海洋環境からのアルギン酸リアーゼ生産放線菌の分離とリアーゼの精製

今田千秋,* 阪田圭, 寺原猛, 小林武志

(2013年9月7日受付, 2014年2月13日受理)

東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科

Isolation of alginate lyase-producing actinomycetes from the marine environment
and purification of lyase

CHIAKI IMADA,* KEI SAKATA, TAKESHI TERAHARA AND TAKESHI KOBAYASHI

Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, Minato,
Tokyo 108-8477, Japan

A total of 605 actinomycetes were isolated from marine and terrestrial sediments of various Japanese coastal areas using several isolation media. The largest number of alginate lyase (A.L.)-producing strains were isolated from marine sediment samples collected in Otsuchi Bay in Iwate Prefecture. The activities of 18 A.L.-producing strains were measured using liquid culture media and were identified by 16S rDNA sequencing analysis. Among the 18 strains, one species belonging to the genus of *Micromonospora* (named as strain OB40608, isolated from Otsuchi Bay at a depth of 100 m) showed high A.L. activity and has never been reported as an A.L. producer, therefore it was selected for further study. A.L. was purified from culture supernatant of strain OB40608 by ammonium sulfate precipitation, cation exchange chromatography (Cellufine C-500 m) and gel filtration chromatography (Sephacryl S-200 HR). The final preparation showed a single band on polyacryl amide gel electrophoresis. The molecular weight of purified A.L. was 114 kDa, and the optimum temperature and pH were 50°C and pH 7.0, respectively.

キーワード: *Micromonospora*, アルギン酸リアーゼ, 海洋, 放線菌

微生物の生産する微生物酵素は種類と供給の面で他の動植物起源のものと比べて圧倒的に有利であることから, 現在産業へ応用されている酵素の大部分は微生物起源である。¹⁾ 利用分野の拡大に伴う酵素供給源として有用な微生物の探索, 育成と培養および酵素の単離・精製の両面における工業生産技術の開発は今後の重要な課題である。アルギン酸リアーゼ (A.L.) は, β -脱離反応によってアルギン酸のグリコシド結合を切断し, 非還元末端に二重結合を持つ不飽和オリゴ糖を生成する酵素である。このアルギン酸は, 海洋環境に多く存在しているコンブやワカメなどの褐藻類の細胞間物質の主成分である。コンブ類を希薄なアルカリ溶液で処理して得た粘稠な水溶液を濾過し, 濾液に酸を添加した時に生じる析出物はアルギン酸 (alginic acid) と命名された。このアルギン酸は褐藻類特有のものではなく, *Pseudomonas aeruginosa* などの細菌からも単離されている。アルギン

酸は β -D-マンヌロン酸 (M) とその C5 エピマーである α -L-グルロン酸 (G) から構成されるポリウロニド多糖類で, MM, MG, GG 領域がランダムに並んだ著しく不均一な化学構造の多糖類である。アルギン酸は海洋環境において主要な資源であるにも関わらず, それに関連した A.L. の酵素学的研究は, 他の多糖類分解酵素と比較して遅れているといえる。これまで A.L. は褐藻類,²⁾ 海産軟体動物,^{3,4)} グラム陰性細菌,⁵⁻⁷⁾ バクテリオファージ⁸⁾ および真菌⁹⁾ などから単離・精製されている。しかしながら, 陸上生物から分離された A.L. はすべて細菌由来である。^{10,11)} 一方, 放線菌については, *Streptomyces* 属,^{12,13)} *Corynebacterium* 属⁶⁾ からの報告例がみられるが, 他の微生物に比べると, 非常に少ないのが特徴である。海洋環境に存在する放線菌は, *Streptomyces* が分布の大半を占める陸上とは異なり, 他の希少放線菌の占める割合が高いことが知られている。¹⁴⁾ そ

れらの中には海洋という特異な環境に適応した結果, 代謝系がシフトし, 新しい二次代謝産物を生産するようになった菌株も存在している。また, 陸上由来のものと分類学的には同一種であっても塩分存在下においてのみ抗生物質を生産する種や生産する物質が異なることも知られており,^{15,16)} 高塩分, 低温, 高水圧, 貧栄養など陸上とは異なった特殊な環境である海洋から新規酵素を探索することは, 非常に合理的といえるであろう。

そこで本研究では, 海洋環境から A.L. 生産放線菌の探索を行い, 得られた A.L. 生産菌について分類学的性状を明らかにするとともに, A.L. を培養上清中から単離・精製し, その諸性状を調べることを目的とした。

