

〔醸酵工学 第58巻 第2号 71-77. 1980〕

カビの菌糸体による *Bacillus subtilis* 溶解酵素の誘導とその機構

中 英幸・岩本 徹*・稲岡 恵*

今治明德短期大学, *愛媛大学農学部農芸化学科

Induction and its mechanism of a lytic enzyme acting on *Bacillus subtilis* with fungal mycelia. NAKA H., T. IWAMOTO*, and M. INAOKA* (Imabari Meitoku Junior College, Imabari-shi, Ehime; *Department of Agricultural Chemistry, Ehime University, Matsuyama-shi, Ehime 790) Hakkokogaku 58: 71-77. 1980.

Streptomyces sp. L-13 strain produced a lytic enzyme against *Bacillus subtilis* cells when grown on a medium containing mycelia of *Aspergillus niger*. The most effective fraction for the lytic enzyme production among several mycelial fractions prepared by means of Vibrongen cell mill disruption and centrifugation, was the crude cell wall fraction. However, even in a medium containing this fraction, no lytic activity was detected in the early period of growth, although chitinase and protease were found from the beginning. The lytic enzyme and β -1,3-glucanase were produced at a later period of growth.

It was found that the reason for this was that the production of this lytic enzyme and β -1,3-glucanase was enhanced by *N*-acetylglucosamine and the soluble digest from the crude cell wall fraction with protease which was produced from the beginning of growth.

The degradative activity of protease produced at a later stage of growth had unexpected lytic action against *B. subtilis* cells as well as *A. niger* mycelia.

前報¹⁾において、*Bacillus subtilis* 細胞を溶解する酵素の生産菌として分離した *Streptomyces* 属の1菌株、L-13が、各種のタンパク質あるいは糸状菌菌体を含む培地で培養すると、強い細菌溶解酵素を生産することを報告した。一般に、溶菌酵素の誘導には、溶菌対象となる細菌の細胞、²⁾あるいはペプトン、酵母エキスなどのタンパク性物質^{3,4)}が用いられている。しかし、供試菌は溶菌酵素の誘導のために、基質として用いた *B. subtilis* 細胞よりもむしろ、細胞壁組成の全く異なる *Aspergillus niger* 菌体が有効であるという興味ある現象を示した。われわれはこの糸状菌の菌体から誘導される溶菌酵素の二、三の性質について検討を加え、その結果をすでに報告した¹⁾。引き続きわれわれは、いかにしてL-13菌が *A. niger* 菌体を利用して生育し、かつ菌体構成成分の異なる *B. subtilis* 細胞に対して活性を有する溶菌酵素を生産するかを検討した。本報ではこの実験結果を報告し、その機構についての考察を加える。

実験材料および方法

***Aspergillus niger* 菌体の調整** L-13菌の培養基質に用いるための糸状菌菌体は *A. niger* IFO 4415を3%コーンステープリカーを含む Czapek-Dox 培地で37℃で3日間振とう培養し、生育した菌体を吸引ろ過により集め、脱イオン水で十分洗浄後凍結乾燥した。

L-13菌の培養 前報¹⁾で設定した *A. niger* 菌体0.4%, K_2HPO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, pH 6.0から成る培地から出発し、培養条件を少しずつ変化させてL-13菌を振とう培養し、溶菌酵素の生産を行った。基本培地は上の培地組成の *A. niger* 菌体の代わりに Fig. 1の粗細胞壁画分(M-2)を0.2%含むものとした。

酵素活性測定法

1)溶菌活性 前報¹⁾に準じて行った。

2)protease 活性 前報¹⁾の proteinase 活性をこ

ここでは protease 活性とし、測定方法は同じである。分画した protease I および II についても全く同様に測定した。

3) chitinase 活性 基質として chitopentaose を用いた前報¹⁾に従い測定した。

4) β -1,3-glucanase 活性 0.2% laminarin 溶液 1.0 ml に 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 0.5 ml および酵素液 0.5 ml を加え、50°C、1 時間反応させ、遊離される還元糖を Somogyi-Nelson 法で定量した。活性はこの条件下で 1 μ g のグルコースを生成する力価を 1 単位として表示した。

