

高等植物プロトプラストの選択的融合法の開発 (I)

今西 茂・樋浦 巖・長岡邦夫*

(山形大学農学部園芸繁殖学研究室,

*山形大学教育学部機械学研究室)

(昭和58年9月1日受理)

Development of a new method to fuse selectively two protoplasts
from different parents in higher plants (I)

Shigeru IMANISHI, Iwao HIURA and Kunio NAGAOKA*

*Laboratory of Horticultural Breeding and Propagation,
Faculty of Agriculture, Yamagata University,*

**Laboratory of Mechanical Engineering, Faculty of
Education, Yamagata University.*

(Received September 1, 1983)

I 緒 論

植物育種の分野において、プロトプラスト融合法を用いた体細胞雑種育成の研究は、種間、属間などの性的交雑の不可能な組合せ間の雑種獲得を可能にし、遺伝子源の飛躍的な増大をもたらすことから、過去10年余にわたって積極的に推進され、かなりの成果を挙げつつある (AHUJA, 1982; MELCHERS, 1982)。しかし、この研究がさらに進展するには、順次解決しなければならない問題点もまだ多数存在する。現在、研究進展の最大の隘路は雑種細胞選抜法であろう。懸念した2種類のプロトプラストに融合処理を施すと、異種間の融合細胞ばかりでなく、同種間の融合細胞や融合しない細胞。しかも、融合細胞においては2個のプロトプラストの融合したものばかりではなく、3個以上の融合したものが混在する集団がえられる。その中から、2個のプロトプラストが融合した雑種細胞またはそれに由来する植物を選抜するのは一般に容易ではない。

もし、2種類のプロトプラストを1対1で選択的に高頻度で融合させる方法が確立されれば、雑種細胞の選抜は容易となり、プロトプラストの融合による体細胞雑種の育成に関する研究にとって有力な手段となるであろう。かような観点から、本研究は薄い金属板に規則正しくあけられた孔をもつスクリーンに、2種類のプロトプラストを順次1個ずつ挿入し、1対1で接着させる方法について検討した。

II 材料と方法

プロトプラストの単離と調整

は種後15日前後のトマト, *Lycopersicon esculentum* (品種強力大型東光) の子葉から葉肉プロトプラストを単離した。すなわち、子葉の裏側表皮を剥いで CPW 液 (KH_2PO_4 27.2 mg/l, KNO_3 101.0 mg/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,480 mg/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 246 mg/l, KI 0.16 mg/l, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg/l, PH 5.7) にマニトールを最終濃度9%で加えた高張液に浮べ、約1時間後、この高張液にメイセラゼ P 2.5%, マセローチム R10 0.25%, ドリストラ

ーゼ0.25%をとかした酵素液に移した。酵素処理は静置状態で29℃暗黒下で4時間おこなった。処理後、低速の遠心(50×g, 5分間)によってえられた葉くづやプロトプラストを21%ショ糖を含むCPW液に懸たくし、同じく低速遠心(70×g, 8分間)によってプロトプラストを浮上させた。集めたプロトプラストは37 μm と53 μm のメッシュを用いて、37 μm 以下および53 μm 以上のものを除去した。

選択的接着法に用いる主な装置

- 光学顕微鏡：前後左右斜めに動かすことのできるステージをもつ。
- 25 μm メッシュ(飯田製作所製)：直径3cm, 深さ0.5cmのステンレスメッシュ。
- スクリーン(飯田製作所製)：厚さ50 μm の四角いニッケルの薄板に1辺の長さ約50, 55, 60または70 μm の四角の孔が250 μm の間隔で前後左右に真直に並んであけられている。表面を円滑にするため電解研磨して用いた。
- 対物レンズアタッチメント：対物レンズの鏡筒にはめることのできるリングに、相対して2本同じ長さの足があり、このリングには鏡筒に固定するためのねじが左右につけられている。

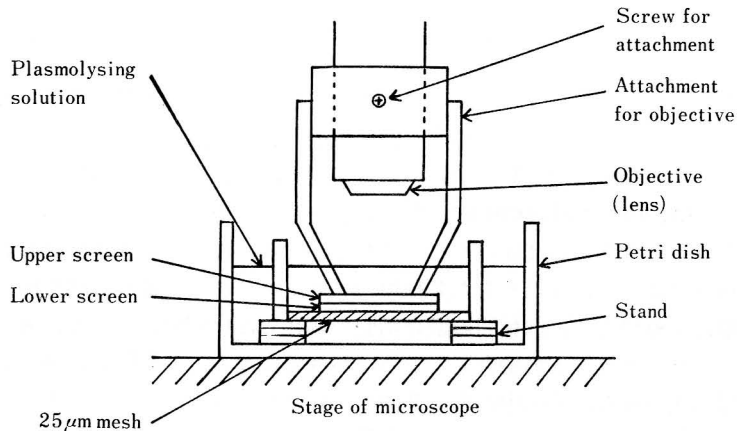


Fig. 1. Side view of an apparatus for selective fusion of protoplasts.

