

Gibberella fujikuroi 菌のプロトプラスト融合による
カウレンの微生物変換に用いる
優良な融合菌の作出の試み

光井 亮司*・河野 豪*・伊藤 和貴*・橘 燥郎*

A Trial for Formation of a Fusant by Protoplast Fusion of *Gibberella fujikuroi* Strains for Improved Microbial Conversion of (-)-Kaurene

Ryoji MITSUI*, Takashi KOHNO*, Kazutaka ITOH* and Sanro TACHIBANA*

Summary : A protoplast fusion between *Gibberella fujikuroi* IFO 9977 strain and *G. fujikuroi* IFO 31251 strain was tried to form a fusant producing greater yields of gibberellins by the microbial conversion of (-)-kaurene with higher biological activities. The maximum yield of protoplasts from *G. fujikuroi* IFO 9977 was obtained by a combination of 5% Novozym-234 and 1% chitinase. On the other hand, the maximum yield of protoplasts from *G. fujikuroi* IFO 31251 was obtained by 5% Novozym-234. In the case of *G. fujikuroi* IFO 9977 strain, the optimum centrifugal force for separation of the protoplasts from reaction mixture was 1000×g. In the case of *G. fujikuroi* IFO 31251 strain, that of the protoplasts was 750×g. It was found that magnesium sulfate was more effective than mannitol as osmotic stabilizers.

Protoplasts from *G. fujikuroi* IFO 9977 and IFO 31251 were fused with polyethyleneglycol. Strains which were grown on a minimal medium agar plate were transferred to a screening medium containing kaurenoic acid, and 16fusants were obtained. Fusants obtained on the agar plate were named as fusants 1 to 16 according to the order of increasing ability for formation of colony.

The amounts of gibberellins produced by the microbial conversion of (-)-kaurene with the fusants 1, 5 and 6 were larger than those of their parental strains. However, the amounts of gibberellins produced by the conversion with the other fusants were intermediate values between those of the parental strains or lower than those of the parental strains. The biological activities of the gibberellins from (-)-kaurene with the Fusant 1 was higher than those of the parental strains.

* 森林資源利用化学研究室 Laboratory of Chemistry and Biotechnology for Utilization of Forest Resources

From the results obtained above, we found a fusant strain, Fusant 1 that produced larger amounts of gibberellins with higher biological activity through microbial conversion than those of the parental strains.

要旨 二種の *Gibberella fujikuroi* IFO 9977菌と *G. fujikuroi* IFO 31251菌との細胞融合により、カウレンの微生物変換によるジベレリンの生産に用いる高ジベレリン生産能を有し且つ高ジベレリン活性を持つ融合菌を作出することを試みた。*G. fujikuroi* IFO 9977菌からのプロトプラストの最大収量は細胞壁溶解酵素ノボザイム234 5 %とキチナーゼ1 %を組み合わせた場合に得られた。また *G. fujikuroi* IFO 31251菌からのプロトプラストの最大収量はノボザイム234 5 %単独で用いた場合に得られた。プロトプラストを単離するための最適な遠心機の遠心力は、*G. fujikuroi* IFO 9977菌の場合1000×gであり、*G. fujikuroi* IFO 31251菌の場合750×gであった。また、プロトプラスト調製時にマンニトールと硫酸マグネシウムの2種類の浸透圧調節剤を使用したが、マンニトールよりも硫酸マグネシウムの方が優れた浸透圧調節剤であった。

G. fujikuroi IFO 9977菌と IFO 31251 菌からのプロトプラストをポリエチレン glycol 法により細胞融合した。最小培地で生育してきた融合菌をカウレン酸を含むスクリーニング培地上で生育させた。その融合菌のうちコロニー形成能力の大きな菌ほど基質変換能が高いと考え、コロニー形成能力の大きな順に16種の融合菌（融合菌1～16と名付けた）を得た。

作出された融合菌1, 5, 6を用いたカウレンの微生物変換により生成されたジベレリン量は両親株のそれらよりも高かったが、他の融合菌の場合は両親株の中間的な値はあるいはそれよりも低い値であった。融合菌1を用いた微生物変換により生成されたジベレリンの生物活性は、両親株のそれらよりも高い値を示したが、融合菌5, 6のそれらは両親株のそれらの中間的な値を示した。これらの結果から、二種の *G. fujikuroi* 菌の細胞融合により、両親株よりもジベレリン活性が高くしかもジベレリン生産能力の高い融合菌を作出することが可能であることが分かった。

1. 緒 言

ジベレリンは稻の馬鹿苗病菌から初めて単離された植物ホルモンの一種で伸長促進効果、開花促進作用、单為結実の誘発、休眠打破、加水分解酵素の賦活化等の生理活性を有する¹⁾。現在116種のジベレリンが知られている²⁾。しかし、農業上広く利用されているのはジベレリン-A₃ (GA₃) のみである。それ以外のジベレリンについては、研究に使用するだけのジベレリン入手するのが難しいためか、それらの利用については殆ど研究されていない³⁾。

橘ら⁴⁾はスギ (*Cryptomeria japonica*) の葉に含まれている一種の環状ジテルペン炭化水素、カウレンの微生物変換により、多種のジベレリンが生成することを報告すると共に、生成したジベレリンは GA₃ よりも更に高い生物活性を有することを示した。そして、バイオリアクターを用いたカウレンの微生物変換によるジベレリンの生産について検討した⁵⁾。さらに、10種の *G. fujikuroi* 菌を用いて微生物変換によるジベレリン生産能の高い菌のスクリーニングを行い、ジベレリン生産能が高くしかも高ジベレリン活性を示す菌として、*G. fujikuroi* IFO 9977菌を見いだした⁶⁾。しかしながら、この微生物変換では基質濃度が高い場合、変換効率が低下する欠点があった⁴⁾。その欠点を改善するため、前報⁷⁾ではジベレリン生産能の高い菌を得る目的で、スクリーニングにより選抜した2種の菌、

G.fujikuroi 菌 IFO 9977菌と IFO 30337 菌とのプロトプラスト融合による融合菌の作出を試みた。その結果、両親株よりも高いジベレリン生産能を有する一種の融合菌を作出できたが、その菌を用いた微生物変換により生産されたジベレリンの生物活性は、親株のそれよりも高くなかった。そこで、本研究では、高ジベレリン生産能を有し且つ高ジベレリン活性を持つ *G.fujikuroi* 菌を探索する一環として、ジベレリン生産能の高い 2 種の *G.fujikuroi* 菌、IFO 9977菌と IFO 31251 菌とのプロトプラスト融合を行った。そして、得られた融合菌のカウレンの微生物変換によるジベレリン生産能並びにそれにより生成したジベレリンの生物活性を調べた。

