[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol.61, No. 4, pp. 443~450, 1987]

Geotrichum candidum Link の産生するリパーゼの 抗原性による *Geotrichum* 属とその類縁菌の類別

原 稔生, 楠 晴雄, 橋本秀昭,
斎藤京子, 須藤恒二
(日本獣医畜産大学化学教室)

昭和 61 年 7 月 28 日 受 理

Yeast Classification Based on Antigenic Properties of Lipase from *Geotrichum candidum* Link

Naruo HARA, Haruo KUSUNOKI, Hideaki HASHIMOTO,
Kyoko SAITO and Tsuneji SUTO

Department of Chemistry, Nippon Veterinary and Zootechnical College,
Musashino-shi, Tokyo 180

Lipase activity and lipase antigenicity were examined in 34 strains of yeasts. The culture supernatants from nine strains of *Geotrichum candidum*, three other strains of *Geotrichum* sp. and two strains of *Endomyces geotrichum* showed significant lipase activity, but seven strains of *G. candidum* and other examined yeasts showed very low or no activity. The culture medium used contained corn steep liquor together with soybean oil. A commercially available crystalline lipase from a *G. candidum* strain was used as an immunogen to produce the antiserum against *Geotrichum* lipase. The antiserum(ALS-1) had two precipitation lines against the homologous antigen. For a purer antiserum, a rabbit was immunized with a precipitation line in agar plates which was considered to originate from the lipase and not from a contaminant. However, the serum(ALS-2) was not specific to the lipase and contained an antibody against a minor contaminant in the preparation or some compounds in the culture supernatants in some examined strains. Both sera produced a precipitation line which was linked to the line produced by the lipase when reacted with the supernatant. The lipase preparations produced by the active strains were supposed to have a common antigenic structure. However, neutralization tests with ALS-2 revealed that the neutralization curves of some yeasts were different. On the basis of titers of 50% inhibition and the inclinations of the curves, yeasts were classified into four groups. This grouping agreed with the classification based on isozyme patterns or the antigenicity of their extracts against the sera prepared by immunizing with cell extracts of *G. candidum*.
(Received July 28, 1986)

緒 言

われわれは *Geotrichum candidum* Link と名付けられている菌の細胞破砕液を抗原とする免疫反応を行い、この分類群の内容が不均質であることを認めている^(1,2)が、最終的結論には達していない。免疫学的距離により生物間の類縁性を検討する試みは数多く行われているが⁽³⁻⁹⁾これには高度に精製された相同性の認められる蛋

白質を抗原にして生成される他の物質とは反応性のない抗血清が要求され、細胞破砕液に対する抗血清は多くの菌体内物質に反応するので定量的補体結合反応のような試験には不適當である。しかしながら *G. candidum* に由来するといわれるリパーゼ標品が市販されているので、これを用いて純度のよい抗血清が得られるなら *G. candidum* 群の群別に役立つと考えられるので、市販の標品を用いて類縁性の検討を行った。

