

博士論文

細胞壁酸性多糖の蓄積に関連したマコンブ突然変異株の単離と解析
Isolation and characterization of *Saccharina japonica* mutants
related to acidic polysaccharide accumulation in the cell

横浜国立大学大学院環境情報学府

環境生命学専攻

指導教員: 中村 達夫

授与年月日: 2016年3月24日

山崎 芳枝

Yoshie Yamazaki

目次

緒言	3
第一章 細胞壁酸性多糖の蓄積に関連した突然変異株の単離	11
1.1 序論	12
1.2 材料と方法	13
1.3 結果と考察	18
1.4 図	22
第二章 酸性多糖の定量法の検討	31
2.1 序論	32
2.2 材料と方法	33
2.3 結果と考察	38
2.4 表, 図	44
第三章 細胞壁酸性多糖に関する突然変異株の解析	59
3.1 序論	60
3.2 材料と方法	61
3.3 結果と考察	63
3.4 図	65
総括	70
謝辞	71
引用文献	72

緒言

コンブやワカメに代表される褐藻類の細胞壁には、陸上植物には存在しないアルギン酸、フコイダン等の細胞壁酸性多糖が含まれている (図 1)。アルギン酸はカルボキシル基を有するウロン酸が結合した多糖である (図 2)。褐藻類より抽出されるアルギン酸の年間生産量は約 30,000 トン (Pawar and Edgar, 2012) で、食品、工業、医療などの分野で広く利用されている。アルギン酸は溶液中で粘性を示し、またゲル化する性質を持つことから、食品分野では増粘剤、ゲル化剤、安定剤等の食品添加物として用いられている (Fenoradosoa et al., 2010)。また、アルギン酸のカルシウム塩やナトリウム塩は、傷口の浸出液を吸収してゲル化することで湿潤環境を保つ効果があり、強い止血作用も示すことから、医療分野では創傷被覆材として治療目的で用いられている (Boateng et al., 2008)。

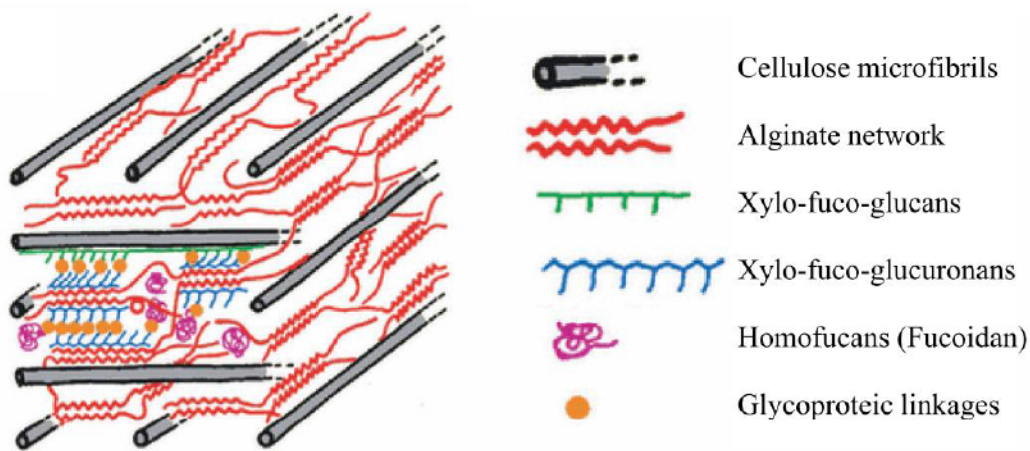
フコイダンは硫酸化フコースを主骨格とする多糖である (図 3)。フコイダンには抗凝血 (Wijesinghe et al., 2011)、凝血促進 (Zhang et al., 2015)、免疫調節 (Jintang et al., 2009)、抗炎症 (Cumashi et al., 2007)、抗ウイルス (Ghosh et al., 2009) 等の様々な生理活性があることがわかっている。フコイダンは現在、健康食品として知られており各メーカーより販売されている。フコイダンの持つ生理活性を活用して、食品、健康、化粧品、医療等様々な分野への応用に向けて研究が進められている (Wijesinghe and Jeon, 2012)。

アルギン酸やフコイダンについての産業や医療方面の研究が多く報告されている一方で、褐藻類における細胞壁酸性多糖の生合成機構や生理的役割は十分に理解されていない。遺伝子レベルの知見としては、褐藻 (*Laminaria digitata*) のアルギン酸生合成に関わる mannuronan C-5-epimerase 遺伝子の機能解析についての報告 (Nyvall et al., 2003) や、褐藻のモデル生物であるシオミドロ (*Ectocarpus siliculosus*) において決定されたゲノム配列情報にもとづいた、細胞壁多糖に関連する遺伝子群の分子系統学的な考察がある (Michel et al., 2010)。アルギン酸の生理的役割については、褐藻類の環境によって葉体の弾力性を変化させることに関与していると考察している報告がある (Fenoradosoa et al., 2010)。フコイダンの生合成に関与する遺伝子の同定や、生理学的役割を解明した報告はまだない。

アルギン酸やフコイダンなどの細胞壁酸性多糖の生合成機構や生理学的役割に関する知見を得るためには、細胞壁酸性多糖の蓄積に関連した突然変異株を単離し解析する方法が有効であると考えられる。シオミドロについては突然変異株の単離法がすでに確立されている (Le Bail and Charrier, 2013)。シオミドロの形態形成に関する突然変異株 (Bail et al., 2011) や、シオミドロの配偶体から孢子体への生活環に異常がみられる突然変異株 (Coelho et al., 2011) が得られており、遺伝子発現解析などが行われている。しかし、これまでに褐藻類の細胞壁酸性多糖に関する突然変異株を単離した報告はまだない。そこで本研究ではマコンブ (*Saccharina japonica*) をモデルとし、細胞壁酸性多糖に関する生合成機構や生理的役割の解明に役立つ突然変異株を作製し、解析することを目的とした。マコンブは

大きさが数 m にまで成長する孢子体世代（複相世代, $2n$ ）と配偶体世代（単相世代, n ）よりなる異形生活環をもつ（図 4）. 本研究では実験材料として配偶体を用いた（図 5）. 配偶体を用いる利点には, 1) 継代培養が可能, 2) 小型培養容器などの中で無菌培養が可能, 3) 単相世代であるため劣性変異を当代で検出することが可能, 4) 単為発生の誘導が可能, などが挙げられる.

