

プロトプラスト融合法による *Rhodosporidium* sp.
J-5B 株の高次倍数体の造成*

赤木盛郎・河村龍二郎**・山田哲也***

**Formation of Multiploid *Rhodosporidium* sp.J-5B
by Cell Fusion Method**

Morio AKAKI, Ryuziro KAWAMURA** and Tetsuya YAMADA***

緒 言

赤木らは、自然界より澱粉資化性酵母の分離検索を行い、澱粉工場の土壌から資化能のすぐれた赤色酵母を得、紫外線照射による変異株を誘起し、菌体外アミラーゼ生産の向上を検討した結果、野性株J株の第二代変異株J-5B株は、親株の10倍に相当するアミラーゼを菌体外に生産することおよび本菌の生産する酵素の諸性質につき報告した。^{1,2)} また、この菌体外アミラーゼ生産のすぐれた赤色酵母の親株の同定を行い *Rhodosporidium* sp.とした³⁾。さらに、澱粉資化性酵母 *Rhodosporidium* sp.J-5B株の遺伝学的改良、育種的手段としてプロトプラスト融合法を考え、本菌を溶菌する溶菌酵素生産菌の検索を試みた結果、すぐれた溶菌酵素生産菌39-5B株を得た⁴⁾。この報告では、得られた溶菌酵素を用い、*Rhodosporidium* sp.J-5B株のプロトプラスト形成、プロトプラスト融合法による高次倍数体の造成を試みた。

実験の部

1. 実験方法

1・1 プロトプラストの調製法

プロトプラストの調製は山本ら⁵⁾の方法に従って行った。YM倍地(0.4%酵母エキス, 0.5%

*澱粉資化性酵母に関する研究

**持田製薬株式会社

***三重大学

ポリペプトン, 3%グルコース, 0.5%KH₂PO₄, 0.2%MgSO₄·7H₂O) 50 ml に供試菌の一白金耳量を接種し, 30℃, 3日間静置培養を行い, 対数期初期~中期まで増殖させた菌体(約2×10⁸個)を遠心分離(4000rpm, 10分間)により集菌し, 上澄を捨て, 2 mlのSEA培地(0.8M Sorbitol, 0.1mM EDTA, 0.1M酢酸緩衝液, pH5.6)に懸濁し, 0.1 mlの2-メルカプトエタノールおよび0.1 mlの0.1M EDTA 溶液を添加後, 30℃, 30分間往復振とうしながら前処理を行った。次に遠心分離(4000rpm, 10分間)により集菌後, 2 mlのSEA培地に再懸濁し, 粗溶菌酵素5mg/mlとなるように加え, 30℃, 3時間反応させプロトプラストを調製した。

1・2 プロトプラスト融合法⁵⁾, 再生法⁶⁾

前述の如くして得られたプロトプラストは, 集菌後3 mlのSEA培地に懸濁し, 1500~2500rpm, 5分間の遠心後, 遠沈管の上部から2 mlを静かに採取した。この操作を数回繰り返すことにより, 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(4000rpm, 15分間)により集菌後, 2 mlの融合用培地(40%ポリエチレングリコール6000, 0.8M Sorbitol, 50mM CaCl₂, 50mM Tris-HCl 緩衝液, pH7.4)に懸濁後, 30℃, 1時間往復振とうしながら融合を行った。

融合後, 融合培地(ただし40%ポリエチレングリコールを除く)2 mlを加え, 遠心分離(3000rpm, 10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後, 再生培地において30℃, 1~2週間培養を行った。再生はTable 1に示したCMA培地⁶⁾, およびMMA培地⁶⁾を用いて行った。融合株の懸濁液0.1 mlを, あらかじめ滅菌シャーレに調製したCMA培地およびMMA培地に表面塗抹し, それぞれ同じ培地をうすく重層する重層法による。

Table 1. Composition of Regeneration Medium.

Complete Medium Agar (CMA)	
Glucose	20.0g
Polypepton *	10.0g
Yeast extract **	10.0g
Agar ***	30.0g
Sorbitol	145.7g
Dist. water	1000 ml
Minimal Medium Agar (MMA)	
Glucose	20.0g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5g
Yeast nitrogen base ****	1.5g
Agar ***	30.0g
Sorbitol	145.7g
Dist. water	1000 ml

* : Daigo Eiyō Kagaku Co., Ltd.

