微生物の生産する糸状菌細胞壁溶解酵素 に関する研究[†]

富 永 嘉 男

(大阪市立工業研究所)

一般に、微生物の細胞は、それぞれの微生物に固有でしかも非常に強固な構造体である細胞壁によって覆われており、これが個々の微生物に特徴的な形態を保持させるとともに、浸透圧など外部の環境の急激な変化によって菌体が破壊されるのを防ぐ役割を果たしている。しかし、ある種の微生物が他の微生物の攻撃によって溶解したり、あるいは微生物がその生育を停止した後に起る自己消化などの現象は古くから観察されており、それがまず細胞壁の溶解にはじまることもしばしば記録されてきた。この細胞壁を分解して菌体を溶解する作用をもつ酵素を微生物細胞壁溶解酵素または溶菌酵素と総称している。

1922 年、Fleming は細菌の細胞壁を溶解する物質が自然界に広く分布していることを見出し、これに「リゾチーム」という名称を与えた⁽¹⁾。また、これと時を同じくして、Giaja はカタツムリの消化液が糸状菌や酵母などの真菌類の細胞壁を溶解することを報告した⁽²⁾が、これら2つの研究が端緒となり、これまでに微生物細胞壁溶解酵素に関する多くの成果が報告された。本稿では、それらのうち筆者の行っている、Zygomycetes に属する Mucorales 目糸状菌の細胞壁を溶解する酵素の研究を中心に、主な微生物由来の糸状菌細胞壁溶解酵素についてその概要を紹介する。

I. 糸状菌の細胞壁組成と細胞壁溶解酵素

いわゆる酵母や糸状菌という名称は、その形態的な特徴に由来する便宜的なものであって、分類学的にはいずれも真菌類 (Eumycetes) に含まれる巨大な微生物群をさしている。これらの細胞壁の組成や構造は非常に多様

であって、種類によって異なることはもとより、同一菌株であっても培養条件や生育段階などによっても異なることが知られており、まだ不明な点も多い。しかし、糸状菌の細胞壁については、主としてグルカン、キチン、キトサンなどの多糖類と、たん白質、脂質、無機塩類などの組成から構成されていることがほぼ明らかになっている (表 I)。したがって、糸状菌細胞壁溶解酵素とは、これらの構成成分のいずれかを分解して細胞壁を崩壊させる作用をもつ酵素群の総称であるといえる。表 II に、これまでの報告をもとにして糸状菌細胞壁溶解酵素と主な溶解の対象菌との関係をまとめてみたが、一般には単一の酵素が関与するよりは、これらの酵素のいくつかが互いに有機的な関連性をもって細胞壁を溶解する場合が多い。また、細胞壁溶解酵素は溶解の対象菌の細胞壁の主要構造を構成する多糖類によって、Ascomycetes や不完全菌に属する糸状菌に作用するものと、Zygomycetes に属する糸状菌の細胞壁を溶解するものとの2つに大きく分類できる。

II. Ascomycetes および不完全菌に属する糸状菌の細胞壁溶解酵素

Ascomycetes や不完全菌に属する糸状菌の細胞壁は、その主要構造がグルカンとキチンから構成されている⁽⁷⁾ので、これらの溶解には主としてグルカナーゼとキチナーゼが関与する。Horikoshi らは *Bacillus circulans* の生産する β -1,3-グルカナーゼに *Streptomyces* のキチナーゼを合わせて作用させると、*Aspergillus oryzae* の細胞壁が速やかに、かつ完全に溶解されることを認めた⁽⁸⁻¹⁰⁾。これが微生物起源の糸状菌細胞壁溶解酵素の研究の草わけであり、以後グルカナーゼ-キチナーゼ系の溶解酵素が糸状菌細胞壁溶解酵素の中心となり多くの研究が行われてきた。たとえば、Skujins らは *Streptomyces* の一菌株が *Aspergillus oryzae* や *Fusarium*

[†] Studies on Filamentous Fungi Lytic Enzymes Produced by Microorganisms.
Yoshio TOMINAGA (The Osaka Municipal Technical Research Institute, Osaka 530)

