

# マボヤのラミナリン分解酵素の精製および特性について

誌名	日本水産学会誌
ISSN	00215392
著者名	永山,文男 梅沢,一民
発行元	日本水産学会
巻/号	41巻4号
掲載ページ	p. 435-441
発行年月	1975年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## マボヤのラミナリン分解酵素の精製 および特性について

永山文男・梅沢一民

(1974年12月13日受理)

### Purification and Properties of Laminarin Hydrolases from the Ascidian, *Halocynthia roretzi*

Fumio NAGAYAMA\* and Kazutami UMEZAWA\*

Laminarin hydrolase of the ascidian, *Halocynthia roretzi*, was found to comprise an endoglucanase (percentage activity, 23%), two exoglucosidases (20 and 42%), and a nonspecific  $\beta$ -glucosidase (15%). They were separated by DEAE-Sephadex chromatography followed by gel filtration.

Endoglucanase (laminarinase, EC 3.2.1.6, or endo-1,3- $\beta$ -glucanase, EC 3.2.1.39, mol. wt. 20,000) produced oligosaccharides and glucose from laminarin, and exhibited maximum activity at pH 5.5. It was inhibited by iodoacetamide but not by glucono-1,4-lactone. Vanadium pentoxide and ethylenediaminetetraacetic acid activated the enzyme.

Exoglucosidase (exo-1,3- $\beta$ -glucosidase, EC 3.2.1.58) was separated into two enzymes. The one (mol. wt. 370,000), exhibiting maximum activity at pH 6.5, was inhibited by glucono-1,4-lactone but not by iodoacetamide, and activated by sodium chloride. The only reaction product was glucose. The other (mol. wt. 120,000), showing maximum activity at pH 6.0, was inhibited by both glucono-1,4-lactone and iodoacetamide. The main product was glucose, but a small quantity of biose was found in the reaction mixture.

Nonspecific  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21) also hydrolyzed laminarin to produce glucose at a slow rate. Its molecular weight was estimated to be 80,000, and the optimum pH was 4.8.

マボヤ *Halocynthia roretzi* の肝臓には各種のアリルグリコシダーゼおよびポリサッカリダーゼの活性が認められ、特にラミナリン分解活性は著しく高い。<sup>1)</sup> ラミナリンはコンブなどの褐藻の貯蔵性炭水化物の一つであつて、この物質を分解する活性の高いことはマボヤの栄養にラミナリンの関与することを示唆するものであろう。

ラミナリンは、endo-型の加水分解をするラミナリナーゼ (EC 3.2.1.6) だけでなく、endo-1,3- $\beta$ -グルカナーゼ (EC 3.2.1.39)、exo-1,3- $\beta$ -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.58) および非特異的な  $\beta$ -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.21) によつても分解されるので、ラミナリナーゼ作用という場合これらの複合酵素系の作用を指すのが普通であり、すでに微生物や植物から分離した個々の酵素の特性はかなり明らかになつている。<sup>2,3)</sup> しかし、水産動物の酵素の特性は、2,3の例<sup>4,5)</sup>以外に知られていない。

われわれは今回、マボヤの肝臓から4種のラミナリン分解酵素を分離し、それぞれについていくつかの性質を明らかにした。

\* 東京水産大学 (Tokyo University of Fisheries, Konan 4, Minato-ku, Tokyo)

## 実 験

**抽出** 石巻産養殖マボヤの肝臓(60g)に少量の石英砂と pH 5.0 のクエン酸-リン酸緩衝液(McILVAINE 緩衝液, 以下同様)を加えて乳鉢で搗潰した後ガーゼでろ過する。残渣を再び同様に処理し,ろ液を合わせ (130 ml), 15,000×g で 30 分遠心分離する。上澄液を粗抽出液とした。

**イオン交換クロマトグラフィー** 上記の抽出液 60 ml を採り, pH 6.0 のクエン酸-リン酸緩衝液で平衡させた Sephadex G-25 のカラム (3×30 cm) を通し酵素活性のある溶出液を採る。この液を, pH 6.0 の上記緩衝液で平衡させた DEAE-Sephadex A-50 のカラム (2×20 cm) に通し, 同じ緩衝液 100 ml で洗浄した後, KCl の直線濃度勾配 (0-0.4 M) を与えて 1 時間 30 ml の速さで 400 ml 溶出, さらに KCl を 2 M にして残留部分を溶出させ, 8 ml ずつ分取した。

