

## 第3回 極限環境微生物の長期保存法 —高度好塩性古細菌，好熱性好酸性古細菌，メタン生成古細菌—

森 浩二

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 extremophiles — Halophilic, thermoacidophilic, and methanogenic archaea —

Koji Mori

NITE 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

酸素が枯渇した地下圏などの嫌気環境，タンパク質が瞬時に変性する海底熱水などの超高温環境，塩田に見られる結晶するほどの高塩環境など，一般的な生物の生息環境とは逸脱した“極限環境”は我々の周りに数多く存在する。こういった極限環境に極限環境微生物が生息していることは周知の事実であり，様々な極限環境微生物が今日までに分離・培養されてきている。主な極限環境微生物として，メタン生成古細菌を含む偏性嫌気性微生物，超好熱性微生物，好酸性微生物，高度好塩性微生物などが挙げられる。極限環境微生物はその生息環境から推測されるように，様々な可能性と付加価値が付随した活性を有しており，これら微生物資源を適切にかつ長期的に保存することは極めて重要である。

極限環境微生物の培養は，それぞれの極限環境のみで増殖するという特性故に様々な手間を必要とするが，その長期保存は真正細菌に用いられるL-乾燥法，凍結乾燥法及び凍結法によって可能である (Rudge, 1984; 坂根ら, 1996; 森地ら, 1977)。ただし，それぞれの極限環境微生物に合わせて，ちょっとしたコツと工夫が必要である。これは，その極限な増殖環境が故に，またはその極限環境微生物が位置する系統群に共通で見られる性状が故に行われる処置であり，これら

処置によりその生残数は飛躍的に上がる。本稿では，高度好塩性古細菌，好熱性好酸性古細菌，メタン生成古細菌について，著者が経験等により知り得た保存法の注意点を中心に紹介したい。このため，一般的な各種保存方法については過去の優れた解説書 (Rudge, 1984; 坂根ら, 1996; 森地ら, 1977) や本連載の「第1回 放線菌の長期保存方法」(田村, 2006)などを参考されたい。

#### 2. 高度好塩性古細菌の長期保存法

高度好塩性微生物とは，飽和に近いNaCl濃度を増殖に要求する微生物のことを指し，系統学的に古細菌と真正細菌に属する。その長期保存法は，浸透圧に留意して高塩濃度環境で常時維持することが最も重要である。また，高度好塩性古細菌の場合は，強度の高い細胞壁を持っていないために，物理的な傷害を受けやすい点も注意が必要である。高度好塩性古細菌は短期間の保存であれば斜面培地で4℃にて数ヶ月間保存可能であるが，*Halobacterium salinarum*のように変異が起りやすい古細菌 (Pfeifer *et al.*, 1981) もいるので，乾燥や凍結方法による保存が望ましい。

##### 1) 粉末セルロースを用いたL-乾燥保存法

保護培地としては，15%のNaClと2%の粉末セルロース (ADVANTEC社製，Cellulose powder C, 300 mesh以上)を含んだSM6 (表1)を使用し，斜

表 1 極限環境微生物の保存に用いられる保護培地 (坂根ら, 1996)

SM1:	Sodium glutamate · H <sub>2</sub> O, 3 g; Adonitol, 1.5 g; L-Cysteine hydrochloride · H <sub>2</sub> O, 0.05 g; 0.1 M Phosphate buffer (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7.0), 100 ml.
SM5:	Sodium glutamate · H <sub>2</sub> O, 3 g; Adonitol, 1.5 g; EDTA · 2Na, 0.4 g; 0.1 M Phosphate buffer (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7.0), 100 ml.
SM6:	Sodium glutamate · H <sub>2</sub> O, 10 g; Adonitol, 1.5 g; Sorbitol, 2 g; Sodium thioglyconlate, 0.05 g; NaCl, 15 g; Cellulose powder, 2 g; 0.1 M Phosphate buffer (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7.0), 100 ml.

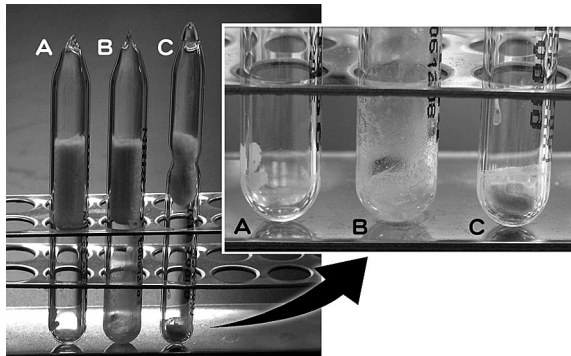


図 1 高度好塩性古細菌の乾燥保存

A : 通常の L-乾燥保存法によるアンプル, B : 高度好塩性古細菌の L-乾燥保存法によるアンプル, C : スキムミルクを使用した凍結乾燥保存法によるアンプル

