

Title	クロカビによるPolygalacturonase生産の生理学的及び動力学的研究
Author(s)	田原, 寅一
Citation	大阪大学, 1975, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/2508">https://hdl.handle.net/11094/2508</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

クロカビによるPOLYGALACTURONASE

生産の生理学的および動力学的研究

田 原 寅 一

論文目録

田原寅一

主論文 クロカビによる Polygalacturonase 生産の  
生理学および動力学的研究

(主論文のうち印刷公表したもの)

1. Translational Repression in the Preferential Synthesis  
of Some Mold Enzymes (I)

(糸状菌酵素優先合成における翻訳レベルでの抑制(I))

Journal of Fermentation

Technology 50巻9号

昭和47年9月25日

1. Process Kinetics of Polygalacturonase Production by Aspergillus niger

(Aspergillus niger によるポリガラクトナーゼ生産の動力学的解析)

Journal of Fermentation

Technology 52巻8号

昭和49年8月25日

(主論文のうち未公表のもの)

1. Translational Repression in the Preferential Synthesis  
of Some Mold Enzymes (II)

(糸状菌酵素優先合成における翻訳レベルでの抑制(II))

執筆中

Journal of Fermentation

Technology 投稿予定

クロカビによる Polygalacturonase 生産の  
生理学的および動力学的研究

田原寅一

## ま え が き

近年の分子生物学，分子遺伝学の飛躍的な発展に伴い，それらの手法が醗酵工学に応用されるに及んで種々の醗酵現象が理論的に解明されてきた。特に酵素合成機構の研究はその最たるものである。しかしながら，工業微生物による酵素合成の機構を生理学的に解析した例は少ない。著者がここに取り上げた *Aspergillus niger* の生産する *pectinase* についてもその例に漏れず，従来の研究では現象面の把握に留まる。この研究では，*A. niger* のアデニン要求株による *polygalacturonase* 生産に特徴的な *catabolite repression* の機構を生理学的に解析すると共に，天然培地での生産をも含め速度論的観点からも解析を行い，工業的応用への基礎的知見を得ることを目的とした。ここに省みるとき，まだ解明されねばならない問題を多分に残しており，今後もその究明に努力する所存である。

1974年 12月

著 者

目 次 頁

緒 論 1

第1章	Polygalacturonase の生産条件の検討 ならびに諸性質	6
第1節	緒 言	6
第2節	実験材料および方法	7
第3節	実験結果	10
1.	合成培地組成の検討	10
2.	Polygalacturonase の分画と諸性質	12
第4節	考 察	20
第5節	要 約	22

第2章	Polygalacturonase の catabolite repression の機構	23
第1節	緒 言	23
第2節	実験材料および方法	25
第3節	実験結果	26
1.	グルコースによる polygalacturonase 生産の阻害	26
2.	Translation レベルでの抑制	29
3.	Transcription への影響	34
第4節	考 察	39

第5節	要約	44
第3章	Polygalacturonase 生産の速度論的解析	46
第1節	緒言	46
第2節	実験材料および方法	47
第3節	実験結果	48
1.	種々培養条件における polygalacturonase 生産経過	48
2.	Polygalacturonase 生産の抑制と lag の性質	51
3.	Polygalacturonase 生成系の安定性	54
第4節	考察	56
第5節	要約	57
第4章	天然培地における polygalacturonase 生産の解析	60
第1節	緒言	60
第2節	実験材料および方法	61
第3節	実験結果	62
1.	天然培地における polygalacturonase 生産と catabolite repression	62
2.	高誘導能 inducer 存在の推定	65
第4節	考察	68

第5節. 要 約 69

総括 および 結論 71

文 献 76



## 緒 論

ペクチン質は高等植物の柔組織に広く分布し、細胞壁中にゲルの状態で存在し細胞どうしを互いに粘着させている。その構造は現在ではD-ガラクトツロン酸の他にL-アラビノース、D-ガラクトース、D-キシロース、L-ラムノースなどを含む複合多糖類であることが認められている<sup>1)</sup>。中性糖類は、特にL-ラムノースは単独でD-ガラクトツロン酸の $\alpha$ -1,4鎖の間に介在し、大部分のL-アラビノース、D-ガラクトースはそれぞれL-アラバン、 $\beta$ -1,4-D-ガラクトンの形で分子の中に含まれていると考えられている<sup>2)</sup>。しかしながらペクチン質の細部の化学構造については未だ明らかにされていない。また天然物中ではD-ガラクトツロン酸の約65%がメチルエステルとしてエステル化されている。ペクチン質が、同じ糖類を構成単位に持つヘミセルロースや植物粘質物と異なる点は $\alpha$ -1,4結合としたD-ガラクトツロン酸の鎖を持つことである。

Pectinase は植物組織崩壊活性を有し、麻の醜醜精鍊、果汁や果実酒の清澄化、植物組織培養等に用いられ、現在工業的に生産され利用されている数多くの加水分解酵素の中でも *amylase* , *protease* と並んで古い歴史を有するものである。しかし、*pectinase* について広汎な研究の結果が集積されているにも拘らず、他の *amylase* などの工業酵素に比べるとその研究はかなり遅れをとっていることは否めな

い。その理由は前述のように基質の複雑さと酵素の種類の多様性にある。

Pectinaseは高等植物や種々の微生物により生産されるが、工業的利用の目的には主にカビ起源の酵素が用いられている。その理由は、カビの生成する酵素はpectinase活性が強力であること、多種類のpectinase群が生産されること、諸性質が使用目的に適していることなどである。

カビの生産するpolygalacturonaseの精製の試みはかなりの数されており、斎藤<sup>3)</sup>は Aspergillus niger, Endo<sup>4~6)</sup>は Coniothyrium diplodiella, Millと Tuttobello<sup>7)</sup>は病害果実より分離した A. niger, 辻坂ら<sup>8)</sup>は A. niger 起源の酵素剤セルロシンACに関して行っている。それらの結果によれば、大部分は単一の酵素ではなく3~4種類の成分酵素より成っている。この点酵母のpolygalacturonase<sup>9)</sup>は1種類、高等植物<sup>10,11)</sup>、細菌<sup>12~14)</sup>のものは大体1~2種類の場合が多いのに比べて、カビのpolygalacturonaseは一層複雑である。Ayresら<sup>15)</sup>は A. foetidus の培養条件、失活、吸着などにより該菌のpectinase複合体を4種に分け、Schubert<sup>16)</sup>も A. niger のpolygalacturonase系が4種類の成分から成ることを報告している。

Polygalacturonaseの作用機構についても最近詳細な解析が行われている。Kimuraら<sup>17)</sup>は Acrocylindrium 属菌の endopolygalacturonaseの作用には基質の非還元末端に少なくとも3個のガラクトロン酸を必要とすることを明らかに

している。Saccharomyces fragilis<sup>18,19)</sup>, Erwinia carotovora<sup>20)</sup> の endopolygalacturonase についても同様の作用機構を持つことを示唆する結果が得られている。一方 exopolygalacturonase には Acrocyllindrium 属菌<sup>21)</sup>, A. niger<sup>22)</sup> の酵素のようにガラクトン酸のモノマー単位で分解するものと, Erwinia aroideae<sup>23)</sup> の酵素のようにダイマー単位で分解するものとが知られている。以上の polygalacturonase はいずれも基質の非還元末端に作用する。また polygalacturonate transeliminase の作用機構も上述の hydrolase と殆んど同様であるが, 作用部位が基質の還元末端であるという違いがある<sup>24~29)</sup>。

以上のような酵素化学的研究とは別に, pectinase の生産を高めるための培地組成, 培養条件の検討が多くの研究者により行われており, 生産の制御を考察した報告<sup>30~32)</sup>もある。しかしながら, 酵素化学的, 生化学的研究に比べて, 生理学的, 動力学的研究は未だ不十分である。

酵素合成の調節機構の研究は 1961 年の Jacob, Monod<sup>33,34)</sup> によるオペロン説発表以来, Escherichia coli の細胞内誘導酵素を中心として目覚ましい発展を遂げ詳細な知見が蓄積されてきた。近年, これらの知見を基礎として工業酵素の醗酵生産を分子レベルで解析し, 応用に結びつけようとする試みがなされている。pectinase 生産についてもこのような試みがなされることが望まれる。

本論文においては, 酵素の給源として利用価値の高い

*A. niger* を用い、そのアデニン要求株による polygalacturonase 生産に顕著な catabolite repression の現象が認められることに着目し、その機構を細菌において得られている詳細な知見と関連させつつ解析すると共に、polygalacturonase 生産型に及ぼす影響を速度論的解析から検討した。さらに catabolite repression の観点から、工業的応用価値の高い天然培地の有用性についても検討を加えた。

第1章では *A. niger* U20-2-5 による polygalacturonase 生産の生理学的、動力学的解析を行うための基礎的知見を得る目的より、生産条件の検討ならびに生成 polygalacturonase の分画を行い、3 の酵素化学的性質を調べた。また種々誘導条件にて生産された polygalacturonase についても分画を行い成分を比較検討した。

第2章では polygalacturonase 生産が低濃度のグルコース添加により著しい catabolite repression を受けることを認めたので、その作用レベルが蛋白合成のどの段階であるかを明らかにすると共に、細菌において得られた知見とも関連させ polygalacturonase の catabolite repression の性質を総合的に把握することを試みた。

第3章では種々培養条件下での polygalacturonase 生産の速度論的解析から、本酵素生産型に対する catabolite repression の重要性について論じ、polygalacturonase 生成系の特性を明らかにしようとした。また酵素生産性が高く工業的応用価値の高い天然培地での polygalacturonase

生産の速度論的解析も試みた。

第4章では速度論的解析より天然培地での *polygalacturonase* 生産はグルコース存在下でも見かけ上 *catabolite repression* を受けないような結果を得たので、この要因の生理学的解析を試みると共に天然培地利用上の問題点を考察した。

# 第 1 章 Polygalacturonase の生産条件の検討 ならびに諸性質

## 第 1 節 緒 言

Pectinase はその基質の構造の複雑さに対応して多種類存在し、分解機構も pectinesterase, poly(methyl)galacturonase の hydrolyase 反応, poly(methyl)galacturonate transeliminase の lyase 反応があり、それぞれペクチン質の分解に関与している。Pectinase は高等植物や種々の微生物によって生産されるが、カビ起源の pectinase が工業的に適した性質を有するので多くの研究がなされている。Deuel ら<sup>35)</sup>, Fogarty ら<sup>36)</sup> の総説によれば、pectinase を生産するカビには Aspergillus 属菌, Penicillium 属菌, Botrytis 属菌, Fusarium 属菌, Rizopus 属菌などがある。

Pectinase の工業的生産の詳細については殆んど知見はないが主に麩を用いる固体培養によっているようである<sup>37)</sup>。Pectinase の生産向上のための培養条件は、Phaff<sup>38)</sup>, 朝井<sup>39)</sup>, Tuttobello ら<sup>40)</sup>, Yamasaki ら<sup>41)</sup>, Mukherjee ら<sup>42)</sup> が主に炭素源、窒素源を中心として検討しており、pectinase 生産にペクチン関連物質の存在が必要であることを指摘している。

本章においては A. niger U20-2-5 による polygalacturonase の生産条件を検討すると共に、種々培養条件下で

生産される polygalacturonase の分画を行い、各成分酵素の 2, 3 の酵素化学的性質を調べ、以降の生理学的、動力学的研究の基礎的知見とすることを目的とした。

## 第2節 実験材料および方法

使用菌株：当教室にて純粋分離した *A. niger* U20-2-5 (Ade<sup>-</sup>)<sup>(43)</sup> を使用した。

培地組成：Polygalacturonase 生産用には第1-1表に示した「ペクチン培地」, 「天然培地」および次の「ペクチン酸培地」, 「カラクトロン酸培地」を使用した。ペクチン

第1-1表 培地組成

Pectin medium		Natural medium	
Pectin	5 %	Soybean meal	5 %
Polypepton	0.7	Corn flour	3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4	Corn-steep liquor	3
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.2
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.05	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.001		
Adenine	750 μM		

Initial pH 5.0

寒天斜面の調製は天然培地に寒天を2%加えて行った。

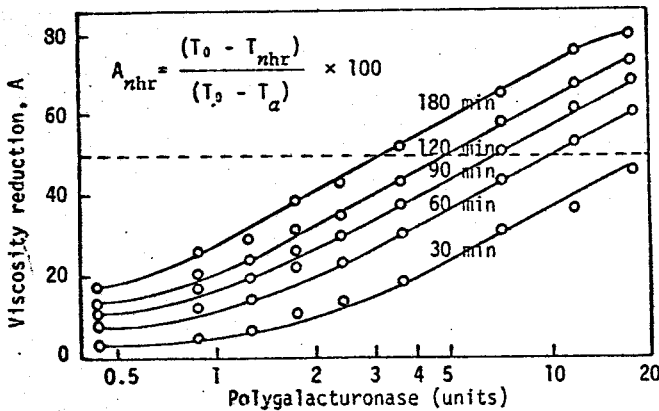
。非誘導菌体の調製には基本培地に DL-リンゴ酸5%を加えた「リンゴ酸培地」を使用した。前培養にはペレット形成防止のため、基本培地に馬鈴薯デンプン15%を加えた「デンプン培地」を使用した。初発pHはいずれも5.0に調

ン酸培地あるいはガラクトロン酸培地とは、上記ペクチン培地よりペクチンを除いたもの(以下この培地を基本培地と称する)にそれぞれペクチン酸5%あるいはガラクトロン酸5%を加えたものと言

整した。

培養方法：前培養はデンプン培地に740~48時間行い、菌体を無菌生理食塩水にて洗浄後元の容量になるように無菌水に懸濁し、inoculation sizeが10%になるように本培養培地に接種した。培養は主に500 ml容あるいは100 ml容(実容それぞれ100 ml, 20 ml)のErlenmeyerフラスコを用い、30°Cでロタリーシェーカー(回転速度180 rpm, 回転半径4 cm)により振盪培養を行った。

Polygalacturonase 活性の測定：ペクチン酸を基質とする粘度低下法によった。0.1 M クエン酸緩衝液にて pH 4.2 に調整した 1% ペクチン酸溶液 5 ml を Ostwald 粘度計 (25 秒計) にとり、30°C にて十分恒温としたのち酵素液 1 ml を添加し速かに混和後、液の落下時間を測定しこれを  $T_0$  (秒) とする。酵素活性の high ときは落下時間の midpoint を以て作用経過時間とし



用経過時間とし外挿法により  $T_0$  を求めた。30°C にて 1 時間反応後の液の落下時間を  $T_{1hr}$  (秒) とし、粘度低下率 (A) を次式より求めた。

第1-1図. 種々反応時間における A 値と polygalacturonase 活性との関係。



$$A_{1kr} = 100 (T_0 - T_{1kr}) / (T_0 - T_a)$$

上式で  $T_a$  は同一粘度計における緩衝液 6 ml の 30°C での落下時間を示す。A 値と酵素量の対数値とは第 1-1 図のように  $20 < A < 80$  の範囲で直線関係にあった。Polygalacturonase 活性の表示は斎藤<sup>3)</sup>の方法に従い、1 時間に粘度を 50% 低下せしめる酵素量を 10 単位とした。

Polygalacturonase の分画：粗酵素液は、培養液の 70% 冷エタノール沈殿区分を 0.02 M クエン酸緩衝液 (pH 4.2) に溶解後、約 50 倍量の 0.01 M 同緩衝液に対して一夜透析して調製した。粗酵素液の分画は DEAE-セファデックス A-50 にて行った。0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 4.2) にて平衡化した DEAE-セファデックス A-50 カラム (19 × 200 mm) に粗酵素液 10 ml を charge し、種々濃度の食塩を含む同緩衝液にて段階的に溶出させた。溶出液はフラクションコレクターにて 5 ml ずつ分取した。溶出操作はすべて 4 ± 2°C にて行った。

蛋白質量の測定：蛋白質量は Beckman DB spectrophotometer により 280 m $\mu$  の吸光度を測定した。

還元糖、ウロン酸の定量：還元糖の定量は次のように行った。試料 5 ml に 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 ml を加え、次に 0.1 N I<sub>2</sub>-IK 5 ml を加え混和後密栓して 20 分間室温に放置した。20 分経過後 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 ml を加え酸性とし、残存 I<sub>2</sub> を 0.04 N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> にて滴定した。還元糖量はガラクトン酸相当量で表示した。ペクチンおよびペクチン酸中のガラクトン酸含量はカルバゾール法<sup>44)</sup>により測定した。

試薬：ペクチン酸はいずれも和光純薬 K.K. 製のものを  
 用いた。培養の目的のためのペクチンは和光純薬 K.K. 製の  
 レモン製のものを用了。酵素の加水分解作用の基質とし  
 てのペクチンは、上記ペクチンを 70% エタノールにて数回  
 洗淨し、99% エタノールおよびエチルエーテルにて脱水後  
 真空乾燥したものを使用した。

### 第3節 実験結果

#### 1. 合成培地組成の検討

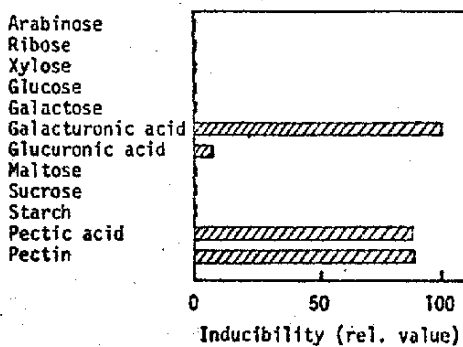
第1-2表. *Polygalacturonase* 生産に対する種々窒素源、ビ  
 タミン混液の効果およびアデニンに対する酵母エキスの代替効果。

Nitrogen sources	Adenine (750 μg)	Yeast ex. (0.5%)	Vitamin mix.	Polygalacturonase (units/ml)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	+	-	-	63
0.5%	+	-	+	84
	-	+	-	116
Casamino acid	+	-	-	186
0.7%	+	-	+	176
	-	+	-	177
Polypepton	+	-	-	296
0.7%	-	+	-	224

