

## 第1章 序論

1881年、スコットランドの化学者 Stanford が沿岸に繁茂する大型褐藻類 *Ascophyllum* の化学成分を研究し、藻体を炭酸ナトリウムのようなアルカリ性の水溶液で煮ると抽出され、その液体を塩酸などで酸性にすると繊維状に固まる物質を発見した。これがアルギン酸の最初の発見である。この物質そのものは酸性であったので、海藻からとれた酸性物質という意味で、ラテン語で藻を意味する "alga" からアルギン酸と名付けられた<sup>1)</sup>。

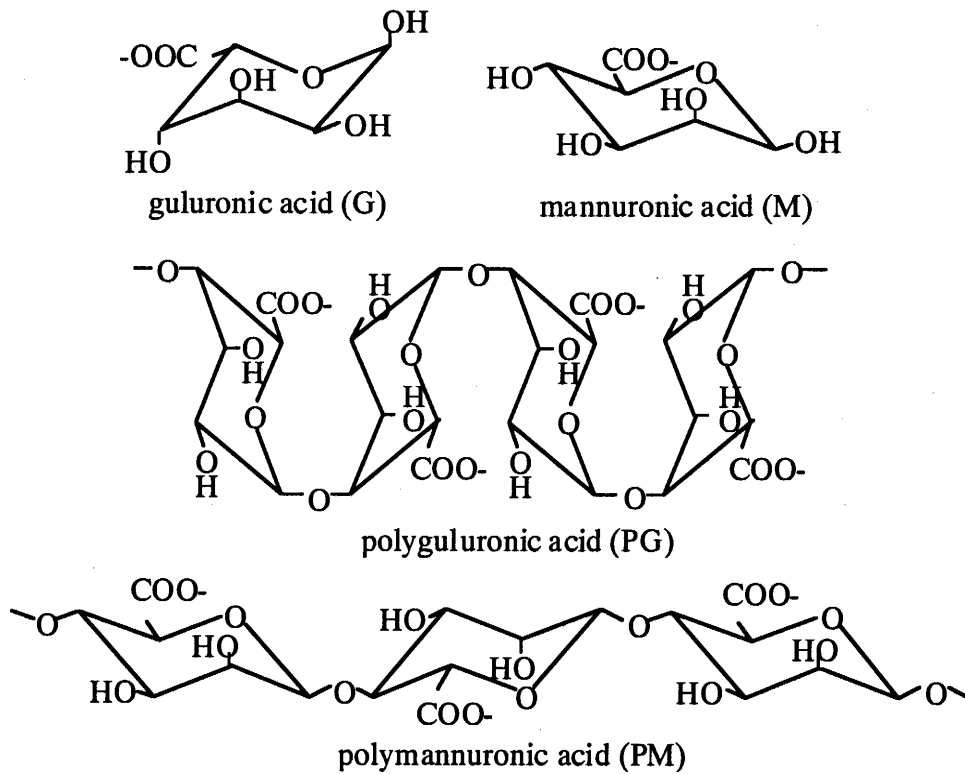
アルギン酸は、褐藻の細胞壁および細胞間に充填物質として存在する多糖質で、褐藻重量のほぼ 30% を占めている。19世紀以降、アルギン酸工業は着実に発展し、年間約 22,000 トンのアルギン酸が採られ、利用されている。265種類の既知の褐藻のうち、アメリカ西海岸の *Macrocystis*、北ヨーロッパの *Laminaria* と *Ascophyllum* の3種類の藻類から現在、アルギン酸が抽出されている。またアルギン酸の発見から約 80年後、海洋に生息するグラム陰性細菌 *Pseudomonas aeruginosa* がアルギン酸を合成することが確認された<sup>2)</sup>。このほかにも *Azotobacter vinelandii*<sup>3)</sup>、*Azotobacter chroococcum*、そしてその他の *Pseudomonas* 細菌も菌体外多糖としてアルギン酸を分泌することが知られている<sup>4)</sup>。

### アルギン酸の化学構造

褐藻由来のアルギン酸は広く利用され、2種類のウロン酸から構成されている。つまり、 $\beta$ -D-マンヌロン酸 (以下 M と表記) と M の C5 位立体異性体である  $\alpha$ -L-グルロン酸 (以下 G と表記) であり、これらが直鎖状に不規則に結合している<sup>5)</sup>。アルギン酸分子中には、G が連なった Poly- $\alpha$ -L-gulonate (PG) 部位、M が連なった Poly- $\beta$ -D-mannuronate (PM) 部位、及び G と M がランダムに連なった (MG ランダム) 部位があり、これら3つのドメインが混在している<sup>6)</sup>。アルギン酸の生合成は、様々な酵素の作用で合成されるが、大まかに述べるとマンノースからマンヌロン酸に変化し、これにエピメラーゼ (異性化酵素) が作用することによってグルロン酸ができる<sup>7)</sup>。しかし、G と M の構成比、アルギン酸そのものの分子量は、褐藻類の生息場所、季節、藻体部位によって様々であり、未だ詳細な化学構造

