

# 植物培養細胞の 超低温保存

国立研究開発法人理化学研究所  
バイオリソース研究センター  
実験植物開発室  
小林 俊弘

2022年9月12日



植物培養細胞リソースについて

超低温保存の原理と技術

問題点と将来

# 植物培養細胞リソースについて

超低温保存の原理と技術

問題点と将来

# 実験植物開発室のリソース

---

## 実験植物種子

130,889系統

4°C保存

シロイヌナズナ

ミナトカモジグサ

---

## 植物DNA

711,240クローン

-80°C保存

シロイヌナズナ

ミナトカモジグサ

ポプラ

キャッサバ

ストライガ

ヒメツリガネゴケ

---

## 植物培養細胞

72細胞株

継代による維持

---

2020年度実績

リソースリスト：<https://epd.brc.riken.jp/ja/resource/list01>

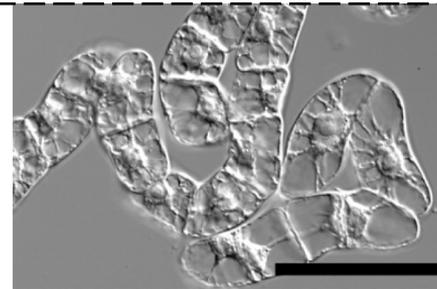
# 植物培養細胞リソース

細胞生物学の研究に使用

脱分化した細胞 — 再分化能を失った細胞株

モデル細胞株

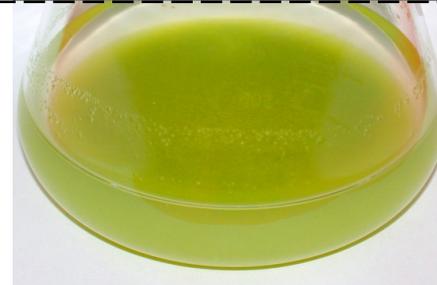
タバコ BY-2



100  $\mu$ m

モデル植物の細胞株

シロイヌナズナ T87



物質生産株

ヨウシュヤマゴボウ PAR



Plant species	Cell line	Plant species	Cell line	Plant species	Cell line		
<i>Nicotiana tabacum</i> — Transgenic line	BY-2	<i>Nicotiana tabacum</i>	NI	<i>Phyllostachys nigra</i>	Pn		
	BY-2H		T91 *		<i>Phytolacca americana</i>	PAP	
	BY-TIPG		T91H *			PAR	
	BY-YTRF3 *		Xan-1			PAW	
	GF11		XD6S2 *			<i>Prunus × yedoensis</i>	Co460
	GT16		XD6S21 *	<i>Prunus persica</i>	P468		
	GV7		<i>Oryza sativa</i>	Oc	<i>Taraxacum officinale</i>	ToF	
	OsmotinPro:RFP *			OS-1	<i>Vitis sp.</i>	VR	
	TBY2-31/41 *			GCR26		VW	
	TBY2-31/ST *		<i>Solanum lycopersicum</i>	GCR237	<i>Asparagus officinalis</i>	Asp-86 **	
	TBY2-31/ST(E) *	Sly-1		<i>Asparagus pastorianus</i>	A.pas		
	TBY2-41/ST *	<i>Amaranthus sp.</i>	H440	<i>Asparagus persicus</i>	A.per		
	TBY2-AtRER1B		CRA	<i>Asparagus plocamoides</i>	A.plo		
	TBY2-G31 *		CrB *	<i>Athyrium yokoscense</i>	AY-01		
	TBY2-R31 *		V208	<i>Bruguiera sexangula</i>	BsLs		
	TBY2-RER/31 *		<i>Citrullus battich</i>	Cba-1		C38 **	
	topless3-GFP *			<i>Commelina communis</i>	TA416		L46 *
					<i>Coptis japonica</i>	Cj	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At tom			156-S	<i>Ceratopteris richardii</i>	Cr-AH *	
	Deep *		<i>Curcuma longa</i>	CI	<i>Daucus carota</i>	kurodagosun	
	Deep-rapid *			Dm		NC *	
	gnom	<i>Duboisia myoporoides</i>		SB489	<i>Nicotiana glauca</i>	G89	
	MM2d *	<i>Fragaria × ananassa</i>	GIV	<i>Sesamum indicum</i>	PSB		
	MM2d-LS *	<i>Glehnia littoralis</i>	GIW		PSG		
	T87	<i>Glycyrrhiza echinata</i>	Ak-1		PSW		
	YG1		Ge	<i>Spinacia oleracea</i>	Spi-12F		
	<i>Brachypodium distachyon</i>	Embryogenic callus	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	M18-1		Spi-I-1	
		BRC525 *		OM		Spi-WT	
<i>Glycine max</i>	DG330	<i>Luffa cylindrica</i>	Lcy-1 **	<i>Triticum vulgare</i>	Cp *		
<i>Lotus japonicus</i>	Lj		LcyD6	<i>Vinca major</i>	Vma-1		
	Lj A		LcyD7	<i>Vitis vinifera</i>	YU-1		
	Ljm A	Mar-1	<i>Zinia elegans</i>	ZE3			
<i>Nicotiana tabacum</i>	3n-3	<i>Mentha arvensis</i>	T-13				
	ATR-r	<i>Nicotiana tabacum</i>					
	NaCl-r	<i>Phyllostachys bambusoides</i>	Pb				

