

藍藻 *Synechocystis* sp. SY-4 の凍結保存法の検討

阪本憲司^{*1,2}, 北嶋克章^{*2}, 雨村明倫^{*1,2}

Cryopreservation of Blue-green Alga *Synechocystis* sp. SY-4

Kenji Sakamoto^{*1,2}, Katsuaki Kitajima^{*2}, and Akinori Amemura^{*1,2}

Rep. Res. Inst. Mar. Biores., Fukuyama Univ., (9), 25-32 (1998).

Cryopreservation of blue-green alga *Synechocystis* sp. SY-4 was examined. *Synechocystis* sp. SY-4 was frozen with high levels of post-thaw relative growth activity (more than 100%), which were achieved by employing a simple protocol using trehalose or DMSO as a cryoprotectant; samples were placed in a cooling-bath preset at -40°C for 30 min, followed by liquid nitrogen freezing. The highest level of relative growth activity (141% or 124%) after freezing and thawing was obtained using cultures at early-stationary phase grown at 25°C , and cryoprotectant of 5% (w/v) trehalose or 7.5% (v/v) DMSO, respectively. Furthermore, the levels for cells cryopreserved in liquid nitrogen for 2 months were 70% and 120% when 5% trehalose and 7.5% DMSO were used, respectively.

Key words: *Synechocystis* sp., cryopreservation, trehalose, DMSO

藍藻 *Synechocystis* sp. SY-4 (以下, SY-4 と略す) は, 本研究所において単離した微細藻である¹⁾。SY-4 は海産魚の種苗生産において初期餌料として用いられているシオミズツボワムシ (以下, ワムシと略す) の培養用餌料に好適であり²⁾, 水温 35°C でも増殖可能な耐高温性を有するため, 夏期における餌料不足を補うことができると期待される。しかし, 水温 20°C 以下の培養が不調であり冬期の屋外培養が困難となるため, この期間の保存が必要となる。そこで本研究では, 元種保存を目的とした SY-4 の凍結保存について検討した。

*1 海洋生物工学科 (Department of Marine Biotechnology, Fukuyama University, Fukuyama 729-0292).

*2 内海生物資源研究所 (Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama University, Innoshima 722-2101).

阪本, 北嶋, 雨村

実験材料および方法

供試細胞 10 lのポリカーボネート製の培養瓶を用いて, 25°C, 3,000 lx・連続照明下でSY-4を培養し, 遠心分離 (3,000 rpm, 15 min) で得られた濃縮細胞を実験に用いた。

凍結試験 1 ml 容エッペンドルフチューブに, 濃縮細胞と各種濃度の凍結保護剤【トレハロース (林原生物化学研究所), DMSO (和光純薬)】を入れ, 凍結保護剤を細胞に浸透させるため水中に5分あるいは10分間放置した。凍結は, Freeze-trap (Taitec)を用いて-40°Cに調整したエタノール液中あるいは液体窒素中 (-196°C)で30分間行った。解凍は, 40°Cに設定した湯浴中で行った。解凍後, 細胞液に滅菌海水を入れて遠心分離 (3,000 rpm, 15 min) を行い, 凍結保護剤を除いた。また, 未凍結で凍結保護剤で処理していない細胞 (Fresh 細胞) を対照として用いた。

2段階凍結は, 先ず-40°Cで30分間凍結し, その後直ちに液体窒素中に移す処理方法とした。

相対増殖活性 細胞を, シリコン栓を施した 500 ml容坂口フラスコに移し, 25°C, 往復振とう数 100 rpm, 3,000 lx・連続照明の条件で3日間培養した。細胞数を, 毎日定時に採取し, トーマ血球計算盤で測定した。相対増殖活性 (%) は, 次式により算出した。

$$\text{相対増殖活性} = (\Delta t_1 / \Delta t_2) \times 100$$

ここで, Δt_1 は凍結解凍細胞の培養3日間の増殖量 (cells/ml), Δt_2 はFresh細胞の培養3日間の増殖量とした (cells/ml)。

結 果

トレハロースおよびDMSOを用いた凍結試験の結果を, Fig. 1およびFig. 2に示した。相対増殖活性が最も高かったのは, トレハロース濃度5% (w/v) で浸透時間5分および10分の両区と, DMSO濃度7.5% (v/v) で浸透時間5分およびDMSO濃度5% (v/v) で浸透時間10分の両区であった。各区の相対増殖活性は, それぞれ100%付近の高い値を示した。これらの条件では増殖曲線にlag (誘導期) がみられず, 凍結保護剤無添加で未凍結のFresh細胞と同様の増殖を示した。また, 凍結保護剤無添加で凍結した細胞の相対増殖活性は, 20%付近の低い値となった。

