

発表番号 25 (0317)

マングローブのプロトプラスト培養系開発

助成研究者：笹本浜子（横浜国大環境情報研究院）

共同研究者：中村達夫（横浜国大環境情報研究院）

海水中にも生育しうるような強い耐塩性の性質を持つマングローブ類は、これまで、細胞培養や組織培養による個体再分化系の開発は難しかった。また、増殖細胞あるいはカルスを得ることも困難なものが多く、ロッカクヒルギや、マヤプシキで一部成功しているにすぎない。特に細胞からさらに細胞壁を除いたプロトプラストからの個体再生系は、今まで成功例が無い。これが確立できると、細胞融合や、細胞選抜により、あるいは遺伝子操作による育種が可能になり、類まれな耐塩性の形質の利用により、塩類集積土壌の改善や、緑化事業に用いる可能性が生まれる。本研究では、マングローブプロトプラストを用いた培養系の開発を目指す。同時に、耐塩性や高浸透圧耐性の形質は、プロトプラストや増殖細胞においても発現しているので、これを利用して、特殊な形質を持つ植物に対する、種々の化学物質の影響を、多穴シャーレを用いて簡単に、定量的にバイオアッセイするシステムをも構築したい。

マヤプシキについて、これまで得られているめしべや種子由来のカルス以外に、簡便な透明カバー平底培養管法と倒立顕微鏡観察により、子葉由来の液体培養から、初めて継代可能な増殖細胞を得ることができた。

プロトプラスト単離について、国内海外を含めて3科、8種について、多穴シャーレを用いて細胞壁分解酵素の組み合わせと、浸透圧条件について探索し、論文化した。24穴シャーレの方が定量性にすぐれたが、簡易性に優れる96穴シャーレと、専用振とうインキュベーターを組み合わせる手法も工夫した。

ロッカクヒルギ葉由来の液体培養細胞の、96穴シャーレによるプロトプラスト培養と、ウェルスキャナー付属の倒立顕微鏡観察により、4種の塩すなわち、Na, K, Mg, Ca 塩に対する反応性を、非耐塩性のバイオマス生産樹ポプラや、草本タバコの培養細胞と比較した結果、草本、木本を通して広く用いられてきたムラシゲ・スクーグ培地の無機塩類濃度よりも高いMg, Ca 塩濃度による促進効果を初めて見出した。

これまで、増殖細胞の誘導が難しかったヒルギダマシポット苗の葉に対して、若干の増殖を得る植物ホルモン条件と、培地無機塩類の低下による反応性は既知であるが、本年度は、既知のナトリウム塩や、糖による促進以外に、マグネシウムとカルシウム塩の高濃度による促進効果を初めて見出した。

マングローブのプロトプラスト培養系開発

助成研究者：笹本浜子（横浜国大 環境情報研究院）

共同研究者：中村達夫（横浜国大 環境情報研究院）

1. 研究目的

海水中にも生育しうるような強い耐塩性の性質を持つマングローブ類は、これまで、細胞培養や組織培養による個体再分化系の開発は難しかった。また、増殖細胞あるいはカルスを得ることも困難なものも多く、ロッカクヒルギや、マヤブシキで一部成功しているにすぎない。特に細胞からさらに細胞壁を除いたプロトプラストからの個体再生系は、今まで成功例が無い。これが確立できると、細胞融合や、細胞選抜により、あるいは遺伝子操作による育種が可能になり、類まれな耐塩性の形質の利用により、塩類集積土壌の改善や、緑化事業に用いる可能性が生まれる。本研究では、マングローブプロトプラストを用いた培養系の開発を目指す。

これまで、助成研究者は、バイオマス生産樹であるが耐塩性は弱いポプラやシラカンバのプロトプラストからの個体再生系の確立を行い、電気細胞融合により、細胞のマイクロマニピュレーション選抜と、個体再生の研究実績がある。また、異種間、異属間林木の細胞融合後の細胞からの個体再生にも成功してきた経験もあり、このような技術を活用して、遺伝子組み換えによらぬ、細胞自身の能力を最大限に引き出す手法を追求したい。

