

# 野菜類遺伝資源凍結保存の基礎としての糖外与 による組織・細胞耐凍性の向上に関する研究

## 学位論文内容の要旨

野菜遺伝資源の長期保存を目的として、野菜組織・細胞の超低温保存が行われるが、本研究は、その技術の重要な構成要素の一つである凍結前糖外与処理の効果について、組織・細胞の生理・形態的变化に着目して検討したもので、内容は次のように要約される。

### 1. 数種野菜組織における糖外与処理と生存性および耐凍性の変化

キャベツ (*Brassica oleracea* L.) (品種・アーリーボール) の葉柄組織、アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) (品種・メリーワシントン500W) の若茎頭部小側枝茎頂およびタマネギ (*Allium cepa* L.) (品種・札幌黄) の鱗葉組織などは、糖外与処理を行わない場合、いずれも $LT_{50} = -3^{\circ}\text{C}$ 前後の耐凍性を示した (アスパラガス茎頂の頂端分裂組織では、 $-5^{\circ}\text{C} > LT_{50} > -7.5^{\circ}\text{C}$ )。しかし、0.8Mソルビトール溶液浸漬による糖外与処理開始直後から、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス茎頂の頂端分裂組織の耐凍性は急激に増大し、その最大耐凍性はキャベツ葉柄組織では $LT_{50} = -13^{\circ}\text{C}$ となり、アスパラガス茎頂の頂端分裂組織では $LT_{50} = -30^{\circ}\text{C}$ に達した。タマネギ鱗葉組織では、耐凍性はほとんど変化しなかったが、糖外与処理およびその後の復水処理が、組織生存率を急激に低下させたことから、組織自体が脱水および浸透価の変化に対して弱いことが理由の一つと考えられる。

### 2. 数種野菜組織における糖外与処理と組織内への糖の取込みおよび耐凍性の変化

キャベツ (品種・アーリーボール) の葉柄組織およびアスパラガス (品種・メリーワシントン500W) の若茎頭部小側枝茎頂を用い、0.8Mソルビトール溶液浸漬による糖外与処理を行った場合の細胞質への糖の取込みについて、lucifer yellow carbohydrazide (LYCH) をトレーサーとして共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、糖外与処理開始数分後から、細胞の原形質分離およびfluid-phase endocytosisによる小胞形成が観察されるとともに、小胞内への糖の取込みが確認された。

つぎに、糖の取込み様式と凍害防御効果の発現との関連について検討したところ、(1) fluid-phase endocytosisによって生じた小胞は原形質分離復帰後でも細胞質内に残存し、凍結・融解後には、組織生存率が向上しているにもかかわらず小胞は消失しなかったことから、fluid-phase endocytosisによって取り込まれた糖は、凍害防御効果の発現にほとんど関与していないこと、(2) 糖輸送阻害剤p-chloromercuribenzenesulfonic acid (PCMBs) で処理すると、糖外与処理による組織内糖含量の増加および耐凍性の増大が抑制されたこと、ならびに、この場合にもfluid-phase endocytosisによる糖の取込みは起きていることなどの事実が確認されたことにより、糖の取込みには、少なくとも2種の様式があり、このうち、糖輸送体による取込みが凍害防御効果の発現に関与しているものと推測される。

### 3. 糖外与野菜組織における糖含量および耐凍性の変動と細胞構造の変化

キャベツ（品種・ゴールドサワー）の葉肉組織に対して1.0Mグルコース溶液浸漬による10分間から3時間の糖外与処理を行うと、最大の凍害防御効果を示したが、この場合、10分間処理したものの耐凍性および組織内グルコース含量は、水洗により減少し、3時間処理したものでは水洗後もほとんど低下しなかった。このことから、短時間（10分間）糖外与処理による耐凍性増大効果が、細胞質中に取り込まれていない細胞外の糖（細胞間中層ならびに細胞壁と細胞膜の間に存在する糖）の効果であることが明らかになった。

キャベツ葉肉組織の凍結挙動をCryo-SEMを用いて調べたところ、糖外与処理を行ってない試料の細胞は、凍結により著しく収縮し、変形した細胞壁間で原形質膜同士が密着していたが、短時間糖外与処理を行った試料では、細胞壁と原形質膜の間に糖溶液が存在し、原形質膜同士が密着している箇所はみられなかった。この細胞の原形質膜破断面をフリーズ・フラクチャー・レプリカ法により観察したところ、生体膜同士の異常接近に起因するaparticulate domains (ADs)およびそれに伴うfracture-jump lesions (FJLs)などの構造変化が、未処理試料ならびに糖外与処理後に水洗した試料に比べて抑制されたことから、短時間糖外与処理による耐凍性増大効果の発現は、原形質分離が、凍結時に細胞壁が原形質膜を押圧することを緩和し、生体膜同士の異常接近の機会を減少させ、凍結傷害の発生を抑制することに起因すると考えられる。