SY-4の各増殖相における耐凍性を調べた結果, 静止期前期の細胞を凍結に供したものが両凍結保護剤添加区において相対増殖活性が最も高くなった (Fig. 3)。さらに, 凍結保護剤無添加で凍結した細胞においても, 相対増殖活性は静止期前期の細胞で47%となり, 各増殖相の同条件下で最も高い値を示した。

SY-4を異なった温度下で培養した場合, 細胞の耐凍性は25°C培養区のもので30°C培養区のものより高まる傾向にあった (Fig. 4)。

2段階凍結を試みた結果, -40°Cおよび-196°C下での1段階凍結を行った細胞よりも相対増殖活性が高まる傾向にあった (Fig. 5)。また, -196°Cで1段階凍結した細胞の相対増殖活性は-40°Cのもの

藍藻 SY-4 の凍結保存

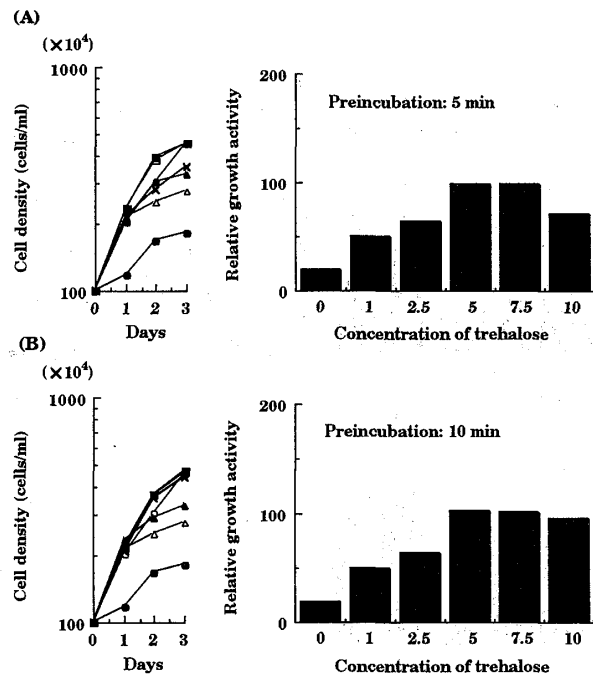


Fig. 1. Relative growth activity of *Synechocystis* sp. SY-4 frozen at -40°C for 30 min with various concentrations of trehalose after preincubation for 5 (A) or 10 (B) min at 0°C .

Growth activity of frozen control without trehalose (Fresh) is taken as 100%.

Concentrations of trehalose (% w/v): \circ , 0 (Fresh); \bullet , 0; \triangle , 1; \blacktriangle , 2.5; \square , 5; \blacksquare , 7.5; \times , 10.

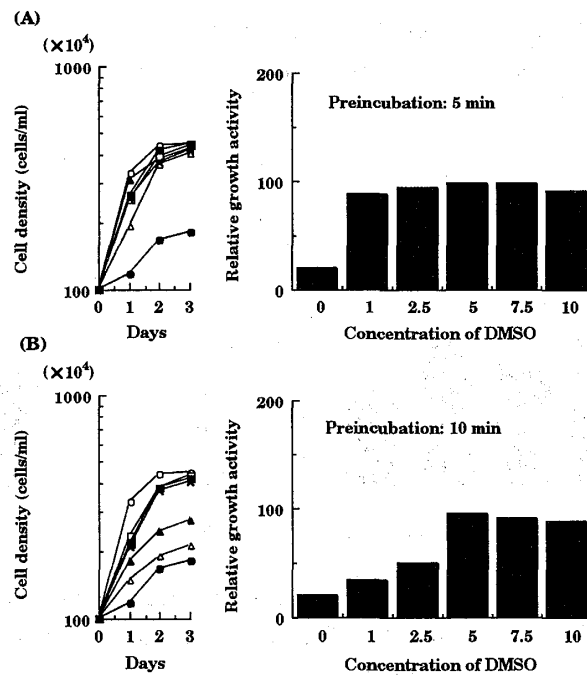


Fig. 2. Relative growth activity of *Synechocystis* sp. SY-4 frozen at -40°C for 30 min with various concentrations of DMSO after preincubation for 5 (A) or 10 (B) min at 0°C .

