真菌細胞壁を分解する細菌型α-1,3-グルカナーゼの特性

誌名	JSM mycotoxins
ISSN	
著者名	矢野,成和 若山,守
発行元	日本マイコトキシン学会
巻/号	66巻1号
巻号補足	
掲載ページ	p. 37-43
発行年月	2016年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

AgriKnowledge

JSM Mycotoxins 66 (1), 37 - 43 (2016)
http://dx.doi.org/10.2520/myco.66.37

JSM Mycotoxins
Japanese Society of Mycotoxicology

プロシーディング
www.jstage.jst.go.jp/browse/myco/-char/ja/

真菌細胞壁を分解する細菌型α-1,3-グルカナーゼの特性

矢野 成和[1]，若山 守[2]

[1]山形大学大学院理工学研究科（〒992-8510　山形県米沢市城南4-3-16）
[2]立命館大学生命科学部生物工学科（〒525-8577　滋賀県草津市野路東1-1-1）

キーワード
グリコシドヒドロラーゼ；α-1,3-グルカナーゼ；真菌細胞壁

連絡先
矢野 成和，山形大学大学院理工学研究科，〒992-8510　山形県米沢市城南4-3-16
電子メール：shige-y@yz.yamagata-u.ac.jp

(2015年12月25日受付,
2016年1月18日受理)

要旨

真菌細胞壁の主な構成多糖としてキチンやβ-グルカンが知られており，これらは細胞構造を維持する役割を担っている．これら多糖以外にもα-1,3-グルカンを細胞壁構成多糖として含む真菌が存在しており，近年の研究でα-1,3-グルカンの役割が明らかになってきた．例えば，いくつかの動・植物に感染する病原性真菌は，宿主に感染する際に積極的に細胞壁表層にα-1, 3-グルカンを生成し，これを宿主免疫システムからの攻撃を防ぐのに利用している．以上の背景から，α-1,3-グルカナーゼ（EC 3.2.1.59）の真菌細胞壁溶解活性に関する研究が行われてきた．α-1,3-グルカナーゼは，アミノ酸配列に基づくグリコシドヒドロラーゼ（GH）分類に従うと，GH71型とGH87型の酵素に大別される．GH71型酵素は，*Trichoderma*属や*Schizosaccharomyces*属などの真菌類にその存在が報告されている．もう一方は，GH87型酵素であり，*Paenibacillus*属や*Bacillus*属などに由来する細菌型酵素である．我々は，*Bacillus circulans* KA-304が生成するGH87型α-1,3-グルカナーゼ（Agl-KA）が，真菌細胞壁の分解活性を有することを見出し，その機能と構造的特徴を解析してきた．さらに，Agl-KAを利用した真菌プロトプラストの調製法に関して検討を行ってきた．本稿では，Agl-KAのドメイン構造とそれら機能を解析した結果を中心に，α-1,3-グルカナーゼ利用研究の現状についても報告する．

はじめに

α-1,3-グルカンは不溶性の多糖であり，グルコースがα-1,3-グルコシド結合によって連なった構造からなる．α-1,3-グルカンは，*Streptococcus mutans*などの口腔内連鎖球菌が菌体外ポリマー（ムタン）として生産することが知られている．また，すべての真菌というわけではないが，細胞壁構成多糖としても存在している．近年の研究で，真菌細胞壁α-1,3-グルカンが様々な役割を担っていることが明らかになってきた．*Schizosaccharomyces pombe*では，形態維持や細胞分裂に関わる重要なグルカンであることが分かってきた[1]．*Aspergillus nidulans*では，α-1,3-グルカン合成遺伝子を欠損させることで，液体培地中での菌糸塊形成が抑えられる[2]．また，ヒトの真菌感染症に関わる*Histoplasma capsulatum*[3]，*Blastomyces dermatitidis*[4]や*Paracoccidioides brasiliensis*[5]では，α-1,3-グルカンが病原性に関わっている．

