

微生物によるグリコシダーゼの生産に関する研究

(第2報) 一種類の誘導物質による複数の
グリコシダーゼの同時誘導生成について*

岩原章二郎, 田中 正

STUDIES ON MICROBIAL PRODUCTION OF GLYCOSIDASES

Part 2. Coordinative Production of Several Glycosidases by an Inducer

Shojiro IWAHARA and Tadashi TANAKA

In the presence of an inducer, a bacterium, 50b strain, isolated from soil, coordinatively produced several glycosidases which hydrolyzed glycoside having glycosidic linkage different from that of each inducer used.

土壌より分離した一細菌(50b菌株)が一種類の誘導物質によって誘導物質の結合様式とは異なる結合様式のグリコシド結合を分解する複数のグリコシダーゼを同時誘導的に生成することを明らかにした。

結 言

前報⁽¹⁾において土壌より分離した一細菌(50b菌株)が*Fusarium* sp. M7-1菌株の多糖成分を部分的に分解することについて報告した。多糖分解酵素の生産条件について検討中に一種類の誘導物質の存在下において誘導物質とは異なる結合様式のグリコシド結合を分解する多種類のグリコシダーゼが同時誘導的に生成する現象を見出したので報告する。

実験材料および方法

1. 使用菌株および培養方法 50b菌株は前報⁽¹⁾の方法に従って培養した。
2. 酵素活性の測定 酵素活性は各種の *p*-nitrophenyl glycosides を基質として測定した。*p*-nitrophenyl glycoside 0.5 μ mole, 適当量の酵素液, phosphate buffer (pH 8.0) 100 μ mole, および CaCl_2 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 0.2 M Na_2CO_3 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 を生成するに必要な酵素量とした。
3. クロマトグラフィー 培養液中のタンパク質および酵素の分析は TSK-5 PW を用いて行った。

実験結果および考察

1. グリコシダーゼの生産に対する誘導物質の効果 前報において α -Mannosidase が α -Methyl-D-mannoside により誘導的に生成することについて報告した⁽¹⁾。 α -Methyl-D-mannoside の存在下で 50b 菌株を培養した場合に α -Mannosidase のほかに多種類のグリコシダーゼが生成していることが明らかになったので、これらのグリコシダーゼの生成に対する各種の誘導物質の効果について検討した。その結果、Table 1 に示すように各種のグリコシド結合

*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)において発表した。

Table 1. Effect of inducers on the production of glycosidases

The microorganism was grown on the medium containing each inducer indicated for 30 hr at 28°C with shaking. After the culture, cells were removed by centrifugation. The enzyme activity in the supernatant was determined. The reaction mixture containing 0.5 μmole of each substrate, 0.2 ml of the supernatant, 700 μmole of phosphate buffer (pH 8.0), 10 μmole of Ca⁺⁺ in a total volume of 1 ml was incubated for 30 min at 30°C.

Inducer added (0.5 mg/ml)	Glycosidase produced (munits/ml)					
	α-Manno- sidase	β-Manno- sidase	β-Galac- tosidase	α-Gluco- sidase	β-Gluco- sidase	β-Xylo- sidase
None	0.6	0.6	0.5	0.7	3.5	3.6
α-Methyl-D-mannoside	43.0	43.3	15.9	7.7	36.7	22.9
α-Methyl-D-glucoside	37.7	40.9	29.4	9.0	49.0	27.3
β-Methyl-D-glucoside	5.6	5.6	4.0	1.6	9.4	3.9
α-Methyl-D-galactoside	0.0	0.6	0.6	0.7	3.4	2.4
Lactose	41.6	41.6	16.0	5.9	34.6	18.8
Isopropyl-β-thio -D-galacto side	15.6	15.6	5.3	3.2	16.3	7.7

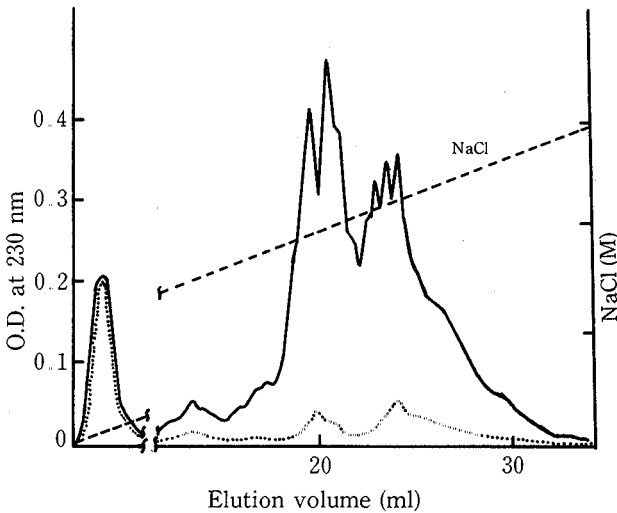


Fig. 1 HPLC of proteins in the culture media.