\* Not released

\*\* Not available

# 維持の特徴

## 生細胞を植継ぎで維持

凍結保存は非常に難しい

寄託以前に10年以上植継ぎで維持されている

## 強い選択圧のもとで維持

特定の培地・培養環境で盛んに増殖する細胞

視覚による選抜

- カルスの形態
- 色素生産

変異が入り放題ではないと考えられる

## 品質管理

DNA検査による植物種・細胞株の判別

一時的な状態の変化（環境に敏感） ≧ 遺伝的变化

# 継代による維持の問題点

コスト・スペース

培地

培養環境

細胞株の損失

微生物の汚染

事故・天災

特性の変化

細胞増殖能

問題解決の唯一の方法

⇒ 液体窒素中の超低温保存

植物培養細胞リソースについて

## 超低温保存の原理と技術

問題点と将来

# 植物細胞を凍結すると…

植物細胞

冷却

細胞内凍結

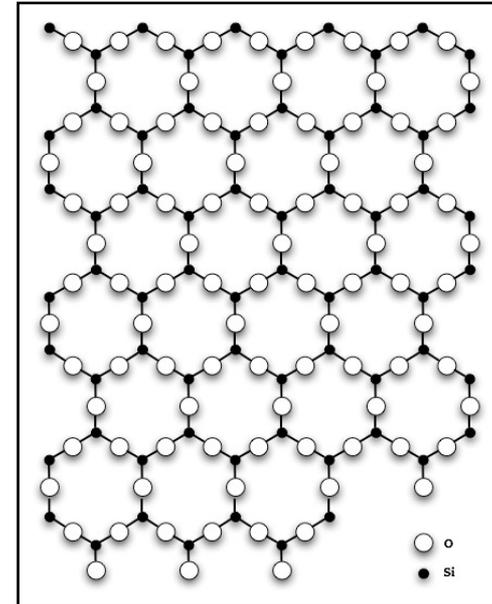
細胞内構造の破壊

加温

細胞死

イオンの流出  
pHの変化

結晶



By User:127.0.0.1

File:SiO2 - Quartz - 2D.png

CC BY-SA 3.0

