

酵母のGC含量測定のための新しい菌体破壊法

長沼孝文・服部憲晃・兎束保之

A New Method of Cell Disruption for Analysis of GC Content in Yeast

Takafumi Naganuma, Noriaki Hattori, and Yasuyuki Uzuka

*Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Faculty of Engineering,
Yamanashi University, Kofu 400*

Abstract

A new method of yeast cell disruption for GC content analysis in DNA was developed. In the new method, cells in a test tube containing glass beads were disrupted with a tower-shaped mixer, making this experimental operation simpler. This new method has the advantage of high recovery of DNA and inhibiting polysaccharides contamination into the DNA. The GC contents in yeasts disrupted by the new method agreed well with those obtained by the established method.

油脂生産菌として知られている *Lipomyces* 属酵母は、もともと世界各地の土壌から分離された土壌生息酵母である (1, 2)。我々も効率の良い分離方法を開発することによって、日本各地の土壌から多数の *Lipomyces* 属と推定される酵母の分離に成功し、現在各種の分類・同定試験を行っている (3, 4)。

酵母の分類・同定を行う方法は、大きく分けて形態的特性や生理学的性質を比較する表現形質に基づく方法と、核酸や細胞構成成分などを比較の対象とする化学分類と呼ばれる方法に分けられる (5, 6)。化学分類の一つに、染色体DNA四塩基中の対合する片方のペアであるグアニン (G) とシトシン (C) の含有割合を調べるGC含量測定法があり、分類・同定に有益な情報をもたらしている (7, 8)。

GC含量を測定する場合、対象とする酵母から染色体DNAを抽出し、その後精製を行ってから融解

温度 (Tm) 法、浮遊密度 (Bd) 法あるいは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法など (9) で分析する手順が用いられる。これら一連の手順の中で、まず問題となるのは対象とする酵母菌体をどのような方法で破壊し、染色体DNAを抽出するかである。これまでに報告されている菌体破壊法の一つである Zymolyase による細胞壁溶解法 (10-16) は、酵素に対する感受性の低い酵母や溶菌スペクトルに含まれない酵母が存在する (17, 18) などの問題点がある。酵素による溶菌法と同様に、以前から良く利用されてきた Braun homogenizer を使った機械的摩砕法においては (19-25)、何れの酵母にも適用は出来るが、装置が高価であり最適条件の設定も難しい (7) などの欠点がある。また、正確な分析値を得るには、抽出DNA溶液中への多糖やタンパク質などの夾雑物の混入は出来るだけ少ないことが望ましいが (7, 12, 21)、*Lipomyces* 属酵母は多糖を多量に産生する性質がある (26,

27)。それ故、このような酵母の染色体DNAを効率良く抽出し、GC含量を正確に測定したい場合、既存の菌体破壊法で十分であるとは考えられなかった。

そこで我々は、*Lipomyces*属酵母のGC含量測定のためのDNA抽出に使用する菌体破壊法に関して、これら既存の方法に比べ、容易な条件設定と操作のもとでDNAの回収が良く、かつ分析に悪影響をおよぼす多糖などの夾雑物が排除でき、更に出来るだけ安価な経費で実験が可能であるなどの利点をもった方法の開発を行った。本報では、これらの開発意図をほぼ満足することができたタワー型ミキサーを使用した新しい方法について述べる。

実験方法

1. 供試菌体

pHを5.0に調整したYEPD培地(28)を3ℓ入れて115°Cで20分間の殺菌を行った5ℓ容ジャーファーマンター(丸菱)に、既報に準じて前培養を行った*Lipomyces starkeyi* CBS 1807 (type)を接種した。培養温度29°C、攪拌回数200rpm、通気量2,000ml/分の条件下でOD_{800nm}が約5(対数増殖期後期)に達するまで培養した。

培養液を遠心集菌(4°C、9,200×g、10分間)(日立高速冷却遠心機、モデル20PR-52D)後、最初に用いた培養液量の2/3倍量のSaline-EDTA溶液(0.15M塩化ナトリウム-0.1MEDTA、pH8.0)(9)に溶解した。この懸濁液を上述の条件で遠心分離する菌体洗浄を2回繰り返してから、湿菌体重量の10倍量のSaline-EDTA溶液に懸濁後、-80°Cで凍結保存した。

