

植物培養細胞技術ノート

目次

1.	植物培養細胞の到着直後の取り扱いについて（テクニカルサポート No. 14）	2
2.	植物培養細胞の取扱いについて（テクニカルサポート No. 5）	3
3.	植物培養細胞の維持について（テクニカルサポート No. 6）	4
4.	植物培養細胞の増殖を調べる方法（テクニカルサポート No. 17）	5
5.	シロイヌナズ T87 培養細胞の形質転換法について（テクニカルサポート No. 16）	6
6.	シロイヌナズナ T87 培養細胞の一過性発現実験（テクニカルサポート No. 19）	7
7.	再分化能を持つ植物培養細胞について（テクニカルサポート No. 22）	8
8.	植物培養細胞でよく受ける質問について（テクニカルサポート No. 7）	9

1. 植物培養細胞の到着直後の取り扱いについて（テクニカルサポート No. 14）

植物培養細胞はチューブまたはシャーレに入れて宅急便でお送りします。到着後、速やかに新鮮な培地に植え継ぐことを推奨しています。その際の注意点について説明します。

1. 到着時に培養細胞が死んでいては増殖しません。その細胞の状態は肉眼ではわかりません。顕微鏡で観察し確認しておくとう安心です。
2. 懸濁培養細胞の増殖は細胞密度に依存することが知られており、移植時の細胞量が著しく少ないと増殖しにくくなります。培養細胞は輸送中にダメージを受けていると思われるので、到着直後の植え継ぎでは通常よりも多くの細胞を移植したほうがいいかもしれません。その次の植え継ぎも増殖の様子を見ながら行ってください。
3. 培養細胞を入れたチューブやシャーレはプラスチックバックに入れて密封し、微生物によるコンタミネーションが起これないよう配慮しています。継代時にも、チューブやシャーレをクリーンベンチに入れる前に 70% エタノールでよく拭く、ピペットやピンセットの先端を容器の縁に触れないようにするなど注意してください。

問題が起こった場合や判断に困った場合には、plant.brc@riken.jp までご相談ください。今後、当室では植物培養細胞に関するデータを蓄積するとともに公開情報を充実させていく予定です。

平成 26 年 10 月号（2014.10.24）

2. 植物培養細胞の取扱いについて（テクニカルサポート No. 5）

今月より植物培養細胞のプロトコルシリーズを開始します。初回は細胞株を入手する際に気を付けていただくポイントについて説明します。

1. 懸濁培養細胞株の場合、細胞懸濁液 25 mL 程度をコニカルチューブに入れてお送りします。懸濁培養細胞株を受け取ったら速やかに新鮮な培地に植え継いで振盪培養を開始してください。放置すると、酸素不足により増殖能力を失ってしまいます。なお、シロイヌナズナ T87 懸濁培養細胞株用に、初回の継代に用いる JPL 培地を有償（¥1,000）で提供しています。ぜひ、ご利用ください。
2. 静置培養細胞株の場合、カルスを寒天培地（プレート）に移植してお送りします。細胞の褐変や培地の乾燥がおきる前に、新鮮な培地に移植してください。
3. 培養細胞は宅急便（常温）でお送りします。到着後も冷蔵庫や冷凍庫で絶対に保管しないでください。最悪の場合、細胞が死滅します。また、通常暗所で培養している細胞株を明所に放置すると、増殖に影響が出ることがありますので、ご注意ください。
4. 取扱いの詳細については発送時に同梱する技術資料を参照してください。技術資料は下記の URL からご覧いただけます。

https://plant.rtc.riken.jp/resource/cell_line/web_documents/index.html

平成 25 年 9 月号（2013.9.27）

3. 植物培養細胞の維持について（テクニカルサポート No. 6）

植物培養細胞のプロトコルシリーズ第2回は、入手した細胞株の培養中に気を付けていただくポイントについて説明します。

1. 植物培養細胞はたいへんデリケートなリソースです。培地へ移植する際のストレスなどにより急に変色して増殖が停止し、最悪の場合には死滅することもあります。また移植する細胞量が不足しても、増殖速度は著しく低下します。新鮮培地に移植した後は増殖や色などに異常がないか、継続して観察してください。
2. カルスが褐変した場合、部分的であれば、変色していない部分を直ちに移植することによりレスキューできる可能性があります。懸濁培養細胞の増殖が悪くなった場合には、細胞密度が高まるまで植え継ぎの時期をずらすことも検討してください。
3. 万が一増殖が著しく悪くなったり細胞の褐変がおきたりした時には、回復が困難な場合がほとんどです。株分けした複数の系統を作成し、時期をずらしつつ別の場所で培養すれば全滅を防ぐことができますが、コストと時間がかかり実行は難しいと思います。そこで、問題がおきた場合には再分譲の請求をお薦めします。当室のスタッフは年間を通して細胞株の安定した維持に努めています。
4. 判断に困った場合には、お気軽に当室までご相談ください。その際、培養物全体の写真や細胞の顕微鏡写真を送っていただけますと、状況の把握に役立ちますのでよろしくお願い致します。

