

## 第2節 細菌

### 2.1 大腸菌の薬剤耐性菌株と薬剤感受性菌株の選択培養法の確立

**【目的】**細菌が生産する生理活性物質やそれらがもつ機能は、数多くの基礎および応用研究の対象となってきた。その成果は食品産業・発酵産業・農業はもとより、医学・薬学や工学の分野にいたるまで貢献してきた。そして細菌の研究やそれらの利用が今日のような発展を遂げる過程では、特定の表現形質をもつ菌株を自然界から選択的に分離・培養する必要があったことはいまでもない。また、バイオテクノロジー技術により有用物質を生産する変異株の分子育種を行う際にも選択培養の手法が不可欠である。

ここでは、寒天平板培地を用いて抗生物質であるアンピシリン (Amp) 耐性をもつ大腸菌株を選択的に培養する手法を確立する。同時に、基礎実験で実習した無菌操作の手法を確認する。

#### 【LB 寒天平板培地の調製】

- 1) 使用する器具と試薬：Bact Tryptone, Bact Yeast Extract, NaCl, 5N NaOH, 寒天末, アンピシリン水溶液, 蒸留水, 1 L ビーカー, 1 L 三角フラスコ, メスシリンダー, スターラー, スターラーバー, ピペット, 9 cm プラスチック製滅菌シャーレ
- 2) 以下の試薬を計り, ビーカーの中に入れ, 約 450mL の蒸留水を加えた後スターラーで良く攪拌して溶かす。

Bact Tryptone (Difco)	5 g
Bact Yeast Extract (Difco)	2.5 g
NaCl	5 g
5N NaOH	100 $\mu$ L

- 3) 蒸留水を加えて 500 mL にメスアップする。
- 4) 7.5 g の寒天末を加える。
- 5) アルミ箔で二重にフタをして, オートクレーブ滅菌する。  
\*滅菌開始前に缶体内に十分な水があることを確認する。
- 6) オートクレーブ缶体から取りだし, 冷めないうちに穏やかにフラスコを振って, 培地が均一になるようにする。このとき, できるだけ気泡ができないように注意する。  
\*缶体のフタを開ける前に内部の圧力が充分下がっていることを確認する。
- 7) 65°C 程度に冷めたら, アンピシリン (50 mg /mL) を 0.5 mL 添加し, ふたたびおだやかに攪拌した後, プラスチック製滅菌シャーレ 1 枚につき, 20~25 mL ずつ無菌的に分注する。  
\*培地の量は適当でよい。液面高をシャーレの厚さの約半分のところ調節する。  
\*アンピシリン (=アミノベンジルペニシリン) は抗生物質の一種で, 細菌の細胞壁ペプチドグリカンの網目状構造の形成を阻害して溶菌に導く。類似の標的酵素が高等動物にはないため, 抗菌性に由来する毒性がない。ペニシリンは 1929 年, A. Fleming により青カビ (*Penicillium*) の培養液中にその存在が報告されたことで有名。
- 8) 水平な所に置いて一晩静置し, 寒天を固まらせる。固まった寒天平板培地はビニール袋に入れて, 冷暗所で約一ヶ月保存が可能。

## 【大腸菌アンピシリン耐性株と感受性株の選択培地の確立】

- 1) 使用する培地： LB 寒天平板培地 (LB)  
アンピシリン添加LB 寒天平板培地 (LB+Amp)
- 2) 供試菌： 大腸菌アンピシリン耐性株 (*Escherichia coli* Amp<sup>r</sup>株と呼ぶ) の菌液  
大腸菌アンピシリン感受性株 (*Escherichia coli* Amp<sup>s</sup>株と呼ぶ) の菌液
- 3) 使用する器具： 白金耳、ガスバーナー、70%エタノール、パラフィルム
- 4) *E. coli* Amp<sup>s</sup>株と Amp<sup>r</sup>株を、無菌操作 (基礎実験テキスト参照) により、LB 培地と LB+Amp 培地にそれぞれ画線する (図 2-1)。37°Cで一晩培養する。
- 5) コロニーの有無および形状を確認する。

