



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	沿岸域海底泥中に存在する珪藻類休眠期細胞の凍結耐性
Author(s)	板倉, 茂; 長崎, 慶三; 河村, 知彦 他
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 62(1), 15-19
Issue Date	2012-03-28
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/49095
Type	departmental bulletin paper
File Information	15-19.pdf



沿岸域海底泥中に存在する珪藻類休眠期細胞の凍結耐性

板倉 茂¹⁾・長崎 慶三¹⁾・河村 知彦²⁾・今井 一郎³⁾

(2011 年 12 月 27 日受付, 2012 年 1 月 11 日受理)

Cryopreservation tolerance of Marine Diatom Resting Stage Cells in the Coastal Sea Bottom Sediments

Shigeru ITAKURA¹⁾, Keizo NAGASAKI¹⁾, Tomohiko KAWAMURA²⁾ and Ichiro IMAI³⁾

Abstract

In spite of its importance in microbiology, information on cryopreservation of marine diatom is limited. An attempt was made to develop cryopreservation procedure of marine diatom resting stage cells which abundantly exist in the bottom sediment of coastal area. Bottom sediment samples from the Seto Inland Sea (Harima-Nada) were used for sub-zero temperature preservation experiment in this study. The condition giving optimal survival of microalgae in cryopreserved sediments was as follows: with sorbitol (1 M) as additives, 1/3 salinity, at -80°C preservation (no pre-cooling). Under this condition, two diatoms, *Thalassiosira pseudonana* and *Nitzschia* sp., and some unidentified microalgae were recovered from the sediments, but the vegetative cells of obtained diatoms were not able to be cryopreserved again under the same conditions. Present result suggests that these two diatoms were preserved as resting stage cells in the coastal bottom sediments, and the diatom resting stage cells might be more resistant to cryopreservation than the vegetative cells.

Key words: diatom, resting stage cells, cryopreservation, coastal bottom sediment, *Thalassiosira pseudonana*, *Nitzschia* sp.

はじめに

現在、微細藻類の系統保存を行う方法としては継代培養法がよく用いられているが、この方法は労力的あるいは経済的負担が大きい上に、ミスラベルや培養中に生ずる遺伝的組成変化等の可能性があり、保存株を確実に維持するためには充分とは言えない。そこで、継代培養法以外の、凍結あるいは乾燥といった手法による長期保存システムの確立が強く望まれることになる。しかし、現時点において藍藻や緑藻などのごく限られた微細藻類の凍結保存条件については知見がみられるが(渡辺ら, 1984; 渡辺, 1990; 村上・小檜山, 2009), その他の多くの微細藻類の凍結保存に関する知見はさきめて少ないのが現状である。特に、今回とりあげた珪藻類の凍結保存に関しては情報が少なく、都留(都留, 1972)や Saks (Saks, 1978), McLellan (McLellan, 1989) による数種の珪藻類についての報告がみられるのみで未だ実用化に至っておらず、珪藻類における凍結保存の困難さが推察される。海産珪

藻類のなかには有用水産生物の種苗生産等で用いられる種も含まれており (Werner, 1977), 凍結保存によってもたらされる利点は産業的にも大きいと考えられる。

沿岸性の珪藻類の中には、休眠孢子 (resting spores) や休眠細胞 (resting cells) と呼ばれる休眠期細胞 (resting stage cells) を形成して、海底泥中で一時期を過ごす種が知られている (Hargraves and French, 1983)。これらの休眠期細胞は、栄養細胞と比較して環境の変化(乾燥や温度変化)に強い耐性を有することが明らかにされており (French and Hargraves, 1980), 珪藻類の凍結保存に際して休眠期細胞を利用すれば、より確実に保存が可能であると予想される。実際に他の藻類においても、例えば藍藻類では、アキネート形成種が非形成種にくらべて凍結乾燥処理に耐性であることが報告されている(都留, 1972; Watanabe, 1959)。しかし珪藻類の場合、これまでに室内培養条件下で休眠期細胞の形成条件が明らかにされた種は少なく、さらにその凍結耐性について調べた例は皆無である。

一方、沿岸域の海底泥中には浮遊珪藻類の休眠期細胞

¹⁾ 独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所環境保全研究センター

(e-mail: itakura@affrc.go.jp)

(Research Center for Environmental Conservation, National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, Fisheries Research Agency)

²⁾ 東京大学大気海洋研究所海洋生物資源部門資源生態分野

(Atmosphere and Ocean Research Institute, University of Tokyo)