真菌細胞壁α-1,3-グルカンを加水分解するα-1,3-グルカナーゼに関して，*S. pombe*[6]と*Trichoderma harzianum*[7),8),9)]が生成する真菌型酵素の研究が先行している．*S. pombe*のα-1,3-グルカナーゼは，細胞分裂に関わる酵素として研究されている．*T. harzianum*は真菌に対する寄生菌で，寄生時に様々な多糖分解酵素を分泌し，その酵素の一つとしてα-1,3-グルカナーゼが研究された．*S. pombe*や*T. harzianum*などの真菌が生産する酵素は，Henrissatらが提唱する触媒ドメインのアミノ酸配列に基づくグリコシドヒドロラーゼ（GH）の分類によると，GH71型の酵素に属しており[10]，上記に述べたような生理学的な役割と反応機構をあわせた議論が行われている．

細菌由来のα-1,3-グルカナーゼは，*Flavobacterium*属細菌[11]，*Pseudomonas*属細菌[12]，*Streptomyces chartreuses*[13]，*Bacteroides oralis*[14]，*Bacillus*

circulans[15], *Paenibacillus*属細菌[16]で報告されていたが，そのほとんどは歯垢除去を目的としたものであった．一方，我々は真菌のプロトプラスト調製を目的として，真菌細胞壁分解菌*B. circulans* KA-304の多糖加水分解酵素を研究していた[17]．その研究の過程で，真菌細胞壁α-1,3-グルカンを加水分解するGH87型α-1,3-グルカナーゼ（Agl-KA）を見出した[18]．本稿では，まず，*B. circulans* KA-304が生成する多糖分解酵素のなかで，プロトプラスト調製に必須な酵素についてAgl-KAを中心に解説し，次いで，酵素学的特徴とAgl-KAが真菌細胞壁溶解に適したドメイン構造を持つことを説明する．最後に，Agl-KAを含めた細菌型α-1,3-グルカナーゼの応用展開についても触れる．

1. *B. circulans* KA-304が生成する真菌細胞壁溶解に関わる酵素種

B. circulans KA-304は，担子菌*Schizophyllum commune*の細胞壁標品を誘導炭素源として培養した時，培養液中に多数の多糖分解酵素を分泌生産する．また，培養濾液の濃縮標品を*S. commune*菌糸に作用させることで，プロトプラストが遊離した（図1A，B）．本結果から，*B. circulans* KA-304の培養濾液中には，*S. commune*細胞壁構成多糖を溶解するのに十分な酵素種が揃っていることが明らかになった．

B. circulans KA-304の培養濾液には，キチナーゼ，β-1,3-グルカナーゼやα-1,6-グルカナーゼが含まれており，α-1,3-グルカナーゼであるAgl-KAも含まれていた[17]．これらの中から*S. commune*プロトプラスト生成に必須な成分の分離を試みた．図1Cに示すように，Agl-KAとキチナーゼIの二成分を混合するだけでプロトプラストが遊離した[18]．さらに，必須成分の分離を行っている際に単離したβ-1,3-グルカナーゼを添加することで，プロトプラスト生成数が飛躍的に増加した．なお，これら三酵素を単独で菌糸にさせてもプロトプラストはまったく生成しなかった．*S. commune*の細胞壁の内層で骨格としての役割を果たすのはキチンとβ-1,3-グルカンであり，α-1,3-グルカンはその外側を覆っていると考えられている．上記の結果から考察すると，Agl-KAが*S. commune*の菌糸表面を覆っているα-1,3-グルカン層を加水分解することで，キチナーゼIは細胞壁内層のキチンに作用できるようになる．そして，最終的には細胞壁にクラックが生じて，そこからプロトプラストが遊離してくる．β-1,3-グルカナーゼについても，α-1,3-グルカンがなくなることで細胞壁内層に作用できるようになるが，細胞壁に与える影響としてはキチナーゼIより弱いため，Agl-KAとβ-1,3-グルカナーゼだけではプロトプラストが生じない．

キチナーゼはGH18型と19型にそのほとんどが分類されるが，真菌細胞壁キチンの分解に適しているのはGH19型の酵素である．もし，*B. circulans* KA-304が生成するキチナーゼがGH18型の酵素であったら，細胞壁α-1,3-グルカンを加水分解できるAgl-KAは発見できなかったであろう．キチナーゼIがGH19型であったこと，さらに，その酵素と協働してプロトプラストを遊離する酵素を分離したことによって，偶然にもAgl-KAが得られた[19]．

