

緑藻クラミドモナス凍結保存 の実施例

北海道大学 低温科学研究所
皆川 純

1. クラミドモナスとは？
2. 凍結保存のごく簡単な概論
3. 凍結条件最適化へ向けての若干の試み
4. 現在の“超簡単”プロトコル
5. 我々が日々どのように凍結保存を行っているか（スナップ写真多数）

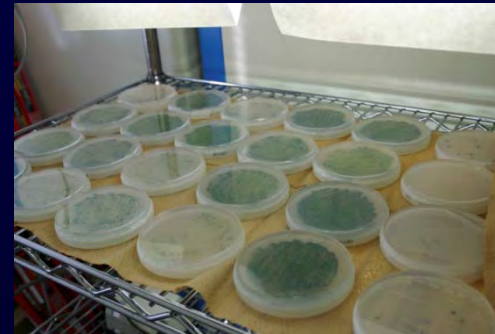
クラミドモナスとは？

1. 植物なのに、暗黒条件でも生育

光合成せずに、酢酸を炭素源とした呼吸によるエネルギーで生育 → 光合成に重要な遺伝子を欠損した変異体の研究

2. 遺伝子操作が容易

単一の葉緑体、ミトコンドリア、核ゲノム全てを改変できる唯一の生物。葉緑体遺伝子の形質転換が初めて行われた。葉緑体遺伝子のノックアウト、部位特異的変異導入が極めて容易。最近では核遺伝子のRNAiによる発現抑制も可能に。



クラミドモナスとは？

3. 生化学的材料として優れる

均一の条件（光強度、栄養条件やCO₂濃度）で大量に培養することができる。



クラミドモナスとは？

4. 古典的なツール、ゲノム時代のツール

古くから光合成研究の材料として用いられ、多数の変異株が蓄積されており、誰でも容易に入手可能。ゲノム配列も（ほぼ）確定し、DNAアレイ、ESTライブラリ、コスミドライブラリ等ゲノム時代のツールも豊富。

5. 高い光環境適応能力

暗黒条件から4000 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ （真夏の直射日光の2倍）の光量まで適応することができる。

「緑の酵母」

「大腸菌のように扱える植物細胞」

「泳ぐ葉緑体」



クラミドモナスの凍結保存

- 常温を好む生物である
(自然界では孢子として凍結の危機を乗り越える)
- 寒さに順化する機構を持たない
(氷点付近で起こるさまざまな障害-細胞内脱水、氷晶による細胞器官の損傷など-に対して無防備)
- 凍結保存の専門家は特別な凍結防御剤を加え、プログラムフリーザーで丁寧に凍結すると思われるが、素人が簡単に保存することはできないのだろうか？ (10年前の状況)

クラミドモナスの凍結保存 の数少ない報告

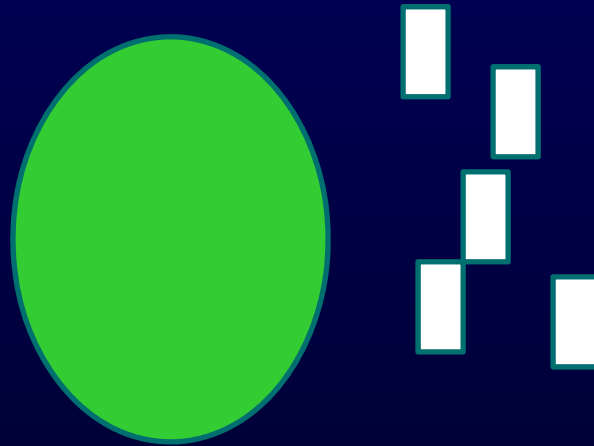
- Hwang, S., and Huddock, G. J. (1971) *Phycol.* 7, 300-303
10% DMSO で凍結保存に成功
- Morris, G.J., Coulson, G., and Clarke, A. (1979) *Cryobiology* 16, 401-410
凍害防御剤なしで凍結保存できるChlorellaと比べて、圧倒的に難しい。
クラミドモナスの凍害防御剤としては、DMSOやグリセロールは無効で、
メタノールが有効

