

佐々木園子*: アルギン酸の生化学

Sonoko SASAKI: Biochemistry of alginic acid

はじめに

褐藻を希塩酸などで抽出し次いでアルカリ液に漬けると藻体は溶けはじめ、やがて粘稠な液の中に組織破片が埋まった状態になる。この液をとり、酸を加えれば含水ゲルとしてアルギン酸が沈でんし、エタノールなどの有機溶媒を加えれば糸状のアルギン酸塩が沈でんする。1881~1883年に STANFORD はコンブ科の褐藻を希炭酸ソーダで抽出処理して得られた粘稠物質を“algin”と呼んだのが、この多糖に対する最初の命名とされている。また現在におけるアルギン酸の高分子物質としての有用性も STANOFRD の発見に源を発しているといえよう¹⁾。それから現在に至るまで 90余年の間アルギン酸は工業的に着実な需要の場を占め、その方面での研究も多く、特にそれが天然で他にあまり例のないウロン酸のみからなる多糖であることからその化学的性質は多糖化学者の関心をひいて来た。最近ある種のバクテリア (*Pseudomonas*²⁾, *Azotobacter*³⁾) もアルギン酸のアセテートを作ることが知られるようになったが、その他の植物においてはアルギン酸は褐藻に特有であるだけに植物系統分類学上も重要視された。しかも多量に存在することから植物生化学の面からも関心を払われ、その生理的意義も次第に解明されようとしている。しかしその珍らしさは同時に一般的な研究方法がそのまま応用されない難しさでもあり、多少なりとも解明に携わってきた者の一人として歯痒いこともある。ここでは、こうしたアルギン酸の基礎的な諸問題を紹介し、多くの方々のご理解を仰ぐとともに、なお一層の進展に向けて有益な資料を得たいと思う。

構成糖と結合様式

アルギン酸の酸水解物から D-マンヌロン酸の存在を証明した最初の人には NELSON と CRETCHER で、彼等はまた脱炭酸反応で生じる炭酸量からこの多糖がウロン酸のみからなるものであることを示した。その結合は HIRST 一派のメチル化分析の結果 2,3-ジメチルマンヌロン酸を生じたこととその左旋性であることを考え合わせて β -1.4 結合であるとされた。過ヨウ素酸酸化の結果もこの結合様式を支持し、また固体試料の X 線回折像も同じ β -1.4 結合からなるセルロースとの対比で規則的な直鎖構造と解釈されこの

* 東京教育大学理学部植物学教室 (112 東京都文京区大塚 3-29-1).
Department of Botany, Tokyo Kyoiku University, Otsuka, Tokyo, 112 Japan.
Bull. Jap. Soc. Phycol., 23: 116-124, Sept. 1975.

結合様式を裏付けることになった。このようにアルギン酸の主要な構造はすでに確立されたかに見えた。しかしこの間の分離分析技術の進歩はアルギン酸の構造に新たな問題を引出すことになった。ウロン酸相互の分離のためペーパークロマトグラフィーを研究していた FISCHER と DÖRFEL が新しい溶剤系を褐藻多糖の水解物の分離に用い、アルギン酸の構成糖として新たに L-グルロン酸の存在を報告したからである⁴⁾。

複合多糖か単純多糖の混合物か——不均一性

一見均質で一つの名で呼ばれる多糖が沈でん法などで分別される例は、でんぷんにおけるアミロースとアミロペクチン、寒天におけるアガロースとアガロペクチンなどがよく知られている。アルギン酸もある種の塩溶液で部分的に沈でんすることが McDOWELL によって報告された⁵⁾。HAUG はさらに KCl, MgCl₂ と CaCl₂ などの塩溶液を用いての分別沈でん法を開発しそれらの画分が2種ウロン酸含有比を異にするものであることを示した⁶⁾。すなわち高濃度の KCl 溶液中で沈でんするアルギン酸はマンヌロン酸残基 (以下 M と略) に富み Mn, Mg, Ca などの二価金属塩溶液ではグルロン酸残基 (G) の多いものが沈でんする。この結果からアルギン酸はそれぞれ M および G のみからなる多糖の混合物であるかにもえた。そこでさらにこれらの分別法を繰返して各単純多糖を精製することが当然試みられた。しかしどの分別法も一定以上の精製をもたらさず (M/G 比 0.4~3.1) 一方アルギン酸の部分分解物として M と G との結合したオリゴ糖も報告されてアルギン酸分子中の M と G との存在様式は、その不均一性を踏えた上での微細構造の研究を必要とすることとなった。

