

ナラワスサビノリ糸状体の超低温保存における前培養条件の 検討

誌名	西海区水産研究所研究報告
ISSN	0582415X
著者	藤吉, 栄次 梅澤, 敏
巻/号	75号
掲載ページ	p. 55-59
発行年月	1997年12月

ナラワスサビノリ糸状体の超低温保存における前培養条件の検討

藤吉 栄次*・梅澤 敏*

Preculturing Conditions for Cryopreservation of Conchocelis of
Porphyra yezoensis form. *narawaensis*

Eiji Fujiyoshi* and Satoshi Umezawa*

ABSTRACT

Various preculturing conditions were studied in order to improve the survival rates of conchocelis cells of *Porphyra yezoensis* form. *narawaensis* after freeze-thaw cycle. The preculturing conditions tested were combinations of temperature (6°C or 18°C), period (1 or 3 days) and with or without cryoprotectant (0.5 M sorbitol, 0.9 M sorbitol or 0.5 M DMSO). The precultured cells were then treated with the cryoprotective solution containing 1.5 M DMSO and 0.5 M sorbitol, cooled at 1°C/min to -45°C and plunged into liquid nitrogen. After the freeze-thaw cycle, the survival rates of the precultured cells were determined. It was found that preculturing cells with 0.5 M sorbitol, 0.9 M sorbitol or 0.5 M DMSO at 6°C for 3 days and with 0.5 M sorbitol at 18°C for 1 day improved the survival rate as much as 20% compared with the cells precultured without cryoprotectant at 18°C.

はじめに

近年、継代培養に代わるアマノリ属糸状体の保存法として、液体窒素中での超低温保存法についての研究が進められてきた(鬼頭ら, 1987; 藤吉ら, 1993a; 藤吉ら, 1993b; Kuwano *et al.*, 1993; 土屋, 1994)。これらの研究から、適切な予備凍結条件等が明らかになり、液体窒素中で保存したのちもかなり高い生存率が得られるようになってきた(藤吉ら, 1993b; Kuwano *et al.*, 1993; 土屋, 1994)。しかし、同一種

を同一方法で保存しても、系統の違いにより、生存率が30%以上異なる場合もあり(Kuwano *et al.* 1994)。超低温保存法の実用化のためには、常に高い生存率が得られる方法を開発することが必要である。

高等植物の超低温保存では、凍結前に低温で培養すること(ハードニング)や、低濃度の凍害防御剤を加えた培養液で培養すること(前培養)が生存率の向上に有効であるとされている(菅原, 1987)が、アマノ

平成9年12月19日受理 (Received December 19, 1997)

西海区水産研究所業績第565号 (Contribution from Seikai National Fisheries Research Institute, No. 565)

本研究の要旨は平成5年度日本水産学会秋季大会において口頭発表した。

*西海区水産研究所 〒850-0951 長崎市国分町49 (Seikai National Fisheries Research Institute, Kokubumachi, Nagasaki 850-0951, Japan)

り属の糸状体については調べられていない。本研究では、ナラワスサビノリ糸状体の液体窒素中での超低温

保存において、解凍後の生存率におよぼす前培養条件の影響について検討した。

材料および方法

材料

佐賀県有明水産振興センターから分譲されたナラワスサビノリ *Porphyra yezoensis* form. *narawaensis* 佐賀 8 号のフリー糸状体を用いた。ブレンダーで細断した糸状体を、18°C、1500lux（白色蛍光灯）、14L : 10 Dの光周期のもとで、ASP₁₂NTA 培養液を用いて、約 1 か月間培養して生長した直径 1 ~ 3mmのコロニーを実験に供した。

方法

前培養 前培養のために培養液に添加する凍害防御剤として、0.5Mまたは0.9Mソルビトールおよび0.5Mジメチルスルホキシド（DMSO）を用いた。凍害防御剤の添加は、糸状体を含む培養液30mlを100ml容の三角フラスコに取り、これに前述の2倍の濃度となるように凍害防御剤を添加したASP₁₂NTA 培養液（100mlあたりストレプトマイシン硫酸塩40mg、ペニシリンGカリウム20mgを含む）を同量（30ml）加えることにより行った。両液がよく混合したのち、育成時と同じ光条件のもと、1日および3日間前培養を行った。高等植物では一般的には材料の育成時と同じ温度で前培養を行うことが多いが（Uragami *et al.*, 1990）、今回の実験では育成時と同じ18°Cに加えて、低温でのハード

ニング効果を考慮し6°Cでも行った。18°Cでの実験と6°Cでの実験は別個に行ったため、6°Cでの実験では対照として18°C無添加の条件でも行った。

凍結および解凍 前培養したのち、糸状体を含む前培養液を水槽中のピーカーに取り、十分冷却したのち、同様に冷却した2倍量の凍害防御液（Table 1）を約10分かけて少量ずつ加えた。さらに、この溶液中より駒込ピペットで糸状体を取り出し、冷却した凍害防御液中に浸漬した。この糸状体を含む凍害防御液1.2mlを1.8ml容のクライオチューブ（nunc社製）に入れ、水槽中で30分間静置した。このチューブを、プログラムフリーザー（太陽酸素CM-3型）を用いて、1°C/分の冷却速度で0°Cより-45°Cまで予備凍結したのち、液体窒素中に浸漬保存した。