は解明されていない。アルギン酸の構造を下に示す。

アルギン酸の代表的な特徴つまり物理的性質は、カルシウムのような二価のカチオンとの親和性が高いことである。これは PM 部位よりも PG 部位の方が強く、アルギン酸分子が二価のカチオンを包括してゲル化が起こる。これをエッグボックス構造と呼ぶ。それゆえカルシウム存在下では、G に富んだアルギン酸は強く脆いゲルを形成し、M に富んだアルギン酸は弱い弾性のあるゲルを形成する<sup>8)</sup>。またアルギン酸は酸性条件下 (pH 4 以下) でもゲル化する。このような性質を利用して食品 (特に人工イクラ)、繊維、発酵、医療、歯科材料、化粧品など多岐の分野で有効利用されている<sup>9)</sup>。細菌由来のアルギン酸は通常、M の 2 位及びまたは 3 位が O-アセチル化されており<sup>10,11)</sup>これがポリマーの水和性や金属イオンとの親和性に影響している<sup>12)</sup>。



Structure of Alginate

## アルギン酸リアーゼのこれまでの研究

アルギン酸分解酵素の研究は 1931 年、大島がアワビ (*Haliotis giganteus*) の内蔵中に海藻酸分解酵素として初めて見出し、Alginase と命名したことに始まる<sup>13)</sup>。これまでに報告されているアルギン酸分解酵素は、酵素反応により基質の非還元末端側に 4-deoxy-erythro-hex-4-enopyranuronosyl 基を生じる  $\beta$  脱離分解酵素である<sup>14)</sup>。1992 年、Gacesa はアルギン酸リアーゼの分解様式について提唱している<sup>15)</sup>。アルギン酸分子中のカルボキシル基を静電的に酵素分子中のある陽イオン性アミノ酸残基が捕らえると、5 位の C-H 電子対が 6 位のカルボニル炭素に引きつけられ、5 位の C-H 結合が弱くなる。次に、もう一つの酵素分子中の求核性のアミノ酸残基が C5 位のプロトンを受容する。その結果生じたエノラートアニオン中間体は共鳴安定化することによって電子を運び、最終的に C4-C5 間に二重結合を生じる。このようにしてアルギン酸はリアーゼによって分解されるので、その分解産物は非還元末端に二重結合をもつオリゴマーとなる。他の多糖質分解酵素、例えばヒアルロネートリアーゼ<sup>16)</sup>やペクテート若しくはペクチン酸リアーゼ<sup>17)</sup>に類似しているが、これらのポリウロン酸は加水分解酵素によっても分解される。しかし、アルギン酸分解酵素はすべてリアーゼであり、加水分解酵素の存在は見出されていない。これまでアルギン酸リアーゼは、その基質特異性の違いから 2 種類に大別されていた。PG に特異的な poly( $\alpha$ -L-guluronate) lyase [EC 4. 2. 2. 11] と PM に特異的な poly( $\beta$ -D-mannuronate) yase [EC 4. 2. 2. 3] である。しかし、近年 PG、PM の両基質を認識する酵素が発見された。1994 年、Kamo *et al.* によって海洋細菌 *Alteromonas sp.* が菌体外に産生する酵素 (明治製菓社報) が、1997 年、Sawabe *et al.* によって *Alrteromonas sp.* H-4 株 (現: *Pseudoalteromonas elyakovii* IAM 14594) が菌体外に産生する酵素<sup>18)</sup>が各々報告されている。また著者は、長崎県大村湾海底泥から単離した *Pseudoalteromonas sp.* (旧名: *Alteromonas sp.*) No. 272 株が菌体外に産生するアルギン酸分解酵素が両基質に活性を示すことを見出した。

これまでアルギン酸リアーゼは、殆どが海洋に生息する生物から単離されている。褐藻<sup>19~21)</sup>、海産軟体動物<sup>22~24)</sup>、グラム陰性細菌<sup>25,26)</sup>、グラム陽性細菌<sup>27,28)</sup>、バク

