

第2章 *Pseudoalteromonas* sp. No.272 株由来 菌体外アルギン酸リアーゼの精製と性状

緒言

アルギン酸リアーゼの研究は古くよりなされているが、その研究報告例は極めて少ないのが現状である。当研究室においても、Muramatsu *et al.* は、サザエの中腸腺から PM Lyase を抽出し、EDTA を全ての緩衝液系に添加し、硫酸塩析、SP-Sephadex C-50 陽イオン交換クロマトグラフィー、Sephadex G-50 ゲル濾過により精製を行っている^{24,35,36}。また、Takeshita *et al.* は海洋細菌 *Vibrio* sp. 由来 PG Lyase について Zobell 2216E 培地による大量培養後、培養上清の硫酸塩析、DEAE-Cellulofine 陰イオン交換クロマトグラフィー、Cellulofine GCL 1000m ゲル濾過、Butyl Cellulofine 疎水クロマトグラフィーを経て精製を行っている⁴⁷。PG、PM の両基質に特異的な酵素については、発見そのものは最近のことであり、研究例は数少ない。その精製法を確立し、単一酵素について性質を調べることは本酵素の構造機能を明らかにするうえでたいへん興味のあることである。

アルギン酸リアーゼの研究は様々な生物起源のものについてなされている。本章で明らかとするが、本酵素は PG、PM の両基質に活性を有する。本酵素以外に同じ基質特異性を有するアルギン酸リアーゼについての研究が Sawabe *et al.* によってなされており^{18,60-63}、その酵素化学的諸性質についてみると、SDS-PAGE による分子量推定は 32 k、等電点 4.7、至適 pH 7.5、最適温度 30°C であった。MnCl₂、BaCl₂ の添加で活性が上昇し、EDTA、ZnSO₄、CdCl₂ の添加で活性が低下する。金属イオンの影響は、精製の際にも非常に重要である。先にも述べたが、Muramatsu *et al.* がサザエの中腸腺より PM Lyase を単離精製した際、EDTA が常時存在しなければ失活してしまうことを見出している³⁵。また、Miyazaki *et al.* は、海洋細菌 *Pseudomonas* sp. F6 株 PG Lyase がカルシウムイオンによって活性が大きく上昇することを明らかとしている⁸²。

今回、長崎県大村湾の海底泥よりアルギン酸リアーゼを産生する細菌をスクリーニングした結果、No. 272 株が他と比較して生育率が高く、かつアルギン酸リアー

ゼ活性が非常に高い酵素を産生する細菌であることが認められた。本菌の同定を日本食品分析センターに依頼し同定し、さらに、本菌の培養条件を検討したところ、Davis の改良培地で 25°C、48 時間培養することで菌体外にアルギン酸リアーゼを最も効率良く産生することが分かった。

そこで本章ではこれらの研究結果について、第 1 節で No. 272 株細菌の種の同定、同菌由来アルギン酸リアーゼの精製、第 2 節で本酵素の酵素化学的諸性質を記述するとともに、基質の円偏光二色性 (CD) スペクトル変化を調べることで、基質特異性を明確にした。

第1節 菌同定と酵素の精製

実験材料

アルギン酸ナトリウム (cps 1000) はナカライテスク社製を用いた。濾過海水は長崎大学海洋資源教育研究センターより提供していただいた。硫酸アンモニウムはシグマ社、透析膜は三光純薬品社、限外濾過膜は Advantec 社より購入した。DEAE-Cellulofine A-500 は生化学工業社、Sephadex G-75 superfine は Pharmacia 社のものを使用した。

実験方法

1. 酵素活性の測定法

アルギン酸リアーゼ活性は、Rapid 法で測定した³⁴⁾。0.2%のアルギン酸ナトリウムを含む 0.1 M Sørensen's glycine II (0.1 M glycine, 0.1 M NaCl) 緩衝液 (pH 8.0) 2.0 ml を 30°C で 10 分間予めインキュベートしておき、この基質溶液に酵素溶液 0.2 ml を添加して、2 分間反応を行った。活性の定義は、便宜的には 235 nm における吸光度が 1 分間に 0.1 増加する酵素量を 1 単位 (unit) としたが、必要に応じて反応産物 $\mu\text{mol}/\text{min}$ に換算した (P 84 参照)。酵素の比活性は、タンパク質 1 mg 当たりの活性 (units/mg) で表した。

2. タンパク質量の測定法

タンパク質量は、Cytoskeleton 社製の Advanced Protein Assay Reagent を使用した。標準タンパク質として牛血清アルブミンを用いた。通常の前培養過程においては、タンパク質溶液の 280 nm における吸光度を測定し便宜的にタンパク質量とした。また、20°C で本酵素の 1% 溶液の A_{280} は 4.9 であった。

3. *Pseudoalteromonas* sp. の培養

Zobell 2216E 培地で前培養を行い、その後 Davis の改良培地で本培養を行った。前培養は 4 本の 100-ml 容の三角フラスコを用いて 50 ml の培地に接種し、25°C、24 時間、回転培養 (150 rpm) した。その後の本培養は 10-L 容のジャーファーマンター (丸菱バイオエンジン社製) を用いて 8 L の培地に前培養液の全量を接種して 25°C、48 時間、攪拌通気培養を行った。培地の組成を Table 1、Table 2 にそれ

ぞれ示す。

Table 1. Ingredients of Zobell 2216E Culture Medium for Preculture

Sodium alginate	0.2 %
NaCl	3 %
KCl	0.07 %
MgSO ₄	0.26 %
MgCl ₂	0.5 %
KH ₂ PO ₄	0.01 %
Yeast extracts	0.1 %
Polypepton	0.5 %

Each reagent was in 1 L of H₂O at pH 7.5.

Table 2. Ingredients of Davis Culture Medium for *Pseudoalteromonas* sp.

Sodium alginate	0.2 %
K ₂ HPO ₄	0.7 %
KH ₂ PO ₄	0.2 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 %
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	0.05 %

Each reagent was in 1 L of seawater at pH 7.0.