2. Agl-KAの酵素学的特徴とドメイン構造

Agl-KAは，直鎖のα-1,3-グルカンだけを加水分解し，その他のα-グルコシド結合を持つデンプン（α-1,4-結合）やデキストラン（α-1,6-結合）等は加水分解しない．また，pH 6-10の広い領域で安定であり，50°Cで10分間熱処理しても活性を保持していた．至適pHは8-9とわずかに高いが，pH 6の反応条件でも約80%の活性を示す[18]．α-1,3-グルカンの加水分解産物は，二から四糖のα-1,3-グルカノオリゴ糖を主たる生成物とする．*B. circulans* KA-304は本酵素を分泌生産しているが，以上の性質から考えると，Agl-KAは一般的な微生物が生育するよな条件下では安定に働き，自然界に存在する真菌細胞壁に由来するようなα-1,3-グルカンを分解することで，*B. circulans* KA-304は栄養成分を獲得しているのだろう．

Agl-KAの分子量は約13万でモノマー酵素である．加水分解酵素としては分子量が大きいが，それはマルチドメイン構造を有するからである．データベースに保存させれる各種タンパク質・酵素の一次構造を比較することで，Agl-KAのドメイン構造を予測した[20]．その結果をもとにしたドメイン構造を図2Aに示す．Agl-KAは，DiscoidinドメインI（DS1），Carbohydrate binding Module 6型ドメイン（CB6），DiscoidinドメインII（DS2），機能未知ドメイン（UCD）と触媒ドメインから構成されている．なお，触媒ドメインのアミノ酸配列に基づいて分類するとGH87型に属しており，真菌型（GH71型）とは相同性を示さなかった．

Agl-KAの触媒ドメイン以外の機能が明らかになっていなかったので，我々は各ドメインの役割を調べるために*N*-末端からの欠失変異酵素を各種作製した．野生型Agl-KAと欠失変異酵素のα-1,3-グルカン加水分解活性，α-1,3-グルカン結合活性とプロトプラスト生成活性を比較した．その結果，*N*-末端

からDS1，CB6とDS2ドメインの欠失数が増えるにつれて，基質の加水分解活性が低下した（図2B）．α-1,3-グルカン結合活性を測定したところ（図2C），野生型Agl-KAはα-1,3-グルカンに対して約30%結合するが，DS1ドメイン欠失させることで結合率が10%低下した．さらに，DS1とCB6の2ドメインを欠失させるとα-1,3-グルカンに対してほとんど結合しなかった．既知の多糖加水分解酵素の多くで，基質結合ドメインを欠失させることで，結合率だけでなく，加水分解活性が低下することが報告されている．以上から，DS1，CB6とDS2の3ドメインが，α-1,3-グルカンへの結合に関わる新規ドメインである

