

遺伝資源事業における微生物株の保存方法

誌名	農業生物資源研究所研究資料
ISSN	13479393
著者名	三木,信雄 久保村,安衛 西山,幸司
発行元	農林水産省農業生物資源研究所
巻/号	4号
掲載ページ	p. 27-37
発行年月	1992年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



遺伝資源事業における微生物株の保存法

2. 糸状菌・酵母の保存法

三木信雄¹⁾・久保村安衛²⁾・西山幸司³⁾

農業生物資源研究所 遺伝資源第二部 305 茨城県つくば市観音台

Synopsis

Freeze-preservation under ultra low temperature in liquid nitrogen is one of the best methods for the long-term preservation of microbes. It has been applied as a convenient method for fungus and yeast cultures in the MAFF Gene Bank Project of Microorganisms under the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF). This report describes the manuals for freeze-preservation of fungi and yeasts, including viability tests, medium preparations and related subjects.

Key words : preservation, fungus, yeast

1. 緒 言

農林水産省微生物遺伝資源ジーンバンク事業は微生物遺伝資源の収集・評価・保存配布等を目的としている。農業生物資源研究所をセンターバンクとして、省内13研究所（サブバンク）の協力の下に1985年に発足し、1987年9月より配布事業を開始した。1990年度までに約3,500菌株がサブバンクよりセンターバンクへ移管され、このうち約1,700菌株が糸状菌及び酵母である。この資料は、「遺伝資源事業における微生物株の保存法(1. 細菌の保存法)」²⁾に引き続き、センターバンクにおいて作業者が一定の水準でこれらの菌株を簡便かつ効率よく長期間安定的に保存するためのマニュアルを取りまとめたものである。

2. 保存法の選択

糸状菌および酵母を長期間安定的に保存するためには各々の菌株に対して最も適当な保存

1) 現在 種苗管理センター胆振農場生産管理部

2) 現在 企画連絡室業務科

3) 現在 農業環境技術研究所環境生物部

法を採用しなければならない。短い期間に最適保存法を明示するのは困難な状況にある。そのため事業用として採用する保存法には最新の成果と共に長年にわたり広く採用されている保存法も重視する必要がある。微生物の保存法については数多くの研究報告があり、「微生物の長期保存法—農林水産関連—」¹⁾にまとめられている。糸状菌の保存法には様々な方法があり、これらには継代培養法、パラフィン重層法、凍結（液体）乾燥法、凍結保存法、液体窒素凍結保存法、その他の保存法がある。これらの長所ならびに短所を述べる以下ようになる。

継代培養法

斜面培地上で培養し、1—2年間隔で新しい培地に移植する方法である。この方法は培養できる全ての菌株に適用でき、常に増殖可能であり菌そうを観察するのに便利であるが、保存数が多くなればなるほど移植の労力や貯蔵場所が必要となる。また、培養中に、病原性や孢子形成能力の消失などの各種の形質に変異が生じやすい。また、雑菌の混入やダニの発生などの問題があり、移植後の検査が必要である。

パラフィン重層法

継代培養したものにパラフィンを重層する方法である。低温または室温で保存することができる。重層するパラフィンの量は斜面培地の上端より20mmまでとし、保存中の培地の乾燥を防ぐには気中菌糸がパラフィンの表面に浮上しないように培養する必要がある。継代培養法の数倍の時間保存可能であるが、移植に手間がかかるほか、継代培養法と同様な短所がある。

凍結乾燥法

分生子を分散媒に懸濁しアンプルに分注した後凍結し、真空状態で乾燥させ、アンプルを熔封して、保存する方法である。アンプルの取扱は非常に簡単であり、作製後は雑菌の混入の恐れはないが、アンプルを作製する労力は大きいほか、分生子等を形成する特定の糸状菌にしか適用できない。

L（液体）—乾燥法

凍結乾燥法と類似の操作過程をとるが、凍結させずに液体のまま真空状態で乾燥させる方法である。凍結乾燥法と同様の利点・欠点があり、凍結に弱い菌株について有効であるが、減圧沸騰しないように乾燥機を調整しなければならない。その他に凍結乾燥法と同様の長所短所がある。

凍結保存法

培地上の培養菌を凍結保護剤とともに凍結し、フリーザーで保存する方法である。分生子等を形成しない菌株でも長期安定保存が可能である。実用範囲は広いが長時間の停電やフリーザーの故障で菌株が死滅する恐れがある。

