

醤油酵母の細胞融合に関する研究

第二報 プロトプラスト調製条件の再検討と遺伝子導入法の予備的検討

小瀬古茂樹*・宮本 佳典・久松 眞・山田 哲也
三重大学生物資源学部 食品化学研究室, *サンジルス醸造株式会社

Studies on Cell Fusion of Soy-Sauce Yeast Part 2 Preparation Condition of Protoplast and Electroporation Condition

Shigeki KOSEKO*, Yoshinori MIYAMOTO, Makoto HISAMATSU
and Tetsuya YAMADA
Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Bioresources
Mie University, Sanjirushi Corporation*

Summary

For improvement of fermentation activity of *Zygosaccharomyces rouxii*, cell fusion of the yeast with *Saccharomyces cerevisiae* was attempted by electric field method. The results are following:

1 For the preparation of protoplast, 2 M KCl and 2 M sorbitol is the best to *Z. rouxii* and 1 M sorbitol is the best to *S. cerevisiae* as osmotic stabilizer. This observation suggests that favorable osmotic pressure is different to yeast species and mutant.

2 For the generation of protoplast, 1M KCl is the best and 2 M KCl is better to *Z. rouxii* as osmotic stabilizer.

3 The concentration and reaction time of Zymolyase-20 T is proved 1000 $\mu\text{g/ml}$ and 60 min as best condition.

4 Preculture condition of yeast for protoplast preparation was surveyed and 10% NaCl addition to medium is favorable for *Z. rouxii* (ade⁻) and no addition is better for *Z. rouxii* (wild).

5 A trial of gene transfer of *S. cerevisiae* to *Z. rouxii* cell by electroporation method gave six strains having excellent fermentation activity.

Key words: cell fusion, Electric field method, Electroporation, soy-sauce,
Zygosaccharomyces rouxii.

緒 言

細胞融合技術は生物学の進歩にともない発展し開発された新しい育種方法であり、多方面より注目されている。

微生物や植物は細胞表層構造において主に多糖、タンパク質より構成されている細胞壁を有している。この細胞壁を酵素処理で取り除くとプロトプラストを形成するが、この融合方法として化学的処理法、物理的処理法があり、それらの処理によってプロトプラストの膜変化を生じ接着、膜融合が起こる。化学的処理法として PEG 法の場

合は、PEG の添加後にプロトプラスト表面電位 (ζ 電位) 低下による凝集が起こり、その後 Ca^{2+} を加えると細胞膜の流動性が高まり膜融合が起こる。又、電気パルス法の場合には、細胞融合セルの非対称電極間にプロトプラストを加え高周波をかけるとプロトプラストの表面電位が中和される。一方、不均一な電場では双極子が誘導され、この誘導された静電引力でプロトプラストは相互に凝集する誘電電気泳導が起こる。その後高電圧パルスを与えると膜の一時的破壊が起こり、同時に修復による細胞融合が生じるとされている¹⁾。当研究室では、醤油諸味中に生息する耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の香気の改善及びアルコール生成能の向上を目的として清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (協会9号) との細胞融合法による育種改良を行ってきた。前報²⁾ において *Z. rouxii* と *S. cerevisiae* の変異処理による栄養要求株の造成、PEG 法による細胞融合、融合株の分離、及びプロトプラスト再生に対する細胞壁構成物質の影響について検討した。この PEG 法によるプロトプラスト融合法は、残存 PEG の毒性により遺伝的影響を与える可能性があるが、電気パルス法であれば完全な物理的方法であるためそのような影響はないと考えられた。この電気パルス法による細胞融合を行う場合、プロトプラスト調製に用いる浸透圧安定剤として、PEG 法では塩化カリウムを用いたが、電気パルス法の場合、塩化カリウムを浸透圧安定剤として使用すると塩化カリウムは電解質であるため高周波電界を与えた場合にプロトプラストの表面電位は中和されず、プロトプラスト相互の接着は起こらない。そこで、前報²⁾ より得られた栄養要求性酵母 *Z. rouxii* (wild), (ade^-), と *S. cerevisiae* (lys^- , chy^+) を用い、塩化カリウムに変わる浸透圧安定剤の選択と同時に他のプロトプラスト化条件の選択、及び電気パルス法による高アルコール生成能を有する酵母の育種について検討した。

実験方法

1. 使用菌株及び培地

当研究室保存菌株 *Zygosaccharomyces rouxii* (wild), (ade^-), 及び *Saccharomyces cerevisiae* (lys^- , cyh^+) の3種類の酵母を供試菌株として使用し、培地は、前報の GYP 培地を使用した。