表 I. 糸状菌の細胞壁組成

	<i>Penicillium chrisogenum</i> ⁽³⁾	<i>Penicillium notatum</i> ⁽⁴⁾	<i>Aspergillus niger</i> ⁽⁵⁾	<i>Mucor rouxii</i> ⁽⁶⁾
灰 分		4.0	0.1~0.8	2.0
中 性 糖	55.2	51.0	73~83	8.7
グルコース	36.0	43.0	64	—
ガラクトース	11.0	7.0	9	1.6
マンノース	4.0	1.0	4	1.6
フコース	—	—	—	3.8
ヘキサミン	20.1	18.5	9.1~13.1	44.5
脂 質		1~2	1.2~7.0	2.0
リン酸塩(H ₂ PO ₄)		1.8	0.05~0.15	23.3
たん白質		8.9	0.45~2.5	6.3

組 成 (%)

表 II. 細胞壁溶解酵素と溶解される糸状菌

	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Mucor</i>	<i>Rhizopus</i>
β-1,3-グルカナーゼ	++	++	—	—
プロテアーゼ	+	+	—	+
キチナーゼ	+	+	+	+
キトサナーゼ	—	—	++	++
β-1,3-グルカナーゼ +プロテアーゼ	+++	+++	—	+
β-1,3-グルカナーゼ +キチナーゼ	+++	+++	+	+
キトサナーゼ+キチナーゼ +プロテアーゼ	+	+	+++	+++

solani の細胞壁を溶解する酵素を生産し、この酵素標品中に、β-1,3-グルカナーゼ活性とキチナーゼ活性とが含まれていることを認めている⁽¹¹⁾。また、Tanaka らも *Bacillus circulans* WL-12 を *Piricularia oryzae* の細胞壁を炭素源として培養すると、この菌が *Piricularia oryzae* をはじめ *Aspergillus oryzae* や *Neurospora crassa* などの細胞壁溶解酵素を生産することを見出した。この粗酵素標品から β-1,3-グルカナーゼ、キチナーゼおよび β-1,6-グルカナーゼを分離し、β-1,3-グルカナーゼとキチナーゼが共存した場合に最も溶解力の強いことを認めた⁽¹²⁾。その他、グルカナーゼ-キチナーゼ系の糸状菌細胞壁溶解酵素生産菌としては、*Brevibacterium lyticum*⁽¹³⁾ や *Trichoderma viride*⁽¹⁴⁾ などが報告されている。

また、*Streptomyces albus*⁽¹⁵⁾、*Coprinus radians*⁽¹⁶⁾ あるいは *Micropolyspora* sp.^(17~19) などの生産する溶解酵素のように、β-1,3-グルカナーゼ活性とプロテアーゼ活性の協奏作用によって糸状菌の細胞壁溶解を遂行するという報告もいくつかある。

III. Zygomycetes に属する糸状菌の細胞壁溶解酵素

Zygomycetes に属する糸状菌は従来のグルカナーゼ系の酵素活性を主体とする真菌類細胞壁溶解酵素の作用をうけないだけでなく、現在市販されている多くの防カビ剤に対しても強い抵抗性を示すなど顕著な特徴をもっている。これはこれらの菌の細胞壁を構成する主要な多糖類がキトサンとキチンである⁽⁷⁾という他の真菌類のそれらとは異なった組成と構造をもつことに起因しているものと考えられる。キトサンはグルコサミンが β-1,4-結合した多糖類であるが、*Phycomyces blaksleeianus*⁽²⁰⁾ の菌糸中に見出されて以来、*Mucor*⁽⁶⁾ や *Rhizopus*^(21,22) の細胞壁にも多量に含まれていることが報告された。

筆者らは真菌類細胞壁溶解酵素の生産菌を検索中、Zygomycetes に属する Mucorales 目糸状菌を強力に溶解する酵素を分泌する一細菌を分離した。形態学的ならびに生理学的性質を検討した結果、本菌が *Bacillus* に属するものと同定し、仮に *Bacillus* R-4 と命名した⁽²³⁾。その当時、Zygomycetes 糸状菌を溶解する酵素の研究はきわめて少なく、わずかに *Streptomyces* に属する一