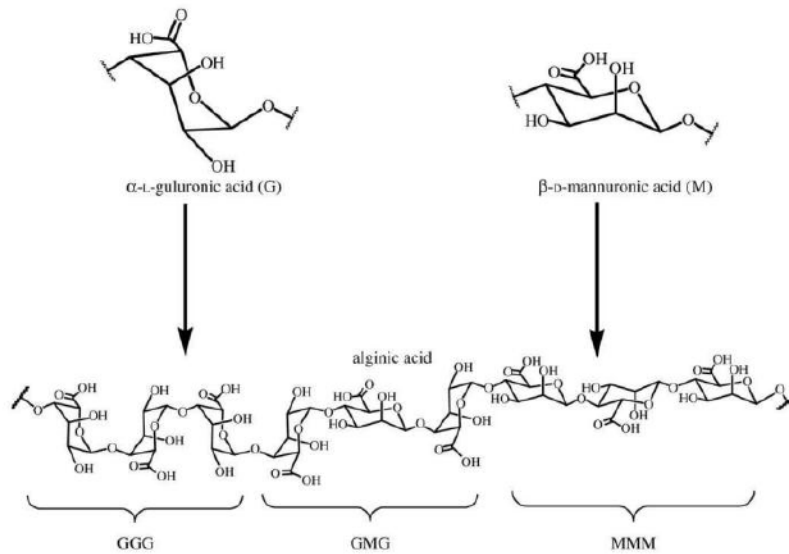
本論文の第一章では, 細胞壁酸性多糖の蓄積に関連したマコンブ突然変異株の単離法の確立と突然変異株の単離について述べる. 細胞壁酸性多糖に関する突然変異株を解析するためには, マコンブ細胞よりアルギン酸やフコイタンを抽出して定量を行うことが必要となる. そのため第二章では, 酸性多糖の抽出と定量のための条件検討について述べる. 第三章では, 突然変異株のアルギン酸とフコイタンに着目した表現型解析について述べる.



(Michel et al., 2010) による図を一部改変

図1 褐藻類の主要な細胞壁多糖類の構造

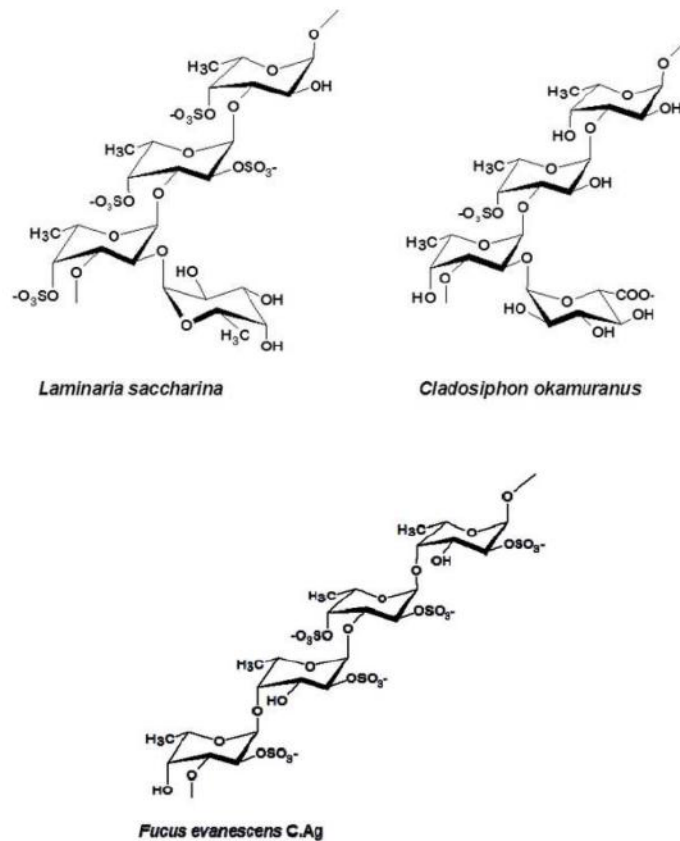
褐藻類の細胞壁は乾燥重量で、アルギン酸約 15~30%、フコイダン約 1.5~15%、セルロース約 1~8%を含んでいる。アルギン酸は細胞壁間隙に広がって存在する。コンブ科の *Saccharina japonica* (*Laminaria japonica*) のフコイダンは表層から 50~150 μm に存在することが蛍光免疫染色により観察されている (Mizuno et al., 2009)。



(Rowbotham et al., 2013) による図を一部改変

図2 アルギン酸の構造

アルギン酸は α -L-guluronic acid (G) と β -D-mannuronic acid (M) が結合した多糖である。G と M の分布量 (M/G 比) とこれらの配列には、褐藻類の中で多様性があることが知られている。また、M/G 比により物理化学的性質に違いがみられる。M/G 比の高いアルギン酸は弾力のあるゲルを形成する。一方、M/G 比の低いアルギン酸は弾力性のないゲルを形成する (Fenoradosoa et al., 2010)。GGG: G ブロック; GMG: ランダムブロック; MMM: M ブロック。



(Ale et al., 2011) より

図 3 カラフトコンブ (*Laminaria saccharina*), オキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus*), ヒバマタ (*Fucus evanescens* C.Ag) のフコイダンの構造
 フコイダンの主骨格は硫酸化フコースを多量に含む。褐藻類のなかで糖鎖の構造や硫酸基の含量に多様性がみられる。