Growth activity of frozen control without DMSO (Fresh) is taken as 100%.

Concentrations of DMSO (% w/v): \circ , 0 (Fresh); \bullet , 0; \triangle , 1; \blacktriangle , 2.5; \square , 5; \blacksquare , 7.5; \times , 10.

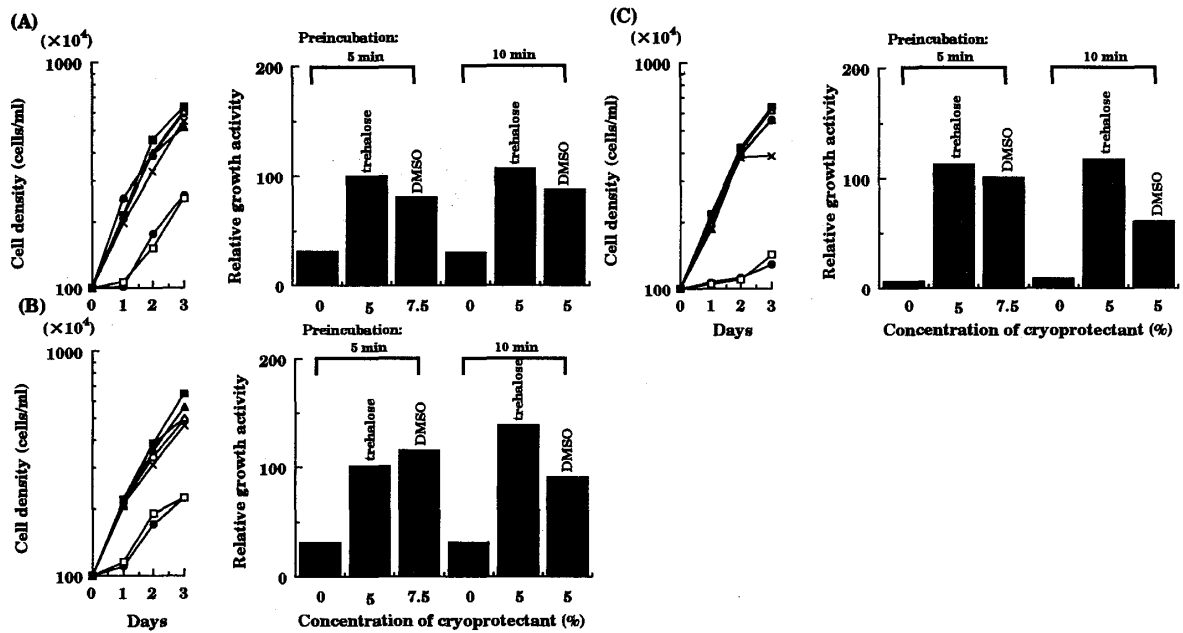


Fig. 3. Relative growth activity of *Synechocystis* sp. SY-4 harvested at different growth phases (A, late-logarithmic; B, early-stationary; C, stationary) and frozen at -40°C for 30 min with trehalose (5%, w/v) or DMSO (5, 7.5%, v/v) after preincubation for 5 or 10 min at 0°C .

Symbols: ○, Fresh; ●, no cryoprotectant (treated at 0°C for 5 min); △, 5% trehalose (preincubated for 5 min); ▲, 7.5% DMSO (preincubated for 5 min); □, no cryoprotectant (treated at 0°C for 5 min); ■, 5% trehalose (preincubated for 10 min); ×, 5% DMSO (preincubated for 10 min).

