

受賞総説

微細藻類の系統保存に携わって —国立環境研究所微生物系統保存施設 (NIES コレクション) における微細藻類の継代保存と管理システムの概要—

(平成 17 年度日本微生物資源学会技術賞受賞)

恵良田真由美^{1), 2)}

¹⁾ 財団法人 地球・人間環境フォーラム つくば研究所

²⁾ 独立行政法人 国立環境研究所 (NIES)

〒 305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2

Culture Collection for Microalgae — Preservation of Algal Strains by Subculture and its Management System at the NIES Collection —

Mayumi Erata^{1, 2)}

¹⁾ Global Environmental Forum, Japan, Tsukuba Laboratories

²⁾ Microbial Culture Collection, National Institute for Environmental Studies, Japan (NIES)

16-2 Onogawa, Tsukuba-City, Ibaraki 305-8506, Japan

Since its establishment in 1983, the Microbial Culture Collection at the National Institute for Environmental Studies (NIES Collection) has served as a center of bioresources in Japan, specializing in microalgae. At present, there are approximately 1,600 strains of microalgae in the NIES Collection, 70% of which are maintained by serial transfer because cryopreservation, which is the only method of long-term preservation of microalgae, is difficult to apply to most algal groups. As a result, the strains can be damaged or spoiled easily, due to the intrinsic instability of algal strains.

I joined the NIES Collection in 1995 and in my work as a curator there for over ten years, I have strived to improve the management system for subcultured strains in order to minimize the damage and loss. This report describes part of the routine work for our culture collection, particularly for such subcultured strains: for example, daily temperature checking of the culture room and incubators, 365-day transfer schedule controlled by a custom-made database system, weekly growth checking for all subcultured strains, and after-care for recovery of poor-grown cultures. In addition, the method of handling the distribution of algal strains is also explained.

はじめに

国立環境研究所微生物系統保存施設 (以下 NIES と略す) は、前身であった国立公害研究所の附属施設として 1983 年に設立されたカルチャーコレクションであり、発足当初より環境問題・環境研究に関わる微細藻類を主体とした収集・維持・分譲を行ってきた。微細藻類では未だに継代培養に頼る保存が主流を占め

ているため、株の日常的な取り扱いについては凍結・乾燥保存が主体となっている他コレクションの収集株と大きく異なる点が多々ある。著者は 1995 年より系統保存業務スタッフの一員として、NIES において微細藻株の継代培養による保存・分譲業務を手がけてきたので、この機会に本施設における保存株の日常的な維持管理および分譲取り扱いの現状を報告し、微細藻

類の系統保存業務上の特色について紹介したい。各方面の方々のご批判・ご助言を仰ぐことができれば幸いである。

NIES 保有株の現状

現在 NIES では、設立当初の守備範囲に加え、可能な限り多様なグループに所属する株の収集・保存に力を入れている。そのため最近になって、特定の藻群との系統を考える上で重要とされる原生動物や絶滅の恐れのある大型藻(特に淡水産紅藻およびシヤジクモ類)等の受け入れもしだいに増えてきているが、依然として NIES における全保有株(非公開株も含めて 2005 年 10 月現在総数 1,836)のうち 1,634 株が微細藻類であり、全体の 9 割近くを占めている(本施設ホームページ：http://www.nies.go.jp/biology/mcc/home_j.htm および (2) を参照)。この中で 485 株が凍結保存により維持されているが(3, 4)、凍結株は今のところシアノバクテリアを中心とした特定のグループに限られ、微細藻株の約 7 割に相当する残り 1,149 株については現在でも継代培養による保存を行なっている。

継代培養における株の亡失の危険性

保存機関に課せられた最低限の義務はいうまでもなく株を絶やさないことであるが、継代培養においては植え継ぎ忘れや生育状態悪化の見落とし、設備不調の発見遅れ等、不注意で株を失ってしまう機会には事欠かない。しかも株数の増加にしたがってその危険性は増大する。カルチャーコレクションの保有株はいわば大切な預かり物であるから、株の状態悪化や死滅という最悪の事態は、保存担当者にとっても大きなストレスとなる。NIES ではこれらの問題点を完全にクリアすることはできないまでも、不安材料を少しでも排除し、保存業務担当者の時間的・心理的な負担を軽くするように、スタッフ自身で工夫したり、あるいは周囲の協力をお願いしたりして、以下に示すような考えられる限りの対応策を取ってきた。

株の日常管理

1. 培養設備(保存室・インキュベータ)の管理

NIES には温度設定の異なる 4 つの保存室(5, 10, 15, 20℃)とインキュベータ 12 台があり、継代株は全てその中で培養保存されている。微細藻類は生長に光を必要とするため、光源として培養棚に取り付けられている蛍光灯は相当数に上り、それらは熱の発生源としても無視できない。したがって空調設備の故障や不

