

海洋試料の アルギン酸分析に向けて



大木 淳之, 藤田 雅紀

1 はじめに

近年, 大気中二酸化炭素を減らす観点から, 大型藻類による炭素隔離効果が注目されている¹⁾. その理由の一つとして, 大型藻類の一種である褐藻類は炭素リッチな粘性多糖 (アルギン酸など) を豊富に含む点がある. アルギン酸は褐藻類の乾燥重量の 30 % を占め, その比重は海水よりも大きいので海水中で沈降し得ると考えられる. 深海の海底面から, アルギン酸を特異的に分解する微生物由来の酵素が見つかったことから²⁾, 褐藻類由来のアルギン酸が深海まで運ばれていることが示唆される. しかし, 海洋試料からアルギン酸を定量した研究事例は, 筆者らが調べた範囲では無い. アルギン酸の深海隔離の効果を明らかにするため, 海洋試料中のアルギン酸を定量分析する手法開発が求められる.

2 アルギン酸の構造

アルギン酸はウロン酸であるグルロン酸とマンヌロン酸 (図 1 (a)) が直鎖状に高分子化した化合物である.

大型藻類の褐藻類がアルギン酸の主要な生産者である. 天然には立体異性体のウロン酸が 4 種存在し, もう 2 種のウロン酸がグルクロン酸とガラクトン酸であり, 多くの植物や微生物が生産する. アルギン酸のカルボキシル基に陽イオンが結合すると粘性やゲル化の特性が現れる. 二価陽イオンが結合すると, 高分子鎖が互いに重なるように重合する. 図 1 (b) に示したのがアルギン酸カルシウムであり, 強固なゲルを形成する. ナトリウムイオンと結合すると水溶性で粘性を有するアルギン酸ナトリウムになる. また, アルギン酸はグルロン酸を多く含むほど強固なゲルになることが知られている.

3 アルギン酸の抽出と精製

アルギン酸の原料である褐藻類からアルギン酸 (塩) を抽出・精製する際には, アルギン酸が持つカルボキシル基に対するイオン交換反応を組み合わせ, アルギン酸 (塩) の溶解と凝固を繰り返して純度を高める. まず, 原料となる試料に対して, 高 pH 下で一価のナトリウム又はアンモニウムイオンを与え, 水溶性のアルギン酸ナトリウム又はアルギン酸アンモニウムとして抽出する. その後, 二価陽イオン塩 (銅やカルシウムなど) としてゲル化させる, あるいはエタノールやプロパノールなどのアルコールを等量以上加えてアルギン酸塩を析出させる. また, およそ pH 3 以下では, アルギン酸のカルボ

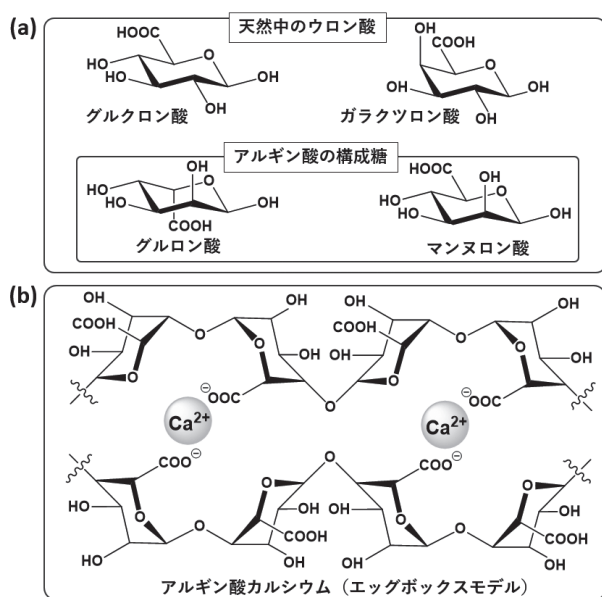


図 1 ウロン酸 (a) とアルギン酸カルシウム (b) の構造

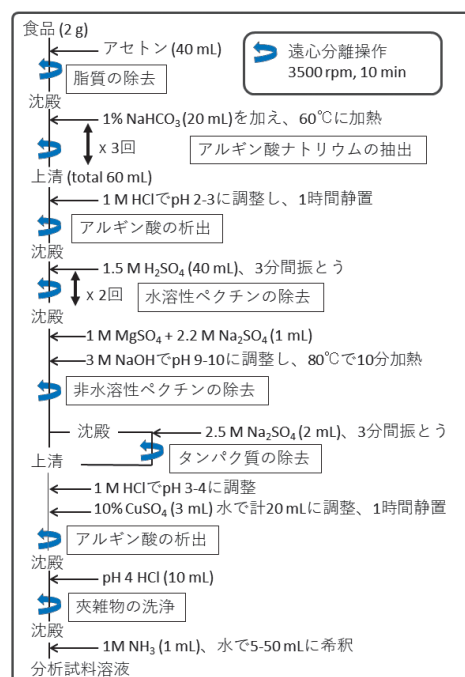


図 2 食品からアルギン酸抽出の公定法

キシル基に水素が結合してアルギン酸の結晶ができの、低 pH 下でアルギン酸を不溶化し析出させることもある。このように、アルカリ性下での溶解と、沈殿形成を繰り返して不純物を除去していく。図 2 に食品からアルギン酸を抽出・精製する公定法を示した³⁾。