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=568470>

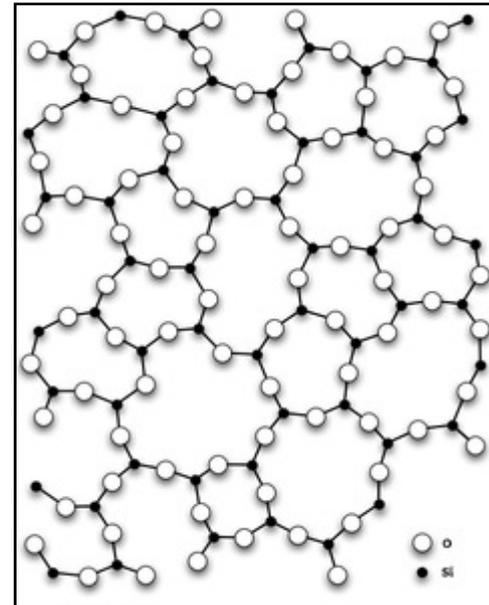
# 細胞内凍結を回避するには…

## ガラス化

ガラス：

液体を急速にガラス転移温度以下に冷却することによって形成される非晶質の固体

非晶質



By User:127.0.0.1

File:SiO2 - Glas - 2D.png

CC BY-SA 3.0

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=568452>

# ガラス化の誘導

## 誘導条件

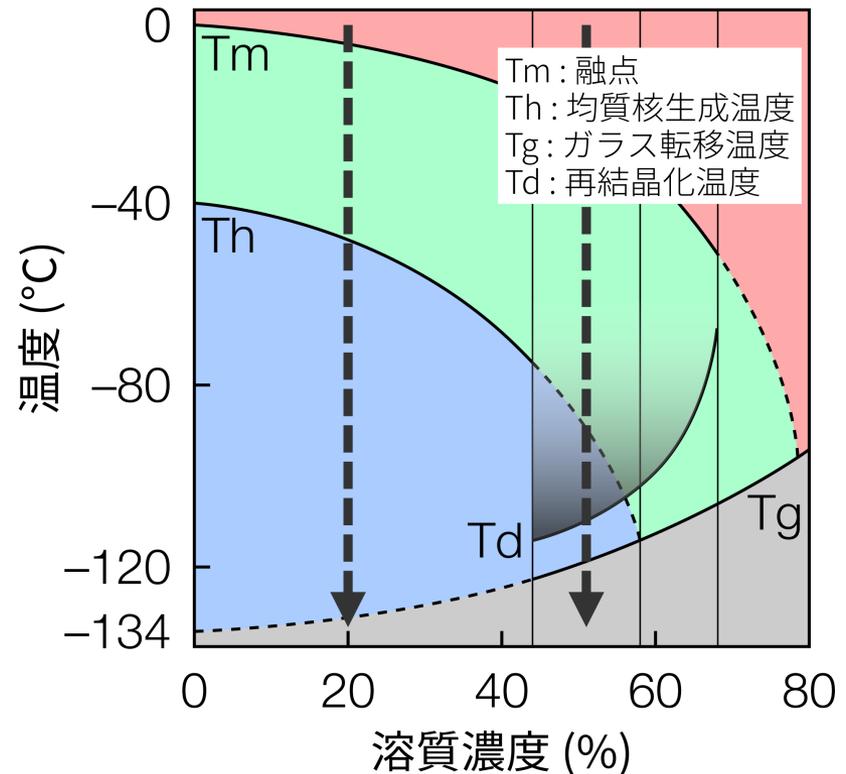
溶質濃度の増加

急速冷却

## 加温条件

急速加温

— 昇温による再結晶化を抑制



平井泰 (2001) 北海道立中央農業試験場報告 第99号  
p 3, Fig II-2を元に作成

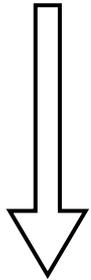
<http://agriknowledge.affrc.go.jp/RN/2010630232.pdf>