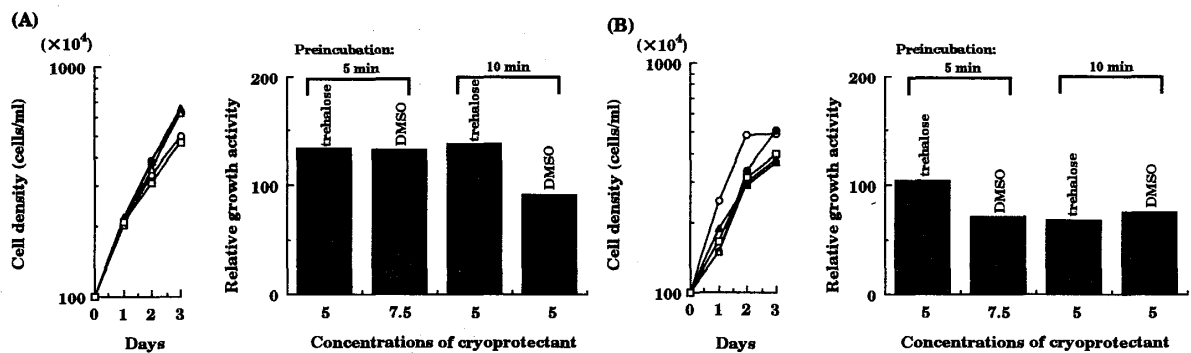


Fig. 4. Relative growth activity of *Synechocystis* sp. SY-4 cultured at different temperatures (A, 25°C ; B, 30°C) and frozen at -40°C for 30 min with trehalose (5%, w/v) or DMSO (5, 7.5%, v/v) after preincubation for 5 or 10 min at 0°C .

Symbols: ○, Fresh; ●, 5% trehalose (preincubated for 5 min); △, 7.5% DMSO (preincubated for 5 min); ▲, 5% trehalose (preincubated for 10 min); □, 5% DMSO (preincubated for 10 min).

藍藻 SY-4 の凍結保存

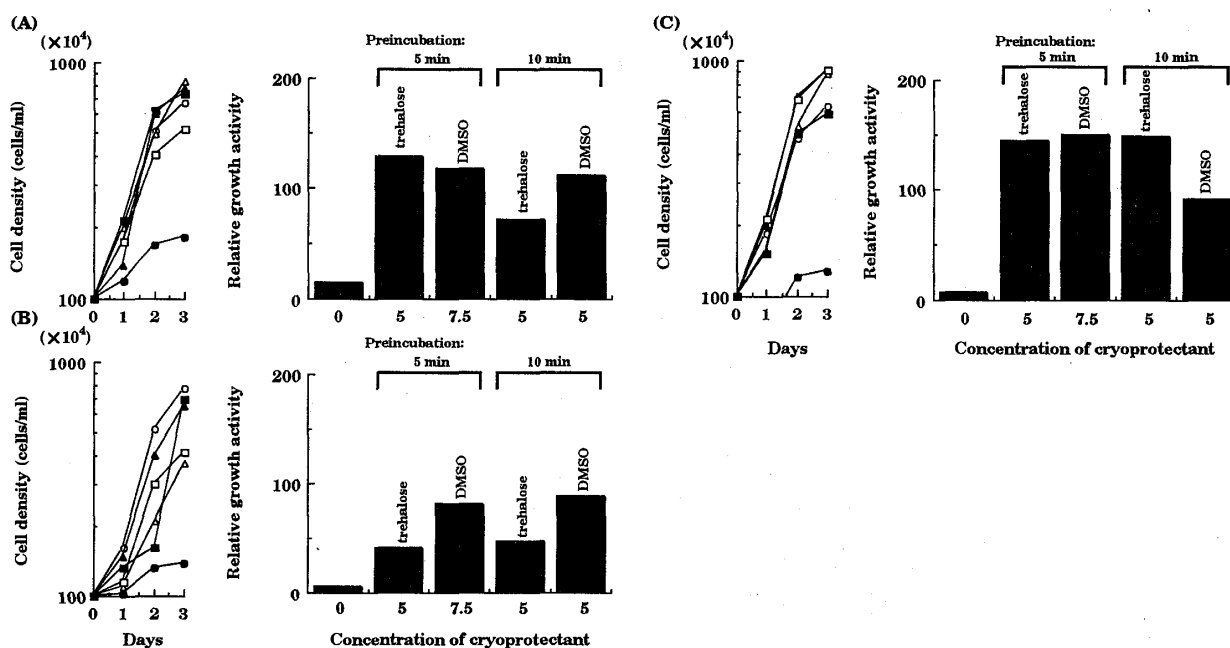


Fig. 5. Relative growth activity of *Synechocystis* sp. SY-4 frozen at -40 (A) or -196 (B) $^{\circ}\text{C}$ for 30 min, or -196°C for 30 min after freezing at -40°C for 5 min (C) with trehalose (5%, w/v) or DMSO (5, 7.5%, v/v) after preincubation for 5 or 10 min at 0°C .

