

22 微生物によるアルギン酸の分解 第2報

Aerobacter aerogenes 型 Y-11 菌の呈するアルギナーゼ作用について

Decomposition of Alginic Acid by Microorganisms (Part II)

On the Alginase Action of *A. aerogenes* Type Y-11 Strain

北海道立衛生研究所 (所長 中村 豊)

技師 井上 勝 弘

I 緒 言

第1報¹⁾においてアルギン酸を適応的に分解する一細菌 *A. aerogenes* 型 Y-11 菌の分離及びアルギン酸の代謝様式について報告したが、今回は該細菌の分泌するアルギナーゼの粗酵素標品を用いてアルギン酸に対する水解作用について検討を加えたのでここに報告する。

アルギナーゼについての研究報告は現在のところきわめて少なく、その酵素的研究は他の多糖類の水解酵素に比べて非常におくれている。この酵素が大島²⁾によつて、アワビの内臓に始めて見出された時は、その作用として単に粘性の低下と還元力の増加が報告されただけであつた。その後 WAKSMAN³⁾が細菌アルギナーゼについてその作用機構を追求し、分解生成物として小分子のウロナイドが生ずることを報告した(このウロナイドは遠藤⁴⁾によつてテトラマンヌロン酸であることが確められた)。更に KOOIMAN⁵⁾は土壤細菌(菌種不明)のアルギナーゼが、アルギン酸に作用して小分子のオリゴウロナイド及びアルギン酸の最少構成単位であるマンヌロン酸を生ずることをペーパクロマトグラムによつて証明した。

このように起源を異にした幾つかのアルギン酸分解酵素の報告はあるが、いずれも精製も不十分であり、その水解機序や水解生成物の確認も決して明白にはなつていない。

著者は前報¹⁾に引続きアルギン酸分解細菌 Y-11 菌のアルギナーゼについてその性状を調べ、若干の知見を得たのでここに報告したい。

II 実験方法

i 使用菌株: *A. aerogenes* Y-11 Strain。

ii 培養: 前報に用いた A 培地に 0.1% の Yeast extract (Difio) を加え、37°C で培養した。

2 酵素の力決定方法: 細菌アルギナーゼは還元力の生成が少なく、粘度の低下が著しい。故にその酵素力の測定は粘度低下度に依存した。すなわち OSTWALD の粘度計を使用して作用液の落下速度を 37° において求め、これより WEBER, & DEUEL の分解数 A を次式により計算し、A をもつて分解度を表わした。

$$A = \frac{T_a - T_{nhr}}{T_a - T_0} \times 100$$

T_a: 不活性化した酵素液を配合した作用液の落下速度 (秒)

T_{nhr}: 酵素液を配合し n 時間作用後の作用液の落下速度 (秒)

T₀: 基質を含有せず水に酵素液を加えた液の落下速度 (秒)

還元力の増加は WILLSTATTER, SCHUDEL 法によつた。但し、還元力の増加は作用液 1cc に対する N/10 沃素溶液の cc 数の増加をもつて表示した。

酵素作用による生成物の検出にはペーパクロマトグラフィーを使用した。展開剤はブタノール、醋酸、水であつて、その混合比を 5:2:3 とした。上昇法で 16~20 時間展開し、呈色剤はアニリン・フタル酸を使用した。

酵素作用液の配合は次の通りにした。基質 1% アルギン酸ソーダ溶液 (pH 7.0~7.4 の Sørensen Buffer) 25cc, 酵素液 (pH 7.0~7.4 Sørensen Buffer) 25cc。この配合液を一定時間恒温槽中に保持した後定量に使用した。

3 酵素液の調製法: 本実験に使用したアルギナーゼは Exo-enzyme である。0.1% Yeast extract 加 A 培地に 10 日間培養した培養液を 30°C において 1/3 容に減圧濃縮し、10,000r.p.m 10 分間で遠沈後上澄にアルコールを 75% まで添加し氷室中に 1 夜放置し、生成する沈澱を再び pH 7.0 Sørensen 燐酸緩衝液に溶かし、48 時間透析後、再びアルコールを加えて沈澱させ、生ずる沈澱を減圧で乾燥して酵素剤とし、適当濃度に溶解して酵素液とした。

