

Medicago sativa と *M. disciformis* の 電氣的細胞融合の諸条件について

柳田大介・小池正徳・嶋田 徹 (帯広畜産大学)

緒 言

近年、細胞の電気融合がポリエチレングリコール (PEG) 法に代わる手法として注目され、融合に関する諸条件 (電気パルス、イオン濃度など) について多くの報告がなされている。しかし、アルファルファについては、Gilmour⁸⁾ などの数例があるだけである。そこで本実験では、アルファルファ栽培種の *Medicago sativa* の子葉と、野生種の *M. disciformis* 系統のカルス由来のプロトプラストを用いてそれぞれ電気融合を行い、融合条件で問題となる(1)電気パルス、(2)Ca²⁺濃度、(3)プロトプラス密度が、プロトプラストの融合率に及ぼす影響を検討した。

野生種の *M. disciformis* は、他品種と比較して耐虫性 (アルファルファタコゾウムシ¹¹⁾) に優れており、したがって栽培種との間に雑種をつくることによって、この形質を栽培種に取り入れることが可能である。

材料及び方法

〔供試植物〕

アルファルファ栽培種 *M. sativa* (品種キタワカバ)、野生種 *M. disciformis* (アルバータ大学 P. D. Walton より分譲) の 2 系統 (70, 1488) を用いた。

〔プロトプラストの単離〕

プロトプラスト単離酵素液の濃度は、高溝の方法 (私信) を基本として設定した。すなわち、酵素濃度は、セルラーゼオノズカRS (ヤクルト) 1.0%、ドリセラゼ (協和発酵) 0.5%、ペクトリアーゼ Y₂₃ (盛進製薬) 0.05% とし、また浸透圧調整のためマンニットを 13%、pH 5.8 とした。

M. sativa は、0.1% ハイポネックスを含んだ寒天培地に無菌播種し、明所 (2,000 lux) で栽培した 2 週間前後のものから胚軸及び子葉を切りとり、酵素液内で 30℃、6 時間、50 回 / min で振とうした。*M. disciformis* 70 及び 1488 は、温室内で栽培された苗の末展開葉を、SH 培地 (2;4-D 2 mg / 1、カイネチン 0.2 mg / 1) 上に置床、25℃、暗所でカルス誘導し 1 カ月後のカルスを使用した。プロトプラストは常法により精製した。

〔融合装置〕

電気融合装置は日本分光 CET 200 型を使用し、日比⁷⁾ によるタバコプロトプラストでの報告を基本として高周波電圧印加 200 V / cm、周波数 500 kHz、パルス電圧幅 0.05 m sec を各実験において一定に設定し、それぞれの融合条件を求めた。

〔パルス電圧〕

パルス電圧は、400 ~ 2,000 V / cm の範囲で処理し、100 V ごと 17 段階とした。プロトプラストは、*M. sativa*、*M. disciformis* 共に 10 × 10⁴ / ml 密度に調整し、13% マンニット溶液 (pH 5.8)

に等量ずつ混合させて懸濁した。

顕微鏡ステージ上にオープンチャンバ（開放型電極）を設置した後、電極のギャップ内に混合させたプロトプラスト（*M. sativa*と*M. disciformis* 70、*M. sativa*と*M. disciformis* 1488）を滴下した。高周波電圧を1分間印加させ、パールチェーンを形成後、パルス電圧を印加させてプロトプラストを融合させた。総融合率、及び*M. sativa*と野生種間の融合（ヘテロカリオン）率について倒立顕微鏡200倍の5視野で測定した。ここで用いた総融合率では、ヘテロカリオンとホモカリオンを合わせたものとし、多重融合は含まないものとした。

〔Ca²⁺濃度〕

Ca²⁺濃度はCaCl₂を、0、1、10、10²、10³、10⁴、μmとなるように加えた（6段階）。プロトプラスト密度は混合状態で10×10⁴/mlとし、パルス電圧は先のパルス電圧の条件設定から得られた結果を参考として、*M. sativa*と*M. disciformis* 70、*M. sativa*と*M. disciformis* 1488ともに1,000 V/cmとし、その後の処理も同じとした。