# 超低温保存の手順

前培養  
前処理

脱水耐性の付与

馴化（低温・浸透圧）



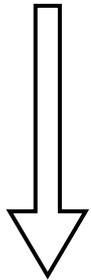
脱水

細胞質の濃縮  
水分含量の減少

凍結脱水（緩速予備凍結法）

浸透脱水（ガラス化法）

風乾（乾燥法）



急速冷却

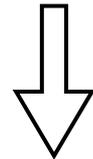
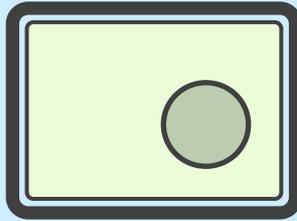
ガラス化の誘導

液体窒素に投入

<p>緩速予備凍結法</p>	<p>ガラス化法</p>	<p>乾燥法</p>
<p>凍結脱水</p>	<p>浸透脱水 高濃度のガラス化液を用いて、浸透差によって脱水</p>	<p>風乾 自然乾燥 シリカゲル乾燥</p>
<p>複雑な構造の器官には不向き</p>	<p>培養茎頂 毛状根 Embryogenic cells</p>	
<p>プログラムフリーザー 通常のフリーザーを使用する簡易法が確立されている</p>	<p>浸透圧ストレス 処理の最適化が面倒</p>	<p>乾燥の調整が困難</p>

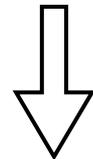
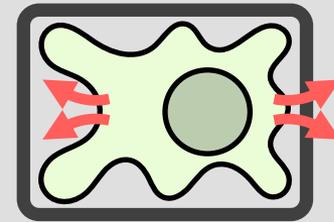
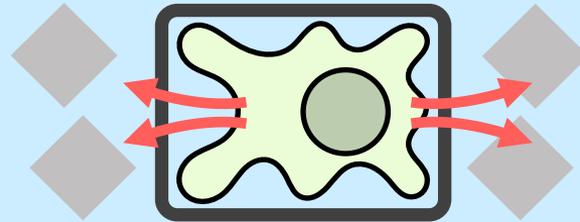
# 凍結脱水

凍害防御剤液



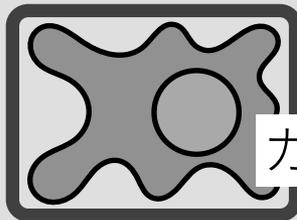
冷却  $0.5 \sim 2.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$

