


連載「微生物資源の保存技術講座」

第1回 放線菌の長期保存方法

田村朋彦

独立行政法人製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジー本部 生物遺伝資源保存部門 (NBRC)
〒 292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足 2-5-8

The long-term preservation of actinomycetes

Tomohiko Tamura

Biological Resource Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation 2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan

1. はじめに

放線菌は細菌の一群であるが、菌糸状に生育し、成熟すると胞子を形成する形態的特徴からその他の細菌とは区別されてきた。しかし、近年の16S rRNA塩基配列を用いた分類から、コリネフォームを形成する *Corynebacterium* などの菌や、球または桿の形態を示す *Micrococcus* などの菌も含めて放線菌と呼ばれるようになってきている。ここでは、菌糸、胞子を形成する放線菌の一群の保存法を中心にとりあげる。

放線菌は代表的な土壌細菌であり、肥沃な土壌1gには 10^6 cellsあるいはそれ以上の放線菌が生息している。放線菌は他の細菌と異なり菌糸状に生育する。しかし、土壌は一般的に栄養が希薄であるため栄養菌糸を伸長させる期間は短く、すぐに胞子を形成して、通常は胞子の状態で生息していると考えられている (Cross, 1981; Goodfellow & Haynes, 1984; 野々村, 1989; Williams *et al.*, 1983)。胞子は自然環境下における外的要因に対して耐性が強く、さらに土壌は胞子の出芽抑制作用を有しているため (Ho & Ko, 1986; 鎌田, 野々村, 1975)、土壌中の放線菌は胞子という休眠状態で長い年月生存していると考えられている。これは、*Micromonospora* や *Thermoactinomyces* が100年以上の前の地層から分離されること (Cross & Attwell, 1974) 等からも推測される。そして放線菌は拮抗する微生物とのバランスや、栄養源、温度、湿度などの条件が揃ったときのみ菌糸状に生育すると考え

られている。

このように、放線菌は胞子を形成するので、胞子さえ形成すれば他の細菌より保存が容易である。しかし少数群放線菌と呼ばれる菌群の多くは、植継ぎを繰り返すと容易に胞子形成能を喪失する。このため、分離株は純化を行った後直ちに、乾燥保存もしくは凍結保存を行うことが望ましい。ただし、純化を行っている段階においても胞子形成能が落ちることがある。この場合、栄養菌糸だけを保存することになるが、胞子を保存するときよりも生残率が減少するものの保存は十分可能である。胞子形成した菌株であれば、室温でも半年から1年間は保存可能な場合が多い (培地が乾燥してしまっても、復元できることもある)。ただし、室温が変化する場合、結露水などで胞子が発芽してしまう場合があるので注意が必要である。

微生物の長期保存方法としては乾燥保存法 (凍結乾燥保存法, L-乾燥保存法) と凍結保存法が知られている。放線菌の長期保存に対する凍結乾燥法や凍結保存法の有効性は報告されている (Carvajal, 1946; Kuznetsov & Rodionova, 1970, 1971; 清野, 1971; Tresner *et al.*, 1960)。NBRCでは放線菌の保存は、一部の *Nocardia* 属菌株を除きL-乾燥保存法を採用している。本方法は菌体懸濁液から直接乾燥を行う方法で、広範な微生物に応用できること (Banno & Sakane, 1979; Iijima & Sakane, 1973a, b; Yokoyama & Asano, 1983)、凍結感受性の菌にも応用できること、乾燥時間が短いことなどの利点がある。ここでは、NBRCで行っている放線菌のL-乾燥保存法と凍結保

E-mail: tamura-tomohiko@nite.go.jp

存法を紹介する。

2. L-乾燥保存法 (坂根ら, 1996)

作業手順

- 1) 菌株培養
- 2) 保護培地への菌体の懸濁
- 3) アンプルへの菌体懸濁液の分注
- 4) 乾燥
- 5) アンプルの溶封
- 6) 生残菌数確認 (加速保存試験)
- 7) 保存
- 8) 復元

