

氏 名(本籍) さ 佐 さ き 木 し ょ う 正 し 治

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 第 3 5 0 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 6 3 年 7 月 2 1 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

学 位 論 文 題 目 麴菌の多糖体と抗腫瘍性に関する研究

論 文 審 査 委 員 (主 査)

教授 山内 文男

教授 目黒 熙

教授 藤本健四郎

論文内容要旨

緒論

日本古来の伝統的食品である清酒、味噌、醤油等はいずれも麹菌を利用して製造されている。麹菌とは一般に日本において醸造に用いられる分生孢子頭が黄緑色の *Aspergillus* の通称で、*Aspergillus oryzae*、*Aspergillus sojae*、*Aspergillus tamarisii* の3分類種が含まれている。これらの麹菌に関する研究は今まで分類、育種、代謝等について数多くの研究が精力的に行なわれてきた。特に最近ではバイオテクノロジーの研究が盛んに行なわれるようになり、麹菌育種の分野でも細胞融合を中心にめざましい発展が認められている。

一方、麹菌の細胞化学に関する研究は細菌、酵母に比較して非常に遅れているのが現状である。麹菌菌体構成成分は細胞壁を構成する多糖体と菌体内成分である蛋白質、核酸に大きく分けられる。細胞壁の多糖体は主としてキチンやグルカンであることが報告されているが、詳細については明らかにされていない。最近、酵母や真菌類の一部の菌体多糖に免疫増強効果や抗腫瘍性効果が認められ、菌体多糖の生物学的機能が注目されるようになってきた。このことは麹菌の細胞壁も細胞の構造と機能を物理的に外界から保護するばかりでなく、何らかの生物学的機能をも保持しているのではないかと推定される。そこで本研究では麹菌細胞壁多糖を細胞化学的に調べた後、構成多糖を分離し、化学構造を検討した。また、抗腫瘍活性について調べ、その生物学的機能についても検討した。

第1章 麹菌菌体の化学組成

液体培養及びナイロンペースト培養で調製した *A. oryzae* 菌体の化学組成について調べた。(Table 1) 両培養菌体とも約40%の蛋白成分と約40%の糖成分から主に構成されていた。このなかで糖成分の構成糖はグルコースとグルコサミンが大部分であった。また、ガラクトサミンも菌体中に約2%含有されていた。一方、液体培養菌体のほうがナイロンペースト培養菌体よりもグルコサミンが多く含有されていた。*A. oryzae* 以外に *A. tamarisii*、*A. sojae* の菌体の化学組成を調べると、菌種が異なっても菌体の化学組成、糖組成で顕著な差異は認められなかった。(Table 1)

第2章 麹菌細胞壁の構造と化学組成

麹菌の液体培養菌体の細胞壁はダイノミルによるガラスビーズ共存下での摩砕、1%ラウリル硫酸ナトリウムによる抽出操作で効率良く、高い純度で調製できた。細胞壁は菌体当たり29~34%であった。細胞壁の90%は糖成分で構成され、そのなかでグルコースとグルコサミンが80~90%をしめていた。(Table 2) また、麹菌の細胞壁は電子顕微鏡観察で形態学的

には0.1~0.2 μ の厚さで存在していた。菌種間での細胞壁糖組成を比較すると、グルコース、グルコサミン量で顕著な差は認められなかった。しかし、細胞壁を分画して糖成分を比較すると、1N NaOH可溶-酢酸中和上澄画分(F-1)及び1N NaOH可溶-酢酸中和沈澱画分(F-2)の割合が菌種によって異なっていた。(Table 3) このことは菌種によりグルカンの可溶性にわずかに差があるのではないかと考えられる。