2. 培養

4°C で保存してあるスラント培養の菌株から、菌を白金耳とり、5 ml の GYP 液体培地に植菌し 30°C, 24 時間静置培養した。そして、この前培養液から 1 ml とり 50 ml の GYP 培地の入っている 100 ml 容マイヤーフラスコに接種し 30°C, 20 時間振とう培養した。

3. 酵母のプロトプラストの調製方法

プロトプラストは前報と同様に調製した。即ち培養細胞懸濁液 5 ml を遠心集菌 (3000 rpm, 5 min) し、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) で3回洗浄後、0.2% 2-メルカプトエタノールと浸透圧安定剤を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) に懸濁した。これを L 字型試験管に移し、全量 5 ml となるように細胞壁溶解酵素 (Zymolyase-20T) を所定濃度加え、30°C で所定時間反応させてプロトプラストを調製した。

4. 酵母のプロトプラストの再生方法

得られたプロトプラストの再生方法は前報と同様に浸透圧安定剤を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) で連続希釈後、その 0.1 ml ずつを浸透圧安定剤を含む GYP 寒天培地上に流し、これに 50°C に保った同組成の培地を重層した。30°C, 4 日間培養して生じたコロニーをプロトプラストからの再生株と非プロトプラスト株の合計の総菌数とした。一方、無菌水で連続希釈後、その 0.1 ml を浸透圧安定剤を含まない GYP 寒天培地上に流し、同様に同組成の培地を重層した。これを 30°C, 4 日間培養して生じたコロニーを非プロトプラスト数とした。この両者の培地に生育したコロニーの差を持ってプロトプラスト数とした。

5. 酵母の細胞質の調製

細胞破碎機エクスプレス (BIOX 製) を使用し、破碎処理した酵母 (*S. cerevisiae*) 菌体は遠心分離 (12000 rpm, 10 min) により細胞壁区分、細胞質区分とに分離した。

6. 遺伝子導入法³⁾

細胞融合及び遺伝子導入装置は島津製作所製細胞融合装置 SSH-2 を使用し、融合チャンバーは FTC-03 を使用した。融合モードは AUTO モードとした。プロトプ

ラスト懸濁液 0.6 ml, 細胞破碎処理後遠心操作で得た細胞質区分溶液 0.2 ml の計 0.8 ml を融合チャンバーに注入し以下に示す電気条件にて室温で操作を行った。即ち, 高周波電界の周波数 FREQ=1 MHz, 電圧 VAC (PRI)=40 V_{pp}, 印加時間 20 S にてパルチェーンを形成させた後に高電圧パルスとして, 電圧 VDC=350 V (1.75 KV/cm), パルス幅 PW=60 μs を 1 秒間で 5 回印加し, 最終パルス印加後に高周波電界 VAC (SEC)=40 V_{pp} さらに 2 秒間継続させた。尚, 融合装置は倒立顕微鏡によって観察し顕微鏡ビデオカメラ装置に収録した。

7. 遺伝子導入株の分離

Z. rouxii (wild) に *S. cerevisiae* の遺伝子を導入した株の分離方法は, 一次スクリーニングとして食塩濃度13%の醤油合成培地に植菌し生育した菌株を食塩耐性株とした。次に二次スクリーニングとして食塩濃度20%, 醤油濃度20%, グルコース 5%の醤油合成培地をダラム管入りの試験管に各々 5 ml 分注, 殺菌後上述の食塩濃度 13%の醤油合成培地に生育した菌株を植菌した。30°C, 一週間培養し親株の *Z. rouxii* よりダラム管内のガス発生量が多い菌株を発酵能の良好な菌株として釣菌した。

結 果

1. プロトプラスト化に及ぼす浸透圧安定剤の影響

プロトプラストの調製方法は, *Z. rouxii* では, 1 M, 2 M ソルビトール, 1 M, 2 M 塩化カリウム, 1 M マンニトールを各々含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) を用い, 細胞壁溶解酵素 (Zymolyase-20 T) の濃度は 1 mg/ml, 30°C で60分間反応させた。又, *S. cerevisiae* では浸透圧安定剤として 0.6 M, 0.8 M, 1 M ソルビトール, 1 M 塩化カリウムを各々含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) を用い同様に細胞壁溶解酵素 (Zymolyase-20 T) の濃度は 1 mg/ml, 30°C で60分間反応させた。*Z. rouxii*, *S. cerevisiae* のプロトプラストの再生方法は, 1 M ソルビトールを含む再生培地で再生させ再生率を求めた。*Z. rouxii* の再生率は, Fig. 1 に示すように 2 M 塩化カリウムと 2 M ソルビトールを使用した場合に約 3.0%と良好な結果が得られ, これら以外は再生率が 1%に満たなかった。又, *S. cerevisiae* の再生率は Fig. 2 に示した。1.0 M ソルビトール, 1.0 M 塩化カリウム

