

数種園芸作物の培養体組織を用いた
凍結保存技術の開発ならびに凍結保存後の
再生植物体における成長促進現象の解析

学位論文内容の要旨

植物組織の超低温凍結保存は、植物遺伝資源の長期安定的な保存技術として最も有望な方法である。園芸作物の多くは栄養繁殖性であるため、栄養体組織の凍結保存技術を確立する意義は極めて大きい。本研究は、従来凍結保存が困難であった数種北方系果樹の培養体組織を材料に、近年開発された新しい凍結保存法を更に改良して、汎用性が高く実用化に耐え得る技術開発を行ったものである。また、従来の研究ではほとんど注目されることがなかった凍結保存後の再生植物体の成長量という視点から、アスパラガスおよびホースラディッシュ培養体組織を用いて 4 つの凍結保存法を比較し、それらの作用性の違いを明らかにするとともに、成長促進が起こる原因を組織細胞学および分子生物学的手法を用いて検証した結果について述べ、凍結保存技術が持つ新たな可能性について論じている。結果の概要は、以下のとおりである。

(1) 数種北方系果樹の培養体組織を用いた凍結保存技術の開発

果樹の組織培養では、コルヒチン処理や胚培養などによって得られた多種類の培養系統を維持するため、凍結保存技術の確立が求められている。本研究では、従来凍結保存が困難であった北方系果樹（アロニア、サンザシ、ハスカップ、クランベリーおよびブルーベリー）の培養体組織を材料として、近年報告されている新しい 3 種類の方法（ガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法）を用いて、凍結保存の可能性を検討した。まず、5 種類の植物材料を植物分類学的視点から比較すると以下ようになる。バラ科に属するアロニアおよびサンザシはともに、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法を用いた場合 62.5～77.8%の比較的高い生存率を示した。スイカズラ科に属するハスカップはビーズ乾燥法を用いて生存率 93.3%を示し、バラ科と同様に凍結保存が容易なグループであった。一方、ツツジ科に属するクランベリーおよびブルーベリーは、凍結法にかかわらず、いずれも最高値で 33.3%および 26.7%の低い生存率しか得られなかったことから、ツツジ科植物は一般に凍結保存が難しいグループであることがわかった。従って、同じ北方圏に生息する植物においても凍結保存の難易に差があり、植物分類学上の類縁関係は凍結保存の可否にも影響を及ぼすことが明らかになった。次に、3 種類の凍結保存法を比較したところ、安定して生存個体が得られたのは、ビーズ乾燥法であった。この場合、生存率に最も強く影響を及ぼす要因は、乾燥処理時間すなわち組織内の含水率であり、検討した全ての材料において含水率が 20%前後の時に生存率が最高となることがわかった。しかし、凍結保存しにくいクランベリーおよびブルーベリーはもとより、凍結保存が比較的容易なアロニアおよびサンザシについても、従来のビーズ乾燥法では実用的には不十分

な生存率しか得られなかったので、ビーズ乾燥法の改良によって生存率を高める必要があった。ビーズ乾燥法の改良を目指し、ビーズ原液およびローディング液に凍害防御物質としてグリセリンを添加するとともに、組織のストレス抵抗性を高めるためにサリチル酸を添加した結果、グリセリンまたはサリチル酸を単独で添加した場合に比べ、両試薬を併用添加（グリセリン 1.0M およびサリチル酸 0.05mM）することにより生存率が飛躍的に上昇することを見出した。この方法により、従来法では低い生存率しか得られなかったツツジ科のクランベリーおよびブルーベリー培養体組織においても、85%以上の高い生存率を得ることに成功したので、この方法を「改良ビーズ乾燥法 (Revised Encapsulation-Dehydration Method)」と名付け、優れた凍結保存法として多くの植物材料への幅広い適用を提案した。

