

プロトプラストの調製と細胞融合

理数科2年 富來 公一 木野 智大
蜷川 雄哉 平田 理紗

1 主題設定の理由

現在バイオテクノロジーは、農業・畜産の分野から、医療、製薬、新素材開発などの最先端の科学技術として利用されている。特に農産物の品種改良など植物細胞を用いた場合、植物細胞を守る細胞壁が逆に大きな障壁となる。そのため、植物細胞を用いたバイオテクノロジー的な操作は、大抵細胞壁を取り除いたもので行われる。植物細胞の細胞壁を取り除いたものはプロトプラストと呼ばれ、この調製方法については、古くから様々な手法が考案されている。

また農産物の品種改良には、近縁種の交配を繰り返す方法や、遺伝子導入など様々な方法がある。その一つに細胞融合により雑種植物を作り出す方法がある。“オレタチ”や“ポマト”という聞きなれない植物はオレンジとカラタチ、ポテトとトマトのプロトプラストを細胞融合させて作られた雑種植物である。

そこで、私たちはこの課題研究で、バイオテクノロジーの基礎となるプロトプラストの調製方法を習得し、その応用として、異種の細胞どうしの細胞融合を試み、自然界に存在しない新しい雑種植物を作り出したいと考えた。

2 目的

今回の課題研究は、次のことを目的として取り組んだ。

- (1)いろいろなプロトプラストの調製方法とその原理を調べ、実際にその方法でプロトプラストが形成されるか試す。
- (2)そのプロトプラスト形成の効率を比較し、最も効率の高い方法を修得する。
- (3)細胞融合の手法と原理を確認し、実際の細胞融合の様子を確認する
- (4)異種植物の細胞融合により、雑種植物を作成する。

3 実験1 古典的なプロトプラストの調製

プロトプラストとは、植物細胞の周囲にある細胞壁を取り除いたものであるため、細胞の形状を維持することができずきれいな球形になる。生物の授業でしばしば出てくるが、2005年入試の東京大学の問題に、「プロトプラストを得る試みは古くから行われ、葉を高張液に浸して鋭利な刃物で切断し穩やかに絞り出す」というものがある。我々はこの入試問題に興味を持ち、この方法でプロトプラストができるか試してみた。

