

微生物によるグリコシダーゼの生産に関する研究

(第1報) 土壌より分離した一細菌の生産する
酵素による *Fusarium* sp. M7-1 菌株多糖の分解*

岩原章二郎, 田中 正, 木口幾夫, 斉藤 誠

STUDIES ON MICROBIAL PRODUCTION OF GLYCOSIDASES

Part 1. Degradation of Polysaccharides of *Fusarium* sp. M7-1
by the Enzymes Produced by a Bacterium Isolated from Soil*

Shojiro IWAHARA, Tadashi TANAKA, Ikuo KIGUCHI and Makoto SAITO

A bacterium, 50b strain isolated from soil by enrichment culture method, produced the enzyme(s) which hydrolyzed polysaccharides of *Fusarium* sp. M7-1 as well as yeast mannan. The reaction product from yeast mannan and neutral polysaccharides of *Fusarium* sp. M7-1 was mannose alone. However, mannose and mannobiose were produced from the acidic polysaccharides of *Fusarium* sp. M7-1 by the enzymic digestion.

集積培養法により土壌より分離した一細菌 (50b 菌株) が *Fusarium* sp. M7-1 菌株の多糖および酵母マンナンを分解する酵素を生産することを見出した。酵母マンナンおよび *Fusarium* sp. M7-1 菌株の中性多糖からの反応生成物は Mannose のみであったが、酸性糖を含有する多糖からの反応生成物は Mannose および Mannobiose であった。

緒 言

Fusarium sp. M7-1 菌株が α , β 不飽和芳香族アルコール酸化酵素を培養液中に生産することについてはすでに報告した^(1,2)。本酵素の精製方法について検討中に培養液中に存在する多糖成分が本酵素と関連性があることが推定された⁽³⁾。本研究は、この多糖成分の化学構造を明らかにするとともに α , β 不飽和芳香族アルコール酸化酵素との関連性を明らかにすることを目的として計画したものである。今回は、この多糖を分解する酵素を生産する微生物の検索を行い、土壌より分離した一細菌、50b 菌株、がこの多糖を部分的に分解することを見出し、本菌の生産する酵素が多糖の構造解明のために応用できる可能性を明らかにしたので報告する。

実験材料および方法

1. 使用菌株および培養方法 *Fusarium* sp. M7-1 菌株は前報⁽³⁾の方法に従って培養した。多糖分解酵素生産菌、50b 菌株の培養には主に下記の組成の培地を用いた。試験管 (18 mm × 18 cm) に培地 4 ml を分注し、殺菌後種菌を斜面培地より 1 白金耳接種して試験管振とう機上 (210 rpm) で 28°C において 24 時間培養したものを同培地 100 ml を含む 500 ml 容三角フラスコに接種して 28°C において回転式振とう培養機上で一定時間培養した。培地組成は α -Methyl-D-mannopyranoside 0.5 g, Yeast extract 1 g, Glycerin 1 g, Casamino acid 10 g, K_2HPO_4 1 g, KCl 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mg, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 5 mg, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 20 mg, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1 mg, 脱イオン水 1 l, pH6.0

*本研究の一部は日本農芸化学会昭和60年度大会 (札幌, 昭和60年7月) および昭和61年度大会 (京都, 昭和61年4月) において発表した。

である。

2. 基質の調製方法 *Fusarium* sp. M7-1 菌株を前報⁽³⁾の方法に従って培養し、ろ過して培養ろ液と菌体とに分離した。培養液は前報⁽³⁾の方法に従って濃縮、透析後 Sephadex G-50 によりゲルろ過を行い多糖成分を含む分画を得て多糖分解菌の検索のために使用した。また、洗浄菌体500 g に対して1% Na₂CO₃ 溶液500 mlを加え120°C、30分加熱抽出し、不溶部を熱水で洗浄後 Ethanol, Acetone および Ether で順次洗浄して多糖分解菌の集積培養用炭素源として使用した。酵素反応の生産物の分析などは以下に述べる部分精製多糖を用いて行った。M7-1 菌株の培養ろ液30 l を約200 mlに濃縮し不溶物を遠心分離により除去し流水中で2日間透析した。透析液を約150 mlに濃縮しこれに0.1 M phosphate buffer, pH8.0 150 mlを加え100°C、15分間加熱してタンパク質を変性させたのち、Pronase をタンパク質の1/50量を加え37°Cで120時間消化を行った。Pronase 消化液を約100 mlに濃縮し、pH 4.8 に調整して99% Ethanol 900 mlを徐々に添加した。遠心分離により沈殿を集めて90% Ethanol で洗浄後、少量の脱イオン水に溶解し脱イオン水に対して3日間透析ののち約100 mlに濃縮した。濃縮液を DEAE-Toyopearl 650M によるイオン交換クロマトグラフィーを行い非吸着部 (Fr. I) と吸着部 (Fr. II) に分画した。さらに、それぞれを Toyopearl HW65, 同75などにより分画しそれぞれの高分子区分を集めて濃縮し実験に供した。