Table I. Strains of Genus *Endomyces* and *Geotrichum* Examined

Organisms	Strain	Source ^a
<i>Endomyces</i>		
<i>E. decipiens</i>	SH 301	IFO 0201
<i>E. geotrichum</i>	SH 278	IFO 9541
<i>E. geotrichum</i>	SH 279	IFO 9542
<i>E. magnusii</i>	SH 302	IFO 0110
<i>E. magnusii</i>	SH 302	IFO 4600
<i>E. cvetensis</i>	SH 304	IFO 1201
<i>E. reessii</i>	SH 305	IFO 1112
<i>Geotrichum</i>		
<i>G. candidum</i>	SH 234	S. Goto No. 16 → ATCC 34013 ⁽⁹⁾
<i>G. candidum</i>	SH 235	S. Goto No. 43 → ATCC 34014 ⁽⁹⁾
<i>G. candidum</i>	SH 269	S. Goto → T. Nakase → AJ 4884 ⁽¹⁰⁾
<i>G. candidum</i>	SH 295	IFO 4597
<i>G. candidum</i>	SH 296	IFO 4598
<i>G. candidum</i>	SH 297	IFO 4601
<i>G. candidum</i>	SH 298	IFO 4602
<i>G. candidum</i>	SH 299	IFO 5368
<i>G. candidum</i>	SH 300	IFO 5767
<i>G. candidum</i>	SH 319	IFO 4599
<i>G. candidum</i>	SH 320	IFO 9538
<i>G. candidum</i>	SH 321	IFO 9539
<i>G. candidum</i>	SH 322	IFO 9540
<i>G. candidum</i>	SH 323	IFO 6454
<i>G. candidum</i>	SH 324	IFO 5959
<i>G. candidum</i>	SH 343	M. Iwai → ATCC 34614 ⁽¹¹⁾
<i>G. capitatum</i>	SH 206	Y. Fukazawa 79-5a → T. Kume ⁽¹²⁾
<i>G. fici</i>	SH 237	S. Goto F-2-9 → ATCC 34015 ⁽⁹⁾
<i>G. rectangulatum</i>	SH 236	S. Soto B-91-1 → ATCC 34016 ⁽⁹⁾
<i>Geotrichum</i> sp.	SH 270	S. Goto → T. Nakase → AJ 4929 ⁽¹⁰⁾
<i>Geotrichum</i> sp.	SH 271	S. Goto → T. Nakase → AJ 4887
<i>Geotrichum</i> sp.	SH 273	S. Goto → T. Nakase A-5
<i>Geotrichum</i> sp.	SH 274	S. Goto → T. Nakase → AJ 4895 ⁽¹⁰⁾
<i>Geotrichum</i> sp.	SH 275	S. Goto → T. Nakase A-52
<i>Geotrichum</i> sp.	SH 276	S. Goto → T. Nakase → AJ 4941
<i>Geotrichum</i> sp.	SH 277	S. Goto → T. Nakase A-106
<i>G. suaveolens</i>	SH 272	S. Goto → T. Nakase → AJ 14198

^a Abbreviation of culture collection : IFO, Institute for Fermentation, Osaka, Japan ; AJ, Central Research Laboratories, Ajinomoto Co. Inc., Kawasaki, Japan ; ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Md., U. S. A.

実験方法

1. 供試菌株 試験に用いた菌株を Table I に示す。

Geotrichum candidum SH 233, SH 235 および SH 269 の 3 株, *Geotrichum fici*, *Geotrichum rectangulatum*, *Geotrichum suaveolens* の各株および *Geotrichum* sp. の 7 株は山梨大学工学部発酵化学研究施設の後藤昭二教授から, *G. candidum* SH 343 は大阪市立工業試験

所の岩井美枝子博士から, また *Geotrichum capitatum* SH 206 は明治薬科大学微生物学教室の深沢義村教授 (現・山梨医科大学) からそれぞれ提供を受けた。その他の株は財団法人発酵研究所 (IFO) から分譲を受けた。

2. 酵母の培養と試験試料の調製

(1) 培養 a. サブロー液体培地 (以下 SB と略す) の 200 ml を 500 ml 容坂ロコルペンの中で 27°C, 96 時間往復振とう培養した。

b. SB の 50 ml を 200 ml 容三角コルペンの中で,

27°C, 48 時間往復振とう培養した。

c. 大豆油 1% を添加した SB (SOB) 50 ml を 200 ml 容三角コルペンで b と同様にした。

d. 大豆油 1%, corn steep liquor 3% の Iwai ら⁽¹¹⁾ の液体培地 (CSL) 50 ml を b と同様にした。

(2) 培養上清 培養液は 12,500 g, 7°C で 30 分間遠心して菌体を分離した。SOB と CSL で培養したものは遠心後、上清の油分を濾過して除いた。この上清はリパーゼ活性度の測定試料とゲル内沈降反応の試料とした。

(3) 細胞破砕液 回収した菌体は蒸留水で洗浄後、Vibrogen cell mill Vi4 で破砕した。試験には 12,500×g, 4°C で 30 分間遠心して得た上清を用いた。菌体 5 g (湿重量) から約 1 ml の上清が得られた。

