

海産動物内臓の海藻細胞壁溶解酵素*

山口邦子, 荒木利芳, 青木恭彦

曾 照 煌, 北御門 学

(1988 年 6 月 22 日受付)

Algal Cell Wall-Degrading Enzymes from Viscera of Marine Animals

Kuniko Yamaguchi,*² Toshiyoshi Araki,*^{2,3} Takahiko Aoki,*²Chao-Huang Tseng,*² and Manabu Kitamikado*²

Polysaccharide-degrading enzymes were assayed for the extracts from the viscera of marine animals. Agar, alginate, κ -carrageenan, CM-cellulose, fucoidan, β -1,4-mannan, porphyran, β -1,3- and β -1,4-xylans were used as substrates. Most of the tested viscera showed only low activity of the enzymes, and were useless for the source of protoplast-isolating enzymes to algal thalli. However, the hepatopancreas of marine snails, topshell and abalone, possessed high activity of alginate-, CM-cellulose-, and β -1,4-xylan-degrading enzymes. The extract from the acetone powder of topshell hepatopancreas isolated protoplast from thalli of many species of green and several of brown and red algae tested. The imperfection of protoplast-isolating activity in the extract may depend on the lack of agar-, fucoidan-, porphyran-, and β -1,3-xylan-degrading enzymes. An addition of several microbial enzymes increased the protoplast-isolating power of the extract.

プロトプラストを利用した研究は、新しい遺伝学や育種学の基礎として発展を続けている。とくに、陸上植物においては、種の類縁関係とは無関係に融合するプロトプラストの性質を利用して、これまでの人為交配や選択法では不可能であった新品種の作出に成功している。しかし、海藻を対象としたこの分野の研究は遅れており、プロトプラストの分離法も確立されていない。緑藻からは、陸上植物と同様に、セルラーゼおよびペクチナーゼの市販酵素標品を用いてプロトプラストを分離した報告があるが、¹⁻⁴⁾ 褐藻および紅藻からは緑藻と同じ酵素標品でプロトプラストを分離することは困難なようである。これは緑藻の細胞壁を構成する多糖類が高等植物と同じくセルロースを主成分とするのに対して、褐藻ではアルギン酸やフコイダン、紅藻では β -1,3-キシラン、 β -1,4-マンナンまたはポルフィラン等の海藻特有の多糖類であることに起因すると思われる。従って、褐藻や紅藻の細胞壁を溶解してプロトプラストを分離するには、これらの多糖類を分解できる酵素標品の開発が必要であろう。そのためには、海藻を分解する能力のある微生物の酵素、⁴⁻⁷⁾ または海藻を餌とする海産動物の消化酵素^{8,9)}

を利用する方法が考えられる。著者らは本研究において、海産動物内臓の抽出液について、海藻細胞壁多糖類分解酵素の活性を調べると共に、プロトプラスト分離能についても検討したので報告する。

材料および方法

海産動物内臓から酵素液の調製 Table 1 に示した 4 種の魚の肝臓、Table 2 に示した 3 種の二枚貝とウニおよびカニの全消化器官、Table 3 に示した 5 種の巻貝の中腸腺に、それぞれ 5 倍重量の 1% 食塩水を加えて、ウルトラディスペンサーを用いてホモジナイズした。13,000 回転、30 分間遠心分離して得た上層液を脱脂綿でろ過し、得られたろ液を酵素液とした。魚貝類は一種類につき複数個を使用し、平均体重をそれぞれの表中に示した。

サザエ中腸腺アセトン乾粉から酵素液の調製 サザエ中腸腺に 8 倍重量の -20°C に冷却したアセトンを加え、ウルトラディスペンサーで 5 分間ホモジナイズした。 -20°C に 1 時間静置後遠心分離し、沈殿物を減圧乾燥してから細粉した。粉末に 20 倍量の 25 mm 2-(N-

*¹ 本研究の概要は、昭和 63 年度日本水産学会春季大会で発表した。

*² 九州大学農学部水産学科 (Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812, Japan).

