

「細胞融合法による酵母 *Trichosporon* sp. X-19 の高次倍数体の形成と菌体外蛋白質生産への影響」西田 淑男\*<sup>1</sup>・山田 哲也・久松 眞・赤木 盛郎\*<sup>2</sup>(三重大学 農芸化学科 \*<sup>1</sup>倉敷紡織(株), \*<sup>2</sup>鈴鹿短期大学)Formation of Multiploid *Trichosporon* sp. X-19 by Cell Fusion Method and its Effect on Extra Cellular Protein ProductionYoshio NISHIDA\*<sup>1</sup>, Tetsuya YAMADA, Makoto HISAMATSU and Morio AKAKI\*<sup>2</sup>(Department of Agricultural Chemistry, \*<sup>1</sup>Kurashiki Spinning Mill, \*<sup>2</sup>Suzuka Junior College)

## 緒 言

微生物による蛋白質生産は高等動植物のそれと異なり工業的手段で行なえることから積極的に研究が進められている。菌体外蛋白質はその分離、精製が容易であり、菌体内蛋白質よりも利点が多いと考えられることから、既に、醸造食品などに利用され、親近感のある酵母による菌体外蛋白質生産に関する検討を進め、酵母 (*Trichosporon* sp. X-19 株) による菌体外蛋白質生産に関する報告を行なった<sup>1-6)</sup>。土壌から *Trichosporon* sp. X-19 株の細胞壁溶解酵素生産菌を分離して得られた酵素を用い、今回は *Trichosporon* sp. X-19 株のプロトプラストの形成、および本菌の菌体外蛋白質生産を高めることを目的としてプロトプラスト融合法により高次倍数体の造成を試みた。

## 実 験 方 法

## 1) プロトプラストの調整法

プロトプラストの調整法は主に山本ら<sup>7)</sup>の方法に従って行なった。すなわち YPG 培地 (0.4% 酵母エキス, 0.5% ポリペプトン, 3% グルコース, 0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 50ml に供試菌の一白金耳を接種し, 30°C 3日間静置培養を行ない, 対数初期~中期まで増殖させた菌体を遠心分離 (500~1000

rpm, 10分間) さらに数回洗浄して単細胞のみ採取した。単細胞を遠心分離 (3500 rpm, 15分間) により集菌し, 上澄みを捨て, 2ml の SEA 培地 (0.8M ソルビトール, 0.1mM EDTA, 0.1M 酢酸緩衝液 pH 5.6) に懸濁し, 0.1ml の 2-メルカプトエタノールおよび 0.1mM EDTA 溶液を添加後, 30°C 30分間往復振とうしながら前処理を行なった。

次に遠心分離 (3500 rpm, 15分間) により集菌後 2ml の SEA 培地に再懸濁し, 土壌から分離した細胞壁溶解酵素生産菌 (*Actinomadura spandix*), から得られた粗溶菌酵素標品 5mg/ml となるように加え, 30°C 3時間反応させてプロトプラストを調整した。

2) プロトプラスト融合法<sup>7)</sup> および再生方法<sup>8)</sup>

得られたプロトプラストは集菌後 3ml の SEA 培地に懸濁し, 遠心分離 (1000~2000 rpm, 5分間) 後遠心管上部から 2.3ml を採取した。この操作をくり返すことにより, 上部にはプロトプラストが, 下部には正常細胞が分離された。次に, プロトプラストを遠心分離 (3500 rpm, 15分間) により集菌後, 2ml の融合培地 (40% ポリエチレングリコール 6000, 0.8M ソルビトール, 50mM  $\text{CaCl}_2$ , 50mM Tris-HCl 緩衝液 pH 7.4) に懸濁後, 30°C 1時間往復振とうしながら融合させた。融合後, 融合用培地 (40% ポリエチレングリコール 6000 を除いたもの) 2ml を加え, 遠心分離 (3500 rpm, 15分間) により融合株を集め, ポリエチレングリコールを除いた融合培地で洗浄した。

酵母の再生は再生培地として Table 1 に示した MMA 培地<sup>8)</sup>で行なった。重層法に従って行なった。すなわち、融合株 0.1 ml をシャーレ中に既に層状にしてある MMA 培地に表面塗抹し、同じ培地をうすく重層し、30°C 1 ~ 2 週間培養を行なった。

Table 1. Composition of Regeneration Medium Minimal Medium Agar (MMA)

Glucose	20.0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 g
Yeast nitrogen base*	1.5 g
Agar**	30.0 g
Sorbitol	145.7 g
Water (distilled)	1000 ml

\* Difco Laboratories.

