

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18710203

研究課題名（和文） 環境保全技術としてのガラス化保存法に関する研究

研究課題名（英文）Study of cryopreservation using vitrification

研究代表者

田中 大介（DAISUKE TANAKA）

秋田県立大学 生物資源科学部 流動研究員

研究者番号：60425593

研究成果の概要：

植物細胞・組織の長期保存におけるガラス化と生存性との関係を明らかにした。組織細胞の液体窒素保存時の応答および水の挙動、熱分析などの基礎的な知見を得て、論理的かつ成功的な植物遺伝資源保存を可能にする手法‘ドロップレット法’を開発した。この方法により普及可能な操作で多様な絶滅危惧植物遺伝資源を高い生存率で保存することが可能になった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：資源保全学

キーワード：ガラス化，資源保全学，絶滅危惧種，生体膜，水，アクアポリン，生物多様性保全，細胞内微細構造

1. 研究開始当初の背景

生物多様性は、生物進化はもとより、地球環境の保全ならびに有用生物資源の保全と持続的開発などに不可欠である。現在、地球上には姿を消しかけている多くの絶滅危惧植物種が存在している。しかし、これまでも多くの植物種が手立てを打つ前に次々と地球上から消失している。環境庁が、

多様性の減少を明らかにしたレッドデータブック（日本自然保護協会）によれば、日本に生息する植物のうち、約 34%は日本固有のものである。全体の 17%の植物種は、絶滅の危機にさらされていると報告されている（日本植物分類学会，1993）。今後、さらなる生物資源の遺伝的浸食が予想されることから、絶滅危惧種の保全を視

野に入れた長期保存技術の研究は、生態系の保全と機能回復に寄与する。これまで、ガラス化法（超低温保存法の一つ）を用いて植物種の保存に成功した報告がなされている。しかしながら、絶滅危惧種は園芸品種などと比べて繁殖力が弱く、環境変動への耐性が低い場合が多い。その上、希少な材料の特性として、試行錯誤することなく最小限の試料で確実に保存しなければならない。超低温保存法の問題点として、材料毎に超低温処理後の生存に必要な冷却前の最適処理条件を試行錯誤によって決定しなければならないこと、超低温保存処理過程における細胞や細胞内水分の挙動というような基礎的な知見が欠けているため、生存率と最適処理条件の関連が確立されていないこと、などが挙げられる。

2. 研究の目的

実践的に有効な生物多様性保全システムの構築、とくにガラス化法を用いた長期保存システムの確立を図るため、絶滅危惧種の多様な生殖質保全技術の確立に関する知見の収集に取り組む。ガラス化法とは、組織細胞においてガラス化現象（高濃度水溶液において、ガラス転移温度以下で液体が微小コンパートメントにトラップされることで、氷結晶を形成せず、かつ、脱水を進行させない状態）を人為的におこさせて超低温保存を可能にするものである。しかし、植物の超低温保存は、ガラス化処理過程における高浸透圧処理などの各ステップに対する細胞の応答の詳細、あるいは、どのような細胞がガラス化処理ステップに耐えられるのか、といった基礎的な知見が欠けているため、成功例は少ない。超低温保存の可否を決定

する細胞の状態や超低温保存処理に対する細胞の様々な挙動を対象に電子顕微鏡観察法により細胞学的、形態学的に解析し、得られた情報をもとにガラス化処理のステップを最適化することを目的とする。さらに、絶滅危惧植物種の効率的かつ普及可能な環境保全技術の開発をおこなうため、簡易培養系とガラス化法を組み合わせることで保存を成功させる。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、絶滅危惧種の超低温保存パイロットモデルとしてハヤチネウスユキソウへの汎用性について調べる。材料に選んだハヤチネウスユキソウは岩手県固有の種であり絶滅が心配されているが、材料が入手可能である。絶滅危惧植物種の培養茎頂を作成し、温帯性植物を材料に現在までにリンドウにおいて確立したガラス化法およびビーズガラス化法を用いて、ガラス化法およびビーズガラス化法を用いたガラス化処理各ステップ（低温馴化、ショ糖含有培地上での培養、グリセロール溶液処理による脱水抵抗性付加、ガラス化液処理など）、最適処理時間等の条件を決定し超低温保存法の確立をする。

(2) ガラス化処理各ステップで凍結置換固定法により得られた植物試料を用いて、超低温保存下における細胞内微細構造や形成された氷晶の観察を行い、生存率との関係を解析する。

(3) 凍結置換固定法の結果と新鮮材料の観察が可能な CRYO-SEM を用いた観察結果と比較し、超低温保存処理で引き起こされる微細構造の変化や氷晶の観察結果にアーティファクトがないことを確