(2) 凍結保存後の再生植物体における成長促進現象の解析

緩速予備凍結法で凍結保存したアスパラガス組織の再生植物体において確認された成長促進現象 (Suzuki et al., 1998) を詳細に検証した。まず、 -40°C まで冷却後、液体窒素 (-196°C) に浸漬せずに融解した材料にも成長促進が確認されたことから、成長促進を引き起こす原因は緩速予備凍結の過程にあることがわかった。また、凍結媒液の組成にも注目し、ラフィノースおよびトレハロースを用いて凍結したところ、ジメチルスルフォキシドを用いた場合と同様に成長促進が認められたことから、凍結媒液の組成と成長促進現象は直接関連しないことがわかった。次に、9 品種（雄株 4 品種 + 雌株 4 品種 + 超雄株 1 品種）のアスパラガスを用いて同様の実験を行ったところ、いずれの材料を用いた場合にも凍結保存後に顕著な成長促進が認められたことから、凍結保存後の成長促進はアスパラガスに共通してみられる現象であることが明らかになった。さらに、緩速予備凍結法、ガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法の 4 種類の凍結保存法を、アスパラガスおよびホースラディッシュの培養体組織を用いて再生植物体の成長という視点から比較した結果、いずれも緩速予備凍結法を用いて凍結保存した場合にのみ再生植物体の成長促進が見られ、その他の方法を用いた場合には成長促進現象は認められなかった。すなわち、緩速予備凍結法は、緩速冷却の手順そのものが一つの大きな特徴となり、他の方法とは異なる作用性を有していることが明らかになった。

緩速予備凍結法が再生植物体の成長促進を誘起する原因を探るため、緩速予備凍結法とその他の方法で凍結保存したアスパラガス組織を透過型電子顕微鏡を用いて経時的に観察した。生存細胞内の微細構造を詳細に観察した結果、緩速予備凍結区に特有の現象が複数確認された。すなわち、凍結・融解直後の細胞の原形質膜付近に多数の小胞が観察され、培養 3 日後には針状物質を内包する膜状構造物が確認された。さらに、培養 5~10 日後の細胞では小胞体が発達し、ミトコンドリア数は他の処理区の 2 倍以上になった。従って、緩速予備凍結区の生存細胞は凍結脱水・収縮の過程で細胞に特異的に生じた傷害が刺激となってミトコンドリア数を急速に増加させた結果、エネルギー生産が容易となり、その後の成長促進にプラスに作用した可能性が示唆された。緩速予備凍結区における代謝活性の変化は、遺伝子発現の面からも裏付けられた。すなわち、ホースラディッシュ組織の凍結保存後の遺伝子発現を、同じアブラナ科植物であるシロイヌナズナの DNA マイクロアレイを利用して検討したところ、成長促進を示した緩速予備凍結区の Upregulated gene の数は、成長促進を示さなかったガラス化区および対照区のそれと比較して明らかに高まっていた。その一方、それらの T/B 比 (処理区の発現強度/Blank の発現強度) は比較的小さいという特徴を有していた。次に、各処理区における遺伝子発現パターンの類似性を比較したところ、緩速予備凍結区が 3 処理区のうちで最も異なる遺伝子発現パターンを示すことがわかった。また、緩速予備凍結区で特異的に発現している遺伝子のうち、T/B 比が 3 倍以上の Upregulated gene 37 個に注目したところ、オーキシン関連遺伝子 2 個、ストレス関連遺伝子 4 個および生体防御関連遺伝子 2 個の存在が確認された。成長

促進現象はオーキシン関連遺伝子の顕著な発現と密接に関連することが予想された。また、ストレスおよび生体防御関連遺伝子が発現していた事実は、緩速予備凍結区の材料が凍結保存の過程においてより強度の傷害を受け、その状態からの回復を図るためにこれらの遺伝子を活発に発現していたことを示唆するものであった。

以上のように、本研究は、「改良ビーズ乾燥法」による果樹培養体組織の実用的な凍結保存技術の確立に成功する一方で、凍結保存後の細胞・組織の成長促進という視点では緩速予備凍結法が有効であることを明らかにした。この結果は、細胞・組織培養を利用した物質生産などに凍結保存技術を積極的に利用できる可能性を示しており、新たな研究に道を拓くものである。

