

分離海洋細菌Streptomyces sp. AP77株由来の β -1,3-グルカナーゼの β -1,3-グルカン分解における至適活性条件

誌名	Coastal bioenvironment
ISSN	13487175
著者	亀井, 勇統 小石澤, 隼
巻/号	12巻
掲載ページ	p. 33-40
発行年月	2008年12月

分離海洋細菌 *Streptomyces* sp. AP77 株由来 β -1,3-グルカナーゼ
のノリ赤腐れ病原真菌 *Pythium porphyrae* に対する溶解解析

亀井 勇統・小石澤 隼

佐賀県唐津市松南町152-1 佐賀大学海浜台地生物環境研究センター

Analysis of lytic activity of β -1,3-glucanase from the marine bacterial isolate, *Streptomyces* sp. AP77 against *Pythium porphyrae* causes the red rot disease of *Porphyra yezoensis*

Yuto KAMEI and Jun KOISHIZAWA

Coastal Bioenvironment Center, Saga University,
152-1 Shonan-cho, Karatsu, Saga 847-0021, Japan

要 約

分離海洋細菌 *Streptomyces* sp. AP77 が産生する β -1,3-グルカナーゼのノリ赤腐れ病原真菌 *Pythium porphyrae* に対する溶解活性について、まず β -1,3-グルカナーゼと *P. porphyrae* の菌糸懸濁液とを混合して菌糸に対する溶解活性を経時的に顕微鏡観察すると共に、*P. porphyrae* の主要細胞壁構成多糖である β -1,3-グルカンに対する分解様式について、 β -1,3-グルカンの最終分解物を質量分析することにより解析した。

その結果、*Streptomyces* sp. AP77 株が産生する β -1,3-グルカナーゼは、顕微鏡による観察においても30分間の反応で *P. porphyrae* の菌糸を分解する様子が確認され、TOF-MSによる質量分析の結果、 β -1,3-グルカナーゼは、 β -1,3-グルカンを内側から2糖毎に分解するエンド型の酵素であることが明らかとなった。

これらの結果から、*Streptomyces* sp. AP77 株が産生する β -1,3-グルカナーゼは、有明海のような冬期にノリの養殖を行う様な低温の環境下でも有効に *P. porphyrae* の菌糸を溶解し、ノリ赤腐れ病の防除に有望であることが期待された。

Summary

The lytic activity of β -1,3-glucanase produced by the marine bacterial isolate, *Streptomyces* sp. AP77 which shows antifungal activity against *Pythium porphyrae* causes the red rot disease of *Porphyra yezoensis* was examined in the time course study by direct observation under the microscope after mixed the enzyme with mycelia of *P. porphyrae*. The lytic mode of action of β -1,3-glucanase was also evaluated by analyzing the final products of β -1,3-glucan of main cell wall component of *P. porphyrae* with time of flight mass spectrometry (TOF-MS) after treated β -1,3-glucan with β -1,3-glucanase.

β -1,3-Glucanase produced by *Streptomyces* sp. AP77 lyzed the mycelia of *P. porphyrae* after treated it for 30 min. TOF-MS analysis showed that β -1,3-glucanase degraded β -1,3-glucan finally to disaccharides and was proved to be an endo-typic enzyme.

These results indicate that β -1,3-glucanase produced by *Streptomyces* sp. AP77 might effectively act against *P. porphyrae* even under lowered temperature condition in winter season cultivating such *P. yezoensis* in the Ariake sea.

緒言

有明海の養殖ノリは、全国1位の生産高を誇り、佐賀県の基幹産業の一つとなっている。しかしながら、例年養殖ノリの病害、赤腐れ病が発生して問題となっている。

ノリ赤腐れ病は、真菌類卵菌目に属する *Pythium porphyrae* により引き起こされる病気で、養殖現場ではその防除に酸処理が行われている。しかしながら、大量の酸処理による有明海的环境汚染が問題視され、近年の有明海ノリの色落ち現象や貝類の大量斃死等の異変は、この酸処理も原因の一つと考えられている。そのため、有明海異変の原因の一つと考えられている酸処理法に代わる新たな赤腐れ病防除対策が求められており、その代替法の一つとして、赤腐れ病原因真菌の構成多糖を分解する酵素を用いた防除方法が考えられ、このような酵素を用いれば、酸処理法に代わる有明海環境保全型の新規ノリ赤腐れ病防除法が確立できるものとして期待されている。

