



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Cryopreservation of Useful Plant Resources : Application of Encapsulation-Dehydration Method to Preservation of Hairy Root Cultures and Microalgae  |
| Author(s)    | Phunchindawan, Monthana   |
| Citation     | 大阪大学, 1997, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/40136">https://hdl.handle.net/11094/40136</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">ご参照ください</a> 。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|            |   |
|------------|---|
| 氏名         | ハンジンダーワン マンタナ<br>Phunchindawan Monthana   |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(薬学)  |
| 学位記番号      | 第 13089 号   |
| 学位授与年月日    | 平成9年3月25日   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>薬学研究科環境生物薬学専攻   |
| 学位論文名      | Cryopreservation of Useful Plant Resources : Application of Encapsulation-Dehydration Method to Preservation of Hairy Root Cultures and Microalgae<br>(有用植物資源の凍結保存: 固定化乾燥法による植物毛状根と微細藻類の保存) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 宮本 和久<br><br>(副査)<br>教授 那須 正夫 教授 溝口 正 教授 西原 力  |

## 論文内容の要旨

凍結保存(超低温保存)は、生物遺伝資源の保存法として有用であり、すでに動物細胞や微生物の系統保存に広く用いられている。しかし、高等植物や微細藻類については、最近成功例は増えているものの、未だ多くの材料に適用できる保存法とは言えない。このためこれらの光合成生物資源については、現在主にフィールドジーンバンクや試験管内培養物の継代培養によって保存されているが、異種生物の混入や遺伝的変化の危険性が高く、コスト面での負担も大きいことから、普遍的かつ簡便な凍結保存法の確立が望まれている。さらに、最近大きな問題となっている広域環境汚染によって、植物や藻類の野性種の絶滅が加速度的に進行し、また近年のめざましい植物バイオテクノロジーの進歩によって、今後遺伝子組み換え体などの有用形質を持つ光合成生物が作出されることも予想される。従って、普遍的凍結保存法の確立は単に栽培種や培養株の系統保存にとどまらず、貴重な遺伝資源を絶滅から救い、さらに新規有用形質の保存と有効利用を目指す上でも、非常に重要かつ緊急度の高い課題である。

凍結保存を成功させるためには、凍結時の細胞傷害の原因となる細胞内凍結を抑えるために、液体窒素中で凍結する前に脱水操作によって細胞内の自由水を減じる必要がある。しかし植物や微細藻類は、細胞の水分含量が高いことや強固な細胞壁を有することから、動物細胞や微生物に比べて脱水を行うことが難しい。さらにこれらの光合成生物は、細胞の構造や活性が器官の違いや細胞齢、環境条件によって大きく異なるため、それぞれの材料の性質に応じて脱水条件を設定する必要がある。

最近開発された固定化乾燥(encapsulation-dehydration,あるいはビーズ乾燥)法は、材料をアルギン酸ビーズに固定化し、これを空气中で乾燥することによって脱水を行うものであり、脱水後直接液体窒素中に保存できること、DMSOなどの細胞毒性の強い添加剤を必要としないことなどの利点がある。そこで本研究では、遺伝資源の保存材料として有用でありながら凍結保存の成功例がほとんどない植物根および海産性(耐塩性)微細藻類の有効な凍結保存法を確立すべく、この固定化乾燥法について種々の検討を行った。

まず西洋ワサビ(*Armoracia rusticana*)の毛状根から誘導したシュート原基を材料として、固定化乾燥法において高い生存率を得るために重要な乾燥条件の設定を行った。このシュート原基は高い植物体再生能を持つことから、人工種子の研究に有用な材料である。検討の結果、材料を0.5 Mスクロースを含むアルギン酸ビーズに固定化し、これを同濃度のスクロースを含む培地上で1日間前培養後、水分含量73%までの緩速乾燥、水分含量を一定に維持しての2日間放置、および水分含量24%までの急速乾燥を行うことによって、約50%の生存率が得られた。

