

## 受賞者総説

## アルギン酸分解性海洋細菌とその応用に関する研究\*1

(平成 11 年度日本水産学会賞奨励賞受賞)

澤 辺 智 雄\*2

北海道大学大学院水産科学研究科

アルギン酸は  $\beta$ -D-マンニユロン酸と  $\alpha$ -L-グルロン酸の 2 種のウロン酸を最小構成単位とした直鎖の多糖類であり,<sup>1)</sup> 食品, 繊維, 印刷, 発酵, 医療・歯科材料および化粧品などの分野で広く利用されている。<sup>2)</sup> アルギン酸原料のほとんどは *Laminaria* 属, *Fucus* 属および *Macrocystis* 属などの主要な大型褐藻類に由来する。このため, 特にコンブ類をはじめ大型褐藻類が広く分布しコンブ養殖が積極的に進められている北海道沿岸域はアルギン酸の宝庫といえる。

アルギン酸は陸上に生息する生物にとっては難消化性の物質であるが, 海洋環境, 特に褐藻類の藻場および養殖域周辺からは, アルギン酸を分解する海洋細菌が多数分離される。<sup>3-7)</sup> 筆者の研究を通じて, アルギン酸分解性海洋細菌の中に水産資源との関わりが極めて深い細菌の存在が明らかとなりつつあり, 特にコンブとアワビに関わりの深い 2 種類の新しいアルギン酸分解性細菌, *Pseudoalteromonas elyakovii*<sup>8)</sup> および *Vibrio halioticoli*<sup>9)</sup> 見いだすことができた。近年, 両菌種を含めた種々の細菌が驚くほど多様なアルギン酸分解戦略を持つことが示され, アルギン酸分解性細菌の生物学と生態学は興味ある研究対象となっている。本総説では, ユニークなアルギン酸分解性細菌の知見を紹介するとともに, 筆者が見いだした 2 種類の海洋細菌の特性と生態について述べる。

## 1. アルギン酸分解性細菌の分布と役割

アルギン酸分解性細菌の分離例は海洋環境試料からの場合が圧倒的に多く, 海水試料,<sup>6-7)</sup> 褐藻類表面,<sup>5,10)</sup> 魚介類組織内<sup>5,11)</sup> など様々である。報告例からのみでは分離されたアルギン酸分解性細菌の種を全て把握することは困難であるが, 現時点で正式に種名が認められているアルギン酸分解性海洋細菌は *Pseudoalteromonas* 属 7 菌種, *Vibrio* 属 4 菌種, *Alteromonas* 属 1 菌種におよび, その他 *Cytophaga* 属, *Shewanella* 属細菌の中にもアルギン酸分解性を示す菌種が存在する。このうち, 筆者

は, コンブ穴あき症患者部から *Pseudoalteromonas elyakovii*<sup>10)</sup> およびエゾアワビ消化管から *Vibrio halioticoli*<sup>12)</sup> を分離し, 新たなアルギン酸分解性海洋細菌として記載した。<sup>8-9)</sup> アルギン酸分解性海洋細菌はアルギン酸を単一の炭素源として利用できる種が多いことから, これらの細菌は褐藻類由来のアルギン酸を効率的に利用するようにアルギン酸分解能を獲得し, かつ褐藻類に密接な生態をおくるように進化したと推察される。