表Ⅲ. *Bacillus* R-4 の生産する細胞壁溶解酵素の糸状菌に対する溶菌スペクトル

<i>Rhizopus delemar</i>	++++ ^a	<i>Aspergillus candidus</i> Link	+
" <i>javanicus</i>	++++	" <i>niger</i> van Tieghem	—
" <i>nigricans</i> Ehrenberg	++++	" <i>niger</i> sp.	—
" <i>acidus</i> Yamamoto	++++	" <i>oryzae</i> sake	±
" <i>peka</i> II Takeda	++++	" <i>flavus</i> Link	±
" <i>niveus</i>	++++	<i>Neurospora crassa</i>	+
" <i>hangchow</i>	++++	" <i>tetrasperma</i>	+
" <i>formosaensis</i>	++	<i>Chaetomium globosum</i>	+++
" <i>chinensis</i>	±	<i>Trichoderma viride</i>	+++
<i>Mucor mucedo</i>	+++	<i>Cladosporium herbarum</i>	+
" <i>javanicus</i>	+++	<i>Dematium nigrum</i>	—
<i>Penicillium citrinum</i>	+	<i>Fusarium solani</i>	—
" <i>glaucum</i>	+	<i>Alternaria longipes</i>	±
" <i>notatum</i> Westling	+	<i>Aureobasidium pullulans</i>	±
" <i>cyclopium</i>	—	<i>Verticillium glaucum</i>	+++

^a —, 0~10%; ±, 11~30%; +, 31~50%; ++, 51~70%; +++, 71~90%; +++++, 91~100%
 なお, % は反応1時間後の細胞壁懸濁液の 660 nm における濁度の減少率を示す。

菌株が *Mucor ramannianus* の細胞壁を溶解する酵素を生産するという Jones らの報告があったにすぎなかった⁽²⁴⁾。しかし彼らの報告ではこの細胞壁溶解酵素の本体がどのようなカテゴリーに属するものであるのかはもちろんのこと、その酵素的性質についても全く不明であった。筆者らは主として *Rhizopus delemar* を溶解の対象菌として選び、研究を進めた結果、Zygomycetes 糸状菌の細胞壁溶解にはキトサナーゼを主体として、さらにプロテアーゼとキチナーゼが関与していることを明らかにした。その研究成果を中心に Zygomycetes 糸状菌の細胞壁溶解酵素について少し詳細に述べる。

1. *Bacillus* R-4 の生産する細胞壁溶解酵素

Bacillus R-4 の酵素生産に及ぼす培地組成の影響を検討したところ、本菌の酵素生産は炭素源よりは窒素源に影響され、しかもその濃度に依存していることが明らかになった。すなわち、一定の濃度範囲（ペプトンで7%以下）で培地の窒素源の濃度に比例して酵素生産量の増加が認められた。また、溶解の対象菌である *Rhizopus delemar* の菌体の添加は酵素生産を全く促進しなかった⁽²⁵⁾。このことは、*Bacillus* R-4 の溶解酵素の生産が非誘導的なものであることを裏付けるものである。一方、細胞壁溶解酵素生産菌の多くは酵素生産に際して培地に溶解の対象菌の細胞壁またはその構成成分の添加を必要とする。たとえば、Kobayashi らは *Bacillus circulans* WL-12 が培地に炭素源として加えた細胞壁に対応する溶解酵素を誘導的に生産することを認めている。この溶解酵素中には作用様式の異なる数種類の β-1,3-

グルカナーゼが含まれており、それらの生産量が添加した細胞壁の種類によって変動することがその要因であろうと推定している⁽²⁵⁾。このように微生物起源の細胞壁溶解酵素の多くが誘導的に生産されるという点を考慮したとき、*Bacillus* R-4 の酵素生産機構は顕著な特徴をもっているといえることができる。

次に、*Bacillus* R-4 の培養濾液の硫酸塩析物(粗酵素)を用い、各種の糸状菌について溶菌スペクトルを調べたところ、表Ⅲに示すように、本酵素はとくに *Rhizopus* や *Mucor* など Zygomycetes 糸状菌の細胞壁をよく溶解し、さらに *Trichoderma* や *Piricularia* など植物病原菌なども溶解した⁽²³⁾。

