

## イネ葉身・葉鞘組織およびカルスからのプロトプラスト分離法\*

中島敏彦・堀野修\*\*

Toshihiko NAKAJIMA and Osamu HORINO\*\* :  
Isolation method of protoplast from rice leaf, sheath tissues and calli\*

### Summary

The method of protoplast isolation from leaf tissues, sheath tissues and calli of rice was established for selecting disease resistant plants on cell levels. Some enzymes were evaluated for their activities and their optimum concentrations for isolating protoplast. The most effective procedure for the isolation of rice protoplast from leaf and sheath tissues is : 1) cut the leaf and sheath tissues by razor, 2) incubated in the enzyme solution (0.5% Macerozyme+0.5% Cellulase+0.5% Driselase in 0.5M Mannitol) at 28°C for 1.5-2 hrs, 3) squeezed through sterilized gauze and nylon-mesh, 4) centrifuged by low speed, 5) washed the protoplast three times with 0.5M Mannitol, 6) placed in the stabilized solution. The protocol of the isolation of protoplast from calli was the same as the isolation from leaf and sheath tissues except incubation time. Under the optimal condition  $1.2 \times 10^7$  protoplasts/ml/g fresh weight of the leaf and sheath tissues were isolated by that method. The current method is also useful to breed other kinds of stress resistant plants on cell levels.

近年バイオテクノロジーの発達にともない、作物の耐病性、耐冷性あるいは耐塩性などの新品種の育成に、単細胞系を用いて選抜を行う新しい育種法の開発が試みられている。イネの品種改良においてもバイオテク技術による新品種の育成が試みられているが、現在、イネ葉肉細胞から活性の高いプロトプラストを単離することが困難なため、葯や未熟胚を用いて一度カルスにした後に、その培養細胞を再分化させる方法<sup>3)</sup>が用いられている。しかし、その実験系では、カルス形成のために長時間を必要とし、形成されたカルス懸濁培養細胞は遺伝的形質の変異性に富むことから、選抜後の固定化などにも問題がある。

本報では、病害抵抗性イネ個体を単細胞系で選抜するため、イネ葉身・葉鞘組織およびカルスから、直接に、しかも短時間でプロトプラストを作出する方法を確立した。なお、本試験の遂行に当たり、三重大学の久能均教授および山岡直人助教授(現北海道大学理学部)より多大の御教示をいただいたので、ここに厚く感謝の意を表する。

### 材料および方法

供試イネ品種・系統には、奥羽247号(真性抵抗性遺伝子型+)、愛知旭(Pi-a)奥羽323号(Pi-a)、トヨニシキ(Pi-a)および関東51号(Pi-k)を用いた。

プロトプラストの分離方法には一段階法と二段階法とがあるが、本試験では一段階法を用いた。イネ葉身・葉鞘組織からのプロトプラストの分離には、本葉5~7葉が展開した供試イネ品種・系統の幼苗を用いた。供試材料を剃刀で細断し、供試酵素液中に浸漬して28°Cの恒温槽中で振盪培養した。ガーゼおよびナイロンメッシュ(メッシュ径30μm)で濾過、低速遠心分離(150xg, 5分間)し、0.5M マンニトール液で3回洗浄した後に安定化培地に移し試験に供した。安定化培地の組成は0.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0mM KNO<sub>3</sub>, 0.1mM MgSO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O), 0.1mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1μM KI, 0.01μM CuSO<sub>4</sub>, 0.1mM MES/0.5M Mannitol (pH5.5-6.0)である。

イネカルス由来のプロトプラストの作出には、種子から誘導したカルスを用いた。滅菌した供試品種・系統の玄米をN<sub>0</sub>固形培地上に静置培養して、イネカルスを誘導した。誘導カルスをN<sub>1</sub>液体培地に移植し、振盪培養しながら小細胞塊になるまで移植を繰り返した。カルスが小細胞塊になった後、低速遠心してカルスを集め、酵

\* この試験の一部は1988年の日本植物病理学会の大会において発表した。

東北農業試験場 Tohoku National Agricultural Experiment Station, Omagari, Akita 014-01

\*\* 現在 Present address : 京都府立大学 Kyoto Prefectural University, Kyoto, Kyoto 606

素液で処理した。酵素液処理以後の作業は、イネ葉身・葉鞘組織からのプロトプラスト分離法と同様の方法で行った。

プロトプラストの生死の判別はニグロシンB溶液に対する染色性の有無により行った。プロトプラストの核の有無は、ピロニン・メチルグリーン染色法 (Unna・Pappenheim 法)<sup>1)</sup> によりプロトプラストを直接染色して観察した。なお、観察には微分干渉顕微鏡を用いた。

