

電気融合法を用いた異種間細胞融合による放線菌の育種

韓 龍雄*・永田信治・味園春雄・長崎 亀

(農学部発酵及び醸造学研究室)

Interspecific Hybridization of *Streptomyces* by Electrofusion

Long-Xiong HAN, Shinji NAGATA, Haruo MISONO, and Susumu NAGASAKI

Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Agriculture

Abstract: Interspecific electrofusion between protoplasts of *Streptomyces rimosus* Asp⁻Otc^r and *S. griseus* Cys⁻Sm^r, derived from *S. rimosus* IFO 12907 and *S. griseus* IFO 3357, respectively, by nitrosoguanidine treatment, was done. After the fusion treatment, protoplasts were regenerated on the R3 medium. The colonies appeared on the regeneration plates were selected successively for prototrophy and resistance to both oxytetracycline and streptomycin, and finally 9 out of 34,971 regenerants were isolated as a fusant. The phenotypes of the fusants resemble those of the parent strains. One of the fusant, designated as LH strain grows faster and accumulates more microbicide (s) in the culture medium than its parent strains do. The microbicide (s) acts on a wide range of microorganisms such as Gram-positive and Gram-negative bacteria, streptomycetes, yeasts, and fungi. Component of the microbicide (s) has not been clarified, but the presence of an antibiotic, which is distinguishable from the products of the parent strains by bioautographic analysis, was suggested.

緒 言

細胞融合は、染色体のみならず細胞質の融合をも伴うため、遺伝子の組換えとはまた違った利点を持った育種方法である。近年、山下らは放線菌のプロトプラスト融合により新規な抗生物質を生産する融合株を育成し、抗生物質探索の新領域を切り開いた^{1, 2)}。放線菌のプロトプラスト融合は、長年ポリエチレングリコールを用いて行われてきたが、操作の簡便性と融合の再現性、雑種細胞の高収率及び融合過程の顕微鏡的観察という面から、電気融合法の適用に大きな期待が寄せられるようになった。岡村らは、放線菌プロトプラストの電気融合法を確立し³⁾、それによって新規な抗生物質を生産する融合株を分離している⁴⁾。本研究において著者らは、グラム陽性菌、グラム陰性菌、酵母、カビに多重抗菌スペクトルを持つ *Streptomyces rimosus* の育種を目的として、*S. griseus* との異種間細胞融合を電気パルスを用いて行った。その結果、親株よりも抗菌物質の生産能が優れ、しかもバイオオートグラフィーにおいて両親株に見られない抗菌スポットを示す融合株を分離したので以下に報告する。

脚注 * : 中華人民共和国, 吉林省・延辺農学院

実 験 方 法

1. 供試菌株 *S. griseus* IFO 3357及び*S. rimosus* IFO 12907を親株として使用した。これら両菌株のニトロソグアニジン (NGT) 処理により栄養要求性変異株を分離し、実験に用いた。*S. griseus*は、*S. rimosus*の生産する抗生物質に対して強い感受性を示し、*S. rimosus*は*S. griseus*の生産する抗生物質に対して弱い感受性を示した。また、*S. rimosus*はオキシテトラサイクリン400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在下でも生育できるが、*S. griseus*は25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在下で生育できなかった。また、*S. griseus*はストレプトマイシン200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在下でも生育可能であるが、*S. rimosus*の生育は阻害された。

