

DA
855
1990
(H)

寄	則
上	野
野	秀
秀	人
人	氏
氏	

放線菌と *Trichoderma* 属糸状菌による
キチナーゼ生産および土壤中のキチナーゼ活性

筑波大学大学院博士課程

農学研究科

応用生物化学専攻

上野 秀人

92005206

目次

第1章 緒言	1
1-1 本研究の背景	1
1-2 本研究の目的	11
第2章 放線菌によるキチナーゼ生産と糸状菌細胞壁の分解	13
2-1 各種土壌から分離された放線菌の各種菌体外酵素生産	13
2-1-1 実験材料および方法	14
2-1-2 結果	19
2-1-3 考察	22
2-2 キチナーゼ産生能の高い放線菌菌株の選抜と同定	25
2-2-1 実験材料および方法	26
2-2-2 結果	26
2-2-3 考察	31
2-3 培養基質がキチナーゼ生産に与える効果	31
2-3-1 実験材料および方法	32
2-3-2 結果	36
2-3-3 考察	44
2-4 <i>Streptomyces erythraeus</i> S-84株の生産する キチナーゼの分離精製と酵素学的性質の検討	48
2-4-1 実験材料および方法	49
2-4-2 結果	53
2-4-3 考察	68

2-5	糸状菌細胞壁の分解	72
2-5-1	実験材料および方法	72
2-5-2	結果	73
2-5-3	考察	80
2-6	要約	81
第3章	<i>Trichoderma</i> 属糸状菌によるキチナーゼ生産	84
3-1	<i>Trichoderma</i> 属糸状菌によるキチナーゼ生産	84
3-1-1	実験材料および方法	84
3-1-2	結果	85
3-2	培養基質が <i>Trichoderma</i> 属糸状菌のキチナーゼ 生産に与える効果	91
3-2-1	実験材料および方法	91
3-2-2	結果	91
3-3	考察	96
3-4	要約	98
第4章	土壌におけるキチナーゼの分布と動態	100
4-1	土壌のキチナーゼ活性およびN-アセチル グルコサミニダーゼ活性の測定法の確立	100
4-1-1	実験材料および方法	102
4-1-2	結果	103
4-1-3	考察	107
4-2	森林土壌のキチナーゼ活性測定	110
4-2-1	実験材料および方法	111
4-2-2	結果	111

4-2-3	考察	115
4-3	各種有機化合物の添加および放線菌の接種が 土壌のキチナーゼ生産に与える効果	119
4-3-1	実験材料および方法	119
4-3-2	結果	120
4-3-3	考察	123
4-4	要約	126
第5章	総合考察	129
5-1	土壌微生物のキチナーゼ生産と糸状菌細胞壁の分解	129
5-2	土壌におけるキチナーゼの動態	131
5-3	生物的防除におけるキチナーゼの将来的方向	133
	要約	135
	謝辞	141
	参考文献	142
	培地組成一覧	148

第1章 緒言

1-1 本研究の背景

農業における近年の問題

日本は比較的温暖な気候と四季に恵まれ、土壌資源や水資源も豊かであり農業生産性が高い国である。さらに、近年農業技術は耕作技術や品種改良、基盤整備などによりここ30年あまりの間に飛躍的な進歩を遂げ、単位面積当りの収穫量は米が1.7倍、キュウリ2.5倍、トマト2.7倍と豊富で安定した作物供給が可能となった。この背景には生産・流通に関わる機械や施設に大規模な資本が投入されたことを抜きに考えることはできない。特に野菜を主とする畑農地は徹底的な集約化、大型化が行われた。昭和41年の野菜の指定産地制度の発足以降、この傾向は加速して広まった。その結果、一定の品質の野菜が豊富に安定供給することができるようになり、農業生産現場では徹底した省労力化が、折りからの農業従事者不足に一役を果たした。

しかしその一方で連作障害("いや地")といわれる作物の生育障害が昭和25年頃から露呈してきた。連作障害の主な内容は、土壌伝染性を中心とした病害によるものが全体の70%あまりを占め、その他に虫害、土壌物理・化学性の悪化、有害物質の生成も原因となっていることが、アンケート調査により明らかになっている(野菜試験場,1978)。いままで野菜の主要産地となってきた場所が、極端な場合ほとんど収穫できない状態にまでになり、産地の移動が行われる状況にまで及んだ。対応策として、露地マルチを利用した土壌の熱消毒、有機物施用、抵抗性品種の開発等が行われてはいるが、効果が一定しない等の理由で専ら薬剤による防除が主流となっている。わが国においては、クロロピクリン、臭化メチルなどのくん蒸剤やPCNBなど

の農薬が土壌消毒によく使用されているが、農薬が作物に残留するため食品安全性の面で問題がある、農業従事者の健康を害する危険性がある、自然環境を破壊する恐れがあるなどの理由でこれ以上の農薬の投入は難しい状況にある。

このような状況の中で考え出されてきたのが生物活性を利用した病害防除（生物的防除）である。土壌中には多種多様な微生物が土壌1g当たり $10^6 \sim 10^8$ CFU存在し、それぞれが影響を及ぼしあいながら生息している。あるものは抗菌性物質を生産したり、あるいは他の菌に寄生したりして、土壌微生物間の相互作用における一現象として病原微生物の生育を阻害することが知られている。また土壌は栄養的に飢餓状態にあると言われており、不特定多数の微生物が限られた栄養源をめぐる病原菌と競合することによって病原微生物の生育を阻害していると考えられている。このような微生物の働きを最大限に引き出すことにより病原微生物の異常な繁殖を抑制し、作物の病害を減少させようとするのが生物的防除の考え方である。

植物病害の生物的防除の現状

現在行われている生物的防除の原理は、①抗菌性物質生産菌を接種する、②siderophoreによってFeキレート化を行い病原菌の必須養分の供給を遮断する、③病原菌に寄生し、分解酵素で病原菌の細胞壁を分解する、④同種あるいは異種の微生物を先に生息させ、外部からの病原菌の進入を阻害する（交叉防除）などとなっている。また土壌においては、微生物間で栄養源に対する競合が起こっており、不特定の微生物が病原菌と栄養源を競合することにより、病原菌の生育を抑制する効果も元来備わっていると考えられている。

生物的防除に用いられている抗菌性物質としては、*Pseudomonas fluorescens*が生産するpyrrolnitrin(Howell et al., 1979)とpyoluteolin(Howell et al., 1980)、*Bacillus*属の細菌が生産するbacitracin、bulbformin、fengymycin、糸状菌が生産

する gliotoxin、gliovirin(Howell et al., 1983)、放線菌が生産する geldanamycin(Rothrock et al., 1984)等が報告されている。これらの抗菌物質を生産する菌は主に種子粉衣されることによって接種が行われている。しかし栄養培地中では抗菌作用を示すが、土壤環境下においては必ずしも安定した効果が得られない場合が少なくない。その原因としては、①一般的に抗菌物質は栄養源に富んでいる状態から飢餓状態に遷移したときに二次代謝産物として生産されると理解されていることから、土壤という栄養源が限られた環境で抗菌物質が生産されると考えることは難しい。②たとえ生産されたとしても粘土粒子や有機物コロイドに吸着されてしまい、有効濃度に達しない可能性がある。③土壤酵素や微生物による分解が生じるなどであり、抗菌物質がどの程度生産され、どの様な挙動を示すかは今後の研究が待たれる所である。

siderophoreは3価の鉄とキレートを生成することにより鉄イオンを固定化する物質である(Teintze et al., 1981)。病害抑止土壤の抑止効果を調べる際、siderophoreを生産する *Pseudomonas*属の細菌が分離され、低温殺菌をすると抑止効果が喪失したことからsiderophoreが病原糸状菌の活動を阻害したという報告が多く出されている(Scher and Barker, 1982)。これらの研究によると作用機作は、根圏で分泌されたsiderophoreがFeと錯体を形成することにより、病原菌の厚膜胞子あるいは小型分生子の発芽および発芽管の伸長に必要なFeが減少するため、病原菌の活動が抑制され、病害が減少すると説明されている。

溶菌作用が最もよく調べられ、病害防除用資材として実用化の研究が最もなされているものは *Trichoderma*属の菌類であろう(Chet et al., 1980; Chet and Henis, 1985; Sivian and Chet, 1986; Paravizas et al., 1983)。菌核として休眠している病原菌細胞に穴をあけたり、増殖している病原菌細胞に絡みついて最終的に死滅させる様子が電子顕微鏡などで観察されている(Elad et al., 1983)。また *Ara-*

*chnula*属、*Acanthamoeba*属などのアメーバも糸状菌に寄生し、穴をあけて細胞内容物を流出させている例も報告されている (Homma et al., 1979; Old and Chakraborty, 1986)。

交叉防除は予め病原糸状菌の近縁の非病原菌あるいは弱病原菌を感染させておく
と病原菌に対する防御作用が強化され、病気にかかりにくくなるというものである。
薬剤による病原菌駆除に勝るとも劣らない成果が得られ、実用性は極めて高い
(小川・駒田, 1984)。しかしこの交叉防除の効果があったとする報告は、主に
Fusarium sp. (Schneider, 1984)や*Verticillium* sp. (Schnathorst and Mathre,
1966; Melok and Horner, 1975)による導管病に偏っている。

特定の微生物を接種するのではなく、有機物を施用することにより、もともと土
壌中に存在する微生物を増殖させ、生物活性を増強させることにより病原菌の生育
阻害を起こさせることも行われている。緑肥やコンポストなどの一般的な有機物施
用がジャガイモそうか病を抑制したり (Sanford, 1926; Millard and Taylor, 1927)、
200種類以上の作物に病害をもたらす*Phymatotrichum omnivorum*の駆除に効果があっ
たと報告されている。これらの効果の機作としては、①栄養源の競合に病原菌が脱
落した、②栄養源により一時的に抗菌物質生産菌が増殖し抗菌物質を生産した、③
*Trichoderma*属糸状菌などの寄生菌が増殖した等の総合的な効果が考えられている。
有機物施用による糸状菌由来の病害防除のうち最も研究が行われているのはキチン
施用である。

キチン施用による植物病害防除の研究

ある種の土壤微生物が病原糸状菌細胞を溶解してその溶解物を生育のための栄養
源として代謝する現象は早くから認められていた (Lily et al., 1952; Mueller
and Durrell, 1957))。また糸状菌溶解を行う微生物はキチナーゼ生産菌であること

もその後の研究で明らかにされていた。しかしそれらは自然現象的に起こるものと思われていた。そこでキチンを土壤に施用することにより、人為的にこれらの糸状菌溶解現象を誘発し、植物病害が抑制されるのを見いだそうとしたのがMitchell and Alexander(1961)である。キチンについては後に詳細に述べるが、キチンはN-アセチルグルコサミン(N-acetyl- β -D-glucosamine)が β -1,4-結合した直鎖状の多糖類であり、土壤中では昆虫や小動物の外骨格として、糸状菌では細胞壁の主成分として大量に存在している有機物である。一般にエビやカニ殻由来のものが入手し易いためよく用いられている。

1961年にMitchell and Alexanderはキチンを土壤に施用することにより植物病害が有意に抑制されたことを報告した。彼らによればインゲン豆根腐れ病菌 *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*が感染した土壤にインゲン豆を播種し、同時に土壤にセルロースや塩化アンモニウム、キチンを施用したところキチンを施用した場合に限り、有意に根腐れが抑制されたとしている。さらに *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*を感染させたニンジンにおいても同様な効果がみられたと報告している。彼らはこれらの結果が得られた理由としてキチン施用により糸状菌溶解微生物数が増加し、キチナーゼや β -1,3-グルカナーゼなどの細胞壁分解酵素が生産され、菌体が溶解することにより糸状菌の活動を阻害したためであろうと考察した。またキチンは特異的に放線菌数を増加させることが知られていたため、放線菌が土壤中で抗菌物質を生産し糸状菌の生育を抑制した可能性もあるともつけ加えている。

Mitchellは1963年にはさらに検討を行い、キチンと同様に糸状菌細胞壁の構成多糖である β -1,3-グルカン(ラミナリン)を土壤に施用してもキチンと同様に特定の糸状菌の生育を阻害したと述べている。この実験において生育阻害を受けた糸状菌は、細胞壁中にキチンと β -1,3-グルカンを含有しているものだけであり、病原糸状菌の抑制には細胞壁分解が深く関与していることが示唆された。Skujinsら(1965)はさら

に *Streptomyces* 属放線菌の生産するキチナーゼと β -1,3-グルカナーゼを用い、両方の酵素が存在した方がより効果的に糸状菌菌体が溶解されると報告した。本邦においてもキチン施用の効果は検討された。井上ら(1964)はキチン施用による病害の軽減と微生物相を調べている。彼らによればキチン施用はダイコン萎黄病に対して絶大な効果をもたらし、完全に病害を抑制してしまったと報告している。微生物相としては糸状菌数と放線菌数が細菌数に比べて急増し、多くの種類の放線菌の増殖がみられたが、糸状菌の場合は増殖した種類は限られたものだけであったと報告している。

しかしキチン施用によりキチン分解菌が増殖し植物病害が抑制され、病原糸状菌菌体を調べてみると菌糸が溶解していたという現象は、放線菌などが生産したキチナーゼが他家溶解させたのではなく、キチン施用によって増殖した微生物が抗菌物質を生産したため、糸状菌が生育障害を起こし、自己溶解を促した可能性が高いとする報告も出された。(Lloyd et al., 1965; Sneh et al., 1971; Sneh and Henis, 1971)

切貫ら(1976)らはこの論議を検討すべく、土壤にキチン、コンブ (β -1,3-グルカン)、*Fusarium* 属糸状菌の乾燥菌体を埋め、放線菌を分離して次のようなカテゴリーに分類した。すなわち①強い抗菌性を有し、キチン分解性のないもの、②強い抗菌性を有し、キチナーゼと β -1,3-グルカン活性を有するもの、③抗菌性を有し、強いキチナーゼ活性と強い β -1,3-グルカナーゼ活性を有するもの、④抗菌性がなく、強いキチナーゼ活性と β -1,3-グルカン活性を有するもの、⑤抗菌性が弱く、強いキチナーゼ活性と弱い β -1,3-グルカナーゼ活性を持つもの、⑥全てに弱い活性しか持たないものである。これらのグループに分類された各放線菌を用いて接種実験を行った結果、最も防除効果の高いのは③のグループであり、播種後20日までは④、⑤グループも効果を示したとしている。そしてその他のグループでは有意な効果は

認められなかった。これらの結果は抗菌物質生産能の強い放線菌の方が病害抑制能力が高いが、キチナーゼや β -1,3-グルカナーゼの高生産能力を有していなければ病害抑制効果は現われないことを示している。また彼らは糸状菌細胞壁分解においてはキチナーゼ生産能の方が β -1,3-グルカナーゼ生産能に比べてその関係が深いとも述べている。

キチン施用による病害防除の機作については未だ確固たる結論が出されていない。しかし、糸状菌細胞壁の分解作用と抗菌性物質の生産が大きな役割を果たしているとは言えそうである。

土壤に施用されたキチンが微生物に代謝されるまでの反応と関連酵素

土壤に施用されたキチンはまずキチナーゼ(chitinase)と呼ばれる加水分解酵素によって分解される(図1-1)。分解は2種類のexo-とendo-キチナーゼによって行われる。exo-キチナーゼは、キチン鎖の末端から2糖(N,N'-ジアセチルキトビオース、N,N'-diacetylchitobiose)ずつ β 1 \rightarrow 4-グルコシド結合を切断していく酵素であり、endo-キチナーゼはキチン鎖の β 1 \rightarrow 4-グルコシド結合を無差別に切断する酵素である。通常これらのキチナーゼが働くことによりキチン鎖は漸次オリゴ糖を経てN,N'-ジアセチルキトビオースにまで分解される。しかしキチンを唯一の炭素源、窒素源として生育する生物のほとんどは、N,N'-ジアセチルキトビオースの形では代謝吸収することができない。そのためN-アセチルグルコサミニダーゼが作用してN,N'-ジアセチルキトビオースをN-アセチルグルコサミンに分解し、初めて利用されることになる。細胞内においてN-アセチルグルコサミンは、フォスフォリアーゼによってN-アセチルグルコサミン-6リン酸となったり、デアセチラーゼとデアミナーゼによってグルコースに変換され、一般的な代謝経路に入ると考えられている。

またキチナーゼによって加水分解を受けるまえにデアセチラーゼによりキトサン

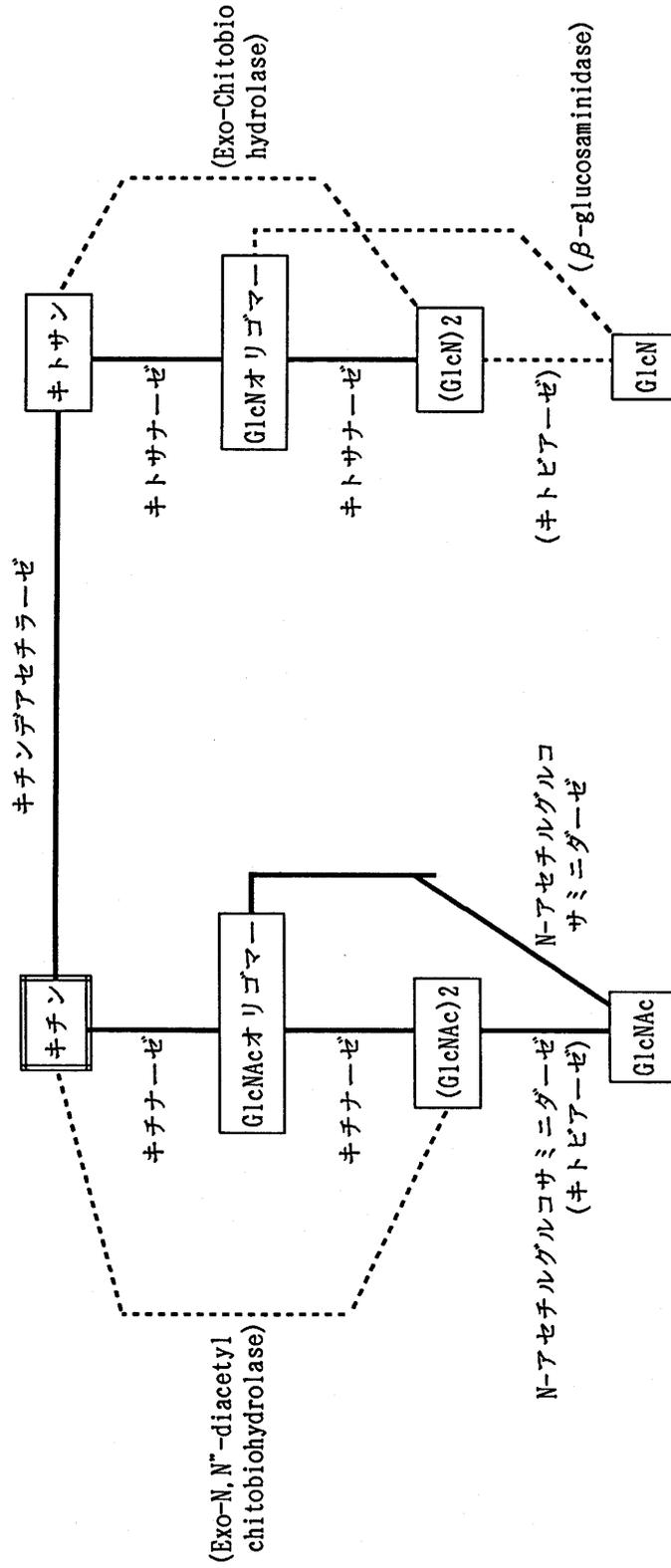


図1-1 キチンおよびキトサンの酵素分解経路 (点線は予想される分解経路、括弧内はその分解酵素)
 矢吹 稔 編著(1988)「最後のバイオマス: キチン、キトサン」p190より引用。
 GlcNAc, N-アセチルグルコサミン; GlcN, グルコサミン

となり、キトサナーゼによってキトビオース(glucosaminyl-glucosaminide)に分解され、さらにグルコサミニダーゼによってグルコサミンにまで分解される経路も存在する。しかしキトサナーゼが関与する経路については、キチナーゼによる分解に比べて報告例が限られており、土壌における一般的キチン分解経路とは考えにくい。

最近のキチンおよび微生物キチナーゼの研究

キチンはN-アセチルグルコサミン(N-acetyl- β -D-glucosamine)が β -1,4-結合した直鎖状の多糖類であり、植物界ではキノコ、カビ、酵母などの菌類および一部の藻類の細胞壁構成成分として存在し、動物界では原生動物から有し、動物までの広い範囲にわたり存在している。その年間生産量は 1×10^9 tとも 1×10^{11} tとも言われており、セルロースにも匹敵するバイオマスであると言える(Tracy, 1957)。キチンの反応性は低く、キチンと同様に構成糖が β -1,4結合している構造を持つセルロースも、比較的反応性の低い、安定な糖類であると考えられているが、キチンの方がさらに強固な構造を有しており、難分解物質であると考えられている。それはキチンの構成糖であるN-アセチルグルコサミンの残基上にはC-2位にアセトアミド基、C-3位に第2級水酸基、C-6位に第1級水酸基が存在し、C-2位のアセトアミド基とC-3位の水酸基の間に水素結合が生じ、さらにこの水素結合と他の残基上のC-6位水酸基が水分子を介して水素結合していることにより(Carlstorm, 1957)、キチン分子全体が非常に強固な結晶構造を形成し、水に不溶で分解性の低い多糖となっているからである。このような性質を持つため、キチンは動物の外骨格や菌類の細胞壁のような高い剛性が必要とされるところに分布しているものと思われる。一般に工業的にはエビやカニ殻由来のものが入手し易いためよく用いられており、用途としてはキトサンに加工して汚水処理のための凝集剤に大部分使われてきたが、最近ではバイオポリマーとしてその用途は広がり、人工皮膚やイオン交換樹脂、オリ

ゴマーは薬効増強剤あるいは成人病予防の薬剤として、にわかにはその利用方法について注目が集まり、精力的に研究が進められている。

キチナーゼを生産する生物は動物、植物を問わず自然界に広く存在する。微生物由来のものは特に報告が多く、細菌では *Serratia* 属 (Monreal and Reese, 1969; Robert and Cabib, 1982)、*Bacillus* 属 (Tsujisaka et al., 1975; Bennet and Hood, 1980)、*Vibrio* 属 (Wortman et al., 1986) など、放線菌では *Streptomyces* 属 (Reynolds, 1954; Berger and Reynolds, 1958; Tominaga and Tsujisaka, 1976; Beyer and Diekmann, 1985; Robbins et al., 1988; Hara et al., 1989)、糸状菌では *Aspergillus* 属 (Otakara, 1961)、酵母では *Saccharomyces* 属 (Elango et al., 1982; Correa et al., 1982) の研究が多い。これらの中のいくつかは工業的にキチナーゼが生産され、市販されている。キチナーゼの利用法は、①エビやカニの殻を分解し、分解産物を SCP (single cell protein) 生産の基質にする (Carroad and Tom, 1978; Tom and Carroad, 1981; Cosio et al., 1982)、②菌類の細胞壁を分解し、プロトプラストやスフェロプラストを生成させ、有用菌株作出の試薬として用いる (Yabuki et al., 1984)、③薬理的価値の高いキチンオリゴマーの生産等が考えられている。

しかし病原糸状菌の細胞壁分解を目的とした微生物キチナーゼの研究は限られており、糸状菌細胞壁分解をする際、①何種類のキチナーゼが関与するのか、②どのような調節を受けてキチナーゼは生産されるのか、③生産されるキチナーゼはどのような特性を有しているのか等については研究例が少なく、知見が不足していると言える。

1 - 2 本研究の目的

本研究の位置

前述した通り、植物病害の生物的防除におけるキチナーゼによる病原糸状菌の細胞壁分解作用の有効性は確立されたと考えられる。さらにキチナーゼが最も注目されている生物的防除エージェントの一つと言われる理由としては、①キチナーゼの作用機作は糸状菌細胞壁分解であるため、キチンを主要な細胞壁構成成分としている糸状菌は全てキチナーゼの基質となりうることから、大部分の病原糸状菌に対してキチナーゼの効果が期待でき、抗糸状菌スペクトルが狭い抗菌物質生産に比べて有利であること、②キチンは高等植物や高等動物には含まれておらず、キチナーゼはそれらに害を及ぼす心配がない等の利点が挙げられる。そのため今までに放線菌や *Trichoderma* 属糸状菌を接種することによる病害防除が検討され、現在では *Serratia marcescens* (腸内細菌) のキチナーゼ遺伝子を根圏細菌に導入したり、植物のキチナーゼ生産を増大させる試みがなされている。

しかし自然土壌で行われる糸状菌細胞壁分解を含めたキチン分解において、放線菌の働きが最も重要であると考えられているにも関わらず、放線菌の糸状菌細胞壁分解、キチナーゼ生産の調節、キチナーゼの酵素学的性質という一連の検討項目に関して、同一の菌株について研究を行った例はない。そこで本研究では土壌から単離したキチナーゼ生産能の高い放線菌を材料として用い、糸状菌細胞壁分解および分解の主体となるキチナーゼの生産調節、酵素学的性質について検討することによって、放線菌による糸状菌細胞壁分解のメカニズムについて総合的な知見を得ることを目的とした。また病原糸状菌に対して溶菌作用を行うために従来から病害防除に用いられている *Trichoderma* 属糸状菌は、宿主糸状菌の細胞壁を分解する際にキチナーゼを生産していることがわかっており、キチナーゼ生産について放線菌と

*Trichoderma*属糸状菌を比較することは、それぞれの微生物の糸状菌細胞壁分解の意義を考える上で重要であると考えられ、本研究の目的の一つとした。さらに土壌のキチナーゼ活性は、適当な測定法がなかったことから有意な情報がほとんどない。そのため土壌のキチナーゼ活性の測定法を開発し、自然土壌におけるキチナーゼの存在量および畑土壌におけるキチナーゼ生産の誘導について検討を行うこととした。

具体的検討項目

前述の目的に対して、本研究では具体的に以下の検討を行った。

- ①土壌中に存在する放線菌がどの程度キチナーゼを初めとする加水分解酵素を生産しているのかを明らかにする。
- ②糸状菌細胞壁分解能を有する放線菌を材料として用い、培養基質とキチナーゼ生産との関係、生産されるキチナーゼの特性について調べることにより、糸状菌細胞壁分解の機構の解明に資する。
- ③ *Trichoderma*属糸状菌について培養基質とキチナーゼ生産との関係を調べ、放線菌の場合と比較することにより、放線菌と *Trichoderma*属糸状菌の行う糸状菌細胞壁分解においてキチナーゼ生産の意義に関して違いがあるかどうかを明らかにする。
- ④感度が高く、簡便な土壌のキチナーゼ活性の測定法を開発する。
- ⑤森林土壌のキチナーゼ活性についてはほとんど報告されておらず、未知な点が多い。種々の森林土壌のキチナーゼ活性を測定し、自然土壌におけるキチナーゼの存在について知見を得る。
- ⑥土壌におけるキチナーゼの生産について、土壌への有機化合物添加と土壌のキチナーゼ生産の誘導について検討し、知見を得る。

以下、①、②については第2章で、③については第3章で、④、⑤、⑥については第4章で述べる。

第2章 放線菌によるキチナーゼ生産と糸状菌細胞壁の分解

放線菌は土壤微生物相を構成する代表的な微生物であり、土壤中に通常グラム当たり $10^5 \sim 10^6$ CFU存在していると考えられている。生物活性の観点から、産業的には抗生物質生産、自然界においてはセルロースやキチン、複合脂質などの難分解性物質の分解等の点で特徴付けられている。

この章では、土壤におけるキチナーゼ生産において、最も重要な役割を果たしていると考えられている放線菌を畑土壌分離菌株から選抜し、培養基質とキチナーゼ生産との関係、生産されるキチナーゼの酵素学的性質、また糸状菌細胞壁分解との関係について調べた。

2-1 各種土壌から分離された放線菌の各種菌体外酵素生産

土壌中には多種多様な有機物化合物が存在する。これは投入される有機物が多様であり、土壤生物や土壤酵素の働きにより様々な経路で分解された中間産物が蓄積したり、時にはそれらが合成を受け、粘土鉱物や金属と結合したり、酸化還元反応を受けたりして変化するからである。このような反応系の中でセルラーゼ、アミラーゼ、キチナーゼ、プロテアーゼ、ペクチナーゼ（ポリガラクトナーゼ）などの加水分解酵素は土壌において生物組織が分解される際の中心的役割を果たしている酵素であり、主に土壤微生物がこれらの分解酵素を菌体外に分泌し、その分解産物を代謝していると考えられている。多糖類はオリゴ糖を経て単糖まで分解され、タンパク質はアミノ酸にまで分解され微生物により吸収される。放線菌は代表的な土壌微生物であり、とりわけ畑土壌においては菌数も多く分布し、セルラーゼ、キシラーゼ等の各種菌体外加水分解酵素の代表的な生産微生物であることから、土壌

中の有機物分解に大きく寄与しているものと考えられている。しかし放線菌の単離はおもに抗生物質生産能を持つものを中心に行われており、生態学的見地から菌体外酵素生産を調べている研究は少ないといえる。ここでは土壌放線菌が行う有機物分解に関して知見を得ることを目的とし、各種土壌から分離された放線菌がどの程度の割合で各種加水分解酵素生産をしているかを調べた。

2-1-1 実験材料および方法

供試菌株

供試した放線菌517株は農林水産省農業環境技術研究所土壌微生物利用研究室に保存されている菌株を用いた（表2-1）。

放線菌の分離・同定

菌株の分離はエッグアルブミン培地、カゼインスターチ培地、キチン培地を用いて行われ、無作意に菌株が単離された(Miyashita et al., 1982; 宮下ら, 1983)。放線菌の同定は、ISP (International *Streptomyces* Program)の方法に準拠して行なわれた(Shirling and Gottlieb, 1966)。菌株保存用及び形態観察用の培地として培地7及び培地8を用いられた。100℃で15～20分間湯浴中で寒天を溶かし、試験管に分注した後オートクレーブで滅菌し、斜面培地として用いられた。炭素源資化能を調べるために培地9を用いられ、炭素源資化能の評価は、炭素源を加えてない培地における菌株の生育を-、グルコースにおける生育を++、グルコースより生育が劣るものを+、-よりわずかに生育しているものを±として行われた。生理学的試験のために培地10と培地11が用いられた。

表2-1 供試放線菌菌株リスト

分離源土壌	菌名	系統番号
東京都農業試験場		
コンポスト区 施用直前土壌	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	S-4, 6, 9, 10, 11(2), 12, 13, 15, 16, 18, 24, 42, 45
	未同定	S-3, 30, 40, 51, 53, 56
	<i>Streptomyces</i> sp.	S-1~56の残り
化学肥料区土壌	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	S-76, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 87, 88, 89, 91, 92, 97
	<i>Streptomyces erythraeus</i>	S-84
	<i>Nocardia</i> sp.	S-94, 98, 109
	未同定	S-71,
	<i>Streptomyces</i> sp.	S-71~113の残り
コンポスト区 施用直後土壌	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	S-128, 132, 147
	<i>Nocardia</i> sp.	S-146
	未同定	S-121, 122, 151, 153, 154, 158
	<i>Streptomyces</i> sp.	S-121~159の残り
千葉県農業試験場		
化学肥料区土壌	未同定	C-1~54
おがくず鶏糞堆肥区 施用直前土壌	未同定	C-101~168
おがくず鶏糞堆肥区 施用直後土壌	未同定	C-201~268
栃木県農業試験場		
12カ月おがくず 腐熟堆肥区土壌	未同定	U-130, 135, 136, 138, 139, 162
	<i>Streptomyces</i> sp.	U-101~162の残り
おがくず堆肥区土壌	未同定	U-244, 261, 265, 274, 275, 276
	<i>Streptomyces</i> sp.	U-201~277の残り
化学肥料区土壌	未同定	U-346, 347, 348, 349, 350, 358, 359, 360, 363, 364, 366, 367
	<i>Streptomyces</i> sp.	U-301~367の残り

放線菌の分離源土壌

供試した放線菌菌株は、東京都農業試験場、千葉県農業試験場、栃木県農業試験場の圃場から分離された。

各供試土壌の理化学性を表2-2に示した。土壌管理および作付については以下の通りである。東京都農業試験場（東京都立川市）は、試験場内の都市ごみコンポスト施用試験畑圃場を対象とした。都市ゴミコンポスト施用が土壌放線菌のフロラに及ぼす影響を調べるため、コンポスト施用直前（1979年8月16日）とコンポスト施用直後（8月22日）に土壌が採取された。また対照区として化学肥料区からも分離が行われた（8月16日）。コンポストの施用量は、10a 当たり毎作2.5tで4月上旬と8月中旬に施用され、すぐに鋤込まれていた。作物は4月から7月まではキャベツ、9月から12月まではレタスが栽培されていた。両区とも化学肥料を各作付け毎10a当たり、N 24kg（元肥14、追肥10）を硫酸で、 P_2O_5 17kg（元肥17）を過リン酸石灰で、 K_2O 15kg（元肥10、追肥5）を硫酸カリウムで施用していた。

千葉県農業試験場（千葉県千葉市）では、おがくず鶏糞堆肥施用区および化学肥料区から放線菌の分離が行われた。化学肥料区は1980年7月21日に採取され、おがくず鶏糞堆肥区からは、施用直前（7月21日）と施用直後（8月4日）の3種類の土壌から分離が行われた。各施用区とも化学肥料施用量は、NPKを成分で10a 当たり5kgずつであった。おがくず鶏糞堆肥は、10a 当たり毎作4t（年8t）施用されていた。栽培作物は春作がビール麦、秋作がニンジンであった。

栃木県農業試験場（栃木県宇都宮市）は、おがくず堆肥施用区、化学肥料施用区、12カ月おがくず腐熟堆肥施用区の3種類の土壌から放線菌が分離された。おがくず腐熟堆肥は重量で10%の稲ワラを混入し、炭素率25~30を目標に鶏糞及び石灰窒素を添加されていた。施肥量は両堆肥区とも10a 当たり毎年4tであり、化学肥料の施用量は10a 当たり窒素(K_2O)が30kg、リン酸(P_2O_5)30kg、カリウム(K_2O)40kgであった。

表 2 - 2 供試土壤の一般理化学性* (化学肥料区)

土壤	pH	全窒素 (%)	交換性塩基 (mg/100g 乾土)			土性
			CaO	MgO	K ₂ O	
東京都農試	6.81	0.38	362	38.0	16.7	Loam
千葉農試	7.40	0.26	756	166	32	Loam
栃木農試	6.5	0.28	588	588	153	Loam

a) 各農業試験場の調べによる。

各種菌体外酵素の生産試験

菌株を各種酵素生産検査のために調製した培地（後述）に接種し、30℃で5から14日間培養した後、コロニーの回りで培地中の基質が菌体外に生産された加水分解酵素によって分解され、透明になった部分（以下クリアゾーンと呼ぶ）の形成の有無及びその大きさを調べた。クリアゾーンが形成された場合を本実験では、酵素生産能陽性と判断した。また、クリアゾーンの大きさから生産量を半定量的に評価した。以下に各種菌体外酵素によるクリアゾーン形成の検出法を述べる。

キチナーゼ生産の検出は、Lingappaら(1962)の方法に準じて行った。キチン寒天培地（培地1）に菌株を接種し14日間培養して、クリアゾーン形成を調べた。クリアゾーンの幅（(クリアゾーンの半径) - (コロニーの半径)、以下同様）が5mm以上のものを++、5mm未満を+、わずかに確認されるものを±、全く確認されないものを-と評価した。

