

赤色酵母 *Rhodosporidium toruloides* 細胞壁を分解する 微生物の分離とその生産する分解酵素について

松本由記奈, 近藤陽太郎

Isolation of Microorganism Degrading the Red Yeast *Rhodosporidium toruloides* Cell Wall and Properties of the Lytic Enzyme Produced by the Isolated Bacterium

Yukina Matsumoto and Yôtarô Kondo

Micoorganisms capable of lysing the cell wall of the red yeast *Rhodosporidium toruloides* were isolated from the soil obtained within the precincts of the Yosida Shrine in Kyoto by screening for their ability to utilize the cell wall prepared from the red yeast as a carbon source which was seeded on an agar plate. The actinomycete strain YM 1-1 supposed to be *Streptomyces* was found to produce the lytic enzymes. The supernatant obtained by culturing of this soil microbe lysed the cell wall of the red yeast. The resulting crude lytic enzyme fractions, after sedimentation by addition of ammonium sulfate, showed the high lytic activity toward the red yeast cell wall and laminarin, indicating mainly contained β -glucan-hydrizing activity. In addition, the actinomycete strain YM1-1 adhered to form flocculent clumps. The tendency to form clumps may facilitate the separation of the microorganism after a batch cultivation.

I. はじめに

赤色酵母の栄養増殖のしかたは、パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) と同じように出芽により増殖する。細胞の形態は球形ないし楕円形で、出芽はパン酵母と異なり、同じ場所から何回も繰返し生ずることが多いといわれている。また、赤色酵母は、カロチノイド色素を合成するためコロニーが赤色を呈するので、赤色酵母と呼ばれ、パン酵母などと比べて発酵能はなく、酸性培地において、培地中に多糖(糖タンパク質)を生産することが特徴的である。赤色酵母は、有性生殖法でも増殖し、胞子を形成して担子状の菌糸を形成するので、担子菌類酵母に属す。そのうち *Rhodosporidium* 属は、そのライフサイクルでテリオスポア(有性的サイクルに参与する厚膜胞子)を形成し完全形に分類されるが、不完全形は *Rhodotorula* 属入れられている¹⁾。

パン酵母にみられるように、一般に酵母の細胞壁はグルカン、マンナンおよびキチンなどの多糖類とタンパク質、脂質などから成り立っているが、細胞壁の構造や組成は種により異なり、同一種でも生育条件により変化するとされている²⁾。赤色酵母の細胞壁の研究報告はパン酵母のそれと比較すると、極端に少なく、赤色酵母 *Rhodosporidium toruloides* においても、その細胞壁の構造についてまだ明らかな点が多い。細胞壁の構造解析を行うためには、細胞壁を酵素により部分分解し、その分解産物の構造を決定することによりなされるが、赤色酵母の細胞壁は市販の細胞壁溶解酵素の分解を受けにくいという報告³⁾もあり、赤色酵母細胞壁の構造解析を行うため、まず赤色酵母細胞壁分解酵素を生産する微生物を自然界より分離(スクリーニング)する必要がある。本報では、土壤中より *Rhodsp. toruloides* 細胞壁を分解する微生物を見いだしたので報告する。

II. 実験方法

1. 赤色酵母細胞壁分解酵素生産微生物のスクリーニング

赤色酵母細胞壁分解菌の分離のため、吉田神社と下鴨神社から採取した土壌を殺菌した大型試験管の下3 cm程(約5 g)まで入れ、試験管に殺菌水25 mlを加えガラス棒でかきまぜ静置した。その一白金耳を、スクリーニング用培地(0.3%赤色酵母細胞壁, 0.1% NH_4Cl , 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0001% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0001% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.0001% $\text{MnSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, 0.0001% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.5%寒天, pH 7.0)に接種し、30℃にて7日間常法平板培養後に生じたコロニーのうちから、生育が良く比較的特徴的なコロニーを選別した。分離菌は、PDA 平板培地⁴⁾(20%ジャガイモ, 1.5%グルコース, 2%寒天)を用い、常法平板培養をくりかえして純化後、使用直前までPDA 斜面培地上に4℃で冷蔵保存した。