4. 酵素の精製

培養液を遠心分離 (10,000 × g, 25 min) により培養上清と沈殿物に分離した。すべての操作を低温室 (4°C) で行った。

得られた上清について 80%飽和硫酸アンモニウム析を行った。析出したタンパク質を遠心分離 (10,000 × g, 90 min) により回収し、粗酵素として以下の方法に従い精製を行った。粗酵素溶液をよく分散し、0.1 M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析を行った。透析外液は 7 回取り換えた。

4.1 DEAE-Cellulofine(陰イオン交換体)を担体としたバッチ法

得られた粗酵素溶液は、粘性が非常に高く直接カラムに供することができなかつたので、DEAE-Cellulofine によるバッチを行った。予め緩衝化したイオン交換体

に透析した粗酵素液を加え攪拌し、ゲルに十分に吸着させた。その後、ガラスフィルターに流し込み、同緩衝液で夾雑タンパク質がなくなるまで、洗浄した。次に、1.0 M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で活性画分を溶出した。1 回につき、200 ml で溶出し、活性がなくなるまでこの操作を繰り返した。ここで得られた活性画分を限外濾過装置 (Amicon 社製、限外濾過膜 :Advantec 社製 UK-10 M.W 10,000) にて濃縮を行った。濃縮後、多くの不溶性タンパク質が生じたが、この不溶性タンパク質も除くことなく可溶性タンパク質と一緒に透析した。透析の条件は上述と同じであった。

4.2 2nd DEAE-Cellulofine による陰イオン交換クロマトグラフィー

0.1 M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で緩衝化した DEAE-Cellulofine カラム (1.5 x 45 cm) に酵素液 (59 ml) をかけ、カラムを同緩衝液で洗浄後、NaCl の濃度勾配法 (0.1-0.6 M)により、ゲルに吸着したタンパク質を溶出させた。流速 0.3 ml/min で流した。得られた画分を前記同様、限外濾過にて濃縮を行った。

4.3 Sephadex G-75superfine によるゲル濾過

0.1 M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で緩衝化した Sephadex G-75 superfine カラム (2.5 x 95 cm) に酵素液 (5 ml) を供した。流速 0.2 ml/min であった。得られた画分を限外濾過で濃縮を行った。

5. 電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Normal PAGE) は Davis の方法⁸³⁾に、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は Laemmli の方法⁸⁴⁾に従った。ゲルは市販 (PAGEL AE-6000 アトー社製、12.5% ゲル濃度) のものを用い、平板を用いたスラブ法で行った。ゲルの染色は、クマシーブリリアントブルー (R-250) を用いて行った。SDS-PAGE の際の分子量測定用の標準タンパク質には、Pharmacia 社製の分子量マーカー (ホスホリラーゼ B (分子量 94,000)、牛血清アルブミン (67,000)、卵白アルブミン (43,000)、カルボニックアンヒドラーゼ B (30,000)、トリプシンインヒビター (20,100)、 α -ラクトアルブミン (14,400)) を用いた。

結果および考察

1. 細菌の同定

長崎県大村湾の海底泥より単離した細菌 No. 272 株の同定を日本食品分析センターに依頼した。本菌の顕微鏡像を Fig. 1 に、検査結果を Table 3 に示す。検査の結果、本菌株は *Pseudoalteromonas* (旧名 *Alteromonas*) 属細菌の一種と同定された。本菌は *A. haloplanktis* や *A. macleodii* に比較的近い性状を示したが、いずれの菌種とも性状が完全には一致せず、種の確定には至らなかった。

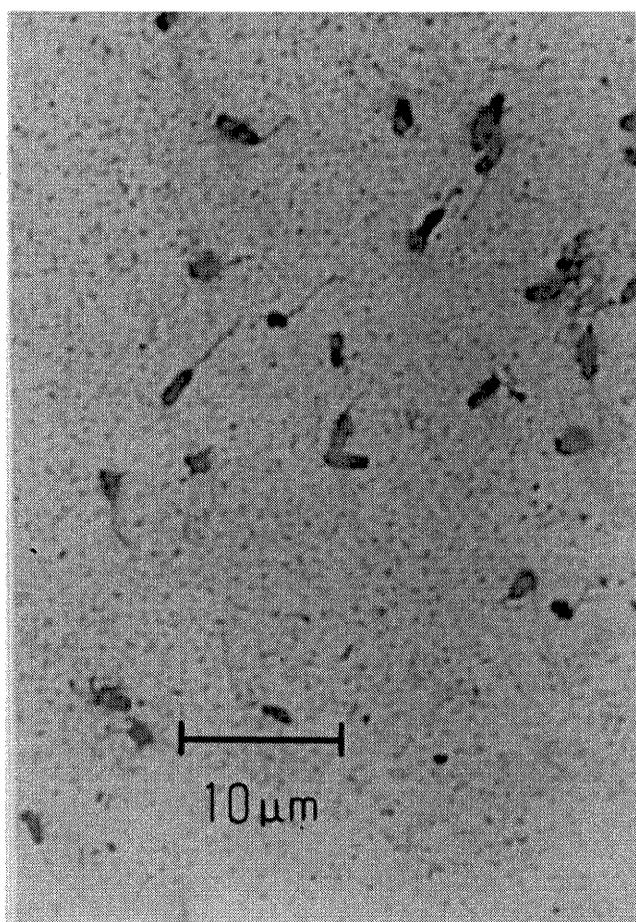


Fig. 1. Electron Micrograph of Strain No. 272 Isolated from Sea Mud of Omura Bay.

The bar represents 10 μm.

Table 3. Characteristics of the Isolated Strain No. 272 from Sea Mud of Omura Bay

	Rods ^{a)}
Shape	
Gram stain	-
Spore	-
Mobility	+
Flagella	+ ^{a)}
Aerobic growth	+
Oxidase	+
Catalase	+
OF test	O
PHB accumulation	-
β -hydroxybutyric acid	-
Growth on NaCl medium (0%)	-
(1%)	-
Sea water	+
Lipase	+
Gelatin liquefaction	+
Glucose	+
Galactose	+
Fructose	+
Sucrose	+
Maltose	+
Cellobiose	-
Melibiose	+
Succinate	-
Fumarate	-
Citrate	-
L-Threonine	-
Methanol	-
Growth at 4°C	+
30°C	+
40°C	-
Nitrate reduction	-
N ₂ -gas	-
Hydrolysis of starch	+
GC content (mol%)	41 ^{b)}
Quinone	Q-8

a), see Fig. 1; b), based on HPLC; +, positive; -, negative.

