

Trichosporon penicillatum のペクチナーゼによる 植物葉肉プロトプラストの単離

三ツ井敏明*・橋本憲明*・出口恭平**・平野眞弓**・伊賀上郁夫*

* 新潟大学農学部

(〒950-21 新潟市五十嵐2の町 8050)

** シキボウ中央研究所

(〒563 池田市伏尾町 103)

(1989年7月31日受付)

(1989年10月2日受理)

Trichosporon penicillatum SNO-3 が生産するエンドポリガラクトンナーゼを用いた植物葉肉プロトプラストの単離について検討した。マリーゴールド、コマツナ、ダイコン、レタス、コムギ、ライムギ、オオムギ、ヒエ、エンバク、トウモロコシおよびイネのシュート切片をセルラーゼオノズカ RS とエンドポリガラクトンナーゼの部分精製標品であるペクチナーゼ SE-150 を組み合わせて処理した。これら調べたすべての葉肉組織からプロトプラストを遊離させることができ、その収量は新鮮重量 1g 当り $1\sim 4 \times 10^6$ 個であった。また、ペクチナーゼ SE-150 酵素系で得られたレタスプロトプラストにおいて、細胞分裂およびコロニー形成が観察された。培養開始後、14 日目のコロニー形成率は約 18% であった。

1. 緒言

坂井ら¹⁻³⁾ は、ペクチン製造を目的にペクチナーゼを多量に生産する酵母 *Trichosporon penicillatum* SNO-3 株を温州ミカンの果皮から分離し、この酵素の精製と諸性質を明らかにした。SNO-3 株の生産するペクチナーゼは、エンドポリガラクトンナーゼ (EC 3. 2. 1. 15; poly- α -1, 4-D-galacturonide glycanohydrolase) で、ペクチン質中のメトキシ基をもたないガラクトン酸間の結合をランダムに切断する酵素であり、各種植物組織に強い親和性を示す。

われわれは、SNO-3 株の培地条件の改良および γ 線照射による菌株の育種によって、より高収量のペクチナーゼを得ることに成功した。本報では、この γ 線処理菌株が生産するペクチナーゼの部分精製酵素標品 (ペクチナーゼ SE-150) を用いたプロトプラスト調製を広範囲の植物葉肉組織について検討し、さらに単離されたプロトプラストの培養およびコロニー形成についても試みた。

2. 材料および方法

(1) ペクチナーゼの調製

i) ペクチナーゼ活性：ペクチナーゼがペクチン質

(ポリガラクトン酸) に作用し、糖化して生ずる還元力の増加をガラクトン酸に換算した。基質は、ポリガラクトン酸ナトリウム (Sigma) 0.5g を 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 100 ml に溶解した。反応は、基質 0.5 ml に対し 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で希釈した酵素液 0.5 ml を加え、37°C、10 分間反応させ、3,5-ジニトロサリチル酸液⁴⁾ (DNS) 1 ml で反応を停止した。基質および酵素液はともに反応開始前に 37°C に予熱した。反応停止後、沸騰水中で 5 分間加熱した後、冷却し、脱イオン水 10 ml を加え混合した。最後に、未分解のペクチン質を除くため、3,000 rpm、10 分間遠沈し、その上清の 540 nm における吸光度を測定した。ブランクは基質 0.5 ml に DNS 液 1 ml を加え、ついで酵素液 0.5 ml を加えて発色させた。酵素の力価は、pH 5.0、37°C で 10 分間にペクチン酸から 1 μ mol のガラクトン酸に相当する還元基を遊離させる酵素量を 1 単位とした。

ii) *Trichosporon penicillatum* SNO-3 株によるペクチナーゼ生産の改良：SNO-3 株によるペクチナーゼ生産を高めるため、培地条件の改良および γ 線照射による菌株の育種を行った。培地条件に関しては、基本培地 (2% (w/v) グルコース、0.5% (w/v) ポリペプトン、0.2