ペクチン培地を基準とし、トリペプトンおよびアデニンをそれぞれ他の窒素源  
 および酵母エキスに置き替えた。ビタミン混液は培地 1 l 当りの各ビタミン  
 量が次のようになるように添加した：チアミン (B<sub>1</sub>) 400 μg；リボフラビン  
 (B<sub>2</sub>) 400 μg；ニコチン酸 400 μg；パントテン酸カルシウム 400 μg；ピリドキ  
 シン (B<sub>6</sub>) 800 μg；p-アミノ安息香酸 100 μg；葉酸 10 μg；ビタミン B<sub>12</sub>  
 1 μg；ビオチン 0.4 μg；イノシトール 5 mg。

テンアン培地生育菌体を上記培地に接種し、72時間培養後培養液  
 中の酵素活性を測定した。

Polygalacturonase 生産に適した単純合成培地組成の検討のため前記ペクチン培地を基準にし、種々の窒素源、増殖制限因子であるアデニンに対する酵母エキスへの代替、およびビタミン混液添加時の polygalacturonase 生産を比較した結果を第 1-2 表に示した。窒素源として  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  を用いると生産性は低く、試験した窒素源中ではポリペプトンが最も有効であった。アデニンと酵母エキスでは効果に大差は認められず、ビタミン群の添加効果もなかった。第 1-2 図にはアデニン欠落培地での種々炭素源の polygalacturonase 誘導効果を示した。Polygalacturonase 生産にはガラクトン酸、ペクチン酸、ペクチンのペクチン関連物質が必須であり、他の炭素源は全く無効であった。

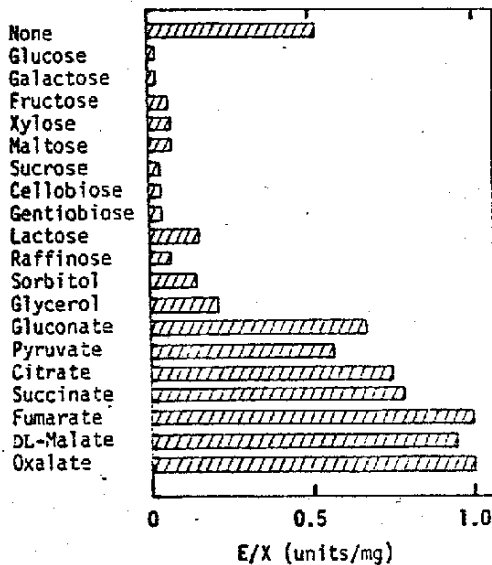


第 1-2 図. 種々炭素源の polygalacturonase 誘導効果。

リンゴ酸培地にて 40 時間培養した菌体を、アデニンを除いた基本培地に 1% の炭素源を添加した培地に置換し、 $30^\circ\text{C}$  に 24 時間振盪培養した。Inducibility の 100 は 49.5 units/ml に相当する。

以上の結果より、以下の実験での polygalacturonase 生産用培地としては主に、培養管理の容易な前記ペクチン培地を使用した。

第 1-3 図はペクチン培地での polygalacturonase 生産に対する他の炭素源の影響を示す。Polygalacturonase 生産期にグルコースをはじめとする一般の糖質炭素源を添加すると、程度の差はあるが



第1-3図. ペクチン培地での *polygalacturonase* 生産に対する種々炭素源の影響。  
 ペクチン培地で42時間培養後還元置換し、炭素源(0.5%)を添加した。8時間振盪培養後、培養液中の酵素活性を測定した。

お、ペクチン培地での *polygalacturonase* 生産は pH 3~5.5 では変化がなかったため、有機酸の添加実験および *polygalacturonase* 誘導実験では pH がこの範囲になるように調整した。

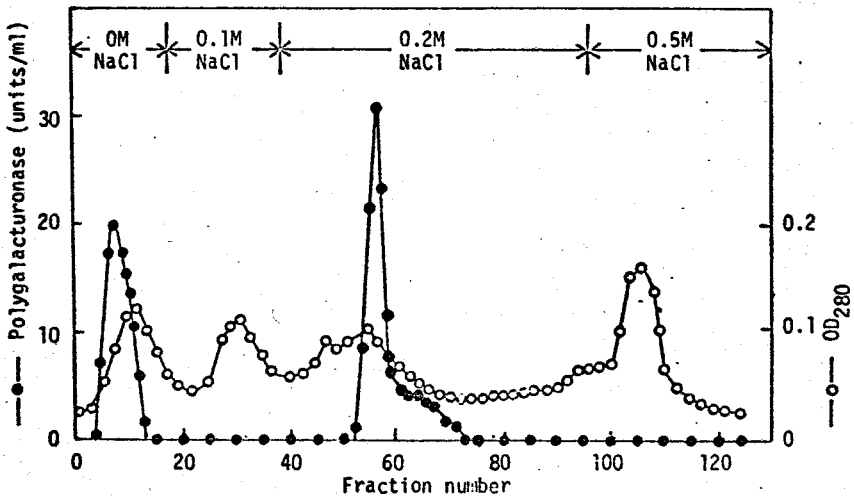
*polygalacturonase* 生産は阻害された。一方、リンゴ酸等の TCA サイクル中間体あるいはグルコン酸、ピルビン酸等は添加しても阻害は認められず、むしろ促進作用を示した。また、これらの有機酸類は適当な inducer なしでは *polygalacturonase* を誘導しなかったため、基本培地に DL-リンゴ酸 5% を添加したリンゴ酸培地を非誘導培地として以下の実験に使用した。な

## 2. *Polygalacturonase* の分画と諸性質

一般にカビの生産する *pectinase* は数種の成分酵素より成ることが知られている。*A. niger* U20-2-5 はペクチン、ペクチン酸あるいはガラクトン酸を炭素源とする半合成培地および *soybean meal* 等を主体とする天然培地において

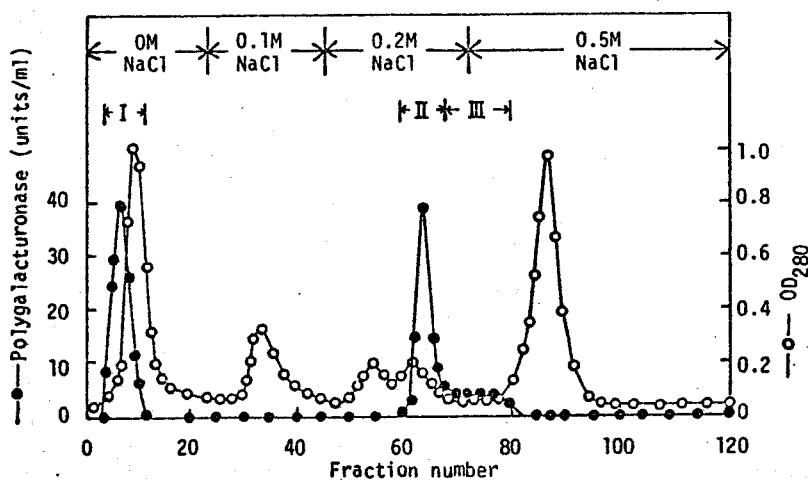
polygalacturonase を生産する。そこで種々培養条件において生産される polygalacturonase の成分酵素を比較検討するために酵素の分画を行った。

ペクチン培地における polygalacturonase 生産培養の前期 (40時間) および後期 (70時間) の培養液中の polygalacturonase を冷エタノールにて沈殿後, 溶解透析処理した粗酵素液を DEAE-セファデックス A-50 にて分画した結果を第 1-4, 1-5 図に示した。Polygalacturonase 活性はい



第1-4図. ペクチン培地にて生産された polygalacturonase の DEAE-セファデックス A-50 による分画 (40時間培養液)。

ペクチン培地にて40時間培養した培養液の70%冷エタノール沈殿成分を溶解後, 0.01Mクエン酸緩衝液 (pH 4.2) に対して一夜透析した粗酵素液を用いた。詳細は実験方法の項参照。粗酵素液中の全蛋白質量, 全 polygalacturonase 活性はそれぞれ 31.6 mg, 1690 単位であり, 958 単位の活性が回収された。

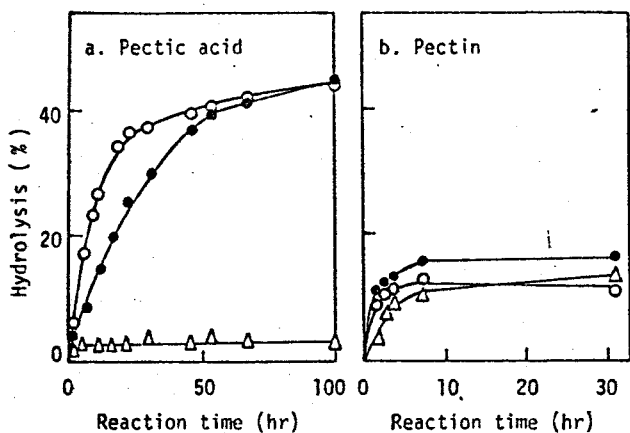


第1-5図. ペクチン培地にて生産された polygalacturonase の DEAE-セファデックス A-50 による分画 (70 時間培養液)。

ペクチン培地にて70時間培養した培養液を第1-4図と同様の方法で処理した粗酵素液を用いた。詳細は実験方法の項参照。粗酵素液中の全蛋白質量, 全 polygalacturonase 活性はそれぞれ 97.5 mg, 2870 単位であり, 分画後 1620 単位の活性が回収された。

どれも3つの区分に現れた。第1-5図の分画で得られた各区分を便宜的に溶出順に PG-I, PG-II, PG-III と名付けた。なお, 結果には示していないが, 以上3成分はセファデックス G-100 による再分画によりいずれも単一ピークを示した。また, PG-I は pH 7.0 では DEAE-セルロースに吸着され, 0.1 M NaCl にて溶出し単一ピークを示した。

第1-6図は, 第1-5図で得られた各成分の還元基増加で見たペクチン酸, ペクチンに対する加水分解作用を比較した結果を示す。酵素の添加量はいずれもペクチン酸に対



第1-6図. *Polygalacturonase* 各成分による  
ペクチン酸, ペクチンの加水分解。

—○— PG-I, —●— PG-II, —△— PG-III

PG-I, PG-II, PG-III はそれぞれ第1-5図の6~9区分,  
63~65区分, 73~75区分を用いた。基質濃度は  
いずれも1%で, 反応系は *polygalacturonase* 反  
応系に準じた。

する粘度低下活  
性を10単位に統  
一したので, こ  
の結果はそのま  
ま加水分解作用  
の差を示す。な  
お, 加水分解率  
はペクチン酸,  
ペクチン中の全  
ガラクトロン酸  
に対する, 生成  
した還元基のガ  
ラクトロン酸相  
当量の割合で表

した。ペクチン酸に対して PG-I, PG-II はほぼ同じ傾向を示し分解限度は約45%であったが, PG-III は著しく分解限度が低く約3%であった。また, 粘度が50%低下した時点(1時間目)での加水分解率はそれぞれ3.5%(PG-I), 2.0%(PG-II), 1.4%(PG-III)であった。一方, ペクチンに対しては3成分とも大差はなく分解限度は12~17%であった。なお, ペクチン酸に対する粘度低下作用には3成分とも大差は認められず殆んど100%粘度を低下せしめた。また, ペクチン培地に70時間培養した培養液について *polygalacturonate transeliminase* 活性を測定した結果, 30℃にて24

瞬間反応後も 235  $\mu$  の吸収増加は認められなかった。以上の結果より、ペクチン培地にて生産された polygalacturonase はいずれもエンド型の加水分解酵素であると考えられた。

第1-3表. ペクチン培地にて生産された polygalacturonase の分画の要約 (70 時間培養液)。

Operation	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Yield (%)
Culture filtrate	16400	88300	5.4	100
70% Ethanol ppt.	3410	88000	25.8	99.6
Dialysate	2560	79100	31.0	89.6
DEAE-PG-I	460	21500	248 *	24.4
Sephadex PG-II	156	17600	391 *	20.0
A-50 PG-III	104	5660	6.9*	6.4

\*: maximum value

第1-3表には第1-5図の分画の要約を示した。DEAE-セファデックス A-50 による分画では約 51% の polygalacturonase 活性が回収されたにすぎなかった。ここで得られた 3 成分の作用様式に相違があったことから、各成分間のペクチン酸の粘度低下に対する相乗作用の有無を検討した。

第1-4表. Polygalacturonase 成分間の相乗作用。

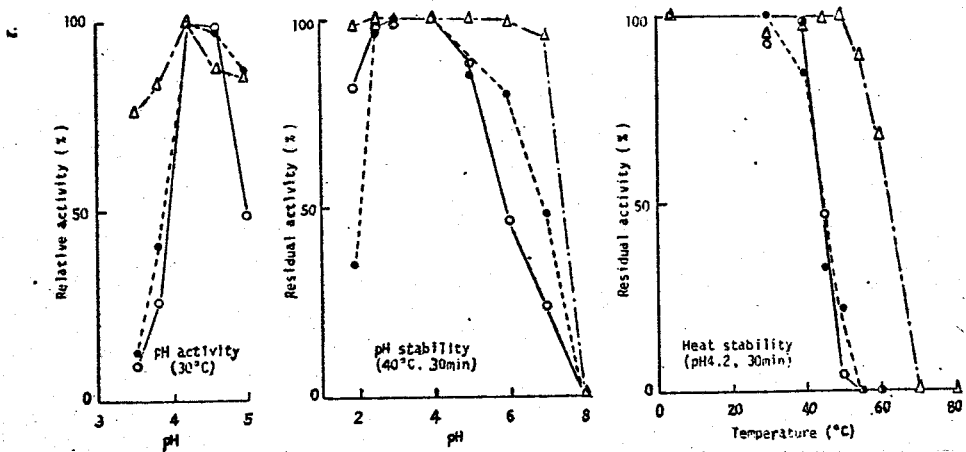
	Calculated value(units)	Measured value(units)
PG-I + PG-II	39100	34200
PG-I + PG-III	27160	54900
PG-II + PG-III	23260	38400
PG-I + PG-II + PG-III	44760	94000

PG-I, PG-II, PG-III はそれぞれ 第1-5図の 6~9 区画, 63~65 区画, 73~75 区画を用い、各成分を 第1-3表で得られた活性比で混合し、その計算値と実測値とを比較した。

第1-4表はその結果を示す。PG-I と PG-II の間には相乗作用は認められなかったが、PG-I と PG-III, PG-II と PG-III の間には



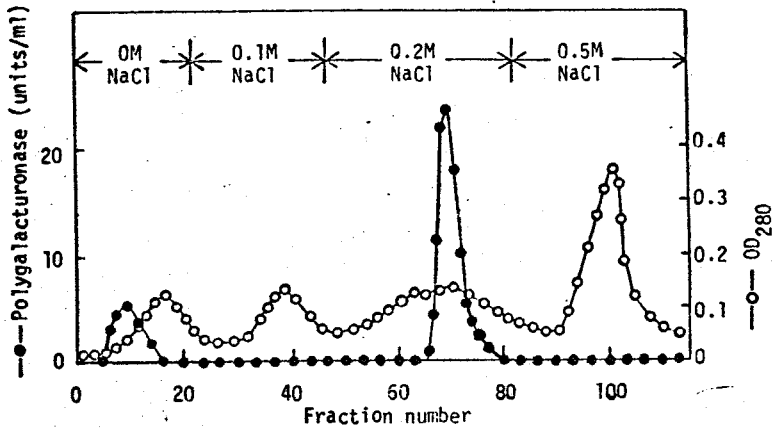
それぞれ明らかな相乗作用が認められた。3成分を混合すると回収率は106%と計算され、ペクチン培地で生産された polygalacturonase はこの3成分から成ると考えられる。第1-7図には3成分の最適pH, pH安定性および熱安定性について示した。最適pHはいずれも4.2付近にあったが, pHおよび熱に対する安定性はPG-IIIが著しく安定であった。



### 第1-7図. Polygalacturonase 各成分の2,3の酵素化学的性質

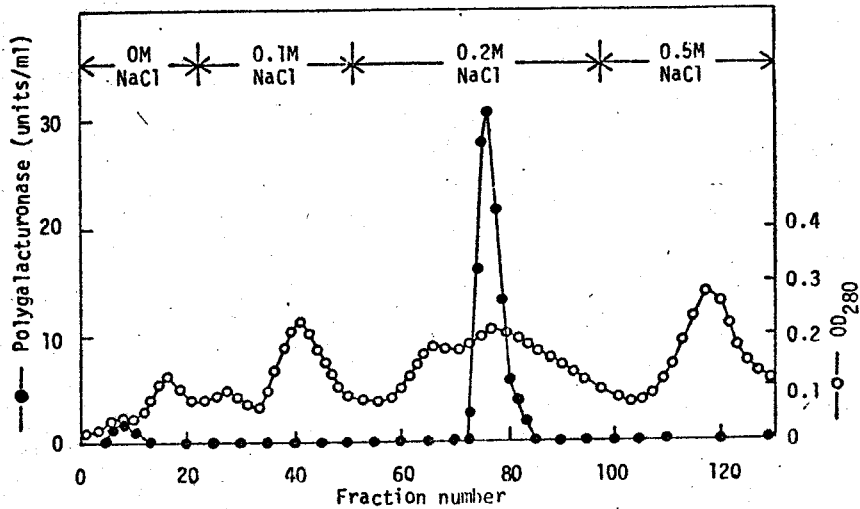
—○— PG-I, ---●--- PG-II, ---△--- PG-III

最適pH検討のための基質の調製, 熱安定性の検討には所定のpHの0.1Mクエン酸緩衝液を用いた。pH安定性の検討にはHCl-KCl緩衝液(pH 2, 2.5), クエン酸緩衝液(pH 3~6), リン酸緩衝液(pH 7, 8)を用い, 次の手順で行った。9mlの0.1M緩衝液に1mlの酵素液を加え, 40°Cにて30分間保持したのち冷却し, 1N HClあるいは1N NaOHにてpHを約4.2に調整後, 0.1Mクエン酸緩衝液(pH 4.2)にて全量を15mlとし残存酵素活性を測定した。PG-I, PG-II, PG-IIIはそれぞれ第1-5図の6~9区分, 63~65区分, 73~75区分を用いた。



