[農化 第 40 卷, 第 4 号, p. 201~208, 1966]

Aspergillus amstelodami に関する研究 (第 6 報)

ascospore の細胞壁中の β -fructofuranosidase が
キチンと結合して存在する可能性について

矢 吹 稔 (千葉大学園芸学部農芸化学科)

昭和 40 年 11 月 5 日 受 理

Studies on *Aspergillus amstelodami*

Part VI. The Possible Role of Chitin in Binding with β -Fructofuranosidase within the Cell Walls of ascospores

By Minoru YABUKI

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Horticulture, Chiba University

The author reported previously that ascospores of *Aspergillus amstelodami*, washed once with dilute phosphate buffer solution, retained its β -fructofuranosidase activity through further washings with the buffer solution of the same concentration. In present study, it was found that the spore wall preparation, obtained from ascospores of *Asp. amstelodami* by mechanical disintegration, retained its β -fructofuranosidase activity of about 80% as compared with that of ascospores once washed with dilute buffer solution. This retained fraction of the enzyme was found to be extracted by increasing the concentration of the buffer solution used in the extraction of the enzyme. On the other hand, the spore wall preparation or chitin from crab shells was found to bind well with purified β -fructofuranosidase from ascospores. In extracting the enzyme from spore wall preparation- or chitin-enzyme complex with buffer solution of varying concentrations, the patterns of enzyme extraction were much resembled to each other. Moreover, chitin was found to bind with other proteins such as milk casein or Takadiastase, and its binding action was much influenced by pH values or concentrations of the buffer solutions used in the system. The extraction of the enzyme from spore wall preparation was also affected by pH values and concentrations of the buffer solutions used in the extraction; and the conditions favorable for enzyme extraction from spore wall preparation- or chitin-enzyme complex and unfavorable conditions for binding the protein with chitin were almost equal.

From these results it was suggested that β -fructofuranosidase in cell walls of ascospores of *Asp. amstelodami* is bound to chitin, in other words, the role of chitin in the cell walls of ascospores is not only to maintain the shape of the cell, but also to localize the periphery enzyme in the surface structure of the cell. Availability of chitin to the purification of enzyme was also presented.

(Received November 5, 1965)

緒 言

著者⁽¹⁾は前報で, *Aspergillus amstelodami* の ascospore は β -fructofuranosidase [β -D-fructofuranoside fructohydrolase, EC. 3.2.1.26] (以下インベルターゼと称する) を含み, その含有量は胞子の熟度と関連を持ち, かつ胞子の表面構造中に存在するのではないかと述べた。

Mandels⁽²⁾ は, *Myrothecium verrucaria* の胞子の,

Metzenberg⁽³⁾ は, *Neurospora crassa* の conidia のインベルターゼが細胞表層に存在すると述べている。丸山ら⁽⁴⁻⁶⁾ は, *Fusarium oxysporum* の microconidia のインベルターゼが細胞壁区分に存在し, DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーによって2つの区分に分別し, おのおのの区分は細胞壁成分であるキチンに由来すると考えられるヘキサミンを含んでいると報告している。

掘越⁽⁷⁾ は, *Asp. oryzae* の胞子細胞壁に相当量のタン

パク質の存在を認め、インペルターゼ、トレハラーゼ、 β -グルコシダーゼが細胞壁と結合していると述べている。

外村ら⁽⁸⁾は、*Asp. oryzae* の α -アミラーゼが、菌糸の細胞壁と結合して存在しているのではなかろうかと述べている。

カビの細胞壁がキチンを含むことはよく知られており、これらの事実から著者は、カビ胞子のインペルターゼが細胞壁中のキチンと結合して存在するのではないかと考え、その可能性を検討するための実験を行なったのでその結果を報告する。

実験方法

(1) *Asp. amstelodami* の ascospore のインペルターゼの調製 *Asp. amstelodami* IAM 2025 を用い、既報⁽⁹⁾のごとく ascospore を収穫したのち、Fig. 1 および Table I に示すように、ascospore のリン酸緩衝液による抽出液に含まれるインペルターゼを、硫酸分画と DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによって、約 45 倍に精製された酵素標品を得たので、これを冷蔵庫中に氷結して保存し実験に用いた。

Fig. 1. Steps in Extraction and Purification of β -Fructofuranosidase from ascospores of *Aspergillus amstelodami* IAM 2025.

