

福井高専生物工学実験のためのカルス誘導プロトコルの事例

高山 勝己*、上島 晃智

福井工業高等専門学校物質工学科 (〒916-8507 福井県鯖江市下司町)

*takayama@fukui-nct.ac.jp

An example of callus induction protocol for biotechnology experiments at Fukui National College of Technology

Katsumi TAKAYAMA* and Akinori UEJIMA

Department of Chemistry and Biology Engineering, Fukui National College of Technology
(Geshi-cho, Sabae-shi, Fukui 916-8507, Japan)

((Received September 16, 2014; Accepted October 10, 2014))

Abstract

It is important for students of biology courses to understand the mechanisms of action of plant hormones. However, this theme concerned with plant hormone is missing from the experiments for students of biotechnology courses at Fukui National College of Technology. Therefore, we have planned to introduce callus induction of *Daucus carota* into a biotechnology experiment. The callus induction protocol was prepared in reference to a commercially available technical book. This paper shows the flow of the protocol and its applied result.

Keywords: Biotechnology experiment, Callus induction protocol, Plant hormones

1. はじめに

多細胞生物は 1 個の胚細胞が分裂し増殖する過程で細胞の役割分担が行われ、組織や器官となりやがて個体を形成する。通常一度細胞が分化すると再分化することはない[1]。

ところが植物の場合、一度分化した細胞であってもある条件下で培養すると容易に脱分化する。カルス誘導はその典型例であり、生成させ

たカルスは適当な植物ホルモン(表1)の添加により根やシュートを形成させることができる[2]。

植物ホルモンは農業分野において重要な役割を果たしており、除草剤としての合成オーキシシンやジベレリンによるブドウの種無し化等、応用事例は数多くある[2]。このようなことから、植物ホルモン作用の実験を通じた体験は生物コースを履修する学生にとって重要であり、実験

課題としてよく取り上げられるのがオーキシシンとサイトカイニンを用いるカルス誘導実験である。

理想としては植物生理学の講義を並行しながら実験を行う方が望ましいといえるが、現段階で福井高専物質工学科の教育カリキュラムに植物関連の講義は時限数の制約のため導入されていない。将来的な高専高度化等によるカリキュラムの再編成を視野にいれながら、その前段階として市販の実験書[1]をもとに、本校物質工学科生物コース生物学実験実習におけるカルス誘導実験プロトコルを作成したので紹介する。

表. 1 各植物ホルモンの種類とその生理作用

植物ホルモン	主要な作用
オーキシシン	胚発生、軸形成、器官形成、屈性反応
サイトカイニン	茎葉部の分化、細胞分裂の促進
ジベレリン	伸長成長、種子発芽の促進
アブシジン酸	種子形成、休眠、乾燥ストレス応答
エチレン	器官の成熟、脱離の促進
ブラシノステロイド	成長・分化全般の促進
ジャスモン酸	ストレス抵抗性反応
サリチル酸	病原抵抗性反応
ストリゴラクトン	枝分かれの抑制

[3] より引用

2. 一般実験書からのカルス誘導実験に対する知見

カルス誘導用培地としては、表 2 に組成を示した MS 培地(Murashige & Skoog Medium)が主流であり、これに他の栄養素やホルモンを添

加する。

カルス誘導実験で使われる植物ホルモンはオーキシシンとサイトカイニンであり、それぞれの濃度比はカルス形成や再分化に影響を与える[1]。

例えば、オーキシシン濃度が高い培地で植物組織を培養すると、植物は一旦カルス形成後シュートへと分化する。そして、オーキシシンとサイトカイニンが等量かつ高濃度で存在する培地ではカルスを形成し続ける。

表. 2 MS 培地の組成

無機塩類組成		mg/L
硝酸アンモニウム		1650
硝酸カリウム		1900
リン酸二水素カリウム		170
ホウ酸		6.2
硫酸マンガン四水和物		22.3
硫酸亜鉛七水和物		8.6
ヨウ化カリウム		0.83
モリブデン酸ナトリウム二水和物		0.025
硫酸銅五水和物		0.025
塩化コバルト六水和物		0.44
塩化カルシウム二水和物		440
硫酸マグネシウム七水和物		370
硫酸銅(II)七水和物		27.8
Na ₂ -EDTA		37.3
有機物組成		mg/L
ミオイノシトール		100
ニコチン酸		0.5
ピリドキシン		0.5
チアミン		0.1
グリシン		2.0