〔プロトプラスト密度〕

プロトプラスト密度は、1×10⁴、2.5×10⁴、5×10⁴、10×10⁴、20×10⁴/mlの5段階とし、それぞれ13%マンニット溶液中に懸濁させたものを使用した。パルス電圧は先のCa²⁺濃度の条件設定と同様、*M. sativa*と*M. disciformis* 70、*M. sativa*と*M. disciformis* 1488ともに1,000 V/cmとした。その後の処理は上記の条件設定と同じとした。

結 果

〔パルス電圧〕

<*M. sativa*と*M. disciformis* 70>

パルス電圧は、総融合率が1,000 V/ml、ヘテロカリオン形成率（ヘテロ融合率）が900 V/mlでそれぞれ18.65%、8.85%の最高融合率が得られた（図1）。

<*M. sativa*と*M. disciformis* 1488>

パルス電圧は、総融合率が1,100 V/ml、ヘテロ融合率が同じく1,100 V/mlでそれぞれ16.81%、6.04%の最高融合率が得られた（図2）。

〔Ca²⁺濃度〕

<*M. sativa*と*M. disciformis* 70>

総融合率、ヘテロ融合率共にCa²⁺濃度が0~10² μM間で融合率の上昇がみられ、10² μMでそれぞれ最高融合率28.58%、10.37%が得られた。Ca²⁺濃度が10³ μM、10⁴ μMの濃度では、総、ヘテロ融合率は共に大きく減少した（図3）。

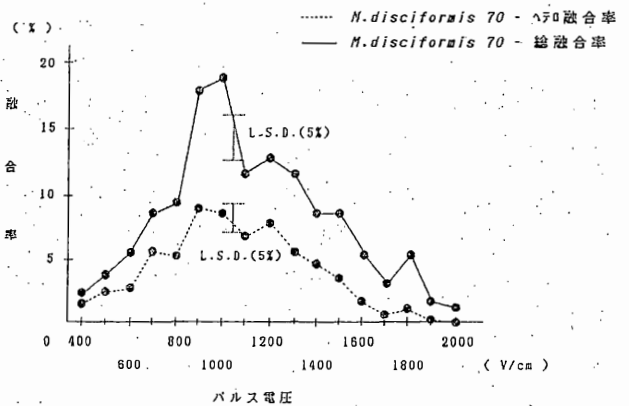


図1. パルス電圧が*M. sativa*と*M. disciformis*70の融合率に及ぼす影響

< *M. sativa* と *M. disciformis*

1488 >

M. sativa と *M. disciformis* 70の時と同様に、 Ca^{2+} 濃度が $0 \sim 10^2 \mu M$ 間で融合率の上昇がみられ、最高融合率は総融合率が 29.23%、ヘテロ融合率が 12.63%となった。また、 Ca^{2+} 濃度が $10 \mu M$ 、 $10^4 \mu M$ 濃度で、その融合率が大きく減少したのは、*M. sativa* と *M. disciformis* 70 の時と同じであった(図4)。

[プロトプラスト密度]

< *M. sativa* と *M. disciformis* 70 >

密度は $20 \times 10^4 / ml$ の時が総融合率、ヘテロ融合率共に最高となり、それぞれ 31.62%、11.84%となった。また、プロトプラスト密度が $2.5 \times 10^4 / ml$ 、 $1 \times 10^4 / ml$ になると融合率は、大きく減少した(図5)。

< *M. sativa* と *M. disciformis*

1488 >

総融合率が 29.34%、ヘテロ融合率が 9.21% でプロトプラスト密度が共に $20 \times 10^4 / ml$ の時に最高融合率が得られた。*M. sativa* と *M. disciformis* 70の場合と同じく、プロトプラスト密度が $2.5 \times 10^4 / ml$ 、 $1 \times 10^4 / ml$ になると融合率は、大きく減少した(図6)。

考 察

Gilmour B²⁾による報告では、*M. sativa* と *M. borealis* の最適電気融合条件は、プロトプラスト密度 $20 \times 10^4 / ml$ 、高周波電圧印加 $40 V/cm$ 、周波数 $500 KHz$ 印加時間 $1 \sim 4$ 分で、パルス電圧は $800 V/cm$ 、 $0.2 ms$ であるとされている。またタバコ、ニンジン間の電氣的細胞融合にお