2. 使用培地 通常の培養には、3%ディフコ製TS培地 (pH 7.2)⁵⁾を用いた。栄養要求株の取得には、最少培地⁶⁾ (1%グルコース、0.1%コハク酸アンモニウム、0.5%塩化ナトリウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.05%リン酸水素二カリウム、0.001%硫酸第二鉄、pH 7.2) 及びCM培地 (1%マルトース、0.2%ディフコ製NAアミンAタイプ、0.1%酵母エキス、0.1%肉汁エキス、pH 7.3)を用いた。プロトプラスト調製用菌体の培養には、グリシン-TS培地 (1%グリシンを含むTS培地)を用い、プロトプラスト調製にはP培地⁷⁾ (ショ糖103 g、硫酸カリウム0.25 g、微量元素溶液⁸⁾ 2 ml、塩化マグネシウム2.03 gを純水800mlに溶解し滅菌後、別に滅菌した0.5%リン酸水素一カリウム10ml、3.68%塩化カルシウム100mlと0.25 M TES緩衝液 (pH 7.2) 100mlを加える)を用いた。プロトプラストの再生にはR3培地⁹⁾ (1.0%グルコース、1.5%コハク酸ナトリウム、0.4%ポリペプトン、0.4%酵母エキス、0.05%塩化カリウム、0.081%塩化マグネシウム、0.022%塩化カルシウム、0.02%リン酸水素二カリウム、0.025m TES緩衝液、pH 7.2)を用いた。抗生物質生産培地として、3%グルコース、1%コーン・スティープ・リカー、0.5%生大豆粉、0.5%塩化ナトリウム、0.3%硝酸ナトリウム、0.5%炭酸カルシウムからなる培地 (pH 7.0)を用いた。抗菌力試験のための細菌の培養には、PV培地 (1%ペプトン、0.3%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム、pH 7.3)、酵母及びカビの培養には、Wickerham培地 (0.3%酵母エキス、0.3%麦芽エキス、0.5%ポリペプトン、1%グルコース、pH 6.8)を用いた。

3. 栄養要求株の取得 親株に栄養要求性のマーカーを付与するため、NTG処理⁶⁾を行った。すなわち、放線菌胞子をMS溶液 (0.05%硫酸マグネシウム、0.5%塩化ナトリウム、ツイーン80)で洗浄した後、 $10^8 \sim 10^9$ 個/mlになるよう同溶液に懸濁した。これに50mM トリスーリンゴ酸緩衝液 (pH 9.0)に溶かしたNTGを加え (最終濃度1.5mg/ml)、30°Cで70分間加温した。0.22 μm のメンブレンフィルター (ゲルマン製)で胞子を集め最少液体培地中に移植し、14時間30°Cで培養して正常胞子を発芽させてから5 μm のメンブレンフィルターで濾過した。濾液中の胞子をCM培地で培養し、生育したコロニーをレブリカ法により最少培地に移植し、ネガティブセレクション法により栄養要求変異株を分離した。栄養要求性の決定は、Beijerinckのオキサノグラフ法によって行った⁹⁾。

4. プロトプラストの調製 プロトプラストの調製は、岡西らの方法⁷⁾を一部改変して行った。斜面培地の保存菌株から胞子を取り、試験管内に直径約4 mmのビーズを含む5 mlのTS培地で2日間振とう培養を行った後、その培養液を100mlのグリシン-TS培地に移植し、さらに20時間振とう培養を行った。遠心分離で菌糸体を集めP培地で洗浄後、同溶液に懸濁した。これに、P培地に溶かしたリゾチーム (シグマ製)とアクロモペプチダーゼ (和光純薬製)を最終濃度がそれぞれ2 mg/mlになるように加え30°Cで、*S. griseus*は50分間、*S. rimosus*は70分間加温した。調製したプロトプラストはP培地で洗浄し、0.3Mショ糖溶液で2回洗浄した後、同溶液に懸濁して5 μm のメンブレンフィルター (ゲルマン製)を用いて菌糸体を除去した。プロトプラスト濃度は、オリンパ

ス位相差顕微鏡を用いてトーマ血球計数器により 1×10^8 個/ml に調整した。

5. プロトプラスト融合 プロトプラスト融合は、岡村らの方法⁴⁾に従って行った。 1×10^8 個/ml に調整した両変異株のプロトプラスト溶液を等量混合し、その $10 \mu\text{l}$ を電極間隔 0.5mm のチャンパー (島津製 SSH-C11) に入れ、島津細胞融合装置を用いて $800\text{V}/\text{cm}$, 1MHz , 15 秒の誘電泳動の後に 6KV の直流パルス $20 \mu\text{s}$ を与えることによって融合処理を行った。

