

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁵
C12N 5/00

(45) 공고일자 1992년08월21일
(11) 공고번호 92-006878

(21) 출원번호	특1984-0007524	(65) 공개번호	특1985-0005882
(22) 출원일자	1984년11월29일	(43) 공개일자	1985년09월26일
(30) 우선권 주장	22415 1984년02월09일 일본(JP)		
(71) 출원인	고야사 쇼오지 가부시끼가이샤 시라하 아끼라 일본국 아이찌켄 나고야시 나카무라구 메이에끼 5쥬메 1방 7고		
(72) 발명자	시바타 데루히코 일본국 효오고켄 고오베시 기따꾸 가라또다이 4쥬메 22-15		
(74) 대리인	박사룡		

심사관 : 김성완 (책자공보 제2904호)

(54) 해태 엽상체의 원형질체 제조방법

요약

내용 없음.

명세서

[발명의 명칭]

해태 엽상체의 원형질체 제조방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 세포 융합에 특히 유용한 해태 엽상체(laver thallus)의 원형질체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

최근 몇 년 사이에 세포 융합에 대한 매우 집중적인 연구가 수행되었고, 육상 식물과 더불어 실질적인 적용단계는 몇몇 경우에 이미 달성되었다.

그러나, 해상조류, 특히 해태(porphyra)의 세포 융합에 대한 연구보고는 매우 드물고, 아직까지 성공한 케이스는 보고된 적이 없었다.

근본적으로 해태 엽상체의 원형질체의 제조는 세포벽을 구성하는 대부분의 다당류가 셀룰로오스인 육상식물에 비해 해태류의 엽상체는 거의 소화가 되지 않는 크실란 및 만난(mannan)을 포함하는 다당류로 주로 구성되는 세포벽을 갖고 있으므로 제조하기가 어렵다.

현재 해태 종(species)으로부터 원형질체를 제조하기 위한 유일한 시도가 효소처리에 의한 해태 또는 청태의 원형질체의 분리 및 그의 개발이란 제목으로 후지따(Fujita)등의 보고 [Synopsis of Lectures, 1982년 가을에(Japan Fisheries Society 에 의해 출판된), p23, 213]에서 발견되었다. 후지따 등의 방법에 따라, 원형질체는 물리적인 방법에 의해 해태의 엽상체를 여러부분으로 자르고, **푸소이도모나스** (Pseudomonas) 종의 균주(균주 p-1)의 배양으로부터 얻어진 조(crude) 효소용액으로 약 4시간 동안 상기 조각을 처리하여 제조된다. 그러나 이러한 방법은 원형질체의 제조에서 효소처리를 위해 장시간을 요하고, 더욱더 신선하지 않은 원형질체를 제조할 가능성이 높아지고, 따라서 물리적인 방법에 의해 절단된 해태의 엽상체가 효소로 처리되기 때문에 이들의 세포융합을 간섭하게 된다. 세포융합 기술에서 이를 위해 사용된 원형질체의 신선도(soundness)는 매우 중요한 인자이고, 세포융합에서 신선하지 않은 원형질체의 사용은 융합의 속도를 낮추고, 또한 배양의 결과 얻어진 동질액의 성장을 저해한다.

더욱더 해태의 엽상체가 상기 제시된 방법으로 잘라지는 이유는 **푸소이도모나스** 종의 균주에 의해 얻어진 효소가 해태의 표면 부분위에서 활동하지 않고 해태의 세포벽을 용해하도록 그 말단(end)을 자르고 원형질체를 생산하는 것으로 인식되는데 기초를 두고 있다.

프레스톤(Preston)등의 보고에 따라, 해태의 표면층은 과립의 형태로 분포된 만난을 포함하고 그 세포벽은 마이크로피브릴의 형태를 갖는 크실란으로 구성되고, 포르피란(porphyrin)은 세포간물질로서 존재한다. 더욱더 표면층이 단백질로 구성된 얇은 층을 포함하는 것은 L.A. Hanic에 의해 또한 보고되었다. 즉, 상기 제시된 해태의 조직학적 견해로부터 해태의 엽상체로부터 원형질체의 제조는 원형질체를 자르지 않는 불가능한 것으로 생각된다.

본 발명자들은 상기의 견해에 기초를 두고 해태 원형질체의 제조를 연구하였고, 세포융합에 사용하기 위해 적합한 해태 엽상체의 신선한 원형질체를 제조하기 위해 물리적인 방법으로 자르지 않고 그의 표면층으로부터 해태의 엽상체를 분해시킬 필요가 있고, 해태 엽상체의 원형질체는 만난(mannan)

가수분해 효소 및 크실란(xylan) 가수분해 효소, 어떤 경우에는 포르피란(porphyrin) 가수분해 효소를 함유하는 효소 용액으로 해태의 엽상체를 처리하여 신선한 상태로 얻을 수 있음을 발견하였다.