** : Daigo Eiyō Kagaku Co., Ltd.

*** : Kanto Chemical Co., Inc.

**** : Difco Laboratories.

1・3 DNAの抽出および定量

DNAの菌体からの抽出はOgur, Rosenの方法^{7,8)}に準じて次に示した方法によった。

- ① 30 mlのYM培地(麦芽エキス0.3%, 酵母エキス0.3%, ポリペプトン(大五栄養製)0.5%, グルコース1%)に供試菌の白金耳量を接種し, 30℃, 3日間, 160rpmの振とう培養を行い, 遠心分離(4000rpm, 15分間)により集菌後, 純水で3回洗浄し, 菌体を純水に懸濁させその濃度がやく 1×10^8 cells/mlになるようにした。次にThomaの血球計算器により細胞数を計測し, 細胞数 5×10^8 個相当を採取し試料菌体とした。
次に冷70%エタノールに懸濁後遠心し, 残分を冷70%エタノール(0.1% PCAを含む)に再懸濁させ遠心分離した。
- ② 操作①の残分を5 mlのエタノールエーテル混液(3:1)に懸濁させ, 沸石を入れ湯浴中(60~70℃)で加温し, 内容物を約3分間沸騰させた。次に遠心して上澄を除去し, この操作を2回繰り返した。
- ③ 操作②の残分に5 mlの冷0.2N PCAを加えすばやく遠心した。この操作をさらに一度すばやく行った。
- ④ 操作③の残分を5 mlの1N PCAに懸濁後, 4℃, 18時間放置しRNAの抽出を行った。次に遠心分離して残分を冷1N PCA 5 mlでさらに2回抽出した。
- ⑤ 操作④の残分を5 mlの0.5N PCAに懸濁させ湯浴中(70℃)で20分間加熱し, DNAの抽出を行った。次に遠心分離し, この操作をさらに一度繰り返し, 抽出液を集め, 10 mlとしてDNAの定量を行った。

DNAの定量は, 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⁹⁾により行った。

標準DNAにはSalmon Sperm(和光純薬)を使用し, 以下に示した試薬および操作法を用いた。

試薬はジフェニルアミン1.5 gを特級氷酢酸100 mlに溶解し1.5 mlの濃硫酸を加えた溶液(冷暗所保存)20 mlに対し, 使用前に0.1 mlのアセトアルデヒド水溶液(16mg/ml)を加えて調製した。

試料溶液2.0 ml(DNA 5~100 μ gを含む)に試薬4 mlを加え, 30℃で16~20時間放置後600nmの吸光度を測定した。

2. 実験結果

2・1 プロトプラストの調製

対数期初期の細胞と対数期後期の細胞および前処理の有無により10~15%のプロトプラスト形成率の差がみられた。プロトプラスト形成率は低張液中での660nmにおける濁度減少率で測定した。したがってプロトプラスト調製の際には対数期初期の細胞を用い, 前処理を行うこと

が望ましいと考えられた。本菌のプロトプラストを Photo. 1, Photo. 2 に示した。

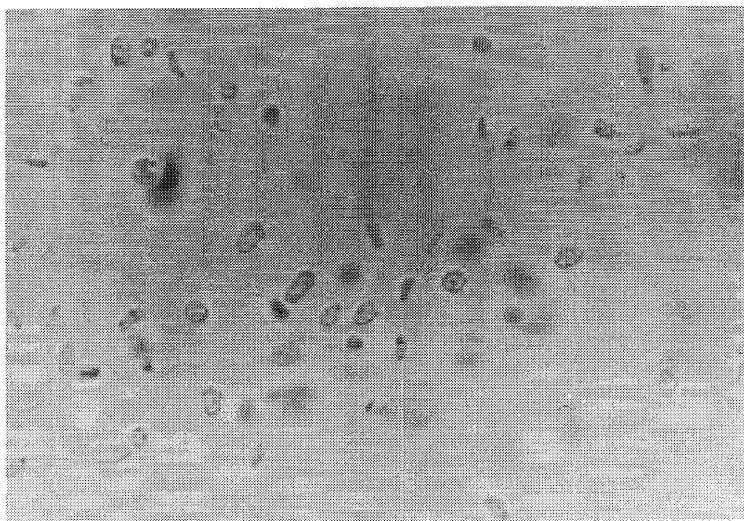


Photo. 1. Protoplast of *Rhodosporidium* sp.
J-5B Strain before Fusion Process.

