

酵母細胞壁溶解酵素の研究

第5報 放線菌原株の溶解酵素生産能の回復と保存

江幡淳子・蛭田いづみ・雲佐知子・大橋由弥子・森本佳代子

Studies on Enzymatic Hydrolysis of Yeast Cell Walls

Part 5. Restoration and Preservation of Lytic Enzyme-productibility of Original Strains of Streptomyces

JUNKO EBATA, IZUMI HIRUTA, SACHIKO KUMO, YUYAKO OHASHI and KAYOKO MORIMOTO

はじめに

著者らは酵母細胞壁溶解酵素の強力な生産菌として、*Streptomyces hygroscopicus* 202 株¹⁾および *St. argenteolus* 042 株²⁾を分離同定したのち、菌の増殖ならびに胞子着生のよい斜面培地に継代培養し保存して来た。しかし酵素の分離精製を行なうために継代培養を繰り返した菌を使用すると液体培養に移した時、溶解酵素の生産能が著しく低下している場合があった。これは他の発酵生産菌株でも屢々起る現象であり、これに対処するために人工変異株の分離が試みられたり、分離した菌株の性質を変えることなく保存する方法が、それぞれの立場で検討されて来た。われわれの場合も低下した酵素生産能の回復をはかり、且つその特性を維持できる菌株の保存条件を確立しておくことが、今後の研究を進める上で必須の課題であると考えた。そこで各種の方法を試みた結果、紫外線照射によって再び高い酵素活性を示す菌株を分離することが出来、その菌株は適当な分散媒中で活性を保持させながら、冷蔵ないしは冷凍保存できる見通しが得られたので報告する。

実験方法

1. 紫外線照射によって酵素生産能を回復した菌の分離方法

斜面培養した保存菌の懸濁液の 0.2 ml を Table 1 または Table 2³⁾ に示す平板培地に接種し、胞子がよく着生するまで約 2 週間、28°C で培養した。生育した菌はかきとり 10 ml の生理的食塩水の入った試験管中に懸濁した。しばらく静置し、菌糸フラグメントの多い上層と夾雑物が多い下層をのぞいて、中間の胞子層を集めた。これ

Table 1. Yeast-agar medium

Dried baker's yeast	10.0 g
K ₂ HPO ₄	2.0 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.1 g
Distilled water	1000 ml
pH	7.0
Agar	20.0 g

Table 2. Tyrosine-agar medium³⁾

Glycerol	15.0 g
L-Tyrosine	0.5 g
L-Asparagine	1.0 g
K ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O	0.5 g
NaCl	0.5 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0.01 g
Distilled water	1000 ml
Trace salts solution	1.0 ml
pH	7.2 - 7.4
Agar	20.0 g
Composition of trace salts solution	
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0.1 g, MnCl ₂ · 4 H ₂ O 0.1 g, ZnSO ₄ · 7 H ₂ O 0.1 g, Distilled water 100 ml

をさらに希釈して約 10⁸ 細胞/ml の懸濁液 (620 nm の O. D. 値が 0.045 付近) を作成した。この 10 ml を直径 9 cm のシャーレに入れマグネチックスターラーを用いて攪拌しながら約 40 cm の高さから紫外線 (15 w の殺菌灯) の

照射を行なった。300秒まで照射する間、適時一定量を採取し $10^6 \sim 10^3$ 倍に希釈したのち、その0.1 mlを取り出し、酵母を含む二層の寒天平板培地¹⁾に流した。28°Cで培養し一週間後コロニー周縁の酵母溶解帯の明確で大きいものを選んで酵母液体培地 (Table 1の組成より寒天を除いたもの) に移植して28°C、48時間振盪し前培養とした。この5 mlを大豆粉培地 (Table 3) 100 ml中に

Table 3. Soybean medium

Soybean flour	10.0 g
Dried baker's yeast	10.0 g
K ₂ HPO ₄	2.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g
Distilled water	1000 ml
pH	6.8 - 7.0