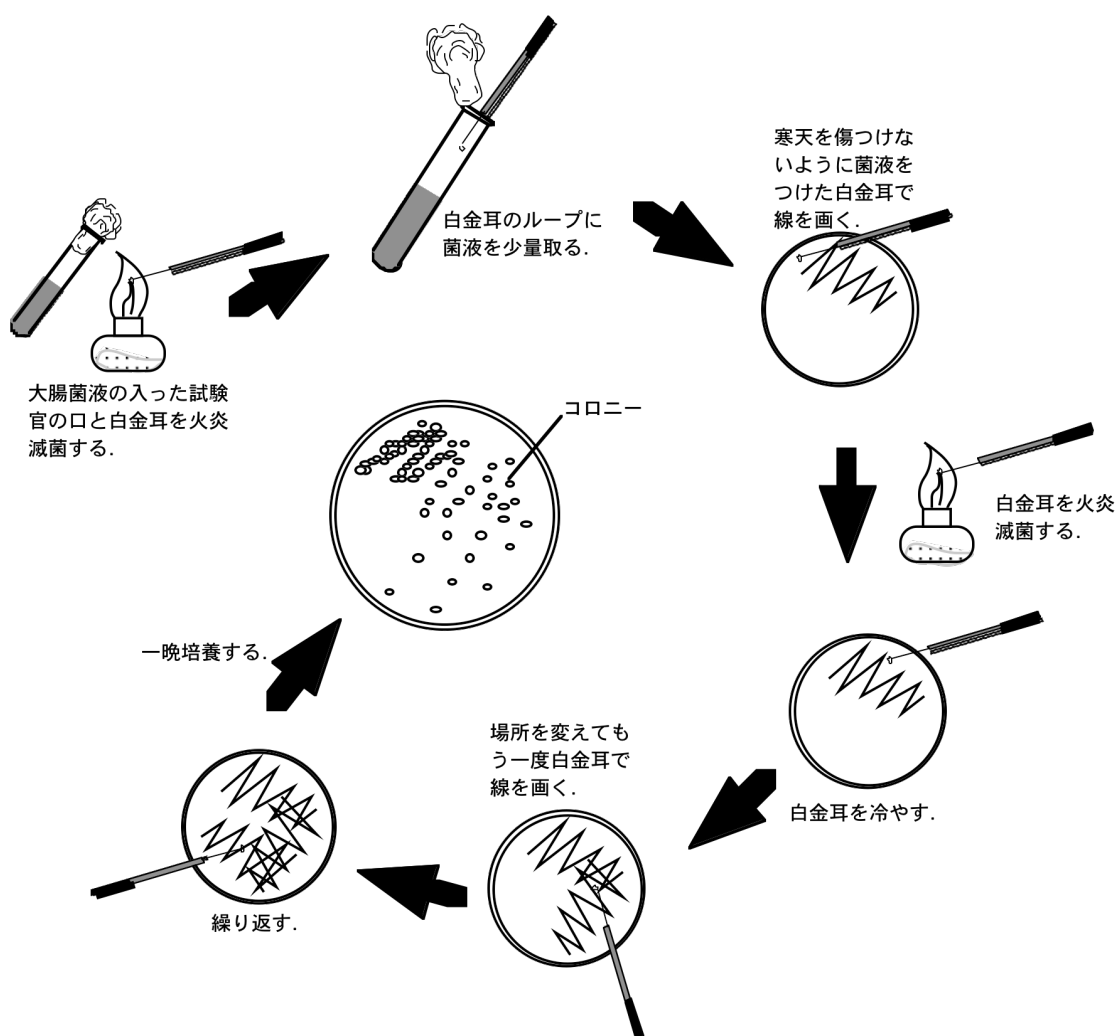


図2-1 画線接種法

## 2.2 大腸菌の形質転換

【目的】二価カチオンで処理を施したアンピシリン感受性大腸菌 (*E. coli* Amp<sup>s</sup>株) コンピテン

ト細胞に、アンピシリン耐性プラスミド (pGLO) を導入し、形質転換する手順を学ぶ。

**【形質転換の基礎知識】** 形質転換(transformation)は、プラスミドなどの適当なベクターを用いて大腸菌や培養細胞に新たな遺伝情報を導入する技術である。Avery ら(1944)は致死性の肺炎双球菌を煮沸して殺菌した後で無毒の肺炎双球菌と混合し、その後でマウスに注射をしたところ、混合しない対照群のマウスが生残しているのに対して、混合して注射したマウスは顕著に死亡率が高いという事実を発見した。そして死んだマウスの体内からは、煮沸滅菌したはずの致死性の肺炎双球菌が多数検出された。Avery らは詳細な実験の結果、致死性肺炎双球菌の DNA が非病原型肺炎双球菌を致死型に遺伝的に変化させるものと結論づけた。DNA が遺伝情報の担い手であることを最初に示した実験である。この形質転換は細菌の染色体 DNA を用いたものであったがその後、大腸菌とプラスミドを用いる形質転換の技術が確立された。現在汎用される大腸菌の形質転換法には次の二つがある。