2. アルギン酸リアーゼの精製

Davis の改良培地で大量培養 (約 120 L) をし、培養液中の酵素タンパク質を硫酸塩析により回収し、DEAE-Cellulofine を担体とするバッチ法、同担体でのカラムクロマト、Sephadex G-75 superfine によるゲル濾過により本酵素を精製した。DEAE-Cellulofine と Sephadex G-75 superfine によるカラムクロマトグラフィーを Fig. 2 と Fig. 3 にそれぞれ示す。また、本酵素の精製の一例の要約を Table 4 に示す。最終精製段階において本酵素は、およそ 34% の回収率で 135.3 倍にまで精製され、比活性 1122.8 units/mg であった。精製酵素の純度検定をポリアクリルアミドゲル電気泳動法により行った結果、Fig. 4 に示すように SDS 存在、非存在下において単一のバンドが得られ、高度に精製されていることがわかった。このようにして精製された酵素を用いて以後の実験を行った。

Table 4. Summary of Purification of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272

Procedure	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Total activity (units)	Yield (%)	Purification (fold)
Ammonium sulfate (0-80%)	1266.9	8.3	10477	100	1.0
Batch on DEAE-Cellulofine	180.8	73.0	13200	126	8.8
2nd DEAE-Cellulofine	7.7	560.6	4317	41	67.5
Sephadex G-75 SF	3.2	1122.8	3593	34	135.3

One unit of the activity was routinely determined as an increase of 0.100 in absorbance at 235 nm per min.

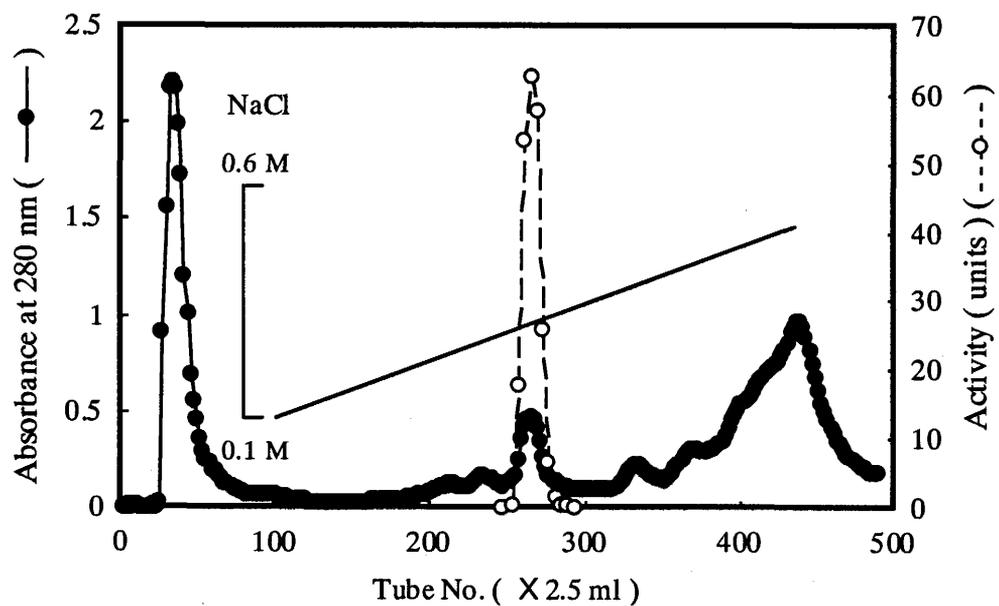


Fig. 2. 2nd DEAE-Cellulofine Column Chromatography of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272.

Crude enzyme was put on DEAE-Cellulofine column (1.5 x 45 cm). The column was washed with 10 mM phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M NaCl, and eluted with an NaCl gradient from 0.1 M to 0.6 M.

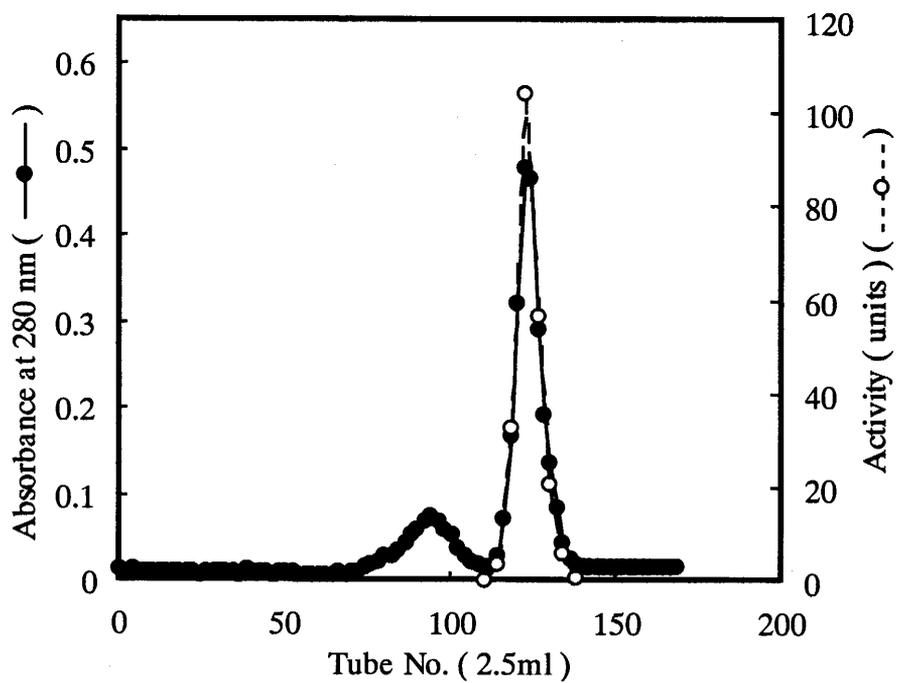


Fig. 3. Gel Filtration of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272 on Sephadex G-75 superfine.

Crude enzyme was put on Sephadex G-75 superfine column (2.5 x 95 cm). The elution buffer was 10 mM phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M NaCl.