凍結保存のごく簡単な理論

- 細胞や組織を凍結保存する場合、融解後の細胞の生存率は、冷却速度／融解速度に大きく依存する。
- その原因は、細胞内外に生じる氷の状態が冷却速度の影響を強く受けるから。

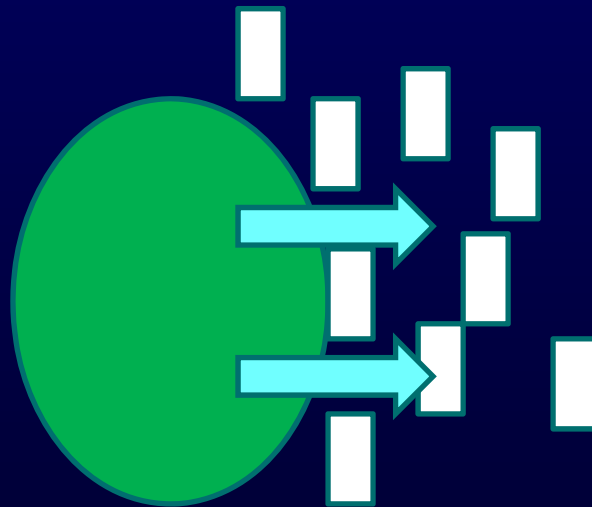
細胞外凍結

- 細胞外側の水溶液の凍結



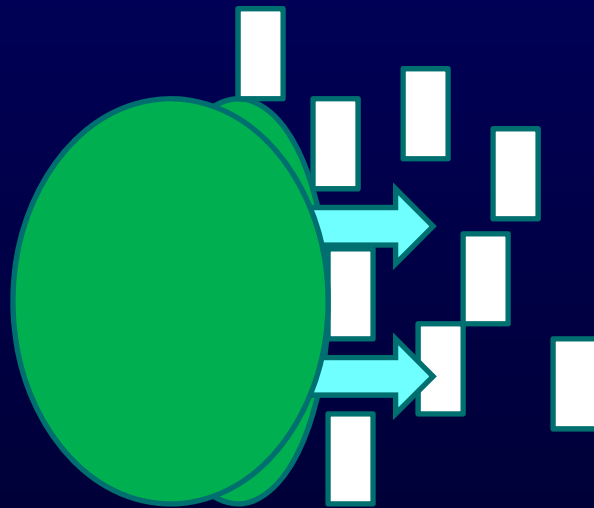
細胞外凍結

- 細胞外側の水溶液の凍結



細胞外凍結

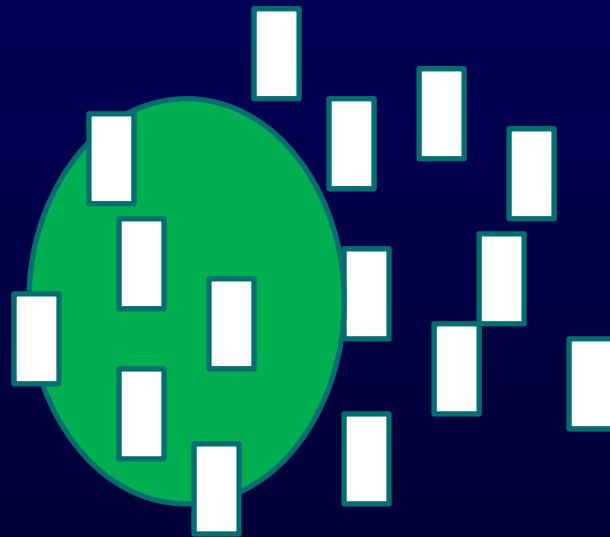
- 細胞外側の水溶液の凍結



- 細胞の生死には関与しないとされる

細胞内凍結

- $-10^{\circ}\text{C} / \text{min}$ よりも急速に冷却すると、細胞内には水が残ったまま過冷却状態に。



- 致命傷を与える

凍結保存のごく簡単な理論

- 細胞外凍結をコントロールし、適度な脱水を行うことにより、細胞内凍結につながる氷晶の形成を抑えればよい
- 凍結防御剤を用い、細胞外凍結による傷害を最小限に抑える

