

プロトプラストの培養

誌名	農林水産技術研究ジャーナル
ISSN	03879240
著者	大槻, 義昭
巻/号	11巻6号
掲載ページ	p. 32-36
発行年月	1988年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



プロトプラストの培養

—イネにおけるニューバイテックの基本—

大槻 義昭

1. はじめに

1月5日付の読売新聞に「遺伝子注入、稲を改造」と題して、「植物工学研究所が世界で初めて、遺伝子工学の方法で稲を改造することに成功した」と報じ、ハイグロマイシンB耐性遺伝子が組み込まれた稲の写真が紹介された。

この研究は、バイオテクノロジー（生命工学）の中の遺伝子工学によって作物改良を行なおうとする研究の先駆けとなるもので、本文の主題である「イネのプロトプラスト培養」の技術が基礎となっている。

プロトプラスト培養技術とは、1個の裸の細胞を取り出して培養を開始し、植物体まで育て上げる一連の培養技術を指し、植物種を特定しないのであれば15年以上も前に開発された技術である。

プロトプラスト培養が可能であるか否かは、材料とする植物の種類によって大きく異なる。双子葉植物のなかには「可能」な種が多数あるが、単子葉植物は非常に困難な植物とされ、2～3年前までは成功例がなかった。単子葉植物の中で最初に成功したのはイネのプロトプラスト培養であり、日本の研究者の活躍が目立っている分野である。

本文では、一般の方には聞き慣れない言葉「プロトプラスト培養」について、最初に、なぜ注目されているのかを述べ、次にイネにおけるプロトプラスト培養の研究進捗状況などを紹介してみたいと思う。

なお、「プロトプラスト」と言う名を聞いて、球形の植物細胞を思い浮かべることが出来、植物の遺伝子工学や細胞融合と深い関係があることを知っておられる読者には、本文は不要かも知れない。

Yoshiaki Otsuki : A basic bio-technology for rice
“Protoplast Culture”

2. プロトプラストのルーツ

1966年、筆者が農林省（当時）植物ウイルス研究所に採用され、治療研究室に配属された時のことである。建部 到室長（現名古屋大学理学部教授）から「プロトプラストはどういうものですか？」と質問された。私は「…なんとかプラストは粒状のものだろうし、プロトは原を意味するのだから、『原粒体』とでも訳するのかな。でも、そんな日本語は聞いたこともないし…」と答えられないでいると、室長は「原形質体と呼んで、細胞壁のない裸の細胞のことですよ」と説明され、「これを読んでおいて下さい」と一遍の論文を手渡された。

その論文は1960年英国コッキング博士が「トマト果実の柔組織から酵素処理によってプロトプラストを作り出した」ことを発表したものであった。この論文が高等植物のプロトプラストを世界で初めて酵素的に取り出すのに成功した報告で、その後植物ウイルス学、細胞学、発生学等の植物学分野および細胞融合、遺伝子工学等のバイオテクノロジー分野などで研究材料となるプロトプラストを世に送り出した論文である。

この論文を支えとして、私達は植物組織のなかで最も一般的な材料—葉—を用いて、酵素的な方法で大量のプロトプラストをとり、ウイルス感染の研究に使うことを目的に実験を開始した。

3. プロトプラストはどんなもの？

前項で室長はプロトプラストのことを「原形質体と呼んで、細胞壁のない裸の細胞のことですよ」と説明された。この内容をもう少し細かく説明しよう。

生物学辞典には「細胞膜につつまれた原形質の塊をいい、細胞壁を除いた全細胞内容をさす。……と

り出されたプロトプラストはもとの細胞の形いかに
 にかかわらず球形を呈し……」と記されている。中
 学校の理科で、動物細胞と植物細胞の違いを学んだ
 時のことを思い出してほしい。「植物細胞は二重の
 膜をもって、外側の膜を細胞壁、内側の膜を細胞
 膜（原形質膜）と呼ぶ。植物細胞を高いショ糖濃
 度の液に入れると原形質分離を観察することが可
 能」。原形質分離を起こし、細胞壁から離れた原形
 質体を取り出したものがプロトプラストである。図
 1はその過程を示す。

