

茸類の生化学的研究 XIV

Pholiota cellulase による分解生成物 4

橋 本 一 哉

Biochemical Studies on the Mushroom XIV

Hydrolytic products from cellulosic substances by *Pholiota cellulase*-4

Kazuya Hashimoto

The mode of cellulase action has been studied by the analysis of the intermediates and products of the hydrolysis of cellulose powder, carboxymethyl cellulose and cellooligosaccharides.

Charcoal chromatographic examination of the products from hyom hydrolysis of the cellulosic substances indicated that cellobiose was the major hydrolytic product. but also it was recognized that the amount of glucose increased gradually with time.

With cellulose column chromatography, the crude enzyme preparation was separated into three main components for saccharifying activities toward carboxymethyl cellulose.

The first and third cellulase component eluted contained β -glucosidase and filter paper degrading activity respectively. but the second was shown to be free from those activities.

前報¹⁾において、*Pholiota nameko* は強い carboxymethyl cellulase 活性を有し、同時に基質特異性の異なる、ろ紙崩壊活性や植物組織崩壊活性をも認めたので cellulase components の分離を試み、cellulose powder, CMC および cellulose に由来するオリゴ糖に対する作用様式について検討した結果 cellulase の酵素的分解機構は、いわゆる Reese²⁾ らの提唱する C₁-C_x 説に従うものと考えられた。

実 験 方 法

1. 酵素液の調製

Pholiota nameko を12日間培養したろ液より前報¹⁾のように調製した粉末酵素を 0.1 M acetate buffer (pH 4.5) で 0.1% に溶解した。

2. 酵素活性測定法

作用条件は pH 4.5, 40°C とした。

- a. Cx 活性および β -glucosidase 活性は前報^{1,3)}に従った。
- b. ろ紙崩壊活性は東洋ろ紙 No. 51A (1×1cm) 2枚を酵素液 5ml と共に L型管に入れて、前報³⁾に従って 60 分間振盪し、残存ろ紙の面積より崩壊率を算出した。

3. Celooligosacchrides の調製

Miller⁴⁾らの方法に従って、粉末ろ紙を塩酸で部分加水分解し、中和後炭素カラムを用いて、cellobiose, cellotriose, cellotetraose および cellohexaose を分離調製した。基質として各々 0.1% 溶液を使用した。

4. 炭素カラムクロマトグラフィー

粒状活性炭 (和光) を使用し、真空侵潤した後、カラム (1.2×18cm) を調製し 100 ml の conc. HCl で洗浄、水洗を行い Cl⁻ の反応がなくなった後、試料をカラムに吸着させて、水から 5% のエタノールに切り換え、ついで 10%, 15%, 20%……40% と stepwise elution 法により溶出した。各 fraction は 10ml 宛集めて、phenol-H₂SO₄ 法により糖量を glucose として測定し、paper chromatography により同定した。

5. Cellulose powder カラムクロマトグラフィー

粉末ろ紙 (東洋ろ紙 100~200mesh) を水洗、微粒子を decanting にて除いた後、0.1M acetate buffer (pH 3.6) で縮衝化した後、カラム (1.2×25cm) を調製し酵素 5ml (500mg を同上の buffer に溶解) をカラム上端に加えて 30 分間吸着させた後に 0.1M acetate buffer (pH 5.6) 200 ml, 続いて蒸留水 200ml を用い流出速度 1ml/min で溶出、フラクションコレクターで 5ml 宛採取した。

実 験 結 果

1. Cellulose 関連物質に対する作用

各基質に対する特異性を比較するために、水解生成物の炭素カラムクロマトグラフィーを行った。CMC および cellulose powder に対する反応時間と水解生成物の関係を Table 1 に示し、基質 10mg 当りの分解生成物 (as mg glucose) として表示した。

CMC を基質とした場合、10 分反応後すでに G₃ 以下のオリゴ糖を認めた。30 分反応後で G₃, G₄ および G₅ が減少し、120 分反応後では G₁ と G₂ を検出し経時的に G₁ および G₂ の増加が認められた。

不溶性の cellulose powder に対する活性も認められ、水解生成物として G₁, G₂ および高重合度のオリゴ糖類を認めたが、G₁ と G₂ 以外は微量であった。更に 480 分反応後も添加基質に対して約 2% の分解率を示したにすぎなかった。

cellohexaose, cellopentaose, cellotetraose, cellotriose および cellobiose の水解生成物をまとめて Table 2 に示した。また hexaose の 60 分および 120 分後の水解生成物について炭素カラムクロマ