材料と方法

放線菌の分離 東京湾にて7点のサンプリングポイント (35°36'91"N, 139°50'74"E; 35°39'93"N, 139°50'95"E; 35°39'35"N, 139°57'23"E; 35°31'31"N, 139°55'19"E; 35°25'65"N, 139°52'11"E; 35°31'37"N, 139°48'34"E; 35°31'48"N, 139°47'01"E), 岩手県大槌湾にて10点 (39°20'43"N, 141°55'68"E; 39°20'55"N, 141°56'76"E; 39°20'79"N, 141°57'70"E; 39°21'36"N, 141°58'74"E; 39°21'81"N, 141°59'60"E; 39°21'98"N, 142°00'78"E; 39°22'97"N, 142°00'35"E; 39°21'20"N, 141°56'23"E; 39°21'20"N, 141°56'43"E; 39°20'20"N, 141°54'02"E), 鹿児島湾にて1点 (31°24'16"N, 130°27'18"E) からスミス-マッキンタイア式採泥器を用いて海底堆積物を採取した。海底堆積物と比較のために, 東京海洋大学品川キャンパス (35°62'69"N, 139°74'76"E) および岩手県上閉伊郡大槌町の山林から陸土壤 (腐葉土) (39°21'25"N, 141°56'55"E) 各1点を採集し, 放線菌の分離を行った。本研究では放線菌分離用培地^{17,18)}として, ISP-2 培地, ISP-4 培地および HV 培地を使用し, これらの培地に終濃度 50 µg/mL Cycloheximide および 20 µg/mL Nalidixic acid を添加した。採集した各々のサンプル 0.1 g を生理食塩水で適宜希釈した後, 分離培地上にその 0.1 mL を塗抹し, 27°C または 50°C で2週間培養した。培養後, 肉眼的にコロニーを観察し, 放線菌種と思われる形状のコロニーを釣菌した。

A.L. 生産菌の探索 (一次スクリーニング) 得られた分離株を, 0.5% ポリペプトン (日本製薬), 0.1% 酵母エキス (Difco), 0.01% FePO₄ および 0.5% アルギン酸ナトリウムを添加した液体培地に植菌し, 27°C または 50°C で2週間培養した。培養後, 培地上に 70% エタノールを添加してしばらく放置後, コロニーの周囲に形成されたアルギン酸分解に基づく透明のハローの有無から, アルギン酸分解能を調べた。¹⁹⁾

A.L. 生産菌の活性測定 (二次スクリーニング) 一次スクリーニングでハローが形成されたアルギン酸分解菌

を前述の液体培地に植菌した後, 27°C において3日間回転振とう培養 (160 rpm) を行った。培養後, 培養液を遠心分離 (17,700×g, 4°C, 10 分間) して, その上清を得た。この上清 50 µL に 50 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.0) 450 µL を加えた後, 30°C で10分間反応させた。反応後, リアゼの作用により生じた不飽和ウロン酸量を紫外外部吸収法 (235 nm)^{20,21)} により計測して, A.L. 活性を求めた。

なお, 本研究において1分間に 235 nm における吸光度を 0.1 増加させる A.L. 酵素量を 1 unit と定義した。

有望株の 16S rDNA の塩基配列解析 二次スクリーニングで活性が確認された18株について, 16S rDNA 塩基配列に基づく系統解析を行った。これらの株を前述の A.L. 生産菌の探索 (一次スクリーニング) で用いた液体培地に植菌した後, 27°C において3日間振とう培養 (160 rpm) を行った。培養後, 培養液を遠心分離 (17,700×g, 4°C, 10 分間) して, 集めた菌体を滅菌 MilliQ 水でよく水洗した。この操作を2回繰り返した後, 0.6 mL の 1×TE バッファーに菌体を懸濁し, DNA 抽出用サンプルとした。スクリュージュにこの全量を移し, ガラスビーズ (φ 0.1 mm) 約 1 g を加えた後, 1×TE バッファー 0.6 mL, Lysozyme (Wako, 5 mg/mL) 20 µL を加え, 時々攪拌しながら 37°C で1時間保温した。これに Proteinase K 溶液 (Invitrogen, 20 mg/mL) 3 µL および 10% SDS 30 µL をそれぞれ加えてよく攪拌した後, 再度 37°C で時々攪拌しながらさらに1時間保温した。

保温後, チューブに PCI 0.6 mL を加え, ビーズを用いて菌体を破碎後 (Tomy, Micro smash MS-100HR, 290×g, 4°C, 15 秒間), 2% CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) 溶液 100 µL を添加し, 5分間振とうした。これを 65°C で10分間インキュベートした後, 遠心分離 (20,300×g, 15 分間, 4°C), 得られた上清に CIA (chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1) 溶液 0.6 mL および 10% SDS 溶液 30 µL を加えて激しく振とうした。その後, 遠心分離 (20,300×g, 5 分間, 4°C) により上清を再度分取した。この上清を 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 60 µL およびイソプロピルアルコール 0.6 mL を用いてイソプロパノール沈殿処理後, 得られた DNA を滅菌水 100 µL に溶解した。これを鋳型として 16S rRNA 遺伝子をターゲットとして PCR 反応を行った。反応液の組成はポリメラーゼ含有 2×Go Taq® Green Master Mix (Promega. Co.) 12.5 µL および 5 µM プライマー各 1 µL, 鋳型 DNA 2 µL, 滅菌水 8.5 µL とした。なお, プライマーは細菌のユニバーサルプライマーである 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') と 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') を用いた。サーマルサイクラー (TaKaRa Bio Inc., Dice