一方, 陸上環境を主たる生息場所とする細菌からは, アルギン酸分解性細菌の分離例は少なく, それらの菌種も限られており, *Pseudomonas aeruginosa*,<sup>13)</sup> *Azotobacter vinelandii* および *A. chroococcum*,<sup>14)</sup> *Klebsiella pneumoniae*,<sup>15)</sup> *Bacillus circulans*,<sup>16)</sup> *Sphingomonas* 属細菌 A1 株,<sup>17)</sup> *Pseudomonas* 属細菌 OS-Alg-9 株<sup>18)</sup> などが知られているのみである。アルギン酸起源物質の少ない土壌, 気圏, 淡水環境に生息する細菌がアルギン酸分解能を示す理由は, 1) 自己の細胞増殖のため, 2) アルギン酸の利用のため, の 2 つが明らかになっている。まず, 前者の細菌には, *P. aeruginosa* を始めとする *Pseudomonas* 属細菌, *A. vinelandii* および *A. chroococcum* が含まれる。これらの細菌は, アルギン酸を合成して細胞表面をコートすることが知られ, アルギン酸生合成オペロンの制御下にアルギン酸分解酵素遺伝子が配置されている。<sup>1)</sup> 従って, アルギン酸を合成する細菌はアルギン酸粘質層で覆われた自己の細胞の分裂・増殖をスムーズに行わせるためにアルギン酸分解能を必要とする。また, 後者の細菌は, バイオテクノロジー産業が新たに生み出したといっても過言ではない細菌であり, アルギン酸ビーズを用いた細胞固定化技術を用いた生産工程を導入した工場の廃液から分離された *Sphingomonas* sp. A1 株<sup>17)</sup> と *Pseudomonas* sp. OS-Alg-9 株<sup>18)</sup> が該当する。驚くことに, *Sphingomonas* sp. A1 株は, アルギン酸分解酵素を菌体外に分泌せず, 細胞表面に“ピット”構造を形成し, 高分子アルギン酸を“丸飲み”にして資化す

\*1 Properties of Novel Alginateolytic Marine Bacteria and their Applications for Fisheries science.

\*2 Tomoo Sawabe (Graduate School of Fisheries Science, Hokkaido University, Minato, Hakodate 041-8611, Japan).

る機構を有している。<sup>19)</sup> 現在、このアルギン酸の“丸飲み”機構に関与する高分子アルギン酸特異的トランスポーター遺伝子群が同定されてきている。<sup>20)</sup>

## 2. コンプの穴あき症と *Pseudoalteromonas elyakovii*

北海道は日本最大のコンプ生産地であり、促成栽培も盛んに行われている。ところが、1985年に利尻島<sup>10)</sup>および1998年に南茅部町<sup>21)</sup>の養殖コンプに穴あき症と呼ばれる疾病が発生し、大きな漁業被害をもたらした。両件とも、本疾病の原因究明のため、罹病コンプの患部について細菌検査を行い、両検体からコンプ片分解性細菌が分離された。このうち、利尻島の罹病個体から分離されたH-4株と南茅部罹病個体から分離されたO21株およびO22株は *Pseudoalteromonas* 属に同定され、3株とも同一種の細菌であることが判明した。<sup>21)</sup> さらに、詳細な分類学的検討を行ったところ、これらの菌株はロシアのウラジオストック近海で採取されたエゾイガイ (*Crenomytilus grayanus*) から分離された *Alteromonas elyakovii* KMM162株とも同種であった。<sup>8,21)</sup> *A. elyakovii* は種名の優先権はあるものの、国際的に正式に認められた菌種ではなかったため、最新の細菌分類体系に従って *Pseudoalteromonas elyakovii* と命名した。<sup>8)</sup> コンプ養殖域周辺環境からは、数多くのアルギン酸分解性細菌が分離され、*P. elyakovii*, *P. carrageenovora*, *P. espejiana* および *P. distincta* などに類似の表現形質をもつ菌株がコンプ分解性を示し、中でも *P. elyakovii* H-4株は極めて強いコンプ片分解性を示した。一般的にコンプをはじめとする褐藻類の細胞壁の主要骨格は、セルロースとアルギン酸であり、小繊維を構成するセルロース鎖にアルギン酸が網状に付着し、その両者を糖タンパク質が架橋し三次元構造を形成している。<sup>22)</sup> また、アルギン酸が細胞間の粘質多糖であることも知られている。穴あき症の発症メカニズムを明らかにするため、H-4株のアルギン酸分解酵素に着目し、酵素の特性を調べたところ、本菌は菌体内と菌体外にアルギン酸分解酵素を産生していることが明らかとなった。そのうち菌体外酵素の精製に成功し、その分子量は32 kDa、サブユニット構造は持たないタンパク質であった。<sup>23-24)</sup> 本菌体外酵素は、アルギン酸分子中のマンニユロン酸ブロックとグルロン酸ブロックのいずれも分解できる今までに報告例がない基質特異性の広い酵素であり、<sup>24)</sup> しかも海水成分で活性化された。<sup>23)</sup> また、菌体内酵素(群)は、高分子のアルギン酸に対する分解性が極めて弱いが、重合度が20程度のポリマンニユロン酸ブロックおよびマンニユ

