



Title	海洋細菌 <i>Alteromonas</i> sp. の産生するアルギン酸分解酵素の特性とその応用に関する研究
Author(s)	澤辺, 智雄
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産学)
Dissertation Number	乙第4880号
Issue Date	1995-12-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3108234
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/42784
Type	doctoral thesis
File Information	sawabe_thesis.pdf



海洋細菌 *Alteromonas* sp. の産生するアルギン酸分解
酵素の特性とその応用に関する研究

北海道大学 平成 7 年度

澤辺 智雄

目次

緒言	-----	1
第一章 海洋細菌 <i>Alteromonas</i> sp. H-4 株の産生するアルギン酸分解酵素の特性について	-----	5
第一節 海洋細菌 <i>Alteromonas</i> sp. H-4 株の分類学的検討	-----	5
材料と方法	-----	6
結果	-----	9
考察	-----	13
第二節 <i>Alteromonas</i> sp. H-4 株のアルギン酸分解酵素産生条件の検討	-----	18
材料と方法	-----	18
結果	-----	21
考察	-----	26
第三節 <i>Alteromonas</i> sp. H-4 株の産生する菌体外アルギン酸分解酵素の精製	-----	31
材料と方法	-----	31
結果	-----	36
考察	-----	51
第四節 精製アルギン酸分解酵素の酵素化学的性状	-----	53
材料と方法	-----	53
結果	-----	55
考察	-----	61
第五節 精製アルギン酸分解酵素の基質特異性とアルギン酸分解様式の推定	-----	68
材料と方法	-----	68
結果	-----	70
考察	-----	79
第一章要約	-----	86
第二章 マコンブ (<i>Laminaria japonica</i>) 細胞のプロトプラスト化への <i>Alteromonas</i> sp. H-4 株のアルギン酸分解酵素の利用	-----	88
第一節 マコンブプロトプラストの作出条件の検討	-----	88
材料と方法	-----	89
結果	-----	93
考察	-----	106

第二節 マコンブプロトプラストの培養条件と藻体再生 の検討	-----	109
材料と方法	-----	109
結果	-----	115
考察	-----	119
第二章要約	-----	125
総合考察	-----	127
謝辞	-----	134
参考文献	-----	135

緒言

アルギン酸は褐藻類の細胞間粘質多糖成分の一つとして良く知られている直鎖の酸性多糖であり、*Laminaria* 属、*Fucus* 属および *Macrocystis* 属の褐藻類では乾燥重量の約 30 %を占めている(Chapman & Chapman,1980)。アルギン酸の最少構成単位は β -D-マンニユロン酸(ManA)とその C5-epimer である α -L-グルロン酸(GulA)の 2 種のウロン酸であり、アルギン酸分子中には、ManA が β -1,4-結合したポリマー領域 (polyM ブロック)、GulA が α -1,4-結合したポリマー領域 (polyG ブロック)および ManA と GulA が不規則に 1,4-結合した領域 (MG random ブロック)の存在が明らかとなっている(Haug et al, 1966, 1967)。褐藻類以外では、アルギン酸を産生する微生物が知られており、例えばヒト肺嚢胞繊維症原因菌 *Pseudomonas aeruginosa* 粘調性変異株、植物病原菌 *P.syringae* pv. *glycinea* および *Azotobacter* 属細菌が産生する菌体外多糖がアルギン酸である。細菌の産生する菌体外アルギン酸は接着因子として、あるいは乾燥や食菌作用から細菌細胞を保護する機能を有しており、*P. aeruginosa* 粘調株の菌体外アルギン酸はヒト肺嚢胞繊維症の病原因子の一つである。しかしながら、細菌が生合成するアルギン酸は β -D-マンニユロン酸がアセチル化されている点で海藻由来のものとは異なっている(Evans & Linker,1973; Osman et al.,1986; Cote & Krull,1988)。アルギン酸の生合成系は mannose あるいは fructose から GDP-mannuronate を経てアルギン酸に重合されることが大型褐藻類 *Fucus* 属、*Azotobacter vinelandii* および *P. aeruginosa* 粘調性変異株等で証明されており(Percival & McDowell, 1981; 西澤, 1985; Hisano et al, 1995)、さらに、polymer-依存性の C5-epimerase の存在が明らかにされていることから、mannuronate から guluronate への変換経路の存在も推定されている(Percival & McDowell, 1981; Gacesa, 1987; Franklin et al., 1994)。海藻由来のアルギン酸は海藻の種類、部位、季節で M/G 比が異なるが、この epimerase 活性の強弱との間に相関性が見られるとの報告例もある(西澤, 1985)。褐藻類を原料として世界中で年間 2 万トン以上生産されているアルギン酸ナトリウム(Alg-Na)はその溶液が粘調性を示し、また、2 価金属イオン、特に Ca^{2+} イオンの存在下で不溶性のゲルを形成する特徴を示すことなどから、食品、繊維、印刷産業、発酵工業、医薬、化粧品分野で広く利用されている(Chapman & Chapman,1980)。

アルギン酸分解酵素は、アルギン酸の分解を触媒する酵素の総称であり、ウニ (Eppley & Lasker,1959)、アワビ(辻野・斉藤, 1963; Nakada & Sweeny,1967; Elyakova & Favorov,1974)、サザエ(Muramatsu et al.,1977)、タツナミガイ(Nishizawa et al.,1968)などの食藻性動物、褐藻

類(Madgwick et al.,1973)、海洋性真菌類(Wainwright & Sherbrock-Cox,1981)あるいは種々の陸性細菌(井上・安藤、1956; Boyd & Turvey,1977; Von Riesen 1980; Hansen et al., 1984; Linker & Evans, 1984; Kennedy et al.,1992)および海洋性細菌でアルギン酸分解酵素の分泌・産生が確認されている。特に、海水、海藻表面および海産食藻動物消化管から分離された海洋細菌にはアルギン酸分解性細菌が高頻度に認められ、その菌種は *Vibrio*(Ando & Inoue,1961; Sutherland & Keen, 1981; 北御門ら, 1989; Sawabe et al., 1995 in press), *Alteromonas* (Preston et al.,1985a; Romeo et al., 1986), *Photobacterium* (Preston et al.,1985a; Romeo & Preston, 1986), *Pseudomonas* (Kashiwabara et al.,1969 ; Davidson et al., 1976; Boyen et al.,1990b)と多岐にわたっている。また、珍しい例では、工場廃液(Yonemoto et al.,1991)やアルギン酸ビーズ固定化生物反応槽(Kinoshita,1991)からアルギン酸分解性細菌が分離されている。これらの生物由来のアルギン酸分解酵素の多くは抽出・精製が試みられ、酵素化学的特徴に関する知見が蓄積されてきており、そのほとんどの酵素が糖鎖の切断とともに反応生成物の不飽和化を伴う lyase であるとされている。加水分解を触媒するアルギン酸分解酵素の報告例はほとんどない(Gacesa,1992)。高等植物の細胞間粘質多糖であるペクチンを分解する酵素では加水分解酵素とリアーゼが見いだされ、その分解形式により詳細にタイプ分けされていることに比べると(Whitaker,1983)、アルギン酸分解酵素は endo-と exo-型の分解形式とアルギン酸分子中に存在する polyM と polyG の homopolymeric 領域それぞれに対する分解選択性の強さで、簡単にタイプ分けがなされているにすぎない(Gacesa,1992)。

これらのアルギン酸分解酵素に関する研究は、食藻動物の消化酵素としての機能の解明に始まり(Eppley & Lasker,1959; 辻野・斉藤、1963; Nakada & Sweeny,1967; Nishizawa et al.,1968; Elyakova & Favorov,1974; Muramatsu et al.,1977)、微生物によるアルギン酸代謝経路の解明(Preiss & Ashwell, 1962)あるいは、アルギン酸の分子構造あるいは生合成系の解明(Min et al.,1977; Boyd & Turvey,1978; Lange et al., 1989)、そして近年では褐藻類のプロトプラスト化に利用する研究が進められている(Preston et al.,1985b; Boyen et al., 1990a; Boyen et al., 1990b; Østgaard et al., 1993)。さらに、菌体外多糖としてアルギン酸を合成する *Pseudomonas aeruginosa* に起因する肺嚢胞繊維症の治療薬として *in vitro* および *in vivo* での効果を調べる試験が行われている他 (Bayer et al., 1992)、酵素反応で生成するオリゴ糖が植物の成長や腸内細菌の増殖を促進する効果も認められており(Natsume et al., 1994; Murata, 1994)、医学・農学等の分野での応用研究も進んできている。

ところで、日本は世界でも有数の食用海藻生産国であり、その中でも北海道沿岸海域は、

主にコンブ目植物を主体とする大型褐藻類の宝庫であり（長谷川、1959; Capman & Capman,1980）、北海道における食用コンブの生産量は日本の全生産量の約 9 割を占めている。特に、北海道南部の噴火湾沿岸域ではマコンブの養殖が盛んに行われている。ところが、マコンブの種苗育成中の種苗糸に赤色斑が生じ培養芽胞体が脱落する赤変病害の発生が見られ始め種苗供給に支障をきたしている。本赤変病害は北海道沿岸に常在する海洋細菌に起因し、本原因菌がコンブ母藻とともに種苗培養水槽中に混入するために発生することが明らかになっている(絵面ら、1988; Yumoto et al.,1989)。養殖マコンブの安定した生産を行うためには種苗培養時における赤変病原菌の防除の他に、マコンブ種苗の無菌培養系の確立や赤変病害抵抗性株の育種、あるいは天然母藻に依存しない種苗育成技術開発が必要である。さらに、細胞レベルでのマコンブの生理や葉状体への分化の機序に関しては不明の点が多く、マコンブの成熟の制御やラミナリア構造に関わる細胞分化因子も未解明の問題として残されている。これらを解明するための有効な手段として、プロトプラスト系の確立が求められている。海藻類のプロトプラストの生物活性を維持するために、海水存在下において低温での反応が要求されることから、これらの条件下でより効率よく働く優れたアルギン酸分解酵素の必要性が高まっている。

また、海洋資源の有効利用の一つとして大型海藻類のバイオマスエネルギーへの転換あるいはこれら藻体に豊富に含まれるビタミン・ミネラル・ファインケミカルズといった有価物を効率よく抽出する手法の開発が期待されている。しかし、高等植物と異なり、特殊な細胞間粘質多糖類（アルギン酸、寒天、カラギナン等）が有価物質抽出技術の大きな障害となっていることから、褐藻類ではアルギン酸分解酵素を、これらの技術開発のために利用することも考慮すべきである。

本研究で使用した H-4 株は 1985 年に利尻島で発生したコンブの穴あき症藻体から分離され、生化学的、形態学的特徴から *Alteromonas* sp. と同定された海洋細菌である。本菌は非常に強いアルギン酸分解活性を持ち、*in vitro* において 1-2 週間程でマコンブ藻体片を原型をとどめないまでに分解することから、コンブ穴あき症原因菌と考えられている(絵面、1986; Sawabe et al.,1992a)。なお、H-4 株が分離された利尻コンブ(*Laminaria japonica* var. *ochotensis*)は分類学上マコンブ(*Laminaria japonica*)の変種であるため、H-4 株のアルギン酸分解酵素はマコンブ藻体の分解にも有効で、細菌由来の新たなアルギン酸分解酵素として使用可能と考えられる。

そこで、本研究では H-4 株の産生するアルギン酸分解酵素の酵素化学的な性状を明ら

かにし、本酵素が現在望まれている難分解性海藻多糖のアルギン酸を効率よく分解できる酵素であることを実験的に立証するとともに、マコンブ細胞壁分解酵素としての利用の可能性についても検討を行った。まず、第一章において本菌の分類学的位置および本菌の産生するアルギン酸分解酵素の産生条件の検討、精製、そして酵素化学的諸性状を解明し、第二章ではマコンブ細胞のプロトプラスト化への応用を中心に H-4 株アルギン酸分解酵素の利用用途の検討を行った。

第一章 海洋細菌 *Alteromonas* sp. H-4 株の産生するアルギン酸分解酵素の特性について

褐藻類においても、バイオテクノロジーを利用した育種や培養技術の改良および宿主-病原菌相互作用の解明のための無菌培養系の確立が望まれている。その手段の一つとしてプロトプラストの作出が考えられるが、活性の高いプロトプラストを数多く得るためには海水成分存在下で効率よく働くアルギン酸分解酵素が必要である。特に、“海水存在下で、低温で効率良く働く酵素”という条件を満たすアルギン酸分解酵素源としては、海産食藻動物あるいは海洋微生物が考えられるが、資源の有限性や酵素活性の季節変動や個体差が大きい海産動物よりは、常時大量培養が可能な微生物を酵素源とする方が利点が多い。アルギン酸分解能を持つ細菌は海水中に比較的多くみられ、海洋環境下から分離されたアルギン酸分解能を有する細菌種は、*Pseudomonas* sp.(Preiss & Ashwell,1962; Kashiwabara et al.,1969; Davidson et al.,1976), *Agarbacterium alginicum*(Williams & Eagon, 1962), *Alginovibrio aquatilis*(Stevens & Levin,1976), *Beneckeia pelagia*(Sutherland & Keen,1981), *Photobacterium* sp.(Preston et al.,1985a; Romeo & Preston,1986), *Alteromonas* sp.(Preston et al.,1985a; Romeo et al.,1986), *Vibrio* sp.(北御門ら、1989; Sawabe et al., 1995 in press)等が報告されている。

当研究室でもコンブ穴あき症藻体から非常に強いアルギン酸分解能を有し、穴あき症の原因菌の一つと思われる、*Alteromonas* 属と同定される海洋細菌 H-4 株を分離している(Sawabe et al.,1992a)。従って、この *Alteromonas* sp. H-4 株の産生するアルギン酸分解酵素を“海水存在下で、低温で効率良く働く酵素”の候補として、その酵素化学的な性状を明らかにし、褐藻類のバイオテクノロジーへの応用や褐藻類の有効利用、さらにはコンブ穴あき症の原因究明にも役立たせることは非常に意義のあるものとする。

そこで、本章の第一節で *Alteromonas* sp.H-4 株の種レベルでの分類学的位置を検討し、第二節では H-4 株のアルギン酸分解酵素の産生条件を、第三節および第四節では H-4 株が菌体外に産生するアルギン酸分解酵素の精製と諸性状の検討を行い、第五節では精製した菌体外アルギン酸分解酵素の基質特異性を明らかにし、その作用様式を推察した。

第一節 海洋細菌 *Alteromonas* sp. H-4 株の分類学的検討

穴あき症はコンブ、ワカメなどの大型海藻類にしばしば認められる疾病である(木村ら,1976)。葉体全面に、海産動物の食害とは異なる形状を示す斑状の穴が多数認められ、そ

の斑状部の拡大とともに莖部のみを残して葉部が消滅する場合もある。H-4 株は穴あき症状を呈するリシリコンブ (*Laminaria japonica* var. *ochotensis*) の藻体表面から分離された海洋性の細菌である (Sawabe et al., 1992a)。本菌は強いアルギン酸分解活性を示し、*in vitro* においてコンブ葉体片を 1 週間足らずで分解することが認められている。従って、これらの特徴から、本菌株はコンブ穴あき症への関与が疑われている。

H-4 株はその主要性状から *Alteromonas* 属と同定されているが (Sawabe et al., 1992a)、現在までに知られているアルギン酸分解能陽性の *Alteromonas* 属菌種は *A. macleodii*, *A. espejiana*, *A. denitrificans* (Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edition, 1994), *A. carrageenovora*, *A. atlantica* (Akagawa-Matsushita et al., 1992) の 5 菌種のみである。そこで、本節では、この穴あき症原因菌と疑われている H-4 株の種レベルでの同定を試みた。

材料と方法

1. 供試菌株

1985 年に稚内水産試験場から送付された穴あき症コンブ藻体から分離し、当研究室に保存中の *Alteromonas* sp. H-4 株、および対照として *Alteromonas* 属 14 菌種の標準株を供試した。供試した対照株の種名、由来は以下の通りである ; *A. macleodii* IAM 12920^T (*Alteromonas* 属 type species), *A. espejiana* IAM 12640^T, *A. haloplanktis* IAM 12915^T, *A. hanedai* IAM 12641^T, *A. undina* IAM 12922^T, *Marinomonas communis* IAM 12914^T, *M. vaga* IAM 12923^T (Bergey's Manual of systematic bacteriology, 1984 では *A. communis*, *A. vaga* にそれぞれ分類), *A. nigrifaciens* IAM 13010^T (以上、東京大学応用微生物研究所より分与)、*A. atlantica* NCMB 301^T, *A. carrageenovora* NCMB 302^T, *A. marinopraescens* (= *A. haloplanktis*; Akagawa-Matsushita, 1993) ATCC 19648, *A. marinovulgaris* ATCC 14394, *A. rubra* ATCC 29570^T, *A. piscicida* NCMB 645。供試菌株はいずれも ZoBell 2216E 寒天培地 [ポリペプトン (日本製薬) 5.0 g, 酵母エキス (日本製薬) 1.0 g, 寒天 15.0 g, 75 % 人工海水 (ASW) 1,000 ml、pH 7.5-7.8; Oppenheimer & ZoBell, 1952] で継代培養を行った。

2. 形態学および生化学的性状

基礎培地として ZoBell 2216E 寒天培地を用い、常法に従って (医科学研究学友会, 1976; 絵面, 1990)、グラム染色、色素産生性、運動性、鞭毛染色 (West et al., 1977)、グルコースの酸化・発酵試験 (Leifson, 1963)、oxidase 試験 (Kovacs 法)、catalase 試験、塩類要求性試

験(Hidaka and Sakai, 1968)、高分子(デンプン・アルギン酸・寒天・キチン・ゼラチン・Tween 80)分解性、硝酸塩の還元能、発育温度域、有機物利用性、poly- β -hydroxybutyrate (PHB)の蓄積性を調べた。なお、有機物利用性は Basal seawater medium (NH_4Cl 1.5 g, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.1125 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.042 g, 50 % ASW 1,500 ml, pH 7.5-7.8; Baumann et al, 1984)を基礎培地とし、有機物(発育因子を要求する菌株は酵母エキスを終濃度で 0.01 %となるように培地に添加した)をそれぞれ添加した液体培地での発育の有無により判定した。また、有機物利用性試験後に、Nile blue 染色法により PHB の蓄積性を調べた(Ostle & Holt, 1982)。つまり、培養菌体をスライドグラスに固定した後、1.0 % Nile blue A 水溶液で 55 °C, 10 分間染色し、水洗後、8.0 % 酢酸で 1 分間処理を行った。この標本を蛍光顕微鏡下(Blue 励起)で観察し、PHB の蓄積性(PHB 顆粒はオレンジ色に染まる)を調べた。なお、いずれの試験とも培養温度は特記しない限り 20 °C とした。

H-4 株の鞭毛の配置は、新鮮培養菌体をコロジオン膜をはった銅メッシュ上にのせ、2 % 酢酸ウラニルで染色した後、透過型電子顕微鏡 (Hitachi H-300 型) で観察した。

菌体からの染色体 DNA の抽出・精製は Marmur (1961)の方法に従って行い、Marmur & Doty (1962) の加熱変性法により DNA の melting point から DNA GC moles %を算出した。

3. 菌体構成タンパク質 (whole Cell Protein) 電気泳動パターンの比較

供試菌株を ZoBell 2216E 液体培地で 20°C, 24 時間振盪培養した後、菌体を遠心分離 (10,000 rpm, 10 分)で集めた。菌体湿重量 1 mg に対し 5 μl の滅菌蒸留水に菌体を懸濁し、それと等量の 2x sodium dodecyl sulfate(SDS)-gel loading buffer[100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 200 mM dithiothreitol (DTT; 使用直前に加える), 2.5 % SDS, 0.2 % bromophenol blue(BPB), 20 % glycerol, Sambrook et al., 1989]を加え、100 °C, 5 分間加熱処理をした。この加熱処理試料を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)に供し、whole cell protein の分離を行った。なお、ゲルのアクリルアミド濃度は 10 % とした。

電気泳動後、ゲルを Coomassie brilliant blue (CBB) R250 で染色し、画像解析装置 (Bioimage, Millpore) の Whole band プログラムにより、各菌株間で分子量の相同なバンド数の解析を行い、2 菌株間で検出された全バンド数に対する相同バンド数の比率を算出し、これを類似度とした。なお、本実験では 94 kDa 以上および 21 kDa 以下のタンパク質は解析の対象としなかった。

4. DNA-DNA 相同性の測定

DNA 相同性の測定は Ezaki et al. (1989)のMicroplate hybridizaion 法に準じて行った。全ての菌株のDNAの抽出・精製はMarmur法(1961)により行った。精製DNAは0.1xSSC溶液(またはDW)に溶解し、使用するまで-20°Cで保存した。DNAの精製度は A_{260}/A_{280} で測定し、1.7以上であることを確認した。なお、*A.hanedai* IAM 12641は供試しなかった。

H-4 株, *A. macleodii* IAM 12920, *A. espejiana* IAM 12640のDNAをエタノール沈殿し、蒸留水に溶解して1,000 µg/mlの濃度に調整した後、photobiotin (SP-1000, Vector Laboratories Inc.)で標識し、probe DNAを調整した。

各菌株から精製したDNA溶液を0.1xSSC溶液で40 µg/mlの濃度に調整した後、100 °Cで5分間加熱し、DNAを1本鎖に変性させた。加熱変性後、直ちに氷冷し、2x (PBS[137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2] +0.1M MgCl₂)溶液を等量加えた。このDNA溶液各100 µlをマイクロプレート(Immuron 200、FIA/LIAプレート, black type; Greiner labotechnik, Germany)の各ウェルに加えて(1菌株DNAにつき 3ウェルづつ使用)、37°Cで1時間保温して、DNAをマイクロプレートに固定した。保温後、DNA溶液を捨て、PBS 250µlで1回マイクロプレートを洗浄し、直ちにハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション反応条件はprobe DNAのGC moles %の値をもとに、Meinkoth-Wahl(1984) の式から算出した。以下にMeinkoth-Wahl(1984) の式を示す；

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log M + 0.41[\%(G + C)] - \frac{500}{n} - 0.627(\% \text{ formamide})$$

M は溶液中の1価のアルカリ金属イオンのモル濃度(mol/l)

n は最少のprobe DNA塩基の長さ

* $M=0.39$ (in 2xSSC)、 $n \approx 300-400$ (after 50W, 5-30 times of sonications)

Pre-hybridization液[2xSSC(0.3M NaCl, 0.03 M Na₃-Citrate·2H₂O), 45 % formamide(ナカライテスク), 5x Denhardt solution[2.0 % bovine serum albumin, 2.0 % polyvinylpyrrolidone(Sigma), 2.0 % ficoll 400(Sigma)], 25 µg/ml denatured salmon sperm DNA, pH 7.0]を加え、37 °C, 1時間のpre-hybridizationを行った。次に、H-4 株, *A. macleodii* IAM 12920, *A. espejiana* IAM 12640 DNAをそれぞれ probe としたhybridization溶液[32 %-36 % formamide, 2xSSC, 5x Denhardt solution, 25 µg/ml denatured salmon sperm DNA (5 µg/well), 100 ng/ml labeled DNA(20 ng/well), 5 % dextran sulfate]を加え、至適反応条件(T_m-25 °C)下(本実験では45 °Cになるようにformamide量を調整した)でhybridizationを行った。反応終了後、streptoavidin-β-galactosidase

溶液[20 µl streptoavidin-β-galactosidase conjugate(Gibco BRL) in 20 ml PBS+0.5 % BSA+0.1 % Triton X-100]を各ウェルに加え1時間反応後、洗浄し、4-methylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside 基質溶液[4-methylumbelliferyl-β-D-galacto-pyranoside(和光純薬) 5.0 mg, 500 µl N,N-dimethylformamide(和光純薬) in 25 ml buffer A(10 mM Na₂HPO₄, 0.15 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂·6H₂O, PH 7.2)]を加え酵素反応を行った。30分毎に各ウェルの蛍光値を蛍光マイクロプレート光度計(MTP-22, Corona Electric Japan; 励起波長360nm, 吸収波長450nm)で測定して、hybridizeしたDNAの検出とDNA相同性の算出を行った。なお、DNA相同性は以下の式から算出した；

$$\text{DNA 相同性(\%)} = \frac{F_t - F_b}{F_r - F_b} \times 100$$

*Fr : 供試したprobe DNAと同一菌株DNA間の蛍光強度

Ft : 被検菌株DNAとprobe DNA間の蛍光強度

Fb : 対照DNA(salmon sperm DNA)とprobe DNA間の蛍光強度

結 果

1. H-4 株と対照菌株の性状の比較

H-4 株と対照菌株の性状を Table 1-1-1 に、H-4 株のネガティブ染色像を Fig. 1-1-1 に示した。H-4 株はグラム陰性の桿菌で、単極毛 (Fig. 1-1-1)による運動性を有し、DNA の GC 含量が 39.8 % (Tm)であり、発育に海水を要求し、酸化的にのみグルコースから酸を産生し、PHB の蓄積が認められないことから、*Alteromonas* 属の海洋細菌と同定した。H-4 株はアルギン酸塩およびデンプン、ゼラチン、Tween 80、DNA の分解能陽性で、D-glucose, D-mannose, D-galactose, D-fructose, sucrose, maltose, cellobiose, melibiose, lactose, D-gluconate, xylose, D-sorbitol, L-proline, acetate, pyruvate, fumarate, succinate, alginate, glycerol などを利用して発育するが、D-mannitol, glucronate, trehalose, citrate, DL-malate, N-acetyl-D-glucosamine, meso-erythritol, α-ketoglutarate などは利用しなかった。

供試した対照菌株のうちアルギン酸分解能を有するものは *A.macleodii*, *A.espejiana*, *A.atlantica*, *A.carrageenovora* の 4 菌株である。H-4 株は *A. espejiana* IAM 12640 および *A. carrageenovora* NCMB 302 に類似した性状を示し、GC moles %も近い値を示した。特に、*A. carrageenovora* とはデンプンの分解性、D-mannose, citrate の利用性などの性状が異なるのみ

Table 1-1-1. Continued

Characteristics	Utilization of													
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucronate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Putrescine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
δ -Aminovariate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
γ -Aminobutyrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Proline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pyruvate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Tyrosine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propionate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acronitate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Glutamate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alginate(polyM)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alginate(polyG)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laminarin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fucoidan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PHB accumulation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Alteromonas</i> sp. H-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. macleodii</i> (IAM 12920)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. espejiana</i> (IAM 12640)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. atlantica</i> (NCMB 301)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. carrageenovora</i> (NCMB 302)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. haloplanktis</i> (IAM 12915)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. hanedai</i> (IAM 12641)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. undina</i> (IAM 12922)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. maritima</i> (ATCC 19648)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. marinovulgatis</i> (ATCC 14394)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. communis</i> (IAM 12914)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. vaga</i> (IAM 12923)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. rubra</i> (ATCC 29570)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. piscicida</i> (NCMB 645)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. nigricans</i> (IAM 13010)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

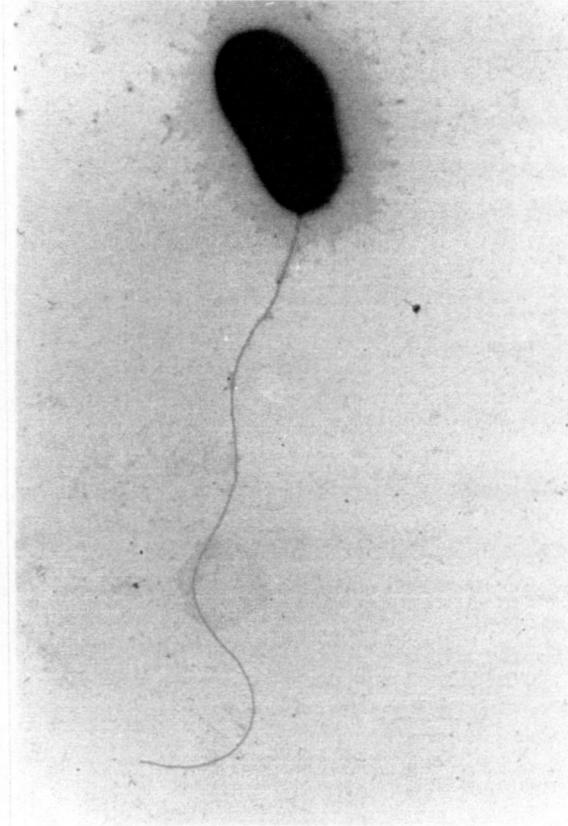


Fig. 1-1-1. Electron micrograph of *Alteromonas* sp. H-4

で、供試対照菌株の中で最も類似した性質を有していた。一方、*A. espejiana* とは D-mannose, D-sorbitol, citrate, glycerol, DL-malate, α -ketogulutarate, D-mannitol, D-gluconate, trehalose の利用性で異なり、明らかに異種と考えられた。他の対照菌株で H-4 株と類似性の認められるものはなかった。さらに、H-4 株は既報の *Alteromonas* 属菌種のいずれとも同定できなかった。

2. Whole cell protein パターンの解析

Alteromonas 属の whole cell protein の電気泳動パターンおよび電気泳動像から算出したパターンの類似度を Fig. 1-1-2 と Table 1-1-2 にそれぞれ示した。供試した対照菌株の中には H-4 株の whole cell protein バンドパターンと一致するパターンを示す対照株は認められず (Fig. 1-1-2)、H-4 株との類似度は *A. marinopraescens* ATCC 19648 が 51.7 % と最も高く、次いで *A. hanedai*, *A. espejiana*, *A. atlantica*, *M. communis* が 40%-50 % 程度で、*A. carrageenovora* とは 27 % の類似度を示したに過ぎなかった。

3. DNA-DNA 相同性

H-4 株および標準株の中から *A. macleodii*, *A. espejiana* の 3 菌株の DNA をそれぞれ probe DNA とし、DNA-DNA 相同性を調べた結果を Table 1-1-3 に示した。H-4 株は *A. carrageenovora* との DNA 相同性が 45.8 % と最も高い値を示し、次いで *A. atlantica*, *A. espejiana* との DNA 相同性がそれぞれ、36.8 % および 35.3 % で、H-4 株と 70 % 以上の DNA 相同性を示す *Alteromonas* 属対照菌株は認められなかった。なお、*A. espejiana* を probe DNA とした場合の *Alteromonas* 属対照菌株間の DNA 相同性は Akagawa-Matsushita et al.(1992) の報告している値のうち、本実験と共通する菌株間の相同性には大きな差は認められなかった。

考 察

Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edition (1994) では *Alteromonas* 属は 12 菌種が記載されているが、この中ではアルギン酸分解細菌はわずかに *A. macleodii*, *A. espejiana*, *A. denitrificans* の 3 菌種である。さらに、これ以外に、Akagawa-Matsushita et al.(1992)により、“*Pseudomonas atlantica*” および“*Pseudomonas carrageenovora*”に同定されていたアルギン酸分解性を示す 2 菌種を、GC moles % の値から *Alteromonas* 属に分類し、*Alteromonas atlantica*

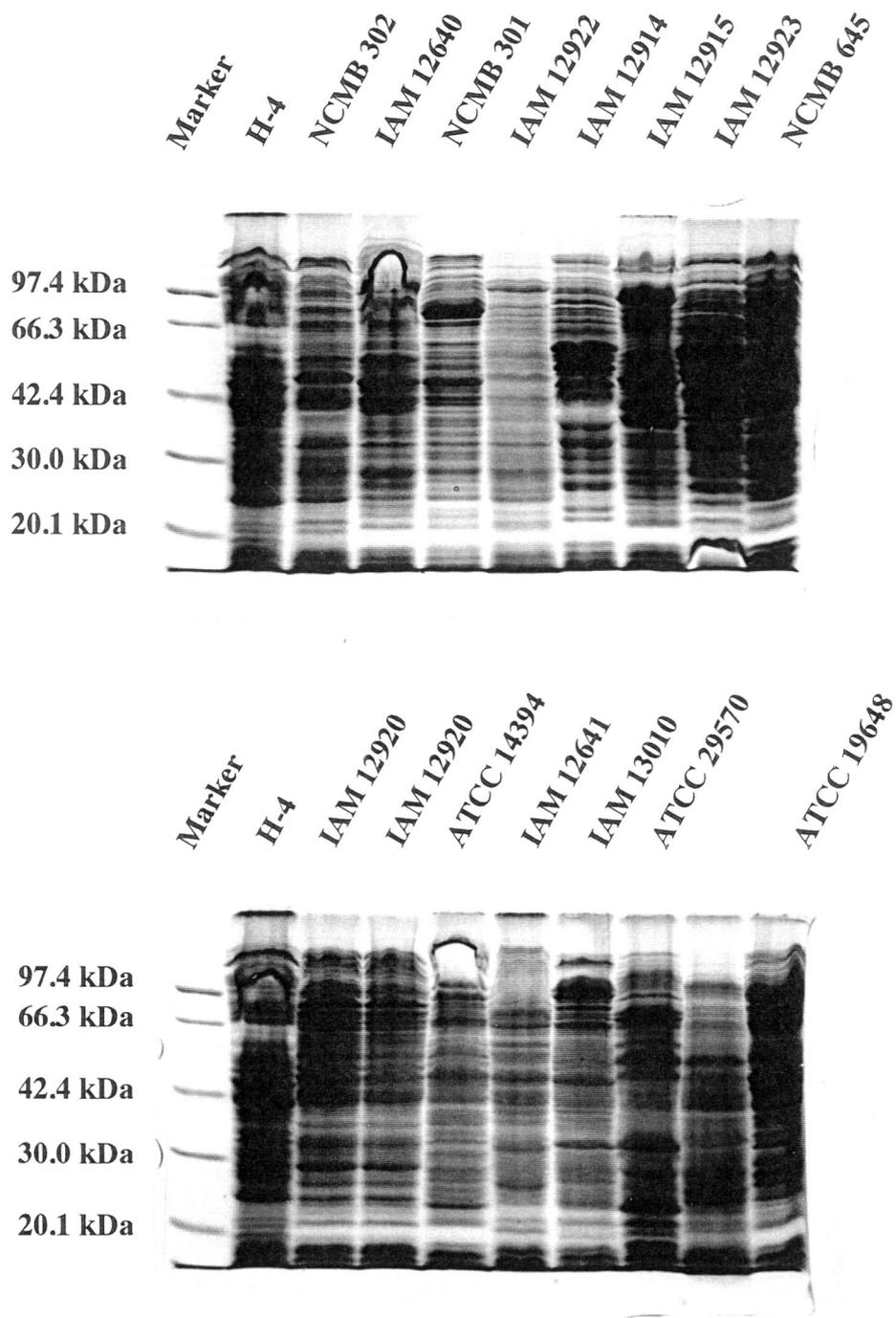


Fig. 1-1-2. Bacterial whole cell protein profiles by SDS-PAGE among *Alteromonas* strains.

Table 1-1-2. Similarity index of SDS-PAGE profiles of whole cell protein among *Alteromonas* strains

Strains	Reference strain				
	H-4	<i>A. espejiana</i> IAM 12640	<i>A. atlantica</i> NCMB 301	<i>A. carrageenovora</i> NCMB 302	<i>A. macleodii</i> IAM 12920
H-4	100.0				
<i>A. espejiana</i>	45.2	100.0			
<i>A. atlantica</i>	41.2	36.1	100.0		
<i>A. carrageenovora</i>	27.0	41.2	41.7	100.0	
<i>A. macleodii</i>	33.3	36.1	30.0	24.4	100.0
<i>A. haloplanktis</i>	43.3	41.9	38.2	27.8	38.2
<i>A. marinovulgaris</i>	51.7	28.6	35.1	42.4	29.7
<i>A. marinopraescens</i>	37.5	40.6	33.3	30.6	26.3
<i>A. undina</i>	27.8	34.3	42.9	63.3	35.1
<i>A. hanedai</i>	46.7	43.8	58.1	33.3	44.1
<i>M. communis</i>	43.3	46.7	51.6	39.4	30.6
<i>M. vaga</i>	25.7	28.6	29.7	34.3	29.7
<i>A. nigrifaciens</i>	36.4	35.3	36.1	41.2	40.0
<i>A. rubra</i>	23.5	22.9	17.9	28.6	24.3
<i>A. piscicida</i>	16.2	57.1	27.0	27.8	30.6

Table 1-1-3. DNA relatedness among *Alteromonas* strains

Strains	G+C content ¹⁾ (moles %)	% Reassociation with biotinylated DNA from:		H-4
		<i>A. macleodii</i> IAM 12920	<i>A. espejiana</i> IAM 12640	
H-4	39.8	7.5	43.1	100.0
<i>A. macleodii</i>	IAM 12920	100.0	4.1	3.3
<i>A. espejiana</i>	IAM 12640	4.0	100.0	35.3
<i>A. atlantica</i>	NCMB 301	4.8	54.5	36.8
<i>A. carrageenovora</i>	NCMB 302	3.8	46.4	45.8
<i>A. marinovulgaris</i>	ATCC 14394	3.3	25.6	28.1
<i>A. nigrifaciens</i>	IAM 13010	3.1	30.4	30.6
<i>A. haloplanktis</i>	IAM 12915	3.8	29.1	28.8
<i>A. marinopraescens</i>	ATCC 19648	5.4	31.9	31.7
<i>A. undina</i>	IAM 12922	3.2	22.4	23.7
<i>A. piscicida</i>	NCMB 645	43-46	10.6	9.2
<i>A. rubra</i>	ATCC 29570	46-48	7.7	7.2
<i>M. communis</i>	IAM 12914	1.9	2.6	4.0
<i>M. vaga</i>	IAM 12923	1.3	2.9	3.1

¹⁾ Source of G+C content data is same as Table 1-1-1.

²⁾ Not tested

および *Alteromonas carrageenovora* とすることが妥当であるとの提案がなされており、現在、アルギン酸分解性を示す *Alteromonas* 属細菌は計 5 菌種の記載がある。これらのアルギン酸分解性を示す 5 菌種の記載性状および *Alteromonas* 属各菌種の標準株を対照株として H-4 株との分類学的検討を行ったところ、形態学的および生化学的性状から H-4 株はアルギン酸分解性 *Alteromonas* 属の中では *A. carrageenovora* に最も近い性状を示すことが明らかとなった (Table 1-1-1)。しかしながら、*A. carrageenovora* とはデンプン分解能および 2 種の有機物利用性で異り、さらに、H-4 株の whole cell protein パターンでも *A. carrageenovora* とは一致しなかった (Fig.1-1-2)。

細菌分類の特別委員会は DNA-DNA 相同性が 70 % 以上で ΔT_m が 5 °C 以内のものを同種とすることを決定している (Wayne et al., 1987)。H-4 株と *Alteromonas* 属対照株との DNA-DNA 相同性を調べた結果、アルギン酸分解性を示す *Alteromonas* 属菌株のうち、*A. espejiana*, *A. atlantica*, *A. carrageenovora* とはそれぞれ 35.3 %, 36.8 %, 45.8 % の相同性を示した。この値は他の *Alteromonas* 属菌株との DNA 相同値よりも比較的高い値を示したが、H-4 株と同種と認められる範囲ではなかった (Table 1-1-4)。以上の結果から、H-4 株は *Alteromonas* 属の新種であることが示唆され、褐藻類の葉体崩壊性を示す海洋細菌あるいは潜在的な穴あき病原菌として重要であることから、“*A. alginocida* sp. nov.” として提唱することを検討中である。

ところで、最近、DNA-rRNA 相同性 (Van Landschoot & De Ley, 1983) あるいは DNA-DNA 相同性 (Akagawa-Matsushita et al., 1992) の解析結果から *Alteromonas* 属は 2 つのブランチ、すなわち *A. macleodii* のみが属するブランチおよび *A. haloplanktis* クラスタに分けられるとの見解がなされている。*A. haloplanktis* クラスタは *M. communis*, *M. vaga* および *A. hanedai* を除く、その他の *Alteromonas* 属菌種を含むものである (Van Landschoot & De Ley, 1983)。本実験結果から、H-4 株は *A. haloplanktis* クラスタに属すると推定されるが、このブランチの中でも海藻多糖分解性を特徴とする *A. espejiana*, *A. atlantica*, *A. carrageenovora* の 3 菌種と比較的高い DNA-DNA 相同性を示し、一つのグループを構成している可能性が考えられた。今後はさらにデータを蓄積し、海藻多糖分解性 *Alteromonas* 属のグループの解析を行う必要がある。

第二節 *Alteromonas* sp. H-4 株のアルギン酸分解酵素産生条件の検討

一般に、酵素の精製を行う場合に、原料中の酵素濃度が以後の実験の成否を左右することが多い。しかしながら、Romeo & Preston (1986) が褐藻 *Sargassum fluitans* から分離した *Photobacterium* sp. のアルギン酸分解酵素産生量はわずか 4.1 $\mu\text{g/L}$ と見積っているように、微生物の産生する酵素の絶対量は非常に少ない。そのため本研究においても、可能な限り多量の酵素を産生させる培養条件を設定する必要がある。

そこで、本節では、H-4 株がアルギン酸分解酵素を多量に産生する培養条件を求めるとともに、本酵素の質的および量的な変動を把握するために、海水、カシトン、アルギン酸ナトリウムの濃度が異なる培地における培養上清中のアルギン酸分解酵素活性の経時変化を比較検討した。さらに、前節の結果から、H-4 株はアルギン酸ナトリウム分解性を示し、アルギン酸ナトリウムを唯一の炭素原として利用しうることが観察されている。そこで、H-4 株の菌体外と菌体内のアルギン酸分解酵素活性およびその基質特異性についても検討を行った。

材料と方法

1. 供試菌

前節と同様に *Alteromonas* sp. H-4 株を供試した。H-4 株の継代、保存用培地としては、酵素誘導用培地[alginase inducing agar medium(AIA)-I 培地; カシトン(Difco) 5.0 g, 酵母エキス(日本製薬) 1.0 g, アルギン酸ナトリウム(和光純薬) 1.0 g, 寒天 15.0 g, 75 % NSW(natural seawater) 1,000 ml, pH 7.5]、あるいは酵素誘導用培地[AIA-II 培地; NH_4Cl 1.0 g, 酵母エキス 0.1 g, アルギン酸ナトリウム 4.0 g, 寒天 13.0 g, 75 % NSW 1,000 ml, pH 7.5]を使用した。特に、AIA-I 培地は H-4 株の保存だけに使用し、供試した H-4 株の通常の継代には AIA-II 培地を使用した。継代培養は 20 °C で行った。

2. アルギン酸分解酵素活性測定法

アルギン酸分解酵素活性は市販のアルギン酸ナトリウム(和光純薬)を基質として使用し、紫外部吸光法により、反応液の 235 nm における吸光値の増加を測定した(辻野・斉藤、1963)。なお、本実験では過塩素酸による反応停止操作を行わず、酵素反応液の吸光値を

直接測定した。反応液の組成は 1.0 % アルギン酸ナトリウムを含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 0.3 ml、0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 2.4 ml を加えた基質液 (計 2.7 ml) に後述の酵素液 0.3 ml を加え、酵素反応液の全量を 3 ml とした。酵素反応は、特記しない限り、30 °C で 30 分間で行った。反応後、直ちに酵素反応液の 235 nm の吸光値を分光光度計 (日立 124 型) で測定し、酵素活性は 235 nm における単位時間・単位容量当りの吸光値の変化量として求めた。

3. 粗酵素液の調製

培養令 5 日以内の H-4 株を前培養培地[alginate production liquid medium(APL)-pre 培地; カシトン 5.0 g(a 組成) または 8.0g(b 組成), 酵母エキス 1.0 g, アルギン酸ナトリウム 1.0 g, 75 % NSW 1,000 ml, pH 7.5]10 ml 入り径 18 mm 試験管 (中試) に一白金耳接種し、20 °C, 24 時間静置培養した。この前培養液 5 ml を 500 ml 容坂口フラスコ中の酵素産生用培地 [APL 培地; カシトン 5.0 g(a 組成) または 8.0g(b 組成), アルギン酸ナトリウム 1.0 g, 75 % NSW 1,000 ml, pH 7.5] 450 ml に接種し、25 °C で振盪培養した。経時的に培養液を 3ml ずつ採取し、そのうちの 1.5 ml は滅菌人工海水で 2 倍に希釈して 620nm の吸光値を測定し、菌の発育量を求めた。残りは遠心分離(2,800 x g、20 分、0 °C)し、上清を粗酵素液としアルギン酸分解酵素活性を測定した。

4. アルギン酸分解酵素産生に及ぼす海水濃度の影響

H-4 株を APL-pre 培地で前培養後、APL 培地(a 組成) の海水濃度を 25 %, 50 %, 75 %, 90 % に変化させた培地に接種し、前述の粗酵素液の調製法に従って菌の発育とアルギン酸分解酵素活性の測定を経時的に行った。

5. アルギン酸分解酵素産生に及ぼすカシトン濃度の影響

APL 培地 (a 組成) のカシトン濃度を 0.5 %, 0.8 %, 1.2 % に変化させた培地を使用し、前述と同様の手法により菌の発育とアルギン酸分解酵素活性を経時的に測定した。

6. アルギン酸分解酵素産生に及ぼすアルギン酸ナトリウムの影響

本実験では APL 培地 (b 組成) および同培地からアルギン酸ナトリウムを除いた培地を使用し、前述と同様の手法により菌の発育とアルギン酸分解酵素活性を経時的に測定した。

7. アルギン酸ナトリウムからのマンニユロン酸ブロック(polyM)、グルロン酸ブロック(polyG)、および MG ランダムブロック(MG random)の調製

アルギン酸分解酵素の基質特異性の測定のため、アルギン酸ナトリウム(Alg-Na)から、マンニユロン酸ブロック(polyM)、グルロン酸ブロック(polyG)、および マンニユロン酸-グルロン酸ランダムブロック(MG random)を調製した。各ブロックの調製は、Haug et al. (1967)の方法に従い、後述した温和な条件下での酸加水分解と酸分別沈殿法により行った。まず、50 g のアルギン酸ナトリウムを 1,000 ml の 0.3 N 塩酸中で 100 °C、20 分間加水分解後、遠心分離 (10,000 rpm, 30 分)し、可溶性画分と不溶性画分に分けた。可溶性画分は中和した後に蒸留水に対して透析し、エバポレーターで濃縮した。この濃縮液に2倍量のエタノールを加え、沈殿を得た。この沈殿を遠心分離で集めた後、エタノールおよびエーテルで洗浄し、乾燥させた。この画分が MG random である。

一方、不溶性画分には再度 0.3 N 塩酸 1,000 ml を加え、100 °C、20 時間の加水分解を行った。加水分解物を遠心分離 (10,000 rpm、20 分) した後に得られた不溶画分を中和しながら蒸留水に溶解させ、蒸留水で透析した。透析後の溶液に 0.1 N となるよう塩化ナトリウムを加え、pH 2.85 となるまで塩酸を加え沈殿を生じさせた。この溶液を遠心分離し、上清と沈殿に分けた。得られた沈殿は中和しながら蒸留水に溶解し、蒸留水に対して透析した。この酸分別沈殿の操作をもう一度繰り返した後、エタノール沈殿を行い沈殿を回収した。この画分が polyG である。沈殿は遠心分離で集めた後、エタノールおよびエーテルで洗浄し、乾燥させた。

また、2回目の酸分別沈殿で得られた遠心上清画分は中和・濃縮後、蒸留水に対して透析した。この画分も、酸分別沈殿操作を2度くり返し、純度を高めた。この溶液に2倍量のエタノールを添加し、沈殿を得た。この画分が polyM である。沈殿は遠心分離で集めた後、エタノールに続きエーテルで洗浄し、乾燥させた。

各ブロックの純度は Penman & Sanderson (1972) および Grasdalen et al. (1979) の方法に従い、 $^1\text{H-MNR}$ (Jeol FX-90Q NMR spectrometer) で測定した。なお、各画分を 25 mg/ml となるように重水素(D_2O)に溶解したものを試料とし、測定温度は 90 °C に設定した。 $^1\text{H-MNR}$ の解析により、polyM に特徴的な 1 つのピーク (B) と polyG に特徴的な 2 つのピーク (A と C) が観察され、これらのピーク面積 (I_A , I_B , I_C) から、以下の式に従い各ブロックの純度 (F_G , F_M) を算出した (Grasdalen et al., 1979)。

$$F_G = \frac{I_A}{I_B + I_C}$$

$$F_{GG} = \frac{I_C}{I_B + I_C}$$

$$F_G + F_M = 1$$

$$F_{GG} + F_{GM} = F_G$$

$$F_{MM} + F_{MG} = F_M$$

純度測定の結果、供試した polyM, polyG, MG random の純度はそれぞれ、92.0 %, 90.4 %, M:G=13:7 であった。また、供試した各基質の推定平均重合度(DP)は Alg-Na が 35, polyM が 13, polyG が 14, MG random が 14 であった。

8. 培養上清のアルギン酸分解活性の基質特異性とその経時変化

APL 培地 (a 組成) で培養した H-4 株の培養上清を前述の方法に準じて、経時的に採取し、Alg-Na、polyM、polyG、および MG random 各基質に対する活性を前述の方法に準じて測定した。

9. 菌体内酵素液の調製

APL 培地 (a 組成) で培養した H-4 株の菌体を遠心分離 (5,700 x g, 20 分, 0 °C) で集め、菌体湿重量の 50 倍量の 4mM Tris-ASW (artificial seawater) 緩衝液 (pH 7.5) で、3 回洗浄した。この洗浄菌体を菌体湿重量の 5 倍量の 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) に懸濁後、-20 °C で一晩凍結した。解凍後、超音波細胞破碎装置 (大竹; 150 W, 30 秒×5 回) で菌体を破碎し、細胞残渣を遠心分離 (9,400 x g, 15 分, 0 °C) で除去した上清を菌体内酵素画分として供試し、Alg-Na、polyM、polyG、および MG random に対する活性を前述の方法に準じて測定した。なお、酵素活性は菌体湿重量あたりの酵素活性として示した。

結 果

1. 紫外部吸光法によるアルギン酸分解酵素活性の測定

25 °C, 72 時間培養した H-4 株の培養上清を粗酵素液として紫外部吸光法によってアルギン酸分解酵素活性を測定した結果を Fig. 1-2-1 に示した。酵素反応時間と 235 nm の吸光値の増加が直線関係となり、酵素反応は 0 次反応に従うことが示された。そこで、一定

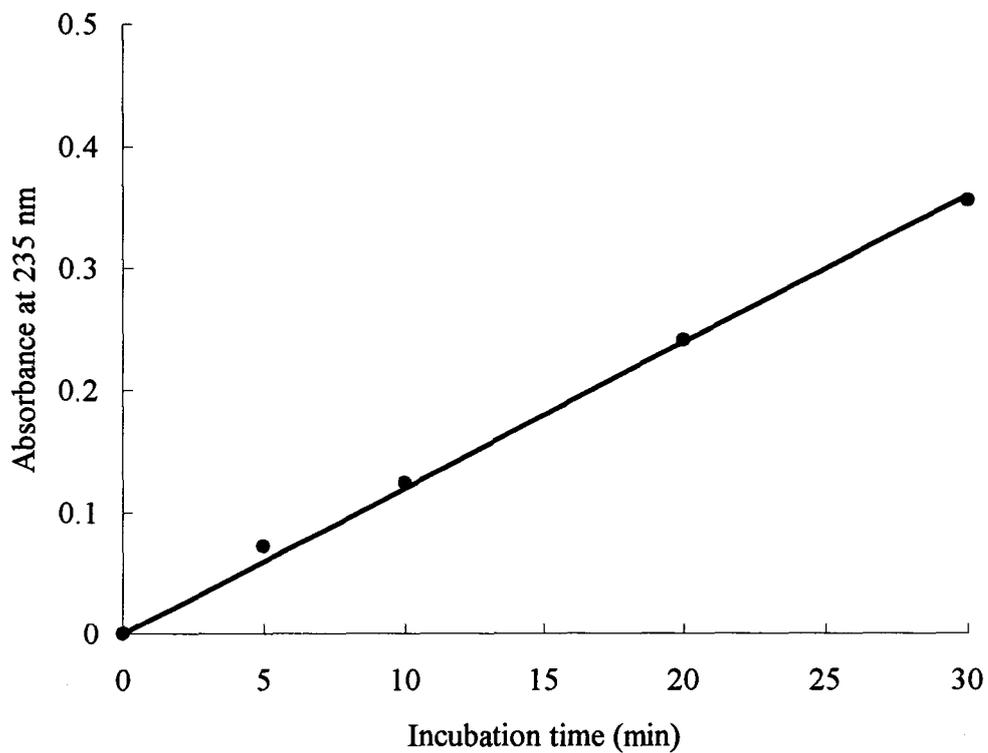


Fig. 1-2-1. Detection and determination of alginate degrading enzyme activity in culture supernatant of *Alteromonas* sp. H-4 by the ultra-violet absorption method.