Symbols: ○, Fresh; ●, no cryoprotectant; △, 5% trehalose (preincubated for 5 min); ▲, 7.5% DMSO (preincubated for 5 min); □, 5% trehalose (preincubated for 10 min); ■, 5% DMSO (preincubated for 10 min).

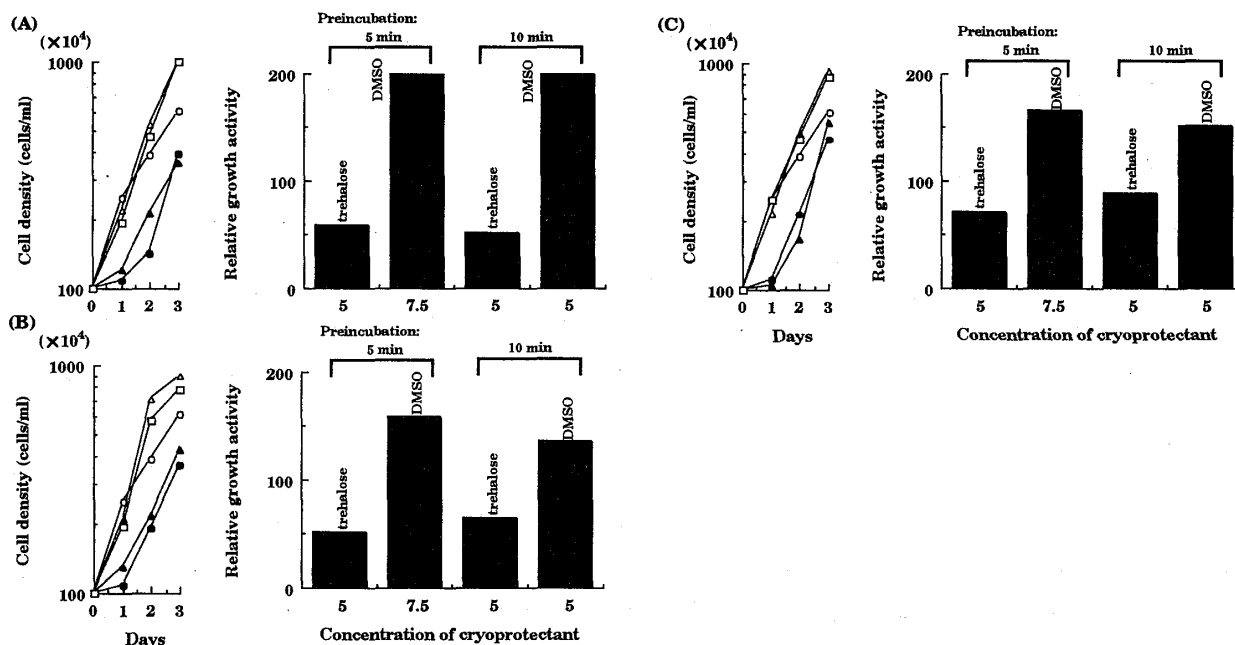


Fig. 6. Relative growth activity of *Synechocystis* sp. SY-4 frozen at -196°C for 30 min after freezing at -40°C for 5 min with trehalose (5%, w/v) or DMSO (5, 7.5%, v/v) after preincubation for 5 or 10 min at 0°C , then preserved for 2 weeks (A), 1 month (B), or 2 month (C) at -196°C .

Symbols: see Fig. 4.