テリオファージ<sup>10,29)</sup>、真菌<sup>30)</sup>、ウイルス<sup>31)</sup>等から分離・精製されている。一方、陸上に生息する生物から分離されたアルギン酸リアーゼはすべて細菌由来である<sup>32,33)</sup>。

### PM Lyasae について

PM Lyase に関する一連の主な研究例としては、Muramatsu *et al.* によるサザエ中腸腺由来の PM Lyase が挙げられる。Muramatsu *et al.* は酵素の活性測定法<sup>34)</sup>、精製分離法を確立し<sup>24,35,36)</sup>、基質特異性の分析方法の開発<sup>37)</sup>、酵素分子の物理的性質・形状<sup>38)</sup>、長鎖のアルギン酸への作用様式<sup>39)</sup>とアルギン酸オリゴマーの調製方法・それらを用いての反応速度論的解析による酵素のサブサイト構造の推定<sup>40)</sup>、活性に関与するアミノ酸残基の推定を化学修飾試薬により行っている<sup>41,42)</sup>。また、真核生物としては世界で初めて一次構造解析に成功し、構造と機能について各種の研究を行っている<sup>43)</sup>。その結果が示すところによれば、サザエ由来 PM Lyase はエンド型の酵素で、分子量 28912.41 の糖タンパク質である。遊離の SH 基が存在し、酸化により失活することより、精製の際に用いる緩衝液にはすべて EDTA が必要である。C 末端側が 2 残基欠如した Isoform が存在することも分かっている。酵素活性に関与するサブサイト数は 5 で非還元末端側から 2 番目と 3 番目の間に切断部位があることが示唆されている。この他、PM Lyase の代表的例として、アワビ (*Haliotis tuberculata*) 由来アルギン酸リアーゼの基質特異性を NMR により詳しく分析することで同酵素が PM Lyase であることを証明し<sup>44)</sup>、HPLC による解析で飽和もしくは不飽和アルギン酸オリゴマーに対する作用様式を検討し、酵素のサブサイト構造について解析している例もある<sup>45)</sup>。

### PG Lyase について

一方、PG Lyase に関する一連の主な研究例としては、Takeshita *et al.* によるマダいの腸内容物から分離した海洋細菌 *Vibrio* sp. 由来の菌体外 PG Lyase が挙げられる。Takeshita *et al.* はアルギン酸リアーゼ産生細菌のスクリーニング法の開発をし<sup>46)</sup>、酵素化学的性質を明らかにしている。同酵素は熱に対して見掛け上高い耐熱性 (100°C、15 分間の加熱処理でも約半分の残存活性をもつ) を示すが、これは加熱処理後の冷却により、タンパク質分子構造のネイティブ構造への復帰によるこ

とに起因することを見出している<sup>47,48)</sup>。酵素のサブサイト構造の解析<sup>49,50)</sup>、活性に関与するアミノ酸残基の推定<sup>49)</sup>について行っている。また、タンパク質変性剤に対する酵素の挙動<sup>51)</sup>についても報告している。また Miyanishi *et al.* が、同酵素の一次構造解析をタンパク質化学的手法で部分構造を決定し、遺伝子の大腸菌を用いたクローニングにより全一次構造解析を行っている<sup>52)</sup>。その結果 *Vibrio sp.* が産生するグルロン酸リアーゼは、291 アミノ酸残基から構成されており、分子量 33088.94 であるが、S-S 結合の位置などについての詳細は解明されていない。

Matsubara *et al.* は、佃煮工場の排水処理施設より分離した *Corynebacterium sp.* ALY-1 株が菌体外に産生するグルロン酸リアーゼについて一連の実験を行っている。この酵素は、他の細菌由来の同酵素と比較して比活性が非常に低いのが特徴で、あまり例のないグラム陽性細菌である。同酵素の精製、タンパク質化学的性質、変性剤に対する挙動について報告している<sup>27)</sup>。また、Muramatsu *et al.* の方法<sup>40)</sup>に従い G オリゴマーの調製を行い、低分子基質への作用様式を反応動力学により調べ、反応産物の HPLC による解析を行い、サブサイト数が 6 個で、非還元末端側から 2 番目と 3 番目の間に切断部位があることも推定している<sup>53)</sup>。一次構造をタンパク質化学的手法と遺伝子からの解析で明らかにしている。その結果、*Corynebacterium sp.* 由来グルロン酸リアーゼは、224 アミノ酸残基から構成されており、分子量 24296.6 であった。酵素タンパク質分子中に 4 つあるシステイン残基は全てシスチンの形で存在し、S-S 結合の位置も決定されている<sup>54)</sup>。活性に関与するアミノ酸残基の推定を Takeshita *et al.* が報告している *Vibrio sp.* と比較検討している<sup>55)</sup>。

