

## メヒルギ葉肉組織からのプロトプラスト調製

飯島倫明<sup>1)</sup>, 江口文陽<sup>1)</sup>, 檜垣宮都<sup>1)</sup>

### Preparation of Leaf Mesophyll Protoplasts of *Kandelia candel* (L.) Druce.

Tomoaki IJIMA<sup>1)</sup>, Fumio EGUCHI<sup>1)</sup> and Miyato HIGAKI<sup>1)</sup>

**Abstract:** Mangrove has useful agronomic such trait as halo-tolerance different from other terrestrial higher plants because it grows in areas of brackish water. Somatic hybridization by protoplast fusion with non-halotolerant plants should permit the production of halotolerant varieties.

Various conditions for the preparation of protoplasts were examined using the leaf mesophyll of *Kandelia candel* (L.) Druce in the family Rhizophoraceae among mangrove tree species. Under the conditions for the preparation using many single isolates of protoplasts, the juvenile leaves were used as source of protoplasts. Mixture of 2% (w/v) *Acronium* cellulase, 0.5% Macerozyme R-10, 0.5% Usukizyme, and 0.5% Pectinase were dissolved in 0.05 M maleic acid buffer of pH 6.0 containing 0.5 M MgSO<sub>4</sub>. The material was treated for three hours with this enzyme mixture. Juvenile leaves provided high protoplast yields of  $6 \times 10^4$  g<sup>-1</sup> fresh weight. Protoplasts were 12~32  $\mu$ m in diameter. The viability efficiencies under the optimum conditions of protoplast preparations was 89%.

**Keywords:** *Kandelia candel*, mangrove, leaf mesophyll, osmotic pressure, protoplasts

#### 緒言

農林水産業の領域では、有用産物の育種年限を短縮する手段として器官や組織を培養する細胞育種法に期待するところが大きくなってきている(斎藤, 1989)。この研究分野は、生理学、分子生物学などの学問領域と相互に関連を有し、有用品種の増殖などに大きな発展をもたらしている。特に植物を材料としたわが国の細胞工学は、野菜や花を中心として他国と比較すると著しく特徴を持った発展を遂げている(西, 1990)。マングローブ樹木においては、汽水域でも高木に成長する優れた耐塩性を持つことから、生理、生態学的研究と同時に、海岸の浸食、荒廃された地域のマングローブ林の再生(檜垣ら, 1990; 加藤, 1994)を目的として、つぎ木繁殖法(Nakata *et al.*, 1985)、胎生種子の育苗(Sakurai&Kuraishi, 1985)などが行われている。しかし、細胞工学的手法を用いての大量増殖法および細胞融合法や遺伝子導入法による優良品種の育種は、報告例がない。マング

ローブ樹木での植物組織培養技術が確立されれば、耐塩性機構の解明と優良品種の大量増殖などに大きな発展をもたらすものと考えられる。このような観点から著者らはこれまでにマングローブ樹木の一樹種であるオヒルギを材料として体細胞から大量にかつ活性の高いプロトプラストを分離するための研究を行ってきた(江口ら, 1995)。本研究では、さらにマングローブ樹木のメヒルギからのプロトプラスト調製を試み、いくつかの知見を得たので報告する。

#### 実験方法

##### 1. 供試樹種と栽培方法

供試マングローブであるメヒルギ *Kandelia candel* (L.) Lamk. の成熟した胎生種子を沖縄県西表島で採集した。この胎生種子を、ワグネルポット(直径25cm, 高さ29cm)を用いて砂耕法により人工気象器内で生育させた。加藤の方法(1992a, 1992b, 1995)に準じて基礎栽培液には、大塚液肥(大塚化学社製) No. 1とNo. 2を

1) Tokyo University of Agriculture, Sakuragaoka 1-1-1 Setagayaku, Tokyo, 156/Japan  
東京農業大学農学部 東京都世田谷区桜丘1-1-1

指定濃度に調整して使用し、栽培区には、基礎栽培液のみ (NaCl 無添加) と基礎栽培液に0.5%と2.0%のNaClを添加した3種類を設定した。ワグネルポット内の栽培液は、2週間おきに同組成のものと交換して3ヶ月間栽培した。なお、栽培条件は、温度 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度70~80%とした。

