

氏 名 (本籍) ひ うら のぞみ
樋 浦 望

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 博 第 3 2 9 号

学位授与年月日 昭和 60 年 3 月 26 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

研 究 科 専 攻 東北大学大学院農学研究科
(博士課程)農芸化学専攻

学 位 論 文 題 目 糸状菌 *Neurospora crassa* の細胞壁
 β -1, 3 - glucan 分解酵素に関する
研究

論 文 審 査 委 員 (主 査)

教授 松 田 和 雄 教授 足 立 達

助教授 渡 辺 敏 彦

論文内容要旨

緒 論

β -1,3-glucanは真菌細胞壁を構成する主要な多糖である。 β -1,3-glucanの研究の主なるものには構造に関するもの、分解酵素(β -1,3-glucanase)に関するもの、生合成に関するものがある。そのうち、構造については β -1,3-glucanが酸・アルカリに対して化学的に強固なために、その精製が困難で微細構造については不明な点が多く残されている。

また、細胞壁 β -1,3-glucan分解酵素の研究は、多糖加水分解酵素あるいは細胞壁溶解酵素の一種としての β -1,3-glucanaseの精製と性質というような純粋な酵素学的立場からの研究が主であり、その材料は細菌やカビの培養濾液中に分泌される非常に活性の強いものを材料として使用しているに過ぎない。

つぎに、真菌細胞壁 β -1,3-glucanをより生化学的・微生物学的な観点から考えると、菌糸の成長とともに行われる細胞壁多糖 β -1,3-glucanの合成は、分解酵素と合成酵素の協同作用と考えられる。すなわち、分解酵素の作用した部位に合成酵素がグルコシル残基をのぼすという考え方や、細胞壁構成のために β -1,3-glucanaseは細胞壁 β -1,3-glucanを必要な大きさにトリミングする働きを有しているといった考え方が推定されている。しかしながら直接それを証明するような研究はまだなされていない。

本研究は真菌細胞壁の主要構成成分である β -1,3-glucanの構造を明らかにし、ついでその構造が菌成長の際、形態変化につれてどのように変化するかその関係を追究し、さらに細胞壁の成長に関して β -1,3-glucanを修飾すると考えられる細胞壁の β -1,3-glucan分解酵素の性質および役割を明らかにすることを目的とした。

なお、材料は菌の研究では標準的と考えられる *Neurospora crassa* IFO 6068 野生株を使用した。

第 1 章 細胞壁 β -1,3-glucan の構造

Neurospora crassa IFO 6068 野生株 (以後 N. crassa と表示) をグルコースを炭素源として用いた完全合成培地で生育させ、定常期の菌糸体をクロロホルム-メタノール (1:1) で脱脂後熱水抽出し、その残渣に対して NaOH の濃度を 4%、8%、16%、24% とあげてアルカリ抽出を行った。アルカリ抽出多糖は中和し、遠心分離により溶解部と不溶解部に分けた。その結果 Table I に示すように 4% NaOH で抽出され、中和後沈澱したフラクション (Fraction 2-II) と 24% NaOH 不溶性残渣 (Fraction 6) に多くの糖が回収された。さらに各フラクションの構成糖を検討すると、Fraction 2-II は 99% 以上がグルコースよりなるグルカンで、Fraction 6 も約 80% がグルコースであることが明らかになった。そこで以後、Fraction 2-II と Fraction 6 を β -1,3-glucan フラクションとして実験を進めて行くことにした。

両フラクションの多糖の構造を明らかにするためメチル化分析を行い、Table II のような結果を得た。すなわち Fraction 2-II と Fraction 6 は平均鎖長の違いより明らかに異なる β -1,3-glucan であり、1,6 結合の存在も示唆された。

さらに微細構造を明らかにするためにスミス分解を行った。(Table III) その結果、Fraction 2-II は過ヨウ素酸で枝が分解し、まったく直鎖の β -1,3-glucan となり、Fraction 6 は過ヨウ素酸酸化を行ったのにもかかわらず、ジメチルグルコースが検出されたことから、側鎖として 2 個以上のグルコースが 1,3 結合で存在していることが明らかとなった。メチル化分析とスミス分解の結果を図に示すと Fig.1 のようになった。