液体窒素保存法

培地上の培養菌を凍結保護剤とともに凍結し液体窒素保存容器で約-150℃から-196℃

で保存する方法である。分生子等を形成しない菌株でも長期間安定保存が可能である。実用範囲は広く通常の保存法のうちでは適用範囲が広く安定している。専用の気相式保存容器では液体窒素供給後1カ月程度はメンテナンスなしに保存可能である。唯一の欠点は液体窒素の補充に維持経費を必要とすることである。

保存可能な菌株の種類が多い順に保存法を並べると継代培養法、パラフィン重層法、液体窒素保存法、凍結保存法、L(液体)ー乾燥法、凍結乾燥法となる。以上より、保存スペースや管理に要する費用や労力などを総合的に考慮して、センターバンクでは以下のような保存体系をとることが最も望ましいと判断された。

糸状菌については液体窒素保存を主体とし、当分の間継代培養も行う。受け入れた菌株は、まず継代培養を行い、少なくとも3年間以上保存する。この期間中に液体窒素保存(長期保存用、配布用、生残検査用チューブとして計10本程度作製)を行い、保存1ヶ月後と1年後に生残検査を行う。凍結保存できないものや生残率が低いものについては継代培養保存を継続し、プログラムフリーズ(凍結速度を制御した凍結法)や凍結保護剤を変更した凍結保存法を開発する。また、継代培養保存より安全に保存できる方法があればその方法を採用する。

酵母は液体窒素保存と凍結乾燥保存を行う。受け入れた菌株について速やかに増殖し、凍結保存用チューブ(長期保存用)、真空凍結乾燥アンプル(長期保存用、配布用、生残検査用アンプル 計10本程度)を作製する。

現在、微生物遺伝資源ジーンバンクで収集保存されている糸状菌の大部分は植物病原菌であり、また酵母の大部分は食品加工用のものである。既存の成果及び筆者らがこの3年間に得た経験から、ジーンバンクにおいて現在取り扱っている大部分の菌株は上述の方法で保存が可能であると考えられる。次にその方法を詳述する。

3. 糸状菌の保存法

A) 液体窒素保存及び生残検査に必要な器材と試薬

(1) 各種培地

これらの培地は試験管に約15ml程度(シャーレ1枚)ずつ小分けしてオートクレーブしておくとう便利である。

PDA 培地

ジャガイモ	200 g
ブドウ糖	20 g
寒天	18 g
蒸留水	1,000ml

皮をむいたジャガイモの煮汁にブドウ糖と寒天をいれ蒸留水で1,000mlとする。

V-8 寒天培地

V-8 野菜ジュース	300ml
CaCO ₃	4.5 g

寒天	18 g
蒸留水	800ml

V 8 野菜ジュースによく攪拌しながら CaCO_3 を 4.5g を加える。その上清 200ml に蒸留水 800ml と寒天 18g を加え 1,000ml とする。

オートミール培地

オートミール	75 g
寒天	18 g
蒸留水	1,000ml

オートミールに水を加えて 70℃ の温湯中でよくかき混ぜ加熱し 2 重ガーゼを通して濾過し、寒天は別に溶解し蒸留水を加えて 1,000ml とする。

サブローブドウ糖寒天培地 (Sabouraud's glucose agar)

ブドウ糖	40 g
ペプトン	10 g
寒天	20 g
蒸留水	1,000ml

pH 5.6 に調整する

三浦 (LCA) 培地

ブドウ糖	1 g
KH_2PO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
KCl	0.2 g
NaNO_3	2 g
酵母エキス	0.2 g
寒天	15 g
蒸留水	1,000ml

これらの培地は試験管に約 15ml 程度 (シャーレ 1 枚分) ずつ小分けしてオートクレーブしておくとう便利である。

(2) 凍結保護剤

10% ジメチルスルホキシド (DMSO) 水溶液

または 10% グリセリン水溶液

(3) クライオチューブ

1.8ml 用 住友ベークライト (MS-4502) 等

クライオチューブに凍結保護剤を 1 ml ずつ分注し、スタンドに立てアルミ箔で包み、110℃ 10 分のオートクレーブを 2 度行う。この時栓は少し緩めておき、終了後にしめるとよい。