化学分析 遊離アミノ基は 2,4,6-trinitrobenzen-sulfonic acid (TNBS) 法⁵⁾により、還元力は Somogyi-Nelson 法により定量した。前者はグルタミン酸、後者はグルコースに換算して示した。

実験結果

A. niger 菌体成分の分画 L-13 菌が *A. niger* 菌体と無機塩からなる培地で生育し、かつ溶菌酵素を生産する系において、*A. niger* のいかなる成分が生育と酵素生産に役割を果たしているかを明らかにするために、*A. niger* 洗浄菌体を Fig. 1 に示した方法で可溶性画分と不溶性画分に分画した。

可溶性画分の全糖の含量はグルコースとして、S-1, 0.3 mg/ml, S-2, 0.4 mg/ml で、一方タンパク質の含量はアルブミンとして S-1, 0.4 mg/ml, S-2, 0.1 mg/ml であった。すなわち Sutherland と Wilkins⁶⁾が述べているように、*A. niger* 菌体を 120°C、15 分間のオートクレーブ処理をすると多量の糖あるいはタンパク質が遊離してくることが認められた。不溶性画

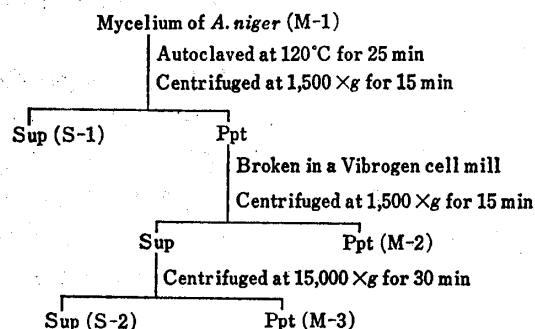


Fig. 1. Fractionation of mycelia of *A. niger*. *A. niger* was cultured for 3 days at 37°C in Czapek Dox medium, pH 5.0.

分の収量は M-1 を 100% として M-2, 35% および M-3, 10% であった。両方の画分の糖の組成は同じで、グルコースと glucosamine とからなっていた。すなわち、両画分とも glucan および chitin からなる細胞壁成分を主に含んでいるものと考えられ、⁷⁾ さらに M-2 画分には多くの種類のアミノ酸がペーパークロマトグラフィーで検出されるのでタンパク質も含んでいる。そこで以後、M-2 を粗細胞壁画分とし、M-3 を細胞壁画分と呼ぶことにする。

菌体画分による溶菌酵素の誘導 分画した *A. niger* 構成成分のうちで、可溶性および不溶性のどの画分が溶菌酵素の誘導に効果が高いかを調べるために、実験方法で記載した出発培地の *A. niger* の全菌体の代わりに、調製した画分を 0.2% になるように加えて L-13 菌を培養し、培養上澄中の溶菌活性を測定した。可溶性画分の培地添加量は、出発の菌体の重量および各処理後の不溶性画分の重量から含量を計算し、0.2% になるようにした。その結果を Fig. 2 に示す。

S-1 では、菌の生育は十分に観察されるにもかかわらず、溶菌酵素の生産の効果は低かった。一方、粗細胞壁(M-2)は未処理菌体と比較すると効果は落ちるが、分画した画分では最も高い効果を示した。そこで以後の実験では、この粗細胞壁画分を供試菌の生育およ

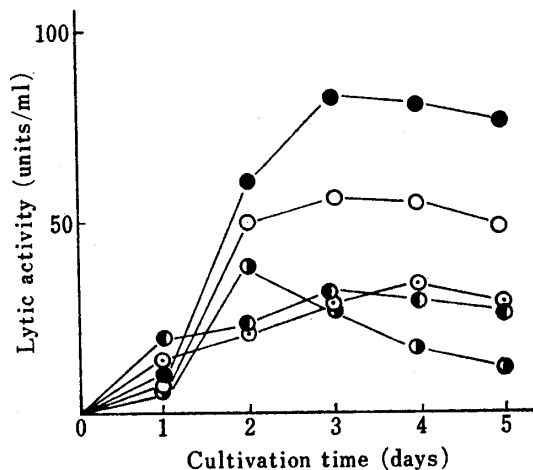


Fig. 2. Induction of lytic enzyme by fractions from *A. niger* mycelia.