アルギン酸分解酵素

化学的に多糖の構造を調べる場合各種分解反応とメチル化反応が主要な手段となっているが、そのいずれにとってもウロン酸多糖はくみし易い対象ではない。その収量の悪さは、反応産物から推察される構造が分子中のどの辺で、またどの程度の部分を占めていたものであるかの疑問を残すことになる。そこで分解酵素を用いての選択的な分解に大きな期待が寄せられる。すでに 1930 年代にある種の土壌細菌⁷⁾及びアワビ、アメフラシ⁸⁾などの海産軟体動物の消化腺に、アルギン酸に働かせてその粘度を低下させ還元糖を生成する酵素が存在することが報告されたが、その基質特異性や酵素としての性質などは、アルギン酸の構造解明と相俟って近年ようやくわかり始めた。

アワビの肝臓の粗抽出液をアルギン酸に働かせその生成物として二糖類を単離精製した辻野と斎藤は、その構成糖にはマンヌロン酸のほかにもう一つ、二重結合をもつウロン酸があることを報告した⁹⁾。同じ年、吉川も細菌起源の酵素によるアルギン酸分解物中から M と G と不飽和ウロン酸残基からなる三糖を得たことを報告した⁹⁾。これらに類する不飽和オリゴ糖はヒアルロン酸などのウロン酸多糖の酵素分解においてすでに

知られており、脱離反応による分解としてエリミネーゼ(リアーゼ)の名がこの種の酵素に与えられた。辻野らおよび吉川のオリゴ糖の記載はアルギン酸分解におけるエリミネーゼの最初のものであった。そうしてその後報告されたアルギン酸分解酵素は、そのほとんどがこのエリミネーゼであった。吉川らの三糖類は、後になって筆者らも得ることとなったが¹⁰⁾、このオリゴ糖の構造説明は2種ウロン酸残基の結合部の証明としても、この酵素の作用部位を知る上でも興味深い。

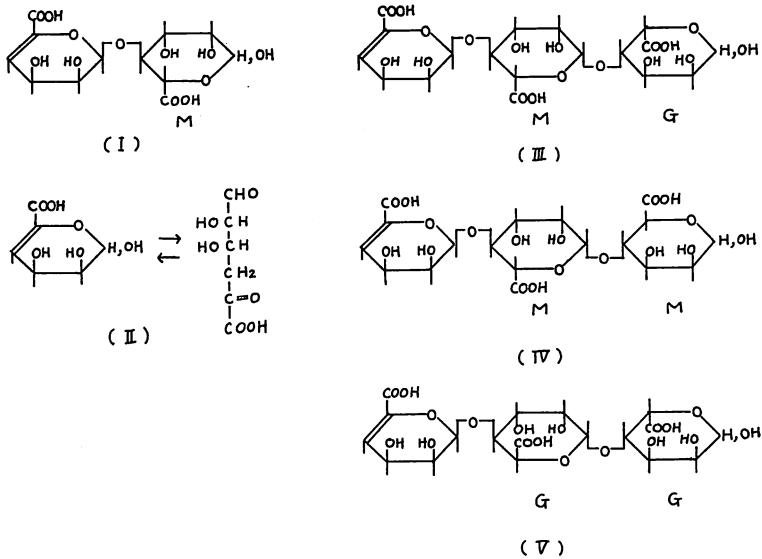


図1. 各組アルギン酸リアーゼの分解産物 (I) アワビ⁸⁾, タツナミガイ¹³⁾, (II) *pseudomonas*¹⁰⁾ 11), (III) *algimonad*⁹⁾, *pseudomonad*¹⁰⁾, (IV) タツナミガイ¹³⁾, (V) *pseudomonad*¹⁴⁾.

