

報 文

Rhodotorula 属に関する研究 (第9報)

無孢子酵母類における Carotenogenesis の分布

長谷川 武治・坂野 勲 (財団法人 醸酵研究所)

Studies on the Genus *Rhodotorula* (IX)

The Distribution of the Carotenogenetic Species among the Asporogenous Yeasts

Takezi HASEGAWA and Isao BANNO (Institute for Fermentation, Osaka)

For investigating the distribution of carotenogenesis among the asporogenous yeasts, twenty-nine yellow or pale-colored strains were selected from among seven hundred and forty-three cultures belonging to seventy-two species of the following genera:

Cryptococcus (5 spp.), *Torulopsis* (22 spp.),
Pityrosporum (1 sp.), *Brettanomyces* (3 spp.),
Candida (30 spp.), *Kloeckera* (5 spp.),
Trigonopsis (1 sp.), *Trichosporon* (4 spp.),
(*Rhodotorula* was omitted.)

The selected cultures were incubated at 28°C for 4 days or more on a rotary shaker, and the extraction of the pigments from them was performed with acetone and petroleum ether.

Among the above genera, only *Cryptococcus* was found to be a producer of the carotenoid pigments. As an exceptional species, *Cr. neoformans* was demonstrated to be incapable of forming the pigments through the investigation of five strains of it. Moreover, it was also found that the pigmentation in these strains of *Cr. neoformans* was not influenced at all by diphenylamine even in a dose sufficient to inhibit the pigment production in other *Cryptococci*. These results led to the conclusion that the intracellular pigment of *Cr. neoformans* cannot be regarded as a carotenoid.

無孢子酵母類のなかで *Rhodotorula* についてはやくからカロチノイドの生産性が認められ、これがこの属を他の無孢子酵母類と区別する唯一の特徴であると考えられて来た。ところが1954年になつて PETERSON ら¹⁾, NAKAYAMA ら²⁾ はそれぞれ別個に *Cryptococcus* 属の数菌株が *Rhodotorula* と同様カロチノイドを形成することを認めた。

したがつて1952年に発表された LODDER, KREGER-VAN RIJ³⁾ の分類体系には大きな疑点が生じたことになる。著者らはこの問題を検討する目的で、既知無孢子酵母諸属間におけるカロチノイド色素生産性の分布を調査した。

有色無孢子酵母類よりの菌体色素の抽出

実験方法

無孢子酵母類72種 (743標本) を Potato-yeast-glucose agar 上に培養後10~15°Cの室内に約3カ月間放置したのち、それらのなかから黄色または淡色に着色した標本29株につき前報記載の方法で振盪培養ならびに菌体色素の抽出を行なつた。使用した酵母類を各属別に記載すれば次のとおりである。

Cryptococcus (5 spp.); *Torulopsis* (22 spp.)
Pityrosporum (1 sp.); *Brettanomyces* (3 spp.)
Candida (30 spp.); *Kloeckera* (5 spp.)
Trigonopsis (1 sp.); *Trichosporon* (4 spp.)

(174)

(長谷川, 坂野) *Rhodotorula* 属に関する研究 (第9報)

色素の抽出困難な菌株については抽出前にあらかじめ下記のとおり種々の処理を培養細胞にほどこしたのち抽出した。

- 1) 石英細砂とともに磨砕しながら, アセトンおよび石油エーテルで抽出を繰り返す。あるいはあらかじめ60°Cで乾燥後抽出する。
- 2) ドライアイス, アセトンを用いて細胞の凍結融解を繰り返す。
- 3) トルオールを用い細胞の自己消化を行なわせる。
- 4) 12% NaOH を含むメタノール溶液を菌体の2倍量加え一夜25°Cに放置し, ベンゼンを加えて1時間振盪したのち遠心分離してベンゼン部を採り, さらにベンゼンを用いて抽出を繰り返す。
- 5) 細胞をリン酸緩衝液中で20KCの音波処理にかける。
- 6) 同量の 2N-NaOH 溶液中に懸濁して20分間沸騰させ, 洗浄後菌体色素を抽出する。

