

氏名(本籍)	上野秀人(岐阜県)		
学位の種類	農学博士		
学位記番号	博甲第855号		
学位授与年月日	平成3年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	放線菌と <i>Trichoderma</i> 属糸状菌によるキチナーゼ生産および 土壌中のキチナーゼ活性		
主査	筑波大学教授	農学博士	大羽裕
副査	筑波大学教授	農学博士	安井恒男
副査	筑波大学教授	農学博士	中原忠篤
副査	筑波大学助教授	農学博士	柿  篤  眞
副査	千葉大学教授	Ph. D.	吉  田  富  男

## 論 文 の 要 旨

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、キチナーゼ（糸状菌細胞壁分解酵素）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。

### 1) 放線菌によるキチナーゼ生産と糸状菌細胞壁分解

東京都農業試験場、千葉県農業試験場および栃木県農業試験場の種々の土壌から分離された放線菌は、ほとんどの場合70～97%という高い割合でプロテアーゼ、アミラーゼ、セルラーゼを菌体外に生産し、それよりやや低い割合でキチナーゼやペクチナーゼを生産した。放線菌は土壌中の有機物分解に重要な役割を果たしていることが示唆された。分離された放線菌の中からキチナーゼ生産能が強く、 $\beta$ -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株を得た。S-84株は糸状菌細胞壁 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* NIAES 5115株および *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* NIAES 5117株) あるいはキチンを培養基質とするキチナーゼを誘導的に生産した。またキチン培地で培養しているときにN-アセチルグルコサミンを添加すると、キチナーゼの生産が促進された。グルコースを添加した場合は逆に抑制された。フラクトースも弱い抑制効果を呈した。これらの抑制は、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を、陰イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過を行い精製分離し

た。2種類のキチナーゼ (chitinase AとB) 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となった。chitinase Bが全活性の99%以上を占めた。キチナーゼ活性の測定はキトオリゴ糖の4-methylumbelliferon (4-MU) 誘導体を用いた。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の酵素学的性質はそれぞれ、分子量が41000と44000、等電点が4.8と8.3、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 $\mu$ Mと13.5 $\mu$ M、4-MU-3糖に対する $K_m$ 値が13.5 $\mu$ Mと2.7 $\mu$ Mであった。chitinase Bは $Pb^{2+}$ イオンとp-chloromer-curibenzoic acidによって活性が阻害された。chitinase Bの抗体を調製し各精製酵素に反応させたところ、各キチナーゼは免疫学的に異なる性質を持つことが示された。各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、両酵素とも2糖を主に生産し、単糖、3糖の生成も確認された。次にp-ニトロフェニルキトオリゴ糖 (1~4糖) を作用させたところ、両酵素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型分解酵素と考えられた。

糸状菌細胞壁の寒天培地に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た。液体培地においては、chitinase Bが糸状菌細胞壁分解の主体になっていることが示唆された。S-84株と病原糸状菌NIAES 5115株をキチン培地上で対峙培養し、S-84株とNIAES 5115株のコロニーが重なった部分を顕微鏡で観察すると、S-84株が糸状菌菌糸に塊状になって増殖していたり、糸状菌菌糸全体を覆うように増殖しており、糸状菌菌体の分解が示唆された。

### 2) *Trichoderma* 属糸状菌によるキチナーゼ生産

*Trichoderma* 属糸状菌は効果の高い生物的防除エージェントであり、その作用機作はキチナーゼ生産であることが知られている。そこで、キチナーゼ生産について放線菌の場合と差異があるかどうかを調べた。

9株と*Trichoderma* 属糸状菌と病原糸状菌NIAES 5115株あるいはNIAES 5117株とを対峙培養したところ、全*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、菌糸が重なった部分および*Trichoderma* 属菌株の菌糸には、キチナーゼ活性が検出された。各*Trichoderma* 属菌株をキチン培地で培養したところ、多くの株はキチンを唯一の炭素源として利用できず、キチン培地でキチナーゼ生産が誘導されるものは、*T. viride* IFO 30498株と沢田氏分離株の2株だけであった。この2株の酵素活性は同程度であり、S-84株の生産量の1/2~1/3ぐらいであった。

*T. viride* IFO 30498株のキチナーゼ生産に対する基質の影響を調べた。キチン培地で培養しているときに、グルコサミンやフラクトースを添加すると、キチナーゼ生産が急激に増加した。特にグルコサミンは4-MU-2糖分解活性だけを高めた。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。グルコースとキシロースは濃度が高くなるほど抑制効果が強く現れた。放線菌とは異なるキチナーゼの生産制御が行われていることが示された。

### 3) 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は適当なものがなかったため、まず活性測定法を開発した。本実験

で開発した方法は簡便で、感度が高く、2種類の基質（4-MU-2糖と4-MU-3糖）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検討したところ、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。制菌剤として加えたトルエンは、特に効果は見られなかった。

森林土壌として、黒ボク土（八ヶ岳）、ポドゾル（十文字峠）、褐色森林土（赤沢ⅠⅡ）を用い、各土壌の層位ごとにキチナーゼ活性と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方から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糖分解活性の順になり、土壌深度が増すにつれて活性が減少する傾向が見られた。しかし十文字峠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、またA<sub>2</sub>層（洗脱層）では局部的に3種類とも低い活性を呈した。各酵素活性を土壌間で比較すると、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性質を有していた。表層土壌の各酵素活性と炭素含量および窒素含量と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る可能性が考えられた。

土壌に種々の炭素源を添加することによるキチナーゼ生産に対する影響を調べた。土壌にキチン、酵母エキス、N-アセチルグルコサミン、グルコースを添加するとキチナーゼ生産が確認された。キチンを添加した場合には4-MU-3糖分解活性が顕著に高くなり、グルコースを添加した場合には4-MU-2糖分解活性だけが増加した。土壌にキチンを添加すると4-MU-3糖分解活性が速く増加し、遅れて4-MU-2糖分解活性が増加した。このことから時期によって生産されるキチナーゼの内容が異なることが示唆された。また土壌にS-84株を接種することによりキチナーゼの生産が早く増加した。

## 審 査 の 要 旨

土壌微生物の分野において、キチナーゼに関する研究報告は極めて少なく未開発の領域であり、本論文は土壌微生物によるキチナーゼ生産性とその生産の誘導条件およびキチナーゼの酵素化学的性質の比較検討を詳細に行ったもので多くの新しい知見をえている。

また土壌中のキチナーゼ活性の簡便かつ高感度の測定法を開発し、この測定法を用いてこれまでほとんど報告されていなかった各種土壌中のキチナーゼ活性を調べ、その結果土壌型による活性の相違やキチナーゼ活性に影響を与える要因などを明らかにした。

これらの研究は、土壌中のキチナーゼ生産菌とその動態に関する研究に新しい知見を加えたものであり、土壌病原糸状菌による植物病害の生物的防除についての今後の研究の発展に大きく寄与するものとして高く評価される。

よって、著者は農学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。