

ブドウの細胞融合技術開発

誌名	農林水産技術研究ジャーナル
ISSN	03879240
著者	秋山, 貴子
巻/号	13巻5号
掲載ページ	p. 34-38
発行年月	1990年5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



ブドウの細胞融合技術開発

秋山 貴子

細胞融合技術開発の中で、最も重要なプロトプラスト培養系の確立をめざして研究を行った。まずプロトプラストから植物体を再生させるために、高い再分化能を持つカルスをつくった。様々な材料についてカルスの誘導および再分化を行った結果、葯由来カルスが再分化能を持ち、さらに葯内の花粉の生育ステージによって再分化率に差があることがわかった。その中で胞原細胞中期のものが、約20%と高い再分化率を示した。しかし、この再分化能を持つカルスは分裂増殖能が低く、プロトプラストの培養はできなかった。

そこで継代を繰り返すことによって、分裂増殖能の高いカルスをつくった。このカルスは再分化能は消失しているが、分裂増殖能があるのでプロトプラストの培養条件を検討することができた。

さらにこのカルスを用いて、conditioned medium法を検討した。conditioned mediumの種類や採取時期を検討し、さらに限外炉過を行ってconditioned medium中の阻害因子を除くことにより、分裂促進効果を高めた。分裂増殖能の低いプロトプラストも、このconditioned mediumを用いることによって培養が可能になった。

再分化能を持つカルスから単離したプロトプラストも、このconditioned mediumを用いることによって分裂を開始し、さらに培地を頻繁に交換することによって分裂を継続した。再生したカルスは再分化能を保持しており、植物体を再生した。

1. はじめに

ワイン醸造の歴史は古く、世界中で広く愛飲されている。その原料であるブドウは、果樹では世界でもっとも多く栽培、生産されている。品種改良についても交配交雑や優良株の選抜などによって、長い間にさまざまなブドウが作ら

れてきた。

組織培養によるブドウの研究も進められており、1974年にオーストラリアでプロトプラストの培養について最初の報告がされている。しかし、一般的に木本類は培養が難しいと言われていたが、ブドウについても同様で15年が経過した今もプロトプラストから植物体が再生したという報告は認められない。