*³ 現勤務先: 三重大学生物資源学部 (Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu, Mie 514, Japan).

morpholino) ethane sulfonic acid (MES) 緩衝液, pH 6.0, を加え, 0°C で 90 秒間ウルトラディスペーザーでホモジナイズ後, 30 分間スターでかくはんした。13,000 回転で 30 分間遠心分離して得た上層液を脱脂綿でろ過し, ろ液を酵素液とした。

多糖類分解酵素の活性測定法 0.2% 寒天 (キシダ化学製, 加熱溶解後冷却してから使用), 0.5% アルギン酸ナトリウム (和光純薬工業製), 0.2% κ -カラゲナン (和光純薬工業製), 0.5% カルボキシメチルセルローズナトリウム (キシダ化学製), 1.0% フコイダン (本研究室製), 0.5% ポルフィラン (本研究室製) の各水溶液 1.0 ml に pH 6.0 の 0.1 M 酢酸塩緩衝液 0.5 ml および酵素液 0.5 ml を加え, 37°C で 3 時間反応させた。また, 1.0% β -1,4-マンナン (本研究室製), 1.0% β -1,3-キシラン (本研究室製), 1.0% β -1,4-キシラン (片山化学製) の各懸濁液 1.0 ml を用いて同様に酵素を反応させた。反応終了後, 反応液を 100°C で 5 分間加熱した。酵素作用によって生成した還元糖を Nelson—Somogyi 法⁹⁾で定量し, 1 分間に 1 μ mol のそれぞれの基質の構成単糖 (寒天, κ -カラゲナン, およびポルフィラン分解酵素活性は D-ガラクトース, アルギン酸塩分解酵素活性は D-マンヌロン酸, セルラーゼ活性は D-グルコース, フコイダン分解酵素活性は L-フコース, β -1,4-マンナン分解酵素活性は D-マンノース, β -1,3- および β -1,4-キシラン分解酵素活性は D-キシロース) に相当する還元力を生成する酵素量を 1 単位とした。なお, 懸濁基質を使用した場合は, 加熱終了後の反応液を遠心分離して, 得られた上層液中の還元糖を定量した。

プロテアーゼの活性測定法 1.2% カゼイン (メルク製) 液を調製し, Hagiwara らの方法¹⁰⁾によって測定した。1 分間に 1 μ mol のチロシンを生成する酵素量を 1 単位とした。

海藻葉体からプロトプラストの分離法 前報⁹⁾に準じて行った。すなわち, 25 ml のパバイン溶液 (2% パバイン, 0.7 M マンニトールおよび 2% 塩化ナトリウムを含む 50 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 7.5) に長さ 1~3 cm に切断した葉体を浸し, 22°C で 15 分間振とうした。さらに, マンニトール MES 緩衝液 (0.7 M マンニトール, 5 mM 塩化カルシウム, 2% 塩化ナトリウム, 0.5% potassium dextran sulfate を含む 25 mM MES 緩衝液, pH 6.0) で洗浄後, メスで細断した。葉体細断片の付着水をろ紙で吸収除去した。つぎに, 20 ml 容三角フラスコに 2.5% サザエ中腸腺アセトン乾粉抽出液を含むマンニトール MES 緩衝液 (以下酵素液 A と記述) 8 ml を入れ, または酵素液 A に β -1,4-マンナン, ポルフィラン, および β -1,3-キシラン分解酵素の各 1 単位, 0.5% セルラーゼオノズカ RS, および 0.2% マセロチーム R-10

を追加した酵素液 (以下酵素液 B と記述) 8 ml を入れ, その各々に葉体細断片約 100 mg を懸濁させ, 22°C で振とうした。90 ないし 150 分後, 生成したプロトプラストを計数した。計数にはトーマの計数盤を用いて, 1 試料について 5 回行い, 平均値を求めた。

フコイダン, ポルフィラン, β -1,4-マンナン, および β -1,3-キシランの調製 フコイダンは, 市販の塩モズクを原料とし, Percival と Ross の方法¹¹⁾に準拠してカリウム塩を調製した。ポルフィランは粉のりを原料として Su と Hassid の方法¹²⁾に準拠して, β -1,4-マンナンは緑藻ミルを原料として Love と Percival の方法¹³⁾により, また β -1,3-キシランは緑藻イワズタを原料として Iriki らの方法¹⁴⁾により調製した。

供試海藻 プロトプラスト分離に使用した海藻は 1987~88 年に福岡県沿岸海域で採集した。

使用酵素 β -1,4-マンナン, ポルフィラン, および β -1,3-キシラン分解酵素は著者らが自然界から単離した 3 株の細菌, *Vibrio* sp. AP-2, *Aeromonas* sp. F-25, および *Vibrio* sp. AX-4 の培養液から前法⁹⁾と同様に調製し, 硫酸塩析した酵素を 25 mM MES 緩衝液, pH 6.0 に透析して用いた。パバインはナガセ生化学工業から, セルラーゼオノズカ RS (Lot 203002) およびマセロチーム R-10 (Lot 202012) は近畿ヤクルト製造から購入した。Abalone アセトン乾粉 (Lot 55F-9505) はシグマ社から購入した。

