

# NIES 藻類コレクションにおける寄託対応と問題点

森 史<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup> 国立研究開発法人国立環境研究所微生物系統保存施設, <sup>2)</sup> 一般財団法人地球・人間環境フォーラム  
〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2

## Trouble-shooting during strain deposition to MCC-NIES

Fumi Mori<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup> Microbial Culture Collection, National Research and Development Agency, National Institute  
for Environmental Studies, <sup>2)</sup> Global Environmental Forum, Tsukuba Laboratories  
16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan

### 1. NIES 藻類コレクションと日常業務

国立環境研究所微生物系統保存施設 (NIES 藻類コレクション) は 1983 年に前身である国立公害研究所に設立され、微細藻類を中心に、絶滅危惧藻類や藻類に近縁な原生動物の系統株の収集・維持・分譲を行ってきた。アオコや赤潮等の環境問題を引き起こす種や日本産の藻類株を多く保有することが当コレクションの特徴の一つである。藻類は「光合成をおこなう生物の中から陸上植物を除いたもの」と定義されたグループであり、原核生物 (シアノバクテリア) から真核生物の様々な大系統群に幅広く分布している。NIES 藻類コレクションは、18 門 63 綱にわたるほぼ全ての分類群を網羅する藻類株と、藻類に近縁だと考えられる原生動物を保有し、現在の保存株数は非公開株も含めて 3,436 株となっている。この内 35% にあたる 1,178 株については、シアノバクテリアを中心とした凍結保存可能な株であり、液体窒素槽内で永久凍結保存を行っている。

一方残りの 65% にあたる 2,258 株は、各々の株に適した培養条件下 (5℃ ~ 50℃ までの 10 種類の温度設定と 0 ~ 40  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$  の光強度設定) で培養され、定期的に新しい培地 (主に試験管液体培地および試験管斜面寒天培地) に植え継いでいくことによる継代培養で維持されている。株によって植え継ぎ周期は異なるが、早いもので 1 週間、長く持つもので 1 年間ごとの植え継ぎ設定となっている。毎週約 400 株について植え継ぎ作業が必要で、常勤非常勤含めて

スタッフ 5 名で分担しながら業務を遂行している。また、そのうち 3 名のスタッフは毎週目視による継代培養株の生育チェックを行い、生育の不良な株は植え継ぎ直されるとともに、生育報告ミーティングで生育改善について報告、協議されている。その他、継代培養用の培地の種類は 90 種類以上に増えており、ほぼ毎週 12 リットル以上の多種多様な培地を作製している。

NIES 藻類コレクションは 2002 年に NBRP 藻類プロジェクトの中核機関としての活動を開始したことも受けて、寄託株数は年々増加、過去 10 年間で約 1,300 株増加した。藻類研究者の退官や異動で大量に移管される年もあるが、ほぼコンスタントに毎年 50 株の寄託株を受けている。当施設の設立当初は 3,000 株の保有が目標とされていたが、2002 年の施設拡大工事にもない凍結保存設備が新設されたため、試算上では継代培養株 4,700 株、凍結保存株 4,000 株の合計 8,700 株が保存可能となっている。年間 130 株のペースで寄託株を受け入れるとしても、保存スペース的には約 30 年間は対応可能ということになる。寄託株が増え保存株数が増加した場合、いかに多くの株を凍結保存に移行できるかと、継代培養を効率的に行うことができるかの 2 点が今後の鍵になりそうである。

### 2. 寄託受付手順

NIES 藻類コレクションへの寄託株は海外からは 4% のみで、殆どは国内から寄託されている。当施設の研究員やプロジェクトの共同研究者等の関係者による寄託も多く、また寄託者の多くは繰り返し寄託を行うことが多い。初めての寄託依頼は全体の 12% ほど

である。当施設のホームページに記載している基本的な寄託受付手順を図 1a に示した。

NIES 藻類コレクションでは、受け入れに際して、①環境研究やライフサイエンスの分野で研究材料として使われた重要な株であること、②履歴が明らかで適正な種名のついた株であること、そして③保存条件が確立しており、安定した培養が可能な株であることといった受け入れ基準を設定しており、こうした基準を基に提出書類を審査した上で、株の受け入れの可否について決定、結果を寄託者に通知している。受け入れが決まった株に関しては、寄託者に培養条件等の確認を行い、受け入れ準備が整い次第、寄託株を送付してもらう。届いた株の試験培養を経て、安定した培養を確立した時点で、NIES 番号を付与、寄託者に通知している。NIES 番号は当施設の保存株の固有の番号であり、例えば学名等の変更があったとしても、変わることはない。特に公開条件が課せられていなければ、速やかに保存株情報を当施設のホームページから公開している。

