

Aspergillus niger 以外に配糖化機能を有する β -キシロシダーゼ産生微生物は存在するか

篠山浩文・角谷順子・藤井貴明
(微生物工学研究室)

Existence of Microorganisms Similar to *Aspergillus niger* Producing β -Xylosidase with Transxylosyl Function

Hirofumi SHINOYAMA, Yoriko KADOYA and Takaaki FUJII
(Laboratory of Microbial Engineering)

ABSTRACT

We isolated xylan-degrading microorganisms from soils and studied reactions and transxylosyl function of β -xylosidases from them in the presence of organic solvents. A few microorganisms, for example *Penicillium* sp. 9201, produced β -xylosidases with stability and transxylosyl function in the presence of organic solvents similar to *Aspergillus niger* β -xylosidase.

緒 言

微生物の産生する糖質分解酵素群の一部にアルコールやケトン類のような有機溶媒共存下で安定でアルコール類を配糖化する機能(配糖化機能)を有するものが知られている^[1,5]。このうち、著者らは *Aspergillus niger* IFO6662の産生する β -キシロシダーゼは、有機溶媒共存下において安定で、配糖化機能が強く、受容体特異性が広いため、アルキル β -キシロシドのような配糖体の合成に非常に有効な酵素であることを報告している^[5-7]。なぜ、*A. niger* β -キシロシダーゼのような糖質分解酵素が有機溶媒共存下で安定で、配糖化機能を有しているのかといったことは興味深く、これは単なる酵素の構造または基質特異性の問題なのか、種に固有の性質なのか、環境によって容易に獲得もしくは失われてしまう性質なのか知りたいところである。他方、ある種のアルコールやケトン類は植物の産生する、生物の生育阻害物質(アレロケミカルズ)として知られている^[3]。アレロケミカルズによる土壤微生物の生育阻害については、いくつか報告が見られるが^[2-4]、アレロケミカルズと土壤微生物の産生する糖質分解酵素群の関係については、ほとんど検討されていない。

以上のような背景に基づき、著者らは、糖質分解酵素群の配糖化機能が土壤生態系において意味のある反応と考え、特に、アレロケミカルズの配糖化、すなわち解毒

に関連しているのではないかといた仮説を発想するに至った。もし、この仮説が正しければ土壤には有機溶媒共存下で安定で、配糖化機能を有する糖質分解酵素を産生する微生物が多数存在するはずである。そこで、まず、本報においては、 β -キシロシダーゼに関して、有機溶媒共存下で安定で、配糖化機能を有する β -キシロシダーゼを産生する微生物が *A. niger* 以外にも土壤中に存在するのかどうかといった点を予備的に調査することを目的に、あまり植生等を考慮せずに土壤よりキシラン分解微生物を分離し、それらが産生する β -キシロシダーゼについて、その配糖化機能、有機溶媒共存下における反応性を *A. niger* と比較しながら検討したので報告する。

実験材料及び方法

1. 土壤採取地

下記に示す地点の、表層部土壤を採取し、キシラン分解微生物の分離実験に供した。

採取地：千葉大学園芸学部(松戸市)雑木林、駒形大神社(市川市)スギ林、泉自然公園(千葉市)スギ林、三石山(千葉県)雑木林、清澄山(千葉県)雑木林、東照宮境内(日光市)歩道、杉並木公園(日光市)スギ林、霧ヶ峰(長野県)歩道、蓼科(長野県)歩道、風頭公園(長崎市)歩道、しゃくなげ平(猪苗代町)草地

2. キシラン分解微生物の分離（スクリーニング）および培養方法

キシラン分解微生物の分離は、キシラン（シグマ社製）20g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0g, KH_2PO_4 4.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4g, 酵母エキス0.2g, 微量ミネラル（蒸留水500mlに NaCl 0.25g, $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 3.0g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, $(\text{NH}_4)_5\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, H_3BO_4 0.1g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.0gを溶解させたもの）2.5mlを1ℓ蒸留水中に含む寒天平板培地に、土壤懸濁液（滅菌済みの蒸留水5mlに採取してきた土壤を少量懸濁したもの）を塗抹し、28°Cにて培養した後、生じたコロニーの中から比較的生育が良好なものを分離、純化し、斜面寒天培地にて保存した。液体培養は、上述した培地30mlを100ml容三角フラスコに分注したものに斜面寒天培地における菌叢から一白金耳を接種し、28°Cにて7日間回転振盪（180 rpm）した。