## 2. プロトプラスト調製のための試料

3ヶ月間の栽培期間を経て胎生種子より発芽、展開した葉および発根した根と胎生種子採取時に胚軸であった部位をプロトプラスト調製用の試料とした。

## 3. プロトプラスト調製

### 1) 酵素

プロトプラスト調製用の酵素は、次の酵素製剤を混合して用いた。

Cellulase ONOZUKA RS (ヤクルト生化学 *Trichoderma viride*), Driselase (協和発酵 *Irpex lacteus*), Meiselase P-1 (明治製菓 *Trichoderma viride*), Macerozyme R-10 (ヤクルト生化学 *Rhizopus arrhizus*), Pectinase (Sigma *Rhizopus sp.*), Usukizyme (協和化成 *Trichoderma sp.*), 工業技術院微生物工業技術研究所の山辺ら (1985) によって開発された *Acremonium cellulase* (明治製菓 *Acremonium cellulolyticus*),

### 2) 処理条件

1の方法によって栽培した葉を採取し、主脈を取り除きメスで2mm角の切片とした。葉肉組織200mg (生重量) に対して、細胞壁溶解酵素と浸透圧調節剤を含む0.05M マレイン酸緩衝液2mlを加えて、温度 $28^\circ\text{C}$ 、100往復/分 (振とう幅: 40mm, 試験管傾斜角45度) の条件で振とうした。処理液をナイロンメッシュ (孔径59 $\mu\text{m}$ ) でろ過し、ろ液を遠心分離 (400 $\times g$ , 5分間) した。得られた沈殿物に2mlの浸透圧調節溶液を加えて、遠心分離を3回繰り返して洗浄し、精製プロトプラストとした。

プロトプラストの単離数は、トーマ氏血球計算板で計数し、粒径組成は、接眼マイクロメーターを用いて測定した。

なお、細胞壁溶解酵素は混合した5種類、浸透圧調節剤の濃度は0.3-0.7M, その種類は、マンニトール、ソルビトール、 $\text{MgSO}_4$  およびKClの4種類、マレイン酸緩衝液のpHは4.0-8.0, 酵素処理時間は1-5時間に変えて、NaCl無添加の栽培液で栽培したメヒルギの葉を使用してプロトプラスト調製の最適条件を検討した。

### 4. プロトプラストの生存率の測定

プロトプラスト懸濁液とフルオレセソグダイアセテート (FDA) 溶液を1:1 (20 $\mu\text{l}$ ずつ) の割合で混合し、混合溶液を血球計算板上に滴下して、5分放置後の蛍光顕微鏡下における蛍光発色したプロトプラスト数と明視野

でのプロトプラスト数とを比較して生存率を測定した。

## 結果および考察

メヒルギの葉肉組織からプロトプラストを調製する酵素処理の方法としては、葉肉組織を細胞壁構成成分に作用する混合酵素によって処理する一段階処理法で行い、プロトプラストを調製する際の諸条件を検討した。まず初めに、プロトプラストを単離する際の最適酵素の組合せを検討した。植物の細胞壁は、セルロース、ヘミセルロース、ペクチン、リグニン等から構成されているため、構成成分に作用するセルラーゼ、ヘミセルラーゼ、ポリガラクトツロナーゼ等を主成分とした酵素製剤を混合した5系統の酵素溶液で葉肉組織を処理して、プロトプラストの単離数を測定した。その結果 Fig. 1 に示したように2% *Acremonium cellulase*, 0.5% *Macerozyme R-*

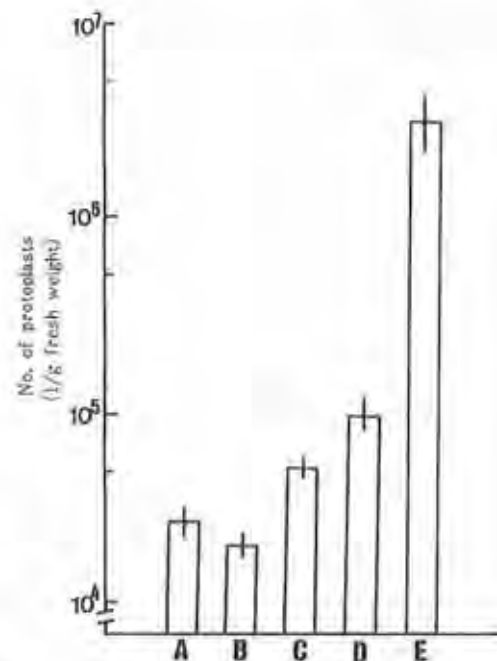


Fig. 1 Influence of enzyme compositions on the isolation of protoplasts.

Legend: A: 2% Cellulase ONOZUKA RS+0.5% Macerozyme R-10+0.5% Usukizyme+0.5% Pectinase.

B: 2% Driselase+0.5% Macerozyme R-10+0.5% Usukizyme+0.5% Pectinase.