% (w/v) 酵母エキス, pH5.0)³⁾ に 0.5% (w/v) 肉エキスおよび 0.05% (w/v) MgSO₄·7H₂O を加えたところ, 基本培地より酵素生産能は約2倍に増加した。これをペクチナーゼ生産基本培地とした。次に, γ 線照射による菌株の改良を行うため, SNO-3 株を基本培地で培養, 集菌後, バイアル瓶に分注し, 100, 200, 400, 800 kR の線量を照射した (大阪府立放射線研究所に依頼)。菌液の濃度は, OD_{660nm} として, 76.4 と 18.7 の2つの濃度を用いた。OD_{660nm}=76.4 の濃度の菌液に 400 kR の線量を照射した時, 生存率が 0.1% と最も低かった。この菌液についてペクチナーゼ高生産株のスクリーニングを行った。 γ 線処理菌株 (13 株) を培養した結果, 無処理菌株に比べて全体的に活性は低かったが, 1 菌株のみが約2倍の活性を示した。これをペクチナーゼ生産培地で培養したところ, もとの SNO-3 株を基本培地で培養した場合より, 約4倍のペクチナーゼ活性の増加が認められた。以後, この γ 線処理菌株を使用した。

iii) ペクチナーゼ SE-150 および SE-200 の調製: 生産基本培地で 24 時間培養後, 濾過で除菌, その濾液を 40~70% のエタノール分画し, 凍結乾燥したものを SE-150 標品とした。SE-150 を CM-トヨパールでさらに精製したものを SE-200 標品 (単一酵素) とした。

現在市販されているペクチナーゼ標品について, ポリガラクトナーゼ活性を比較した結果を Table 1 に示す。

(2) 葉肉プロトプラストの調製

種々の植物シュートの葉肉組織をカミソリで細かく切断した後, 葉肉組織 1g 当り 10 ml のプロトプラスト調製用酵素液に浸漬した。プロトプラスト調製用酵素液の標準的な組成は以下のとおりであった: 0.5% (w/v) ペクチナーゼ SE-150, 0.5% (w/v) セルラーゼオノズカ RS (ヤクルト生化学), 0.5% (w/v) デキストラン硫酸カリウム, 0.5M マンニトール, 5 mM MgCl₂, 20 mM MES (pH 5.6)。1 分間軽く脱気した後, 27°C, 3 時間, 40 spm で振盪処理を行った。生成されたプロトプラ

Table 1. Polygalacturonase activities in various commercially available pectinases.

Enzyme	Activity
Pectinase ^a	4,396 U/ml
Pectolyase Y-23 ^b	345 U/mg
Protoenzyme ^c	205 U/mg
Macerozyme R-10 ^d	33 U/mg
Pectinase SE-150 ^e	2,052 U/mg
Pectinase SE-200 ^e	22,800 U/mg

^a Sigma, ^b Kikkoman, ^c Ueda Kagaku Kogyo,

^d Yakuruto, ^e Shikibo.

ト数は, トーマ血球計算盤を用いて測定した。測定は5回繰り返し, その平均値を求めた。

(3) レタス葉肉プロトプラストの培養

レタス葉肉プロトプラストの培養は鈴木らの方法⁵⁾に従って行った。

3. 結果と考察

ダイコン (*Raphanus sativus*) のシュートの葉肉組織を用いて, ペクチナーゼ SE-150 によるプロトプラスト化の最適反応条件の検討を行った。Fig. 1 は, プロトプラスト調製用酵素液中のペクチナーゼ SE-150 の濃度とダイコン葉肉組織から生成されるプロトプラストの収量との関係を示している。各濃度のペクチナーゼ SE-150 を含む酵素液で3時間処理した後, その収量を測定した結果, 0.5% (w/v) が最適濃度であることがわかった。対照としてペクチナーゼ SE-150 非存在下でのプロトプラスト生成の実験を行ったが, まったくプロトプラスト化は見られなかった。また, マリーゴールド (*Tagetes minuta*) の葉肉組織を用いて同様の実験を試みたところ, やはり 0.5% がペクチナーゼ SE-150 の最適濃度であった。Fig. 2 は, ダイコン葉肉プロトプラスト生成の経時的変化を示している。0.5% ペクチナーゼ SE-150 を含む酵素液で処理すると, 3 時間で生成されるプロトプラスト数は飽和することがわかった。マリーゴールド葉肉組織でも同様の結果が得られた。さらに, マン