2. *Rhodosp. toruloides* の培養と菌体及び細胞壁の調製

YPD 培地(2%ポリペプトン, 7%グルコース, 0.5% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.004% $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$, 0.004% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002% thiamine HCl)で25℃, 3日間振盪培養した *Rhodosp. toruloides* IFO 0413 の集菌洗浄菌体から桂⁵⁾の方法で調製した。

3. 走査電子顕微鏡

走査電子顕微鏡写真撮影のための試料は、常法に従いグルタルアルデヒド-四酸化オスミウム二重固定法^{6,7)}により調製した。

4. 微生物 YM 1-1 の資化性実験

YM 1-1 が、どのような炭素源で生育するか調べるため、7種類の炭素源を用い平板培養した。平板培地は、スクリーニング用培地から赤色酵母細胞壁成分を除き、それぞれの炭素源を加えたものを用いた。これにPDA 斜面培地で7日間培養した微生物 YM 1-1 を一白金耳量取り、蒸留水に懸濁し約2000倍に希釈し、希釈液0.1 mlをプレートに滴下し、自製スプレッダーを用いてプレート全面に塗り広げ、30℃にて3日間培養した。

5. 赤色酵母細胞壁分解酵素液の調製

細胞壁分解酵素生産のための培養には、YM 培地(1%グルコース, 0.15% yeast extract, 0.7% KH_2PO_4 , 0.5% Na_2HPO_4 , 0.15% NH_4Cl , 0.06%

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02% NaCl , 0.001% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0008% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.00001% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)を用いた。培養は、PDA 斜面培地にて7日間培養した YM 1-1 を、YM 培地10 mlに一白金耳接種し、25℃にて40時間往復振とう(125 rpm)し前培養を行ったのち、これをYM 培地500 mlを加えた3 L三角フラスコに移し、25℃にて23時間回転振とう(125 rpm)し本培養した。培養液は、4℃, 10000×gで10分間遠心分離し、菌体と培養上清液に分けた。菌体は、蒸留水で3回洗浄(4℃, 10000×gで10分間)し、60%エタノールで2回、80%エタノールで1回、エーテルで3回洗浄(室温, 3000×gで10分間)した。培養上清液は、粗酵素液として、濁度による赤色酵母細胞壁分解酵素の活性試験に用いた。酵素精製のため、残りの培養上清液に40%続いて80%飽和になるよう固体硫酸アンモニウムを攪拌しながら加え、2画分の沈殿物を得た。生じた沈殿物は、遠心分離(4℃, 10000×gで20分間)回収後、0.1 M コハク酸ナトリウム緩衝液(5 ml, pH 5.5)に溶解し、同じ緩衝液で透析(2 L×3, 20時間)した。透析後の溶液を酵素サンプルとして、赤色酵母細胞壁分解酵素活性を測定した。

6. 赤色酵母細胞壁分解酵素の活性試験と活性測定

分解活性試験は、酵素分解が濁度により変化することを利用し、吸光度により調べた。使用した基質は、中井⁸⁾の方法に従い調製した。即ち、赤色酵母 *Rhodosp. toruloides* IFO 0413 を YEPD 培地(1% yeast extract, 1% peptone, 0.5% glucose, pH 5.5)で前培養24時間、本培養48時間し、集菌洗浄したのちガラスビーズで破碎した菌体を用いた。基質0.5 mgを0.1 M コハク酸ナトリウム緩衝液(2 ml, pH 5.5)に溶解させ、これに粗酵素液1 mlを加え反応を開始し、30℃にてインキュベートして、90分ごとに420 nmで吸光度測定した。また、活性は、基質として赤色酵母の菌体とラミナリン(シグマ社、アメリカ)を用い、遊離してきた還元糖の量で測定した。1%基質(0.2 ml)に0.1 M コハク酸ナトリウム緩衝液(0.1 ml, pH 5.5)を加え、これに酵素液0.1 mlを加えて反応を開始し、30℃で1時間インキュベートした後、生じた還元糖量を Somogyi⁹⁾-Nelson¹⁰⁾法にて定量した。1 unit(酵素活性の1単位)は、酵素1 mgが1分間に1 μmolのグルコースまたはそれに相当する還元力を遊離する酵素量とした。タンパク質の定量は、Lowry¹¹⁾と Folin¹²⁾の方法を使用した。

