

# ポリエチレングリコールを用いた異種間細胞融合による放線菌の育種

岡村 徳光・永田 信治・味園 春雄・長崎 亀

(農学部発酵及び醸造学研究室)

## Streptomycetes Improvement by the Interspecific Protoplast Fusion Induced by Polyethylene Glycol

Tokumitsu OKAMURA, Shinji NAGATA, Haruo MISONO and Susumu NAGASAKI

Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Agriculture

**Abstract :** The polyethylene glycol induced interspecific fusion between protoplasts of *Streptomyces antibioticus* producing multihomocysteinyl streptomycin and *S. fradiae* producing neomycin generated a fusant which has an ability to synthesize multihomocysteinyl streptomycin and a new antibiotic. After the polyethylene glycol-induced fusion treatment, we obtained fusants which resist to multihomocysteinyl streptomycin and neomycin. The regeneration of protoplast or self-fused protoplast, however, did not generate a clone resist to both antibiotics. One of the fusants, F1 strain, has a high antibiotic productivity and produces at least 6 antibiotics in which multihomocysteinyl streptomycin and new antibiotic are included but not neomycin. This strain is very similar in physiological properties to parent strains. The new antibiotic which has not been produced by the parent strains has a comparatively high antibiotic activity against some range of gram-positive bacteria. Thus, the interspecific fusion treatment on the streptomycetes protoplast was shown to be a useful tool for the breeding of a novel antibiotic producer.

### 緒 言

放線菌のプロトプラスト融合は、抗生物質生産菌の生産能の改良や新規な抗生物質生産能の育成に、有効な手段になる可能性を持っている。これまでに、放線菌のプロトプラストの再生や同種間の細胞融合によって、新たに抗生物質耐性能を獲得した例<sup>1)</sup>や、異種間細胞融合によって新規な抗生物質を生産する放線菌を育種した例<sup>2-4)</sup>が知られている。本研究において著者らは、マルチオマイシン生産菌 *Streptomyces antibioticus* の育種及び抗生物質生産能の遺伝学的研究を目的として、本菌株とは互いに生育を阻止し合うネオマイシン生産株 *S. fradiae* との異種間細胞融合を、ポリエチレングリコール法に従って行った。その結果、両抗生物質に耐性であると共に親株が従来生産しなかった抗生物質を生産する融合株を分離した。

### 実験方法

#### 1. 供試菌株

クマイイ化学より譲与されたマルチオマイシン生産菌 *S. antibioticus* 及び、ネオマイシンを生産する *S. fradiae* IFO 12733 を用いて実験を行った。これらは共に自らが生産する抗生物質に対する耐性能を持つが、相互の生育は阻止し合う菌株である。

## 2. 使用培地

通常の培養には3%ディフコ製TS培地 (pH 7.2)<sup>5)</sup>を用いた。またプロトプラスト調製のための培養には、グリシン-TS培地 (0.8%グリシンを含むTS培地)を用いた。抗生物質生産培地として、MM培地 (4%ラクトース, 4%生大豆粉, 0.9%りん酸水素一カリウム, 0.4%硫酸ナトリウム, 0.4%麦芽エキス, pH 5.2)あるいはYM培地 (1%麦芽エキス, 0.4%酵母エキス, 0.4%グルコース, pH 7.2)を用いた。融合菌株の保存には、CM培地 (1%マルトース, 0.2%ディフコ製NZアミンAタイプ, 0.1%酵母エキス, 0.1%肉汁エキス, 2%寒天末, pH 7.3)を用いた。

## 3. プロトプラストの調製

岡西らの方法<sup>6)</sup>に従ってプロトプラストの調製を行った。斜面培地の保存菌株から胞子を取り、試験管内に直径約4mmのビーズを含む5mlのTS培地に移植した。*S. fradiae*は二日後、*S. antibioticus*は三日後に、その培養液1mlを5mlのグリシン-TS培地に移植し、さらに24時間振とう培養を行った。遠心分離後の菌糸体をテフロン製ホモジナイザーで粉砕し、P培地で洗浄後同じ溶液に懸濁した。これにリゾチーム (シグマ製)とアクロモペプチダーゼ (和光純薬製)をそれぞれ1mg/mlになるように加え、30°Cで50分間加温した。調製したプロトプラストを滅菌したガーゼによって菌糸体と分離し、遠心後P培地で洗浄し同培地に懸濁した。プロトプラスト濃度の調整は、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行った。

