

研究ノート

タバコ培養細胞 BY-2 の凍結保存

古谷育代・安原裕紀・松中昭一

タバコの懸濁培養細胞 BY-2 は、非常に高率で細胞周期を同調化できる¹⁾ことをはじめとして、植物細胞生物学研究の材料として優れた数多くの性質を持っている^{2,3)}。最近では、BY-2 細胞から得たプロトプラストから、液胞を含まず核と細胞質の殆ど全てを含むミニプロトプラストを得る方法が開発されている⁴⁾。このミニプロトプラストから得た細胞質抽出物中では微小管が容易に再重合するため、この系を用いて植物の微小管結合タンパク質の研究が活発に進められている^{5,6)}。

これらの手法を用いるには、BY-2 細胞を良好な状態で継代培養し、維持しておく必要がある^{2,3)}。しかしながら、BY-2 細胞を適正な状態で継代、維持しておくことは、この細胞の培養の初心者にはしばしば困難な場合がある³⁾。また、現在の条件で継代培養を続けたとしても、将来に渡ってこれらの有用な性質が失われない保証はない。さらに、将来、何らかの変異形質を持った BY-2 細胞が得られた場合には、これらを保存する方法が必要になるが、多数の変異株をそれぞれ継代培養によって維持するには多くの場所と労力を要するためこれはあまり現実的な方法ではない。

そこで、BY-2 細胞を安定に保存する方法として、凍結保存の可能性を検討したところ、比較的簡単な方法で、凍結保存が可能であることが分かったので報告する。

BY-2 細胞は、0.2 mg/l 2,4-D と 3% ショ糖を含み KH_2PO_4 を 370 mg/l に高めた LS 改変培地(継代培地)で 7 日ごとの継代培養により維持した⁷⁾。凍結保存の方法は、Sakai ら⁸⁾の簡易法を改変して用いた。継代 4 日目の細胞を 0.3 M トレハロースを含む継代培地に移し 20 時間前培養を行った。前培養した細胞 2 ml (packed volume) を 4°C の凍害防御剤混合液(10% ジメチルスルホキシドと 0.5 M エチレングリコールを含む 0.4 M ショ糖水溶液)8 ml に懸濁し 10 分間静置した後、2 ml 容

のクライオバイアル(Nalgen company, NY, U. S. A.)に 0.5 ml ずつ分注し、-35°C のフリーザーに移して空中で 1 時間予備凍結した。予備凍結後クライオバイアルを液体窒素に浸して急速凍結し、そのまま液体窒素中で保存した。凍結保存した細胞の解凍は、クライオバイアルを 40°C の湯に浸けて行い、解凍した細胞懸濁液(0.5 ml)を 4°C の 1.2 M ショ糖水溶液 1.2 ml で希釈した後、固形培地(シャーレに作成した 0.3% ゲランガムを含む

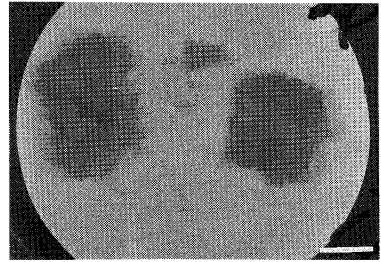


Fig. 1 Calli formed from BY-2 cells that had been frozen in liquid nitrogen.

Four-day-old BY-2 cells were transferred to subculture medium that contained 0.3 M trehalose and cultured for 20 hours. After the culture 2 ml (packed volume) of the cells were suspended in 8 ml of a mixed solution of cryoprotectants (0.4 M sucrose containing 10% dimethyl sulfoxide and 0.5 M ethylene glycol) and incubated for 10 minutes. Each 0.5 ml of the cell suspension was loaded in 2 ml cryovials. The cryovials were placed in a freezer at -35°C for an hour, and then immersed into liquid nitrogen for an hour. After rapid thawing at 40°C in water, the cell suspension was diluted with 1.5 ml of 1.2 M sucrose solution. Samples of 0.2 ml of diluted cell suspension were dispensed onto a double layer filter paper, placed on subculture medium containing 0.3% gelatin gum in a petri dish. After a day culture, the cells with the upper layer of the filter paper were transferred to other petri dishes containing the same medium and cultured for 2 weeks. Bar; 10 mm

Ikuyo FURUTANI, Hiroki YASUHARA and Shooichi MATSUNAKA
Cryopreservation of Tobacco BY-2 Cells.