3. リパーゼ活性度の測定法 Bunch と Emerson⁽¹³⁾ の方法に準じて行った。50 ml 容栓栓沈殿管に基質溶液 (オリーブ油を 1% になるように加えてホモジェナイズした 0.05 M 酢酸緩衝液, pH 5.6) の 12 ml を入れ 30°C の恒温槽であたためておいたものに酵素液の 1 ml を加えた。その後 30°C で 4 時間振とうしながら反応させた。反応液は 50 ml のエタノール:エーテル混液 (9:1) を用いて定量的に 200 ml 容ビーカーに移し、0.05 N NaOH で pH 10.65 まで滴定した。被検液の滴定値から盲検値を差し引き、その差を 0.05 N NaOH の値として表した。pH 10.65 までの滴定はマグネチック スターラーで静かに攪拌しながら、ダブルジャンクションのガラス電極を装備した pH メーターによって終点を決定することによって行った。リパーゼの力価は次式で表した。

1 単位 = 1 ml の 0.05 N NaOH / 4 時間

4. リパーゼ抗血清の作成

(1) 抗血清 ASL-1 抗原は *G. candidum* の産生するリパーゼ結晶⁽¹⁴⁾ (生化学工業製・純度は超遠心分析で単一) の 5 mg を滅菌食塩水 1 ml に溶解したのち、Freund のコンプリートアジュバント (Iatron 製) 1 ml と乳化したものを 1 回の免疫に用いた。免疫にはニュージランドホワイト種のウサギ (雄, 2 kg) を用いた。抗原の注射は四肢の手掌部と後肢大腿部の皮下に 21 日間隔で 3 回行った。3 回目の注射後 10 日目に抗体価を測定し、その後採血した。このときの力価は 128 倍であった。抗体価は 2 倍から 256 倍まで希釈した抗血清と標準リパーゼ (36 単位/ml) を Ouchterlony 法に準じて寒天ゲル内で反応させ確認できる沈降線を生じるときの抗

血清の希釈倍数を用いた。

(2) 抗血清 ALS-2 抗血清 ALS-1 とリパーゼ標品とのゲル内拡散沈降反応ではリパーゼに由来する明瞭な沈降線の他にその線と抗血清との間に 1 本の沈降線が見られた。そこで抗血清の純度を高めるためにリパーゼ由来の沈降線を抗原として抗血清の作成を試みた。

抗原の作成方法: 径 9 cm のペトリ皿に厚さ 4 mm の寒天ゲルを作り、ゲル面を 4 等分した位置に内径 4 mm の穴を 4 mm の間隔で六角形の各頂点と中心にあけた。中心の穴に抗血清 ALS-1 を入れ、周囲の 6 個の穴には 1 ml 当り 36 単位の抗原を満した。これを 1 組としてペトリ皿 1 枚の中で 4 組のゲル内沈降反応を行った。蓋をして室温で 2 日間静置したのち、リパーゼに由来する沈降線の部分を切り出し、生理食塩水と蒸留水で洗ったゲルを (1) と同様に同容積のアジュバントと乳化して抗原とした。1 回の注射にペトリ皿 5 枚分を用いた。免疫の日程は標品と同じである。

5. 寒天ゲル内沈降反応 対照のリパーゼ標品は 36 単位/ml 溶液を用いた。培養上清の活性の低いものでは 10 倍に濃縮して用いた。活性の高いものと細胞破砕液はそのまま用いた。実施は Ouchterlony 法に準じて行った。

6. 中和試験^(6,15) CSL 培養上清のリパーゼ活性が約 30 単位以上みられた *G. candidum* 9 株, *Geotrichum* sp. 3 株および *Endomyces geotrichum* 2 株を用いて新たに CSL 培養を行って比較した。試験には CSL 培養上清と抗血清 ALS-2 を用いた。

培養上清は 1/2 から 1/16 まで希釈し、抗血清は 1/2 から 1/128 まで希釈した。希釈した培養上清を 1 ml ずつスピッツにとり、それにおのおの希釈した抗血清の 1 ml を加えた。反応はスピッツをパラフィルムで密封し、バイブレーターで攪拌してから一夜 7°C のチャンバー内で行った。リパーゼの残存活性は上記 3 の方法で行った。

結果と考察

1. 培養条件とリパーゼ活性

SB で 96 時間の培養上清ではほとんどすべての株でリパーゼ活性が認められたが、顕著なものではなかった。したがって *G. candidum* SH 234 を用いて SB, SOB 培地での経時変化を検討した。その結果、48 時間で最高値を示し、その後低下し菌体外に分泌されたリパ

