

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05697

研究課題名(和文)植物遺伝資源と共生微生物の二員超低温保存法の開発

研究課題名(英文) Establishment of cryopreservation method for plant and microorganism using two members culture

研究代表者

田中 大介 (Tanaka, Daisuke)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・遺伝資源センター・上級研究員

研究者番号：60425593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生態系と持続的農業環境の保全には、植物と共生する微生物の存在が重要である。宿主植物と二員でなければ生存が難しい微生物の長期保存は非常に困難である。本研究課題では植物組織細胞に微生物を接種し、二員培養を元にガラス化処理する新規超低温保存法「二員ガラス化法」の開発に取り組んだ。卵菌類は、緩慢凍結保存が困難な微生物の一つとされる。本研究ではドロップ・ガラス化法を用いて100%近い生存率が得られる保存技術の確立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物と共生する微生物には、驚くべき機能が期待される。微生物遺伝資源の多様性は、生態系と持続的農業環境の保全にとっても重要である。宿主植物と二員でなければ生存が難しい微生物の長期保存は非常に困難である。本研究結果は、従来の保存法にとらわれずに植物や動物遺伝資源保存分野で用いられているガラス化保存技術を応用して、微生物の新規超低温保存技術を開発した。他の難保存性微生物の管理・系統保存技術の開発にも寄与するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Vitrification-based method was successfully established for storage at -196°C of Oomycetes. The optimal droplet vitrification method using Oomycetes for the storage at -196°C is as follows. Oomycete isolates were cultured with the rape seeds for 30 days at 25 °C on solidified PDA medium. Rape seeds containing oomycete were placed in 15 ml petri dish and osmoprotected with LS (liquid medium supplemented with 1.0 M sucrose and 2.0 M glycerol) for 30 min. Then they were dehydrated PVS2 for 20 min at 25°C. After dehydration placed in wells on an aluminum cryo-plate, and directly plunged into liquid nitrogen and maintained at -196 °C. As results, three Oomycetes isolates were successfully cryopreserved with 100% viability. Vitrification-based protocol was cryopreservation method for reliable long-term preservation of Oomycetes resources.

研究分野：超低温保存学

キーワード：超低温保存 ガラス化 二員ガラス化法 微生物 植物組織細胞

1. 研究開始当初の背景

持続的農業環境と生態系の保全をする上で、植物と共生する微生物の存在が重要であることが分かってきた。微生物では世代時間が短いため、継代培養法による菌株維持管理では、孢子形成能や物質産生能の低下など培養による性質の変化が起こる。また、コンタミネーションのリスクが高まることが懸念される。一方で、微生物の中には宿主である植物と二員でなければ生存が難しい種があり、凍結保存による長期保存は困難である。

2. 研究の目的

細胞や組織の水を極低温を用いてガラス化させることで生存性を維持したまま長期保存することが可能である。本研究課題では植物組織細胞に微生物を接種し、二員培養を元にガラス化処理する新規超低温保存法「二員ガラス化法」の開発に取り組む。ガラス化法は組織細胞を超急速冷却することにより致命的な細胞内凍結なしにガラス化させること可能である。上記機序が超低温保存の生存性に重要であり、微生物の保存法として主に用いられている緩慢凍結法と大きく違う点である。植物組織細胞と共生微生物を効率よく保存するために、冷却速度を速めてガラス化させる有効な手段である熱伝導率の高い金属製デバイスを用いた手法開発が必要である。研究材料には、アーバスキュラー菌根菌と卵菌類を用いる。アーバスキュラー菌根菌などと共生関係を結ぶゼニゴケの仲間のフタバネゼニゴケを宿主として利用し、絶対寄生菌の保存技術の開発を行う。また、クロミスタ界に属する卵菌類は、プログラムフリーザーで冷却する緩慢凍結保存(一般的な微生物凍結保存法)が困難な微生物の一つとされる。植物種子に侵入させる超低温保存法を開発する。

3. 研究の方法

アーバスキュラー菌根菌

二員培養に用いる宿主植物となるフタバネゼニゴケの無菌化技術を開発する。一般的にコケの無菌化には孢子を無菌化し使用するが、二員培養をベースに保存技術を開発する目的から、屋外から採取した葉状体および無性芽を材料にした。表面殺菌方法として一般的な植物茎頂に用いるエタノール、次亜塩素酸ナトリウム溶液および新導入した薬剤(物質X)を供試した。

屋外に生息するフタバネゼニゴケ無性芽および葉状体を採取し材料調整後、超低温保存実験を行う。フタバネゼニゴケを脱水耐性付与処理および脱水処理した後、熱伝導率の高い金属製デバイスを用いて液体窒素温度まで急速冷却する。また、屋外で採取したフタバネゼニゴケ葉状体の液体窒素保存にも取り組む。

無菌的に培養したフタバネゼニゴケ培養体を増殖させ、無菌フタバネゼニゴケ無性芽で一菌系に由来するアーバスキュラー菌根菌の菌系を単離・超低温保存する準備を進める。一方で、グリセロール、高濃度の糖類をガラス化処理に用いるため雑菌混入による生育阻害リスクが課題になることが懸念される。そこで、滅菌した土壤にアーバスキュラー菌根菌を含有する土壤を少量添加して共生植物(バヒアグラス、クローバー)と二員で培養し雑菌の蔓延を抑えた実験系を開発を進めた。