해태 엽상체의 원형질체 제조를 위해 더욱 연구한 결과, 본 발명자들은 해태 엽상체의 신선한 원형질체들은 해태 엽상체를 단백질 분해 효소 선처리하고, β -1,3-크실란아제와 β -1,4-만난아제의 결합 또는 β -1,3-크실란아제, β -1,4-만난아제 및 포르피란아제의 결합으로 처리하여 매우 짧은 시간 내에 제조할 수 있음을 발견하였고, 본 발명을 완성하였다.

따라서 본 발명의 첫 번째 목적은 수득된 원형질체가 신선하고, 세포융합에 효과적으로 사용할 수 있도록 매우 짧은 시간 내에 해태 엽상체의 원형질체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 다음 설명으로부터 명백해질 것이다.

본 발명의 주요한 특징은 세포막에 손상을 입지 않은 신선한 원형질체가 세포벽의 표면층에 존재하는 단백질의 부분을 가수분해하도록 단백질 분해 효소로 해태의 엽상체를 선처리하고 그 다음 어린 엽상체의 경우에 β -1,3-크실란아제와 β -1,4-만난아제의 결합으로 또는 성인 엽상체의 경우에 상기 효소와 포르피란아제의 결합으로 해태의 엽상체를 처리하여 매우 짧은 시간 내에 제조할 수 있다는 사실이다.

본 발명의 방법은 또한 해태종의 **콘코셀리스(Conchocelis)** 상으로부터 원형질체의 제조에 적용되므로, 상기 사용한 것처럼 "해태의 엽상체"항은 해태종의 **콘코셀리스** 상의 사상체를 내포하는 것으로 이해해야 한다.

본 발명자들은 해태의 엽상체를 구성하는 크실란, 만난 및 포르피란을 분리 및 정제하고, 과요오드 산염 산화방법에 의해 이들의 구조를 분석하고, 액체 크로마토그래피로 이들을 가수분해하여 이들의 단당류 조성을 결정하였다. 그 결과 크실란은 β -1,3-연결을 갖는 크실로스의 단중합체이고, 만나는 β -1,4-연결을 갖는 만노스의 단중합체이고, 포르피란은 갈락토스의 중합체이다.

더욱더, 해태의 엽상체중에서 성숙한 엽상체(대략 5mm)는 포르피란 함량이 상당히 높는데 반해 어린 엽상체(1~2mm)는 포르피란 함량이 매우 낮음을 발견하였다.

이러한 관점에서 몇몇 육상 식물들은 드물게 셀룰로오스에 부가하여 세포벽의 다당류 성분으로서 소량의 크실란을 포함하나, 이들의 대부분은 β -1,4-연결을 갖고 있다. 한편, 주성분으로서 만난을 갖고 있는 식물[파라지옥(devil's-tongue)과 같은]에서, 단당류 성분은 글루코사이고, 만노스는 β -1,4-연결에 의해 결합된다.

즉, 상기-제시한 발견의 기초위에서 본발명은 세포벽의 표면층에 존재하는 단백질의 부분을 가수분해하도록 단백질 분해 효소로 해태의 엽상체를 선처리하고, 그다음(어린 엽상체의 경우에) β -1,3-크실란아제 및 β -1,4-만난아제의 결합으로 또는(성숙한 엽상체 또는 **콘코셀리스** 상의 경우에) 상기 두 효소 및 포르피란아제의 결합으로 해태의 엽상체를 처리하여 짧은 시간 내에 해태 엽상체의 신선한 원형질체의 제조를 가능하게 만든다.

이러한 관점에서 크실란 가수분해 효소는 β -1,3-크실란아제 및 β -1,4-크실란아제로 분류되고, 만난 가수분해 효소는 β -1,3-만난아제 및 β -1,4-만난아제로 분류되고, β -1,4-크실란아제 및 β -1,3-만난아제의 결합으로 해태의 엽상체의 처리는 그 세포벽을 구성하는 다당류의 가수분해를 일으킬 수 없음이 기재될 것이다.

