

## 第4章 細胞を培養する

### 第1節 植物細胞

#### 1.1 オオムギ葉からのプロトプラストの単離と培養

細胞壁で覆われた植物細胞は原形質連絡 (PM) によって隣接する多くの細胞と繋がっており、これらの PM を通して生育に必要な様々な分子をやり取りして、生存している。多くの植物種において、葉などの植物組織を細胞壁分解酵素溶液で処理することで細胞をバラバラにして溶液中に取り出すことが可能である。細胞壁を失い、細胞膜で覆われた植物細胞のことを**プロトプラスト (protoplast)** と呼ぶ。プロトプラストは細胞レベルでの遺伝子発現や各種物質の蓄積などを解析するための優れた系である。例えばある種の薬剤や微生物の侵入に対して植物細胞がどのような反応を示すかを遺伝子発現のレベルで調べたいとき、植物体を用いた場合には全ての細胞に同時に刺激を与えることは不可能であるが、プロトプラストを利用すればそれが可能になる。この他にもプロトプラストを用いて細胞融合実験や形質転換植物の作出などを行うことができる。

本項では、単子葉植物であるオオムギからのプロトプラスト (図 4.1-1) の単離法とその培養方法について説明する。

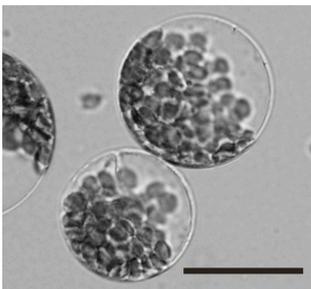


図 4.1-1 オオムギプロトプラスト、bar=50um

**【注意点】** プロトプラストは非常に壊れやすいので、慎重に取り扱うこと。

**【試薬】** 酵素液 (1%(w/v)セルラーゼを含む 0.6 M マンニトール, pH 5.5)、プロトプラスト培養液 (0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM  $\text{KNO}_3$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\mu\text{M}$  KI, 0.01  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , 0.6 M マンニトール, pH 6.5)、Hoegland's 培地 (5 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 127  $\mu\text{M}$  EDTA  $\cdot$  Na  $\cdot$  Fe  $\cdot$   $3\text{H}_2\text{O}$ , 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5 mM  $\text{KNO}_3$ , 80  $\mu\text{M}$  KCl, 46.6  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 9.3  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.83  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.32  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.26  $\mu\text{M}$   $\text{MoO}_3$ )

**【器具】** カミソリ、プラスチックシャーレ、ロート、ガーゼ 20cm<sup>2</sup>、50ml ポリプロピレン製遠心チューブ、ヘマトメーター、マイクロチューブ、ペーパータオル

**【器材】** 卓上遠心機、アスピレーター、人工気象器、光学顕微鏡

**【材料】** 播種 5-6 日後のオオムギ (*Hordium vulgare* cv. Goseshikoku)

① バーミキュライトとピートモスを 3 : 1 の割合で混合した培養土をポットに入れ、ここにオオム

ギの種子を蒔き、さらに表面をごく薄く培養土で覆う。Hoegland's 培地を培養土に充分含ませた後、ポットをトレーに置く。トレーには常に Hoegland's 培地がなくならないよう留意しながら約 5-6 日間 25°C、16 時間光照射下でオオムギを培養する。

- ② オオムギの葉の向軸面にカミソリで軽く切れ目を入れ、背軸側の表皮を剥離し、葉の剥離側を下にしてシャーレに入れた 20ml の酵素液に浮かべる。25°C で 2 時間～3 時間静置した後、シャーレをやさしく回転させさらに 15 分間静置する。
- ③ 2 層のガーゼで濾過し、丸底ポリプロピレン製遠心チューブに移し、遠心分離 (700 rpm, 3 min) によってプロトプラストを沈澱させる。
- ④ 上澄みを少し残して吸い取り、残った液でプロトプラストを再懸濁する。0.6 M マンニトール+10 mM CaCl<sub>2</sub> をチューブの 8 分目まで加え、遠心分離し、プロトプラストを沈澱させる。
- ⑤ 上澄みを少し残して吸い取り、再懸濁後、5 ml の 0.6M マンニトールを加える。
- ⑥ **プロトプラスト濃度の測定** ヘマトメーターにカバーガラスをのせ、割らないように注意しながら両手の親指でゆっくりと圧力を加えて、ニュートンリングを形成させる。⑤のプロトプラスト懸濁液を約 10 μl をカバーガラスの縁の部分からゆっくり注入してプロトプラスト懸濁液をヘマトメーターの格子部分に到達させる。
- ⑦ 各種実験に供したプロトプラストは一旦遠心をかけて沈殿させ、上清をアスピレーターで除いた後、適当な量のプロトプラスト培養液に懸濁して、25°C の人工気象機内で培養する。培養に際し、ペーパータオルを一枚上から被せて光が直に当たらないようにする (光が強すぎると葉緑体が脱落することがある)。