TABLE I. β -FRUCTOFURANOSIDASE ACTIVITY OF ENZYME FRACTION AT EACH PURIFICATION STEP

Fraction	Total enzyme (unit)	Total protein (mg)	Specific activity	Recovery of enzyme (%)
Crude enzyme	1,168,000	712	1.6	100
1st ammonium sulfate fraction	901,000	102	8.8	86.4
2nd ammonium sulfate fraction	579,000	44	13.0	49.5
Purified enzyme	320,000	4.8	72.7	27.3

(2) カニの甲からキチンの調製 Hackman ら⁽¹⁰⁾の方法により調製した。すなわち、乾燥粉砕して 100 メッシュの篩を通ったカニの甲を 1 夜 1 l の 1 N-HCl に浸漬してカルシウムを除く。この不溶性部分を 3,000 r.p.m., 10 分の遠沈で集め、200 ml の 1 N-NaOH で沸とう水浴中で 16 時間抽出する。この不溶性部分を再び遠沈で集め、さらに 1 回同様にアルカリ処理をする。この不溶性部分を前同様遠沈で集め、2 N-HCl で酸性にして残存するカルシウムを除いたのち、セロハン袋に入れて Cl⁻ イオンの反応がなくなるまで透析する。このキチン懸濁液を冷蔵庫に入れて保存し、以後の実験に用いた。

コロイドキチンは Lingappa ら⁽¹¹⁾の方法により、アセトンで湿らせたキチンを濃塩酸で溶解したものを大量の水中に分散させ、Cl⁻ イオンの反応がなくなるまで遠沈で洗い調製し、懸濁液として実験に用いた。

(3) インペルターゼ作用の測定 前報⁽¹⁾に述べたように、内径 15 mm, 25 ml 容量の試験管に 10% ショ糖溶液 (ショ糖の純度 99.95%) 0.25 ml, McIlvaine の緩衝液 (pH 5.8) 0.25 ml, および適当に希釈した酵素溶液 0.5 ml を入れ、25°, 15 分間恒温水槽中でインキュベートしたのち還元糖定量試薬 2 ml を加えて酵素反応を停止させたのち、純水 1 ml を加えて試験管内容を 4 ml にする。酵素反応によって生成した還元糖を、百瀬ら⁽¹²⁾の 3,6-ジニトロフタル酸法により、島津ボッシュロムのスペクトロニック 20-分光光度計を用いて比色定量し、グルコースとして表わした。この条件で 1 μ g のグルコースを生成する酵素量を 1 単位とし、タンパク質 1 μ g 当りの酵素単位を比活性とした。

(4) タンパク質の定量 Lowry ら⁽¹³⁾の方法によりフェノール試薬を用い、牛血清を標準として比色定量した。

実験および実験結果

(1) 種々の ascospore 細胞壁標品, キチンおよび多糖類とインペルターゼとの結合

細胞壁の調製には収穫後保存してある intact の孢子, 沸とう 80% エタノールで 4 時間抽出した孢子, ソクスレー脂肪抽出器を用い, エチルエーテルで 6 時間抽出した孢子, または Blumenthal ら⁽¹⁴⁾ のカビ菌体のキチン定量法に準じて 10% HCl と 10% NaOH で交互に抽出後水でよく洗った孢子を材料とした。細胞の破壊には上記の材料をその重量の 10 倍量のガラス粉末と少量の水とともに Potter-Elvehjem 型のホモジナイザーで氷水中で冷却しながら 30 分処理するか, または同じく孢子の重量の 10 倍量の glass beads (Glasperlen, 0.45~0.50 mm, B. Braun Apprathbau Melsungen) とともに少量の水を加え, Braun mechanical cell homogenizer で 30 秒処理しては氷水中で冷却して, 合計 3 分間孢子の破壊を行なう。