2. 実験

2.1 基質、カウレンの単離⁴⁾

愛媛農協学園（愛媛県松山市）内に植栽されているスギの葉から橋ら⁴⁾ の方法により単離した。スギの葉（生重量 10.6kg）を *n*-ヘキサンで加熱抽出して得られる抽出物（260.09g）をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ、*n*-ヘキサンで溶離した。溶出液を TLC でモニターしながら、カウレンの存在するフラクションを集めて濃縮し、粗カウレンフラクション（26.76g）を得た。粗カウレンフラクションをメタノール：エーテル = 1 : 1 (v/v) で再結し、白色結晶（11.03g）、mp 46-48°C を得た。（収率：0.10%，対生葉）(lit. mp 45-47°C)⁴⁾ 単離したカウレンは、前報⁷⁾ で単離したカウレンとのコガスクロマトグラフィーにより、保持時間が一致すること並びに混融試験によって、カウレンであることを確認した。

2.2 *Gibberella fujikuroi* 菌の細胞融合

2.2.1 供試菌

ポテトシュクロース培地⁴⁾ 上で生育させた *G.fujikuroi* IFO 9977菌及び IFO 31251菌の 2 種を用いた。

2.2.2 *G.fujikuroi* 菌の増殖曲線の作成⁷⁾

300 ml の三角フラスコに 100 ml の ICI 溶液⁸⁾ (N40%) を入れて加熱滅菌後、2 種の供試菌を 1 白金耳植菌した。これを 25°C で 1 ~ 8 日間で振とう培養 (150 rpm) した。この培養液を 1 日毎に 10 ml とり、ブフナーロートでろ過して得た菌体の乾燥重量を測定した。

2.2.3 液体培養

300 ml の三角フラスコに 100 ml の ICI 溶液⁸⁾ (N40%) を分注し、オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌したものに、2.2.1 で述べた 2 種の供試菌を 1 白金耳ずつ植菌し、25°C, 150 rpm で 2 ~ 3 日間振とう培養した。

2.2.4 プロトプラストの調製^{9,10)}

A. 使用酵素

3 種の酵素、セルラーゼ “ONOUZUKA” R-10, ノボザイム 234 及びキチナーゼ (*Streptomyces griseus* 由来) を使用した。セルラーゼ “ONOUZUKA” R-10 及びノボザイム 234 は各々ヤクルト(株), ノボノルディスクバイオインダストリー(株)より購入した。またキチナーゼはシグマケミカルス(株)より購入した。

B. プロトプラスト調製

プロトプラストの調製は前報⁷⁾ の方法に準じて行った。2.2.3 の液体培地で *G. fujikuroi* IFO 9977は2日間, *G. fujikuroi* IFO 31251 は3日間液体培養した培養液をろ別し, 菌糸体とろ液に分けた。各々の菌糸体(1.0g)を試験管に取り, 下記に示した様々な酵素を組み合わせた溶液(酵素液A～J)(5ml)を加え, 38℃で5時間振とうした(165 rpm)。*G. fujikuroi* IFO 9977菌の場合は, 酵素液A～Gを使用した。酵素液A:ノボザイム(NV)(2%)とキチナーゼ(CH)(0.2%)を含む0.6M MgSO₄溶液。酵素液B:NV(2%)とCH(0.5%)を含む0.6M MgSO₄溶液。酵素液C:NV(2%)とCH(1.0%)を含む0.6M MgSO₄溶液。酵素液D:NV(5%)とCH(1.0%)を含む0.6M MgSO₄溶液。酵素液E:NV(2%)とCH(1.0%)を含む0.6M マンニトール溶液。酵素液F:NV(10%)とCH(1.0%)を含む0.6M MgSO₄溶液。酵素液G:NV(5%)とセルラーゼ(CE)(1.0%)を含む0.6M MgSO₄溶液。*G. fujikuroi* IFO 31251菌の場合は, 酵素液A～E, H～Jを使用した。酵素液H:NV(5%)を含む0.6M MgSO₄溶液。酵素液I:NV(5%)とCH(0.5%)を含む0.6M MgSO₄溶液。酵素液J:NV(5%)を含む0.6M マンニトール溶液。反応後, ガラスフィルターを用いて吸引ろ過し, 菌糸体断片を取り除いた後, ろ液を遠心分離(室温, 1000×g, 10分間)して, プロトプラストを沈澱させた。上澄液を捨てた後, 0.6M MgSO₄または0.6M マンニトール水溶液を加えて懸濁し, プロトプラスト懸濁液を得た。生成したプロトプラスト数は血球計算器により計測した。

2.2.5 細胞融合^{9,10)}

前報⁷⁾と同様にして行った。2.2.4で得た2種の菌のプロトプラスト懸濁液(1×10^6 個/ml)(1ml)を混合し, これに30%ポリエチレングリコール(PEG)を含むグリシン溶液[0.1M グリシン溶液(pH 8.5)中に30%のPEGと50mM CaCl₂を含む]2mlを加え, 30℃で30分間静置した。その後, 0.6M MgSO₄を含むグリシン溶液(pH 8.5)2mlを加え, 遠心分離(室温, 1000×g, 10分間)した。上澄み液を捨てた後, 沈殿を0.6M MgSO₄溶液(5ml)に懸濁した。その懸濁液(1ml)を前報⁷⁾に示した組成を持つ最小培地にまき, 25℃で培養した。生育してきたコロニーは, Table 1に示したカウレン酸を含むスクリーニング培地に移した。大きなコロニーを形成する程基質変換能が高いと考え, 16のコロニーを採取し, コロニーの大きいものから順に1から16の番号をつけた。得られた融合菌1～16は各々ポテトシュクロース斜面寒天培地⁴⁾上で生育させた後, スラントとして使用直前まで0℃で保存した。スクリーニング用培地の組成をTable 2に示した。

Table 1 Composition of screening medium

Chemicals	Concentration (%)
Saccharose	1.0
Kaurenoic acid	0.1
Tween 80	0.54
Agar	1.0

