

プロトプラストの教材化に関する基礎的研究 IV*
 —商店で入手可能な植物からのプロトプラストの単離について—

楠元 守**・木下 鉄雄***

神奈川県立教育センター

Basic Research on Making Teaching Materials Using Protoplast IV :
 The Isolation of Protoplast From Plants
 Collected From Vegetable Stores and Flower Shops

Mamoru KUSUMOTO and Tetuo KINOSITA
 KANAGAWA PREFECTURAL EDUCATION CENTER

はじめに

プロトプラストに関する研究は近年著しく発展しており^{3)11)~15)}, 高等学校生物の教科書でも実験・観察事項の一つとして記載されるようになった。また, マスコミでも, バイオテクノロジーの話題として体細胞雑種植物を取り上げる場合の必須用語となっており, 生物・科学的用語としてだけでなく一般的な日常用語ともなっている。しかし, これまでの中・高校生物の学習で利用されてきた既存の薬品や既知の方法だけでは, 実際に, 生徒にプロトプラストを観察させることは困難であり, 供試薬品・供試材料・方法など, 教材化に関する基礎的研究の必要性が高まっている。

筆者の一人楠元^{4)~5)}楠元^{6)~10)}は, すでに細胞やプロトプラストの教材化のために, 材料となる植物の種類・材料の採取部位・酵素の種類および濃度・酵素処理時の裏表皮の有無・吸引処理・植物が育った環境等とプロトプラストの単離等々について実験し, それらの結果の検討から, 50分間の授業でも

プロトプラストの単離・観察が可能であることを報告した。生物教材を自然から入手する場合, 種によっては季節性という隘路がある。しかし, 栽培植物は品種改良・栽培技術・輸送手段等の進歩によって, 店頭では1年中新鮮な状態で販売されるようになってきた。これらの商品の教材として利用することが可能になれば, 植物教材の季節性という問題の一部は解決されるものと考えられる。今回は, 教材化という視点から, 身近なスーパー・八百屋・花屋等で入手可能な植物を用いて, プロトプラストの単離や観察に適する種・供試材料の採取部位および処理酵素の濃度等について実験を行い, その教材化についても検討したので報告する。

材料および方法

1) 供試材料

供試した材料としては, 直接, 八百屋・花屋等から購入したものを中心に, ブロッコリー (*Brassica oleracea* var. *italica*), ダイコン (*Raphanus sativus*), ストック (*Mathiola incana*), ニンニク (*Allium sativum* var. *pekinense*), ニラ (*Allium tuberosum*), ミツバ (*Cryptotaenia canadensis*), クレソン (*Roripa Nasturtium aquaticum*), キンセ

1995年3月4日受理

* 本研究の概要は昭和60年度日本生物教育学会全国大会で発表した。

** 現在 日本大学

*** 現在 茅ヶ崎市立松浪中学校

ンカ (*Calendula officinalis*), シュンギク (*Chrysanthemum coronarium* var. *spatiosum*), ハクサイ (*Brassica pekinensis*), セントポーリア (*Saintpoulia ionantha*), サクラソウ (*Primura malacoides*), シクラメン (*Cyclamen persicum*), キク (*Chrysanthemum morifolium*), オモト (*Rohdea japonica*), パセリ (*Petroselinum sativum*), テッポウユリ (*Lilium longiflorum* var. *insulare*) の17種の葉を用いた。これらの多くは実験の前日または当日購入したものを用いたが、ニンニクは1カ月前から実験室内で水栽培したものを用い、ブロッコリーは2ヶ月前に県立教育センターの畑に播種したものを用いた。種の学名は、石戸¹⁾・石井他²⁾・牧野¹³⁾によった。

2) 材料の処理

プロトプラストの単離に用いる葉は、これまでの研究では、酵素処理を容易にするために葉の裏側の表皮を剥がすという前処理を行ってから酵素液に入れていた。しかし、裏表皮が剥がれにくい種も多く、剥がれ易い種でも、裏表皮を剥がすのは容易ではない。まして、生徒に表皮を剥がさせるのは時間がかかるとともに失敗の大きな原因となる。