調は即座に温度上昇を招き、微細藻株にとって取り返しのつかないダメージを与える恐れがあるため、保存室やインキュベータの温度状態は常にモニターしておく必要がある。

NIES では保存室の温度管理は空調機械設備のメンテナンス業者が行なっているが、完全に他人任せにするのではなく、保存スタッフ自身でも温度チェックを毎日午前午後には必ず 1 回ずつ行ない、結果をチェックリストに記入している。またスタッフは保存室への出入りの際の温度確認を習慣づけており、温度の変動に気づいた場合は直ちに関係先に連絡し、速やかに対処してもらうよう気を配っている。

2. 植え継ぎ忘れの防止：MCC システム

NIES での継代株の維持管理に不可欠なのが、「MCC システム」と名づけられた保存株データベースである。

微細藻類では種類によって、また株によっても生長速度に違いがあるため、それぞれ植え継ぎを行なう間隔が異なっている。NIES では短い方から 10 日、14 日、20 日、1 ヶ月、45 日、2 ヶ月、3 ヶ月、4 ヶ月、6 ヶ月、1 年と、さまざまな植え継ぎ周期の株があるが、多くのものでは 1～2 ヶ月ごとに植え継ぎを行なっている。一方、個々の株は温度や光の条件によって異なる保存室や培養棚に置かれており、使用する培地も数十種類に及ぶ(1, 2)。保有株数が少ないうちは記憶に頼っても何とかなるが、数百株以上ともなるとそれらの植え継ぎを漏れなく、しかも間違いなく行なうのは事実上不可能である。また株の数が多くなれば全部の株の植え継ぎを 1 日のうちに終わらせるのは時間的にも無理である。植え継ぎ作業に従事するスタッフの貼り付けや培養に使用する試験管・ピペット類の使い回しや培地のストック等との兼ね合いもあるので、保存機関としては毎日平均して同じくらいの数の株を植え継ぐことが最も能率的と考えられるが、これらの問題をクリアするためにはコンピュータの助けを借りることがどうしても必要となってくる。

どこの機関でも株の番号や学名と履歴や特性についての情報を網羅したデータベースを保有しているが、NIES ではそうした基本データだけでなく、植え継ぎなど日常管理のためのデータも含めたシステムが絶対に必要であるとして、それを設立当初の早い時期から作り上げ(1984 年～)、運用してきた。本施設の設立当初はパソコンが普及し始めたばかりで、市販のデータベースソフト等も存在していなかったため、藻類研究者ではないが当時から NIES の協力スタッフであっ

株番号

2005/10/20 Total:30 植え継ぎ作業指示書 作成日時:2005/10/12 16:41:01								
株番号	管理番号	学名	培地名	保存室内での	前培養温度	前培養光度	前培養期間	コメント
330	35	Achnanthes subconstricta	f/2	10A 2F	-----	-----	-----	
620	748	Gomphonema angustatum	CSI	15A 2F	-----	-----	-----	
	710	Ankistrodesmus sp.	CB	15A 2R	-----	-----	-----	
	711	Ankistrodesmus sp.	CB	15A 2R	-----	-----	-----	
1016	1243	Hymenomonas coronata	ESM	15A 2R	-----	-----	-----	
1018	1246	Prymnesium parvum	ESM	15A 2R	-----	-----	-----	
388	95	Phaeocystis globosa	ESM	15B 2F	20	4000	-----	
666	796	Yamagishiella unicocca	VT	20D 2R	-----	-----	-----	
667	797	Yamagishiella unicocca	VT	20D 2R	-----	-----	-----	
652	798	Gonium quadratum	AF-6	20D 2R	-----	-----	-----	
653	799	Gonium quadratum	AF-6	20D 2R	-----	-----	-----	
1259	1483	Cylindrospermopsis raciborskii	CT	20D 4F				
1260	1484	Cylindrospermopsis raciborskii	CT	20D 4F				
1261	1485	Cylindrospermopsis raciborskii	CT	20D 4F				
18	356	Tetraselmis cordiformis	C	20E 3F	-----	-----	-----	
670	808	Chattonella verruculosa	ESM	20F 3F	-----	-----	-----	
671	809	Chattonella ovata	ESM	20F 3F	-----	-----	-----	
672	810	Oitmannsiellopsis geminata	ESM	20F 3F	-----	-----	-----	
674	812	Alexandrium catenella	ESM	20F 3F	-----	-----	-----	
1323	1574	Umbilicosphaera sibogae	MNK	20F 4F				フラスコ
1324	1575	Umbilicosphaera sibogae	MNK	20F 4F				フラスコ
1696	1760	Anabaena ucrainica	CB	20G 3R				
1697	1761	Anabaena cf. heterospora	CB	20G 3R				
1698	1762	Anabaenopsis sp.	CB	20G 3R				
1310	1545	Emiliana huxleyi	ESM	20G 4F				
1313	1548	Emiliana huxleyi	MNK	20G 4F				
1314	1549	Emiliana huxleyi	MNK	20G 4F				
863	1128	Volvox africanus	AF-6/2	H7 R	-----	-----	-----	
865	1130	Volvox carteri	MG	H7 R	-----	-----	-----	
866	1131	Volvox carteri	VTAC	H7 R	-----	-----	-----	