III. 実験結果と考察

1. スクリーニング

吉田神社社務所より東南約 300 m の地点より採取した土壌について、赤色酵母細胞壁分解酵素生産菌と思われる 3 菌株, YM 1-1, YM 1-4 と YM 1-6 を得た。これらのうち, YM 1-1 は液体培地, 平板培地での生育が最もよく, また興味深いことに他の種に見られない凝集性が見られたことより, 以後の実験に YM 1-1 を用いることとした。

2. 分解酵素生産菌 YM 1-1 の形態

本菌の主な炭素源の資化性は, 表 1 にまとめた。本菌はアラビノース, ガラクトース, グルコース, マンノースと赤色酵母細胞壁および細胞外多糖を炭

表 1 放線菌 YM 1-1 の炭素源に対する資化性

炭 素 源	成長の程度 *
アラビノース	+
キシロース	-
ガラクトース	+
グルコース	+
マンノース	++
赤色酵母細胞壁 (菌体)	+++
赤色酵母細胞外多糖	+++

*Symbols: -, not found; +, good; ++, very good; +++, excellent

素源として利用したが, キシロースについては利用できなかった。PDA 斜面培地で培養した菌株 YM 1-1 の電子顕微鏡による観察では, 糸状の菌糸が放射状に伸長することから, 放線菌の一種と考えられる (図 1)。PDA 培地上で本菌株は最初白色を呈していたが, 成長と同時に培地中に薄橙褐色の色素を分泌し, 徐々に表面が薄灰白色のコロニーへと成熟した。コロニーは表面が灰白色で内部は白色であった。このため YM 1-1 のこれらの部分の形態が同一菌によるものなのかを調べるために, 別々にこれらの部分を PDA 培地上で 25℃にて培養し, その色, 形の経時的变化を観察した (比較対照として酵母様形態を示した菌株 YM 1-6 も同様の操作を行った)。PDA 培地上で両方のコロニーが, 培地に橙色色素を分泌し, その上面が最初は白色を呈し (図 2 ; 培養 4 日目), 最終的にどちらもコロニーの表面が白色から灰白色へと経時的に同じように変化したため (図 3 ; 培養 14 日目), これらは同一の微生物であると判断した。これは放線菌の特徴であり「発育の色」と表現されるものと考えられ, 基生菌糸が伸展し, 気菌糸を伸長させ, 胞子を形成してゆく培養の経過に伴って, 菌叢色に変化する¹³⁾ 結果と考えられる。また, 胞子の形成についても, 本菌を PDA 培地にてシャーレの蓋を下にして培養し, 蓋に胞子が落下するかどうか調べたが, 蓋には何もついていなかったことから, 本菌は射出胞子 (液体