C: 2% Meiselase P-1+0.5% Macerozyme R-10+0.5% Usukizyme+0.5% Pectinase.

D: 1% *Acremonium cellulase*+0.5% Macerozyme R-10+0.5% Usukizyme+0.5% Pectinase.

E: 2% *Acremonium cellulase*+0.5% Macerozyme R-10+0.5% Usukizyme+0.5% Pectinase.

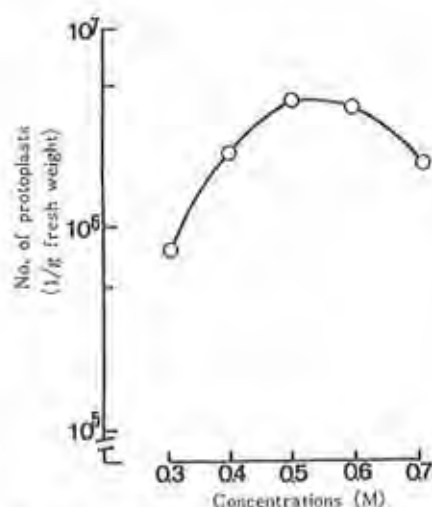


Fig. 2 Effect of the concentrations of osmotic stabilizers (mannitol) on the isolation of protoplasts.

10, 0.5% Usukizyme および 0.5% Pectinase の混合酵素 E の単離数が他の混合酵素と比較すると極めて多かった。また、混合酵素 E の組成のうち、Acremoniumcellulase の濃度のみを 1% に変えた混合酵素 D においても他の 3 系統の混合酵素よりもプロトプラストの単離数が多い結果を得た。この結果は、オヒルギの葉肉組織からのプロトプラスト調製の最適酵素と同一であった (江口ら, 1995)。実験に供した 5 系統の混合酵素は、Cellulase ONOZUKA RS, Driselase, Meiselase P-1 および Acremoniumcellulase の主にセルラーゼを主成分とする酵素の違いだけで、混合酵素中の他の 3 種類の酵素製剤は、同種類、同濃度である。単離数が多かった混合酵素 D と E は Acremoniumcellulase を含む。したがって Acremoniumcellulase は、メヒルギなどのマングローブ樹木の葉肉組織からのプロトプラスト調製のセルラーゼ系酵素製剤として最も適していると考えられる。Acremoniumcellulase の使用において良好な結果が得られた原因としては、他のセルラーゼ系酵素と比較してセルラーゼの分解力が強く糖化性に極めて優れている (山辺ら, 1985) ことと同時に、この酵素そのものにポリガラクトナーゼの活性があるためと考えられる。以上の結果から、メヒルギ葉肉組織からのプロトプラスト調製の最適酵素は、混合酵素 E であると結論付けた。

プロトプラストを細胞固有の浸透圧に調節するための浸透圧調節剤の種類と濃度およびその緩衝液の pH について検討した。浸透圧調節剤の濃度を 0.3-0.7M に変えてプロトプラストの単離数を測定したところ、Fig. 2 に示したようにマンニトール濃度 0.5-0.6M の時にはほぼ同程度の数のプロトプラストが単離された。マンニトール濃度の最適範囲は、オヒルギ (江口ら, 1995) では 0.4-0.6M であることからメヒルギの方がやや狭い最適範囲

であった。プロトプラストの単離数は、浸透圧調節剤の濃度が高くては低くても減少し、特に浸透圧調節剤の濃度が低い場合にはプロトプラストの単離数が著しく減少した。この現象は、メヒルギ、オヒルギ (江口ら, 1995) の両種からのプロトプラスト調製にみられる特徴であった。なお、メヒルギの単離数の多かったマンニトール濃度は 0.5-0.6M であったが、以下の実験では 0.5M を浸透圧調節剤の最適濃度として用いた。浸透圧調節剤にマンニトール、ソルビトール、MgSO<sub>4</sub> および KCl の 4 種類を使用してプロトプラストの単離数を比較したところ、Fig. 3 に示したように MgSO<sub>4</sub> を用いた時の単離数が他の 3 種類の浸透圧調節剤よりも多い有意な差が認められたため、MgSO<sub>4</sub> を最適な浸透圧調節剤として採択した。さらに、酵素製剤と浸透圧調節剤を溶解する緩衝液の pH を 4.0-8.0 に設定してプロトプラストの単離数を検討したところ、Fig. 4 に示したようにプロトプラストは、pH 5.0-7.0 の時には単離数に差は認められなかった。本実験に用いた酵素の最適 pH は、Acremoniumcellulase が pH 4.5, Macerozyme R-10 が pH 5.0-6.0, Usukizyme が pH 4.0-6.0, Pectinase が pH 4.0 である。