L-13 strain was grown at 37°C on medium containing K_2HPO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1% and *A. niger* mycelial fraction 0.2%, at pH 6.0. Lytic activity in the culture filtrate was determined with *Bacillus subtilis* cells.

●: M-1, ○: M-2, ◐: M-3, ●: S-1, ●: S-2
For the fractionation of mycelium, see Fig. 1.

び酵素誘導用基質として用いた。すなわち, M-2 0.2%, K_2HPO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, pH 6.0 の組成の培地を基本培地として以後の培養を行った。

L-13 菌酵素による粗細胞壁の分解 L-13 菌は細胞壁を初めとする *A. niger* 構成成分を利用して生育するので, これらの成分を分解する酵素を生産するはずである。そこで, 基本培地で 37°C, 3 日間振とう培養した L-13 菌の培養上澄を, 硫酸 0.8 飽和で塩析後水に対して透析して粗酵素液を調製し, これを 50°C, pH 6.0 の条件下で粗細胞壁懸濁液に作用させた。溶解の程度を 660 nm の吸光度と, 可溶化されて遊離してくるアミノ基および還元基を測定して調べた。Fig. 3 に示すように, 溶解による濁度の減少に伴い, 遊離アミノ基および還元基の増加が認められた。この粗酵素液中には強い活性の protease, chitinase および β -1, 3-glucanase の存在が認められた。

各加水分解酵素生産の経時的変化 粗酵素液中に存在が認められたこれらの酵素と, 溶菌活性との関係を調べるために, 基本培地で供試菌を培養し, 経時的

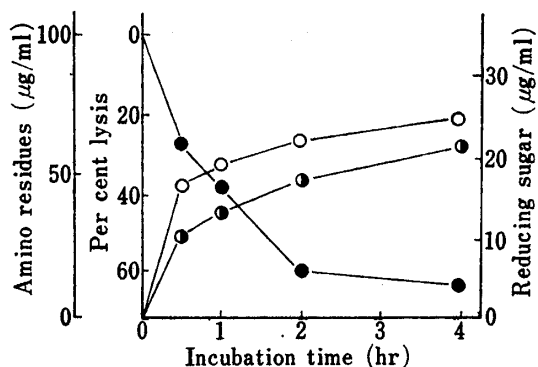


Fig. 3. Digestion of crude cell wall of *A. niger* by crude enzyme in the culture filtrate.

The basal medium was composed of 0.2% crude cell wall fraction (M-2 in Fig. 1), 0.2% K_2HPO_4 , and 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Crude enzyme was prepared from the culture filtrate of L-13 strain grown in the basal medium for 3 days. After a reaction mixture consisting of 0.35% crude cell wall fraction and 2 mg of lyophilized preparation of the crude enzyme in 15 ml of 0.05 M phosphate buffer, pH 6.0, was incubated at 50°C, aliquots of the mixture were subjected to determination of turbidity (●), reducing sugar (○) and amino residues (○). Reducing sugar and amino residues were expressed in terms of glucose and glutamic acid, respectively.

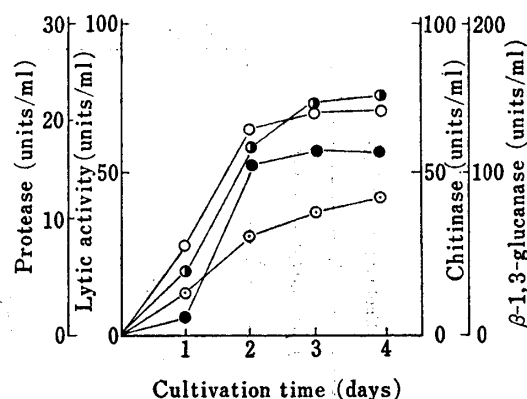


Fig. 4. Time course of production of enzymes responsible for digestion of fungal cell wall. Lytic activity (●), protease (○), chitinase (○) and β -1,3-glucanase (⊙) induced by crude cell wall fraction were determined with the culture filtrate of L-13 strain.

