



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	植物培養細胞の凍結融解後の生存に及ぼす Ca^{++} の効果
Author(s)	菅原, 康剛; SUGAWARA, Yasutake; 酒井, 昭 他
Citation	低温科学. 生物篇, 33, 21-28
Issue Date	1976-03-18
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17818
Type	departmental bulletin paper
File Information	33_p21-28.pdf



植物培養細胞の凍結融解後の生存に 及ぼす Ca^{2+} の効果*

菅原康剛・酒井 昭

(低温科学研究所)

(昭和50年11月受理)

I. 緒 言

高等植物の凍結障害機構や耐凍性の機構を細胞あるいはより低いレベルで理解するために培養細胞を用いて研究をすすめるのは多くの点で有利である。またこの様な基礎的な研究によって培養細胞株の凍結保存法の確立が可能になるものと思われる。

現在、数種の培養細胞は液体窒素温度までの冷却に生存できる¹⁻⁴⁾。しかし他の多くの培養細胞は種類によってその凍結に耐える最低温度がかなり異なっている。また同じ植物の同じ組織由来の培養細胞でもその strain によってその耐凍度は異なる⁵⁾し、さらに同じ細胞でもその培養条件によってその耐凍度は変動する⁶⁾。

この様な培養細胞を超低温で生存させるためには、適当な凍害防御物質の存在下で少なくとも -40°C 以下の緩慢凍結に耐える様にしなければならない^{3,4)}。しかし例えば本報で述べられるタバコの培養細胞の様なものは従来の方法ではせいぜい -30°C 位までしか耐えない。この様な細胞をそれ以下の温度に耐えさせるためには、これらの細胞の凍結障害機構をより明らかにする必要がある。

一方、 Ca^{2+} が植物細胞の凍結融解に際し、その生存率を高める効果については、既に Levitt (1957), 照本 (1959) の断片的な報告がある。 Ca^{2+} は植物細胞での役割から考えてその作用部位はおそらく膜であると考えられるが、それ以後このことについてほとんど顧みられていない。

ここでは、凍害の機構を明らかにするために凍害防御物質の存在下でも比較的高い温度で凍害をうける培養細胞を用い、それらの細胞の凍結融解後の生存に及ぼす Ca^{2+} の効果について調べた結果を報告する。

なお、本実験において使用したタバコの培養細胞株を譲与された北里大学薬学部の庄野邦彦博士に深く感謝する。

II. 材料と方法

培養細胞とその培養条件： 使用した培養細胞は、1966年にタバコ *Nicotiana tabacum* var. Bright Yellow の髓組織から分離後 1.0 mg/l の 2,4-D と 0.1 mg/l のカイネチンを含む Mura-

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1754号

shige-Skoog (以下 MS) の寒天培地上でカルス化され、以後同じ培地で継代培養されたものである。培地の寒天濃度は 0.8%, pH 5.6 で、寒天あるいは液体培地のいずれの場合にも、MS の基本培地からグリシン, エダミンは除いてある。培養は 26°C の温度で約 1,500 lux. の白色光下で行った。液体培養は 2,4-D と、カイネチンの濃度を半分に下げた MS 培地 100 ml を、500 ml の坂ロフラスコ中で 1 分間約 120 往復の振盪培養で行った。実験に際しては液体培養を数代以上繰り返した細胞を使用した。

防御物質処理と凍結融解： 基本的な方法は前報³⁾ とほぼ同様であるが少し改めた。上記の培養条件で活発に増殖している細胞を遠心で集め、新しい培地で数回洗浄後、細胞浮遊液を目盛付のスピッツ管 (15 ml) に入れた。これを 2,000×g, 5 分間の遠心後、各管の packed cell volume を 1 ml に合せた。その上澄を捨て、各管を 10°C でインキュベートしながら、等量の 20% (V/V) DMSO と 10% (W/V) のグルコースを蒸留水に溶した凍害防御物質溶液を 1 時間かけて徐々に加えた。CaCl₂ を添加する場合にはこの溶液中に予め所定の濃度の CaCl₂ を加えておいた。なお以後の実験でのべる CaCl₂ の濃度は試料の最終体積を基準に表示した。したがって CaCl₂ はこの実験条件ではほとんど細胞内へ入らないと考えられるので実際の濃度はもっと高いはずである。