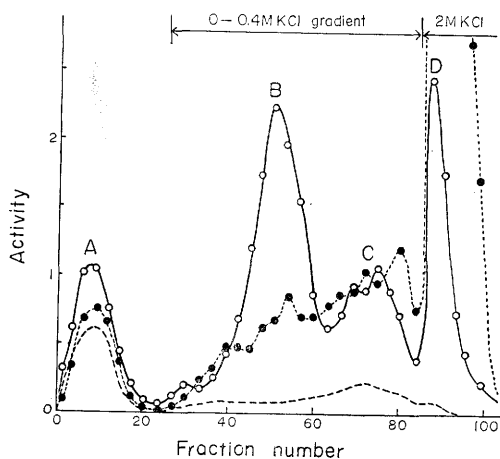
**ゲルろ過** 分かれた活性画分をそれぞれコロジオンバッグで吸引濃縮した後, pH 5.0 のクエン酸-リン酸緩衝液で平衡させた Sephadex G-200 のカラム (2.5×32 cm) を用い, 上昇法で 1 時間 15 ml の速さでゲルろ過し, 4 ml ずつ分取した。

**酵素活性の測定** 酵素液 0.2 ml, 必要な pH のクエン酸-リン酸緩衝液 0.4 ml, 基質 (1% ラミナリンまたは 0.5% でんぷん, または 0.01 M ニトロフェニル-β-グルコシド) 0.2 ml を混合し, 30° で一定時間反応させる。ラミナリンの分解度は NELSON-SOMOGYI 法で還元糖を, でんぷんの分解度はジニトロサルチル酸法で還元糖を, また β-グルコシドの分解度は遊離ニトロフェニルをそれぞれ比色定量して求めた。

**反応生成物の検出** 反応液を減圧濃縮し, ろ紙 (東洋 50 A) につけ, 酢酸エチル・ピリジン・水 (8 : 2 : 1)<sup>9)</sup> で上昇展開, アニリン・水素フタル酸で発色させた。

## 結 果

**酵素の分離精製** DEAE-Sephadex A-50 のカラムによりマボヤのラミナリン分解酵素は 4 成分に分けられた (Fig. 1)。溶出の順に A, B, C, D とすると, B の活性が他のものより大きく, 溶出曲線から求められる各成分のおおよその活性比は 15 : 42 : 20 : 23 であつた。この段階ではラミナリン分解酵素とアミラーゼおよび β-グルコシダーゼとの分離が不完全であるが, それぞれの画分を Sephadex G-200 のカラムで処理するとアミラーゼ活性は完全に除かれた (Fig. 2)。β-グルコシダーゼ活性は B と D にはほとんど, または全くみられず, C でもラミナリン分解活性の主要画分にはわずかしかみられなかつた。しかし A ではラミナリン分解酵素と β-グルコシダーゼの溶出曲線が一致した。なお A には弱い CMC 分解活性が認められた。A~D それぞれの main peak の, 活性の強い部分を集めて特性観察の実験に用いた。



**Fig. 1.** DEAE-Sephadex A-50 chromatography of laminarin hydrolase extracted from the ascidian hepatopancreas, resulting in appearance of four components, A~D.

The column (2×20 cm) equilibrated with McILVAINE's citrate-phosphate buffer, pH 6.0, was developed with 400-ml of 0-0.4 M KCl gradient in citrate-phosphate buffer, followed by 200 ml of 2 M KCl, at a flow rate of 30 ml/hr. The effluent was collected in 8 ml fractions. Laminarin hydrolase was assayed at pH 6.0 (—○—), amylase at pH 7.0 (—●—), and β-glucosidase at pH 4.0 (---)