細胞外凍結



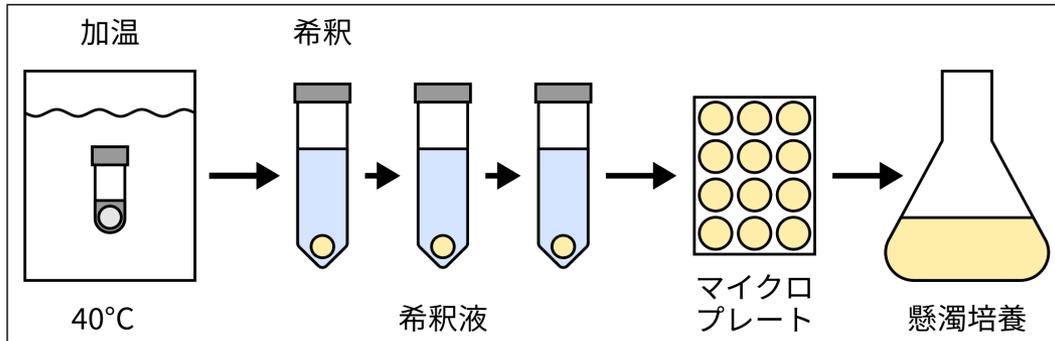
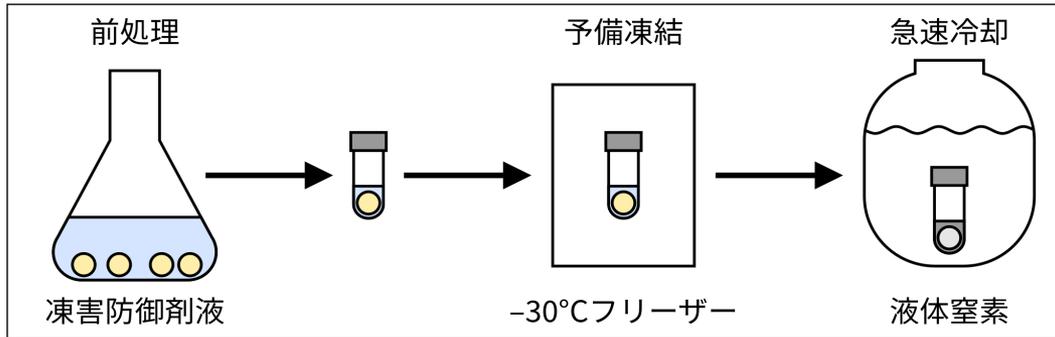
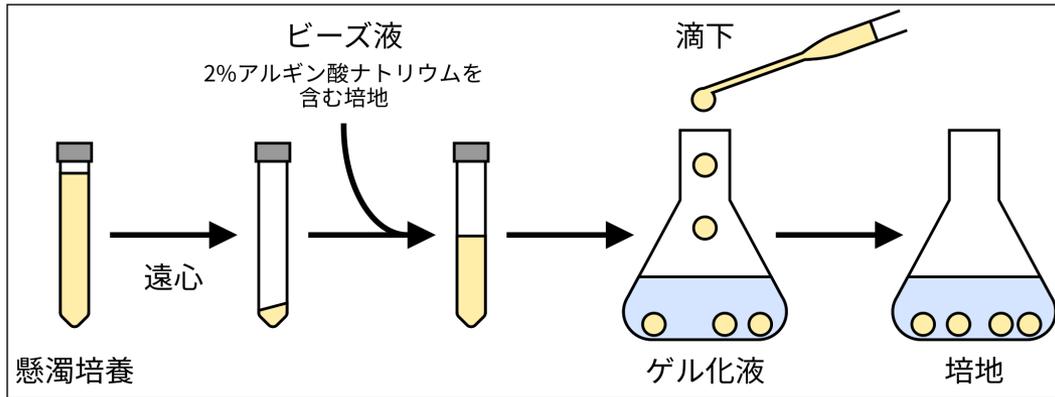
急速冷却 液体窒素

凍結



ガラス化 (細胞内)

# ビーズ簡易予備凍結法



# 植物培養細胞の保存成績

細胞株 <sup>a</sup>	前処理 (分)	予備凍結 (時間)	細胞生存率 (%) <sup>b</sup>	再増殖率 (%) <sup>c</sup>	培養日数 <sup>d</sup>
BY-2	60	2.0	63.1 ± 6.5	100	< 7
T87 <sup>e</sup>	40	3.0	55 ~ 60	100	< 14
Coll23-2	75	1.0	36.0 ± 4.1	100	< 14
Coll23-3	60	1.5	4.6	0	
LerL	60	1.0	59.5 ± 4.6	100	< 14
WsL	60	2.0	3.3	0	
WsL23	75	1.5	65.0 ± 11.9	100	< 14
WsL45	60	1.5	50.6 ± 4.9	100	< 14

<sup>a</sup> ビーズ簡易予備凍結法で保存 (凍害防御剤液：2 M glycerol、0.4 M sucrose)

<sup>b</sup> 培養1日目の細胞生存率 [BY-2：エバンスブルー排除法、BY-2以外：TTC還元法 (無処理に対する相対%)]

<sup>c</sup> 30バイアル (Coll23-3とWsLは5バイアル) を用いた場合の懸濁培養誘導の成功率

<sup>d</sup> 継代可能になるまでに要した日数

<sup>e</sup> 川原・菅原・小林(正) (未発表)

# 参考文献

Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1991) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) by simple freezing method. *Plant Science* 74: 243–248.

DOI: [10.1016/0168-9452\(91\)90052-A](https://doi.org/10.1016/0168-9452(91)90052-A)

Menges M, Murray JAH (2004) Cryopreservation of transformed and wild-type *Arabidopsis* and tobacco cell suspension cultures. *Plant Journal* 37: 635–644.