2.3 カウレンの微生物変換⁷⁾

2.3.1 *G. fujikuroi*の前培養⁷⁾

- A. 300 ml の三角フラスコに60 ml の ICI 溶液(N40%)を入れて滅菌したものに, 菌体を1白金耳植菌し, 25℃で3日間振とう培養した。
- B. Aで得た培養液から0.6 ml を無菌的にとり, 滅菌した30 ml の ICI 溶液(N40%)の入った300 ml の三角フラスコに加えた。この時, 生長抑制剤を0.5 mg 添加し, 25℃で3日間振とう培養した。生長抑制剤は[4-(1'-piperidinecarboxy)-5-isopropyl-2-methyltrimethyl-ammonium chloride](商

品名 AMO-1618) を用いた。

C. Bで得た培養液を無菌的に濾過し、菌体を分離した。

2.3.2 *G.fujikuroi* の本培養⁷⁾

2.3.1 の C で得た菌体を 50 ml の ICI 溶液 (N0%) の入った 300 ml の三角フラスコに加えた。これに基質のカウレン 50 mg と AMO-1618 (0.5mg) を添加し、25℃で 7 日間振とう培養した。

2.4 代謝物の抽出、分析⁴⁾

2.4.1 代謝物の抽出

2.3.2 で 7 日間振とう培養した培養液から菌体を濾別し、残渣を蒸留水でよく洗浄した。濾液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 75 ml を加え、75 ml の酢酸エチルで 2 回抽出した。抽出液は飽和食塩水で洗浄後、芒硝で乾燥した。その後、減圧濃縮して抽出物（中性部）を得た。更に、水層は塩酸で pH 2.5 とし、75 ml の酢酸エチルで 3 回抽出した。抽出液は飽和食塩水で洗浄後、芒硝で乾燥した。その後、減圧で濃縮して抽出物（酸性部）を得た。さらに、酸性部は分取 TLC [展開溶媒；EtOAc : CHCl₃ : CH₃COOH = 20 : 8 : 1 (v/v)] に掛けた。TLC 上でジベレリンの呈色¹¹⁾ を示す部分をかかりとり、酢酸エチルで溶出して、ジベレリン (GAs) フラクションを得た。

2.4.2 代謝物の分析

2.4.1 で得たジベレリン (GAs) フラクション (1 mg) 及び GA₃ (0.5mg) と GA₄ (0.5mg) に各々 1 ml のジアゾメタンのエーテル溶液を加え、0℃で一晩放置してメチル化した。その後、溶媒を留去し、減圧乾燥させて GAs-メチルエステル、GA₃-メチルエステル、GA₄-メチルエステルを得た。これらのメチルエステルに N,O -Bis-Trimethylsilylacetamide (BSA) (18 μl), トリメチルクロロシラン (9 μl), ピリジン (18 μl) を加えて TMS 化⁷⁾ を行い、各々のメチルエステルトリメチルシリルエーテル (ME-TMS エーテル) を得た。これらを下記の条件でガスクロマトグラフ (GLC) に掛けた。なお比較のため、GA₁, GA₅, GA₇, GA₉ の Me-TMS エーテルも GLC に掛けた。GLC 条件：カラム；キャピラリーカラム OV-101 (0.25mm × 25m), 分析温度：200℃で 1 min 保持、200から 290℃まで 5℃/min で昇温、290℃で 10 min 保持、注入温度：250℃、検出器温度：250℃、キャリヤーガス；He : 3kg/cm², Air : 1.1kg/cm², H₂ : 1.3kg/cm², スプリット比 : 1/30。

2.5 代謝物の生物活性試験⁷⁾

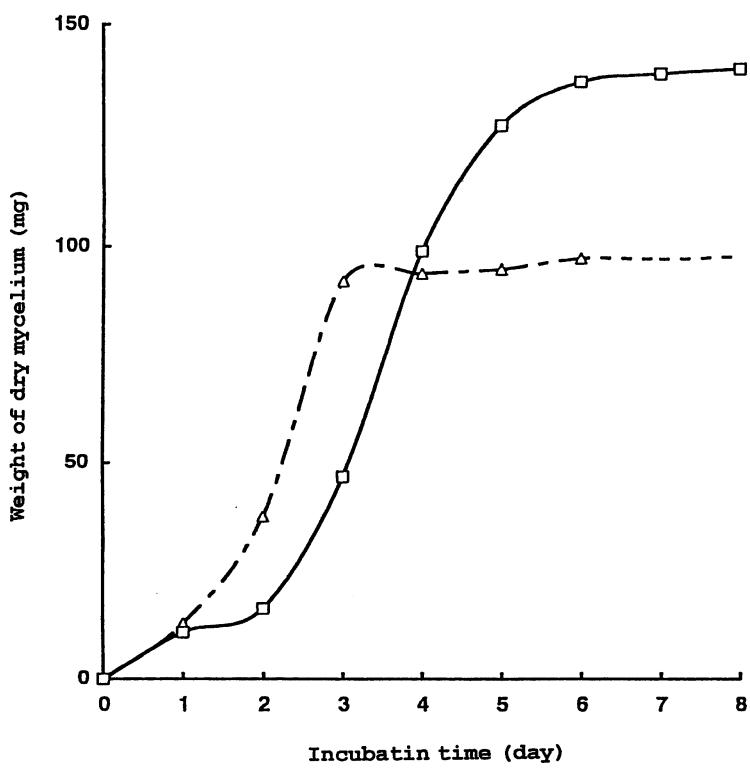
矮性稻、短銀坊主を用いる Nishijima と Katsura¹²⁾ の方法で生物活性を調べた。短銀坊主の種子を 0.5% の次亜塩素酸ナトリウム水溶液で 5 分間殺菌した後、水洗し、20 ppm ウニコナゾール溶液に 24 時間浸漬した (30℃, 暗黒下)。水洗した後、水道水に浸して、30℃の明所に約 2 日置いて発芽させた。子葉鞘が約 2 mm 伸びた時に、1% 寒天を深さ 3 cm の高さまで入れた管ビン (直径 3 cm) に 5 個ずつ植え、30℃の明所下に置いた。第 2 子葉の先端が第 1 子葉から約 2 mm 伸びた時に、第 1 子葉と第 2 子葉の間にマイクロシリンジで 1 μl の被験液を滴下した。3 日後第 2 子葉鞘の長さを測定した。被験液は、各菌の培養で得たジベレリンフラクションの 0.1 μg/μl, 1 μg/μl の濃度の 50% アセトン水溶液を使用した。なお、比較のため、GA₃, GA₄ の 1ng/μl, 10ng/μl 50% アセトン水溶液も使用した。またコントロールとして、50% アセトン水溶液のみを用いた。