筆者の一人楠元は⁷⁾、単子葉植物の裏表皮の極めて剥がれにくい種から、簡単にプロトプラストを得る方法として、葉脈に直角に切って2mm幅の切片を作って酵素処理をすると、容易にプロトプラストが得られることを報告した。また、単子葉植物以外の種でも同様の処理で容易にプロトプラストを単離できることが明らかになったので、本実験でも同様の方法を用いた。すなわち、採集した材料をよく水洗いした後、ガーゼ等の布で水分を除き、大きい葉脈のある材料では主脈を切り取り、葉の中央部を幅20mm程度の短冊形に切り揃えた。これを10枚程度重ね、よく切れる安全カミソリで、葉脈にできるだけ直角になるような方向に切って切片を作った。双子葉植物は平行脈ではないので必ずしも葉脈と直角にはならないが、全体的に見てできるだけ主な葉脈に直角に近いように心がけた。

切片の幅は1.5~2.0mm、長さ25mmを最大とし、各1gを供試した。

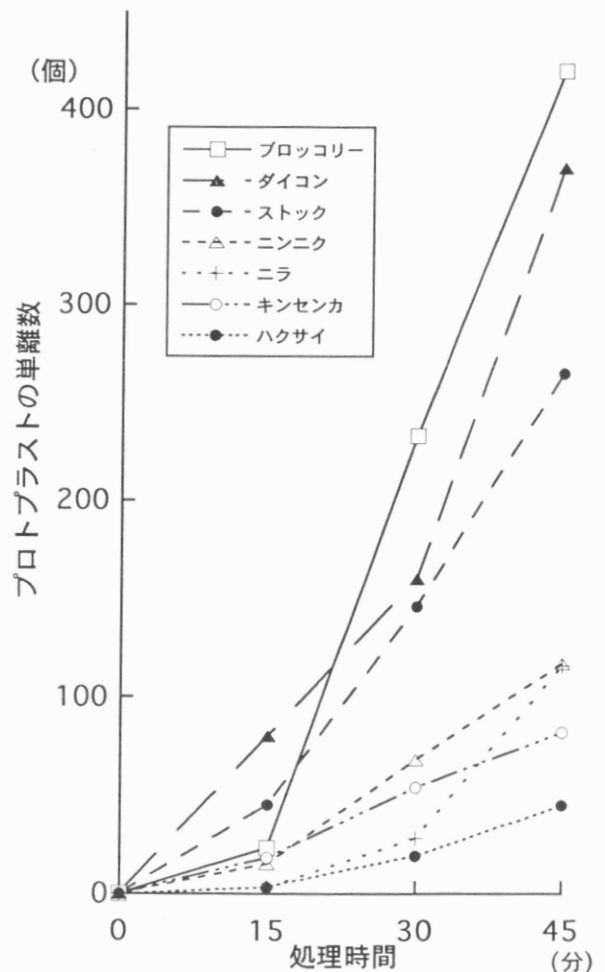
3) 酵素処理とプロトプラストの計数

100mlの三角フラスコに酵素液(0.1%ペクトリ

アーゼ Y-23, 2%セルラーゼ オノズカ RS, 0.5%デキストラン硫酸カリウム, 0.6 MD-マンニトールをpH5.5に調整した液)を10ml入れ、30℃にして、試料1gを加え、酵素液を試料の組織内に浸透させるために真空ポンプで1分間吸引した。これを30℃に設定した恒温槽内で、毎分60回・振幅3cmの往復振とうを振とう機を用いて行った。

酵素処理開始後15分毎にピペットを用いて、三角フラスコ内の液面下5mm位のところから酵素液とともにプロトプラストを採集してプレパラートを作り、150倍で検鏡して、3視野中の平均値を四捨五入して示した。