凍結防御剤

良く使われる凍結防御剤

glycerol, DMSO, ethanol, methanol
sucrose, sorbitol, dextran, PVP, ...

- 溶液の氷点を下げる
- 凍結温度での氷晶形成量を減らす
- 細胞内外での塩濃度の濃縮を抑える

等とされるが、経験的に用いられている(?)

望ましい凍結方法

1. 緩やかに冷却し、細胞外凍結を誘導することによって、細胞内の脱水を進める
2. 凍結防御剤の助けを借りて、細胞内凍結を起こさせないようにする
3. 脱水が進んだ時点で急速冷却を行い、一気に液体窒素温度まで低下させる

Morris et al (1979) の原法

凍結

1. 20°Cで7日間培養した細胞を用意
2. 凍害防御剤を添加した培地を用意
3. 1と2を混合し、20°Cで5分静置
4. - 0.25°C / minの冷却速度で予備凍結
5. 予備凍結に続いて液体窒素温度への急速冷却

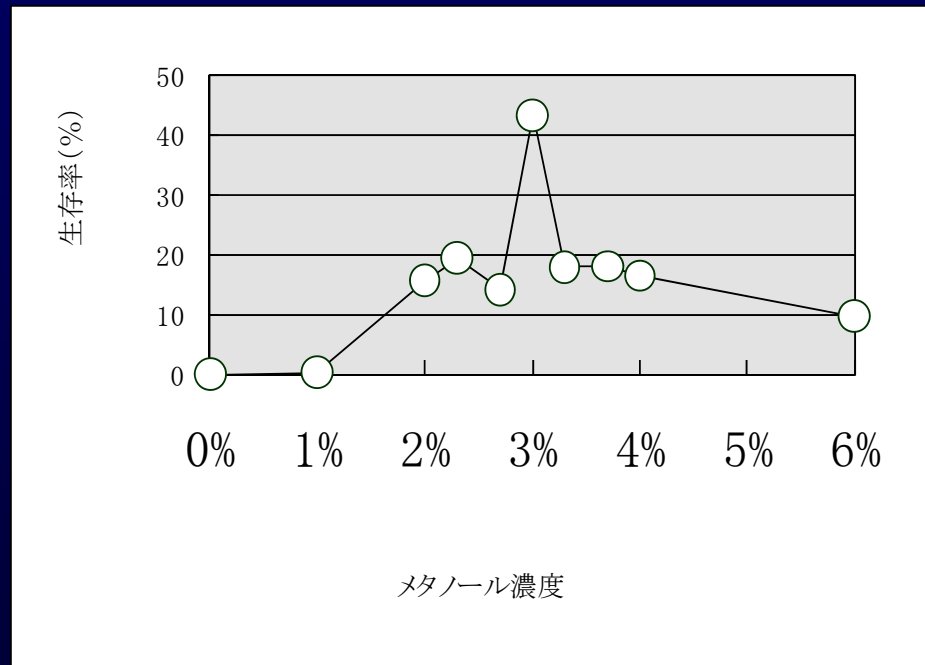