認する。

(4) フリーズ・フラクチャー・レプリカ法により試料を調整し、ガラス化処理過程における生体膜の構造変化を計測する。

(5) 生体膜分子アクアポリンの細胞内局在性と挙動を解明し、ガラス化液処理過程における水チャネルあるいはアクアグリセロポリンの役割を評価する。

(6) 以上の結果を総合的に踏まえて得られた知見を基に、高い生存率を得られる簡便な超低温保存法を検討し、絶滅危惧植物種を広範に網羅する超低温保存のプロトコルを確立する。

4. 研究成果

(1) 絶滅危惧植物種の効率的かつ普及可能な環境保全技術の開発をおこなうパイロットモデルとして絶滅が心配されているハヤチネウスユキソウの簡易培養系を作成し、現在までに確立したガラス化法を組み合わせ、絶滅危惧植物種への保存応用できるか解析した。その結果、ガラス化現象を基礎としたガラス化処理各ステップ、最適処理時間等の条件を決定し超低温保存法の確立に成功した。

各処理の至適条件と植物組織細胞の生存性、ならびに電子顕微鏡観察結果をあわせて考察した。絶滅危惧種をはじめとした希少種などの植物を扱う場合、茎頂分裂組織を取り巻く形態を理解した上でガラス化処理時間を検討する必要がある。すなわち、組織細胞に対する脱水あるいは浸透処理効果の不均一さが保存の成功を困難にしている要因の一つとしてあげられる。この知見は、同様のことが野生に生息する他の植物種にも広く言えると推察される。溶液の浸透性は脱気や界面活性剤あるいは茎頂の摘出方法を工夫することでクリアできるものと思われる。

(2) 単子葉植物の環境保全技術パイロットモデルとして日本および海外遺伝資源が揃う栄養繁殖植物イグサを材料として、簡易培養系を作成し超低温保存法の確立に成功した。イグサは内因性ホルモンの作用により、分げつ性が決定しており増殖は非常に困難である。そこで、液体培地を用いた回転培養について検討した。ガラス化処理に最適な均質かつ大量の試料を得ることが成功の鍵となった。この結果は、絶滅危惧植物の多様性を最小限のサンプリングによって効率的に保存する系の確立に貢献するものである。また、ガラス化法およびビーズガラス化法を用いて超低温保存が可能になったことが明らかになり、現在までに全国 200 品種を供試し保存に成功した。

(3) 細胞内微細構造と生存性について解析するため、上記試料を液体窒素に浸漬し超低温下まで急速冷却した際の細胞内微細構造および水の挙動を CRYO-SEM を用いて解析した。アルギン酸ゲルに包埋された茎頂細胞は、短時間のガラス化液 (PVS2) 処理時間では細胞内に氷晶形成が観られるものの、生存率が高まる最適時間処理した場合、組織細胞内およびビーズは凍ることなくガラス化していた。ガラス化法によって最適条件で処理した培養茎頂の原形質膜超微細構造変化を調べるため、超低温処理した茎頂の原形質膜超微細構造をフリーズ・フラクチャー・レプリカ法と透過型電子顕微鏡を組み合わせで原形質膜破断面を観察した。その結果、脱水に伴う膜同士の異常接近 (膜融合などによって膜が本来的に持っている半透膜としての機能が失われ不可逆的な傷害) によって引き起こされる構造変化はみられず、膜タンパク質粒子 (IMPs; intramembrane particles) が均一に散在する構造が観察された。以上の成果から、ガラス化液による脱水・浸透作用

が均一におこなわれること、細胞にとって致命的な氷の形成(細胞内凍結)を抑えること、段階的に最適処理することで植物細胞の脱水耐性を高め、ガラス化液による生体膜構造変化の発生を抑制することが重要であることが考えられる。

(4) 超低温保存ステップにおけるストレス耐性および脱水とアクアポリンの関係について研究をおこなった。これまでの研究から、超低温に曝し生存性を保つためには、いかに細胞内の水を脱水し、かつガラス化させるかが鍵となる。具体的には超低温保存ステップにおいて、高張溶液による浸透圧脱水で含水率を下げ、効果的にガラス化させるDMSOあるいはエチレングリコールを細胞内に浸透させ超低温に曝す。また、上記脱水処理に耐えられるようにあらかじめ細胞組織を低温条件下に曝しストレス耐性付与する。したがって、一連のガラス化ステップは、植物体を常に低温条件下で処理する。そこで、低温条件下での水の収支に着目し本研究では、細胞内外の水を超高速輸送する膜分子アクアポリンの挙動について詳しく解析した。イネの組織細胞を用いてアクアポリンの低温発現プロファイリングを行なった。その結果、イネアクアポリン遺伝子は、低温処理によって発現量を減少させ、細胞内外の水輸送を滞らせることが明らかになった。超低温保存処理の観点から考察すると、低温処理は、低温ストレス応答の一つである適合溶質を蓄積させ、同時に水の収支を低くする。すなわち、適合溶質によって高まった細胞内溶質濃度を下げないように調整している。したがって、ガラス化処理ステップで用いられているローディング溶液やガラス化液の主成分である高張なグリセロールは、主として浸透圧脱水に役立っているといえる。