こうして得られた孢子の homogenate を, 水でうすめ攪拌したのちデカントしてガラス粉末, glass beads を

のぞき 2,500 r. p. m. で遠沈, 水洗を 8 回くりかえして水洗液が還元糖を含まぬことを前記の 3,6-ジニトロフタル酸法でたしかめる。これを孢子細胞壁標品とし凍結保存した。後に述べるように細胞壁標品中にはインペルターゼ活性を示すものがあるので, その場合は細胞壁標品を 500 mM, pH 6.0 のリン酸緩衝液で 30 分処理して, できるだけタンパク質を除いたのち遠心分離して再び水に懸濁し, これを沸とう水中に 10 分間つけて残存酵素活性を失活させたのち 3 回水洗し実験に供した。

DEAE-セルロースは, Brown社のものを N/2 の NaOH で活性化したのちよく水洗して用い, 粉末セルロース (東洋沔紙製), でんぶん, 可溶性でんぶんはいずれも 10 mM の pH 6.0 のリン酸緩衝液でよく洗って用いた。

以上の物質を, 細胞壁標品はもとの孢子 5 mg/ml 相当量, キチン, コロイドキチンは 1 mg/ml, DEAE-セルロース, でんぶん, 可溶性でんぶんは 2 mg/ml になるようにそれぞれ 10 mM, pH 6.0 のリン酸緩衝液に懸濁する。この懸濁液 2 ml に前記精製インペルターゼを同じ緩衝液で稀釈した溶液 2 ml (140~500 単位) を加

TABLE II. BINDING OF β -FRUCTOFURANOSIDASE BY SUSPENSION OF SPORE WALL PREPARATION, CHITIN, AND SOME POLYSACCHARIDES

Material	Origin	Method for preparation	Enzyme activity	
			Suspension (unit/ml)	Supernatant (unit/ml)
Spore wall	Washed ascospores	Tissue homogenizer	78	0
Spore wall	Ethanol extracted ascospores	Tissue homogenizer	80	0
Spore wall	Ether extracted ascospores	Tissue homogenizer	78	0
Spore wall	NaOH and HCl extracted ascospores	Tissue homogenizer	88	0
Spore wall	Washed ascospores	Braun mechanical cell homogenizer	102	0
Spore wall	Ether extracted ascospores	Braun mechanical cell homogenizer	79	0
Chitin	Crab shell	HCl and NaOH treatment	102	0
Colloidal chitin	Crab shell chitin	Acetone and conc. HCl treatment	120	0
Colloidal chitin	Commercial chitin	Acetone and conc. HCl treatment	94	0
DEAE-cellulose	Brown U. S. A.		69	0
Cellulose powder	Toyo Roshi		288	280
Starch	Sweet potato		255	260
Soluble starch	Reagent		275	250

Final concentrations of suspending materials in enzyme binding systems were: spore wall preparation was the amount equivalent to 5 mg of ascospores per ml, chitin was 1 mg per ml, DEAE-cellulose was 5 mg per ml, and other polysaccharides were 2 mg per ml.

Enzyme binding system is consisted of one volume of above mentioned suspension and one volume of enzyme solution (150 to 500 units), after 30 min. standing at room temperature the enzyme activity of both suspension and supernatant was measured.