関西大学工学部生物工学科

(〒564 大阪府吹田市山手町 3-3-35)

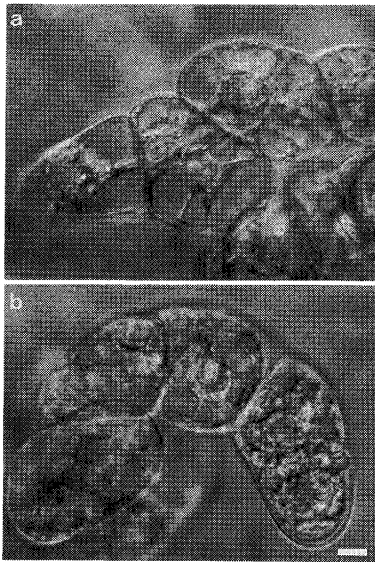
Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Kansai University, 3-3-35 Yamate-cho, Suita, Osaka 564, Japan

Table 1. Effect of preculture condition on the survival of cryopreserved BY-2 cells.

Sugar added to the preculture medium	Viability (%±S. D.)	Regrowth*
none	11.4±2.0	0/4
0.3 M sucrose	4.1±2.0	0/3
0.3 M mannitol	12.7±2.4	2/4
0.3 M glucose	19.1±1.3	2/3
0.3 M trehalose	42.9±2.5	6/7

Four-day-old BY-2 cells were transferred to subculture medium that contained 0.3 M sucrose, 0.3 M mannitol, 0.3 M glucose or 0.3 M trehalose and cultured for 20 hours. Precultured cells were treated with a mixed solution of cryoprotectants (0.4 M sucrose containing 10% dimethyl sulfoxide and 0.5 M ethylene glycol) for 10 minutes, and placed in a freezer at -35°C for an hour, and then immersed into liquid nitrogen for an hour. After the immersion into liquid nitrogen, cells were thawed and cultured for 2 weeks. Viability of the thawed cells was examined by the staining with fluorescein diacetate. At least 300 cells were examined for each determination of viability.

* Number of experiments in which regrowth of the thawed cells was observed/Number of total experiments.

**Fig. 2** Effect of preculture on vacuoles of BY-2 cells.

Four-day-old BY-2 cells were precultured in subculture medium containing 0.3 M trehalose for 20 hours. The cells before (a) and after (b) the preculture were observed under a differential interference contrast optics. Vacuolar spaces of the BY-2 cells were decreased by the preculture. Bar; 10 μm

継代培地)上に重ねて敷いた2枚の濾紙上に、シャーレ当たり0.2 ml 注入し、 27°C 暗所で培養した。1日後、濾紙1枚とともに細胞を新しい固形培地に移してさらに

培養を続けた。解凍した細胞の生存率は1.2 M ショ糖水溶液で希釈後の細胞を一部採取し、二酢酸フルオロセイン (FDA) で染色して求めた。

液体窒素中の保存期間を1時間として、上記の方法を試みたところ、培養5から7日後に濾紙上にカスの形成が認められ、さらに増殖した (Fig. 1)。ネーブルオレンジ⁸⁾とアスパラガス⁹⁾の培養細胞の簡易法による凍結保存では、いずれにおいても前培養を行わずに凍結保存に成功しているが、BY-2 細胞の場合には前培養を行わなかった場合には解凍した細胞の増殖は見られなかった (Table 1)。これは、BY-2 細胞が対数増殖期においても細胞体積の多くを占める液胞を持つためと思われる。トレハロースによる前培養を行った細胞と行わなかった細胞を微分干渉顕微鏡で観察したところ、前培養による液胞の体積の減少が認められた (Fig. 2)。前培養に用いる培地に添加する糖としてトレハロース以外に、マンニトール、グルコース、ショ糖を検討したが、解凍後の細胞の生存率、解凍した細胞の増殖ともにトレハロースを用いた場合が最も良い結果であった (Table 1)。

凍害防御剤混合液として前述のもの以外に、0.5 M エチレングリコールの代わりに0.5 M グリセリンを用いたもの、0.4 M ショ糖の代わりに0.4 M トレハロースを用いたもの、また、すでに報告されている簡易法による凍結保存^{8,9)}において用いられている2 M グリセリンを含む0.4 M ショ糖水溶液についても検討したが、前述の10%ジメチルスルホキシドと0.5 M エチレングリコールを含む0.4 M ショ糖水溶液が最も良い結果であ

Table 2. Effect of cryoprotectants on the survival of cryopreserved BY-2 cells.

Mixed solution of cryoprotectants	Regrowth*
0.4 M sucrose containing 2 M glycerol	1/5
0.4 M sucrose containing 10% DMSO and 0.5 M glycerol	2/5
0.4 M sucrose containing 10% DMSO and 0.5 M ethylene glycol	3/4
0.4 M trehalose containing 10% DMSO and 0.5 M ethylene glycol	2/4

Four-day-old BY-2 cells were transferred to subculture medium that contained 0.3 M trehalose and cultured for 20 hours. Precultured cells were treated with various mixed solutions of cryoprotectants for 10 minutes, and placed in a freezer at -35°C for an hour, and then immersed into liquid nitrogen for an hour. After the immersion into liquid nitrogen, cells were thawed and cultured. Regrowth of the cells was examined after 2 weeks culture.