平成 25 年 10 月号 (2013.10.25)

4. 植物培養細胞の増殖を調べる方法（テクニカルサポート No. 17）

植物培養細胞は延々と増殖し続けています。この性質があるため、常に実験に使用することができます。それだけでなく、細胞増殖は培養細胞の状態のバロメーターにもなります。健康に維持されている培養細胞は安定して増えているはずですが、その増殖量はフラスコやシャーレを眺めていても、なかなかわかりにくいと思います。

カルス培養、懸濁培養ともに継代直後に写真を撮影しておけば、培養期間中に増殖したかどうかわかりやすくなります。定期的に撮影すれば、より比較しやすくなるでしょう。

懸濁培養では、細胞増殖の簡便な指標に静置細胞量（settled cell volume）と圧縮細胞量（packed cell volume）があります。どちらも、まず培養物をよく攪拌し、一部を目盛りのついた遠心管にサンプリングします。静置細胞量は一定の時間静置した後に、圧縮細胞量は一定の条件で遠心した後に、沈殿した細胞の体積を測定します。ただし、培養細胞が生きているかどうかを判定するには、顕微鏡観察が必要です。その他の細胞増殖の測定方法は総説を参考にしてください。

Mustafa *et al.* (2011) Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. Nature Protocols 6: 715–42. DOI: [10.1038/nprot.2010.144](https://doi.org/10.1038/nprot.2010.144)

平成 27 年 9 月号 (2015.9.28)

5. シロイヌナズ T87 培養細胞の形質転換法について (テクニカルサポート No. 16)

培養細胞を用いる際の大きな利点は、細胞の均一性です。植物においては、葉や根などの組織が存在しています。葉だけに着目しても、さらに細かく細胞の種類が分化しています。一方で培養細胞の場合、本質的に細胞特性は均一性が極めて高く、生化学的な解析などに最適といえます。シロイヌナズ T87 細胞は、Axelos (参考文献 [1]) らによって 1992 年に樹立が報告されて以来、多くの研究に用いられてきました。プロトプラストを用いた一過性の発現実験や、アグロバクテリウムを用いた形質転換実験にも適しており、シロイヌナズナ研究の脇役から主役をもこなす、なくてはならない存在となっています。

2014 年も残りわずかとなってきましたが、今年も T87 細胞への遺伝子導入実験を用いた優れた研究が Science 誌、PNAS 誌、Plant Cell 誌などに報告されています。当室のホームページのラボマニュアル欄には、植物培養細胞 (T87 細胞) の形質転換技術についてのプロトコルを掲載しております。是非、ご参考にされると共に、これまで T87 細胞をご使用にならなかったことのない方も、新たに実験系の導入をご検討されてみませんか？

https://plant.rtc.riken.jp/resource/cell_line/cell_line_detail.html?brcno=rpc00008

http://epd.brc.riken.jp/ja/wp-content/uploads/plant_cell_lines/transformation_protocol.pdf

当室ではアグロバクテリウムを用いた T87 細胞の形質転換に関する技術研修を行ってきました。今年度は新たに、プロトプラストを用いた一過性の発現実験についての技術研修を実施しました。T87 細胞への遺伝子導入に関するご質問、また、技術研修内容などに関するご要望などありましたら、plant.brc@riken.jp まで、お気軽にご問い合わせ下さい。

参考文献

- [1] Axelos M *et al.* (1992) A protocol for transient gene expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolated from cell suspension cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* 30: 123–128

平成 26 年 12 月号 (2014.12.24)

6. シロイヌナズナ T87 培養細胞の一過性発現実験 (テクニカルサポート No. 19)

解析技術の発達に従い、解析に使用するサンプルの重要性が、これまでもまして高まってきています。例えば組織を細かく分けて解析を行い、従来は分からなかった植物組織における生理反応の多様性などが報告されています。培養細胞は均一な細胞集団であることから、植物研究においてもその重要性が再認識され始めています。シロイヌナズナの T87 細胞においても、細胞特性である均一性を活かした生化学的な解析などが多く報告されています。当室ではアグロバクテリウムを用いた T87 細胞の形質転換に関する技術研修を行ってきましたが、昨年度より新たにプロトプラストを用いた一過性の発現実験についての技術研修を実施しています。

プロトプラストを用いた研究の第一人者である Jen Sheen 博士らが 2007 年に報告した葉肉プロトプラスト用のプロトコルは非常に優れており、世界的に高い評価を受けています (参考文献)。

特に酵素液の調製法において、55°C 処理を行い余計な酵素活性を低下させる一方、細胞壁分解活性は向上させるなど、一般的にはあまり知られていないポイントが記されており、「なるほど」と思わせてくれます。この手法は特に T87 細胞と相性が良く、一度に多くのサンプルをこなすことが可能です。プロトプラストを用いた解析では、健全な材料からプロトプラストを調製することが 1 番のポイントと考えられますが、培養細胞はこのような材料の安定供給にも優れているといえます。プロトプラストを用いた実験は、一見、「しきいの高い」研究手法と思われるがちですが、一旦、技術を習得すると、非常に便利で効率的なツールとなります。これまで T87 細胞をご使用になったことのない方も、是非新たな実験系の導入を検討されてみませんか？