### 3. 寄託受付時によくある問題と改良点

当施設で株寄託を受けるにあたり、現場でよく生じる問題とそれらに対する取り組みについて紹介したい。寄託手順の改善点については、図 1b に示した。

#### 1) 寄託依頼書兼同意書の受け付けに際して

当施設では寄託の受け付けの際、寄託者には、まず当施設のホームページからダウンロードした寄託依頼書兼同意書に必要事項を記入、原本として2通を印刷、

署名の上で、当施設に郵送して頂いている。しかし、株の寄託が初めての方だけでなく、何度も寄託されたような方でも、記入漏れや誤記入等の不備が見受けられることがある。この場合、こちらから情報の不備を指摘して、改めて寄託依頼書を作成、郵送して頂くことになるが、一度の指摘では済まないことが多く、時間と労力を費やしてしまうことになる。そこで、寄託者側とコレクション側の双方の作業量を減らすために、寄託に関する問い合わせや書類の受け付けの初期の段階で、寄託者から寄託依頼書のファイルをメールで添付してもらうようにしている。寄託株の受け入れ基準に合致しているかどうか、ファイルベースで内容の不備についてチェックを行い、こちらからもメールで寄託書の書き漏れの指摘や培養条件等の問い合わせを行うようにしている。こうした寄託者とのやりとりを経て完成された寄託依頼書を原本として、郵送して頂いている。

#### 2) 寄託微生物株の受け入れに際して

寄託者からの寄託依頼書兼同意書原本の提出により、寄託株の MTA が締結され、また当施設での受け入れ体制（培地や培養条件等の準備）が整った後に、いよいよ培養株を送ってもらうことになる。コレクションに到着した株は輸送中にダメージを受けている可能性が高いため、薄暗い培養条件で1日置いて休ませてから、多めの細胞量を指定された培地に植え込み、適切な培養条件下で培養するようにしている。しかし、問い合わせも無く生物株だけがいきなり届くこともある。このような場合、受け入れたい株であっても培地

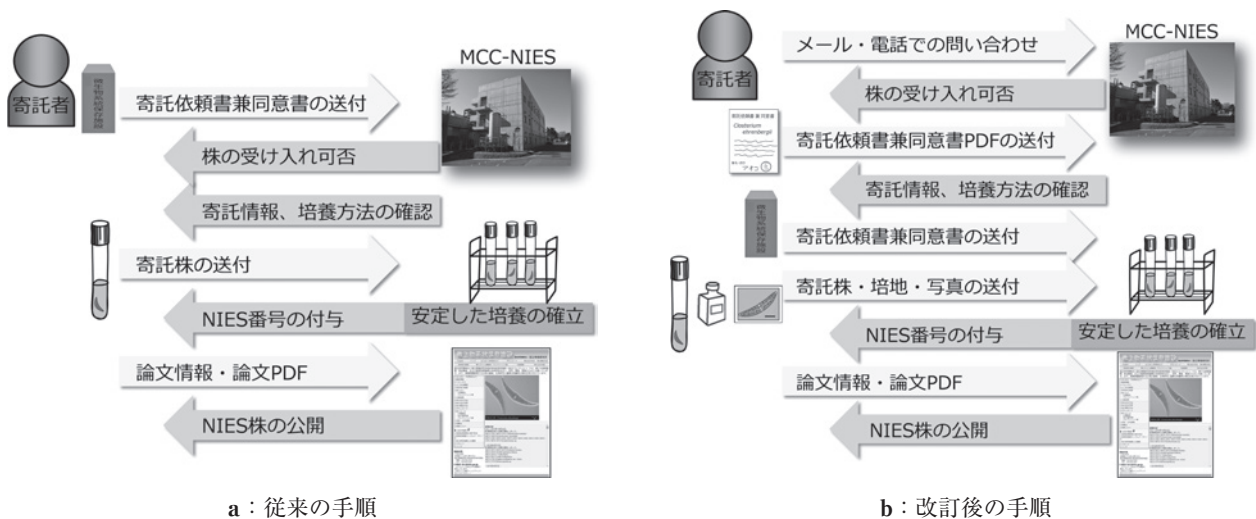


図 1 NIES 藻類コレクションでの寄託手続き

やインキュベータ設定などの受け入れ準備ができておらず、株の維持が難しくなることがある。

藻類は長期の継代培養によりしばしば細胞形態が変化することが知られている。特に新種の原生動物が寄託される際、餌となる生物と混合培養されていることがあり、どの細胞が対象の細胞であり、またそれが正常な状態であるかどうか判断が困難な場合がある。そこでこれらの解決策として、寄託者に対象生物の写真をスケールバー付きで送ってもらうことにした。寄託提供時の株の形態が把握でき、写真情報も得られるので大変助かっている。