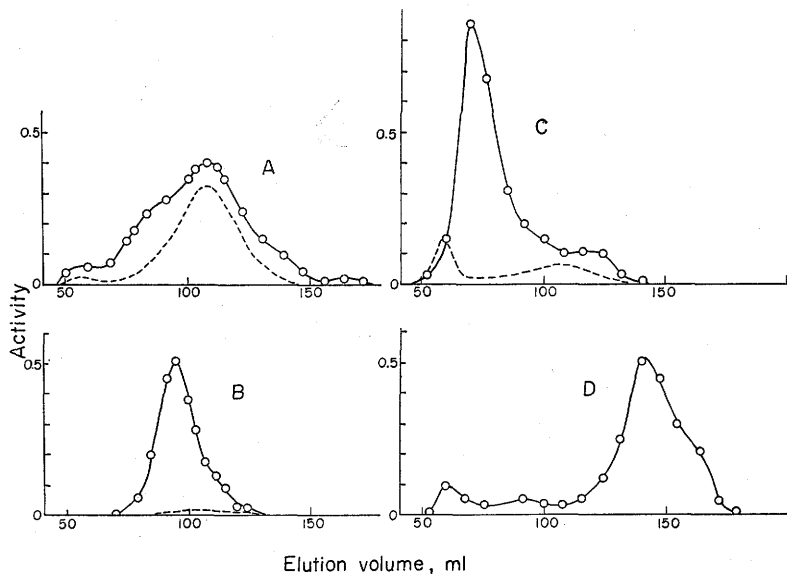


Fig. 2. Gel filtration of laminarin hydrolase components A~D from the ascidian hepatopancreas on a Sephadex G-200 column.

Activities of laminarin hydrolase at pH 6.0 (—○—) and  $\beta$ -glucosidase at pH 4.0 (---) were assayed at 30°. No amylase activity was detected. Fractions of each main peak exhibiting strong activity of laminarin hydrolase were collected and used in the following experiments.

Sephadex G-200 からの溶出速度より算定される分子量は、A 80,000, B 120,000, C 370,000, D 20,000 であつた (Fig. 3)。

それぞれの酵素の各精製段階での比活性は Table 1 にあげたが、粗抽出液の活性を基準にすると、最終的に A が 4 倍、B が 30 倍、C が 80 倍、D が 170 倍の比活性を示した。

#### 酵素の特性

1. pH の影響 粗抽出液の酵素作用の至適 pH は 5.8 付近であつたが、分離した酵素の至適 pH はそれぞれ異なり、A 4.8, B 6.0, C 6.5, D 5.5 であつた (Fig. 4)。以下の実験ではそれぞれの酵素の至適 pH で反応を行なわせた。

2. 各種化合物の影響 Table 2 にみられるように、各種化合物の酵素活性に及ぼす影響は、分離されたそれぞれの酵素によつて著しく異なるものであつた。

すなわち、塩化ナトリウムは C のみを著しく賦活、EDTA は A 以外の酵素特に D を賦活、五酸化バナジウムは D のみを賦活、硫酸マンガンは C 以外特に A を著しく賦活、塩化第二水銀はすべての酵素を阻害、モノヨード酢酸は A と D を抑制、ヨードアセタミドは C 以外の酵素を著しく阻害、グルコノ-1,4-ラク톤は D 以外特に B と C を強く阻害、グルタミン酸は C 以外をやや賦活した。

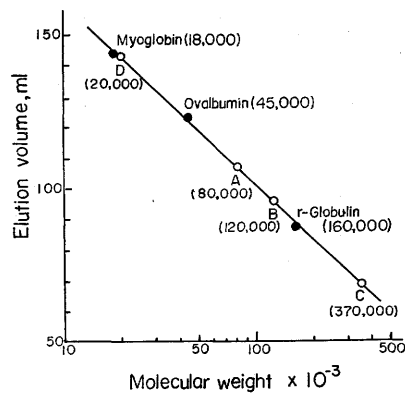
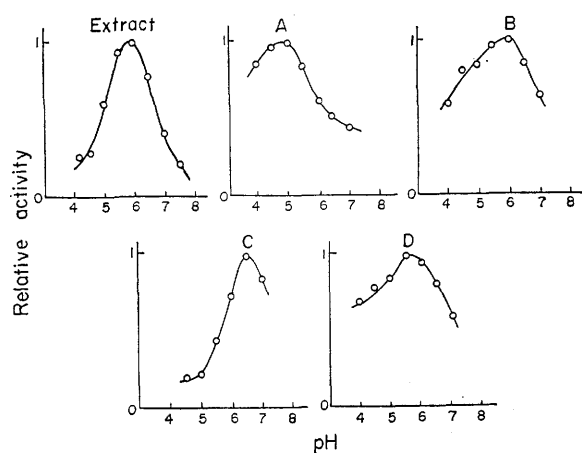