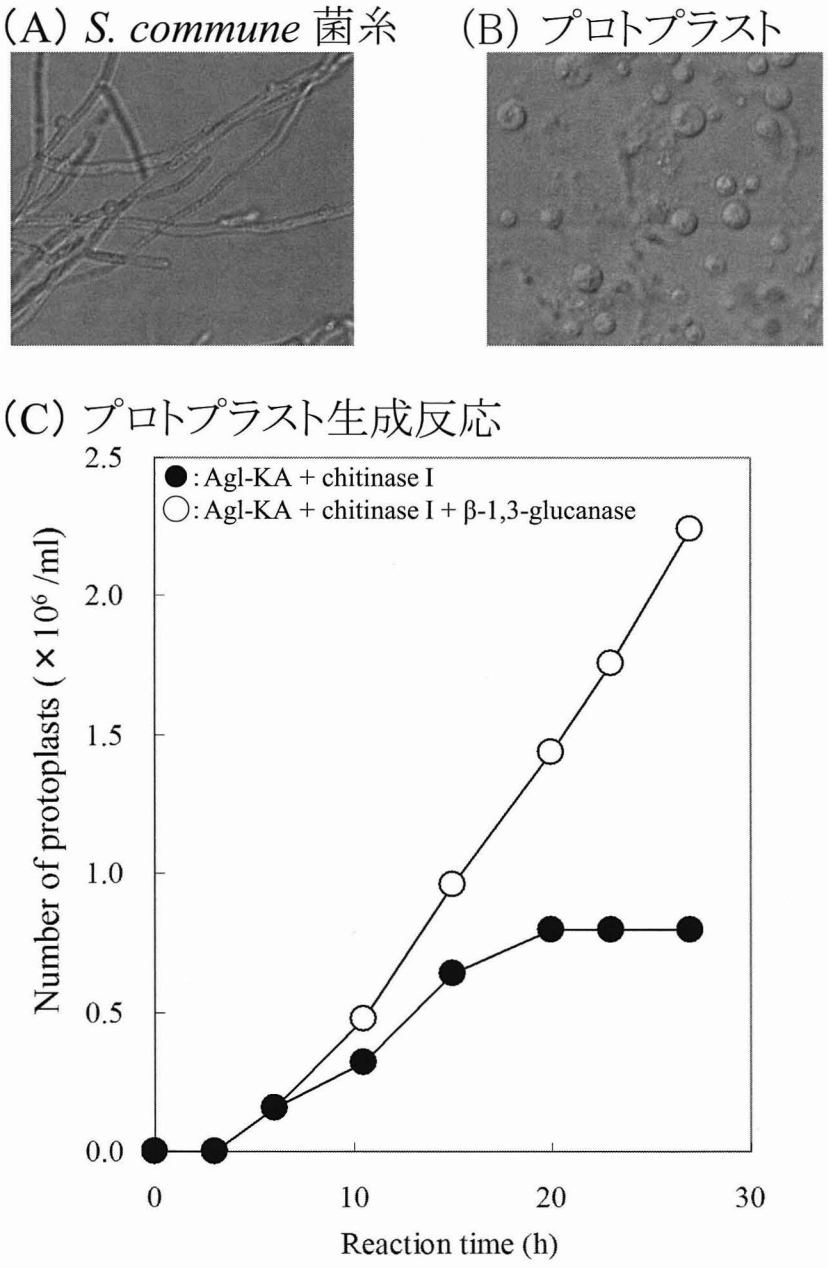

図1 *Bacillus circulans* KA-304の培養濾液を用いた*Schizophyllum commune*プロトプラストの調製（A，B）と精製酵素を用いたプロトプラスト生成反応（C）．

（A，B）*S. commune*菌糸に，*B. circulans* KA-304培養濾液の硫酸アンモニウム濃縮標品を作用させて，プロトプラストを調製した．反応液には，0.1 g/mlの*S. commune*菌体，0,5%濃縮酵素，50 mMリン酸緩衝液（pH 6.5）と等張剤として0.5 Mマンニトールを加えた．

（C）*B. circulans* KA-304培養濾液から精製したAgl-KA（0.1 mg/ml），キチナーゼI（50 U/ml）とβ-1,3-グルカナーゼ（100 U/ml）を用いて，プロトプラスト生成反応を行った．プロトプラスト数は，トーマ血球計算板を用いて顕微鏡下で測定した．