3. 薄層クロマトグラフィー（TLC）による糖の検出

反応液中の糖の検出は既法^[5]で述べたTLCによる方法で行った。

4. キシロピオースまたはフェニルβ-キシロシドを基質としたときのキシラン分解微生物の培養液による反応

培養液1ml, キシロピオースまたはフェニルβ-キシロシド溶液1mlを混合し、30°C, 48時間反応後、反応生成物をTLCを使用して確認することにより検討した。

5. β-キシロシダーゼ活性の測定

β-キシロシダーゼ活性の測定は既法^[5]で述べたフェニルβ-キシロシドを基質とした方法で行った。

6. 試薬類

キシロピオースはサントリー社製のキシロオリゴ糖混合液から活性炭カラムクロマトグラフィーにより精製したものを使用した。フェニルβ-キシロシドは半井化学薬品社製の特級試薬を用いた。その他の試薬はすべて市販のものを用いた。

結果及び考察

1. キシラン分解微生物の培養液によるキシロピオースおよびフェニルβ-キシロシドに対する分解性

スクリーニングにより得られた96菌株をキシランを含む液体培地で28°C, 7日間培養した後、得られた培養液

についてキシロピオース（2%, w/v）に対する分解性を検討した。96菌株のうち糸状菌6株（9201株, 9203株, 9221株, MI-4株, NGS-8株, INS-5株）、細菌1株（INS-3株）由来の培養液が比較的高い分解性を示し、キシロピオースはほとんど残存していなかった（Fig. 1）。なお、データで示さなかったが、寒天平板培養、光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡観察により、9201, 9203, 9221株に関しては*Penicillium*属, NGS-8株に関しては*Aspergillus*属と同定したが他の菌株も含めてこれ以上の詳しい同定は行っていない。

次に上述した7菌株由来の培養液についてフェニルβ-キシロシド（2%, w/v）に対する分解性を検討した（Fig. 1）。その結果、*A. niger*と同様にフェニルβ-キ

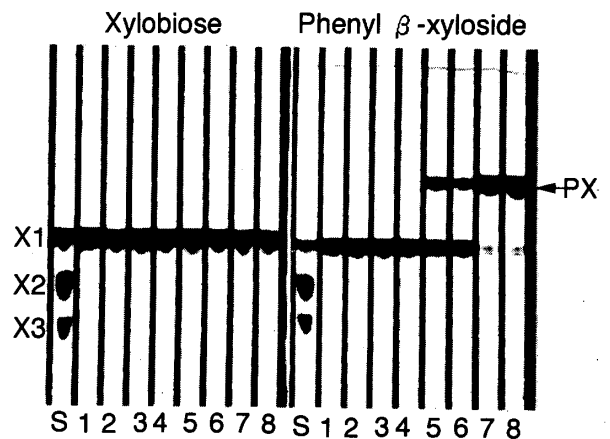


Fig. 1 Thin layer chromatogram (TLC) of reaction products from xylobiose and phenyl β-xyloside by some β-xylosidases from isolated xylan-degrading microorganisms. The reaction mixture consisted of 0.5ml of each enzyme solution and 0.5ml of xylobiose (2%, w/v) or phenyl β-xyloside (2%, w/v). After the mixtures were incubated for 48h at 30°C, the samples were analyzed by TLC on a Whatman LK5D silica gel plate, using the solvent system of 1-propanol-H₂O (85:15). After development, the sugars were detected by spraying with 50% (v/v) sulfuric acid solution. S, standards (X1, xylose; X2, xylobiose; X3, xylotriose); PX, phenyl β-xyloside; 1, β-Xylosidase solution from 9201; 2, 9203; 3, NGS-8; 4, *A. niger*; 5, INS-3, 6, INS-5, 7, 9221; 8, MI-4.

