



Title	光合成細菌
Author(s)	嶋田, 敬三
Description	1章 植物・藻類・細菌の材料の入手と栽培・培養 1
Relation	光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Citation	低温科学, 67, 3-7
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39083
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-002.pdf



1. 光合成細菌

嶋田 敬三¹⁾

酸素非発生型光合成機能を持つ細菌は絶対好気性のものを含め 200 種ほどが記載され、主に菌株保存機関から入手できる。培地、培養法は種や目的によりさまざまであるが、よく用いられる条件について注意点を記した。

Photosynthetic Bacteria: Culture and maintenance

Keizo Shimada

Many species of anoxygenic photosynthetic bacteria belonging to four phyla have been isolated and deposited to culture collections. Various culture media and cultural methods have been developed. In this section, notable points for preparation of culture media and cultural skills for frequently used species are described with a few examples.

シアノバクテリアを除く原核光合成生物を慣習的に“光合成細菌”と呼ぶ。大別すると紅色細菌、緑色イオウ細菌、緑色糸状（繊維状）細菌、ヘリオバクテリアのそれぞれ別の門（Phylum）に属する 4 つのグループに分けられる。いずれも酸素を発生しない“酸素非発生型光合成”を行う能力を持つ。1970 年代まではすべて絶対嫌気性あるいは通性嫌気性で、通性嫌気性のものでも光合成装置は嫌気条件下のみで合成されるとされてきたが、1978 年に芝、佐藤らにより好気条件下で酸素呼吸に主に依存しながら少量の光合成装置を合成するいわゆる“好気性光合成細菌”が見出され、近年海洋を中心に多くの種が単離されるようになった¹⁻³⁾。ここではすでに単離されている光合成細菌を培養・維持する方法についてその概略を述べる。

1.1 入手法

好気性を含め多くの光合成細菌が DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) や ATCC (American Type Culture Collection) などから購入できる。国内では IFO を引き継いだ製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門 (NBRC) あるいは理研バイオリソースセンターに光合成細菌株が保存されており分与を行っている。詳細は以下のオンラインカタログのサイトを参照されたい。

DSMZ : http://www.dsmz.de/microorganisms/main.php?contentleft_id=6

ATCC : <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/tabid/112/Default.aspx>

NBRC : <http://www.nbrc.nite.go.jp/gene.html>

理研 BRC : http://www.jcm.riken.go.jp/JCM/JCM_Home.J.shtml

このほか場合によっては国内の大学のラボなどから分与を受けることが可能な株もある。

1.2 培地

光合成細菌は上記のように 4 つのグループに大別されるが、培地、培養法はひとつのグループの中でもさまざまであり、場合によっては同じ種でも株 (strain) によって異なる場合がある。上記の各菌株保存施設のカatalogにもそれぞれの種独自の培地が記されているものもあるが、目的と異なる培地のみが示されている場合や、必ずしもそれぞれの種や株に最適とは言えない一般性のある培地のみが示されている場合もある。たとえば DSMZ のカatalogでは紅色非イオウ細菌の多くの種に対して共通な培地 (Rhodospirillaceae Medium) が示され、嫌気条件にするため窒素ガスの通気などやや面倒な方法が記されているが、特定の種にとっては不要と考えられる成分 (例えばいくつかのビタミン) や操作 (厳密な嫌気状態の形成など) も含まれている場合が多い。実際、実験によく用いられている紅色非イオウ細菌の多くは通性嫌気性で酸素に強く、培地が最初から厳密な嫌気状態であ

1) 首都大学東京理工学研究科生命科学専攻

る必要はない場合が多い。したがって、実験の目的にもよるが、はじめて扱う株の培養にあたっては、可能な限り実際にその株を使った論文あるいは経験者にあたってみるのが望ましい。

培地には光独立栄養条件用の無機培地と（光）従属栄養培養のための有機培地がある。通常、完全無機培地を用いるのは紅色および緑色イオウ細菌の一部だけで、多くの場合多少なりとも有機物を加えた培地を用いる。いわゆる紅色非イオウ細菌も H_2 などを電子供与体とする独立栄養生長は可能であるが、菌体を得る目的の場合は乳酸、コハク酸などの有機物を炭素源かつ電子供与体として光従属栄養的に生長させる場合がほとんどである。