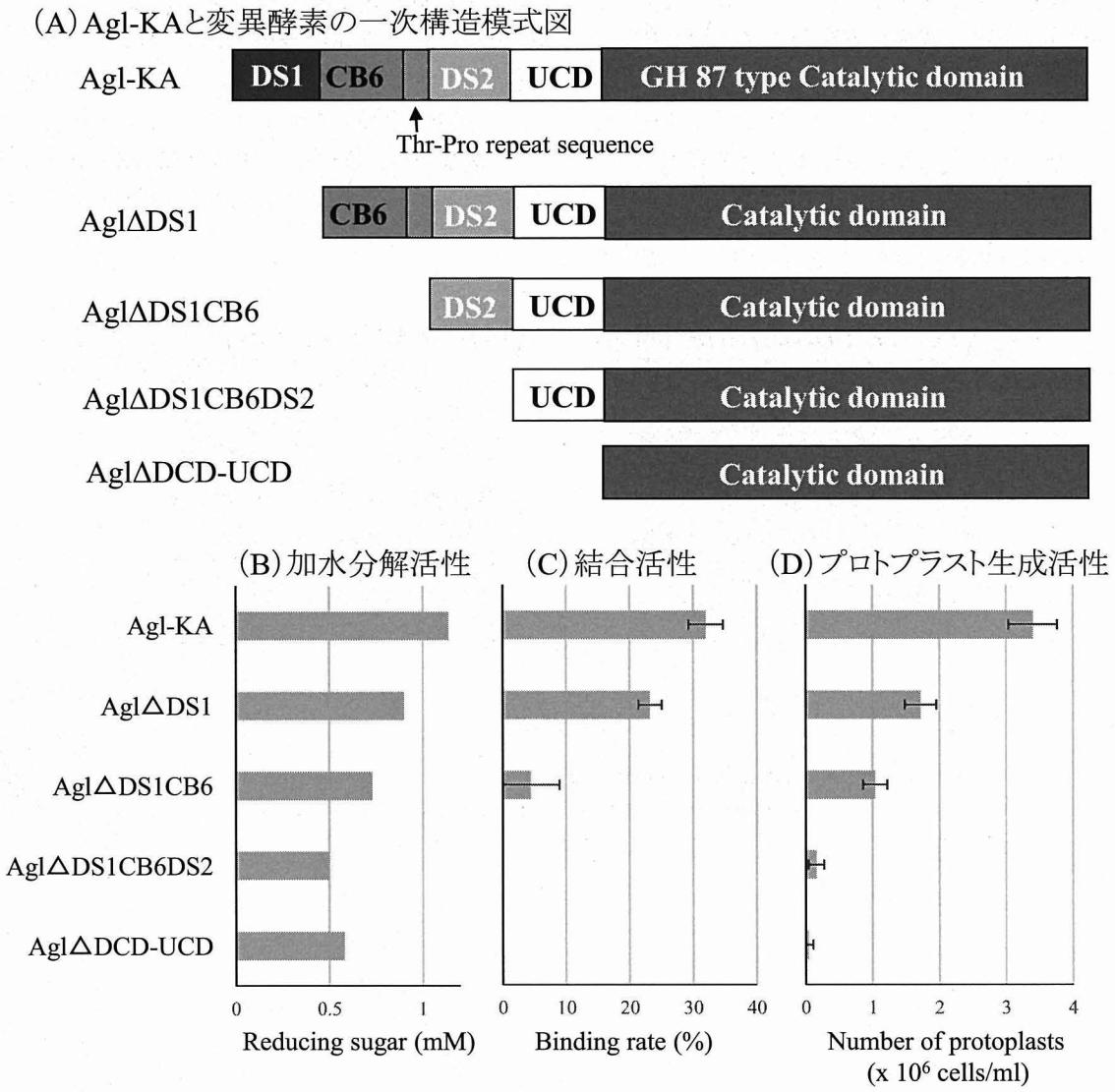

図2　Agl-KAと変異酵素の構造模式図 (A) と各種酵素のα-1,3-グルカン加水分解活性 (B), α-1,3-グルカン結合活性 (C) とプロトプラスト生成活性 (D).

(A) 模式図内の略号，DS1；Discoidin ドメインI (DS1)，CB6；Carbohydrate binding Module 6型ドメイン，DS2；Discoidin ドメインII，UCD；機能未知ドメイン.

(B) α-1,3-グルカン加水分解活性に用いた反応液は，1% α-1,3-グルカンと50 mMリン酸緩衝液 (pH 6.5) を含んでいる．反応30分後の遊離還元糖量をジニトロサリチル酸法で測定した.

(C) 結合活性は，1% α-1,3-グルカンに対する結合率より求めた．反応液は，4℃で1時間保った後に遠心分離し，上清中のタンパク量を測定した.

(D) 反応液は，50 U/mlのキチナーゼ Iを含んでおり，2 nmol/mlのAgl-KA，あるいは変異酵素を加えた．反応13時間後のプロトプラスト数を測定した.

ことが示唆された.

さらに，これらドメインのプロトプラスト生成活性に与える影響も調べた (図2D). DS1, CB6とDS2ドメインをすべて持つ野生型Agl-KA に対して，DS1を一つ欠失させたAglΔDSでは生成するプロトプラスト数が半減した．欠失数を増やしていくことで，著しくプロトプラスト生成数が低下した．真菌細胞壁は多数のグルカンや壁タンパクから構成されており，実際にはかなり複雑な構造であると考えられる．その細胞壁に含まれるα-1,3-グルカンを加水分解するためには強固にα-1,3-グルカンに結合する必要があり，Agl-KAは複数の結合ドメインを持つことでそれを可能としている．Agl-KAは複雑なドメイン構造を持つが，これは真菌細胞壁α-1,3-グルカンを加水分解するのに適した構造であることが分かった.

