

海藻多糖の有効利用と新規 β -1,3-グルカナーゼの探求

秦 正弘*

Marine Brown Algal Polysaccharides and β -glucan Lytic Enzyme, β -1,3-glucanase

Masahiro HATA

Synopsis : Marine brown algal polysaccharides, especially, fucoidans and laminaran have many biological activities (anticoagulant, antithrombotic, antiviral, and antitumoral). These biological activity related to structure, linkage of sugar residues, sulfate content, position of sulfate and molecular size. Shorter bioactive polymer (higher oligomer) could be obtained by enzymatic depolymerization process. Lytic enzyme β -1,3-glucanases hydrolyze laminaran

Key word : marine algal polysaccharide; fucoidan; laminaran; β -1,3-glucanase.

1. はじめに

本プロジェクトでは CO_2 を海洋プランクトンをはじめとする水生植物に吸収させることによって CO_2 削減を図ろうとするものである。沖合いでは植物プランクトン、沿岸海域では海藻の生産量の増大が期待される。植物プランクトンを直接利用することは困難であるが海藻については既に利用していることもあり問題がない。未利用海藻についてはバイオマスとしての利用がまず考えられるが、含有成分の有効利用を図ったうえで残渣についてバイオマスとして利用するのが付加価値の増加の点で有利と思われる。本レビューでは生理活性が期待されている海藻多糖と海洋微生物の β -1,3-グルカナーゼについて概観する。それ故に文献は新しい研究報告を例示するにとどめた。

2. 海藻多糖

海藻には多くの種があるが、量的に多いのは緑藻、褐藻、紅藻である。生産量としては褐藻が最も多く、次いで紅藻である。それぞれに特徴的な多糖が含まれているが、生理活性が研究されている多糖としては褐藻に含まれるフコイダン (フコイジン)、ラミナランが挙げられる。

2.1 フコイダン

普遍的に存在する細胞間粘質多糖である。以前はフコイジンとよばれていた。ラミナランとともに抽出されるが、イオン交換クロマトグラフィーで分離できる。その構造はフコース (Fuc) を主成分とし硫酸基 ($-\text{SO}_3^-$) が結合している、いわゆる硫酸化多糖である^{1,2)}。糖としてはグルクロン酸 (GlcA)、ガラクトース、キシロースが含まれる場合

もある³⁾。ヒバマタの1種 *Fucus vesiculosus*, クロメ *Ecklonia kurome*, カラフトコンブ *Laminaria saccharina* の基本構造から得られるフコイダンは $-\text{[}\rightarrow\text{Fuc4}(\text{OSO}_3^-)\alpha\text{1}\rightarrow\text{]}_n-$ で、これに分枝が存在する。オキナワモズク *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA は $-\text{[}\rightarrow\text{3Fuc4}(\pm\text{OSO}_3^-)\alpha\text{1}\rightarrow\text{]}_5\rightarrow\text{3[GlcA}\alpha\text{1}\rightarrow\text{2]Fuc}\alpha\text{1}\rightarrow\text{]}_n-$ である⁴⁾。分枝構造や硫酸基の数によって種々の分子種が存在する。分子量は幅広く 10–1000 kDa にわたる。

フコイダンの生理活性は幅広く研究が行われている⁵⁾。セレクチンを阻害することによる血管炎症の亢進や血栓の生成の抑制^{6–10)}、抗ガン作用¹¹⁾、転移の抑制¹²⁾、抗ウイルス作用^{13,14)}、抗酸化作用¹⁵⁾、抗HIV作用^{16,17)}、抗胃潰瘍¹⁸⁾、胃におけるヘリコバクターピロリの付着阻害¹⁹⁾などが報告されている。抗凝固作用についてヒバマタ目の一種 *Ascophyllum nodosum* のフコイダンを使用し分子のサイズ、硫酸基との関係をみたところ、分子量 4,000 から 10,000 の範囲では分子量が大きいほど、硫酸基の位置は 0–2 はすべて、0–3 はところどころが必要であったが、0–4 は不必要であった²⁰⁾。フコイダンの生理作用はいつもヘパリンやデキストラン硫酸と比較されてきた。健康食品への利用もなされている²¹⁾。

