

21 微生物によるアルギン酸の分解 第1報

Aerobacter aerogenes Y-11 菌によるアルギン酸 の分解とアルギナーゼの適応的生成

Decomposition of Alginic Acid by Microorganisms Part I

Decomposition of Alginic Acid by *Aerobacter aerogenes* Type
Y-11 strain and Adaptive Formation of Alginase

北海道立衛生研究所 (所長 中村 豊)
技 師 井 上 勝 弘
技 師 安 藤 芳 明

I 結 言

アルギン酸は海藻のうち、特に昆布やわかめなどの褐藻類に多量に含有される重要な細胞成分であり、細胞膜間に塩の形で存在している。化学的には炭水化物に属しているが、澱粉、繊維素などと異なり、遊離のカルボキシル基をもち、その化学構造は d-マンマロン酸が β -1.4 結合したポリウロナイドと考えられている。

さきに大島^{1,2)}は数種の海産軟体動物の内臓中に、アルギン酸を分解する酵素の存在することを発見し、アルギナーゼと命名した。その後遠藤^{2,4)}、及び WAKSMAN, CAREY, ALLEN 等^{5,6)}によつてある種の細菌がアルギン酸を分解する能力を有することが報告された。しかしながらその分解様式についてはいまだ不明の点が多く残されている。最近、KOOIMAN⁷⁾は土壌から分離したアルギン酸分解細菌のアルギナーゼ粗酵素標品を用いて、アルギン酸の分解を試み、この酵素がアルギン酸の最少構成単位であるマンヌウロン酸にまで分解し、中間物としてオリゴウロナイドが生ずることを述べている。

著者等は今回健康成人の糞便から強力にアルギン酸を分解する *Aerobacter* 群細菌を分離し、これらの細菌のアルギン酸代謝様式について若干の知見を得たのでここに報告する。

II 実 験 の 部

(1) アルギン酸分解細菌の分離

数人健康成人の 10^{-1} 倍稀釈便液の 1cc をアルギン酸を唯一の炭素源とする A 培地〔 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 5g, KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g, Na-Alginate 10g, H_2O 1000cc, pH 7.2〕に加え、 37°C 数日間培養し、このうち粘度の低下した培地から数日金耳を新たな A 培地に移植し、以後同様な方法で数回撰択培養を繰返した後、著しく粘度を低下し、且つ、フェーリング氏液を還元するようになった培地から 1 白金耳を寒天加 A 培地平板に塗抹培養し、生じた白色微少の多数の集落を釣菌し、A 培地に移植しアルギン酸を分解するのを確かめ、普通寒天斜面に移植して保存菌株とした。すなわち、Y-11, K-12, A-16 の 3 株である。

(2) 分離細菌の分類学上の位置

分離菌はすべてアルギン酸を唯一の炭素源とする培地に発育し、速かにアルギン酸を分解する。分離菌は、第1表に示す如くグラム陰性無芽胞の短桿菌で、乳糖を分解し、IMVICシステム(PARR) --++ で、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology により検索すれば、*Aerobacter* に属し、他の一般生物学的性状より（細菌の試験法は American Bacteriologist Society の方法によつた）*Aerobacter aerogenes* の異型菌と思われる。（なお、菌種の同定は次報に詳報する）

第1表 分離菌 Y-11, K-12, A-16 の分類学的性状

Short rods: 0.5 to 1.0 by 1.0 to 2.0 microns.
Motile with peritrichous flagella.
No spore observed.
Gram negative.
Agar colonies: Small, punctiform, grayish white; smooth, moist, glistening, convex: becoming opaque; edges entire.
Gelatin: not liquefied
Agar slant: Abundant growth, white, form to spreading, glistening. Medium unchanged. Non-chromogenic.
Broth: Slight pellicle. Moderate turbidity with compact, slight sediment.
Litmus milk: Red with acid production. Coagulum is formed. No peptonization.
Nitrites produced from nitrates.
Ammonia produced.
Hydrogen sulfide not produced.
Indol not produced.
Methyl red test negative.
Voges-Proskauer test positive.
Citrate utilized.
Catalase positive.
Hipric acid hydrolyzed.
Alginate utilized as sole source carbon.
Acid and gas from arabinose, xylose, glucose, fructose, mannose, galactose, sucrose, lactose, maltose, cellobiose, trehalose, starch, inuline, dextrin, glycerin, adonitol, mannitol, duleitol, sorbitol, salicin and inositol.
Source: From human feces.