第3章 麴菌の培養条件と細胞壁成分組成

A. oryzaeの細胞壁はナイロンペースト培養による固体培養菌体のほうがやや多かった。細胞壁の化学組成は両培養とも還元糖とアミノ糖が80~84%をしめていた。(Table 4) 両培養菌体の細胞壁の主要構成糖は共通であるが、ナイロンペースト培養の方が液体培養よりもグルコース、グルコサミンが少ないのに対して、マンノース、ガラクトサミンが多く含まれていた。ナイロンペースト培養菌体では菌体中の糖の55%が細胞壁に存在していた。また、菌体中の還元糖の51%、グルコサミンの87%、ガラクトサミンの33%が細胞壁に存在していた。一方、液体培養菌体では菌体中の糖の73%が細胞壁に存在していた。また、菌体中の還元糖の74%、グルコサミンの81%、ガラクトサミンの7%が細胞壁に存在していた。細胞壁を分画するとナイロンペースト培養の方が液体培養よりもF-1画分が多くなっていた。(Table 5) F-1画分はグルコース以外にマンノースやガラクトースが多く、複雑なヘテロ多糖の状態で存在しているものと考えられる。このように培養方法の違いによって細胞壁多糖の構成糖の種類は同じでも糖含量が異なっており、これが菌の形態、酵素の分泌等に影響するのではないかと考えられる。

第4章 麴菌の育種と細胞壁糖組成

麴菌を人工変異や細胞融合により人為的に変えた場合、細胞壁多糖に及ぼす影響について糖組成より検討した。A. oryzaeの紫外線照射による逐次的変異により、高プロテアーゼ生産能変異株の細胞壁グルコサミン量は逐次増加した。(Table 6) このことは逐次的変異により、高プロテアーゼ生産株を造成すると、細胞壁グルコサミン量は増加の方向に進み、その多寡は変異処理の回数、即ち、親株からの近遠に対応しているように思われる。また、交雑株は両親株の中間型のグルコサミン量を示し、プロテアーゼ生産能の高い菌株の方が細胞壁グルコサミン量も高いことが明らかになり、変異株と類似の傾向を示した。このことは変異と交雑が細胞壁グルコサミン量に同様の変化を与えることを示し注目される。また、逐次的変異によるプロテアーゼ生産能の増加に伴い、変異株の細胞壁のグルコース/マンノース比(Glc/Man)も増加した。この糖比の増加は主にマンノースの減少に起因しており、麴菌の変異処理では細胞壁の糖成分のマンノース量に強く影響が及ぶことを示している。このようにGlc/Man比もグルコサミン量と同様に増

加しており、この傾向もまた変異に付随する菌体内成分変化にもう一つの方向性を示していると考えられる。交雑株では両親株の中間型のGlc/Man比を示した。また、細胞壁のGlc/Man比は変異株、交雑株にかかわらずプロテアーゼ生産能とほぼ比例していた。(Fig. 1) 変異や交雑が高プロテアーゼ生産能麹菌の細胞壁のグルコサミン量、Glc/Man比に同時に影響を及ぼし、酵素生産能の増加と細胞壁糖成分の変化が深い関係にあることが明らかになった。これらの知見から、細胞壁グルコサミン量、Glc/Man比は麹菌の変異や交雑に付随する菌体内成分変化の方向性を知るうえで重要な指標になるものと思われる。

第5章 麹菌細胞壁多糖の分離と化学構造

A. oryzae 細胞壁を1N NaOH抽出、酢酸沈澱により、F-1、F-2及び1N NaOH不溶画分(F-3)の3画分に分離した。このなかで細胞壁の約41%をしめるF-2画分はグルコースが大部分であった。このF-2画分からゲル濾過法で精製グルカンを単離した(F-2-I)。このグルカンは細胞壁に対して約30%の収率で得られ、グルコースのみから構成されていた。また、ゲル濾過法で測定した平均分子量は140万であった。このグルカンは *Bacillus circulans* の endo- β -1, 3-グルカナーゼによる酵素分解で47%分解率で分解され、 β -1, 3-グルカンで主に構成されているものと考えられる。さらに、過ヨウ素酸酸化、スミス分解、緩和スミス分解、メチル化分析により、細胞壁から調製されたグルカンの単位構造は Fig. 2 に示すような構造をとっているのではないかと推定される。A. oryzae 細胞壁グルカンの構造は *Neurospora crassa* や *Pyricularia oryzae* の細胞壁グルカンの構造と類似していた。このことは糸状菌細胞壁のグルカンは分子量の大きいグルカンで構成され、その最少単位は1-3結合の直鎖構造をとっているのが多いのではないかと考えられる。

