

ノリのフリーリビング糸状体の凍結保存について

土屋 仁

はじめに

ノリは、フリーリビング糸状体の培養技術の確立により培養保存が可能となった。フリーリビング糸状体の保存には、通常1年に数回の培養液の交換が必要であり、増加する一方の養殖品種を保存するには多大の労力を要するようになってきている。また長期間にわたる培養保存では、保存中に遺伝的な変異を生ずることの有無も提起されている。

さらに近年、バイオテクノロジーの進歩に伴い、遺伝資源として品種の保存が重要な課題となっている。

そこで長期的な保存方法について、陸上植物で行われている凍結保存技術を応用して、試験を実施し若干の知見を得たので、予報として報告する。

材料と方法

恒温室で24℃、明期12時間の条件で培養したフリーリビング糸状体（昭和51年に分離した品種名KN）を用いて、-85℃で凍結保存をした。

一般に、培養細胞は培養液中での凍結には耐えられない²⁾ことから、本試験では、濾過滅菌海水（以下、海水と言う）に凍害防御剤としてDMSO（ジメチルスルホキシド）を10%（V/V）添加し、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンでpHを8.2に調整した溶液（以下、分散媒と言う）を用いて凍結した。

10ml容のねじ口ガラス瓶（16.5×45mm）に分散媒を1ml入れ、この中に直径2mm程度の糸状体を濾紙で水分を取った後に各3株ずつ入れた。

試験後の培養は、恒温室で24℃、明期12時間、9cmのガラスシャーレを用い、ProvasoliのES培地で静置培養（以下、恒温室で培養と言う）した。

DMSOの毒性試験

DMSOの毒性が想定されるため、恒温室で24℃、40時間分散媒に浸漬した糸状体の3株を、海水で洗浄した後に恒温室で培養し、13日目に糸状体の生死を調べた。

凍結保存試験

試験は、糸状体を分散媒に入れた直後に、-85℃の超低温庫で凍結したもの、さらに恒温室で24℃、28時間および40時間放置後に-85℃で凍結したものの3区分とした。

凍結した糸状体は、試験開始20日目に取り出し、約30℃の湯浴で凍結による溶液の結晶がなくなるまで解凍し、ただちに海水で洗浄し、恒温室で培養した。

糸状体の生存の判定は、解凍直後と解凍後14日間恒温室で培養した後、顕微鏡で細胞の色素の有無、糸状体の生長の有無により行った。

結 果

DMSOの毒性試験

DMSOの毒性に関しては、色素が抜けて透明になった死細胞が一部に認められたが、生存する細胞はその後順調な生長を示して、3株とも糸状体の塊が大型化したため、40時間の処理では糸状体に与える影響は少ないと考えられた。

凍結試験

解凍直後は、3試験区の各株とも、色素が細胞全体に広がって不明瞭で緑変しているもの、また細胞が膨張するものが多く認められた。

14日間培養後は、3試験区の各株とも大半の細胞が枯死し、細胞内容物が流失したため透明になっていたが、一部に生き残った細胞が分裂して分枝しているものが観察された。（図1）

各株の細胞の生存率は、定量的検討はできないが、検鏡結果から枯死細胞と生存細胞を比較すると1/1,000以下と推定される。しかし各株とも生存が認められ、株としての生存率は100%を示した。

考 察

ノリの糸状体を、-85℃で20日間の凍結保存を試み、解凍後の培養により、すべての株で一部分の生存と生存した部位の生長を確認することができた。

藻類の凍結保存については、都留²⁾が取りまとめて

おり、*Chlorella* 等の微細藻類は、液体窒素や凍結乾燥等により、最長で8年間の保存が可能としている。さらに、Hwangによると *Chlamydomonas reinhardtii* を緩慢凍結後に液体窒素で保存したところ、生存細胞数は約1/1,000になったが、6~17カ月保存後もそれ以上の減少は認められなかったとしている。

また陸上植物細胞の凍結保存の機構については、酒井³⁾が取りまとめており、リンゴの枝の芽と韌皮組織を、1年間異なる温度で凍結保存し、その生存率から、-30℃以下の温度に置かれたものでは害をうけなかったとしている。これらのことから、本方法は、フリーリビング糸状体の長期保存に有効な手段と考えられる。