## 4. プロトプラスト融合

プロトプラスト融合は山下らの方法<sup>2)</sup>を一部改良して行った。P培地で約 $1 \times 10^9$ 個/mlに調整したプロトプラスト溶液を、0.9mlのポリエチレングリコール溶液と混合して室温で3分間加温した。このポリエチレングリコール溶液は4gのポリエチレングリコール4000を、6mlのDMSO-P培地 (15:85)に溶かしたものを使用した。融合処理後、9mlのP培地で洗浄し1mlの同培地に懸濁した。

## 5. プロトプラストの再生

白浜らの方法<sup>7)</sup>に従い、下層培地として1.8%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P培地に希釈し、融解した上層培地と共に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14日間静置培養を行った。

## 6. 融合株の選択

抗生物質耐性をマーカーとして融合株の選択を行った。再生処理三日後に、1 $\mu$ g/mlのマルチオマイシン及びネオマイシンを含むR3寒天培地を重層することによって両耐性株を選択した。さらに再生した菌株の胞子を1 $\mu$ g/mlの両抗生物質を含むCM培地に移植し、30°Cで7日間静置培養の後に両耐性株を選別した。

## 7. 生理学的諸性質と胞子の観察

糖の資化性、でんぷんの加水分解能などの生理学的性質は、従来の方法に準じて調べた。さらにゲル電気泳動法を用いた酸化還元酵素の検出は、超音波破碎した菌体の遠心分離後の上清を粗抽出液として、Davisの方法<sup>8)</sup>に従って電気泳動した。アミノ酸及びアルコール脱水素酵素の検出は大島らの方法<sup>9)</sup>に準じて行った。また胞子の形態観察は、保存培地より胞子を取りコロジオン支持膜作製法に従って固定し、日立電子顕微鏡HS-7S型により行った。

## 8. 抗生物質の分離と解析

親株及び融合株の胞子をMM培地もしくはYM培地で30°C、7日間振とう培養した後に遠心分離し、その上澄み及び沈澱物のアセトン抽出液を用いて、カップ法により抗生物質生産能を調べた。被験菌としてグラム陽性菌 *Bacillus subtilis* ATCC 6633、グラム陰性菌 *Escherichia coli* K 12、酵母

*Saccharomyces lactis*, カビ *Mucor javanicus* を用いた。また抽出液をキーゼルゲル 60 F-254 (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。抗生物質の精製には、アセトン、酢酸エチルやヘキサンによる抽出・沈澱とシリカゲル (シグマ製) カラムクロマトグラフィー及び日立高速液体クロマトグラフィー装置 655 A-II を用いた ODS カラム AM-312 (山村科学製) による逆相クロマトグラフィーを用いて行った。精製標品の分析は、吸収及び蛍光スペクトル、赤外分光分析により行った。

## 結果及び考察

### 1. 複数の耐性能を有する融合株の分離

*S. antibioticus* は、自己の生産するマルチオマイシンに対する耐性能を持つが、ネオマイシンに対して  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  で感受性を示す。逆に *S. fradiae* は、自己の生産するネオマイシンに対する耐性能をもつが、マルチオマイシンに対して  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  で感受性を示す。そこでまずプロトプラスト化あるいは自己融合によって、両抗生物質に対する耐性能を持つ菌株の分離を試みたが、*S. antibioticus*, *S. fradiae* 共に両抗生物質を含む培地上で生育可能な菌株は得られなかった。しかしながら異種間細胞融合によって、両者に耐性能を有する菌株を得ることができた (Table 1)。従ってこの両耐性株は、二種の親株のそれぞれの形質を受け継いだ結果、得られたものであることが推定される。このような菌株は、新たな抗生物質の生産能と耐性能を持つ可能性が期待される<sup>10)</sup> ので、さらに多くの両耐性株を分離し以下の実験に用いた。

Table 1. Appearance of MM<sup>r</sup> NM<sup>r</sup> clones after protoplast fusion treatment