酵素の濃度がプロトプラストの単離数に及ぼす影響については、酵素液のうちセルラーゼ オノズカ RSの濃度だけを変えて実験を行った。

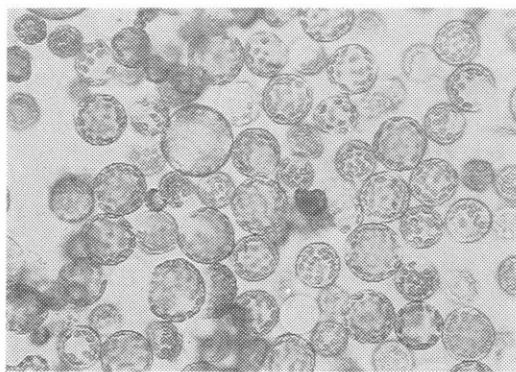


第1図 プロトプラストの単離数が多かった種と単離数の時間的経過

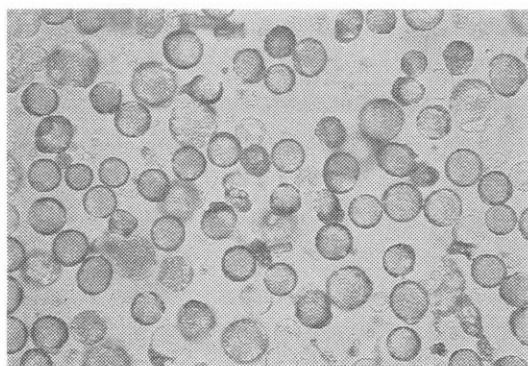
結果と考察

1) 教材化に適する種

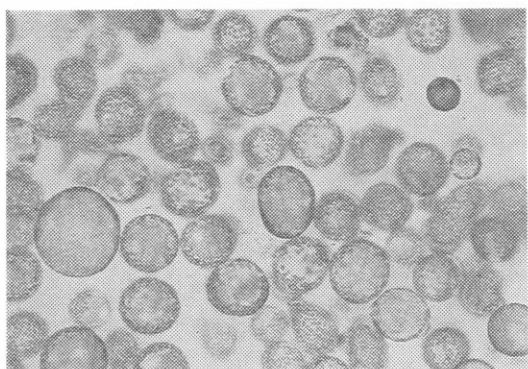
酵素処理開始15分後には、1視野平均のプロトプラスト数はダイコン80個、ストック45個、ブロッコリー23個、ニンニク・キンセンカ11個などとなり、



a



b



c

第2図 単離されたプロトプラスト

a. ブロッコリー b. ニラ c. ニンニク

観察に適当な数のプロトプラストが単離した。そして、時間の経過とともにプロトプラストの単離数は増加し、45分後にはブロッコリー420個、ダイコン370個、ストック265個、ニラ117個、ニンニク116個、キンセンカ82個、ハクサイ45個が観察された(第1図)。これら7種のプロトプラストの大きさは直径40~50 μm のものが多かったが、ニンニクとニラのプロトプラストの中には100 μm 葉に達する大きいものが観察された。この大きいプロトプラストでは葉緑体の分布にかたよりが観察され、液胞と推察される葉緑体の観察されない部分が観察されることから、成長した細胞から得られらプロトプラストであると考えられる(第2図)。

ストックとブロッコリーのプロトプラストでは、大きい葉緑体が観察され、その数も多かった。

以上のほかクレソン・シュンギクでは、30分後には20個のプロトプラストが単離し、その直径は20~30 μm であった。セントポーリア・サクラソウ・シクラメン・キク・パセリ・ミツバ・テッポウユリ等では、30分後には4~15個のプロトプラストが単離したが、オモトでは単離しなかった。

以上の結果から、教材として利用する場合、プロトプラストの単離に最も適する種(最適種)は、順にブロッコリー・ダイコン・ストック・ニラ・ニンニク・キンセンカ・ハクサイ等であることがわかった。最適種ではないが、30分処理で1視野当たり20個が単離されたクレソン・シュンギク等も教材として利用可能であると考えられた。セントポーリア・サクラソウ・シクラメン・キク・パセリ・ミツバ・テッポウユリ等では単離したプロトプラストが少なかったため、教材化のためにはさらに検討する必要があるものと考えられる。

2) 葉の採取部位とプロトプラストの単離数

筆者の一人楠元⁹⁾¹⁰⁾は、細胞の単離には葉齢が関係しており、若齢葉のほうが細胞の単離が早いキクタイプと、老熟葉のほうが細胞の単離が早いダイコンタイプがあることを明らかにした。また、プロトプラストの単離でも同様の結果が得られている⁴⁾⁵⁾¹⁰⁾。本研究では、ブロッコリー・ダイコン・ストック・キンセンカの4種を供試して、葉の採取部位とプロトプラストの単離について実験を行った。