一方、M7-1 菌株の菌体から多糖を抽出し部分精製して実験に供した。M7-1 菌株の生菌体500 g に対して4% NaOH 600 mlを加え120°Cで30分間加熱し、酢酸で中和後遠心分離により菌体を除去した。上澄液を約200 mlに濃縮し流水中で3日間透析後約50 mlに濃縮し、不溶物を遠心分離により除去した。上澄液に99% Ethanol 400 mlを加え沈殿を遠心分離により集め50 mlの脱イオン水に溶解して2日間透析した。つぎに、培養液の場合と同様に Pronase による消化を行った。Pronase 消化液に99% Ethanol を最終濃度が90%になるように加えて遠心分離により沈殿を集め少量の脱イオン水に溶解した。この溶液を脱イオン水に対して透析した。透析液を DEAE-Toyopearl 650M によるイオン交換クロマトグラフィーを行い微量の非吸着成分を除去し、吸着成分を食塩を用いて傾斜溶出法により溶出した。多糖区分を集めて濃縮した。濃縮液を Toyopearl HW75 によるゲルろ過を行い高分子区分を集めて濃縮した。この画分を Fr. III として実験に供した。Fr. I は Mannose を主成分とし微量の Galactose および Glucose を含む中性多糖であり、Fr. II は中性糖約60%、酸性糖約40%を含む酸性多糖で中性糖として Mannose, Galactose および Glucose を含みその比は6:3:1であった。Fr. III も中性糖約60%、酸性糖40%から成る酸性多糖で中性糖として Mannose, Galactose および Glucose を含みその比は5:4:1であった。Fr. II および Fr. III はいずれも酸性糖を40%程度含有していたが糖組成は明らかでない。これらの多糖の化学構造については現在検討中である。

3. 集積培養 香川大学農学部周辺の土壌約1 g を10 mlの殺菌水にけんだくし、その1滴を下記組成の培地4 mlに接種し28°Cで7日間振とう培養した。明らかに菌が生育し培地中の炭素源として使用した *Fusarium* sp. M7-1 菌株の菌体の溶解が認められたものを選び、その1白金耳を新しい培地に接種し5日間振とう培養した。平板培養法により菌の分離を行った。その結果細菌80菌株およびかび20菌株を得た。培地組成は、M7-1 菌株の菌体(1% Na₂CO₃での抽出残渣) 1 g, NH₄NO₃ 2 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 脱イオン水 1 l, pH 6.0 である。

4. 酵素活性の測定 α -Mannosidase 活性は *p*-nitrophenyl- α -D-mannopyranoside および酵母マンナンを基質として測定した。*p*-Nitrophenyl- α -D-mannopyranoside 0.5 μ mole, 適当量の酵素液, phosphate buffer (pH8.0) 100 μ mole および CaCl₂ 10 μ mole を含む全容 1 mlの反応液を30°Cで30分間反応させた。反応後0.2M Na₂CO₃ 2 mlを加えて反応を停止させた。生成した *p*-Nitrophenol を420 nmにおける吸光度により定量した。酵素活性1 unit は1分間に1 μ mole の *p*-Nitrophenol を生成するために必要な酵素量とした。酵母マンナンを基質とする場合には、酵母マンナン 2 mg, 適当量の酵素液, phosphate buffer (pH8.0) 150 μ mole, CaCl₂ 15 μ mole を含む全容 1.5 mlの反応液を30°Cで1時間反応させ生成する Mannose を Somogyi-Nelson 法により定量して酵素活性を測定した。酵素活性1 unit は1分間に1 μ mole の Mannose を生成するために必要な酵素量とした。なお、酵素活性は *p*-Nitrophenyl- α -D-mannopyranoside を基質として測定した場合には α -Mannosidase (PNPMP) で酵母マンナンを用いた場合には α -Mannosidase (mannan) で表した。

