

## スギ不定胚細胞および雄性不稔スギのフラスコ苗を利用したプロトプラスト単離と培養の試み

細井佳久・丸山 E. 毅・石井克明 (森林総合研究所)

**要旨:** スギの未熟種子胚から不定胚形成能力を持つ増殖細胞 (不定胚形成細胞) を誘導した。液体培地で2週間毎に継代培養した不定胚形成細胞からプロトプラストを単離した。プロトプラストは96ウェルプレートを用い、液体培地で培養した。培養後、プロトプラストは、2週間ほどで細胞壁を再生し、分裂した。多くの分裂細胞は、サスペンサー細胞を分化させ、不定胚形成細胞に再分化した。その後、不定胚形成細胞を増殖させ、マルトースやポリエチレングリコールなどを添加した不定胚成熟用固形培地に移植すると、不定胚を得ることができた。得られた不定胚を、植物生長調節物質を含まない発芽用培地に移植すると、低率だが植物体を得ることができた。6種の雄性不稔スギから当年枝を採取し、3cmに切り分けて多芽誘導用の固形培地上で培養した。その結果、得られたシュートを発根培地に移してフラスコ苗を多数育成した。得られたフラスコ苗の根、葉、または植物体上に生じたカルスについてメスで細断し、プロトプラスト単離を試みた。試みた全ての材料でプロトプラストが単離可能であったが、収量が少なく、さらに単離効率を上げる必要があった。福島2号の細断した葉から単離したプロトプラストについて、96ウェルプレートで液体培養すると、変形肥大、分裂が観察された。

**キーワード:** スギ, 雄性不稔, 不定胚, プロトプラスト

**Abstract:** Embryogenic suspension cultures obtained from immature zygotic embryos were maintained and proliferated by subculturing at 2-week-intervals. Protoplasts isolated from the embryogenic cells were cultured in 96-well plates containing liquid media. After 2 weeks of culture, protoplasts formed cell walls and divided, and many of them redifferentiated embryogenic cells. The maturation of somatic embryos occurred on media containing maltose and polyethylene glycol. After transfer to hormone-free medium, somatic embryos germinated and formed plantlets. About 3 cm long shoot segments excised from 6 male-sterile trees were cultured on media for multiple shoot induction. Regenerated shoots were rooted and converted into plantlet on medium containing IBA. Protoplast isolation was attempted from roots, shoots and calli of regenerated plantlets. Protoplasts were isolated from all explants tested; however, it is necessary to improve the isolation method because the achieved protoplast yield was small. Cell wall formation and cell division was observed in protoplasts isolated from shoots of Fukushima 2 cultured in 96-well plates.

**Keywords:** *Cryptomeria japonica*, male sterility, somatic embryo, protoplast

### I はじめに

スギ花粉症患者の増加は大きな社会問題となっており、その対策の一つとして各地の林業関係機関で、花粉の少ないスギや雄性不稔スギの選抜が行われている。筆者らは、選抜個体の増殖や組換え体作出に資するため、スギ精栄樹の種子胚や、数種の雄性不稔スギについて無菌培養を行った。針葉樹の培養では、不定胚形成細胞を利用した植物体再生の報告が多数あり、スギに関しても植物体を形成させることが可能となってきた(1)。こうした植物体再生系を利用した組換え体作出の研究もなされるようになってきている。しかし、プロトプラストからの植物体形成についてはほとんど報告がない。そこで、今

回は精栄樹から誘導した不定胚形成細胞と、雄性不稔個体から誘導したフラスコ苗を材料としてプロトプラストの培養を行った。

### II 実験方法

1. 不定胚形成細胞を利用したプロトプラスト培養  
実験に用いた種子は、20010年7月初旬に森林総合研究所千代田苗畑に生育している個体から採取した。種子表面の殺菌は、99.5%エタノールに3分間浸した後、2%アンチホルミン溶液に30分浸漬・攪拌し、滅菌水で洗浄して行った。その後、種皮を剥ぎ取り、種子胚を含む雌性配偶体を不定胚形成細胞誘導用の培地に置床した。直

Yoshihisa Hosoi, Tsuyoshi E. Maruyama, and Katsuaki Ishii (Forestry and Forest Products Research Institute, Matsunosato 1, Tsukuba, Ibaraki, 305-8687, Japan) Protoplast isolation and culture from embryogenic cells and male-sterile tree explants of *Cryptomeria japonica*.

