

フコイダン分解菌 *Vibrio* sp. N-5 の フコイダナーゼ生産特性

古川 真一*

緒言

褐藻に特有に存在するフコイダンは、抗ウイルス作用¹⁾、抗凝血性^{2),3)}および高脂血漿清澄作用⁴⁾などを有することから、フコイダンそのものやその分解産物の治療医薬品などへの利用性が期待されている。フコイダンは、 α -1,2結合したL-フコース-4硫酸⁵⁾を基本構造とし、部分的に α -1,3結合や α -1,4結合が存在し、硫酸基も4位だけではなく、2位、3位にも存在すると考えられ、また構成糖もフコースの他に、ガラクトース、キシロースおよびグルコースを持つ難分解性のヘテロ多糖である。しかしながら、現在でもその構造の詳細については不明点が多い。従って、より新しい構造研究の手段が待たれる。

我々は、この観点から以前フコイダンの構造解析に微生物の酵素を利用する目的で、フコイダン分解菌 *Vibrio* sp. N-5を海砂より分離し、本菌によるフコイダン分解酵素（フコイダナーゼとフコイダンスルファターゼ）の生産性について報告した。そして、本菌によるフコイダナーゼ生産がフコイダンによる誘導生産⁶⁾であることを示した。しかしながら、この *Vibrio* sp. N-5によるフコイダナーゼ誘導生産は、単なるフコイダンによる誘導だけではなく、他に誘導因子的なもの存在が認められていた。

本報告は、本菌によるフコイダナーゼ生産条件を検討したさいに得られたフコイダナーゼ誘導生産の特性に関する記述である。

材料および実験方法

試薬 フコイダンは、ガゴメコンブ (*Kjellmaniella crassifolia*) の熱水抽出液より調製したものを使用した。ブイオンは、市販品（日本水産社製、一般細菌用）を、酵母エキスは、市販品（オリエンタル

酵母工業製）を用いた。クロラムフェニコールは、Sigma社製のものを使用した。

その他の試薬は、市販の一級品を用いた。

フコイダンの調製 培養時の炭素源およびフコイダナーゼの基質として用いたフコイダンは、富士川の方法⁷⁾に準拠して調製した。ガゴメコンブの熱水抽出液よりフコイダン-セチルピリジニウム複合体として沈殿させ、これを塩化カリウム（結晶）の添加（最終濃度約2M）により溶解後、98%エタノールによる沈殿精製を繰り返して過剰のセチルピリジニウムクロリドと塩化カリウムを除去し、次いでバリウムイオンの添加で沈殿する画分を遠心分離により除去し、続くエタノール沈殿とアセトン処理後、風乾し、フコイダンの白色粉末とした。

微生物 海砂より分離したフコイダン分解菌 *Vibrio* sp. N-5を使用した。⁸⁾ 本菌は、実験に供する数週間前には継代培養し直し、生育の確認を行い、生育の盛んなカルチャーを用いた。

培地組成 普通培地は、硝酸アンモニウム2g、硫酸マグネシウム7水塩2g、塩化カルシウム2水塩0.05g、リン酸水素ナトリウム0.5g、塩化ナトリウム25g、チアミン塩酸塩 6×10^{-6} Mおよびフコイダン3gを蒸留水1000mlに溶解して調製した。培地のpHは、濃炭酸ナトリウム溶液で8.0に調整した。ブイオン培地は、市販のブイオン15gを2.5%塩化ナトリウム1000mlに溶解して作製した。この場合も、培地のpHは8.0に調整した。

一般培養法 一般培養は、基本的にはフコイダンを添加した普通培地を用いて、25℃で3日間の振とう培養により行った。培養に関する細かな条件の変更点は、本文中かまたは図表中に明記した。

フコイダナーゼ誘導培養法（二段階培養法） この培養法は、二段階で構成させた。第一段階は菌体生産を

* 生活学科

目的とした前培養であり、第二段階は酵素の誘導生産を目的とした。すなわち、ブイヨン培地（第一培地）250mlの入った1000ml容坂口フラスコに本菌1白金耳量を移植し、25℃で2日間振とう培養した。培養終了後、遠心分離により集菌し、冷却した2.5%滅菌塩化ナトリウム溶液で2回洗浄した後、再び遠心分離（12,000×g, 20分間）により菌体を集めた。得られた菌体5g（湿重量）を滅菌海水50mlに懸濁し、続いてこの菌体懸濁液を200ml誘導培地（第二培地）[培地組成：フコイダン3g, 硝酸アンモニウム1g, 酵母エキス（オリエン特酵母社製）1gを蒸留水1000mlに溶解し、pH 7.5に調整したもの]に添加して、25℃で適当な時間間隔で振とう培養した。この培養の場合、第二段階の培養からは開放系であり、混入してくる別種微生物の生育も考えられるため、培養時間は18時間を限度とした。