ロン酸-グルロン酸混合結合ブロックに強い分解性を示す酵素であった。<sup>25)</sup> この菌体内酵素(群)の精製には成功していないが、これらが本菌の細胞内でのアルギン酸代謝の出発点となる鍵酵素と考えられる。以上、本菌がアルギン酸を唯一の炭素源として利用し、同分子を海水中で極めて効率よく分解できる単純かつ合理的なアルギン酸分解戦略を有していることから、本菌のアルギン酸分解メカニズムはコンプにとって疾病の脅威となるものと推察される。

ところで、*P. elyakovii* はコンプ穴あき症の発症に関与する病原細菌の側面を持つが、一方でH-4株の産生する菌体外アルギン酸分解酵素は基質特異性が広く、かつ海水中での安定性が高い特徴を示した。そこで、本酵素の有効利用を検討した結果、本酵素を用い細胞膜機能を十分に保持した活力の高いコンプのプロトプラストを大量に作出することに成功した。<sup>26)</sup> さらに、得られたプロトプラストの培養を試み、3-4ヶ月後にはほぼ幼孢子体に近い状態まで再生させることに世界ではじめて成功した。<sup>27-28)</sup>

また、本酵素を用いてアルギン酸を分解して生じるアルギン酸オリゴ糖を魚肉タンパク質の機能改変を目的とした糖修飾に利用したところ、コイ筋原繊維タンパク質の1) 低いイオン強度下における溶解性の向上、<sup>29)</sup> 2) 熱安定性の向上、<sup>3)</sup> 3) 乳化活性および乳化安定性の向上<sup>3)</sup> に効果があることが示された。この効果は、糖修飾試薬として一般的に用いられる低分子剤のグルコースや高分子剤のデキストリンによる機能改変効果より優れていた。

## 3. アワビと *Vibrio halioticoli*

エゾバフンウニ、エゾアワビは褐藻類に嗜好性を示す海の草食性動物として知られる。これらの海産動物の消化管内からも数多くのアルギン酸分解細菌が分離されており、<sup>12)</sup> 摂餌した海藻成分の分解における宿主と消化管内細菌との間の様々な関係が注目された。

中でもエゾアワビ消化管から分離された菌株の大部分を占めるアルギン酸分解性非運動性通性嫌気性細菌は *Vibrio* 属の新種、*V. halioticoli* と命名された。<sup>9)</sup> 本菌はアルギン酸ゲルへの付着性を有し、アルギン酸を唯一の炭素源として利用し、さらに多種のアルギン酸分解酵素を菌体内外に産生するなど、アルギン酸分解に関連した非常にユニークな特性を示した。<sup>4)</sup> このことは、*V. halioticoli* がエゾアワビ消化管内に定着し、消化管内環境に適応した効率的なアルギン酸分解機構を発達させているものと考えられている。ルーメン細菌の一種である *Ruminococcus* 属細菌などは、セルラーゼ複合体(セル

\*3 佐藤 良, 澤辺智雄, 佐伯宏樹:平成12年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 2000, p. 186.

\*4 澤辺智雄, 大塚美和, 杉村逸郎, 絵面良男:平成8年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 1996, p. 102.

