糸状菌の骨格多糖 β -Glucan とその加水分解酵素 β -Glucanase の細胞壁構築における機能

Roles of the β -glucanases in fungal cell wall β -glucan assembly

東北大学大学院農学研究科

阿部 敬悦 Keietsu ABE

山形 洋平 Yohei YAMAGATA

中島 佑 Tasuku NAKAJIMA

Key words: β -glucanase; fungal cell wall; β -glucan assembly

1. β -Glucan 複合体と真菌細胞壁

酵母, カビなど真菌の細胞壁の形を決定している多糖は一般的には β -1,3-glucan とされているが厳密にいうと, β -1,3-結合および β -1,6-結合がいろいろな割合で入った β -1,3-1,6-branched glucan といったほうが正しい. 筆者らはシイタケ (*Lentinus edodes*) の細胞壁の骨格多糖複合体が3種類の β -1,3-1,6-glucan と chitin からなるモデルを示した¹⁾ (図 1a). 出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) でも β -1,3-glucan は細胞壁 β -glucan の主鎖として存在してお

り, β -1,6 結合の側鎖をもつ分岐構造をしている. 一方, 直鎖上の β -1,6-glucan が chitin やマンナンタンパク質などの構成要素を連結する側鎖として存在するモデルが示された. さらに近年細胞壁結合型の glycosylphosphatidylinositol (GPI) タンパク質は β -1,6-glucan に結合していると考えられており, β -1,6-glucan が真菌細胞壁構築の蝶番としての役割があると考えられる^{2), 3)} (図 1b).

2. β -Glucanase と細胞壁多糖の分解

細胞壁多糖の加水分解酵素の機能は, 細胞の伸張すなわち細胞壁の拡大に伴う細胞壁構成成分の組換え, あるいは細胞分裂時の壁構造の消失と再生に役割を担っていると考

図 1 真菌細胞壁多糖複合体モデル

(Ia): シイタケ子実体 (*Lentinus edodes* fruit body) の β -glucan/chitin 複合体モデル. (Ib): 出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 細胞壁多糖複合体モデル, G-G, β -1,3-glucosidic linkages; G, β -1,6-glucosidic linkages; M-M, β -mannosidic linkages; AA, amino acid residues; EtN, ethanolamine.

図2 赤パンカビ (*Neurospora crassa*) 細胞壁 β -Glucan 複合体の β -Glucanase 群による段階的分解パターン

えられている。赤パンカビ (*Neurospora crassa*) は2種の β -1,3-glucanase⁴⁾ と1種の β -1,6-glucanase をもっているが⁵⁾、これらの酵素を *N. crassa* の細胞壁 β -glucan に作用させその分解パターンから細胞壁多糖の分解過程が示された⁵⁾ (図2)。

出芽酵母の β -1,3-glucanase (EXG1) の性質を調べると細胞壁 β -glucan の構造的組換えを示唆する興味深い結果が得られた⁶⁾。大腸菌で発現させた出芽酵母の EXG1 の基質特異性を詳細に検討すると、今までの報告とは異なり、exo- β -1,3-glucanase 活性はあるものの、さまざまな基質に対する *K_m* 値から判断すると β -1,3-glucobiose (laminaribiose, 9.8 mM), β -1,6-glucobiose (gentiobiose, 11.1 mM), pNP- β -glucoside (2.8 mM) のような低分子に対して、より親和性が高く、高分子基質、 β -1,3-glucan (laminaran, 13.0 mM), β -1,6-glucan (pustulan, 24.8 mM) に対しては親和性が低いという結果がでたことから、exo- β -1,3-glucanase と解釈するのは間違いであり、どちらかという β -glucosidase の性質に似ていることが示された。さらに、本酵素は非常に強い糖転移活性をもっていること、高分子基質により阻害を受けることなど、今までに見いだされた β -1,3-glucanase とは全く異なったユニークな性質をもつことが明らかになり、この性質から本酵素は細胞壁 β -1,3-glucan と β -1,6-glucan の分解と構造的組換えに関与している可能性が考えられた⁶⁾。

3. カビの β -1,3-Glucanase, β -1,6-Glucanase 遺伝子とその機能

我々は、黒麹菌 (*Aspergillus saitoi*) より exo- β -1,3-glucanase 遺伝子 (*exgS*)、また赤パンカビ (*N. crassa*) から endo- β -1,6-glucanase 遺伝子 (*neg1*) をクローニングし塩基配列を決定した^{7), 8)}。糸状菌の β -glucanase 遺伝子は、クローニングの例も少なく、特に β -1,6-glucanase についての報告はほとんどない。これは β -1,6-glucan の存在量の少なさもあり、局在性、機能についての知見もほとんど得られていないことによる。図3で今までに知られている主なカビ由来の β -1,3-glucanase のアミノ酸配列と、*N. crassa* の β -1,6-glucanase 遺伝子のアミノ酸配列の比較を行った。