そこで、当研究室では、酸処理法に代わる効果的な赤腐れ病防除対策の一つとして、これまでに *P. porphyrae* に対する抗真菌性遺伝子を導入した耐病性ノリ種苗の確立、育種を目的に、*P. porphyrae* の細胞壁構成多糖に対する選択分解酵素の探索、並びに組換え体ノリ細胞壁分解酵素を用いた効率的なノリプロトプラスト作出する酵素の探索を行ってきたが、これらの研究成果の中で、有明海ノリ養殖環境から *P. porphyrae* に対して、抗真菌活性を有する分離海洋細菌 *Streptomyces* sp. AP77株が産生する抗真菌タンパクを見いだした他、本タンパクの抗真菌活性の作用機序を明らかにするとともに、*P. porphyrae* の細胞壁構成多糖分解酵素である β -1,3-グルカナーゼを産生する海洋細菌を多数見いだして来た(青木, 2002; Kitamura *et al.*, 2002; Woo *et al.*, 2002; Kitamura & Kamei, 2003; Woo & Kamei, 2003; Kitamura & Kamei, 2006; 小石澤 & 亀井, 2007; 小石澤 & 亀井, 2008)。これらの研究の中で、新たに抗真菌性のタンパクを探索した研究成果の一つとして、*P. porphyrae* の細胞壁構成多糖の一つである β -1,3-グルカンの特異的に分解する酵素、 β -1,3-グルカナーゼを見いだしたため、この β -1,3-グルカナーゼを酸処理法に代わるノ

リ赤腐れ病防除対策として応用すべく、分離海洋細菌 *Streptomyces* sp. AP77株が産生する *P. porphyrae* の細胞壁分解酵素 β -1,3-グルカナーゼの産生に関する至適産生条件、さらにはこの至適産生条件によって培養上清から得た β -1,3-グルカナーゼ粗酵素について、*P. porphyrae* の主要な細胞壁構成多糖 β -1,3-グルカンの分解に対する至適反応時間ならびに至適反応温度を新たに明らかにしてきた(亀井&小石澤, 2008)。

そこで、本研究では、 β -1,3-グルカナーゼの基質となる *P. porphyrae* の主要細胞壁構成多糖 β -1,3-グルカンではなく、実際の β -1,3-グルカナーゼによる *P. porphyrae* 自身に対する溶解活性を経時的に顕微鏡観察すると共に、その β -1,3-グルカンに対する分解様式をマススペクトロメトリーにより併せて検討したので報告する。

材料および方法

【供試菌】

当研究室で抗 *Pythium* 活性細菌のスクリーニングの結果、最も強い抗 *Pythium* 細菌として有明海より分離して、 -85°C で凍結保存してある *Streptomyces* sp. AP77株を本研究に用いた。

【*Streptomyces* sp. AP77株の大量培養】

保存 *Streptomyces* sp. AP77株を、まず5 ml の ZoBell 2216E液体培地(0.5% ポリペプトン; 0.1% 酵母エキス; 75% 人工海水 (インスタントオーシャン, アクアリアム システムズ・ジャパン); pH 7.5) に1白金耳接種して、 25°C で2日間、120 rpmで振盪培養した。次いで、得られた5 mlの前培養液を、0.1% カードラン(β -1,3-グルカン)を含む10リットルの低濃度ポリペプトン-ZoBell 2216E改変液体培地(0.1% ポリペプトン; 0.1% 酵母エキス; 75% 人工海水 (インスタントオーシャン, アクアリアム システムズ・ジャパン); pH 7.5) に接種し、15L-ジャーファーメンターにより120 rpm 攪拌、5 L/mlのエアーレーションを行いながら、 25°C で5日間培養した。

