

Trichosporon sp. X-19株溶菌酵素の生産菌について*

赤木盛郎 ・西田淑男**
山田哲也*** ・久松 眞***

On the Microbes that Produce Yeast Cell (*Trichosporon* sp. X-19)Lytic Enzyme

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

緒 言

微生物による蛋白質の生産は、将来の人類の課題のひとつである蛋白質源取得の一方法として注目され、世界各国で関心がもたれている。

現在まで主に研究されている微生物起源の蛋白質は菌体内蛋白質であり、微生物が菌体外に生産する蛋白質は酵素以外では、鶴高ら^{1,2)}の細菌についての報告および上田ら^{3,4)}がRNA高生産株で形質転換手法の導入により菌体外に多量の蛋白質を生産する菌株を得た報告などが散見される程度である。

菌体外蛋白質は、その分離、精製が安易なこと、蛋白質以外に夾雑物が混入する可能性が少ないことなどから菌体内蛋白質よりも利点が多い。赤木らは菌体分離の安易さとすでに種種食品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ついて一連の研究を進めてきた。

本報告で使用した酵母は、キシロース資化性酵母として赤木が果実から分離した株で、菌体外に蛋白質を生産し、同定の結果、*Trichosporon*属の新種 *Trichosporon* sp. X-19⁵⁾と命名されている。

分子生物学、分子遺伝学の急速な進歩に伴い、新しい育種法が開発され、その一つであるプロトプラスト融合の研究は微生物、高等植物について行われ、その際利用される細胞壁溶解酵素に強い関心がもたれるようになった。

酵母の細胞壁溶解酵素については、Giaja⁶⁾によるカタツムリ消化管内の酵素の適用が報告され利用されてきたが、この酵素は大量調製とその精製が容易でないため以後微生物酵素が検索

* 酵母による菌体外蛋白質生産に関する研究
** 愛知県食品工業試験場
*** 三重大学

された。北村らは *Arthrobacter luteus*⁷⁾、土井らは *Arthrobacter* YCWD-3⁸⁾、田端らは *Streptomyces albidoflavus*⁹⁾ の生産する酵母溶菌酵素を得ており、その外種報告があるが¹⁰⁻¹⁴⁾、これらは主として *Saccharomyces* sp., *Candida* sp., *Hansenula* sp. を対象としたものである。赤色酵母に関しては、村尾ら^{15,16)} が *Penicillium lilacinum* による *Rhodotorula glutinis* の細胞壁溶解酵素生産および白石ら¹⁷⁾ の細菌による *Sporobolomyces ruberrimu* の細胞壁溶解酵素生産の報告がある。現在広く用いられている酵素には *Arthrobacter luteus* が生産する酵素 Zymolase¹⁸⁻²⁴⁾ があるが、通常使用されている濃度では、本研究の使用酵母 *Trichosporon* sp. X-19株に対してほとんど溶菌性を示さなかったため、本菌を溶菌する微生物の検索同定を行った。

実験の部

1. 供試菌および実験方法

赤木らが²⁵⁾ 土壌から分離した放線菌39-B株が *Trichosporon* sp. X-19株を溶菌する酵素を生産することが判明したので、39-B株の諸性質を調べ同定を行った。

1・1 菌学的諸性質

菌学的諸性質は主に長谷川武治編、微生物の分離と同定²⁶⁾、長谷川武治編、改定版微生物の分離と同定²⁷⁾、および駒形和男編、微生物の化学的分類実験方法²⁸⁾ を参考にして検討した。

1・2 全菌体中におけるジアミノピメリン酸の存在の検討

39-B株を酵母エキス-グルコース培地(酵母エキス1%, グルコース1%, pH7.2)で30℃, 2日間回転振とう培養(160rpm)を行い、遠心分離(6000rpm, 20分間)により集菌し、エタノール、アセトンにより脱水し乾燥菌体とした。

乾燥菌体10mgを3mlのサンプル管にとり、6N HCl 1mlを加え、100℃, 18時間加水分解後、東洋濾紙No. 2で濾過した。濾紙上の残渣を数滴の脱イオン水で洗い、その洗液を濾液に加えた。得られた濾液を減圧下で濃縮する操作を繰り返しHClを除去後、最終残渣を0.3mlの脱イオン水に溶解し試料とした。

調整した試料を2, 6-ジアミノピメリン酸を対照として、PPCでメタノール-水-10NHCl-ピリジン(80:17.5:2.5:10)の溶媒を用い下降法で展開した。展開後0.5%ニンヒドリン含有ブタノールにより発色させ検討した。