融解

6. 35°Cの湯浴上で急速加温し、融解

Morris et al (1979) からの改良点

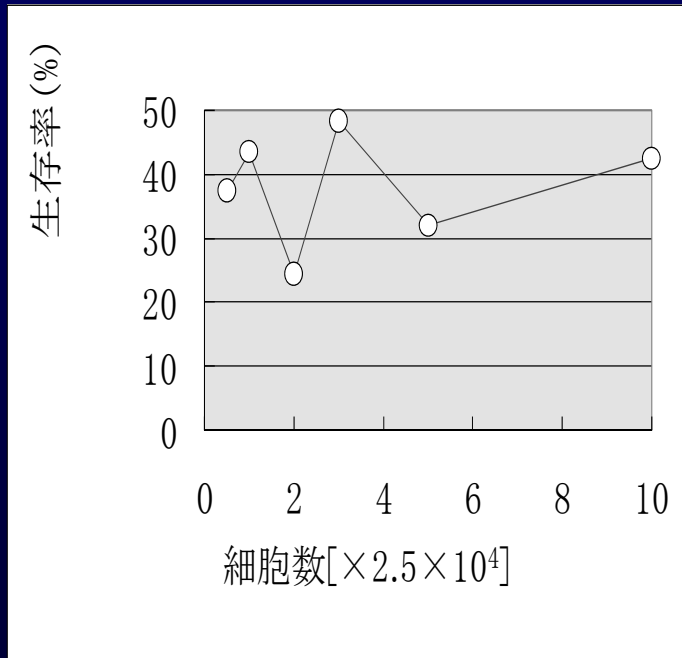
- 現在、より一般的なTAP培地
- 対数増殖期の細胞 ($1 \sim 2 \times 10^6 / \text{mL}$)
- 凍害防御剤としてmethanol
- 緩速予備凍結は、安価なミスターフロスティー

メタノール濃度の影響



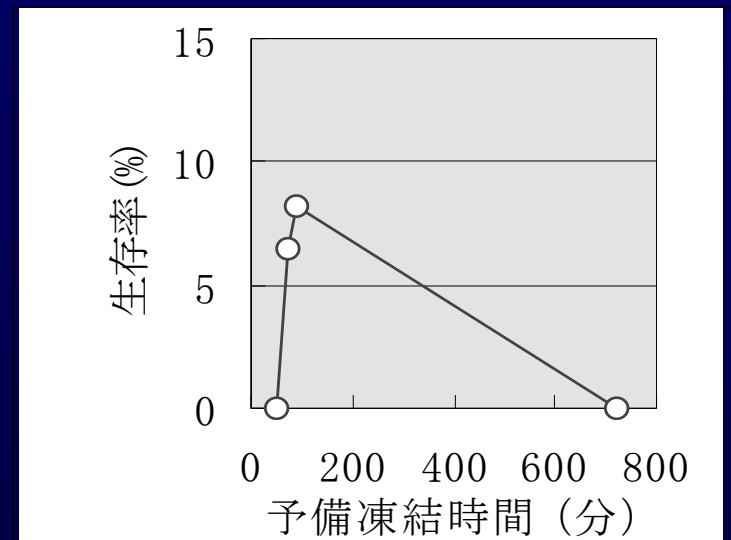
メタノールは凍結防御剤として有効で、3%が至適濃度(45%生存)

細胞数



細胞数は影響しない

予備凍結時間



- <50min、 >12hでは全く生存しない
- 50min時点では脱水は不十分
- 12h時点では過剰な脱水
- 70~90minで適度な脱水が行われ、細胞内の氷晶化でなくガラス化が進んだ

Current protocol (2008)