상기 제시한 것처럼, 본 발명의 방법은 세포벽의 표면층에 존재하는 단백질의 부분을 가수분해하도록 단백질 분해 효소로 해태의 엽상체를 선처리하는 단계를 포함한다. 이것은 해태의 엽상체가 β -1,3-크실란아제 및 β -1,4-만난아제의 결합으로 직접 처리된다면, 해태의 엽상체는 각각의 세포들이 하나씩 분리되는 것처럼 그의 가장자리 부분부터 분해될 것이고, 신선한 원형질체는 그의 세포막이 손상을 입을 수 있고, 나쁜 경우에 세포함량이 유출되기 때문에 항상 얻어질 수 없다는 사실에 기인한다. 더 특별히, 해태의 엽상체는 그 세포벽의 표면층에 존재하는 단백질을 가수분해하도록 단백질 분해 효소로 선처리하고, 그 다음 β -1,3-크실란아제 및 β -1,4-만난아제의 결합으로 처리할 때, 해태의 엽상체는 그의 가장자리 부분부터 분해되지 않고 전부분에 걸쳐 분해되므로 엽상체는 파괴되고, 그의 세포벽은 원형질체를 제조하기 위해 짧은 시간(약 30분) 내에 사용된다.

단백질 분해 효소로 해태의 엽상체의 처리는 바람직하게는 실온에서 약 10분 동안에 수행된다. 또한 단백질 분해 효소로서 파파인(papain)을 사용하는 것이 바람직하다.

단백질 분해 효소로 처리한 엽상체는 어린 엽상체의 경우에 씻은 다음 실온에서 약 20분 동안 β -1,3-크실란아제 및 β -1,4-만난아제를 함유하는 혼합된 효소 용액으로 처리하거나 또는 성숙한 엽상체 또는 **콘코셀리스** 상의 경우에 상기 언급한 두 효소 및 포르피란아제를 함유하는 혼합된 효소 용액으로 상기와 같은 방법으로 처리한다.

이러한 목적을 위해 사용된 효소 용액은 β -1,3-크실란아제 및 β -1,4-만난아제를 함유하고, 필요하다면 포르피란아제를 더 함유하는 조(crude) 효소 용액의 혼합물일 수 있다. 이러한 효소 용액은 예

를 들면 거의 소화되지 않는 다당류를 가수분해할 능력을 갖는 **푸소이도모나스** 속의 미생물을 분리하고, 유도자(inducer)로서 해태 또는 해태-유도된 다당류를 함유하는 배지에서 배양하고, 얻어진 배양액으로부터 고체 물질을 제거하여 얻을 수 있다. 그러나, 짧은 시간 내에 원형질체를 제조하기 위해 각 효소의 정제된 제법을 함유하는 용액의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다.

본 발명에 따라 상기에 제시된 형태 엽상체의 원형질체를 페트리 접시에 방치하고 하기에 제시된 조성을 갖는 연공해수(Asp. 12 조류를 위한)에 현탁시킬 때, 원형질체들은 페트리접시의 바닥에 부착

하게되고 매우 좋은 조건으로 성장한다.

NaCl	28g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	4g
KCl	700mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.47g
NaNO ₃	100mg
K ₂ HPO ₄	10mg
글리세로인산염나트륨	10mg
비타민 B ₁₂	0.2μg
비오틴	1μg
티아민	100μg
P II 금속	10ml
S II 금속	10ml
트리스아미노메탄	1g
중류수	1,000ml
pH	8.0~8.1

[표 1]

P II 금속의 조성		S II 금속의 조성	
EDTA	1mg	NaBr	1.2mg
H ₃ BO ₃	1mg	AlCl ₃ · 6H ₂ O	1.2mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.14mg	SrCl ₂ · 6H ₂ O	0.6mg
FeCl ₂ · 6H ₂ O	0.05mg	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.12mg
ZnCl ₂	0.01mg	PbCl	0.03mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	4μg	KI	1.5μg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.5μg	중류수	1ml
중류수	1ml		

상기 제시한 것처럼 본 발명의 방법은 매우 짧은 시간내에 세포융합의 목적을 위해 적합한 해태 엽상체의 신선한 원형질체의 제조를 가능하게 하고, 해태 엽상체를 위한 세포 융합 기술을 더욱 촉진시키기 위해 공헌하는 것으로 믿어진다.

본 발명을 더 설명하기위해, 다음 실시예가 제시되었다. 그러나 이러한 실시예들은 단지 본 발명을 설명할뿐이고, 본 발명의 범위를 제한하지는 않는다.

[실시예 1]

해태의 어린 엽상체(길이 1~2mm) 약 0.1g(젖은 무게)을 L-자형의 시험관에 넣고 0.5% 파파인 용액(M/15 트리스-HCl 완충용액에 pH 7.4) 10ml을 가한후 시험관을 흔들어 주면서(분당 100회) 25°C의 온도에서 10분간 배양한다. 이렇게 처리된 엽상체를 해수 및 그 다음 M/15 인산염 완충용액(pH 7.0)으로 충분히 씻어주고, 다른 L-자형의 시험관으로 옮긴다. β-1,3-크실란아제용액 5ml 및 β-1,4-만난아제 용액 5ml을 가한후, 시험관은 흔들어주면서(분당 100회) 25°C의 온도에서 20분간 배양한다.