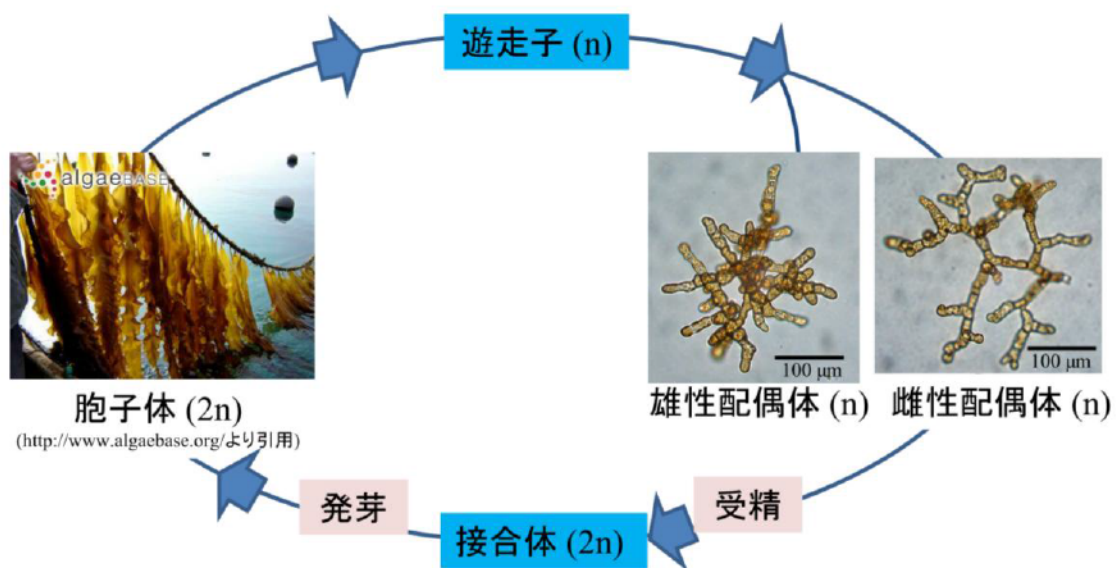


図4 マコンブの生活環

マコンブは孢子体（複相世代， $2n$ ）と配偶体（単相世代， n ）の異形生活環をもつ。成熟したマコンブ孢子体（ $2n$ ）の遊走子囊より遊走子（ n ）が海中に放出される。遊走子は岩場に付着して発芽し，配偶体（ n ）になる。雄性配偶体が生産する精子と雌性配偶体が生産する卵が受精して受精卵（ $2n$ ）となり発芽，孢子体に成長する。

A



雄性配偶体

雌性配偶体

B

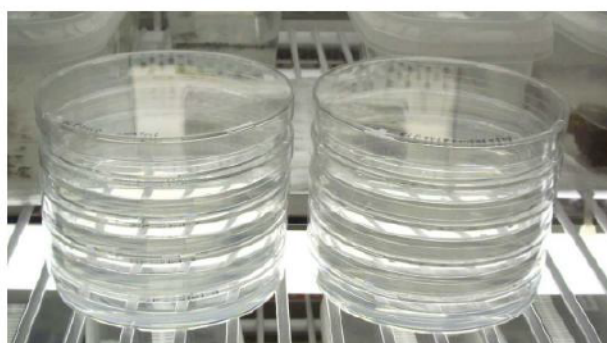


図5 マコンブ配偶体の培養の様子

(A) 小型培養容器中での無菌培養. (B) シャーレ中での培養.

第一章

細胞壁酸性多糖の蓄積に関連した突然変異株の単離

1.1 序論

褐藻類の突然変異株を作製するには、紫外線 (UV) 照射による変異原処理法が効果的である (Godfroy et al., 2015). 褐藻類のモデル生物であるシオミドロ (*Ectocarpus siliculosus*) については突然変異株の単離法がすでに確立されており (Le Bail and Charrier, 2013), 突然変異株作製にはシオミドロの配偶子嚢から放出された配偶子の細胞に UV 照射による変異原処理が用いられている. 変異原処理後の配偶子は, 単為胞子体になるまで培養され, 顕微鏡観察により形態形成に関する突然変異株 (Bail et al., 2011) や, 配偶体から胞子体への生活環に異常がみられる突然変異株 (Coelho et al., 2011) が報告されている. これらの突然変異株については, DNA マイクロアレイやリアルタイム PCR 等の手法を用いて遺伝子発現解析が行われている. しかし, 褐藻類の細胞壁酸性多糖に関する突然変異株を単離して解析したという報告はまだ見当たらない.

当研究室では, マコンブ (*Saccharina japonica*) 配偶体の無菌クローン株を用いた変異原処理法をすでに確立している. 細切後, フィルターを通して均一な大きさにした配偶体細胞に UV 照射を行う変異原処理法である. そこで, 本研究では変異原処理を行ったマコンブ配偶体細胞のなかから, 酸性多糖に関する突然変異株のスクリーニングによる単離を試みた.

変異原処理した多数の細胞より酸性多糖を蓄積した突然変異株を見出すには, 染色による方法が適当であると考えられる. そこで, いくつかのカチオン性色素について有効性を検討することにより, 配偶体細胞塊に含まれる酸性多糖を簡便に染色し評価する方法を確立した. また, この確立した方法を用いて, UV照射による変異原処理を行った配偶体細胞のなかから, 酸性多糖を多く蓄積するマコンブの突然変異株の単離を行った.

1.2 材料と方法

1.2.1 実験材料

マコンブ (*Saccharina japonica*) の雌雄配偶体は青森県大間産の孢子体より単離された無菌株を用いた。無菌的に通気ができるように作製されたポリプロピレン性の培養容器中に人工海水 ASP₁₂ (NTA) 培地 (ASP) を約 200 ml を注ぎ、この中にカミソリで細切した無菌株を入れた。この容器を 18°C、短日条件 (明 10 時間, 暗 12 時間)、光の強さ 30~40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に設定した人工気象器内に置いて培養を行った。容器内の ASP 培地は 1~2 カ月ごとに交換した。

1.2.2 UV 照射による変異原処理

配偶体の細胞塊 (細胞塊と略す) 湿重量約 0.1 g をガラスシャーレに採り、カミソリで細切し、ASP 2 ml を加え細切した配偶体細胞を懸濁させた。この懸濁液を 30 μm のナイロンフィルターに通した。このナイロンフィルターを通した懸濁液 120 μl をあらかじめ ASP 20 ml を注いだポリスチレン製シャーレに滴下した。このシャーレを UV ランプの下に置いて配偶体細胞に UV 照射処理を行った。これらの操作はすべてクリーンベンチ内で行った。

1.2.3 トルイジンブルーO (TBO) -ASP 溶液の調製

トルイジンブルーO (TBO, WALDECK GmbH) 10 mg を ASP 10 ml に溶解した後、滅菌フィルター Minisart® (sartorius stedim) を用いてろ過し、1 mg/ml TBO-ASP 溶液を調製した。この溶液を適宜、ASP で希釈して実験に用いた。調製した溶液は遮光して 4°C で保存した。

1.2.4 TBO 染色した細胞塊の目視による観察

「1.2.2 UV 照射による変異原処理」の方法に従って配偶体細胞を処理し、約 1 カ月培養した。シャーレ内の ASP 培地を除き、1 mg/ml TBO-ASP 溶液 1 ml をシャーレの縁から注ぎ、シャーレ内の細胞塊全体にいきわたらせて 5 分間静置した。シャーレ内の余分な TBO-ASP 溶液はろ紙片で吸い取った後、細胞塊の染色の状態を目視で観察した。