The compositions of reaction mixture were follows; 0.3 ml of 1 % sodium alginate -0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5), 2.4 ml of 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.5), 0.3 ml of culture supernatant of *Alteromonas* sp. H-4.

The mixture was incubated at 30 °C.

条件下 (1 % Alg-Na を含む 0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5), 0.3 ml; 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5), 2.4 ml; 酵素液, 0.3 ml, 反応温度 30 °C)で酵素反応を行った時、1 分間に 235 nm の吸光値を 0.010 増加させるアルギン酸分解酵素活性を 1 unit (U) とした。以後の実験では、アルギン酸分解酵素産生量は、この紫外吸光法により培養上清のアルギン酸分解酵素活性を測定することで評価し、培地条件や培養時間によるアルギン酸分解酵素産生量の比較を行った。

2. アルギン酸分解酵素の産生に及ぼす海水濃度の影響

海水濃度を 25%~90% に変化させた培地中での H-4 株の発育とアルギン酸分解酵素産生量の経時変化を Fig. 1-2-2 に示した。50 %、75 %、90 % の海水濃度の培地では H-4 株の発育はほぼ同程度であったが、25 % 海水濃度の培地では若干発育量が多いにもかかわらずアルギン酸分解酵素産生量は微弱であった(Fig. 1-2-2)。なお、25 % の海水濃度の培地においては発育のピークは 60 時間、その他の培地では 83 時間に見られた。一方、アルギン酸分解酵素の産生量は培地中の海水濃度の増加にともない高くなり、75 %と 90 %の海水培地において最も多く、この両条件下での酵素産生量はほぼ同程度であった(Fig. 1-2-2 (B))。25 % の海水濃度の培地ではアルギン酸分解酵素産生量のピークは認められなかったが、その他の海水濃度の培地ではピークに達するまでの時間は 60 時間であった。培養 60 時間目の酵素産生量を 25 % の海水濃度の培地の場合と比較すると、50 %濃度で 5 倍、75 %濃度および 90 %濃度で 7 倍であった。

3. アルギン酸分解酵素の産生に及ぼすカシトン濃度の影響

カシトン濃度を 0.5~1.2 % に変化させた培地での H-4 株の発育とアルギン酸分解酵素産生量の経時変化を Fig. 1-2-3 に示した。カシトン濃度の増加にともない対数増殖期が長くなり(Fig.1-2-3 (A))、同時にアルギン酸分解酵素産生量がピークに達するまでの培養時間も長くなることが認められた。発育と酵素産生量がピークに達する培養時間はカシトン濃度が 0.5 %, 0.8 %, 1.2 % の場合それぞれ 60 時間、96 時間、120 時間であった。また、酵素の産生量は培地中のカシトン濃度の増加とともに減少し、0.5 %カシトン濃度の培地で H-4 株を培養した場合のピーク時のアルギン酸分解酵素産生量を 100 %とし、他のカシトン濃度の培地での酵素産生量と比較すると、0.8 %カシトン濃度の培地の場合は 90 %と若

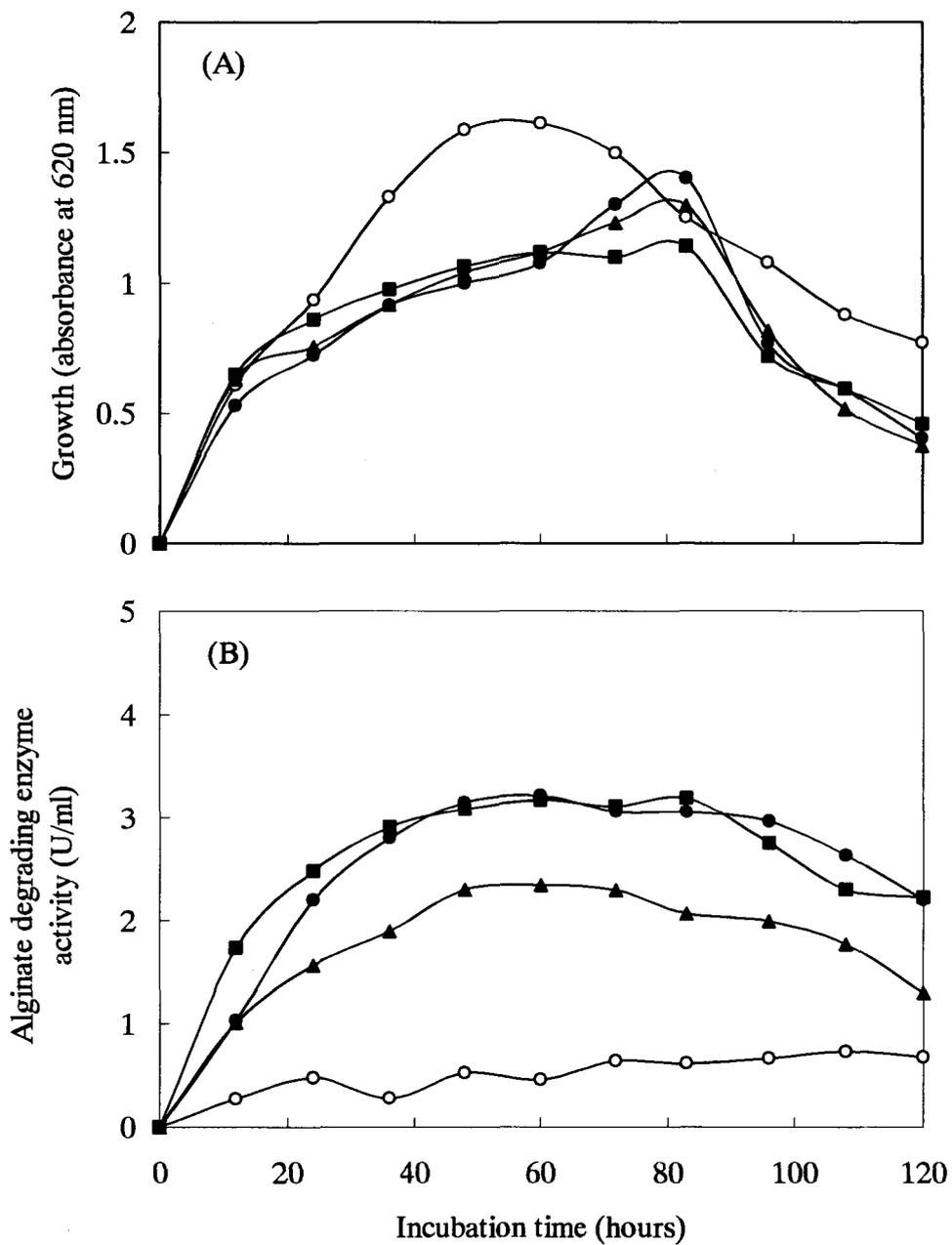
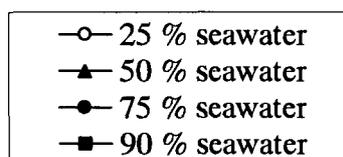


Fig. 1-2-2. Effect of the seawater concentration on the growth (A) and the activity of extra-cellular alginate degrading enzyme (B) from *Alteromonas* sp. H-4.



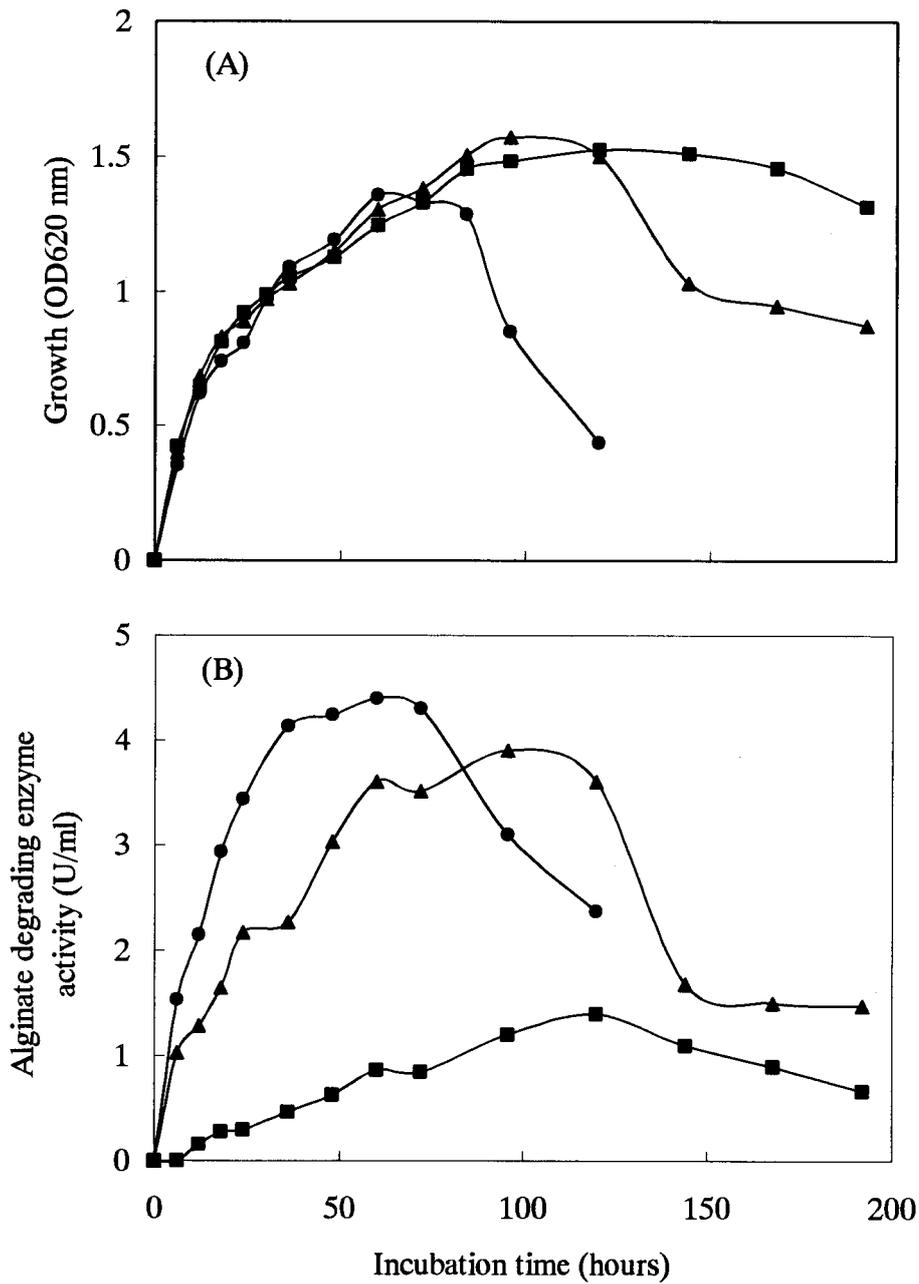
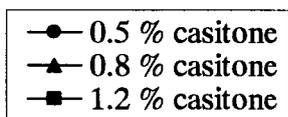


Fig. 1-2-3. Effect of the casitone concentration on the growth (A) and the activity of extra-cellular alginate degrading enzyme (B) from *Alteromonas* sp. H-4.



干低くなり、1.2 %カシトン濃度の培地の場合は 30 %と大きく減少した (Fig. 1-2-3 (B))。なお、H-4 株の発育量および酵素産生量がピークに達した後の減少傾向はカシトン濃度の低いもの程大きかった。

4. アルギン酸分解酵素産生に及ぼすアルギン酸ナトリウム添加の影響

0.1 %アルギン酸ナトリウムを添加した培地と無添加の培地での H-4 株の発育とアルギン酸分解酵素産生量の経時変化を Fig. 1-2-4 に示した。アルギン酸ナトリウム無添加培地で H-4 株の培養を行った場合、H-4 株の発育量は添加培地に比べ若干劣る傾向が見られた (Fig.1-2-4 (A))。一方、アルギン酸ナトリウム無添加培地においてもアルギン酸分解酵素活性が認められたが、アルギン酸ナトリウムを培地に 0.1 % 添加すると、アルギン酸分解酵素活性は幾分増強され、その差はピーク時で約 1 U/ml であった (Fig.1-2-4 (B))。

5. H-4 株の菌体外および菌体内アルギン酸分解酵素活性とその基質特異性

H-4 株の培養上清(菌体外)は供試した4種のいずれの基質 (Alg-Na, polyM, polyG, および MG random) に対しても分解活性を示し、その活性は H-4 株の増殖に伴い変動し、活性のピークは培養 72 時間付近であった (Fig. 1-2-5 (A))。供試した基質のなかでは、polyM (5 U/ml) > MG random (3.8 U/ml) > polyG (2.7 U/ml) \geq Alg-Na (2.5 U/ml) の順に高い活性を示した (Fig. 1-2-5 (A))。

一方、H-4 株の菌体内画分は polyM および MG random に対して非常に強い活性を示したが、polyG に対しては polyM および MG random に対する活性の 1/5 以下、Alg-Na に対しては全く活性を示さなかった (Fig. 1-2-5 (B))。polyM および MG random に対する活性は、H-4 株の増殖がピークになる前後にそれぞれ 2 つのピークを示した。polyM に対する活性は H-4 株の増殖のピーク以前に、MG random に対する活性は H-4 株の増殖のピーク以後に最高値となる傾向が認められた (Fig. 1-2-5 (B))。

考 察

本実験により *Alteromonas* sp.H-4 株が産生する菌体外アルギン酸分解酵素の産生量は、培地中の海水濃度、有機物濃度により影響を受けることが明らかとなった。H-4 株の発育量は培地中の海水濃度を増加させても大きな変化は認められなかったが、アルギン酸分解酵素

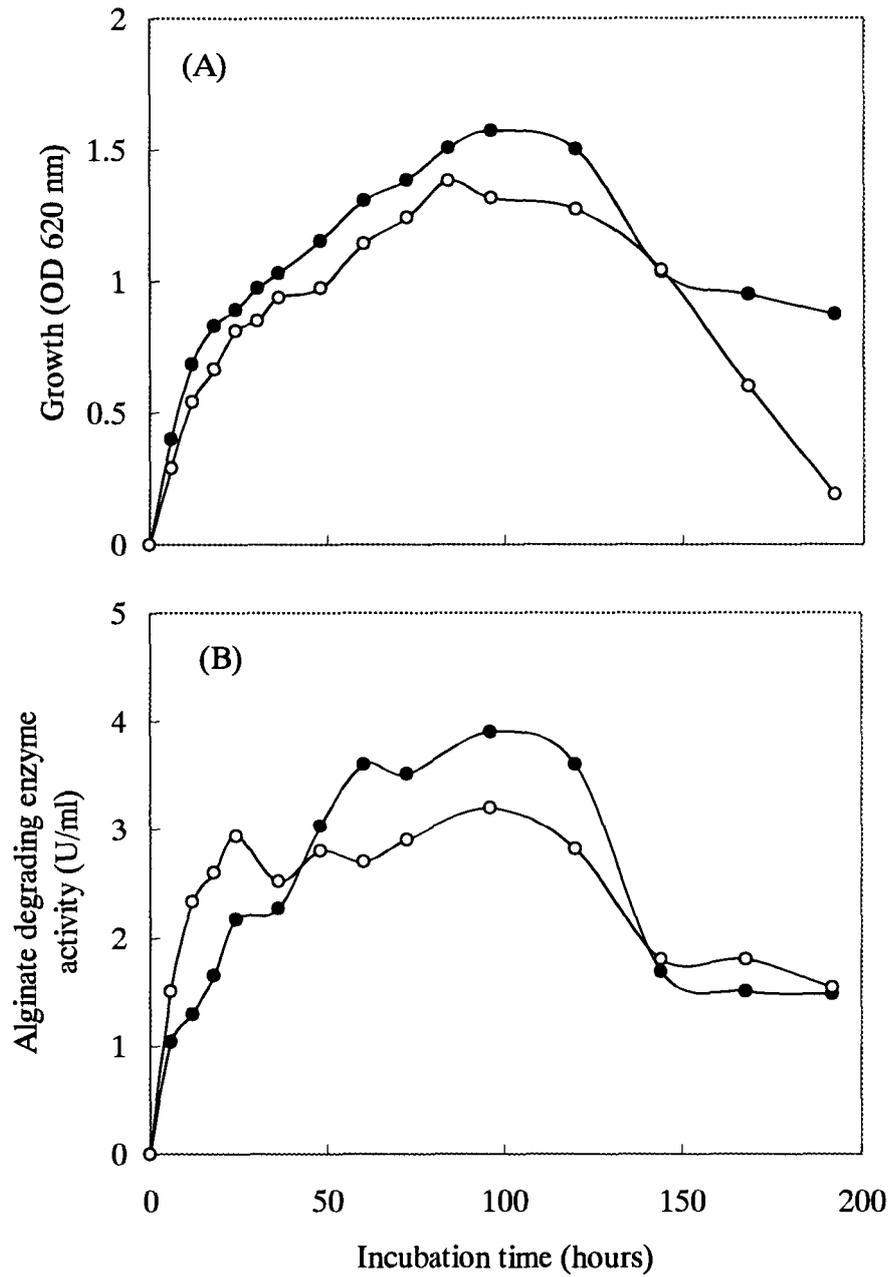
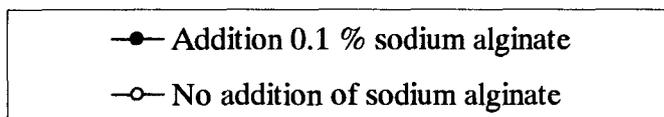


Fig. 1-2-4. Effect of the sodium alginate on the growth (A) and the activity of extra-cellular alginate degrading enzyme(B) from *Alteromonas* sp. H-4.



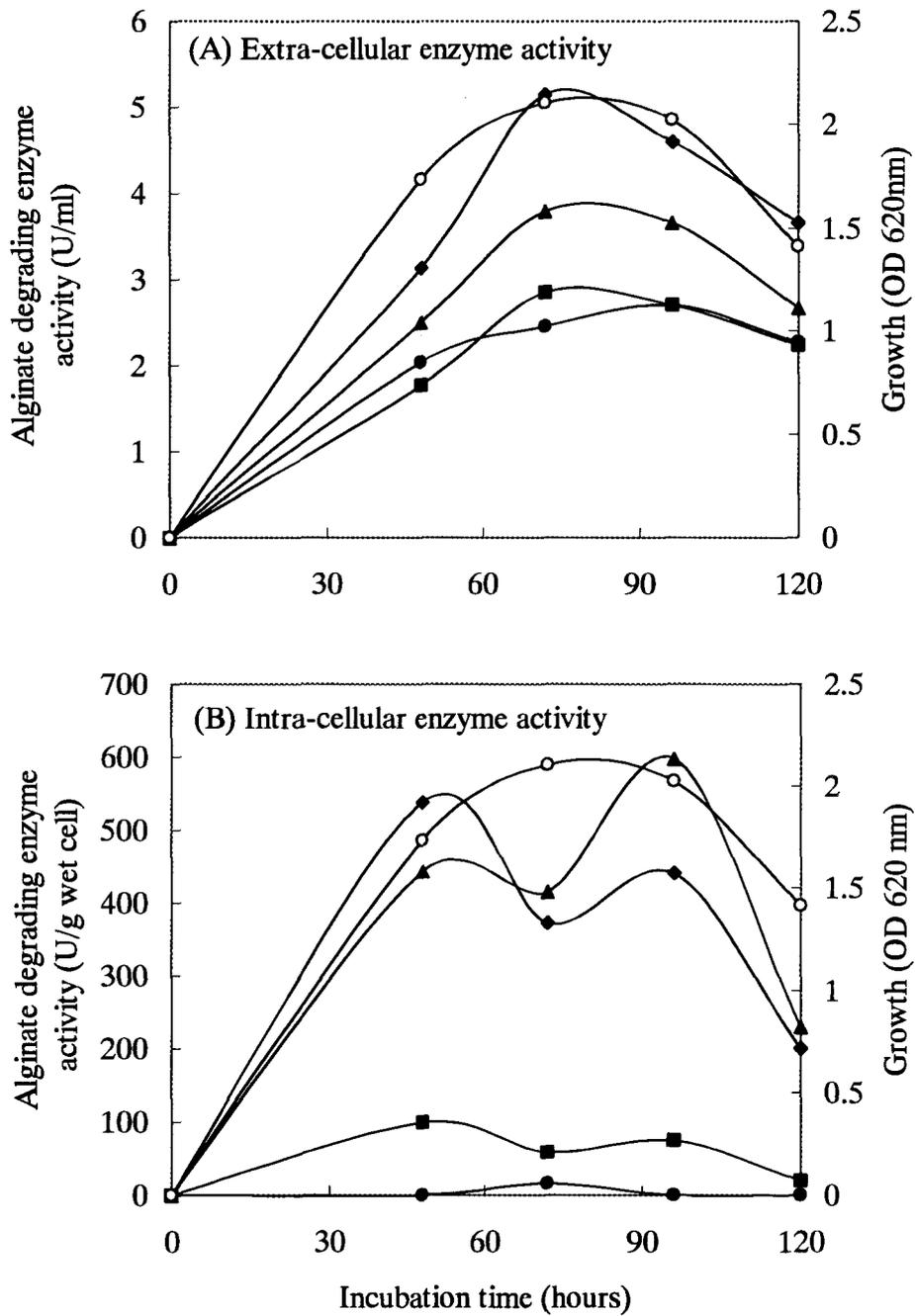
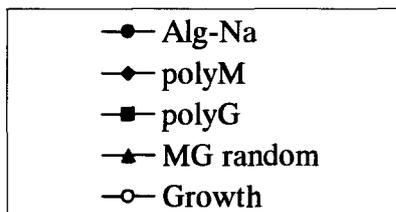


Fig. 1-2-5. Alginate degrading enzyme activity and the substrate specificity of extra-(A) and intra-cellular (B) enzyme from *Alteromonas* sp. H-4.



の産生量は増加し、75-90 % の海水培地で最大となり (Fig. 1-2-2)、H-4 株のアルギン酸分解酵素産生に最適な培地中の海水濃度は 75% 以上であった。培地中の海水濃度の増加とともに発育量に差は認められないものの酵素産生量が増加する現象は、*Alteromonas* 属の海洋細菌 (コンブ種苗糸赤変原因菌) の溶菌酵素においても認められており (山田,1989)、海洋細菌の酵素産生には海水の存在が必要であることが示唆された。さらに、第四節で後述するが H-4 株菌体外アルギン酸分解酵素の失活が海水成分により抑制されることが観察された。このことから、培地の海水濃度の増加により酵素活性が増加した理由として海水中に比較的高濃度に含まれる Na^+ , Mg^{2+} などのイオンの保護効果により、見かけ上、酵素産生が増加したことも考えられる。また、培地中のカシトン濃度が高くなるとともに H-4 株のアルギン酸分解酵素産生量は減少したが、逆に産生量がピークに達した後の産生酵素量の減少はカシトン濃度の低い方が速やかであった (Fig. 1-2-3)。この原因は現在のところ不明であるが、カシトン中のアルギン酸分解酵素活性阻害因子の存在、あるいはカシトンの添加によるプロテアーゼ等のアルギン酸分解酵素を失活させるような酵素の誘導などが原因として考えられる。H-4 株は発育に伴ってアルギン酸分解酵素を産生し、多くの培養条件下において発育と酵素産生の経時変化がほぼ一致したこと (Figs. 1-2-2~4)、および基質無添加培地においても酵素活性が発現することから、本酵素は構成型の酵素である可能性が考えられた。なお、このようなタイプのアルギン酸分解酵素を産生する菌株は Doubet & Quatrano (1982) と北御門ら (1989) によっても報告されている。

また、H-4 株の菌体外に産生されるアルギン酸分解酵素は Alg-Na をはじめ polyM, polyG, MG random のいずれの基質に対しても活性を示した (Fig.1-2-5(A))。しかし、菌体内のアルギン酸分解酵素は、polyM, MG random に対してのみ非常に強い活性を示し、Alg-Na および polyG に対する活性は非常に低かった (Fig.1-2-5(B))。この活性は H-4 株の発育とともに上昇し、増殖期後期に最大となった。Kinoshita et al. (1991) はアルギン酸分解性 *Pseudomonas* 属細菌の菌体内アルギン酸分解酵素活性が発育とともに上昇し、増殖期後期に最大となる傾向にあることを述べており、H-4 株の結果と類似していた。この H-4 株の菌体内の酵素の基質選択性は菌体外酵素に比較して、非常に限定されたものであるが、反応性を示すのがアルギン酸構成糖であることから、アルギン酸代謝に関りを持つ酵素であることが考えられる。以上の H-4 株の菌体外と菌体内で分解される基質の相違は菌体内外におけるアルギン酸分解の役割分担を暗示していると考えられ、菌体内酵素の詳細な解析を進める必要が

ある。

ところで、H-4 株のアルギン酸分解酵素を褐藻類のプロトプラスト化へ応用する場合、菌体内の酵素は Alg-Na の分解性が低いことから不適當であると考えられる。逆に、菌体外酵素は Alg-Na をはじめ polyM, polyG, MG random いずれの基質に対しても活性が認められたため、プロトプラスト化への応用が可能と考えれることから、以後の実験は菌体外酵素について行った。

また、本節での H-4 株のアルギン酸分解酵素の産生条件の検討結果から、以後の実験には、75 %海水、0.8% カシトン、0.1 % アルギン酸ナトリウムを含む培地(APL 培地(b 組成))で 25°C, 96 時間培養した培養上清を粗酵素液として供試することとした。

第三節 *Alteromonas* sp. H-4 株の産生する菌体外アルギン酸分解酵素の精製

前節において *Alteromonas* sp. H-4 株が菌体外に産生するアルギン酸分解酵素は、Alg-Na, polyM, polyG, MG random のいずれにも分解活性を示すことが明らかとなった。さらに H-4 株の菌体外アルギン酸分解酵素産生量は培地の海水含量の増加とともに多くなる傾向が認められ、海水適応型のアルギン酸分解酵素を産生している可能性が示唆された。そこで、本節では H-4 株の産生する菌体外アルギン酸分解酵素の酵素化学的特徴を調べるために、本酵素の精製を試みた。

材料と方法

1. 供試菌

前節と同様 *Alteromonas* sp. H-4 株を供試菌として用い、継代・保存には AIA-II 培地(前節参照)を使用した。

2. 培養上清の調整

培養令 5 日以内の H-4 株を APL-pre 培地(前節参照)10 ml に一白金耳量接種し、25 °C、24 時間静置培養した後、この前培養液 5 ml を 500 ml 容坂口フラスコ中の APL 培地(前節参照)450 ml に接種し、25 °C、4 日間振盪培養した。培養後、培養液を遠心分離(15,000 x g、30 分、0 °C)し、その上清を粗酵素液とし、次項に示した方法に従い精製を行った。

3. H-4 株培養上清からのアルギン酸分解酵素の精製

以下に示した濃縮、精製手順により、H-4 株培養上清からアルギン酸分解酵素の精製を行った(Fig.1-3-1)。なお、精製に関する全ての操作は 0-4 °C の冷蔵庫内で行った。

3-1. 培養上清の濃縮

培養上清の濃縮は Pellicon Cassette System (Millipore)により分子排除限界 10 kDa の polysulfone 製の限外濾過膜(Millipore)を使用し、前述の培養上清約 800 ml を 50 ml 前後まで濃縮後、その濃縮試料を 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)に対し 8-9 時間透析した。透析後、濃縮培養上清を遠心分離 (7000 x g, 20 分)し、溶液中の不溶物を除去した。

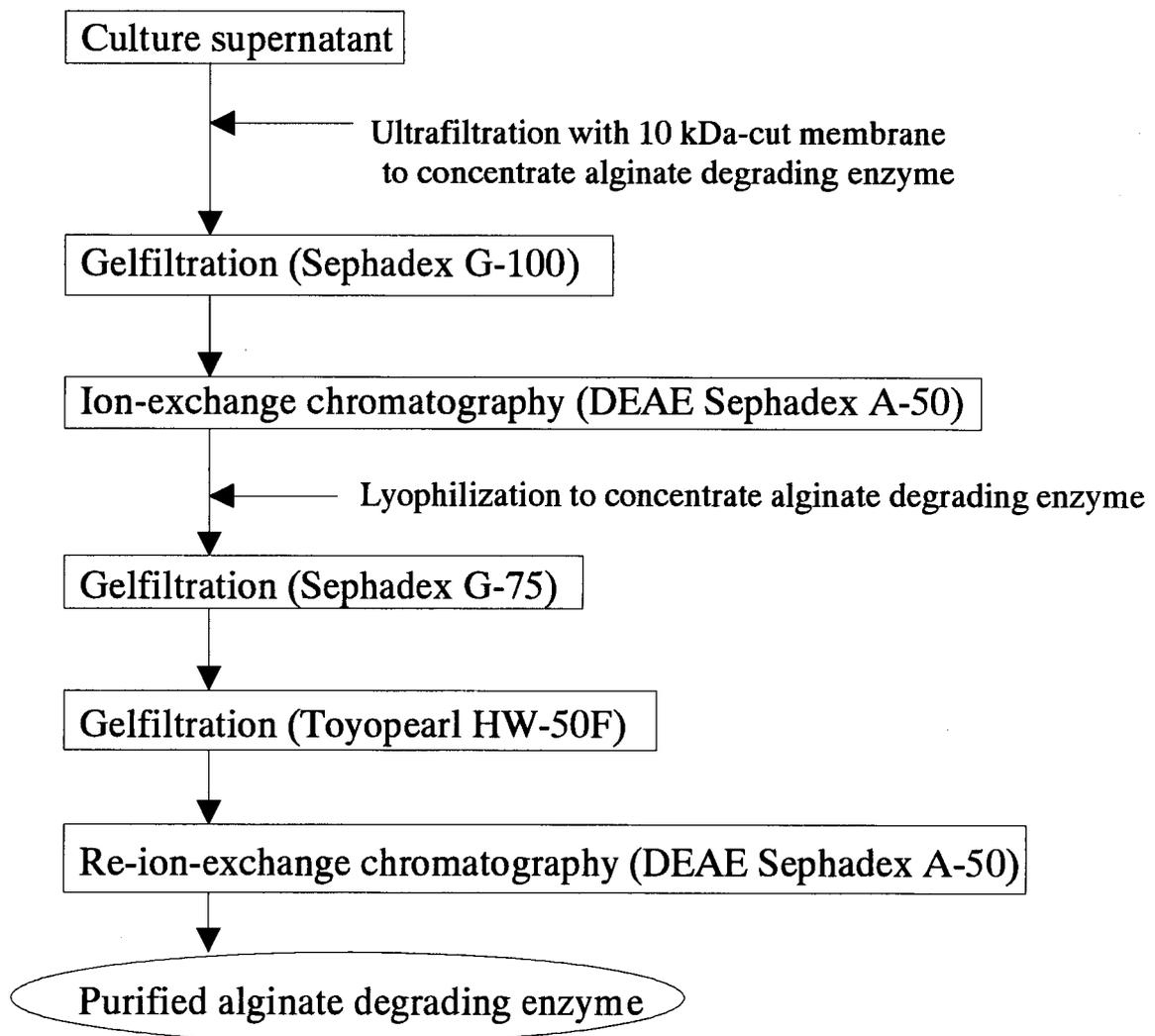


Fig. 1-3-1. Outline of purification steps of an extra-cellular alginate degrading enzyme from *Alteromonas* sp. H-4.

3-2. Sephadex G-100 によるゲル濾過

濃縮、脱塩を行った培養上清を凍結乾燥機(LABCONCO Model 75035)により液量が 5 ml 程度となるまで濃縮した。この試料をあらかじめ 50 mM MgCl₂ を含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)で平衡化した Sephadex G-100(Pharmacia Co Ltd.)カラム(2.64 cm x 64 cm)に負荷し、同緩衝液で溶出(流速 19 ml/h)した。アルギン酸分解酵素活性画分を集め、次の陰イオン交換クロマトグラフィーに供試した。

3-3. DEAE-Sephadex A-50 によるイオン交換クロマトグラフィー

DEAE-Sephadex A-50(Pharmacia Co.Ltd.)カラム(2.64 cm x 40 cm)をあらかじめ 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)で平衡化し、ゲル濾過により分画したアルギン酸分解酵素活性画分を DEAE-Sephadex A-50 ゲルに吸着させ、0.1 M Tris-HCl(pH 7.5)で充分洗浄した後、直線的に塩化ナトリウム(NaCl)濃度勾配(0~0.5 M)をかけ、流速 26 ml/h で溶出した。活性を示した画分を集め 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)に対し 8-9 時間透析し、脱塩した。

3-4. Sephadex G-75 によるゲル濾過

前項(3-3)のアルギン酸分解酵素活性画分 50~70 ml を凍結乾燥により 5 ml まで濃縮し、50 mM MgCl₂ を含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液で平衡化した Sephadex G-75(Pharmacia Co.Ltd.)カラム(2.64 cm x 94 cm)に負荷し、同緩衝液を使用し、流速 19 ml/h で溶出した。アルギン酸分解酵素活性画分を集め、次のゲル濾過に供試した。

3-5. Toyopearl HW-50F によるゲル濾過

前項(3-4)のアルギン酸分解酵素活性画分を凍結乾燥により濃縮し、50 mM MgCl₂を含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)で平衡化した Toyopearl HW-50F(TOSOH Co.Ltd.)カラム(2.64 cm x 94 cm)に負荷し、同緩衝液により流速 20 ml/h で溶出した。アルギン酸分解酵素活性画分を集め、次の精製段階に供試した。

3-6. DEAE-Sephadex A-50 による再クロマトグラフィー

前項(3-5)で分画したアルギン酸分解酵素活性画分を凍結乾燥により濃縮し、再び DEAE-Sephadex A-50 カラム(2.64 cm x 40 cm)に負荷した。このカラムは前項 3-3 と同様の手法で平衡化し、アルギン酸分解酵素の溶出も同様の条件で行った。なお、NaCl 濃度勾配

は 0~0.7 M とした。得られた精製酵素液は脱塩し、-20 °C で凍結保存した。

4. アルギン酸分解酵素活性測定法

各精製段階のアルギン酸分解酵素活性の測定は前節と同様の方法(紫外部吸光法)および反応条件で行い、前節と同様に 1 分間に 235 nm の吸光値を 0.010 増加させる酵素活性を 1 U と定義した。なお、紫外部吸光法によるアルギン酸分解酵素活性測定法の妥当性と本酵素反応の定量性について再確認するために、ゲル濾過とイオン交換クロマトグラフィーで精製したアルギン酸分解酵素を供試し、酵素濃度および反応時間等の反応条件を変えて活性を測定した。

5. タンパク質定量法

各精製段階のタンパク質濃度は牛血清アルブミンを標準タンパク質として使用し、Bearden (1978) のタンパク質色素結合法によって測定した。すなわち、Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 を 1 mg/ml になるように 85 % (W/V) リン酸に溶かし、これを 5 倍に希釈しタンパク質定量用試薬とした。この試薬 0.5ml に各精製段階のアルギン酸分解酵素液を 0.5 ml 混和し、10 分間発色させ、発色後、465 nm と 595 nm の吸光値の差を測定し、牛血清アルブミンの標準曲線からタンパク質量を算出した。

6. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

精製したアルギン酸分解酵素の純度検定には下記の 2 種のポリアクリルアミドゲル電気泳動を使用した。ゲルの作製及び試料の泳動は Laemmli(1970)、一島(1975)、宮崎ら(1982) などに従って行った。

6-1 ラウリル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS- PAGE)

精製したアルギン酸分解酵素を 10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)に対し透析し、凍結乾燥し、これに SDS-PAGE loading solution [7 % glycerol, 2 % SDS, 5 % β -mercaptoethanol(2-ME), 0.0625 M Tris, 0.005 % BPB, pH 6.8]を 20 μ l 加え、混和し、この試料液(タンパク質量 6 μ g)を SDS-PAGE に供試した。SDS-PAGE は厚さ 1.0 mm のスラブゲルを使用し、分離ゲルのゲル濃度は 10 % acrylamide/0.27 % bis-(acrylamide)[0 % acrylamide, 0.27 % bis-(acrylamide), 0.375 M Tris, 0.1 % SDS, 0.05 % ammonium persulfate(APS), 0.05 % N,N,N',N'-tetra-

methylethylenediamine(TEMED), pH 8.8]とし、濃縮ゲルのゲル濃度は 2.5 % acrylamide/0.625 % bis-(acrylamide)[2.5 % acrylamide,0.21 % bis-(acrylamide), 0.125 M Tris, 0.1 % SDS, 0.0375 % APS, 0.01 % TEMED, pH 6.8]とした。BPB マーカーが濃縮ゲル中にある時は 12~15 mA で、分離ゲル中に移動してからは 24~30 mA で泳動用緩衝液(25 mM Tris, 187 mM glycine, 1.0 % SDS, pH 8.3)を用い通電した。泳動後、スラブゲルを CBB R-250 で染色した。分子量マーカーとして SDS 分子量マーカーキット(MW-SDS-70L, Sigma chemical)を使用した。マーカータンパク質の各分子量は albumin (bovine)(66,000), ovalbumin (45,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36,000), carbonic anhydrase (29,000), trypsinogen (24,000), trypsin inhibitor (20,100), α -lactalbumin (14,200)である。

6-2. 未変性-ポリアクリルアミド電気泳動 (Native-PAGE)

精製したアルギン酸分解酵素液 125 μ l に対し Native-PAGE loading solution(20 % glycerol, 0.167 M Tris, 0.33 % BPB, pH 6.8)を 75 μ l 加えたものを試料とした。この試料を Native-PAGE に供試した。Native-PAGE は厚さ 0.1 mm のスラブゲルを使用し、分離ゲルのゲル濃度は 7 % acrylamide / 0.187 % bis-(acrylamide) [7 % acrylamide, 0.187 % bis-(acrylamide), 0.375 M Tris, 0.05 % APS, 0.05 % TEMED, pH 8.8]とし、濃縮ゲルのゲル濃度は 2.5 % acrylamide / 0.625 % bis-(acrylamide)[2.5 % acrylamide, 0.625 % bis-(acrylamide), 0.125 M Tris, 0.0375 % APS, 0.01 % TEMED, pH 6.8]とした。ゲル作製後、泳動用緩衝液(25 mM Tris, 187 mM glycine, pH 8.3)を使用し、0~4 °C の冷蔵庫内で 12 mA で 1 時間予備通電し、その後、前述の試料を添加して 0~4 °C, 2~4 mA で 8~10 時間通電し電気泳動を行った。電気泳動後、1 枚のゲルは、CBB R-250 で染色し、残りは後述の活性染色に供した。

7. 等電点電気泳動 (isoelectric focusing: IEF)

精製アルギン酸分解酵素(385 U/ml, 150 μ g/ml protein)の等電点電気泳動は、等電点 (pI) が 3~10 のタンパク質が分離するゲルを用い、PhastSystem™ (Pharmacia) で電気泳動を行った。サンプルコームは 1 μ l の試料を泳動できるものを用いた。1 試料につきタンパク質検出用と活性染色用のゲルをそれぞれ用意した。泳動条件は Pharmacia 社のマニュアルに従った。

8. 活性染色

Native-PAGE および IEF 後、Caswell et al. (1986)の基質含有寒天重層法に改良を加えた方

法により活性染色を行いアルギン酸分解活性を示すタンパク質の確認と特定を行った。0.5 % Alg-Na および 1.5 % 寒天を 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)に加温溶解し、この溶液をゲルと同じ大きさのガラス板 (1 mm 厚)の間に流し込み、冷却して固めた。この Alg-Na 含有寒天ゲルを電気泳動後のポリアクリルアミドゲルに重ね、湿潤箱中で 30 °C, 1~2 時間反応させた。反応後、寒天ゲルを 10 %塩化セチルピリジニウム溶液に浸し、アルギン酸分解活性の検出を行った。

9. 精製アルギン酸分解酵素の N-末端アミノ酸配列解析

精製した H-4 株の菌体外アルギン酸分解酵素 (1 nmol, 32 µg) を SDS-PAGE で分離した後、transfer 液[10 mM 3-cyclohexylaminopropanesulfonic acid (CAPS), 10 % MeOH, pH 11.0]を用い、Immobilon™-P^{SO} PVDF 膜 (Millipore)にブロッティング(200 mA,1 時間)した。この膜を CBB R-250 で染色・脱色し、さらにグリシンの混入を最小限に抑えるため純水でよく洗浄した。CBB R-250 で染色されたバンドを切り抜き、乾燥させた後、分析するまで -80 °C で保存した (LeGendre & Matsudaira, 1992)。

この膜に転写されたタンパク試料の N-末端アミノ酸配列は 473A 型気相プロテインシーケンサー(ABI) で分析を行った。

結 果

1. 酵素反応定量性の検討

前節で使用した酵素液は培養上清であることから培地成分等の夾雑物が相当量含まれており、紫外吸光法によるアルギン酸分解酵素活性の測定条件並びに反応の定量性についての詳細な検討を行うまでには至らなかった。そこで、本節では、本酵素反応に定量性が成立するか否かを確認することとした。一回目の DEAE-Sephadex A-50 で分画した画分を供試し、酵素濃度と反応量並びに反応時間との関係を調べた結果を Fig.1-3-2 に示した。H-4 株の産生するアルギン酸分解酵素は酵素濃度を 3/4, 1/2, 1/4 に希釈しそれぞれ反応を行っても、各反応系全てにおいて反応量と反応時間には直線関係が得られた(Fig.1-3-2(A))。さらに、一定の反応時間では反応系に加えた酵素濃度が 1/2 になると反応量も 1/2 になり、酵素濃度と反応量との間にも比例関係が認められた(Fig.1-3-2(B))。従って、本酵素反応には定量性が成立することから、波長 235 nm を使用した紫外吸光法により各精製段階の

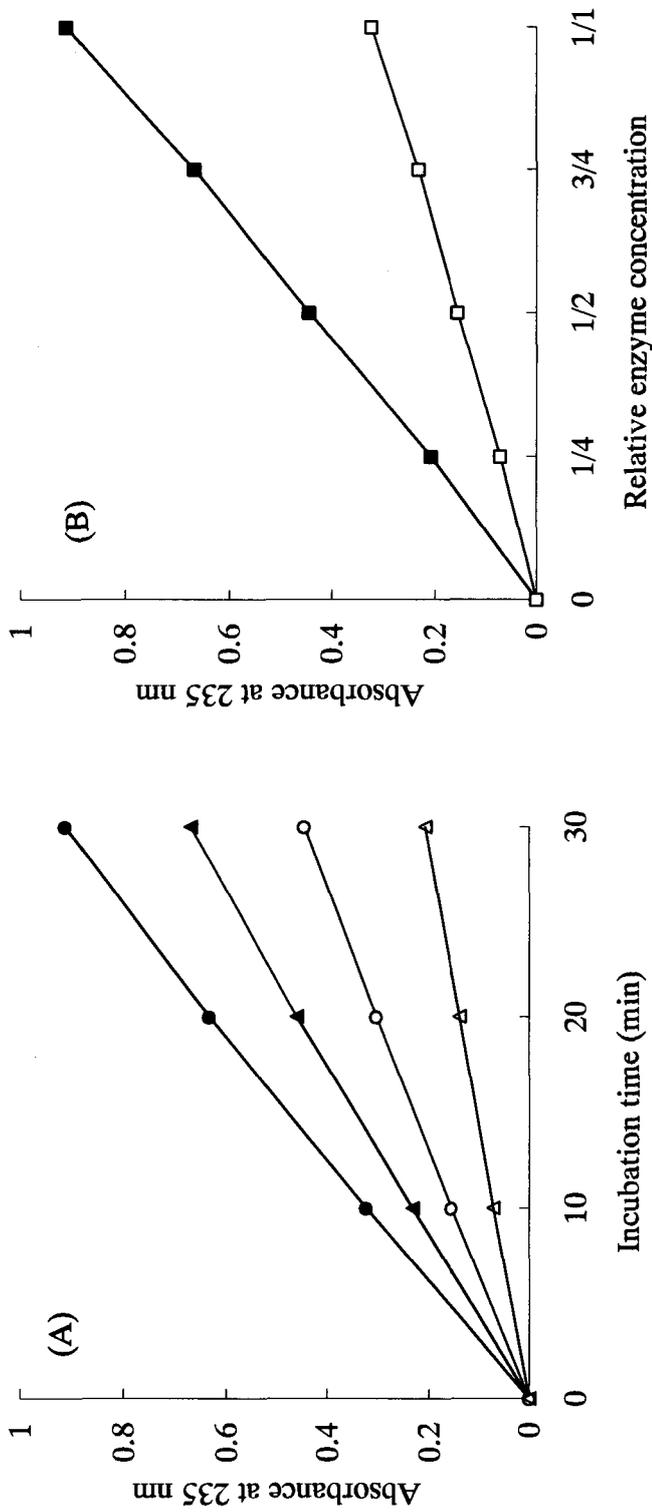


Fig. 1-3-2. Linearity of the ultra-violet absorption assay with respect to incubation time (A) and alginase degrading enzyme concentration (B).