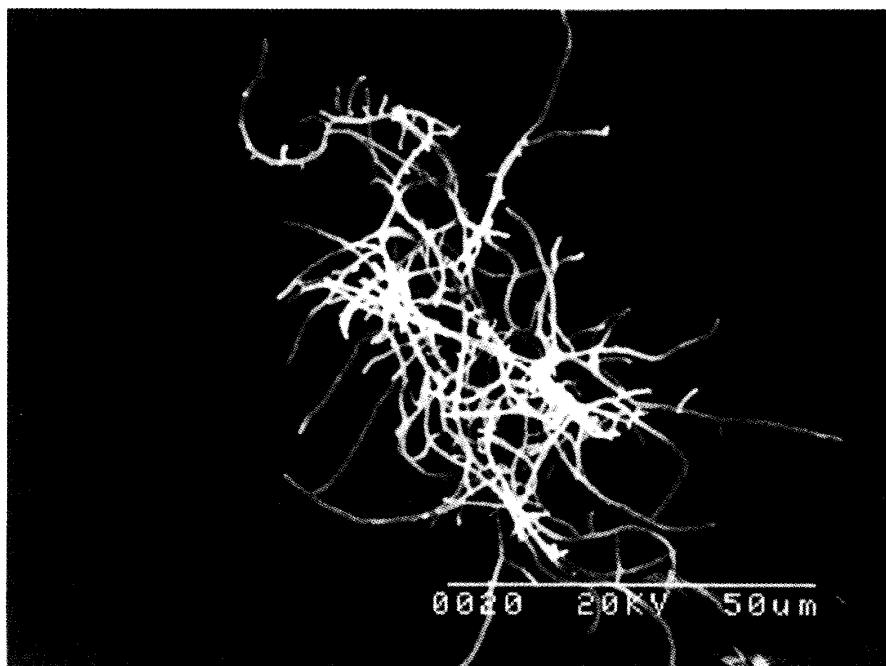


図 1 放線菌 YM 1-1 の走査電子顕微鏡写真

の小滴とともに射出される無性孢子)を形成しないと判断した。しかし、電子顕微鏡下での観察では少量の球形孢子(直径約 $3.5 \mu\text{m}$) がみられたが(図4)、孢子囊、運動性の孢子や分節孢子は観察できなかった。比較的長い基生菌糸(直径約 $0.6 \mu\text{m}$; 長さ $50 \mu\text{m}$ 以上)の生育がみられ、多方向に分岐し、気菌糸は直線状であった(図5)。これらの特徴を考えると、本放線菌は *Streptomyces* に属するもの

と推定される(菌株の同定は現在依頼中)。本菌の液体振盪培養直後において、菌体自体は沈降凝集していて培養液は透明度が高く、集菌操作は容易であった。

3. 赤色酵母細胞壁分解活性と粗酵素液の調製

48時間培養後の培養液を使って赤色酵母細胞壁分解活性を調べたところ、酵素タンパク 1mg 当たり、1分間に、菌体 0.9g を分解する活性を有すること

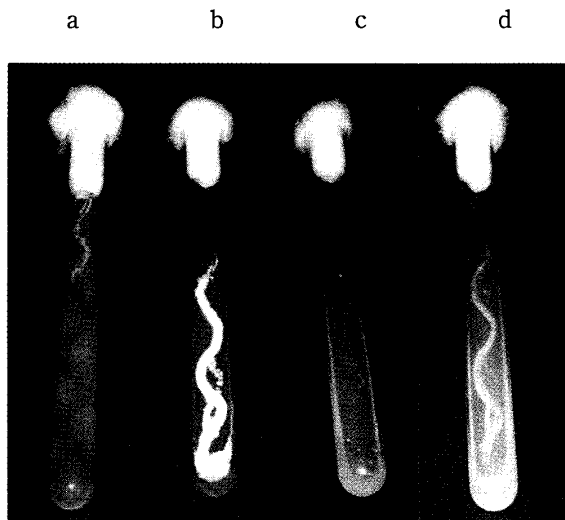


図2 放線菌 YM 1-1 (培養4日目, PDA 培地) a, YM 1-1 (表面灰白色部より集菌した b の培地裏側); b, YM 1-1 (表面灰白色部より集菌); c, YM 1-1 (内部白色部より集菌); d, YM 1-6 (対照)

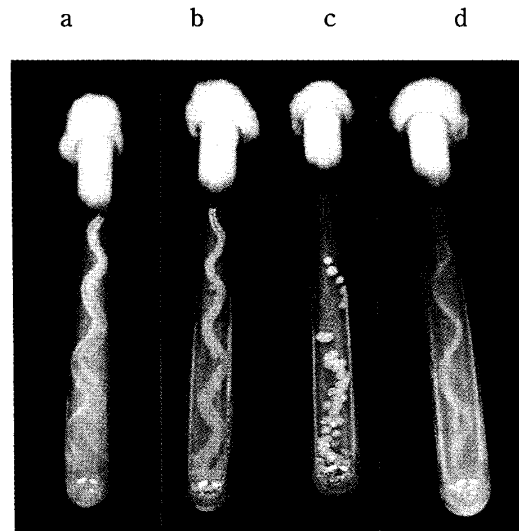


図3 放線菌 YM 1-1 (培養14日目, PDA 培地) a, YM 1-1 (表面灰白色部より集菌した b の培地裏側); b, YM 1-1 (表面灰白色部より集菌); c, YM 1-1 (内部白色部より集菌); d, YM 1-6 (対照)

