

糸状菌培養株の長期保存

(財)発酵研究所

中桐 昭

微生物培養株を安全にしかも長期間保存することは遺伝資源の保存というポテンシャルな意義だけでなく、現在用いられている技術や知識の拠り所を確保維持するという意味でも重要である。発酵研究所 (IFO) は、各種微生物の培養株の保存機関として様々なユーザーに対して微生物株の分譲を行い、また、研究者から菌株の寄託を受けてその保存を行っている。ここでは、現在 IFO で行っている糸状菌培養株の保存の現状、保存法の概説、保存法の改良例などを紹介し、より安全な保存法をめざして今後取り組むべき問題点、課題について述べてみたい。

1. IFO の保存菌株数とその保存法

現在、IFO に保存されている糸状菌の各分類群ごとの保存菌株数とその保存方法を以下の表に示す。約 7,600 株の糸状菌培養株のほとんどが凍結または乾燥法によって保存されている。

IFO の糸状菌保存菌株数と保存方法

分類群	保存菌株数	保存方法
鞭毛菌類	227	液体窒素凍結法
接合菌類	476	L-乾燥法、-80℃凍結法
子囊菌類	1880	-80℃凍結法、L-乾燥法
担子菌類	1324	-80℃凍結法、流動パラフィン法、継代培養
不完全菌類	3688	L-乾燥法、-80℃凍結法

2. 保存方法

IFO で糸状菌培養株の保存に用いている 4 つの方法について、以下に簡単に説明する。

1) 液体窒素凍結法

鞭毛菌類の保存に用いている。凍結保護剤として 10% グリセリン水溶液を用い、凍結用プラスチックチューブに入れた菌体をプログラムフリーザーを用いて冷却速度 1℃/分 で凍結し、液体窒素気相タンク (-170℃) に貯蔵する。

2) -80℃凍結法

担子菌の全株および接合菌、子嚢菌、不完全菌の内、胞子の形成能がないか不良な菌株の保存に用いる。凍結保護剤として10%グリセリン水溶液を用い、凍結用プラスチックチューブに入れた菌体を直接、電気式ディープフリーザーに入れて -80℃で貯蔵する。

3) L-乾燥法

接合菌、子嚢菌、不完全菌の内、胞子形成が良好な菌株（一部担子菌も可）に用いる。胞子を分散媒に懸濁してガラスアンプルに分注し、凍結させることなくそのまま真空下で胞子を乾燥させる。乾燥後アンプルを封じ、5℃で貯蔵する。

4) 流動パラフィン法

凍結保存が不可能な担子菌培養株の保存標品として、また、他の分類群の保存株のバックアップとして用いている。試験管斜面培地に菌を生育させ、その上に滅菌した流動パラフィンを重層して菌体への空気の流通を遮断する。室温で貯蔵する。

3. 保存法の改良

凍結法においては、菌株によって凍結標品の死滅や保存中の生残率の低下などの問題が見られる。そのため、これまで凍結標品の調製や復元の各ステップごとに様々な改良を試みてきた。その改良例のいくつかを示す。

1) 前培養

菌根性担子菌ホンシメジ *Lyophyllum shimeji* を麦飯培地で前培養して -80℃凍結保存すると生残性が改善されるなど、前培養培地を改良することによって凍結保存が可能となった菌株は多い。

2) 凍結保護剤

鞭毛菌ミスカビ *Saprolegnia parasitica* の凍結保護剤10%グリセリン水溶液に5-10%トレハロースを加えると生残性が顕著に改善された。

3) 冷却速度

鞭毛菌のプログラムフリージングにおいて、冷却速度2-5℃/分よりも、0.5-1℃/分で凍結した方が生残性が高かった。また、フリージングボックスの改良によって、凍結標品の生残性が改善された。

4) 解凍速度

鞭毛菌の液体窒素凍結標品の解凍方法としては、従来用いられてきた40℃温水・3分間浴よりも30℃温水・5分間浴の方が生残性で良好な成績が得られた。

5) 復元培地

菌根性担子菌マツタケ *Tricholoma matsutake* を復元する際に、寒天培地に代えて液体培地を用いると生残性が改善される場合があった。

4. 菌株保存の問題点と今後の課題

1) 凍結保存不調株の存在

担子菌類、特にテングタケ *Amanita* 属などの菌根菌類の培養株の中に -80℃凍結保存ができない株がある。いろいろな前培養法、凍結保護剤、凍結法などの様々な組み合わせを試行検討して、最適な凍結条件を見出す必要がある。

2) 長期保存不調株の存在

-80℃凍結標品の生残性が保存期間の経過に伴って低下する株があることがわかってきた。すべての凍結標品を液体窒素または-150℃ディープフリーザーで貯蔵するなどして、生残性だけでなく菌株の遺伝的安定性をも保てる、より安全な保存法を用いることが必要である。

以上