同時に、耐塩性や高浸透圧耐性の形質は、プロトプラストや増殖細胞においても発現しているため、これを利用して、特殊な形質を持つ植物に対する、種々の化学物質の影響を、多孔シャーレを用いて簡単に、定量的にバイオアッセイするシステムをも構築したい。

2. 研究方法

2.1. 増殖細胞誘導と継代培養条件の検討

ヒルギダマシ(*Avicennia marina*)種子のポット苗の葉を材料として用いた。種子は主に西表島において採取され、水道水に保存して用いた。発根した種子をバーミキュライトを入れた 1/10,000 ポットに植え、水を張ったバットの中でハイポネックスを適宜与えて育成された苗を用いた。中性洗剤で予備洗浄後、1~5%次亜塩素酸 Na 溶液、10-50 分間などの滅菌処理後、クリーンベンチ内にて、オートクレーブ滅菌した逆浸透 (R.O.) 水により 3 回洗浄し、無菌シャーレ内でメスにより細断した細断片を 10-50ml 平底管ビン中の

0.5-2ml 液体培地に入れ、オートクレーブ滅菌した透明なフィルムのカバーをして、29 暗所において振とう培養を行い、倒立顕微鏡観察を行った(透明カバー平底培養管法)。簡易顕微鏡ステージを用いて、観察の効率を上げた。

ヒルギダマシと同じように海側に生育するマヤプシキ(*Sonneratia alba*)については、苗育成が難しいので、沖縄西表島において、完熟種子を持つ実を採集し、種子を次亜塩素酸Na滅菌して寒天0.8%のみあるいは、MS (Murashige & Skoog, 1962)の基本培地のみを含む寒天培地で育成した芽生えの子葉、胚軸などを用いた。ヒルギダマシと同じように、「透明カバー平底培養管法」を用いて、不定胚形成細胞などの分化能の強い細胞を得るため、遊離細胞に注目して最適培地条件の検索を行った。液体培養により、基本培地として、多くの草本、木本材料で用いられてきたMSの塩類、有機酸、アミノ酸、3%ショ糖条件を用いた。植物ホルモンとして、オーキシンの2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D) 0.1 μ Mのみ、およびN-(2-クロロ-4-ピリジル)-N'-フェニルウレア(CPPU) 0.1 μ Mを加えた条件で増殖した細胞を、誘導時と同じ条件で継代培養を試みた。

2.2. プロトプラスト単離

ヒルギダマシのポット苗の葉、マヤプシキの種子から得られた無菌芽生えの子葉、胚軸、非無菌芽生えの葉、および、メヒルギ(*Kandelia candel*)、オヒルギ(*Bruguiera gymnorhiza*)、協力者により入手した、外国産マングローブ種子(マルバヒルギダマシ *Avicennia alba*, ウラジロヒルギダマシ *A. officinalis*, コヒルギ *Celiops tagal*, フタバナヒルギ *Rhizophora apiculata*)材料について、ポット苗および、ペットボトルと川砂を用いた苗育成を行い、その葉等からプロトプラストを単離する細胞壁分解酵素条件を探索した。浸透圧調節剤としてソルビトールの0.4Mから1.8Mの濃度範囲の影響を調べた。セルラーゼR10、セルラーゼRS、ヘミセルラーゼ、ドリセラーゼ20、マセロザイムR10、ペクトリアーゼY-23を組み合わせた24種の条件を用い、倒立顕微鏡観察と、助成研究者が工夫したマイクロチューブによる簡易定量法と、フルオレセイン2酢酸の蛍光検出によるプロトプラストの生存率測定によって、単離最適条件を判断した。酵素濃度はペクトリアーゼ以外は4%などの高濃度も用いた。

これまでの24穴シャーレによる0.4ml探索法の他に、96穴シャーレと、専用恒温シェーカーの組み合わせを用いて、少量の材料と酵素50 μ lによる単離も試みた。

2.3. プロトプラスト培養

ヒルギダマシ葉や、マヤプシキ子葉のプロトプラスト培養の際に用いた方法により、メヒルギ葉プロトプラストの培養条件の探索を行った。その際、ソルビトール1.2Mを含むMS培地を基本に、植物ホルモンの、オーキシン2,4-D サイトカイニンとして、BA, CPPU, Kinetin, 2-IPの他に、アブシジン酸(ABA)を用いた。