よりも低くなる傾向にあった。さらに, 2 か月間の凍結期間を経ても細胞の相対増殖活性は, トレハロース濃度 5% (w/v) で浸透時間 5 分および 10 分の両区で 70%, DMSO 濃度 7.5% (v/v) で浸透時間 5 分および DMSO 濃度 5% (v/v) で浸透時間 10 分の両区で 100% 以上の高い値が得られた (Fig. 6)。

考 察

トレハロースは, 細菌, 酵母, カビ, 藻類, 植物, 昆虫, 無脊椎動物など様々な生物に見出されている^{2,3)}。また, 酵母⁴⁾ やカビ⁵⁾ の細胞内のトレハロース含量が, 耐高温性, 耐乾性および耐凍性などに相関性のあることが知られている。さらに, 乾燥に対する細胞膜の保護と凍結に対する保護剤としてのトレハロースの機能について, 幾つかの報告がある⁹⁻¹⁴⁾。細菌¹⁵⁾, 酵母¹⁶⁾, 植物細胞¹⁷⁾ の凍結に関する報告では, トレハロースの凍結保護効果が認められている。本研究では, トレハロースを用いた SY-4 の凍結保存を試みた。その結果, 高い凍結保護効果が認められ, 最も高い相対増殖活性が得られたのはトレハロース濃度 5% (w/v) で浸透時間が 5 分および 10 分のものであった。浸透時間の違いが至適トレハロース濃度に影響をおよぼさなかった理由として, トレハロースの細胞膜透過度が比較的低いことによるものと考えられる。その作用機序として, 細胞膜の安定化, 氷点降下による細胞外の塩濃度増大の抑制・水の構造の変化などが考えられる。つまり, トレハロースの濃度が 5% (w/v) のときに, これらの作用が最大になるものと推察される。一方, 凍結保護剤として広く用いられている DMSO の凍結保護効果を調べた結果, SY-4 の凍結後の相対増殖活性は浸透時間が 5 分で DMSO 濃度 7.5% (v/v), 浸透時間が 10 分で DMSO 濃度 5% (v/v) で最も高くなった。DMSO は細胞膜透過型であるため, 浸透時間の違いにより至適 DMSO 濃度に差異が生じたものと考えられる。

回分培養された微細藻類は, 培養齢により耐凍性が異なることが知られている¹⁸⁾。一般に, 培養齢が増殖期から静止期にかけて耐凍性が高まる。その要因として, 増殖速度の減退に伴い細胞内に貯蔵蛋白質や脂質が蓄積し, 液胞化の程度を減ずることにより耐凍性が増すと考えられている¹⁹⁾。SY-4 においても, 対数増殖期後期から静止期にかけて凍結後の相対増殖活性は高まる傾向にあった。SY-4 の蛋白質含量は, 対数期から静止期前期にかけて増加する傾向にあり, また脂質含量は, 対数期後期で最も高くなる¹⁹⁾。このことから, SY-4 の耐凍性が対数期後期から静止期前期に高くなったと推察される。さらに, SY-4 の蛋白質と脂質の各含量は, 静止期前期から静止期にかけて減少することから¹⁹⁾, 凍結保護剤無添加区の細胞の耐凍性が低下し, 静止期の細胞の相対増殖活性が比較的低くなったものと考えられる。

幾つかの微細藻類の耐凍性は, 培養温度が低くなるにつれて増加することが知られている²⁰⁻²⁵⁾。Benz-Amotz and Gilboa²⁴⁾ は, 海産微細藻類を低温処理した場合に, 凍結後の増殖活性が高まることを見出した。Morris²⁵⁾ は, この現象について細胞膜のリン脂質を構成する脂肪酸の不飽和化が促進され, このことが凍結による細胞へのダメージを減ずるからだとして提示している。本試験では, SY-4 を 25℃ と 30℃ で培養を行い各々の耐凍性を調べた。その結果, 25℃ で培養した細胞の凍結後の相対増殖活性は, 30℃ で培養した細胞のそれよりも高まる傾向にあった。

SY-4 の 2 段階凍結を試みた結果, -40℃ および -196℃ 下で 1 段階凍結を行った細胞よりも相対増殖

藍藻 SY-4 の凍結保存

活性が高まる傾向にあった。細胞の長期保存を行うには、特別に凍結速度を制御する必要のない液体窒素中で行うのが望ましいと考えられる。本試験結果から、2か月間の凍結後も高い相対増殖活性が得られたことから、長期にわたる元種保存が可能と考えられる。

