

〔醸酵工学 第56巻 第1号 15-18, 1978〕

懸濁菌糸からの核酸関連物質の漏出過程に及ぼす かく拌の影響*

田中 秀夫・上田 清基

東京教育大学農学部生物化学工学科

Effect of agitation on leakage process of intracellular nucleic acid-related substances from suspended mycelia.* TANAKA, H. and K. UEDA (*Department of Biochemical Engineering, Tokyo University of Education, Tokyo 153*) *Hakkokogaku* 56: 15-18, 1978.

Experiments were made in order to clarify the mechanism of the remarkable leakage of intracellular nucleic acid-related substances observed on mechanical agitation of mycelial suspension. As reported previously, the leakage occurred through two processes, namely, the degradation of intracellular high molecular nucleic acid-related substances (HN) to low molecular ones (LN) and the permeation of intracellular LN through the surface layer of mycelia.

In the present report, the following facts were demonstrated. Agitation has a direct effect on the latter process. Permeation did not occur through a biochemical system which promoted the permeation of LN, but by diffusion. Therefore, it was suggested that the direct effect of agitation on the permeation was to decrease mass-transfer resistance in the surface layer of mycelia and/or in the liquid film around mycelia.

著者らは、糸状菌菌糸の懸濁液を液内培養条件でかく拌した時、多量の菌糸内低分子核酸関連物質が短時間に漏出する現象について言及したが、¹⁻⁴⁾その漏出現象がいかなる機構により生ずるのかについては、未だ明らかにしていない。

本報では、その機構を解明するための第1段階として、その漏出現象を構成する二つの過程、すなわち、菌糸内高分子核酸関連物質の低分子化過程と細胞表面における低分子核酸関連物質の透過過程について、かく拌がいずれの過程に直接的な影響を与えるのかを検討したので、それらの結果について報告する。

実験方法

使用菌株 *Mucor javanicus* NI 1051 を用いた。

菌糸懸濁液の調製 前報⁴⁾の調製に従って行った。なお、菌糸濃度は特にことわらない限り、100 ml の水に対して乾燥重量として 100 mg に相当する量を加えた。

かく拌装置 菌糸懸濁液のかく拌装置として、5 l ジャーフェーマンター³⁾と 500 ml 振とうフラスコを用いた。ジャーフェーマンターには 2.5 l の液を入れ、そのかく拌はインペラーの回転速度を 0 から 950 rpm の範囲の間を選んで行った。振とうフラスコには 100 ml の液を入れ、振幅 70 mm の往復振とう機上で振とうした。かく拌に際して、懸濁液の温度は特にことわらない限り 30°C に保った。

菌糸内、外の核酸関連物質の定量 核酸関連物質を便宜上、高分子核酸関連物質（以後、高分子核酸と略す）と低分子核酸関連物質（以後、低分子核酸と略す）に分け、その定量は前報⁴⁾に従って行った。

RNA 分解酵素液の調製 0.02 M りん酸緩衝液 (pH 7.0) 15 ml に水で洗浄した菌糸（乾燥重量として 100 mg）を懸濁し、これをフレンチプレスを用いて 200 kg/cm² の条件で 2 度処理して、菌糸を破碎した。この破碎菌糸懸濁液に 0.1 %ゼラチン溶液を加えて全量を 100 ml とし、これを酵素液とした。

RNA 分解酵素活性の測定 Takahashi の方法⁵⁾に従って行った。

* 糸状菌の液内培養における菌糸に与えるかく拌の影響に関する研究（第 7 報）
Studies on the Effect of Agitation on Mycelia in Submerged Mold Culture (VII)

実験結果および考察

菌糸内高分子核酸の低分子化に対するかく拌の影響の検討 菌糸懸濁液を種々のかく拌条件下でかく拌した際に、菌糸内低分子核酸の菌糸外への漏出現象が認められる。その低分子核酸の漏出現象と、それに伴う菌糸内的高分子および低分子核酸の変動との相関関係を実験的に明らかにし、それらの関係を Fig. 1 に示すように模型化した。Fig. 1 に示したように、かく拌による低分子核酸の漏出現象は、二つの過程で構成されている。すなわち、菌糸内高分子核酸の低分子化過程（過程Ⅰ）と、細胞表層における菌糸内低分子核酸の透過過程（過程Ⅱ）である。本実験では、このような漏出現象を生ずる原因として、かく拌がこれらの過程に直接影響を与えた結果であるかどうかを明らかにするため、かく拌と過程Ⅰとの間の関係について、まず検討した。