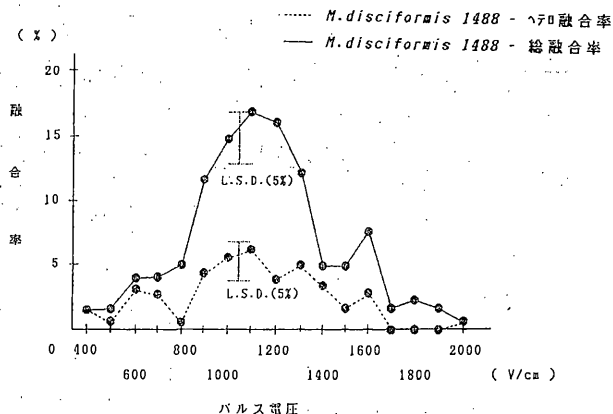


図2. パルス電圧が *M. sativa* と *M. disciformis* 1488 の融合率に及ぼす影響

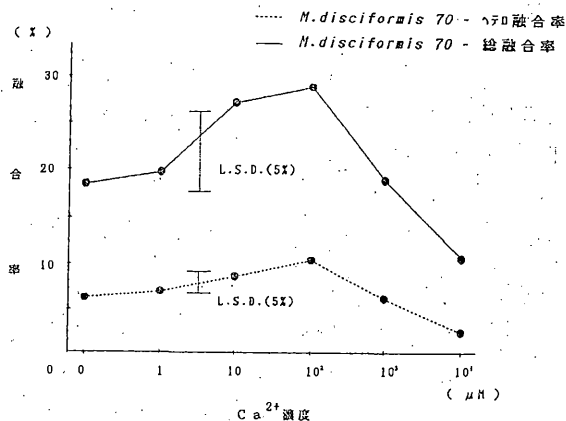


図3. Ca^{2+} 濃度が *M. sativa* と *M. disciformis* 70 の融合率に及ぼす影響

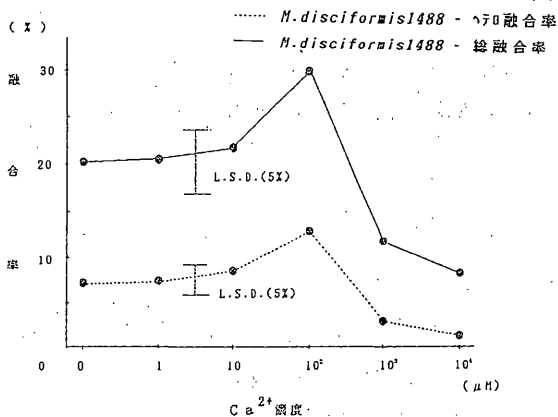


図4. Ca^{2+} 濃度が *M. sativa* と *M. disciformis* 1488 の融合率に及ぼす影響

いて、その最適融合条件は、パルス電圧が 650 V/cm の時であるという報告がなされている⁷⁾。

プロトプラストの脂質二重層を破壊し、速やかに修復させるパルス電界強度は一般的に細胞直径に反比例し³⁾、またパルス幅が長いほど減少する^{4) 5)}。本実験で得られた最適パルス電圧は、Gilmour^ら²⁾のパルスの電界強度と比較して、高い傾向にある。おそらくこれは、アルファルファ品種間における差異、及び細かい設定条件の違いなど様々な要因が絡んでいるものと推測される。

一般に、プロトプラスト懸濁液に数 mM 程度の Ca^{2+} を添加すると融合率の上昇がみられる。本実験では、*M. disciformis* の 2 系統 (70, 1488) は共に最適 Ca^{2+} 濃度は $10^2 \mu M$ であり、これ以上の Ca^{2+} の添加はパールチェーンの形成 (細胞の泳動) が著しく阻害された。この結果は、イオン濃度の上昇は懸濁液ジュール熱による熱対流、及び細胞膜表面の分極能力の低下を引き起こすという考えを裏づけるものである^{5) 6)}。

最適プロトプラスト密度は 70, 1488 共に Gilmour^ら²⁾の報告の $20 \times 10^4 / ml$ と同じ結果が得られた。

最適パルス電圧では、*M. minima* の $1,300 V/cm$ ¹²⁾ に対して *M. disciformis* 70, 1488 共にこれとは差があり、これは品種間における差異であると推測される。また、同種の *M. disciformis* 2 系統間でも、ヘテロカリオン形成率で、 $200 V/cm$ 、総融合率で、 $100 V/cm$ の最適パルス電圧の差異が確認された。