PREISS と ASHWELL は海泥より分離した *pseudomonad* の酵素を用いて分解産物を調べた¹¹⁾。分解酵素は多様であるらしいことは分るが、それらの分離は難かしく、また生成物の大部分は不飽和ウロン酸であり、この細菌によるアルギン酸分解の経路は明らかにされたが、アルギン酸自身の構造説明には、この菌の酵素は役立つものではなかった。

一方、カリフォルニア産のアワビの肝臓から分解酵素を抽出した NAKADA らは M に富むアルギン酸をよく分解する主要な画分のほかに、G に富むアルギン酸を切る小さな画分が分離されたことを報じた¹²⁾。筆者らもタツナミガイ (*Dolabella auricula* SOLANDER) の肝臓の酵素について調べてきたが、すでに粗抽出標品の段階で圧倒的に M の結合に特異性を示し、その反応混液には、M のみを含む不飽和三糖から M と G の両者を含む四糖以上のオリゴ糖群から G に富む残存アルギン酸に至る一連の連続し

たオリゴウロナイドがみられた¹³⁾。

それらはそれ以上同じ酵素によって分解されず、従ってそれぞれ最終産物と考えられ、親アルギン酸分子の中には酵素分解を限定するなんらかの箇所のあることが推察された。一方同じ研究室において柏原らが腐朽褐藻より分離した *Pseudomonad* の酵素は、タツナミガイのものと同様に G-結合および M と G のある部分をよく分解した¹⁴⁾。このことにより、これら2種の酵素標品の相補的作用は、不均一で複雑なアルギン酸の全体像を求めるために有用であると思われた。最近北方の海産軟体動物 *Littorina* の酵素について精製もなされたがこのものも M-結合に特異性があるようである¹⁵⁾。

以上はアルギン酸を栄養源とする細菌や動物が、それ自身で作るアルギン酸リアーゼによりこの多糖を分解するという話であったが、褐藻自体の中にも同種の酵素が存在することが明らかになってきた。最近筆者らの研究室で調べたアラメとワカメ中のリアーゼ活性は、組織の古いところほど強いことは面白い¹⁶⁾。この活性は上記の酵素に比べてきわめて低くその性質など調べにくい、これもエリミナーゼであり、基質特異性の違う数種の酵素からなっているようであった^{16,17)}。

ブロック構造

M に富む分子から G に富む分子に至る複合多糖アルギン酸において、M と G はどのように分布しているのかは多糖化学上興味ある問題であった。これについては HAUG らの巧妙な部分分解と、その生成物の分離の結果がまず大まかなイメージを与えた¹⁸⁾。すなわち酸水解に抵抗性といわれるアルギン酸が、実は 1 M 蔞酸、100°C、5時間ほどの水解で容易に重合度 20 くらいブロックに寸断され、最初の 20 分で可溶化するものは M/G 比が 1 に近く、最後に不溶物として残ったものをアルカリ液に溶解して pH を 3 付近に調節して生じた沈でんには G が圧倒的に多かった。この際の可溶性画分には M が多かった。これらの結果に基づき、彼等は不溶性(結晶性)のホモポリマーブロックの間に可溶性のヘテロポリマーブロックが介在している分子構造を提出した。それらブロックの組合わせ次第で M/G 比や物理化学的性状が異なった様々なアルギン酸分子が出来上るものと考えた。

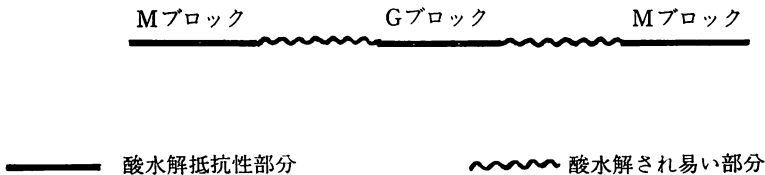


図 2. Haug によるブロック構造の模式図¹⁸⁾

一方著者らはインゲのアルギン酸を塩分別して3種の画分を得、それぞれについてタ

ツナミガイと *pseudomonad* の酵素を働かせて生成物を分析するという方法でこの問題の解明に迫ったが、同じく各ウロン酸残基の局在する部分とともに2種ウロン酸残基が入りこんで出来た部分からなるという結果を得た。ただ酸水解法によってはほぼ重合度20の均質なブロックとして示されたが、さきに述べたような酵素分解の結果からはブロックには長短様々の種類があることが推論された¹⁹⁾。

また、可溶性ブロックとして得られるヘテロオリゴ糖に関して、HAUG 一派は2種ウロン酸残基の酸水解の kinetics から M と G との交互構造を提唱した²⁰⁾。しかしわれわれは、対応する画分から酵素分解産物を得、これが必ずしも100% 交互構造ではなく、その大部分はごく短いホモブロックの反復からなるものと考えられ、正確な交互構造はそれほど長鎖では存在しないと思われる結果を得た¹⁹⁾。

