

茸類の生化学的研究—IX

トレハロースの分解について

橋本 一哉

Biochemical Studies on the Mushroom - IX

Trehalase from *Agaricus bisporus*

KAZUYA HASHIMOTO

Trehalose was found to be the only simple sugar in the cultivated mushroom, *A. bisporus*, in which it is considered to serve as the carbon and energy reservoir.

In unripened fruiting body of *A. bisporus*, the level of trehalose is approx. 6 to 7% of the dry weight, but decrease markedly at the ripening stage of fruiting body construction. (Fig. 3)

In the present studies, the presence of trehalase activity was shown in the extract of *A. bisporus*, and the enzyme was purified from the ripe fruiting bodies of *A. bisporus* by the ammonium sulfate fractionation and acetone precipitation. (Table 1)

The enzyme is stable below 45° and in the pH range between pH 4.4 and 6.0. (Fig. 6, 7)

It has maximal activity is attained at pH 4.4 at 35° to 45° (Fig. 8, 9) and hydrolyzes trehalose to 2 equivalents of glucose quantitatively. (Table 2)

トレハロースは Basidiomycetes に普遍的に見られるが、*Agaricus bisporus* の子実体に遊離の状態で存在する唯一の disaccharide でもある。別名茸糖とも称され、マンニットと共に茸の味に関係があり、本物質の多いほど食用茸としてすぐれているとも云える。

1925年 IWANOFF¹⁾ によって Myxomycetes の一種 *Reticularia Jycoperdon* の子実体成熟中にトレハロースが消出することを見出して以来、昆虫²⁻⁴⁾、酵母⁵⁻⁷⁾、菌類^{9,10)} 等のトレハラーゼについて多くの研究が見られるが茸類についてはその報告が見られない。本報では、*A. bisporus* 子実体の完熟期にトレハロースが減少することを見出し、さらにトレハラーゼの抽出を試み、その酵素化学的諸性質について検討を行った。

実 験 方 法

1. 供 試 菌 *Agaricus bisporus* 子実体は収穫即日実験に供した。

2. 分析法 グルコースは Somogyi, Nelson の改良法¹¹⁾ トレハロースは phenol, H₂SO₄ 法¹²⁾, マンニットはクロモトローブ酸法¹²⁾, 蛋白は Folin 法¹³⁾ で卵白アルブミンから検量線を作製し比色定量を行った。
3. トレハラーゼ活性の測定 0.1 M trehalose 0.1 ml, 0.1 M 酢酸緩衝液 0.3 ml, 酵素液 0.1 ml 配合の作用液を振盪しながら反応を継続し反応終了後 5 分間沸湯水中で酵素反応を止め, 生成還元力を測定した。
4. 酵素力価 pH 4.4, 温度 40°C で15分間酵素反応を行い上記作用液中に 0.1 μmol のグルコースを遊離する酵素量を 1 unit とした。

実験結果および考察

1 *A.bisporus* の経時的变化

a 子実体の生長曲線

室内温度 10±5°C にて発生した子実体の高さとうの径を24時間毎に測定した結果を Fig. 1 に示した。菌糸束より子実体原基の発生は肉眼的に観察出来ないので、覆土上にピンヘッドとして発生後実験を開始した、また子実体の veil の破れた日を完熟日と仮定してこれを 0 日と

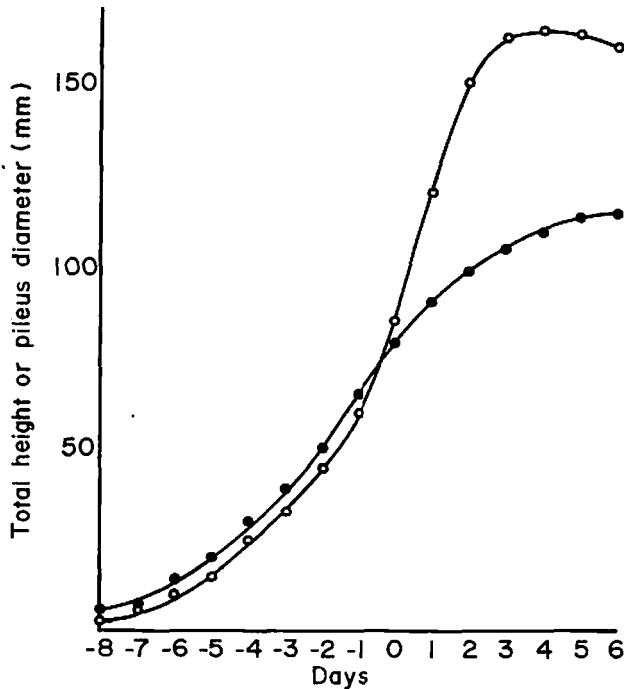


Fig. 1 Growth curves of fruit-body of *Agaricus bisporus*

●—● Total height
○—○ Diameter

定めた。

ピンヘッドが発生して完熟日に至るまでは子実体の高さや径は並行的に増加するが、完熟後は径が急速に増加し4日後最大となり、その後 pileus の gill 面が上部に反転し見かけ上径は減少し暗褐色さらに黒変し、枯死する。

