

1Bp-8

ゼニゴケプロトプラスト再生細胞の耐凍性と超低温における生存

菅原康剛・竹内正幸（埼玉大・理・生体制御）

植物の培養細胞は培地の組成などの培養条件を変えることによって、その耐凍性を高めることができる。このような培養細胞を用いた研究は、植物の耐凍性や凍結障害の細胞機構を理解する上で有効であり、また、培養細胞株の凍結保存法の確立のための多くの情報を提供するものと思われる。演者らは、各種のプロトプラストの凍結保存について既に報告した。ここでは、ゼニゴケプロトプラストの培養に伴う耐凍性の変化について報告する。

ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* L.) のプロトプラストは、Murashige-Skoog (MS) の培地で継代培養されたカルスから 2 % ドリセラーゼを処理して分離した。分離後、プロトプラストを 0.23 M マニトールを含む培地 (M 培地) に懸濁し、1.0 % の活性炭を含む MS 寒天培地にまき、26 °C の明所 (1.5 W/m²) あるいは暗所で培養した。この培養条件では、明所あるいは暗所いずれの場合も、培養開始後、数十分で細胞壁の再生が観察され、2 日後には 90 % 以上のプロトプラストで細胞壁が再生された。また、細胞分裂は明所では 2 日目あたりから観察され、8 日目までに約 50 % のプロトプラストが分裂した。この細胞分裂はほぼ完全に光に依存しており、暗所での分裂頻度は数 % 以下であった。これら培養されているプロトプラストを順に凍結した。M 培地に懸濁したプロトプラストを -8 °C で植氷後、1 分間に 0.5 ~ 1.0 °C の冷却速度で各温度まで凍結した。また、融解は 35 °C の水中で行った。プロトプラストの生死の判定は、Evans blue による染色法によって行った。また、凍結融解したプロトプラストを 1.0 % の活性炭を含む上記の寒天培地上で培養した。

分離直後のプロトプラストを凍結した場合、-40 °C で生存率は 10 % 以下まで低下した。しかし、培養時間と共に生存率は増加し、培養時間 18 時間あたりでピークに達し、-40 °C での生存率はおよそ 70 % になった。その後、培養時間と共に生存率は低下し、48 時間後には 20 % 以下まで低下した。同様な変化は、暗所で培養したプロトプラストでもみられたが、暗所の培養では、18 時間以降の生存率の低下は明所に比べ徐々に進行した。これらの結果から、プロトプラスト培養における耐凍性の変化は、細胞の分裂周期の変化と必ずしも関連していないことが示唆された。次に、18 時間培養され細胞壁を再生したプロトプラストを 2 % ドリセラーゼで 20 分間処理した。Calcofluor White ST (CFW) 染色によって観察すると、再生された細胞壁はこの処理によってほぼ完全に消失した。このプロトプラストを上記の条件で凍結したところ、生存率はおよそ 25 % まで低下した。このことから、プロトプラスト再生細胞の耐凍性の変化は、細胞壁の再生と関連していることが示唆された。また、CFW 染色による観察では、培養 18 時間の再生細胞の壁の蛍光は弱いことから、細胞壁再生の初期の変化が重要であることが考えられる。つぎに、18 時間培養された再生細胞を上記の条件で -50 °C までの各温度まで凍結 (予備凍結) 後、急速に液体窒素温度 (-196 °C) まで冷却した。その結果、予備凍結温度が -30 °C の時に最も生存率が高く、およそ 45 % の再生細胞が生存しており、再培養によって正常に増殖した。