### 3) 寄託株の培養

寄託株は、できる限り依頼書に書かれた培養条件下で試験培養を行うようにしている。増殖が確認された後に最適な培養条件と並行して、暗めの光強度、低温の条件での培養を開始し、なるべく植え継ぎ周期を長く設定できるよう検討を行うこととなる。しかしながら、安定的な培養の確立は一番難しい問題であり、指定の培養条件下で培養を行っても増殖しない場合がある。そこで現在では、増殖不良の原因をなるべく絞り込むために、寄託者の作成した培地を寄託株と一緒に送ってもらうように依頼している。

### 4) NIES 番号の交付と株公開

寄託株を受け入れた後、通常、安定的な増殖が確認できた時点で、NIES 番号を付与、寄託者に通知している。同時に、寄託株の公開の可否を寄託者に確認して、了解が得られれば、当施設のホームページから公開されることになる。ホームページ上で公開する際には、寄託株の株情報を保存株管理データベース（MCC データベース）に登録して、一時的にホームページ上で公開、内容に不備や間違いが無いかを寄託者自身で確認してもらった後に、一般に公開するようにしている。

寄託者の中には、論文に掲載するために、NIES 番号の早期交付を希望される方がいる。寄託依頼書の内容に不備がなく、また寄託者の培養施設で安定的に維持することを条件に、NIES 番号を付与することもある。また、論文発表準備のため株の公開をしばらく見合わせてほしいと要望されることがある。非公開期間は原則寄託後1年以内としており、寄託者から論文発表の連絡を受けた後、株の公開・分譲を開始している。

当施設では、保存株が使われた論文等に関する情報を収集して、保存株の付加情報の一つとして公開して

いる。株の寄託者や利用者には、こうした論文発表に関する情報提供をお願いしているが、NIES 番号が付与されると当施設への報告を失念される寄託者も多く、論文発表の情報が送られてこないことがある。このため、定期的にコレクション側から「NIES」と「algae」をキーワードとして論文検索をかけ、論文が発表されていれば寄託者に公開可能かどうかの問い合わせを行っている。

## 4. 寄託依頼書兼同意書の整備

ここで寄託依頼書兼同意書について、紹介しておきたい。NIES 藻類コレクションの「寄託依頼書」は設立2年後の1985年発行の第1版保存株リスト（当時、公開株262株、全保有株約500株）に初めて掲載された。それから2001年発行の第6版リストまで「寄託依頼書」は見開き2ページ分くらいの分量で、同意事項の記載や捺印欄は設けられていなかった。その後、2004年に発行された第7版保存株リストから、提出書類名が「微生物株寄託依頼書兼同意書」と変わり、3ページ目に「寄託にあたっての同意事項」と寄託者の捺印欄が載せられている。また、当施設のホームページは2008年から運用開始され、「微生物株寄託依頼書兼同意書」はホームページからもダウンロード可能となっている。

余談ではあるが、保存株リスト第1版から第6版までの寄託株の受け入れ基準は、「①環境汚染の原因および指標となる微生物、②自浄作用、廃水及び廃棄物処理に関係する微生物、③有機合成化合物の分解や金属の酸化・還元作用に関係する微生物、のいずれかの特徴を持つこと」と限定されていた。その後、第7版保存株リストからは、寄託条件は特に環境問題に関わる微生物に限定はされていない。

### 1) 寄託株情報の記入項目

寄託依頼書で記入を求めている寄託株情報の項目は、第1版保存株リストでは2ページ39項目であったが、現在では4ページ70項目と、項目数は倍近くに増えている。保存株データベースが構築され、またホームページ上で様々な付加情報を公開できるようになったことと併せて、こうした保存株情報の整備、拡大が進められてきたためである。しかしながら、記入する側にとっては、入力する手間が増えたことも事実で、そのためか株情報の書き漏れが大変多くなっている。特に問題となってきた株情報項目を以下いくつか挙げておく。