結 果

以上の結果は第1表に示すとおりである。

Table 1. Extraction test of the carotenoid pigments from colored torulas

Species	Strains	Color of cells	Color of P.E. extract	Light absorption maxima
<i>Crypt. albidus</i>	<i>T. gelatinosa</i> (3 cul.)	Pale yellow	Yellow	450(420,480)*m μ
	<i>T. albida</i> (2 cul.)	Yellowish white	Slightly yellow	450
	<i>Tr. liquefaciens</i>	Pale yellowish brown	Slightly yellow	450
	CBS, L-142	Pale yellow	Yellow	450(420, 480)
<i>Crypt. diffluens</i>	CBS, L-160	Pale yellow	Yellow	450(420, 480)
<i>Crypt. laurentii</i>	<i>T. laurentii</i>	Dull yellow	Yellow	450(420, 480)
	<i>T. aurea</i> (2 cul.)	Pale yellow	Yellow	450(420, 480)
	<i>T. flavescens</i> (2 cul.)	Pale yellow	Yellow	450(420, 480)
	CBS, L-140	Dull yellow orange	Yellow	450(420, 480)
<i>Crypt. luteolus</i>	<i>T. luteola</i> (2 cul.)	Yellow orange	Yellow	450(420, 480)
<i>Crypt. neoformans</i>	CBS, L-132		Colorless	—
	NI,7496 from CONANT		Colorless	—
	<i>T. histolytica</i> , from TANNER	Yellow orange -dull yellow	Colorless	—
	<i>T. histolytica</i> , original		Colorless	—
	<i>Sacch. lithogenes</i> CBS, L-1830	White	Colorless	—
<i>Torulopsis aerea</i>	<i>T. aerea</i> (2 cul.)	Pale yellowish brown	Colorless	—
<i>Candida krusei</i>	NI,7492 from CONANT	Yellowish gray	Colorless	—
<i>Candida pseudotropicalis</i>	NI,7494 from CONANT	Dull yellow	Colorless	—
<i>Candida pseudotropicalis</i> var. <i>lactosa</i>	<i>Tr. kefir</i>	Pale yellow	Colorless	—
<i>Candida scottii</i>	DIETRICHSON's strain	Dull yellow	Colorless	—
<i>Candida humicola</i>	original strain	Yellowish gray	Colorless	—
	WICHERHAM's strain		Colorless	—
<i>Candida mycoderma</i>	<i>Mycoderma vini</i>	Pale yellowish brown	Colorless	—
<i>Trichosporon cutaneum</i>	<i>Parend. asteroides</i>		Colorless	—
	<i>Parend. balzeli</i>	Pale yellowish brown	Colorless	—
	<i>Hemisp. rugosa</i>		Colorless	—
<i>Trichosporon pullulans</i>	<i>Oidium pullulans</i>	Pale yellow	Colorless	—
<i>Trichosporon beigelii</i>	original strain	Pale yellowish brown	Colorless	—

* 括弧内の数字は吸光曲線の Shoulder の位置を示す

無孢子酵母のなかで, Carotenogenesis を行なう種類は *Rhodotorula* を除くと, やはり *Cryptococcus* に限るようである。しかしながら, その *Cryptococcus* のなかでも病原酵母, *Cr. neoformans* に所属する5菌株では Carotenoid 色素は抽出されて来ない。したがって *Cr. neoformans* の菌体色素が他の *Cryptococcus* のようにカロチノイドであるかどうかには疑問がある。

この点をさらに確かめる目的で Diphenylamine による色素形成阻害試験を行なった。

Diphenyl amine (DPA) による色素形成阻害試験

実験方法

DPA が菌体の増殖過程でカロチノイド色素の生成を阻害する事実については GOODWIN, COHENBAZIRE⁶⁾, STANIER⁷⁾, SCHLECHTER et al.⁸⁾, ZSOLT, FERENEZY⁹⁾ および中川, 辰己¹⁰⁾の報告がある.

Potato-yeast-glucose agar に DPA をそれぞれ 0, 20, 40, 80 ppm の濃度に加えてから固まらせて斜面としたものへ *Rhodotorula* および *Cryptococcus* 11株を選んで接種し, 3週間にわたって発育と Colony の色調を観察比較した.

