



酵母の出芽様式と分類

酵母の出芽様式は出芽部位とその数、細胞形態と出芽部位・出芽痕の形状との関係、母細胞と出芽細胞との連結基部壁層の状態などを含み、分類学上基本的に重要な標徴の1つである。出芽部位から単極、両極、多極出芽に大別されるが、顕微鏡観察の知見から母細胞壁の内外層が出芽細胞のそれと連続している全分芽型 (holoblastic)、内層だけが連続し外層は出芽基部で外側にはつれた状態になる内分芽型 (enteroblastic) に分けることも試みられている。¹⁾ 子の菌系酵母は主に全分芽型、担子菌系酵母は内分芽型である。^{1,2)} von Arx ら¹⁾ は *Candida*, *Torulopsis* 属などの出芽型と intact cells の構成糖から分類を試み第 I 群は主要構成糖マンノース、グルコース、全分芽型、求頂的 (acropetal) な多極出芽のキャンディダ科 (Candidaceae)、第 II 群はマンノース、グルコースのほかガラクトース、フコースなど、内分芽型、求基的 (basipetal) なスポロボロミケス科 (Sporobolomycetaceae)、第 III 群はマンノース、グルコースのほかキシロースなど、通常は内分芽型、求基的なフィロバシディウム科 (Filobasidiaceae) とした。酵母群を生化学的特性からみると [A] DNA の GC 含量 30~50 mol %, ユビキノタイプ Q₆₋₈, urease, DNase 活性 (-), コロニーの Diazonium Blue B (DBB) 呈色反応なく、イノシトール同化性 (-); [B] GC 含量 50~70 mol %, ユビキノタイプ Q₉₋₁₀, urease, DNase 活性 (+), DBB 反応赤色の 2 群に大別される。¹⁻⁶⁾ 前述の von Arx らの第 I 群は [A] の特性をもつ子の菌系酵母に相当し、第 II・III 群は [B] の特性をもつ担子菌系酵母に相当する。

ところで担子菌系の *Cryptococcus bhutanensis* GOTO et SUGIYAMA, *Cr. himalayensis* GOTO et SUGIYAMA, *Cr. vishniacii* VISHNIAC et HEMPFLING は担子菌系酵母の特性の1つである urease 活性 (-) の例外的菌種である。求基的に同一極での反復出芽で増殖するが、単極性で第1芽は全分芽型、第2芽から内分芽によるという他

の酵母にみられない様式であることが報告された。⁷⁾ なお、両極出芽のサッカロミコデス科 (Saccharomycodaceae), *Kloeckera* 属は子の菌系酵母のなかで担子菌系酵母に類似した求基的反復出芽を行うが、最近 *Brettanomyces* と記載された二、三の菌株で *Kloeckera* と同様の出芽様式をもつことが発見され、ユビキノタイプや、二、三の生理的性質が *Kloeckera* のそれと異なることから新属 *Eeniella* が提案された。⁸⁾ また、*Kl. corticis* (Klöcker) Janke の二、三の菌株において両極以外の第3、第4の極からも出芽する多極出芽現象も報告されている。⁹⁾ 今後、出芽様式の詳細と生化学的特性との関連から酵母の系統的分類の発展が期待される。

- 1) von Arx, J. A., Weijman, A. C. M.: *Antonie van Leeuwenhoek*, **45**, 547 (1979).
- 2) Moore, R. T.: *Botanica Marina*, **23**, 361 (1980).
- 3) 駒形: イースト工業会技術懇談会記録, **41**, 33 (1971).
- 4) 山田: 発酵と工業, **37**, 940 (1979).
- 5) Sen, K., Komagata, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **25**, 127 (1979).
- 6) Van der Walt, J. P., Hopsu-Havu, V. K.: *Antonie van Leeuwenhoek*, **42**, 157 (1976).
- 7) Baharaeen, S., Vishniac, H. S.: *Mycologia*, **73**, 618 (1981).
- 8) Smith, M. T. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **31**, 196 (1981).
- 9) Goto, S.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **27**, 349 (1981).

(山梨大・発酵研・後藤昭二)

枯草菌宿主ベクター系による *Bacillus amyloliquefaciens* α-アミラーゼ遺伝子のクローン化と分泌用ベクター

遺伝子工学的手法を用い、インターフェロンなどの高等動植物が持っている優れた性質を微生物に組み込ませて工業生産させようとする場合、合成させた物質を培地中に分泌させれば、高純度の物質を得るための純化が簡単であり、また合成させた物質が細胞外へ出るために細胞内の物質代謝に大きな影響を与えないと思われるので、大量の物質を生産させることができる。

だ液 α-アミラーゼなど多くの消化酵素は細胞内で合成され、細胞膜を通過して細胞外へ分泌されるタンパク質である。これらのタンパク質の分泌の過程につい

ては1975年, Blobel ら¹⁾によりシグナル説が提唱され, これは多くの実験によって確かめられている. 分泌タンパク質の前駆体は完成型タンパク質の NH₂ 末端に 20~30 アミノ酸残基からなるシグナルペプチドを余分に持ち, その部分が分泌のためのシグナルとなって膜の通過に直接関係しているという説である. この機構は下等な微生物から高等動物に至るまで同じであると考えられている.