Addition to medium	<i>S. antibioticus</i>		<i>S. fradiae</i>		<i>S. antibioticus</i> + <i>S. fradiae</i>	
	Colony No.	Frequency	Colony No.	Frequency	Colony No.	Frequency
None	$1.1 \times 10^{10}$	1.0	$3.1 \times 10^{10}$	1.0	36	$1.7 \times 10^{-9}$
MM	$1.1 \times 10^{10}$	1.0	0	0	$5.5 \times 10^9$	$2.6 \times 10^{-1}$
NM	0	0	$3.1 \times 10^{10}$	1.0	$1.6 \times 10^{10}$	$7.4 \times 10^{-1}$
MM+NM	0	0	0	0	2	$9.3 \times 10^{-11}$

MM, Multhiomycin; NM, Neomycin (in 10 ml protoplast mixture)

### 2. 強い抗菌活性をもつ融合株の選択

分離したマルチオマイシン及びネオマイシン耐性能を持つ融合株の抗生物質生産能を調べた。

Table 2. Antimicrobial spectra of parent strains and fusants

Organisms	<i>S. antibioticus</i>	<i>S. fradiae</i>	Fusants					
			1	2	3	4	5	6
<i>B. subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>S. lactis</i>	-	+	-	+	-	+	+	+
<i>M. javanicus</i>	-	+	-	+	-	+	+	+
<i>S. antibioticus</i>	-	+	-	+	-	+	+	+
<i>S. fradiae</i>	+	-	+	+	+	+	+	+

+, Inhibition zone was formed; -, Inhibition zone was not formed

MM 培地で30°C, 7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カップ法により抗菌活性を調べた。その結果さまざまな抗菌スペクトルを持つ融合株が分離された (Table 2)。さらに, これら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。*S. fradiae* に類似する融合株が多くみられたが, 枯草菌に対しては両放線菌の混合した型のもが多く, 両方の親株に由来する抗生物質を作っていることが示唆された (Fig. 1)。そこで, これらの中でも特に顕著な抗菌活性を示した融合株 F1 strain を選択した。

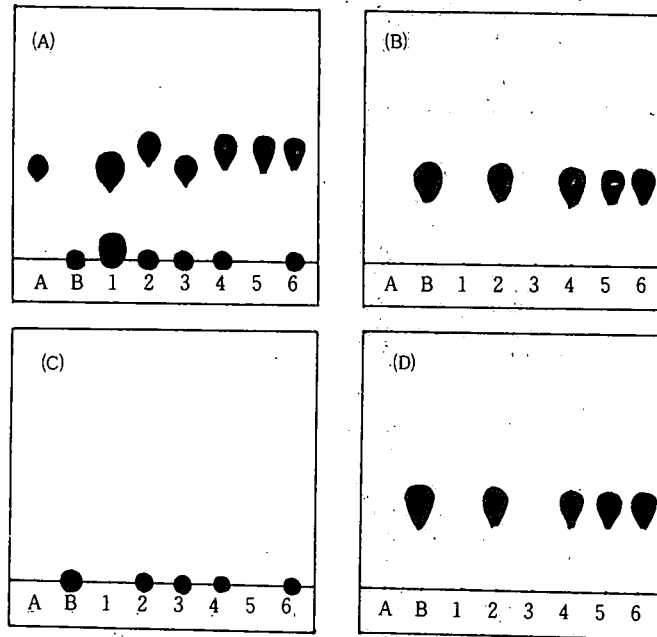


Fig. 1. Bioautograms of the products from parent strains and fused strains.

A, *S. antibioticus*; B, *S. fradiae*; 1-6, Fused strain.

Antibiotic activities were determined against *B. subtilis* (A), *S. lactis* (B), *E. coli* (C), and *M. javanicus* (D).

### 3. F1 strain の生理学的及び形態的諸性質

融合株 F1 strain について, まずその生理学的性質を調べ親株との比較を行った。Table 3 に示すように, 両親株間で見られる糖の資化性の相違について, F1 strain は *S. antibioticus* に類似していたが, ゲル電気泳動による酸化還元酵素を比較するとアラニン脱水素酵素は *S. antibioticus* 型, バリン脱水素酵素は *S. fradiae* 型, アルコール脱水素酵素は *S. antibioticus* 型とさらに親株には見られない強い活性バンドが確認された。また, 電子顕微鏡により各菌株の胞子の形状を観察したところ, 顕著な差異は認められなかった (Fig. 2)。さらに, 生育と抗生物質生産能の関係について調べたところ, *S. antibioticus* の生育が遅いのに対して F1 strain は *S. fradiae* と同じほど速く, さらに多量の抗生物質を培養液中に放出していることが確かめられた (Fig. 3)。以上のように融合株 F1 strain は両方の親株由来の形質を持つと共に, 生育も速く抗生物質生産には有利な特徴をもっていることが明らかになった。