径 90mm のプラスチックシャーレを用い、培地には、無機塩を 1/2 濃度に下げた EM 培地 (2) に、1% ショ糖、10mM グルタミン、0.3% ゲランガム (MP Biomedicals, Inc.)、 $10\mu\text{M}$  2,4-D、 $5\mu\text{M}$  BAP を添加した固形培地を用いた。培養は暗黒下、 $25^{\circ}\text{C}$  で行った。誘導後の不定胚形成細胞は、誘導時の培地と同一の培地、培養環境で維持・増殖させた。

不定胚形成細胞からのプロトプラストの単離は、浸透圧調節剤として 0.6M マンニトール、1% セルラーゼオノズカ RS (Yakult)、0.1% ペクトリアーゼ Y-23 (Kikkoman) を添加した 40ml の酵素液を用い、100ml の広口培養フラスコ内でおこなった。処理後、プロトプラストを含む酵素液を、 $62\mu\text{m}$  ナイロンメッシュで濾して未消化組織を除去し、遠心機にかけた。遠心後に沈殿物として残ったプロトプラストは、0.6M マンニトールで 2 回遠心・洗浄し、回収した。遠心は、低速遠心機で約  $60\times g$  の遠心力で、3 分間行った。遠心用の容器には 50ml 遠心チューブを用いた。プロトプラストの培養は、96 ウェルプレートを用いて、 $25^{\circ}\text{C}$ 、暗黒下で静置培養した。培地として、1 ウェルあたり  $60\mu\text{l}$  の液体培地を分注して用いた。培地には、硝酸アンモニウム無添加で、その他の無機塩濃度を 1/2 にした MS 培地に 3% ショ糖、10mM グルタミン、 $1\mu\text{M}$  2,4-D を添加した液体培地を用いた。また、浸透圧調節剤として 0.6M マンニトールを添加した。培養密度は、 $2\times 10^3$  プロトプラスト/ml に調整した。プロトプラスト培養で得られた分裂細胞は、増殖・継代培養のため、直径 90mm のシャーレで培養した。培地には不定胚形成細胞誘導用の培地と同一組成の培地を用いて、 $25^{\circ}\text{C}$ 、暗黒下で培養した。

**2. プロトプラストから再分化した不定胚の成熟化と個体再生** 不定胚の成熟用培地には継代培養用の 1/2EM 基本培地に 10mM グルタミン、6% マルトース、 $50\mu\text{M}$  ABA、15% ポリエチレングリコール (平均分子量 3,000)、0.2% 活性炭 (純正化学)、0.3% ゲランガムを添加した固形培地を用いた。直径 90mm のシャーレを用い、 $25^{\circ}\text{C}$ 、暗黒下で培養した。不定胚の発芽用には、硝酸アンモニウム無添加で、その他の無機塩濃度を 1/2 にした MS 基本培地に 2% ショ糖、0.7% 寒天を添加した固形培地を用いた。培養は、16 時間蛍光灯照明下、 $25^{\circ}\text{C}$  で行った。

**3. 雄性不稔個体のフラスコ苗の育成** 福島 2 号、5 号、富山 3 号、三重 1 号、青森 1 号、田原 1 号の 6 種について当年枝の先 3cm を切り取り、種子胚と同様に殺菌した。その後、多芽誘導用に無機塩濃度を 1/2 にした LP 基本培地に  $0.03\mu\text{M}$  NAA、 $10\mu\text{M}$  BAP、2% ショ糖、0.5% 活性炭、0.7% 寒天を添加した固形培地を用いた。多芽か

ら伸ばしたシュートは、発根用培地として、硝酸アンモニウムを 1/4、その他無機塩を 1/2 にした MS 基本培地に  $6\mu\text{M}$  IBA、2% ショ糖、0.2% 活性炭、0.7% 寒天を添加した固形培地に移植した。その後、発根個体は同様の培地で培養・増殖させて、プロトプラスト単離用のフラスコ苗とした。多芽誘導、発根、フラスコ苗の継代培養は、同様に 300ml 広口培養フラスコを用い、16 時間蛍光灯照明下、 $25^{\circ}\text{C}$  で行った。

**4. プロトプラストの単離** 6 種の不稔個体について、増殖させたフラスコ苗の葉、根を 5mm 程度に細断してプロトプラスト単離用酵素液に浸した。また、三重 1 号の植物体の下部に生じたカルスについても同様に 5mm 角程度に細断して材料に用いた。酵素液には不定胚形成細胞からの単離に用いたものと同一組成の酵素液を用いた。単離操作についても同様の手順で行った。