Fig. 3. Estimation of the molecular weights of components A~D by Sephadex G-200 gel filtration.

**Table 1.** Purification of laminarin hydrolases of the ascidian hepatopancreas

Step	Specific activity $\mu$ mole glucose/min/mg protein	
Extraction with citrate-phosphate buffer, pH 5.0	0.0065	
Gel filtration on Sephadex G-25 column at pH 6.0	0.0155	
DEAE-Sephadex A-50 chromatography at pH 6.0 with KCl gradient	A	0.0037
	B	0.100
	C	0.152
	D	0.148
Gel filtration on Sephadex G-200 column at pH 6.0	A	0.028
	B	0.175
	C	0.500
	D	1.08

**Fig. 4.** Effect of pH on the activities of laminarin hydrolases from the ascidian at 30°C.**Table 2.** Effect of various reagents on laminarin hydrolases A~D of the ascidian

Reagent*	Relative activity, %			
	A	B	C	D
None	100	100	100	100
NaCl	107	107	141	104
EDTA	104	118	126	153
V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	97	104	97	165
MnSO <sub>4</sub>	164	113	99	110
HgCl <sub>2</sub>	18	12	4	13
CH <sub>2</sub> ICOOH	84	102	113	76
ICH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	55	36	104	19
Glucono-1,4-lactone	73	29	23	104
Glycine	91	105	102	108
Glutamic acid	130	122	95	131

\* 2 mM in final concentration, except NaCl (50 mM).

Table 3. Products of laminarin hydrolysis by the enzymes of the ascidian

Enzyme	Incubation time, hr	Product*		
		Glucose	Biose	Oligosugar
A	6	±		
	12	+		
	24	卅		
B	6	+		
	12	卅		
	24	卅卅	±	
C	6	+		
	12	卅		
	24	卅卅		
D	6	±	±	+
	12	±	±	卅
	24	卅	+	+

\* Detected by paperchromatography using ethyl acetate-pyridine-water, 8 : 2 : 1.

3. 反応生成物 ラミナリンを基質とした各酵素の反応生成物をペーパークロマトグラフィーにより検出して Table 3 のような結果を得た。A, B, C はいずれもグルコースのみを生じ、Dは短時間の反応でトリオースおよびテトラオースと思われるオリゴ糖を生じ、また長時間の反応ではグルコースを生成することが認められた。Aは他の酵素にくらべてグルコース生成能が低いようであった。

4. 温度の影響 15~45°C の範囲における反応速度と温度との関係を、B と D について観察し Fig. 5 に示す結果を得た。活性化エネルギーは B 13.8, D 12.7 kcal/mole であった。

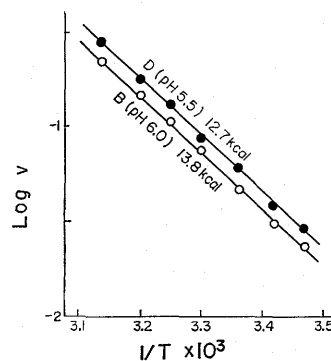


Fig. 5. ARRHENIUS plots for laminarin hydrolysis by the ascidian enzymes B and D.