- 1) CaCl<sub>2</sub> 処理法 : Oishi と Cosloy(1972)は、大腸菌を塩化カルシウムで処理することによって外来 DNA を取り込み易い大腸菌を作成し、効率良く大腸菌を形質転換する手法を開発した。この外来 DNA を取り込み得る能力のことを受容能(competence)といい、受容能を獲得した細胞をコンピテント細胞(competent cell)という。この効果は Mg<sup>2+</sup>などの他の 2 価カチオンでも見られるものの、DNA 取り込みの分子機構の詳細は明らかにされていない。ともあれ、この方法は大腸菌の形質転換法として現在広く普及している。
- 2) 電気穿孔法 (electroporation) : 電気パルスにより電荷を加えて膜を圧縮させ、それが膜弾性を越えたためにできた nm サイズの細胞膜の孔 (電氣的穿孔) から DNA を受動的に細胞内に導入させる原理に基づいている。

こうした形質転換技術を種々の微生物に適用することにより、未知遺伝子機能の解明や有用形質の分子育種が可能になっている。

**【組換え DNA 実験におけるバイオハザード対策】** バイオハザード(biohazard)とは、ヒトを含む生物すべてに対して、ある生物またはその代謝産物が及ぼす危険性や障害 (hazard) のことをいう。DNA 組換え技術の進歩により、これまで自然界には存在しなかった新たな生物体を人為的に創出できるようになった。この技術の潜在的危険性を回避するために国際会議が催され、「バイオセーフティーに関するカルタヘナ議定書」が 2000 年 1 月に採択された。日本はこの議定書を 2003 年 11 月 21 日に締結し、その 90 日後の 2004 年 2 月 19 日から、この議定書の内容がわが国に対して効力を持つようになっている。また国内法としても、議定書の実施に必要な法律(「遺伝子組換え生物等の使用等による生物の多様性の確保に関する法律」)が制定され、2003 年 6 月 18 日に公布後、2004 年 2 月 19 日より施行されている。この法律や議定書、また同法に基づいて制定された「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」(二種省令)には組換え DNA 実験を計画・実施する際に遵守すべき安全確保対策や、そのための物理的封じ込め(physical containment)および生物的封じ込め(biological containment)の二つの基準が示されている。物理的封じ込めレベルは実験室の設計・設備・実験実施要項ごとに、また生物的封じ込めレベルは宿主として使用する生物およびベクターの安全性の程度に応じて定められている。本実験の物理的封じ込めレベルは P1、生物的封じ込めレベルは EK1 である。

**【供試菌とプラスミド】** *E. coli* Amp<sup>S</sup>株のコンピテント細胞, プラスミド pGLO (ハイオラッド社製; 図 2-2), あらかじめ DNA 分解酵素 DNaseI でプラスミド pGLO を分解した産物 (これを pGLO+DNaseI と呼ぶ)

**【培地・試薬・器具】** LB 寒天平板培地, アンピシリン添加 LB 寒天平板培地 (LB+Amp 平板培地), アンピシリン+アラビノース添加 LB 寒天平板培地 (LB+Amp+Ara 平板培地)

1. 4M 2-メルカプトエタノール, フタ付 PP チューブ, ピペット, ウォーターバス (42°C), シェーカーインキュベーター (37°C), SOC 培地, スプレダー