有機培地でも無機塩類を加える必要のあるものも多い。同じ無機塩類をよく使う場合は終濃度の 50~100 倍程度の無機塩類のみの Basal Salt Solution を作り置きする場合が多いが、作成の際には水酸化鉄（Ⅲ）を生じない（アルカリにしない）ようにする、リン酸塩の沈殿を生じないためにリン酸カリウムなどは別の Stock Solution にする、などの注意が必要である。微量元素（Trace elements）も通常別に濃い Stock Solution を作っておいて少量を Basal Salt Solution に加えて用いる。

培地に加える成分でしばしば欠かせないものとしてビタミン類がある。紅色あるいは緑色イオウ細菌はビタミン B_{12} のみ加えれば良い場合が多いが、紅色非イオウ細菌のビタミン要求性は種によってさまざまであるため Bergey's Manual^{4,5)} などで確認する必要がある。可能性のあるビタミン類をすべて含んだ Vitamin mixture を作っておいて用いても良いが、オートクレーブ滅菌が出来ないもの（パントテン酸）もあるので注意を要する。

これに限らず、熱耐性、揮発性などの理由でオートクレーブ滅菌に適さない物質（炭酸水素ナトリウムなど）はろ過滅菌して培地に加える必要がある。他の物質との反応性のためオートクレーブ滅菌を分けて行わねばならないもの（硫化ナトリウム、グルコースなど）もあるが、少量の場合はろ過滅菌を行う方が手間はかからない。

過去現在を通じて多く用いられている光合成細菌は Proteobacteria 門 α ないしは β クラスに属するいわゆる紅色非イオウ細菌で、*Rhodobacter (Rba.) sphaeroides*, *Rhodopseudomonas (Rps.) palustris*, *Rhodospirillum (Rsp.) rubrum*, *Rubrivivax (Rvi.) gelatinosus* などの通性嫌気性の種が多い。これらは酸素に強いいため特に培地から酸素を除く操作は必要としない。しかし、紅色非イオウ細菌であっても *Rsp. photometricum*, *Pheospirillum (Phs.) molischianum* などの酸素に弱い種では、酸素を

除くため培地に少量のアスコルビン酸やシステインあるいは微量の硫化水素 (Na_2S として) を加えることがしばしば行われる。

培地あるいはそれを使った光合成細菌の単離法、培養・維持については可能なら文献⁶⁻⁹⁾ も参照されるとよい。また、いくつかのよく使われる光合成細菌種について筆者らが使っている培地・培養の例も最後（1.5）に挙げる。

1.3 培養法

1.3.1 嫌気光合成培養

好気性光合成細菌以外の光合成細菌の液体培養は、多くの場合嫌気条件で密閉可能なガラス容器中で光照射することにより行われる。特に緑色イオウ細菌など絶対嫌気性光合成細菌の場合は嫌気光合成培養以外の培養法はない。*Rhodobacter* や *Chloroflexus* のような通性嫌気性細菌の場合は容器内に多少空気層を残して、菌体が沈殿しがちな場合に時々容器を振って菌体を攪拌分散させてやると良い。なお、容器を密閉するため温度変化やガス発生に伴う内圧変化で容器破損が起こることがあるので、場合によっては注意・対策が必要である。

絶対嫌気性細菌の場合でも、ヘリオバクテリアのような極端に酸素に弱いもの以外、特に生化学的な研究に良く用いられるような種には、植継ぎの際などに培地に多少の酸素が混入しても実質的な影響はないものが多い。しかし、光を与えるにあたっては通性嫌気性の種でも、緑色糸状細菌以外は、植継ぎ後しばらく暗所に置いて培地中の酸素を消費させてからにするなど、酸素存在下で強い光に当てることは避けた方が良い。