実験結果および考察

海産動物内臓抽出液の多糖類分解酵素活性 9 種類の海藻細胞壁構成多糖類に対する酵素活性を測定した。Table 1 に示すように, 供試した魚類の多くは雑食性であったが, 多糖類分解酵素活性は低かった。Table 2 に示すように, ウニおよびモズクガニでもセルラーゼ活性が僅かに強いのみで, 海藻プロトプラストの分離に必要な酵素活性は持たないと推測された。一方, Table 3 に示すように, 海産巻貝中腸腺の酵素活性は他の動物の酵素活性より強く, とくにサザエとアワビは多くの種類の多糖類分解酵素を有し, またそれらの活性も強いことが判明した。しかしながら, サザエとアワビ中腸腺の抽出液でも, 海藻プロトプラストの分離に使用されるシグマ製 abalone アセトン乾粉の数%抽出液と比較すると (Table 4 参照), プロトプラスト分離に必要な酵素活性には不足していると推察された。最後に, サザエ中腸腺のアセトン乾粉から酵素液を調製して, その活性を市販 abalone 乾粉抽出液のものと比較した。結果は Table 4 に示しているが, 市販セルラーゼ標品からの抽出液の酵素活性も同時に記載している。サザエ中腸腺アセトン乾粉の抽出液は, アルギン酸塩分解酵素, κ -カラゲナン分

Table 1. Activity of polysaccharide-degrading enzymes and protease in viscera of marine animals—I
(units/wet weight g)

Average body weight (g)	Origins	Aigo	Umazura-hagi	Kyusen	Madai
		<i>Siganus fuscescens</i>	<i>Navodon modestus</i>	<i>Halichoeres poccilopterus</i>	<i>Chrysophrys major</i>
Substrates		425	135	152	520
Agar		0.039	0.016	0.086	0.007
Alginate		0.009	0.011	0.074	—
κ -Carrageenan		0.036	0.007	0.014	0.006
CM-Cellulose		0.028	0.022	0.035	0.013
Fucoidan		0.021	—	0.024	—
β -1,4-Mannan		—	0.004	0.013	—
Porphyran		0.107	0.102	0.109	0.065
β -1,3-Xylan		—	—	0.007	—
β -1,4-Xylan		—	—	—	—
Casein		0.309	0.280	0.124	0.573

—: negligible activity
Viscera: liver.

Table 2. Activity of polysaccharide-degrading enzymes and protease in viscera of marine animals—II
(units/wet weight g)

Average body weight (g)	Origins	Akagai	Usukinuta-agemaki	Magaki	Murasakiuni	Mokuzugani
		<i>Anadara broughtonii</i>	<i>Solecurtus wilsoni</i>	<i>Ostrea gigas</i>	<i>Anthocardis crassispina</i>	<i>Eriocheir japonicus</i>
Substrates		146	49	30	85	77
Agar		0.004	0.104	0.008	0.031	0.092
Alginate		0.011	0.144	—	—	—
κ -Carrageenan		0.044	0.056	0.047	0.047	0.083
CM-Cellulose		0.229	0.234	0.388	0.220	0.255
Fucoidan		—	0.155	—	0.028	0.182
β -1,4-Mannan		0.053	0.163	—	0.004	0.484
Porphyran		0.047	0.087	—	0.006	0.023
β -1,3-Xylan		—	—	—	—	0.009
β -1,4-Xylan		0.213	0.233	0.138	0.069	0.834
Casein		0.206	0.289	0.218	0.072	0.147

—: negligible activity
Viscera: all digestive organs.