3. 結果及び考察

3.1 *G. fujikuroi* IFO 9977菌と IFO 31251菌との細胞融合

3.1.1 *G. fujikuroi* 菌の増殖曲線

前報⁷⁾と同様に、本研究でも、生理学的に最も活発な栄養増殖期初期の菌糸を使用した。使用した2種の *G. fujikuroi* の増殖曲線を Fig. 1 に示した。この図に示すように、*G. fujikuroi* IFO 9977菌では2日目が、*G. fujikuroi* IFO 31251では3日目が対数増殖期初期に相当すると考えられた。そのため、本研究では、*G. fujikuroi* IFO 9977菌では2日間、*G. fujikuroi* IFO 31251菌では3日間液体培養した菌糸体をプロトプラスト調製に用いた。

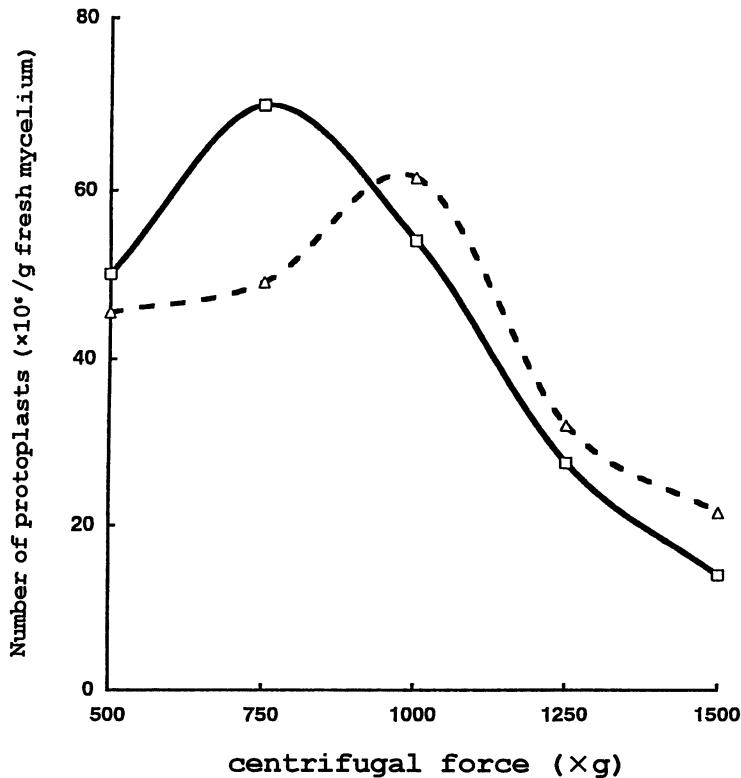


Notes : —△— : *G. fujikuroi* IFO 9977 ;
—□— : *G. fujikuroi* IFO 31251.

Fig. 1 Growth curves of *Gibberella fujikuroi* strains.

3.1.2 プロトプラスト回収に対する遠心機の遠心力の影響

プロトプラスト調製時に使用する遠心機の遠心力がプロトプラスト回収に及ぼす影響を Fig. 2 に示した。この図に示すように、*G. fujikuroi* IFO 9977の場合、遠心力が $1000 \times g$ の場合に最も多くのプロトプラストが得られた。遠心力が $1000 \times g$ よりも強くなつても弱くなつても得られたプロトプラスト数は減少した。これは遠心力が $1000 \times g$ を越えた場合は、生成したプロトプラストが遠心力により、押しつぶされて一部破裂されるためであり、 $1000 \times g$ より低い場合は、プロトプラストが懸濁液に分散していく沈殿しにくいためと考えられた。一方、*G. fujikuroi* IFO 31251の場合には、遠心力が $750 \times g$ の場合に最も多くのプロトプラストが得られた。*G. fujikuroi* IFO 9977からのプロトプラスト



Notes : -△- : *G. fujikuroi* IFO9977 : Novozym 5% - Chitinase 1% in 0.6M MgSO₄; -□- : *G. fujikuroi* IFO 31251 : Novozym 5% - Chitinase 1% in 0.6M MgSO₄.

Fig. 2 Effect of centrifugal force on separation of protoplasts from reaction mixture.

は *G. fujikuroi* IFO 31251からのそれに比べ、遠心力が低い場合でも沈殿したことから、プロトプラスト自体の質量が若干 IFO 9977からのそれよりも重いものと考えられた。以上より、本研究でのプロトプラストの調製には、*G. fujikuroi* IFO 9977の場合、遠心機の回転数は1000×gに相当する値が、*G. fujikuroi* IFO 31251の場合、遠心機の回転数は750×gに相当する値が最適と考えられた。ここで得られた結果から、以後のプロトプラストの調製の際にはこれらの回転数を使用した。