mini TP 100)を用いて、反応液を94℃で5分間加熱後、94℃1分間・60℃2分30秒間・72℃2分30秒間を30サイクル繰り返し、最後に72℃で7分間の伸長反応を行った。得られたPCR産物は1.2%アガロースゲル電気泳動で確認後、Promega製のキット(Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System)を用いて精製した。続いて、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)のプロトコールに準じてサイクルシーケンシング反応を行い、反応物を精製した。なお、サイクルシーケンシング反応のプライマーには27Fと1492Rをそれぞれ用いた。シーケンサー(Applied Biosystems 3130xl, ジェネティックアナライザ3130xl-100)を用いて塩基配列を解読後、得られた塩基配列をデータ処理ソフトGenetyx Ver. 7で解析し、DNA Data Bank of Japan (DDBJ)のBLAST検索を用いてデータベースと照合して有望株の近縁種を特定した。

A.L. 高活性保有株と標準菌株の培養性状および生理・生化学的性状試験 選抜されたA.L. 高活性保有株 *Micromonospora* sp. OB40608 株と高い相同性を示した *M. aurantiaca* NBRC 16155T^{22,23} *M. lupini* NBRC 106141T²⁴ および *M. chokoriensis* NBRC 106472T²⁵ をNBRC (Biological Resource Center, NITE) から入手して、本菌と並行実験を行い、その生理・生化学的性状を比較した。

なお、特に断りがない限り、培養試験は27℃で2週間行い、温度別生育試験のみ各温度で2週間培養を行った。

培養性状 OB40608 株および標準株3株をISP-2 培地、ISP-3 培地、ISP-4 培地、ISP-5 培地、ISP-6 培地、ISP-7 培地、glucose-asparagine 培地 および sucrose-nitrate 培地に植菌し培養後、培地上における放線菌の生育を肉眼的に観察した。また、アルギン酸の分解は前述の一次スクリーニングと同様の方法で調べた。

生育 NaCl 濃度、生育温度および pH 0-7% NaCl を添加したISP-4 培地を調製し、OB40608 株および標準株3株を培養後、培地上の生育の有無から耐塩性を判定した。生育温度はISP-4 培地にこれらの4株を植菌し15-50℃で培養後、培地上の生育の有無から判定した。生育 pH は5-10 に調整した nutrient 液体培地に供試菌を植菌し培養後、培地中の生育の有無から判定した。

炭素源の資化性試験 炭素源の資化性試験はあらかじめオートクレーブ滅菌したSAP II 培地²⁶⁾に、以下に示す炭素源を濾過滅菌して終濃度1%になるように培地に添加し、これに供試菌を植菌後、培養を行った。本実験に用いた炭素源は、D-glucose, L-arabinose, sucrose, D-xylose, meso-inositol, D-mannitol, D-fructose, L-rhamnose および D-raffinose の9種類である。なお、炭素源資化性の有無の判定はD-glucose を基準としてこ

れと同等の生育を示したものを陽性、また無添加のものと同等程度の生育しか示さなかったものを陰性と判定した。

A.L. の培養上清からの単離・精製 1/4 強度の人工海水に0.5% アルギン酸ナトリウムおよび0.5% ファルマメディア(綿実粉, Southern Cotton Oil Company, USA)を添加して培地(20 mL, pH 6.0)を作成し、バッフル付100 mL 容三角フラスコに入れたのち、本菌を接種して27℃において3日間回転振とう培養を行った。得られた培養液を種菌として、バッフル付3 L 容三角フラスコ中の同一組成培地(600 mL)に接種した後、1週間回転振とう培養を行った。培養後、遠心分離(10,000×g, 4℃, 20分間)を行った上清を-20℃で保存し、以下の実験に供した。

培養上清を解凍後、飽和濃度の95%まで(NH₄)₂SO₄を添加した後、4℃にて一昼夜攪拌放置した。これを遠心分離(10,000×g, 4℃, 20分間)し、得られた沈殿物を50 mM Tris-HCl バッファー(pH 7.0)に溶解後、透析膜(ヴィスキングチューブ, φ28.6 mm, 日本メディカルサイエンス)に注入し、同一バッファーに対して一昼夜透析を行い、この透析内液を回収した。