解酵素, セルラーゼ, β -1,4-マンナン分解酵素および β -1,4-キシラン分解酵素の活性が強く, abalone アセトン乾粉抽出液の酵素活性に匹敵するか, あるいはそれ以上の酵素活性を示した。また, -40°C で保存すると 6 カ月後もこれらの酵素活性の低下は見られなかった。しかしながら, 本抽出液は, abalone アセトン乾粉抽出液もまたそうであるが, 寒天, フコイダン, ポルフィラン, および β -1,3-キシラン分解酵素の活性が弱くて, これらの多糖類を細胞壁構成糖として含有する海藻に対するプロトプラスト分離能は期待できないと推測された。

海藻葉体からのプロトプラストの分離 Table 5 に示すように, 4 種の緑藻 (アオサ, アナアオサ, ヒトエグサ, フクロアオノリ) からは酵素液 A または B を作用

させると多数のプロトプラストが分離された (Fig. 1-A, B, C)。5 種の褐藻 (アラメ, ウミウチワ, カヤモノリ, ワカメ, ワタモ) のうち, アラメおよびウミウチワからは酵素液 A ではプロトプラストの分離はなかったが, 酵素液 B では少数ではあったが分離可能であった。カヤモノリ, ワカメ, ワタモにおいては酵素液 A により少数のプロトプラストが分離され, 酵素液 B ではより多数のプロトプラストが分離された (Fig. 1-D, E, F)。一方, 4 種の紅藻 (ツルツル, スサビノリ, スジウスバノリ, ムカデノリ) のうちツルツル, スサビノリ, およびムカデノリからは酵素液 A でも B でも多数のプロトプラストが分離されたが (Fig. 1-G, H, I), スジウスバノリからはいずれの酵素液によってもプロトプラストの分離は全くな

Table 3. Activity of polysaccharide-degrading enzymes and protease in viscera of marine animals—III
(units/wet weight g)

Average body weight (g) \ Substrates	Origins	Kuroawabi <i>Haliotis discus</i>	Sazae <i>Turbo cornutus</i>	Tengunishi <i>Hemifusus ternatanus</i>	Nishikiuzu <i>Trochus maculatus</i>	Bai <i>Babyloma japonica</i>
		389	311	448	20	79
Agar		0.032	0.171	0.082	0.109	0.029
Alginate		0.366	0.482	0.007	0.295	—
κ -Carrageenan		0.119	0.189	0.065	0.043	0.111
CM-Cellulose		0.616	1.384	0.191	0.415	0.157
Fucoidan		0.103	—	0.041	0.134	0.052
β -1,4-Mannan		0.204	0.529	—	0.277	0.070
Porphyran		0.110	0.079	0.101	0.041	0.136
β -1,3-Xylan		—	0.106	0.005	0.117	0.002
β -1,4-Xylan		1.686	1.477	0.105	0.720	0.128
Casein		0.873	0.018	1.084	0.345	3.271

—: negligible activity

Viscera: hepatopancreas.

Table 4. Activity of polysaccharide-degrading enzymes and protease in the acetone powder of topshell hepatopancreas and commercial enzyme preparations.

(units/dry weight g)

Substrates	Origins	Topshell acetone powder	Abalone acetone powder	Cellulase ONOZUKA- RS	Driselase	Macerozyme R-10
Agar		0.153	0.153	0.200	—	—
Alginate		1.192	2.015	—	—	—
κ -Carrageenan		0.693	0.447	0.570	3.388	0.877
CM-Cellulose		2.544	2.056	23.610	21.844	12.472
Fucoidan		0.120	0.100	—	—	—
β -1,4-Mannan		1.201	0.839	8.294	6.339	2.523
Porphyran		0.269	0.087	0.056	—	—
β -1,3-Xylan		0.071	—	0.174	0.349	—
β -1,4-Xylan		5.258	2.893	37.604	108.979	62.506
Casein		0.078	—	38.880	9.474	—

—: negligible activity.

く、葉体組織の崩壊も観察されなかった。酵素液の作用時間を 24 時間まで延長してみたが、プロトプラストの分離は認められなかった。

酵素液 A と B のプロトプラスト分離能を比較すると、全般的に酵素液 B の分離能が勝り、とくに褐藻を対象とした場合に明瞭に表れていた。この主な原因としては、前述のように酵素液 A (サザエ中腸腺抽出液) には寒天、フコイダン、ポルフィラン、および β -1,3-キシランに対する分解酵素が不足していること、対照的に酵素液 B ではこれらの酵素の一部が微生物起源の酵素によって補充されていることが考えられる。

海産動物内臓の抽出液中にはプロテアーゼ活性が存在する。海藻プロトプラスト分離時のプロテアーゼの働きについては不明であるが、Table 4 に示すように、市販セルラーゼ標品中にもかなり強力なプロテアーゼ活性が

存在すること、および予めプロテアーゼ処理した海藻葉体を使用すると無処理の葉体からよりも多数のプロトプラストが分離されること⁷⁾ などから推測すると、幾らかのプロテアーゼ活性の存在はプロトプラストの分離に好影響を与えるようである。

