

第7回 酵母の保存技術について (2) 出芽酵母突然変異株の凍結保存

金子嘉信

大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1

Cryopreservation for the budding yeast mutants

Yoshinobu Kaneko

Division of Advanced Science and Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University
2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

1. はじめに

多くの微生物保存機関で採用されている酵母の長期保存法としては、前稿「酵母の保存法」の鈴木を紹介にあるように凍結保存法、凍結乾燥法やL-乾燥法が知られている(根井, 1977; 坂根ら, 1996; Mikata & Banno, 1987). ここでは文部科学省のナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)で取り扱っている出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子破壊株などの突然変異株の保存について紹介する. 一般に *S. cerevisiae* では、15%(v/v)グリセロール細胞懸濁液として -60°C 以下の低温で長期保存が可能で、栄養寒天培地(たとえば、YPAD培地)に培養したものでも乾燥しないようにして 4°C 保存で1年ほどは保存可能とされているが、菌株によっては1ヶ月くらいのものであると言われている(Sherman, 2002; Amberg *et al.*, 2005). また、 -55°C 以上の長期保存では数年後には死んでいる可能性が高いようである. 一方、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の突然変異株の場合では、20%あるいは30%(v/v)グリセロールを含んだYE培地に細胞を懸濁して凍結保存するか、YE培地あるいは適当な選択培地の培養液2.3 mlに対して1 mlのグリセロールを加えた細胞懸濁液を -70°C で凍結保存する方法が紹介されている(Alfa *et al.*, 1993). NBRPでの出芽酵母の保存には、保存試料の作製の簡便さと復元培養株の送付ということを考えて、超低温フリーザーを利用した -80°C での凍結保存を行っている. 以下、その詳細を菌株の培養、凍結保

存試料の調製と凍結、そして菌株の復元の3つの操作に分けて説明する.

2. 菌株の培養

保存する菌株は、通常YPAD平板培地で培養する(図1a). YPAD平板培地で培養した酵母細胞をオートクレーブ滅菌した爪楊枝で掻き取り、滅菌した10%グリセロール溶液にできるだけ濃い濃度(10^8 細胞/ml以上)で懸濁する. 対数増殖期の細胞より定常期の細胞の方が凍結ストレスに対して耐性があると言われている. また、凍結によりある一定割合の細胞は死滅するので、細胞懸濁液の細胞濃度はできるだけ濃い方がよいとされている. したがって、細胞数も必要で

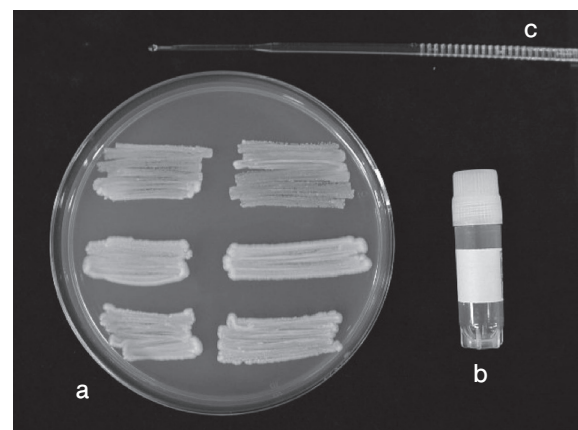


図1 凍結保存する出芽酵母のYPAD平板培養(a)、凍結チューブ(b)および復元時に使用する植菌ループ(c)

あるから、2～3日の培養で十分細胞数を確保するようにしている。プラスミドの保持が必要な遺伝子組換え体の場合は、プラスミドの選択符号によって、適切な選択培地を使用する。栄養要求性選択符号が栄養要求性の場合には通常最少合成平板培地 (SD) に選択符号の栄養要求物以外の適切なアミノ酸や核酸塩基の栄養要求物を加えた合成平板培地に菌株を植菌している。YPAD 培地, SD 培地および分裂酵母の YE 培地の組成はそれぞれ次のとおりである: YPAD 平板培地 (1% Bacto-Yeast extract, 2% Bacto-Peptone, 2% Glucose, 0.02% Adenine, 2% Agar), SD 平板培地 (0.67% Bacto-Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids, 2% Glucose, 2% Agar), YE 平板培地 (0.5% Bacto-Yeast extract, 3% Glucose, 2% Agar)。

3. 凍結保存試料の調製と凍結

凍結保護剤は出芽酵母の場合、10～20% グリセロール溶液や 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO) が有効である。Mikata & Banno の報告 (1987) では、IFO0213 を使用して 20 回の融解凍結を繰り返しても生残率の低下はわずかで、10% と 20% グリセロールの差もほとんど見られなかった。さらに 10% DMSO でもほぼ同じであった。また、IFO0573 と IFO0636 の 10% グリセロール細胞懸濁液での 2 年後の生残率はそれぞれ 76% と 59% であった。したがって、NBRP の出芽酵母の保存には 10% グリセロールを採用して凍結保存している。

