

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658086

研究課題名(和文) 高等植物培養細胞の常温ガラス化による長期保存法の開発

研究課題名(英文) Development of a long-term preservation method by vitrification at ambient temperatures in cultured cells of higher plants

研究代表者

菅原 康剛 (SUGAWARA, Yasutake)

埼玉大学・理工学研究科・名誉教授

研究者番号：70114212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：高等植物培養細胞の乾燥による長期保存法を開発するために、主に柑橘類培養細胞を用いて乾燥耐性の増大等に関する研究を行った。その結果、柑橘類の培養細胞は高濃度のショ糖を含む培地で前培養することにより、著しく高い乾燥耐性を示すことが明らかになった。乾燥により含水量が低下した細胞のガラス転移温度は20℃付近にあった。さらに、前培養の過程で高温処理や高Ca処理により、乾燥後の細胞の生存率が高まることが明らかになった。同様な乾燥耐性の増大について、イネの培養細胞についても調べ、その特徴を明らかにした。柑橘類培養細胞の乾燥状態での保存では、5℃以下の低温では比較的長期の保存が可能であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To establish a new method for long-term preservation of cultured cells of higher plants under desiccation conditions, the development of desiccation tolerance in these cells was investigated. It was found that cultured cells of citrus show very high levels of desiccation tolerance after preculture in media with high concentrations of sucrose. Survival rate of cells desiccated for 24 hrs was more than 80% and glass transition temperature of these cells was about 20°C. Improvement in survival rates of cells after desiccation was achieved by treatment at high temperatures or with high concentration of calcium in media during preculture. In cultured cells of rice, desiccation tolerance of cells also developed under preculture conditions, although these cells did not show a high level of tolerance to that of cultured cells of citrus. Cultured cells of citrus desiccated for 24 hrs were preserved for 6 months, and it was shown that high survival rates were maintained at temperatures below 5°C.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：植物 培養細胞 保存 乾燥耐性 ガラス化 バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

現在、植物培養細胞の長期保存法として、液体窒素による超低温保存法が広く用いられている。しかし、私たちはゼニコケの培養細胞において、細胞の乾燥耐性を高め、乾燥による細胞を常温でガラス化させる新たな保存方法を見出した。この方法は超低温保存法に比べ数多くの利点がある。例えば、液体窒素による保存では細胞のガラス転移温度が低く、細胞の保存ではガラス転移温度よりも低い温度で維持する必要があり、温度維持のためのコスト、輸送方法に大きな問題が生じている。それに対して、細胞の乾燥による保存では、細胞のガラス転移温度は高く、したがって保存可能温度が広く、液体窒素を用いなくとも長期保存が可能であり、保存コストが低く、また細胞の保存状態での輸送が容易になるなどの利点がある。

2. 研究の目的

本研究では、主に高等植物の柑橘類培養細胞を用い、細胞の乾燥耐性を高める条件を検討し、高等植物の培養細胞を常温でガラス化させ、それらをガラス状態で維持しながら長期保存を可能にする方法の確立を目的としている。また、イネなどの他の植物の培養細胞との比較を行い、乾燥耐性の機構を明らかにすることを試みる。

3. 研究の方法

高等植物の培養細胞の乾燥耐性を高める方法として、ゼニコケ培養細胞で明らかになった、細胞を高濃度のショ糖を含む培地で前培養する方法を用いた。また、細胞の乾燥耐性をさらに高めるために、この前培養の過程でいくつかの細胞への処理、例えば高温処理等を試みた。前培養後はシリカゲル上で細胞を急速に乾燥させた。乾燥時間は通常24時間とした。乾燥後の細胞の再吸水はゆっくりと行い、吸水後はTTC還元法を用いて細胞の生存率を測定した。また、吸水後の細胞の再培養では、再度高濃度のショ糖培地に移して

から通常培地で培養するようにした。

4. 研究成果

(1) 柑橘類培養細胞の前培養による乾燥耐性を高める培養条件として、1.0M ショ糖を含む培地で3~4日間培養することにより乾燥耐性が十分高まることが明らかになった。柑橘類の耐性が高まった培養細胞では、シリカゲル上で24時間、室温で乾燥させると、細胞の含水量は0.06 gH₂O/gDW位まで低下するが生存率は80%位であることが明らかになった。この時の細胞のガラス転移温度は20付近であることが明らかになっている。

(2) 乾燥後の細胞の生存率を高めるために、前培養の過程で高温処理を行った。その結果、乾燥処理直前に1.0M ショ糖を含む培地での前培養中に40~45℃で1時間の高温処理を行うことにより、乾燥後の生存率が高まることが明らかになっている。なお、この高温処理は高濃度のショ糖を含まない培地では効果が見られないことから、高濃度のショ糖の存在が必要であることが示唆された。また、培養細胞は乾燥処理により障害を受けると細胞外にタンパク質や低分子物質の漏出が見られるが、この高温処理によって、これらの漏出量が低下することが明らかになっており、高温処理により膜障害が抑えられることが示唆された。

(3) さらに、乾燥後の細胞の生存率を高めるために、高温処理と同様にカルシウムの効果を調べた。その結果、乾燥処理直前に、1.0M ショ糖を含む培地での前培養中に20mM 硝酸カルシウムを含む培地で3時間培養することによって、乾燥後の細胞の生存率さらには増殖量も高まることが明らかになった。これらの結果から、カルシウムは凍結の場合と同様に乾燥においても細胞に保護的に働いていることが示唆された。