結果

その結果は第2表に示すとおりである.

Table 2. Inhibition of the carotenoid production by DPA

Name	DPA Concentration (p.p.m)							
	0		20		40		80	
	Growth	Color	Growth	Color	Growth	Color	Growth	Color
<i>Rht. glutinis</i>	+++	Pink	+++	Yellowish Pink	++	Yellow	-	-
<i>Rht. glutinis</i> var. <i>aurantiaca</i>	+++	Orange	+++	Orange	+++	Orange	±	White
<i>Rht. glutinis</i>	+++	Reddish Pink	++±	Orange	++±	Yellow	++	White
<i>Rht. mucilaginos</i>	+++	Pink	+++	Cream	+++	White	+++	White
<i>Rht. rubra</i>	+++	Pink	+++	Yellowish Cream	++±	White	++	White
<i>Rht. flava</i>	+++	Yellow	+++	Yellow	+++	Cream	++	White
<i>Crypt. albidus</i>	+++	Pale yellow	+++	Pale yellow	+++	White	++	White
<i>Crypt. laurentii</i>	+++	Yellow	+++	Yellow	++	Cream	+	White
<i>Crypt. neoformans</i> 1	+++	Yellow	+++	Yellow	+++	Yellow	++	Yellow
<i>Crypt. neoformans</i> 2	+++	Yellowish cream	+++	Yellowish cream	+++	Yellowish cream	+++	Yellowish cream
<i>Crypt. neoformans</i> 3	+++	Yellowish cream	+++	Yellowish cream	+++	Yellowish cream	+++	Yellowish cream

この実験の結果はさきの結果ときわめてよく一致した. すなわち, *Cr. neoformans* に所属する諸菌株を除き, いずれも明瞭な阻害を示し, ある場合発育には影響なく色素形成だけが阻害された. これに対して *Cr. neoformans* の諸菌株では上記の阻害濃度に DPN を用いた場合でも Colony の着色に変化を認めなかつた.

考察

Cryptococcus は1833年, KÜTZING によりその Capsule 形成性を特徴として設定された属であるが, 明確な定義が与えられなかつたため, この名称は一時使用されなくなつたことがある. しかし, 1901年になつて VUILLEMIN はこの属名を病原性無孢子酵母に限定して用い, 以後医学の領域ではこの名称が一般化した, それと同時に病原性を有しない酵母類にもこの名称が使用されるようになったため, *Torulopsis* BERLESE および *Rhodotorula* HARRISON との分類学上の区別に問題が生じた.

1952年 LODDER, KREGER-VAN RIJ はカロチノイドを生産しない無孢子酵母群 (*Cryptococcoideae*) のなかで非醗酵性の白色または淡色かつ細胞が Capsule によつて包まれ, 同時に細胞外に澱粉様物質を形成する種類をこの属に集め, その下に5種2変種をおいた. これによつて *Cryptococcus* は *Torulopsis* とはおもに醗酵性の有無によつて, また *Rhodotorula* とはカロチノイド生産性の有無によつてそれぞれ区別されることになつたが, この分類区分が上記の諸結果から修正を要することは事実である. LODDER らによつて定義された *Cryptococcus* のうち, 病原酵母 *Cr. neoformans* を除く諸菌株はいずれもカロチノイド生産性を有するからこれらをカロチノイド生産性酵母群 (*Rhodotoruloideae*) に所属させるのが当然である. これに対して *Cr. neoformans* の菌体色素はカロ

(176)

(長谷川, 坂野) *Rhodotorula* 属に関する研究 (第10報)