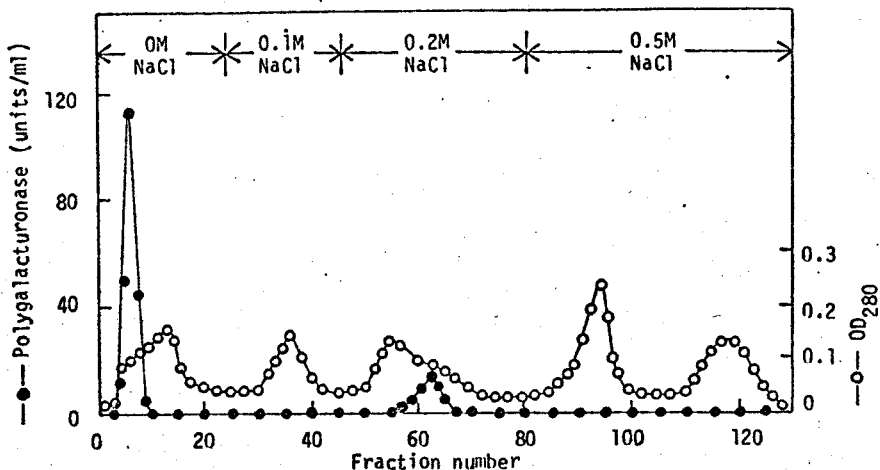
第1-8図. ペクチン酸培地にて生産された polygalacturonase の DEAE-セファデックス A-50 による分画。

ペクチン酸培地で70時間培養した培養液を第1-4図と同様の方法で処理した酵素液を用いた。粗酵素液中の全蛋白質量, 全 polygalacturonase 活性はそれぞれ 83.6 mg, 952 単位であり, 分画後 795 単位の活性が回収された。



第1-9図. ガラクツロン酸培地にて生産された polygalacturonase の DEAE-セファデックス A-50 による分画。

ガラクトン酸培地で70時間培養した培養液を第1-4図と同様の方法で処理した粗酵素液を用いた。粗酵素液中の全蛋白質量, 全 polygalacturonase 活性はそれぞれ 89.2 mg, 975 単位であり, 分画後 803 単位の活性が回収された。



第1-10図. 天然培地にて生産された polygalacturonase の DEAE-セファデックス A-50 による分画。

天然培地で 70 時間培養した培養液を第 1-4 図と同様の方法で処理した粗酵素液を用いた。粗酵素液中の全蛋白質量、全 polygalacturonase 活性はそれぞれ 27.6 mg, 1760 単位であり、分画後 1550 単位の活性が回収された。

ペクチン同様 polygalacturonase 誘導能を持つペクチン酸、ガラクトン酸を誘導基質とする半合成培地および天然培地にて生産された polygalacturonase を同様の方法で分画した結果が第 1-8, 1-9, 1-10 図である。ペクチン培地で生産された polygalacturonase の分画と異なり、活性ピークは 2 つしか現れなかった。第 1-8, 1-9, 1-10 図の分画での polygalacturonase 活性の回収率はそれぞれ 84%, 82%, 88% と高く、また、各活性区分間の相乗作用が認められなかったことから、これらの polygalacturonase には PG-III が含まれていないものと思われた。

以上の分画の結果より、種々誘導条件で生産された

polygalacturonase の成分比をまとめた結果を第1-5表に示す。誘導条件の違いによって polygalacturonase 成分にか

第1-5表. 種々誘導物質により生産された polygalacturonase の成分比。

Inducing substrate	PG-I	PG-II	PG-III	Total activity (units/ml culture)
Pectin (40hr)	26 %	23 %	7 %	59
Pectin (70hr)	27	22	7	233
Pectic acid	28	72	0	147
Galacturonic acid	5	95	0	164
Natural medium	81	19	0	405

Total activity は分画に用いた培養液中の polygalacturonase 活性を示す。

なりの量的変動が認められた。しかしながら、誘導物質をペクチンに限ると polygalacturonase 生産培養の前期と後期とでの各成分比はほぼ一定であった。

## 第4節 考 察

*A. niger* U20-2-5 による polygalacturonase 生産に誘導物質としてガラクトン酸, ペクチン酸あるいはペクチンを必要とすることは従来の報告と一致する。しかしながら Tuttobello ら<sup>40)</sup>, Mukherjee ら<sup>42)</sup> は *A. niger* による polygalacturonase 生産は蔗糖, マルトース等を炭素源とした場合にも, ペクチンを炭素源とした場合に匹敵する生産を示すこと, ペクチン存在下に他の種々糖類を添加しても顕著な生

産の変化がないのみならず、生産を増大させるものもあることを報告している。これに対して、本菌ではグルコースをはじめとする種々の糖類は inducer として無効であるばかりでなく、ペクチン存在下での polygalacturonase 生産を著しく阻害した。この点本菌の polygalacturonase 生産は他と著しく異なる。

ペクチンを誘導物質として生産された polygalacturonase は DEAE-セファデックス A-50 によって 3 成分に分画された。結果には示していないが、3 成分をさらにセファデックス G-100, DEAE-セルロース (pH 7.0) により再分画した限りではいずれも単一ピークを示した。従って、本菌の生産する polygalacturonase は 3 成分から成るものと思われた。

3 成分中 PG-Ⅲ の作用様式は他の 2 成分と著しく異なっていた。PG-Ⅲ のペクチン酸分解限度が約 3% であつたのに対しペクチン分解限度が約 13% であつたことは、むしろメチルエステル化されたガラクトuron酸残基により親和性の高い polymethylgalacturonase に属するものかも知れない。ペクチンを誘導物質としたときのみ PG-Ⅲ が生産されたことも以上のことを示唆する。しかし詳細な作用機作を論ずるには構造の明らかな合成基質標品を用いる必要がある。

誘導条件の違いにより polygalacturonase 成分の量的変動のあることはそれぞれに独自の制御が行われていることを示唆し、生産機構の解析を困難にするものである。しかしながら、誘導物質をペクチンに限定すると polygalacturo-

nase 生産培養の前期 (40 時間) と後期 (70 時間) での成分比はほぼ一定であり, 各成分がほぼ平行して生産されるものと考えられることは好都合な事実である。

## 第5節 要 約

1. *Aspergillus niger* U 20-2-5 による polygalacturonase 生産には炭素源としてペクチン, ペクチン酸あるいはガラクトuron酸が必須であり, グルコースをはじめとする他の供試糖質炭素源は無効であるばかりでなく, ペクチン存在下での polygalacturonase 生産を著しく阻害した。窒素源としてはポリペプトンが有効で,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  では生産量は低かった。
2. ペクチンを誘導物質として生産された polygalacturonase は DEAE-セファデックス A-50 カラムにより 3 成分 (溶出順に PG-I, PG-II, PG-III) に分離され, いずれもエンド型の加水分解酵素であった。3 成分の比率は培養前期 (40 時間培養) と後期 (70 時間培養) とでほぼ一定であった。PG-III の酵素化学的性質, 作用様式は PG-I, PG-II と著しく異なり, ペクチン酸の粘度低下作用において PG-I あるいは PG-II との相乗作用が認められた。
3. ペクチン, ペクチン酸, ガラクトuron酸を誘導基質とする半合成培地あるいは天然培地で生産された polygalacturonase の成分比はそれぞれ異なっていた。また PG-III はペクチンによるのみ誘導された。

## 第 2 章 Polygalacturonase の catabolite repression の機構

### 第 1 節 緒 言

微生物による種々の catabolic enzyme の合成は、グルコースや他の容易に代謝される化合物が培地中に加えられると抑制を受ける。この現象は生合成に必要な量以上の catabolism が起こるときに生ずる<sup>45, 46)</sup>と考えられ、グルコース効果<sup>47)</sup>あるいは catabolite repression<sup>45, 48)</sup>と呼ばれている。

Epps ら<sup>47)</sup>が amino acid deaminase 合成がグルコースの添加により阻害されることを明らかにして以来 catabolite repression の観察例は歴大な量に達し、多くの詳細な知見が得られてきた。特に Escherichia coli のラクトースオペロンの catabolite repression について詳細な研究がなされた。Magasanik ら<sup>49, 50)</sup>の一連の研究により、抑制は  $\beta$ -galactosidase の mRNA の合成速度を低下させることにより生ずることが明らかにされた。さらに、Perlman と Pastan<sup>51, 52)</sup>は  $\beta$ -galactosidase の抑制が cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (以下 cAMP と略す) により解除されることを明らかにし、tryptophanase<sup>51)</sup> についても同様の効果を確認した。同様の結果は Ullman と Monod<sup>53)</sup>も報告している。一方、グルコースの存在下では E. coli の細胞内 cAMP 濃度が急速に低下

するとの Makman と Sutherland<sup>54)</sup> の報告より, *catabolite repression* は cAMP 濃度を低下させることを介して発揮されると推定された<sup>55)</sup>。また, cAMP の作用点がオペロンのプロモーター部位であること<sup>56)</sup>, cAMP の効果の発揮には cAMP 受容蛋白 (以下 CRP と略す) の関与が必要であること<sup>57,58)</sup> も明らかにされ, *in vitro* の実験より cAMP と CRP との複合体の関与により RNA polymerase のプロモーターへの親和性を高めることにより  $\beta$ -galactosidase の合成を円滑に行わしめるとの推定もなされた<sup>59)</sup>。

しかしながら, *E. coli* の *tryptophanase* 合成の cAMP による促進は translation レベルで起こる<sup>60)</sup> ことが明らかにされているし,  $\beta$ -galactosidase の抑制が translation レベルでも起こるとの報告<sup>61~63)</sup> や cAMP が既存の mRNA からの  $\beta$ -galactosidase 合成を促進すると報告<sup>63,64)</sup> もあり, translation の抑制の機構や cAMP の作用機構については明らかにされていない。また, corepressor の実体などについても諸説があり統一の見解はない。

一方, 真核微生物における *catabolite repression* に関する知見は極めて少なく, *Saccharomyces carlsbergensis* の  $\alpha$ -glucosidase<sup>65)</sup>, *Trichoderma viride* の cellulase<sup>66)</sup> など、3 の報告があるにすぎない。

本章では *A. niger* U20-2-5 による polygalacturonase 生産がグルコースその他の種々の糖類の添加により著しく阻害され, この阻害が *catabolite repression* によることを認め



たので、その作用レベルが蛋白合成のどの段階であるかを検討した。また、グルコースによる抑制中の *polygalacturonase* 生成系の挙動についても検討を加えた。

## 第2節 実験材料および方法

培養方法： *Polygalacturonase* 誘導培地としてはペクチンを誘導基質とするペクチン培地を使用した（第1章参照）。非誘導菌体の調製にはペクチン培地のペクチンをルリノゴ酸5%に置き替えたリンゴ酸培地を用い、脱誘導培地としてはリンゴ酸培地よりアデニンを除去し、ポリペプトンを  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.5%に置き替えたものを使用した。グルコースや各種阻害剤の添加実験等の還元置換培養は次のようにして行った。ペクチン培地にて40~48時間培養した菌体を無菌的に浚別し約3倍量の無菌生理食塩水にて洗浄した（以下この菌体を誘導菌体と呼ぶ）。菌体を分離した培養液を熱処理により既存の *polygalacturonase* を失活させ、前記誘導菌体を再懸濁し実験を開始した。置換培養はすべてアデニン欠除による増殖停止下にて行った。mRNA蓄積実験は次のように行った。42時間誘導菌体を元の培養浚液あるいは脱誘導培地に懸濁し、同時にシクロヘキシミド（ $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）またはグルコース（2%）を添加した。0, 2, 4, 6時間振盪培養後菌体を集め約3倍量の無菌生理食塩水にて洗浄した。洗浄菌体をペクチン培地の42時間培養浚

液あるいは脱誘導培地に再懸濁後アクチノマイシン  $S_3$  (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を添加し、既存の mRNA を発現させ生成した polygalacturonase 量を比較した。特記しない限り培養は  $30^\circ\text{C}$  にて行った。

細胞内 polygalacturonase の抽出法： 洗浄菌体を石英砂と共に 20 分間磨碎し、tween 80 (100 ppm) を含む  $0.02\text{M}$  クエン酸緩衝液 (pH 4.2) にて 3 回抽出した。

測定法： 菌体量の測定は充填容法によった。目盛付遠沈管 (10 ml 容) を用い、 $1000\times$  子、1 分間で沈降した培養液 10 ml 当りの菌体充填容で求め、 $1\text{ml}$  菌体充填容 / 10 ml = 10 mg 乾燥菌体量 / ml とし乾燥重量に換算した。グルコース量の測定は glucose oxidase を用いるグルコスタット法によった。核酸の分画は Schmidt-Thannhauser-Schneider 法 (67,68) によった。放射能活性は液体シンチレーションカウンター (Nuclear-Chicago Co., Type 6801) により測定した。

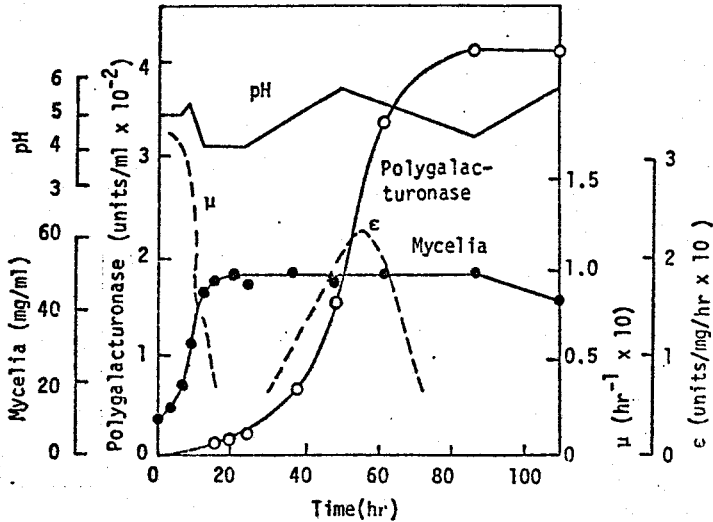
試薬： RNA 合成の阻害には、その作用機作がアクチノマイシン D と殆んど同じであるアクチノマイシン  $S_3$  (69) (第一化学薬品 K.K. 製) を使用した。シクロヘキシイミドは半井化学 K.K. のものを使用した。

### 第3節 実験結果

#### 1. グルコースによる polygalacturonase 生産の阻害

A. niger U20-2-5 はペクチン、ペクチン酸、ガラクト

ロン酸を誘導物質として polygalacturonase を生産する。第2-1 図はペクチン培地における典型的な polygalacturonase 生産の経時変化を示す。増殖は約20時間後に停止し以後一

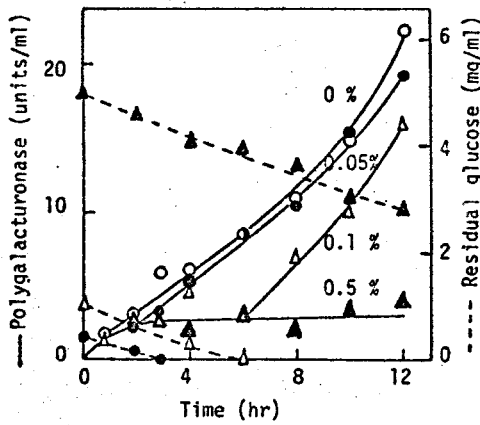


第2-1 図、ペクチン培地における polygalacturonase 生産の経時変化。

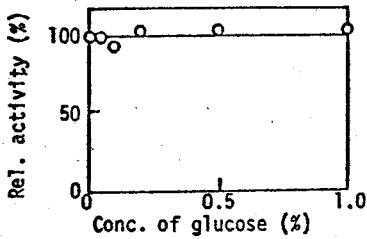
テンパン培地生育菌体を洗浄後、ペクチン培地に接種した (Inoculation size : 10%)。

定値を保った。増殖停止期にアデニン再添加を行うと増殖が再開したことより、増殖の停止はアデニン欠乏によるものと考えられた。Polygalacturonase 生産は増殖停止後急速に起り、比酵素生産速度  $\epsilon$  は約55時間に最大値を示した。

第2-2 図はペクチン培地に748時間培養した酵素生産期の菌体の置換培養での polygalacturonase 生産に対する、種々濃度のグルコースの阻害効果を示す。グルコース濃度



第2-2図. グルコースによる非増殖相における polygalacturonase 生産の阻害。  
 ペクチン培地の48時間培養を用い、還元置換培養を行った。図中の数字は添加グルコースの濃度を示し、実線は polygalacturonase 活性を、破線は残存グルコース濃度を示す。



第2-3図. Polygalacturonase 活性に対するグルコースの影響。  
 酵素反応混液中の最終濃度が上記の濃度になるようにグルコースを添加した。

0.05% では殆んど阻害は認められなかったが、0.5% では12時間の間 polygalacturonase 生産は完全に阻害された。また、グルコースの消費と共に生産は再開したが、0.1% でも数時間は完全に阻害された。上述のグルコースの阻害効果が酵素反応の阻害あるいは菌体外への酵素の分泌の阻害によるものでないことを示したのが第2-3図と第2-1表である。第2-3図よりグルコースは1%でも polygalacturonase 活性に何ら影響を及ぼさないことが明らかである。第2-1表はペクチン培地にて42時間培養後にグルコース0.5%を添加したときの菌体内 polygalacturonase 活性を測定した結果を示す。グルコース添加により培養液中の polygalacturonase の蓄積が停止しても、

菌体内への polygalacturonase の蓄積は認められず培養液中の活性の 8% 程度であった。この結果は、グルコースは polygalacturonase の分泌を阻害するのではなく、合成を阻害することを示している。

第2-1表。誘導菌体による polygalacturonase 生産に対するグルコースの影響。

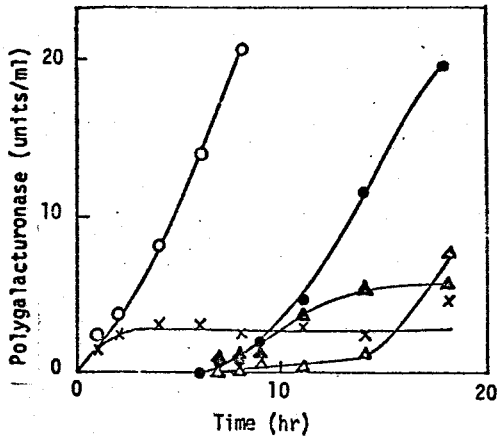
Time (hr)	Polygalacturonase (units/ml)		
	Without glucose added	With 0.5% glucose added at 0 time	
	Culture filtrate	Culture filtrate	Intracellular*
0	42.5	48.9	4.4
4	45.6	50.2	3.5
8	54.5	47.8	3.9
12	69.2	45.2	3.7

