

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山本 伸一

植物、微生物、動物細胞など生物遺伝資源を長期間、安定的に安全に保存することは、ライフサイエンスの学術研究基盤を支える生物多様性を維持する上で非常に重要である。微生物および動物細胞では超低温での保存が一般的であるが、植物では多くの場合、種子による保存が行われている。しかし、植物の中には種子による保存が困難もしくは不適切なものがあり、その一例として栄養繁殖性作物があげられる。栄養繁殖性作物は無性的に栄養体を増殖して利用するイモ類、果樹などの作物であるが、その遺伝資源は通常圃場栽培で維持される。そのため、保存用の圃場や栽培管理の手間など維持管理コストが高く、天候災害や病虫害による滅失のリスクに常にさらされているなど、長期間にわたる保存には問題点がある。

茎頂など植物体の一部を -135°C 以下の超低温で保存する手法は維持管理の容易さや遺伝的安定性が保たれることなどから、低コストで安定的に保存が可能な長期保存に適する方法であり、現在まで多くの研究が行われている。しかしながら、日本も含め各国ジーンバンクでの実際の利用はあまり進んでいない。その理由の一つとして、開発されてきた方法は実験室レベルでの手法で、大規模に超低温保存を行う事業保存に適していなかった点があげられる。本研究では、超低温保存を事業レベルで行うため、迅速かつ簡便に実施できる標準的な手法の確立を目指して、アルミニウム製のクライオプレートを用いた新規の超低温保存法(クライオプレート法)を開発するとともに、その適用作物種の拡大を図るためにその標準化と応用を試みた。

1. アルミニウム製クライオプレートを用いた超低温保存法の開発

本研究では、まずアルミニウム製のクライオプレートを試作し、これを用いた超低温保存法(クライオプレート法)の開発を行った。クライオプレートは凹みの直径の異なる 2 種類を作成し、固着作業、処理時の茎頂の脱落等を考慮し、作業のしやすいものを選択した。ジョチュウギクの培養茎頂を用いて処理条件を検討したところ、65~90%と高い再生育率を得ることができた。また、クライオプレート法は操作性に優れ、急速冷却・加温が可能などの利点があり、事業用途で実用的に利用可能と考えられた。

2. クライオプレート法のおよび標準化の検討

開発したクライオプレート法の標準化を図るために、ミントの培養茎頂を用いて、材料の準備、茎頂の摘出、前培養、茎頂のプレートへの固着、脱水耐性付与処理、脱水処理、LN 浸漬・保存、加温、再培養等の各手順について最適条件を検討した。その結果、系統「福山自生」のミントを超低温保存した茎頂の再生育率は90%以上に達し、また他の16系統のミントにおいても73~100%と高い再生育率を達成した。

また、他植物にも適用可能なプロトコルを作成するために、イチゴ、熱帯産クワ、パレイショについてもクライオプレート法の最適条件を決定した。これらの結果から、前培養、脱水耐性付与処理、脱水処理を中心とした条件設定を行うことによりクライオプレート法の最適条件を決定する標準的なプロトコルを提案した。

3. 長期保存事業としてのクライオプレート法の可能性

クライオプレート法が多くの作物種に適用可能であることが示されたため、長期保存事業への組込の検討を行った。その結果、クライオプレートにより習熟度の低い技術者によっても容易にガラス化処理が可能となることが確かめられた。さらに、長期保存のための設備、器具等を検討し、長期保存作業が容易に簡単にできる体制を構築した。クライオプレート法は他の手法に比べ様々な面で長所が見られた。特に再生育率については他の手法に比べ高く、この理由としては急速冷却・加温が可能なが考えられた。また、クライオプレートを用いることにより、1回の操作で多くの茎頂が処理できかつ、操作中に茎頂が受ける損傷が軽減され高い再生育率を得ることができた。以上の結果から、クライオプレート法は、ジーンバンク等における遺伝資源の標準的な超低温保存プロトコルとして実用的に利用可能であると考えられた。

以上を要するに、本研究ではアルミニウム製のクライオプレートを利用して栄養繁殖性作物の培養茎頂を簡便かつ大規模に超低温保存できる保存法を開発した。従来法と比べ再生育率が高く、操作性に優れ、急速冷却・加温が可能なることを明らかにした。また、最適条件決定のための標準的なプロトコルを提案した。さらにクライオプレート法を用いた、長期保存法の実践に向け、マニュアル化を行い、ジーンバンク等における事業保存に十分利用可能であることを実証した。これらの成果は、学術上また応用上きわめて価値が高い。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文に値するものと認めた。