The marks in (A) show the following reaction system; The marks in (B) plotted the alginase degrading enzyme activity against enzyme concentration under the below conditions;

- Enzyme 1/1
- ▲— Enzyme 3/4
- Enzyme 1/2
- △— Enzyme 1/4

- Under 30 min reaction
- Under 10 min reaction

アルギン酸分解酵素活性を比較することが可能と判断した。

2. アルギン酸分解酵素の精製

各精製段階における結果の概略を Table 1-3-1 にまとめて示した。H-4 株の培養上清から精製したアルギン酸分解酵素の最終的な収率は 7.87 % で、限外濾過後の粗酵素液に比べ 16.2 倍に精製された。

2-1. Sephadex G-100 による精製

H-4 株の培養上清を限外濾過濃縮した酵素液を Sephadex G-100 によって分画した時のクロマトグラムを Fig.1-3-3 に示した。このカラム (2.64cm x 64 cm)のボイド体積(130 ml, フラクション No.26)付近とベッド体積(350 ml, フラクション No.70)付近に 2 つの大きなタンパク質のピークが確認され、アルギン酸分解酵素活性を示した画分はその 2 つのタンパク質のピークの谷間に認められたただけであった。Sephadex G-100 による最初のクロマトグラフィーでアルギン酸分解酵素は約 9 倍に精製された。

2-2. DEAE-Sephadex A-50 による精製

前項 2-1 で分画されたアルギン酸分解酵素活性画分を集め、DEAE-Sephadex A-50 に負荷し、分画した際のクロマトグラムを Fig.1-3-4 に示した。イオン交換クロマトグラフィーによっても、単一のアルギン酸分解酵素活性画分が確認され、そのピークは 0.3 M 前後の NaCl 濃度において溶出された。タンパク質のピークもほぼ同様のフラクションに認められたが、裾広がりピークとなっておりアルギン酸分解酵素活性を示したピークと完全に一致しなかった。Sephadex G-100 画分に比べ精製度は 1.3 倍上昇したが、回収率は 60 % と低かった。

2-3. Sephadex G-75 による精製

前項 2-2 で分画されたアルギン酸分解酵素活性画分を Sephadex G-75 に負荷し、分画した際のクロマトグラムを Fig.1-3-5 に示した。タンパク質のピークはフラクション No.90 付近に 1 つ認められたのみであった。このタンパク質のピークの裾野はアルギン酸分解酵素活性を示したピークに重なっていた。DEAE-Sephadex A-50 画分に比べ精製度は 1.5 倍上昇し、回収率は 94 % と高かった。

Table 1-3-1. Summary of the purification of the alginate degrading enzyme from *Alteromonas* sp. H-4

Purification step	Volume (ml)	Activity ^{a)} (U/ml)	Protein ^{b)} (mg/ml)	Specific activity (U/mg)	Folds ^{c)}	Yield (%)
Culture supernatant	4916	4.3				100.0
Ultrafiltration	356	28.7	142.5	0.2	1	48.5
Sephadex G-100	334	22.1	12.3	1.8	8.9	35.1
DEAE-Sephadex A-50	136	32.5	14.1	2.3	11.5	21.0
Sephadex G-75	146	28.5	7.9	3.6	17.9	19.7
Toyopearl HW-50F	35	96.7	25.9	3.7	18.7	15.9
2nd DEAE-Sephadex A-50	44	37.5	11.6	3.2	16.2	7.9

^{a)} The alginate degrading enzyme unit was calculated from increase of absorbance at 235 nm.

^{b)} Assayed according to protein-dye binding assay with BSA as standard.

^{c)} Folds were calculated by specific activity on which the ultrafiltration fraction was based.

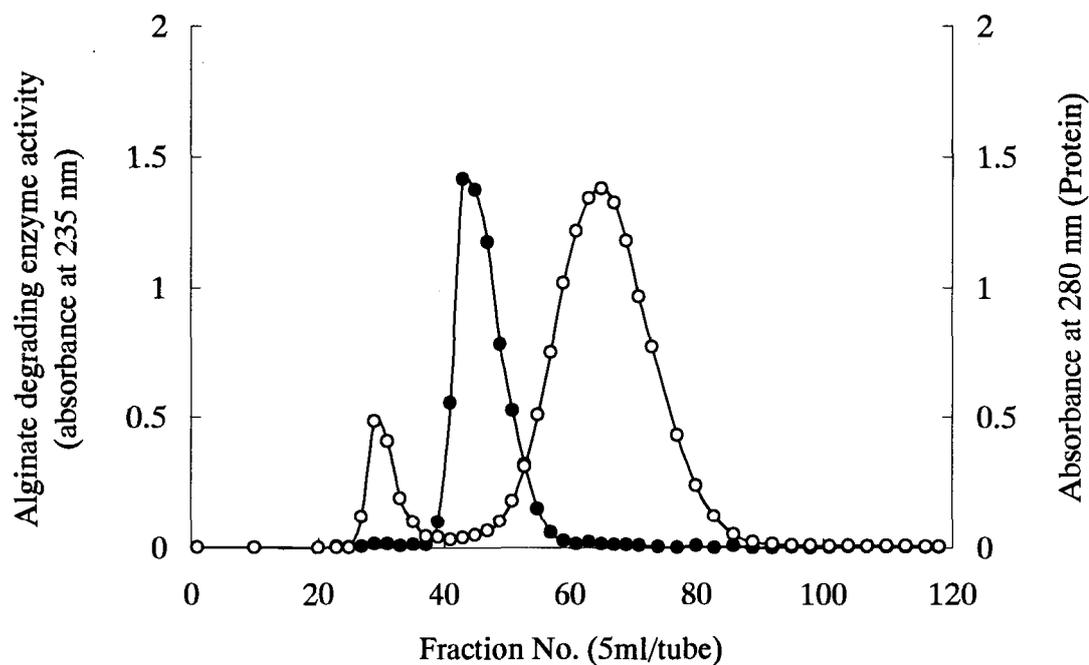
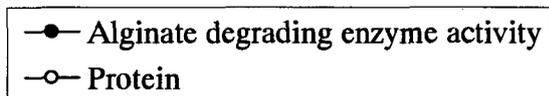


Fig. 1-3-3. A gelfiltration chromatography of an extra-cellular alginate degrading enzyme from *Alteromonas* sp. H-4 on Sephadex G-100.

Conditions of the chromatography was as follows;
 column size: 2.64 cm x 64 cm, flow rate: 18 ml/h.



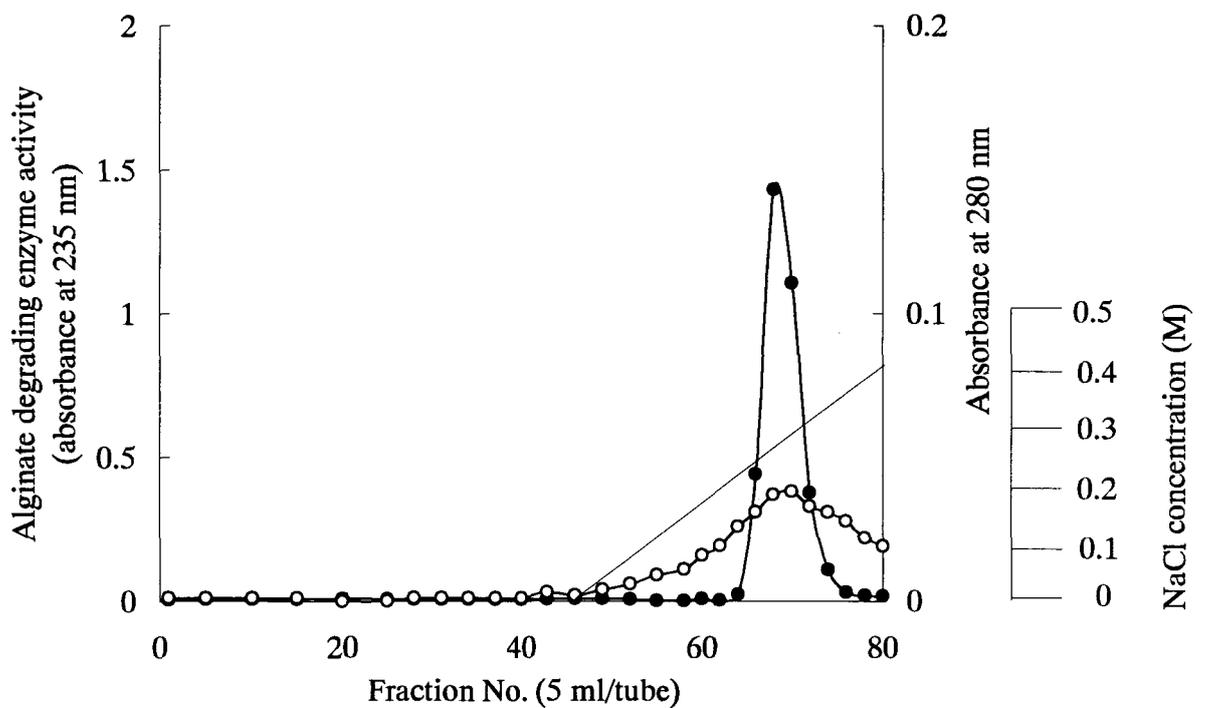
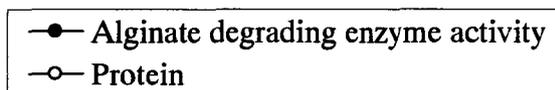


Fig.1-3-4. An anion-exchange chromatography of the alginate degrading enzyme from H-4 on DEAE-Sephadex A-50 after gelfiltration.

Conditions of the chromatography were as follows;
 column size: 2.64 cm x 40 cm, flow rate: 26 ml/h.



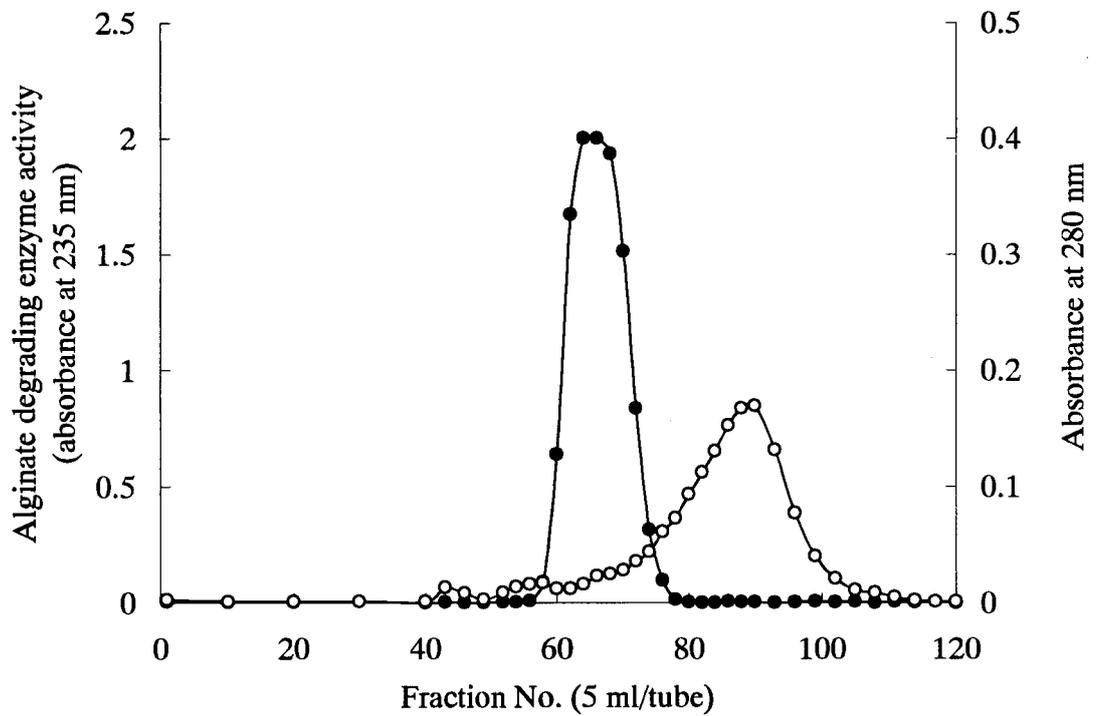
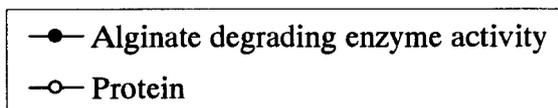


Fig.1-3-5. A gelfiltration chromatography of the alginate degrading enzyme on Sephadex G-75

Conditions of the chromatography were as follows; column size: 2.64 cm x 94 cm, flow rate: 19 ml/h.



2-4. Toyopearl HW-50F による精製

前項2-3で分画されたアルギン酸分解酵素活性画分を Toyopearl HW-50F カラムに負荷し、分画した際のクロマトグラムを Fig.1-3-6 に示した。アルギン酸分解酵素活性を示す鋭い単一ピークが確認され、しかもタンパク質のピークとほぼ一致していた。しかし、前の精製段階に比べ精製度は 1.04 倍とほとんど上昇しなかった。回収率は 80 % と高かった。

2-5. DEAE-Sephadex A-50 による再クロマトグラフィー

前項 2-4 で分画され、タンパク質のピークとほぼ一致したアルギン酸分解酵素活性画分を再び DEAE-Sephadex A-50 で分画した際の、クロマトグラムを Fig.1-3-7 に示した。このイオン交換クロマトグラフィーにおいてもアルギン酸分解酵素活性を示したピークとタンパク質のピークとは一致した。精製度は前の精製段階に比べ低下した上、回収率も 50 % と低かった。

3. 精製アルギン酸分解酵素の純度検定

ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーなどの手法により H-4 株の培養上清から精製したアルギン酸分解酵素を Native-, SDS-PAGE および IEF に供試した。その結果、Native-PAGE では単一のバンドが認められ、活性染色によりこのタンパク質バンドのみがアルギン酸分解活性を示すことを確認した(Fig.1-3-8(A))。また、SDS-PAGEによっても、単一バンドが確認された(Fig.1-3-8(B))。なお、同時に泳動を行った、分子量マーカーの移動度と精製アルギン酸分解酵素の移動度の比較により、H-4 株の産生するアルギン酸分解酵素が分子量 32 kDa であることが推定された(Fig.1-3-9)。

さらに、精製酵素を IEF 後に活性染色を行った結果を Fig. 1-3-10 に示した。精製酵素は IEF でも単一のバンドを示し、その等電点は 4.7 と推定された (Fig. 1-3-11)。活性染色法により、検出されたタンパク質のみがアルギン酸分解活性を示すことが確認され、他にアルギン酸分解活性は全く検出されなかった (Fig. 1-3-10)。これらの結果は H-4 株の菌体外アルギン酸分解酵素が電気泳動的に均一に単離精製できたことを示すものであった。

4. 精製アルギン酸分解酵素の N-末端アミノ酸配列

精製した H-4 株の菌体外アルギン酸分解酵素の N-末端アミノ酸配列を調べた結果を Table 1-3-2 に示した。本酵素の N-末端アミノ酸分析で計 30 アミノ酸残基を決定すること

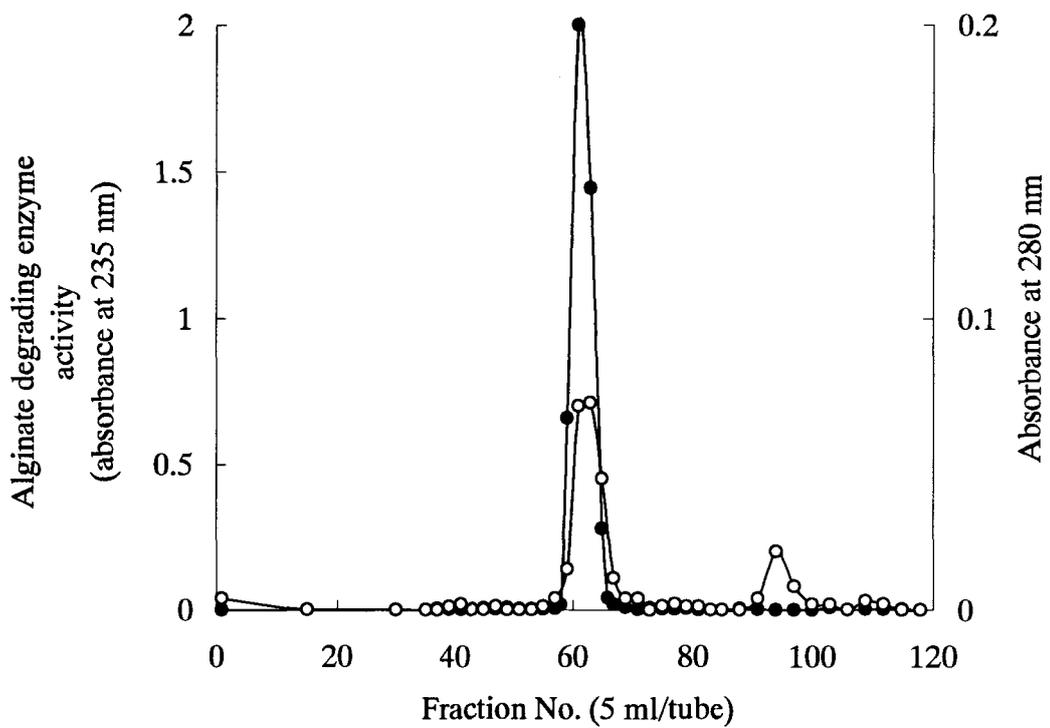
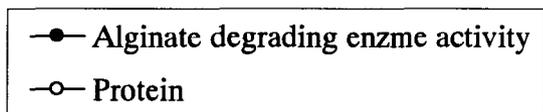


Fig. 1-3-6. A gel filtration chromatography of the alginate degrading enzyme on Toyopearl HW-50F.

Conditions of the chromatography were as follows; column size: 2.64 cm x 94 cm, flow rate: 20 ml/h.



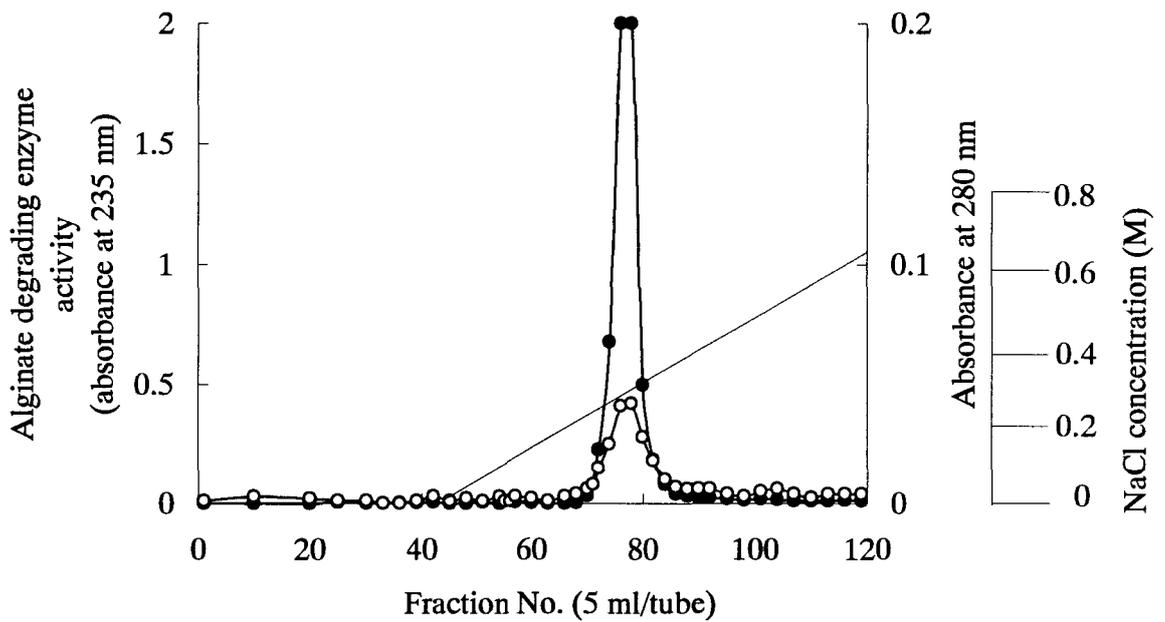
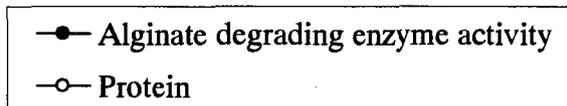


Fig. 1-3-7. The re-chromatography of the alginate degrading enzyme activity on DEAE Sephadex A-50.

Conditions of the chromatography were as follows;
 column size: 2.64 cm x 40 cm, flow rate: 25 ml/h.



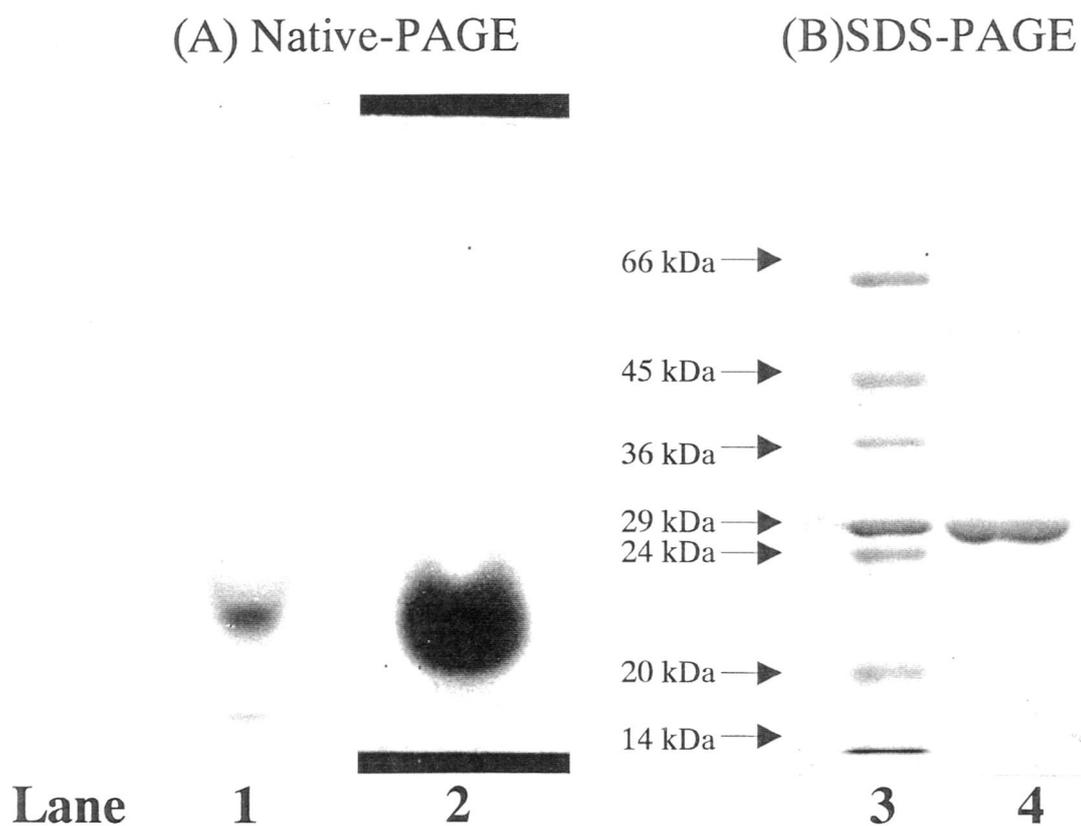


Fig. 1-3-8. Native- and SDS- PAGE of the purified alginate degrading enzyme from *Alteromonas* sp. H-4.

(A) Native-PAGE (7 % gel) of the purified alginate degrading enzyme;

Lane 1: CBB R250 staining.

Lane 2: Activity staining with gel-overlay technique containing alginate.

(B) SDS-PAGE (10 % gel) of the purified alginate degrading enzyme;

Lane 3: Markers (albumin (bovine):66 kDa, ovalbumin:45 kDa, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase:36 kDa, carbonic anhydrase:29 kDa, trypsinogen:24 kDa, trypsin inhibitor:20.1 kDa, α -lactalbumin:14.2 kDa).

Lane 4: The purified alginate degrading enzyme (30 μ g).

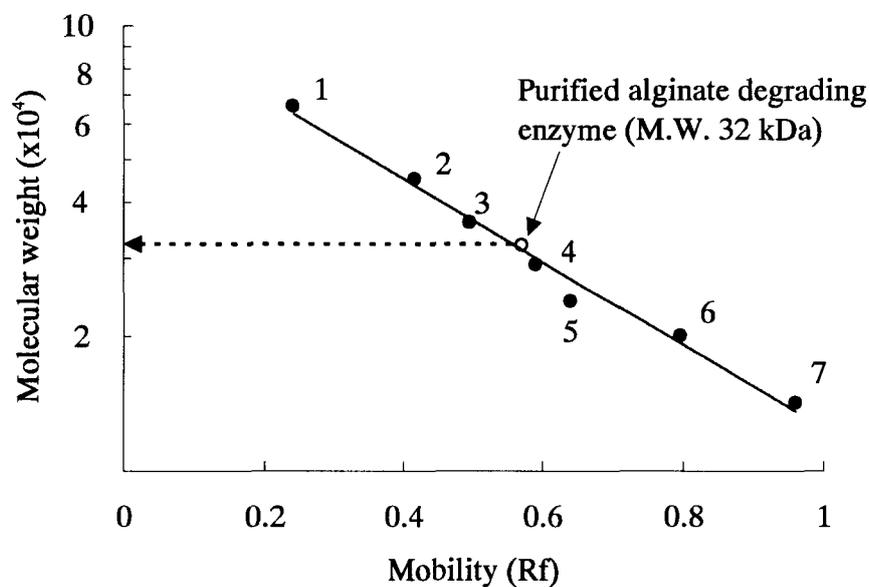


Fig. 1-3-9. Molecular weight estimation of the purified alginate degrading enzyme by SDS-PAGE.

Closed circles indicate the following standard proteins;

- 1: bovine serum albumin (66 kDa)
- 2: ovalbumin (45 kDa)
- 3: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa)
- 4: carbonic anhydrase (29 kDa)
- 5: trypsinogen (24 kDa)
- 6: trypsin inhibitor (20.1 kDa)
- 7: α-lactalbumin (14.2 kDa)

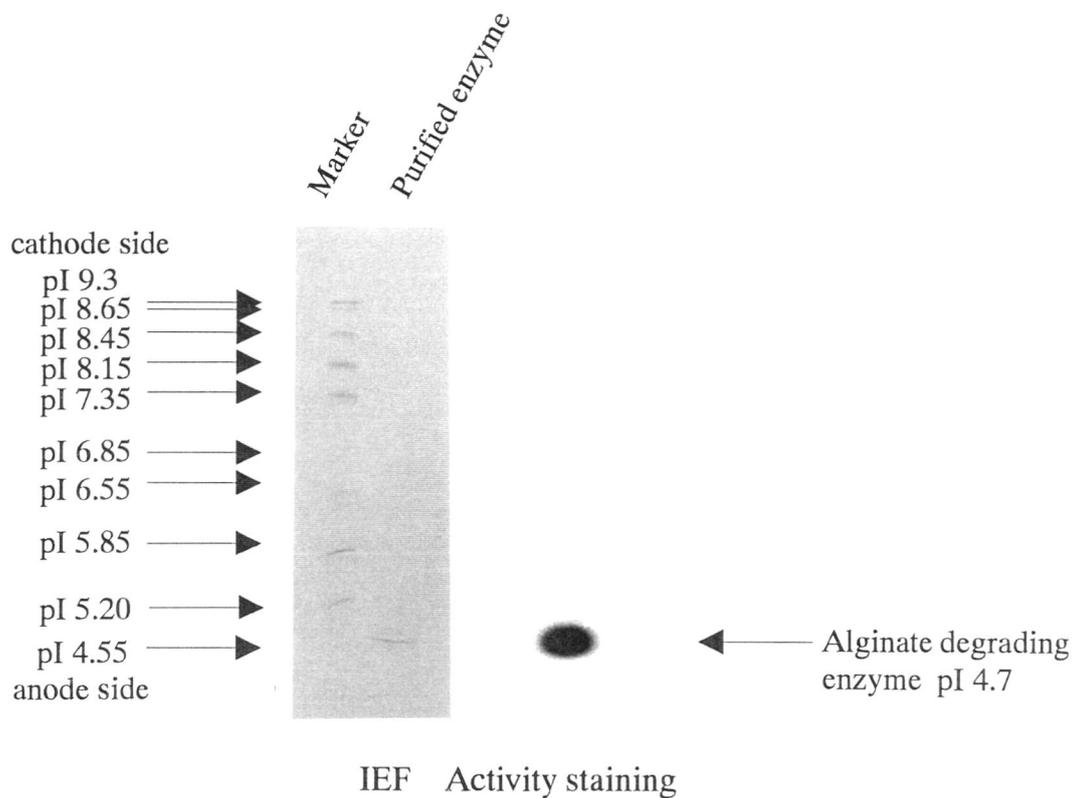


Fig.1-3-10. Isoelectric focusing of the purified alginate degrading enzyme from *Alteromonas* sp. H-4 and activity staining with gel containing alginate.

Marker proteins: trypsinogen: pI 9.30, lentil lectin-basic band: pI 8.65, lentil lectin-middle band: pI 8.45, lentil lectin-acidic band: pI 8.15, horse myoglobin-basic band: pI 7.35, horse myoglobin-acidic band: pI 6.85, human carbonic anhydrase B: pI 6.55, bovine carbonic anhydrase B: pI 5.85, β -lactoglobulin A: pI 5.20, soybean trypsin inhibitor: pI 4.55.

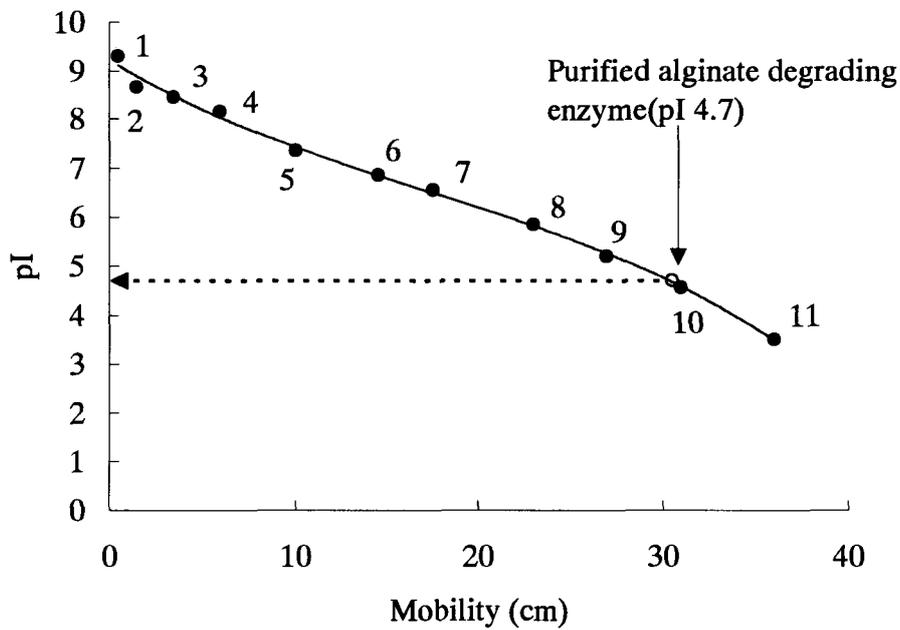


Fig. 1-3-11. Estimation of isoelectric point (pI) of the purified alginate degrading enzyme.

Closed circles indicate the following standard proteins;

- 1: trypsinogen (pI 9.30)
- 2: lentil lectin-basic band (pI 8.65)
- 3: lentil lectin-middle band (pI 8.45)
- 4: lentil lectin-acidic band (pI 8.15)
- 5: horse myoglobin-basic band (pI 7.35)
- 6: horse myoglobin-acidic band (pI 6.85)
- 7: human carbonic anhydrase B (pI 6.55)
- 8: bovine carbonic anhydrase B (pI 5.85)
- 9: β -lactoglobulin A (pI 5.20)
- 10: soybean trypsin inhibitor (pI 4.55)
- 11: amyloglucosidase (pI 3.5)

Table 1-3-2. Comparison of N-terminal amino acid sequence in various alginate degrading enzymes from bacteria

Origin	Sequenced from;	N-terminal amino acid sequence	Reference
<i>Alteromonas</i> sp. H-4	Protein	G D T G S G S G I A S N I T N G S I F D L E G N N P H P L V	In this study
<i>Pseudomonas</i> sp. OS-ALG-9	Gene	E K T Y T I S S A A E L S Q L N L M P G D K V I M K S G E W	Maki et al. (1993)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gene	A D L V P P P G Y A A V G E R K G S A G S P A V P P P Y	Schiller et al. (1993)
<i>Vibrio</i> SFFB 080483 A	Protein	D S A P Y D D K	Romeo & Preston (1986)
<i>Vibrio</i> ATCC 433367 20 kDa	Gene	G V E F S N P	Malissard et al. (1993)
<i>Vibrio</i> ATCC 433367 10 kDa	Gene	K D K E M X X A D V	Malissard et al. (1993)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>aerogenes</i>	Gene & Protein	A V P A P G D K F E L S G W S L S V P V D S D N D G K A D Q	Baron et al. (1994)

ができた。本精製酵素の N-末端からは唯一グリシン(G)のみが検出され、単一タンパク質であることが示された。また、現在までに報告されている細菌由来の種々のアルギン酸分解酵素タンパク質の N-末端アミノ酸配列(タンパク質の direct sequencing の結果あるいは酵素遺伝子の塩基配列から翻訳したアミノ酸シーケンスの結果)もあわせて示したが、本酵素はいずれのアルギン酸分解酵素とも高い類似度を示さなかった。

考 察

海産動物由来や細菌由来のアルギン酸分解酵素の精製に関する報告は多数あるが (Elyakova & Favorov, 1974; Davidson et al.,1976; Hansen et al.,1984)、そのほとんどが部分精製の段階にとどまり、単離精製した報告例は比較的限られている。Muramatsu et al.(1977)が巻き貝の消化管から、Stevens & Levin(1977)が *Alginovibrio aquatilis*、Romeo & Preston(1986)が *Photobacterium* sp. 培養上清からアルギン酸分解酵素を単離精製したとの報告がなされているにすぎない。本研究においては、限外濾過濃縮、ゲル濾過(Sephadex G-100、SephadexG-75、Toyopearl HW-50F)、陰イオン交換クロマトグラフィー(DEAE-Sephadex A-50)などを用い H-4 株の培養上清からアルギン酸分解酵素を電気泳動で単一と確認されるまでに精製した(Fig.1-3-8, 1-3-10)。

H-4 株の培養上清からのアルギン酸分解酵素の精製では、本節で示した以外の精製法(疎水結合クロマトグラフィー、水素結合クロマトグラフィー)と濃縮法(硫酸沈殿法、ポリエチレングリコール沈殿法)について検討を行なったが、いずれの手法も回収率が悪かった。このため、現時点においては本節で示した限外ろ過濃縮後、ゲルろ過およびイオン交換クロマトグラフィーを行う精製法が適当と考える。特に濃縮法については、凍結乾燥法、限外濾過法ともに 10 倍程度の濃縮が限界であり、凍結乾燥法は回収率が 60-90 %と高いが濃縮処理能力が低く、限外濾過法は処理能力は高いが回収率が 50 % と低かった。また、硫酸塩析は濃縮率、処理能力とも高いが、飽和硫酸濃度でも本アルギン酸分解酵素の回収率は 25 % 以下と低かった。より有効な濃縮方法を見いだすことは今後の課題である。

最初の精製段階に用いた Sephadex G-100 によるゲル濾過ではアルギン酸分解酵素活性を示したピークとその他のタンパク質のピークが分離され(Fig.1-3-3)、培養上清中の約 90 % のタンパク質がアルギン酸分解活性画分以外に検出された(Table 1-3-1)。従ってこのゲル濾過クロマトグラフィーは H-4 株のアルギン酸分解酵素の精製に非常に有効である

ことが示された。また、Toyopearl HW-50F によるゲル濾過で、アルギン酸分解活性画分とタンパク質のピークとがほぼ一致したが、その両者のピーク形に若干ずれが生じていることが観察された(Fig.1-3-6)。そのために、本酵素の単離・精製の確認の意味で、再びイオン交換クロマトグラフィーを行った。その結果、本酵素の比活性の低下が認められたが(Table 1-3-1)、両者のピーク形は完全に一致した(Fig.1-3-7)。しかし、Toyopearl HW-50F 画分の SDS-PAGE でも単一バンドが得られたため、再イオン交換クロマトグラフィーは必ずしも本酵素の単離・精製には必要ないと考えられた。

また、H-4 株の培養上清から精製したアルギン酸分解酵素は分子量 32 kDa , pI 4.7 のタンパク質と推定された(Fig.1-3-9 & 11)。細菌由来のアルギン酸分解酵素として、SDS-PAGE での推定分子量が 50 kDa(*Pseudomonas*; Davidson et al.,1976)、40 kDa(*Bacillus circulans*; Hansen et al.,1984)、35 kDa および 110 kDa(属不明の海洋細菌; Doubet & Quatrano,1984)、29 kDa(*Photobacterium* sp.; Romeo & Preston,1986)、28 kDa (*Pseudomonas alginovora*; Boyen et al.,1990b)、57 kDa(*Vibrio harveyi* AL-128; Kitamikado et al.,1992)、47 kDa (*Vibrio alginolyticus* ATCC 17749; Kitamikado et al.,1992)、25 kDa および 31 kDa(*V.alginolyticus* AL-9; Tseng et al., 1992) のものが報告されているが、特に、細菌由来の菌体外アルギン酸分解酵素には 30 kDa 前後の分子量を持つものが多い。また巻き貝の消化酵素からも分子量 32 kDa (Muramatsu et al.,1977)のアルギン酸分解酵素が確認されている。分子量の面からは H-4 株のアルギン酸分解酵素もこれらとほぼ同様のものと思われる。さらに、細菌由来のアルギン酸分解酵素は pI が 4.0~6.0 のものが多く(Boyen et al.,1990b; Kitamikado et al.,1992; Tseng et al.,1992; Romeo & Preston,1986)、H-4 株のアルギン酸分解酵素もこれらと類似した pI を示した。

第四節 精製アルギン酸分解酵素の酵素化学的性状

本節では前節で精製した *Alteromonas* sp. H-4 株の菌体外アルギン酸分解酵素の一般的な酵素化学的性質を知るために反応至適 pH、反応至適温度、インヒビター、塩類の影響などの諸性状を調べ、既報のアルギン酸分解酵素との比較を試みた。

材料と方法

1. 酵素液

前節で精製した *Alteromonas* sp. H-4 株の菌体外アルギン酸分解酵素を供試した。

2. 酵素活性測定法

アルギン酸分解酵素活性の測定は前節と同様に紫外部吸光法を用いた。なお、本節の一部の実験では、還元糖定量法ならびに粘度測定法も使用した。

各測定法の詳細は以下の通りである。

2-1. 紫外部吸光法

紫外部吸光法によるアルギン酸分解酵素活性の測定は前節と同様に行い、酵素液は酵素反応で直線関係が得られる範囲の活性に希釈して使用し、反応時間は 30 分とした。

2-2. 還元糖定量法

還元糖定量法は Somogyi-Nelson 法(Somogyi,1952)に従って行った。1.0 %Alg-Na を含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH7.5) 0.2 ml と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)1.6 ml を混和したものを基質液とし、酵素液 0.2 ml を加え、30 °C において所定時間反応を行った。反応後、Somogyi 試薬 2 ml を静かに注ぎ酵素反応を停止させ、その後直ちに 100 °C、10 分間加熱した。加熱後、水中で 3 分間冷却し、さらに Nelson 試薬 2ml を加え激しく混合して発色させた。発色後 17 分間静置し、蒸留水を 4 ml 添加して希釈し、分光光度計(日立 240 型)により 660 nm の吸光値を測定した。また、ブランクは酵素液添加後ただちに反応を停止させ、同様の方法で発色させたものとした。

2-3. 粘度測定法

粘度測定はオストワルド粘度計を使用し、北御門ら(1989)の報告に準じて粘度測定を行った。0.25 % Alg-Naを含む 0.1M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5) 5 ml を粘度計に添加し、30 °C においてあらかじめ恒温化した。これに 6 U/ml の酵素液 0.5 ml を混合し、経時的に基質の流下時間を測定し、粘度の低下率を算出した。粘度低下率は次式に基づいて計算した。

$$A(\%) = \frac{T_a - T_t}{T_a - T_o} \times 100$$

A: 粘度低下率

Ta: 基質の流下時間(秒)

Tt: 反応後 t 分後の反応液の流下時間

To: 水の流下時間

3. 精製アルギン酸分解酵素の反応に及ぼす pH と温度の影響

反応液の pH を 4~9 の範囲で設定した反応液中で酵素反応を行い、紫外部吸光法によりアルギン酸分解酵素活性を測定し、酵素活性に及ぼす pH の影響を調べた。pH 4~6 は 0.1 M 酢酸緩衝液、pH 6~7 は M/30 リン酸緩衝液、pH 7~9 は 0.1 M Tris-HCl 緩衝液を使用した。反応液の組成は酵素液を 0.3 ml と 0.1 % Alg-Na を含む各 pH の緩衝液 2.7 ml として 30 °C、30 分の酵素反応を行った。

また、0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)を使用し、反応温度を 10~60 °C の範囲に設定し、30 分の酵素反応を行いアルギン酸分解酵素活性を測定した。

4. 精製アルギン酸分解酵素の pH 安定性と温度安定性

前項と同様の pH 4~9 までの各 pH 緩衝液 0.9 ml に精製酵素液 0.1 ml を加え、0 °C で 6 時間放置したものを酵素液とし、前述の条件下(酵素液:0.3ml, 基質: 2.7 ml, pH 7.5)で 30 °C、30 分の反応を行い、紫外部吸光法によってアルギン酸分解酵素活性を測定し、酵素の pH 安定性を調べた。

また、精製酵素液 1 ml を中試に入れ、パラフィルムでシールして、30~70 °C の範囲で 10 分間と 30 分間加熱したものを、前述の条件下(酵素液: 0.3ml、基質: 2.7 ml、30 °C、30 分)で酵素反応を行い紫外部吸光法によりアルギン酸分解酵素活性を測定した。

5. 精製アルギン酸分解酵素反応に及ぼす塩類、金属イオン、金属キレート剤 (EDTA)、SH

基保護剤(DTT)の影響

1 % Alg-Na を含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5) 0.3 ml と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5) 1.4 ml および各種化合物を以下に示した終濃度となるように溶解した 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)を 1 ml 混合し、これに酵素液 0.3 ml を添加し、30 °C、30 分間の反応を行い紫外部吸光法によってアルギン酸分解酵素活性を測定した。なお、対照には、各種物質を添加していない反応系の活性を用いた。供試した塩類は、NaCl (終濃度 10~500 mM)、KCl (終濃度 10~500 mM)、MgCl₂ (終濃度 10~300 mM)、MgSO₄ (終濃度 10~300 mM)、Na₂HPO₄ (終濃度 10~300 mM)、KH₂PO₄ (終濃度 10~300 mM) の 6 種類とした。また、金属イオンは MnCl₂, CoCl₂, NiCl₂, ZnSO₄, CdCl₂, BaCl₂, CaCl₂ (終濃度 1 mM および 10 mM) の 7 種類を供試した。その他の阻害剤として、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, trisodium salt) と DTT を供試した。CaCl₂ を除く金属イオンおよび阻害剤の終濃度はいずれも 1 mM となるように添加した。

6. 酵素の熱安定性に及ぼす塩類および海水の影響

NaCl は終濃度で 10 mM, 50 mM, 100 mM, MgCl₂ は 20 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 海水は 21 %, 42 %, 83 % となるように酵素液に添加した後、40 °C で 15 分間加熱し、加熱後の活性の残存率から酵素の熱安定性に与える塩類および海水の影響を調べ、塩類無添加の反応系における酵素活性の残存率と比較した。

7. 酵素反応に及ぼすカシトンの影響

1.0 % Alg-Na を含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5) 0.3 ml と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5) 1.4 ml およびカシトンを以下の終濃度となるように溶解した 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5) 1 ml とを混合し、これに酵素液 0.3 ml を添加して、30 °C、30 分の酵素反応を行い紫外部吸光法によってアルギン酸分解酵素活性を測定した。反応液中に添加したカシトンの終濃度は 0.025 %, 0.05 %, 0.10 %, 0.15 % とした。