Note 1: Screen is 50 μm in thickness and has square holes with length of 60 μm in one side and the holes are in line with an interval of 250 μm .

Note 2: Attachment for objective is used to press an upper screen.

装置の設定

全体の装置は第1図に示す通りである。25 μm メッシュの網の上にスクリーン(下部スクリーン)を1枚張りつけ、これを径6cmのシャーレに固定された2個の台の上に張りつけて、それら全体を、顕微鏡のステージに動かないように固定した。そして、上部スクリーンを下部スクリーンの上に乗せた。つぎに、対物レンズ(P15X)の鏡筒に対物レンズアタッチメントをはめるが、その足が上部スクリーン上に接触したとき上部スクリーンの表面に焦点が合うように装着した。つづいて、プロトプラストの単離に用いた高張液をシャーレにそそぎ、液面が上部スクリーンの上までくるようにした。その後、検鏡(接眼

レンズ; WF 10X) しつつステージを動かし, 上下スクリーンの孔を一致させた。

プロトプラストの1対1の接着のための操作

一方のプロトプラストの懸だく液をマイクロピペットで1滴づつ25 μm メッシュ上の上部スクリーンの上から滴下し, プロトプラストがスクリーンの全部の孔に入ったことを確認したのち, ステージを動かして下部スクリーンの孔を少しずらした。上部スクリーンに残ったプロトプラストをマイクロピペットを用いて全て除去したのち, ステージを動かして上・下スクリーンの孔を一致させ, 再度, プロトプラスト懸だく液を滴下した。

III 結果と考察

37 μm と53 μm のメッシュによってふるい分けられたプロトプラストは, 約90%が37 μm から53 μm の間の大きさであった。大きさが均一であるほどプロトプラストをそれと対応する大きさの孔へ1個づつ挿入するのに適していると考えられるので, プロトプラストの大きさの斉一度を高めるために, 例えば, 37 μm と44 μm あるいは44 μm と53 μm のメッシュによってふるい分けることを試みる必要があると思われる。

Table 1. Percentage of the respective holes which were occupied by one to more than three protoplasts, when four types of screen in size of a hole were used

Size of a hole in an upper or lower screen (μm)	No. of the protoplasts in one hole in lower screen		No. of the protoplasts in one hole in a set of upper and lower screens		
	1	2-	1	2	3-
50	90-100*	0-10		—	
55 or 60	80- 90	10-20	0 - 5	70-90	10-30
70	60- 70	30-40		—	

Note : * ; including a number of deformed protoplasts which were forced to be put into smaller holes than the protoplasts in size.

上・下スクリーンの孔を一致させたのち, プロトプラストの懸だく液を滴下すると, 孔には1個ないし2, 3個のプロトプラストが挿入された。つぎに, 上・下スクリーンの孔をずらして上部スクリーン上のプロトプラストを除去し, 再び, 孔を一致させると, 孔の大きさや実験の反復間で変動はあったが, 下部スクリーンの孔には60~100%の割合で1個のプロトプラストが挿入されていた(表1)。スクリーンの孔の大きさの影響を検討してみたが, 70 μm の場合には2個以上挿入される場合が30~40%に達し, 逆に, 50 μm の場合には2個以上挿入されたものは非常に少なかったが, プロトプラストの変形しているものが20~30%に達した。55 μm または60 μm の孔をもつスクリーンを使用すると, 1個のプロトプラストが挿入される割合は80~90%前後であり, 残りの10%前後には2個挿入されていたり, こわれたプロトプラストが挿入されていた。つぎに, 再度プロトプラスト懸だく液をスクリーン上に滴下すると, 70~90%の孔に2個のプロトプラストが挿入された(表1)。孔に挿入されなかったプロトプラストはマイクロピペットで静かに除去した。こわれかかったプロトプラストの挿入や小形のプロトプラストが2個以上入ることのため, 正常なプロトプラストを1個づつ2個全ての孔に挿入することはできないにしても, 80~90%の割合で目的を達することが可能であった。