Nibu *et al.* は、土壌細菌 *Enterobacter cloacae* M-1 由来 PG Lyase について一連の実験を行っている。同菌体外酵素の精製、タンパク質化学的性質の解明を行い<sup>26)</sup>、菌体内 PG Lyase についても Shimokawa *et al.* が同様に行っている<sup>56)</sup>。Shimokawa *et al.* は、飽和・不飽和アルギン酸オリゴマーの調製法<sup>57)</sup>、オリゴマーの分析法を開発し<sup>58)</sup>、酵素の飽和または不飽和オリゴマーに対する作用様式やサブサイト構造について明らかにしている<sup>56,59)</sup>。

## PG、PM 両基質に活性を有するアルギン酸リアーゼについて

さらに、PG と PM の両基質に活性を有するアルギン酸リアーゼについての報告は、本章にも記した通り Kamo *et al.* (1994 年) (明治製菓社報) による *Alteromonas macleodii* 由来、Sawabe *et al.* (1997 年)<sup>18)</sup> の *Alteromonas sp.* H-4 株由来菌体外アルギン酸リアーゼのみである。前者の酵素についての詳細な実験報告は殆どない。Sawabe *et al.* が見出した *Alteromonas sp.* H-4 株由来アルギン酸リアーゼは、穴あき症コンブの表面から単離した細菌が菌体外に産生する酵素である。この菌は、少なくとも 5 種類のアルギン酸リアーゼを産生する。そして、その幾つかが両基質に活性を有する。そのうち最も活性が高い酵素について一連の実験を行っている<sup>18),60)~63)</sup>。その結果、電気泳動的に単一な標品が得られるまで精製し、性質を調べたところ、等電点が 4.7 と酸性タンパク質であり、Gel overlay 法により両基質を分解することを明らかとし、G への作用が M よりも高いことを反応動力学定数より導き出している<sup>63)</sup>。しかし、アルギン酸オリゴマーを用いての解析は行っておらず、サブサイト数の推定には至っていない。また同酵素をコードする遺伝子より一次構造の決定を行っており、その結果によれば 234 アミノ酸残基から構成されており、分子量 25397.39 であった<sup>64)</sup>。同酵素は、G と M の両基質を分解すること、細菌そのものが海洋環境での生存能力が高いことより、海藻 (コンブ) のプロトプラストを作成するのに適した酵素であると指摘している。

## アセチル化アルギン酸リアーゼについて

この他、細菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来のアルギン酸 (M の 2 位及びまたは 3 位が O-アセチル化されているアルギン酸、以下アセチル化アルギン酸と表記する) に特異的に作用する *Sphingomonas sp.* A1 株由来菌体内アルギン酸リアーゼについて Murata *et al.* が一連の研究を行っている。*Sphingomonas sp.* A1 株を水田より単離し、その菌が産生するアルギン酸リアーゼ 3 種類のうち、A1-I は海藻由来のアルギン酸にも細菌由来のアセチル化アルギン酸両方に対して分解能を有する。A1-II は海藻由来に、A1-III はアセチル化アルギン酸に活性を示す<sup>65)</sup>。何故このような 3 種類の酵素が産生されるかという A1-I (66 k) がオートプロセシング

により、A1-II (25 k) と A1-III (40 k) に成るという機構を明らかにしている。これらの酵素の緒性質については明らかにしているが、反応動学的解析は行われていない。しかし、アルギン酸分解酵素としては初めて、A1-II と A1-III について X 線結晶構造解析を行っている<sup>66,67)</sup>。また、大腸菌を用いてのクローニングを行い、A1-I~III の過剰発現に成功し、その精製、緒性質についても明らかとしている<sup>68)</sup>。さらに、A1-III について 192 番目のヒスチジンをアラニンに変換し、部分特異的変異をした結果、円偏光二色性 (CD) による構造解析からネイティブのものに変化は見られなかったが、活性が 3 万分の 1 程度に減少していた。このことより、このヒスチジン残基が活性発現に深く関係していることを示している<sup>69)</sup>。また、A1-III にアルギン酸トリマーを共存させて結晶化させ、活性部位にアルギン酸トリマーが結合していることを確認した。そこから解析したところ、246 番目のチロシン残基が触媒残基であろうとも推定している<sup>70)</sup>。