結 果

1. 精製酵素の活性に及ぼす pH と温度の影響

精製アルギン酸分解酵素の活性に及ぼす pH と温度 の影響の結果を Fig.1-4-1 に示した。

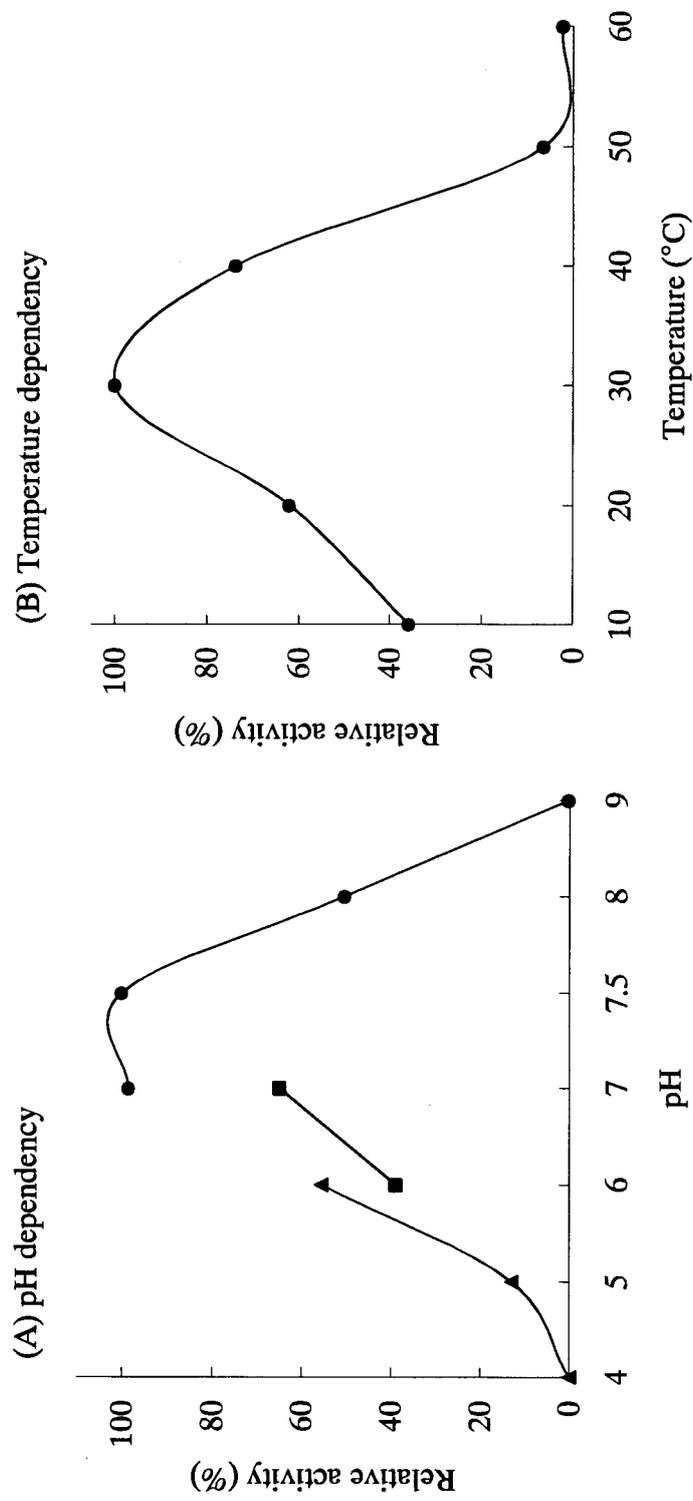
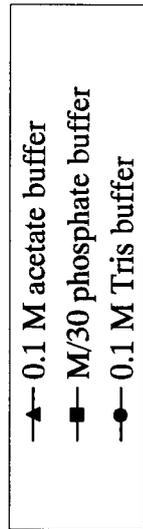


Fig. 1-4-1. Effects of pH (A) and temperature (B) on the activity of the purified enzyme.



pH 5~8 の範囲で精製酵素に活性が認められ、至適反応 pH は 7.5 (Fig.1-4-1(A))であった。

また、10~40 °C の範囲で精製酵素に活性が認められ、至適反応温度 30 °C であった (Fig.1-4-1(B))。反応温度が 10°C では 30 °C の活性の 35.8 %、20 °C では 63.0 %、40 °C では 73.8 % であった。

2. 精製酵素の pH 安定性と温度安定性

精製アルギン酸分解酵素の pH 安定性と温度安定性を測定した結果を Fig.1-4-2 に示した。精製酵素は pH 6 では無処理時の 86 %の活性が残存していたが、pH 5 では 16 %、pH 4 ではわずか 2 % しか活性が残存していなかった。一方、pH 6~9 の範囲では精製酵素は比較的安定で 85 % 以上の活性が残存していた(Fig.1-4-2(A))。

また、温度安定性については、30 °C、10 分の加熱では未加熱処理酵素の活性に比べ 80 % の活性が残存していたが、40 °C、10 分では 37 %、60 °C、10 分の加熱ではわずか 4.1 % しか活性が残存しておらず、精製酵素は比較的熱に不安定であった(Fig.1-4-2(B))。また、30 °C、30 分の加熱で残存活性が約 50 %に低下したが、30 °C 以上では 30 分間の加熱処理後の残存活性は 10 分間の加熱処理の場合とほぼ同程度であった。

3. 酵素活性および熱安定性に及ぼす塩類の影響

精製アルギン酸分解酵素活性に及ぼす塩類の影響を Fig.1-4-3 に示した。供試した 6 種類の塩類の中で、 $MgCl_2$ 、 $MgSO_4$ の添加によりアルギン酸分解酵素は著しく賦活化された。いずれのマグネシウム化合物ともに 50 mM の濃度で最も本酵素を賦活化し、塩無添加時の 2.2~2.3 倍の活性が得られた。また、NaCl と KCl は添加した濃度の増加とともに酵素活性が上昇し、KCl では 200 mM の添加で最大活性が得られ、塩無添加時の 1.5 倍であった。さらに、調べた濃度の範囲では NaCl は 500 mM 添加した場合で最大活性を示し、塩無添加時の 1.8 倍の活性が得られた。一方、 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 の添加は、逆に、アルギン酸分解酵素活性に対し阻害的に作用した。 Na_2HPO_4 の場合 50 mM の添加で最大活性を示したが、塩濃度の増加とともに活性は減少し、200 mM の添加では塩無添加時の 65% の活性であった。また、 KH_2PO_4 も Na_2HPO_4 と同様、添加した塩の濃度の増加とともに活性が減少し、200 mM の添加では塩無添加時の 47% の活性であった。

次に、NaCl, $MgCl_2$, 海水の存在下での酵素の熱安定性を調べた結果を Table 1-4-1 に示した。NaCl は熱安定性を向上させる効果は示さなかったが、 $MgCl_2$ は 200mM まで、および

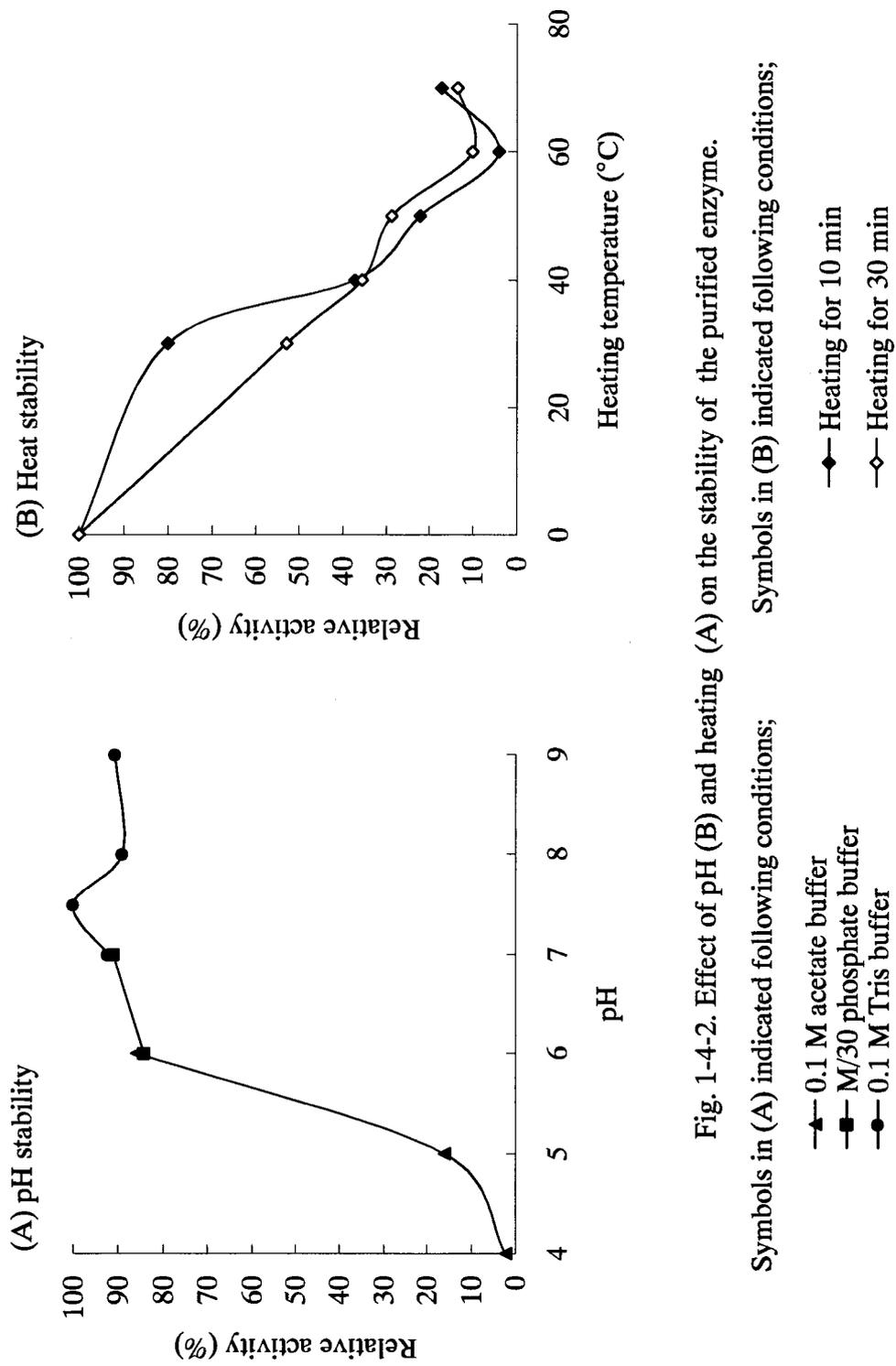


Fig. 1-4-2. Effect of pH (B) and heating (A) on the stability of the purified enzyme.

Symbols in (A) indicated following conditions; Symbols in (B) indicated following conditions;

- ▲ 0.1 M acetate buffer
- M/30 phosphate buffer
- 0.1 M Tris buffer
- ◆ Heating for 10 min
- ◇ Heating for 30 min

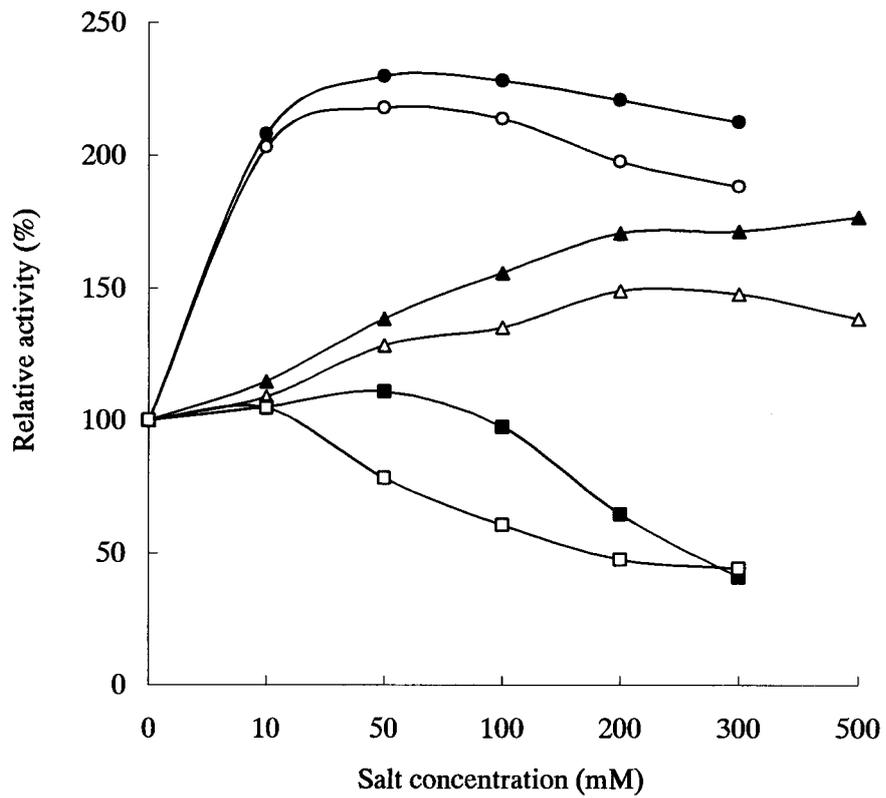


Fig.1-4-3. Effect of various salts on the activity of the purified enzyme

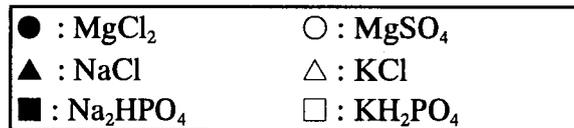


Table 1-4-1. Heat stability of the purified enzyme in buffers containing Na⁺, Mg²⁺ and seawater

	Concentration	Alginase activity(U/ml)		Remained activity (%)
		Before heating	After heating ¹⁾	
NaCl	10 mM	4.2	2.6	61.9
	50 mM	5.0	3.3	66.0
	100 mM	5.2	3.1	59.6
MgCl ₂	20 mM	7.0	4.6	65.7
	50 mM	8.7	6.6	75.8
	100 mM	9.4	7.2	77.0
	150 mM	9.9	7.6	76.8
	200 mM	10.3	8.2	79.6
Seawater	21%	8.0	5.9	73.8
	42%	9.6	6.9	71.9
	83%	9.9	8.5	85.9
Control		4.0	2.5	62.5

¹⁾ Heating condition: 40°C, 15 min

海水は 83 %までそれぞれ濃度の増加とともに残存活性が上昇する傾向にあり、いずれの場合も最大約 80 %の活性が加熱後に残存していた。

4. 酵素活性に及ぼす金属イオン、金属キレート剤ならびに SH 基保護剤の影響

酵素活性に及ぼす金属イオンと金属キレート剤 (EDTA)および SH 基保護剤(DTT)の影響を調べた結果を Table 1-4-2 に示した。金属キレート剤である EDTA・3Na と CdCl₂の添加により残存活性は無添加時の約 30 %に、ZuSO₄の添加では 50 % に減少し、精製酵素活性に対し阻害的に作用した。逆に CaCl₂(10 mM 添加時), MnCl₂および BaCl₂の添加では活性が無添加時の約 1.4 倍に上昇した。

5. 酵素活性に及ぼすカシトンの影響

第一節で培地中のカシトン濃度が高くなるにつれて酵素産生量が減少したことから、酵素活性に及ぼすカシトンの影響を調べた。その結果は Table 1-4-3 に示した。酵素反応液に添加したカシトンの濃度の増加とともに酵素活性は低下し、0.1 % の添加では無添加時の活性の 80 % であったが、0.15 % の添加では 50 % 以下であった。

6. 粘度測定法および還元糖定量法によるアルギン酸分解酵素活性の測定

粘度測定法および還元糖定量法によるアルギン酸分解酵素活性の測定結果を Fig.1-4-4 に示した。基質の Alg-Na の粘度は、反応開始とともに短時間で著しく低下し、20 分以内に低下率が 90 % に達したが、その後は大きな変化が認められなかった。一方、還元糖定量法によるアルギン酸分解酵素活性の測定により、還元糖の生成が確認され、その生成量はほぼ反応時間に比例しており、紫外吸光法の測定結果と還元糖の生成パターンは類似の傾向を示した。

考 察

精製した H-4 株の菌体外アルギン酸分解酵素は 50 mM MgCl₂, 0.5 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 200 mM KCl の添加で著しく賦活化された(Fig.1-4-3, Table 1-4-2)。海水中の主要イオンの濃度は Na⁺が 0.47 M, Mg²⁺が 53 mM, Ca²⁺が 10 mM および K⁺が 10 mM と分析されていることから(Martin,1970)、本酵素が賦活化に必要なイオン濃度は、海水中の各イオン濃度に非常に

Table 1-4-2. Effect of EDTA, DTT, and some metals on the activity of the purified enzyme

Compounds	Concentration	Relative activity (%)
EDTA3Na	1 mM	32.5
DTT	1 mM	94.2
CaCl ₂	1 mM	108.7
CaCl ₂	10 mM	151.0
MnCl ₂	1 mM	138.3
CoCl ₂	1 mM	89.7
NiCl ₂	1 mM	86.1
ZnSO ₄	1 mM	49.7
CdCl ₂	1 mM	30.8
BaCl ₂	1 mM	143.1
Control		100.0

Table 1-4-3. Effect of casitone on the activity of the purified enzyme

Casitone concentration (%)	Relative activity (%)
0.000	100.0
0.025	95.5
0.050	93.6
0.100	80.6
0.150	46.9

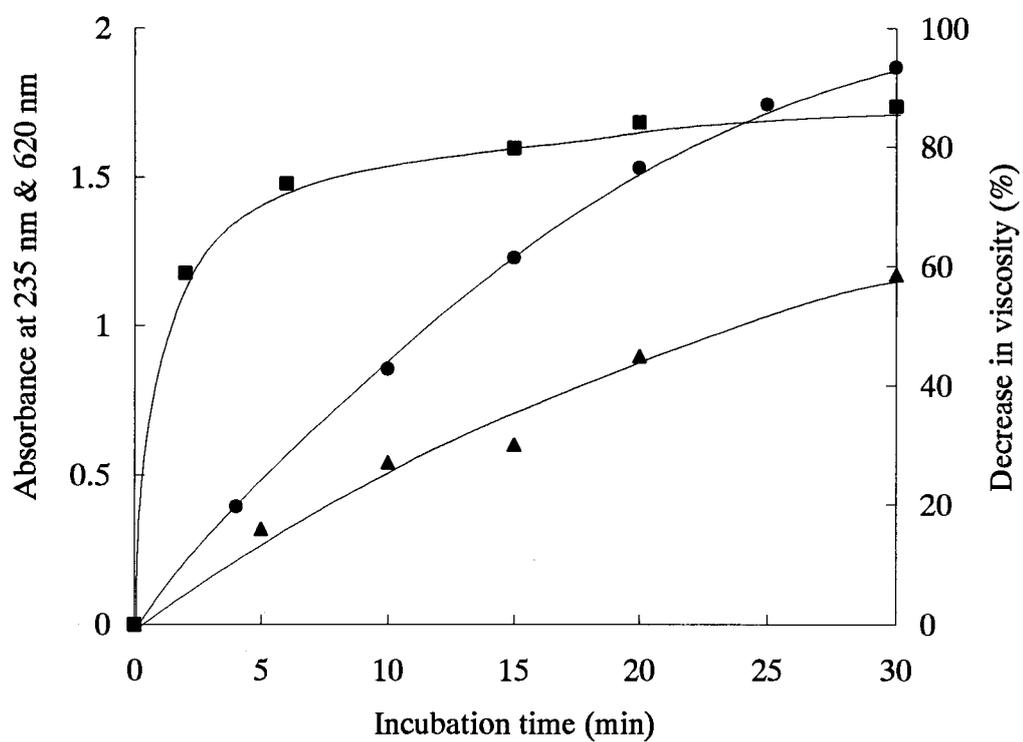


Fig.1-4-4. Reaction profiles of the purified enzyme measured by UV absorption method reducing sugar determination, and viscometric assay.

The alginate degrading enzyme activity were measured by the following assay system;

- UV absorption method (at 235 nm)
- ▲ Reducing sugar determination (at 620 nm)
- Viscometric assay

近似していた。また、本酵素は 30°C, 10 分の加熱で 20 %活性が低下し、40°C, 10 分の加熱では 50~60 %活性が低下したことから、易熱性の酵素であると考えられたが(Figs.1-4-1 & 1-4-2)、40 °C, 15 分の加熱処理においても MgCl₂あるいは海水を反応液中加入することで、酵素の失活が抑制された(Table 1-4-1)。さらに、本酵素は pH 6~9 の範囲で安定で、至適反応 pH は 7.5 であった(Figs.1-4-1 & 1-4-2)。以上のことから、本酵素は、海水中で非常に安定的に保持され、そして効率良くアルギン酸分解活性を発現するものと推察された。

現在までに報告されている細菌由来及び海産動物由来のアルギン酸分解酵素の精製度、至適 pH および塩類要求性、基質特異性などの諸性状を Table 1-4-4 にまとめて示した。海産動物由来のアルギン酸分解酵素は肝膵臓あるいは中腸腺から抽出および精製されており、polyM に特異性が強いことが特徴的である。至適 pH は 4~5 のものと pH 7~9 のものに分かれ、Na⁺, K⁺ および Mg²⁺の要求性は低い傾向にあり、海産動物由来の酵素と H-4 株の酵素ではイオンの要求性に若干の性状の相違が認められた。また、陸性細菌のアルギン酸分解酵素は、菌体内酵素に関する研究例が多いが、*Klebsiella aerogenes* (Boyd & Tuvey, 1977), *Bacillus circulans*,(Hansen et al., 1984), *Pseudomonas* OS-ALG-9 (Kinoshita et al., 1991)では菌体外酵素について調べられている(Table 1-4-4-B)。ただ、陸性細菌由来の酵素で、塩類要求性を詳細に調べた報告例は *K.aerogenes* 由来の菌体外酵素のみであった。*K.aerogenes* 由来の酵素は 0.3 M NaCl および KCl、0.1 M MgCl₂で活性化され、H-4 株酵素との間に類似性が見られた。しかし、Table 1-4-4 に示した通り、陸性細菌由来の酵素の酵素化学的性状に関する情報は非常に限定されているため、H-4 株酵素との比較を十分に検討することは困難であった。

一方、海藻表面および海水中から分離されているアルギン酸分解性海洋細菌では菌体内外のアルギン酸分解酵素について、種々の性質が比較的詳しく調べられている(Table 1-4-4-C)。陸性細菌とは異なり、菌体外酵素に関する報告例が多く、海洋細菌由来の菌体外酵素はいずれも海水レベルの塩類の要求性を示す傾向が認められる。それらのうち、特に、腐敗途中の褐藻 *Sargassum* 属から分離された *Photobacterium* sp.の産生する菌体外酵素と H-4 株菌体外酵素とは塩類要求性、分子量、至適反応 pH、pI 値は非常に類似した性質を示していた。

次に、H-4 株菌体外アルギン酸分解酵素は金属キレート剤である EDTA の添加によって酵素活性が 70 % 減少し、Mg²⁺や Mn²⁺等の二価金属イオンにより賦活化されることから、本酵素は活性中心部位に金属を必要とする酵素であると考えられた(Table 1-4-2)。また SH

Table 1-4-4. Biochemical characters of alginases from some organisms previously reported

Source	Origin	Purification stage	Optimal pH	Salt requirement	Substrate specificity	Enzyme location	Reference
A) Marine mollusks							
<i>Haliotis hannai</i>		Crude extract	7.0-7.5	No requirement	ND	Liver	Tujino & Saito (1963)
<i>H. rufescens</i> & <i>H. corrugata</i>		Partial purified	7.4-7.6	50 mM Na ⁺ , K ⁺ 60-80 mM Mg ²⁺	polyM	Hepatopancreas	Nakada & Sweeney (1967)
Alginase I		Partial purified	4.0	50 mM Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺	polyG		
Alginase II		Homogeneity	5.6	0.25 M Na ⁺ 0.125 M K ⁺	polyM	Hepatopancreas	Elyakova & Favorov (1974)
<i>Littoriana</i> sp.		Homogeneity	8.8-9.2	7.5 mM Ca ²⁺	ND		
Alginase VI		Crude extract	7.0	0.1 M NaCl ND	polyM		
<i>Turbo cornutus</i>		Homogeneity	8.8-9.2	0.1 M NaCl	ND	Mid gut gland	Muramatsu et al. (1977)
<i>Dolabella auricula</i>		Crude extract	7.0	ND	polyM	Hepatopancreas	Nishizawa et al. (1968)
B) Terrestrial bacteria							
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Clinical	Partial purified	7.0	0.3 M NaCl, KCl 0.1 M MgCl ₂ 50 mM MgSO ₄	polyG	Extra-cellular	Boyd & Turvey (1977)
<i>Klebsiella aerogenes</i>		Homogeneity	7.0	0.1-0.3 M Na ⁺ , K ⁺ 50-100 mM Mg ²⁺	polyG	Intra-cellular	Lange et al. (1989)
<i>Pseudomonas maltophilia</i>		Partial purified	7.8	ND	polyM	Intra-cellular	Sutherland & Keen (1981)
<i>Pseudomonas putida</i>		Partial purified	7.8	ND	polyM	Intra-cellular	Sutherland & Keen (1981)
<i>Bacillus circulans</i>	Soil		5.8	10 mM Mg ²⁺	polyM	Extra-cellular	Hansen et al. (1984)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Clinical		6.2	ND	polyM	Intra-cellular	Linker & Evans (1984)
<i>Pseudomonas</i> sp. OS-ALG-9	Alginatc beds (reactor)	Homogeneity	7.5	ND	ND	Intra-cellular	Kinoshita et al. (1991)
Intra-cellular enzymes		Partial purified	ND	ND	ND	Extra-cellular	
Extra-cellular enzymes		Partial purified	6.8	ND	polyM	Periplasm	Kennedy et al. (1992)
<i>Azotobacter chroococcum</i>		Partial purified	7.2	ND	polyM	Periplasm	
<i>Azotobacter vinelandii</i>							
<i>Sphingomonas</i> sp.(?) A1	Ditch sample	Homogeneity	8.0	ND	polyM, polyG both	Intra-cellular	Yonemoto et al.(1991);
A1-I		Homogeneity	8.0	ND	polyM	Intra-cellular	Murata (1994);
A1-II		Homogeneity	7.6	ND	polyG	Intra-cellular	Hisano et al., (1994)
A1-III							
<i>Sphingomonas</i> sp.(?) A2	Ditch sample	Homogeneity	8.0	ND	ND	Intra-cellular	Yonemoto et al.(1991)
A2-II-1							

ND: Not described

Table 1-4-4. Continued

Source	Origin	Purification stage	Optimal pH	Salt requirement	Substrate specificity	Enzyme location	Reference
C) Marine bacteria							
Pseudomonad	Seawater	Crude extract	7.0-8.0	50 mM NaCl, KCl	ND	Intra-cellular	Preiss & Ashwell (1962)
<i>Agaracterium alginicum</i>	Seaweed	Crude extract	7.0	0.1 M Na ⁺ , K ⁺ , NH ₄ ⁺	ND	Intra-cellular	Williams & Eagon (1962)
Pseudomonad	Seaweed	Homogeneity?	7.5	ND	polyG	Intra-cellular	Davidson et al. (1976)
<i>Alginovibrio aquatilis</i>	Seawater	Homogeneity	7.0-8.0	Cs ⁺ , Rb ⁺ , K ⁺ , Na ⁺ , Li ⁺	ND	Extra-cellular	Stevens & Levin (1976); Stevens & Levin (1977)
<i>Beneckeia (Vibrio) pelagia</i>	Seaweed	Partial purified	8.0	ND	polyG	Intra-cellular	Sutherland & Keen (1981)
Marine bacteria							
Strain A3		Partial purified	ND	ND	polyM	Intra-cellular	Doubet & Quatrano (1982);
Strain W3		Homogeneity	ND	ND	polyG	Extra-cellular	Doubet & Quatrano (1984)
<i>Photobacterium</i> sp.	Seaweed	Homogeneity	7.8	0.3-0.4 M Na ⁺ , K ⁺ 50 mM Mg ²⁺ , Ca ²⁺	polyM	Extra-cellular	Preston et al. (1985a); Romeo & Preston (1986); Preston et al. (1985a);
<i>Alteromonas</i> sp.							
Strain FM	Seaweed	Crude extract	8.0	ND	polyM, polyG both	Extra-cellular	Romeo & Preston (1986)
Strain B	Seaweed	Partial purified	8.0	ND	polyM	Intra-cellular	
Strain C	Seaweed	Crude extract	8.0	ND	polyM, polyG both	Extra-cellular	
<i>Pseudomonas alginovora</i>	Seaweed	Crude extract	8.0	ND	polyM, polyG both	Extra-cellular	
	Seaweed	Partial purified	7.5	60 mM KCl & NaCl 30-40 mM MgCl ₂	polyG	Extra-cellular	Boyen et al. (1990b)
<i>Vibrio alginolyticus</i> AL-9	Seaweed	Homogeneity	9.0	0.3-1.0 M Na ⁺ 0.05-0.1 M K ⁺	polyG	Extra-cellular	Kitamikado et al. (1989), Tseng et al. (1992)
Fraction A							
Fraction B-2		Homogeneity	8.0	0.1-1.0 M Na ⁺ 0.05-1.0 M K ⁺	polyM	Extra-cellular	
<i>Vibrio harveyi</i> AL-128	Fish intestine	Homogeneity	8.0	1-100 mM Ca ²⁺ 0.3-1.0 M NaCl 0.1 M MgCl ₂	polyG	Extra-cellular	Kitamikado et al. (1992)
<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 17749	Spoiled fish	Homogeneity	8.2	10 mM CaCl ₂ 5-10 mM CaCl ₂ 1.0 M NaCl	polyM	Extra-cellular	Tseng et al. (1992), Kitamikado et al. (1992)
<i>Alteromonas</i> sp. H-4	Seaweed	Homogeneity	7.5	10-100 mM MgCl ₂ 0.2 M KCl 0.3 M NaCl	polyM, polyG both	Extra-cellular	Sawabe et al. (1992a,b)
<i>Alteromonas</i> sp. H-4	Seaweed	Crude extract	8.0	Not required 50 mM Mg ²⁺	polyM & MG random	Intra-cellular	Unpublished data

ND: Not described

基保護剤である DTT の添加では酵素活性に影響がみられなかったことから、SH 基が本酵素の活性に関与していないことが推察された(Table 1-4-2)。金属イオンの添加においては、 $MnCl_2$ と $BaCl_2$ が賦活化効果を示したが、 $ZnSO_4$ と $CdCl_2$ は活性を阻害した(Table 1-4-2)。Stevens & Levin(1977)は海水から分離した *Alginovibrio aquatilis* のアルギン酸分解酵素について Ia 族の一価陽イオンによる賦活化効果を調べ、本菌のアルギン酸分解酵素は活性の発現に Cs^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Li^+ の順にイオンを要求することから、同族の一価陽イオン内でのイオン径あるいは原子重量とアルギン酸分解酵素活性との間に相関関係があることを報告している。H-4 株のアルギン酸分解酵素は Ia 族の一価陽イオンである Na^+ と K^+ により賦活化され、さらに IIa 族の Mg^{2+} と Ba^{2+} で賦活化された。逆に、IIb 族の Cd^{2+} と Zn^{2+} で活性が阻害されたことから、二価陽イオンにおいても同族間の元素は海洋細菌のアルギン酸分解酵素に対し同様の効果を及ぼすのではないかと考えられた。これらイオンの影響については Ib 属元素や原子重量・イオン径と賦活化の関係等についてもさらに詳細に調べる必要がある。

ところで、H-4 株のアルギン酸分解酵素によるアルギン酸ナトリウムの分解は、反応時間に比例して 235 nm に吸収を示す物質あるいは還元糖の生成が認められた。しかもこの両者の増加傾向が似ていたことから 235 nm に吸収がある物質と還元糖とが同時に生成していることが示唆された(Fig. 1-4-4)。Tujino & Saito(1962)はエゾアワビ内臓のアルギナーゼを用いてアルギン酸を分解し、その主要分解生成物として α,β -不飽和カルボキシルに特有な 235 nm に紫外部吸収を示す不飽和ジウロナイドを単離している。これらのことから H-4 株のアルギン酸分解酵素はセルラーゼやカラギナーゼのような単なる加水分解酵素ではなく、Preiss & Ashwell(1962)や辻野・斉藤(1963)が報告しているようなアルギン酸多糖のグリコシド結合を切り離すとともにその非還元末端に 2 重結合の導入をともなうタイプと同様の作用を示すアルギン酸分解酵素であり、酵素番号 EC[4.2.2.3] に属するアルギン酸リアーゼ(alginate lyase)であると考えられる。なお、Table 1-4-4 に示した種々の生物由来のアルギン酸分解酵素はいずれも alginate lyase であると認められている。また、本酵素反応によってアルギン酸ナトリウムの粘度が急激に低下する現象が認められたことから(Fig.1-4-4)、本酵素は、Alg-Na 分子の一端あるいは両端からグリコシド結合を順に一つずつ切り離す exo 型の酵素ではなく、アルギン酸分子をランダムに分解する endo 型の酵素である可能性が示唆された。そこで、次節においては、本酵素の基質特異性およびアルギン酸分解様式について検討することとした。

第五節 精製アルギン酸分解酵素の基質特異性とアルギン酸分解様式の推定

アルギン酸は β -D-マンニユロン酸(ManA)とその C5-epimer である α -L-グルロン酸(GluA) を最少構成単位とするポリウロン酸である。アルギン酸分子はこの 2 種のウロン酸がランダムに配列した heteropolymeric な多糖であるが、ManA のみが糖鎖を形成しているポリマンニユロン酸ブロック(polyM), GluA のみが結合しているポリグルロン酸ブロック(polyG), および ManA と GluA がランダムに結合している MG random ブロックが分子中に存在することが知られている(Haug et al., 1976)。現在までに報告されているアルギン酸分解酵素はアルギン酸分子中に見いだされる 2 種類の homopolymeric ブロック (polyM および polyG) のどちらに高い分解性を示すか、すなわち基質特異性の強さにより、polyM lyase あるいは polyG lyase の 2 種類に大別されている(Gacesa, 1992)。

本節では、前節までに精製した H-4 株の菌体外アルギン酸リアーゼが polyM および polyG どちらの構造に強い基質特異性を示すかを調べるとともに、酵素反応生成物の解析を行い本酵素の分解反応様式の推定を試みた。

材料と方法

1. 供試酵素

第三節で精製した H-4 株の菌体外アルギン酸リアーゼを供試した。また、polyM に基質特異性を示すと報告されているアワビ肝臓由来のアルギン酸リアーゼ(Haugen et al., 1990) を対照として用いた。アワビアルギン酸リアーゼは市販のアワビアセトン粉末 (abalone acetone powder; Sigma) を 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に溶解した後、遠心分離 (14,000 rpm、10 分) して不溶物を除去した上清を酵素液とした。

2. アルギン酸ナトリウムからの polyM, polyG および MG random ブロックの調製

第二節と同様の手法で各ブロックの調製を行った。なお、第二節でも述べたが、供試した polyM, polyG および MG random の純度はそれぞれ、92.0 %, 90.4 % および M:G=13:7 であり、各基質の推定平均重合度(DP)は Alg-Na が 35, polyM が 13, polyG が 14, MG random が 14 であった。

3. Alg-Na, polyM, polyG および MG random に対する分解活性の測定

基質として Alg-Na, polyM, polyG および MG random を用い、前節までと同様に紫外部吸光法により、各基質に対する分解活性の測定を行った。H-4 株の菌体外アルギン酸リアーゼは 38.6 U/ml のものを、アワビ由来のアルギン酸リアーゼは 0.5 % 溶液 (70 U/ml 相当) のものを供試した。

4. 等電点電気泳動(IEF)および活性染色

第三節と同様の手法で精製アルギン酸リアーゼ(385 U/ml, 150 μ g/ml protein)の IEF を行った。IEF 後、基質として Alg-Na, polyM および polyG をそれぞれ 0.5 % となるように溶解した寒天ゲル重層し、前述の手法により活性染色を行った(第三節参照)。

5. 酵素反応動力学的解析

Alg-Na, polyM, polyG および MG random を基質とし、それぞれ基質濃度を 0.01 %~0.2% に調整した反応液を用い、酵素反応を行った。H-4 株アルギン酸リアーゼ(210 U/ml, 68 μ g/ml protein)を添加後、恒温装置付きダブルビーム分光光度計(日立 200-20 型)でそれぞれの反応液の 235 nm における吸光値の変化を経時的に記録した。なお、0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) を基礎緩衝液系とし、反応温度は 30°C とした。各基質濃度での 235 nm における吸光値の変化から、反応速度を算出した。そして、基質濃度の逆数に対し酵素反応速度の逆数をプロット(Leinweaver-Burk plot) し、 K_m および V_{max} を算出した。また、本酵素は $MgCl_2$ の添加で活性化されたことから、上記基礎緩衝液系に 50 mM $MgCl_2$ を添加した反応系での酵素反応速度の解析も同様に行った。

6. 反応分解産物の解析

4 種の基質、Alg-Na, polyM, polyG および MG random に、130~150 U/ml の 2 種類のアルギン酸リアーゼ(H-4 株菌体外酵素およびアワビ由来酵素)をそれぞれ加え、30°C で 12 時間反応させた後、酵素反応液 (6 mg 基質)をゲルろ過クロマトグラフィー(Cellulofine GLC25m, 生化学工業、1.34 cm x 40 cm, flow rate 25 ml/h)に負荷し、0.1 M Na_2SO_4 を溶出液に用い(Haugen et al., 1990)、分解物の分離を行った。分解物の検出は Hitachi L-4200 UV-VIS 検出器を用い、リアーゼ反応で生じる不飽和ウロン酸由来の 235 nm の吸収を測定し、同時に、溶出液を 1.2 ml ずつ分画し、235 nm で検出されたピークに相当するフラクションの総ウロ

ン酸残基数 (福井, 1969; Dubois, 1956)と総還元末端基数 (福井, 1969; Somogyi,1952) の測定を行い、総ウロン酸残基数に対する総還元末端基数の比率を求め、各ピークの糖鎖の重合度 (Degrees of polymerization; DP)を算出した。

なお、ウロン酸の定量に用いた phenol-硫酸法は、それぞれ反応に用いた基質により発色度合が異なるため、総ウロン酸残基数の算出には、それぞれの基質を標準試料として用いた。また、還元糖の定量ではグルコースを標準試料とした。

結果

1. H-4 株の菌体外アルギン酸リアーゼの基質特異性

Fig.1-5-1.に Alg-Na, polyM, polyG および MG random に対する H-4 株および対照のアワビ由来アルギン酸リアーゼの反応性を示した。H-4 株アルギン酸リアーゼは poly M および polyG の双方に対し活性を示し、反応性の高い順に MG random > Alg-Na \geq polyG \geq polyM であった(Fig.1-5-1(A))。一方、アワビアルギン酸リアーゼは polyG に対しては全く分解性が認められなかったが、polyM に対しては非常に強い分解活性を示し、Alg-Na と MG random に対しても強い活性を示した(Fig.1-5-1(B))。このことは既報の結果(Haugan et al, 1990)を実証するとともに、用いた基質の純度を確認できる結果ともなった。

次に、精製した H-4 株菌体外アルギン酸リアーゼを IEF 後、Alg-Na, polyM, polyG を基質として活性染色を行った結果を Fig.1-5-2 に示した。第三節で述べた様に、IEF 後の活性染色により、精製した H-4 株の菌体外アルギン酸リアーゼが単一の酵素タンパクであることが明らかとなっているが、さらに、アルギン酸分解性を示した酵素タンパクと同一位置に polyM と polyG の両基質に対しても強い分解性が確認された(Fig. 1-5-2)。

さらに、Alg-Na, polyM, polyG および MG random それぞれの基質に対し、H-4 株由来菌体外アルギン酸リアーゼの酵素反応動力学的解析を行った結果を Table 1-5-1 に示した。基質により Km 値および Vmax 値が異なり、Km 値は polyG が 66 μ g/ml、MG random が 165 μ g/ml Alg-Na が 229 μ g/ml、polyM が 1431 μ g/ml であった。poyM と polyG を基質とした場合では Km 値に約 20 倍程度の開きが認められた。また、50 mM MgCl₂存在下では、いずれの基質の場合も Km 値が 1/4~1/13 程度に低下した(Table 1-5-1)。また、Vmax も MgCl₂存在下では上昇する傾向が観察され、Vmax/Km で示した反応効率も 1~2 オーダー上昇した。

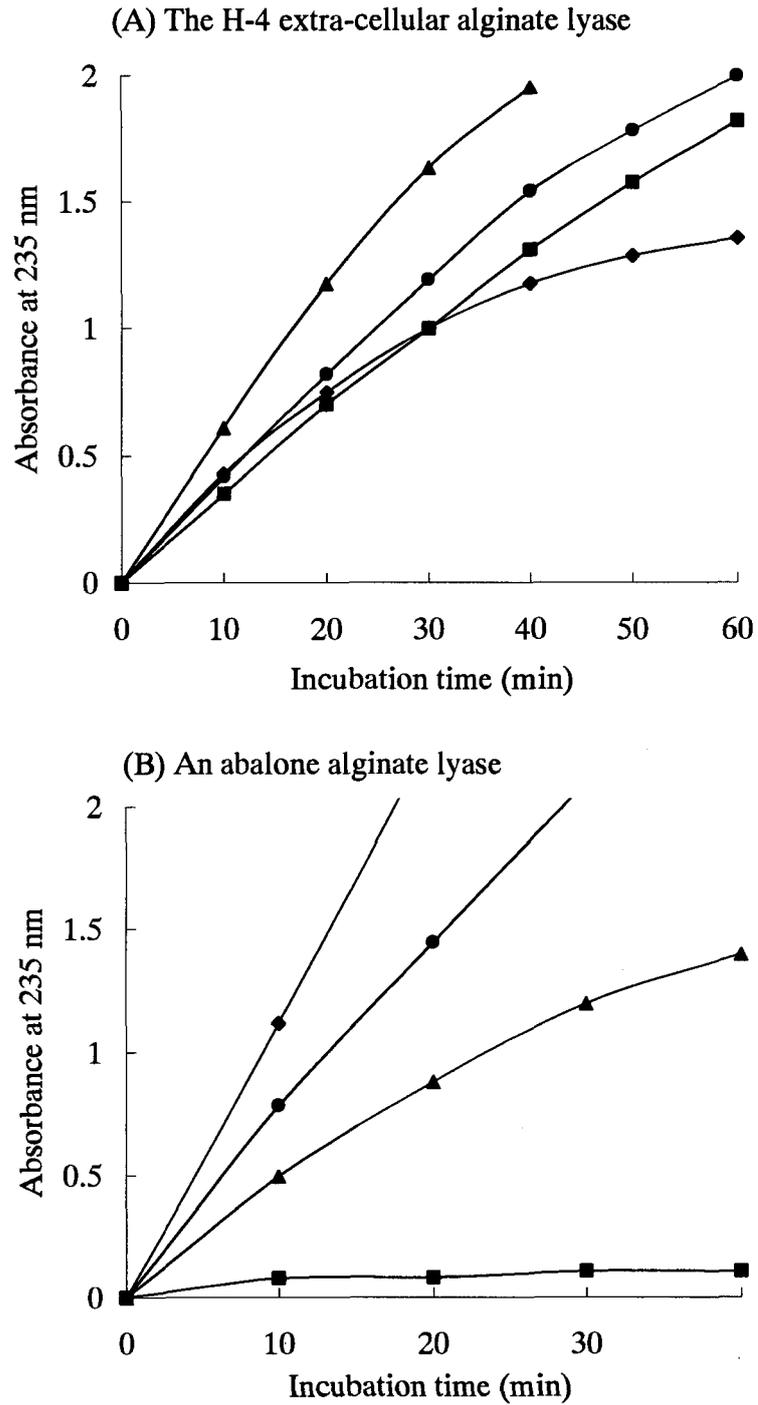


Fig.1-5-1. Substrate specificity of alginate lyases from *Alteromonas* sp. H-4 (A) and abalone (B).

The alginate lyase activity was measured to the following 4 different substrates;

- Alg Na
- ◆ M block
- G block
- ▲ MG random

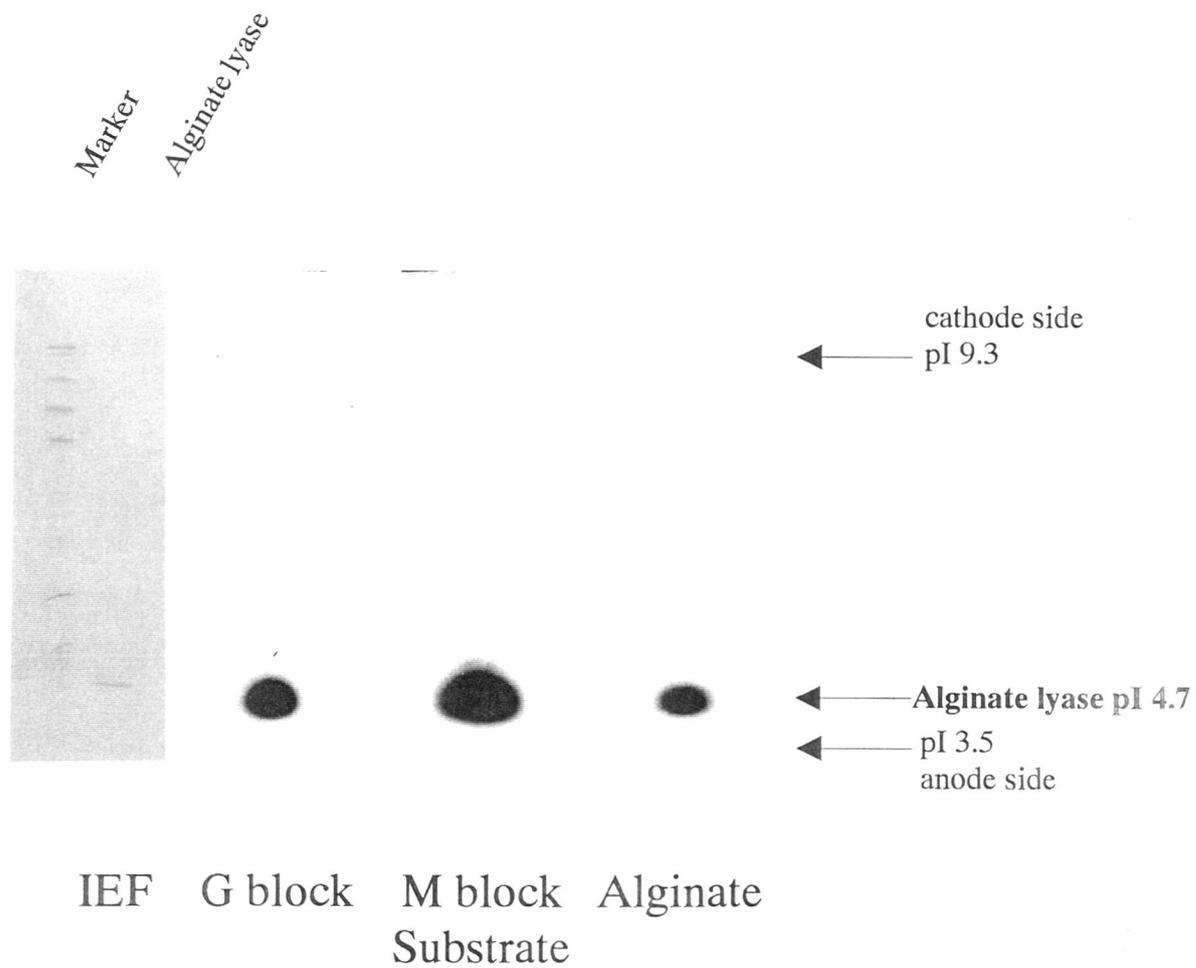


Fig.1-5-2. Activity staining profiles of the alginate lyase from *Alteromonas* sp. H-4 after isoelectric focusing gel electrophoresis.