2. 菌体破壊

凍結保存菌体懸濁液を流水で解凍後、培養液遠心分離時と同条件下で集菌し、湿菌体約60gを得た。これを1.2ℓのSaline-EDTA溶液に懸濁後、遠心集菌し、再度120mlのSaline-EDTA溶液に懸濁したものを以下の菌体破壊あるいは溶菌に供試した。

1). 既存の方法

①Braun homogenizer法

菌体懸濁液40mlを、40gのガラスビーズ(φ0.45-0.5mm)を入れた75ml容破壊専用フラスコ入れ、Braun mechanical cell homogenizer(モデルMSK)を用いて(7, 19)、出来るだけ低温下にて2,000rpmの条件下で所定の時間振盪し、菌体破壊を行った。

②Zymolyase法

菌体懸濁液40mlにβ-メルカプトエタノールを0.5ml添加し、37°Cで15分間静置した。これに、

Saline-EDTA溶液に溶解したZymolyase 100 T(キリンビール)を終濃度として300unitsとなるように添加し(13)、さらに、Saline-EDTA溶液を加えて全量を45mlとした。この溶液を37°C、45rpmで振盪しながら所定の時間溶菌反応させた。

2). 新しい方法(Mix-Tower法)

7.5gのガラスビーズ(φ1.0-1.05mm)を入れた試験管(20×180mm)に、菌体懸濁液を3mlずつ分注し、14本の試験管を同時に大洋Mix-TowerモデルA-14に架けた。タワー部分を断熱材(発砲スチロール)で囲った中に液化炭酸ガスを流し約2-8°Cにした条件下で、2,500rpm(最高回転数:目盛10)で振盪することによって菌体破壊を行った(29)。

3. 菌体破壊率および溶菌率の測定

1). 破壊率

トーマ血球計算盤を用いて初発菌数と、所定時間破壊処理後に残存する未破壊の菌数を測定し次式から求めた。

$$\frac{(\text{初発菌数} - \text{残存する未破壊の菌数}) \times 100}{\text{初発菌数}}$$

2). 溶菌率(30)

分光光度計を用いて初発のOD_{800nm}と、所定時間反応後のそれを測定し次式から求めた。

$$\frac{(\text{初発OD}_{800nm}\text{値} - \text{反応後のOD}_{800nm}\text{値}) \times 100}{\text{初発OD}_{800nm}\text{値}}$$

4. 菌体破壊液からのDNA抽出と精製(7, 9)

Braun homogenizer法とMix-Tower法では、菌体破壊液にTris-SDS溶液(10%のドデシル硫酸ナトリウムを含む0.1M Tris-塩酸緩衝液、pH9.0)を2ml添加し、60°Cで10分間静置した。また、Zymolyase溶菌系では同液を2ml加えた後、同温で30分間静置反応させた。引き続きこれらの溶液は常法に従って処理し、DNAのガラス棒への巻き取りおよび精製を行った。

5. 抽出DNA溶液中への多糖の混入量の測定

菌体破壊液あるいは精製後のDNA溶液を、沸騰水中で10分間加熱後急冷してDNAを熱変性させ一本鎖にした。次にヌクレアーゼP1を加え、DNAおよびRNAをヌクレオチド単位にまで分解した。

この溶液を0.01M酢酸で予備展開しておいた濾紙(東洋、No.50、2×20cm)にスポットし、酢酸エチル-酢酸-ピリジン-水(5:1:5:3)で8時間展開して多糖を分離した。多糖画分が含まれる濾紙部分を切り取り、pHを10にした水酸化ナトリウム溶液の中に入れ、Mix-Towerで4時間振盪後12時間以上放置した。フィルター(ゲルマン、0.45μm)を用いて濾紙繊維を除去してから、フェノー

ル-硫酸法 (31) で多糖を定量した。

6. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるGC含量分析

精製DNAをヌクレアーゼP 1 およびアルカリフォスファターゼ処理を行い (9)、HPLC分析用の試料とした。

島津高速液体クロマトグラフLC-6AにガードカラムのCosmosil 10C18 Packed Column (4.6×50mm)と分析用カラムのCosmosil 5C18Packed Column (4.6×150mm) (Nakarai Tesque)を接続した。移動相に0.2Mリン酸二水素アンモニウム-アセトニトリル (20:1) (32)を用い、流速1.0 ml/分、カラム温度25°C、検出UV260nmの条件下でヌクレオシドを分析した。