凍結は試料に防御物質溶液を添加後 -10°C の空中で約 5 分間静置してから -10°C のエタノール槽中で植氷後、管を -16, -22, -30, -40, -50 および -70°C にそれぞれ冷却されたエタノール槽中に順次移することにより行った。各エタノール槽中にはいずれも 6 分間おいた。各槽で所定の時間凍結処理を行ったのち、細胞は 40°C の温水中で融解された。細胞は融解後、10°C の水中で 30 分間おかれたのち新しい培地で徐々に希釈後約 10 倍量の培地で 3 回洗浄された。

細胞の生存率の判定： 細胞の生存率の判定は前報³⁾ 同様 Steponkus and Lanphear の方法¹¹⁾ に従って TTC 還元法で行った。なお反応は 26°C で行った。細胞中に生成されたフォオマザンは 95% エタノールで沸騰水浴中で抽出され最終抽出体積 3 ml を基準にして 530 nm の O. D. で表示された。また凍結融解後の細胞の増殖も調べた。すなわち洗浄後の細胞を 10 ml の新しい培養液の入った 50 ml のエーレンマイヤーフラスコ中で上記の培養条件で振盪培養し、12 日後の細胞の packed cell volume と生重量を測定した。なお、packed cell volume は 2,000×g, 5 分間の遠心後測定し、生重量は細胞浮遊液から培地を口紙上で吸収して除き、細胞をかき取って秤量した。

III. 結 果

凍結温度と細胞の TTC 還元量の関係： 細胞を蒸留水に浮遊して凍結した場合、-10°C の凍結においてもその TTC 還元量は著しく低い。凍害防御物質として適当な 10% DMSO と 5% グルコースの混液 (いずれも最終濃度) を徐々に細胞に加えただけでその TTC 還元量は最初の約 30~40% まで低下した。さらに洗浄後の細胞の増殖量は TTC 還元量に見合った減少がみられた。これらのことは、かなりの細胞が防御物質の薬害によって死んだことを示している。なお、クワの葉を用いた実験では 10% DMSO 処後理、未洗浄で TTC 還元量を測定してもそ

の低下はみられなかった。

防御物質の存在下で凍結した細胞の生存率が第1図に示されている。この場合防御物質を加えただけの未凍結のものを100%とした。なおタバコの培養細胞をこの条件で凍結した場合 -30°C までは融解後増殖可能である。0.125 M の CaCl₂ が同時に存在した場合、防御物質による薬害は軽減できなかったが、凍結後の生存率が明らかに高かめられ、50% の TTC 還元量で両者の生存率を比較した場合、約 12°C だけの低温側へのずれがみられた。この凍害防御効果は -22°C で最も高かったが、-40°C 以下においてはその効果はほとんどみられなかった。なお以下の実験はすべて -22°C の凍結温度で行った。

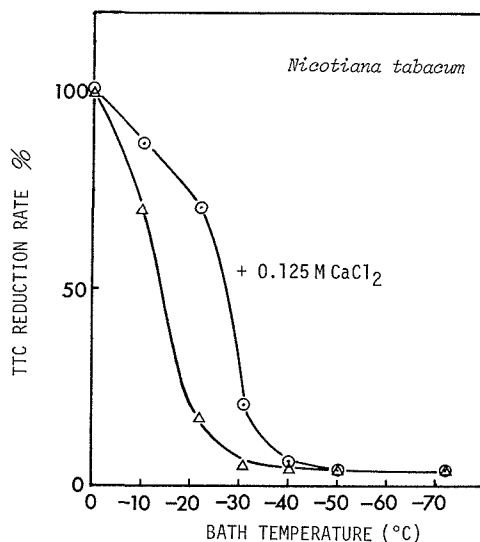
Ca⁺ 以外の一価及び二価金属イオンの効果：

ここでは同じ濃度の多くの一価および二価の金属塩化物について調べた。第1表に示した

様に CaCl₂ 以外では SrCl₂ で、かなりの効果がみられたが、MgCl₂ は逆に TTC 還元量を低下させた。一価の金属塩は概してわずかな効果しかみられなかった。これらの結果から、この効果は Ca⁺ に特異的と言える。