### 結果および考察

これまで多くの作物などで行われているプロトプラスト一段階法<sup>2)</sup>を用いて、イネ葉身・葉鞘組織から、プロトプラストの分離を試みた。供試イネ品種・系統の幼苗を細断した後、0.1% Cellulase Onozuka RS および 0.5% Macerozyme を含む 0.5M マンニトール溶液中に 3

時間浸漬し、濾過後遠心、洗浄後安定化培地に移植して実験に供した。この方法で作出したプロトプラストの直径を測定したところ、5  $\mu\text{m}$  径のものから 50  $\mu\text{m}$  径以上のものまで認められたが、多くのプロトプラストは 5 ~ 15  $\mu\text{m}$  径であり、平均直径は 12.4  $\mu\text{m}$  であった (Fig. 1)。作出されたプロトプラストの核の有無を調べたところ、全プロトプラストの 77% が核を有していた (Fig. 2)。さらに、作出されたプロトプラストの活性を生存率で調べた結果、作出 24 時間後の生存率は 90%、同 35 時間後の生存率は 50% であり、作出 54 時間後ではほとんどのプロトプラストの死滅が観察された (Fig. 3)。

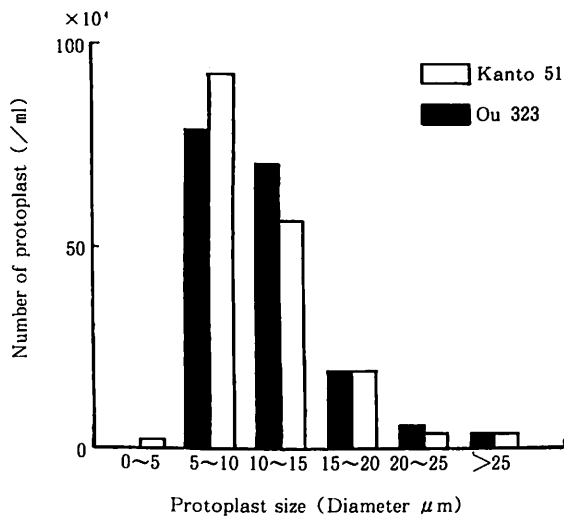


Fig. 1 Frequency distribution of the protoplast' size isolated from rice leaf and sheath tissues

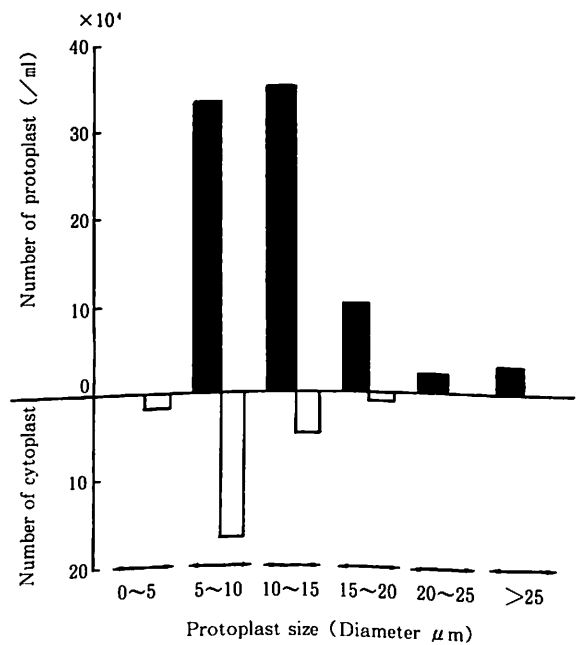


Fig. 2 Frequency distribution of protoplast and cytoplasm isolated from leaf and sheath tissues of rice line, Ou 247

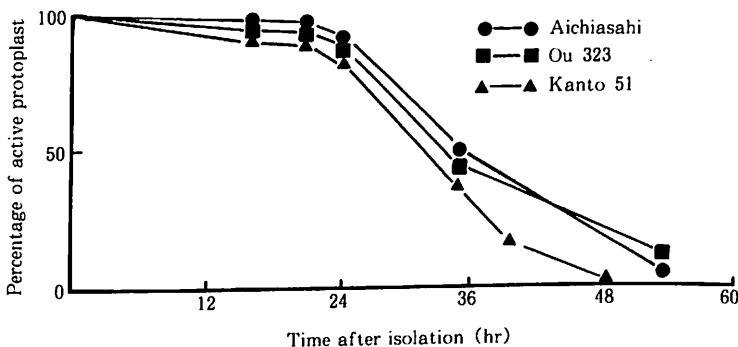


Fig. 3 Time course of activity of protoplast isolated from leaf and sheath tissues of three rice cultivars