さらに Sakai・Yoshida³⁾が実施したクワの皮層組織切片では、10℃/分以下の冷却速度で-75℃まで冷却すると、細胞外凍結となりすべての細胞が生存するが、10℃/分以上では、冷却中に細胞内凍結が起きて、死ぬ細胞が増加するとしている。このことから、-85℃の条件に直接投入する方法は、生存率向上の点から検討する必要があると考えられる。

フリーリビング糸状体の凍結操作中の生存率向上には、冷却速度、凍害防御剤の種類についての検討が、さらに実用化するには凍結保存温度と細胞の生存期間についての検討が今後の課題と考えられる。今回の報告では、20日間の試験結果であるが、同一サンプルの

凍結保存試験を継続中であり、長期保存における生存率の変化について、今後検討を実施する予定である。

要 約

- 1) ノリのフリーリビング糸状体を、-85℃で20日間凍結保存した。
- 2) 凍結保存には、海水にDMSOを10%添加し、PHを8.2に調整した溶液を用い、糸状体を溶液に入れた直後、28時間後、40時間後に-85℃で凍結した。
- 3) 凍結20日目に、約30℃で解凍し、E S培地で培養した。
- 4) 14日目の調査で、糸状体の株の生存率は、100%であったが、各株の細胞の生存率は、1/1,000以下と推測された。生存部では、生長が認められた。

文 献

- 1) 社団法人 日本水産資源保護協会(1980)：昭和54年度種苗特性分類調査書。
- 2) 都留 信也(1977)：微生物の保存法。東京大学出版会、東京、375~397。
- 3) 酒井 昭(1982)：植物の耐凍性と寒冷適応。学会出版センター、東京、55~182。

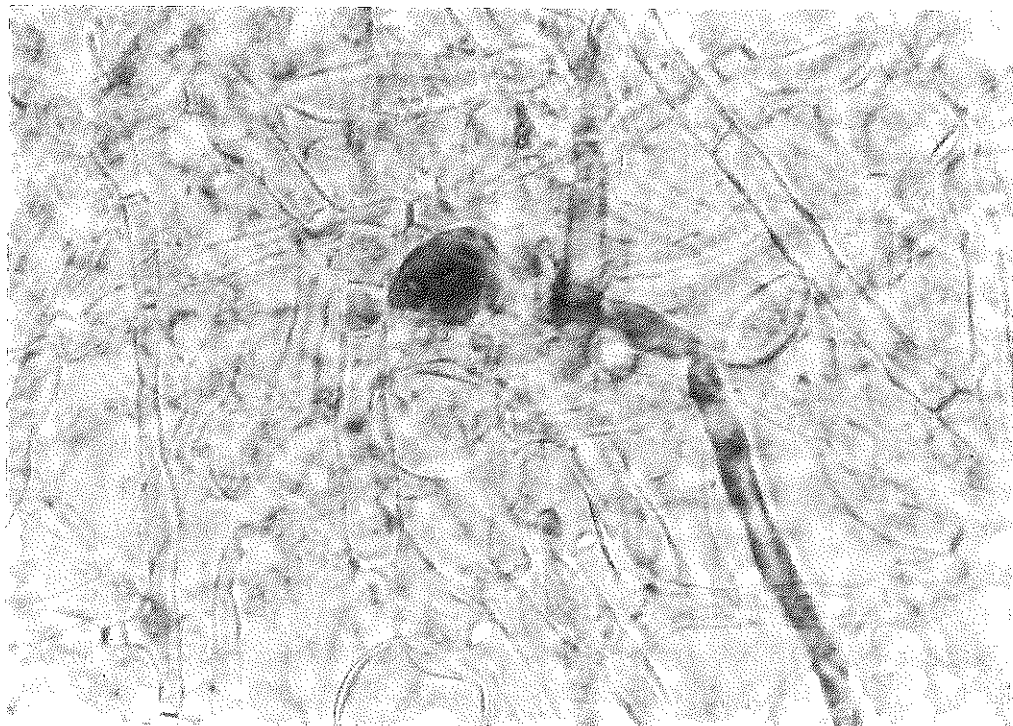


図1 凍結20日目に解凍して、培養14日目の糸状体