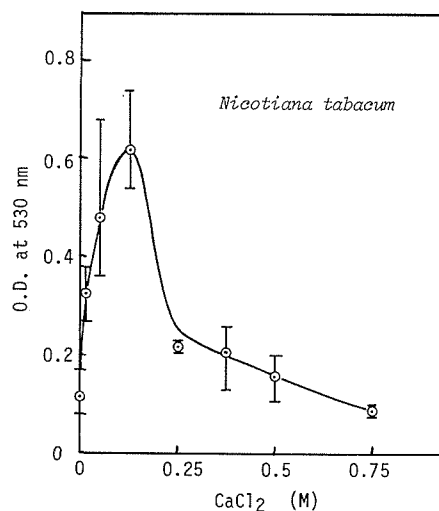
第1表 凍結融解後の細胞の TTC 還元量に及ぼす各種金属塩化物の効果

実験	添加された塩	濃度 (mM)	O. D. (530 nm)	%
1	なし	—	0.182	100
	CaCl ₂	125	0.548	301
	MgCl ₂	125	0.062	34
	KCl	125	0.236	130
	NaCl	125	0.218	120
	LiCl	125	0.242	133
2	なし	—	0.204	100
	CaCl ₂	100	0.487	239
	SrCl ₂	100	0.305	150
	MnCl ₂	100	0.273	134
	MgCl ₂	100	0.150	74
	ZnCl ₂	100	0.068	33



第1図 凍結温度と融解後の細胞の TTC 還元量との関係

△—△, 10% DMSO と 5% グルコース中で凍結;
○—○, 10% DMSO と 5% グルコース中に 0.125 M CaCl₂ を同時に添加後凍結



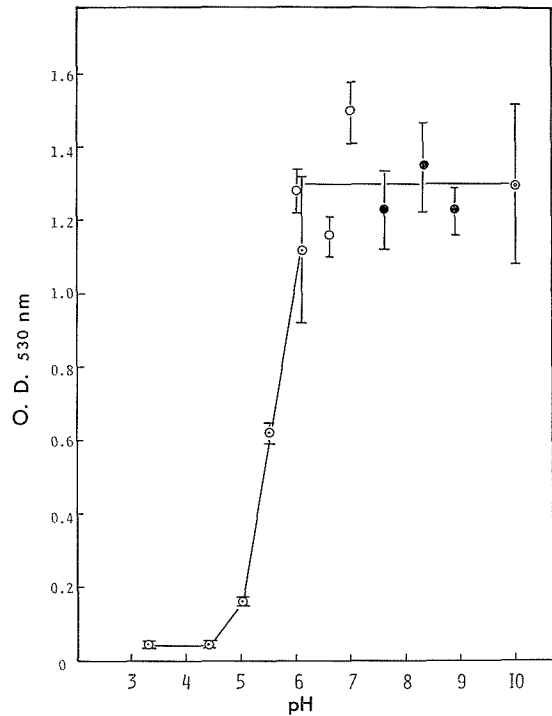
第2図 凍結融解後の細胞の TTC 還元量に及ぼす CaCl₂ の濃度の影響

CaCl₂ 添加法、濃度の表示法は本文参照
凍結温度、-22°C

Ca⁺ 効果の CaCl₂ 至適濃度と pH 依存性： 凍結融解後の細胞の TTC 還元量に及ぼす CaCl₂ の濃度の影響を調べた。第 2 図に示した様に低濃度の CaCl₂ が存在すると明らかにその効果がみられ、濃度が高まるに従いその効果は増大するが、0.125 M で最大になりそれ以上の濃度では逆にその効果は低下した。

つぎに Ca⁺ 効果に及ぼす pH の影響を調べた。第 3 図に示した様に pH 6.0 以上においては使用した緩衝液の種類にかかわらずその効果は高く、少なくとも pH 10.0 まではほぼ同程度の効果がみとめられたが、pH 5.0 以下においてはその効果は著しく低かった。

Ca⁺ による細胞の TTC 還元量の増加と細胞の増殖量の関係： Ca⁺ の凍害防御効果はたんに細胞の TTC 還元量を増加させるのみで生存率の向上を伴わない可能性があるため、凍結融解後の細胞の増殖量に対する Ca⁺ の影響を調べた。第 2 表に示した様に 12 日間の培養では Ca⁺ 効果による TTC 還元量の増加量にほぼ比例、あるいはこれより少し高い packed cell volume あるいは生重量の増加がみられた。



