

高張酵素液処理によるネギのサイトプラストの単離

田代 洋丞・水谷 高幸・大山 知泰・宮崎 貞巳

(生物工学講座)

平成3年10月31日受理

Isolation of Cytoplasts from *Allium fistulosum* L. by Treatment with Hypertonic Enzyme Solution

Yosuke TASHIRO, Takayuki MIZUTANI, Tomohiro OHYAMA and Sadami MIYAZAKI

(Laboratory of biotechnology and plant breeding)

Received October 31, 1991

Summary

A competent method was developed for the isolation of cytoplasts from *Allium fistulosum* L.

Cytoplasts were isolated easily by the treatment of elongated inner epidermal cells with hypertonic enzyme solution. They were purified by the density gradient centrifugation with Ficoll. After centrifugation remaining protoplasts with nuclei were removed from cytoplast suspension by micromanipulation.

The cytoplasts isolated and purified by these methods were available for electric cell fusion.

Key words: *Allium fistulosum*, cytoplast, plasmolysis, hypertonic enzyme solution, cell fusion

緒 言

植物の細胞質は独自の遺伝子を持ち、これらの中には雄性不稔性と関係する遺伝子などが含まれているので、重要な育種材料である。特に、タマネギ (*Allium cepa* L.) の同種内に存在する雄性不稔細胞質の利用に関する研究は古くから行われ^{1,2)}、同細胞質はタマネギの一代雑種の普及に大きな貢献をしている³⁾。一方、田代⁴⁾はシャロット (*A. cepa* L. *Aggregatum* group)⁵⁾ とネギ (*A. fistulosum* L.) の核と細胞質の相互作用をゲノム添加法によって研究し、ネギの細胞質がシャロットの核内遺伝子の形質発現、特に、葯の発達に顕著な影響を及ぼすことを明らかにした。このことはネギの細胞質を利用したタマネギ雄性不稔系統の作出の可能性が有ることを示唆している。

従来異種細胞質を有する植物を作出する場合には核置換 (細胞質置換) が行われ、その方法としてコルヒチン核置換法あるいは戻交雑核置換法が用いられて来た⁶⁾。しかし、これらの方法では交雑可能な組み合わせに限られること、中間産物がある程度の稔性を有する必要があること、さらに、核置換が完了するまでに永年を要することなどの制約があり、種間で核置換が成功した植物は少なく、ネギ属においては成功例が無い。そこで、近年著しく進歩した細胞融合技術を単離したネギの細胞質体 (サイトプラスト) とタマネギの核の融合に応用することによつ

て、ネギの細胞質を有するタマネギ（核細胞質雑種）を一挙に作出することが可能になれば便利である。

細胞融合によりタマネギとネギの核細胞質雑種を作出する為には良好なネギサイトプラストを単離した状態で得る方法を確立する必要がある。これまでに植物のサイトプラストを単離するための種々の方法が考案されているが⁷⁾、均質で良好なサイトプラストを大量に得る方法としては十分ではない。本研究は、高張液中で植物細胞が原形質分離を起こす際に生じる原形質の分割現象を応用して、良好なネギサイトプラストを効率よく大量に単離する方法を開発することを目的として行った。

実験1. 種々の浸透圧下でのネギ表皮細胞の原形質分離の様相

まず、ネギの原形質の分割現象を引き起こす条件を明らかにするために、ほぼ均一で細長い細胞で構成されているネギの表皮を用いて、種々の浸透圧下での原形質分離の様相を調べた。

材料及び方法

ネギの展開葉の葉鞘から内側の表皮を 3×3 mm の大きさに切り取り、0.5~1.2M ソルビトール水溶液（塩化カルシウムを10mM 添加）に浸漬し、30分後に表皮細胞の原形質分離の様相を顕微鏡で観察した。

結果及び考察

0.55M 以上のソルビトール濃度区で原形質分離が観察され、0.7M 以上ではすべての表皮細胞が原形質分離を起こしていた（第1図）。さらに、0.7M 以上では原形質が細胞の長軸方向に大きく収縮し、この軸と直角な細胞壁から分離するとともに、核を含む部分（ミニプロトプラスト）と細胞質のみの部分（サイトプラスト）に分割されている細胞が観察された（写真1）。このようにして形成されたミニプロトプラスト及びサイトプラストのほとんどは分割面を含めて全表面が原形質膜で包まれており、原形質が流出したり、崩壊することはなかった。ソルビトール濃度が高いほど原形質の収縮の程度は大きくなり、0.8M では過半数の、0.9M 以上ではほとんどの細胞の原形質が分割され、サイトプラストを形成した（第2図）。また、0.7~1.0M での細胞あたりのサイトプラスト数はソルビトール濃度にほぼ比例して大きくなった（第3図）。しかし、1.2M でのそれは1.0M とほとんど変わ