4 基質の調製法: 市販アルギン酸ソーダ (一級品) を水に溶かし、稀酸を加えて凝固させた後、数時間流水で洗滌後、NaOH を徐々に加えて溶かし、アルコールを加えて脱水した後、乾燥した白色の粉末を試料とした。

II 実験結果

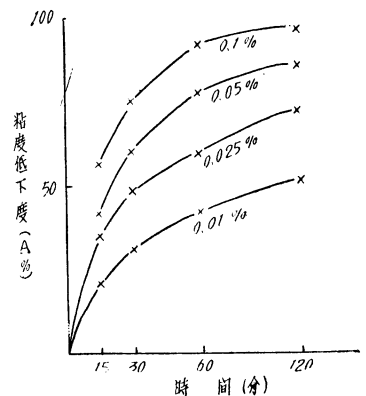
5 酵素作用

i 酵素濃度の影響: 酵素剤の作用液中の濃度を 0.1, 0.05, 0.025, 0.01% として各作用時間毎に粘度を測定した。便宜上作用温度、測定温度共 38°C とした。その結果を図 1 に示す。

ii 作用時間の影響: 基質は精製アルギン酸ソーダとし、その濃度を 0.5% として作用せしめた。酵素剤の濃度は 0.05% とした。各作用時間後の粘度低下率及び還元力の増加、塩酸、酸性アルコール、硫酸、トリクロール醋酸を別個に添加したときの凝固状況及び生成物の検査結果を表 1 に示す。

(a) アルギン酸に対する作用: 表 1 に示す如く粘度低下が急激に起るにもかかわらず還元力の増加は僅少であり、粘度の低下が終了した後に徐々に増加する。酵素濃度をきわめて高くしてもこの現象は変わらず、還元力の最高に達した場合で基質アルギン酸の約 25% が分解されているに過ぎない。生成物を検索する目的をもつて作用液に稀硫酸を添加し、生成する沈澱を除去し、濾液に水酸化バリウムを加えて過剰の硫酸を除いた後、減圧濃縮して原点へ反復添付してペーパクロマトグラムを作成した。その結果は表 1 に示す如く、酵素濃度 0.05% の場合は 96 時間後に Rf=0.1 を示すスポットがわずかに生じ、140 時間後には明らかに Rf=0.24, 0.17, 0.1, 0.05 の四つのスポットが生じた。又、酵素濃度 0.1% の場合は反応 3 時間で Rf=0.04, Rf=0.1~0.08 の二つのスポットが生じ、6 時間後に

図 1 酵素濃度と作用力 (分解度) との関係



は更に Rf=0.13~0.15 のもの、そして 24 時間後には明らかに異なる Rf=0.04, 0.1, 0.13~0.15, 0.23 の四つのスポットが生じた。

表1 アルギナーゼによるアルギン酸の分解

時 間 (hrs)		0	1/4	1/2	1	3	6	12	24	48	96	144
粘 度 低 下 度 (A%)			(67.3)	(79.2)	(84.8)	⁷¹ (94.6)						
還 元 力 (N/10 Jcc)		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0.5)	0 (0.81)	0 (1.2)	0 (1.4)	0.6 (1.5)	1.8 (1.9)	2.2 (2.2)	2.2
沈 澱 剤	2N H ₂ SO ₄	+++ (+++)	+++ (+++)	+++	+++	+	+	-	-	-	-	
	HCl alcohol	+++	+++	+++	+++	+	+	-	-	-	-	
	CaCl ₂	+++	+++	+++	+++				++	+		±
分 解 生 成 物 のペーパク ロマトム	0.05 (Rf)					(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+
	0.1 (Rf)					(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+
	0.15 (Rf)						(+)	(+)	(+)	(+)		+
	0.24 (Rf)								(+)	(+)		+