5. 糖の定量 全糖はフェノール硫酸法⁽⁴⁾により、還元糖は Somogyi-Nelson 法⁽⁵⁾によりそれぞれ Mannose を標準物質として定量した。

6. クロマトグラフィー 糖成分の分析のための薄層クロマトグラフィー (TLC) はメルク社製シリカゲルプレート 60 F₂₅₄ (5 cm×10 cm, 0.25 mm厚) を使用して下記の溶媒を用いて室温で上昇法により展開して行った。発色は濃硫酸を噴霧し加熱して行った。展開溶媒の組成は下記の通りである。n-butanol-ethanol-water (6:2:2; v/v/v),

n-butanol-acetone-water (4:5:1, v/v/v), ethylacetate-*n*-propanol-water (10:2:0.5, v/v/v)。また, Bio-Gel P-2 を用いるゲルろ過による反応生成物の分析も行った。

実験結果および考察

1. 多糖分解酵素生産菌の検索 下記組成の培地 4 ml を試験管 (18 mm×18 cm) に分注し, 24時間28℃において振とう培養したものを同培地100 mlを含む500 ml容三角フラスコに接種し28℃で3日間振とう培養した。培地組成は *Fusarium* sp. M7-1 菌株の生菌体 30 g, Peptone 10 g, KH₂PO₄ 2 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 脱イオン水 1 l, pH6.0 である。培養後遠心分離により菌体を除去し 0.1M Phosphate buffer (pH6.0) に対し24時間4℃において透析した。*Fusarium* sp. M7-1 菌株の培養液多糖 (Sephadex G50 によるゲルろ過により調製したもの) を基質として透析液の還元糖の生成能を測定した。細菌80株, かび20株について調べた結果, 多くの菌株において多糖分解活性は認められなかったが, Table 1 に示すように, 2, 3の菌株については活性が認められとくに50 b 菌株が高い分解活性を示した。以後の実験は本菌株を用いて行った。本菌株は無べん毛非運性で内生孢子を形成しない短桿菌である。本菌株の菌学的諸性質の細詳については現在検討中である。

2. 酵素の生産条件 後述するように, 本菌の培養液を多糖に作用させた場合に生成する還元糖の主成分は Mannose であったので分解に関与する酵素は α -Mannosidase であろうと推定し, *p*-Nitrophenyl- α -D-mannopyranoside を基質とする α -Mannosidase 活性を指標として酵素生産の条件について検討した。その結果は Table 2 および Fig. 1 のとおりで本酵素の生産に対して *Fusarium* sp. M7-1 菌株の菌体または Methyl- α -D-mannoside が顕著な効果を示した。このことは本酵素が誘導酵素であることを示すものである。誘導物質の存在下では酵素の生産は培養20時間目頃からはじまり24時間目頃に最高となり以後徐々に低下する傾向が認められた。

Table 1. Production of polysaccharide-degrading enzyme by the isolated bacteria.

The reaction mixture containing 200 μ g of the polysaccharide, 100 μ mole of phosphate buffer pH 6.0 and 0.5 ml of the dialyzed culture filtrate in a total volume of 1 ml was incubated for 12 hr at 30°C. Reducing sugar liberated was determined by the method described in the text.

Strain tested	Enzyme activity (Reducing sugar liberated, μ g/ml)
6 a	14.1
10 c 3	14.2
10 c 4	36.4
18 a 2	4.1
18 b	3.5
20 b	3.5
50 b	55.9
50 c	38.5
53	45.5
44 c	15.5

Table 2. Effect of inducers on the production of α -mannosidase.

The bacterium was grown for 30 hr at 28°C with shaking.

Inducer	α -Mannosidase (PNPMP)* produced (munits/ml)
None	0.1
Mycelium of <i>Fusarium</i> sp. M7-1 (30 mg/ml)	4.6
α -Methyl-D-mannopyranoside (500 μ g/ml)	18.0

*Enzyme activity was determined with *p*-nitrophenyl α -mannopyranoside as substrate.

