

5 プロトプラストの単離と融合

1. 目的

バイオテクノロジーという言葉が浸透して久しいが、高校段階においてははまだ先端技術の一端に触れる機会は少ない。そこで高校の実験室にある装置、器具を利用し、バイオテクノロジーの入り口ともいえるプロトプラストの単離と細胞融合を試みる。

2. 準備

試料：ピーマン、パプリカ（黄、赤）、アロエ、ミカン、トマト

使用薬品：D-マンニトール、セルラーゼ・オノズカ、マセロザイム、ペクトリアーゼ、塩化カリウム、塩化カルシウム、ポリエチレングリコール (PEG)

使用器具：顕微鏡、スライドガラス、カバーガラス、ピンセット、メス、ビーカー、マイクロメーター、エッペンドルフチューブ、アスピレーター、マイクロピペット、温度計、葉さじ、葉包紙、電子天秤

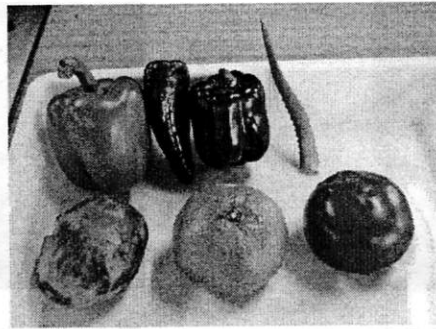


図1 試料とした植物

3. 方法

(1) 酵素液の作製

ア. マンニトール (0.5M) 9.1 g、セルラーゼ・オノズカ 1.0 g、マセロザイム 0.2 g、ペクトリアーゼ 10mg、塩化カリウム (3.5%) 3.5 g、塩化カルシウム (0.5%) 0.5 g を蒸留水 80ml に溶かす。