粗酵素標品について、従来、真菌類細胞壁溶解酵素として報告されているものを中心に各種の酵素活性を調べた結果、キトサナーゼ活性とプロテアーゼ活性のみが認められた。そこで *Rhizopus* 細胞壁溶解活性、キトサナーゼ活性およびプロテアーゼ活性を指標としてこの酵素を精製した。粗酵素標品は SP-Sephadex を用いたカラムクロマトグラフィーによって、それぞれ細胞壁溶解活性をもつ2つの画分 (Fraction I と II) に分離され、Fraction I にはプロテアーゼ活性が、また Fraction II にはキトサナーゼ活性が認められた (図1)。続いて、Sephadex G-75 および G-100 を用いてゲル濾過を行い、両 Fraction を超遠心的にもディスク電気泳動的にも単一な状態にまで精製した。この全精製過程において、Fraction I ではプロテアーゼ活性が、また Fraction II ではキトサナーゼ活性が細胞壁溶解活性と全く同じ挙動

図 1. *Bacillus* R-4 の生産する細胞壁溶解酵素の SP-Sephadex によるカラムクロマトグラム。

○—○, 溶解活性; ●—●, キトサナーゼ活性; □—□, プロテアーゼ活性; ———, A 280; ----, 食塩濃度。

を示すことから、両 Fraction はそれぞれ細胞壁溶解活性をもつプロテアーゼとキトサナーゼであることが明らかにした^(26,27)。

このうち、プロテアーゼは分子量が 19,000 で、pH 7.6 付近に作用最適 pH をもち、EDTA によって強く阻害された。また、活性発現に Zn^{2+} が必要であり、その安定化に Ca^{2+} が寄与しているなど中性プロテアーゼとしての典型的な性質をそなえていた⁽²⁸⁾。さらに粗酵素標品による溶菌スペクトルのうち、植物病原菌の溶解にはこのプロテアーゼのみが関与しており、一方、*Mucor* の細胞壁には全く作用しなかった。

糸状菌の細胞壁にたん白質が存在するかどうか、また存在するとすればその含量はどの程度であるのかという点に関しては、細胞壁区分に対する考え方の相違や、そのことからくる細胞壁の調製法の違いなどにより研究者によってその見解が異なり、古くより議論されてきた。しかし、酵母の細胞壁に多糖類-たん白質複合体という形でたん白質の存在することが確かめられてから^(29,30)は糸状菌の細胞壁にも、その構成成分の一つとしてたん白質の存在が認められるようになった。また、古屋ら⁽¹⁵⁾、川合⁽¹⁶⁾および岡崎ら⁽¹⁷⁻¹⁹⁾の研究をはじめとして、プロテアーゼが β -1,3-グルカナーゼと協同して糸状菌の細胞壁を溶解するという報告も多数にのぼっている。しかし、それらはいずれも β -1,3-グルカナーゼが溶解作用の主体であって、プロテアーゼは補助的な役割を果たしているにすぎないといわれてきた。さらに、これらのプロテアーゼの溶解の対象菌は Ascomycetes や不完全菌

に属するものに限られており、Zygomycetes 糸状菌を溶解することはできない。筆者らも数種類の代表的な微生物起源のプロテアーゼについて *Rhizopus* の細胞壁溶解力を検討してみたが、いずれも溶解活性のないことを認めている⁽²⁶⁾。したがって、*Bacillus* R-4 の生産するプロテアーゼが単独で *Rhizopus* の細胞壁をある程度溶解できるという事実は、このプロテアーゼが他のプロテアーゼにはない作用特異性をもつものであり、また同時に、*Rhizopus* の細胞壁のたん白質の構造や存在状態が他の糸状菌のそれらとは異なっていることを示唆しているものと考えられる。

一方、キトサナーゼについてみると、これまでキトサンを加水分解する酵素の存在はもとより、このような活性をもつ酵素が糸状菌の細胞壁溶解に関与するという報告はほとんどなかった。しかし、筆者らが *Rhizopus* の細胞壁溶解にキトサナーゼが関与しているという事実を見出したのと相前後して、キトサナーゼに関する報告がそれぞれ独立に数報発表された。

Ramirez らは、先に Jones らが分離した *Streptomyces* sp.⁽²⁴⁾の培養濾液が Zygomycetes 糸状菌の細胞壁のみを溶解し、さらにこれがキトサンをも加水分解することを報告した⁽³¹⁾。また、Monaghan らは *Rhizopus rhizopodiformis* などの病原性糸状菌による疾病の治療薬に細胞壁溶解酵素を利用することを目的として、上記の菌体を炭素源として検索を行い、細菌および真菌類など約 30 種の溶解酵素生産菌を得た。そして、これらの菌の生産する酵素中のキトサナーゼ活性と *Rhizopus*

rhizopodiformis 溶解活性との間に関連性のあることを指摘した⁽³²⁾. Hedges らも *Myxobacter* に属する一細菌の生産する *Rhizopus* 細胞壁溶解酵素を精製し、細胞壁の溶解にキトサナーゼ活性が関与していることを明らかにした⁽³³⁾.