これをあらかじめ50 mM 酢酸ナトリウムバッファー(pH 5.0)で平衡化させたCellufine C-500 m カラム(φ2.6×10 cm, 生化学工業)にアプライし、同バッファーと同バッファーに1 M NaClを加えた溶液で直線濃度勾配溶出によってA.L.を溶出させ(流速1.0 mL/min), フラクション(Fr.)を分取した(1 Fr.=5 mL)。分取した各Fr.についてOD₂₈₀を測定するとともに、A.L. 活性および塩分濃度計(Horiba, Compact salt meter)でNaCl濃度を測定した。また、得られた活性Fr.を合一した後、再度A.L. 活性とOD₂₈₀の測定を行った。

この合一Fr.を遠心分離(10,000×g, 4℃, 10分間)した後、限外濾過(Millipore, Nominal molecular weight limit: 5,000)によって5 mLまで濃縮後、50 mM Tris-HCl バッファー(pH 7.0)へのバッファー置換を行った。

この限外濾過濃縮液をあらかじめ50 mM Tris-HCl バッファー(pH 7.0)で平衡化させたSephacryl S-200 HR カラム(φ1.6×90 cm, GE Healthcare Bio-Science)にアプライし、同バッファーで溶出させ(流速0.5 mL/min), Fr. (1 Fr.=5 mL)を分取した。分取した各Fr.についてOD₂₈₀およびA.L. 活性を測定し、得られた活性Fr.を合一し、精製A.L.として以後の実験に用いた。

A.L. のポリアクリルアミドゲル電気泳動(native-PAGE) PAGEは主に「改訂第3版 タンパク質実験ノート 下」²⁷⁾を参考に行った。精製A.L.とPAGEサンプルバッファーを1:4の割合で混合し、これをe・

Table 1 No. of A.L. producing actinomycetes from several marine and terrestrial sediments

Temperature	Marine sediments						Terrestrial soils				Total	
	Tokyo Bay		Otsuchi Bay		Kagoshima Bay		Tokyo Bay		Otsuchi Bay			
	27°C	50°C	27°C	50°C	27°C	50°C	27°C	50°C	27°C	50°C	27°C	50°C
No. of isolates	130	169	168	38	12	24	18	16	18	12	346	259
No. of A.L. producers	3(2.3)*	0	10(6.0)	0	0	0	0	0	5	0	18(5.2)	0

* % of A.L. producers

パジェル ET-10L (ATTO) にアプライして電気泳動 (20 mA, 70 分間) を行った。この泳動バッファーは Tris-Glycine バッファーを用いた。分子量マーカーには HMW Native Marker Kit (GE Healthcare Bio-Science) を用いた。電気泳動後, EZstain Silver (ATTO) を用いてゲルを銀染色し, タンパク質のバンドを確認した。

A.L. の熱安定性試験 精製 A.L. を 10, 20, 30, 40, 50, 60 の各温度で 30 分間インキュベートした後, 急冷した。この A.L. 50 μ L に 0.5% のアルギン酸ナトリウムを添加した 50 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.0) 450 μ L を加えて, 10 分間反応後, A.L. 活性を測定し, 残存酵素活性を調べた。

A.L. の至適温度 0.5% のアルギン酸ナトリウムを添加した 50 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.0) 450 μ L に精製 A.L. 50 μ L を加え, 10, 20, 30, 40, 50, 60°C の各温度で, 10 分間反応させて冷却後, A.L. 活性を測定した。

A.L. の pH 安定性 50 mM クエン酸リン酸バッファー (pH 3.0-7.0), 50 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.0-5.0), 50 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.0-9.0) および 50 mM Glycine-NaOH バッファー (pH 9.0-10.0), 各 900 μ L に精製 A.L. 100 μ L を加えて, 4°C で 1 時間インキュベートした。この A.L. 50 μ L に 0.5% のアルギン酸ナトリウムを添加した 50 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.0) 450 μ L を加えて 10 分間反応後, A.L. 活性を測定し, 残存酵素活性を調べた。

A.L. の至適 pH の測定 0.5% のアルギン酸ナトリウムを添加した 50 mM クエン酸リン酸バッファー (pH 3.0-7.0), 50 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.0-5.0), 50 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.0-9.0) および 50 mM Glycine-NaOH バッファー (pH 9.0-10.0), 各 450 μ L に精製 A.L. 50 μ L を加えて 10 分間反応後, A.L. 活性を測定した。

A.L. の金属塩および化学試薬の影響 0.5% のアルギン酸ナトリウムを添加した 50 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.0) 450 μ L に精製 A.L. 50 μ L を加え, 反応液を作製した。この反応液に各種金属塩および化学試薬を終濃度 2.5 mM となるように加えて 10 分間反応後,

Table 2 No. of A.L. producing actinomycetes from three media

	27°C			50°C			Total
	ISP-2	ISP-4	HV	ISP-2	ISP-4	HV	
No. of isolates	125	126	93	127	24	108	603
No. of A.L. producers	5(4.0)*	12(9.5)	1(1.1)	0	0	0	18(3.0)