1・3 細胞壁中におけるグリシンの存在の検討

1・2と同様に培養した39-B株の湿菌体10gを0.1Mリン酸緩衝液(pH8.0)30mlに懸濁し、少量のガラスビーズを加え超音波で細胞を破碎した。未破碎細胞およびガラスビーズを遠心分離(3000rpm, 15分間)で除き、上澄みを遠心分離(15000rpm, 15分間)して粗細胞壁

を集めた。得られた粗細胞壁を90%エタノールで2回洗浄した後、2% KOH 含有エタノールに懸濁し、37℃インキュベーターで振とうしながら2日間鹼化した。さらに95%エタノールで2回、脱イオン水で2回、0.1Mリン酸緩衝液 (pH8.0) で3回洗浄した。これをトリプシン溶液 (1 ml の0.1Mリン酸緩衝液, pH8.0, に3 mgのトリプシンを溶解させたもの) 中、37℃, 2時間処理し、0.1Mリン酸緩衝液 (pH8.0) で2回、脱イオン水で2回、0.02N HCl で2回それぞれ洗浄した。次にペプトン溶液 (3 mgのペプトンを0.02N HCl 1 ml に溶解したもの) に懸濁させ、37℃で24時間処理した。細胞壁の沈渣を0.02N HCl で2回、脱イオン水で2回、エタノールで2回、さらにクロロホルムで1回洗浄し、減圧下で乾燥し試料とした。

調整した細胞壁5 mgを3 ml容のサンプル管に入れ6 N HCl 1 mlを加え、100℃, 18時間加水分解した。分解後は先のジアミノピメリン酸と同様の操作でHClを除き、最終残渣を100 μ lの脱イオン水に溶解し試料とした。

調整した試料をn-ブタノール-ピリジン-水-氷酢酸 (60:40:30:3) の溶媒を用いて下降法でPPCを行った。展開後ジアミノピメリン酸の場合と同様にニンヒドリン発色させグリシンの存在を検討した。

調整した試料をアミノ酸自動分析機 (日本電子KK JLC-3BC アミノ酸アナライザー) にかけてグリシンの存在を検討した。

1・4 菌体中におけるマジュロースの存在の検討

1・2と同様にして得た乾燥菌体50mgを3 ml容のサンプル管にとり、1 N H₂SO₄ 1 mlを加え、100℃, 12時間加水分解した。加水分解後遠心分離 (3000rpm, 10分間) し、上澄みをBa(OH)₂, BaCO₃でpHが5.0~5.5になにように調整した。生じたBaSO₄の沈澱を遠心分離 (3000rpm, 10分間) で除き、上澄みを減圧下で濃縮乾固させ、0.4 mlの脱イオン水に溶解して分析試料とした。

分析試料を各種の糖と *Actinomadura libanotica* 1 FO 14095を分析試料と同様に処理した加水分解物を対照として、n-ブタノール-ピリジン-水-トルエン (5:3:3:4) の上層を溶媒として下降法でPPCを行った。発色には硝酸銀を使用した。

1・5 形態学的観察

39-B株をISP II 培地およびISP IV 培地 (DIFCO 社) において30℃, 3日間の静置培養を行い、その形態を観察した。

さらにオートミール寒天培地 (DIFCO 社の BACTO OATMEAL AGAR と同様に調整した) において30℃, 3日間の培養を行いその形態を観察した。

