

# 海洋無脊椎動物アルギナーゼによる未利用海藻の資源化技術の開発

尾 島 孝 男 [北海道大学大学院水産科学研究科/助教授]

田 中 啓 之 [北海道大学大学院水産科学研究科/助手]

西 田 清 義 [北海道大学大学院水産科学研究科/教授]

佐々木 忠勝 [南茅部町川汲漁業協同組合/専務理事]

## 背景・目的

アルギン酸リアーゼ(アルギナーゼ)は、コンブやワカメなど褐藻の構造多糖であるアルギン酸を、 $\beta$ 脱離反応により分解する酵素である。本酵素はアワビやサザエなどの藻食性巻貝や、ある種の海洋微生物および土壌細菌に分布し、以前よりアルギン酸の微細構造の解析や褐藻プロトプラストの作成などに利用されてきた。本研究では、海産巻貝のアルギナーゼでコンブの未利用部分や雑海藻を分解することにより、アルギン酸オリゴ糖や減容藻体、藻体エキスなどを製造し、未利用褐藻を資源化するための基礎技術の開発を目的とする。

## 内容・方法

### (1) 軟体動物アルギナーゼ給源の開発

アルギナーゼ給源としては、アワビ *Haliotis discus hannai*、タマキビガイ *Littorina brevicula*、クボガイ *Chlorostoma lischkei* の3種類の海産巻貝を用いた。アルギナーゼはこれらの肝臓および消化液から10 mM リン酸ナトリウム(pH 7.0)で抽出し、70-100%飽和における硫酸分画とCM-Toyopearlカラムクロマトグラフィーにより精製した。

一方、アワビ・アルギナーゼを安価かつ大量に生産可能とするために、既に著者らがクローン化したアワビ・アルギナーゼのcDNAを用いてpET-16bプラスミド-大腸菌BL21(DE3)発現系を構築した。

### (2) アルギナーゼによるコンブ試料の分解

コンブ試料としては、南茅部産養殖マコンブの乾燥粉末、およびエタノールにより色素成分を抽出したコンブ残渣を用いた。各試料は終濃度1%になるように炭酸ナトリウムに溶解した後、pH 8.0、30°Cにおいて0.1~5 U/mlのアルギナーゼで分解した。分解の程度は、反応液を10,000 xgで10分間遠心分離して得た上清中のウロン酸量を、カルバゾール-硫酸法で定量することにより調べた。なお、アルギナーゼ1Uは、アルギン酸分解に伴い235nmの吸光度を1分間に0.01上昇させる酵素量と定義した。

## 結果・成果

### (1) 軟体動物アルギナーゼの調製

アワビ消化液中のアルギナーゼ活性を測定した結果、中型アワビ(殻長:約8~6 cm)1個分の消化液には約1,000 Uのアルギナーゼが含まれることが分かった。そこでアワビ20個分の消化液を集め、そこから70-100%飽和での硫酸分画とCM-Toyopearl 650Mカラムクロマトグラフィーでアルギナーゼを精

製した。精製したアワビ・アルギナーゼは分子量約28,000の単量体酵素で、その収量は消化液に含まれる全酵素量の約21%であった。このことから、中型アワビ1個から約210 Uのアルギナーゼを調製可能であることが分かる。この方法によれば、タマキビガイおよびクボガイからもアルギナーゼを精製できた。ただし、これらの小型巻貝(殻長1~2 cm)から消化液だけを採取するのは困難であったので、いったん貝殻ごと凍結した試料をミルで破碎し、そこに10 mM リン酸ナトリウム(pH 7.0)を加えることにより粗酵素を抽出することとした。その結果、タマキビガイからは分子量約31,000、28,000、および23,000の3種類の酵素が、クボガイからは分子量約30,000の酵素が得られることが分かった。これらの小型巻貝は北海道沿岸の潮間帯に普通に見られ、その資源量も豊富であることからアワビ以外のアルギナーゼ給源として有用と考えられた。

一方、pET-16bに組み込んだアワビ・アルギナーゼcDNAをBL21(DE3)大腸菌で誘導発現させた結果、全菌体タンパク質の約35%(1 lの培養当たり約100mg)におよぶ組換え酵素タンパク質を得ることができた。しかし、そのほとんどは不溶性の封入体として生産されており、8 M尿素による可溶化と中性緩衝液への透析によっても活性のある酵素に再生できなかった。ただし、発現誘導時の温度を19°Cまで低下させることにより、全発現タンパク質の0.2%程度と少量ではあるが可溶性の活性酵素が得られることが分かった。今後発現条件の最適化により、より大量の組換え酵素が生産可能になると考えられる。

### (2) コンブ試料のアルギナーゼ処理の効果

コンブ試料をアワビ・アルギナーゼで分解し、これを遠心分離して得た上清中のウロン酸量を定量した。その結果、アルギナーゼ分解によりコンブ乾燥重量の最大15%程度のアルギン酸オリゴ糖が藻体から遊離することが分かった。また、低濃度(0.1 U/ml程度)のアルギナーゼ分解では5糖以上のアルギン酸オリゴ糖が、比較的高濃度(2.5 U/ml)の分解では4糖以下のアルギン酸オリゴ糖が主に得られることが分かった。一方、分解に伴うコンブ試料の粘性変化と遠心分離後の残渣(固形分)の量および形態の変化を調べた結果、アルギナーゼ分解は試料の粘度を顕著に低下させ、水和膨潤したコンブ固形分の体積を50%以下に減ずることが明らかになった。さらに、分解物の遠心上清としてコンブ・エキスを得ることも可能となった。

## 今後の展望

本研究により、軟体動物アルギナーゼの給源としてアワビだけでなくタマキビガイやクボガイも利用可能であること、さらにアワビ組換えアルギナーゼも大腸菌により生産可能であることが明らかになった。一方、アルギナーゼ分解によって、コンブ試料から様々な分子サイズのアルギン酸オリゴ糖を生産でき、さらに粘性や固形分体積を減じたコンブ藻体やコンブ・エキスも製造できることが明らかになった。本研究成果は、アイヌワカメやアカモクなどの未利用海藻からのアルギン酸オリゴ糖の生産や、フコイダンやラミナランなどの多糖成分の効率的抽出などにも応用可能と考えられる。