* % of A.L. producers

残存 A.L. 活性を測定した。

結 果

放線菌の分離および A.L. 生産菌の探索 各海域から採集した海底堆積物およびその比較対照のために採集した陸土壤 (腐葉土) について, 3 種類の培地を用い, 27°C および 50°C で培養し, 放線菌を分離した。その結果, 海底堆積物から 541 株, また陸土壤から 64 株の合計 605 株の放線菌が分離された。27°C では 346 株中 18 株 (5.2%) が A.L. 活性菌であったのに対し, 50°C では 259 株中には全く活性菌が存在しなかった (Table 1)。

A.L. 活性菌は海底堆積物から 13 株 (2.4%), 陸土壤からは 5 株 (7.8%) が分離された。分離株に対する活性菌の割合は東京湾 (130 株中 3 株, 2.3%) と比較すると大槌湾 (168 株中 10 株, 6.0%) では高い値であった。

分離培地別の A.L. 生産菌の結果を Table 2 に示した。この表からわかるように, 27°C 培養では ISP-2 培地, ISP-4 培地および HV 培地から分離された株からはそれぞれ, 125 株中 5 株 (4.0%), 126 株中 12 株 (9.5%) および 93 株中 1 株 (1.1%) に A.L. 活性が見られた。

18 株 (6+11+1 株) の A.L. 生産菌の二次スクリーニング結果と A.L. 生産菌の 16S rDNA 塩基配列に基づく系統解析を Table 3 に示した。この表から明らかなように, 陸土壤および海洋環境では *Streptomyces* や *Nocardia* 属などに A.L. 生産菌が多かった。ISP-4 培地からは A.L. 生産菌 4 属すべてが分離された。以上のことから, A.L. 生産放線菌は大槌湾の海底堆積物から, ISP-4 培地を用いて分離すると種類, 数ともに多く得られることが判明した。本研究では安定して高い A.L. 活

性がみられた, *Micromonospora* sp. OB40608 株 (大槌湾水深 100 m から分離) に着目し, 以後の実験に用いた。本株の 16S rDNA 塩基配列に基づく同定の結果, *Micromonospora lupini* NBRC 106141^T と 95.8% (1331/1390), *M. aurantiaca* NBRC 16155^T と 96.2% (1331/1384) および *M. chokoriensis* NBRC 106572^T と 96.5% (1337/1385) の相同性を示した。本菌株と標準菌株の生理・生化学的性状の試験結果を Table 4 に示した。この表から明らかなように, 本菌株と標準菌株には生育温

度, 生育 pH に大きな相違は見られなかったが, 炭素源の資化性において, 本菌株は *M. lupini* NBRC 106141^T と高い類似性が見られた。本菌の 16S rDNA 塩基配列をアクセッション番号 AB872012 で DDBJ へ登録した。本菌株と標準菌株の培養性状を調べた結果, 本菌株は各培地での生育状況が *M. lupini* NBRC 106141^T とよく類似しており, ISP-6 を除くすべての培地で両株ともよく増殖し, コロニー色はオレンジから黒であった (データ未発表)。

A.L. の単離・精製 OB40608 株の生産する A.L. を培養液上清中から, 硫酸沈殿, Cellufine C-500 m および Sephacryl S-200 HR によるカラムクロマトグラフ

Table 3 Results of the second screening and 16S rDNA analysis of 18 A.L. producing actinomycetes

Strain No.	A.L. activity units/mL	Genus	Sample	Isolation media
TBa20713	0.3	<i>Streptomyces</i>	Tokyo Bay MS*	ISP-2
TBa20515	0.2	<i>Nocardiopsis</i>	Tokyo Bay MS	ISP-2
TBc40211	0.5	<i>Streptomyces</i>	Tokyo Bay MS	ISP-4
OB40509	0.9	<i>Streptomyces</i>	Otsuchi Bay MS	ISP-4
OB40505	1.2	<i>Nocardiopsis</i>	Otsuchi Bay MS	ISP-4
OB40602	0.1	<i>Nocardiopsis</i>	Otsuchi Bay MS	ISP-4
OB40604	0.9	<i>Nocardiopsis</i>	Otsuchi Bay MS	ISP-4
OB40603	0.2	<i>Micromonospora</i>	Otsuchi Bay MS	ISP-4
OB40608	1.1	<i>Micromonospora</i>	Otsuchi Bay MS	ISP-4
OBH0602	0.2	<i>Brevibacterium</i>	Otsuchi Bay MS	HV
OB40701	0.3	<i>Nocardiopsis</i>	Otsuchi Bay MS	ISP-4
OB40906	0.4	<i>Brevibacterium</i>	Otsuchi Bay MS	ISP-4
OB40911	0.6	<i>Nocardiopsis</i>	Otsuchi Bay MS	ISP-4
KT20001	0.1	<i>Nocardiopsis</i>	Tokyo TS**	ISP-2
KT20008	0.5	<i>Nocardiopsis</i>	Tokyo TS	ISP-2
KT20009	0.5	<i>Nocardiopsis</i>	Tokyo TS	ISP-2
OT41303	0.4	<i>Streptomyces</i>	Otsuchi TS	ISP-4
OT21414	0.4	<i>Nocardiopsis</i>	Otsuchi TS	ISP-4

* MS, Marine sediment, ** TS, Terrestrial soil

(A) Marker ; (B) Purified A.L.

