

褐色腐朽菌オオウズラタケの産生する
酵素による木材多糖類の加水分解に関
する研究

1986

石原光朗

褐色腐朽菌オオウズラタケの産生する
酵素による木材多糖類の加水分解に関
する研究

1986

石原光朗

目 次

	頁
序 言	1
第 1 章 褐色腐朽の特性について	4
1.1 緒 言	4
1.2 実 験	5
1.2.1 供 試 菌	5
1.2.2 腐朽材の調製	6
1.2.2.1 針葉樹材ブロックの腐朽	6
1.2.2.2 固型培養法による広葉樹材の腐朽	6
1.2.3 リグニンの定量	6
1.2.4 腐朽材の糖組成分析	6
1.2.5 腐朽材多糖のフェニルカルバモイル化	7
1.2.6 ゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー (GPC)	7
1.2.7 結晶化度の測定	7
1.3 結果と考察	8
1.3.1 腐朽過程における褐色腐朽菌の基質特異性	8
1.3.2 褐色腐朽による木材セルロースの重合度低下	12
1.3.3 褐色腐朽による木材セルロースの結晶化度の低下	14
1.4 要 約	16
第 2 章 オオウズラタケのセルラーゼ, ヘミセルラーゼ生産のための 培養条件について	17
2.1 緒 言	17
2.2 実 験	19
2.2.1 供 試 菌	19

2.2.2	液体培養法	19
2.2.3	固型培養法	19
2.2.4	粗酵素の調製	20
2.2.5	ヘミセルラーゼ基質の調製	21
2.2.6	酵素活性の測定	21
2.2.7	SDS ポリアクリルアミドゲル・スラブ電気泳動	21
2.2.8	オオウズラタケ粗酵素によるカラマツホロセルロース の加水分解	21
2.3	結果と考察	22
2.3.1	オオウズラタケの好氣的な液体培養によるセルラーゼ, ヘミセルラーゼの生産	22
2.3.2	オオウズラタケの固型培養によるセルラーゼ, ヘミセル ラーゼの生産	27
2.4	要 約	31
第3章	オオウズラタケの菌体外に産生する多糖類加水分解酵素の精製 と性質について	33
3.1	緒 言	33
3.2	実 験	35
3.2.1	オオウズラタケ粗酵素の調製	35
3.2.2	基 質	35
3.2.2.1	セルラーゼ基質	35
3.2.2.2	マンナーゼ基質	36
3.2.2.3	キシラナーゼ基質	36
3.2.2.4	グリコシダーゼ基質	37
3.2.3	酵素活性の測定	37
3.2.4	蛋白質の定量	37
3.2.5	アフィニティクロマトグラフィー	37

3.2.6	電気泳動	37
3.2.7	分子量の測定	38
3.2.8	薄層クロマトグラフィー (TLC)	38
3.3	結果と考察	38
3.3.1	Cx-セルラーゼ	38
3.3.1.1	Cx-セルラーゼの精製	38
3.3.1.2	Cx-セルラーゼの性質	41
3.3.2	マンナーゼ	45
3.3.2.1	マンナーゼの精製	45
3.3.2.2	マンナーゼの性質	48
3.3.3	キシラーゼ	51
3.3.3.1	キシラーゼの部分精製	51
3.3.3.2	キシラーゼの性質	54
3.3.4	β -D-キシロシダーゼ	56
3.3.4.1	β -D-キシロシダーゼの精製	56
3.3.4.2	β -D-キシロシダーゼの性質	58
3.4	要 約	64
第4章	木材ヘミセルロースの酵素分解生成物の検索	66
4.1	緒 言	66
4.2	実 験	67
4.2.1	木材ヘミセルロースの調製	67
4.2.2	糖類の分析方法	67
4.2.3	広葉樹キシランの酵素分解生成物から単離された酸性 オリゴ糖の同定	68
4.2.4	針葉樹グルコマンナンの酵素分解生成物から単離され たオリゴ糖の同定	70
4.3	結果と考察	73

4.3.1	広葉樹キシランの酵素分解	73
4.3.2	針葉樹グルコマンナン	79
4.4	要約	84
結	言	86
謝	辞	88
引用	文献	89
Summary		107

序 言

近年、微生物やその産生する酵素を活用した生化学的反應を利用して、林地除間伐材、未利用広葉樹、木材工場の残廢材、モミガラ、バガスなどリグノセルロース資源を、食飼料、化学工業原料、エネルギー等へ変換することへの可能性が検討されるようになった。リグノセルロースから、嫌気性のセルロース分解微生物によって糖化と発酵を同時に行い、直接エタノールやケミカルスを得る試みも検討されつつあるが (Cooneyら, 1978; Zeikus, 1980; Ngら, 1981; Zertucheら, 1982; Ohmiyaら, 1983; Tayaら, 1984), リグノセルロースを加水分解酵素によって単糖類にまで糖化し、糖類を菌体蓄積性の微生物により SCP (Single Cell Protein) あるいは *Saccharomyces cerevisiae* 等によりエタノールへ変換するプロセスに、より強い関心が持たれている (Su, 1978; Bernhardtら; 石原; Ladischら; Weiss, 1979; Seidlら; 田中, 1980; Huff; 越島, 1981; Gargら, 1982; Saddlerら, 1982 a, b; Uengら, 1982; Dekkerら; 上久保ら; Koshijimaら; Majdanacら; Pulsら, 1983; 志水, 1983 b; Shinkeら, 1983; Crosthwaiteら, 1984)。リグノセルロースの糖化工程で、セルラーゼやヘミセルラーゼなどの多糖類加水分解酵素が必要となるが、現在、*Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, *Irpez lacteus* 等を起源とするセルラーゼ系酵素がわが国で工業的に生産されており、実用化に近い段階にある。また、セルラーゼ、ヘミセルラーゼを効率的に産生する菌株を得るために優良な系統の選抜 (Saddler, 1982 c; Thejaら, 1983; Macris; Mishraら, 1984) やそれらの育種、改良の研究 (Mishraら, 1982; Bernierら; Erikssonら; Moloneyら; Panbangredら; 1983; Panbangredら, 1984) も進められている。

自然界で木材を分解する微生物群は木材腐朽菌と呼ばれ、腐朽の形態により白色腐朽菌、褐色腐朽菌および軟腐朽菌に大別される。本論文で褐色腐朽菌の産生する多糖類加水分解酵素を研究対象とした理由は、褐色腐朽菌に以下のような興味深い特徴が認められているからである。

- (1) リグニンの分布する木材細胞壁のセルロース、ヘミセルロースを選択的に分解し、腐朽末期にはほとんどリグニンからなる細胞壁の原形が残渣として残る (Liese; Wilcox, 1970)。
- (2) 重量減のわずかな腐朽初期の段階で、木材セルロースの重合度を急激に低下させる (香山, 1962; Cowling, 1969)。

(3) リグニンの量が多く、構成単位間の縮合度も高いことなどから、針葉樹材は酵素糖化のために広葉樹材よりも過酷な前処理が必要であると考えられているが (Shimizu ら, 1983), 褐色腐朽菌の侵害力はリグニンの存在によって影響を受けず、むしろ針葉樹材に多く出現する。近年、北海道で褐色腐朽菌による木造家屋の甚大な被害が報告されている (土居ら, 1981)。

(4) 褐色腐朽菌はセルロース分解性の微生物であるにもかかわらず、 C_1 -セルラーゼを欠如しているとみられている (Highley, 1973)。これまで、 C_1 -セルラーゼの欠如したセルラーゼ系酵素による結晶セルロースの分解に関する研究例は極めて少なく、その機構は十分解明されていない。

木材細胞壁中の多糖類成分をセルラーゼ、ヘミセルラーゼで単糖類にまで速やかに加水分解する上で、2つの阻害要因が考えられる。第1に、主要な多糖類成分であるセルロースが高結晶性であること、第2に、リグニンが細胞壁の大半を占める2次壁中でセルロースやヘミセルロースと化学的、物理化学的に緊密に結合し、酵素の基質への接近を妨げていることである。褐色腐朽菌は木材中の結晶セルロースを分解する能力を持ち、また脱リグニン処理を必要とせずセルロース、ヘミセルロースを選択的に分解するなど、木材の酵素糖化における2つの障害を克服している。そこで、褐色腐朽菌の分解機作を酵素レベルで究明することは、木材の酵素糖化技術の発展に重要な示唆を提示するものと期待される。

オオウズラタケ *Tyromyces palustris* (Berk. et Curt.) Murr. FPRI 0507 は、褐色腐朽菌のなかでは最も生育の早いものの一つで、針葉、広葉樹材に対して著しい重量減を引起すことから、木材の腐朽試験 (JIS Z 2119) および木材の防腐効力試験 (JIS A 9302) の規格に採用されている。分類学上は、ヒダナシタケ目 (Ahylophorales) サルノコシカケ科 (Polyporaceae) に属する。この菌株は第二次大戦前に分離され、林業試験場の保存の下にワタグサレタケ *Poria vaporaria* (Pers. ex Fr.) Cooke として日本で広く培養されてきた。しかし青島 (1962) による米国の *Tyromyces palustris* との和合現象の研究から *Poria vaporaria* は同定違いであったことが報告されている。

セルロースの酵素による分解機構は未だ十分に解明されていないが、本稿では結晶性のセルロース (濾紙や α -セルロース) に対して糖化力を示す酵素を C_1 -セルラーゼ (したがって本稿での C_1 -セルラーゼは必ずしもセロビオヒドロラーゼに相当しない)、また水溶性のセルロース誘導體 (カルボキシメチルセルロース) に対して糖化力を示す酵素を C_x -セルラーゼと表現した。

本論文の構成とその概要を示せば以下のとおりである。

第1章では褐色腐朽による木材成分の化学的変化について述べる。腐朽過程における褐色腐朽菌の基質選択性、ならびに褐色腐朽菌によるセルロースの重合度低下および結晶化度低下の作用について考察する。

第2章ではオオウズラタケのセルラーゼ、ヘミセルラーゼの産生と培養条件の関係について述べる。また、*in vivo*での褐色腐朽菌による結晶セルロースの分解に非酵素的因子が関与し、褐色腐朽菌の産生する多糖類加水分解酵素系に C₁-セルラーゼの欠如している可能性を検討する。

第3章ではオオウズラタケの産生する菌体外の酵素系から、各種のカラムクロマトグラフィによる C_x-セルラーゼ、マンナーゼ、キシナーゼおよびβ-キシロシダーゼのそれぞれの精製とそれらの精製酵素の諸性質について述べる。

第4章では第3章で述べるキシナーゼおよびマンナーゼを用いて、広葉樹材、針葉樹材の主要なヘミセルロースである4-O-メチルグルクロノキシランとグルコマンナンを酵素分解し、得られた各生成物の構造と収量から両酵素の基質特異性およびヘミセルロースの酵素糖化における化学構造上の問題点を検討した結果を述べる。

第 1 章 褐色腐朽の特性について

1.1 緒 言

木材を分解する微生物は木材腐朽菌と総称されるが、腐朽形態の相違によって、担子菌類 (Basidiomycetes) に属する白色腐朽菌と褐色腐朽菌、および子嚢菌類 (Ascomycetes) または不完全菌類 (Fungi Imperfecti) に属する軟腐朽菌に大別される。それらの木材腐朽菌の分布、木材細胞壁に対する攻撃様式、菌糸の侵入・蔓延に伴う細胞壁の微細構造や構成成分の変化など、木材の微生物分解機構は、かなり詳細なところまで解明されてきている (Meier, 1955 ; Cowling, 1969 ; Keilich ; Liese ; Wilcox, 1970 ; 原口, 1975 ; 布施, 1982)。

木材腐朽菌のうち、白色腐朽菌だけはリグニンを含むすべての木材成分を分解する能力を有する。褐色腐朽菌と軟腐朽菌のリグニン分解能力は限られており、木材中の炭水化物を選択的に分解するが、腐朽形態の上で両者は異なる。軟腐朽は、針葉樹材にも広葉樹材にも出現するが、後者に被害が多く、菌糸が細胞壁へ侵入すると繊維軸方向にセルロースマイクロフィブリルに沿って、らせん状に生長し、二次壁中層 (S_2) を直接蝕害し空洞化して、軟腐朽に特有の Cavity を形成する。しかし、軟腐朽の場合、その攻撃は菌糸の近傍に限られている。褐色腐朽菌は針葉樹材に比較的多く出現し、その菌糸が細胞内腔に侵入して、細胞壁と接触し、多糖成分の分解酵素を分泌する。菌体外の酵素は二次壁内層 (S_3) から中層 (S_2) へと浸透拡散し、酵素により分解された生成物は菌糸体に取り込まれ、代謝される。白色腐朽菌の場合、細胞内腔に入った菌糸は、まず S_3 層を攻撃し、 S_2 層、 S_1 層 (二次壁外層) と内側から順々に細胞壁を溶解し、薄くしながら、細胞壁の分解を進めていくが、一方、褐色腐朽菌はリグニン分解力を実質的に持たないため、リグニン分布の少ない S_2 層が最初に分解を受け、続いて S_1 層、 S_3 層にも分解が進み、腐朽末期にはほとんどリグニンからなる細胞壁の原形が残渣として残る。

天然セルロースの微生物分解は、複数の酵素の相乗作用 ($C_1 + C_x$) で行われるという考え方が一般化しつつあるが (Reese, 1950 ; Eriksson, 1972 ; Nisizawa, 1973), 白色腐朽菌についても、固体セルロースに対する C_1 , C_x タイプのセルラーゼの作用の相乗効果が報告されている (Streamer, 1975 ; Kanda, 1976)。しかしながら、褐色腐朽菌については結晶性のセルロースの分解に必須の C_1 -セルラーゼ (β -1, 4-グルカンセロビオヒドロラーゼ) 成分についての報告例がなく (Highley, 1973 ; Ishihara, 1984 a), 褐色腐朽菌による天然セルロースの分解機構が

十分解明されているとは言えない。

褐色腐朽菌の攻撃を受けた木材セルロースは、腐朽による重量減がわずかでも重合度は大幅に低下するが、褐色腐朽と対照的に白色腐朽では腐朽が進行しても腐朽材セルロースは健全材に近い重合度を保持している（香山，1962；Cowling，1969）。したがって、同じ重量減少率で腐朽材の物理的強度を比較すると、白色腐朽よりもセルロース鎖のランダムな切断を受ける褐色腐朽の方が強度低下は速やかである（Merrillら，1965）。また、褐色腐朽菌は純粋なセルロース基質で培養した場合、セルロースを分解しないが、木材などのようにリグニンや炭水化物を含む培地で培養するとセルロースを分解すると報告されている（Nilsson，1974；Highley，1977）。

褐色腐朽菌によるセルロース繊維の分解を追跡した最近の電子顕微鏡観察（Highleyら，1983 a, b）によれば、褐色腐朽菌菌糸は繊維表面や繊維間にランダムに生長するが、菌糸が接触している繊維表面に局部的分解とみられる Erosion を形成せず、また細胞壁への菌糸の侵入も認められなかった。供試されたいずれの褐色腐朽菌においても菌糸を包む菌体外マトリックス（Sheath）が存在し、Sheath が菌糸からかなり離れた距離に伸びて繊維をおおっていたことが観察されている。すでに同様な Sheath は木材の腐朽で観察されており（Palmerら，1983 a, b），腐朽菌の分泌する酵素の輸送や分解生成物の取込みを機能するものと考えられてきている。とくに褐色腐朽菌では菌糸の侵入を受けていない繊維においても、セルロースは分解を受けており、セルロースの初期分解に関与する菌体内物質の低分子解重合剤〔Small diffusible depolymerizing agent；Highley（1982）の提案では菌体外で $\cdot\text{OH}$ ラジカルとして存在する〕の濃縮や移動において Sheath が重要な役割を果たすであろうと示唆されている。

第1章では褐色腐朽菌の産生する多糖類加水分解酵素に関する基礎的知見を得ることを目的として、カラマツ（*Larix leptolepis*）およびシラカンバ（*Betula platyphylla*）をオオウズラタケ（*Tyromyces palustris*）で腐朽させ、褐色腐朽にともなう木材成分の化学的変化を追跡した。腐朽過程における褐色腐朽菌の基質選択性、ならびに褐色腐朽菌によるセルロースの重合度および結晶化度の低下作用について述べる。

1.2 実 験

1.2.1 供 試 菌

オオウズラタケ *Tyromyces palustris* (Berk. et Curt.) Murr. FPRI 0507 を使用した。

1.2.2 腐朽材の調製

1.2.2.1 針葉樹材ブロックの腐朽

600 ml容の培養ビンに、100 mlの麦芽寒天（ディフコ社，U.S.A.；麦芽抽出物3%，寒天1.5%，滅菌後のpH 5.5）を入れ，オオウズラタケを接種した。1週間経過後，寒天の上にオオウズラタケの菌糸体がマット状に広がってから，カラマツ（*Larix leptolepis*）の辺材，心材ブロック（各20×20×3，mm）を無菌条件下で菌糸体の上に乗せ，温度26℃，相対湿度90%の室内で3～14週間腐朽させた。腐朽後，各ブロック表面の菌糸体を取り除き，真空乾燥機を用いて40℃で乾燥し，恒量値から重量減を求めた。各種の分析に供試するにあたって，腐朽材ブロックを40～80メッシュに粉砕した。

1.2.2.2 固型培養法による広葉樹材の腐朽

培養函（ステンレス18×24×5，cm）を用いてオオウズラタケを2～9週間固型培養した。培地は蒸煮シラカンバ材〔*Betula platyphylla*，チップを水蒸気圧13%で20分蒸煮し，リファイナー（クリアランス：5mm）で解繊した〕を水洗したものの160g（乾量）を唯一の炭素源とし，ペプトン20g，イーストエキス2g，KH₂PO₄ 2g，Na₂HPO₄ 200mg，MgSO₄·7H₂O 1g，CaCl₂ 600mg，FeSO₄·7H₂O 20mg，MnSO₄·4H₂O 2mg，CuSO₄·5H₂O 4mg，CoCl₂ 4mgからなり，水分はシラカンバ材重量の307%に調整した。上記と同じ組成の培地でオオウズラタケを1週間固型培養したものの20gを接種して，26℃で所定期間培養後，7.5ℓのM/10酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液（pH 3.80）により，固型培地中に生産された酵素をホモゲナイザーを用いて抽出した。遠心分離により酵素抽出液と培養残渣に分離し，培養残渣は真空乾燥機を用いて40℃で乾燥し，恒量値から重量減を求めた。上澄の酵素抽出液は第2章の実験試料に供した。

1.2.3 リグニンの定量

クラークソン・リグニンはJIS P 8008にしたがって求めた。酸可溶性リグニンは，クラークソン・リグニン定量時の濾液の205 nmにおける吸光度から， $\epsilon = 110 \text{ l/g}\cdot\text{cm}$ （Swan，1965）を用いて算出した。

1.2.4 腐朽材の糖組成分析

腐朽材中の多糖の糖組成分析は，クラークソン・リグニン定量時の濾液を試料として，

Kesler (1967)の方法にしたがい、テクニコン糖分析計で行った。

1.2.5 腐朽材多糖のフェニルカルバモイル化

腐朽材中の多糖の分子量分布の測定のため、多糖のフェニカルバモイル化誘導体を、Kösslerら(1981)の方法にしたがって調製した。まず、40~80メッシュに粉碎した腐朽材木粉を亜塩素酸塩法(Browning, 1967)によって脱リグニン処理し、得られた腐朽材ホロセルロース0.1gをフラスコに入れ、40℃、真空下で一晩乾燥後、蒸留精製した乾燥ピリジン7mlと蒸留精製したフェニルイソシアネート3mlを加え、100℃で10時間反応させた(Schroederら, 1979)。反応後、フェニルカルバモイル化したホロセルロースをアセトンに溶解し、溶液からメタノールで沈澱させた。沈澱物をメタノールで洗浄し、40℃、真空下で乾燥した。対照試料として、健全材のホロセルロース、ホロセルロースからアルカリ抽出したキシランとグルコマンナンおよびアルカリ抽出残渣である α -セルロースのフェニルカルバモイル化試料をそれぞれ調製した。

1.2.6 ゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー(GPC)

フェニカルバモイル化した腐朽材多糖の分子量分布は、GPCによって測定した。装置は東洋曹達社HLC-802UR型で、縦に接続した2本の60cmカラム(TSK-GEL GMH₆, 東洋曹達社)を使用した。フェニルカルバモイル化したサンプルをテトラヒドロフランに0.2%で溶解させ、メンブランフィルターで痕跡の不溶部を除いた後、0.5mlをカラムにインジェクトした。溶媒はテトラヒドロフラン、流速は1.0ml/min、検出には屈折計を使用した。

1.2.7 結晶化度の測定

腐朽材多糖の結晶化度はX線回折法により求めた。亜塩素酸塩法により脱リグニン処理した腐朽材ホロセルロース200mgをIR試料調製用の錠剤成型器で5分間100%で加圧し、無配向の円板状の試料(20mm ϕ × 1mm^T)を作製した。NiフィルターによるCu-K α の単色X線源を装備したX線回折装置(理学電機社、モデル4032A2)を用いて管電圧30kV、管電流15mAで、回折角 $2\theta = 40^\circ$ から 5° まで $2^\circ/\text{min}$ の回転速度で測定した。結晶化度はX線回折図の結晶部分、非晶部分の面積比率から、Jaymeら(1964)の方法にしたがって算出した。

1.3 結果と考察

1.3.1 腐朽過程における褐色腐朽菌の基質特異性

木材腐朽菌は木材細胞壁中のセルロースやヘミセルロースを炭素源として利用し、分解を進めていくが、それらの炭水化物成分の相対的な分解速度について検討した例は限られている。香山(1962a, 1964)は、パルプ原木としての腐朽材の評価に関する研究で、ヘミセルロースはグルカンよりも分解消失率が高く、褐色腐朽菌はマンナンを、白色腐朽菌はキシランを選択的に分解することを報告している。Kirkら(1973)は白色腐朽菌、褐色腐朽菌による針葉樹材の主要成分の量的経時変化を追跡し、グルカンよりもマンナンおよびキシランが早期に分解消失する結果を得たが、その傾向は褐色腐朽菌により強く認められた。ただし、香山およびKirkらの報告では、ペーパークロマトグラフィーによる糖分析でガラクトースとグルコースが分離されておらず、ガラクトースはグルコースの一部として定量されている。また針葉樹材の主要なヘミセルロースであるグルコマンナンには25%前後のグルコース残基が含まれているが(Timell, 1965; 越島, 1968), グルカンの値についてこのグルコマンナン由来のグルコース量の補正も省略されている。

白色腐朽菌は広葉樹材に、褐色腐朽菌は針葉樹材に比較的多く出現するが、Lewis(1975)は広葉樹と針葉樹に分布するヘミセルロースの相違に基づく木材腐朽菌の基質選択性について研究し、針葉樹材を攻撃する腐朽菌は広葉樹キシランよりも針葉樹グルコマンナンに対してより大きい分解力を持ち、一方、広葉樹材を攻撃するものは広葉樹キシランに対してより高い分解力を示すと報告している。また、木材腐朽菌の産生するキシラナーゼについて、針葉樹キシランを分解するキシラナーゼは普遍的に存在するが、広葉樹キシランを分解するキシラナーゼの存在は限定されると示唆している。

Highley(1976)は、広葉樹木粉、針葉樹木粉をそれぞれ培地とした場合の白色腐朽菌および褐色腐朽菌の産生するヘミセルロース分解酵素の相違から木材腐朽菌の宿主選択性を検討したが、白色腐朽-広葉樹材、褐色腐朽-針葉樹材の選択性を積極的に肯定する結果は得られなかった。また、褐色腐朽菌のCx-セルラーゼ、ヘミセルラーゼのインデューサーとして、木材多糖成分のうちマンナンが最適であり、結晶セルロースは最不適であったことを報告している。

Rypáček(1977)は木材ヘミセルロースを構成する単糖類を炭素源として菌糸の生長を比較し、木材腐朽菌の基質選択性を検討した。広葉樹材にのみ、あるいは針葉樹材にのみ出現する木材腐朽菌には、それぞれ糖の種類により菌糸の生長に差が認められたが、*Pleurotus ostreatus*(白色腐朽菌)や*Phaeolus schweinitzii*(褐色腐朽菌)の

よりに広葉樹材，針葉樹材の両者を宿主としうる木材腐朽菌では，特定の糖類への選択性は認められなかった。

以上述べてきたように，木材腐朽菌の産生する加水分解酵素と木材中の多糖成分の関係について，まだまだ曖昧な点が多い。そこで，ヘミセルロースとしてマンナンとキシランを含有するカラマツ材を対象としてオオウズラタケの基質選択性を検討した。

カラマツ材の辺材部および心材部から調製したブロックをオオウズラタケにより26℃で3～14週間強制腐朽させた。腐朽による重量減は腐朽期間に応じて増加し，14週間腐朽の辺材部で65%，心材部で58%に達した。重量減を腐朽の進行の指標として，各腐朽段階の辺材部，心材部についてリグニンの定量と腐朽材中の糖組成分析を行った。辺材および心材における木材成分組成の変化をそれぞれ図1および図2に示した。

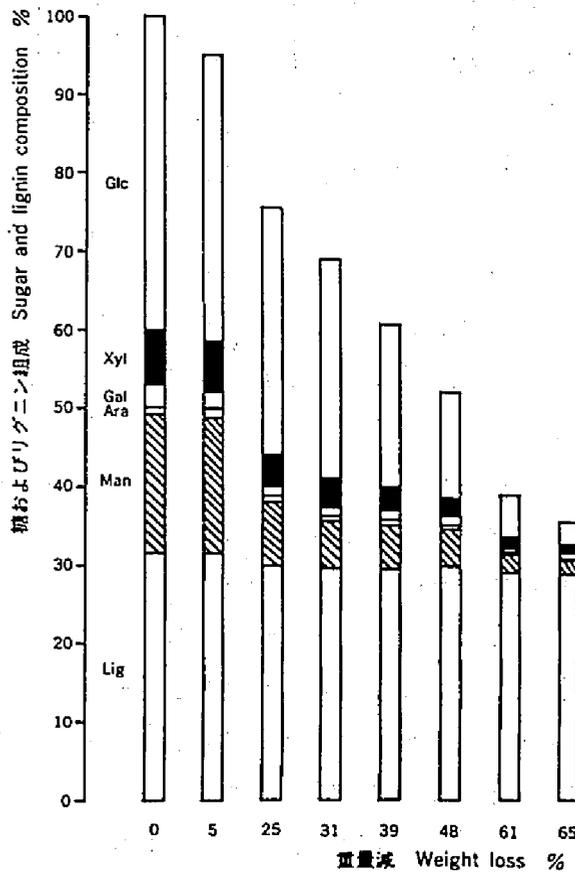


図1. 腐朽過程におけるカラマツ辺材の糖組成およびリグニン含量

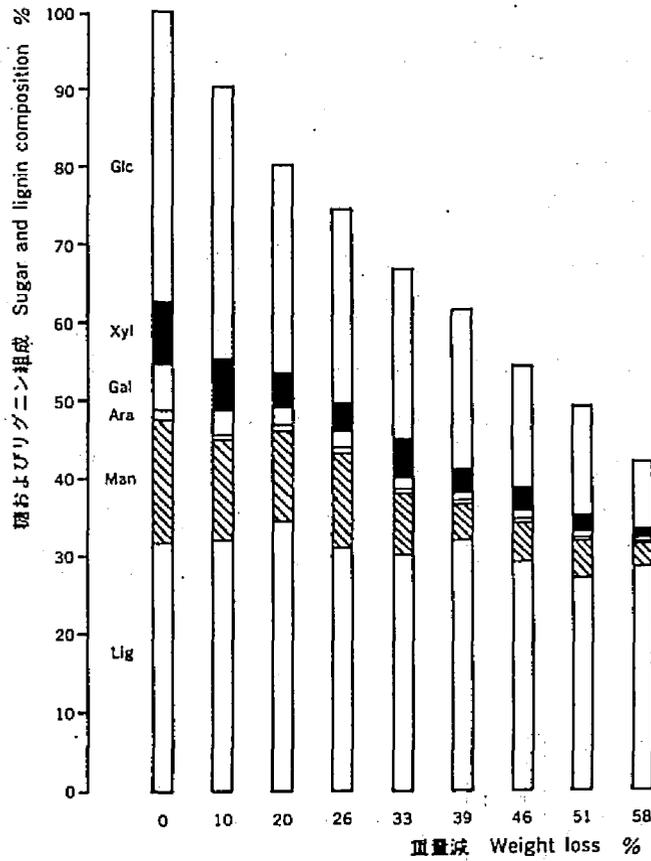


図2 腐朽過程におけるカラマツ心材の糖組成およびリグニン含量

オオウズラタケは木材中のセルロース，ヘミセルロースを選択的に分解し，腐朽が進行してもクラフン・リグニンと酸可溶性リグニンのトータルは健全材のリグニン含量とほとんど変化していないことが認められた。酸可溶性リグニンの量は腐朽の程度が進むにつれて辺心材ともに若干増加した。

腐朽材の糖組成分析の結果から，各腐朽段階におけるカラマツ辺心材の多糖成分（セルロース，キシラン，グルコマンナン）の分解率を求め，オオウズラタケの基質選択性を検討した。辺材および心材の結果をそれぞれ図3および図4に示した。多糖成分の分解率を算出するにあたり，針葉樹材のグルコマンナンは β -(1 \rightarrow 4)-結合の直鎖状の構造をもつポリマーで，構成するD-グルコース残基とD-マンノース残基の比率を1:3とし，またD-グルコース残基がグルコマンナン中にランダムに分布していると仮定した（Timell, 1965；越島, 1968）。すなわち，多糖成分のうち，キシランとグルコマンナンの分解率は腐朽によって消費されたキシロースおよびマンノースのそれぞれの比率によって推定したが，セルロースの分解率はグルコマンナンの分解に由来するグルコース量を補正して求めた。

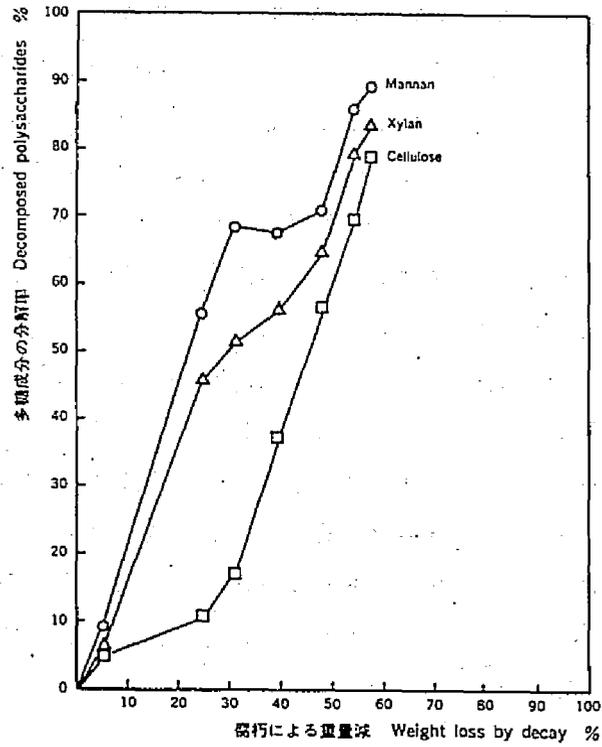


図 3. カラマツ辺材の腐朽過程における多糖成分の分解率

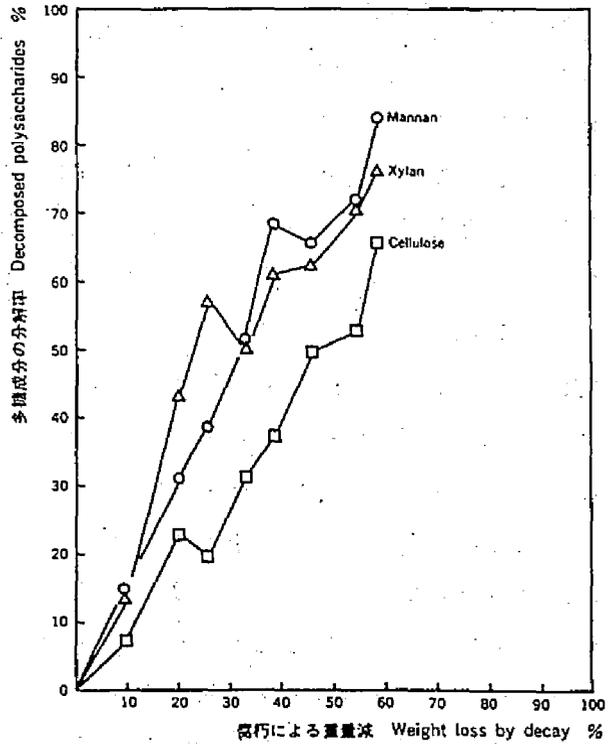


図 4. カラマツ心材の腐朽過程における多糖成分の分解率

辺材の場合、オオウズラタケにはグルコマンナン>キシラン>セルロースというはっきりとした基質選択性の順序が認められ、セルロースの分解は腐朽の初期で弱く、重量減が30%を越す段階から急速に進んだ。心材では、カラマツに特有の多糖成分であるアラビノガラクトンが存在することや微生物の生長にマイナスの影響を及ぼす微量の心材成分など結果をより複雑にする因子が考えられるが、腐朽の初期段階ではキシランがグルコマンナンより分解されやすく、腐朽の進行とともにその関係は逆になった。褐色腐朽菌 *Poria Placenta* の培養濾液によって、水溶性多糖であるアラビノガラクトンは全く分解されなかったと報告されている (Highley, 1976)。しかし、その存在量はグルコマンナンやキシランに比べるとはるかに少なく、オオウズラタケによる心材腐朽の場合、ガラクトースの大半は腐朽の初期に消失することが認められた。セルロースは辺材の場合と同様、ヘミセルロース成分よりも分解を受けにくかった。オオウズラタケは広葉樹材、針葉樹材の両者を宿主としうる木材腐朽菌であるが、カラマツ辺心材の腐朽過程からセルロースよりもヘミセルロース、とくにマンナンを優先的に攻撃すると考えられる。

1.3.2 褐色腐朽による木材セルロースの重合度低下

腐朽の進行による木材多糖の重合度変化を知るために、腐朽材から調製したホロセルロースをフェニルカルバモイル化誘導体に変換し、ゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー (GPC) により分子量分布を調べた。フェニルカルバモイル化セルロースが比較的安定な誘導体であることが見いだされ (Burchhard, 1964)、さらに GPC でセルロースの分子量分布を測定するための誘導体として、従来用いられてきた硝酸セルロースと比較してフェニルカルバモイル化セルロースの優れている点が報告されている (Valtasaari ら, 1975)。

健全なカラマツ材から単離した多糖成分であるホロセルロース、 α -セルロース、キシランおよびグルコマンナンのゲル・パーミエーション・クロマトグラムと分子量マーカールとしての数種のポリスチレンの溶出位置を図5に示した。ホロセルロースのクロマトグラムではセルロースの重合度分布に相当する第1のピークが、高分子側の溶出位置 (26 ml) に、ヘミセルロースの存在に基づく第2のピークが低分子側 (29 ml) に現れた。ホロセルロースよりアルカリ抽出したヘミセルロースおよびアルカリ抽出残渣の α -セルロースは、いずれもホロセルロースの対応するピークよりも低分子側に溶出したが、アルカリ抽出操作の過程で、ある程度重合度が低下したものとみられる。