絶対嫌気性の種の場合、単離などのため寒天プレートでの培養が必要な場合にプレートを嫌気条件下に置いて光照射を行う必要がある。このためには嫌気チャンバーが使えれば理想的ではあるが、多少とも酸素耐性のあるものなら Gas Pack (BD BBL)、アネロパック（三菱ガス化学）などの嫌気ジャーを用いたシステムを利用するか、食品用の脱気密封システムを使ってプレートをエージレスなどの脱酸素剤と共にディスポーザブルの袋に密封して（しばらく暗中に置いて）明条件に置くことで、光合成細菌コロニーを得る方法がある。この他、試料を寒天培地中に薄く分散して細いガラスチューブに入れ両端を密封して光嫌気培養を行ってコロニーを得る方法もある^{7,9)}。また、通常の嫌気性細菌でも用いられる穿刺培養も保存のためなどには良く用いられる。

1.3.2 好気培養, 半好気 (Semi-aerobic) 培養, 微好気培養

上記のように紅色非イオウ細菌には多くの通性嫌気性細菌があり、酸素呼吸でも生育する。酸素濃度が高いと色素や光合成タンパクの合成は抑制されるが、生育は光合成培養より早い場合が多い。酸素濃度を抑制したいいわゆる半好気 (semi-aerobic) 培養では生育速度は遅くなるが、色素や光合成タンパクの合成は行われる。したがって、半好気培養は光合成機能欠損株の培養などによく用いられる。なお、上記のように酸素存在下での光照射は生長阻害を起こすため、紅色非イオウ細菌の好気培養あるいは半好気培養はあまり強い光のない場所で行う必要がある。

酸素に弱い紅色非イオウ細菌でも微好気生育が可能とされている種がある。しかし、これは非常に微妙な条件でのみわずかな生育が見られるという意味で、ある程度の菌体量を得る培養として用いることは難しい。

紅色非イオウ細菌のほか *Chloroflexus* の類にも好気培養が可能な種・株が多くあるが、高温による水分の蒸発が激しいため好気培養はやや注意が必要である。

通性嫌気性光合成細菌では寒天プレート培養も好気暗条件下でよく行なわれる。コロニーの小さいうちは無色でも、生長につれコロニー内部の酸素濃度が下って色素合成が起こるため、嫌気ジャーなどを用いなくても他の菌との判別が容易であるためである。

Roseobacter などのいわゆる好気性光合成細菌は嫌気光合成条件では生育しないため、暗中での振盪培養や通気による好気培養で生育させる。色素や光合成タンパクも好気条件でのみ合成されるが、必ずしも酸素濃度は高いほど良いとは限らない場合もある¹⁰⁾。好気性光合成細菌でも色素や光合成タンパクの合成は光によって抑制される種が多いので、通常培養は暗黒下で行う。

1.3.3 その他の培養法

通性あるいは好気性の種では系統にもよるが、脱窒 (denitrification) や DMSO (dimethylsulfoxide), TMAO (trimethylamine N-oxide) を電子受容体とする嫌気呼吸が可能なものもあり、必要に応じてこのような嫌気呼吸による培養も行われる¹¹⁾。

1.3.4 光源

光合成細菌はいずれの種もバクテリオクロロフィルによる主吸収帯が近赤外領域にあるため、嫌気光合成培養に用いられる光源としては通常タングステンランプが用いられる。蛍光灯でも原理的には生育可能であるが、生長速度はかなり遅い。一方、タングステンランプは熱線も強いので培養は光源から離すか水層を隔てて光照射す

る必要がある。特に夏場は冷却可能なサーキュレーターを備えた水槽に培養容器を浸して光照射をするのが安全であろう。熱発生が少ない近赤外 LED を光源として用いれば発熱の問題は回避できると考えられる。

培養に用いる光強度は目的によって異なる。液体の大量培養では光が全細胞に行き渡るように強い方が良いが、チューブなどによる少量の培養の場合は強光では色素・光合成タンパクの合成抑制があり得るし、酸素が残存していると生育阻害が起こることがある。特に緑色イオウ細菌など本来あまり明るくない環境にいるものは弱い光の方が良い場合が多い。

1.3.5 温度

培養温度は好熱菌でない限り 30°C がよく用いられる。しかし、これは同時に他の種も培養する場合の妥協点で、至適温度は種により多少異なる。したがって単独で培養する場合は Bergey's Manual^{4,5)}などを参照してその種の至適温度に合わせたほうが良い。なお、DSMZ のカタログでは 25°C が指示されている種が多いが、実際の至適温度はこれより高いものが多い。一方、上記のようにタングステンランプを光源に用いる場合は温度が上がり過ぎないように環境が必要である。