現在市販されているペクチン分解酵素には Macerozyme R10, Pectolyase, Pectinase, Rohament P 5 などがあり、その主成分はポリガラクトナーゼである。そのうち、Pectolyase にはペクチンリアーゼも含まれている。セルロース分解酵素には Cellulase Onozuka RS, Cellulase Onozuka R10, Cellulase YC, Cellulase TY, Driselase, Meicellase などがあり、その主成分はセルラーゼである。そのうち、Driselase にはヘミセルラーゼおよびペクチンリアーゼもふくまれている。そこで、ペクチン分解酵素の Macerozyme R10 および Pectolyase と、セルロース分解酵素の Cellulase Onozuka R10 および Driselase を以下のように組み合わせ、各酵素液処理によるプロトプラストの分離効率

を検討した。① 0.1% Pectolyase + 1% Cellulase (P + C と略す、以下同様)、② 0.1% Pectolyase + 1% Driselase (P + D)、③ 0.1% Pectolyase + 0.5% Cellulase + 0.5% Driselase (P + C + D)、④ 0.5% Macerozyme + 1% Cellulase (M + C)、⑤ 0.5% Macerozyme + 1% Driselase (M + D)、⑥ 0.5% Macerozyme + 0.5% Cellulase + 0.5% Driselase (M + C + D)、⑦ 0.25% Macerozyme + 0.05% Pectolyase + 0.5% Cellulase + 0.5% Driselase (M + P + C + D)。

なお、Pectolyase の長時間処理は作出プロトプラストに害作用があることが知られていることから、Pectolyase を含む酵素液の処理時間は 0.5~1 時間処理をも検討し

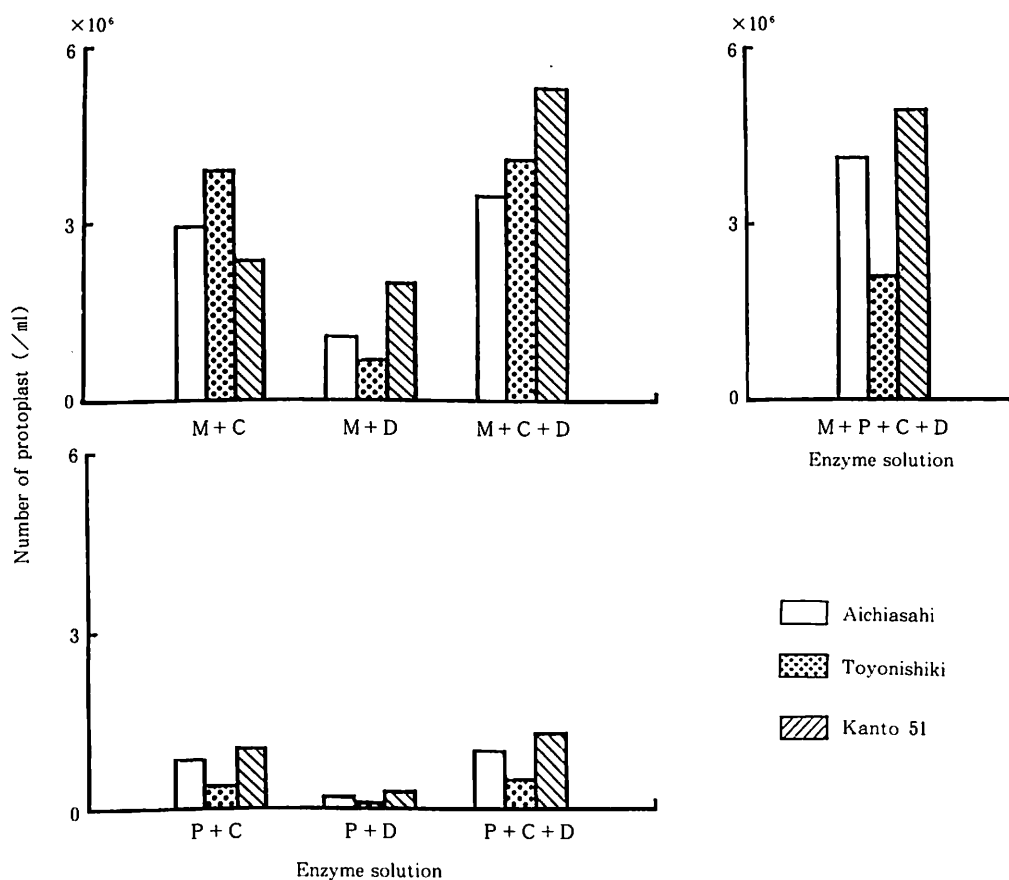


Fig. 4 Relation between the combination of enzyme solutions and the number of protoplast isolated from leaf and sheath tissues.