オオウズラタケに腐朽を受けたカラマツ辺材から調製したフェニルカルバモイル化ホ

ロセルロースのゲル・パーミエーション・クロマトグラムを図6に示した。腐朽の進行

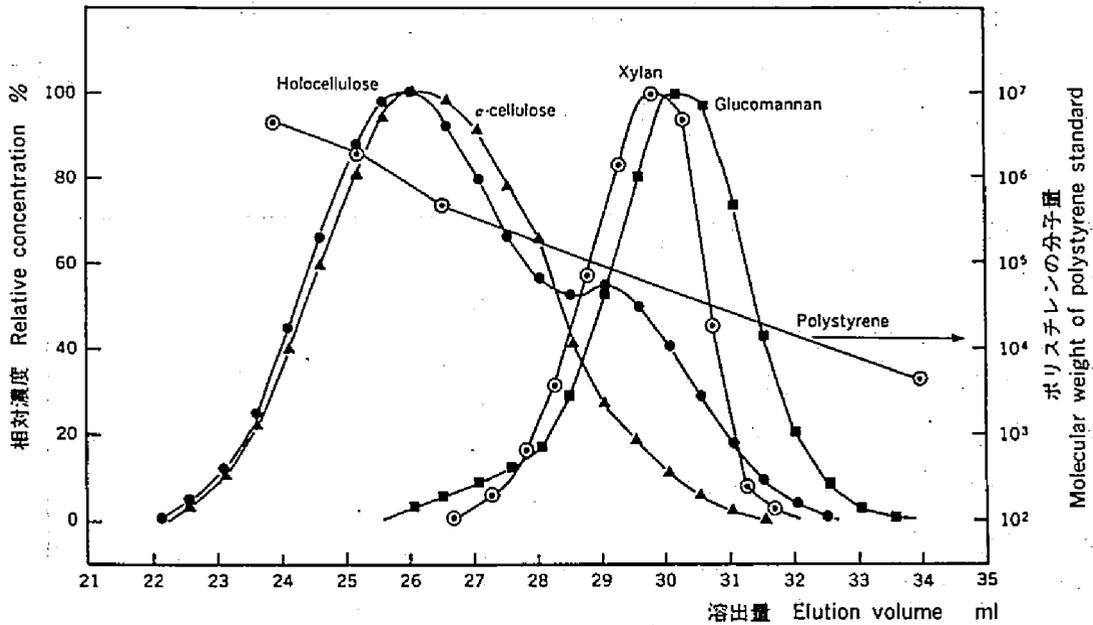


図5. ホロセルロース, α -セルロース, キシランおよびグルコマンナンのゲル・パーミエーション・クロマトグラムと分子量既知ポリスチレンの溶出位置

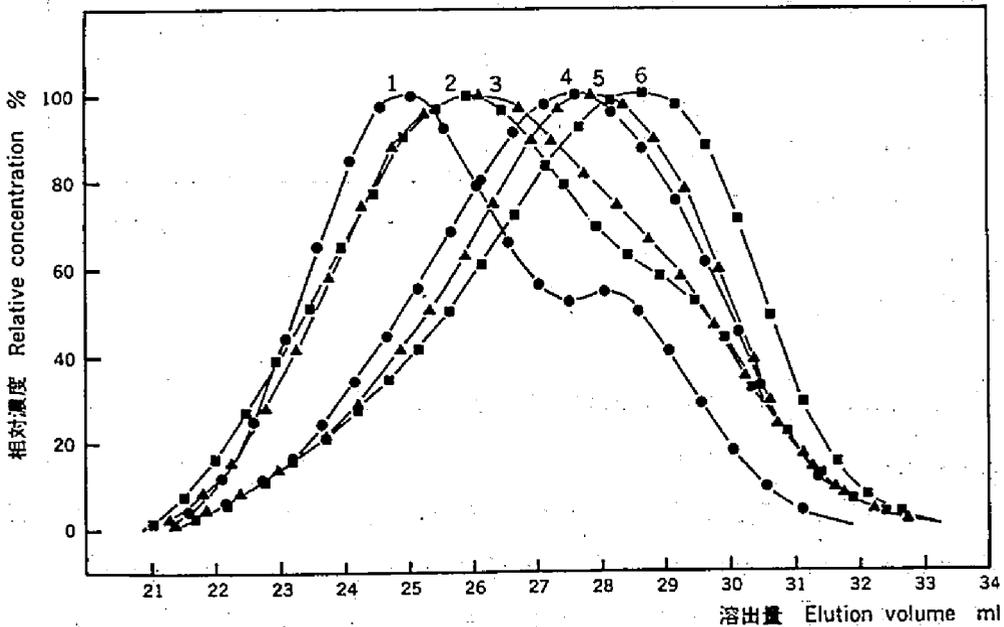


図6. 腐朽過程におけるカラマツ辺材ホロセルロースのゲル・パーミエーション・クロマトグラム
 1. 健全材, 2. 重量減 0.0%, 3. 重量減 5.1%, 4. 重量減 24.6%
 5. 重量減 31.1%, 6. 重量減 39.3%

とともにセルロースの第1のピークは低分子側に移行し、また第2のピークは腐朽初期の段階でショルダーとなり次いで消失した。セルロースの重合度分布が腐朽の進行とともに低分子側に移行したので、ヘミセルロースの重合度低下の経過は明らかでないが、オオウズラタケの腐朽により腐朽材中の多糖成分の解重合は着実に進んでいる。心材の腐朽においても、辺材と同様の傾向が認められた。

腐朽に伴うカラマツ辺心材ホロセルロースの数平均分子量の低下の経過を図7に示した。腐朽による重量減が15%程度までの初期段階で、腐朽材ホロセルロースの重合度は大幅に低下し、それ以降の腐朽段階で重合度の低下は緩やかになった。褐色腐朽菌 *Poria monticola* による Sweetgum (*Liquidambar styraciflua*) 辺材の腐朽について化学的研究を行なった Cowling ら (1969) も、10~20%の重量減で腐朽材ホロセルロースの重合度が level-off 重合度にまで速やかに低下したと報告している。Cowling らの結論と同様、褐色腐朽菌は腐朽の初期段階に非晶部分を選択的に分解し、腐朽の進んだ段階での腐朽材ホロセルロースの重合度はセルロース結晶部分の重合度に相当すると考えられる。

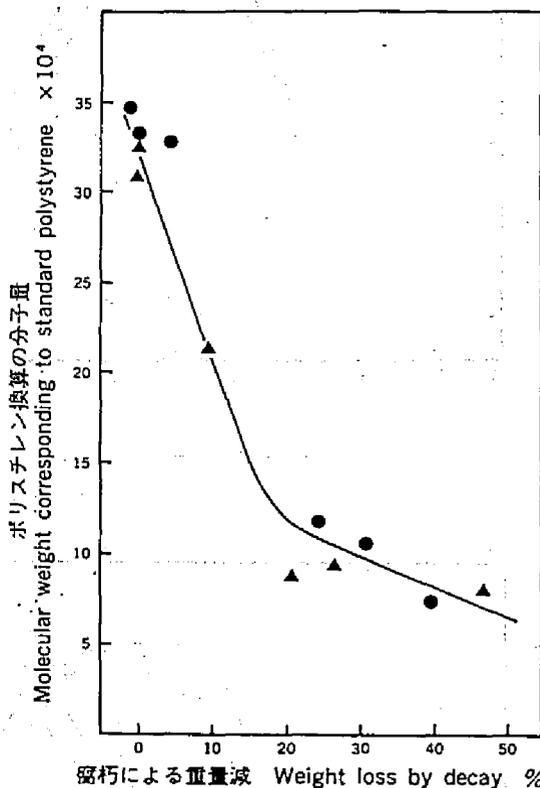


図7. 腐朽によるカラマツホロセルロースの重合度低下
▲: 心材, ●: 辺材

1.3.3 褐色腐朽による木材セルロースの結晶化度の低下

褐色腐朽によるシラカンバおよびカラマツホロセルロースの結晶化度の変化をX線回折法により追跡した。腐朽程度の異なるシラカンバ材から調製したホロセルロースのX線回折図を図8に示した。得られた結果は、002面の回折ピークが $2\theta = 22.6^\circ$ に、また101面および $10\bar{1}$ 面の回折ピークが $2\theta = 14^\circ \sim 18^\circ$ に現れ、典型的なセルロースIの回折パターンを示した。腐朽が進んだ段階では、002面と、101面および $10\bar{1}$ 面の回折ピークの強度がそれぞれ著しく低下し、オオウズラタケの腐朽によってセルロースの結晶部分も分解を受けることは明らかである。カラマツ腐朽材について

もシラカンバ腐朽材と同様の結果を得た。

シラカンバおよびカラマツ腐朽材のホロセルロースの回折図形から、各腐朽段階におけるそれぞれの結晶化度を算出した。腐朽による重量減と腐朽材ホロセルロースの結晶化度の関係を図9に示した。シラカンバ、カラマツともに、腐朽による重量減が20%程度まで腐朽材ホロセルロースの結晶化度は漸増し、それ以降の段階では次第に低下することが認められた。この結果から、腐朽の初期段階で非晶領域のセルロースの分解が優先し、腐朽が進むにつれて結晶領域のセルロースも分解を受けるものと考えられる。

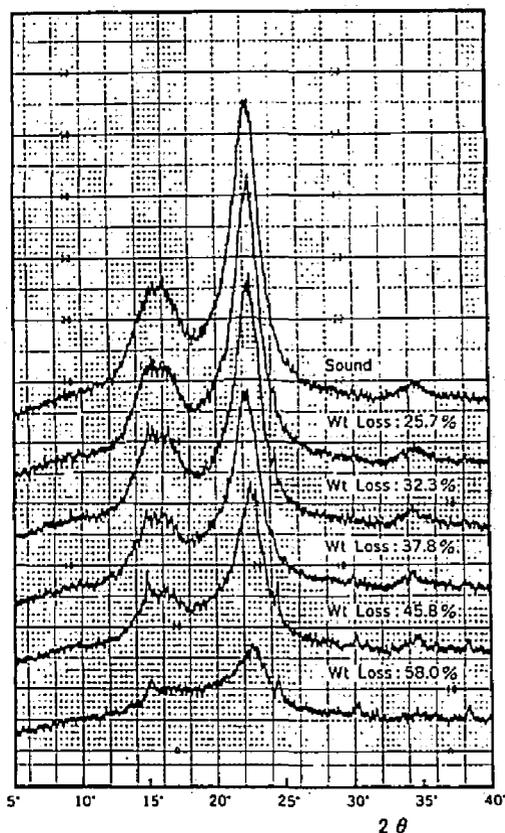


図8. 腐朽過程におけるシラカンバホロセルロースのX線回折図

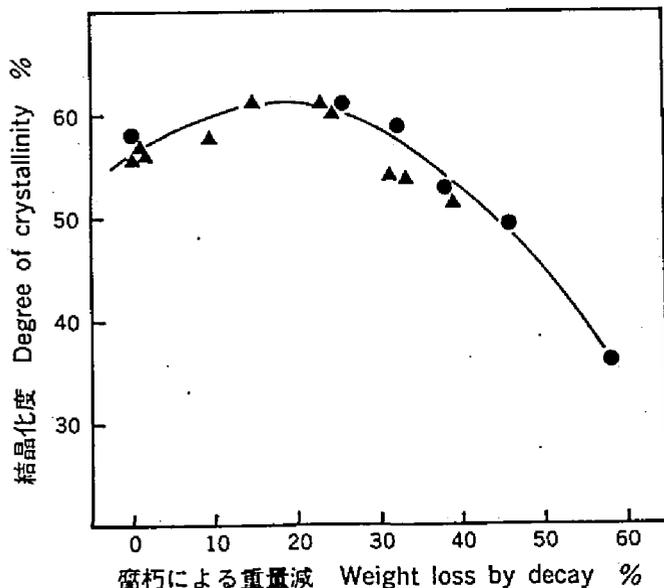


図9. 腐朽によるカラマツおよびシラカンバホロセルロースの結晶化度の変化

▲ : カラマツ, ● : シラカンバ

1.4 要 約

褐色腐朽菌オオウズラタケは9～14週間の実験室レベルの腐朽で針葉樹材，広葉樹材に関係なく，50.0%以上の重量減を生じさせた。各腐朽段階におけるカラマツ腐朽材の糖組成分析およびリグニンの定量結果から，オオウズラタケはセルロースよりもヘミセルロース，とくにマンナンを選択的に攻撃することが明らかとなった。また分解を受けないリグニンは腐朽残渣として集積された。腐朽材ホロセルロースのGPCおよびX線回折の分析結果から，褐色腐朽の特性としてホロセルロースの重合度および結晶化度の低下作用を考察したが，重合度低下は腐朽の初期段階（重量減：15～20%まで）で，結晶化度の低下は初期段階以降（重量減：20%以上）で顕著であることを認めた。

第 2 章 オオウズラタケのセルラーゼ，ヘミセルラーゼ生産のための培養条件について

2.1 緒 言

自然界で木材の微生物分解の主役を担っているのは担子菌類であるが、白色腐朽菌と褐色腐朽菌の比較研究によって担子菌類の産生するセルラーゼの特徴が明らかにされてきた。横田(1955)は19種類の木材腐朽菌を用いてそれらのセルラーゼ活性を比較し、一般に、澱紙の分解力(C₁-セルラーゼ)は白色腐朽菌が褐色腐朽菌をはるかに上回り、逆にC_x-セルラーゼは褐色腐朽菌の方がより顕著であると報告している。King(1966)は褐色腐朽菌 *Coniophora cerebella* (イドタケ)の液体培養からの菌体外酵素系にC_x-セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、グルコアミラーゼ、ラミナリナーゼ、ペクチナーゼおよび数種のグリコシダーゼの諸活性を認めたが、*C. cerebella* のC₁-セルラーゼ活性は非常に僅少であった。Highley(1973)は、白色腐朽菌3種、褐色腐朽菌3種を用いてそれぞれのセルラーゼ活性に及ぼす炭素源の影響を検討したが、白色腐朽菌からC₁- およびC_x-セルラーゼが誘導的に産生されたのに対して、褐色腐朽菌ではC₁-セルラーゼは見出されず、C_x-セルラーゼは構成酵素として、すなわち、単糖類や非セルロース系の多糖類を炭素源としても産生されることを認めた。Nilsson(1974)は褐色腐朽菌のC₁-セルラーゼ活性の発現について詳細に検討し、褐色腐朽菌の結晶セルロースを分解する能力はリグニンにおおわれたセルロース培地で生ずるものであり、セルロースのみの培地ではC₁-セルラーゼを産生しないと示唆している。

褐色腐朽菌の産生する多糖類加水分解酵素は、菌体細胞壁の分解に関与するラミナリナーゼを例外として、いずれも誘導酵素であるという説(King, 1966)と、単糖類や非セルロース系の多糖類を炭素源としても産生されうることから、少なくともC_x-セルラーゼは構成酵素であるという説(Highley, 1973)があるが、いずれにしてもセルラーゼ、ヘミセルラーゼおよび関連するグリコシダーゼの生産にあたっては、Induction effect (誘導効果)とCatabolite repression (グルコース阻害)を考慮しなければならない。とくに、担子菌類のセルラーゼの産生は菌体の増殖の総量よりも増殖速度によって大きく影響される(Hulmeら, 1974)ことから、インデューサーの選択の外に、単糖類など取込の容易な炭素源の種類や濃度を検討することが必要である。

芝本ら(1952)はグルコースとマルト・エキスを含む液体培地で、白色腐朽菌は集積されたシュウ酸をギ酸と炭酸ガスに分解し、培地のpHがアルカリ側に戻ることを認めたが、褐色腐朽菌ではシュウ酸を分解することができず、培養日数が経過しても培地

の pH は低酸性側の約 1.8 にとどまっていることを報告した。島菌ら (1955, 1957) は白色腐朽菌 *Collybia velutipes* からシュウ酸をギ酸と炭酸ガスに分解する酵素 (シュウ酸脱カルボキシラーゼ) を分離精製しその性質を報告している。褐色腐朽菌は、シュウ酸脱カルボキシラーゼを持たず、培地にシュウ酸を集積する。炭水化物からの中間分解物であるオキサロ酢酸は低い pH 条件下で脱炭酸されるが、高い pH 条件下ではシュウ酸を生成する (図 10)。したがって褐色腐朽菌のシュウ酸の集積濃度は培地の生理学的アルカリ度で決まると考えられている (De Stevens ら, 1951)

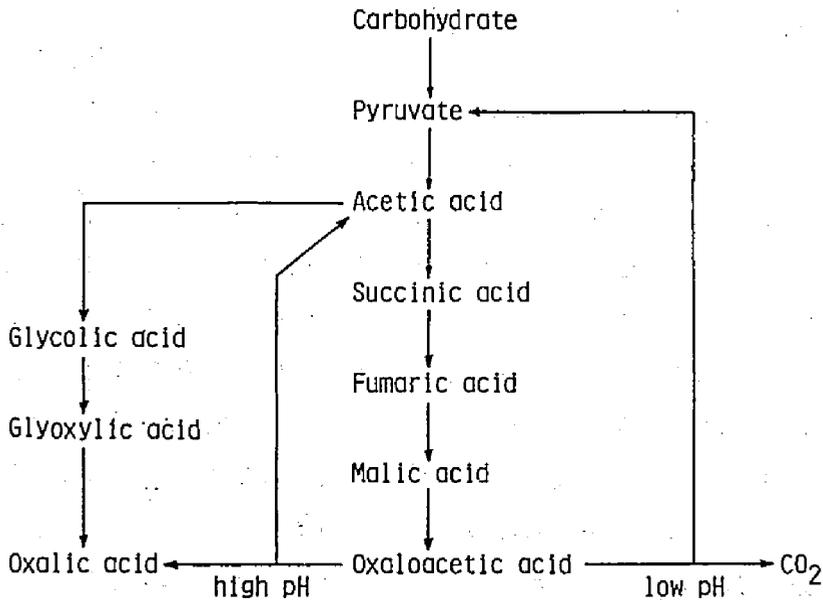


図 10. 褐色腐朽菌による炭水化物からシュウ酸の生成経路
(De Stevens ら, 1951)

培地に集積されるシュウ酸の褐色腐朽における役割は明らかにされていない。シュウ酸は酸化度の高い化合物であり炭水化物に含まれるカロリーの大半を菌体が利用し尽くした残渣とみられるが、シュウ酸の分泌によって菌体内および菌体外における pH の調節やイオン強度を平衡化する機能が最小限のエネルギーで果されているという考え方もある (Swift, 1982)。

褐色腐朽菌はリグニンに包埋された木材細胞壁中のセルロース、ヘミセルロースを選択的に分解するが、結晶セルロースを単独の炭素源とした場合にはそれを分解することはできない (Nilsson, 1974)。褐色腐朽菌 *Poria placenta* による結晶セルロースの分解 (Highley, 1977) にホロセルロース、マンナン、デンプン、セロビオース、グルコースなどセルロース以外の炭水化物の存在が必要であったが、キシランの存在が有効でなかったことは褐色腐朽菌の針葉樹材への宿主選択性を考えると興味深い。褐色

腐朽菌が結晶セルロースを分解するためにはリグニンやセルロース以外の炭水化物の存在を必要とすることから、褐色腐朽菌の C_1 -セルラーゼの産生能力を仮定すると、これまでに知られている C_1 -セルラーゼ生産菌と異なり、 C_1 -セルラーゼ産生のための褐色腐朽菌に特有な因子を考慮しなければならない。また *in vivo* での木材セルロースの分解における褐色腐朽の特性として、腐朽初期の段階で重合度が急激に低下すること、腐朽の進行とともに結晶領域のセルロースも次第に分解を受けることを第1章で述べたが、それらの作用への C_1 、 C_x -セルラーゼの関わりも、これまで究明されていない。

第2章ではオオウズラタケのセルラーゼ、ヘミセルラーゼの生産を目的として、液体培養法および固型培養法による酵素生産条件を検討する。また、*in vivo* での褐色腐朽菌による結晶セルロースの分解に非酵素的因子が関与し、褐色腐朽菌の産生する多糖類加水分解酵素系に C_1 -セルラーゼの欠如している可能性を考察する。

2.2 実 験

2.2.1 供 試 菌

オオウズラタケ *Tyromyces palustris* (Berk. et Curt.) Murr. FPRI 0507 を使用した。

2.2.2 液体培養法

20ℓの培地を含むジャー・フェルメンター（丸菱理化社MSJ-U30L，総容量30ℓ）に振盪フラスコで約1週間増殖させたオオウズラタケを接種し、6~11日間、26~27℃で好氣的に培養した。基本的な培地は水道水1ℓあたり、グルコース20g、ペプトン10g、イースト・エキス1g、ブナKP5g、 KH_2PO_4 1g、 Na_2HPO_4 100mg、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 500mg、 $CaCl_2$ 10mg、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10mg、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 1mg、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1mg、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 2mgから構成されており、滅菌後に初発pHを5.0に調整した。オオウズラタケはグルコースを含む培地でシュウ酸を集積し、pHを極端に低下させるので、培養によっては1N NaOHの滴下によりpHの制御を試みた。

2.2.3 固型培養法

固型培養法については1.2.2.2に記述した。

2.2.4 粗酵素の調製

粗酵素の調製操作は低温室内（5℃）で行った。液体培養の場合、培養終了後、先ず培養液を濾液と菌体に分別し、菌体は5ℓの1/10M酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）を使用してホモゲナイザーで磨砕し、菌体内酵素を抽出した。固型培養では、7.5ℓの1/10M酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液（pH3.8）を使用してブロック状の培地をホモゲナイザーで磨砕し、培地中に生産された酵素を抽出した。

液体培養からの培養濾液と菌体内酵素抽出液、および固型培養からの酵素抽出液をそれぞれ硫酸アンモニウムで90%飽和にし、一晚放置後、遠心分離により沈澱部を回収した。沈澱を少量の水に溶解しウシ膀胱膜中に入れて、透析外液に硫酸イオンが検出されなくなるまで、脱イオン水に対して透析を続けた。脱塩された粗酵素液の不溶部を遠心分離で除去した後、ホローファイバー（アミコン社、U.S.A.、分画分子量5,000）を用いて濃縮した。濃縮された粗酵素液を凍結乾燥し、乾燥粉末として、液体培養からの菌体外粗酵素と菌体内粗酵素および固型培養からの粗酵素をそれぞれ得た（図11）。

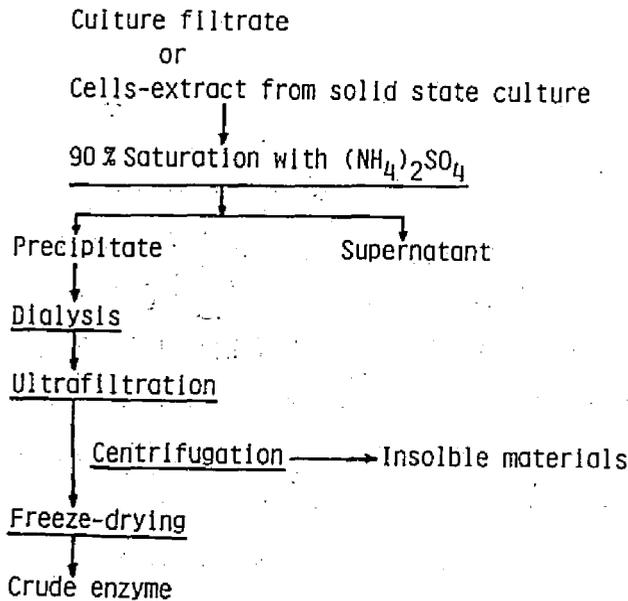


図11. オオウズラタケ粗酵素の調製方法

2.2.5 ヘミセルラーゼ基質の調製

広葉樹キシランと針葉樹グルコマンナンの単離方法および単離したキシランとグルコマンナンの分析結果は3.2.2.2および3.2.2.3で述べる。

ヘミセルラーゼ基質は最終的に0.1M酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)中で0.5%基質濃度となるよう以下の方法で調製した。キシランは、0.5gを40mlの水に懸濁させ、沸騰浴で15分間加熱し、透明な溶液とした後に0.166Mの酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)で全量を100mlとした。グルコマンナンの場合は、0.5gを予め0.3N NaOH(20ml)に溶解させ、0.125M酢酸で全量を100mlとした。

2.2.6 酵素活性の測定

Cx-セルラーゼ、キシラナーゼ、マンナーゼおよび β -グルコシダーゼは、カルボキシメチルセルロース(CMC, 和光純薬, 置換度:0.53); キシラン, グルコマンナンおよびp-ニトロフェニール- β -D-グルコシド(半井化学)をそれぞれ基質とし、0.5%基質(pH5.0)2mlに適当に希釈された酵素液0.5mlを加え、40°Cで10~30分間インキュベーションした後、生成した還元糖をSomogyi-Nelson(1952)法で定量した。Cx-セルラーゼ活性は、L字試験管に濾紙(東洋濾紙No51, 1cm×1cm, 2枚)27~28mg, 粗酵素10mg, 1/10M酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)10mlを入れ、モノーの振盪機で40°C, 24hインキュベーションを行った。反応後、濾液中の還元糖量をSomogyi-Nelson法で定量した。酵素の活性単位は、40°C, 30分間のインキュベーションで1 μ Mの単糖を生成する酵素量を1単位と定義した。

2.2.7 SDSポリアクリルアミドゲル・スラブ電気泳動

オオウズラタケの粗酵素成分の分子量の分析のため、スラブ電気泳動装置(アトー社, ST-1060・SDH型)により0.1%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含む10%のポリアクリルアミドゲル, トリス・グリシン緩衝液(pH8.3)を用いてスラブ電気泳動を行った。蛋白の染色には7%酢酸に溶解した1%アミドブラック液を使用し、7%酢酸で脱色した。

2.2.8 オオウズラタケ粗酵素によるカラマツホロセルロースの加水分解

酵素加水分解は、L字試験管にカラマツホロセルロース200mg, 粗酵素50mg, 1/10M酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)10mlを入れ、モノーの振盪機で40°C, 48hインキュベーションすることにより行った。反応後、G4のガラスフィルターで糖化

液と未分解残渣に分別し、カラマツホロセルロースの重量減から加水分解率を求めた。酵素糖化液の糖組成は1.2.4にしたがって分析した。

2.3 結果と考察

2.3.1 オオウズラタケの好氣的な液体培養によるセルラーゼ、ヘミセルラーゼの生産

オオウズラタケのセルラーゼ、ヘミセルラーゼの生産に及ぼす主要な因子として、培養期間、炭素源とインデューサーの種類と濃度、培地のpH条件等が考えられる。そこで、基本的な液体培養のモデルとして、培養日数：10日間、炭素源：グルコース2%、インデューサー：ブナKP0.5%、および培地のpH条件として、初発pH：5.0、最低（制御）pH：2.0を設定し、それらの因子を変動させることにより、合計8回の培養を試みた。とくに、培地のpHは最も重要な因子と考えられ、制御条件を詳細に検討した。

表1. 各種の液体培養条件下で得られたオオウズラタケの粗酵素の収量

No. of Culture	Culture period (days)	Culture medium			pH condition		Yield of crude enzyme (mg)	Yield of crude enzyme per carbohydrate used (%)
		Carbon source	Inducer	Inorganic salt	Lowest pH	Final pH		
1	6	2% Glc	0.5% Hardwood meal		1.50 ^b	1.80	Ex* 1,612 In** 344	0.4
2	11	2% Glc	0.5% Buna KP		1.40 ^b	2.15	Ex* 3,225 In** 378	0.7
3	10	2% Glc	0.5% Buna KP		2.00	3.25	Ex*12,307 In** 396	2.5
4	10	2% Glc	0.5% Buna holocellulose		2.00	3.10	Ex*14,307 In** 563	3.0
5	9	2% Glc	0.5% Buna KP		2.95	3.05	Ex*14,410 In**1,382	3.2
6	9	2% Glc	0.5% Buna KP		2.30	3.25	Ex* 8,224 In* 1,100	1.9
7	10	2% Xyl	0.75% Buna KP	a	2.00	2.90	Ex*24,350 In**1,722	4.6
8	8	0.5% Glc	0.75% Buna KP	a	2.75	4.10	Ex* 6,159 In**1,677	3.1

* Extracellular crude enzyme, ** Intracellular crude enzyme

a) CaCl₂ (6g/20liter) and CoCl₂ (40mg/20liter) were added to the basal medium.

b) The pH of the culture medium was not controlled.

合計 8 回の培養の諸条件と得られた菌体外、菌体内粗酵素の収量を表 1 に示した。褐色腐朽菌は、グルコースを含む培地でその代謝物としてシュウ酸を集積するので（島菌ら，1952；Shibamoto ら，1952），培地の pH を制御しない場合（表 1 の培養 1 と 2）は，pH 値が 1.4 ～ 1.5 にまで極端に低下した。培養 3 ～ 8 では，アルカリを添加することにより最低 pH が 2.0 ～ 2.95 の範囲の所定の値より低下しないようにそれぞれ制御した。菌体外および菌体内粗酵素の収量から，好氣的な液体培養でオオウズラタケは産生した酵素の大半を菌体外に分泌していることが認められた。粗酵素の収量および培地の炭水化物あたりの粗酵素の収率は，pH を制御した培養では制御しなかった場合に比べて飛躍的に向上したが，制御した最低 pH の値（2.0 ～ 2.95）の間ではとくに差異はなかった。

試みた 8 回の培養の中で，培養経過を示す代表例として培養 2，7 および 8（表 1 参照）の培地の糖濃度と pH の経時変化，培養濾液中に見出された酵素量の経時変化をそれぞれ図 1 2 - 1 4 に示した。いずれの培養においても，オオウズラタケはグルコース（またはキシロース）を短期間に消費して増殖した。糖の代謝によりシュウ酸が培地に集積され pH は低下したが，pH の制御を行わなかった培養（図 1 2.）では，最低 pH は 1.4 にまで低下した。pH の戻りは，低いグルコース濃度での培養（図 1 4）を除いて

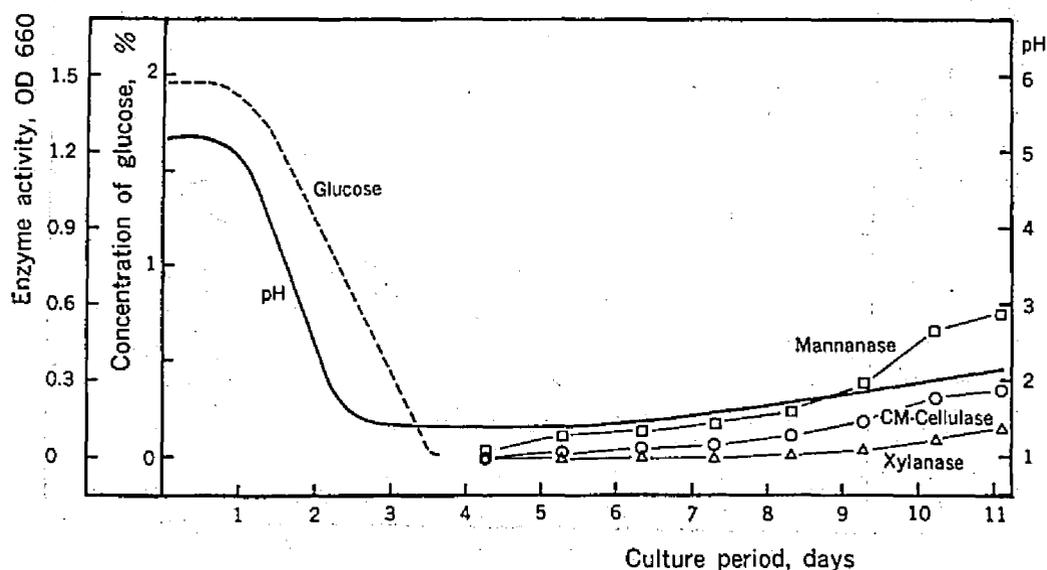


図 1 2. オオウズラタケの液体培養（Ⅱ 2）における酵素の生成と培地の pH 変化

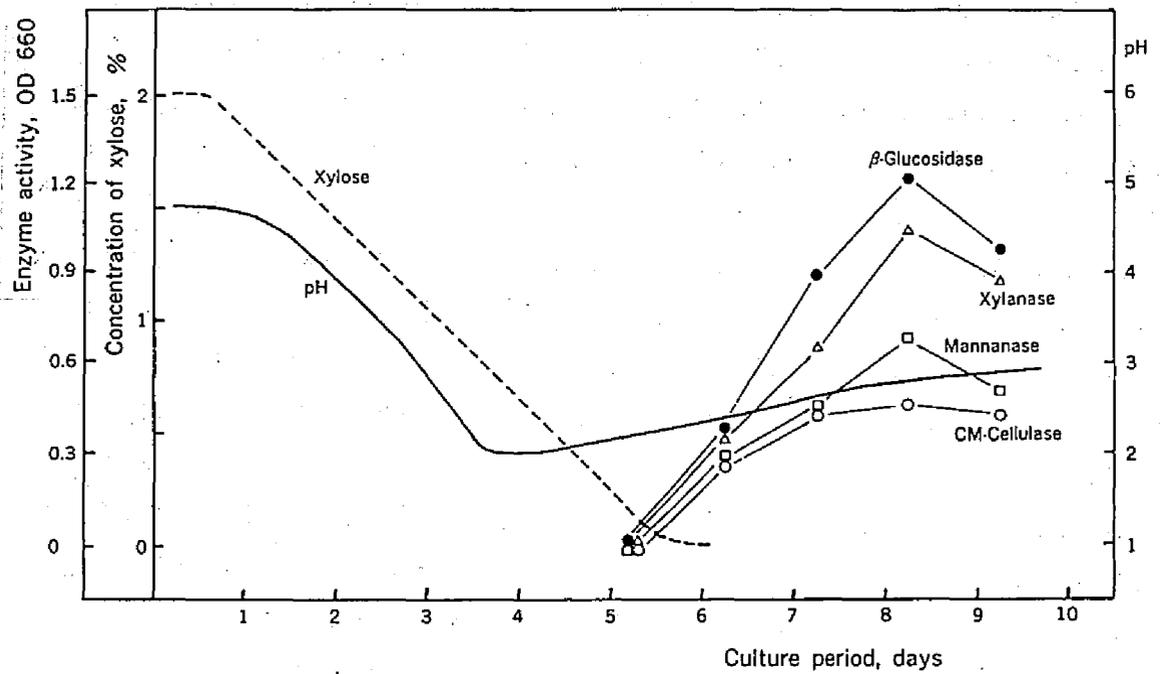


図 1 3. オオウズラタケの液体培養 (Ⅱ 7) における酵素の生成と培地の pH 変化

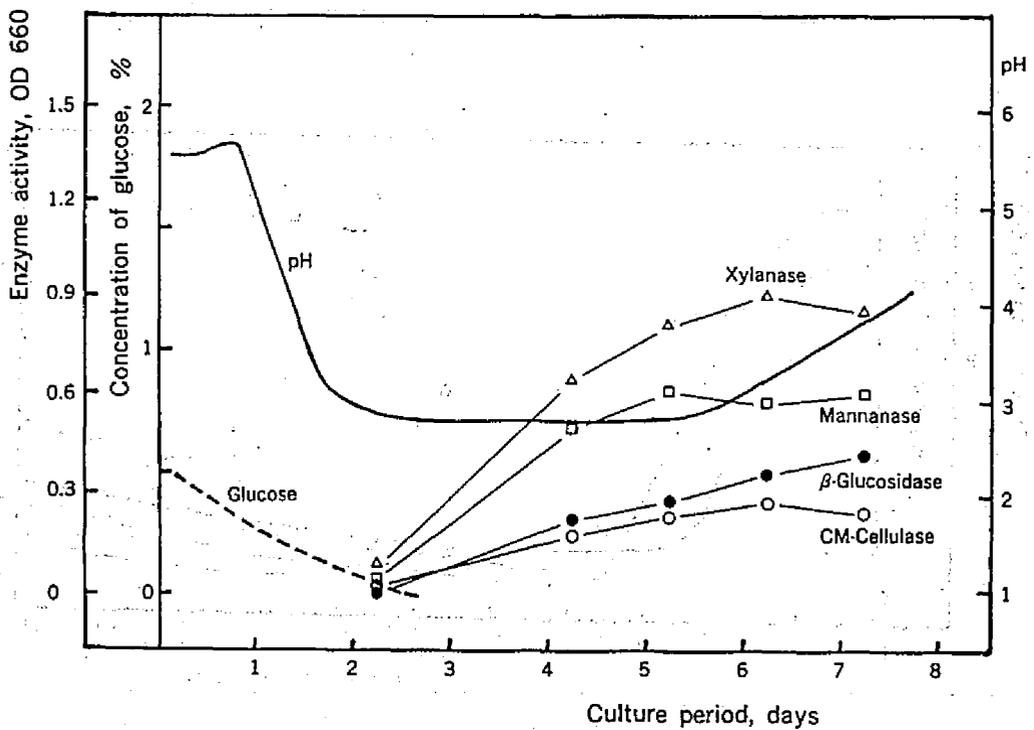


図 1 4. オオウズラタケの液体培養 (Ⅱ 8) における酵素の生成と培地の pH 変化

て緩やかであった。グルコースの代わりにキシロースを炭素源として用いた場合(図13), その取込速度がグルコースより遅く, pHの制御が容易となり, また粗酵素の収量もグルコースの場合より増加した。Cx-セルラーゼ, ヘミセルラーゼおよび β -グルコシダーゼは培地中の単糖が完全に消費されて初めて濾液中に出現し, それらの酵素の相対的な濃度は培養日数が経過しても出現期からほとんど変化しないことが認められた。したがって, 酵素の誘導, 生産にあたって, 培養の初期条件はとくに重要であると考えられる。

各種の培養条件で得られた菌体外粗酵素の比活性(粗酵素1mgあたりの酵素活性)を図15に示した。培地のpHを制御しなかった培養であるNo.1と2では, 制御を試みた培養であるNo.3-8に比べて, Cx-セルラーゼ, キシラナーゼ, マンナーゼの酵素活性が低い値であった。とくにキシラナーゼの活性は著しく抑えられ, キシラナーゼ生産のためにはpHの制御が不可欠であると考えられる。 β -グルコシダーゼは, 培地のpH条件に関係なくほぼ一定のレベルにあり, グルコースの代わりにキシロースを炭素源とした場合(No.7)のみ, 50%程度比活性の増加が認められた。