ペクチン培地にて 42 時間培養後にグルコースを添加し実験を開始した。菌体内 polygalacturonase の抽出法は実験方法の項参照。  
\* 培養液 1ml 当りの活性に換算した。

前述のように、この種の阻害現象はグルコース以外の種々の糖類によってももたらされる（第 1-3 図）ことから所謂 catabolite repression の範疇に入るものである。次項では catabolite repression の機構を明確にするために、グルコースを代表にとり詳細な解析を行った。

## 2. Translation レベルでの抑制

第 2-4 図はグルコースによる polygalacturonase 生産の抑制が可逆的であることを示す結果である。グルコース除去と共に、抑制されていた polygalacturonase 生産が速かに再開された。グルコース除去と同時に蛋白合成阻害剤シク



実験条件は次の通りである。

Time (hr)	0 ← 6	←
—○—	—	—
—x—	+	+
—●—	+	(-)
—△—	+	(-) (Cycloheximide)
—▲—	+	(-) (Actinomycin S <sub>3</sub> )

—: グルコース無添加。

(-): 菌体を洗浄してグルコースを除去し、ペクチン培地の42時間培養液に再懸濁後、グルコース無添加。

+: 0時間にグルコース(0.5%)添加。

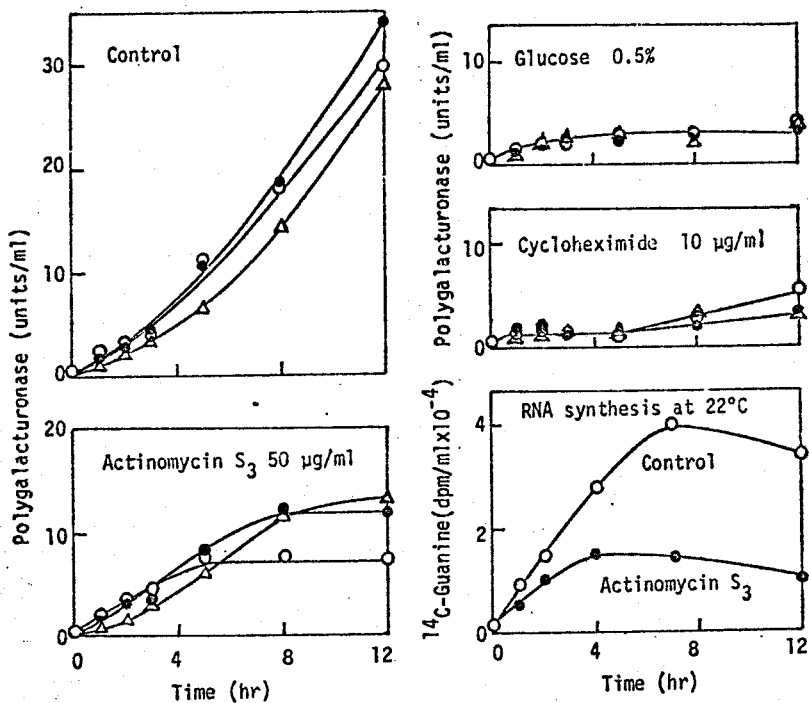
シクロヘキシミド、アクチノマイシンS<sub>3</sub>はそれぞれ10 μg/ml, 50 μg/mlの濃度で用いた。

第2-4図. *Catabolite repression*の可逆性と *polygalacturonase* 生産活性の回復に対する種々抗生物質の影響。ペクチン培地に72時間培養した誘導菌体を用いて置換培養を開始した。

ロヘキシミドを添加すると生産の再開は阻害された。この結果は、グルコース除去による *polygalacturonase* 合成再開が *de novo* 合成によるものであり、*proenzyme* の活性化や菌体内に蓄積された酵素の分泌によるものではないことを示す。換言すれば、*catabolite repression* は *proenzyme* の活性化阻害あるいは酵素の分泌阻害の結果ではないと言える。一方、グルコース除去と同時にRNA合成阻害剤アクチノマイシンS<sub>3</sub>を添加すると *polygalacturonase* 生産は約8時間継続した。上の結果はグルコース除去時には *polygalacturonase* 生成系(mRNA)が存在することを示す。後述のように *polygalacturonase* 生成系の寿命が30℃で約5時間であることを考えると抑制中にmRNAの合成が起こっていたか、または

グルコース添加時以前に存在した mRNA が保存されていたことになる。このことはグルコース存在下では *polygalacturonase* の translation が阻害されていたことを示唆する。

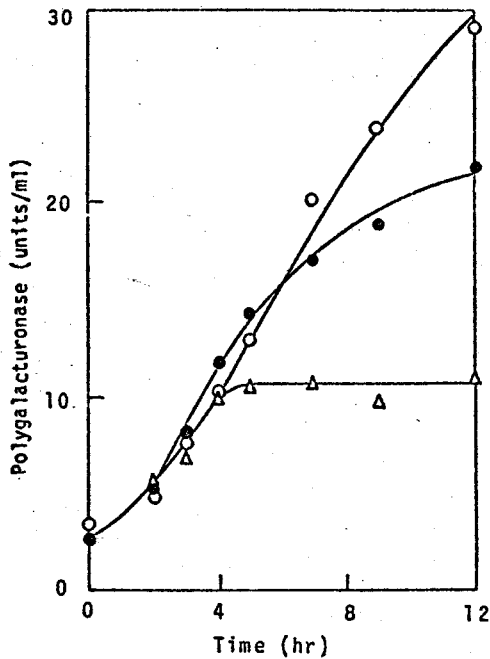
以上の結果をさらに確認するために種々培養温度におけるグルコース, シクロヘキシミドおよびアクチノマイシン S<sub>3</sub> の *polygalacturonase* 生産の阻害様式を比較した。



第2-5図. 非増殖相における種々培養温度での *polygalacturonase* 生産に対するグルコース, シクロヘキシミドおよびアクチノマイシン S<sub>3</sub> の阻害作用。ペクチン培地に 7 30°C で 42 時間培養した誘導菌体の還元置換培養に種々阻害剤を添加し, 同時に各温度に移した。還元置換培養の培養温度: -○- 30°C, -●- 26°C, -△- 22°C.

ペクチン培地に73°Cで42時間培養した誘導菌体の置き換え培養に種々阻害剤を添加し、同時に各温度に移した。第2-5図に示すように、アクチノマイシンS<sub>3</sub>を添加すると30°Cでは約5時間で *polygalacturonase* 生産は停止したが、26°C、22°Cと低温ほど生産は長時間継続した。これは低温ほどRNA分解活性低下に伴うmRNAの寿命伸長の結果と思われた。第2-5右下図に22°CにおけるRNA合成に対するアクチノマイシンS<sub>3</sub>の影響を示したが、この結果は30°Cでの結果と大差がなかった。これに対して、シクロヘキシイミドおよびグルコースはいずれの培養温度でも速かに酵素生産を抑制した。グルコースによる抑制がアクチノマイシンS<sub>3</sub>よりもむしろシクロヘキシイミドの抑制様式に類似しているという結果は、*polygalacturonase* の *catabolite repression* が蛋白合成の *translation* レベルで起こることを示唆する。このことはRNA合成のない条件下での *polygalacturonase* 生成系に対するグルコースの作用を測定して直接証明できる。第2-6図はペクチン培地で42時間培養した誘導菌体を置き換えたあと22°Cに移し4時間培養後、アクチノマイシンS<sub>3</sub>を添加し、さらに2時間後にグルコースを添加したときの *polygalacturonase* 生産の経時変化を示している。アクチノマイシンS<sub>3</sub>を添加した培養では、無添加対照に比べて若干の生産阻害が見られるが測定時間内では酵素生産は継続した。さらにアクチノマイシンを含む培地に、アクチノマイシン添加後2時間にグルコースを添加すると約2時間の





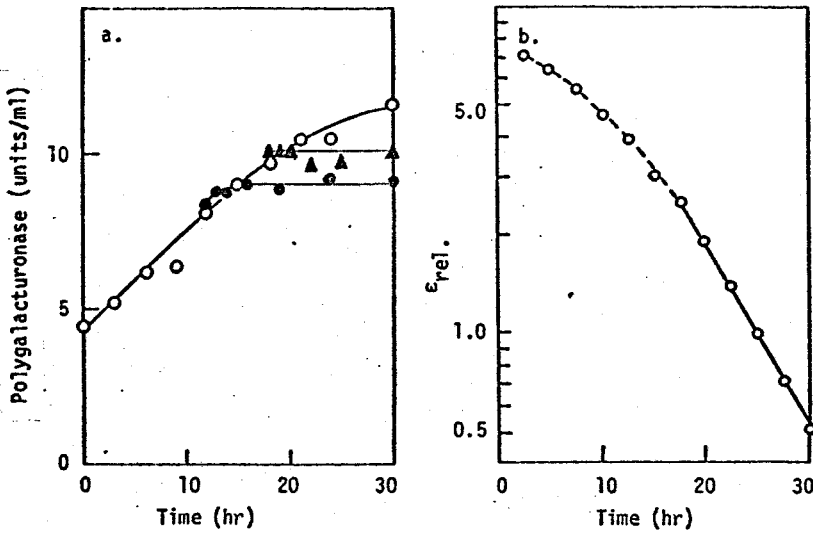
第2-6 図. アクチノマイシン S<sub>3</sub> 存在下での polygalacturonase 生産に対するグルコースの影響。

ペクチン培地で 30°C にて 42 時間培養した誘導菌体を還元置換したあと 22°C に移し 4 時間振盪培養のち実験を開始した。

- 対照 (無添加)
- 0 時間に アクチノマイシン S<sub>3</sub> (50 μg/ml) 添加。
- △— 0 時間に アクチノマイシン S<sub>3</sub> (50 μg/ml) 添加, 2 時間に グルコース (0.5%) 添加。

translation のみによっていると考えられた。脱誘導培地

lag の後に酵素生産は完全に停止した。したがってアクチノマイシン S<sub>3</sub> 存在下でのグルコースの阻害作用は transcription のレベルでは説明できず, グルコースが translation を阻害することを示す。第 2-7 図に脱誘導過程における polygalacturonase 生産がグルコースによって抑制されることを示した。誘導菌体を脱誘導培地に置換すると polygalacturonase 生産は約 30 時間続く。置換後 16 時間以降は比酵素生産速度  $\epsilon$  が一分子的低下を示し, *de novo* の mRNA 合成はなく, polygalacturonase 合成は専ら既存の mRNA の



第2-7図. 脱誘導過程における polygalacturonase 生産に対する グルコースの影響。

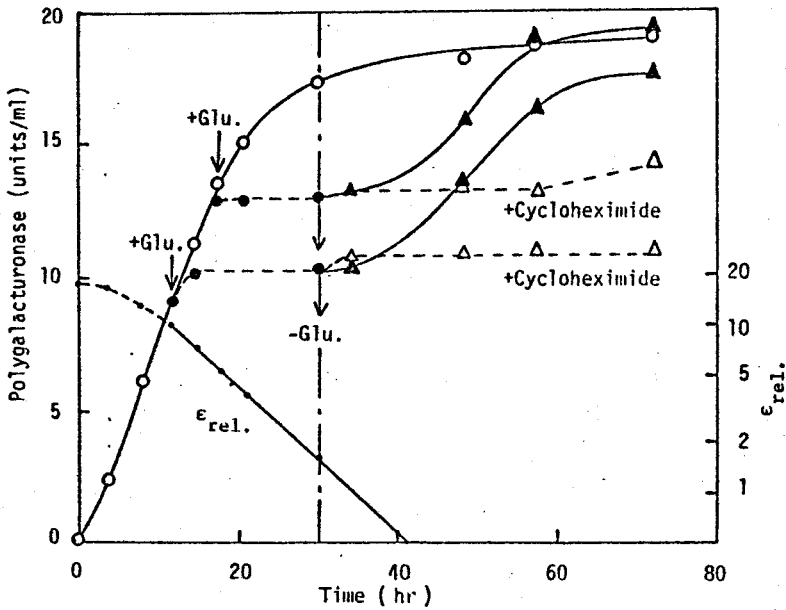
- a: ペクチン培地に742時間培養した誘導菌体を下記組成の脱誘導培地に置換したのちの polygalacturonase 生産経過:  
 DL-リンゴ酸 5%,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.4%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05%,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.001%, pH 5.0.  
 —○— 対照(無添加), —●— 0.5% グルコース添加(12時間),  
 —▲— 0.5% グルコース添加(18時間)
- b: 対照培養の polygalacturonase 生成活性の片対数プロット。  
 Erel. は比酵素生産速度  $\epsilon$  の相対値を示す。

に置換後12, 18時間でグルコースを添加すると polygalacturonase 生産は速かに抑制された。以上の結果もまた, catabolite repression が translation レベルで起こっていることを示す。

### 3. Transcription への影響

前項でグルコースによる *catabolite repression* が *polygalacturonase* の *translation* のレベルで起こっていることを明らかにしたが、本項ではグルコースの *transcription* への影響を検討した。

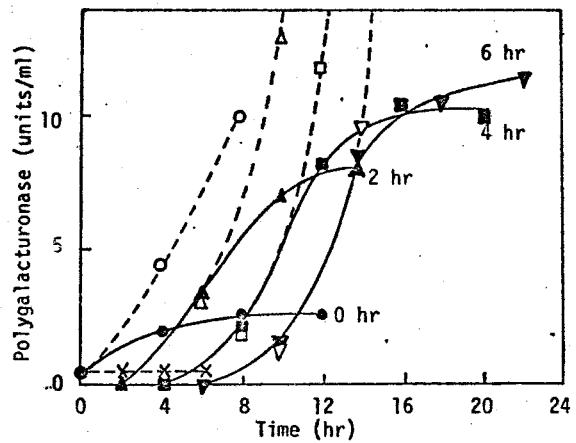
まず、グルコース存在下における *polygalacturonase* 生成系 (mRNA) の挙動を調べた。第2-8図は脱誘導過程に



第2-8図. 脱誘導過程におけるグルコースによる抑制中の *polygalacturonase* 生成系の安定性。

バクチン培地に74時間培養した誘導菌体を脱誘導培地に置換し、12時間あるいは18時間後にグルコース(2%)を添加(—●—)し、30時間後にそれぞれからグルコースを除去した(—▲—)。—○—: 対照(グルコース無添加)、—△—: グルコース除去と同時にシクロヘキシמיד(20 $\mu$ g/ml)添加。  
 $\epsilon_{rel.}$  は対照培養の比酵素生産速度 $\epsilon$ の相対値を示す。

おいてグルコースを添加したときに mRNA が崩壊するか否かを検討した結果を示す。前項で述べたように、脱誘導培地に置換後12時間以降は $\epsilon$ は一分子的に低下するが、この時期(12時間, 18時間)にグルコースを添加し polygalacturonase 合成を抑制した。グルコース無添加対照の polygalacturonase 生産が殆んど停止する時点(30時間)でグルコースを除去すると polygalacturonase 合成は再開され、ほぼ対照のレベルにまで達した。この合成はシクロヘキシミドにより阻害されることより de novo の蛋白合成によるものであり、前駆体の活性化などによるものでないことは前項の結果と一致する。以上の結果よりグルコースによる抑制下では polygalacturonase 生成系は殆んど崩壊しないことが強く示唆された。以上の結果はグルコースによる translation 阻害がシクロヘキシミド

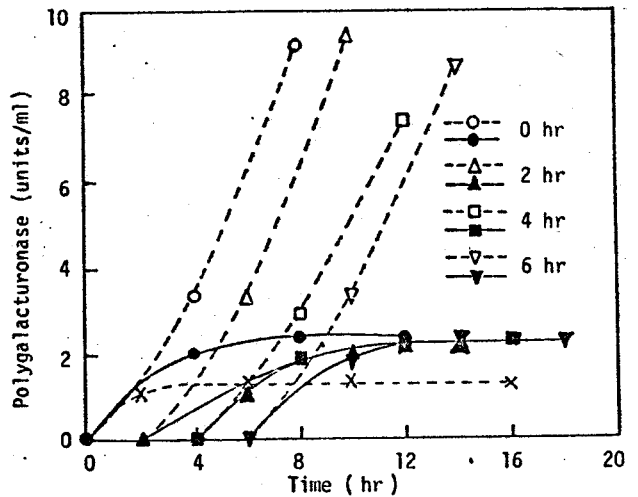


第2-9図. シクロヘキシミドによる阻害下での polygalacturonase 生成系の蓄積。

ペクチン培地にて42時間培養した誘導菌体を還元置換しシクロヘキシミド(20 $\mu$ g/ml)を添加した。0, 2, 4, 6時間経過後菌体を集め洗浄後、ペクチン培地の42時間培養液に再懸濁しアクチマイシン $S_3$ (50 $\mu$ g/ml)を添加し振盪培養した。図中の時間はシクロヘキシミドと接触させた時間を示す。Open symbols はアクチマイシン $S_3$ 無添加の対照の酵素生産を示す。---x---: シクロヘキシミド添加培養の酵素生産。

ド<sup>70,71)</sup>のそれと、mRNAの崩壊を保護する点で類似していることを示す。

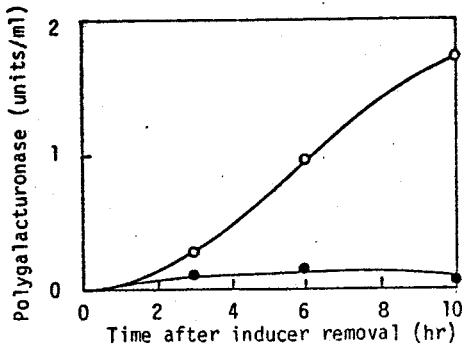
以上の結果を利用してグルコースによる抑制下のmRNA合成の有無を調べた。グルコースがtranscriptionを阻害しないとすれば、グルコース添加によるpolygalacturonase抑制中はmRNAが安定な形で保護されmRNAの蓄積が認められるはずである。まず、類似の作用を示すシクロヘキサミドの存在下でmRNAが蓄積することを確認した結果を第2-9図に示した。誘導菌体を置換培養し培地中のシクロヘキサミドと0, 2, 4, 6時間接触させた後、シクロヘキサミドを除きアクチノマイシンS<sub>3</sub>存在下で生成するpolygalacturonase量を測定し、蓄積されていたmRNA量を推定した。polygalacturonaseのmRNAが安定であるため0時間でも相当量のmRNAが存在するが、シクロヘキサミドとの接触時間が長いほどpolygalacturonase生産量が増大し、明確なmRNAの蓄積が認