え、ときどき振りながら室温で 30 分間放置する。この懸濁液と、その $10,000\times g$, 10 分間の遠沈上清についてインペルターゼ作用を測定した結果を Table II に示す。

細胞壁標品, キチン, コロイドキチン, DEAE-セルロースの懸濁液とインペルターゼ溶液との混合物は, インペルターゼ作用を示すにもかかわらず, その遠沈上清には全くインペルターゼ活性は消失する。すなわち酵素は完全にこれらの固体と結合したものと考えられる。これに対して比較のために用いたセルロース, でんぷん等の多糖類はこの条件下ではほとんどインペルターゼと結合しなかった。

(2) ascospore またはその細胞壁標品からインペルターゼの抽出

著者⁽¹⁾は前報で, *Asp. amstelodami* の ascospore のインペルターゼは 33 mM, pH 6.0 のリン酸緩衝液で容易に抽出される区分と, この胞子をさらに同濃度の緩衝液で処理しても, もはやインペルターゼは抽出されず, カタツムリ酵素処理を行えば抽出されてくる区分とがあると報告した。今回は低濃度緩衝液でインペルターゼを抽出し, もはや同濃度の緩衝液ではインペルターゼを抽出することができない ascospore, または Braun me-

chanical cell homogenizer で調製した細胞壁標品から, 種々の濃度のリン酸緩衝液を用いてインペルターゼの抽出を試みた。

すなわち ascospore 100 mg を 20 ml の 10 mM, pH 6.0 のリン酸緩衝液とともにワーリングブレンダーで 3°, 5 分間処理し, 抽出されてくるインペルターゼを除く。

$10,000\times g$, 10 分間の遠心分離によって胞子を集め, これに 10 mM から 500 mM, pH 6.0 のリン酸緩衝液を加えて懸濁し, さらに 3°, 5 分間ワーリングブレンダーで処理したのち $10,000\times g$, 10 分間遠心分離し, その上澄液についてインペルターゼ作用を測定し, 酵素の抽出量をみた。同様の実験を胞子細胞壁標品 (胞子 100 mg 相当量) について行なった。

Fig. 2 は ascospore からのインペルターゼの抽出であるが, 緩衝液の濃度が高くなるにつれて酵素の抽出量が増加してくることが示されている。この場合, 胞子をあらかじめエーテルで抽出して, リピドを除いたものからの酵素の抽出量を示す曲線は, 胞子からのそれと全く同様であり, 300 mM の緩衝液濃度まで抽出量は直線的に増加し, 胞子とインペルターゼとの結合にリピドは関係がないことを示している。

Braun mechanical cell homogenizer によって調製し

Fig. 2. Extraction of Invertase from ascospores.

○—○ washed spores
○- - -○ defatted spores

Fig. 3. Extraction of Invertase from Cell Walls of ascospores.

○—○ washed spores
○- - -○ defatted spores

Fig. 4. Extraction of Invertase from Enzyme-chitin or Enzyme-DEAE-cellulose Complex.

○—○ chitin
○- - -○ DEAE-cellulose

Fig. 5. Extraction of Invertase from Enzyme-cell Wall Complex.

○—○ washed spores
○- - -○ defatted spores

た細胞壁標品は孢子重量の 30~40% 程度得られ、インペルターゼ活性は、もとの 10mM 緩衝液で洗った孢子の約 80% を保持していたが、それらの標品から種々の濃度の緩衝液でインペルターゼを抽出した結果を Fig. 3 に示す。この場合も 300mM の緩衝液による抽出液中に最も多く酵素が抽出されてくるが、孢子からの抽出の場合と異なって 100mM の濃度までは、ほとんどみるべき量の抽出は行なわれなかった。この場合も細胞壁標品中のリビドの有無は、酵素の抽出に影響を与えなかった。