3.1.3 酵素の影響

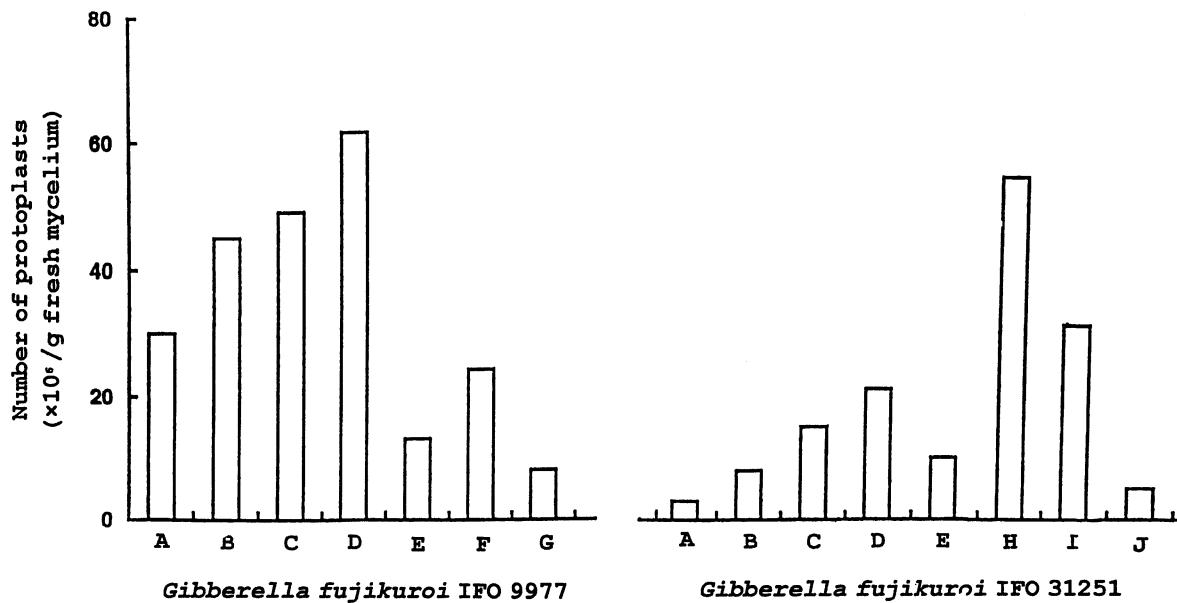
G. fujikuroi 菌は子囊菌類に属し¹³⁾、その細胞壁中にはキチンを含んでいる¹⁴⁾。そのため、*G. fujikuroi* のプロトプラスト調製の際には細胞壁を構成する多糖類を分解できる酵素に加えてキチナーゼも使用した。本研究では、2.2.4に示したセルラーゼ、ノボザイム及びキチナーゼの3種の酵素のうち2種の酵素を組み合わせた酵素液(A～J)を使用した。2日間あるいは3日間液体培養して得た各々の菌からの菌糸体に2.2.4に示した酵素液を加えて処理し、プロトプラストを得た。酵素の組み合わせと生成されたプロトプラスト数の結果をFig. 3に示した。この図に示すように、*G. fujikuroi* IFO 9977 菌では酵素液(A～D)におけるキチナーゼの添加量が増加するに従って、生成されるプロトプラスト数の増加が認められた。しかし、酵素液Eではキチナーゼの添加量は酵素液Dと同じであるにも拘らず生成したプロトプラスト数は、酵素液Dで処理した場合の約1/5であった。これは、ノボザイムの添加量が多くなったため、全体に占めるキチナーゼの割合が相対的に少なくなったためと考えられた。*G. fujikuroi* IFO 9977菌の場合、酵素液D [ノボザイム (NV) (5 %)

とキチナーゼ (CH) (1 %) を含む0.6M MgSO₄溶液] で処理した場合が最も多くのプロトプラスト (62.5×10^6 個/g 生菌重) が得られた。しかし、酵素液F [NV (5 %) とセルラーゼ (CE) (1 %) を含む0.6M MgSO₄溶液] や酵素液G [NV (5 %) とCH (1 %) を含む0.6M マンニトール溶液] の場合は、生成されたプロトプラスト数は少なく、酵素液Dの場合の各々約3/10, 1/10であった。

G. fujikuroi IFO 31251菌の場合は、酵素液Hの組み合わせで最も多くのプロトプラスト (54.9×10^6 個/g 生菌重) が得られた。また、キチナーゼを含む酵素液A～E, Iで処理した場合に得られたプロトプラスト数は酵素液Hで処理した場合の約6/10～1/20であった。*G. fujikuroi* IFO 9977の場合は酵素液の中に含まれるキチナーゼの割合が増加する程生成されるプロトプラスト数が多くなった。しかし、*G. fujikuroi* IFO 31251の場合はキチナーゼを含むとノボザイム (酵素液H) のみの場合よりも生成されるプロトプラスト数が減少した。これは *G. fujikuroi* IFO 9977とIFO 131251の細胞壁を構成する多糖類とキチンに量的、および質的な違いがあるためと推察された。

Bruckner ら¹⁵⁾は、*Trichoderma harzianum* 由来のセルラーゼを含む菌体外粗酵素とカタツムリの消化酵素を用いて、*Gibberella fujikuroi* (SAW) WR. 菌からプロトプラストの調製を行った。その時、生成されたプロトプラスト数は 8.75×10^6 ～ 252×10^6 個/g 生菌重と報告している。本研究で用いた酵素でも、Bruckner ら¹⁵⁾が報告した値とほぼ同数のプロトプラストを得ることができた。

MgSO₄とマンニトールの2種の浸透圧調節剤を使用し、プロトプラスト回収に及ぼす浸透圧調節剤の影響を調べた。同じ酵素組成で浸透圧調節剤の効果を比較した場合、*G. fujikuroi* IFO 9977菌の場合は、MgSO₄を用いた場合 (酵素液D) の方がマンニトールを用いた場合 (酵素液E) に比べ、生成されるプロトプラスト数は約7.5倍多かった (Fig. 3)。また、*G. fujikuroi* IFO 31251菌の場合



Notes: NV: Novozym 234; CH: Chitinase; CE: Cellulase "ONÖZUKA"R-10.

- A. NV 2% + CH 0.2% in 0.6M MgSO₄; B. NV 2% + CH 0.5% in 0.6M MgSO₄;
- C. NV 2% + CH 1% in 0.6M MgSO₄; D. NV 5% + CH 1% in 0.6M MgSO₄;
- E. NV 10% + CH 1% in 0.6M MgSO₄; F. NV 5% + CE 1% in 0.6M MgSO₄;
- G. NV 5% + CH 1% in 0.6M Mannitol; H. NV 5% in 0.6M MgSO₄;
- I. NV 5% + CH 0.5% in 0.6M MgSO₄; J. NV 5% in 0.6M Mannitol.

Fig. 3 Effect of combination of enzymes on production of protoplasts from *Gibberella fujikuroi* strains.

も、同じ酵素組成で処理した場合には、生成されるプロトプラスト数は $MgSO_4$ を用いた場合（酵素液H）の方がマンニトールを用いた場合（酵素液J）よりも約10倍多かった。これらのことから、ここで使用した2種の浸透圧調節剤では、マンニトールよりも $MgSO_4$ の方が優れているものと考えられた。Bruckner ら¹⁵⁾は、*Gibberella fujikuroi* (SAW) W.R.からのプロトプラスト調製時に4種の浸透圧調節剤、KCl (0.6M), NaCl (0.8M), マンニトール (0.8M) 及びソルビトール (0.8M) を使用し、そのプロトプラスト生成に及ぼす影響について調べているが、いずれの調節剤でもその効果に差異は認められなかったことを報告している。本研究の結果と Bruckner ら¹⁵⁾の結果との相違は、使用した *G. fujikuroi* 菌の違いから生じたものと考えられる。