第2-10図. 誘導菌体によるpolygalacturonase生成系の合成に対するグルコースの影響。

シクロヘキサミドをグルコース2%に置き替えたほかは第2-9図に準じた。

められた。次に、グルコースについて同様の検討を行い第2-10図にその結果を示した。グルコースを添加した場合にはグルコースとの接触時間を延長しても、解除後アクチノマイシン存在下で生成する polygalacturonase 量は一定であった。しかしながらグルコースの添加により inducer の取り込みが阻害される可能性があるため、これを検討した結果を第2-11図に示す。非誘導菌体を inducer を含む培地に懸濁



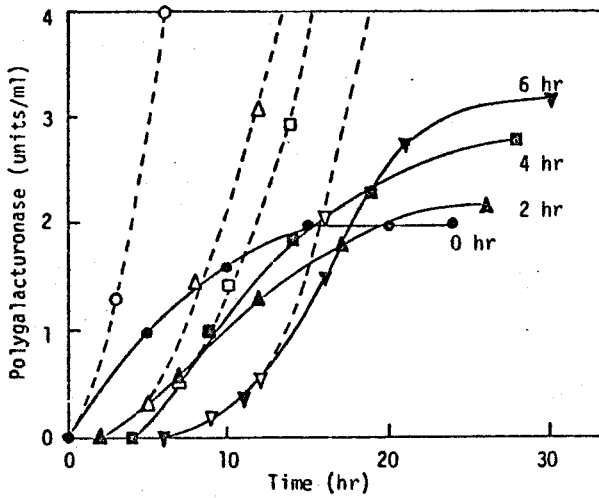
第2-11図. 非誘導菌体による inducer 取り込みに対するグルコースの影響。

リンゴ酸培地に748時間培養した非誘導菌体をペクチン培地の42時間培養液に置換し、2%のグルコース存在(—○—), 不在(—●—)下にて6時間振盪培養後、菌体を集め洗浄後、脱誘導培地に置換したあとの polygalacturonase 生産を示す。

し6時間振盪培養するとその後 inducer を除去しても polygalacturonase が生産された。しかしながら、誘導時にグルコースを添加した場合には

inducer 除去後には polygalacturonase 生産が認められなかった。以上の結果は非誘導菌体による inducer の取り込みがグルコースにより阻害されることを示している。誘導菌体については本実験

方法では調べられなかったが、仮にグルコースにより inducer の取り込みが速かに阻害され脱誘導状態になったとしても、第2-7, 2-8図の脱誘導実験の結果から実験時間内(6時



第2-12図. 脱誘導過程におけるシクロヘキシミドによる阻害下での polygalacturonase 生成量の蓄積。

ペクチン培地に72時間培養した誘導菌体を脱誘導培地に置換し、シクロヘキシミド(20μg/ml)を添加した。シクロヘキシミド除去後、脱誘導培地に懸濁した他は第2-9図に準じた。

の catabolite repression は translation を阻害するほか、transcription をも阻害すると考えられる。

#### 第4節 考 察

前章の酵素分画の実験結果より *A. niger* U20-2-5 の生産する polygalacturonase は3成分より成っている。本章では培養液中の全酵素活性を取り扱って解析したが、グルコース添加により polygalacturonase 合成は完全に停止し一定値を保つこと、抑制前後の polygalacturonase の分画結果

間)では菌体内の inducer による mRNA 合成は可能と推定される。さらに、第2-12図に示すように inducer 除去による脱誘導過程においても、シクロヘキシミド存在下で mRNA の蓄積が認められた。

以上の結果から、グルコースによる polygalacturonase

(第2-2表)より3成分全ての合成が停止していることから、培養濾液中の活性が個々の成分酵素の挙動を代表しているものとして取り扱っても大過はないものと思われた。

第2-2表. Polygalacturonase 成分の catabolite repression

Time (hr)	Polygalacturonase (units/ml)							
	Without glucose added				With 0.5% glucose added			
	Culture filtrate	PG I	PG II	PG III	Culture filtrate	PG I	PG II	PG III
0	37.0	10.4	9.1	2.7	35.5	10.0	8.7	2.6
10	62.0	15.1	12.4	4.0	38.5	10.5	7.0	2.5

バクチン培地の42時間培養を用いて実験を開始した。培養濾液を70%エタノール沈殿、透析後 DEAE-セフアデックス A-50 により分画した。分画方法の詳細は第1章実験方法の項参照。

第2-1表の結果より polygalacturonase の分泌はグルコースにより阻害されないものと考えたが、Bacillus amyloliquefaciens の protease<sup>72)</sup> の場合のように蛋白合成と分泌との共役があるとすれば即決できないかも知れない。しかし酵素の分泌機構については未解決の問題点が多く、今後の研究にまたねばならない。

A. niger U20-2-5 による polygalacturonase 合成のグルコースによる catabolite repression が transcription, translation の两段階で起こっていることは非常に興味ある結果であり、真核微生物における catabolite repression の機構の詳細な研究に好都合な材料である。E. coli の  $\beta$ -galactosidase の catabolite repression の作用レベルに関する研究は多数あり、Loomis ら<sup>50)</sup>, Jacquet ら<sup>73)</sup>, Silverstone ら<sup>56)</sup> は catabolite



repression は mRNA の合成速度を低下させると結論した。一方, Yudkin ら<sup>62)</sup>, Aboud ら<sup>63)</sup> は  $\beta$ -galactosidase 合成に対するグルコースの影響は translation レベルで起こると述べている。また, E. coli の tryptophanase 合成については Pastan ら<sup>64)</sup> は cAMP が translation を促進すると報告しているのに対し, Ramírez ら<sup>74)</sup> は transcription を促進するとの結果を得ている。以上はいずれも transcription あるいは translation の一方にのみ着目したものであるが, Van Wijk ら<sup>65)</sup> は S. carlsbergensis の  $\alpha$ -glucosidase が両レベルで抑制を受けることを認めている。また, Yudkin<sup>75)</sup> はラクトースオペロンの catabolite repression は両レベルで起こるが, それぞれのレベルの抑制の割合が E. coli の strain 間で異なることを明らかにしている。以上のことを考え合わせれば, catabolite repression は本来 transcription, translation の両段階を阻害するものかも知れない。

真核微生物による酵素合成の調節は一般に translation レベルで行われていることが多い。小川ら<sup>76)</sup> は Penicillium variable の CMCase が, Nishizawa ら<sup>66)</sup> は I. viride の cellulase が translation レベルで catabolite repression を受けることを報告している。また, Shinmyo ら<sup>77)</sup> は A. niger の菌体内 inducer による acid protease 合成が  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  により translation レベルで抑制されることを明らかにしている。Translation レベルでの調節は, 本菌の polygalacturonase のように mRNA が安定であるような場合

に合目的的であると言えよう。

グルコースによる translation 阻害に伴い polygalacturonase 生成系 (mRNA) の崩壊が阻害され、安定な形で保存されることは非常に興味深い (第 2-8 図)。Aboudら<sup>63)</sup>も *E. coli* の  $\beta$ -galactosidase について同様の現象を認めている。この保護作用はクロラムフェニコール<sup>78~80)</sup> やシクロヘキシミド<sup>70,71)</sup> によるペプチド合成阻害に伴う mRNA の保護作用に非常に類似しており、catabolite repression の機構解明に有効な手がかりを与えるものと思う。即ち、抑制下では mRNA はポリゾームの形で保存され RNase による分解から保護されているのかも知れない。シクロヘキシミドはポリゾームの形成を阻害しない<sup>81)</sup> ものと考えられているが、グルコースによる catabolite repression 下ではポリゾームの形成が阻害されるとすれば新たに合成された mRNA は安定な形で保存されないことになり、第 2-10 図の結果より transcription が阻害されると結論できないことになる。しかし、細菌の例を適用するのは性急に過ぎるかも知れないが、グルコース存在下でも  $\beta$ -galactosidase の mRNA が蓄積するとの Aboudらの報告<sup>64)</sup> があり、グルコースの添加によるポリゾーム形成阻害の可能性は少ないものと思われる。いずれにしてもグルコース存在下では polygalacturonase の functional な mRNA は合成されない。

Dobrogosz<sup>82)</sup> は N-acetylglucosamine が、Satoら<sup>83)</sup> は phosphoenolpyruvate が corepressor として重要な役割を演ず

るものと推定している。Polygalacturonase の catabolite repression には、前章第 1-3 図の結果よりピルビン酸以前の解糖系中間体が関係しているものと思われた。しかしながら抑制しない炭素源についてはその資化性が問題となるので第 2-3 表に再検討の結果を示した。抑制の程度と資化性には比較

第 2-3 表. ペクチン培地での polygalacturonase 生産に対する種々炭素源の影響と資化性。

Carbon sources	PG act. (rel.)	Growth	Carbon sources	PG act. (rel.)	Growth
None	100		Glycerol	51	++
Glucose	9	+++	Erythritol	63	++
Galactose	8	+++	Sorbitol	44	++
Mannose	8	+++	Mannitol	46	++
Fructose	10	+++	Inositol	50	++
Xylose	10	+++	Ethanol	74	-
Arabinose	79	±	Methanol	44	-
Ribose	80	±	Succinate	142	++
Lactose	39	++	Citrate	143	+
Cellobiose	7	+++	Di-Malate	130	+
Sucrose	6	+++	Fumarate	133	+
α-Methylglucoside	91	+++	cis-Aconitate	134	NT
β-Methylglucoside	13	+++	Pyruvate	120	+

ペクチン培地にて 42 時間培養後炭素源 (1%) を添加し 8 時間振盪培養した。PG act. は 8 時間の間に生産された polygalacturonase 量を示し、100 は 10.2 units/ml に相当する。+++、++、+ は単一炭素源としたときの増殖の程度を示す。- : 増殖の認められなかったもの、NT: 試験しなかったもの。

的相関性はあったが、コハク酸等の例外もあり抑制しないのは代謝されなかったためだけではないものと思われる。また、Davis ら<sup>84)</sup> は *A. niger* の acid protease 生産についても類似の結果を得ており炭素源の摂取速度測定の結果、クエン酸、リンゴ酸等は抑制の認められる糖類相当の速度で摂取されるにも拘らず acid protease 生産を抑制しないことを明ら

かにしている。

本章では cAMP と *catabolite repression* との関係については論じなかった。簡単のため解析はすべてアデニン欠除による増殖停止菌体を用いて行ったため、cAMP の添加による増殖が著しく解析には不適當であった。そこで cAMP の効果の検討のためにはアデニン以外の化合物の要求株を用いることが望ましく、この問題は今後の研究に譲りたい。

## 第5節 要 約

1. アクチン存在下での *polygalacturonase* 生産は低濃度 (約 30 mM) のグルコースの添加により著しく阻害され、これは *polygalacturonase* 反応、酵素の分泌の阻害の結果ではなく *catabolite repression* によるものであった。

2. *Catabolite repression* は可逆的でありグルコース除去と共に速かに *polygalacturonase* 生産は再開したが、この生産はシクロヘキシミドにより阻害された。

3. 種々培養温度でのアクチノマイシン  $S_3$ 、シクロヘキシミドおよびグルコースによる *polygalacturonase* 生産の阻害様式比較の結果、アクチノマイシン  $S_3$  では低温ほど阻害剤添加後も長時間生産が継続したのに対し、シクロヘキシミドおよびグルコースは 22~30°C の測定範囲ではいずれの温度でも添加後速かに生産が停止した。また 22°C におけるアクチノマイシン  $S_3$  存在下および脱誘導過程におけ

る *polygalacturonase* 生産はいずれもグルコースの添加により速かに阻害された。

4. 脱誘導過程にグルコースを添加し、グルコース無添加対照の *polygalacturonase* 生産が殆んど停止した時期にグルコースを除去すると *polygalacturonase* 生産が再開されほぼ対照の生産レベルにまで達した。

5. シクロヘキシイミドによる阻害下では *polygalacturonase* 生成系が蓄積されたのに対し、グルコースによる抑制下ではその蓄積は認められなかった。非誘導菌体による *inducer* 取り込みはグルコースにより阻害されたが、*inducer* の除去による誘導菌体の脱誘導過程においてもシクロヘキシイミド存在下で *polygalacturonase* 生成系の蓄積が認められた。

6. 以上の結果から、グルコースによる *catabolite repression* により *translation* レベルが阻害されるほか、*transcription* レベルも阻害されることが推定された。

## 第 3 章 Polygalacturonase 生産の 速度論的解析

### 第 1 節 緒 言

Pectinase の生産を取り扱った報告は多数あり、Zetelaki-Horvath ら<sup>85)</sup> は種々のカビによる pectinase 生産の速度論的解析を試みているが、生理学的立場から酵素生成系の挙動を研究し、その結果にもとづいて動力学的解析を行った例はない。*A. niger* U20-2-5 の生産する polygalacturonase は 3 成分より成り、その挙動を個々の成分にまで分析して解析するのは繁雑であり多くの困難を伴う。しかしながらペクチン質の分解は単一の成分酵素によるよりも、作用機作を異にし、相乗作用を有する数種の成分酵素により行われる方がより効率的である。その意味より、数種類の pectinase を混合物として生産するカビ起源の酵素が工業的に主として利用されている。従って工業的応用の見地からは、数種の成分酵素の生産を包括的に捉えることも意義深いものと考え、その解析の一例を述べる。

Terui ら<sup>86)</sup> は酵素合成の律速段階が mRNA 濃度にあるとの仮定のもとに微生物水解酵素優先合成の速度論的解析を行い、*Bacillus subtilis* の  $\alpha$ -amylase 生産<sup>87)</sup>、*A. niger* U20-2-5 の glucamylase 生産<sup>88)</sup>、acid protease 生産<sup>89)</sup> について生理学的研究とも合わせ報告している。

既述のように，ペクチン培地での *polygalacturonase* 生産は前記の酵素と同様典型的な *nongrowth-associated* 型を示し，増殖相では殆んど生産が認められない。それに対し，ガラクトuron酸培地および天然培地では増殖相でも顕著な *polygalacturonase* 生産が認められた。本章ではその要因を生理学的立場から究明すると共に，Terui ら<sup>86)</sup>の動力学モデル式を用いて速度論的解析を行い，*polygalacturonase* 生成系の特性を明らかにすることを目的とした。

## 第2節 実験材料および方法

培養方法： *Polygalacturonase* 生産用にはペクチン培地，ガラクトuron酸培地および天然培地を使用し，菌糸接種の場合の前培養にはゲンアン培地を使用した（第1章参照）。菌体量測定のため天然培地成分のうち *soybean meal* および *corn flour* は 250  $\mu$  シュ以下の粒度のものを使用した。*Catabolite repression* を受けていない非誘導菌体の調製にはリンゴ酸培地を使用した（第2章参照）。菌体増殖はアデニン量（0～750  $\mu$ M）を変化させて制御した。培養は主に 500 ml 容（実容 100 ml）Erlenmeyer フラスコを用い 30℃にて振盪培養を行った。菌糸接種の場合にはゲンアン培地に748時間培養した増殖停止菌体を洗浄後，元の容量になるように無菌水に懸濁し *inoculation size* が10%になるように植菌した。胞子接種の場合にはレット形成防止の

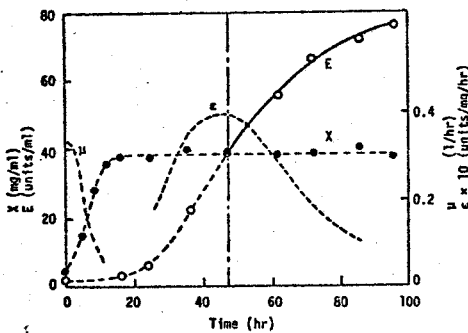
ため、少量(5ml)の無菌水に多量の胞子を懸濁分散させたものを加えた。

菌体量の測定：半合成培地での菌体量測定は第2章に準じた。天然培地での菌体量の測定に際しては、250メッシュの篩にて培地成分から菌体を分離し、十分洗浄後乾燥重量(乾燥条件：90℃，8時間)を測定した。

### 第3節 実験結果

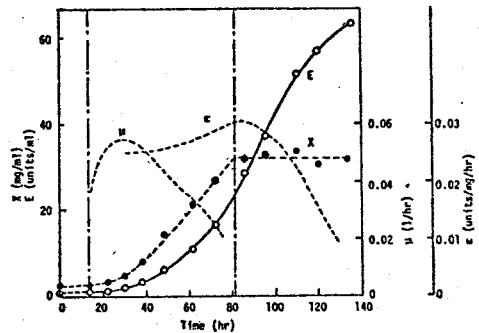
#### 1. 種々培養条件における polygalacturonase 生産経過

第3-1，3-2，3-3図にはそれぞれペクチン培地，ガラクトuron酸培地，天然培地における典型的な polygalacturonase 生産の経時変化を示した。ペクチン培地における



第3-1図. ペクチン培地における polygalacturonase 生産の経時変化(菌糸接種)。

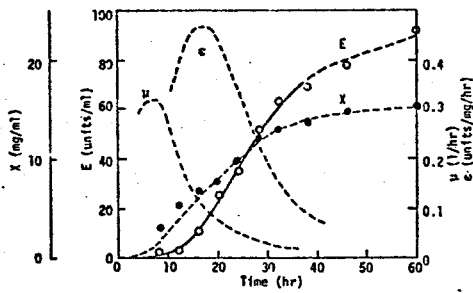
実線は非増殖相における理論曲線を示す。



第3-2図. ガラクトuron酸培地における polygalacturonase 生産の経時変化(胞子接種)。

この場合、理論曲線(実線)は増殖相，非増殖相の両方を cover することが出来た。





第3-3図. 天然培地における polygalacturonase 生産の経時変化 (胞子接種).  
実線は増殖相の理論曲線を示す。

polygalacturonase 生産は主に増殖停止後に認められ, nongrowth-associated 型に属する生産型を示した。増殖停止後の polygalacturonase 生産は次の Okazaki ら<sup>85)</sup> の非増殖相の動力学モデル式により解析した (記号説明は後記)。

$$\begin{aligned} E &= E_m e^{-k(t-t_m)} + K_1 \{ e^{-\lambda(t-t_m)} - e^{-k(t-t_m)} \}; \\ E &= \int_{t_m}^t E X dt + E_{t_m}. \end{aligned}$$