第6章 麹菌細胞壁多糖の抗腫瘍性

A. oryzae, A. sojae, A. tamarii の液体培養菌体の細胞壁はICR/JCLマウスに移植したSarcoma 180細胞に対して、腹腔内投与で腫瘍阻止率80%以上の高い抗腫瘍活性を示した。(Table 7) 特に活性の高いA. oryzae細胞壁の活性画分を調べるとグルカン画分(F-2)に高い活性が認められた。(Table 8) このグルカンは平均分子量が140万の β -1, 3結合を含むグルカンであることが推定されており、このグルカンが抗腫瘍効果をもたらしたものと考えられる。また、経口投与や皮下投与よりも腹腔内投与でより大きな腫瘍阻止効果が認められたのは担子菌類の多糖と類似していた。さらに、この細胞壁及び分画グルカンは次のような抗腫瘍効果の特徴を示していた。活性発現は直接細胞毒性を示さないことより宿主仲介性であるものと考えられること。毒性のバランスから算出される最適投与量ではなく、特異な最適投与量があること。ICR/JCLマウスでは活性は高いが、C3H/Heマウスでは低くなり、マウスの系

統により抗腫瘍性に強弱を示し、動物により応答力の強いものと弱いものがある点である。麴菌以外に *Penicillium citrinum*, *Rizopus japonicus*, *N. crassa*, *Torichoderma viride* の細胞壁にも抗腫瘍活性が認められた。(Table 9) これらの細胞壁の抗腫瘍活性はグルコース含量の高い細胞壁ほど高い抗腫瘍活性を示しており、その活性発現がグルカンに大きく依存しているように思われる。また、*N. crassa* 細胞壁でも抗腫瘍効果の特徴は麴菌の場合と同様であり、その抗腫瘍効果発現の機構が類似しているものと考えられる。

総 括

麴菌細胞壁多糖体の特性、化学構造及びその生物学的機能について調べ、以下の新知見を明らかにすることができた。

麴菌菌体の糖成分の60～70%は細胞壁多糖として存在していた。細胞壁多糖は成分組成からグルカンとキチンで主に構成されていた。細胞壁多糖は固体培養と液体培養のように培地条件が異なると、キチンの構成成分であるグルコサミン量に変化が認められた。一方、人工変異や細胞融合による交雑により、細胞壁のグルコサミン量、グルコース/マンノース比とプロテアーゼ活性の間に特徴ある傾向が認められ、変異や交雑の方向性を知るうえで重要な知見が得られた。

麴菌細胞壁の約30%はグルコースのみからなるグルカンであった。このグルカンはゲル濾過法で分子量が140万と推定された。このグルカンは酵素分解、スミス分解、緩和スミス分解、メチル化分析の結果、Fig. 2に示すような β -1, 3結合を主鎖にもつ単位構造をとっているものと推定された。

麴菌細胞壁及び分画グルカンはICR/JCLマウスに移植したザルコーマ180細胞に対して、80%以上の高い抗腫瘍活性を示すことを明らかにした。また、麴菌細胞壁は直接細胞毒性を示さないことから、他の担子菌類多糖体と同様にその抗腫瘍効果は宿主仲介性によるものと考えられる。このように麴菌細胞壁多糖の生物学的機能が初めて明らかになった。麴菌は酵母や担子菌類に比較して菌体の培養が容易で、菌体収率も極めて高いこと、さらに多糖体の調製も容易であることより、今後、麴菌多糖体は医学をはじめとして、各方面への応用が一層期待されるものと考えられる。