1.2.5 TBO-ASP 溶液の蛍光特性解析

10 $\mu\text{g/ml}$ TBO-ASP 溶液 200 μl を 96 穴プレートに採り、蛍光プレートリーダー Varioskan Flash (Thermo Scientific) により、450~690 nm の励起光に対する 710 nm の蛍光強度を測定して励起スペクトルを作成し、570 nm の励起光に対する 590~800 nm の蛍光強度を測定して蛍光スペクトルを作成した。

1.2.6 TBO 染色した配偶体の蛍光特性解析

雌雄配偶体の細胞塊をそれぞれ 96 穴プレートに採り、10 $\mu\text{g/ml}$ TBO-ASP 溶液を 200 μl

滴下し、5 分間染色を行った。余分な TBO-ASP 溶液を取り除いた後、蛍光プレートリーダーにより 570 nm の励起光に対する 600~800 nm の蛍光強度を測定して蛍光スペクトルを作成した。

1.2.7 TBO と混合したアルギン酸とフコイダンのドットプロットングを用いた解析

アルギン酸ナトリウム 300~400cP (和光純薬工業) の水溶液 2~20 $\mu\text{g/ml}$ それぞれ 1600 μl を 2 ml のチューブに採り、これに TBO 1 $\mu\text{g/ml}$ 水溶液を 400 μl 加えて混合した。ドットプロットマニホールド MINIFOLD®-1 (Schleicher & Schuell) の台上にナイロンメンブラン Magnaprobe, Nylon, Transfer Membrane, pore size 0.45 μm (フナコシ) をセットした。ドットプロットマニホールドの各ウェルにアルギン酸ナトリウムと TBO の混合液を 500 μl ずつアプライした (n=3)。ブランクとして水 1600 μl に TBO 1 $\mu\text{g/ml}$ 水溶液 400 μl を加えて混合し、アルギン酸ナトリウムと同様に操作した。すべての混合液をアプライした後、吸引した。次に、ドットプロットマニホールドよりナイロンメンブランを取り出し、65°C の乾燥器内で 10 分間乾燥させた。このナイロンメンブランを厚さ 1 mm のガラス板にはさんで蛍光スキャナー Typhoon Trio+ (GE ヘルスケア・ジャパン) のステージ上に置き、蛍光スキャンを行った。

フコイダン (*Fucus vesiculosus* 由来のフコイダン, Sigma-Aldrich) 0.5~5 $\mu\text{g/ml}$ についても、アルギン酸ナトリウムと同様に操作してプロットングおよび蛍光スキャンを行った。蛍光スキャナーの測定条件は次のとおりである : laser, Red 633 nm; filter, 610BP30; PMT, 400 V; pixel size, 200 microns; focal plane, +3 mm.

蛍光スキャンにより得られた画像イメージは、画像解析ソフト ImageQuant TL (GE ヘルスケア・ジャパン) を用いて解析した。

1.2.8 TBO, SYBR Gold, SYBR Green I を用いた配偶体細胞塊の染色

SYBR® Gold nucleic acid gel stain (SYBR Gold, Life Technologies) (Tuma et al., 1999) 2 μl を TAE buffer 20 ml に溶解させた。この溶液 1 ml に ASP を加えて 20 ml とした。SYBR® Green I nucleic acid gel stain (SYBR Green I, Cambrex Bio Science) についても SYBR Gold と同様に操作して ASP 溶液 (200 \times 10³ 希釈) を作製した。蛍光染色用のシャーレとして、細切後フィルターを通した雌性配偶体細胞を ASP 約 20 ml の入ったシャーレに滴下して、約 1 カ月培養したものを用いた。

TBO と SYBR Gold, SYBR Green I の蛍光染色の比較は次の操作に従った。シャーレ内の ASP は捨て、1 ng/ml TBO-ASP 溶液および SYBR Gold と SYBR Green I の ASP 溶液 (200 \times 10³ 倍希釈) 各 20 ml をシャーレの縁よりゆっくりと注いだ。これらのシャーレは遮光して 18°C の人工気象器内のマイルドミキサー上に置き、30 分間染色を行った。これら染色を行ったシャーレについて、蛍光スキャナーにより測定と解析を行った。TBO 染色した配偶体細胞塊のプレートの測定条件は次のとおりである : laser, Red 633 nm; filter, ,

610BP30; PMT, 400 V; pixel size, 200 microns; focal plane, +3 mm. SYBR Gold と SYBR Green I 染色した配偶体細胞塊のシャーレの測定条件は次のとおりである : laser, Blue 488 nm; filter, 520BP40; PMT, 400 V; pixel size, 200 microns; focal plane, +3 mm.

1.2.9 スクリーニングに用いる TBO-ASP 溶液の濃度の検討

「1.2.2 UV 照射による変異原処理」の方法に従って作製したシャーレを用いた。シャーレ内の ASP を捨て、0.5, 1 および 5 ng/ml TBO-ASP 溶液各 20 ml をそれぞれのシャーレの縁よりゆっくりと注いだ。18°C の人工気象器内のマイルドミキサー (MODEL-2230, WAKENYAKU) 上に置き、60 分間染色を行った。

蛍光スキャナーのステージ上に ASP 20 ml の入ったコントロールの細胞塊のシャーレと TBO 染色したシャーレを並べて配置して蛍光スキャンを行った。蛍光スキャナーの測定条件は次のとおりである : laser, Red 633 nm; filter, 610BP30; PMT, 500 V; pixel size, 200 microns; focal plane, +3 mm. 各シャーレ内の TBO 染色した細胞塊の蛍光の値 (max intensity, n=10) とシャーレ内の細胞塊がみられない箇所をバックグラウンドとして蛍光の値 (n=10) を求めた。

1.2.10 TBO-ASP 溶液中での配偶体の生育

1.2.2 UV 照射による変異原処理の方法に従って作製した細胞塊のシャーレを用いた。シャーレ内の ASP を捨て、1 ng/ml TBO-ASP 溶液 20 ml をプレートの縁よりゆっくりと注いだ。シャーレを 18°C の人工気象器内のマイルドミキサー上に置き、60 分間染色を行った (n=3)。蛍光スキャナーにより、シャーレ内の TBO 染色された細胞塊のクロロフィル蛍光を 7 日間経日的に測定した。ASP 20 ml を新たに注いだシャーレをコントロール (n=3) として、同様に細胞塊のクロロフィル蛍光を 7 日間経日的に測定した。蛍光スキャナーの測定条件は次のとおりである : laser, Blue 488nm; filter, 670BP30; PMT, 400 V; pixel size, 200 microns; focal plane, +3 mm.

