

氏名(本籍)	ひら 平	やま 山	とし 壽	や 哉
学位の種類	農	学	博	士
学位記番号	農博第	239	号	
学位授与年月日	昭和54年	3月	27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	植物病原菌 <i>Pyricularia</i> <i>oryzae</i> の産生するセルラーゼ 系酵素に関する研究			

論文審査委員 (主査)

教授 松田和雄 教授 高橋 甫

助教授 長山英男

論文内容要旨

第1章 緒論

微生物によるセルロースの分野は主に木材腐朽菌を用いて研究がなされ、1950年、ReeseらによるC₁-C_x酵素説、あるいは1958年、Whitakerらによる単一酵素説により説明されて来た。しかし、1972年、セロビオース単位にセルロース鎖を水解するexo-セロビオヒドロラーゼの発見を期に新たにendo-, exo-セルラーゼによりセルロースが水解されるとする考えが生じた。

一方、これまでのセルロース分解機構の研究では、常に β -グルコシダーゼの誘導を認めていたにもかかわらず、それ自体セルロース分解能を有していなかったことから、 β -グルコシダーゼについての詳細な研究はなされず、単にセロビアーゼとしてのみ推察されたにすぎなかった。

しかしながら、前述の様なexo-セルラーゼの発見と、その活性がセロビオースにより阻害され、 β -グルコシダーゼの添加により活性化されるという最近の報告及び著者が認めた、endo-セルラーゼもまたセロビオースにより阻害されるという結果は、俄にセルロース分解に於ける β -グルコシダーゼの重要性と研究の必要性を強調してきたが、セルロース分解時に誘導される β -グルコシダーゼに関する報告は今日まで著者の報告^{1,2)}以外に2報あるにすぎず、完全な究明はなされていない。

一方、植物病原菌が宿主に侵入する際にセルラーゼが重要な役割を担うとする報告があり、須藤らは稲いもち病菌*Pyricularia oryzae*の病原性の強さとセルロース分解能とに相関性のあることを指摘した。

そこで本研究ではセルロース分解菌の β -グルコシダーゼの研究の必要性に基づき、しかも死組織を崩壊する木材腐朽菌とは異なりセルロース分解機構の研究のほとんどない植物病原菌、とりわけ*Pyricularia oryzae*のセルロース分解機構の解明を目的とした。

第2章 *Pyricularia oryzae* の産生するセルラーゼ

第1節 セルラーゼの精製と性質

まず初めに本菌の産生するセルラーゼを精製し、その性質を究明した。

本菌を結晶性セルロースであるAvicelを炭素源とした完全合成培地で培養すると、セルラーゼ活性は19日目頃、 β -グルコシダーゼ活性は14日目頃、最大に達した。そこで14日間培養した培養濾液を用い、DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G 200, DEAE-Sephadex CL6B, Sephadex G100などのカラムクロマトによりセルラーゼの単離・精製を行った。

本菌の培養濾液中には、2種のセルラーゼ、即ち、セルラーゼI (M.W.108,000) とセルラーゼII (M.W. 58,000) が存在し、いずれもendo-セルラーゼであり、木材腐朽菌*Trichoderma*属や*Irpex*属などに認められた結晶性セルロース分解能に富むexo-セロビオヒドロラーゼの活性

は非常に低いか、全く存在しないことが指摘された。

これらの endo-セルラーゼに関しては、セルラーゼ II は I に比べ、ランダム度が低く (Fig1), リン酸膨潤セルロース, Avicel といった不溶性セルロース水解能が高いことが特徴であった (Table I)。

しかし、これらの酵素は至適 pH, 至適温度, 化学試薬の影響などの点で酷似し、セロトリオース, セロテトラオースに対する反応動力学にも差は認められなかった。従って、これらの酵素が果してアイソザイムか否かという重大な疑問を生じた。

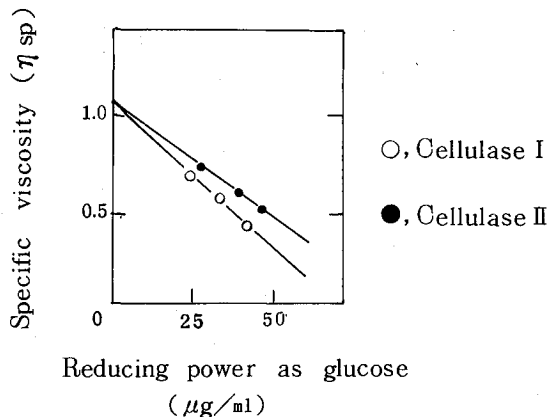


Fig1. Relationship between increases in fluidity and reducing power during the hydrolysis of CMC by cellulases I and II