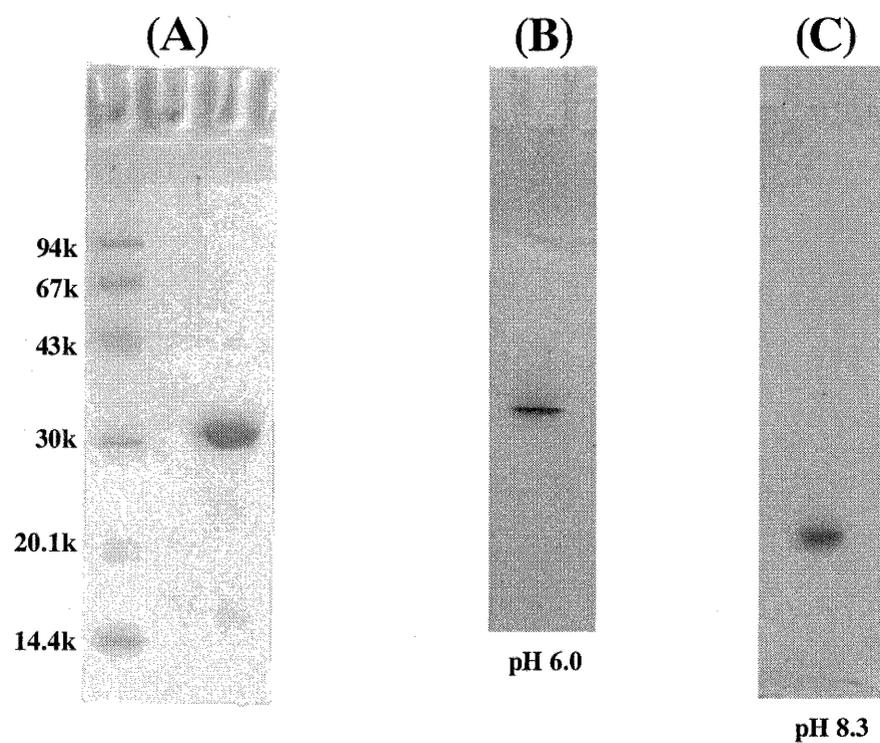


Fig. 4. PAGE of the Purified Enzyme in the Presence (A) and Absence of SDS at pH 6.0 (B) and pH 8.3 (C).

PAGE with and without SDS was done by using 12.5% polyacrylamide gel. The standards of molecular weight is shown to the left of the gel plate (A). The protein was stained with Coomassie Brilliant Blue.

第2節 酵素の一般的性状

実験材料

アルギン酸ナトリウム (cps 1000) はナカライテスク社製を用いた。

実験方法

1. 分子量の測定法

a) SDS-PAGEによる分子量測定法

第1節 5.電気泳動に記述した方法に従った。電気泳動に供した位置からの移動距離を測定し、その全長に対する比率と各標準タンパク質の分子量の対数との関係より最小自乗法を用いて直線を求め、本酵素の分子量を推定した。

b) ゲル濾過(Sephadex G-75 superfine)による分子量測定法

第1節 4.酵素の精製に記述した Sephadex G-75 superfine ゲル濾過と同条件で行った。標準タンパク質には、Pharmacia 社製の LMW Gel Filtration Calibration Kit (ブルーデキストラン 2,000、牛血清アルブミン、67,000；蛋白アルブミン、43,000；キモトリプシノーゲン A、25,000；リボヌクレアーゼ A、13,700) を用いた。各標準タンパク質の溶出位置から検量線を作成し、本酵素の分子量を推定した。

c) アミノ酸分析による分子量推定

酵素タンパク質の酸加水分解は、PICO-TAG™ ワークステーション (Waters 社製) で行った。この装置は、塩酸気相中で加水分解を行うことができ、塩酸溶液でサンプルを直接汚染することを最小限に抑えることができる。本酵素 1 mg を超純水 1 ml で溶解し、10 μ l ずつ 3 本のマイクロチューブに分注し、それぞれを反応バイアル瓶に入れ、減圧乾固した。1% フェノールを含む 6 N 塩酸 200 μ l をマイクロチューブ中に入らないように反応バイアル瓶に入れ、100°C で 24、48、72 時間酸加水分解した。酸加水分解したサンプルを 0.02 N 塩酸 30 μ l に溶解し、サンプル瓶に移し、L-8500 形高速アミノ酸分析計 (日立製作所製) で分析した。

2. 等電点電気泳動

等電点電気泳動は、Pharmacia 社製の Multiphor II、MultiDriver XL 電気泳動装置を用いて測定した。標準タンパク質として同社の pI Calibration Kit (アミノグルコ

シダーゼ、3.50；大豆トリプシンインヒビター、4.50； β -ラクトグロブリン A、5.20；ウシカ-ボニックアンヒドラーゼ B、5.85；ヒトカ-ボニックアンヒドラーゼ B、6.55；ウマミオグロビン-酸性側バンド (有色マーカー)、6.85；ウマミオグロビン-塩基性側バンド (有色マーカー)、7.35；レンチルレクチン-酸性側バンド、8.15；レンチルレクチン-中間バンド、8.45；レンチルレクチン-塩基性側バンド、8.65；トリプシノーゲン、9.30) を用いた。各標準タンパク質の移動距離から SDS-PAGE による分子量測定法と同様にして本酵素の等電点を推定した。

3. pH 及び温度の影響

pH の影響を調べるのに用いた緩衝液は、McIlvaine's 0.1 M citric acid-0.2 M phosphate 緩衝液 (pH 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5)、0.1 M Sørensen's glycine II 緩衝液 (pH 8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0) であった。

至適 pH

0.4% アルギン酸水溶液と各緩衝液を各 1 ml ずつ混和し、30°C で 10 分間インキュベートした後、酵素溶液 (0.13 mg/ml) を 20 μ l 加え、酵素活性を測定した。基質溶液と緩衝液を混合することで pH が変化するので、各溶液ごとに補正を行い、結果は補正 pH に対する相対活性で示した。

pH 安定性

酵素溶液 (0.13 mg/ml) と各緩衝液を 15 μ l ずつ混和し、30°C で 2 時間インキュベートした後、そのうちの 20 μ l について活性を測定した。pH 補正を同様に行い、結果は補正 pH に対する相対活性で示した。