The microorganism was grown on the medium (100 ml in 500-ml Erlenmeyer flask) in the presence or absence of methyl-D-mannopyranoside for 30 hr at 28°C with shaking. The cells were removed by centrifugation. The supernatant was concentrated to about 1 ml by ultrafiltration. The concentrate was loaded on a column of TSK-5 PW equilibrated with 0.1 M phosphate buffer, pH 6.0 and eluted with linear gradient of NaCl in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.0. Protein in the eluate was determined by measuring of absorbance at 230 nm.

..... : proteins produced in the absence of inducer,
 ————— : proteins produced in the presence of α-methyl-D-mannopyranoside as an inducer

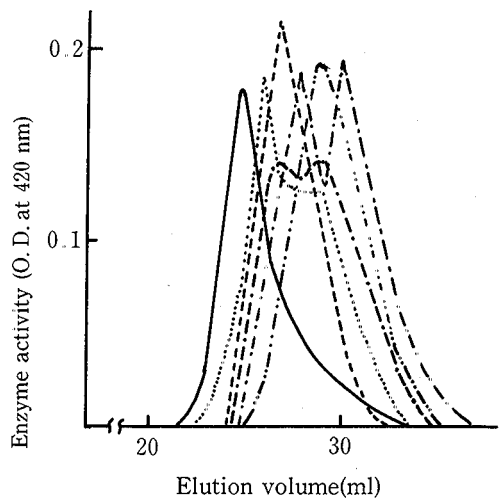


Fig. 2 HPLC of Glycosidases

Conditions for the chromatography were the same as those in Fig. 1. One-ml fractions were collected and enzyme activity was determined according to the method described in the text.

- - - - - : α-Glucosidase, - - - - - : β-Glucosidase, ——— : β-Galactosidase, - · - : α-Mannosidase, - · · - : β-Mannosidase, ····· : β-Xylosidase

を有する化合物それぞれの存在下において菌を培養した場合に誘導物質の結合様式とは異なるグリコシド結合をも分解する複数の酵素活性が同時に認められた。誘導物質無添加の場合にはいずれの酵素活性も微弱であった。このことは一種類の誘導物質によって複数の酵素が同時誘導的に生成したことを示すものである。 α -Methyl-D-galactoside はいずれの酵素の生成に対しても効果を示さなかった。また、いずれの誘導物質の存在下においても α -Galactosidase の生成は認められなかった。

2. 培養液中のタンパク質および酵素の HPLC による分析 前述の実験結果から一種類の誘導物質によって複数の酵素が同時誘導的に生成するものと推定される。しかし、誘導的に生成する一種類の酵素が複数の酵素活性を示すことも考えられる。この点を確かめるため、誘導物質を添加して培養した場合に生成するタンパク質および酵素を HPLC で分析し Fig. 1 および Fig. 2 に示す結果を得た。Fig. 1 に示すように、誘導物質として α -Methyl-D-mannoside の存在下で培養した場合には明らかに無添加の場合に比較して多種類のタンパク質の生成が認められた。他の誘導物質を用いた場合にもほぼ同様の結果が得られた。Fig. 2 に示すように、それぞれの酵素は不完全ながら相互に分離することが明らかとなった。このことは一種類の誘導物質の存在下で多種類のグリコンダーゼが同時誘導的に生成したことを示すものである。

酵素の誘導的生成については、大腸菌における β -Galactosidase の Lactose や Isopropyl- β -thio-D-galactoside などのようなその酵素の基質または、その構造類似物質による誘導的生成についてよく知られている。この現象についての一連の研究から Jacob and Monnod⁽²⁾ により提唱されたオペロン説が酵素の誘導機構として一般に認められている。一般的には酵素の基質またはその構造類似物質が誘導物質として作用する。本研究で得られたような一種類の誘導物質によりその結合様式とは異なるグリコシドをも分解する酵素を複数同時誘導的に生成する現象については今までに知られておらず興味ある現象である。この現象は、リプレッサーが各種の誘導物質に対して親和性をもっており、しかもそのリプレッサーが複数の構造遺伝子群を支配していると考えればオペロン説で説明できる現象である。また、一般に自然界においては一種類の結合様式をもった多糖またはオリゴ糖が単独で存在していることはまれであり、むしろ多種類のグリコシド結合をもった多糖の混合物の状態で存在していることがほとんどである。したがって、一種類のグリコシドによって、存在が予想される他のグリコシド結合をも分解する酵素を同時誘導的に生成することは微生物が多糖を利用するための合理的な機構であるように考えられる。このような現象が微生物に一般的なものであるか、50b 菌株に特異的なものであるかどうか、またこの現象がどのような機作によるものであるかなどの問題については現在検討中である。

引用文献

- (1) 岩原章二郎, 田中正, 木口幾夫, 斉藤誠, 本誌, 39, 65 (1987). (2) Jacob, F. and Monnod, J., *J. Mol. Biol.* 3, 318 (1961).

(1987年5月27日受理)