Table 1 Main Components of Mycelia

Fungi	Medium ^a	Components (%) ^b						
		Neutral sugar	Glucosamine	Galactosamine	Nitrogen	Lipid	Nucleic acid	Ash
A.oryzae	N	32.4	5.52	2.0	7.15	3.05	6.5	5.31
A.oryzae	S	29.1	7.91	1.6	7.01	7.35	3.8	5.72
A.tamarii	S	36.7	7.96	0.5	6.42	7.46	3.9	6.35
A.sojae	S	34.2	7.03	1.2	6.31	8.50	4.8	8.27

a N, Nylon-paste culture; S, submerged culture.

b dry basis

Table 2 Yield and Main Components of Cell Wall of Fungi

Fungi	Yield (%)	Components (%)				
		Neutral Sugar	Glucosamine	Galactosamine	Protein	Lipid
A.oryzae	33.4	64.5	19.10	0.47	0.69	2.17
A.tamarii	33.6	70.3	18.95	1.55	1.48	1.34
A.sojae	28.5	68.6	19.70	2.47	0.83	2.56

(dry basis)

Table 3 Chemical Components of Cell Wall Fractions

Fungi	Fraction	Content in cell wall (%)	Components (%)					
			Neutral sugar ^a				Hexosamine ^a	
			Glc	Man	Gal	Ara	GlcN	GalN
A.oryzae	Cell wall	100.0	58.5	1.4	1.4	0.6	19.1	0.5
	F - 1	12.5	64.6	4.5	6.1	0.3	0.9	0.9
	F - 2	47.4	89.3	0	0	0	0.3	0.5
	F - 3	40.1	37.2	2.4	2.5	0	46.0	Trace
A.tamarii	Cell wall	100.0	62.1	1.3	1.7	1.4	19.0	1.6
	F - 1	9.7	86.6	6.0	5.3	0.1	1.2	1.6
	F - 2	49.7	84.2	0	0	0	0.4	0.9
	F - 3	40.6	25.7	1.5	1.7	0	45.5	1.0
A.sojae	Cell wall	100.0	58.7	1.9	2.4	0.8	19.7	2.5
	F - 1	24.8	72.2	4.1	5.8	0.1	1.0	4.8
	F - 2	34.9	85.9	0	0	0	0.7	0.8
	F - 3	40.3	26.9	2.5	1.9	0	50.3	1.1

a Glc, glucose; Man, mannose; Gal, galactose; Ara, arabinose;

GlcN, glucosamine; GalN, galactosamine.

Table 4 Yield and Main Components of Cell Wall of Fungi

Fungi	Medium ^a	Yield ^b (%)	Components (%) ^b				
			Neutral Sugar	Glucosamine	Galactosamine	Protein	Lipid
A.oryzae	N	27.2	61.0	17.50	2.40	5.40	1.66
A.oryzae	S	33.4	64.5	19.10	0.47	0.69	2.17

a N, Nylon-paste culture; S, Submerged culture

b dry basis

Table 5 Chemical Components of *A.oryzae* Cell Wall Fractions

Culture method	Fraction	Content in cell wall (%)	Components (%)					
			Neutral sugar ^a				Hexosamine ^a	
			Glc	Man	Gal	Ara	GlcN	GalN
	Cell wall	100.0	44.9	8.5	2.0	2.3	17.5	2.4
Nylon-paste culture	F - 1	26.4	62.5	8.9	3.8	0.3	0.9	0.2
	F - 2	37.6	81.3	2.6	0	0	0.9	6.1
	F - 3	36.0	21.4	6.1	2.9	0	38.1	Trace
	Cell wall	100.0	58.5	1.4	1.4	0.6	19.1	0.5
Submerged culture	F - 1	12.5	64.6	4.5	6.1	0.3	0.9	0.9
	F - 2	47.4	89.3	0	0	0	0.3	0.5
	F - 3	40.1	37.2	2.4	2.5	0	46.0	Trace

a Glc, glucose; Man, mannose; Gal, galactose; Ara, arabinose; GlcN, glucosamine; GalN, galactosamine.