Table I Substrate specificity of cellulases I and II

Substrate	I (Enzyme activity; R. S. formed per 30 min)	II (Enzyme activity; R. S. formed per 30 min)
0.2% Laminaran	0	0
0.2% Soluble starch	0	0
0.2% o-Nitrophenyl-β-D-glucoside	0	0
0.33 mM Cellobiose	0	0
0.27 mM Cellotriose	7.4	7.2
0.35 mM Cellotetraose	27.8	33.1
0.2% CMC (n=500)	29.6	30.8
0.2% HEC (cps 20-30)	57.2	51.3
0.15% Phosphoric acid swollen-cellulose	4.9	6.4
0.4% Avicel*	1.3	2.8

* Incubation was carried out for 5 h with the enzyme of which concentration was 4 fold of that used in other reactions.

一方、アイソザイム以外のセルラーゼ成分の存在を指摘する報告があり、このような多成分化の原因として Eriksson らは非酵素的、機械的原因を提唱して居り、更に、著者の酵素的に生ずるとする報告³⁾と時を同じくして 1976 年、中山らにより *Trichoderma viride* のセルラーゼの多成分化

の原因はプロテアーゼであるとする報告がなされた。

そこで、この“アイソザイムか否か”という問題を究明した。

第2節 セルラーゼ成分の相互関係—プロテアーゼによる変換—

まず、菌体外、菌体内に於けるセルラーゼの数的比較を行った。その結果、前者はセルラーゼ I

と II から成っていたのに対し、後者はセルラーゼ I のみから成り、菌体の内外で明瞭な差が認められた (Fig. 2)。従って、菌体外に於けるセルラーゼ II への変換が推察され、その Factor として中山らが指摘した様なプロテアーゼの可能性を考えた。しかし著者は、プロテアーゼの調製に際しては、

中山らのアプローチとは異なり、直接、セルラーゼを精製した培養濾液から調整することにした。その結果、Avicel を炭素源とした完全合成培地で本菌を生育させた培養濾液から 3 種のプロテアーゼ (P-I, P-II, P-III) を分離でき、その中で、 β -グルコシダーゼ活性、セルラーゼ活性いずれとも完全に分離できた P-III をセルラーゼ I へ作用させ、セルラーゼの変換を観察した。セルラーゼ I にプロテアーゼ P-III を作用させた結果、反応液中にはセルラーゼ I 以外の新たなセルラーゼが出現し、

Disc 電気泳動での移動度はセルラーゼ II のそれと一致し、その量は経時的に増加することが確認された (Fig. 3)。

従って、菌体外にのみ検出されたセルラーゼ II はセルラーゼ I が菌体外に於いて、プロテアーゼ P-III の作用を受け出現することが明らかとなった。

以上の事から、*P. oryzae* のセルラーゼに認めた多様性は endo-セルラーゼの多成分化に起因するものであり、このセルラーゼの変換により不溶性セルロース分解活性が活性化を受けることは、本菌の培養濾液中に結晶性セルロース分解能に富む exo-セロビオヒドロラーゼが検出されなかったことを考慮すると、本菌のセルロース分解に大きな利点となることが理解される。

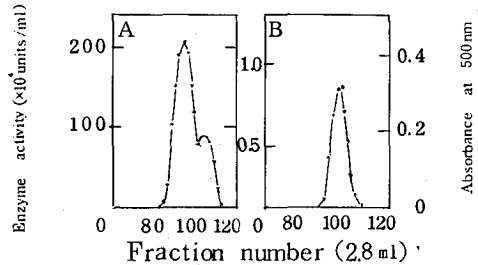


Fig. 2. Column chromatography of extracellular and intracellular cellulases on Sephadex G-200
A, Extracellular cellulase;
B, Intracellular cellulase