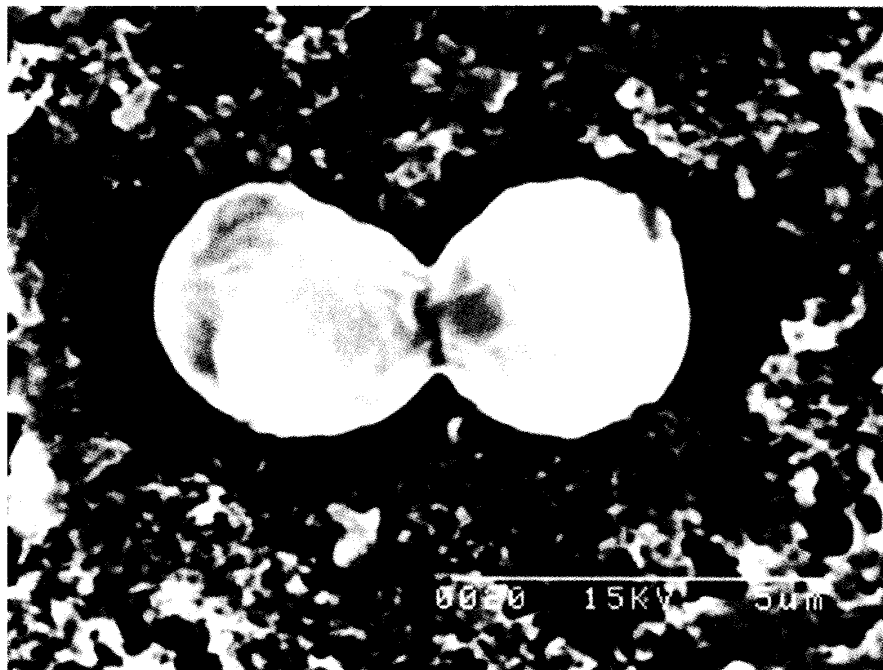


図4 放線菌 YM 1-1 の孢子の走査電子顕微鏡写真

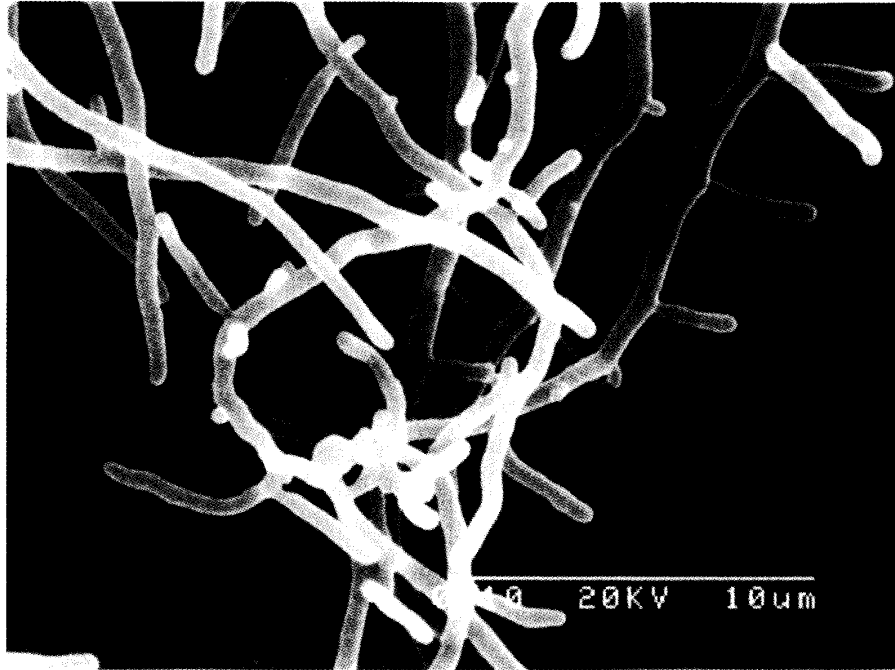


図5 放線菌 YM 1-1 の走査電子顕微鏡写真

表2 放線菌 YM 1-1 が生産する赤色酵母細胞壁 (菌体) 分解酵素活性

基質	40% 硫安飽和画分活性	80% 硫安飽和画分活性
	比活性 (Unit/mg タンパク質)	
菌体	271	127
ラミナリン	112	127

が分かった。酵素を硫安沈殿法により部分精製するため、40%と80%硫安飽和画分を回収し、赤色酵母細胞壁とラミナリンに対する分解活性を調べた(表2)。細胞壁分解活性は40%硫安飽和画分に多く、ラミナリン分解活性は80%硫安飽和画分に多くみられたが、特異性は際だったものではなかった。全細胞壁分解活性は383 unit/mg、全ラミナリン分解活性は254 unit/mgであり、細胞壁分解活性の方が高かったが、主な分解活性は、ラミナリナーゼ(β -1,3-glucanase)活性であると思われる。また、使用した赤色酵母細胞壁の構成糖には主にマンノース、ガラクトースおよびグルコースが含まれているので^{5,13,14,15)}、グルカナーゼ活性以外にマンナナーゼやガラクトンダーゼ活性などを含むものと考えられる。

IV. おわりに

赤色酵母細胞壁の構造研究をめざして、土壌から細胞壁分解酵素生産菌をスクリーニングしたとこ

ろ、吉田神社採集土壌中から *Streptomyces* 属と推定される放線菌 YM 1-1 を単離した。本菌の生産する糖質分解酵素は、主にラミナリナーゼ(β -1,3-glucanase)からなるものと考えられるが、赤色酵母細胞壁に対して、より多くの活性が検出された。また、液体振盪培養後にすぐに凝集沈殿することから、菌体と培養液(菌体外酵素)の分離が容易で手間が省けることもあり、赤色酵母細胞壁分解酵素生産菌としての利用が有望である。

V. 謝辞

Rhodosp. toruloides IFO 0413 株を分譲して頂きました鳥取大学農学部教授 北本 豊先生に感謝いたします。また、電子顕微鏡写真撮影に協力して頂きました京都女子大学家政学部教授 岩城 操先生と園部浩子修士に深謝いたします。