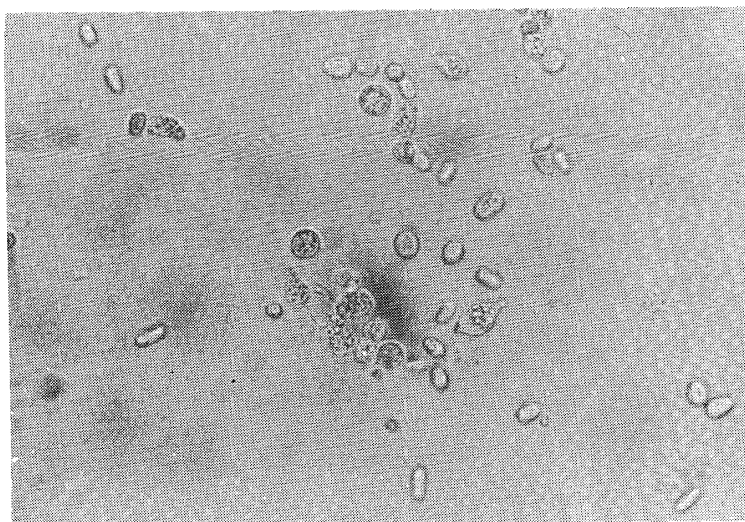


Photo. 2. Protoplast of *Rhodosporidium* sp.
J-5B Strain before Fusion Process.

2・2 プロトプラストの融合および融合株の分離

CaCl₂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. 3 に示した。

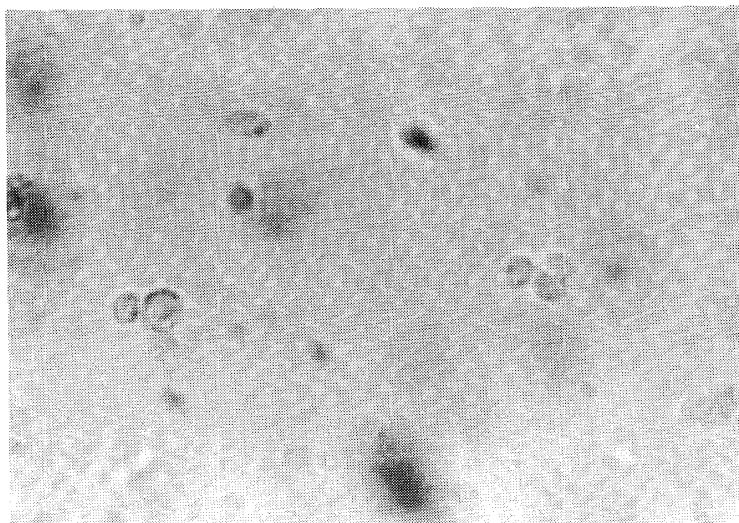


Photo. 3. Protoplast of *Rhodosporidium* sp.
J-5B Strain after Fusion Process.

写真からも明らかなように, 2つまたはそれ以上のプロトプラストの融合が観察された。また再生培地で培養したところ Photo. 4 に示したように, 融合株と思われる株のコロニーは他に比べ非常に大きく, 増殖速度が速く, またコロニーの色調も他のものはカロチノイド系色素様

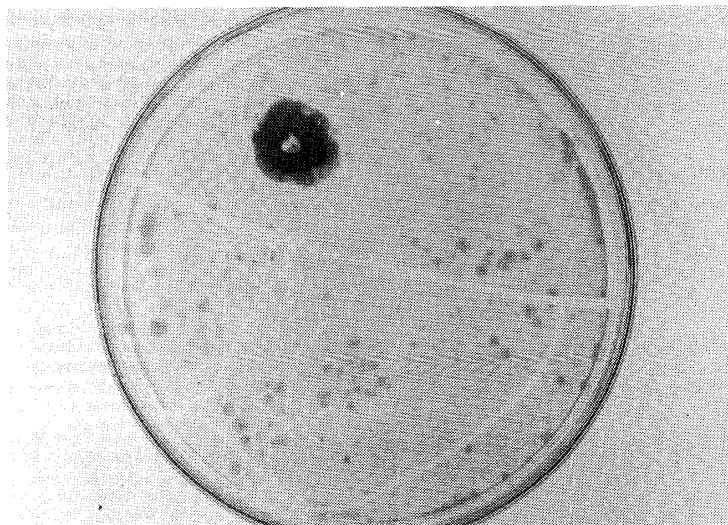


Photo. 4. Colony of Regeneration Strain.