結果

1. 破壊率あるいは溶菌率とDNA巻き取り量におよぼす影響

菌体から、出来るだけ多量の染色体DNAを抽出しようとする時、菌体が十分破壊された方が効率が良いと考え、各方法における振盪時間と菌体破壊率あるいは反応時間と溶菌率の関係を調べ、Fig. 1 A、B、Cに示した。Braun homogenizerで破壊すると、振盪時間の経過と共に破壊率は上昇し、12分で90%以上の菌体が破壊された。Zymolyaseによる溶菌では、1時間の反応で溶菌率は大きく増大したが、それ以上反応時間を延長しても増大はみられなかった。Mix-Tower法では、振盪時間が長くなるにつれて破壊される菌数が増加し、30分間の振盪で約90%の破壊率を示した。

各破壊方法における各反応時間でのDNA巻き取り度合い (肉眼による目測値)をTable 1に示した。Braun homogenizer法の場合、振盪8分目が最も多かった。Zymolyaseを用いると、溶菌1時間目で最大を示し、以後大きな変化は見られなかった。Mix-Tower法では30分間の振盪で最も多量のDNAが巻き取れた。各方法間で比較すると、Zymolyase 1時間処理が最も多くの量のDNAが巻き取れ、続いてMix-Towerで30分間振盪した場合であった。Braun homogenizerで菌体破壊をすると、最適条件下でも他の二つの方法よりも巻き取れる量がかなり少なく、精製操作での損失分を考えると、他の二方法よりも大量の菌体を使用しなければならぬことが分かった。

2. 抽出DNA中に混入してくる多糖量への影響

*Lipomyces*属酵母は、細胞外に多糖を産生するが (26, 27)、抽出DNA溶液中への多糖の混入はなるべく少ないことが望ましい (7, 12, 21)。そ

こで、菌体破壊法の違いが多糖混入量におよぼす影響を調べた。なお、この実験では、DNAが十分回収できた (Table 1) Zymolyase法 (1時間反応)とMix-Tower法 (30分間振盪)について実験を行い、結果をTable 2に示した。Zymolyaseによる溶菌処理に比べて、Mix-Towerによる菌体破壊の方が、精製前および精製後の何れの抽出DNA溶液に対しても、多糖の混入量が少なかった。

3. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるGC含量分析におよぼす影響

ここまで用いてきた*Lipomyces starkeyi* CBS 1807と、新たに*Lipomyces tetrasporus* CBS 5910 (type)、*Lipomyces kononenkoae* IFO 10375 (type)、*Saccharomyces cerevisiae* IAM 4274 (0C-2)を対象に加え、DNAの回収量が良好であったZymolyase法とMix-Tower法 (Table 1)で菌体破壊し、DNAを抽出しHPLC法でGC含量を測定した。なお、Zymolyase法は1時間の溶菌反応を行い、Mix-Tower法では*Lipomyces*属は30分間、*Sacch. cerevisiae* IAM 4274は5分間の振盪破壊を行った。

結果をTable 3に示した。*L. starkeyi* CBS 1807と*L. tetrasporus* CBS 5910および*Sacch. cerevisiae* IAM 4274の3菌株では、Zymolyase法およびMix-Tower法の何れの方法で菌体破壊しても、各菌株毎ではほぼ同じ値が再現性良く得られた。しかし、Fig. 2に示したように*L. kononenkoae* IFO 10375においては、Mix-Towerによる振盪破壊ではHPLC分析により信頼性あるGC含量が測定できたのに対し、Zymolyase溶菌では不純物のピークが多数出現してしまい、再現性ある値を得ることが出来なかった。

考察

酵母菌体から染色体DNA抽出し、正確なGC含量を求めるには、対数増殖期の菌体を湿重量で10-30g必要である (9, 19)。しかし、対数増殖期の菌体を多量に得ることはそれ程容易ではなく、しかも多数の菌株のGC含量を分析したい時などは、勢い少量の菌体からでも多量のDNAが抽出できる効率の良い菌体破壊法が必要となる。このような観点から今回の実験結果を眺めてみると、同じ菌体量から出発してもBraun homogenizer法では、他の二方法よりも回収できるDNA量が少なかったことより (Table 1)、培養規模を大きくしなければならぬため、多数の菌株を取り扱いながら効率良く実験を進めたいような場合には、この方法は不適当であると判断できる。