温度安定性

本酵素の温度安定性を調べると同時に、トリス緩衝液とリン酸緩衝液に対する影響も調べた。用いた緩衝液は、50 mM トリス緩衝液 (pH 7.0)、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) であった。

酵素溶液 (0.065 mg/ml) 15 μ l と各緩衝液 285 μ l を混合し、各温度 (20.5、26、30、35、40、45、50°C) で 30 分間プレインキュベートした後、氷冷した。その酵素溶

液 200 μ l について活性を測定した。結果は各温度に対する相対活性で示した。

4. 金属イオンに対する影響

本実験に用いた金属化合物は、 $MgCl_2$ 、 KCl 、 $CoCl_2$ 、 $ZnCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $NaCl$ 、 $MgSO_4$ 、 $NiSO_4$ 、 $Ba(OH)_2$ 、 $CdCl_2$ 、 $MnCl_2$ であり、金属キレート剤である EDTA による影響も調べた。活性測定に用いた基質は 0.2% アルギン酸ナトリウム、0.1% PG、0.1% PM であった。

0.2%アルギン酸ナトリウム

本酵素溶液 (1.00 mg/ml) 5 μ l と 56 mM の各金属イオンを含む 0.1 M Sørensen's glycine II 緩衝液 (pH 8.5) 45 μ l を混和し、30 $^{\circ}$ C、10 分間プレインキュベートした。その後、酵素・金属イオン混合溶液 45 μ l について活性測定した。プレインキュベート時の金属イオンの終濃度は 50 mM、活性測定に用いた酵素は 0.0045 mg であった。結果は金属イオンを含まない上記同緩衝液で処理した活性を 100% とし、残存活性を相対活性で示した。

0.1%PG、PM

本酵素溶液 (1.00 mg/ml) 10 μ l と 56 mM の各金属イオンを含む 0.1 M Sørensen's glycine II 緩衝液 (pH 8.5) 90 μ l を混和し、30 $^{\circ}$ C、10 分間プレインキュベートした。その後、酵素・金属イオン混合溶液 48 μ l ずつをとり、予め 30 $^{\circ}$ C、10 分間インキュベートしておいた 0.1% PG、0.1% PM 溶液 (2 ml) に加え活性を測定した。プレインキュベート時の金属イオンの終濃度は 50 mM であり、活性測定に用いた酵素は 0.0053 mg であった。結果は 0.2% アルギン酸ナトリウムと同様に示した。

また、PM については 50 mM $CaCl_2$ において活性が大幅に上昇し、かつ基質溶液の沈澱が生じたので、25 mM $CaCl_2$ で処理したものについて活性を測定した。

5. 基質特異性

本酵素の基質特異性は、基質 (PG、PM) の円偏光二色性 (CD) スペクトル変化により調べた³⁷⁾。CD 測定装置は、円偏光二色性分散計 J500A (日本分光社製) を用いた。測定中は、装置内に窒素ガスを流入させ、空気中のオゾンの影響を避けた。調製した 0.1% PG、PM を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 2 ml に本酵素 (0.012

mg/ml) 20 μ l を 30°C で 3 時間作用させ、その前後での各基質の CD スペクトル変化を比較した。結果は、4 回測定した平均をスペクトルとして示した。セルは、1 mm のものを使用した。平均残基分子量は、176 を用い、平均残基橢円率は次式で求めた。

$$[\theta] = (\theta_{\text{obs}} \times \text{MRW}) / (10 \times d \times c)$$

ここで、 $[\theta]$ は平均残基橢円率、 θ_{obs} は測定角 (degree)、MRW は平均残基分子量、d はセル長 (cm)、c はサンプル濃度 (g/ml) である。

結果および考察

1. 分子量の測定

本酵素の分子量を Sephadex G-75 superfine によるゲル濾過から推定した結果を Fig. 5 に示す。*Pseudoalteromonas* sp. 由来アルギン酸リアーゼの分子量は、SDS-PAGE から 33.9 k (データは示していない)、ゲル濾過から 23 k と推定された。変性タンパク質 (SDS-PAGE) と未変性タンパク質 (ゲル濾過) で推定分子量に 10 k 程度の差があったが、これは時として電気泳動による分子量推定で観察されることであり、本酵素がサブユニット構造をとっていることは考えにくい。SDS-PAGE の際に、還元剤 (β -メルカプトエタノール) 処理、未処理の酵素タンパク質を同時に泳動したところ、未処理の酵素タンパク質の方が低い位置にバンドが認められた (データは示していない)。本酵素は、非常にコンパクトな構造をしていることが示唆された。現在までに報告されている他起源由来アルギン酸リアーゼは、全て単量体であり、分子量は 25~100 k であることが示されている。

さらに本酵素のアミノ酸組成分析から分子量の推定を行った。分析結果を Table 5 に示す。本酵素タンパク質 1 mol (分子量 34 k として) あたりのアミノ酸含量は酸性アミノ酸残基の量に富み、アスパラギン酸 (アスパラギン) が 52 残基、グルタミン酸 (グルタミン) が 36 残基であった。また、スレオニンも多く 41 残基であった。逆にプロリン残基、メチオニン残基は少なかった。システイン残基については、過ギ酸酸化法⁸⁵⁾とカルボキシメチル化法⁸⁶⁾より 2 残基存在し、それらがシスチンの形であることも推定された。トリプトファン残基の定量⁸⁷⁾を行った結果、0.023 と求められ、本酵素タンパク質中には存在しないという結果が得られた。しかし、これまでに報告されているアルギン酸リアーゼは、トリプトファンが活性発現に必須であることより、本酵素にも恐らく 1 分子中、1 mol のトリプトファンが含まれるものと示唆される。アミノ酸組成分析より、本酵素の分子量は 35 k と推定された。正確なアミノ酸組成と分子量は、後述のアミノ酸配列分析結果によって示されている。