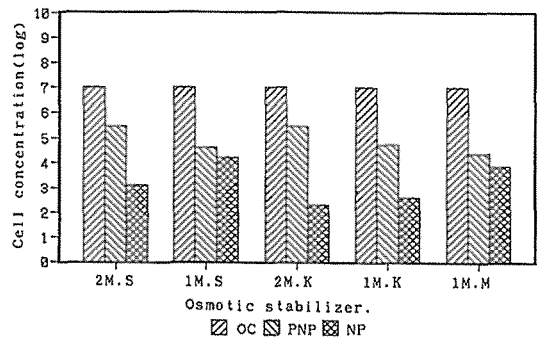


Fig. 1 Effect of concentration and species of osmotic stabilizer on protoplast preparation of *Z. rouxii*. S: Sorbitol. K: KCl. M: Mannitol. OC: Colony number (Cell/ml) of original cell (non Zymolyase treatment.) PNP: Colony number of protoplast and non-protoplast (Zymolyase treatment with sorbitol.) NP: Colony number of non-protoplast (Zymolyase treatment without sorbitol.)

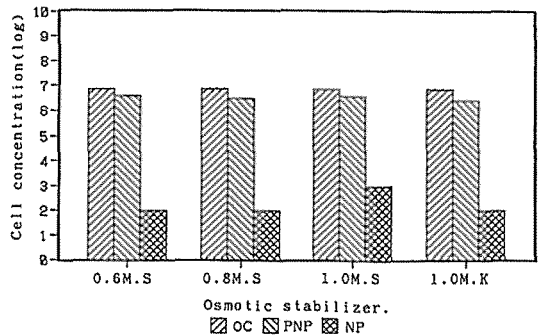


Fig. 2 Effect of concentration and species of osmotic stabilizer on protoplast preparation of *S. cerevisiae*. Symbols are same as Fig. 1.

において, 共に約0.6%の再生率を得, 0.6 M, 0.8 M ソルビトールでは0.1%前後と低い再生率であった。

2. プロトプラスト再生に及ぼす浸透圧安定剤の影響

Z. rouxii 株のプロトプラスト調製の浸透圧安定剤は, 2 M ソルビトールを使用した。プロトプラスト再生培地の浸透圧安定剤は, 1 M ソルビトール, 2 M ソルビトール, 1 M マンニトール, 1 M 塩化カリウム, 2 M 塩化カリウムを使用し, 各々の浸透圧安定剤を含む再生培地にプロトプラストを培養後, 生育したコロニーの再生率を求めた。結果を Fig. 3 に示した。1 M 塩化カリウムで 6.3%, 2 M 塩化カリウムで3.3%と高い再生率が得られ

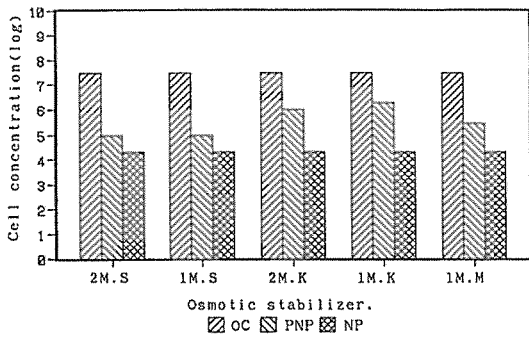


Fig. 3 Effect of concentration and species of osmotic stabilizer on protoplast regeneration medium of *Z. rouxii*.

Symbols are same as Fig. 1.