交配交雑に比べて細胞融合は、交雑の範囲が広がることや細胞質の遺伝情報が導入できることなどのいくつかの利点があるが、細胞融合を

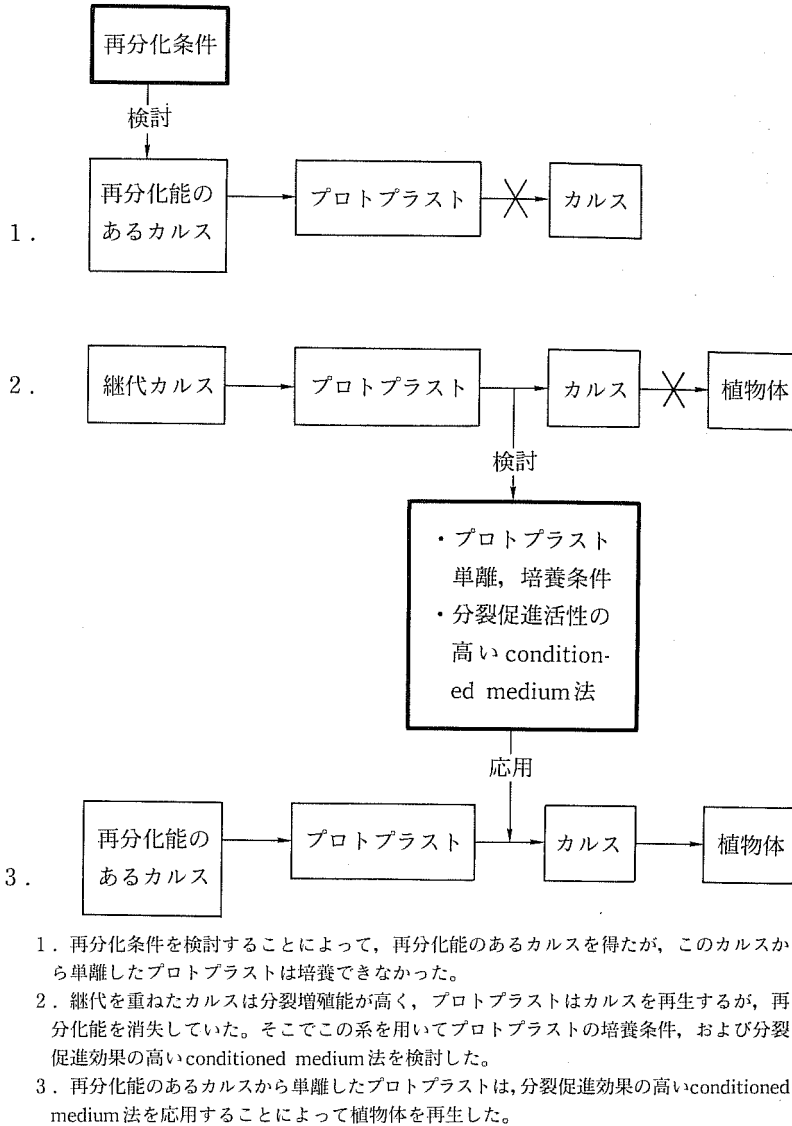


図1 研究の概要

行うにはまずプロトプラストから植物体再生までの技術が確立されていなければならない。

そこで, 再分化能の高い材料の選択, プロトプラスト培養条件の検討, さらに conditioned medium 法の開発により, 白ワイン醸造用品種 Riesling について, プロトプラストから植物体を再生させることに成功したので報告する。

2. 再分化能の高い材料の選択

プロトプラストから植物体を再生させるには, まず材料カルスが高率で再分化する必要がある。しかしブドウは再分化についての成功例も少なく, 再分化率も高いもので10%以下である。また品種間差異もあり, 限られた品種でしか成功していない。最近では甲州三尺で embryogenic callus 形成の報告がある。

この実験に用いた白ワイン醸造用品種 Riesling は, 当時再分化例はなかったので, 葉, 葉柄, まきひげ, 葯と部位の検討から始めた。カ

ルスの誘導は基本培地MS, B5, Gamborg, White, Nitch-Nitch, オーキシンは $2 \cdot 4\text{-D}$, NAA, IAA, サイトカイニンはBA, Kinetin, Zeatinの各種で検討し、それぞれサイトカイニンだけの培地に移植することによって再分化を試みた。光照射条件は明条件(全明), 暗条件の両方行い、 25°C で培養した。その結果、葯から誘導したカルスが一例だけ再分化した。このときの条件は、 $2 \cdot 4\text{-D}$ $0.1\text{mg}/\ell$, BA $1.0\text{mg}/\ell$, を含むMS培地で、暗条件でカルスを誘導し、2カ月後 $2 \cdot 4\text{-D}$ を除いた培地に移植し、全明条件に変えたものであった。

葯由来のカルスに再分化能がある事がわかったので、さらに培地条件や光照射条件を検討した。培地条件はオーキシンをNAAにかえた方が分裂増殖能のあるカルスが形成されたが、再分化率を高めるものではなかった。光照射条件は、明条件でカルスを誘導するとカルス形成率が下がり、再分化もしなかった。しかし暗条件でカルスを誘導したものは暗条件のままでも再分化するので、光は必ずしも再分化に必要ではなく、再分化の要因は別の所にあると思われた。