海産動物内臓の多糖類分解酵素活性は個体や漁獲の季節、場所によって、市販酵素標品の活性は標品ロットごとに異なると考えられるので、プロトプラスト分離に不足しがちな酵素の含量には注意が必要であろう。また、本実験で使用した酵素液 B は、サザエ中腸腺抽出液、3 株の細菌の酵素、および市販セルラーゼ 2 標品酵素の混合物であり、強力でしかも多種類の多糖類分解酵素を含有していたにも拘らず、外観上は何らの影響を受けない海藻もあった。その理由としては、これらの海藻は葉体が生長して細胞壁が強固であった、細胞と細胞とが密着

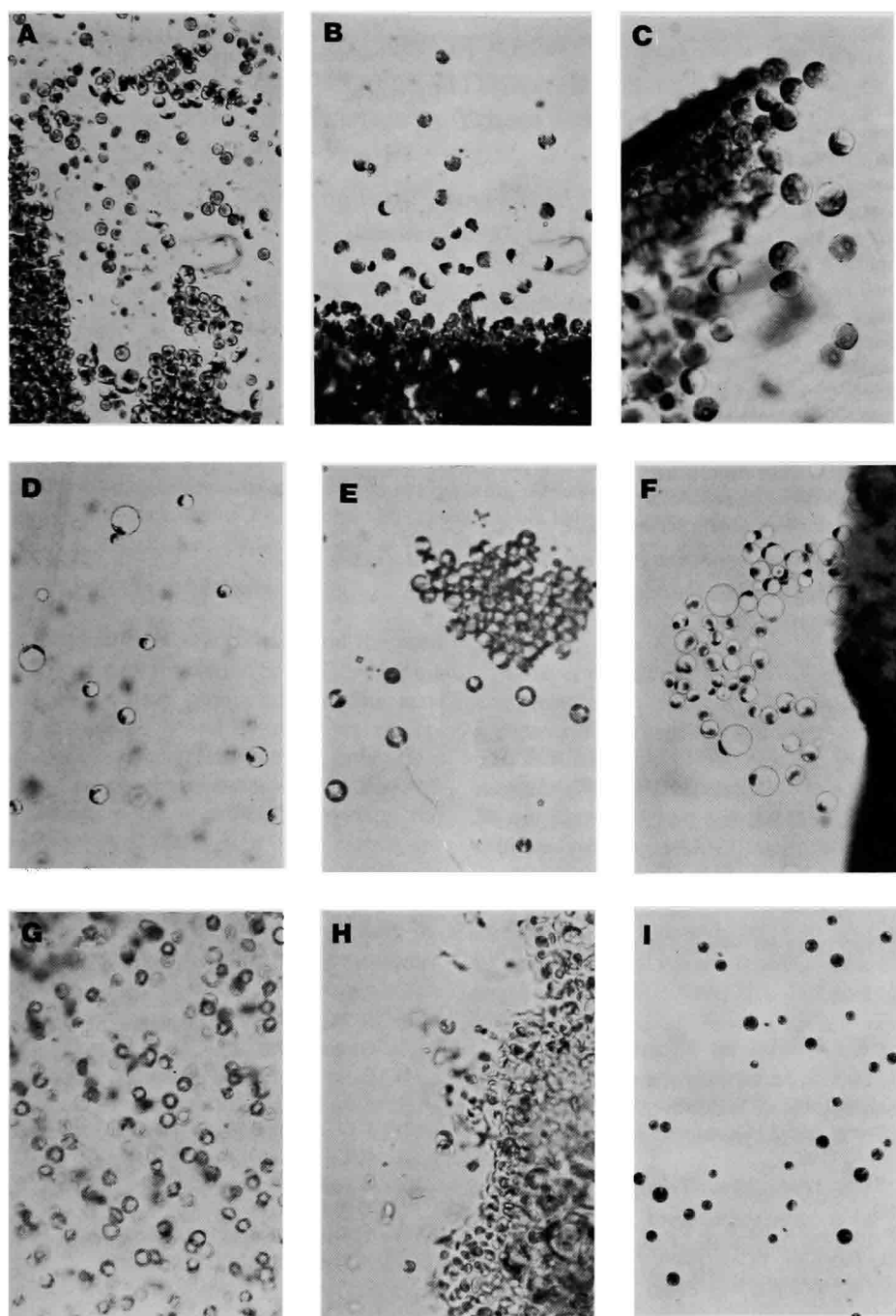


Fig. 1. Protoplasts isolated from algal thalli.