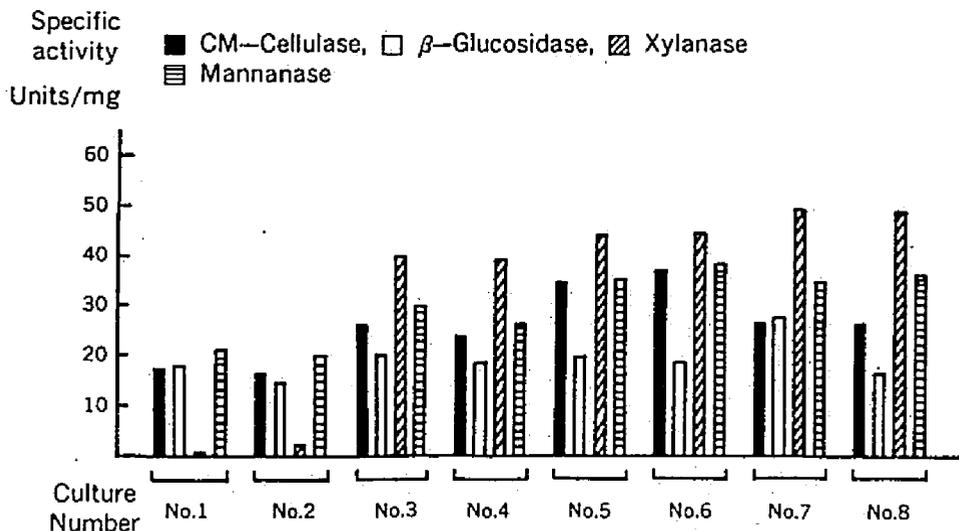


図15. オオズラタケの液体培養から得られた菌体外粗酵素の比酵素活性

極端に低い pH 条件の下では、木材の多糖成分の分解に關与する酵素系の産生が抑制されるか、あるいは産生されたとしてもそれらの一部が pH 条件のために失活するものと思われる。トリコデルマ属の液体培養で、低い pH 条件にセルラーゼが比較的安定であるのに対して、 β -グルコシダーゼは pH 3.0 以下の条件で特異的に産生の抑制を受けかまたは失活すると報告されている (Sternberg, 1976)。オオウズラタケの場合、トリコデルマ属とは対照的に β -グルコシダーゼは低い pH 条件でも一定のレベルで産生されたが、キシラナーゼが pH 条件に最も鋭敏であり、培地の pH を制御することによりその生産性が著しく改善された。

C_1 -セルラーゼは、いずれの菌体外粗酵素においても C_x -セルラーゼやヘミセルラーゼと比較して極端に低い活性レベルにあった。培養 $\#7$ と 8 では、オオウズラタケのセルラーゼ生産に及ぼすグルコース阻害を考慮して、培地の炭素源であるグルコースをキシロースに代替するか ($\#7$) またはグルコース濃度を低下させ ($\#8$)、さらにトリコデルマ属のセルラーゼの生産に有効であると報告されている塩化コバルトと塩化カルシウム (Mandelsら, 1957) を無機塩類として培地に加えたが、それらの効果は、 C_1 -セルラーゼ、 C_x -セルラーゼともに認められなかった。

オオウズラタケの液体培養から得られた各菌体外粗酵素の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を図 16 に示した。分離ゲルの上端がマイナス、下端がプラス

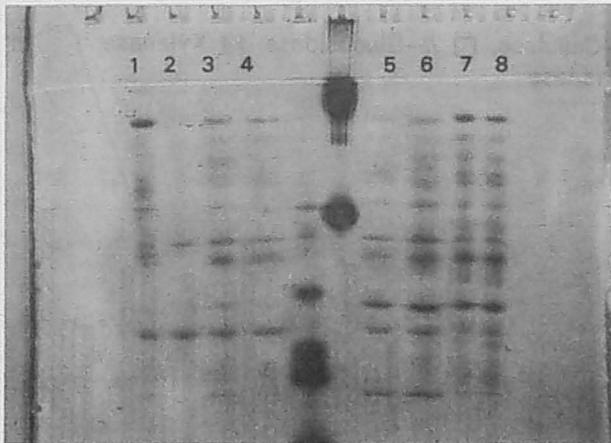


図 16. 液体培養から得られたオオウズラタケ菌体外粗酵素の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

トラック $\#1-8$ は、表 1 の各培養 $\#$ からの粗酵素に対応する。中央部の 2 つのトラックには以下の既知分子量の蛋白をチャージした：右側のトラック；Myosin (205,000), Bovine serum albumin (67,000), 左側のトラック；Ovalbumin (45,000), Myoglobin (17,800), Cytochrome C (12,400)。

スの電極であり、各粗酵素試料は電気泳動により上方から下方に移動した。標準蛋白質の移動位置から、オオウズラタケの菌体外粗酵素は10数万から1万までの幅広い分子量域で数多くの蛋白から構成されていることが認められた。また、培養条件の異なる各粗酵素間で蛋白ゾーンの濃淡の差はみられるが構成については類似していた。

2.3.2 オオウズラタケの固型培養によるセルラーゼ、ヘミセルラーゼの生産

第1章で、オオウズラタケによるシラカンバおよびカラマツの腐朽で重量減が20%を越す段階から、腐朽材ホロセルロースの結晶化度が低下し始め、腐朽がさらに進んだ段階でセルロースの結晶部分も次第に分解を受けることを述べた。しかしながら、オオウズラタケの液体培養で、 C_x -セルラーゼやヘミセルラーゼは菌体外酵素に見出されたが、結晶性セルロースに作用する C_1 -セルラーゼは、事実上、産生されなかった。そこで、自然界での腐朽条件に近いと考えられる固型培養によってオオウズラタケから C_1 -セルラーゼが産生されるのか否か、また固型培養の培養期間を長くすることによって C_1 -セルラーゼ成分が増加するのか否か関心が持たれた。

オオウズラタケの固型培養による粗酵素の収量および炭素源であるシラカンバ蒸煮処理材の組成変化に及ぼす培養期間の影響を表2に示した。広葉樹材の水蒸気による蒸煮処理は多糖成分の加水分解酵素に対する反応性を著しく改善するが(Shimizuら,1983c)、シラカンバ材を蒸煮、解繊後、可溶化したヘミセルロースを水で抽出した残渣を

表2 オオウズラタケの固型培養における粗酵素の収量および蒸煮シラカンバ材の組成変化に及ぼす培養期間の影響

Culture period	Yield of crude enzyme	Yield of crude enzyme per carbohydrate used	Weight loss by decay	Holocellulose content	Klason lignin content
day	mg	%	%	%	%
0	—	—	0.0	73.4	26.7
13	620.7	0.38	25.7	55.6	41.2
25	795.4	0.49	32.3	50.9	44.8
38	832.9	0.52	37.8	46.2	49.3
49	541.1	0.33	45.8	38.3	56.1
63	457.7	0.28	58.0	28.6	66.8

唯一の炭素源とする固型培養によってオオウズラタケはよく増殖し、培養の経過とともに固型培地は菌糸体に完全に被われたブロックとなり、9週間の培養でシラカンバ蒸煮材の見掛けの58%を消費した。表2の腐朽による重量減、ホロセルロース含量およびクラフソン・リグニン含量の各値について、培養残渣に含有されているオオウズラタケ菌糸体の重量の補正を行っていない。第3章で述べるように、オオウズラタケの産生する加水分解酵素の等電点は3.35 - 3.60に偏っているため、酵素の培地への吸着を最小限に抑えるため、酵素の抽出にはpH 3.8の緩衝液を使用した。固型培養法による炭素源あたりの粗酵素の収率は液体培養法に比較して一桁オーダーが低く、また培養期間による収量の変化は、培養日数38日で最高となり、セルロースの結晶部分の分解が進行しているとみられる培養期間49~63日ではかなり低下した。

固型培養法によりオオウズラタケから得られた各粗酵素の比活性を図17に、各粗酵素による瀘紙の加水分解率を表3に示した。Cx-セルラーゼ、 β -グルコシダーゼ、ヘミセルラーゼともに培養期間によって変化せず、それぞれ一定の比活性を示したが、液体培養からの粗酵素と比較して、Cx-セルラーゼの比活性は特異的に向上した(図15参照)。Cx-セルラーゼの比率が高くなった理由については、液体培養でグルコース濃度を抑えてもCx-セルラーゼの比活性の向上がとくに認められなかったことから、培地

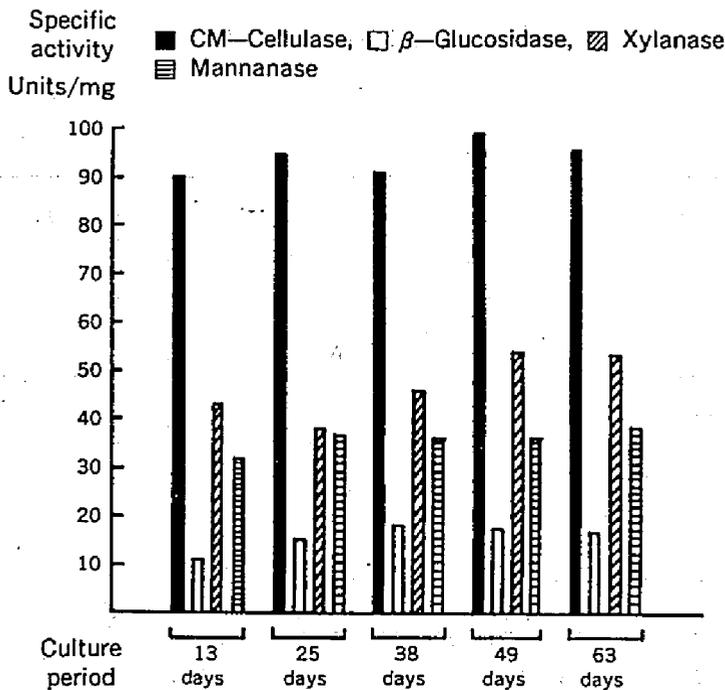


図17. オオウズラタケの固型培養から得られた粗酵素の比酵素活性

表3. オオウズラタケの固型培養および液体培養によって得られた粗酵素による濾紙の加水分解率

Enzyme		Substrate enzyme ratio	Hydrolysis rate %
Solid-state culture	25 days	25mg/10mg	5.3
	38 days	25mg/10mg	6.4
	49 days	25mg/10mg	5.5
	63 days	25mg/10mg	5.4
Liquid culture No.3		50mg/100mg	5.7
		50mg/50mg	5.4
		50mg/20mg	6.0

の炭素源組成で単糖類を含有するか否かの因子よりも、むしろ培養方式の相違によるものと考えられる。C₁-セルラーゼに関しては、基質に対する酵素の割合を十分高くして各酵素のC₁-セルラーゼ活性を測定したが、濾紙の分解率は培養方法や酵素濃度の違いで差が見られず、非晶部分の選択的分解とみられる6%前後の低い水準にとどまり、固型培養の期間を長くしてもC₁-セルラーゼの産生は認められなかった。

カラマツホロセルロースを基質として、固型培養からの粗酵素によってカラマツの多糖成分（セルロース、キシラン、グルコマンナン）がどの程度に加水分解されるか検討した結果を表4に示した。加水分解液中のグルコースの一部はグルコマンナンの分解に

表4. オオウズラタケの固型培養によって得られた粗酵素によるカラマツホロセルロースの加水分解

Culture period days	Hydrolysis rate %	Sugar composition of hydrolyzate					Estimated decomposition rate ^a		
		Man %	Ara %	Gal %	Xyl %	Glc %	Cellulose %	Xylan %	Glucoman- nan %
25	18.2	38.9	5.3	4.6	25.3	25.9	3.2	71.9	39.8
38	23.3	44.2	2.2	5.7	26.5	21.4	2.1	96.5	57.9
49	23.9	46.0	3.1	6.1	26.4	18.4	1.0	98.6	61.8
63	23.9	45.0	3.1	6.4	22.9	22.6	2.5	85.5	60.4
Liquid culture No. 3	22.7	46.3	2.7	4.8	20.6	25.7	3.4	73.1	59.1

^a Based on the assumption that glucomanan is β -(1 \rightarrow 4)-linked linear polymer consisting of D-glucose and D-mannose residues in a molar ratio of 1:3.

由来するとして計算した。カラマツホロセルロースの加水分解率は、液体培養（Ⅱ3）からの粗酵素と同様、18～24%であり、各多糖成分の分解率はセルロースが1～3%、キシランが70～100%、グルコマンナンが40～60%であると推定され、ヘミセルラーゼに関する限りオオウズラタケは培養方式に関係なくヘミセルロースを糖化するのに十分な活性単位を産生したと考えられる。キシランに比べて、グルコマンナンの分解率が相対的に低いのはグルコマンナンがキシランよりもセルロースマイクロフィブリル側に密接して存在しているためであろうと推定される（Nelson, 1961）。生菌レベルにおいて、セルロース、とくに結晶部分はヘミセルロース成分よりも遅れて分解を受けることが認められたが、長期間の固型培養によって得られた粗酵素でもセルロースの分解率の向上は認められなかった。また、固型培養からの粗酵素のCx-セルラーゼの比活性は液体培養からの粗酵素に比べて2～3倍高くなったが、セルロースの分解率は全く改善されず、オオウズラタケの産生する酵素系にC₁-セルラーゼが欠如することをさらに示唆した。

これまで褐色腐朽菌からの酵素系で、酵素の濃度をいかに高くしても不溶性の結晶セルロースを実質的に分解することは不可能であった（Highley, 1977b; Herr, 1978a）。また、セルロースに作用し、わずかな糖化力で大幅な重合度低下を引起す酵素の報告例もない。したがって、褐色腐朽菌の *in vivo* で木材中の結晶セルロースを分解する機構は、従来、提案されてきたC₁-、Cx-セルラーゼの相乗作用によるセルロースの分解機構と全く別の様式を採用している可能性が考えられる。

Koenigs (1972a; 1972b; 1974a; 1974b) は褐色腐朽菌が菌体外にH₂O₂を生成することを見出し、さらにH₂O₂ + Fe²⁺（フェントン試薬）による酸化作用を受けた木材の重量減、強度低下、重合度低下、アルカリ可溶性などの変化が、褐色腐朽を受けた材のそれらの変化と非常に類似していることを報告している。綿セルロースに対するH₂O₂単独の作用は穏やかであるが、Halliwell (1965) はFe²⁺の存在下で強い酸化作用を示し、pH 範囲：3～5、H₂O₂濃度：0.4～0.04%、Fe²⁺濃度：0.02～2 mMの条件の下で綿セルロースは短繊維化し、次第に溶解することを報告している。Koenigs (1975) によれば、Fe²⁺に対してH₂O₂の濃度が高い場合には、セルロースを構成するグルコースのC₆炭素が酸化されてウロン酸が生成し、Fe²⁺に対してH₂O₂の濃度が低い場合にはC₂、C₃の炭素が酸化作用を受け、アルデヒドを経てカルボキシル基となり、最終的にピラノース環は開裂するものと考えられている（図18）。

Koenigsの提案した菌体外のH₂O₂/Fe²⁺系による褐色腐朽菌のセルロース分解説に対して、Highley (1981a; 1982a) は、KoenigsのH₂O₂の定量に採用したカタラー

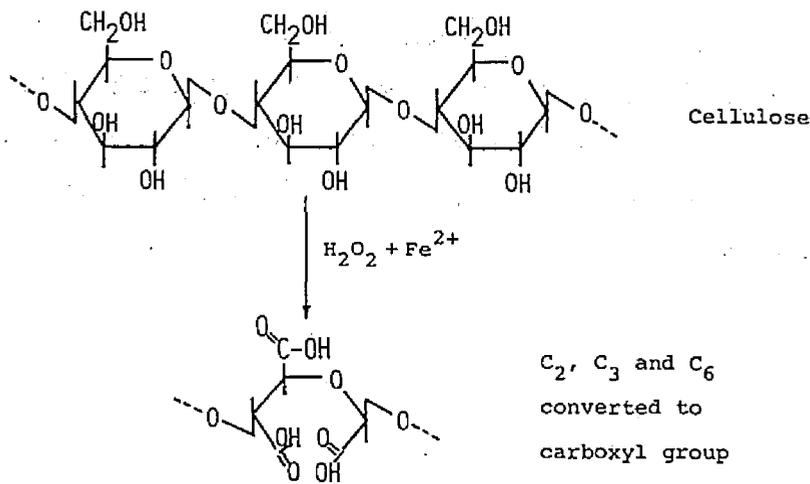


図18. H_2O_2/Fe^{2+} 系によるセルロースの分解経路
(Koenigs, 1975)

ゼーアミノトリアゾル法は木材腐朽菌からの培養液を試料とするとき、培養液は一般にカタラーゼのインヒビターを含んでいるので適当な定量法でなく、彼の採用したオージアニジン試薬法 (Kerwin, 1969) では、 H_2O_2 を生成する酸化酵素は1菌株の例外を除いて褐色腐朽菌の菌体外に見出されなかつたと報告している。しかし、供試したいずれの褐色腐朽菌の培養液によっても、*p*-ニトロソジメチルアニリンが漂白されたことから、菌体外に $\cdot OH$ ラジカルの存在することが示唆され、 $\cdot OH$ ラジカルの生成過程と褐色腐朽菌のセルロース分解におけるその関わりを考察している。

2.4 要 約

9～14週間の実験室レベルの腐朽で針葉樹材、広葉樹材ともに50%以上の重量減を起こす褐色腐朽菌オオウズラタケからセルラーゼ、ヘミセルラーゼを生産するための培養条件を検討した。炭素源としてグルコースやキシロースを含む液体培養では、糖の代謝によりシュウ酸が培地に集積されたので、 O_x -セルラーゼやヘミセルラーゼの生産性の改善のためには培地のpHを少なくとも2.0以上に制御することが必要であった。とくにキシラナーゼは低いpH条件に鋭敏であり、キシラナーゼの生産のためにはpHの制御は不可欠であると考えられた。 β -グルコシダーゼは培養方式に関係なく、また極端に低いpH条件下でも一定のレベルで産生された。液体培養によってオオウズラタケから C_1 -セルラーゼが得られなかつたので、自然界での腐朽条件に近いと考えられる

固型培養によってC₁-セルラーゼの生産を試みた。固型培養から得られた粗酵素には、C_x-セルラーゼの比活性の向上が認められたが、固体セルロースの酵素分解の結果は、液体培養からの粗酵素と同様、C₁-セルラーゼの欠如していることを示唆した。褐色腐朽菌の生菌レベルでの結晶セルロースの分解には、C₁-セルラーゼに代わる菌体外のH₂O₂/Fe²⁺系または・OHラジカルによる酸化作用など非酵素的因子の関与している可能性が考えられる。

第 3 章 オオウズラタケの菌体外に産生する多糖類 加水分解酵素の精製と性質について

3.1 緒 言

微生物は自然界における物質循環の歯車として重要な機能を果しており、菌体外に産生される加水分解酵素について多くの研究が行われてきた。しかし、木材の分解の一部を分担している褐色腐朽菌については、木造家屋における甚大な被害（例えば土居ら、1981）が報告されているが、そのセルラーゼ、ヘミセルラーゼの精製や性質に関する研究は、これまでのところ極めて少ない。

Sisonら（1958）は褐色腐朽菌 *Poria vaillantii* の培養濾液から冷アセトン沈澱によりセルラーゼの分画を試み、Cx-セルラーゼリッチ画分と β -グルコシダーゼリッチ画分を得た。Cx-セルラーゼは酸性側の pH で安定であり、至適 pH は 3.2、至適温度は 60℃であった。Baileyら（1969）および Keilichら（1969）は褐色腐朽菌 *Polyporus schweinitzii*（カイメンタケ）の培養濾液から、硫酸分画、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーによってCx-セルラーゼを分離精製し、精製酵素の性質を報告している。ゲル濾過法による精製セルラーゼの分子量は $45,000 \pm 4,500$ で、この酵素は酸性側の pH で安定であり至適 pH は 4.0、至適温度は 60℃であった。精製されたセルラーゼは *P. schweinitzii* の産生する唯一のセルラーゼ成分で、再生セルロースを分解するが綿セルロースを分解せず、また C₁-セルラーゼ活性は濾液にも菌体内にも見出されなかった。Herrら（1978a）は褐色腐朽菌 *Lenzites trabea* の培養濾液から、分子篩、イオン交換クロマトグラフィーなどによってCx-セルラーゼを分離精製した。精製セルラーゼの分子量は 29,000、至適 pH は 4.4、至適温度は 70℃、CMC（置換度：0.75）に対する Km 値は 13.05 mg/ml であった。

褐色腐朽菌のヘミセルラーゼの分離精製に関する研究は、Kingら（1968）のキシラナーゼを対象としたものだけで、マンナーゼについては皆無である。Kingらは広葉樹キシランを炭素源として褐色腐朽菌 *Coniophora cerebella*（イドタケ）を培養し、菌体外のキシラン分解酵素系を探索した。菌体外酵素にキシラナーゼおよび β -キシロシダーゼの活性が見出されたが、広葉樹キシランの側鎖であるウロン酸残基を遊離させる酵素は確認されなかった。冷エタノール沈澱およびイオン交換クロマトグラフィーにより、キシラナーゼと β -キシロシダーゼを分離し、キシラナーゼの分子量はゲル濾過法により 34,000~38,000 と推定した。広葉樹キシランの酵素分解により、このキシラナーゼは中性糖として、キシロースとキシロピオースからキシロペンタオースまでのオ

リゴ糖を生成し、endo型の酵素であると考えられたが、酸性糖の構造は精査されなかった。

Herrら(1978b)は*Lenzites trabea*の培養濾液の高分子画分からイオン交換クロマトグラフィーにより β -グルコシダーゼを分離精製した。精製酵素の分子量は320,000で、酵素的性質はそのC_x-セルラーゼ(Herrら, 1978a)に類似しており、至適pHは4.5、至適温度は75℃であった。Km値は

-

ニトロフェニル- β -D-グルコシドに対して 4.1×10^{-4} mM、セロビオースに対して 16.4×10^{-4} mMで、また精製酵素はアリル- β -D-キシロシドに対してもアリル- β -D-グルコシドと同程度に作用することが認められた。Wolterら(1980)およびHighleyら(1981b; 1982b)は*Poria placenta*の培養濾液中にキシラン、マンナン、CMCなどの高分子基質に対してと同様、 α 、 β -D-グルコシド、 α 、 β -D-ガラクトシド、 β -D-キシロシドなどのグリコシドに対しても加水分解作用を触媒する複数の機能を持つ酵素の存在を見出した。この酵素のグリカナーゼ活性とグリコシダーゼ活性は各種の分子篩やイオン交換クロマトグラフィーによっても分離することができず、薄層等電点電気泳動において異常に低い等電点値(1.8)の単一バンドを示した。ゲル濾過法による分子量は $185,000 \pm 5,000$ で、またSDSポリアクリルアミドゲルによる電気泳動の結果から少なくとも5つのサブユニットにより構成されていることが確認された。酵素的性質は酸性側のpHで安定で、各酵素活性の至適pHは4、至適温度は60-70℃、キシランやCMCなどの高分子基質に対してはendo型に作用することが認められた。

木材腐朽菌は培地に生育しさえすれば多少なりともプロテアーゼを生成することが知られているが(川合, 1976)、小林ら(1975)は褐色腐朽菌*Tremellodon gelatinosum*(ニカワハリタケ)の培養濾液に凝乳活性を示す酸性プロテアーゼを見出し、凝乳酵素の精製と性質を検討し、精製酵素によるゴータチーズ製造を試みている。

オオウズラタケもプロテアーゼを産生することが当然予想され、そこでセルラーゼやヘミセルラーゼの精製過程においてプロテアーゼによる変成や分解を最小限に抑えるため、菌体外粗酵素(液体培養№1; 表1参照)に含まれるプロテアーゼの酵素作用に及ぼすpHの影響を検討した(図19)。カゼインを基質としたが、粗酵素にカゼインを消化する酸性(pH3以下)および中性(pH6-8)プロテアーゼの存在することが見出された。プロテアーゼの影響を考慮すると、セルラーゼやヘミセルラーゼの精製過程での緩衝液のpHは5付近が最適であると考えられる。また、各酵素精製のためのイオン交換クロマトグラフィーにおける溶出液のpH選択の指標を得るため、菌体外粗酵素(75mg, 液体培養№3)を試料としpH3-10のキャリアーアンホライトを用いて

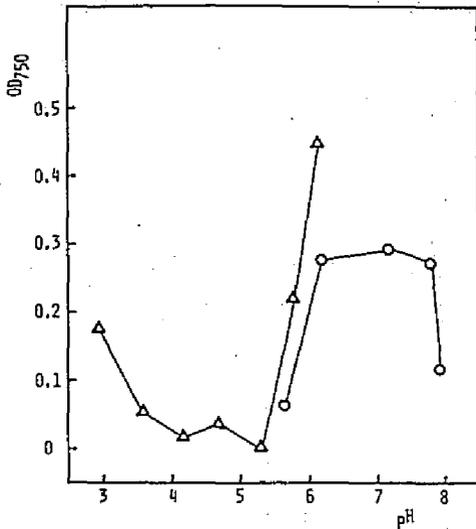


図19 菌体外粗酵素(液体培養No.1)に含まれるプロテアーゼ活性に及ぼすpHの影響
 基質: 1%カゼイン溶液,
 インキュベーション: 0.1 M酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(△), 0.1 Mリン酸塩緩衝液(○), 40℃, 30分

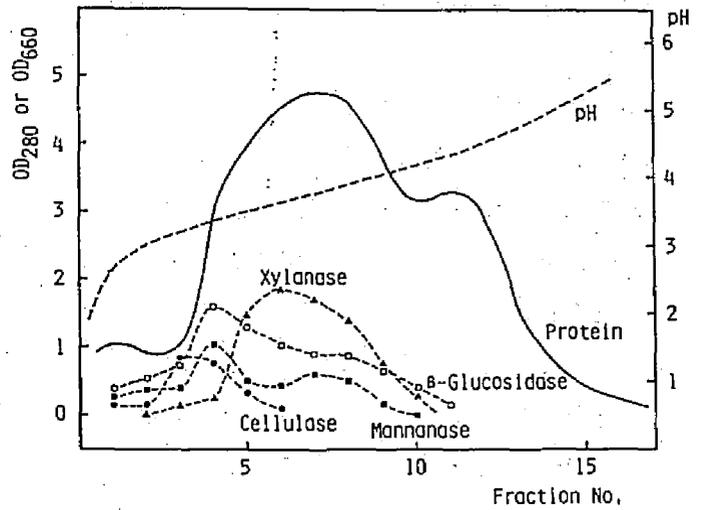


図20 菌体外粗酵素(液体培養No.3)の等電点電気泳動
 フラクション液量: 2.5 ml,
 キャリアーホライト: pH3-10,
 400v, 40h

等電点電気泳動を試みたが、蛋白の等電点は3-5の範囲に偏って分布し、とくに各酵素の等電点は3.5付近に集っていることが認められた(図20; pH範囲5.5~10は省略)。

第3章では、オオウズラタケの液体培養によって得られた菌体外の酵素系から2種のC_x-セルラーゼ、マンナーゼ、キシラーゼおよびβ-キシロシダーゼの精製と得られた各精製酵素の諸性質について述べる。

3.2 実験

3.2.1 オオウズラタケ粗酵素の調製

粗酵素の調製については2.2.4に記述した。

3.2.2 基質

3.2.2.1 セルラーゼ基質

セルラーゼの基質として(1)-(5)のセルロースを使用した。

- (1) カルボキシメチルセルロース(CMC): 和光純薬製品, 置換度: 0.53。
- (2) Cellulose-azure: シグマ製品。

(3) リン酸膨潤セルロース：Walseth (1952)の方法にしたがってアビセルから調製した。

(4) 濾紙：東洋濾紙№51A。

(5) アビセル：旭化成製品。

3.2.2.2 マンナーゼ基質

マンナーゼの基質としてカラマツ (*Larix leptolepis*) から(6)グルコマンナンを単離した (Ishihara ら, 1980)。カラマツを40-80メッシュの木粉に粉碎し、メタノールで抽出成分を十分にとり除いた後、水抽出により水溶性多糖のアラビノガラクトンを分離した。この抽出済み木粉を亜塩素酸塩法によって脱リグニン処理し、続いて Beelik ら (1967) の方法にしたがってキシラン、ガラクトグルコマンナン、グルコマンナンの各ヘミセルロース成分をアルカリで逐次抽出した。すなわち、ホロセルロースからまず1% Ba(OH)₂ の存在下で10% KOHによりキシランを、続いて1% NaOHによりガラクトグルコマンナンを、さらに15% NaOHによりグルコマンナンをそれぞれ抽出した。200gのホロセルロースから42.2gのグルコマンナンが得られ、収率はカラマツ材あたり14.0%、ホロセルロースあたり2.1%であった。全加水分解によるグルコマンナンの糖組成はMan 72.6%、Ara 0.5%、Gal 1.6%、Xyl 2.0%、Glc 23.2%でありGlcとManの比率は1.0:3.1であった。酵素活性測定のためのグルコマンナン溶液の調製方法は2.2.5に記述した。

3.2.2.3 キシランナーゼ基質

キシランナーゼの基質としてシラカンバ (*Betula platyphylla*) から(7)4-O-メチルグルクロノキシランを単離した (Ishihara ら, 1975)。シラカンバを100-200メッシュに粉碎し、メタノールで抽出成分を十分にとり除き、さらに水抽出により水可溶成分を分離した。この抽出済シラカンバ木粉 (6kg) から直接10%のKOH溶液でキシランを抽出し、中和後エタノールで沈澱させ、水→エタノール→エーテルの溶媒置換で脱水乾燥した。キシランの収量は928.8gで、収率はシラカンバ材あたり15.5%であった。このキシランは2.56%のメトオキシル基、9.7%のウロン酸、0.63%のクラーソン・リグニン、0.92%の酸可溶性リグニンを含有していた。カドキセン溶液での固有粘度は73.0 ml/gで、重合度183に相当すると推定された (Wirkström, 1968)。全加水分解後、中性糖のアルディトール・アセテートによるガスクロマトグラフィー分析から、キシロース以外に微量のラムノースが検出された。酵素活性測定のためのキシラン溶液の調製方法は2.2.5に記述した。

3.2.2.4 グリコシダーゼ基質

グリコシダーゼの基質として(8)および(10)-(13)は市販品を使用した。

- (8) フェニル- β -D-キシロシド：半井化学製品。
- (9) キシロピオース：筑波大学安井恒男教授より分与された。
- (10) *p*-ニトロフェニル- β -D-キシロシド：半井化学製品。
- (11) セロピオース：東京化成製品。
- (12) メチル- β -D-グルコシド：半井化学製品。
- (13) メチル- α -D-グルコシド：東京化成製品。

その他、(14)-(16)の基質はグルコマンナンおよび4-O-メチルグルクロノキシランの酵素分解生成物より単離し、使用した(第4章参照)。

- (14) マンノピオース
- (15) O- β -D-Glc*p*-(1 \rightarrow 4)-D-Man
- (16) O-(4-O-Me- α -D-Glc*p*A)-(1 \rightarrow 2)-D-Xyl

3.2.3 酵素活性の測定

C_x-セルラーゼ、マンナーゼ、キシラーゼの酵素活性の測定は2.2.6にしたがった。 β -D-キシロシダーゼについては、フェニル- β -D-キシロシドを基質とし、0.25%基質(pH 5.0) 2 mlに適当な濃度の酵素液1/2 mlを加え、40℃で5-30分間インキュベーションした後、酵素反応により生成した還元糖量をSomogyi-Nelson(1952)法で定量した。

3.2.4 蛋白質の定量

酵素標品の蛋白質の定量はLowryら(1951)の方法にしたがって行い、標準蛋白質としてウシ血清アルブミン(シグマ製品)を用いた。またカラムクロマトグラフィーの溶出液の蛋白質濃度は紫外吸収(280 nm)でモニターした。

3.2.5 アフィニティクロマトグラフィー

β -D-キシロシダーゼの精製のために、*p*-アミノフェニル-1-チオ- β -D-キシロピラノシドをリガンドとするSephroseを調製した。膨潤後、安定化剤を除去したCNBr活性化CH-Sephrose 4B(5g)にリガンド(50mg)、カルボジイミド(800mg)を加え、総容量を4.0 mlとした。このゲルサスペンションのpHをHClで5.0に調節し、24 h室温で振盪攪拌を続けた。反応後、未結合のリガンドをゲルから完全に洗い流し、Sephrose-リガンド結合体を緩衝液に平衡化させた。

3.2.6 電気泳動

ディスクの電気泳動はOrnsteinとDavis(1964)の方法にしたがい、トリス・グリ

シン緩衝液系で7.5%ポリアクリルアミドゲル(pH8.3)で行った。蛋白質の染色にはアミドブラックを使用した。

等電点分画は110ml容のLKB等電点分画用カラムを使用した。両性電解質はキャリアーアンホライト(LKB, pH2.5-4と3-10)を使用し、カラム内の密度勾配はエチレングリコール(0-75%, v/v)で作成した。

3.2.7 分子量の測定

精製酵素の分子量の測定はゲル濾過法または超速心分析により行った。ゲル濾過法は、Sephadex G-100のカラムを用いて、分子量既知の標準蛋白質、ガンマグロブリン(160,000)、ウシ血清アルブミン(67,000)、オブアルブミン(45,000)、ミョグロビン(17,000)、チトクロームC(12,400)により検量曲線を作成し、精製酵素の溶出位置から分子量を推定した。超速心分析では、精製酵素の純度検定と沈降係数の測定のため分析用超速心機(日立工機モデル282)を用いて、吸収走査記録法およびシュリーレン法により沈降速度実験を行った。また、得られた沈降係数からSvedbergの式(3.2.7.1)を用いて精製酵素の分子量を推定した。

$$M = \frac{RTs}{D(1-\bar{v})} \quad (3.2.7.1)$$

上式で、 s 、 D 、 \bar{v} はそれぞれ無限希釈状態での沈降係数、拡散係数、比容積、また R は気体常数、 T は絶対温度を示す。

3.2.8 薄層クロマトグラフィー(TLC)

精製した C_x -セルラーゼによるリン酸膨潤セルロースの加水分解生成物の検索は、TLC(TLC plastic sheet silica gel 60, メルク製品)により行った。展開剤はn-ブタノール:ピリジン:水=6:4:3(v/v)で上昇法により3回展開し、TLC上の糖はエタノール中の5%硫酸の噴霧により検出した。

3.3 結果と考察

3.3.1 C_x -セルラーゼ

3.3.1.1 C_x -セルラーゼの精製

C_x -セルラーゼ(1, 4- β -D-Glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.4)の精製には液体培養No.7(表1参照)から得られた菌体外粗酵素を使用した。

粗酵素(6,795mg)を先ずゲル濾過カラムクロマトグラフィー(Sephadex G-100)で分画し、分子量の異なる C_x -セルラーゼ活性画分(I, III, IV, 図6.0参照)を得た。 β -グルコシターゼ活性は高分子側の画分(I)にのみ認められ、低分子側の画分(III)

と(IV)は β -グルコシダーゼ活性を全く含んでいなかった。そこで、(III)と(IV)の両画分をそれぞれ0.1 M酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH 3.8)で平衡化させたアニオン交換カラム(DEAE Sephadex A-50)に吸着させ、NaClのグラジェントでC_x-セルラーゼの分離を試みた。両画分ともC_x-セルラーゼは0.25-0.3 MのNaCl濃度で溶出した(III-2, IV-3)ので、それらの画分をさらにゲル濾過カラムクロマトグラフィー(Sephadex G-75)で精製した(図21)。2つのセルラーゼ精製画分(III-2-1, IV-3-1)はゲル濾過カラムクロマトグラフィーにおいて、蛋白とC_x-セルラーゼの溶出位置が完全に一致し、しかも左右対称となった。また両画分の紫外吸収スペクトルは280 nmに極大を持つ典型的な蛋白のカーブであり、 ϵ_{280} と ϵ_{260} の比はそれぞれ約1.9であった。精製過程における蛋白とセルラーゼの回収率を表5に示した。

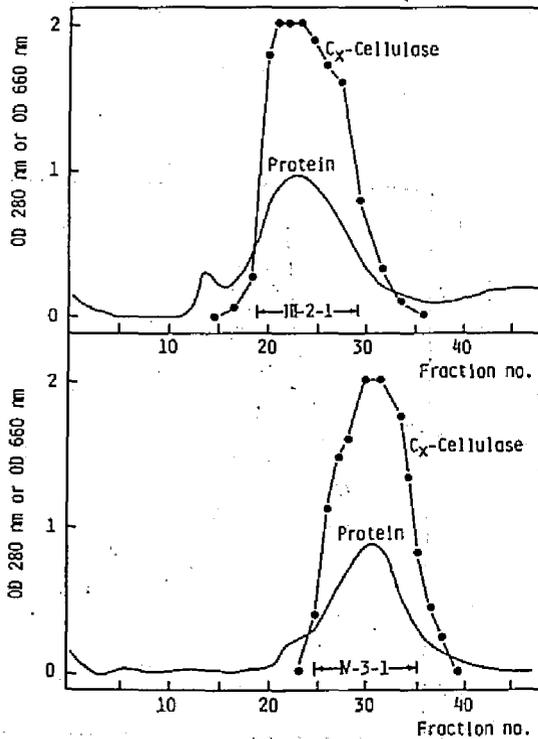


図21 C_x-セルラーゼ精製画分III-2(上)とIV-3(下)のSephadex G75ゲル濾過クロマトグラフィー
フラクション液量: 4.5 ml

得られた2つの精製酵素の純度をディスクのポリアクリルアミドゲル(pH 8.3)電気泳動で検定したところ、いずれも単一のバンドであった。また、等電点電気泳動の結果(図22)からもIII-2-1, IV-3-1ともに高度に精製されていることが確かめられたが、それぞれ非常に近い等電点を持つわずかのキシラナーゼを含有していることが認められた。精製酵素の等電点はIII-2-1が3.45, IV-3-1が3.55であった。

