

短 報

凍結保存したイネ培養細胞からのプロトプラスト収量の変動

栗 山 昭・川 田 訓 平・河 合 文 雄

金 森 正 雄・渡 辺 克 美*・前 田 柊 夫**

(環境科学総合研究所・*近畿大学農学部・**福井大学教育学部)

Changes in the Yield of Protoplast from Cryopreserved Rice Suspension Cells

Akira KURIYAMA, Kunpei KAWATA, Fumio KAWAI,

Masao KANAMORI, Katsumi WATANABE* and Masuo MAEDA**

(Interdisciplinary Research Institute of Environmental Sciences, Shichihon-matsu, Itsutsuji-dori,

Kamigyō-ku, Kyoto 602, Japan; *Faculty of Agriculture, Kinki University, Nara 631, Japan;

**Department of Natural Science, Faculty of Education, Fukui University, Fukui 910, Japan)

1996年5月16日受理

Key words: Cell culture, Cryopreservation, Plasma membrane, Protoplast, Rice.

キーワード: イネ, 細胞培養, 細胞膜, 凍結保存, プロトプラスト.

培養細胞や茎頂の凍結保存は, 作物の遺伝資源を長期にわたって安定に保存する方法としてはすぐれている^{4,6)}. イネでもカルス⁷⁾, 懸濁培養細胞⁵⁾, Embryogenic cells³⁾で, すでに凍結保存の成功例は報告されている. Cella ら¹⁾は, 凍結保存したイネの培養細胞の生理学的な研究を行い, 融解直後の細胞では細胞膜には構造的障害あるいは機能的障害が認められるが, 再培養開始2~3日でこれらの障害(傷害)は修復されると報告している. この場合, 細胞膜の構造的傷害の指標は, プロトプラストの収量により求めている. それによると, 融解直後の細胞を, 細胞壁分解酵素で処理しても, 細胞は破裂して正常なプロトプラストはほとんどとれない. しかし, 再培養2~3日目でその収量は, 未凍結細胞のそれと同程度までに回復する. 我々も, 凍結保存したイネの細胞の細胞膜の構造的な傷害の進行と修復の過程をみるために, 凍結前から融解直後さらに再培養の過程でプロトプラストの収量を測定したところ, Cella らの報告と一部で異なる結果が得られたので報告する.

材料と方法

材料のイネ (*Oryza sativa* L. cv. *Nipponbare*) 培養細胞は, Linsmaier-Skoog²⁾の基本培地に2,4-Dを10 μ M加えた液体培地 (LS培地) で27°Cで2週間ごとに継代培養している. 凍結保存には, 植え継ぎ後6日目の細胞を用いた. 凍結, 融解の方法は

渡辺らの方法に従った⁷⁾. すなわち, 液体培地に懸濁した細胞に凍害防御剤溶液 (10% (v/v) ジメチルスルホキシド+20% (w/v) グルコース) を30分かけて徐々に加えていき, それぞれの最終濃度が5%と10%になるようにした. 凍害防御剤処理した細胞は, 2 mLのポリプロピレンチューブに分注し, プログラムフリーザー内で毎分-1°Cの冷却速度で-30°Cまで予備凍結した後に, 液体窒素中に入れた. 1日またはそれ以上保存した細胞は, 60°Cの湯浴中で急速に融解した. 融解した細胞は, あらかじめ20 mLのLS寒天培地を分注しておいてシャーレ (径9 cm) にプレートして, 27°Cで培養した.

未凍結細胞ならびに凍結融解後の細胞から, プロトプラストの単離をこころみた. 細胞1 mgを20 mLの酵素液 (1% (w/v) セルラーゼ RS, 0.1% (w/v) ペクトリアーゼ Y23, 0.6 M マンニトール, 5 mM CaCl₂, pH 5.8) に入れ, 30°C, 毎分60回の往復振蕩の条件で, 2時間処理した. プロトプラストの収量は血球計算板を用いて求めた.