**5. 福島 2 号のプロトプラスト培養と単離条件の再検討** 福島 2 号について、細断した葉から単離したプロトプラストを 96 ウェルプレートで培養した。酵素組成を含め、単離条件は不定胚形成細胞からの単離に用いたものと同一とした。培地には MS 基本培地に 0.6M マンニトール、10mM グルタミン、3% ショ糖を添加し、2,4-D と BAP を組み合わせて添加した液体培地で培養した。培養密度は、 $2\times 10^2$  プロトプラスト/ml とした。培養は、 $25^{\circ}\text{C}$ 、暗黒下で行った。また、さらにプロトプラストの単離効率を上げるため、酵素組成・濃度を変えて収量の比較を行った。セルラーゼオノズカ RS とペクトリアーゼ Y-23、ドリセラゼ (協和発酵工業) を組み合わせて単離効率を比較した。生存率を FDA 法により測定した (1)。

### III 結果と考察

**1. 不定胚形成細胞の誘導効率** 培養に供した 180 個の種子胚のうち、14 個の種子胚で不定胚形成細胞が誘導でき、誘導効率は約 7.8% であった。種子採取の時期をずらすことで、さらに効率を上げられる可能性がある。その後のプロトプラスト培養には、この中の 1 つのストレインを増殖させて用いた。

**2. 不定胚形成細胞からのプロトプラスト単離・培養** プロトプラストの単離状況を顕微鏡下で観察しながら行い、酵素処理時間は約 5 時間とした。プロトプラストのサイズは直径約 25~60 $\mu\text{m}$  とばらつきが大きかった (図-1)。伸長途中のサスペンダー細胞から単離された大きなプロトプラストと、不定胚形成能力を持つ緻密な細胞塊から単離された小さなプロトプラストが混在しているためと思われる。培養開始約 2 週間で分裂が観察さ

れた(図-2)。培養開始後約40日でサスペンサー細胞を伸長させ、不定胚形成細胞へと分化する細胞がみられた。プロトプラストの分裂効率は約42%であり、そのほとんどの分裂細胞が不定胚形成細胞へと再分化した。得られた不定胚形成細胞を増殖させ、成熟用培地へ移すと約60日後に子葉部の発達した黄白色の不定胚が得られた(図-3)。90mmシャーレあたり約19個の不定胚が得られた。しかし、幼根部が発達不良の不定胚も多く、さらに不定胚成熟に適した培地を検討する必要がある。正常な不定胚は、発芽用培地に移植すると植物体を形成した(図-4)。

3. 雄性不稔個体のシュートからの植物体再生 培養した6種の個体とも多芽を形成し、その後シュートを形成した。伸長したシュートを発根用培地に移植すると、発根し、植物体を得ることができた。植物体はシュートカルチャーにより増殖させてプロトプラスト単離の材料とした(図-5)。

4. 6種の雄性不稔個体におけるプロトプラスト単離の比較 表-1に示した通り、福島2号の葉から単離した場合に収量が $31.0 \times 10^4$  個/gFWとなり、最高であった(図-6)。三重1号のカルスを材料にした場合には、細胞壁が未消化な細胞が多く、低収量となった。根については、根端の小さな分裂部からのみ単離されるのではないかと予想したが、単離されたプロトプラストの観察ではサイズにばらつき(10~50 $\mu$ m)があり、細断した切断面付近の細胞もプロトプラスト化されているようであった。

5. 福島2号のプロトプラスト培養 収量が比較的多かった福島2号の葉について、単離したプロトプラストを培養したところ、1週間ほどでプロトプラストが肥大した。そのうち少数のもので分裂がみられた(図-7)。

プロトプラスト単離効率を向上させるため、酵素組成を検討した結果を表-2に示した。収量、生存率ともに2%セルラーゼオノズカRS、0.4%ベクトリアーゼY-23を組み合わせた場合に好結果が得られた。セルラーゼRSとドリセラーゼを2%ずつ添加した場合には、細胞が崩れてしまい、ほとんどプロトプラスト化しなかった。

今回の不稔個体の実験では、三重1号を除きフラスコ苗の葉や根を直接用いたが、プロトプラスト収量が低く培養が困難であった。さらに単離効率を上げる酵素条件を検討する必要がある。また、直接葉や根を用いるのではなく、一度液体培地中で培養し、培養細胞化してから単離材料として用いることも検討したい。

IV 参考文献

(1) 平井篤志・内宮博文・杉浦昌弘(1982) 生物化学

実験法 16 植物細胞培養育種入門 学会出版センター(東京) 38P.