ところで、*Bacillus* R-4 の生産するキトサナーゼはその分子量が約 31,000 で、モノヨード酢酸などの SH 阻害剤で完全に不活性化されるいわゆる SH 酵素であった。また、pH 5.6 付近でキトサンやグルコシルキトサンを最もよく分解するが、キチンやグルカン類には全く作用せず、きわめて限られた基質特異性をもっていた。さらに、このキトサナーゼはキトサンを比較的大きな重合度単位で不規則に加水分解したが、細胞壁のような多成分の高分子物質からなる構造体は、その一部分が分解されることによって、構造体全体の崩壊が引き起される場合が多く、このキトサナーゼが endo 型の分解様式を

もつことは細胞壁を溶解するのに適しているものと考えられる⁽²⁷⁾. また、筆者らはこのキトサナーゼを用いて *Mucor mucedo* のスフェロプラストを調製することができたが、これは本酵素が生菌体の細胞壁にも作用することを立証するものである⁽³⁴⁾ (図 2).

2. *Streptomyces orientalis* の生産する細胞壁溶解酵素

Bacillus R-4 の生産するプロテアーゼとキトサナーゼを同時に *Rhizopus* の細胞壁に作用させた場合、溶解は約 80% で停止し、反応液中に繊維状の残渣が残る (図 3). この残渣を酸加水分解し構成成分を調べたところ、主として *N*-アセチルグルコサミンが検出されたことから、この繊維状物質を構成する多糖類はキチンであろうと推定した⁽²²⁾. そこで、酵素作用のみで *Rhizopus* の細胞壁を完全に溶解することを企図して、この目的にかなうキチナーゼ生産菌を検索した。その結果、*Strepto-*

図 2. キトサナーゼによる *Mucor mucedo* のスフェロプラスト

(A) 無処理菌体, (B) キトサナーゼ処理菌体 (25% シュ糖溶液), (C) キトサナーゼ処理菌体 (12.5% シュ糖溶液), (D) キトサナーゼ処理菌体 (6.25% シュ糖溶液).

図 3. *Rhizopus* 細胞壁中の繊維状物質の走査型電子顕微鏡写真

myces orientalis が *Rhizopus* の細胞壁溶解活性をもつ強力なキチナーゼを生産することを見出した。本菌の培養濾液中には、それぞれ細胞壁溶解活性をもつ2種類のキチナーゼ (I と II) が含まれており、SP-Sephadex および Sephadex G-100 を用いたカラムクロマトグラフィーで両者を超遠心的に単一な状態にまで精製した⁽³⁵⁾。

キチナーゼ I および II の酵素的性質は、分子量、等電点および耐熱性がわずかに異なる以外、きわめて類似したものであった⁽³⁵⁾。また、上記の繊維状残渣はいずれのキチナーゼによっても完全に分解され *N*-アセチルグルコサミンが遊離されることから、これがキチンから構成されていることを確認した⁽²²⁾。

Oomycetes に属する *Phytophthora cinnamoni*⁽³⁶⁾ や酵母の一種である *Schizosaccharomyces*⁽²⁰⁾ などの少数のものを除けば、大部分の真菌類の細胞壁にはキチンが含まれており、しかもそれが細胞壁の骨格を形成している場合が多い。とくに、*Aspergillus oryzae*⁽³⁾ や *Allomyces macrogynus*⁽³⁷⁾ のように、細胞壁重量の 50% あるいはそれ以上のキチンを含んでいるものもある。したがって、糸状菌の細胞壁の溶解にキチナーゼが関与しているという報告は、Horikoshi らの報告をはじめ多数にのぼっている⁽⁹⁾。たとえば、Troy らは *Streptomyces* の生産するキチナーゼによって *Penicillium chrysogenum* の細胞壁の 73% が可溶化したと報告している⁽³⁸⁾ し、また Skujins らも *Streptomyces* の一菌株が生産するキチナーゼと β -1,3-グルカナーゼによって *Fusarium solani* の細胞壁の 94% が可溶化したと報告している⁽¹¹⁾。