3. 細菌型α-1,3-グルカナーゼの応用展開

細菌型α-1,3-グルカナーゼの多くは，オーラルケアの観点で研究開発が行われており，口腔内で*Streptococcus*属細菌が生産するバイオフィルの形成阻害試験やバイフィルム除去試験が進められてきた[16]．Agl-KAが真菌細胞壁の溶解に寄与することが明らかになって，細菌型α-1,3-グルカナーゼの用途が広がったと言える．我々が検討しているプロトプラスト調製用酵素としても，真菌の遺伝子組換えを今までよりも効率的に行え，また，プロトプラスト化することで真菌生体内の成分をマイルドな条件で抽出することを可能にするので，研究開発のレベルで活躍できる．また，動・植物に対する病原真菌の防除用酵素としても応用できる．すでに，Fujikawaらは，Agl-KA遺伝子を組込んだイネを作出しており，病原真菌からの感染を防ぐことに成功している[21]．

我々は，Agl-KA以外の細菌型α-1,3-グルカナーゼが真菌細胞壁溶解活性を持つか調べるために，α-1,3-グルカン資化性菌の分離と酵素の精製を行った．その結果，*Paenibacillus glycanilyticus* FH11株の培養濾液からα-1,3-グルカナーゼAgl-FH1とAgl-FH2の二種を単離することに成功した[22]．Agl-FH1とAgl-FH2は，Agl-KAと同様のマルチドメイン構造を有していた．Agl-FH1は，触媒ドメインのアミノ酸配列がAgl-KAと相同性が低かった．酵素学的性質として大きく異なる点は，Agl-FH1の至適pHが5.5ということである．Agl-FH2に関しては，アミノ酸配列の相同性はAgl-KAと高く，酵素学的性質はAgl-FH1と似ていた．図3に，これら酵素を用いてプロトプラスト生成反応を行った結果を示す．反応液のpH条件を変化させて実験を行ったが，どの条件でも，Agl-FH1とAgl-FH2は，Agl-KAと同等にプロトプラストを遊離させた．以上の結果から，細菌型α-1,3-グルカナーゼの多くが，真菌細胞壁α-1,3-グルカンの加水分解活性を有していることが示唆された．歯垢除去の観点で研究されてきた多くの細菌型α-1,3-グルカナーゼのなかには，Agl-KAより優れた細胞壁α-1,3-グルカン分解活性を示すものが存在する可能性があり，今後，さらなる酵素のスクリーニングを行うことで，真菌細胞壁溶解酵素として産業利用できる酵素が現れるかもしれない．

おわりに

近年，動植物に感染する真菌のなかに，宿主に感染する際に積極的に細胞壁表層にα-1, 3-グルカンを生成し，これを宿主免疫システムからの攻撃を防除するのに利用していることが分かってきた．これら研究が進むにつれて，真菌細胞壁α-1,3-グルカンを加水分解できる酵素が注目されるようになってきた．しかしながら，α-1,3-グルカナーゼに関する研究は，基質となるα-1,3-グルカンの入手が困難であったために遅れている．特に，細菌型α-1,3-グルカナーゼに関しては，立体構造や反応機構が解明されておらず，早急な進展が求められる．