枯草菌は菌体外酵素を培地中に生産する能力を持っており, それらの酵素の分泌生産も当然シグナルペプチドが関係しているものと予想される. シグナルペプチド部分にあたる DNA 断片を取り出し, 他の生物が生産する優れた性質を持つ物質の遺伝子と *in vitro* で連結させ, 枯草菌に導入させれば, 目的とする物質を培地中に生産させることが可能である.

枯草菌 α -アミラーゼは, 酵素構造遺伝子や生産制御遺伝子など遺伝学的基礎が蓄積され, 上述のような分泌用ベクターの開発に最もかなっていると考えられて枯草菌テンプレートファージ P11 中にクローン化された²⁾ が, その利用にはまだまだ多くの問題が含まれていた. ところが, 最近 Palva らによって, *B. amyloliquefaciens* の α -アミラーゼ遺伝子が枯草菌プラスミド pUB 110 にクローン化された.³⁾ 彼らは *B. amyloliquefaciens* 染色体 DNA を *Mbo* I で部分分解し, pUB 110 を *Bam* HI で切断した DNA と連結させ, *amy*⁻ 株に導入後, *Km*^r, *Amy*⁺ で選択した. その結果, 約 2.3 Kb の DNA が組み込まれ, α -アミラーゼ構造遺伝子を含み, *in vitro* タンパク合成系で約 60,000 ダルトンの α -アミラーゼ前駆体が合成され, 分泌された完成型 α -アミラーゼ (分子量 58,000 ダルトン) とは区別されることが示された. クローン化した α -アミラーゼ遺伝子の NH₂ 末端側の DNA 塩基配列を調べたところ, NH₂ 末端側に 31 アミノ酸残基からなるシグナルペプチドがついていること, translation が始まる ATG コード付近には Pribnow box, SD (Shine-Dalgarno) 塩基配列も含まれていること, Chung, Friedberg⁴⁾ が報告している *B. amyloliquefaciens* 菌体外 α -アミラーゼの NH₂ 末端付近 65 アミノ酸残基の配列とも 4 か所しか異なっていないことを述べている. α -アミラーゼ遺伝子をクローン化した細胞は 50 コピーに近い構造遺伝子を持つことになり, 培養のある時期では合成されるタンパク質の 50% が α -アミラーゼにあたると考えている.

プラスミド pUB 110 に導入した遺伝子は, その

DNA 中に欠損を起こしやすいなど多くの問題があるなかで, この α -アミラーゼ遺伝子のクローン化は非常にラッキーなものと思われる. 今後この酵素のシグナル部分にあたる DNA を分泌用ベクターとして用いる研究が盛んになるものと思われるが, 分泌用ベクターとして異種生物に由来する有用物質を生産させるために, このような外来の遺伝子を使用するのが良いのか, また枯草菌本来の遺伝子による方が良いのかは今後の問題であろう.

- 1) Blobel, D., Dobberstein, D.: *J. Cell Biol.*, **67**, 852 (1975).
- 2) 山根: 農化, **54**, 877 (1980).
- 3) Palva, I. et al.: *Gene*, **15**, 43 (1981).
- 4) Chung, H., Friedberg, F.: *Biochem. J.*, **185**, 387 (1980).

(筑波大・生物科学系・山根國男)

新しい環状グルカン

シクロデキストリンは α -1,4-グルコシド結合した環状オリゴ糖であるが, これより分子量が約 3 倍大きい β -1,2-グルカンも環状であることが最近明らかになった. このグルカンは, 双子葉植物に腫瘍 (crown gall) を作る *Agrobacterium tumefaciens* の培養液から細胞外多糖類を除いたのち, 90% エタノール溶液にして生ずる沈殿物として初めて報告され,¹⁾ 後に β -1,2-グルカンであることがわかった.²⁾ その後, 種々の *Agrobacterium* や豆科植物の根に根粒を作る *Rhizobium* でも β -1,2-グルカンを生産することがわかってきたが, いずれも 1,2-結合以外の結合を約 20% も含むものであった.³⁻⁵⁾ このマイナー物質は, 細胞外多糖類の繰り返し単位物質 (重合度 8) であることが判明した.⁶⁾ この繰り返し単位物質は, ピルビン酸やコハク酸を含む酸性物質であるため, DEAE-セルロースのカラムにより両者を分けることができる. 中性区分に溶出された β -1,2-グルカンには 1,2-グルコシド結合以外の結合はもはや検出されない. また, 還元末端の存在も認められない. このようにして細胞外に生産された β -1,2-グルカンは, 枝分かれのない環状の物質であることが証明された.⁶⁾ ところで, *Rhizobium* の菌体をフェノール抽出した区分にも環状 β -1,2-グルカンが存在する報告もある⁷⁾. いずれも分子量は類似していて, おそらく培養条件により β -1,2-グルカンは細胞表面から培養液中に遊離される