解凍は、1日後に40°Cの温水中で振とうしながら行った。これを冷却した滅菌海水を用いて、ゆっくりと希釈洗浄したのち、生存率を調べた。生死の判定はニュートラルレッド染色（Saga, 1989）で行い、糸状体1コロニーにつき200細胞の生死を調べた。実験は2回行い、1回につき5コロニー、計10コロニーの平均により生存率を求めた。

Table 1. Contents of cryoprotective solution.

Component	Amount in liter
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	1.5 mol
Sorbitol	0.5 mol
KCl	5×10^{-3} mol
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	17×10^{-3} mol
ASP ₁₂ NTA	330ml

The pH of this solution was adjusted to 8.0.

結 果

18°Cでの前培養 凍結融解後の生存率は、Table 2 に示した。0.5Mソルビトールを添加し1日間前培養を行った場合の生存率は73.1%であり、コントロール（無添加）と比べて20.0%高い生存率が得られた。しかし、3日間前培養を行った場合は、生存率は49.6%に低下した。0.9Mソルビトールおよび0.5M DMSOを添加して前培養を行った場合の生存率は、無添加のときのそれとほぼ同程度かやや低かった。

6°Cでの前培養 凍結融解後の生存率は、Table 3 に示した。0.5Mソルビトールを添加し1日間前培養を行った場合の生存率は67.9%、3日間の場合は74.3%であり、無添加（18°C）と比べてそれぞれ16.4%、21.8%高い生存率が得られた。また、0.9Mソルビトールおよび0.5M DMSOを添加して3日間前培養を行った場合も、無添加（18°C）と比べてそれぞれ19.8%、18.5%高い生存率が得られた。

Table 2. Effects of preculturing conditions at 18°C on survival after freeze-thaw cycle.

Preculture medium* ¹	Preculture period (days)	
	1	3
	Survival rate (%±S.D.)	
Control* ²	53.1±3.7	54.4±5.0
With 0.5M sorbitol	73.1±9.2* ³	49.6±6.0* ³
With 0.9M sorbitol	53.6±4.8	44.4±3.9* ³
With 0.5M DMSO	54.9±5.7	51.0±9.4

*¹ Cryoprotectants were dissolved in ASP₁₂NTA medium.

*² Precultured without cryoprotectant.

*³ Significantly different from the control (T test, p<0.05).

Table 3. Effects of preculturing conditions at 6°C on survival after freeze-thaw cycle.

Preculture medium* ¹	Preculture period (days)	
	1	3
	Survival rate (%±S.D.)	
Control* ²	51.5±8.6	52.5±6.0
Without cryoprotectant	57.4±8.3	57.0±6.0
With 0.5M sorbitol	67.9±5.6* ³	74.3±4.1* ³
With 0.9M sorbitol	51.6±5.6	72.3±3.1* ³
With 0.5M DMSO	49.5±5.7	71.0±7.6* ³

*¹ Cryoprotectants were dissolved in ASP₁₂NTA medium.

*² Precultured at 18°C without cryoprotectant.

*³ Significantly different from the control (T test, p<0.05).

考 察

前培養が耐凍性を高める理由については、高張液で処理されることにより含水量が減少することと関連しているようであるが、高等植物においてもその機構は明らかではない(酒井, 1992)。乾燥法によるアスパラガス *Asparagus officinalis* 腋芽の超低温保存の場合、前培養によって生じる細胞内の糖濃度の増加が、液体窒素中で急冷する前に必要な脱水操作によって生じる悪影響を緩和するためではないかと言われている(Uragami *et al.*, 1990)。高等植物では浸透的脱水を含む乾燥ストレスに対して、アブシジン酸の生合成の誘導など種々の応答機構が働くことが明らかになってきており(篠崎・篠崎, 1993)、アスパラガスについても複数の系が関与している可能性も考えられる。また、キャベツ *Brassica oleracea* の葉を1Mグルコース溶液中で180分前培養した場合には、蒸留水で洗浄後にもグルコース含量の増加と前培養効果が見られることから、細胞内に浸透したグルコースが耐凍性の向上をもたらしているのではないかと考えられている(Jitsuyama *et al.*, 1997)。

広塩性の紅藻 *Caloglossa leprieurii* では、高塩分の培養液中に入れると、細胞内のマンニトール濃度が、24時間程度かけてゆっくりと増加することが知られている(Mostaert *et al.*, 1995)。同様に、ウシケノリ *Bangia atropurpurea* (Reed, 1985) やナラワサビノリと同じアマノリ属の *Porphyra purpurea* の葉状体(Reed *et al.*, 1980) では、細胞内のフロリドシド濃度が増加することが知られている。今回実験に用