しかしながら、Zygomycetes 糸状菌の細胞壁は主としてキチン-キトサンから構成されているにもかかわらず、これらの細胞壁をキチナーゼが溶解したという報告は認められない。高山らは、キチナーゼ活性を含む細胞壁溶解酵素が多く酵母や糸状菌を溶解するにもかかわらず、

Zygomycetes 糸状菌の細胞壁を溶解しなかったと報告している⁽¹³⁾。また、Lamirez-Leon ら⁽³¹⁾ や Monaghan ら⁽³²⁾ も *Rhizopus* の細胞壁の溶解はキトサナーゼのみによって遂行されており、キチナーゼには溶解活性がないものと推定している。このような事実からみて、*Streptomyces orientalis* の生産する2種類のキチナーゼは *Rhizopus* の細胞壁を溶解するという点で、従来のキチナーゼとは異なる特徴的な作用特異性をもつものであるといえる。

3. 細胞壁溶解酵素による *Rhizopus* の細胞壁構造の検討

これまでに糸状菌の細胞壁構造について多くの研究が行われ、いくつかの貴重な知見が得られている。掘越らは、*Aspergillus oryzae* の細胞壁が、 β -1,3-グルカンからなる外層と、繊維状のキチンからなる中層と、その詳細が不明である内層の3層から構成されていると報告している⁽³⁹⁾。Hamilton らは、*Penicillium chrysogenum* の細胞壁が、骨格構造としてキチン層をもち、これと化学的に異なる多糖類からなる層との少なくとも2層以上の層構造をもっていることを示唆している⁽⁸⁾。また、*Neurospora crassa* の細胞壁については、ペプチド-グルコガラクトサミン複合体からなる表層部の下に β -1,3-グルカンとキチンの各層が存在するという Mahadevan らの報告⁽⁴⁰⁾ のほかに、Hunsley らは、この細胞壁が、外層から順に β -グルカン層、たん白質あるいはたん白質-多糖類複合体層およびキチン層からなると報告している⁽⁴¹⁾。これらの報告を総合すると、Ascomycetes や不完全菌に属する糸状菌の細胞壁は、多糖類やたん白質あるいはこれらの複合体が層を形成して、骨格

図 4 細胞壁溶解酵素による *Rhizopus* 細胞壁の溶解 ●---●, プロテアーゼ; ○---○, キチナーゼ; ●—●, キトサナーゼ; ○—○, プロテアーゼ, キチナーゼおよびキトサナーゼ。

図 5. プロテアーゼとキトサナーゼによって溶解された *Rhizopus* 細胞壁の走査型電子顕微鏡写真
 A-1, A-2, 対照; B-1, B-2, プロテアーゼによって溶解された細胞壁; C-1, C-2, キトサナーゼによって溶解された細胞壁; D-1, D-2, プロテアーゼとキトサナーゼによって溶解された細胞壁.

構造である繊維状のキチンを覆うような構造をもっているものと考えられる。

一方、Zygomycetes に属する糸状菌の細胞壁構造については、Bartnikv-Garcia らの研究を除けばほとんどない。彼らは *Mucor rouxii* の酵母様菌体と糸状菌体の細胞壁構造を検討し、酵母様菌体の細胞壁が厚さ 0.5 ~ 1 μm の 2 層構造からなることを電子顕微鏡によって観察するとともに、この細胞壁の酸分解残渣として、網目構造をもつ繊維状キチンを得ている。また、糸状菌体の細胞壁は微細な網目構造からなる一様な厚さの単層構造であると報告している⁽⁹⁾。

筆者らは、*Rhizopus* 細胞壁溶解活性をもつ *Bacillus* R-4 のプロテアーゼとキトサナーゼおよび *Streptomyces orientalis* のキチナーゼの細胞壁溶解機構を調べ、さらにその溶解状態を走査型電子顕微鏡によって観察することにより、*Rhizopus* の細胞壁構造を検討した⁽²²⁾。