A. saitoi の exo- β -1,3-glucanase (ExgS) は内部に180アミノ酸残基よりなるリンカー部分をもつのが特徴的である。真菌の β -1,3-glucanase は *S. cerevisiae*⁶⁾ や *Trichoderma* sp.⁹⁾ などいくつかの酵母、糸状菌から単離され、塩基配列が明らかとなっており、アミノ酸の一次構造の類似性から glycosyl hydrolase family 5¹⁰⁾ に属しているが、筆者らの黒麹カビ β -1,3-glucanase (EXGS) はこの分類に入らない。一方、 β -1,6-glucanase 遺伝子の塩基配列情報は *T. harzianum* BGN16.2 の一例のみであり¹¹⁾、*N. crassa* ゲノムデータベース上には、BGN16.2 と推定アミノ酸配列が有意に相同性を示す塩基配列は確認されなかった。

N. crassa β -1,6-glucanase (Neg1) は glycosyl hydrolase family 30¹²⁾ に属する数種のタンパク質と20~30%程度の相同性を示したが、*S. cerevisiae* ゲノム中には相同性を示す配列が存在しないことが示された。Neg1中に保存される family 30 活性中心の Glu242 (proton donor) と Glu321 (nucleophile) の Ala への置換は酵素活性を失わせた¹³⁾。

Neg1 の生理的機能を明らかにする目的で、repeat-induced point mutation (RIP) 法による *neg1* 遺伝子破壊株の作製を行った¹⁴⁾。遺伝子破壊株の表現型を種々の条件にて観察したが顕著な表現型の差は認められなかった。しかし、*neg1* を破壊した R12-1 株はタンパク質変性作用のある陰イオン性界面活性剤 SDS および陽イオン性界面活性剤臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) に対して2% sorbose を含む培地で弱い感受性を示し、さらに0.005% SDS 存在下では Congo-red に対しても弱い感受性を示した。

この結果より、細胞壁の物理的強度や抵抗性などに対する Neg1 の寄与は少ないが、Neg1 欠損により生長に伴う細胞壁 β -1,6-glucan の修飾が起こらなくなり、1,6- β -D-

(27)

glucan を認識・結合するタンパク質の細胞壁への親和性を低下させている可能性がある。検定培地中の sorbose は菌糸生長を抑制するが、さらに SDS や CTAB が存在することで細胞壁タンパク質が変性し、相乗的に生長を阻害していることが考えられる。また、Congo-red は β -glucan 結合性の色素であり、これによる生育阻害が見られることは、細胞壁 β -1,6-glucan の Neg1 による修飾が菌糸生長に何らかの役割をもつことを示唆している。もう一方の可能性として、分生子からの発芽時の細胞壁タンパク質の再構成への関与が考えられる。R12-1 株分生子の発芽は野性株のそれと比較して、イオン性界面活性剤存在下で抑制されていたことから、Neg1 による β -1,6-glucan の修飾は発芽段階でも起きている可能性がある。

これらの可能性は、 β -1,6-glucanase 活性が対数増殖期で急激に増加し、定常期の初期に急激に減少することと一致している¹⁴⁾。しかしながら β -1,6-glucanase の活性は定常期後期に再び上昇することから、Neg1 は発芽や菌糸生長以外にも、不要になった菌体細胞壁の資化や、他種からの重複感染への防御的な役割を有しているのかもしれない。

1) M. Shida, Y. Ushioda, T. Nakajima, and K. Matsuda: *J.*

- Biochem.* (Tokyo), **90**, 1093-1100 (1981).
- 2) R. Kollar, B. B. Reinhold, E. Petrakova, H. J. Yeh, G. Ashwell, J. Drgonova, J. C. Kapteyn, F. M. Klis, and E. Cabib: *J. Biol. Chem.*, **272**, 17762-17775 (1997).
 - 3) T. Fujii, H. Shimoi, and Y. Iimura: *Biochem. Biophys. Acta*, **1427**, 133-144 (1999).
 - 4) N. Hiura, M. Kobayashi, T. Nakajima, and K. Matsuda: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2461-2467 (1986).
 - 5) N. Hiura, T. Nakajima, and K. Matsuda: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 3315-3321 (1987).
 - 6) K. Suzuki, T. Yabe, Y. Maruyama, K. Abe, and T. Nakajima: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1310-1314 (2001).
 - 7) K. Oda, S. Kasahara, Y. Yamagata, K. Abe, and T. Nakajima: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1587-1590 (2002).
 - 8) S. Oyama, Y. Yamagata, K. Abe, and T. Nakajima: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1378-1381 (2002).
 - 9) R. Kohen-Kupiec, K. E. Broglie, D. Friesen, R. M. Broglie, and I. Chet: *Gene*, **226**, 147-154 (1999).
 - 10) B. Henrissat and A. Bairoch: *Biochem. J.*, **293**, 781-788 (1993).
 - 11) J. M. Lora, J. Dela Cruz, A. Llobell, T. Benites, and J. A. Pintor-Toro: *Mol. Gen. Genet.*, **247**, 639-645 (1995).
 - 12) B. Henrissat, I. Callebaut, S. Fabrega, P. Lehn, J. P. Mornon, and G. Davies: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 7090-7094 (1995).
 - 13) S. Oyama, Y. Yamagata, K. Abe, H. Inoue, and T. Nakajima: unpublished.
 - 14) N. Hiura, I. Honjyo, T. Nakajima, and K. Matsuda: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1041-1047 (1984).