シロシドに対しても分解性を示すもの (9201, 9203, NGS-8 株), フェニル β-キシロシドに対する分解性が低いもの, もしくは全く示さないもの (INS-3, INS-5, 9221, MI-4 株) が存在した。

2. 培養液中のβ-キシロシダーゼ活性に及ぼす有機溶媒の影響

フェニルβ-キシロシドに対して分解性を示した *Penicillium* sp. 9201, *Penicillium* sp. 9203, *Aspergillus* sp. NGS-8 由来培養液中のβ-キシロシダーゼ活性に及ぼす有機溶媒 (25% (v/v)) の影響を検討した。3株とも *A. niger* とほとんど同様な結果を示したが, 1-プロパノール, 2-プロパノール共存下では *A. niger* よりも比較的高い活性を示した (Table 1)。なお, 検討した4株とも1-プロパノール, 2-プロパノール共存下における活性が, 無添加時と比較してかなり上昇している。

Table 1. β-Xylosidase activity in the presence of organic solvents

Strain	Relative Activity (%)				
	Control	1-Propanol	2-Propanol	Acetone	Acetonitrile
<i>A. niger</i>	100	175	199	72.0	54.0
9201	100	198	255	69.8	50.0
9203	100	203	230	75.6	52.4
NGS-8	100	203	247	40.8	18.0

The reaction mixture consisted of 0.25ml of 0.04M phenyl β-xyloside, 0.25ml of various organic solvents and 0.5ml of enzyme solution (0.05U/ml). The enzyme activity is expressed as a percentage of the control (substituted 0.25ml of H₂O for organic solvent solution).

これは, β-キシロシダーゼの活性発現において, 受容体として水よりもアルコールに対して親和性が強く, 賦活化されたためと考えられる。

次に1-プロパノール, アセトンに関して濃度を変化させたときのβ-キシロシダーゼ活性について調べた。1-プロパノールに関してはスクリーニングにより得られたものは全般に活性が *A. niger* よりも高い傾向を示した。なお, NGS-8 株を除いて1-プロパノール濃度が10%の時に最大となり, それ以上では活性が低下しているが, これは, 1-プロパノールの添加により賦活化されるものの1-プロパノール濃度の上昇に伴って, β-キシロシダーゼの構造が変化しはじめたために徐々に活性が低下したものである。一方アセトンに関してはNGS-8 株が濃度の上昇とともに低下が顕著だったが, ほかのものは *A. niger* と同様な傾向を示していた (Fig. 2)。

3. キシロビオースを基質としたときの有機溶媒共存下における反応

前項で *A. niger* と同様な傾向を示した菌株のうち *Penicillium* sp. 9201, *Penicillium* sp. 9203, さらにフェニルβ-キシロシドに対して分解性の低かった *Penicillium* sp. 9221, INS-3 株についてキシロビオースを基質としたときの有機溶媒 (25% (v/v)) 共存下における反応生成物をTLCを用いて検討した。

ここにおいても9201, 9203株は *A. niger* とほとんど同様な結果を示し, 1-プロパノール, 2-プロパノール

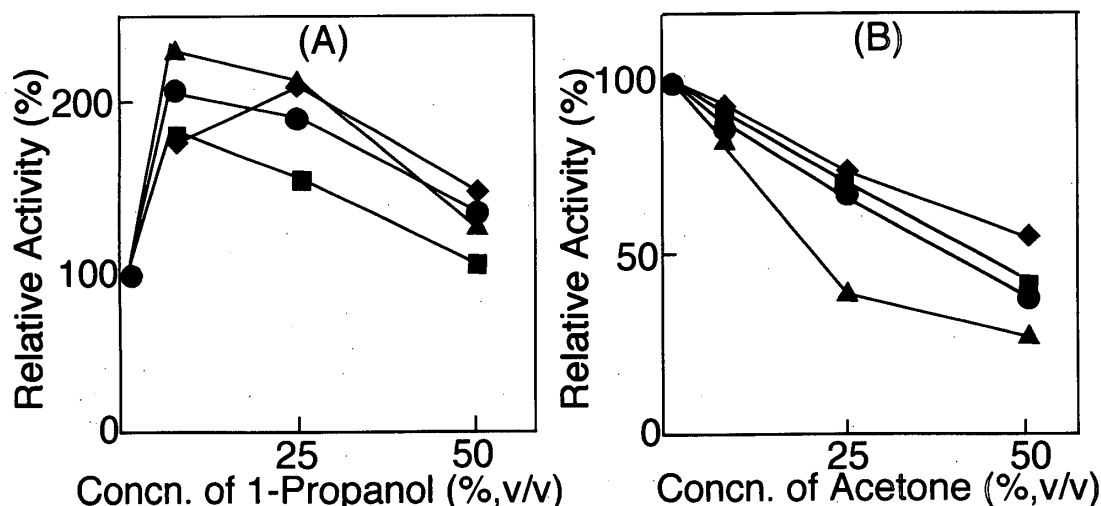


Fig. 2 β-Xylosidase activities in the presence of various concn. of 1-propanol or acetone. The reaction mixture consisted of 0.25ml of 0.04M phenyl β-xyloside, 0.5ml of 1-propanol (A) or acetone (B) solution in various concentrations and 0.25ml of enzyme solution (0.1U/ml). The enzyme activity is expressed as a percentage of the control (substituted 0.5ml of H₂O for organic solvent solution). ■, *A. niger*; ●, 9201; ◆, 9203; ▲, NGS-8.