DOI: [10.1046/j.1365-3113X.2003.01980.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.2003.01980.x)

Kobayashi T, Niino T, Kobayashi M (2005) Simple cryopreservation protocol with an encapsulation technique for tobacco BY-2 suspension cell cultures. *Plant Biotechnology* 22: 105–112.

DOI: [10.5511/plantbiotechnology.22.105](https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.22.105)

Kobayashi T, Niino T, Kobayashi M (2006) Cryopreservation of tobacco BY-2 suspension cell cultures by vitrification with encapsulation. *Plant Biotechnology* 23: 333–338.

DOI: [10.5511/plantbiotechnology.23.333](https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.23.333)

Ogawa Y, Suzuki H, Sakurai N, Aoki K, Saito K, Shibata D (2008) Cryopreservation and metabolic profiling analysis of *Arabidopsis* T87 suspension-cultured cells. *Cryo-Letters* 29: 427–436.

<https://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2008/00000029/00000005/art00008>

Ogawa Y, Sakurai N, Oikawa A, Kai K, Morishita Y, Mori K, Moriya K, Fujii F, Aoki K, Suzuki H, Ohta D, Saito K, Shibata D (2012) High-throughput cryopreservation of plant cell cultures for functional genomics. *Plant and Cell Physiology* 53: 943–952.

DOI: [10.1093/pcp/pcs038](https://doi.org/10.1093/pcp/pcs038)

植物培養細胞リソースについて

超低温保存の原理と技術

**問題点と将来**

# 現状の問題

## 運用できていない

技術の習熟が必要（技術員）  
常に提供している

## 適用できる細胞株が少ない

タバコ BY-2

シロイヌナズナ

ニンジン NC

× 物質生産株

## ⇒ 形質転換BY-2の超低温保存

寄託が増えている  
提供数は少ない  
評価しやすい



# 保存する材料の重要性

## 材料の質は非常に重要

健康状態 >> 厳密な操作

## 保存しやすい細胞

小さい細胞・meristematicな細胞

細胞質に富む = 液胞が小さい

増殖が速い

## 材料の特性

どの細胞がどのくらい生き残ればいいのか

脱水・低温感受性

- 耐性の誘導
- 低温馴化
  - 浸透圧処理
  - ABA

# 保存する材料と方法

材料		保存法	生存部位	回復
培養細胞	懸濁	緩速予備凍結法	細胞	多くの細胞 一細胞でも生き残れば回復する可能性（時間がかかる、技術が必要）
	硬いカルス	ガラス化法		
培養茎頂 毛状根		ガラス化法	成長点	一外植片 一植物体
Embryogenic cells		ガラス化法 緩速予備凍結法	再分化する細胞	増殖が遅い 再分化しない液胞化した細胞は生き残りにくい