表5 精製過程における蛋白とセルラーゼ活性の回収率

Purification step	Protein mg	Recovery %	$\epsilon_{280}/\epsilon_{260}$ ratio	Cellulase units	Recovery %	Relative purity
Crude enzyme	6,795	100	1.11	37,900	100	1
G-100, III	1,000.4	14.7	1.06	16,500	43.5	2.9
A-50, III-2	347.7	5.1	1.78	9,900	26.1	5.1
G-75, III-2-1	147.5	2.2	1.89	7,540	19.8	9.0
G-100, IV	563.7	8.3	1.03	9,800	25.8	3.1
A-50, IV-3	253.1	3.7	1.64	6,190	16.3	4.4
G-75, IV-3-1	104.8	1.5	1.87	5,250	13.8	9.2

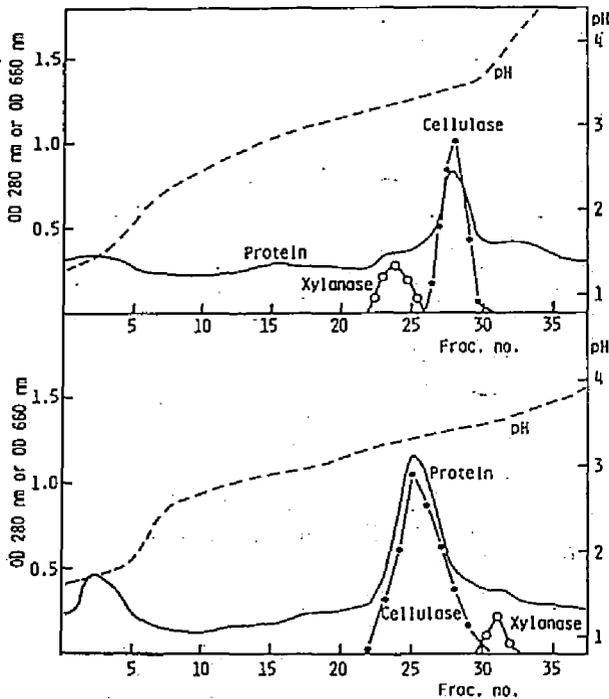


図22 Cx-セルラーゼ精製画分III-2-1 (上)とIV-3-1(下)の等電点電気泳動
フラクション液量: 3.5 ml,
キャリアーアンホライト: pH 2.5-4,
400V, 40h

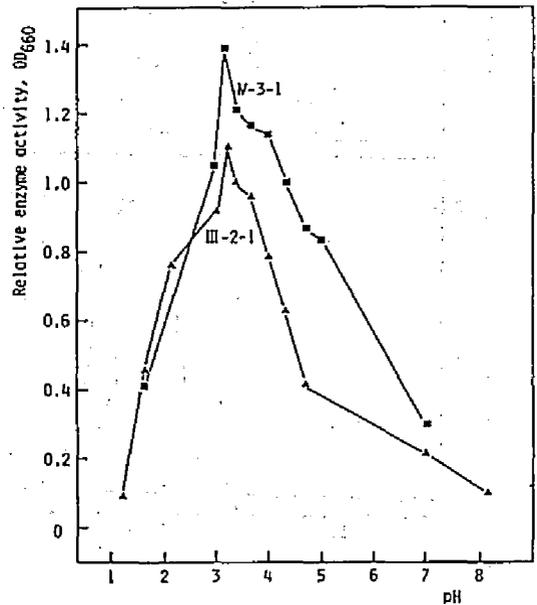


図23 Cx-セルラーゼ精製画分 III-2-1とIV-3-1の pH依存性

3.3.1.2 C_x-セルラーゼの性質

精製 C_x-セルラーゼ (Ⅲ-2-1, Ⅳ-3-1) の作用に及ぼす pH と温度の影響をそれぞれ図 23, 図 24 に示した。両 C_x-セルラーゼの至適 pH と至適温度はⅢ-2-1 が 3.15 と 61℃, Ⅳ-3-1 が 3.15 と 51℃ であった。酵素の pH 安定性については, 暴露時間 20 h, 25℃ の条件で両 C_x-セルラーゼとも pH 2.0-8.0 の間で安定であり似かよっていたが (図 25), 熱に対する安定性では 10 分間加熱の条件でⅢ-2-1 が 65℃ まで安定であったのに比べ, Ⅳ-3-1 は 40-65℃ で部分的な失活が生じ熱にやや不安定であることがわかった。(図 26)。

褐色腐朽菌はグルコースを含む培地でシュウ酸を集積し, 菌の生育にとって不適とみられるほどに培地の pH を低下させることが知られている。そこで, Ⅲ-2-1, Ⅳ-3-1 の C_x-セルラーゼ活性に及ぼすシュウ酸濃度の影響を検討した。0.1 M 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中での反応をコントロールとしたとき, 図 27 に見られるように適当な濃度のシュウ酸の存在 (0-0.1 M) により両 C_x-セルラーゼとも酵素活性は著しく増大した。また, 0.125 M のシュウ酸を含んだ低 pH 条件下 (pH 1.85) においても, 両 C_x-セルラーゼの酵素活性はコントロール条件下と同一レベルにあった。

表 6 セルラーゼ活性に及ぼす金属イオン (2mM) の影響

Metal ion	Relative enzyme activity (%)	
	Ⅲ-2-1	Ⅳ-3-1
Ba ²⁺	107.6	106.4
Ca ²⁺	93.1	89.9
Co ²⁺	124.0	96.8
Cu ²⁺	53.5	70.0
Fe ²⁺	115.6	103.5
Fe ³⁺	94.1	101.5
Hg ²⁺	0.0	0.0
Mg ²⁺	89.0	105.0
Mn ²⁺	46.0	11.9
Ni ²⁺	120.8	88.9
Pb ²⁺	89.9	70.3
Zn ²⁺	120.0	80.7

C_x-セルラーゼ活性に及ぼす各種の金属イオン (2mM) の影響を 0.1 M 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中で検討したが, 両 C_x-セルラーゼとも Hg²⁺, Mn²⁺ により著しく失活し, また Ca²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ により一部失活を受けることがわかった (表 6)。天然界での褐色腐朽では, セルラーゼの反応系はシュウ酸酸性であり, 金属イオンがシュウ酸塩となって不溶化することから, セルラーゼ活性を阻害するそれらの金属イオンに対して許容度の高くなることが考えられる (Sutter ら, 1983)。

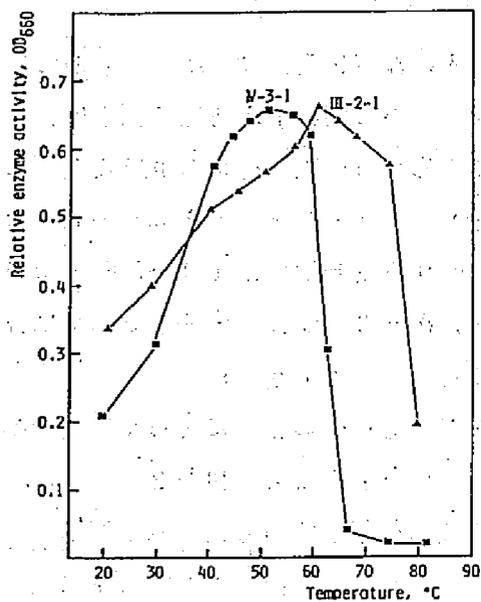


図 2.4 Cx-セルラーゼ精製
画分Ⅲ-2-1とⅣ-3-
1の温度依存性

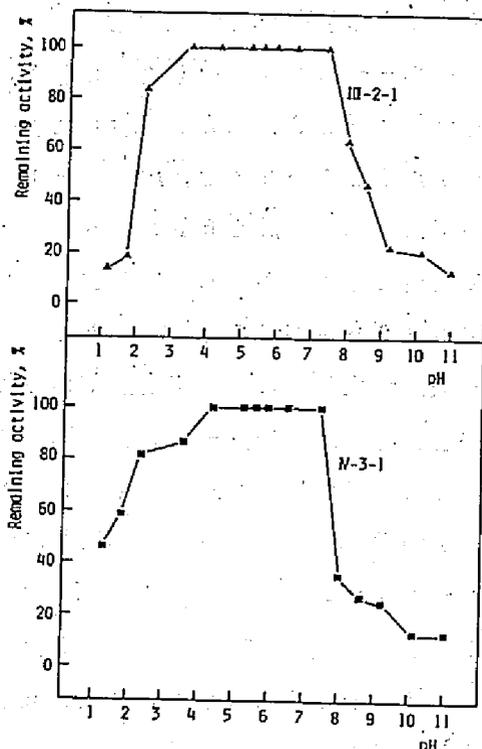


図 2.5 Cx-セルラーゼ精製画分
Ⅲ-2-1とⅣ-3-1の
pH安定性

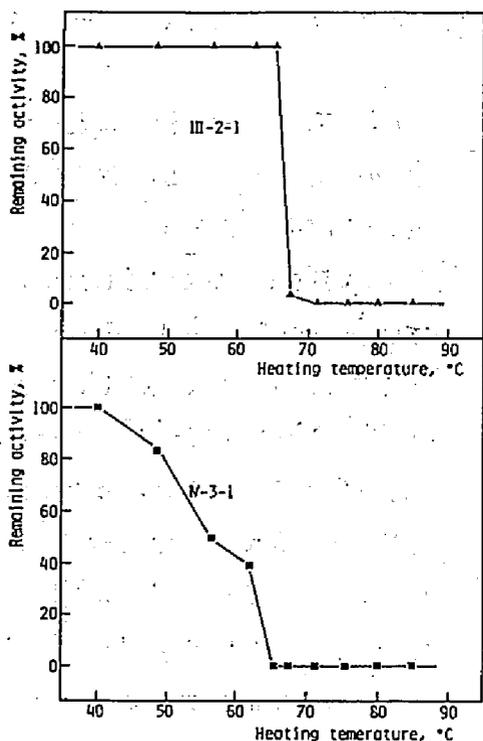


図 2.6 Cx-セルラーゼ精製
画分Ⅲ-2-1とⅣ-3-
1の熱安定性

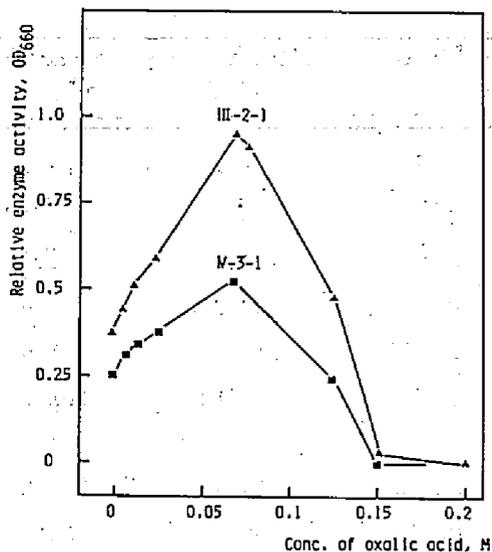


図 2.7 セルラーゼ活性に及ぼす
シュウ酸濃度の影響
酵素: Cx-セルラーゼ精
製画分Ⅲ-2-1とⅣ-3-
1, シュウ酸濃度:
0 - 0.2 M

精製 C_x-セルラーゼ (III-2-1, IV-3-1) の各種の基質に対する比活性を表 7 に示した。両 C_x-セルラーゼともにセロビオース, *p*-ニトロフェニル-β-D-グルコシド, キシロビオースなどの β-グリコシドに対して全く作用せず, また濾紙やアビセルのような結晶性のセルロース基質に対しても分解率は極めて低く, 48 h のインキュベーションで還元糖の生成は 2.0 - 2.7 % に過ぎなかった。Cellulose-azure や

表 7 各種基質に対するセルラーゼ III-2-1, IV-3-1 の酵素活性

Substrate	Concentration of substrate %	Incubation time	Specific activity units/mg-enzyme	
			III-2-1	IV-3-1
CMC	0.4	4 min	51.1	50.1
Cellulose-azure	0.5	24 hr	0.102	0.091
Swollen cellulose	0.5	24 hr	0.068	0.108
Filter paper	0.5	48 hr	0.0074	0.0072
Avicel	0.5	48 hr	0.0080	0.0060
Cellobiose	0.5	24 hr	0.0	0.0
<i>p</i> -Nitrophenyl-β-D-glucoside	0.2	1 hr	0.0	0.0
Xylan	0.4	1 hr	0.99	0.26
Xylobiose	0.5	24 hr	0.0	0.0

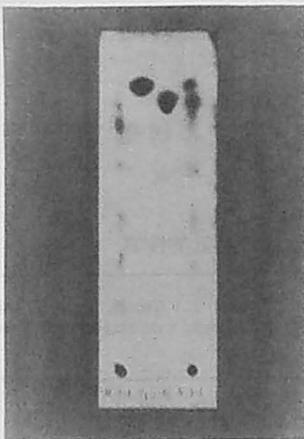


図 28 C_x-セルラーゼ精製画分 III-2-1 と IV-3-1 によるリン酸膨潤セルロース加水分解物の薄層クロマトグラム
G₁: グルコース, G₂: セロビオース, 展開溶剤; *n*-ブタノール: ピリジン: 水 (6 : 4 : 3, v/v)

リン酸膨潤セルロースを基質としたとき, ある程度分解の進むことが認められ, 24 h のインキュベーションで還元糖の生成は 14 - 19 % に達した。市販のセルラーゼ活性測定用の基質である Cellulose-azure は C₁-セルラーゼ活性を欠くセルラーゼ標品によっても分解されるとみられており (Leisola ら, 1976), 表 7 の結果から精製セルラーゼ (III-2-1, IV-3-1) はいずれもセルロースの非晶領域に選択的に作用するものと考えられる。また両 C_x-セルラーゼは, それぞれ等電点や分子量において非常に類似しているキシラナーゼ成分をわずかに含有していることが認められた。

リン酸膨潤セルロースを基質として両 C_x-

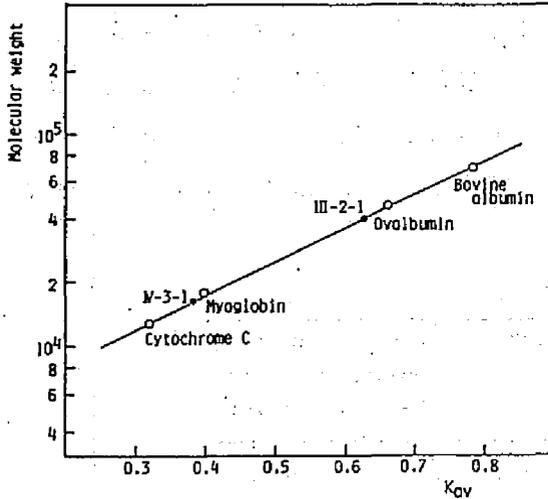


図 29 ゲル濾過クロマトグラフィーによる C_x-セルラーゼ精製画分 III-2-1 と IV-3-1 の分子量の推定

セルラーゼを 24 h 作用させ、得られた分解生成物を薄層クロマトグラフィーで分析した結果を図 28 に示した。III-2-1 からの加水分解生成物はセロトリオース、セロビオースおよび四糖以上のオリゴマーであり、一方、IV-3-1 からはセロビオース、セロオリゴマーに加えてグルコースが生成し、両者の分解生成物の間に差が見出された。そこで III-2-1 と IV-3-1 は相異なるエンド型のグルカナーゼであると考えられた。

精製 C_x-セルラーゼの分子量は、ゲル濾過法 (Sephadex G-100) により既知

分子量の蛋白の溶出位置から III-2-1 が 39,500、IV-3-1 が 16,000 と推定された (図 29)。これまでにさまざまな微生物起原のセルラーゼの分子量が報告されてきたが、IV-3-1 はセルラーゼとしてかなり低分子量であると判断される。セルラーゼの分子サイズが小さければ小さいほど、木材繊維中の毛細管内への拡散移動が容易となり、基質との接触の機会も増加するが、低分子セルラーゼである IV-3-1 は平均的なセルラーゼの分子サイズと考えられる III-2-1 よりも熱安定性や金属イオンに対する抵抗性などの面で劣っていた。

褐色腐朽菌からのセルラーゼの精製や性質についてこれまでに研究された例は極めて

表 8 褐色腐朽菌から分離されたエンド型セルラーゼの酵素的性質

Source	Investigator	pH optimum	pH stability	Temp. optimum	Temp. stability*	Molecular weight × 10 ³
<i>Poria vaillantii</i>	Sison et al., 1958	3.0	2.0 - 7.5	60°C	70°C	
<i>Polyporus schweinitzii</i>	Keilich et al., 1969	4.0	2.6 - 7.5	60°C	70°C	45 ± 4.5
<i>Lenzites trabea</i>	Herr et al., 1978a	4.4		70°C		29
<i>Tyromyces palustris</i> III-2-1		3.15	2.0 - 8.0	61°C	66°C	39.5
IV-3-1		3.15	2.0 - 8.0	51°C	56°C	16

* Temperature caused 50% loss of the original activity.

少ないが (Sison ら, 1958 ; Keilich ら, 1969 ; Herr ら, 1978a), オオウズラタケの C_x -セルラーゼ (III-2-1, IV-3-1) との比較を表 8 にまとめた。報告されたいずれのセルラーゼもエンド型のグルカナーゼ (1, 4- β -D-Glucan glucanohydrolase) に相当すると考えられ, 結晶性のセルロースに作用する *exo*型のグルカナーゼ (Cellobiohydrolase) に関する褐色腐朽菌の報告例は見当たらない。オオウズラタケの C_x -セルラーゼの酵素的性質における特徴は既往の文献値とよく一致していることが認められた。CMC (置換度: 0.53) を基質としたときの K_m (ミハエリス定数) は, III-2-1: 2.70 mg/ml , IV-3-1: 3.29 mg/ml の値が得られたが (図 30), *Lenzites trabea* の CMC (置換度: 0.75) を基質としたセルラーゼの値 1.305 mg/ml (Herr ら, 1978a) に比較してオオウズラタケの両 C_x -セルラーゼは一桁小さい K_m 値であった。

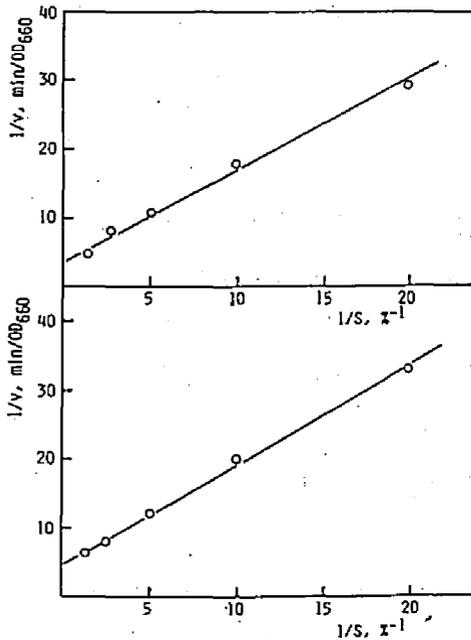


図 30 C_x -セルラーゼ精製画分 III-2-1 (上) と IV-3-1 (下) の反応速度に及ぼす基質濃度の影響
基質濃度: $0.25-8.0 \text{ mg/ml}$, 0.1 M 酢酸・酢酸ナトリウム
緩衝液, $\text{pH} 5.0$

3.3.2 マンナーゼ

3.3.2.1 マンナーゼの精製

マンナーゼ (1, 4- β -D-Mannan mannanohydrolase, EC 3.2.1.78) の精製には液体培養 No 1 (表 1 参照) から得られた菌体外粗酵素を使用した。この粗酵素標品の特徴は, 培養期間中一切 pH 制御を行わなかったため異常に低い pH 条件下 ($\text{pH} 1.4-1.8$) で産生されたことである。この粗酵素標品を用いて, 5%アンモニア水に浸漬処理したシラカンバ木粉 (Ishihara ら, 1979a) と脱リグニン処理したカラマツホロセル

表9 菌体外粗酵素（液体培養No.1）による前処理した木材の加水分解率と糖化液の糖組成

Substrate	Hydrolysis rate (%)	Sugar composition of hydrolyzate				
		Man	Ara	Gal	Xyl	Glc (%)
Shirakamba treated with 5% NH ₄ OH	3.7	63.7	2.0	7.8	15.6	10.9
Karamatsu holocellulose	4.3	58.0	1.7	6.5	5.1	28.7

Reaction condition: Substrate 200 mg, enzyme 50 mg, pH 5.0, 40°C, 48h (Shirakamba) or 18h incubation (Karamatsu holocellulose)

コース (Sudo ら, 1976) の糖化を試みた。これらの前処理されたシラカンバ材およびカラマツ材はセルラーゼやヘミセルラーゼの攻撃に対して十分基質となりうることが報告されているが、表9に見られるように糖化率は4%前後に過ぎなかった。糖化液の糖組成分析により、いずれもマンノースが主構成糖であることが認められ、またマンナンは広葉樹材でグルコマンナンとして、針葉樹材ではグルコマンナンやガラクトグルコマンナンとして存在すること、さらに両基質に対して糖化率の低かったことを考慮すると、この粗酵素はマンナーゼおよびβ-マンノシダーゼリッチであり、マンナーゼの精製を目的とするのに適すると推定された (図15参照)。微生物起原のマンナーゼは、誘導的にも構成的にも産生されるようであるが (Dekker ら, 1975; Dey, 1978) オオウズラタケの場合、マンナーゼがマンナンをほとんど含まない炭素源でも常に一定のレベルで産生されたので (第2章)、誘導的というよりもむしろ構成的に産生されるように思われる。

粗酵素 (1,900mg) を先ずゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephadex G-75) で分画したが、マンナーゼの活性画分 (II, 図60参照) は2つのC_x-セルラーゼ成分 (III-2-1, IV-3-1) よりも高分子領域に、またグリコシダーゼ活性画分 (I) よりも低分子側に溶出することが認められ、Sephadex G-75 の分子篩がマンナーゼ以外の成分との粗分別に有効であることがわかった。得られたマンナーゼ活性画分 (II) を0.1 M酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) で平衡化させたアニオン交換カラム (DEAE Sephadex A-50) に吸着させ、NaClのグラジエントでマンナーゼの分離を試みた。マンナーゼは0.3-0.4MのNaCl濃度で溶出した (II-3) ので、その画分をさらにゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephadex G-75) で精製した。図31に

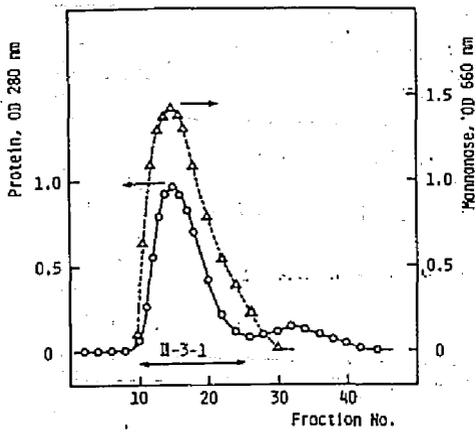


図 3 1 マンナーゼ精製画分II-3の Sephadex G-75ゲル 濾過クロマトグラフィー フラクション液量: 5ml

示したように、マンナーゼ精製画分 (II-3-1) のゲル濾過クロマトグラフィーにおいて蛋白の溶出位置と酵素活性が極めてよく一致していることが認められた。また、純度の検定のためにディスクのポリアクリルアミドゲル (pH 8.3) 電気泳動を試みたが、マンナーゼII-3-1 が単一の成分にまで精製されていることがわかった。さらに、pH 範囲 2.5-4 のキャリアーアンホライトを用いた等電点電気泳動においても蛋白と酵素活性が完全に重なり、精製マンナーゼの均一性が確認された (図 3 2)。マンナーゼII-3-1の等電点は3.45であつ

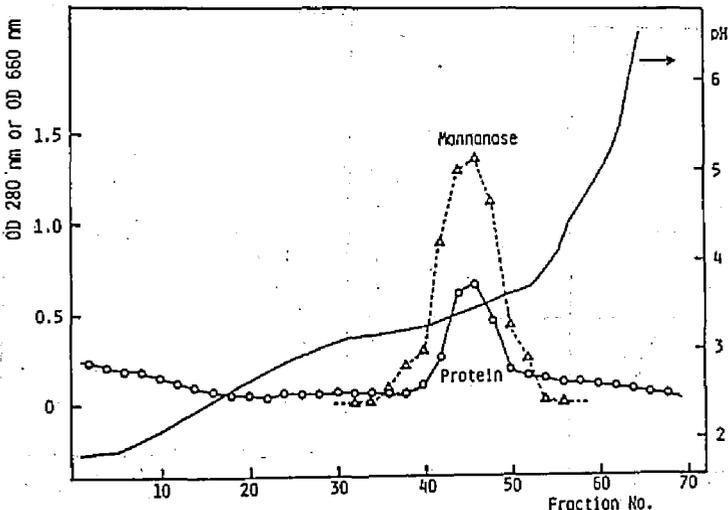


図 3 2 マンナーゼ精製画分II-3-1の等電点電気泳動 フラクション液量: 1.5ml, キャリアーアンホライト: pH 2.5-4, 400V, 40h

た。精製マンナーゼには、CMC, キシラン, アリル-β-グルコシド, セロビオース およびマンノピオースに対する活性は認められなかった。精製過程における蛋白とマンナーゼの回収率を表10にまとめた。

表10 精製過程における蛋白とマンナーゼの回収率

Purification step	Protein mg	Recovery %	$\epsilon_{280}/\epsilon_{260}$ ratio	Relative enzyme units*	Recovery %	Relative purity
Crude enzyme	1900	100	1.19	2287.4	100	1
G-75, II	372	19.6	1.38	1313.7	57.4	2.9
A-50, II-3	89.2	4.7	1.84	512.1	22.4	4.7
G-75, II-3-1	67.3	3.5	1.86	479.4	21.0	6.0

* Relative enzyme units were expressed as a sum of ΔOD_{660} per 10 min incubation.

3.3.2.2 マンナーゼの性質

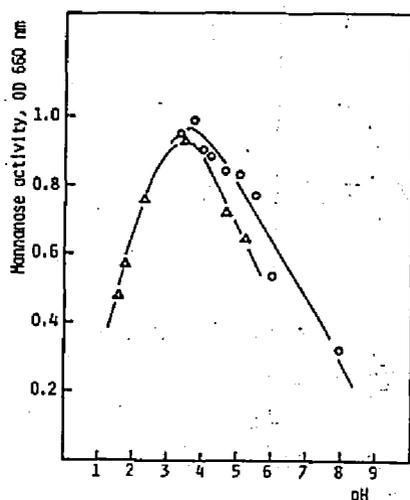


図33 マンナーゼ精製画分 II-3-1 の pH 依存性
 インキュベーション: 0.1M 酢酸・塩酸緩衝液 (pH 1.55-5.25), 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.65-8.18), 40°C, 30 min

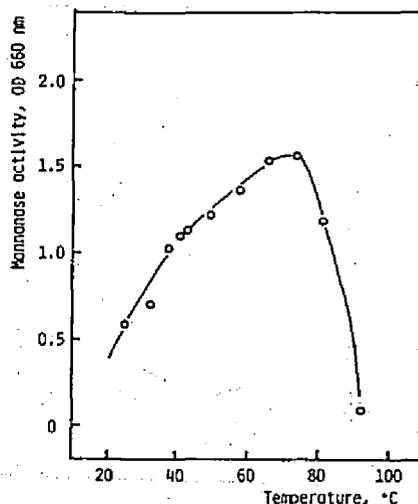


図34 マンナーゼ精製画分 II-3-1 の温度依存性
 インキュベーション: 0.05 M 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液, pH 5.0, 30 min

マンナーゼ II-3-1 の作用に及ぼす pH と温度の影響をそれぞれ図 33, 図 34 に示した。マンナーゼの至適 pH は 3.5 - 3.8 にあり, 至適温度はかなり高温で, 75°C であった。精製酵素の pH 安定性については, 暴露時間 20 h, 25°C の条件で広い pH 範囲 (2.5 - 10) で安定であり (図 35), また熱に対する安定性でも高温域で安定であることがわかった (図 36)。すなわち, 55°C の加熱条件では活性が 100% 保持

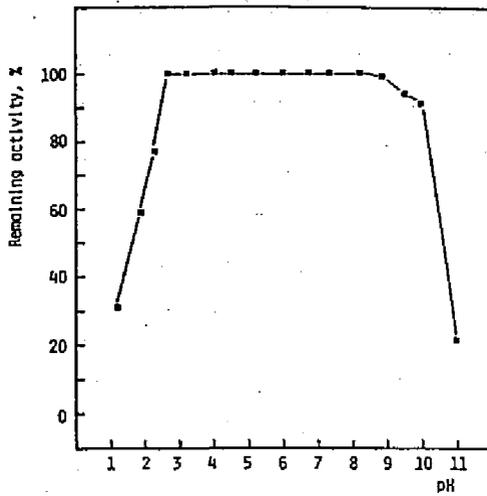


図 35 マンナーゼ精製画分 II-3-1 の pH 安定性

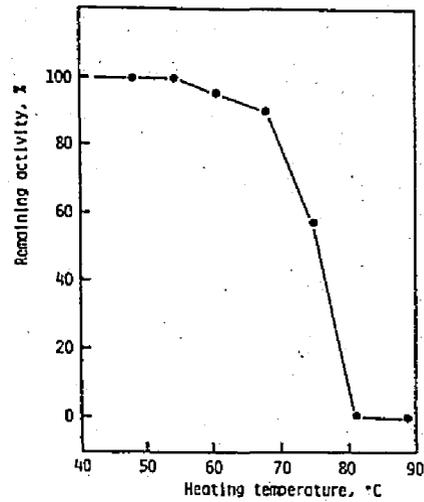


図 36 マンナーゼ精製画分 II-3-1 の熱安定性

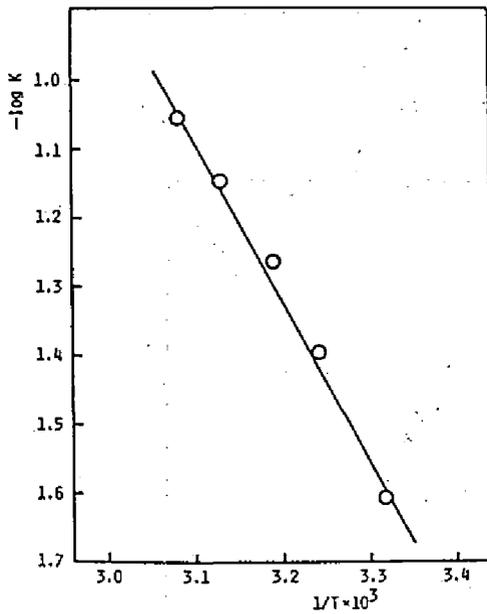


図 37 マンナーゼ精製画分 II-3-1 の反応速度に及ぼす温度の影響
T: 絶対温度, K: 反応速度定数

表 11 マンナーゼ活性に及ぼす
金属イオン (2mM, 5mM)
の影響

Metal ion	Relative enzyme activity (%)	
	2 mM	5 mM
Ba ²⁺	124.1	110.8
Ca ²⁺	122.9	101.9
Co ²⁺	130.2	112.5
Cu ²⁺	112.9	75.4
Fe ²⁺	122.2	95.0
Fe ³⁺	95.3	40.0
Hg ²⁺	0.0	0.0
Mg ²⁺	102.3	79.4
Mn ²⁺	107.0	65.2
Ni ²⁺	114.4	111.5
Pb ²⁺	94.4	94.6
Zn ²⁺	119.2	111.3

され、70℃においても約80%の活性が残存していた。しかし、80℃ではほとんど完全に失活した。本精製酵素が熱安定性にすぐれていることが認められたので、グルコマンナンを基質とした場合の反応速度に及ぼす温度の影響を検討した。2.8℃から5.2℃の温度範囲で、反応速度の対数(log K)と絶対温度の逆数(1/T)の間に良好な直線関係が認められ、Arrheniusの式から求めた活性化エネルギーは10,500 cal/molであった。(図37)。

マンナーゼ活性に及ぼす各種の金属イオン(2mMと5mM)の影響を0.1M酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)中で検討したが、マンナーゼII-3-1は Hg^{2+} により著しく失活し、5mMの Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} により一部失活を受け、また Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} の存在により安定化されることがわかった(表11)。

本精製酵素の分子量は超速心法によって推定した。図38に見られるように、マンナーゼII-3-1は超速心的に単一で、沈降係数は3.65Sと算出され、本精製酵素の拡散

係数を $0.56 \times 10^{-7} cm^2/sec$ 、比容積を $0.74 cm^3/g$

(Whitakerら、1954)と仮定することにより、

Svedbergの式から分子量は61,000と推定された。グルコマンナンを基質としたときのマンナーゼII-3-1のミハエリス定数をLineweaver-Burk plot

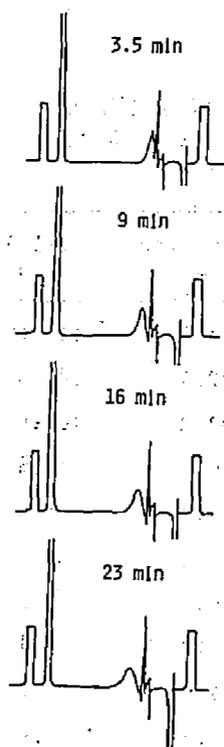


図38 紫外吸収走査によるマンナーゼ精製画分II-3-1の超速心沈降パターン
回転数: 60,000rpm,
酵素濃度: 0.033%,
温度: 2.10℃

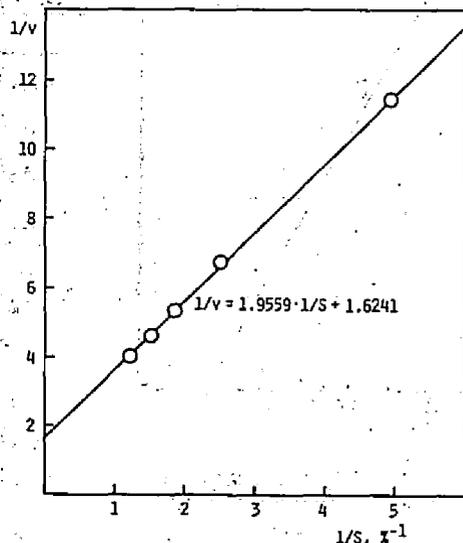


図39 マンナーゼ精製画分II-3-1の反応速度に及ぼす基質濃度の影響
基質濃度: 1.0-10.0mg/ml, 0.1M
酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液,
pH5.0

法により求めた(図3.9)。pH 5.0, 40℃の反応条件で本精製酵素の K_m は $1.20 \times 10 \text{ mg/ml}$ と推定された。基質となるマンナン類(マンナン, ガラクトマンナン, グルコマンナン, ガラクトグルコマンナン)の構造の差により同一のマンナーゼ標品でも K_m 値はかなり変動するが(愛水, 1972), 本精製酵素の K_m は *Bacillus subtilis* 起原のマンナーゼの K_m (愛水, 1972: $2.8-5.9 \text{ mg/ml}$)に比較して大きい値であった。

3.3.3 キシラナーゼ

3.3.3.1 キシラナーゼの部分精製

一般に, セルロース分解性の微生物からの酵素標品にはキシラナーゼ(1,4- β -D-Xylan xylohydrolase, EC 3.2.1.8)活性の存在することが認められている。木材腐朽菌についても多くの例が報告されているが, それら酵素標品のキシラナーゼ活性は各種のクロマトグラフ的手法によっても電気泳動的手法によってもセルラーゼ活性と重なり合うことが多く, キシラナーゼまたはセルラーゼを互に完全に分離精製することは非常に困難である(Ahlgrenら, 1967a, b; Erikssonら, 1968; Erikssonら; Varadiら, 1971; Herrら, 1978a; Urbanekら, 1978; Zalewska-Sobczakら, 1981)。さらに, *Trichoderma viride*(Todaら, 1971)や *Irpex lacteus*(Kandaら, 1976a)のように単一の蛋白にまで精製されたセルラーゼがキシランに対しても作用するという報告例がある。キシランの骨格構造はセルロースを構成するグルコピラノース残基のC₅の位置のアルコールを水素原子に置き換えたものであり, したがってセルロースおよびキシランに作用するこれらの酵素は基質特異性の範囲が広く, 酵素・基質の結合に際してセルロースとキシランの構造の差を識別できないものと考えられる。

そこで, オオウズラタケの産生するキシラナーゼの分離においては, セルラーゼ活性を持たない標品を得ることを主眼として精製を試みた。精製の出発材料には, グルコース2%, シラカンバ木粉0.5%を炭素源とする10日間のオオウズラタケの液体培養から得られた菌体外粗酵素(3,278mg)を使用した。この培養では培地のpH制御を行わず, グルコースが完全に消費された時点(培養3日経過後)で, pHは最低の1.7にまで低下し, その後緩やかに戻りはじめ, 培養終了時(10日後)のpHは3.55であった。