移植して上と同様4日間培養した。培養上清0.5 mlを用いて濁度減少法²⁾により酵母細胞溶解活性 (Lytic activity, L. A.) を測定し、次式により%で表わした。

$$L. A. (\%) = \frac{D_0 - D_t}{D_0} \times 100$$

D₀: 酵素を加えない酵母懸濁液の吸光値

D_t: 酵素を加えた酵母反応液の吸光値

またL. A.の高かった平板上の菌は、Table 2のチロシン寒天培地およびTable 1の酵母寒天培地に移植して以下の保存試験に供した。

2. 菌の保存試験

a) 継代培養保存法。上記培地のほかに、酵母エキス・でんぶん寒天培地 (Table 4) およびアスパラギン・グルコース寒天培地 (Table 5) に菌を接種し、28°C、2週間生育させた斜面培養を、5°Cに保存した。

b) 流動パラフィン重層法⁶⁾。042菌株ではチロシン寒天斜面培養および酵母エキス・でんぶん寒天斜面培養、202菌株では酵母寒天斜面培養の上に滅菌した流動パラフィンを培地の上1 cmまで重層し、密栓して4°Cの低温室に保存した。

c) 蒸留水懸濁法⁶⁾。b)と同じ組成の平板培地に生育した菌を集めて滅菌蒸留水に懸濁し、2 mlずつ小型スクリュウキャップ付バイアルに分注し、4°Cの低温室に保存した。

d) 希薄寒天液懸濁法⁶⁾。c)と同様に培養した菌を滅菌した1/10,000濃度のTriton X-100溶液 (保湿剤) 中に懸濁し、これに加温溶解した栄養寒天 (Oxoid, Table 6) を最終寒天濃度1.25g/lになるように加えた。

Table 4. Yeast-starch-agar medium⁴⁾

Soluble starch	10 g
Yeast extract	2 g
Agar	15 g
Distilled water	1000 ml
pH	7.0

Table 5. Asparagine-glucose-agar medium⁵⁾

Asparagine	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
Beef extract	2.0 g
Distilled water	1000 ml
pH	6.8 - 7.0
Agar	17.0 g
Glucose	10.0 g

Table 6. Nutrient agar (Oxoid)

'Lab-Lemco' beef extract	1 g
Yeast extract (Oxoid L 20)	2 g
Peptone (Oxoid L 20)	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Distilled water	1000 ml
pH	7.4

この懸濁液を2 mlずつ c)と同様分注して4°Cで保存した。

e) 寒天斜面培養の凍結保存法⁶⁾。小型スクリュウキャップバイアルにb)と同じ組成の斜面培地をつくり、菌を充分生育させたのち密栓して-20°Cで凍結保存した。

f) 50%グリセリン懸濁液凍結保存法⁶⁾。b)と同じ組成の平板培地に生育させた菌を集めて滅菌した50%グリセリンに懸濁し小型バイアルに分注し密栓してから-20°Cで凍結保存した。

g) 液体窒素による凍結保存⁶⁾。酵母寒天培養およびチロシン寒天培養の場合は50%グリセリン懸濁液とし、酵母エキス・でんぶん寒天培養の場合は孢子着生が少ないため滅菌したコルクボーラーで菌体を含む寒天をうちぬき50%グリセリンを入れたバイアルに5~6枚加えて浸漬した。これらのバイアルをアセトン中につけ、ドラ