面培地等で増殖した菌体を保護培地に懸濁して菌液を調製する (Sakane *et al.*, 1992 ; 坂根ら, 1996). 高度好塩性古細菌は, 乾燥過程での浸透圧の変化や塩の再結晶による物理的な傷害を受けやすいと考えられている. このため, 乾燥時は急激な減圧を避けるとともに, 乾燥物は粉末セルロースを添加することで大きな塩の結晶が出来るのを軽減し, 出来るだけアモルファス状態 (非晶質) になるようにする. NBRC では出来るだけ微生物の乾燥物がガラス表面に広がるように L-乾燥標品を作製している (図 1). 復元する際には, 物理的傷害が起らないように, 乾燥微生物に液体培地をゆっくりとなじませた後, 固形培地上に塗抹する.

### 2) スキムミルクを用いた乾燥保存法

物理的な傷害を避けるためにスキムミルクを使用し微生物を吸着させる担体を作製する. 凍結乾燥に用いるガラスアンプル内に 20% スキムミルク懸濁液 200  $\mu$ l を添加し, オートクレーブ滅菌後, 凍結乾燥により吸着担体を作製する. これに斜面培地より保護培地 (SM6 より粉末セルロースを除いたもの) に懸濁した菌液 100  $\mu$ l 程度を染み込ませた後, 真空乾燥する (Tindall, 1991). 復元する際には, 復水液を添加して, スキムミルクの担体ごと寒天培地上に塗抹する. 図 1

にスキムミルク担体を用いた凍結乾燥標品を示した.

### 3) 凍結保存法

斜面培地等で増殖した菌体を終濃度で 5% となるように DMSO (dimethylsulfoxide) を添加した新鮮な培地に懸濁し, 液体窒素または  $-80^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫で保存する (Tindall, 1992). 10% グリセロール (終濃度) を DMSO の代わりに添加しても良いが, 経験上 DMSO を保護剤に用いた方が生残率が良い.

### 3. 好熱性好酸性古細菌の長期保存法

好熱性微生物は, 例外 (Ward, 1978) はあるが, 基本的に増殖後  $4^{\circ}\text{C}$  に放置することで数ヶ月間保存できる. また, 長期保存に関しても真正細菌と同様な乾燥法や凍結法の適用が可能である. 一方, 好熱性好酸性古細菌の長期保存にはいくつかの留意点がある. 好熱性好酸性古細菌とは, *Sulfolobus* 属に代表される pH 2 付近を至適増殖条件とする古細菌群である. 酸性条件下で旺盛に増殖するが, 酸性条件下で低温に放置すると, 数ヶ月後には生存が全く認められないものが少なからず存在するので (Seegerer *et al.*, 1986), できるだけ早い段階で適切な長期保存法を施した方が良い.

#### 1) L-乾燥保存法, 凍結乾燥保存法

保護培地として SM5 (表 1) を使用する (Sakane *et al.*, 1992 ; 坂根ら, 1996). 著者の経験上, SM5 で著しく生残率が落ちる好熱性好酸性古細菌も存在するが, 保護培地として SM1 (表 1) を使用することで改善が認められた. 保存時には pH を中性に保った方が良い菌種が多いので, 至適 pH 条件下で液体培地などを使用して培養した後, 保護培地で細胞を数回洗浄する. それから保護培地に菌体を再懸濁し, L-乾燥または凍結乾燥保存を行う. 復元の際には, コロニー形成が難しい微生物もあるので, 液体培地でも培養した方が無難である.



図2 ヒラサワ社製嫌気グローブボックス



図3 ベックマン社製多機能小型遠心機

## 2) 凍結保存法

細胞を pH が中性の保護培地（例えばリン酸緩衝溶液）で洗浄した後に、DMSO を終濃度で 5% 加えた中性の保護培地に懸濁し、液体窒素または  $-80^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫で凍結保存する。復元時に液体培地へ接種する場合は、DMSO が増殖阻害を起こすため、融解後に培地などで洗浄した細胞を植菌する。

## 4. メタン生成古細菌の長期保存法

メタン生成古細菌は系統学的に *Euryarchaeota* にのみ存在する微生物群であるが、形態的、生理学的、生態学的に非常に多様である。メタン生成古細菌の長期保存が難しい理由のひとつは偏性嫌気性微生物であることによる。実際に、凍結乾燥の保存作業中または保存後に酸素に曝露されると、メタン生成古細菌の生残数が著しく低下する（森永、井上、1990）。このため、如何に嫌気環境を維持するかが最も重要であろう。*Methanopyrus* 属や *Methanosaeta* 属のように保存自体