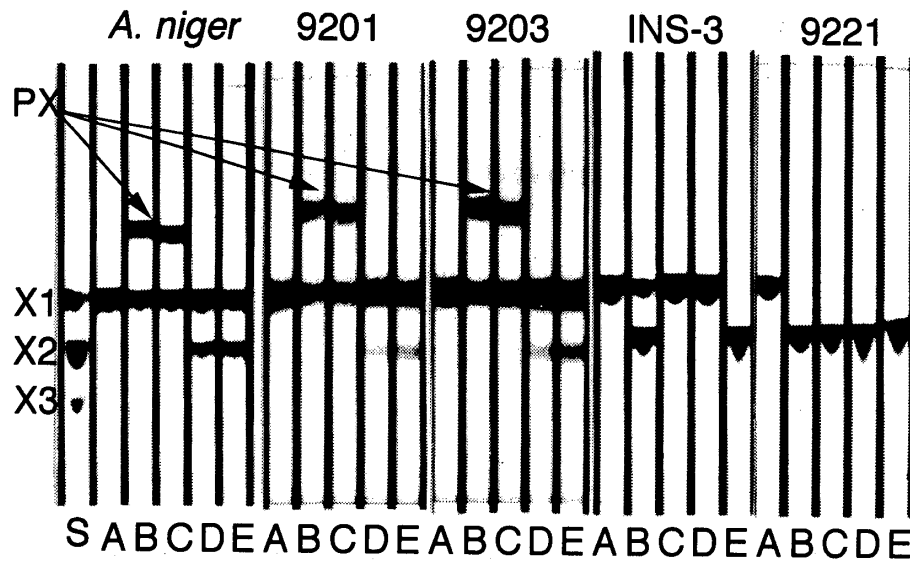


Fig. 3 TLC of reaction products from xylobiose in the presence of organic solvents. The reaction mixture consisted of 0.5ml of each enzyme solution, 0.25ml of various organic solvents and 0.25ml of xylobiose (4%, w/v). After the mixtures were incubated for 48h at 30°C, the samples were analyzed by the same method as described in Fig. 1. S, standards (X1, xylose; X2, xylobiose; X3, xylotriose); PX, propyl β -xyloside; A, no organic solvent (substituted 0.25ml of H₂O for organic solvent solution); B, 1-propanol; C, 2-propanol; D, acetone; E, acetonitrile.

共存下では反応生成物として1-プロピル β -キシロシド、2-プロピル β -キシロシドといった配糖体の生成が示唆された。これに対し9221株は溶媒共存下でキシロースの遊離がほとんど観察されなかったことから、溶媒により失活したものと思われた。INS-3株は溶媒間で差が認められるものの、2-プロパノール共存下でA. nigerと同様に、キシロピオースがほとんど分解されてキシロースの遊離が観察されたが、プロピル β -キシロシドの生成は認められなかった (Fig. 3)。

4. 各種アルコール共存下における反応

Penicillium sp. 9201, *Penicillium* sp. 9203, *Penicillium* sp. 9221, INS-3株について、各種アルコールを共存させたときの配糖体の生成の有無をTLCを用いて検討した (Table 2)。

9201, 9203株に関してはA. nigerと同様に各種アルコールを受容体として配糖体の生成が認められた。これに対し、9221, INS-3株については配糖体の生成が全く認められず、この要因としてINS-3株については当該 β -キシロシダーゼが配糖化機能を有さないことによるものと考えられるが、9221株については、配糖化機能以前の問題として、当該 β -キシロシダーゼがアルコールに対してかなり不安定であることによるものと考えられた。

以上の結果だけで土壤生態系においてA. nigerのよ

Table 2. Formation of alkyl β -xylosides in the presence of alcohols.