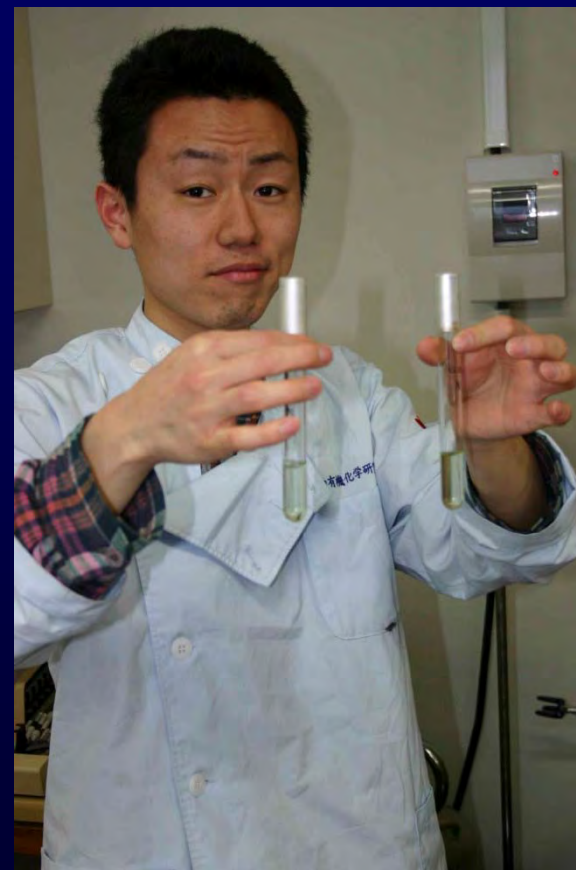
Freezing

1. Cells are grown in a liquid TAP medium ($1\sim 6 \times 10^6/\text{mL}$)
2. Mix 4.85 mL of culture and 150 μL of methanol (final conc. 3%) in a test tube
3. Transfer 500 μL of the mixture to a Falcon cryotube
4. Place the Falcon tube onto a "Mr. Frosty" (ambient temp.)
5. Place the "Mr. Frosty" in a deep freezer (-80°C) for 90'
6. Transfer the Falcon tube into a liquid N_2 bath
7. Store the frozen Falcon tubes in a liquid N_2 container (Cryosystem 4000, MVE)

Current protocol (2008)

Thawing

1. Thaw a frozen stock at 35 °C
2. Transfer the thawed cell suspension into a TAP liquid medium (10mL) in a test tube
3. Incubate at 25 °C over night under the dim light
4. Spread 800 μ L of the culture on a TAP agar plate
5. Incubate at 25 °C for 1-2 weeks
6. Typically 2000-4000 colonies appear within 1-2 weeks