マヤブシキ子葉のプロトプラストは、寒天培地によって育成した無菌芽生えを用いて、培養を試みた。上記植物ホルモンの各種濃度組み合わせを用いた。

ロッカクヒルギの液体培養細胞からのプロトプラストおよび、ポプラ葉プロトプラスト、および、草本タバコ培養細胞(BY-2)のプロトプラスト培養を多穴シャーレを用いて行い、細胞の変形肥大やコロニー形成に対する4種の塩すなわち Na, K, Mg, Ca の影響を比較した。ウェルスクャナーを用い、倒立顕微鏡観察によってコロニー数を数えた。ロッカクヒルギとタバコは、MS 基本培地、ポプラは、硝酸アンモニウムを除いた MS 基本培地を用いた。浸透圧調節のためマンニトール 0.3M から 0.6M を用いた。96 穴シャーレ中 50 μ l の培地に 10^4 - 10^6 /ml の細胞密度のプロトプラストサスペンションを 5 μ l 分注し、28 暗所の炭酸ガス培養器内(炭酸ガス供給無し)の温室で培養した。

2.4. 細胞融合

電気細胞融合実験は本研究の予定には無いが、過去に行ったヒルギダマシの子葉プロトプラスト、ロッカクヒルギプロトプラスト等の電気融合条件を、ポプラ葉プロトプラストの電気細胞融合条件とデータ整理によって比較を行った。

3. 結果と考察

3.1. 増殖細胞の誘導継代培養

マヤブシキについて、これまで得られているめしべや種子由来のカルス以外に、以下のように、子葉由来の液体培養から、初めて継代可能な増殖細胞を得ることができた(未発表)。寒天培地および、これに MS の無機塩を含む培地によって育成した、マヤブシキの無菌の芽生えの子葉を用いて、液体振とう培養 透明カバー平底培養管法によって、倒立顕微鏡観察により最適ホルモン条件を決定し、得られた増殖細胞を、誘導時と同じ2種類すなわち、2,4-D、0.1 μ M のみおよび、2,4-D, CPPU、各 0.1 μ M の植物ホルモン条件において、継代培養することが初めて可能になった。この増殖細胞は、2,4-D のみの培地においては、単細胞が多く、CPPU を含むと細胞塊が多い傾向があった。また、後者で、不定根の分化が得られた¹⁾。

これまで、増殖細胞の誘導が難しかったヒルギダマシポット苗の葉からの誘導に対して、若干の増殖を得る植物ホルモン条件などはわかっているので(植物ホルモンのサイトカイニン高濃度要求性の他に、ジベレリン酸の分裂促進効果、培地中の、窒素、リン、カリウム、カルシウム等の低濃度の影響)¹⁾、本年度新しい要因検索を行った。すなわち塩の濃度を低下させる実験はこれまで行ってきたが、高濃度の実験は初めて行った。これにより、その初期分裂反応の特徴として、既知のナトリウム塩や、マンニトールなどの糖による促進効果、および、カリウムによる阻害効果以外に、マグネシウムとカルシウム塩の高濃度

による促進効果を初めて見出した²⁾。

3.2. プロトプラスト単離

葉からのプロトプラスト単離について、国内海外を含めて3科、8種について、多穴シャーレを用いて細胞壁分解酵素の組み合わせと、浸透圧条件について探索し、論文化した³⁾ (Fig. 1, 2)。特徴として、セルラーゼ RS が R10 に比べて効果的である点があげられる。6種の酵素の組み合わせと、酵素濃度、浸透圧の調節によって、すべての種において、十分単離可能であった。*Rhizophora apiculata* のように、比較的低い浸透圧条件で単離されるものもあったが、他の多くは、高い浸透圧を要求し、かつ広い浸透圧範囲濃度によって単離された。この他、ヒルギダマシ、*A. lanata* の子葉⁴⁾、マヤブシキの子葉、胚軸、などからプロトプラストが単離できている。

