

酵母, *Trichosporon* X-19菌, 菌体外蛋白質生産に 及ぼすアルギニン濃度の影響

山田 哲也, 西田 淑男*, 久松 眞, 赤木 盛郎**

(三重大大学農学部, 農芸化学科, *倉敷紡績株式会社(現在), **鈴鹿短期大学(現在))

緒 言

微生物による蛋白質生産は高等動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ってきた¹⁻⁷⁾。今回はアルギニン濃度の蛋白質生産への影響及びその時の菌体の形態変化について検討した。

実 験 方 法

1. アルギニン濃度が蛋白質生産に及ぼす影響

1) 培地組成

菌体外蛋白質の培地としては, Table 1 の Czapek-Dox 改良培地を基本培地とした。グリシン (0.3%) をアルギニンに代え, その濃度を0.1%, 0.211% (グリシン0.3%に相当), 0.5%, 1%, 3%, 5%とした。培地は1 N HCl で初発 pH 5 に調整した。

Table 1 Czapeck-Dox Modified Medium

Glycine	3.00 g
K ₂ HPO ₄	1.00 g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0.50 g
KCl	0.50 g
FeSO ₄	0.01 g
Glucose	30.0 g
Water (distilled)	1000 ml
adjusted to pH 3.0 with 1 N HCl	

2) 培養条件

新鮮な斜面培地から一白金耳をとり100ml容三角フラスコ中の YM 培地¹⁾ 25mlに接種し, 30°C, 24時間, 回

転振盪機 (160rpm) で前培養後, その0.2mlを100ml容三角フラスコ中の Czapek-Dox 改良培地25mlに接種し, 30°C, 48時間同一振盪条件で培養した。

3) 蛋白質の抽出と定量

培養終了後培養液を濾過 (東洋濾紙No.2) して菌体と培養濾液に分離し, 菌体は0.05 N NaOH 25mlを加え攪拌後, 同一条件で濾過を行ないアルカリ洗浄液を得た。これと培養濾液にそれぞれトリクロル酢酸 (TCA) を終濃度7%になるように加え, 生じた沈澱を遠心分離で集めてさらに5% TCA で洗浄した後, この沈澱を0.1 N NaOH25mlに溶解し, Itzhaki & Gill のマイクロビュレット法⁸⁾で蛋白質の定量を行なった。

2. アルギニン濃度変化時の菌体の走査型電子顕微鏡観察

アルギニン濃度を0.1%, 0.211%, 0.5%, 1%, 3%, 5%にしたCzapek-Dox 改良培地で1,2)と同様に培養し, 濾過により集めた菌体を純水で3回洗浄し, 下記に従って固定操作を行い観察した。

- 1) 5%グルタルアルデヒドに0.2% (W/V) となるようにタンニン酸を加え, 室温で約6時間処理した。
- 2) 5%グルタルアルデヒドに2% (W/V) となるようにタンニン酸を加え, 室温で6時間~15時間処理した。
- 3) 1時間水洗した。
- 4) 1% OsO₄水溶液中で3時間~15時間処理した。
- 5) 1時間水洗した。
- 6) エタノール脱水 (30%, 50%, 70%, 90%, 95%) を各20分間行なった。
- 7) 100%エタノール中で3回各30分間脱水処理した。
- 8) 酢酸イソアミル処理として, エタノール: 酢酸イソアミル = 1 : 1 の溶液中で3回各10分間処理した後, 酢酸イソアミル中で3回各10分間処理した。

9) 臨界点乾燥後、金の厚さが200Åになるように金蒸着を行ない試料した。

観察は HITACHI HHR-2 Xを使用し、加速電圧15 KV で行なった。

3. アルギニン濃度変化時の菌体の透過型電子顕微鏡観察

1,2) と同様に培養、処理した菌体を下記に従って固定、包埋、および超薄切片作成操作を行ない観察した。

固定操作

菌体を2%素寒天になすりつけ、その上に固まる直前温度の2%素寒天を流し、菌体を寒天のサンドイッチとした。この切片を1% KMnO_4 水溶液で1時間処理後、1時間水洗した。次に1% OsO_4 水溶液で3時間処理した。1時間水洗後、エタノール脱水処理として30%, 50%, 70%, 90%と順次濃度を上げて各10分間処理後、100%エタノール中で3回各10分間処理して完全脱水した。