図1 植え継ぎ作業指示書

株番号・学名とともに培地名、保存スペース内でのラックの場所、前培養条件、作業上必要なコメントの一覧が表示される。

た国立公害研究所（当時）職員の清水明氏（現、国立環境研究所社会環境システム領域主任研究員）の尽力により作り上げられたのがこのデータベースシステムであり、Microbial Culture Collectionの頭文字を取って、MCCシステムと命名された。NIESでは本システムをオリジナルの形で長らく愛用してきたが、MS-DOSベースで構築されたプログラムであったため、さすがに作られてから20年を経て、扱えるデータが英語（アルファベット）に限られることや入力時の操作性、プリントアウトの自由度不足等、さまざまな点で立ち遅れが無視できなくなった。このため、昨年このオリジナルシステムを下敷きにして、外部の業者に依頼して発展型の「新」MCCシステムが出来上がり、現在その試験運用を行なっている状況である。

MCCシステムの基本構造はオリジナル、発展型を通じて同一である。紙幅の都合で全てを列挙しないが、個々の株について株番号、生物の学名、産地等履歴に関する情報、その株の特性、採集者・寄託者名等といった、個々の株に関するごく一般的な項目と、メンテナンスに必要な情報（植え継ぎ周期、培地の種類、保存室内でのラックの所在、等）を含んだデータベース

システムである。後者の中で継代株の日常管理にとって特に重要なのが植え継ぎ周期と、それをいつから始めるか、という日付（植え継ぎ起算日）、の2つの項目である。

仮に、ある株の植え継ぎ周期が1ヶ月であるとするとき、その株の植え継ぎを毎月1日に行なうと決めておけば、（保存担当者がそんなに多忙でなければ）さしたる問題は起こらない。ところが、植え継ぎ周期が20日の株の場合には初めての植え継ぎを1月1日に行なったとき、2回目以降の植え継ぎは1月21日、2月10日、3月2日（うるう年の場合は3日）、となり、植え継ぎ日を直感的に認識するのがだんだん難しくなっていく。現実には株の総数は1,000を超えており、その一方で植え継ぎ周期は前述のように株によってさまざまであり、このような状況では、どの株をいつ植え継げばよいのか、保存スタッフが頭の中で考えていては訳がわからなくなってしまう。

MCCシステムではこれら2項目を手掛かりにして、データベースに登録されている全ての継代株について、植え継ぎ起算日から次の植え継ぎ日、さらに次の植え継ぎ日、…といった具合に、その株がNIESの保

直しを行なう。このときやり直した新しい試験管には、スタッフがたまたま保存室に入った場合でも目に留まりやすく、折に触れての経過観察ができるように、赤色のシールを貼り、その株が現在不良であることがひとめでわかるようになっている。

生育チェックの際には、増殖状況だけでなく、万一の植え継ぎ忘れや培地の取り違い、さらに試験管に記入されている株番号の書き間違い等がないかどうかの確認も同時に行なっており、不注意によるミスを最小限に留めるように二重三重にカバーする体制を採っている。

金曜日に「不良」と判定されて植え継ぎのやり直しをした株については、翌週月曜日の午前中までにもう一度状態を観察し、よくなる兆しがあるかどうかの経過を記録しておく。月曜日の午後には研究スタッフとの定例ミーティングがあり、その席上で前週に行なったチェックの結果と不良株についての経過を報告することになっている。その際に個々の不良株について、引き続き経過を見守るか、さらに別の対策、たとえばもう一度植え継ぎ直しをする、再単離する、培地や明るさなどの条件を変えてみる、等を施すべきか、研究スタッフも交えて検討を加える。ある株が不良状態に陥った場合はいろいろとあの手この手をつくしてのケアを試みることになる。何回か手当てしているうちに幸いにも株が回復すれば言うことはないが、そこはやはり生き物のことであるから残念ながら死滅してしまうケースも生じる。保存スタッフとしては、少なくとも不注意等の人為的な要因で株の状態の悪化や死滅を招くことのないよう、日々の努力を重ねていっているつもりである。