ブロッコリーとダイコンでは内側の葉が若く外側ほど成熟しているため、内側(内部葉)、中間部(中

間部葉), 外側(外部葉)に分けて採取することにしたが, ダイコンの外部葉は除去されていたので自然の形態から推察すると内部葉と中間部葉を供試したことになる。

結果は, ブロッコリーでは, 酵素処理開始15分後には内部葉・中間部葉・外部葉の順に, 1視野中に20個・20個・23個, 30分後には44個・115個・233個のプロトプラストが単離され, 45分後には56個・170個・420個のプロトプラストが単離された。また, ダイコンでは, 酵素処理開始15分後には内部葉・中間葉の順に53個・76個, 30分後には81個・160個, 45分後には175個・370個のプロトプラストが単離された。

以上のように, ブロッコリー・ダイコンともに内側の若齢葉より外側の成熟葉を供試したほうが, 多くのプロトプラストを単離できることがわかった。

両種ともにアブラナ科であり, この結果はコマツナの細胞の単離およびプロトプラストの単離でも同じであり^{5)~10)}, ナス科, サトイモ科でも同様であるという報告がある¹⁴⁾。すなわち, 細胞やプロトプラストの単離には, アブラナ科では外側の成熟葉が適しているものと考えられる。

ストックとキンセンカは茎が上へ伸長するので, 葉の成熟度は, 葉が茎のどの位置についているかによって判断することにした。すなわち, 上位葉・中位葉・下位葉に区分したが, 両種ともに下位葉は除去して市販されているので, 上位葉と中位葉にあたると思われる葉を供試した。

結果は, スtockでは, 酵素処理開始15分後には上位葉・中位葉の順に, 1視野中に7個・45個のプロトプラストが単離され, 30分後には95個・157個, 45分後には220個・265個のプロトプラストが単離された。

キンセンカでは, 酵素処理開始15分後には上位葉・中位葉の順に, 1視野中に5個・11個, 30分後には52個・54個, 45分後には77個・82個のプロトプラストが単離された。

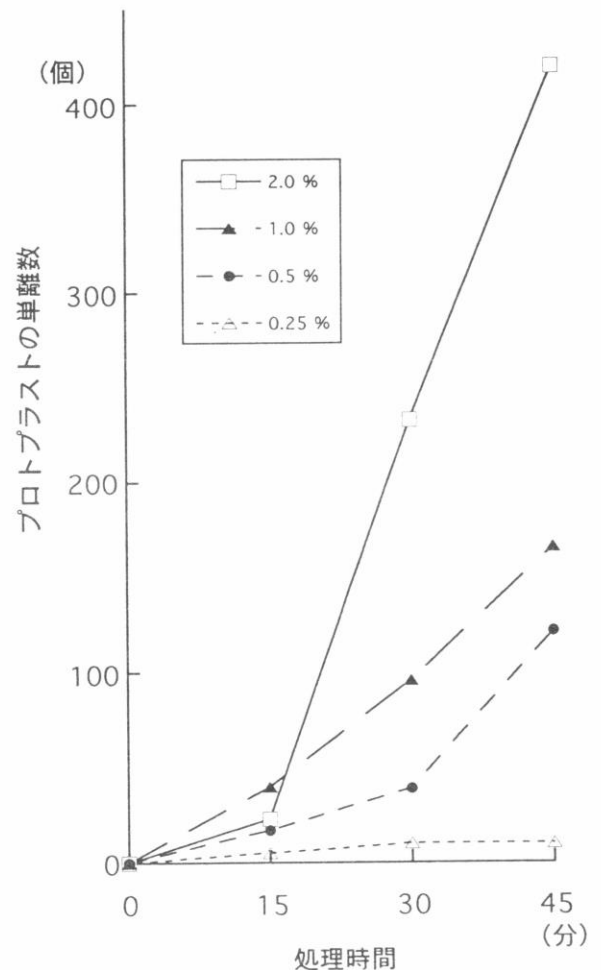
以上の結果から, スtockは茎が上へ長く伸長するにもかかわらず, アブラナ科であるのでキクタイプとは異なり, 上位の若齢葉より下位の成熟葉のほうがプロトプラストの単離の多いダイコンタイプであることがわかった。キンセンカはキク科であるが, 上・中位葉ともに大きな差は見られなかった。また, プロトプラストの単離数もストックよりすく