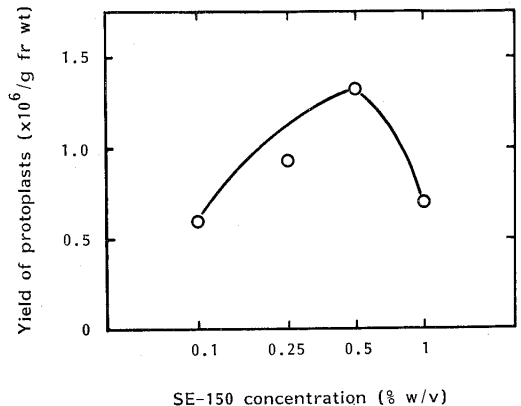


Fig. 1. Effect of pectinase SE-150 enzyme concentration on protoplast yield. Japanese-radish leaf tissue (1 g) were incubated with the enzyme solution (10 ml) containing various concentrations (0.1-1% w/v) of pectinase SE-150, 0.5% (w/v) cellulase ONOZUKA RS, 0.5% (w/v) potassium dextran sulfate, 0.5M mannitol, 5 mM MgCl₂ and 20 mM MES (pH 5.6) at 27°C for 3 hr.

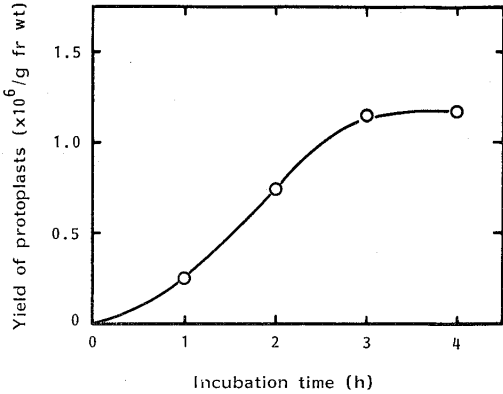


Fig. 2. Time course of protoplast liberation. Japanese-radish leaf tissues (1g) were incubated with the enzyme solution (10 ml) consisting of 0.5% (w/v) pectinase SE-150, 0.5% (w/v) cellulase Onozuka RS, 0.5% (w/v) potassium dextran sulfate, 0.5 M mannitol, 5 mM $MgCl_2$ and 20 mM MES (pH 5.6) at 27°C for 1 to 4 hr.

ニトール濃度についても検討したところ、0.5 M がプロトプラスト生成の最適濃度条件であった。以上の結果から、材料および方法に述べられているプロトプラスト調製の反応条件を以下の実験に用いることにした。

ペクチナーゼ SE-150 が広範囲の植物葉肉細胞のプロトプラスト化に有効であるかどうか検討するため、双子葉植物として、マリーゴールド、コマツナ (*Brassica rapa*)、ダイコン、レタス (*Lactuca sativa*)、単子葉植物として、コムギ (*Triticum aestivum*)、ライムギ (*Secale cereale*)、オオムギ (*Hordeum vulgare*)、ヒエ (*Panicum crusgalli*)、エンバク (*Avena sativa*)、トウモロコシ (*Zea mays*)、イネ (*Oryza sativa*) の葉肉組織のプロトプラスト化を試みた。ダイコンおよびマリーゴールドの葉肉組織で得られた反応条件で種々の葉肉組織を処理した結果、 $1\sim 4 \times 10^6$ 個/g 新鮮重量のプロトプラストが生成されることが明らかになった (Table 2)。ただ、ライムギの場合、葉肉組織 1g に対して酵素液 100 ml で処理すると 10^7 個/g 新鮮重量のプロトプラストが生成するという結果を得ており、したがって、それぞれの葉肉組織でのプロトプラスト化の最適反応条件を検討すれば、さらに高収量のプロトプラストが得られる可能性があると考えられる。

酵素処理によって生じた植物プロトプラストが細胞としての機能を有するものであることを確かめる一つの方法は、プロトプラストを培養し、コロニー形成を観察

Table 2. Liberation of protoplasts from various plant mesophyll tissues with SE-150 enzyme system.

