微生物によるアルギン酸の分解—VI.

2 種のアルギナーゼの作用様式について

安藤 芳明・井上 勝弘

(1936 年 5 月 31 日 受理)

DECOMPOSITION OF ALGINIC ACID BY MICROORGANISMS—VI.
ON THE MODES OF ACTION OF TWO ALGINASES

Yoshiaki ANDO* and Katsuhiro INOUE*

Two alginase preparations, extracellular enzyme (ECE) and intracellular enzyme (ICE), have been obtained from filtrates of cultures and sonicated cells of an alginolytic marine bacterium. Both the enzymes cleave alginic acid into the same ultraviolet absorbing product, which indicates that the glycosidic bond of alginic acid is split by eliminative hydrolysis, resulting in the formation of unsaturated uronic acid moieties.

However, marked differences in their modes of action have been recognized with aid of paper chromatographic detection. ECE attacks alginic acid in a random manner, liberating unsaturated oligouronides as well as a large amount of low polyuronide. The end products of this reaction are found to be a series of unsaturated oligouronides, which are not degraded further by this enzyme.

In contrast, ICE attacks not only alginic acid but also its degraded products by ECE action. ICE is able to hydrolyze low polyuronide and such unsaturated oligouronides as tetra-, tri-, and diuronide. The ultimate end product of these reactions is found to be a monouronide, which seems to be identical with 4-deoxy-5-ketohexuronic acid reported by PREISS and ASHWELL.

最近アルギナーゼによるアルギン酸の dehydrative hydrolysis に関して吉川¹⁾, 辻野および斎藤²⁾, PREISS and ASHWELL ら³⁾ が相継いで報告し, その分解生成物として彼らは各々不飽和トリ, ジ, モノウロナイドなどの分離同定に成功している。これらの研究成果は, アルギナーゼが従来考えられていたような単なる glycoside hydrolase ではなく, いわゆる eliminase 作用を伴うことを証明したものととして極めて有意義である。

しかしながらアルギナーゼの本態並びにその分解様式に関しては, まだ十分明らかにされていない。著者ら⁴⁾ は先に一海洋細菌のアルギナーゼの主として extracellular enzyme (ECE) について研究し, 本酵素がアルギン酸の粘度低下に関与するいわゆる depolymerase に属すること, 並びに最終分解生成物はマンシロン酸でないある種のオリゴウロナイドであることを報告した。その後 ECE と同時に intracellular enzyme (ICE) についても分離精製を試み, 両者のアルギナーゼ作用を比較検討したところ, いずれも eliminase 作用を有するが, その分解様式にいちじるしい相違のあることを知った。本報においてはそれらの実験結果, 並びに本菌のアルギナーゼ作用機構について若干の知見を述べる。

実 験

使用細菌 *Aeromonas* sp. SO-20**

* 北海道衛生研究所 (Hokkaido Institute of Public Health, Sapporo, Japan)

** 前報⁴⁾ において *Vibrio* sp. SO-20 を, 分類の再検討により本属名に改めた⁵⁾。

酵素の分離精製法

細胞外酵素 (ECE): 前報⁴⁾の調製法により得た粗酵素液 (2,500 U/ml) を用い、さらに DEAE セルロース吸着法によつて精製した。予め 0.005 M リン酸ナトリウム (pH 7.0) で緩衝化した DEAE セルロースカラム (15×160 m/m) に試料 30 ml を負荷し、0.05 M, 0.1 M, および 0.1 M+0.5 M 食塩の各リン酸ナトリウム (pH 7.0) 50 ml で順次段階的に溶離すると、アルギナーゼ活性は最後の溶離液フラクションにのみ見出された。このフラクションを集め、蒸留水に対して 24 時間透析して細胞外酵素とした。