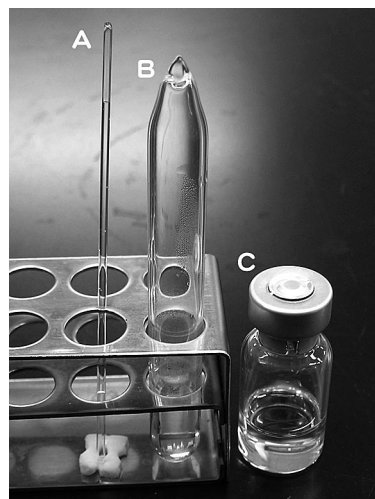


図4 偏性嫌気性微生物の凍結保存に使用する容器。A：ガラスキャピラリー、B：ガラスアンプル、C：小型バイアル瓶

が極めて難しいものもあるが、全てのメタン生成古細菌は嫌気環境さえ維持すれば凍結法により長期保存可能である。

### 1) 凍結保存法

メタン生成古細菌は、培養液の嫌気環境を保った状態で遠心分離などにより培地と菌体を分け、保護培地に菌体を再懸濁する。この際の保護培地には、増殖培地に終濃度で DMSO を 5% またはグリセロールを 10% 添加したものを使用する。これら凍結保護剤は、あらかじめ窒素存在下で別途オートクレーブ滅菌しておく。嫌気環境を維持して遠心分離することは煩雑で困難な作業であるが、メタン生成古細菌を保存するうえでは要となる。古賀ら（1992）は、嫌気グローブボックス（図2）とゴムパッキンの蓋付きステンレス製遠心管を使用した方法を紹介している。この煩雑な作業について、NBRC では培養に供したバイアル瓶を瓶ごと遠心することで保護培地との置換を容易に行っている（図3；多機能小型遠心機 Allegra X-12, ベックマン社製）。保護培地に再懸濁したメタン生成古細菌は、適切な凍結保存容器に嫌気環境を保った状態で分注し、液体窒素または  $-80^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫で凍結保存する。図4に凍結用の容器として用いられる、キャピラリー、ガラスアンプル及びブチルゴム栓の付いた 2 ml 容のバイアル瓶（日電理化学硝子社製）を示した。NBRC では図4のガラスアンプルを使用して主に凍結保存を行っている。これはブチルゴム栓の付いたガラスアン

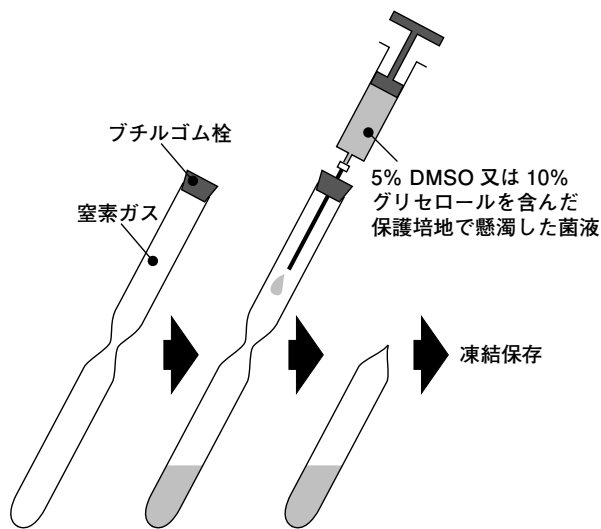


図5 メタン生成古細菌の凍結保存法

プルをあらかじめ窒素置換・滅菌処理を行い、保護培地に懸濁した菌液をゴム栓越しにシリンジを用いて分注し、ガスバーナーにより溶封したものである(図5)。図4で示したキャピラリーを用いた一連の凍結保存操作は、Hippe (1984) によって詳しく紹介されているので、参考されたい。小型バイアル瓶容器による凍結保存法は特別な機器を必要としないので、メタン生成古細菌を培養できる研究設備があれば、簡易に適用可能である。しかしながら、凍結によるゴム栓の劣化から嫌気環境が維持できない可能性もあり、半永久的に保存するには向かない。Winter (1983) は、この小型バイアル瓶を更に窒素ガスで満たしたガラスアンプル内に入れて長期凍結保存する方法を報告している。凍結保護剤としてグリセロールよりもDMSOを使用した方が経験上復元率が良いが、DMSOは増殖阻害を起すため、復元の際にはDMSOを除去する処置が必要である。