ローソーム)を産生し、ルーメン内でのセルロース分解に適応していることが知られる。<sup>30)</sup> *V. haliotocoli* の細胞構造の詳細な電子顕微鏡観察は行っていないが、本菌がセルロソームあるいは類似の構造体を有している可能性も期待され、陸上草食性動物消化管内の微生物ワールドと対比しうる海洋細菌として注目される。

次に、*V. haliotocoli* のアワビ消化管に定着するメカニズムの解明を目的とし、本菌の生態を検討した。まず、*V. haliotocoli* 菌株を可能な限り迅速に、そして高い精度で同定するための2種類の特異検出同定手法を開発した。一つは *V. haliotocoli* と他の *Vibrio* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の相違を利用し多型を観察する 16S rDNA PCR/RFLP 法であり、<sup>35)</sup> 他方は *V. haliotocoli* と他の細菌種との DNA 相同性の低いことを利用し染色体 DNA をプローブに用いたコロニーハイブリダイゼーション法である。<sup>36)</sup> 両特異検出同定手法を利用し、アワビ養殖施設周辺環境海水、餌料珪藻、糞便および他の海産無脊椎動物消化管内から *V. haliotocoli* の検出を行ったところ、1) *V. haliotocoli* はエゾアワビが底性生活に移行した稚貝の餌料となる付着微細藻類に付着し消化管内に取りこまれるが、稚貝の時期には消化管で優勢とならない、<sup>37)</sup> 2) 餌料がコンブおよび海藻粉末を含む人工配合飼料に代わるとともに *V. haliotocoli* の増殖しやすい環境が消化管内に構築される、<sup>38)</sup> 3) *V. haliotocoli* がエゾアワビ以外に、クロアワビ、トコブシ、フクトコブシ、サザエの消化管から分離され、アワビ類を中心とした極めて限られた海産動物種の消化管に生息している<sup>39)</sup> ことを明らかにした。以上の結果は、*V. haliotocoli* がアワビ類との間に共生状態を成立させていることを示すものと考えられた。

#### 4. おわりに

環境中には様々なアルギン酸分解性細菌が存在し、それぞれ独自のアルギン酸分解機構を発達させている。筆者が見いだした *P. elyakovii* および *V. haliotocoli* も例外ではなく、それぞれ特徴的なアルギン酸分解機構を有する。さらに、この2菌種は海洋生物との関わりが深く、水産学的にも重要な細菌種であることが明らかになった。これまでに、*P. elyakovii* H-4 株から菌体外アルギン酸分解酵素遺伝子のクローン化に成功しているため、<sup>40)</sup> 今後はこの遺伝子を用い、1) コンブ穴あき症防

除対策の一環である *P. elyakovii* 菌株の迅速検出法の開発、2) オリゴ糖の大量調製に必要な酵素を供給するための組換え酵素の大量発現系の検討などを進める。また、*V. haliotocoli* では、アワビとの直接的な共生関係が成立しているか否かの証明を行うため、エゾアワビ消化管内細菌相の人工的置換を試みている。いずれの課題とも、コンブおよびアワビの養殖事業へ大きく貢献できることを願って研究を進展させている。

#### 謝 辞

本稿で紹介した著者の研究は、北海道大学水産学部微生物学講座において行ったものであり、北海道大学大学院水産科学研究科教授絵面良男先生には格別のご配慮をいただきました。心から感謝いたします。また、本研究の遂行に当たり、ご指導ご鞭撻を賜った北海道大学名誉教授木村喬久先生、北海道大学大学院水産科学研究科教授吉水守先生、同助教授田島研一先生に心から御礼申し上げます。また、本研究を大きく進展させる貴重な御助言、御協力をいただいた北海道大学名誉教授辻野勇先生、東海大学教授嵯峨直恒先生、マンチェスターメトロポリタン大学教授ピーター・ガセサ先生、フランス国立科学研究所リチャード・クリステン博士、北海道大学大学院水産科学研究科助教授佐伯宏樹先生をはじめとする皆様方には厚く御礼申し上げます。さらに本研究の多くの部分に協力していただいた学生・大学院生の皆様に深く感謝いたします。最後に、本研究に格別の評価をしていただいた日本水産学会および多くの皆様に感謝申し上げます。