³⁾ 北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物資源科学部門海洋生物学分野

(Faculty of Fisheries Sciences Graduate School of Fisheries Sciences School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

が高密度 ($10^3 \sim 10^6/\text{g} \cdot \text{wet sediment}$) で存在することが明らかにされており (今井ら, 1990; 板倉・今井, 1991), 海底泥試料を利用することで珪藻類休眠期細胞の凍結耐性についての情報 (凍結耐性種や凍結条件等) が得られるものと期待される。本研究では, このような背景のもとで, 微細藻類の長期保存システムの確立を目指す上で必要な基礎的知見を蓄積することを目的として, 凍結・解凍を経た現場海底泥試料中で生残し出現する珪藻種の分離・同定を行った。また, 実験によって得られた珪藻類の栄養細胞について再び凍結実験を行い, 底泥中に存在する細胞 (休眠期細胞) と培養株 (栄養細胞) の耐凍性の違いについても検討した。

材料及び方法

実験には, 1992 年 5 月 13 日に水産庁南西海区水産研究所 (現在: 独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所) の調査船「しらふじ丸」で K K 式柱状採泥器によって採取した播磨灘の海底泥 (底泥表面から 1 cm 深まで) を使用した。採取した海底泥は, 不透明なプラスチック容器に入れ, 約 11°C の暗条件下に 2 週間保存した。この海底泥試料の適量を, ① ソルビトール (凍害防止剤, 最終濃度 1 M となるよう添加) の有無, および ② 塩分濃度 1 (海水の塩分濃度のまま) と塩分濃度 1/3 (蒸留水で海水を 1/3 に希釈) の, それぞれの組み合わせ (4 通り) の条件下で調製し, 凍結保存用チューブ (Nunc クライオチューブ: Nunc 社製) に分注後 (泥: 溶媒 = 1:2 の体積比), 6 通りの保存条件 (① 温度 -20°C で凍結, ② -80°C で凍結, ③ -20°C で予備凍結した後 -196°C で凍結, ④ -50°C で予備凍結した後 -196°C で凍結, ⑤ -196°C で凍結, ⑥ 11°C で保存) で保存した。ただし, 予備凍結はいずれも 20 分間とした。これらのサンプルを, 凍結保存開始後 2 日目および 37 日目に取り出し, 水道水を張ったバット中で解凍後, 微細藻類培養用の改変 SWM-3 培地 (伊藤・今井, 1987) を用いた遠心分離による洗浄 ($\times 100 \text{ g}$, 10 分間) を 2 回施してから, 組織培養用容器 (48 ウェル・マルチプレート: Costar 社製) のそれぞれ 5 ウェルずつに分注した。マルチプレートは, 20°C , 14 hL: 10 hD (約 4,000 lux) の培養条件下に置いた。海底泥中に存在する多くの珪藻類休眠期細胞は, 光の照射が引き金となって約 1 日以内に発芽するので (板倉ら, 1993; 板倉, 2000), 培養開始後 4-5 日後に倒立顕微鏡下で微細藻細胞の増殖の様子を観察し, 微細藻細胞の増殖がみられたウェルの数を記録した。なお微細藻細胞の増殖活性の有無は, 倒立型落射蛍光顕微鏡 (DIAPHOT-TMD: Nikon 社製) を用いて青色励起光下での観察を行い, クロロフィルの赤色自家蛍光の有無で判定した。

上記のプレート観察により増殖が確認された微細藻細胞を, マイクロピペット法 (岩崎, 1967) により洗浄・分離し, 改変 SWM-3 培地で洗浄後, 組織培養用容器の 1 ウェ

ルに 1 細胞ずつ単離し, 20°C , 14 hL: 10 hD (約 4,000 lux) の条件下で培養した。単離した微細藻細胞のうち珪藻類については透過型電子顕微鏡による形態観察を行ない, 種を同定した。

さらに, 得られた各微細藻株の栄養細胞について, 海底泥試料の凍結実験の結果から最適と判断された凍結条件 (1 通り) を用いた再凍結と保存を試みた。凍結開始後 1 週間目に, 前記の実験と同様の方法で解凍・洗浄し, 培養を行なった。解凍後 7 日目に倒立顕微鏡下で藻細胞の増殖の様子を観察し, 藻細胞の増殖がみられたウェル数を記録した。