b 子実体の水分

Fig. 2 に示すように pileus の水分含量は-4日以後は一定の比(91.5%)を示したが、stipe は0日後は低下した。即ち pileus が生理的に重要な役割を果す上で一定の水分を要求していることを暗示させる。

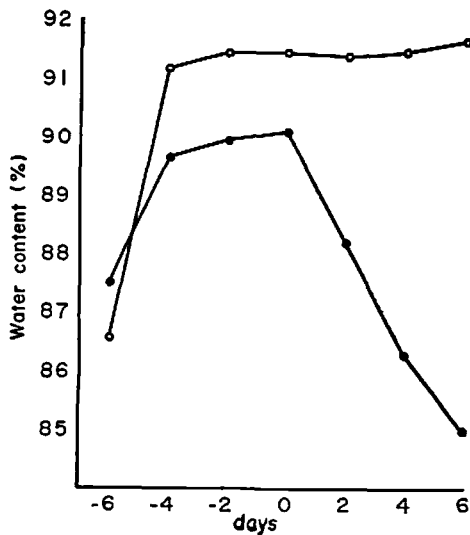


Fig. 2 Changes in the water content of fruit body of *Agaricus bisporus* during growth
Stipe ●—● Pileus ○—○

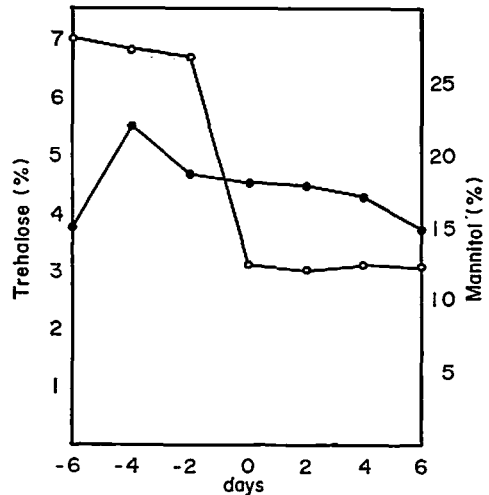


Fig. 3 Changes in trehalose and mannitol content of fruit body during growth
Trehalose ○—○
Mannitol ●—●

c 子実体のトレハロースとマンニット

Fig. 3 に示すように、マンニットは完熟日前後の変化は殆ど見られないが、トレハロースは子実体が完熟日に達すると約1/2量に減少した、完熟日に消費されることから、エネルギー源として生理的な役割を果していることを暗示させる。完熟日に達した子実体よりトレハラーゼを抽出し、その性質について検討した。

2 トレハラーゼの精製

完熟期を経過した子実体 200 g に等量の氷冷した 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.4) を加えて磨砕し氷室で2時間抽出、木綿布で濾過後遠心分離 (8,000 rpm, 15 min) 上澄液 100 ml に粉末硫酸 54 g

Table 1 Purification of Trehalase

Step	Volume ml	Unit	Protein mg	Specific activity units/mg	Recovery %
Crude extract	120	105.0	396	0.27	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	30	75.5	93	0.81	71.9
Acetone	8	24.7	12	2.06	23.5

を攪拌しながら徐々に添加して1時間氷室に放置する、生成した沈澱は遠心分離 (12,000 rpm, 15 min) により集め、少量の 0.1 M 酢酸緩衝液に溶解して、5°C で上記緩衝液を数回更新しながら1夜透折を行い、透折内液と同量の -20°C に冷却した acetone を攪拌しつつ徐々に添加し、生成した沈澱を遠心分離 (12,000 rpm, 10 min) により集め、少量の上記緩衝液に溶解して、1夜透折を行った。