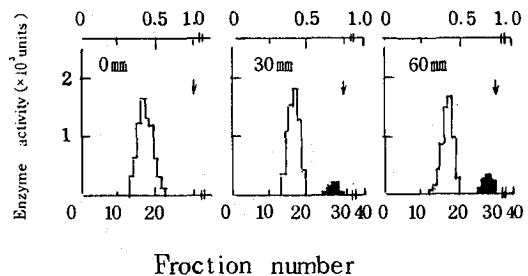


Fig. 3. Conversion of cellulase I into cellulase II by protease P-III

第3章 *Pyricularia oryzae* の産生する β -グルコシダーゼ

次にセルラーゼ以外に、本菌のセルロース分解に際して、重要な役割を担うと考えた、 β -グルコシダーゼについて検討した。

第1節 β -グルコシダーゼの誘導とその成分

まず初めに、 β -グルコシダーゼは単にセルロースだけでなく、 β -1,4結合やそれ以外の β -結合を有するオリゴ糖でも誘導されることが考えられたので、種々の炭素源を用いて、誘導される β -グルコシダーゼの質的、量的違いを検討した。

β -グルコシダーゼ活性は、 β -結合を有するグルコシドやオリゴ糖、及びセルロースを炭素源とする。完全合成培地、Yeast extract 添加培地で検出され、中でも Avicel を炭素源とする、完全合成培地と Yeast extract 添加培地 (Avicel-YE 培地) で顕著であった。次いで、 β -グルコシダーゼの誘導を認めた培養濾液中の β -グルコシダーゼの質的相違を DEAE-cellulose カラムクロマトにより検討した。その結果 (Table II), 明らかに用いた培地で質的相違が確認され、10 mM acetate buffer pH 5.5 で吸着されない成分 GA は Yeast extract 添加培地で、0 M から 0.3 M NaCl までの linear gradient 溶出により 0.15 M NaCl 付近に溶出される GB-1 は用いた全ての培地で、0.2 M NaCl 付近に溶出される GB-2 はセロビオースやゲンチオビオース以外の培地で検出された。

従って、 β -グルコシダーゼ GB-1 と GB-2 とは互いに誘導性を異にすると結論した。更に、GA はセルロースを炭素源とする完全合成培地では検出されなかったことから、本菌のセルロース分解に際しては GB-1 と GB-2 のみが関与するものと考え、GB

Table II. β -Glucosidase activities of the cultures on various carbon sources at different growth stages.

Carbon source	Culture time (day)	GA ($\times 10^{-3}$)	GB-1 units/ml of broth	GB-2 units/ml of broth
MG	1.5	0	2.72	1.10
	2.5	0	4.11	1.50
Cellobiose	1.5	0	3.13	0
	2.5	0	5.77	0
Gentiobiose	1.5	0	1.31	0
HEC	1.5	0	1.80	0.11
	2.5	0	5.99	0.42
	3.5	0	8.49	1.14
Avicel	8	0	1.63	0.87
	11	0	12.3	1.16
	13	0	31.3	1.69
HEC-YE	2.0	0.13	11.1	1.75
	3.0	0.20	18.0	1.85
Avicel-YE	7	0.36	20.3	0.56
	11	0.62	26.4	2.01

- 1 と GB-2 を精製し性質を検討した。

第2節 β -グルコシダーゼの精製及びその性質

GB-1 の精製は、 β -グルコシダーゼ活性が強く、しかも GB-2 の比較的少ない Avicel-YE 培地を用い、6 日間培養を行った培養濾液から、DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G 200, DEAE-cellulose, 焦点電気泳動, Bio-Gel A 0.5 m カラムクロマトなどの操作により SDS 電気泳動で単一なバンドが得られるまで精製した。

一方、GB-2 の精製は、 β -グルコシダーゼ活性が強く、GB-2 の活性を顕著に認めた Avicel 完全合成培地を用い、14 日間培養を行った培養濾液から、DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G 200, DEAE-cellulose, Bio-Gel A 0.5 m などのカラムクロマトにより SDS 電気泳動で単一となるまで精製した。

これらの β -グルコシダーゼの分子量を蔗糖密度勾配遠心により求めると、共に 205,000 であった。しかし、SDS 電気泳動により求めた値は、GB-1 240,000, GB-2 120,000 であった。従って、GB-1 は分子量約 240,000 のシングルポリペプチドであり、GB-2 は分子量約 120,000 のサブユニット 2 個からなるものと推察し、四次構造の有無及び誘導性の違いからこれら 2 種の β -グルコシダーゼはアイソザイムと結論した。

アミノ酸組成は共に酸性アミノ酸に富み、マンノース、グルコースを含む糖蛋白であったが、Threonine の占める割合が GB-2 で少なかった。

酵素化学的性質は、共に一致した至適 pH を示したが、温度に対し、GB-2 は GB-1 より不安定であった。また、いずれの酵素も PCMB により顕著に阻害を受けた。