\*\* Kanto Chemical Co., Inc.

Table 2. Czapeck-Dox Modified Medium

Glycine	3.00 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.00 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.50 g
KCl	0.50 g
FeSO <sub>4</sub>	0.01 g
Glucose	30.0 g
Water (distilled)	1000 ml

Adjusted to pH 3.0 with 1 N HCl

### 3) 再生株の菌体外蛋白質生産性の検討

再生株の菌体外蛋白質生産性の検討は、主に中世古<sup>2)</sup>が蛋白質生産菌を分離した方法に従って行なった。すなわち、Table 2 に示した Czapek-Dox 改良培地に 2% の寒天を加え、100°C で 30 分間加熱し、あらかじめ滅菌したシャーレに分注し、冷却して平面培地を作成した。この培地に親株と再生株を各々一白金耳ずつ接種し、30°C 3 日間培養後、コロニーを水洗し除去後、0.5% トリクロロ酢酸を加えて白濁度を比較した。

### 4) DNA の抽出方法

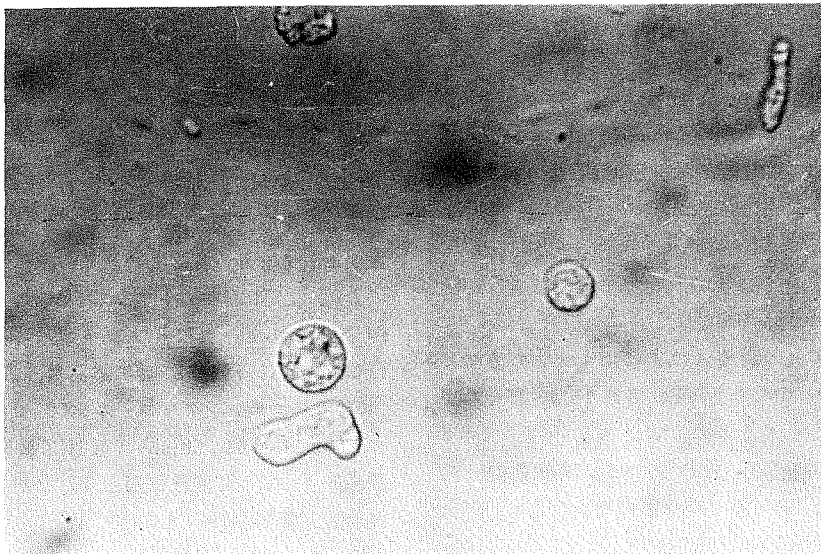
菌体からの DNA の抽出は Ogur, Rosen 法<sup>9)10)</sup> および, Schneider 法<sup>11-13)</sup> により行なった。

Ogur, Rosen 法では、実験方法 1) と同条件で培養し、単細胞のみを集め純水で 3 回洗浄し、 $1 \times 10^8$  個の菌体を用い DNA 画分を抽出した。