に培養上澄の各酵素の活性を測定した。Fig. 4 に示すように, protease および chitinase の生産は, 溶菌酵素の生産よりも早く行われた。肉眼的所見を加えると, L-13 菌接種前の培地は粗細胞壁のために均一に濁っているが, L-13 菌の生育とともに濁りは消失し, L-13 菌の粒子状の菌糸体のみとなる。前報¹⁾において L-13 菌は 2 種類の protease を生産し, そのうち一方のみが溶菌活性を示すことを報告した。すなわち, ここで培養 24 時間に生産される protease は溶菌活性を持たない方の protease である。このことは, この培養ろ液を Biogel P-60 で分画することにより確認された。すなわちこの分画では protease のピークは一つであり, このピークは溶菌活性を示さなかった。

L-13 精製諸酵素による粗細胞壁の分解 L-13 菌の *A. niger* 菌体の資化性をさらに明確にするために, 関連酵素を分別し, それぞれの酵素の粗細胞壁分解作用を比較した。

Fig. 5 および Fig. 6 に, 粗酵素液の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフと Biogel P-60 によるゲルろ過のパターンをそれぞれ示した。

実際の精製は DEAE-セルロースカラムクロマトグラフで得た各酵素のピークを濃縮し, それぞれを Biogel P-60 でゲルろ過を行ったが, Fig. 5 および 6 に示したように, 各酵素の分別は二つのカラムクロマトグラフを組み合わせると容易に行えることがわかる。すなわち, DEAE-セルロースで溶出位置に近い β -1, 3-glucanase と溶菌活性をもつ protease (P-I) は分

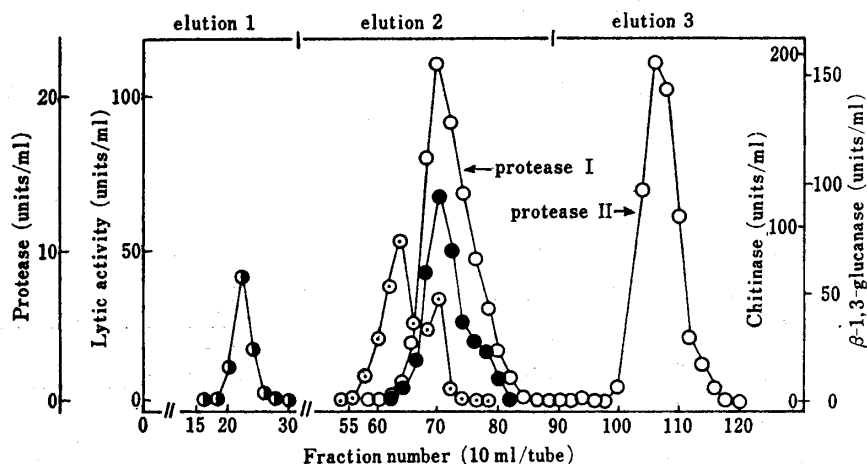


Fig. 5. Chromatographic pattern of the enzymes on a DEAE-cellulose column.

Fifty mg of a lyophilized preparation of the crude enzyme was dissolved in 4 ml of 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0, and placed on a DEAE-cellulose column (3×45 cm) equilibrated with the same buffer. Enzymes were eluted with the following elution system: elution 1; 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0), elution 2; 0.05 M phosphate buffer (pH 6.0), elution 3; linear gradient of NaCl from 0 to 1.0 M in 0.01 M phosphate buffer (pH 6.0). The volume of each fraction was 10 ml.

●: Lytic activity, ○: Protease, ●: Chitinase, ⊙: β-1,3-Glucanase.

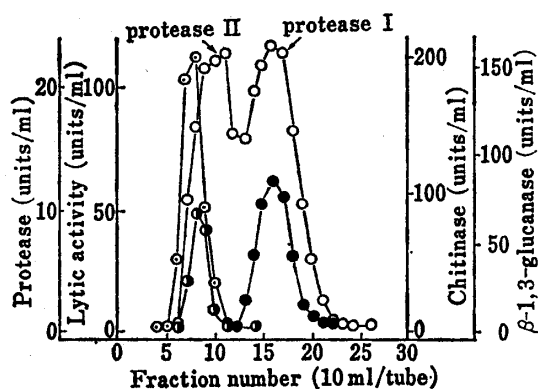


Fig. 6. Chromatographic pattern of the enzymes on Biogel P-60.