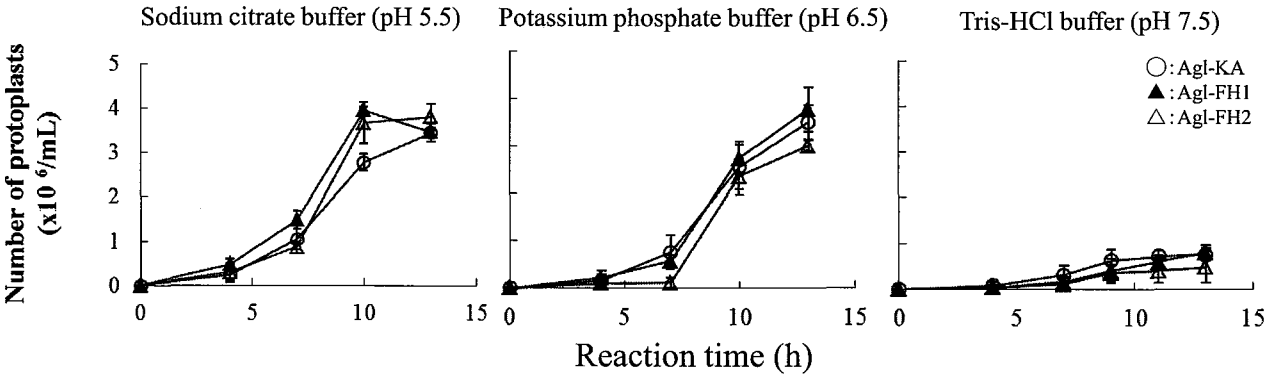

図3 Agl-KA，Agl-FH1とAgl-FH2を用いたプロトプラスト生成反応．

各種α-1,3-グルカナーゼ（2 nmol/ml）とキチナーゼI（50 U/ml）を用いて，プロトプラスト生成反応を行った．緩衝液として，50 mMクエン酸ナトリウムバッファー（pH 5.5），50 mMリン酸カリウムバッファー（pH 6.5）と50 mM Tris-HClバッファー（pH 7.5）を用いた．なお，等張剤として0.5 Mマンニトールを加えた．

引用文献

1) Hochstenbach, F., Klis, F. M., Van Den Ende, H., Van Donselaar, E., Peters, P. J., Klausner, R. D.: Identification of a putative alpha-glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fussion yeast. Proc Natl Acad Sci USA, **95**, 9161-9166 (1998)

2) Yoshimi, A., Sano, M., Inaba, A., Kokubun, Y., Fujioka, T., Mizutani, O., Hagiwara, D., Fujikawa, T., Nishimura, M., Yano, S., Kasahara, S., Shimizu, K., Yamaguchi, M., Kawakami, K., Abe, K.: Functional analysis of the α-1,3-glucan synthase genes agsA and agsB in *Aspergillus nidulans*: agsB is the major α-1,3-glucan synthase in this fungus. PLoS One, **8**, e54893 (2013)

3) Rappleye, C. A., Eissenberg, L. G., Goldman, W. E.: *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan block innate immune recognition by the beta-glucan receptor. Proc Natl Acad Sci USA, **104**: 1366-1370 (2007)

4) Hogan, L. H., Klein, B. S.: Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. Infect Immun, **62**, 3543-3546 (1994)

5) Villalobos-Duno, H., San-Blas, G., Paulinkevicius, M., Sánchez-Martín, Y., Nino-Vega, G.: Biochemical characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* α-1,3-glucanase Agn1p, and its functionality by heterologous Expression in *Schizosaccharomyces pombe*. PLoS One, **8**, e66853 (2013)

6) Dekker, N., Speijer, D., Grün, C. H., van den Berg M., de Haan A., Hochstenbach F.: Role of the α-glucanase Agn1p in fission-yeast cell separation. Mol Biol Cell, **15**, 3903-3914 (2004)

7) Ait-Lahsen, H., Soler, A., Rey, M., de La Cruz, J., Monte, E., Llobell, A.: An antifungal exo-α-1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Appl Environ Microbiol, **67**, 5833-839 (2001)

8) Sanz, L., Montero, M., Redondo, J., Llobell, A., Monte, E.: Expression of an alpha-1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. FEBS J, **272**, 493-499 (2005)

9) Grün, C. H., Dekker, N., Nieuwland, A. A., Klis, F. M., Kamerling, J. P., Vliegenthart, J.F., Hochstenbach, F.: Mechanism of action of the endo-(1,3)-α-glucanase MutA form the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. FEBS Lett, **580**, 3780-3786 (2006)

10) Henrissat, B., Davies, G. J.: Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. Curr Op Struct Biol, **7**, 637-644 (1997)

11) Ebisu, S., Kato, K., Kotani, S., Misaki, A.: Isolation and purification of *Flavobacterium* alpha-1,3-glucanase-hydrolyzing, insoluble, sticky glucan of Streptococcus mutans. J Bacteriol, **124**, 1489-1501 (1975)

12) Inoue, M., Yakushiji, T., Katsuki, M., Kudo, N., Koga, T.: Reduction of the adherence of *Streptococcus sobrinus* insoluble alpha-D-glucan by endo-(1-3)-α-D-glucanase. Carbohydr Res, **182**, 277-286 (1988)

13) Takehara, T., Inoue, M., Morioka, T., Yokogawa, K.: Purification and properties of endo-α-1,3-glucanase from a *Streptomyces chartreuses* strain. J Bacteriol, **145**, 729-735 (1981)

14) Takahashi, N., Satoh, Y., Takamori, K.: Subcellular localization of D-glucanase in *Bacteroides oralis* Ig4a. J Gen Microbiol, **131**, 1077-1082 (1985)