粗酵素溶液の調製 培養後、遠心分離により集めた菌体全量を50mM トリス-塩酸緩衝液、pH 8.0に懸濁し、0℃, 20KHzで6分間の超音波処理により細胞を破壊した。続いて、15,000×gで30分間、さらに25,000×gで60分間の遠心分離により、細胞と細胞破片を除去して得られた上清を粗酵素溶液とした。

一般分析方法

微生物の生育 フコイダン分解菌の生育は、培養液の濁度を660nmで測定するか、または菌体の湿重量を測定して求めた。すなわち、培養した菌体を遠心分離により集め、2.5%滅菌塩化ナトリウム溶液、続いて蒸留水で洗浄し、再度遠心分離により集菌して十分に水分を除いた後、重量を測定した。

還元糖の定量 酵素反応によりフコイダンから生成される還元糖は、Somogyi-Nelson法⁹⁾により測定した。この場合、生成される還元糖の中にはフコースの硫酸エステルやフコースのオリゴ糖硫酸エステルも存在するが、酵素作用により出現する全還元性糖をL-フコースとして計算した。

タンパク質の定量 菌体抽出液やフコイダン分解酵素の粗酵素液中のタンパク質量は、Lowry等の方法¹⁰⁾により測定した。標準物質としては、牛血清アルブミン（Sigma社製）を用いた。

フコイダナーゼ活性測定 前報⁹⁾の方法に準拠した。すなわち、0.5%ガコメフコイダン1.0mlに被検酵素液1.0mlを添加し、40℃, pH 8.0で24時間から48時間反応させた。このとき防腐剤としてトルエンを1, 2滴添加した。50%トリクロロ酢酸溶液（TCA）0.5mlの添加により酵素反応を停止させ、同時に12,000×gで20分間の遠心分離により除タンパクを行い、得られた

上清0.5ml中の還元糖をSomogyi-Nelson法により測定した。空実験には、3分間加熱処理をした粗酵素液を用いた。L-フコースの量は、あらかじめ作成したL-フコースの検量線により計算して求め、酵素活性は、生成するフコース量として $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{mg-protein}$ で表示した。

結果および考察

i) フコイダナーゼの誘導培養法

本培養法における本菌の生育とフコイダナーゼ生産の様子をFig. 1に示した。図より明かなように、本培養法の第二段階における培養では、フコイダンの存在しない場合では、生育の増加が認められないのに対して、フコイダンが存在すると少量ではあるが生育の増加が見られた。一方、フコイダナーゼ生産は同時期に大きく高揚した。しかし、この現象はフコイダンが存在しないと見られなかった。このことは、前報⁹⁾において、本菌をブイヨン培地で2日間培養した後、最終濃度1.5%になるようにフコイダンを添加すると、フコイダナーゼとフコイダンスルファターゼが誘導生産される現象と同じであった。このことにより、本培養法を用いて、本菌によるフコイダナーゼの誘導生産を検討できることが明らかとなった。また、この

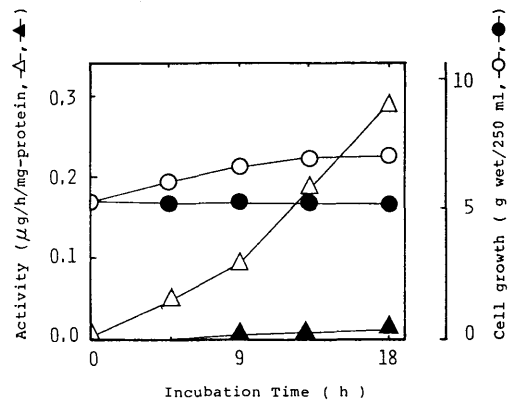


Fig. 1 Two-Step Cultivation of *Vibrio* sp. N-5 and Production of Fucoiodanase.

The cells (5g wet weight) grown in the bouillon medium (first medium) were transferred to 200 ml of an induction medium (second medium) in the presence (open symbols) or the absence (closed symbols) of fucoidan, and cultivated at 25℃ with shaking (8cm amplitude, 90 stroke/min). The cells were collected by centrifugation and then used for an assay of fucoiodanase activity. Symbols: circle; cell growth; triangle; fucoiodanase activity.

ことでこのフコイダナーゼ誘導が炭素源であるフコイダンに起因することが再確認された。

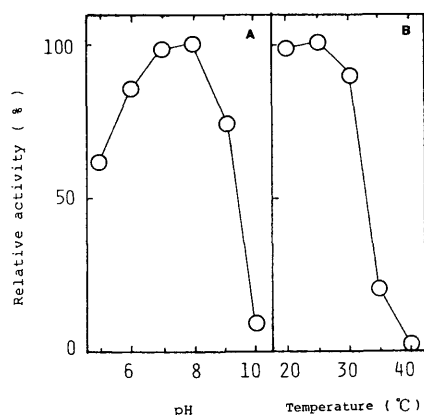


Fig. 2 Effects of pH and Temperature on Production of Fucoindanase.