一方, Schneider 法では、上記と同様に培養後、洗浄した菌体  $5 \times 10^7$  個を用いて核酸部分を抽出した。

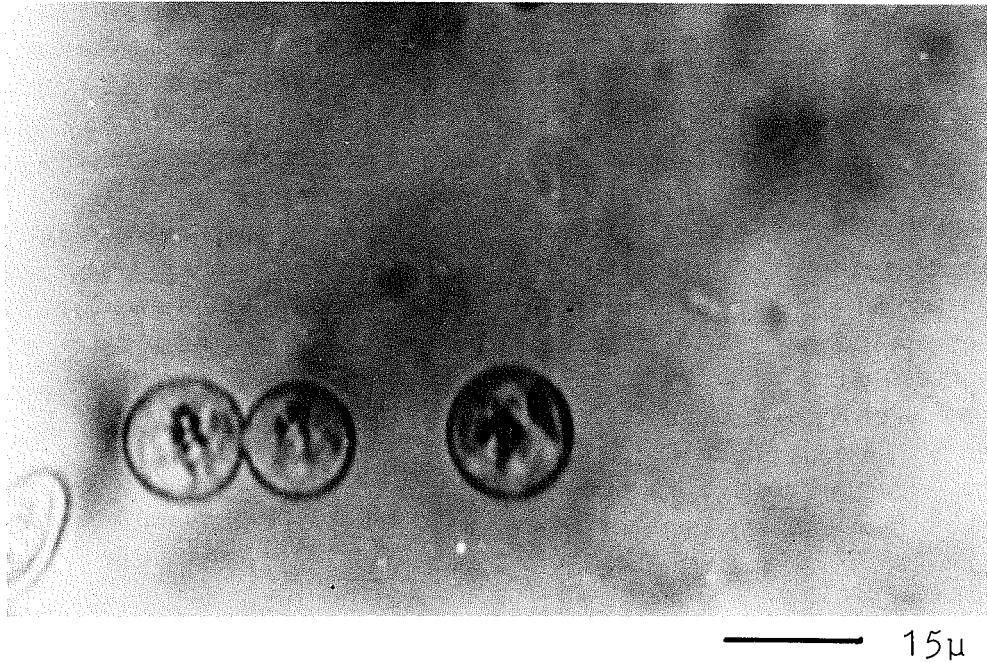
### 5) DNA の定量法

Ogur, Rosen 法で抽出した DNA 画分、および, Schneider 法で抽出した核酸部分を、DNA 中のプリンと結合しているデオキシリボースに対するジフェニルアミンの呈色反応の感度、特異性をアセトアルデヒドを加えることにより改良した Burton 法<sup>14)</sup> により定量した。



15μ

Photo. 1. Protoplast of *Trichosporon* sp. X-19 Strain before Fusion Process.

Photo. 2. Protoplast of *Trichosporon* sp. X-19 Strain after Fusion Process.

### 実験結果

1) プロトプラストの調整およびプロトプラスト融合。  
プロトプラストの調整には対数初期～中期の細胞を用いた結果、Photo. 1 のようなプロトプラストが得られた。

CaCl<sub>2</sub> 存在下、ポリエチレングリコール処理により融合させた際の写真を Photo. 2 に示した。この過程で細胞が2ヶ又はそれ以上のプロトプラスト融合（再生を含まない）が観察された。

2) 融合株の分離および菌体外蛋白質生産。

重層法で融合株の再生を行ない、30°C、1～2週間で生育してきた株を再生してきた株を再生株として114株分離した。再生株について平面培養法で蛋白質生産性を検討した結果、18株が一次選択され、Czapek-Dox 改良培地の液体培養法<sup>6)</sup>で検討した結果、菌体外蛋白質高生産株が1株得られた。この融合株と思われるものと親株とを比較した結果を Fig. 1 に示した。その結果、約1.3倍の菌体外蛋白質生産の向上がみられた。

3) 融合株のDNA含量。

菌体外蛋白質高生産株と親株の1細胞当たりのDNA含量を Ogur, Rosen 法および, Schneider 法により比較した結果を Table 3 に示した。その結果、親株に対し融

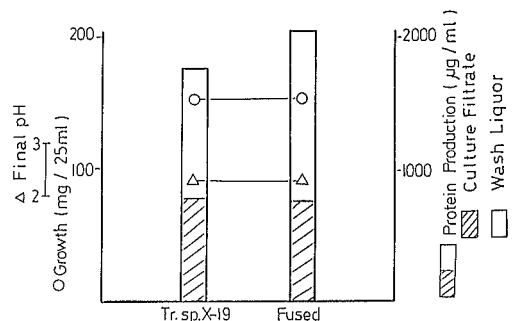
Fig. 1. Comparison of Protein Production (*Trichosporon* sp. X-19 and Fused).

Table 3. Content Ratio of DNA (in a cell)

	Ogur, Rosen Method	Schneider Method
<i>Trichosporon</i> sp. X-19	1.0	1.0
Fused Strain	2.0	2.2

合株と思われる株は Ogur, Rosen 法で2.0倍、Schneider 法で2.2倍であったため、融合株と思われるものは2倍体であることが明らかになった。菌体の大きさは原株と比較して顕著な差は見られなかったが、理論的に云えば

体積が2倍となるとした場合直径では1.26倍にしかならないため、統計的处理を行わない、目測では前述の結論は当然と云える。

### 考 察

今回の一連の実験操作に単細胞を  $6 \times 10^8$  を用いてプロトプラスト形成率60%，融合頻度  $3 \times 10^{-8}$  で融合株が得られた。融合頻度については、一般的に、酵母はカビや放線菌に比べ低く  $10^{-3} \sim 10^{-7}$  程度と言われているが、今回の場合は特に低かった。効率よく融合株を得るには、用いる菌株に応じて、プロトプラスト化、融合、再生の最適の条件を検討する必要があると思われた。