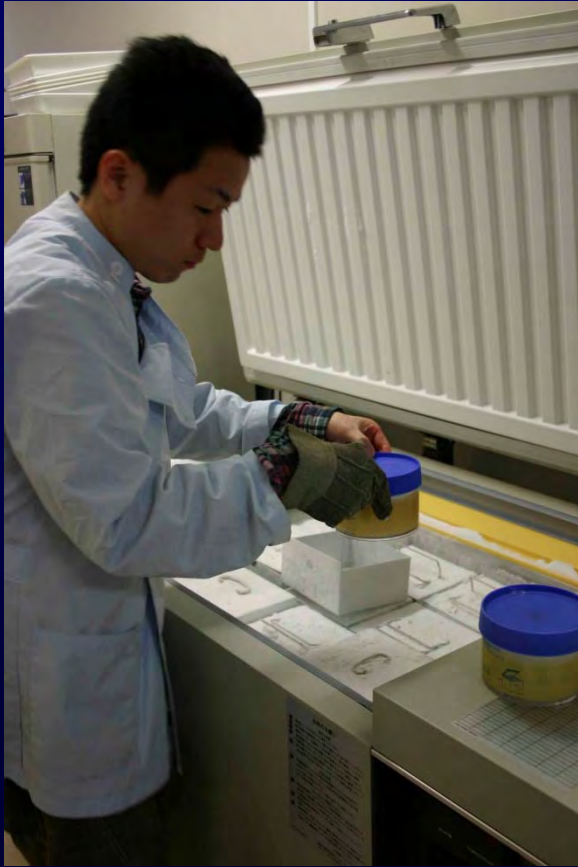


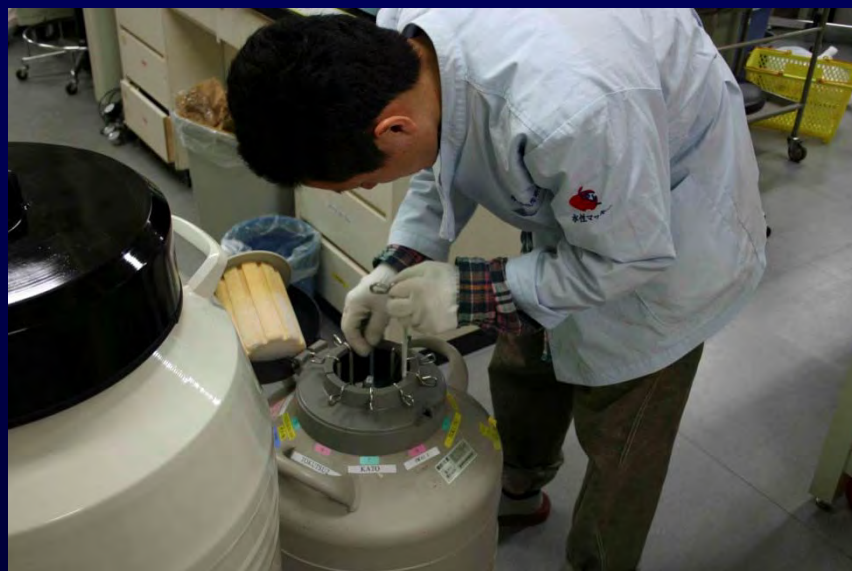




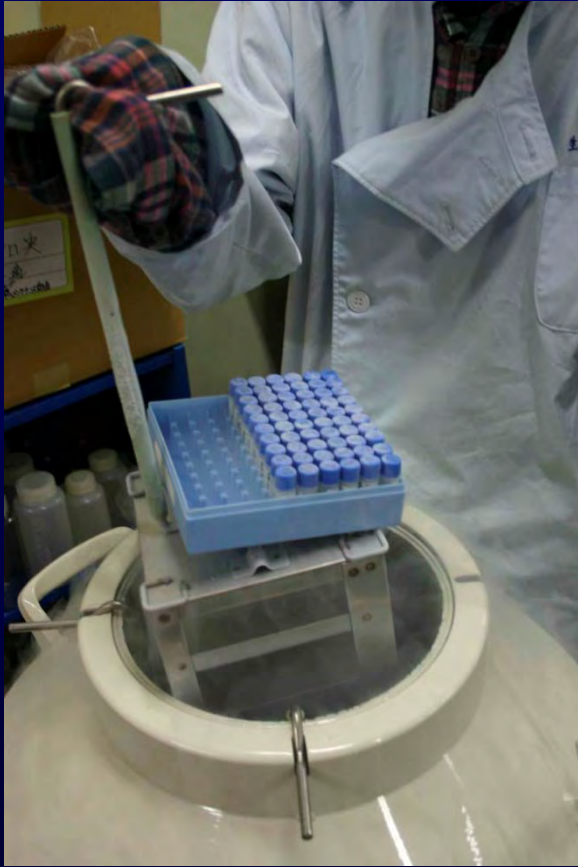


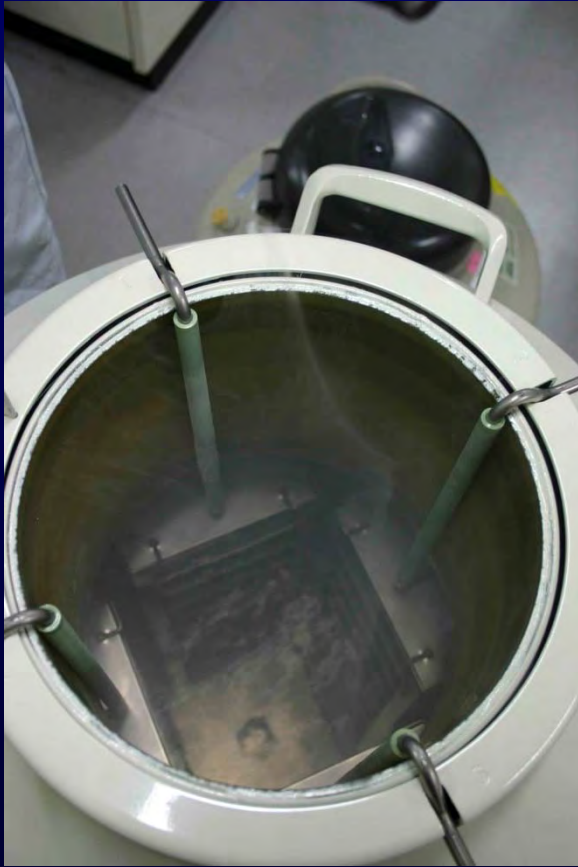