The cells (5g wet weight) grown in the bouillon medium (first medium) were transferred to 200 ml of an induction medium (second medium) adjusted to pH(B) or indicated pH(A) and incubated at 25 °C (A) or indicated temperature (B) with shaking (8cm amplitude, 90 stroke/min). When the absorbance (660 nm) of the culture attained to 3.0, the cells were harvested and their fucoindanase activities were measured. The activity was represented as a percentage of the maximum value.

ii 培地の pH と培養温度の影響

本培養法の第二段階での培養に対して、菌の生育とフコイダナーゼ生産に与える培地 pH、培養温度の影響を調べた。常法どおりブイヨン培地で培養し、遠心分離により集めた菌体 5g (湿重量) を、種々の pH に設定した誘導培地 200ml に移植し、25°C で振とう培養した。また、培養温度の影響を調べる場合も同様に操作したが、培地の pH を 7.5 とし、種々の温度で振とう培養した。本培養法の第二段階における培養で培地の濁度 (OD₆₆₀ の測定値) が 3 に到達したときに集菌し、得られた菌体から細胞抽出液を調製してフコイダナーゼ活性を測定した。酵素活性は、いずれも最も高い活性値を 100 とした相対活性 (%) により表示した。上記のように操作した場合でのフコイダナーゼ生産の様子を Fig. 2 に示した。これによると、第二段階での培養においては、フコイダナーゼの誘導生産は、pH 7~8 において、また培養温度では、25°C 以下で最も高かった。

iii 窒素源と単糖 (D-グルコースと L-フコース) の影響

本培養法の第二段階で使用する培地での窒素源と単糖が与えるフコイダナーゼ生産への影響を調べた。(Table 1) この場合、窒素源としてはペプトン (極東製薬工業社) を用いた。Table 1 より、窒素源として 0.1% ペプトンを使用した場合、本法の第一段階での培養におけるフコイダナーゼ生産に比べ約 3 倍程度しか増加が見られないのに対して、0.1% 酵母エキ

Table 1 Effects of Nitrogen Sources and Sugars on Production of Fucoindanase by *Vibrio* sp. N-5

Medium	Incubation time (h)	Fucoindanase activity (L-fucose μg/ml/mg-protein)
First medium	18	0.021 (1.0)
Second medium (yeast extract free)	18	0.034 (1.6)
+ 0.1% yeast extract	15	0.315 (15.0)
+ 0.1% peptone	15	0.064 (3.0)
+ 0.1% yeast extract + 0.1% peptone	13	0.872 (41.5)
+ 0.1% yeast extract + 0.3% D-glucose	10	0.403 (19.2)
+ 0.1% yeast extract + 0.3% L-fucose	10	0.019 (0.9)

The cells (5 g wet weight) grown in the bouillon medium (first medium) were transferred to 200 ml of an induction medium (second medium, yeast extract free) supplemented with various nitrogen sources and sugars, and cultivated at 25 °C with shaking (8 cm amplitude, 90 strokes/min). When the absorbance (660 nm) of the culture attained at 3.0, the cells were harvested and their fucoindanase activities were measured. The incubation times in the table indicate the times required to attain at the turbidity of 3.0 at 660 nm.

Table 2 Comparison of Production of Fucoidanase by *Vibrio* sp. N-5

Culture	Incubation time (h) (T)	Culture volume (l) (L)	Fucoidan content (g) (C)	Cells (g wet)	Fucoidanase activity (L-fucose μ g/ml/mg-protein)	Cell production ratio ($\times 10^{-3}$) (Cells/T/L/C)	Fucoidanase production ratio ($\times 10^{-5}$) (Activity/T/L/C)
Normal cultivation*	72	4.00	20.0	8.1	1.50	1.4(1.0)	3.2(1.0)
2 step cultivation	66	0.25	0.75	5.2	0.29	420.2(300.0)	450.1(140.7)

*; cultivated at the normal medium; fucoidan, 5.0g, yeast extract, 2.0g, NH_4NO_3 , 2.0, and ferric citrate, 0.5g in 1000 ml of an artificial sea water.