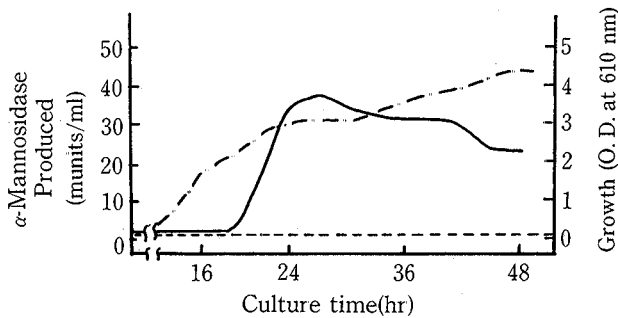


Fig. 1. Effect of α -methyl-D-mannopyranoside on the production of α -mannosidase.

----- : α -mannosidase produced without addition of inducer,
 ————— : α -mannosidase produced with addition of α -methyl-D-mannopyranoside, - · - : Growth

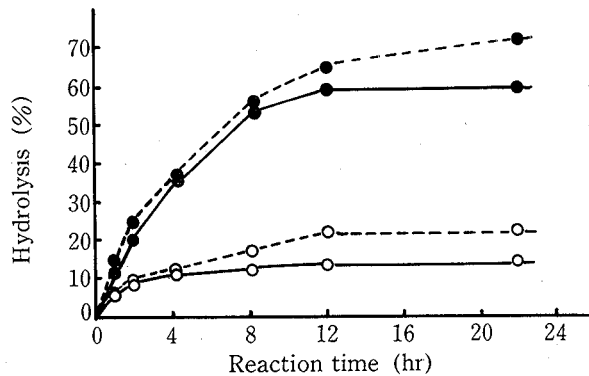


Fig. 2. Time course of hydrolysis of the polysaccharides by the crude enzyme preparation.

The reaction mixture containing 20 mg of each polysaccharide, crude enzyme solution (300 munits as α -mannosidase(mannan)), 1 μ mole of CaCl_2 and 100 μ mole of phosphate buffer (pH 8.0) in a total volume of 2 ml was incubated at 30 $^\circ\text{C}$ for a period indicated.

—●— : Fr. I, —○— : Fr. II, —○— : Fr. III, —●— : Yeast mannan

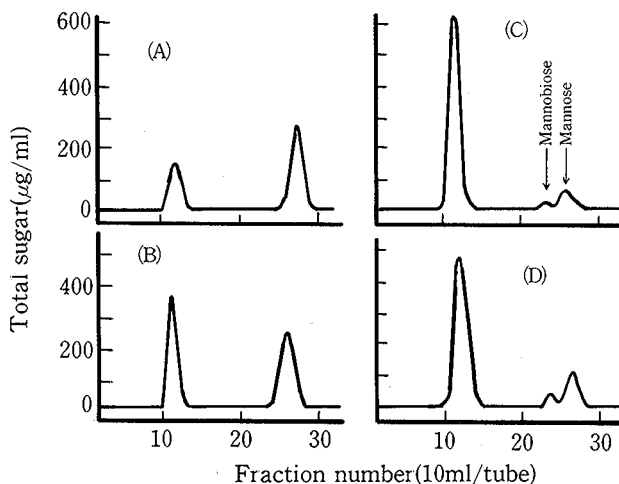


Fig. 3. Gel filtration of the reaction products on Bio-Gel P-2.

The reaction conditions were the same as those in Fig. 2. One ml of each reaction mixture incubated for 24 hr was poured over a column (2.6 cm x 68 cm) of Bio-Gel P-2 equilibrated with deionized water and eluted with deionized water at a flow rate of 1 ml per min. Ten-ml fractions were collected.

(A): Yeast mannan, (B): Fr. I, (C): Fr. II, (D): Fr. III

Table 3. TLC and HPLC of monosaccharide fraction in the reaction products.

Material	R _f value on TLC			Retention time (min)	
	A	B	C	Hitachi 3013N*	Hitachi GL-C611**
Monosaccharide fraction from					
Fr. I	0.41	0.48	0.16	13.0	17.0
Fr. II	0.40	0.47	0.16	13.0	17.0
Fr. III	0.41	0.48	0.16	13.1	17.1
Yeast mannan	0.41	0.48	0.15	13.0	17.0
Mannose	0.41	0.48	0.15	13.1	17.0
Galactose	0.30	0.40	0.07	25.0	16.0
Glucose	0.38	0.41	0.09	80.0	15.5

A: *n*-Butanol-ethanol-water (6:2:2, v/v/v)

B: *n*-Butanol-acetone-water (4:5:1, v/v/v)

C: Ethylacetate-*n*-propanol-water (10:2:0.5, v/v/v)

* Eluted with 0.167 M borate buffer (pH 7.5) at a flow rate of 1 ml per min at 65°C.