まず、プロテアーゼ、キトサナーゼおよびキチナーゼをそれぞれ単独で *Rhizopus* の細胞壁に作用させ、反応液の濁度の減少によって溶解力を調べたところ、いずれも反応の初期に溶解が急速に進み、最終的に濁度の減少率はプロテアーゼを作用させた場合約 30%、キチナーゼの場合約 50%、またキトサナーゼの場合には約 60% に達した。また、これら 3 種類の酵素を同時に作用させると、細胞壁はほぼ完全に溶解された (図 4)。次に、プロテアーゼとキトサナーゼを細胞壁に作用させ、その溶解状態を走査型電子顕微鏡で観察したところ、図 5 に示すように、プロテアーゼを作用させた場合、反応初期には細胞壁の表面が部分的に脱落していくのが認められ、一方、キトサナーゼを作用させた場合、まず細胞壁の表層部が溶解されて繊維状物質からなるネットワーク構造が露出し、最終的にはそのネットワーク構造も崩壊していくのが認められた。さらに、*Rhizopus* の細胞壁をプロテアーゼとキトサナーゼによって徹底的に溶解した後、それぞれの反応液を可溶性区分と不溶性残渣とに分離し、凍結乾燥後、その重量を測定した。その結果、プロテアーゼを作用させた場合には細胞壁全重量の約 60% が可溶化され、キトサナーゼあるいはキトサナーゼとプロテアーゼを同時に作用させた場合には約 70% が可溶化された。また、前者の場合、*Rhizopus* の細胞壁中の全ヘキソサミン量の約 16% が可溶化区分に含まれ、後者の場合には約 60% 以上のヘキソサミンが可溶化された。なお、先にも述べたように、プロテアーゼと

キトサナーゼによっても分解されずに残る不溶性残渣はキチナーゼによって完全に分解された。

以上 3 種類の細胞壁溶解酵素の *Rhizopus* 細胞壁に対する作用は次のように要約することができる。

(1) プロテアーゼ、キトサナーゼおよびキチナーゼの協同作用で、*Rhizopus* の細胞壁はほぼ完全に溶解される。

(2) プロテアーゼ、キトサナーゼおよびキチナーゼはそれぞれ単独でもある程度 *Rhizopus* の細胞壁を溶解する。

(3) プロテアーゼによる溶解の場合にも、可溶性区分にヘキソサミンが含まれる。

(4) 各酵素の細胞壁溶解力を濁度法と重量法で測定した場合、両測定値の間には相関関係が認められない。

従来、Ascomycetes や不完全菌に属する糸状菌の細胞壁は主としてグルカン-キチンからなる多層構造であるといわれている。しかし、(1) および (2) の結果は *Rhizopus* の主要構造を構成する多糖類がキトサン-キチンであることを示し、さらに、(2)、(3) および (4) の結果は、キチン、キトサンおよびたん白質などの各成分が層状に局在しているのではなく、少なくとも各溶解酵素の作用をうけうる状態で細胞壁を構成していることを示唆するものである。これらの知見と走査型電子顕微鏡による溶解状態の観察などから、Zygomycetes に属する *Rhizopus* の細胞壁は Ascomycetes や不完全菌に属する糸状菌のそれらとは全く異なり、キトサンとたん白質がモザイク状に散在し、これらがネットワーク構造をもつ繊維状のキチンを結合した単層構造であろうと推定された⁽²²⁾。

これまで、微生物細胞壁溶解酵素は医薬、農薬、防腐・防カビ剤あるいは微生物菌体内の有効成分の抽出手段などその応用上の重要性が認識され活発に研究されてきたが、さらに最近では遺伝子工学の分野にもその利用の範囲が広がり、この目的に適した溶解酵素の開発も望まれている。今後は、このような応用上の立場から、糸状菌細胞壁溶解酵素に関しても、より系統的な研究の発展が期待されている。

本研究を行うにあたり、終始、ご指導、ご鞭撻をいただいた大阪市立工業研究所前所長辻阪好夫博士、生物化学課岩井美枝子博士に深く感謝いたします。また、有益なご助言とご援助をいただいた生物化学課の諸氏に厚く