第 3 図 凍結融解後の細胞の TTC 還元量におよぼす CaCl₂ の効果の pH 依存性

○, 50 mM 酢酸緩衝液; ●, 25 mM トリス-マレイン酸緩衝液; ◐, 25 mM トリス-塩酸緩衝液; ◑, 25 mM グリシン緩衝液
いずれも 10% DMSO と 5% グルコースおよび 0.1 M CaCl₂ を含む各濃度の緩衝液中で凍結凍結温度, -22°C

第 2 表 凍結融解後の細胞の TTC 還元量とその後の増殖量におよぼす CaCl₂ 添加の効果

処 理	融解後 TTC 還元量 O. D. (530 nm)	融解後の細胞の増殖量*	
		PCV** (ml)	生重量 (g)
対 照 (-CaCl ₂)	0.158 ± 0.028	1.73 ± 0.85	0.72 ± 0.46
CaCl ₂ 添 加***	0.537 ± 0.039	6.82 ± 0.92	3.16 ± 0.45

* 培養 12 日目に測定。培養条件、測定条件は本文参照

** PCV, packed cell volume *** 凍害防御物質溶液へ 0.2 M になる様に添加凍結温度, -22°C

CaCl₂ の添加時の効果： 以上までの結果は CaCl₂ を予め凍害防御物質溶液中に入れておいた場合のものであった。Ca⁺ の効果が融解後に作用するという報告⁷⁾があるので、それを確かめた。この場合、試料が -22°C で凍結中に、融解後の最終濃度が表示された濃度にある様にそ

第3表 CaCl₂ の添加方法と凍結融解後の細胞の TTC 還元量との関係

処 理 条 件		濃 度 (mM)	O. D. (530 nm)	%
対 照* (-CaCl ₂)		—	0.182	—
CaCl ₂ 添加	凍 結 前	125	0.548	100
	融 解 直 後**	125	0.456	83
		63	0.448	81

* 10% DMSO と 5% グルコース中で凍結

** CaCl₂ の添加方法は本文参照

凍結温度, -22°C

れぞれの量の 1 M CaCl₂ を予め試料の上に加えて凍結しておいた。この様な加え方を「融解直後」とした。第3表に示した様に融解直後に加えた場合、凍結前に加えた時の約 80% の効果がみられた。この場合少し低い濃度においてもかなりの効果がみられた。これらの結果から、凍結に及ぼす Ca²⁺ の防御効果の大半は、凍結中ではなく、おそらく凍結融解中におきた何らかの障害を修復するか、あるいは融解後に進行する障害過程を阻止することにあることを示唆している。

IV. 考 察

凍害防御物質の存在下で凍結されたタバコ培養細胞は CaCl₂ の存在によってその生存率は高まる。融解直後に加えられてもその大半の効果がみられることから CaCl₂ の作用部位は原形質膜であるものと思われる。CaCl₂ の作用の至適濃度、pH 依存からみておそらく膜の蛋白あるいは磷脂質へ結合すると思われる。しかしそれを証明する直接的な証拠は今のところない。

植物の凍結障害と膜障害の関連についての報告は多い。Greenham¹²⁾ はアルファルファのクラウンの組織を用いて凍結に伴う組織の低周波電気抵抗を測定した。その結果、凍結開始後温度低下に伴いその抵抗は高まるが、ある温度以下においては逆に低下することを明らかにした。その後 Sukumaran 等¹³⁾ もバレイシヨの葉を用いてほぼ同様な結果を得ている。これらのことは細胞の原形質膜が凍結過程で何らかの損傷をうけて ionic barrier としての性質を失ったことを示唆している。

