

## 第4回 微細藻類の凍結保存方法

森 史

独立行政法人国立環境研究所 微生物系統保存施設  
財団法人地球・人間環境フォーラム つくば研究所  
〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2

### Cryopreservation methods of microalgae

Fumi Mori

Microbial Culture Collection, National Institute for Environmental Studies  
Global Environmental Forum, Japan, Tsukuba Laboratories  
16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan

#### 1. はじめに

藻類が多系統であり多様な生物の寄せ集めであることは、近年周知の事実となっている。藻類学の教科書的な「藻類の多様性と系統」(千原編, 1999)を開くと、「藻類とは、酸素を発生する光合成を行う生物の中からコケ植物、シダ植物、および種子植物を除いた残りのすべて」という広い定義がなされている。さらには、渦鞭毛藻やミドリムシ藻の中には光合成を行わない種も存在し、それらも現在は藻類として扱われている。

多くの他の生物に違わず、藻類における最良の長期保存法は液体窒素内での凍結保存である (Day *et al.*, 1997)。しかしながら、多様である藻類には広く適応する一つの凍結プロトコルがまだ見つからない。よって、全ての分類群、種、株ごとの条件検討が必要となる。これは世界のカルチャーコレクションにおいて、微細藻類の凍結保存が他の生物と比較して立ち遅れていることの一つの理由の一つであると思われる。

国立環境研究所 (NIES) では現在、保有する微細藻類株の約 25% を凍結保存している。その内訳は藍藻 (シアノバクテリア) と紅藻、そして緑藻の一部である。本稿では NIES で実用している凍結手順 (図 1) を紹介し、経験上著者が留意している点や凍結困難株に対し検討する条件についても触れたいと思う。

#### 2. 凍結保存法

##### 1) 培養

藻類株それぞれの増殖に適した培地・条件下で培養する。通常、寒天培地を使用している株においても試験的に液体培養を並行して行うが、結果的には長期間をかけて寒天培養した方が高い細胞収量を得られることが多い。微細藻類では一般に対数期終期から定常期初期の細胞が凍結保存に適している (Fenwick &

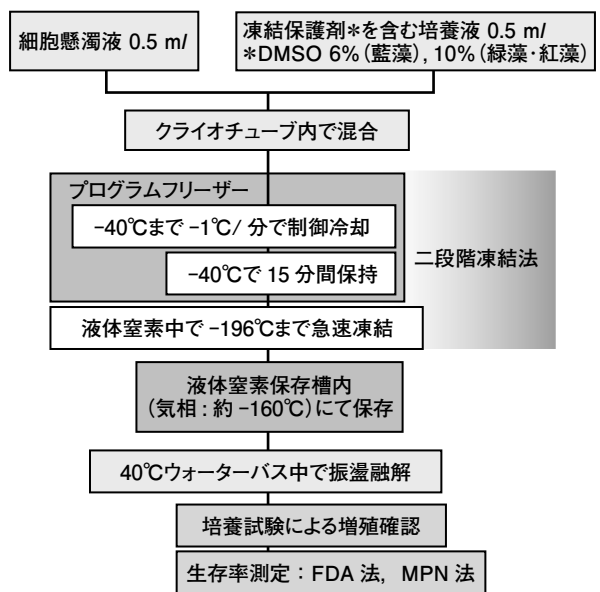


図 1 NIES での微細藻類の凍結保存手順



図2 プログラムフリーザーと温度記録計

Day, 1992; 寺内ら, 1997). 培養期間は株によって異なるが、液体培養の場合は細胞増殖が安定するまで1-2ヶ月は必要となる。また、寒天培養には4ヶ月ほどをかけることもある。

凍結困難株においては増殖曲線を求め、各ステージでの生存率比較が必要となる(引地ら, 1996)。

## 2) 凍結保護剤

凍結保護剤が細胞に対してどのように機能しているかについてはまだ解明されていないが、過冷却温度を下げ、致命的となる細胞内凍結をおこりにくくすると考えられている。藻類の凍結保存においても凍結保護剤は経験的に使用されており、最も代表的なものはジメチルスルホキシド(dimethylsulfoxide, DMSO)である。本施設では藍藻に最終濃度3%DMSO、紅藻と緑藻トレボキシア藻綱には5%DMSOを使用している。