褐藻の種類や部分とアルギン酸の多様性

すでに1955年、FISCHER と DÖRFEL は新しいウロン酸グルロン酸の発見とともに十数種の褐藻のアルギン酸についてその M/G 比を調べ、それぞれ異なっていることをみている⁴⁾。褐藻の種類とアルギン酸の構成ウロン酸比 (M/G) の関係はさらに HAUG によって調べられたが²¹⁾、系統との関係はみられず、アルギン酸分子の不均一性がいよいよ明らかにされ、ひいてはより微細な藻体内分布が重要になってきた。

FREI と PRESTON は *Alaria*, *Chorda*, *Himanthalia* の藻体標品を用い、熱水、アルカリ抽出などの処理前後のX線回折像を調べ、褐藻の細胞壁においてセルロースと並んで結晶性を示す細胞壁成分があることやそれが従来細胞間物質として知られてきたアルギン酸の中の G に富む分子であること、M の多いアルギン酸が細胞間粘質物として存在することなどの卓見を発表した²²⁾。また *Ascophyllum*, *Fucus* の藻体の各部分においてアルギン酸を比較した HAUG は、その生殖器托 (receptacle) の内部粘液の主要成分が95% 以上もの M を含むアルギン酸であることや生長点に近い新しい藻体部分ほど M が多く古い部分ほど G が多いこと、皮層においては G が多く髄においては M が多いことなどを観察し、細胞間隙の粘液は M の多いアルギン酸であり細胞壁をなすものは G ないし MG からなるアルギン酸であろうという PRESTON らと同じ見解を得た²³⁾。そして細胞間隙ないし粘液質の少ない褐藻種は全体として M/G 比が低くなることを示した。アルギン酸が結晶性の壁成分として存在するとの見解は電子顕微鏡による観察からも支持された²⁴⁾。

アルギン酸の生合成

でんぷんをはじめ多くの植物性多糖が糖ヌクレオチドを基質として各糖残基転移酵素によって逐次合成されることは HASSID らの研究室で精力的に証明され、アルギン酸もそのような経路で合成される可能性がまず彼らにより示された。14.4 kg の *Fucus* の藻

体から 3μ moles の GDP-マンヌロン酸と 0.5μ moles の GDP-グルロン酸を得て該当糖スクレオチドを証明した彼らは²⁵⁾, 次いで図式のような酵素系の存在を予想しそれぞれの ^{14}C -標識基質を調製し藻体片および抽出液で逐一取込んだ物質を同定して裏付けた²⁶⁾。

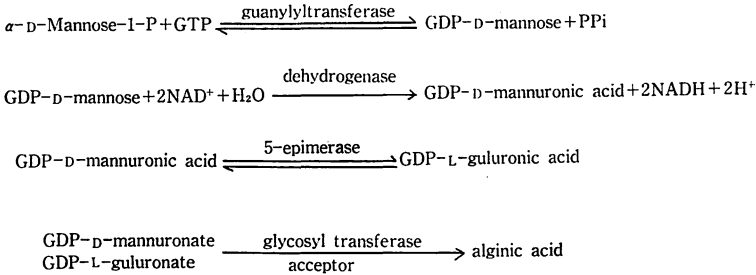


図3 アルギン酸の生合成²⁶⁾

しかしこのような仕事からはこの複合多糖における興味ある分子全体の不均一性, 2種uron酸の配列がどのように作られているかといったことは未解決であった。この問題に関連して $^{14}\text{CO}_2$ を含んだ海水中でイシゲを短時間光合成させ続いて明暗両条件で普通の海水で培養しアルギン酸内での ^{14}C の分布を調べた結果は興味深い²⁷⁾。図で明らかのように, 引続き明所で培養した場合は ^{14}C はまず M 画分の M 残基に多く取込まれ, 続いて MG 画分の M に多く, G 画分の G には最も遅く取込まれた。暗所培養の場合は明所の場合に比較して MG 画分への取込みが多いことが注目された。HELLBUST らは *Laminaria* について同様の実験を行ない, ブロック間に同じ関係のあることをみている²⁸⁾。

一方最近, アルギン酸の高分子内部でuron酸残基の相互転換が酵素的に行われることを HAUG 一派が細菌の場合において報告した²⁹⁾。 *Azotobacter* の培養基中で, 彼らは Ca イオンの存在下でアルギン酸の M/G が M が減少する方向で変化することをまず発見した。そしてこれが多糖鎖内のuron酸残基に働らく Epimerase に類する酵素反応であることを確めた。続いて同じ酵素が褐藻 *Pelvetia* にもあることを認めている³⁰⁾。しかしこの酵素が褐藻自身に本当に存在するかどうかは, 褐藻の酵素の扱いにくさもあって, この酵素の詳細がまだ出されていないので不明である。最近筆者らの研究室の報告によると, 褐藻酵素による G→M 転換がないともいえない結果が得られているが, その真偽のほどは今後の研究に残されている¹⁶⁾。