キチン培地の培養基質であるコロイド状キチンの調製は、粒子の大きさをできるだけ小さく、かつ均一で再現性のあるコロイド状キチンを得るために、Kuznetsov and Yangulova(1970)の方法を改良し、以下の手順で行った。5gのキチン粉末（カニ殻より調製されたもの、半井化学社製）に20mlのアセトンを加え全体を湿らせた後、500mlの氷冷した濃塩酸を加え、氷浴中で冷やしながらか全体がシロップ状になり、キチンが溶けるまで攪拌した。次にこのキチン溶液を2,000mlの冷水に攪拌しながら滴下し、粒子の粗いコロイド状キチンを生成させた。しばらく静置して上澄み液を除いた後、さらに遠心分離を行い、コロイド状キチンをポリカーボネート製の遠心管に集め、再び氷冷しながら濃塩酸を加えてコロイド状キチンを完全に溶かし、ガラスウール濾紙を備えたブフナーロートで減圧濾過を行った。濾液を再び冷水中に攪拌しながら滴下し、コロイド状キチンを生じさせた。静置後、沈澱したコロイド状キチンを遠心分離で集め、蒸留水でpHが4.5以上になるまで洗浄した。キチン濃度は、

乾燥重量を求めることにより求めた。

セルラーゼ生産の検出は、セルロース培地（培地2）に菌株を接種し、1週間培養した後、2mlの1%臭化セチルトリメチルアンモニウム水溶液を加えて、クリアゾーン形成を調べた。クリアゾーンの幅が15mm以上のものを++、15mm未満を+、わずかに確認されるものを±、全く確認されないものを-と評価した。

アミラーゼ生産の検出は、スターチ培地（培地3）に菌株を接種し、30℃で5～7日間培養した後、ルゴール液を加えてクリアゾーン形成を調べた。クリアゾーンの幅が20mm以上のものを++、20mm未満を+、わずかに確認されるものを±、全く確認されないものを-と評価した。ルゴール液は2gのヨウ化カリウムを10mlの蒸留水に溶かした後、ヨウ素1gを溶かし蒸留水を加えて300mlとして用いた。

プロテアーゼ生産の検出は、ゼラチン培地（培地4）に菌株を接種して5日間30℃で保温し、飽和硫酸アンモニウム溶液を加え、クリアゾーン形成を調べた。クリアゾーンの幅が10mm以上のものを++、10mm未満を+、わずかに確認されるものを±、全く確認されないものを-と評価した。

ペクチナーゼ生産の検出は、ペクチン培地（培地5）に菌株を接種し、5～7日間30℃で培養した後、1%臭化セチルトリメチルアンモニウム溶液を加えて、クリアゾーン形成を調べた。クリアゾーンの幅が5mm以上のものを++、5mm未満を+、わずかに確認されるものを±、全く確認されないものを-と評価した。

2-1-2 結果

各土壌から分離された放線菌の菌体外酵素生産割合

各土壌から分離された放線菌の菌体外酵素の生産割合を表2-3に示した。東京都農業試験場においては化学肥料区土壌、コンポスト施用区土壌から分離された放線菌

を用いた。コンポスト施用区土壌はコンポスト施用直前と施用7日後に分離された菌株を用いた。全土壌において全分離菌株(121菌株)に占める各酵素生産菌株の割合は、セルラーゼが78~91%、プロテアーゼが91~98%、アミラーゼが56~80%と極めて高い値を示した。それに対してキチナーゼは24~72%、ペクチナーゼは34~46%とやや低い割合となった。分離菌株は86%が*Streptomyces*属放線菌であり、*Nocardia*属は3%であった。各酵素生産菌株は、*Streptomyces*属放線菌の菌株が多かった。中でもプロテアーゼは、*Streptomyces*属放線菌の100%、セルラーゼも90%が生産していた。各処理区で比べてみるとプロテアーゼは処理区間で差が見られなかった。セルラーゼ、アミラーゼ、ペクチナーゼについてはコンポスト施用区のほうが化学肥料区に比べて生産菌株の割合が低く、コンポスト施用前と施用後では施用後の方が低かった。キチナーゼ生産割合は化学肥料区よりコンポスト施用区で高い割合を示したが、コンポスト施用直後は減少した。

千葉県農業試験場においても、化学肥料区、コンポスト施用区土壌から分離された放線菌を供試した。東京都農試の場合と同様に、セルラーゼ、プロテアーゼ、アミラーゼを生産する菌株の割合が高く、ペクチナーゼ生産菌株の割合は低くなっていた。また千葉農試の場合、セルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ陽性菌の割合は、コンポスト施用区で化学肥料区よりも高かった。特にコンポスト施用後はすべての酵素生産において施用前よりも生産菌株の割合が高くなっていた。

栃木県農業試験場の場合も、分離菌株のうち*Streptomyces*属放線菌の占める割合は高く、88%であった。セルラーゼ、プロテアーゼ、アミラーゼを生産する菌株の割合が高く、特にプロテアーゼ、アミラーゼについては、どの処理区においても92~97%と高い値を示した。しかし、キチナーゼ、ペクチナーゼについては他農試土壌の結果と同様に低い値を呈した。プロテアーゼ、アミラーゼについては各処理区内で差はみられなかった。セルラーゼ、ペクチナーゼ生産割合は化学肥料区が最も高か

表 2 - 3 各農業試験場の畑土壌から分離された放線菌の菌体外酵素生産割合 (菌株数)

土壌	キチナーゼ ^a		セルラーゼ ^a		プロテアーゼ ^a		アミラーゼ ^a		ペクチナーゼ ^a	
	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±
(東京都農業試験場)										
化学肥料区	20(57.1)	4 11	32(91.4)	0 3	33(94.3)	0 2	28(80.0)	0 7	16(45.7)	3 16
コンポスト施用前	33(71.7)	5 8	38(82.6)	2 6	42(91.3)	1 3	36(78.3)	1 9	18(39.1)	6 22
コンポスト施用後	10(24.4)	10 21	32(78.0)	1 8	40(97.6)	0 1	23(56.1)	0 18	14(34.1)	2 25
(千葉県農業試験場)										
化学肥料区	測定せず		32(61.5)	3 17	37(71.2)	3 12	41(78.8)	3 8	26(50.0)	2 24
コンポスト施用前	測定せず		50(73.5)	1 17	59(86.8)	1 8	57(83.8)	3 8	31(45.6)	0 37
コンポスト施用後	測定せず		61(89.7)	3 4	65(95.6)	0 3	61(89.7)	2 5	42(61.8)	1 25
(栃木県農業試験場)										
化学肥料区	34(50.7)	11 22	55(82.1)	2 10	63(94.0)	1 3	64(95.5)	0 3	51(76.1)	0 16
おがくず施用区	43(56.6)	20 13	59(77.6)	0 17	73(96.1)	2 1	73(96.1)	0 3	51(67.1)	0 25
12カ月腐熟堆肥施用区	31(50.8)	13 17	45(73.8)	0 16	59(96.7)	1 1	56(91.8)	2 5	35(57.4)	0 26

a) + : 生産(++を含む)、± : 判定困難、- : 非生産

った。おがくず施用区と12カ月腐熟堆肥施用区を比較すると、腐熟堆肥区の方がキチナーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、ペクチナーゼ生産割合が低かった。

本研究においてキチナーゼ生産の検討は、キチン寒天培地で培養し、14日目に生じているクリアゾーンからキチナーゼ生産を評価することにより行ったが、さらに1ヵ月以上培養すると、キチナーゼを生産しないと考えられた菌株のコロニーの下面が僅かに透明になっている場合があり、最終的にどの処理区においても分離菌株の90%以上がキチナーゼ生産能を有していることになった。

以上に述べた3農試の各土壌における結果を比較すると、全ての供試土壌においてセルラーゼ、プロテアーゼ、アミラーゼを生産する菌株の割合が高く、キチナーゼ、ペクチナーゼ生産菌株の割合はそれよりも低かった。土壌間及び同じ土壌での処理区間で、各酵素生産菌株の割合はそれぞれ違いがみられたが、総合してみると、一定した傾向は必ずしも認められなかった。

2-1-3 考察

放線菌の加水分解酵素生産割合について

調査した加水分解酵素の中で生産割合が高かった順に並べると、プロテアーゼ、アミラーゼ>セルラーゼ>キチナーゼ、ペクチナーゼのようになり、全体的に高頻度に加水分解酵素を菌体外へ生産していた。この傾向は土壌の種類や有機物施用の違いに関わらず、ほとんどの畑土壌においてみられた。このことは畑土壌に生息する放線菌は元来多種類の加水分解酵素生産能力を有していることを示唆している。とくにプロテアーゼ、アミラーゼ生産は、ほとんどの土壌において分離菌株の80~98%が生産しており、畑土壌に生育する放線菌にはタンパク質やアミロースの資化能力を有することが重要であることが示唆される。

本研究では畑土壌から分離された放線菌のプロテアーゼ、アミラーゼ、セルラーゼを生産割合を調べたが、和田・石沢(1980)は海岸及び湖岸砂地などの自然土壌から放線菌を分離し、プロテアーゼ、アミラーゼ、セルラーゼの生産割合を調べている。彼らによれば、草生地から分離された放線菌は本研究同様、高い割合でアミラーゼとセルラーゼを生産したが、プロテアーゼ生産割合はどの土壌においても8~30%程度と低く、アミラーゼやセルラーゼにしても松林土壌では、4~30%と低い割合であったと報告している。このように自然土壌においては加水分解酵素生産能力は必ずしも高くなく、本研究で行った畑土壌での結果と相違がみられた。このような違いが生まれた主な原因は、放線菌のフロラが異なっていたためであると考えられる。すなわち、畑土壌から分離された放線菌は、多くの加水分解酵素を生産すると考えられる *Streptomyces* 属放線菌が約90%を占めており、自然土壌から分離された放線菌には *Streptomyces* 属が少なかったことが原因であると考えられる。土壌耕起の効果については、放線菌のアミラーゼの生産割合が増加したり (Ishizawa and Araragi, 1976)、土壌のアミラーゼ (Haben, 1966, 1967)、セルラーゼ活性 (Karamshuk, 1975)が増加するなどの報告がある。

放線菌のキチン生産能は、キチン寒天培地においてクリアゾーンを形成することにより判断した。キチン寒天培地は通常 *Streptomyces* 属放線菌を特異的に分離するための選択培地として用いられている (Lingappa and Lockwood, 1962; Baxby and Gray, 1968; Hsu and Lockwood, 1975)。それはキチン分解活性が *Streptomyces* 属放線菌の重要な特徴となっているからである (Skinner and Dravis, 1937; Veldkamp, 1955; Williams and Robinson, 1981)。本研究に供試した放線菌は畑土壌から分離されたものであり、その約90%以上が *Streptomyces* 属放線菌であった。また表2-3に示した分離放線菌のキチナーゼ生産割合は24~72% (14日間培養) であったが、さらに長時間培地を保温するとコロニーの下面が透明になっており、最終的に約90%の放線

菌がキチナーゼ生産能を有していた。このようなことから、土壌放線菌のキチナーゼ生産は生産量において相当の差異があるが、大部分の放線菌がキチナーゼ生産能を有していることを示唆している。そして *Streptomyces* 属放線菌のほとんどがキチナーゼを生産するという見解と一致したと言える。

土壌放線菌のペクチナーゼ生産割合についての知見はほとんどない。本実験では分離放線菌の34~76%がペクチナーゼを生産することが示されており、他の酵素に比べて低い生産割合であることは注目される。

有機物添加が土壌放線菌の加水分解酵素生産割合に及ぼす影響

一般に特定の有機物を土壌に施用すると、その有機物を分解、資化しやすい微生物が増殖し、土壌微生物相の優先種になり得ると考えられる。放線菌においても土壌の優先種となり得る菌株は、利用できる基質のスペクトラムが広いことが大きな要因と考えられている (Kuster, 1976)。そして、セルロースやキチンなどのような比較的難分解といわれる有機物を施用したときほどその傾向が強くなると考えられる。この意味において、有機物を施用することにより、特定の加水分解酵素を生産する微生物相に変化することが考えられた。本研究において畑土壌から分離された放線菌は、高い割合でプロテアーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、ペクチナーゼを生産する能力を有し、各処理区において過半数の放線菌がこれらの加水分解酵素を生産することがわかったが、有機物添加による一定の傾向は特に見られなかった。土壌や土壌管理の違いよりもむしろ、各加水分解酵素間での差異が見られたと言える。土壌に有機物を施用した場合には、放線菌を含めた土壌微生物が有機物を分解し増殖すると考えられるが、本研究のように高い割合で加水分解酵素を生産する放線菌が放線菌菌相を占有する場合には、有機物添加による加水分解酵素の生産割合の変化は見られにくいと考えられる。また一定の傾向は見られなかった

が、土壌や土壌管理の違いにより、そこに棲息する放線菌の加水分解酵素生産割合は異なっていた。有機物施用以外の要因も放線菌の加水分解酵素生産割合を決定しているものと考えられる。

2-2 キチナーゼ産生能の高い放線菌菌株の選抜と同定

放線菌のキチナーゼ生産および糸状菌細胞壁の分解を調べるための材料を得ることを目的として、2-1で得られた分離菌株の中から選抜、同定を行った。選抜の基準は、糸状菌細胞壁分解酵素であるキチナーゼ、 β -1,3-グルカナーゼを大量に生産すること、より多くの種類の加水分解酵素生産能を有していることの2つとした。多くの加水分解酵素生産能を有していることを選抜基準に加えた理由は以下の通りである。①数は限られてくるが、病原糸状菌の中には細胞壁中にセルロースを多く含む卵菌類(Wessels and Sietsma, 1981)、セルロース-グリコーゲン結合体を多く含む *Dictyostelium* 属、*Acytostelium* 属、*Polysphondylium* 属などが存在する。従って、より多くの病原糸状菌に対して溶菌作用を行う可能性を広げるためにはアミラーゼなども必要と考えられる。②糸状菌細胞壁表面にはタンパク質が結合し、細胞壁分解酵素の働きかけを妨害する可能性がある。プロテアーゼはこの付着タンパク質を分解し、その結果として細胞壁分解酵素が作用し易くなることが予想される。③糸状菌細胞壁分解に限らず土壌中に存在する種々の有機物の分解についても応用の可能性がある。④放線菌の菌体外酵素生産の機構を明らかにする際、各酵素の生産調節のメカニズムを解明する必要がある。このためには実験材料として複数の酵素を生産する菌株が必要である。

2-2-1 実験材料および方法

供試菌株

前節で供試した放線菌菌株のうちキチナーゼ産生能が高く、多くの加水分解酵素を生産する菌株を10菌株選抜し用いた。即ち東京都農業試験場からの分離菌株を7菌株（S-1, S-15, S-19, S-76, S-83, S-84, S-136）、そして栃木県農業試験場からの分離菌株を3菌株（U-216, U-217, U-271）供試した。

菌体外酵素産生能の高い菌株の選抜

供試した10菌株について再度キチン寒天培地（培地1）を初めとする各種寒天培地に接種して培養し、クリアゾーンの形成を調べた。形成されたクリアゾーンの大きさから各菌株の各加水分解酵素生産量を判定し、各酵素産生能の高い菌株を選抜した。ここでは前節で調べた各酵素の他に、 β -1,3-グルカナーゼ生産についても検討した（培地6）。 β -1,3-グルカナーゼ生産能の判定はクリアゾーンの幅が10mm以上のものを++、10mm未満を+、わずかに確認されるものを±、全く確認されないものを-と評価した。

放線菌菌株の同定

放線菌の同定は2-1-1に記述した方法と同様に行った。

2-2-2 結果

菌体外酵素高生産菌株の選抜

予め選抜した10菌株のキチナーゼ生産菌株の加水分解酵素生産を表2-4に示した。

表 2 - 4 放線菌 10 菌株の菌体外酵素生産

菌株 ^{a)}	キチナーゼ ^{b)}	β -1,3-グルカナーゼ ^{b)}	セルラーゼ ^{b)}	プロテアーゼ ^{b)}	アミラーゼ ^{b)}	ペクチナーゼ ^{b)}
S- 1	+	-	++	+	++	+
S- 15	++	-	+	+	+	-
S- 19	+	-	++	++	+	-
S- 76	++	+	++	+	+	-
S- 83	+	±	++	+	++	+
S- 84	++	++	++	++	++	+
S- 136	++	±	++	+	+	-
U- 216	+	+	±	+	-	-
U- 217	+	+	+	+	+	-
U- 271	++	+	+	+	+	-

a) S : 東京都農業試験場から分離された。U : 栃木県農業試験場から分離された。

b) ++ : 高生産、+ : 生産、± : 判定困難、- : 非生産



写真 2 - 1 *Streptomyces erythraeus* S-84株をキチン寒天培地に
接種したときに生じたクリアーゾーン（接種 1 週間目のもの）
中央の黒色のコロニーの回りに白く抜けたクリアーゾーンが見える。

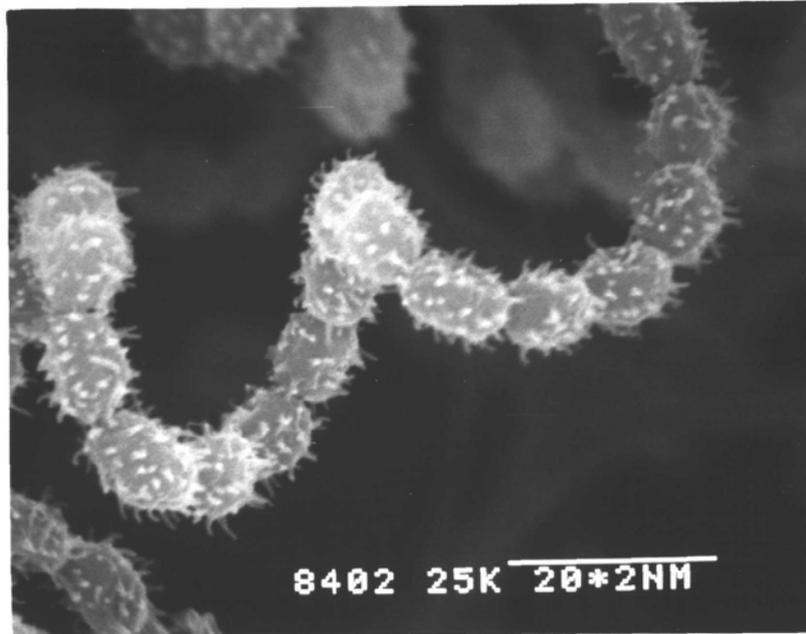


写真 2 - 2 *Streptomyces erythraeus* S-84株の孢子鎖の

走査型電子顕微鏡写真

バーの長さは $2 \mu\text{m}$ を示す。

表 2 - 5 S-84株の形態学的及び生理学的性質

気中菌糸色	赤～褐色	
孢子鎖	ラセン状	
孢子表面	とげ状	
メラニン生成	培地6 (ISP)	-
	培地7 (ISP)	-
炭素源資化能*	サリシン	+
	アラビノース	++
	シュクロース	+
	キシロース	+
	イノシトール	±
	マンニトール	++
	フラクトース	++
	ラムノース	++
	ラフィノース	+
	ガラクトース	+
菌体外酵素生産能*	キチナーゼ	++
	β -1,3-グルカナーゼ	++
	プロテアーゼ	++
	セルラーゼ	++
	ペクチナーゼ	+
	アミラーゼ	++

a) ++ : 高活性を示した。 + : 活性あり ± : 判定困難
 - : 活性示さず。

その結果、セルラーゼ、プロテアーゼ、アミラーゼを大量に生産している菌株は多かったが、 β -1,3-グルカナーゼ、とペクチナーゼをともに大量に生産している菌株は少なかった。しかしその中で、S-84株はキチナーゼ（写真2-1）、 β -1,3-グルカナーゼはもちろんのことセルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼも大量に生産していることが確認された。S-84株は東京都農業試験場の化学肥料施用区から分離された菌株である。以下の実験はS-84株を用いることとした。

菌株の同定

写真2-2にS-84株の孢子鎖の電子顕微鏡写真を示した。また表2-5にS-84株の形態学的、生理学的性質を示した。これらの結果から、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology第8版により、S-84株は*Streptomyces erythraeus*に属することが判明した。

2-2-3 考察

S-84株と同程度にキチナーゼを大量に生産する菌株は、供試菌株の中にいくつか見られた。しかし、 β -1,3-グルカナーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、ペクチナーゼも生産する菌株は限られた。供試した10菌株中S-84株は、とりわけ β -1,3-グルカナーゼ活性が高く糸状菌細胞壁分解活性が高いことが予想される。

2-3 培養基質がキチナーゼ生産に与える効果

放線菌のキチナーゼは誘導酵素であることが多くの研究者によって報告されている。即ち土壤中の放線菌は環境中の誘導物質の存在を感知し、その結果キチナーゼの生産を開始する。しかしキチンは水に対して不溶性であるため放線菌が直接的に

キチンの存在を感知するとは考え難く、そこに何らかのメカニズムが存在すると考えられる。キチンと同様に不溶性多糖であり、環境中に大量に存在するセルロースの場合には、そのメカニズムは以下のように考えられている。①微生物が常に極微量のセルラーゼを構成的に生産、分泌する。②その微生物の近傍にセルロースが存在すると、構成的に生産された少量のセルラーゼにより分解され分解産物（水溶性の低分子加水分解産物）が生じる。③その分解産物を微生物が感知し、大量にセルラーゼの生産を開始する（誘導的生産）。

キチンにおいても同様のメカニズムが考えられているが、研究例は少ない。そこで、分離放線菌 *Streptomyces erythraeus* S-84株のキチナーゼ生産がどのような培養基質によって誘導され、また抑制されるかを調べた。

2-3-1 実験材料および方法

供試菌株

キチナーゼ生産を検討する放線菌菌株として *Streptomyces erythraeus* S-84株を用い、糸状菌細胞壁を調製するために *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* NIAES 5115株および *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 5117株を用いた。

キチナーゼ生産の誘導

ステンレス製（半径10mm）スプリングの入った三角フラスコに30mlの無機塩培地（培地12）を加え、オートクレーブで殺菌後、0.3%濃度の基質を無菌的に加えた。基質として、糸状菌細胞壁、コロイド状キチン、カルボキシメチルセルロース、キシラン、 β -1,3-グルカン、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、グルコサミン、グルコース、フラクトース、キシロース、アラビノース、グルタミ

ン酸ナトリウム、ピルビン酸ナトリウムを用いた。この他に完全培地としてLB培地（培地13）を用いた。以上の培地にS-84株を接種し、適当な時間をおいて培養液を採取し、遠心分離を行い、上澄液のキチナーゼ活性およびタンパク質濃度を測定した。コロイド状キチンの調製法は2-1-1に記述した。

糸状菌細胞壁の調製

病原糸状菌の細胞壁調製は、Tsujisakaら(1973)の方法に準じて行った。使用した菌株は、*Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* NIAES 5115株（サツマイモつる割れ病病原菌）と*F. oxysporum* f. sp. *cucumerunum* NIAES 5117株（キュウリつる割れ病病原菌、色素生産菌株）であり、糸状菌培養用培地（培地15）200mlにそれぞれ接種し、30℃で2日間振盪培養した。培養液を2枚のガーゼで濾過し、菌体を採取して250mlの蒸留水に希釈した後、超音波処理（Ultrasonic社製、20kHz、200W、10分間）を行った。その後蒸留水で3回洗浄し遠心分離（16000rpm、4℃、10分間）した後、100mlのアセトンで3回洗浄した。このとき100mlの蒸留水で懸濁し、遠心分離を行い、上澄液の蛋白質含量を測定（後述）したところ、検出限界以下（5μg/ml）であった。また光学顕微鏡で細胞壁を観察し（800倍）、細胞内容物が放出されていることを確認した。その後100mlのエチルエーテルに懸濁し、1時間攪拌し、遠心分離で上澄を除去し、真空デシケーター内で乾燥させた。

キチナーゼ生産の促進および抑制

ステンレス製スプリングの入った500ml容三角フラスコに150mlのキチン培地を入れ、滅菌後S-84株を接種した。48時間培養した後（対数増殖初期）、培養液を同じくスプリングの入った50ml容三角フラスコに20mlずつ無菌的に分注し、キチナーゼ生産に影響を与えると考えられる種々の基質（カルボキシメチルセルロース、キシ

ラン、 β -1,3-グルカン、N-アセチルグルコサミン、グルコサミン、キシロース、グルコース、フラクトース、グルタミン酸ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム)を濃度を変えて加えた。その後30℃で振盪培養をしながら、経時的に培養液を採取し、キチナーゼ活性を測定した。

キチナーゼ活性測定

キチナーゼ活性測定は、Robbinsら(1988)の方法を若干改良して行った。基質としてN-アセチルグルコサミン(N-acetyl- β -D-glucosamine)のオリゴマー(2糖と3糖)の還元末端に蛍光色素である4-methylumbeliferon(以後4-MUと略す)が結合したものをを用いた。即ち4-MU-N,N'-diacetylchitobioside、4-MU-N,N',N"-triacetylchitotrioside(以後それぞれ4-MU-2糖、4-MU-3糖と略す; Sigma Chemical Co. Ltd., St. Louis MO, USA)を用いた。測定の原理はキチナーゼがこれらの基質に作用することにより、糖鎖と4-MUの間のグリコシド結合が加水分解され、遊離した4-MU量を蛍光光度計で測定するというものである。尚、N-アセチルグルコサミンの還元末端に4-MUが結合した4-MU-N-acetyl- β -D-glucosamine(以下4-MU-単糖と略す)を基質として用いることにより、N-アセチルグルコサミニダーゼの測定も行った。

キチナーゼおよびN-アセチルグルコサミニダーゼ活性測定の手順を以下に述べる。試験管に基質(100 μ Mの4-MU-単糖あるいは60 μ Mの4-MU-2糖、25 μ Mの4-MU-3糖)を1,800 μ l、0.1M Tris-HCl(pH 6.8)を100 μ l入れ湯浴中で37℃で予め保温した後、100 μ lの酵素試料を加えることによって反応を開始した。適当時間(通常5分~30分)反応させた後、1mlの0.1M K_2HPO_4 -NaOH(pH 11.0)を加えることにより反応を停止させ、酵素反応によって遊離された4-MUの蛍光の強度を励起光を360nm、吸収光を450nmとして蛍光光度計((株)日本光学工業製、FP-550)で測定した。蛍光強度を予め用意した検量線を用いて4-MU量に換算した。酵素活性の単位(1Unit)は1分間に

1 μ moleの4-MUが放出されるとき酵素活性とした。

この反応系における酵素活性測定の最高感度は0.01 mUnit/ml程度であり、4-MU量としては、10 μ mole/試験管 までの測定が可能であった。また4-MUの蛍光は安定であり、反応停止後2時間以上放置しても蛍光強度は変化しなかった。

タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度はBCA (bicinchoninic acid)法を用いた(Smith et al., 1985)。測定はタンパク質測定キットをPierce Co. Ltd. (Rockford, IL, USA)から購入して用いた。検量線作成のための標準タンパク質としてエッグアルブミンを使用した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

タンパク質試料は、培養液1mlをプラスチック製試験管にいれ、減圧濃縮用遠心分離器(大洋科学工業社製)により50 μ lまで濃縮することによりタンパク質試料とした。電気泳動用の試料は、タンパク質試料あるいは標準タンパク質溶液に20%容の0.5M Tris-HCl(pH 6.8)、32%容の10%SDS、8%容の2-メルカプトエタノールを加えて100°Cで3分間加熱することにより調製した。電気泳動槽はBio-Rad社製Protean IIシステムを用いた。また電気泳動ゲルの調製は、堀尾と山下(1981)の成書に準じて行い、分離ゲルのアクリルアミド濃度を12.5%、ラウリル硫酸ナトリウム(以下SDSと略す)濃度を0.1%とした。標準タンパク質としてMW-MARKER PROTEINS(オリエンタル酵母社製、分子量 12,400、24,800、37,200、49,600、74,400のタンパク質を含む)を用いた。泳動は試料が濃縮ゲルを流れているときは15mA/ゲル、分離ゲルを流れ始めたときから25mA/ゲルに電流を設定した。染色は0.25% Coomassie Brilliant Blue R-250溶液(エタノール:酢酸:蒸留水=9:2:9(v/v/v))に3時間以上浸漬することにより行い、脱色はエタノール:酢酸:蒸留水混合液(25:8:65(v/v/v))を用い、固

定液としてメタノール：酢酸：蒸留水混合液（10:15:175(v/v/v)）を用いた。

2-3-2 結果

各種培養基質によるキチナーゼ生産の誘導

S-84株を種々の培養基質で培養し、キチナーゼ生産の誘導について調べた。S-84株は各培養基質を利用して良好に生育した。糸状菌細胞壁とコロイド状キチンを基質とした場合、有意にキチナーゼ生産が誘導された（表2-6）。糸状菌細胞壁とコロイド状キチンを比べた場合、糸状菌細胞壁の方が、2種類の植物病原性糸状菌（NIAES 5115株とNIAES 5117株）の細胞壁のどちらにおいても、コロイド状キチンよりキチナーゼ活性は早く増加した。2つの細胞壁の分解およびキチナーゼ生産を比べるとNIAES 5115株の方がNIAES 5117株より細胞壁粒子が早く消失し、キチナーゼ生産も早く高くなった。

N-アセチルグルコサミン、LB培地、キシロース、N-アセチルガラクトサミンを培養基質としたときは、培養時間とともにキチナーゼ活性は緩やかに増加したが、糸状菌細胞壁やキチンを基質としたときに比べて、同程度の低いキチナーゼ活性を示した。表2-6には示さなかったが、アラビノース、カラボキシメチルセルロース、ピルビン酸ナトリウム、グルタミン酸ナトリウムを培養基質にしたときのキチナーゼ生産は、ほぼキシロース程度であった。フラクトース、グルコースを基質とした場合は、培養全時期を通して、微少な活性しか検出されなかった。

各種培養基質をキチンでの培養に添加したときのキチナーゼ生産の変化

次にS-84株をキチン培地で培養し、キチナーゼを誘導生産させている途中に各種基質を加え、それらがキチナーゼの生産に与える影響を調べた（表2-7）。N-アセチ

表 2-6 各種炭素源で培養したときにおける *Streptomyces erythraeus* S-84 株のキチナーゼ生産

培地中の炭素源・ あるいは培地	キチナーゼ活性 (mUnit/ml)					
	4-MU-2 糖分解活性		4-MU-3 糖分解活性		培養時間 (時間)	
	3 3	7 2	3 3	7 2	3 3	7 2
糸状菌細胞壁 NIAES 5115 ^b	1 3 9	4 8. 5	2 4 6	8 1. 9		
5117 ^c	5 1. 2	4 0. 9	8 7. 2	6 8. 7		
コロイド状キチン	1 0. 4	4 8. 5	1 9. 9	8 1. 5		
N-アセチルグルコサミン	3. 0 8	3. 1 5	5. 0 3	5. 8 8		
グルコサミン	2. 6 5	3. 5 5	4. 3 4	5. 9 1		
L B 培地	2. 2 6	2. 4 3	3. 9 6	4. 6 3		
キシロース	1. 1 8	1. 8 0	1. 9 9	3. 1 1		
N-アセチルガラクトサミン	0. 9 2	1. 1 0	1. 6 5	2. 2 1		
フラクトース	0. 3 0	0. 4 5	0. 5 1	0. 7 8		
グルコース	0. 1 3	0. 1 4	0. 2 2	0. 2 6		

a) 各種炭素源を終濃度 0.3% になるように無機塩培地に加えた。

b) *Fusarium oxysporum* f. sp. *bataias* NIAES 5115

c) *F. oxysporum* f. sp. *cucumerim* NIAES 5117

ルグルコサミンを培養の途中に加えると、加えない場合に比べて添加26時間後には10倍程度活性が高くなった。一方グルコースをキチンの培養途中に加えた場合、キチナーゼ活性は無添加の場合に比べて極端に低く、グルコースがキチナーゼ生産を強力に抑制していることが示された。 β -1,3-グルカンを添加することによっても、若干キチナーゼ活性は低くなった。ピルビン酸、カルボキシメチルセルロース、キシロース、グルタミン酸ナトリウム、キシランを添加した場合は、無添加に比べてキチナーゼ活性の増加あるいは現象がみられたが、N-アセチルグルコサミンやグルコース添加の場合ほど顕著ではなかった。

培養基質の添加濃度がキチナーゼ生産に与える効果と培養液のタンパク質構成

表2-7においてN-アセチルグルコサミン添加はS-84株のキチナーゼ生産に対して顕著な促進的効果を、またグルコース添加は顕著な抑制的効果をもたらすことが示された。さらにフラクトースを唯一の培養基質とした場合、グルコースと同程度の低い活性であった(表2-6)。そこでこれらの培養基質について表2-7と同じ条件で基質添加実験を行い、添加濃度だけを変化させ、キチナーゼ生産と添加濃度との関係について調べた(表2-8)。グルコサミンは今までの結果からS-84株のキチナーゼ生産に対して影響の少ない培養基質と考えられ、他の培養基質との比較のために検討した。

N-アセチルグルコサミンを添加した場合は表2-7にも示されたように無添加のコントロールに比べて各添加濃度において高い活性がみられ、キチナーゼ生産が促進されていると考えられる。グルコサミンを添加した場合には、どの濃度においても無添加より僅かに高いが、ほぼ同等の活性を呈し、キチナーゼ生産には影響を与えない培養基質と言える。フラクトースを添加した場合は、添加濃度によってキチナーゼ生産に変化がみられた。フラクトースを終濃度0.3%になるように添加した場合は、

表2-8 *Streptomyces erythraeus* S-84株をキチン培地で培養している途中に種々の濃度の培養基質を添加したときの培地中のキチナーゼ活性*

添加基質	濃度 (%)	キチナーゼ活性(mUnit/ml)	
		4-MU-2 糖分解活性	4-MU-3 糖分解活性
無添加	-	18.4	28.3
N-アセチルグルコサミン	0.3	29.1	50.0
	0.1	25.8	43.4
	0.05	29.8	50.7
グルコサミン	0.3	20.0	34.5
	0.1	19.3	31.9
	0.05	18.1	32.3
フラクトース	0.3	20.6	34.1
	0.1	28.3	46.1
	0.05	29.6	50.0
グルコース	0.3	6.5	11.0
	0.1	7.0	11.1
	0.05	40.8	72.1

a) キチン培地に *Streptomyces erythraeus* S-84株を接種し、48時間培養した後、種々の基質を添加して培養を続け、基質添加後41時間目の培養液のキチナーゼ活性を測定した。

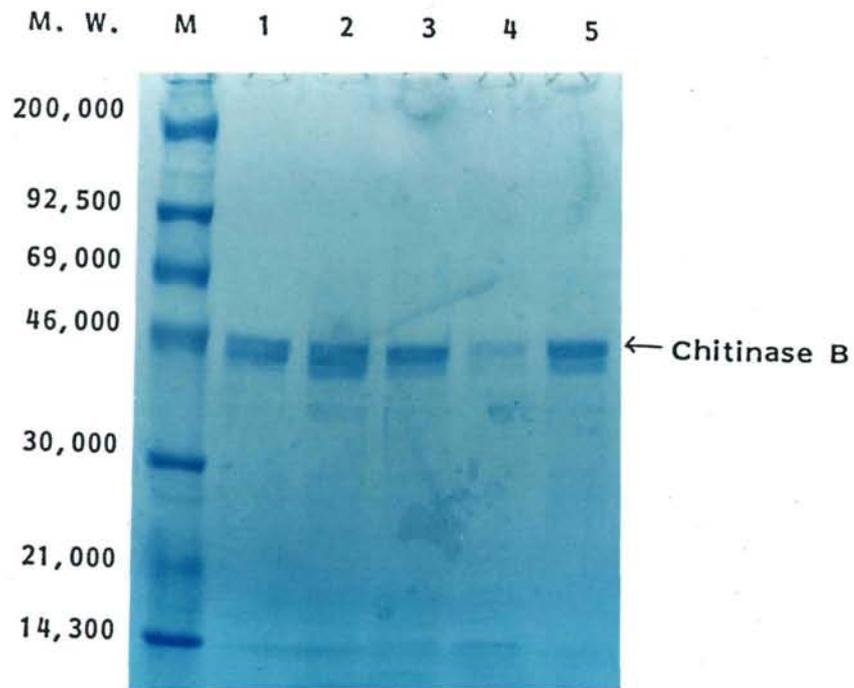


写真 2 - 3 *Streptomyces erythraeus* S-84株をキチン培地で培養している
途中に各種炭素源を添加し培養したときの培養液のSDS-ポリアクリルアミド
ゲル電気泳動