Plant tissue	Yield of protoplasts ($\times 10^6$ /g fr wt)
<i>Tagetes minuta</i>	1.8
<i>Brassica rapa</i> ^a	1.7
<i>Raphanus sativus</i>	1.3
<i>Lactuca sativa</i>	2.9
<i>Triticum aestivum</i>	1.5
<i>Secale cereale</i>	3.1
<i>Hordeum vulgare</i>	1.6
<i>Panicum crusgalli</i>	1.3
<i>Avena sativa</i>	1.5
<i>Zea mays</i>	4.1
<i>Oryza sativa</i>	0.9

One gram of leaf tissues were incubated with 10 ml of the enzyme solution described in Fig. 2 at 27°C for 3 hr.

^a The tissues (1g) were incubated with 50 ml of the enzyme solution for 4 hr.

することである。最近、Engler ら (1982)⁶⁾、Berry ら (1982)⁷⁾、および鈴木ら (1986)⁵⁾ によって、レタスのプロトプラストからの植物体再生についての報告がなされている。われわれは、鈴木らが開発した植物体再生培地 (改良 MS 培地) を用いて、ペクチナーゼ SE-150 酵素処理によって得られたレタス葉肉プロトプラスト (Fig. 3 A) の培養を試みた。プロトプラストを培地 1 ml 当たり 2×10^4 個になるように酵素液から植物体再生培地に移し変えた後、約 4 日目で最初の細胞分裂が認められた (Fig. 3 B)。培養後 10 日目には 10 細胞程度の集団まで成長し (Fig. 3 C)、14 日目ではさらに細胞分裂が進みコロニー形成が観察された (Fig. 3 D)。14 日目におけるコロニー形成率は約 18% であった。また、コロニーを固体培地に移したところ、30 日目において 3~4 mm のカルス形成が認められた。

以上の結果、すなわち、ペクチナーゼ SE-150 酵素処理により広範囲の植物葉肉組織から十分量のプロトプラストが生成されたこと (Table 2); そして、生じたプロトプラストを培養すると相当の頻度で細胞分裂、コロニー形成が観察されたこと (Fig. 3) から、われわれは、植物葉肉プロトプラストの調製にペクチナーゼ SE-150 が有効であると結論した。

Table 3 には市販のペクチナーゼ (ペクトリアーゼ Y-23, マセロザイム R-10)、ペクチナーゼ SE-150 および SE-200 を用いて、それぞれのプロトプラスト化の最適酵素濃度におけるプロトプラスト収量の経時変化をダイコンの葉肉組織を用いて比較検討した結果を示した。

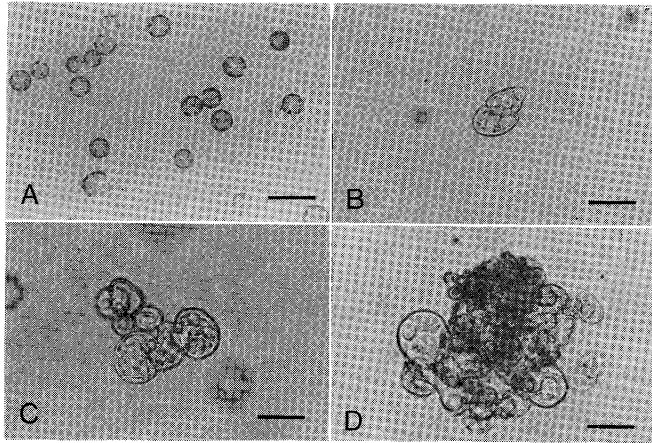


Fig. 3. Colony formation from lettuce protoplasts. Lettuce protoplasts isolated were cultured in a modified MS medium as described by Suzuki *et al.*⁵⁾ A: Freshly isolated protoplasts. Bar=40 μ m. B: First division of a protoplast (4th day). Bar=30 μ m. C: Protoplast-derived colony on the 10th day. Bar=40 μ m. D: Protoplast-derived colony on the 14th day. Bar=40 μ m.

Table 3. Comparison of protoplast liberating ability of macerating enzymes for Japanese-radish mesophyll.

