

°長田敏行(東大教養生物), 建部 到(植物ウイルス研)

植物の葉のような分化した組織の細胞も適当な条件で培養すると, 分裂増殖することは既に知られている(Kohlenbach, 1959; JoshiおよびBall, 1967; UsuiおよびTakebe, 1969)。また植物の種々の組織よりプロトプラストをとる方法については, いくつか報告があるけれども(Cocking, 1960; Takebeら, 1968), 単離したプロトプラストを長期にわたって培養し, 分裂増殖させたという報告はない。しかし, プロトプラストが細胞壁を再生することを観察している人はいる(Pojnarら, 1967)。我々は, 酵素的方法によってえられたプロトプラストが細胞壁の再生を行ない, 分裂して数細胞になることを認めた。細胞壁の確認には, 蛍光色素のCalcofluorを用いたが, この方法は大変有効であった。

〔材料および方法〕 *Nicotiana tabacum* L. "Xanthine" のほぼ展開しきった葉から既報(Takebeら, 1968)と, ほぼ同じ方法でプロトプラストを単離した。ただし, 無菌的なプロトプラストをとるために, 葉の表面殺菌および酵素の無菌化を行った。葉の表面殺菌は, 2-2.5%の次亜塩素酸ナトリウムに30分つけることを主体とする方法により完全に行なうことができた。酵素の無菌化には, ミリポアフィルター(GSおよびUG)を用いた。えられたプロトプラストを表に示す液体培地10mlに, 細胞数 1×10^5 個/ml程度になるように懸濁し, 2600ルクスの白色蛍光灯連続照射下, 25°Cで静置培養した。培地の無菌化は, ミリポアフィルター-PHで行なった。細胞壁の再生は, 培養したプロトプラストを, 0.1%のCalcofluor White STで5分間染色してから, よく洗い, 蛍光顕微鏡で観察した。核, 染色体の確認は, lacto-propionic orcein法(Eriksson, 1966)によった。

〔結果〕 ペクテナーゼで単離した細胞をCalcofluorで染色すると, 細胞壁に強い蛍光が見られるが, セルラーゼで処理してえられたプロトプラストには, 全く蛍光は見られない。培養後2日で弱い蛍光が, 細胞の表面のある部位に現われはじめ, 3日目には, 全表面に蛍光が見られる。細胞の分裂は, この時期に見られるのであるが, 分裂した細胞の隔壁がよく染まる(図1)。1週間目には, 細胞壁は染色しなくても見える様になる。この時期の細胞をセルラーゼで処理すると, 再びCalcofluorで染めても蛍光が見られなくなる。

培養プロトプラストの最初の分裂(図2)は, 細胞壁の再生にやや遅れて, 3日目より確認され, 有糸分裂も見られる。分裂は, 7-10日の間に, 2-3回繰り返され, その結果8細胞位迄分裂する細胞も見られ, ほとんど全ての細胞が分裂を行なう。しかし, その後2週間目頃より細胞は死にはじめ, 最も長く生きた細胞で約45日である。プロトプラストは, 葉緑体を持っているが, 培養とともに, 葉緑色は褪色した。以上の他に植物ホルモンの効果等培養条件の影響についての実験も行なった。

培地組成			
D-mannitol	0.7 M	Benzyladenine	1 μg/ml
KH_2PO_4	0.2 mM	2,4-D	1 μg/ml
KNO_3	1 mM	Thiamine HCl	1 μg/ml
MgSO_4	1 mM	myo-inositol	100 μg/ml
CaCl_2	10 mM	Glycine	2 μg/ml
KI	1 μM		
CuSO_4	0.01 μM	pH	5.8

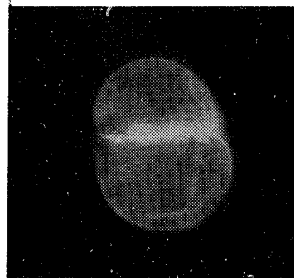


図 1

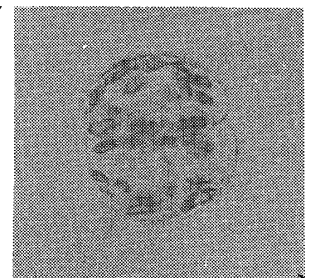


図 2