【 β -1,3-グルカナーゼ粗酵素の調製】

上記大量培養で得た10リットルの *Streptomyces* sp. AP77株培養液を 4°C , 6,300 x gで、20分間遠心した。上清を $0.45\ \mu\text{m}$ ポア

サイズの濾過膜 (φ142 mm, アドバンテック) を用いた加圧式濾過装置 (日本ポール) で濾過除菌後, 限外濾過(ペリコン2, 10,000 分子量-カットオフ濾過膜, ミリポア)による濃縮を行った。80%飽和硫酸による塩析, さらには人工海水に対する透析処理後, 0.22 μm ポアサイズのボルトトップフィルター (コーニング) により濾過除菌して, 最終的に100倍に濃縮したβ-1,3-グルカナーゼ粗酵素100 mlを調製した。なお, 調製したβ-1,3-グルカナーゼ粗酵素のタンパク質濃度は, BCA Protein Assay Kit により測定した。

【β-1,3-グルカナーゼの*P. porphyrae*菌糸に対する溶解活性の経時的モニタリング法】

*P. porphyrae*株を, 10 ml のCSL液体培地に接種して, 25℃で2日間培養した。

培養後, 1 ml の培養液を35 μmメッシュの滅菌セルストレーナー (12 × 75 mm, ファルコン) により菌糸を回収して, 1 ml の滅菌人工海水で3回洗浄後, 得られた菌糸を1 ml の滅菌人工海水に再懸濁することにより菌糸懸濁液を調製した。15 μlの菌糸懸濁液と等量の上記100倍濃縮したβ-1,3-グルカナーゼ粗酵素を96-ウェルマイクロプレート中25℃で, 5分, 30分, 60分, 90分, 120分, 150分, 180分, 210分, およ

び240分反応させ, タイムラプスシステム顕微鏡 (TMU-100K-U, ニコン) を用いて, 300倍の倍率で経時的な*P. porphyrae*の菌糸の形態を観察モニタリングした。この際, 陰性対照として15 μlの滅菌ZoBell 2216E液体培地を用い, 同様な方法で菌糸の形態を比較観察した。

【β-1,3-グルカナーゼによるβ-1,3-グルカン分解産物の解析法】

β-1,3-グルカンの分解物の解析は, 1.5 ml エッペンドルフチューブ中の90 μlの0.5%カードランに対し, 10 μlのβ-1,3-グルカナーゼ粗酵素を添加して, 25℃で10秒, 30秒, 1分, 5分, 30分, 1時間, 3時間, 6時間反応後, 反応液を100℃で5分間加熱して反応を停止させた。反応液に90 μl のMili Q 水を添加, 希釈後, TOF-MS (シリーズ1100, アジレントテクノロジー) により, 生じたオリゴ糖の解析を行った。なお, 質量分析は, イオン源をESI とし, ポジティブモードにより質量範囲50 ~ 1200の範囲で解析し, 移動層には50%の10 μM酢酸ナトリウムと50%メタノールを用いて行った。