[1]より引用

カルス誘導実験は西洋ニンジン (*Daucus carota subsp. sativus*) の形成層を用いた事例が多い。カルス形成までの培養を暗黒下で行い、カルス形成後、光を照射してカルスの部分が緑色になれば葉緑体を持ったということが目で確認することができる。

カルス誘導実験で、問題となる現象にサンプル腐敗がある。これには防腐剤を用いて、微生物の侵入・発育・増殖を防止して、腐敗・発酵が起らないようにするとよい。

またニンジンが傷付いた際、図 1 に示すように、傷の部分から分泌されるフェノール類が空气中で酸化して褐色に変化することがある。

これには、酸化防止剤として、アスコルビン酸 (ビタミン C)、トコフェロール (ビタミン E)、BHT (ジブチルヒドロキシトルエン)、BHA (ブチルヒドロキシアニソール)、亜硫酸ナトリウム、二酸化硫黄、クロロゲン酸、カテキンなどを培地に添加しておくことで一定の防止効果が期待できる。



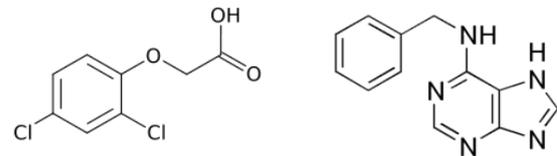
図 1 褐変化によりカルス化に失敗した事例

3. 人参カルス実験プロトコル

2 で記述した知見を考慮し、カルス誘導実験のためのプロトコルを編成した。

3.1 試薬

培地は市販の MS 培地を用いた。植物ホルモンには、オーキシシンとして 2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸、サイトカイニンとして 6-ベンジルアデニンを選択した。それぞれの化学構造式を図 2 に示す。



2,4-ジクロロフェノキシ酢酸

6-ベンジルアデニン

図 2 植物ホルモンの化学構造式

防腐剤液は Plant Cell Technology 社の Plant Preservative Mixture (PPM) を、酸化防止剤にはアスコルビン酸 (市販品特級) を用いた。消毒剤としての次亜塩素酸ナトリウム、エタノールは市販特級品を使用した。他に 1M 水酸化ナトリウム水溶液、1M 塩酸水溶液を pH 調整用等に必要とする。人参はできるだけ新鮮なものを実験直前に購入したものを使用した。中性洗剤は市販の台所洗剤を用いた。実験に使用する水は蒸留水または蒸留水をオートクレーブ滅菌 (121°C, 0.12MPa, 20min) したものを用いた。

3.2 器具・機器・設備

ピペットマン (200) : 1 本、50mL ビーカー : 2 個、1L ビーカー : 6 個、200 mL 三角フラスコ : 10 個、調製した薬品類の保存瓶 (50~500mL) : 5 本、ピンセット : 1 本、メス : 1 本、コルクボーラー (5 mm i.d.) : 1 本、滅菌済みディスクシャーレ : 21 枚 (1 枚は人参をカットするためのトレーとして使用)、ビニールテープ : 1 巻、アルミホイル : 1 箱、電子天秤、スターラー、オー

トクレーブ、恒温インキュベーター、クリーンベンチ 各1台。

3.3 操作

植物カルス作成実験のフローを図4に示し、各工程に対する詳細を以下に記述する。

① 100 ppm オーキシシンとサイトカイニン溶液の調製

オーキシシン(2,4-ジクロロフェノキシ酢酸)を 3 mg 量りとり、5mL の蒸留水を加え 1M-NaOH を滴下しながら溶解し、蒸留水を加えて 30 mL までメスアップする。pH を 6~7 に調整する。未使用時は冷暗所に保存する。

サイトカイニン(6-ベンジルアデニン)を 3 mg 量りとり、5mL の蒸留水を加え 1M-HCl を滴下しながら溶解し、蒸留水を加えて 30 mL までメスアップする。未使用時は冷暗所に保存し、使用時に pH を 6~7 に調整する。

② 酸化防止剤溶液の調製

アスコルビン酸を 5.28 g 量りとり、30 mL の蒸留水に完全に溶かして 1M の水溶液を作った後、フィルター濾過滅菌する。

③ MS 培地の作成

ビーカーに市販の MS 培地 0.94 g、スクロース 6.0g、蒸留水で 200 mL にメスアップする。培地を 100mL の 10 個の三角フラスコに 20mL ずつ分注する。