註 酵素濃度 0.1%。

iii 作用 pH 値の影響： 0.5% のアルギン酸を使用して上記の如く配合し、作用 pH 値を種々に変化して最適 pH 値の決定を試みた。作用時間は 1 時間である。図 2 に示す通り 7.0~8.0 の間に最適 pH 値が存在する。

図 2 酵素作用と作用 pH との関係

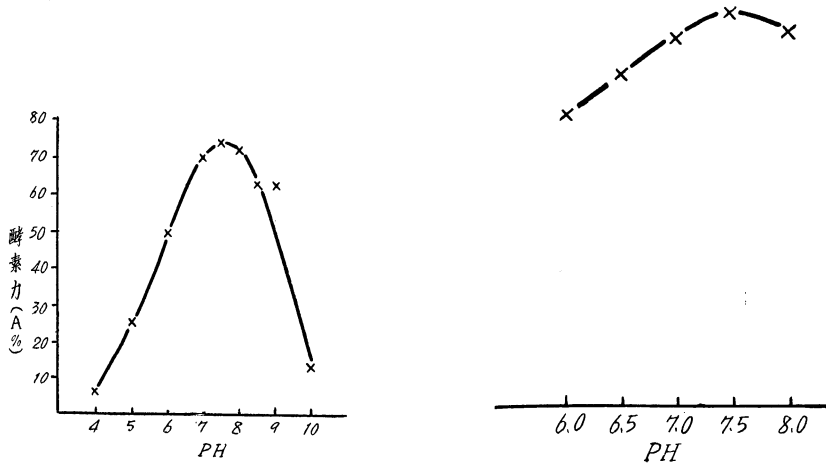


表 2 酵素の熱抵抗性

温 度	30	40	50	60	70
粘 度 低 下 度 (A%)	78.2	75.8	75.8	20.1	—
比 較 値 (%)	100.0	96.9	96.9	25.5	0

iv 温度による酵素の不活性化： 酵素液を 30°~70°C の間に 20 分間保持した後、冷却して常法通り配合して 38°C で 1 時間作用した後粘度を測定した。2 表に示す如く 70°C 20 分間で完全に酵素作用が消滅した。前報においてこの細菌の培養濾液を用いた酵素液は熱にかなり抵抗性のあることを報告したが、精製したアルギナーゼでは熱抵抗性は認められなかった。

v 作用温度の影響： 各温度において 1 時間作用させた。図 3 に示す通り 45°C において最大の粘度低下率を示した。

vi 賦活物質及び阻害物質： 配合液に種々の化合物を添加してその影響を検索した。表 3 に示す如く、特に賦活作用を示すものはなく、阻害作用を示すものとして、醋酸鉛、硫酸銅、硫酸アルミニウムがあつた。

図 3 酵素作用に及ぼす温度の影響

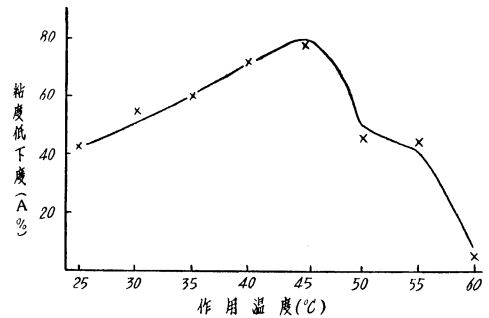


表 3 酵素作用に及ぼす塩類の影響

添加物	添加物の濃度	粘度低下率(A%)	比較値(%)	添加物	添加物の濃度	粘度低下率(A%)	比較値(%)
NaCl	1×10 ⁻² M	77.1	89.1	Leadacetate	1×10 ⁻² M	61.3	75.6
"	2×10 ⁻²	79.9	98.5	CuSO ₄	"	29.8	36.3
Ammoniumoxalate	1×10 ⁻²	83.6	103.0	CoCl ₂	"	80.3	99.0
"	2×10 ⁻²	82.1	101.2	Al ₂ (SO ₄) ₃	"	33.9	44.1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1×10 ⁻²	80.9	99.7	CaCl ₂	"	82.3	101.0
"	2×10 ⁻²	81.8	100.8	(NH ₄)SCN	"	83.7	103.3
AgNO ₃	1×10 ⁻² M	68.0	83.9	Control	"	81.1	100.0