(1) 実験方法

入試問題には、具体的な方法が示されていなかったので、高校の授業で行われる、原形質分離の実験を参考にして、次のように行ってみた。

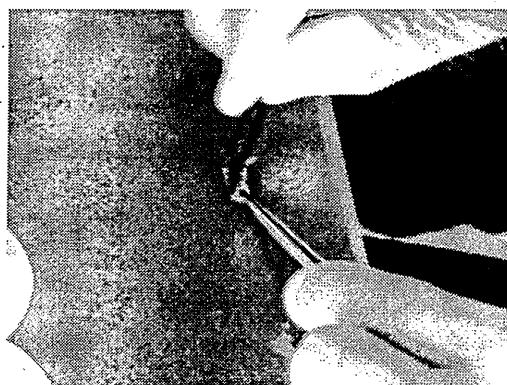
手順①：葉を20%の高張なスクロース液に浸して原形質分離させる。

手順②：その葉をカミソリで細かく切断する。

手順③：それを顕微鏡で観察する。

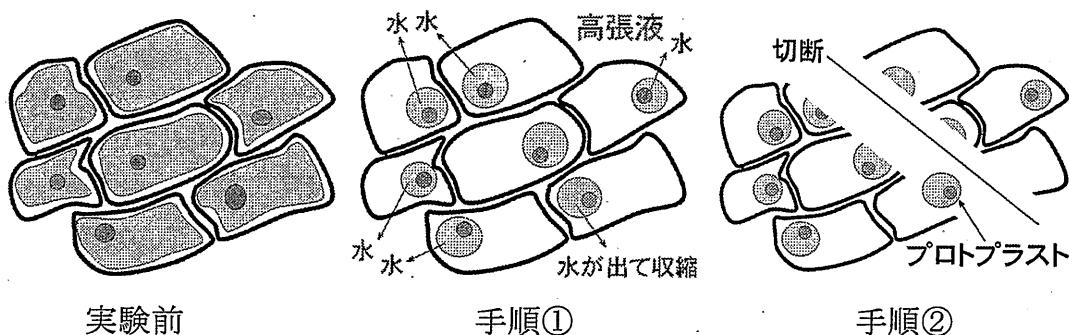


手順①



手順②

実験の原理を下の図に示す。手順①に示したように植物細胞を高張液に浸すと、細胞内より水が出ることによって原形質分離が起こる。このさい、原形質はすでにプロトプラストの状態になっている。これを手順②のように鋭利な刃物で切断すると、一定の確率で原形質を破壊する事なくプロトプラストを得ることができる。



(2) 実験結果

右の写真は、切断したところからプロトプラストが出てきている様子をとらえたものである。原形質分離をさせているので、大変小さいプロトプラストしか確認できなかつた。しかし、本当にきれいな球形をしたプロトプラストを初めて見ることができた。

この実験では、偶然で切断されない場合にしかプロトプラストを獲得できない。そのため、どのように工夫しても、また実験操作に習熟しても、プロトプラスト形成の効率を上げることはできなかつた。



4 実験2 酵素液を用いてのプロトプラストの調製

実験1で、古典的な方法でもプロトプラストを取り出せることを確認することができた。しかし、この方法では一度に数個のプロトプラストしか調製できない。そこでより効率よくプロトプラストを取り出す方法はないかとインターネットで検索すると、甲南大学のホームページに酵素液を使った調製法が紹介されており、この方法を試みることにした。

<http://www.geocities.cco.jp/Technopolis-Mars/8764/index.html>

(1) 実験方法

ホームページには酵素液の実験キットの販売も行っているとあったが、今回私たちは自分で酵素液を作り実験を行うことにした。

手順①: 次の薬品を水100mlに溶かし、酵素液を作る。

- I、塩化カリウム 3.5% (KCl) …… 3.5g
- II、塩化カルシウム 0.5% (CaCl₂) …… 0.5g
- III、マンニトール (0.5M) …… 9.1g
- IV、ペクトリアーゼ Y-23 …… 10mg
- V、マセロザイム R-10 …… 0.2g
- VI、セルラーゼ・オノゾカ R-10 …… 1.0g