P + C means 0.1% Pectolyase + 1% Cellulase, P + D : 0.1% Pectolyase + 1% Driselase, P + C + D : 0.1% Pectolyase + 0.5% Cellulase + 0.5% Driselase, M + C : 0.5% Macerozyme + 1% Cellulase, M + D : 0.5% Macerozyme + 1% Driselase, M + C + D : 0.5% Macerozyme + 0.5% Cellulase + 0.5% Driselase, M + P + C + D : 0.25% Macerozyme + 0.05% Pectolyase + 0.5% Cellulase + 0.5% Driselase, in 0.5 M Mannitol solution

た。その結果は Fig. 4 に示した。分離されたプロトプラスト量は⑥M+C+D>⑦M+P+C+D>④M+C>⑤M+D>③P+C+D>①P+C>②P+Dの順に多かった。このうち、比較的プロトプラストが効率よく

得られた③P+C+D, ④M+C, ⑥M+C+D, ⑦M+P+C+Dの酵素液処理により作出されたプロトプラストの径を調べた。その結果, 10 $\mu$ m以上の径の核を有するプロトプラストが多く分離されたのは⑥M+C+D

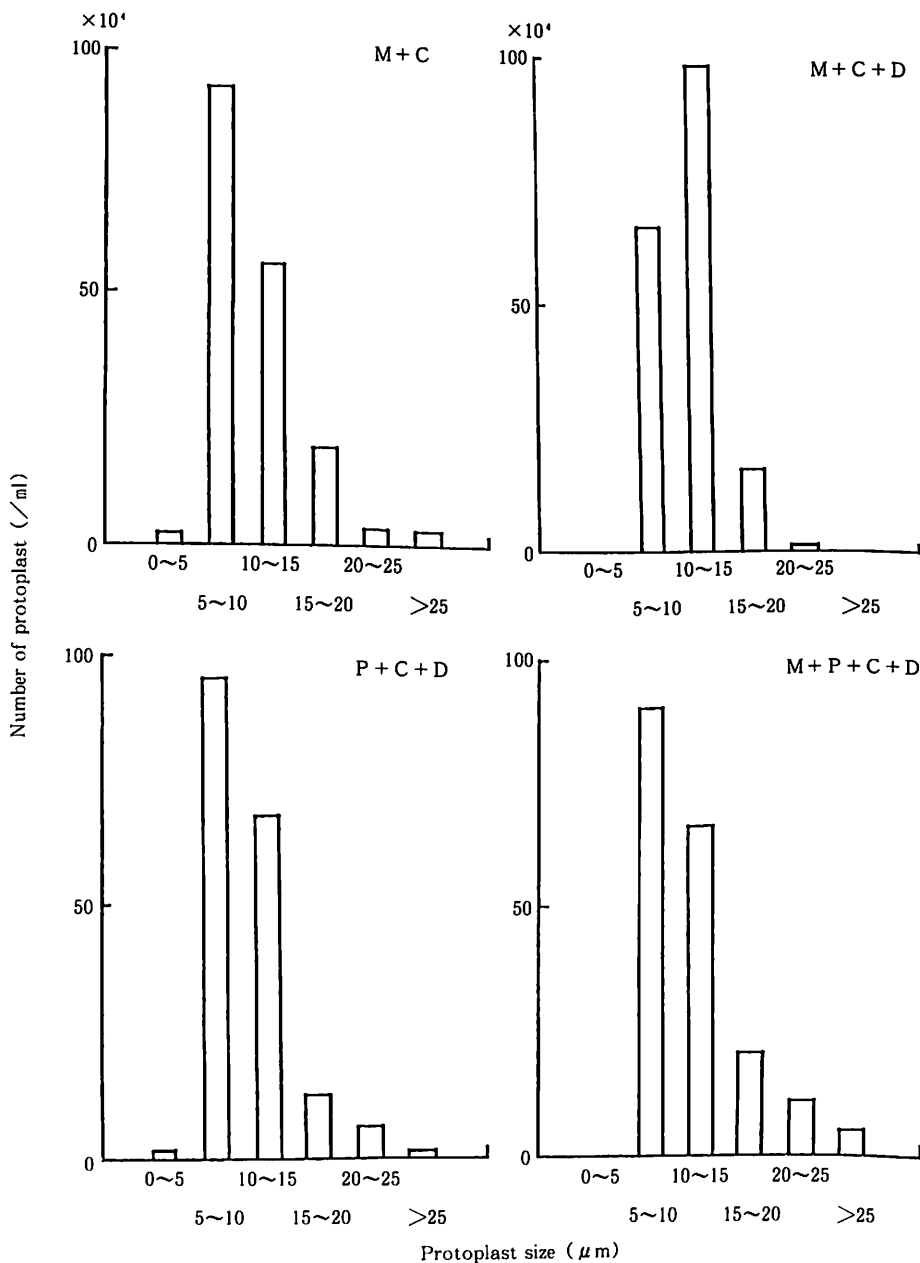


Fig. 5 Frequency distribution of protoplast size isolated by the four combination of enzyme solutions

P+C+D means 0.1 % Pectolyase+0.5 % Cellulase+0.5 % Driselase, M+C : 0.5 % Macerozyme+1 % Cellulase, M+C+D : 0.5 % Macerozyme+0.5 % Cellulase+0.5 % Driselase, M+P+C+D : 0.25 % Macerozyme+0.05 % Pectolyase+0.5 % Cellulase+0.5 % Driselase, in 0.5 M Mannitol solution  
Kanto 51 was tested

であった (Fig. 5)。以上の結果から、⑥M+C+Dの酵素液を用いて再度処理時間の検討を行ったところ、最適処理時間を1.5~2時間に短縮することができた。また、その手法によりイネ葉身・葉鞘組織から作出されたプロトプラストの分離量は、至適条件下で、 $1.2 \times 10^7$  個/ml/g 生体重であった。