第3節 β -グルコシダーゼの反応動力学的特徴

一方、GB-1 と GB-2 の反応動力学には明確な相違が認められた。GB-1 のセロオリゴ糖に対する Lineweaver-Burk プロットは Michaelis-Menten 型を示し、1 mM 付近で顕著な基質阻害が観察されるのが特徴であった (Fig. 4)。更に、GB-1 の種々オリゴ糖に対する K_m は鎖長の長いもの程親和性の高いことを示し、Laminaran, Zeagallan, Pustulan, CMC などの β -グルカンに対しても作用を示した。

従って、GB-1 は、CMC に対する作用を有しないと報告された *Trichoderma viride* の β -グルコシダーゼとは明らかに異なっていた。しかも、本酵素は、これまで報告された *exo*- β -グルカナナーゼとほぼ同程度の K_m で Laminaran に作用し、これらの *exo*- β -グルカナナーゼでは水解できないセロオリゴ糖などをも水解することから、新しいタイプのグルカナナーゼと考えられた。しかし、Avicel への作用はほとんど認められなかった。

一方、GB-2のセロオリゴ糖に対するLineweaver-BurkプロットはGB-1のそれと異なり、2相性を示し(Fig. 5), その2相性は基質により異なっていたことから、Scheme Iのような2つの基質結合部位を想定した反応機構を考え、基質が互いに影響を及ぼすアロステリック酵素と結論した。

GB-2のセロオリゴ糖に対する K_m はGB-1のそれとは逆に鎖長の短いもの程親和性の高いという特徴を示した。また、GB-2はGB-1の7倍の K_m でLaminaranに作用したが、CMCやPustulanへの作用は認められなかった。

次に、これらの酵素に対するグルコースの阻害を検討した結果、GB-1は拮抗阻害、GB-2は非

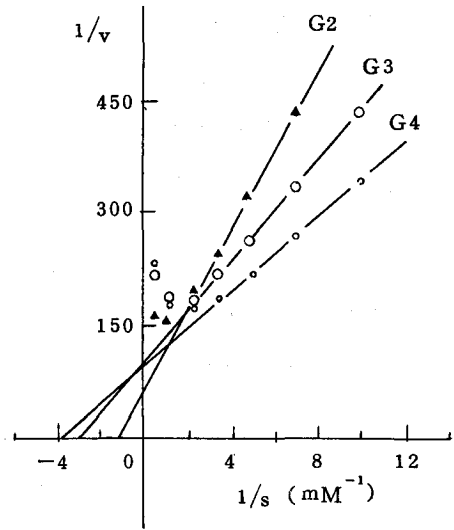


Fig. 4 Hydrolysis of celooligosaccharide by GB-1

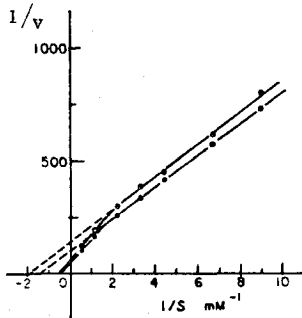
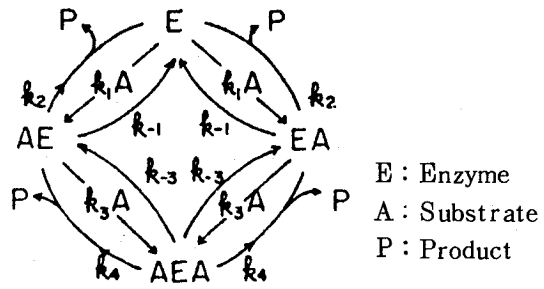


Fig. 5 Hydrolyses of cellotriose and cellotetraose by GB-2
○, Cellotriose
●, Cellotetraose

Scheme I



拮抗阻害を受けることが明らかとなり、GB-2には生成物であると同時に阻害剤ともなりうるグルコースのbinding siteの存在が考えられた。

以上で得た本菌のセルラーゼ系酵素に関する知見に基づき、本菌のセルロース分解機構を次のように理解した。

まず、本菌はセルロース培地中にセルラーゼIと β -グルコミダーゼGB-1, GB-2を分泌する。そしてセルラーゼIはプロテアーゼP-IIIにより作用を受け、不溶性セルロース水解能に富むセルラーゼIIへ変換する。次に、これらのセルラーゼはendo-型の作用様式でセルロースの非結