3.2 *G. fujikuroi* IFO 9977菌と IFO 31251 菌の細胞融合

前報⁷⁾と同様にして *G. fujikuroi* IFO 9977菌と IFO 31251菌との細胞融合を行った。最小培地⁷⁾上で生育してきた融合菌を Table 1 に示したカウレン酸を含むスクリーニング培地上で選抜した。スクリーニング培地にカウレン酸を使用したのは、カウレンが水に不溶のためと、カウレンからジベレリンが生産される時にカウレン酸を経由するので、カウレン酸を代謝できる菌はカウレンも代謝できると考えたためである。スクリーニング培地上で大きいコロニーを形成する融合菌ほど、基質変換能つまりジベレリン生産能力が高いと考えられる。そこで、コロニーを形成する能力の高い菌から順に1～16と名付けた16種の融合菌を得て、これらを後の実験に供した。両菌からのプロトプラストによる細胞融合の場合、細胞の核まで融合した体細胞雜種と核は融合しないヘテロカリオン及び細胞質のみ融合した細胞質雜種（シブリッド）が生じる¹⁶⁾。Torres ら¹⁷⁾はヘテロカリオンや2倍体等を単離する方法を報告しているので、本研究で得た融合菌1～16が体細胞雜種あるいは細胞質雜種であるのかについては今後調べていく必要があろう。なお、後述するが、融合菌の代謝物の GLC 分析では両親株に共通するジベレリンのピークと両親株には見られないピークが認められたので、融合菌であると考えている。融合菌1～16が融合菌であることを更に確認するため、今後融合菌および両親株のアイソザイム分析が必要と考えられた。

3.3 融合菌を用いた微生物変換により生成されるジベレリンについて

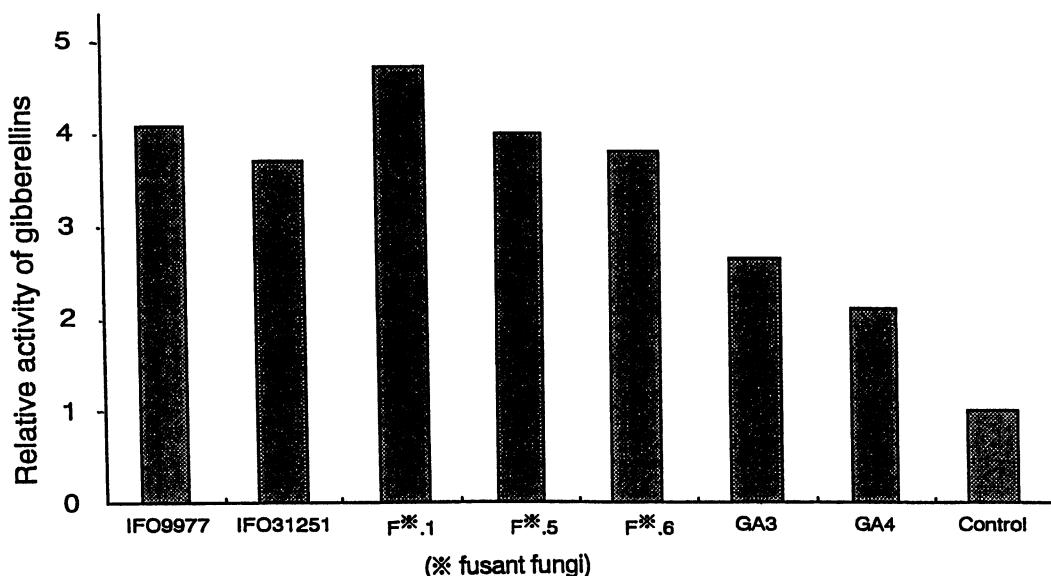
3.3.1 ジベレリン生産能

両親株及び融合菌1～16を用いた微生物変換により得られたジベレリン量を Table 2 に示した。この表に示すように、融合菌1～16の微生物変換により得られたジベレリンは基質に対して各々1.6%～13.7%であった。*G. fujikuroi* IFO 9977菌及び IFO 31251菌による収量は各々10.5%, 9.7%であり、融合菌1, 5, 6の各収量は両親株よりも高い値を示した。ここで得られた結果は、細胞融合により両親株よりも基質変換能が高い菌を作出できたことを示している。Torres ら¹⁷⁾は、*Gibberella fujikuroi* (SAW) 3422 菌からのプロトプラストを細胞融合させ融合菌を得た。そして、更にその融合菌に UV 照射を行い、得られた24種の突然変異体の GA_3 の生産能を調べた。9種の菌は親株のそれよりも GA_3 生産能が10～25%向上したが、他の15種の菌では親株のそれよりも低かった。本研究で細胞融合により得られた16種の菌のうち、両親株よりも高い基質変換能を有する菌（3種）の作出割合は19%であった。Torres ら¹⁷⁾の結果は両親株よりも GA_3 生産能の高い菌が38%作出できることを示している。優良な融合菌作出の割合を高めるため、PEG 法による融合でなく電気融合法の検討や本研究で作出した融合菌について更に突然変異処理や分子育種等について検討することも必

Table 2 Comparison of the amounts of gibberellins produced by the microbial conversion of (-)-kaurene with parent strains and its fusant fungi.

Strain	Amount of gibberellins in acidic fraction (%, of (-)-kaurene)
<i>G. fujikuroi</i> IFO 9977	10.5
<i>G. fujikuroi</i> IFO 31251	9.7
Fusant fungus 1	11.2
2	4.1
3	7.3
4	8.9
5	13.7
6	11.0
7	5.1
8	4.0
9	5.1
10	4.3
11	8.9
12	1.6
13	10.5
14	10.2
15	4.4
16	6.7

Fig. 4 Comparison of biological activity of gibberellins produced by microbial conversion of (-)-kaurene with parent and fusant strains.