以下にそれぞれ手順を紹介する。

1) 菌株培養

放線菌それぞれの増殖に適した寒天培地または液体培地で培養する。 *Streptomyces* は7日から10日以上、 *Actinokineospora* は10日から14日程度培養したときが最も孢子形成が良いので、その時期の菌体を使用する。その他のほとんどの放線菌は寒天平板で14日間程度培養を行い、十分増殖させた細胞を乾燥に供する。孢子を着生する菌株は、孢子が十分着生するまで培養を続ける。生育が良好な培地は必ずしも気菌糸・孢子形成が良好な培地ではない。特に少数群放線菌では富栄養な培地より、貧栄養な培地のほうが気菌糸・孢子形成が良好な場合が多い。このため、指定培地では気菌糸・孢子形成が不良な場合もあるので、数種の培地に接種し、気菌糸・孢子形成と菌体量のバランスがとれている培地を使用することが望ましい。 *Frankia* は液体培地で1ヶ月以上の培養が必要である。 *Pilimelia* 等の増殖速度が遅い放線菌は、新鮮な培地への継代移植を2～3回繰り返して、使用する培地の数を増やすなど、必要菌体量を得る工夫が必要である。

2) 保護培地への菌体の懸濁

- ① 斜面培地もしくは平板培地に生育した菌をかき取り、保護培地¹とガラスビーズ (径3 mm) が入った試験管に懸濁する。気菌糸・孢子を旺盛に着生した菌株は白金耳で容易にかき採ることができる。気菌糸・孢子着生が貧弱な菌株や非着生株などでは、寒天の中で生育している基生菌糸を得るために固いコロニーを寒天ごとにかき採る必要がある。白金耳のループ先端部分をヤスリがけしておく、コロニーを培地から剥ぎ取りやすくなる。また、

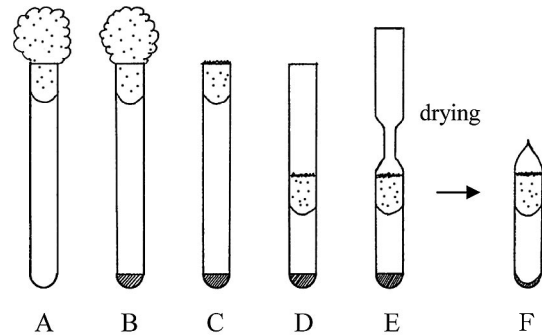


図1 L-乾燥標品の作業手順 (坂根ら, 1996)

平板培地からかき採る場合は分離用メスまたはマイクロスパーテルを用いる。

- ② Vortex ミキサーで振盪してよく懸濁させる。
- ③ 適量の保護培地を加え、よく懸濁させ、これを菌液とする。

菌液は菌数が 10^9 cells/ml であることが望ましい。しかし、放線菌は細菌のような濃厚な菌液を得ることが困難な菌株が多い。乾燥後の生存菌数を増やすため、アンプルへの菌液分注量を0.2 mlに増量してもよい。特に、 *Pilimelia*, *Dermatophilus*, *Thermocristum* は乾燥後の生残率が低いため、初発菌濃度をできるだけ高くしてL-乾燥することが望ましい。 *Frankia* の場合は遠心分離して菌体を集め、保護培地に懸濁すると比較的均一な菌液を得られる。

¹ 保護培地 SM1 : グルタミン酸ナトリウム 3 g, アドニトール 1.5 g, システイン塩酸 0.05 g, 0.1 M リン酸緩衝液 (KH_2PO_4 - K_2HPO_4 , pH7.0) 100 ml

3) アンプルへの菌体懸濁液の分注

- ① 準備した滅菌アンプル²に0.1 mlずつ分注する (図1-B)。長い注射針をセットした連続分注器 (Stepper[®], TRIDAK など) を用いると便利である。寒天片が詰まりやすいので、なるべく内径の大きい注射針を使用する。
- ② 綿栓を1.5～2.0 cm 残して上部を切断する (図1-C)。
- ③ 綿栓をアンプル内の中央部まで押し込む (図1-D)。乾燥時に、綿栓への菌液の付着を避けるため、綿栓は管底から約2 cm以上離れたほうが良い。
- ④ ガラスバーナーでアンプルの綿栓上部分を3～5 mmの細さに伸ばす (図1-E)。NBRCではこの作業を専用の機械 (図2) で行っている。