Fig. 1 PAGE of purified A.L. from strain OB40608.

Table 4 Taxonomical characteristics of strain OB40608 and three *Micromonospora* type strains

Characteristic	Strain OB40608	<i>M. lupini</i> NBRC106141 ^T	<i>M. aurantiaca</i> NBRC16155 ^T	<i>M. chokoriensis</i> NBRC106572 ^T
Similarity (%)	—	95.8	96.1	96.5
Degradation of alginate	+	—	—	—
NaCl tolerance (%)	3	1	3	1
Temperature range for growth (°C)	15–37	15–37	15–45	15–37
pH range for growth	6–8	6–8	6–9	6–8
Utilization of				
D-Glucose	+	+	—	+
L-Arabinose	+	+	—	+
Sucrose	+	+	—	+
D-Xylose	+	+	w	+
meso-Inositol	w	w	w	w
D-Mannitol	w	w	—	—
D-Fructose	+	+	—	+
L-Rhamnose	w	w	—	—
D-Raffinose	w	w	—	+

* +, Positive; w, Weak; —, Negative

Table 5 Purification of A.L. from strain OB40608

Procedure	Volume (mL)	Activity (units/mL)	OD ₂₈₀	Specific activity (units/OD ₂₈₀)	Total activity (units)	Yield (%)	Purification factor
Culture supernatant	1100	22	12.84	1.7	24200	100.0	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation (95%)	90	57	5.92	9.6	5130	21.2	5.6
Cation exchange chromatography (Cellufine C-500 m)	108	14	0.03	466.7	1512	6.2	272.9
Gel filtration chromatography (Sephacryl S-200 HR)	135	7	0.01	700.0	945	3.9	411.8

Fig. 2 (a) Thermostability and optimum temperature of purified A.L. from strain OB40608; (b) pH stability and optimum pH of purified A.L. from strain OB40608.

ィーによって精製した。その結果, Fig. 1 に示すように最終精製物はポリアクリルアミドゲル電気泳動 (native-PAGE) 的に単一であった。本酵素の精製の概略を Table 5 に示した。この表から分かるように, 本 A.L. は培養上清から回収率 3.9% で 410 倍の純度にまで精製された。分子量マーカーから検量線を作成し, 本 A.L.

の分子量を求めたところ, 114 kDa であることが判明した。

A.L. の酵素化学的性状 本 A.L. の温度に対する影響を調べた結果を Fig. 2a に示した。なお, 本研究では精製された酵素量が少なかったため, A.L. の酵素活性測定はすべて $n=2$ で行った。本 A.L. の至適温度は 50°C

Table 6 Effects of various metal salts and chemicals on the activity of A.L. from strain OB40608

Chemical	Relative activity (%)
None	100
MgCl ₂	91
CaCl ₂	101
MnCl ₂	52
PbCl ₂	23
CoCl ₂	52
ZnCl ₂	19
NaCl	81
KCl	103
MgSO ₄	87
ZnSO ₄	64
EDTA	30

であった。しかし、熱安定性を調べたところ、本 A.L. は 40°C まで安定であった。

次に本 A.L. の pH に対する影響を調べた結果、本 A.L. の至適 pH は 7.0 であり、pH 5~10 の範囲で安定であった (Fig. 2b)。

本 A.L. の金属塩および化学試薬に対する影響を調べた結果を Table 6 に示した。この表からわかるように、CaCl₂ および KCl は A.L. 活性に影響を及ぼさなかったが、他の金属塩および EDTA は A.L. 活性を阻害した。

考 察

本研究では、各海域から採集した海底堆積物およびその比較のために採集した陸土壤（腐葉土）から、27°C および 50°C で放線菌を分離し、A.L. 活性菌を採取した。その結果、27°C では 346 株中 18 株 (5.2%) が A.L. 活性菌であったのに対し、50°C では 259 株中には全く活性菌が存在しなかった。この理由として、50°C では特定の放線菌属のみが生育したことが原因なのかもしれない。また、東京湾と比較して大槌湾から高い割合で A.L. 活性菌が分離されたのは、この湾では褐藻類などコンブの藻場が多いため、アルギン酸分解菌が栄養循環に重要な役割を果たしているためではないかと考えられる。^{28,29)} 各種分離培地の中では ISP-4 培地の A.L. 生産菌分離率が最も高かった。この培地には各種微量塩類が添加されており、これらを生育に要求する A.L. 生産菌が多く分離されたのではないかと考えられた。