卵菌類

卵菌類菌株を無菌的に植物種子内に接種させ、1ヶ月後に菌糸が侵入した種子ごと供試した。LS液による脱水耐性付与処理およびPVS2液による最適処理時間の検討を行い、熱伝導率の高い金属製デバイスを用いて液体窒素温度まで急速冷却するドロップレット・ガラス化法を検討した。走査型電子顕微鏡を用いて種子内部への卵菌侵入の様子を確認するために走査型電子顕微鏡を用いた。次に、培養前の種子表面(種皮)に紙やすりで傷付した処理実験をおこなった。

4. 研究成果

アーバスキュラー菌根菌

アーバスキュラー菌根菌と共生関係を結ぶフタバネゼニゴケを宿主として利用し、一菌系に由来するアーバスキュラー菌根菌の菌糸を単離できる系を用いた。まず、この技術を確認する上でキーとなるフタバネゼニゴケの雑菌除去と超低温保存技術開発に取り組んだ。屋外から採集したフタバネゼニゴケの無性芽および葉状体を新導入した薬剤(物質 X)で処理した。エタノール、次亜塩素酸ナトリウム溶液処理は、葉状体および無性芽ともに細胞が白化し生存できなかった。一方で、本研究で取り入れた物質 X で処理をおこなった場合、2~10 分間では細胞の白化などの悪影響は観察されることもなく、サンプル表面の無菌化に成功した。物質 X で無菌化したサンプルは、継代を繰り返してもバクテリアや糸状菌によるコンタミネーションは観察されなかったため、本研究手法において有効な手段と評価できる。また、同手法は生態系中のコケ類多様性保全という視点で培養・保存技術(簡易無菌化して凍結保存)に利用されることが期待される。

また、脱水耐性付与処理および脱水処理後、熱伝導率の高い金属製デバイスを用いて液体窒素温度まで急速冷却した結果、無性芽と葉状体ともに 100%の生存・再生率が得られるプロトコルを確立した。

卵菌類

クロミスタ界に属する卵菌類は、プログラムフリーザーで冷却する凍結保存が困難な微生物の一つとされる。我々は、ドロップ・ガラス化法を用いた技術確立に成功した。本研究は、従来の保存法以上に効果的な新規超低温保存法の開発を目指して、卵菌類同様に細胞壁を持つ植物遺伝資源のガラス化保存技術を応用し、実践的な技術開発に取り組んだ。卵菌類菌株を PDA 培地で継代培養する際、表面処理した滅菌植物種子を菌と共に置床した。その後、菌糸が侵入した種子ごと、LS 液と PVS2(ガラス化液)処理した。アルミニウム製プレートの凹みに種子を付着して液体窒素で急速冷却した。再生育は、急速融解後に種子ごと常温の PDA 培地上に置床し、生残性評価を 3 日後に行った。

その結果、種子に菌糸を侵入させていないサンプルは生存できないが、種子に菌糸を侵入させたサンプルでは、生残率約 60~100%と比較的高い値が得られた。電子顕微鏡観察により、種子内部への菌糸侵入程度と生残性に関係があることが判明した。卵菌が種皮表面裏までしか侵入していないサンプルよりも、種子の中心(胚乳内部)まで菌糸が侵入しているサンプルで高い生存率が得られた。その結果を踏まえ、そこで、種子表面に紙やすりを用いた傷つけ処理を行い再び PDA 培地上に卵菌類と置床し保存材料を調整した。その結果、種子への卵菌接種後 1 週間培養した材料においても高い生存率が得られ、さらに、2 週間培養した材料では、100%近い生残率が得られ、再生育も良く、複数の菌株を供試して同様の結果が得られた。

中桐(2014)によれば、卵菌類の細胞は多核嚢状体で、菌糸の太さは直径 10 μm 以上になるものもあるが隔壁がほとんどないため、ひとつのコロニーが多核嚢状体の 1 細胞で作られる場合もある。したがって、Slow freezing 法では細胞内が十分脱水されずに冷却過程において致命的な細胞内凍結(氷晶形成にともなう物理的破壊)が起きたと考えられる。本手法は、ガラス化液を用いて細胞内水分を浸透脱水し、同時に凍結防御剤を細胞内に浸透させることで冷却過程において細胞が完全ガラス化する。したがって、太く長い細胞でも細胞内凍結の発生を回避し、高い生残率が得られたと考えられる。保存処理に要する時間は、60 分以内と短く、実用性も高い。本研究では、卵菌類遺伝資源におけるドロップレット・ガラス化法による保存技術を確認した。

本研究ではドロップ・ガラス化法を用いて 100%近い生残率が得られる保存技術の確立に成功した。ガラス化とは、液体のランダムな原子配列のまま、ガラス(非結晶質の固体)になることである。致命的な氷晶形成が細胞内でおきないので、細胞を極低温で生かす手段として唯一の方法である。ガラス状態は、高い粘性のため分子拡散を伴う化学反応すべてが停止する。サンプル表面の水の蒸気圧が非常に小さく脱水濃縮や収縮が起きない。そのため、細胞・組織を安定状態で長期保存することが可能になる。

今後、同手法は、他の難保存性微生物の管理・系統保存技術の開発にも寄与するものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shihomi Uzuhashi, Takayuki Aoki, Daisuke Tanaka, Hiromi Nakajima, Miyuki Yamazaki, Mamoru Satou
2. 発表標題 Enhancement of quality of Oomycetes in the NARO Genebank
3. 学会等名 AMC 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------