6. プロトプラストの再生 白浜らの方法⁵⁾に従い、下層培地として 1.6% 寒天を含む R3 培地を、上層培地として 0.4% 低融点アガロース (ニッポンジーン製) を含む R3 培地を用いた。融合処理後のプロトプラスト溶液を 0.3M ショ糖溶液で希釈し、融解した上層培地と共にあらかじめ固めておいた下層培地上に流し込んだ。室温で 2 時間クリーンベンチ内で寒天培地表面を乾燥させ、 30°C で $8 \sim 10$ 日間静置培養を行った。

7. 融合株の選択 抗生物質耐性能と両親株の変異処理によって付与した栄養要求性をマーカーとして融合株の選択を行った。すなわち再生後のコロニーを、最少平板培地にレプリカして栄養要求株を淘汰した後、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ オキシテトラサイクリンと $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシンを含む最小培地に移植して、プロトトロフィックな両耐性株を選択した。

8. 抗生物質の生産能 両親株と融合株の胞子を抗生物質生産培地に植え、 30°C で 6 日間振とう培養した後、その上澄み及び菌体のアセトン抽出液を用いて、カップ法により抗生物質の生産能を調べた。被験菌としてグラム陽性菌 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, グラム陰性菌 *Escherichia coli* K12, 酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, カビ *Aspergillus oryzae* と *Mucor javanicus* を用いた。また抽出液を、イソプロパノール:ピリジン:酢酸:水 ($15:10:3:12$) 及び酢酸エチル:イソプロパノール:水 ($65:24:11$) を展開溶媒として、キーゼルゲル 60F₂₅₄ (メルク製) による薄層クロマトグラフィーで展開後、バイオオートグラフィーを行った。被験菌には、*B. subtilis* ATCC 6633 を使用した。

結果及び考察

1. 栄養要求変異株の分離 NTG 処理により分離した変異株の栄養要求性をオキサノグラフ法によって調べたところ、*S. griseus* の変異株はシステイン要求株、*S. rimosus* の変異株はアスパラギン酸要求株であった。これらの変異株の復帰率は 10^{-7} 以下であり、抗生物質耐性能の変化は見られなかった。

2. 融合株の分離 両変異株のプロトプラスト融合処理後に再生した $34,971$ 株のうち、最少培地で生育する菌株 83 株を分離した。さらにこのうちストレプトマイシンとオキシテトラサイクリンの両方に対して耐性な融合株 9 株を分離した。これらの融合株について形態学的性状を観察したところ、すべての融合株が両親株の特徴を併せ持っていた。次に、得られた融合株の抗生物質生産能を調べた。抗生物質生産培地で 30°C , 6 日間振とう培養し、その培養液及び菌体のアセトン抽出液を用いてバイオオートグラフィーを行った (Fig. 1)。融合株のバイオオー

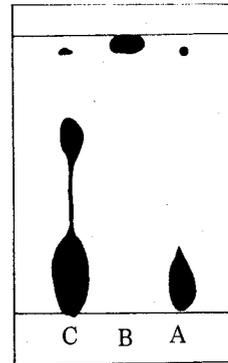


Fig. 1: Bioautogram of the products from parent strains and fused strain. The filtrated cultures were chromatographed with an ethylacetate/isopropanol/water ($65:24:11$) solvent system. A, *S. rimosus*; B, *S. griseus*; C, LH strain. Antibiotic activities were determined against *B. subtilis*.