M, 分子量マーカー（標準タンパク質）； 1, 無添加； 2, 0.3% N-アセチルグルコ
サミン添加； 3, 0.3% フラクトース添加； 4, 0.3% グルコース添加；
5, 0.3% グルコサミン添加

無添加と同程度の活性がみられたが、添加濃度を0.1%、0.05%と減少させるにしたがって、キチナーゼ活性の増加がみられた。このことによりフラクトースは高濃度で存在すると、キチナーゼの生産に対して弱い抑制作用を持つことが示された。グルコース添加の場合、添加濃度によってキチナーゼ生産に与える効果はフラクトースの場合よりさらに顕著に変化した。すなわち添加濃度が0.3%および0.1%のときは、共に無添加の活性の3分の1程度しか生産されておらず、有為なキチナーゼ生産抑制が確認された。しかし、添加濃度を0.05%にしたときには無添加の2倍以上の活性が確認され、抑制作用は働かず、むしろグルコースがキチナーゼ生産に対して促進的に作用した。

表2-8の実験において、基質を0.3%添加したときの培養液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の試料として供試し、結果を写真2-3に示した。無添加（コロイド状キチンのみ）の時は培地中のタンパク質のほとんどはキチナーゼ（chitinase B, 2-4で詳述する）であった。その他N-アセチルグルコサミン、フラクトース、グルコサミンを添加しても同程度の濃さのキチナーゼバンドが見られた。しかし、グルコースを添加したときに限り、キチナーゼのバンドが薄くなっていた。このようにグルコースの添加によるキチナーゼ生産の抑制はchitinase B生産が抑制されるためであることが示された。

キチナーゼ生産の抑制に対するcAMP添加の効果

S-84株のキチナーゼ生産はグルコース添加によって顕著に抑制されることが示された。そこでグルコースと同時にcAMP(cyclic adenosine-3',5'-monophosphate)も添加し、抑制が解除されるか否かを検討した。抑制が解除された場合、cAMP関与のカタボライト抑制であると推定される。表2-9にその結果を示したが、cAMP添加によってグルコースによるキチナーゼ生産の抑制は解除されなかった。

表 2 - 9 種々の炭素源による *Streptomyces erythraeus* S-84株の
キチナーゼ生産の抑制およびcAMPの効果

添加基質	cAMP添加 (0.3%)	キチナーゼ活性 (相対値%)	
		4-MU-2 糖分解活性	4-MU-3 糖分解活性
無添加	-	100	100
	+	104	109
グルコース	-	69.5	72.0
(0.3%)	+	70.7	75.8
	-	74.4	76.5
フラクトース	-	98.8	103
(0.3%)	+	93.9	98.5

各培養基質のキチナーゼ生産に対する誘導効果

本研究において有意にキチナーゼ生産を誘導したと考えられたものは糸状菌細胞壁とキチンであった。カルボキシメチルセルロース、キシラン、 β -1,3-グルカン、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、グルコサミン、キシロース、アラビノース、グルタミン酸ナトリウム、ピルビン酸ナトリウムを培養基質とした場合、キチンや糸状菌細胞壁の場合に比べて有意に活性は低いが、培養時間とともに緩やかにキチナーゼ活性が増加し同程度の活性を呈した。これらの活性のレベルは、誘導的生産が行われたとは考え難く、S-84株の増殖に伴う構成的生産のレベルであると考えられる。グルコースやフラクトースを唯一の培養基質とした場合には、S-84株は良好に生育したが、キチナーゼ活性は構成的生産レベルを下回っていると考えられ、これらの培養基質はキチナーゼの構成的生産に対して抑制効果をもつと考えられる。

N-アセチルグルコサミンはキチンの構成糖であるため、キチナーゼ生産を誘導することが予想されたが、糸状菌細胞壁やキチンほどの強力な誘導効果は確認できなかった。キチナーゼ生産を誘導する物質については研究が少ないが、細菌(Monreal and Reese, 1969; Yabuki et al., 1986)、放線菌(Reynolds, 1954; Tiunova et al., 1976; Tominaga and Tsujisaka, 1976)のキチナーゼ生産はキチンによって誘導されることが見いだされている。Reynolds(1954)は *Streptomyces* 属放線菌の菌株のキチナーゼ生産条件を調べており、グルコース+アスパラギン酸、N-アセチルグルコサミン、キチンを基質として培養した結果、キチナーゼ生産を誘導したものはキチンだけであったと報告している。*Serratia marcescens* のキチナーゼ生産の場合、やはりキチンによって強力に生産が誘導されており、N-アセチルグルコサミ

ンや α -D-グルコースペンタ酢酸、シュークロースモノパルミチン酸等によっても微弱な活性が検出されたと報告されている(Monreal and Reese, 1969)。本研究においてもN-アセチルグルコサミンを基質とすることにより微量のキチナーゼが生産されることが示されており、この結果と一致している。*Bacillus megaterium*のキチナーゼ生産条件についてはBennett and Hood(1980)が詳細に調べている。彼らによるとキチンによってやはり強力にキチナーゼ生産が誘導されるが、グルコサミンによってもキチンの場合の2分の1程度の生産が誘導されたと報告している。その他に酵母エキス、セルロース、セロビオース、N-アセチルグルコサミン、キトサン、キトビオースを基質とした場合キチナーゼ活性は全く検出されず、これらの基質ではキチナーゼ生産が誘導されないとしている。また彼らは培養液にガラスビーズを添加し、適当な速度で振盪させることによりキチナーゼ生産を増大させることができたことを報告しており、これは振盪効果の増大により培地への酸素供給が増大したためと考察している。このようにキチンによってキチナーゼ生産が強力に誘導されたと報告するものが大部分であるが、糸状菌の中にはキチン以外の基質を用いることによって大量のキチナーゼを生産する菌株も報告されており(Vessey and Pegg, 1973; Ishikawa et al., 1981)、細菌や放線菌のキチナーゼ生産調節機構とは異なる機構が働いている可能性が示唆される。

糸状菌細胞壁を培養基質としたときのキチナーゼ生産

糸状菌細胞壁を基質としたときキチナーゼ生産が早期に行われ、最大であった。コロイド状キチンよりも活性が高かった理由としては次のことが考えられる。①糸状菌細胞壁中に存在するキチン以外の物質がキチナーゼの生産を促進した、②コロイド状キチンはカニ殻由来でありキチン繊維が密に集束しているためキチナーゼの作用部位が比較的少ないと考えられるが、それに対して糸状菌細胞壁中のキチンは

比較的キチナーゼが作用し易い繊維構造をとっていた等の可能性が考えられる。

糸状菌細胞壁を培養基質とするとキチナーゼは誘導的に生産されたが、糸状菌の種類によって、キチナーゼの生産時期、細胞壁の消失時期に違いがみられた。すなわち色素を生産しないNIAES 5115株の細胞壁を培養基質としたときは、色素生産菌株であるNIAES 5117株細胞壁の場合に比べてキチナーゼ生産が早く行われ、培養液中の細胞壁も早く消失した。これらの糸状菌は同じ*Fusarium oxysporum*に属し、細胞壁構造は類似していることが考えられる。そうした場合、色素生産がキチナーゼに対して阻害的に働き、糸状菌細胞壁分解を遅速化させた可能性が高いことが考えられる。キチン分解が夾雑物の存在により遅速化される例としていくつか報告がある。Bull(1970)は土壌における糸状菌菌体溶解の抑制について研究をしており、メラニンがキチナーゼ活性の阻害を生じさせることを報告している。メラニンを含んでいる細胞壁はメラニンを含まないものよりも難分解であり、昆虫や節足動物に代表される無脊椎動物中に含まれるキチンが分解しにくいのは、色素が含まれていることと関係していると述べている。またOkafor(1966b)はキチン源としてバッタの羽を用いた実験を行っている。すなわち脱油脂、脱タンパク処理を行った羽は、無処理の羽よりも速く分解されたと報告している。このように自然界に存在するキチンには夾雑物が存在する場合があります、夾雑物の存在によりキチナーゼによる分解が阻害され、その結果キチナーゼ生産も影響を受けると考えられる。

各種培養基質のキチナーゼ生産に対する促進効果

S-84株をキチン培地で培養する際、N-アセチルグルコサミンを添加するとキチン単独の場合に比べて顕著にキチナーゼ生産が促進された。他の培養基質を添加した場合でも若干の促進効果は確認されたが、N-アセチルグルコサミンほどの効果は確認されなかった。他のキチナーゼ生産菌においても例は少ないが、このような促進

効果を持つ培養基質について研究がなされている。(Monreal and Reese, 1969; Yabuki et al., 1984; Yabuki et al., 1986)。キチン培地に酵母エキスやペプトンを添加しているものが多いが、その成分が不明瞭なためキチナーゼ生産にどのような関わりを持っているのかは理解しにくい。Bennet and Hood(1980)は *Bacillus megaterium* をキチン培地で培養する際、0.1%酵母エキスを添加することにより最もキチナーゼ生産が増大したと報告しており、他にも0.1%グルコサミン、0.1%N-アセチルグルコサミン、0.1%ペプトンを添加することにより、キチンを単独の培養基質とするときに比べて有意にキチナーゼ生産が増大したと報告している。本実験においては、酵母エキスよりもN-アセチルグルコサミンによってキチナーゼ生産が著しく促進された。N-アセチルグルコサミンはS-84株においてキチナーゼ生産を促進させる特定の培養基質であると考えられる。また本研究においては、キチナーゼ生産に対して抑制的に働くと考えられるグルコースやフラクトースなどの培養基質以外は、概してキチナーゼ生産を増加させたと言える。

各種培養基質のキチナーゼ生産に対する抑制効果

S-84株をキチンを培養基質として培養したときに行われるキチナーゼの誘導的生産は、グルコースを添加することによって有意に抑制されることが確認された。またフラクトースの添加によっても弱い抑制効果がみられた。グルコースを添加することによってキチナーゼ生産が抑制されたと報告する例は多い(Monreal and Reese, 1969; Bennet and Hood, 1980; Yabuki et al., 1984)。グルコース以外の抑制物質もいくつか報告されているが、グルコースを初めとした抑制物質は濃度に依存するものが多く、低濃度ではほとんど抑制されないか、むしろ促進効果を呈する傾向があると言える。*Bacillus megaterium* の場合では、酵母エキス、グルコサミン、ペプトンを0.5%の濃度になるように添加すると有意にキチナーゼ活性が抑制されている

(Bennet and Hood, 1980)。しかしこれらの基質を0.1%濃度で添加した時は、キチン単独の場合に比べてキチナーゼ活性が増加したと述べている。本研究においてもグルコースを0.3%あるいは0.1%添加した場合には、キチナーゼ生産が有意に抑制されたが、0.05%添加では、逆にキチナーゼ活性が高くなっており、同様な傾向がみられている。このような現象は、抑制物質が一定濃度に達するとカタボライト抑制が急速に生じることを示唆している。

本実験においてはcAMP関与のカタボライト抑制について検討を行ったが、cAMP添加による生産抑制の解除は確認されず、S-84株においてはcAMPが関与しない抑制機構が存在していることが示唆された。放線菌のカタボライト抑制にcAMPが関与していないことは他の菌株について観察されている。*Streptomyces coelicolor*ではヘキシキナーゼが関与していることまでは分かっているが、その詳細な機構は不明である(Hodogson, 1982)。

2-4 *Streptomyces erythraeus* S-84株の生産するキチナーゼの分離精製と酵素学的性質の検討

Streptomyces erythraeus S-84株は前節により、キチナーゼを大量に生産する菌株であることが示された。また、キチナーゼ生産に対して誘導的、促進的、抑制的に作用する培養基質が存在し、正と負の生産制御が行われていることが明らかになった。しかし、S-84株の生産するキチナーゼの性質については4-MU-キトオリゴ糖の分解において、4-MU-2糖よりも4-MU-3糖分解活性が高いことしか分かっていない。

ここではS-84株の生産するキチナーゼの分離精製を行い、何種類のキチナーゼを生産しているのか、それらは酵素学的にどのような性質をもっているのか、それらのキチン分解様式はどのようなものなのか等について詳細な知見を得ることを目的

とし、キチン- β -1,3-グルカン培地で生産されたキチナーゼを分離精製し、酵素学的な性質を調べた。

2-4-1 実験材料および方法

供試菌株

Streptomyces erythraeus S-84株を供試した。菌株の保存にはLB培地（培地13）に1.5%の寒天を加えたものを用いた。

培養

菌体を培養中、分散させるために直径10mmのステンレス製スプリングを入れた500ml容三角フラスコに200mlのキチン- β -1,3-グルカン培地（培地14）を入れ、滅菌したものを培養基とした。S-84株の胞子を1エーゼ接種し、37℃に設定したロータリー式振盪培養器中で培養した。培養中、キチナーゼ活性及びタンパク質濃度を逐次測定した。

タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度はBCA (bicinchoninic acid)法を用いた(Smith et al., 1974)。測定用試薬は、Pierce Co. Ltd. (Rockford, IL, USA) から購入した。クロマトグラフィーにおいては、280nmの吸光によりタンパク質含量を推定した。

キチナーゼの精製

96時間培養した培養液をWhatman No.2で濾過し、濾液を凍結乾燥し、少量の蒸留水に溶解させて遠心分離(12,000rpm, 15min)を行って上澄液を得た。限外濾過膜

(Diaflo PM-10, Amicon Division, W. R. Grace & co., Danvers, MA, USA、最大排出限界分子量10,000)をつけた限外濾過セル (Model 8050、Amicon Co.) を用いて蒸留水により脱塩を行い、脱塩後20mM Tris-HCl, pH 8.2緩衝液で置換を行った。最終的に2~5mlにまで濃縮したものを粗酵素とした。

粗酵素からのキチナーゼの分画は、陰イオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過により行った。両クロマトグラフィーは、FPLC(Fast Protein Liquid Chromatography, Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Uppsala, Sweden)システムを用いた。まず0.5mlの粗酵素 (1.2mgのタンパク質を含む) を予め初期緩衝液 (20mM Tris-HCl, pH 8.2) で平衡化した陰イオン交換用カラム (Mono Q 5/5、内径5mm x 長さ5cm) に供し、緩衝液を0.5ml/minの流速で流しながら、緩衝液中のNaCl濃度を直線的な勾配 (0-0.7M) で増加させることにより、吸着タンパク質を分画した。溶出液は0.5mlずつ採取した。

次に各溶出画分のうちでキチナーゼ活性のあるものを、減圧濃縮により10倍に濃縮し、20mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) で予め平衡化させたゲル濾過カラム (Superose 6 HR10/30、内径10mm、長さ30cm) に供した。試料添加後、前述緩衝液を0.2ml/minの流速で流し、溶出液を0.4mlごとに採取した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動および分子量推定

電気泳動用の試料は、タンパク試料あるいは標準タンパク質溶液に20%容の0.5M Tris-HCl (pH 6.8)、32%容の10%SDS、8%容の2-メルカプトエタノールを加えて100°Cで3分間加熱することにより調製した。

電気泳動は、ポリアクリルアミド4~20%の濃度勾配型の既製ゲル (フナコシ薬品株式会社製) を用い、25~50 μ gのタンパク質を含む試料溶液を各ウェルに注入した後、ゲル1枚当たり20mAの電流を流して行った。タンパク質の染色はCoomassie

Brilliant Blue R-250を用い、脱色はエタノール-酢酸-蒸留水混合液(25:8:65, v/v/v)で行い、メタノール-酢酸-蒸留水混合液(10:15:175, v/v/v)で固定した。

分子量推定のためのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は12%固定濃度の同じく既製ゲルを用いて行った。標準タンパク質としてレインボウマーカー(Rainbow Colored Protein Molecular Weight Markers, Amersham Int. plc, Buckinghamshire, England)を用い、相対移動度により試料タンパク質の分子量を求めた。

等電点の測定

精製されたキチナーゼ蛋白の等電点の測定は、PhastSystem (Pharmacia LKB Biotech. Inc.)により測定した。精製したキチナーゼタンパクを減圧濃縮により約10mg/mlに濃縮し、試料とした。標準蛋白としてProtein Mixture 9 (Serva社製)を用いた。電気泳動用ゲルは、PhastGel IEF 3-9 (Pharmacia LKB Biotech. Inc.)を用いた。

キチナーゼ活性に与える反応液pHおよび各種試薬の影響

反応液pHがキチナーゼ活性に与える影響を調べるために、pH2.5~5.0まではMacIlvaine緩衝液を、pH5.0~9.0の間はトリスマレイン酸緩衝液を用いた。緩衝液の終濃度は50mMとし、他の条件は前述の活性測定法に準じた。各種試薬の反応液中における終濃度は1mMとした。

コロイド状キチン、キトオリゴ糖およびp-ニトロフェニルキトオリゴ糖の分解産物の同定

1.5ml用プラスチック製試験管に990 μ lの0.5%コロイド状キチン-5mMリン酸緩衝液(pH 6.5)、10 μ lの精製キチナーゼ(4-MU-2糖分解活性で1.5Unit/ml相当)を

入れ、ヒートブロック（37℃）で保温した。適当時間反応させた後100 μ lの反応液を採取し、限外濾過用遠心管（Ultrafree C3GC、排除限界分子量10,000、Millipore Co., Milford, MA USA）に注入し、遠心分離（5,000rpm）を行うことによって、コロイド状キチンとキチナーゼタンパク質を除き分解産物を得た。分解産物の同定法については後述する。

キトオリゴ糖のp-ニトロフェノール誘導体（p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosamine, p-nitrophenyl-N,N'-diacetylchitobioside, p-nitrophenyl-N,N',N''-triacetylchitotrioside, p-nitrophenyl-N,N',N'',N'''-tetraacetylchitotetraoside; Seikagaku Kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japan）の分解産物の場合は、同じく1.5ml容プラスチック試験管に90 μ lの2mmole/ml各種誘導体、5 μ lの0.1M緩衝液（キチナーゼF4の場合はMcIlvaine緩衝液（pH 3.8）、F23の場合はリン酸緩衝液（pH 6.5））、5 μ lの精製キチナーゼ（4-MU-2糖分解活性で0.5 Unit/ml相当）を加え、ヒートブロックで37℃で保温し、適当時間後に100℃で3分間加熱することにより反応を停止させた。尚、基質は100℃で3分間加熱しても影響を受けないことを予め確認した。反応は基質が10%以上分解しないように行い、分解の初速度を求めた。

キトオリゴ糖の分解は、p-ニトロフェニルキトオリゴ糖の分解と同様の方法で測定した。

キトオリゴ糖及びp-ニトロフェニルキトオリゴ糖は、HPLC（島津製作所製、LC-6A）を用いてOhtakaraら（1988）の方法に準じて行った。使用したカラムは μ Bondasphere NH2-100A（内径3.9mm 長さ15cm、Waters Associates, Inc., Milford, MA, USA）であり、溶出は75%アセトニトリルを1ml/minの流速で行った。各種糖及び糖誘導体の検出は210nmと410nmの吸光度を測定することにより行いピーク面積を求め、予め作成した検量線により定量を行った。

キチナーゼF23に対する抗血清の作成およびキチナーゼ活性に及ぼす影響

精製したキチナーゼF23溶液 (150 μ g/ml) を生後2週間目のうさぎに3~4日おきに8回注射を行った。その際、注射量を0.5、0.5、1.0、1.0、1.5、1.5、2.0、2.0 mlと徐々に増加させた。最終的な採血は心臓から行い、4°Cに保冷して血餅を生じさせ、血餅を除くことにより抗血清 (25.9mg 蛋白質/ml) を得た。抗血清は-70°Cで保存した。

50 μ lの精製したキチナーゼF4およびF23 (それぞれ3.3 μ Unit/ml) に生理食塩水 (0.85% NaCl(w/v)) で種々の濃度に希釈したF23抗体を加え、37°Cで40分間保温した。その後この溶液のキチナーゼ活性を測定した。

2-4-2 結果

S-84株のキチナーゼ生産

S-84株のキチナーゼ生産は、前節で述べたように培地の培養基質の種類に依存してかなり多様であることがわかっている。キチナーゼ精製分離を行うについて予め、キチン、キチン+N-アセチルグルコサミン、キチン- β -1,3-グルカンで培養した培養液を用いて行ったところ、キチン- β -1,3-グルカン培地で培養した時において、微量しか生産されないchitinase A (後述) が精製可能なほどに増加する傾向があり (図示せず)、しかも全体のキチナーゼ生産も促進されたので (表2-10)、放線菌の生産するキチナーゼの種類を調べるためにも、キチン+ β -1,3-グルカンを培地として用いることにした。図2-1にS-84株をキチン- β -1,3-グルカン培地で培養したときの培地中のキチナーゼ活性とタンパク質濃度の経時的变化を示した。キチナーゼ活性は培養時間が50時間になるまでは緩やかに増加したが、50時間以降急速な活性の増大がみられた。活性の内容は、全培養時期を通して4-MU-2糖分解活性よりも

表 2-10 キチン培地に種々の炭素源を加えた培地に *Streptomyces erythraes*
S-84株を接種したときの培地中のキチナーゼ活性最高値生産

炭素源	培地中のキチナーゼ活性の最高値 (mUnit/ml)	
	4-MU-2 糖分解活性	4-MU-3 糖分解活性
キチン (0.3%)	105	222
キチン + β -1,3-グルカン*	262	719
キチン + キシラン*	213	496
キチン + スターチ*	8.18	9.88

a) キチン0.15%、添加炭素源0.15%になるようにした。

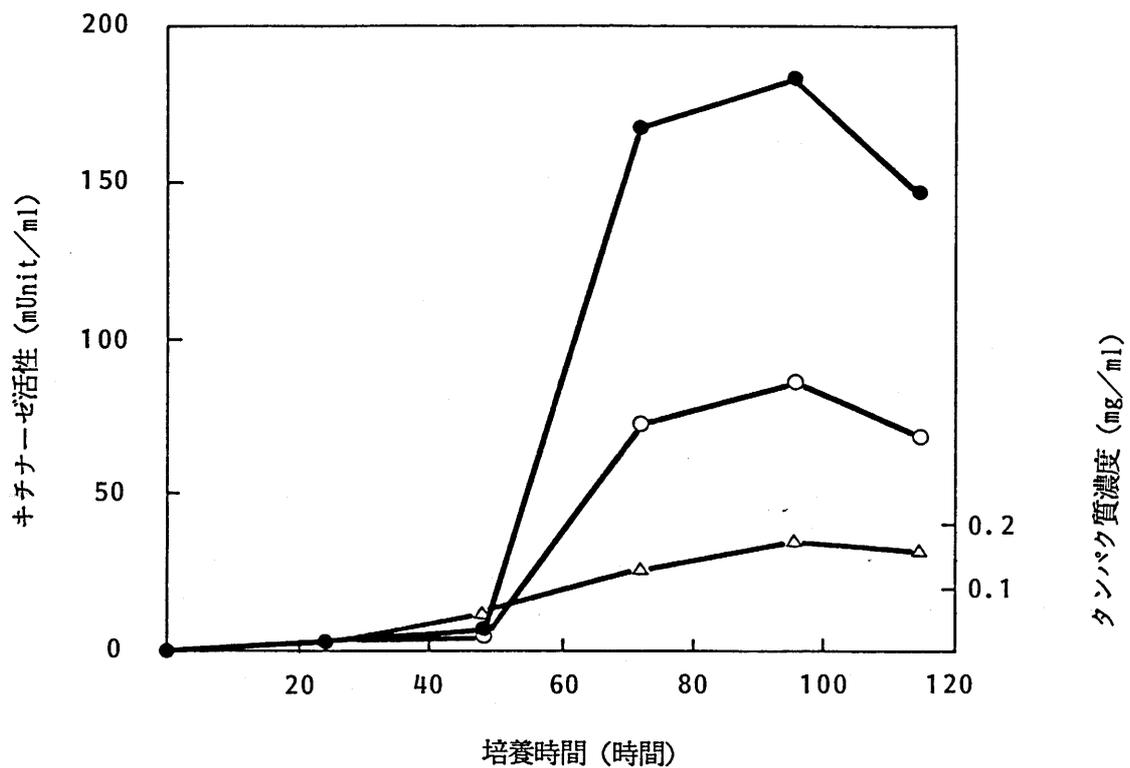


図 2-1 キチン- β -1,3-グルカン培地に *Streptomyces erythraeus* S-84 株を接種したときの培地のキチナーゼ活性とタンパク質濃度の経時的变化
 ○, 4-MU-2 糖分解活性; ●, 4-MU-3 糖分解活性;
 △, タンパク質濃度.

4-MU-3 糖分解活性の方1.5~1.8倍高い値を示しており、活性の相対比はほとんど変化しなかった。キチナーゼ活性が最高値に達したとき、培養濾液の4-MU-単糖の分解活性 (N-acetylglucosaminidase) を測定したところ検出されなかった。しかし培養菌体を除かないで培養液の活性を測ったところ活性が検出された。

培養液中のタンパク質濃度は、培養全期を通じて徐々に増加した。

キチナーゼの精製

S-84株の生産するキチナーゼの精製分離の結果を表2-11に示した。キチナーゼ精製に用いた培養液は活性が最も高いときの培養を用いた。最初、培養液を濃縮するために凍結乾燥を行ったが、キチナーゼは凍結乾燥による失活が少なく、約80%以上の活性が保持された。つぎの排出限界分子量5,000の膜を用いた限外濾過では、4-MU-2 糖、4-MU-3 糖分解活性の比活性が、それぞれ6.46、4.73倍と高くなった。限外濾過により、脱塩、濃縮、クロマトグラフィーのための緩衝液の平衡化を行い、陰イオン交換クロマトグラフィーに供したところ、2つのキチナーゼ画分に分かれた (図2-2)。最初に溶出した画分をchitinase A、次に溶出した画分をchitinase Bと命名した。chitinase Aは4-MU-2 糖分解活性の方が、4-MU-3 糖分解活性よりも高く、chitinase Bはこれとは逆に4-MU-3 糖分解活性の方が高かった。活性の量比で比べると、chitinase Bが圧倒的に多く、全活性の99%以上を占めた。

次に2つの活性画分を減圧濃縮し、ゲル濾過に供した。両キチナーゼともゲルクロマトグラフィーにおいて単一のピークを呈した (図2-3)。特にchitinase Bの場合は、クロマトグラムにおいて、1つのピークしか現われなかった。

最終的に精製された2つのキチナーゼタンパクをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した (写真2-4)。電気泳動で両酵素とも単一のバンドを呈した。

表 2 - 1 1 *Streptomyces erythraeus* S-84株が生産するキチナーゼの精製表

分画	蛋白量 (mg)	4-MU-2 糖分解活性		4-MU-3 糖分解活性		活性比 2糖:3糖
		活性 (Unit)	比活性 (U/mg)	活性 (Unit)	比活性 (U/mg)	
培養濾液	125	61.3	0.49	133	1.06	32:68
粗酵素	12.2	38.5	3.16	61.0	5.01	39:61
chitinase A						
Mono Q	0.93	0.15	0.160	0.021	0.023	87:13
Superose	0.06	0.012	0.195	0.006	0.097	67:33
chitinase B						
Mono Q	0.69	19.7	28.4	32.4	46.7	38:62
Superose	0.30	9.50	31.8	17.4	58.2	35:65

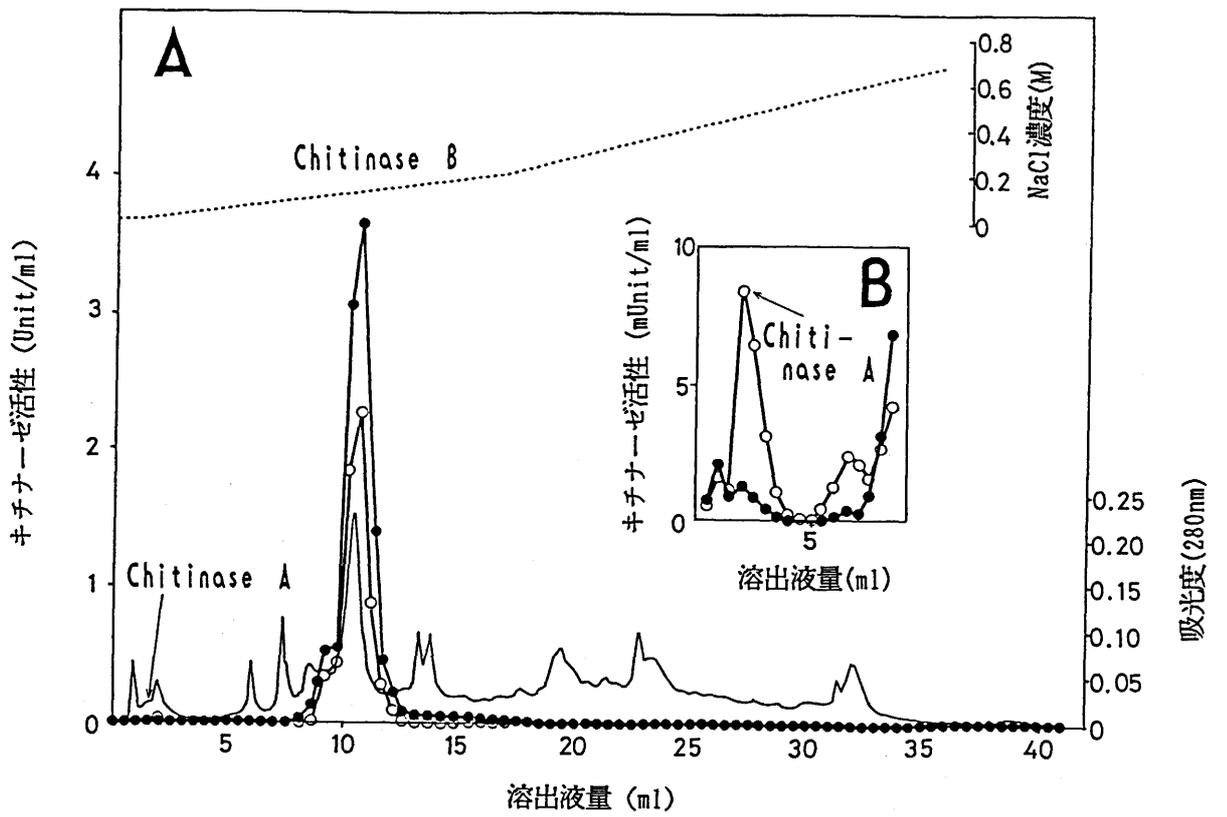


図 2 - 2 *Streptomyces erythraeus* S-84株の生産するキチナーゼの陰イオン交換クロマトグラム (A)
 Bは部分的に活性を200倍に拡大して表示したもの。
 ○, 4-MU-2 糖分解活性; ●, 4-MU-3 糖分解活性; —, 280nm 吸光度

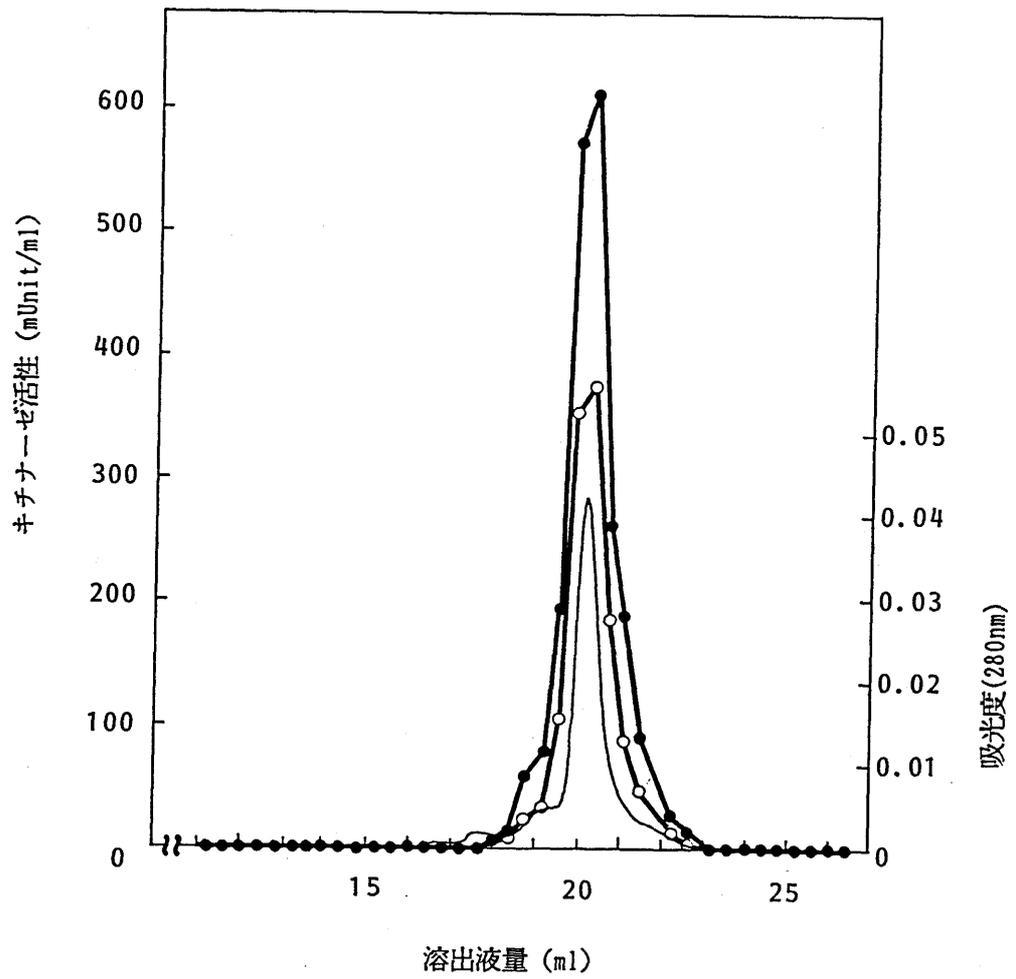


図2-3 Mono Qカラムで分画されたChitinase BのSuperose 6によるゲルクロマトグラム
 ○, 4-MU-2 糖分解活性; ●, 4-MU-3 糖分解活性; —, 280nm 吸光度

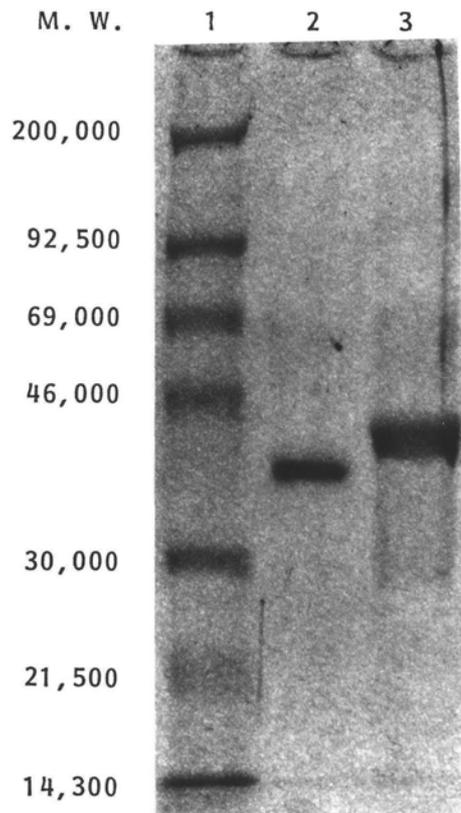


写真 2 - 4 *Streptomyces erythraeus* S-84株由来の精製された
キチナーゼのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動
1, 分子量マーカー (標準タンパク質) ; 2, chitinase A;
3, chitinase B