2) 包埋操作

脱水後、切片をプロピレンオキシドで3回各10分間処理した。切片を Table 2 に示したエポキシ樹脂混合液とプロピレンオキシドの等量混合液中で攪拌後、密栓して12時間室温で放置した。プロピレンオキシド樹脂混合液を捨てた後、樹脂混合液のみを入れ室温で12時

間放置し浸透させた。切片をゼラチンカプセルに入れ樹脂混合液を流し込んで1晩室温で放置後、45°Cで12時間、次いで24時間熱重合させた。

Table 2 Composition of Epoxy Resin

Epon 812 (Quetol 812)	7.0ml
DDSA (Dodecenyl Succinic Anhydride)	6.0ml
MNA (Methyl Nadic Anhydride)	5.0ml
DMP-30 (Tri-Dimethyl Aminomethyl Phenol)	0.25ml

3) 超薄切片作成

ミクロトームを使用し、ガラスナイフで切片の厚みが500Å以下になるように超薄切片を作成した。(180Åメッシュのグリッドを使用した。)

電子顕微鏡観察は HITACHI H-700Hを使用し、加速電圧100 KV、フィラメント電流15 μA で行なった。

結 果

1. アルギニン濃度が蛋白質生産に及ぼす影響

アルギニン濃度を变化させ培養した結果を Fig. 1 に示した。その結果アルギニン濃度が0.211%~0.5%で蛋白質生産が最大となり、それ以上になると蛋白質生産が低下した。

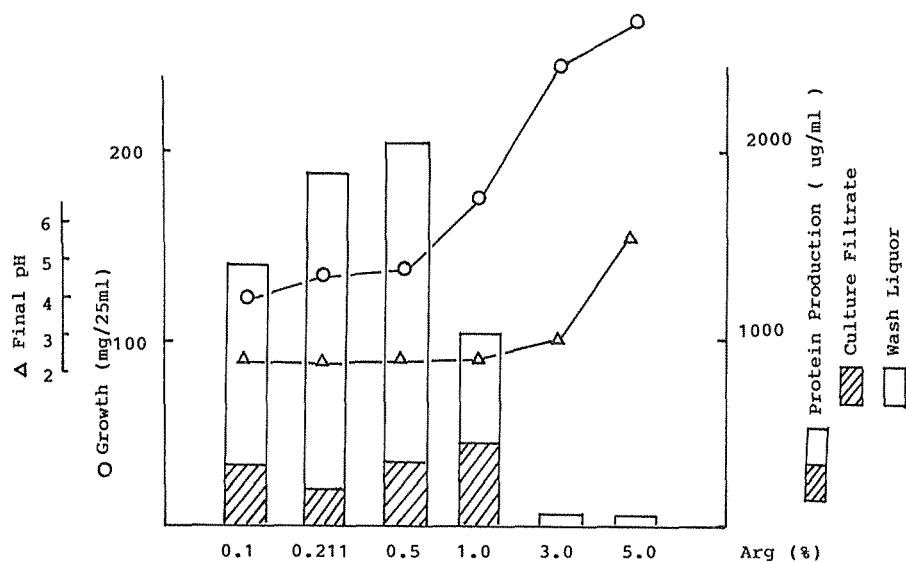


Fig.1 Effect of arginine on protein production by the yeast

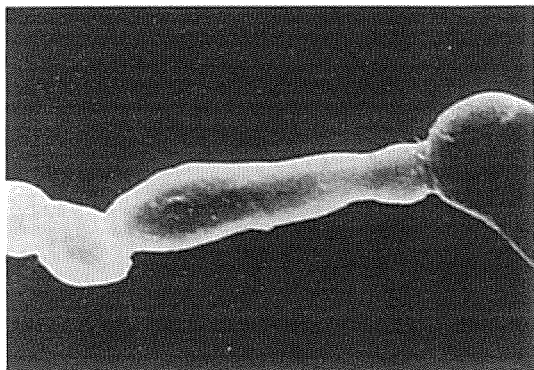


Photo. 1. SEM of Cell (*Trichosporon* sp. X-19)
Arginine 0.15% (X2500)