晶部あるいは結晶部に作用し、セロオリゴ糖を生ずる。このようにして生成したセロオリゴ糖はただちに、鎖長の長いもの程親和性の高い β -グルコシダーゼGB-1により水解され、グルコースとより鎖長の短いセロオリゴ糖に分解される。次いで、生じた鎖長の短いセロオリゴ糖はGB-2によりグルコースに水解されるとするスキームである。

一方、 β -グルコシダーゼGB-1、GB-2は、前者が基質阻害、後者はホモトロピックな効果により、更に生成物であるグルコースにより、その水解速度に変化を受けることが明らかとなった。従って著者は、 β -グルコシダーゼのセルラーゼ系に於ける役割を単にendo-セルラーゼの作用により生じたセロオリゴ糖を無秩序に水解するものではなく、調節的役割をもつと考えた。

なお、このように1菌種のセルラーゼ系の全貌が把握されたのは本論文が初めてである。

文 献

1. Studies on Cellulases of a Phytopathogenic Fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara II. Purification and Properties of a β -Glucosidase.
T. Hirayama, S. Horie, H. Nagayama, K. Matsuda (1978).
J. Biochem. 84, 27-37.
2. Studies on Cellulases of a Phytopathogenic Fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara III. Multiplicity of β -Glucosidase, and Purification and Properties of a Second Component.
T. Hirayama, H. Nagayama, K. Matsuda, J. Biochem. in press.
3. Studies on Cellulases of a Phytopathogenic Fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara I. Number and Interrelation of Components of Cx Enzyme from *P. oryzae*
T. Hirayama, T. Sudo, H. Nagayama, K. Matsuda, K. Tamari. (1976)
Agr. Biol. Chem. 40, 2137-2142

審 査 結 果 の 要 旨

微生物におけるセルロース分解酵素の研究は主として木材腐朽菌について行なわれ、植物病原菌についての研究は極めて少ない。また、これらセルロース分解酵素に関する研究は大部分高分子基質に作用してオリゴ糖を生成する endo- または exo- セルラーゼに関するものであり、最終分解産物であるグルコースの生成に関与する β -グルコシダーゼについての研究は乏しく、その性質も部分的に解明されているにすぎない。

本論文は病原性の強さとセルロース分解能との間に相関性のあることの指摘されたイネイモチ病菌 (*Pyricularia oryzae*) のセルロース分解酵素系を詳細に究明しようと試みたものである。著者は、本菌のセルロースを炭素源とする培養液中にセルラーゼ、 β -グルコシダーゼが夫々2成分分泌されることを認め、これらの酵素を精製して夫々の酵素化学的性質を明らかにするとともに、多成分系として現われる酵素の相互関係をも明らかにしようと試みた。

2種のセルラーゼは何れも endo-型の作用形式を示し、exo-、endo- 両型のセルラーゼから成る木材腐朽菌のセルラーゼとは明らかに異なっていた。さらに、これら2つのセルラーゼはランダム度、不溶性基質水解能に差が認められた以外、他の諸性質は著しく類似していた。そこで、これらのセルラーゼが真のアイソザイムであるか否かを検討した結果、低分子量のランダム度が低く、不溶性基質水解能に富むセルラーゼⅡは高分子量のセルラーゼⅠが菌体から分泌された後、プロテアーゼにより部分的修飾を受けて二次的に生成したものであることが判明した。一方、 β -グルコシダーゼ (GB_1 、 GB_2) については誘導性の違い、四次構造の有無から、これらはアイソザイムであると結論した。 GB_1 は糖鎖の長いセロオリゴ糖に対してより高い親和性を示し、逆に GB_2 は基質の糖鎖が短いほど親和性が高かった。なお、 GB_1 は β -1,3 グルカンであるラミナランなどの高分子基質に対しても優れた分解活性を示し、 β -グルコシダーゼであると同時に、従来報告された exo- β -グルカナーゼよりも広い基質特異性を有する新しい型の β -グルカナーゼであると考えた。 GB_2 は高分子基質に対して活性を示さず、反応速度論的解析からアロステリック酵素と結論された。 GB_1 、 GB_2 とも高濃度の基質の存在下で、前者は基質阻害により、後者はホモトロピックな効果により水解速度が抑えられることから、これら β -グルコシダーゼはセルロース分解系において調節的役割を果すものと推論した。

以上、本論文は、イモチ病菌のセルロース分解酵素系の全貌を明らかにしたもので幾つかの新しい知見を含んでいる。よって、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。