一方 HASSID らの GDP-グルロン酸の発見と, アルギン酸の藻体内での壁成分と細胞間粘液質という存在形態のちがいを考え合わせると, 多様なアルギン酸分子はそれぞれ

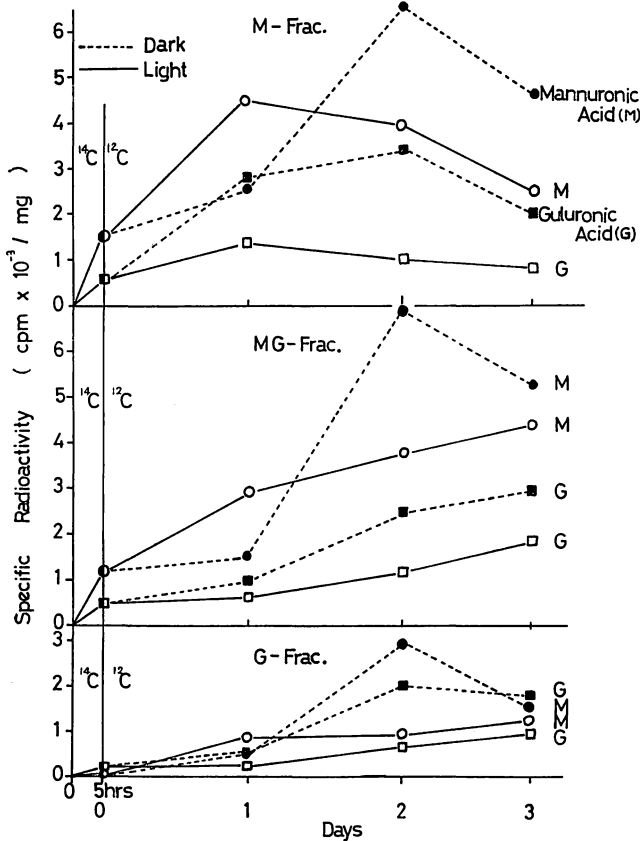


図4 アルギン酸の3画分中の M, G 残基への ¹⁴C の取込み²⁷⁾

にターンオーバー速度の違う多糖として生合成されたり分解されたりしていることも十分考えられよう。近年顕微鏡下での褐藻多糖の識別も進み、藻体の発生期からその分化を追って観察も出来るようになり、形態的に細胞壁の起源を求める方向が開けてきたので、これらの方法と生化学的な研究が相携えることにより、将来この分野の解明が期待される。