1.2.11 一次スクリーニング

「1.2.2 UV 照射による変異原処理」の方法に従って作製した細胞塊のシャーレ内の ASP を捨て、1 ng/ml TBO-ASP 溶液 20 ml をシャーレの縁よりゆっくりと注いだ。このシャーレはアルミホイルで包んで遮光し、18°C の人工気象器内のマイルドミキサー上に置き、30 分間染色を行い一次スクリーニング用のシャーレとした。UV 照射を行っていないコントロールの細胞塊についても同様に TBO 染色の操作を行った。

蛍光スキャナーのステージ上に ASP 20 ml が入った UV 照射を行っていない細胞塊のシャーレ、TBO 染色したコントロールおよび一次スクリーニング用のシャーレを並べて配置して蛍光スキャンを行った。蛍光スキャナーの測定条件は次のとおりである : laser, Red 633 nm; filter, 610BP30 and 670BP30 (autolink); splitter, 630 nm; PMT, 550 V; pixel size,

200 microns; focal plane, +3 mm.

蛍光スキャンにより得られた各シャーレの画像イメージは、画像解析ソフトを用いて解析を行った。手順は次のとおりである。はじめに、蛍光フィルター610BP30での画像イメージを解析した。ASP 20 mlが入った細胞塊のシャーレの画像イメージを観察して、それぞれの細胞塊由来の蛍光がほとんど観察されないことを確認した。TBO染色したコントロールの細胞塊の画像イメージより、TBO染色された各細胞塊由来の蛍光の平均値（画像解析ソフト中ではmax intensityにあたる）を求めた。一次スクリーニング用シャーレ中の細胞塊を観察して、コントロールの蛍光の平均値より高い蛍光を示す細胞塊を見出した。これらの細胞塊については、蛍光フィルター610BP30と蛍光フィルター670BP30でのスキャン画像の比較により、TBO染色による蛍光が生細胞に由来するクロロフィル蛍光と重なることを確認した。

高い蛍光を示す細胞塊が見出された一次スクリーニング用シャーレ内のTBO-ASP溶液を捨て、新たなASP培地20 mlに替えた。18°C、短日条件の人工気象器内の光量が弱い場所（光の強さ約 $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）にこのシャーレを置いて培養を続けた。シャーレ内の細胞塊が目視で確認出来るまで（約1カ月後）培養し、蛍光値の高かった細胞塊を200 μl のチップを付けたマイクロピペッターで吸い取り、ASP 20 mlの入った新たなシャーレに単離した。

1.2.12 二次、三次スクリーニング

「1.2.11 一次スクリーニング」で単離した突然変異株候補の細胞塊は約1~2カ月培養を続けた。この細胞塊をガラスシャーレに採り、カミソリで細切した。ASP 約500 μl を加えて細切した細胞を懸濁させた後、30 μm のナイロンフィルターに通した。この液をASP 20 mlが入った新たなプレート複数枚に分けて滴下した。人工気象器内で1週間培養した後、「1.2.11 一次スクリーニング」と同様に操作して、コントロールの細胞塊の蛍光の平均値より高い細胞塊を単離した（二次スクリーニング）。再度、この操作を繰り返す（三次スクリーニング）、蛍光値が高かった細胞塊は突然変異株候補として単離した。

1.2.13 無菌化操作

抗菌剤のアンプシリンナトリウム（生化学用、和光純薬工業）、カナマイシン硫酸塩（生化学用、和光純薬工業）、スペクチノマイシン二塩酸塩五水和物（生化学用、和光純薬工業）それぞれが50 $\mu\text{g/ml}$ になるようにASP 100 mlに添加した。突然変異株候補の細胞塊をカミソリで細切し、この一部を採り、抗菌剤を添加したASP 100 mlの入った培養容器の中に入れ、18°C、短日条件の人工気象器内で約3週間培養した。培養容器より一部の細胞塊を取り出し、カミソリで細切し、抗菌剤を添加したASP 100 mlの入った別の培養容器の中に入れ、再び培養を続けた。この操作をさらに1回繰り返した後、細胞塊の一部を取り出し、カミソリで細切して、新たなASP 200 mlの入った培養容器に移した。

1.2.14 無菌状態の確認

培養容器中の突然変異株候補の細胞塊の一片と培地 1 ml を 1000 μ l のチップを付けたマイクロピペッターで吸い取り，確認用培地 1 ml の入った試験管に加えた．シリコン栓をして 30°C インキュベーター中で一晩振とうさせた後，試験管内の確認用培地が白濁していないことを確認した．さらに，室温に 3~4 日置いて確認用培地が白濁していないことを確認した．確認用培地はトリプトン (Fluka) 0.5 g，乾燥酵母 (ナカライテスク) 0.1 g，海水 80 ml に水を加えて全量 100 ml とし，加圧滅菌をして作製した．

1-3 結果と考察

1.3.1 TBO 染色した細胞塊の目視による観察

植物の細胞壁や細胞質を染色するカチオン性色素として、TBO が知られている (Retamales and Scharaschkin, 2014). TBO については、褐藻類の細胞壁酸性多糖であるフコイダンやアルギン酸を染色することが光学顕微鏡により確認されている (Burns et al., 1982). また、海草細胞中の硫酸化多糖を TBO 染色して部位による蓄積の程度を、染色の色調により比較した報告もみられる (Aquino et al., 2005). そこで、TBO 染色したシャーレ内の細胞塊を目視により観察して、酸性多糖を蓄積した突然変異株を見出す方法について試みた。雌雄配偶体を TBO 染色して光学顕微鏡により観察したところ、TBO により染色されていることが確認された (図 1-1 A). しかし、TBO に強く染まる突然変異株の細胞塊を、シャーレ内の多数の細胞塊の中から目視で見分けるのは困難であると考えた (図 1-1 B, C).

1.3.2 TBO-ASP 溶液と TBO 染色した配偶体細胞塊の蛍光特性

TBO の TE buffer (pH 8) 溶液が蛍光を示すことがわかっている (Ilanchelian and Ramaraj, 2011). また、TBO 染色した類粘膜組織を蛍光顕微鏡で観察した研究例 (Kömerik et al., 2002) もある。このため、TBO を用いた蛍光染色による突然変異株のスクリーニング法について検討した。

通常、酸性多糖の染色には TBO 酸性溶液 (pH 4) が用いられる (Aquino et al., 2005) が、低 pH 条件が配偶体細胞の生育に大きく影響することが考えられたため、細胞塊を染色するには、ASP 溶液を用いたほうが適当であると考えた。そこで、10 µg/ml TBO-ASP 溶液について蛍光プレートリーダーを用いて励起スペクトルと蛍光スペクトルを測定したところ、この溶液においても蛍光が確認された。最大励起波長 (Ex max) は 630 nm 付近、最大蛍光波長 (Em max) は 660 nm 付近に見られた (図 1-2).