Cultural condition: cultivation on MMA medium at 30°C for 7 days.

のオレンジ色であったが, 融合株のコロニーは黒色に観察された。以上の点と, 細胞の大きさから融合株と思われる3株を分離し, F-1, F-2, F-3株として以後の実験に使用した。

2・3 融合株の観察と DNA 含有量

親株 *Rhodosporidium* sp. J-5B 株および融合株を YPG 培地に 30°C, 3日間, 160 rpm の振とう培養した際の菌体の写真を Photo. 5 ~ Photo. 10 に示した。

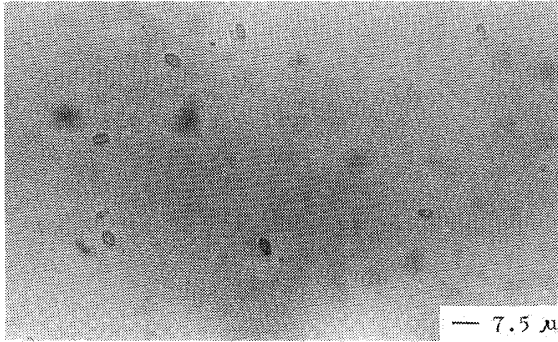


Photo. 5. *Rhodosporidium* sp. J-5B Strain.
Cultural condition: cultivation in YPG medium
at 30°C for 3 days.



Photo. 6. F-1 Strain.
Cultural condition: cultivation in YPG medium
at 30 °C for 3 days.

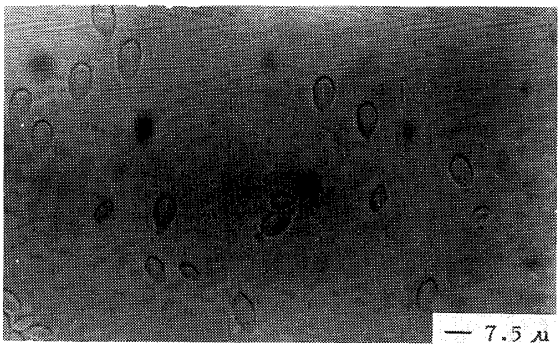


Photo. 7. F-2 Strain.
Cultural condition: cultivation in YPG medium
at 30°C for 3 days.

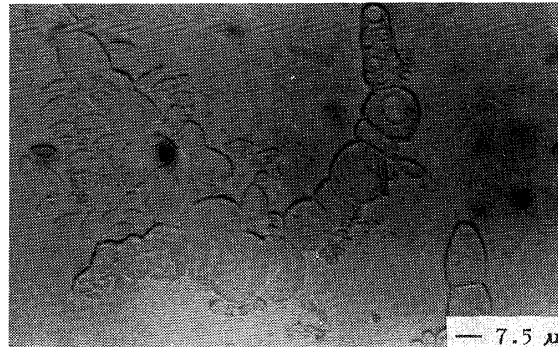


Photo. 8. F-2 Strain.
Cultural condition: cultivation in YPG medium
at 30°C for 3 days.



Photo. 9. F-3 Strain.
Cultural condition: cultivation in YPG medium
at 30°C for 3 days.

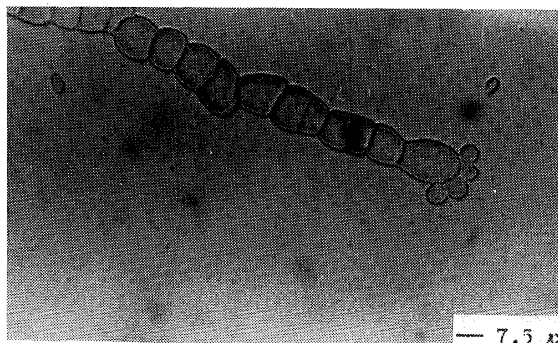


Photo. 10. F-3 Strain.
Cultural condition: cultivation in YPG medium
at 30°C for 3 days.