얻어진 액체는 현미경하에서 시험할 때 5.9×10^4 원형질체가 얻어졌음을 확인하였다.

이 실시예에 사용된 β-1,3-크실란아제 및 β-1,4-만난아제 용액은 다음 방법으로 제조되었다.

β-1,3-크실란아제 용액 :

배양된 해태의 엽상체에 부착된 박테리아 중에서, 한천을 가수분해할 능력이 있는 박테리아를 분리

하고, 펩톤, 이스트 추출물 등을 가한 해수로 구성된 배지에서 배양하고, 더욱더 β -1,3-크실란은 10% 농도로 얻기 위해 유도자로서 가해진다. 얻어진 배양액은 상등액을 회수하기 위해 원심분리하고, 황산암모늄으로 정제한 다음 M/15 인산염 완충용액(pH 7.0)으로 투석시킨다. 즉 얻어진 β -1,3-크실란아제 용액은 23단위/ml의 활성을 갖고 있다.

β -1,4-만난아제 용액 :

1%의 농도로 얻기 위하여 유도자로서 β -1,3-크실란 대신에 β -1,4-만난을 가한 상기 언급한 매질을 사용하는 것을 제외하고 상기 제시된 방법을 반복한다.

즉 얻어진 β -1,4-만난아제 용액은 18단위/ml의 활성을 갖고 있다.

사용된 파파인은 와꼬(wako) 약품공업 주식회사 제품(10단위/mg)이다.

그다음 상기에서 얻어진 해태엽상체의 원형질체는 다음 순서에 따라 배양하였다.

배지로서 인공해구 Asp. 12을 사용하여, 8×10^4 원형질체는 빛 강도 5000룩스(교대로 9시간 밝게하고, 15시간 어둡게하여)의 조명하에 17℃의 온도에서 배양되었다. 배양의 과정에서 현미경으로 얻어진 관찰의 결과는 다음표에 제시되었다.

	배양 3일 후	배양 4일 후	배양 5일 후
발견	10~20%의 세포벽형성	60~70%의 세포벽형성	60~70%의 세포벽 및 세포분할의 형성

[실시에 2]

어린 엽상체 대신에 성숙한 해태의 엽상체(길이 약 5cm)를 사용하고, 포르피란아제 용액 5ml을 β -1,3-크실란아제(5ml) 및 β -1,4-만난아제용액(5ml)에 가하여 사용하는 것을 제외하고 실시예 1에 제시된 것과 같은 방법에 따라 원형질체를 제조한다. 얻어진 유체가 현미경으로 시험할 때, 4.0×10^4 원형질체가 얻어짐을 확인하였다.

이 실시예에 사용된 포르피란아제 용액은 1%의 농도로 얻기 위해 β -1,3-크실란아제 용액을 위해 β -1,3-크실란 대신에 포르피란을 가하는 것을 제외하고, 상기에 제시한 것과 같은 방법으로 제조하였다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

단백질 분해 효소로 해태의엽상체를 처리한 다음, β -1,3-크실란아제 및 β -1,4-만난아제를 결합한 효소로 상기 해태의 엽상체를 처리함을 특징으로 하는 세포융합에 사용하기에 적합한 해태 엽상체의 원형질체를 제조하는 방법.

청구항 2

단백질 분해 효소로 해태의엽상체를 처리한 다음, β -1,3-크실란아제 및 β -1,4-만난아제 및 포르피란아제를 결합한 효소로 상기 해태의 엽상체를 처리함을 특징으로 하는 세포융합에 사용하기에 적합한 해태 엽상체의 원형질체를 제조하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단백질 분해 효소가 파파인임을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 단백질 분해 효소가 파파인임을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 해태의 엽상체가 어린 엽상체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 해태의 엽상체가 성숙한 엽상체 또는 해태 종의 콘코셀리스 상임을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 해태의 엽상체가 실온에서 약 20분 동안 β -1,3-크실란아제 및 β -1,4-만난아제를 함유하는 혼합된 효소 용액으로 처리됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제2항에 있어서, 상기 해태의 엽상체가 실온에서 약 20분도안 β -1,3-크실란아제 및 β -1,4-만난아제 및 포르피란아제를 함유하는 혼합된 효소 용액으로 처리됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제3항에 있어서, 파파인으로의 처리는 실온에서 약 10분동안 수행됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제4항에 있어서, 파파인으로의 처리는 실온에서 약 10분동안 수행됨을 특징으로 하는 방법.