Twenty mg of the enzyme dissolved in 1.5 ml of 0.01 M phosphate buffer, pH 6.0, was placed on a Biogel P-60 column (3×45cm) and eluted with the same buffer. Fractions of 10 ml were collected.

●: Lytic activity, ○: Protease, ●: Chitinase, ⊙: β-1,3-Glucanase.

分子量が異なるのでゲルろ過では容易に分離され、逆に分子量の近い chitinase と β-1,3-glucanase は DEAE-セルロースに対する吸着能が非常に異なるので、先に完全に分別できるということが明らかである。この二つのカラムによってそれぞれの酵素活性が互いに混

入していない程度の各酵素標品を調製した。これらの酵素の *A. niger* 粗細胞壁に対する作用を次に示す。

1) chitinase および β-1,3-glucanase の作用 終濃度 0.35% の *A. niger* 粗細胞壁懸濁液 5.0 ml に両酵素の Biogel P-60 ゲルろ過標品 5.0 ml (chitinase 99.0 units/ml, β-1,3-glucanase 150.8 units/ml) および 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 10.0 ml を加え、50°C で反応を行い、経時的に反応上澄中に遊離してくる糖を測定し、その結果を Fig. 7 に示した。chitinase の方が β-1,3-glucanase よりも *A. niger* 粗細胞壁を強く分解して多くの遊離還元糖を生成した。

2) protease の作用 Fig. 5 に示したように DEAE-セルロースカラムクロマトグラフによって粗酵素中の protease は二つに分別された。先に溶出してくる画分 (P-I) は *B. subtilis* に対して溶菌活性を有するが、あとから溶出される画分 (P-II) は溶菌活性を持たない。この 2 種の protease 溶液を粗細胞壁懸濁液に加えて酵素反応を行い、反応液上澄中の遊離アミノ基を経時的に測定した。またそれぞれの protease で 24 時間反応を行ったのち、他方の protease を添加して反応を続行させる実験も行った。結果は Fig. 8 に示すように、カゼインに対する酵素力価を等しく調整した両 protease も粗細胞壁標品を基質とした場合に

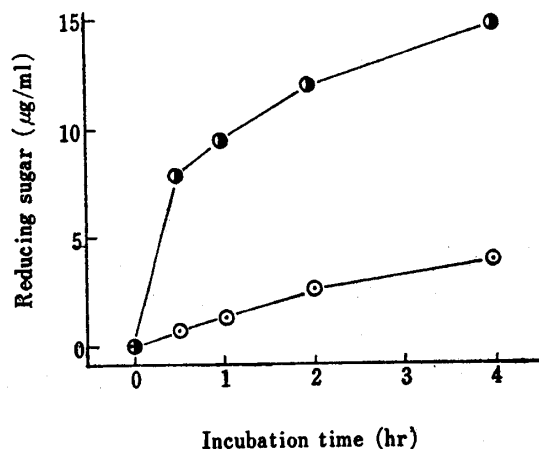


Fig. 7. Decomposition of crude cell wall by chitinase and β -1,3-glucanase.

The reaction mixture, composed of 5.0 ml of a 0.35% suspension of crude cell wall, 10 ml of 0.1 M phosphate buffer, pH 6.0, and 5.0 ml of purified chitinase or β -1,3-glucanase solution, was incubated at 50°C and reducing sugars liberated into the mixture were determined at appropriate intervals.

● : Chitinase, ○ : β -1,3-Glucanase.

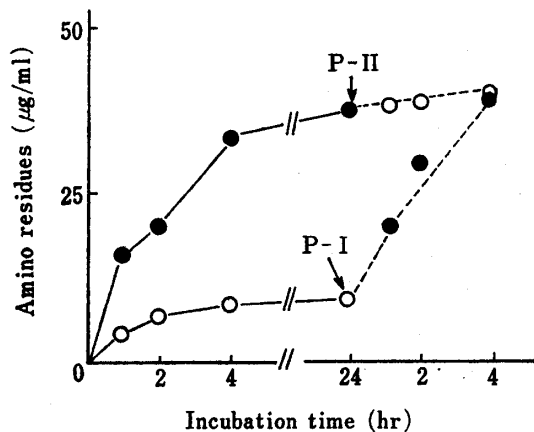


Fig. 8. Decomposition of crude cell wall of *A. niger* by two sorts of proteases.