イアスを除々に加えて温度の降下速度を毎分1°C前後になるよう調節しながら試料を-30°C付近まで下げて完全に凍結させた。ついで液体窒素中(-196°C)に移して急激に温度を下げてそのまま保存した。

h) 凍結乾燥法⁶⁾。b)と同じ組成の平板培地に生育した菌を集めて滅菌した分散媒(スキムミルク10%, グルタミン酸ナトリウム1%)中に懸濁した。これを滅菌した綿栓付アンプル(6×100mm)中に0.1mlずつ分注したのち、綿栓を3~4mm残して炎でやき、チューブ内に約1cm押し込み、このアンプルをアセトンにつけ、g)の場合と同じ要領でドライアスを加え-30°Cまで下げてから真空凍結乾燥機で乾燥させた。終了後、五酸化リンを入れたデシケーターに移し真空ポンプで1~2時間減圧乾燥し、アンプルを取出し、凍結乾燥機が多岐管に装着して真空にしてから綿栓の上部をバーナーで溶封後、4°Cに保存した。

i) L-乾燥法⁶⁾。この方法は少量の孢子懸濁液の水分を真空下で急速に蒸発乾燥させて保存する方法である。操作は予備凍結の部分を除きh)の項と同様であるが、分散媒は3%グルタミン酸ナトリウムを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0)を用いた。シャーレ4枚分の孢子を4mlの分散媒に懸濁し、L-乾燥用アンプル(8×110mm)に0.1mlずつ分注した。綿栓を切って約6cm程中に押し込み、綿栓より上をバーナーで熱してひいて細くし、このアンプルを真空ポンプで20~30分減圧乾燥し完全に乾燥したら細くした部分を再びバーナーで真空溶封した。凍結乾燥菌体の場合と同様4°Cで保存した。

1ヵ月保存後の202菌および7ヵ月保存後の042菌の一部についてL.A.の産生能を調べた。残りは引き続き

同じ状態で保存した。202菌の生存率を測定するためつぎのような操作を行なった。0.3% Tween 80を含む滅菌した生理的食塩水1ml中に保存した菌の孢子の少量をとって出来るだけ均質な懸濁液を作り、一部をとってトーマ氏血球計算盤を用いて顕微鏡により全孢子数を計算した。一方懸濁液を適当な濃度に希釈したのち、その0.1mlを酵母平板培地に植菌しよくひろげてから28°Cで培養し、コロニー数を測定して生存孢子数を求めた。これより、

$$\text{菌の生存率} = \frac{\text{生存孢子数}}{\text{全孢子数}} \times 100 \text{ を求めて} \% \text{ で示した。}$$

実験結果と考察

1. 202菌株および042菌株の紫外線照射による酵素生産能の回復

Table 7. Relationship between irradiation time and relative survival cells of *St. argenteolus* 042

time	survival	cells
0 ^{sec}	4.2×10^{10}	100%
40	6.9×10^9	16.4
80	3.1×10^8	0.7
120	2.5×10^7	0.06
160	1.0×10^5	0.0002
200	2.0×10^5	0.0005

Table 8. Production of L.A. of mutants derived from *St. argenteolus* 042 by irradiation of U. V. light

No. of colony	time	L. A.	No. of colony	time	L. A.	No. of colony	time	L. A.
1	100 ^{sec}	41%	11	100 ^{sec}	74%	21	200 ^{sec}	8%
2	"	64	12	"	13	22	"	42
3	"	16	13	"	46	23	"	11
4	"	16	14	"	57	24	160	12
5	"	14	15	"	68	25	"	45
6	"	41	16	"	38	26	"	39
7	"	17	17	"	19	27	"	70
8	"	52	18	200	13	28	120	83
9	"	50	19	"	78	29	"	61
10	"	50	20	"	35			

継代培養によって自然に変異退化した菌の酵素生産能を甦らせる手段としてこれまで多くの微生物に用いられてきた紫外線照射法を選んだ。これに先立ち、紫外線(2537 Å, 15W)を40cmの高さより042菌株の孢子懸濁液に照射して、照射時間と菌の生存率との関係を調べ、Table 7 に示した。一般に変異株の出現頻度が高いとされている10%以下の生存率を示すための照射時間は、本菌の場合80秒以上であると判断した。そこで孢子懸濁液に100~200秒間紫外線を照射したのち、生き残った菌を分離して液体培養しL.A.の生産能を調べた。Table 8 で明らかのように、042菌の28株中4株が70%以上のL.A.を示し、その発現率は14%であった。また202菌株についても同じ方法で100~300秒照射し、72個のコロニーの中から50%以上のL.A.を示した10菌株を分離した。Table 9 にその結果を示したが、L.A.が最も高

