



Title	植物液体培養細胞の液体窒素中における生存
Author(s)	菅原, 康剛; SUGAWARA, Yasutake; 酒井, 昭 他
Citation	低温科学. 生物篇, 31, 79-83
Issue Date	1974-01-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17810
Type	departmental bulletin paper
File Information	31_p79-83.pdf



Yasutake SUGAWARA and Akira SAKAI 1973 Survival of Liquid Cultured Plant Cells after Immersion in Liquid Nitrogen. *Low Temperature Science Ser. B*, **31**.

植物液体培養細胞の液体窒素中における生存*

菅原 康 剛

(北海道大学大学院理学研究科)

酒 井 昭

(低温科学研究所)

(昭和48年8月受理)

現在、高等植物の培養細胞あるいは組織を長期間保存するための有効な方法は確立されていない。とくに最近、これらの組織培養法の技術的進歩はめざましく、種々の目的、さまざまな分野でこれが応用される様になり¹⁾、これと同時に培養細胞あるいは組織の凍結保存法の早急な確立が望まれている。また、植物の有用遺伝子源の長期保存の立場からも、培養細胞あるいは組織を液体窒素温度で生存させる方法の開発が強く望まれている²⁾。しかし、このような要請にもかかわらず、これら培養細胞の長期凍結保存に関する研究はほとんどすすんでいない。著者らの知る限りでは、アサの培養細胞を -50°C で1カ月間保存したという Quatrano (1968) の報告³⁾があるのみである。

植物を超低温で生存させる方法として、予備凍結法が有効であることは、すでに酒井が明らかにした⁴⁾。この方法は耐凍性の高い材料についてとくに有効であり、耐凍性の低い材料についても DMSO やグルコースなどの凍害防御物質の添加によってこの方法が可能になるものと考えられる⁵⁻⁹⁾。このさい必要な予備凍結温度と予備凍結後の冷却速度は、おもにその植物の耐凍度、媒液の種類や濃度によって決まると考えられている⁸⁾。

著者らは、高等植物の液体培養細胞を液体窒素中で生存させる目的で、サイカモアカエデの細胞で実験を行なった。その結果、 -10°C までの凍結に耐えない培養細胞でも、凍害防御物質で処理してから $-40\sim-50^{\circ}\text{C}$ まで予備凍結すれば、その後液体窒素温度(-196°C)まで冷却しても細胞は生存し増殖可能であることが明らかになった。

実験に使用した液体培養細胞は、ポーランド産のサイカモアカエデ (*Acer pseudoplatanus* L.) の枝条由来のものである。カルの誘導および培養法は Lamport の方法¹⁰⁾に従った。培養液の組成は White の培地を一部改変したものを基本培地とし、それに生長制御物質として 2, 4-D を 6 mg/l とココナットミルクを 10% (v/v) 加えたものである。培養は 500 ml の坂口フラスコに上記の液体培地 100 ml を入れ、連続照明下 (液面約 1500 lux.) で 1 分間 120 往復の振盪で行なった。なお培養は 26 ないし 28°C の温度でおこなった。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 1260 号

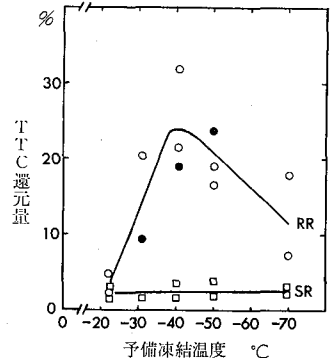
上記の培養条件で6ないし8日間培養した細胞を主として用いた。これは生長曲線から、誘導期の後期または分裂期の前期にあたる。細胞あるいは細胞集団(以下「細胞」とよぶ)の浮游液を目盛つきのスピッツ管(15 mm, 110 mm)へ移し、静置して細胞を自然落させてから、上清を除き、各管の細胞容積を0.5 mlにした。ついで、0.5 mlの24% (v/v) DMSO+10% (w/v) グルコースを蒸留水へ溶解した溶液を各管へ徐々に加え、室温(22~24°C)に約15分間放置後、凍結実験に用いた。