The mixture consisted of 0.35% crude cell wall fraction, 10 ml of 0.1 M buffer, pH 6.0, and 5.0 ml of either protease I or protease II solution. After incubation at 50°C for 24 hr, the reaction was stopped by heating at 100°C for 15 min and then protease I or protease II was added to the other protease system, followed by incubation. At indicated intervals, each supernatant was subjected to amino residues assay.

● : Protease I, ○ : Protease II.

は P-I の方がかなり溶解作用が強いことがわかった。また P-II を作用させた反応液にさらに P-I を加えると新たに分解が進むが、逆に P-I 反応液に P-II を添加してもそれ以上分解は進まなかった。

A. niger 粗細胞壁の P-II 消化物の酵素生産への影響 *A. niger* の粗細胞壁で L-13 菌を培養した場合、生産される 2 種の protease のうち、P-II が P-I よりも早い時期に生産される。このことは P-II による粗細胞壁の分解生成物が P-I の生成に何らかの誘導効果⁸⁾を持つ可能性を示唆する。この可能性を確かめるために、基本培地に粗細胞壁の P-II 酵素消化物の遠心上澄を加えた培地、および基本培地の粗細胞壁の代わりにこの遠心した沈殿を加えた培地で、L-13 菌の培養を行い、各酵素の活性を測定した。結果は Fig. 9 に示すように遠心上澄の添加では β -1,3-glucanase の著しい促進と protease、溶菌活性の増大がみられ

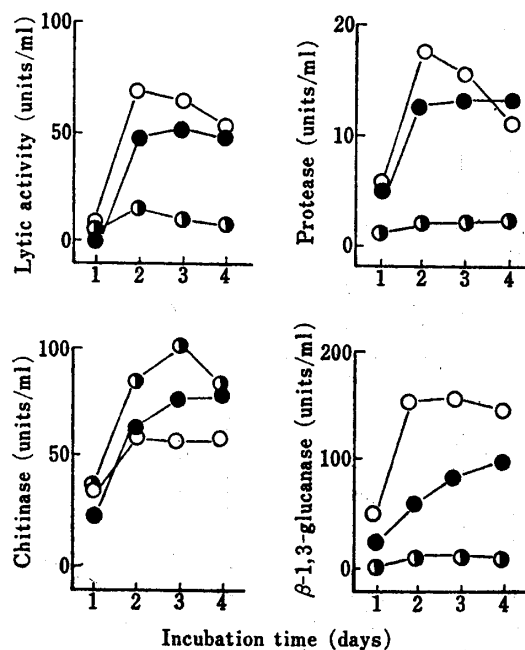


Fig. 9. Effect of protease digest of crude cell wall on the enzyme production.

After the crude cell wall preparation was digested by protease II at 50°C for 24 hr, the suspension was centrifuged. L-13 strain was grown on the basal medium plus supernatant from the digest or a medium consisting of centrifuged pellet and inorganic salts, shown in Fig. 2. Lytic enzyme, protease, chitinase and β -1,3-glucanase produced in the culture liquid were determined as a function of time.

● : Basal medium, ○ : Basal medium plus supernatant, ◐ : Pellet plus inorganic salts.

た。これに対し、沈殿を含む培地では chitinase 活性は促進したが、 β -1,3-glucanase および protease とともに極端に低下した。このことから P-II の可溶性の分解生成物は β -1,3-glucanase および溶菌性 protease の誘導に高い効果をもつことがわかった。

Glucose および *N*-acetylglucosamine の酵素生産への影響 *A. niger* 粗細胞壁で培養すると L-13 菌は chitinase あるいは β -1,3-glucanase をよく生産することが認められた。この画分はそれぞれの酵素の基質と関連があり、しかも酵素生産のための inducer としての効果も期待される。そこで、この推察の妥当性を確かめるために *N*-acetylglucosamine およびグルコースを基本培地に 0.4% 添加して両酵素の生産を比較した。結果は Fig. 10 に示す。基本培地にさらにグルコースを添加すると、いずれの酵素の生産も未添加と比較して低下した。一方、*N*-acetylglucosamine の基本培地への添加では特に protease と β -1,3-glucanase の生産に著しい促進が観察された。

