

[J. Ferment. Technol., Vol. 54, No. 5, p. 316~322, 1976]

Streptomyces sp. による Exo β -N-Acetylglucosaminidase の生産と分泌*

岩本 徹・加納 誠・佐々木 毅・稲岡 恵

愛媛大学農学部農芸化学科

Production and Secretion of Exo β -N-Acetylglucosaminidase from a *Streptomyces* sp.*

Tooru Iwamoto, Makoto Kano, Takeshi Sasaki and Megumu Inaoka

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture
Ehime University, Matsuyama-shi, Ehime

The formation and secretion of exo β -N-acetylglucosaminidase (EC 3.2.1.30) produced by a strain of *Streptomyces* (L-13) was studied. This strain secreted only a small amount of the enzyme into the culture broth while most of the enzyme appeared to be bound to the exterior of the cell, from which it was not easily released except by incubation with 2% NaCl, 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0), or lysozyme solution at 40°C. Other agents such as detergent, saccharide and protease were not effective for the liberation of this enzyme from the cell. The β -N-acetylglucosaminidase thus liberated from the cell was found to be reabsorbed onto the cell. When the L-13 strain cells with bound enzyme were incubated with enzyme substrate solution, the substrate was hydrolysed in the same pattern as by the cell-free enzyme. Other strains of *Streptomyces* could also form exo β -N-acetylglucosaminidase to some extent.

結 言

前報¹⁾で報告した *Bacillus subtilis* を強く溶解する酵素を生産する *Streptomyces* の一菌株 (L-13 菌) が培養液中中の溶菌酵素とは別に、菌体に exo type の β -N-acetylglucosaminidase [E. C. 3. 2. 1. 30] を結合していることを見出した。

微生物における本酵素の存在は、*Aspergillus niger*,²⁾ *A. oryzae*,³⁾ *B. subtilis*⁴⁾ あるいは *Diplococcus pneumoniae*⁵⁾ などに報告されているが、多種多様の加水分解酵素を生産することが知られている *Streptomyces* には、本酵素についての報告が見当たらない。既報の細菌細胞壁

* 細菌細胞壁溶解酵素の研究 (第4報)
Studies on Enzymes Lysing Bacterial Cell Walls (IV)

溶解酵素生産菌で、溶菌酵素と本酵素を併せて生産するという菌株も見当たらない。

Exo type の β -N-acetylglucosaminidase は、直接細菌細胞壁の溶解には関与しないが、リゾチームのような endo type の *N*-acetylmuramidase で消化したペプチドグリカン分解物に作用すると考えられる。本酵素を生産する *B. subtilis* B において、この酵素の生理的役割に、細胞分裂の際に作用する autolysin のような働きを期待している報告もある。⁶⁾ そこで、L-13 菌の生産する本酵素を細菌細胞壁溶解酵素の一部としてとり上げ、この特性を明らかにして他の微生物起源の酵素と比較しつつ、*Streptomyces* 属一般の本酵素の位置づけを行い、本酵素の生理的役割を調べることを目的として実験を行った。

本報では主に本酵素の局在性について報告する。

実験材料および方法

供試菌および培養条件 前報¹⁾の *Streptomyces* L-13 菌を使用し, 本菌との比較のために発酵研究所より分譲された放線菌も用いた. L-13 菌の培養は次の 5 種類の培地を適宜使用し, 37°C で 2~5 日間振とうして行った. 培地 (A); グルコース 0.5%, 酵母エキス 0.2%, K_2HPO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1% および $NH_4H_2PO_4$ 0.1%, pH 7.0, 培地 (B); pH 9.0 に調製した培地 (A), 培地 (C); 1.5% 食塩を含む培地 (A), 培地 (D); ワックスマン培地, 培地 (E); 溶菌酵素生産用培地,¹⁾ pH 7.0 を用いた.

酵素活性測定法 1 mM *p*-nitrophenyl β -N-acetylglucosaminide 1.0 ml, 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) 0.5 ml および酵素液 0.5 ml を含む反応液組成を 50°C で 10 分間反応させ, 遊離した *p*-nitrophenol を 8.0 ml の 0.1 M Na_2CO_3 溶液を加えて呈色し, 430 nm の吸光度を測定した. 酵素活性はこの条件下で, 1 分間に 1 μ mole の *p*-nitrophenol を遊離した時 1 単位とした.

