

クロララクニオン藻の凍結保存法の開発

豊島 克己 (筑波大学 生物学類)

指導教員：平川 泰久 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

微細藻類の培養株の多くは、定期的に植え継ぐことで維持されている。しかし継代培養には管理のための労力やコンタミネーションなどのリスクが伴う。

微細藻類の株保存施設などでは、液体窒素を用いた凍結保存も行われている。しかし、凍結保存が難しい微細藻類もあり、継代培養のみで維持されている株も多くある。

本研究では、形態の異なる2種類のクロララクニオン藻を用いて、凍結保存法の開発を試みた。クロララクニオン藻は海産の単細胞性藻類で、アメーバ細胞、球状細胞、遊走細胞などの形態を持つ(図1、2)。当研究室では複数のクロララクニオン藻株を継代培養しているが、凍結保存株は存在していない。本藻類を凍結保存するために、冷却及び解凍時の速度または温度条件に加え、凍結保護剤の種類や濃度、様々な条件を検討した。また、凍結保存から復帰させる際に使用する栄養リッチな培地の検討も行った。

【材料と方法】

実験に用いた2種のクロララクニオン藻はそれぞれ、*Amorphochlora amoebiformis* (図1) がアメーバ細胞で、*Lotharella globosa* (図2) が細胞壁を持つ球状細胞である。*L. globosa* は培養条件により遊走細胞へと変化する。継代培養には海水培地 ESM を使用し、22℃で12:12時間の明暗周期で行った。

i) 制御凍結法

前処理として、細胞懸濁液に最終濃度が0、3、5、10、15%になるように凍結保護剤(メタノールまたはDMSO)を添加して、室温で15分間静置した。細胞溶液の入ったチューブを凍結処理容器(BICELL)に入れて、冷凍庫内で30℃まで緩慢冷却した後、液体窒素中で急速冷却した。その後、ディープフリーザーで24時間以上保存した。解凍は39℃ウォーターバスで迅速に行った。解凍後はESM培地で細胞を希釈し、暗めの光条件に1日置いて、通常の光条件に戻して培養した。

ii) 急速冷凍法

制御凍結法と同様の前処理を行った後、細胞溶液の入ったチューブを液体窒素で急速凍結した。以降は制御凍結法と同様の操作を行った。

iii) 栄養リッチな改良培地

ESM培地は有機物を含まない完全無機培地であるが、そこに1%から2%のグルコースを添加したESM+G培地、また4つの有機物(酢酸ナトリウム、グルコース、トリプトン、酵母エキス)を加えたESM+B-V培地を準備した。それぞれの培地で、クロララクニオン藻を通常の光条件と完全暗条件で培養し、細胞増殖を観察した。

【結果】

L. globosa においては、10% DMSOのもと急速冷凍法で凍結した場合で解凍後の生存が確認された。解凍後6から8日目に顕微鏡で観察したところ、10% DMSOを用いて凍結を行った細胞は緑色を維持しており、遊走細胞も確認された。他の条件で凍結した場合は、細胞の色素がなくなり、増殖した様子も観察されなかった。一方、*A. amoebiformis* では条件に関わらず解凍後の生存は確認できず、解凍直後、損傷した細胞が多く観察された。しかし、15%の凍結保護剤を用いた細胞では、それ以外のものと比較して、細胞形状を維持しているものが多く観察された。

有機物を添加した改良 ESM での培養実験では、いずれの培地でも、完全暗条件での細胞増殖は観察されなかった。一方、通常の光条件下での培養では、ESM+B-Vで、ESMを使用した場合よりも顕著な細胞増殖が観察された。

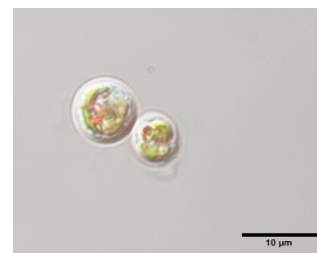
【考察】

凍結の際に細胞が損傷を受ける主な要因は、細胞内での氷晶形成による物理的損傷か、溶質濃度の上昇による生理的損傷のいずれかであると考えられている。

制御凍結法では、細胞外の水分が先に凍結し、浸透圧変化に伴う水分の放出で、溶質濃度が上昇し有害となった可能性があり、2種とも復活しなかった要因の一つと考えられる。

急速冷凍法では細胞内の水分が放出される前に凍結するため、氷晶形成による内部からの物理的な損傷が、細胞の生存を妨げると考えられている。*A. amoebiformis* は解凍後に細胞が破裂していたが、*L. globosa* は形状を維持していた。このことから、氷晶が形成されても、細胞壁によって細胞構造が維持され、解凍後も生存できる可能性が示唆された。

A. amoebiformis が ESM+B-V でより顕著な増殖を示したことから、いずれかの有機物を利用している可能性が示唆された。しかし、完全暗条件での培養はできなかったことから、光はクロララクニオン藻の増殖に必須であると考えられる。しかしながら、ESM+B-V 培地は本藻を増殖させるのに有効な新規培地である。

図1 *Amorphochlora amoebiformis* 図2 *Lotharella globosa*