**株番号：**寄託者自身のオリジナル株番号の記入が漏れていることがしばしばある。NIES 番号が付与される前、すなわち寄託株の安定した培養が確立されるまでは、寄託者のオリジナル株番号で管理しているため、必須の情報といえる。

**緯度経度情報：**採集場所情報を世界測地系 WGS84 形式 10 進法（例：36.048556, 140.117521）での記入をお願いしているが、60 進法（例：緯度 36° 02' 54" 801, 経度 140° 07' 03" 075）で書かれてくることが多い。この場合、変換して情報を書き直している。手間のかかる作業であるが、一地点ずつ整合性が取れているか確認を行い、採集地名と全く異なる地点が登録されている際は寄託者に問い合わせている。なお当施設では、全世界の生物を対象として、生物多様性情報を共有しようとする GBIF への情報提供、登録を行っており（<http://www.gbif.org/dataset/c26bed28-1ac2-4c07-a18e-c801f3f188c1>）、こうした緯度経度情報は登録時の必須項目となっている。

**無菌検査方法：**無菌とされている株については 3 種類の無菌チェック培地で培養試験を行うが、バクテリアやカビのコンタミが発覚することも少なくない。そのため、寄託者側での無菌検査方法を記入してもらうように項目を追加している。カビがコンタミしている場合は再単離が必要となるが、カビの排除はかなり困難な作業となる。

**遺伝子情報：**近年、寄託者自身により寄託株の遺伝子情報を取得、解析することが多いため、寄託者には可能な限り、寄託株の遺伝子情報、例えば DNA データバンクへの登録情報（アクセス番号）を記入してもらっている。また、種同定が進んでいない株を寄託される場合は、18S rDNA または 16S rDNA の配列情報を添付するよう強くお願いしている。

## 2) 寄託株情報のエクセル化

生息環境の詳細や緯度経度情報、細胞サイズなどの付加情報項目の記入が増えたことで、寄託者からは寄託依頼書の作成に躊躇しているのご指摘を頂くことがある。また、必須の記入項目と付加的な情報入力とが区別しづらいとのご意見ももらっている。寄託者によっては多数の株を一度に寄託されることがあり、1 株につき 4 ページの寄託依頼書を作成するのは大変な作業量となり、コレクション側にとってもチェック作業が膨大で、大きな負担となっている。こうした問題をいくらかでも改善するために、株情報をエクセル入

力できるように、項目の整理や入力内容の整備の作業を進め、現在は、コレクション関係者にモニター利用してもらっている。エクセルシート株情報入力では、必須の入力項目を色分けして、入力内容が決まっている項目ではドロップダウン形式の入力方法を採用するとともに、項目の整理と絞り込みを行うなど、寄託者にとっての利便性を高めている。またコレクション側にも入力内容のチェックが容易になり、データベースへの登録作業を効率的に行えるなどのメリットがあるため、できるだけ早い時期に移行できるよう、現在も作業を進めている。

## 5. 今後の課題

海外の主要な藻類コレクション（米 ATCC、米 NCMA、英 CCAP、独 SAG 等）では、ホームページに寄託手順を詳しく掲載しておらず、まずは寄託問い合わせフォームもしくはメールで問い合わせるといった手順が取られているようである。

当施設では、寄託株の受け入れに関する課題や他のコレクションの例を踏まえて、これまでの受け入れ手順を見直すことを検討している。例えば、当施設の寄託株受け入れ基準に寄託者の株が合致しているかどうかを、寄託者自身で事前にチェックできるような確認シートを整備したいと考えている。最初のステップとして、寄託者がホームページから寄託依頼書をダウンロードするのではなく、寄託者にはまずこうした寄託確認シートを提出して頂く。寄託株が条件を満たすのを確認した上で、当施設から寄託者に寄託依頼書兼同意書を送り、詳細な株情報を記入頂くという手順である。

重要かつ貴重な株がコレクションに寄託されることは、寄託者とコレクションの双方にとって有益であることは疑いない。寄託者が記入を躊躇することのないように、寄託手続きを今後も改善していきたいと考えている。これにより寄託者の裾野を広げ、コレクションが一層充実したものになることを期待したい。

## 謝 辞

平素より暖かくご指導頂き、また本稿を執筆するにあたり、貴重な多くのご助力を賜りました国立環境研究所生物・生態系環境研究センター生物資源保存研究推進室 河地正伸室長に心から感謝申し上げます。