2. 実験結果

2・1 化学的検索

全菌体を加水分解してPPCを行った結果、本菌には meso 体のジアミノピメリン酸が存在することが認められた。

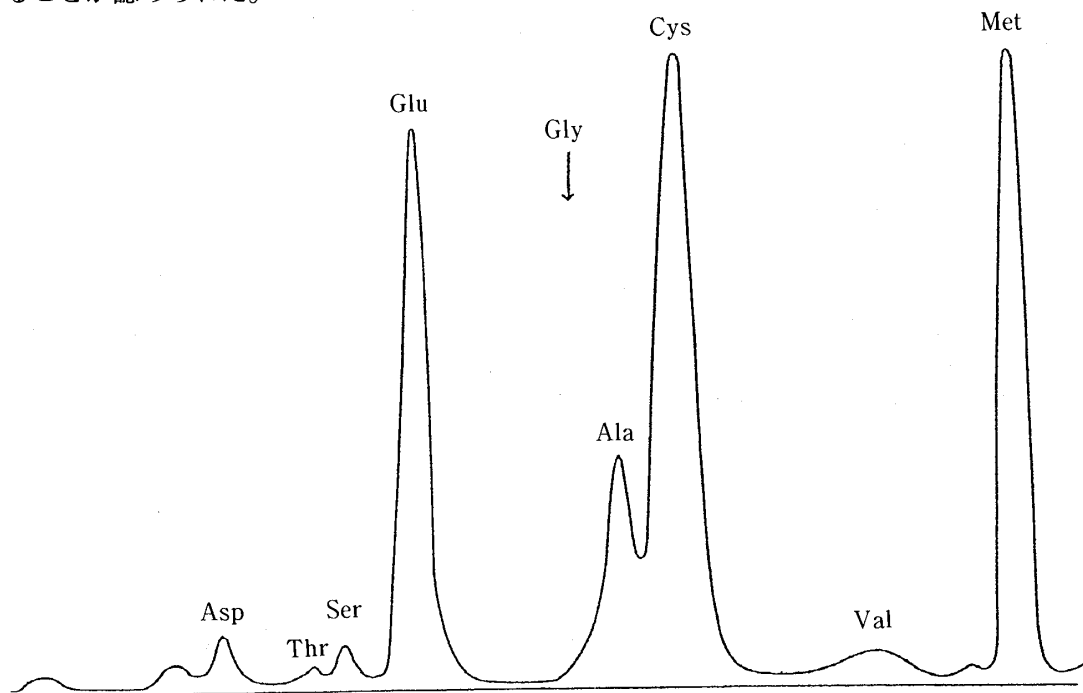


Fig. 1. Amino Acid Component of Cell Wall.

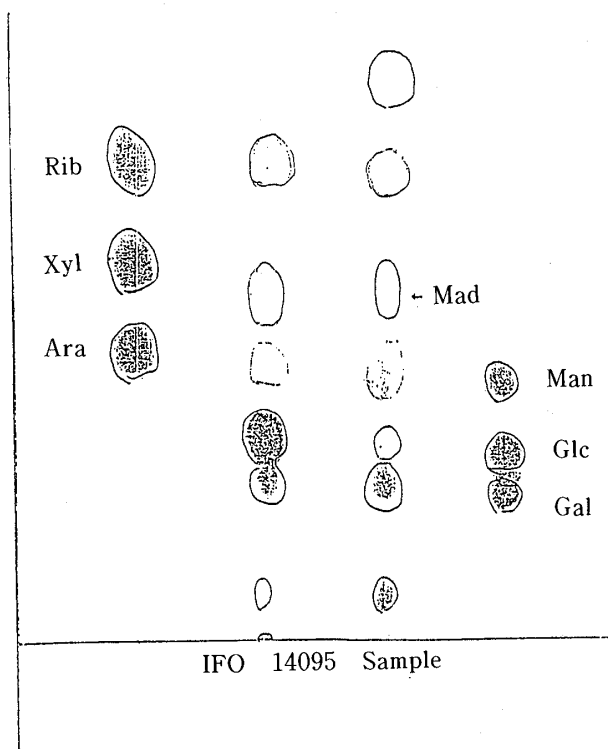


Fig. 2. PPC of Hydrolysis Products from Cell.

また、細胞壁を加水分解して PPC を行った結果、グリシンの存在は認められなかった。アミノ酸自動分析機による分析結果を Fig. 1 に示したが、ここでもグリシンの存在は認められなかった。

全菌体を加水分解して、対照として *Actinomadura libanotica* IFO 14095 の加水分解物を用いて、PPC を行った結果を Fig. 2 に示した。その結果、本菌にはマジュロースが存在することが認められた。