I. IIを一緒に、その後III～VIの順にマグネチックスターで混合する。

* III～VIは順番を間違えると酵素液が決してできないため、薬品を無駄にしたくなければ厳守すること。

* 酵素液は1.5mlずつマイクロチューブに分注して、冷凍保存する。

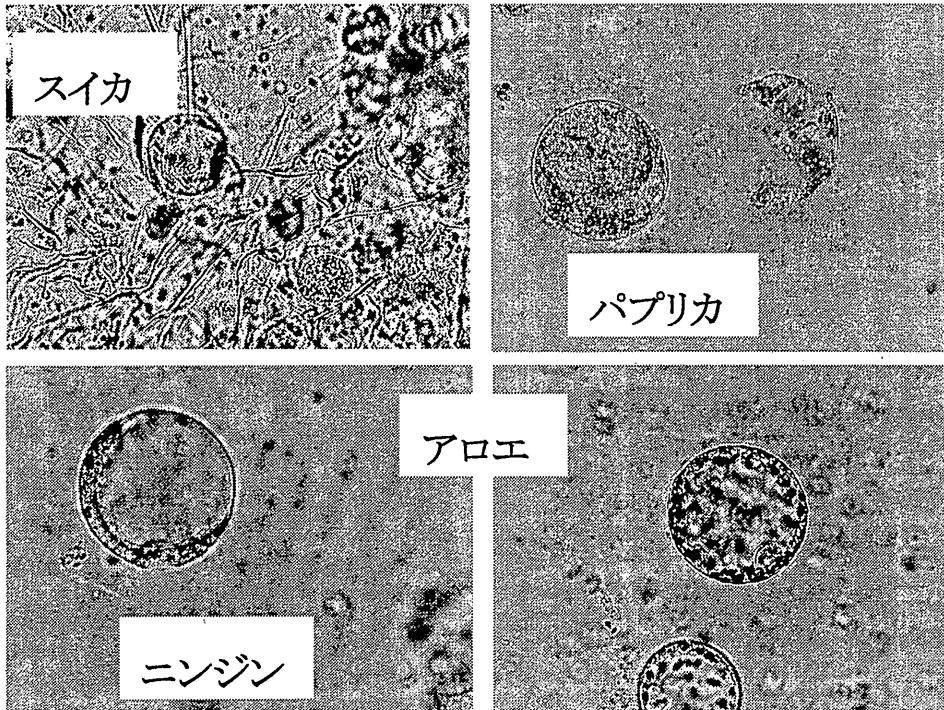
手順②: 野菜を小さく刻み酵素液に入れ、空気を抜き減圧沸騰させる。

手順③: それを、30°Cの湯に30分間つけ5分毎に振る。

手順④: 顕微鏡で観察する。

(2) 実験結果

スイカ・パプリカ・ニンジン・アロエを試したところ、全てのプロトプラストを確認することができた。実験を重ねるたびに我々も手際がよくなり一度に大量に調製できるようになった。また、パプリカ・アロエ・ニンジンは細胞自体に色が付いているわけではなく細胞に含まれる色素体に色が付いているだけであることもわかった。



5 実験3 PEG を用いての細胞融合

プロトプラストの利用の一つに細胞融合による雑種細胞の研究がある。細胞の融合方法には電気刺激法、センダイウイルス法、PEG 处理法の三つがあり、植物細胞の融合は PEG による融合が一般的である。そこで私たちも調製したプロトプラストに PEG 处理を行い、異種の植物細胞を融合させ雑種細胞を作つてみることにした。

PEG とはポリエチレングリコールのこと、エチレングリコールが重合した構造をもつ高分子化合物（ポリエーテル）である。分子量 50,000 以下のものをいう。構造は $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$ である。また、PEG は水、メタノール、ベンゼン、ジクロロメタンに可溶、ジエチルエーテル、ヘキサンには不溶である。タンパク質など他の高分子に PEG 構造を付加することを PEG 化 (Pegylation、ペグ化) という。これを用いることで細胞同士の結合が促進されるとある。

出典：フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』

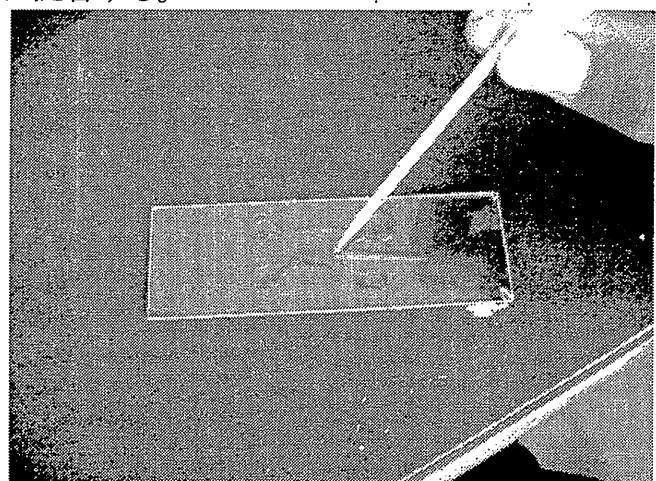
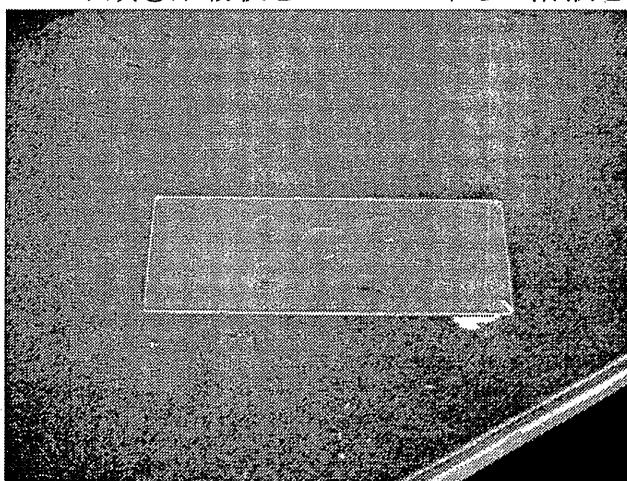
(1) 実験方法