第 2 章 菌の成長に伴う β -1,3-glucan およびその分解酵素の変化

前章において、N. crassa の細胞壁 β -1,3-glucan には 2 種類存在することを

示した。これら2種類の構造体の成因の1つとして細胞壁中に存在する分解酵素が考えられる。この問題を明らかにするために *N. crassa* の生産する β -1,3-glucan 分解酵素について検討することにした。本研究で使用した *N. crassa* の成長曲線には Fig. 2 に示すように培地中の残存グルコース量の減少と pH の変化が各成長のステージを決定する良いマーカーとなることが明らかになり、以下に示す4期に分けた。すなわち、pHが1番下がる時期を Stage II、その前期を Stage I、上昇し始める時期を Stage III、そして pH が一定となる時期を Stage IV とした。

まず、細胞外酵素の各成長ステージの活性変化については Fig. 3 に示すように β -1,3-glucanase、 β -1,6-glucanase とともに2つの活性のピークが現われた。つぎに、細胞内酵素については Fig. 4 に示すように両酵素とも定常期に増加が認められた。

一方、 β -1,3-glucan の構造と成長曲線との関係を明らかにするため、各ステージの菌糸体から抽出される β -1,3-glucan について *Bacillus circulans* 由来の endo- β -1,3-glucanase 処理を行ったところ、Stage II から III において溶解率の減少が認められた。(Fig. 5) また、各ステージの菌糸体のアルカリ抽出物を Sepharose CL-6B の gel chromatography に供したところ、 V_0 に溶出するフラクションの減少と分子量 50 万から 25 万付近のフラクションの低分子側への移動が認められた。(Fig. 6)

これらの結果より、*N. crassa* 細胞壁 β -1,3-glucan は菌の成長に伴ってなんらかの構造的および分子量的変化が生じていることが推定された。

第 3 章 細胞壁 β -1,3-glucan 分解酵素の精製と性質

前章において明らかになった細胞壁 β -1,3-glucan の構造的変化および分子量的変化に関係すると考えられる細胞壁 β -1,3-glucan 分解酵素のうち、2種

の細胞内 β -1,3-glucanase と細胞外 β -1,6-glucanase の精製を試みた。

まず、細胞内 β -1,3-glucanase の精製については菌糸体を摩砕後、遠心分離し、その残渣を 30℃ で 12 時間インキュベートして酵素を可溶化し、得られた酵素をラミネアリデキストリンをリガンドにした substrate affinity chromatography に供した。その結果、Fig. 7 のようなパターンが得られ、オリゴ糖で溶出するフラクションの酵素 (1,3-Glucanase I) と、1 M NaCl で溶出するフラクションの酵素 (1,3-Glucanase II) とに分別された。1,3-Glucanase I はディスク電気泳動法によりタンパク的に均一な酵素として精製された。また、1,3-Glucanase II は Con A-Sepharose 4B chromatography、Sepharose CL-6B chromatography および ディスク電気泳動法により酵素的に均一な酵素として精製された。

ついで 細胞外 β -1,6-glucanase は CM-cellulofine chromatography、Con A-Sepharose 4B chromatography、Sepharose CL-6B chromatography、Affinity 電気泳動法によりタンパク的に均一な酵素に精製された。

以上、精製された 3 種の glucanase の一般的性質は Table IV のようで、特に 1,3-Glucanase II は pH に関して 1,3-Glucanase I より不安定で、多糖に対する親和性も低いことが明らかになった。

基質特異性については Salicin に対する差異が認められ、1,3-Glucanase II が 1,3-Glucanase I に比べ親和性が高い結果を示した。このことは、1,3-Glucanase II は β -glucosidase としての活性を有していることを示すものである。