2.2 ラミナラン

ラミナランは褐藻の貯蔵多糖である。冷水に対する溶解性より可溶性ラミナラン、不溶性ラミナランに分けられる。構造は β -1,3-グルカンを基本とし、 β -1,6-の分枝構造が存在している。また β -1,3-結合と β -1,6-結合が直鎖を作っているとの報告もある²²⁾。マンニトールが少量含まれ、それらは、ラミナラン分子の還元末端に結合している。不溶性ラミナランで約 50%、可溶性ラミナランで 70% の還元末

端がマンニトールと結合している。溶解性はマンニトールの数ではなく、分枝の程度により、分枝数が多いほど溶解性が高い。平均重合度は20-30とされている。コンブの1種 *Laminaria digitata* では重合度33, 分岐度0.07で分枝のグルコースは1以上とされている²³⁾。ラミナランの含有量は種により、また季節により異なる。コンブの1種 *Laminaria longicruris* では秋に最も含有量が多くなりその前後夏、冬は少ない。また古い葉体は若い葉体よりも多く、浅所のものは深所よりも多い。マンニトールも同じ変動をするが深度による変化は少ない²⁴⁾。マンニトールがラミナランの前駆体であることは確かめられており、両者が同じ変動を示すのも当然と思われる。成長期には、ラミナランの蓄積はなく窒素代謝が活発である²⁵⁾。これらのことは収穫時期や葉体の成熟度に注意を払う必要があることを示している。

ラミナランなどの種別の含量については古いデータがあるのみであるので、現在分析方法の工夫を含め調査中である。現在までのデータの一部を Table 1 に示した。

ラミナランの生理作用としては免疫賦活による抗腫瘍作

用がある²⁶⁾。β-グルカンによるこの活性は高次構造が関係し、三重螺旋構造が重要とされていたが特別に関係はなさそうである。むしろ分枝構造が重要とされている。抗腫瘍活性は *in vitro* で強く、*in vivo* では弱い傾向があり、経口投与ではこの点に考慮が必要である。ヒトマクロファージにはβ-グルカンの受容体があり、その結合サイズは最小7糖であり、7量体とラミナランはアンタゴニストの関係にある²⁷⁾。

β-1,3-グルカンは微生物の細胞壁の構成成分であるので、カビなどにより病気が引き起こされた際にはβ-グルカンがアレルギーの原因物質となりうる。また血中β-グルカンを測り病気の感染の有無や程度を知ることでもできる。†

3. β-1,3-グルカナーゼ

前述したようにβ-1,3-グルカンには免疫賦活作用があり、それらは抗腫瘍活性に関係づけられて現在大変注目されている物質である。

マクロファージのβ-グルカン受容体の結合サイズは最小7量体であり、また一重螺旋構造で活性が発現するとなれば、分子サイズが小さい程投与時の吸収や分散が良い点で有利となる。抽出した多糖のサイズを分解により小さくすれば結果的に活性分子数を増やすことになり有効利用の点からも望ましい。糖鎖の切断は化学的には酸加水分解が行われるが、分解はアトランダムで、また官能基の離脱や変化があり、望むオリゴ糖を効率よく得るのは困難である。そこで酵素を利用することが考えられる。グルカナーゼは植物をはじめ微生物に多く分布することが知られている。酵素源としては多量に得ることを考えると微生物になる。カビがよく研究されており多くの報告がある²⁹⁾。我々の研

Table 1. Contents of laminaran in some marine brown algae³⁰⁾.

Species	contents(% dry matter)
<i>Laminaria japonica</i> (makonbu)	1~6
<i>Laminaria religiosa</i> (hosome)	1
<i>Undaria pinnatifida</i> (wakame)	1
<i>Eklonia cave</i> (kajime)	2~9
<i>Eisenia bicyclis</i> (arame)	8~15
<i>Ishige okamurayae</i> (ishige)	4~7
<i>Hizikia fusiformis</i> (hijiki)	1
<i>Sargassum fulvellum</i> (hondawara)	1
<i>Sargassum ringgoldianum</i> (oobamoku)	1
<i>Sargassum tortile</i> (yoremoku)	2~3
<i>Sargassum micracanthum</i> (togemoku)	1
<i>Sargassum thunbergii</i> (umitoranoo)	1
<i>Colpomenia sinuosa</i> (fukuronori)	1