### 4. 野菜茎頂の凍結前糖外与処理（糖前培養）と含水率、糖含量および耐凍性の変動ならびに細胞内小器官および原形質膜超微細構造の変化

アスパラガス（品種・メリーワシントン500W）の若茎頭部小側枝茎頂は、0.5Mグルコース添加培地を用いた2日間の培養による糖外与処理を行うと、緩速予備凍結法による凍結保存が可能になった。この場合における含水率、可溶性糖含量、デンプン含量、細胞内微細構造および耐凍性に及ぼす糖外与処理の影響について調べたところ、含水率の低下、可溶性糖含量およびデンプン含量の増加、数種の細胞内小器官の増加が認められるとともに耐凍性が著しく増加したことから、糖外与処理に伴う浸透価の上昇（含水率の低下および糖含量の増加）および細胞内小器官の変化が耐凍性増大に関与していると推測される。

糖外与処理後に凍結したアスパラガス茎頂の頂端分裂組織細胞における原形質膜破断面をフリーズ・フラクチャー・レプリカ法により観察したところ、凍結に伴うADsおよびFJLsなどの構造変化が抑制されていたことから、この糖外与処理の凍害防御効果の発現は、細胞質内に取り込まれた糖が生体膜間のスペーサーとして働き、凍結時における原形質膜同士の異常接近を回避させ、凍結傷害を抑制することに起因すると考えられる。

### 5. 培養細胞に対する糖外与処理または低温処理と耐凍性・糖含量およびタンパク質の変化

アスパラガス（品種・メリーワシントン500W）由来のembryogenic callusに対して0.8Mスクロース添加培地を用いた培養による糖外与処理を行い、耐凍性の変化について調べたところ、耐凍性は、糖外与処理開始2日後から8日後まで最大（ $LT_{50}=-23^{\circ}\text{C}$ 前後）となったのち低下することが明らかになった。アスパラガスembryogenic callus内の可溶性糖含量は、糖外与処理開始1日後から2週間後まで高い値を維持することが明らかになり、組織内糖含量と耐凍性との間に密接な関連のあることがわかった。

また、糖外与処理は、アスパラガスembryogenic callus内のタンパク質含量、特に、可溶性タンパク質含量を増加させることが明らかになった。7種の可溶性タンパク質が糖外与処理中に増加し、そのうちの4種の熱安定性タンパク質については、LEAタンパク質（植物の耐凍性獲得に関与すると考えられる）の一つであるdehydrinに対する抗体と反応したことから、この糖外与処理の耐凍性増大効果には、細胞質に取り込まれた糖の効果に加え、浸透圧ストレ

スによって誘導されたタンパク質の補助的な効果があるものと推測される。

以上のように、野菜組織・細胞に糖外与処理を行った場合の凍害防御効果としては、従来考えられていた細胞質に取り込まれた糖による直接的な効果のほかに、高浸透価によって誘起される原形質分離による効果、ならびに浸透圧ストレスによって誘導されるタンパク質による補助的効果が考えられ、これらが複合的に試料の耐凍性を高めるものと考えられる。

本研究において明らかになった事象および得られた知見は、野菜遺伝資源の凍結保存技術を確立し発展させるための基礎として、重要な役割を果たすものと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 原 田 隆  
副 査 教 授 千 葉 誠 哉  
副 査 助 教 授 藤 川 清 三

学 位 論 文 題 名

## 野菜類遺伝資源凍結保存の基礎としての糖外与 による組織・細胞耐凍性の向上に関する研究

本論文は、緒論、本章6章、摘要、引用文献133、図67を含む177頁の和文論文で、別に参考論文4編が添えられている。

野菜類の組織・細胞を凍結保存し、必要に応じて融解し培養することにより植物体を再生させる方法は、野菜類遺伝資源の長期・安定的保存に有効である。この場合、凍結前の保存用試料に糖外与処理を行うことにより、耐凍性が高くなり、凍害防御効果により凍結傷害が軽減される場合があるが、この糖外与処理による凍害防御効果の詳細については未だ明らかになっていない。