(3) *Aerobacter aerogenes* Y-11 菌によるアルギン酸の分解様式

細菌によるアルギン酸分解様式については、その報告も少なく、又細菌の種類によつても異なるものと思われる。著者等は分離細菌のうち Y-11 菌株によるアルギン酸分解様式を粘度の低下、還元力の変化、又ペーバクロマトグラフィーによつて、その分解生成物を経時的に追跡することによつて検討を加えた。すなわち 1L の平底フラスコに 800cc の A 培地を入れ、常法によつて滅菌した後、Y-11 菌の数白金耳を移植し、37°C、25 日間培養し、経時的に培養液を採取し、以下の実験に供した。

粘度の測定： オストワルド粘度計を使用し、培養液 10cc の 25°C における流下時間を測定して比粘度をもつて表わした。（第1図参照）

還元力の測定： BERTRAND 法によつて測定し M/100 KMnO₄ の滴定値をもつて示した。（第

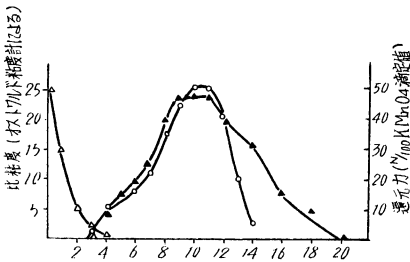
図参照)

(4) ペーパークロマトグラフィーによる分解生成物の確認

培養液をザイツの濾過器を用いて菌体を除き、その約10~20ccに稀硫酸を加え、未分解のアルギン酸を沈澱除去し、濾液にバリタ水を加えて過剰の硫酸を除き、低温で減圧濃縮して少量のシラツプを供試液とした。展開は東洋濾紙 No. 50 を用い、n-ブタノール、酢酸、水(5:2:3)の溶媒で一次元で展開し、室温で12~16時間放置し、アニリン・ヒドロジェン、フタレイト試薬により発色させた。その結果は第2図に示す。

Y-11 菌を接種後 1~2 日で培地の粘度は速かに低下し、5 日後にはその比粘度は殆んど 1 となり、未分解のアルギン酸は全く認められない。又培養 3~4 日頃より徐々に培地の還元力は増加し、10 日目まで最高に達し以後漸減する。培養 20 日目には培養の還元力は殆んど消失する。

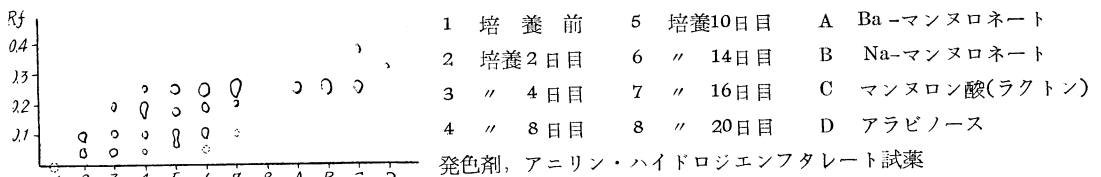
第1図 Y-11 菌株によるアルギン酸の分解) 粘性と還元力の変化)



各培養時におけるアルギン酸分解生成物の確認は主としてペーパークロマトグラフィーによつたが、第2図に示すように接種前の培養液には勿論何等のスポットを生じる物質もない。しかし、接種後2日目粘度が最初の2/3減じた培養液では Rf=0.05, Rf=0.10 の二つのスポットが現われる。比粘度が完全に 1 となつた4日目の培養液では Rf=0.2 の新たなスポットが現われ、以後培地の還元力が増加し、更に還元力が減少し始める12日目頃まで、

マット上に Rf=0.05, Rf=0.10~0.11, Rf=0.17~0.20, Rf=0.23~0.26 の明らかに異なる四つのスポットが確認された。以後、培地の還元性物質が最高時の半分以下に減少する14日目頃より Rf=0.05 のスポットが消失し、更に次の Rf=0.10 のスポットが消え、最後に培地の還元性物質の消失した18~20日目頃ではマット上のスポットは全く見られなくなる。同時に展開したマンヌロン酸ソーダ塩の Rf=0.26 であり、前記のマット上の最上端のスポットと一致する。他の三つのスポットは恐らくアルギン酸がマンヌロン酸へ分解される場合の中間生成物で下より、テトラ、トリ、ジ、マンヌロナイドと推定されるが、これ等の確認は逐次実験により明らかにしたい。以上の実験成績より、*A. aerogenes* Y-11 菌によるアルギン酸の分解は次の如く行われるものであろう。

第2図 Y-11 株の発育過程におけるアルギン酸分解生産物のペーパークロマトグラム



初期における粘度の急激な低下、その際に殆んど還元力を生じないこと、又分解生成物に比較的分子の大きいもののみが見出されることから、アルギン酸は先ず大きく分割されて、幾つかのウロナイドが生じ、これらのウロナイドが二次的に細かくグリコシッド結合を切られて単一のウロン酸を生ずるのであろう。これは粘度の低下後に起る還元力の急激な上昇及びマンヌロン酸がペーパークロマトグラムで明らかに確認されることによつて推察される。その後、マンヌロン酸は何等かの形

で代謝消費される。*Bact. terrestalgiricum* によるアルギン酸代謝の最終生成物は酢酸であると報告されているが、Y-11 菌については目下不明である。かように Y-11 菌はアルギン酸を分解するが、これ等の代謝に関与する酵素は単一の酵素であるか、あるいは2種以上の酵素を含むものかは今後の研究に俟たねばならない。