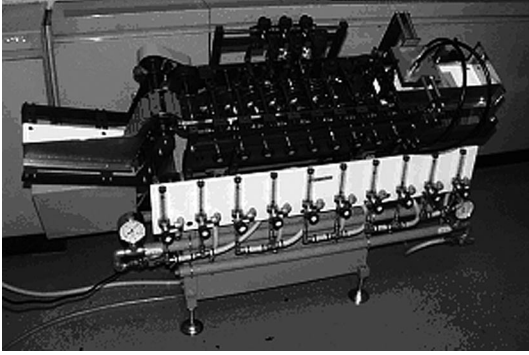


図2 ガラスアンプル延伸機

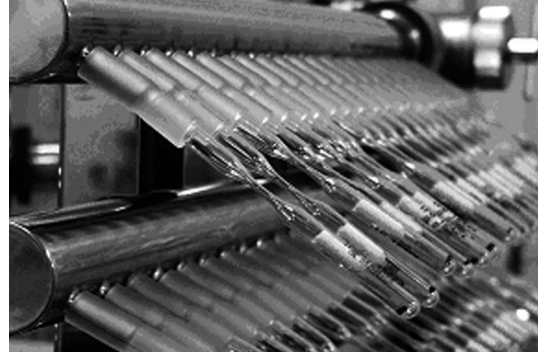


図3 多岐管乾燥機による乾燥



図4 溶封

² 硬質ガラス試験管 (Pyrex[®]) 9 mm × 110 mm (1 mm thick). ラベルはインクジェットプリンター (アルコール耐性インクを使用する)で行う。脱脂綿で栓をする(約 1.5 cm) (図 1-A)。使用前に 150°C で 3 時間乾熱殺菌を行う。

4) 乾燥

アンプルを乾燥機に取り付け、乾燥を開始する (図 3)。試料に寒天片が入っている場合は粘度が高くなるため、乾燥開始時には突沸しやすい。最初は多岐管のコックを一部開いた状態で徐々に減圧する。数分後には気化熱が奪われて試料温度が下がり、試料部分のアンプル表面に水滴がつく。この状態に達すれば突沸は起こらないのでコックを全開にする。通常 1.5 ~ 2 時間乾燥で十分であるが、寒天片などが入っている場合、安全性のため 2 ~ 3 時間乾燥する。

5) アンプルの溶封 (図 4)

アンプルの綿栓上部分 (細く伸ばした部分) で溶封する (図 1-F)。この操作はある程度の熟練を必要とする。溶封部分が鋭利になっていると危険であるとともに、わずかな衝撃で先端が折れ、空気が流入する恐

れがあるので、先端は丸めておく。

溶封したアンプルは、保存する前にテスラーコイルで内部が真空に保たれていることを確認する。この真空度チェックは、溶封した直後よりも一夜保存した後に行うことで、確実にピンホールなどの異常の有無を検知できる。放電の色が青色 ~ 青紫色 (およそ 0.1 Torr 以上の真空度) であれば問題ない。放電しない場合 (内部が常圧になっている) や濃赤紫色の放電の場合 (真空度が悪い) は保存性が悪いため、標品を再調製する。保存は冷暗所 (5°C 以下) で行う。

6) 生残菌数確認 (加速保存試験)

長期保存するため調製した標品が、実際何年保存できるのかということは保存を行う者にとって重要な問題である。この問題に対して、5°C で L-乾燥標品を保存した場合 1) 6 ~ 8 年保存する間に標品が安定化し、それ以上の菌数低下は起こらないこと、2) その標品が安定化したときの生存菌数は 37°C、2 週間の加速保存試験で予測できることが見いだされた (Banno & Sakane, 1981; Sakane & Kuroshima, 1997)。したがって、調製直後に加速保存試験を行い、一定以上の生存菌数が確認された標品は 5°C で保存する限り半永久的に保存が可能であると考えられる。