結果と考察

Table 1 に, それぞれの保存条件下における実験結果を示した。凍害防止剤 (ソルビトール) を加えなかった実験区では, 解凍後の微細藻細胞の増殖が全くみられなかったのに対し, 添加区では -20°C 凍結区を除く全ての実験区で解凍後の微細藻細胞の増殖が確認された。このことから, 底泥中に存在した微細藻細胞の凍結時の損傷がソルビトールの添加により緩和されたものと考えられた。また, 塩分濃度 1 の実験区と塩分濃度 1/3 の実験区を比較した場合, 微細藻細胞の増殖がみられたウェル数にはほとんど差が認められなかったが, 落射蛍光顕微鏡で観察したクロロフィルの赤色自家蛍光は, 塩分濃度 1/3 の実験区のほうが顕著であった。つまり, 塩分濃度 1/3 の実験区の方が凍結解凍後の藻細胞の活性が高く保持されているものと判断された。凍結温度については, 予備凍結を行わず直接 -80°C で凍結した場合が最も生残率が高かった。これに対して, -196°C (液体窒素中) で保存した試料の生残率はそれと比較してやや低いものであった。また, 凍結後 2 日目で解凍した場合の方が, 37 日目に解凍した場合と比較して生残率は低いという一見矛盾した結果となった。このような結果が得られた理由は不明であるが, 泥粒子の影響や凍結温度などの点を含めて今後の検討が必要と思われる。

以上の結果から, 底泥中の微細藻細胞の凍結保存には, ソルビトール 1 M 添加, 塩分濃度 = 海水 $\times 1/3$, 予備凍結を経ずに -80°C で凍結, の条件が最も適していると判断された。そこで, これ以降の凍結実験 (分離した微細藻の再凍結実験) においてもこの条件を用いることとした。

上記の最適条件で凍結した海底泥試料を凍結後 2 日目に解凍した結果, 球形, 米粒型, 針型等の微細藻類の増殖が確認された。それらをマイクロピペットで洗浄・分離し, 組織培養用容器の 1 ウェルに 1 細胞ずつ単離した結果, 最終的に 25 株を得た。各株について光学顕微鏡による観察を行なった結果, 少なくとも 7 種が分離されたものと推定された。それぞれの形態学的特徴を Table 2 に示した。なお, 各タイプの名は, 分離されたウェルの番号を表す。珪藻類以外の微細藻類は種を同定することが

Table 1. Observed well numbers (out of 5 wells) of viable microalgae existence after the cryopreservation experiment with various kinds of conditions.

Cryopreservation condition ^{*1}	With sorbitol ^{*2}				Without sorbitol			
	Salinity 1 ^{*3}		Salinity 1/3 ^{*4}		salinity 1		salinity 1/3	
	after 2 days	after 37 days	after 2 days	after 37 days	after 2 days	after 37 days	after 2 days	after 37 days
①	0	n.t. ^{*5}	0	n.t.	0	n.t.	0	n.t.
②	5	5	5	5	0	n.t.	0	n.t.
③	2	5	2	4	0	n.t.	0	n.t.
④	4	5	3	5	0	n.t.	0	n.t.
⑤	1	4	1	4	0	n.t.	0	n.t.
⑥	5	5	5	5	5	n.t.	5	n.t.

^{*1} ①: Preserved under -20°C ^{*2} ②: Preserved under -80°C ^{*3} ③: Kept under -20°C first (pre-cooling), then preserved under -196°C ^{*4} ④: Kept under -50°C first (pre-cooling), then preserved under -196°C ^{*5} ⑤: Preserved under -196°C ⑥: Preserved under 11°C (control)^{*2} Sorbitol (a final concentration of 1 M) was added as an agent for preventing the adverse effects of freezing.^{*3} Preserved under the seawater salinity.^{*4} Preserved under the diluted salinity (1/3 seawater salinity).^{*5} Not tested.

Table 2. The morphological characteristics of the isolated microalgae and the result of species identification with their cryopreservation tolerance.

Cell type	Morphological characteristics	Result of species identification	Cryopreservation tolerance [*]
A3	Roundish cell shape with dark green pigments. Cell diameter: 2-3 μm	Unidentified	5
A4	Roundish cell shape with dark green to pale cinnamon color pigments.	Unidentified	5
B3	Round to oval cell shape. Forms short cell chains. Dark green pigments.	Unidentified	0
B4	Centric diatoms, Cell diameter: ca. 3 μm . No cell chains.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	0
E1	Pennate diatoms, Major axis: 5 to 6 μm . Dark cinnamon color pigments.	<i>Nitzschia</i> sp.	0
E5	Pennate diatoms, Major axis: ca. 15 μm . Dark cinnamon color pigments.	<i>Nitzschia</i> sp.	0
H1	Centric diatoms, Cell diameter: ca. 3 μm . Light cinnamon pigments.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	0

^{*} Number of wells (out of 5 wells) in which viable cells were observed after the cryopreservation experiment of each microalga.