(2) MARUYAMA E, HOSOI Y, ISHII K, MOROHOSHIN(2000) Embryogenic cell culture, protoplast regeneration, cryopreservation, biolistic gene transfer and plant regeneration in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don ) Plant Biotechnology 17: 281-296

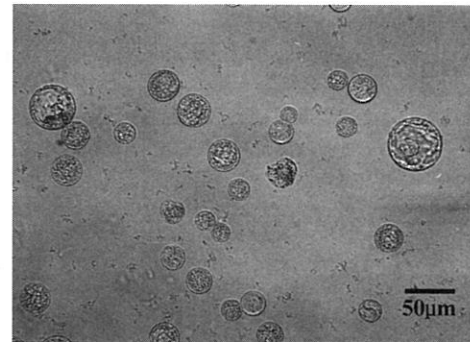


図-1. 不定胚形成細胞から単離したプロトプラスト  
Fig.1. Freshly isolated protoplasts from embryogenic cells

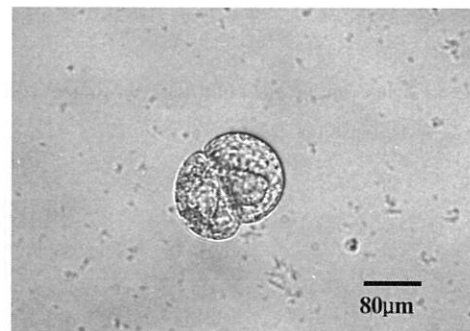


図-2. 分裂したプロトプラスト  
Fig.2. First division in a regenerated cell

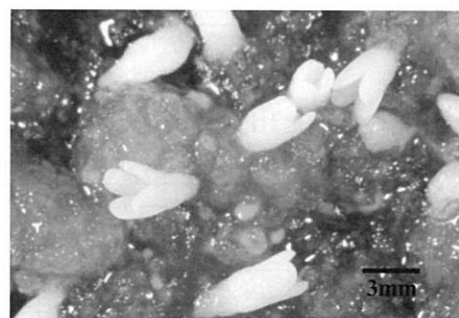


図-3. プロトプラストから分化した不定胚  
Fig.3. Somatic embryos regenerated from protoplasts



図-4. 不定胚から分化した植物体  
Fig. 4. Regenerated plant from somatic embryo

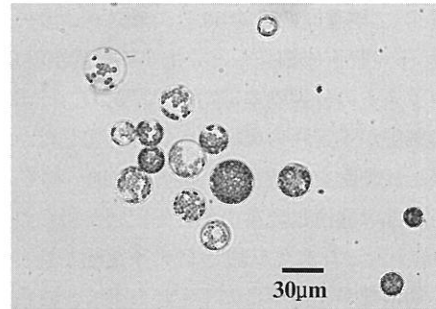


図-6. 細断した葉から単離したプロトプラスト  
Fig. 6. Freshly isolated protoplasts from leaves



図-5. シュートカルチャーにより培養中の不稔個体  
(福島2号)  
Fig. 5. Male-sterile plant proliferated by shoot culture  
(Fukushima 2)

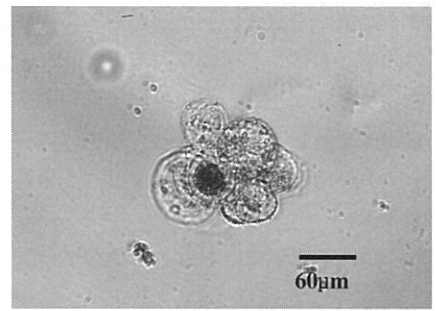


図-7. 分裂を繰り返すプロトプラスト  
Fig. 7. Dividing cells

表-1. 6種の不稔個体のプロトプラスト収量の比較  
Table 1. Comparison of protoplast yield among 6 male-sterile plants

個体名	田原1	田原1	福島2	福島2	福島5	福島5	富山3	富山3	青森1	青森1	三重1
	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	C
プロトプラスト収量 [×10 <sup>4</sup> 個 / gFW]	18.0 (1.6)	4.0 (1.6)	31.0 (2.6)	4.5 (1.9)	12.0 (4.3)	4.0 (1.6)	20.0 (7.1)	4.5 (1)	16.5 (5.3)	10.5 (1.9)	21.0 (2)

\*表中のL, R, Cはそれぞれ葉, 根, カルスを示す。数値は4回測定の平均、括弧内は標準偏差。

表-2. 福島2号における酵素条件の違いによるプロトプラスト収量と生存率の比較  
Table 2. Comparison of protoplast yield and viability among 4 enzyme solution in Fukushima 2

酵素液(0.6M マンニトールを含む)			収量 [×10 <sup>4</sup> / gFW]	生存率 [%]
酵素組成				
Cell. RS [%]	Pect. Y-23 [%]	Driselase [%]		
1	0.1	-	11.7 (1.8)	42.3
1	-	1	13.5 (3.4)	36.7
2	0.4	-	18.0 (5.1)	95.0
2	-	2	0.9 (1.8)	0

\*数値は4回測定の平均、括弧内は標準偏差。