Table 9. Production of L. A. of mutants derived from *St. hygroscopicus* 202 by irradiation of U. V. light

No. of colony	time	L.A.	No. of colony	time	L.A.
5	300 ^{sec}	54%	18	150 ^{sec}	52%
8	250	58	22	"	61
9	100	55	44	"	60
10	"	54	47	"	64
12	"	60	72	200	62

かったのは、No.7株で64%であった。これは042菌から分離したNo.28株の83%に比べるとはるかに低い値であるが、いずれも自然界からスクリーニングした時の原菌株のL.A.に匹敵するものであった。酵母細胞壁溶解作用の主役を演ずるのはβ-グルカナーゼであり、放線菌の生産するβ-1,3-グルカナーゼはβ-グルカンによって誘導生成されることが報告されている。われわれの分離した菌の場合も合成培地中にブストラン、酵母グルカン、ラミナリンを添加すると、この順に培養液中の溶解酵素の生成が促進され、β-グルカナーゼの活性も上昇していることが観察されている²⁾。一方溶解酵素生産能を失った菌では、これらの誘導物質の添加効果は全く認められなかった。紫外線照射によって細胞内のDNA中にチミンダイマーが生成されることはすでに確認されているが⁷⁾、その後の研究によると、この変異にはさらにいくつかの修復機構が働き、中でもエラーがちの修復

機構が変異成立の主因であるといわれている⁸⁾。042菌株や202菌株の酵素生産能の回復には、果して上記のような修復機構が働いたかどうかは、明らかでない。いずれにしても、紫外線照射によってL.A.生産能の高い菌株を分離することができた。

2. 菌の保存方法

つきに、これらの菌の生理的特徴を失うことなく必要な期間、できれば半永久的に保存するにはどのような方法がよいかについて検討を行った。従来斜面培地に継代培養する方法が微生物の一般的保存方法として広く使われているが、最大の欠点は菌の変異や退化の危険が大き

Table 10. Relationship between repeated inoculation of strain 042 and its production of lytic activity

No. of inoculation	medium	L.A.
1st	Tyrosine-agar	68%
2nd	Tyrosine-agar	57
3rd	Tyrosine-agar	24
	Yeast-tyrosine-agar*	32
	Yeast extract-starch-agar	54
	Yeast-agar	74

* One percent of dried baker's yeast was added to tyrosine-agar medium.

Table 11. Relationship between repeated inoculation of strain 202 and its production of lytic activity

medium	L.A.	
	5 days culture	7 days culture
Tyrosine-agar medium	58%	77%
Yeast-agar medium	0	41
Tyr. -agar m. → tyr. -agar m.	6	—
Tyr. -agar m. → yeast-agar m.	62	81
Yeast-agar m. → yeast-agar m.	65	77
Yeast-agar m. → yeast-agar m.	28	50

ということである。Table 10にその一例を示したが、042菌株を、菌の生育と胞子の着生の良好なチロシン寒天培地に3回植えつぐと、液体培養液中に生産されるL. A.が次第に低下していくことがわかった。しかし3回目の移植時に酵母を含む培地を用いるとこの低下は抑制された。Table 11に示したように202菌株についても同様のことが観察された。202菌を分離した平板上の集落から、まずチロシン培地に移植すると生育もよくL. A.は58%であった。つぎに同じ培地に植えつぐとL. A.は6%に低下した。しかし2回目に酵母培地に植えつぐとL. A.生産能は全く低下しなかった。はじめに平板上より酵母斜面培地に移植すると、その菌のL. A.が液体培地に現われる日数は、チロシン培地に移植した菌の場合よりも5日程遅れることが観察された。これは2回目以降の植えつぎでは正常の生産経過に戻った。しかし酵母のみを有機栄養源とする培地で継代培養をくり返すと菌の増殖が次第にわるくなるため、この方法も好ましくないとされた。以上の結果から継代培養は本菌の保存に適切でないと判断した。