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 鈴 木 卓
副 査 教 授 大 澤 勝 次
副 査 教 授 藤 川 清 三
副 査 教 授 三 上 哲 夫

学 位 論 文 題 名

数種園芸作物の培養体組織を用いた 凍結保存技術の開発ならびに凍結保存後の 再生植物体における成長促進現象の解析

本論文は3章からなり、図42、表4、引用文献97を含む、総頁数131の和文論文であり、他に参考論文2編が付されている。

植物組織の超低温凍結保存は、植物遺伝資源の長期安定的な保存技術として優れている。特に栄養繁殖性が多い果樹などの園芸作物では、栄養体組織の凍結保存技術を確立する意義は極めて大きい。本研究は、従来凍結保存が困難であった数種北方系果樹の培養体組織を材料に、近年開発された新しい凍結保存法を更に改良して、汎用性が高く実用に耐え得る技術開発を行った。

更に、これまで注目されることが少なかった「凍結保存後の再生植物体の成長が促進される現象」について、アスパラガスおよびホースラディッシュの培養体組織を用いて実証するとともに、その作用性の違いを明らかにし、成長促進が起こる原因を組織細胞学および分子生物学的手法を用いて解析した。結果の概要は、以下のとおりである。

(1) 数種北方系果樹の培養体組織を用いた凍結保存技術の開発

果樹の組織培養では、コルヒチン処理や胚培養などによって得られた貴重な培養系統を維持するためにも安定した凍結保存技術の確立が求められている。本研究では、北方系果樹5種（アロニア、サンザシ、ハスカップ、クランベリーおよびブルーベリー）を用い、比較的凍結保存が困難とされている培養体組織を材料として、近年開発された3種類の凍結保存方法（ガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法）を用いて安定した凍結保存技術を検討した。バラ科に属するアロニアおよびサンザシはともに、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法を用いた場合 62.5～77.8%の比較的高い生存率を示し、スイカズラ科に属するハスカップはビーズ乾燥法の生存率が 93.3%を示した。一方、ツツジ科に属するクランベリーおよびブルーベリーは、凍結法の如何にかかわらず、いずれも最高値で 33.3%および 26.7%の生存率で、凍結保存技術が難しいグループであることがわかった。

凍結保存方法を比較したところ、安定して生存個体が得られたのは、ビーズ乾燥法であった。この場合、生存率に最も強く影響を及ぼす要因は、乾燥処理時間すなわち組織内の含水率であり、全ての

材料において含水率 20%が凍結保存に優れていた。しかし、そもそも生存率が低いクランベリーおよびブルーベリーはもとより、比較的生存率の高いアロニアおよびサンザシについても、従来のビーズ乾燥法では不十分であり、生存率を安定して 90%近辺に高める技術開発が必要であった。そこで、ビーズ乾燥法の改良を目指し、ビーズ原液およびローディング液に凍害防御物質としてのグリセリンとともに、組織のストレス抵抗性を高める効果を期待してサリチル酸を添加した実験を行った。その結果、グリセリンまたはサリチル酸を単独で添加した場合に比べ、両者を併用添加（グリセリン 1.0M およびサリチル酸 0.05mM）することにより生存率が飛躍的に上昇することを見出した。この方法により、ツツジ科のクランベリーおよびブルーベリー培養体組織においても、85%以上の高い生存率を得ることに成功したので、この方法を「改良ビーズ乾燥法 (Revised Encapsulation-Dehydration Method)」と名付け、これまで困難であった植物材料への適用を提案した。