Table 1-5-1. Kinetic constants of the alginate lyase from *Alteromonas* sp. H-4

Substrate	K _m (mg/ml)		V _{max}		V _{max} /K _m	
	(O.D.235/min/mg protein)					
	0.1 M Tris	+Mg ²⁺ *	0.1 M Tris	+Mg ²⁺ *	0.1 M Tris	+Mg ²⁺ *
Alg-Na	229	18	0.021	0.036	9.2x10 ⁻⁵	2.0x10 ⁻³
Poly M	1431	227	0.042	0.062	2.9x10 ⁻⁵	2.7x10 ⁻⁴
Poly G	66	16	0.016	0.036	2.4x10 ⁻⁴	2.2x10 ⁻³
MG random	165	14	0.029	0.032	1.8x10 ⁻⁴	2.3x10 ⁻³

*The reaction mixture based on 0.1 M Tris-HCl buffer (pH7.5) containing 50 mM MgCl₂.

2. アルギン酸リアーゼによる基質分解物の解析

Fig. 1-5-3 に反応時間を 12 時間とした時の H-4 株の菌体外アルギン酸リアーゼによる Alg-Na, polyM, polyG および MG random の分解物のクロマトグラムを示した。ピークの横に示した数字は、それぞれのピークに相当するフラクションの総ウロン酸残基数と総還元末端基数の比から推定した糖鎖の重合度 (DP) である。H-4 株の菌体外アルギン酸リアーゼ反応で生ずる分解物は、いずれの基質からも類似した DP を示す 3 種のオリゴ糖が生成していることが観察された。それらの分解物の構成は Alg-Na からは DP 7, DP 6 および DP 4 のオリゴ糖が、polyM からは DP 8, DP 5 および DP 3 のもの、polyG からは DP 7, DP 6 および DP 3 のもの、MG random からは DP 7, DP 6 および DP 3 であることが推定された (Fig. 1-5-3)。なお、polyM 分解物では、わずかながら DP 8 以上の不飽和オリゴウロン酸の生成も認められた (Fig. 1-5-3(B))。

また、Fig. 1-5-4 にはアワビアルギン酸リアーゼによる分解物を解析した結果を H-4 株の場合と比較して示した。アワビアルギン酸リアーゼは polyG には分解性を示さなかったことから (Fig. 1-5-1(B))、polyG を基質とした場合の分解物の解析は行わなかった。アワビ酵素による分解物のパターンは H-4 株の酵素分解物のそれに比べ、用いた基質により大きく異なっていた。つまり、アワビ酵素が最も強い分解性を示した polyM の分解物 (Fig. 1-5-1(B)) では DP 4-5 程度の短い糖鎖を中心に生成していたが、MG random からは DP 8 程度の比較的長い糖鎖が主要構成成分となっており、Alg-Na 分解物は polyM と MG random の両分解物の中間的なパターンが観察された (Fig. 1-5-4(B))。また、H-4 株およびアワビアルギン酸リアーゼで分解した基質の分解物をクロマトグラフィーで分離して得られたピークから回収された総ウロン酸の回収率を Table 1-5-2 に示した。H-4 株アルギン酸リアーゼ分解物の回収率は 99~122 % 程度であり、ほぼ全てのウロン酸が回収された。一方、アワビアルギン酸リアーゼでは、polyM 分解物の回収率は 110 % とほとんどのウロン酸が回収されていたのに対し、Alg-Na 分解物では 74.5%、MG random 分解物では 86.2 % の回収率となり、未分解な部分が残存していることを伺わせる結果となった。

次に、基質 (Alg-Na および MG random) の分解反応時間を 1 時間にした場合の反応生成物をゲル濾過で解析した結果を Fig. 1-5-5 に示した。反応 1 時間では比較的高い DP の不飽和オリゴ糖の比率が高く、DP 3~4 程度の短い糖鎖の生成が少ないことが観察された。反応時間を 12 時間とし、十分に酵素反応を行うことにより、反応生成物中の短い糖鎖 (DP 3~4, DP 5~6) の占める比率が高くなった。また、H-4 株の菌体外アルギン酸リアーゼは 50 mM Mg²⁺

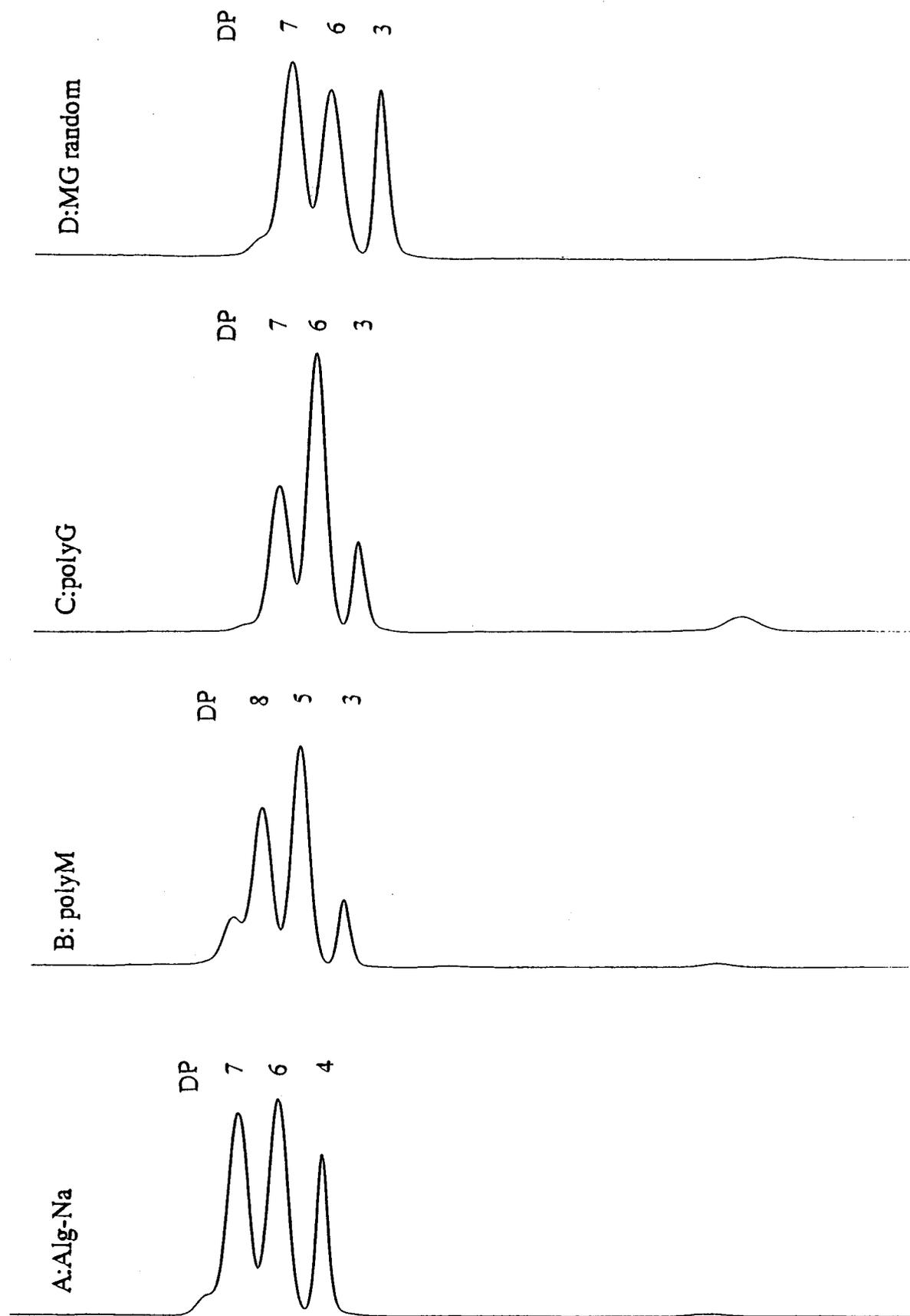
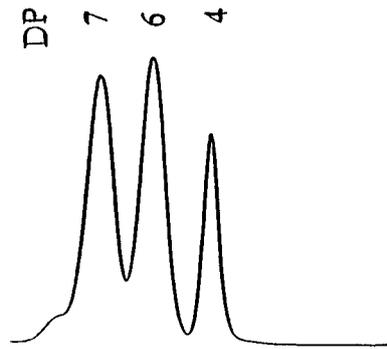


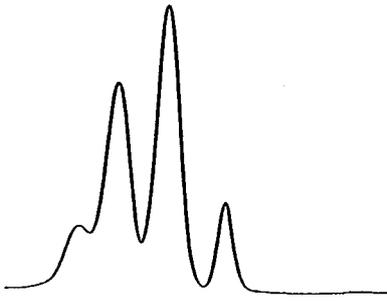
Fig. 1-5-3. Elution profiles of the end products from different substrates degraded by the extra-cellular alginate lyase from *Alteromonas* sp. H-4.

A: *Alteromonas* sp. H-4 alginate lyase

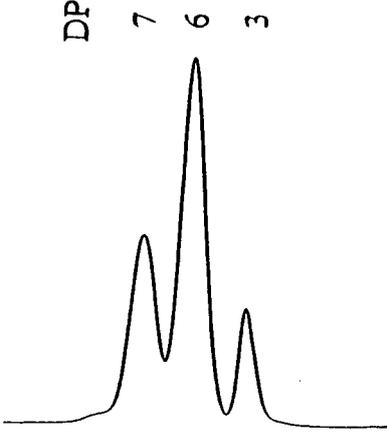
(a) Alg-Na



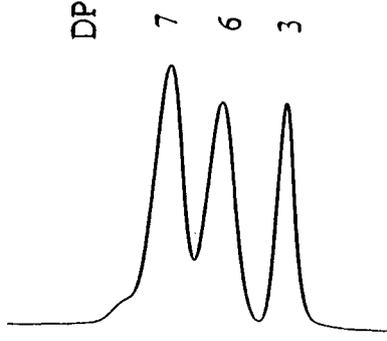
(b) polyM



(c) polyG

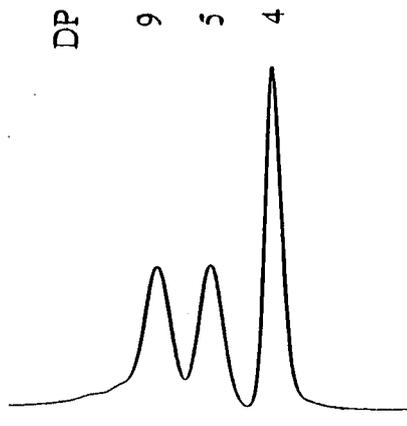


(d) MG random

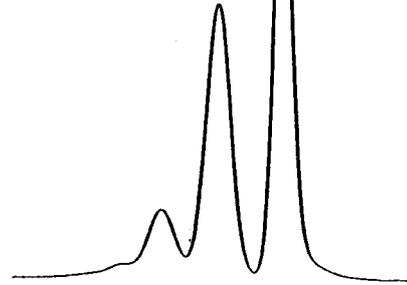


B: Abalone alginate lyase

(a) Alg-Na



(b) polyM



(c) MG random

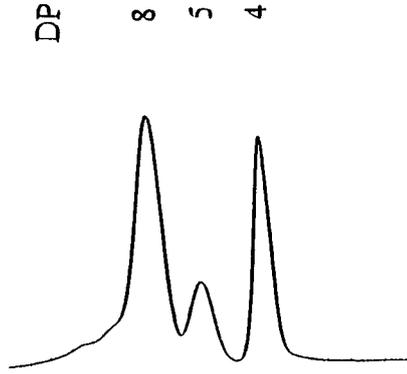


Fig.1-5-4. Elution profiles of the end products from different substrates degraded by the H-4 alginate lyase (A) and the abalone alginate lyase (B)

Table 1-5-2. Recovery rates of uronates separated by gel-filtration chromatography of the alginate lyase products

Substrate	The H-4 alginate lyase				Abalone alginate lyase			
	Alg-Na	polyM	polyG	MG random	Alg-Na	polyM	polyG	MG random
Applied amounts of uronate (mg)	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	NT ¹⁾	6.00
Total amounts of uronate after gel-filtration (mg)	6.97	7.3	5.91	6.89	4.47	6.62	NT	5.17
Recovery (%)	116.2	121.7	98.5	114.8	74.5	110.3	NT	86.2

NT¹⁾ : Not tested.

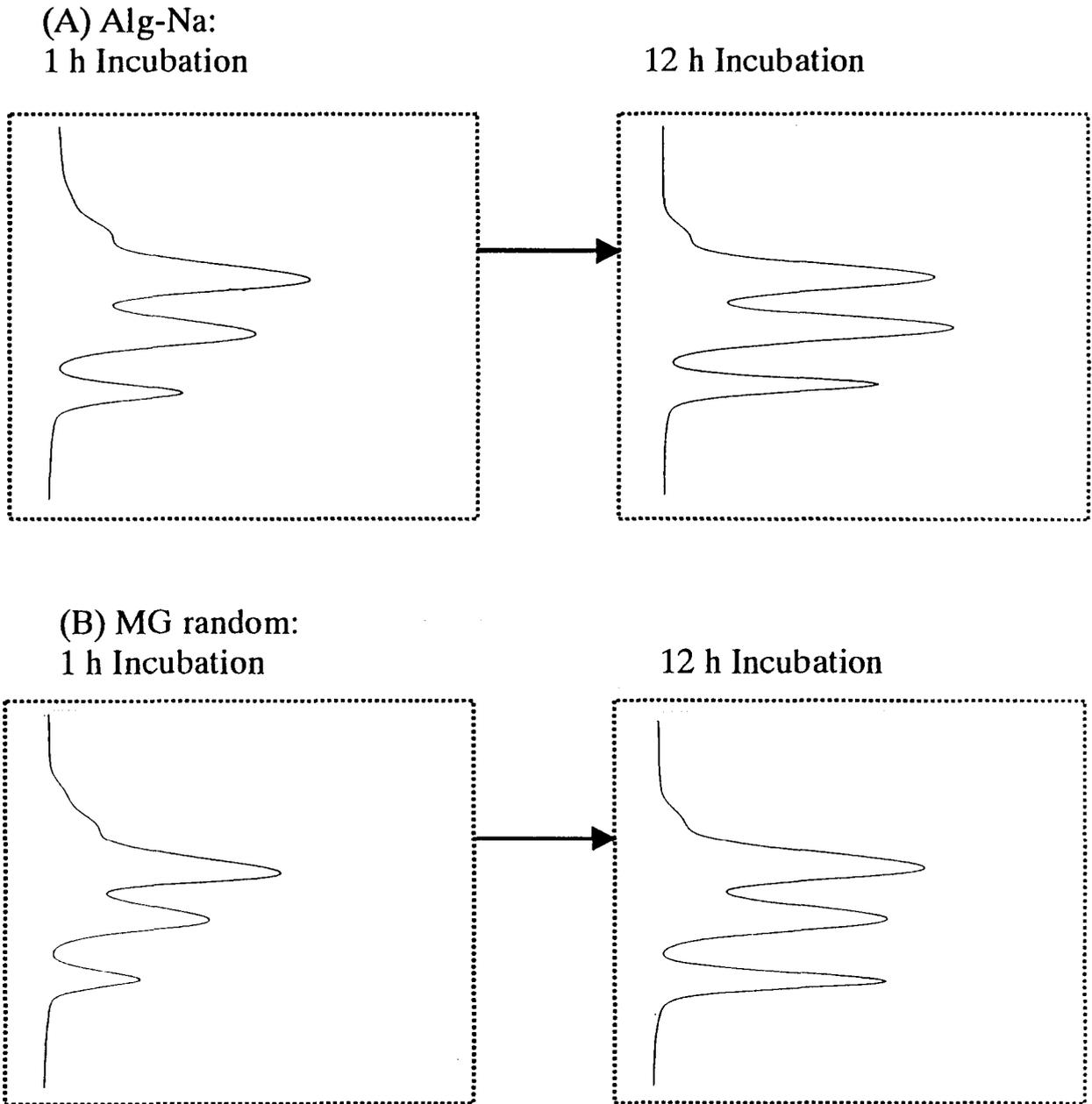


Fig.1-5-5. Changes of elution profiles of unsaturated uronates generated from alginate (A) and MG random (B) by incubation time of the H-4 alginate lyase.

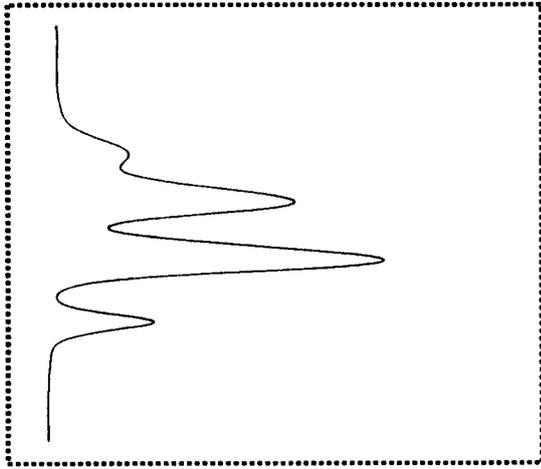
存在下で活性が2.2 倍に上昇し、前述の K_m 値も Mg^{2+} 存在下で低下したことから、50 mM $MgCl_2$ 存在下と非存在下での反応生成物の解析を行った。その結果、12 時間という十分な分解条件下でも、分解生成物中の DP 3~4, DP 5~6 と推定される糖鎖の占める比率が Mg^{2+} 無添加時に比べて高くなり、生成する不飽和オリゴ糖の低分子化が顕著になる傾向が認められた(Fig. 1-5-6)。

考察

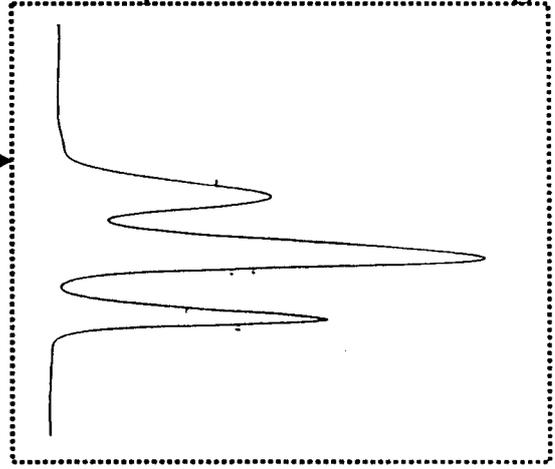
H-4 株の培養液から精製した菌体外アルギン酸リナーゼは Alg-Na, polyM, polyG および MG random の各基質に対し明らかな分解性を示した(Fig. 1-5-1)。さらに、IEF 後に Alg-Na, polyM および polyG を基質とした活性染色法を行った結果、単一の酵素タンパク質が polyM および polyG を分解していることが示唆された(Fig.1-5-2)。そして、本酵素による Alg-Na, polyM, polyG および MG random の分解物として、いずれも同様な DP を示す3種の不飽和ウロン酸が検出され(Fig. 1-5-3)、クロマトグラフィー後のこれら不飽和ウロン酸の回収率はほぼ100%であった(Table 1-5-2)。以上の解析結果は、本酵素が polyM および polyG の両基質を分解していることを支持するものであると考えられる。前節の Table 1-4-4 に示したとおり、これまでに基質特異性が報告されているアルギン酸分解酵素はすべて polyM あるいは polyG のいずれかに対して強い特異性を示している。例えば、本実験でも対照酵素として供試したアワビ肝臓由来の酵素、および *Photobacterium* sp., *Pseudomonas aeruginosa* の産生する酵素は代表的な polyM 特異的リナーゼであり(Romeo & Preston, 1986; Linker & Evans, 1984)、*Klebsiella aerogenes* 由来の酵素は polyG 特異的リナーゼとして最も良く知られている(Boyd & Turvey, 1977)。H-4 株の菌体外アルギン酸リナーゼのように、単一の酵素で polyM および polyG の両ブロック構造を分解する酵素が見いだされた報告例はなく、本研究で精製した *Alteromonas* sp. H-4 株の菌体外酵素は新規な分解様式を示すアルギン酸リナーゼであると考えている。

なお、Preston et al. (1985a) が海藻から分離した *Alteromonas* sp. (前節 Table 1-4-4)やウニ消化管の主要菌相を形成している *Vibrio* 属細菌(Sawabe et al., 1995 in press)のように、平板培地法で細菌のアルギン酸分解特異性を調べた場合、polyM および polyG いずれにも分解能を示す細菌が見いだされている。しかし、平板培地法では、基質特異性の異なる複数の酵素の存在を見分けることができないことから、今後の精製酵素による検討が待たれる。

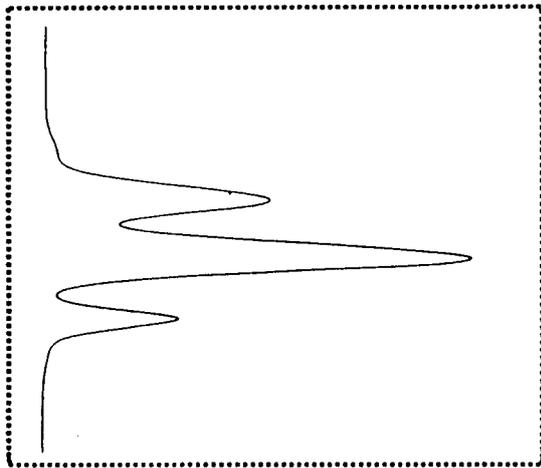
(A) polyM:
12 h Incubation



12 h Incubation
in the presence of 50 mM MgCl₂



(B) polyG:
12 h Incubation



12 h Incubation
in the presence of 50 mM MgCl₂

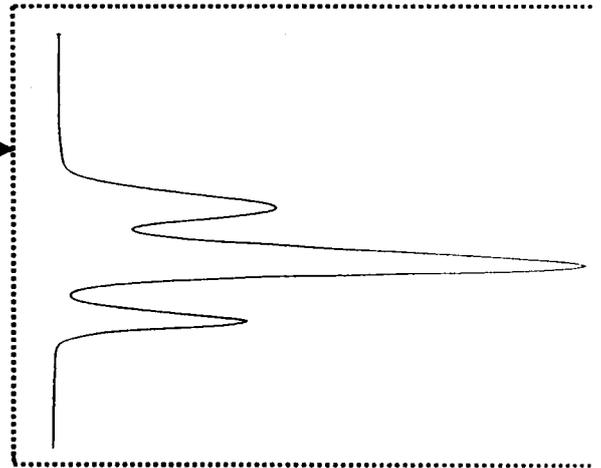


Fig.1-5-6. Changes of elution profiles of unsaturated uronide generated from polyM (A) and polyG (B) by the H-4 alginate lyase in the presence of MgCl₂.

また、工場排水から分離された *Sphingomonas* sp. A1 株は A1-I, II, III の 3 種のアルギン酸分解酵素を菌体内に有し、それらのうち A1-I が polyM と polyG に分解性を示すことが報告されている(Hisano et al.,1994)。しかし、アミノ酸の一次構造解析および遺伝子配列解析により、A1-I(66 kDa)は内部配列がプロセッシングをうけ、polyM に特異的な A1-II(25 kDa)と polyG に特異的な A1-III(38 kDa)に開裂されることが示唆されている(Hisano,1994; Murata,1994)。polyM と polyG に分解性を示す H-4 株の精製酵素は菌体外酵素であり、分子量が 32 kDa と比較的小さいことから、さらにプロセッシングを受けるとは考え難いが、*Sphingomonas* sp. A1 株と同様に H-4 株の菌体外アルギン酸リアーゼ遺伝子の解析も必要であると考える。

さらに、本研究で精製した H-4 株の菌体外酵素は polyM を基質とした場合に得られた K_m 値が、その他 3 種の基質(Alg-Na, polyG, MG random)の K_m 値、特に polyG の K_m 値に比べ約 20 倍ほど高かった(Table 1-5-1)。この結果は本酵素の polyM と polyG に対する基質親和性が異なることを示唆するものと考えられる。ただし、Gacesa(1992)が述べているように、アルギン酸リアーゼの基質特異性は Alg-Na から調製した homopolymeric な領域に対する活性の強弱で判定しており、homopolymeric な基質中に混在する可能性のある異種結合(M-M, G-G は同種結合、G-M, M-G は異種結合となる)の分解性は事実上、無視されているのが現状である。本実験で用いた polyM および polyG は純度の測定値が約 90 %であったが、混在する異種結合の位置は不明である。Haugen et al.(1990)は基質の M-M, M-G(=G-M), G-G 結合の頻度を十分に考慮にいれ、種々の結合が混在した基質を用い、活性の変化と分解物の還元末端と非還元末端側(リアーゼ反応では C4-C5 位で不飽和化がおこるため推定値となる)のウロン酸の種類を NMR で解析することで、アワビ由来の polyM 特異的リアーゼは M-M, G-M, M-G を分解可能であり、*Klebsiella* 由来の polyG 特異的リアーゼは G-X(M or G) を分解可能であるとの解析結果を報告している。酵素反応動力的観点から厳密な基質特異性の解析を行うためには、Haugen et al.(1990)の手法を用いるとともに、酵素分解物のウロン酸の構造を決定し、さらに、切断可能な糖鎖の DP を明らかにしていくことが必要である。

次に、H-4 株の菌体外アルギン酸リアーゼ反応により、DP 3~4, DP 5~6 および DP 7~8 の 3 種の不飽和オリゴ糖が生成することが認められた(Fig.1-5-3)。そこで、本酵素分解物との比較のため、既報の各種のアルギン酸分解酵素反応生成物の種類およびその作用をまとめて Table 1-5-3 に示した。アルギン酸分解酵素分解物の解析は菌体外酵素分解物について

Table 1-5-3 Summary of major end-products generated from alginate by alginate lyases, and their physiological functions

Source	Location	Major end-product	Minor product	Physiological functions of end-product	Reference
A) Bacterial alginases					
<i>Alteromonas</i> sp. H-4	Extra-cellular	Pentamer to Hexamer Heptamer to Octamer	Trimer to Tetramer	ND ¹⁾	In this report
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Periplasm	Monomer		ND	Kennedy et al. (1992)
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Periplasm	Monomer		ND	Kennedy et al. (1992)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Extra-cellular	Dimer & Trimer	Tetramer	ND	Boyd & Turvey (1977)
<i>Photobacterium</i> (<i>Vibrio</i> sp.?)	Extra-cellular	Trimer	Dimer & Longer than Pentamer	ND	Romeo & Preston (1986)
<i>Pseudomonas</i> sp.OS-ALG-9	Intra-cellular	Octamer		ND	Kinoshita et al. (1991)
<i>Alteromonas macleodii</i>		Dimer & Trimer		Root growth promoting activity	Natsume et al. (1994)
<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 17749	Extra-cellular	Tetramer to Hexamer	Monomer to Trimer	Bacteriostatic action	Kitamikado et al. (1993)
<i>Vibrio alginolyticus</i> AL-9	Extra-cellular	Trimer		No bacteriostatic action	Kitamikado et al. (1993)
<i>Sphingomonas</i> sp. A1	Intra-cellular	Avg. MW 1800		Growth enhancement of <i>Bifidobacterium</i> , Oligosaccharine-like effect	Murata (1994); Yonemoto et al. (1993)
B) Animal alginases					
Abalone acetone powder	Hepatopancreas	Trimer		ND	In this report
<i>Haliotis discus hannai</i>	Hepatopancreas	Dimer		ND	Tujino & Saito (1962)
<i>Dolabella auricula</i>	Hepatopancreas	Dimer & Trimer		ND	Nishizawa et al. (1968)

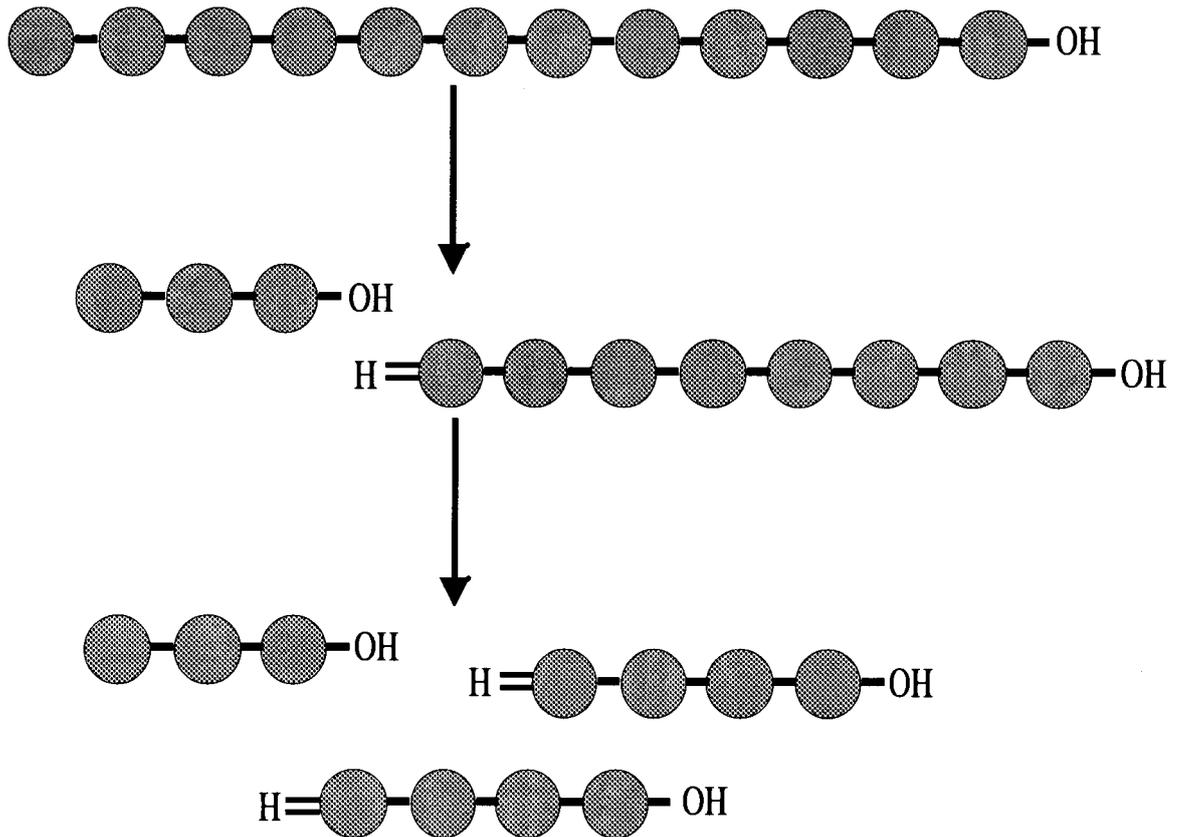
ND ¹⁾ : Not tested.

の報告が多く、菌体内酵素は *Pseudomonas* sp. OS-ALG-9 (Kinoshita et al.,1991)、*Azotobacter* 属細菌(ペリプラズマ画分; Kennedy et al.,1992)由来の酵素についてのみであった。そのため、主要最終産物は単糖ではなく、2糖から8糖程度のオリゴ糖であるとの報告例が多く、細菌が直接代謝できるレベルにまでは至っていないことが伺える。H-4株菌体外酵素分解物も例外ではなかった。動物由来の酵素では、アワビの肝臓由来のアルギン酸分解酵素反応生成物についての報告がなされているが、2糖が主要最終産物であると報告されており (Tujino & Saito, 1962)、比較的短い糖鎖に分解されていた。なお、近年、分解物であるアルギン酸オリゴ糖の生理活性に関する報告例が多くなされている。例えば、好気性および嫌気性真正細菌に対する静菌作用(北御門ら,1993)、*Bifidobacterium* 属細菌に対する増殖促進作用(Murata,1994)、および高等植物に対する成長促進効果(Natsume et al.,1994; Murata,1994)などはその一例である。静菌作用は5~6糖で、植物の根の発育促進効果は3糖が最も強いことも明らかとなっている(北御門ら,1993; Natsume et al., 1994)。H-4株の菌体外アルギン酸リアーゼ分解物のDP分布を考えると、種々の生理活性が期待される。

さらに、本精製酵素によるアルギン酸分解産物の経時変化を簡単に調べた結果、反応開始直後の分解産物は、比較的長い不飽和ポリウロン酸が主要な生成物であったが、さらに反応を続けることで短い不飽和オリゴウロン酸の比率が増加していく傾向にあった (Fig.1-5-5)。この様に、均一なサイズの不飽和オリゴ糖が常に生成されるのではなく、また、前節で述べたように Alg-Na 基質の粘度が急激に低下することから (Fig.1-4-4)、本精製酵素は endo-型の分解酵素であることが示唆された。また、アルギン酸リアーゼ反応は 4-O-glycosidic bond の elimination 反応の結果 C₄ と C₅ の間、つまり非還元末端側に2重結合が導入される反応と解釈されている (Gacesa, 1992)。H-4株のアルギン酸リアーゼによって生じた不飽和ウロン酸のDP値と反応時間との関係から (Figs.1-5-5)、Fig.1-5-7 に示したように、本酵素は Alg-Na 分子を非還元末端側に近い領域から切断する機構を有するものと推定された。

ところで、第二節で述べたように、H-4株の菌体内画分からは polyM と MG random にのみ分解性を示す酵素が見いだされた (Fig.1-2-5)。前章の Table 1-4-4 に示したように、細菌の菌体内アルギン酸分解活性は polyM に特異性を有するものが多い傾向が認められる。特に、Romeo et al.(1986)によれば、*Alteromonas* sp.の菌体内外のアルギン酸分解酵素の解析結果から、polyM 特異的な菌体外 endo-型酵素と polyM と polyG とともに分解性を示す菌体内 exo-型酵素が見いだされ、菌体外酵素でアルギン酸を小断片化し、菌体内に取り込んだ後、菌

(A) Alginate degradation



(B) Substrate specificity

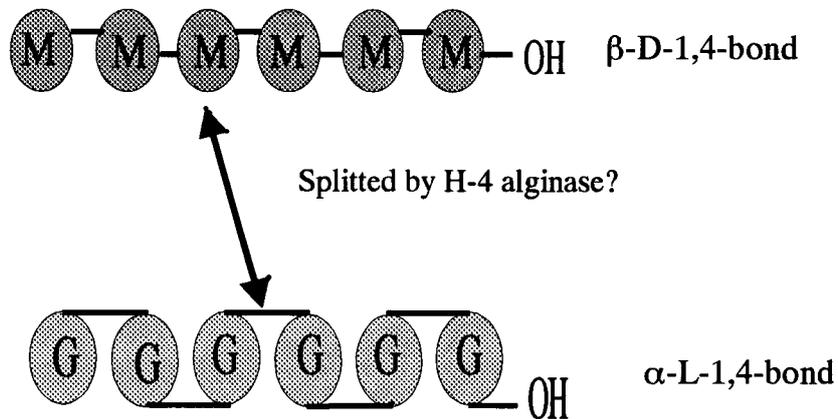


Fig. 1-5-7. A proposal model of alginate degradation mechanism by the extra-cellular alginate lyase from *Alteromonas* sp. H-4.

体内 *exo*-型酵素で代謝可能な単糖まで分解するという機構が提案されている。H-4 株の菌体内酵素の性状は未だ明らかにされていないが、アルギン酸の効率的な代謝に菌体内外のアルギン酸分解酵素群が協同して働いている可能性が示唆されるものである。H-4 株のアルギン酸分解系が明らかにすることにより、Romeo et al.(1986)の提案を支持する結果を得られることも考えられる。

以上、酵素化学的な性状と作用様式の知見から、H-4 株の菌体外アルギン酸リアーゼが海水適応型の酵素で、しかもマコンブ細胞壁の主要構成成分であるアルギン酸の 2 種の *homopolymeric* 領域および *heteropolymeric* な領域のいずれも効率よく分解することが明らかとなった。このことから、本酵素がマコンブプロトプラスト作出に十分効果を発揮するものと期待され、その応用を次章において検討することとした。

第一章要約

コンブ穴あき症藻体から分離された *Alteromonas* sp. H-4 株の分類学的位置および同株の産生するアルギン酸分解酵素の特性を検討し、以下の結果を得た。

1. *Alteromonas* sp. H-4 株は対照菌株として供試した *Alteromonas* 属標準株の中で *A. carrageenovora* NCMB 302^T に良く類似した性状を示しており、わずか 3 性状が異なるのみであった。しかし、両菌株間の DNA-DNA 相同性が低く、whole cell protein 電気泳動パターンも異なることから同種とは同定できなかった。また、他の対照菌株とも一般性状、DNA-DNA 相同性、whole cell protein 電気泳動パターンいずれも異なり、さらに、その他の既報の *Alteromonas* 属菌種の記載に一致しないことから、H-4 株は *Alteromonas* 属の新種であることが示唆された。

2. *Alteromonas* sp. H-4 株の培養上清中の酵素活性は培地中の海水濃度の増加とともに上昇し、海水濃度が 75 % 以上の時に最大となった。一方、培地中のカシトン濃度の減少とともに培地の酵素活性は増加するが、酵素活性の持続性は逆の傾向にあり、カシトン濃度が 0.5 % の場合に活性が最も高くなった。また、H-4 株はアルギン酸無添加培地でもアルギン酸分解酵素を産生し、その活性はアルギン酸添加培地での培養に比べわずか 1 U/ml の差であった。このことから、H-4 株が産生する菌体外酵素は構成型酵素であることが示唆された。さらに、H-4 株菌体外アルギン酸分解酵素は Alg-Na, polyM, polyG, MG random 領域のいずれにも反応性を示した。しかし、菌体内画分からは Alg-Na には全く分解性を示さないが、polyM, MG random に対してのみ分解活性を示す酵素の存在が確認された。

3. 本菌の培養上清から限外濾過濃縮法、ゲル濾過および陰イオン交換クロマトグラフィーにより、アルギン酸分解酵素を精製した。得られた酵素は Native-, SDS-PAGE および IEF で単一に精製されていることおよび Native-PAGE および IEF で確認されたタンパク質は活性染色法でアルギン酸分解活性を示すことが確認された。本酵素の分子量は 32 kDa、pI は 4.7 と推定された。本酵素の N-末端のアミノ酸配列は既知の他のいずれのアルギン酸分解酵素とも類似性が低かった。

4. 精製酵素の反応至適 pH は 7.5、至適温度は 30 °C であった。また、本酵素は 50 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 200 mM KCl, 10 mM CaCl₂ の添加で賦活化される好塩性酵素であった。さらに、本酵素は 40 °C, 10 分の加熱で 50 % 活性が低下したが、MgCl₂ あるいは海水の添加により、熱安定性が上昇した。また、本酵素による Alg-Na の分解において反応液の 235nm の

吸光値および還元糖量が増加し、かつ粘度の急激な減少が観察された。

5. 本酵素は Alg-Na および polyM, polyG, MG random のいずれに対しても分解性を示し、IEF 後の活性染色では、いずれの基質に対する分解活性も IEF のタンパク質バンドの位置に一致した。また、本酵素反応生成物は Alg-Na および polyM, polyG, MG random のいずれを基質とした場合でも、DP 7~8, DP 5~6 および DP 3~4 の3種の糖鎖の不飽和オリゴuron酸が検出された。さらに、酵素反応動力学的な解析により、 K_m 値は $\text{polyG} < \text{MG random} < \text{Alg-Na} < \text{polyM}$ の順であった。

以上の結果を総合すると、*Alteromonas* sp.H-4 株が菌体外に産生するアルギン酸分解酵素は糖鎖の切断とともに非還元末端側の C4-C5 結合に2重結合を導入するタイプの酵素であり、基質の粘度を急激に低下させ、3種の長さの異なるオリゴ糖が生成したことから、EC[4.2.2.3.] に属する endo-型の alginate lyase であることが明らかとなった。また、海水存在下で安定的でかつ効率的にアルギン酸を分解できる性質を有し、polyM, polyG, MG random のいずれの基質に対しても分解性を示す単一酵素タンパクであることが示された。このようなタイプのアルギン酸リアーゼの報告例はなく、新規なアルギン酸リアーゼである可能性が示唆された。なお、H-4 株の菌体内画分には菌体外酵素とは基質特異性を異にするアルギン酸分解酵素が存在しており、本菌株が特異的かつ効率的なアルギン酸分解機構を備えていることが推察された。

第二章 マコンブ(*Laminaria japonica*)細胞のプロトプラスト化への *Alteromonas* sp. H-4 株のアルギン酸分解酵素の利用

Millner et al.(1979)による海藻類からのプロトプラストの作出および Chen & Taylor(1978)による海藻の組織培養の成功が報告されて以来、10 数年の間に、有用海藻類の育種や遺伝子工学的研究が飛躍的に進んできた。これは、高等植物で確立されつつある細胞のプロトプラスト化、細胞融合、組織培養などの技術の導入がなされてきた結果である。

植物細胞のプロトプラスト化は細胞壁の酵素分解による手法が主流である。しかし、緑藻類以外の褐藻類、紅藻類には細胞壁成分としてアルギン酸、寒天、カラギーナンなど特有の多糖が含まれていることが知られている。そのため、高等植物の細胞壁を構成しているセルロースやペクチンを分解する酵素製剤のみの使用では、褐藻類、紅藻類のプロトプラストが得られず、これらの特有の細胞壁多糖成分がプロトプラスト化への大きな障壁となってきた。現在では、海産動物の消化酵素や細菌由来の多糖分解酵素を使用することで一部の褐藻類と紅藻類からもプロトプラストの作出が可能となっている。

前章の結果から、*Alteromonas* sp. H-4 株の菌体外アルギン酸リアーゼは海水存在下で非常に効率よくアルギン酸を分解することが明らかとなったことから、褐藻類のプロトプラスト化に有効な新たな酵素として利用の可能性が期待される。そこで、本章では主に、北海道沿岸に生育し、その資源価値も高い褐藻類マコンブ(*Laminaria japonica*)のプロトプラスト作出に本酵素を利用することを試みた。第一節ではプロトプラストの作出条件を検討し、第二節では得られたプロトプラストの培養条件を調べた。

第一節 マコンブプロトプラストの作出条件の検討

現在までに、褐藻類や紅藻類の中でプロトプラストが作出されている主な属としては褐藻類では *Laminaria* (Saga & Sakai, 1984; Butler et al.,1989), *Macrocystis* (Saga et al.,1986; Kloareg et al.,1989), *Sargassum* (Preston et al.,1985b; Saga et al.,1986; Fisher & Gibor,1987), *Undaria* (藤田・右田, 1985; Tokuda & Kawashima, 1988), *Dictyota* (Kajiwara et al.,1988), *Fucus* (Kloareg & Quatrano,1987), *Sphacelaria* (Ducreux & Kloareg, 1988)で、紅藻類では *Gracilaria* (Cheney,1984; Cheney et al.,1986), *Porphyra* (Saga & Sakai, 1984; 藤田・右田, 1985; Saga et al.,1986; 荒木ら, 1987) などがある。これらの報告の大部分は、プロトプラストの作出の

ために海産動物の粗抽出した消化酵素あるいは細菌培養液を各研究者が自ら調製し、利用している。しかし、多くの場合、プロトプラストの収率や生存率が低く、大きな問題を残している。特に、ウニ(*Strongylocentrotus intermedius*)の消化管から抽出した酵素を使用し、*L.japonica* からプロトプラストを作出した報告例では、収量が 10^3 cells/ml 以下、生存率も 10 % 以下と低く(Saga & Sakai,1984)、実用性に乏しいとされている。アルギン酸分解酵素は、褐藻類のプロトプラスト化には必須であり、プロトプラスト化の効率、プロトプラストの生存性を高める酵素を細菌や海産食藻動物から求める研究が積極的に進められている(Boyen et al., 1990a; Boyen et al., 1990b; Østgaard et al., 1993)。前章で明らかにしたようにコンブ穴あき症の一原因菌と考えられる *Alteromonas* sp. H-4 株の産生する菌体外アルギン酸リアーゼが海洋環境下によく適応している酵素であることから、本酵素がマコンブのプロトプラスト化に十分利用可能と考えられる。

そこで、本節では精製段階の異なる H-4 株のアルギン酸分解酵素を使用してマコンブ芽胞体からプロトプラストの作出を試み、さらにプロトプラストの収量と生存性を考慮してプロトプラスト作出に及ぼす種々の要因について検討を行った。

材料と方法

1. 供試マコンブ芽胞体

1990 年から 1994 年までの間に、北海道南茅部町尾札部種苗供給センターおよび鹿部種苗供給センターから分与を受けたマコンブ(*Laminaria japonica*)芽胞体(採苗後約 2 カ月培養、全長 0.5-2.0 cm)を当研究室に持ち帰り、PESI 培地[natural seawater(NSW) 100 ml, PESI 原液(DW2 100 ml, NaNO_3 350 mg, グリセロリン酸ナトリウム 50 mg, $\text{Fe} \cdot \text{EDTA}$ 2.5 mg, PII 金属混液{DW2 100 ml, $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$ 100 mg, FeCl_3 1 mg, H_3BO_3 20 mg, MnCl_2 4 mg, ZnCl_2 500 μg , CoCl_2 100 μg } 25 ml, Tris 500 mg, KI 100 μg , pH 7.8) 2 ml; Saga & Sanbonsuga(1988)]で 15 °C、14:10 時間の明暗周期、3000 lx の条件下において培養したものを供試した。

2. 種々の高張液による芽胞体の前処理

供試マコンブ芽胞体を 0.7 M マンニトールを含む種々の高張液(pH 7.5)に 15 分間浸漬した。その後、滅菌海水で洗浄し、0.01 % Evans blue(Sigma)および 0.02 % neutral red(関東化学)を含む ESI 培地に移し、30 分間染色し(Saga,1989)、滅菌海水で洗浄後、細胞の生存

性および組織の損傷の程度を光学顕微鏡下で観察した。高張液として、NSW、0.1 M Tris-HCl あるいは 0.1 M HEPES(N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) により pH を 7.5 に調整した ASW(artificial seawater; NaCl 30.0 g, KCl 0.7 g, MgSO₄ 5.3 g, MgCl₂ 10.8 g, CaSO₄ 1.3 g, DW 1000 ml)、ASW 中から 1 価 あるいは 2 価の陽イオン成分を除き 0.1M Tris-HCl あるいは 0.1 M HEPES により pH を 7.5 に調整したもの、0.1 M Tris あるいは 0.1 M HEPES 緩衝液(pH 7.5)、10 mM Tris あるいは 10 mM HEPES 緩衝液、5 mM HEPES-25 mM MgCl₂-50% NSW(pH 7.5)の計 12 種類を試験した。

3. プロトプラスト作出用酵素

供試したアルギン酸分解酵素液は前章で用いた H-4 株の培養上清から分画した次の精製段階のものである。(1):培養上清を排除限界分子量 10 kDa の polysulfone 製の限外濾過膜(Millipore Co.Ltd.)で濃縮した限外濾過濃縮液。(2):(1)の限外濾過濃縮液を 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)に対し 0°C で 8 時間透析した後、さらに凍結乾燥により濃縮し、Sephadex G-100 カラム (2.64 cm x 64 cm) に負荷して分画したゲル濾過画分。(3):(2)のゲル濾過で分画したアルギン酸分解酵素を DEAE-Sephadex A-50 カラム(2.64 cm x 40 cm)に負荷し、0~0.5 M まで直線的に塩化ナトリウムの濃度勾配をかけ分画したイオン交換クロマトグラフィ画分である。これらの酵素液は供試高張液 (主に 0.7M マンニトール-5 mM HEPES-25 mM MgCl₂-50% NSW 溶液)に対し 0°C, 8 時間透析した後、供試した。さらにプロトプラスト作出用酵素液としては Cellulase Onozuka R-10(ヤクルト本社)を単独あるいは上記のアルギン酸分解酵素と併用して供試した。

また、対照として市販のアワビアルギン酸分解酵素(abalone acetone powder; Sigma)も供試した。なお、供試酵素濃度は後述の通りである。

4. マコンブ芽胞体からのプロトプラストの作出

マコンブプロトプラスト作出法は嵯峨・Gibor(1986)の手法に基づいて行った。その概略を Fig.2-1-1 に示した。マコンブ芽胞体を滅菌 ASW でよく洗浄した後、剃刀で細切し小片とした。この小片を高張液に浸漬し、15°C、15 分間高張処理を行った。その処理後、250 μm のナイロンメッシュで濾過し、ナイロンメッシュで藻体を保持しながら洗浄を数回繰り返した。細切した芽胞体の湿重量 0.5 g に対して後述する酵素濃度および酵素の組み合わせからなるプロトプラスト作出用酵素液を 5 ml の割合で加え、50 ml 容三角フラスコあ

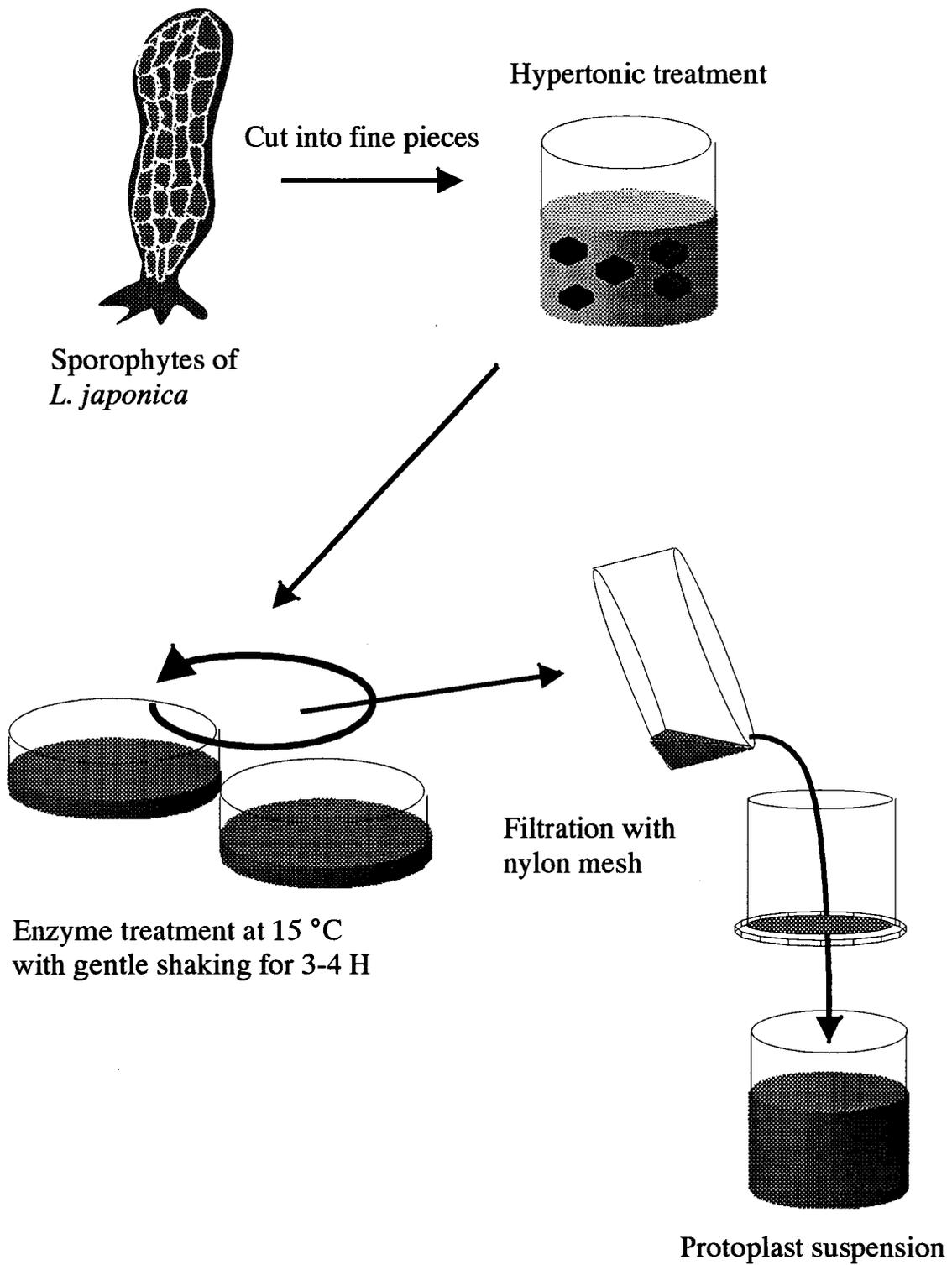


Fig. 2-1-1. Enzyme treatment for isolation of *Laminaria japonica* protoplasts.

