

氏 名	畑中 理恵
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	博理工甲第 767 号
学位授与年月日	平成 22 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Studies on Development of Desiccation Tolerance and Glass Formation in Cultured Plant Cells (植物培養細胞の乾燥耐性増大機構およびガラス形成に関する研究)
論文審査委員	委員長 教 授 菅原 康剛 委 員 准 教 授 金子 康子 委 員 准 教 授 竹澤 大輔 委 員 准 教 授 田中 秀逸

## 論文の内容の要旨

植物は乾燥を含む厳しい環境変化に対して速やかに応答し、適応する機構を発達させてきた。乾燥に強い種子、多くのコケ植物、そして限られた被子植物では高い乾燥耐性を示し、ほぼ完全に脱水しても生命を維持できるものが知られている。このような生物は 90%以上の脱水、つまり乾燥重量 1 g あたりの水分含量が 0.1 g (含水量 0.1 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> DW) 以下になると代謝が停止するが、吸水後に活動を再開できる。いくつかの乾燥種子においては常温でガラス状態にあり、ガラス化が乾燥耐性増大と関連していることが示唆されている。これまでの生物ガラスの研究は、乾燥耐性の高い生物あるいは糖やタンパク質、脂質といったモデルシステムを用いたものに限定されている。本論文では、細胞レベルでの乾燥耐性獲得とガラス形成機構を明らかにするため、植物培養細胞を用いて乾燥耐性誘導条件の検討と耐性獲得機構、培養細胞のガラス形成、細胞のガラス化と乾燥耐性の関連について解析を行い、その研究結果を示し考察した。

第 1 章では、序論として、本研究の背景である植物の乾燥ストレス適応機構および生物ガラスの概説、本研究の目的と意義、そして本論文の構成について述べた。

第 2 章では、植物培養細胞の乾燥耐性を誘導する前培養条件の検討について述べた。培養細胞の乾燥耐性（生存率）は、乾燥処理後の細胞の増殖量から評価した。ゼニゴケ培養細胞の乾燥耐性は低く、細胞の含水量が 0.1 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> DW 以下まで低下すると死滅した。ゼニゴケ培養細胞で高い乾燥耐性を誘導するには、0.3 M ショ糖培地で 12 時間培養後、0.5 M ショ糖培地に移し替えてさらに 4 日間培養する方法が、最も効果的な前培養条件であった。0.5 M ショ糖培地で前培養した細胞の生存率は、含水量が 0.1 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> DW 以下まで低下した場合でも 87%であった。他の濃度のショ糖やマンニトール、アブシジン酸を用いた前培養処理は、ゼニゴケ培養細胞にわずかな脱水耐性を与えるのみであった。一方、シロイヌナズナ培養細胞では、高い濃度のショ糖を含む培地で前培養しても、ゼニゴケ培養細胞と同等の高い乾燥耐性を誘導することは困難であった。

第 3 章では、高い乾燥耐性を獲得したゼニゴケ培養細胞の細胞構造および生化学的解析について述べた。共焦点レーザー顕微鏡や電子顕微鏡で細胞の微細構造を観察し、前培養処理により液胞をはじめとする膜構

造が著しく変化することを明らかにした。また、前培養処理時に乾燥重量あたり 12% を占めるショ糖が細胞内に蓄積しており、細胞が培地の高浸透圧に応答して積極的に培地から取り込んでいることが示唆された。さらに、シクロヘキシミドを用いたタンパク質合成阻害実験から、前培養処理時のタンパク質合成は乾燥耐性の増大に必須であることを明らかにし、このタンパク質合成は脱水により誘導されることを示した。ゼニゴケ培養細胞において、前培養処理により誘導される多量のショ糖蓄積と新規合成タンパク質蓄積の少なくとも 2 つの変化が、乾燥耐性増大に必要であることを明らかにした。

第 4 章では、ゼニゴケ培養細胞において前培養時に多量に蓄積したタンパク質の同定と構造解析について述べた。ストレス関連タンパク質として知られる LEA (late embryogenesis abundant) タンパク質 (グループ 3) が同定され、FT-IR による解析の結果、このゼニゴケ LEA タンパク質も溶液中では無構造であるが乾燥によって構造化するというグループ 3 共通の特徴を示すことを明らかにした。

第 5 章では、植物培養細胞のガラス形成について述べた。0.5 M ショ糖培地で前培養した細胞は乾燥耐性の有無にかかわらず、低含水量ではガラス状態にあることを示した。さらに、含水量が  $0.1 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ DW}$  以下の細胞では  $0^\circ \text{C}$  以上でガラス化すること、ガラス化それ自体が必ずしも細胞に乾燥耐性を与えるものではないことを明らかにした。

第 6 章では、常温での長期保存におけるガラスの効果について述べた。乾燥耐性を獲得してガラス化した細胞をアンブル中で保存した場合、 $4^\circ \text{C}$  で 1 年間は増殖能を維持していることを示した。保存時に乾燥が進んだサンプルでは生存率が低下するとともにガラス状態も不均一であったことから、細胞の含水量を変化させずにガラス状態を維持することで、常温で長期間、細胞を乾燥保存できることを明らかにした。

第 7 章では本論文を総括した。

本研究では、植物培養細胞の乾燥耐性増大機構を明らかにし、耐性が増大した細胞の乾燥保存においてガラス化が細胞に長期安定性を与えることを示した。細胞レベルでの生物ガラスを研究するには、ゼニゴケ培養細胞は最適な実験系であるとともに、今後この系を用いた研究のさらなる発展が期待される。