6種の酵素の濃度組み合わせを用いて、定量的に実験を行うため、24穴シャーレを用い、マイクロチューブ、ピペットマンを用いた簡易精製定量法を確立した。

24穴シャーレの方が定量性にすぐれたが、本年特に材料の少量化を目的とした、96穴シャーレを用いた単離法の改良を行った。専用振とうインキュベーターを組み合わせるにより、24穴シャーレとの定性的反応差は無いので、多くの材料を一時に試みることができ、セパレートタイプの96穴シャーレを用いることにより、酵素をあらかじめ溶解分注した後、冷凍保存したものを用意しておき、必要な時に融解して用いることができること、などの利点があり、簡易性に優れる。

3.3. プロトプラスト培養

より低温の環境に強いと考えられるメヒルギの葉プロトプラストの細胞肥大には、植物ホルモンのアブシジン酸(ABA)の高濃度が促進的であり⁵⁾、マヤブシキ子葉のプロトプラストの細胞肥大・分裂に対しても、比較的高濃度のアブシジン酸が効果的であった⁶⁾。ABAは、ポプラ葉プロトプラストに対して阻害的であり、一般に植物の成長に対して分裂阻害に働くことが多いのに対し、特異な反応と言える。ヒルギダマシ葉のプロトプラスト培養については、調べたどのホルモン条件下でも、若干の細胞肥大以外は、細胞分裂は誘起できなかった⁷⁾。

ロッカクヒルギ葉由来の液体振とう培養細胞の、96穴シャーレによるプロトプラスト培養と、ウェルスクャナー付属の倒立顕微鏡観察により、4種の塩すなわち、Na, K, Mg, Ca塩に対する反応性を、非耐塩性のバイオマス生産樹ポプラや、草本タバコの培養と比較した。その結果、草本、木本を通して広く用いられてきたMS培地の無機塩類濃度よりも高いマグネシウム塩、カルシウム塩濃度による促進効果を初めて見出した (Fig. 3, 4)。これにより、ナトリウム塩ばかりでなく、マグネシウム塩、カルシウム塩に対する耐性を持っているのが、マングローブの特徴であることが明らかになった。また、培地のpH変化

により、それらの塩の影響は大きく変化する (Fig. 5)。このような特徴は、マングローブ生育域の pH の広い範囲の変化と、土壌中のマグネシウム塩やカルシウム塩の高濃度との関係を示唆する²⁾。

プロトプラスト培養では、96穴シャーレ中の極少量の培地量での、色々な植物ホルモンなどの濃度変化の影響を調べることができるので、プロトプラスト培養の結果を参考にし、組織片からの増殖細胞誘導条件を絞り込むことができる。同じように、塩の影響についても、ロッカクヒルギプロトプラスト培養から得られた、マグネシウム、カルシウム塩の効果も、組織片からの他のマングローブの細胞増殖誘導に利用して、同様な促進効果が得られた⁸⁾ (本稿3.1.)。

96穴シャーレを用いて、プロトプラストからの細胞肥大や、分裂細胞数、コロニー数などを計測することにより、容易に反応を定量化でき、細胞壁のある細胞に対する影響をみる場合よりも定量的に評価しやすい利点がある。このように、無菌的に単離されたプロトプラストは、微量化学物質の影響を調べる、簡易アッセイシステムにもなりうる。現在のところ、既知の植物ホルモン類の種々の濃度の影響や、無機塩類、糖などの効果を検討しているが、同じような手法で、作用が未知の物質の検定にも、用いることができると考えられる。目的にかかげた、多穴シャーレを用いて簡単に、定量的にバイオアッセイするシステムを構築することが可能になったと判断する。

3.4 細胞融合

非無菌条件でのヒルギダマシ子葉プロトプラスト内の電気融合は可能であった。また、ロッカクヒルギのプロトプラスト内、およびロッカクヒルギとポプラ葉プロトプラスト間 (異科間) の電気融合は、他の異科間の電気融合の場合⁹⁾と同じように、ポプラ葉同一種内プロトプラスト電気融合¹⁰⁾と同じ条件において可能であった。すなわち、2.5mM CaCl₂を含む0.55M マンニトール中で、200V/cmの交流電圧によって、パールチェーンを作り、2KV/cm, 100 μ秒の直流パルス電圧を与えると効率的に融合がおき、それぞれ無菌培養も可能であった¹¹⁾。