つぎに継代培養に代る菌の保存方法として実験方法の項でのべた8種類の方法について検討した。このうちb)~d)の方法は、菌を酸素との接触を断つかあるいは栄養分を除いた条件のもとで代謝速度を低下させて保存する方法であり、e)~i)の方法は菌を凍結するか水分を除去して細胞内の代謝を休止させた状態にして長時間生存させる方法である。

042菌株は7カ月保存後の標品を、202菌株は1カ月保存後の標品を用いて、まずチロシン寒天培地および酵母寒天培地にそれぞれ生育させて液体培養に移してそのL. A.産性能を測定した。042菌についてはその時のグルカナーゼの活性を、202菌については生在率も調べた。その結果をTable 12およびTable 13に示したが、代謝を低下させて保存する方法としては流動パラフィン重層法が、代謝を休止させて保存する方法の中では50%グリセリン懸濁液凍結保存法がそれぞれよい成績を示した。前者の場合、流動パラフィンを重層した斜面培地から菌を植えつぐと菌糸の生育が不良になる場合があったが、一旦生育すれば菌のL. A.生産能の再

Table 12. Production of lytic enzyme activity from strain 042 after seven month's storage

preservation	slant culture	L. A. glucanase	
Slant culture covered with liquid paraffin at 4°C	tyr. agar*	79	1.1 U/ml
	yeast agar**	78	1.2
Spore suspension in distilled water, stored at 4°C	tyr. agar	55	1.1
	yeast agar	20	0.4
Spore suspension in 0.125% Oxoid agar, stored at 4°C	tyr. agar	73	1.2
	yeast agar	65	1.1
Slant culture kept in a freezer at -20°C	tyr. agar	73	2.0
	yeast agar	70	1.0
Spore suspension in 50% glycerol, stored at -20°C	tyr. agar	73	1.0
	yeast agar	83	1.1
Spore suspension in 50% glycerol stored in liquid N	tyr. agar	77	1.0
	yeast agar	26	0.3
Freeze dried spore kept in a cold room at 4°C	tyr. agar	26	0.3
Suck-dried spore kept in a cold room at 4°C	tyr. agar	26	0.3

After preservation, the strain 042 was inoculated to tyrosine-agar medium* and yeast-agar medium** respectively.

Table 13. Production of lytic enzyme activity from strain 202 after one month storage

Preservation	slant culture	survival L. A.	
Slant culture covered with liquid paraffin at 4°C	tyr. agar	%	43%
	yeast agar	—	55
Spore suspension in 0.125% Oxoid agar, stored at 4°C	tyr. agar	—	55
	yeast agar	—	10
Slant culture kept in a freezer at -20°C	tyr. agar	17	40
	yeast agar		42
Spore suspension in 50% glycerol stored at -20°C	tyr. agar	94	51
	yeast agar		12
Spore suspension in 50% glycerol stored in liquid N	tyr. agar	100	23
	yeast agar		62

現性は高かった。後者の方法では分散媒として用いるグリセリン濃度は、通常、10~15%の場合が多いようであるが、放線菌に関しては特殊な性質を保持させるために高い濃度が適しているといわれているので、今回は50%を採用した。