IV 考 察

アルギン酸はすべて d-マンヌロン酸から成り立っているにかかわらず、酸による加水分解に際して抵抗性が強く、定量的に d-マンヌロン酸にならない。現在、その構造は一応 β·1.4 結合しているものと考えられているが、この物質の加水分解に結びついた実験困難のため、アルギン酸のすべてがこのような構造になっているかは明確ではない。

大島以降の既往のアルギナーゼ作用を見るにアルギン酸が酵素的分解を受ける場合は、初期において粘性の降下が著しく、後期に還元力が漸増することが知られている。その場合、還元力の最大値はアルギン酸量の 27.2% に当り、全量の約 1/4 に相当する⁵⁾。この事実は海産軟体動物のアルギナーゼも、細菌アルギナーゼにも共通の結果が得られている。しかし、分解生成物は小分子のウロナイドのみを生ずるものと、更にこれを分解してマンヌロン酸にまで分解するものとが報告されている。

Y-11 菌のアルギナーゼは分解生成物としてマンヌロン酸を生ずるから、若しアルギナーゼを 2 型に別ければ後者のものに近い。本菌のアルギナーゼはアルギン酸に作用してその粘度を急激に低下

せしめ、その後還元力が増加する。又生成物も粘度低下後に分子の大きなものと思われるオリゴウロナイドが先ず生じ、マンヌロン酸は反応の後期に漸く生じるからこの細菌のアルギナーゼの主要な作用はアルギン酸の粘度低下を来たす型の酵素で、第二には粘度低下によつて生じた Polymer の結鎖を切断する Polyase が作用して Oligouronide を生成すると考えられ、更に Oligase が単一のマンヌロン酸を生ずるように思われる。

これが一つの酵素であるか、又は複合酵素によつているものであるかは、精製が不十分であるので現在の段階では論議できない。しかし本菌のアルギナーゼは少なくともアルギン酸の分子の分解は末端から切断するのではなく、先ずランダムに大きく分割し、その結果生じた Polymer が順次に低分子の物質に分解されるものと思われる。

V 要 旨

- 1 *Aerobacter aerogenes* 型 Y-11 菌の分泌するアルギナーゼについて実験を行い、アルギン酸の粘度を急激に低下するが、還元力の増加は余り生じないことを観察した。
- 2 この酵素の粘度低下作用は酵素濃度に比例せず、多くの多糖類の水解明素がそうであるように一次反応式にあてはまらない。
- 3 ペーパクロマトグラムより分解生成物を検索し、三つの Oligouronide とマンヌロン酸を認めた。
- 4 粘度低下測定によるこの酵素の作用最適 pH は 7.0~8.0 の間にあり、最適温度は 45°C, 70°C 20 分間で不活性化される。
- 5 酵素の賦活物質としては、特に著しいものは認められず、阻害物質として醋酸鉛、硫酸銅、硫酸アルミニウムを指摘した。

終りに、御校閲を頂いた本研究所長中村豊博士、御教示、御助言を頂いた北大教授斎藤恒行博士及び本研究所技師安藤芳明博士に深謝致します。

(なお、本研究の要旨は日農化誌 31 巻、第 11 号 (1957) に掲載した。)

文 献

- 1) 井上勝弘, 安藤芳明: 日農化誌 30, 742 (1956)
- 2) 大島幸吉: 日農化誌 7, 332 (1931)
- 3) S. A. WAKSMAN, M. C. ALLEN: J. Am. Chem. Soc., 56, 2,701 (1934)
- 4) 遠藤庄三: 「多糖質化学」241 (1955)
- 5) P. KOOIMAN: Biochem. et Biophys. Acta, 13, 338 (1954)
- 6) 遠藤庄三: 「多糖質化学」240 (1955)