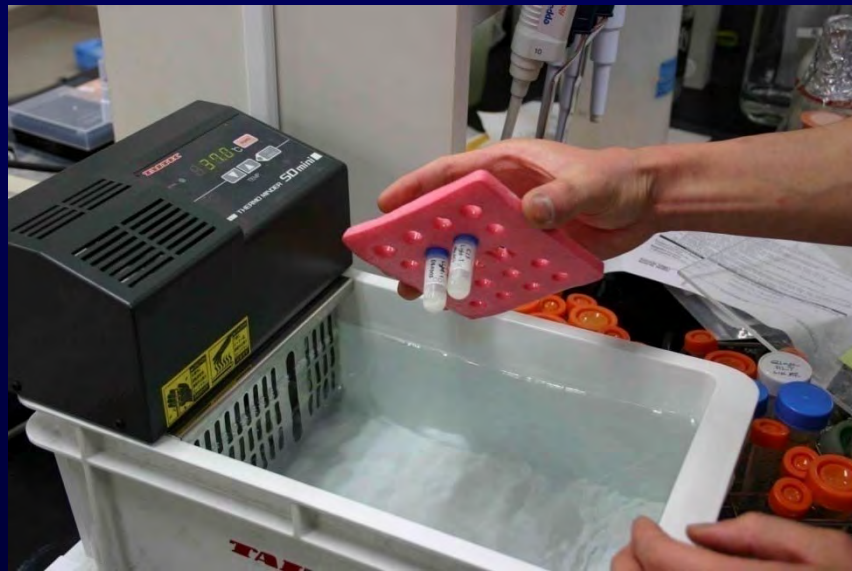




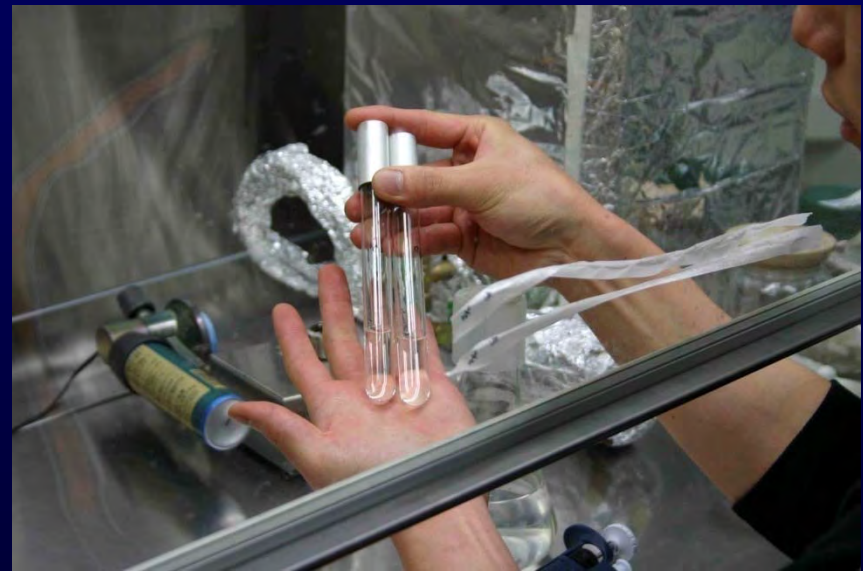






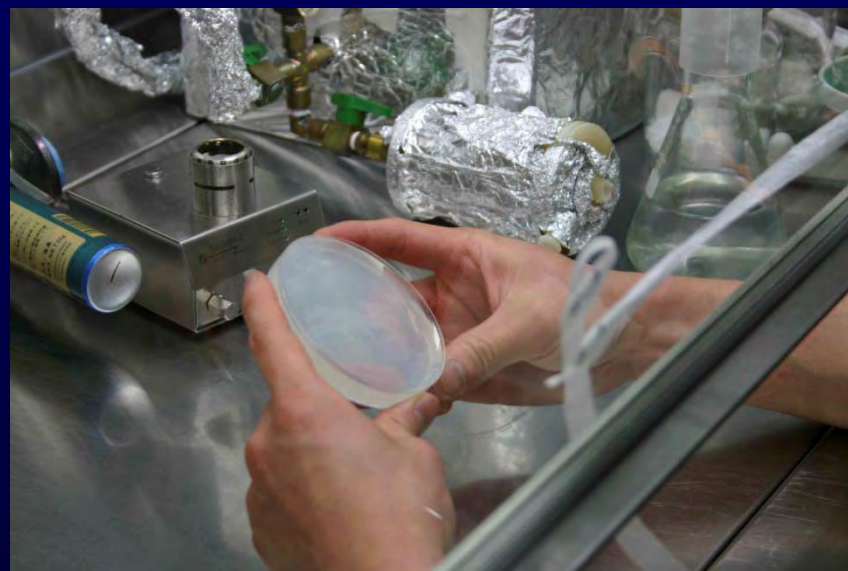


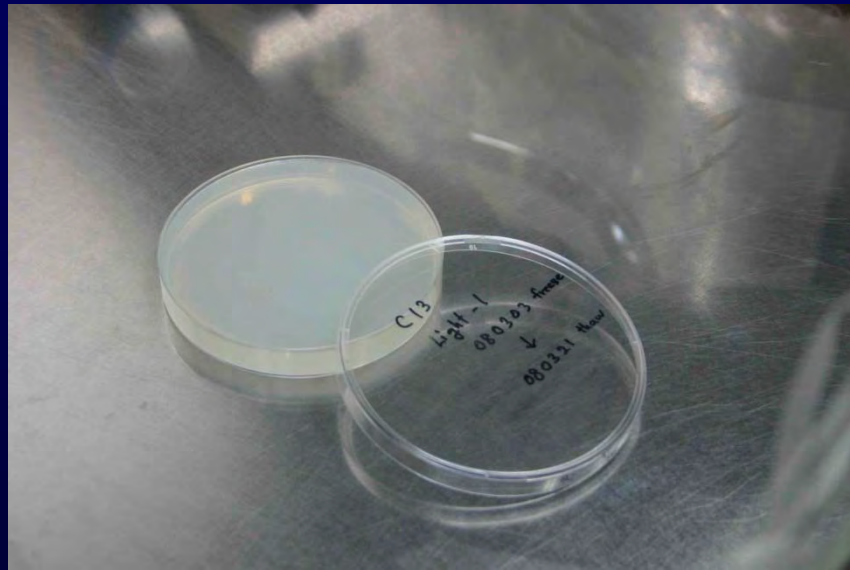
















080303凍結→080321解凍(撮影)



080325撮影

プロトコルは

<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/plantadapt/minagawa/>

の研究内容のページからダウンロードできます。