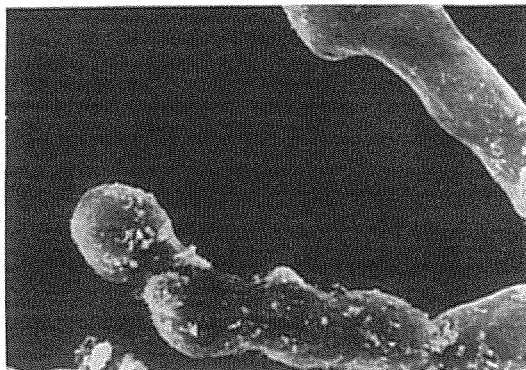


Photo. 2. SEM of Cell (*Trichosporon* sp. X-19)
Arginine 0.211% (X2500)

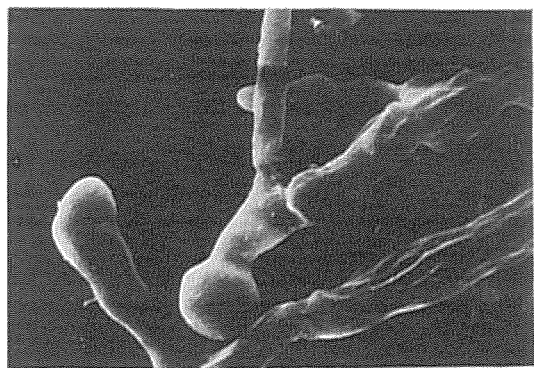


Photo. 3. SEM of Cell (*Trichosporon* sp. X-19)
Arginine 0.5% (X2500)

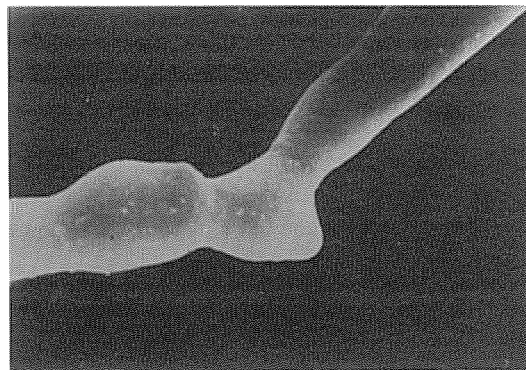


Photo. 4. SEM of Cell (*Trichosporon* sp. X-19)
Arginine 1.0% (X2500)

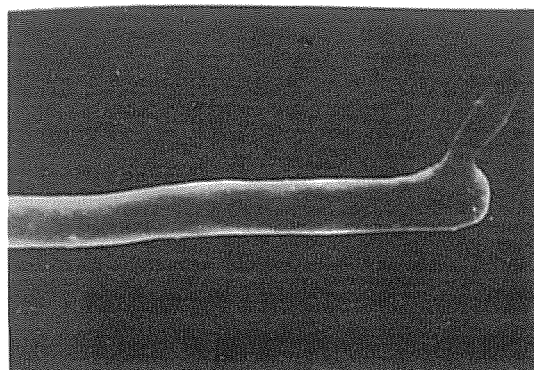


Photo. 5. SEM of Cell (*Trichosporon* sp. X-19)
Arginine 3.0% (X2500)

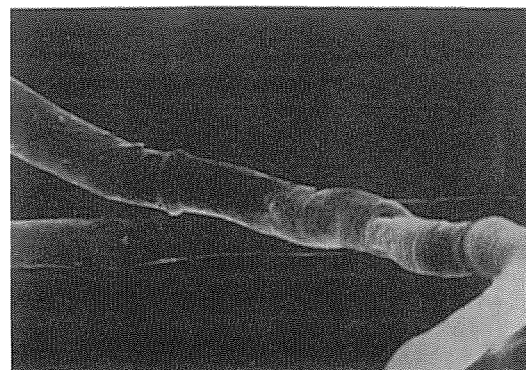


Photo. 6. SEM of Cell (*Trichosporon* sp. X-19)
Arginine 5.0% (X2500)