結果

【β-1,3-グルカナーゼによる*P. porphyrae*溶解の経時的活性】

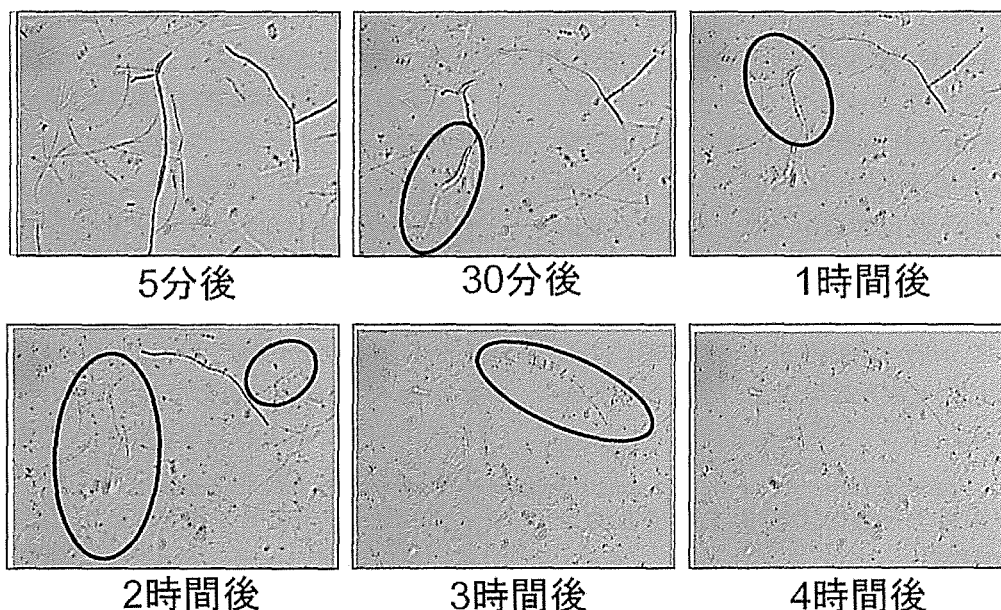


図1 *Streptomyces* sp AP77 株が産生するβ-1,3-グルカナーゼの25℃におけるノリ赤腐れ病原真菌*Pythium porphyrae*菌糸に対する経時的溶解活性。

円で囲った部分が顕微鏡による肉眼観察でも菌糸の溶解が観察された部分を示す。

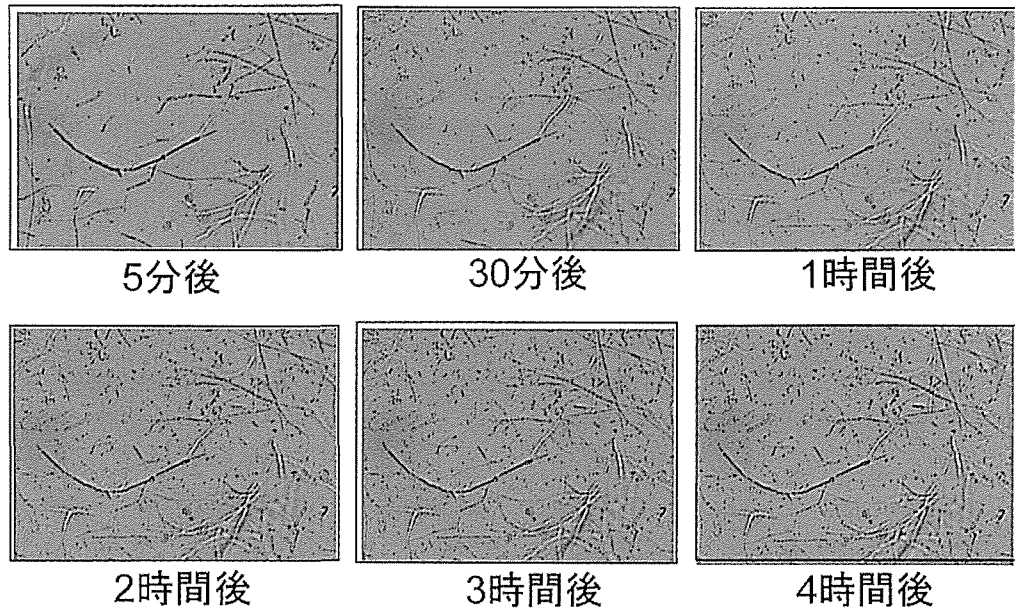


図2 *Streptomyces* sp AP77 株培養用ZoBell 2216E液体培地と25℃で反応させたノリ赤腐れ病菌*Pythium porphyrae*菌糸の径時的形態.

