

凍結解凍覚醒技術仮説報告書 (Freeze-Thaw Awakening Method to End Hunger)

Setsuzo Tanaka¹

[前書き]

地球誕生から46億年間の歴史で、生命誕生は38億年前ともいわれています。

そして現在の地球生物は8億5千万年前に動物と植物に分岐しました。

既にその当時から地球生物は、生存本能に基付き触覚、視覚(光)、聴力(波動)、嗅覚(香り)、平衡感覚(重量)、等の生存に必要な認識能力は確保されて居たと考えています。

また地球誕生から現在迄の46億年間に、地球生物は何千何万回もの氷河期を経験しています。

その氷河期を越える度に地球生物は、激しく進化発展しています。

その氷河期(凍結現象)を体験した植物は、氷河期前と氷河期後の気候変化にも見事に順応して今日も繁栄しています。

その氷河期効果に注目してこれらの熱帯植物を温帯地域で栽培出来無いかと考えました。

熱帯植物と言えども氷河期には、気温の低い環境に適応して生きてきた事実に注目致しました。

1万3千年前終了した前氷河期(ヴェルム氷期)には、2.1万年前(Last Glacial Maximun)での日本列島周辺は、瀬戸内海や東京湾は陸地で、北海道と樺太ユーラシア大陸は陸続きでした。

東南アジアでは赤道直下のパプアニューギニアに氷河が存在して居ました。

その様な極めて寒冷な気候が約6万年間存在して居ましたが、その様な極めて寒冷な気候でも現在の熱帯植物は生存して居ました。

しかしその後の温暖化に順応した結果、現在の熱帯植物の性格が固定化して温帯地域での生存が不可能と成りました。

そこで現在の熱帯植物を再度氷河期環境に戻して温帯地域で発芽させて、温帯地域で栽培すれば温帯の気候に順応するのでは無いかと閃き、細胞保護剤として動物細胞保護に開発されていた、当時の林原生物科学研究所(現在の名称 株式会社林原)の開発したトレハロースを、熱帯植物の活性化温度26℃で濃度13%以上溶液を作成して72時間以上の含浸処理を行った。

¹ General incorporated foundation ASCO.

※) 濃度10%以下では濃度対流が発生して氷結晶速度が促進される為濃度対流を防ぐ13%以上の濃度を用いた。

トレハロース含浸処理後、緩慢に凍結させ緩慢に解凍する外部ストレスを与えたところ、極めて速い成長速度と耐気候性が発現しました。

以下その基本行程と結果、その現象原因の考察を報告致します。

[第1章 凍結工程]

熱帯作物パパイヤ凍結工程の例

① 乾燥したパパイヤ種子1,000個を完熟果実から採取後、清水流にて不純物を除去し、日陰にて自然乾燥を行い粗絶乾状態にさせた試験種子を作成した。

② この乾燥パパイヤ種子を細胞保護溶液に72時間浸透処理した細胞保護溶液を含浸させた試験種子を作成した。

(凍結工程) その細胞保護溶液の中に入った状態で24時間あたり0.5℃以下の極めて緩慢な冷却を継続的に例下60℃に至る極低温凍結を行なった。

(解凍工程) 細胞保護溶液中で凍結した凍結種子を常温下に置いて自然解凍した。

その後常温下で生命を失った種子は、自然腐敗した腐敗種子を、清水で分離して正常種子を選別した。

[第2章 播種発芽工程]

完成した凍結解凍種子は、電気式温熱マット上に置いた培養土入りの縦横75mm角深さ100mm×40個のトレー式ポットに播種した。

この時電気式温熱マットの温度は培養土の地温が25℃に成る様に調整して約10日間で発芽を開始してその後15日で全ての発芽を確認した。

その後60日間で苗丈が15cmに達した成長段階で栽培用の培養土に定植した。

その後約90日で開花結実を開始して90日間後から果実の収穫を開始した。

第1果収穫に要した時間は、255日で有った。

この栽培時の平均気温環境は17.3℃で在った。

同時に比較栽培した同胎種子「未処理区」は同時に同様な条件で播種栽培を行ったが、成長は極めて緩慢で同時間に於いても開花は無く収穫結果はその後秋に入って外気温の低下で枯死して岡山市の露地収穫は不可能であった。