Table II. Lipase Activity of Supernatant of Culture Broth and Cell Mill Extract

Yeasts		Lipase activity (unit/ml)						
Species	Strain	SB-96 C. S	SB-48		SOB-48		CSL-48	
			C. S	C. M. E	C. S	C. M. E	C. S	C. M. E
<i>G. candidum</i>	SH 343	—	28.0	8.5	2.3	30.5	31.0	47.0
<i>G. candidum</i>	SH 297	4.5	13.8	10.3	22.5	93.5	40.0	4.5
<i>G. candidum</i>	SH 298	3.2	10.8	3.5	8.2	67.5	48.5	42.5
<i>G. candidum</i>	SH 319	6.5	2.6	+	13.0	12.5	73.5	40.0
<i>G. candidum</i>	SH 296	2.7	9.5	10.0	49.8	116.6	51.0	10.5
<i>Geotrichum</i> sp.	SH 270	1.5	2.0	+	5.5	1.5	54.5	26.5
<i>G. candidum</i>	SH 295	2.6	13.5	12.8	22.5	40.3	72.0	41.0
<i>G. candidum</i>	SH 234	6.6	9.1	+	15.0	23.0	40.5	18.0
<i>Geotrichum</i> sp.	SH 275	4.5	9.5	5.0	+	19.0	64.5	55.5
<i>Geotrichum</i> sp.	SH 273	9.9	12.0	+	5.5	69.0	69.0	41.5
<i>E. geotrichum</i>	SH 279	3.0	+	+	+	1.0	45.0	+
<i>G. candidum</i>	SH 323	4.5	8.9	0.8	+	4.0	29.8	16.0
<i>E. geotrichum</i>	SH 278	3.5	+	+	+	3.8	52.0	1.5
<i>G. candidum</i>	SH 299	2.9	1.5	—	1.1	0.5	32.5	24.5
<i>G. candidum</i>	SH 269	1.4	+	—	12.0	20.5	15.8	14.5
<i>E. reessii</i>	SH 305	2.0	+	—	+	12.0	13.5	—
<i>G. candidum</i>	SH 324	4.0	28.0	14.5	3.5	11.5	10.0	48.0
<i>G. candidum</i>	SH 321	2.5	1.8	+	12.0	+	12.0	+
<i>G. candidum</i>	SH 300	2.4	1.2	+	2.9	—	8.0	6.0
<i>G. candidum</i>	SH 320	3.0	3.2	+	14.0	+	+	—
<i>G. candidum</i>	SH 322	2.5	4.6	2.0	10.5	+	+	—
<i>G. candidum</i>	SH 235	1.2	2.8	66.0	+	+	+	—
<i>Geotrichum</i> sp.	SH 276	1.0	+	+	+	—	+	—
<i>G. suaveolens</i>	SH 272	+	+	+	—	+	+	—
<i>Geotrichum</i> sp.	SH 274	3.0	—	—	—	—	+	—
<i>Geotrichum</i> sp.	SH 277	1.5	—	+	+	+	+	—
<i>G. capitatum</i>	SH 206	—	—	—	—	—	—	—
<i>G. fici</i>	SH 237	+	—	—	+	—	0.5	+
<i>G. rectangulatum</i>	SH 236	+	—	—	+	+	+	—
<i>E. ovetensis</i>	SH 304	2.5	—	—	+	+	+	—
<i>E. magnusii</i>	SH 303	2.5	+	—	—	5.0	—	—
<i>E. magnusii</i>	SH 302	2.5	+	—	—	—	—	—
<i>E. decipiens</i>	SH 301	1.5	+	—	—	+	—	—
<i>Geotrichum</i> sp.	SH 271	1.0	1.5	+	—	—	—	—

Lipase activity was assayed according to the method of Bunch and Emerson. Enzyme activity was expressed as the volume of 1/20N NaOH required to titrate the fatty acid liberated in 4 hr by 1 ml of a sample containing lipase. 1 unit=1 ml of 1/20N NaOH/4 hr. Abbreviations: SB-48 etc. are same as in Fig. 1. +, trace; —, not detected.