長期保存の可否は、加速保存試験の前後で生存菌数を測定し、保存試験における生存菌数の低下率も考慮して判定することが望ましいが、便宜的に保存試験のみ菌数測定を行って判定してもよい。加速保存試験後の生存菌数がアンプルあたり 10^4 CFU (Colony Forming Unit) 以上であれば長期保存可能であるとされている。放線菌の場合、CFU が一つの細胞由来とは限らず、一本の菌糸由来、一つの菌糸束由来、一つの寒天片 (多くの細胞を含む) 由来かもしれない。このため、 10^4 CFU 以下でも十分保存可能である。筆

者は簡易的に目測で 10^3 CFU 以上であれば長期保存可能であると判断している。また、放線菌の場合、気菌糸・孢子形成、菌体の色、可溶性色素の有無と色という外見の特徴があるので、その特徴が変異なく保存されているか確認しておくといふ。低頻度の突然変異は乾燥保存法に共通した問題であるが、細菌株については保護培地の改善により、実用的には問題ない程度まで変異誘発を抑制できるようになっている（坂根, 1990）。

7) 復元

アンプル開封後は直ちに復水液を加え、増殖用培地に接種した後、なるべく早く増殖至適温度の移すことが望ましい。放線菌の復水液としては NBRC medium No. 707³ を使用している。

³NBRC medium No. 707 : peptone 5 g, yeast extract 3 g, MgSO₄·7H₂O 1 g, Distilled water 1 L, pH 7.0

3. 凍結保存法

凍結保存法は生残率、安全性は高い、適用範囲が広い、処理が簡便（迅速な保存が可能）等の利点があり、最も広く採用されている保存法である。欠点としてはランニングコストが高い、収容性が悪い、フリーザーは突然の故障のリスクがある、液体窒素は高圧ガスとしての管理が必要であることがあげられる。これらの欠点がクリアするならば、実験室内での保存には最も有効である。

作業手順

- 1) 菌株培養
- 2) 凍結チューブへの菌体の分注
- 3) 保存
- 4) 復元

以下にそれぞれステップを紹介する。

1) 菌株培養

L-乾燥保存と同様に、気菌糸・孢子形成の良好で生育も良好な培地に菌株を接種し、十分な孢子形成を行うまで培養を行う。

2) 凍結チューブへの菌体の分注

平板培地に生育した菌を、内径 5～8 mm の滅菌

したストローを用い、生育した菌を寒天ごと打ち抜く。

先端をL字型にした白金耳で打ち抜いた寒天片を引き上げ、10%グリセロール（またはDMSO）を1 ml 分注した凍結チューブに入れる。同様に、斜面培地からも作製できる。この場合、寒天ごと菌体を切り出し、凍結チューブに入れる。単細胞で生育する放線菌は滅菌した10%グリセロール（またはDMSO）に菌体を懸濁し、滅菌した凍結チューブに分注する。

3) 保存

菌体が入った凍結チューブを直ちに-80℃のディープフリーザーもしくは液体窒素で保存する。

4) 復元

凍結チューブから寒天片を先端がL字になった白金耳で取り出し、平板培地または斜面培地、液体培地で培養を行う。単細胞で生育する放線菌はピペットで増殖培地に接種する。

酸素感受性の嫌気性細菌の場合、菌液の調製及びアンプルへの分注等の操作は嫌気グローブボックス内で行う必要がある。通性嫌気性である *Propionibacterium* は、菌液の調製、アンプルの分注等の操作を手早く行う、保護培地、復水培地は脱気を行う、懸濁はなるべく空気が混じらないように穏やかに行う等々を注意することで、大気中でも乾燥標品を作製することができる。

4. おわりに

放線菌が大きな注目を集めたきっかけは、1944年に Waksman らのグループ (Schatz *et al*, 1944) が *Streptomyces griseus* の一菌株から結核の治療薬として有効なストレプトマイシンを発見したことである。これ以降、放線菌は抗生物質をはじめ、酵素、酵素阻害剤、ビタミンなどの多種多様な生理活性物質を生産する発酵工業上重要な微生物群として、広範な探索研究が行われるようになった。90年前後から天然物探索における放線菌の優先度は下がったといわれているが、“The Journal of Antibiotics” に掲載された新規物質生産菌の種類では、現在でも依然として40%以上を放線菌が占めており、天然物探索に重要な微生物群である。また近年では難分解性物質の分解や環境保全等でも注目されており、今後も放線菌の有効利用が期待される。放線菌は継代培養を繰り返すことにより気菌糸・孢子形成など二次分化が失われることがあ