(5) Y-11 菌によるアルギン酸分解酵素の適応的生成

Y-11 菌は基質、すなわちアルギン酸の存在において始めてアルギナーゼ（この場合は粘度低下を来す酵素）を分離し、これを含みぬブイヨン培地、KOSER の拘椽酸培地等では全く分泌しない。故にこの酵素は適応的性格を有すものと思われる。WAKSMAN の分離した海水細菌は、アルギン酸の炭素源とするより寧ろ葡萄糖や澱粉を含有した培地に培養した方が、アルギナーゼの産生が良好であるといわれるから、この菌の酵素は構成的性格を有するものと思われる。著者等は Y-11 菌のアルギン酸分解酵素の生成に及ぼす17種の炭素源の影響について検討を加えた。

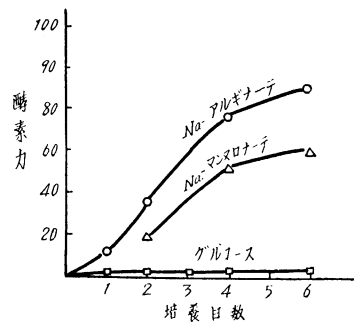
実験方法としては、100cc のペプトン水に各0.5%になるように各種炭素源を加え、37°C で4日間培養し、48時間後及び4日後の培養液をとり菌体をザイツ濾過器で濾別し、粗酵素液としてその酵素力を測定した。酵素力の測定は次の如くして行つた。すなわち、粗酵素液 10cc, M/15 磷酸緩衝液 (pH=7.2) に1%の割合でアルギン酸ソーダを溶かした基質溶液 10cc の割合で混合し、トルオール少量を加え、37°C, 60分, 24時間、それぞれ反応させ反応前及び反応後の反応液の粘度を25°C でオストワルド粘度計で測定し、次の計算式によつて酵素力を見た。

$$A = \frac{T_0 - T_{1hr}}{T_0 - T_a} \times 100 \quad \left\{ \begin{array}{l} A \text{ は酵素力, } T_0 \text{ は反応前の反応液の落下時間, } T_{1hr} \text{ は反} \\ \text{応1時間後の反応液の落下時間, } T_a \text{ は純水の落下時間} \end{array} \right.$$

第2表 各種炭素源のアルギナーゼ産生に及ぼす影響

炭 素 源	アルギナーゼの生産
Na-アルギネート	+++
Na-マンヌロネート	++
d-マンヌロン酸 (ラクトン)	+
d-Manno sacch. acid	—
澱 粉	—
デキストリン	—
グルコース	—
マンノース	—
ガラクトース	—
ラク トース	—
アラビノース	—
グリセリン	—
クエン酸ソーダ	—
ベ ク チ ン	—
アラビアゴム	—
ペ プ ト ン	—
グ リ シ ン	—
肉 汁	—

第3図 各種炭素源のアルギナーゼ産生に及ぼす影響及び経時的な酵素の変化



その結果は第2表、第3図に示す如く、炭素源として、アルギン酸及びその分解生成物のマンヌロン酸が該酵素の生成に必須であり、他の炭素源はいずれもアルギン酸分解酵素の生成を見ることは出来なかつた。

Ⅱ 要 約

著者等は人糞便よりアルギン酸を適応的に分解する細菌を分離し、その性状及び該細菌のアルギン酸の分解様式を検討し、次の如き知見を得た。

(Ⅰ) 分離菌はすべて *Aerobacter aerogenes* に属し、多くの健康成人の糞便に見出される。

(Ⅱ) 分離細菌 Y-11 菌はアルギン酸を分解して、小分子のウロナイドを経て単一のウロン酸を生じ、更にウロン酸をも代謝消費する。

(Ⅲ) 分離細菌 Y-11 菌の分泌するアルギナーゼは適応酵素であり、該酵素の形成は炭素源としてアルギン酸及びその分解物であるマンヌロン酸を必要とする。

終りに臨み種々御教示を頂いた北大斎藤恒行教授、又御便箋を頂いた本研究所長中村豊博士に感謝致します。

(なお、本研究の要旨は日農化誌 30 卷 11 号 (1956) に掲載した。)

文 献

- 1) 大島幸吉：日農化誌 7, 332 (1931)
- 2) 大島幸吉, 板谷真一：札幌農林学会報 27, 132 (1936)
- 3) 遠藤庄三：動物学誌 46, 351 (1934)
- 4) 遠藤庄三：植物学誌 55, 39 (1941)
- 5) S. A. WAKSMAN, C. L. CAREY. M. C. ALLEN: J. Bact, 28, 213 (1934)
- 6) S. A. WAKSMAN, M. C. ALLEN: J. Am. Chem. Soc 56, 2701 (1934)
- 7) P. KOOIMAN: Biochim. et. Biophys. Acta 13, 338 (1954)

11
11