細胞内酵素 (ICE): 本菌を前報⁴⁾記載の合成培地に 30°C, 3 日間培養した後菌体を遠沈により集め、1 % 食塩水で 3 回洗浄後 -15°C に凍結保存した。酵素作製に当り室温に戻した菌体ペーストをその約 8 倍量の 0.1 M リン酸塩バッファー (pH 7.2) に浮遊させ、10 Kc 磁歪式音波発生装置を用いて氷冷しながら 20 分間で菌体を破壊する。この液を遠沈 (10,000 rpm, 20 分) により不溶成分と分ける。黄褐色上清に核酸除去のため、ストレプトマイシン硫酸塩を約 1 % になるよう加えてよくかき混ぜる。10 分間放置後遠沈 (14,000 rpm, 15 分) により黄色透明上清を得る。これに硫酸を 0.3 飽和に加えて析出する沈殿を遠沈により除き、さらに 0.9 飽和にする時析出する沈殿を遠沈により集める。これを少量の 0.005 M リン酸ナトリウムに溶解しておき、同液に対して 12 時間ずつ 3 回透析した。透析液をさらに DEAE セルロースによつて精製を試みたところ、上述の溶離方法によつて混在している若干の ECE 活性を示すフラクションが得られたが、後述のような ICE に特有な酵素活性を示すフラクションは全く分離されなかつた。よつて本酵素の精製はこれ以上行なわず、透析液を細胞内酵素 (若干の ECE を含む) とした。

酵素作用の測定 作用液の組成および作用条件は、前報⁴⁾と全く同様である。作用力の測定は次の諸法により実施した。

粘度法: 前報⁴⁾記載の方法により測定した。

紫外吸収法: 辻野および斎藤⁶⁾の方法により測定した。

チオバルビツル酸法: WEISSBACH and HURWITZ⁷⁾の方法により測定した。

還元力法: SOMOGYI-NELSON 法⁸⁾により測定した。還元力の標定には結晶マンヌロン酸ラク톤を使用した。

ペーパークロマトグラフィー: 反応液を 100°C, 30 秒加熱して酵素作用を停止させた後減圧濃縮した液を試料とし、東洋ろ紙 No. 50 を用い上昇法により実施した。展開液、*n*-ブタノール:酢酸:水=5:2:3。展開条件、室温にて 20 時間。発色剤、アニンフタル酸またはチオバルビツル酸⁷⁾。

使用基質

アルギン酸ナトリウム: 市販品 (和光純薬製) を精製して使用した。

不飽和ジウロナイド: 辻野勇博士より寄贈された結晶 m. p. 135.5~136.5°C を使用した。

不飽和トリウロナイド: 吉川三吉博士より寄贈された白色無定形バリウム塩を使用した。

不飽和テトラウロナイド: アルギン酸酵素分解物のイオン交換樹脂吸着法⁹⁾によつて分離されるテトラウロナイド区分を、さらにペーパークロマトグラフィー (PC) にかき相当するスポットより溶出して用いた。

結 果

I. アルギン酸に対する ECE および ICE の作用

両酵素の作用過程において粘度低下、還元力増加、不飽和ウロナイドの生成などを調べた結果は、Fig. 1 および Fig. 2 に示すとおりである。この際両者の酵素濃度は粘度法による単位がほぼ同一となるように調製してあるので、50 % 粘度低下速度は大体同じである。しかし粘度低下が 90 % 以上になると、両者の速度に大きな差異がみられた。ECE の場合では 90 % 以上における粘度低下速度は極めて緩慢であり、48 時間でようやく 97 % を示したに過ぎない。そしてこの時酸を加えると凝固沈殿する物質 (低分子ポリウロナイド) がかなり残っていた。これに対して ICE の場合では単時間に 100 % に達し、この時酸による沈殿物

はほとんどみられなかつた。還元力についてみると、ECE は ICE に較べてその増加速度が遅く、また最終還元基生成量は後者のほぼ 1/3 であつた。同様な傾向は不飽和オリゴウロナイドの生成、すなわち紫外吸収 (UV) およびチオバルビツル酸反応 (TBA) についてもみられる。しかも ECE ではこれら 3 者の増加曲線が大体並行的であるのに対して、ICE では UV がほぼ一定になつてからでもなお還元力および TBA の急激な増加がみられた。すなわち ICE の作用過程においては、UV の吸収はないが還元力および TBA 呈色を示す物質の生成増加が認められる。