凍結によって膜が具体的にどのような変化を被るか明らかでない。僧都¹⁴⁾ は、酵母において急速な凍結融解あるいは凍結乾燥によってその脂質の抽出性が変わることを明らかにした。この理由として急速な凍結融解あるいは乾燥によって、膜の構造維持に重要な役割を果していると考えられている疎水結合の安定化に役立っている水の脱着あるいは状態変化がこの結合を弱めまたは破壊してしまい、その結果膜構造の変化を引き起こすと考えている。竹原¹⁵⁾ は赤血球膜を用いて凍結融解した場合、膜結合の ATPase の活性が高まることを明らかにした。これは凍結によって膜がこわれ基質である ATP が酵素に近すぎやすくなるためと考えられている。また凍結によって膜自身がガリパーゼやトリプシンの様な酵素の分解を受けやすくなることも明らかにしている^{16,17)}。この様な障害を受けた細胞の膜は全体としてあるいは局部的に構造がき

わめてルーズにそして不安定になりその選択的透過性は失なわれると思われる。そしてその障害の程度は細胞の種類や状態、凍結融解条件によりかなり異なると考えられる。そしてその程度が比較的軽度な場合には外部からの Ca^{2+} の添加により回復するが、よりはげしい障害をうけている場合には、かなり高分子の物質も細胞内へ自由に出入り出来る様になり¹⁸⁾、さらに二次的な障害へとつながるものと思われる。タバコの培養細胞において凍結によって溶出するニンヒドリン陽性物質の量を調べてみると、 -22°C の凍結では溶出する大部分の量は融解後約10分間に出てしまうが、 CaCl_2 が存在するところの溶出量は明らかに軽減された。しかし融解後10分以後に CaCl_2 を添加した場合はその効果は著しく低くかった¹⁹⁾。

Ca^{2+} によって膜障害が修復されるという今回の結果ときわめて類似した例がある。Amar 等²⁰⁾ はインゲンマメの葉を用いてコールドオスモテック処理を与えた場合、細胞の蛋白の約3.5% が遊離してきてアミノ酸の取り込み能が低下するが、この時 10^{-4}M の CaSO_4 が存在すると細胞の回復を促進すると述べている。Skou²¹⁾ はニンジンの組織に γ 線を照射した場合、膜障害をうけその半透性は失われてしまうが 0.01M の CaCl_2 がこの障害を修復することを報告している。インゲンマメの場合は RNA、蛋白合成阻害剤によりその回復が遅れることがみられている²⁰⁾。

これらの現象は質的に同じかどうか判らない。しかし Ca^{2+} で回復可能なこれらの障害はいずれも膜表面でおきている marginal な現象の様に思われる。既に高等植物では吉田²²⁾ が、酵母では僧都¹⁴⁾ が明らかにしている様に、組織あるいは細胞が凍結障害をうけ、それらの細胞の膜構造に組み込まれていると考えられるホスホリパーゼか何らかのきっかけで膜のリン脂質が分解するように機能し始めた場合、この様な膜構造の変化は細胞にとって回復不可能な致命傷になると思われる。

Levitt⁷⁾ や照本⁸⁾ は -10°C 附近の比較的高い温度での凍結でこの Ca^{2+} の効果をみている。しかしタバコの培養細胞では -20°C 以下の温度でもこれがみられるのは細胞内に DMSO が存在するためと思われる。

摘 要

タバコ *Nicotiana glauca* var. Bright Yellow の培養細胞を用いて DMSO とグルコースの存在下で凍結した時の細胞の生存におよぼす Ca^{2+} の効果について調べた。

凍結融解に対する Ca^{2+} の防御効果は、 -30°C 以上の凍結温度においてみられたが、 -40°C 以下の温度においてはみられなかった。 Ca^{2+} 以外の一価あるいは二価の金属塩化物の効果調べた結果、この効果は Ca^{2+} に特異的なものと思われる。予め防御物質溶液中へ 0.25M の CaCl_2 を加えた時が最も凍結防御効果が高かった。pH 6.0 からすくなくとも 10.0 までの範囲では Ca^{2+} の効果は高く、しかもその範囲内では効果に著しい差はみられなかった。また pH 5.0 以下では Ca^{2+} 効果はみられなかった。 CaCl_2 の存在下で凍結融解された細胞はその後の培養で、 CaCl_2 による融解後の TTC 還元量内の増加にはほぼ見合った増殖量の増加がみられた。融解直後に CaCl_2 を加えた場合、凍結前に加えた時の約 80% の効果がみられたことから、 Ca^{2+} は凍結融解の過程に原形質膜でおこった何らかの障害を修復するものと思われる。

