

31 細胞融合

「サラダ細胞」をつくろう ～植物のプロトプラスト作成と細胞融合の試み～

目的

プロトプラストは、細胞融合や遺伝子導入などによる新しい育種技術に利用されている。プロトプラストを作成して、さらにその融合を試みることで、植物細胞の構造とバイオテクノロジー技術への理解を深めよう。

準備

材料 トマト，サニーレタス → この2つの異種細胞が融合(接着)したものを「サラダ細胞」と仮に命名する。

器具 シャーレ，カミソリ，ピンセット，マイクロチューブ，チューブフロート，パスツールピペット，簡易真空保存容器，温浴用湯(約35℃)，検鏡用具

試薬 プロトプラスト作成用酵素液(ペクチナーゼ・セルラーゼ・0.6mol/Lマンニトール・pH5.8)
細胞融合用促進液(P E G液：30%ポリエチレングリコール)

方法 I プロトプラストをつくる → II 細胞融合をする → 観察

[I]プロトプラストをつくる

1. サニーレタス(表皮をはがすようにちぎる)とトマト(果肉細胞を約3mm角に切り出す)を，それぞれ酵素液の入ったマイクロチューブに浸る程度に入れる。
2. 簡易真空保存容器にふたを開けた1のチューブを入れ，ポンプで抜気する。
(泡が出てきて材料の色が濃くなるまで2分程度)
3. 約35℃の温浴槽にふたを閉めたチューブをチューブフロートごと浮かせて，15分間おく。
(3分毎に素早く取り出して強く振る)
4. 3のチューブから切片を取り除き，2分間静置する。
5. チューブの底に沈んだプロトプラストを，パスツールピペットで静かに取り，スライドガラスに置いて検鏡・観察する。(カバーガラスはかけない)

[II]細胞融合をする

1. スライドガラス上にサニーレタスとトマトのプロトプラスト液を一滴ずつ取り，混ぜる。
2. 1のスライドガラス上にP E G液を4滴置き，一滴ずつプロトプラスト混合液に混ぜる。
3. スライドガラスを軽く揺すり，プロトプラストが融合(接着)する様子を検鏡・観察する。
(カバーガラスはかけない)

結果と考察

1. スケッチ

トマト細胞	サニーレタス細胞	「サラダ細胞」異種細胞が融合(接着)したもの

(各細胞の特徴)

2. 植物細胞の細胞壁の主成分は何か。
3. 植物細胞どうしを接着している物質は何か。
4. 方法 I の5で観察されたプロトプラストが，通常の植物細胞と形状が異なるのはなぜか。
5. 方法 II の3では，どのような組み合わせのプロトプラストの融合(接着)が観察されたか。

実験の反省・感想

クラス 番号 氏名

◆◇◆ 細胞融合について ◆◇◆

1. 実験系の設定にあたって

一般にプロトプラストの単離は、細胞への遺伝子導入や融合細胞の育種等のための細胞培養への前処理として実験系が組まれている。そのため、無菌処理や細胞の活性向上、収量を考慮したものになっており、使用薬品の種類も多く時間がかかり手順も煩雑である。しかし、生徒が1時間の授業の中でプロトプラストを観察することを主目的として位置づければ、その多くを簡略化できると考えた。よって、この実験は「プロトプラストの観察と細胞の融合(接着)を試みる」ことをのみ目的として組まれている。

「本当に融合させたい」「融合後、培養したい」と考える場合は、処理液の組成や処理操作に変更が必要となる。(収量をさらに上げ、細胞への傷害を防ぐ酵素液組成と操作・酵素液の洗浄、遠心分離・PEG液の段階的洗浄と培養液への置き換えによる融合操作・全行程無菌操作等)

プロトプラストの観察は、中学校以来顕微鏡で見慣れた植物細胞の新たな姿として、生徒の感動を呼び、細胞の構造やバイオテクノロジー技術への理解の一助となるに違いない。

2. 準備の検討

材料 トマト、サニーレタスの他、ピーマン、アロエ、アジサイ、ユキノシタ、ハウレンソウ、ムラサキキャベツなどでも可能。この2種を選んだのは、1年中スーパーで材料が手に入り、短時間である程度の収量が見込める、そして、2つのプロトプラスト間で大きさや色が明確に異なるためである。

器具 簡易真空保存容器は、乾物の保存や漬け物作成に使われる調理器具で、手軽に簡易減圧を実現できる。(市価2,000円程度。教材カタログには簡易真空槽エアーフレッシュという名称で2,800円で載っていた。)アスピレーターを使うことも可能だが、注意深く観察しないと突沸するおそれがある。