2・2 形態学的観察

ISP 培地で生育後顕微鏡観察を行った結果を Photo. 1 に示した。

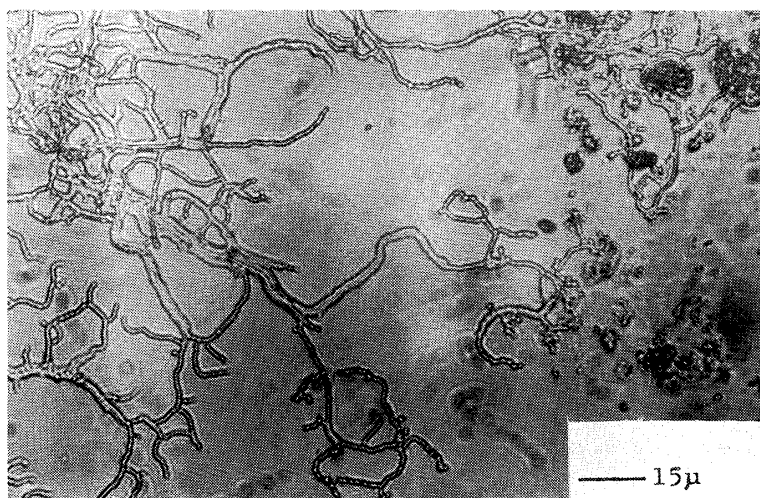


Photo. 1. 39-B Strain.

Cultural condition : cultivation in ISP II medium at 30°C for 3 days.

その結果、胞子嚢を欠くこと、胞子分裂は一方にのみ起こること、胞子は気菌糸上に生じること、胞子は3個以上の連鎖となること、胞子の連鎖は3～6個の範囲を超えること等のこと



Photo. 2. 39-B Strain.

Cultural condition : cultivation in ISP II medium at 30°C for 3 days.

が判明した。さらに ISP II (Yeast ext.) 培地で生育後の結果を Photo. 2 に示した。栄養菌糸の色は茶色であった。オートミール寒天培地生育後の結果を Photo. 3 に示した。気菌糸の色

は灰色であった。

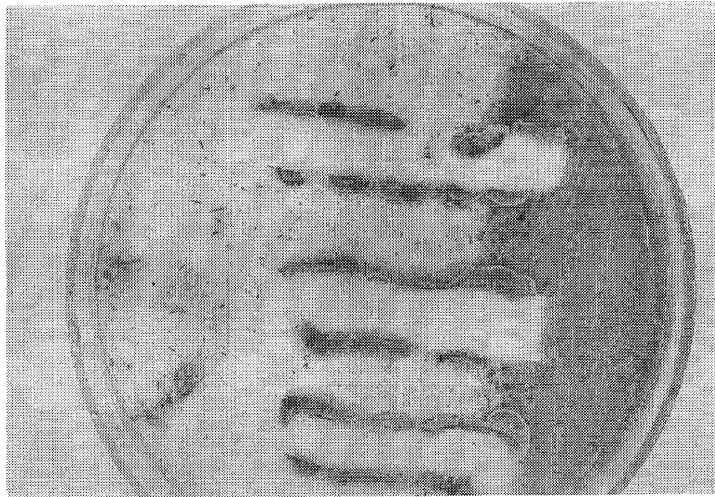


Photo. 3. 39-B Strain.

Cultural condition : cultivation in oatmeal agar plate at 30°C for 3 days.

考 察

放線菌類は分類学上かなり特異な位置を占める生物の一群で、好気性放線菌のあるものは形態分化が著しく、かびのようなバクテリアといわれるほど多彩な形態を示すが、形態観察は主観的であるため不確実性がつきまとい、ときには全く誤った判断を下すおそれがある。このようなことから細菌類と同様、放線菌の分類においても形態学的特徴に他の指標を加味し、より普遍的な分類体系の確立を目指して各種の分類方法が提案されてきている。近年は化学分類法が盛んに提案されつつあり、細胞壁組成を主とする属の検索式²⁸⁾(清野, 長谷川, 1982)に従い検討を行った。アミノ酸自動分析の結果、放線菌には一般に含有されていない Met が検出されたためにその検討を行った結果、グルコサミンが自動分析機で Met と同じ位置にピークを持つことが認められたために Met と思われたピークは菌体中の N-アセチルグルコサミンが加水分解したグルコサミンによるものと考えられた。化学的検索の結果、39-B 株は Fig. 3 に示すように、*Planomonospora*, *Planobispora*, *Streptosprangium*, *Spirillospora*, *Dermatohilus*, *Excellospora*, *Microbispora*, *Actinomadura* の属のいずれかに属することがわかった。次に形態学的観察をした結果を検索式で検討すると他の *Actinomadura* 属についての記載²⁸⁾とも一致することが確認されたことから、39-B 株は *Actinomadura* 属であると同定された。