4. 今後の課題

マヤプシキ子葉プロトプラストからの若干の分裂条件が明らかになり、一方子葉由来の継代培養可能な培養細胞が得られたので、さらに分裂効率を上げるための条件および、再分化条件の探索が課題である。

ヒルギダマシポット苗の葉は、一応無菌のプロトプラストは得られるようになったが、増殖の反応性は、子葉や胚軸の方が高い。胚軸、子葉は共に、バクテリアやカビ汚染が強く、現在のところ長期間の培養は難しいが、将来、無菌化が容易な新鮮な種子を入手することが望まれる。

細胞融合については、本年2月より異科間の細胞融合が遺伝子組み換えと同様な扱いとなった。今後は、同種間の融合により、ポプラにおいて少数でのプロトプラスト培養が可能になった例や、植物ホルモンに対する反応性が変化し、培養が容易になった利点などを生かして、同種間同属間細胞融合を培養の効率化に用いることが考えられる。

本研究によって、いろいろなマングローブ種からプロトプラスト単離条件が明らかになったので、これらを用いた培養系開発研究が可能となった。

5 . 文献等

- 1) 笹本浜子、中村達夫、ソルトサイエンス研究財団平成14年度助成研究報告集 249-258, 2004
- 2) T. Fukumoto, T. Nakamura, M. Suzuki, S. Ogita, T. Mimura, H. Sasamoto, *Plant Biotechnology* (accepted)
- 3) Y. Kawana, H. Sasamoto, Y. Mochida, K. Suzuki, *Mangrove Science* (accepted)
- 4) H. Sasamoto, Y. Wakita, S. Baba, *Plant Biotechnology* 14,101-104.1997
- 5) 川名祥史、笹本浜子、鈴木邦雄、日本マングローブ学会 03年次大会講演要旨集p2, 2003
- 6) 笹本浜子、福元健志、中村達夫、21回日本植物細胞分子生物学会大会講演要旨集 p145, 2003
- 7) 笹本浜子 日本マングローブ学会 02年次大会講演要旨集p2, 2002
- 8) 川名祥史、笹本浜子、福元健志、68回日本植物学会大会発表予定 2004
- 9) H. Sasamoto, T. Fukumoto, Y. Wakita, S. Yokota, N. Yoshizawa, T. Katsuki, Y. Nishiyama, T. Yokoyama, M. Fukui 2004 World Congress on In Vitro biology Abst. P72A, 2004
- 10) H. Sasamoto, Y. Wakita, S. Yokota, N. Yoshizawa: *J. For. Res.* 5(4)265-270, 2000.
- 11) 笹本浜子、荻田信二郎、三村徹郎, 111回日本林学会大会学術講演集 p603 2000.