先ず粗酵素をゲル濾過カラムクロマトグラフィー(Sephadex G-75)で分画したが, キシラナーゼの主要画分(II)は蛋白の1番目と2番目のピークの谷に位置し, C_x-セルラーゼの溶出位置よりも少し高分子側であった(図4.0)。高分子側の蛋白の1番目のピークの溶出位置にも, キシラナーゼ, C_x-セルラーゼの活性が認められたが, 同様に β -キシロシダーゼ, β -グルコシダーゼの活性が強く検出された。

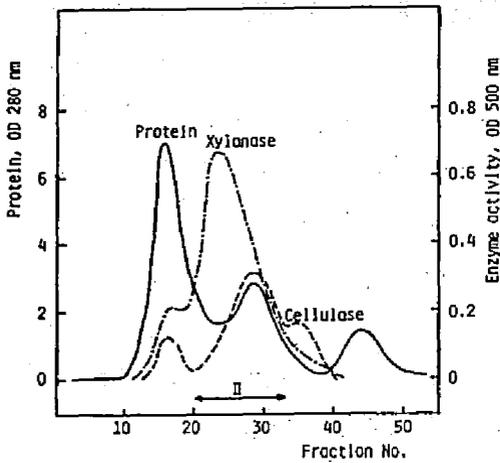


図40 菌体外粗酵素のSephadex G-75
ゲル濾過カラムクロマトグラフィー
カラム: 25×400mm, 溶出液: 0.1
M酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH
5.0), フラクシオン液量: 5ml

次にキシラナーゼ活性画分(II)からキシラナーゼ成分とCx-セルラーゼ成分に分別するためにイオン交換クロマトグラフィーにおける溶出条件を検討した。すなわち、過剰の酵素液(画分II)の一定量を各種のpH, イオン強度に平衡化させた一定量のDEAE Sephadex A-50に吸着させ、蛋白量, キシラナーゼ, Cx-セルラーゼの吸着率を測定した(図41)。その結果, DEAE Sephadex A-50のカラムでキシラナーゼとCx-セルラーゼを分離するために, 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液のpH, イオン強度をpH6.0, 0.1μ→pH5.0, 0.3μ→pH4.0, 1.0μとステ

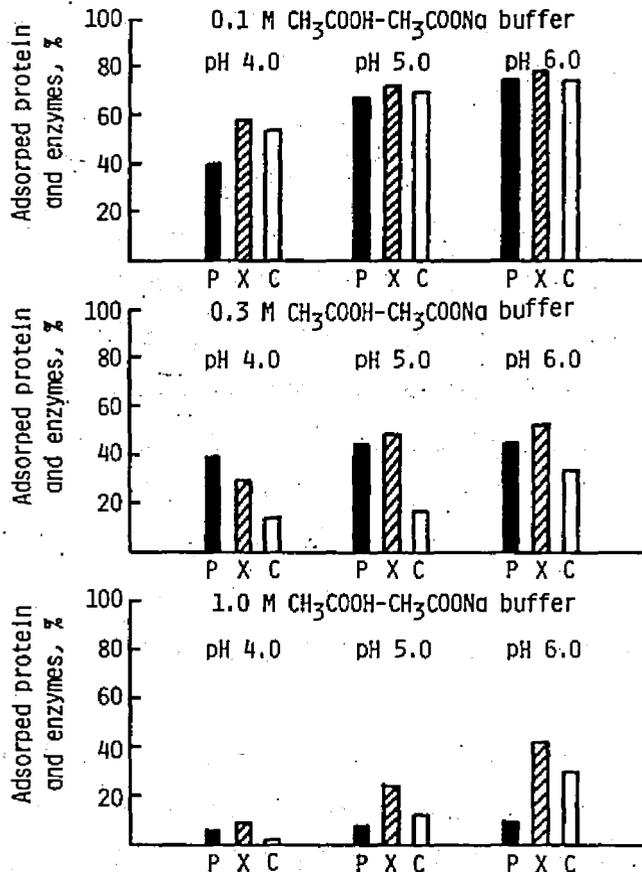


図41 キシラナーゼ精製のためのDEAE Sephadex A-50イオン交換クロマトグラフィーにおける溶出条件の検討 P: 蛋白, X: キシラナーゼ活性, C: Cx-セルラーゼ活性

ップワイズに溶出することが有効であると考えられた。

イオン交換カラムクロマトグラフィーにより、キシラナーゼリッチの画分(II-S3)が得られ、この画分をさらにゲル濾過カラムクロマトグラフィー(Sephadex G-100)で精製した。ゲル濾過クロマトグラフィーにおいて、キシラナーゼの主要ピーク(II-S3-2)は左右対称で、2番目の蛋白のピークと溶出位置が完全に一致したが、同様にC_x-セルラーゼの分布していることが認められた(図42)。

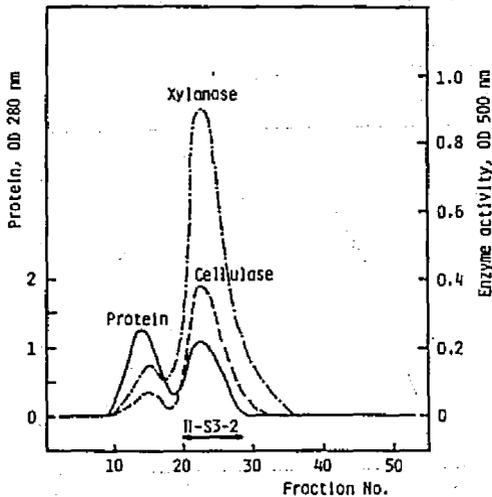


図42 キシラナーゼ精製画分II-S3のSephadex G-100ゲル濾過カラムクロマトグラフィー
カラム: 25×400 mm,
溶出液: 0.1M酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0),
フラクション液量: 5 ml

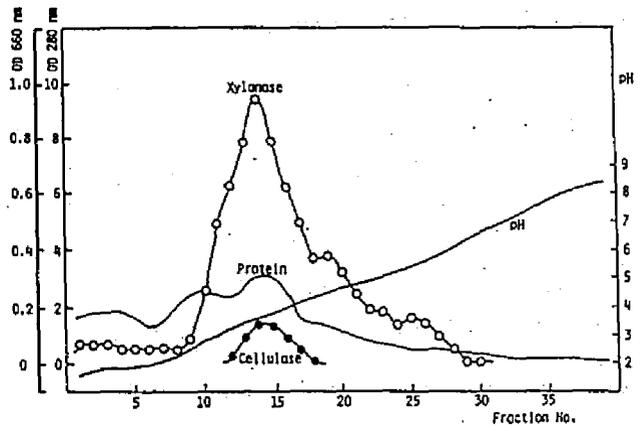


図43 キシラナーゼ精製画分II-S3の等電点電気泳動
フラクション液量: 2.5 ml,
キャリアーアンボライト: pH3-10, 400v,
40h, キシラナーゼ活性: OD 660 nm,
蛋白: OD 280 nm

表12 精製過程における蛋白とキシラナーゼ活性の回収率

Purification step	Protein mg	Recovery %	$\epsilon_{280}/\epsilon_{260}$ ratio	Xylanase activity units*	Recovery %	Relative purity
Crude enzyme	3278	100	1.18	6334	100	1
G-75, II	1377	42.0	1.35	4103	64.8	1.54
A-50, II-S3	197.0	6.0	1.88	1441	22.7	3.78
G-100, II-S3-2	32.8	1.0	1.90	1066	16.8	16.96

* One xylanase unit was defined as 1 μ mole xylose equivalent liberated per 30 min at 40°C.

そこで、精製キシラナーゼ画分(II-S3-2)のキシラナーゼとCx-セルラーゼの新たな分離の可能性を検討するために、キシラナーゼ画分(II-S3)の等電点電気泳動を試みた。等電点電気泳動により、相異なる2つの蛋白ピーク(等電点3.0, 3.6)が認められたが、画分(II-S3)に含まれるキシラナーゼとCx-セルラーゼの等電点はそれぞれ3.6で一致したので、キシラナーゼの精製は画分II-S3-2の部分精製にとどめた(図4.3)。この精製キシラナーゼにはキシロビアーゼおよびアリルーβ-キシロシダーゼ活性は認められなかった。精製過程における蛋白とキシラナーゼの回収率を表12にまとめた。

3.3.3.2 キシラナーゼの性質

キシラナーゼの精製は部分精製にとどまったが、精製画分II-S3-2の諸性質を検索した。キシラナーゼの作用に及ぼすpHと温度の影響をそれぞれ図4.4, 図4.5に示した。キシラナーゼの至適pHは3.5, 至適温度は高く76℃であった。また、pHを酵素にとって安定な4.0に固定したときの酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液のイオン強度の影響を検討したが、キシラナーゼの作用は0.1~1.0μの範囲でイオン強度と反比例の関係にあった(図4.6)。

精製酵素のpH安定性については、暴露時間が20h, 25℃の条件で、広いpH範囲(2.5-9)で安定であることが認められた(図4.7)。また、熱に対する安定性では、精製酵素が安定であるpH3.86およびpH5.30, 70℃, 20分間の加熱条件で、それぞれ加熱前の80%の活性が残存しており、高温域で極めて安定であることが判明した(図4.8)。キシラナーゼ活性に及ぼす金属イオン(2mMと5mM)の影響を0.1M酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)中で検討したが、本精製酵素

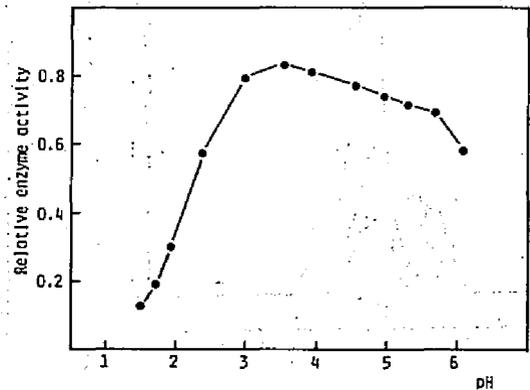


図4.4 キシラナーゼ精製画分II-S3-2のpH依存性

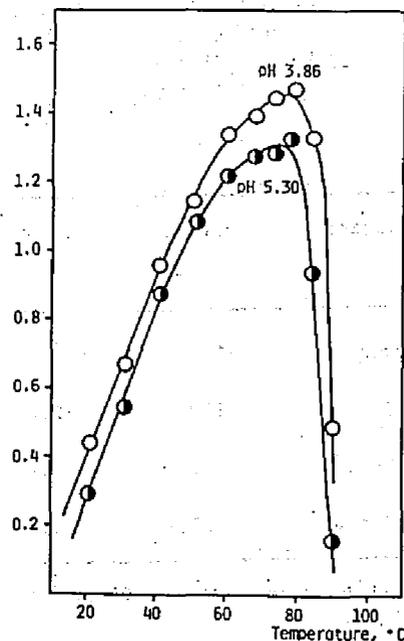


図4.5 キシラナーゼ精製画分II-S3-2の温度依存性

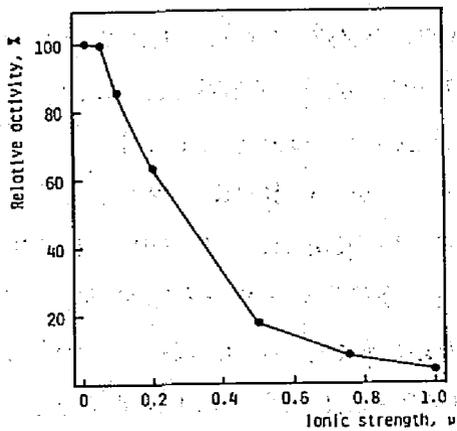


図46 キシラナーゼ精製画分II-S3-2の酵素活性に及ぼすイオン強度の影響

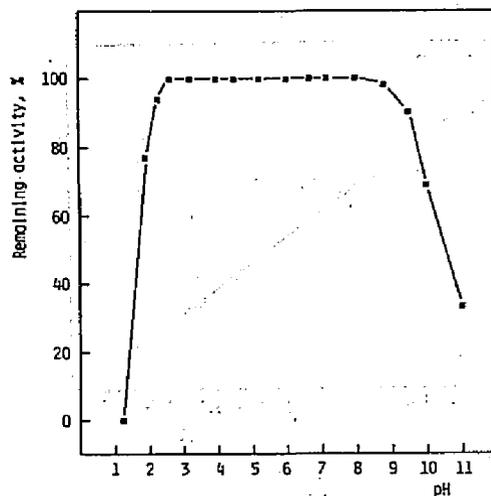


図47 キシラナーゼ精製画分II-S3-2のpH安定性

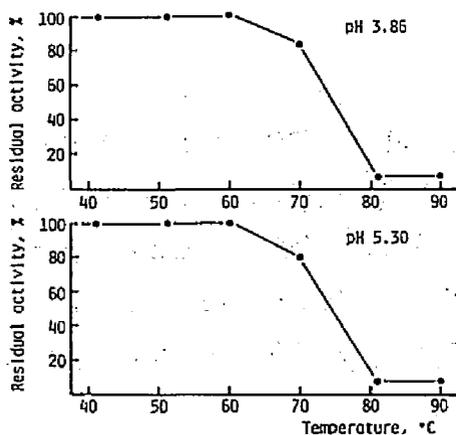


図48 キシラナーゼ精製画分II-S3-2の温度依存性

表13 キシラナーゼ活性に及ぼす金属イオン(2mM, 5mM)の影響

Metal ion	Relative enzyme activity (%)	
	2 mM	5 mM
Ba ²⁺	126.0	116.4
Ca ²⁺	128.1	98.5
Co ²⁺	119.7	86.8
Cu ²⁺	111.6	80.3
Fe ²⁺	89.3	79.7
Fe ³⁺	29.6	7.4
Hg ²⁺	0.0	0.0
Mg ²⁺	117.9	86.8
Mn ²⁺	45.1	20.8
Ni ²⁺	110.7	29.7
Pb ²⁺	105.9	90.1
Zn ²⁺	101.2	101.2

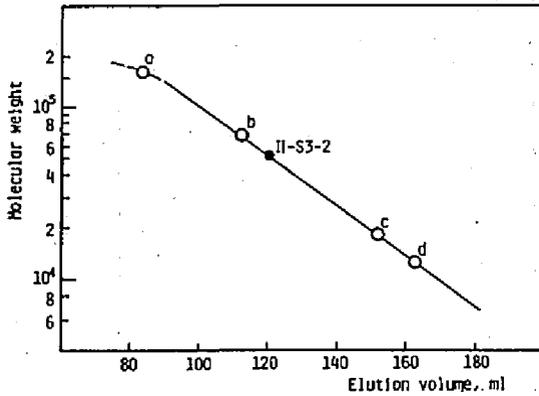


図49 ゲル濾過クロマトグラフィーによる
キシラナーゼ精製画分II-S3-2の
分子量の推定
a:ガンマグロブリン, b:ウシ血清ア
ルブミン, c:ミヨグロビン, d:チト
クロームC

3.3.4 β -D-キシロシダーゼ

3.3.4.1 β -D-キシロシダーゼの精製

β -D-キシロシダーゼ (β -D-Xyloside xylohydrolase, EC 3.2.1.37) の精製には液体培養Na 3 (表1参照) から得られた菌体外粗酵素を使用した。この粗酵素標品 (50 mg) を用いてカラマツホロセルロース (200 mg) を加水分解したところ、ホロセルロースに存在するキシランの73%がキシロースにまで糖化され (表4参照)、この粗酵素標品にキシラナーゼおよび β -D-キシロシダーゼがかなり含まれていると推定された。

粗酵素 (2,740 mg) を先ずゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephadex G-100) で分画したが、 β -D-キシロシダーゼ活性画分 (I, 図60参照) はキシラナーゼ活性画分 (II) から高分子側に分離し、Sephadex G-100 カラムの排除体積に近い位置に溶出した。この高分子画分 (I) は各種のグリコシダーゼ活性を含んでおり、グリカナーゼ活性画分 (II, III, IV) よりも、通常電気泳動的に多くの蛋白成分から構成されているので、 β -D-キシロシダーゼの効率的精製のためアフィニティクロマトグラフィーを試みた。すなわち、 β -D-キシロシダーゼに対して阻害剤で、かつフリーのアミノ基を有する *p*-アミノフェニル-1-チオール- β -D-キシロピラノシドをリガンドとして (Pazur, 1981)、CNBrで活性化したCH-Sepharose 4B に結合させたアフィニティカラムを調製した。図50に示したように、 β -D-キシロシダーゼ活性を含まない蛋白成分 (I-1) はアフィニティカラムに吸着されず、また β -D-キシロシダーゼ

は2 mMの Hg^{2+} 、 Fe^{3+} および5 mMの Mn^{2+} 、 Ni^{2+} により著しく失活し、また Ba^{2+} 、 Zn^{2+} の存在により安定化されることがわかった (表13)。

キシラナーゼII-S3-2の分子量はゲル濾過法 (Sephadex G-100) により求めた。分子量マーカーとしての数種の蛋白の溶出位置から本精製酵素の分子量は51,000と推定された (図49)。

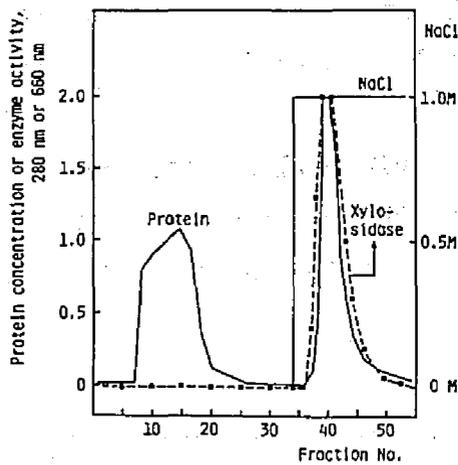


図50 β -D-キシロシダーゼ精製画分 I のアフィニティクロマトグラフィー
フラクション液量: 5 ml

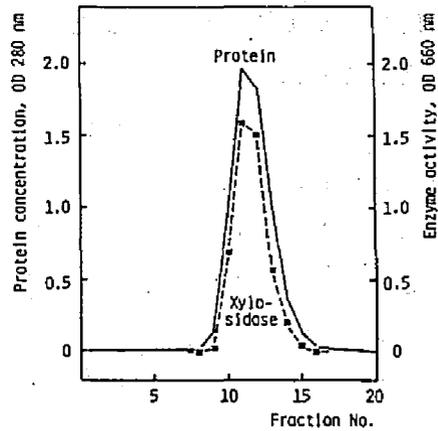


図51 β -D-キシロシダーゼ精製画分 I-2-2 の Sephadex G-100
ゲル濾過クロマトグラフィー
フラクション液量: 5 ml

活性画分 (I-2) は 1M NaCl を含む緩衝液で溶出した。この画分 (I-2) をさらにゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephadex CL-6B) で分画したが、分子量の異なる2つの β -D-キシロシダーゼ活性画分 (I-2-1, I-2-2) に分離され、ゲル濾過クロマトグラフィーにおいて蛋白のピークと酵素活性のピークがそれぞれよく重なり合っており、低分子側の画分 I-2-2 が β -D-キシロシダーゼの全体の活性の大半を占め、主成分であることが判明した。精製キシロシダーゼ画分 I-2-2 の純度の検定のため、篩サイズの異なるゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephadex G-100)

表14 精製過程における蛋白と β -D-キシロシダーゼの回収率

Purification step	Protein mg	Recovery %	$\epsilon_{280}/\epsilon_{260}$ ratio	Xylosidase activity units*	Recovery %	Relative purity
Crude enzyme	2740	100	1.19	3154	100	1
G-100, I	811.9	29.6	1.50	2096	66.5	2.2
Affinity, I-2	255.5	9.3	1.80	1533	48.6	5.2
CL-6B, I-2-2	129.5	4.7	1.91	1166	36.9	7.9

*キシロシダーゼ1単位は40°C 30分のインキュベーションで1 μ モルのキシロースを遊離させる酵素量として定義した。

で分画を試みたが、蛋白と酵素活性のピークが左右対称で完全に一致することが確認された(図51)。また、精製画分I-2-2の紫外吸収スペクトルは $\epsilon_{280}/\epsilon_{260}$ 比が1.91の典型的な蛋白のカーブであった。精製過程における蛋白と β -D-キシロシダーゼの回収率を表14にまとめた。

本精製酵素はディスクのポリアクリルアミドゲル(pH 8.3)電気泳動で単一のバンドであることがわかった(図52)。また、狭いpH範囲(pH 2.5-4)の等電点電気泳動の結果からもキシロシダーゼI-2-2は単一の成分にまで精製されていることが確認され、その等電点は3.55であった(図53)。

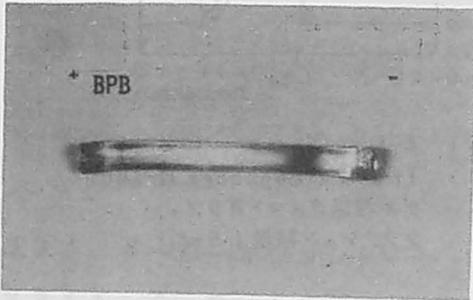


図52 β -D-キシロシダーゼ
精製画分I-2-2のデ
ィスクゲル電気泳動

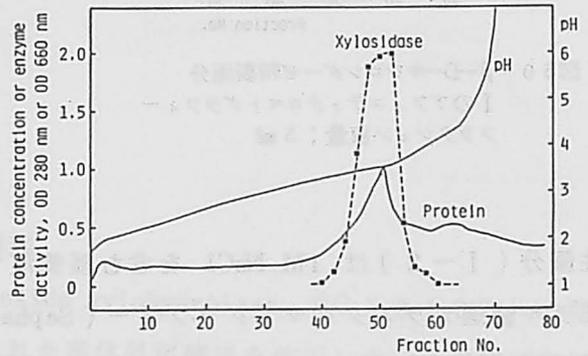


図53 β -D-キシロシダーゼ精製画分I-2-2
の等電点電気泳動
フラクシヨン液量: 1.5ml,
キャリアーアンホライト: pH 2.5-4
400V, 40h

3.3.4.2 β -D-キシロシダーゼの性質

β -D-キシロシダーゼI-2-2の作用に及ぼすpHと温度の影響をそれぞれ図54、図55に示したが至適pHと温度は4.2と70℃であった。本精製酵素のpH安定性については、暴露時間が20h、25℃の条件で、広いpH範囲(pH 2-8)、とくに酸性側において安定であることが認められた(図56)。また熱に対する安定性試験でも、65℃、10分間の加熱条件でほとんど失活せず高温域で安定であった(図57)。温度が65℃以上になると徐々に

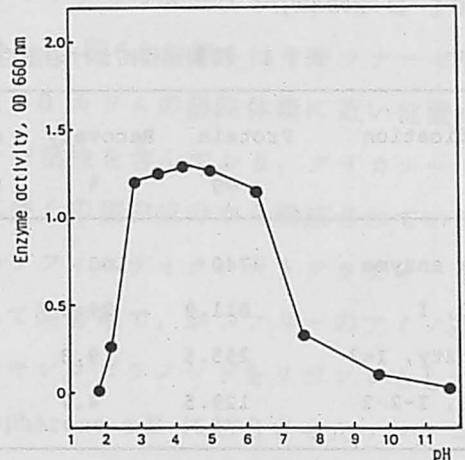


図54 β -D-キシロシダーゼ精製
画分I-2-2のpH依存性

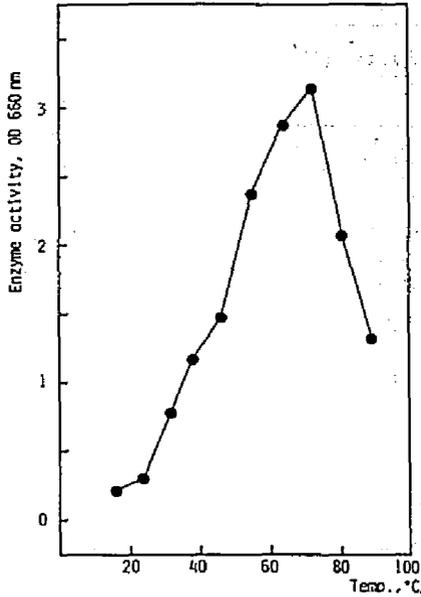


図55 β -D-キシロシダーゼ精製
成分 I-2-2 の温度依存性

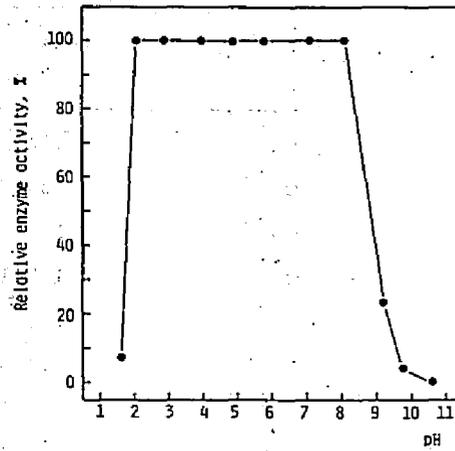


図56 β -D-キシロシダーゼ精製
成分 I-2-2 の pH 安定性

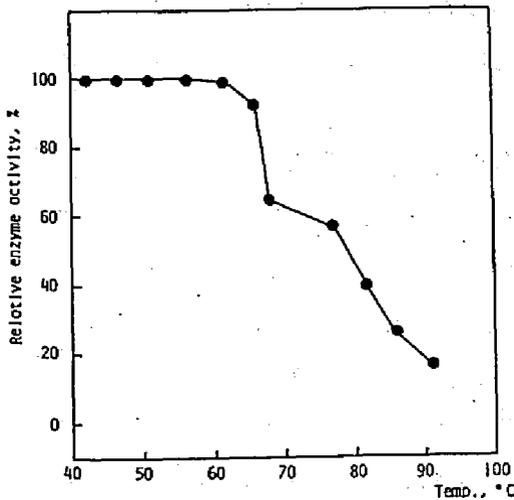


図57 β -D-キシロシダーゼ精製成分
I-2-2 の熱安定性

失活した。

β -D-キシロシダーゼ活性に及ぼす各種の金属イオン(2mMと5mM)の影響を0.1M酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)中で検討したが、本精製酵素は Hg^{2+} 、 Fe^{3+} により著しく失活し、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Pb^{2+} の存在により安定化されることがわかった(表15)。

電気泳動的に単一成分であると確認された本精製酵素の分子量は超速心法によって求めた。超速心分析で沈降係数が10.6Sの左右対称な単一の沈降ピークが観察され(図58)、本精製酵素の拡散係数および比容積をそれぞれ $0.56 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ 、 $0.74 \text{ cm}^3/g$ (Whitaker, 1954)と仮定することにより、Svedbergの式から174,000の分子量が求められた。微生物起原の多糖類加水分解酵素の分子量について、グリカナーゼの分子量はグリコシダーゼの分子量よ

表15 β -D-キシロシダーゼ活性に及ぼす金属イオン
(2mM, 5mM)の影響

Metal ion	Relative enzyme activity (%)	
	2 mM	5 mM
Ba ²⁺	131.9	121.7
Ca ²⁺	139.8	105.5
Co ²⁺	136.2	109.7
Cu ²⁺	122.1	84.4
Fe ²⁺	113.7	109.0
Fe ³⁺	94.8	36.5
Hg ²⁺	13.9	0.0
Mg ²⁺	136.2	98.4
Mn ²⁺	103.2	90.7
Ni ²⁺	119.7	100.9
Pb ²⁺	118.0	102.9
Zn ²⁺	113.4	98.5

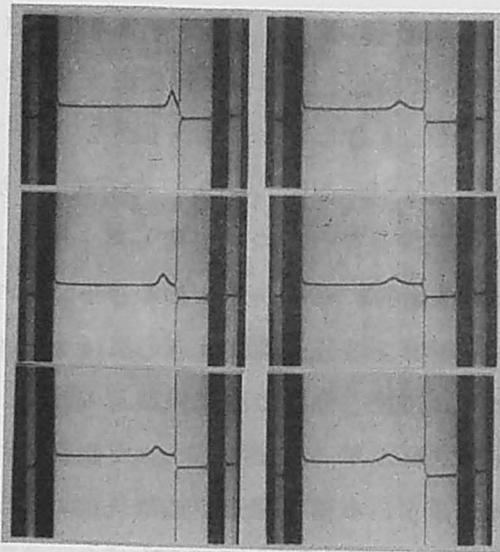


図58 シュリーレン法による β -D-キシロシダーゼ精製画分I-2-2の超速心沈降パターン
回転速度:45,000rpm,
酵素濃度:0.123%
45,000rpmに整定後,6mm毎に撮影した。

りも小さいと提案されているが(Ahlgrenら, 1967a, b), オオウズラタケの場合も同様な関係にあることが認められた。

本精製酵素の各種のグリコシドや木材に分布する多糖成分に対する酵素活性を表16にまとめたが, 本精製酵素に α -グルコシダーゼ, 広葉樹キシランの側鎖であるウロン酸残基の遊離を触媒する α -(1 \rightarrow 2)-グルクロニダーゼ, C_x-セルラーゼ, キシラナーゼ, マンナーゼの諸活性は認められなかった。 β -D-グルコシダーゼの各種基質に対して, 本精製酵素はいずれも十分作用することが判明した。また β -D-マンノシダーゼ活性も確認されたが微弱であり, 本精製酵素のキシロビオース, セロビオース,

表16 各種基質に対する β -D-キシロシダーゼI-2-2の酵素活性

Enzyme	Substrate	Concentration of substrate %	Specific activity units/mg
β -Glucosidase	Cellobiose	0.1	37
	p-Nitrophenyl- β -D-glucoside	0.2	110
	Methyl- β -D-glucoside	0.2	18
	O- β -D-Glcp-(1+4)-D-Man	0.1	27
β -Xylosidase	Xylobiose	0.1	18
	Phenyl- β -D-xyloside	0.2	9.0
β -Mannosidase	Mannobiose	0.1	2.9
α -Glucosidase	Methyl- α -D-glucoside	0.2	0.0
α -(1-2)-Glucuronidase	O-(4-O-Me- α -D-GlcpA)-(1+2)-D-Xyl	0.1	0.0
Cellulase	CMC	0.4	0.0
Xylanase	Xylan	0.4	0.0
Mannanase	Glucomannan	0.4	0.0

マンノピオースに対する反応速度比は6:12:1であった。

本精製酵素は電気泳動的にも超速心的にも単一成分であることが確認されたが、 β -D-キシロシダーゼ活性と同様 β -D-グルコシダーゼ活性を持つことが認められた。そこで、 β -D-キシロシダーゼ、 β -D-グルコシダーゼの両活性が酵素分子内の同一の活性中心に由来するの否か、反応動力学的な検討を行った。先ず、本精製酵素のフェニル- β -D-キシロシドおよびp-ニトロフェニル- β -D-グルコシドに対するミハリス定数をLineweaver-Burkのプロットより求めたが、それぞれ 7.1×10^{-1} mg/ml, 3.3×10^{-1} mg/mlであった(図59)。

酵素反応が阻害剤(i)によって拮抗的に阻害されるとき、反応速度(v)に及ぼす拮抗阻害剤の影響は酵素・阻害剤の結合の解離定数を K_i とすると次式によって表わされる(Dixonら, 1979)。

$$v = \frac{V}{1 + Km/S(1 + i/K_i)} \quad (3.3.4.2.1)$$

本精製酵素が相異なる2つのグリコシダーゼ基質、すなわちフェニル- β -D-キシ

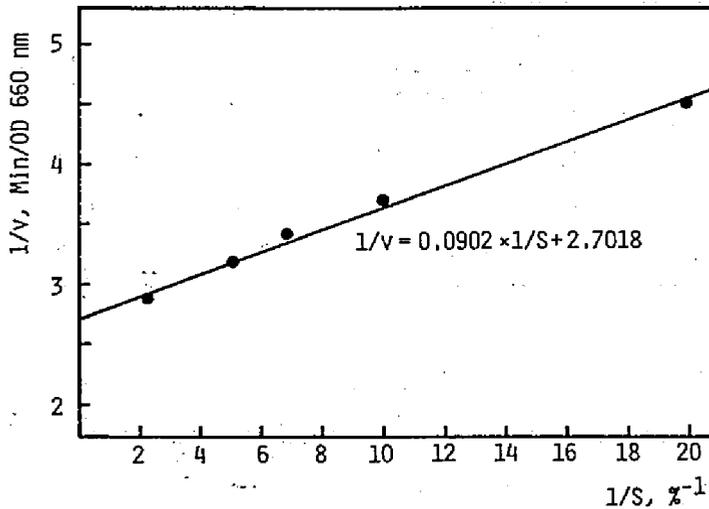
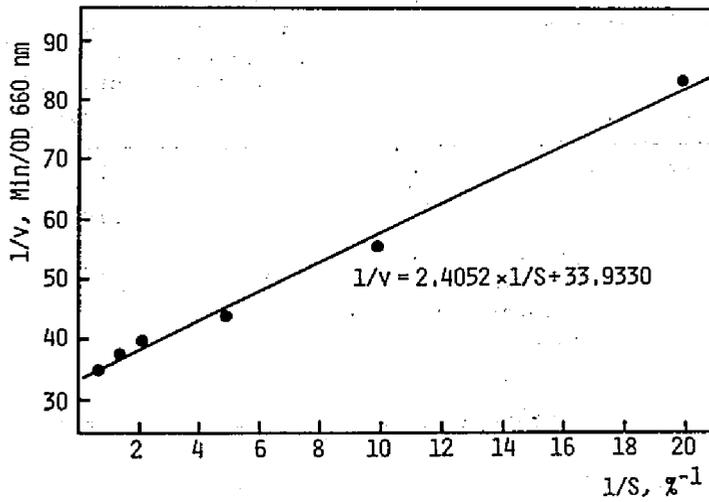
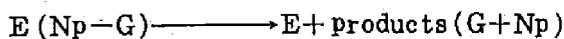
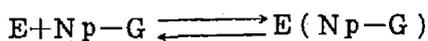
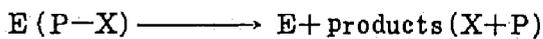


図59 β -D-キシロシダーゼ精製画分 I-2-2 の反応速度に及ぼす基質濃度 [フェニル- β -D-キシロシド(上)と p-ニトロフェニル- β -D-グルコシド(下)] の影響

ロシド (P-X) および p-ニトロフェニル- β -D-グルコシド (Np-G) と同じ活性中心で作用すると仮定すると、酵素反応はつぎのように考えられる。



反応系に P-X と Np-G が共存するとき、P-X と Np-G は互に拮抗阻害剤として作用するから、(3.3.4.2.1) 式との比較によって P-X および Np-G の加水分解速度 v_x ,

v_g は, V_x , V_g および K_x , K_g をそれぞれの基質に対する最大速度およびミハエリス定数とすると, つぎのように与えられる。

$$v_x = \frac{V_g}{1 + K_x/x (1 + g/K_g)} \quad (3.3.4.2.2)$$

$$v_g = \frac{V_x}{1 + K_g/g (1 + x/K_x)} \quad (3.3.4.2.3)$$

そこで2つの反応速度の和を v_t として表わすと以下の式を得る。

$$v_t = v_x + v_g$$

$$= \frac{V_x \cdot x/K_x + V_g \cdot g/K_g}{1 + x/K_x + g/K_g} \quad (3.3.4.2.4)$$

本精製酵素がフェニル- β -D-キシロシドおよび *p*-ニトロフェニル- β -D-グルコシドに対して同じ活性中心で作用すると仮定すると, 両基質の共存する反応系での全体の反応速度は (3.3.4.2.4) 式に従うものと考えられる。一方, 本精製酵素が両基質に対して互に異なる活性中心で作用すると仮定すると, 両基質が共存するときの全体の反応速度は各々の基質が単独に存在するときの反応速度の単純な和になると考えられる。全体の基質濃度を 2.5 mg/ml とし, フェニル- β -D-キシロシドと *p*-ニトロフェニル- β -D-グルコシドの構成割合の異なるそれぞれの反応系での測定結果 (表17) か

表17 フェニル- β -D-キシロシド(P-X)と *p*-ニトロフェニル- β -D-グルコシド(Np-G)両基質の構成割合の異なる反応系での β -D-キシロシダーゼ精製画分 I-2-2 の反応速度

Concentration of substrate		Velocity for each individual substrate			v_t observed	v_t calculated
Np-G $\times 10^{-2}\%$	P-X $\times 10^{-2}\%$	v_g	v_x	$v_g + v_x$		
2.5	22.5	0.138	0.024	0.162	0.041	0.078
5	20	0.224	0.023	0.247	0.100	0.120
10	15	0.272	0.021	0.293	0.199	0.191
15	10	0.287	0.018	0.305	0.274	0.247
20	5	0.314	0.012	0.326	0.287	0.291

ら, 本精製酵素の全体の反応速度は (3.3.4.2.4) 式に一致していると判断され, 本精製酵素の β -D-キシロシダーゼ, β -D-グルコシダーゼ両活性は同じ活性中心に由

来することが判明した。

3.4 要 約

褐色腐朽菌オオウズラタケの液体培養で得られた菌体外酵素系から C_x -セルラーゼ、マンナーゼ、キシラーゼ、 β -D-キシロシダーゼをそれぞれ分離精製し、各精製酵素の蛋白化学的ならびに酵素化学的諸性質を明らかにした。

オオウズラタケの菌体外粗酵素をゲル濾過カラム (Sephadex G-75 または G-100) で分画すると、培養条件によって溶出パターンの相違は認められるが、一般に吸光度 280 nm に吸収を持つ 3 種類のピーク (分子量の大きい順に A, B, C とする) が得られ (図 60), 肉眼的特徴としてピーク A は白濁, ピーク B は無色透明, ピーク C は褐色を帯びていた。本章で分離精製した各酵素成分とピーク A, B, C との関係では、 β -D-キシロシダーゼ (I-2-2) はピーク A とほぼ一致し、マンナーゼ (II-3-1) とキシラーゼ (II-S3-2) はピーク A と B の谷間に、 C_x -セルラーゼ (III-2-1) はピーク B に一致し、また C_x -セルラーゼ (IV-3-1) はピーク B と C の谷間に位置した。ピーク C は分子量 1 万の限外濾過膜 (ダイアフィルター G-10 T) を通過しないが、ゲルカラムの総容積よりも遅れて溶出する傾向にあることから、Sephadex とある程度の親和性を持つ成分と考えられる。

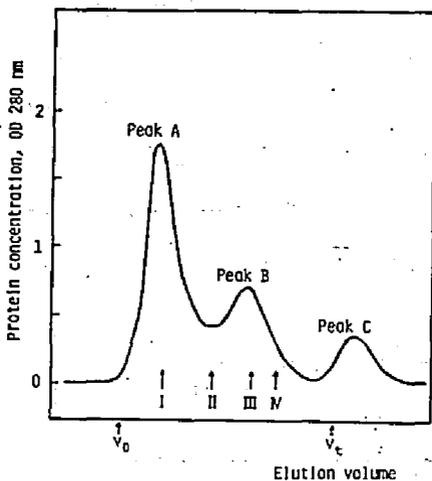


図 60 オオウズラタケ菌体外粗酵素のゲル濾過クロマトグラフィーの模式図
 V_0 : カラムの排除容積,
 V_t : カラムの総容積,
I, II, III, IV: 酵素活性の溶出位置

とある程度の親和性を持つ成分と考えられる。

オオウズラタケの菌体外粗酵素から分離した各精製酵素の蛋白化学的ならびに酵素化学的性質を表 18 にまとめた。各酵素とも酸性側の低い pH で活性が高く、安定であり、また至適温度はかなり高温で熱に対して高い安定性を示し、これまでに報告された褐色腐朽菌からの C_x -セルラーゼや β -D-グルコシダーゼの性質 (Sisonら, 1958; Keilichら, 1969; Herrら, 1978 a, b) とよく一致している。分子量については、微生物起原の酵素の場合、グリカナナーゼはグリコシダーゼよりも小さい分子量を持つと提案されているが (Ahlgrenら, 1967 a, b), オオウズラタケにおいても同様な関係にあることが確認された。本章で述べた β -D-キシロシダーゼ I-2-2 は電気泳動的にも超速心的

確認された。本章で述べた β -D-キシロシダーゼ I-2-2 は電気泳動的にも超速心的

表18 オオウズラタケから分離精製されたセルラーゼ, ヘミセルラーゼの性質

Enzyme	Fraction	pH optimum	pH stability	Temp. optimum	Temp. stability*	Molecular weight	Isoelectric point
C _x -Cellulase	III-2-1	3.15	2.0-8.0	61°C	66°C	39,500 ^a	3.45
C _x -Cellulase	IV-3-1	3.15	2.0-8.0	51°C	56°C	16,000 ^a	3.35
Mannanase	II-3-1	3.8	2.6-9.0	75°C	76°C	61,000 ^b	3.45
Xylanase	II-S3-2	3.5	2.6-9.0	76°C	76°C	51,000 ^a	3.60
β -D-Xylosidase	I-2-2	4.2	2.0-8.0	70°C	80°C	174,000 ^b	3.55

* Temperature caused 50% loss of the original activity.