## 論文の審査結果の要旨

当学位論文は平成22年1月27日16時15分より理学部2号館9番教室において公開で発表会を開催し、詳細な質疑を行って論文内容を審査した。以下に、その審査結果の要約を示す。

植物の培養細胞・組織は、適切な培養条件で培養すると種々の環境ストレスに対して耐性を示すようになる。これは植物では厳しい環境変化に速やかに応答して適応する機構が発達していることによると考えられる。多くの環境ストレスのうち乾燥ストレスは、陸上植物にとって最も深刻なストレスであり、植物によってその対応が異なっているが、細胞のガラス化を含めたその耐性機構の解析は十分には進んでいない。特に、その細胞レベルでの解析が遅れているが、そのための新たな実験系の開発がきよく望まれており、培養細胞の系は有効なものの1つと考えられる。

本論文では、細胞レベルでの乾燥耐性獲得とガラス形成機構を明らかにするために、植物培養細胞を用いて乾燥耐性誘導条件の検討と耐性獲得機構、培養細胞におけるガラス形成、細胞のガラス化と乾燥耐性の関連について行った研究の結果を示し、さらにそれらについて考察している。

第1章では、序論として本研究の背景である種々の植物における乾燥ストレス耐性および適応機構、生物ガラスの概説、細胞・組織培養系を用いた本研究の目的と意義、さらに本論文の構成について述べている。

第2章では、植物培養細胞の乾燥耐性を誘導する前培養条件の検討結果について述べている。培養細胞の乾燥耐性（乾燥後の生存率）は、乾燥処理後の細胞の増殖量から評価している。ゼニゴケ培養細胞は、通常の培養条件で培養した細胞の乾燥耐性は著しく低く、含水量が $0.1 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ DW}$ 以下まで低下すると死んでしまうが、前培養として $0.3 \text{ M}$  ショ糖培地で12時間培養後、 $0.5 \text{ M}$  ショ糖培地に移し替えて、さらに4日間培養すると乾燥耐性を著しく増大させ、87%の細胞が $0.1 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ DW}$ 以下までの含水量の低下に耐えられるようになる。しかし、他の濃度のショ糖やマンニトール、アブシジン酸を用いた前培養処理は、ゼニゴケ培養細胞にわずかな乾燥（脱水）耐性しか誘導しなかった。一方、シロイヌナズナ培養細胞では、高い濃度のショ糖を含む培地で前培養しても、ゼニゴケ培養細胞と同程度の高い乾燥耐性を誘導することが困難であることを明らかにしている。

第3章では、高い乾燥耐性を獲得したゼニゴケ培養細胞の細胞構造および生化学的解析について述べている。細胞構造については、共焦点レーザー顕微鏡や電子顕微鏡で細胞の微細構造を観察し、前培養により液胞をはじめとする膜構造が著しく変化することを明らかにしている。また、前培養処理時に乾燥重量あたり12%を占めるショ糖が細胞内に蓄積しており、細胞が培地の高浸透圧に応答して積極的に培地から取り込んでいることを示唆している。さらに、シクロヘキシミドを用いたタンパク質合成阻害実験から、前培養処理時の新たなタンパク質合成は細胞の乾燥耐性の増大に必須であること、また、このタンパク質合成は脱水により誘導されることを示している。これらの結果から、ゼニゴケ培養細胞において、前培養処理により誘導される多量のショ糖蓄積と新規合成タンパク質蓄積の少なくとも2つの変化が、乾燥耐性増大に必要であることを明らかにしている。

第4章では、ゼニゴケ培養細胞において、前培養時に多量に蓄積したタンパク質の同定と構造解析について述べている。この蓄積したタンパク質の1つに、ストレス関連タンパク質として知られるLEA(late embryogenesis abundant)タンパク質（グループ3）が同定され、FT-IRによる解析の結果、このゼニゴケLEAタンパク質は、溶液中では無構造であるが乾燥によって構造化するというグループ3共通の特徴を示すことを明らかにしている。

第5章では、植物培養細胞のガラス形成について述べている。DSCによる解析の結果、 $0.5 \text{ M}$  ショ糖培地で前培養した細胞は乾燥耐性の有無にかかわらず、低含水量ではガラス状態にあることを明らかにしてい

る。さらに、含水量が  $0.1 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ DW}$  以下の細胞では  $0^\circ\text{C}$  以上でガラス化すること、ガラス化それ自体は必ずしも細胞に乾燥耐性を与えるものではないことを述べている。

第6章では、ゼニゴケ培養細胞の常温での長期保存におけるガラスの効果について述べている。乾燥耐性を獲得してガラス化した細胞は、含水量を変化しない条件では、 $4^\circ\text{C}$  で1年間の長期保存に耐えるが、保存時に含水量が変化する条件では生存率が低下し、ガラス状態も不均一になっていることを明らかにしている。これらの結果から、細胞の長期保存では含水量を変化させないようにしてガラス状態を維持することが重要であることを示唆した。

第7章では、本論文を総括している。

以上のように、本研究では、植物の培養細胞を用いて、(1) 高い乾燥耐性を誘導するための培養条件、(2) 耐性増大に伴う細胞の変化、(3) 乾燥による細胞のガラス化と乾燥耐性の関連、(4) ガラス状態における細胞の長期保存について解析し、多くの新たな知見を得ている。これらはきわめて有意義であり、今後植物の乾燥耐性機構を解明する上で大きく寄与するものと考えられる。これらの研究結果の一部は、レフリー制のある外国専門誌を含め、4編の論文の筆頭著者として既に発表している。これらの成果から、本審査委員会は本論文を博士（理学）の学位を授与するに値するものと判断した。