Table 3. Physiological properties of parent strains and F1 strain

Characteristics	<i>S. antibioticus</i>	<i>S. fradiae</i>	F1 strain
Chromogenicity: deep brown pigment on organic media	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+
Cellulose decomposition	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+
Proteolytic activities: gelatin liquefaction	+	+	+
milk peptonization	+	+	+
Carbon utilization: glucose, arabinose, xylose	++	++	++
galactose, sucrose, mannose	++	-	++
mannitol, rhamnose, cellulose	-	-	-
Alanine dehydrogenase	+(A)	+(F)	+(A)
Valine dehydrogenase	+(A)	+(F)	+(F)
Alcohol dehydrogenase	+(A)	+(F)	+(A)
			+(UN)

(A), *S. antibioticus* form ; (F), *S. fradiae* form ; (UN), unknown form

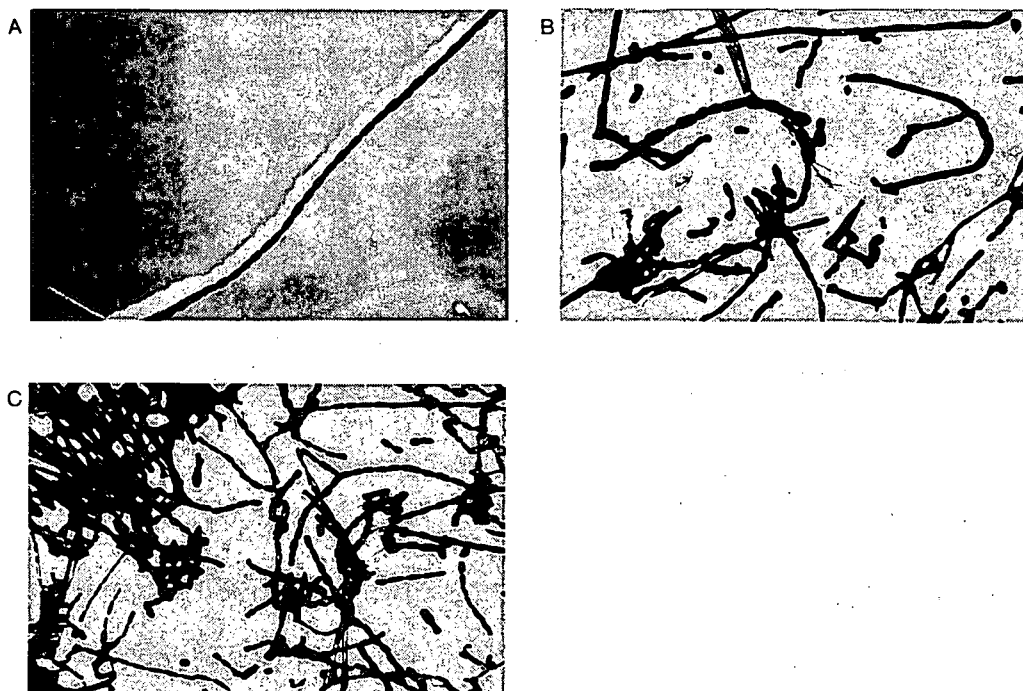


Fig. 2. Electron micrographs of spores of parent strains and fusant.

Photographs were taken with an Hitachi electron microscope HS-7 S ( X 2000 ).

A, *S. antibioticus* ; B, *S. fradiae* ; C, F1 strain.