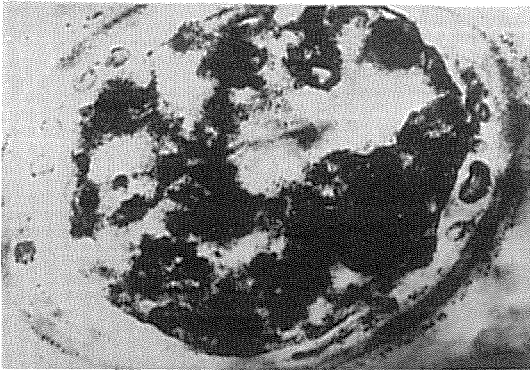


Photo. 7. TEM of Cell (*Trichosporon* sp. X-19)
Arginine 0.15% (X21000)

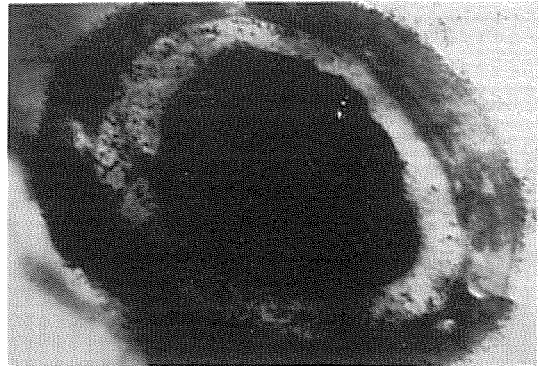


Photo. 8. TEM of Cell (*Trichosporon* sp. X-19)
Arginine 0.211% (X21000)

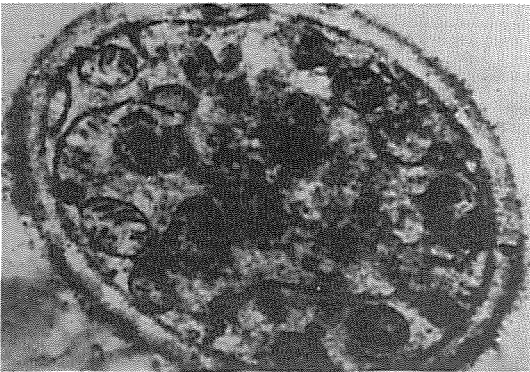


Photo. 9. TEM of Cell (*Trichosporon* sp. X-19)
Arginine 0.5% (X18000)

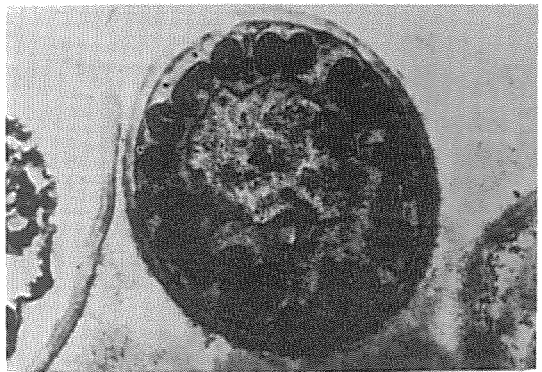


Photo. 10. TEM of Cell (*Trichosporon* sp. X-19)
Arginine 1.0% (X10000)

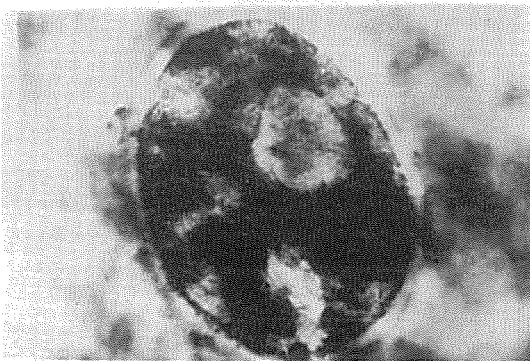


Photo. 11. TEM of Cell (*Trichosporon* sp. X-19)
Arginine 3.0% (X15000)