まずは、インターネット等で紹介されている方法で、細胞融合を試みた。

手順①調製した二種類のプロトプラストをスライドガラス上に少量採り混合する

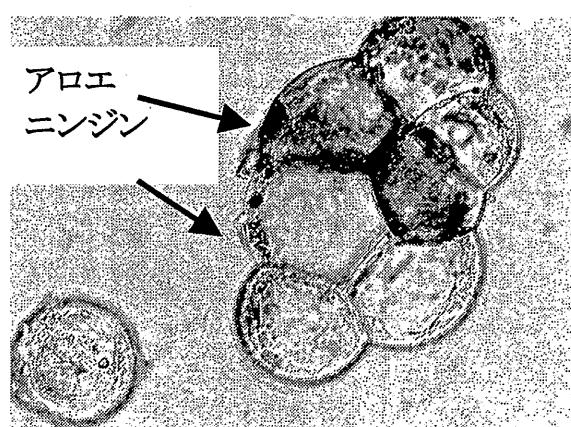
手順②PEG をまわりに4滴ほど加え混合する。

手順③爪楊枝をつかつてこれらの溶液を静かに混合する。



(2) 実験結果

PEG の処理の後、顕微鏡で観察すると、たくさんのプロトプラストが結合している様子が観察された。次の写真はアロエとニンジンの細胞で細胞融合を行つたときのものである。PEG を加えるまでは、このようにプロトプラストが結合することはなかったが、PEG の処理によって劇的に細胞同士の結合が行われた。しかし、この写真でも分かるように、たくさんのプロトプラストが結合しているだけで、これ以後ひとつにまとまるような変化は起きなかつた。



実験を繰り返しても、細胞融合を観察できなかつたので、もう一度調べ直すと、PEGの処理で細胞の結合が促進され、このあとPEGを除去すると融合するとあつた。しかし、いくら調べてもPEGの除去の仕方が示されていなかつた。