Table 6 Yield and Main Chemical Composition of Cell Wall of Mutants and Intrastrainic Hybrids

Strain number	Yield ^a	Components ^b				
		Reducing sugar	Glucosamine	Galactosamine	Amino acid	
Parent No. 13	27.2	16.6	4.8	0.7	2.0	
Mutants	No. 40	35.8	22.2	5.2	2.3	1.7
	No. 732	35.2	22.7	6.8	2.4	1.5
	No. 868	41.3	29.8	7.3	2.0	1.6
	No. 8536	32.0	21.5	7.0	1.0	0.7
Hybrids	No. 201	37.6	27.6	4.9	1.6	0.9
	No. 429	37.1	24.2	6.1	1.9	1.1

^a g/100 g of mycelia.

^b g in cell wall/100 g of mycelia.

The galactosamine was determined with an amino acid analyzer after hydrolysis of cell wall with 6 N HCl in a boiling water bath for 8 hr.

The amino acid was determined with an amino acid analyzer after hydrolysis of cell wall with 6 N HCl at 110°C for 24 hr.

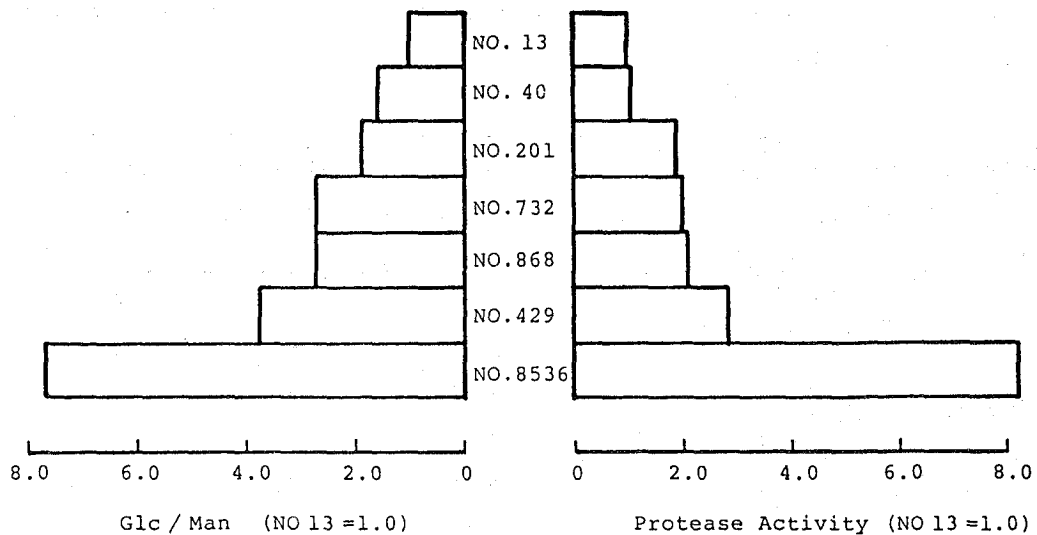


Fig. 1 The Relationship between Protease Activity and Glc / Man

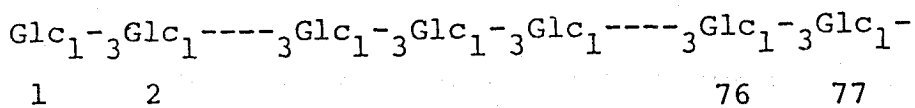


Fig. 2 The Proposed Structure of Fraction F-2-I from the *A.oryzae* Cell Wall

Table 7 Antitumor Activity of Fungal Cell Walls against Sarcoma 180

Sarcoma 180 cells ($1-2 \times 10^7$) were transplanted subcutaneously into the right groin of ICR/JCL mice. The samples were injected intraperitoneally 10 times (once a day), starting 24 hr after tumor implantation, and the results were recorded after 5 weeks.