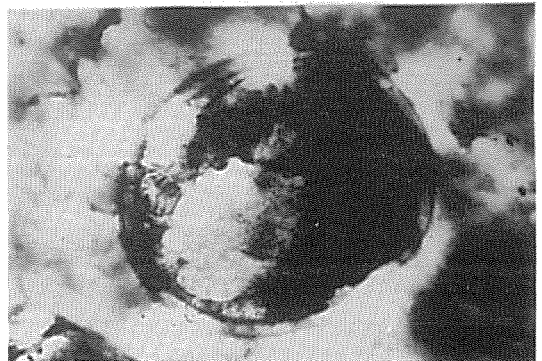


Photo. 12. TEM of Cell (*Trichosporon* sp. X-19)
Arginine 5.0% (X10000)

2. アルギニン濃度変化時の菌体の走査型電子顕微鏡観察

各種培養条件の観察結果を photo. 1~6 に示した。その結果アルギニン濃度が0.5%までは分泌物と思われる付着物と細胞の変形度（異常肥大細胞の出現率）は増加していたが、これ以上にアルギニン濃度が増加すると分泌物と思われる付着物や細胞の変形度がかえって減少していくことが観察され、菌体外蛋白質生産結果と一致した結果となった。

3. アルギニン濃度変化時の菌体の透過型電子顕微鏡観察

各種培養条件の酵母の観察結果を photo. 7~12 に示した。菌体の切断部位により同一菌体でもかなりの差が生ずるので本報告に採用した切片写真はできるだけ中央部位での切片とした。総括的に云ってアルギニン濃度が0.211%, 0.5%で培養したものは細胞部分の像が濃いことから密である、と推定され、低濃度および高濃度では淡いことより粗である、と推定された。又0.211%と0.5%での培養菌体に原形質分離をおこしている細胞の率が高かった。但し、photo 9 に示した0.5%培養菌体切片は原形質分離は観察されなかったものである。中央部に於ける切片は photo 7~12 に示した様に細胞壁の厚みが殆ど同一であることを示している。

考 察

本酵母による菌体外蛋白質生産がみられた培地の窒素源中、アルギニンのみ初発 pH が6でも生産が可能であること、初発 pH 2~5 の範囲で生産性も殆んど変わらないことを既に報告しているが、このことは鶴高⁹⁾らのバクテリアによる菌体外蛋白質生産においてグリシンやイソロイシンが生産性に影響を与えること、又、特にグリシンがバクテリアの細胞壁の構造を変化させることの報告と考え併せると、本酵母においてもアルギニン濃度の増大により酵母の細胞壁構造に何らかの変化を来とし、その結果として生産性が向上することが当初示唆されたので、本実験を行なったのである。結果は予期したものと異なり、アルギニン1%以上ではむしろ生産性は減少すること、又、細胞の形状も正常化すること、そしてアルギニンの増加に伴ない生育度も著しく増加することが認められた。

更に、電子顕微鏡により、菌体外蛋白質生産時と非生産時とでは、菌体の変形度や菌体外蛋白質の一部と思わ

れる付着物の量に大きな差が見られたが、細胞切断面での細胞壁部分の厚みは変化が見られなかった。しかし、写真で見られる如く、両者の細胞壁の濃淡にかなりの差があることから密度が異なると考えられ、この差が菌体外蛋白質によると考えると菌体外蛋白質は主として細胞壁中に蓄積されるものと推定された。この事は菌体外蛋白質生産時の培養菌体のアニリンブルー染色性試験の結果からも支持された。アルカリ洗浄により菌体外蛋白質を抽出後の細胞壁はアニリンブルー染色性を著しく減じており本蛋白質が着色性の良いことと考え併せると本蛋白質の細胞壁内蓄積を示唆するものである。