基質 *p*-nitrophenyl β -N-acetylglucosaminide は Koch-Light 製品を用いた.

実験結果

培地中の酵素の蓄積 L-13 菌を種々の培地で培養し培地中に生産される β -N-acetylglucosaminidase 量を調べた. 培地 (A)~(E) の 100 ml を 500 ml 容坂口フラスコにとり, これに前培養した L-13 菌を 10 ml 接種し, 37°C で振とう培養を行い, 経時的に培養液の酵素活性を測定した (Fig. 1).

培地 (A) および培地 (E) では, 培地中の酵素活性は培養後 5 日目に至るまで非常に低かった. これに対して, 培地 (B) および培地 (C) では接種後 2 日目で最高に達し, その量も多いことが認められた. これは酵素の生産よりむしろ酵素の菌体外への分泌の問題ではないかと考え, 本酵素の L-13 菌における所在を調べた.

酵素の L-13 菌体における局在性 上の実験において, 培地中に多量の酵素を蓄積した培地 (B) および (C) と, 酵素量の少なかった培地 (A) を用い L-13 菌を 2 日間培養した後, Fig. 2 に示したように調製した各フラクションの酵素活性を測定した (Table 1).

フラクション I はこの菌株が培地中に分泌した酵素を示し, フラクション III は菌体内酵素を示している

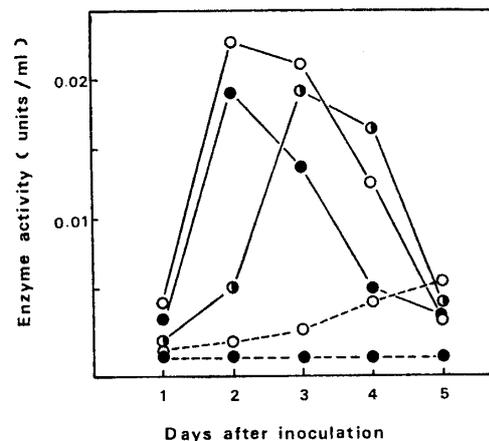


Fig. 1. Time course of β -N-acetylglucosaminidase accumulation in various culture broths by L-13 strain.

—○— medium (A), —□— medium (B),
—●— medium (C), —■— medium (D),
—●— medium (E)

が, フラクション II はそのいずれとも異なるので菌体結合酵素と仮称する.

Table 1 に示したように, 検討を加えないで培地でも, 菌体内酵素は殆んど認められなかった. 培地 (A) では分泌酵素に対して菌体結合酵素の割合が高く, 培地 (B) および (C) では逆に, 分泌酵素の割合が高いことが認められた. すなわち, いずれの培地でも本酵素は生産されるが, 培地に分泌されるか否かに差があるということである. この菌体結合酵素と分泌酵素が

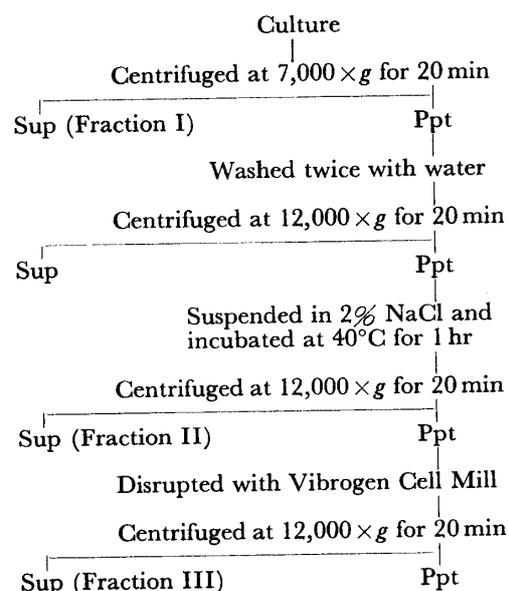


Fig. 2. Fractionation procedure of β -N-acetylglucosaminidase from the culture of L-13 strain.

Table 1. β -N-Acetylglucosaminidase in three fractions obtained from L-13 strain grown on various media.