Table 2. Properties of β-1,3-glucanases from some marine fungi and marine bacteria.

species	optimum temp.°C	pH optimum	stability	substrate specificity	Km	inhibitor	MW
<i>Rhinotrichell spp.</i>							
D-1 Fr.1	50	5	50°C60min	β-1,3-	0.86	Hg,Cu,Zn,Mn	35K ※1,2)
Fr.2	50	5	50°C120min	β-1,3-	4.4	Hg,Cu,Zn,Mn	50K
D-2 Fr.1	55	5	50°C120min	β-1,3-	0.63	Hg,Cu,Pb,Mn	
Fr.2	55	6	50°C60min	β-1,3-	4	Fe2,Fe3 Hg,Cu,Mn	
<i>Flabobacterium or Cytophaga</i>							
K	45	6	50°C15min	β-1,3- β-1,6-	2.87	Hg,Cu,Pb	※3,4
<i>Alteromonas</i>							
L	40	6	50°C75min	β-1,3-	10	Cu,Pb,Hg	

※M.Hata, H.Kageyama, S.Koike, T.Suzuki and M.Takeuchi:Annual meeting of marine biotechnology,1995,p.6.

※Y.Narasaka, K.Wada, T.Suzuki, M.Hata and M.Takeuchi:Annual meeting of marine biotechnology,1996,p.308D

※S.Shibata and M.Hata :Annual meeting of Jap.Soc.Sci.Fish.,1997,No1312.

※N.Saito and M.Hata:Annual meeting of Jap.Soc.Sci.Fish.,1999,No817.

† β-1,3-グルカンは珪藻やユーグレナにも貯蔵多糖として存在し、それらはクリソラミナラン、パラミロンと称されている。また陸上植物や微生物にも存在している。

硫酸基を有する紅藻多糖についても活性を有することが知られている。硫酸基の導入による活性の発現の試みもなされている。

海老名²⁸⁾はカワラタケ蛋白結合β-グルカン(PSK)の癌局所投与が有効であること、純化したβ-グルカンは効果が低下することを述べている。

蛋白や粗抽出物にはアヂェバンド効果があることを示しており興味深い。

研究室では海洋微生物にこだわり、酵素源を探索してきた。まずカビについて海藻より採集し、分離培養したが特別に有利な性質の酵素は見出されなかった。むしろ培養に多くの手間がかかる欠点が認められた。

次いで海泥より集積培養により酵素産生能の高い細菌2株を得た。これらのK, L株はその性質より *Flabobacterium* 属あるいは *Cytophaga* 属および *Alteromonas* 属とされたが種の判定までにはいたらなかった。これらの株の産生するグルカナナーゼは β -1,3-グルカンのみを分解した。エンド型活性を示し生成オリゴ糖は4糖以下であった。その他の酵素化学的性質も特別異なることもなかった (Table 2)。既報告と異なる点は膜結合酵素であり、培養液に酵素を放出しないことである。これまでの報告では膜結合酵素のみの例はなく遊離型がむしろ多い。そこであらたに海泥を採集し β -1,3-グルカナナーゼ産生菌を分離した。酵素の分解活性の型については現在分析中であるが、興味深い結果が得られている。それは分離された菌のおおよそ50%が β -1,3-グルカンを分解する能力を有しており、また酵素はすべて膜結合型であることである³¹⁾。無限の空間に生息する海洋細菌は分解生成物を直ちにとりこむ必要があり、そのためには菌体と β -1,3-グルカンが接触することが必要であるためであろう。