キチナーゼの分子量および等電点の推定

chitinase Aとchitinase Bの分子量推定をゲル濾過とSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により行った。chitinase Bの場合、ゲル濾過による推定値と電気泳動による推定値に大きな隔たりが生じた。即ち、ゲル濾過では、分子量5,500と推定されたが、電気泳動では44,000と推定された。chitinase Aの場合は、これほどの違いは生じなかったが、ゲル濾過では34,000、電気泳動では、41,000となった。

2つのキチナーゼの等電点を測定したところ、chitinase Aは4.8、chitinase Bは8.3であった。

精製キチナーゼの酵素学的性質

図2-4に反応液のpHを変えたときの活性に与える影響を示した。chitinase Aは、4-MU-2糖分解活性も4-MU-3糖分解活性も同じ挙動を示し、pH3.4から4.2の範囲で最高活性を呈した。chitinase Bの場合もやはり、4-MU-2糖分解活性も4-MU-3糖分解活性も同様な挙動を示したが、最高活性値はchitinase Aよりも高いpH6.3~6.8の間でみられた。

chitinase Aの4-MU-2糖および4-MU-3糖に対する K_m 値はそれぞれ49.2 μ M、13.5 μ Mであった。chitinase Bの場合はchitinase Aよりも低く、4-MU-2糖に対する K_m 値は13.5 μ M、4-MU-3糖に対しては2.7 μ Mであった。

キチナーゼ活性に対する各種金属イオンおよび蛋白修飾試薬、分解産物とその類似化合物の影響を調べた(表2-12)。その結果、有意に活性を阻害したり、促進させる金属イオンはなかったが、鉛(Pb^{2+})において比較的強い活性阻害がみられた。修飾剤p-chloromercuribenzoic acidによってやや強い阻害はみられたが、他の修飾剤によって活性に変化を受けることはなかった。分解産物であるN-アセチルグルコサミンおよび構造的に類似した各種糖の影響は全く確認されなかった。

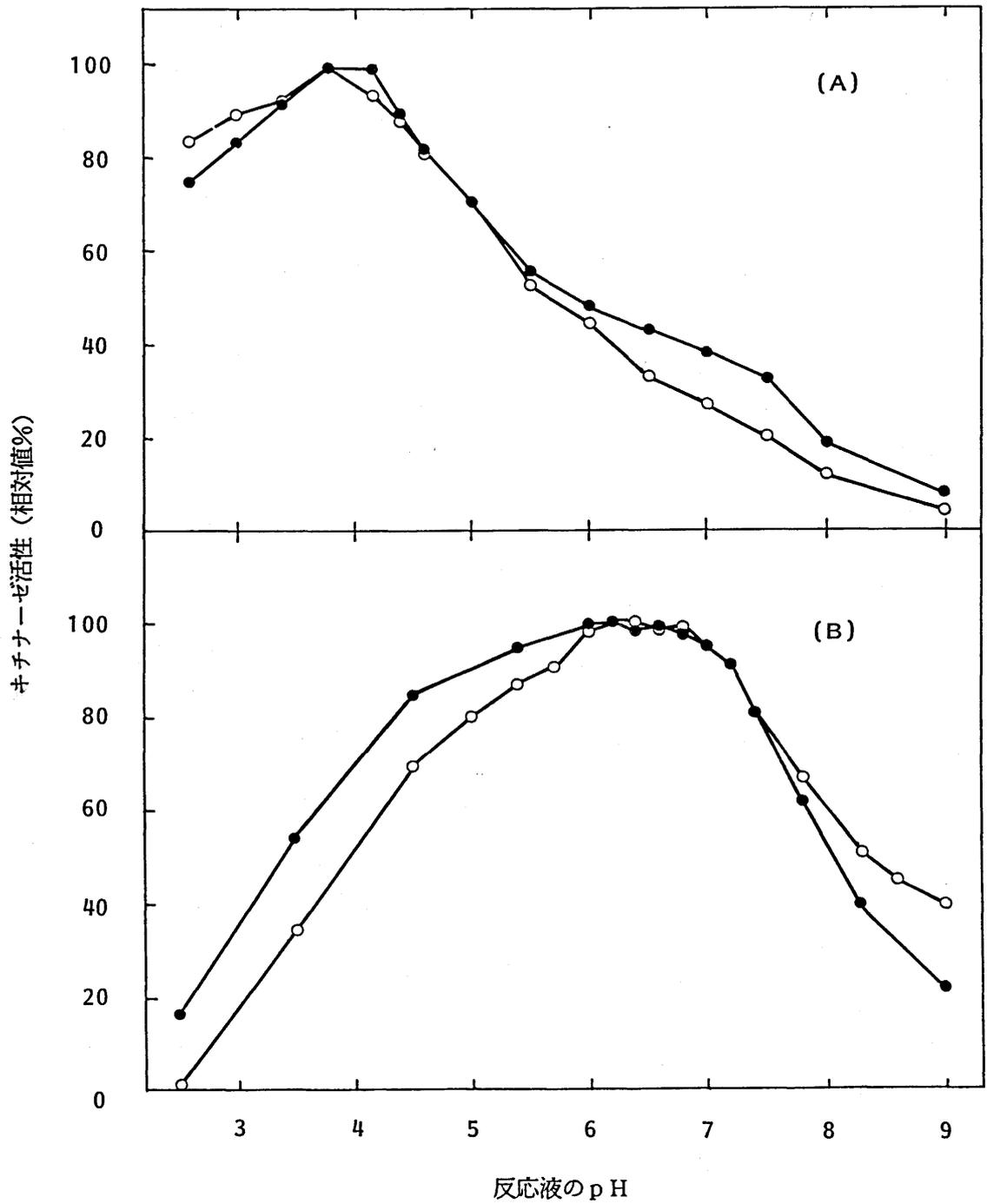


図 2 - 4 反応溶液の pH がキチナーゼ活性に及ぼす影響
 (A), Chitinase A; (B), Chitinase B.
 ○, 4-MU-2 糖分解活性; ●, 4-MU-3 糖分解活性.

表2-12 Chitinase B に対する各種化合物の影響

化合物 ^a	相対的キチナーゼ活性 (%)	
	4-MU-2 糖分解活性	4-MU-3 糖分解活性
無添加	100	100
CaCl ₂	97	111
CdCl ₂	91	86
Co(NO ₃) ₂	95	87
CuSO ₄	114	104
FeSO ₄	116	121
HgCl ₂	75	82
MgSO ₄	100	116
MnCl ₂	95	109
NaCl	99	111
NiSO ₄	91	99
PbCl ₂	43	42
ZnSO ₄	95	88
MIA	112	110
DTT	85	99
EDTA	111	118
2-M EtOH	98	105
pCMB	55	66
酢酸ナトリウム	98	102
Gal	99	98
GalNAc	93	97
Glc	92	97
GlcN	98	100
GlcNAc	96	101

a) 添加物濃度は反応液の終濃度が1mMになるようにした。

MIA, モノヨード酢酸; DTT, dithiothreitol; 2-M EtOH, 2-メルカプトエタノール; pCMB, p-chloromercuribenzoic acid; Gal, ガラクトース; GalNAc, N-アセチルガラクトサミン; Glc, グルコース; GlcN, グルコサミン; GlcNAc, N-アセチルグルコサミン

Chitinase B抗体のキチナーゼ活性に対する活性阻害

シロウサギにおいて生産されたChitinase Bに対する抗体を生理食塩水で各段階に希釈し、2種類の精製キチナーゼに加えたときの活性阻害を図2-5に示した。

Chitinase Aにおいては抗体濃度を最高1/256希釈まで増加させてもほとんど活性の阻害は見られなかった。しかし、chitinase Bに抗体を作用させると1/1024倍希釈より濃度を増加させた時、有意に活性阻害が確認された。しかし同濃度の抗体をchitinase Aに作用させても活性の阻害は認められず、chitinase Aは、chitinase Bとは免疫学的に異なる性質を有することが示された。

コロイド状キチンの分解産物の同定

chitinase Aにコロイド状キチンを基質として反応させると、分解初期はN-アセチルグルコサミンの単糖から4糖までが生成された。量的には2糖が生産物の大部分を占めた。反応時間を長くするにしたがって、単糖から3糖までの蓄積がみられたが、4糖は次第に消失した。最終的に生産物は、2糖が大部分を占め、単糖と3糖がわずかに蓄積された。

chitinase Bの反応生産物は、単糖から3糖までが確認された(図2-6)。

chitinase Aと同様に2糖の蓄積が大部分を占めた。2糖に比べて単糖と3糖の生産速度は、反応時間が長くなるにつれて遅くなった。

キトオリゴ糖の分解パターン

精製された2種類のキチナーゼに標準キトオリゴ糖(2糖~4糖)を基質として作用させたところ、両酵素とも同様な傾向を示した。すなわち、4糖を基質とすると分解産物はほとんどが2糖であり、3糖と単糖はわずかしか検出されなかった。3糖を基質とすると単糖と2糖が検出されたが、分解速度は4糖の分解速度よりも

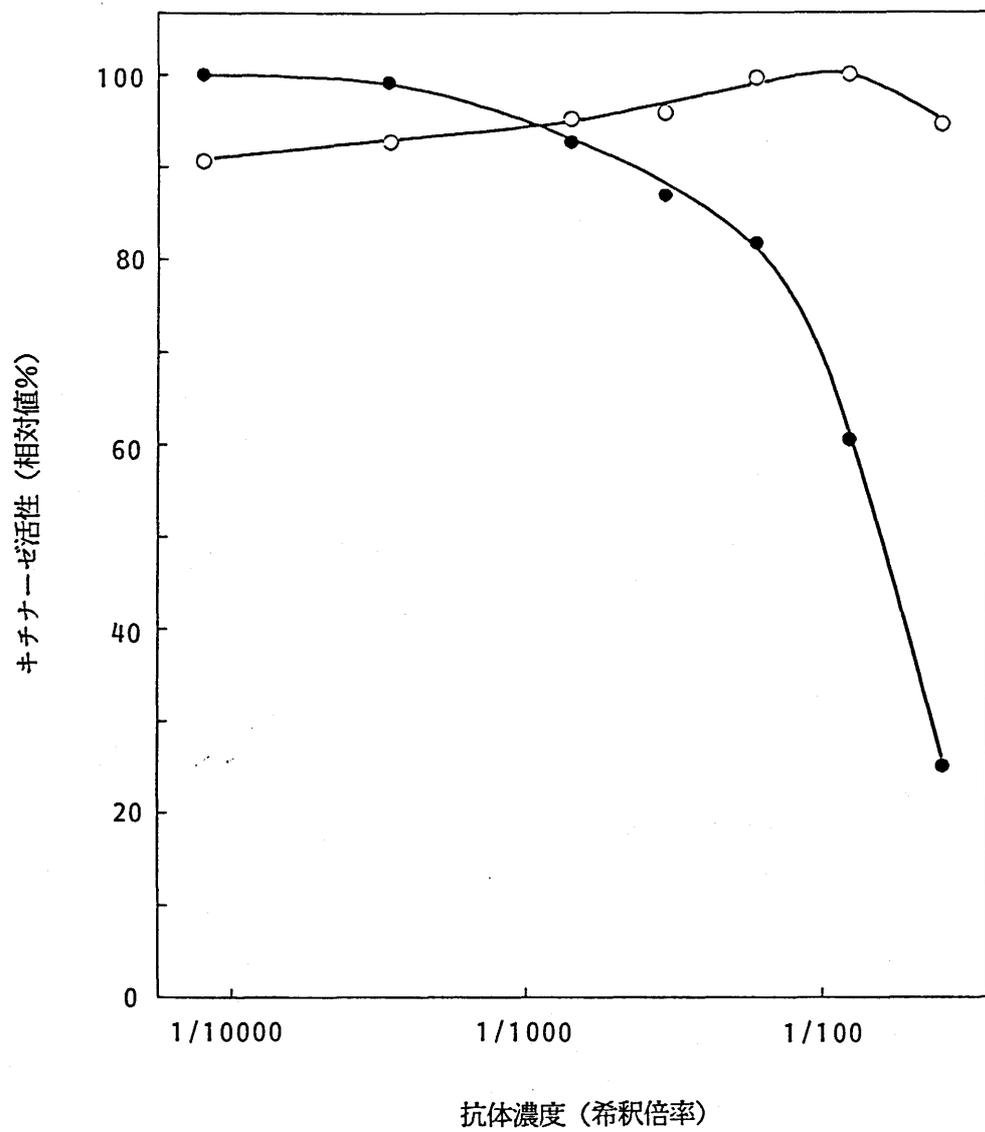


図2-5 Chitinase B抗体が精製されたChitinase AとChitinase Bの活性に与える影響(4-MU-2糖分解活性)
 ○, Chitinase Aの活性; ●, Chitinase Bの活性.

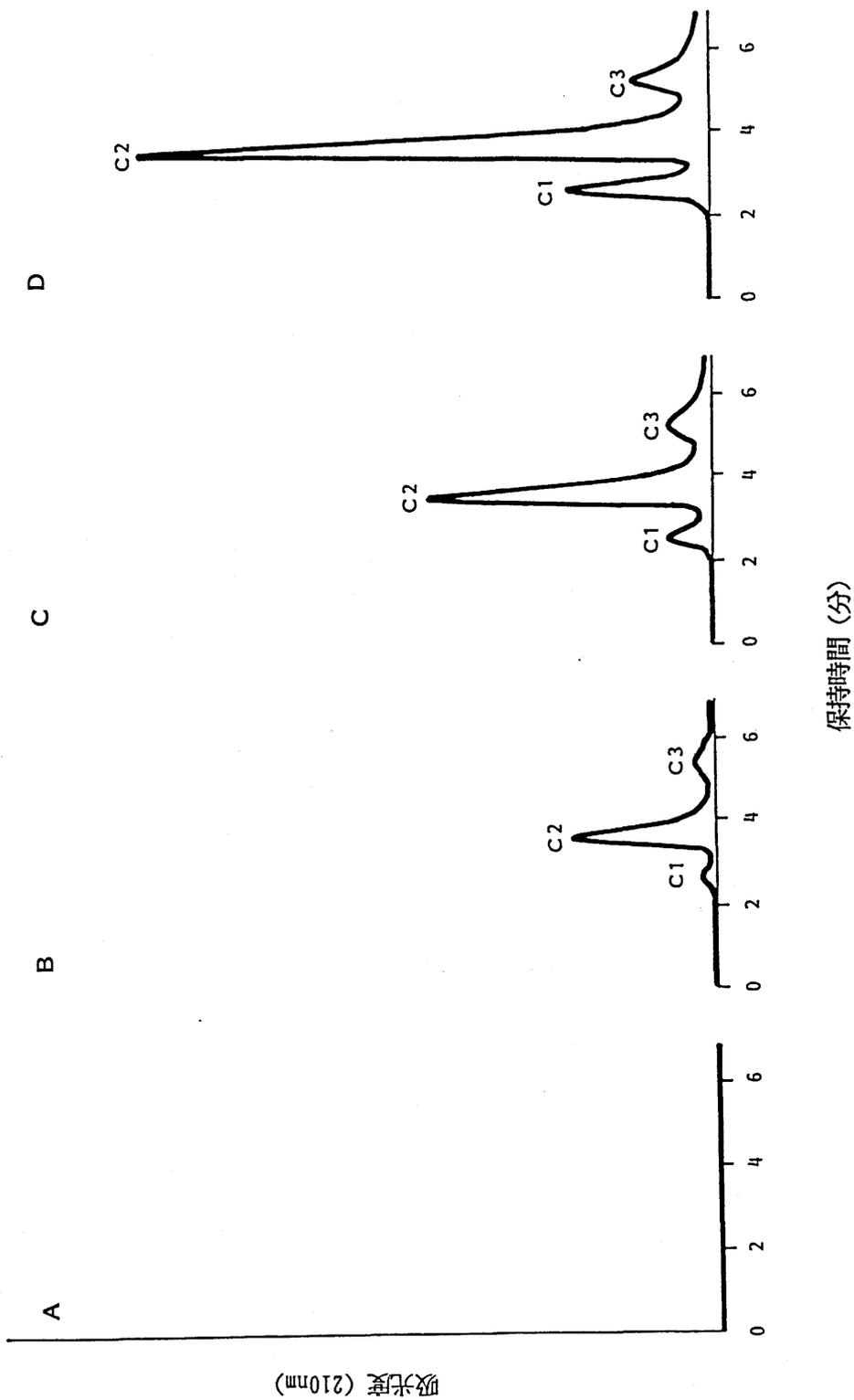


図2-6 Chitinase Bをコロイド状キチンに作用させたときの反応生成物のHPLCクロマトグラム
 反応時間は0分(A)、10分(B)、40分(C)、180分(D)とした。
 C1, N-acetyl- β -D-glucosamine; C2, N,N'-diacetylchitobiose;
 C3, N,N',N''-triacetylchitotriose.

Chitinase A

0 — G — pNP

1 (100) — G — pNP

15 12 37 — G — pNP

4 101 11 41 — G — pNP

Chitinase B

0 — G — pNP

0 (100) — G — pNP

18 103 143 — G — pNP

3 131 12 163 — G — pNP

図2-7 精製キチナーゼによるp-ニトロフェニルキトオリゴ糖の相対的分解速度

p-ニトロフェニルキトビオースのニトロフェニル-グルコシド結合の相対的加水分解速度(括弧で囲まれた数字)を100として他の結合の相対的加水分解速度を表した。

遅かった。しかし、2糖を基質とした場合、全く分解されなかった。このことより精製されたキチナーゼは、N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を持たないことが示された。

それぞれの反応系において反応時間を60分まで延長したが、基質の糖鎖よりも長いオリゴ糖は検出されず、糖転位 (transglycosylation) は反応時間が60分以内では生じないことが示された。

キトオリゴ糖のp-ニトロフェニル誘導体の分解速度パターン

図2-7にp-ニトロフェニル基を還元末端に結合させたキトオリゴ糖を基質として chitinase Aとchitinase Bを反応させたときの各グルコシド結合の加水分解速度を示した。chitinase Bの場合、糖鎖が長くなればなるほど、ニトロフェニルグルコシド結合を切断し易い傾向が見られたのに対し、chitinase Aでは特にこのような傾向はみられなかった。また2種類のキチナーゼとも非還元末端から2つめのグルコシド結合を切り易い傾向がみられた。

2-4-3 考察

S-84株の生産するキチナーゼを精製する際にキチン- β -1,3-グルカン培地を用いた理由は、①キチン単独で培養した時よりも高いキチナーゼ活性が得られ、しかも最大活性が得られるまでの培養時間も短くなること、②少量しか生産されない chitinase AがキチンやキチンにN-アセチルグルコサミンを添加した場合に比べて多く生産する傾向にあったことである。キチンやキチンにN-アセチルグルコサミンを添加した培地ではchitinase Aの生産量が少ないため、分離精製することは困難であると考えられた。 β -1,3-グルカンがどのように作用したのかは不明であるが、この

現象により chitinase A の生産調節機構が chitinase B と異なっている可能性も残された。また chitinase A の生産時期などについてさらに検討を加えれば、chitinase A の分離精製がさらに容易になったと考えられる。

S-84株の培養濾液中ではN-アセチルグルコサミニダーゼ活性は検出されなかったが、培養液中に分散している菌体を除かないで活性を測定したところ活性が検出されたことは、N-アセチルグルコサミニダーゼが菌体表面に存在していることを示唆している。このような現象は、*Streptomyces orientalis*など他の放線菌でも報告されている (Tominaga and Tsujisaka, 1976; Iwamoto et al., 1978)。キチナーゼによってキチンがキトオリゴ糖さらにキトピオースまで分解された後、放線菌菌体表面に存在するN-アセチルグルコサミニダーゼによって単糖であるN-アセチルグルコサミニダーゼにまで分解し、吸収、代謝されると考えられる。

キチナーゼの分離精製においては2種類のキチナーゼが確認された。最初の陰イオン交換クロマトグラフィーで活性の99%以上を占めるピークと微弱なピークに分かれたが、chitinase A の生産量があまりにも微量であるため、chitinase A は chitinase B の分解産物である可能性が想定された。しかし4-MU-キトオリゴ糖の分解活性の違いを初めとした、種々の酵素学的性質の違い、免疫学的性質の違いから全く異なるキチナーゼであると考えられる。明確にchitinase A とBの違いがみられるのは、まず至適pHである。chitinase A の至適pHは酸性側にあった。近似の至適pHを持つキチナーゼはいくつか報告されている (Robbins et al., 1988)。

chitinase B の至適pHはこれに対して中性域にあり、多くキチナーゼでこのような性質は見られる (Berger and Reynolds, 1958; Monreal and Reese, 1969; Reynolds, 1954; Robbins et al., 1988)。

chitinase B の分子量を推定する際、SDS-PAGEによる推定値とゲル濾過による推定値が大きく異なった。これは、ゲル濾過にもちいたゲル担体と酵素蛋白が相互作用

を及ぼしあい、吸着現象が生じたために酵素蛋白の溶出時期が遅くれたためと考えられた。ゲル濾過を行うにあたっては、吸着を最小限にするよう0.1M NaClを溶出液に加えたが、ゲル濾過で分子量推定をするには、活性は失われるがグアニジン処理などが必要となろう。chitinase Aにおいても、推定値の差異は生じたがchitinase Bほど大きな違いではなかった。これはchitinase AとBにおけるゲル担体との親和性の違い、さらには等電点の違いを反映するものと考えられる。いずれにしてもchitinase Bの分子量の推定値はSDS-PAGEによるものがより信頼できると考えられる。chitinase A、Bの分子量はそれぞれ41,000と44,000で近似しており、いくつかの細菌由来のchitinase Bも同程度の分子量を有している (Beyer and Diekmann, 1985; Robbins et al., 1988; Usui et al., 1987)。

*Streptomyces plicatus*は同時に4種類のキチナーゼを生産することが報告されている (Robbins et al., 1988)。また*Streptomyces lividans* 66は分子量、至適pH、基質の分解様式がすべて異なる4種類のキチナーゼを同時に生産することが分かっている (Miyashita et al., 私信)。このような事実から*Streptomyces*属の放線菌は一般的に異なるキチナーゼを数種類同時に生産していることが多いと考えられる。その点S-84株は一つのキチナーゼを大量に生産していることからユニークであると思われる。少量しか生産されないchitinase Aのキチン分解における役割については、chitinase Bと異なる酵素学的性質を持つことからchitinase Bとは異なる役割を果たしていることは推測できるが、生産量があまりにも少量であるため、通常のキチン分解においては、効果は低いと考えられる。しいて予想するならば、chitinase Aの至適pHは3.4~4.2とchitinase Bに比べて低く、chitinase Bが最高活性の50%前後しか活性が現れないpH条件下で活性が最高になることから、S-84株が酸性条件下でキチン分解を行うときの中心となる酵素であるとも考えられる。

コロイダルキチンを精製した酵素で分解したときの分解産物は、chitinase Aが単

糖から4糖までのキトオリゴ糖であり、chitinase Bの分解産物は、単糖から3糖までであった。このように比較的 low molecular weight のキトオリゴ糖しか検出されなかった原因としては、基質であるキチンの構造に関係があると考えられる。キチン粒子は、N-アセチルグルコサミンが β -1,4-グルコシド結合で直鎖状に並んでいるものが単位となって何本もまとまり、水素結合によって強固な繊維状の構造をつくっていることが分かっている(Carlstrom, 1957)。そのためキチナーゼ蛋白が、キチン繊維の途中に結合し、グルコシド結合を切断する可能性は低いと考えられる(Monreal and Reese, 1969)。今回コロイダルキチンを基質としたとき、その分解産物として検出されたのは、キチン繊維の末端の繊維がほぐれた部分にキチナーゼが作用し、放出されたものであると考えられる。酵母あるいは小麦胚芽由来のキチナーゼを使った実験で、キチン合成酵素(chitin synthetase)によって生産された、まだ繊維状になっていない、キチン鎖を基質としてその分解産物をしらべたところ、キチン繊維を基質としたときよりもかなり鎖長の長いキトオリゴ糖が検出されたことが報告されている(Correa et al., 1982; Morano et al., 1979)。

chitinase Aは4-MU-3糖よりも4-MU-2糖をより速く分解した。その反対にchitinase Bは4-MU-3糖を4-MU-2糖よりも速く分解した。またchitinase Bはp-ニトロフェニルキトオリゴ糖のうち糖鎖の長いものをより速く分解する傾向にあった。Robbinsら(1988)の定義によれば、chitinase Aはこれらの分解様式からexo-chitinase、chitinase Bはendo-chitinaseと類別される。しかしながら両酵素をコロイド状キチンに作用させたときの主要生産物が、どちらもキトビオース(2糖)であったことと矛盾が生じる。Robbinsら(1981)はまたキチンを非還元末端からキトビオース単位に切断する酵素をexo-chitinaseと定義することを提案しているが、微生物キチナーゼにおいてキチンの分解産物が完全にキトビオースであった例は今までに報告されておらず、本研究同様、キトビオース以外に単糖やオリゴ糖が生産されて

いる (Beyer and Diekmann, 1985; Roberts and Cabib, 1982)。後者の定義に従えば S-84株の生産するキチナーゼは両方ともendo型であると類別される。分解様式におけるこれらの矛盾は、定義についてさらに検討することが必要であることを示唆している。

2-5 糸状菌細胞壁の分解

Streptomyces erythraeus S-84株は糸状菌細胞壁を基質とすることによりキチナーゼを大量に生産することが示された(2-2)。ここでは顕微鏡観察により、S-84株による糸状菌細胞壁分解がどのように行われるのか、また糸状菌細胞壁分解とキチナーゼ生産の関わりについて知見を得ることを目的とした。

2-5-1 実験材料および方法

供試菌株

糸状菌細胞壁分解能を検討する放線菌菌株として *Streptomyces erythraeus* S-84株を用い、糸状菌細胞壁を調製するために *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* NIAES 5115株および *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 5117株を用いた。

糸状菌細胞壁の分解試験

糸状菌細胞壁培地(培地16、糸状菌細胞壁の調製法は2-3-1に記述した)で寒天平板を調製し、この寒天平板にS-84株を接種し、30℃で10日間保温した。コロニーの周りのクリアゾーンの有無により、菌株が細胞壁分解酵素を生産しているか否かを判定した。また液体培養によっても糸状菌細胞壁分解を調べた。すなわち30mlの糸

糸状菌細胞壁培地をスプリング入り100ml容三角フラスコに調製し、S-84株を接種して30℃で12日間培養後、少量の培養液を採取し、400倍で顕微鏡観察を行った。

S-84株と病原糸状菌を対峙培養したときの顕微鏡観察

キチン寒天培地にS-84株とNIAES 5115株をプレートの両端に間隔をあけて接種し、30℃で保温した。NIAES 5115株は増殖が速く、S-84株のコロニー上にも菌糸を伸ばした。この2つの菌株が接触している部分の寒天をカミソリで切り取り、寒天の表面部分だけをスライドグラスに移し、0.1% アニリンブルー・ラクトフェノール液で染色し、カバーグラスをかけた後400倍で顕微鏡観察を行った。

糸状菌細胞壁分解に伴うキチナーゼ生産の経時的変化

NIAES 5115株の細胞壁を唯一の培養基質として糸状菌細胞壁培地（培地16）を調製しS-84株を接種した後、経時的に培養液を採取し、キチナーゼ活性、タンパク質濃度を測定すると共に、培養液1mlを減圧濃縮し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の試料とした。電気泳動の方法については2-3-2に記述した方法を用いた。

2-5-2 結果

寒天平板における糸状菌細胞壁分解

サツマイモつる割れ病病原糸状菌 NIAES 5115株とキュウリつる割れ病病原糸状菌 NIAES 5117株から調製した糸状菌細胞壁寒天培地（培地16）にS-84株を接種し、30℃で10日間培養したときの写真を示した（写真2-5）。S-84株はコロニーの周りに明確なクリアゾーンを形成した。両病原糸状菌の細胞壁分解の様子を比べてみると、NIAES 5117株よりも NIAES 5115株の方がより分解されていた。

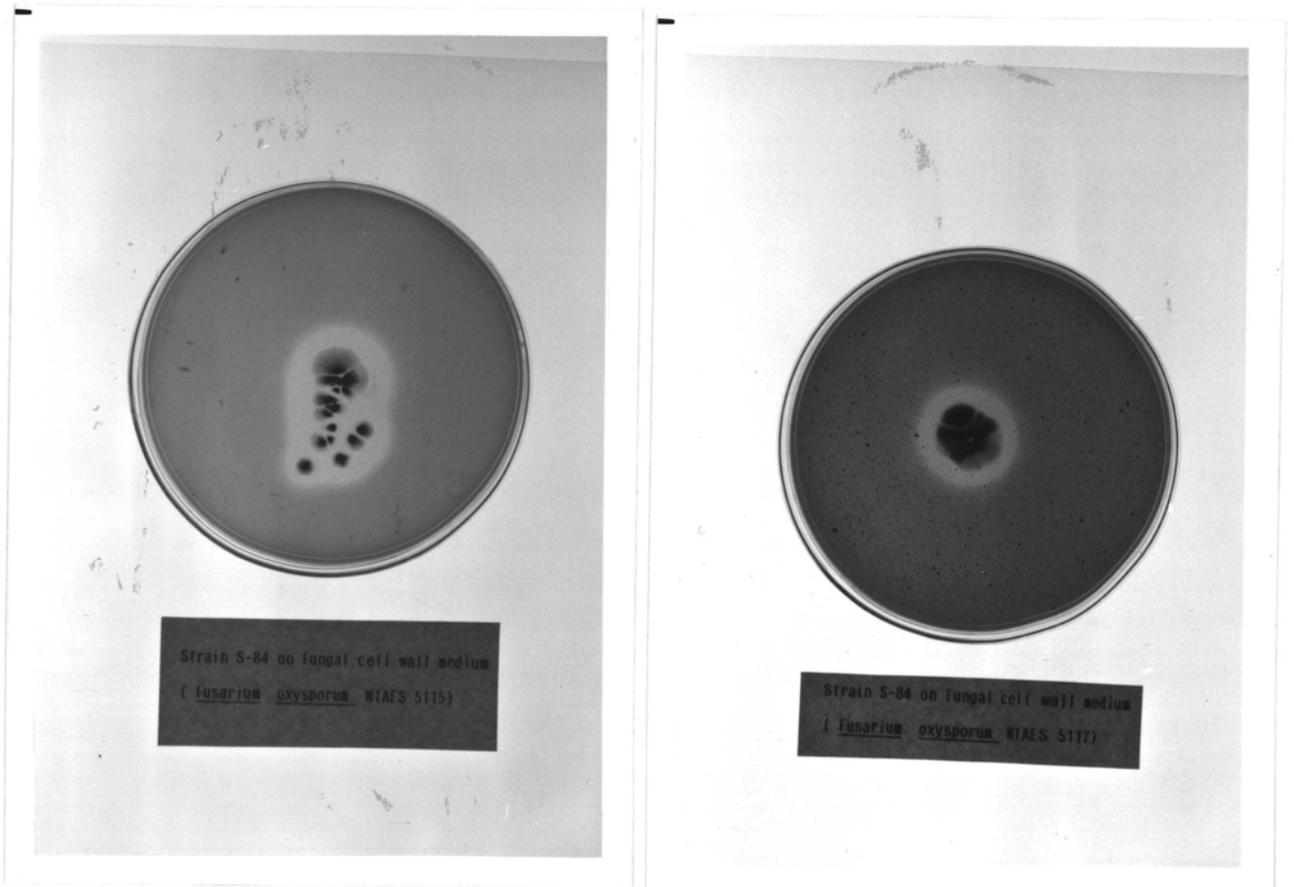


写真 2 - 5 糸状菌細胞壁寒天培地に *Streptomyces erythraeus* S-84株を
接種する事によって生じたクリアゾーン

左) *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* NIAES 5115 (さつまいもつる割れ病
病原菌) の細胞壁培地

右) *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* NIAES 5117 (キュウリつる割れ病病原菌)
の細胞壁培地

両写真において、中央のコロニーの回りに白く抜けたクリアゾーンが見える。

液体培養による糸状菌細胞壁分解

糸状菌細胞壁を唯一の培養基質とした糸状菌細胞壁培地を調製し、S-84株を接種したときの細胞壁分解を顕微鏡で検討した（写真2-6）。写真の通り、培養前は培地中に糸状菌細胞壁が見られたが、S-84株を接種、培養した後は培養前のような糸状菌細胞壁はほとんど確認できず、代わりにS-84株菌糸の増殖が見られた。S-84株がコロニーを形成している状態も見られた。

S-84株と病原糸状菌を対峙培養したときの顕微鏡観察

S-84株とNIAES 5115株を対峙培養しても、両菌株の生育はお互いに阻害されることはなかった。このことにより、S-84株はこのNIAES 5115株に対して抗菌物質を生産していないことが示された。ここではキチン寒天培地を用いたが、LB培地を用いても同様な結果が得られた。

S-84株とNIAES 5115株が重なり合って生育しているところでは、写真2-7（左）の様に比較的太い糸状菌菌糸の周辺に比較的細い菌糸のS-84株がコロニーを形成しており、糸状菌細胞壁の分解が示唆された。また写真2-7（右）のようにS-84株が糸状菌菌糸の外側を覆っているものも数多く存在した。

糸状菌細胞壁分解に伴うキチナーゼの誘導的生産

糸状菌細胞壁を唯一の培養基質とした糸状菌細胞壁培地にS-84株を接種し、経時的に培地中のキチナーゼ活性とタンパク質濃度を測定した（図2-8）。図のようにキチナーゼ活性は約30時間後から急速に増加しており、培養70時間後に最大活性が得られた。それに対して培養液中のタンパク質濃度は緩やかに増加し、40時間以降はほとんど変化がみられなかった。比活性は70時間後以降は変化しなかった。