* Number of experiments in which regrowth of the thawed cells was observed/Number of total experiments.

Table 3. Effects of period of cryopreservation on the regrowth of BY-2 cells.

Period	Regrowth*
an hour	4/4
7 days	2/2
30 days	3/3
60 days	3/4
120 days	2/2

BY-2 cells were cryopreserved in liquid nitrogen. After various periods of the cryopreservation the cells were thawed and cultured. Regrowth of the cells were examined after 2 weeks culture.

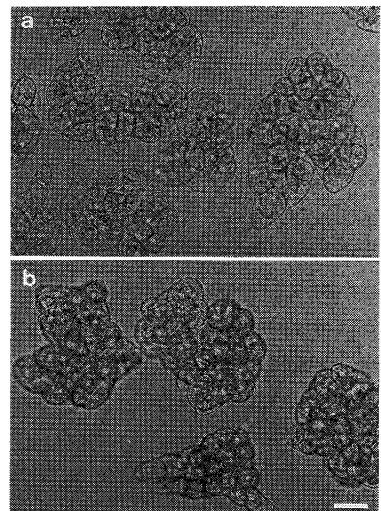
* Number of experiments in which regrowth of the thawed cells was observed/Number of total experiments.

った (Table 2).

つぎに長期に渡って凍結保存することが可能かどうかを検討したところ、120日間凍結保存した細胞からもカルスの増殖が見られた (Table 3)。そこで、凍結保存によって BY-2 細胞の性質が変化していないかどうかを120日間の凍結保存を経た細胞について検討した。性質の検討は、1)同調培養が高率で行えるかどうか、2)ミニプロトプラストの調製ができるかどうか、3)サイトカニン処理で細胞が伸張するかどうか、の3点について行った。

凍結保存した細胞は、初めカルスの状態で増殖させたので、これを元の懸濁培養の状態に戻すために、カルスが5g程度まで増殖した時点で、30mlの液体培地に移し、振とう培養を行った。5から7日後に細胞が増殖定常期に入った段階で培養液1mlを新しい継代培地に移し、以後は通常の7日ごとの継代培養を行った。凍結保存を経た細胞の増殖速度は、継代培養によって維持している通常の BY-2 細胞と同様であった。カルスは液体培

地に移して振とう培養すると容易にほぐれたが、1つ1つの細胞塊の大きさは、継代培養によって維持している

**Fig. 3** Light micrograph of the control BY-2 cells and the resuspension cultured BY-2 cells derived from cells that had been cryopreserved for 120-days.

About 5 g of calli regrown from cells that had been cryopreserved for 120-days were transferred to 30 ml of liquid subculture medium and cultured on a reciprocal shaker at 130 rpm. Five to 7 days after the transfer when the cells were in stationary phase of growth, 1 ml of the cell suspension was transferred to 30 ml of fresh medium. After that, the cells were subcultured every 7 days. After the second subculture, 4-day-old cells were examined under light microscope. The cells derived from the cryopreserved cells (b) could not be distinguished from the control BY-2 cells (a). Bar; 50 μm

通常の細胞のものより大きかった。しかし、細胞塊の大きさは継代培養を2ないし3回繰り返すと、通常のBY-2細胞と同様になった(Fig. 3)。このような処理を行って得られた懸濁培養細胞を用いて凍結保存によるBY-2細胞の性質の変化の有無を検討した。

同調培養は、DNA合成阻害剤アフィディコリンと微小管重合阻害剤プロピザミドを用いた二段階法¹⁾によって行った。その結果、凍結保存を経た細胞を用いた場合にも、継代培養によって維持した通常のBY-2細胞を用いた場合と同様に分裂期の細胞の割合が最大で80ないし90%となるような、高率の同調培養が可能であった(Fig. 4)。

ミニプロトプラストの調製は、すでに報告されている方法^{4,5)}に従って行った。BY-2細胞を酵素処理してプロトプラストにした後、0.6 M マンニトールを含む30%パーコール水溶液に懸濁し12,000 gの高速遠心を30分間行った。遠心分離後、遠心チューブの底付近にミニプロトプラストが得られたが、収率、純度共に凍結保存した細胞を用いた場合も、継代培養によって維持した細胞を用いた場合と同様であった。

