

2007年度 卒業論文

単細胞藻類*Chlamydomonas reinhardtii*の凍結保存条件の検証

高知工科大学
物質・環境システム工学科
1080030 木村尚美

指導教官 大濱 武 教授

2007 年3 月20 日

[要旨]

現在モデル生物 *Chlamydomonas reinhardtii* は継代培養によって維持されている。これが冷凍保存出来れば、省スペース化や継代培養に伴う労力を省く事が出来る。

冷凍保存の研究は 1960 年代から始まり、1970 年代には *Chlorella* で多くの知見が得られた。*Chlamydomonas* での研究は 1971 年が最初で、その後の研究で *Chlorella* に比べ *Chlamydomonas* は冷害を受けやすい事が判明した。

液体窒素ストッカーなどの特殊な器具や装置を使わず凍結保存することが可能なのか、また、どのような凍結防御剤が適しているか。その凍結防御剤が本研究室で取り扱っている他の単細胞緑藻類にも有効かを検証した。

本研究では予備凍結後の急速冷却・急速加温による凍結保存法を用いた。細胞の培養液に凍結防御剤を添加して予備冷却後、ドライアイス・エタノール（または液体窒素）で急速冷却をし、その後、 -80°C のフリーザーで一日保存。解凍は、 35°C の湯浴上で急速解凍。解凍後、液体培地で一晚（16 時間）培養後、寒天培地に塗布した。凍結前の培養液を一定量寒天上に塗布して形成させたコロニー数と凍結後に形成したコロニー数を比較して、凍結処理後の生存率を再出した。

Chlamydomonas にはメタノールが最適な凍結防御剤であり、他の単細胞緑藻類 KS-1、*B.braunii* にもメタノールは有効であった。凍結処理した直後に解凍した場合には高い生存率が得られるのに対して、 -80°C のフリーザーで保存することにより、生存率は著しく落ちるため凍結保存の実用的な方法は確立できなかった。