細胞壁溶解酵素を用いて溶菌を行う場合、対象とする酵母が溶菌スペクトルに含まれているか否か、あるいは含まれていても十分溶解されるか(17, 18)が問題である。それに対して、Braun homogenizer法やMix-Tower法などの機械的摩砕法は酵母の種類を選ばない利点がある。しかし、Braun homogenizer法は破壊率が最大に達する前に既にDNAの巻き取り量が減少してしまい(Fig. 1とTable 1)、最適破壊時間の設定が非常に難しい。一方、Mix-Tower法は、破壊率がほぼ最大に到達した時点で巻き取り量も最大となり(Fig. 1とTable 1)、最適条件の設定が容易である。この結果は、既に報告したMix-Tower法による酵素抽出のための菌体破壊実験の結果(29)と良く類似しており、この方法が菌体内からの成分抽出のための破壊法として広範囲に利用可能であることを示唆している。

Zymolyaseによる溶菌とMix-Towerによる振盪破壊で得たDNA中のGC含量をHPLC分析した場合、Zymolyase法で得た試料はMix-Tower法のそれに比べて、*L. kononenkoae* IFO 10375の例に代表されるように(Fig. 2)、不純物のピークが多くまた高い値であった。これは、Zymolyase法では多糖の混入が多かったこと(Table 2)から推定して、それ以外の夾雑物も多く含まれてしまうのではないかと考えられる。

Mix-Tower法を用いて本実験で得た*Lipomyces*属三菌株と*Saccaromyces*属一菌株のGC含量を、既に報告されている値(2, 22)と比較してみると、本実験で求めた値(Table 3)は報告値と最大でも2.6%の差しかなく、また各菌株間での差異は既報のものと同じ傾向であった。また、Mix-Tower法は破壊条件の設定が容易でDNAの回収が良く(Fig. 1とTable 1)、多糖などの夾雑物の混入が抑えられ(Table 2とFig. 2)、装置が簡単で初期投資だけで実験が繰り返し可能ななどの利点があり、更に機械的摩砕法であるのでかなり多くの酵母のGC含量測定のための菌体破壊に利用できると考えられる。

要 約

*Lipomyces*属酵母のGC含量測定のための新しい菌体破壊法の開発を行った。試験管にガラスビーズと菌体を入れ、タワー型ミキサーを用いて振盪破壊する新しい方法は、これまで用いられてきた同じ機械的破壊法であるBraun homogenizer法よりもDNAの回収が良好であった。また、同じく既存の方法であるZymolyase溶菌法に比べて、多糖など

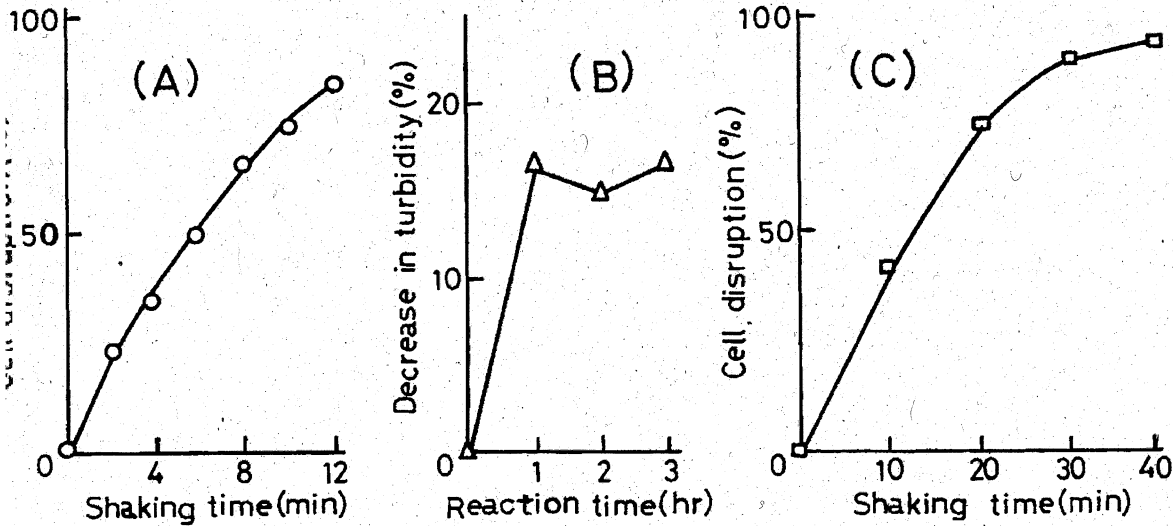
の夾雑物の混入量が少なく、この方法で再現性が得られにくい菌株でも、新しいMix-Tower法では信頼性の高い分析値が得られた。