た。これら以外は1%以下であった。

3. プロトプラスト化に及ぼす細胞壁溶解酵素濃度とその作用時間の影響

前述の結果より、*Z. rouxii* のプロトプラスト調製の浸透圧安定剤は2M ソルビトール、プロトプラスト再生の浸透圧安定剤は1M 塩化カリウムとした。このときの細胞壁溶解素 (Zymolyase-20 T) の最適酵素濃度とそ

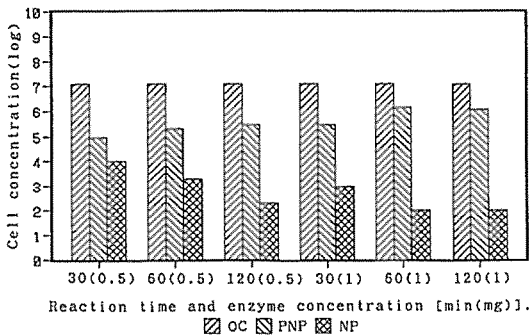


Fig. 4 Effect of enzyme concentration and reaction time for protoplast preparation on regeneration of *Z. rouxii*.

Symbols are same as Fig. 1.

Table. 1 Regenerating ratio of *Z. rouxii* protoplast induced of *S. cerevisiae* gene by electroporation.

	Salt concentration in pre-culture medium	Original cell ($\times 10^7$)	Protoplast ($\times 10^7$)	Regeneration protoplast ($\times 10^6$)	Non-protoplast ($\times 10^3$)	Regeneration ratio (%)
<i>Z. rouxii</i> (wild)	0%	7.77	6.90	6.78	3.00	9.82
<i>Z. rouxii</i> (ade^-)	10%	7.17	6.70	6.25	4.48	9.32

の反応時間について調べた。細胞壁溶解酵素濃度は500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ の2種とし、酵素反応時間は、30分、60分、120分で行った。結果を Fig. 4 に示した。酵素濃度1000 $\mu\text{g/ml}$, 酵素作用時間は60分のときがプロトプラスト再生率が10.9%と高くなることが認められた。

4. プロトプラスト化に及ぼす前培養時の食塩濃度の影響

一般に *Z. rouxii* は食塩濃度5%前後で最も生育が早くなると言われている。食塩濃度が高濃度になるほど生育が遅くなり *S. cerevisiae* より培養日数を長くする必要がある。前培養が低食塩濃度で可能ならば実験期間が短縮され結果の入手が容易となる。*Z. rouxii* (wild), (ade^-) 株の前培養時の食塩濃度を0%と10%にして24時間培養した時のプロトプラストの再生率を Fig. 5 に示した。*Z. rouxii* (ade^-) 株では食塩10%添加の方が再生率は良好であり、又、*Z. rouxii* (wild) 株では食塩を添加しない方が再生率は良好であった。

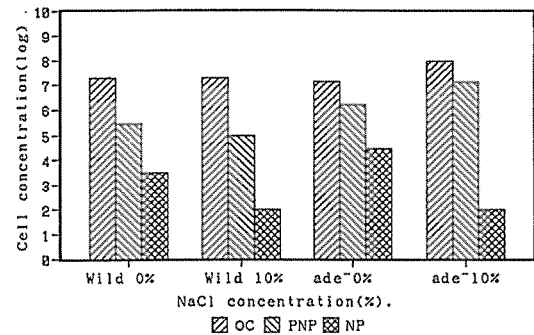


Fig. 5 Effect of NaCl concentration in preculture medium on regeneration of *Z. rouxii*.

Symbols are same as Fig. 1.

5. 遺伝子導入法の予備的検討

Z. rouxii に *S. cerevisiae* の遺伝子導入を行ない、再生状態の結果を Table. 1 に示した。どちらも9.82%

9.32%と高い再生率を示した。この導入処理後の再生コロニーより400株の再生酵母を得たので、これを食塩濃度20%の醤油合成培地に生育させ発酵能を調べた結果をTable. 2に示した。即ち、一次スクリーニングにおいてダーラム管内に発酵後のガスが親株のそれより多く、全体積の50%以上占めた31菌株が得られ、さらに二次スクリーニングから一次スクリーニングと同様の判定方法により発酵能の良好な菌株6株を得た。

Table. 2 Result of fermentation activity of *Z. rouxii* treated by electroporation.

Fermentation activity	+	++	+++
1st	166	223	31
2nd	14	11	6

1st: 1st screening. Soy-sauce synthetic medium (NaCl 13%, Soy-sauce 10%, Glucose 5%). 2nd: 2nd screening. Soy-sauce synthetic medium (NaCl 20%, Soy-sauce 20%, Glucose 5%).

- + : inferior. (CO₂ volume in darham tube is less than 30%.)
- ++ : standard. (CO₂ volume in darham tube is between 30% and 50%.)
- +++ : superior. (CO₂ volume in darham tube is more than 50%.)