Samples	Culture method	Dose (mg/kg x 10)	Average tumor weight (g)	Inhibition ratio (%)	Complete regression
Control	-	-	8.50	0	0/10
<u>A.oryzae</u>	N	50	2.76	68.5	0/6
<u>A.oryzae</u>	S	1.7	3.78	55.6	0/10
		6.3	2.99	64.9	2/10
		25	0.13	98.5	4/10
		50	1.04	87.8	4/10
<u>A.tamarii</u>	S	25	1.90	77.6	3/10
		50	0.39	95.4	1/10
<u>A.sojae</u>	S	25	0.61	92.8	7/10
		50	0.64	92.5	3/10

Table 8 Main Chemical Components and Antitumor Activity of A.oryzae Cell Wall Fractions

Fraction	Content in cell wall (%)	Components (%)							Antitumor activity		
		Neutral sugar					Hexosamine		Amino acids ratio (%)	Inhibition ratio (%)	Complete regression
		Glc	Man	Gal	Ara	Others	GlcN	GalN			
F - 1	12.5	64.6	4.5	6.1	0.3	0	0.9	0.9	2.2	40.1	0/10
F - 2	47.4	89.3	0	0	0	0	0.3	0.5	0.2	97.5	8/10
F - 3	40.1	37.2	2.4	2.5	0	0.7	46.0	Trace	0.6	49.4	1/10

Table 9 Antitumor Activity of Cell Walls against Sarcoma 180 Cells

Samples	Dose (mg/Kg x 10)	Average tumor weight (g)	Inhibition ratio (%)	Complete regression
Control	-	7.19	-	0/7
P.citrinum	25	0.00	100.0	7/7
	50	3.17	55.9	3/7
R.japonicus	25	0.64	91.1	2/7
	50	1.43	80.1	3/7
M.racemosus	25	2.98	58.6	0/7
	50	2.48	65.5	0/7
N.crassa	25	0.00	100.0	7/7
	50	0.03	99.6	5/7
T.viride	25	0.11	98.5	6/7
	50	0.93	87.1	4/7
N.globerula	25	1.96	72.7	0/7
	50	1.83	74.5	0/7
S.griseus	25	1.60	77.7	2/7
	50	5.00	30.5	1/7

審査結果の要旨

麴菌の細胞化学に関する研究は、酵母に比較して非常に遅れている。麴菌菌体構成成分は細胞壁を構成する多糖体と菌体内成分である蛋白質、核酸に大きく分けられる。細胞壁の多糖体は主としてキチンやグルカンであることが報告されているが、詳細については明らかにされていない。そこで本研究では麴菌細胞壁多糖を細胞化学的に検討した後、構成多糖を分離し、化学構造を明らかにした。また抗腫瘍活性について調べ、その生物学的機能についても明らかにした。

麴菌菌体の糖成分の60~70%は細胞壁多糖として存在していた。細胞壁多糖は固体培養と液体培養のように培地条件が異なると、キチンの構成成分であるグルコサミン量に変化が認められた。一方、人工変異や細胞融合による交雑により、細胞壁のグルコサミン量、グルコース/マンノース比とプロテアーゼ活性の間に特徴ある傾向が認められ、変異や交雑の方向性を知るうえで重要な知見が得られた。

麴菌細胞壁の約30%はグルコースのみからなるグルカンであった。このグルカンはゲル濾過法で分子量が140万と推定された。また、酵素分解、スミス分解、緩和スミス分解、メチル化分析の結果 β -1, 3結合を主鎖にもつ単位構造をとっているものと推定された。麴菌細胞壁及び分画グルカンはICR/JCLマウスに移植したザルコーマ180細胞に対して、80%以上の高い抗腫瘍活性を示した。また麴菌細胞壁は直接細胞毒性を示さないことから、他の担子菌類多糖体と同様にその抗腫効果は宿主仲介性によるものと考えられる。

麴菌は、酵母や担子菌類に比較して菌体の培養が容易で、菌体収率も極めて高いこと、さらに多糖体の調製も容易であることより、今後、麴菌多糖体は医学をはじめとして、各方面への応用が一層期待されるものと考えられる。よって著者は、農学博士を授与する資格ありと判定した。