Chloroflexus, *Chlorobaculum tepidum* などの (中度) 好熱菌の場合は恒温水槽で培養すると水蒸気の発生が著しいため水槽に蓋をする必要が生じる。蓋に水滴が多量につくなどの問題があるため、外から光照射が可能な乾式の恒温インキュベータがあれば便利である。

1.4 保存

光合成細菌の長期保存法としては通常の細菌と同じく 15% グリセロールあるいは 5% ジメチルスルホキシド (DMSO) 中などでの凍結保存 (−70°C 以下) が多くの場合有効であるが、穿刺培養あるいは液体培養のままでも数ヶ月あるいは 1 年以上生存可能な種も少なくない。歴史的にしばしば生理・生化学実験に用いられている種・系統は多くがこのような丈夫なものなので、このようなものを時々実験に用いる場合は必ずしも超低温槽は必要なく、3 ヶ月から半年ごとくらいに植え継いでおけばよい。なお、前記の *Rsp. photometricum* や *Rhodocyclus purpureus* のような酸素に弱い種についてはもう少し頻繁に (毎月一回程度) 植え継ぐことが薦められている⁹⁾。

液体培養のまま保存すると菌体は沈殿するが、色調が変わらない限り新しい培地に多めに植え継げば生育を再開する場合が多い。なお、液体培養の状態での保存は暗所よりは多少とも光がある場所で培養温度より低い温度

あるいは冷蔵庫中が良い⁶⁾と言われる。

1.5 培地および培養例

よく使用される種では菌株保存施設のカatalogに記されている培地より作製が簡便な培地を用いる場合も多い。その例を示す。

【PYL medium】

この培地は天然培地のため組成が単純で作製に手間がかからない点が長所である。*Rps. palustris* など種によっては水道水など多少の無機イオンの含まれる水を用いれば Basal Salt Solution を省いても十分な生育が得られる培地である¹²⁾。炭素源は乳酸ばかりでなくコハク酸 (2Na-Succinate) などを用いても良い場合が多い。

Rps. palustris, *Rsp. rubrum*, *Rvi. gelatinosus* および *Rba. sphaeroides* のいくつかの株が良好な生育を示す。なお、アンモニウム塩が含まれていないため *Rps. palustris* などではニトロゲナーゼからの水素ガス発生があり、容器を密閉していると破裂することがあるので栓を緩めるなどしてガス抜きをする必要がある。

なお、下記のような Basal Salt Solution にコハク酸などの炭素源、硫酸アンモニウムなどの窒素源およびリン酸塩、ビタミン類を加えた合成培地（さらに Yeast Extract を加える場合も多い）も多く利用される。

培地組成 (1 L あたり)

1. Yeast Extract	1 g
2. Polypeptone	5 g
3. Na-Lactate	2~5 g
4. Basal Salt Solution ^a	10 ml

pH 7.0 に合わせる。

^aBasal Salt solution (1 l あたり)

EDTA-3Na	4.12 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1.11 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	24.65 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2.94 g
NaCl	23.4 g
Trace element solution ^b	10 ml

^bTrace element solution (500 ml あたり)

MnSO ₄ · 4H ₂ O	5.58 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.44 g
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	1.46 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.26 g

Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1.21 g
H ₃ BO ₃	1.55 g
EDTA-3Na	20.6 g

【*Allochromatium* (*Alc.*) *vinosum* (旧称 *Chromatium* strain D) 用培地】¹³⁾

紅色イオウ細菌には酸素を嫌う種が多く、培地作製や培養も手間のかかるものが多いが、*Alc. vinosum* は例外的に酸素にも強く扱いやすい種である。さらに硫化水素耐性も強いので、滅菌操作を省いても硫酸還元菌以外は混入しにくく滅菌設備のない施設でも利用できるという長所がある。ただし、純粋培養では硫化水素が枯渇しやすいので、実際は硫酸還元菌を共存させたままの状態を維持・培養することが多い。