- | | |
|--|--|
| A: Aosa <i>Ulva lactuca</i> ($\times 210$) | F: Watamo <i>Colpomenia bulbosa</i> ($\times 210$) |
| B: Anaosa <i>Ulva pertusa</i> ($\times 210$) | G: Tsurutsuru <i>Grateloupia turuturu</i> ($\times 420$) |
| C: Fukuroaonori <i>Enteromorpha bulbosa</i> ($\times 420$) | H: Mukadenori <i>Grateloupia filicina</i> ($\times 420$) |
| D: Kayamonori <i>Scytosiphon lomentaria</i> ($\times 210$) | I: Susabinori <i>Porphyra yezoensis</i> ($\times 210$) |
| E: Wakame <i>Undaria pinnatifida</i> ($\times 420$) | |

Table 5. Isolation of protoplasts from algal thalli by topshell hepatopancreas extract (Enzyme A) and its mixture with microbial enzymes (Enzyme B)

Algae	Number of protoplasts isolated*	
	Enzyme A	Enzyme B
Chlorophyta		
Aosa <i>Ulva lactuca</i>	++++	++++
Anaosa <i>Ulva pertusa</i>	+++	++++
Hitoegusa <i>Monostroma nitidum</i>	++++	+++++
Fukuroaonori <i>Enteromorpha bulbosa</i>	+++	++++
Phaeophyta		
Arame <i>Eisenia bicyclis</i>	—	+
Umiuchiwa <i>Padina arborescens</i>	—	+
Kayamonori <i>Scytosiphon lomentaria</i>	+	+++
Wakame <i>Undaria pinnatifida</i>	+++	++++
Watamo <i>Colpomenia bulbosa</i>	++	++++
Rhodophyta		
Tsurutsuru <i>Grateloupia turuturu</i>	+++++	+++++
Mukadenori <i>Grateloupia filicina</i>	++++	++++
Susabinori <i>Porphyra yezoensis</i>	++++	+++++
Sujiusubanori <i>Acrosorium polyneurum</i>	—	—

* Number of protoplasts isolated from ca. 100 mg of algal thalli in 8 ml of enzyme solution.

— 0
 + 10⁰–10³
 ++ 10³–10⁴
 +++ 10⁴–10⁵
 ++++ 10⁵–10⁶
 +++++ 10⁶–10⁷

して酵素が浸透しなかった、細胞壁に特殊な構成成分を持っていた、などが考えられる。より多種類の海藻からプロトプラストの分離を可能にする強力な酵素の開発が望まれる。

謝 辞

酵素活性の測定に協力して頂いた関山博史君に御礼を申し上げます。

文 献

- 1) P. A. Millner, M. E. Callow, and L. V. Evans: *Planta*, **147**, 174–177 (1979).
- 2) D. Zhang and J. Shandong: *Coll. Oceanol.*, **13**, 57–65 (1983).
- 3) N. Saga: *Bot. Mag. Tokyo*, **97**, 423–427 (1984).
- 4) Y. Fujita and S. Migita: *Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.*, **57**, 39–45 (1985).
- 5) 幡手英雄, 青木恭彦, 荒木利芳, 北御門学: 日

水誌, **52**, 545–548 (1986).

- 6) 荒木利芳, 青木恭彦, 北御門学: 日水誌, **53**, 1623–1627 (1987).
- 7) Y. Fugita and S. Migita: *Jap. J. Phycol.*, **35**, 201–208 (1987).
- 8) 嵯峨直恒, A. Gibor: 植物バイオテクノロジー (山田康之, 岡田吉美編), 東京化学同人, 東京, 1986 pp. 64–68.
- 9) M. Somogyi: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19–23 (1952).
- 10) B. Hagiwara, H. Matsubara, M. Nakai, and K. Okunuki: *J. Biol.*, **45**, 185–194 (1958).
- 11) E. G. V. Percival and A. G. Ross: *J. Chem. Soc.*, 717–720 (1950).
- 12) J. C. Su and W. Z. Hassid: *Biochemistry*, **1**, 468–474 (1962).
- 13) J. Love and E. Percival: *J. Chem. Soc.*, 3345–3350 (1964).
- 14) Y. Iriki, T. Suzuki, K. Nishizawa, and T. Miwa: *Nature*, **187**, 82–83 (1960).