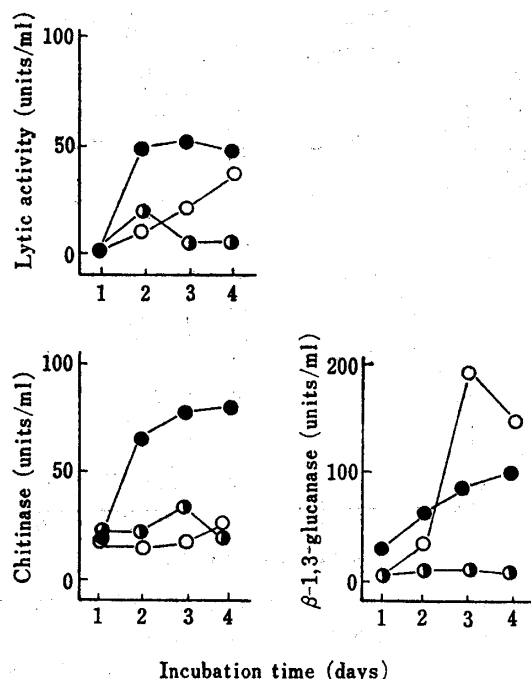


Fig. 10. Effects of glucose and *N*-acetylglucosamine on the enzyme production.

L-13 strain was cultured in the basal medium plus either 0.4% glucose or 0.4% *N*-acetylglucosamine. At the indicated intervals, culture filtrate was removed and subjected to enzyme assays.

●: Basal medium, ○: Addition of glucose, ○: Addition of *N*-acetylglucosamine.

考 察

細菌細胞溶解酵素生産菌として分離した *Streptomyces* L-13 菌は、糸状菌菌体と無機塩とからなる簡単な組成の培地で培養すると、活発に生育し細菌細胞壁を溶解する酵素を生産する。そこで、L-13 菌がいかんして *A. niger* 菌体を利用して生育し、かついかにして細胞壁成分が異なる *B. subtilis* の細胞に対して溶解活性を有する酵素を生産するかを明らかにすることを目的として実験を行った。

A. niger の振とう培養で得た菌体を、機械的破壊によって可溶性画分と不溶性画分に分け、それぞれの画分の *B. subtilis* 細胞溶解酵素の生産能を調べた。可溶性画分は大量の糖質あるいはタンパク質を含み、L-13 菌の生育促進効果を示すにもかかわらず、溶菌酵素の生産に対しては不溶性画分に比べて非常に劣るという結果が得られた。これに対して、機械的破壊で残った不溶性画分の溶菌酵素生産効果は、未処理菌体に比較すると低下するが、なお十分認められた。系を単純化して実験を行うために、この不溶性画分を用いてこの画分による L-13 菌の生育、溶菌酵素の生産機構を検討した。この不溶性画分の完全加水分解物の構成アミノ酸と糖をペーパークロマトグラフで調べると、アミノ酸は種類が多くて同定が不能であったが、糖ではグルコースと glucosamine が検出され、この画分はタンパク質、glucan および chitin を主成分とする細胞壁画分と考えられる。この画分と無機塩組成の培地で L-13 菌を培養すると、培養上澄に強い活性の溶菌酵素とともに protease, β -1,3-glucanase, chitinase の存在が認められ、上に述べたこの画分の構成成分と誘導される酵素との間に相関関係がみられる。これらの酵素の経時的生産をみると、protease および chitinase は溶菌酵素に先立って生産され、 β -1,3-glucanase は比較的遅く生産されるが、それほど顕著な特徴は認められない。前報¹⁾で L-13 菌は二つの protease を生産し、その一方が *B. subtilis* の溶菌を起こす protease であることを示した。従って先に生産される protease は溶菌活性のない protease である。