4-MU-2糖や4-MU-3糖に対する活性は、キチンを基質としたときと同様に、4-MU-3

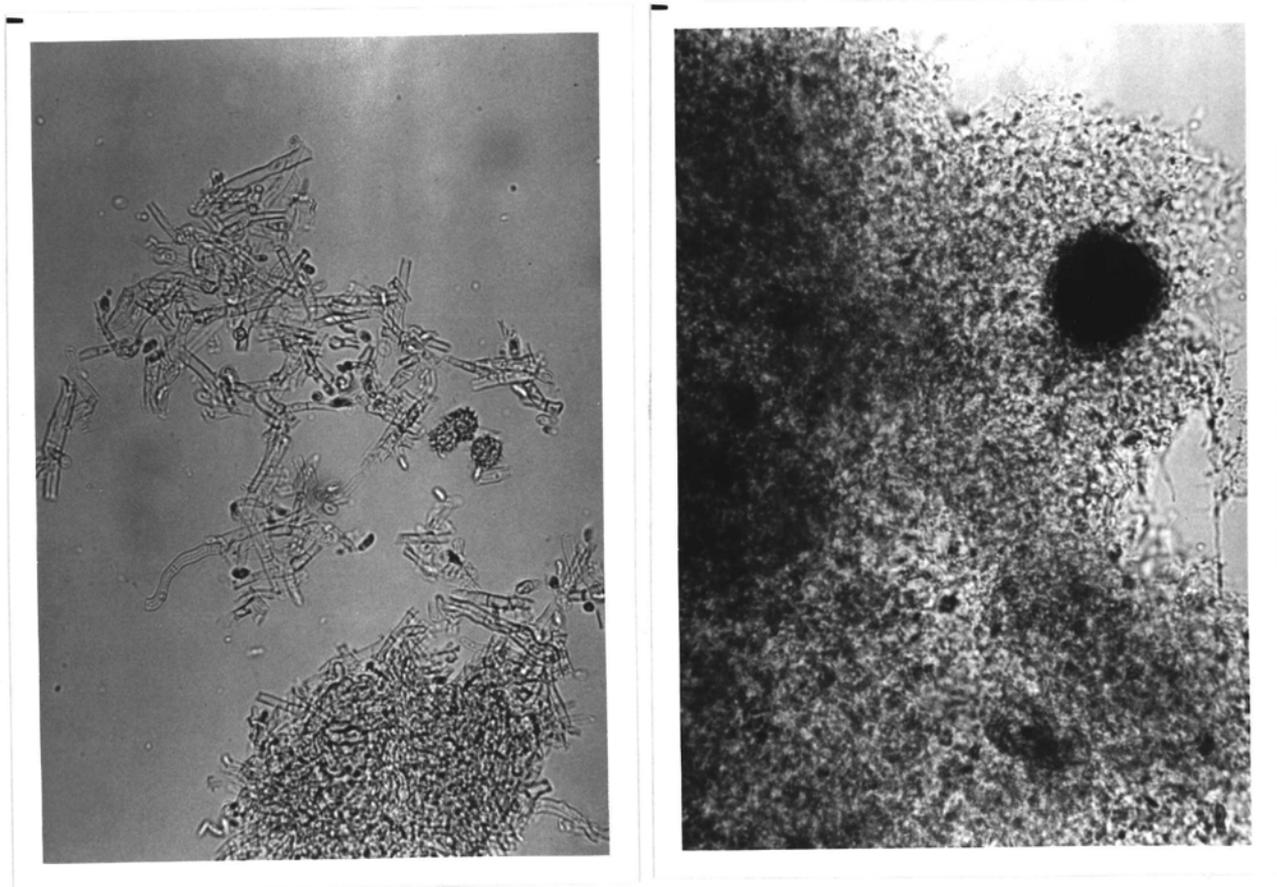


写真 2 - 6 糸状菌細胞壁培地に *Streptomyces erythraeus* S-84株を
接種する前（左）及び接種後の顕微鏡写真（右）

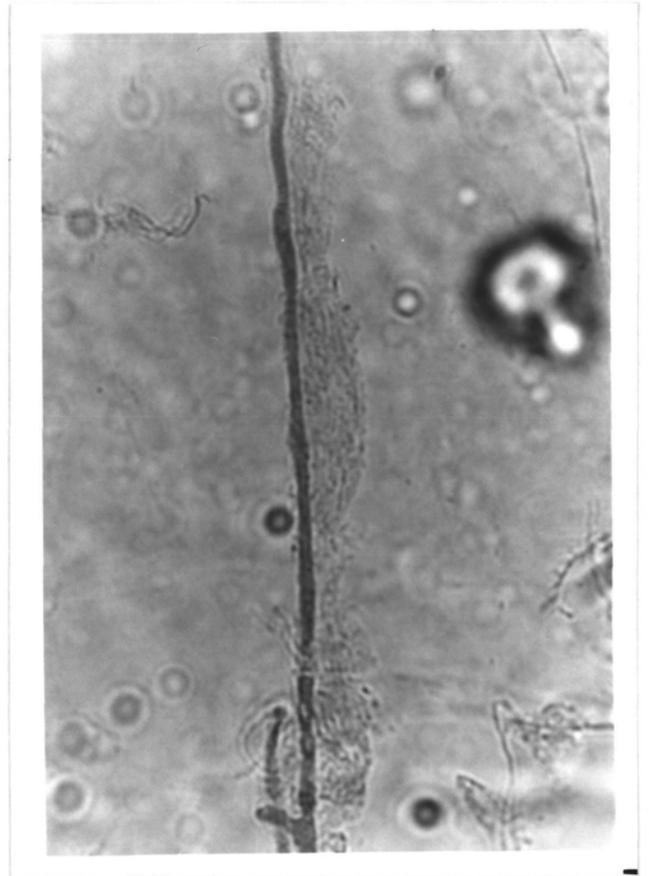


写真 2 - 7 *Streptomyces erythraeus* S-84株と *Fusarium oxysporum* f. sp

batatas NIAES 5115株を対峙培養したときの顕微鏡写真

左) S-84株が糸状菌菌糸の一部に塊状となって接触して増殖している。

右) S-84株が糸状菌菌糸を覆うように生育している。

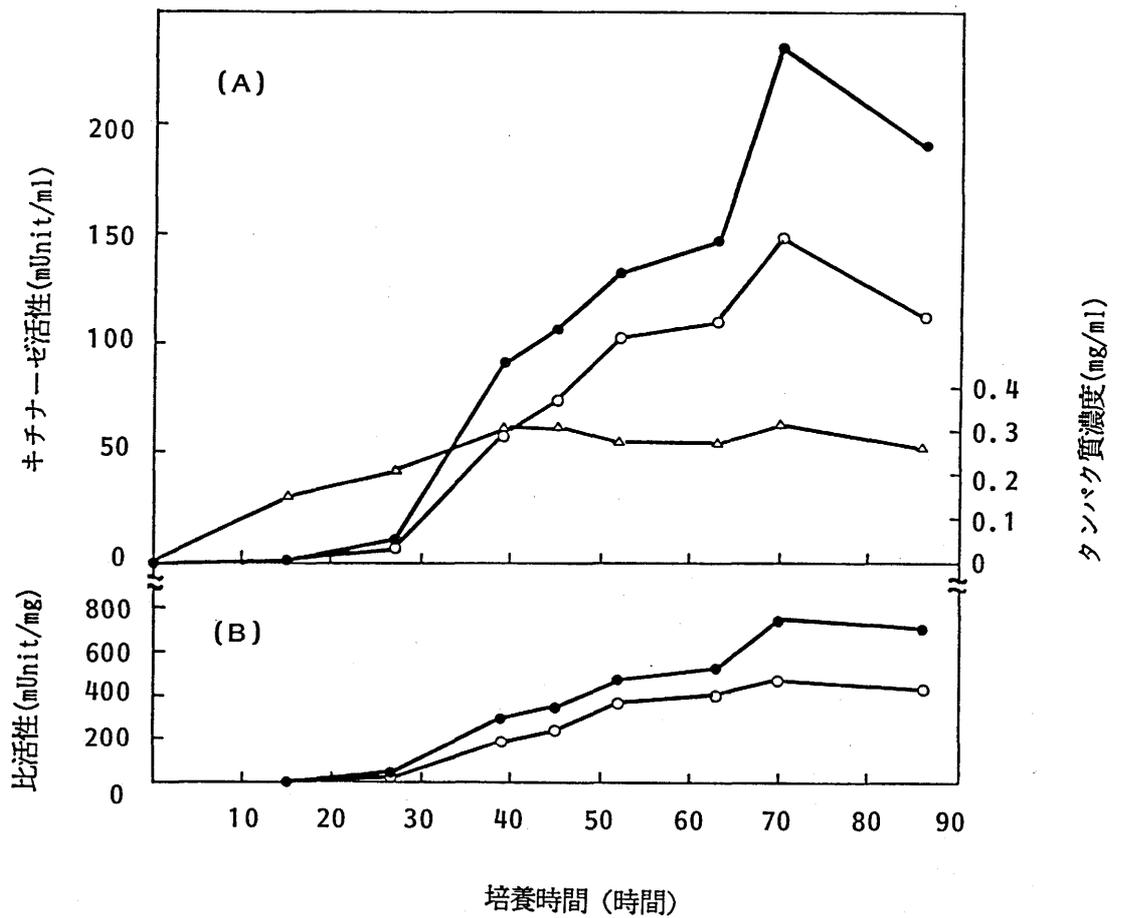


図 2-8 糸状菌細胞壁培地に *Streptomyces erythraeus* S-84 株を接種したときの培地のキチナーゼ活性、タンパク質濃度、比活性の経時変化
 (A): ○, 4-MU-2 糖分解活性; ●, 4-MU-3 糖分解活性;
 △, タンパク質濃度.
 (B): ○, 4-MU-2 糖分解活性; ●, 4-MU-3 糖分解活性.

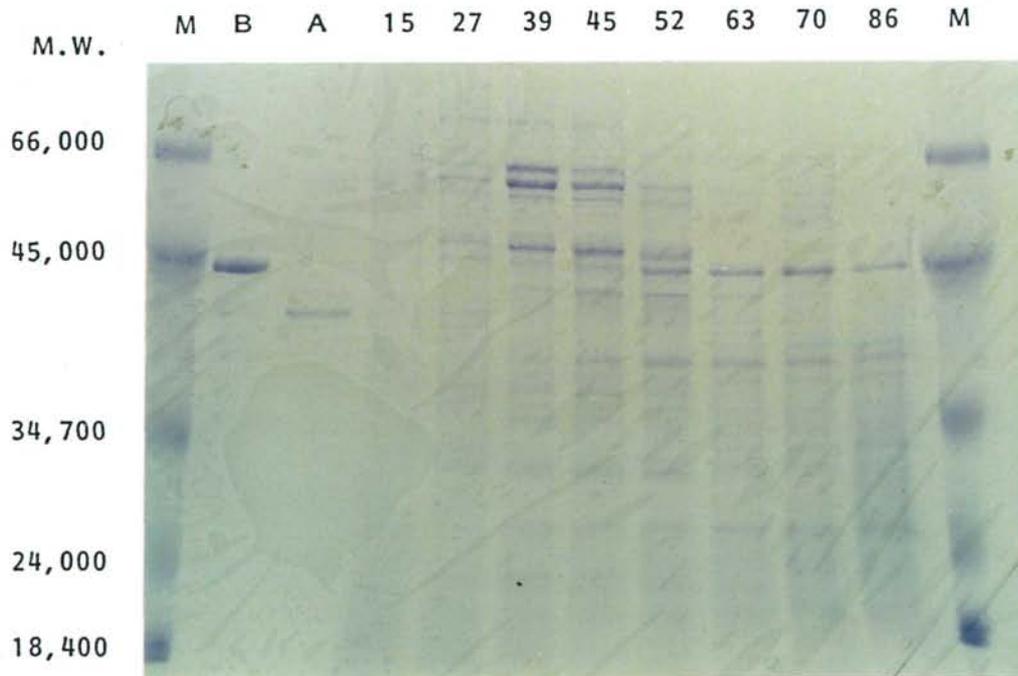


写真 2 - 8 *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* NIAES 5115株の細胞壁を炭素源とした培地で *Streptomyces erythraeus* S-84株を培養したときの培養液の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動
M, 分子量マーカー(標準タンパク質); A, Chitinase A;
B, Chitinase B; 数字は培養時間(hr)を表す。

糖分解活性の方が高かった。4-MU-2 糖と4-MU-3 糖分解活性の比率は培養全般にわたって大きく変化することはなかった。

それぞれの活性測定時に1mlの培養液を採取し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した結果を写真2-8に示した。写真のとおり時間を経るにしたがって、chitinase Bのバンドが濃くなった。またバンドの濃さはキチナーゼ活性の増加に平行して濃くなっていることが確認された。これらのことにより、S-84株の糸状菌細胞壁分解においてはchitinase Bが誘導的に生産され、細胞壁分解が行われていることが示された。chitinase Aのバンドについては培養27時間後の培養液中に同程度の分子量を持つ微量の蛋白が確認されたが、このバンドの同定にまで至らなかった。

2-5-3 考察

S-84株は糸状菌(NIAES 5115株とNIAES 5117株)細胞壁を分解した。また糸状菌細胞壁分解において、S-84株はchitinase Bを誘導的に生産し、細胞壁分解を行っていることが示された。糸状菌細胞壁を基質にしたときの培養後期には殆ど糸状菌細胞壁が確認されないほど分解されており、S-84株はキチナーゼ以外にも、これらの糸状菌細胞壁を分解するために必要な酵素を生産しているものと考えられる。しかし本実験で用いた糸状菌細胞壁はアセトン処理によって脂質やタンパク質がある程度除かれており、自然界における細胞壁の分解においてその分解速度は当然遅くなるであろう。

S-84株とNIAES 5115株を対峙培養した時に、両菌株間において拮抗現象は確認されず、むしろ両菌株の菌糸は接触していた。これはS-84株が抗菌物質生産を行わず、NIAES 5115株の生育がS-84株に比べて旺盛であったためと考えられる。また両菌株の菌糸が接触している部分を顕微鏡観察したところ、S-84株がNIAES 5115株の菌糸

に接触して増殖していること観察されたが、その形態はS-84株が塊状になって糸状菌菌糸に接触しているもの、糸状菌菌糸表面を覆うように増殖しているものの2種類に分けられた。塊状になっているものは糸状菌菌糸の一部分に接触しているため、おそらく糸状菌細胞壁の一部分を分解し、そこから漏出した細胞内容物を栄養源として増殖した結果、そのような形状になったものと考えられる。

放線菌による糸状菌菌糸の溶解については、寄生性の放線菌が糸状菌菌糸を部分的に分解し、糸状菌菌体中に貫入しているところの電子顕微鏡写真を撮影した報告がある(Sutherland and Lockwood, 1984; Sutherland et al., 1984)。これらの菌株は糸状菌細胞壁を分解して細胞内に進入しており、キチナーゼ生産が行われていたと報告している。S-84株の場合、糸状菌細胞壁を分解し糸状菌菌体に接触して増殖することは確認されたが、寄生については確認できなかった。

2-6 要約

土壌放線菌が行う有機物分解に関して知見を得ることを目的とし、各種土壌から分離された放線菌がどの程度の割合で各種加水分解酵素生産をしているかを調べた。東京都農業試験場と千葉県農業試験場の化学肥料区、コンポスト施用区、および栃木県農業試験場の化学肥料区、おがくず堆肥施用区、12カ月腐熟堆肥施用区から分離された放線菌517菌株のキチナーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ、ペクチナーゼ生産を各種寒天培地を用いて調べた。分離源土壌に関わらず、プロテアーゼ、アミラーゼ、セルラーゼを菌体外に生産する放線菌の割合が高く、ほとんどの場合、分離放線菌菌株の70~97%がこれらの酵素を生産していた。キチナーゼやペクチナーゼ生産割合は若干低く、大半の土壌において分離菌株の30~70%が生産していた。土壌の種類あるいは管理が異なってもそれぞれの酵素生産割合には一定の

傾向は見られなかった。

分離された放線菌菌株の中からキチナーゼ生産能が強く、 β -1,3-グルカナーゼ、セルラーゼ、プロテアーゼ、アミラーゼ、ペクチナーゼを有する菌株を選抜した (*Streptomyces erythraeus* S-84株)。以後この菌株のキチナーゼ生産について検討を行った。

S-84株の培養基質とキチナーゼ生産の関係について調べた。培養基質として糸状菌細胞壁 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* NIAES 5115株および *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* NIAES 5117株)、キチンを用いることによりキチナーゼ生産が強力に誘導された。またキチン培地にN-アセチルグルコサミンを添加することにより、キチナーゼ生産の促進効果がみられた。一方キチンで培養している途中でグルコースを添加することにより、キチナーゼ生産が抑制された。フラクトースにおいても弱い抑制効果がみられた。これらの抑制効果は、cAMPを培地に添加しても解除されず、cAMP濃度関与ではないことが示唆された。

S-84株の生産するキチナーゼの分離精製を行った。精製は陰イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過を行い、chitinase Aとchitinase Bの2種類のキチナーゼが単離され、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一のバンドを呈した。活性量比としては、chitinase Bが全活性の99%以上を占めた。chitinase Aは4-MU-3糖よりも4-MU-2糖分解活性が高く、chitinase Bは逆の傾向を示した。chitinase Aとchitinase Bの酵素学的性質を調べたところそれぞれ、分子量が41,000と44,000、等電点が8.3と4.8、至適pHが3.4~4.2と6.3~6.8、4-MU-2糖に対する K_m 値が49.2 μ Mと13.5 μ M、4-MU-3糖に対する K_m 値が13.5 μ Mと2.7 μ Mであった。chitinase B活性に対する金属イオン、修飾試薬、糖類の影響を調べたところ、 Pb^{2+} イオンとp-chloromercuribenzoic acidによって活性の阻害がみられた。chitinase Bの抗体をウサギを用いて調製し、各精製酵素に反応させたところ、

chitinase Aの活性は阻害されなかったがchitinase Bの活性は有意に阻害され、2つのキチナーゼは免疫学的に異なることが証明された。精製酵素にコロイダルキチンを作用させ、分解物質を同定したところ、2種類の酵素ともN,N'-ジアセチルキトビオース（2糖）を主に生産していた。そのほかに若干量のN-アセチルグルコサミン（単糖）、N,N',N"-トリアセチルキトリオース（3糖）の精製が確認された。p-ニトロフェニルキトオリゴ糖（1～4糖）に精製キチナーゼを反応させたところ、両キチナーゼとも非還元末端から2つめのグリコシド結合の分解速度が速いことが分かった。またchitinase Aは糖鎖が長くなるにつれて分解速度が速くなる傾向があった。両キチナーゼはendo型酵素と考えられた。

病原糸状菌（NIAES 5115株およびNIAES 5117株）の細胞壁を唯一の培養基質とした寒天培地にS-84株を接種したところ、S-84株は糸状菌細胞壁を分解し、コロニーの周辺を透明にした。このことからS-84株は糸状菌細胞壁分解酵素を菌体外に分泌することが確認された。また液体培地に接種した場合にも糸状菌細胞壁の分解が認められた。S-84株とNIAES 5115株をキチン培地上で対峙培養したところ、NIAES 5115株は阻害されることなく生育し、菌糸の一部がS-84株の菌糸と接触した。このことからS-84株はこの*Fusarium*属糸状菌に対する抗菌物質を生産しないと考えられた。S-84株の菌糸とNIAES 5115株の菌糸が接触した部分を顕微鏡観察したところ、S-84株が糸状菌菌糸の一部分に塊状となって接触して増殖したり、糸状菌菌糸を覆うように増殖しているところが見られ、糸状菌菌体を溶解していることが示唆された。

第3章 *Trichoderma*属糸状菌によるキチナーゼ生産

*Trichoderma*属糸状菌には病原糸状菌に寄生し、糸状菌を死滅させるものが多く報告されている。これらは病原糸状菌抑制のための生物的防除の手段として注目を集め、既に実用化されている。これらの*Trichoderma*属糸状菌による病害抑制の機作については、*Trichoderma*属糸状菌の生産する抗菌性物質によるものと考えられていたが、最近ではキチナーゼによるものとする説が有力である。こうした*Trichoderma*属糸状菌のキチナーゼ生産を培養基質の観点から検討し、放線菌の場合と比較することは、キチナーゼの生物的防除への利用を図る上で重要であると考えられる。ここでは*Trichoderma*属糸状菌によるキチナーゼ生産と培養基質の関係を中心に検討を行った。

3-1 *Trichoderma*属糸状菌によるキチナーゼ生産

*Trichoderma*属糸状菌が病原糸状菌に寄生する際には細胞壁分解酵素としてキチナーゼを生産していると報告が多く、*Trichoderma*属糸状菌の病原糸状菌に対する寄生にはキチナーゼ生産が不可欠であると考えられる。そこで本研究では9菌株の*Trichoderma*属糸状菌を供試し病原糸状菌と対峙培養を行い、*Trichoderma*属糸状菌の菌糸と病原糸状菌菌糸が接触する部分でキチナーゼが生産されているのかどうかを調べた。

3-1-1 実験材料および方法

供試菌株

本実験に用いた菌株は、北海道大学農学部(AHU)と(財)発酵研究所(IFO)から譲渡された保存菌株と、農林水産省農業環境技術研究所の沢田泰男氏が土壌から分離した菌株を用いた。表3-1に使用菌株の名称とコロニー色を示した。これらの菌株はポテトデキストロース寒天培地(培地17)あるいは、麦芽エキス寒天培地(培地18)で保存した。また病原糸状菌として、*Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* NIAES 5115株および*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* NIAES 5117株を用いた。

対峙培養およびキチナーゼ生産

ポテトデキストロース寒天培地に各*Trichoderma*属糸状菌と各病原糸状菌(NIAES 5115株とNIAES 5117株)を同時に接種し、25°Cで保温した。

菌糸のキチナーゼ活性の測定は、培養を始めて2週間後に*Trichoderma*属糸状菌の菌糸および*Trichoderma*属糸状菌菌糸と病原糸状菌菌糸が接触している部分を滅菌したつまようじで採取し、濾紙(Whatman No. 2)に移して、0.1M Tris-HCl (pH 6.8)と4-MU-2糖あるいは3糖の基質の1:1(v/v)混液50 μ lを添加し、5分後に50 μ lの0.3M K₂HPO₄-NaOH (pH 11.0)を加えて反応を終了させ、トランスイルミネーター上に置いてキチナーゼによって遊離された4-MUの発する蛍光の有無を調べた。キチナーゼ活性がある場合には、紫色の蛍光が確認された。なおコントロールとして基質混液を用い、キチナーゼ活性の存在の確認を行った。

3-1-2 結果

*Trichoderma*属糸状菌と病原糸状菌との対峙培養

*Trichoderma*属の各菌株と病原糸状菌(NIAES 5115株あるいはNIAES 5117株)をポ

表 3 - 1 供試 *Trichoderma* 属菌株

菌株名	菌株番号	コロニーの色
<i>Trichoderma viride</i> Persoon ex Gray	AHU 9140	暗緑～暗青緑
<i>Trichoderma album</i> (Bonorden) Bainier	AHU 9462	緑
<i>Trichoderma lignorum</i> Rifai	AHU 9476	淡緑～黄緑
<i>Trichoderma koningii</i> Oudemans	AHU 9485	白→緑→暗緑
<i>Trichoderma polysporum</i> (Link ex Rersoon) Rifai	IFO 9322	白
<i>Trichoderma pseudokoningii</i> Rifai	IFO 30903	黄緑
<i>Trichoderma viride</i> Persoon ex Fries	IFO 30498	暗緑
<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonorden) Baincer	IFO 31291	淡黄緑
<i>Trichoderma viride</i> (沢田氏分離株)	sawada	暗緑

a) 菌株番号にAHUがついている菌株は北海道大学農学部、IFOがついているものは(財)発酵研究所から譲渡を受けたものである。

テトデキストロース寒天培地上で対峙培養した。病原糸状菌の2菌株を単独で接種した場合には、同培地上に10日前後でプレート一面に増殖することが予め確認された。対峙培養を行って一週間目の各 *Trichoderma* 属糸状菌と病原糸状菌2菌株の生育状態を写真3-1に示した。培養期間中 *Trichoderma* 属の菌株に比べて、病原糸状菌の生育は2菌株とも遅い傾向があった。*Trichoderma* 属糸状菌においては *T. album* AHU 9462株と *T. polysporum* IFO 9322株は他の *Trichoderma* 属の菌株に比べて生育が若干遅い傾向にあった。写真3-1のように *F. oxysporum* NIAES 5117株がピンクの色素を生産していた。

培養2週間目では、全ての *Trichoderma* 属糸状菌が両病原糸状菌のコロニー上に菌糸を伸長させた。とくに *T. koningii* AHU 9485株は培養1週間目ですでに両病原糸状菌のコロニー上に緑色の菌糸を伸ばし、両病原糸状菌のコロニーの大部分を覆っていた(写真3-1)。AHU 9485株は最終的に両病原糸状菌のコロニーを覆いつくし、病原糸状菌の菌糸と思われるものは確認できなくなった。NIAES 5117株の生産した色素も徐々に色が確認されないまでに消失した。他の菌株ではAHU 9485株ほどではなかったが、徐々に両病原糸状菌のコロニー上に菌糸を伸ばしている様子が観察された。本実験で用いた *Trichoderma* 属の菌株からは、両病原糸状菌に対する抗菌物質は特に生産されていないことが示された。

Trichoderma 属糸状菌によるキチナーゼ生産

対峙培養で生育させた各 *Trichoderma* 属糸状菌の菌糸を採取してキチナーゼ活性の有無を調べたところ、本研究に供試した全ての *Trichoderma* 属糸状菌において、*Trichoderma* 属糸状菌だけが生育している部分および *Trichoderma* 属糸状菌と病原糸状菌の菌糸が接触している部分に、はっきりとキチナーゼ活性が確認された(図示せず)。菌体量を正確に把握できないため活性を定量するには至らなかったが、

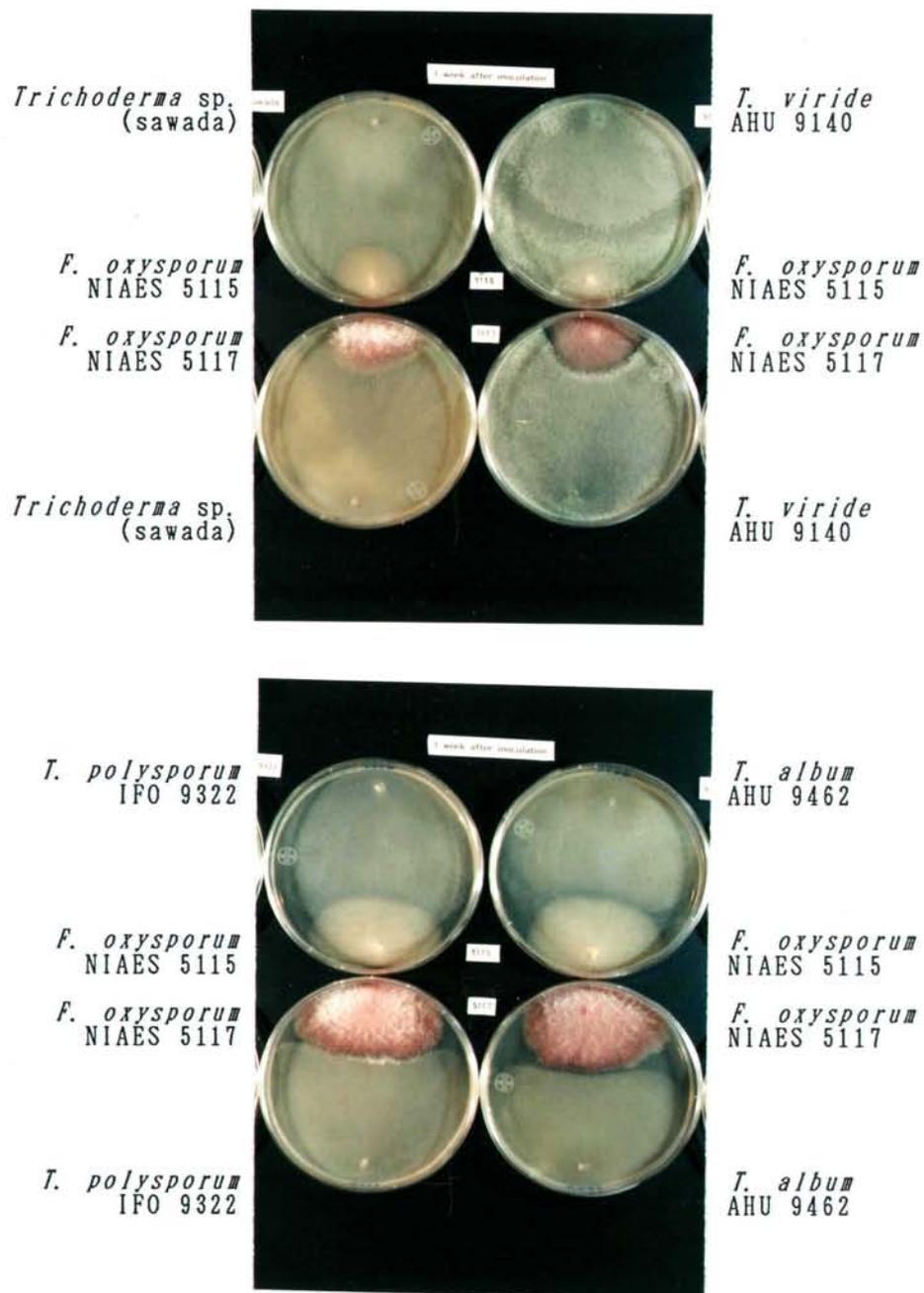


写真3-1 ポテトデキストロス寒天培地におけるに各 *Trichoderma* 属菌株と各 *Fusarium* 属菌株の対峙培養（接種後1週間目のもの）

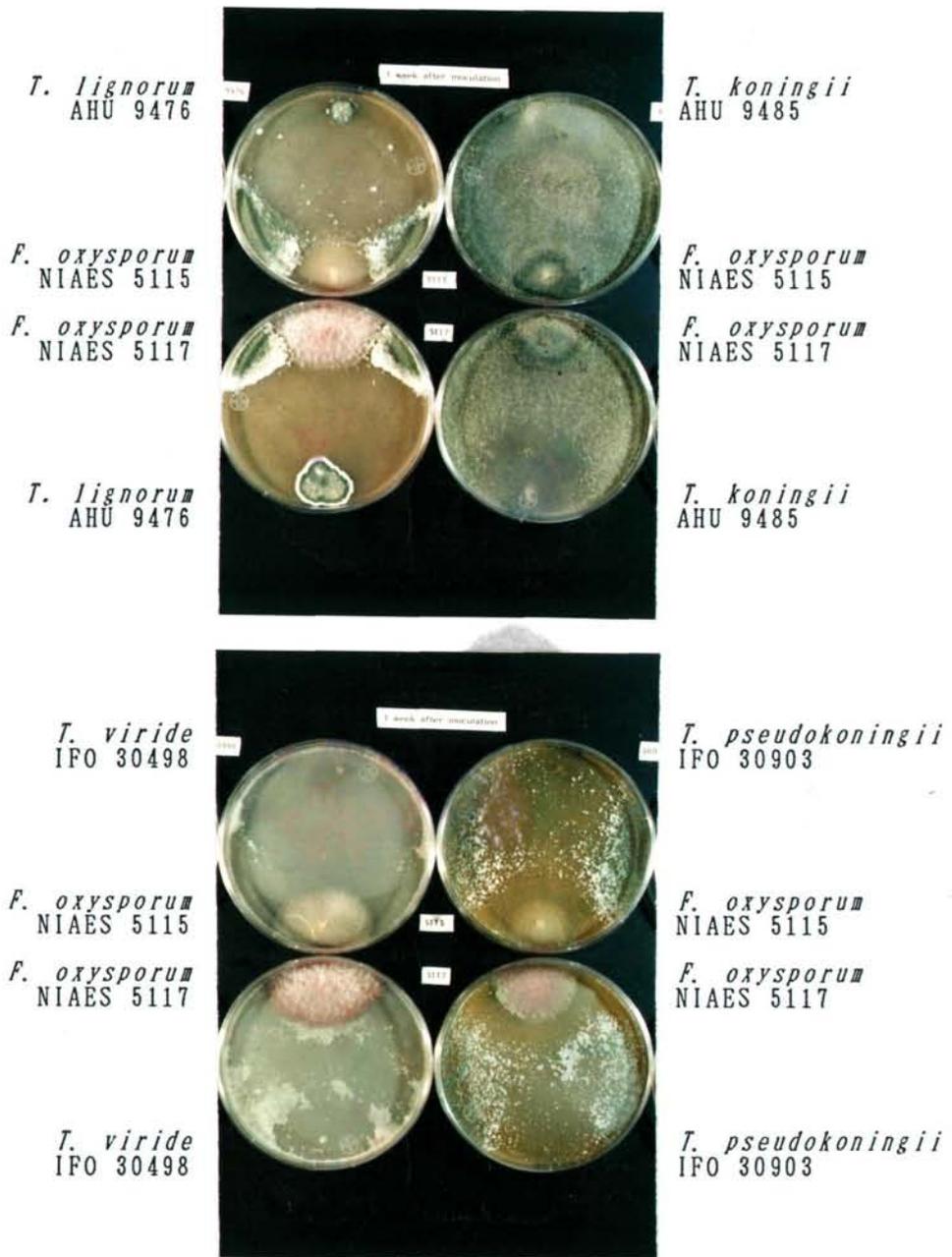


写真3-1 ポテトデキストロース寒天培地におけるに各 *Trichoderma* 属菌株と
 (続き) 各 *Fusarium* 属菌株の対峙培養 (接種後1週間目のもの)

T. hamatum
IFO 31291

F. oxysporum
NIAES 5115

F. oxysporum
NIAES 5117

T. hamatum
IFO 31291

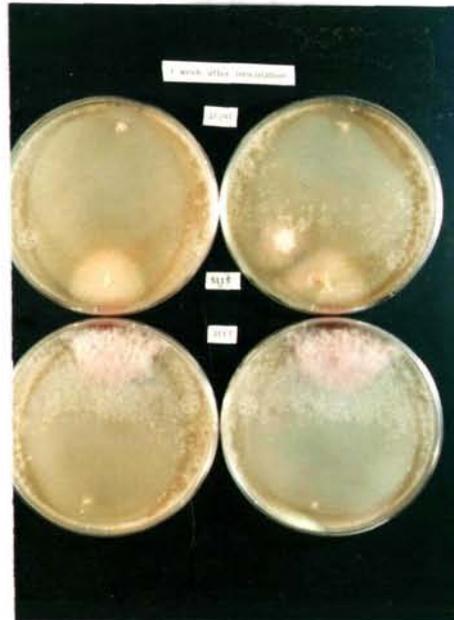


写真3-1 ポテトデキストロス寒天培地におけるに各 *Trichoderma* 属菌株と
(続き) 各 *Fusarium* 属菌株の対峙培養 (接種後1週間目のもの)

4-MU-2糖、3糖とも分解活性があることが確認された。また培地そのものにはキチナーゼ活性がないことも確認された。

3-2 培養基質が *Trichoderma* 属糸状菌のキチナーゼ生産に与える効果

2-3において放線菌のキチナーゼ生産における培養基質の効果を検討したと同様に、*Trichoderma*属糸状菌においてもキチナーゼの生産条件を調べ、放線菌と差異があるか否かについて検討した。

3-2-1 実験材料および方法

供試菌株

*Trichoderma*属糸状菌として表3-1に示した9菌株を供試した。

液体培養

培養基質がキチナーゼ生産に与える効果を調べるための方法は2-3-2に記述されたものと同様に行った。また構成的に生産されるキチナーゼ量を調べるために、グリセロール培地（培地19）を用いた。

3-2-2 結果

各 *Trichoderma* 属の菌株を放線菌の場合と同様にキチン培地で培養し、キチナーゼ生産が生じるかどうかを調べた。その結果を表3-2に示した。本研究で用いた *Trichoderma* 属糸状菌のうち、キチン培地でよく生育するものは少なく、*T. viride*

表3-2 各 *Trichoderma* 属菌株をキチン培地で培養したときの
培地のキチナーゼ活性の最高値

菌株		キチナーゼ活性(munit/ml)	
		4-MU-2 糖分解	4-MU-3 糖分解
<i>T. viride</i>	AHU 9140	0.13	0.45
<i>T. album</i>	AHU 9462	ND	ND
<i>T. lignorum</i>	AHU 9476	0.28	0.11
<i>T. koningii</i>	AHU 9485	0.01	0.01
<i>T. polysporum</i>	IFO 9322	0.48	1.27
<i>T. pseudokoningii</i>	IFO 30903	0.48	0.94
<i>T. viride</i>	IFO 30498	13.1	41.2
<i>T. hamatum</i>	IFO 31291	0.24	0.56
<i>T. viride</i>	sawada*	10.2	38.4

a) 沢田泰男氏分離株

ND : 検出されず。

表3-3 各 *Trichoderma* 属菌株をグリセロール培地で培養したときの
培地のキチナーゼ活性の最高値

菌株		キチナーゼ活性(munit/ml)	
		4-MU-2 糖分解	4-MU-3 糖分解
<i>T. viride</i>	AHU 9140	0.30	0.01
<i>T. album</i>	AHU 9462	0.03	0.01
<i>T. lignorum</i>	AHU 9476	0.01	ND
<i>T. koningii</i>	AHU 9485	0.04	0.03
<i>T. polysporum</i>	IFO 9322	ND	ND
<i>T. pseudokoningii</i>	IFO 30903	ND	ND
<i>T. viride</i>	IFO 30498	0.01	0.01
<i>T. hamatum</i>	IFO 31291	0.01	ND
<i>T. viride</i>	sawada ^a	0.01	ND

a) 沢田泰男氏分離株

ND : 検出されず。

表3-4 各種炭素源添加が *Trichoderma viride* IF0 30498 のキチナーゼ生産に与える影響*

添加基質	濃度	キチナーゼ活性 (mUnit/ml)					
		基質添加 7 2.時間後			基質添加 9 6 時間後		
		4-MU-2 糖分解活性 (%)	4-MU-3 糖分解活性	4-MU-2 糖分解活性	4-MU-3 糖分解活性	4-MU-2 糖分解活性	4-MU-3 糖分解活性
無添加	-	0.08	0.37	1.3		2.5	
N-アセチルグルコサミン	0.3	0.04	0.05	0.08		0.09	
グルコサミン	0.3	8.4	6.7	11.0		8.1	
フラクトース	0.3	4.2	6.4	4.9		5.2	
	0.1	2.3	2.7	2.2		2.1	
グルコース	0.3	0.01	0.03	0.05		0.26	
	0.1	0.02	0.13	4.6		2.6	
キシロース	0.3	0.01	0.09	0.31		1.8	
	0.1	0.06	0.34	57.0		2.2	

a) *T. viride* IF0 30498 を 2 日間キチン培地で培養し、各炭素源を添加して 72 時間後と 96 時間後の培地中のキチナーゼ活性を測定した。