写真からも明らかなように、融合株の細胞は親株同様楕円形で多極出芽増殖を示したが、細胞の大きさは直径で親株の約2.5～3倍の大きさを示した。その他、Photo. 8およびPhoto.10に示したような異状に肥大した奇形とも考えられる菌糸をのばし、菌糸からも多数の単細胞の出芽がみられた。

DNAの含有量の測定結果をTable 2に示した。

Table 2. Deoxyribonucleic Acid Content in Yeast Cell.

Strain	<i>Rhodosp.</i> sp. J-5B	F-1	F-2	F-3
Content of DNA ($\mu\text{g}/10^8\text{cells}$)	4.1	15.5	18.4	16.7
Relative content of DNA	1.0	3.8	4.4	4.1

その結果、融合株F-1, F-2, F-3は単位細胞数当たり親株の約4倍のDNA含量を示し4倍体であることが分かった。

考 察

本研究の一連の実験操作により、プロトプラスト形成率65%、プロトプラスト再生率CMA培地7%、MMA培地4%、融合頻度(融合株数/再生プラスト数)CMA培地 2×10^{-7} 、MMA培地 1×10^{-8} で融合株F-1, F-2, F-3が得られた。

プロトプラスト化の段階では、前処理の有無によりかなり形成率に差があった。未処理の場合には形成率約40%であったが、処理することにより約65%まで形成率を高めることが可能であった。これは、高濃度の2-メルカプトエタノールにより、細胞壁を構成するタンパク質のジスルフィド結合を切り、プロテアーゼの作用を容易にしているためと考えられた。郡家¹⁰⁾は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%と形成率を高めるほど再生率が下がると報告しているが、本実験で再生率が低かったのは、プロトプラスト化処理または再生方法の検討がさらに必要と考えられた。すなわち、酵素処理されたプロトプラストは再生の際細胞壁を生合成するが、酵素処理により完全に細胞壁が除去されたものより、細胞壁が若干存在しているいわゆるスフェロプラストの方が再生しやすいと考えられるので、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考えられる。また本実験では再生培地の寒天濃度を3%としたが、この濃度は*Saccharomyces* sp.について検討された結果、もっとも再生率のよ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とも考えられるので、寒天濃度についての検討も必要と考えられ、さらに今回の実験で偶然にも融合株のコロニーが親株のコロニーに比べ色調が濃く、黒色に近いことを見

い出し、融合株を選択することができたが、栄養要求性などの遺伝マーカーによる選択培地を考慮に入れることで融合株を選択する方が容易に確実に融合株が得られると考えられた。融合頻度については一連の操作条件が相互に関与していると思われる、融合頻度を考慮して各段階の処理条件を検討する必要がある。菌体外酵素生産には構造遺伝子、制御遺伝子以外の制御機構が考えられている。

要 約

Rhodospiridium sp. J-5B 株の高次倍数体の造成をプロトプラスト法により試みた結果、融合頻度 3×10^{-7} で 4 倍体を得られた。

文 献

- 1) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 山田哲也, 中尾孝子: 本誌, 10, 1 (1990)
- 2) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 山田哲也, 中尾孝子: 本誌, 11, 81 (1991)
- 3) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 山田哲也, 中尾孝子: 本誌, 11, 91 (1991)
- 4) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 山田哲也, 岡野節子: 本誌, 12, (1991)
- 5) M.YAMAMOTO and S.FUKUI: *Agric. Biol. Chem.*, 41, 1829 (1977)
- 6) B.M.ALLMARK, A.J.MORGAN and P.A.WHITTKE: *Molec. gen. Genet.*, 159, 297 (1978)
- 7) OGUR, M, ROSEN, G.: *Arch. Biochem.*, 25, 262 (1950)
- 8) 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, p284
- 9) K.BURTON: *Biochem. J.*, 62, 315 (1956)
- 10) N.GUNGE: *J. Genet. Japan.*, 53, 42 (1978)
- 11) 池田庸之助著: 微生物遺伝学, 地球社, 1975, p265