さらに種について Preobrazhenskaya²⁹⁾らの *Actinomadura* 属の種検索式に従い検討を行った。ISP II 培地での観察結果とオートミール寒天培地上で気菌糸が灰色であることから *Actinomadura spadix* に属すると考えられた。さらに *Actinomadura spadix* を提案し、性質を記載した野々村の報告と比較し、ISP II 培地でコロニーの裏側の色が Dark brown になることで一致したが、この種であるとの同定には、炭素化合物の資化性や他の培地でのコロニーの色等の確認をさらに必要とする。

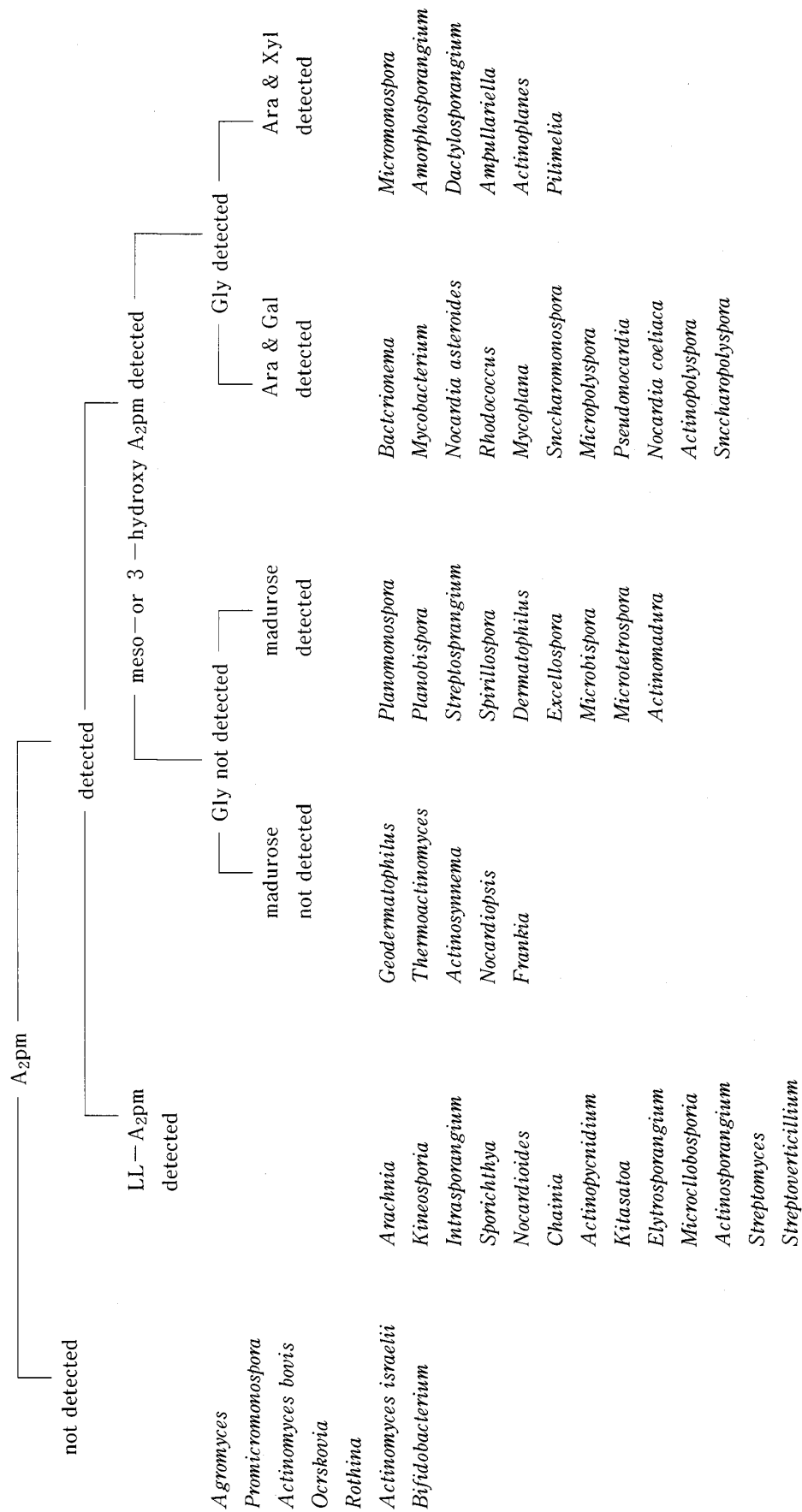


Fig. 3. Chemotaxonomy of Actinomycete (by KIYONO & HASEGAWA)