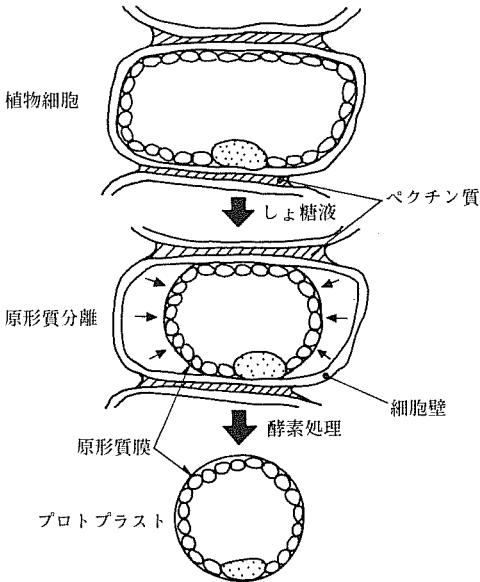


図1 プロトプラストの取り出し

植物細胞の形は、板状、紡錘形、アメーバ状など
 いろいろな形があるが、それらの形はすべて細胞壁
 の形によって決められている。細胞壁を除かれたプ
 ロトプラストは薄い細胞膜に包まれているだけであ
 るから、特有の形を維持することができず、最も表
 面積の少ない形「球形」になる。シャボン玉と同じ
 である。ただ、シャボン玉のように中身は空でなく、
 細胞成分によって満たされている。

4. プロトプラストはどのようにして 取り出すのか？

前述のコッキング博士はセルラーゼと呼ばれる酵
 素を用いてトマト果実からプロトプラストを取り出
 した。原形質分離を起こした細胞をメスで切り開い
 てプロトプラストを取り出すことも不可能ではない
 が、酵素を用いた方がはるかに容易に、また大量の

プロトプラストを取り出すことができる。

高等植物の組織を構成する細胞は、ペクチンと呼
 ばれる物質で隣同士の細胞が結合し、細胞の原形質
 体はセルロースからなる細胞壁に被われているから
 (図1参照)、ペクチンとセルロースを除けばプロト
 プラストを取り出せる訳である。ペクチンを分解す
 る酵素をペクチナーゼと呼び、セルロースを分解す
 る酵素をセルラーゼと呼ぶ。いずれの酵素も微生物
 によって生産され、ある程度精製された酵素が市販
 されている。これらの酵素を別々に、あるいは混合
 して葉などの植物組織に作用させることにより、ペ
 クチンと細胞壁を消化させて、大量のプロトプラ
 ストを得ることができる。

プロトプラストは水の中に取り出されると、水を
 吸ってたちまち破裂してしまうので、高い濃度の糖
 溶液に酵素を溶かして用い、破裂しないようにし
 ている。

酵素処理により、1枚のタバコの葉から2千万個
 以上のプロトプラストを約1時間でとることが可能
 である。多くの双子葉植物では、葉を材料としてプ
 ロトプラストを取る場合が多い。前述のトマト果実
 の柔組織は特殊な材料であり、その後はほとんど用
 いられていない。

5. プロトプラストの能力

酵素処理によって取り出されたプロトプラストは、
 ばらばらの状態で溶液中に浮かび、生きた細胞であ
 る。もとは高等植物の組織を構成する1部品であ
 った細胞であるが、裸の細胞—プロトプラスト—にさ
 れたことにより、普通の植物細胞には認められない
 特殊な能力を持っていることが発見された。

3つの主な能力は：

(1)：植物体再生が可能である。

プロトプラストを培養すると、まず細胞壁を再生
 する。そして細胞分裂を再開して増殖し、最後には
 完全な植物体を復元することができる。言いかえ
 ると、植物組織の1構成員であった細胞がプロトプ
 ラストにされることによって、受精卵のように、完全
 な個体を作る最初の1個の細胞としての能力を発揮
 できるようになったわけである。このように、プロ
 トプラストから植物体まで育て上げる培養技術が
 「プロトプラスト培養」と呼ばれる。

(2)：外部から遺伝物質を細胞内へ取り込むこと
 ができる。

「プロトプラストが外部から物を取り込むことができる」ことは、ある物質の存在下でウイルス粒子と混合すると、プロトプラストがそのウイルスに感染することから確認された。ウイルス粒子ばかりでなく、プロトプラストは遺伝物質であるRNAやDNAも容易に取り込むことが次々に発見され、更に取り込まれた遺伝物質は細胞の中で発現することも確認された。DNAは遺伝子の本体である。