なかった。これらのことからストックは成熟葉を利用すると, 短時間に多数のプロトプラストが単離し, 教材として利用価値の高い種であることがわかった。

3) セルラーゼの濃度とプロトプラストの単離数

実験に要する経費はできるだけ安くすることが要求される。プロトプラストを観察するには, ある一定時間に, 観察に必要な数のプロトプラストが単離されればよいので, ブロッコリーの成熟葉は供試して必要な酵素の濃度を調べた。

酵素液のうち, セルラーゼ オノズカRSの濃度だけを変えて2%・1%・0.5%・0.25%として結果, 15分後には順には40個・20個・17個・3個となり, すでに1%以上では観察に適する数のプロトプラストが単離し, 30分後には233個・96個・39個・



第3図 酵素濃度がプロトプラストの単離に及ぼす影響 (ブロッコリー)

10個、45分後には420個・166個・122個・10個のプロトプラストが単離した(第3図)。

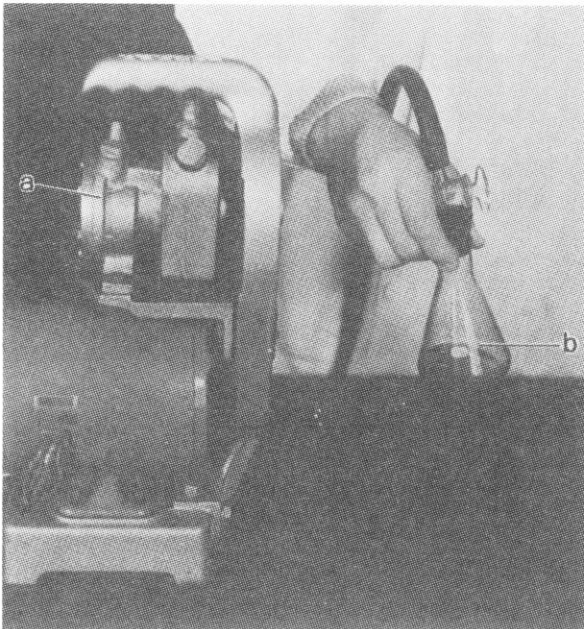
プロトプラストを生徒に観察させるためには一視野中20~30個程度観察されればよいので、この結果から、ブロッコリーの成熟葉を供試して30分間酵素処理する場合は、セルラーゼ オノズカRS濃度は0.5%でも良いことがわかった。また、一視野中のプロトプラスト数を多くする方法としては、供試する試料の量を多くすることも考えられる。すなわち、この研究では酵素液10mlに対して1gの割合で試料を加えたが、試料2gを加えることによって観察されるプロトプラストはほぼ1.8倍に増加した。

4)教材化について

以上のことを総合すると、プロトプラストの観察を生徒に50分間で実施させるためには、次のような準備および具体的方法が良いと考えられる。

「準備」

材料 八百屋から購入したブロッコリーやダイコンの外側の葉、花屋から購入したストックの中央から下の葉等



第4図 真空ポンプによる吸引
a:真空ポンプ b:試料

器具 検鏡器具、ピンセット、100ml三角フラスコ、こまごめピペット、カミソリの刃、真空ポンプ、振とう機(なければ手動でよい)、ガーゼ、恒温振とう機
薬品 酵素液(0.1%ペクトリアーゼ Y-23, 0.5~2% セルラーゼ オノズカRS, 0.5%デキストラン硫酸カリウム, 0.6MD-マンニトールをpH5.5に調整した液)