また、反応型式については、1,3-Glucanase I は exo 型で 1,6-Glucanase は endo 型であることが明らかになった。

第 4 章 細胞壁 β -1,3-glucan 分解酵素の役割

1,3-Glucanase I と 1,3-Glucanase II の菌の成長に伴う活性の変化を検討した。 Fig. 8 に示す結果より、菌の成長初期では 1,3-Glucanase I の占める割合が大きく、成長後期になると逆に 1,3-Glucanase II の占める割合が大きくなるという興味ある事実が認められた。

さらに、精製した上記の酵素が N. crassa の細胞壁 β -1,3-glucan にどのように作用するのかを検討する目的で、Stage I の菌体の β -1,3-glucan フラクションについて酵素処理を行った。その分解物を Sepharose CL-6B gel chromatography に供したところ (Fig. 9) 1,6-Glucanase はその V_0 に溶出するフラクションを、また 1,3-Glucanase I は V_0 に溶出するフラクションと分子量 50 万から 25 万付近のフラクションを修飾することが明らかとなった。このことは、第 2 章で明らかにした菌の成長に伴う細胞壁 β -1,3-glucan の構造的ならびに分子量的変化に少なくとも 1,6-Glucanase と 1,3-Glucanase I が関与していると推定される。

第 5 章 考 察

Neurospora crassa IF0 6068 野生株の細胞壁には 2 種類の β -1,3-glucan が存在する。すなわち、それぞれ β -1,3 結合の長い直鎖にグルコースが 1 個 β -1,6 結合した β -1,3-glucan (Fraction 2-II) と、上記構造を持つ β -1,3-glucan 分子が β -1,6 の分子間結合により何重にも重なっている β -1,3-glucan である。

このような 2 種類の細胞壁 β -1,3-glucan の成因を考えると、1 つの可能性として細胞壁に存在する β -1,3-glucan 分解酵素の作用があげられる。この点を明らかにするために、N. crassa の β -1,3-glucan 分解酵素を単離し、その性質を明らかにし、さらに各種酵素により細胞壁 β -1,3-glucan の修飾を試みた。その結果、Fig. 10 に示したような N. crassa 細胞壁 β -1,3-glucan

の酵素による修飾のモデルが考えられた。

すなわち、はじめに Fraction 6 のような構造をもつ β -1,3-glucan 巨大分子が存在し、それに endo- β -1,6-Glucanase および exo- β -1,3-Glucanase I が作用し、Fraction 2-II で示されるような β -1,3-glucan に順次トリミングされて行く過程である。このことは、細胞壁 β -1,3-glucan の gel chromatography パターンが示すように、菌の成長に伴って β -1,3-glucan が一定の大きさに整えられているという結果をも支持している。

また、菌の成長が終わり定常期の後半になると exo- β -1,3-Glucanase II の活性の割合が増してくる。従って Fraction 2-II のような β -1,3-glucan は上記酵素によりオリゴ糖、そして glucose へと分解が進む。それが Autolysis の過程と考えられる。(Fig. 10)

しかし、実際の生きた cell wall の場では、以下の諸点の考慮が必要と思われる。

1. β -1,3-glucan の立体構造
2. キチンやタンパクと β -1,3-glucan の関係
3. 分解酵素のインヒビター等、酵素活性調節物質の存在
4. 酵素の存在場所

以上の点をふまえて、*N. crassa* 細胞壁の成長過程における形態変化を β -1,3-glucan の構造とその分解酵素という観点から考えると真菌細胞壁多糖は各成長段階で、その状況に応じて非常に微細な部分で少なくとも2種の分解酵素による修飾をうけていることが考えられる。