かく拌によって菌糸内低分子核酸が漏出していくにもかかわらず、低分子核酸の濃度が菌糸内高分子核酸の分解によって一定水準に維持されることが実験的にわかっている。この低分子化には、RNA 分解酵素が関与しているので、菌糸内 RNA 分解酵素活性に、かく拌が直接影響を与えるか否かを検討した。菌糸懸濁液のかく拌は、ここでは往復振とう機上のフラスコ中で行った。振とう間の菌糸内 RNA 分解酵素活性を経時的に測定した。その結果を Table 1 に示した。振とう時間と関係なく、酵素活性はほとんど一定であった。また、ジャーフェーマンターにおいて、種々のかく拌速度でかく拌した場合においても同様に酵素活性は一定であった。従って、菌糸内の RNA 分解酵素活

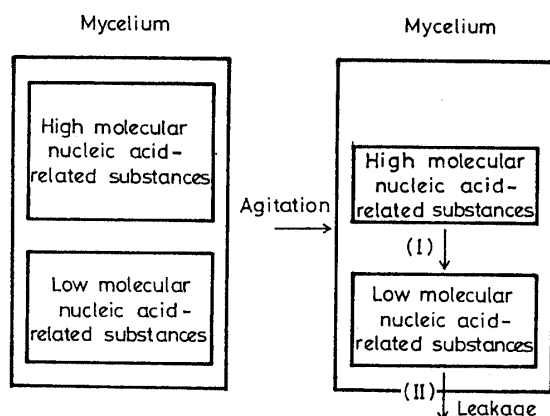


Fig. 1. Schematic diagram showing leakage of nucleic acid-related substances on agitation of mycelial suspension.

Table 1. Relation between shaking time and ribonucleolytic activities.

Shaking time (hr)	Ribonucleolytic activities (units/mg)	Leakage (E ₂₆₀)
0	33.0	0.179
1	32.6	0.385
2	31.9	0.590

性に、かく拌が直接影響をおよぼすことはなかった。

この分解酵素は、前報¹⁾の結果から、緒方⁶⁾の分類によれば 3'-phosphodiesterase を含む RNA depolymerase であろうと推定されるが、菌糸に含まれるこの酵素の活性を、pH 7.0, 30°C の条件で120分間酵母 RNA と反応させて測定すると、約 120 (units/mg) であるのに対し、菌糸懸濁液をかく拌した際に、高分子核酸の低分子化に働く酵素活性はせいぜい 0.5 (units/mg) であった。このような高活性の RNA depolymerase は、菌糸内の低分子核酸濃度を一定に保つためだけに働くように制御されているものと推定された。なお、菌糸内の低分子核酸濃度を一定水準に保とうとする生理的理由は、現在明らかでないが、*Saccharomyces* 属の酵母においても、菌体内の低分子核酸濃度が一定に保たれている報告⁷⁾がある。

以上の結果より、かく拌と過程Ⅰとの関係は、かく拌による低分子核酸の菌糸外への漏出に伴い、菌糸内では低分子核酸濃度を一定水準に維持しようとする制御が働いて、菌糸内的高分子核酸が、高活性の RNA depolymerase により瞬時に低分子化するというように考えられる。従って、かく拌が過程Ⅰに直接影響を与えることはないと考えられる。

かく拌と細胞表層における低分子核酸の透過との関係 過程Ⅰにかく拌が何ら直接的に影響を与えないことが明らかとなったので、かく拌は過程Ⅱに影響を与えていることになる。

微生物の細胞表層の物質透過機構について、これまで、いくつかの透過模型が提案されているが、今、物質の細胞表層における細胞内から細胞外への透過について考察してみると、菌糸内低分子核酸の細胞表層における透過について、次の二つの機構が考えられる。