細胞浮游液はエタノール槽中で-10°Cまで冷却後、植氷して凍結させた。ついで約3分ごとに、-15, -23, -30, -40, -50および-70°Cの各温度に予め冷却しておいたエタノール槽中へ順次移して-70°Cまで冷却した。また各温度まで冷却し、そこに3分間おいて予備凍結したのち、それぞれの温度から液体窒素中に浸した。そこに15ないし20分間おいた後、細胞は40°Cの温水中で急速に、あるいは0°Cの空中でゆっくり融解された。融解後、新鮮な培養液で最初は徐々に希釈し、ついで約20倍量の培養液で4回洗浄した。

生死の判定の目安として、洗浄後直ちに Steponkus 等の方法¹¹⁾に従って TTC 還元法を行なった。なお、その反応温度は約27°Cであった。凍結融解後の細胞の TTC 還元量は、上記の DMSO+グルコース溶液を加えたのみの未凍結の細胞の還元量を基準としてパーセントで表わした。

第1図に示すように、-23°Cまで予備凍結された細胞は、液体窒素処理後、急速に融解されても、ゆっくり融解されても還元量はきわめて低く、5%以下であった。しかし、-23°C以下の温度まで予備凍結され急速に融解されたものは、予備凍結の温度が低下するにつれて還元量は増加し、-40°Cの予備凍結温度において最も高い値が得られた。さらに予備凍結温度が低下するにつれて還元量は低下した。一方、ゆっくり融解した場合には、還元量はきわめて低く、-40°C以下まで、予備凍結しても還元量の増加はみられなかった。

このように細胞の TTC 還元量は液体窒素処理後の融解速度に大きく影響され、ゆっくり融解した場合には、いずれの温度まで予備凍結しても還元量は著しく低い。このことはすでに報告⁴⁻⁹⁾されているように、用いた予備凍結温度において細胞の脱水が充分に進んでおらず、急速に冷却する過程で生成した微氷晶がゆっくり融解する間に致死的な大きさまで生長したと考えられる。また、-40°C以下-70°Cまでの各温度までゆっくり凍結し、急速に融解した場合、それらの細胞の TTC 還元量は-40°C以下-70°Cまで温度の低下につれて減少する¹²⁾。この還元量の低下は、この温度範囲においても、なお細胞の脱水が徐々に進行していることに起因するのかもしれない。いずれにしても第1図の急速融解された細胞における-50°C以下での還元量の低下は、液体窒素処理前の予備凍結中にその原因となる傷害によってすでにおこっていることは明らか



第1図 各温度まで予備凍結後、液体窒素処理を受けた細胞の TTC 還元量

RR (●○), 40°C の水中で急速融解, ●で示された細胞の一部は培養実験に用いられ、その結果は第2図に示される
SR (□), 0°C の空气中で緩慢融解

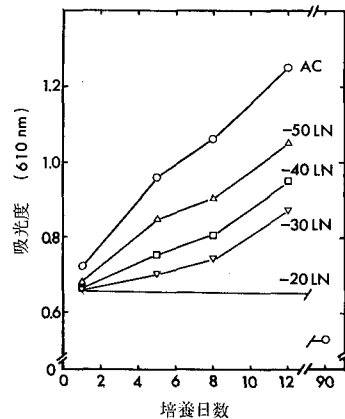
である。

ある温度までの予備凍結による細胞の脱水の程度は、その細胞の種類や状態によって異なる⁵⁾。予備凍結によって細胞の脱水が十分にすすみ細胞内のいわゆる凍り易い水が除かれておれば、その後液体窒素までの冷却中におこる細胞内凍結による害は、加温速度の緩急にかかわらず受けないと考えられる。しかし脱水が不十分であれば、致命的な細胞内凍結を避けるためには、ある速度以上の冷却および加温速度が必要である。つまり、冷却中に生じた細胞に有害とならないほどの細胞内微氷晶が生長し易い温度範囲におかれる時間が問題になる。この実験で用いた条件下では、予備凍結後液体窒素へ浸漬した時の冷却速度は -20°C から -100°C までの平均速度でおよそ $420^{\circ}\text{C}/\text{min}$ であった。このことは第1図で示されるように、このような培養細胞では少なくとも -40°C 以下まで予備凍結されれば、この程度の冷却速度で細胞は生存可能であることを示している。

