

氏 名	長 崎 泉 吉
	なが さき せん きち
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	論 理 博 第 246 号
学位授与の日付	昭 和 43 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Physiological studies on the age of <i>Aspergillus niger</i> mycelia
	(クロコウジカビ菌糸の age に関する酵素的研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 芦 田 讓 治 教 授 北 村 四 郎 教 授 竹 内 郁 夫

論 文 内 容 の 要 旨

主論文の研究は、クロコウジカビの平板培養において、菌糸の齢による生理活性の変化を、発育生理上重要な役割をもつと考えられるフォスファターゼの面から調べたものである。

第 1 部では、まず、寒天培地表面にセロファンを敷き、その上に生じた菌蓋を培養日数を追って採集し、凍結磨砕の後、遠心分離の上清を透析し、その酵素活性を調べた。

リボヌクレアーゼ (RNase)、デオキシリボヌクレアーゼ (DNase)、フォスフォモノエステラーゼ (PMase)、およびピロフォスファターゼ (PPase) は、いずれも、2つの最適 pH をもち、その値は、PNase では4.5と6.0、DNase では5.2と7.8、PMase では4.5と8.6、PPaseでは5.0と7.5であった。そして、これら酵素のいずれにおいても、若い菌蓋においては、最適 pH の高い酵素活性の方が大きく、古い菌蓋では逆に、最適pHの低い酵素活性の方が大きかった。フォスフォジエステラーゼ (PDase) は、その最適 pH が5.2だけであり、若い菌蓋では活性が低く、古くなるほど活性が高かった。分生胞子の着生完了とその成熟は、それぞれ培養5日頃と10日頃に見られるが、菌蓋における各酵素の活性の変動経過は、これらの生理的齢と関係がみられた。

培養1日および17日の菌蓋から得た抽出液に、基質として母酵核酸を加え、分解された核酸塩基を調べたところ、アデニンとウラシルを遊離する酵素活性は、老若いずれの菌蓋の抽出液でも高いが、グアニンを遊離する活性は、若い菌蓋の抽出液だけにみられた。そして、RNase に対する銅および亜鉛の阻害は、古い菌蓋の抽出液よりも、若い菌蓋の抽出液において大であり齢によって RNase の型に消長のあることが示された。

RNase の存在様式をみるため、菌蓋抽出液を10万 g で分画したところ、若い菌蓋標品では、pH6.0 活性と pH4.5 活性は、ともに、沈殿よりも上清中に多かった。老菌蓋でも、同様なことがいえるが、上清中の pH4.5 活性以外の活性は低下していた。リボソームは老化に伴って崩壊するので、この現象と2種の RNase 活性との関係をみるため、³²P リン酸を含む培地で培養した菌蓋の抽出液を 10万 g 遠心で上清

と沈殿に分け、ラベルされない菌蓋から得た同様の分画と組み合わせて反応させ、酸可溶となった放射能を測った。その結果、上清および沈殿中の pH6.0RNase は、それぞれ自己の分画中のリボ核酸(RNA)を分画するが、他の分画のRNAを分解し得ないこと、および pH4.5RNase では、上清のものは、自己分解中RNAを分解せず、沈殿中のRNAを分解し、沈殿中のものは、いずれの分画のRNAをも分解しないことがわかった。また、リボソームの崩壊を直接に見るため、1万gの上清をpH6.0と4.5で40分間保温した後、リボソームの超遠心パターンを得たところ、40sおよび60s粒子が著しく減少していた。(pH 4.0では凝集のため分離できなかった。)

以上第1部における研究は、菌糸の齢の進行に伴うフォスファターゼ活性の変化を、培養日数の異なる菌蓋を用いて概括的に証明したものである。菌糸の生長は、その先端のみでおこると考えられているから、菌糸には、先端から基部に向かう生理齢の傾斜があるはずである。したがって、フォスファターゼ活性が、菌糸の部分によりどのように分布するかは、興味ある問題であり、第2部は、これについて研究したものである。

菌糸の基部から先端へのプロファイルは菌蓋の縦断面に示されるが、その観察を容易にするため、特殊の培養方法が考察された。この断面につき、アルカリ性 PMase 活性の所在を細胞化学的反応で調べたところ、菌糸の若い部分では、比較的大きい丸い小体に反応が局在し、老化部分では、細胞質中に散在する比較的小さい不規則形の小体にも反応がみられた。これら小体は、いずれもギムザ陽性であったので、アルカリ性 PMase 活性は、若い菌糸では主として核に局在し、老化菌糸では、核のほか細胞質に散在するものと推定された。これは老化菌糸の核がこわされやすいことと関係があろう。

酸性 PMase は、菌糸の先端から少し下った部分から老化部にかけて、主として細かい顆粒に所在し、老化部では、その顆粒数が増す傾向がみられた。これらの顆粒には、ネオテトラゾリウムおよびコハク酸脱水素酵素の反応を示す顆粒と一致しないものがあるので、酸性 PMase は、ミトコンドリアのみならず、他の小顆粒にも存在すると思われる。もっとも、PMase 陽性顆粒が人為産物である可能性もある。