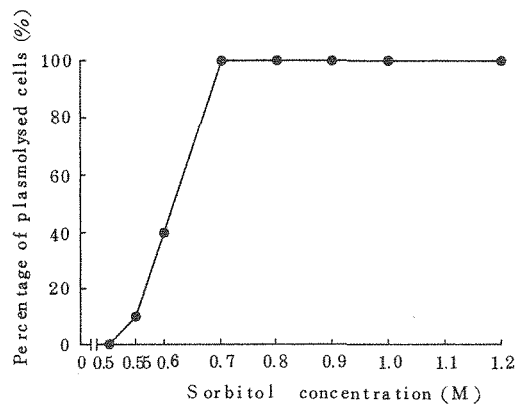


Fig. 1 Effect of sorbitol concentration on plasmolysis of inner epidermal cells of *Allium fistulosum*.

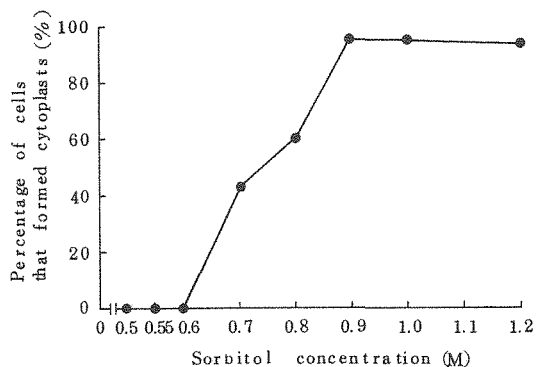


Fig. 2 Effect of sorbitol concentration on cytoplast formation of inner epidermal cells of *Allium fistulosum*.

らなかった。

なお、塩化カルシウムを添加しない区も設けて同様な実験を行い、添加した区と比較した結果、10mMの塩化カルシウムの添加はソルビトール濃度が0.7及び0.8Mの区でサイトプラスト形成を促進し、1.0及び1.2Mの区でサイトプラストの崩壊を抑制する効果があると考えられた。

実験2. 高張酵素液処理によるネギサイトプラストの単離

実験1の結果から、ネギの展開葉の葉鞘表皮細胞を0.7M以上のソルビトール水溶液で処理すると、原形質分離のみならず原形質の分割が起こり、細胞壁内にサイトプラストが容易に形成されることが明らかになった。そこで、本実験ではこの高張液処理とプロトプラスト単離用の酵素処理を組み合わせることでネギサイトプラストの単離を試みた。

材料及び方法

実験1と同様な材料を0.5~1.2Mソルビトール水溶液にペクトリアーゼ Y-23を0.2%、セルラーゼオノヅカ RSを1%、塩化カルシウムを10mMの濃度になるように加えた酵素液に浸漬し、2.5~3時間振とう処理した。得られたプロトプラスト懸濁液に少量の酢酸カーミンを加えて核染色を行った後、プロトプラストの核の有無を顕微鏡下で調査し、無核のプロトプラスト(サイトプラスト)が調査した全プロトプラストに占める割合(百分率)をサイトプラスト率とした。さらに、マイクロメーターを用いてサイトプラストの直径を調査した。

結果及び考察

いずれのソルビトール濃度区でもサイトプラストが単離され(写真2)、サイトプラスト率は0.5~0.7M区間で有意差がなく約15%であったのに対し、0.8M以上では濃度に比例して高くなり、1.2Mでは約50%であった(第4図)。

実験1で細胞壁内に形成されたサイトプラスト及びミニプロトプラストが、酵素処理によって全て細胞壁から解放され、単離されると仮定し、第3図の結果をもとにそれぞれのソルビトール濃度区の単離後のおおよそのサイトプラスト率を計算すると、0.5~0.6M:0%, 0.7M:30%, 0.8M:50%, 0.9M:70%, 1.0及び1.2M:75%となる。本実験の結

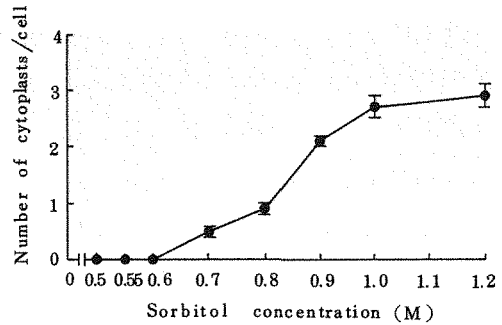


Fig. 3 Effect of sorbitol concentration on number of cytoplasts in inner epidermal cells of *Allium fistulosum*.