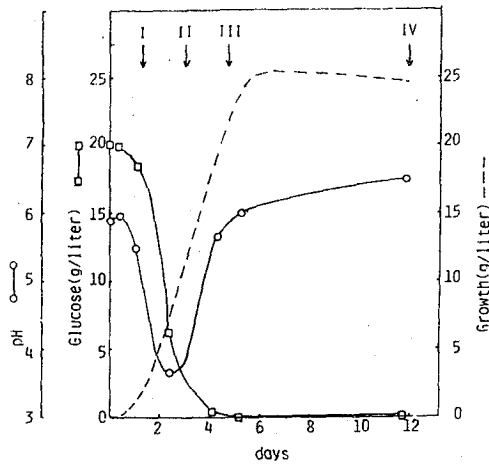


Fig. 2. Growth curve of *Neurospora crassa*

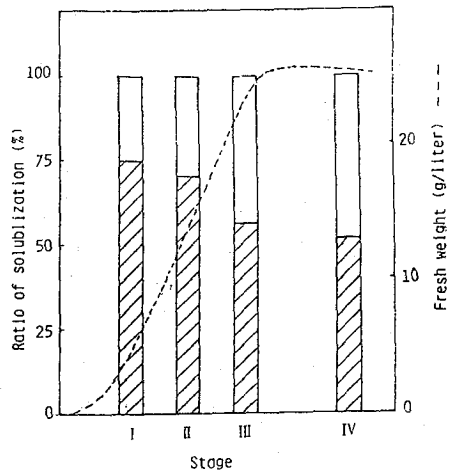


Fig. 5. Solubility of the β -1,3-glucan fr. with endo- β -1,3-glucanase

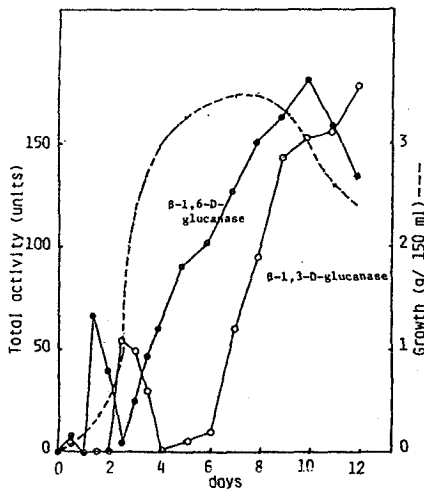


Fig. 3. Development of extracellular enzyme activity

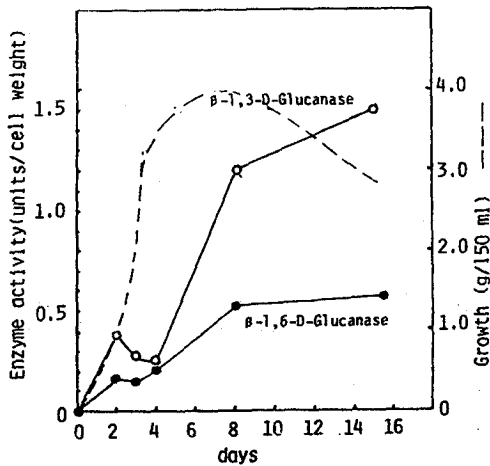


Fig. 4. Development of intracellular enzyme activity

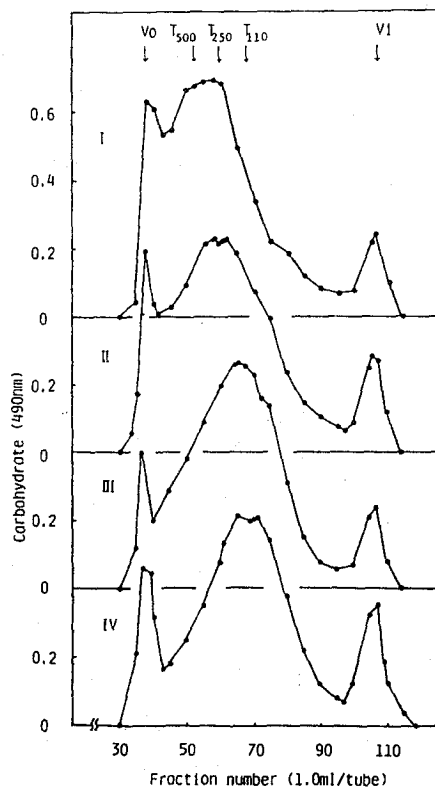


Fig. 6. Sepharose CL-6B gel chromatography of 4% NaOH ext.