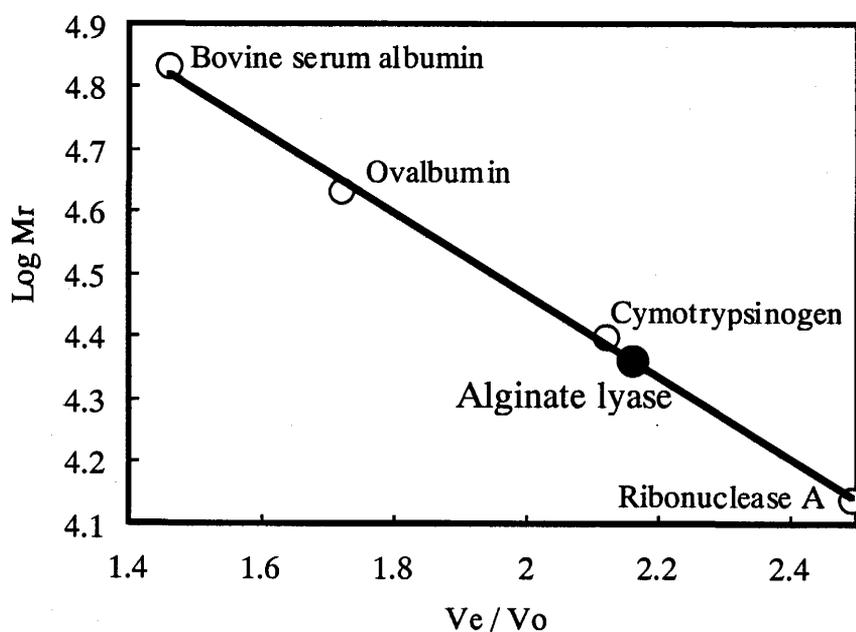


Fig. 5. Estimation of Molecular Weight of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272 on Sephadex G-75 superfine Gel Filtration.

The line was drawn by the method of the least squares. Gel filtration of enzyme and marker proteins was carried out on a Sephadex G-75 superfine column (2.5 x 95 cm). Proteins were eluted with 10 mM phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M NaCl at a flow rate of 12 ml/hr. V_o and V_e represent void volume of the column determined by blue dextran and elution volume of each protein, respectively.

Table 5. Amino Acid Composition of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272 Determined from Acid Hydrolysis

Number of each amino acid was shown as integer. The amount of Ser and Thr was corrected by the extrapolation to zero time of acidic hydrolysis, and the Val, Ile and Leu were from 72-hr hydrolysis.

Amino acid	Residues per molecule (mol/mol)
Lys	13
His	5
Arg	8
Asx	52
Thr	41
Ser	34
Glx	36
Pro	3
Gly	28
Ala	11
Val	28
Met	3
Ile	14
Leu	17
Tyr	12
Phe	17
Trp ^{a)}	0
Cys ^{b)}	2

a) Trp was determined spectrophotometrically by the method of Edelhoch⁸⁷⁾.

b) Cys was determined as cysteic acid with the amino acid analyzer after acid hydrolysis of oxidized protein for 24 hr. The oxidized protein was prepared with performic acid by the method of Moore⁸⁵⁾.

2. 等電点電気泳動

本酵素の等電点推定の結果を Fig. 6 に示す。本酵素の等電点は、3.8 と推定された。現在までに報告されているアルギン酸リアーゼの等電点は、4~9 付近である。本酵素は、前例のない酸性タンパク質であることが示された。このことは、先に述べたアミノ酸組成分析の結果でアスパラギン酸やグルタミン酸の含有量が多いことと一致する。

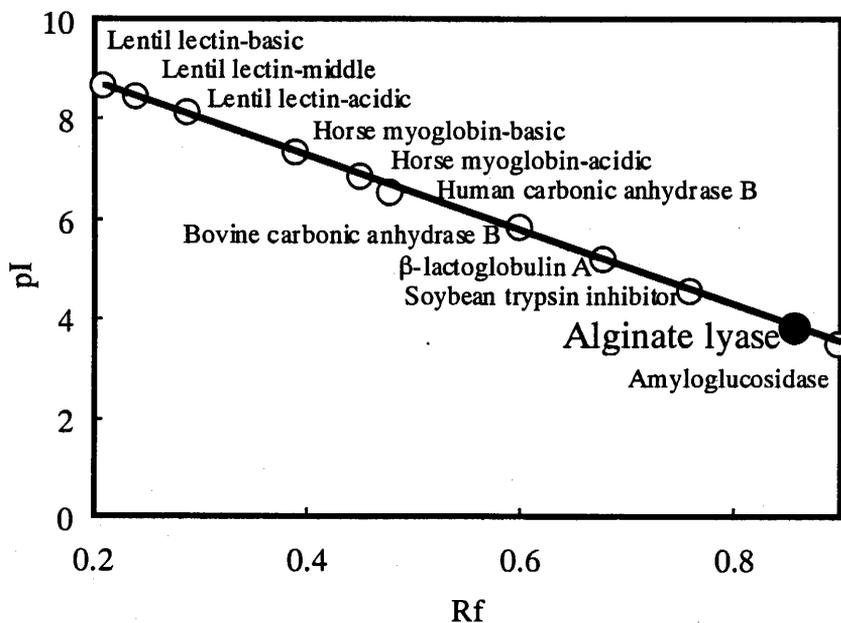


Fig. 6. Estimation of pI of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272 on Isoelectric Focusing.

The line was drawn by the method of least square. Isoelectric focusing of alginate lyase was carried out by using a density gradient gel (pH 3 to 10).

3. pH 及び温度の影響

各種緩衝液を用いて本酵素の pH に対する影響を調べた結果を Fig. 7 に示す。本酵素の至適 pH は、6.5~8.0 でわずかに緩衝液の組成に依存した (Fig. 7 A)。また、本酵素と各種緩衝液を混合し 30°C、30 分間反応させた後の残存活性を測定して pH 安定性を調べたところ、pH 5~11 で安定であった (Fig. 7 B)。他起源由来のアルギン酸リアーゼも中性付近の pH で最適に作用し、なおかつ安定である。*Pseudoalteromonas* sp. 由来アルギン酸リアーゼも他起源由来の同酵素と同様、pH に対する影響は同じであることがわかった。

温度安定性を調べた。また、緩衝液の組成で本酵素活性が阻害されることがないかを調べるために 50 mM トリス緩衝液 (pH 7.0) と 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いて行った。30 分間加熱処理し、氷冷した後の残存活性を Fig. 8 に相対活性で示している。本酵素は、両緩衝液で 30 分間の加熱で 35°C まで安定であった。しかし、その後 50°C まで温度を上昇させると、リン酸緩衝液のほうがトリス緩衝液よりも活性の低下が緩やかであった。ゆえに、本酵素を処理する際には、リン酸緩衝液を用いた方が、酵素がより安定に保つことが出来ると考えられる。サザエ由来 PM Lyase は、トリスによって明瞭な酵素活性の失活が観察されておりタンパク質分子への $[-N\equiv]^+$ の影響があるのかも知れない。