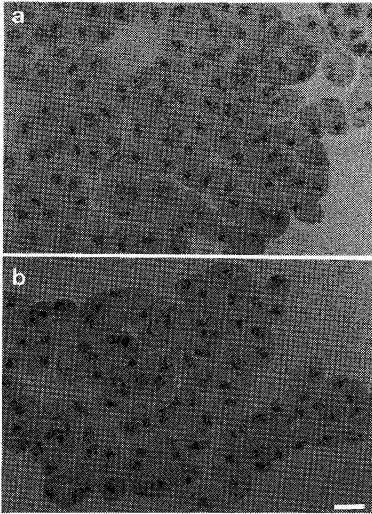


Fig. 4 Influence of cryopreservation on the synchronization of cell cycle in BY-2 cells. Cell cycles of BY-2 cells that have not been cryopreserved(a) or BY-2 cells derived from cells that had been cryopreserved for 120-days(b) were synchronized by using aphidicolin and propyzamide. Both cells were sampled 10 hours after the termination of treatment with aphidicolin and stained with lactopropionic orcein for nuclei and chromosomes. The cryopreservation did not affect the synchronization of cell cycle. Bar; 50 μ m

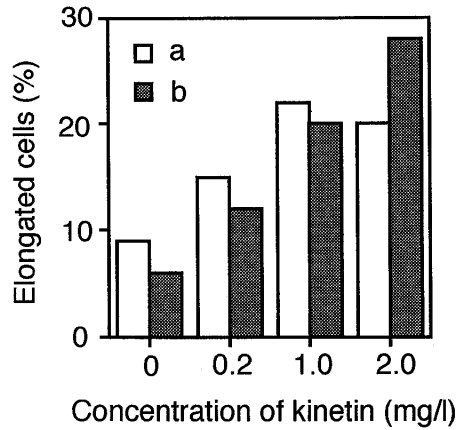


Fig. 5 Effects of cryopreservation on the elongation of BY-2 cells by a treatment with kinetin.

Protoplasts that were prepared from BY-2 cells that have not been cryopreserved (a) or BY-2 cells derived from cells that had been cryopreserved for 120-days(b) were cultured for 10 days in subculture medium that contained 0.4 M mannitol and various concentrations of kinetin. After the culture, percentages of elongated cells (cells whose length was larger than three times' widths of the cells) were examined under light microscope. The cryopreservation did not affect the elongation of BY-2 cells by a treatment with the cytokinin. At least 250 cells were examined for each determination.

BY-2細胞のプロトプラストをサイトカイニンを含む培地で培養すると、伸張した細胞になることが知られている¹⁰⁾。この性質が凍結保存を経た細胞に保持されているかどうかを調べた。継代培養によって維持した細胞と、凍結保存を経た細胞をそれぞれプロトプラストにした後、0, 0.2, 1.0あるいは2.0 mg/lのカイネチンと0.4 M マンニトールを含む継代培地で静置培養したところ、凍結保存を経た細胞から得たプロトプラストからも継代培養によって維持した細胞のプロトプラストからと同様に、カイネチンの濃度に依存して伸張した細胞の割合の増加が認められた(Fig. 4)。

以上のような結果から、凍結保存を経たBY-2細胞の性質は、通常の継代培養によって維持している細胞と同様であると判断した。

今回用いた方法により、少なくとも120日間は性質を変えずに凍結保存が可能であることが分かった。非常に有用な研究材料であるBY-2細胞を将来に渡って利用し続けるため、また、有用な変異形質を持つBY-2

細胞を保存するためには、より長期に渡って安定に凍結保存ができることが望まれる。現在、今回用いた方法で、さらに長期の保存が可能かどうかを検討中である。

謝 辞

本研究を行うにあたり北海道大学名誉教授、酒井 昭博士には有益なご助言を多数頂きました。厚く御礼申し上げます。また、実験に協力いただいた、関西大学工学部生物工学科の上田哲郎君に感謝します。

(1996年8月19日受理)

文 献

1) Kakimoto, T., H. Shibaoka, 1988. *Protoplasma*,

Suppl. 2: 95-103.

- 2) Nagata, T., Y. Nemoto, S. Hasezawa, 1992. *Int. Rev. Cytol.*, **132**: 1-30.
- 3) Shibaoka, H., 1993. *J. Plant Res.*, Special Issue **3**: 3-15.
- 4) Sonobe, S., 1990. *Protoplasma*, **155**: 239-242.
- 5) Jang, C. J., S. Sonobe, H. Shibaoka, 1992. *Plant Cell Physiol.*, **33**: 497-501.
- 6) Jang, C. J., S. Sonobe, 1993. *J. Cell Sci.*, **105**: 891-901.
- 7) Nagata, T., K. Okada, I. Takebe, C. Matsui, 1981. *Mol. Gen. Genet.*, **184**: 161-165.
- 8) Sakai, A., S. Kobayashi, I. Oiyama, 1991. *Plant Sci.*, **74**: 243-248.
- 9) Nishizawa, S., A. Sakai, Y. Amano, T. Matsuzawa, 1992. *Cryo-Letters*, **13**: 379-388.
- 10) Hasezawa, S., K. Syono, 1983. *Plant Cell Physiol.*, **24**: 127-132.