できなかったが、珪藻類については細胞の形態的特徴から種を同定した (Table 2)。Fig. 1 に今回分離された珪藻類 2 種 (Table 2 のタイプ B4, E1, E5, H1) の蓋殻の透過型電子顕微鏡写真を示した。タイプ B4 および H1 の株は短円筒形の細胞で、蓋殻は直径 2.3-7.8 μm のほぼ円形であった。蓋殻縁には 10 μm に 7-8 本の有基突起輪があり、その中の 2 本の有基突起間に 1 本の唇状突起がある。蓋殻の中

心付近にも 1 本の有基突起が存在する。これらの特徴および蓋殻面の小室配列は Hasle (1978) や高野 (1990) が記載した *Thalassiosira pseudonana* Hasle et Heimdal の特徴と一致する (Fig. 1-a)。また、タイプ E1 および E5 の株は、蓋殻長 5.4-14.5 μm 、幅 2.4-4.9 μm の羽状珪藻である。蓋殻の片方の縁に縦溝管 (竜骨) があり、縦溝管の間板は 1 μm に約 2 本ある。蓋殻面には 1 列の小孔列からなる切頂条線

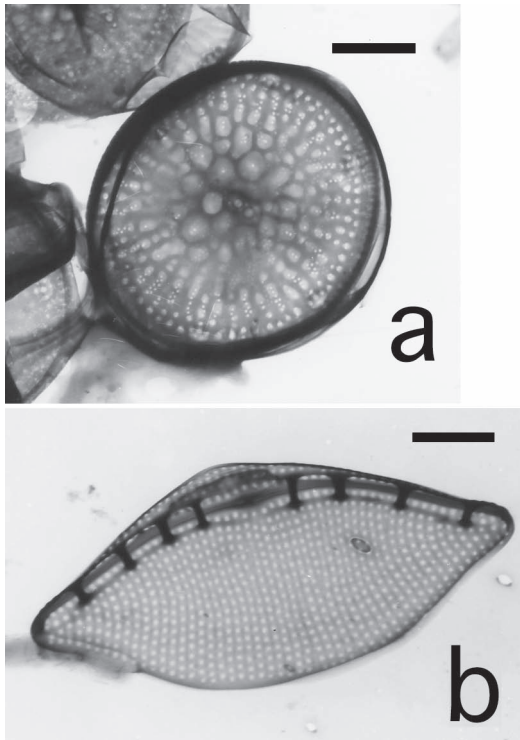


Fig. 1. Transmission electron micrographs of isolated diatoms which recovered from the coastal sediments after cryo-preservation. Scale bar: 1 μ m.
a: *Thalassiosira pseudonana* Hasle et Heimdal.
b: *Nitzschia* sp.

が1 μ mに5-8本ある。これらの特徴から、この種は *Nitzschia* 属の珪藻と考えられるが、これまでに記載された種には一致した形態的特徴を持つものが認められなかったため、本論文では *Nitzschia* sp. とした (Fig. 1-b)。

得られた微細藻類の再凍結実験において、タイプ A3 および A4 の株では耐凍性が再確認され (Table 2)、栄養細胞の状態でも凍結保存可能な微細藻種と考えられた。しかしながら、他のタイプ、特に珪藻類では底泥試料の凍結実験でみられたような耐凍性を全く再現することができなかった。この結果から、今回分離された珪藻類においては、海底泥中に存在している状態 (休眠期細胞) の方が培養された状態 (栄養細胞) よりも強い耐凍性を有していることが示唆された。

今回分離された珪藻類のうち特に *Thalassiosira pseudonana* は、エビ類や二枚貝類の幼生の初期餌料として頻繁に用いられる産業的にも重要な植物プランクトンである (Werner, 1977)。本種における休眠期細胞の形成条件については現在不明であるが、将来、室内培養条件下で休眠期細胞の形成に成功すれば、凍結保存を通じた *Thalassiosira pseudonana* 株の安定的な保存と供給へとつながる可能性があり、産業への貢献が期待される。

今回の実験では、現場海底泥中に *Thalassiosira* と同程度かあるいはそれ以上の密度で休眠期細胞が存在している *Chaetoceros* 属や *Skeletonema* 属の珪藻類 (今井ら, 1990) が