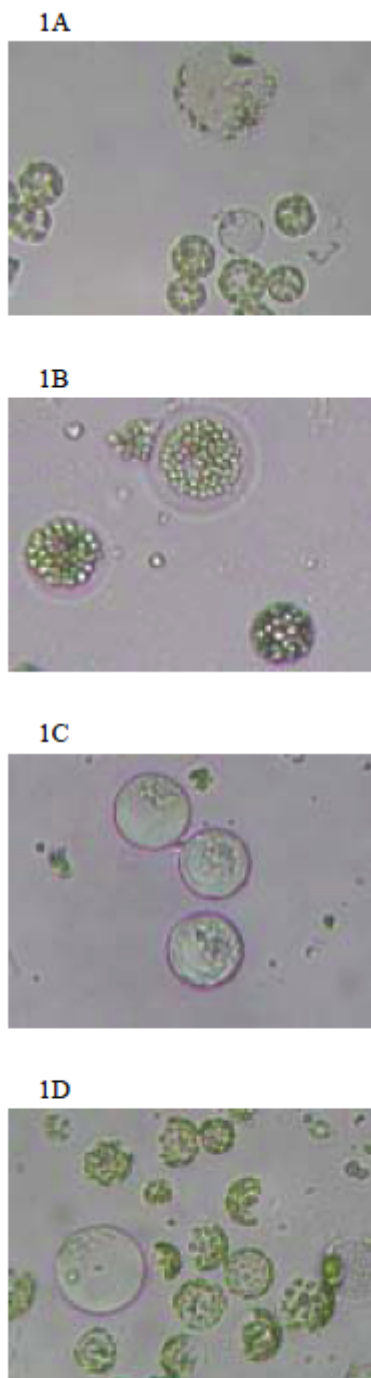


Fig.1. Photographs of isolated protoplasts of *Avicennia officinalis* (A), *Sonneratia alba* (B), *Rhizophora apiculata* (C), *Kandelia candel* (D).

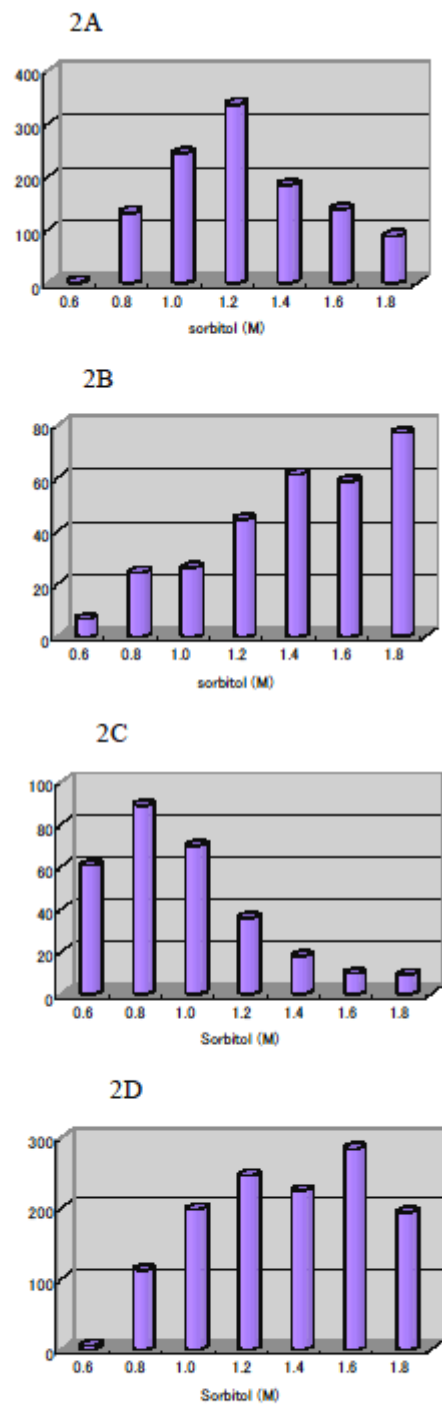


Fig.2. Effects of sorbitol concentrations on isolation of protoplasts of *Avicennia officinalis* (A), *Sonneratia alba* (B), *Rhizophora apiculata* (C), *Kandelia candel* (D).