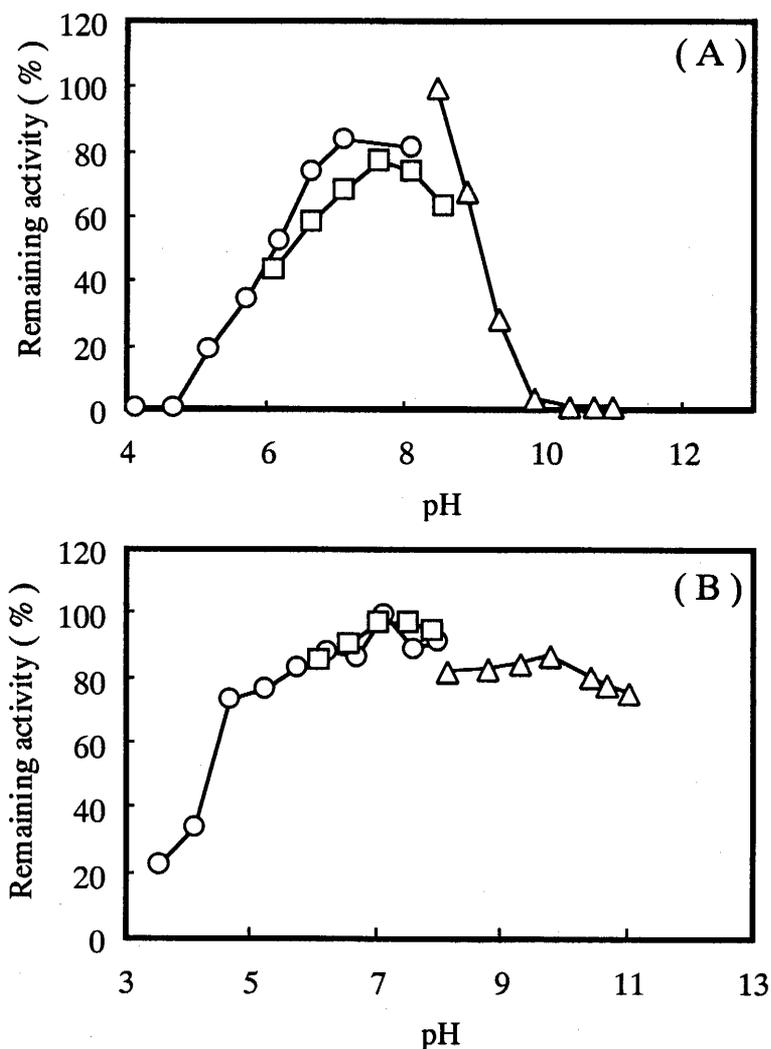


Fig. 7. Effects of pH on Enzymatic Activity (A) and on Stability (B) of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272.

(A) Substrate solution (2 ml of 0.2% sodium alginate) with different pHs was incubated at 30°C for 10 min before addition of 20 μ l of the enzyme solution (0.13 mg/ml). The activity at various pHs was assayed by addition of the enzyme by RAPID method³⁴. Buffers used: (○), 0.1 M McIlvaine's citric acid-phosphate buffer; (□), 0.1 M phosphate buffer; (△), 0.1 M Sørensen's glycine II buffer. (B) An appropriate amount of the enzyme in buffers with different pHs was incubated at 30°C for 2 hrs before assay. The incubated enzyme solution (20 μ l) was added to 2 ml of 0.2% sodium alginate and residual activity was assayed at pH 8.0 by RAPID method³⁴. Symbols were the same as in (A).

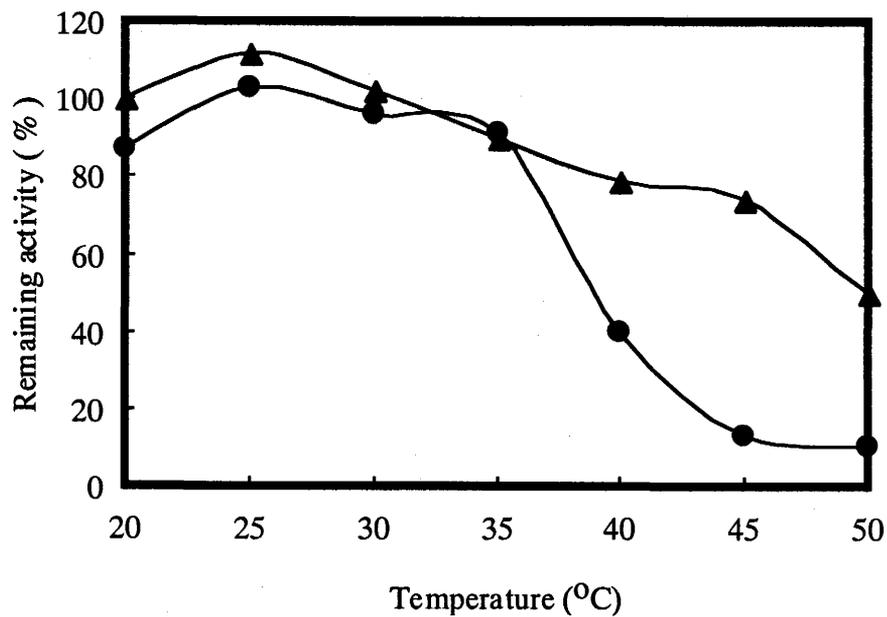


Fig. 8. Thermal Stability of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272.

The enzyme was incubated at various temperatures indicated in the figure for 30 min in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0) (▲) and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) (●), and then cooled in ice water before assay. The heat-treated enzyme (20 μ l) was added to 2 ml of 0.2% sodium alginate solution and the residual activity was assayed at pH 8.0.