要と考えられた。

3.3.2 代謝物の生物活性

矮性稻、短銀坊主を用いた滴下法により調べたジベレリンの生物活性の結果を Fig. 4 に示した。この図には、両親株よりも高い基質変換能を有する融合菌 1, 5, 6 が生成したジベレリンの生物活性を示している。融合菌 1, 5, 6 のジベレリンの生物活性は、コントロールのそれの各々 5.1 倍, 4.0 倍, 3.8 倍であった。これらの値は GA₃ の 2.6 倍, GA₄ の 2.1 倍よりも高かった。*G. fujikuroi* IFO 9977 及び IFO 31251 菌の両親株のジベレリンの生物活性はコントロールの各々 4.4 倍, 3.7 倍であった。融合菌 5, 6 は両親株のそれらの中間的な値であったが、融合菌 1 の値は、両親株のそれらよりも高い値を示した。つまり、融合菌 1 は両親株よりも基質変換能並びに生成されるジベレリン生物活性が高

く、両親株よりも優れた菌株であることを示している。以上のことから、細胞融合により両親株よりも優れた性質を持つ菌が作出できることが判明した。

3.3.3 代謝物の GLC 分析

結果の一部を Fig. 5 に示した。この図には、融合菌 1 及びその両親株を用いた微生物変換により得られたジベレリンの GLC クロマトグラムを示した。入手できた標品との比較並びにスパイキングにより、融合菌 1 からのジベレリンには、GA₃, GA₁, GA₇ と iso-GA₃^{18,19)} のピークが認められた。

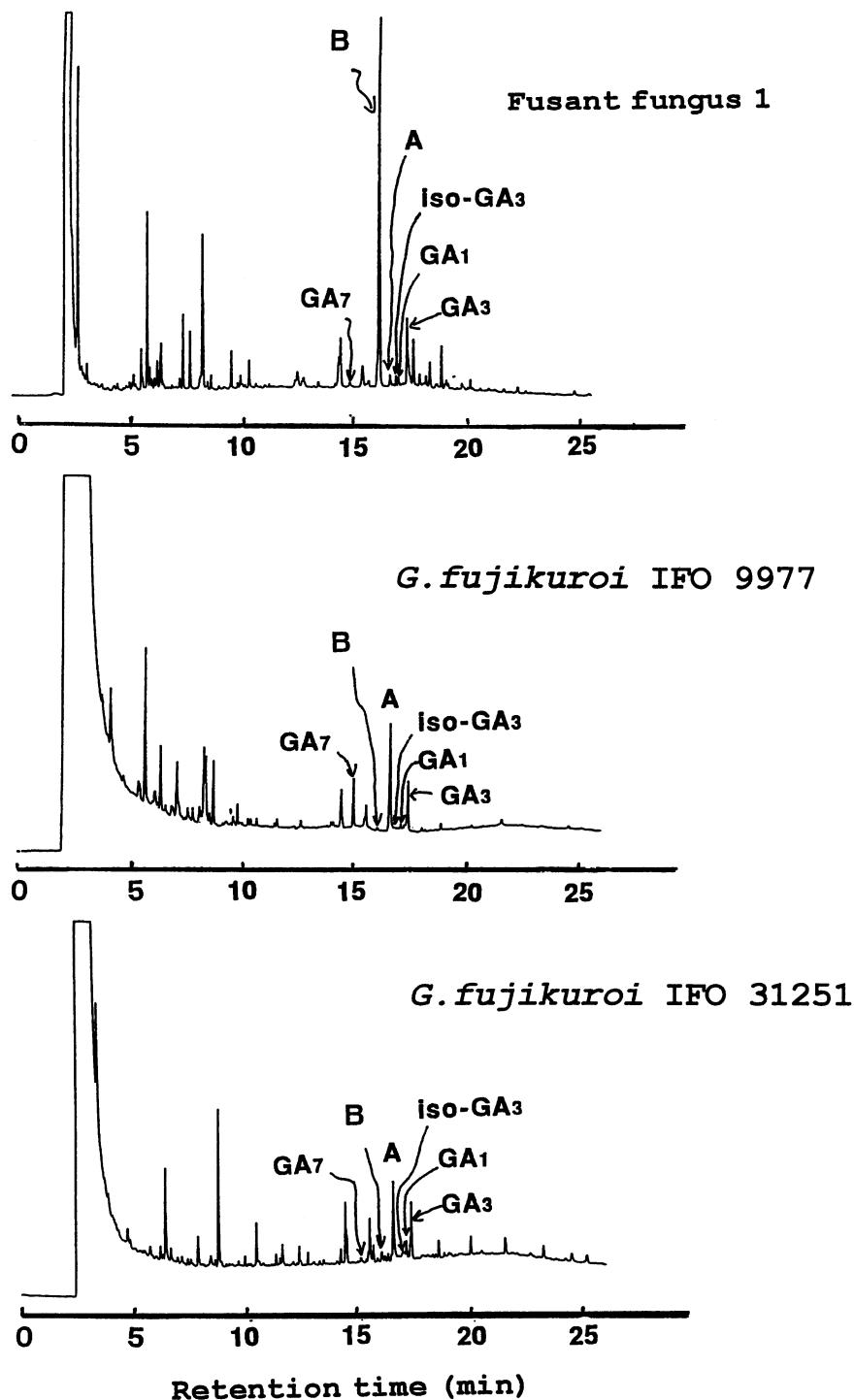


Fig. 5 GLC chromatogram of the gibberellins produced by the microbial conversion of (-)-kaurene with parent strains and the fusant fungus 1.

それ以外のピークについては今後、GC-MS 分析や各ジベレリンを単離して同定する必要があろう。

G. fujikuroi IFO 9977からのジベレリンの GLC チャート上には未知ジベレリン(ピーク A), GA₇ 及び GA₃ の比較的大きなピークが認められた。また, GA₁ 及び未知ジベレリン (ピーク B) の小さなピークが認められた。*G. fujikuroi* IFO 31251からのジベレリンの GLC チャート上には, ピーク A, GA₃ の比較的大きなピークと, GA₇, iso-GA₃, GA₁ 及びピーク B の小さなピークが認められた。一方, 融合菌 1 からのジベレリンの GLC チャート上にはピーク B の大きなピークと, GA₃ の比較的大きなピークが認められ, さらに GA₇, iso-GA₃, GA₁ 及びピーク A の小さなピークが認められた。ジベレリンの GLC 分析結果より, 融合菌 1 が生成したジベレリンには両親株のそれらとは明らかに違っているものと, 同じものが含まれていることが分かった。そのため, この融合菌 1 は両親株から得られた融合菌であると考えられる。その他の融合菌 2 ~ 16についても融合菌 1 の場合と同様の結果を得た。これらのことは, 選抜した 2 ~ 16 の菌株はいずれも *G. fujikuroi* IFO 9977 菌と IFO 31251 菌とのプロトプラスト融合により得られた融合菌であることを示唆しているものと考えられた。

4. 結論

Gibberella fujikuroi IFO 9977 菌と *G. fujikuroi* IFO 31251 菌との細胞融合により, カウレンの微生物変換によるジベレリンの生産の際に用いるジベレリン生産能が高く且つ生成したジベレリンの生物活性の高い融合菌の作出を試みた。