** Eluted with water at a flow rate of 1 ml per min at 60°C.

Table 4. Yield of mannose and mannobiose.

Substrate	Reaction products (μg/mg of substrate)		Ratio of Mannobiose/Mannose
	Mannose	Mannobiose	
Fr. I	490	—	—
Fr. II	92	20	0.22
Fr. III	167	49	0.29
Yeast mannan	660	—	—

3. 粗酵素液の酵母マンナンおよび *Fusarium* sp. M7-1 菌株多糖に対する作用 50 b 菌株の培養液を遠心分離して菌体を除去し, 上澄液の pH を 6.0 に調整し固形硫酸を 90% 飽和になるように加えた。4°C において 24 時間放置後遠心分離により沈殿を集め 0.1 M Phosphate buffer (pH 8.0, Ca⁺⁺ 10⁻³M を含む) に溶解し限外ろ過により濃縮した。濃縮液を 0.1 M Phosphate buffer (pH 8.0, Ca⁺⁺ 10⁻³M) に対して 24 時間 4°C において透析し不溶性物質を遠心分離により除去して粗酵素液として以下の実験に供した。

粗酵素液を酵母マンナンおよび *Fusarium* sp. M7-1 菌株の多糖 (Fr. I, Fr. II および Fr. III) に作用させたところ, Fig. 2 に示すように本酵素標品は酵母マンナンを最もよく分解した。*Fusarium* 多糖のうちの Fr. I も酵母マンナンとほぼ同様によく分解された。しかし, Fr. II および Fr. III の分解率はあまり良好ではなかった。つぎに, 反応生成物について Bio-Gel P-2 によるゲルろ過分析を行った結果, Fig. 3 に示すように酵母マンナンおよび Fr. I からの生成物は Monomer 区分のみピークが認められた。一方, 酸性糖を含有している Fr. II および Fr. III からの生成物は Monomer 区分のほか Dimer と推定される成分の生成が認められた。両成分について TLC および高速液体クロマトグラフィーにより分析した。その結果, Table 3 に示すように Monomer 区分の R_f 値は Mannose のそれと一致した。一方, Dimer 区分については質量分析, NMR などによる分析結果から Mannopyranosyl β1 → 2mannopyranoside であることが確認されている (Agric. Biol. Chem. 投稿中)。このような Mannobiose は酵母マンナンや *Fusarium* sp. M7-1 菌株の中性多糖からは全く生成されず, 酸性糖である Fr. II および Fr. III からのみ生成した (Table 4)。このことはこのような構造単位が *Fusarium* sp. M7-1 菌株の酸性糖を含む多糖中に特異的に存在していることを示すもので

ある。*Fusarium* sp. M7-1 菌株多糖の分解にどのような酵素が関与しているかは明らかでないが、本酵素標品が酵母マンナンを分解すること、 $\alpha 1 \rightarrow 2$ および $\alpha 1 \rightarrow 6$ Mannobiose を分解すること、反応生成物中には Mannose および Mannobiose 以外の糖が認められないことなどから考えて多糖の分解に関与している酵素は α -Mannosidase(s) であると考えられる。また、本酵素標品が $\beta 1 \rightarrow 2$ Mannobiose を生成することは興味ある現象であり、本酵素標品は多糖中の $\beta 1 \rightarrow 2$ Mannobiose 構造の定性・定量のための試薬として使用できる可能性がある。本酵素の諸性質の詳細については現在検討中である。

引用文献

- (1) Iwahara, S., Nishihira, T., Jomori, T., Kuwahara, M. and Higuchi, T., *J. Ferment. Technol.*, **58**, 183 (1980).
(2) 岩原章二郎, 杉山裕子, 木材誌, **29**, 324 (1983).
(3) 岩原章二郎, 木下典和, 香川大農学術報告, **35**, 27 (1983).
(4) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Reber, P. A. and Smith, F., *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1966).
(5) Somogyi, M., *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952). (1987年5月27日受理)