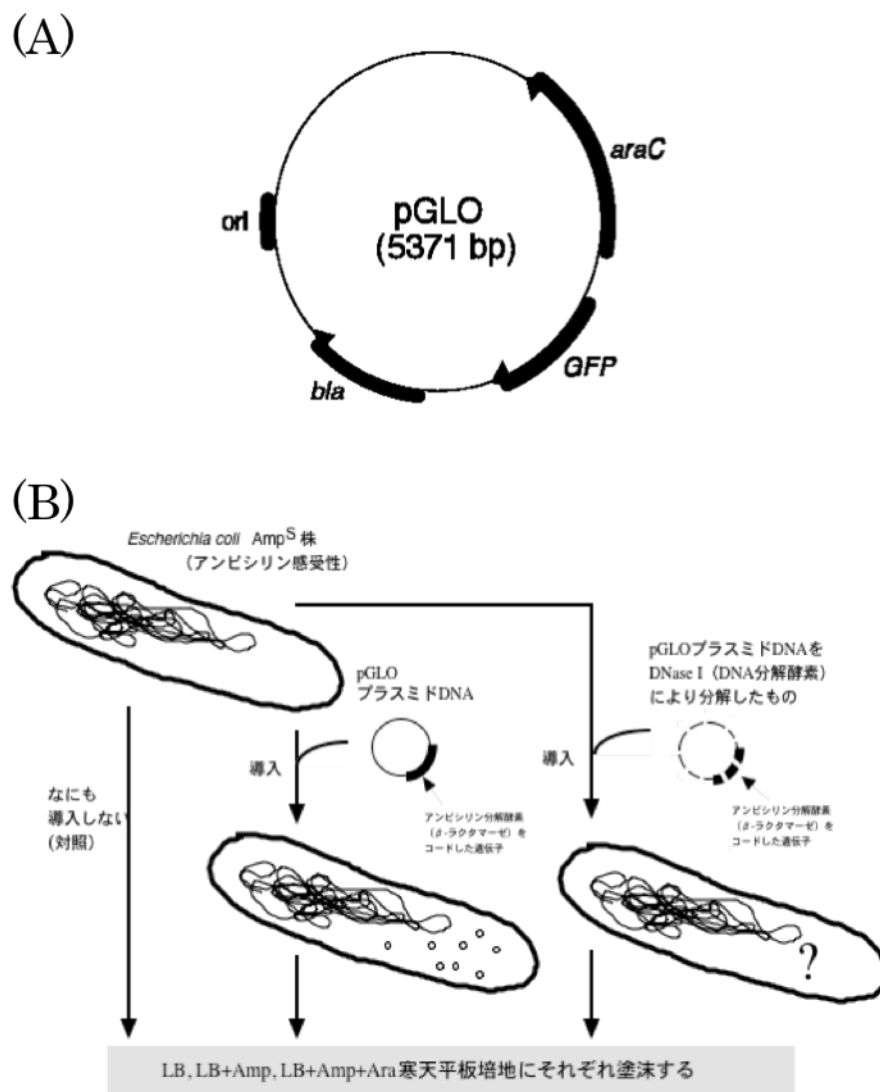


図2-2 プラスミドpGLOの構造 (A) とプラスミドDNA導入による大腸菌の形質転換実験 (B)

### 【形質転換法】

- 1) 保存チューブ内で凍結している *E. coli* Amp<sup>s</sup> 株のコンピテント細胞（菌液；100  $\mu$ L）を氷上で融かす。
- 2) 保存チューブを軽く振り、菌体を混合する。
- 3) 1.4M 2-メルカプトエタノール 1.75  $\mu$ L を加え、直ちに穏やかに混合する。
- 4) 形質転換に用いる次の3種類のサンプルを菌液に加え、軽く混合する。
  - ・DNA を含まない滅菌超純水 1  $\mu$ L
  - ・pGLO (1ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L
  - ・pGLO+DNaseI (1ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L
- 5) あらかじめ冷やしておいたフタ付 PP チューブに菌液全量を移す。
- 6) フタ付 PP チューブを氷上で 30 分間静置する。
- 7) フタ付 PP チューブを 42°C のウォーターバスに浸け、45 秒間加熱しヒートショックを加える。
- 8) すぐに氷上に戻し、2 分間冷やす。
- 9) 37°C に加温しておいた SOC 培地を 0.9mL 加える。
- 10) 37°C のシェーカーインキュベーターで、1 時間振盪培養する。
- 11) 塗抹法により各々の菌液 100  $\mu$ L を、3 種の寒天平板培地（LB, LB+Amp, および LB+Amp+Ara）に接種し（図 2-2）、37°C で一晩培養する。
- 12) 寒天平板培地上に現われたコロニーに紫外線ランプを照射して、コロニーが緑色蛍光を発するかどうか観察する。