こうした作用過程を PC にかけて追跡した結果は、Fig. 3 および Table 1 に示すとおりである。Fig. 3 において、ICE の場合スポットは上からモノ、ジ、トリ、テトラ、およびペンタウロナイドなどに相当し、また ECE の場合ではモノマーの位置にスポットはなく、ジ以下ペンタまでのオリゴウロナイドのスポットがみられる。これらのスポットは発色剤としてアニリンフタル酸または TBA のいずれを用いても全く同一態度を示した。また ICE の場合にみられるモノマーは、同時に *o*-フェニレンジアミンによる α -ケト酸の呈色反応¹⁰⁾ をも示した。両者の作用過程を経時的にみると、オリゴウロナイドの生成様式は一層明確である。ECE の場合では反応初期にポリウロナイド (原点) が出現し、次第にペンタ以下ジウロナイドへと分解が進むが、モノマーの生成は全く認められない。しかも反応後

Fig. 1. Hydrolysis of alginic acid by ECE (110 U/ml) with elapse of time. Reaction mixture: 4 ml of 0.5% sodium alginate; 5 ml of M/15 phosphate buffer containing NaCl in 6%, pH 7.2; 1 ml of enzyme solution. Incubated at 30°C. Alginase activity was assayed as viscosity decrease (VISCO.), ultraviolet absorption (UV), reducing power (RED.), and thiobarbituric acid reaction (TBA), respectively.

Fig. 2. Hydrolysis of alginic acid by ICE (110 U/ml) with elapse of time.

Reaction mixtures and enzyme assays same as for Fig. 1. Incubated at 30°C.

Fig. 3. Paper chromatogram of the hydrolyzates of alginic acid by the action of the two alginases.

A, ECE action on alginic acid for 6 hours.

B, ICE action on alginic acid for 6 hours.

Samples were developed on Toyo-Roshi's No. 50 filter paper with the solvent; *n*-butanol, acetic acid, water (5 : 2 : 3). The spots were revealed by spraying with periodate followed by thiobarbituric acid.

Table 1. Paper chromatographic analysis of the uronides produced during hydrolysis of alginic acid by the two alginases.

ECE							ICE						
Time	Uronides						Time	Uronides					
	Mono-	Di-	Tri-	Tetra-	Penta-	Poly-		Mono-	Di-	Tri-	Tetra-	Penta-	Poly-
10 min.	—	—	—	—	—	+	10 min.	—	—	—	—	—	+
30 "	—	±	±	+	+	+	30 "	—	±	±	+	+	+
60 "	—	+	+	+	+	+	60 "	±	+	+	+	+	+
3 hrs.	—	+	+	+	+	+	3 hrs.	+	+	+	+	+	+
6 "	—	+	+	+	+	+	6 "	+	+	+	+	+	+
15 "	—	+	+	+	+	+	15 "	+	+	+	+	+	+
24 "	—	+	+	+	+	+	24 "	+	+	+	±	±	±
72 "	—	+	+	+	+	+	72 "	+	+	+	—	—	—

期においてポリウロナイドはなおも存在していた。これに対して ICE の場合では、反応初期においては ECE の場合と同様であるが、ジおよびトリウロナイドの出現後モノマーの生成がみられ、しかも反応後期においてテトラ以上のオリゴまたはポリウロナイドの残存は全く認められなかった。

II. 低分子ポリウロナイドに対する ECE および ICE の作用

上述のようにアルギン酸に対する ECE 作用の結果、多量の酸不溶性ポリウロナイドが生成する。これを分離して水洗およびアルコール沈殿を繰返して精製した。このものをナトリウム塩となし、その 0.5% 水溶液を基質として両酵素の作用を調べた。その結果は Fig. 4 に示すように、ECE ではほとんど作用されず、ICE によってさらに分解されることがわかった。

Fig. 4. Hydrolysis of low polyuronide by the two alginases with elapse of time. Reaction mixtures and enzyme assays same as for Fig. 1 except that the low polyuronide obtained from the ECE reaction mixture was used as substrate. Incubated at 30°C.