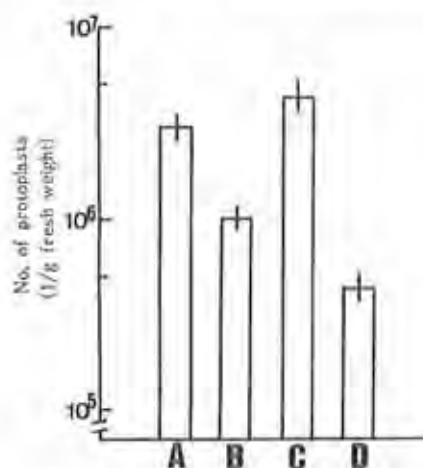


Fig. 3 Effect of the osmotic stabilizer (0.5M) on the isolation of protoplasts.

Legend: A: Mannitol, B: Sorbitol, C: MgSO<sub>4</sub>, D: KCl

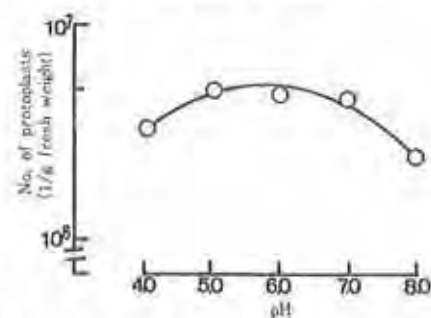


Fig. 4 Effect of pH on the isolation of protoplasts.

ことから、供試酵素の相対活性値が高く、プロトプラストの単離数の多い pH5.0 を最適 pH とした。

次にプロトプラスト調製における酵素処理時間の影響を検討した。酵素処理時間の設定を 1-5 時間としたところ、3 時間までは時間の経過とともにプロトプラストの単離数は加速的に増加する傾向を示した。しかし、4 時間以上の酵素処理を行っても、プロトプラストの単離数はほとんど増加しなかった。これらの結果は、オヒルギ (江口ら, 1995) とはやや異なった。酵素処理によって調製されるプロトプラストは、生存率の高いものが多く単離されることが望ましいことから、FDA 溶液を使用して酵素処理時間ごとのプロトプラストの生存率を測定した。その結果、3 時間の酵素処理によって調製したプロトプラストの生存率が最も高く約 89% であった。以上の結果から、最適酵素処理時間は 3 時間とした。

以上の結果をもとに確立したメヒルギ葉肉組織からのプロトプラスト調製の最適条件下での単離数は、1 g の葉肉組織当たり約  $6 \times 10^6$  個であり、オヒルギ (江口ら, 1995) の約  $1 \times 10^6$  個よりも多かった。また、プロトプラスト粒径は、Fig. 6 に示したように直径 12~32  $\mu\text{m}$  であり、その平均粒径は 21  $\mu\text{m}$  であった。なお、オヒルギ (江口ら, 1995) のプロトプラストは 12~36  $\mu\text{m}$  のものが観察され、平均粒径は 28  $\mu\text{m}$  であった。メヒルギの葉肉組織からのプロトプラストをオヒルギと比較すると、単離数はメヒルギの方が多量のもので、単離されるプロトプラストの粒径は小さいことが特徴である。

さらに、メヒルギ葉肉組織からのプロトプラスト調製

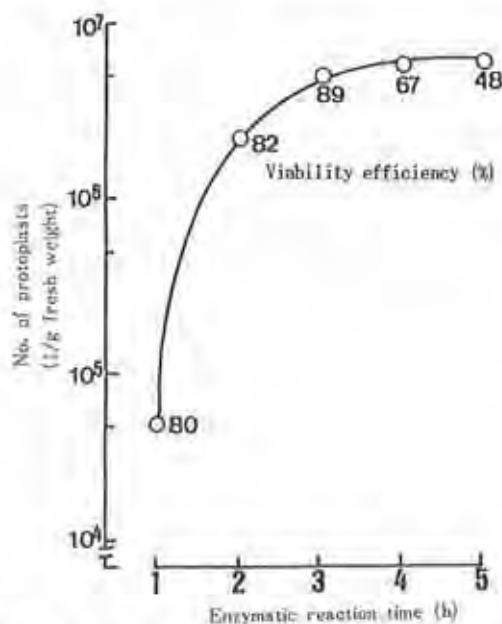


Fig. 5 Effect of the enzymatic reaction times on the isolation of protoplasts.