### 【塗抹法】（図 2-3）

- 1) 実験台を無菌操作ができるように整える。
- 2) 平板培地の中央に、ピペットで試料溶液（菌液）を 100  $\mu$ L 滴下する。
- 3) 形状を確かめながらアルミ箔から滅菌コンラジ棒とりだす。この時アルミ箔の表側は滅菌されていないことに注意する。菌液に触れるコンラジ棒の三角形の部分は絶対に汚染されないようにする。
- 4) 平板培地上に菌液をまんべんなく塗り広げる。ターンテーブルを使っても良い。菌液が寒天平板培地に吸い込まれ、コンラジ棒に摩擦を感じはじめたら塗抹終了。
- 5) シャーレを逆さまにして、パラフィルムを巻く。
- 6) 37°C、気相のインキュベーターで一晩培養し、得られたコロニーを観察する。

シャーレのフタを屋根代わりに使って、上方からの雑菌の落下を防ぐ。

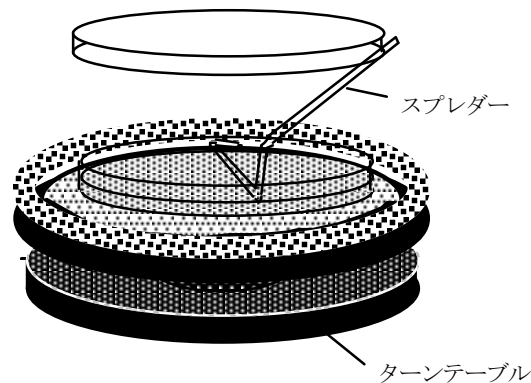


図 2-3 塗抹法による寒天平板培地への接種

## 2.3 自然環境に生息する細菌（環境微生物）の培養・計数・分離

**【目的】**周囲の環境から採取した土壌や水試料,あるいは身近な物品や動植物に生息する細菌を,寒天平板培地を用いて培養してみよう. 定量的な実験をすればその数を推定することもできる. また,大腸菌をモデル細菌として,抗菌物質を探索することもできる. 実験を通じて環境中の微生物環境を推測する.

**【環境】**種々の土壌,湖水,河川水,海水,空気,石や壁の表面,植物体,動物体,動物の腸管,糞便,食品など,我々が日常接している環境のみならず,大深度地下や油田,鉱山,深海底,氷河,温泉,塩田,そして成層圏などのいわゆる極限環境にいたるまで,地球上のあらゆる場所に細菌や古細菌,カビなどの生息域が存在する. これらは一般に環境微生物 (environmental microbes) と称され,様々な研究の対象とされる. 環境微生物を研究する目的は大きく2つある. 第1の目的は,ある環境で機能し固有の生態系を構成する微生物(細菌・古細菌)群集構造を知るための研究であり,局所生態系の物質循環や生物生産に及ぼす微生物の役割は思う以上に大きい. 第2は,環境中から未知の機能を持つ有用微生物を探索する目的で環境微生物を研究するものである. 温泉や鉱山などの極限環境は有用微生物の宝庫であり,耐熱酵素や生理活性物質などの産業的に有用な物質を生産する新規な微生物が次々と発見されている.

**【試料】**各自が持ち寄った環境試料(食品,植物,動物,日用品等). 班ごとに実験系を組み立てて比較できるようにすると,面白い考察ができる.

**【器具・培地など】**白金耳,スプレダー (=コンラジ棒),滅菌ピペット,ターンテーブル,パラフィルム,試料保管容器(滅菌済みのコーニング遠心管,15mL容と50mL容),その他(試料採取に必要な滅菌綿棒や滅菌ピンセットなど),LB寒天平板培地,希釈水

### 【自然環境からの微生物試料の採取】

環境試料を採取する時に注意しなければならないのは,研究者自身が原因となるコンタミネーションを防ぐことである. 従って試料は滅菌したピンセット,注射器や綿棒,あるいは専用の採泥器や採水器を用いて採取し,直接手で触れないことが望ましい. 少なくとも用具は良く洗浄したうえで乾燥したものを使用すべきである. 採取した試料は滅菌した密封容器に保存し,速やかに実験に供する. これは保存中にも微生物の増殖や死滅・不活化がおこり,結果的に採取時の微生物相が変化してしまうからである. この微生物相の変化をできるだけ少なくするために試料の保存では以下の点に注意する.

- 1) 水試料はできるだけ容器一杯に入れる(空気との接触を避ける).
- 2) 嫌気環境の試料は酸化防止の処置をする.
- 3) できるだけ低温(4℃)で保存する.(しかし一部の好熱菌は低温化で死滅するのに対して,好冷菌は低温化で良好に増殖する事が知られている.)