ーゼはあまり安定ではなく、96 時間の培養は不適当と考えられたので 48 時間での比較を行った。

SB 培地に対する大豆油の添加は一部の株では Table II にみられるように促進がみられたが、逆に低下あるいは不変のものがあるので一定の傾向はみられなかった。

しかし Iwai⁽¹¹⁾の報告した corn steep liquor を基本とし大豆油を加えた CSL 培地では、これらの株は 3 群に分かれた。すなわち顕著なリパーゼ活性を示す群、

中程度の群とはほとんど活性を示さない群とに分かれた。

第 1 群には *G. candidum* の 9 株と *Geotrichum* sp. の 3 株および *G. candidum* の完全世代といわれる *E. geotrichum* の 2 株が含まれ、中程度の群には *G. candidum* の 4 株と *Endomyces reessii* が含まれた。第 3 群にはその他の *Geotrichum* 属菌と *Endomyces* 属菌が含まれ、また *G. candidum* SH 235, SH 320, SH 322 の 3 株も含まれるが、この 3 株は後にも示すように他の株との性

質を異にしている。したがって *Geotrichum* 属とその類縁菌のリパーゼ産生能の検討には CSL 培地の使用が適当であろう。

2. 細胞破碎液のリパーゼ活性

細胞破碎液でのリパーゼ活性は培養上清での活性が高いものでおおむね高い値がみられた。しかし一部の株では低い値を示した。したがってリパーゼの産生と細胞外への分泌は株によって違いがあるものと考えられた。

3. リパーゼ標品と抗血清の純度

結晶リパーゼで免疫して得た抗血清 ALS-1 はゲル内沈降反応で Fig. 1 にみられるようにリパーゼ標品に対しリパーゼそのものに由来すると考えられる沈降線の他に 1 本の弱い沈降線を生じた。この沈降線はリパーゼ由

来の沈降線を抗原として作成した抗血清 ALS-2 では現れないことから、リパーゼの精製過程で除くことができなかった極微量の汚染物によるもので、その抗原性は強いものと考えられる。また ALS-2 は ALS-1 よりは純度の高いことが期待されたが、培養液および破碎液との反応においてリパーゼ由来の沈降線の他に数本の短いはっきりしない沈降線を生じることから予期していたような単相血清ではなかった。しかし多くの培養上清に対しリパーゼと繋がる明瞭な沈降線を与えるので、それ以上の処理は加えなかった。

4. 培養上清のゲル内沈降反応

ゲル内沈降反応の結果は模式にして Fig. 1 に示した。同じ位置にある沈降線は互いに繋がるものである。繋がる

Antigen		SB-96	SB-48				SOB-48				CSL-48			
Antiserum		C.S	C.S	C.M.E	C.S	C.M.E	C.S	C.M.E	C.S	C.M.E	C.S	C.M.E	C.S	C.M.E
Species		ALS-1	ALS-2	ALS-1	ALS-2	ALS-2	ALS-1	ALS-2	ALS-1	ALS-2	ALS-1	ALS-2	ALS-1	ALS-2
G.candidum	SH 343													
G.candidum	SH 297													
G.candidum	SH 298													
G.candidum	SH 319													
G.candidum	SH 296													
Standard lipase														
Geotrichum sp.	SH 270													
G.candidum	SH 295													
G.candidum	SH 234													
Geotrichum sp.	SH 275													
Geotrichum sp.	SH 273													
E.geotrichum	SH 279													
G.candidum	SH 323													
E.geotrichum	SH 278													
G.candidum	SH 299													
G.candidum	SH 269													
E.reessii	SH 305													
G.candidum	SH 324													
G.candidum	SH 321													
G.candidum	SH 300													
G.candidum	SH 320													
G.candidum	SH 322													
G.candidum	SH 235													
Geotrichum sp.	SH 276													
G.suaveolens	SH 272													
Geotrichum sp.	SH 274													
Geotrichum sp.	SH 277													
G.capitatum	SH 206													
G.fici	SH 237													
G.rectangulatum	SH 236													
E.ovetensis	SH 304													
E.magnusii	SH 303													
E.magnusii	SH 302													
E.decipiens	SH 301													
Geotrichum sp.	SH 271													