トグラムは *S. rimosus* のそれに類似し, *S. griseus* とは明かに異なっていた。さらに, 融合株には両親株にない抗菌スポットが検出された。

3. 融合株 LH strain の生育と抗生物質生産能 融合株の中で顕著な抗菌活性を示した LH strain を用いて, 3 倍濃度の CM 培地における生育と抗生物質生産能の経時的变化について調べた。Fig. 2 に示すように LH strain は初期生育が僅かに早く, 培養 2 日目から抗生物質を培養液中に放出し, *B. subtilis* に対して最も強い抗菌活性を示すことがわかる。

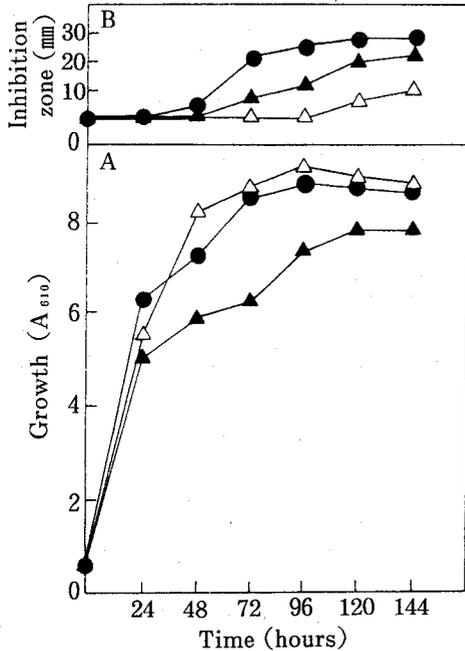


Fig. 2. Time course of growth (A) and antibiotic production (B). Parent strains and LH strain were respectively incubated at 30°C in CM medium with shaking. The antibiotic activities of filtrates of the cultured broth were examined against *B. subtilis*, using the cup assay method. -▲-, *S. rimosus*; -△-, *S. griseus*; -●-, LH strain.

4. LH strain の抗菌活性 両親株と融合株について, 培養 6 日後の培養濾液の抗菌活性を比較した (Table 1)。まず, 濾過滅菌した培養濾液を 5 ml の PV 培地に添加し *B. subtilis* を接種した結果, LH strain の培養濾液は 15 $\mu\text{l/ml}$ の添加で生育を阻止し, *S. rimosus* は 100 $\mu\text{l/ml}$, *S. griseus* は 200 $\mu\text{l/ml}$ を必要とした。また, 湿菌体 1 g のアセトン抽出液についてカップ法により検定した結果, その阻止帯の平均直径は *S. rimosus* の抽出液が 22.5 mm, *S. griseus* が 16.5 mm, LH strain が 27.5 mm であり融合株の抗生物質生産能が両親株の生産能よりも優れていた。さらに, 各菌株の生産する抗生物質の抗菌試験の結果を Table 2 に示した。融合株 LH strain の生産する抗生物質は, *S. rimosus* と同様に細菌, 酵母, カビなどに広く効果があり, さらに強い活性を示すことがわかる。

Table 1. Antibacterial activity of parent strains and LH strain against *B. subtilis*

Organisms	Filtrated cultures ($\mu\text{l/ml}$ of medium)							
	400	200	100	50	25	15	10	5
<i>S. rimosus</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>S. griseus</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
LH strain	+	+	+	+	+	+	-	-

+, Inhibition zone was formed.;

-, Inhibition zone was not formed.

Table 2. Antimicrobial spectra of parent strains and LH strain

Organisms	Inhibition zone (mm)				
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>M. javanicus</i>	<i>A. oryzae</i>
<i>S. rimosus</i>	19.0	22.0	26.5	21.5	21.5
<i>S. griseus</i>	14.0	10.0	—	—	—
LH strain	20.5	28.0	30.0	36.5	22.5

—, Inhibition zone was not formed.