今回は試料容器としてγ線滅菌済みのコーニング遠心管(50mL容か15mL容)を用いる. 各自の

判断で試料は採取し、保存すること。

### 【試料の LB 寒天平板培地への接種】

各自が採取した細菌を含む試料は下記のいずれかの方法で寒天平板培地に接種する。

- 1) 液状の試料は塗抹法で接種する。
- 2) 粘稠な試料（スライムなど）は画線法で接種する。蒸留水などで適当に希釈し、塗抹法で接種しても良い。
- 3) 固体の試料は LB 寒天平板培地上に試料を静置する。または LB 寒天平板培地上で試料を転がす。滅菌綿棒で試料表面をぬぐった後、その綿棒で画線しても良い。また、試料を希釈水に浸し、良く攪拌したうえで希釈水を塗抹しても良い。

## 2.4 細菌の増殖量の測定

【目的】大腸菌の液体培養を材料として濁度測定法により細菌の増殖量を簡便に解析する手法を実習する。得られた増殖曲線（growth curve）から大腸菌の世代時間を計算する。

【細菌の増殖測定法】細菌の増殖は、培地の種類、培養温度、pH、通気条件等により変化する。細菌の増殖量あるいは増殖速度を定量することは、その細菌自身の増殖特性にする知見が得られるだけでなく、各種の生理活性を検討するうえでも重要である。一般に細菌の増殖特性を解析する実験は液体培養で行い、一定時間ごとの培養液中の細胞数（細胞量）を下記のいずれかの方法で計測したうえで比増殖速度などのパラメーターを計算する。

- 1) 直接検鏡法：細菌細胞の核酸物質に結合して特異的な蛍光を発する色素（アクリジンオレンジや DAPI\*など）で培養液中の細菌を処理した後、ろ過により孔径  $0.2\mu\text{m}$  のフィルター上に細菌を展開し、落射型蛍光顕微鏡を用いて観察・計数するもの。その他ある種の細菌やタンパク質、遺伝子などを特異的に検出する蛍光プローブ（probe、もともとは「探査」「探針」という意味だが、この場合は、抗体や特定の塩基配列に相補的な DNA 断片などを指す。）を用いることもできる。

\* DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

- 2) 平板培養法：培養液を適当に希釈し、一定量（通常は  $100\mu\text{L}$ ）をその細菌種に適した寒天平板培地に塗抹する。培養後、生ずるコロニー数を計数することにより、もとの培養液中における生細胞数を求めることができる。ただし、この方法は原液中の生細胞がすべてこの平板培地上でコロニーを形成するという前提に基づいている。
- 3) 濁度測定法：培養液の濁度の上昇を測定することにより、細胞数の増加の相対値を得る方法である。その原理については下記の項を参照。
- 4) 重量測定法：遠心分離などにより培養液から細菌細胞を分離し、その重量を測定する方法である。厳密には水分を除いた乾燥重量を測る必要があるが、簡便法として乾燥処理を行わず湿重量をそのまま測定することもある。

【増殖曲線と世代時間】 1 個の細胞が分裂によって 2 個になるのに要する平均時間を、世代時間

(generation time)という。世代時間は、同一菌株でも培養条件によって異なる。いま、最初の細胞数を  $N_0$  個、 $x$  回分裂後の細胞数を  $N$  個とすると、

$$N = N_0 \times 2^x \quad \text{----- (式 1)}$$

となる。ここで世代時間を  $g$ (分) とすると  $t$  分後における分裂回数  $x$  は、

$$x = t/g \quad \text{----- (式 2)}$$

であり、したがって式1は、

$$N = N_0 \times 2^{t/g} \quad \text{----- (式 3)}$$

となる。ここで両辺の対数をとると式3は、

$$\log N = C \cdot t + \log N_0 \quad \text{----- (式 4)}$$

と変形でき、培養時間 ( $t$ ) の一次関数と見なすことができる。(ただし、 $C = (\log 2)/g$ )

さて、グラフ上で培養時間を横軸に算術目盛で、細胞の増殖度合 (細胞数、濁度、菌体重量のいずれでもよい) を縦軸に対数目盛で描くと、実際には図2-3のようになる。新しい培地に植菌してしばらくは適応するための時間がかかり (誘導期)、つぎに急速に増殖する時期に入り (対数期または対数増殖期)、最後に栄養源の消失などにより増殖が停止する (定常期)。対数期を示す直線部は、上の式4の関係に相当するので、この直線の傾きにより世代時間  $g$  を求めることができる。