考 察

浸透圧安定剤として塩化カリウムを用いて電気パルス法によるプロトプラスト融合を行うと、高周波を与えても誘電電気泳導によるプロトプラストの接着によるパールチェーンは形成されない。これに代わるプロトプラス

ト化の浸透圧安定剤を検討したところ *Z. rouxii* では 2 M ソルビトール、2 M 塩化カリウムの場合に最適となり、又 *S. cerevisiae* では 1 M ソルビトール、1 M 塩化カリウムの場合が最適であった。即ち *Z. rouxii* と *S. cerevisiae* 2種の酵母のプロトプラスト間に大きな浸透圧差があることより、前報において *Z. rouxii* を 1 M 塩化カリウムでプロトプラスト化した際、凝集し易いことが観察されている事実から、低浸透圧によるバーストの結果と思われる。従って、どちらかの酵母のプロトプラストに最適な浸透圧下での融合を行った場合に *S. cerevisiae* に有利な条件では *Z. rouxii* の浸透圧の低下によるバースト、又逆の条件では *S. cerevisiae* の浸透圧の上昇による圧偏等の影響のためプロトプラスト再生率の低下が生じると考えられる。前報においてプロトプラスト融合の際、浸透圧安定剤として 1 M 塩化カリウムを使用し、得られた融合株の糖資化性、糖発酵性、耐塩性、菌体内タンパク質パターンより *S. cerevisiae* に近い融合株、又は *S. cerevisiae* の back mutant が生育したと考察しているが、上述の *Z. rouxii* と *S. cerevisiae* の浸透圧の関係から、*Z. rouxii* プロトプラストの浸透圧の低下によるバーストが大幅に生じ、本菌が大きく減少した結果、再生、分離された菌株は殆どが *S. cerevisiae* に帰属されたと考えられる。そこで、プロトプラスト再生に影響する浸透圧安定剤の影響、さらに細胞壁溶解酵素濃度とその作用時間、及び前培養時の影響等について検討し、最適と思われるプロトプラスト調製、再生条件を Table. 3に示した。また、Fig. 6にプロトプラスト調製法を示した。*Z. rouxii* の (ade⁻) 株と (wild) 株間で前培養時の食塩濃度の影響が異なることがわかる。即ち同じ種間、

Table. 3 Preparation and regeneration condition of protoplast.

	<i>Z. rouxii</i> (wild)	<i>Z. rouxii</i> (ade ⁻)	<i>S. cerevisiae</i>
1. Pre culture	GYP	GYP+10%NaCl	GYP
2. Culture time	20 hr	20 hr	20 hr
3. 2ME* treatment	need	need	need
4. Osmotic stabilizer of preparation	2MKCl or 2MSorbit	2MKCl or 2MSorbit	1MKCl or 1MSorbit
5. Osmotic stabilizer of preparation	1MKCl or 2MKCl	1MKCl or 2MKCl	1MKCl or 1MSorbit
6. Enzyme concentration	1 mg/ml	1 mg/ml	1 mg/ml
7. Reaction time	1 hr	1 hr	1 hr

*2ME: 2-mercaptoethanol.

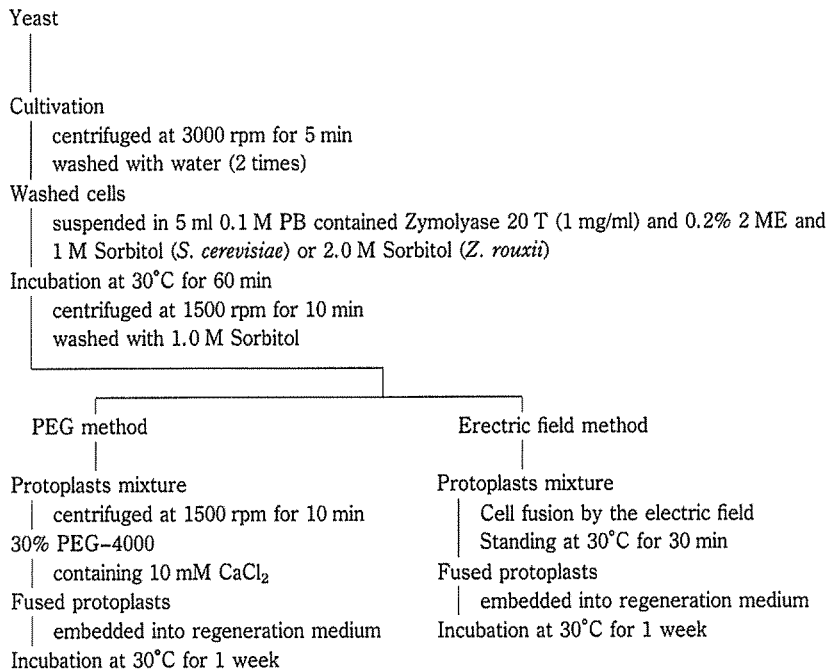


Fig. 6 Cell fusion of scheme of *S. cerevisiae* and *Z. rouxii*.