Table 2. Hydrolysis of unsaturated di-, tri-, and tetrauronides by the two alginases as shown by paper chromatography.

Unsaturated oligouronides	ECE		ICE	
	Time	Products	Time	Products
Dimer	2.5 hrs.	none	2.5 hrs.	Monomer
Trimer	2.5 "	"	2.5 "	Monomer, Dimer
Tetramer	1.5 "	"	1.5 "	Monomer, Trimer
"	4.5 "	"	4.5 "	Monomer, Dimer, Trimer

Dimer was kindly given by Dr. I. TSUJINO.

Trimer was kindly given by Dr. M. YOSHIKAWA.

Tetramer was isolated and purified paper chromatographically by the authors.

Fig. 5. Paper chromatogram of the hydrolyzates of unsaturated di-, tri-, and tetrauronides by ICE action.

- 1, action on dimer for 2.5 hours.
- 2, action on trimer for 2.5 hours.
- 3, action on tetramer for 1.5 hours.
- 4, action on tetramer for 4.5 hours.

III. 不飽和オリゴウロナイドに対する ECE および ICE の作用

既知の不飽和ジおよびトリウロナイド、およびアルギン酸の ECE 作用分解生成物より分離した不飽和テトラウロナイドの3者を各基質として両酵素の作用を調べた。その結果は Table 2 に示すように、ECE の場合ではこれらのオリゴウロナイドは長時間の作用でも全く分解されないが、ICE の場合では速かに分解されることがわかった。ICE 作用分解生成物を PC にかけて、Fig. 5 に示すようにこれらのオリゴウロナイドはいずれもモノマーにまで分解される。不飽和テトラウロナイドの分解においては、反応初期に不飽和ジウロナイドの生成はみられず、後期に至つてそれが認められた。

なおテトラウロナイドに対する ICE 作用の至適条件を調べたところ、Fig. 6 に示すように至適 pH は 7.5、食塩の賦活作用最適濃度は 0.25% であった。これらの条件における作用過程は、Fig. 7 に示すとおりである。

Fig. 6. Effect of pH and NaCl concentration on hydrolysis of unsaturated tetrauronide by ICE.

Enzyme activity was assayed as TBA. Incubated at 30°C.

Fig. 7. Hydrolysis of unsaturated tetrauronide by ICE with elapse of time.

Reaction mixture: 0.4 ml of 0.5% tetramer; 0.5 ml of M/15 phosphate buffer containing NaCl in 0.5%, pH 7.5; 0.1 ml of enzyme solution. Incubated at 30°C. Enzyme activity was assayed as TBA. Control contains 0.1 ml of water instead of the enzyme solution.

考 察

本菌のアルギナーゼは、細胞外酵素と細胞内酵素に分けることができる。両者ともアルギン酸に作用して不飽和オリゴウロナイドを生成するから、いわゆる eliminase に属するものである。しかし基質の分解様式からみた場合、両者の性状は大いに異なっている。ICE は同一粘度単位の ECE に較べて還元力の生成度がいちじるしい。そしてその分解過程においてポリウロナイドを残さず、最終分解生成物はモノマーである。このものは UV 吸収を示さないが、還元性および TBA 反応を示すから、PREISS and ASHWELL³⁾ のいう