凍結容器には 2 ml 容のアウトターキャップタイプの滅菌クライオチューブ (Greiner bio-one; 図 1b) を使用して、1 ml のオートクレーブ滅菌した 10% グリセロールを無菌的に分注している。インナーキャップタイプではなくアウトターキャップタイプの凍結チューブを使用するのは、キャップ開閉時の微生物汚染の可能性が低いだらうと考えてのことである。菌株番号はハンディ熱転写プリンタ (BRADY® TLS2200, 日本ブレイディ) でラベルを作成してキャップと胴体の 2ヶ所に貼り付けている。細胞をしっかりと懸濁させた後にチューブを 100 本立てクライオボックス (Greiner bio-one クライオボックスあるいは IWAKI セラムチューブラック) に収納してそのまま超低温フリーザー (サンヨー MDF-53V など) に入れて、凍結速度の制御をせずに自然凍結させている。酵母細胞懸濁液は放置しておくとも細胞が沈澱してくる。フリーザーに入れる前には必ず懸濁しておかないと復元の際に細胞数が低い上部をとることになるので、気をつけ

たい。突然変異株の種類によって違いがあると予想されるが、現在までに取り扱った突然変異株はプログラム凍結などをしなくても少なくとも 7 年は無事生存性を確保して保存できている。

4. 菌株の復元

復元は、凍結チューブをフリーザーから取り出して上部表面部分をシャーベット状として植菌ループ (Nunc inoculating loop 1 μ l 254410; 図 1c) で少量掻き取り、YPAD 平板培地に植えている。当然、平板培地上では直ぐに溶けてしまう。凍結融解の繰り返しによる生残率の低下が気になるので、復元の際には全体を融解させないようにできるだけ素早く操作を行い、凍結チューブを短時間でフリーザーに戻すように心がけている。培養は通常 30°C で行っているが、高温生育感受性突然変異体は 25°C で培養している。また、グルコースを炭素源として利用できない突然変異体は生育可能な培地を使用して復元させるなど突然変異体に応じて適切な培養条件を選んでいる。

5. おわりに

我々の研究室では大学キャンパス電気設備の点検のため、年 2、3 回は計画停電 (ほぼ半日) がある。この停電時には、フリーザーあたり 2 kg のドライアイスブロックを 2 個入れて、対応している。また、設置スペースの点から縦型の超低温フリーザーを採用しており、さらに 1 台の超低温フリーザーにできるだけ多くの菌株を収納したいので以下に説明するように特定のクライオボックスを使用している。凍結チューブは 100 本の単位でボックス収納の方が菌株へのアクセスの上で便利だが、100 本収納のボックスは 81 本収納のボックスより若干サイズの大きいもの (たとえば 148 × 148 mm サイズ) が多い。我々が使用しているサンヨーバイオメディカルの超低温フリーザーの貯蔵ケースでは、81 本収納ボックスサイズ (133 × 133 mm) でないとボックス収納数が減少するので、100 本収納でありながらサイズの小さいクライオボックス (Greiner bio-one クライオボックスあるいは IWAKI セラムチューブラック) を選んでいる。しかし、アウトターキャップ型のクライオチューブを 100 本詰めると非常に窮屈になり、霜が付くなどすると凍結チューブの出し入れや蓋の開閉に若干支障が出てくるのが実情である。このため、NALGENE の SYSTEM 100™ クライオボックスとクライオバイアルの検討を考えている。

最後に今後の課題として、出芽酵母全遺伝子を対象とするようなゲノムワイドの研究で作製された数百から千個単位の大量のリソースの保存やその大量分譲に備えるために96穴マイクロプレートなどによる保存および提供も検討する必要があるが出てきている。

文 献

Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M. & Warbrick, E. (1993). Experiments with Fission Yeast, A Laboratory Course Manual, p. 151, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Amberg, D.C., Burke, D.J. & Strathern, J.N. (2005). Methods in Yeast Genetics, A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, 2005 Edition, p. 211,

Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Mikata, K. & Banno, I. (1987). Preservation of yeast cultures by freezing at -80 C: I. Viability after 2 years storage and the effects of repeated thawing-freezing. IFO Res. Commun. **13**: 59-68.

根井外喜男 (編) (1977). 微生物の保存法, 東京大学出版, 東京.

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.

Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. Method Enzymol. **350**: 3-41.

(担当編集委員: 岡根 泉)