Enzyme	Optimal enzyme concentration (% w/v)	Incubation time (hr)			
		1	2	3	4
(Yield of protoplasts, $\times 10^6$ /g fr wt)					
Pectinase SE-150	0.5	0.24	0.74	1.14	1.18
Pectinase SE-200	0.06	0.28	0.58	0.96	1.06
Pectolyase Y-23	0.06	0.28	0.62	0.98	1.00
Macerozyme R-10	0.5	0.30	0.50	0.64	0.64

The experimental conditions were identical to that of Materials and Methods.

SE-150 のプロトプラスト化能力は市販のものと同等あるいはそれ以上であった。

また SE-150 とマセロザイム R-10 を比較した場合、ポリガラクトナーゼ活性は SE-150 が 62 倍も大きいと同じ酵素濃度でプロトプラスト収量は 2 倍しか差がなかった。したがってポリガラクトナーゼ活性とプロトプラスト収量の間には相関は認められなかった。

一方 SE-150 は市販されている他のペクチナーゼに比べてポリガラクトナーゼ活性は著しく高い (Table 1)。SE-150 に含まれているポリガラクトナーゼ活性が葉肉細胞プロトプラスト化にどの程度寄与しているかを検討するため Table 3 に SE-200 を用いた結果も示した。0.06% SE-200 のもつポリガラクトナーゼ活性は 0.5% SE-150 のその 1.3 倍あるにもかかわらず、SE-200 によるプロトプラスト収量は $80 \pm 4\%$ であることか

ら、SE-150 にはポリガラクトナーゼ活性に加えて、著しい効果はないがプロトプラスト化を促進する因子が含まれていると考えられる。

石井ら^{8,9)} はペクトリアーゼ Y-23 中に、ペクチナーゼによるマセレーションを増強する酵素様の因子が含まれていることについて詳細な研究を行っている。

実験に用いた元の菌株を供与してくださった大阪府立大学農学部 坂井拓夫博士に謝意を表します。

文 献

- 1) Sakai, T., M. Okushima, M. Sawada, 1982. *Agric. Biol., Chem.* **46**: 2223-2231.
- 2) 坂井拓夫, 1979. *発酵と工業*, **37**: 928-939.
- 3) Sakai, T., 1988. *Methods Enzymol.*, **161**: 335-350.

- 4) Bernfeld, P., 1955. *Methods Enzymol.*, **1**: 149-158.
- 5) 鈴木裕志, 榎本末夫, 大山勝夫, 1986. *植物組織培養*, **3**: 83-85.
- 6) Engler, D. E., R. G. Grogan, 1982. *Plant Sci. Lett.*, **28**: 223-229.
- 7) Berry, S. F., D. Y. Lu, D. Pental, C. Cocking, 1982. *Z. Pflanzen Physiol.*, **108**: 31-38.
- 8) Ishii, S. and K. Kiho, 1976. *Phytopathology*, **66**: 1077-1081.
- 9) Ishii, S., 1977. *Phytopathology*, **67**: 994-1000.

Summary

Isolation of Plant Mesophyll Protoplasts with an Endo-polygalacturonase from *Trichosporon penicillatum*

Toshiaki MITSUI,* Noriaki HASHIMOTO,* Kyohei DEGUCHI,**
Mayumi HIRANO** and Ikuo IGAUE*

* *Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Niigata University, 2 Ikarashi, Niigata 950-21, Japan*

** *Central Research Laboratory, Shikibo Ltd., 103 Fushio-cho,
Ikeda-city, Osaka 563, Japan*

Plant mesophyll protoplasts with an endo-polygalacturonase produced by *Trichosporon penicillatum* SNO-3 was isolated. The following mesophyll tissues of shoot were used for the isolation: *Tagetes minuta*, *Brassica rapa*, *Raphanus sativus*, *Lactuca sativa*, *Triticum aestivum*, *Secale cereale*, *Hordeum vulgare*, *Panicum crusgalli*, *Avena sativa*, *Zeamays* and *Oryza sativa*. Pectinase SE-150, a partially purified endo-polygalacturonase, combined with cellulase ONOZUKA RS liberated protoplasts from all mesophyll tissues tested.

The protoplast yields were $1\sim 4 \times 10^6$ per gram fresh weight. Cell division and colony formation from lettuce protoplasts obtained with a pectinase SE-150 enzyme system were also observed. The percentage of colony formation on the 14th day after incubation in a culturing medium was estimated to be approximately 18%.