(4) 滅菌シャーレ

直径約 9 cm の薄形がよい。

- (5) 滅菌ストロー
直径約 5 mm のものを長さ10cm に切断して10本程度ずつガス滅菌用紙袋にいれガス滅菌を行うと便利である。コルクボーラーでも代用できる。
- (6) 白金耳
寒天を引っかけやすい鈎型のものがよい。
- (7) 消毒液
70%エタノール
- (8) 機械類
液体窒素式保存容器
雑菌の混入を避けるため気層式が望ましい。
超低温フリーザー(−80℃)
プログラムフリーザー
冷却室の温度とサンプル温度が計測でき両者の温度に 反応してプログラム可能なものが望ましい。
恒温器(4℃ 20℃ 25℃)
クリーンベンチ
ウォーターバス
- (9) その他
クライオチューブラック
(オートクレーブ可能なもの)
油性マジックインキ

B) 液体窒素保存法の手順

- (1) シャレー上の PDA 平板培地 (推奨培地があるときは その培地) に菌そうを植えつけ、約 1–2 週間培養する。
- (2) 4℃ に 2 日間静置し耐凍性を高める。
- (3) クライオチューブに菌株番号を記入し凍結保護剤を 1 ml 滅菌したものを用意しておく。
- (4) 滅菌したストローで外周部菌そうより直径 5 mm のディスクに打ち抜く。そして白金耳で10個ずつクライオチューブに移す。ディスクが凍結保護剤の中に浸るようにすること。
- (5) 4℃ に 2 時間静置する。
- (6) −80℃ に静置して凍結したのち液体窒素保存容器に移し保存する。
糸状菌は種によっては変異を起こしてセクターを生じることがある。その場合には菌株本来の培養を確かめる必要がある。液体窒素保存されている菌株は長期間保存可能であると考えられるが、数年に一度は検査することが望ましい。

C) 生残検査 (凍結保存) の手順

- (1) 1 ヶ月後にクライオチューブを液体窒素保存容器から取り出し、38℃のウォーターバスに浸して急速に解凍する。この時温水が流入するのを防ぐため、下半分を浸したほうがよい。3–4 分後チューブ内の氷が消失したら引き上げる。

- (2) 白金耳でディスクを取り出し、三浦 (LCA) 培地等の平板シャーレに植えつける。約1週間培養して生残率を調査する。この培地上では比較的多くの種が分生子を形成するので、この時分生子などを観察して雑菌の混入や取り違えの有無等の検査をする。
- (3) 1年後に再び生残率を調査する。生残率が低いものは継代培養保存を行い、プログラムフリーズによる凍結方法の検討を行うとともに、培地や凍結保護剤についても検討を行い凍結保存を行う。

D) プログラムフリーズによる凍結保存法

プログラムフリーズは冷却速度を制御して凍結する方法である。通常の緩慢凍結では凍結時に潜熱が発生して一時的に温度が上昇し、細胞に悪影響を及ぼす。

以下の方法は朝日ライフサイエンス社 プラナーバイオ (KRYO-10) を使用して試料40本の場合の一例である。

凍結のためのプログラムはプログラムフリーザーの機種や試料の量によって冷却する熱量等が異なるので事前にダミーを使用して試行することが必要である。

- (1)–(5) 液体窒素保存の手順と同様に行う。
- (6) プログラムフリーザーの冷却庫の温度を4℃に設定し、クライオチューブを入れる。
- (7) 冷却庫の温度を毎分1℃の速度で-6℃まで冷却し、試料温度が-6℃になるまで冷却庫の温度を維持する。
- (8) 冷却庫の温度を分速90℃で冷却し、冷却庫の温度を-60℃に下げる。この時に試料温度は滑らかに低下させなければならない。
- (9) 冷却庫の温度を毎分40℃で-20℃に加熱する。この操作で冷却庫温度と試料温度をほぼ一致させる。
- (10) 冷却庫の温度を毎分1℃の速度で冷却し、試料温度を-40℃に冷却する。
- (11) 冷却庫の温度を毎分10℃の速度で冷却し、試料温度を-80℃に冷却する。
- (12) すばやく液体窒素式保存容器に移し保存する。

E) クライオチューブの保存管理

クライオチューブは超低温で保存されているので、一度保存した後に出し入れすることはチューブの急激な温度変化を招くため取扱には注意を要する。このため、保存した菌株の棚卸しや並び換えは事実上困難である。そこで液体窒素保存容器のなかのラックや引出し等に番地をつけ保存した菌株を記録しておく。