分譲時の株の取り扱い

NIESでは所内向けに提供しているものも含め、毎年コンスタントに400から600程度の株を研究用に分譲している。そのときには当然継代しているカルチャーそのものを送ることになるので、株の送付に際してはそれなりの工夫が必要となる場合がある。最後にこのことについて簡単に紹介したい。

実際には比較的丈夫な株も多く、輸送によるダメージをほとんど受けないか、多少あったとしても新鮮な培地に入れてやれば回復するケースが大半であるので、そのような株の場合は硬化ガラス製のねじ口試験管(15×100 mm)に細胞懸濁液をほぼ一杯に満たして、パラフィルムでシールしたものをクッション材を用いて梱包し、原則として速達郵便で送付している。

NIESでは所外向け分譲の場合、送料は依頼者負担であるため、できるだけ安い方法を選択するという基本姿勢で、特に支障のない限りは郵送による送付となっている。通常は梱包したものを株データ等の同封文書と一緒にそのまま封筒に入れて発送しているが、夏季は丈夫な株でも暑さで弱ってしまう危険性があるため、状況に応じて断熱性の箱(発泡スチロール製)に入れて送ることも多い。

一方、一部の藻類、特に渦鞭毛藻やラフィド藻など、細胞サイズが比較的大きい上に細胞壁をもたないような生物群では、途中で温度が上昇したり、輸送車両の振動によって細胞懸濁液が常に振り混ぜられるという物理的ストレスに非常に弱いものが数多くある。NIESではそういった株をカタログ中に「Untransportable」(輸送困難)と表示し(2)、依頼者に株が良好な状態で到着しない可能性が高いことをあらかじめ了解してもらうのと同時に、たとえば輸送中もサンプルの入った試験管を立たせた状態に保つ、一年を通じて断熱性の箱に入れ必要に応じて保冷剤を使用する、さらにサンプル中の細胞密度を低めにする、等を行なって、株へのダメージをできるだけ少なくするように努めている。特に温度管理は重要で、冷やし過ぎも株にとってよくない場合が多いので、分譲先の土地の翌日(先方への到着予定日)の予想最高気温をインターネットの気象情報で必ずチェックしてから保冷剤を同封するかどうかを判断するなどの注意を払っている。

おわりに

以上のように微細藻類はかなり特殊な取り扱いを要する生物群であるが、NIESはナショナルバイオリソースプロジェクトの藻類部門の中核機関と位置づけられており、今後もたくさんの微細藻株を受け入れてゆくことは確実である。野外サンプルから株を確立するためにたいへんな労力を要することは著者も自身の研究材料を集めた経験からよく理解しているつもりであり、大勢の人の努力によって確立された株をより多く、より良い状態で保存すること、また研究材料として世界中の研究者に提供することができるよう、これからも力を尽くす所存である。

謝辞

今回著者は技術賞受賞という身に余る光栄に浴する機会を得ましたが、NIESで現職に就いた1995年以来現在までの間、常に系統保存業務の全般において有益

な指導・助言を与えてくださった(独)国立環境研究所環境研究基盤ラボラトリー長渡邊信博士, 種々の微細藻の取り扱いに関する的確なアドバイスをくださった同研究所系統・多様性研究室長笠井文絵博士および主任研究員河地正伸博士, さらにMCCシステムの構築と安定運用に尽力くださった同研究所情報解析研究室主任研究員清水明氏に, 心から感謝の気持ちを捧げます。

そして, 今日まで10年余りにわたってNIESでの系統保存業務を無事に勤めてくることができたのは, いうまでもなく保存スタッフとして一緒にやってきた(財)地球・人間環境フォーラム職員の森史氏, 湯本康盛氏, 佐藤真由美博士, 石本美和氏を始めとして, 過去にNIESでの業務に携わってきた人々の努力とアイデアの結集があってのことです。この場を借りて厚くお礼申し上げます。

文献

1. Andersen, R.A. (Ed.) *Algal Culturing Techniques*, p.578, Elsevier, Amsterdam (2005).
2. Kasai, F., Kawachi, M., Erata, M. and Watanabe M.M. (Eds.) *NIES-Collection. List of Strains, Seventh Edition, Microalgae and Protozoa*, p.257, *Microbial Culture Collection, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba* (2004).
3. Mori, F., Erata, M. and Watanabe M.M. *Cryopreservation of cyanobacteria and green algae in the NIES-Collection. Microbiol. Cult. Coll.* **18**: 45-55 (2002).
4. 森史. 国立環境研 NIES-Collection におけるバーコードを用いた凍結試料管理. *日本微生物資源学会誌* **21**: 87-91 (2005).
5. 西澤一俊, 千原光雄 (編). *藻類研究法*, p.754, 共立出版, 東京 (1984).