「方法」

- ① 材料の葉を水洗いし、ガーゼで水分をとる。
- ② 葉の中肋をカミソリの刃で切り取り、さらに、小さい葉脈に沿って幅1.5~2cmの短冊形に切り取る。
- ③ ②の葉を数枚ずつ重ね、よく切れるカミソリの刃で、できるだけ葉脈に直角方向に切って、2mm幅の切片を作る。
- ④ 切り取った材料1~2gをピンセットで三角フラスコに入れ、酵素液10mlを加えて真空ポンプで吸引する(第4図)。
- ⑤ 約1分間吸引すると気泡がでなくなり、切片の中に酵素液が浸入して変色したら吸引をやめ、約30℃の恒温振とう機内で、往復3cm、毎分70~80回で15分~30分振とうする。振とう機がない場合は手動で水平に往復振とうしてもよい。
- ⑥ 振とう開始15分後頃から観察に適する量のプロトプラストが単離してくるので、振とうをやめ、フラスコの底部に近いところから酵素液とともにピペットで少量吸引し、プレパラートにして検鏡する。20分・30分後にも同様にして検鏡する。
- ⑦ 検鏡は、プロトプラストの形態とともに、プロトプラスト内の葉緑体の液泡などについても観察する。また、単離の初期には組織から細胞が単離する状況や、それから推察される組織の構造、20~30分後には維管束・気孔や孔辺細胞を含む表皮・気孔の構造など、植物体の構造を知る上で大切な多くの観察が可能である。

摘 要

酵素の働きを利用して、プロトプラストを単離し、教材として利用するために商店から購入可能な植物を対象にして、適する種・最良の供試部位・酵素の濃度について検討した。

- 1 試供した17種の植物のうちプロトプラストの単離が多かった種（最適種）は、多かった順にブロッコリー・ダイコン・ストック・ニラ・ニンニク・キンセンカ・ハクサイ等であった。次いで（次適種）、クレソン・シュンギク等も教材として利用可能であると考えられる。
- 2 供試する葉は、ブロッコリー・ダイコン・ストックなどアブラナ科の植物では、成熟葉がプロトプラストの単離が早いダイコンタイプであることがわかった。
- 3 ブロッコリーではプロトプラストの単離が早いので、教材として利用する場合は、セルラーゼオノズカRSの濃度は0.5%でも良いことがわかった。
- 4 ブロッコリーをプロトプラストの観察材料として利用する場合の、教材化について考察した。

引用文献

- 1) 石戸 忠, 1975, 原色植物検索図鑑, 北隆館, 東京.
- 2) 石井・井上他, 1971, 最新園芸大事典, 誠文堂新光社, 東京, 全7巻.
- 3) 馳澤盛一郎, 1984, プロトプラストの単離と培養, 遺伝, 38(3): 34~39.
- 4) 楠元 守・見富信義・葛西一憲, 1983, プロトプラストの教材化に関する基礎的研究, 生物教育, 24(2): 5~9.
- 5) 楠元 守・沼田俊作, 1984, プロトプラストの教材化に関する基礎的研究 II, 神奈川県立教育センター研究収録, 3: 51~56.
- 6) 楠元 守, 1983, 酵素の働きを利用した植物の組織および細胞の観察法, 生物教育, 24(3): 15~20.
- 7) 楠元 守, 1983, 体細胞雑種植物の育種に関する研究, 園学春要旨, 296~297.
- 8) 楠元 守, 1984, 酵素の働きを利用した組織および細胞の観察 III, 神奈川県立教育センター研究収録, 2: 44~51.
- 9) 楠元 守, 1985, 酵素の働きを利用した組織および細胞の観察 II, 生物教育, 24(3・4): 121~126.
- 10) 楠元 守, 1992, プロトプラストの教材化に関する基礎的研究 III, 生物教育学雑誌, 3: 1~6.
- 11) 竹内正幸・中島哲夫・古谷 力, 1979, 新植物組織培養, 朝倉書店, 東京, 130~176.
- 12) 建部 到, 1979, 植物細胞のプロトプラスト, 遺伝, 33(3): 2~8.
- 13) 牧野富太郎, 1975, 新日本植物図鑑北隆館, 東京.
- 14) 西 貞夫, 1983, 注目を浴びる植物の育種法, 日本の科学と技術, 24(221): 56~65.
- 15) 原田 宏・駒嶺 穆, 1979, 植物細胞組織培養, 理工学社, 東京, 161~214.