普通の植物細胞は細胞壁と言う壁を持っているため、「遺伝子を外部から取り込む」などとは考えられなかったが、プロトプラストの出現はその考えを打ち破った。これが植物における遺伝子工学導入の引き金となった理由である。

(3)：異種の細胞と融合できる。

細胞壁のないプロトプラストは、化学的方法や電気的方法により他のプロトプラストと融合し、融合細胞を形成する能力をもつ。

植物の育種では、交配により遺伝子を混合させ雑種個体を得ている。両親の類縁関係が一定の範囲以内の場合は交配が可能であるが、その範囲を越えると種子は得られず、従って雑種個体を得ることが非常に困難となる。プロトプラストでは両親の類縁関係にかかわらず細胞と細胞とがくっつく。極端な例では、高等植物と苔の細胞を融合させることも可能である。しかし、このような融合細胞から雑種植物は得られていない。融合細胞からいろいろな段階の雑種植物が得られた例では、同じナス科植物であるトマトとジャガイモの組み合わせ、ジャガイモの野生種と栽培種の組み合わせ、アブラナ科の種間・属間、イネとヒエといったように比較的近い関係にある組み合わせで行われ、いくつかの成功例がある。

以上に掲げた能力のうち、②および③で説明した遺伝子工学に関係する部分および細胞融合の部分は、高等植物の細胞がプロトプラストにされたとき、初めて発揮される能力である。これが植物分野において作物改良を目指すバイオテクノロジーとしてプロトプラストの利用に熱い目が向けられている理由である。なお、①および②に掲げた事項は1970年前後に、世界にさきがけ日本で発見された。農林水産省植物ウイルス研究所で治療研究室の研究グループがその研究に従事した。

遺伝子工学や細胞融合で植物を改良しようとするとき、プロトプラストが用いられることは今までの説明から理解していただけたと思う。しかし、裸の細胞に遺伝子を挿入できた、あるいは細胞を融合さ

せた、だけでは植物の改良につながらない。それらの細胞から植物体を再生させなければ実用に供することは出来ない。1個のプロトプラストから植物体を復元させる技術、すなわち「プロトプラスト培養」の成功が遺伝子工学や細胞融合にとって絶対に必要な条件である。

6. 双子葉植物と単子葉植物の プロトプラスト培養の違い

双子葉植物であるタバコ、ジャガイモ、トマト、アブラナ科やキク科植物などではプロトプラストをとる材料として葉が用いられている例が圧倒的である。これらのプロトプラストは分裂能が高く、植物体への再分化能も高いものが多い。一方、単子葉植物に属するイネ、トウモロコシなどのイネ科植物は成熟した葉からは酵素的な方法でプロトプラストをとることが非常に困難である。芽を出したばかりの若い植物体からは、いくつかのプロトプラストをとることは可能であるが、それらの細胞は分裂能力が極度に低く、再分化能は確認されていない。イネ科植物のプロトプラスト培養系がなかなか成功しなかったのは、植物体を材料としてプロトプラストを得ようとしたところにあった。

イネのプロトプラスト培養が可能となったのは、植物体でなく培養細胞（カルス）を材料とするようになってからである。しかし、得られたイネ・プロトプラストは分裂能力が低く、また、植物体への復元も簡単ではなかった。

1985年になって、三井東庄、京都大学、東北大学から相次いでイネのプロトプラスト培養が成功したと発表され、引き続いて本文の冒頭で紹介した植物工学研究所、農業生物資源研究所や英国のコッキング博士の研究グループでも実験系が確立された。

以下に、植物工学研究所の方法を中心にイネのプロトプラスト培養がどのようにして行われているかを紹介する。

7. イネのプロトプラスト培養の実際

前述のように、イネではプロトプラスト材料として、カルス細胞が用いられている。カルス細胞の作り方から、プロトプラストの調製及び培養、そして植物体への再分化にいたる経過を図2に模式化した。