(a) 細胞表層に透過酵素などの透過を積極的に促進する物質が存在し、低分子核酸はその働きで細胞表層を透過する。

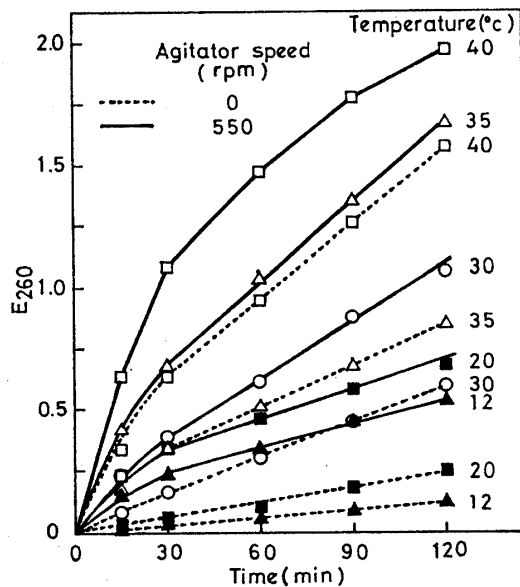


Fig. 2. Effect of temperature on leakage of nucleic acid-related substances.

(b) 細胞表層に透過を積極的に促進する物質が存在せず、低分子核酸はもっぱら、濃度勾配に基づく拡散により、細胞表層を透過する。

菌糸内低分子核酸が、以上の二つのうち、いずれの機構に基づいて細胞表層を透過するかを次に検討した。

①漏出速度と温度との関係

菌糸内低分子核酸の細胞表層における透過が(a)の機構によるとすれば、酵素が関与するため、温度の影

Table 2. Effect of temperature on ΔE_{260} .

Temperature (°C)	$(\Delta E_{260})_1$	$(\Delta E_{260})_0$	$*(\Delta E_{260})_2$
12	0.200	0.060	0.140
20	0.240	0.106	0.135
30	0.450	0.300	0.150
35	0.635	0.350	0.285
40	—	0.635	—

$$* (\Delta E_{260})_2 = (\Delta E_{260})_1 - (\Delta E_{260})_0$$

響が顕著に現れるものと考えることができる。そこで、かく拌の影響で促進される漏出速度と温度の関係を検討した。ジャーフェンター中の菌糸懸濁液を、温度およびかく拌速度を変えて、菌糸内低分子核酸の漏出経過を測定した。その結果を Fig. 2 に示した。明らかに、かく拌速度が0および550rpmいずれにおいても、温度の高い程漏出量が多く、その直線部分の傾きで示される漏出速度も大きいことがわかる。次に、各々の温度において、かく拌速度が0rpmの場合の直線部分の傾きで示される漏出速度、 $(\Delta E_{260})_0$ 、かく拌速度550rpmの場合の漏出速度、 $(\Delta E_{260})_1$ 、および、それら両者の速度差、 $(\Delta E_{260})_2$ 、を先の図より求め、それらを Table 2 にまとめて示した。なお、40°Cにおいてかく拌した場合、直線的な漏出経過が得られなかったもので、記載しなかった。ここで、 $(\Delta E_{260})_2$ は、各温

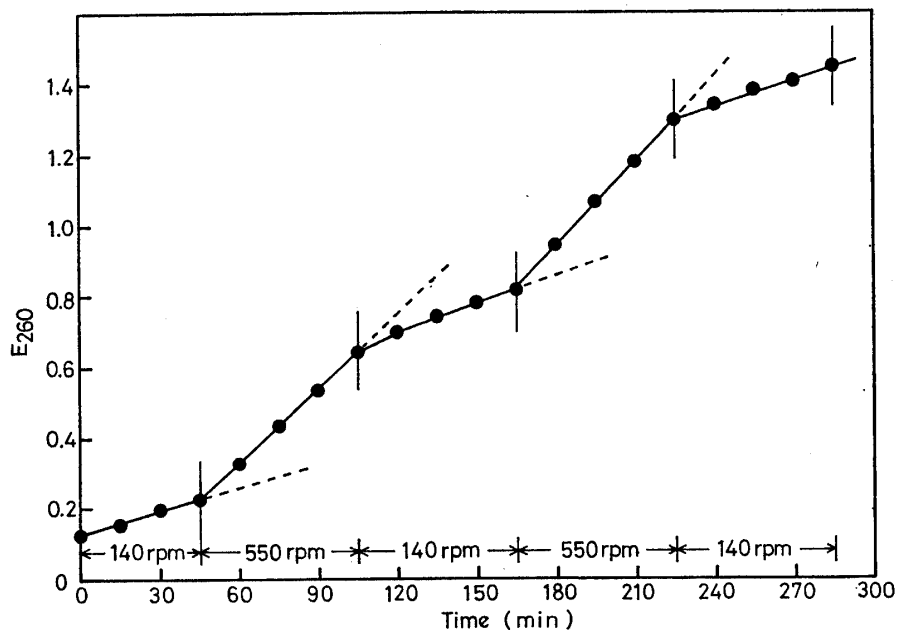


Fig. 3. Response of leakage of nucleic acid-related substances to agitator speed change.