文 献

- 1) Latta, R. 1971 Preservation of suspension cultures of plant cells by freezing. *Can. J. Bot.*, **49**, 1253-1254.
- 2) Nag, K. K. and Street, H. E. 1973 Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. *Nature*, **245**, 270-272.
- 3) 菅原康剛・酒井 昭 1973 植物液体培養細胞の液体窒素中における生存. 低温科学, 生物篇, **31**, 79-83.
- 4) Sugawara, Y. and Sakai, A. 1974 Survival of suspension-cultured sycamore cells cooled to the temperature of liquid nitrogen. *Plant Physiol.*, **34**, 722-724.
- 5) Daugall, D. K. and Wetherell, D. F. 1974 Storage of wild carrot cultures in the frozen state. *Cryobiology*, **11**, 410-415.
- 6) Finkle, B. J.・菅原康剛・酒井 昭 1975 植物培養細胞の凍結 (II). 日本植物生理学会年会講演要旨集 p. 57.
- 7) Levitt, J. 1957 The moment of frost injury. *Protoplasma*, **48**, 289-302.
- 8) 照本 熊 1959 植物細胞の耐凍性に影響する媒液中の無機塩類の効果について. 低温科学, 生物篇, **17**, 9-19.
- 9) Jones, R. G. W. and Lung, O. R. 1967 The function of calcium in plants. *Bot. Rev.*, **33**, 407-426.
- 10) Murashige, T. and Skoog, F. A. 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- 11) Steponkus, P. L. and Lanphear, F. O. 1967 Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol.*, **42**, 1423-1426.
- 12) Greenham, C. G. 1966 The stages at which frost injury occurs in alfalfa. *Can. J. Bot.*, **44**, 1471-1483.
- 13) Sukumaran, N. P. and Weiser, C. J. 1972 Freezing injury in potato leaves. *Plant Physiol.*, **50**, 564-567.
- 14) 僧部 博 1969 酵母細胞脂質におよぼす凍結融解及び凍結乾燥の影響. 低温科学, 生物篇, **27**, 23-30.
- 15) 竹原一郎 1969 ウサギ血球膜 ATPase に対する凍結の影響 II. 低温科学, 生物篇, **27**, 161-164.
- 16) 竹原一郎 1970 ウサギ血球膜の凍結: 血球膜に対するホスホリパーゼ C の反応性. 低温科学, 生物篇, **28**, 87-89.
- 17) 竹原一郎 1971 ウサギ血球膜の凍結: 血球膜に対するトリブシンの反応性. 生物篇, 低温科学, **29**, 65-68.
- 18) Souzu, H. 1967 Location of polyphosphate and polyphosphatase in yeast cells and damage to the protoplasmic membrane of the cell by freeze-thawing. *Arch. Biochem. Biophys.*, **120**, 344-351.
- 19) Sugawara, Y. and Sakai, A. in preparation.
- 20) Amar, L. and Reinhold, L. 1973 Loss of membrane transport ability in leaf cells and release of protein as a result of osmotic shock. *Plant Physiol.*, **51**, 620-625.
- 21) Skou, J. P. 1963 Changes in the permeability of carrot tissues due to γ -irradiation and other physical and chemical treatments. *Physiol. Plant.*, **16**, 423-441.
- 22) 吉田静夫・酒井 昭 1973 植物の凍結障害とリン脂質の分解 I. 凍結中における植物のリン脂質の分解. 低温科学, 生物篇, **31**, 31-39.

Summary

Effect of calcium ion on the survival of cultured tobacco cells (*Nicotiana tabacum* var. Bright Yellow) after freeze-thawing was studied in the presence of dimethyl sulfoxide and glucose as cryoprotective additives.

In the cells frozen to the temperatures higher than -30°C , the survival was noticeably increased in the presence of calcium chloride, but not of other monovalent or bivalent metal chlorides. The highest survival was obtained when chloride was added to the cryoprotective solution at the concentration of about 0.25 M in the range of pH from 6.0 to at least 10.0. The survival of frozen-thawed cells was almost the same when chloride solution was added either freezing or immediately after thawing. These results suggest that calcium ion appears to play an important role in repairing some deleterious changes produced in plasma membranes during freeze-thawing.