Fig. 1. Gel Diffusion Precipitation Analysis of *Geotrichum candidum* and Related Species. Abbreviations: SB-48, 48 hr culture with Sabouraud broth; SB-96, 96 hr culture with Sabouraud broth; SOB-48, 48 hr culture with Sabouraud broth added with 1% soybean oil; CSL-48, 48 hr culture with corn steep liquor added with 1% soybean oil; C.S, supernatant of culture broth; C.M.E, cell mill extract; Yest cells were disrupted with a Vibrogen cell mill Vi-4 (Edmund Bühler, West Germany) and were centrifuged at 10,000 rpm for 30 min at 4°C. About 1 ml of supernatant was obtained from 5g (wet weight) of cells; ALS-1, anti lipase serum-1. Antiserum prepared by crystalline lipase purchased; ALS-2, anti lipase serum-2. Antiserum prepared by precipitin line between ALS-1 and crystalline lipase; |, precipitin line linked with a main line formed by standard lipase; !, precipitin line linked with one another but not with standard lipase line; ‡, short precipitin line linked with on line; blank, precipitin line was not detected.

Fig. 2. Residual Activity Curves (A) and 50% Neutralization Values (B) of Standard Lipase Plotted against Dilution of the Antiserum. (A), (1)=80.8 U/ml, (2)=61.1 U/ml, (3)=39.4 U/ml; (B), The three points "(a), (b), (c)" represent dilution of the antiserum able to neutralize half of the activity of the preparation of "(1), (2), (3)" in (A), respectively. Dilution of antiserum necessary to neutralized the half of 50 units lipase was obtained from the line drawn manually these three points.

りのみられない沈降線は「または」印で示した。

(1) 抗血清 ALS-1 との反応

ALS-1 は Fig. 1 にみられるように SB-96 の上清には標品と繋がる沈降線を示さない。SB-48 あるいは SOB-48 に対しては一部の株で標品と繋がる線を示すが、不鮮明な弱い線であることが多い。これは ALS-1 のほうが血清としての力価が高く、リパーゼ濃度の低い試料では沈降線生成の最適比がゲル内にみられなかったためと考えられる。そして不純物に由来する沈降線はむしろ多いので図からはこの成績は除外した。

(2) 抗血清 ALS-2 との反応

SB, SOB, CSL のいずれの培養上清でもリパーゼ標品と繋がる沈降線がみられる株は互いに類似した共通の抗原決定基を持つリパーゼを産生することが考えられる。

この沈降線は CSL 培養では *G. candidum* にのみみられたが、SB, SOB の培養では *E. geotrichum*, *E. reessii*, *Geotrichum* sp. の一部にもみられる。このことはこれらが *G. candidum* の一部の株と類縁性のあることを示している。また CSL 培養でリパーゼ産生が少なく、ゲル内沈降線反応を示さなかった *G. candidum* SH 300

と Butler⁽¹⁶⁾ が分離した SH 320, SH 321, SH 322 の 3 株は細胞破砕液で作成した抗血清でのゲル内沈降反応でもリパーゼ陽性群とは異なっていた⁽²⁾。

リパーゼ標品とは繋がらない沈降線は抗血清 ALS-2 を作るときに免疫原として用いた沈降線に吸着し濃縮された汚染物に由来するものと考えられる。この沈降線の出現は培地によって違いがあるが、いずれも *G. candidum* の一部の株とその類縁酵母にみられることから、リパーゼ標品中にはこれらの菌株の細胞質とは共通した抗原決定基を持ち、免疫原性が強くリパーゼと分離することが困難な物質が存在するものであろう。

5. 細胞破砕液のゲル内沈降反応

細胞破砕液で抗血清 ALS-1 と反応するものでは 1 本から 4 本の沈降線がみられた。ところが抗血清 ALS-2 との間では沈降反応を示さなかったり沈降線が減少した。一部の株では抗血清 ALS-2 との間でリパーゼ標品と繋がる沈降線がみられたが、ほとんどの顕著なリパーゼ活性を示す破砕液は沈降線を示さず、また活性も抗血清によって中和されない。酵素(抗原)が抗体と結合することによって生じる活性の阻害は抗体が結合する位置によって起こる立体障害⁽¹⁷⁾であることから、細胞破砕液

Fig. 3.