当部分精製の各操作過程における酵素活性および比活性は Table 1 に示した。

3 トレハラーゼの酵素化学的性質

上記の部分精製酵素を用いて、各性質について検討した。

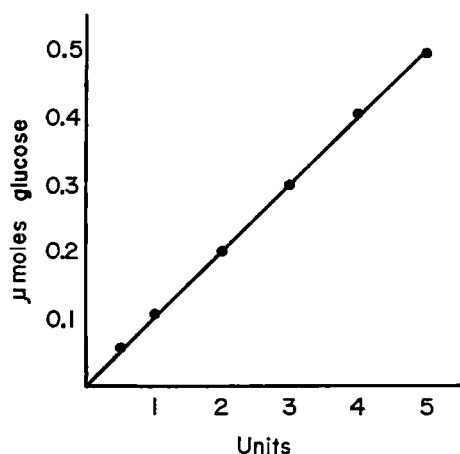


Fig. 4 Correlation between Enzyme Units and amounts of glucose produced from trehalose

1) 酵素作用と酵素濃度の関係

各酵素量に対する生成グルコース量は Fig. 4 に示すように直線性を示し、酵素量と活性は比例した。

2) 反応時間と生成グルコース量の関係

所定の時間反応させた時生成されるグルコース量は、Fig. 5 のように30分まで直線性を

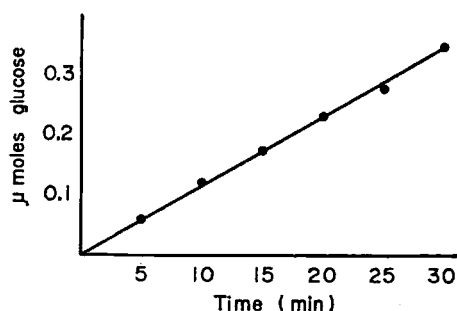


Fig. 5 Time course of the enzymic reaction

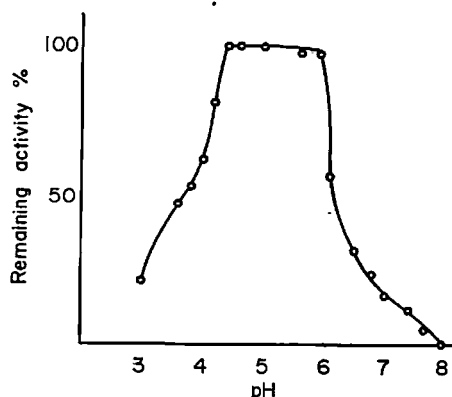


Fig. 6 pH stability of trehalase

示した。

3) 酵素の安定性におよぼす pH 値の影響

0.1 ml の 3 単位の酵素液を 0.1 ml の 0.1 M 酢酸緩衝液または 0.1 M 磷酸緩衝液と混合し、37°C で 24 時間放置した後、残存酵素力を測定した結果は Fig. 6 に示すように、当酵素は pH 4.4~6.0 の間では安定であるが、それ以外の pH 域では容易に失活した。

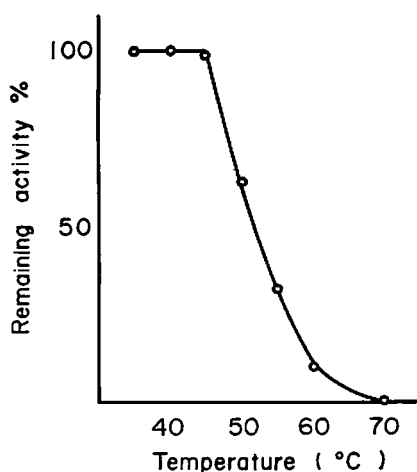


Fig. 7 Heat stability of trehalase

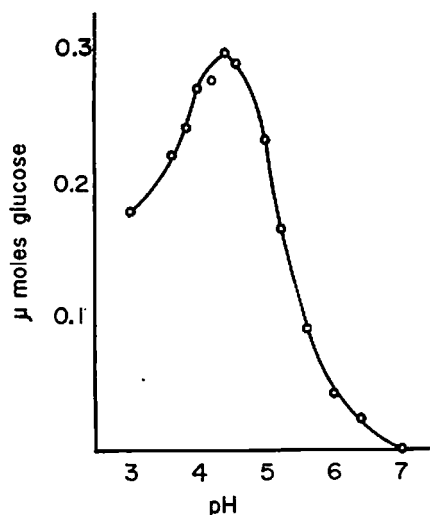


Fig. 8 pH optimum curve

4) 酵素の安定性におよぼす温度の影響

酵素液と 0.1 M 酢酸緩衝液の混液 (pH 4.4) を種々の温度で 5 分間加熱処理し急冷後、残存酵素力を測定した。その結果は Fig. 7 に示すように、45°C 以下では安定であるがそれ以上では次第に不安定となり 70°C では完全に失活した。

5) 最適 pH と最適温度

Fig. 8, Fig. 9 にそれぞれ示すように、当酵素の活性は pH 4.4 の時最適を示した。また pH 4.4 においてその最適温度は 40°C 附近であった。