4. 金属イオンに対する影響

アルギン酸リアーゼの活性に及ぼす金属と金属キレート剤の影響を調べた結果を Table 6 に示す。本実験に用いた基質は、未処理アルギン酸ナトリウム、PM、PG であった。ZnCl₂、NiSO₄、Ba(OH)₂ でわずかに活性が低下したが、その他の金属化合物の影響は認められなかった。金属キレート剤である EDTA による影響も全く認められなかった。いくつかの他起源由来のアルギン酸リアーゼは、金属イオンの存在により活性化されることが報告されている。例えば、海洋細菌 *Pseudomonas* sp. F6 株が菌体外に産生する同酵素は、二価の陽イオンの Ca²⁺ の添加により活性が顕著に上昇した⁸²⁾。このことは、以前 Gacesa らによって報告されている¹⁵⁾が、酵素と基質が結合する際に Ca²⁺ が架橋剤として働き、酵素-基質複合体を安定化させていると考えられている。しかし、本酵素は後述の X 線結晶構造解析により 1 原子の Ca²⁺ をタンパク質分子中に含むことが明らかになっている。この Ca²⁺ は本酵素の安定化に寄与していると現在考えている。この Ca²⁺ は EDTA 処理の結果から判断して強固にタンパク質分子に結合しているものとする。

Table 6. Effect of Metal Ions on Alginate Lyase Activity

Compound (50 mM)	Relative activity(%)	
	0.2% Alginate-Na	0.1%-PM 0.1%-PG
EDTA	97.3	81.9 77.7
MgCl ₂	114.1	118.2 116.6
KCl	125.6	108.4 101.5
CoCl ₂	120.3	119.5 87.1
ZnCl ₂	64.3	82.0 48.8
CaCl ₂	-	127.0* 101.1
NaCl	103.1	105.4 101.1
MgSO ₄	113.4	108.8 110.4
NiSO ₄	56.7	92.0 51.0
Ba(OH) ₂	56.3	90.0 61.5
CdCl ₂	76.1	111.4 79.4
MnCl ₂	116.4	114.2 104.1

*25 mM CaCl₂

5. 基質特異性

本酵素の基質特異性は基質として PG と PM を用いることにより、このいずれかにも活性があることから両基質に作用することは明らかであるが、更に基質 (PG、PM) に酵素を作用させる前後での基質の CD スペクトル変化より検討した。結果を Fig. 9 に示す。図からも明らかのように酵素を作用させる前後で基質の CD スペクトルが PG、PM 共に変化していることが分かる。ゆえに、*Pseudoalteromonas* sp. 由来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た。これまでに報告されているアルギン酸リアーゼは、殆どが PG 若しくは PM のどちらか一方にのみ作用することがわかっている。しかし近年になって、Sawabe *et al.* が、コンブの腐葉体から単離された *Pseudoalteromonas elyakovii* IAM 14594 が菌体内外に産生するアルギン酸リアーゼがこの両基質に活性を有することを本酵素の基質特異性の解明とほぼ同時期の 1997 年に報告している¹⁸⁾。この以前にも、1994 年に Kamo *et al.* も *Alteromonas macleodii* 由来の同酵素が PG、PM の両基質に作用するアルギン酸リアーゼについて報告している。よって、本酵素はこれまでにあまり報告例のない PG、PM の両基質に活性を有するアルギン酸リアーゼであることが明らかとなった。

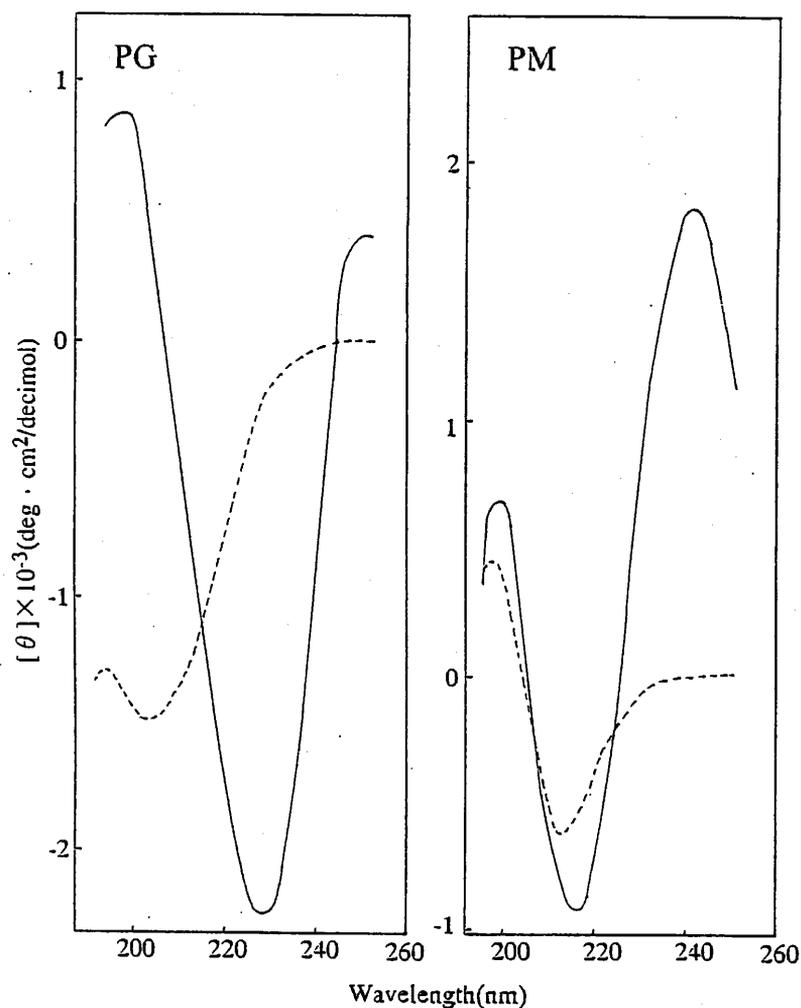


Fig. 9. CD Spectra of Poly-L-gulonate (PG) and Poly-D-mannuronate (PM) before (-----) and after (——) Treatment with Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272.

Two ml of PG and PM (0.1% in 10 mM phosphate buffer, pH 7.5) were treated with the enzyme (0.24 μ g) at 30°C for 3 h and then the CD spectra of each sample were recorded. All spectra are given as the signal average of four consecutive measurements and with appropriate base-line subtraction.