Table 1 Hydrolytic products from cellulosic substances

Substrate	Time of incubation (min)	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅	Degradation %
C M C	10	1.82	4.01	1.04	0.57	0.30	77.4
	30	2.84	5.19	0.29	0.24	+	85.6
	120	3.32	5.82	—	—	—	91.4
Cellulose powder	60	0.04	0.07	+	+	+	1.1
	480	0.05	0.14	+	+	+	1.9

as mg glucose

Table 2 Hydrolytic products from various cellooligosaccharides

Substrate	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅	Degradation %
Hexaose	1.26	5.74	0.63	1.75	—	93.8
Pentaose	1.15	5.94	1.44	0.71	—	92.4
Tetraose	1.76	7.61	0.39	(0.12)		97.6
Triose	0.54	0.50	(8.13)			10.4
Biose	1.20	(8.74)				12.0

as mg glucose

トグラフィーによって分別したパターンの一例を Fig. 1 に示した。

各オリゴ糖の分解率は hexaose, pentaose および tetraose が 90% 以上を示したが triose と biose は 10% 程度で両オリゴ糖に対する活性は低かった。このことから重合度の低いオリゴ糖に対する水解は困難であると推定出来る。G₄ 以上のオリゴ糖からはいずれも cellobiose の生成が最も多かった。

hexaose, pentaose および tetraose からの生成糖量の関係はそれぞれ G₂ > G₄ > G₁ > G₃, G₂ > G₅ > G₁ > G₄, G₂ > G₁ > G₃ の順序であった。

hexaose は中央部と両端の結合がまた pentaose は両端の結合が水解されにくく, tetraose は両端のいずれの結合よりも中央部の結合を水解し易いという特性を認めた。

2. Cellulose powder に対する Pholiota cellulase の吸着性

Cellulase が cellulose 分子に作用して加水分解が進行する条件として, 先ず酵素が基質である cellulose 分子の表面に物理的に吸着される必要があると仮定して, cellulose powder に対する吸着性を測定した。

1% 酵素液 2.5ml, cellulose powder 500mg, Macllvain buffer 2.5ml を共検試験管に採り,

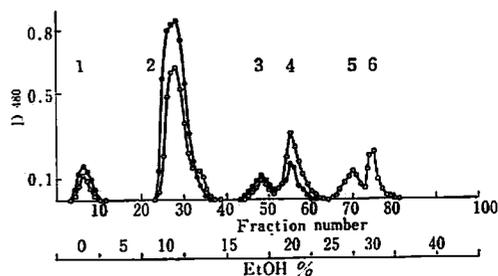


Fig. 1 Chromatographic Separation of hydrolytic products from cellohexaose

○—○ 60min ●—● 120min

室温で30分間振盪(200rpm)後、遠心分離を行い未吸着部の cellulase 残存量を Cx 活性で表示した。Fig. 2 に示すように pH3 においては92%吸着されたが、pH6 で最も弱く43%を示した。また吸着した Cx 活性は蒸溜水で容易に離脱することを認めた。

3. Cellulose powder による cellulase components の分別

Cellulose powder に対する吸着性を利用して各成分の分別を行い Fig. 3 に示した。0.1 M acetate buffer で溶離を行うと明確に2つの Peak (1,2) に分離した。5~12 の fraction (Peak 1) は Cx のほかに β -glucosidase 活性が混在したが、28~37 の fraction (Peak 2) は Cx だけを含み、続いて蒸溜水で溶離した46~53の fraction (Peak 3) はろ紙崩壊活性(C_1)を混在し白濁を呈した。

Peak 2 は Cx 活性だけを有する less random な成分であったが、salicin や cellulose powder だけに特異的な成分を単離することは出来なかった。

4. 各成分による CMC 水解生成物の分別

各 cellulase components (Peak 1, 2 および 3) の内 Peak 2 は Cx 活性だけを示したが、他の2成分は β -glucosidase また C_1 を混在した。これら3成分の作用特異性を比較するために CMC を基質として120分間作用させた水解生成物を Table 3 に示した。

CMC の分解率は Peak 1 が最も高く約87%、Peak 2、Peak 3 はそれぞれ43%、60%を示した。水解生成物に占める cellobiose の割合はいずれも約60%に達し cellulose 分子鎖の末端から2分子