(2) 凍結保存後の再生植物体における成長促進現象の解析

緩速予備凍結法で凍結保存したアスパラガス組織の再生植物体において確認された成長促進現象 (Suzuki et al., 1998) を詳細に検証した。まず、 -40°C まで冷却後、液体窒素 (-196°C) に浸漬せずに融解した材料にも成長促進が確認されたことから、成長促進を引き起こす原因は緩速予備凍結の過程にあることがわかった。また、凍結媒液の組成にも注目し、ラフィノースおよびトレハロースを用いて凍結したところ、ジメチルスルフォキシドを用いた場合と同様に成長促進が認められたことから、凍結媒液の組成と成長促進現象は直接関連しないことがわかった。次に、9 品種（雄株 4 品種 + 雌株 4 品種 + 超雄株 1 品種）のアスパラガスを用いて同様の実験を行ったところ、いずれの材料を用いた場合にも凍結保存後に顕著な成長促進が認められたことから、凍結保存後の成長促進はアスパラガスに共通してみられる現象であることが明らかになった。さらに、緩速予備凍結法、ガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法の 4 種類の凍結保存法を、アスパラガスおよびホースラディッシュの培養体組織を用いて再生植物体の成長という視点から比較した結果、いずれも緩速予備凍結法を用いて凍結保存した場合にのみ再生植物体の成長促進が見られ、その他の方法を用いた場合には成長促進現象は認められなかった。すなわち、緩速予備凍結法は、緩速冷却の手順そのものが一つの大きな特徴となり、他の方法とは異なる作用性を有していることが明らかになった。

緩速予備凍結法が再生植物体の成長促進を誘起する原因を探るため、緩速予備凍結法とその他の方法で凍結保存したアスパラガス組織を透過型電子顕微鏡を用いて経時的に観察した。生存細胞内の微細構造を詳細に観察した結果、緩速予備凍結区に特有の現象が複数確認された。すなわち、凍結・融解直後の細胞の原形質膜付近に多数の小胞が観察され、培養 3 日後には針状物質を内包する膜状構造物が確認された。さらに、培養 5~10 日後の細胞では小胞体が発達し、ミトコンドリア数は他の処理区の 2 倍以上になった。従って、緩速予備凍結区の生存細胞は凍結脱水・収縮の過程で細胞に特異的に生じた傷害が刺激となってミトコンドリア数を急速に増加させた結果、エネルギー生産が容易となり、その後の成長促進にプラスに作用した可能性が示唆された。

緩速予備凍結区における代謝活性の変化は、遺伝子発現の面からも裏付けられた。すなわち、ホースラディッシュ組織の凍結保存後の遺伝子発現を、同じアブラナ科植物であるシロイヌナズナの DNA マイクロアレイを利用して検討したところ、成長促進を示した緩速予備凍結区の Upregulated gene の数は、成長促進を示さなかったガラス化区および対照区のそれと比較して明らかに高まっていた。その一方、それらの T/B 比（処理区の発現強度/Blank の発現強度）は比較的小さいという特徴を有していた。次に、各処理区における遺伝子発現パターンの類似性を比較したところ、緩速予備凍結区が 3 処理区のうちで最も異なる遺伝子発現パターンを示すことがわかった。また、緩速予備凍結区で特異的に発現している遺伝子のうち、T/B 比が 3 倍以上の Upregulated gene 37 個に注目したところ、

オーキシン関連遺伝子 2 個、ストレス関連遺伝子 4 個および生体防御関連遺伝子 2 個の存在が確認された。成長促進現象はオーキシン関連遺伝子の顕著な発現と密接に関連することが予想された。また、ストレスおよび生体防御関連遺伝子が発現していた事実は、緩速予備凍結区が凍結保存の過程においてより強度の傷害を受け、その状態からの回復を図るためにこれらの遺伝子を活発に発現していたことを示唆するものであった。

以上のように、本論文は、「改良ビーズ乾燥法」による果樹培養体組織の実用的な凍結保存技術の確立に成功するとともに、「凍結保存後の再生植物体の成長が促進される現象」に対して組織細胞学および分子生物学的解析を行い、多くの新知見を得た。その成果は学術的、応用的に高く評価される。よって、審査員一同は嘉見大助が博士（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。