### アルギン酸及びアルギン酸オリゴマーの利用

前にも述べたが、海産多糖質アルギン酸は二価のカチオンの存在でゲル化が起こる独特な性質から多くの分野で利用されている。高分子アルギン酸の生理活性に関する研究は、多々行われている。特に、免疫賦活作用<sup>71,72)</sup>や癌細胞の形態変化<sup>73)</sup>をもたらすといった点は非常に興味を持つところである。一方アルギン酸リアーゼを用いてアルギン酸オリゴマーを調製し、オリゴマーの生理活性についての研究例は多くない。これまでの報告は、静菌作用<sup>74)</sup>、ピフィズス菌の成長促進作用<sup>75)</sup>、各種高等植物の幼根の成長促進作用<sup>76~79)</sup>や最近では、ラットの血圧上昇抑制作用などがある<sup>80)</sup>。Murata *et al.* は *Sphingomonas* sp. A1 株が菌体外に産生する分子量 40 k のアルギン酸リアーゼが *Pseudomonas aeruginosa* によって合成されるアセチル化アルギン酸に特異的に作用することを利用して、白人特有の嚢胞性繊維症の治療薬としての応用を検討している<sup>81)</sup>。アルギン酸は、高分子としての利用が殆どであり、昔より良質の食物繊維として人々に摂取されてきた。低分子化されたものについても以上のように人類に有用と思われる生理活性があることから酵素消化で得られたアルギン酸オリゴマーの利用も今後の課題となるであろう。

## 本研究の目的と意義

これまでに見出されてきたアルギン酸リアーゼは、PG か PM のどちらか一方のみに活性を示す。しかし、近年 *Pseudoalteromonas* sp. が菌体外に産生するアルギン酸リアーゼは PG、PM の両基質に活性を有することが明らかとなっている<sup>18)</sup>。今回、長崎県の大村湾の海底泥より単離した *Pseudoalteromonas* sp. No. 272 が産生する菌体外アルギン酸リアーゼも両基質に活性を有することが明らかとなった。アルギン酸リアーゼの酵素学的研究は、他の多糖質分解酵素と比較して一般的に少ない。色々な起源から酵素そのものは得られているが、前にも述べたように、サザエ由来の PM Lyase、海洋細菌 *Vibrio* sp.、*Corynebacterium* sp. ALY-1 株、土壌細菌 *Enterobacter cloaccae* M-1 由来 PG Lyase、水田に生息する細菌 *Sphingomonas* sp. A1 株由来アセチル化アルギン酸リアーゼなどの酵素的ならびにタンパク質化学的性質が報告されているに過ぎない。殊に、PG、PM の両基質に活性を有するアルギン酸リアーゼに関する研究は殆ど行われていないのが現状である。酵素の構造と機能発現との関連から両基質活性を有するものと、単独の活性を有するものとの比較は酵素機能の基礎的研究をするうえで特に意義あることである。また、アルギン酸の有効利用を考慮すると、一つの酵素を用いて高分子の両基質に作用し、低分子化した両オリゴマーの活用を見い出すことが有益と考えられる。両基質に活性を有する酵素を用いてアルギン酸を低分子化することは、G と M 両方のオリゴマーが効率良く得られることを意味している。そこで、著者は *Pseudoalteromonas* sp. No. 272 株が産生するアルギン酸リアーゼについて以下に記述する一連の実験を行い、酵素の諸種の性状と若干の利用性について検討した。

## 論文の構成

本論文は次の 6 章から構成されている。

第 1 章は上述の通りである。

第 2 章では、長崎県大村湾の海底泥より単離した菌体外アルギン酸リアーゼ産生能を有する No. 272 株細菌の同定、菌体の培養と酵素の精製、そのタンパク質



化学的性質、酵素化学的性質などについて記述する。

第 3 章では、本酵素のタンパク質化学的手法による部分一次構造決定、それを基にした PCR 法による全一次構造解析、CD スペクトルによる 2 次構造の推定と芳香族アミノ酸の存在環境の比較、X 線結晶構造解析による 3 次元構造解析について記述する。

第 4 章では、化学修飾により活性に関与するアミノ酸残基の同定、重合度の異なる低分子基質の調製、サブサイト構造の推定や活性中心の数について検討する。また、上記以外の酵素の活性中心に関する知見について幾つか調べる。

第 5 章では、アルギン酸を本酵素で分解して得られる不飽和オリゴマーの生理活性について検討する。1 つは、ニンジンとイネの幼根に対する成長促進効果について、もう 1 つは、免疫賦活作用をヒト末梢血より得た白血球に不飽和オリゴマーを作用させサイトカインの誘導性について *in vitro* の実験系で確認する。

第 6 章では、本論のまとめを行う。