# 技術開発の方向性

## 簡便さ

- 誰でも 技術の習熟が不要
- すぐに 条件検討が不要
- 何でも 材料の種類・質に依らない

## 周辺技術

### 培養技術

- ビーズカプセル化
- マイクロカルチャー

### 移植技術（動物）

### 凍害防御剤

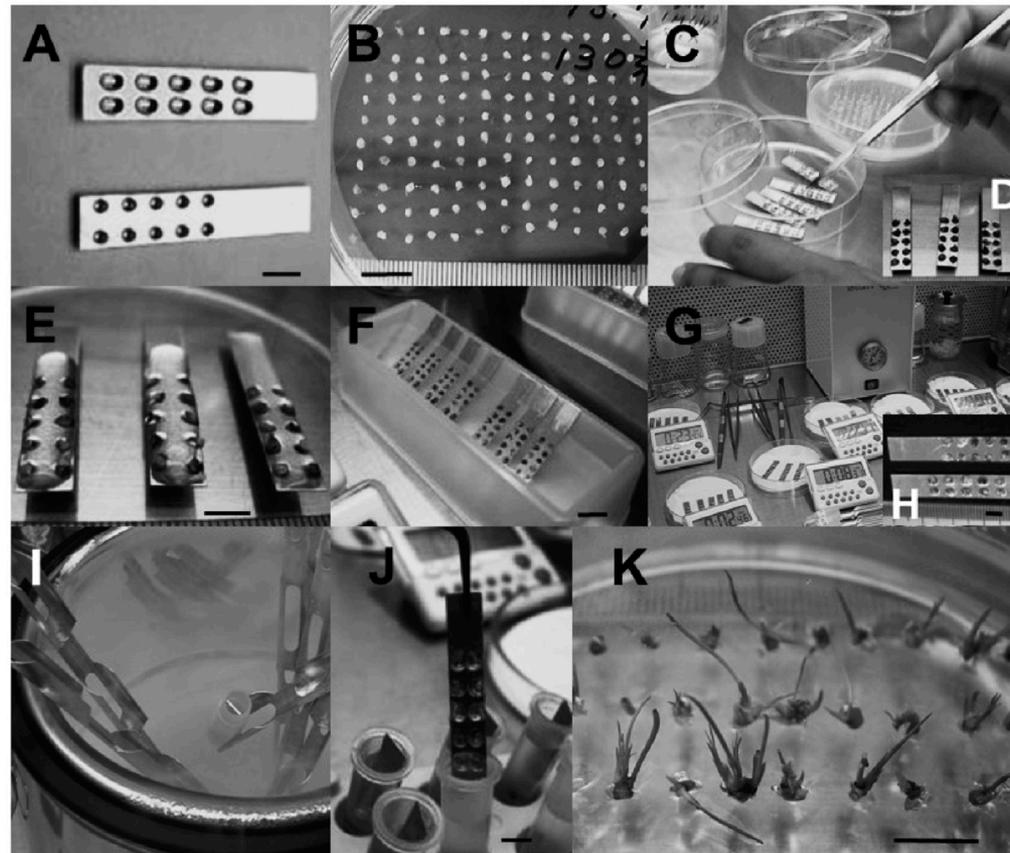
- 低毒性

# Cryo-plate法

Niino et al. (2014) Plant Biotechnology 31: 281–287  
<https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.14.0624a>

## 超急速冷却・加温によるガラス化の促進

小さい試料をアルギン酸ゲルでアルミニウムプレートに固定し、  
液体窒素に直接投入



## 装置

液体窒素凍結保存容器

- キャニスター
- バイアルボックス

プログラムフリーザー（必須ではない）

<https://planer.com/>

バイオメディカルフリーザ

振とう機・ローテーター

ウォーターバス

## 試薬（凍害防御剤）

Glycerol

Sucrose

Dimethyl sulfoxide（ガラス化法）

Ethylene glycol（ガラス化法）

## 器具

デュワー瓶

ケーン

<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home.html>

クライオバイアル（外蓋の方がコンタミしにくい）

<https://shop.gbo.com/ja/japan/products/bioscience/>

クライオプレート関連（必須ではない）

# 参考

実験植物開発室

<https://epd.brc.riken.jp/ja/>

植物培養細胞ラボマニュアル

<https://epd.brc.riken.jp/ja/manual/cell>

技術研修

[https://ja.brc.riken.jp/consulting/kensyu\\_plant27.shtml](https://ja.brc.riken.jp/consulting/kensyu_plant27.shtml)

基礎生物学研究所 IBBPセンター

<https://www.nibb.ac.jp/ibbp/>

生物遺伝資源新規保存技術開発共同利用研究

<http://www.nibb.ac.jp/collabo/invite/invite.html>

Cryopreservation Conference (2014～)

<https://ibbp.nibb.ac.jp/cryoconf2019/>

農研機構 遺伝資源センター

<https://www.naro.go.jp/laboratory/ngrc/index.html>

低温生物工学会

<http://square.umin.ac.jp/jscc/jp/index.html>