しかし、鞭毛を持ち遊泳する緑藻類やユグレナ藻類においては、3-10%メタノールがより有効なことがある(Day *et al.*, 2000)。グリセロールの有効性は藻類ではあまり高くないが、著者の予備実験結果ではグリセロールのみで凍結可能な株も稀に存在する。ただし無菌株でない場合、解凍後の培養中に増殖の速いバクテリアに取って代わられる危険性が高いため、解凍後のグリセロール除去を念入りに行うなど留意する。いずれにしても新たな分類群の株を凍結保存するには、3-10%DMSO、3-10%メタノール、5-15%グリセロールを用いて予備実験を行い、適した保護剤を検討



図3 ウォーターバスでの解凍

する必要がある。

海産微細藻類においては、50%海水(海水をDWで希釈)で作製した培地に保護剤を添加した方が高生存率を示す場合があるため(Fenwick and Day, 1992; 寺内ら, 1997)、検討条件に加えている。

## 3) 凍結手順

慣習的にDMSOとメタノールはMillex-LGフィルター(Millipore, USA)でろ過滅菌、グリセロールはオートクレーブ滅菌(121°C, 20分間)している。他の使用器具も滅菌し、以降の作業はクリーンベンチ内の無菌条件下で行う。

凍結保護剤が最終濃度の2倍になるよう培地と混合して保護溶液を作製し、氷上で0°Cに冷やしておく。これは保護溶液と細胞懸濁液を混合した際に発熱し、細胞にダメージを与えるのを防ぐためである。十分な濃度の細胞懸濁液を得るため、寒天培養株の場合は液体培地に懸濁し、液体培養株は遠心分離(2,000-2,500 rpm)で細胞を集める。細胞懸濁液はコントロールの生存率測定用に0.5 mlほど取り置いておく。

ポリプロピレンクライオチューブ(クライオバイアル, 2 ml, U底, 自立, 内蓋, 滅菌済, グライナー, Germany)に細胞懸濁液0.5 mlを分注し、氷冷した保護溶液を0.5 ml加えてキャップをしっかりと閉める。キャップは強く閉めすぎるとパッキンがよれて隙間ができてしまうため、強すぎず緩すぎず適度なところで止めなければならない。チューブをよく振って溶液を混合した後、室温に15分間静置して保護溶液を細胞に浸透させる。

藻類の凍結では二段階凍結法が急速凍結法に比べて明らかに有効である (Taylor & Fletcher, 1999). プログラムフリーザー (Kryo 320-1.7, PLANER, UK; 図2) の庫内を予め 20°C に保温しておき, 庫内のケーンにチューブをセットする. プログラムを走らせて毎分 1°C の冷却速度で -40°C まで下げ, そのままプログラムフリーザー内 (-40°C) で 15 分間保持する (第一段階). その後, チューブをケーンから素早く外し, 液体窒素を入れたデュワー瓶 (Shuttle Drum JIK-S10, THERMOS, 東京) に投入して急速凍結を行う (第二段階). 液体窒素に 1 時間以上浸けた後に液体窒素保存槽 (約 -160°C 気相保存) に収納する.

第一段階の予備凍結温度は, 多くの藻類で -30°C から -50°C の間とされ, 良い結果を得られている (Taylor & Fletcher, 1999). 著者は初め予備凍結温度を -30°C としていたが (Mori *et al.*, 2002a), Kuwano *et al.* (1993) および Kuwano & Saga (2000) に従い, 現在は -40°C までプログラムフリーザーで冷却している.

冷却速度は生存率に大きく影響する条件の一つである. 致命的ダメージとなる細胞内氷晶の形成を避けるため, 冷却速度を調整して細胞内の適度な脱水を行わなければならない (Morris *et al.*, 1986). 細胞内凍結を生じやすい細胞は毎分 0.5°C のゆっくりとした冷却速度にした方がよい (Day *et al.*, 2000).