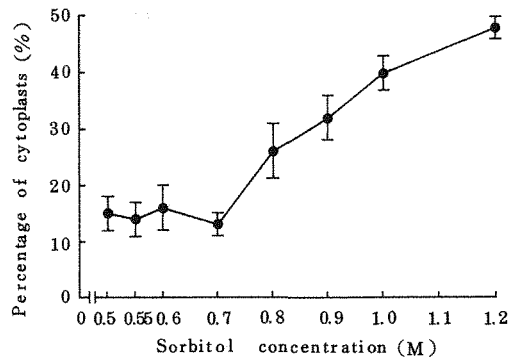
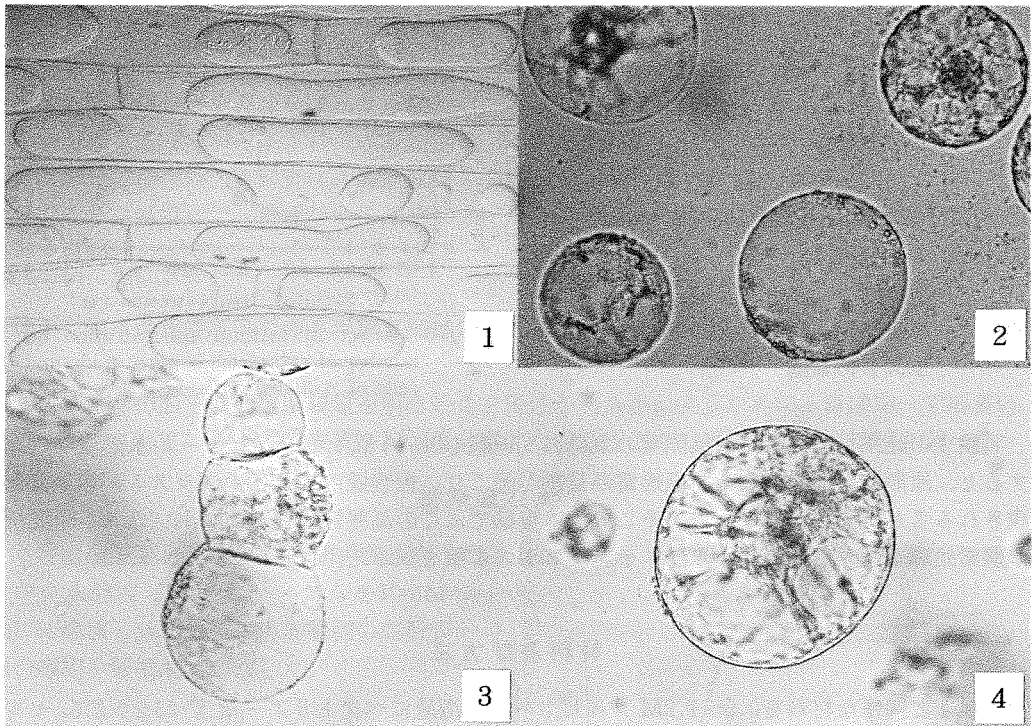


Fig. 4 Effect of sorbitol concentration on percentage of cytoplasts in protoplasts isolated from inner epidermal cells of *Allium fistulosum*.



Explanations of photographs 1-4.

1. Inner epidermal cells of *Allium fistulosum* treated with 0.8M sorbitol for 30 minutes. Plasmolysis and split of protoplasm occur remarkably.
2. Cytoplasts (lower 2) and miniprotoplasts with nuclei (upper 2) isolated from inner epidermal cells of *Allium fistulosum* treated with hypertonic enzyme solution.
3. Electrofusion of cytoplasts (top and bottom) with miniprotoplast (center) isolated from inner epidermal cells of *Allium fistulosum*.
4. A fused cell 30 minutes after electrofusion in Photograph 3. The shape has become globular.