Fractionation	Enzyme activity (units/ml $\times 10^{-3}$)		
	(A)	(B)	(C)
Fraction I (extracellular)	1.2	23.0	19.2
Fraction II (cell-bound)	15.7	4.0	6.2
Fraction III (intracellular)	0.3	0.4	0.4

L-13 strain was cultivated in the medium (A), (B) or (C) for 2 days, and each fraction obtained by the treatment shown in Fig. 1 was subjected to enzyme assay.

同じものであれば、分泌酵素は何らかの因子によって、菌体結合酵素が菌体より遊離して培地中に放出されたものではないかと考えられる。そこで、分泌酵素と菌体結合酵素の性質の異同を調べることにした。

分泌酵素と菌体結合酵素の異同 分泌酵素としては培地 (B) で培養した培養液を用い、菌体結合酵素としては培地 (A) で培養した菌体から食塩によって遊離させた酵素を用いた。実験に先だち、それぞれの酵素を硫酸アンモニウムによる塩析 (0.8飽和) を行い、水に対して透析した後凍結乾燥した。

分泌酵素および菌体結合酵素が L-13 菌体に再結合するかどうかを調べた。食塩処理によって菌体結合酵素を取り除いた L-13 菌体を 100°C で 5 分間煮沸し、さらにブフナーロート上で 0.1N 塩酸で 1 回洗った。これを水洗して完全に塩酸を除き凍結乾燥した。

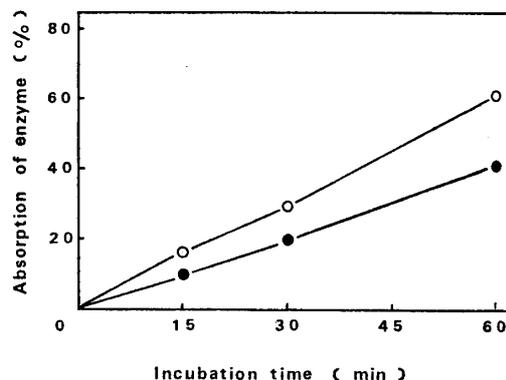


Fig. 3. Reabsorption of two forms of the enzyme onto cells of L-13 strain.

The L-13 strain cells from which cell-bound enzyme was removed by NaCl solution were suspended in extracellular or cell-bound enzyme solution and the suspension was incubated at 30°C with shaking. At appropriate intervals, aliquots of the suspension were withdrawn and filtered with Toyo Roshi No 5 C and the filtrate was submitted to enzyme assay. Enzyme absorbed by the cells was expressed as the per cent decrease in the enzyme activity of the suspension during the incubation.

○: cell-bound enzyme
●: extracellular enzyme

凍結乾燥した分泌酵素および菌体結合酵素標品 20 mg を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 ml に溶かし、その酵素液に 200 mg の凍結乾燥した L-13 菌体を懸濁し、30°C でゆるく攪拌した。適宜、菌体懸濁液を取り出し、菌体を除いた上清の酵素活性を測定した。そして、最初の酵素活性とこの上清中の酵素活性の差を菌体に再結合した量として相対比で表した (Fig. 3)。

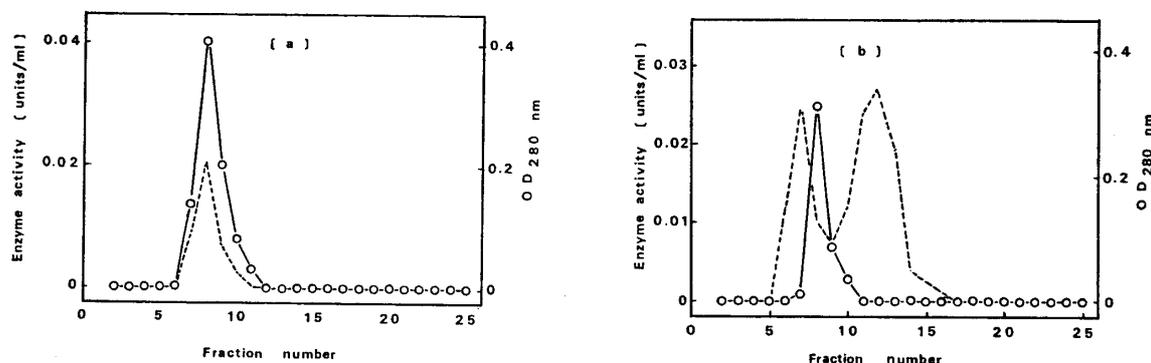


Fig. 4. Pattern of gel filtration of two forms of the enzyme with Biogel P-60.