各フラスコに、各ホルモン濃度が表3に示した組み合わせ濃度になるように、ピペットマン(200)を用いて、各 100ppm のオーキシシン溶液とサイトカイニン溶液を、指定量(表中に示した容量)加える。さらに、全てのフラスコに、寒天 1.6g と防腐剤液を 40 μL(0.2%になる)添加してから培地の pH を 5.8 に調整する。

④ オートクレーブ処理

培地の入った三角フラスコ(10個)、蒸留水(十分な量:1L ビーカーに 0.8 L 程度入れる)、1L ビーカー5個をオートクレーブ処理(121°C, 0.12 MPa, 20min)する。

表3 ホルモン濃度の組み合わせ

No.	オーキシシン ppm (添加容量*)	サイトカイニン ppm (添加容量*)
1	0 (0 μL)	0 (0 μL)
2	0.1 (20 μL)	0.1 (20 μL)
3	0.1 (20 μL)	0.5 (100 μL)
4	0.1 (20 μL)	1.0 (200 μL)
5	0.5 (100 μL)	0.1 (20 μL)
6	0.5 (100 μL)	0.5 (100 μL)
7	0.5 (100 μL)	1.0 (200 μL)
8	1.0 (200 μL)	0.1 (20 μL)
9	1.0 (200 μL)	0.5 (100 μL)
10	1.0 (200 μL)	1.0 (200 μL)

*ただし添加する各ホルモン濃度は 100ppm

⑤ MS 培地への酸化防止剤の添加

MS 培地の温度が 50°C程度まで下がったら、各フラスコに 1M アスコルビン酸水溶液を 0.2mL 加える。

⑥ MS 培地プレートの作成

クリーンベンチ内で各シャーレの高さ半分程度の高さまで培地を注ぐ(条件ごとにプレート2枚)。固化するまでしばらく放置し、水蒸気を取り除く。

⑦ 人参カット処理

人参をよく水洗してから、15mm 程度の厚みで輪切りにする。

⑧ 洗剤による人参の洗浄処理

台所用中性洗剤液(メーカー仕様に従い水で希釈したもの)に、輪切りにした人参を浸漬し、

蒸留水で3回洗浄する。

⑨ エタノールによる人参の殺菌処理

人参を70%エタノールに約5分間浸漬し、容器ごとクリーンベンチ内に入れる。人参とエタノールの体積比は1:3とする。

⑩ 滅菌水による洗浄処理

滅菌済みビーカーに滅菌水をいれ、人参を漬け置き洗いする。

⑪ 次亜塩素酸処理

人参を1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に20分間浸漬する（この間に溶液を一回交換する）。人参と次亜塩素酸の体積比は1:3とする。

⑫ 滅菌水による洗浄処理

人参の表面が薄く白くなったことが確認できたら、滅菌水で3回洗浄する。

⑬ 人参のMSプレート上への植え付け

人参を火炎滅菌したピンセットを用いて滅菌シャーレ上におく。火炎滅菌したメスを用いて、人参の白くなった部分を取り除き（厚さが5~8mm程度になる）、火炎滅菌したコルクボーラー（5mm i.d.）を用いて、形成層の部分にあて、円柱形状の人参（5mm i.d.×5mm H.）を必要数くり抜く。プレート1枚あたり5個ずつ等間隔になるようMS培地表面に人参を軽く置床する。

⑭ 経過観察

プレートを25℃に設定したインキュベーター中に置き暗所で培養する。3~4週間ほど観察を定期的に続ける。同じ条件ごとにカルス化した人参の個数をカウントする（2枚の合計数で最大10個）。