[緩慢凍結及び緩慢解凍での差異原因]

この様な差の原因は、緩慢凍結ストレスと常温下緩慢解凍ストレスで以下の何れかの現象を発現させていると想像している。

仮説 ① 考えられることは緩慢凍結ストレス及び緩慢解凍ストレスでDNAの塩基4つのうちシトシンの5位の炭素がメチル化を起こすことで、遺伝子の情報発現を変化させていると想定している。

仮説② またこのストレス現象は、ゲノム情報本体であるDNAを折り畳んで(糸車の

様にDNAを巻き付けてDNAをコンパクトに収容している。)この構造物ヌクレオソーム(nucleosome)この構造が遺伝子情報転写を制御している。

このDNAを折り畳んでいるヒストン(histone)が緩慢凍結や緩慢解凍ストレスが変異を発現させ、その結果ヒストンに化学的な修飾現象を発現させ、ゲノムを制御して活性化及び抑制化現象を発現させていると想定している。

現在このDNAメチル化の塩基4つのうちシトシン5位の炭素がメチル化起こすことで遺伝子情報発現が変化するのか?

或いはヒストン(H2A、H2B、H3、H4)を持ちそれぞれ2分子ずつが集まりヒストン八量体(ヒストンオクタマー)を形成して約146bpのDNAを左巻きに1.65回巻き付けてヌクレオソーム(nucleosome)を形成しているが、ヒストンが化学修飾することでクロマチン機能の制御が変異を発現させているとの想定しているが、現段階では断定出来無い。

尚、トレハロース含浸処理の効果もかなりの部分で本件変異現象の要素と成っている事は、トレハロース以外ではこの様な現象が発生しない点も注目している。

トレハロースの秘めたる能力が存在して、凍結解凍後の蘇生に大きな影響を与えている事は紛れも無い事実です。

また解凍ストレスの緩和調整にも影響を与えています。

トレハロース溶液中での蘇生率と溶液外での緩慢解凍では、極端に蘇生率に差が発生することからもトレハロースの蘇生効果は明らかと断言出来ます。

安定同位体について (説明)

安定同位体は、生態系の研究や地球科学、資源探査において利用されている。地球上には、100種類以上の元素が存在する。元素の性質を決める「陽子」は同じであるが、「中性子」の数が異なる為、同じ性質を有する原子でありながら重さ(質量)が異なる原子が存在する。これが「同位体」。

例えば、水素を例にすると、陽子が一つだけの水素、陽子及び一つの中性子をもつ重水素、さらに陽子と中性子2つをもつ三重水素などがある。この同位体の中で、不安定で時間が経つと放射能を発して、中性子を放ち、原子番号が変わってゆく、放射性同位体と、安定して存在する安定同位体の2種類がある。例えば窒素を例にすると大気中の窒素の中で ^{14}N は、99.635%を占め、 ^{14}N より中性子が一つ多く、重い ^{15}N は、0.365%存在している。なお、表記は低能であることから、‰(パーミル)で示す。

植物の炭素同位体比は、空気中の二酸化炭素を光合成により植物体内に取り込む際の光合成の回路により決まります。陸上植物の多くはC3植物といわれ、炭素安定同位体比は、平均で-27‰(-30~-25‰程度)であ方、サトウキビや、トウモロコシなど乾燥、高温の環境で生育するイネ科植物は、C4植物といわれC3植物と光合成回路が異なる。このような植物は高温・乾燥地域に多く生育します。C4植物の炭素安定同位体比は、平均-12‰(-15~-10‰程度)

窒素安定同位体比($\delta^{15}\text{N}$)は、土壌の窒素分の由来により異なる。野生状態で、雨水や植物の空気中の窒素固定(豆など)由来の窒素が主体の場合、土壌の窒素安定同位体比は、空気中の窒素安定同位体比と大きく異ならない。従って、空気中の窒素を標準物質とした場合、土壌の窒素安定同位体比は、ゼロに近くなる。

慣行農法において使用される化学肥料の場合も、化学肥料中の窒素は、大気中の窒素を使用していますので、化学肥料を用いた土壌の窒素安定同位体比の値も同様にゼロ%に近くなる。

