

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB	絶滅危惧植物の万能細胞バンク創設に関わる基盤研究～体細胞クローン技術開発～				
研究テーマ (欧文) AZ	Fundamental studies on creating of stem cell bank of endangered plant species: development of technology necessary to somatic cell cloning				
研究氏 代表名 者	カカナ CC	姓) わたなべ	名) まさみ	研究期間 B	2012～ 2013年
	漢字 CB	渡辺	正巳	報告年度 YR	2013年
	ローマ字 CZ	Watanabe	Masami	研究機関名	千葉大学大学院
研究代表者 CD 所属機関・職名	渡辺正巳 千葉大学大学院 園芸学研究科 准教授				
概要 EA (600字～800字程度にまとめてください。)	<p>本研究は、植物の多様性を保全するために、絶滅危惧植物の体細胞から万能細胞を作成し、万能細胞バンクの設立を目指す。植物の体細胞は動物細胞とは異なり分化全能性があり、個体再生能力があるが、多くの植物では葉から単細胞(プロトプラスト)を単離すると、単離および培養過程で、プログラム細胞死が起こる。本研究は、万能細胞バンク設立のための最初の段階として、プロトプラストのプログラム細胞死を回避する方法を考案することである。</p> <p>プロトプラストを単離する過程で、活性酸素(ROS)および一酸化窒素(NO)が発生し、プロトプラストのプログラム細胞死が誘導されることが示唆されている。そこで、ROS/NOの発生を抑制するために、ROS/NO消去剤の種類と濃度がプロトプラスト収率に及ぼす効果を検討した。その結果、1mM還元型グルタチオンまたは10μM phenylene-1,3-bis(ethane-2-isothiourea) dihydrobromide (PBIT)を酵素液に添加することで、プロトプラスト収率が改善された。収率が良くなることは、プロトプラスト単離時のプログラム細胞死が抑制されていることを示す。そこで、さらにプロトプラスト収率を改善するために、プロトプラストを単離する葉にあらかじめ試薬を吸水処理し、プロトプラストを単離した。その結果、タンパク質合成阻害剤のサイクロヘキシミド(CHX)を0.1μM吸水させる処理が、最も効果的であった。前処理として、0.1μM CHX, 酵素液に1mM還元型グルタチオンおよび10μM PBITを添加し、プロトプラストを単離した。その結果、細胞死するプロトプラストを、2～3割抑制できた。</p> <p>プロトプラスト単離時のROS、NOの発生をフローサイトメーターで測定し、ROS消去剤およびNO生合成・消去剤のそれぞれの消去効果を比較検討した。その結果、プロトプラスト収率が最大となる試薬の濃度とは必ずしも一致しなかった。したがって、プロトプラスト単離時のプログラム細胞死を完全に回避し、万能細胞を作成するためには、プロトプラスト収率の最大化とROS/NO発生を最小化する試薬の選択と濃度のさらなる検討が必要である。</p>				
キーワード FA	万能細胞バンク	プロトプラスト	プログラム細胞死		

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要^{EZ}

The final objective of this research is to construct stem cell banks of endangered plant species. The first step to achieve this final goal is to develop methods for isolation of viable protoplasts. Protoplasts are cell wall-removed cells and subjected to many stresses during protoplast isolation. Reactive oxygen species (ROS) and nitric oxides (NO) are generated during protoplast isolation procedures. These radical substances induce program cell death. In order to scavenge the radicals, radical scavengers were added to the protoplast isolation medium, then number of protoplasts were counted. The protoplast yield was compared between scavenger-untreated protoplasts and scavenger-treated. 1 mM GSH and 10 μM PBIT were effective for ROS and NO scavengers, respectively. Increase in the protoplast yield indicates evasion of program cell death during protoplast isolation. Further, absorption of 0.1 μM cycloheximide (CHX), a protein synthesis inhibitor before protoplast isolation also increased the protoplast yield. The combination of CHX absorption before the isolation and addition of GSH and PBIT into protoplast isolation medium improved the protoplast yield by 20 to 30%.

Flow cytometry was used to measure ROS and NO in protoplast cells. The optimum concentrations of scavengers and CHX for scavenging ROS/NO were not identical to those for producing the highest yield. These results indicated that choice of the optimum radical scavengers and concentrations were necessary to avoid the programmed cell death during protoplast isolation and obtain stem cells.