#### 4) 解凍

試料は 1 週間以上液体窒素保存槽に保管した後, 生存率確認のために解凍を行っている. 凍結試料の解凍は 30-40°C で急速解凍するのが一般的である. 著者はウォーターバス (サーマルロボ TR-1, アズワン, 大阪; 図3) の温度を当初 40°C に設定して用いていたが, 現在は温度の振れ幅を考慮して 39.5°C 設定としている. ケーンの最下段にチューブを速やかにセットし, ウォーターバス中でチューブ内の氷晶が完全に消えるまで振盪解凍する. 解凍すべきチューブが数本ある際は, ケーンを 3 本まで使用し一度に解凍している. ただし, 使用した凍結保護液が異なる場合は, 融解速度に大きく差が生じるためこの方法は避ける.

解凍したチューブは周囲をエタノール消毒し, なるべく迅速に中の細胞懸濁液 0.3 ml を液体培地 10 ml が入った試験管に移し, よく攪拌する. さらに凍結保護剤の細胞への毒性を懸念し, 細胞を植え込んだ試験管から 1 ml を取り, 新しい培地の入った試験管に移す. 2 本の試験管は通常条件よりも弱い光強度下で培

養し, 細胞の増殖を確認する.

Fleck *et al.* (2006) によるユーグレナ藻の研究では, 二段階解凍法 (液体窒素から -130°C のプログラムフリーザー内に移して 30 分間置き, その後 40°C ウォーターバス中で解凍) が急速解凍法よりも良い生存率を示している.

#### 5) 生存率測定

生存率が低い場合, 耐凍性を持つ細胞だけがセレクションされる危険性があるため, なるべく 50% 以上の生存率を得たいと考えている. 著者が日常的に使用している測定法は以下の fluorescein diacetate (FDA) 法と 最確数 (Most Probable Number: MPN) 法である.

##### (1) FDA 法

FDA (SIGMA, USA) を 100% アセトンで溶き, 0.5% FDA ストック液を作製する. 1.5 ml エッペンチューブに少量 (50-100  $\mu$ l) を分注し -20°C で保管しておき, 使用時にストック液を培地で 50 倍希釈する. この染色液には時間経過と共に結晶の析出が見られるため, 使用の度に調整して直ぐに使用する. スライドグラス上に細胞懸濁液と培地で 50 倍希釈した染色液を等量 3.5  $\mu$ l ずつを置いて軽く混ぜ, カバーグラスをかけて 5-20 分間室温に置く. B 励起フィルター (BP460-490 と BA515IF) を入れた蛍光顕微鏡 (BX50, OLYMPUS, 東京) で観察し, 蛍光を発する生細胞数を数え生残率を算出する (生残率 = 蛍光を発する細胞数  $\div$  可視光下で見える細胞数  $\times$  100). 凍結前コントロールと解凍後の生存率を比較し, 最終的な生存率を得る (Day & DeVille, 1995).

FDA 法による生存率測定は, 迅速で簡便なので全凍結保存株について行っている. 蛍光顕微鏡観察では同時に, 細胞に形態変化が生じていないのかも確認する. 藍藻と紅藻は比較的染色されやすいが, 緑藻は全般的に染まりにくいいためカウントが困難であることが多い. また藍藻以外では, 死細胞内でのエステラーゼ活性の残留が懸念されるため, 生存率カウントは解凍後 6 時間以上経過したもので行っている (Mori *et al.*, 2002b).

生体染色による細胞の生死判定は細胞分裂能の有無を評価しているわけではない. つまり, 生細胞でも分裂能を失っている可能性が考えられるため, 生体染色法による生存率の数字だけの判断は避け, 培養後の生育状況を踏まえた上で評価することが重要である.