温浴用湯(約35℃)は、スチロール容器等にお湯を張って準備する。

試薬 プロトプラスト作成用**酵素液**(ペクチナーゼ・セルラーゼ・0.6mol/1マンニトール・PH5.6～5.8程度)
ペクトリアーゼ Y 23 0.2g (マセロチームR10として 10g 10,700円)
セルラーゼ R 10 1.0g (10g 10,700円)
マンニトール 10.8g (ショ糖20.5gでも良い)
C a C l ₂ 3.5g
以上を水で溶解して、100mLにする。(マイクロチューブ各2.0mLで約45本分)
スターラーを使って、完全に溶解するのに20～30分程度かかる。溶解後10分程度静置して、上澄から使用する。前日に作成した場合は、冷蔵保存する。
細胞融合用促進液(**P E G 液**：30%ポリエチレングリコール)
ポリエチレングリコール重合度400 (500g 4,100円)

3. 方法の検討

[I]プロトプラストをつくる

- (1) サニーレタス(表皮をはがすようにちぎる)とトマト(果肉細胞を約3mm角に切り出す)を、それぞれ酵素液の入ったマイクロチューブに浸る程度に入れる。→あまり細かくしすぎるとゴミばかりが増えるので注意する。よく切れるカミソリを使用する。
- (2) 簡易真空保存容器にふたを開けた1のチューブを入れ、ポンプで抜気する。
(泡が出てきて材料の色が濃くなるまで2分程度)→この操作で酵素液を試料内に浸透させることで酵素処理を短時間に簡略化できる。ポンプが動きにくくなるまでしっかり続ける。
- (3) 約35℃の温浴槽にふたを閉めたチューブをチューブフロートごと浮かせて、15分間おく。
(3分毎に素早く取り出して強く振る)→素早く操作しないと温浴の効果が小さくなる。

(4) 3のチューブから切片を取り除き、2分間静置する。→ピンセットでとれる程度のものはすべて取り除く。遠心分離を省略しているのでゴミが残ると観察しにくくなる。

(5) チューブの底に沈んだプロトプラストを、パストツールピペットで静かに取り、スライドガラスに置いて検鏡・観察する。(カバーガラスはかけない)→プロトプラストは酵素液の中にそのままおいても1時間程度は壊れないので、洗浄操作を省略する。

[II]細胞融合(接着)をする

- (1) スライドガラス上にサニーレタスとトマトのプロトプラスト液を一滴ずつ取り、混ぜる。
→静置したチューブの底から取る。できるだけ収量が多い方が接着しやすい。
- (2) 1のスライドガラス上にP E G 液を4滴置き、一滴ずつプロトプラスト混合液に混ぜる。
→パストツールピペットで糸を引くように一滴ずつ混合する。すぐに接着が観察できる。
- (3) スライドガラスを軽く揺すり、プロトプラストが融合(接着)する様子を検鏡・観察する。
→接着は同種間・異種間で同様に起こる。その後、細胞質が融合するためには、PEG液の濃度を段階的に下げ、培養液に置き換えていく必要がある。今回はあくまでも接着であり、融合細胞の作出や培養には更なる手法が必要であることを生徒には説明したい。

4. プロトプラスト単離キットについて

本実験では手軽にバイオテクノロジーの一端を体験できるが、手順を簡略化したとはいえ、酵素液の調整やP E G 液の準備にはまだまだ時間と資金(酵素の使用量はごくわずかだが、購入には最小単位でも10,000円以上。冷蔵でも使用できるのは2～3年か。)がかかる。そこで、市販のプロトプラスト作製キットを利用することで、その点の改善を試みた。

(1)ヤクルト工業 プロトプラストキット 2,000円
プロトプラスト単離用酵素剤 (セルラーゼオノズカRS・マセロチームR10・マンニトール)
クエン酸溶液(PH調整用) 45mL
付属品 漏斗・ろ過用ナイロンメッシュ・スライドガラス・ガラスろ紙
簡単に酵素液を調整できたが、生徒各人がプロトプラストを作製するためには2セット必要であり、また、酵素剤と溶解液以外の付属品は本校では必要としないものだった。

(2)甲南大学バイオテクノロジー教材開発チーム プロトプラスト迅速単離キット 3,000円
酵素液 (50本、調整済みでマイクロチューブに各0.9mL入り、要冷凍)
PEG液 (8本、調整済みでマイクロチューブに各0.9mL入り)
吸引瓶1本・チューブフロート5枚・CD-ROM 1枚・マニュアル 1部
付属のCD-ROM やマニュアルに、写真・動画でていねいに操作方法や注意点が掲載されている。酵素液は調整済みですでに分注されており、このマイクロチューブを配付して生徒が直接試料切片を投入することができる。また、吸引瓶は本校では必要なかったが、酵素液(0.9mL 10本 500円)やPEG液(0.9mL 10本 100円)のみの購入ができるので、2回目以降はこれを利用すると経済的である。(その他、要冷凍の送料として本校の場合は1,260円がかかった。)インターネットで発注できる。取り扱いは、旭理研工業社。

参考文献

池上正人，2003：植物バイオテクノロジー，理工図書

駒嶺 穆編著，2003：植物細胞工学入門，学会出版センター

遺伝学普及会編，1998：とっておき生物実験 生物の科学 遺伝 別冊10号，裳華房

高山 寛，1987：図解バイオテクノロジー，農業図書

山田康之，植物細胞培養マニュアル，講談社