チノイドとは異なると推定されるから, この種類は分類位置の変更を必要としない. 元来, *Cr. neoformans* は無胞子酵母として扱われて来たが, 一方においてはこの種類の子嚢胞子形成が TODD, HERRMAN¹³⁾, REDAELLI et al.¹⁴⁾, GIORDANO¹⁵⁾および BENHAM¹⁶⁾によつて報告されている. WICKERHAM は *Cr. neoformans* が *Lipomyces* と近縁の種類であることを示唆し, さらに BENHAM はこれが *Lipomyces starkei* と同一種であると結論した. 著者らは *Lipomyces* 数株について上記の方法で菌体色素の抽出を試みたが, やはりカロチノイドを証明することができなかつた. また BENHAM¹⁵⁾は *Cr. neoformans* とその他の *Cryptococcus* との相違点として37°Cにおける生育および病原性の有無を挙げ, これが分類学上または診断学上重要な性質であることを指摘しており, これは上記の結論とは矛盾しない, すなわち, 以上の分類法の変更は *Torulopsis*, *Cryptococcus* および *Rhodotorula* の分類学上の定義を従来より, さらに明確化するものと考えられる.

要 旨

無胞子酵母類のカロチノイド生産性に検討を加え, その性質が *Rhodotorula* を除けば *Cryptococcus* にのみ存在することを確認した. また *Cryptococcus* のなかでは病原酵母 *Cryptococcus neoformans* 群にこの性質を認めなかつた.

終りに, 御援助御鞭撻をいただいた武田研究所長桑田智博士, 終始御懇篤な御指導を仰いだ醸酵研究所長佐藤喜吉博士, 恩師坂口謹一郎博士ならびに東京大学教授有馬啓博士に深甚の謝意を表す. また実施に当り御熱心に御協力をいただいた山内栄, 見方洪三郎, 上野鮎子の諸氏に厚く御礼を申し述べ.

本研究の一部は文部省科学研究費によつた. なお, 本報の一部は昭和34年日本農芸化学会大会に発表した.

文 献

- 1) PETERSON W.J., BELL, T.A. ETHELLETS, J.L. and SMART Jr, W.W.G. : J. Bact. **67**, 708 (1954). 2) NAKAYAMA T., MACKINNEY G. and PHAFF H.J. : Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. **20**, 217 (1954).
- 3) LODDER J., KREGER-VAN RIJ N.J.W. : The yeasts, a taxonomic study (1952). 4) GOODWIN, T. W., OSMAN H.G. : Biochem. J. **53**, 541 (1953). 5) GOODWIN, T.W., OSMAN, H.G. : Biochem. J. **56**, 222 (1954). 6) GOODWIN, T.W. : Adv. Enzymology **20**, 319 (1959). 7) COHEN-BAZIRE, G. and STANIER R.Y. : Nature, **181**, 250 (1958). 8) SCHLECHTA, L., GABRIEL, O. HOFFMANN-OSTENHOF : Nature, **181**, 268 (1958). 9) ZSOLT, J. and FERENCZY L. : Act. Univ. Szegediensis, **9**, 65 (1958).
- 10) 中川昌平, 辰巳忠次 : 日農化, **34**, 199 (1960). 11) KÜTZING, F. : Algarum aquae dulcis Germaniae, Decas III (1833). 12) VUILLEMIN, A. : Revue Gen. Sc. **12**, 732 (1901). 13) TODD, R. L. and HERRMANN W.H. : J. Bact., **32**, 89 (1936). 14) REDAELLI, P., CIFERRI R. and GIORDANO A. : Boll. Sez. Ital. Soc. Intern. Microbiol. **1**, 1 (1937). 15) GIORDANO, A. : Mycopathologia **1**, 274 (1938). 16) BENHAM, R.H. W. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **89**, 243 (1955). 17) WICKERHAM, L.J. : Ann. Rev. Microbiol., **6**, 317 (1952). 18) BENHAM, R.H. W. : Trans. N.Y. Acad. Sc. **11**, 17, 418 (1955). 19) BENHAM, R.H. W. : Bact. Rev. **20**, 189 (1956). (昭和35, 9, 29 受付)

Rhodotorula 属に関する研究 (第10報)カロチノイド生産性 *Cryptococcus* のビタミン要求性

長谷川 武治・坂野 勲 (財団法人 醸酵研究所)

Studies on the Genus *Rhodotorula* (X)The Vitamin Requirement of the Carotenogenetic *Cryptococci*

Takezi HASEGAWA and Isao BANNO (Institute for Fermentation, Osaka)