属間でプロトプラストの形成率、及び再生率が異なると考えられる。従って効率よく融合株を得るには細胞融合に用いる酵母及び変異処理酵母に応じて、予めプロトプラスト化、融合、再生の各段階での最適条件を設定する必要がある。今回、アルコール発酵能の強い清酒酵母 *S. cerevisiae* と耐塩性酵母 *Z. rouxii* から融合株を得、アルコール発酵能の強い耐塩性酵母を取得するのが目的であったが、上述の検討結果より通常の細胞融合法では融合株を得るのは困難と結論された。そこで *S. cerevisiae* の細胞破碎処理を行い得られた細胞質区分にプラスミド DNA、オルガネラ等遺伝を司る部分が存在することが考えられるので、これを *Z. rouxii* のプロトプラストへ導入による形質転換を試みた。これまで大腸菌で行われていた組換え DNA の研究が酵母でも同様に形質転換体を得られるようになり、それらについて報告⁴⁻⁷⁾ されている。この操作に比べれば、はるかに簡便な方法であるが近縁種間でのプラスミドの発現は起こり得ると考えられる。本研究では電気パルス処理後、得られた菌株 400 株につきアルコール発酵能、耐塩性の点で親株より良好に発酵する菌株として 6 株を得たが、マーカーを導

入していないので、これら菌株に、*S. cerevisiae* の遺伝子部分が導入され発現した形質転換体か、*Z. rouxii* の 2 倍体株か、電気パルス処理中の高周波、高電圧パルスによる影響か不明である。今後さらに発酵速度等につき検討する予定である。

要 約

1 プロトプラスト化に影響する浸透圧安定剤の濃度は、*Z. rouxii* では 2 M 塩化カリウム、2 M ソルビトールが良好であり *S. cerevisiae* では 1 M ソルビトールが良好となり 2 種類の浸透圧の違いが明らかとなった。

2 プロトプラスト再生に影響する浸透圧安定剤の濃度は、1 M 塩化カリウムでは 6.3% と 2 M 塩化カリウムでは 3.3% と良好な再生率を得た。

3 プロトプラスト化に及ぼす細胞壁溶解酵素濃度とその作用時間の関係は、酵素濃度 1000 $\mu\text{g/ml}$ 、酵素作用時間は 60 分のときに最も高いプロトプラスト再生率が得られた。

4 プロトプラスト化に影響する前培養時の食塩濃度

は, *Z. rouxii* (ade⁻) 株では食塩10%添加の方がプロトプラストの形成は良好であり, *Z. rouxii* (wild) 株では食塩を添加しない方が良好であった。同じ種間, 属間においてプロトプラストの形成率, 及び再生率が異なる事より効率よく融合株を得るためのプロトプラスト化, 融合, 再生の各段階での最適条件を設定した。

5 遺伝子導入法の予備的分離として400株の再生菌体から親株より発酵能の良好な菌株6株をスクリーニングした。

文 献

- 1) 長田敏行, プロトプラストの遺伝工学. 講談社サイエンティフィック, p. 24-42 (1987).
- 2) 山田哲也, 小瀬古茂樹. 三重大学生物資源学部紀要 投稿中.
- 3) 十川好志, 戸田健三, 高山慎一郎. 細胞電気融合. 島津評論, 44: 17-28 (1987).
- 4) T. ASHIKARI, N. NAKAMURA, and Y. TANAKA. Rhizopus Raw-Starch Degrading Glucoamylase, *Agric. Biol. Chem.*, 50: 957-964 (1986).
- 5) Y. TANAKA, T. ASHIKARI, and NAKAMURA. Comparison of Amino Acid Sequences of Three Glucoamylase and Their Structure-Function Relationships, *Agric. Biol. Chem.*, 50: 965-969 (1986).
- 6) 平野 正. 酵母のバイオテクノロジー. 学会出版センター, p. 199-210 (1988).
- 7) 永井 進. 酵母の細胞工学と育種. 学会出版センター, p. 167-185 (1986).