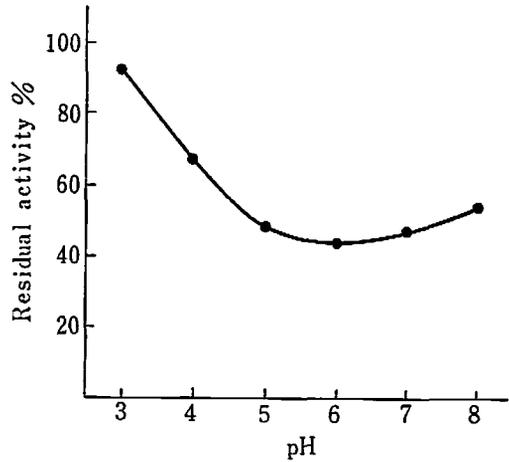


Fig. 2 Absorption of Cx activity on cellulose

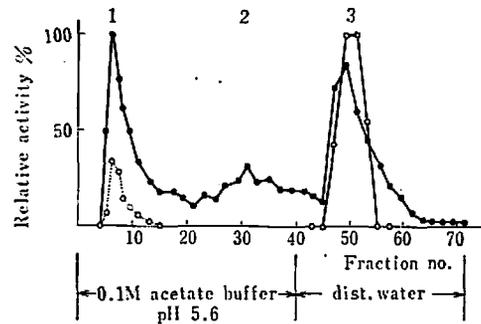


Fig. 3 Fractionation of pholiota nameko cellulase with cellulase column

○—○ C_1 ●—● Cx
○····○ β -glucosidase

Table 3 Hydrolytic products by some fractions of Pholiota cellulase

Fraction	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅	Degradation %
Peak 1	2.43	5.14	0.55	0.52	0.07	87.1
Peak 2	0.18	2.87	0.48	0.44	0.37	43.4
Peak 3	0.49	4.46	0.62	0.30	0.08	59.5

as mg glucose

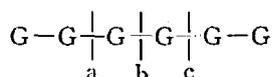
ずつ水解されることを暗示した。

β -glucosidase 活性を含まない Peak 2 と Peak 3 によっても glucose の生成が認められたが、おそらく分解過程における glucosyl 残基と考えられる。しかし、その量は Peak 1 に比較して少く CMC の水解には Cx と β -glucosidase の共存がより効果的であることを暗示した。

考 察

Pholiota nameko の cellulase は基質特異性の異なった数種類の成分の混合物であろうと推定される。biose や triose に対する活性は低く、それよりも重合度の大きな少糖類や可溶性 cellulose 誘導体に対する活性が高いことを認めた。また不溶性の cellulose powder に対する活性は低く、おそらく cellulose 分解の最初の step が最も遅く行われるものと推定される。

水解生成物として、多くの cellobiose を生ずるので高重合度の cellulosic substance から cellobiose 単位で分解することを推定した。例えば、60 分間作用後の cellohexaose からの水解生成物である tetraose, triose biose の生成比は 1 : 0.3 : 3 を示したが、



上図において、a と c の結合における被水解度の頻度が等しいものとしても b 結合における水解が著るしく困難であると推定出来る。

要 約

Ppholiota nameko の生産する cellulase の作用様式を cellulose powder, CMC および少糖類中間生成物から検討した。その結果、triose, cellobiose および不溶性の cellulose powder に対する活性は低く、tetraose 以上の少糖類や可溶性の cellulose 誘導体には作用し易く、少量の glucose の他は圧倒的に cellobiose を生成した。このことから、cellulosic substance を cellobiose 単位で水解するものと推定した。

cellulose powder を用いたカラムクロマトグラフィーでは CMC 糖化力を有する 3 成分に分離したが、Peak 2 は Cx 活性のみを有する区分と考えられたが Peak 1 および 3 はそれぞれ β -glucosidase や C₁ を混在し単独の活性を有する成分を得ることは出来なかった。Cx 活性は β -glucosidase と共存した時に活性が高まった。

本研究を行うに当たって終始有益なご教示を賜った高橋善次郎先生に深く感謝の意を表する。

文 献

- 1) 橋本：本誌, 10, 163, (1972)
- 2) E. T. Reese, R. G. H. Siu and H. S. Levinson : *J. Bacteriol.*, 59, 485 (1950).
- 3) 橋本：本誌, 10, 175, (1972)
- 4) G. L. Miller, J. Dean and R. Blum : *Arch. Biochem. Biophys.* 91, 21 (1960).