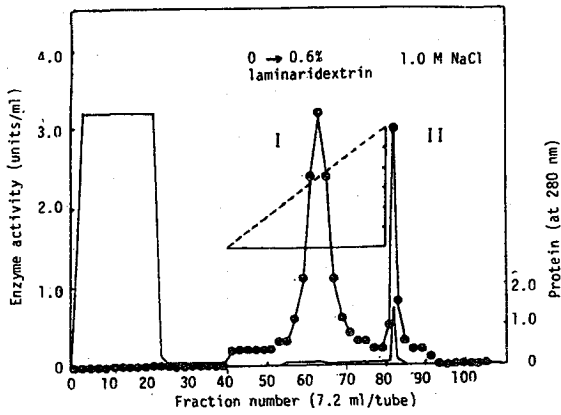


Fig. 7. Substrate affinity chromatography of β -1,3-glucanase

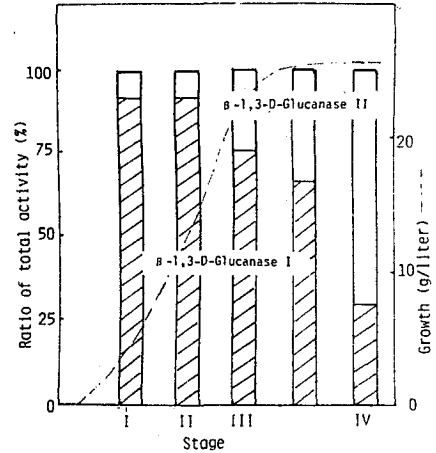


Fig. 8. Ratio of β -1,3-Glucanase I and β -1,3-Glucanase II

Table IV. General properties of β -glucanases

	β -1,3-D-Glucanase		β -1,6-D-Glucanase
	I	II	
Optimum pH	4.5	4.5	5.0
pH Stability	4.0 - 7.0	4.0 - 5.5	4.0 - 8.0
Optimum temp.	45°C	45°C	-
Temp. stability	below 45°C	below 45°C	below 50°C
Km(mg/ml)	1.0 (laminaran)	2.9 (laminaran)	0.8 (α -1,6-glucan)

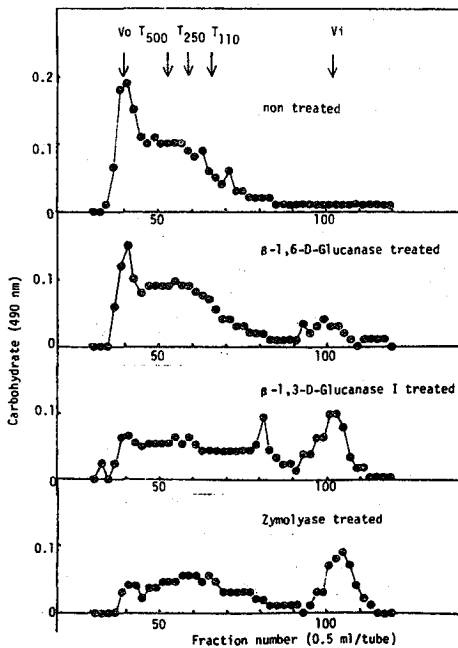


Fig. 9. Sepharose CL-6B gel chromatography of the β -1,3-glucan fr. treated with various β -glucanases

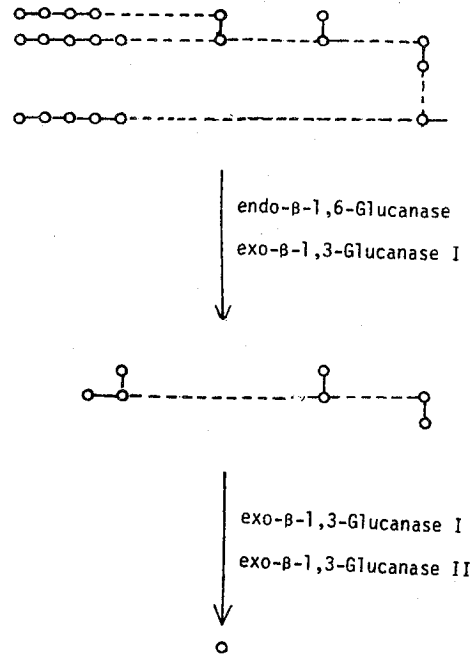


Fig. 10. Possible function of β -glucanases in the cell wall of *Neurospora crassa*