中のリパーゼは培養上清に分泌されたリパーゼにみられる抗原決定基を露出していないものと推定される。

抗血清 ALS-1 との反応においてリパーゼ標品と繋がらない沈降線と、抗血清 ALS-2 においてもみられる同様な沈降線はリパーゼとは起源の異なる細胞質に由来するものと考えられる。このうち互いの株の間で繋がりがみられるものは共通の抗原決定基を有しており類縁性のあるものと考えられる。G. candidum の完全世代とされる E. geotrichum とその類縁種といわれる E. reessii⁽¹⁸⁾ がいずれの培養でも再現性よく多くの G. candidum と繋がる沈降線を示すこともその現れであろう。また Geotrichum sp. SH 270, SH 273, SH 275 の 3 株は他の Geotrichum sp. 2 株に比べてこのリパーゼの製造に用いられた G. candidum に近いものといえよう。

6. 中和試験

以上のように純度のよいことが期待された抗血清 ALS-2 でも培養上清とはそのなかに含まれる不純物である抗原性物質と反応することがみられた。したがって補体結合反応あるいは定量沈降反応で得られる類縁性に関連した成績の定量性については疑問がもたれるので、リパーゼ活性の阻害すなわち中和反応によってなんらかの成績が得られるか否かについて検討した。

中和反応にはチェス盤滴定を行い、各濃度の上清またはリパーゼと各希釈濃度の抗血清 ALS-2 との反応後の残存活性を片対数方眼紙上に (Y 軸には残存活性の百分比, X 軸には抗血清の希釈濃度を対数目盛に) プロッ

トし、残存活性曲線を得た。Fig. 2 (A) はリパーゼ標品について示した。この残存活性曲線を用いて得た各濃度の上清の活性を 50% 中和するのに要する抗血清濃度を対数目盛の X 軸に、各濃度の活性単位を Y 軸にとると Fig. 2 (B) の直線が得られた。培養上清中のリパーゼ活性が 30 単位以上で直線が得られた。このようにしておのおの株について得たグラフを用いてリパーゼ活性 50 単位の 50% を阻害する抗血清の希釈度と直線の傾斜角を各株について測定した。その結果を Fig. 3 に示した。なお G. candidum SH 299 の残存活性曲線は培養上清のリパーゼ活性が 30 単位より低かったので得られなかった。

供試した培養上清中の酵素はいずれも互いに繋がる沈降線を生ずることから類似した共通の抗原構造を持つものである。したがって Fig. 3 に示した抗血清の希釈度と中和直線の傾斜角の関係からリパーゼ標品の位置を中心として互いの類縁度を知ることができよう。それにより中和試験に供された 14 株を 4 群に区分した。すなわち A は標品よりリパーゼ活性が阻害される度合は強いが類縁性は遠いものである。B は標品に近い類縁性を持ち、最も同質のもの集まりであると推察される群で、G. candidum の 6 株と Geotrichum sp. の 3 株からなっている。C は B よりは標品に対する類縁性が遠い群であるが、このなかには E. geotrichum の 2 株が含まれるのでこれらの株の不完全世代は B 群以外から求められるであろう。そして D はリパーゼ活性が低い群であり若干の

G. candidum のほかに他の *Geotrichum* 属菌および *Endomyces* 属菌が含まれる。

この群別は Isozyme 像⁽¹⁹⁾あるいは原形質に対する抗血清の反応態度による群別^(1,2) とかなりよく一致する。

後藤ら⁽⁹⁾は *Geotrichum* 属を形態的、生理的性質によって分類、同定し、*G. candidum* SH 234 と SH 235 は同種としているが、生育に要するピリドキシンの有無で両者を区別している。このうち SH 234 は中和試験でリパーゼ標品が得られた *G. candidum* に近縁とみられる B 群に属し、SH 235 はリパーゼが低い D 群に属した。また *G. suaveolens* の同定で *G. candidum* との間に混乱がみられることを指摘しているが⁽⁹⁾、本試験からも *G. suaveolens* はリパーゼ活性が低いので一部の *G. candidum* からは区別されるが、活性の低い *G. candidum* もあるので混乱はそれらとの間で生ずるかもしれない。さらに後藤ら⁽⁹⁾が新種と記載した *G. fici* SH 237 と *G. rectangulatum* SH 236 はリパーゼの抗原性からも *G. candidum* とは明らかに異なる分類群に属することが示唆された。