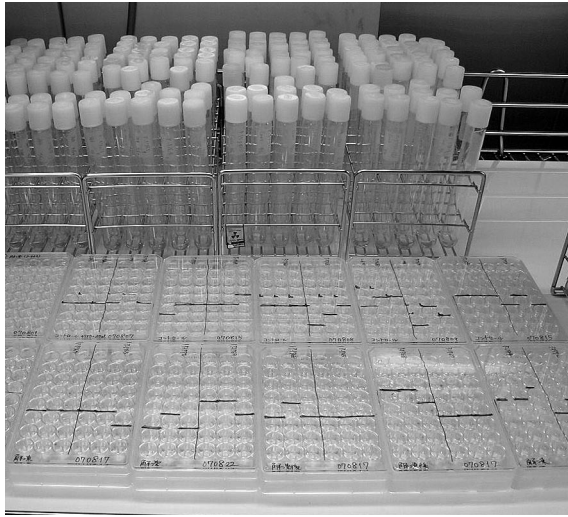


図4 MPN法のプレート培養

## (2) 最確数 (MPN) 法

FDAで染色されにくい株については、MPN法での生存率測定も同時に行う。解凍した細胞懸濁液 0.5 ml を試験管の液体培地 4.5 ml に入れよく混合する。植え込んだ試験管から同じ要領で 0.5 ml を培地 4.5 ml 入りの試験管に順次移し、全部で 8 段階の希釈液を作製する。それぞれの試験管から 48 穴プレートの 3 穴ずつに分注する。通常条件よりも弱い光強度下で培養し (図 4)、細胞の増殖が見られた希釈倍率とプレートの穴数を MPN 換算表 (MPN Calculator; [www.i2workout.com/mcuriale/mpn/index.html](http://www.i2workout.com/mcuriale/mpn/index.html)) に入力して細胞密度を計算する。凍結前コントロールの細胞懸濁液は細胞密度が 2 倍であるため、最初の希釈を細胞懸濁液 0.25 ml と培地 4.75 ml に変え、後は同様にして細胞密度を出す。凍結前後の細胞密度を比較し、生存率を計算する。

## 3. その他の検討項目

単細胞性の藍藻は比較的凍結保存が容易である。しかし、糸状体の藍藻や他の藻類では解凍後の生存率が極めて低い場合が多い。そのような場合、検討できる項目を以下に挙げる。

- ・低温前培養：低温 4℃ で 4 週間前培養することにより、凍結解凍後の生存率が高くなるという報告がある (Morris, 1976)。凍結保護剤感受性が高いものに有効だと思われる。

- ・アキネート形成：前培養条件によりアキネート (休眠孢子) 形成を誘導し、それを凍結する方法。藍藻 *Anabaena* や黄緑色藻 *Tribonema* で報告があり (Bai &

Cui, 1983; Nagao *et al.*, 1999)、アキネート形成種ならば試行できる。

- ・アルギン酸カプセル化法：高等植物で一般的である凍結法 (新野ら, 2006) を応用し、微細藻類数種においても成功が報告されている (Hirata *et al.*, 1996; Day *et al.*, 2000)。凍結保護剤感受性の高い株や低温耐性が低い株には適した方法とされる。

## 4. おわりに

本稿は様々な検討条件を挙げたために解りにくくなり、利用しづらくなってしまったかもしれない。ただ、種により株により最適条件が異なるため、微細藻類の凍結保存方法は簡潔に説明することができないのが現状である (著者も試行錯誤の日々である)。しかし逆の観点から考えれば、藻類はとても興味深い生物群であり、凍結保存法の開発も果てしない可能性を秘めているといえるだろう。動物細胞、植物細胞や菌類など一見遠く離れて見える生物の凍結保存法が、藻類には有効であるかもしれない。