実験値より求めた係数, 定数は次の通りであり,

$$k = 0.14, \lambda = 0.05, K_1 = 0.066, t_m = 48, E_m = 0.039$$

この理論曲線は実験値とよく一致した (第3-1図)。

一方, ガラクツロン酸培地では増殖は極めて遅く最大増殖速度  $\mu_{max}$  はペクチン培地の約  $\frac{1}{6}$  であったが, 増殖相でも顕著な polygalacturonase 生産が認められた。増殖相での polygalacturonase 生産は次の Terui ら<sup>86)</sup> の増殖相の動力学モデル式により解析した。

$$\begin{aligned} E &= e^{-k(t-t_0)} \left\{ a \int_{t_0}^t \mu e^{k(t-t_0)} dt + b \left| \int_{t_0}^t \left( -\frac{d\mu}{dt} \right) e^{k(t-t_0)} dt \right| + E_0 \right\}; \\ E &= \int_{t_0}^t E X dt + E_0. \end{aligned}$$

ここで係数, 定数を

$$k = 0.10, a = 0.05, b = 0, t_0 = 14, \epsilon_0 = 0$$

とすると理論曲線は実験値とよく一致した(第3-2図)。ここで注目すべきことは増殖に伴う *repression* に関する係数が  $b=0$  であることであり、ガラクトン酸培地では増殖に伴う *repression* (*anabolite repression*) が存在しないことを示す。前章の *catabolite repression* の結果を考え合わせれば、以上のことから前記ペクチン培地において増殖相で *polygalacturonase* 生産の認められない原因は、ペクチン標品中の何らかの物質による *catabolite repression* であると考えられた。ガラクトン酸培地においても非増殖相で *polygalacturonase* 生産は長時間持続し、非増殖相の動力学モデル式による解析の結果次の係数、定数を得た。

$$k = 0.10, \lambda = 0.04, K_1 = 0.07, t_m = 82, \epsilon_m = 0.030.$$

*Soybean meal* 等を主体とする天然培地ではゲンゴウをはじめとする多量の糖類が含まれ、グルコースについて測定した限りでも増殖相で約1%存在していたにも拘らず、増殖相での *polygalacturonase* 生産経過はガラクトン酸培地におけるものと類似の型を示した。この培養経過は次の係数、定数を用いた増殖相の動力学モデル式によく適合した(第3-3図)。

$$k = 0.14, a = 0.47, b = 0, t_0 = 0, \epsilon_0 = 0.$$

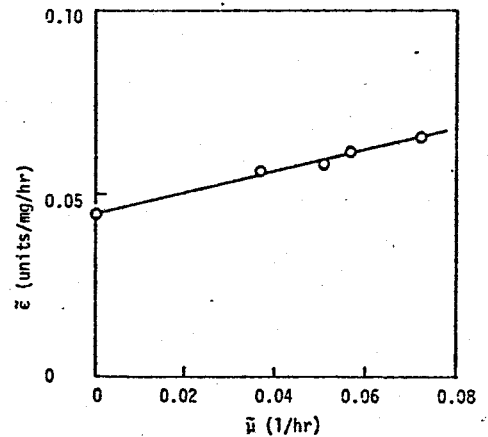
この解析結果より、天然培地においては仮に *catabolite repression* が存在しても無視し得るものかも知れない。また、 $b=0$  であることより増殖に伴う *repression* もないこと

が示された。

以上のように種々培養条件において polygalacturonase 生産型が著しく変化することが認められたので、この要因について以下に生理学的立場からも解析した。

## 2. Polygalacturonase 生産の抑制と lag の性質

本菌の glucanase 生産は高濃度のグルコース存在下でも catabolite repression を受けない。しかしながら顕著な増殖に伴う repression (anabolite repression) が存在し、増殖相での酵素生産抑制の主体を成していることが認められている<sup>90)</sup>。前項においてペクチン培地の増殖相で polygalacturonase 生産が認められない(第3-1図)原因は anabolite repression ではなく主に catabolite repression にあると推定したが、anabolite repression が存在しないことを明らかにするために、アデニン再添加による shift-up 実験により比酵素生産速度 ( $\epsilon$ ) と比増殖速度 ( $\mu$ ) との関係を検討した。ペクチン培地で42時間培養後の増殖停止期に種々濃度(0

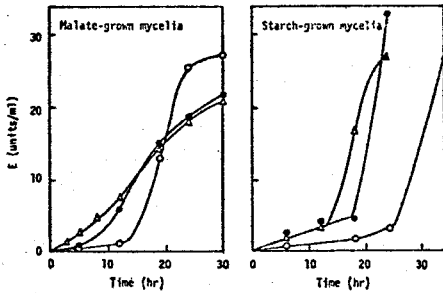


第3-4図. Catabolite repression 不在下での  $\epsilon$  と  $\mu$  の関係。

ペクチン培地に72時間培養後、同時期の培養液を1/2倍に希釈し、種々濃度(0~750 $\mu$ M)のアデニンを添加した。 $\epsilon$ ,  $\mu$  は shift-up 後3時間から5時間の間の平均の  $\epsilon$ ,  $\mu$  を示す。

~750  $\mu\text{M}$ ) のアデニンを再添加し、その培養経過から上記の関係 ( $\epsilon$  対  $\mu$ ) を求めた。第3-4図に示すように、添加アデニン量に応じて  $\mu$  が増大しても  $\epsilon$  は低下しないばかりかむしろ正の相関を示した。この結果は *glucamylase* 生産の場合  $\epsilon$  と  $\mu$  が負相関を示した<sup>9)</sup> こととは著しい相違である。すなわち、*polygalacturonase* 生産には増殖に伴う *repression* は存在せず、比酵素生産速度 ( $\epsilon$ ) は比増殖速度 ( $\mu$ ) と正相関することになる。従って、ペクチン培地の増殖相で *polygalacturonase* 生産が認められない原因は増殖に伴う *repression* 以外にあることになる。

*Polygalacturonase* 生産の遅れは培地中の *inducer* の種類と密接な関係があるものと思われるので種々 *inducer* による *polygalacturonase* 誘導の lag について検討した。リン



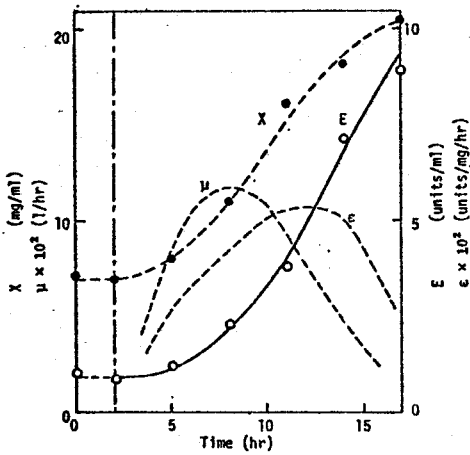
第3-5図. 種々 *inducer* による *polygalacturonase* 誘導の経時変化。

1% の *inducer* を添加した基本培地 (アデニンを除く) を用い、置換培養を行った。

- Crude pectin; —●— Refined pectin;
- △— Galacturonic acid.

ゴ酸培地あるいはデンプン培地に748時間培養した増殖停止菌体を用い、種々の *inducer* を添加した基本培地に置換培養したときの *polygalacturonase* 誘導の時間経過を第3-5図に示した。リンゴ酸培地生育菌体ではガラクトロン酸によって *polygalacturonase* が速かに誘導されたのに対して、

ペクチンでは著しい lag (10 時間以上) の後に誘導が見られた。しかしながら市販ペクチン標品はグルコースを相当量含有する。そこで 70% エタノールで数回洗浄し、夾雑するグルコースを除去した *refined pectin* を用いると lag は約 5 時間に短縮された。ペクチンが高分子物質であることを考えると、この lag の一部には真の *inducer* が誘導に十分なレベルに達するまでの時間が含まれている可能性がある。一方、デンプン培地生育菌体による *polygalacturonase* 誘導ではすべてさらに長い lag が認められた。これは菌体内に *catabolite repression* を起こす物質が存在し、その消費に相当長時間要することを示す。したがって、ペクチン培地の増殖相で *polygalacturonase* 生産が認められなかった第 3-1 図の結果は、前培養菌体内および、ペクチン標品に由来する培地中に存在する *catabolite repression* の原因物質によるもの、さらに誘導の遅れなどの因子が総合されて起こるものであることが示唆された。誘導の遅れのない *inducer* としてガラクトロン酸を用い、孢子接種により菌体内の *catabolite* に起因する *repression* をなくした培養では増殖相でも著量の *polygalacturonase* 生産が認められた (第 3-2 図)。この事実は上の説明をさらに明らかにするものである。また、ペクチン培地においても、接種後予め 42 時間培養を行った培養液にアデニンを再添加しリンゴ酸培地に生育した菌体を接種すれば、第 3-6 図に示すように増殖相でも *polygalacturonase* 生産が認められた。これは培養中



第3-6図. ペクチン培地の42時間培養  
 培養液下の polygalacturonase 生産経過。

42時間培養培養液に750μMのアデニン  
 を添加し、リンゴ酸培地生育菌体を接種し、  
 実線は増殖相の理論曲線を示す。

にペクチン培地の catabolite  
 repression 原因物質が除去さ  
 れたか、直接の inducer がペ  
 クチンから生成され培地中  
 に蓄積されていたか、また  
 は両方に起因するものであ  
 ろう。この培養経過は次の  
 係数、定数を用いた増殖相  
 の動力学モデル式によく適  
 合した。

$$k = 0.14, \quad a = 0.10, \quad b = 0,$$

$$t_0 = 2, \quad \epsilon_0 = 0.$$

増殖に伴う repression に関

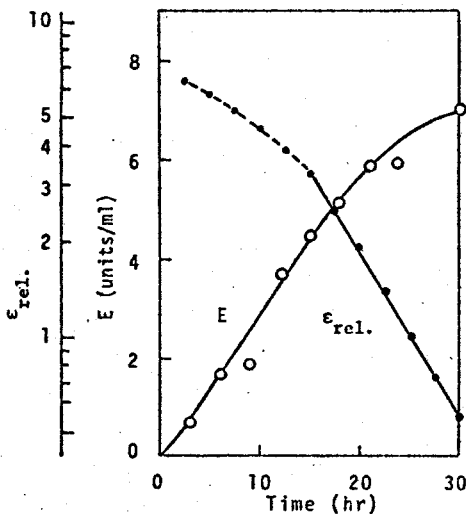
する係数  $b$  は 0 であり、polygalacturonase 生成系は増殖に  
 正相関して合成され、既存の生成系は一分子的に崩壊する  
 というガラクトン酸培地での培養経過(第3-2図)と同  
 様の生産型であった。さらにこの場合、ガラクトン酸培  
 地では得られなかった高い  $\mu_{max}$  値(約 0.12)でも anabo-  
 lite repression が認められなかったことは注目すべき結果  
 である。

### 3. Polygalacturonase 生成系の安定性

Polygalacturonase 生産経過の動力学的解析により推定  
 した polygalacturonase 生成系の崩壊速度定数  $k$  は 0.10 ~ 0.14

$hr^{-1}$  と低い値であったことより, *polygalacturonase* 生成系の律速成分であると思われる mRNA が高度に安定であることが推定された。そこで本項では脱誘導実験により *polygalacturonase* 生成系の安定性について検討を加えた。

mRNA の安定性の検討に先だつて, ペクチン培地における *polygalacturonase* 生産が酵素蛋白質の *de novo* の合成であることを述べなければならぬ。前章第 2-5 図の結果で, 真核微生物の蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミド添加によって *polygalacturonase* 生産が速かに停止したことより, この生産は *de novo* 合成であり分泌の遅れなどはないものと考えられた。また第 2-1 表の結果では, 酵素生産期の



菌体内の *polygalacturonase* 活性は培養液中の 8% 程度にすぎなかった。

第 3-7 図はペクチン培地に 7 42 時間培養した誘導菌体を脱誘導培地に置換したときの *polygalacturonase* 生産と E の経時変化を示す。置換後 14 時間以降は E は一分子的に低下し, その勾配より *polygalacturonase* 生成系の崩壊速度定数は  $0.14 hr^{-1}$  と推定され, 前述の  $k = 0.10$

第 3-7 図. 脱誘導過程における *polygalacturonase* 生産と E の経時変化。  
ペクチン培地に 7 42 時間培養した誘導菌体を脱誘導培地 (第 2 章参照) に置換した。E<sub>rel.</sub> は E の相対値を示す。

~0.14 hr<sup>-1</sup> を用いた理論式の妥当性が示唆された。

## 第4節 考 察

本章では培養液中の全 polygalacturonase 活性を用いて解析を行ったが、厳密には構成成分間に幾分挙動の違いがあるかも知れない。しかしながら、*catabolite repression* のない培地では polygalacturonase 生産は動力学モデル式によく適合したことより、3成分間での挙動の本質的な相違はないものと思われた。

本章の解析で *catabolite repression* と増殖に伴う *repression* の相違が明らかにされた。後者は便宜的に *anabolite repression* と呼ばれており、 $\mu$  を律速する菌体内 *anabolite* により起こるものである。*Anabolite repression* の定量的取扱いは既に Terui ら<sup>86)</sup>が行っている。*A. niger* U 20-2-5 による種々水解酵素の *repression* をまとめると次のように表わされる。

Product	Catabolite repression	Growth-associated (anabolite) repression
Glucamylase	- ~ ±	strongly +
Acid protease	+	strongly +
Polygalacturonase	strongly +	-

*Catabolite repression* がない培養条件では、増殖相での polygalacturonase 生産は  $b=0$  とした動力学モデル式によく適合した。したがって、polygalacturonase 生成系は増殖に



正相関して合成され，既存の生成系は一分子的に崩壊するという極めて単純な生産型であることを示す。ただ一般の細胞蛋白質の合成との違いは *polygalacturonase* 生成系が高度に安定であることである。また，*polygalacturonase* 生産型を支配する他の因子として誘導 lag がある可能性もあることが推定された。

*Soybean meal* 等を主体とする天然培地では，培地中にグルコースが多量（約1%）存在していたにも拘らず著量の *polygalacturonase* 生産が認められ，見かけ上 *catabolite repression* を受けていないとの解析結果を得た（第3-3図）。ここで見られたような生産型を示す要因については，次章で主に生理学的立場から解析した。

## 第5節 要 約

1. ペクチンを誘導基質とする半合成培地における *polygalacturonase* 生産は典型的な *nongrowth-associated* 型を示し増殖相では生産は殆んど認められなかったが，*shift-up* 実験では  $\epsilon$  と  $\mu$  が正相関を示し，増殖に伴う *repression* (*anabolite repression*) が存在しないことが明らかにされた。

2. ガラクツロン酸を炭素源とするような培養系では，誘導 lag がなく，*catabolite repression* を受けず，増殖相でも顕著な *polygalacturonase* 生産が認められた。この培養経過は，増殖に伴う *repression* に関する係数  $b$  を0とした

## 増殖相の動力学モデル式

$$\varepsilon = e^{-k(t-t_0)} \left\{ a \int_{t_0}^t \mu e^{k(t-t_0)} dt + b \left| \int_{t_0}^t \left( -\frac{d\mu}{dt} \right) e^{k(t-t_0)} dt \right| + \varepsilon_0 \right\}$$

によく適合し, *polygalacturonase* 生成系は増殖に正相関して合成され, 既存の生成系は一分子的に崩壊するという極めて単純な生産型を示すことが明らかにされた。

3. 非増殖相においても *polygalacturonase* 生産は長時間持続し, 非増殖相の動力学モデル式

$$\varepsilon = \varepsilon_m e^{-k(t-t_m)} + K_1 \left\{ e^{-\lambda(t-t_m)} - e^{-k(t-t_m)} \right\}$$

によく適合した。非増殖相における生産持続の主要因は *polygalacturonase* 生成系の高度な安定性にあり, その崩壊速度定数は  $0.10 \sim 0.14 \text{ hr}^{-1}$  であった。この値は脱誘導実験による生理学的解析の結果ともよく一致した。

4. *Soybean meal* 等を主体とする天然培地では, *catabolite repression* を起こすグルコースなどの糖類が存在するにも拘らず, 増殖相において顕著な *polygalacturonase* 生産が認められた。この培養経過は増殖相の動力学モデル式によく適合し, 増殖に伴う *repression* に関する係数  $b$  は 0 であった。

5. 前培養菌体内およびペクチン標品に由来し培地中に存在する *catabolite repression* 原因物質や, 誘導物質に固有の誘導 lag が, ペクチン培地の増殖相での *polygalacturonase* 生産を遅らせる主な要因となっている可能性につ

いて議論された。

## 記号

- $a$  : 定数 ('differential' constant) ;  
 $b$  : 定数 ('repression' constant or coefficient of growth-associated repression) ;  
 $E$  : 酵素濃度 (units/ml) ;  
 $E_0$  :  $t = t_0$  における酵素濃度 (units/ml) ;  
 $E_{t_m}$  :  $t = t_m$  における酵素濃度 (units/ml) ;  
 $K_1$  : 定数 (system constant) ;  
 $k$  : 酵素に特異的な mRNA の分解速度定数 ( $hr^{-1}$ ) ;  
 $t$  : 時間 (hr) ;  
 $t_0$  :  $t$  より  $\Delta t$  以前の時間あるいは実験開始時間 (hr) ;  
 $t_m$  :  $E$  が最大値  $E_m$  に達した時間 (hr) ;  
 $X$  : 菌体濃度 (mg/ml) ;  
 $\mathcal{E}$  : 比酵素生産速度 (units/mg/hr) ;  
 $\mathcal{E}_0$  :  $t = t_0$  における  $\mathcal{E}$  (units/mg/hr) ;  
 $\mathcal{E}_m$  :  $t = t_m$  における  $\mathcal{E}$  (units/mg/hr) ;  
 $\lambda$  : 非増殖相における菌体内 RNA の分解速度定数 ( $hr^{-1}$ ) ;  
 $\mu$  : 比増殖速度 ( $hr^{-1}$ ) .