これまで、プロトプラスト作出のためのイネカサの誘導には、異なる培地を用いて前培養した後に後培養する<sup>9)</sup>などの手法も報告されている。しかし、本試験の結果から、カサ形成には培地の成分の変更のための処理は必要ないことが判明した。カサからのプロトプラスト分離のために、イネ葉身・葉鞘組織からのプロトプラスト最適分離法であった⑥M+C+Dの酵素液を用いてプロトプラストの分離を試みた。その結果、1~2時間の酵素液処理時間では、離脱カサ細胞は認められるものの、分離プロトプラストの数は少なく、不十分であった。そこで、カサ由来のプロトプラスト作出のための最適な酵素液処理時間を検討したところ、3.5~4時間処理が最適で、その際のカサ由来プロトプラストの分離量は最適条件下で $2 \times 10^6$  個/ml/カサgであった。

本法は細胞レベルでの病害抵抗性品種の選抜に用いるプロトプラストの作出のために開発された手法ではあるが、耐冷性や耐塩性など他のストレス耐性の単細胞系での育種選抜にも利用が可能である。

### 摘 要

細胞レベルでの病害抵抗性の植物個体選抜を目的とし

てイネ葉身・葉鞘およびカサからのプロトプラスト分離法を確立した。プロトプラスト作出のための酵素・培養条件を検討した結果、イネ葉身・葉鞘組織から最も効率よく分離された方法は以下のとおりであった。1) 組織を細断、2) 酵素液 (0.5M マンニトール溶液中に0.5% マセロザイム+0.5% セルラーゼ+0.5% ドリセラゼ) 中に、28°C で1.5~2時間浸漬、3) 濾過、4) 遠沈、5) 洗浄、6) 安定化培地中保存。この方法により、至適条件下で、 $1.2 \times 10^7$  個/ml/1グラム生体重のプロトプラストが得られた。カサからの効率的プロトプラスト作出法は、上述と同様のプロトコールで酵素処理時間を約2倍にした方法であった。

### 引用文献

- 1) 明日山秀文・向 秀夫・鈴木直治編 (1962) 植物病理実験法 日本植物防疫協会、東京、pp845.
- 2) 長田敏行 (1986) プロトプラストの遺伝工学 講談社、東京、pp122.
- 3) 鳥山欽哉・日向康吉 (1985) イネ懸濁培養とプロトプラストからのカサ形成 育種 35 別刷 (1) 52~53.
- 4) Wang, D., Miller, P.D. and Sodahl, M.R. (1989) Plant regeneration from protoplasts of Indica type rice and CMS rice Plant Cell Reports 8 : 329~332.

(1993年10月26日受領)