## 文 献

- Bai, K.Z. & Cui C. (1983). Cryopreservation of the akinetes of blue-green alga *Anabaena azollae*. *Kexue Tongbao* **28**: 288.
- 千原光雄 (編) (1999). 藻類の多様性と系統, 裳華房, 東京.
- Day, J.G. & DeVille, M.M. (1995). Cryopreservation of Algae (Chapter 9), *In* Day, J.G. & McLellan, M.R. (eds.), *Methods in Molecular Biology* vol. 38, *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, p. 81-89, Humana Press, Totowa, USA.
- Day, J.G., Fleck, R.A. & Benson, E.E. (2000). Cryopreservation-recalcitrance in microalgae: novel approaches to identify and avoid cryoinjury. *J. Appl. Phycol.* **12**: 369-377.
- Day, J.G., Watanabe, M.M., Morris, G.J., Fleck, R.A. & McLellan, M.R. (1997). Long-term viability of preserved eukaryotic algae. *J. Appl. Phycol.* **9**: 121-127.
- Fenwick, C. & Day, J.G. (1992). Cryopreservation of *Tetraselmis suecica* cultured under different nutrients regimes. *J. Appl. Phycol.* **4**: 105-109.
- Fleck, R.A., Pickup, R.W., Day, J.G. & Benson, E.E. (2006). Characterisation of cryoinjury in *Euglena gracilis* using flow-cytometry and cryomicroscopy.

- Cryobiology **52**: 261-268.
- 引地邦夫, 寺内栄一, 岡内正典, 嵯峨直恆 (1996). 餌料用微細藻類数種 (NRIA カルチャーコレクション) の凍結保存法の開発. 低温生物工学会誌 **42**: 85-92.
- Hirata, K., Phunchindawan, M., Tukamoto, J., Goda, S. & Miyamoto, K. (1996). Cryopreservation of microalgae using encapsulation-dehydration. Cryo-Letters **17**: 321-328.
- Kuwano, K., Aruga, Y. & Saga, N. (1993). Cryopreservation of the conchocelis of *Phorpyra yezoensis* Ueda (Rhodophyta) in liquid nitrogen. Plant Sci. **94**: 215-225.
- Kuwano, K. & Saga, N. (2000). Cryopreservation of Marine Algae: Applications in Biotechnology, In Fingerman, M. & Nagabhusanam, R. (eds.), Recent Advances in Marine Biotechnology vol. 4 Part A, Seaweeds and Invertebrates, p. 23-40, Science Publishers, New Hampshire.
- Mori, F., Erata, M. & Watanabe, M.M. (2002a). Cryopreservation of cyanobacteria and green algae in the NIES-Collection. Microbiol. Cult. Coll. **18**: 45-55.
- Mori, F., Kawachi, M., Kasai, F. & Watanabe, M.M. (2002b). Application of the FDA method to measure survival rates of microalgae after freezing and thawing. Algae 2002 abstract: 159.
- Morris, G.J. (1976). The cryopreservation of *Chlorella*. 2. Effect of growth temperature on freezing tolerance. Arch. Microbiol. **107**: 309-312.
- Morris, G.J., Coulson, G.E. & Engels, M. (1986). A cryomicroscopic study of *Cylindrocystis brebissonii* De Bary and two species of *Micrasterias* Ralfs (Conjugatophyceae, Chlorophyta) during freezing and thawing. J. Exp. Bot. **37**: 842-856.
- Nagao, M., Arakawa, K., Takezawa, K., Yoshida, S. & Fujikawa, S. (1999). Akinete formation in *Tribonema bombycinum* Derbes et Solier (Xanthophyceae) in relation to freezing tolerance. J. Plant Res. **112**: 163-174.
- 新野孝男, 平井 泰, 松本敏一, 田中大介 (2006). 植物超低温保存マニュアル, (独) 産業生物資源研究所, 茨城.
- Taylor, R. & Fletcher, R.L. (1999). Cryopreservation of eukaryotic algae — a review of methodologies. J. Appl. Phycol. **10**: 481-501.
- 寺内栄一, 桑野和可, 岡内正典, 嵯峨直恆 (1997). テトラセルミス *Tetraselmis tetrathele* (緑色植物門, プラシノ藻綱) の凍結保存法の開発. 養殖研報 **26**: 13-25.

(担当編集委員: 岡根 泉)