安全のため数年に一度取り出して生残率を検査することが望ましい。

4. 酵母の保存法

A) 凍結保存及び生残検査に必要な器材と試薬

(1) 各種培地

YM 培地

酵母エキス

3g

麦芽エキス

3g

ペプトン	5 g
ブドウ糖	10 g
寒天	18 g
蒸留水	1,000ml

YM液体培地

上記培地の寒天を除いたものを滅菌し小試験管に4 ml ずつ分注しておくとい
その他の指定された培地

(2) 凍結保護剤

10%ジメチルスルホキシド(DMSO)水溶液

または10%グリセリン水溶液

試験管に4 ml ずつ分注しオートクレーブしておく

(3) クライオチューブ

1.8ml 用 住友ベークライト(MS-4502)等

菌株番号をマジックインクで記入しておく

(4) 試験管(16.5×125mm 16×18mm 等)

(5) パスツールピペット

綿栓をつめるかシリコンキャップをつけアルミ箔で包んでオートクレーブしておく。

(6) 白金耳

太さ1 mm 環の内径4 mm (菌のかき取り用), 太さ0.6mm 環の内径3 mm (菌の移植用) の2本あると便利である。

(7) 機械類

液体窒素保存容器

雑菌の混入を避けるため気層式が望ましい。

クリーンベンチ

恒温機(25℃)

超低温フリーザ(-80℃)

卓上型ミキサー(振動型)

(8) その他

クライオチューブラック

(オートクレーブ可能なもの)

油性マジックインキ

B) 酵母の凍結保存法

- (1) YM 斜面培地に移植し23-28℃で2日間培養する
- (2) 太めの白金耳で1斜面の全量の菌をかきとって凍結保護剤のはいった小試験管に分散させる。
- (3) 小試験管を卓上ミキサーで塊がなくなるまで攪拌する。
- (4) パスツールピペットを使用してクライオチューブに1 ml ずつ分注する。(2)から(4)までの操作は30分以内に行う。
- (5) -80℃で一晩凍結静置したのち液体窒素式保存容器に移し保存する。

C) 生残検査

- (1) 液体窒素式保存容器より取り出したクライオチューブを、38℃のウォーターバスに浸し急速に解凍する。この時温水が流入するのを防ぐため、下半分を浸したほうがよい。チューブ内の氷が消失したら引き上げる。
- (2) クライオチューブより1-2回白金耳にとり液体培地に分散させよく攪拌する。
- (3) 液体培地より斜面培地に移植して生育を確かめる。
- (4) また平板培地に画線培養して雑菌の混入、変異の有無等を確認する。

D) 真空凍結乾燥に必要な器材と試薬

酵母の真空凍結乾燥は資材や基本的な操作方法は細菌と同じであり「遺伝資源事業における微生物株の保存法(1. 細菌の保存法)」²⁾に詳しく示されている。

- (1) 各種培地
YM 培地等
- (2) 分散媒
10%スキムミルク+1%グルタミン酸ナトリウム水溶液
16×125mm 試験管に2 ml ずつ分注する。115℃で15分、翌日再び115℃で5分間オートクレーブする。熱で褐色に変色しやすいのでオートクレーブ終了後は取り出しておくこと。
- (3) 白金耳
太さ1 mm 環の内径4 mm (菌のかき取り用)、太さ0.6mm 環の内径3 mm (菌の移植用) の2本あると便利である。
- (4) 消毒液
70%エタノール水溶液
- (5) 滅菌アンプル
8 mm×150mm の試験管型アンプル(パイレックス特注品)の口に綿栓またはシリコン栓をつけて180℃で2時間乾熱滅菌をしておく。事前にマジックインクで番号を書き込んでおくと焼付け印刷したようになり消えにくい。
- (6) シリコン栓
アンプル用シリコン栓は大量の菌株を使用するときは便利である。繰り返し使用できる。真空度劣化の原因となる綿栓の細かいくずも発生しない。(信越ポリマー特注品)。
- (7) 分注器具
ルアロック吸上針(18G×15mm)
アルミ箔でつつんで滅菌しておく
滅菌シリンジ(2.5ml)
分注器(トライダックステッパー #4003)
- (8) パスツールピペット
綿栓をつめるかシリコンキャップをつけ、アルミ箔に包んで滅菌しておくといよい
- (9) 機械類
真空凍結乾燥機
フリーザー(-40℃)
クリーンベンチ