果をこれらの計算値と比較すると、0.5~0.6M 区では約15%高いが、0.7~1.2M 区では約15~35%低い。したがって、本実験では高張液処理に酵素処理を加えたことにより、0.5~0.6M 区では新たにサイトプラストが形成されるようになったが、0.7~1.2M 区ではサイトプラストが形成されにくくなったことになる。本実験の結果からこれらの現象について原因を解明するのは困難であるが、1) 材料の表皮を切り出したときに切断された細胞がサイトプラストを形成した、2) 酵素処理中に部分的に消化された細胞壁から突出した原形質がサイトプラストを形成した、3) 酵素処理により原形質と細胞壁の付着力が減少し、原形質を分割する張力が減少した、などの原因が考えられる。なお、0.5~0.6M のソルビトールを添加した酵素液は多くの植物のプロトプラスト単離に用いられているので、ネギと同様に単離されたサイトプラストが融合用のプロトプラストへ混入している可能性があり、今後の研究課題として興味もたれる。

Bradley⁸⁾はタマネギの鱗片の内側の表皮をB5培地の無機塩類にマンニトールを0.7M、セルリシンを0.5%及びペクチナーゼを0.1%加えた酵素液で5時間処理した後に表皮細胞を観察した結果、細胞壁はまだ未消化であったが、原形質は収縮し、約8%の細胞で原形質が核を含む部分と含まない部分に分割されており、さらに、酵素液で18時間処理した後に単離されたプロトプラストを観察した結果、低率ではあるがサイトプラストが含まれていたことを報告している。著者らの実験I及び本実験の0.7M 区の結果を彼の結果と比較すると、著者の方が処理液の浸透圧は低いにもかかわらず、サイトプラスト形成細胞率(40%以上)はBradleyのそれ(約8%)よりかなり高く、単離後のサイトプラスト率(約15%)もBradleyのそれ(a small percentage)より高かった。その主な原因として両者が用いた材料の違いが考えられるので、著者らはネギの葉鞘及びタマネギの鱗片を用いて内側の表皮細胞の縦径と横径の比を調査した。その結果、ネギでは約20:1であったのに対し、タマネギでは約6:1であった。したがって、ネギの葉鞘の表皮細胞はタマネギの鱗片のそれより細長いために高張酵素液処理によりサイトプラストを単離し易いと考えられる。

単離したサイトプラストの直径は0.5~0.8M 区間で有意差が無く、約50 μ mであったが、0.9M 以上では濃度に比例して小さくなり、1.2M で約35 μ mであった(第5図)。また、1.2M 区で単離されたサイトプラストを0.8M ソルビトール水溶液に浸漬すると直径が大きくなったが、0.8M 区と比較すると明らかに小さかった。したがって、0.9M 以上で単離されたサイトプラストの大きさは高張酵素液処理により1個の原形質が分割されて形成されたサイトプラストの数に反比例していると考えられる。

実験3. フィコール不連続密度勾配遠心分離及びマイクロマニピュレーションによるネギサイトプラストの精製

実験2で高張液処理と酵素処理を組み合わせることにより容易にサイトプラストを単離することができたが、得られたサイトプラストはミニプロトプラスト及び分割されなかったプロトプラストと混在しているので、これらから分離・精製する必要がある。そこで、本実験では核と細胞質の比重の相異を利用し

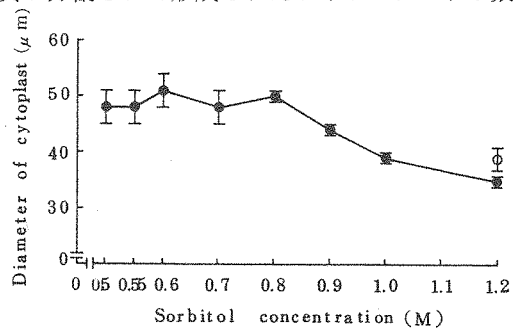


Fig. 5 Effect of sorbitol concentration on diameters of cytoplasts from inner epidermal cells of *Allium fistulosum*.
○: Sorbitol concentration was decreased from 1.2M to 0.8M after cytoplast isolation.