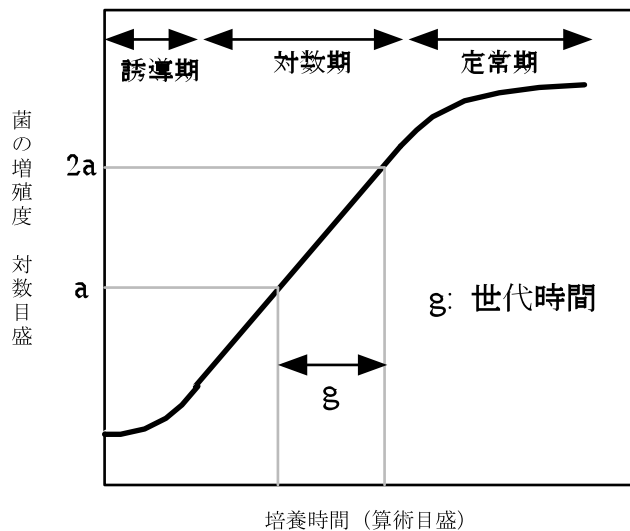


図 2-4 細菌の増殖曲線

**【液体培養の濁度測定による増殖量検定の原理】** 細菌が増殖するとそれに伴い培養液の濁度 (turbidity) が上昇する。細菌の細胞浮遊液に可視光を照射すると、光は細胞により散乱を受ける。形やサイズが均一の細胞集団を仮定すれば、この散乱光の強さはほぼ細胞数に比例して増大することが知られている。したがって、分光光度計を用いて透過光の強さを測定することにより、散乱光の大きさを間接的に見積もることができる。いま、入射光の強さを  $I_0$ 、透過光の強さを  $I$ 、吸光度を  $A$  とすると、

$$E = -\log (I/I_0) = kc \quad \text{----- (式 5)}$$

が成立する (Lambert-Beer の法則)。ただし、 $c$  は単位体積あたりの細胞数 (細胞密度)、 $k$  は細胞の形やサイズに依存する定数である。したがって分光光度計で測定した吸光度 (absorbance) の値



は、培養液の濁度に比例することになる。ここで対数増殖期の細菌細胞の形やサイズは一定で式 5 の  $k$  値は定数であると仮定すれば、この吸光度の値の増加はそのまま細菌数の増加を反映していると考えることができる。通常、細菌の増殖を吸光度で調べる場合、入射光の波長としては 600 nm や 660 nm の赤色光が適当であり、特にこの場合の吸光度を OD600 や OD660 (optical density, 光学密度) とあらわすことが多い。

**【供試菌】** *E. coli* Amp<sup>s</sup> 株の対数増殖期の培養液 (前培養液)

**【培地・器具】** LB 液体培地, 滅菌パストゥールピペット (綿栓つき), ニップル, 分光光度計, キュベット (光路長 1 cm), 恒温振盪器 (=シェーカー付きウォーターバス) (37°C), 試験管, 試験管立て

### **【方 法】**

- 1) 一晚培養して対数増殖期にある大腸菌 *E. coli* Amp<sup>s</sup> 株の前培養液 1mL をピペットで取り, 300mL 三角フラスコに入れた LB 液体培地 (100mL) に植菌する。
- 2) 37°C の恒温振盪培養機を用いて, 振盪しながら培養する\*。  
\*大腸菌は通性嫌気性細菌であるが, 振盪して通気を良くした方が, 増殖速度, 菌収率ともに高くなる。
- 3) 植菌後, 約 30 分毎に培養液 0.2mL を無菌的に採取し, 新鮮な LB 培地 0.8mL を加えて良く攪拌した後 (5 倍希釈), 分光光度計を用いて波長 660nm における吸光度を測定する。
- 4) 経時的な吸光度変化を片対数グラフ上に図示し, 増殖曲線を作成する。
- 5) 増殖曲線上の直線部分を対数増殖期とし, この部分から最低 3 個以上のデータセット (x 軸を培養時間  $t$  とし, y 軸を OD660 の対数とする。) を抽出する。最小二乗法を用いて一次式を回帰し, その傾き (式 4 の  $C$  値) から世代時間 ( $g$ ) を算出する。