Each lyophilized preparation of extracellular and cell-bound enzyme was dissolved in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0 and applied to a Biogel P-60 column (3 \times 45 cm). Chromatography was carried out with the same buffer collecting 5 ml in each tube.

(a): cell-bound enzyme, (b) extracellular enzyme
—○— enzyme activity, ——— OD at 280 nm

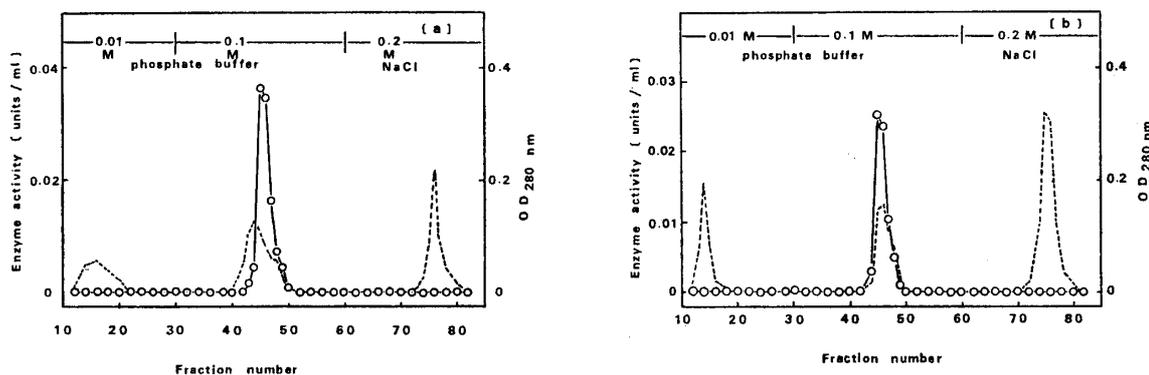


Fig. 5. DEAE-cellulose column chromatography of two forms of the enzyme.

Each crude enzyme preparation dissolved in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) was loaded on a DEAE-cellulose column (1.5 × 45 cm) equilibrated with the same buffer. The column was eluted by stepwise elution with 0.01 M and 0.1 M phosphate buffer and finally with 0.1 M phosphate buffer containing 0.2 M NaCl. Fractions of 5 ml were collected.

(a): cell-bound enzyme, (b): extracellular enzyme
—○— enzyme activity, ——— OD at 280 nm

Figure 3 に示したように、菌体結合酵素のみならず、分泌酵素も菌体に結合することが認められた。

次に Biogel P-60 によるゲル濾過を行い両酵素の濾過される位置を比較した。凍結乾燥標品 10 mg を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 ml に溶かし、同じ緩衝液でゲル濾過を行ったところ、分泌酵素および菌体結合酵素とも 8 本目に酵素活性のピークが認められた (Fig. 4)。

さらに、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーも試みた。0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で緩衝化した DEAE-セルロース (1.5 × 45 cm) に、同緩衝液に溶かした酵素液 (10 mg の凍結乾燥標品を含む) をかけ、同緩衝液次に 0.1 M 緩衝液で溶出をはかった (Fig. 5)。

分泌酵素および菌体結合酵素とも、0.01 M では溶出されず 0.1 M 濃度で 15 番目のフラクションに活性ピークを認めた。この後、0.2 M 食塩で溶出してもいずれも活性は認められなかった。

以上の菌体への再吸着およびカラムクロマトグラフィーの結果から、分泌酵素と菌体結合酵素の挙動は同じであり、両酵素は本来同じものと考えられるが、以上の方法では識別できない供試菌が培地中に放出する際に生ずる構造上の変化や酵素タンパクの一部の修飾の可能性は残っている。