15) Matsuda, S., Kawanami, Y., Takeda, H., Ooi, T., Kinoshita, S.: Purification and properties of mutanase from *Bacillus circulans*. J Ferment Bioeng, **83**, 593-595(1997)

16) Shimotsuura, I., Kigawa, H., Ohdera, M., Kuramitsu, H. K., Nakashima, S.: Biochemical and molecular characterization of a novel type of mutanase from *Paenibacillus* sp. Strain RM1: Identification of its mutan-binding domain, essential for degradation of *Streptococcus mutans* biofilms. Appl Environ Microbiol, **74**, 2759-2765 (2008)

17) Yano, S., Yamamoto, S., Toge, T., Wakayama, M., Tachiki, T.: Occurrence of a specific protein in Basidiomycetelytic enzyme preparation produced by *Bacillus circulans* KA-304 inductively with a cell-wall preparation of *Schizophyllum commune*. Biosci Biotechnol Biochem, **67**, 1976-1982 (2003)

18) Yano, S., Wakayama, M., Tachiki, T.: Cloning and Expression of an Alpha-1,3-Glucanase Gene from *Bacillus circulans* KA-304: the Enzyme Participates in Protoplast Formation of *Schizophyllum commune*. Biosci Biotechnol Biochem, **70**, 1754-1763 (2006)

19) Yano, S., Rattanakit, N., Wakayama, M., Tachiki, T.: Cloning and expression of a *Bacillus circulans* KA-304 gene encoding chitinase I, which participates in protoplast formation of *Schizophyllum commune*. Biosci Biotechnol Biochem, **69**, 602-609 (2005)

20) Suyotha, W., Yano, S., Takagi, K., Rattanakit-Chandet, N., Tachiki, T., Wakayama, M.: Domain structure and function of α-1,3-glucanase from *Bacillus circulans* KA-304, an enzyme essential for degrading basidiomycete cell walls. Biosci Biotechnol Biochem, **77**, 639-647 (2013)

21) Fujikawa, T., Sakaguchi, A., Nishizawa, Y., Kouzai, Y., Minami, E., Yano, S., Koga, H., Meshi, T., Nishimura, M.: Surface α-1,3-glucan facilitates fungal stealth infection by interfering with innate

immunity in plants. PLoS Pathog., **8**, e1002882 (2012)

22) Suyotha, W., Yano, S., Itoh, T., Fujimoto, H., Hibi, T., Tachiki, T., Wakayama, M.: Characterization of α-1,3-glucanase isozyme from *Paenibacillus glycanilyticus* FH11 in a new subgroup of family 87. J Biosci Bioeng, **118**, 378-385 (2014)

Participation of bacterial α-1,3-glucanases on fungal cell-wall degradation

Shigekazu Yano[1], Mamoru Wakayama[2]

[1]Department of Biochemical Engineering, Graduate School of Science and Technology, Yamagata University, 4-3-16 Jonan, Yonezawa, Yamagata 992-8510, Japan

[2]Department of Biotechnology, Faculty of Life Sciences, Ritsumeikan University, 1-1-1, Noji-Higashi, Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan

The fungal cell-wall is a complex structure composed of cross-linked polysaccharides and glycoproteins. Chitin and β-1,3-glucan are the main skeletal polysaccharides of most fungi. On the other hands, α-1,3-glucan has been found in various fungal species and has an important role in some fungi. For example, α-1,3-glucan acts as a virulence factor in some pathogenic fungi. Considering this background, α-1,3-glucanase (EC3.2.1.59) has been studied as a biological control agent of pathogenic fungi. α-1,3-Glucanases are classified into two families, 71 and 87, of glycoside hydrolases (GH) based on their amino acid sequences. Type 71 α-1,3-glucanase have been found in fungi, and type 87 enzymes have been found in bacteria. We isolated type 87 α-1,3-glucanase (Agl-KA) from culture filtrate of *Bacillus circulans* KA-304. Agl-KA hydrolyzed the fungal cell-wall α-1,3-glucan and released the protoplasts from *Schizophyllum commune* mycelia in cooperation with GH family type 19 chitinase. Here, we report that domain structure and function of Agl-KA. Furthermore, we briefly discuss potential future applications of bacterial α-1,3-glucanases.

Keywords: fungal cell-wall; α-1,3-glucanase; glucoside hydrolase