IFO 30498株と沢田氏分離菌株だけであり、この2菌株だけが高いキチナーゼ活性を示した。残りの菌株は若干生育が確認され、極く低いキチナーゼ活性を呈するにとどまった。*T. album* AHU 9462株はキチン培地では全く生育しなかった。キチナーゼ活性の高かった*T. viride* IFO 30498株と沢田氏分離菌株の最高活性は同程度であったが、*Streptomyces erythraeus* S-84株の生産量に比べると1/2~1/3の程度であった。

グリセロールは*Trichoderma*属の菌株の酵素生産に影響が少ない基質とする報告があることから、供試菌株をグリセロール培地で培養し、構成的に生産されるキチナーゼのレベルを調べた。各*Trichoderma*属糸状菌の生育は良好で、接種後3日目ではほとんどの菌株で菌体密度が最高に達していた。培養液中のキチナーゼの最高活性を表3-3に示したが全体的に活性は低く、高いものでも*T. viride* AHU 9140株の4-MU-2糖分解活性にみられる程度であり、*T. polysporum* IFO 9322株や*T. pseudo-koningii* IFO 30903株では全くキチナーゼ活性が検出されなかった。

キチン培地で生育し、キチナーゼを生産した*T. viride* IFO 30498株を用い、キチン培地で生育させている途中（接種48時間後）に各種の基質を加えて、キチナーゼの生産に対する基質の影響を調べた。表3-4がその結果であるが、何も加えない場合に比べて、グルコサミン、フラクトースを添加した場合には、キチナーゼ生産が急激に増加することが確認された。特にグルコサミンを添加したときには、4-MU-2糖分解活性だけが高まっており、他の培地での場合と大きく異なっていた。N-アセチルグルコサミン、グルコース、キシロースを添加した場合には、無添加の場合に比べキチナーゼ活性が低く、キチナーゼ生産が抑制されていた。N-アセチルグルコサミン添加は、S-84株の場合むしろキチナーゼ生産を促進させており、IFO 30498株は逆の結果を呈した。グルコースやキシロースは濃度が高くなるほど抑制効果が強く現れていた。

3 - 3 考察

供試した全ての *Trichoderma* 属糸状菌は、ポテトデキストロース寒天培地における対峙培養で、キチナーゼ生産を行っていた。本実験では、*Trichoderma* 属糸状菌のキチナーゼ生産は *Trichoderma* 属糸状菌の菌糸を採取し、直接基質を作用させて活性の有無を調べたが、このような方法はキチナーゼ活性を持つ菌株の選抜において汎用されており、活性が存在する場合、はっきり 4-MU-の蛍光が確認されるため、キチナーゼ生産の有無について調べる限りでは信頼がおける方法であると考えられる。

Trichoderma 属糸状菌のキチナーゼ生産を放線菌の場合と比較するためにキチン培地で生育させたところ、放線菌と一致しない点がみられた。すなわち、放線菌でキチナーゼを生産する菌株はキチンを唯一の培養基質として生育し、キチナーゼを誘導的に生産するが、*Trichoderma* 属糸状菌の場合はキチナーゼ生産菌であってもキチン培地で生育できない、すなわちキチンを唯一の培養基質として生育できない菌株が存在するということである。グリセロール培地には生育因子 (growth factor) を添加しなくても旺盛な増殖を行うことが確認されており、キチン培地で生育しなかったのは生育因子が存在しなかったためではなく、キチンを唯一の培養基質として利用できなかったためであると考えられる。このような点から *Trichoderma* 属糸状菌におけるキチナーゼ生産の意義は放線菌のものとは異なっていることが考えられる。すなわち、放線菌の場合はキチナーゼを生産してキチン分解物を菌体内に吸収し、菌体の炭素源およびエネルギー源として用いる。しかし *Trichoderma* 属糸状菌の場合はキチンを唯一の培養基質として生育できない菌株も存在することから、基質として利用するためよりもむしろ糸状菌に寄生するための手段としてキチナーゼを生産している菌株が存在することが示唆される。しかし *Trichoderma* 属糸状菌のうち *T. viride* IFO 30498 株と沢田氏分離菌株においては放線菌と同様にキチンを唯一の

培養基質として生育することができ、放線菌同様キチンによってキチナーゼ生産が誘導されたと考えられる。

*Trichoderma*属糸状菌にはそれ自身の細胞壁にキチンが存在するために、放線菌に比べ、多量のキチナーゼを構成的に生産している可能性が高いと考えられる。また構成的に大量のキチナーゼを生産する菌株も報告されている。このような理由から *Trichoderma*属糸状菌のキチナーゼの構成的生産レベルを知るために、*Trichoderma*属の各菌株をグリセロール培地で培養を行った。全部の菌株において良好な増殖が確認されたが、キチナーゼ活性は *T. viride* AHU 9140株の4-MU-2糖分解活性において若干高い値が得られているだけで、他のキチナーゼ活性はかなり低いものであった。放線菌をキチン以外の基質で培養してもこの程度の活性は確認されており、グリセロールによって構成的なキチナーゼの生産も抑制されている可能性も考えられる。

放線菌と同様にキチンを唯一の培養基質として生育し、キチンによってキチナーゼ生産が誘導される *T. viride* IFO 30498株のキチナーゼ生産についてさらに詳しい知見を得るために、キチン培地で培養している途中に各種基質を添加して、キチナーゼ生産に及ぼす影響を調べた。結果的にS-84株の場合といくつかの相違点があることが分かった。すなわち *Streptomyces erythraeus* S-84株のキチナーゼ生産に関して基質は、①キチナーゼ生産を誘導するもの、②キチナーゼ生産に対して促進的に働くもの、③キチナーゼ生産を抑制するものの3種類に分類された。IFO 30498株においてもキチナーゼ生産に関わる基質は少なくとも上記の①～③に分類される。しかし、その内容についてはS-84株の場合に比べてかなり違いが生じている。なぜならS-84株では促進効果をもつN-アセチルグルコサミンが抑制効果を、弱い抑制効果を持つフラクトースが促進効果を、グルコサミンとキシロースがそれぞれ促進効果をもっているのである。グルコースを添加したときのみ両菌株においてキ

チナーゼ生産の抑制がみられるという点で一致したにすぎなかった。*Trichoderma*属糸状菌のキチナーゼ生産と培養基質基質の関係は、S-84株の場合とかなり異なっていたが、キチナーゼ生産において独特な生産調節が行われることが分かった。

3-4 要約

*Trichoderma*属糸状菌は病原糸状菌に寄生することにより病害を抑制する特性を持つことから生物的防除の手段として注目を集め、実用化されている糸状菌である。

*Trichoderma*属糸状菌が病原糸状菌に寄生する際にキチナーゼを生産して細胞壁を分解していることが判っており、キチナーゼが重要な役割を担っていることが示されている。キチナーゼの生物的防除としての利用を図るにおいて、放線菌のキチナーゼ生産の場合と比較してどのような点が異なるのかについて知見を得ることは重要であると考え、培養基質とキチナーゼ生産との関係について検討を行った。

*Trichoderma*属糸状菌9菌株と病原糸状菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* NIAES 5115株および *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* NIAES 5117株) 2菌株をそれぞれ対峙培養したところ、全ての *Trichoderma*属糸状菌は両病原糸状菌のコロニー上に菌糸を伸長させた。また全ての *Trichoderma*属糸状菌は両病原糸状菌に対して抗菌物質を生産しなかった。各 *Trichoderma*属糸状菌の菌糸を採取してキチナーゼ活性の有無を調べたところ、全菌株においてキチナーゼ活性が確認された。4-MU-2糖、3糖とも分解活性が存在した。

各 *Trichoderma*属糸状菌を放線菌の場合と同様にキチン培地で培養し、キチナーゼ生産が生じるかどうかを調べたところキチン培地でよく生育し、キチナーゼ生産がキチンによって誘導されるものは、供試した9菌株中 *T. viride* IFO 30498株と沢田氏分離菌株の2菌株だけであった。*Trichoderma*属糸状菌の生産するキチナーゼは糸

状菌に寄生する手段としての意義が大きい可能性が示唆された。*T. viride* IFO 30498株と沢田氏分離菌株の最高活性は同程度であり、*Streptomyces erythraeus* S-84株の生産量の1/2~1/3にあたった。

グリセロール培地を用いて構成的に生産されるキチナーゼのレベルを調べたところ供試した9菌株の*Trichoderma*属糸状菌は全て良好に生育したが、キチナーゼ活性は全体的に低く、*T. viride* AHU 9140株の4-MU-2糖分解活性において若干高い値が確認された程度であった。グリセロールによるキチナーゼ生産の抑制も考えられた。

キチン培地で生育し、キチナーゼを生産した*T. viride* IFO 30498株を用い、キチン培地で生育させている途中に各種の基質を加えて、キチナーゼの生産に対する基質の影響を調べた。何も添加しない場合に比べて、グルコサミン、フラクトースを添加した場合には、キチナーゼ生産が急激に増加し、特にグルコサミンを添加したときには、4-MU-2糖分解活性だけが高まった。N-アセチルグルコサミン、グルコース、キシロースを添加した場合には、キチナーゼ生産が抑制された。グルコースやキシロースでは濃度が高くなるほど抑制効果が強く現れた。これらの結果は放線菌S-84株の場合とは異なる点が多く、異なるキチナーゼ生産調節が行われていることが示唆された。

第4章 土壌におけるキチナーゼの分布と動態

土壌酵素の研究における興味対象は、酵素の供給源、存在場所、粘土粒子や腐植物質との関係、植物への養分供給に対する寄与、有機物や活性物質の変換反応に集中し、多様な土壌を用い、種々の土壌管理を行い、植物の種類を変えるなどして研究が行われてきた。キチナーゼにおいても土壌の活性が測定され、キチン施用によるキチナーゼ生産を調べたり、作物や無機肥料施用によるキチナーゼ生産に及ぼす効果が調べられたりしている。しかしキチナーゼ生産に関する基本的な知見はまだまだ少なく、測定法に関しても問題があると考えられる。そこでこの章ではまず簡便で信頼性の高い情報が得られる新しいキチナーゼ活性測定方法を検討し、続いて森林土壌のキチナーゼ活性測定、並びに畑地土壌にキチンや他の基質を添加したときのキチナーゼ活性について検討を行った。

4-1 土壌のキチナーゼ活性およびN-アセチルグルコサミニダーゼ活性の測定法の確立

カニ殻を土壌に施用することにより土壌のキチナーゼ活性が誘導的に生産され、病原糸状菌の生育が阻害を受け植物病害が抑制される報告は、前章でのべたように1960年代初頭から出されているが、土壌のキチナーゼ活性の増大と植物病害の抑制作用の関係を明確に説明している研究はない。その最大の原因は土壌のキチナーゼ活性を測定する適当な方法が開発されていなかったためと考えられる。土壌のキチナーゼ活性は、Rodriguez-Kabana(1983)らが開発した方法によって測定がなされてきた(Hanzlikova et al., 1987; McClaugherty and Linkins, 1990)。この方法の原理は、試料土壌にコロイダルキチン溶液を加え20時間程度37℃で保温した後、

生成したN-アセチルグルコサミンの量をReisigら(1955)の方法で測定するというものである。しかしながら、この方法は以下の点で問題があると考えられた。①感度が低いために20時間という長時間の反応が必要となり、その結果として土壤に含まれるキチナーゼタンパクが長時間の保温のために徐々に変性し、失活するため正確な酵素活性測定が行われない危険性が高い。②長い反応時間の間に反応生成物であるN-アセチルグルコサミンが土壤生物によって代謝・吸収されたり、また腐植酸と反応することにより、吸着されたりする可能性が高い。つまり反応生産物の評価が正確に行われない可能性が高い。③多くの微生物由来のあるいは植物由来のキチナーゼは、キチンを基質としたときの分解産物として、そのほとんどが、N,N'-ジアセチルキトビオースを中心とした、N-アセチルグルコサミンのオリゴマーを生産しており、これらのオリゴマーはReisigらの方法によっては、定量する事ができない。Rodriguez-Kabanaらの方法は、キチナーゼによって生産されたN-アセチルグルコサミンオリゴマー(特にダイマー)が土壤に付随的に存在するN-アセチルグルコサミニダーゼによってN-アセチルグルコサミンにまで分解されて生じた量を測定していることになる。つまりキチンの分解が2段階で行われていることになり、1段階めのキチナーゼ活性のみの測定ができないばかりか、活性の測定値は、土壤のN-アセチルグルコサミニダーゼ活性に依存してしまう危険性が高い。④キチン分解反応の最終生産物であるN-アセチルグルコサミンはデアセチラーゼによって脱アセチル化されてグルコサミンになりうる。グルコサミンはReisigらの方法では、測定できないためにキチナーゼの反応生成物として測定できなくなる。⑤基質として用いられるコロイダルキチンは、その調製の特異性からコロイド粒子の大きさが不均一であり、また研究室や、調製者、さらには調製するごとにその性状が異なり易い性質のものであるため、一定の品質を保つのが難しい。特に基質の性状は酵素活性に大きく影響を及ぼすため、コロイダルキチンを基質とすることについては再現

性やデータの解釈の上で問題を生じる。

以上の理由から短時間で正確に土壤のキチナーゼ活性を測定する方法が必要と考えられた。本研究では上記の①、②、③、⑤の問題点を改善することを目的とし、新しい土壤のキチナーゼ活性の測定法の確立を検討した。

4-1-1 実験材料および方法

使用土壤

供試土壤として筑波大学農林技術センター内畑地土壤（淡色黒ぼく土）を用いた。一般理化学性は、pH(H₂O) 5.2、全炭素 5.25%、全窒素 0.41%であった。

土壤のキチナーゼ活性およびN-アセチルグルコサミニダーゼ活性の測定

2mmの篩を通した新鮮土壤あるいは、採取後4℃で保存された土壤を適当量（0.5g以下）試験管にとり、制菌剤として0.1mlのトルエンを加え、室温で10分間放置した。その後1mlの0.5M トリス-マレイン酸緩衝液（pH 6.2）を加えて37℃の振とう器付きウォーターバス（太陽工業社製）で振とうしながら（150rpm）10分間保温した。その際試験管は斜めにセットして、土壤が十分に混合されるようにした。2mlの基質を加えることによって酵素反応を開始させ、適当な反応時間（通常30分程度）をおいて5mlのエタノールを加え、タッチミキサーで十分混合することにより反応を終了させた。その後卓上遠心分離器（佐久間製作所製、R90-20）で土壤を沈澱させ（2500rpm 10in）、上澄液2mlを別の試験管にとり、そこに1mlの0.5M グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液（pH 11.0）を加え、タッチミキサーで十分に混合した。この液の蛍光を蛍光光度計（日本分光製、FP-550）を用いて測定した（励起波長360nm、測定波長450nm）。測定した蛍光の強度は別に用意した検量線を用いること

により、土壌のキチナーゼおよびN-アセチルグルコサミニダーゼによって放出された4-MU量を算出した。反応液組成中の基質の代わりに蒸留水を用いたものをブランクとして測定値から差し引いた。

一方、試験管当たり、10 μ moleの4-MUを加えて、上記の方法と同様な実験を行い、加えた4-MUの回収率を算出し、土壌キチナーゼ活性値の補正を行った。

活性は、1 μ moleの4-MUを1分間に放出する酵素量を1Unitとし、乾土1 g当たりの活性として表示した。

4-1-2 結果

土壌試料量の検討

酵素反応系における土壌試料量とキチナーゼ活性およびN-アセチルグルコサミニダーゼ活性によって生産される4-MU量の関係を図4-1に示した。土壌量を少しずつ増加させた場合、0.6gを越えると、酵素反応生成物量が土壌試料量に対応して増加しなくなった。

また50mlの三角フラスコを用いて反応系を5倍量にすることにより土壌試料量を5倍量にすることも可能であった。

反応時間の検討

土壌のキチナーゼ活性およびN-アセチルグルコサミニダーゼ活性測定における反応時間と反応生成物(4-MU)量との関係を図4-2に示した。反応時間は通常20分程度で十分であるが、活性の低い土壌を試料とする場合は、反応時間を増加させることも必要となるため、ここでは、180分間まで反応時間を延長した場合の反応生成物量を検討した(図4-2)。2種類のキチナーゼ活性およびN-アセチルグルコサミニダーゼ

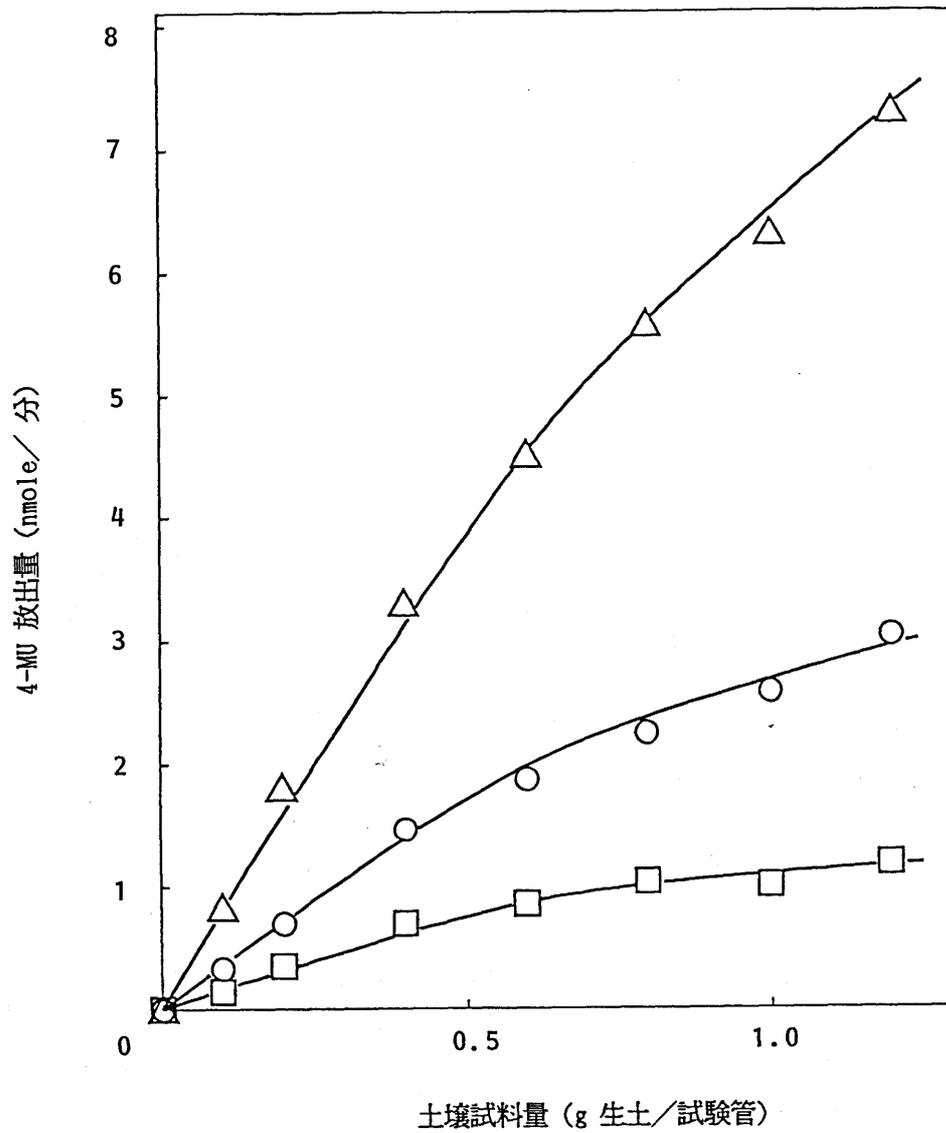


図4-1 土壤試料量と4-MU生成量との関係
 ○, 4-MU-2 糖分解活性; □, 4-MU-3 糖分解活性;
 △, N-アセチルグルコサミニダーゼ活性.

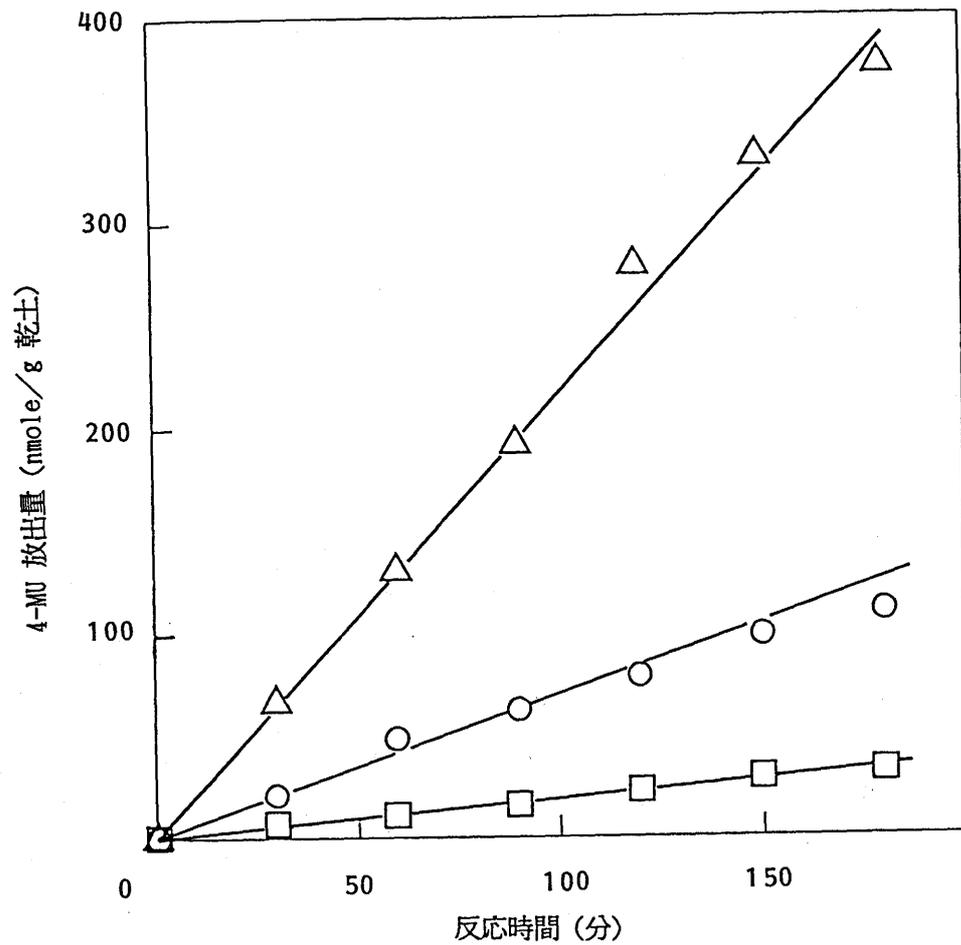


図 4 - 2 反応時間と4-MU生成量との関係
 ○, 4-MU-2 糖分解活性; □, 4-MU-3 糖分解活性;
 △, N-アセチルグルコサミニダーゼ活性.

表 4-1 キチナーゼ及びN-アセチルグルコサミニダーゼ活性測定に対するトルエン処理の効果

反応時間 (分)	トルエン処理	各酵素反応による4-MU生成量* (nmole/g 乾土)	
		N-アセチルグルコサミニダーゼ	キチナーゼ
		4-MU-2 糖分解活性	4-MU-3 糖分解活性
30	+	94.9 (4.5)	14.7 (0.2)
	-	94.7 (2.6)	14.8 (0.4)
120	+	371 (11.3)	55.0 (2.3)
	-	370 (5.5)	59.4 (4.4)
			18.6 (0.2)
			22.1 (3.3)

a) 測定は4連で行なった。括弧内の数字は標準偏差を示す。

とも反応時間を180分間まで延長しても酵素反応生成物は、時間経過に比例して増加した。

トルエン添加の検討

多くの土壌酵素の活性測定法において、酵素反応中、土壌生物（特に微生物）の増殖による酵素反応に対する影響を最小限にするためトルエンが、土壌に添加されている。つまりトルエンには制菌作用があり、微生物を死滅溶解させたり、酵素活性を損失させることなく微生物の生育のみを抑える働きがあるため、長時間の反応にも関わらず微生物の影響を無視できるというものである。キチナーゼにおいてもトルエン添加の必要性について調べてみた。

土壌のキチナーゼおよびN-アセチルグルコサミニダーゼ活性測定においてトルエンを添加したときとしないときの反応生産物量を反応時間を変えて測定した結果を表4-1に示した。反応時間が30分の場合は、3酵素活性ともほとんど同じ値を呈した。反応時間が4倍の120分の場合は3酵素とも値がほぼ4倍となり、N-アセチルグルコサミニダーゼはトルエン添加の有無に関わらずほぼ同じ値になった。しかし、キチナーゼ活性測定の場合、2種類の活性測定ともトルエンを加えない方が反応生成物量が多かった。しかしトルエン添加による反応生成物量の差は有意ではなかった。

4-1-3 考察

土壌試料量の検討

土壌試料量と各酵素活性によって生産される4-MU量の関係を検討した場合、試験管当たり土壌試料量が0.6gを越えると、酵素反応生成物量が土壌試料量に対応して増加しなくなった。この原因としては、土壌試料量を増加させることにより、反応

液の粘度が増加するため、基質の分散が十分に行えなくなり、反応速度が減少するためと考えられる。この活性測定法の反応系においては土壌試料量を0.6g以下にして測定すべきだと考えられる。一般的に土壌試料量を多くすることによって、測定の精度は高くなるが、この測定法においては、土壌試料量を試験管当たり0.1gとした場合でも他の土壌酵素測定法に匹敵するだけの十分な精度が得られている。しかし、土壌によっては、試料量を多くせざるを得ない場合も考えられるが、50mlの三角フラスコを用いて反応系を5倍量にすることにより解決された。しかしながら通常の測定においては、基質が比較的高価であるため、標準法の方が望ましいと考えられる。また試験管を用いた方が酵素反応後の遠心分離を容器を移し変えないでそのまま行えるため、操作が簡便になるという利点がある。実験操作が1段階でも簡便であることは、土壌試料が多い場合において特に重要なことと考えられる。

反応時間の検討

2種類のキチナーゼ活性およびN-アセチルグルコサミニダーゼとも反応時間を180分間まで延長しても酵素反応生成物は、時間経過に比例して増加しており、両酵素は180分間の保温条件下でも失活しないと考えられる。しかし、反応時間が180分間以上になると反応液の水分蒸発も問題になり、また多くの試料の測定をしなければならぬ場合には、不便を生じる可能性が考えられる。

酵素反応系を設計するに当たっては、基質の濃度決定は重要な問題となる。一般に基質濃度は高いほうが正確な酵素反応の初速度を測定できる。この測定で基質として用いているN-アセチルグルコサミンの4-MU誘導体は比較的水に対する溶解度が低く、ほぼ飽和した水溶液をもってやむを得ず基質溶液としているが、通常の測定時間の9倍の反応時間でも酵素活性が正確に測定可能であるということは、基質濃度が酵素反応を制限してはいないことを示唆している。

トルエンの添加について

コロイド状キチンを基質として土壌のキチナーゼ活性を測定した

Rodriguez-Kabanaら(1983)は微生物抑制剤としてトルエンを用いている。彼らによれば最長72時間まで反応時間を延長してもキチナーゼ活性測定には差し支えなかったと報告している。しかし、試料土壌によっても異なるのであろうが、トルエンの効果は2、3時間であるとの報告もあり、長時間におよぶ反応は酵素タンパク質を変性させ、活性の低下を引き起こすことから、いずれにしてもトルエンを使用しなくても測定できるほど短時間で測定することが重要であり、トルエンを過信することは誤ったデータを導く恐れがあると考えられる。本実験においては反応時間を標準的な時間(30分間)の6倍に延長してもトルエンの添加効果は確認されず、本測定法ではトルエンの添加は必要がないと考えられた。

腐植物質の除去について

本研究における土壌のキチナーゼおよびN-アセチルグルコサミニダーゼの活性測定法は、反応液を最終的にアルカリ性にした(pH11.0)。これは、①酵素反応を停止させる、②生産された4-MUを発色させるためである。しかし、土壌溶液をアルカリ性にするると粘土粒子が沈澱しにくくなったり腐植物質が抽出されたりするため、反応液が濁ったり、褐色を帯びたりして正確な測定は行えない。そのため本実験ではエタノールを反応液に加えることにより反応を停止させ、遠心分離によって粘土鉱物と有機物を除いた後、グリシン緩衝液でアルカリ性にするという方法をとった。

他の土壌酵素測定法のうち、phosphomonoesterase(Tabatabai and Bremner, 1969; Eivazi and Tabatabai, 1977)、phosphodiesterase(Browman and Tabatabai, 1978)、arylsulfatase(Tabatabai and Bremner, 1970)等についても、反応液をアルカリ性にする必要があり、0.5M CaCl₂溶液を土壌溶液に加えた後、0.5M NaOH溶液を

加えることによりこれらの問題を解決している。本実験において活性測定法を確立するにあたり、0.5M CaCl₂溶液を反応停止前に添加して検討してみたところ、粘土粒子の分散と腐植物質の溶出が抑えられ、測定は可能であったが、エタノールを用いた場合とくらべて、反応生成物である4-MUの回収率が10~20%低かった。そのため本実験ではエタノールで反応を停止し、土壌を除いた後アルカリ性にする事とした。

4-2 森林土壌のキチナーゼ活性測定

森林土壌のキチナーゼ活性に関する報告はほとんどない。土壌全体のキチナーゼに関する報告も多いとは言えず、そのほとんどが畑地土壌にキチンを施用したときの活性値であったり、作付や土壌管理の違いがキチナーゼ活性に及ぼす影響を調べたものである。森林土壌は長年にわたって植物遺体が供給されている土壌であり、人為的な影響がほとんど加えられていない土壌であるため、そこに生息する土壌生物の活動は活発であり、独特の生態系をつくり出している。ここでは、細菌、放線菌、糸状菌が相互作用を及ぼしあい、安定なバランスを作り上げていると考えられる。キチナーゼは糸状菌細胞壁分解酵素として、糸状菌菌体の溶解に関与していると考えられる。特に森林土壌の上層においては糸状菌が微生物の大部分を占めると言われており、森林土壌のキチナーゼ活性を測定することは糸状菌の自然土壌における生態を知る上で重要と考えられる。また森林土壌は昆虫や節足動物など、その外骨格の主成分をキチンとする生物が豊富に存在しており、それらの生物遺体の分解もキチナーゼが行っていることから森林土壌のキチナーゼ活性は畑地土壌に比べて高いことが予想される。ここでは土壌型や母材の異なる種々の森林土壌のキチナーゼ活性およびN-アセチルグルコサミニダーゼ活性を測定し、各土壌酵素活性の分

布および土壌特性がキチナーゼ生産に及ぼす影響について知見を得ることを目的とした。

4-2-1 実験材料および方法

使用土壌

実験に用いた森林土壌の一般理化学性を表4-2に示した。土壌は採取後クールボックスにいれ、低温で保存しながら実験室に運んだ。土壌の保存は4℃で行い、2mmの篩を通したものを試料土壌とした。酵素活性は、試料採取後、数日以内に測定した。

キチナーゼおよびN-アセチルグルコサミニダーゼ活性測定

活性測定は、4-1-1で記述した方法を用いた。試料土壌量を試験管当り0.5gとし、反応時間を20分として測定を行った。酵素反応は4連で行い、それぞれについて2回の4-MU濃度測定を行った。

4-2-2 結果

各供試土壌のN-アセチルグルコサミニダーゼ活性、キチナーゼ活性及び4-MUの回収率を表4-3に示した。全体的にN-アセチルグルコサミニダーゼがキチナーゼ活性よりも高い値を示した。キチナーゼのうちでは、4-MU-2糖分解酵素活性が4-MU-3糖分解酵素活性よりも高い値を呈した。しかし十文字土壌の上層では逆に、4-MU-3糖分解活性が4-MU-2糖分解活性よりも高い活性を示した。各土壌においては、深度が増すにつれて各土壌活性が低下していく傾向があった。しかし十文字ポドゾル土壌

表 4 - 2 供試土壌の諸性質*

土壌	採取地	母材	層位	深度 (cm)	水分 (%)	pH(H ₂ O)	全炭素 (%)	全窒素 (%)	土性
黒ボク土 (Humic Andosol)	八ヶ岳	火山灰	A 11	0-18	32.8	4.8	21.2	1.51	HC
			A 12	18-32	53.2	5.1	11.8	0.75	LiC
			A 3	32-50	52.3	5.3	9.5	0.59	HC
			B W	50-80	78.7	5.3	2.0	0.18	HC
褐色森林土 (Dystric Cambisol)	赤沢 I ^b	堆積岩	A 1	0-18	56.5	4.1	12.0	0.37	LiC
			B 1	18-32	39.6	5.2	1.2	0.17	LiC
			B 2	32-77	31.7	5.2	0.7	0.12	LiC
			C	77-95	12.6	5.3	0.1	0.05	L
褐色森林土 (Humic Cambisol)	赤沢 II ^b	火山灰	A 11	0-11	60.4	4.8	20.7	1.11	HC
			A 12	11-21	57.9	5.0	15.1	0.81	HC
			B 1	21-41	58.9	5.2	4.9	0.49	LiC
			B 2	41-75	57.4	5.7	2.1	0.19	LiC
ポドゾル (Gleyic Podzol)	十文字 ^b	堆積岩	H	+1-0	75.3	4.0	36.6	2.18	-
			A 2	0-11	21.1	3.8	2.5	0.14	L
			B h	11-19	42.4	3.9	7.5	0.44	CL
			B i	19-27	41.3	4.2	10.2	0.46	CL
			B 23	27-49	35.6	4.7	6.0	0.31	CL
			B 24	49-64	31.9	4.9	4.5	0.25	CL
			B C	64-81	39.2	4.9	4.5	0.25	CL
			C	>81	30.8	-	1.0	-	-

a) -:測定せず。 b) 赤沢 I、II及び十文字土壌のpH、全炭素、全窒素、土性については、それぞれ Watanabe(1978)及びHonma(1976)の報文より引用した。