### 考 察

マボヤの肝臓から分離した4種のラミナリン分解酵素は、次のように分類されよう。

A) DEAE-Sephadex と Sephadex からの溶出曲線が  $\beta$ -グルコシダーゼの溶出曲線と一致し、ラミナリンに対する比活性が他の画分にくらべてかなり低く、長時間の反応でグルコースを生成し、その作用がグルコノ-1,4-ラクトンで阻害される<sup>7)</sup>ことなどから、非特異的な  $\beta$ -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.21) に相当すると考えられる。

B および C) ニトロフェニル- $\beta$ -D-グルコシドを分解せず、反応生成物がグルコースであり、その作用がグルコノ-1,4-ラクトンで著しく阻害される<sup>8)</sup>ことから、exo-1,3- $\beta$ -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.58) と考えられる。なお、Bの反応生成物に微量のビオースが認められるが、ウニ,<sup>4)</sup> ユーグレナ,<sup>9)</sup> *Basidiomycetes*<sup>10)</sup> の exo-型酵素で観察されていることと一致する。一方 C はグルコースのみを生成する強い活性を示す酵素である。

D) 反応生成物にオリゴ糖がみられることと、グルコノ-1,4-ラクトンで全く阻害されない<sup>8)</sup>ことから、endo-型の加水分解をするラミナリナーゼ (EC 3.2.1.6) か endo-1,3- $\beta$ -グルカナーゼ (EC 3.2.1.39) と

思われる。この2つの酵素の違いは、後者が1,3- $\beta$ -結合のみに作用し、前者は1,3- $\beta$ - および1,4- $\beta$ -結合に作用する点<sup>13)</sup>にあるが、本実験では基質特異性について詳細な検討を行なっていないので、いずれとも判定できない。

微生物<sup>12)</sup>をはじめいくつかの生物からラミナリン分解酵素を分離した報告例があるが分離された酵素の数や、それらの構成比は生物の種類により異なる。ユーグレナ<sup>9)</sup>では *exo*-型 2 種、*endo*-型 1 種が認められ、二枚貝<sup>5)</sup>では 2 種の酵素があり *endo*-型が量的に多いことが報告されている。マボヤの場合、分離された酵素は約 23% の *endo*-型、62% の *exo*-型の酵素、15% の  $\beta$ -グルコシダーゼからなっている。この傾向は、海産無脊椎動物など<sup>13)</sup>のラミナリン分解活性が、主に *exo*-型酵素によるもので、 $\beta$ -グルコシダーゼも多少関与しているとする報告に符合するように思われる。

マボヤの酵素 D の至適 pH (5.5) は、二枚貝<sup>5)</sup> (5.8)、*Bacillus*<sup>14)</sup> (5.8)、タバコ<sup>15)</sup> (5.0)、カビ<sup>8)</sup> (6.0) の *endo*-型酵素の至適 pH と大差がない。しかし B と C の至適 pH (6 および 6.5) は、ウニ<sup>4)</sup> (4.8-5.6)、*Basidiomycetes*<sup>10)</sup> (4-6)、ユーグレナ<sup>9)</sup> (4.5-5.5)、カビ<sup>8)</sup> (5.0) の *exo*-型酵素の至適 pH よりやや中性寄りの値を示している。

分子量については、比較する報告例が少ないが、D の分子量 (20,000) は二枚貝<sup>5)</sup>の *endo*-型酵素の分子量 (22,000) とほぼ一致する。しかし、B と C のそれ (120,000 および 370,000) は他の生物の *exo*-型酵素の例 (ウニ<sup>4)</sup> 60,000、酵母<sup>16)</sup> 22,000-40,000、*Basidiomycetes*<sup>10)</sup> 51,000) にくらべてかなり大きなものである。

一般にラミナリン分解酵素はマンガンイオンで賦活される<sup>2)</sup>といわれるが、マボヤの酵素 C は *Basidiomycetes* の *exo*-型酵素の例<sup>10)</sup>と同様に、マンガンイオンで全く賦活されない。

ヨードアセタミドとモノヨード酢酸の阻害効果も酵素によつて異なり、特に C はいずれの化合物でも阻害されないことから *Basidiomycetes* の酵素<sup>10)</sup>と同様、非 SH 酵素と思われる。一方、D と A はこの2つの化合物により強く阻害されるので SH 酵素と考えられる。B もヨードアセタミド阻害を受ける点から、活性に SH が関与している可能性がある。