プロトプラスト化の段階では、2-メルカプトエタノールによる前処理は多くの報告で、有効であり、2-メルカプトエタノールのかわりにジチオスライツールやチオグリコレート、システインなどを用いる報告もあるが、2-メルカプトエタノールで前処理すると生菌体数が著しく減少する *Saccharomyces rouxii* は前処理を行わなくても細胞壁溶解酵素によく溶菌されるという報告もある。郡家<sup>15)</sup> は、*Saccharomyces* sp. のプロトプラスト形成率と再生率の関係を検討し、形成率40%で再生率60%，形成率80%で再生率10%となり、形成率を高めるほど再生率が低下することを報告している。今回、前処理を行っても生菌体数の減少はみられなかったが、プロトプラスト形成率を低くおさえれば再生率は向上するものと思われた。融合の段階ではポリエチレングリコールに代わる融合促進剤として植物の場合は、ポリビニルアルコールが良いとされ、これはポリビニルアルコールは細胞毒性が少ないという点でポリエチレングリコールより優れているため、酵母の細胞融合への応用も十分考えられた。さらに、電気パルスを与えると融合がおきる方法との併用も考えられた。再生の段階では寒天の濃度や温度が大きく影響する。今回再生培地の寒天濃度を3%としたが、これは、*Saccharomyces* sp. について検討した結果、最も再生率が良いとされる条件であるので、

供試菌株によりその最適条件が異なる可能性は存在する。

融合株の選択のために一般的には栄養要求性やプロトプラスト生成時にプラスミドを取り込ませた遺伝子マーカーなどによる再生選択培地を検討することで融合株の判別が容易になるが、今回は単なる倍数体の菌株を得る目的なのでこの操作は省略した。

得られた2倍体は、菌体蛋白質生産が1.3倍に増加したが、この融合株の核状態については核融合して単核になったか、ヘテロカリオンの状態かが問題であるが、DAPI (4'6-diamino-2-phenyl-indole) 染色による蛍光顕微鏡観察の必要があるので、現在検討中である。

### 文 献

- 1) AKAKI, M., Y. NAKASEKO. and T. YAMADA: Agric. Biol. Chem., **42**, 2391, 1978.
- 2) 赤木盛郎・中世古幸信・山田哲也：三重大農学報，第58号，123 (1979).
- 3) 赤木盛郎・中世古幸信・山田哲也：化学と生物，**18**(9)，607，(1980).
- 4) AKAKI, M., Y. NAKASEKO and T. YAMADA: The Bulletin of the Faculty of Agriculture, Mie Univ., **64**, 51, 1982.
- 5) FURUICHI, Y., T. TAKAHASHI, T. YAMADA and M. AKAKI: Nutr. Report Intern., **31**(2), 329, 1985.
- 6) 赤木盛郎・西田淑男・久松 眞・山田哲也：三重大農学報，第71号，97 (1985).
- 7) YAMAMOTO, M. and S. FUKUI: Agric. Biol. Chim., **41**, 1829 (1977).
- 8) Allmark, Barbara, M., Andrew. J. Morgan and Peter. A. Whittake: Molec. Gen. Genet., **159**, 297 (1978).
- 9) Ogur, M, Rosen. G.: Arch. Biochem., **25**, 262 (1950).
- 10) 渡辺 格，三浦謹一郎：「実験化学講座23. 生物化学I」，日本化学会編，1957，p. 284.
- 11) Schneider, W, C.: J. Biol. Chem., **164**, 747 (1946).
- 12) Herbert, D., P. J. Phipps and R. E. Atrange: Methods in Microbiology, vol. 5B, p. 324, Academic, 1971.
- 13) 「微生物学実験法」微生物研究法懇談会編，講談社，1976，p. 260.
- 14) Burton, K.: Biochem. J., **62**, 315 (1965).
- 15) Gunge, N.: J. Genet. Japan., **53**, 42 (1978).

### Summary

A trial of formation of multiploid *Trichosporon* sp. X-19, yeast, by cell fusion method was conducted for promotion of extra cellular protein (ECP) production.

The protoplast of yeast for cell fusion was prepared by treatment with a cell wall lytic enzyme which had been prepared from a culture broth of *Actinomadura spandix* newly separated from soil.

It was estimated by DNA analysis that the fused yeast cell had twice the DNA content of the original cell.

With the ECP production test, an increase in production of about thirty percent over the original was observed in the fused yeast culture.