さらに今回の実験結果をもとにして、現在アガロース・ビーズ法を用いて融合細胞を培養中であり、雑種カルの育成、雑種植物間の再分化の操作を行う予定である。

摘 要

M. sativa と、野生種の *M. disciformis* 70 と *M. disciformis* 1488 間で電気融合を行い、融合率に及ぼすパルス電圧、 Ca^{2+} 濃度、プロトプラスト密度の影響について検討した。

融合率は、*M. sativa* と *M. disciformis* 70 間の融合で総融合率が $1,000 V/cm$ 、ヘテロカリオン形成率が $900 V/cm$ で最高となった。また、*M. sativa* と *M. disciformis* 1488 間では $1,100 V/cm$ で総融合率、ヘテロカリオン形成率共に最高となった。*M. sativa* と *M. disciformis* 70、*M. sativa* と *M. disciformis* 1488 の両方で、 Ca^{2+} 濃度では $10^2 \mu M$ 、プロトプラスト密度では

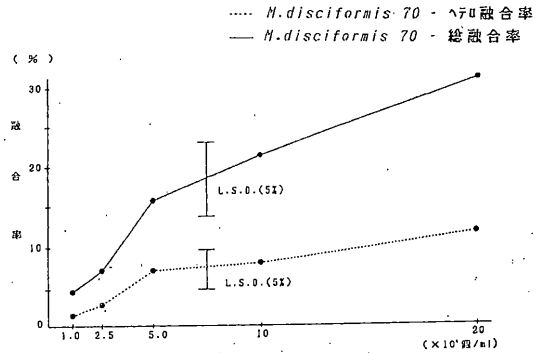


図 5. プロトプラスト密度が *M. sativa* と *M. disciformis* 70 の融合率に及ぼす影響

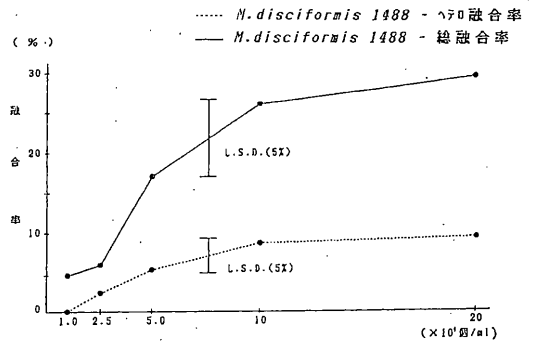


図 6. プロトプラスト密度が *M. sativa* と *M. disciformis* 1488 の融合率に及ぼす影響

$20 \times 10^4 / ml$ が総融合率及びヘテロカリオン形成率が最高となった。

引用文献

- 1) Christov, A.M & Vaklinova, S.G. (1987) Plant Physiol 83, 500-504.
- 2) D.M.Gilmour, M.R.Davey, and E.C.Cocking, (1989) Plant Cell Reports 8: 29-32.
- 3) Sale.A.J.H. & Hamilton.W.A. (1968) Biochim Biophys. Acta. 163, 37-43.
- 4) Dimitrov, D.S.: J. Menbr. (1984) Biol, 78, 53-60.
- 5) 植物細胞工学編集部、十川好志(1989) 植物細胞工学 Vol. 1, №1.
- 6) 三浦靖高、十川好志、山田康之(1989) 植物組織培養 5(2)、101-103.
- 7) 日比忠明(1987) トキシコロジーフォーラム、10(4): 418-431.
- 8) D.M.Gilmour, M.R.Davey, and E.C.Cocking, (1987) Plant Science, 53: 263-270.
- 9) Bates, G.W., J.J.Gaynor, N.S.Shekhavvat, (1983) Plant Physiol., 72: 1110.
- 10) Peter Scheurich, Ulrich Zimmermann, (1981) Plant Physiol., 67: 849-853.
- 11) D.M.Gilmour, T.J. Golds and M.R.Davey, (1989) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 8.
- 12) 藤本ゆり、日詰 圭、小池正徳、嶋田 徹、(1991) 北海道草地研究会報 № 25.