オリゴ糖の合成として合成酵素や分解酵素の逆反応を利用することも可能である。膜結合酵素を固定酵素として利用することもおもしろいであろう。

文 献

- 1) 前田昌徹, 西沢一敏: 総合多糖類科学, 下, 原田篤也, 三崎旭編, 講談社サイエンティフィック, 東京, (1974), 289.
- 2) O.C.Alexander, A.Dell, H.R.Morris, S.M.Haslam, R.A.McDowell, A.S.Shashkov, N.E.Nifantëv, E.E.Khatuntseva and A.I.Usov: *Carbohydr. Res.*, **320** (1999), 108.
- 3) M.E.Duarte, M.A.Cardoso, M.D.Nosedá and A.S.Cerezo: *Carbohydr. Res.*, **334** (2001), 281.
- 4) M.Nagaoka, H.Shibata, I.Kimura-Takagi, S.Hashimoto, K.Kimura, T.Makino, R.Aiyama, S.Ueyama and T.Yokokura: *Glycoconj. J.*, **16** (1999), 19.
- 5) H.Tani and H.Ohishi: *New Food Industry*, **43** (2001), 6.
- 6) K.Bojakowski, P.Abramczk, M.Bojakowska, A.zwolinska, J.Przybylski and Z.Gaciong: *J. Physiol.*, **52** (2001), 137.
- 7) F.Trento, F.Cattano, R.Pescador, R.Porta and L.Ferro: *Thromb., Res.*, **102** (2001), 457.
- 8) B.C.Brenner, S.Kadel, S.Grigorovich and O.Linderkamp: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **291** (2002), 237.
- 9) D.Klintman, R.Schramm, M.D.Menger and H.Thorlacius: *J. Hepatol.*, **36** (2002), 53.
- 10) A.J.Levine, K.Parkes, S.J.Rooney and R.S.Bonser: *Ann. Thorac. Surg.*, **73** (2002), 1101.
- 11) G.Zugmaier, R.Favoni, R.Jaeger, N.Rosen and C.Knabbe: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **886** (1999), 243.
- 12) H.Itoh, H.Noda, H.Amano and H.Itoh: *Anticancer Res.*, **15** (1995), 1937.
- 13) S.C.Feldman, S.Reynaldi, C.A.Stortz, A.S.Cerezo and E.B.Damont: *Phytomedicine*, **6** (1999), 335.
- 14) S.Preepreme, K.Hayashi, J.B.Lee, U.Sankawa and T.Hayashi: *Chem. Pharm. Bull.*, **49** (2001), 484.
- 15) P.Ruperez, O.Ahrazem and J.A.Leal: *J. Agric. Food Chem.*, **50** (2002), 840.
- 16) D.J.Schaeffer and V.S.Krylov: *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **45** (2000), 208.
- 17) H.X.Wang and T.B.Ng: *Planta Medica*, **67** (2001), 669.
- 18) H.Shibata, I.Kimura-Takagi, M.Nagaoka, S.Hashimoto, R.Aiyama, M.Iha, S.Ueyama and T.Yokokura: *Biofactors*, **11** (2000), 235.
- 19) H.Shibata, I.Kimura-Takagi, M.Nagaoka, S.Hashimoto, H.Sawada, S.Ueyama and T.Yokokura: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **45** (1999), 325.
- 20) L.Chevolet, A.Foucault, F.Chaubet, N.Kervarec, C.Sinquin, A.M.Fisher and C.Boisson-Vidal: *Carbohydr. Res.*, **319** (1999), 154.
- 21) T.Sakai and I.Kato: *New Food Industry*, **43** (2001), 8.
- 22) M.Maeda and K.Nishizawa: *J. Biochem.*, **63** (1968), 199.
- 23) Y.-T.Kim, E.-H.Kim, C.Cheong, D.L.Williams, C.-H.Kim and S.-T.Lim: *Carbohydr. Res.*, **328** (2000), 331.
- 24) A.R.O.Chapman and J.S.Craigie: *Mar. Biol.*, **46** (1978), 209.
- 25) A.R.O.Chapman and J.S.Craigie: *Mar. Biol.*, **40** (1977), 197.
- 26) N.Ohno: *Nihon Saikin Gakkai-shi*, **55** (2000), 527.
- 27) E.Lowe, P.Rice, T.Ha, C.Li, L.Kelly, H.Ensley, J.Lopez-Perez, J.Kalbfleisch, D.Lowman, P.Margl, W.Browder and D.Williams: *Microbes Infect.*, **3** (2001), 789.
- 28) T.Ebina: *Gan to Kagaku-Ryohou*, **28** (2001), 1515.
- 29) S.M.Pitson, R.J.Sevior and B.M.McDougall: *Enzyme Microb. Technol.*, **15** (1993) 178.
- 30) 高橋武雄: 海藻工業 (増訂), 産業図書, 東京, (1951), 102.
- 31) 日下美穂, 秦 正弘: マリンバイオテクノロジー学会講演要旨, (2002), 1.