

プロジェクト名：植物培養細胞・組織におけるガラス形成機構の研究

プロジェクト代表者：菅原康剛（理工学研究科・教授）

1. 研究の目的

ガラスは非晶質の固体であるが、粘度が非常に高いために測定し得る時間内では安定な結晶状態に戻りえない過冷却の液体とも言える。また、多成分系のガラスでは、相分離は起こらずに均一な固溶体の形態をとる。ガラス状態では、分子の運動や流動性がほぼ停止することから化学反応や酵素反応などの速度過程が著しく抑制される。したがって、生物の細胞・組織内で生じたガラスでは、結晶形成の場合と異なり、細胞は障害を受けることなく、齢の進行を停止したまま長期間生存できると考えられている。最近、この細胞のガラス状態が、極度の乾燥に耐えるある種の昆虫や植物種子、花粉が常温でガラス状態であることが明らかになり、この細胞・組織のガラス化がこれらの生物が長期に生存できるメカニズムであると考えられている。現在、これらの生物のガラス形成機構の解明について、その基礎的な研究面あるいは多くの細胞の新たな長期保存法の開発などの応用面からも大きな興味を持たれている。

本研究では、植物の細胞培養系を用い、細胞のガラス形成機構、ガラス化の細胞に及ぼす効果について、糖・タンパク質の分析、熱分析などの手法、顕微鏡を用いた細胞学的手法を用いて、その解析を試みた。

2. 研究の成果

植物の培養細胞としてゼニゴケ懸濁培養細胞を用い、細胞の乾燥耐性を高め、さらに細胞内のガラス化を容易にするために高濃度の糖（ショ糖）を含む培地で前培養を行い、その過程での細胞内の変化を解析した。その結果、前培養によって細胞内に多量の糖が蓄積すること、蓄積した糖の分析から、最も多量に蓄積する糖はショ糖であり、ブドウ糖、果糖も僅かながら増加することが明らかになった。また、前培養の過程で、細胞内に新たなタンパク質、特に熱可溶性の数種のタンパク質が合成されることが明らかになった。このタンパク質の1種について、アミノ酸配列を調べたところ、乾燥耐性の高い種子等での蓄積が知られているLEAタンパク質（group 3）であることが明らかになった。このタンパク質の機能として、乾燥によって変性した細胞内のタンパク質の修復が良く知られている。また最近になり、このタンパク質の糖ガラス化への作用についての解析が行われている。さらに、ゼニゴケ培養細胞の前培養の過程で、タンパク質合成阻害剤によりこのタンパク質の生合成を阻害すると、細胞の乾燥耐性が低下すること、さらに細胞のガラス転移温度（ T_g ）が低下することから、このタンパク質は細胞の乾燥耐性、ガラス化に密接に関わっていることが示唆された。

前培養によって乾燥耐性が増大したゼニゴケ培養細胞は、極度の脱水・乾燥に耐えることが明らかになった。乾燥剤のシリカゲル上で24時間乾燥させると、その含水量は $0.1\text{gH}_2\text{O/gDW}$ 以下にまで低下するが、細胞の生存率は80%以上を維持していた。この含水量のレベルは乾燥種子等に匹敵するものであり、生きた状態でこのレベルまで細胞を乾燥させた本研究の事例は、盛んに増殖しつつある植物の培養細胞については初めて見出されたものである。さらに本研究では、培養細胞から細胞壁分解酵素により、細胞壁を取り除いたゼニゴケプロトプラストを作出して、前培養による乾燥耐性の増大と乾燥によるプロトプラストのガラス化についても試みた。その結

果、細胞壁の除かれたプロトプラストの状態においても通常の細胞の状態と同様に乾燥耐性の増大とガラス化が起こることが明らかになった。

示差走査熱量測定 (DSC) によって細胞の T_g を測定すると、乾燥によって細胞の含水量が $0.1\text{gH}_2\text{O/gDW}$ 以下まで低下した時には、細胞の T_g は 30°C 付近まで上昇することから、細胞は乾燥の過程でガラス化し、常温ではガラス状態にあることが明らかになった。

前培養したゼニゴケ培養細胞を、常温で乾燥させ含水量を $0.1\text{gH}_2\text{O/gDW}$ 以下まで低下させ、様々な温度で長期間の保存を試みた。その結果、細胞のガラス転移温度よりも 20°C 以上低い 5°C では、少なくとも5年以上保存しても細胞の生存率は高いレベル (60% 以上) を維持しており、この細胞の常温におけるガラス化保存が可能であることが明らかになった。糖などのガラスについては、それらの T_g よりも $10\sim 20^\circ\text{C}$ 以上低い温度では、ガラス状態が安定していることが知られており、これら細胞の結果でもそれらによく一致していた。

3. 今後の展望

本研究では、ゼニゴケ培養細胞を用い、その乾燥耐性の増大と乾燥処理による常温におけるガラス化について解析を行ってきた。その結果、この培養細胞では、ある種の乾燥種子や花粉と同様に極度の乾燥に耐え、さらに容易にガラス化することが明らかになった。ゼニゴケは、自然条件において乾燥に対して比較的高い耐性を常時発現できる植物であるが、高等植物では、種子や花粉などの特定のステージに乾燥耐性を発現させることができる。今後、このような高等植物の培養細胞について、それらの耐性発現機構に注目して研究を進展させる必要がある。

さらに、細胞は様々な細胞内微細構造からなるきわめて不均一な構造を持っている。このような細胞では、ガラス化が一様に起こるとは考えにくく、ガラス形成の細胞内へ及ぼす効果も細胞内の部域によって異なっていると考えられる。今後は、プロトプラストのような単一の細胞を用いて、ガラス形成の解析とその形成が細胞におよぼす影響をさまざまな側面から解明する必要がある。