イ. さらに蒸留水を加えて 100ml にする。

ウ. pH を 5.8 にする。

エ. エッペンドルフチューブに 900 μ l の酵素液を入れる。

(2) プロトプラストの単離

ア. 試料を洗い、3~4mm に切る。

イ. エッペンドルフチューブ 1 本あたり、約 10 切片の試料を入れる。

ウ. エッペンドルフチューブのふたを開け、アスピレーターで吸引する。

エ. エッペンドルフチューブごと、30°C の湯に 30 分間つける。5 分ごとに手で強く振る。

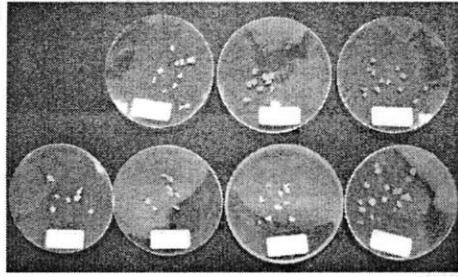


図2 試料の切片

(3) 観 察

ア. エッペンドルフチューブの底部にプロトプラストが沈殿する。この部分をマイクロピペットを使ってそと取り出す。

注：従来の方法では遠心分離をかける必要があったが、この方法ではその必要がなく、時間を短縮することができる。

イ. マイクロピペットで取り出したプロトプラストをスライドガラスに直接置く。

ウ. プロトプラストが壊れるのを防ぐため、カバーガラスはかけず、150倍程度で観察する。

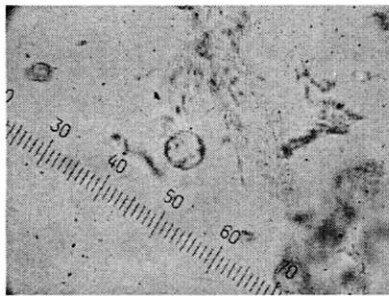


図3 ミカンのプロトプラスト

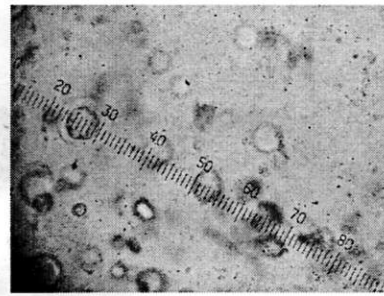


図4 ピーマンのプロトプラスト

(4) 接着・融合

ア. スライドガラスの中央に融合させたい2種類のプロトプラストを20 μ lずつ置く。

イ. 2つの試料をよく混ぜる。

ウ. 試料の周辺4か所に、40 μ lずつのPEG（ポリエチレングリコール）液を置く。

エ. PEG液と試料の間に糸を引くようにして両液をつなぎ、静かに混ぜ、観察する。

注：作製したプロトプラストを融合させようとする場合、プロトプラストの単離後、できるだけ時間をあけずに行わないと、プロトプラストが壊れてしまうので注意が必要である。

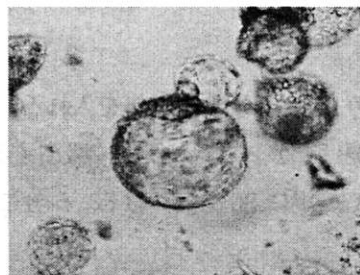


図5 ピーマンとパプリカ(黄)の融合細胞

4. 結果

(1) プロトプラストの単離について

- ア. ここにあげた試料のどの細胞においてもプロトプラストを単離することができた。
- イ. トマトについては細胞の形が不定形であり、細胞とプロトプラストの形状の違いがわかりにくい。
- ウ. 試料を大きめ (3~4mm) に切ることで、細胞の断片が少なくなり、プロトプラストの収量を増やすことができる。
- エ. 細胞壁が溶けたことを確認するためにはプロトプラストに蒸留水を加えてみると、細胞が破裂する様子が観察できる。

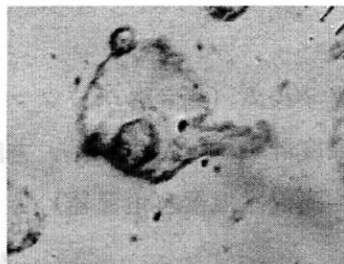


図6 蒸留水を加えて破裂したピーマンのプロトプラスト

(2) プロトプラストの接着、融合について

- ア. トマトの細胞にピーマンの細胞が取りこまれるように融合する様子、ピーマンの細胞同士が融合する様子を顕微鏡で観察することができた。
- イ. PEG 液を混合すると短時間接着した細胞を数多く観察することができる。
- ウ. 融合状態の細胞は、時間をおいても確認できる数が少なかった。

5. 考察

- (1) 酵素液の作製と、試料の準備さえ、事前に行っておけば、授業の範囲内でプロトプラストの観察は充分可能である。
- (2) 細胞の接着はPEG融合はすべてのプロトプラストで確認されるわけではない。また、PEG液は細胞を選別するわけではないので同種のプロトプラストでも接着、融合はある。
- (3) 色の異なるプロトプラストの融合が視覚的に観察しやすい。今回行ったものではピーマン、パプリカ(黄)が融合しやすく、視覚的にも確認しやすい。

6. まとめ・発展

本実験は「遺伝」56巻4号の「50分間でプロトプラストを作り観察する」という記事の追試である。授業時間内で失敗なくプロトプラストの観察が可能になったという点で非常に優れている。

次の課題としては、プロトプラストから植物体を培養する。融合細胞から植物体を培養する。などが考えられる。設備・時間の上で難しい点も多いが、生徒達の興味ある分野であるので、これから研究していきたい部分である。

7. 参考文献

- 水田憲男・水野清貴・中川早苗・田中修「50分間でプロトプラストを作り観察する」、『遺伝』、56巻4号、2002年、裳華房
- 楠元守「植物のプロトプラストの実験と観察」、『とっておき生物実験 生物の科学 遺伝』、別冊10号、1998年、裳華房