葯培養は半数体育種に用いられる技術であるが、その際花粉の生育ステージが重要となる。そこに着目して花粉の生育ステージとカルスの再分化率との関係を調べたところ、Rieslingの葯は 0.15mm から形成し、 1.30mm で開葯するが、その間 0.05mm の単位で正確に生育ステージを分けることができた。生育ステージはフェーマー液で一晩葯を固定し、酢酸カーミンで染色したのち、押し潰し法で観察した。減数分裂期以外は、葯をそのままプレート上で押し潰すだけでも簡単に観察できた。生育ステージは胞原細胞前期、胞原細胞中期、胞原細胞後期、減数分裂期、四分子期、花粉形成期、花粉成熟期、開花の8つがあり、再分化率は各ステージで差が見られた。その中でも、胞原細胞中期では約20%と高い数字が得られた。

3. プロトプラスト培養条件の検討

再分化能のあるカルスは分裂増殖能が低く、プロトプラストにしてもすぐに褐変してしまい、このままでは培養条件を探すことは不可能であった。そこでカルスの中で分裂増殖のよい部分を選んで継代を繰り返し、分裂活性の高いカルスを作った。このカルスは再分化能を消失していたが、3日で2倍の量に増殖し、均一なプロトプラストが大量に単離できるので、プロトプラストの培養条件を検討するのに適していた。

その結果葯由来プロトプラストは、 KH_2PO_4 を1/100に修正したNT培地にNAA $0.1\text{mg}/\ell$, BA $1.0\text{mg}/\ell$ を加えた条件で頻繁に分裂することがわかった。最適培養密度は $5 \times 10^4 \text{ cells}/\text{ml}$ で、 $1 \times 10^3 \text{ cells}/\text{ml}$ 以下になると分裂しなかった。

4. conditioned medium 法の開発

この継代カルス由来プロトプラストを用いて、conditioned medium 法を検討した。この方法は細胞を液体培養(suspension culture)し、その培養培地(conditioned medium)をプロトプラストの培地に加えるもので、分裂を促進する効果を示すことがある。プロトプラストは培養密度が低くなると分裂増殖能が下がるので、培地にconditioned mediumを加えることによって分裂率がどのくらい上昇するのか比較し、分裂促進効果のより高い方法を開発した。

数種の植物のsuspension cultureから採取したconditioned mediumを検討したところ、ナスのものが分裂促進効果を示した。conditioned mediumには阻害作用もあるので、suspension cultureの継代周期やconditioned mediumの採取時期を検討することによって、分裂促進効果が高く阻害作用が低い条件をみつけた。

さらに分裂促進効果を上げるため、分裂促進因子の精製を試みた。限外濾過を行って分子量

で成分を分けたところ、高分子側に分裂促進効果が見られた。一般に植物細胞の分裂促進因子は、フィーダーレイヤー法等でセロハン膜がナス細胞との仕切りに使われるように、低分子（分子量1000前後）のものと考えられているので、これはとても興味深いことである。

分裂促進因子が分子量 10 万以上の高分子側にあるため、阻害作用の一因といわれている conditioned medium 中に残存する培地成分、その他の低分子成分と分けることができ、分裂促進効果が上昇した。高分子成分を濃縮して用いるとさらに効果が高まり、また低分子成分を排除することによって凍結乾燥が容易になった。このナスの conditioned medium は不安定で、短期間で変化してしまうために冷蔵および冷凍保存もできず、実験に使うには不都合であったが、凍結乾燥によって保存が可能になった。凍結乾燥を行うと高濃縮ができるので、分裂促進効果がどのようになるのか、またゲル濾過等を行って精製度を高めることによって分裂促進因子を見つけることができるのかどうか、期待される場所である。

5. プロトプラストから植物体再生

再分化能があるカルスは分裂増殖能が低いので、そのままではプロトプラストの培養はできないが高い分裂促進効果を持つ conditioned medium を加えることによって分裂を始めた。さらに分裂を継続させるため、5日ごとに