参 考 文 献

- 1) Purification and Properties of Glycogen in Sclerotia of Corticium rolfsii
N. Hiura, T. Nakajima, K. Kato, Y. Ueno, and K. Matsuda
J. Jpn. Soc. Starch Sci., 29, 294-298 (1982)
- 2) Two Cell Wall β -D-Glucans from Neurospora crassa
N. Hiura, T. Nakajima, and K. Matsuda
Agric. Biol. Chem., 47, 1317-1322 (1983)
- 3) Alkali Extraction of β -D-Glucans from the Sclerotia of Corticium rolfsii
N. Hiura, M. Hiura, T. Nakajima, K. Kato, Y. Ueno, and K. Matsuda
Agric. Biol. Chem., 48, 541-542 (1984)
- 4) Change of the Structure of Cell Wall β -1,3-D-Glucan with the growth of Neurospora crassa Cells
N. Hiura, I. Honjyo, T. Nakajima, and K. Matsuda
Agric. Biol. Chem., 48, 1041-1047 (1984)
- 5) Structure of the Cell Wall Proteogalactomannan from Neurospora crassa. I. Purification of the Proteoheteroglycan and Characterization of Alkali-Labile Oligosaccharides
T. Nakajima, M. Yoshida, N. Hiura, and K. Matsuda
J. Biochem., 96, 1005-1011 (1984)
- 6) Structure of the Cell Wall Proteogalactomannan from Neurospora crassa. II. Structural Analysis of the Polysaccharide Part
T. Nakajima, M. Yoshida, M. Nakamura, N. Hiura, and K. Matsuda
J. Biochem., 96, 1013-1020 (1984)

審 査 結 果 の 要 旨

真菌細胞壁の構成成分はその大半が多糖により占められている。その中で、もっとも量的に多く存在するのは β -1, 3-グルカンである。この多糖は細胞壁の主構成成分であるとともに、壁の形態、構造維持に関与する重要な多糖であるが、精製が困難なため微細構造についてはなお不明な点が多い。また、この多糖を分解する酵素についても、純粋に酵素学的立場からの研究が主で、細胞壁の機能と関連させての研究は極めて少ない。

本研究において著者は、真菌細胞壁の主要構成成分である β -1, 3-グルカンが菌糸の生長とともにどのように変化するか、さらにその変化に際して分解酵素がどのように関与するかを検討しようとした。著者はまず、*Neurospora crassa* IFO 6068 野生株から調製した β -1, 3-グルカンに2種類の β -1, 3-グルカンが存在することを認めそれぞれの構造を明かにした。ついで、菌の成長に伴う β -1, 3-グルカンの分子量的・構造的変化ならびに細胞内外の細胞壁 β -1, 3-グルカン分解酵素の活性の変化を検討した結果、細胞壁の構造変化と分解酵素との作用の間に相関性の存在することを見出した。最後に、著者は本菌細胞壁の骨格多糖としての β -1, 3-グルカンの構造を修飾する酵素として、2種類のエキソ- β -1, 3-グルカナーゼ（細胞内酵素）と1種類のエンド- β -1, 6-グルカナーゼ（細胞外酵素）を単離精製し、それぞれの酵素的諸性質を明かにするとともに、菌の成長に伴う細胞壁の構造変化におけるこれらの酵素の役割についても考察した。

以上、本論文は真菌細胞壁における構造多糖の機能に関して新しい知見を与えるものであり、審査員一同、著者は農学博士の学位を授与される資格を有するものと判定した。