細胞にとって無害な細胞内凍結を起させるに必要な冷却速度を決める要因として、予備凍結による細胞の脱水の程度や細胞内の糖濃度のほか、外から加えられたDMSOなどの凍害防御物質の濃度なども考えられる⁸⁾。木の枝の皮層細胞では細胞の耐凍度の高まりにつれて、液体窒素温度まで冷却後生存させるのに必要な予備凍結温度や冷却および加温速度が著しくことになる。このことは細胞内の物質の含量のほかに細胞の構造的変化が耐凍度の変化に関与することを示している^{5,7,8)}。培養細胞においても、その細胞内微細構造は培養日数の経過につれて大きく変化する¹³⁾。実際、ここで用いたサイコモアカエデの培養細胞も凍結融解後のTTC還元量は、その培養の時期によって異なり、培養日数6~8日の時期の細胞の還元量をもっとも高い¹²⁾。第1図で示されている各予備凍結温度においてTTC還元量の値がかなり大きくばらつくのは、生長のステージが微妙に関与していると考えられる。

次に $-20\sim-50^{\circ}\text{C}$ の温度まで予備凍結後、液体窒素温度まで冷却し、ついで急速に融解された細胞の増殖について調べた。第1図の黒丸で示されたものとまったく同一条件下で同時に凍結融解された細胞について、その後の増殖の経過をErikssonの方法¹⁴⁾に従い610nmの吸光度の変化を調べた(第2図)。 -30 、 -40 および -50°C のいずれの温度まで予備凍結された細胞も順調に増殖した。なお、 -20°C まで予備凍結されたものの結果は別の実験のものであるが、3カ月後においても吸光度の増加はみられなかった。これらのことは、 -30°C 以下の温度まで予備凍結された細胞は、液体窒素処理後急速融解すれば生存し、増殖可能であることを示している。

ここで用いたTTC還元法は、細胞が凍結されて害を受けた場合、凍結によって脱水素酵素が失活するのではなく¹⁵⁾、細胞の膜構造が凍結によって破壊され、脱水素酵素に必要な助酵素や基質の拡散、漏出と、それらを供給する



第2図 各温度まで予備凍結後、液体窒素処理ついで急速融解された細胞の増殖

ACは凍害防御物質を加えた未凍結細胞、 -20 LN 、 -30 LN 、 -40 LN 、 -50 LN はそれぞれ -20 、 -30 、 -40 および -50°C で予備凍結後液体窒素処理

酵素系、特に膜構造に密接に関連した酸化的磷酸化系の失活の結果、全体として脱水素酵素の活性低下をきたすという考え¹¹⁾にもとづいている。そして最初、Steponkus 等によりキズタの茎や葉の生死の判定に用いられた¹¹⁾。その後、彼らはこの方法を植物の培養組織の凍結融解後の生存率の判定に用いている¹⁶⁾。それによると、組織の凍結融解後の TTC 還元量とその後の増殖率の間には必ずしも完全な相関関係はなかったと報告している¹⁶⁾。本文で示された結果についても両者の間には必ずしも密接な相関関係はない様に思われる。-50°C で予備凍結後液体窒素処理された細胞について、その TTC 還元量と凍結融解後の増殖の関係についてみるなら、得られた TTC 還元量はおよそ 23% に対して増殖による 610 nm の吸光度の増加の未凍結細胞のその増加に対するパーセントはおよそ 75% である。この値は、ここで我々が用いた Eriksson の方法の限界を加味しても、かなり大きな値である。しかし、凍結融解された細胞についてのみ TTC 還元量と 610 nm の吸光度の増加の関係をみると、それらの間ではあまり大きなずれはないように思われる。タバコの培養細胞についても我々は同様な関係を得ている¹⁷⁾。