一方、堆肥などの有機質が土壌の窒素源である場合には、動物の食物連鎖の過程で窒素同位体は濃縮され、 $\delta^{15}\text{N}$ の値は大きくなります。完熟堆肥などでは、+20%程度を示す。

炭素は、大気中には通常の炭素 ^{12}C は98.894%、安定同位体炭素 ^{13}C は1.106%と存在している。植物は光合成で大気中二酸化炭素を吸収（炭素12と13ともに吸収して利用）し、植物体をつくり成長を続けており、安定同位体炭素もそのまま植物体の構成元素として蓄積されることになる。細かな議論は避けて表記していますので、詳細は成書・文献に譲ります。

パパイヤの成長と安定同位体の分析について（試験分析）

<目的>

2種のパパイヤ葉中の炭素および窒素安定同位体濃縮状況の分析を行い、窒素肥料の吸収状況、安定同位体炭素の濃縮状況から光合成能について検討する。

<方法>

試料：普通栽培のパパイヤ葉と覚醒処理パパイヤ葉

試料調整：60℃の恒温乾燥器内で1週間乾燥後、粉碎。

試料分析：安定同位体精密質量分析計（SIサイエンス）

<結果及び考察>

1. 覚醒処理パパイヤ葉中の窒素は、普通種パパイヤに比べ明らかに濃度が高く濃縮されていることが認められた。

2. 一方、安定同位体炭素の濃縮については、本結果からは光合成能の優劣については明確にできなかった。光合成が活発であると、徐々に安定同位体炭素の濃縮が進むことから、植物生理学分野では光合成評価に使用されている。

3. 再度、両パパイヤ葉を拝受いたしましたので、炭素及び窒素の安定同位体濃縮状況を確認し光合成能等について検討いたします。

<まとめ>

同じ栽培条件下では、明らかに覚醒処理パパイヤの成長旺盛であることは視覚的にも明白で、窒素濃縮も普通種に比べ高いことから窒素分の吸収が多く、成長に寄与していることが推察された。今回の安定同位体炭素の濃縮からは、光合成については明確にできなかった。

<参考>

葉緑素計（ミノルタ社製）で2種のパパイヤ用の葉緑素（クロロフィル量）を計測した。覚醒処理用は普通種に比べ約2倍の値を示したことから、光合成能は普通種に比べ大きなことがいえる。光合成が活発であることは、当然、光合成産物の増加につながることから収穫量は多くなると言える。

パパイヤの成長と安定同位体の分析について（第2回）

1. 試料および分析方法

試料：ASCO本部圃場植栽（2017年5月初旬）の覚醒処理パパイヤ葉（小葉10枚と大葉10枚）を採取した。また、比較のため未覚醒処理パパイヤ葉（10枚）を採取した。

試料調整：60℃の恒温乾燥器内で1週間乾燥後、粉砕。

試料分析：安定同位体精密質量分析計（SIサイエンス）

2. 結果および考察

表-1に安定同位体の分析結果を示す。 ^{13}C は未覚醒処理パパイヤ葉では-29.8‰（パーミル）であるが、覚醒処理パパイヤ葉ではともに-28.9‰を示し、0.9‰の濃度上昇（濃縮・蓄積）であった。この結果は、覚醒処理パパイヤ葉の活発な光合成で大気中の二酸化炭素（炭酸ガス）を大量に取り込み、植物体に同化したことが推察できる。

また、 ^{15}N は未覚醒処理パパイヤ葉に比べ覚醒処理パパイヤ葉（大）では8.5‰の差（濃縮・蓄積）、覚醒処理パパイヤ葉（小）においても5.1‰の濃縮・蓄積が認められた。

覚醒処理パパイヤ葉は明らかに光合成が活発で大気から二酸化炭素を大量に取り込み、樹体を成長させるための必須元素である窒素を光合成つかさどるクロロフィル（葉緑素）の構成元素として吸収していることが考えられる。図-1にクロロフィルの化学構造を示す。前回のクロロフィル計測で覚醒処理葉のクロロフィルが高濃度であることを確認しているが、今回の安定同位体 ^{15}N の分析結果からも覚醒処理パパイヤの光合成の活発なことがあらためて確認された。更に、未覚醒処理パパイヤ葉と覚醒処理パパイヤ葉中のマグネシウム（Mg）の定量分析を行うことでさらに、光合成についての考察が深まるだろう。