筆者のアルギン酸研究の指導にあたられ、今回は原稿を読んで下さった日本大学水産学科西沢一俊教授に深く感謝いたします。

文 献

1) PERCIVAL, E. and McDOWELL, R. H. (1967). Alginic acid. Chemistry and

- Enzymology of Marine Algal Polysaccharides. 99-126. Academic Press.
- 2) LINKER, A. and JONES, R. S. (1964). A polysaccharide resembling alginic acid from a *Pseudomonas* microorganism. *Nature* **204**: 187-188.
 - 3) GORIN, P.A.J. and SPENCER, J.F.T. (1966). Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*.
 - 4) FISCHER, F.G. and DÖRFEL, H. Die Polyuronsäure der Braunalgen. *Z. physiol. Chem.* **302**: 186-203.
 - 5) McDOWELL, R.H. (1958). A method for the fractionation of alginates. *Chem. & Ind.* **1958**: 1401-1402.
 - 6) HAUG, A. and SMIDSRØD, O. (1965). Fractionation of alginates by precipitation with calcium and magnesium ions. *Acta Chem. Scand.* **19**: 1221-1226.
 - 7) 遠藤庄三 (1934). アメフラシの消化酵素。動物学雑誌 **46**: 351-355.
 - 8) TSUJINO, I. and SAITO, T. (1961). A new unsaturated uronide isolated from alginate hydrolysate. *Nature* **192**: 970-971.
 - 9) 吉川三吉 (1961). アルギン酸の酵素分解でえられるオリゴウロナイドについて (I). 生化学 **33**: 30-34.
 - 10) 関庚喜 (1974). Studies on alginate lyases from *Pseudomonas* sp. 東京教育大学学位論文
 - 11) PREISS, J. and ASHWELL, G. (1962). Alginic acid metabolism in bacteria. *J. Biol. Chem.* **237**: 309-316.
 - 12) NAKADA, H.I. and SWEENEY, P.C. (1967). Alginic acid degradation by eliminases from abalone hepatopancreas. *J. Biol. Chem.* **242**: 845-851.
 - 13) NISIZAWA, K., FUJIBAYASHI, S. and KASHIWABARA, Y. (1968). Alginate lyases in the hepatopancreas of a marine mollusc, *Dolabella auricula* Solander. *J. Biochem.* **64**: 25-37.
 - 14) KASHIWABARA, Y., SUZUKI, H. and NISIZAWA, K. (1969). Alginate lyases of pseudomonads. *J. Biochem.* **66**: 503-512.
 - 15) ELYAKOVA, L.A. and FAVOROV, V.V. (1974). Isolation and certain properties of alginate lyase VI from mollusk *Littorina* sp. *Biochim. Biophys. Acta* **358**: 341-354.
 - 16) SHIRAIWA, Y., ABE, K., SASAKI, S., IKAWA, T. and NISIZAWA, K. (1975). Alginate lyase activities in the extracts from several brown algae. *Bot. Marina* **18**: 97-104.
 - 17) MADGWICK, J., HAUG, A. and LARSEN, B. (1973). Alginate lyase in the brown alga *Laminaria digitata* (HUDS.) LAMOUR. *Acta Chem. Scand.* **27**: 711-712.

- 18) HAUG, A., LARSEN, B. and SMIDSRØD, O. (1966). A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. *Acta Chem. Scand.* **20**: 183-190.
- 19) FUJIBAYASHI, S., HABE, H. and NISIZAWA, K. (1970). Heterogeneity of alginate in special reference to the enzymatic degradation. *J. Biochem.* **67**: 37-45.
- 20) LARSEN, B., SMIDSRØD, O., HAUG, A. and PAINTER, T. (1969). Determination by a kinetic method of the nearest neighbour frequencies in a fragment of alginic acid. *Acta Chem. Scand.* **23**: 2375-2388.
- 21) HAUG, A. (1964). Composition and properties of alginates. Report No. 30 Norwegian Inst. of Seaweed Research, Trondheim.
- 22) FREI, E. and PRESTON, R.D. (1962). Configuration of alginic acid in marine brown algae. *Nature* **196**: 130-134.
- 23) HAUG, A., LARSEN, B. and BAARDSETH, E. (1969). Comparison of the constitution of alginates from different sources. *Proc. Intl. Seaweed Symp.* **6** 443-451.
- 24) McCULLY, M. E. (1965). A note on the structure of the cell walls of the brown alga, *Fucus*. *Can. J. Bot.* **43**: 1001-1004.
- 25) LIN, T. Y. and HASSID, W. Z. (1966). Isolation of guanosine diphosphate uronic acids from a marine brown alga, *Fucus gardneri* SILVA. *J. Biol. Chem.* **241**: 3282-3293.
- 26) LIN, T. Y. and HASSID, W. Z. (1966). Pathway of alginic acid synthesis in the marine brown alga, *Fucus gardneri* SILVA. *J. Biol. Chem.* **241**: 5284-5297.
- 27) ABE, K., SAKAMOTO, T., FUJIBAYASHI-SASAKI, S and NISIZAWA, K. (1973). *In vivo* studies on the synthesis of alginic acid in *Ishige okamurai*. *Bot. marina* **16**: 229-234.
- 28) HELLEBUST, J. A. and HAUG, A. (1969). Alginic acid synthesis in *Laminaria digitata* (L) LAMOUR. *Proc. Intl. Seaweed Symp.* **6**: 463-471.
- 29) HAUG, A. and LARSEN, B. (1971). Biosynthesis of alginate. Part II Polymannuronic acid 5-epimerase from *Azotobacter vinelandii* (LIPMAN). *Carbohydr. Research.* **17**: 287-296.
- 30) MADGWICK, J., H, HAUG, A. and LARSEN, B. (1973). Polymannuronic acid 5-epimerase from the marine alga *Pelvetia canaliculata* (L.) DCNE. et THUR. *Acta Chem. Scand.* **27**: 3592-3594.