指示色素によって測った結果によれば、細胞内 pH は、菌糸の齢にかかわらず pH5~6 の程度であったので、フォスファターゼ活性の最適 pH が齢によって異なるという現象との対応は発見できなかった。

分生子形成に伴う PMase 活性の変化を追跡したところ、分生子柄、小柄、および分生子の各器官において、そのおのおのの新生期には、各細胞の中の小顆粒に酸性およびアルカリ性 PMase 反応が認められ、器官形成が終るとともに、反応が低下した。

酸性およびアルカリ性フォスファターゼ活性について、気中菌糸と下面菌糸とを比較したところ、若い培養から古い培養にいたるまで、種々の齢のいずれにおいても、下面菌糸の方が、活性が高かった。

なお、第1部において、齢が進むとともに酵素活性の交代がみられたので、培養齢の異なる菌糸のPMaseをDEAEカラムに吸着させ、食塩溶液で展開したところ、1日培養の菌糸のアルカリ性 PMase は、大きい2つのピークA、Bと小さいピークCを示したが、5日培養のものでは、A、Bがなく、Cのみであった。また、酸性 PMase については、1日培養では、小さいピークAと大きいピークBがみられたのに対し、5日培養では、Aがなくなり、Bのほかに新たにCが認められた。このような変化は、アルカリ性 PMase の電気泳動像においてもみられた。

以上によって、糸状菌菌糸内の酵素系の菌糸齢に伴う変化の一端が明らかとなり、また、若干の酵素の生理的意義を考察する資料が得られた。

論文審査の結果の要旨

糸状菌の発育に伴う生理学的研究は少なくないが、その多くは、醗酵工業に関連する液体培養についての研究であり、固形培地上に生育する菌糸に関しては、未開拓の問題が多い。主論文の研究は、固形培地に生育するクロコウジカビについて、齢に伴う酵素活性の変化を追跡したものである。酵素として、生育に重要な役割を演じるリン酸代謝関係のものをとりあげ、培養齢の異なる菌蓋から抽出して調べる方法と、齢の異なる菌糸部分について細胞化学的に調べる方法とを併用している。

申請者が菌蓋抽出液について調べた5種のフォスファターゼのうち、4種はそれぞれ2個の最適 pH を示し、フォスフォジェステラーゼ (PDase) のみは、酸性側に単一の最適 pH を示した。老化菌蓋では、若いものに比し、前記4種の酵素はいずれも酸性酵素の活性が高く、PDase の活性も高かった。このことは、細胞内 pH が老化とともに低下するならば、よく説明がつくが、指示色素を用いて測定した限りにおいては、細胞内 pH の齢による変化は小さく、この点からの説明は困難である。他方、最適 pH を異にする各酵素の活性の変動を、日を追って調べた結果は、その変動が、分生子の形成および成熟の時期に関係のあることが示されている。

リボヌクレアーゼ (RNase) において、最適 pH4.5 のものは T_2 に、6.0 のものは T_1 に似た核酸水解能をもつことが示された。また、菌蓋抽出液を10万 g で遠心分画すると、上清中の pH 6 酵素は上清中のリボ核酸を、沈殿部中のそれは沈殿中のリボ核酸を分解するが、相互に他の分画中のリボ核酸は分解せず、他方 pH4.5 酵素では、上清中のものが沈殿中のリボ核酸を分解するのみで、上清と沈殿とその他の組み合わせでは、みるべき分解がないという、興味ある事実が明らかになった。RNase 活性は、一般に10万 g 遠心による上清中に、沈殿部中より多く含まれること、また、用いた RNase 標品が、リボソームの沈降係数を低下させることも確かめられている。

フォスフォモノエステラーゼ (PMase) については、酸性およびアルカリ性酵素のおおのちに、二、三の成分があり、これらの成分が齢に伴って消長することを、クロマトグラフィーおよび電気泳動を用いて明らかにした。また、細胞化学的方法によって、アルカリ性 PMase 活性は、若い菌糸では核にみられ、古い菌糸ではギムザ染色陽性の顆粒にみられること、酸性 PMase 活性は、ミトコンドリアの反応を示す顆粒と、そうでは顆粒とにみられること、また、分生子形成の際につくられる二、三の器官の細胞において、器官新生の頃には、酸性およびアルカリ性 PMase の活性があり、器官完成とともに、それらの活性が低下することを観察している。

以上のように、主論文は、クロコウジカビを用いて、菌糸の齢によるフォスファターゼ活性の変化を詳細に調べたものである。現象が複雑であるため、生理学的意味付けの努力が十分報いられていないという面はあるが、多くの興味ある事実を明らかにして、糸状菌の発育生理に関して少なからぬ寄与をしている。なお、参考論文2編において、申請者は、酵母菌の特殊な核酸の作用につき、興味ある研究を行なっている。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値があるものと認める。