菌体結合酵素の溶離因子 今までの実験では食塩処理によって菌体より遊離させた酵素を菌体結合酵素と呼んできた。食塩以外にこの効果をもつ因子を探ってみた。本酵素を結合している L-13 菌体、すなわち培

地 (A) で 2 日間培養して集菌、水洗した菌体に対して、先の食塩処理と同じ処理を Table 2 に示した各化合物を用いて行った。また、この菌体に数種の酵素を作用させてその溶離効果も検討した (Table 2)。

その結果、食塩の他に 0.2 M リン酸緩衝液に高い溶離効果が認められ、また酵素では特にリゾチームにその効果が認められた。一方、糖の浸透圧あるいは界面

Table 2. Some agents releasing β -N-acetylglucosaminidase from cell of L-13 strain.

Agent	Concn. (%)	Enzyme activity (units/ml × 10 ⁻³)
Tween 80	1.0	0
SDS	1.0	0
Glucose	1.0	0
Maltose	1.0	0
Sucrose	1.0	0
Lysozyme	0.02	11.6
Pronase	0.02	1.7
Trypsin	0.02	1.1
NaCl	2.0	28.0
Urea	0.3 M	0
Phosphate buffer (pH 7.0)	0.2 M	31.5

The L-13 strain cells cultivated in the medium (A) for 2 days were washed with water and suspended in each reagent solution or enzyme solution. After incubation of the suspension at 40°C for 1 hr, the supernatant obtained by centrifugation was subjected to enzyme assay.

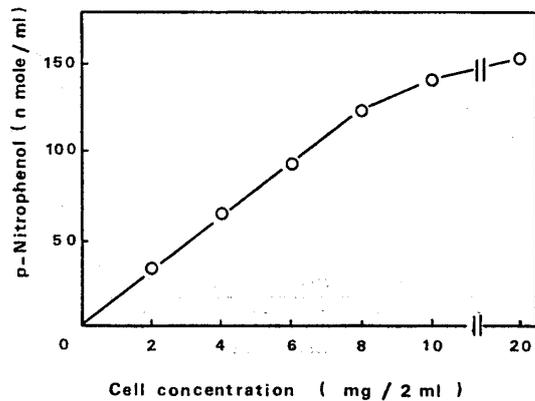


Fig. 6. Enzymic action of L-13 strain cells binding β -*N*-acetylglucosaminidase.

Various amounts of lyophilized cells were suspended in 2.0 ml of 2 mM *p*-nitrophenyl β -*N*-acetylglucosaminide solution dissolved in 0.01 M phosphate buffer (pH 6.5) and the suspension was incubated at 40°C. After the incubation for 10 min, *p*-nitrophenol liberated in the suspension was determined as usual.

活性剤では効果は全くなく、プロテアーゼに少し認められた。リン酸緩衝液を用いて酵素の菌体からの溶離の至適条件を検討した。その結果、L-13 菌体を 0.2 M 濃度、pH 6.5~7.0 の緩衝液に懸濁し、40°C で 2 時間ゆるく攪拌すると菌体結合酵素の溶離が最高となったので、これを以後菌体結合酵素の菌体よりの溶離の至適条件とした。

菌体結合酵素の酵素作用 菌体結合酵素が菌体にくっついた状態で酵素作用を行えるか否かを検討した。本酵素を結合している L-13 菌体を凍結乾燥し、その菌体を 2 mg から 20 mg までを秤量し、それぞれを 2.0 ml の基質溶液 (0.01 M のリン酸緩衝液に溶解) に懸濁し、40°C で 10 分間攪拌した。この懸濁液を東洋濾紙 No. 5C で濾過し、その濾液 1.0 ml を 9.0 ml の Na₂CO₃ 溶液に加え、430 nm の吸光度を読み遊離の *p*-nitrophenol 量を求めた (Fig. 6)。

予備実験より、この条件では本酵素の菌体よりの遊離は認めていないので、Fig. 6 の結果から菌体結合酵素は菌体に結合したままで酵素作用を行うことができるといえる。なお、菌体に結合された状態での酵素活性は遊離の酵素活性の 60~70% であった。

その他の放線菌による本酵素の生産 L-13 菌の β -*N*-acetylglucosaminidase が培地中に蓄積してくるのは、食塩を添加した培地かあるいはアルカリ側にした培地で培養した場合であった。そこで、同じような傾

Table 3. Production of β -*N*-acetylglucosaminidase by various actinomycetes.