Isozyme による類別⁽¹⁹⁾では *G. candidum* SH 234 と SH 235 は異なる Isozyme 像を示す。そして SH 234 と似た Isozyme 像を示した *Geotrichum* sp. SH 270 と SH 275 の 2 株は中和試験で SH 234 と同じ B 群に含まれた。このように生理的性質や他の類別の方法からみてリパーゼの産生能とその抗原性は類別に適用できよう。さらにまた本試験に用いられたリパーゼ結晶のように超遠心分析で単一とされた精製酵素が免疫原としては複数の抗体を与えることが少なくない。これは物理的な精製過程では除くことの困難な微量の汚染物に起因するものである。したがって免疫学的に単一でなくても酵素のように活性を指標にしうる物質であれば類縁性を数量的に知るのにある程度その抗原性を利用しうるものと考えられる。

要 約

Geotrichum 属とその類縁酵母の産生するリパーゼの抗原性を調査して、類別への適用について検討した。

(1) これらの菌のリパーゼ産生能の検討には corn steep liquor を基本とし大豆油を加えた培地が適していた。

(2) 供試した菌はリパーゼの活性の強弱から 3 群に分かれた。*G. candidum* はいずれの群にも含まれていた。

(3) 市販のリパーゼ標品を用いて単相血清を得ることができなかったが、抗リパーゼ血清と培養上清とのゲル内沈降反応によって標品と繋がりのある沈降線を生じる菌株とそれとは異なる菌株を区別できた。

(4) 酵素活性の強かった *E. geotrichum* と *G. candidum* の群は中和試験によって抗原構造の違いから 3 群に区分された。

以上の成績からリパーゼの産生能とその抗原性は類別に適用しうること、また免疫学的に単一でない酵素も利用しうる場合もあることが考えられた。

- (1) 斎藤京子, 原 稔生, 須藤恒二: 第 48 回日本細菌学会関東支部総会講演抄録, 1982, p. 44.
- (2) 原 稔生: 日本菌学会第 29 回大会講演要旨集, 1985, p. 7.
- (3) A. B. Champion, E. L. Barrett, N. J. Palleroni, K. L. Soderberg, R. Kunisawa, R. Contopoulou, A. C. Wilson and the late M. Doudoroff: *J. Gen. Microbiol.*, **120**, 485 (1980).
- (4) B. McFadden and A. R. Dened: *J. Bacteriol.*, **110**, 633 (1972).
- (5) J. London and K. Kline: *Bacteriol. Rev.*, **37**, 453 (1973).
- (6) L. G. Wayne and G. A. Diaz: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **26**, 38 (1976).
- (7) L. G. Wayne and G. A. Diaz: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **29**, 19 (1979).
- (8) L. G. Wayne and G. A. Diaz: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **32**, 296 (1982).
- (9) 後藤昭二, 山川祥秀, 横塚 勇: 農化, **49**, 519 (1975).
- (10) T. Nakase and K. Komagata: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **17**, 363 (1971).
- (11) M. Iwai, Y. Tsujisaka, T. Okamoto and J. Fukumoto: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 929 (1973).
- (12) 久米常夫, 塚本俊一, 小野寺 強: 畜産の研究, **33**, 41 (1979).
- (13) L. D. Bunch and R. L. Emerson: *Clin. Chem.*, **2**, 75 (1956).
- (14) Y. Tsujisaka, M. Iwai, J. Fukumoto and Y. Okamoto: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1457 (1973).
- (15) 須藤恒二: 「微生物の化学分類実験法」, 駒形和男編, 学会出版センター, 1982.
- (16) E. E. Butler: *Phytopathology*, **50**, 665 (1960).
- (17) M. Sasaki, S. Iida and T. Murachi: *J. Biochem.*, **73**, 673 (1985).
- (18) E. E. Butler and L. J. Petersen: *Mycologia*, **64**, 365 (1972).
- (19) N. Hara, K. Saito and T. Suto: *Bull. Nippon Vet. Zootech. Coll.*, **34**, 223 (1985).