液体窒素中(-196°C)に保存する場合も同濃度のグリセリンを分散媒として用いた。凍結の際はすべて緩慢凍結法を採用した。液体窒素中に保存したL. A.の産生能は標品によってばらつきが見られた。これは保存後の融解速度に問題があったのかも知れない。一般に保存温度は低いほど良いようであり、凍結時の菌の死滅が少なければ凍結保存法は良い方法であると考えられる。今後分散媒の種類や濃度、凍結や融解速度を考慮しながら保存温度を考えてこの保存法のより良い条件を検討したいと考えている。胞子を懸濁液として冷蔵保存する場合は分散媒として蒸留水よりも希薄な栄養寒天液を用いる方が良いようであった。一方042菌について水分を除去して保存する凍結乾燥法と、L乾燥法を行い4°Cに保存した。7カ月後の菌の生育は良かったが、酵素の生産能は3分の1に低下した。この理由はまだ明らかにされていないが、代謝を休止させる手段としては、この方法より凍結させる方法が、本菌の場合より安全であると判断された。放線菌類の凍結乾燥保存法は清野⁹⁾によって

広く調べられており、これによると32属929菌株が乾燥直後ではいづれの属の菌株もすべて再生育し、保存上困難な点はないとされている。これより前に箕浦¹⁰⁾は放線菌の中には植つき、mineral oil seal、土壤保存、凍結保存では長期間保存できない菌株のあることを示したが、この点について清野⁹⁾は、その様なlabileな菌は新しい物質を生産するという事実から分離された新菌株に多いので、これらを凍結乾燥法で長期間変異せずに保存し得るかどうかは、今後の課題であると述べている。これらを参考にして放線菌のL乾燥法についてもさらに検討する予定である。

要 約

著者らの分離した放線菌 *St. nigroscopicus* 202 および、*St. argenteolus* 042 の酵母細胞壁酵素生産能は斜面培養を繰り返すと次第に低下したが、紫外線照射によって、再びこれを回復させることができた。

8種の保存法を用いて2種の菌の保存を試みたうち、最もよくL. A.の生産能を維持できたのは流動パラフィンを重層した斜面培養を冷蔵(4°C)保存する方法と、胞子を50%グリセリンに懸濁して凍結保存する方法であった。ついで希薄栄養寒天懸濁液の冷蔵保存法と寒天斜面培養の冷凍保存法が良好であった。

文 献

- 1) 江幡淳子, 角田万里子, 田中えり子, 栗田潤子; 本紀要; **22**, 15 (1974)。
- 2) 江幡淳子, 蛭田いずみ, 野川えり子, 安井由美; 本紀要; **29**, 1 (1981)。
- 3) E. B. Shirling and D. Gottlieb, Intern. J. Systematic Bacteriol., **16**, 313 (1966)。
- 4) H. E. Lechevalier *et al.*, J. Gen. Microbiol., **26**, 1 (1961)。
- 5) W. C. Haynes *et al.*, Appl. Microbiol., **3**, 361 (1955)。
- 6) 微生物研究会懇談会編: 微生物学実験法, 講談社, P. 94 (1976)。
- 7) R. B. Setlow and W. L. Carrier: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **51**, 226 (1964)。
- 8) E. W. Witkin; Bacteriol. Rev **40**, 869 (1976)。
- 9) 清野昭雄; 凍結及び乾燥研究会会誌, **17**, 25 (1971)。
- 10) 箕浦久兵衛; 醱酵協会誌, **22**, 345 (1964)。

(昭和59年11月6日受理)

Summary

In previous studies, two microorganisms, which strongly produced yeast-lytic enzyme were isolated and identified as *Streptomyces hygroscopicus* 202 and *S. argenteolus* 042.

Lately repeated inoculations of these were found to cause gradual decreases of the lytic activity.

However the activity was restored to the level of that of the original strains by irradiation of X-ray.

The reactivated strains were subjected to the storage test using various preparations such as the slant cultures, the spore suspensions suspended in different media and the dried specimens.

After the preservation for one month with the strain 202 and for seven months with the strain 042, the slant cultures covered with liquid n-paraffin kept at 4°C and the spore suspensions in 50% glycerol kept at -20°C were superior in survival and keeping the producibility of the lytic enzyme.

In the cases of the spore suspensions in diluted nutrient agar kept at 4°C and the slant cultures kept at -20°C, the producibility of the lytic enzyme was also relatively high.