- 参考文献

Yoo S-D *et al.* (2007) Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols* 2: 1565–1572. DOI: [10.1038/nprot.2007.199](https://doi.org/10.1038/nprot.2007.199)

- シロイヌナズナ T87 細胞株 (rpc00008) :

https://plant.rtc.riken.jp/resource/cell_line/cell_line_detail.html?brano=rpc00008

- 技術研修資料 (アグロバクテリウムを用いた T87 細胞の形質転換) :

http://epd.brc.riken.jp/ja/wp-content/uploads/plant_cell_lines/transformation_protocol.pdf

- 技術研修 (平成 27 年度は終了しましたがニーズがあれば 28 年度も開催致します) :

http://ja.brc.riken.jp/consulting/kensyu_plant20.shtml

平成 27 年 11 月号 (2015.11.25)

7. 再分化能を持つ植物培養細胞について（テクニカルサポート No. 22）

添加した培地上で適切な植物組織を培養すると脱分化した培養細胞になり、さらに植物ホルモンの濃度を調整すると植物個体や器官を再生します。しかし、再分化能はずっと維持されるわけではありません。培養期間が長くなるにつれて、失われていきます。実験植物開発室が提供する細胞株のうち、ニンジンの kurodagosun 株（rpc00002）とミナトカモジグサの embryogenic callus（rpc10001）は再分化能を持つ培養細胞です。この二つの株は、再分化能の高い培養細胞を提供するため一定期間ごとに新しく誘導しております。植物個体を再分化させる場合には、ニンジンは提供後半年、ミナトカモジグサは一ヶ月以内程度で使うことを勧めています。

再分化能の高い培養細胞を作るためには、培養に適した良い材料を選ぶことが大切です。ミナトカモジグサの場合は小さい未熟胚を使いますので、材料の準備がとても大変です。実験植物開発室が提供する embryogenic callus を使えば、準備にかかる手間や時間を省いてすぐに実験することができます。熟練した専門の技術員が作るミナトカモジグサの embryogenic callus が研究のお役にたつことを願っております。

ちなみに、ニンジンとミナトカモジグサ以外の細胞株は再分化能を失った培養細胞です。植物ホルモンの濃度を変えても再分化することはありません。培養細胞を一層活用するために、動物の iPS 細胞のように遺伝子を制御して分化全能性をよみがえらせる技術の開発が期待されます。

平成 28 年 12 月号（2016.12.21）

8. 植物培養細胞でよく受ける質問について（テクニカルサポート No. 7）

植物培養細胞のプロトコルシリーズ第3回は、これまでにユーザーの皆様から受けた代表的な質問について紹介します。

Q1. シロイヌナズナ T87 細胞を MS 培地で維持することは可能ですか？

A1. 可能ですが性質が変わる恐れがあります。

開発者が報告した細胞株の性質を可能な限り守るため、バイオリソースセンターでは開発者らの論文で報告された培地を使用して維持を続けています。

Q2. 培養細胞をクール宅急便で送ってもらえますか？

A2. 大部分の植物培養細胞は低温に弱く、最悪の場合褐変して死滅します。

万が一冷凍庫に入れた場合には、細胞が完全に破壊されて再生不可能になります。このため、バイオリソースセンターでは常温で細胞株を発送しています。なお、同理由で到着した細胞株を冷蔵庫等で一時保存することも避けてください。

Q3. 植物培養細胞を液体窒素下で保存できないのでしょうか？

A3. 植物細胞は動物細胞と比較して含水量が多く、凍結耐性が低いとされています。

冬芽や培養茎頂などを液体窒素条件下で保存する技術が開発されていますが、含量が特に多い培養細胞の超低温保存は難しく、プログラムフリーザーなどの特殊な機器が必要とされていました。バイオリソースセンターでは 2005 年にタバコ BY-2 細胞を液体窒素条件下で保存する簡便な方法を開発し、技術研修を開催するとともにプロトコルを公開して普及を図っています。ご関心のある方は以下のリンクでご確認ください。

http://epd.brc.riken.jp/ja/wp-content/uploads/plant_cell_lines/cryopreservation_protocol.pdf

平成 25 年 11 月号 (2013.11.21)

2018年5月18日作成

2018年8月21日改訂：リンク先のアドレスを更新

2022年8月1日改訂：E-mail アドレスを更新（旧：plant@brc.riken.jp、新：plant.brc@riken.jp）

国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センター実験植物開発室

〒305-0074 茨城県つくば市高野台 3-1-1

FAX: 029 836 9053

E-mail: plant.brc@riken.jp

<http://epd.brc.riken.jp/ja/>