解凍後に出現してこなかった。今回の凍結実験では海底泥試料を用いているので、多くの要因の影響が考えられるが、これらの珪藻種の休眠期細胞は耐凍性に相違があるものと判断される。今後はさらに条件を変えて凍結実験をするとともに、人工的に形成させた休眠期細胞を用いた凍結実験を行なう必要もあろう。また、現場海底泥試料を冷暗所 (約 10°C) で保存した場合、約 3 年後にも珪藻類が出現してくることが知られているが (今井ら, 1990)、凍結保存によってどの程度の期間保存可能であるか、といった問題も今後検討しなければならない。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、海底泥の採取に協力して戴いた瀬戸内海区水産研究所の調査船「しらふじ丸」の乗組員の方々に深く感謝いたします。また、広島大学名誉教授遠部 卓博士、東京大学アジア生物資源環境研究センター教授福代康夫博士、香川大学瀬戸内圏研究センター長本城凡夫博士、ならびに独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所資源生産部沿岸資源グループ長薄 浩則博士には、有益な御助言ならびに実験への御協力を戴きましたことを感謝いたします。本研究は環境庁の国立機関公害防止予算「有害赤潮の生態学的制御による被害防除技術の開発に関する研究」(平成元年~5年度)の一環として行なわれた。記して謝意を表します。

参 考 文 献

- French, F.W. and P.E. Hargraves (1980) Physiological characteristics of plankton diatom resting spores. *Mar. Biol. Lett.*, **1**, 185-195.
- Hargraves, P.E. and F.W. French (1983) "Survival strategies of the algae." ed. by G.A. Fryxell, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 49-68.
- Hasle, G.R. (1978) Some freshwater and brackish water species of the diatom genus *Thalassiosira* Cleve. *Phycologia*, **17**, 263-292.
- 今井一郎・板倉 茂・伊藤克彦 (1990) 播磨灘および北部広島湾の海底泥中における珪藻類の休眠細胞の分布. 沿岸海洋研究ノート, **28**, 75-84.
- 板倉 茂・今井一郎 (1991) 海底泥中の珪藻類休眠細胞密度の地理的分布と季節変化. 「有害赤潮の生態学的制御による被害防除技術の開発に関する研究」平成2年度研究報告書, 南西水研, pp. 15-30.
- 板倉 茂・山口峰生・今井一郎 (1993) 培養条件下における浮遊性珪藻 *Chaetoceros didymus* var. *protuberans* 休眠胞子形成と発芽. 日本水産学会誌, **59**, 807-813.
- 板倉 茂 (2000) 沿岸性浮遊珪藻類の休眠期細胞に関する生理生態学的研究. 瀬戸内海区水産研究所研究報告, **2**, 67-130.
- 伊藤克彦・今井一郎 (1987) ラフィド藻. 「赤潮生物研究指針」, 日本水産資源保護協会編, 秀和, pp. 122-130.
- 岩崎英雄 (1967) 微細藻類の分離と培養. 日本水産資源保護協会, pp. 1-55.
- 村上明男・小檜山篤志 (2009) 1章 植物・藻類・細菌の

- 材料の入手と栽培・培養-9. 藻類. 低温科学, **67**, 53-59.
- McLellan, M.R. (1989) Cryopreservation of diatoms. *Diatom Research*, **4**, 301-318.
- Saks, N.M. (1978) The preservation of salt marsh algae by controlled liquid nitrogen freezing. *Cryobiology*, **15**, 563-568.
- 高野秀昭 (1990) 珪藻綱円心目コスキノディスクス亜目タラシオシーラ科 *Thalassiosira pseudonana* Hasle et Heimdal. 日本の赤潮生物, 福代康夫・高野秀昭・千原光雄・松岡數充 (編), 内田老鶴圃, 東京 pp. 222-223.
- 都留信也 (1972) 微細藻類長期保存の試み. 凍結及び乾燥研究会誌, **18**, 55-57.
- Watanabe, A. (1959) Some devices for preserving blue-green algae in viable state. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **5**, 153-157.
- 渡辺 信 (1990) 海産微細藻類の系統保存・凍結保存. 月刊海洋, **22**, 126-130.
- 渡辺 信・笠井文絵・桶渡武彦・須田彰一郎・根井外喜男 (1984) 各種微細藻類の液体窒素による凍結保存法の検討—凍結後の生存について. 凍結及び乾燥研究会誌, **30**, 23-26.
- Werner, D. (1977) *The biology of diatoms (Botanical monographs)*. Blackwell Scientific Publications, London.