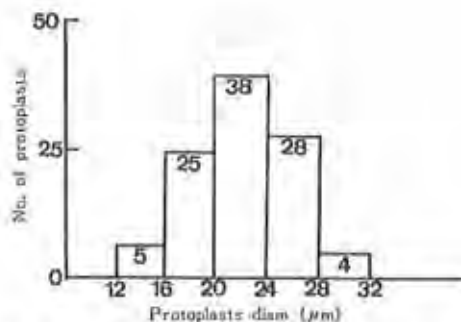


Fig. 6 Size distribution of protoplasts from mesophyll prepared under the optimum condition.

の最適条件で、胎生種子の胚軸であった部位と発根した主根からのプロトプラスト調製を試みたが、プロトプラストはほとんど単離されなかった。葉肉組織以外の部位からのプロトプラスト調製を行うには、それら各部位ごとに詳細な酵素処理条件等の検討が必要であると考えられる。

マングローブ樹木は、海水に浸かった状態で枯れることなく成長する耐塩性機構を持つことから、NaCl 濃度を 0%、0.5% および 2.0% に変えた栽培液肥で生育させ、良好な成長が確認されたメヒルギの展開葉からそれぞれプロトプラスト調製し、単離数および粒径組成の変化について検討した。しかし、NaCl 濃度の違いはそれらにまったく影響を及ぼさないことがわかった。

また、著者らはこれまでにオヒルギ葉肉組織からのプロトプラストは、栽培液肥の NaCl 濃度により、その膜浸透圧耐性が異なると報告 (江口ら, 1995) しているが、メヒルギではオヒルギと同様な結果は得られなかった。

## 結論

マングローブ樹木のうちヒルギ科のメヒルギ葉肉組織からプロトプラストを調製するための条件について検討した。メヒルギ葉肉組織から細胞生存率の高いプロトプラストを大量に調製するための条件は、特に細胞壁溶解酵素に高いセルラーゼ活性とポリガラクトツロナーゼ活性を有する *Acremonium cellulase* を使用することであり、確立したメヒルギ葉肉組織からのプロトプラストの最適調製条件は、細胞壁溶解酵素に 2% *Acremonium cellulase*、0.5% *Macerozyme R-10*、0.5% *Usukizyme* および 0.5% *Pectinase* の混合酵素、浸透圧調節剤に 0.5 M の  $\text{MgSO}_4$  を含む 0.05 M マレイン酸緩衝液 (pH6.0) を使用し、酵素処理時間を 3 時間とした場合であった。この条件で得られたプロトプラスト数は、生重量 1 g の葉肉組織あたり約  $6 \times 10^6$  個であり、その平均粒径は 21  $\mu\text{m}$  であった。さらに単離されたプロトプラストの生存率は、約 86% であることから葉肉組織からのプロトプラストは、細胞工学的な手法を取り入れたマングローブの育種および耐塩性機構解明のための有用な材料になるも

のである。

### 謝 辞

Acremoniumcellulase の使用をご許可いただいた工業技術院微生物工業技術研究所山辺倫博士ならびに酵素製剤をご提供いただいた明治製菓株式会社生物科学研究所に深謝いたします。

### 文 献

江口文陽他 (1995): オヒルギ葉肉組織からのプロトプラスト調製, 木材学会誌 41, (10): 932-937.

楡垣宮都他 (1990): 東南アジアのマングローブ, 東京農業大学総合研究所, 147-168 (文部省科学研究費海外学術調査 (1985-1987) 報告).

加藤 茂 (1992a): 塩生植物の塩応答性について (1) マングローブ植物, メヒルギと塩環境, 日本海水学会誌,

46, (2): 89-95.

Kato, S. (1992b): Mangrove Plant, *Bruguiera gymnorhiza* and Its Salt Environment for Growth, *Bull. Soc. Sea. Water Sic. Japan*, 46, (6): 397-404.

加藤 茂 (1994): マングローブ植物, ヤエヤマヒルギと塩 (NaCl) 環境, 日本海水学会誌, 48, (1): 15-21.

Nakata, G. et al. (1985): Studies on the Mangrove Ecosystem, NODAI RESEARCH INSTITUTE, 113-117.

西 貞夫 (1990): 野菜の組織・細胞培養と育種, 農業図書, 11-12.

斎藤 明 (1989): 木本植物の増殖と育種, 農業図書, 19-22.

Sakurai, N. & Kuraishi, S. (1985): Studies on the Mangrove Ecosystem, NODAI RESEARCH INSTITUTE, 94-101.

山辺 倫他 (1985): 特告昭60-43954.