たサイトプラストの精製方法を検討した。さらに、精製を完全にするために、マイクロマニピュレーションによるミニプロトプラスト及び分割されなかったプロトプラストの除去を試みた。

材料及び方法

実験2のソルビトール0.8M区及び1.2M区の高張酵素液処理により得られたプロトプラスト懸濁液を、フィコール (Type 400) を用いた不連続密度勾配遠心分離 (第6図) に2000rpmで30分間かけ、各画分のプロトプラストの総数及びサイトプラストの数を調査した。さらに、倒立顕微鏡上でマイクロインジェクター (ナリシゲIM-6) と連結したマイクロピペットをマイクロマニピュレーター (ナリシゲMO-104) で操作しながら、サイトプラスト率が高い画分からミニプロトプラスト及び分割されなかったプロトプラストをピックアップ除去し、サイトプラストのみを残した。

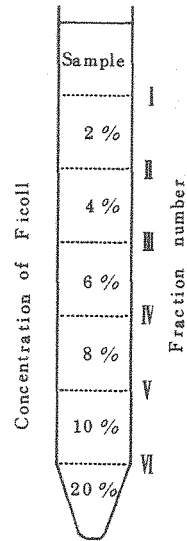


Fig. 6 Ficoll density gradient for separation of cytoplasts isolated from inner epidermal cells of *Allium fistulosum*.

結果及び考察

フィコール不連続密度勾配遠心分離の結果、プロトプラストの総数は0.8, 1.2M区共に画分IIIが最も多かったが(第7図)、サイトプラスト率は両区共に画分Iが最も高く、約85%であった(第8図)。したがって、フィコール不連続密度勾配遠心分離によって0.8M区ではサイトプラスト率を約3倍に、1.2M区では約2倍に上げることができた。しかし、画分Iにはなお約

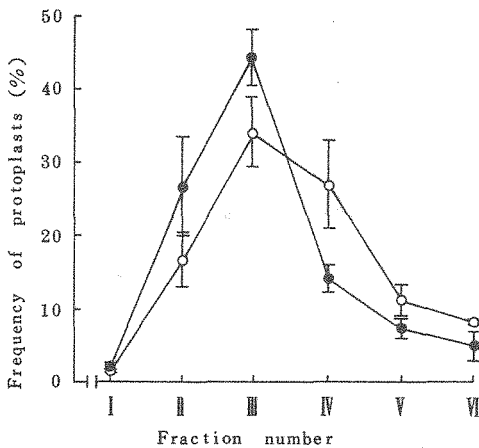


Fig. 7 Distribution of protoplasts, including miniprotoplasts and cytoplasts, to fractions after Ficoll density gradient centrifugation.
○—○ : 0.8M sorbitol
●—● : 1.2M sorbitol

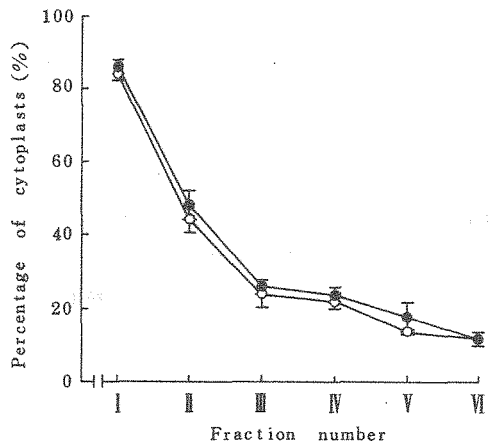


Fig. 8 Percentage of cytoplasts in fractions after Ficoll density gradient centrifugation.
○—○ : 0.8M sorbitol
●—● : 1.2M sorbitol

15%の有核のミニプロトプラストあるいは分割されていないプロトプラストが含まれているので、細胞融合の材料としては完全ではない。そこで、画分Iからマイクロピペットを用いてこれらの有核のプロトプラストを除去した結果、サイトプラストのみ(サイトプラスト率100%)の懸濁液を得ることができた。

実験IIで述べたBradleyの実験では18時間酵素液で処理した後に得られたプロトプラスト懸濁液の中からマイクロピペットを用いてサイトプラストの方をピックアップすることによりサイトプラストのみの集団を得ている。しかし、彼の方法では細胞融合を行うのに十分な量のサイトプラスト集団を得ようとすればマイクロマニピュレーションのために時間がかかるうえに、マイクロピペットの操作によってサイトプラストが障害を受け易いと考えられる。また、大きな遠心力(20000~45000×g)やサイトカラシンBを用いて植物のプロトプラストを脱核することによりサイトプラストを単離する方法が考案されているが^{9,10)}、これらの方法では脱核の過程で細胞質にも大きな遠心力が負荷されるので、色素体等のオルガネラが核とともに除去されてしまったり、細胞質が障害を受けるなどの欠点がある(著者ら、未発表)。これらの点で、著者らの方法はサイトプラストの単離及び精製が効率的かつ穏やかであるので、優れた方法であると言えよう。