培地組成 (1 l あたり)

1. NaCl	10 g
2. KH ₂ PO ₄	0.5 g
3. K ₂ HPO ₄	0.5 g
4. NH ₄ Cl	1 g
5. MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.5 g
6. CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.06 g
7. FeCl ₃ · 6H ₂ O	5 mg
8. NaHCO ₃	3 g
9. Na ₂ S ₂ O ₃	2 g
10. Na ₂ S · 9H ₂ O	1 g

1~7 は 2 倍液を Stock Solution としておくとよい。

8~10 は使う直前に加える。

この培地に (通常より) かなり多めに (たとえば 1/4~1/3) 植継ぐと生長開始が速い。

【緑色イオウ細菌用培地】¹⁴⁾

緑色イオウ細菌は独特のバクテリオクロフィルとそれから成る光捕集装置 “クロロソーム” を持ち微弱光下での生育が可能な特徴を持つ。一般にはやはり培養が容易でない種が多いが、*Chlorobium limicola* f. sp. *thiosulfatophilum*, *Chlorobaculum tepidum* などチオ硫酸塩も電子供与体として利用できる種・株は比較的容易に培養できる。

培地組成 (1 l あたり)

1. KH ₂ PO ₄	2.2 g
2. K ₂ HPO ₄	0.5 g
3. EDTA-3Na	0.05 g
4. (NH ₄) ₂ SO ₄	0.4 g

5. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4 g
6. NaCl	0.4 g
7. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
8. Fe-EDTA	5 mg
9. Trace Elements	
10. $\text{CH}_3\text{COO NH}_4$	0.5 g
11. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.0 g
12. VB_{12} (0.004%)	0.5 ml
13. NaHCO_3	2 g
14. $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.6 g

1～9はStock Solutionとしておくとよい。これに10～12を加えオートクレーブ滅菌し、最後に13, 14をろ過滅菌で加える。植菌した後空気をほとんど残さないように容器に密栓をし、暗所に数時間置いてから（酸素を吸収させた後）弱めの光で培養する。なお、好熱菌の場合は容器に温度変化に伴う圧力がかからないような工夫が必要となる。

参考文献

- 1) T. Shiba, U. Shimidu, & N. Taga, Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. **45** (1979) p.801.
- 2) K. Sato, FEBS Lett., **85** (1978) p.207.
- 3) V. Yurkov & J. T. Csotonyi, The Purple Phototrophic Bacteria, eds. C. N. Hunter, F. Daldal, M. C. Thurnauer and J. T. Beatty, Springer Netherlands, 2008, p.31
- 4) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2nd edition) vol. 1, eds D. R. Boone and R. W. Castenholz, Springer-Verlag, 2001
- 5) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2nd edition) vol. 2, eds D. J. Brenner, N. R. Krieg and J. T. Staley, Springer, 2005
- 6) H. Biebl & N. Pfennig, The Prokaryotes, eds. M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, and H. G. Schlegel, Springer-Verlag, 1981, vol. I, p.267
- 7) N. Pfennig & H. G. Truper, The Prokaryotes, eds. M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, H. G. Schlegel, Springer-Verlag, 1981, vol. I, p.278
- 8) R. W. Castenholz, & B. K. Pierson, The Prokaryotes, eds. M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, H. G. Schlegel, Springer-Verlag, 1981, vol. I, p.290
- 9) 星野八洲雄, 「光合成細菌」北村博, 森田茂廣, 山下仁平編, 学会出版センター, 1985, p.18
- 10) T. Shiba, Plant Cell Physiol. **28** (1987) p.1313.
- 11) T. Satoh, Arch. Microbiol. **115** (1977) p.293.
- 12) A. Fukushima, K. Matsuura, K. Shimada, & T. Satoh, Biochim. Biophys. Acta **933** (1988) p.399.
- 13) S. K. Bose, Bacterial photosynthesis, eds. H. Gest, A. San Pietro, L. P. Vernon, Yellow Springs, Antioch Press, 1963, p.501
- 14) T. M. Wahlgund, C. Woese, R. W. Castenholz, & M. T. Madigan, Arch. Microbiol. **156** (1991) p.81.