(5) これまでに得られた、ガラス化現象と

生存性および水の挙動解析結果と熱分析等の結果から、ガラス化による生存を可能にする統一的概念をまとめ、簡便で普遍的な方法ドロップレット法を確立した。ドロップレット法は、植物細胞に脱水による傷害が軽い短時間ガラス化液処理を行なったのち、細胞組織をすなわち窒素スラッシュに浸漬し超急速冷却でガラス化させ保存する。本ドロップレット法によって超低温保存した植物体は、加温後の再生育速度も速く旺盛な生育が観られる。すなわち、細胞組織への傷害が低い証拠である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

D. Tanaka, T. Matsumoto, A. Nishiuichi, T. Niino, Cryopreservation of in vitro Grown Black Chokeberry shoot tips by Droplet vitrification, Acta Horticulturae, In press, 査読有り

T. Matsumoto, H.L. Lian, W.A. Su, D. Tanaka, C. W. Liu, I. Iwasaki, Y. Kitagawa, Role of the aquaporin PIP1 subfamily in the chilling tolerance of rice, Plant and cell Physiology, 50(2) 216-229, 2009, 査読有り

小館琢磨, 田中大介, 岩手県北東部の雑穀遺伝資源の探索, 植物遺伝資源探索導入調査報告書, Vol.24, 33~39, 2008, 査読有り

白田和人, 福井邦明, 田中大介, 新野孝男, 農業生物資源ジーンバンク事業における超低温保存の利用. 低温生物工学会誌, 54, 9-14, 2008, 査読有り

D. Tanaka, ガラス化による植物茎頂の保存. NSL News Letter. 2008, 2007-2,

24~27, 査読なし

T. Niino, D. Tanaka, R.R. Tantely, K. Fukui K. Shirata, Cryopreservation of basal stem buds of in vitro-grown mat rush (*Juncus* SPP.) by vitrification, *CryoLetters* Vol.28(3), 197-206, 2008, 査読有り

D. Tanaka, T. Niino, Y. Tsuchiya, M. Uemura, Cryopreservation of shoot tips of endangered Hayachine-usuyukiso (*Leontopodium hayachinense* (Takeda) Hara et Kitam) using vitrification protocol, *Plant Genetic Resources*, 6, 164-166, 2008, 査読有り

[学会発表](計9件)

D. TANAKA, T. Matsumoto, A. Nishiuchi, T. Niino, What Differences Are There Between Droplet Vitrification and Vitrification Protocols of Cryopreservation?, The first International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species, 2009.3, Leuven, Belgium

D. TANAKA, T. Niino, T. Matsumoto, S. Fujikawa, Ultrastructural evidence for the effects of rapid cooling on plant shoot apices by the vitrification based protocol using cryo-scanning electron microscopy, The first International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species, 2009.3, Leuven, Belgium

T. Matusumoto, H.L. Lian, W.A. Su, D. Tanaka, C.W. Liu, I.Iwasaki, Y. Kitagawa, イネ低温耐性における OsPIP1;3 の役割, 第 50 回日本植物生理

学会年会, 2009.3, 名古屋大学, 愛知県 田中大介, 松本直, 岩崎郁子, 北川良親, 麹菌 (*Aspergillus Oryzae*) におけるア クアポリンの機能解明, 第 8 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2008.11, 石川県文京会館

D. Tanaka, T. Niino, M. Uemura S. Fujikawa, Ultrastructural observation of plasma membrane of plant shoot apices in vitrification-based protocol, 2007.7, CRYO2007 (44th MEETING OF THE SOCIETY FOR CRYOBIOLOGY), Lake Louise, Canada

田中大介, 新野孝男, R. R. Tantely, 福井邦明, 白田和人, イグサ遺伝資源の超低温保存, 2007.10, 園芸学会, 高知大学 田中大介, 行弘文子, 西内明子, 新野孝男, ガラス化長期保存法における原形質膜超微細構造の観察, 園芸学会, 2007.3, 京都テレサ

田中大介, ガラス化法における冷却時の細胞挙動と新たな保存法への試み, 2006, 7 日本植物細胞分子生物学会, 筑波大学 田中大介, 西内明子, 新野孝男, ドロップレット法を用いたアロニア培養茎頂の超低温保存法開発, 園芸学会, 2006.3, 千葉大学

[図書](計1件)

D. Tanaka, *Plant Cryopreservation*, Reed B.M. edited, Springer verlag, 2008, 4, Berlin, Germany,

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 大介 (DAISUKE TANAKA)

秋田県立大学生物資源科学部・流動研究員
研究者番号: 60425593

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：