#### 文 献

- 1) P. Gacesa: Bacterial alginate biosynthesis-recent progress and future prospects. *Microbiol.*, **144**, 1133-1143 (1998).
- 2) V. J. Chapman and D. J. Chapman: Algin and alginates, in "Seaweeds and their uses" (eds. By V. J. Chapman and D. J. Chapman), Chapman and Hall, New York, 1980, pp. 194-278.
- 3) R. S. Doubet and R. S. Quatrano: Isolation of marine bacteria capable of producing specific lyases for alginate degradation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 754-756 (1982).
- 4) J. F. Preston III., T. Romeo, J. C. Bromley, P. W. Robinson, and H. C. Aldrich: Alginate lyase-secreting bacteria associated with the algal genus *Sargassum*. *Dev. Ind. Microbiol.*, **26**, 727-740 (1985).
- 5) 北御門学, 曾照皇, 青木恭彦, 山口邦子, 荒木利芳: アルギン酸分解酵素産生細菌の自然界からの分離. 日水誌,

\* 5 田中礼士, 澤辺智雄, 絵面良男: 平成 11 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 1999, p. 41.

\* 6 田中礼士, 澤辺智雄, 絵面良男: 平成 11 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, 1999, p. 92.

\* 7 田中礼士, 澤辺智雄, 吉水 守, 絵面良男: 平成 12 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 2000, p. 33.

\* 8 田中礼士, 澤辺智雄, 絵面良男: 平成 10 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, 1998, p. 112.

\* 9 瀬戸口央, 田中礼士, 澤辺智雄, 吉水守, 樋口 聡, 瀬戸口脩, 絵面良男: 平成 12 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 2000, p. 34.

\*10 澤辺智雄, 絵面良男, Peter Gacesa: 平成 11 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 1999, p. 41.