(3) DEAE-セルロース, キチンおよび細胞壁と結合させたインペルターゼの緩衝液による抽出

精製インペルターゼの 100mM, pH 6.0 のリン酸緩衝液による稀釈液 4ml (800 単位) と同じ緩衝液に、活性化、水洗の後懸濁した DEAE-セルロース 16ml (160mg), またはキチン 16ml (64mg) とを混合し、室温に 30 分間放置したのち 10,000×g, 10 分間遠心分離する。この上澄液はまったく酵素作用を示さなかった。沈でん部分をもとの容積まで同じ緩衝液を加えて懸濁し、その 2ml ずつを遠沈管にとり、前と同条件で遠心分離し上澄液を捨てる。このキチン-インペルターゼ結合物に種々の濃度の pH 6.0 のリン酸緩衝液 2ml を加えてときどき振りまぜながら室温で 30 分間インペルターゼを抽出し、10,000×g, 10 分間遠心分離した上澄液についてインペルターゼ作用を測定した結果を Fig. 4 に示す。すなわちキチンとインペルターゼの結合物からの酵素の抽出されるようすは Fig. 3 の細胞壁自体が保有するインペルターゼの抽出のそれと極めてよく相似していた。

DEAE-セルロースとインペルターゼとの結合物からのインペルターゼの抽出の状態は、キチンの場合とはやや異なり、50mM の緩衝液濃度の部分にインペルターゼ作用の小さいピークが存在した。

実験 (1) に述べた残存酵素をできるだけ除去した細胞壁標品と精製インペルターゼとを前記同様に結合させ、再びインペルターゼを抽出した結果を Fig. 5 に示す。

この場合の酵素の抽出の状態は、Fig. 3 の細胞壁が保持する酵素の抽出、あるいは Fig. 4 のキチン-インペルターゼ結合物からの酵素の抽出の場合と全く同様の傾向を示した。実験に用いた細胞壁標品は、Blumenthal ら⁽¹⁴⁾の方法で定量した結果、約 15% のグルコサミン相当量のキチンを含んでいた。

(4) キチンとタンパク質との結合

以上の結果から、キチンはインペルターゼ酵素タンパ

ク質と結合することが明らかとなったので、さらに他のタンパク質であるミルクカゼイン、タカジアスターゼとの結合の有無について実験を行なった。

キチンはカニの甲から自製したもののほかに 350mg のキチンを 500mg のタンパク質分解酵素製品 (プロチーム, 協和醸酵 (株) 製品) とともに pH 7.0 で 37°, 4 時間消化したのち 300mM, pH 6.0 のリン酸緩衝液で残存タンパク質を抽出後純水で 3 回洗ったもの、および 350mg のキチンを 50ml の 40% NaOH で 30°, 2 時間処理したのち純水で充分に洗ったアルカリキチン等を 10mM, pH 6.0 のリン酸緩衝液に 7mg/ml になるように懸濁する。比較のために活性化した DEAE-セルロース 1mg/ml の懸濁液を調製した。これらの懸濁液 5ml にミルクカゼイン 1,160 μg/ml (pH 6.0), またはタカジアスターゼ 1,020 μg/ml (pH 6.0) 溶液 5ml を加え、室温に 30 分間放置してから、これらキチン, DEAE-セルロースとタンパク質の混合物の汙液についてタンパク質の定量を行ない、汙液中の残存タンパク質量から結合したタンパク質の量を求め Table III に示した。

TABLE III. BINDING OF PROTEIN BY SUSPENSION OF CHITIN OR DEAE-CELLULOSE

Suspending material	Amount of bound protein per mg of suspending material	
	Milk casein	Takadiastase
Chitin	136 μg	103 μg
Deproteinized chitin	139	97
Alkali chitin	117	110
DEAE-cellulose	1,114	788

Original protein solution contained 1,160 μg of milk casein or 1,020 μg of Takadiastase per ml of distilled water.

Binding experiment was undertaken as follows: 5 ml of protein solution was added by 5 ml suspension of binding material (35 mg of chitin or 5 mg of DEAE-cellulose), and stand at room temperature for 30 min. and protein content of the filtrate was determined by phenol reagent method of Lowry et al.⁽¹²⁾.