るいは小型のプラスチックシャーレ(Terumo 製)に入れ、15 °C において振盪(40- 50 stroke/min)しながら酵素処理を行った。酵素処理後、フラスコあるいはシャーレ内容物を 80 μ m ナイロンメッシュで濾過して残渣を除きプロトプラスト懸濁液を得た。プロトプラストの収量は血球計数盤により計数し、藻体 1 g 当りの細胞数として算出した。プロトプラストの生存率はプロトプラスト懸濁液に 0.02 % neutral red 液(0.7 M マンニトール, 0.02 % neutral red を NSW に溶解)を等量加え、15 °C, 30 分間プロトプラストを染色し、50 細胞中の neutral red を取り込んだ染色細胞数を計数して、生存率を算出した(Millner et al.,1979; Saga,1989; Saga et al.,1990)。

また、得られたプロトプラストの細胞壁が除去されていることの確認は、0.7 M マンニトールを含む NSW に 0.1 %の割合で Calcofluor White M2R(Sigma)を溶解した染色液でプロトプラストを染色し、細胞壁中のセルロースに特異的に吸着する Calcofluor White の青色の蛍光の有無を UV フィルター(励起方法: Ultra-violet、吸収フィルター: L435)を装着した落射蛍光顕微鏡(Olympus)により観察して判定した(Nakazawa et al.,1969; Galbraith, 1981)。

5. プロトプラスト作出条件の検討

プロトプラスト作出条件として収量と生存率に及ぼす酵素処理時間、アルギン酸分解酵素の精製度合(本節 3 項を参照)の影響、各種濃度のセルラーゼとアルギン酸分解酵素との混合比、および酵素処理高張液中の海水濃度(0-100 %), $MgCl_2$ 添加効果(0 mM および 25 mM), 緩衝液系(Tris と HEPES 緩衝液系: 0-100 mM), マンニトール濃度(0.3-0.7 M)の影響について検討した。酵素処理高張液組成の影響を調べるに際して、各供試高張液に対してアルギン酸分解酵素液を透析し、溶媒を置換した後、酵素活性を約 30 U/ml に調整して実験に用いた。その他の条件下では 0.7M マンニトール-5 mM HEPES-25 mM $MgCl_2$ -50% NSW 緩衝液を基本高張液とした。いずれの条件下も、酵素処理後、ナイロンメッシュで濾過し、その濾液中のプロトプラストの収量、生存率を算出した。

なお、プロトプラスト作出用酵素液として 0 %, 1.5 % および 3.0 % の各濃度のセルラーゼと 0 U/ml, 15 U/ml および 30U/ml の各濃度のアルギン酸分解酵素を組合せたものを使用した。また、酵素処理時間の影響については、1, 3, 5, 7, 9 および 15 時間目に酵素処理液を 0.5 ml ずつ抜き取りナイロンメッシュで濾過し、その濾液についてプロトプラストの収量と生存率を算出した。

6. アルギン酸分解酵素活性測定法

アルギン酸分解酵素活性は第二章と同様に紫外部吸光法によって測定した。

7. セルラーゼ活性測定法

セルラーゼ活性の測定は基質として CM-セルロースナトリウム (CM-cellulose-Na; 和光純薬)を使用し、還元糖定量法(Somogyi,1952)によって測定した。すなわち、0.3 % CM-cellulose-Na を含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5) 1.8 ml に酵素液 0.2 ml を加え、30 °C, 30 分間反応を行い、反応後、前章第三節と同様の方法で発色させ、660 nm の吸光値を測定した。なお、酵素活性におよぼす ASW 濃度の影響を調べるに当り、0.3 % CM-cellulose-Na-50 % ASW-0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)と 0.3 % CM-cellulose-Na-100 % NSW-0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)を基質液として使用した。

結 果

1. マコンブ芽胞体に及ぼす高張液の影響

芽胞体を 12 種類の高張液で浸漬処理した結果を Table 2-1-1 に示した。試験した計 12 種類の高張液の中で芽胞体細胞の生存性が特に悪かったものは 4 種類(0.1 M Tris と 0.1 M HEPES 緩衝液、0.1M Tris あるいは 0.1 M HEPES で pH を調整した 2 価陽イオンを欠く ASW)で、生存性に全く影響を与えなかったものは 4 種類 (NSW、10 mM Tris と 10 mM HEPES 緩衝液、5 mM HEPES-50 % NSW)、生存性が若干低くなったものが 4 種類(0.1 M Tris あるいは 0.1 M HEPES で pH を調整した ASW、0.1 M Tris あるいは 0.1 M HEPES で pH を調整した 1 価陽イオン成分を欠く ASW)であった。同濃度であっても HEPES 緩衝液系よりも Tris 緩衝液系による処理の方が組織の崩壊が激しく、生細胞も少なかった。以上の高張液処理芽胞体を Evans blue 染色した代表例を Fig. 2-1-2 に示した。NSW、5 mM HEPES-50 % NSW による処理では、Evans blue で染色される死細胞はほとんど見られなかった(Fig.2-1-2(A, D))。ところが、0.1 M Tris-HCl 緩衝液で芽胞体を処理した場合、全ての細胞が Evans blue で染色され、生存細胞は全く認められず、さらに組織の崩壊も観察された(Fig.2-1-2(B))。0.1 M Tris で pH を調整した ASW による処理では死細胞が全体の約半分ほど観察されたが、0.1 M Tris-HCl 緩衝液処理に比べ細胞の損傷は軽減されていた(Fig.2-1-2(C))。さらに、0.1M Tris で pH を調整した 2 価陽イオン成分を欠く ASW で処理した

Table 2-1-1. Cytotoxic effects of hypertonic solutions on *Laminaria japonica* cells

Hypertonic solutions ¹⁾	Cytotoxic effects ²⁾
NSW	—
0.1 M Tris-HCl	+
0.1 M HEPES	+
10 mM Tris-HCl	—
10 mM HEPES	—
0.1 M Tris-ASW	Week
0.1 M HEPES-ASW	Week
0.1 M Tris-ASW without divalent cations	+
0.1 M HEPES-ASW without divalent cations	+
0.1 M Tris-ASW without monovalent cations	Week
0.1 M HEPES-ASW without monovalent cations	Week
5 mM HEPES-25 mM MgCl ₂ -50 % NSW	—

Abbreviations; NSW: Natural Seawater, ASW: Artificial Seawater.

¹⁾ All hypertonic solution contained 0.7 M mannitol and adjusted pH 7.5.

²⁾ Cytotoxic effect indicated as follows;

+ : Significant cytotoxic effects, Week: Less than half of cell were damaged., — : No effects.

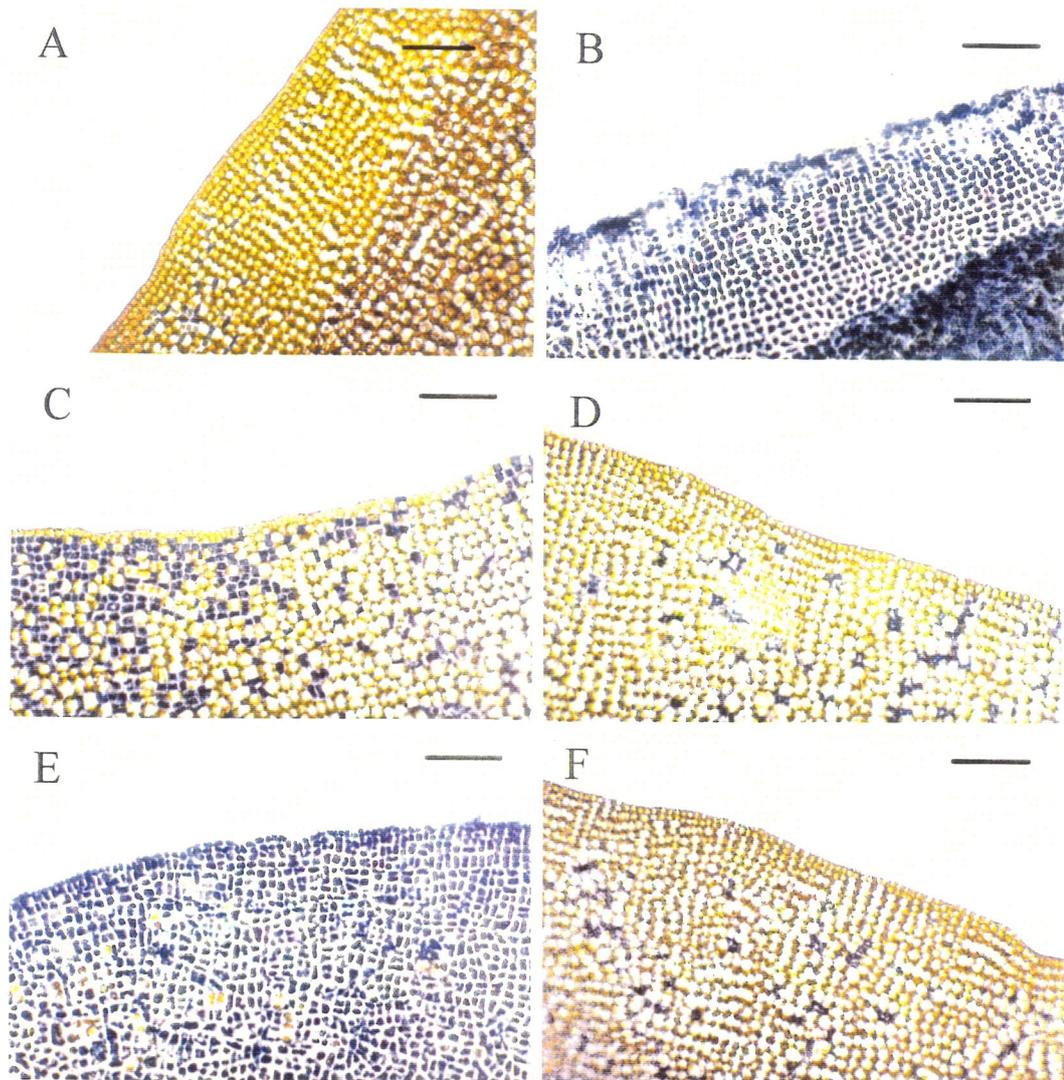


Fig. 2-1-2. Cytotoxic effects of hypertonic solutions on *Laminaria japonica* cells.

Hypertonic solutions used as follows;

(A) Natural seawater,

(B) 0.1 M Tris-HCl buffer,

(C) 0.1 M Tris-artificial seawater,

(D) 5 mM HEPES-25 mM $MgCl_2$ -50 % natural seawater,

(E) (C) solution without divalent cations,

(F) (C) solution without monovalent cations.

Laminaria tissues were stained with Evans blue.

Each hypertonic solutions contained 0.7 M mannitol and adjusted pH 7.5.

Scale of bar: 100 μ m.

場合は、0.1 M Tris-HCl 緩衝液による処理と同様の結果が得られ、ほぼ全ての細胞が死細胞であったが(Fig.2-1-2(E))、0.1 M Tris で pH を調整した 1 価陽イオン成分を欠く ASW による処理では、死細胞は少なかった(Fig.2-1-2(F))。なお、neutral red 染色では生細胞が色素を取り込み赤く染まるが、Evans blue 染色での評価と全く同一の観察結果が得られた。以上の芽胞体の高張処理の結果から、マコンブ藻体が細胞の生存性維持に 2 価のイオンを必要とすることが明らかとなった。そこで、以後の実験にはコンブ細胞に対し影響の少なかった 0.7M マンニトール-5mM HEPES-50 % NSW 溶液に 25 mM MgCl₂ を添加した高張液をプロトプラスト作出に使用することとした。

2. 芽胞体からのプロトプラストの作出

Alteromonas sp. H-4 株の部分精製アルギン酸分解酵素(イオン交換クロマトグラフィー画分)を 0.7 M マンニトール-5 mM HEPES-25 mM MgCl₂-50 % NSW 高張液に対し透析し、アルギン酸分解酵素活性を 30 U/ml に合わせ、さらに 1.5 % の割合で Cellulase Onozuka R-10 を加えたものを酵素液とし、マコンブ芽胞体からプロトプラストの作出を試みた。その結果を Fig.2-1-3 に示した。酵素処理 1 時間後からプロトプラストの遊離が認められ、酵素処理 3 時間後には切片全域から、多数のプロトプラストが遊離した(Fig.2-1-3(B))。5 時間経過後の酵素処理液から得られたプロトプラストは球形、黄褐色で、直径は 10-25 μm であった(Fig.2-1-3(C))。得られたプロトプラストの多くは neutral red 色素を取り込み原形質内が赤く染色され、生存性を示すことが観察された(Fig.2-1-3(D))。さらに、Calcofluor White M2R でプロトプラストを染色した結果を Fig.2-1-4 に示した。作出されたプロトプラスト細胞は蛍光を発せず、細胞壁の除去が確認された。

3. プロトプラストの収量と生存率に及ぼすアルギン酸分解酵素の精製度の影響

Alteromonas sp. H-4 株の培養上清から得られた各精製段階のアルギン酸分解酵素液(限外濾過濃縮画分、ゲル濾過画分、イオン交換クロマトグラフィー画分)を 0.7 M マンニトール-5 mM HEPES-25 mM MgCl₂-50 % NSW に対し透析し、アルギン酸分解酵素活性を 30 U/ml に揃え、1.5 % Cellulase Onozuka R-10 を添加したものを酵素液とし、マコンブ芽胞体を 3 時間処理した時のプロトプラストの収量と生存率を Table 2-1-2 に示した。精製段階の異なるアルギン酸分解酵素で芽胞体を処理して得られるプロトプラストの収量には大差はみられなかった。しかし、イオン交換クロマトグラフィー画分の酵素で処理した場合がプロト

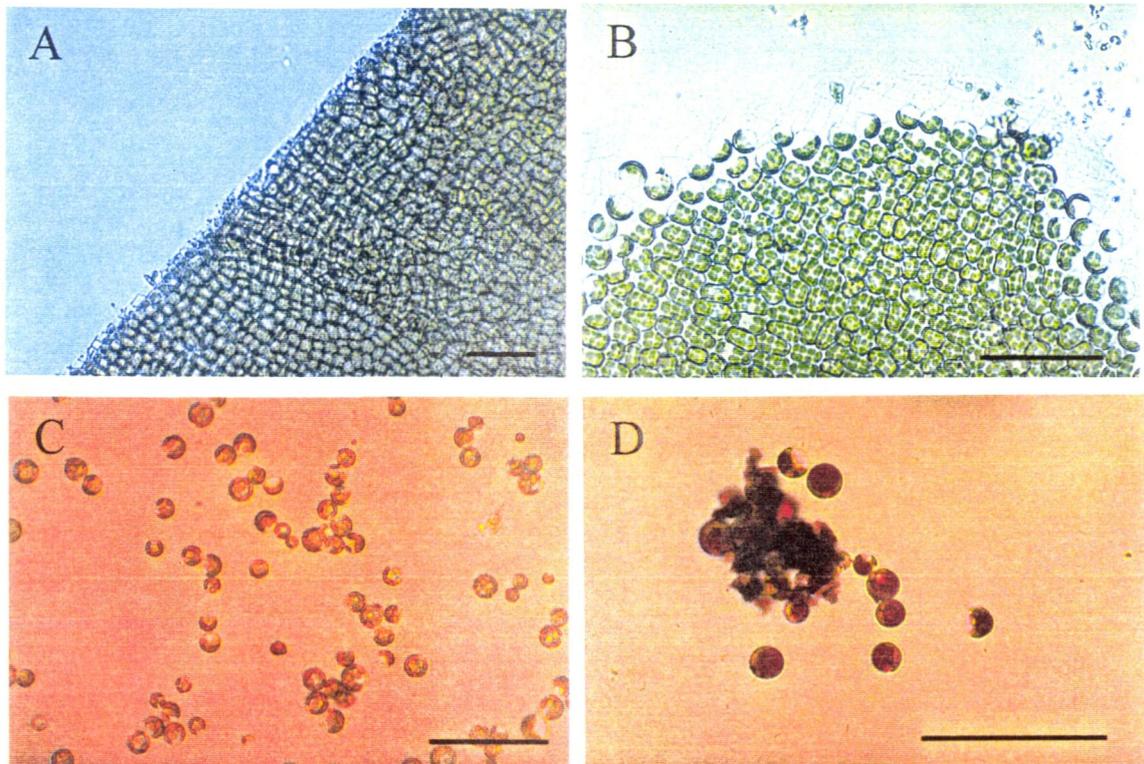
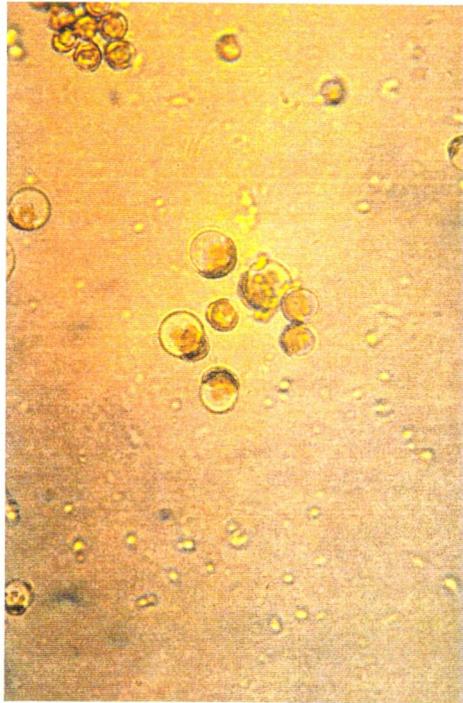


Fig. 2-1-3. Isolation of protoplasts from sporophytes of *Laminaria japonica*.

- (A) Sporophyte tissue (before enzyme treatment).
- (B) Sporophyte treated with enzyme mixture for 3 hours.
- (C) Isolated protoplasts for 5 hours enzyme treatment.
- (D) Viable protoplasts incorporated neutral red.

Scale of bar: 100 μm

(A) Light microscopic view



(B) Fluorescence microscopic view



Fig. 2-1-4. Observation of *Laminaria japonica* protoplasts in light microscopy (A) and stained with Calcofluor White M2R in fluorescent microscopy (B).

Table 2-1-2. Effect of purification level of the alginate lyase from culture supernatant of *Alteromonas* sp. H-4 on protoplast isolation from *Laminaria japonica* sporophytes

Purification step	Yields (cells/g FW) ^{a)}	Viability (%) ^{b)}	Estimated number of viable protoplasts (cells/g FW) ^{c)}
(1) Ultrafiltration	2.5 x 10 ⁶	72.0	1.8 x 10 ⁶
(2) Gel filtration by Sephadex G-100	2.5 x 10 ⁶	82.9	2.1 x 10 ⁶
(3) Ion-exchange by DEAE-Sephadex A-50	3.9 x 10 ⁶	81.4	3.2 x 10 ⁶

^{a)} Number of protoplasts derived from 1 g sporophyte (Fresh weight).

^{b)} Ratio of viable protoplasts (percentages).

^{c)} Estimated number of viable protoplasts was calculated from protoplast yield and viability.

Table 2-1-3. Effect of concentrations of cellulase and alginate lyase on protoplast isolation from *Laminaria japonica* sporophytes

Alginate lyase activity (U/ml)	Cellulase conc. (%)	Yields (cells/g FW) ^{a)}	Viability (%) ^{b)}	Estimated number of viable protoplasts (cells/g FW) ^{c)}
0	3.0	ND ^{d)}	—	ND
30	0.0	ND	—	ND
30	1.5	1.2 x 10 ⁶	81.8	9.8 x 10 ⁵
30	3.0	6.5 x 10 ⁵	87.5	5.6 x 10 ⁵
15	1.5	5.5 x 10 ⁵	90.0	5.0 x 10 ⁵

^{a)} Number of protoplasts derived from 1 g sporophyte (Fresh weight).

^{b)} Ratio of viable protoplasts (percentages).

^{c)} Estimated number of viable protoplasts was calculated from protoplast yield and viability.

^{d)} Any protoplasts were not detected.

プラストの収量が最も高く、高度に精製したアルギン酸分解酵素で処理して得られる生存プロトプラスト数がより多い傾向にあった。

4. プロトプラストの収量と生存率に及ぼすアルギン酸分解酵素とセルラーゼの影響

マコンブ芽胞体から生存性の高いプロトプラストを単離するためにはイオン交換クロマトグラフィーの段階まで精製したアルギン酸分解酵素が適当であった。そこで、本精製段階のアルギン酸分解酵素とセルラーゼの酵素濃度を变化させた酵素液を用い、マコンブ芽胞体を3時間酵素処理した時のプロトプラストの収量と生存率の結果を Table 2-1-3 に示した。3.0 % セルラーゼのみあるいは30 U/ml アルギン酸分解酵素のみではプロトプラストの作出は観察されなかった。また、30 U/ml のアルギン酸分解酵素と1.5 %セルラーゼ濃度の組み合わせの場合のプロトプラストの収量は 1.2×10^6 cells/g と最も高かった。30 U/ml アルギン酸分解酵素と3.0 %セルラーゼ濃度では 6.5×10^5 cells/g であり、15 U/ml アルギン酸分解酵素と1.5 %セルラーゼ濃度では 5.5×10^5 cells/g であった。プロトプラストが得られた条件下での生存率に大差はなかったが、15 U/ml アルギン酸分解酵素-1.5 % セルラーゼ系が90 %と最高値を示した。しかし、収量は最も低かった。そこで、以後の実験ではプロトプラスト生細胞数の最も多かった30 U/ml アルギン酸分解酵素-1.5 % セルラーゼ系を用いることとした。

5. プロトプラストの収量および生存率に及ぼす酵素処理時間の影響

プロトプラスト作出用酵素として、30 U/ml のイオン交換クロマトグラフィー画分に1.5 % の割合で Cellulase Onozuka R-10 を添加した系を用い反応時間の影響を調べた。この時のプロトプラストの収量と生存率の経時変化を調べた結果を Fig. 2-1-5 に示した。プロトプラストの収量は酵素処理時間が長くなるにつれ増加し、3時間後には 4.5×10^6 cells/g、5時間後には 1.3×10^7 cells/g となり、その後はわずかずつ増加した。一方、生存率は3時間後には75 % 以上あったが、酵素処理時間が長くなるにつれ減少し、7時間後には33 % に、9時間後には18 % に低下した。

6. プロトプラスト収量及び生存率に影響を及ぼす高張液組成の影響

Table 2-1-4 に高張液の海水濃度、緩衝液系およびマンニトール濃度を变化させた時のプロトプラストの収量および生存率の変化を示した。なお、アルギン酸分解酵素活性および

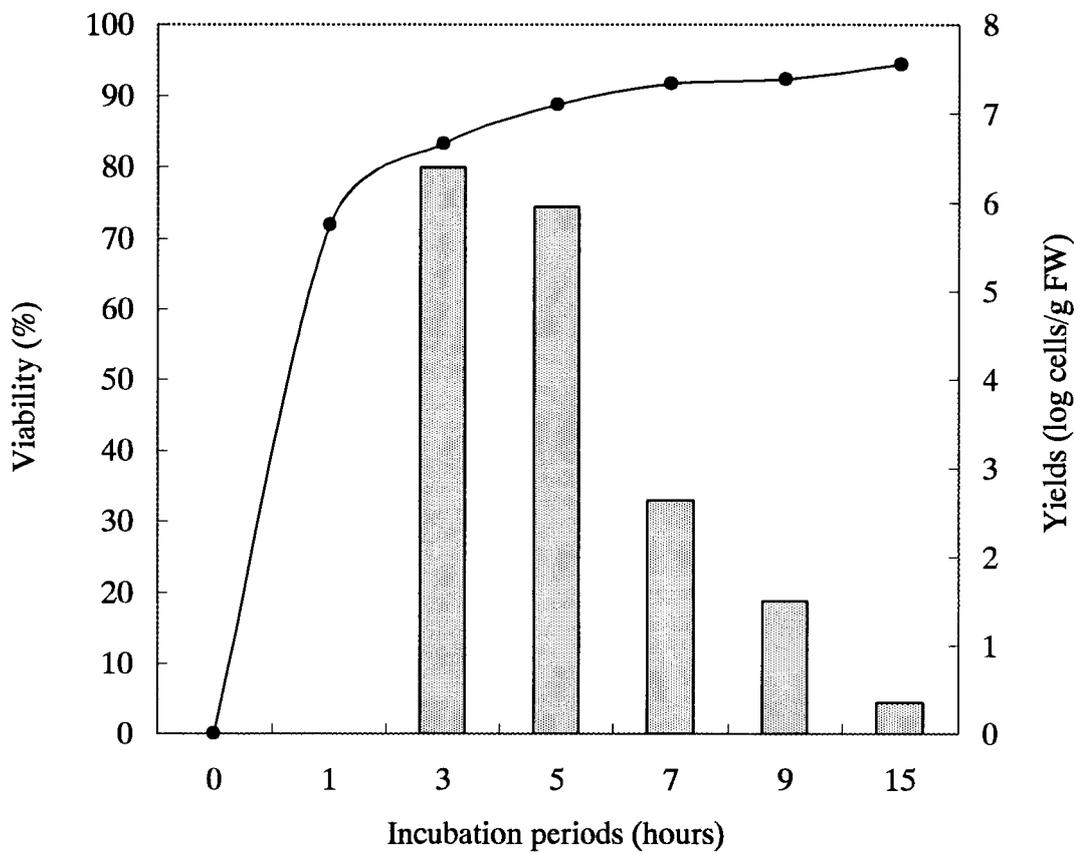


Fig. 2-1-5. Time course of yields and viability of isolated protoplasts from *Laminaria japonica* sporophytes with the enzyme treatment.

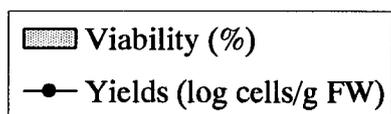


Table 2-1-4. Factors in the hypertonic solutions affecting the yield and viability of protoplast isolation from *Laminaria japonica*

Hypertonic solution		Seawater concentration (%)	Mannitol concentration (%)	MgCl ₂ concentration (%)	Protoplast yield ^{a)} (x 10 ⁶ cells/g FW)	Viability (%)	Estimated number of viable protoplasts ^{b)} (cells/g FW)
Buffer system	concentration & MgCl ₂ addition						
A) Seawater concentration & MgCl₂ addition							
HEPES: 5 mM	0	0.7	0	ND	—	—	—
HEPES: 5 mM	0	0.7	25	0.39 ± 0.52	44.6	0.17 x 10 ⁶	
HEPES: 5 mM	25	0.7	25	1.2 ± 0.33	95.8	1.1 x 10 ⁶	
HEPES: 5 mM	50	0.7	0	0.98 ± 0.08	94.6	0.92 x 10 ⁶	
HEPES: 5 mM	50	0.7	25	1.6 ± 0.45	96.1	1.5 x 10 ⁶	
HEPES: 5 mM	75	0.7	25	0.63 ± 0.34	87.9	0.55 x 10 ⁶	
HEPES: 5 mM	100	0.7	0	ND	—	—	
HEPES: 5 mM	100	0.7	25	0.16 ± 0.18	86.7	0.14 x 10 ⁶	
B) Buffer system							
HEPES: 5 mM	50	0.7	25	3.7 ± 1.4	96.7	3.5 x 10 ⁶	
25 mM	50	0.7	25	2.9 ± 0.23	99.2	2.8 x 10 ⁶	
50 mM	50	0.7	25	1.4 ± 0.66	91.1	1.3 x 10 ⁶	
100 mM	50	0.7	25	0.63 ± 0.38	74.5	0.47 x 10 ⁶	
Tris: 5 mM	50	0.7	25	2.0 ± 0.34	95.9	1.9 x 10 ⁶	
25 mM	50	0.7	25	3.2 ± 0.96	99.2	3.2 x 10 ⁶	
50 mM	50	0.7	25	2.2 ± 1.5	90.8	2.0 x 10 ⁶	
100 mM	50	0.7	25	0.59 ± 0.15	90.8	0.53 x 10 ⁶	
No addition	50	0.7	25	1.4 ± 0.31	92.0	1.3 x 10 ⁶	
C) Mannitol level							
HEPES: 5 mM	50	0.3	25	1.3 ± 0.46	76.7	1.0 x 10 ⁶	
HEPES: 5 mM	50	0.5	25	8.0 ± 1.9	97.7	7.8 x 10 ⁶	
HEPES: 5 mM	50	0.7	25	4.8 ± 1.1	97.1	4.7 x 10 ⁶	

^{a)} Protoplast yield ± S.D.

^{b)} Estimated number of viable protoplasts was calculated from protoplast yield and viability.

セルラーゼ濃度はいずれの条件下においてもそれぞれ 30 U/ml および 1.5 %に調整し、酵素処理時間は3時間とした。

高張液に $MgCl_2$ を加えなかった場合、海水を高張液に添加しなかった場合、および 100 % 海水を用いた場合ではプロトプラストを得ることが出来ず、高張液の海水濃度が 50 % の場合のみプロトプラストの作出が可能であり、収量は 9.8×10^5 cells/g であった。さらに、海水濃度が異なる各高張液に 25 mM $MgCl_2$ を加えた場合、プロトプラストの収量が増加し、海水を高張液に添加しなかった場合、および 100 % 海水を用いた場合でもプロトプラストの作出が可能となった。海水が 50 % 含まれている高張液に 25 mM $MgCl_2$ を添加した場合、得られるプロトプラストの収量 (1.6×10^6 cells/g FW)、生存率 (96.1 %) とともに最も高くなり、次いで海水濃度が 25 % の場合であった。海水を高張液に添加しなかった場合、および、100 % 海水を用いた場合にいずれもプロトプラストの生存率あるいは収量が著しく低下することが認められた (Table 2-1-4(A))。なお、Table 2-1-5 に種々の濃度の海存在下での H-4 株由来アルギン酸リアーゼ活性および Cellulase Onozuka R-10 のセルラーゼ活性の変化を示した。いずれも、50 % 海水存在下で最大活性を示した。

次に、HEPES 緩衝液系と Tris 緩衝液系を用い、それぞれ濃度を変化させた高張液でプロトプラストの単離を行ったところ、HEPES 緩衝液系では 5 mM (3.7×10^6 cells/g, 96.7 %)、Tris 緩衝液系では 25 mM (3.2×10^6 cells/g, 99.2 %) の場合に得られたプロトプラストの収量および生存率が最も高くなった。また、緩衝液成分の濃度の増加とともにプロトプラストの収量が減少する傾向が認められた (Table 2-1-4(B))。さらに、浸透圧調整のために添加しているマンニトールの濃度を変化させた場合、0.5 M の添加時にプロトプラストの収量および生存率が最も高くなった (8.0×10^6 cells/g よび 97.7 %) (Table 2-1-4(C))。

7. *Alteromonas* sp. H-4 株アルギン酸分解酵素およびアワビアルギン酸分解酵素によるマコンブプロトプラスト作出の比較

0.5 M マンニトール-5 mM HEPES-25 mM $MgCl_2$ -50 % NSW を高張液とし、アルギン酸分解酵素源を市販のアワビアルギン酸リアーゼとしてプロトプラストの作出を試みた結果を H-4 株由来酵素の場合と比較して、Table 2-1-6 に示した。どちらのアルギン酸分解酵素活性も 30 U/ml に調整した。H-4 株アルギン酸リアーゼの使用ではプロトプラストの単離が効率良く認められたのに対し、アワビアルギン酸リアーゼではプロトプラストの単離が全く認められなかった。

Table 2-1-5. Effect of seawater concentration on the enzyme activities

Seawater concentration (%)	Relative activity (%)	
	Alginate lyase activity	Cellulase activity
	(The H-4 extra-cellular enzyme)	(Cellulase Onozuka R-10)
0	100	100
50	257	111
100	163	57

Table 2-1-6. Effect of alginase sources on isolation of protoplasts from *Laminaria japonica*

Alginase source ^{a)}	Protoplast yield ^{c)} (x 10 ⁶ cells/g FW)	Protoplast viability (%)	Estimated number of viable protoplasts ^{b)} (cells/g FW)
<i>Alteromonas</i> sp. H-4 alginate lyase	10.4 ± 2.2	94.2	9.8x10 ⁶
Abalone alginate lyase	ND ^{b)}	—	—

a) Each activity of the *Alteromonas* sp. H-4 and abalone alginate lyase was adjusted to 30 U/ml.

b) Any protoplasts were not detected.

c) Protoplast isolation was performed under the following condition;

0.5 M mannitol-5 mM HEPES-25 mM MgCl₂-50 % sea water (pH7.5).

Protoplast yield ± S.D.

考 察

Alteromonas sp. H-4 株の培養上清から部分精製したアルギン酸分解酵素を利用し、マコンブ芽胞体からプロトプラストの作出を試みた。その結果、収量が 10^6 ~ 10^7 cells/g と高く、しかも 75 % 以上という高い生存率でプロトプラストを作出することができた(Table 2-1-2, Fig.2-1-3)。これまでに、細菌由来のアルギン酸分解酵素を用いて褐藻類、紅藻類からプロトプラストを作出したという報告は少なく、紅藻類の *Porphyra* 属で 2 例(藤田・右田、1985 ; 荒木ら、1987) と、褐藻類 *Laminaria* 属では、海産動物由来と細菌由来のアルギン酸分解酵素を併用して使用した 3 例のみ(Butler et al.,1989; Boyen et al., 1990b; Østgaard et al., 1993)が報告されている。本研究が細菌由来のアルギン酸分解酵素を唯一のアルギン酸分解酵素源として用い、効果的に褐藻類 *Laminaria* 属のプロトプラストを作出した初めての報告例である。海産動物の資源の有限性や季節変動を考えると、常に必要に応じて調製できる細菌のアルギン酸分解酵素がマコンブ芽胞体のプロトプラスト化に利用可能であったことは、学術的にも産業的にも非常に意義のあるものと考えらる。

さらに、本研究では生存プロトプラストを出来るだけ多く得るために種々の条件の検討を行った。まず、プロトプラスト作出のための酵素処理に際して、マコンブ組織に対し可能な限り影響が少ない高張液について検討した。なお、芽胞体細胞の生存性の判定には Evans blue および neutral red 色素の排出・取り込み能を評価する手法を採用した。Evans blue および neutral red は高等植物のプロトプラストの生存性の確認に使用されており、Evans blue は生細胞の場合には染色されないが、逆に neutral red は生細胞に取り込まれ細胞が染色される色素である(Saga,1989)。この生体染色法で褐藻類のマコンブ細胞の生存性を調べることも可能であった。その結果、0.7 M マンニトールを含む 0.1 M Tris あるいは 0.1 M HEPES 緩衝液処理ではコンブ細胞の生存性は著しく低下したが(Table 2-1-1, Fig.2-1-2(B))、0.1 M Tris で pH を 7.5 に調整した ASW やこれから海水成分中の 1 価陽イオンを除いたものによる高張処理ではコンブの細胞の生存性の低下は認められなかった (Table2-1-1, Fig.2-1-2(C,F))。このことから海水成分のなかで Mg^{2+} , Ca^{2+} 等の 2 価の陽イオンがコンブ細胞の生存性維持に必要であることが明らかとなった。プロトプラストの収量と生存率も高張液の海水濃度と緩衝液系の濃度に著しく影響を受け、海水濃度は 50 %、緩衝液系は 5 mM HEPES あるいは 25 mM Tris が生存プロトプラストを単離するには最適であった(Table 2-1-4(A,B))。H-4 株のアルギン酸リアーゼ活性および Cellulase Onozuka R-10 のセルラーゼ活性

は、海水濃度が 50 %の場合に最大活性を示したことから(Table 2-1-5)、効率良く細胞壁の分解が進行し、この高張液組成が最も高いプロトプラスト収量を与えたと考えられる。そのうえ、高張液中の緩衝液成分の濃度と海水濃度がマコンブ細胞にも酵素作用にも適当であったため、得られたプロトプラストの生存率が非常に高かったと考えられ、プロトプラストが高収量、高生存率で得られたものと考えられる。

Cocking(1972)は高等植物のプロトプラスト化に使用している生物試料から粗抽出した酵素液は植物細胞壁多糖分解酵素の他にプロテアーゼ、リパーゼあるいは低分子物質が含まれており、これらの物質の影響でプロトプラストの収量及び生存率が低下すると報告している。さらに、Butler et al.(1989)は、海産動物から粗抽出されたアルギン酸分解酵素液が *Laminaria saccharina* と *L. digitata* の細胞に対し茶色の葉緑体色素を緑色化させ、さらに原形質膜の破壊を引き起こすような毒性を示したが、精製することでこれは解消し、プロトプラスト収量も高まったことを報告している。H-4 株のアルギン酸分解酵素でも、より高度に精製したアルギン酸分解酵素で芽胞体を処理した場合に、得られるプロトプラストの生細胞数が高くなる傾向が認められたことから(Table 2-1-2)、培養上清中に存在すると考えられるコンブ細胞の生存性を低下させる要因(プロテアーゼ、リパーゼ等)を可能な限り取り除く必要があると考えられた。ただ、本実験の結果で、部分精製段階であるイオン交換クロマトグラフィー画分の使用でも十分な収量、生存率が得られたことから、精製に要する時間と経済性を考慮すれば、本酵素を純品にまで精製する必要はないものと考えられる。

マコンブの芽胞体からプロトプラストを作出するためには、H-4 株のアルギン酸分解酵素の他にセルラーゼの併用が必須であった(Table 2-1-3)。この点に関しても Butler et al.(1989)が全く同様のことを報告している。現在、Kloareg & Quatrano(1988)によって褐藻類の細胞壁構造のモデルが提案されている。それによると、褐藻類の細胞壁は主要骨格として、セルロースとアルギン酸で構築されていて、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とされている。本実験においても、セルロースとアルギン酸からなる褐藻類の細胞壁はセルラーゼとアルギン酸分解酵素それぞれ単独では分解できず(Table 2-1-3)、両者の相乗作用によって初めて分解され、プロトプラストの作出が可能となった。これは、Kloareg & Quatrano(1988)のモデルを支持する結果であり、マコンブ細胞壁もこのモデルに近いものと思われた。加えて、褐藻類の細胞壁を効率的に分解するには細胞壁を構築しているアルギン酸分子の homo-および hetero-polymeric 領域の存在様式とそれぞれの含有比が褐藻類の種

類や季節により異なることから、これらの領域の分解性が大きく影響する可能性が高い。Butler et al.(1989)は、海産動物の polyM 特異的アルギン酸分解酵素と細菌由来の polyG 特異的アルギン酸分解酵素を組み合わせる酵素処理した場合、それぞれのアルギン酸分解酵素を単独で使用した場合より単離されたプロトプラストの収量が高かったことを報告している。本研究結果においても、polyM 特異的酵素であるアワビアルギン酸分解酵素を 30 U/ml の活性(0.25 %程度に相当する)に調整して酵素分解を行ったところ、マコンブ芽胞体からプロトプラストを単離することができなかった(Table 2-1-6)。polyG 特異的アルギン酸分解酵素源の積極的な探索はこのような理由に端を発するものである(Boyen et al., 1990b; Østgaard et al., 1993)。H-4 株のアルギン酸分解酵素はアルギン酸分子の polyM および polyG 両領域に分解性を示すことから(第一章五節、Figs.1-5-1, 2 & 5)、アルギン酸分解酵素源を本酵素のみとしてもマコンブ細胞壁中のアルギン酸を十分に分解し、高収量のプロトプラストを得ることができたと考える。

以上の結果から、H-4 株の菌体外アルギン酸リアーゼがマコンブ細胞アルギン酸を効率良く分解し、かつ、マコンブ細胞の生存性には何等の悪影響も及ぼすことなくマコンブ細胞のプロトプラスト化に非常に適した酵素であることが明らかとなった。H-4 株のアルギン酸分解酵素は細胞壁構成成分にアルギン酸を持つ海藻類のプロトプラスト化に広く適用可能であると考えられる。

第二節 マコンブプロトプラストの培養条件と藻体再生の検討

前節で *Alteromonas* sp. H-4 株の菌体外アルギン酸リアーゼがマコンブ芽胞体からプロトプラストを作出するのに非常に有効で、高収量で生存性の高いプロトプラストが得られることを示した。しかしながら、褐藻類のプロトプラストの再生は困難であり、これまでに褐藻類のプロトプラストで再生が確認された報告例はほとんどないことから、培養法の検討が最も大きな課題となっている。

そこで、本節ではマコンブ芽胞体から得られたプロトプラストの培養条件と得られたプロトプラストから藻体への再生の検討を行った。

材料と方法

1. 供試藻体

前節と同様の藻体を供試した。

2. プロトプラスト作出用酵素液の調製

前節と同様、*Alteromonas* sp. H-4 株の培養上清から限外濾過、ゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィーにより部分精製し、0.5 M マンニトール-5 mM HEPES-25 mM $MgCl_2$ -50 % NSW の高張液に対し透析したアルギン酸リアーゼを供試した。プロトプラスト作出に用いたアルギン酸リアーゼの活性は 30~40 U/ml に調製し、これにセルラーゼ (Cellulase Onozuka R-10) を 1.5 % となるように添加したものをプロトプラスト作出用酵素液とした。

3. プロトプラスト作出法

前節と同様の方法でマコンブ芽胞体からプロトプラストの作出を行った。細切したマコンブ組織片を高張液(0.5 M マンニトール-5 mM -HEPES-25 mM $MgCl_2$ -50 % NSW, pH7.5) で 15°C, 15 分間高張処理した後、30~40 U/ml の H-4 株アルギン酸リアーゼと 1.5 % セルラーゼを含む酵素液で 15°C, 3~4 時間酵素処理した。その後、酵素反応液を 80 μ m のナイロンメッシュで濾過して組織片を除去し、プロトプラスト懸濁液を得た。

4. プロトプラストの洗浄および精製

得られたプロトプラストの洗浄および精製操作の概略を Fig. 2-2-1 に示した。マコンブ芽胞体から得た約 7 ml のプロトプラスト懸濁液をスピッツ管内の 20 % sucrose を溶解させた NSW 3 ml の上に重層し、低速で遠心分離 (100 x g, 10 °C, 10 分間) を行い、プロトプラストを sucrose 溶液とプロトプラスト懸濁液との境界面に集めた。次いで、上清を静かにパストツールピペットで吸い出した後、0.5 M マンニトールを含む ESI 培地(前節参照)を約 7 ml 新たに加え、細胞を静かに舞い上がらせて、プロトプラストを洗浄した。再び、低速遠心で細胞を集め、上清を捨てた。この操作を 3 回繰り返して、プロトプラストの精製を行った。最終的に Fig. 2-2-2 に示したようなプロトプラストの層が形成され(Fig. 2-2-2(A))、このプロトプラスト層をパストツールピペットで静かに吸いだし、0.5 M マンニトール-ESI 培地で培地 1 ml 当たりの細胞数を調整した後、培養を行った。

5. プロトプラストの培養法

プロトプラストの培養は 10 ml 容スピッツ管を用いたバッチ培養および 50 ml 容プラスチックシリンジを用いた連続培養により行った。その概略を Fig.2-2-3 に示した。プロトプラスト培養用培地としては培養開始時には 0.5 M マンニトールを含む ESI 培地を使用し、5 °C、12:12 明暗周期下で 3000~3500 lx (34.2~39.9 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) の光照射下で培養を行った。バッチ培養および連続培養ともに培地のマンニトールの濃度は 1 回の培地交換で 20 % ずつ減少させた。

バッチ培養ではスピッツ管内の細胞密度を $10^3\sim 10^4$ cells/ml として培養を行い、3 回/1 日となるように培養液を交換した。培養液の交換は、低速遠心で細胞を集め、上清を静かに吸い出した後、新たな培地を加える手法で行った。細胞壁の再生が確認された後は、1 日に 2 回培養液の交換を行った。

一方、連続培養は Fig. 2-2-4 に示した装置を用いて行った。50 ml 容プラスチックシリンジを培養器とし、5 μm のナイロンメッシュを容器内に装着し、その上で細胞を保持する形式をとった。細胞の密度は培養容器(内容量 40 ml)内の細胞数が $10^3\sim 10^4$ cells/ml となるように調整した。培養液貯留タンクからペリスタポンプを用いて培養液を連続的に培養器内に供給し、培地の流量は 25.5 ml/h (612 ml/日; 15 回転/日)に設定した。連続培養についても培養液貯留タンク内の培地を 3 回/1 日交換し、交換の度に培地のマンニトール濃度を 20 % ずつ減少させた。

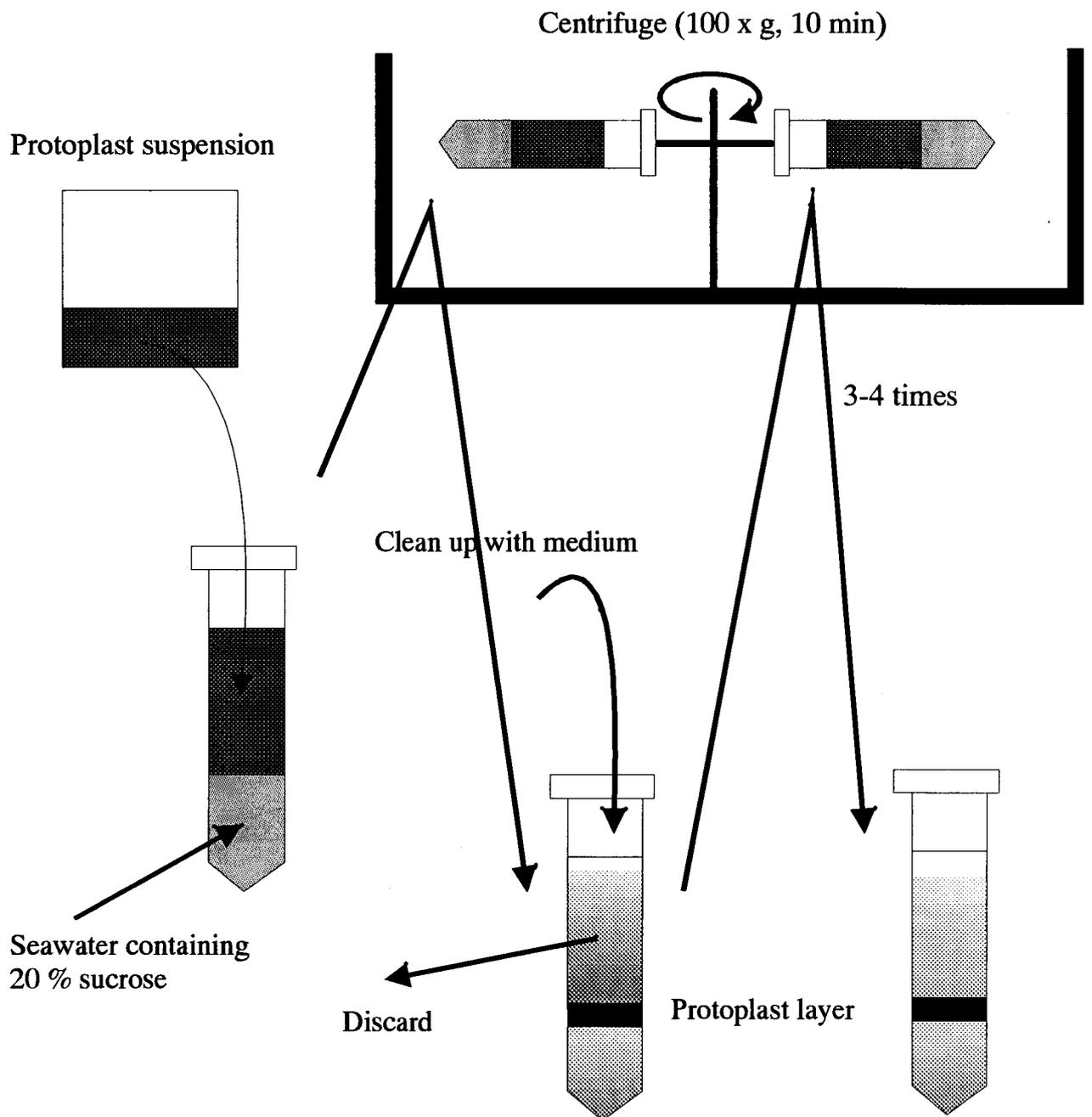


Fig. 2-2-1. Washing and purification procedure for isolated protoplasts with sucrose-cushion centrifugation.