マボヤの酵素は  $\beta$ -グルコシダーゼを除き 3 種とも EDTA で賦活される。このことはラミナリン分解酵素についての既往の観察例<sup>2,12)</sup>と著しく異なる点である。この効果は恐らく妨害金属の除去によるものと考えられるが詳かでない。 $\beta$ -グルコシダーゼのマンガンによる賦活と EDTA に対する不感受性は、他の3種の酵素と全く対照的である。

マボヤの酵素 C でみられる塩化ナトリウムによる賦活効果は、麦芽のラミナリナーゼでも観察されているが、<sup>2)</sup> この賦活が  $\alpha$ -アミラーゼや  $\beta$ -ガラクトシダーゼ<sup>17)</sup>の場合のように塩素イオンの作用によるものか否かは、さらに検討する必要がある。

酵素 D に対する五酸化バナジウムの賦活効果は極めて特異的であるがその作用機作は明らかでない。ちなみに、バナジウムはホヤ類の被のうのセルロース合成系に関与することが推測され、<sup>18)</sup> またラットでもバナジウムの注射によるグルコース代謝の促進が認められている<sup>19)</sup>が、生理的な作用の機構は知られていない。

C を除く 3 種の酵素に対するグルタミン酸の賦活作用は塩化ナトリウムの作用と全く逆で、何らかのイオンの効果によるものかも知れない。

終りに、研究材料を寄贈された石巻市小野寺芳太郎氏、ならびに実験の一部に協力された東京水産大学土田修氏に感謝の意を表する。

## 文 献

- 1) 永山文男・梅沢一民： 本誌，39，1179-1181 (1973).
- 2) A. T. BULL and C. G. C. CHESTERS: *Advances in Enzymol.*, 28, 325-364 (1966).
- 3) E. PERCIVAL and R. H. McDOWELL: *Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides*, Academic Press, New York, 1967, pp. 65-68.

- 4) A. V. MUCHMORE, D. EPEL, A. M. WEAVER, and R. T. SCHIMKE: *Biochim. Biophys. Acta*, **178**, 551-560 (1969).
- 5) V. V. SOVA, L. A. ELYAKOVA, and V. E. VASKOVSKY: *ibid.*, **212**, 111-115 (1970).
- 6) R. J. BLOCK, E. L. DURRUM, and G. ZWEIG: *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Academic Press, New York, 1955, p. 142.
- 7) R. HEYWORTH and P. G. WALKER: *Biochem. J.*, **83**, 331-335 (1962).
- 8) C. G. C. CHESTERS and A. T. BULL: *ibid.*, **86**, 38-46 (1963).
- 9) D. R. BARRAS and B. A. STONE: *Biochim. Biophys. Acta*, **191**, 342-353 (1969).
- 10) F. I. HUOTARI, T. E. NELSON, F. SMITH, and S. KIRKWOOD: *J. Biol. Chem.*, **243**, 952-956 (1968).
- 11) M. FLORKIN and E. H. STOTZ (Ed.): *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 13, Third Edition (Enzyme Nomenclature), Elsevier Sci. Publ. Co., Amsterdam, 1973, pp. 212, 218.
- 12) C. G. C. CHESTERS and A. T. BULL: *Biochem. J.* **86**, 31-38 (1963).
- 13) C. O. NEILSEN: *Nature*, **199**, 1001 (1963).
- 14) K. HORIKOSHI, H. KOFFLER, and K. ARIMA: *Biochim. Biophys. Acta*, **73**, 268-275 (1963).
- 15) K. KATŌ, A. YAMADA, and M. NOGUCHI: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1269-1275 (1973).
- 16) A. T. H. ABD-EL-AL and H. J. PHAFF: *Biochem. J.*, **109**, 347-360 (1968).
- 17) 永山文男・斉藤佑尚: *本誌*, **35**, 933-939 (1969).
- 18) D. B. CARLISLE: *Proc. Roy. Sci.*, **B 171**, 31-42 (1968).
- 19) M. MEEKS, R. R. LANDOLT, W. V. KESSLER, and G. S. BORN: *J. Pharm. Sci.*, **60**, 482-483 (1971).