Strain	Enzyme activity (units/ml $\times 10^{-3}$)
<i>Streptomyces albus</i>	17.1
<i>Streptomyces albidus</i>	29.5
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	19.0
<i>Streptomyces carifornicus</i>	4.7
<i>Streptomyces griseoflavus</i>	4.5
<i>Streptomyces griseus</i>	1.1
<i>Streptomyces rimosus</i>	1.2
<i>Micromonospora fuscus</i>	1.0
<i>Micropolyspora brevicatena</i>	1.2
<i>Nocardia corallina</i>	2.9
<i>Streptosporandium roseum</i>	3.0
<i>Streptomyces</i> L-13	27.4

Each strain was grown on a medium composed of 1.0% meat extract, 1.0% peptone, 1.0% NaCl and 0.2% yeast extract, pH 7.0, for 2-5 days, and enzyme activity of the culture filtrate was determined.

向をもった放線菌が存在するのではないかと考え、数種の放線菌についてこの酵素の生産の有無を調べた。L-13 菌以外の放線菌は、今まで使用したいずれの培地においても生育が非常に悪かったので、0.2% 酵母エキスを含むワックスマン培地 (食塩濃度は 1.0%) を使用し、37°C で 2 日から 5 日間培養して生育が旺盛となった培養ビンの培養濾液をとり、その培養濾液中の酵素活性を測定した (Table 3)。

試験したいずれの *Streptomyces* の菌株も酵素活性に強弱はあるけれども、本酵素を生産することが認められた。特に、*Streptomyces albidus* はこの条件下では L-13 菌よりも高い値を示した。

考 察

β -*N*-acetylglucosaminidase は糖タンパクあるいは糖脂質などの複合糖質の糖鎖の構造解明の一手段として使用が期待され、^{7,8)} 一部市販されているものもある。⁹⁾ また、本酵素は細菌細胞壁溶解酵素の研究の一部として、細胞壁ペプチドグリカンのグリカン部分を切断する酵素が、*N*-acetylglucosaminidase か *N*-acetylmuramidase であるかを、本酵素を用いて識別することができるかと報告されている。^{10,11)} 我々は *B. subtilis* 溶解酵素生産菌として分離した *Streptomyces* の一菌株¹⁾ が、菌体に結合した本酵素をもっていることを見出し

た。一方, *Streptomyces* 属についてみるとキチナーゼ系の研究の一部として, キトビアーゼが β -N-acetylglucosaminidase 活性を併せもっているという報告^{12,13)} 以外に本酵素を生産するという報告はほとんど見当らない。

さらに, Ortiz⁴⁾ らは本酵素を生産する *B. subtilis* をみつけ, 本酵素は培地中に不溶性のまま存在し, 高濃度の食塩によって可溶化できると報告し, さらに, 本酵素はこの細菌の細胞壁成長に何らかの役割をはたしているのではないかと推察している。^{6,14)} 細胞壁構造に関しては, *Streptomyces* と細菌では類似しているので著者らの本酵素も L-13 菌にとって, 細菌の autolysin のような生理的役割^{10,15)} をはたしているのではないかと考え, その性質を明らかにすることを試みた。

供試菌による本酵素の生産を, 培地の条件を種々変化させて比較した。培地中に多量の本酵素を蓄積するのは, 培地の pH をアルカリにした場合かあるいは, 0.5~1.0% の食塩を培地に加えた場合であり, ふつうの培養条件下では, 本酵素は菌体に結合して存在していた。これらの培地中にはいずれも, 本酵素の基質となるものは含まれていないので, この酵素は供試菌に構成的に合成されるものと考えられる。菌体に結合している酵素は, イオン強度の高い溶液あるいは, リゾチームを作用させることによって容易に菌体より遊離させることができる。そこで, 供試菌が培地中に放出した β -N-acetylglucosaminidase と食塩処理によって遊離させた菌体結合酵素の異同を調べたところ, L-13 菌体への再結合あるいは, カラムクロマトグラフィーなどに両酵素はほとんど同じ挙動を示した。この結果と本酵素が構成酵素であろうという推察とを併せ考えると, 供試菌の本酵素の生理的役割は菌体に結合された状態ではたされ, ふつうの培養条件下で培養後期に培地中に放出される酵素は, この菌体に結合されていた酵素が, 菌の自己融解あるいは培地の条件変化によって, 菌体より遊離してきたものであろうと推察した。