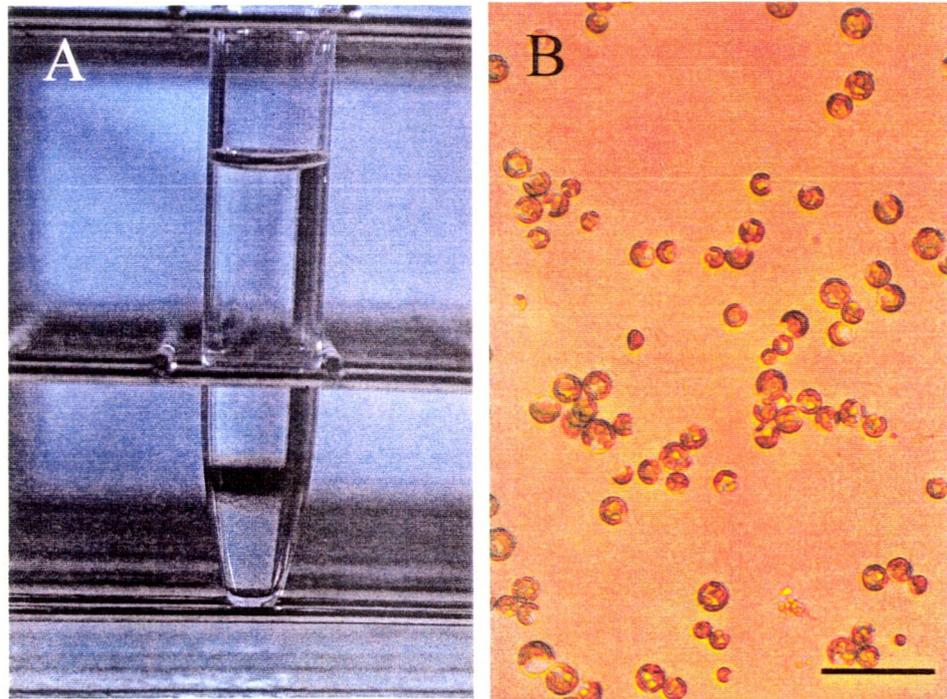


Fig.2-2-2. Purified protoplasts of *Laminaria japonica* by sucrose cushion-centrifugation

(A) Protoplast layer after sucrose cushion centrifugation.

(B) Purified protoplasts (Scale of bar: 100 μm).

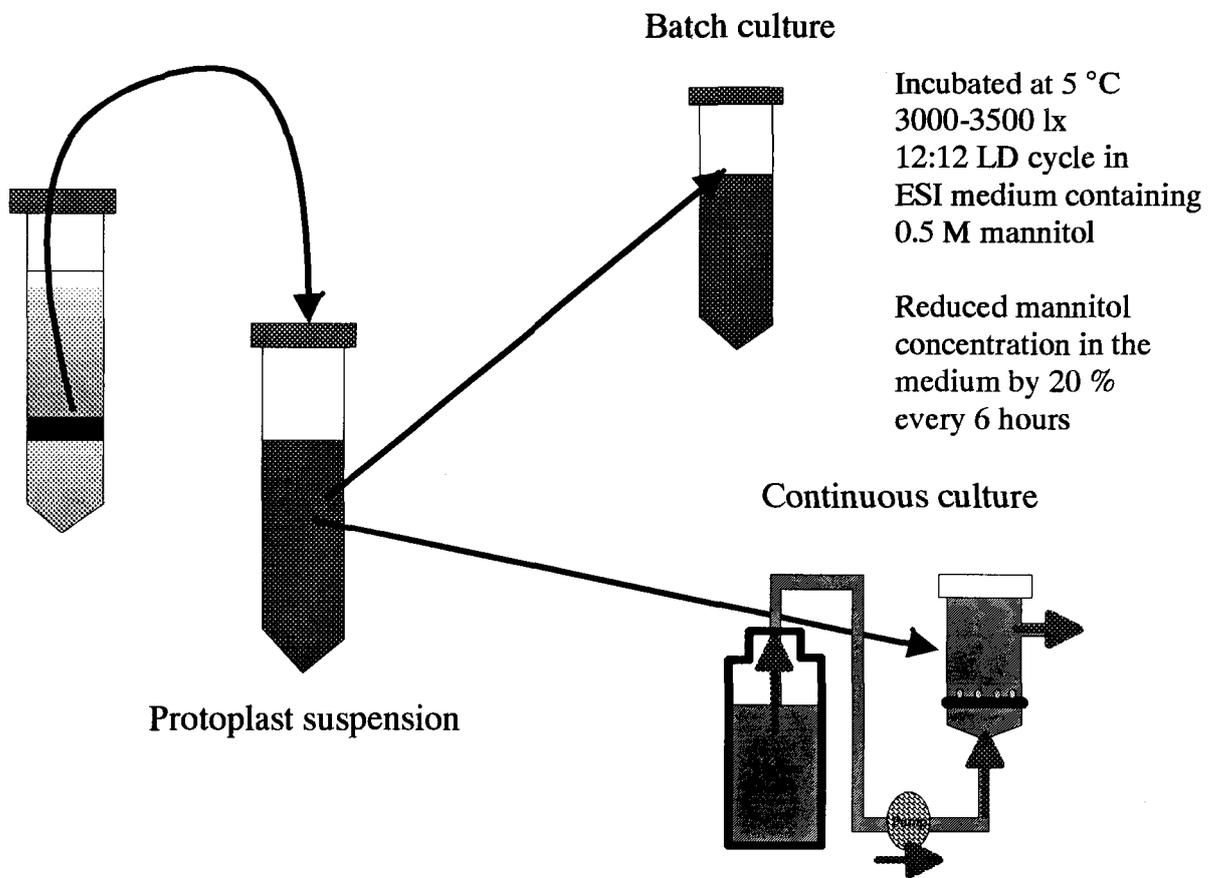


Fig. 2-2-3. Procedures of protoplast incubation.

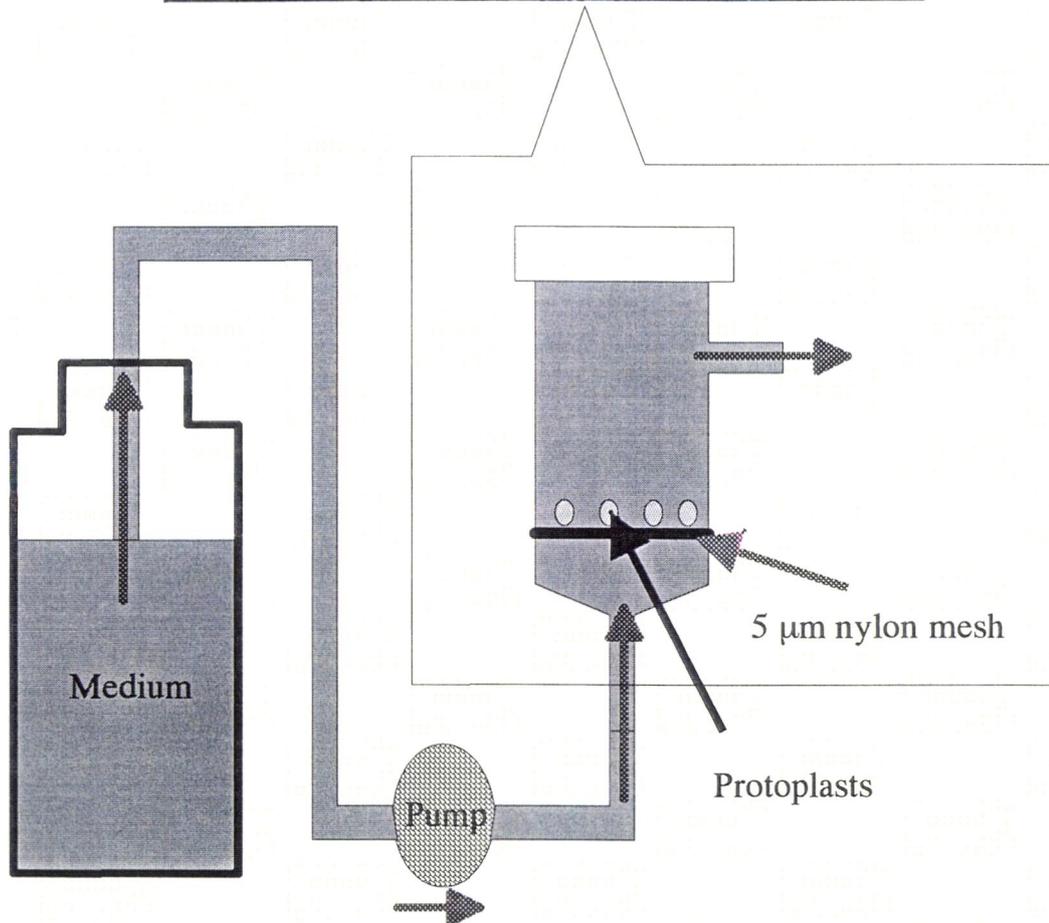
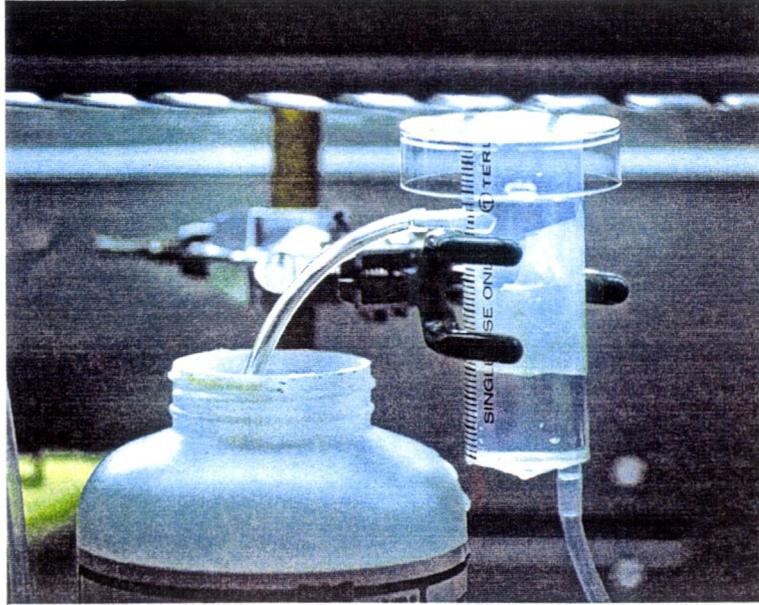


Fig. 2-2-4. Outline of a continuous culture system.

6. 細胞壁の再生と細胞分裂の観察

バッチ培養および連続培養それぞれから、培養液 0.3 ml を所定の培養時間毎に取り出し、細胞の分裂度合と Calcofluor white M2R 染色(前章参照)による細胞壁の再生度合の確認を顕微鏡下で観察した。プロトプラストの細胞壁再生率は Calcofluor white 染色後、蛍光顕微鏡下でプロトプラストの周囲に沿って青白い蛍光が観察される細胞数を数え、30~50 細胞当たりの比率として算出した。また、細胞の分裂度合は光学顕微鏡下で分裂細胞を観察し、2~5 細胞分裂ステージにある細胞群数を識別できる範囲でそれぞれ数え、30~50 細胞当たりの比率として算出した。再生した細胞の状態も経時的に光学顕微鏡で観察した。

7. 組織の再生状態の観察

60 日間連続培養を行い、分裂が観察された組織を 50 ml 容プラスチックフラスコ(イワキガラス)へ移し、ESI 培地で培養を継続した。培養は 5 °C、12:12 明暗周期下で 3000 lx (34.2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) の光照射下で行い、1 週間に 1 度、培地の交換を行った。その間、培養中のマコンブ組織の再生過程の観察を行った。また、芽胞体様形態に再生したものはメチレンブルー溶液で染色を行い粘液腔道の発達度合およびその形状を観察した。

結果

1. 細胞壁の再生

マコンブプロトプラストは sucrose-cushion 遠心分離で、細胞の大きさも比較的均一なもの(15~20 μm)が得られ(Fig.2-2-2(B))、バッチ培養および連続培養のいずれにおいても培養 1~2 日目から細胞壁が再生しはじめた(Fig. 2-2-5)。バッチ培養では、培養 7 日目までに生存しているプロトプラストのほとんどが細胞壁を再生した(Fig.2-2-6)。一方、連続培養では、培養 3 日目までに全ての細胞で細胞壁が再生し(Fig.2-2-6)、細胞壁の再生はバッチ培養よりも連続培養の場合に速やかであった。

2. 細胞分裂

バッチ培養および連続培養ともに、細胞壁の再生に続いて分裂を開始した細胞が観察され、細胞塊にまで至ったものも認められた。

バッチ培養でプロトプラストから組織様体への再生の過程を Fig.2-2-7 に示した。バッチ培養では培養 9 日目から、細胞分裂が認められ(Fig.2-2-7(A))、培養 16-30 日目には活発に細

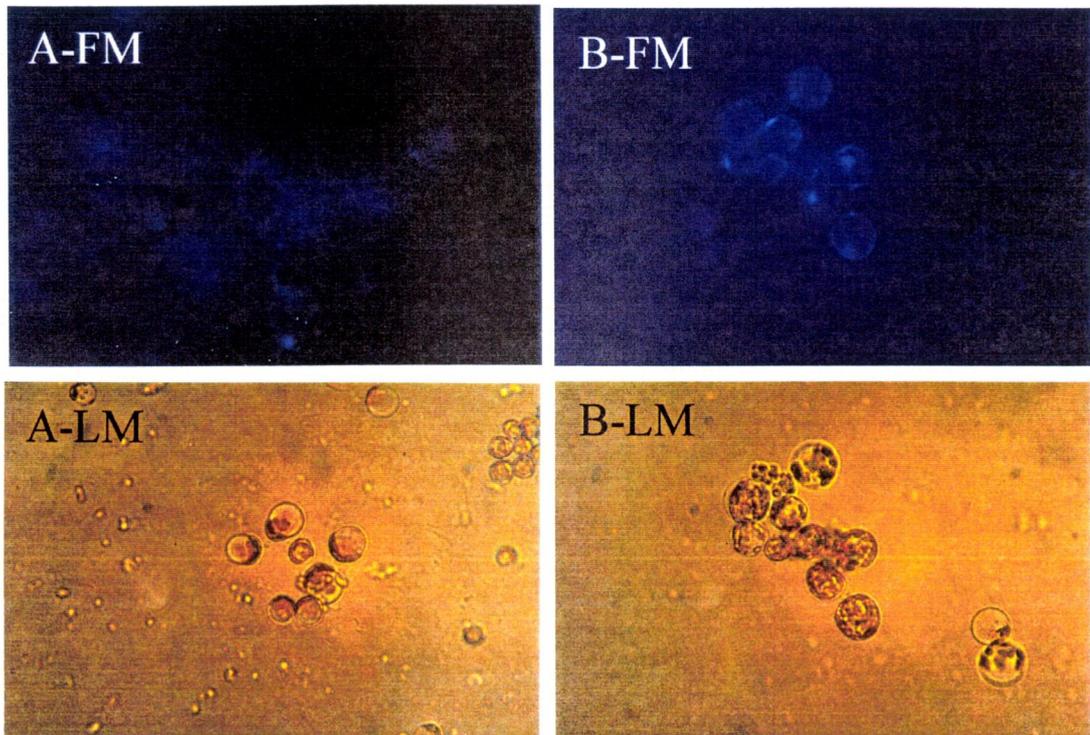


Fig. 2-2-5. Cell wall regeneration of protoplasts of *Laminaria japonica*.

(A)-FM: Fluorescence microscopic view of protoplasts.

(A)-LM: Light microscopic view of protoplasts.

(B)-FM: Fluorescence microscopic view of protoplasts after 3-day culture.

(B)-LM: Light microscopic view of protoplasts after 3-day culture.

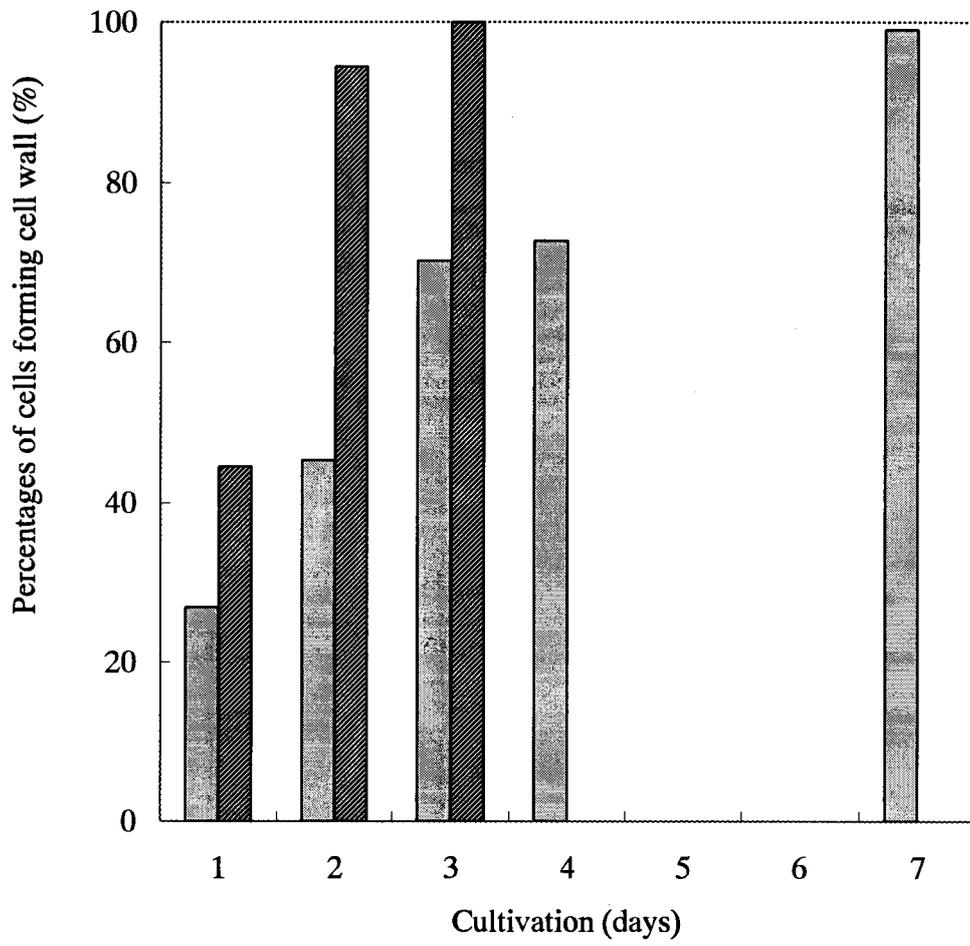
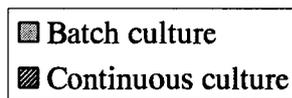


Fig. 2-2-6. Rate of cell wall regeneration of protoplasts in batch and continuous culture.



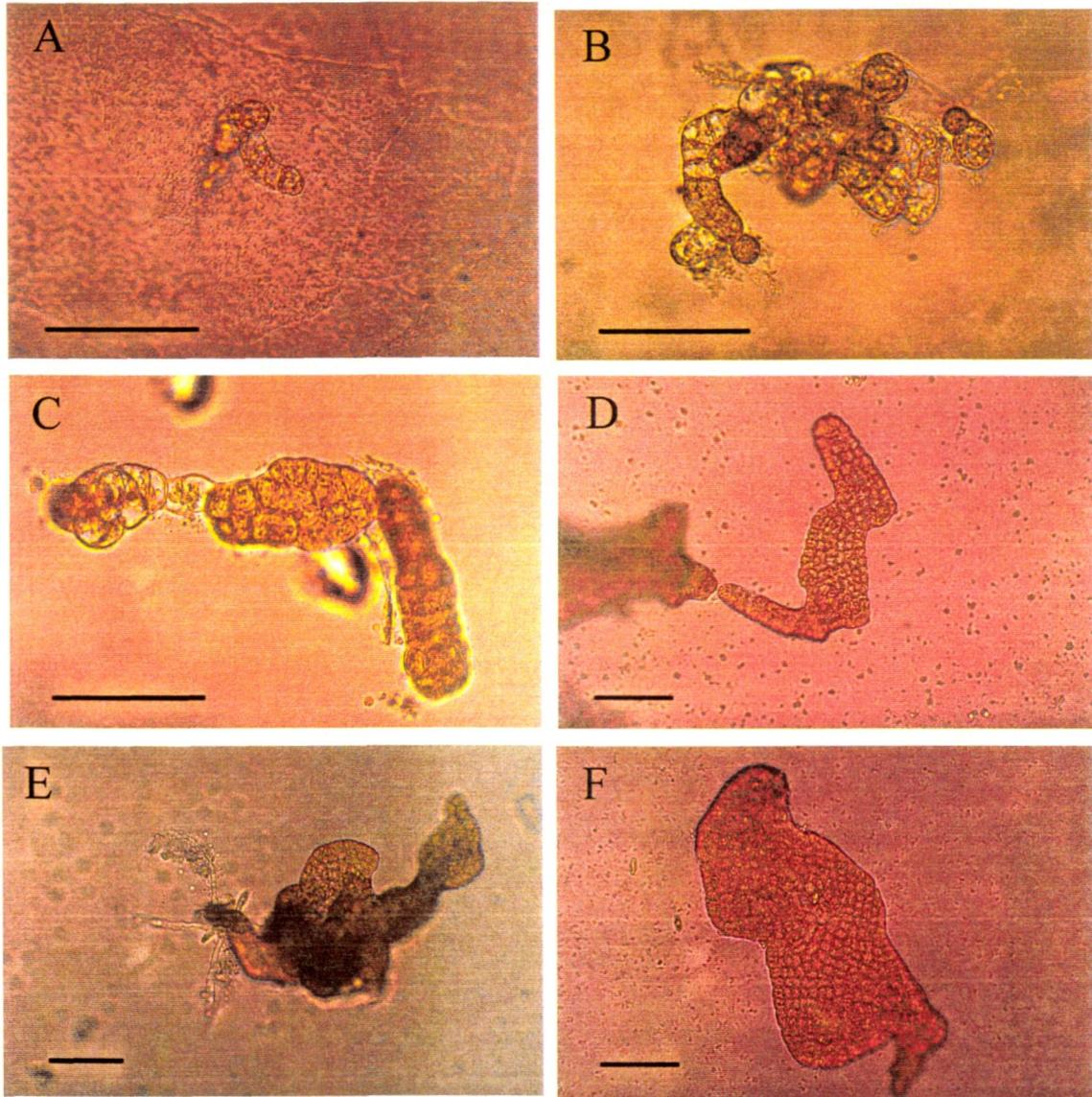


Fig. 2-2-7. Protoplast regeneration in the batch culture.

- (A) Dividing cells after 9-day culture.
- (B) Dividing cells after 16-day culture.
- (C) Dividing cells after 30-day culture.
- (D) Regenerated sheet-shaped tissue after 35-day culture.
- (E) Regenerated sporophyte-like tissue after 35-day culture.
- (F) Regenerated tissue after 39-day culture.

Scale of bar: 100 μ m.

胞分裂を行い 10~20 細胞状態あるいは細胞塊を形成した(Fig.2-2-7-(B,C))。培養 35 日以降は細胞がシート状に並んだ葉体様形態を形成しはじめ(Fig.2-2-7(D,F))、仮根状の構造体を形成して芽胞体と類似の形態にまで発達したのも観察された(Fig.2-2-7(E))。しかしながら、培養 40 日以降、バッチ培養では原生動物および細菌による汚染のため、組織体数が減少し観察が困難になった。

一方、連続培養でプロトプラストが再生する過程を Fig.2-2-8 に示した。連続培養でも 30 日目まではバッチ培養と同様にプロトプラストから葉体様組織まで再生した(Fig.2-2-8(A-D))。連続培養では 40 日以降も、培養を継続することが可能であり、さらに、組織が再生していく過程が観察できた(Fig.2-2-8(D, E))。培養 60 日には、不定形ではあるが良く再生した組織体が多数観察された(Fig.2-2-8(E))。Fig.2-2-9 には、連続培養での分裂細胞の比率と分裂状態を培養 23 日目まで、経時的に観察した結果を示した。分裂した細胞は培養時間とともに数多く観察され、培養 16 日目では観察した細胞の約半数が分裂していた。なお、培養 16 日目までの分裂細胞の分裂度合は 2 細胞状態にあるものが多かった。培養 20 日目以降にはさらに分裂細胞の割合が上昇し、その上、細胞の分裂度合も 3 細胞以上に進行したものが多く観察されはじめた。培養 23 日目では分裂度合が 5 細胞以上の細胞が大半を占めた。

3. 組織体への再生

連続培養で約 60 日間培養し、再生した組織をプラスチックフラスコに移し、培養を継続した結果を Fig.2-2-10 に示した。培養 3 ヶ月後には、フラスコ内壁に付着し、全長が 5 mm 程度まで生長した組織体が観察された(Fig.2-2-10(A))。さらに、続いて 1 ヶ月培養した後には、全長約 3cm の芽胞体様組織にまで達した(Fig.2-2-10(B))。しかし、先枯れ現象が起こり、その後の培養は成功しなかった。また、再生した芽胞体様組織をメチレンブルーで染色し、粘液腔道の発達度合およびその形状と形成されている部位を確認した結果、茎部から葉体中間部にかけて、網目構造状に粘液腔道が発達していた(Fig. 2-2-10(C,D))。なお、この粘液腔道の特徴はマコンブのものに類似していた(川島, 1993)。

考察

藻類の中でも皮層、表層、髄層の 3 層から成る複雑なラミナリア構造を持ち細胞の分化

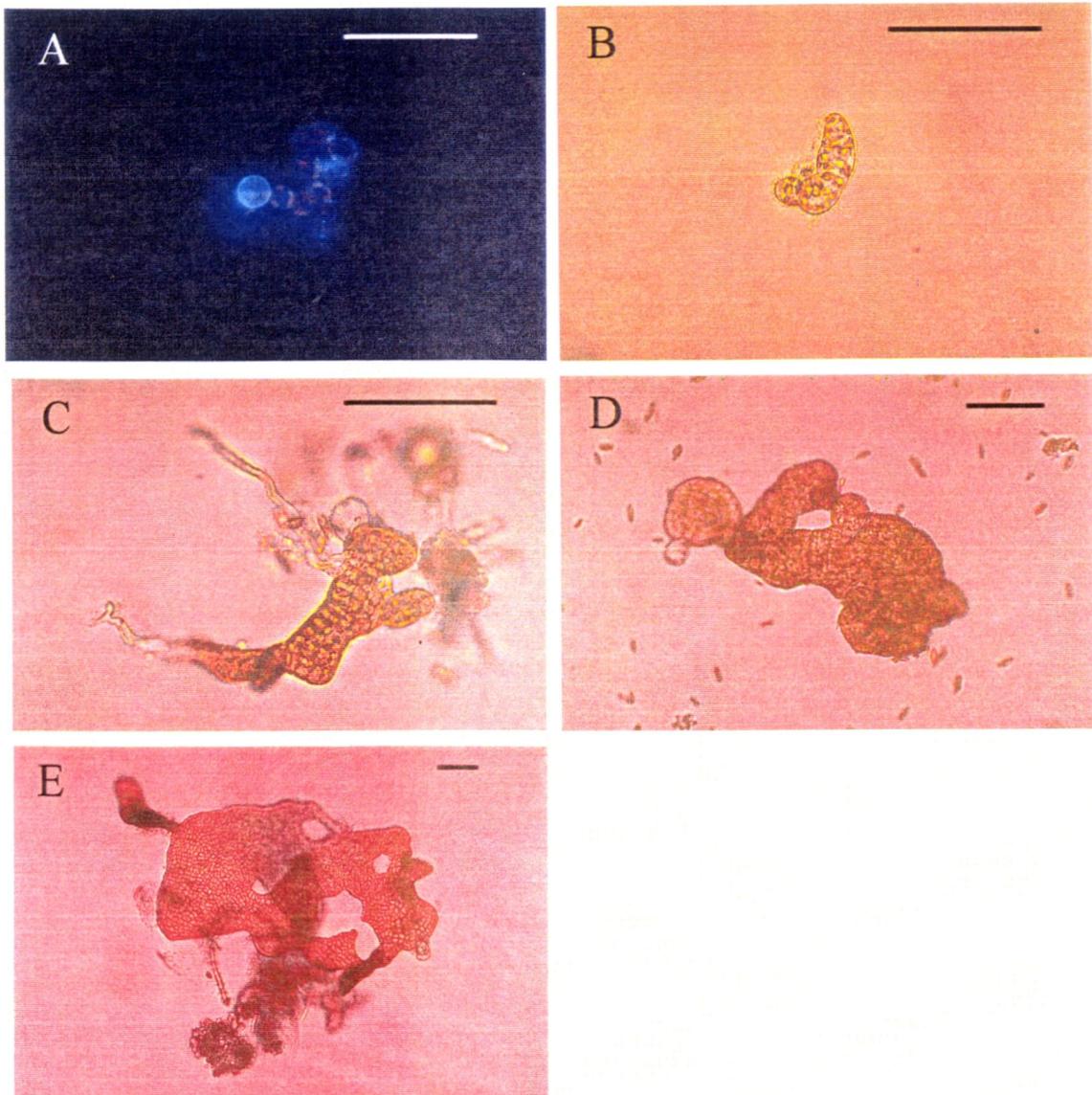


Fig. 2-2-8. Protoplast regeneration in the continuous culture.

- (A) Cell wall regeneration after 3-day culture.
- (B) Dividing cells after 12-day culture.
- (C) Dividing cells after 30-day culture.
- (D) Dividing cells after 40-day culture.
- (E) Dividing cells after 60-day culture.

Scale of bar: 100 μm .

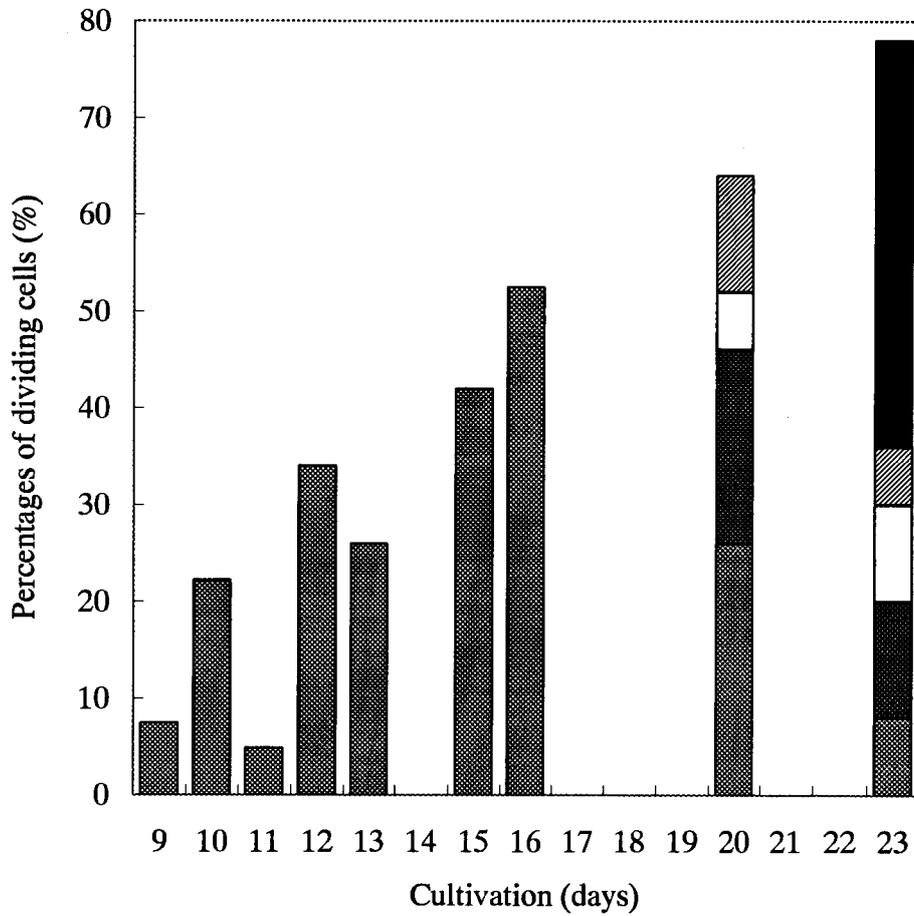
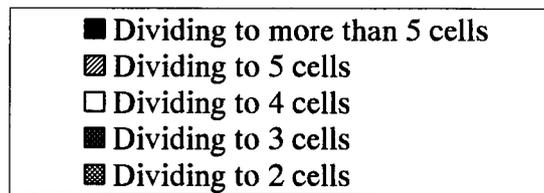


Fig. 2-2-9. Changes of the extent of cell division in the continuous culture



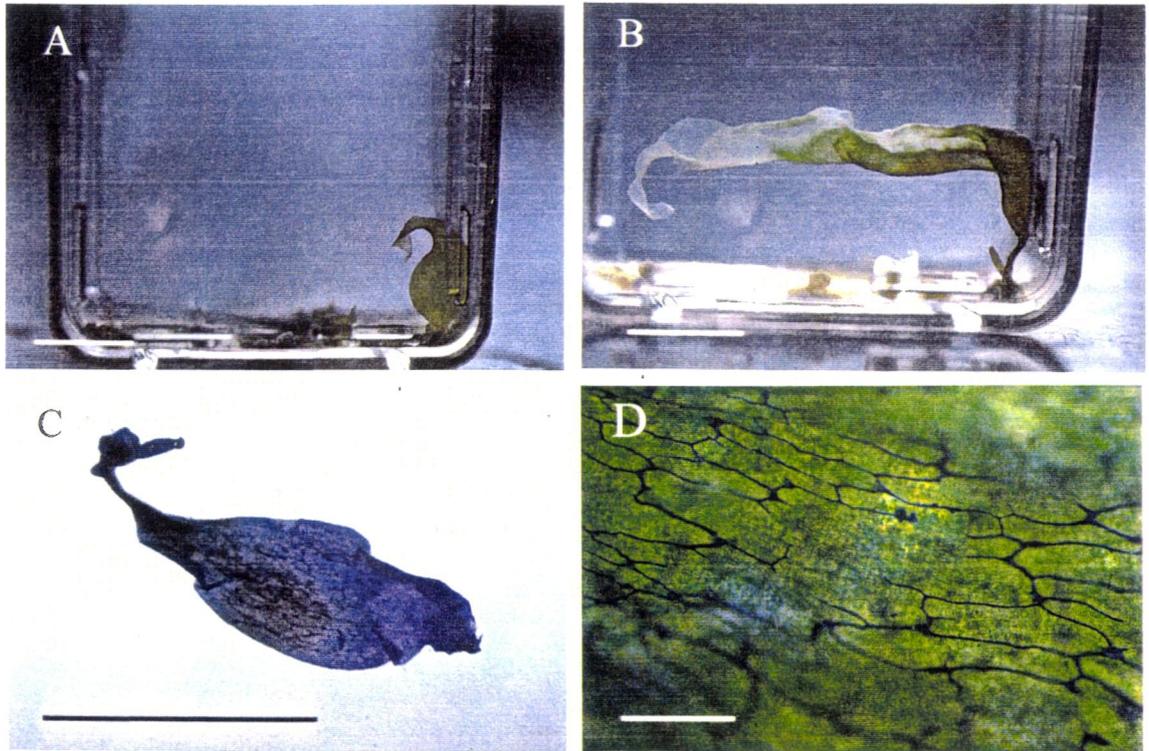


Fig. 2-2-10. Regeneration of *Laminaria japonica* protoplasts to plantlets and observation of their mucilage-canal in the continuous culture.