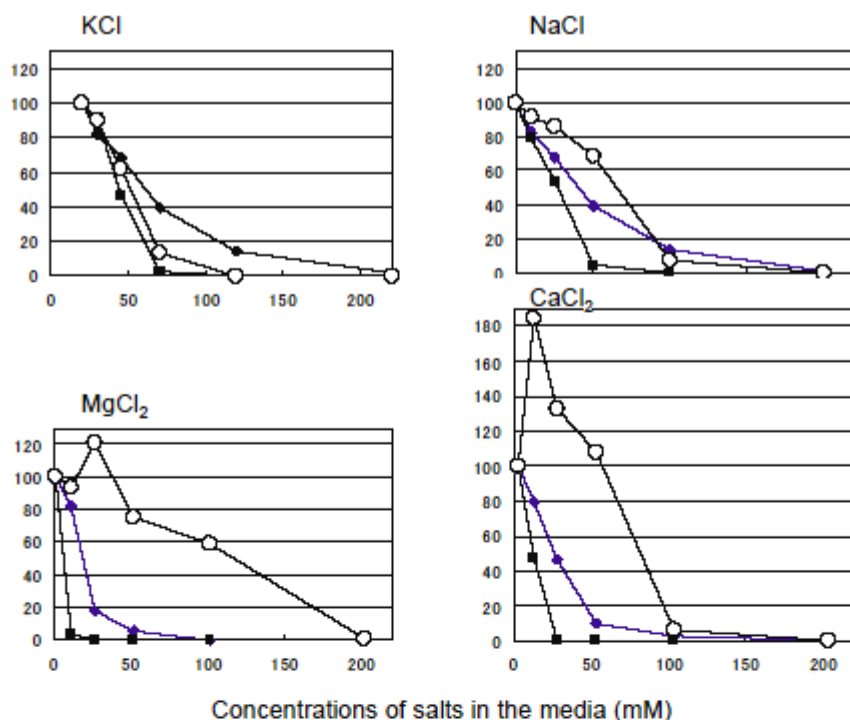


Fig. 3. Effects of different concentrations of salts (A: KCl, B: NaCl, C: MgCl₂, D: CaCl₂) in the medium on numbers of colonies of *B. sexangula* (open circle) and *P. alba* (closed square) and numbers of elongated cells of tobacco BY2 cells (closed diamond) in protoplast cultures at pH 5.7. Data were described as the percentage of the average value at the concentration of each salt (KCl: 20mM, NaCl: 0, MgCl₂: 1.5mM, CaCl₂: 3mM) of MS medium.

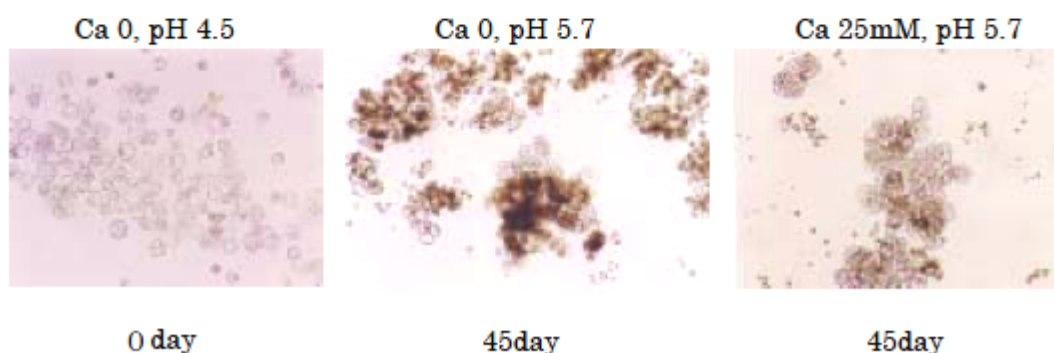


Fig. 4. Photographs of protoplasts of *Bruguiera sexangula* after 45days of culture.