表 4-3 供試土壌のN-アセチルグルコサミニダーゼ活性及びキチナーゼ活性・

土壌	層位	回収率 (%)	N-アセチルグルコサミニダーゼ (mUnit/g 乾土)		キチナーゼ (mUnit/g 乾土)	
			4-MU-2 糖分解活性	4-MU-3 糖分解活性	4-MU-2 糖分解活性	4-MU-3 糖分解活性
黒ボク土 (ハヶ岳)	A11	32.8	9.42 (1.59)	2.78 (0.24)	2.20 (0.28)	
	A12	53.0	2.75 (0.40)	0.46 (0.12)	0.30 (0.07)	
	A3	52.3	2.28 (0.29)	0.31 (0.06)	0.15 (0.01)	
	Bw	78.7	0.13 (0.03)	0.01 (-)	0.01 (-)	
褐色森林土 (赤沢 I)	A1	66.8	2.08 (0.42)	0.62 (0.13)	0.22 (0.06)	
	B1	90.1	0.42 (0.06)	0.07 (0.01)	0.02 (-)	
	B2	90.1	0.22 (0.03)	0.04 (-)	0.02 (-)	
	C	94.3	0.02 (-)	- (-)	- (-)	
褐色森林土 (赤沢 II)	A11	47.5	1.39 (0.45)	2.97 (0.52)	0.74 (0.08)	
	A12	76.0	2.18 (0.21)	0.40 (0.06)	0.16 (0.01)	
	B1	86.7	0.66 (0.06)	0.14 (0.03)	0.06 (0.01)	
	B2	89.4	0.34 (0.10)	0.04 (-)	0.02 (0.01)	
ポドゾル (十文字)	H	18.2	3.52 (0.29)	1.51 (0.22)	1.69 (0.14)	
	A2	78.0	0.22 (0.03)	0.10 (0.01)	0.11 (0.01)	
	Bh	50.3	0.87 (0.10)	0.15 (0.02)	0.29 (0.02)	
	Bi	60.1	0.68 (0.21)	0.04 (0.01)	0.04 (0.01)	
	B23	81.8	0.19 (0.03)	0.01 (-)	0.01 (-)	
	B24	83.7	0.23 (0.04)	0.01 (-)	0.01 (-)	
	BC	90.1	0.13 (0.02)	0.01 (0.01)	0.01 (-)	
	C	92.5	0.16 (0.03)	0.01 (-)	- (-)	

a) 測定は4回の繰り返しを行い、括弧の中に標準偏差を記した。-:0.01 (mUnit/g 乾土) 以下の値

表 4 - 4 各供試土壌の上層土壌^{a)}の酵素活性と全炭素および全窒素含量との相関係数

成分	各土壌酵素活性との相関係数	
	N-アセチルグルコサミニダーゼ	キチナーゼ
全炭素	0. 9 3 7	0. 9 4 9
全窒素	0. 9 1 8	0. 9 5 2
		4-MU-3 糖分解活性
		0. 7 3 5
		4-MU-2 糖分解活性
		0. 9 1 4

a) 各供試土壌の上層土壌としてハヶ岳のA11層、赤沢IのA1層、赤沢IIのA11層、十文字のA2層を用いて計算した。

のA2層では、上下の隣接した層に比べて3種類の酵素活性が全部低くなっていた。

各土壌間では、ハヶ岳（黒ボク土）と赤沢Ⅱ（褐色森林土）の酵素活性が同程度に高く、赤沢Ⅰ（褐色森林土）と十文字（ポドゾル）が同程度に低い値を示した。

4-MUの回収率は18.2～94.3%の範囲にあり、全体的に上層ほど低く、下層ほど高くなる傾向がみられた。十文字土壌のH層ではとくに低い回収率がみられた。回収率の平均は70.6%であった。4-MUの回収率と試料土壌の炭素含量、窒素含量に対して相関係数を求めたところ、炭素含量に対しては $r=-0.888$ （0.1%水準で有意）、窒素含量に対しては $r=-0.877$ （0.1%水準で有意）という高い負の相関関係がみられた。つまり土壌の炭素含量や窒素含量が増加するほど回収率が減少する傾向がみられた。

各供試土壌における上層の各土壌酵素活性と全炭素及び全窒素含量との相関係数を表4-4に示した。各酵素活性とも土壌の炭素含量、窒素含量に対して高い相関関係がみられた。しかし4-MU-3糖分解酵素活性の土壌炭素含量に対する相関係数は他のものに比べて低い値をとった。

4-2-3 考察

土壌のキチナーゼ活性における森林土壌と畑土壌の比較

今までに森林土壌のキチナーゼ活性はほとんど調べられていないが、畑地土壌の活性についてはいくつかの報告がある(Rodoriguez-Kabana et al., 1983; Hanzlikova et al., 1987)。彼らによると通常の畑地土壌の土壌のキチナーゼ活性は、N-アセチルグルコサミン放出量として20～100 $\mu\text{mole/hr}\cdot\text{g soil}$ 前後あるいは20 $\mu\text{mole/sec}\cdot\text{g soil}$ としている。これらの値はコロイド状キチンを基質として測定しており、活性の表示もN-アセチルグルコサミン生産量をもとに表示してあるため、本実験の結果とは単純に比較することはできないが、これらの値は本実験における

畑地土壌のキチナーゼ活性値と同程度のもと考えられる。本実験で測定した森林土壌のキチナーゼ活性値は、上層土壌だけを比較した場合、前述の畑地土壌の活性値よりも高い値を示した。特にハヶ岳黒ボク土や、赤沢Ⅱ褐色森林土においては畑地土壌の10倍近い値を呈した。このことは畑地土壌に比べて森林土壌の方がキチンの存在量が多く、キチンの生産と分解の回転率が高いことの反映と考えられる。またこの結果は、畑地土壌に比べて森林土壌は甲殻類や節足動物などキチンをその外骨格の主成分とする昆虫や動物に富んでおり、生息する微生物も糸状菌の占める割合が高いという多くの報告とも一致すると言える。キチンの構成糖であるN-アセチルグルコサミンは窒素を含んだ糖類であるため土壌中の有機性炭素、有機性窒素の一形態と言える。森林土壌においてN-アセチルグルコサミンに含まれる窒素は土壌窒素の約2~16%を占めると報告されており(Sowden, 1959)、土壌窒素の給源として大きな役割を果たしていると言える。キチナーゼはキチン分解によりN-アセチルグルコサミン生産を行う酵素であり、自然土壌においては安定した窒素循環を促すため、キチナーゼはバランスのとれた生産が行われていると考えられる。

土壌型がキチナーゼ活性に及ぼす影響

森林土壌においても土壌の種類や母材の違いにより酵素活性の違いが見られた。最も酵素活性が高かったのはハヶ岳黒ボク土であり、続いて赤沢Ⅱ褐色森林土であった。この2つ土壌に共通していることは土壌をつくっている母材が火山灰であることと土性がHeavy Clayであり、粘土含量が高いということである。火山灰由来の土壌は孔隙が多く、しかも糸状菌や放線菌などの微生物が生息し易い大きさの孔隙が多く存在していると言われている。そのため糸状菌や放線菌などの生物活性が高く、一般に肥沃な土壌と言われている。また2つの土壌はポドゾルのH層を除けば有機物含量が高い土壌と考えられ、母材と有機物含量がキチナーゼおよびN-アセチ

ルグルコサミニダーゼ活性に関係していると考えられる。一方活性の低かった赤沢 I 褐色森林土と十文字ポドゾルはその母材が体積岩由来であり、有機物含量が低いという点でも一致している。

ポドゾルでは他の土壌ではみられない現象がみられた。まず、ポドゾルの特徴である漂白層（A2層）では、各酵素活性が上下の隣接した層に比べて極端に低くなっているということである。漂白層はフルボ酸などの水溶性低分子腐植物質によって鉄やアルミニウムが溶脱された層であり、有機物含量が低く酸性も強い。従って土壌生物が生息するには適していない層位であると言える。かえって漂白層の下層にある Bh層や Bi層の方が、酵素活性が高く現われた。これはこれらの層には有機物などが集積するため、生物活性が高くなっているからであると考えられる。土壌試料採取の際にも A2層には細根や毛根はほとんど見られなかったが、Bh層や Bi層には多くの根が広がっている様子が観察された。一般に土壌酵素活性は、土壌表層部が最も活性が高く、深くなるにつれて活性が漸減する例が多くみられる。これは土壌深度が増加することにより、酸素の供給量が減少すること、落葉や毛根など栄養源となる植物遺体の供給源から離れてしまうこと、土壌硬度が高まること等から微生物を含めた土壌生物は土壌表層に多く分布していることに関係していると思われる。しかし、ポドゾルのように土壌水によって有機物や無機成分が溶脱現象がみられる土壌においては、必ずしも上層の方が活性が高いとは限らず、下層であっても生物活性の高い層位であるならば酵素活性は高いと推測される。本実験以外でポドゾルの土壌酵素活性を測定した例はいくつか報じられているが、このように A2層ではっきり酵素活性が激減しているものはなかった。キチナーゼ活性のみの傾向であるかも知れない。

さらにポドゾルでは、4-MU-キトオリゴ糖分解において他の土壌とは異なる傾向がみられた。すなわち他の土壌では、4-MU-2 糖分解活性が4-MU-3 糖分解活性よりも

高くなっているのに対して、ポドゾルではその反対の結果が得られていることである。これは予想されなかったことではあるが、これはおそらくキチナーゼ生産微生物の種類が他の土壌とは異なるためであると思われる。他の土壌と比べると、十文字ポドゾルは通年にわたって寒冷な気候下で発達する土壌であり、微生物フロラは低温域に生育温度を持つ糸状菌に偏っていると予想される。そのため糸状菌を中心としてキチナーゼが生産され、他とは異なる4-MU-基質分解パターンが現われた可能性が考えられる。

4-MU-の回収率について

土壌に反応生産物である4-MUを既知量添加し、その回収率を求めたところ試料土壌により様々な値が得られた。土壌炭素、窒素含量との相関をとると高い相関係数が得られ、明らかに土壌有機物含量が高いほど回収率は低くなっていることが分かった。求められた回収率をもとに測定値を修正し酵素活性としているため、測定において反応生産物である4-MUの回収率が低いことは測定の誤差が大きくなることを示す。活性値は有機物含量が高い試料の方が高くなる傾向があるため、活性の高い土壌においては誤差が大きくなる危険性が高いと言える。測定の精度を高めるためには、4-MU-の有機物への吸着現象を最小限に抑えることが必要と考えられる。具体的には反応液の塩濃度を高めたり、pHを低下させるなどの対応策が考えられるが、酵素反応に及ぼす影響の方が大きいと考えられ効果的な方法を開発するには至らなかった。

4-3 各種有機化合物の添加および放線菌の接種が土壌のキチナーゼ生産に与える効果

土壌にキチンを施用することによってキチナーゼ生産が誘導されることが報告されている。しかし、キチン以外の基質がキチナーゼ生産に及ぼす影響はほとんど調べられていない。また本研究で開発したキチナーゼ活性測定法では、4-MU-2 糖分解活性と4-MU-3 糖分解活性に分けて測定できるため、どのような活性パターンを示すかについても興味深いといえる。これらの知見を得るため土壌にキチンをはじめとする種々の有機化合物を土壌に添加し、キチナーゼ生産との関係について検討した。さらにキチナーゼを高生産する放線菌である *Streptomyces erythraeus* S-84株を土壌に接種し、土壌のキチナーゼ生産に与える効果についても検討した。

4-3-1 実験材料および方法

供試土壌

供試土壌は、筑波大学農林技術センター内畑地土壌を用いた(4-1-2参照)。

供試菌株

キチナーゼを高生産する放線菌として *Streptomyces erythraeus* S-84株を供試した。

基質添加実験

100mlガラスビーカーに供試土壌50gを秤量し、最大容水量の60%になるように水分を調節した。そこに0.5gの各種炭素化合物を添加し、25℃で保温した。保温槽には、

土壌水分の減少を最小限にするために、水を入れたビーカーを置いた。適当な時間をおいて2~4gの土壌を採取し、4-MU-2糖、4-MU-3糖に対するキチナーゼ活性、およびN-アセチルグルコサミニダーゼ活性を測定した。保温中蒸発した水分は、試料採取時に減少分だけ補充し、最大容水量が常に60%になるようにした。

4-3-2 結果

土壌に各種有機化合物を添加したときのキチナーゼ活性

土壌に各種基質を添加したときのキチナーゼ活性に対する効果について調べた(表4-5)。表のように酵母エキス、N-アセチルグルコサミニンによって強くキチナーゼ活性が増大することが示された。キチンを添加した場合には、10日間で4-MU-3糖分解活性が20倍近くまで増加した。グルコース、キトサンによっても僅かに生産が増大した。しかし活性の内容は添加基質によって様々な違いがみられた。キチンによって誘導されたキチナーゼは、4-MU-2糖分解活性と4-MU-3糖分解活性の比率が同じくらいであったのに対し、N-アセチルグルコサミニダーゼ、酵母エキス、グルコース、キトサンを添加したときの活性は、4-MU-3糖分解活性よりも4-MU-2糖分解活性の方が2倍以上高く、とくにグルコースに至っては4-MU-2糖分解活性が4-MU-3糖分解活性の6.2倍も高くなっていた。

土壌にキチンを添加したときのキチナーゼ活性の経時的变化と *Streptomyces*

erythraeus S-84株の接種効果

まず土壌にキチンを添加し、キチナーゼやN-アセチルグルコサミニダーゼ生産が誘導されるかどうかを調べた(図4-3-A)。図4-3-Aに示された通り、キチナーゼ活性及びN-アセチルグルコサミニダーゼ活性の増加がみられ、これらの酵素生産が誘

表 4 - 5 畑土壤に種々の基質を添加したときのキチナーゼ生産

添加基質・	キチナーゼ活性		活性比
	4-MU-2 糖分解活性 (mUnit/乾土g)	4-MU-3 糖分解活性 (mUnit/乾土g)	
無添加	0. 5 6	0. 2 4	2. 3 5
キチン	5. 5 1	4. 6 4	1. 1 9
キトサン	0. 8 5	0. 3 6	2. 3 7
セルロース	0. 5 2	0. 2 3	2. 2 6
ラミナリン	0. 4 2	0. 1 5	2. 7 5
キシラン	0. 4 5	0. 1 8	2. 5 3
グルコース	1. 6 2	0. 2 6	6. 2 1
キシロース	0. 5 2	0. 1 6	3. 2 5
N-アセチルグルコサミン	8. 2 0	2. 3 0	3. 5 6
酵母エキス	6. 4 6	2. 6 4	2. 4 5

a) 各基質を終濃度1%(w/w)になるように土壤に添加した。

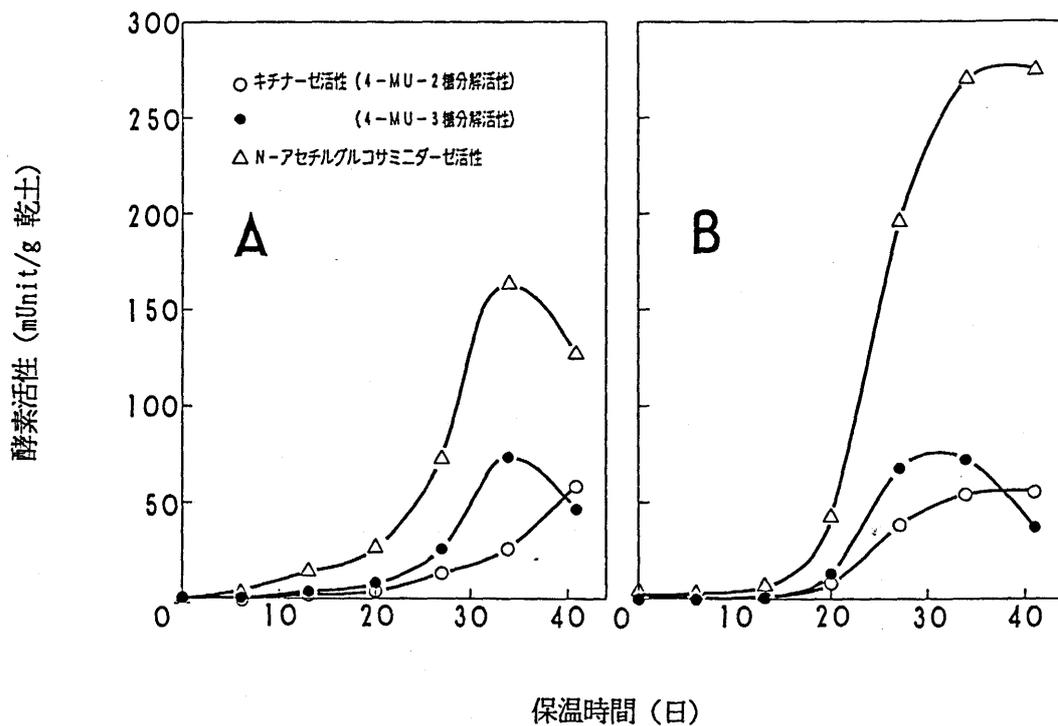


図 4 - 3 キチンを土壤に添加したときの土壤のキチナーゼ活性とN-アセチルグルコサミニダーゼ活性の経時的变化および *Streptomyces erythraeus* S-84株の接種効果
 (A), 非接種; (B), *Streptomyces erythraeus* S-84株を 10^6 /乾土50g接種.
 ○, 4-MU-2糖分解活性; ●, 4-MU-3糖分解活性;
 △, N-アセチルグルコサミニダーゼ活性.

導されることが示された。活性のピークは4-MU-2糖分解活性が基質添加して4 1日後、4-MU-3糖分解活性が3 4日後、N-アセチルグルコサミニダーゼ活性が同じく3 4日後に見られた。活性の高さを比べてみると、キチン添加前は、N-アセチルグルコサミニダーゼ活性>4-MU-2糖分解活性>4-MU-3糖分解活性の順であったが、キチン添加後はN-アセチルグルコサミニダーゼ活性>4-MU-3糖分解活性>4-MU-2糖分解活性と入れ替わり、最終的にまた元の順番に戻った。

S-84株を土壌に 2×10^8 CFU接種することにより土壌におけるキチナーゼ生産に対する効果について検討を行った(図4-3-B)。図4-3-AのS-84株を接種しない場合と比べてみるとキチナーゼの場合、活性の高さは同程度であったが、4-MU-2糖、4-MU-3糖分解酵素生産が早く誘導され、共に7日間ほど早くピークが現れた。またN-アセチルグルコサミニダーゼ活性のピークは、1.7倍近く高い値をとった。S-84株を接種した場合でもやはり活性の高さの順番は、キチンを添加することにより、N-アセチルグルコサミニダーゼ活性>4-MU-3糖分解活性>4-MU-2糖分解活性と変化し、最終的にまた元の順番に戻った。

4-3-3 考察

基質添加がキチナーゼ生産に及ぼす効果について

キチンを土壌に施用することによってキチナーゼ活性が増加することは今までの報告において一致した見解である(Rodriguez-Kabana et al., 1983; Hanzlikova et al., 1987)。本研究においてもキチン施用により有意にキチナーゼ生産が誘導された。しかし土壌にキチンを施用した後、キチナーゼの最高活性がみられるのは、施用後7日目であったり(Hanzlikova et al., 1987)、6~8週間目であったりして(Rodriguez-Kabana et al., 1983)、かなりの変動があるようである。本研究にお

いてはキチン添加後、34日目で最高活性が得られている。この差異は、土壌の違い、基質となるキチンの種類や性状の違い、キチナーゼ生産微生物の違いによるものと考えられる。

土壌におけるキチナーゼの生産誘導について調べている研究はもともと少ないが、本研究のようにキチン以外の物質を添加することにより土壌のキチナーゼ活性が高まったと報告している例はない。本研究においては生産量に違いはあるが、キチンの他にN-アセチルグルコサミン、酵母エキス、キトサン、グルコースによってキチナーゼ生産が誘導されることが示された。しかし、4-MU-オリゴ糖の分解パターンが添加した基質によって異なっており、異なるキチナーゼが生産された可能性が高い。これらのパターンによって分類するならば、①4-MU-2糖より4-MU-3糖分解活性の方が高いキチナーゼの生産が誘導される場合（キチン）、②4-MU-3糖より4-MU-2糖分解活性の方が高いキチナーゼの生産が誘導される場合（酵母エキス、N-アセチルグルコサミニダーゼ、キトサン）、③4-MU-2糖分解活性のみを誘導される場合（グルコース）に分けられると考えられる。しかし②の酵素については、①と③の酵素が混在して存在している場合も同様な減少がみられるので簡単には判別できない。

キチンによるキチナーゼ生産の誘導について考えてみると、一般にキチンを分解する際には、キチンを早く分解させるために糖鎖の途中から分解を行うendo型の酵素が最初に働き、ある程度キチン鎖が短くなったものをexo型と呼ばれる酵素によってより低分子に分解されたほうが、効率よく分解が進むと考えられる。この意味で4-MU-3糖分解活性は4-MU-2糖分解活性に比べて長い糖鎖のものを分解する活性を表すものと考えられることから、キチンを施用することによって4-MU-3糖分解活性が高い酵素が先に生産され、続いて4-MU-2糖分解活性が高くなることは納得できることであるといえる。このとき分解前期は①のキチナーゼ、分解後期には②のキチ

ナーゼが生産されると考えられる。

また①、②、③の場合にはそれぞれ異なる微生物が酵素を生産している可能性も考えられる。この点については本研究では検討できなかったが、酵素生産菌を分離してみれば何等かの知見が得られると思われる。

本研究以外で、種々の有機化合物を施用することによってキチナーゼ生産に及ぼす影響を調べているのは、いまのところHanzlikovaら(1987)だけである。彼らは土壌(チェルノーゼム)に同量の水を加えた状態に、キチン添加(0.6% w/w)を行ったところへグルコース(0.6%)、リン酸アンモニウム(0.12%)、カゼイン加水分解物(0.12%)を添加したがキチナーゼ生産の誘導は阻害されず、グルコースを添加した場合には、むしろ高い活性が確認されたと報告している。この原因としては、グルコース添加により微生物の増殖が行われたことが考えられると考察している。この結果についての詳細な記述はないが、しかし本実験で得られた知見ではキチン添加によって生じるキチナーゼ生産と、グルコース添加によって生じるキチナーゼ生産はキチナーゼの生産量と性質がはっきり異なっており、単純にグルコースを栄養源として増殖し、その傍らキチナーゼを生産したことからキチナーゼ活性が高まったとは考えにくい。むしろグルコースを利用して細菌や糸状菌が急速に増殖し、グルコースがなくなった後、キチナーゼ生産菌が施用されたキチンと増殖した糸状菌菌体を分解することによってキチナーゼ生産が高まったと考えられる。

また彼らの実験条件は本研究で行ったものに比べて水分量が多く、通常の土壌の状態とは言えない。水分が多いためにおそらく土壌が還元状態になり、一部分の土壌微生物がキチンを分解したものと予想される。放線菌(特に *Streptomyces* 属)は好気性であり、乾燥を好む傾向があるため、このような条件下ではキチン分解には関与していないと考えられる。

キチナーゼ生産におけるS-84株の接種効果

キチナーゼ高生産菌であるS-84株をキチン添加土壤に接種したところキチナーゼ生産の誘導が早く行われ、またN-アセチルグルコサミニダーゼ活性が増加したという結果が得られた。これらの結果が得られた理由としては以下のことが推定される。S-84株はおそらく土壤に先住するキチン分解菌に比べてキチナーゼ生産能が高いと考えられ、まず土壤に添加されたキチンによってキチナーゼを誘導的に生産する。S-84株が生産するキチナーゼは4-MU-3糖分解活性が高い酵素であり、生産量も多いことから土壤中のキチナーゼ活性としては早い時期に4-MU-3糖分解活性が高くなる。この酵素作用によりキチン糖鎖はオリゴ糖にまで分解が進むが、S-84株を接種しない場合に比べてオリゴ糖の生成速度が早いため、4-MU-2糖分解活性の強いキチナーゼも早く誘導されることになる。このようにキチナーゼ生産が急速に行われると土壤中のN,N'-ジアセチルキトビオース濃度が高まり、それによってN-アセチルグルコサミニダーゼ生産も誘導・促進されるため、土壤中の活性が高まったものと考えられる。つまりS-84株の接種によりキチン分解の最初の分解が効率よく行われるため、続いて行われる2段階の分解反応も連鎖的に酵素生産誘導が行われ、結果的にキチン分解が短時間でされると予想される。

4-4 要約

土壤のキチナーゼの活性測定法については今までに報告があったが、感度が低い、時間がかかる、手間が多い、試料が多く必要、得られる結果が必ずしも活性を反映していない可能性があるなどの理由により、新しい活性測定法を開発した。本実験で開発した方法は上記の問題を解決した上に、基質を2種類の基質を使用することにより、キチナーゼの反応特性についての情報も得られるという利点も有した。

活性測定法の定量性を調べたところ、土壌試料量は0.6gを上限とし、反応時間は2時間程度までの範囲において定量性が確認された。制菌剤としてのトルエンは、活性測定においてとくに効果はみられなかった。

森林土壌として、八ヶ岳の黒ボク土、十文字峠のポドゾル、赤沢ⅠとⅡの褐色森林土を用い、各土壌の層位ごとのキチナーゼ活性並びにN-アセチルグルコサミン活性を測定した。全体的に酵素活性は高い順にN-アセチルグルコサミニダーゼ>4-MU-2糖分解活性>4-MU-3糖分解活性のようになり、土壌深度が増すにつれて活性は低下する傾向がみられた。しかし十文字のポドゾルにおいてはN-アセチルグルコサミニダーゼ>>4-MU-3糖分解活性>4-MU-2糖分解活性の順になり、A2層では局部的に3種類の酵素活性とも低い活性を呈した。土壌間で比較すると、八ヶ岳の黒ボク土と赤沢Ⅱの褐色森林土において同程度の高い酵素活性がみられ、十文字峠のポドゾルと赤沢Ⅰの褐色森林土において同程度の低い活性がみられた。これらの違いは母材と粘土含量、有機物量の違いであると考えられ、活性が高いグループは母材が火山灰で、相対的に粘土含量が高く、有機物含量が多かった。活性の低いグループは母材が体積岩で、相対的に粘土含量が低く、有機物含量が少なかった。各表層土壌の土壌酵素活性と土壌の炭素含量および窒素含量の間には正の相関があった。酵素反応生成物である4-MUの回収率は、土壌の炭素含量および窒素含量との間には高い負の相関がみられ、土壌有機物が活性測定の精度を低下させていると考えられた。

土壌に種々の有機化合物を添加することによりキチナーゼの生産を調べたところ、キチン、酵母エキス、N-アセチルグルコサミンを添加したときに有為なキチナーゼ生産が確認された。その他にキトサンやグルコースを添加した場合には弱い誘導が見られた。キチンを添加した場合には4-MU-3糖分解活性の強いキチナーゼが、その他の基質を添加した場合には4-MU-2糖分解活性の強いキチナーゼが誘導的に生産さ

れた。供試した畑土壌の酵素活性は高いほうから、N-アセチルグルコサミニダーゼ活性 > 4-MU-2 糖分解活性 > 4-MU-3 糖分解活性の順であったが、キチンを添加することによりN-アセチルグルコサミニダーゼ > 4-MU-3 糖分解活性 > 4-MU-2 糖分解活性の順に変化した。また4-MU-3 糖分解活性が先に増加し、遅れて4-MU-2 糖分解活性が増加したことから、異なる酵素が時期を隔てて生産されていることが示唆された。

キチン施用土壌にキチナーゼ産生能の高い放線菌菌株 *Streptomyces erythraeus* S-84株を 10^6 (CFU/50g 乾土)接種することにより、キチナーゼの生産時期が早期化し、N-アセチルグルコサミニダーゼ活性が増加した。

第5章 総合考察

5-1 土壤微生物のキチナーゼ生産と糸状菌細胞壁の分解

放線菌と *Trichoderma* 属糸状菌によるキチナーゼ生産の相違

本研究において放線菌および *Trichoderma* 属糸状菌のキチナーゼ生産と培養基質との関係について検討を行った。放線菌の場合は分離菌株の90%以上がキチンを唯一の培養基質として生育し、キチナーゼを生産した。一方 *Trichoderma* 属糸状菌の場合は、供試菌の9菌株全てがポテトデキストロース寒天培地上でキチナーゼを生産したが、そのうち7菌株はキチン培地で培養しても生育せず、キチナーゼを生産しなかった。このことから *Trichoderma* 属糸状菌は、キチナーゼ生産菌株であってもキチンを唯一の培養基質として生育できない菌株が多いこと、*Trichoderma* 属糸状菌のキチナーゼ生産はキチンによって誘導されず、別の生産調節機構が存在することが示唆された。放線菌におけるキチナーゼ生産はキチンを分解し、その分解産物を資化するために行われると考えられるが、*Trichoderma* 属糸状菌の場合には、必ずしもキチンを資化するためにキチナーゼを生産するとは限らず、糸状菌に寄生するための溶菌酵素としてキチナーゼを生産している可能性が示唆される。

Trichoderma 属糸状菌のうち *T. viride* IF0 30498株と沢田氏分離菌株の2菌株は放線菌と同様にキチンを唯一の培養基質として生育することができ、キチンによってキチナーゼ生産が誘導された。しかし IF0 30498株をキチン培地で培養している途中で各種基質を添加して、キチナーゼ生産に及ぼす影響を調べたところ、*Streptomyces erythraeus* S-84株の場合といくつか相違点が見られた。すなわちキチンによってキチナーゼ生産が誘導され、グルコースによってカタボライト抑制が生じることは一致したが、他の基質についてはかなり異なった現象がみられた。最も顕著な

違いは、N-アセチルグルコサミンに対する反応であり、S-84株の場合はキチン培地で培養している途中に添加するとキチナーゼ活性が急速に増加したが、IFO 30498株の場合はキチナーゼ生産が抑制された。またS-84株では影響がみられなかったキシロースにおいてもIFO 30498株の場合にはキチナーゼ生産が抑制された。さらにS-84株においては影響が現れなかったグルコサミンと弱い抑制作用が見られたフラクトースは、IFO 30498株においてキチナーゼ生産を促進させた。特にグルコサミンを添加した場合には、4-MU-2 糖分解活性/4-MU-3 糖分解活性比が極端に高くなり、グルコサミンが特定のキチナーゼの生産を促進させた可能性が考えられた。このような知見からキチナーゼ生産に与える基質の影響は、放線菌と *Trichoderma* 属糸状菌ではかなり異なることが示唆された。それぞれの微生物におけるキチナーゼ生産の意義の違いを反映しているものと考えられる。

放線菌による病原糸状菌細胞壁分解

畑土壌から分離された放線菌 *Streptomyces erythraeus* S-84株が病原糸状菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* NIAES 5115株および *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* NIAES 5117株) の細胞壁を分解し、分解産物を吸収するまでの過程をまとめてみると次のようになると考えられる。①S-84株の近傍に糸状菌細胞壁が存在すると、S-84株はchitinase Bを誘導的に生産する。②chitinase Bはendo型分解酵素であるため、糸状菌細胞壁中のキチンをオリゴ糖に分解し、最終的に2糖まで分解する。③2糖まで分解されたキチンは、S-84株の菌体表面近くに存在するN-アセチルグルコサミニダーゼによって単糖 (N-アセチルグルコサミン) に分解される。④生成したN-アセチルグルコサミンはS-84株に吸収される。⑤吸収されたN-アセチルグルコサミンはキチナーゼ生産を促進し、糸状菌細胞壁中のキチンの分解は加速される。

しかし、実際S-84株が糸状菌細胞壁を分解する際には、①細胞壁中に色素などの挟雑物が存在したり、細胞表面に脂質やタンパク質の層が存在して分解が遅速化する、②キチン以外の糸状菌細胞壁構成成分である β -1,3-グルカンの分解も行われるなどの現象も考えられ、糸状菌細胞壁分解はさらに複雑な経路を経て行われるものと考えられる。本研究では行えなかったが、キチナーゼ生産と β -1,3-グルカナーゼ生産、あるいは他の加水分解酵素生産との関連を調べることにより、糸状菌細胞壁分解酵素の見地から推定される細胞壁分解の機作が、さらに明確になると考えられる。

5-2 土壌におけるキチナーゼの動態

土壌環境とキチナーゼ生産

適当な土壌のキチナーゼ活性の測定法が出されていないために、土壌のキチナーゼ活性を調べた研究は限られており、特に森林土壌のキチナーゼ活性についてはほとんど知見がない。そのため本研究で得られた知見は最初のものであると考えられる。

土壌型、母材を異にする森林土壌を用いることにより、自然土壌におけるキチナーゼの分布について検討を行ったところ、土壌によってかなりの差があり、一定の傾向がみられた。すなわち土壌のキチナーゼ活性を規定している土壌の性質として、①有機物含量、②母材の種類、③土壌深度が挙げられた。しかし自然土壌においてこれらの因子は相互に関連していると考えられる。有機物含量は微生物の炭素源や窒素源、エネルギー源の量を反映するものであり、一般に有機物含量が高ければバイオマス量も多く、キチン含量も高いと考えられる。また有機物含量が高いと、土壌の団粒化が促進されることから土壌の構造が発達し、通気性、保湿性等が向上す

ることから、好气的条件を好む放線菌や糸状菌にとって生育し易い環境となり、キチナーゼの生産速度も増加すると考えられる。

土壌の母材に関しては、火山灰と堆積岩という構造的性質の異なる母材においてはっきりとした差が確認された。結果的には火山灰を母材とする土壌のキチナーゼ活性は、堆積岩を母材とする土壌に比べて数倍高いことが示された。これは前述した通り火山灰土壌は容積重が小さいため、必然的に気相が占める割合が高く好气的であるが保水性も比較的高いという放線菌や糸状菌の生息に適している環境を創出しているためと考えられる。また火山灰土壌は、有機物を保持し易い性質があり、有機物含量を高めていることも関係していると考えられる。

土壌深度は、通気性と水分ポテンシャル、圧密に関係し、一般に深度が浅いほど生物活性が高くなる傾向がある。また一般的に深度が浅いほど有機物含量が高くなる傾向がある。

総合してみると、基質となる有機物量が多く、通気性が高く、適当な水分があるという好気性微生物の生育に適した環境がそろっている土壌においてキチナーゼ活性が高い傾向にあったと結論づけられるかも知れない。

土壌におけるキチナーゼ生産に対する基質添加と微生物接種の効果

放線菌や *Trichoderma* 属糸状菌を用いて得られたキチナーゼ生産に対する種々の基質添加についての知見が土壌においても当てはまるかどうかを調べたところ、土壌にキチンを添加することにより土壌のキチナーゼ活性が急激に増加し、純粋培養系での結果と一致した。つまりキチンが土壌に添加されることにより、不特定の土壌微生物がキチナーゼを誘導的に生産したことが示された。またキチンを添加した場合には、4-MU-2 糖分解活性、4-MU-3 糖分解活性、N-アセチルグルコサミニダーゼ活性が時期を異にして増加した。このことは、保温時間によって生産される酵素の

種類が違ふこと、あるいは生産する微生物の種類が違ふことを反映していると考えられ興味深い。N-アセチルグルコサミンや酵母エキス、グルコースを添加することによつてもキチナーゼの生産が確認されたが、4-MU-2 糖分解活性/4-MU-3 糖分解活性比がキチンを添加した場合と異なっていた。生産されたキチナーゼの内容が異なることが示唆された。特にグルコースを添加した場合には4-MU-2 糖分解活性しか増加せず、キチンを添加した場合に生産されるキチナーゼとは全く異なる酵素が生産されることが考えられた。

第2章で培養基質とキチナーゼ生産との関係、生産されるキチナーゼの特性について調べられたS-84株を土壤に接種することにより、キチナーゼ生産が早まり、N-アセチルグルコサミニダーゼ活性も増加した。S-84株の接種密度は土壤50g当たり 10^6 CFUであり、決して高密度に接種されたとは言えない。それにも関わらず、非接種の場合に比べて有意な効果が見られたことから、S-84株は供試土壤に生息するキチン分解微生物よりも高いキチナーゼ産生能を有していたと考えられる。これらの結果は、キチナーゼ産生能の高い微生物を土壤に接種することにより、土壤中のキチナーゼ生産が早期に効率よく行われることを示唆している。

5-3 生物的防除におけるキチナーゼの将来的方向

微生物のキチナーゼを利用することによつて植物病害を抑制しようとする研究は既に始められている。従来はキチナーゼを大量に生産する微生物を接種することが考えられていたが、現在では分子生物学的手法の進展により、キチナーゼ遺伝子がクローニングされ、キチナーゼ生産を人為的に制御できるようになりつつある。このような手法を用いる理由としては、①キチナーゼの人為的な生産制御が可能となるため、通常では生産しない高いレベルのキチナーゼを生産させたり、誘導や抑制