35 μm メッシュのセルストレーナーを用いて回収、調製した*P. porphyrae*菌糸懸濁液を β -1,3-グルカナーゼ粗酵素で反応させたところ、5分間の反応では肉眼での菌糸の溶解は確認できなかった。しかしながら、30分の反応になると、すでに1視野当りに観察される*P. porphyrae*菌糸の部分的な溶解の様子が肉眼でも確認されるようになり、その後反応時間の経過とともに*P. porphyrae*菌糸の溶解が進行した。最終的には、本試験で行った4時間もの反応では、ほぼ完全に菌糸を溶解し、*Streptomyces* sp. AP77株が産生する β -1,3-グルカナーゼは、強い*P. porphyrae*溶解活性を有していることが本実験によっても証明された(図1)。一方、対照のZoBell 2216E液体培地中では、4時間の反応でも菌糸の形態に全く変化はなく、このことから β -1,3-グルカナーゼ反応液で観察された菌糸の溶解は、*P. porphyrae*菌糸の自然溶解によって生じたことによるものではないことが明らかとなった(図2)。

【 β -1,3-グルカナーゼによる β -1,3-グルカン分解産物の解析】

まず、 β -1,3-グルカンを β -1,3-グルカナーゼにより10秒間反応させたところ、わずか10秒間の反応でも分解されていることが観察され、 β -1,3-グルカンのオリゴ糖である6糖のラ

ミナリヘキソースにNaイオンが付加した質量数1013のイオンピークが検出され、その他、5糖のラミナリペンタオース、4糖のラミナリテトラオース、3糖のラミナリトリオース、2糖のラミナリビオースにそれぞれNaイオンが付加した質量数851, 689, 527, および365のイオンピークがそれぞれ検出された(図3)。この結果により、*Streptomyces* sp. AP77株が産生する β -1,3-グルカナーゼは、上記顕微鏡による5分間の観察では確認できなかった溶解が分子レベルでは進行していることが確認でき、酵素と基質との反応直後にすでに分解が起こっていることが明らかとなった。その後、30秒間の反応では、6糖のラミナリヘキソースは検出されず、最大の分解産物は5糖のラミナリペンタオースとなり、その他、ラミナリテトラオース、ラミナリトリオースおよびラミナリビオースのイオンピークがそれぞれ検出された(図4)。さらに反応が進み、5分間の反応では、4糖のラミナリテトラオースが最大の分解産物として検出された他、ラミナリトリオースとラミナリビオースのイオンピークも併せて検出された(図5)。その後、反応時間の経過とともに、多重のオリゴ糖から主に2糖と3糖へと分解が進み、反応1時間後には、ラミナリトリオースとラミナリビオースの他、新たに単糖のグルコースのイオンピークも検出されるようになった(図6)。最終的に

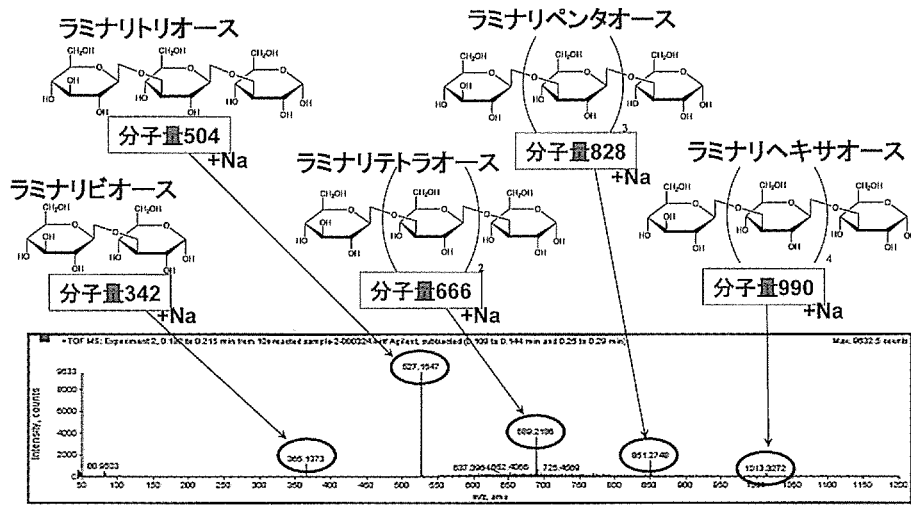


図3 *Streptomyces* sp AP77 株由来の β -1,3-グルカナーゼにより25°Cで10秒間処理した β -1,3-グルカンの分解産物のTOF-MS解析.