キチンは DEAE-セルロースにくらべるとそのタンパク質との結合力は弱い、明らかにインペルターゼ以外のタンパク質とも結合し、除タンパク、アルカリ処理等をキチンに加えても、タンパク質との結合にほとんど影響を与えなかった。

キチンとタンパク質との結合に緩衝液濃度と pH がどのように影響するかについて、前記同様の条件でカゼインについて実験を行なった。Table IV, Table V に示されるように、キチンとタンパク質との結合はその混合

TABLE IV. INFLUENCE OF CONCENTRATION OF BUFFER SOLUTION ON THE PROTEIN BINDING ACTIVITY OF CHITIN

Concentration of buffer solution	μg bound protein/ mg of chitin
5 mM	149
100	138
200	127
300	100
400	89
500	54

Milk casein was used as protein and experimental conditions were the same as described in Table III.

TABLE V. INFLUENCE OF pH VALUE OF BUFFER SOLUTION ON THE PROTEIN BINDING ACTIVITY OF CHITIN

pH value of 5 mM phosphate buffer solution	μg of bound protein/ mg of chitin
4.3	156
6.0	165
8.0	67
8.9	35

Experimental conditions were the same as described in Table III.

Fig. 6. Extraction of Invertase by 300 mM Phosphate Buffer at Varying pH Values.

物の緩衝液濃度が低いほど、またその pH が低いほど強いことが明らかとなった。すなわち、一般にタンパク質がイオン交換体と結合する場合の条件⁽¹⁶⁾とよく相似していることがわかった。さらに前記キチン-インペルターゼ結合物、ascospore から 300 mM のリン酸緩衝液で種々の pH でインペルターゼの抽出を試みた Fig. 6 の結果にみられるように、インペルターゼの抽出は pH 8 で最も大きく、pH 5 付近では著しく小さくなり、Table IV の結果である pH 8 付近でキチンとタンパク質との結合が小さくなることと一致した傾向を示している。

(5) キチンによる ascospore インペルターゼの精製
以上述べたように、キチンは DEAE-セルロースにくらべるとそのタンパク質との結合力は弱い、その結合は pH とリン酸塩濃度に大きく影響されることは、キチンがイオン交換体のような行動をするのではないかと考えられるので、陰イオン交換体としての滴定曲線を作り、DEAE-セルロースのそれと比較した。

DEAE-セルロース、またはキチン懸濁液をそれぞれ乾燥重量 1 g 相当量を取り N/2 NaOH 50 ml を加えよく混ぜたのち吸引ろ過し、濾液が中性となるまで水洗する。ついでこの交換体を少量の水でフラスコに移し 1 N NaCl 25 ml を加える。これをスターラーでかきまぜながら N/10 HCl で pH 3 になるまでガラス電極 pH メーターを用いて滴定した結果を Fig. 7 に示す。キチンは DEAE-セルロースにくらべると、そのイオン交換量は約 3 分の 1 程度であるが、イオン交換能力はあるものと考えられた。そこでキチンに ascospore インペルターゼを結合させたのち、溶出に用いるリン酸緩衝液の濃度を段階的に変化させて batchwise extraction により酵素の精製を試みた。

Fig. 1 に示した ascospore インペルターゼ精製過程

Fig. 7. Titration Curves of One gram (dry weight) of Chitin or DEAE-cellulose Against N/10 HCl Solution.

Fig. 8. Batchwise Extraction of Invertase from Enzyme-chitin Complex by Phosphate Buffer at pH 6.0.