^a by gel filtration

^b by ultracentrifugation

にも単一成分であったが、本精製酵素に β -D-グルコシダーゼ活性の存在することが認められた。しかし反応動力学的検討の結果から、本精製酵素の β -D-キシロシダーゼ、 β -D-グルコシダーゼ両活性は同一の活性中心に由来することが判明した。

Lenzites trabea からの精製 β -D-グルコシダーゼにも β -D-キシロシダーゼ活性が認められ (Herrら, 1978b), また *Polia placenta* からグリコシダーゼ基質に対してと同様多糖類に対しても作用する基質特異性の広い酵素が報告されており (Wolterら, 1980; Highleyら, 1981b; 1982), 褐色腐朽菌のグリコシダーゼが複数の酵素機能をもって存在することは、必ずしも特異的ではないように推論される。

第4章 木材ヘミセルロースの酵素分解生成物の検索

4.1 緒 言

木材のヘミセルロースはセルロースと異なりヘテロポリマーで側鎖や分岐があり，構成糖の種類も多いため，効率的な酵素糖化を目指すためにはその化学構造をよく理解することが必要である。広葉樹材，針葉樹材のそれぞれ主要なヘミセルロースである4-O-メチルグルクロノキシランおよびグルコマンナンを基質として，第3章で記述したキシナーゼII-S3-2，マンナーゼII-3-1でそれぞれ酵素分解を行った。本章では得られた酵素分解生成物を検索し，各生成物の構造と収量からキシナーゼ，マンナーゼの基質特異性および広葉樹キシラン，針葉樹グルコマンナンの酵素糖化における化学構造上の問題点を検討する。

広葉樹材から得られる4-O-メチルグルクロノキシランは樹種によって存在量に差はあるが（材あたり10～35%），館，山森（1951）がハルニレ材のキシランについて報告したように，その構造は β -（1→4）結合したキシロース主鎖からなり，それに側鎖として9個のキシロース残基あたり1個のO-メチル-D-グルクロン酸が直接結合している。その後，Aspinallら（1954）によるブナ材から直接アルカリで抽出したキシランのメチル化研究によって，4-O-メチルグルクロノキシランは4-O-メチルグルクロン酸の単一側鎖がキシラン主鎖中のキシロースのC₂の位置に α -（1→2）結合したものであることが明らかとなった。この4-O-メチルグルクロン酸のキシラン主鎖における分布について規則性があるのか否か，これまでのところ確証はない。

Timell（1962）は市販ベクチナーゼによるWhite birch材キシランの酵素分解生成物から，中性オリゴ糖としてキシロビオースからキシロヘキサオースまでを，また4-O-メチルグルクロン酸とキシロースからなる酸性オリゴ糖としてアルドテトラオウロン酸からアルドオクタオウロン酸まで単離し，アルドヘキサオウロン酸までを同定している。それら酸性オリゴ糖の構造は，いずれもウロン酸が非還元末端のキシロース残基についたもので，またウロン酸が2個以上ついたものは見出されていない。4-O-メチルグルクロン酸を含む酸性糖のほか，キシランの加水分解物中に見出される酸性糖としてガラクトウロン酸がある。このガラクトウロン酸はベクチン由来のものでなく，広葉樹キシランの構成酸性糖であると考えられているが（Samuelsonら，1966；Shimizu；Ericssonら，1975；Ericssonら，1977），キシラン分子中のガラクトウロン酸の分布，結合様式についてははっきりとした証拠はこれまで報告されていない。

針葉樹材のヘミセルロースとして主体をなすものはグルコマンナンであり、その存在量は材あたり10-15%である。分離には予め脱リグニン処理を必要とし、水酸化カリウム/水酸化ナトリウムの逐次抽出法(Beelikら, 1967)によってキシランを含まない純度の高いグルコマンナンが効率よく得られる。グルコマンナンの構造は部分加水分解によって得られたオリゴ糖の構造やメチル化研究によって、本質的にはD-グルコース残基とD-マンノース残基がランダムに分布する β -(1 \rightarrow 4)結合の直鎖状のポリマーで、D-ガラクトースの側鎖が主鎖中のD-グルコースまたはD-マンノース残基のC₆の位置に α -(1 \rightarrow 6)結合したものであることが明らかにされた (Meier, 1960; Aspina11ら, 1962; Schwarzら; Millsら, 1963; Timell, 1965; 越島, 1968)。ガラクトース, グルコース, マンノースの構成モル比は、通常0.1:1:3であり (Timell, 1965), 針葉樹材の水溶性ヘミセルロースのガラクトグルコマンナン(糖組成; Gal:Glc:Man=1:1:3)とは、D-ガラクトース残基の構成モル比において異なる。

4.2 実 験

4.2.1 木材ヘミセルロースの調製

針葉樹グルコマンナンおよび広葉樹キシランの調製方法は3.2.2.2および3.2.2.3で記述した。

4.2.2 糖類の分析方法

旋光度は水溶液で自動旋光度計(日本分光, DIP-SL)により測定した。酸性糖の分子量(Equivalent weight)は0.1N水酸化ナトリウムによる中和当量から推定した。

ガスクロマトグラフィー(GLC)は、島津製作所製のガスクロマトグラフ(GC-1C)で水素炎検出法により各試料を測定した。カラムは試料に応じて、メチル化糖のメタノリシス生成物用にOV17(3%, Shimalite W, 80-100 mesh), メチル化糖アルジトールアセテート用にECNSS-M(3%, Gas Chrom Q, 100-120 mesh)とPoly-A-101A(5%, Chromosorb W, 80-100 mesh), およびメチル化オリゴ糖アルジトールアセテート用にDexsil GC 300(3%, Gas Chrom Q, 100-120 mesh)とSE 30(3%, Gas Chrom Q, 100-120 mesh)をそれぞれ使用した。

マススペクトルの測定はガスクロマトグラフ(日本電子, JGC-20K)/マススペクトロメーター(日本電子, D-300, イオン化エネルギー: 20eV, イオン化電流: 300 μ A)/マスマデータ解析装置(日本電子, JMA-2000)により行った。メチル化キシロ酸性オリゴ糖およびメチル化マンノオリゴ糖のマススペクトルのフラグメントイオンにA~Jおよびa~eの記号を付した(Kochetokovら, 1966; Kováčikら, 1968)。

中性糖の糖組成分析は、Kesler(1967)の方法に従いテクニコン糖分析計で行った。

オリゴ糖のアルジトールへの還元は、水溶液中に水素化ホウ素ナトリウムを加え室温で4h処理した。反応後、先ずナトリウムイオンをイオン交換樹脂で除去し、次にメタノールを加えて減圧下で蒸発乾固することによりホウ酸をとり除いた。オリゴ糖のメチル化は箱森(1964)の方法にしたがってジメチルスルオキシド中でメチルスルフィニル・カルバニオン-ヨウ化メチルにより行った。酸性オリゴ糖のメタノリシスは2.5%塩酸メタノールの還流冷却下で8h処理することにより行い、中和後、得られた生成物をGC-MSにより分析した。オリゴ糖およびメチル化オリゴ糖アルジトールの加水分解は2Mトリフルオロ酢酸(TFA)により120°Cで1h行った。加水分解生成物は、アルジトールアセテート誘導体としGC-MSにより分析した。

4.2.3 広葉樹キシランの酵素分解生成物から単離された酸性オリゴ糖の同定

分離精製画分1-1: S1はO-(4-O-Me- α -D-GlcpA)-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-D-Xylであった。2M TFAによる加水分解により2-O-(4-O-Me- α -D-GlcpA)-D-XylとXylが生成し、またメチル化後のメタノリシスによりMethyl 2,3-di-O-methyl-D-xylosidesとMethyl 3,4-di-O-methyl-2-O-(methyl 2,3,4-tri-O-methyl- α -D-glucopyranosyluronic acid)-D-xylosidesが生成した。重合度はイオン交換クロマトグラフィにおけるDv値の対数とモノマー単位数の関係から決定した(図65参照)。

分離精製画分1-2: S1はO-(4-O-Me- α -D-GlcpA)-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-D-Xylであった。旋光度: $[\alpha]_D^{25} -1.0^\circ$ [水溶液(C, 1.14)], 中和滴定による分子量: 741 (C₂₇H₄₄O₂₃, 736)。分離精製画分1-1: S1と同様に、2M TFAによる加水分解により2-O-(4-O-Me- α -D-GlcpA)-D-XylとXylが生成し、またメチル化後のメタノリシスによりMethyl 2,3-di-O-methyl-D-xylosidesとMethyl 3,4-di-O-methyl-2-O-(methyl 2,3,4-tri-O-methyl- α -D-glucopyranosyluronic acid)-D-xylosidesが生成した。

分離精製画分1-3: S1はO- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 3)-O- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)-O-(α -D-GalpA)-(1 \rightarrow 4)-D-Xylであった。旋光度: $[\alpha]_D^{25} +1.2^\circ$ [水溶液(C, 1.62)], 中和滴定による分子量: 722 (C₂₇H₄₄O₂₃, 736)。2M TFAによる加水分解により、酸性糖として4-O-(α -D-GalpA)-D-Xylと少量のGalAが得られ、また中性糖として生成モル比2:1のXylとRhaが得られた。アルジトールへの還元後の酸加水分解から酸性部に4-O-(α -D-GalpA)-D-Xylitolを認めた。メチル化後のメタノリシスによりMethyl 2,3,4-tri-O-methyl-D-xylosides, Methyl 2,3-di-O-methyl-D-xylosides, Methyl 2,4-di-O-methyl-4-O-(methyl 3,4-di-O-methyl- α -D-

galactopyranosyluronic acid)-D-xylosides, および少量の Methyl (methyl 3, 4-di-O-methyl-D-galactopyranosid) uronates を生成した。メチル化後の 2 M TFA による加水分解生成物の中性部をアルジトールアセテート誘導体とし GC-MS により分析したが, 1, 5-Di-O-acetyl 2, 3, 4-tri-O-methyl-D-xylitol, 1, 4, 5-Tri-O-acetyl-2, 3-di-O-methyl-D-xylitol, および 1, 3, 5-Tri-O-acetyl-2, 4-di-methyl-L-rhamnitol の存在を認めた。

分離精製画分 2 : S1 は $O-(4-O-Me-\alpha-D-GlcpA)-(1\rightarrow2)-O-\beta-D-Xylp-(1\rightarrow4)-O-\beta-D-Xylp-(1\rightarrow4)-D-Xyl$ であった。旋光度: $[\alpha]_D^{25} + 28.0^\circ$ [水溶液 (C, 1.25)], 中和滴定による分子量: 609 ($C_{22}H_{38}O_{19}$, 604)。2 M TFA による加水分解生成物, およびメチル化後のメタノリシス生成物は 1-1 : S1 と同様であった。

分離精製画分 3-1 : S1 は $O-\beta-D-Xylp-(1\rightarrow4)-O-\beta-D-Xylp-(1\rightarrow3)-O-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow2)-D-GalA$ であった。旋光度: $[\alpha]_D^{25} - 39.3^\circ$ [水溶液 (C, 0.59)], 中和滴定による分子量: 615 ($C_{22}H_{38}O_{19}$, 604)。2 M TFA による加水分解により, 中性糖ではモル比が 2 : 1 の Xyl と Rha および Gal A が生成した。部分加水分解によりキシロビオース, キシロース, ラムノースが生成した。メチル化後のメタノリシスにより Methyl 2, 3, 4-tri-O-methyl-D-xylosides, Methyl 2, 3-di-O-methyl-D-xylosides, Methyl 2, 4-di-O-methyl-L-rhamnosides および Methyl (methyl 3, 4-di-O-methyl-D-galactopyranosid) uronates が生成した。

分離精製画分 3-1 : S2 は $O-\beta-D-Xylp-(1\rightarrow3)-O-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow2)-O-\alpha-D-GalpA-(1\rightarrow4)-D-Xyl$ であった。旋光度: $[\alpha]_D^{25} + 19.1^\circ$ [水溶液 (C, 4.70)], 中和滴定による分子量, 604 ($C_{22}H_{38}O_{19}$, 604)。2 M TFA による加水分解によりモル比 1 : 1 の Xyl と Rha および $4-O-(\alpha-D-GalpA)-D-Xyl$ が生成した。水素化ホウ素ナトリウムによる還元後の加水分解により $4-O-(\alpha-D-GalpA)-D-xylitol$ が生成した。メチル化後のメタノリシスにより, Methyl 2, 3, 4-tri-O-methyl-D-xylosides, Methyl 2, 4-di-O-methyl-L-rhamnosides, Methyl 2,3-di-O-methyl-4-O-(methyl 3, 4-di-O-methyl- α -D-galactopyranosyluronic acid)-D-xylosides および少量の Methyl (methyl 3, 4-di-O-methyl-galactopyranosid)-uronates が生成した。

分離精製画分 4 : S1 は $O-(4-O-Me-\alpha-D-GlcpA)-(1\rightarrow2)-O-\beta-D-Xylp-(1\rightarrow4)-D-Xyl$ であった。旋光度: $[\alpha]_D^{25} + 43.2^\circ$ [水溶液 (C, 0.37)], 中和

滴定による分子量, 483 ($C_{17}H_{28}O_{15}$, 472)。2 M TFA による加水分解生成物, およびメチル化後のメタノリシス生成物は 1-1 : S1 や 1-2 : S2 と同様であった。

分離精製画分 5 : S1 は $O-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow2)-O-(\alpha-D-GalpA)-(1\rightarrow4)-D-Xyl$ であった。旋光度: $[\alpha]_D^{25} + 51.0^\circ$ [水溶液 (C, 0.81)], 中和滴定による分子量, 491 ($C_{17}H_{28}O_{15}$, 472)。部分加水分解により Rha と $4-O-(\alpha-D-GalpA)-D-Xyl$ が生成した。メチル化後のメタノリシスにより, Methyl 2, 3, 4-tri-O-methyl-L-rhamnosides および Methyl 2, 3-di-O-methyl-4-O-(methyl 3, 4-di-O-methyl- α -D-galactopyranosyluronic acid)-D-xylosides を生成した。

分離精製画分 6 : S1 は $O-(4-O-Me-\alpha-GlcA)-(1\rightarrow2)-D-Xyl$ であった。中和滴定による分子量: 343 ($C_{12}H_{20}O_{11}$, 340)。Diaion および Aminex A-27 でのイオン交換クロマトグラフィーにおける Dv 値は標品 (Shimizu ら, 1973) の値と一致した。さらにメチル化糖のマススペクトルにおいて, 標品に一致するフラグメントイオンが見出された。

分離精製画分 7 : S1 は $4-O-(\alpha-D-GalpA)-D-Xyl$ であった。旋光度: $[\alpha]_D^{25} + 92.5^\circ$ [水溶液 (C, 0.54)], 中和滴定による分子量, 330 ($C_{11}H_{18}O_{11}$, 326)。Diaion および Aminex A-27 でのイオン交換クロマトグラフィーにおける Dv 値, およびメチル化糖のマススペクトル (図 67 参照) がそれぞれ標品と一致した。

分離精製画分 8 : S1 は $4-O-Me-GlcA$ であった。旋光度: $[\alpha]_D^{25} + 42.1^\circ$ [水溶液 (C, 2.28)], 中和滴定による分子量, 236 ($C_7H_{12}O_7$, 208)。Diaion および Aminex A-27 でのイオン交換クロマトグラフィーにおける Dv 値, およびメチルエステルメチル化糖のシリル化誘導体のマススペクトルがそれぞれ標品と一致した。

4.2.4 針葉樹グルコマンナンの酵素分解生成物から単離されたオリゴ糖の同定

分離精製画分 2 : E1 は $4-O-\beta-D-Manp-D-Man$ (マンノビオース) であった。2 : E1 は最終精製段階の Aminex A-6 の分配クロマトグラフィーで単一ピークであった。酸加水分解により D-マンノースのみが生成した。アルジトールに還元後のメチル化糖は GLC で単一のピークを示し, その高分解能マススペクトルに m/e 425.2365 ($C_{10}H_{37}O_{10}$, 425.2384 : $M^+ - 45$), 381.2093 ($C_{17}H_{33}O_9$, 381.2123 : $M^+ - 89$) のフラグメントイオンが認められた。アルジトールに還元後のメチル化分析により, 1,2,3,5,6-Penta-O-methyl-D-mannitol および 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-

D-mannoseの存在が認められた。冷メタノールから結晶化後の2:E1の融点は193～194.5℃, 旋光度: $[\alpha]_D^{25} - 5^\circ$ [水溶液(C, 1.5)]であり, 文献値と一致した(Staněkら, 1965)。

分離精製画分2:E2は4-O- β -D-Glc_p-D-Man(エピセロビオース)であった。2:E2はAminex A-6の分配クロマトグラフィーで単一のピークであり, 酸加水分解によりモル比が1:1のD-ManとD-Glcが生成した。また2:E2をアルジトールに還元した後の酸加水分解により生成した還元糖はD-Glcだけであった。アルジトールに還元後のメチル化糖はGLCで単一のピークを示し, その高分解能マススペクトルに m/e 425.2397 (C₁₉H₃₇O₁₀, 425.2384: M⁺-45), 381.2092 (C₁₇H₃₃O₉, 381.2123: M⁺-89)のフラグメントイオンが認められた。アルジトールに還元後のメチル化分析により, 1,2,3,5,6-Penta-O-methyl-D-mannitolと2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucoseの存在が認められた。メタノールから結晶化後の2:E2の融点は170～172℃, 旋光度: $[\alpha]_D^{25} + 1^\circ$ [水溶液(C, 1.2)]であり, いずれも文献値よりわずかに低い類似値であった(Staněkら, 1965)。

分離精製画分2:E3は4-O- β -D-Glc_p-D-Glc(セロビオース)であった。2:E3はAminex A-6の分配クロマトグラフィーで単一のピークであり, 酸加水分解によりD-Glcのみが生成した。分配クロマトグラフィーにおけるDv値は標品と一致した。アルジトールに還元後のメチル化糖の高分解能マススペクトルにおいて, m/e 425.2406 (C₁₉H₃₇O₁₀, 425.2384: M⁺-45), 381.2125 (C₁₇H₃₃O₉, 381.2123: M⁺-89)のフラグメントイオンが認められた。アルジトールに還元後のメチル化分析により, 1,2,3,5,6-Penta-O-methyl-D-glucitolと2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucoseの存在が認められた。

分離精製画分3:E1はO- β -D-Man_p-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-Man_p-(1 \rightarrow 4)-D-Man(マンノトリオース)であった。3:E1のAminex A-6の分配クロマトグラフィーにおけるDv値は標品と一致した。アルジトール還元後のメチル化糖の高分解能マススペクトルにおいて, m/e 629.3373 (C₂₈H₅₃O₁₅, 629.3382: M⁺-45), 585.3096 (C₂₆H₄₉O₁₄, 585.3119: M⁺-89)のフラグメントイオンが認められた。アルジトールに還元後のメチル化分析により, 1,2,3,5,6-Penta-O-methyl-D-mannitol, 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-mannose, および2,3,6-Tri-O-methyl-D-mannoseの存在が認められた。メタノールから結晶化後の3:E1の融点は210～212℃, 旋光度: $[\alpha]_D^{25} - 21^\circ$ [水溶液(C, 3.0)]であり, 文献値と一致した(Staněkら, 1965)。

分離精製画分 3 : E2 は $O-\beta-D-Glcp-(1\rightarrow4)-O-\beta-D-Manp-(1\rightarrow4)-D-Man$ (エピセロピオシルマンノース) であった。3 : E2 は Aminex A-6 の分配クロマトグラフィーで単一のピークであり、酸加水分解により D-Man と D-Glc をモル比 2 : 1 で生成した。またアルジトールに還元後のメチル化糖の高分解能マススペクトルにおいて、 m/e 629.3381 ($C_{28}H_{53}O_{15}$, 629.3382 : $M^+ - 45$), 585.3111 ($C_{26}H_{49}O_{14}$, 585.3119 : $M^+ - 89$) のフラグメントイオンが認められた。アルジトールに還元後のメチル化分析により 1, 2, 3, 5, 6 - Penta-O-methyl-D-mannitol, 2, 3, 4, 6 - Tetra-O-methyl-D-glucose, および 2, 3, 6 - Tri-O-methyl-D-mannose の存在が認められた。メタノールから結晶化後の 3 : E2 の融点は 160 ~ 162 °C, 旋光度 : $[\alpha]_D^{25} - 16^\circ$ [水溶液 (C, 0.5)] であった。

分離精製画分 3 : E3 は $O-\beta-D-Manp-(1\rightarrow4)-O-\beta-D-Glcp-(1\rightarrow4)-D-Man$ であった。3 : E3 は Aminex A-6 の分配クロマトグラフィーで単一のピークであり、酸加水分解により D-Man と D-Glc をモル比 2 : 1 で生成した。またアルジトールに還元後の酸加水分解により還元糖として D-Man と D-Glc がモル比 1 : 1 で生成した。アルジトールに還元後のメチル化糖の高分解能マススペクトルにおいて、 m/e 629.3288 ($C_{28}H_{53}O_{15}$, 629.3382 : $M^+ - 45$), 585.3099 ($C_{26}H_{49}O_{14}$, 585.3119 : $M^+ - 89$) のフラグメントイオンが認められた。アルジトールに還元後のメチル化分析により, 1, 2, 3, 5, 6 - Penta-O-methyl-D-mannitol, 2, 3, 4, 6 - Tetra-O-methyl-D-mannose および 2, 3, 6 - Tri-O-methyl-D-glucose の存在が認められた。

分離精製画分 3 : E4 は $O-\beta-D-Manp-(1\rightarrow4)-O-[\alpha-D-Galp-(1\rightarrow6)]-D-Man$ であった。3 : E4 は Aminex A-6 の分配クロマトグラフィーで単一のピークであり、旋光度 : $[\alpha]_D^{25} - 8^\circ$ [水溶液 (C, 0.15)] であった。酸加水分解により D-Man と D-Gal をモル比 2 : 1 で生成した。アルジトールに還元後のメチル化糖の高分解能マススペクトルにおいて、 m/e 499.2793 ($C_{22}H_{43}O_{12}$, 499.2752 : $M^+ - 175$), 439.2544 ($C_{20}H_{39}O_{10}$, 439.2544 : $M^+ - 203$) のフラグメントイオンが認められた。アルジトールに還元後のメチル化分析により, 1, 2, 3, 5 - Tetra-O-methyl-D-mannitol, 2, 3, 4, 6 - Tetra-O-methyl-D-mannose および 2, 3, 4, 6 - Tetra-O-methyl-D-galactose の存在が認められた。

分離精製画分 4 : E1 は $O-\beta-D-Manp-(1\rightarrow4)-O-\beta-D-Manp-(1\rightarrow4)-O-\beta-D-Manp-(1\rightarrow4)-D-Man$ (マンノテトラオース) であった。4 : E1 は Aminex A-6 の分配クロマトグラフィーで単一のピークであり、旋光度 : $[\alpha]_D^{25} - 32^\circ$

[水溶液 (C, 0.6)] で文献値と一致した (Staněkら, 1965)。酸加水分解により, D-Man のみが生成した。アルジトールに還元後のメチル化糖の高分解能マススペクトルにおいて, m/e 703.3737 ($C_{31}H_{59}O_{17}$, 703.3749 : $M^+ - 175$), 643.3540 ($C_{29}H_{55}O_{15}$, 643.3538 : $M^+ - 251$) のフラグメントイオンが認められた。アルジトールに還元後のメチル化分析により, 1, 2, 3, 5, 6 - Penta-O-methyl-D-mannitol, 2, 3, 4, 6 - Tetra-O-methyl-D-mannose および 2, 3, 6 - Tri-O-methyl-D-mannose の存在が認められた。

分離精製画分 4 : E2 は O- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)-D-Man であった。酸加水分解により D-Man と D-Glc がモル比 3 : 1 で生成した。アルジトールに還元後のメチル化糖の高分解能マススペクトルにおいて, m/e 703.3740 ($C_{31}H_{59}O_{17}$, 703.3749 : $M^+ - 175$), 643.3545 ($C_{29}H_{55}O_{15}$, 643.3538 : $M^+ - 235$) および 627.3245 ($C_{28}H_{51}O_{15}$, 627.3538 : $M^+ - 251$) のフラグメントイオンが認められた。アルジトール還元後のメチル化分析により, 1, 2, 3, 5, 6 - Penta-O-methyl-D-mannitol, 2, 3, 4, 6 - Tetra-O-methyl-D-glucose および 2, 3, 6 - Tri-O-methyl-D-mannose の存在が認められた。

4.3 結果と考察

4.3.1 広葉樹キシランの酵素分解

シラカンバ材から単離した 4-O-メチルグルクロノキシラン (10 g) を用いて, 2% 基質溶液 (500 ml, pH 5.0) を調製し, これに精製キシラナーゼ II-S3-2 (5.4 mg) を加えて 40°C, 24 h インキュベーションを行った。反応後, 酵素分解生成物を限外濾過膜 [ダイアフィルター G-01 T (分画分子量, 1,000), バイオエンジニアリング製品] を用いて酵素と未分解残渣から分離した。酵素分解生成物に N/10 水酸化ナトリウムを滴下し, pH 8.0 に 4 h 保持した後, アニオン交換カラム (Dowex 1 \times 8, OAc-form) に通し, 水による溶出で中性糖 (収量 3.69 g), 続いて 5 M 酢酸による溶出で酸性糖 (収量 1.01 g) を得た。

中性糖はテクニコンの糖分析計で分析した。主な生成物は D-キシロースとキシロビオースでそのモル比は 1.4 : 1.0 であり, またキシロトリオースの存在がわずかに認められた。中性部の分解生成物から, キシラナーゼ II-S3-2 はトリマーに作用しモノマーとダイマーを最終生成物とするタイプのグリカナーゼであると判断された。

酸性糖は Carlsson ら (1970) の方法にしたがい, 二種のアニオン交換カラムクロ

マトグラフィー〔Diaion (23-25 μ) と Aminex A-27 (12-15 μ)〕によって分離を試みた。アニオン交換カラムの溶出液として、各酸性糖の分配係数に応じて (A) 0.08 M 酢酸ナトリウム, (B) 0.02 M 酢酸ナトリウム, (C) 1.0 M 酢酸, (D) 0.5 M 酢酸, (E) 0.25 M 酢酸を使用した。先ず, Diaion のカラムで溶出液 (A) により分画したが (図 61), 酸性部は数多くのピークに分かれたため, 本章では図 61 の 8つの画分

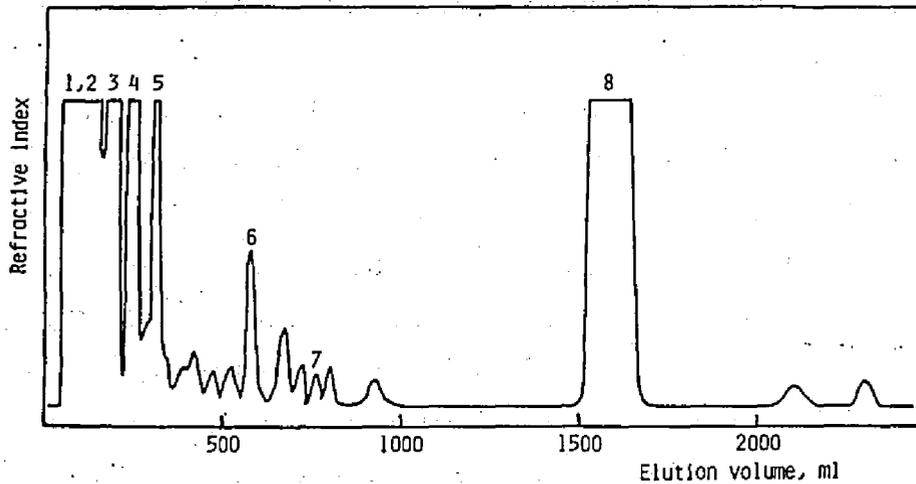


図 61 4-O-メチルグルクロキシランの酵素分解生成物の酸性部のイオン交換クロマトグラフィーによる分離
カラム: Diaion (15×930 mm, acetate form), 溶出液: 0.08 M 酢酸ナトリウム, 流速: 2 ml/min

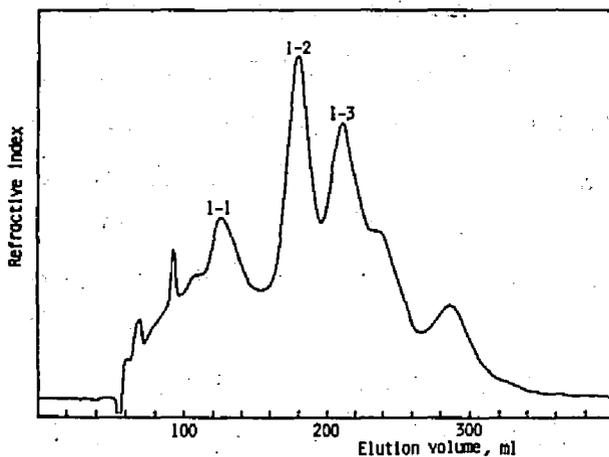


図 62 画分 1 の分離精製
カラム: Diaion (15×930 mm, acetate form),
溶出液: 0.02 M 酢酸ナトリウム, 流速: 2 ml/min

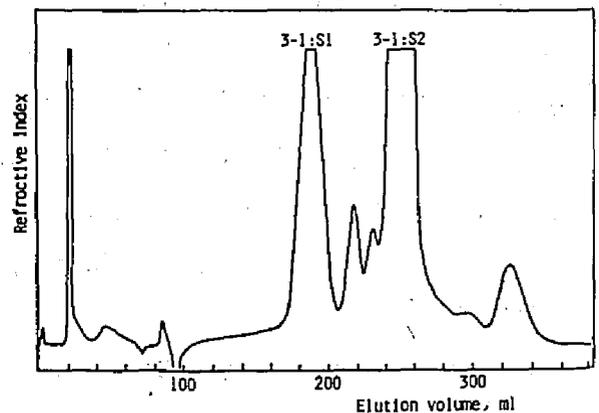


図 63 画分 3-1 の分離精製
カラム: Aminex A-27 (10×900 mm, acetate form), 溶出液: 0.5 M 酢酸, 流速: 1 ml/min

(1-8)を検索の対象とし、微量とみられるその他の画分については省略した。1-8の画分のうち、画分1はDiaionのカラムで溶出液(B)により再分画したが(図62)、3個の主要なピーク(画分1-1, 1-2, 1-3)に分かれた。画分3は画分1と同様にDiaionのカラムで溶出液(B)により再分画したが、1個のピーク(画分3-1)が溶出したただけであった。そこでAminex A-27のカラムで溶出液(D)により画分3-1の分離を試みたところ、2個の主要なピーク(画分3-1:S1, 3-1:S2)に分かれた(図63)。二種のアニオン交換カラムおよび溶出液を選択することにより、最終的に単一の成分として11の酸性部精製画分を単離した。単離した各酸性糖のDiaionおよびAminex A-27のアニオン交換カラムクロマトグラフィーにおけるDv値の対数を図64に、また各酸性糖の収量と構造を表19にまとめた。単離した11の酸性糖のうち、1-1:S1, 1-2:S1, 2:S1, 4:S1, 6:S1は4-O-メチル-D-グルクロン酸とD-キシロースを構成単位とする酸性糖で、分配係数(Dv)の対数と重合度間に良好な直線関係が認められた(図65)。

表19に示した各酸性糖の構造は、アニオン交換クロマトグラフィーにおける標品とのDvの比較、旋光度の測定、中和当量(0.1N水酸化ナトリウムによる中和滴定)からの分子量の推定、部分加水分解後の中性糖、酸性糖の検策、およびメチル化後の

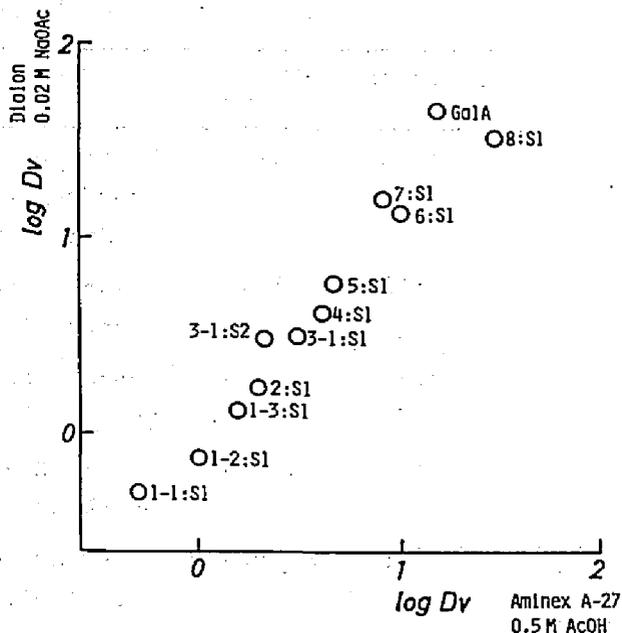


図64 4-O-メチルグルクロンキシランの酵素分解生成物から分離精製された酸性糖画分のアニオン交換クロマトグラフィー(DiaionとAminex A-27)におけるDv値
ガラクトウロン酸(Gal A)は標品を用いた。