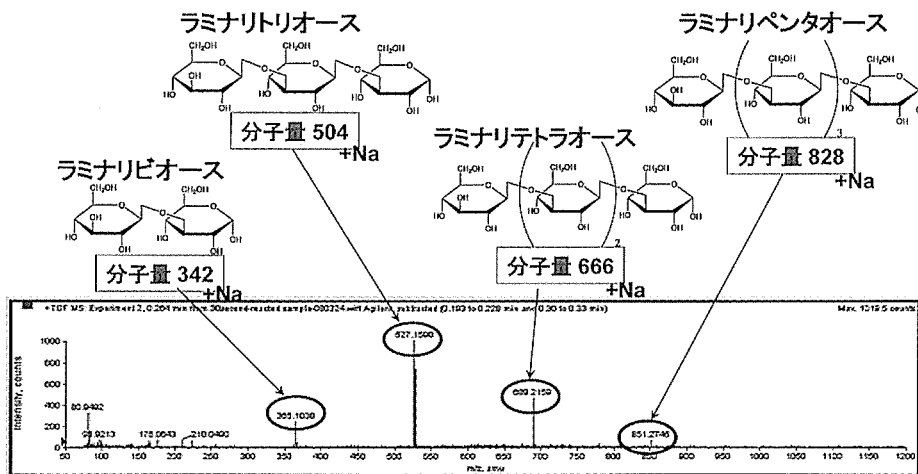


図4 *Streptomyces* sp AP77 株由来の β -1,3-グルカナーゼにより25°Cで30秒間処理した β -1,3-グルカンの分解産物のTOF-MS解析.

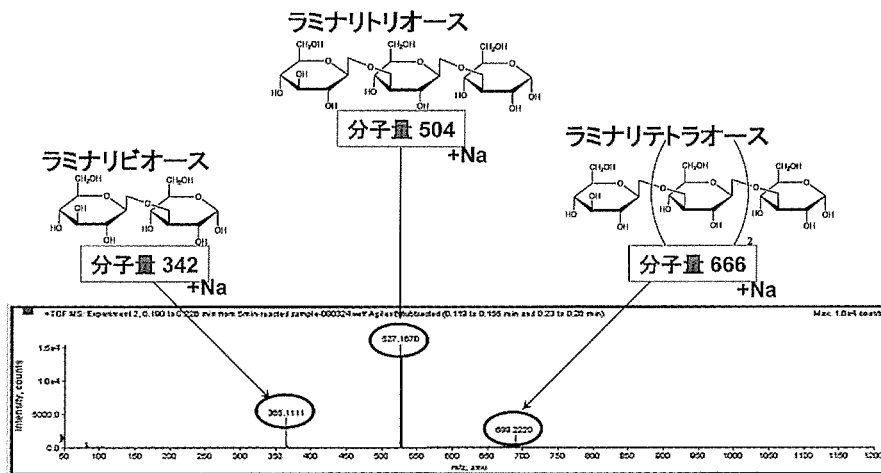


図5 *Streptomyces* sp AP77 株由来の β -1,3-グルカナーゼにより25°Cで5分間処理した β -1,3-グルカンの分解産物のTOF-MS解析.

6時間の反応では、単糖と2糖のみしか検出されなかった(図7)。

これらの結果から、*Streptomyces* sp. AP77株が産生する β -1,3-グルカナーゼの β -1,3-グルカンに対する分解様式は、2糖であるラミナリビオースとラミナリビオース間を標的として分解し、最終的には単糖と2糖からなる分解産物を産出することが明らかとなった。したがって、*Streptomyces* sp. AP77株が産生する β -1,3-グルカナーゼは、*P. porphyrae*の主要な細胞壁構成多糖である β -1,3-グルカンを内側から2糖ずつ次々に分解するエンド型分解酵素であり、このような β -1,3-グルカンの分解によって*P. porphyrae*を溶解することが示唆された。