今回得られた A.L. 生産菌 4 属のすべてが大槌湾の海底堆積物から分離された株であり、高い分離率であるとともに大槌湾は様々な種類の異なる A.L. 生産菌を分離しやすい海域であると考えられた。研究を開始した当初、観測点をいくつか選定して、地点間による差や、水深によって分離株や A.L. 生産菌の特性に違いがあるかどうかを調べる計画をしていた。しかし、大槌湾のよう

に小さな湾で観測点間に大きな隔たりがないためか地点間や水深による差を明確に議論できるほどのデータは取れなかった。これまでの研究によると *Streptomyces*,¹²⁾ *Corynebacterium*⁶⁾ 属から A.L. 生産菌の報告がみられる。しかし、*Micromonospora* 属からの報告は現在のところ見られず、本研究が初めてである。なお、*M. lupini* NBRC 106141^T は、陸上植物の根圏土壌から分離された株であり、また、OB40608 株と相同性の高かった *M. aurantiaca* NBRC 16155^T および *M. chokoriensis* NBRC 106572^T も陸土壤から分離された株である。^{22,24,25)} 各培地におけるコロニーの色調や（データ未発表）A.L. 活性の有無において、OB40608 株はこれら 3 種類の標準菌株 (*M. aurantiaca* NBRC 16155^T, *M. chokoriensis* NBRC 106572^T, *M. lupini* NBRC 106141^T) とは明らかに異なっていた。本研究では培養上清から高い純度で A.L. を単離精製できた。Cao *et al.*¹³⁾ は *Streptomyces* の生産する A.L. を 7.6% の回収率で 14 倍の純度に精製し、Nakagawa *et al.*⁷⁾ は *Bacillus* の生産する A.L. を 5.8% の回収率で 25 倍の純度にまで精製している。これら過去の報告と比較したところ、本 A.L. の回収率はやや低いものの、少ないステップで高い純度に精製されたといえる。陸上から分離した *Streptomyces* 由来の A.L. は 37°C が最適温度であり、50°C まで安定であるなど、30°C 付近で安定かつ最適に作用するものが多く報告されている。¹³⁾ これまで報告されている A.L. は pH 7-8 付近に最大活性を有し、なおかつ安定なものが多い。³⁰⁾ しかし、昆布のような褐藻類に含まれるアルギン酸を工業原料に加工する工場では、比較的酸性の廃棄物や廃水を処理する際に、至適 pH の低い A.L. の使用が求められているが、海洋糸状菌 *Dendryphiella* 由来の A.L. の至適 pH は 5 と最も低いものの、産業的利用はされていない。³⁰⁾ 文献によると、海洋微生物由来の A.L. は 2 価のカチオンによって活性が増大したり、あるいは活性発現に必須であることが知られている。^{31,32)} 本 A.L. の生産株である *Micromonospora* sp. OB40608 株は培養および A.L. の生産に微量塩が必要であるが、A.L. の活性にカチオンはあまり重要ではないことから、本来陸上に生息していた本菌が雨、風や河川水によって海洋環境に流入し、そこに住み着いたと考えられた。

文 献

- 1) Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 2005; **58**: 1-26.
- 2) Madgwick J, Haug A, Larsen B. Alginate lyase in the brown alga *Laminaria digitata* (Huds). *Acta Chem. Scand.* 1973; **27**: 711-712.
- 3) Tsujino I, Saito T. A new unsaturated uronide isolated from an alginate hydrolyzate. *Nature* 1961; **192**: 970-971.
- 4) Muramatsu T, Hirose S, Katayose M. Isolation and properties of alginate lyase from the mid-gut gland of