いたナラワサビノリの糸状体についても、高張液中で培養されることにより、前述の紅藻類と同様に細胞内の糖類が増加し、そのことが生存率の向上をもたらした1つの要因となっているのかも知れない。

今回、18°Cの条件下では、0.5Mソルビトールを添加し1日間前培養を行った場合に、無添加と比べて20%高い生存率が得られている。しかし、同一の条件で、3日間前培養を行った場合にはむしろ生存率の低下が見られた(Table 2)。高等植物においても、同一条件での前培養期間の延長が、生存率の低下をもたらした例が知られており(Suzuki *et al.*, 1994)、耐凍性の発現機構について今後の究明が望まれる。

6°Cの条件下では、0.5Mソルビトールを添加し1日間前培養を行った場合に加えて、0.5M、0.9Mソルビトールや0.5M DMSOを添加して、3日間前培養を行った場合にも高い生存率が得られている(Table 3)。この原因としては、低温により高浸透圧のおよぼす悪影響やDMSOの葉害が緩和されたことが考えられる。また、6°Cでは低温によるハードニング効果が期待されたが、無添加の場合の生存率は18°Cと比べて大きな違いは見られなかった(Table 3)。

今回の結果から、ナラワサビノリの糸状体の超低温保存において、適切な前培養を行うことにより、凍結融解後の生存率の向上が期待されることが明らかになった。さらに、ワカメ *Undaria pinnatifida* 雌性配偶体についても前培養の効果が知られており(藤吉未発表)、他の海藻類にもその効果が期待される。

謝 辞

本研究に際し、有益なご助言をいただいた北海道大学名誉教授酒井昭博士並びに本報をまとめるにあたり

ご協力いただいた国際農林水産業開発センター主任研究官マーシー・ワイルダー博士に深く感謝します。

文 献

- 藤吉栄次・山崎 誠・鬼頭 鈞 1993a: ナラワサビノリ糸状体の超低温保存. 水産増殖, 41(1), 85-87.
藤吉栄次・山崎 誠・梅澤 敏・鬼頭 鈞 1993b:

- ナラワサビノリ糸状体の超低温保存における予備凍結条件の検討. 水産増殖, 41(4), 547-551.
Jitsuyama, Y., T. Suzuki, T. Harada and S. Fuji-kawa 1997: Ultrastructural study on mecha-

- nism of increased freezing tolerance due to extracellular glucose in cabbage leaf cells. *Cryo-Letters*, 18, 33-44.
- 鬼頭 鈞・山崎 誠・井上清和 1987: アマノリ組織の超低温保存. 昭和62年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p157.
- Kuwano, K., Y. Aruga and N. Saga 1993: Cryopreservation of the conchocelis of the marine alga *Porphyra yezoensis* Ueda (Rhodophyta) in liquid nitrogen. *Plant Science*, 94, 215-225.
- Kuwano, K., Y. Aruga and N. Saga 1994: Cryopreservation of the conchocelis of *Porphyra* (Rhodophyta) by applying a simple pre-freezing system. *J. Phycol.*, 30, 566-570.
- Mostaert, A. S., U. Karsten and R. J. King 1995: Inorganic ions and mannitol in the red alga *Caloglossa leprieurii* (Ceramiales, Rhodophyta): response to salinity change. *Phycologia*, 34(6), 501-507.
- Reed, R. H. 1985: Osmoacclimation in *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta, Bangiales): the osmotic role of floridoside. *Br. Phycol. J.*, 20, 211-218.
- Reed, R. H., J. C. Collins and G. Russel 1980: The effects of salinity upon galactosyl-glycerol content and concentration of the marine red alga *Porphyra purpurea* (Roth) C. Ag. *J. Exp. Bot.*, 31(125), 1539-1554.
- Saga, N. 1989: Further study on determining cell viability in marine red and brown algae by using staining dyes. *Bull. Hokkaido Reg. Fish. Res. Lab.*, 53, 43-53.
- 酒井 昭 1992: 植物培養細胞・組織・胚の超低温保存. *化学と生物*, 30(7), 441-448.
- 篠崎和子・篠崎一雄 1993: 植物遺伝子の乾燥応答と発現調節. *化学と生物*, 31(7), 457-463.
- 菅原康剛 1987: 細胞・組織の凍結保存における問題点. 「凍結保存」(酒井昭編), pp170-175, 朝倉書店.
- Suzuki, M., T. Niino and T. Akihama 1994: Cryopreservation of shoot tips kiwifruit seedlings by the alginate encapsulation-dehydration technique. *Plant Tissue Culture Letters*, 11(2), 122-128.
- 土屋 仁 1994: ノリのフリーリビング糸状体の凍結保存について—Ⅲ. 千葉水試研報, 52, 27-30.
- Uragami A., A. Sakai and M. Nagai 1990: Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown in vitro. *Plant Cell Reports*, 9, 328-331.