plant Physiol.* 64 : 532-535
- 15) O. Lee-Stadelman, I. Chung and E. J. Stadelmann 1985. Plasmolysis of glycine max mesophyll cells; The use of octylguanidine and its implication in protoplast isolation. *Plant Sci.* 38:1-7
- 16) C. Shin, T. Tseng and C. Hwa. 1979. Subcellular changes during protoplast isolation of *oryza sativa*. *L. Bot. Bull. Academia Sinica* 20:50-57.
- 17) J. Singh. 1982. Alterations of membranes in rice cells during lethal freezing and plasmolysis stress; Mechanism of freezing injury. *Plant Physiol.* 69: (Suppl) 106.
- 18) A. C. Cohen, R. B. Popovic and S. Zalic. 1979. Effects of polyamines on chlorophyll and protein content, photochemical activity and chloroplast ultrastructure of barley leaf discs during senescence. *Plant Physiol.* 64:717-720
- 19) B. J. Gno and O. Schieder, 1983. Callus and root formation from mesophyll protoplasts of chinese cabbage (*Brassica chinesis* L.) *Z. Pflanzenphysiol.* 110:375-377.
- 20) H. Uchimiya and T. Murashige. 1976. Influence of the nutrient medium on the recovery of dividing cells from tobacco protoplasts. *Plant Physiol.* 57:424-429
- 21) J. S. Machall and L. D. Dove. 1968. Ribonuclease activity in tomato leaves to development and senescence. *Nyw phytol.* 67:505-515
- 22) S. H. Cheng and H. Cao. 1984. The role of proteolytic enzymes in protein degradation during senescence of rice leaves. *Physiol. Plant* 62:231-232
- 23) P. Weckmann and P. Martin. 1984. Endopeptidase activity and nitrogen mobilization in senescing leaves of *nicotiana rustica* in light and dark. *Physiol. Plant.* 60:333-340
- 24) T. Mae and K. Ohira, 1985. The relationship between proteolytic activity and loss of soluble protein in rice leaves from anthesis through senescence. *Soil Sci. Plant Nutr.* 30(3):427-434
- 25) K. V. Thimann. 1985. The senescence of detached leaves of *Tropaelum*. *Plant Physiol.* 79:1107-1110
- 26) M. R. Thomas and R. J. Rose. 1983. Plastid number and plastid structural changes associated with tobacco mesophyll protoplast culture and plant regeneration. *Planta.* 158:329-338.
- 27) T. M. Wardlaw, P. L. Bhalla and M. J. Dalling. 1984. Changes in the number and composition of chloroplasts during senescence of mesophyll cells of attached and detached primary leaves of wheat (*Tritium aestivum* L.) *Plant Physiol.* 75:421-424
- 28) M. Nishimura and T. Akazawa. 1975. Photosynthetic activities of spinach leaf protoplasts. *Plant Physiol.* 55:712-716.
- 29) S. Schoch and F. X. Vielnerth. 1983. Chlorophyll degradation in senescent Tobacco cell culture (*Nicotiana tabacum* va. *sun sun*) *Z. Pflanzenphysiol.* 110:309-317.
- 30) M. B. Wilkins. 1969. Physiology of plant growth and development. Mc Graw-Hill, New York. p103-105.

- 31) F.Skoog and D.J.Armstrong. 1970. Cytokinins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21:367-370.
- 32) R.H.Hall. 1973. Cytokinins as a probe of developmental processes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24:424-426.
- 33) K.Kaul and P.S.Saliharwal.1974.Kinetin induced changes in 8-Aminolevalinic acid dehydratase of *tobacco callus*. *Plant Physiol.* 54:644-648.
- 34) R.M.Tetley and K.V.Thimann. 1974. The metabolism of out leaves during senescence. *Plant Physiol.* 54:294-303.
- 35) Y.Yoshida. 1961. Nuclear control of chloroplast activity in *Elodea* leaf cells. *Protoplasma* 54:476-492
- 36) Y.Yoshida.1974.Role of the cell nucleus in relation to the senescence of chloroplasts in detached *Elodea* leaves. *Simposia Cell Biol.*25:131-140.
- 37) H.T.Choe and K.V.Thimann.1974:The senescence of isolated chloroplasts. *Planta.* 121:201-203.
- 38) 大島雅子. 1981. *Tradescantia albiflora* のプロトプラスト及びサイトプラストの単離と、その培養過程における葉緑体の変化. お茶の水女子大学卒業論文.
- 39) K.Ohira, K.Ojima and Aujiwara.1973.Studies on the nutrition of rice cell culture. I. A. simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant & Cell Physiol.* 14:1113-1121.
- 40) T.Fujimura, M.Sakurai, H.Akagi, T.Negishi and A.Hirose. 1985. Regeneration of rice plant from protoplasts. *Plant tissue culture Letters.* 2(2):74-75.
- 41) 鳥山欣哉. 日向康吉. 1986.イネ, プロトプラストからの植物体再分化. *遺伝* 40 (6)
- 42) I.Portrykus, C.T.Harms. Jr, J.Tsang and A.W.Galston. 1977. Leaf pretreatment with senescence retardants as basis for protoplast improvement. *Plant & Cell Physiol.* 18:1309-1317.
- 43) K.N.Kao and M.R.Michayluk. 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplast of Alfalfa. *Z. Pflanzenphysiol.* 96:135-141.
- 44) C.Lu, V.Vasil and I.K.Vasil.1981. Isolation and culture of protoplasts of *Panicum maximum Jacq.* (Guinea Grass) somatic embryogenesis and plantlet formation. *Z.Pflanzenphysio.* 104:311-318
- 45) J.W.Heyser.1984. Callus and shoot regeneration from protoplasts of Proso Millet (*Panicum miliaceum*) *Z.Pflanzenphysiol.* 113:293-299.
- 46) 磯村純一. 湧口泰昌. 1981.組織培養法を応用したビタミンEの研究について *栄養と食料*34 : 513-522
- 47) 平井俊策. 1985.ビタミンEと老化…生化学の面から…ビタミンE—基礎と臨床:243.
- 48) C.J.Mittelheuser and R.F.M.Van—Stevenick. 1971. The ultrastructure of wheat leaves of Kinetin and ABA on detached leaves incubated in the dark. *Protoplasma.* 1973:239-252.
- 49) C.J.Mittelheuser and R.F.M.Van—Stevenick. 1971. The ultrastructure of wheat leaves. II. The effects of Kinetin and ABA on detached leaves incubated in the light. *Protoplasma.* 1973:253-262.
- 50) R.K.Horine and A.W.Ruesink. 1972. Cell wall regeneration around protoplasts isolated from *Convolvulus tissue culture*. *Plant Physiol.* 50:438-445
- 51) Y.Meyer and W.O.Abel. 1975. Budding and cleavage division of Tobacco mesophyll protoplasts in relation to pseud-wall and wall formation. *Planta.* 125:1-13.
- 52) 久留戸 涼子. 1986.アブラナ属のプロトプラストの単離と培養に及ぼす浸透圧の影響 *お茶の水女子大卒業論文*