文 献

- 1) K. Sakamoto, E. Okimasu, and A. Amemura: Isolation of a microalga, *Synechocystis* sp. SY-4, potentially useful as a rotifer feed. *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, 157-160 (1996).
- 2) A. D. Elbein: The metabolism of α, α -trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **30**, 227-256 (1974).
- 3) J. M. Thevelein: Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol. Rev.*, **48**, 42-59 (1984).
- 4) T. Hottinger, T. Boller, and A. Wiemken: Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEBS Lett.*, **220**, 113-115 (1987).
- 5) A. van Laere: Trehalose, reserve and/or stress metabolite? *FEMS Microbiol. Rev.*, **63**, 201-210 (1989).
- 6) A. Wiemken: Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **58**, 209-217 (1990).
- 7) G. J. Lewis, R. P. Learmonth, and K. Watson: Role of growth phase and ethanol in freeze-thaw stress resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1065-1071 (1993).
- 8) P. van Dijck, D. Colavizza, P. Smet, and J. M. Thevelein: Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 109-115 (1995).
- 9) J. H. Crowe, L. M. Crowe, and D. Chapman: Preservation of membranes in anhydrobiotic. *Science*, **223**, 701-703 (1984).
- 10) J. H. Crowe, A. A. Whittam, D. Chapman, and L. M. Crowe: Interactions of phospholipid monolayers with carbohydrates. *Biochim. Biophys. Acta*, **769**, 151-159 (1984).
- 11) L. M. Crowe, R. Mouradian, J. H. Crowe, S. A. Jackson, and C. Womersley: Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities. *Biochim. Biophys. Acta*, **769**, 141-150 (1984).
- 12) J. F. Carpenter, S. C. Hand, L. M. Crowe, and J. H. Crowe: Cryoprotection of phosphofructokinase with organic solutes: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. *Arch. Biochem. Biophys.*, **250**, 505-512 (1986).
- 13) Y. Oda, K. Uno, and S. Ohta: Selection of yeasts for breadmaking by the frozen dough method. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 941-943 (1986).

- 14) J. H. Crowe, S. C. Crowe, J. F. Carpenter, and C. Aurell-Wistrom: Thrombin-induced phosphoinositide hydrolysis in platelets. Receptor occupancy and desensitization. *Biochem. J.*, **242**, 1-10 (1987).
- 15) G. L. De Antoni, P. Perez, A. Abraham, and M. C. Anon: Trehalose, a cryoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus*. *Cryobiology*, **26**, 149-153 (1989).
- 16) C. Coutinho, E. Bernardes, D. Felix, and A. D. Panek: Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast strains. *J. Biotechnol.*, **7**, 23-32 (1987).
- 17) I. S. Bhandal, R. M. Hauptmann, and J. M. Widholm: Trehalose as cryoprotectant for the freeze preservation of carrot and tobacco cells. *Plant Physiol.*, **78**, 430-432 (1985).
- 18) 渡辺 信: 藻類の凍結保存. 凍結保存 (酒井 昭編), 朝倉書店, 東京, 1987, pp. 251-256.
- 19) K. Sakamoto and N. Murakami: Suitable culture medium for *Synechocystis* sp. SY-4 and biochemical composition of the cells at various growth phases. *Rep. Res. Inst. Mar. Biores., Fukuyama Univ.*, **8**, 19-29 (1997).
- 20) S. Hatano, H. Sadakane, M. Tutumi, and T. Watanabe: Studies on frost hardiness in *Chlorella ellipsoidea* I. Development of frost hardiness of *Chlorella ellipsoidea* in synchronous culture. *Plant & Cell Physiol.*, **17**, 451-458 (1976).
- 21) G. J. Morris: Effects of growth temperature on the cryopreservation of *Prototheca*. *J. Gener. Microbiol.*, **94**, 395-399 (1976).
- 22) G. J. Morris: The cryopreservation of *Chlorella* 2. Effect of growth temperature on freezing tolerance. *Arch. Microbiol.*, **107**, 309-312 (1976).
- 23) G. J. Morris: Cryopreservation of 250 strains of Chlorococcales by the method of two-step cooling. *Br. Physiol. J.*, **13**, 15-24 (1978).
- 24) A. Benz-Amotz and A. Gilboa: Cryopreservation of marine unicellular algae. 1. A survey of algae with regard to size, culture age, photosynthetic activity and chlorophyll-to-cell ratio. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **2**, 157-161 (1980).
- 25) G. J. Morris: Cryopreservation, Institute of Terrestrial Ecology, Cambridge, United Kingdom, 1981, p. 27.