要 約

赤木らの得た菌体外に蛋白質をよく生産する酵母, *Trichosporon* sp. X-19株の遺伝的改良の手段としてプロトプラスト融合法を考え, *Trichosporon* sp. X-19株の細胞壁溶解酵素生産菌を土壌から分離した。分離した放線菌の諸性質を検討し同定を試みた結果, 本菌は *Actinomadura* 属に属することが判明した。

文 献

- 1) S. UDAKA : *Agric. Biol. Chem.* 40, 523 (1976)
- 2) S. MIYASHIRO, H. ENEI, Y. HIROSE and S. UDAKA : *Agric. Biol. Chem.*, 44, 105 (1980)
- 3) T. HARA, Y. FUJIO and S. UEDA : *J. Fac. Agric., Kyushu Univ.*, 26, 205 (1982)
- 4) T. HARA, Y. FUJIO and S. UEDA : *Agric. Biol. Chem.*, 47, 2237 (1983)
- 5) 赤木盛郎, 中世古 幸 信, 山田哲也 : 三重大農学報, No58, 123 (1979)
- 6) GIAJA, J. : *Compt. Rend. Soc. Paris*, 86, 708 (1922)
- 7) K. KITAMURA and Y. YAMAMOTO : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 15, 317 (1969)
- 8) Kenji DOI, Akemi DOI and Toshio FUKUI : *Agric. Biol. Chem.*, 37, 1619 (1973)
- 9) 田端司郎, 照井堯造 : 醸酵工学, 40, 366 (1962)
- 10) Y. TSUJISAKA, N. HAMADA and R. KOBAYASHI : *Agric. Biol. Chem.*, 45, 1201 (1981)
- 11) S. UEHARA, K. HASEGAWA and K. IWAKI : *Agric. Biol. Chem.*, 43, 1991 (1979)
- 12) S. NAGASAKI, H. MORI and S. YAMAMOTO : *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2689 (1981)
- 13) R. KOBAYASHI, T. MIWA, S. YAMAMOTO and S. NAGASAKI : *J. Ferment. Technol.*, 58, 311 (1980)
- 14) 高田三夫, 平緒一暁, 木村義夫, 野田国彦 : 農化, 44, 393 (1970)
- 15) S. MURAO, R. YAMAMOTO and M. ARAI : *Agric. Biol. Chem.*, 40, 23 (1976)
- 16) M. ARAI, R. YAMAMOTO and S. MURAO : *Agric. Biol. Chem.*, 40, 27 (1976)
- 17) 白石 淳, 藤井久雄 : 農化, 52, 533 (1978)
- 18) T. KANEKO, K. KITAMURA and Y. YAMAMOTO : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 15, 317 (1969)
- 19) K. KITAMURA, T. KANEKO and Y. YAMAMOTO : *Arch. Biochem. Biophys.*, 145, 402 (1971)
- 20) K. KITAMURA, T. KANEKO and Y. YAMAMOTO : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 18, 57 (1972)
- 21) K. KITAMURA and Y. YAMAMOTO : *Arch. Biochem. Biophys.*, 153, 403 (1972)
- 22) T. KANEKO, K. KITAMURA and Y. YAMAMOTO : *Agric. Biol. Chem.*, 37, 2295 (1973)
- 23) K. KITAMURA, T. KANEKO and Y. YAMAMOTO : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 20, 323 (1974)
- 24) K. KITAMURA and Y. YAMAMOTO : *Agric. Biol. Chem.*, 45, 1761 (1981)
- 25) 赤木盛郎, 西田淑男, 小林裕志, 久松 眞, 山田哲也 : 日本農芸化学会関西支部・中部支部合同大会およびシンポジウム (シンポジウム-バイオサイエンスとバイオインダストリー) 講演要旨集, P34 (昭和60年)
- 26) 岡見吉郎, 清野昭雄 : 微生物の分離と同定, 長谷川 武 治編, 学会出版センター, 1979
- 27) 岡見吉郎, 清野昭雄 : 改定版微生物の分離と同定, 長谷川 武 治編, 学会出版センター, 1985
- 28) 長谷川 徹, 清野昭雄 : 微生物の化学的分類実験法, 駒形和男編, 学会出版センター, 1982
- 29) T. D. PEROBRAZHENSKAYA, M. A. SVESHNIKOVA and L. P. TEREKHOVA : *Actinomyces*, 12, 30 (1977)
- 30) H. NONOMURA and Y. OHARA : *J. Ferment. Technol.*, 49, 904 (1971)