次に生存率をさらに上げるために、凍結防御剤として知られるグリセロールをスクロースと組み合わせて用いたところ、0.5 Mスクロースと1 Mあるいは1.5 Mのグリセロールを添加した場合に、0.5 Mスクロース単独添加よりも有意に高い生存率が得られ、特に水分含量30%前後まで乾燥させた場合には、90%を上回る値が得られた。この条件においては、乾燥過程で組織内のスクロースおよびグリセロール含量が大きく上昇し、また浸透圧ストレスに対する適合溶質として知られるプロリンの蓄積も認められた。これらの物質の膜保護作用や細胞内自由水を減少させる作用によって、材料は乾燥および凍結傷害に対する耐性を獲得し、その結果液体窒素保存後も高い生存率が維持されたものと考えられる。本法で凍結保存したシュート原基においては、保存後の植物体再生能の低下および再生植物の形態異常は認められなかった。また、6ヶ月間液体窒素中で保存した場合も生存率の低下は認められなかった。

そこで、スクロースとグリセロールを組み合わせて添加する条件を、臨床検査薬として有用なペルオキシダーゼを生産する西洋ワサビ毛状根の根端部に適用したところ、0.3 Mスクロースと0.5 Mグリセロールを組み合わせて添加し、平均水分含量30%まで乾燥する条件で、約60%の生存率が得られた。また、凍結後の毛状根の増殖能、形態およびペルオキシダーゼ生産量は、凍結前と変わらなかった。植物根の凍結保存についてはこれまで3例の報告があるが、固定化乾燥法による保存の報告はなく、本研究が最初の成功例である。

さらに、固定化乾燥法を数株の微細藻類に適用したところ、0.5 Mスクロースを添加剤として用いて水分含量40%前後まで乾燥させた場合に、海産性(耐塩性)真核微細藻類7株中6株、淡水性真核微細藻類6株中1株、およびラン藻7株中4株の凍結保存に成功した。従って、本法は海産性(耐塩性)微細藻類の凍結保存に適していると考えられる。

以上の結果から、添加剤としてスクロース単独、あるいはスクロースとグリセロールを組み合わせて用いる固定化乾燥法は、西洋ワサビのシュート原基と毛状根および海産性(耐塩性)微細藻類の凍結保存法として有効であることが示された。植物根については、植物に致命的な影響を与えることなく均一な材料が多数得られることや、根端に生長点を有し植物体再生も可能なことから、遺伝資源の保存材料として有用である。しかし根の場合、他の材料に比べて水分含量が高いことや脱水過程で傷害を受け易いこと、DMSOなどの凍害防御剤に対する感受性が高いことなどから、これまでの方法では細胞活性を高く維持しながら脱水することが困難であった。従って、添加物の種類や濃度、あるいは乾燥速度を変えることによって、比較的広範な脱水条件の設定が可能な固定化乾燥法は、脱水が難しい根の有効な凍結保存として、今後多くの植物種への適用が期待できる。

## 論文審査の結果の要旨

植物や藻類などの光合成生物は、環境の健全性の維持に大きく寄与している。しかし、最近では地球規模の環境汚染によって、これらの生物資源が絶滅の危機に曝されるようになった。本研究は、動物細胞や微生物の系統保存に広く用いられている凍結保存法を光合成生物に適用し、普遍的な保存法を確立することを目的としたものである。高等植物の培養組織や微細藻類の凍結保存に関する研究をまとめた本論文の主な成果は、以下のように要約することができる。

最近開発された固定化乾燥法を導入して、西洋ワサビの毛状根から誘導したシュート原基の凍結保存を試み、スクロースを添加剤とする2段階乾燥により、46%の生存率で凍結保存に成功した。生存率の向上には、スクロースとともにグリセロールを添加することが有効であることを見出し、94%の生存率を達成した。保存後に再生したシュートからは、正常な形態をもつ植物体を得られたことから、本法が植物資源や人工種子の長期安定保存法として非常に有用であると考えられる。ついで、これまで成功例のなかった西洋ワサビ毛状根の根端部の保存にこの方法を適用し、59%の生存率で、毛状根の根端部の凍結保存が可能であることを示した。さらに、スクロースを添加剤とする固定化乾燥法を応用し、数種の微細藻類の凍結保存にも成功している。

以上のように、本論文は、比較的簡便な操作で脱水速度や脱水到達点などを幅広く制御できる固定化乾燥法の有用性を実証し、従来法では困難視されてきた正常根など、より広範な植物材料への適用に道を拓くものであり、博士論文としての価値があるものと認める。