6) 酵素反応の化学量論的検討

種々の濃度のトレハロース、3 単位の酵素および 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.4) にて全量を 0.5 ml とし 40°C で 30 min および 60

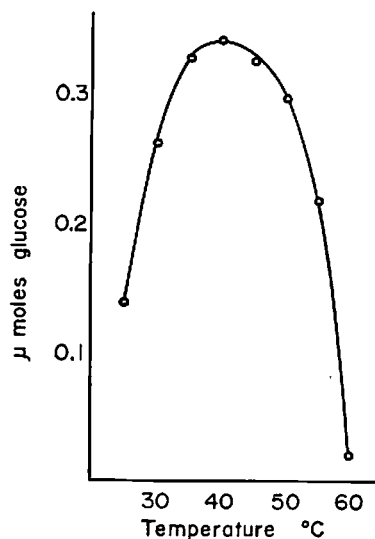


Fig. 9 Temperature optimum curve

Table 2 Stoichiometry of trehalase reaction

Trehalose added	μ mole Glucose formed after incubation for	
	30 min.	60 min.
μ mole	μ mole	
0.05	0.09	0.09
0.08	0.16	0.16
0.10	0.20	0.19
0.20	0.41	0.40

Table 3 Comparison of some properties of trehalase preparations from *Agaricus bisporus* and other origins

Origin	Opt. pH	Opt. temp.	Stabilities
<i>Galleria mellonella</i> ²⁾	5.5	—	Stable at 0°C for 1 month
<i>Phormia regina</i> ³⁾	5.6	45°C	Unstable at 55°C
<i>Aspergillus oryzae</i> ¹⁰⁾	4.0	—	Unstable at 60°C for 5 min
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ⁷⁾	5.7	45-50°C	Unstable at 55°C
<i>Agaricus bisporus</i>	4.4	35-45°C	Inactivated at 70°C for 5 min

min反応し、それぞれ生成されたグルコース量は Table 2 に示すように、トレハロースから 2 当量のグルコースを生成した。

種々の生物起源によるトレハラーゼと当酵素の性質を比較すると Table 3 に示すように *Agaricus bisporus* の最適 pH は昆虫類のトレハラーゼより低い値を示し *A. oryzae* とほぼ一致した。

要 旨

1. 子実体の生長期間を通じて pileus の水分含量は一定であるが stipe では完熟後は減少した。
2. マンニットは 15-20% を示した、トレハロースは 3-7% で完熟期に急速に消費された。
3. マッシュルームトレハラーゼは pH 4.4、温度 35~45°C に最適を示した。
4. 当酵素の pH に対する安定性は 4.4~6.0 であり、温度に対する安定性は 45°C、5 分の処理では影響はないが、50°C 以上では急速に不安定となり、70°C で完全に失活した。

5. 化学量論的にはトレハロースは当酵素で加水分解されて、2 当量のグルコースを生成した。

以上貯蔵物質として子実体中に存在するトレハロースは子実体の成熟と共に共存するトレハラーゼにより分解されて胞子形成、その重要な生理作用に必要なエネルギー源として供給されるものと推察される。

終りに臨み、本研究に御協力された岡信子さん、篠木豊秋、今村英市氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) IWANOFF, N.N., *Biochem. Z.*, 162, 455 (1925).
- 2) KALF, G.F., and RIEDER, S.V., *J. Biol. Chem.*, 230, 691 (1958).
- 3) FRIEDMAN, S., *Arch. Biochem. Biophys.*, 87, 252 (1960).
- 4) SAITO, S., *J. Biochem.*, 48, 101 (1960).
- 5) CABIB, E., and LELOIR, L.F., *J. Biol. Chem.*, 231, 259 (1958)
- 6) PANEK, A., *Arch. Biochem. Biophys.*, 98, 349 (1962).
- 7) — *J. Biol. Chem.*, 239, 1671 (1964).
- 8) HILL, E.P., and SUSSMAN, AS., *Arch. Biochem. Biophys.*, 102, 389 (1963).
- 9) — — *J. Bact.*, 88, 1556 (1964).
- 10) HORIKOSHI, K., *J. Bact.*, 91, 1883 (1966).
- 11) WHISTLER, R.L., and WOLFROM, M.L., "Methods in Carbohydrate Chemistry" Vol.1
New-York and London Acad. press., p386 (1962).
- 12) 橋本, 磯部, 高橋, 本誌 8, 395 (1968).
- 13) 赤堀四郎編 "酵素研究法" 朝倉 Vol. 1. p 164 (1955)