の条件を変えたりすることができる、②土壌から分離されたキチナーゼ生産菌はその分離土壌においては定着するが、他の土壌においては定着しない場合の方が多いため、土壌の優占微生物や根圏微生物にキチナーゼ遺伝子を導入し、高い定着率を図ることにより、安定した接種効果を得ることができるなどがあげられる。実際に研究が進められているのは、*Serratia marcescens*のキチナーゼ遺伝子を用いたものであり、この菌株のキチナーゼ遺伝子を*Pseudomonas*属などの根圏に普遍に存在している微生物に導入し、植物根の周りのキチナーゼ活性を増加させ、病原糸状菌の根への進入を抑えようとするものである。また植物細胞にキチナーゼ遺伝子を導入することにより病害防衛機能を強化し、抵抗性品種を作出しようとして試みられている。放線菌のキチナーゼ遺伝子のクローニングも精力的に行われており、放線菌のキチナーゼ遺伝子を利用した研究も今後進められていくと考えられる。しかし土壌に生息する放線菌の多くは、すでにキチナーゼ生産能を有しており、放線菌の菌密度を増加させたり、キチナーゼ生産が行われ易い環境を創出するなど他のアプローチも考えられる。本研究では土壌の生物性の改善から考えた土壌病害の防除を検討したが、土壌の改善によって病原菌の異常な繁殖を抑制する環境を創出したり、抵抗性品種を開発するなどの総合的な方法により、さらに生物的防除が大きな効果を生み出すものと考えられる。

要約

本研究は、自然界で放線菌や *Trichoderma* 属糸状菌によって行われる糸状菌細胞壁の分解作用について、分解酵素であるキチナーゼの生産と酵素学的性質の観点、および土壌におけるキチナーゼの動態の観点から検討を行うことにより、キチナーゼを用いた植物病害の生物的防除の研究に資することを目的とした。

放線菌によるキチナーゼ生産と糸状菌細胞壁の分解

土壌中のキチン分解微生物としては圧倒的に放線菌が多いことが報告されており、本研究では東京都農業試験場、千葉県農業試験場の化学肥料区、コンポスト施用区、および栃木県農業試験場の化学肥料区、おがくず堆肥施用区、12カ月腐熟堆肥施用区から分離された517菌株の放線菌においてキチナーゼのほかにセルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ、ペクチナーゼ生産を各種寒天培地を用いて調べることにより、土壌管理が放線菌の加水分解酵素生産割合に与える影響について調べた。プロテアーゼ、アミラーゼ、セルラーゼを菌体外に生産する放線菌の割合は、どの分離土壌においても高く、ほとんどの場合、分離放線菌株の70~97%がこれらの酵素を生産していた。キチナーゼやペクチナーゼについては、大半の菌株が30~70%の割合で生産をしていた。土壌の種類あるいは管理が異なっても菌体の酵素生産割合には有意な違いはみられなかった。分離された放線菌の中からキチナーゼ生産能が強く、 β -1,3-グルカナーゼ、セルラーゼ、プロテアーゼ、アミラーゼ、ペクチナーゼ生産能を有する *Streptomyces erythraeus* S-84株が得られた。

S-84株の培養基質とキチナーゼ生産の関係について調べたところ、基質として糸状菌細胞壁(サツマイモつる割れ病病原菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* NIAES 5115株およびキュウリつる割れ病病原菌 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

5117株)、キチンを用いることによりキチナーゼ生産が強力に誘導された。またキチン培地にN-アセチルグルコサミンを添加することにより、キチナーゼ生産の促進効果がみられた。一方キチンで培養している途中にグルコースを添加することにより、キチナーゼ生産が抑制された。フラクトースにおいても弱い抑制効果がみられた。これらの抑制効果は、cAMPを培地に添加しても解除されず、cAMP関与のカタボライト抑制機構とは異なるものであることが示唆された。

S-84株の生産するキチナーゼの分離精製を行った。精製は陰イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過を行い、chitinase Aとchitinase Bの2種類のキチナーゼが単離され、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一のバンドを呈した。活性量比としては、chitinase Bが全活性の99%以上を占めた。chitinase Aは4-MU-3糖よりも4-MU-2糖分解活性が高く、chitinase Bは逆の傾向を示した。chitinase Aとchitinase Bの酵素学的性質を調べたところそれぞれ、分子量が41,000と44,000、等電点が8.3と4.8、至適pHが3.4~4.2と6.3~6.8、4-MU-2糖に対するKm値が49.2 μ Mと13.5 μ M、4-MU-3糖に対するKm値が13.5 μ Mと2.7 μ Mであった。chitinase B活性に対する金属イオン、修飾試薬、糖類の影響を調べたところ、Pb²⁺イオンとp-chloromercuribenzoic acidによって活性の阻害がみられた。chitinase Bの抗体をウサギを用いて調製し、各精製酵素に反応させたところ、chitinase Aの活性は阻害されなかったがchitinase Bの活性は有意に阻害され、2つのキチナーゼは免疫学的に異なる性質を持つことが証明された。精製酵素にコロイダルキチンを作用させ、分解物質を同定したところ、2種類の酵素ともN,N'-ジアセチルキトビオース(2糖)を主に生産していた。そのほかに若干量のN-アセチルグルコサミン(単糖)、N,N',N''-トリアセチルキトトリオース(3糖)の精製が確認された。p-ニトロフェニルキトオリゴ糖(1~4糖)に精製キチナーゼを反応させたところ、両キチナーゼとも非還元末端から2つめのグリコシド結合の分解速度が速いことが分かった。

またchitinase Aは糖鎖が長くなるにつれて分解速度が速くなる傾向があった。両キチナーゼはendo型酵素と考えられた。

糸状菌細胞壁を唯一の培養基質とした寒天培地にS-84株を接種したところ、S-84株は糸状菌細胞壁を分解し、コロニーの周辺を透明にした。このことからS-84株は糸状菌細胞壁分解酵素を菌体外に分泌することが確認された。また液体培地に接種した場合には糸状菌菌体が分解されるにつれて、S-84株がchitinase Bを誘導的に生産していることが確認された。S-84株とNIAES 5115株をキチン培地上で対峙培養したところ、S-84株とNIAES 5115株の菌糸が重なる部分が生じ、顕微鏡観察したところ、S-84株が糸状菌菌糸の一部分に接触して増殖していたり、糸状菌菌糸を覆うように増殖している様子が観察された。

Trichoderma属糸状菌によるキチナーゼ生産

*Trichoderma*属糸状菌は病原糸状菌に寄生することにより病害を抑制する特性を持つことから生物的防除の手段として注目を集め、実用化されている糸状菌である。

*Trichoderma*属糸状菌が病原糸状菌に寄生する際にキチナーゼを生産して細胞壁を分解していることが判っており、キチナーゼが重要な役割を担っていることが示されている。キチナーゼの生物的防除としての利用を図るにおいて、放線菌のキチナーゼ生産の場合と比較してどのような点が異なるのかについて知見を得ることは重要であると考え、培養基質とキチナーゼ生産との関係について検討を行った。

供試した9菌株の*Trichoderma*属糸状菌は病原糸状菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* NIAES 5115株および*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 5117株と対峙培養したところ、供試した全ての*Trichoderma*属糸状菌は各病原糸状菌のコロニー上に菌糸を伸ばした。また*Trichoderma*属糸状菌菌糸、および*Trichoderma*属糸状菌と病原糸状菌菌糸が接触した部分を採取してキチナーゼ活性の有無を調べたところ、供試

した全 *Trichoderma* 属糸状菌菌株においてキチナーゼ活性が確認された。4-MU-2 糖、3 糖分解活性とも存在した。

各 *Trichoderma* 属糸状菌を放線菌の場合と同様にキチン培地で培養し、キチナーゼ生産が生じるかどうかを調べたところキチン培地でよく生育し、キチナーゼ生産がキチンによって誘導されるものは、*T. viride* IFO 30498 株と沢田氏分離菌株だけであった。*Trichoderma* 属糸状菌の生産するキチナーゼは、他の糸状菌に寄生するための細胞壁分解酵素として生産され、分解産物は資化されない可能性が示唆された。両菌株の最高活性は同程度であり、*Streptomyces erythraeus* S-84 株の生産量の 1/2~1/3 にあたった。グリセロール培地を用いて構成的に生産されるキチナーゼのレベルを調べたが、全体的に活性は低かった。

キチン培地で生育し、キチナーゼを生産した *T. viride* IFO 30498 株を用い、キチン培地で生育させている途中に各種の基質を加えて、キチナーゼの生産に対する基質の影響を調べた。何も加えない場合に比べて、グルコサミン、フラクトースを添加した場合には、キチナーゼ生産が急激に増加し、特にグルコサミンを添加したときには、4-MU-2 糖分解活性だけが高まった。N-アセチルグルコサミン、グルコース、キシロースを添加した場合には、キチナーゼ生産が抑制された。グルコースやキシロースでは濃度が高くなるほど抑制効果が強く現れた。放線菌のキチナーゼ生産制御とはかなり異なることが示唆された。

土壌におけるキチナーゼの分布と動態

土壌のキチナーゼ活性の測定法については今までに報告があったが、感度が低い、時間がかかる、手間が多い、試料が多く必要、得られる結果が必ずしも活性を反映していない可能性があるなどの理由により、新しい活性測定法を開発した。本実験で開発した方法は上記の問題を解決した上に、基質を2種類の基質を使用すること

により、キチナーゼの反応特性についての情報も得られるという利点も有した。活性測定法の定量性を調べたところ、土壌試料量は0.6gを上限とし、反応時間は2時間程度までの範囲において定量性が確認された。制菌剤としてのトルエンは、活性測定においてとくに効果はみられなかった。

森林土壌として、八ヶ岳の黒ボク土、十文字峠のポドゾル、赤沢ⅠとⅡの褐色森林土を用い、各土壌の層位ごとのキチナーゼ活性並びにN-アセチルグルコサミニダーゼ活性を測定した。全体的に酵素活性は高い順にN-アセチルグルコサミニダーゼ \gg 4-MU-2糖分解活性 $>$ 4-MU-3糖分解活性のようになり、土壌深度が増すにつれて活性は低下する傾向がみられた。しかし十文字のポドゾルにおいてはN-アセチルグルコサミニダーゼ \gg 4-MU-3糖分解活性 $>$ 4-MU-2糖分解活性の順になり、A2層では局部的に3種類の酵素活性とも低い活性を呈した。土壌間で比較すると、八ヶ岳の黒ボク土と赤沢Ⅱの褐色森林土において同程度の高い酵素活性がみられ、十文字峠のポドゾルと赤沢Ⅰの褐色森林土において同程度の低い活性がみられた。キチナーゼ活性の高かった土壌は、母材が火山灰で、相対的に粘土含量が高く、有機物含量が多いという特性を有していた。表層土壌の土壌酵素活性と土壌の炭素含量および窒素含量の間には正の相関があった。酵素反応生成物である4-MUの回収率は、土壌の炭素含量および窒素含量との間には高い負の相関がみられ、土壌有機物が活性測定精度を低下させていると考えられた。

土壌に種々の有機化合物を添加することによりキチナーゼの生産を調べたところ、キチン、酵母エキス、N-アセチルグルコサミンを添加したときに有為なキチナーゼ生産が確認された。その他にキトサンやグルコースを添加した場合には弱い誘導が見られた。キチンを添加した場合には4-MU-3糖分解活性の強いキチナーゼが、その他の基質を添加した場合には4-MU-2糖分解活性の強いキチナーゼが誘導的に生産された。供試した畑土壌の酵素活性は高いほうから、N-アセチルグルコサミニダーゼ

活性 > 4-MU-2 糖分解活性 > 4-MU-3 糖分解活性の順であったが、キチンを添加することにより N-アセチルグルコサミニダーゼ > 4-MU-3 糖分解活性 > 4-MU-2 糖分解活性の順に変化した。また 4-MU-3 糖分解活性が先に増加し、遅れて 4-MU-2 糖分解活性が増加したことから、異なる酵素が時期を隔てて生産されていることが示唆された。

キチン施用土壤にキチナーゼ産生能の高い放線菌菌株 *Streptomyces erythraeus* S-84 株を 10^6 (CFU/50g 乾土) 接種することにより、キチナーゼの生産時期が早期化し、N-アセチルグルコサミニダーゼ活性が増加した。

謝辞

本研究を行うにあたりご指導を頂きました、筑波大学応用生物化学系 大羽 裕教授、吉田富男教授（現千葉大学教授）、永塚鎮男教授、東 照雄助教授、富川昭男助手に感謝申し上げます。また論文を作成するにあたり貴重な御指導と御助言を頂きました、筑波大学応用生物化学系 安井恒男教授、中原忠篤教授、農林学系 柿畠 眞助教授に感謝申し上げます。

本研究は主に農林水産省農業環境技術研究所土壌微生物利用研究室で行ったものであり、澤田泰男室長、宮下清貴主任研究官、藤井 毅研究員、小川直人研究員、熱帯農業研究所 横山 正研究員に御指導を頂きました。感謝申し上げます。

最後に有益な御助言を頂きました筑波大学応用生物化学系土壌科学研究室の方々および環境科学研究科土壌環境研究室の方々に感謝申し上げます。

参考文献

- Bade, M. L., and Stinson, A. (1981): Chitin and chitinase: a kinetic model., *J. Theol. Biol.* 93:697-300
- Baxby, P., and Gray, T. R. G. (1968): Chitin decomposition in soil I: media for isolation of chitinoclastic microorganisms from soil., *Trans. Br. mycol. Soc.* 51:287-292
- Baxby, P., and Gray, T. R. G. (1968): Chitin decomposition in soil II. The ecology of chitinoclastic microorganisms in forest soil., *Trans. Br. Mycol. Soc.* 51:293-309
- Bennet, C. B., and Hood, M. A. (1980): Effects of cultural conditions on the production of chitinase by a strain *Bacillus megaterium*, in *Developments in industrial Microbiology* 21:357-263
- Berger, L. R., and Reynolds, D. M. (1958): The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. *Biochim. Biophys. Acta* 29:522-534
- Beyer, M., and Diekmann, H. (1985): The chitinase system of *Streptomyces* sp. ATCC 11238 and its significance for fungal cell wall degradation., *Appl. Microb. Biotech.* 23:140-146
- Bull, A. T. (1970): Inhibition of polysaccharidases by melanin: Enzyme inhibition in relation to mycolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 137:345-356
- Browman, M. G., and Tabatabai, M. A. (1978): Phosphodiesterase activity of soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42:284-290
- Carlstorm, D. (1957): Crystal structure of α -chitin., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3:669-683
- Carroad, P. A., and Tom, R. A. (1978): Bioconversion of shellfish chitin wastes; process conception and selection of microorganisms. *J. Food Sci.* 43:1158
- Chet et al., (1980): Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70:994-998
- Chet, I., and Henis, Y. (1985): *Trichoderma* as a biocontrol agent against soilborne root pathogens., in *Ecology and management of soilborne plant pathogens*, ed. by Parker, C. A. et al., pp.110-112, Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, Minn. USA.
- Correa, J. U., Elango, N., Polacheck, I., and Cabib, E. (1982): Endochitinase, a mannan-associated enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 257:1392-1397
- Cosio, I. G., Fisher R. A., and Carroad, P. A. (1982): Bioconversion of shellfish chitin wastes; waste pretreatment, enzyme production, process design, and economic analysis., *J. Food Sci.* 47:901
- Eivazi, F., and Tabatabai, M. A. (1977): Phosphatases in soil. *Soil Biol. Biochem.* 9:167-172
- Elad, Y., Chet, I., Boyle, P., and Henis, Y. (1983): Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*: Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. 73:85-88

- Elango, N., Correa, J. U., and Cabib, E. (1982): Secretory character of yeast chitinase. *J. Biol. Chem.* 257:1398-1400
- Haben, L. (1966): Effect of subsoiling on the activity of microbial processes in the soil. *Ved. Pr. Vysk. Ust. Rastl. Vyroby Piestanoch.* 4:139-152, *in* *Soil Enzymes*, ed. by Burns, R. G., pp.126-126, Academic Press, New York.
- Haben, L. (1967): Effect of ploughing depth and crop plants on the microflora and enzymatic activity of soil. *Ved. Pr. Vysk. Ust. Rastl. Vyroby Piestanoch.* 5:157-169, *in* *Soil Enzymes*, ed. by Burns, R. G., pp.126-126, Academic Press, New York.
- Hanzlikova, A., Sotolova, I., and Jandera, A. (1987): chitinase in the rhizosphere and on plant roots., ed. by Vancura, V., and Kunc, F., *in* *Interrelationships between microorganisms and plants in soil*, pp.293-299, Elsevier Sci. Pub. Co. Inc., New York.
- Hara, S., Yamamura, Y., Fujii, Y., Mega, T., and Ikenaka T. (1989): Purification and characterization of chitinase produced by *Streptomyces erythraeus*. *J. Biochem.* 105:484-489
- Hodgson, D. A. (1982): Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxy-glucose. *J. Gen. Microbiol.* 128:2417-2430
- Homma, Y., Sitton, J. W., Cook, R. J., and Old, K. M. (1979): Perforation and destruction of pigmented hyphae of *Gaeumannomyces graminis* by vampyrellid amoebae from Pacific Northwest wheat field soils. *Phytopathology* 69:1118-1122
- Honna, T., and Oba, Y. (1976): On the physicochemical properties, free oxides and humus composition of mountain Podzol in Central Japan., *Pedologist* 20:3-13
- 堀尾武一・山下仁平 (1981): 蛋白質・酵素の基礎実験法, 南江堂出版
- Howell, C. R., and Stipanovic, R. D. (1979): Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* 69:480-482
- Howell, C. R., and Stipanovic, R. D. (1980): Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedings by *Pseudomonas fluorescens* and antibiotic. *Phytopathol.* 70:712-715
- Howell, C. R., and Stipanovic, R. D. (1983): Glivirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens*, and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. *Can. J. Microbiol.* 29:321-324
- Hsu, S. C. and Lockwood, J. L. (1975): Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of Actinomycetes in water and soil., *Appl. Microbiol.* 29: 422-464
- 井上義孝・竹内昭士郎・駒田 且 (1964): 土壤病害防除の方向: 特にダイコン萎黄病にたいするキチン施用による生物的防除について. *東海近畿農業試験場研究速報* 1:6-11
- Ishaque, M. and Kluepeel, D. (1980): Cellulose complex of a mesophilic *Streptomyces* strain. *Can. J. Microbiol.* 28:183-189
- Ishikawa, F., Oishi, K., Aida, K. (1981): Chitinase production by *Conidiobolus lamprauges* and other *Conidiobolus* species. *Agric. Biol. Chem.* 45:2361

- Ishizawa, S., and Araragi, M. (1976): Composition of Actinomycete population in soil., in Actinomycetes the Boundary Microorganisms, ed. by Arai, T., pp97-107, Toppan Co. Ltd.
- Iwamoto, T., Okiura, T., Sasaki, T., and Inaoka, M. (1987): Kinds of glycosidase and properties of β -N-acetylglucosaminidase bound to mycelia of *Streptomyces* sp. J. Ferment. Technol. 65:593-596
- Karamshuk, Z. P. (1975): Cellulase activity of dark chestnut soil on fallow-cereal rotation. Izv. Sib. Otd. Akad. Nauk USSR 5/1:11-16, in Soil Enzymes, ed. by Burns, R. G., pp.126-126, Academic Press, New York.
- 切貫武代司・尾藤博道・鈴木直治 (1976): 放線菌のキチナーゼ、 β -1,3-グルカナーゼ活性とキュウリつる割病初期感染防止効果. 神戸大農研報 12:41-48
- Kuster, E. (1976): Chromogenicity of Actinomycetes., Actinomycetes, ed. by Arai, T., pp.43-54, Toppan, Tokyo.
- Kuznetsov, V. D., and Yangulova, I. V. (1970): Utilization of medium containing chitin for isolation and quantitative enumerization of Actinomycetes from soil., Mikrobiologiya 39:902-906
- Lily, V. G., Nair, U. K., Pandalai, K. M., and Menon, K. P. V. (1952): Indian Coconut J. 5:162
- Lingappa, Y., and Lockwood, J. L. (1962): Chitin media for selective isolation and culture of Actinomycetes., Phytopathology 52:317-327
- Lloyd, A. B., and Lockwood, J. L. (1966): Lysis of fungal hyphae in soil and its possible relation to autolysis., Phytopathology 56:595-602
- Lloyd, A. B., Noveroske, R. L. (1965): Lysis of fungal mycelium by *Streptomyces* spp. and their chitinase systems., Phytopathology 55:871-875
- McClagherty, C. A., and Linkins, A. E. (1990): Temperature responses of enzymes in two forest soils., Soil Biol. Biochem. 22:29-33
- Melouk, H. A., and Horner, C. E. (1975): Cross protection in mints by *Verticillium nigriscens* against *V. dahliae*. Phytopathol. 65:767-769
- Millard, W. A., and Taylor, C. B. (1927): Antagonism of microorganisms as the controlling factor in the inhibition of scab by green manuring. Annals Appl. Biol. 14:202-216
- Mitchell, R. (1963): Addition of fungal cell-wall components to soil for biological disease control., Phytopathology 53:1068-1071
- Mitchell, R., and Alexander, M. (1961): The mycolytic phenomenon and biological control of *Fusarium* in soil. Nature 190:109-110
- Miyashita, K., Kato, T., and Tsuru, S. (1982): Actinomycetes occurring in soil applied with compost., Soil Sci. Plant Nutr. 28:303-313
- 宮下清貴・加藤哲郎・都留信也 (1983): 都市ゴミコンポスト施用土壤の放線菌. 土と微生物 25:23-31
- Monreal, J., and Reese, E. T. (1969): The chitinase of *Serratia marcescens*., Can. J. Microbiol. 15:689-696

- Molano, J., Polacheck, I., Duran, A., and Cabib, E. (1979): An endochitinase from wheat germ: Activity on nascent and preformed chitin. *J. Biol. Chem.* 254:4901-4907
- Mueller, K. E., and Durrell, L. W. (1957): Sampling tubes for soil fungi. *Phytopathol.* 47:243-243
- 小川 奎・駒田 旦 (1984): 非病原性 *Fusarium oxysporum* によるサツマイモつる割病の生物的防除. *日植病報* 50:1-9
- Ohtakara, A. (1988): Chitinase and β -N-acetylglucosaminidase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Meth. Enzymol.* 161:462-470
- Okafor, N. (1966): Ecology of micro-organisms on chitin buried in soil., *J. Gen. Microbiol.* 44:311-327
- Okanishi, M., Katagiri, K., Furumai, t., Takeda, K., Kawaguchi, K., Saitoh, M., and Nabesyhima, S. (1983): Basic techniques for DNA cloning and conditions required for *Streptomyces* as a host., *J. Antibiotics* 36:99-108
- Old, K. M., and Chakraborty, S. (1986): Mycophagous soil amoebae; Their biology and significance in the ecology of soil-borne plant pathogens. *Progress in Protistology* 1:163-194
- Otakara, A. (1961): Studies on chitinolytic enzymes of black-koji mold; part II. purification of chitinase. *Agric. Biol. Chem.* 25:54-60
- Paravizas, G. C., Dunn, M. T., Lewis, J. A., and Beagle-Ristaino, J. (1984): Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. *Phytopathol.* 74:1171-1175
- Reissig, J. L., Strominger, J. L., and leloir, L. F. (1955): A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylaminosugars., *J. Biol. Chem.* 217:959-966
- Reynolds, D. M. (1954): Exocellular chitinase from a *Streptomyces* sp., *J. Gen. Microbiol.* 11:150-159
- Robbins, P. W., Albright, C., and Benfield, B. (1988): Cloning and expression of a *Streptomyces plicatus* chitinase (chitinase-63) in *Escherichia coli*., *J. Biol. Chem.* 263:443-447
- Robbins, P. W., Wirth, D. F., and Hering, C. (1981): Expression of the *Streptomyces* enzyme endo-glucosidase H in *Escherichia coli*., *J. Biol. Chem.* 256:10640-10644
- Roberts, R. L., and cabib, E. (1982): *Serratia marcescens* chitinase: one-step purification and use for the determination of chitin., *Anal. Biochem.* 127:402-412
- Rodriguez-Kabana, R., Godoy, G., Morgan-Jones, G., and Shelby, R. A. (1983): The determination of soil chitinase activity; conditions for assay and ecological studies., *Plant and Soil* 75:95-106
- Rothrock C. S., and Gottlieb, D. (1984): Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. *Can. J. Microbiol.* 30:1440-1447
- Sanford, G. B. (1926): Some factors affecting the pathogenicity of *Actinomyces scabies*. *Phytopathology* 16:525-547

- Scher, F. M., and Barker, R. (1982): Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology* 72:1567-1573
- Schneider, R. W. (1984): Effects of nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* on celery root infection by *F. oxysporum* f. sp. *apii* and a novel use of the Lineweaver-Burk double reciprocal plot technique. *Phytopathology* 74:646-653
- Schnathorst, W. C., and Mathre, D. E. (1966): Cross-protection in cotton with strains of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* 56:1204-1209
- Shirling, E. B., and Gottlieb, D., (1966): Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16:313-340
- Sivian, A., and Chet, I. (1986): *Microbial communities in soil*, ed. by Jensen, V. et al., pp. 89-95, Elsevier Appl. Sci. Pub., London.
- Skinner, C. E., and Dravis, F. (1937): A quantitative determination of chitin destroying microorganisms in soil. *Ecology* 18:391-397
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenza, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid., *Anal. Biochem.* 150:76-85
- Sneh, B., and Henis, Y. (1971): Production of antifungal substances active against *Rhizoctonia solani* in chitin-amended soil., *Phytopathology* 62:595-600
- Sneh, B., Katan, J., and Henis, Y. (1971): Mode of inhibition of *Rhizoctonia solani* in chitin-amended soil., *Phytopathology* 61:1113-1117
- Sowden, F. G. (1959): Investigations on the amount of hexosamines found in various soils and methods for their determination., *Soil Sci.* 88: 138-143
- Sutherland, E. D., Baker, K. K., and Lockwood, J. L. (1984): Ultrastructure of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* oospores parasitized by *Actinoplanes missouriensis* and *Humicola fuscoatra*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 82: 726-729
- Sutherland, E. D., and Lockwood, J. L. (1984): Hyperparasitisms of oospores of some peronosporales by *Actinoplanes missouriensis* and *Humicola fuscoatra* and other actinomycetes and fungi. *Can. J. Plant Pathol.* 6:139-145
- Tabatabai, M. A., and Bremner, J. M. (1969): Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1:301-307
- Tabatabai, M. A., and Bremner, J. M. (1970): Arylsulphatase activity of soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 34:225-229
- Teintze, M., and Leong, J. (1981): Structure of Pseudomobactin A, a second siderophore from plant growth promoting *Pseudomonas* B10. *Biochemistry* 20:6457-6462
- Tiunova, N. A., Pirieva, D. A., Feniksova, R. V., and Kuznetsov, V. D. (1976): Formation of chitinase by Actinomycetes in submerged culturing., *Mikrobiologiya* 45:625-629
- Tom, R. A., and Carroad, P. A. (1981): Effect of reaction conditions on hydrolysis of chitin by *Serratia marcescens* QMB 1466 chitinase., *J. Food Sci.* 46:646

- Tominaga, Y., and Tsujisaka, Y. (1976): Purifications and some properties of two chitinases from *Streptomyces orientaris* which lyse *Rhizopus* cell wall., Arr. Biol. Chem. 40:2325-2333
- Tracy, M. V. (1957): Chitin., Rev. Pure Appl. Chem. 7:1-14
- Tsujisaka, Y., Tominaga, Y., and Iwai, M. (1973): Taxonomic characters and culture conditions of a bacterium which produce a lytic enzyme *Rhizopus* cell wall., Agric. Biol. Chem. 37:2517-2525
- Tsujisaka, Y., Tominaga, Y., and Iwai, M. (1975): Purification and some properties of the lytic enzyme from *Bacillus* R-4 which acts on *Rhizopus* cell wall., Agric. Biol. Chem. 39:145-152
- Usui, T., Hayashi, Y., Nanjo, F., Sakai, K., and Ishido, Y. (1987): Transglycosylation reaction of a chitinase purified from *Nocardia orientaris*., Biochem. Biophys. Acta 923:302-309
- Vessey, J. C., and Pegg, G. F. (1973): Autolysis and chitinase production in cultures of *Verticillium Albo-atrum*., Trans. Br. Mycol. Soc. 60:133-143
- Veldkamp, H. (1955): A study of the aerobic decomposition of chitin by microorganisms. Meded. Landbouwhoges. Wageningen 55:127-174
- 和田修治・石沢修一 (1980): 海岸及び湖岸砂地土壤の放線菌フロア. 土肥誌 51:73-78
- Watanabe, T. (1978): Genetic characteristics of Brown forest soils derived from volcanic ash., Master Thesis, Tokyo Univ. of Educat.
- Wesels, J. G. H., and Sietsma, J. H. (1981): fungal cell walls; a survey, in Encyclopedia of Plant Physiology, New Series vol. 13B, Plant Carbohydrates II, ed. by Tanner, W, and Loewus, F. A., pp352-394, Springer-Verlag, New York
- Williams, S. T., and Robinson, C. S. (1981): The role of Streptomyces in decomposition of chitin in acidic soils., J. Gen. Microbiol. 127:55-63
- Wortman, A. T., Somerville, C. C., and Colwell, R. R. (1986): Chitinase determinants of *Vibrio vulnificus* ;Gene cloning and applications of a chitinase probe., Appl. Environ. Microbiol. 52:142-145
- 野菜試験場 (1978): 野菜における連作障害の現況. 野菜試研究資料 5:89
- Yabuki, M., Kasai, Y., Ando, A., and Fujii, T. (1984): Rapid method for converting fungal cells into protoplasts with a high regeneration frequency. Exp. Mycol. 8:386
- Yabuki, M., Mizushima, K., Amatatsu, T., Ando, A., Fujii, T., Shimada, M., and Yamashita, M. (1986): Purification and characterization of chitinase and chitiobiase produced by *Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes* A 52. J. Gen. Appl. Microbiol., 32:25-38
- 矢吹 稔 (1988): 最後のバイオマス: キチン、キトサン, キチン、キトサン研究会編, 技報堂出版
- Yoshikawa, M. Macromolecules, recognition and the triggering of resistance., ed. by Callow, J. E., in Biochemical Plant Pathology, pp267-298, John Wiley, Chichester, England

培地組成一覧

培地1 キチン培地 (キチン寒天培地)

コロイド状キチン 2.5g, K_2HPO_4 0.7g, KH_2PO_4 0.3g, $MgSO_4$ 0.5g, $FeSO_4$ 0.01g,
 $ZnSO_4$ 0.001g, NH_4NO_3 0.3g, 蒸留水 1000ml, pH 6.5

*キチン寒天培地の場合は寒天を20g加えた。

培地2 セルロース培地

カルボキシメチルセルロースナトリウム塩 50mg, NH_4NO_3 0.3g, K_2HPO_4 1.0g
 $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 7H_2O$ 微量, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, 寒天 10g, 蒸留水 1000ml, pH 6.5

培地3 スターチ培地

可溶性デンプン 2.0g, NH_4NO_3 0.3g, K_2HPO_4 1.0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g
 $Fe_2(SO_4)_3$ 微量, 寒天 15g, 蒸留水 1000ml, pH 7.0

培地4 ゼラチン培地

ゼラチン 4.0g, ペプトン 5.0g, 肉エキス 3.0g, 寒天 15g, 蒸留水 1000ml, pH 7.0

培地5 ペクチン培地

$(NH_4)_2SO_4$ 2.0g, KH_2PO_4 4.0g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 6.0g, $MgSO_4 \cdot 12H_2O$ 0.2g,
酵母エキス 1.0g, ペクチン 5.0g, 寒天 15.0g, 水道水 1000ml, pH 7.4

培地6 β -1,3-グルカン培地

β -1,3-グルカン 2.5g, K_2HPO_4 0.7g, KH_2PO_4 0.3g, $MgSO_4$ 0.5g, $FeSO_4$ 0.01g
 $ZnSO_4$ 0.001g, NH_4NO_3 0.3g, 寒天 20g, 水道水 1000ml, pH 6.5

培地7 Yeast extract-Malt extract Agar

Bacto-Yeast Extract (Difco Lab., Detroit, Mich. USA) 4.0g, Bacto-Malt
Extract (Difco) 10.0g, Bacto-Dextrose (Difco) 4.0g, Bacto-Agar (Difco)
20.0g, 蒸留水 1000ml, pH 7.0

培地8 Inorganic salt starch-agar

溶液I: 可溶性デンプン(Difco)10.0gを少量の冷蒸留水に溶かし、ペースト状に
した後、蒸留水で500mlに定容。

溶液II: K_2HPO_4 1.0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0g, NaCl 1.0g, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0g, $CaCO_3$ 2.0g,
蒸留水 500ml, 微量塩溶液 1.0ml

微量塩溶液: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g, 蒸留水 100ml

溶液Iと溶液IIを混合し、寒天(Difco)20gを加えた。

培地9 Carbon utilization medium

A液(炭素源無菌溶液): 以下の炭素源について10%(w/v)濃度の溶液を調製した。

D-glucose (positive control), L-arabinose, sucrose, l-inositol,
D-mannitol, D-fructose, rhamnose, raffinose, cellulose.
negative controlとして炭素源を加えないものも調製した。

滅菌はフィルター濾過によって行ったが、inositolおよびcelluloseの滅菌は、
それぞれエーテル、エチレンオキサイドにを用いて滅菌を行った。

B液(Pridham and Gottlieb trace salts): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.64g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.79g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15g, 蒸留水 100ml. 3~5°Cで保存。

C液(Basal mineral salts agar): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.64g, KH_2PO_4 2.38g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
5.65g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, B液 1ml, 蒸留水 1000ml, Noble Agar(Difco)あるいは
Purified Agar(Difco) 15.0g, pH 6.8-7.0

滅菌したC液を60°Cに冷やし、滅菌したA液を1%(V/V)になるように無菌的に加えて
攪拌し、直径9cmのペトリ皿に25mlずつ分注して用いた。

培地10 Peptone-Yeast extract iron agar

Bacto-Peptone Iron Agar (Difco) 36.0g, Bacto-Yeast Extract (Difco) 1.0g,
蒸留水 1000ml, pH 7.0-7.2

培地11 Tyrosine agar

グリセロール 15.0g, L-tyrosine (Difco) 0.5g, L-asparagine (Difco) 1.0g,
 K_2HPO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, NaCl 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, 微量塩溶液(培地8)
1ml, 蒸留水 1000ml, Bacto-agar (Difco) 20g, pH 7.2-7.4

培地12 無機塩培地

K_2HPO_4 0.7g, KH_2PO_4 0.3g, MgSO_4 0.5g, FeSO_4 0.01g, ZnSO_4 0.001g, NH_4NO_3 0.3g
蒸留水 1000ml, pH6.5

培地13 LB培地

Bacto Tryptone(Difco社製) 10g, 酵母エキス(Difco社製) 5g, NaCl 5g,
グルコース 1g, 蒸留水1000ml

培地14 キチン-β-1,3-グルカン培地

K_2HPO_4 0.7g, KH_2PO_4 0.3g, MgSO_4 0.5g, FeSO_4 0.01g, ZnSO_4 0.001g, NH_4NO_3 0.3g
コロイド状キチン 1.5g, カードラン 1.5g, 蒸留水 1000ml, pH6.5

培地15 糸状菌培養用培地

酵母エキス 0.4%, 麦芽エキス 1.0%, グルコース 0.4%

培地16 糸状菌細胞壁培地（糸状菌細胞壁寒天培地）

糸状菌細胞壁 2.5g, K_2HPO_4 0.7g, KH_2PO_4 0.3g, $MgSO_4$ 0.5g, $FeSO_4$ 0.01g
 $ZnSO_4$ 0.001g, NH_4NO_3 0.3g, 寒天 20g, 蒸留水 1000ml, pH6.5

*糸状菌細胞壁寒天培地の場合は寒天を20g加えた。

培地17 ポテトデキストロース寒天培地

Poteto Dextrose Agar 39g, 蒸留水 1000ml

培地18 麦芽エキス寒天培地

麦芽エキス 20g, 寒天 20g, 蒸留水 1000ml

培地19 グリセロール培地

KH_2PO_4 1.36%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2%, KCl 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.015%, グリセリン 0.5%,
pH 4.6