度におけるかく拌の影響で促進される漏出速度である。12~30°Cの間では、ほぼ等しい ($4E_{260}$)₂ が得られることより、かく拌による漏出現象において、温度の依存性がかなり少ないことがわかる。

②かく拌速度変化に対する漏出速度の対応

かく拌の強弱により、菌糸内低分子核酸の漏出速度が変化するが、³⁾ もし (a) の機構に支配されると仮定すれば、かく拌速度の強弱により透過酵素の活性化される割合が異なることを意味する。そこで、かく拌速度を一定時間間隔で変化させた場合に、どのような漏出経過を示すか検討した。その結果を Fig. 3 に示した。かく拌速度の変化に対して、即座に漏出速度も対応して変化し、しかも、同じかく拌速度に対しては、等しい漏出速度を示した。このようなかく拌速度変化に対する漏出速度の対応は、透過酵素が関与したと仮定すると、酵素の活性化と不活性化がかく拌の強弱により即座に行われることになる。従って、透過酵素が関与するとは考え難い。

③漏出現象と酸素要求性との関係

かく拌速度の強弱は、液表面からの酸素の巻き込み量の大小と相関性があり、従って、菌糸内低分子核酸の細胞表層における透過が (a) の機構による場合、酸素の関与する可能性が考えられる。そこで、漏出現象と酸素要求性との関係を検討した。

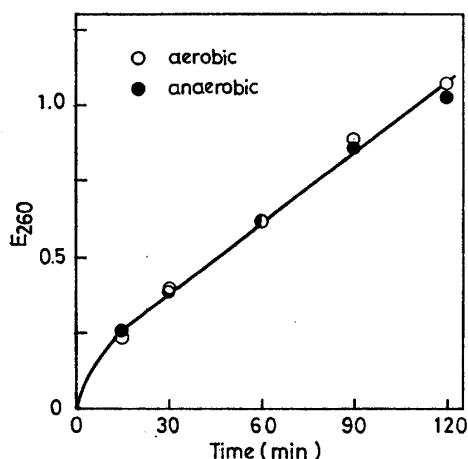


Fig. 4. Leakage of nucleic acid-related substances under aerobic and anaerobic conditions.

ジャーフェーマンター中の菌糸懸濁液の溶存酸素を窒素で置換し、さらに、上部の気相に窒素を通気しながら、550 rpm でかく拌した場合の漏出経過と、窒素で置換しない対照の漏出経過を比較した。その結果が Fig. 4 である。明らかに、両者の間でほとんど相違が認められなかった。従って、かく拌による低分子核酸の漏出現象には酸素が何等関与していないことがわかる。

以上の実験結果より、かく拌による菌糸内低分子核酸の細胞表層における透過が (a) の機構によるより、(b) の機構による可能性が明らかとなった。従って、このような機構のもとでのかく拌の過程(Ⅱ)への影響は、細胞表層や細胞周辺の液境膜における物質移動抵抗などを減少させることであると推定することができた。

要 約

かく拌による菌糸内低分子核酸の漏出過程について検討を行い、次のような結果を得た。

(1) 漏出過程は、菌糸内高分子核酸の低分子化過程と、細胞表層における菌糸内低分子核酸の透過過程の2つで構成されているが、かく拌の直接的な影響は後者の過程に与えられる。

(2) 低分子核酸の細胞表層における透過機構は、濃度勾配に基づく拡散によるもので、かく拌は細胞表層や細胞周辺の液境膜における物質移動抵抗を減少させている。

文 献

- 1) 田中, 宮川, 上田: 醸工, **52**, 646 (1974).
- 2) 田中, 宮川, 上田: 醸工, **52**, 652 (1974).
- 3) 田中, 高橋, 上田: 醸工, **53**, 18 (1975).
- 4) 田中, 上田: 醸工, **53**, 27 (1975).
- 5) Takahashi, K.: *J. Biochem.* (Tokyo), **49**, 1 (1961).
- 6) 緒方: *Amino Acid, Nucleic Acid*, **8**, 1 (1963).
- 7) 山中, 三輪, 岩沢, 広嶋, 滝波: 昭和52年度日本農芸化学会講演要旨集, 398 (1977).

(昭52.10. 3受付)