①表面を殺菌したイネの玄米を寒天で固めた培養

液（カルスを作らせるために生長ホルモンである2, 4-Dが加えられている）の上に置いておくと、②種子の胚盤のあたりからカルスが生じる。約1カ月後、③そのカルスを液体の培地に移し、振盪し続けカル

スを増殖させる。④ペクチナーゼとセルラーゼの混合液でカルスを処理すると数時間で⑥プロトプラストが得られる。実物のプロトプラストの写真は写真1に示す。イネのプロトプラストの場合は直径が1

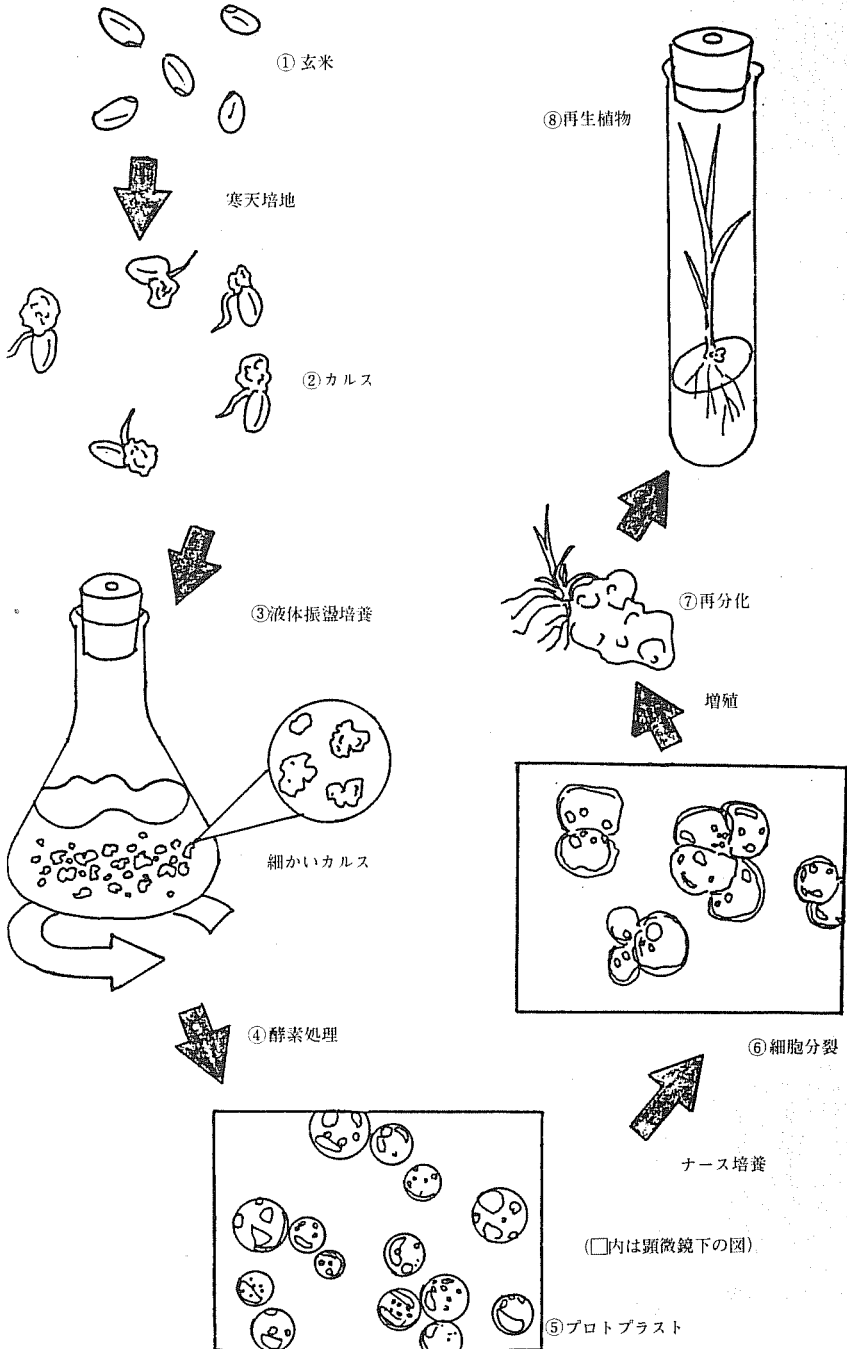


図2 イネのプロトプラスト培養

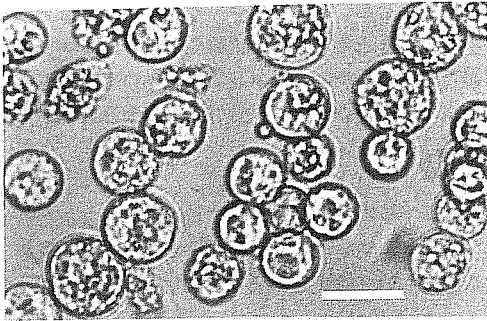


写真1 イネのプロトプラスト (バーは20 μm)

mmの約50分の1かそれ以下で、高等植物のプロトプラストの中では小さい方である。

分裂能の低いイネのプロトプラストを効率良く分裂させるために、特殊な培養法が用いられている。その方法は「ナース培養」と呼ばれて、具体的には、プロトプラストを埋めこんだアガロース（寒天の仲間）の塊をシャーレ中の液体培地に入れ、その液体培地の中に増殖中のカルス細胞を加えて一緒に培養する方法である（図3）。この方法は、カルス細胞から分泌される物質により、プロトプラストの分裂を促進させようというものである。

再び図2に戻って、⑥分裂を開始したプロトプラストは1～2カ月で直径1～数mmのカルスに生長する。⑦これを生長ホルモンを含まない寒天培地に移し、培養を継続することによって、カルスから植物体を再生させることができる。⑧再生した植物は試験管の中で更に生長させてから取り出す。

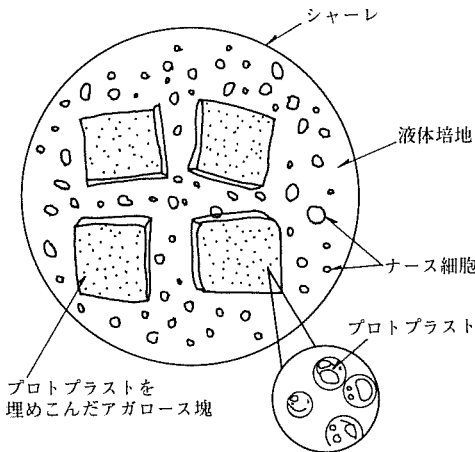


図3 ナース培養

8. 問題点