(4) 現在まで4種類の柑橘類培養細胞の乾燥耐性について調べてきたが、いずれも同様

の乾燥耐性を示すことが明らかになっている。さらに、他の高等植物の培養細胞の乾燥耐性を明らかにするために主にイネの培養細胞を用いて調べた。その結果、高濃度のショ糖を含む培地で前培養をすることに乾燥耐性は増大するが、その耐性は柑橘類培養細胞ほどではなく、また最適な乾燥条件等は柑橘類の培養細胞と異なっていた。これらの結果から、柑橘類培養細胞は本研究で用いた培養条件では最も高い乾燥耐性を示すことが明らかになった。

(5)すでに述べているように培養細胞の乾燥耐性を高めるためには高濃度の糖を含む培地で前培養する必要がある。ゼニゴケ培養細胞の乾燥耐性の増大で明らかになっているように、この前培養の過程で細胞内に糖の蓄積が起こる。柑橘類の培養細胞でも同様に糖の蓄積が起こることが明らかになっている。細胞内に蓄積した糖は、細胞のガラス化や細胞を乾燥や凍結における障害から守ることが明らかになっている。この蓄積した糖が異なる種類の細胞間における乾燥耐性の差にどのように関わっているか現在のところ明らかでない。一方、細胞内への糖の取り込みの仕組みについて2つのシステムが関わっているとされている。すなわち、細胞膜における輸送系とエンドサイトシスによるものである。さらに多量の糖の取り込みには後者が重要な働きをしているとされている。そこで、柑橘類培養細胞の高い乾燥耐性の機構の特徴を明らかにするために、この細胞への糖の取り込みと乾燥耐性の増大との関係を明らかにするために、エンドサイトシスの阻害剤として知られている Wortmannin と LY294002 の乾燥耐性の増大への効果について調べた。その結果、いずれの阻害剤も耐性増大への阻害作用が認められ、このシステムの関与が高い乾燥耐性への変化に関わっている可能性が示唆された。

(6)乾燥状態での柑橘類培養細胞の長期保

存を試みた。その結果、6か月間の保存では、細胞の生存率は室温の23℃では30%以下まで低下したが、-30℃ではほぼ100%、5℃ではおよそ70%の細胞の生存率が維持されることが明らかになった。なお、イネの培養細胞では、乾燥条件の違いにより含水量が異なるが、ここまで高い生存率が維持されないことが分かった。

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3件)

Yamaguchi, M., A. Kuriyama, and N. Murase, Enhancement of desiccation tolerance and successful cryopreservation of rice cells pre-cultured with sucrose-rich medium, *Cryobiology and Cryotechnology*, 査読有, Vol. 59, No.2, 2013, 83-93

山口 直輝、山崎 秀幸、山口 直人、栗山 昭、村勢 則郎、乾燥した植物懸濁培養細胞の高温耐性、低温生物工学会誌、査読有、58巻、2012、169-172

山口 直輝、山崎 秀幸、栗山 昭、村勢 則郎、乾燥した植物懸濁培養細胞のさまざまな温度での保存、低温生物工学会誌、査読有、57巻、2011、153-156

[学会発表](計8件)

Sugawara, Y., K. Mukae, R. Hatanaka and H. Kunitake, Effect of endocytic inhibitors on the development of desiccation tolerance in suspension-cultured cells of *Citrus reticulata*, *Plant Biology* 2014, 2014.7.12-16, Oregon Convention Center (USA)

Sugawara, Y., K. Mukae, R. Hatanaka and H. Kunitake, Development of

desiccation tolerance and long-term preservation after desiccation of suspension-cultured cells of Citrus reticulata, CRYO2013, 2013.7.28-31, Marriott Bethesda North Hotel & Conference Center (USA)

菅原 康剛、迎 恭輔、畑中 理恵、國武 久登、柑橘類培養細胞の乾燥耐性と乾燥による長期保存、第 58 回低温生物工学会年会、2013.6.23、関西大学(大阪市)

Sugawara, Y., K. Mukae and R. Hatanaka, Development of desiccation tolerance in suspension-cultured cells of Citrus, Plant Biology 2012, 2012.7.20-24, Austin Convention Center (USA)

山口 直輝、山崎 秀幸、山口 直人、栗山 昭、植物培養細胞の常温保存の試み、第 57 回低温生物工学会年会、2012.5.31、つくば国際会議場(つくば市)

菅原 康剛、畑中 理恵、田中 寛子、近藤 奈央、國武 久登、植物培養細胞の常温ガラス化による保存のための新たな方法、第 29 回植物細胞分子生物学会大会、2011.9.7、九州大学(福岡市)

Sugawara, Y., R. Hatanaka, H. Tanaka and H. Kunitake, Desiccation tolerance in several cultured cells of Citrus, Plant Biology 2011, 2011.8.6-10, Minneapolis Convention Center(USA)

菅原 康剛、畑中 理恵、田中 寛子、近藤 奈央、國武 久登、柑橘類培養細胞の乾燥耐性と乾燥後の増殖能、第 56 回低温生物工学会年会、2011.7.8、岩手県情報交流センター(盛岡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 康剛 (SUGAWARA, Yasutake)
埼玉大学・大学院理工学研究科・名誉教授
研究者番号：70114212

(2) 研究分担者

栗山 昭 (KURIYAMA, Akira)
東京電機大学・理工学部・教授
研究者番号：00318156