終わりに、Zymolyase 100 Tを御恵与下さいましたキリンビール株式会社に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Starkey, R. L.: *J. Bacteriol.*, **51**, 33 (1946).
- 2) Phaff, H. J., Kurtzman, C. P.: The yeasts, a taxonomic study, (Kreger-van Rij, N. J. W.), 3rd. Ed., p.252, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam (1984).
- 3) 安藤、長沼、兎束: 日本農芸化学会誌(講演要旨集)、**64**, 404 (1990).
- 4) 日比、長沼、兎束: 日本農芸化学会誌(講演要旨集)、**65**, 158 (1991).
- 5) 坂野: 酵母研究における方法論、(永井 編)、p. 1, 学会出版センター、東京(1982).
- 6) 柳田: 微生物科学 1、p. 60, 学会出版センター、東京(1980).
- 7) 金子: 微生物の化学分類実験法、(駒形 編)、p. 225, 学会出版センター、東京(1985).
- 8) 後藤: 微生物の分類と同定 上、(長谷川 編)、p. 193, 学会出版センター、東京(1984).
- 9) 鈴木、江崎、朴: 新しい分類学に伴走する細菌同定法、(日本細菌学会教育委員会 編)、p. 88, 菜根出版、東京(1987).
- 10) Cryer, D. R., Eccleshall, R., Marmur, J.: *Methods in Cell Biology*, (Prescott, D. M.), vol 12, p.39, Academic Press, New York-San Francisco-London (1975).
- 11) Johnston, J. R.: *Yeast, a practical approach*, (Campbell, I., Duffus, J.H.), p.107, IRL Press, Oxford-Washington DC (1988).
- 12) Nakase, T., Suzuki, M.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **31**, 49 (1985).
- 13) Van der Walt, J. P., Von Arx, J. A., Ferreira, N. P., Richards, P. D. G.: *System. Appl. Microbiol.*, **9**, 115 (1987).
- 14) Van der Walt, J. P., Yamada, Y., Nakase, T., Richards, P. D. G.: *System. Appl. Microbiol.*, **9**, 121 (1987).
- 15) Nakase, T., Itoh, M., Suzuki, M., Komagata, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **34**, 493 (1988).
- 16) Nakase, T., Suzuki, M.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **32**, 125 (1986).

- 1) Kitamura, K., Kaneko, T., Yamamoto, Y.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **145**, 402 (1971).
- 2) Kaneko, T., Kitamura, K., Yamamoto, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 2295 (1973).
- 3) Nakase, T., Komagata, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **14**, 345 (1968).
- 4) Nakase, T., Komagata, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **17**, 43 (1971).
- 5) Nakase, T., Komagata, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **17**, 121 (1971).
- 6) Nakase, T., Komagata, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **17**, 227 (1971).
- 7) Nakase, T., Komagata, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **17**, 363 (1971).
- 8) Hamamoto, M., Sugiyama, J., Komagata, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **32**, 215 (1986).
- 25) Nakase, T., Suzuki, M.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **32**, 225 (1986).
- 26) Slodki, M. E., Wickerham, L. J.: *J. Gen. Microbiol.*, **42**, 881 (1966).
- 27) 高、長沼、兎束: 日本農芸化学会誌(講演要旨集)、**64**, 216 (1990).
- 28) 中島: バイオテクノロジー実験マニュアル、(山内、日向、水野、勝野、編)、p.46, 三共出版、東京(1987).
- 29) Naganuma, T., Uzuka, Y., Tanaka, K.: *Anal. Biochem.*, **141**, 74 (1984).
- 30) Kitamura, K., Kaneko, T., Yamamoto, Y.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **18**, 57 (1972).
- 31) 福井: 還元糖の定量法、p.45, 東京大学出版会、東京(1969).
- 32) Kaneko, T., Katoh, K., Fujimoto, M., Kumagai, M., Tamaoka, J., Katayama-Fujimura, Y.: *J. Microbiol. Methods*, **4**, 229 (1986).