6 実験4 PEGの除去による細胞融合の誘導

PEGを取り除く方法については調べることができなかつたので、自分たちでその方法を検討し、次に示す方法を試みた。

(1) 実験方法

手順①異種細胞をマイクロチューブで混合し、さらに少量のPEGを加えて処理を行い、3分間遠心分離しプロトプラストを沈殿させる。

手順②PEGを含む上澄みを廃棄する。

手順③PEGを含まない等張なマンニトール溶液を加え、沈殿したプロトプラストを懸濁する。



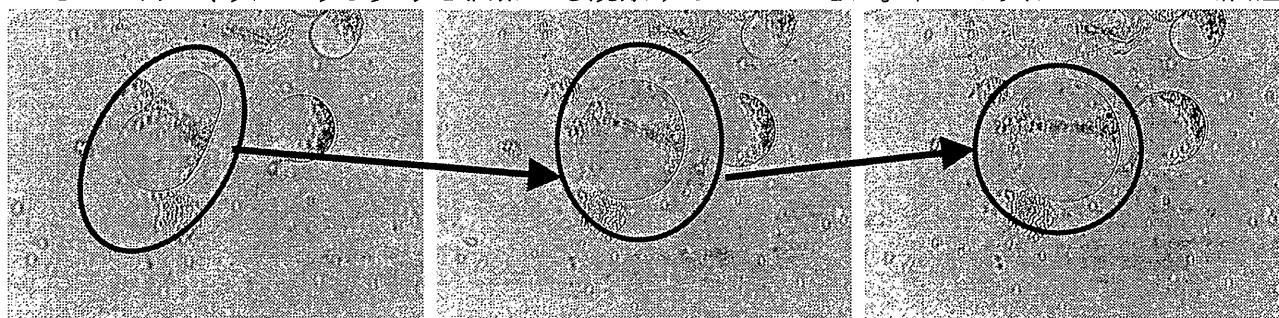
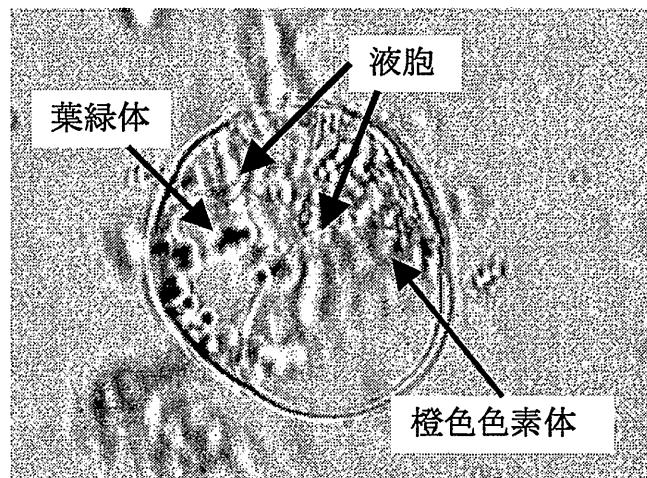
遠心分離器

(2) 実験結果

以上の方針でPEGを取り除けると考え、実験を繰り返したが、融合したプロトプラストどころかプロトプラストの数も減っていた。これは、遠心分離などの機械的な衝撃により、プロトプラストが破壊されているのではないかと考えられる。そこで、実験操作を慎重に行い、できるだけ衝撃を与えないなどの工夫を行って実験することにした。次の写真は、実験3と同様のニンジンとアロエの細胞融合の結果観察された雑種細胞である。橙色の色素体を持つニンジンの細胞と、葉緑体を持つアロエの細胞が一つの細胞に融合している様子が分かる。また細胞膜は融合しても、それぞれの細胞に存在する液胞は融合していない。

このように、異種の細胞が融合したプロトプラストはわずかにしか得られなかつた。そのため、融合した細胞を組織培養し、雑種植物を作り出すまでには至らなかつた。

その一方で、次のような現象を偶然にも観察することができた。下の写真はニンジンの細胞どう



しの融合である。左から、細胞どうしが接着しただけのひょうたん型のものが、15分から30分をかけて次第にきれいな球形になっている様子が観察できる。このように、細胞融合はゆっくりと進むものであることも知ることができた。