次に、TBO 染色した細胞塊と染色していない細胞塊の蛍光スペクトルを測定し比較したところ、TBO 染色した細胞塊において波長 610~660 nm 付近に蛍光値の増加が見られたことから、この波長域を利用して蛍光強度を測定することが可能であると考えられた。TBO 染色していない細胞塊では 600~630 nm 付近ではほとんど蛍光を示さず、685 nm 付近で最大となった (図 1-3). このため、TBO-ASP 溶液の Em max 660 nm 付近では、配偶体細胞のクロロフィル蛍光が、TBO 染色由来の蛍光に大きく影響すると予想された。そこで蛍光スキャナーの条件として、蛍光フィルターに波長 610 nm ± 15 nm の光を透過する 610BP30 を用い、励起光には TBO の Ex max 630nm に近い Red 633 nm を用いることとした。

1.3.4 細胞塊の染色に用いる蛍光試薬の比較

蛍光スキャナーを用いて突然変異株のスクリーニングを行うために適した蛍光試薬につ

いて検討を行った。蛍光を示すカチオン性色素である SYBR Gold と SYBR Green I について、シャーレ中の細胞塊を染色して TBO 染色と比較した (図 1-4)。蛍光スキャンにより得られたデータは、平面と立体の異なる表示で比較した。SYBR Green I 染色については染色した細胞塊の蛍光を明確に観察することが出来なかった。SYBR Gold 染色ではバックグラウンドがやや高く、染色された細胞塊の蛍光強度の評価に影響すると考えられた。TBO 染色ではバックグラウンドが低く、TBO 染色された細胞塊を明確に観察することが出来た。これら 3 種のカチオン性色素のなかでは、TBO 染色が最もスクリーニングに適している可能性が示された。

1.3.5 アルギン酸とフコイダンのドットブロッキングを用いた解析

TBO により細胞塊が染色されることを示したが、酸性多糖であるアルギン酸とフコイダンが TBO により染色されることを確認する必要がある。そのために、ドットブロッキングを用いた解析を行った。アルギン酸またはフコイダンを TBO 溶液と混合してナイロンメンブラン上にドットブロッキングを行い、ナイロンメンブラン上のドットを蛍光スキャナーにより測定したところ、アルギン酸とフコイダンのドットは蛍光を示し、この蛍光強度は一定の濃度範囲で濃度依存的であることがわかった。画像解析ソフトにより蛍光強度を求め、濃度に対してプロットしたところ、アルギン酸ではおよそ 0~20 $\mu\text{g/ml}$ 、フコイダンではおよそ 0~3 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で濃度依存的な蛍光強度の増加が示された (図 1-5)。これより、酸性多糖であるアルギン酸とフコイダンは TBO により染色され、蛍光スキャナーにより半定量的に解析出来ることが明らかになった。この結果より、TBO による細胞塊の染色においては、細胞塊に含まれるアルギン酸とフコイダンが染色されていることが示唆された。

1.3.6 スクリーニングに適した TBO-ASP 溶液の濃度の検討

スクリーニングに適した TBO の濃度について検討を行った。0.5, 1, 5 ng/ml TBO-ASP 溶液中の細胞塊の蛍光強度とシャーレ内のバックグラウンドの蛍光強度を求め、これらの比 (細胞塊の蛍光強度 (平均値) / バックグラウンドの蛍光強度 (平均値)) は、それぞれ 1.5, 3.6, 1.7 であった。蛍光スキャンにより得られたデータ画像を用いて、多数の細胞塊より TBO によく染色される突然変異株の細胞塊を見出すには、細胞塊の蛍光の観察が容易で、バックグラウンドの影響が少ない 1 ng/ml TBO-ASP 溶液を用いるのが適当であることが示された。

1.3.7 TBO-ASP 溶液中での配偶体の生育

TBO 染色では、細胞塊を含むシャーレに TBO-ASP 溶液を注ぎ、この溶液中で細胞塊の蛍光を測定する手法を用いた。これにより、通常の染色法で行われる脱色操作による染色のばらつきを避けられると考えた。また、使用する TBO は低濃度 (1 ng/ml) ではあるが、

TBO が配偶体細胞の生育に与える影響について確認する必要がある。そこで、1 ng/ml TBO-ASP 溶液中の細胞塊と ASP で培養した細胞塊のクロロフィル蛍光を 7 日間経日的に測定し比較することで、TBO が配偶体の生育に与える影響を解析した。ASP 中の細胞塊は徐々にクロロフィル蛍光が増して、7 日後には 0 日目の蛍光値と比較すると、それぞれ雌性配偶体で 1.05 倍、雄性配偶体で 1.03 倍になった。これに対して、TBO-ASP 溶液中の細胞塊のクロロフィル蛍光は、7 日後には雌雄いずれも 0.85 倍にまで低下した (図 1-6)。この結果から、TBO-ASP 溶液中では配偶体細胞が衰弱することが考えられるため、配偶体細胞へのストレスを軽減するために、染色中はアルミホイルでシャーレを包んで遮光し、染色時間は 30 分間とした。またスクリーニング後は、シャーレ中の TBO-ASP 溶液はただちに新たな ASP と交換することとした。TBO 染色後に培地を交換した細胞塊は、人工気象器で低光量 (約 $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) の光条件下で静置することにより、正常な生育を示すことがわかった。

1.3.8 突然変異株スクリーニング

上述の検討により決定した条件を用いて、UV 照射による変異原処理を行った配偶体細胞より突然変異株の単離を行った。一次スクリーニングには培養期間 21 日前後の細胞塊を用いた。この培養期間内の細胞塊は大きさが均一であるため、TBO 染色による蛍光の強度を比較するには適していると考えた。スクリーニングでは、蛍光スキャナーによる 1 回のスキャンでシャーレ 10 個程度の蛍光スキャンを行った。TBO 蛍光の測定には、配偶体細胞由来のクロロフィル蛍光を検出しない蛍光フィルター (610BP30) と、クロロフィル蛍光を検出する蛍光フィルター (670BP30) を用い、各蛍光フィルターを用いて得た画像を重ね合わせることで、強く TBO 染色される細胞塊を選抜した (図 1-7)。