公定法では、凝集や再溶解を経てペクチンやタンパク質を除いている。酵素を使ってペクチンやタンパク質を分解・除去する方法もある⁴⁾。公定法では、硫酸銅溶液を添加してアルギン酸銅としてゲル化させ、アンモニア水で再溶解させる。また、タンパク質などの夾雑物を酵素分解して除去した後に、塩化マグネシウム溶液と 4 倍量のエタノールで沈殿させることで、アルギン酸を選択的に抽出・精製する方法も提案されている⁴⁾。

4 アルギン酸の比色定量

従来研究により、アルギン酸を含む多糖の比色分析法が検討されてきた。例えば、ウロン酸総量を測定する、カルバゾール試薬を用いたカルバゾール硫酸法⁴⁾やナフトレゾルシノール法³⁾が知られている。これらの方法は汎用的な分光分析器で測定が可能であり、簡便かつハイスループットな測定ができる。ただし、比較的少量の試料が必要であり、また精製が十分でない場合、アルギン酸以外の多糖類やウロン酸も呈色してしまう問題が残されている。

5 HPLC を用いたアルギン酸の定量

液体クロマトグラフィー (HPLC) でアルギン酸を定量することも検討されている。HPLC 分析にあたり、事前にアルギン酸をオリゴマーまで分解する必要があり、酸加水分解する方法とアルギン酸分解酵素を用いる方法が報告されている⁵⁾。酸加水分解法ではアルギン酸以外の多糖類も分解されるため、アルギン酸だけを定量するには不都合である。一方、アルギン酸分解酵素を用いれば、他の多糖類が混在していてもアルギン酸のみを特異的に分解し定量可能である。アルギン酸分解酵素は海

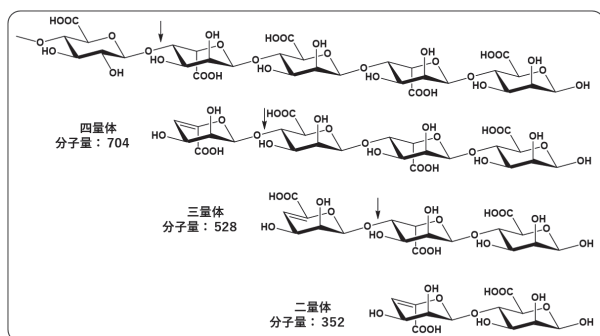


図 3 アルギン酸リアーゼにより分解される位置 (矢印) と生成するオリゴマーの構造及び分子量

洋の細菌および真核生物から見いだされており、海洋環境におけるアルギン酸分解に主要な役割を果たしていると考えられる。細菌 *Flavobacterium* sp. UMI-01 株からクローニングされた FlAlaA は、これまでに知られるアルギン酸分解酵素の中で最も高い活性を示し²⁾、アルギン酸をオリゴ糖 (図 3) へと分解するリアーゼ活性を有する。このようなアルギン酸分解微生物は、アルギン酸を主要な炭素源として利用していると考えられる。

アルギン酸から生じたオリゴマーを逆相あるいはイオン交換体を担体として分析する事例が生化学および食品化学分野で数例報告されている⁵⁾。検出にタンデム質量分析計 (MS/MS) を用いた Multiple Reaction Monitoring 測定を行うことで、血漿試料などの微量かつ夾雑物が多いサンプルにおいても、高感度かつ高い選択性をもって分解物の検出が可能である⁵⁾ (図 3)。MS/MS 分析ではいずれのオリゴマーからも末端の糖に由来する共通の m/z 141 のプロダクトイオンが観測されるため、そのピークの保持時間と面積で特異的な定量が可能である。高い基質選択性を持つアルギン酸分解酵素と MS/MS 分析の併用で、複雑な混合物である海洋試料中の微量なアルギン酸を定量分析する手法を確立することが期待される。

文 献

- 1) T. Kuwae, M. Hori : "Blue Carbon in Shallow Coastal Ecosystems", p101 (2019), (Springer Nature Singapore).
- 2) A. Inoue, M. Anraku, S. Nakagawa, T. Ojima : *J. Biol. Chem.*, **291**, 15551 (2016).
- 3) 厚生労働省生活衛生局食品化学課 : 第 2 版食品中の食品添加物分析法, (平成 12 年, 衛化第 15 号).
- 4) 宇田川知子, 小関由紀子, 小泉慶子, 五十嵐友二, 淵上賢一 : 日本食品化学会誌, **60**, 654 (2013).
- 5) T. Shibata, R. Fujii, H. Miyake, R. Tanaka, T. Mori, M. Takahashi, T. Takagi, H. Yoshikawa, K. Kuroda, M. Ueda : *Nat. Prod. Comm.*, **2017**, 12, 941.



大木 淳之 (OOKI Atsushi)

北海道大学大学院水産科学研究院 (〒041-8611 北海道函館市港町 3-1-1)。東京大学理学系研究科地球惑星科学専攻博士課程修了。博士 (理学)。《現在の研究テーマ》大型藻類ブルーカーボン、海洋のヨウ素循環。《趣味》家庭菜園。
E-mail : ooki@fish.hokudai.ac.jp



藤田 雅紀 (FUJITA Masaki)

北海道大学大学院水産科学研究院。東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物科学専攻博士課程修了。博士 (農学)。《現在の研究テーマ》海洋天然物化学、微生物の化学生態学。《趣味》焚火。
E-mail : masakifujita@fish.hokudai.ac.jp