スの添加により約15倍、酵母エキスとペプトンを併用すると約42倍の生産増加を示した。また、酵母エキスを除くとその酵素生産は極少量であった。このように、本菌によるフコイダナーゼの誘導生産は、第二段階の培地中に酵母エキスが存在する場合に特に顕著に認められた。このことは、酵母エキス中の何かがフコイダナーゼの生産を促進させる効果を有するものと推測される。このことには、前報⁶⁾において本菌の生育と酵素生産の検討を行ったさいに、使用したフコイダン合成培地中に微量要素としてチアミン塩酸塩を存在させると菌体生産が高揚することなどと関連付けて考えると、酵母エキス中のビタミンB系物質ではないかと想像している。これら物質については現在検討中である。

また、上記の窒素源と同時にD-グルコースとL-フコースなどの単糖を添加するとフコイダナーゼ生産に影響がみられた。D-グルコースの場合は、フコイダナーゼ生産を高揚させたが、一方フコイダンの構成糖であるL-フコースを添加するとフコイダナーゼ生産は阻害された。このことは、本菌の炭素源に対する資化能力の違いによるものと考えられるが、L-フコースの場合には内在するフコイダナーゼの活性阻害が原因とも考えられる。

また、結果は示していないが抗生物質クロラムフェニコール (50 μ g/ml) を誘導培地に添加するとフコイダナーゼ生産の増加はみられなかった。

以上、*Vibrio* sp. N-5 によるフコイダナーゼ誘導生産の特性を調べ、その誘導がフコイダンのみではなく、窒素源であるペプトンや酵母エキス中の物質によっても促進されることが明らかとなった。

最後に、本誘導培養法を考察すると、現在のところ炭素源となるフコイダンの調製にはまだ時間と手数が必要で、また一時期に調製される量にも限度があることなどから、フコイダンを培養基として用いる場合、必然的にフコイダンの経済性を考慮する必要がある。Table 2 は、本菌による菌体の生産性とフコイダナーゼの生産性を普通培地を用いる一般培養とこの二段階

培養とで比較したものである。結果的に、その菌体生産比率とフコイダナーゼ生産比率は、一般培養に比べてそれぞれ300倍と140倍となった。このことより、この二段階培養法は、本菌によるフコイダナーゼ生産の特性を検討するために使用したのもではあるが、特にフコイダンの経済性を重視すると、小規模かつフコイダンの消費量も少なく、しかしその割には菌体の生産性やフコイダナーゼの生産性も良いことなどから、フコイダナーゼ生産用培養法としても優れていると考えられる。

要 約

フコイダンの構造研究やオリゴ糖形成に対して有用な酵素であるフコイダナーゼ取得のために、フコイダ分解菌 *Vibrio* sp. N-5 のフコイダナーゼ生産特性をブイヨン組成の栄養培地とフコイダン組成培地を用いる二段階培養を用いて調べた。本培養では、pH 7.5, 25°C で酵素生産は約42倍となった。この酵素生産性の高揚には、フコイダンおよび酵母エキスが必須であった。また、この高揚はL-フコースやクロラムフェニコールの添加により阻止された。

文 献

- 1) N. Nakashima, Y. Kido, N. Kobayashi, Y. Motoki, M. Neushue and N. Yamamoto, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **31**, 1524 (1987).
- 2) T. Nishino and T. Nagumo, *Carbohydr. Res.*, **214**, 193-197 (1991).
- 3) T. Nishino, Y. Aizu, and T. Nagumo, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 791-796 (1991).
- 4) G.F. Springer, H.A. Wurzel, G.M. McNeal, Jr., N.T. Ansell, and M.F. Doughty, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **94**, 404-409 (1957).
- 5) P.E. Lloyd and K.D. Lloyd, *Biochem. J.*, **85**, 193-202 (1967).

- 6) S. Furukawa, *Bull. Hijiya Wom. Jun. Col.*, No.26, 129 (1992).
7) T. Fujikawa, *Bull. Hijiya Wom. Jun. Col.*, No.24, 151 (1990).
8) S. Furukawa and T. Fujikawa, *Nippon Nogeikagaku kaishi*, 58, 1120-1126 (1984).
9) M. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, 195, 19-27 (1952).
10) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).

(受理 平成10年10月5日)

SUMMARY

Production of Fucoidanase by Fucoidan-degrading Bacterium *Vibrio* sp. N-5

Shin-ichi FURUKAWA*

Fucoidanase is a useful enzyme for structural analysis and its oligosaccharides of fucoidans. The production of the fucoidanase by the fucoidan-degrading bacterium *Vibrio* sp. N-5 was examined by the two-step cultivation using both the first medium of buillon and the second in addition of fucoidan.

In the two-step cultivations (pH 7.5, 25 °C) the fucoidanase was produced increasingly 42 times, compared with that produced in the case of the first medium. The fucoidan and the yeast extract were essential for a promotion of the fucoidanase production, whereas the promotion was repressed by the addition of L-fucose or antibiotics chloramphenicol.

(Received October 5, 1998)

* Department of Human Life Studies