実験4. 高張酵素液処理で単離されたネギサイトプラストの電気融合

実験2および3で単離・精製したネギサイトプラストが実際に細胞融合の材料として利用可能であるかどうかを確認するためにこれらを用いて電気融合を試みた。

材料及び方法

実験2及び3で述べた方法で単離・精製したネギのサイトプラストとミニプロトプラストを組み合わせ、0.6M ソルビトール水溶液の中で混合し、電気融合処理をおこなった。電気融合装置は島津SH-2を用い、融合条件は細胞泳動用高周波電圧(VAC)を30V、融合用方形波パルス電圧(VDC)を300V及び同パルス幅(PW)を30 μ sとした。

結果及び考察

サイトプラストとミニプロトプラストは泳動後、融合し、時間の経過とともに融合細胞が球状になるのが観察された(写真3, 4)。

以上の結果から、本方法で得られたネギサイトプラストは電気融合の材料として十分に利用可能であることが実証された。なお、本方法で得られるサイトプラストは元となった細胞質の一部分から成っているため、細胞融合に用いる場合には相手核との量的関係が問題になると考えられるが、適当な数のサイトプラストを1個の核と融合させることにより細胞質と核の量的関係を調節することが可能であり、この問題は解決されるであろう。著者らはネギサイトプラストの細胞融合の相手として有効なタマネギの核の単離方法、両者間の融合細胞からの核細胞質雑種植物の育成方法などについてさらに検討中である。

謝 辞

本研究は文部省科学研究費補助金(課題番号63480036)により行った。また、本研究の遂行にあたっては厚地真紀子嬢の熱心な協力を得た。記して感謝の意を表する。

摘 要

ネギの細胞質体(サイトプラスト)を単離・精製する為の方法を検討した。

1. ネギの葉鞘の表皮細胞を高張液(0.7M以上のソルビトール水溶液)で処理すると、細胞が原形質分離を起こすのみならず、原形質が核を含む部分(ミニプロトプラスト)と細胞質のみの部分(サイトプラスト)に分割され、浸透圧が高いと細胞あたりのサイトプラスト数が大きくなった。
2. サイトプラスト形成のための高張液処理とプロトプラスト単離のための酵素処理を組み合わせた高張酵素液処理によりネギの表皮細胞から容易にサイトプラストが単離された。高張酵素液の浸透圧が高いと、単離された全プロトプラスト中のサイトプラスト率は高くなったが、サイトプラストの直径は小さくなった。
3. 高張酵素液処理によって得られたサイトプラストを精製するためフィコールを用いた不連続密度勾配遠心分離を行った結果、サイトプラスト率を約85%まで高めることができた。さらに、これらのサイトプラストと混在しているミニプロトプラスト及び分割されなかったプロトプラストをマイクロマニピュレーションにより除去した結果、サイトプラストのみの集団がえられた。
4. ネギの表皮細胞から得られたサイトプラストを用いてミニプロトプラストとの電気融合を行った結果、これらは泳動後、融合し、融合細胞は球状になった。したがって、本方法で得られるサイトプラストは細胞融合の材料として利用可能であることが実証された。

引 用 文 献

1. Jones, H.A. and S.L. Emsweller (1936). A male-sterile onion. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **34**: 582-585.
2. Jones, H.A. and A.E. Clarke (1943). Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **43**: 189-194.
3. Jones, H.A. and L.K. Mann (1963). *Onion and their allies*. Leonard Hill [Book] Ltd. London. pp.73-97.
4. 田代洋丞 (1984). ワケギの起源に関する細胞遺伝学的研究. 佐賀大農彙 **56**: 1-63.
6. Tashiro, Y., S. Miyazaki and K. Kanazawa (1982). On the shallot cultivated in the countries of southeastern Asia. *Bull. Fac. Agr., Saga Univ.* **53**: 65-73.
6. Kihara, H. (1951). Substitution of nucleus and its effect on genome manifestation. *Cytologia* **16**: 177-193.
7. Bradley, P.M. (1983). The production of higher plant subprotoplasts. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**: 117-123.
8. Bradley, P.M. (1978). Production of enucleated plant protoplasts of *Allium cepa*. *Plant Science Letters* **13**: 287-290.
9. Lörz, H., J. Paszkowski, C. Dierks-Ventling and I. Potrykus (1981). Isolation and characterization of cytoplasts and miniprotoplasts derived from protoplasts of cultured cells. *Physiol. Plant.* **53**: 385-391.
10. Bracha, M. and N. Sher (1981). Fusion of enucleated protoplasts with nucleated miniprotoplasts in onion (*Allium cepa*). *Plant Science Letters* **23**: 95-101.