L-13 菌に限らず *Streptomyces* の数種の菌株も比較的強い活性を有する β -N-acetylglucosaminidase を生産することを認めた。ただし, この実験は, L-13 菌が菌体に酵素を結合しているような条件では他の放線菌の生育は非常に悪かったので, L-13 菌でも培地に酵素を蓄積した条件, すなわち培地に食塩を加えて培養を行っている。それゆえ本酵素の生産が認められた *Streptomyces* の菌株が, L-13 菌と同じように酵素を菌体に結合しているかどうかは断定しがたいが, 本酵素

がこれらの *Streptomyces* の菌株にとって何らかの共通した生理的役割をはたしている可能性は十分考えられる。そして, この可能性を考えれば, まだまだ多くの *Streptomyces* に本酵素を生産するものが見出されるものと思われる。現在, これらの生理的役割の解明の手がかりとして, 強い活性をもつことが認められた *S. albidus* の β -N-acetylglucosaminidase と L-13 菌の本酵素とを比較しながら性質について検討を加えている。

要 約

1. *Streptomyces* L-13 菌の β -N-acetylglucosaminidase は構成的に生産され, ふつうの培養条件ではその大部分は菌体に結合して存在している。そして, L-13 菌を食塩を添加した培地かあるいは pH を高くした培地で培養すると, 本酵素は培地中に分泌される。
2. 菌体に結合している酵素も分泌された酵素もカラムクロマトグラフィーおよび菌体への再結合に同じ挙動を示し, これら両酵素は同じものではないかと推察される。
3. 菌体に結合している酵素はリゾチームによって, あるいは高濃度の食塩溶液あるいはリン酸緩衝液で処理することによって, 菌体から容易に遊離させることができる。また, この遊離した酵素は逆に菌体に再結合する。
4. 菌体に結合している酵素は結合されたままで, 遊離酵素と同じように酵素作用を行うことができる。
5. L-13 菌以外の放線菌による本酵素の生産性を調べると, いずれの *Streptomyces* の菌株も活性に強弱はあるけれども本酵素を生産することが認められた。

文 献

- 1) 岩本, 中, 佐々木, 稲岡: 醸工, **54**, 308 (1976).
- 2) Bahl, O. P., Agrawal, K. M. L.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 2970 (1969).
- 3) Mega, T., Ikenaka, T., Matsushima, Y.: *J. Biochem.*, **68**, 109 (1970).
- 4) Ortiz, J. M., Gillespie, J. B., Berkeley, R. C. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **289**, 174 (1972).
- 5) Hughes, R. C., Jeanloz, R. W.: *Biochemistry*, **3**, 1543 (1964).
- 6) Berkeley, R. C. W., Brewer, S. J., Ortiz, J. M., Gillespie, J. B.: *Biochim. Biophys. Acta*, **309**, 157 (1973).
- 7) 吉田, 奥山, 野本: 化学と生物, **11**, 242 (1973).

- 8) 村松：蛋白質・核酸・酵素, **19**, 114 (1974).
9) Muramatsu, T.: *J. Biochem.*, **64**, 521 (1968).
10) Ghuysen, J. M.: *Bacteriol. Rev.*, **32**, 425 (1968).
11) Hughes, R. C.: *Biochem. J.*, **119**, 849 (1970).
12) Berger, L. T., Reynolds, D. M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 522 (1958).
13) Ohtakara, A.: *Bull. Hiroshima Women's Univ.*
Domestic Sci., **6**, 1 (1971).
14) Ortiz, J. M.: *J. Bacteriol.*, **117**, 909 (1974).
15) Forsberg, C., Rogers, H.: *Nature*, **229**, 272 (1971).

(昭51. 2.14受付)