

新規酵素 Fucoidanase の発見とその利用による F-Fucoidan の構造決定

褐藻類はそれぞれ、硫酸化フコースを含む数種類の多糖を持つ。例えば、昆布科の海藻の数種は、少なくとも 2 種類の硫酸化フコース含有多糖を持つ。我々はウロン酸を含むものを U-Fucoidan、ウロン酸を含まずほとんどが硫酸化フコースからなるものを F-Fucoidan と命名し、U-Fucoidan については、その分解酵素(endo-fucoidan-lyase)を用いて酵素消化を行い、その反応生成物の構造から、全体構造をほぼ決定した¹⁾。一方、F-Fucoidan は多くの褐藻類において、硫酸化フコース含有多糖の主成分であるが、これまで平均的構造が報告されていたにすぎない。今回、新規な Fucoidanase を利用して F-Fucoidan の構造を決定したので報告する。

なお、F-Fucoidan は昆布科の中でもその含量が多いガゴメ昆布(*Kjellmaniella crassifolia*)由来のものを用いた。また、fucoidanase は海洋から単離した *Alteromonas* 属細菌の菌体外酵素を使用した。

まず、風乾したガゴメ昆布の粉碎物を 80%エタノールにより洗浄後、fucoidanase を含む緩衝液に懸濁して F-Fucoidan の抽出と酵素消化を同時に行った。酵素消化後、排除分子量 3,000 のホロファイバーを用いて限外ろ過し、ろ液(低分子化画分)を集め、脱塩後、陰イオン交換樹脂により分画した。吸着画分を、セルロースアセテート膜電気泳動で分析すると 2 種の主要成分(Fr. I and Fr. II)からなることが判明したので、それぞれを疎水カラムクロマト、ゲルろ過等により精製し、糖組成、MS、NMR 分析等に供した。その結果、Fr. I は硫酸化フコースのみからなる 7 糖で、Fr. II は 21 糖であることが判明した。確認のため、Fr. II を再度 fucoidanase で処理したところ Fr. I と同じオリゴ糖が検出され、Fr. II は反応中間体として存在することが判明した。Fr. I と Fr. II の NMR 分析結果を比較することによって Fr. I が図 1 に示すような α 1-3 結合により互いに結合して Fr. II を形成することも判明した。すなわち、F-Fucoidan は図 1 に示す構造を持つこと、本 Fucoidanase は、F-Fucoidan を 7 糖単位で切断する F-Fucoidan endo-1,3- α -fucosidase であることも判明した。

図 1 の構造は全く新規なものであるが、本酵素が昆布科の数種の海藻の F-Fucoidan を低分子化することから、ガゴメ昆布 F-Fucoidan のみではなく昆布科海藻 F-Fucoidan の普遍的構造と考えられる。すなわち、昆布科海藻の F-Fucoidan は 2 位に分岐のある 1-3 fucan が多いこと及び高度に硫酸化された構造を持つこと(Fucose の水酸基 14 個あたり 12 個が硫酸化)が判明した。

本酵素は F-Fucoidan の構造決定や、構造の均一な、F-Fucoidan オリゴ糖の調製に非常に有用である。

なお、本 fucoidanase は既に活性型として大腸菌による大量発現が可能な状態である今後、

本酵素を用いた F-Fuoidan オリゴ糖の大量生産も可能となった。

(1) T.Sakai *et al.* Abs. XVIIIth Jap. Carbohydr.Symp., p159 (1996)