## 第 4 章 天然培地における Polygalacturonase 生産の解析

### 第 1 節 緒 言

一般に、醗酵生産の解析の目的には組成の明確な単純合成培地が用いられるが、実際工業的には目的生産物の生産性の高い天然培地を用いることが多い。しかしながら、単純合成培地を用いて得られた結果を天然培地に直接応用するには少々問題がある。そこで、多くの困難が伴うけれども天然培地での醗酵生産を解析することが非常に重要な問題となる。

天然物が醗素生産を促進する例はかなり認められている。Tsuchidaら<sup>12)</sup>、Tomizawaら<sup>13)</sup>は Erwinia aroideae の pectinase 生産がニンジンの熱水抽出液により、また佐藤ら<sup>14)</sup>は Streptomyces fradiae の pectate lyase 生産が大豆粉、白菜等の熱水抽出残渣により促進されることを認めている。林ら<sup>15)</sup>、内田ら<sup>16)</sup>は大豆の熱エタノール抽出液を冷却して得られる沈殿物「大豆油糖」が細菌、放線菌などの protease 生産を著しく促進し、その有効成分が一部酸化された phosphatidylinositol であることを明らかにしている。

A. niger U20-2-5 による polygalacturonase 生産には soybean meal 等を主体とする天然培地が有効であることを認めたと、この天然培地では多量のグルコースが存在する

にも拘らず高単位の *polygalacturonase* 生産が認められ，前章の動力学的解析によれば，恰も本酵素生産に顕著な現象である *catabolite repression* が存在しないかのような結果を得た。そこで本章では，このような生産型を示す要因について検討を加えた。

## 第2節 実験材料および方法

菌体の置換培養方法：250メッシュ以下の粒度の *soybean meal* および *corn flour* を使用した天然培地およびペクチン培地にてそれぞれ42時間培養後，天然培地生育菌体は滅菌した250メッシュの篩にて，ペクチン培地生育菌体は殺菌漏斗中濾紙にてそれぞれ培養液から分離した。分離した菌体と無菌生理食塩水にて洗浄後，互いに他の培養液に再懸濁して実験を開始した。

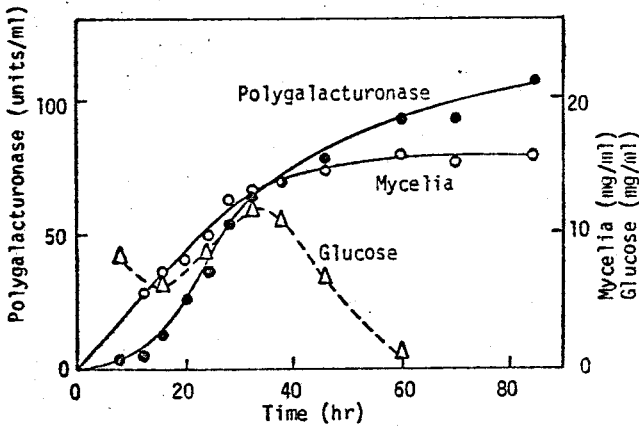
有効成分の検出法：Inducer以外の有効成分の存在の可能性も考えられることから，inducer供給のためペクチン培地を用いて行った。ペクチン培地にて42時間培養した誘導菌体を還元置換後グルコース2%を添加し，さらに5時間振盪培養を続け抑制効果の十分現れた時点に，試験成分を添加しさらに5時間振盪培養し，その間に生産された *polygalacturonase* 量で検定した。

グルコースの定量：天然培地の培養液中のグルコース量は *glucose oxidase* を用いるグルコスタット法により

測定した。

### 第3節 実験結果

#### 1. 天然培地における polygalacturonase 生産と catabolite repression

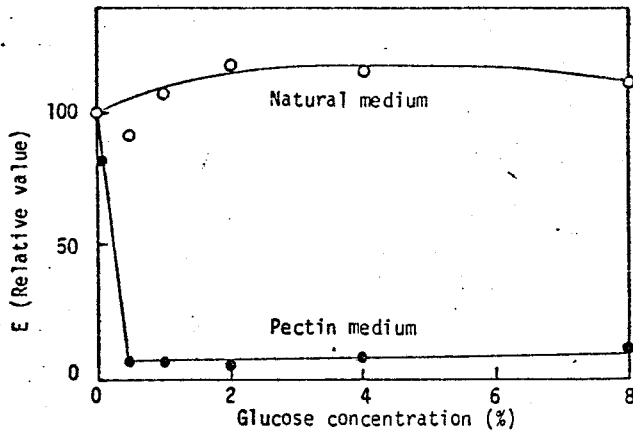


第4-1図. 天然培地における polygalacturonase 生産の経時変化。

天然培地成分中 soybean meal および corn flour は 250メッシュ以下の粒度のものを用いた。胞子を接種した。菌体量の測定方法は第3章実験方法参照。

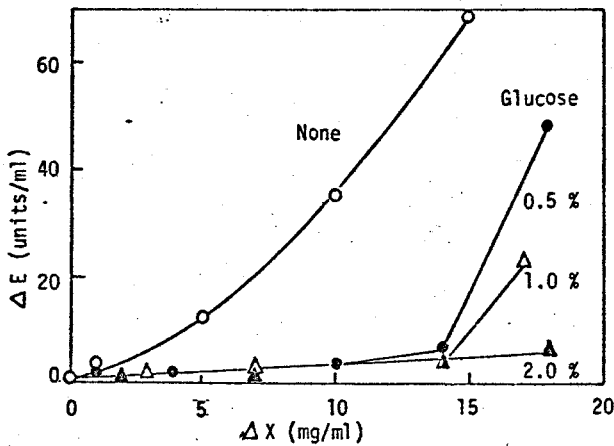
産が認められた。第4-2図には、天然培地にさらに添加したグルコースが polygalacturonase 生産に及ぼす影響を検討した結果を示した。既述のように、ペクチン培地では0.5%のグルコース添加により polygalacturonase 生産がほぼ完全に抑制されるのに対して、天然培地では8%の高濃度でも polygalacturonase 生産は殆んど影響されなかった。しか

第4-1図に天然培地における polygalacturonase の生産経過を示した。前章でも指摘したように、抑制に十分な量のグルコース(約1%)が存在するにも拘らず、増殖相において著量の polygalacturonase 生



第4-2図. 天然培地およびペクチン培地における polygalacturonase 生産に対する添加グルコース濃度の影響。

天然培地, ペクチン培地でそれぞれ 24, 42 時間培養後, 種々濃度のグルコースを添加し, さらに 12 時間培養し, その間に生産された polygalacturonase の相対量で表した。E=100 はそれぞれ 20.8 units/ml (天然培地), 17.7 units/ml (ペクチン培地) に相当する。



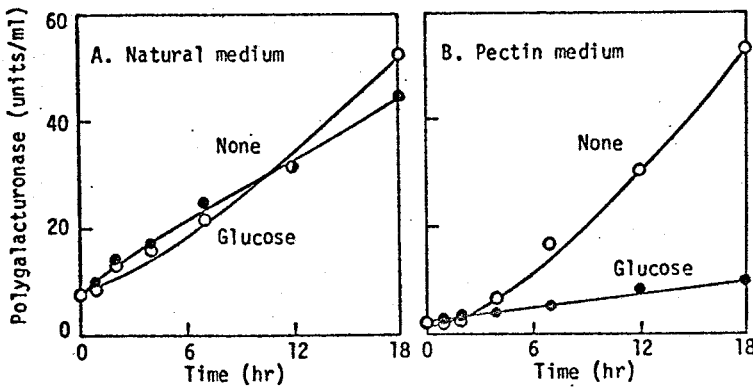
第4-3図. ペクチン培地の増殖相における polygalacturonase 生産の catabolite repression。

ペクチン培地にて 42 時間培養した誘導菌体を選え置換し, 750 μM アデニンおよび種々濃度のグルコースを添加した。

しながら, 天然培地での polygalacturonase 生産の解析では増殖相を取り扱わねばならないので, 非増殖相を取り扱って得られたペクチン培地での知見をそのまま応用できない可能性がある。そこで, ペクチン培地の増殖相での catabolite repression の様相を, アデニン再添加による shift-up 実験によって検討した。第4-3図に示したように, 増殖相でも 0.5% のグルコースによって polygalacturonase 生産は著しく抑制された。

次に, 天然培地生育菌体が catabolite

repression 耐性を獲得しているのか、それとも天然培地中にのみ有効成分が存在するのかを検討した。天然培地およびペクチン培地にてそれぞれ42時間培養した菌体を洗浄後、互いに他方の培養液に懸濁後の polygalacturonase 生産に対するグルコースの影響を調べた。第4-4図に示すように、



天然培地生育菌体でもペクチン培地に置換するとグルコースにより抑制を受け、ペクチン培地生育菌体でも天然培地に置換するとグルコース添加の影響は認めら

第4-4図. Catabolite repression の発現に対する培地の影響。

- A. ペクチン培地生育菌体を天然培地に置換した。
  - B. 天然培地生育菌体をペクチン培地に置換した。
- グルコースはそれぞれ2%添加した。置換培養方法の詳細は実験方法の項参照。

れなかった。すなわち、天然培地成分中に何らかの有効成分が存在することを示す。

そこで、天然培地ではグルコース存在下でも著量の polygalacturonase を生産する要因として次の2つの可能性を考え、次項で検討した。

- i) 天然培地成分中に catabolite repression を解除する物質が存在する。



- ii) 天然培地成分中に誘導能の高い inducer が存在し、そのため catabolite repression を受けているにも拘らず高い生産を示す。

## 2. 高誘導能 inducer 存在の推定

第4-1表. グルコース存在下での polygalacturonase 生産に対する天然培地各成分の効果。

Additives	E (units/ml)
None	0.8
Corn-steep liquor (CSL), 3 %	1.6
Corn flour (CF), 3 %	-1.4
Soybean meal (SM), 5 %	18.9
CSL + CF	1.5
CSL + SM	25.3
CF + SM	25.5
CSL + CF + SM	29.7

培養方法は実験方法の項参照。

第4-2表. Soybean meal 中の有効成分の抽出条件の検討。

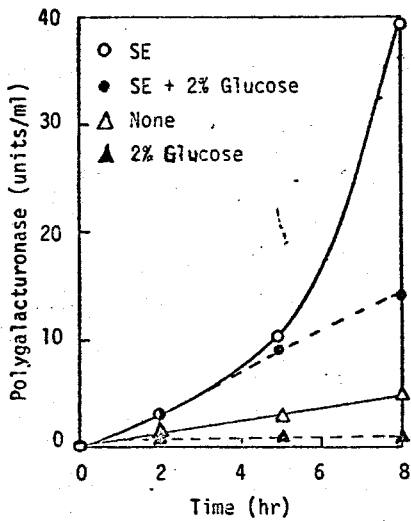
Additives	E (units/ml)
None	0
Hot water (121°C, 30min) extract	26.5
Hot water (121°C, 30min) residue	0
Ammonium oxalate (1%, 85°C, 30min) extract	7.4
Ammonium oxalate (1%, 85°C, 30min) residue	1.5
NaOH (1N, 25°C, 30min) extract	15.0
NaOH (1N, 25°C, 30min) residue	0
Soybean meal 5 %	39.4

Soybean meal の重量の10倍量の種々溶液にて抽出した。抽出液には3倍量のエタノールを添加し、その沉殿区分を培養に使用した。抽出残渣は pH 5.0 に調整後培養に使用した。培養方法は実験方法の項参照。

天然培地の各成分のうち、グルコース存在下での polygalacturonase 生産に対して効果を發揮する成分を検索した結果を第4-1表に示した。Soybean meal を添加した場合にのみグルコース存在下でも polygalacturonase 生産が認められ、corn-steep liquor, corn flour は全く無効であった。第4-2表には soybean meal より有効成分の抽出条件を検討した結果を示した。1N NaOH

にても有効成分はかなり抽出されたが、 $121^{\circ}\text{C}$ 、30分間の加圧熱水抽出が最も良好な結果を与え、有効成分の大部分を可溶化することが出来た。なお、この実験では抽出溶媒を除去するために抽出液をエタノール沈殿処理したが、熱水抽出操作が有効であったことから以下の実験では熱水抽出液そのものを使用した。

ペクチン培地の *polygalacturonase* 生産期に上記熱水抽出液（以下 SE と略す）を添加したときの *catabolite repression* の様子を置換培養によって検討した結果を第4-5図に示した。

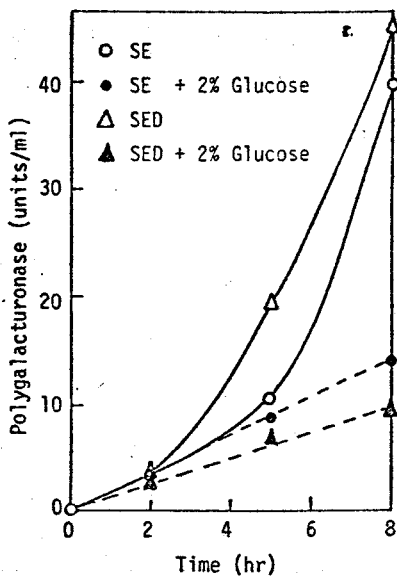


第4-5図. ペクチン培地における *polygalacturonase* 生産の *catabolite repression* に対する大豆抽出液 (SE) の効果。

ペクチン培地に742時間培養した誘導菌体を還元置換し、図示した添加物を加えた。SEの添加量は次の通りである。5gの大豆粉から調製したSE 50mlを50mlの置換培養に添加した。

SE無添加培養ではグルコースによる著しい *catabolite repression* が認められたのに対して、SEを添加すると *polygalacturonase* 生産は促進され、しかも置換後数時間は添加グルコースの影響は殆んど認められなかった。しかしながらこの場合、SEのみを添加した対照実験にもSEに由来する糖類が多量（グルコース相当の全糖として $12.4\text{mg/ml culture}$ ）含まれていたの、これを対照とするのは不適當である。第4-5図におい

て5時間目以後に、SEのみを添加した培養で *polygalacturonase* 生産が急上昇しているのは、これらの糖類の消費に伴い脱抑制されたためであると考えられる。SEに含まれるこれらの糖類は透析を行うことにより大部分が除去されたので、SEの透析内液(以下SEDと略す)を用いて同様の検討を行った。透析による糖類除去の結果、SED添加培養の培地中のSEDに由来する全糖の濃度は2.8 mg/mlに低下した。第4-6図に示すようにSED添加培養では初期から明確な *catabolite repression* が認められた。しかしながら、グルコース無添加ではSED添加培養の酵素生産速度はSE添加培養のそれよりも大であった。この結果はSE添加培養での *polygalacturonase* 生産はSEに由来する培地中の糖類によって抑制を受けていることを意味し、前項で挙げた後者の可能性を支持する。しかしながらペクチン培地で *polygalacturonase* 生産を完全に阻害するグルコース濃度でも、SEあるいはSEDを添加した培養では70~75%の阻害



第4-6図. ペクチン培地における *polygalacturonase* 生産の *catabolite repression* に対する大豆抽出液(SE) およびその透析内液(SED)の効果。

SEDはSEを約50倍量の脱イオン水に対して一夜透析して調製した。他は第4-5図に準じた。

から明確な *catabolite repression* が認められた。しかしながら、グルコース無添加ではSED添加培養の酵素生産速度はSE添加培養のそれよりも大であった。この結果はSE添加培養での *polygalacturonase* 生産はSEに由来する培地中の糖類によって抑制を受けていることを意味し、前項で挙げた後者の可能性を支持する。しかしながらペクチン培地で *polygalacturonase* 生産を完全に阻害するグルコース濃度でも、SEあるいはSEDを添加した培養では70~75%の阻害

に止まるのは，SE あるいは SED 中にグルコースの阻害作用を妨げる物質が存在するためかも知れない。したがって前者の可能性の存在も否定できない。以上の結果から，天然培地ではグルコース存在下でも著量の *polygalacturonase* を生産する要因の 1 つは，大豆中に存在する誘導能の高い *inducer* にあることが強く示唆された。

#### 第4節 考 察

天然培地ではグルコース等の糖類が多量に存在するにも拘らず顕著な *polygalacturonase* 生産を示す要因の 1 つは，大豆中に存在する誘導能の高い *inducer* にあることが示唆され，天然培地での *polygalacturonase* 生産は相対的に抑制されたレベルのものであると推定された。しかしながら天然培地ではペクチン培地の場合と異なり，*polygalacturonase* 生産は完全に抑制されなかったことから，大豆中にグルコースの阻害作用を妨げる物質の存在する可能性も考えられた。これらの有効物質の実体については明らかではないが，工業的応用のためにも今後さらに追究してゆきたい。

大豆の熱エタノール抽出液を冷却して得られる沈殿区分「大豆油糖」中に細菌，放線菌などの *protease* 生産を促進する物質が存在することが認められており，その有効成分と言われている *phosphatidylinositol*<sup>(95, 96)</sup> が上記有効物質

の一員として天然培地での *polygalacturonase* 生産に影響を及ぼしているのか否かについても今後検討したい。

第4-6図の結果より、大豆中に存在する誘導能の高い *inducer* を用いて *catabolite repression* を受けなような培養を行えば、*polygalacturonase* の生産性を現在よりもさらに上昇させることが可能であると考えられる。

Hsu ら<sup>31)</sup> は炭素源制限培養を行うと *Aeromonas liquefaciens* による *polygalacturonate transeliminase* 生産の差速度が著しく増大することを認めている。したがって、大豆中の *inducer* を分離することなく天然培地そのものを用いる場合には、深部培養よりも栄養源の供給速度の遅い固体培養を行うことにより *catabolite repression* の原因物質である糖類の供給を制限すれば、*polygalacturonase* 生産性の向上が可能であろう。工業的には主に固体培養が行われる理由の1つがこの点にあるものと思われる。また、工業的応用面では難点があるかも知れないが、透析培養により低分子糖類を培養系外に除去すること、あるいは酵母との混合培養を行うことにより *catabolite repression* の原因物質である糖類を除去することなどにより生産性の向上が達せられるかも知れない。Hsu<sup>31)</sup> は透析培養により *A. liquefaciens* の *polygalacturonate lyase* 生産速度が著しく増大することを認めている。

## 第5節 要 約

1. Soybean meal 等を主体とする天然培地においては、約1%のグルコースが存在するにも拘らず増殖相で高単位の polygalacturonase 生産が認められ、さらに8%のグルコースを添加しても polygalacturonase 生産は全く影響されなかった。

2. 天然培地生育菌体をペクチン培地に置換すると polygalacturonase 生産は添加グルコースにより抑制され、天然培地でグルコース存在下でも著量の polygalacturonase 生産が認められる要因が天然培地成分中に存在する有効物質にあることが示された。