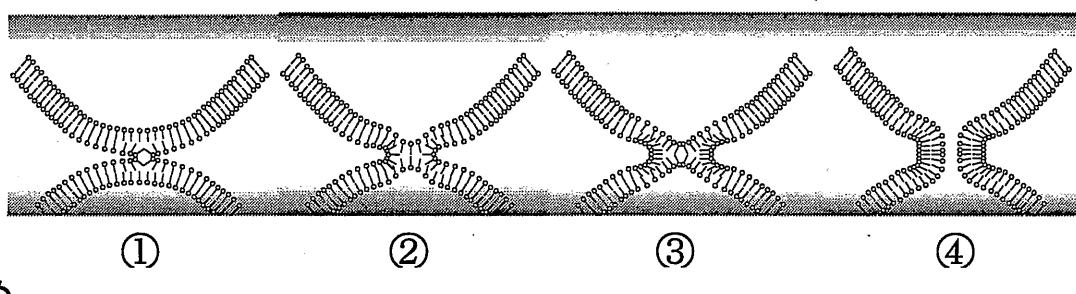
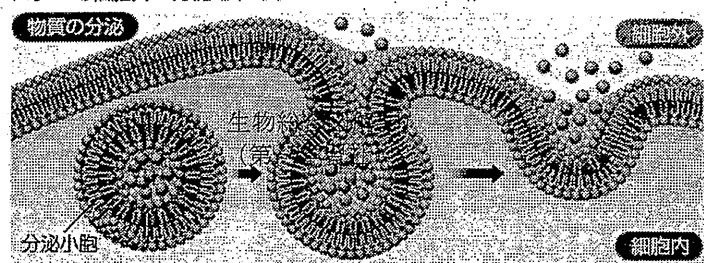
7 考察

最後に我々は、この細胞融合の現象がどのように起こるのか、その原理を細胞膜の分子の動きで考えてみた。

我々の持つ細胞膜のイメージでは、ビニール袋などのようなものを想像してしまう。しかし細胞膜は、リン脂質という分子が二重に層を形成している単なる油の膜である。一つ一つのリン脂質の分子は結合しておらず、疎水性の脂肪酸の部分に水が触れないようするために集合しただけのものである。そのため、細胞同士が接近したときに互いのリン脂質の二重層がそれぞれのリン脂質の二重層に一体化してしまうのではないかと考える。右の図は、細胞がホルモンを分泌する際のエキソサイトシスの仕組みである。これを参考に、細胞融合について下の図のように推測した。

● 開口分泌(エキソサイトシス)

ホルモンや消化酵素は、それらを含む分泌小胞の膜が細胞膜と接着することによって細胞外へ分泌される。



8 まとめ

- (1) 古典的な方法や、酵素を用いたプロトプラストの調製を行うことができるようになった。特に、酵素を用いた方法は、数多くの実験をこなしてきたので、その技術を完全に習得した。
- (2) 細胞融合に関しては、いくつか実際に融合した細胞を得ることができたが、その数は十分とはいえないかった。しかし、偶然にもその融合の過程を目にすることができたのは幸運だった。
- (3) 今回得られた雑種細胞は、無菌状態での実験で得られたものではなく、抗生物質等の使用もできないので、細菌や菌類の混入により、組織培養により完全な植物体としての生育は望めなかつたと。

9 感想

これらの実験を通して、初めてプロトプラストを見たとき、きれいな球形をした植物細胞に感動を感じた。また、細胞融合については、PEGの除去という難解な問題にぶつかり、何度も繰り返し実験を行いながらバイオテクノロジーの難しさを思い知った。さらに、これらの細胞で見られる現象も、実はすべて生体物質の分子レベルのはたらきであることを改めて痛感した。

10 個人の感想

富來:私は、この課題研究を通して“研究”的楽しさを学ぶことができた。プロトプラストを初めて見つけたときの嬉しさは、一生忘れない。また、だんだん内容が深まり、難しくなると成功の喜びも一段と大きかった。この経験をこれからに活かしていきたいと思う。

木野:難しかった実験も回数を重ねるごとに効率よくできるようになり、繰り返し行うことの大切さがわかった気がする。今後やりたいこととしてさらに一段階進んで、カルスを形成し植物体へ成長させたい。

蜷川:私は、この研究を通して“興味を持ったものはとことんやれる”ということがわかった。この事を活かし、自分の好きなものにはとことんやる事を大事にしようと思った。

平田:はじめは実験方法などがよくわからず班の人々に迷惑をかけてしまった。しかし、実験が成功したときはとてもうれしく、実験を通して生物についてのこと以外にもたくさん学ぶことができた。