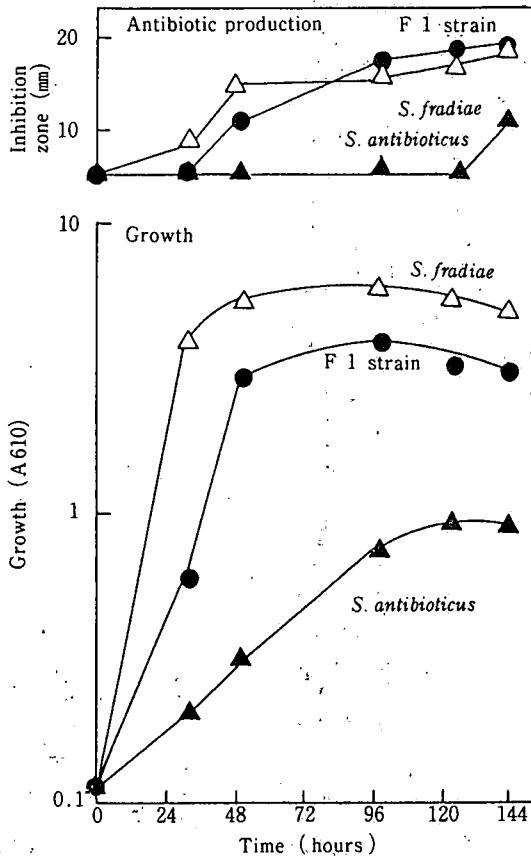


Fig. 3. Time course of growth and antibiotic production.

Parent strains and F1 strain were respectively incubated at 30°C in YM-medium with shaking. The antibiotic activities of filtrates of the cultured broth were examined against *B. subtilis*, using the cup assay method. —▲—, *S. antibioticus*; —△—, *S. fradiae*; —●—, F1 strain.

#### 4. F1 strain の抗生物質生産の至適条件

F1 strain の抗生物質生産における至適培地を、MM 培地を基本として検討した。Table 4 に示すように糖源、グルコースの添加、pH の影響などを調べたが、ラクトースを糖源とする pH 5.2 の MM 培地で生育させた場合が最も早く、力価も高かった。さらに同培地での培養時間と抗生物質生産の経過を調べた。培養液上清を毎日等量分取し薄層クロマトグラフィーにより展開後、枯草菌を被験菌としてバイオオートグラフィーを行った。Fig. 4 に示すように抗菌活性の強いスポット (A, B) が得られた。培養 5 日目に最も強い抗菌活性を示し、その後移動度の小さいスポット (B) が移動度の大きいスポット (A) に移行しているように思われる。後述するように、A はマルチオマイシンとその他数種類の物質を含んでいる。マルチオマイシンの生産は親株 *S. antibioticus* でも長い誘導期を要することから、A の経時的増加が理解できると共に、B の抗菌力を維持した分解物もしくは誘導体を含むことも考えられる。

Table 4. Antibiotic productivity in various media

Media	Inhibition zone (mm)	Time (day)	Final pH
Lactose (MM)	16	5	7.2
Glucose	15	7	6.5
Galactose	13	8	6.5
Maltose	19	5	7.1
Sucrose	9	8	7.2
Starch	14	6	7.0
MM + 0.4% glucose	13	5	7.2
Galactose + 0.4% glucose	11	8	7.3
Maltose + 0.4% glucose	10	8	7.3
Starch + 0.4% glucose	14	7	7.1
MM pH 6.0	15	7	6.8
pH 7.0	12	3	6.9
pH 8.0	10	3	7.2
pH 9.0	13	5	6.8

4.0% Carbon source, 4.0% soybean flour, 0.9%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.4%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0.4% malt extract (pH 5.2)

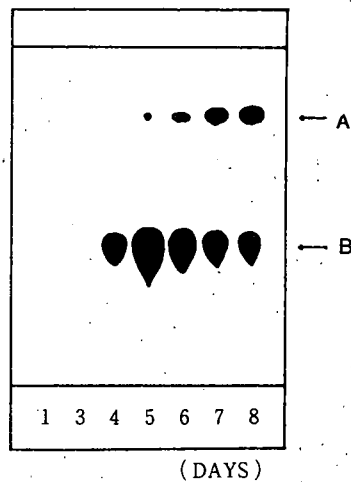


Fig. 4. Bioautogram of the filtrated culture of F1 strain.

F1 strain was incubated at 30°C in MM medium with shaking. The filtrates of the cultured broth were chromatographed with an ethyl acetate-isopropyl alcohol-water (65:24:11) solvent system. Antibiotic activity was examined against *B. subtilis*.