考 察

近年の有明海の異変は、ノリ養殖現場で毎年発生している赤腐れ病の防除に用いられている

酸処理も原因の一つと考えられている。ノリ赤腐れ病は、原因真菌*Pythium porphyrae*により感染初期にノリ細胞内色素の遊離により、葉体表面に赤錆色の斑点を生ずることから名付けられたもので、この病斑は後に緑黄色から淡黄色となり、病状の進行とともに罹病部は褪色し、最終的にはノリ網から腐敗脱落する。本病害の進行速度は速く、発症すると一晩にして壊滅的な被害を招くことから、ノリ養殖現場において赤腐れ病の防除対策に、クエン酸等の有機酸やリン酸などが用いられている。

我々は、大量の酸処理による有明海の環境汚染が問題視されている酸処理法に代わる新たな赤腐れ病防除対策の一つとして、赤腐れ病原因真菌の細胞壁構成多糖を分解する酵素を用いた防除方法の確立を試みているが、これまでに*Streptomyces* sp. AP77株が産生する β -1,3-グルカナーゼ回収のための*Streptomyces* sp.

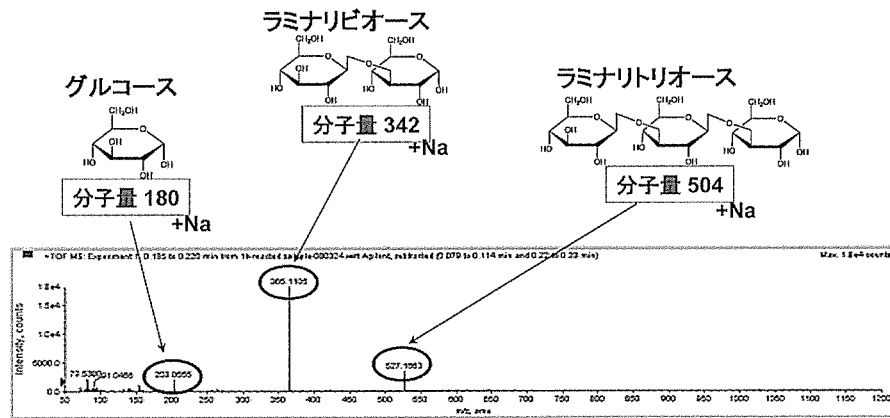


図6 *Streptomyces* sp AP77 株由来の β -1,3-グルカナーゼにより25°Cで1時間処理した β -1,3-グルカンの分解産物のTOF-MS解析。

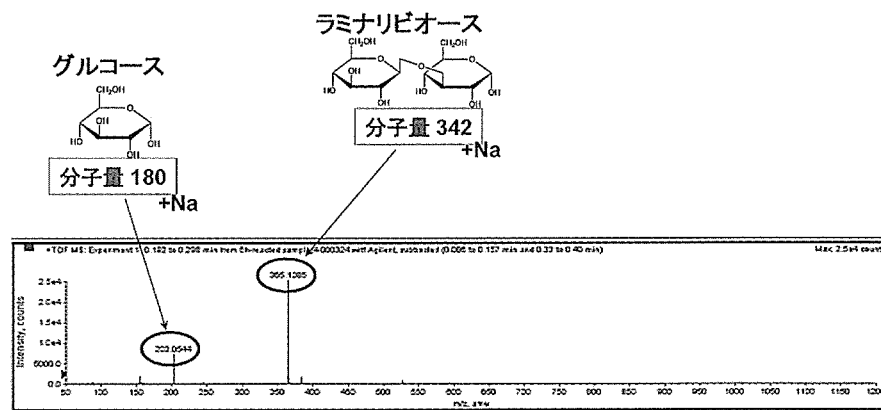


図7 *Streptomyces* sp AP77 株由来の β -1,3-グルカナーゼにより25°Cで6時間処理した β -1,3-グルカンの分解産物のTOF-MS解析。

AP77株の至適培養時間の他、本酵素の基質となる*P. porphyrae*の主要な細胞壁構成多糖 β -1,3-グルカンに対する至適反応時間ならびに至適反応温度についてすでに報告している(亀井&小石澤, 2008)。