- 1) *G. fujikuroi* IFO 9977 菌では, ノボザイム 5 % とキチナーゼ 1 % を組み合わせた酵素液で, *G. fujikuroi* IFO 31251 菌では, ノボザイム 5 % で, 各々 38°C, 5 時間反応させた場合に最も多くのプロトプラストを得ることができた。*G. fujikuroi* IFO 9977 菌および IFO 31251 菌から各々最高 62.5×10^6 , 54.9×10^6 個 (g 生菌体重当たり) のプロトプラストが得られた。また, プロトプラストを単離するための最適な遠心機の遠心力は, *G. fujikuroi* IFO 9977 菌の場合は $1000 \times g$ であり, *G. fujikuroi* IFO 31251 菌の場合は $750 \times g$ であった。浸透圧調節剤として, マンニトールと硫酸マグネシウムを用いて検討したが, マンニトールよりも硫酸マグネシウムの方が優れた浸透圧調節剤であった。両菌からのプロトプラストをポリエチレンギリコール法で融合させ, 最小培地上に生育してきた菌をスクリーニング培地上で選抜し, 16種の融合菌を得た (融合菌 1 ~ 16 と名付けた)。
- 2) 融合菌 1 ~ 16 を用いた微生物変換によるジベレリンの収量は基質に対して 1.6 % ~ 13.7 % であった。*G. fujikuroi* IFO 9977 菌 および IFO 30337 菌からは各々 10.5 %, 9.7 % であり, 融合菌 1, 5, 6 からの値は両親株よりも高い値を示した。しかし, それ以外の融合菌の値は両親株の中間的な値または両親株よりも低い値を示した。融合菌 1, 5, 6 を用いた微生物変換により得られたジベレリンの生物活性は融合菌 5, 6 は両親株の中間的な値を示したが, 融合菌 1 は両親株よりも高い値を示した。

以上, *G. fujikuroi* IFO 9977 菌 と IFO 31251 菌との細胞融合により, 両親株よりもジベレリン生産能が高くしかも生成されるジベレリンの生物活性の高い融合菌を作出できた。両親株よりも更にジベレリン生産能が高くしかも生成されたジベレリンの生物活性も高い融合菌を作出することが今後の課題と考えられた。

引用文献

- 1) 勝見允行 (1991) 植物のホルモン. 250pp, 袞華堂, 東京. 46-53.
- 2) Nakayama, M., Nishijima, T., Koshioka, M., and Yamane H. (1998) Identification of GA113, GA114, GA115, GA116 and further novel Gibberellins in *Raphanus sativus*. *Phytochemistry* 48(4) : 587-594.
- 3) 西村 淳 (1980) ジベレリンにまつわる話—日本人により発見され、世界の人々によって育てられた植物ホルモン—. 遺伝 34(5) : 41-46.
- 4) 橋 燐郎・上村雅彦・住本昌之 (1989) 微生物・酵素・化学変換による林産有機資源の有効利用に関する研究(第3報). カウレンおよびその誘導体の微生物変換によるジベレリンの合成. 木材学会誌 35(8) : 761-770.
- 5) 伊藤和貴・橋 燐郎・小野木利成・久保田 実・東 昌弘 (1993) バイオリアクターを用いたカウレンの微生物変換によるジベレリンの生産. 木材学会誌 39(5) : 610-615.
- 6) Hirabayashi, H., Itoh, K., Tachibana, S., Oki, T., and Higashi, M. (1996) Screening of a Strain of *Gibberella fujikuroi* for Improved Microbial Conversion of (-)-kaurene. *Mokuzai Gakkaishi* 42(11) : 1134-1138.
- 7) 柳田高志・岡村知帆・伊藤和貴・沖 妙・橋 燐郎 (1996) *Gibberella fujikuroi* 菌のプロトプラスト融合による融合菌作出の試み. 愛媛大学農学部演習林報告 No.34 : 93-106.
- 8) Cho, K. Y., Sakurai, A., Mamiya, Y., Takahashi, N., and Tamura, S. (1979) Effects of the new plant growth retardants of quaternary ammonium idodides on gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Plant Cell Physiol.* 20(1) : 75-81.
- 9) GOLD, M. H., CHENG, T. M., and ALIC, M. (1983) Formation, Fusion, and Regeneration of Protoplasts from Wild-Type and Auxotrophic Strains of the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46(1) : 260-263.
- 10) 橋 燐郎・和田みゆき・伊藤和貴・伊藤智仁・沖 妙 (1996) 機械パルプの微生物処理に関する研究(第8報). *Phanerochaete chrysosporium* と *Fusarium solani* の細胞融合による機械パルプの光による色戻り抑制能を持つ融合菌作出の試み. 紙パ技協誌 50(10) : 1446-1455.
- 11) 池川信夫・丸茂晋吾・星 元紀 (1984) 生理活性物質のバイオアッセイ. 170pp, 講談社, 東京.
- 12) Nishijima, T., and Katsura, N. (1989) A Modified Micro-Drop Bioassay Using Dwarf Rice for Detection of Femtomol Quantities of Gibberellins. *Plant Cell Physiol.* 30(5) : 623-627.
- 13) 田村三郎 (1969) ジベレリン. 200pp, 東京大学出版会, 東京, 9-10.
- 14) 柳田友道 (1980) 微生物科学 1. 330pp, 学会出版センター, 東京, 276-277.
- 15) Bruckner, B., May, R., and Loeffler, B. (1990) Formation and regeneration of protoplasts from *Gibberella fujikuroi*. *J. Basic Microbiol.* 30(3) : 147-152.
- 16) 田中秀夫・高山真策・真野佳博・林 隆久・猪口雅彦 (1992) 植物細胞工学. 188pp, オーム社, 東京, 170-178.
- 17) TORRES, K. B., BRUCKNER, B., and MEIER, B. (1992) Obatining Mutants for Protoplasts Fusion of Gibberellin-Forming *Gibberella fujikuroi* Strains. *Appl. Biochem. Biotechnol.*

33: 83-95.

- 18) Zaretskii, V. I., Wulfson, N. S., Papernaja, I. B., Gurvich, I. A., Kucherov, V. F., Milstein, I. M., Serebryakov, E. P., and Simolin, A. V. (1968) MASS SPECTROMETRY OF GIBBERELLINS-II. THE LOCATION OF THE DOUBLE BOND IN THE GIBBANE SYSTEM. *Tetrahedron* 24: 2327-2333.
- 19) 岡村知帆 (1995) 愛媛大学農学部修士論文(平成7年度). 21-31.