結果と考察

第1図に, 凍結保存の実験操作の異なる段階における, イネ培養細胞からのプロトプラストの収量を示した. 融解直後の細胞からは, 凍害防御剤無処理の未凍結細胞や, 凍害防御剤処理した未凍結細胞からと同程度, あるいはそれ以上のプロトプラストの収量があった. 再培養1日目, その値は著しく低下したが, 再培養2日目にはプロトプラストの収量は1日目の2倍以上に回復し, 3日目には未凍結細胞と同程度まで回復した. 本実験に用いた材料は, 未凍結時, 融解直後, 再培養時いずれにおいても,

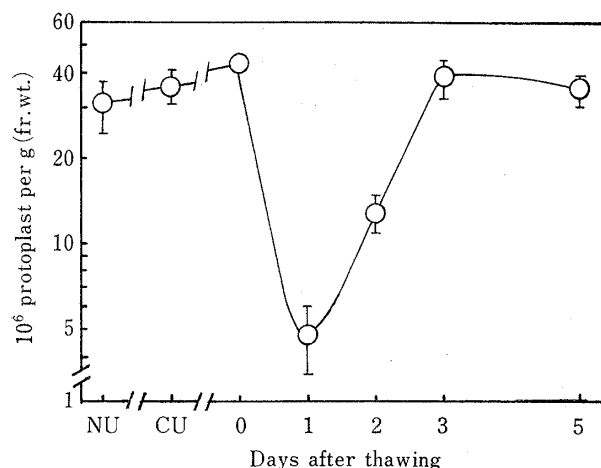


Fig. 1. Changes in yield of protoplasts from rice cells at the different stages in cryopreservation process.

NU; Noncryoprotected-unfrozen cells. CU; Cryoprotected-unfrozen cells. Each value represents the mean of 10 measurements \pm standard deviation.

酵素によって細胞壁はほぼ完全に消化されたので、未消化の材料がプロトプラストの収量に影響をおよぼしたとは考えられない。

Cella ら¹⁾は、凍結保存したイネの培養細胞の生理学的な研究を行い、融解直後の細胞では、細胞のエネルギー生産系に障害が生じるとともに、細胞膜にも機能的障害が認められると報告している。しかし、これらの障害は、再培養開始2~3日で修復されると報告している。細胞膜の構造的障害の指標である、プロトプラストの収量に関しても、融解直後の細胞では、プロトプラストはほとんど単離できないが、再培養の過程で収量の値は急速に回復し、培養3日目には未凍結細胞と同程度までに達する。一方、Withers と Street⁸⁾は、融解直後の生死判別においては、生きてしていると判定された細胞が、再培養においてほとんど死んでしまう例を示した。この結果から Withers と Street は、凍結融解により生じた障害(傷害)には修復不可能で致命的なレベルにまで進行するものもあると考えた⁸⁾。今回の我々の

結果は、著しく低下したプロトプラストの収量が、再培養の過程で急速に回復する点では Cella らの結果と一致する。したがって、我々の材料においても、凍結融解により細胞膜に構造的な傷害が生じるものの、再培養の過程でそれらは修復されることができる。しかし、融解直後のプロトプラストの収量については、Cella らと我々の値はまったく異なっていた。すなわち、我々の実験では、融解直後の細胞からは、未凍結細胞と同程度のプロトプラストが単離できるのに対し、Cella の実験では正常なプロトプラストはほとんどとれず、酵素処理の過程でほとんどのプロトプラストは破裂するのである¹⁾。このことは、Cella らの材料 (*Oryza sativa* L. cv. *Roncarola*) では融解直後にすでに細胞膜に構造的な傷害が生じていて、それが再培養の開始とともに徐々に修復されていくのに対し、我々の材料 (cv. *Nipponbare*) では、融解直後の細胞膜の構造的なダメージはほとんどなく、培養24時間前後で酵素処理に耐えられない程度の構造的な傷害にまで達することを示している。この違いの原因としては、品種や細胞株といった材料の違いによるものや、実験方法の違いによるものなどが考えられるが、現時点でははっきりしたことはいえない。

引用文献

1. Cella, R. et al. 1982. *Physiol. Plant.* 55: 279-284.
2. Linsmaire, E.M. et al. 1965. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.
3. Lynch, P.T. et al. 1994. *Plant Science* 98: 185-192.
4. 酒井 昭 1982. 植物の耐凍性と寒冷適応. 学会出版センター, 東京. 69-79.
5. Sala, F. et al. 1979. *Physiol. Plant.* 45: 170-176.
6. 菅原康剛 1982. *細胞工学* 1: 292-297.
7. 渡辺克美ら 1986. *環境科学総合研究所年報* 6: 63-72.
8. Withers, L.A. et al. 1977. *Physiol. Plant.* 39: 171-178.