3. 有効物質は主に大豆中に存在し、121℃、30分間の加圧熱水抽出により可溶化された。この熱水抽出液(SE)をペクチン培地に添加すると polygalacturonase 生産は促進され、しかも SE 添加後5時間の間はグルコースを添加しても酵素生産速度には全く影響が認められなかった。しかしながら5時間後に、グルコース無添加の SE 添加培養の polygalacturonase 生産速度が急上昇した。

4. 透析によって大豆の熱水抽出液から低分子糖類を除去した透析内液(SED)をペクチン培地に添加したときの polygalacturonase 生産速度は SE 添加培養のそれよりも大であり、有効物質の1つは誘導能の高い inducer であることを示唆する結果を得た。SED 添加培養では2%のグルコースによって polygalacturonase 生産は抑制されたが、約75%の阻害に止まった。

## 総括 および 結論

カビの生産する *pectinase* は工業的利用目的に適した性質を有することから多くの研究者により取り扱われている。著者がここに取り上げた *Aspergillus niger* のアデニン要求株 U20-2-5 は *pectinase* を多量に生産し、かつ本菌株は当研究室で種々の加水分解酵素生産の解析に用いられその性質がよくわかっている。この利点を生かして、従来は現象面の把握に留まり勝ちであった *pectinase* 生産の解析を生理学的および動力学的の両面から行ったのが本論文であり、ここで得られた結果は次のように総括結論される。

第1章では *A. niger* U20-2-5 による *polygalacturonase* の生産条件を検討し、炭素源としてペクチン、ペクチン酸あるいはガラクトuron酸が必須であり、窒素源としてポリペプトンが有効であることを認めた。また、グルコースをはじめとする他の糖質炭素源は *inducer* として無効であるばかりでなく、ペクチン存在下での *polygalacturonase* 生産を著しく阻害することを認めた。

培養液の DEAE-セファデックス A-50 による分画によって、ペクチンを誘導基質とする半合成培地で生産された *polygalacturonase* はいずれもエンド型の加水分解酵素である3成分からなり、各成分は培養経過中ほぼ平行して生産されるとの結論を得た。上述の3成分の酵素化学的性質および作用様式にはかなりの差異があり、一部成分間に相

乗作用のあることが認められた。また、種々誘導条件下で生産された *polygalacturonase* は、その成分酵素の含量比に著しく相違があることを明らかにした。

第2章では、*polygalacturonase* 生産が約30 mM のグルコースにより著しく阻害され、これが *polygalacturonase* 反応あるいは酵素の分泌の阻害によるものではなく、*catabolite repression* によるものであることを認めた。グルコースによる *catabolite repression* は可逆的でありグルコース除去と共に *polygalacturonase* 生産は再開されたが、この生産はシクロヘキシイミドにより阻害された。以上の実験からグルコースは *proenzyme* の活性化を阻害するものではないことが明らかにされた。アクチノマイシン  $S_3$  添加により RNA 合成を阻害しても *polygalacturonase* 生産は一定時間継続されたが、この継続時間は低温ほど長時間であった。しかしながらグルコース添加では、22~30℃ の測定範囲ではいずれの培養温度でも生産は速かに停止し、ペプチド合成阻害剤シクロヘキシイミドと類似の阻害様式を示した。また、アクチノマイシン  $S_3$  存在下での *polygalacturonase* 生産および脱誘導過程における *polygalacturonase* 生産はいずれも、グルコース添加によって速かに抑制された。以上の結果から、*A. niger* U20-2-5 における *polygalacturonase* のグルコースによる *catabolite repression* は *translation* を阻害することが明らかにされた。脱誘導過程においてグルコースを添加し *translation* を阻害すると、*polygalac-*



turonase 生成系 (mRNA) の崩壊が阻害され著しく安定化されることを示す実験結果を得たが、グルコース存在下で誘導菌体を inducer と共に振盪しても polygalacturonase 生成系の増加は見られなかった。mRNA の崩壊を阻害するという点で類似の作用を持つシクロヘキシミドにより蛋白合成を阻害すると polygalacturonase 生成系の蓄積が認められた。同様の結果は、誘導菌体の脱誘導過程においても認められたことより、上述の結果はグルコースによって transcription が阻害されたためであると考えられた。以上の結果を総合し、*A. niger* U20-2-5 における polygalacturonase のグルコースによる catabolite repression は transcription と translation の両レベルで阻害されていると結論された。

第3章では、ペクチンを誘導基質とする半合成培地での polygalacturonase 生産は典型的な nongrowth-associated 型を示し増殖相で殆んど polygalacturonase を生産しないのに対し、ガラクトuron酸を誘導基質とすると増殖相でも著量の polygalacturonase を生産することを認めた。後者の増殖相での polygalacturonase 生産経過を動力学モデル式により解析した結果、増殖に伴う repression (anabolite repression) に関する項の係数は0であった。ペクチン培地の増殖停止期に種々濃度のアデニンを添加した shift-up 実験で比酵素生産速度  $\epsilon$  と比増殖速度  $\mu$  が正相関を示したことから、polygalacturonase 生産は増殖に伴う repres-

sion を受けないことが明らかとなった。さらに、ペクチンとガラクトン酸の *polygalacturonase* 誘導の時間経過の比較から、*catabolite repression* と誘導物質に固有の誘導 lag が *polygalacturonase* の生産型を支配する重要な因子となり得ることを認めた。脱誘導実験から、*polygalacturonase* 生成系が非常に安定であり、その崩壊速度定数は  $0.14 \text{ hr}^{-1}$  と推定された。この値は動力学モデル式による解析から得られた値とよく一致した。*Polygalacturonase* 生成系の高度の安定性が非増殖相での生産持続の主要因であると考えられた。以上の結果から、*catabolite repression* のない理想的な培養系においては *polygalacturonase* 生成系は増殖に正相関して合成され、既存の生成系は一分子的に崩壊するという極めて単純な生産型を示し、酵素生成系の高度な安定性のため非増殖相でも *polygalacturonase* 生産が長時間持続すると結論された。

*Soybean meal* 等を主体とする天然培地ではグルコース等の *catabolite repression* を起こす糖類が存在するにも拘らず、ガラクトン酸を誘導基質とした半合成培地での培養経過と同様の理想的な生産型を示すことが動力学的解析より明らかにされた。

第4章では、天然培地ではグルコース存在下でも著量の *polygalacturonase* が生産される要因について検討を加え、この要因が天然培地の成分である大豆中に存在する有効物質にあり、その有効物質は  $121^\circ\text{C}$ 、30分間の加圧熱水

抽出により可溶化されることを明らかにした。この大豆抽出液をペクチン培地に添加した培養によって検討した結果、大豆抽出液から *catabolite repression* の原因物質である糖類を除去すると *polygalacturonase* の生産速度が上昇することを認めた。以上の結果から、天然培地ではグルコース存在下でも増殖相で著量の *polygalacturonase* が生産される要因の1つが、大豆中に存在する誘導能の高い *inducer* にあることが示唆され、天然培地での *polygalacturonase* 生産は、完全ではないが、相対的に *catabolite repression* を受けたレベルのものであることが示された。

# 文 献

- 1) Aspinall, G.O., Fanshawe, R.S. : J. Chem. Soc., 4215 (1961).
- 2) Stoddart, R.W., Barrett, A.J., Northcote, D.H. : Biochem. J., 102, 194 (1967).
- 3) 斎藤 : 農化, 28, 814 (1954).
- 4) Endo, A. : Agr. Biol. Chem., 28, 535 (1964).
- 5) Endo, A. : Agr. Biol. Chem., 28, 543 (1964).
- 6) Endo, A. : Agr. Biol. Chem., 28, 551 (1964).
- 7) Mill, P.J., Tuttobello, R. : Biochem. J., 79, 57 (1961).
- 8) 辻坂, 奥村, 竹西, 岡田 : 醸工, 51, 464 (1973).
- 9) Phaff, H.J., Demain, A.L. : J. Biol. Chem., 218, 875 (1956).
- 10) Patel, D.S., Phaff, H.J. : Food Res., 23, 693 (1958).
- 11) Patel, D.S., Phaff, H.J. : Food Res., 25, 47 (1960).
- 12) 梶 : 農化, 27, 699 (1953).
- 13) 梶, 宍吹 : 農化, 29, 775 (1955).
- 14) Nagel, C.W., Vaughn, R.H. : Arch. Biochem. Biophys., 93, 344 (1961).
- 15) Ayres, A., Dingle, J., Phipps, A., Reid, W.W., Solomons, G.L. : Nature, 170, 834 (1952).
- 16) Schubert, E. : Nature, 169, 931 (1952).
- 17) Kimura, H., Uchino, F., Mizushima, S. : J. Gen. Microbiol., 74, 127 (1973).
- 18) Luh, B.S., Phaff, H.J. : Arch. Biochem. Biophys., 51, 102 (1954).

- 19) Patal, D.S., Phaff, H. J. : *J. Biol. Chem.*, 234, 237 (1959).
- 20) Nasuno, S., Starr, M.P. : *J. Biol. Chem.*, 241, 5298 (1966).
- 21) Kimura, H., Mizushima, S. : *Agr. Biol. Chem.*, 37, 2589 (1973).
- 22) 畑中, 小沢 : *農化*, 43, 77 (1969).
- 23) 畑中, 小沢 : *農化*, 43, 764 (1969).
- 24) Nagel, C.W., Anderson, M.M. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 112, 322 (1965).
- 25) Nagel, C.W., Hasegawa, S. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 118, 590 (1967).
- 26) 岡本, 畑中, 小沢 : *農化*, 38, 237 (1964).
- 27) MacMillan, J. D., Phaff, H. J., Vaughn, R. H. : *Biochemistry*, 3, 572 (1964).
- 28) Hatanaka, C., Ozawa, J. : *Agr. Biol. Chem.*, 34, 1618 (1970).
- 29) Moran, F., Nasuno, S., Starr, M.P. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 125, 734 (1968).
- 30) Moran, F., Starr, M.P. : *Eur. J. Biochem.*, 11, 291 (1969).
- 31) Hsu, E. J., Vaughn, R. H. : *J. Bacteriol.*, 98, 172 (1969).
- 32) Kimura, H., Mizushima, S. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 20, 33 (1974).
- 33) Jacob, F., Monod, J. : *J. Mol. Biol.*, 3, 318 (1961).
- 34) Jacob, F., Monod, J. : *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 26, 193 (1961).
- 35) Deuel, H., Stutz, E. : *Advances in Enzymology*, 20, 341 (1958).
- 36) Fogarty, W.M., Ward, O.P. : *Process Biochem.*, 7, August, 13 (1972).

- 37) Swangard, W. M. : *The Pectic Substances*, p. 378, N. Y. Interscience Publishers Inc. (1951).
- 38) Phaff, H. J. : *Arch. Biochem.*, 13, 67 (1947).
- 39) 朝井, 奇藤 : *農化*, 26, 381 (1952).
- 40) Tuttobello, R., Mill, P. J. : *Biochem. J.*, 79, 51 (1961).
- 41) Yamasaki, M., Yasui, T., Arima, K. : *Agr. Biol. Chem.*, 30, 142 (1966).
- 42) Mukherjee, S. K., Majumdar, S. K. : *J. Ferment. Technol.*, 49, 759 (1971).
- 43) 黒田, 照井 : *醜工*, 38, 366 (1960).
- 44) McComb, E. A., McCready, R. M. : *Anal. Chem.*, 24, 1630 (1952).
- 45) Magasanik, B. : *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 26, 249 (1961).
- 46) Yamane, K., Suzuki, H., Hirotsani, M., Ozawa, H., Nishizawa, K. : *J. Biochem.*, 67, 9 (1970).
- 47) Epps, H. M. R., Gale, E. F. : *Biochem. J.*, 36, 619 (1942).
- 48) Neidhardt, F. C. : *J. Bacteriol.*, 80, 536 (1960).
- 49) Nakada, D., Magasanik, B. : *J. Mol. Biol.*, 8, 105 (1964).
- 50) Loomis Jr., W. F., Magasanik, B. : *J. Mol. Biol.*, 23, 487 (1967).
- 51) Perlman, R., Pastan, I. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 30, 656 (1968).
- 52) Perlman, R., Pastan, I. : *J. Biol. Chem.*, 243, 5420 (1968).
- 53) Ullman, A., Monod, J. : *FEBS letters*, 2, 57 (1968).
- 54) Makman, R. S., Sutherland, E. W. : *J. Biol. Chem.*, 240, 1309 (1965).

- 55) Perlman, R.L., de Crombrughe, B., Pastan, I. : *Nature*, 223, 810 (1969).
- 56) Silverstone, A., Magasanik, B., Resnikoff, W.S., Miller, J.E., Beckwith, J.R. : *Nature*, 221, 1012 (1969).
- 57) Zubay, G., Schwartz, D., Beckwith, J. : *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 66, 104 (1970).
- 58) Emmer, M., de Crombrughe, B., Pastan, I., Perlman, R. : *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 66, 480 (1970).
- 59) de Crombrughe, B., Chen, B., Anderson, W., Nissley, P., Gottesman, M., Pastan, I., Perlman, R. : *Nature new Biol.*, 231, 139 (1971).
- 60) Pastan, I., Perlman, R.L. : *J. Biol. Chem.*, 244, 2226 (1969).
- 61) Moses, V., Yudkin, M.D. : *Biochem. J.*, 110, 135 (1968).
- 62) Yudkin, M.D., Moses, V. : *Biochem. J.*, 113, 423 (1969).
- 63) Aboud, M., Burger, M. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 38, 1023 (1970).
- 64) Aboud, M., Burger, M. : *Biochem. J.*, 122, 219 (1971).
- 65) Van Wijk, R., Ouwehand, J., Van den Bos, T., Koningsberger, V.V. : *Biochem. Biophys. Acta*, 186, 178 (1969).
- 66) Nishizawa, T., Suzuki, H., Nishizawa, K. : *J. Biochem.*, 71, 999 (1972).
- 67) Schmidt, G., Tannhauser, J. : *J. Biol. Chem.*, 161, 83 (1945).
- 68) Schneider, W.C. : *J. Biol. Chem.*, 164, 747 (1946).
- 69) Furukawa, M., Inoue, A., Asano, K., Kawamata, J. : *J. Antibio.*, 21, 568 (1968).

- 70) Schneider, R.P., Wiley, W.R. : J. Biol. Chem., 216, 4784 (1971).
- 71) Cybis, J., Weglenski, P. : Eur. J. Biochem., 30, 262 (1972).
- 72) Both, G.W., McInnes, J.L., Hanlon, J.E., May, B.K., Elliott, W.H. : J. Mol. Biol., 67, 199 (1972).
- 73) Jacquet, M., Kepes, A. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 36, 84 (1969).
- 74) Ramírez, J.M., Conde, F., Del Campo, F.F. : Eur. J. Biochem., 25, 471 (1972).
- 75) Yudkin, M.D. : Biochem. J., 114, 307 (1969).
- 76) 小川, 河原, 照井 : 日本醱酵工学会大会講演要旨集, p. 173 (1968).
- 77) Shinmyo, A., Mitsuhashi, K., Terui, G. : J. Ferment. Technol., 50, 647 (1972).
- 78) Fan, P.D., Higa, A., Levinthal, C. : J. Mol. Biol., 8, 210 (1964).
- 79) Nakada, D., Fan, P.D. : J. Mol. Biol., 8, 223 (1964).
- 80) Lindahl, L., Forchhammer, J. : J. Mol. Biol., 43, 593 (1969).
- 81) Williamson, A.R., Sweet, R. : J. Mol. Biol., 11, 358 (1965).
- 82) Dobrogosz, W.J. : J. Bacteriol., 97, 1083 (1969).
- 83) Sato, T., Aida, K., Uemura, T. : J. Gen. Appl. Microbiol., 16, 361 (1970).
- 84) Davis, K.I., Takara, T., Shinmyo, A., Enatsu, T. : J. Ferment. Technol. (in preparation).
- 85) Zetelaki-Horvath, K., Bekassy-Molnar, E. : Biotech. Bioeng., 15, 163 (1973).



- 86) Terui, G., Okazaki, M., Kinoshita, S. : *J. Ferment. Technol.*, 45, 497 (1967).
- 87) Kinoshita, S., Okada, H., Terui, G. : *J. Ferment. Technol.*, 45, 504 (1967).
- 88) Okazaki, M., Terui, G. : *J. Ferment. Technol.*, 45, 1147 (1967).
- 89) Shinmyo, A., Okazaki, M., Terui, G. : *J. Ferment. Technol.*, 46, 1000 (1968).
- 90) 岡崎, 照井 : 醗工, 44, 276 (1966).
- 91) 岡崎, 新名, 照井 : 醗工, 43, 581 (1965).
- 92) Tsuchida, T., Nakamura, K., Fujii, Y., Takahashi, H. : *Agr. Biol. Chem.*, 32, 1355 (1968).
- 93) Tomizawa, H., Izaki, K., Takahashi, H. : *Agr. Biol. Chem.*, 34, 1064 (1970).
- 94) 佐藤, 梶 : 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.271 (1974).
- 95) 林, 内田, 福島, 荒井 : 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.62 (1964).
- 96) 内田, 福島 : 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.229 (1967).
- 97) Hsu, E. : *Abstracts of 1st Intersectional Congress of International Association of Microbiological Societies, Japan*, p.131 (1974).

## 謝 辞

この研究を行なうにあたり、終始御指導を賜った恩師  
照井堯造先生、江夏敏郎先生をはじめ、岡田弘輔先生、  
芝崎勲先生、田口久治先生、大嶋泰治先生、市川邦介先  
生、原田篤也先生、高野光男先生、高田信男先生、山田  
靖宙先生、新名惇彦先生、小川隆平先生ならびに教室員  
の方々に心から感謝致します。

また、研究の便宜を画っていただいた土井清二氏、梅  
崎良則氏、吉田信幸氏、小谷博一氏、奥村直司氏、不二  
製油 K.K. 橋田度博士に深謝致します。

本論文に關係ある主な報告

Translational Repression in the Preferential Synthesis  
of Some Mold Enzymes (I)

Journal of Fermentation Technology, 50, 655 (1972)

Process Kinetics of Polygalacturonase Production by  
Aspergillus niger

Journal of Fermentation Technology, 52, 517 (1974)

Translational Repression in the Preferential Synthesis  
of Some Mold Enzymes (II)

Journal of Fermentation Technology (in preparation)