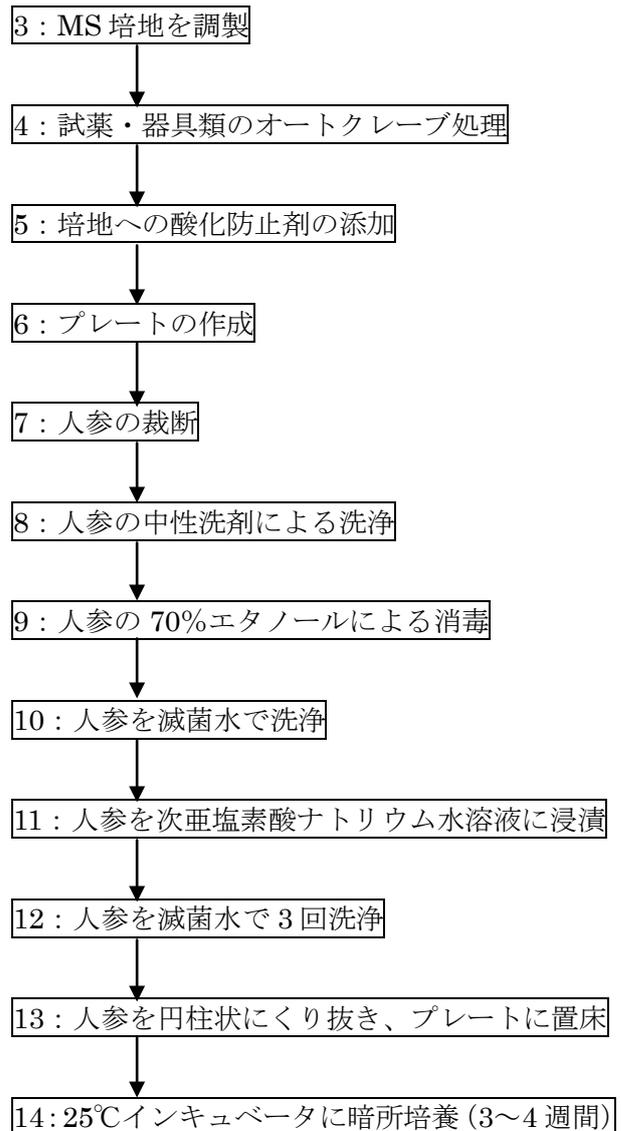
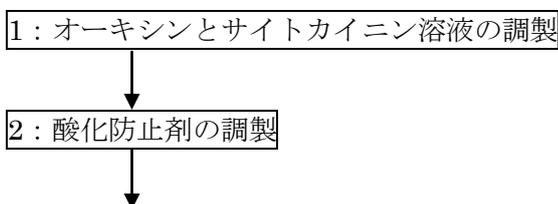


図4 植物カルス作成操作の流れ

4. 結果と考察

図5は、本実験プロトコルに従って本校物質工学科5年生生物工学コース学生が誘導したカルスの実例であり、図6はホルモン濃度比がカルス化に及ぼす影響を検討した結果である。ただし、実験の繰り返し再現性は検討していないので結果はあくまで一例である。

ところで、本実験を生物工学実験テーマとして導入した初年度は、カルス化の成功率は2割程度と極めて低かった（図7:カルス化する前に

細菌やカビによるコンタミネーションを起こしてしまい観察が継続できなくなる)。そこで、研究室配属の学生に卒業研究のサブテーマとして一年間コンタミネーション対策を検討させた。

その結果、最大のコンタミネーションの要因は⑨のアルコール処理と、⑪の次亜塩素酸処理工程にあることが判明した。両浸漬工程での人参の体積に対する各殺菌液の体積が少なくとも3倍以上にしないと殺菌効果が著しく減少するということが判明した。



図5 人参カルス化成功事例

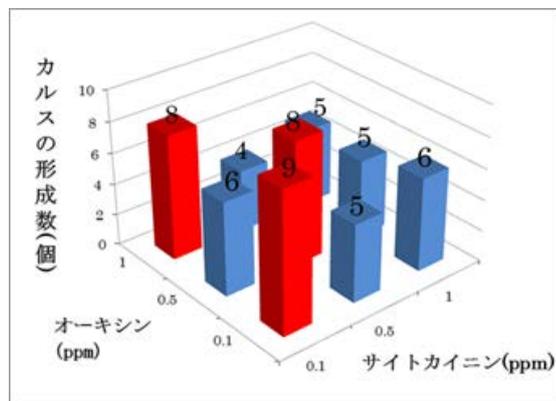


図6 ホルモン濃度比がカルス形成に及ぼす効果 (本データはあくまで一例として掲載)



図7 人参の周囲に様々な雑菌が発生した事例

5. 結論

カルス誘導化実験は植物バイオテクノロジーの初歩実験として紹介されているが、気軽にどこでも誰にでもできるというものではない。培養の期間が長期間(約1か月)に及ぶため、実験を成功させるためには殺菌と無菌操作を徹底しなければならない。

学生はこのカルス実験を通して、植物ホルモンの効果に対する理解に加え、微生物実験における滅菌・無菌操作の重要性を理解し、操作が習得できたかは実験そのものの成否によって知るができる。

参考文献

- [1] 日本生物工学会編, 生物学実験書 改訂版, 培風館, pp.216-222
- [2] 小柴共一, 神谷勇治編, 新しい植物ホルモンの科学 第2版, 講談社
- [3] 西谷和彦著, 新・生命科学シリーズ 植物の成長, 裳華房, p.117