モノウロナイド, 4-deoxy-5-ketohexuronic acid と同一物質と思われる。これに対して ECE は初期の粘度低下速度は速いが, 酵素作用が早く限界点に達し, 還元力の増加および不飽和オリゴウロナイドの生成は僅少で止まつてしまう。この時の最終分解生成物は不飽和ジウロナイドであり, しかも同時に多量の酸不溶性ポリウロナイドの生成を伴う。このものは比粘度がほとんど 1 に近いので, 元のアルギン酸よりもはるかに低分子量のポリウロナイドと考えられる。そしてこのものに新たに ECE を作用させてもそれ以上全く分解されないが, ICE の作用では速かに分解される。このように高分子多糖類の酵素作用によつて限界生成物の得られる例は, 他にもデンプンに対するアミラーゼ作用で生成する limit dextrin, あるいはペクチン酸に対する細菌ポリガラクトナーゼ作用¹¹⁾で生成する低分子ポリウロナイドなどにもみられ, 粘度低下力強く糖化力の弱いいわゆる depolymerase の特徴といえよう。

一方両酵素の性状の相違は, 不飽和オリゴウロナイドに対する作用においても顕著にみられた。ECE はテトラ, トリ, ジなどの不飽和オリゴウロナイドに対して全く親和性をもたないが, ICE はそれを有しこれを分解して最終的にモノマーを生成する。そして不飽和テトラウロナイドの分解過程は, まず, テトラ→モノ+トリの反応が起こり, その後でトリ→モノ+ジの反応が起こるものである。すなわち, ICE のこれらオリゴウロナイドに対する作用は, 非還元末端基において順次に端から一つずつ切断すると同時に, その eliminase 作用によつて不飽和基の導入を伴っているものである。

以上の知見をまとめると, 本菌のアルギナーゼの作用機構について次のように考えられる。本菌のアルギナーゼは細胞外と内とで本質的に異なった型の 2 種の酵素より成っている。ECE はアルギン酸分子を at random に切断して小分子の不飽和オリゴウロナイドを生成すると同時に, 多量のそれ以上分解されない低分子ポリウロナイドを生成する。ICE は ECE の作用によつて生成したこれら不飽和オリゴウロナイドおよび低分子ポリウロナイドをさらに分解して, 最終的にモノマーを生成する。そしてここに生成したモノマーは, PREISS and ASHWELL¹²⁾の報告している代謝系路によつてエネルギー源として本菌に利用されるものと思われる。

総 括

- 1) アルギン酸分解細菌のアルギナーゼを細胞外酵素と細胞内酵素に別けて分離精製し, その各々の分解様式を比較検討した。
- 2) 細胞外酵素はアルギン酸分子に at random に作用してその粘度を急激に低下せしめ, 多量の低分子ポリウロナイドを生成すると同時にその eliminase 作用によつて不飽和オリゴウロナイドを生成する。
- 3) 細胞内酵素は細胞外酵素の作用によつて生成した低分子ポリウロナイドおよび不飽和オリゴウロナイドを, その eliminase 作用によつてさらに分解して最終的にモノマーを生成する。

本研究に当り, 貴重な試料の提供を賜つた北大水産学部辻野勇博士並びに兵庫農大吉川三吉博士に厚く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 吉川三吉: 生化学, **33**, 794 (1961).
- 2) TSUJINO, I. and SAITO, T.: *Nature*, **192**, 970 (1961).
- 3) PREISS, J. and ASHWELL, G.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 309 (1962).
- 4) 安藤芳明・井上勝弘: 本誌, **27**, 342 (1961).
- 5) ————: 日本水産学会年会講演 (1964).
- 6) 辻野 勇・斎藤恒行: 本誌, **29**, 58 (1963).
- 7) WEISSBACH, A. and HURWITZ, J.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 705 (1959).
- 8) SOMOGYI, M.: *J. Biol. Chem.*, **160**, 61 (1945).
- 9) 斎藤恒行・辻野 勇: 日本水産学会年会講演 (1964).
- 10) LANNING, M. C. and COHEN, S. S.: *J. Biol. Chem.*, **189**, 109 (1951).
- 11) 梶 明・穴吹吉夫: 農化誌, **29**, 775 (1955).
- 12) PREISS, J. and ASHWELL, G.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 317 (1962).