そこで、本研究では、酸処理法に代わる*P. porphyrae*分解酵素を用いた環境保全型のノリ赤腐れ病防除法の確立に資する基礎情報を得ることを目的に、まず、実際に β -1,3-グルカナーゼが*P. porphyrae*を溶解する様子が肉眼的に観察されるのかを検討するために、タイムラプスシステム顕微鏡により径時観察した結果、5分間の反応では肉眼的な菌糸の溶解は確認できなかったものの、30分後には*P. porphyrae*菌糸の部分的溶解が肉眼でも確認され、最終的に、4時間もの反応では、ほぼ完全に菌糸を溶解することが観察された。さらに、 β -1,3-グルカンに対する分解様式をマススペクトロメトリーにより併せて検討したところ、 β -1,3-グルカンは β -1,3-グルカナーゼとの反応時間の経過とともに、多重オリゴ糖から最終的に単糖であるグルコースと2糖のラミナリビオースにまで分解されたことから、 β -1,3-グルカナーゼは β -1,3-グルカンの内側から二糖毎に分解するエンド型の分解により β -1,3-グルカンを分解することにより*P. porphyrae*を溶解することが明らかとなった。

これらの結果から、*Streptomyces* sp. AP77株が産生する β -1,3-グルカナーゼは、わずか10秒という短時間の処理でも*P. porphyrae*の細胞壁構成多糖である β -1,3-グルカンを分解し、最終的には2糖以下にまで分解することによって*P. porphyrae*を肉眼でも溶解が観察されるほど強い分解活性があり、海洋汚染が問題となっている有明海ノリ養殖現場での酸処理法に代わる新たなノリ赤腐れ病防除対策への利用が期待される。

参考文献

- 1) 青木幸久(2002): 分離海洋細菌 *Pseudomonas* sp. ND137株由来多糖分解酵素遺伝子のクローニングおよびその組換え体酵素によるノリプロトプラストの作出に関する研究. 佐賀大学大学院農学研究科修士論文.
- 2) 亀井勇統・小石澤 隼(2008): 分離海洋細菌 *Streptomyces* sp. AP77株由来の β -1,3-グルカナーゼの β -1,3-グルカン分解における至適活性条件. *Coastal Bioenvironment* 11, 27-35.
- 3) Kitamura, E., H. Myouga, and Y. Kamei (2002): Polysaccharolytic activities of bacterial enzymes which degrade the cell walls of *Pythium porphyrae*, a causative fungus of red rot disease in *Porphyra yezoensis*. *Fisheries Sci.*, 68, 436-445.
- 4) Kitamura, E. and Y. Kamei (2003): Molecular cloning, sequencing and expression of the gene encoding a novel chitinase A from a marine bacterium, *Pseudomonas* sp. PE2 and its domain structure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61, 140-149.
- 5) Kitamura, E. and Y. Kamei (2006): Molecular cloning of the gene encoding β -1,3(4)-glucanase A, that is essential enzyme for degradation of *Pythium porphyrae* cell walls from *Pseudomonas* sp. PE2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71, 630-637.
- 6) 小石澤 隼・亀井勇統(2007): ノリ赤腐れ病原真菌を溶解する *Streptomyces* sp. AP77株由来 β -1,3-グルカナーゼ遺伝子のクローニングと解析. *Coastal Bioenvironment* 9, 41-50.
- 7) 小石澤 隼・亀井勇統(2008): ノリ赤腐れ病原真菌を溶解する *Streptomyces* sp. AP77株由来 β -1,3-グルカナーゼの性状. *Coastal Bioenvironment* 10, 11-18.
- 8) Woo, J. H., E. Kitamura, H. Myouga, and Y. Kamei (2002): An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. strain AP77 is specific for *Pythium porphyrae*, a causative agent of red rot disease in *Porphyra* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 2666-2675.
- 9) Woo, J. H. and Y. Kamei (2003): Antifungal mechanism of an anti-

Pythium protein (SAP) from the marine bacterium *Streptomyces* sp. strain AP77 is specific for *Pythium porphyrae*, a causative agent of red rot disease in *Porphyra* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62, 407-413.