の第 2 硫安分画の部分 10 ml (14,500 単位, 比活性 15.3) をキチン懸濁液 10 ml (18.4 mg キチン) に加えてキチンとインペルターゼとを結合させる。この結合物を 10 mM, pH 6.0 のリン酸緩衝液で 2 回, $10,000 \times g$, 10 分間の遠心分離によって洗ったのち 50 mM から 500 mM の pH 6.0 のリン酸緩衝液 10 ml を加えて 10 分間抽出後, 遠心分離しこの操作をくりかえし, 得られた抽出液中のインペルターゼ活性, 比活性を測定した。Fig. 8 に示すように, 400 mM の緩衝液濃度で抽出される酵素区分は比活性 72.1 を示し, DEAE-セルロースを用いて得られた比活性 72.7 と全く同じものが得られ, 酵素の精製に対してもキチンが有効であることが示された。

考 察

Bartnicki-Garcia ら⁽¹⁶⁾によれば, *Mucor rouxii* の細胞壁は約 40% がキトサンとキチンから構成されているといわれ, 堀越⁽¹⁷⁾によれば, *Asp. oryzae* の菌糸細胞壁の中層はキチン様物質の微結晶であるとされ, 従来一般に糸状菌の細胞壁はキチンを含むとされ, *Asp. oryzae* の孢子細胞壁⁽⁷⁾もその菌糸細胞壁と構造上類似していると考えられている。著者も⁽¹⁾, *Asp. amstelodami* の

ascospore が約 8% のグルコサミンを含むことを報告し, この実験に用いた ascospore 細胞壁標品も 15% のグルコサミンを加水分解の結果生じた。緒論で述べたように, カビ孢子に含まれるインペルターゼは細胞壁に存在しているといわれており, 著者はインペルターゼは細胞壁中のキチンと結合している可能性について検討した。

著者⁽¹⁾は, *Asp. amstelodami* の ascospore を低濃度リン酸緩衝液で抽出した場合に, この孢子をさらに同濃度緩衝液で抽出してもインペルターゼは溶出されないと述べた。丸山⁽⁴⁾は *Fusarium oxysporum* の microconidia のインペルターゼは抽出が困難であると述べており, Metzenberg⁽³⁾ は *Neurospora crassa* の conidia のインペルターゼは, 全活性の 13% 以上の抽出は困難であったと述べている。

しかし著者のこの実験結果は, *Asp. amstelodami* の ascospore およびその細胞壁標品は, 10 mM リン酸緩衝液で充分洗浄したのちにも相当量のインペルターゼが残存するが, これをさらに濃度の高い 300 mM の緩衝液を用いれば, 抽出が可能であることを示している。

機械的破壊によって得られた ascospore 細胞壁区分は, 材料となった 1 回 10 mM 緩衝液で抽出した ascospore の示すインペルターゼ作用の約 80% の酵素活性を示したが, この標品から, できるだけタンパク質を除いたもの, あるいはキチン定量法⁽¹⁴⁾に準じて, 酸, アルカリ処理によって得られた細胞壁, キチン, コロイドキチン等は ascospore から抽出精製したインペルターゼときわめてよく結合することも明らかとなり, 同時にこの結合させたインペルターゼの再抽出条件と前記細胞壁に元来含まれているインペルターゼの抽出条件とは全く類似していることが明らかとなった。

Ascospore をエチルエーテルで抽出し lipid を除いたものについてもインペルターゼの抽出条件を検討したが, lipid の有無は抽出条件に影響せず, インペルターゼの細胞内所在に lipid は関係しないものと考えられる。

またキチンはインペルターゼのみでなく, ミルクカゼインやタカジアスターゼ等のタンパク質ともよく結合し, DEAE-セルロースにくらべるとその結合力は小さいが, その結合にはそれが行なわれる系の pH, および緩衝液濃度に大きく左右され, pH 8.0, 濃度 300 mM 以上になると結合が弱められ, この条件は ascospore の細胞壁標品からインペルターゼがよく抽出されてくる条件と一致する。

キチンは DEAE-セルロースよりもそのイオン交換容量は小さい実験結果が得られたが、キチンの N-アセチルアミノ基がタンパク質との結合に関与しているのではないと思われる。

Gilmour⁽¹⁸⁾ は Hackman の報告を引用し、昆虫ではキチンは常にタンパク質と密接にあいともなっており、新鮮な外皮におけるキチン-タンパク質の結合は、さほど強いものではなく、穏和な化学的処理、たとえば pH 9.0 にすることによって切ることができると述べている。