## 2) L-乾燥保存法, 凍結乾燥保存法

メタン生成古細菌のL-乾燥や凍結乾燥保存法は、一部の菌種で行われた実績があり、可能であることが確認されている(Iino & Suzuki, 2006; 森永, 井上, 1990)。保護培地としてはSM1(表1)を使用するが、保存作業中は嫌気グローブボックス(図2)を使用するなどして、終始嫌気環境を保つことが重要である(森永, 井上, 1990)。現在NBRCでは、Iinoら(2006)の方法を使用して、NBRCが保有する様々なメタン生成古細菌にL-乾燥保存法を展開している。これに

より、L-乾燥保存法のメタン生成古細菌への汎用性が確認できるものと期待している。

## 5. おわりに

生物がとても生息できないと考えがちな様々な極限環境にも、我々の想像を超えた極限環境微生物が生息しているかもしれない。その極限環境に微生物が生息しているか否かについては、16S rRNA 遺伝子などの分子指標を精査することで可能であり、系統学的な知見を得ることはさほど難しくなく、しかし、その検出された微生物の獲得となると確立された手法など無く、様々に創意工夫をこらした培地と培養方法を展開し、可培養化を成し得る。新たな微生物獲得は微生物の分離に携わるものにおいては至極の成果である。しかし、死滅してしまっただけが水泡に帰すこととなる。植継ぎでうまくいっている場合はついつい忘れがちであるが、リスクと安全性を考慮して、できるだけ早い段階で何らかの保存処置をすることが望ましい。何かあってからでは遅いのである。

新種提案の際の基準株でなければ微生物の公的機関への寄託は少なく、研究成果は研究者自らが管理しているのが現状であろう。このため、本稿は個々研究者らの微生物保存助長を念頭に概説した。一方で、その研究が終極に達した段階、または何らかの理由により自身の管理が出来なくなった段階で、公的な機関に貴重な微生物資源を預ける習慣も遺伝資源とその英知を保存するうえで重要である。

## 謝 辞

極限環境微生物の保存において、終始ご助言、ご支援いただいた坂根 健博士と伊藤 隆博士に感謝いたします。

## 文 献

- 古賀洋介, 大神真美 (1992). メタン生成細菌の液体窒素による凍結保存. 醗酵工学会誌 **70**: 303-309.
- Hippe, H. (1984). Maintenance of methanogenic bacteria, *In* Kirsop, B.E. & Snell, J.J.S. (eds.), *Maintenance of Microorganisms*, p. 69-81, Academic Press, London.
- Iino, T. & Suzuki, K. (2006). Improvement of the L-drying procedure to keep anaerobic conditions for long-term preservation of methanogens in a culture collection. *Microbiol. Cult. Coll.* **22**: 99-104.
- 森永 豪, 井上耕一 (1990). メタン生成細菌の乾燥

- 保存・凍結及び乾燥研究会誌 **36**: 93-96.
- 森地敏樹, 山里一英, 鈴木正敏, 高野光男, 根井外喜男 (1977). 微生物の保存法, 根井外喜男 (編), 微生物の保存法, p. 3-77, 東京大学出版会, 東京.
- Pfeifer, F., Weidinger, G. & Goebel, W. (1981). Genetic variability in *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* **145**: 375-381.
- Rudge, R.H. (1984). Maintenance of bacteria by freeze-drying, *In* Kirsop, B.E. & Snell, J.J.S. (eds.), *Maintenance of Microorganisms*, p. 23-33, Academic Press, London.
- Sakane, T., Fukuda, I., Itoh, T. & Yokota, A. (1992). Long-term preservation of halophilic archaeobacteria and thermoacidophilic archaeobacteria by liquid drying. *J. Microbiol. Methods* **16**: 281-287.
- 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. *日本微生物資源学会誌* **12**: 91-97.
- Seegerer, A., Neuner, A., Kristjansson, J.K. & Stetter, K.O. (1986). *Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov., and *Acidianus brierleyi* comb. nov.: facultative aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing archaeobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**: 559-564.
- 田村朋彦 (2006). 放線菌の長期保存方法. *日本微生物資源学会誌* **22**: 37-41.
- Tindall, B.J. (1991). Cultivation and preservation of members of the family Halobacteriaceae. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 95-98.
- Tindall, B.J. (1992). The family Halobacteriaceae, *In* Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K.-H. (eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, p. 768-808, Springer-Verlag, New York.
- Ward, D.M. (1978). Thermophilic methanogenesis in a hot-spring algal-bacterial mat (71 to 30 degrees C). *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 1019-1026.
- Winter, J. (1983). Maintenance of stock cultures of methanogens in the laboratory. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**: 558-563.

(担当編集委員: 岡根 泉)