1. Cell disruption by the methods of Braun homogenizer, Zymolyase and Mix-tower

Lipomyces starkeyi CBS 1807 was grown aerobically at 29°C for about 50 h in the YEPD medium and harvested by centrifugation. After washing, 20 g packed wet cells were suspended in 40 ml of saline-EDTA (9) and were disrupted following these methods:

(A) Braun homogenizer method: A 75-ml homogenizing flask contained 40 ml of cell suspension and 40 g of glass beads (diameter 0.45-0.5 mm). The flask was shaken at 2,000 rpm in the Braun Model MSK mechanical cell homogenizer while being cooled.

Cell disruption (%) = (initial cell number - cell number after shaking) × 100 / initial cell number.

(B) Zymolyase method: After adding 0.15 ml of β-mercaptoethanol and 3 mg of Zymolyase 100T into 40 ml of the cell suspension, the suspension was shaken at 37°C on a reciprocal shaker at 45 rpm.

Decrease in turbidity (%) = (initial OD_{600nm} - OD_{600nm} of reaction mixture) × 100 / initial OD_{600nm}.

(C) Mix-Tower: 3 ml of cell suspension was pipetted into a test tube (20 × 200 mm) containing 7.5 g of glass beads (diameter 1.0-1.05 mm). Fourteen test tubes were set on the Taiyo Mix-Tower Model A-14 and shaken at 2,500 rpm while being cooled. Cell disruption (%) was calculated to be the same as in the Braun homogenizer method.

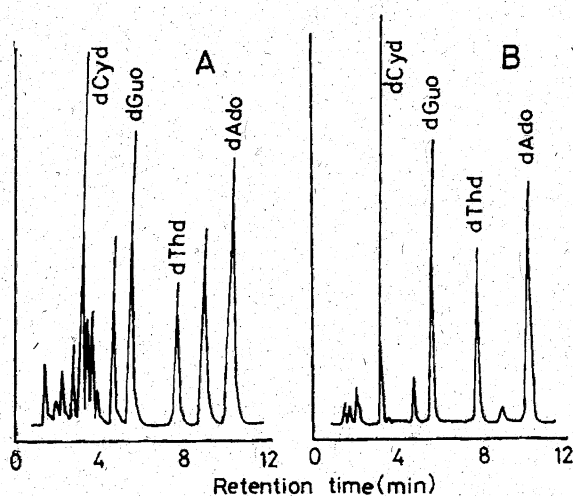


Fig. 2. Chromatograms of nucleosides obtained from DNA in *Lipomyces kononenkoae* IFO 10375 disrupted by Zymolyase method and Mix-Tower method.

Key: A, Zymolyase method; B, Mix-Tower method; dCyd, deoxycytidine; dGuo, deoxyguanosine; dThd, deoxythymidine; dAdo, deoxyadenosine.

Table 1. Effect of disruption method on DNA recovery

Method	Condition	DNA recovery
Braun homogenizer	2 min shaking	+
	5	++
	8	+++
	12	++
Zymolyase	1 hr reaction	+++++++
	2	+++++++
	3	+++++++
Mix-Tower	10 min shaking	+++
	20	++++
	30	+++++
	40	+++++

DNA recovery was measured by eye estimation as the quantity of spooling crude DNA that sticks onto a glass rod.

Table 2. Influence of disruption method on the contamination of polysaccharides into DNA

Method	Polysaccharides in DNA (%)
Zymolyase	1.64
Mix-Tower	0.92

Polysaccharides were isolated by paper chromatography determined by the phenol-sulfuric acid method (31).

Table 3. GC contents in DNA extracted by Zymolyase method and Mix-Tower method

Yeast	GC content (mol %)	
	Zymolyase	Mix-Tower
<i>Lipomyces starkeyi</i> CBS 1807	45.9±0.1	45.6±0.2
<i>tetrasporus</i> CBS 5910	46.9±0.2	46.5±0.1
<i>kononenkoae</i> IFO 10375	*	46.0±0.3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IAM 4274	38.5±0.0	37.4±0.3

After purification, DNA was digested by enzymes to form nucleosides, and the nucleoside composition was analyzed by HPLC. The conditions of analysis were as follows: column, Cosmosil 5C packed column (4.6×150 mm)(reversed phase); mobile phase, 0.2M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ - CH_3CN (20:1, v/v); flow rate, 1.0 ml/min; detector, UV (280 nm).

* Obtaining reliable data from the nucleoside composition was impracticable because many unknown peaks appeared on chromatograms as shown in Fig. 2.