- (A) Regenerated plantlet for 3-month culture (Scale of bar: 1.0 cm).
- (B) Regenerated plantlet for 4-month culture (Scale of bar: 1.0 cm) .
- (C) Regenerated plantlet stained by methylen blue(Scale of bar: 1.0 cm).
- (D) Mucilage-canal of regenerated plantlet stained by methylen blue(Scale of bar: 250 μm)

が海藻中で最も著しいコンブ類(Chapman,1981)においては、プロトプラストから葉状体にまで再生したという報告例はない。褐藻類では細胞壁の再生と細胞塊の形成が認められたとの報告例はあるが、プロトプラストから植物体への再生に関する報告例はわずかに *Sphacelaria* sp.で認められているにすぎない(Ducrex & Kloareg, 1988)。また、紅藻類でも *Porphyra* 属を除いた多く種で植物体への再生が認められていない(Pinchetti et al., 1993)。本研究は、マコンブ *L.japonica* のプロトプラストから植物体への再生を報告した初めての例であろう。また、H-4 株の菌体外アルギン酸リアーゼの利用によって得られたプロトプラストは細胞膜の透過性を指標とした細胞生存率が高いだけでなく、十分に分裂能および再生能も有していることが明らかとなった。このことは、*Laminaria* 属をはじめとした褐藻細胞のプロトプラスト化への H-4 株のアルギン酸リアーゼ利用の有効性を強く示唆する結果と考えている。

高等植物プロトプラストはプレート培養や低融点アガロースに包埋して培養する方法が主体となっていることから、*L.japonica* プロトプラストを組織培養プレート培養および寒天培地に包埋して培養する方法も試みたが、分裂したプロトプラストは観察できなかった。これらの場合では、藻体材料に消毒処理を施していないこともあり、汚染菌が増殖し、細胞の生長に悪影響を与えたと考えられる。しかし、細菌の汚染を抑制させるために抗生物質を培地に添加した場合でも再生は認められなかった。本実験で用いた 2 種の培養法は、新鮮な培地を可能な限り交換し続け、汚染菌を洗い流してその増殖を遅らせることを目的としている。この培養法により、マコンブプロトプラストの再生を確認した。特に、本研究で考案した連続培養は簡便かつ優れたプロトプラスト培養系となり得る。細胞膜機能が正常に維持されているが植物体への再生に成功していない褐藻類および紅藻類プロトプラストには有効な培養系であると考えている。

なお、プロトプラストの融合法による高等植物の育種は、再生系が確立している植物の種類が少ないこともあり、*Agrobacterium* の感染による *Ti* (Tumor-inducing)-plasmid を媒体とした遺伝子導入やパーティクルガンを用いた細胞への直接的な DNA 導入法に取って代られている(Olempska-Beer et al., 1993)。しかし、植物病理学の中でもウイルス-細胞相互作用の研究分野ではプロトプラスト系は有効な解析手段となっているほか(Wood, 1985)、海藻類では遺伝学的研究や植物病理学研究を基礎とする研究が徐々に進み、エレクトロポレーション法による *Porphyra miniata* プロトプラストへの外来 DNA 導入の成功例も最近報告されている(Kübler et al., 1994)。このような背景から、海藻研究へのプロトプラスト系の応用

範囲は広く、本研究で得られた成果が、さらに海藻類の種々の研究分野に役立つことを期待したい。

ところで、本研究では、単離されたプロトプラストを再生させることに重点を置いたため、供試藻体材料には特に消毒処理を施さなかった。しかし、今後、種々の海藻類のプロトプラストを用いた実験系の確立には、無菌培養系の開発が最重要課題となる。このため、無菌培養藻体の調製は必須であると考えられるが、現在までにマコンブ藻体を無菌化するまでには至っていない。鬼頭・国本(1993)はノリ糸状体を界面活性剤と超音波処理を施すことで、無菌糸状体を得ることに成功しており、同様の手法をコンブ藻体に応用することも必要であろう。また、本実験では、プロトプラストの培養は一貫して5°Cで行った。10°Cおよび15°Cでの培養も試みたが、これらの温度では細菌の増殖が活発になり、プロトプラストの培養を継続することが困難であったため、低温での培養を余儀なくされた。そのため、マコンブプロトプラストの適切な培養温度の検討は行えず、今後、培養温度の詳細な検討が必要である。このためにも無菌培養系の確立を早急に検討する必要がある。

第二章要約

Alteromonas sp. H-4 株の産生する菌体外アルギン酸リアーゼをマコンブ細胞のプロトプラスト化への利用を試み、マコンブプロトプラストの作出に及ぼす高張液および酵素液組成の影響と、得られたプロトプラストの培養条件並びに藻体への再生の検討を行い、以下の結果を得た。

1. プロトプラスト細胞の作出時に用いる高張液組成のマコンブ芽胞体細胞に対する影響を検討し、0.7 M マンニトール-5 mM HEPES-25 mM MgCl₂-50 % NSW がマコンブ細胞に影響の少ないことを明らかにした。
2. マコンブプロトプラストの作出に要する酵素液には精製 H-4 株アルギン酸リアーゼとセルラーゼが必要で、30 U/ml の H-4 株アルギン酸リアーゼと 1.5 %セルラーゼの組み合わせで、15 °C、3~5 時間処理することにより、最も数多くのプロトプラストを得ることができた。得られたプロトプラストは黄褐色、球形で、直径は 10-25 μm であった。
3. プロトプラストの収量および生存率におよぼす高張液組成を調べた結果、0.5 M マンニトール-5 mM HEPES-25mM MgCl₂-50 % NSW からなる高張液を用いた場合にプロトプラストの収量および生存率が最も高くなり、その時のプロトプラストの収量は 8.0 x 10⁶ cells/gFW、生存率が 97.7% であった。なお、対照として供試したアワビアルギン酸リアーゼでは、H-4 株酵素と同一条件下で酵素処理を行ってもマコンブ芽胞体からプロトプラストを得ることはできなかった。
4. 得られたマコンブプロトプラストの培養を試みたところ、培地の交換頻度を高くした 2 種の培養法（バッチ培養法と連続培養法）で培養 1~2 日目から細胞壁の再生が観察され、バッチ培養では培養 7 日目までに、連続培養では培養 3 日目までに全ての細胞で細胞壁が再生した。さらに、培養 15 日目以降では活発に細胞分裂を行って細胞塊に至り、培養 30 日で葉体様形態に至ったものが観察された。なお、バッチ培養では細菌・原生動物の増殖等により、これ以上の期間培養を延長することが困難であった。
5. 連続培養で再生した葉体様組織をフラスコに移し培養を継続したところ、培養 3 ヶ月で芽胞体様の形態に再生した個体が認められた。この個体は培養 4 ヶ月で藻体長が 3 cm に達し、再生した個体には網目構造の粘液腔道がすでに形成されていた。しかし、その後、先枯れ現象がおこり、枯死した。

以上の結果を総合すると、*Alteromonas* sp.H-4 株が産生する菌体外アルギン酸リアーゼを用いてマコンブ細胞のプロトプラスト化が可能であることが明らかとなり、しかも、本酵素の使用により、マコンブ細胞の生物活性および生存性が十分に維持されている状態で、プロトプラストを作出することができた。さらに、得られたマコンブプロトプラストの培養にも初めて成功し、芽胞体様の形態を示すまでに再生させることができた。本研究成果は *Laminaria* 属をはじめとした褐藻類細胞のプロトプラスト化への H-4 株アルギン酸リアーゼ利用の有効性が強調される結果となると考えている。

総合考察

アルギン酸は褐藻類の細胞壁構成成分の一つとして、あるいは粘調性集落を形成するある種の細菌 (*Pseudomonas aeruginosa* 粘調性変異株:Evans & Linker,1973, 植物病原菌 *P.syringae* pv. *glycinea*: Osman et al.,1986, および *Azotobacter* 属細菌: Cote & Krull,1988)の菌体外多糖として見いだされる直鎖の酸性多糖である。アルギン酸の最少構成単位は β -D-マンニユロン酸(ManA)とその C5-epimer である α -L-グルロン酸(GulA)の2種のウロン酸であり、1,4-結合により糖鎖が形成されている。また、アルギン酸分子中には、ManA が β -1,4-結合したポリマー領域 (polyM ブロック)および GulA が α -1,4-結合したポリマー領域 (polyG ブロック)および ManA と GulA が不規則に1,4-結合した領域(MG random ブロック)が存在する(Haug, et al, 1966, 1967)。

アルギン酸分解酵素は、アルギン酸の分解を触媒する酵素の総称であり、ウニ (Eppley & Lasker,1959)、アワビ(辻野・斉藤、1963; Nakada & Sweeny,1967; Elyakova & Favorov,1974)、サザエ(Muramatsu et al.,1977)、タツナミガイ(Nishizawa et al.,1968)などの食藻性動物、褐藻類(Madgwick et al.,1973; Gacesa, 1992)、海洋性真菌類(Wainwright & Sherbrok-Cox,1981)あるいは種々の陸性細菌(井上・安藤、1956; Boyd & Turvey,1977; Von Riesen, 1980; Hansen et al., 1984; Linker & Evans, 1984; Kennedy et al.,1992)および海洋性細菌等でアルギン酸分解酵素の分泌・産生が確認されている。特に、海水、海藻表面および海産食藻動物消化管から分離される海洋細菌中にはアルギン酸分解性細菌が高頻度に出現し、その菌種は *Vibrio*(Ando & Inoue,1961; Sutherland & Keen, 1981; 北御門ら, 1989; Sawabe et al., 1995 in press), *Alteromonas* (Preston et al.,1985a; Romeo et al., 1986), *Photobacterium* (Preston et al.,1985a; Romeo & Preston, 1986), *Pseudomonas* (Kashiwabara et al.,1969 ; Davidson et al., 1976; Boyen et al.,1990b)と多岐にわたっている。また、工場廃液(Yonemoto et al.,1991)やアルギン酸ビーズ固定化生物反応槽(Kinoshita et al.,1991)からアルギン酸分解性細菌が分離された例もある。これらの生物由来のアルギン酸分解酵素の多くは分離・精製がなされ、アルギン酸の分子構造あるいは生合成系の解明(Min et al.,1977; Boyd & Turvey,1978; Lange et al., 1989)、褐藻類のプロトプラスト化への利用(Preston et al.,1985b; Boyen et al., 1990a; Boyen et al., 1990b; Østgaard et al., 1993)、アルギン酸を菌体外多糖とする *Pseudomonas aeruginosa* に起因する肺嚢胞繊維症の治療薬への利用(Bayer et al., 1992)、生物活性アルギン酸オリゴ糖の探索(Natsume et al., 1994; Murata, 1994)など医学・農学分野での応用研究が盛んに進められている。

ところで、我国は世界有数の食用海藻生産国であり、北海道南部の噴火湾沿岸域ではマコンブの促成栽培が盛んである。しかしながら、昭和 53 年頃からマコンブの種苗育成中に細菌性の赤変病害の発生が確認され始め、種苗供給に支障をきたすようになってきた(絵面ら、1988; Yumoto et al.,1989)。マコンブの安定した生産を行なう上で、種苗培養時における赤変病原菌の防除の他に、赤変病害抵抗性株の育種およびマコンブ種苗の無菌培養系の確立、あるいは天然母藻に依存しない種苗育成技術開発等が望まれている。また、細胞レベルでのマコンブの生理、成分組成の変動ならびに葉状体への分化の機序に関しては不明の点が多い。これらの問題を解決するための新しい試みとして、試験管内培養プロトプラスト系の利用が有効と考えられ、その確立が強く求められている。海藻類のプロトプラスト化は、海藻細胞の生物活性を維持するために、海水存在下での反応が要求され、しかも比較的低温で効率よく働く優れた細胞壁分解酵素系が必要とされている。さらに、海洋資源の有効利用の一つとして大型海藻類のバイオマスエネルギーへの転換あるいはこれら藻体に豊富に含まれるビタミン・ミネラル・ファインケミカルズといった有価物を効率よく抽出する手法の開発が期待されている。海藻細胞壁に特有な多糖類(アルギン酸、寒天、カラギナン等)は有価成分の抽出の妨げとなることから、褐藻類を対象とする場合にはアルギン酸を効率良く分解できる酵素の利用も考慮すべきであると考えられる。

本研究では利尻コンブ (*Laminaria japonica* var. *ochotensis*) の穴あき症藻体から分離され、強いアルギン酸分解活性を示す *Alteromonas* sp.H-4 株の分類学的検討と同株の産生するアルギン酸分解酵素の酵素化学的な性状を明らかにするとともに、細菌由来の新たなマコンブ細胞壁分解酵素として褐藻類のプロトプラスト系確立への利用の可能性について検討を行った。

まず、第一章では *Alteromonas* sp.H-4 株の分類学的位置および同株の産生するアルギン酸分解酵素の産生条件の検討、精製、そして酵素化学的諸性状の解明を行った。第一節では、*Alteromonas* sp.H-4 株の分類学的位置を明らかにするために、対照として供試した *Alteromonas* 属標準株 14 菌種と形態学的性状、生化学的性状、whole cell protein 電気泳動パターン、DNA-DNA 相同性について比較検討した。H-4 株は供試した *Alteromonas* 属対照菌株の中で *A.carrageenovora* NCMB 302^r に最も類似した性状を示し、デンプン分解性、D-mannose, citrate の利用性で異なっているのみであった。しかし、H-4 株は *A.carrageenovora* とは DNA-DNA 相同性が 45.8%と低く、whole cell protein 電気泳動パターンも異なることから、同種とは同定できなかった。他の対照菌株とも一般性状、DNA-DNA 相同性、whole cell

protein 電気泳動パターンがいずれも異り、また、その他の既報の *Alteromonas* 属菌種の記載とも一致しないことから、H-4 株は *Alteromonas* 属の新種であることが示唆された。H-4 株は褐藻類の葉体崩壊性あるいは穴あき病疾病への関与が疑われていることから、“*Alteromonas alginocida* sp. nov.”として提唱することを検討中である。また、*Alteromonas* 属の中でアルギン酸分解能陽性の菌種として、*A.macleodii*, *A.espejiana*, *A.atlantica*, *A.carrageenovora*, *A.denitrificans* の 5 菌種が記載されているが、H-4 株は本実験で供試した *A.espejiana*, *A.atlantica*, *A.carrageenovora* の 3 菌種と 35 %~46 %の DNA-DNA 相同性を示した。この DNA-DNA 相同性はその他の *Alteromonas* 属供試菌株との値に比べて高い値であったことから、さらに 16S rRNA などのデータを加味し、海藻多糖分解性 *Alteromonas* 菌種が一つのグループを形成している可能性を検討する必要がある。

第二節では、H-4 株のアルギン酸分解酵素の産生条件について検討を行った。H-4 株の培養上清中のアルギン酸分解酵素活性は培地の海水濃度の増加とともに上昇し、海水濃度が 75 %以上の時に最大となった。一方、培地中のカシトン濃度の減少とともに培地中の酵素活性は増加する傾向にあり、カシトン濃度が 0.5 %の場合に活性が高くなった。また、H-4 株はアルギン酸ナトリウム(Alg-Na)無添加培地でも本酵素を産生し、Alg-Na 添加培地での培養に比べわずか 1 U/ml の差であった。

さらに、H-4 株の培養上清(菌体外酵素)は供試した Alg-Na, polyG, polyM および MG random のいずれに対して分解性を示し、高い活性を示した基質は polyM > MG random > polyG \geq Alg-Na の順であった。一方、H-4 株の菌体内からは Alg-Na および polyG にはほとんど分解性を示さないが、polyM と MG random に対してのみ高い分解性を示す活性が検出された。

以上の結果から、菌体外のアルギン酸分解酵素は構成型の酵素であり、Alg-Na, polyG, polyM および MG random いずれの基質にも分解性を示し、培地中の海水濃度は 75 %、カシトン濃度は 0.5 %の時にアルギン酸分解酵素の活性が高くなることがわかった。一方、菌体内酵素は、菌体外酵素に比べ基質特異性が限定されており、polyM と MG random に対してのみ活性が認められた。このことから、H-4 株は菌体内外に基質特異性の異なるアルギン酸分解酵素を有し、連係して異なる役割を分担していることが示唆された。

第三節では、H-4 株の培養上清中の菌体外酵素を精製した。H-4 株の培養上清を限外濾過濃縮後、ゲル濾過(Sephadex G-100、Sephadex G-75、Toyopearl HW-50F)、イオン交換クロマトグラフィー(DEAE-Sephadex A-50)により精製した。精製酵素は Native-PAGE,

SDS-PAGE, IEF で単一に精製されたことおよび Native-PAGE および IEF のタンパク質バンドは活性染色法でアルギン酸分解活性を示すことが確認された。最終的な収量は約 8% で、限外濾過濃縮画分に比べ約 16 倍に精製された。また、本精製酵素の分子量は 32 kDa, pI 4.7 と推定された。

既報のアルギン酸分解酵素は推定分子量が 30kDa 前後のものが多く、*Bacillus circulans* で 40 kDa(Hansen et al.,1984), *Photobacterium* sp. で 29 kDa(Romeo & Preston, 1986)、巻き貝の消化酵素からは 32 kDa のものも確認されている(Muramatsu et al.,1977)。また、細菌由来の酵素の pI 値は 4.0-6.0 のものが多く、H-4 株のアルギン酸分解酵素はこれらと類似した分子量および pI 値を示していた。しかし、N-末端から 30 残基のアミノ酸を分析したところ、既報のアルギン酸分解酵素と高い相同性を示すものはなかった。

ところで、精製の第一段階である培養上清の濃縮が非常に困難で、種々検討を行ったが、回収率・濃縮率ともに高い方法を見いだすことが出来なかった。今後、さらに回収率を高め、精製の効率を高めるような濃縮・精製法の検討が必要と思われる。

第四節では、第三節で精製した菌体外アルギン酸分解酵素の酵素化学的な性状を調べた。精製したアルギン酸分解酵素の至適 pH は 7.5、至適温度は 30 °C であった。また、本精製酵素は酸性域(pH 5 以下)と加熱(40 °C 以上)に対し不安定であった。さらに、本精製酵素は海水中に含まれる MgCl₂, NaCl, CaCl₂ と同程度の濃度で強く賦活化されたこと、および MgCl₂あるいは海水の添加により熱安定性が上昇したことから好塩性の酵素と考えられた。これらのことから、H-4 株のアルギン酸分解酵素は海水中で酵素活性が高く、安定であると推測された。なお、現在までに報告されている海洋環境試料由来のアルギン酸分解酵素の至適 pH や塩類要求性等の性状と H-4 株の産生するアルギン酸分解酵素の性状には類似性が認められた。

さらに、本精製酵素の反応においては、235 nm の吸光値の増加に伴い、還元糖量も増加したことから、*Alteromonas* sp. H-4 株の菌体外アルギン酸分解酵素は、Preiss & Ashwell(1962)と辻野・斉藤(1963)が報告しているようなアルギン酸多糖のグリコシド結合の切断とともにその非還元末端に 2 重結合の導入をともなうアルギン酸リアーゼ (alginate lyase) EC[4.2.2.3.] と考えられた。また、酵素反応開始直後に基質溶液の粘度が急激に低下したことから、endo-型の分解様式が推定された。

第五節では、精製した H-4 株菌体外アルギン酸リアーゼの基質特異性および作用様式を明らかにした。本精製酵素は Alg-Na, polyM, polyG および MG random のいずれに対しても

分解性を示し、IEF 後の活性染色では、いずれの基質に対する活性も IEF のタンパク質バンドの位置に一致した。酵素反応動力学的な解析により、 K_m 値が $\text{polyG} < \text{MG random} < \text{Alg-Na} < \text{polyM}$ の順で低く、 polyG (66 $\mu\text{g/ml}$)と polyM (165 $\mu\text{g/ml}$)では 20 倍程度の開きが認められた。なお、 MgCl_2 存在下の反応では K_m 値はいずれの基質の場合も 1/4~1/13 まで低くなった。さらに、本酵素反応生成物は Alg-Na , polyM , polyG および MG random のいずれを基質とした場合でも、DP 7~8, 5~6, 3~4 の 3 種の糖鎖の不飽和オリゴuron酸が検出され、いずれの場合もuron酸の回収率は 100 %であった。

これらの結果から、精製した H-4 株菌体外アルギン酸リアーゼは polyM と polyG に分解性を示す単一の酵素タンパク質であることが示唆され、現在までに報告されてない新規な分解様式を示すアルギン酸リアーゼであると考えられた。しかし、 polyM および polyG を基質として酵素反応動力学的解析を行った結果、基質親和性に大きな開きが認められたことから、本酵素の polyM と polyG の分解様式を明らかにするためには分解生成物の詳細な解析を行う必要があると考える。

なお、工場排水から分離された *Sphingomonas* sp. A1 株は A1-I, II, III の 3 種のアルギン酸分解酵素を産生することが報告されている(Yonemoto et al.,1991; Murata, 1994)。A1-I(MW 66 kDa)は polyM と polyG の両者に分解性を示すが、アミノ酸配列の解析と遺伝子解析結果から、A1-I はプロセッシングを受け polyM に特異的な A1-II(MW 25 kDa)と polyG に特異的な A1-III(MW 38 kDa)に開裂することが示されている(Hisano et al.,1994)。H-4 株の精製酵素は菌体外に産生され、分子量も 32 kDa と小さいことから、さらに、プロセッシングを受けるとは考え難いが、H-4 株のアルギン酸リアーゼ遺伝子の解析も必要と考える。

以上、本章で H-4 株菌体外アルギン酸リアーゼは海水存在下で安定かつ非常に効率良くアルギン酸を分解することが明らかとなったことから、第二章では本酵素を利用し、マコンブ細胞のプロトプラスト化を検討することとした。

第二章、第一節では H-4 株菌体外アルギン酸リアーゼをマコンブ細胞のプロトプラスト化へ利用し、マコンブプロトプラストの作出に及ぼす高張液および酵素液組成の影響を調べた。プロトプラスト作出時に用いる高張液は、0.7 M マンニトール-5 mM HEPES-25 mM MgCl_2 -50 % NSW がマコンブ細胞生存性に影響が少ないことが明らかとなった。また、プロトプラスト作出のための酵素としては精製した H-4 株アルギン酸リアーゼとセルラーゼが必要で、30 U/ml の H-4 株アルギン酸リアーゼと 1.5 %セルラーゼの組み合わせで 15 °C, 3~5 時間酵素処理によって生存性の高いプロトプラストを数多く得ることができた。さら

に、プロトプラストの収量および生存率は高張液中の海水濃度、緩衝液の種類と濃度、マンニトール濃度に影響を受けることが判明し、高張液の組成として 0.5 M マンニトール-5 mM HEPES -25 mM MgCl₂-50 % NSW が至適であった。

以上の結果を総合して、マコンブ芽胞体からのプロトプラスト作出条件は、酵素液として、30 U/ml H-4 株精製アルギン酸リアーゼに 1.5 % セルラーゼを添加したものをを用い、0.5 M マンニトール-5 mM HEPES-25 mM MgCl₂-50 % NSW を含む高張液中で、15 °C、3~5 時間の酵素処理が至適と考えられ、この手法でマコンブ芽胞体 1 g 当り 8.0 x 10⁶ cells のプロトプラストが得られ、これらの生存率は 97.7 % と高かった。細菌由来のアルギン酸リアーゼ用い、褐藻からプロトプラストを作出した報告例は少なく、本研究が細菌由来のアルギン酸リアーゼを唯一のアルギン酸分解酵素源として用い、効果的に褐藻類 *Laminaria* 属のプロトプラストを作出した初めての報告例である。海産動物資源の有限性やその酵素活性の季節変動を考えると、常に必要に応じて調製できる細菌のアルギン酸分解酵素がマコンブ芽胞体のプロトプラスト化に利用可能であったことは、学術的にも産業的にも非常に意義のあるものとする。なお、アワビアルギン酸リアーゼは polyM 特異的リアーゼとして知られているが、H-4 株アルギン酸リアーゼと同一条件下ではプロトプラストの単離が認められなかった。アワビアルギン酸リアーゼと細菌由来の polyG 特異的リアーゼを組み合わせることでより効果的にプロトプラストが作出できるとの報告がなされているが (Butler et., 1989)、H-4 株菌体外アルギン酸リアーゼは polyM と polyG いずれに対しても分解性を示すため、単独の使用でも効果的にプロトプラストの作出が可能になったと思われる。

第二節では、マコンブプロトプラストの培養を試みた。得られたプロトプラストは培地の交換頻度を高くした 2 種の培養法(バッチ培養と連続培養)で細胞壁が再生し、細胞分裂をくり返して細胞塊に至った。細胞壁の再生は培養 1~2 日から観察され、バッチ培養では培養 7 日目までに、連続培養では培養 3 日目までに全ての細胞で細胞壁が再生した。さらに、培養 15 日以降には活発に細胞分裂を行って細胞塊に至り、培養 30 日で葉体様形態に至ったものが観察された。しかしながら、バッチ培養では細菌・原生動物の増殖等により、これ以上の期間培養を継続することが困難であったが、連続培養では再生した葉体様組織をフラスコに移し培養の継続ができた。その結果、培養 3 ヶ月で芽胞体様の形態に再生した個体が認められ、培養 4 ヶ月で藻体長が 3 cm に達し、再生した個体には網目構造の粘液腔道がすでに形成されていた。本研究がマコンブプロトプラストから芽胞体様の形態にまで再生した初めての報告例である。種々の大型海藻の細胞レベルでの研究が進展しているこ

とから、本研究成果が多くの面で有効に活用されることを期待する。

以上、本研究で明らかになった知見を要約すると、*Alteromonas* 属の新種と考えられる H-4 株は菌体内外にアルギン酸分解酵素を産生し、各々の酵素の基質特異性が異なっていた。菌体外酵素は Alg-Na, polyM, polyG および MG random いずれの基質にも分解性を示し、菌体内酵素は polyM と MG random にのみ分解性を示した。海藻のプロトプラスト化へ利用するために、多くの基質を分解できる菌体外酵素の精製を行った。精製菌体外アルギン酸分解酵素は海水環境下に良く適応した酵素であり、アルギン酸分子の polyM と polyG の両ブロックを分解する単一の酵素タンパク質であり、また、本酵素は EC[4.2.2.3] に属するアルギン酸リアーゼであることが明らかとなった。さらに、本酵素を利用して、マコンブ芽胞体から生存性の高いプロトプラストの作出のみならず、得られたプロトプラストから芽胞体への再生に成功し、H-4 株の産生するアルギン酸リアーゼが褐藻類からプロトプラストを効果的に作出できる新たなアルギン酸分解酵素であることが示された。

今後、*Alteromonas* sp. H-4 株の菌体内に見いだされたアルギン酸分解酵素の性状および作用機序を明らかにし、本研究で明らかとなった菌体外酵素との関連性を調べ、またそれぞれのアルギン酸分解酵素遺伝子群の解析を進め、H-4 株におけるアルギン酸分解代謝並びに、その制御機構についても研究を進める必要があると考えている。さらに、全ての生長段階の藻体から短時間にプロトプラストの作出が可能な条件を確立するとともに、無菌のプロトプラストを作出し、マコンブの無菌実験系を確立して、これを、マコンブ細胞と微生物との相互作用を含めた、発育および分化促進因子の探索へ利用したいと考える。

謝 辞

稿を終えるに当り、終始御懇篤なる御指導と御鞭達を賜り、厳密なる御校閲を頂いた北海道大学水産学部微生物学講座 絵面良男教授および木村喬久北大名誉教授に深甚なる謝意を表す。さらに本研究遂行上、適切な助言と御指導を頂いた北海道大学水産学部食品製造学講座 信濃晴雄教授、植物学講座 山本弘敏教授、微生物学講座 田島研一助教授ならびに吉水守助教授に心から感謝申し上げます。

また、本研究の遂行に当り種々御協力頂いた渡島東部地区水産技術普及指導所の各位ならびに尾札部、臼尻、鹿部各コンブ採苗場の各位に謝意を表す。さらに、本研究遂行中、有益な御助言と御指導を頂いた辻野勇北大名誉教授、東海大学嵯峨直恒教授ならびに北海道大学大学院工学研究科 木下晋一教授に感謝申し上げます。

また、御助言と御協力を頂いた、村上久美子事務官および微生物学講座諸兄に感謝の意を表す。

参考文献

- Akagawa-Matsushita, M., M.Matsuo, Y.Koga, K.Yamasato (1992). *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, **42**, 621-627.
- Akagawa-Matsushita, M., Y.Koga, K.Yamasato (1993). DNA relatedness among nonpigmented species of *Alteromonas* and synonymy of *Alteromonas haloplanktis* (ZoBell and Upham 1944) Reichelt and Baumann 1973 and *Alteromonas tetraodonis* Simidu et al. 1990. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, **43**, 500-503.
- 荒木利芳・青木恭彦・北御門学(1987): スサビノリ野生株とアサクサノリ緑色変異株からのプロトプラストの作出と再生. 日水誌., 53:1623-1627.
- Ando, Y., and K.Inoue(1961): Decomposition of alginic acid by microorganisms-IV. On the vibriotype bacteria, newly isolated from the decaying *Laminaria*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **27**: 339-341.
- Baron, A.J., T.Y.Wong, S.J.Hicks, P.Gacesa, D.Willcock and M.J.McPherson(1994): Alginate lyase from *Klebsiella pneumoniae*, subsp. *aerogenes*: gene cloning, sequence analysis and high-level production in *Escherichia coli*. *Gene*, **143**:61-66.
- Baumann, P., M.J.Gauthier, and L.Baumann(1984) Genus *Alteromonas* Baumann, Baumann, Mandel and Allen 1972, 418.^{AL} In "Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1, (eds.) N.R.Krieg and J.G.Holt." pp 343-352. Williams and Wilkins, Baltimore,
- Bayer, S.A., S.Park, .M.C.Ramos, C.C.Nast, F.Eftekhar and N.L.Schiller(1992):Effect of alginate on the natural history and antibiotic therapy of experimental endocarditis caused by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect.Immun.*, **60**:3979-3985.
- Bearden, J.C., Jr.(1978): Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay. *Biochemica et Biophysica Acta.*, **533**: 525-529.
- Boyen, C., B.Kloareg, M.Polene-Fuller and A.Gibor(1990a): Preparation of alginate lyases from marine molluscs for protoplast isolation in brown algae. *Phycologia*, **29**: 173-181.
- Boyen, C., Y.Bertheau, T.Barbeyron and B.Kloareg(1990b): Preparation of guluronate lyase from *Pseudomonas alginovora* for protoplast isolation in *Laminaria*. *Enzyme Microb.Technol.*, **12**:885-890.
- Boyd, J., and J.R.Turvey(1977): Isolation of a poly- α -L-guluronate lyase from *Klebsiella aerogenes*. *Carbohydr.Res.*, **57**: 163-171.
- Boyd, J., and J.R.Turvey(1978): Structural studies of alginic acid, using a bacterial poly- α -L-guluronate lyase. *Carbohydr. Res.*, **66**: 187-194.
- Butler, D.M., K.Østgaard, C.Boyen, L.V.Evans, A.Jensen and B.Kloareg (1989): Isolation condition for high yields of protoplasts from *Laminaria saccharina* and *L.digitata* (Phaeophyceae). *J. Experimental Botany*, **40**: 1237-1246.

- Caswell, R.C., P.Gacesa, A.J.Weightman (1986). Detection of alginate lyase by isoelectric focusing and activity staining. *Int.J.Biol.Macromol.*, **8**, 337-341.
- Chapman, V.J. and D.J.Chapman(1980): Seaweeds and their uses. pp.194-278. Chapman and Hall, New York.
- Chapman, A.R.O.(1981): 体の構造.海藻の生物学(千原光雄訳). pp.53-71.共立出版社.
- Chen, L.C.-M., and A.R.A.Taylor(1978): Medullary tissue culture of the red alga *Chondrus crispus*. *Can. J. Bot.*, **56**: 883-886.
- Cheny, D.P.(1984): Genetic modification in seaweeds: applications to commercial utilization and cultivation. In "Biotechnology in the marine sciences.(eds.) R.R. Colwell, E.R.Parister and A.J.Sinskey." pp.161-175. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Cheny, D.P., E.Mar, N.Saga and J.van der Meer(1986): Protoplast isolation and cell division in the agar-producing seaweed *Gracilaria*(Rhodophyta). *J. Phycol.*, **22**: 238-243.
- Cocking, E.C.(1972): Plant cell protoplasts-isolation and development. *Ann.Rev. Plant Physiol.*, **23**:29-50.
- Cote, G.L. and L.H. Krull(1988): Characterization of the exocellular polysaccharides from *Azotobacter chroococcum*. *Carbohyd.Res.*, **181**:143-152.
- Davidson, I.W., I.W.Sutherland and C.J.Lawson(1976): Purification and properties of an alginate lyase from a marine bacterium. *Biochem. J.*, **159**:707-713.
- Doubet, R.S., and R.S.Quatrano(1982): Isolation of marine bacteria capable of producing specific lyases for alginate degradation. *Appl.Environ. Microbiol.*, **44**: 754-756.
- Doubet, R.S., and R.S.Quatrano(1984): Properties of alginate lyase from marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**:699-703.
- Dubois, M., K.A.Gilles, J.K.Hamilton, P.A.Rebers and F.Smith(1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *J.Anal.Chem.*, **28**, 350-356.
- Ducieux, G., and B.Kloareg (1988): Plant regeneration from protoplasts of *Sphacelaria* (Phaeophyceae). *Planta*, **174**:25-29.
- Elyakova, L.A., and V.V.Favorov(1974): Isolation and certain properties of alginate lyase VI from the mollusk *Littorina* sp. *Biochemica et Biophysica Acta.*, **358**: 341-354.
- Eppley, R.W. and R.Lasker(1959):Alginase in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*, **129**: 214-215.
- Evans, L.R. and A.Linker(1973): Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* .*J.Bacteriol.*, **116**:915-924.

Ezaki, T., Y.Hashimoto, E.Yabuuchi (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, **39**:224-229.

絵面良男(1986): 冷水海域に生息する細菌の産生する生理活性物質に関する研究. バイオテクノロジー先端技術シーズ培養研究、昭和 60年度成果報告書. 農林水産技術会議事務局., 149-157.

絵面良男・山本啓之・木村喬久(1988): 促成マコンブ種苗糸赤変原因菌の分離. 日水誌., **54**: 665-672.

絵面良男(1990): 細菌相に関する調査. 沿岸環境調査マニュアル II (水質・微生物編). pp. 357-364. 恒星社厚生閣, 東京.

Franklin, M.J., C.E.Chitnis, P.Gacesa, A.Sonesson, D.C.White and D.E.Ohman(1994): *Pseudomonas aeruginosa* AlgG is a polymer level alginate C5-mannuronan epimerase. *J.Bacteriol.*, **176**:1821-1830.

Fisher, D.D., and A.Gibor(1987): Production of protoplasts from the brown algae, *Sargassum muticum*(Yendo) Fensholt(Phaeophyta). *Phycologia*, **26**:488-495.

藤田雄二・右田清治(1985): 数種海藻からのプロトプラストの分離と培養. 長大水研報., **57**: 39-45.

福井作蔵(1969).還元糖の定量法. pp.7-80. 学会出版センター, 東京

Gacesa, P.(1987): Alginate-modifying enzymes -a proposed unified mechanism of action for the lyases and epimerases-. *FEBS Letters*, **212**:199-202.

Gacesa, P.(1992): Enzymic degradation of alginates. *Int.J.Biochem.*, **24**:545-552.

長谷川由雄(1959): 北海道沿岸産有用コンブ族植物の分布. 北水試月報., **16**: 201-206.

Galbraith, D.W.(1981): Microfluorimetric quantitation of cellulose biosynthesis by plant protoplasts using Calcofluor white. *Physiol.Plant.*, **53**: 111-116.

Grasdalen, H., B.Larsen and O.Smidsrød(1979) A P.M.R. study of the composition and sequence of uronate residues in alginates. *Carbohydr. Res.*, **68**: 23-31.

Hansen, J.B., R.S.Doubet and J.Ram(1984): Alginase enzyme production by *Bacillus circulans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**:704-709.

Haug, A., B.Larsen and O.Smidsrød (1966): A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. *Acta Chem. Scand.*, **20**: 183-190.

Haug, A., B.Larsen and O.Smidsrød(1967): Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta Chem. Scand.*, **21**:691-704.

Haugen, F., F.Kortner and B.Larsen(1990): Kinetics and specificity of alginate lyase: part I, a case study. *Carbohydr.Res.*, **198**: 101-109.

Hidaka, T., and M.Sakai(1968):Comparative observation of inorganic salt requirement of the marine and terrestrial bacteria. In “Proceeding of U.S. and Japan seminar on marine microbiology (eds.)H.Kadota and N.Taga.” pp. 125-149. *Bull.Misaki Mar.Biol.Inst.Kyoto Univ.* No.12.

Hisano, T., M.Nishimura, T.Yamashita, T.Imanaka, T.Muramatsu, A.Kimura and K.Murata(1994): A simple method for determination of substrate specificity of alginate lyases. *J.Ferment.Bioeng.*, **78**:182-184.

Hisano, T., Y.Yonemoto, T.Yamashita, Y.Fukuda, A.Kimura and K.Murata(1995): 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.

Holt, J.G., N.R.Krieg, P.H.A.Sneath, J.T.Staley and S.T.Williams(1994) Gram-negative aerobic/ microaerophilic rods and cocci. In “Bergey’s manual of determinative microbiology, 9 th edition.” pp.71-174. Williams and Wilkins, Baltimore.

医科学研究所学友会(1976): 細菌学実習提要. 医科学研究所学友会編. pp.58-158. 丸善, 東京

井上勝弘・安藤芳明(1956): 微生物によるアルギン酸の分解 (第一報). 農芸化学雑誌., **30**:742-746.

Kajiwara, T., A.Hatanaka, T.Fujimura, T.Kawai and M.Irie(1988): Isolation of protoplasts from marine brown algae *Dictyotaceae* plants. *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.*, **54**:1255.

Kashiwabara, Y., H.Suzuki and K.Nisizawa(1969): Alginate lyase of pseudomonads. *J.Biochem.*, **66**:503-512.

川島昭ニ(1993): 日本産コンブ類図鑑. pp.17-28. 北日本海洋センター, 札幌.

一島英治(1975): 22.純度検定.“生化学講座 5. 酵素研究法.日本生化学会 編.” pp.337-385. 東京化学同人, 東京.

Kennedy, L., K.McDowell and I.W.Sutherland(1992):Alginases from *Azotobacter* species. *J.Gen.Microbiol.*, **138**:2465-2471.

木村喬久・絵面良男・田島研一 (1976). ワカメあなあき症の発生機構に関する研究.気仙沼におけるワカメあなあき症ならびにワカメ養殖環境の微生物学的検討. 東北水研報, **36**, 57-65.

Kinoshita, S., Y.Kumoi, A.Ohshima, T.Yoshida and N.Kasai(1991): Isolation of an alginate-degrading organisms and purification of its alginate lyase. *J.Ferment.Bioeng.*, **72**:74-78.

北御門学・曾照皇・青木恭彦・山口邦子・荒木利芳(1989): 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., **55**: 709-713.

Kitamikado, M., C.-H.Tseng, K.Yamaguchi and T.Nakamura(1992): Two types of bacterial alginate lyases. *Appl.Environ.Microbiol.*, **58**:2474-2478.

北御門学,西村光弘,山口邦子,曾照煌(1993):アルギン酸から酵素分解によって調製したオリゴ糖の静菌作用.日水誌.,**59**:315-320.

鬼頭釣・国本正彦(1993): アマノリフリー糸状体の無菌化について. 平成5年度日本水産学会秋季大会講演要旨集. pp.295.

Kloareg, B., and R.S.Quatrano(1987): Isolation of protoplasts from zygotes of *Fucus Ditichus* (L.) Powell (Phaeophyta). *Plant Science*, **50**: 189-194.

Kloareg, B., and R.S.Quatrano(1988): Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr.Mar.Biol.Annu Rev.*, **26**: 259-315.

Kloareg, B., M.Polne-Fuller and A.Gibor(1989): Mass production of viable protoplasts from *Macrocystis pyrifera*(L.)C.Ag.(Phaeophyta). *Plant Science*, **62**:105-112.

Kübler et al.(1994): Transient expression of the GUS reporter gene in protoplasts of *Porphyra miniata* (Rhodophyta). *J.Mar.Biotech.*, **1**: 165-169.

Laemmli,U.K.(1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.

Lange, B., J.Wingender and U.K.Winkler (1989): Isolation and characterization of an alginate lyase from *Klebsiella aerogenes*. *Arch.Microbiol.*, **152**:302-308.

LeGendre, N., and P.Matsudaira (1992).SDS-PAGEによるタンパク質とペプチドの精製. マイクロシークエンスのための微量タンパク質精製法. ポール・マツダイラ編. pp.53-70.羊土社. 東京.

Leifson, E.(1963): Determination of carbohydrate metabolism of marine bacteria. *J.Bacteriol.*, **82**: 33-36.

Linker, A., and L.R.Evans(1984): Isolation and characterization of an alginase from mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.*, **159**:958-964.

Madgwick, J., A.Haug and B.Larsen(1973): Alginate lyase in the brown alga *Laminaria digitata* (Huds.) Lamour. *Acta. Chemica. Scand.*, **27**:711-712.

Maki, H., A.Mori, K.Fujiyama and S.Kinoshita (1993): Cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of a gene encoding an alginate lyase from *Pseudomonas* sp. OS-ALG-9.*J.Gen.Microbiol.*, **139**:987-993.

Malissard, M., C.Duez, M.Guinand, M.-J.Vacheron, G.Michel, N.Marty, B.Joris, I.Thamm and J.-M.Ghuysen(1993): Sequence of a gene encoding a (poly ManA) alginate lyase active on *Pseudomonas aeruginosa* alginate. *FEMS Microbiol. Lett.*, **110**: 101-106.

Martin, D.F.(1970): Physical and chemical properties of sea water. In "Marine chemistry vol.2." pp.1-39. Marcel Dekker, Inc.

Marmur, J. (1961): A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J.Mol.Biol.*,**3**:208-218.

Marmur, J. and P.Doty(1962): Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J.Mol.Biol.*, **5**: 109-118.

Meinkoth, J. and G.Wahl(1984). Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal.Biochem.*, **138**: 267-284

Millner, P.A., M.E.Callow and L.V.Evans(1979): Preparation of protoplasts from the green alga *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. *Planta*, **147**:174-177.

Min, K.H., S.F.Sasaki, Y.Kashiwabara, M.Umekawa and K.Nishizawa (1977): Fine structure of SMG alginate fragment in the light of its degradation by alginate lyases of *Pseudomonas* sp. *J. Biochem.*, **81**:555-562.

宮崎香・長島嘉信・斉藤拓(1982): SDS ゲルディスク電気泳動およびゲルスラブ電気泳動法. "蛋白質・酵素の基礎実験法. 堀尾・山下編." pp.314-333. 南江堂, 東京

Muramatsu, T., S.Hirose and M.Katayose(1977): Isolation and properties of alginate lyase from the mid-gut gland of wreath shell *Turbo cornutus*. *Agric.Biol.Chem.*, **41**: 1939-1946.

Murata, K.(1994): Bacterial alginate lyase: enzymatic and genetic aspects of the lyase and its application to agricultural, food, and pharmaceutical processes. *Comments Agric. Food Chem.*, **3**: 87-110.

Nakada, H.I., and P.C.Sweeny(1967):Alginic acid degradation by eliminases from abalone hepatopancreas. *J. Biol. Chem.*, **242**:845-851.

Nakazawa, S., K.Takamura and M.Abe(1969):Rhizoid differentiation in *Fucus* Eggs labeled with Calcofluor White and birefringence of cell wall. *Bot.Mag.Tokyo.*, **82**: 41-44.

Natsume, M., Y.Kamo, M.Hirayama and T.Adachi(1994): Isolation and characterization of alginate-derived oligosaccharides with root growth-promoting activities. *Carbohyd.Res.*, **258**:187-197.

Nishizawa, K., S.Fujibayashi and Y.Kashiwabara(1968): Alginate lyase in the hepatopancreas of a marine mollusc, *Dolabella auricula* Solander. *J.Biochem.*, **64**:25-37.

西澤一俊(1985): 海藻の化学とその利用. 7.アルギン酸を巡る諸酵素. (株)富士経済付属阿部研究所報告, **3**:1-10.

Olempska-Bier, Z.S., P.M.Kuznesof, M.DiNovi and M.J.Smith(1993): Plant biotechnology and food safety. *Food Sci.*,**47**(12), 64-72.

Oppenheimer, C.H., and C.E.ZoBell (1952). The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *J.Mar.Res.*,**11**:10-18.

- Osman, S.F., W.F.Fett and M.L.Fishman(1986): Exopolysaccharides of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J.Bacteriol.*, **166**:66-71.
- Østgaard, K., S.H.Knutsen, N.Dyrset and I.M.Aasen(1993): Production and characterization of guluronate lyase from *Klebsiella pneumoniae* for applications in seaweed biotechnology. *Enzyme Microb.Technol.*, **15**:756-763.
- Ostle, A.G. and J.G.Holt(1982): Nile blue A as fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate. *Appl.Environ.Microbiol.*, **44**:238-241.
- Penman, A., and G.R.Sanderson(1972) A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. *Carbohyd. Res.*, **25**: 273-282.
- Percival, E., and R.H.McDowell(1981): Algal walls-composition and biosynthesis. In "Encyclopedia of plant physiology. Vol.13B, (eds.) W.Tanner and F.A.Loewus." pp.277-316. Springer-Verlag, Berlin.
- Pinchetti, J.L.G., M.Bjrök, M.Pedersén and G.G.Reina(1993): Factors affecting protoplast yield of the carrageenophyte *Solieria filiformis* (Gigartinales, Rhodophyta). *Plant Cell Rep.*, **12**:541-545.
- Preiss, J., and G.Ashwell(1962): Alginic acid metabolism in bacteria-I. *J.Biol.Chem.*, **237**: 309-316.
- Preston, J.F.III., T. Romeo, J.C.Bromly, P.W.Robinson and H.C.Aldrich (1985a): Alginate lyase-secreting bacteria associated with the algal genus *Sargassum*. *Dev. Ind. Microbiol.*, **26**:727-740.
- Preston, J.F.III., T.Romeo, A.Gibor and M.Polne-Fuller(1985b): Investigation of *Sargassum* species for bioconversion to methane: mannitol levels, temperature requirements, and protoplast formation. *Proc. Int. Gas. Res. Conf.*, **1984**: 567-579.
- Romeo, T., J.C.Bromley and J.F.Preston III (1986): Alginate lyase of varying substrate specificities from marine bacteria. In "Biomass energy development ed. W.H.Smith." pp.303-320. Plenum Press, New York.
- Romeo, T., and J.F.Preston III(1986): Purification and structural properties of an extracellular (1-4)- β -D-mannuronan-specific alginate lyase from a marine bacterium. *J. Biochem.*, **25**:8385-8391.
- Saga, N., T.Uchida and Y.Sakai(1978): Clone *Laminaria* from single isolated cell. *Bull.Jap.Soc.Sci. Fish.*, **44**:87.
- Saga, N., and Y.Sakai(1984): Isolation of protoplasts from *Laminaria* and *Porphyra*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **50**:1085.
- Saga, N., M.Polne-Fuller and A.Gibor(1986):Protoplasts from seaweeds :production and fusion. *Beihefte Zur Nova Hedwigia.*, **83**: 37-43.
- 嗟峨直恒・A.Gibor(1986): 藻類の無菌培養. 植物バイオテクノロジー.山田・岡田編. pp.55-71. 東京化学同人.

- Saga, N and Y.Sanbonsuga(1988): Tissue culture and genetic engineering for seaweed aquaculture. NOAA Tech.Rep. "In News and innovative advances in biology/engineering with potential for use in aquaculture. (ed.) A.K.Sparks". pp.47-54. National Marine Fisheries Service, Seattle.
- Saga, N.(1989): Further study on determining cell viability in marine red and brown algae by using staining dyes. *Bull.Hokkaido Reg.Fish.Res.Lab.*, **53**:43-53.
- Saga, N., Y.Ishikawa and Y.Sakanishi(1990): The use of staining-dyes for viability determinations of protoplasts in marine green algae. *Bull. Hokkaido Natl.Fish.Res.Inst.*, **54**: 51-56.
- Sambrook, J., E.F.Fritsh and T.Maniatis(1989): Lysis of bacteria. In "Molecular cloning, 2nd edition, Vol.3. Section18.pp.40-41.." Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Sawabe, T., Y.Ezura and T.Kimura(1992a): Characterization of an alginolytic marine bacterium from decaying Rishiri-kombu *Laminaria japonica* var. *ochotensis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**:141-145.
- Sawabe, T., Y.Ezura and T.Kimura(1992b): Purification and characterization of an alginate lyase from marine *Alteromonas* sp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**:521-527.
- Sawabe, T., Y.Oda, Y.Shiomi and Y.Ezura(1995): Alginate degradation by bacteria isolated from the gut of sea urchins and abalones. *Microb.Ecol.*, **30**. (in press)
- Schiller, N.L., S.R.Monday, C.M.Boyd, N.T.Keen and D.E.Ohman(1993): Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* alginate lyase gene(algL): cloning, sequence, and expression in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.*, **175**:4780-4789.
- Somogyi, M.(1952): Note on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, **195**: 19-23.
- Stevens, R.A., and R.E.Levin (1976): Viscometric assay of bacterial alginase. *Appl.Environ. Microbiol.*, **31**: 896-899.
- Stevens, R.A., and R.E.Levin (1977): Purification and characteristics of an alginase from *Alginovibrio aquatilis*. *Appl.Environ.Microbiol.*, **3**: 1156-1161.
- Sutherland, I.W., and G.A.Keen(1981): Alginases from *Benekea pelagia* and *Pseudomonas* spp. *J. Appl. Biochem.*, **3**:48-57.
- Tokuda, H. and Y.Kawashima(1988): Protoplast isolation and culture of a brown alga, *Undaria pinnatifida*. In " Algal biotechnology. (eds.) T.Stadler, J.Mollison, M.-C.Verdus, Y.Karamanos, H.Morvan and D.Christiaen." pp.151-157. Elsevier Applied Science. England.
- Tseng, C.-H., K.Yamaguchi, M.Nishimura and M.Kitamikado(1992): Alginate lyase from *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**: 2063-2067.
- Tujino, I., and T.Saito(1962): Studies on alginase. Part II. a new unsaturated uronide isolated from alginate hydrolysate. *Agr.Biol.Chem.*, **26**: 115-118.
- 辻野勇・斉藤恒行(1963): アルギナーゼの研究-IV.エゾアワビアルギナーゼの反応条件の検討. 日水誌., **29**: 58-65.

Van Landschoot, A., and J. De Ley (1983). Intra- and intergeneric similarities of the rRNA cistrons of *Alteromonas*, *Marinomonas*(gen. nov.) and some other gram-negative bacteria. *J.Gen.Microbiol.*, **129**: 3057-3074.

Von Riesen, V.L.(1980): Digestion of algin by *Pseudomonas maltophilia* and *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**:92-96.

Wainwright, M., and V.Sherbrock-Cox(1981): Factors influencing alginate degradation by the marine fungi: *Dendryphilla salina* and *D.arenaria*. *Bot.Mar.*, **24**: 489-491.

Wayne,L.G., D.J.Brenner, R.R.Colwell, P.A.D.Grimont, O.Kandler, M.I.Krichevsky, L.H.Moore, W.E.C.Moore, R.G.E.Murray, E.Stackebrandt, M.P.Starr, H.G.Trüper (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, **37**, 463-464.

West, M., N.M.Burdash and F.Freimuth(1977): Simplified silver plating stain for flagella. *J.Clin.Microbiol.*, **6**:414-419.

Whitaker, J.R.(1983): Microbial pectolytic enzymes. In *Microbial enzymes and biotechnology*, 2nd edition, (eds.)W.M.Fogarty and C.T.Kelly. pp.133-176. Elsevier Applied Science, England.

Williams, A.K., and R.G.Eagon(1962): Studies on the alginase of *Agarbacterium alginicum*. *Can.J. Microbiol.*, **8**: 649-654.

Wood (1985) 組織培養による植物病理学研究－ウイルス、植物細胞・組織培養の実際。R.A.Dixon 編。(遠山益・久世洋子訳)。pp 235-261..丸善, 東京

山田毅史(1990): マコンブ種苗糸赤変原因菌 *Alteromonas* sp.の産生する溶菌酵素に関する研究。北海道大学修士論文。pp.59-65.

Yonemoto, Y., K.Murata, A.Kimura, H.Yamaguchi and K.Okayama(1991):Bacterial alginate lyase: characterization of alginate lyase-producing bacteria and purification of the enzyme. *J.Ferment.Bioeng.*, **72**:152-157.

Yumoto, I., Y.Ezura and T.Kimura (1989): Distribution of the *Alteromonas* sp., the causative agent of red-spot on the culture bed of Makonbu *Laminaria japonica*, in the coastal area of Funka Bay. *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.*, **55**: 453-462.