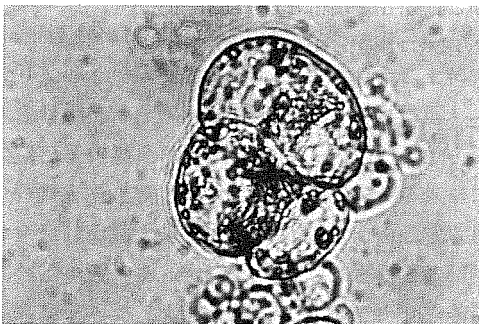


写真1 プロトプラスト分裂 (培養7日)

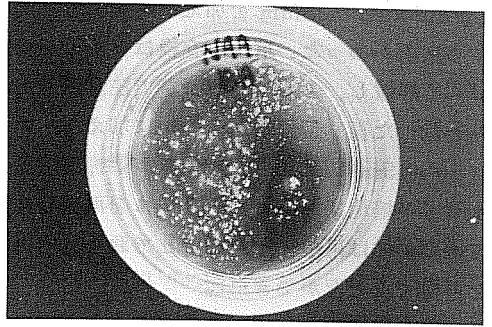


写真2 カルス再生 (培養1カ月半)

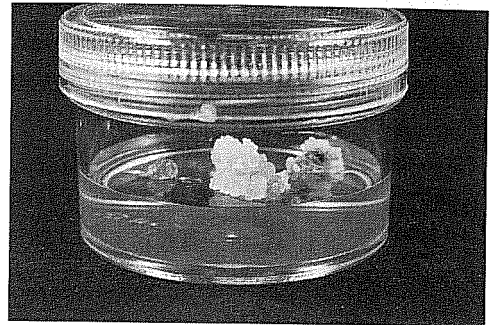


写真3 再分化 (培養3カ月)



写真4 植物体再生 (培養6カ月)

conditioned medium を加えた新鮮培地と交換する必要があった。培地の交換はシャーレをしばらく静置し、1 ml のシリンジで注意深く上澄みを除いた後、新鮮培地を静かに加えた。コロニーが0.5mmほどに成長したところで、0.1%ゲルライト培地に移植するとカルスを再生した。このカルスは再分化能を維持しており、植物体を再生することができた。

6. 今後の展開

細胞融合によって新品種を生み出すためには、プロトプラスト培養法、細胞融合法、雑種細胞選抜法等の技術開発が必要であるが、まず第一に必要なのはプロトプラスト培養法の確立であ

る。この研究によってRieslingについてプロトプラストから植物体を再生することに成功したが、まだ確立と呼べる程安定した技術ではない。しかし、再分化能を持つプロトプラストの培養ができなかったブドウについて、分裂促進因子の利用によって培養が可能になることがわかったので、ブドウの細胞融合の可能性が高まった。

これはブドウに限らず、プロトプラスト培養が難しい他の植物にも応用できると思われる。逆にいうと、どの植物にでも応用できる効果の高い分裂促進因子を見つけだせるように、細胞融合法の開発と共に研究を進めていきたいと考えている。

(サントリー(株)基礎研究所植物工学研究室 研究員)

耕耘作業の変遷と技術開発の方向

農林水産省農業研究センター編
A5判 132頁 定価1,200円 円250円

耕耘作業は近年農業機械化の進展に伴い、もっとも機械化、省力化が進んだ分野です。しかし、最近耕地の浅耕化が問題になるなど、耕耘作業の問題と今後の技術的対応の検討が迫られています。

このような時期に、農業研究センターでは調査研究を行い、その成果を取り纏めました。この成果は広く農業に関心を持たれる方々や、実際に営農にたずさわっている方々にとって極めて有益と思いますので、広く活用されるようお褒めいたします。

[主な内容] 第I編：稲作における耕深変化と技術的問題、第II編：畑作における耕耘作業の多様化と技術的問題、第III編：農耕様式の変貌に対応した技術開発の方向

発行所

社団法人 農林水産技術情報協会

〒103 東京都中央区日本橋兜町15-6 (製粉会館内)
電話 03 (667) 8931(代) 振替 東京 1-71476