培養初期に生産される chitinase を、分画した粗細胞壁に作用させると、還元糖すなわち *N*-acetylglucosamine 誘導体を生成する。L-13 菌は exo 型の β -*N*-acetylglucosaminidase を生産し、菌体表面に結合している⁹⁾ので、この酵素と chitinase が共同して細

胞壁の構成 chitin から *N*-acetylglucosamine を生成し、これが供試菌の炭素源の一部になっている可能性が高い。興味あることに、粗細胞壁画分を含む培地に *N*-acetylglucosamine を添加すると chitinase の生産は抑制されるのに対して、protease と β -1,3-glucanase の生産は著しく促進された。従って、*N*-acetylglucosamine は生育のため炭素源として利用されるばかりでなく、これらの酵素の誘導効果ももっていると考えられる。

一方、培養初期に生産される protease (P-II) は粗細胞壁溶解作用が P-I に比べて劣るが、この酵素の粗細胞壁分解産物の可溶性物質を基本培地に加えて生育させると、溶菌性 protease および β -1,3-glucanase の生産が促進されることがわかった。すなわち、この P-II は L-13 菌の生育のための窒素源あるいは炭素源の供給のために役立っているばかりでなく、両酵素の誘導のためにも役立っていると推察される。P-II のこのような酵素誘導に対する効果は、同じく培養の初期に生産される chitinase のそれに類似して、興味ある現象である。

以上の実験結果から *A. niger* 菌体により、*B. subtilis* 細胞を溶解する酵素が誘導される機構は、供試菌が *A. niger* 菌体を利用して生産した2種の protease のうちの一方が、*B. subtilis* の細胞壁の構成タンパク質にも作用して、これを溶解すると考えると妥当である。逆にいえば、*A. niger* と *B. subtilis* の細胞壁中には、P-I に感受性をもつタンパク質が存在することを示唆している。

要 約

Streptomyces L-13 菌は *Aspergillus niger* 菌体と無機塩を含む培地で生育すると *Bacillus subtilis* 細胞を溶解する酵素を生産する。*A. niger* の chitin, glucan およびタンパク質からなる粗細胞壁画分が細菌細胞溶解酵素の誘導に効果が認められた。

培養初期には、chitinase と溶菌活性のない protease (P-II) の生産が、溶菌活性を有する protease

(P-I) および β -1,3-glucanase の生産に先立って行われる。

粗細胞壁の P-II 酵素消化産物を生育培地に添加すると P-I および β -1,3-glucanase の生産が促進し、また *N*-acetylglucosamine の添加でも同じ効果が認められた。

A. niger 菌体より chitinase および P-II が先に生産され、両酵素の菌体の分解産物によって、 β -1,3-glucanase および *A. niger* の粗細胞壁を溶解する protease (P-I) の生産が促進され、炭素源あるいは窒素源の供給が十分となり、供試菌の生育が活発に進む。

B. subtilis の細胞壁中には、P-I に対して感受性をもつ菌体の機械的強度を担うタンパク質の存在が示唆される。

文 献

- 1) 岩本, 中, 佐々木, 稲岡: 醸工, **54**, 308 (1976).
- 2) Ensign, J. C., Wolfe, R. S.: *J. Bacteriol.*, **90**, 395 (1965).
- 3) Ghuysen, J. M., Dierickx, L., Boville, M. L., Strominger, J. L., Bricas, E., Nicat, C.: *Biochemistry*, **4**, 2237 (1965).
- 4) Ensign, J. C., Wolfe, R. S.: *J. Bacteriol.*, **91**, 524 (1966).
- 5) 奥山, 笠井: 蛋白質・核酸・酵素, **18**, 1153 (1973).
- 6) Sutherland, I. W., Wilkins, J. F.: *Methods in Microbiology*, (Norris, J. R., Ribbons, D. W.), Vol. 5B, 345, Academic Press Inc., New York (1971).
- 7) Crook, E. M., Johnson, I. R.: *Biochem. J.*, **83**, 325 (1962).
- 8) 中, 岩本, 佐々木, 稲岡: 昭和53年度農化大会講演要旨集, 475 (1978).
- 9) 岩本, 加納, 佐々木, 稲岡: 醸工, **54**, 316 (1976).

(昭和54. 10. 19 受付)