- wreath shell *Turbo cornutus*. *Agric. Biol. Chem.* 1977; **41**: 1939-1946.
- 5) Sawabe T, Ezura Y, Kimura T. Purification and characterization of an alginate lyase from marine *Alteromonas* sp. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1992; **58**: 521-527.
 - 6) Matsubara Y, Kawada R, Iwasaki K, Oda T, Muramatsu T. Extracellular poly(α -L-guluronate) lyase from *Corynebacterium* sp.: purification, characteristics and conformational properties. *J. Protein Chem.* 1998; **17**: 29-36.
 - 7) Nakagawa A, Ozaki T, Chubachi K, Hosoyama T, Okubo T. An effective method for isolating alginate lyase-producing *Bacillus* sp. ATB-1015 strain and purification and characterization of the lyase. *J. Appl. Microbiol.* 1998; **84**: 328-335.
 - 8) Davidson IW, Lawson CJ, Sutherland IW. An alginate lyase from *Azotobacter vinelandii* phage. *J. Gen. Microbiol.* 1977; **98**: 223-229.
 - 9) Schaumann K, Weide G. Enzymatic degradation of alginate by marine fungi. *Hydrobiologia.* 1990; **204**: 589-596.
 - 10) Nibu Y, Satoh T, Nishi Y, Takeuchi T, Murata K, Kusakabe I. Purification and characterization of extracellular alginate lyase from *Enterobacter cloacae* 'M-1. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1995; **59**: 632-637.
 - 11) Boyd J, Turvey JR. Isolation of a poly- α -L-guluronate lyase from *Klebsiella aerogenes*. *Carbohydr. Res.* 1977; **57**: 163-171.
 - 12) Kim DE, Lee EY, Kim HS. Cloning and characterization of alginate lyase from a marine bacterium *Streptomyces* sp. ALG-5. *Mar Biotechnol.* 2009; **11**: 10-16.
 - 13) Cao L, Xie L, Xie X, Tan H, Liu Y, Zhou S. Purification and characterization of alginate lyase from *Streptomyces* species strain A5 isolated from banana rhizosphere. *J. Agric. Food Chem.* 2007; **55**: 5113-5117.
 - 14) Fiedler HP, Bruntner C, Bull AT, Ward AC, Goodfellow M, Potterat O, Puder C, Mihm G. Marine actinomycetes as source of novel secondary metabolites. *Antonie Leeuwenhoek* 2005; **87**: 37-42.
 - 15) Okami Y, Okazaki T, Kitahara T, Umezawa H. A new antibiotic, aplasmomycin, produced by a streptomycetes isolated from shallow sea mud. *J. Antibiot.* 1976; **10**: 1019-1025.
 - 16) Okazaki T, Okami Y. Actinomycetes tolerant to increased NaCl concentration and their metabolites. *J. Ferment. Technol.* 1975; **53**: 833-840.
 - 17) 日本放線菌学会. 放線菌の分離と同定 (Identification manual of actinomycetes). 日本学会事務センター, 東京. 2001; pp. 33-47, 193-200.
 - 18) Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* 1987; **65**: 501-509.
 - 19) 木村喬久. アルギン酸分解菌の簡易識別法について. 北海道大学水産学部研究集報 1961; **12**: 41-47.
 - 20) Muramatsu T. Change in circular dichroic spectra of the substrate caused by alginate lyase. *Agric. Biol. Chem.* 1986; **50**: 1311-1313.
 - 21) Muramatsu T, Katsuki F, Miyazaki M. Change in ultraviolet absorption spectra of polyguluronate caused by poly(α -L-guluronate) lyase and activity measurement by the circular dichroic spectral change. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1993; **57**: 2168-2169.
 - 22) Sveshnikova MA, Maksimova TS, Kudrina ES. The species of the *Micromonospora orskov*, 1923 and their taxonomy. *Mikrobiologiya* 1969; **38**: 883-893.
 - 23) Sveshnikova MA. Species of the genus *Micromonospora orskov*, 1923 and their taxonomy. in the actinomycetales. Gustav Fischer Verlag, Jena. 1970; p. 196.
 - 24) Trujillo ME, Kroppenstedt RM, Molinero CFP, Schumann P, Molinero EM. *Micromonospora lupini* sp. nov. and *Micromonospora saelicesensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007; **57**: 2799-2804.
 - 25) Ara I, Kudo T. Two new species of the genus *Micromonospora*: *Micromonospora chokoriensis* sp. nov. and *Micromonospora coxensis* sp. nov., isolated from sandy soil. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2007; **53**: 29-37.
 - 26) Imada C, Okanishi M, Okami Y. Intergenous protoplast fusion between *Streptomyces* and *Micromonospora* with reference to the distribution of parental characteristics in the fusants. *J. Biosci Bioeng.* 1999; **88**: 143-147.
 - 27) 岡田雅人, 宮崎 香編. 改訂第3版 タンパク質実験ノート 下巻. 羊土社, 東京. 1996; pp. 17-37.
 - 28) Tang JC, Taniguchi H, Chu H, Zhou Q, Nagata S. Isolation and characterization of alginate-degrading bacteria for disposal of seaweed wastes. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009; **48**: 38-43.
 - 29) Amani MD, Aliaa ME. Optimization of medium composition for extracellular alginate lyase of a marine bacterium. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2012; **6**: 2403-2409.
 - 30) Wong TY, Preston LA, Schiller NL. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000; **54**: 289-340.
 - 31) Hansen JB, Doubet RS, Ram J. Alginase enzyme production by *Bacillus circulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984; **47**: 704-709.
 - 32) Gacesa P. Enzymic degradation of alginates. *Int. J. Biochem.* 1992; **24**: 545-552.