Alcohols	Strain				
	A. niger	9201	9203	9221	INS-3
Methanol	+	+	+	-(-)	-(+)
Ethanol	+	+	+	-(-)	-(+)
1-Propanol	+	+	+	-(-)	-(+)
1-Butanol	+	+	+	-(-)	-(+)
1-Pentanol	+	+	+	-(-)	-(+)
1-Hexanol	+	+	+	-(+)	-(+)
1-Heptanol	+	+	+	-(+)	-(+)
1-Octanol	+	+	+	-(+)	-(+)
2-Propanol	+	+	+	-(-)	-(+)
2-Butanol	+	+	+	-(-)	-(+)
3-Butanol	+	+	+	-(-)	-(+)
Benzyl alcohol	+	+	+	-(-)	-(+)
Cyclohexanol	+	+	+	-(-)	-(+)

The reaction mixture consisted of 0.5ml of enzyme solution, 0.25ml of various organic solvents and 0.25ml of xylobiose (4%, w/v). After the mixtures were incubated for 48h at 30°C, the samples were analyzed by the same method as described in Fig. 1. +, detected; -, not detected. (), hydrolytic activity for xylobiose.

うな β -キシロシダーゼを産生する微生物が特殊なものなのか、一般的なものなのかどうか、さらにその土壤生態系における役割などを論じることはできないが、少なくともアレロケミカルズとして知られているアルコール

やケトン類（有機溶媒）共存下において、安定で、配糖化機能を示す β -キシロシダーゼを産生する微生物が *A. niger* 以外にも存在し、*A. niger* β -キシロシダーゼとかなり類似した反応を示すことが明らかとなった。今回は予備的な検討であったので、今後は、植生等採取地土壤の環境を考慮した糖質分解酵素産生微生物の分離を試み、 β -キシロシダーゼに限らず、各種糖質分解酵素について、アルコール、ケトン類以外にもフェノール類など、他のアレロケミカルズ共存下における反応も調べることにより、アレロケミカルズと土壤微生物の生産する糖質分解酵素群の関係について明らかにしていきたい。

摘 要

土壤よりキシラン分解微生物を分離し、それらが産生する β -キシロシダーゼについて、その有機溶媒類共存下における反応性、配糖化機能を検討したところ *Penicillium* sp. 9201 のように、有機溶媒共存下で安定で、配糖化機能を有する β -キシロシダーゼを産生する微生物が *A. niger* 以外にも存在することが明らかとなった。

本研究の概要は、日本生物工学会平成5年度大会（筑波）にて発表した。

謝 辞

本研究を行うにあたり、キシロオリゴ糖混合液を分与下さいましたサントリー（株）に感謝いたします。

引用文献

[1] NAKANO, H., S. KITAHATA, H. KINUGASA, Y.

WATANABE, H. FUJIMOTO, K. AJISAKA and S. TAKENISHI (1991): Transfer Reaction Catalyzed by Exo- β -1, 4-galactanase from *Bacillus subtilis*, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2075-2082.

- [2] RICE, E. L. (1984): 林業及び園芸に果たすアレロパシーの役割 (アレロパシー, Elroy L. Rice 著, 八巻敏雄・安田 環・藤井義晴共訳), 学会出版センター, 東京, 79-124.
- [3] RICE, E. L. (1984): アレロパシー物質の化学的性質 (アレロパシー, Elroy L. Rice 著, 八巻敏雄・安田 環・藤井義晴共訳), 学会出版センター, 東京, 301-332.
- [4] RICE, E. L. (1984): アレロパシーと窒素循環 (アレロパシー, Elroy L. Rice 著, 八巻敏雄・安田 環・藤井義晴共訳), 学会出版センター, 東京, 269-299.
- [5] SHINOYAMA, H., Y. KAMIYAMA and T. YASUI (1988): Enzymatic Synthesis of Alkyl β -Xylosides from Xylobiose Application of the Transxylosyl Reaction of *Aspergillus niger* β -Xylosidase, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2197-2202.
- [6] SHINOYAMA, H. and T. YASUI (1988): Superiority of *Aspergillus niger* β -Xylosidase for the Enzymatic Synthesis of Alkyl β -Xylosides in the Presence of a Variety of Alcohols, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2375-2377.
- [7] SHINOYAMA, H., A. ANDO, T. FUJII and T. YASUI (1991): The Possibility of Enzymatic Synthesis of a Variety of β -Xylosides Using the Transfer Reaction of *Aspergillus niger* β -Xylosidase, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 849-850.