外村⁽⁸⁾ は, *Asp. oryzae* の α -アミラーゼと細胞壁との結合には、細胞壁中のアミノ基に関与しているのではなかろうかと述べている。

以上のことから、キチンはカビの細胞壁の形態を保持するだけの役割のみでなく、インペルターゼ等のいわゆる細胞周辺に存在する酵素と結合して、細胞周辺に局在せしめる役割をも持つものであろうと推論した。

さらにキチンを酵素の精製に利用し得る可能性もあることが明らかとなった。

要 約

Asp. amstelodami の ascospore の細胞壁標品は 10 mM, pH 6.0 のリン酸緩衝液で洗浄した ascospore の示すインペルターゼ活性の約 80% の酵素活性を示した。

この細胞壁標品を pH 8, 300 mM のリン酸緩衝液で抽出すると、結合しているインペルターゼの溶出が起った。

この細胞壁標品から、できるだけタンパク質を除いたもの、あるいはキチンは ascospore から抽出精製したインペルターゼと低濃度緩衝液中でよく結合する。この結合させたインペルターゼの再抽出の条件と細胞壁自体の保持するインペルターゼの抽出条件はよく一致し、抽出に用いる緩衝液の pH と濃度に大きく影響される。

またキチンはインペルターゼのみならず、ミルクカゼイン、タカジャスターゼのようなタンパク質ともよく結合することが示された。

以上のことから、ascospore のインペルターゼは、細胞壁区分にキチンと結合して存在するのであろうと考察

した。

なお、キチンが酵素の精製にも利用され得ることを示した。

終りに御指導いただきました本学部高野一郎助教授、工業技術院発酵研究所岩本博道博士に厚く感謝し、有益な助言と細胞破壊に御便宜を与えられた同所外村健三博士に深謝します。

本報告の概要は、昭和 40 年 10 月、農芸化学会関東支部大会で講演した。

- (1) 矢吹 稔：本誌, **39**, 138 (1965).
- (2) G. R. Mandels : *J. Bacteriol.*, **71**, 684 (1956).
- (3) R. L. Metzenberg : *Biochim. Biophys. Acta*, **77**, 455 (1963).
- (4) 丸山芳治, 小野寺一清, 瀬戸治男, 舟橋三郎：第 15 回酵素化学シンポジウム講演集, p. 157 (1963).
- (5) 丸山芳治, 小野寺一清, 舟橋三郎：第 16 回酵素化学シンポジウム講演集, p. 191 (1964).
- (6) 丸山芳治, 小野寺一清, 舟橋三郎：昭和 40 年日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 15 (1965).
- (7) 堀越弘毅：同上, p. 209 (1965).
- (8) K. Tonomura, F. Futai, O. Tanabe : *Biochim. Biophys. Acta*, **78**, 802 (1963).
- (9) 矢吹 稔：本誌, **38**, 407 (1964).
- (10) R. H. Hackman, M. Goldberg : *Anal. Biochem.*, **8**, 325 (1964).
- (11) Y. Lingappa, J. L. Lockwood : *Phytopathol.*, **52**, 317 (1962).
- (12) 百瀬 勉, 向井良子, 河辺節子, 鈴木順子, 山本恭子：分析化学, **11**, 956 (1962).
- (13) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- (14) H. J. Blumenthal, S. Roseman : *J. Bacteriol.*, **74**, 222 (1957).
- (15) 赤堀四郎編：酵素研究法, 第 4 巻, p. 61 (1961).
- (16) S. Bartnicki-Garcia, W. J. Nickerson : *Biochim. Biophys. Acta*, **58**, 102 (1962).
- (17) 堀越弘毅, 有馬 啓：本誌, **39**, 18 (1965).
- (18) D. Gilmour : *Biochemistry of Insects* (伊藤智夫訳：昆虫生化学), p. 190 (1961).