

Studies on Basidiomycete Cell-wall Lytic Enzymes (担子菌細胞壁溶解酵素に関する研究)

矢野 成和

担子菌は食・飼料としてだけでなく、いくつかの工業分野における重要な微生物資源であるが、生育速度や病害糸状菌に対する感受性などの点に欠点がある。そのため、分子育種が重要な課題になっているが、これを行うには再生可能なプロトプラストの調製が不可欠である。

Bacillus circulans KA304を、*Schizophyllum commune* (スエヒロタケ) の細胞壁標品を含む培地中で生育させて得た培養口液 (KA-prep) は、スエヒロタケ菌糸からプロトプラストを生成するが、本標品は、そのプロトプラスト生成活性だけでなく、生成プロトプラストの再生率が高いという点で、既知細胞壁溶解酵素標品より優れている。そのため、KA-prepを、分子育種に使用できるような他種担子菌のプロトプラストの調製に利用することが期待されている。

そのため、本研究では、まず、KA-prepを主成分とする、*Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ) プロトプラストを調製するための酵素系を検討した。また、生成プロトプラストの形質転換への利用を検討した。次いで、KA-prep中のグリコシダーゼ類を分析することによって、効率的なプロトプラスト調製の情報を得るとともに、各酵素の比較生化学的研究を行った。

第1章では、まず、KA-prepがヒラタケ菌糸からプロトプラストを生成することを示した。次いで、KA-prepに入手容易な数種の酵素標品を添加すると、プロトプラスト生成量が顕著に増加し、生成プロトプラストをヒラタケ形質転換系に利用できることを明らかにした。また、KA-prepが、担子菌のプロトプラスト生成に不可欠の成分を含有していることを示唆する結果を得た。

第2章では、スエヒロタケプロトプラストの生成に必要な、KA-prep中の成分を分析し、これが α -1,3-グルカナーゼであることを示した。本酵素は、単独ではプロトプラストを生成しない。しかし、キチナーゼ類と β -グルカナーゼ類を含むがプロトプラスト生成能を持たない、KA-prepの硫酸アンモニウム30-50%画分に添加すると、プロトプラストを生成した。この結果は、 α -1,3-グルカナーゼ以外に、キチナーゼ類や β -グルカナーゼ類もプロトプラスト生成に関与することを示すものであり、第3章と第4章の課題となった。 α -1,3-グルカナーゼの理解とその生産のために、本酵素遺伝子のクローニングならびに発現を検討した。

第3章では、まず、KA-prepの硫酸アンモニウム30-50%画分から、キチナーゼ類と β -グルカナーゼ類を含む標品を分離し、 α -1,3-グルカナーゼとキチナーゼ標品が、プロトプラストを生成するために最低限必要な成分であること、またそのプロトプラスト生成活性が、 β -グルカナーゼ標品を加えると向上することを認めた。次いで、 α -1,3-グルカナーゼ存在下でプロトプラストを生成するキチナーゼが、キチナーゼ標品中のキチナーゼIであることを示した。遺伝子による触媒ドメインの比較から、キチナーゼIが、細胞壁中のキチンの分解に関与すると言われる、ファミリー19型キチナーゼであることを示した。ヒラタケプロトプラスト調製用酵素系の添加物として有効であった、*Streptomyces cyaneus* SP-27のファミリー19型キチナーゼについても、プロトプラスト生成に対する寄与を確認した。

第4章では、KA-prep中の β -グルカナーゼ類について検討した。前章で、プロトプラスト生成に2次的な役割をはたすと考えられていた、 β -グルカナーゼ標品には、少なくとも4種の β -グルカ

ナーゼ (I、II、III、IV) が含まれており、そのうち β -グルカナーゼIVが、 α -1,3-グルカナーゼとキチナーゼIを含む反応液のプロトプラスト生成活性を高めることを認めた。

以上で検討した各酵素のプロトプラスト生成における役割を考察し、プロトプラスト生成を改善するための示唆を得た。