この装置を用いる場合の問題点は、まず、上部スクリーンを押えるアタッチメントが対物レンズに固定されているため、スクリーン上の視野を動かすことができず、また、ステージの上下動による焦点合せができないことである。ただし、焦点合せは液の増減によって可能であった。他のもう一つの問題点は、2種類のプロトプラストを1対1で孔に挿入したのち、上部スクリーンに残ったプロトプラストを除去する方法にある。マイクロピペットで吸い取る方法では吸引力が強すぎると孔に挿入されたプロトプラストも吸い出されてしまうからである。それゆえに他の方法を工夫する必要があると考えられる。

これらの点が解決されれば、本研究の選択的プロトプラスト接着法は選択的融合法へ結びつけることが可能であると考えられる。

高等植物のプロトプラストの選択的融合法に関しては、ZIMMERMANN & SCHEURICH (1981)が電気的方法によって2種類のプロトプラストを高頻度で選択的に融合させうる可能性のあることを報告した。すなわち、*Vicia faba*の葉肉プロトプラストを用い、電極間でプロトプラストを“dielectrophoresis”によって1対1で接着させ、つづいて電気的刺激によって融合させた。しかし、この方法は高価な装置を必要とする上に、電気的刺激によってプロトプラストが損傷を受ける欠点があると考えられる。本研究におけるプロトプラストを孔に挿入する方法は、ZIMMERMANNらの方法の欠点を回避できる可能性があり、さらに、この方法は機械的方法によって1個ずつ2個のプロトプラストを捕捉し隔離する方法であるから、最終的にはより高頻度で雑種細胞を獲得する可能性が期待できであろう。

IV 摘 要

プロトプラストの選択的融合法を開発するため、2種類のプロトプラストをそれぞれ1個ずつ1対1で大量に接着させる装置を考案した。本装置では、顕微鏡のステージに固定したシャーレ内に、きわめて目の小さいメッシュが固定されており、その中に、一定の間隔で孔をあけられたスクリーンが2枚重ねて置かれ、下部スクリーンはメッシュの網に接着し、上部スクリーンは対物レンズに装着したリングで下部スクリーンに押えつけてある。操作の手順はつぎのようである。

- (1) 対物レンズのアタッチメントで上部スクリーンを押え、検鏡しつつステージを動かして、上部スクリーンと下部スクリーンの孔を一致させる。
- (2) プロトプラストの懸たく液をマイクロピペットにより上部スクリーンの上に滴下し、プロトプラストが上・下スクリーンの孔に入ったことを確認してからステージを動かして下部スクリーンの孔を少しずらす。
- (3) 上部スクリーンに残っているプロトプラストをピペットで吸い取り除去する。
- (4) 上・下スクリーンの孔を一致させたのち、再び、プロトプラスト懸たく液を上部スクリーンの上に滴下する。孔に挿入されたもの以外のプロトプラストはマイクロピペットで静かに除去する。

以上の手順によって、顕微鏡の視野内の80~90%の孔に、プロトプラストを2個ずつ挿入することが可能であった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、本学部園芸繁殖学研究室白岩恵美子氏には実験材料の準備を一部担当していただいた。ここに記し感謝の意を表します。

引用文献

- 1) AHUJA, M. R.(1982). Isolation, culture, and fusion of protoplasts : Problems and prospects. *Silvae Genetica* **31** ; 2-3 : 66-77.
- 2) MELCHERS, G. (1982). The first decennium of somatic hybridization. Proc. 5 th Intl. Cong. Tissue and Cell Culture. *Plant Tissue Culture*. **1982** : 13-18.
- 3) ZIMMERMANN, U. and P. SCHEURICH (1981). High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta* **151** : 26-32.

Summary

In order to develop a device for selective fusion of protoplasts, an apparatus for selective adhesion of protoplasts was devised. In this apparatus, two metal screens, in which holes of equal size were bored at a regular interval, were piled and set in a petri dish fixed on the stage of microscope. The procedure for bringing two protoplasts in touch with each other is the following. After the holes of a lower screen are made to meet to those of upper one, protoplast suspensions are dropped into plasmolysing solution on the upper screen. Being filled with protoplasts, the holes of the two screens are shifted a little from each other and then protoplasts remaining on the upper screen are removed by pipetting. Holes of the two screens are made to meet each other and protoplasts are added again onto the upper screen. Protoplasts except for those which are put into holes are gently removed with a micropipette. By means of this procedure, 80-90 percent of the holes in the field of vision were occupied by two protoplasts in a hole.