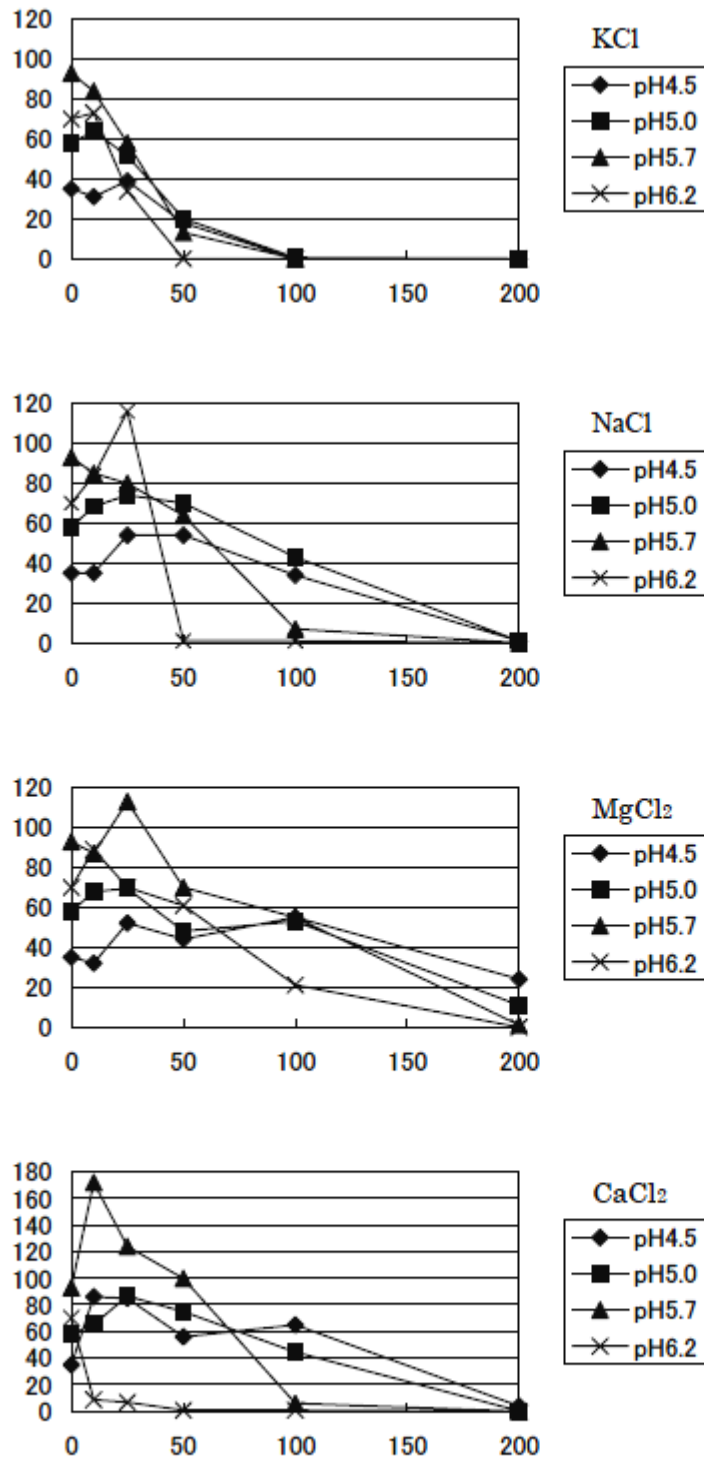


Fig. 5. Effects of pHs, 4.5 (closed diamond), 5.0 (closed square), 5.7 (closed triangle), 6.2 (cross), and salts (KCl, NaCl, MgCl₂, CaCl₂) on numbers of colonies after 45 days of protoplast culture of *B. sexangula*.

Development of Protoplast Culture System of Recalcitrant Mangrove Trees

Hamako Sasamoto and Tatsuo Nakamura

Faculty of Environment and Information Sciences, Yokohama National University

Summary

Mangrove trees are very salt tolerant and can grow even in seawater. They have been recalcitrant for cell and tissue culture except for a few species. No report has been published on protoplast cultures in which cell walls are removed under osmotic conditions and plants regenerated. Establishment of protoplast culture system of mangrove cells will be valuable, not only for basic research of the whole process from single cell to plant regeneration, but also for genetic engineering of unique characteristics of mangrove trees through cell fusion and cell selection, and their utilization for reforestation and improvement of salt-rich soil areas.

The main theme of this study is to establish a protoplast culture system from recalcitrant mangrove trees. Another important aspect is to develop a unique bioassay system of cell cultures to study the effects of different additives, such as plant growth regulators and chemicals on mangrove protoplasts. This approach will shorten the time needed to analyze their effects on the environment using a whole plant system.

We have developed an efficient surveying method using multi-well plates for the determination of optimum enzyme combinations and osmotic conditions needed for the isolation of leaf protoplasts from eight mangrove species of three different families. Using multi-well culture plate method, we found stimulatory effects of high concentrations of Mg and Ca salts at various pHs on cell divisions of a mangrove, *Bruguiera sexangula*, protoplasts.

Stimulatory effects of Mg and Ca salts were also first found with leaf culture of *Avicennia marina* by using a flat-bottomed tube method. Free cells and callus formation were subsequently observed under an inverted microscope. Sustainable liquid culture was first obtained from cotyledons of *Sonneratia alba* by using the above method.