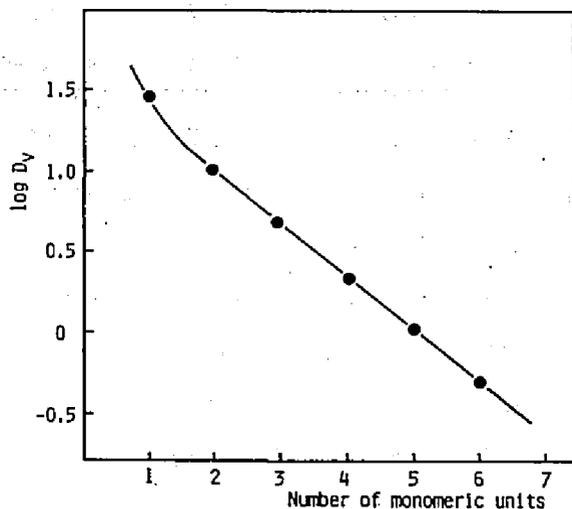


図65 4-O-メチル-D-グルクロン酸とキシロースを構成単位とする酸性糖の重合度とDvの対数の関係
カラム: Diaion(15×930mm, acetate form), 溶出液: 0.02 M酢酸ナトリウム, 流速: 2ml/min

表19 4-O-メチルグルクロノキシラン (10g) の酵素分解生成物の酸性部から分離精製された画分の収量と構造

Fraction	Yield mg	Structure
1-1:S1	21.6	O-(4-O-Me- α -D-GlcpA)-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-D-Xyl
1-2:S1	17.4	O-(4-O-Me- α -D-GlcpA)-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-D-Xyl
1-3:S1	27.5	O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 3)-O- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)-O-(α -D-GalpA)-(1 \rightarrow 4)-D-Xyl
2:S1	161.9	O-(4-O-Me- α -D-GlcpA)-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-D-Xyl
3-1:S1	8.6	O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 3)-O- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)-D-GalA
3-1:S2	20.7	O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 3)-O- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)-O-(α -D-GalpA)-(1 \rightarrow 4)-D-Xyl
4:S1	68.6	O-(4-O-Me- α -D-GlcpA)-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)-D-Xyl
5:S1	17.0	O- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)-O-(α -D-GalpA)-(1 \rightarrow 4)-D-Xyl
6:S1	14.8	O-(4-O-Me- α -D-GlcpA)-(1 \rightarrow 2)-D-Xyl
7:S1	6.7	4-O-(α -D-GalpA)-D-Xyl
8:S1	170.1	4-O-Me-D-GlcA

メタノリシス生成物のGC-MS分析などにより精査した。

アルドテトラオウロン酸 (2:S1) のメチル化後のメタノリシス生成物を試料として得られたガスクロマトグラムを図6.6に示したが, Methyl 2,3-di-O-methyl-D-xylosides および Methyl 3,4-di-O-methyl-2-O-(methyl 2,3,4-tri-O-methyl- α -D-glucopyranosyluronic acid)-D-xylosides の存在が認められた。この結果は4-O-メチル-D-グルクロン酸残基が非還元末端のキシロース残基のC₂の位置に(1 \rightarrow 2)結合していることを示している。

得られた酸性糖のうち, 画分1-3:S1, 3-1:S1, 3-1:S2, 5:S1 および7:S1はガラクトウロン酸を含む酸性キシロオリゴ糖であった。ガラクトウロン酸を含む酸性糖からもメチル化後のメタノリシスによりそれぞれの結合様式を説明するメチルエステル部分メチル化糖および中性の部分メチル化糖の存在が認められた。たとえば画分

1-3 : S1 からは Methyl 2,3,4-tri-O-methyl-(α, β)-D-xylosides, Methyl 2,3-di-O-methyl-(α, β)-D-xylosides, Methyl 2,4-di-O-methyl-(α, β)-L-rhamnosides および Methyl 2,3-di-O-methyl-4-O-(methyl 3,4-di-O-methyl- α -D-galactopyranosyluronic acid)-(α, β)-D-xylosides が確認された。メチル化後の画分

7 : S1 のマススペクトル (図 67) は, α -(1 \rightarrow 4) 結合を持つアルドピオウロン酸のメチルエステルメチル化糖のフラグメンテーションのパターン [m/e 394 (baB₁), 319 (baF₁), 233-201-169 (aA₁-aA₂-aA₃), 101 (F₁), 88 (H₁)] を示している (Kováčik ら, 1968 ; Shimizu, 1975)。ガラクトウロン酸を含む各酸性糖の構造は, メチル化後の酸加水分解

からの中性糖をアルジトールアセテート誘導体とし, GC-MS 分析によりさらに確認した。すなわち, 画分 1-3 : S1, 3-1 : S1, 3-1 : S2, 5 : S1 の構造から考えられる部分メチル化糖のアルジトールアセテート誘導体がそれぞれ認められた。

一例として, 画分 1-3 : S1 についてのガスクロマトグラムを 図 68 に示したが,

1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-xylitol, 1,4,5-Tri-O-acetyl-

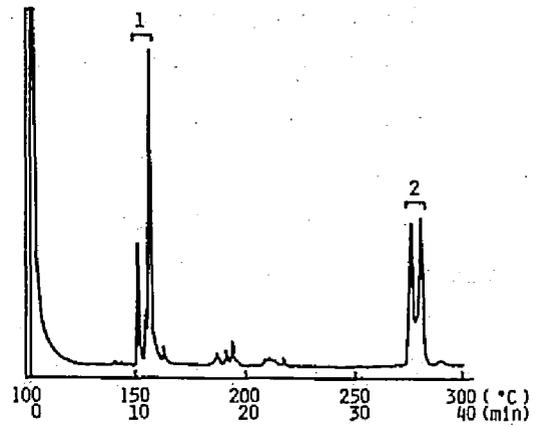


図 66 アルドテトラオウロン酸 (2 : S1) のメチル化後のメタノリシス生成物のガスクロマトグラム
カラム : OV17 (3%, Shimalite W, 80-100 mesh, 0.3 \times 187.5 cm
1. Methyl 2,3-di-O-methyl-(α, β)-D-xylosides
2. Methyl 3,4-di-O-methyl-2-O-(methyl 2,3,4-tri-O-methyl- α -D-glucopyranosyluronic acid)-(α, β)-D-xylosides

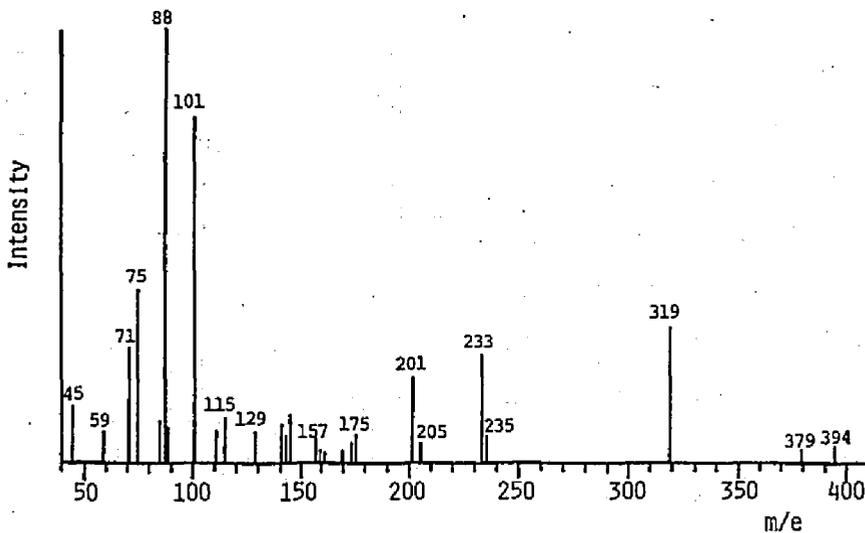


図 67 メチル化した 4-O-(α -D-galactopyranosyluronic acid)-D-xylose (7 : S1) のマススペクトル

2,3-di-O-methyl-D-xylitolおよび1,3,5-Tri-O-acetyl-2,4-di-O-methyl-L-rhamnitolのピークが出現した。また、最後のアルジトールアセテートのマススペクトルを図69に示した(Björndalら, 1970参照)。

アルドテトラオウロン酸(画分2:S1)は収量の上で最も多く得られた酸性糖の一つであるが、これまでに広葉樹キシランの酵素分解によって得られた主要な酸性部の生成物も同じ構造のアルドテトラオウロン酸であった(Timell, 1962; Comtatら, 1974)。また画分2:S1と同系列のアルドuron酸(画分1-1:S1, 1-2:S1, 4:S1)において、4-O-メチルグルロン酸残基はすべて非還元末端のキシロース残基に結合していた。したがって、4-O-メチルグルクロノキシランに対してキシラナーゼII-S3-2はウロン酸側鎖を持つキシロース残基の左側の β -(1 \rightarrow 4)キシロシド結合に強い親和性を持ち、アルドテトラオウロン酸が多く生成したことからウロン側鎖の右側の少なくとも2個までの β -(1 \rightarrow 4)キシロシド結合はキシラナーゼの作用に対して抵抗性を持つものと考えられる。また、4-O-メチル-D-グルクロン酸(画分8:S1)が著量に得られたことからキシラナーゼII-S3-2には α -(1 \rightarrow 2)-グルコニダーゼが含まれていたものとみられる。

4-O-メチル-D-グルクロン酸を含む酸性糖の外に、ガラクトウロン酸残基を持

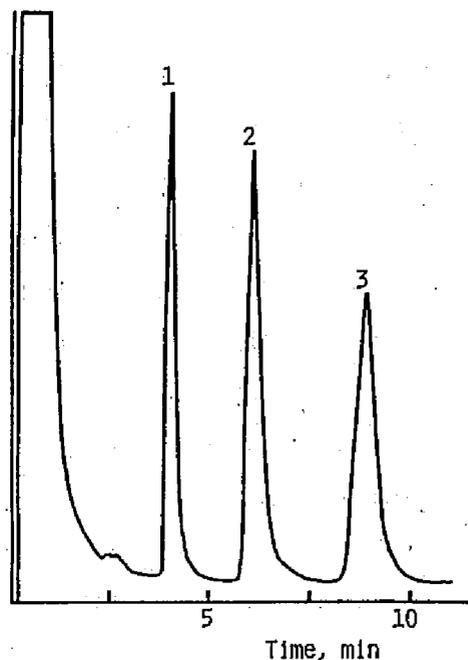


図68 メチル化した1-3:S1の酸加水分解によって得られた中性糖のアルジトールアセテート誘導体のガスクロマトグラム
 カラム: ECNSS-M(3%, Gas Chrom Q, 100-120 mesh, 0.3 \times 200 cm, at 180 $^{\circ}$ C)
 1. 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-xylitol
 2. 1,3,5-Tri-O-acetyl-2,4-di-O-methyl-L-rhamnitol
 3. 1,4,5-tri-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-D-xylitol

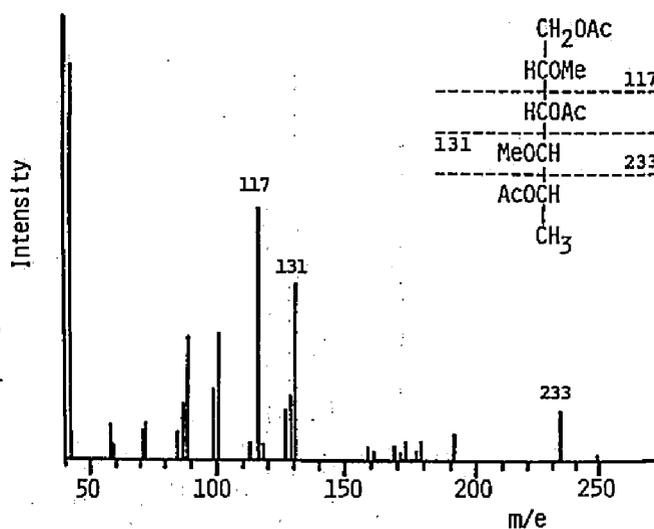


図69 1,3,5-Tri-O-acetyl-2,4-di-O-methyl-L-rhamnitolのマススペクトル

つ5つの画分(1-3:S1, 3-1:S1, 3-1:S2, 5:S1, 7:S1)が単離された。それらの酸性糖が見い出されたことにより、ラムノースおよびガラクトウロン酸が、 β -D-Xylp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 4)-D-Xyl の結合様式でシラカンバヘミセルロースに存在することが確認された。最近の birch や aspen のキシラン末端部の構造研究で、広葉樹キシランの還元末端のキシロースに直接ガラクトウロン酸が α -(1 \rightarrow 4)結合していることが報告されている(Ericssonら, 1977; Johanssonら, 1977 a,b; Samuelson, 1980)。また、還元処理したトウヒ木粉から調製したホロセルロースの酵素分解生成物からキシリトール末端を持つ酸性オリゴ糖が単離され、針葉樹のヘミセルロースにおいても広葉樹と同様に β -D-Xylp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 4)-D-Xyl の末端構造の存在することが報告されている(Anderssonら, 1983)。

4.3.2 針葉樹グルコマンナンの酵素分解

カラマツ材から単離したグルコマンナン(10g)を用いて、2%基質溶液(500ml, pH 4.0)を調製し、これに精製マンナーゼII-3-1(約20mg)を加えて40℃, 48hインキュベーションを行った。反応後、酵素分解生成物を限外濾過〔ホロファイバーH1P5(分画分子量, 5000), アミコン社(USA)]により酵素と未分解残渣から分離した。カチオン交換樹脂により反応緩衝液中のナトリウムイオンをとり除き凍結乾燥したが、酵素分解生成物の収量は6.77gであった。

得られた分解生成物は、先ず水を溶出液としてBio-Gel P-2の分子篩カラムクロマトグラフィーにより分離した。図70に示したように単糖類から9糖類(画分1-9)に

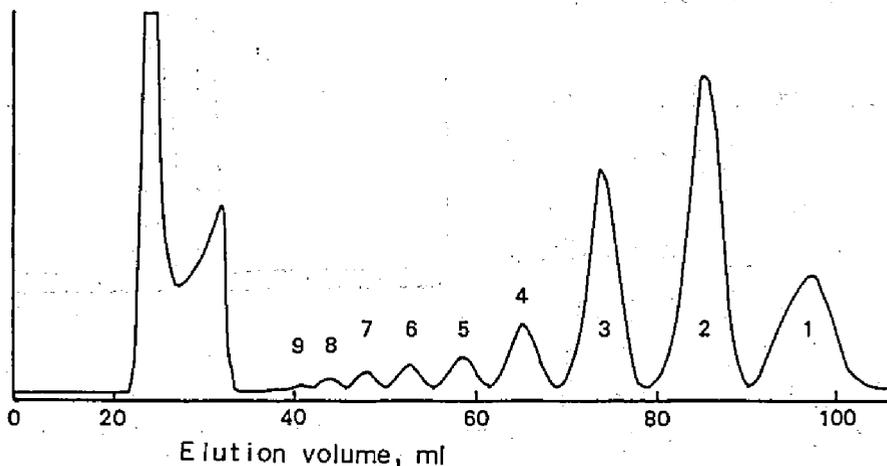


図70 グルコマンナンの酵素分解生成物の分離のための分子篩カラムクロマトグラフィー
カラム: Bio-Gel P-2 (10×1500mm, 65℃), 溶出液: 蒸留水, 流速: 0.2 ml/min

までよく分離し、各画分の分配係数 (Dv) の対数と重合度の方に良好な直線関係が認められた (図 71)。本章では画分 1-4 を分解生成物の検索の対象とし、5 糖類以上の画分については省略した。

分子篩カラムクロマトグラフィーで得られた単糖類から 4 糖類までの各画分をそれぞれ 80% エタノールを溶出液として Aminex A-14 (sulfate form) カラムの分配クロマトグラフィーで分離した。一例として画分 3 のクロマトグラムを図 72 に示したが、3 糖類は主要ピークの 3:E1, 3:E2 および小ピークの 3:E3, 3:E4 の 4 つの成分に分離した。Aminex A-14 のカラムで分離された各フラクションは、さらに Aminex A-6 (lithium form) カラムの分配クロマトグラフィーにより最終的に単一成分にまで精製された。グルコマンナの酵素分解によって得られた 11 の画分の Aminex A-14 および Aminex A-6 の分配クロマトグラフィーにおける Dv 値を図 73 に、また各画分の収量と構造を表 20 に示した。

各オリゴ糖の構造は、旋光度の測定、酸加水分解生成物の検索、アルジトールに還元後の酸加水分解生成物の検索、アルジトールに還元後のメチル化糖の GC-MS 分析、メチル化分析などにより精査した。

アルジトールに還元後、メチル化した 2 糖類および 3 糖類の各画分のマススペクトルのフラグメントイオンは、画分 3:E4 を除いて、(1→4) 結合を有するメチル化オリゴ糖アルジトール類のフラグメンテーション

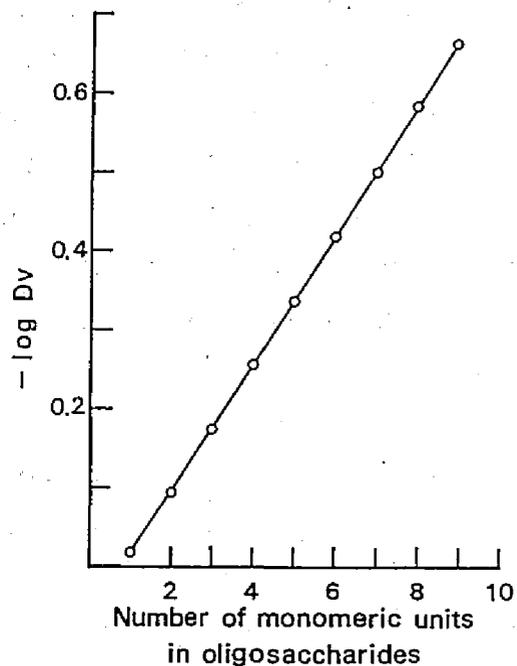


図 71 分子篩カラムクロマトグラフィーにおけるグルコマンナの酵素分解によって得られた単糖類から 9 糖類の Dv の対数と重合度の関係
カラム: Bio-Gel P-2 (10×1500mm, 65°C), 溶出液: 蒸留水, 流速: 0.2 ml/min

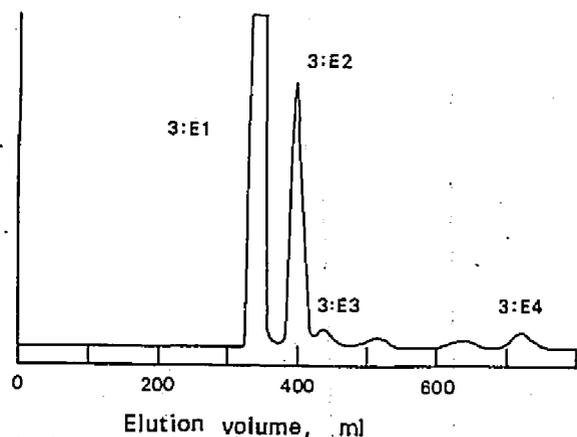


図 72 グルコマンナの酵素分解によって得られた 3 糖類 (画分 3) の分配クロマトグラフィー
カラム: Aminex A-14 (10×700mm, sulfate form, 75°C), 溶出液: 80% エタノール, 流速: 1.0 ml/min

表 20 グルコマンナン (10 g) の酵素分解生成物から分離精製された画分の収量と構造

Fraction	Yield mg	Structure
1:E1	454	D-Mannose
1:E2	393	D-Glucose
2:E1	1,334	4-O-β-D-Manp-D-Man
2:E2	345	4-O-β-D-Glcp-D-Man
2:E3	14	4-O-β-D-Glcp-D-Glc
3:E1	447	O-β-D-Manp-(1→4)-O-β-D-Manp-(1→4)-D-Man
3:E2	443	O-β-D-Glcp-(1→4)-O-β-D-Manp-(1→4)-D-Man
3:E3	74	O-β-D-Manp-(1→4)-O-β-D-Glcp-(1→4)-D-Man
3:E4	20	O-β-D-Manp-(1→4)-O-[α-D-Galp-(1→6)]-D-Man
4:E1	54	O-β-D-Manp-(1→4)-O-β-D-Manp-(1→4)-O-β-D-Manp-(1→4)-D-Man
4:E2	135	O-β-D-Glcp-(1→4)-O-β-D-Manp-(1→4)-O-β-D-Manp-(1→4)-D-Man

のパターン (Kärkkäinen , 1970 ; 1971 ; Lönnngren ら , 1974) をもとに容易に帰属することができた (図 74 参照) 。 すなわち , 2 糖類の画分では , m/e 425 ($M^+ - 45$) , 381 ($M^+ - 89$) , 295 (abJ_1) , 235 (bA_1) , 219 - 187 - 155 ($aA_1 - aA_2 - aA_3$) , 171 (bA_3) , 133 , 115 , 101 (F_1) , 88 (H_1) , 75 (J_1) , 71 , 45 の各フラグメントイオンが存在した。また直鎖状の 3 糖類の画分では , m/e 629 ($M^+ - 45$) , 585 ($M^+ - 89$) , 499 ($abcJ_1$) , 439 - 407 - 375 ($bcA_1 - bcA_2 - bcA_3$) , 295 (bcJ_1) , 235 (cA_1) , 171 (cA_3) , 219 - 187 - 155 ($aA_1 - aA_2 - aA_3$) , 133 , 115 , 101 (F_1) , 88 (H_1) , 75 (J_1) , 71 , 45 の

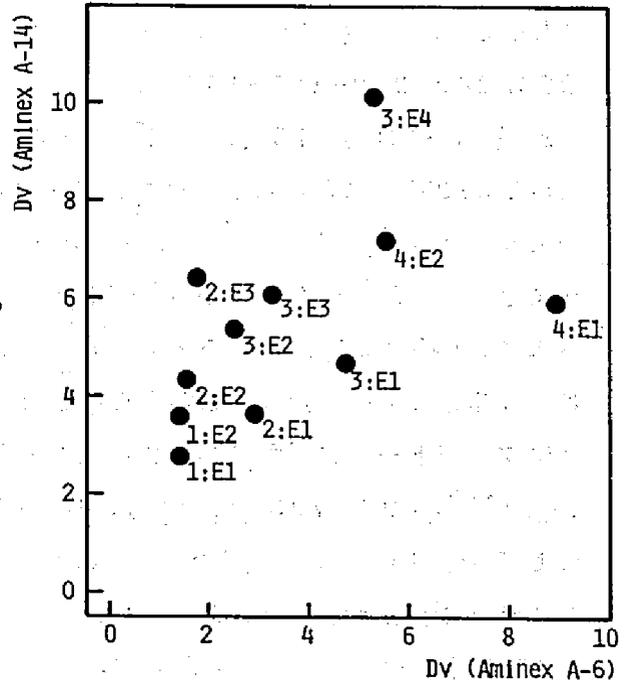


図 73 グルコマンナンの酵素分解生成物から分離精製された画分のイオン交換クロマトグラフィー (AminexA-14 と AminexA-6) における Dv 値

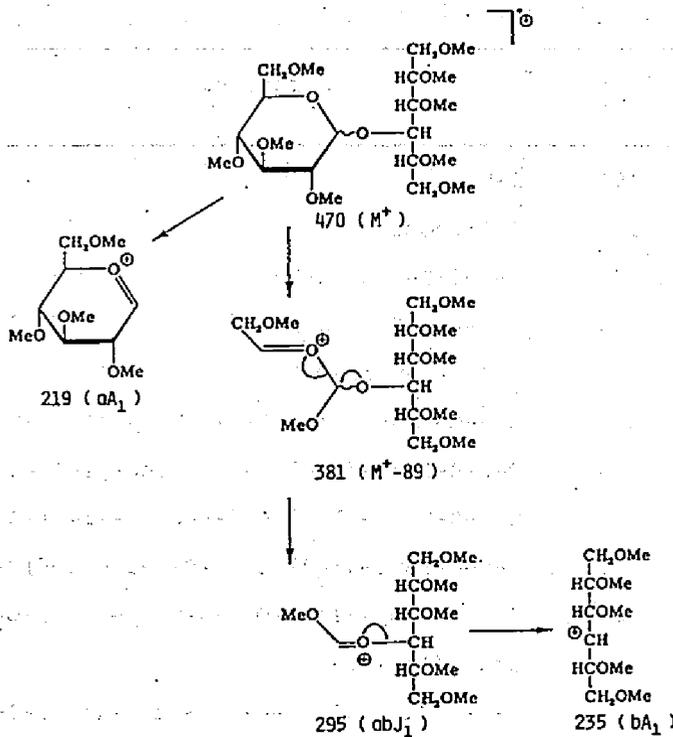


図74 メチル化した二糖類アルジトールのフラグメンテーションのパターン(Lönngrenら, 1974)。

各フラグメントイオンが認められた。D-ガラクトピラノース残基の側鎖を持つ画分3 : E4 では、マススペクトルに m/e 499 ($aebJ_1$ と $eabJ_1$), 439 (baA_1 と beA_1), 335, 249, 219-187-155 ($aA_1 - aA_2 - aA_3$ と $eA_1 - eA_2 - eA_3$), 111, 101 (F_1), 88 (H_1), 75 (J_1), 71, 45 の各フラグメントイオンが見出された。 m/e 45 と 219 の間における主要なフラグメントイオンは直鎖状の3糖類のものと同一であったが、 m/e 499 と 439 のフラグメントイオンにより直鎖状の3糖類と区別することができ、また M^+-45 および M^+-89 のフラグメントイオンは事実上認められなかった。さらに、 m/e 295 と 235 のフラグメントイオンが認められなかったことから、3 : E4 は還元末端に分岐を持つことが明らかとなった。4糖類のフラクシオンのマススペクトルはアルジトールに還元後のメチル化糖を直接導入することによって得られ、 m/e 789 (M^+-89), 703 ($abcdJ_1$), 643 ($bcdA_1$), 627 ($cabA_1$), 499 ($bcdJ_1$), および m/e 45 と 499 の間では直鎖状の3糖類の画分から得られたのと同じフラグメントイオンの存在が認められた。

非還元末端のマノース残基とグルコース残基の区別は、219 (aA_1), 187 (aA_2) 155 (aA_3) のフラグメントイオンの強度比率で行った (Lindhら, 1981)。マノース残基が非還元末端に存在するとき、その強度比率は 1 : 1.0 ~ 0.8 : 0.4 ~

0.2であったのに対し、グルコース残基が非還元末端に存在するときは、1 : 6.5 ~ 4.0 : 0.4 ~ 0.2であった。4糖類のマススペクトルでは、非還元末端がマンノース残基の場合でも、またグルコース残基の場合でも m/e 155 (aA_3) のフラグメントイオンの強度が相対的に増加した。還元末端の糖残基は、酸加水分解生成物の検索、およびアルジトールに還元後の加水分解生成物の検索により同定したが、さらにGC-CI-MS分析により分岐ではないマンノース、グルコース還元末端残基を意味する4-O-アセチル-1,2,3,5,6-ペンターO-メチル-D-マンニトールおよびグルシトールをそれぞれ確認した。これらの化合物のCI-マススペクトルでは、295 ($M^+ - 1$), 263 ($M^+ - 32$), 235 ($M^+ + 1 - 32$), 235 ($M^+ + 1 - 60$) のフラグメントイオンが存在したが、その強度比率はマンニトール誘導体で1.0 : 0.5 ~ 0.6 : 0.4 ~ 0.5であったのに対しグルシトール誘導体では0.7 ~ 0.9 : 0.3 ~ 0.4 : 1.0であった。

グルコマンナンの酵素分解により得られた主要なオリゴ糖は、マンノビオース (2 : E1), エピセロビオース (2 : E2), マンノトリオース (3 : E1), エピセロピオシルマンノース (3 : E2) でその生成モル比は4 : 1 : 1 : 1であった。その他の分離されたオリゴ糖の収量は低く、いずれも (1 → 4) 結合の β -D-マンノースと β -D-グルコース単位の単独または両者からなるものであったが、唯一の例外として α -ガラクトース残基が C₆ の位置に結合した画分 (3 : E4) が得られた。分配クロマトグラフィにおいては、一般にオリゴ糖の分子量サイズにしたがって小さいものから順に溶出してくるが (Havlicekら, 1972) 同系列のオリゴ糖間で、すなわちD-マンノオリゴ糖および非還元末端に1個のD-グルコース残基を持つD-マンノオリゴ糖の間で、分配クロマトグラフィにおける D_v 値の対数と重合度間に良好な直線関係がそれぞれ認められた (図75)。

アニオン交換樹脂 (Aminex A-14) での分配クロマトグラフィでは前者の系列のオリゴ糖が後者の系列のオリゴ糖よりも先に溶出され、カチオン交換樹脂 (Aminex A-6) での分配クロマトグラフィでは

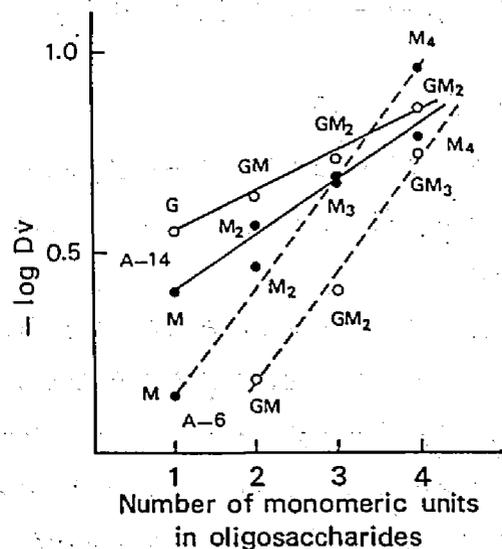


図75 グルコマンナンの酵素分解生成物から分離精製された画分の分配クロマトグラフィにおける D_v の対数と重合度の関係
Aminex A-14: ———, Aminex A-6: - - - -

逆の関係になった。

ガラクトグルコマンナンのガラクトース残基の結合様式に関して、Norwegian spruce 材ガラクトグルコマンナンの酸による部分加水分解生成物から $6-O-\alpha-D-Galp-D-Man$ と $O-\alpha-D-Galp-(1\rightarrow6)-O-\beta-D-Manp-(1\rightarrow4)-D-Man$ が単離されたことから、 $\alpha-D$ -ガラクトースが D -マンノース残基の C_6 の位置に結合していることが明らかとなった (Meier, 1960)。また、Amabilis fir 材ガラクトグルコマンナン B (グルコマンナン) の酸による部分加水分解生成物から、非還元末端に $(1\rightarrow6)$ 結合した $\alpha-D$ -ガラクトース残基を含むマンノオリゴ糖の 4 糖類、5 糖類が単離されている (Schwarz ら, 1963)。しかし、グルコマンナンの酵素分解生成物として、これまでのところ使用された酵素が未精製のため D -ガラクトース残基を含むオリゴ糖は得られていない (Perila ら, 1961; Bouveng ら, 1963)。画分 3 : E4 は、酵素分解によって得られた D -ガラクトース残基を有する最初のオリゴ糖であり、酸による部分加水分解からのオリゴ糖の構造と異なり、 $\alpha-D$ -ガラクトース残基は還元末端の D -マンノース残基に結合していた。

単離された単糖類、オリゴ糖類の収量と構造からマンナーゼ II-3-1 は典型的なエンド型の酵素であると判断されるが、非還元末端に 1 個の D -グルコース残基をもつマンノオリゴ糖 (2 : E2, 3 : E2, 4 : E2) がかなり多く単離されたことから、グルコマンナン中の $\beta-D-Glcp-(1\rightarrow4)-\beta-D-Manp$ に対してよりも、 $\beta-D-Manp-(1\rightarrow4)-\beta-D-Glcp$ に対してより高い親和性を持つと考えられる。

4.4 要 約

第 3 章で述べたキシラーゼ II-S3-2, マンナーゼ II-3-1 を使用して、広葉樹キシラン、針葉樹グルコマンナンをそれぞれ酵素分解し、得られた分解生成物の検索を行った。

広葉樹キシランから得られた加水分解物の中性部は主として、キシロースとキシロビオースでそのモル比は 1.4 : 1.0 であった。酸性部は 2 系列の酸性糖が得られ、第 1 の系列は 4-O-メチル-D-グルクロン酸と D -キシロースが構成単位でアルドヘキサウロン酸までを含む 6 種のアルドウロン酸であり、量的には 4-O-メチル-D-グルクロン酸とアルドテトラウロン酸が酸性部の大部分を占めた。第 2 の系列は、 L -ラムノース、 D -ガラクトウロン酸および D -キシロースが構成単位の 5 種の酸性糖で、それらの構造から広葉樹ヘミセルロース中にラムノースとガラクトウロン酸が $\beta-D-Xylp-(1\rightarrow3)-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow2)-\alpha-D-GalpA-(1\rightarrow4)-D-Xyl$ の結合様

式で存在することを明らかにした。

針葉樹グルコマンナンからの酵素分解生成物は分子篩 (Bio - Gel P-2) カラムクロマトグラフィーおよびイオン交換樹脂 (Aminex A-14 と Aminex A-6) を用いた分配クロマトグラフィーによって分別し、D-マンノースとD-グルコースの単糖類および9種のオリゴ糖類を同定した。主要なオリゴ糖はマンノビオース、エピセロビオース、マンノトリオース、エピセロビオシルマンノースで、その生成モル比は4 : 1 : 1 : 1であった。また量的にはわずかであるが、還元末端のD-マンノース残基に結合したD-ガラクトース残基を有する3糖類の画分が得られた。非還元末端にD-グルコース残基を持つマンノオリゴ糖が多く単離されたことから、マンナーゼII-3-1は β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Manp に対してよりも β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp に対してより高い親和性を持つと考えられる。

結 言

褐色腐朽菌は本質的にリグニン分解力を持たないにもかかわらず、リグニンに包埋された木材細胞壁中のセルロース、ヘミセルロースを選択的に分解する。そこでリグノセルロース資源を食飼料、化学工業原料、エタノール等へ変換するための糖化工程で、褐色腐朽菌オオウズラタケの産生する多糖類加水分解酵素の適用の可能性を検討した。

腐朽材中の多糖類成分の分析から、オオウズラタケはセルロースよりもヘミセルロース、とくにマンナンを選択的に分解し、また腐朽の初期段階（重量減：0～20%）で著しくセルロースの重合度を低下させ、初期段階以降（重量減：20%以上）でセルロースの結晶化度も低下させる能力を持つことが認められた。

オオウズラタケによる多糖類加水分解酵素の効率的な産生条件を検討したが、液体培養法では培地のpHを少なくとも2.0以上に制御することが必要であった。ヘミセルラーゼに関しては、木材から単離したキシランやグルコマンナンおよびホロセルロース中のヘミセルロースを糖化するのに十分な活性単位が産生された。 β -グルコシダーゼは、培養方式、培養条件に関係なくほぼ一定のレベルで産生された。オオウズラタケから C_1 -セルラーゼは、自然界での腐朽条件に近いと考えられる固型培養法によっても、液体培養法と同様に産生されなかった。褐色腐朽菌による *in vivo* でのセルロースの重合度低下や結晶セルロースの分解の究明には、菌体外の H_2O_2/Fe^{2+} 系またはOHラジカルによる酸化作用など C_1 -セルラーゼに代わる非酵素的因子の役割を明らかにしていく必要があると考えられる。

オオウズラタケの菌体外酵素系から C_x -セルラーゼ、マンナーゼ、キシナーゼ、 β -キシロシダーゼを分子篩、イオン交換、アフィニティカラムクロマトグラフィーなどによりそれぞれ分離精製した。精製酵素の酵素的性質は、いずれも酸性側の低いpHで活性が高く、安定であり、また至適温度はかなり高温で熱に対して高い安定性を示し、褐色腐朽菌からの多糖類加水分解酵素についてこれまで報告された結果と同様の傾向を示した。多糖類加水分解酵素の分子量について、微生物起原の場合グリコナーゼはグリコシダーゼよりも小さい分子量を持つとされているが、オオウズラタケにおいても同様な関係にあることが確認された。

広葉樹材、針葉樹材の主要なヘミセルロースである4-O-メチルグルクロノキシランとグルコマンナンをオオウズラタケ菌体外酵素系から分離精製したキシナーゼII-S3-

2 , マンナーゼ II-3-1 でそれぞれ酵素分解し, 得られた分解生成物を検索した。広葉樹キシランから, 中性部としてキシロースとキシロビオース (モル比 1.4 : 1.0) が, また酸性部として 2 系列の酸性糖が得られた。第 1 の系列は 4-O-メチル-D-グルクロン酸と D-キシロースが構成単位のアルドウロン酸で, 収量的には 4-O-メチル-D-グルクロン酸とアルドテトラオウロン酸が多く得られた。広葉樹キシランを効率的に酵素糖化するためにはウロン酸側鎖を遊離する酵素 (α -グルクロニダーゼ) の共存が不可欠であると考えられる。第 2 の系列は D-ガラクトウロン酸を含む酸性糖で, それらの構造から D-ガラクトウロン酸が広葉樹ヘミセルロースの構成酸性糖であることが明らかとなった。針葉樹グルコマンナンからは, 分解生成物として D-マンノースと D-グルコースおよびオリゴ糖類を分離同定した。主要なオリゴ糖はマンノビオース, エピセロビオース, マンノトリオース, エピセロビオシルマンノースでその生成モル比は 4 : 1 : 1 : 1 であった。非還元末端に D-グルコース残基を持つマンノオリゴ糖が多く単離されたことから, マンナーゼ II-3-1 は β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Manp に対してよりも β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp に対してより高い親和性を持つと考えられる。