一次スクリーニングで用いた細胞塊は、異なる変異を持つ 10 程度の細胞に由来すると考えられるため、突然変異株を単離するためには、スクリーニングを数回繰り返す必要があると考えた。そのため、一次スクリーニングで単離した細胞塊については、細切と培養を繰り返して二次および三次スクリーニングを行った。

1.3.9 スクリーニングの結果

一次スクリーニングで観察した 344 枚のシャーレに含まれる細胞塊の総数約 10 万個以上より、一次スクリーニングにより 21 系統、二次スクリーニングにより 5 系統、三次スクリーニングにより 5 系統が選抜された。これらを培養したところ、正常な生育を示した 4 系統が得られ、それぞれ AP-M1, AP-F1, AP-F2, AP-F3 と命名した (AP は Acidic Polysaccharide の略である。M は Male, F は Female を表す)。三次スクリーニング後に得た突然変異株候補は、野生型株と比較して全体的に TBO 由来の蛍光値が高くなったことを確認した (図 1-8)。三次スクリーニングまで行うことにより、均一な突然変異株の細胞塊が得られたと考えられる。

突然変異株が得られたことにより、本研究で確立したスクリーニング法は有効であることが示された。しかし、単離した突然変異株の表現型である TBO 染色による高い蛍光値が、何に由来するのかを明らかにする必要がある。高い蛍光値の要因として、突然変異株の細胞ではアルギン酸またはフコイダンの蓄積量が増えたことが考えられる。または、蓄積量の変化ではなく、糖鎖構造の変化（アルギン酸中のグルロン酸とマンヌロン酸の比率や配列）や、フコイタン中の硫酸基数の増加などの可能性も考えられる。あるいは、配偶体細胞と比較すると突然変異株の細胞塊が凝集していたため、見掛け上 TBO に強く染色されたように観察された可能性も考えられる。これらの点を明らかにするために、突然変異株の細胞より酸性多糖を抽出して、蓄積量や糖鎖の構造を解析して明らかにしていく必要がある。

1.3.10 突然変異株の無菌化

TBO 染色や突然変異株の単離操作などはすべて、細菌の混入等がないようクリーンベンチ内で行った。しかし、得られた突然変異株 4 株について確認を行ったところ、有菌の状態であることがわかった。そのため無菌化の操作を行い、再び無菌状態の確認を行った結果、突然変異株 4 株はすべて無菌状態となったことを確認した。

Pseudomonas 属や *Azotobacter* 属の細菌はアルギン酸を生合成し、菌体外多糖として分泌することが知られている (May and Chakrabarty, 1994; Remminghorst and Rehm, 2006)。そのため、突然変異株が有菌状態であると、アルギン酸などの酸性多糖の解析が菌体外多糖に影響されてしまうことが考えられる。無菌状態の株を用いることにより、配偶体細胞や突然変異株細胞から正確な情報が得られると考えられる。

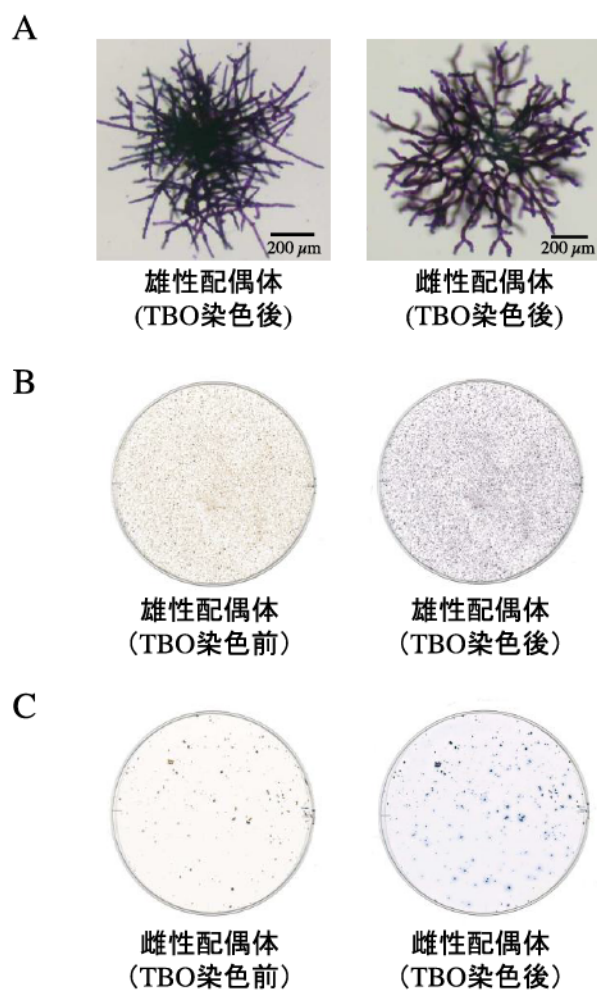


図 1-1 配偶体細胞塊の TBO 染色

(A) 雌雄配偶体を 0.05% TBO-0.6 M マンニトール溶液で染色し、明視野顕微鏡により観察した。(B) UV 照射後、シャーレ中で約 1 カ月培養した雄性配偶体 (左) と TBO-ASP 溶液で染色後の雄性配偶体 (右) のスキャン画像。(C) UV 照射後、シャーレ中で約 1 カ月培養した雌性配偶体 (左) と TBO-ASP 溶液で染色後の雌性配偶体 (右) のスキャン画像。

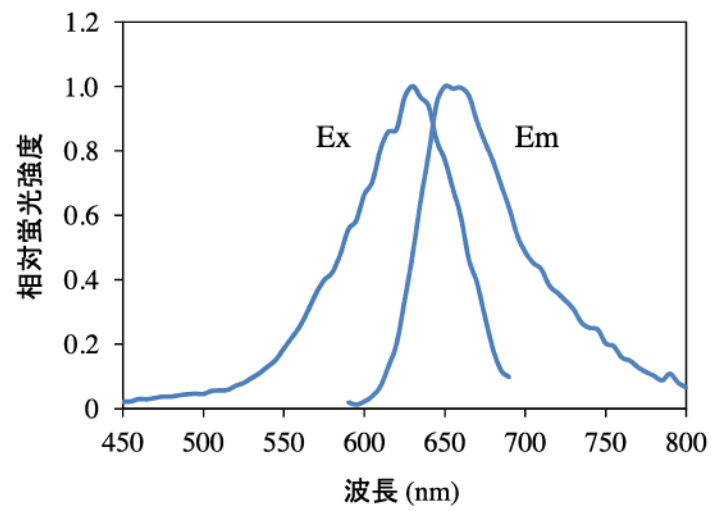


図 1-2 TBO-ASP (10 µg/ml) 溶液の励起スペクトルと蛍光スペクトル
励起スペクトル (Ex) と蛍光スペクトル (Em) それぞれの最大値を 1 とし相対強度を示した。