お礼申し上げます。

- (1) A. Fleming : *Proc. R. Soc.*, **93**, 306 (1922).
- (2) J. Giaja : *C. R. Soc. Biol.*, **86**, 708 (1922).
- (3) R. B. Hamilton and S. G. Knight : *Arch. Biochem. Biophys.*, **99**, 282 (1962).
- (4) D. A. Applegarth : *Arch. Biochem. Biophys.*, **120**, 471 (1967).
- (5) K. Horikoshi and S. Iida : *Biochim. Biophys. Acta*, **83**, 197 (1964).
- (6) S. Bartnicki-Garcia and W. J. Nickerson : *Biochim. Biophys. Acta*, **58**, 102 (1962).
- (7) S. Bartnicki-Garcia : *Ann. Rev. Microbiol.*, **22**, 87 (1968).
- (8) K. Horikoshi and K. Sakaguchi : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **4**, 1 (1958).
- (9) K. Horikoshi and S. Iida : *Nature*, **183**, 186 (1959).
- (10) K. Horikoshi, H. Koffer and K. Arima : *Biochim. Biophys. Acta*, **73**, 268 (1963).
- (11) J. J. Skujins, H. J. Potgieter and M. Alexander : *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 358 (1965).
- (12) H. Tanaka, N. Ogasawara, T. Nakajima and K. Tamari : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **16**, 39 (1970).
- (13) 高山健一郎, 宇田川清, 阿部重雄 : 農化, **34**, 652, 656 (1960).
- (14) N. Toyama and K. Ogawa : *J. Ferment. Technol.*, **46**, 626 (1968).
- (15) 古屋 晃, 池田庸之助 : 農化, **34**, 33, 38 (1960).
- (16) 川合正充 : 醸工, **48**, 295, 397, 405 (1970).
- (17) 岡崎博司, 飯塚 広 : 醸工, **50**, 228 (1972).
- (18) H. Okazaki and H. Iizuka : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **16**, 537 (1970).
- (19) H. Okazaki : *J. Ferment. Technol.*, **50**, 405 (1972).
- (20) D. R. Kreger : *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, 1 (1954).
- (21) J. J. Distler and S. Roseman : *J. Biol. Chem.*, **235**, 2538 (1960).
- (22) Y. Tominaga and Y. Tsujisaka : *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1569 (1981).
- (23) Y. Tsujisaka, Y. Tominaga and M. Iwai : *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2517 (1973).
- (24) D. Jones, J. S. D. Bacon, V. C. Farmer and D. M. Webley : *Antonie van Leeuwenhoek*, **34**, 173 (1968).
- (25) Y. Kobayashi, H. Tanaka and N. Ogasawara : *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 959, 967, 974 (1974).
- (26) Y. Tsujisaka, Y. Tominaga and M. Iwai : *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 145 (1975).
- (27) Y. Tominaga and Y. Tsujisaka : *Biochim. Biophys. Acta*, **410**, 145 (1975).
- (28) Y. Tominaga and Y. Tsujisaka : *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1937 (1976).
- (29) A. A. Eddy : *Proc. R. Soc. London Ser. B*, **149**, 425 (1958).
- (30) E. D. Korn and D. H. Northcote : *Biochem. J.*, **75**, 12 (1960).
- (31) I. F. Ramirez-Leon and J. Ruiz-Herrera : *J. Gen. Microbiol.*, **72**, 281 (1972).
- (32) R. L. Monaghan, D. E. Eveleigh, P. P. Tewari and E. T. Reese : *Nature New Biol.*, **245**, 78 (1973).
- (33) A. Hedges and R. S. Wolfe : *J. Bacteriol.*, **120**, 844 (1974).
- (34) Y. Tominaga and Y. Tsujisaka : *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2607 (1979).
- (35) Y. Tominaga and Y. Tsujisaka : *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 2325 (1976).
- (36) S. Bartnicki-Garcia : *J. Gen. Microbiol.*, **42**, 57 (1966).
- (37) M. A. Aronson and L. Machlis : *Am. J. Botany*, **46**, 292 (1959).
- (38) A. F. Troy and H. Koffeler : *J. Biol. Chem.*, **244**, 5563 (1969).
- (39) 堀越弘毅, 有馬 啓 : 農化, **39**, 18 (1965).
- (40) P. R. Mahadevan and E. L. Tatum : *J. Cell Biol.*, **35**, 295 (1967).
- (41) D. Hunsley and J. H. Burnett : *J. Gen. Microbiol.*, **62**, 203 (1970).