謝 辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたって、京都大学木材研究所教授 越島哲夫博士には研究全般にわたって終始変らぬ激励と懇切なご指導を賜った。また京都大学木材研究所教授 樋口隆昌博士ならびに京都大学木材研究所教授 西本孝一博士には本論文の作成にあたり多くのご教示とご指導を賜った。

本論文は農林水産省林業試験場林産化学部に在籍してから現在に至るまでの研究成果をとりまとめたものであるが、林産化学部長 石原達夫博士ならびに林産化学部微生物化学研究室長 志水一允博士には微生物・酵素取扱いの手ほどきを受けて以来、多くのご教示とご指導を賜わり、本論文のとりまとめに際して多大な援助と便宜を与えられた。また科学技術庁在外研究員としてオーストラリアでの留学中の恩師、James Cook University 教授 Geoffrey N. Richards 博士（現在 Director of Wood Chemistry, University of Montana）には本研究実施上有益かつ的確なご助言と激励を賜った。さらに林業試験場林産化学部、木材利用部、木材部、保護部の関係各位には本研究の実施に際して多くの援助と便宜を与えられた。

以上の方々に対して、ここに謹んで深甚な謝意を表する。

引用文献

- Ahlgren, E., Eriksson, K-E., and Vesterberg, O.: Characterization of cellulases and related enzymes by isoelectric focusing, gel filtration and zone electrophoresis. I. Studies on *Aspergillus* enzymes, *Acta Chem Scand*, 21, 937-944 (1967a)
- , and Eriksson, K-E.: Characterization of cellulases and related enzymes by isoelectric focusing, gel filtration and zone electrophoresis. II. Studies on *Stereum sanguinolentum*, *Fomes annosus* and *Chrysosporium lignorum*, *Acta Chem Scand*, 21, 1193-1200 (1967b)
- Andersson, S-I., Samuelson, O., Ishihara, M., and Shimizu, K.: Structure of the reducing end-groups in spruce xylan, *Carbohydr Res*, 111, 283-288 (1983)
- 青島清雄: オホウヅラタケについて, *木材工業*, 17, 579 (1962)
- Aspinall, G.O., Hirst, E.L., and Mahomed, R.S.: Hemicellulose A of beechwood (*Fagus sylvatica*), *J Chem Soc*, 1734-1738 (1954)
- , Begbie, J.E., and McKay, J.E.: The hemicelluloses of european larch (*Larix decidua*). Part II. The glucomannan component, *J Chem Soc*, 214-219 (1962)
- Bailey, P.J., Liese, W., Roesch, R., Keilich, G., and Afting, E.G.: Cellulase (β -1,4-Glucan 4-glucanohydrolase) from the wood degrading fungus *Polyporus schweinitzii* Fr., *Biochim Biophys Acta*, 185, 381-391 (1969)
- Beelik, A., Conca, R.J., Hamilton, J.K., and Partlow, E.V.: Selective extraction of hemicelluloses from softwoods, *Tappi*, 50, 78-81 (1967)
- Bernhardt, W., Menrad, H., and König, A.: Ethanol aus Biomasse

- als zukünftiger Kraftstoff für Automobile, *Stärke*, **31**, 254-259 (1979)
- Bernier, R.JR., Driguez, H., and Desrochers, M.: Molecular cloning of a *Bacillus subtilis* xylanase gene in *Escherichia coli*, *Gene*, **26**, 59-65 (1983)
- Björndal, H., Hellerqvist, C.G., Lindberg, B., and Svensson, S.: Gas-liquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides, *Angew Chem Internat Edit*, **9**, 610-619 (1970)
- Boutelje, J., Eriksson, K-E., and Hollmark, B.H.: Specific enzymic hydrolysis of the xylan in a spruce holocellulose, *Svensk Papperstidn*, **74**, 32-37 (1971)
- Bouveng, H.O., Iwasaki, T., Lindberg, B., and Meiyer, H.: Studies on glucomannan from norwegian spruce. 4. Enzymatic hydrolysis, *Acta Chem Scand*, **17**, 1796-1797 (1963)
- Browning, B.L.: *Methods of wood chemistry*, John Wiley and Sons Inc., New York, 1967, p. 395
- Burchhard, W.: Über die Gestalt von Amylose- und Cellulose-tricarbanilat in verschiedenen Lösungsmitteln, *Z Phys Chem*, **42**, 293-313 (1964)
- Carlsson, B., Johnson, S., and Samuelson, O.: Uronic acids from scandinavian spruce, *Stärke*, **73**, 168-174 (1970)
- Comtat, J., Joseleau, J-P., Bosso, C., and Barnoud, F.: Characterization of structurally similar neutral and acidic tetrasaccharides obtained from the enzymatic hydrolyzate of a 4-O-methyl-D-glucurono-D-xylan, *Carbohydr Res*, **38**, 217-224 (1974)
- Cooney, C.L., Wang, D.I.C., Wang, S-D., Gordon, J., and Jiminez, M.: Simultaneous cellulose hydrolysis and ethanol production by a cellulolytic anaerobic bacterium, *Biotechnol Bioeng*

- Symp, 8, 103-114 (1978)
- Cowling, E.B., and Brown, W.: Structural features of cellulosic materials in relation to enzymatic hydrolysis, *Adv Chem Ser*, 95, 152-186 (1969)
- Crosthwaite, C., Ishihara, M., and Richards, G.N.: Acid-ageing of lignocellulosics to improve ruminant digestibility — application to bagasse, wheat and rice straw and oat hulls, *J Sci Food Agric*, 35, 1041-1050 (1984)
- Dekker, R.F.H., and Richards, G.N.: Hemicellulases — their occurrences, purification, properties, and mode of action, *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 33, 277-352 (1975)
- , and Wallis A.F.A.: Enzyme saccharification of sugar-cane bagasse pretreated by autohydrolysis-steam explosion, *Biotechnol Bioeng*, 25, 3027-3048 (1983)
- DeStevens, G., DeBaum, R.M., and Nord, F.F.: On the mechanism of enzyme action. XLV. The role of certain dicarboxylic acids in the formation of oxalic acid by wood-destroying molds, *Arch Biochem Biophys*, 33, 304-313 (1951)
- Dey, P.M.: Biochemistry of plant galactomannans, *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 35, 361-375 (1978)
- Dixon, M., and Webb, E.C.: *Enzymes*, 3rd Ed., Longman Group Ltd., London, 1979, p. 332
- 土居修一, 斉藤光雄: 木造住宅のナミダタケ被害調査 — 旭川市における事例を中心として, *木材工業*, 36, 486-489 (1981)
- 愛水重典: 枯草菌のヘミセルラーゼに関する研究, 大阪市立大学理学部学位論文, 1972. P.76
- Ericsson, T. and Samuelson, O.: Treatment of birch xylan with chlorine in aqueous solution, *Acta Chem Scand*, 29, 309-314 (1975)

- , Petersson, G., and Samuelson, O.: Galacturonic acid groups in birch xylan, *Wood Sci Technol*, 11, 219-223 (1977)
- Eriksson, K-E., and Pettersson, B.: Extracellular enzyme system utilized by the rot fungus *Stereum sanguinolentum* for the breakdown of cellulose. II. Purification of the cellulase, *Arch Biochem Biophys*, 124, 142-148 (1968)
- , and Pettersson, B.: Purification and characterization of xylanase from the rot fungus *Stereum sanguinolentum*, *B Int Biodetn Bull*, 7, 115-119 (1971)
- , and Pettersson, B.: Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Chrysosporium lignorum* for the breakdown of cellulose, *Biodeterioration of materials*, Vol. 2, Appl Sci Publ Ltd, London, 1972, p. 116-120
- , and Johnsrud, S.C.: Mutants of the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum* with increased cellulase and β -D-glucosidase production, *Enzyme Microb Technol*, 5, 425-429 (1983)
- 布施五郎：木材腐朽と微小菌類，化学と生物，20，778-788 (1982)
- Garg, S.K. and Neelakantan, S.: Bioconversion of sugar cane bagasse for cellulase enzyme and microbial protein production, *J Food Technol*, 17, 271-279 (1982)
- Hakomori, S-I.: A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide, *J Biochem*, 55, 205-208 (1964)
- Halliwell, G.: Catalytic decomposition of cellulose under biological conditions, *Biochem J*, 95, 35-40 (1965)
- 原口隆英：腐朽，木材工業，30，495-499 (1975)
- Havlicek, J., and Samuelson, O.: Chromatography of oligosaccharides from xylan by various techniques, *Carbohydr Res*, 22, 307-

- 316 (1972)
- Herr, D., Baumer, F., and Dellweg, H.: Purification and properties of an extracellular endo-1,4- β -glucanase from *Lenzites trabea*, Arch Microbiol, 117, 287-292 (1978a)
- , Baumer, F., and Dellweg, H.: Purification and properties of an extracellular β -glucosidase from *Lenzites trabea*, European J Appl Microbial Biotechnol, 5, 29-36 (1978b)
- Highley, T.L.: Influence of carbon source on cellulase activity of white-rot and brown-rot, Wood and Fiber, 5, 50-58 (1973)
- : Hemicellulases of white- and brown-rot fungi in relation to host preferences, Mater Org, 11, 33-46 (1976)
- : Requirements for cellulose degradation by a brown-rot fungus, Mater Org, 12, 25-36 (1977a)
- : Degradation of cellulose by culture filtrates of *Poria placenta*, Mater Org, 12, 161-174 (1977b)
- : Deradation of cellulose by *Poria placenta* in the presence of compounds that affect hydrogen peroxide, Mater Org, 15, 82-90 (1980)
- : Catalase-aminotriazole assay, an invalid method for measurement of hydrogen peroxide production by wood decay fungi, Appl Environ Microbiol, 42, 925-927 (1981a)
- , Wolter, K.E., and Evans, F.J.: Polysaccharide-degrading complex produced in wood and in liquid media by the brown-rot fungus *Poria placenta*, Wood and Fiber, 13, 265-274 (1981b)
- : Is extracellular hydrogen peroxide involved in cellulose degradation by brown-rot fungi?, Mater Org, 17, 205-214 (1982a)
- , and Wolter, K.E.: Properties of a carbohydrate-degrading enzyme complex from the brown-rot fungus *Poria placenta*, Mater Org, 17, 127-134 (1982b)

- , Palmer, J.G. and Murmanis, L.: Decomposition of cellulose by *Poria placenta* — light and electron microscopy study, *Holzforschung*, 37, 179-184 (1983a)
- , Murmanis, L., and Palmer, J.G.: Electron microscopy of cellulose decomposition by brown-rot fungi, *Holzforschung*, 37, 271-277 (1983b)
- Huff, G.F.: Ethanol from biomass, *Altern Energy Sources — Part A*, 331-353 (1981)
- Hulme, M.A., and Stranks, D.W.: Influence of carbohydrate accessibility on cellulase production by *Lenzites trabea* and *Polyporus versicolor*, *Aust J Biol Sci*, 27, 457-464 (1974)
- Ishihara, M., Shimizu, K., and Ishihara, T.: Purification and properties of intracellular xylanases from the mycelium of a brown rotting fungus, *Tyromyces palustris*, *Mokuzai Gakkaishi*, 21, 680-685 (1975)
- , Shimizu, K., and Ishihara, T.: Hemicellulases of brown rotting fungus, *Tyromyces palustris*. III. Partial purification and mode of action of an extracellular xylanase, *Mokuzai Gakkaishi*, 24, 108-115 (1978)
- , and Shimizu, K.: Hemicellulases of the brown rotting fungus, *Tyromyces palustris*. IV. Purification and some properties of an extracellular mannanase, *Mokuzai Gakkaishi*, 26, 811-818 (1980)
- , and Shimizu, K.: Hemicellulases of the brown rotting fungus, *Tyromyces palustris*. V. Purification and some properties of an extracellular β -D-xylosidase and β -D-glucosidase complex, *Mokuzai Gakkaishi*, 29, 315-323 (1983)
- , and Shimizu, K.: Purification and properties of two extracellular endo-cellulases from the brown rotting fungus,

- Tyromyces palustris*, Mokuzaï Gakkaishi, 30, 79-87 (1984a)
- 石原光朗, 志水一允: オオウズラタケによる褐色朽の化学的特性, 林試研報, 330, 141-152 (1984b)
- , 志水一允: 褐色腐朽菌オオウズラタケのセルラーゼ, ヘミセルラーゼの生産のための培養条件, 林試研報, 330, 153-164 (1984c)
- Ishihara, T., and Ishihara, M.: Enzymatic hydrolysis of woods. IV. The effect of pretreatment with aqueous ammonia, Mokuzaï Gakkaishi, 25, 804-807 (1979a)
- 石原達夫: 残廃材からの微生物蛋白の生産, 木材工業, 34, 192-197 (1979b)
- Jayme, V.G., and Knolle, H.: Beitrag zur empirischen röntgenographischen Bestimmung des Kristallinitätsgrades cellulosehaltiger Stoffe, Das Papier, 18, 249-255 (1964)
- Johansson, M.H., and Samuelson, O.: Reducing end groups in birch xylan and their degradation, Wood Sci Technol, 11, 251-263, (1977a)
- , and Samuelson, O.: Alkaline destruction of birch xylan in the light of recent investigations of its structure, Svensk Papperstidn., 80, 519-524 (1977b)
- 上久保正, 松野隆一: セルラーゼによるセルロース性物質の加水分解, 化学工学, 47, 291-296 (1983)
- Kanda, T., Wakabayashi, K., and Nisizawa, K.: Xylanase activity of an endo-cellulase of carboxymethyl-cellulase type from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*), J Biochem, 79, 989-995 (1976a)
- , Wakabayashi, K., and Nisizawa, K.: Synergistic action of two different types of endo cellulases components from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*) in the hydrolysis of some insoluble celluloses, J Biochem, 79, 997-1006 (1976b)

Kärkkäinen, J.: Analysis of disaccharides as permethylated disaccharides alditols by gas-liquid chromatography-mass spectrometry, *Carbohyd Res*, 14, 27-33 (1970)

—: Structural analysis of trisaccharides as permethylated trisaccharide alditols by gas-liquid chromatography-mass spectrometry, *Carbohyd Res*, 17, 11-18 (1971)

川合正允：担子菌類の加水分解酵素，発酵と工業，34，834-842（1976）

香山 彌：パルプ原木としての腐朽材の化学的研究（第3報）腐朽による材の構成多糖類の変化，木材学会誌，8，32-37（1962a）

—：パルプ原木としての腐朽材の化学的研究（第5報）腐朽材セルロースの重合度変化および生成パルプの重合度，結晶領域におよぼす腐朽の影響，木材学会誌，8，197-203（1962b）

Kayama, T.: Chemical studies on decayed wood as a raw material for pulp. V. Degradation of wood holocellulose by brown and white rotting fungi, *Mokuzai Gakkaishi*, 10, 102-105 (1964)

Keilich, G., Bailey, P.J., Afting, E.G., and Liese, W.: Cellulase (β -1,4-glucan 4-glucanohydrolase) from the wood-degrading fungus *Polyporus schweinitzii* Fr. II. Characterization, *Biochim Biophys Acta*, 185, 392-401 (1970)

—, Bailey, P.J., and Liese, W.: Enzymatic degradation of cellulose, cellulose derivatives and hemicelluloses in relation to the fungal decay of wood, *Wood Sci Technol*, 4, 273-283 (1970)

Kerwin, R.M., and Ruelius, H.W.: Production of alcohol oxidase by several basidiomycetes, *Appl Microbiol*, 17, 347-351 (1969)

Kesler, R.B.: Rapid quantitative anion-exchanger chromatography of carbohydrates, *Anal Chem*, 39, 1416-1422 (1967)

King, N.J.: The extracellular enzymes of *Coniophora cerebella*, *Biochem J*, 100, 784-792 (1966)

—: The xylanase system of *Coniophora cerebella*, *Biochem J*,

108, 571-576 (1968)

Kirk, T.K. and Highley, T.L.: Quantitative changes in structural components of conifer woods during decay by white- and brown-rot fungi, *Phytopath*, 63, 1338-1342 (1973)

小林文男, 矢吹 稔, 星野一雄, 坂本正義: 担子菌 *Trametes ostreiformis* K-1 の自然界からの分離同定とその生成する凝乳酵素の性質, *農化*, 49, 81-92 (1975)

Kochetokov, N.K., and Chizhov, O.S.: Mass spectrometry of carbohydrate derivatives, *Advan Carbohydr Chem*, 21, 39-93 (1966)

Koenigs, J.W.: Effects of hydrogen peroxide on cellulose and on its susceptibility to cellulases, *Mater Org*, 7, 133-147 (1972a)

—: Production of extracellular hydrogen peroxide and peroxidase by wood-rotting fungi, *Phytopath*, 62, 100-112 (1972b)

—: Hydrogen peroxide and iron — a proposed system for decomposition of wood by brown-rot basidiomycetes, *Wood and Fiber*, 6, 66-80 (1974a)

—: Production of hydrogen peroxide by wood-rotting fungi in wood and its correlation with weight loss, depolymerization, and pH changes, *Arch Microbiol*, 99, 129-145 (1974b)

—: Hydrogen peroxide and iron — a microbial cellulolytic system?, *Biotech Bioeng Symp*, 5, 151-159 (1975)

越島哲夫: 木材化学(上), 右田伸彦, 米沢保正, 近藤民雄編, 共立出版, 1968, P. 281-284

—: 木材の酵素加水分解とその前処理, *木材研究*, 16, 16-25 (1981)

Koshijima, T., Yaku, F., Muraki, E., Tanaka, R., and Azumä, J.: Wood saccharification by enzyme systems without prior delignification, *J Appl Plm Sci: Appl Polym Symp*, 37, 671-683 (1981)

Kössler, I., Danhelka, J., Netopilik, M., Samková, M., and Katuscáková, G.: The carbanilate method for determination of

- polymerization of cellulose, *Svensk Papperstidn*, 84, R137-R140 (1981)
- Kováčik, V., Bauer, Š., Rosík, J., and Kováč, P.: Mass spectrometry of uronic acid derivatives. Part III. The fragmentation of methyl ester methyl glycosides of methylated uronic and aldobiouronic acids, *Carbohyd Res*, 8, 282-290 (1968)
- Ladisch, M., Flickinger, M.C., and Tsao, G.T.: Fuels and chemicals from biomass, *Energy*, 4, 263-275 (1979)
- Leisola, M., and Linko, M.: Determination of the solubilizing activity of a cellulase complex with dyed substrates, *Anal Biochem*, 70, 592-599 (1976)
- Lewis, P.F.: The possible significance of the hemicelluloses in wood decay, *Beihefte zu Mater Org*, 10, 113-119 (1975)
- Liese, W.: Ultrastructural aspects of woody tissue disintegration, *Ann Rev Plant Pathology*, 8, 231-258 (1970)
- Lindh, F., Lundsten, J., and Svensson, S.: Mass spectrometry of disaccharides as permethylated alditols. Detailed analysis of fragmentation patterns, *Proc of 6th Int Symp on Glycoconjugates*, Tokyo, 1981, p. 325
- Lönngrén, J., and Scensson, S.: Mass spectrometry in structural analysis of natural carbohydrates, *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 29, 41-106 (1974)
- Lowry, O.H., Rosebraugh, N.J., Fall, A.L., and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent, *J Biol Chem*, 193, 265-275 (1951)
- Macris, B.J.: Enhanced cellulase and β -glucosidase production by a mutant of *Alternaria alternata*, *Biotechnol Bioeng*, 26, 194-196 (1984)
- Majdanac, L., and Jakševac, J.R.: The influence of some pre-

- treatment conditions of hardwood cellulose on its enzyme degradability, *Cellu Chem Technol*, 17, 315-322 (1983)
- Mandels, M., and Reese, E.t.: Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals, *J Bacteriol*, 73, 269-278 (1957)
- Meier, H.: Über den Zellwandabau durch Holzvermorschungspilze und die submikroskopische Struktur von Fichtentracheiden und Birkenholzfasern, *Holz als Roh- und Werkstoff*, 13, 323-328
- , Studies on glucomannans from norwegian spruce. III. partial hydrolysis, *Acta Chem Scand*, 14, 749-756 (1960)
- Merrill, W., French, D.W., and Hossfeld, R.L.: Effects of common molds on physical and chemical properties of wood fiberboard, *Tappi*, 48, 470-474 (1965)
- Mills, A.R., and Timell, T.E.: Constitution of three hemicelluloses from the wood of engelmann spruce (*Picea engelmanni*), *Can J Chem*, 41, 1389-1395 (1963)
- Mishra, S., Gopalkrishnan, K.S., and Ghose, T.K.: A constitutively cellulase-producing mutant of *Trichoderma reesei*, *Biotechnol Bioeng*, 24, 251-254 (1982)
- , and Gopalkrishnan, K.S.: New method for isolation of cellulase constitutive mutants in *Trichoderma reesei* and partial characterization of one, *J Ferment Technol*, 62, 495-500 (1984)
- Moloney, A.P., Hackett, T.J., Considine, P.J., and Coughlan M.P.: Isolation of mutants of *Talaromyces emersonii* CBS 814.70 with enhanced cellulase activity, *Enzyme Microb Technol*, 5, 260-264 (1983)
- Nelson, R.: The use of holocellulose to study cellulose supermolecular structure, *J Polymer Sci*, 51, 27-58 (1961)
- Ng, T.K., Ben-Bassat, A., and Zeikus, J.G.: Ethanol production

- by thermophilic bacteria — fermentation of cellulosic substrates by cocultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Appl Environ Microbiol*, **41**, 1337-1343 (1981)
- Nilsson, T.: Comparative study on the cellulolytic activity of white-rot and brown-rot fungi, *Mater Org*, **9**, 173-198 (1974)
- Nisizawa, K.: Mode of the action of cellulases, *J Ferment Technol*, **51**, 267-304 (1973)
- Ohmiya, K., Nokura, K., and Shimizu, S.: Enhancement of cellulose degradation by *Ruminococcus albus* at high cellulose concentration, *J Ferment Technol*, **61**, 25-30 (1983)
- Ornstein, L., and Davis, B.J.: Disk electrophoresis, *Ann New York Acad Sci*, **121**, 305-650 (1964)
- Palmer, J.G., Murmanis, L., and Highley, T.L.: Visualization of hyphal sheath in wood-decay Hymenomycetes. I. Brown-rotters, *Mycologia*, **75**, 995-1004 (1983a)
- , Murmanis, L., and Highley, T.L.: Visualization of hyphal sheath in wood-decay Hymenomycetes. II. White-rotters, *Mycologia*, **75**, 1005-1010 (1983b)
- Panbangred, W., Kondo, T., Negoro, S., Shinmyo, A., and Okada, H.: Molecular cloning of the genes for xylan degradation of *Bacillus pumilus* and their expression in *Escherichia coli*, *Mol Gen Genet*, **192**, 335-341 (1983)
- , Kawaguchi, O., Tomita, T., Shinmyo, A., and Okada, H.: Isolation of two β -xylosidase genes of *Bacillus pumilus* and comparison of their gene products, *Eur J Biochem*, **138**, 267-273 (1984)
- Pazur, J.H.: Affinity chromatography of macromolecular substances on adsorbents bearing carbohydrate ligands, *Adv Carbohydr Chem*

- Biochem, 39, 405-447 (1981)
- Perila, O., and Bishop, C.T.: Enzymatic hydrolysis of a gluco-mannan from jack pine (*Pinus banksiana*), Can J Chem, 39, 815-826 (1961)
- Puls, J., Ayla, C., and Dietrichs, H.H.: Chemicals and ruminant feed from lignocelluloses by the steaming-extraction process, J Appl Plm Sci: Appl Polym Symp, 37, 685-695 (1983)
- Reese, E.T., Siu, R.G.H., and Levinson, H.S.: The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis, J Bacteriol, 59, 485-497 (1950)
- Rypáček, V.: Chemical composition of hemicelluloses as a factor participating in the substrate specificity of wood-destroying fungi, Wood Sci Technol, 11, 59-67 (1977)
- Saddler, J.N., Brownell, H.H., Clermont, L.P., and Levitin, N.: Enzymatic hydrolysis of cellulose and various pretreated wood fractions, Biotechnol Bioeng, 24, 1389-1402 (1982a)
- , Hogan, C., Chan, M.K-H., and Louis-Seize, G.: Ethanol fermentation of enzymatically hydrolyzed pretreated wood fractions using *Trichoderma* cellulases, *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*, Can J Microbiol, 28, 1311-1319 (1982b)
- : Screening of highly cellulolytic fungi and the action of their cellulase enzyme systems, Enzyme Microb Technol, 4, 414-418 (1982c)
- Samuelson, O., and Wictorin, L.: Uronic acids in birch hemicellulose, Svensk Papperstidn, 69, 777-782 (1966)
- : The impact of polysaccharide chemistry on the wood pulp industry, Int Congr Appl Chem, 27th, Pergamon press, Oxford,

1980, p. 291-298

Schroeder, L.R. and Haigh, F.C.: Cellulose and wood polysaccharides — gel permeation chromatographic analysis, *Tappi*, 62, 103-105 (1979)

Schwarz, E.C.A., and Timell, T.E.: Characterization of three hemicelluloses from the wood of amabilis fir (*Abies amabilis*), *Can J Chem*, 41, 1381-1388 (1963)

Seidl, R.J.: Energy from wood — a new dimension in utilization, *Tappi*, 63, 26-29 (1980)

Shibamoto, T., Fukuzumi, T., and Yanagawa, R.: Studies on the scheme of decomposition of oxalic acid by some wood-rotting fungi, and its effect on the change of pH in a glucose malt extract medium, *Bull Tokyo Univ Forest*, 43, 105-110 (1952)

Shieh, C-H., Barnett, S.M., and Hira, A.U.: Production of enzymes and single cell protein from rice hulls, *Food Process Eng*, 2, 289-294 (1980)

島 藤 平 雄, 田 窪 健 次 郎: 木 材 腐 朽 菌 の 生 化 学 (第 1 報) パーベンダム氏反応と蔞酸集積, *林試研報*, 53, 117-125 (1952)

Shimazono, H.: Oxalic acid decarboxylase, a new enzyme from the mycelium of wood destroying fungi, *J Biochem*, 42, 321-340 (1955)

—, and Hayaishi, O.: Enzymatic decarboxylation of oxalic acid, *J Biol Chem*, 227, 151-159 (1957)

Shimizu, K., and Samuelson, O.: Uronic acids in birch hemicellulose, *Svensk Papperstidn*, 76, 150-155 (1973)

—: Partially methylated uronic acids from methylated hardwood xylan, *Mokuzai Gakkaishi*, 21, 662-668 (1975)

—, Ishihara, M., and Ishihara, T.: Hemicellulases of brown rotting fungus, *Tyromyces palustris*. II. The oligosaccharides

- from the hydrolysate of a hardwood xylan by the intracellular xylanase, *Mokuzai Gakkaishi*, 22, 618-625 (1976)
- , and Ishihara, M.: Isolation and characterization of oligosaccharides from the hydrolyzate of larch wood glucomannan with endo- β -D-mannanase, *Agric Biol Chem*, 47, 949-955 (1983a)
- 志水一允: 木質系資源の酵素糖化による総合利用, *化学工学*, 47, 296-300 (1983b)
- Shimizu, K., Sudo, K., Nagasawa, S., and Ishihara, M.: Enzymatic hydrolysis of woods. VI. Enzymatic susceptibility of autohydrolyzed woods, *Mokuzai Gakkaishi*, 29, 428-437 (1983c)
- Shinke, R., Nakayama, S., Nanmori, T., Aoki, K., and Nishira, H.: Studies on biomass utilization by microbiological activities. II. Utilization of cellulosic resources by microbial cellulolytic enzymes, *Sci Rept Fac Agr Kobe Univ*, 15, 343-348 (1983)
- Sison, B.C., Schbert, W.J., and Nord, F.F.: On the mechanism of enzyme action. LXV. A cellulolytic enzyme from the mold *Poria vaillantii*, *Arch Biochem Biophys*, 75, 260-272 (1958)
- Somogyi, M.: Notes on sugar determination, *J Biol Chem*, 195, 19-23 (1952)
- Staněk, J., Černý, M., and Pacák, J.: The oligosaccharides, Academic Press, New York, 1965, p. 216-295
- Sternberg, D.: Production of cellulase by *Trichoderma*, *Biotechnol Bioeng Symp*, 6, 35-53 (1976)
- Streamer, M., Eriksson, K-E., and Pettersson, B.: Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. Functional characterization of five endo-1,4- β -glucanases and one exo-1,4- β -glucanase, *Eur J Biochem*, 59, 607-613 (1975)
- Su, T.M.: Bioconversion of plant biomass to ethanol, *AIChE Sym*

- Ser, 74, 75-78 (1978)
- Sudo, K., Matsumura, Y., and Shimizu, K.: Enzymatic hydrolysis of woods. I. Effect of delignification on hydrolysis of woods by *Trichoderma viride* cellulase, *Mokuzai Gakkaishi*, 22, 670-676 (1976)
- Sutter, H-P., Jones, E.B.G., and Wälchli, O.: The mechanism of copper tolerance in *Poria placenta* (Fr.)Cke. and *Poria vaillantii* (Pers.)Fr., *Mater Org*, 18, 241-262 (1983)
- Swan, B.: Isolation of acid-soluble lignin from the Klason lignin determination, *Svensk Papperstidn*, 68, 791-795 (1983)
- Swift, M.J.: Basidiomycetes as components of forest ecosystems, *British Mycol Society Symp Ser*, 4, 307-337 (1982)
- 館 勇, 山森 昇: ヘミセルロースに関する研究 (第3報) ハルニレ材ヘミセルロースの組成及び構造に就いて (その1), *農化*, 25, 12-17 (1951)
- 田中三男: セルロース性資源の再利用, *醸酵工学*, 58, 145-155 (1980)
- Taya, M., Suzuki, Y., and Kobayashi, T.: A thermophilic anaerobe (*Clostridium* species) utilizing various biomass-derived carbohydrates, *J Ferment Technol*, 62, 229-236 (1984)
- Theja, K., Shamala, T.R., Sreekantian, K.R., and Sreenivasa, M.V.: Microbial degradation of cellulosic materials — screening of fungal isolates, *J Food Sci Technol*, 20, 84-86 (1983)
- Timell, T.E.: Enzymatic hydrolysis of a 4-O-methylglucuronoxylan from the wood of white birch, *Svensk Papperstidn*, 65, 435-447 (1962)
- : Wood hemicelluloses. Part II., *Advan Carbohydr Chem*, 20, 409-483 (1965)
- Toda, S., Suzuki, H., and Nisizawa, K.: Some enzymatic properties and the substrate specificities of *Trichoderma*

- cellulases with special reference to their activity toward xylan, *J Ferment Technol*, 49, 499-521 (1971)
- Ueng, P.P., and Gong, C-S.: Ethanol production from pentoses and sugar-cane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Mucor* and *Fusarium* species, *Enzyme Microb Technol*, 4, 169-171 (1982)
- Urbanek, H., Zalewska-Sobczak, J., and Borowińska, A.: Isolation and properties of extracellular cellulase-hemicellulose complex of *Phorma hibernica*, *Arch Microbiol*, 118, 265-269 (1978)
- Valtasaari, L., and Saarela, K.: Determination of chain length distribution of cellulose by gel permeation chromatography using the tricarbanilate derivative, *Paperi ja Puu*, 57, 5-10 (1975)
- Váradi, J., Nečesný, V., and Kovács, P.: Cellulase and xylanase of fungus *Schizophyllum commune*. III. Purification and properties of xylanase, *Drevársky výskum*, 14, 147-159 (1971)
- Walseth, C.S.: The influence of the fine structure of cellulose on the action of cellulases, *Tappi*, 35, 233-238 (1952)
- Weiss, D.E.: Energy from biomass, *Appita*, 33, 101-110 (1979)
- Whitaker, D.R., Colvin, J.R., and Cook, W.H.: The molecular weight and shape of *Myrothecium verrucaria* cellulase, *Arch Biochem Biophys*, 49, 257-262 (1954)
- Wilcox, W.W.: Anatomical changes in wood cell walls attacked by fungi and bacteria, *Bot Rev*, 36, 1-28 (1970)
- Wirkström, R.: A study of the macromolecular properties of xylan from birch in a wide molecular weight range, *Svensk Papperstidn*, 71, 399-404 (1968)
- Wolter, K.E., Highley, T.L., and Evans, F.J.: A unique polysaccharide- and glycoside-degrading enzyme complex from the wood decay fungus *Poria placenta*, *Biochem Biophys Res Comm*,

- 97, 1499-1504 (1980)
- Yokota, S.: Comparative activities degrading cellulosic substances by wood-rotting fungi, Bull Tokyo Univ Forest, 50, 37-44 (1955)
- Zalewska-Sobczak, J., and Urbanek, H.: Cellulose and xylan degrading enzymes of *Fusarium avenaceum*, Arch Microbiol, 129, 247-250 (1981)
- Zeikus, J.G.: Chemical and fuel production by anaerobic bacteria, Ann Rev Microbiol, 34, 423-464 (1980)
- Zertuche, L., and Zall, R.R.: A study of producing ethanol from cellulose using *Clostridium thermocellum*, Biotechnol Bioeng, 24, 57-68 (1982)

Studies on Hydrolysis of Wood Polysaccharides with
Enzymes produced by the Brown Rotting Fungus,
Tyromyces palustris

Summary

Basidiomycetes belonging to the group of brown rotting fungi are known to degrade wood cellulose and hemicelluloses vigorously without prior delignification and to leave the lignin matrix nearly undigested. Thus, the polysaccharide degrading enzyme system of the brown rotting fungus, *Tyromyces palustris*, has been studied with a view to applying biochemical conversion of lignocellulosics to fermentable sugars. In this article, the following four subjects were discussed: (1) change of wood polysaccharide constituents in progressive stages of decay; (2) cultural conditions for production of cellulase and hemicellulases by *T. palustris*; (3) purification and properties of cellulase and hemicellulases produced by *T. palustris*; (4) hydrolysis products of hardwood xylan and softwood glucomannan by purified xylanase and mannanase.

In Chapter 1, the change of the wood polysaccharide constituents in the progressive stages of decay was described. Karamatsu (*Larix leptolepis*) and shirakamba (*Betula platyphylla*) were subjected to fungal decay of the brown rotting fungus. Through the analysis of the wood constituents during a wide range of decay, the substrate specificity, and the changes of the molecular size and the crystallinity index of the decayed wood polysaccharides were studied. The fungus attacked hemicelluloses, especially mannan, more selectively than cellulose

and caused a rapid depolymerization of the wood polysaccharides during the initial stages of decay (weight loss by decay: up to 15-20%). The crystalline cellulose resisted the initial attack of the fungus but began to degrade under successive attacks.

In Chapter 2, the conditions of the submerged and solid state fermentations were described with reference to the production of polysaccharide degrading enzymes by *T. palustris*. To obtain and maintain high C_x -cellulase and hemicellulase yields in the submerged fermentation, the pH of the medium had to be kept above 2.0 by addition of alkali. β -Glucosidase was produced in a constant level irrespective of the culture method and the pH condition of the medium. Cellulase of the C_1 -type was not produced by any fermentations, even by a solid state fermentation in which the crystalline cellulose of the medium was obviously degraded. In the case of brown rotting fungi, therefore, an unexplored way of cellulose degradation might be imaginable that some non-enzymatic reactions by the extracellular H_2O_2/Fe^{2+} system or highly reactive radicals are involved in the cellulose degradation via oxidation in nature.

In Chapter 3, purification and properties of extracellular cellulase and hemicellulases produced by *T. palustris* were described. Extracellular C_x -cellulase, mannanase, xylanase and β -D-xylosidase components were separated and purified by means of column chromatography on molecular sieving, anion exchanger and agarose derivative containing a substrate inhibitor, respectively. The purified polysaccharide degrading enzymes were so similar in physicochemical properties to brown rotters' previously reported (pH and temperatures opti-

ma, pH and temperature stabilities and molecular weight). Enzymes hydrolysing high molecular weight substrates were smaller molecules than those hydrolysing low molecular weight substrates.

In Chapter 4, the hydrolysis products of hardwood xylan and softwood glucomannan by the extracellular purified xylanase and mannanase were described. The neutral sugars in the xylan hydrolyzate were xylose and xylobiose in a molar ratio of 1.4 : 1.0. The acidic part contained two series of oligouronides. The first series included aldouronic acids up to the aldohexaouronic acid. The main sugars were 4-O-methyl-D-glucuronic acid and the aldotetraouronic acid. All the oligouronide in this series carried the 4-O-methyl-D-glucuronic acid residue at the nonreducing xylose end group. The acids of the second series were composed of L-rhamnose, D-galacturonic acid and 1-3 D-xylose residues, indicating the presence of the following structure, β -D-Xylp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 4)-D-Xyl, in shirakamba hemicellulose. The main oligosaccharides isolated from the glucomannan hydrolyzate were mannobiose, epicellobiose, mannotriose and epicellobiosyl mannose in a molar ratio of 4:1:1:1. Isolation of the D-mannooligosaccharides of different DP having a D-glucose residue at the nonreducing end suggested that the extracellular mannanase has stronger affinity for β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp than β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Manp.