#### 5. F1 strain の生産する抗生物質

F1 strain を MM 培地で 30°C, 5 日間培養し, 培養液は直接, 沈澱物はアセトン抽出後酢酸エチル処理により抗生物質を回収した。これと同様の処理をした *S. antibioticus* 及び *S. fradiae* の抽出標品を, 薄層で酢酸エチル: イソプロパノール: 水 (65:24:11) により展開すると, Fig. 5-1 に示すように融合株にはマルチオマイシンと一致する A スポットと, 親株にはない B スポットが検出さ

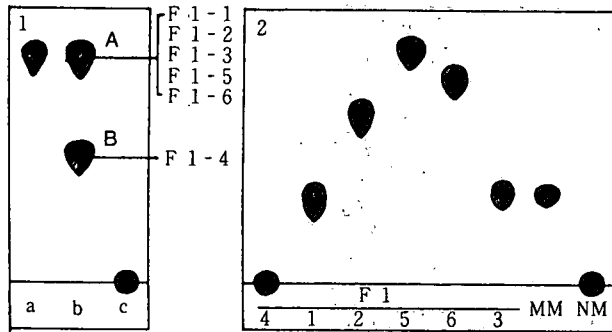


Fig. 5. Bioautograms of the antibiotic produced by the fusant.

1. The filtrated cultures were chromatographed with an ethyl acetate-isopropyl alcohol-water (65 : 24 : 11) solvent system. a: *S. antibioticus*, b: F1 strain, c: *S. fradiae*.

2. The isolated antibiotics were chromatographed with an ethyl acetate-hexane-methanol (6 : 5 : 2) solvent system. F1-1~6, antibiotics from F1 strain ; MM, multihomycin ; NM, neomycin. Antibiotic activity was determined against *B. subtilis*.

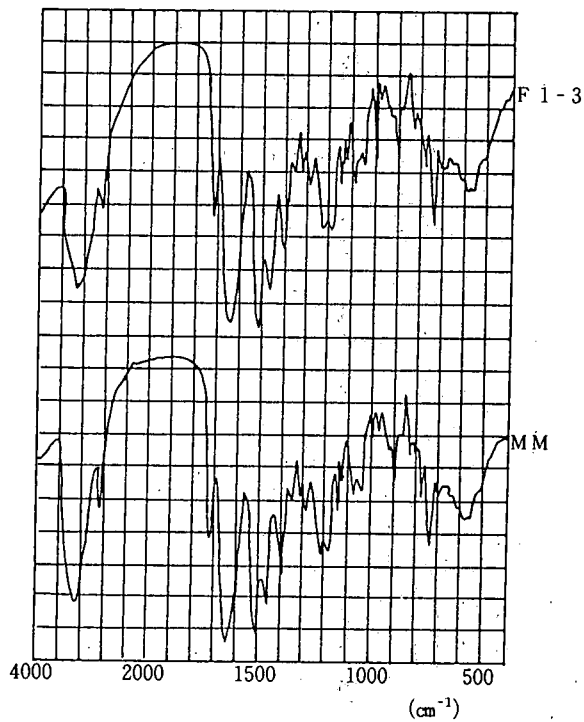


Fig. 6. IR spectrum of purified F1-3 and multihomycin.



れた。しかしながら、融合株からネオマイシンは検出されなかった。さらにこの標品からヘキサシロシカゲルカラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーなどにより、6種類の抗菌性物質を分離することができた (Fig. 5-2)。これらの中で、FI-3は吸光及び蛍光スペクトル、赤外分光分析 (Fig. 6) によりマルチオマイシンであることが示された。生産される抗生物質のうち最も活性が強く、親株が生産しないFI-4は薄層クロマトグラフィーの結果からマルチオマイシン及びネオマイシンとは異なることが示唆され、またTable 5に示すようにグラム陽性菌に対して強い抗菌活性を有していた。しかしながらグラム陰性菌やカビ、酵母などには全く活性を示さなかった。以上の結果よりポリエチレングリコール法を用いた放線菌の異種間細胞融合によって、従来親株が生産しない抗生物質を生産する融合株が得られた。FI-4が新規な抗生物質であるかどうかについては、さらに詳細な構造解析が必要である。先に山下らは、ストレプトマイシン生産菌 *S. griseus* とイスタマイシン生産菌 *S. tenjimariensis* との異種間細胞融合によって、新しい抗生物質インドリゾマイシンを分離している<sup>2-4)</sup>。融合株が新たな抗生物質を作り出す原因として、休止遺伝子の発現や従来持つ抗生物質合成経路の混成によることなどが考えられる。また合成系の異常から、抗菌活性をもつ前駆体の出現する可能性もある。しかしながらFI-4は、*S. antibioticus* 及び *S. fradiae* の紫外線照射、NTGなどによる変異処理によって得ることはできなかった。従ってFI-4が従来親株が作っていた抗生物質の前駆体である可能性は少ない。さらに遺伝子レベルでの解析を要するが、放線菌の異種間細胞融合は新規抗生物質生産菌の育種に有効な手段であることが示唆された。