7に記したイネのプロトプラスト培養は全過程を無菌条件下で行われ、操作はかなり複雑である。また長期間にわたり、図2の1サイクルで最短3カ月以上を要する。また生きた細胞を扱うため、細胞の活性を損なわないよう注意する必要もある。

イネの品種・系統は無数にあるが、プロトプラスト培養が成功したのは、ほんの一部の品種に過ぎない。日本晴、ササニシキ、藤坂5号、ヤマホウシ、祝稲などで20品種に満たない。これらのほとんどは日本稲に分類される1群に入るが、日本稲であればどんな品種でも同じ方法でプロトプラスト培養が可能であるわけではない。品種によって培養が困難なものと、比較的やさしいものがあり、インド稲には培養の難しいものが多い。すなわち、プロトプラスト培養が可能になったとはいえ、全ての稲品種が自在に扱えるようになったわけではない。

9. おわりに

本文の前半で述べたように、プロトプラスト培養系は植物における遺伝子工学や細胞融合などの適用に当たって必須の技術である。しかし、この培養系はあくまで基盤技術であって、作物改良を直接的に行う技術ではない。作物の改良に繋がる遺伝子工学はまだ研究が始まったばかりであるし、体細胞を用いた細胞融合では、得られた新植物に種子が形成されない場合が多い。また、培養の途中で遺伝的な変異の発生も報告されている。

主要作物の多くが含まれるイネ科植物のなかで、イネは最初にプロトプラスト培養系が作られた。これはイネにおけるバイオテクノロジーの適用に道が開かれたことを意味するのであって、これらの技術を用いた品種改良が行われるまでには、幾多の課題があり、解決に時間が必要と思われる。しかし、最近の学会等におけるこの分野の研究と進捗は歩を速めており、近い将来、プロトプラスト培養の技術を利用して画期的なイネ品種が育成されることを期待したい。

(農業研究センター 育種工学研究室長)