本研究は、野菜類遺伝資源の保存を目的とする組織・細胞の凍結保存技術の効率と安定性を向上させるため、その技術の重要な構成要素の一つである凍結前における糖外与処理の条件と効果について検討したもので、内容は以下のように要約される。

### (1) 数種野菜組織における糖外与処理と生存性および耐凍性の変化

高濃度 (0.8M) ソルビトール溶液による糖外与処理 (3~10時間) を行った場合、組織の耐凍性 (LT<sub>50</sub>) が向上したのは、キャベツ (*Brassica oleracea* L.) 葉柄組織 (-3℃→-13℃) およびアスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 若茎頭部小側枝茎頂 (-3℃→-30℃) で、より低い温度での凍結にも耐えられるようになったが、タマネギ (*Allium cepa* L.) 鱗葉組織では-3℃からほとんど変化しなかった。このように糖外与処理効果は、野菜の種類または組織の種類によって異なることがわかった。

### (2) 数種野菜組織における糖外与処理と組織内への糖の取込みおよび耐凍性の変化

糖外与処理による耐凍性向上効果の認められたキャベツ葉柄組織およびアスパラガス若茎頭部小側枝茎頂を用いて、高濃度 (0.8M) ソルビトール溶液による糖外与処理 (1時間) を行い、糖の取込み様式と凍害防御効果の発現との関連について検討した。その結果、少なくとも、2種の糖の取込み様式すなわちfluid-phase endocytosisによる取込み (原形質分離の際に原形質膜から生ずる小胞内に取り込む) と糖輸送体による取込

みとがあり、このうちの糖輸送体によって取り込まれた糖が凍害防御効果の発現に関与していることが示唆された。

### (3) 糖外与野菜組織における糖含量および耐凍性の変動と細胞構造の変化

キャベツの葉肉組織に対して高濃度 (1.0M) グルコース溶液による糖外与処理を行う場合、10分間～3時間で凍害防御効果が現れるが、この効果は、長時間処理の場合には、細胞質内に取り込まれた糖によるものであり、短時間処理の場合には、細胞間中層または細胞壁・原形質膜間の空隙 (原形質分離による) に存在する糖によることが明らかになった。

つぎに、細胞構造について調べたところ、無処理組織の細胞では、凍結過程で生じた細胞外氷晶により細胞壁が押圧され、それに伴って原形質膜同士が異常に接近したことにより凍結傷害が生じたのに対し、短時間処理組織の細胞では、原形質分離が起こり、このような傷害の発生を防止していることがわかった。

### (4) 野菜茎頂の凍結前糖外与処理 (糖前培養) と含水率、糖含量および耐凍性の変動ならびに細胞内小器官および原形質膜超微細構造の変化

高濃度 (0.5M) グルコースを含む寒天培地を用いた2日間の培養による糖外与処理を行うと、アスパラガス若茎頭部小側枝茎頂では、可溶性糖含量の増加および含水率の低下が認められ、浸透価が上昇した結果、耐凍性が増大し、凍結・融解後の組織生存率が向上することが明らかになった。

つぎに、この場合の頂端分裂組織の細胞原形質膜の破断面をフリーズ・フラクチャー・レプリカ法により観察し、異状が認められなかったことから、取り込まれた糖が生体膜間のスペーサーとして働き、原形質膜同士の異常接近を回避させ、凍結傷害を抑制することにより、凍害防御効果が発現することを示した。

### (5) 培養細胞に対する糖外与処理または低温処理と耐凍性・糖含量およびタンパク質の変化

アスパラガス embryogenic callus に対して高濃度 (0.8M) スクロース添加培地を用いた培養による糖外与処理を行い、可溶性糖含量の増加と耐凍性の増大との関連について検討した結果、embryogenic callus においても、両者の間に密接な関連のあることが明らかになった。また、この場合、embryogenic callus 中では、糖含量および耐凍性の増減に対応して7種の可溶性タンパク質の含量が増減し、このうち4種の熱安定性タンパク質については、dehydrin (植物の耐凍性に関与するLEAタンパク質) に対する抗体と反応したことから、糖外与処理による耐凍性増大効果には、糖による直接的な効果に加えて、浸透圧ストレスによって誘導されたタンパク質による効果があるものと推測される。

以上のように、本研究は、これまで明らかにならなかった野菜類の組織・細胞における糖外与処理と、耐凍性向上および凍結傷害防止などの凍害防御効果との関連について検討したもので、明らかになった事象および得られた知見は、野菜類遺伝資源の凍結保存技術の改良に貢献するとともに耐凍性獲得機構の研究にも有効なものとして高

く評価される。

よって審査員一同は、実山 豊が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。