Table 5. Antibacterial activity of FI-4

Organisms	MIC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	<0.2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> IFO 3762	<0.2
<i>Micrococcus luteus</i> IFO 12708	<0.2
<i>Bacillus subtilis</i> NIHJ PCI 219	<0.2
<i>Bacillus cereus</i> FDA 5	<0.2
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	>100
<i>Salmonella typhimurium</i> IFO 12529	>100
<i>Citrobacter freundii</i> IFO 12681	>100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO 3317	>100
<i>Enterobacter cloacae</i> IFO 12937	>100
<i>Serratia marcescens</i> IFO 12648	>100
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 21100	>100
<i>Proteus vulgaris</i> IFO 3988	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 12689	>100
<i>Alcaligenes faecalis</i> IFO 13111	>100
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IFO 13006	>100

## 要 約

本研究では、マルチオマイシン生産菌 *Streptomyces antibioticus* の育種及び抗生物質生産能の遺伝学的研究を目的として、本菌株とは互いに生育を阻止し合うネオマイシン生産株 *S. fradiae* との異種間細胞融合を行った。ポリエチレングリコール法に従って細胞融合した結果、両抗生物質に耐性であると共に従来親株が作らない抗生物質を生産する融合株を分離した。①両菌株をそれぞれのプロトプラストの再生あるいは自己細胞融合による耐性能の変化を試みたが、マルチオマイシン及びネオマイシンの両者に耐性な菌株は得られなかった。②異種間細胞融合によって両抗生物質に耐性な融合株が分離できた。これらは二種の親株の形質を受け継いでいると共に、新たな抗生物質の生成能及び耐性能を持つことが期待された。③両耐性能を持つ融合株の抗生物質生産能を調べたところ、親株由来のものと共に親株が生産しない抗生物質も生産する融合株を分離した。④特に強い抗菌活性を示した F1 strain は、グラム陽性菌に対して強い抗菌活性を示し、*S. antibioticus* の生産するマルチオマイシンと従来親株が生産しない抗生物質 F1-4 を生産した。⑤ F1 strain は、その生理学的性質に関して *S. antibioticus* とよく類似したが、増殖速度などについては、*S. fradiae* とよく似た性質を示した。

本研究に対し終始有益な御助言と御援助を賜った、武田薬品工業株式会社中央研究所小野英男博士に深謝いたします。

## 文 献

- 1) YAMASHITA, F., HOTTA, K., OKAMI, Y., and UMEZAWA, H.: *J. Antibiot.*, 38, 126-127 (1985).
- 2) YAMASHITA, F., HOTTA, K., KURASAWA, S., OKAMI, Y., and UMEZAWA, H.: *J. Antibiot.*, 38, 58-63 (1985).
- 3) HOTTA, K., YAMASHITA, F., OKAMI, Y., and UMEZAWA, H.: *J. Antibiot.*, 38, 64-69 (1985).
- 4) GOMI, S., IKEDA, D., NAKAMURA, H., NAGANAWA, H., YAMASHITA, F., HOTTA, K., KONDO, S., OKAMI, Y., UMEZAWA, H., and IITAKA, Y.: *J. Antibiot.*, 37, 1491-1494 (1984).
- 5) BALTZ, R. H.: *J. Gen. Microbiol.*, 107, 93-102 (1978).
- 6) OKANISHI, M., SUZUKI, K., and UMEZAWA, H.: *J. Gen. Microbiol.*, 80, 389-400 (1974).
- 7) SHIRAHAMA, T., FURUMAI, T., and OKANISHI, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 45, 1271-2731 (1981).
- 8) DAVIS, B. D.: *Ann. New York Acad. Sci.*, 121, 404-427 (1964).
- 9) OHSHIMA, T., MISONO, H., and SODA, K.: *J. Biol. Chem.*, 253, 5719-5725 (1978).
- 10) OKAMURA, T., NAGATA, S., MISONO, H., and NAGASAKI, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1433-1438 (1988).

(昭和63年9月30日受理)

(昭和63年12月27日発行)