鶴高らは、^{9,10)} 蛋白質生産性の高いグラム陽性菌の研究を進展させた過程で、細胞壁構造と蛋白質分泌の関係を追究し、蛋白質生産のメカニズムを明らかにしている。さらに異種遺伝子導入による蛋白質生産の宿主として、この蛋白質生産菌を用い成功している。この点から本酵母の遺伝子工学への利用が期待されるが、本酵母の場合、菌体外蛋白質生産時にはかなりの頻度で原形質分離が観察されることから細胞壁の変化以外に細胞膜、又細胞内部も変化していることが示唆されるが、アルギニン濃度がある程度以上に上昇するとこれが解消されると云う結果から、前述のバクテリアの分泌機構とかなり異なるメカニズムにより菌体外蛋白質生産が制御されているものと考えられる。アルギニン濃度が、ある一定の範囲でのみ有効であり、高濃度で正常化する事実は非常に興味深く、植物ホルモンの生理作用と類似している。しかし、余りに濃度に違いがあるので、いわゆる「トリガー」ではなく、本質的な代謝過程での変化が原因していると考えられる。

文 献

- 1) M. AKAKI, 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) M. AKAKI, Y. NAKASEKO and T. YAMADA : *The Bulletin of the Faculty of Agriculture, Mie Univ.*, **64**, 51, 1982
- 5) Y. FURUICHI, 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) 西田淑男，山田哲也，久松 眞，赤木盛郎：三重大学農学部学術報告 73号 75 (1986)
- 8) R. F. ITZHAKI and O. M. GILL: *Anal. Biochem.*, **9**, 401 (1964)
- 9) S. MIYASHIRO, H. ENEI, Y. HIROSE and S. UDAKA : *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 105 (1980)
- 10) S. UDAKA : *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 523 (1976)
- 11) S. MIYASHIRO, H. ENEI, K. TAKINAMI, Y. HIROSE, T. TSUCHIDA and S. UDAKA : *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2297 (1980)
- 12) H. YAMADA, N. TSUKAGOSHI and S. UDAKA : *J. Bacteriol.*, **148**, 322 (1981)
- 13) A. TSUBOI, N. TSUKAGOSHI and S. UDAKA : *J. Bacteriol.*, **151**, 1485 (1982)
- 14) H. OHMIZU, T. SASAKI, N. TSUKAGOSHI, S. UDAKA, N. KANEDA and K. YAGI : *J. Biochem.*, **94**, 1077 (1983)
- 15) N. TSUKAGOSHI, H. IHARA, H. YAMAGATA and S. UDAKA : *Mol. Gen. Genet.*, **193**, 58 (1984)
- 16) W. TAKAHASHI, H. YAMAGATA, K. YAMAGUCHI, N. TSUKAGOSHI and S. UDAKA : *J. Bacteriol.*, **156**, 1130 (1983)
- 17) T. TSUKAGOSHI, R. TABATA, T. TAKEMURA, H. YAMAGATA and S. UDAKA : *J. Bacteriol.*, **158**, 1054 (1984)

Effect of Arginine Concentration on Extra Cellular Protein Production by Yeast, *Trichosporon* X - 19

Tetsuya YAMADA, Yoshio NISHIDA*, Makoto HISAMATSU
and Morio AKAKI**

(Department of Agricultural Chemistry, Mie University,
*Kurashiki Spinning Mill, **Suzuka Junior College)

Summary

We reported in the previous paper that the yeast, *Trichosporon* X - 19, produced extra cellular protein (ECP) when it was cultured in an acidic environment. However, adoption of arginine as a nitrogen source for the medium made it possible for the yeast to produce ECP even though in a neutral environment.

Having proven that high concentration glycine modified and collapsed bacterial membranes, we discussed the effect of arginine concentration on the ECP production and cell membrane construction of the yeast. To summarize our findings : arginine acted differently from glycine, that is, an arginine concentration of 0.2-0.5% gave maximum ECP production, however in the high concentration medium only poor ECP production was observed. Observation of the yeast cells under an electron microscope (SEM and TEM) also revealed apparent abnormalities, such as protoplasmolysis, in the cells cultured in the medium containing 0.2-0.5% arginine. In contrast, hardly any abnormalities were observed in the cells cultured in the medium containing under 0.1% or over 1% arginine.