文献

- 1) H. J. Phaff, M. W. Miller and E. M. Mrak: The

- Life of Yeast (永井 進訳) : 酵母菌の生活, 学会出版センター, 東京 (1982)
- 2) 柳島直彦: 酵母の生物学, 東京大学出版, 東京 (1988)
 - 3) 吉田光方子, 西 晶子, 大淵和彦, 北条知子, 松澤昭仁, 浜地正昭, 熊谷知栄子: 生物工学会誌, **75**, 229 (1997)
 - 4) C. Booth: *Methods in Microbiol.*, **4**, 49 (1971)
 - 5) 桂 太郎: 鳥取大学大学院農学研究科修士論文 (1992)
 - 6) F. Yamaoka, Y. Kagei, S. Tomita, Y. Kondo and S. Hirano: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1255 (1989)
 - 7) 兼西暢代, 加藤圭子, 近藤陽太郎: 京都女子大学食物学会誌, **50**, 43, (1995)
 - 8) 中井智子: 京都女子大学家政学部学士論文 (1995)
 - 9) M. Somogyi: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952)
 - 10) N. Nelson: *J. Biol. Chem.*, **153**, 357 (1944)
 - 11) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
 - 12) O. Folin and V. Ciocalteu: *J. Biol. Chem.*, **73**, 627 (1927)
 - 13) 長谷川武治編著: 微生物の分類と同定 <下>, 学会出版センター, 東京 (1995)
 - 14) 釜屋和美: 京都女子大学家政学部学士論文 (1994)
 - 15) 園部浩子: 京都女子大学大学院家政学研究科修士論文 (1997)