- 55, 709–713 (1989).
- 6) M. Uchida and A. Nakayama: Isolation of *Laminaria*-frond decomposing bacteria from Japanese coastal waters. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 1865–1871 (1993).
  - 7) M. Uchida, A. Nakayama, and S. Abe: Distribution and characterization of bacteria capable of decomposing brown algae fronds in waters associated with *Laminaria* vegetation. *Fisheries Sci.*, **61**, 117–120 (1995).
  - 8) T. Sawabe, R. Tanaka, M. M. Iqbal, K. Tajima, Y. Ezura, E. P. Ivanova, and R. Christen: Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM162<sup>T</sup> and five strains isolated from spotted fronds of *Laminaria japonica* to *Pseudoalteromonas elyakovii* comb. nov. and the extended description of the species. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **50**, 265–271 (2000).
  - 9) T. Sawabe, I. Sugimura, M. Ohtsuka, K. Nakano, K. Tajima, Y. Ezura, and R. Christen: *Vibrio halioticoli* sp. nov., a non-motile alginolytic marine bacterium isolated from the gut of abalone *Haliotis discus hannai*. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, **48**, 573–580 (1998).
  - 10) T. Sawabe, Y. Ezura, and T. Kimura: Characterization of an alginolytic marine bacterium from decaying Rishirikombu *Laminaria japonica* var. *ochotensis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 141–145 (1992).
  - 11) E. P. Ivanova, V. V. Mikhailov, E. A. Kiprianova, G. F. Levanova, A. D. Garagulya, G. M. Frolova, and V. I. Svetashev: *Alteromonas elyakovii* sp. nov. a new bacterium isolated from marine mollusks. *Russian J. Mar. Biol.*, **22**, 209–215 (1996).
  - 12) T. Sawabe, Y. Oda, Y. Shiomi, and Y. Ezura: Alginate degradation by bacteria isolated from the gut of sea urchins and abalones. *Microb. Ecol.*, **30**, 192–202 (1995).
  - 13) A. Linker and L. R. Evans: Isolation and characterization of an alginase from mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **159**, 958–964 (1984).
  - 14) L. Kennedy, K. R. McDowell, and I. W. Sutherland: Alginases from *Azotobacter* species. *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 2465–2471 (1992).
  - 15) J. Boyd and J. R. Turvey: Isolation of a poly- $\alpha$ -L-guluronate lyase from *Klebsiella aerogenes*. *Carbohydr. Res.*, **57**, 163–171 (1977).
  - 16) L. B. Hansen, R. S. Doubet, and J. Ram: Alginase enzyme production by *Bacillus circulans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 704–709 (1984).
  - 17) Y. Yonemoto, K. Murata, A. Kimura, H. Yamaguchi, and K. Okayama: Bacterial alginate lyase: characterization of alginate lyase-producing bacteria and purification of the enzyme. *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 152–157 (1991).
  - 18) S. Kinoshita, Y. Kumoi, A. Ohshima, T. Yoshida, and N. Kasai: Isolation of an alginate-degrading organisms and purification of its alginate lyase. *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 74–78 (1991).
  - 19) T. Hisano, Y. Yonemoto, T. Yamashita, Y. Fukuda, A. Kimura, and K. Murata: Direct uptake of alginate molecules through a pit on the bacterial cell surface: a novel mechanism for the uptake of macromolecules. *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, 538–544 (1995).
  - 20) K. Momma, W. Hashimoto, O. Miyake, H.-J. Yoon, S. Kawai, Y. Mishima, B. Mikami, and K. Murata: Special cell surface structure, and novel macromolecule transport/depolymerization system of *Sphingomonas* sp. A1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 425–435 (1999).
  - 21) 澤辺智雄, 成田幹夫, 田中礼士, 生地暢, 田島研一, 絵面良男: マコンブ穴あき症藻体からの *Pseudoalteromonas elyakovii* 菌株の分離. 日本誌, **66**, 249–254 (2000).
  - 22) B. Kloareg and R. S. Quatrano: Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu Rev.*, **26**, 259–315 (1988).
  - 23) T. Sawabe, Y. Ezura, and T. Kimura: Purification and characterization of an alginate lyase from marine *Alteromonas* sp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 521–527 (1992).
  - 24) T. Sawabe, M. Ohtsuka, and Y. Ezura: Novel alginate lyases from a marine bacterium *Alteromonas* sp. strain H-4. *Carbohydr. Res.*, **304**, 69–76 (1997).
  - 25) T. Sawabe, C. Sawada, E. Suzuki, and Y. Ezura: Intracellular alginate-oligosaccharide degrading enzyme activity that is incapable of degrading intact alginate from a marine bacterium *Alteromonas* sp. *Fisheries Sci.*, **64**, 320–324 (1998).
  - 26) T. Sawabe, Y. Ezura, and T. Kimura: Application of an alginate lyase from *Alteromonas* sp. for isolation of protoplasts from a brown algae *Laminaria japonica*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 705–709 (1993).
  - 27) T. Sawabe and Y. Ezura: Regeneration from *Laminaria japonica* Areschoug (Laminariales, Phaeophyceae) protoplasts isolated with bacterial alginase. *Plant Cell Reports*, **15**, 892–895 (1996).
  - 28) T. Sawabe, Y. Ezura, and H. Yamamoto: Plant regeneration from protoplasts of *Laminaria japonica* Areschoug (Laminariales, Phaeophyceae) in a continuous-flow culture system. *Plant Cell Reports*, **17**, 109–112 (1997).
  - 29) R. Sato, T. Sawabe, H. Kishimura, K. Hayashi, and H. Saeki: Preparation of neoglycoprotein from carp myofibrillar protein and alginate oligosaccharide: Improved solubility in low ionic strength medium. *J. Agri. Food Chem.*, **48**, 17–21 (2000).
  - 30) H. J. Gilbert and G. P. Hazlwood: Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 187–194 (1993).