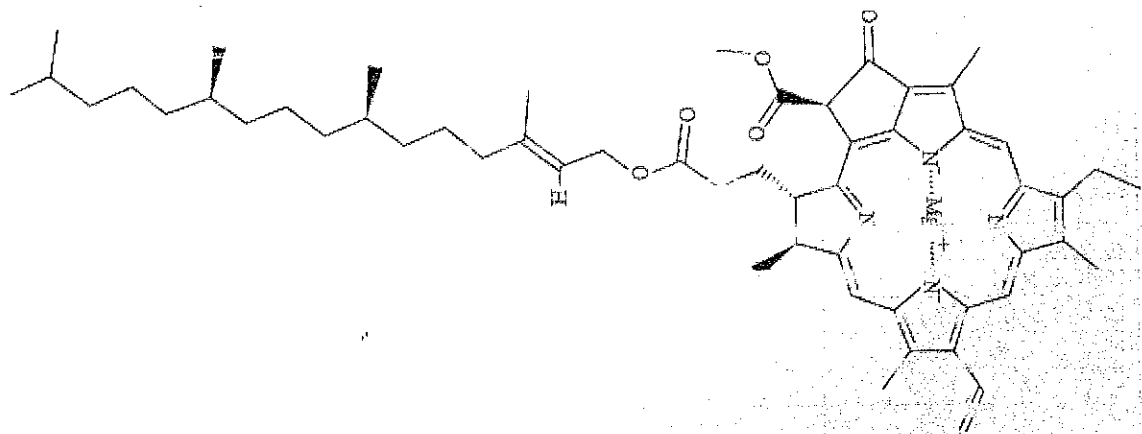


図-1 クロロフィル化学構造

表-1 パパイヤ葉中の安定同位体 ^{13}C と ^{15}N の濃度

試料名	^{13}C (‰)	^{15}N (‰)
未覚醒処理パパイヤ葉	-29.8	10.7

覚醒処理パパイヤ葉 (小)	-28.9	16.1
覚醒処理パパイヤ葉 (大)	-28.9	19.2

文責：加藤茂 2017-9-26

上記「凍結解凍覚醒処理済」パパイヤ葉細胞体と「未覚醒処理パパイヤ葉」の成蹊大学農学部 加藤 茂 教授 殿 の解析研究資料を思考しますと、明らかに「凍結解凍覚醒処理済」のパパイヤ葉中の安定同位体¹⁵N(窒素同位体)が(小)未成長葉よりも(大)成長葉の方が16.1→19.2と成長と共に増加している点が注目されます。

また未覚醒処理パパイヤ葉10.7に比較して凍結覚醒処理済パパイヤ葉は19.2もの増加が確認出来ました。

この分析結果から凍結解凍覚醒処理技術によって科学的見地からもその効果は確認出来ると言えます。

栄養成分比較表 (可食部100gあたりの含有量)				
		バナナ		
エネルギー	kcal	86	66	
水分	g	75.4	81	
たんぱく質	g	1.1	1.4	
脂質	g	0.2	0.4	
炭水化物	g	22.5	16.1	
灰分	g	0.8	1.1	
ナトリウム	mg	微量	—	1.0mg/100g以下
カリウム	mg	360	570	
カルシウム	mg	6	10.8	
マグネシウム	mg	32	24.6	
リン	mg	27	25.1	
鉄	mg	0.3	0.24	
亜鉛	mg	0.2	0.21	
銅	mg	0.09	0.06	
マンガン	mg	0.26	0.05	
カロテン	μg	56	230	
ビタミンB1	mg	0.05	0.03	
ビタミンB2	mg	0.04	0.06	
ビタミンB6	mg	0.38	0.266	
ナイアシン	mg	0.7	0.71	
ビタミンC	mg	16	10	
ビタミンE	mg	0.5	2.6	
葉酸	μg	26	39	
パントテン酸	mg	0.44	0.25	
食物繊維総量	g	1.1	2.9	
水溶性食物繊維	g	0.1	0.8	
不溶性食物繊維	g	1	2.1	
「日本食品標準成分表2015」より				
もんげーバナナ分析：2018/06/25 一般財団法人 日本食品分析センター				