(10) その他

スタンド（分注器をとめるもの）

油性マジックインク

脱脂綿

E) 凍結乾燥保存法

- (1) 以下の作業で移植及び分注はクリーンベンチ内で行うこと。
- (2) YM 斜面培地に移植し23℃から28℃で2日間培養する。
- (3) 太めの白金耳で1斜面の全量の菌をかきとって分散媒の入った小試験管に分散させる。
- (4) 卓上ミキサーで軽く攪拌する。
- (5) ルアロック吸上針を、注射筒に付け、小試験管より吸い上げ、アンプルに0.1ml ずつ分注する。この操作は30分以内にする。またはパスツールピペットでできるだけ均等に約0.1ml ずつ分注する。分注量が多すぎると乾燥時に融解して生残率の低下を招く。
- (6) -40℃で凍結させる。この状態で作業を中断することができる。
- (7) アンプルを4-5本ずつ取り出して口先を下を向けてすばやく綿栓またはシリコン栓をとり、連続して真空凍結乾燥機に取り付ける。一時的に真空度は上昇するが、数分で低下し、真空度が50 μ m以下になったら次のアンプルを取り付ける。
- (8) 真空度が20 μ m以下を示し3時間以上吸引した後バーナーで熔封し切断する。
- (9) 凍結乾燥が完了したかどうか知るためには同量の蒸留水を凍結させたアンプルを付け、氷が乾燥消滅したのち熔封するとよい。念のために氷が消滅してから約60分程度余分に吸引させるとよい。

F) アンプル開封及び生残検査時に必要な器材と試薬

- (1) 各種液体培地
YM 培地等
4 ml ずつ小試験管に分注しておくとい
- (2) 滅菌済パスツールピペット
綿栓をつめておくか、シリコンキャップをつけてアルミ箔で包んでオートクレーブしておくとい
- (3) アンプルカッター
東西通商製ダイヤモンドカッターはアンプルに簡単にキズをつけることができ、少し力を入れるだけで開封することができ便利である。
- (4) 消毒液
70%エタノール
- (5) ティッシュペーパー
180℃ 2時間の乾熱滅菌を行う
- (6) 滅菌シャーレ
- (7) 機械類
恒温器
低温恒温器

クリーンベンチ

G) アンブル開封及び生残検査

- (1) 70%エタノールで湿らせた脱脂綿を用いてアンブルを拭き消毒する。
- (2) アンブルカッターでアンブルに傷をつける。
- (3) 滅菌ティッシュペーパーで包み静かにアンブルを折る。
- (4) 小試験管内の液体 YM 培地をパスツールピペットで0.5ml とりアンブルに入れ、サンプルをよく溶かし再び吸い取って滅菌小試験管に戻しよく攪拌する。
- (5) 白金耳で斜面培地に移植して培養生育を確かめる。
- (6) 平板培地にも画線培養して雑菌の混入、変異の有無等を確認する。

H) アンブルの保管

作製したアンブルは菌株ごとにまとめ菌株番号と学名を記入した紙袋にいれロッカー等に整理しておくことと便利である。取り出しやすいように二つ折りにして菌株番号順に並べておくこととよい。低温(10℃以下)の暗所に保存する必要がある。光や高温は生残菌数の減少に関係する。長期間保存可能であるが、数年に一度生残検査することが望ましい。

5. 摘 要

菌株を増殖保存する場合それぞれの菌株に最も適した方法を選択しなければならない。しかし、数多くの菌株を扱うときにはそれが困難であることが多い。センターバンクでは、多くの菌株を長期間安定して保存できる方法として、糸状菌には液体窒素保存法を採用し、補助的に継代培養保存を行うこととし、酵母には凍結保存法と凍結乾燥法を採用している。本資料はセンターバンクにおいて保存・増殖業務を順調に進めるために、保存法の作業手順をまとめたものである。

引用文献

- 1) 農林水産省農林水産技術会議事務局・農業環境技術研究所(1987). 微生物の長期保存法—農林水産関係一, 183pp
- 2) 西山幸司・久保村安衛・三木信雄(1991) 農業生物資源研究所研究資料 2: 1-12 遺伝資源事業における微生物株の保存方法—(1) 細菌の保存法

Summary

Preservation Methods of Microorganisms for the MAFF Gene Bank Project

2. Fungi and Yeasts

Nobuo MIKI, Yasue KUBOMURA, Koushi NISHIYAMA

Department of Genetic Resources II
National Institute of Agrobiological Resources
Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

Preservation of fungi in liquid nitrogen was adopted in the MAFF Gene Bank from the viewpoints of saving labour, and space and for safety reasons. Most of fungus and yeast cultures in the MAFF Gene Bank Project of Microorganisms seem to tolerate freezing. For smooth progress of the project, manuals were prepared describing the method of making of vials for freeze-preservation, checking viability and the preparation of cultures and suspension media.