いずれにせよ、このような培養細胞は必ずしも均一な細胞の集団ではなく、集団の中で分裂能力をもった細胞のみが増殖に関与するし、それらが分裂を開始できるためには、ある数以上の細胞によっていわゆる培地がコンディションングされる必要がある¹⁸⁾。したがって、凍結融解後生存していた細胞数は必ずしもその後の増殖率を反映するとは限らない。

ともかくも、液体窒素処理後生存していた細胞のその後の増殖率が、その TTC 還元量から予想されるよりもかなり高いことと、さきに述べたように、培養開始後 6~8 日目の誘導期後期あるいは、分裂期の初期にあると思われる細胞が凍結融解後の TTC 還元量が高いことは¹²⁾、Quatrano³⁾ がアサの培養細胞でみた、凍結および未凍結細胞のプレート後のコロニー形成率が、両者の間であまり差がなかったことと関連して興味深いことである。

文 献

- 1) 竹内正幸・石原愛也・古谷力編 1972 植物組織培養. 朝倉書店, 東京, 468 pp.
- 2) Bennett, E. 1965 Plant induction and genetic conservation: Geneecological aspects of an urgent problem. Scottish Plant Breeding Station, William Blackwood and Sons Ltd., Edinburgh, 113 pp.
- 3) Quatrano, R. S. 1968 Freeze-preservation of cultured flax cells utilizing dimethyl sulfoxide. *Plant Physiol.*, **43**, 2057-2061.
- 4) 酒井 昭 1956 超低温における植物組織の生存. 低温科学, 生物篇, **14**, 17-23.
- 5) Sakai, A. 1965 Survival of plant tissue at super-low temperature. III. Relation between effective prefreezing temperatures and the degree of frost hardiness. *Plant Physiol.*, **40**, 882-887.
- 6) Sakai, A. 1967 Survival of plant tissue at super-low temperatures by rapid cooling and rewarming. In *Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms*, (É. Asahina, ed.) Institute of Low Temperature Science, Sapporo, 119-130.
- 7) Sakai, A., Otsuka, K. and Yoshida, S. 1968 Mechanism of survival in plant cells at super-low temperatures by rapid cooling and rewarming. *Cryobiology*, **4**, 165-173.
- 8) Sakai, A. 1971 Some factors contributing to the survival of rapidly cooled plant cells. *Cryobiology*, **8**, 225-234.
- 9) Sakai, A. and K. Otsuka 1972 A method for maintaining the viability of less hardy plant

- cells after immersion in liquid nitrogen. *Plant & Cell Physiol.*, **13**, 1129-1133.
- 10) Lamport, D. T. A. 1964 Cell suspension cultures of higher plants. Isolation and growth energetics. *Exptl. Cell Res.*, **33**, 195-206.
 - 11) Steponkus, P. L. and F. O. Lanphear 1967 Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol.*, **42**, 1423-1426.
 - 12) Sugawara, Y. and A. Sakai 未発表.
 - 13) Sutton-Jones, B. and H. E. Street 1968 Studies on the growth in culture of plant cells. II. Changes in fine structure during the growth of *Acer pseudoplatanus* L. cells in suspension culture. *J. Exptl. Bot.*, **19**, 114-118.
 - 14) Eriksson, T. 1965 Studies on the growth requirement and growth measurements of cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Physiol. Plant.*, **18**, 976-993.
 - 15) Steponkus, P. L. 1971 Effect of freezing on dehydrogenase activity and reduction of triphenyl tetrazolium chloride. *Cryobiology*, **8**, 570-573.
 - 16) Steponkus, P. L. and L. Bannier 1971 Cold acclimation of plant tissue cultures (Abstract of 8th Annual Meeting). *Cryobiology*, **8**, 386-387.
 - 17) 菅原康剛・酒井 昭 未発表.
 - 18) Henshaw, G. G., K. Jha, A. R. Mehta, D. J. Shakeshaft and H. E. Street 1966 Studies on the growth in culture of plant cells. I. Growth patterns in batch propagated suspension cultures. *J. Exptl. Bot.*, **17**, 362-377.