るが、同時に二次代謝産物生産なども失われる危険性を含んでいる。このため、菌株入手後の早い段階で長期保存標品を作製することは、試験の再現性を確保するためにも、生理活性物質生産性を保全するためにも重要である。

文 献

- Banno, I. & Sakane, T. (1979). Viability of various bacteria after drying. IFO Res. Commun. **9**:35-45.
- Banno, I. & Sakane, T. (1981). Prediction of prospective viability of L-dried cultures of bacteria after long-term preservation. IFO Res. Commun. **10** : 33-38.
- Carvajal, F. (1946). Biological strains of *Streptomyces griseus*. Mycologia **38** : 596-607.
- Cross, T. (1981). Aquatic actinomycetes : A critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. J. Appl. Bacteriol. **50** : 397-423.
- Cross, T. & Attwell, R.W. (1974). Recovery of viable thermoactinomycete spores from deep mud cores, In Barker, A.N. (ed.), Spore Research 1973, p. 11-20, Academic Press, London.
- Goodfellow, M. & Haynes, J.A. (1984). Actinomycetes in marine sediments, In Ortiz, L. et al. (eds.), Biological, Biochemical, and Biomedical Aspect of Actinomycetes, p. 453-472, Academic Press, New York, London.
- Ho, W.C. & Ko, W.H. (1986). Microbiostasis by nutrient deficiency shown in natural and synthetic soils. J. Gen. Microbiol. **132** : 2807-2815.
- Iijima, T. & Sakane, T. (1973a). A method for preservation of bacteria and bacteriophages by drying *in vacuo*. Cryobiol. **10** : 379-385.
- Iijima, T. & Sakane, T. (1973b). Method for preservation of bacteria and bacteriophages by drying *in vacuo*. IFO Res. Commun. **6** : 4-17.
- 鎌田誠啓, 野々村英夫 (1975). 生土壤による放線菌の生育阻害. 昭和50年農芸化学大会講演要旨集, p. 264.
- Kuznetsov, V.D. & Rodionova, E.G. (1970). Maintenance of some antibiotic-producing actinomycetes by various methods. Antibiotiki. **15** : 879-883.
- Kuznetsov, V.D. & Rodionova, E.G. (1971). A study on viability and cultural properties of actinomycetes maintained for prolong periods of time in lyophilized state. Antibiotiki. **16** : 586-589.
- 野々村英夫 (1989). 土壤放線菌の分離, 分類及び生態に関する研究. Actinomycetol. **3** : 45-54.
- 坂根 健 (1990). 乾燥による変異誘発とその防止. 凍結及び乾燥研究会会誌 **36** : 81-87.
- Sakane, T. & Kuroshima, K. (1997). Viabilities of dried cultures of various bacteria after preservation for over 20 years and their prediction by accelerated storage test. Microbiol. Cult. Coll. **13** : 1-7.
- 坂根 健, 西井忠止, 伊藤忠義, 見方洪三郎 (1996). L-乾燥法による微生物株の長期保存法. Microbiol. Cult. Coll. **12** : 91-97.
- 清野昭雄 (1971). 放線菌類の凍結乾燥保存. 凍結及び乾燥研究会会誌 **17** : 25-32.
- Schatz, A., Bugle, E. & Waksman, S.A. (1944). Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-negative and gram-positive bacteria. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **55** : 66-69.
- Tresner, H.D., Danga, F. & Porter, J.N. (1960). Long-term maintenance of *Streptomyces* in deep freeze. Appl. Microbiol. **8** : 339-341.
- Williams, S.T., Lanning, S. & Wellington, E.M. (1983). Ecology of actinomycetes, In Goodfellow, M., Mordarski, M. & Williams, S.T. (eds.), The Biology of Actinomycetes, p. 481-528, Academic Press, London.
- Yokoyama, T. & Asano, I. (1983). Preservation of ISP strains of Actinomycetes by L-drying. IFO Res. Commun. **11** : 47-59.