以上の実験結果は、電気融合法を用いた放線菌の異種間細胞融合が、抗生物質生産菌の育種に有効な手段であることを示唆している。本研究で得られた融合株 LH strain が、新規な抗生物質を生産しているかどうかについては、さらに詳細な解析が必要であるが、形態学的・生理学的性状において LH strain が両親株の優性形質を示し、さらに高い抗生物質生産能を有することが明らかになった。

これまでに、異種間細胞融合によって放線菌の育種が行われ、実用化されつつある^{1,2,4,11)}。細胞融合によって、新たな抗生物質が生産されるようになる原因として、休止遺伝子の発現や両親株の持っている抗生物質合成経路の混成、合成系に異常をきたし抗菌活性をもつ前駆体が出現するようになることなどが考えられる。今後さらに融合株の生産する抗生物質や遺伝子の解析を要するが、異種間細胞融合は新規な抗生物質生産や抗菌活性の増幅など、抗生物質生産性放線菌の育種において、広く有効な手段であることが示唆された。

要 約

本研究では、*S. rimosus* IFO 12907 と *S. griseus* IFO 3357 の NTG 変異処理によって、選択マーカーとして栄養要求性を有する変異株を作製し、両菌株の電気融合を試みた。得られた融合株は、形態学的・生理学的に両親株の性状を有することを確かめた。融合株の中から選択した LH strain は両親株に比べ生育も早く、最も優れた抗生物質生産能を有していた。LH strain の生産する抗生物質は、細菌・酵母・カビに対して抗菌力を示した。さらにバイオオートグラフィーの結果から、両親株の生産しない新規な抗生物質を生産することが示唆された。

文 献

- 1) YAMASHITA, F., HOTTA, K., KURASAWA, S., OKAMI, Y., and UMEZAWA, H.: New antibiotic-producing streptomycetes, selected by antibiotic resistance as a marker. (I) New antibiotic production generated by protoplast fusion treatment between *Streptomyces griseus*. *J. Antibiot.*, **38**, 58-63 (1985).
- 2) HOTTA, K., YAMASHITA, F., OKAMI, Y., and UMEZAWA, H.: New antibiotic-producing streptomycetes, selected by antibiotic resistance as a marker. (II) Features of a new antibiotic-producing clone obtained after fusion treatment. *J. Antibiot.*, **38**, 64-69 (1985).
- 3) OKAMURA, T., NAGATA, S., MISONO, H., and NAGASAKI, S.: Interspecific electrofusion between protoplasts of *Streptomyces antibioticus* and *Streptomyces fradiae*. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1433-1438 (1988).
- 4) OKAMURA, T., NAGATA, S., MISONO, H., and NAGASAKI, S.: New antibiotic-producing

- Streptomyces TT-strain, generated by electrical fusion of protoplasts. *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 221-225 (1989).
- 5) BALTZ, R. H.: Genetic recombination in *Streptomyces fradiae* by protoplast fusion and cell regeneration. *J. Gen. Microbiol.*, **107**, 93-102 (1978).
 - 6) 石川辰夫編: 微生物学実験法, p. 301-303, 共立出版, 東京 (1985).
 - 7) OKANISHI, M., SUZUKI, K., and UMEZAWA, H.: Formation and reversion of streptomycete protoplasts: cultural condition and morphological study. *J. Gen. Microbiol.*, **80**, 389-400 (1974).
 - 8) 岡西昌則: 遺伝子組換え実用化技術第三集, p. 127-132, フジテクノシステム, 東京 (1981).
 - 9) 東京大学農芸化学教室編: 実験農芸化学, p. 267-270, 朝倉書店, 東京 (1960).
 - 10) SHIRAHAMA, T., FURUMAI, T., and OKANISHI, M.: Modified regeneration method for streptomycete protoplasts. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1271-2731 (1981).
 - 11) GOMI, S., IKEDA, D., NAKAMURA, H., NAGANAWA, H., YAMASHITA, F., HOTTA, K. KONDO, S., OKAMI, Y., and UMEZAWA, H.: Isolation and structure of a new antibiotic, indolizomycin, produced by a strain SK2-52 obtained by interspecies fusion treatment. *J. Antibiot.*, **37**, 1491-1494 (1984).

(平成元年9月30日受理)

(平成元年12月27日発行)