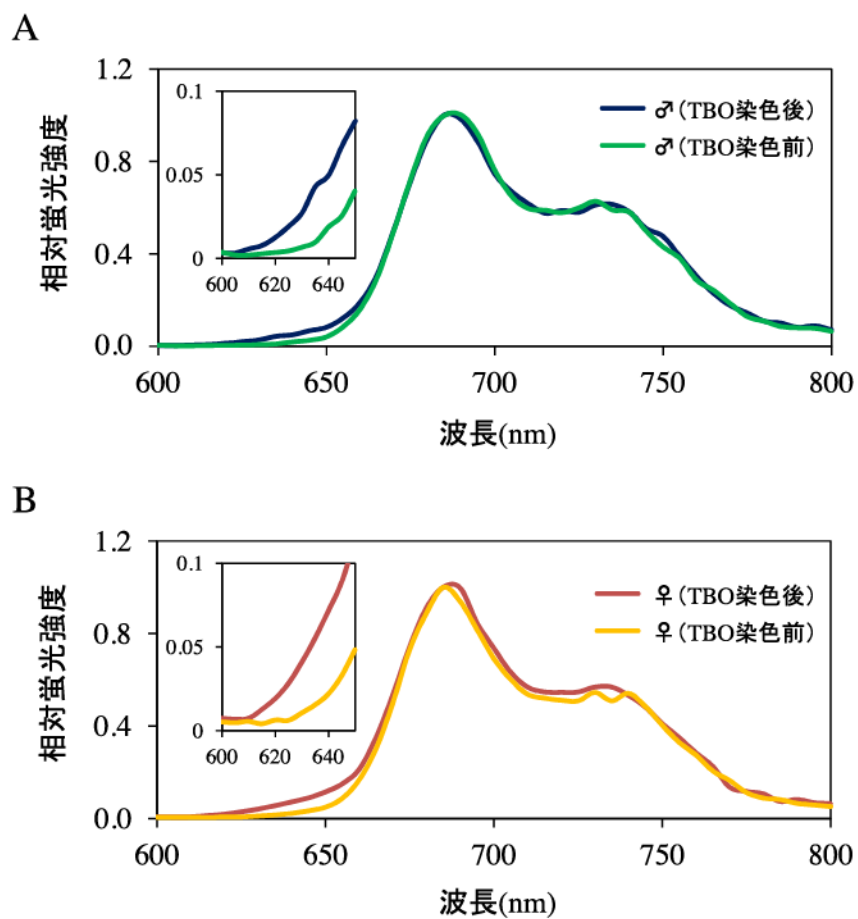
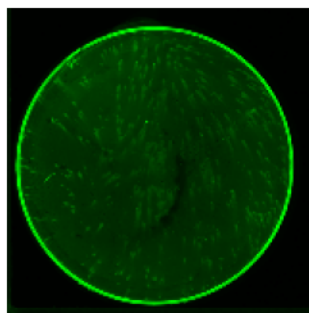


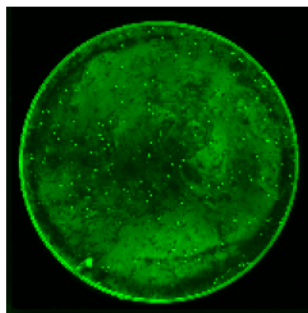
図 1-3 TBO 染色した雌雄配偶体の蛍光スペクトル

(A) 雄性配偶体のクロロフィル蛍光と TBO 染色後の蛍光スペクトル. 挿入図では波長 600-650 nm の蛍光スペクトルを拡大した. (B) 雌性配偶体のクロロフィル蛍光と TBO 染色後の蛍光スペクトル. 挿入図では波長 600-650 nm の蛍光スペクトルを拡大した.

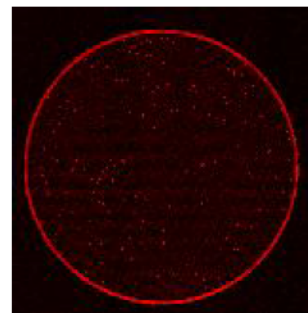
A



SYBR Green 染色

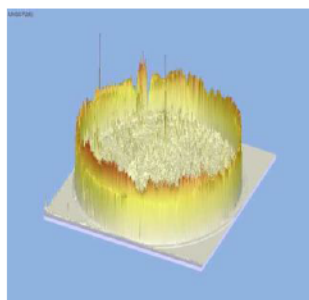


SYBR Gold 染色

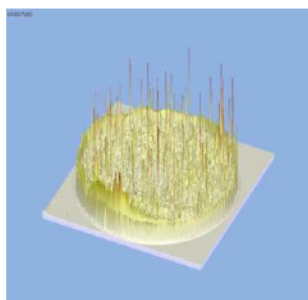


TBO 染色

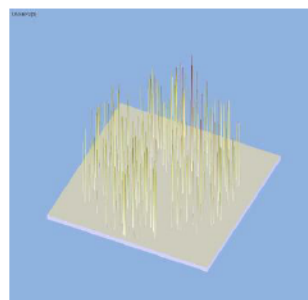
B



SYBR Green 染色



SYBR Gold 染色

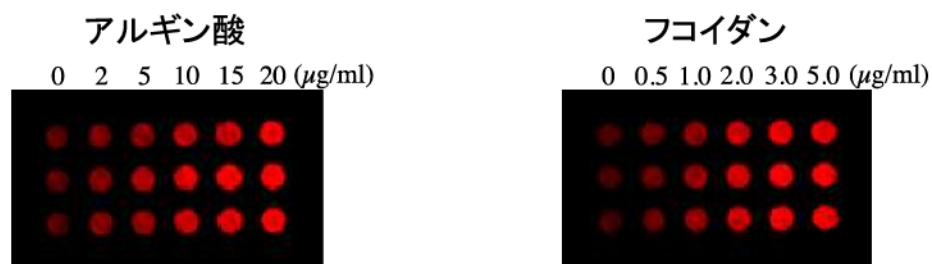


TBO 染色

図 1-4 TBO, SYBR Gold および SYBR Green I による細胞塊の蛍光染色

(A) TBO, SYBR Gold および SYBR Green I により染色した細胞塊の蛍光スキャン画像. (B) 各蛍光試薬の各蛍光スキャン画像を立体表示した.

A



B

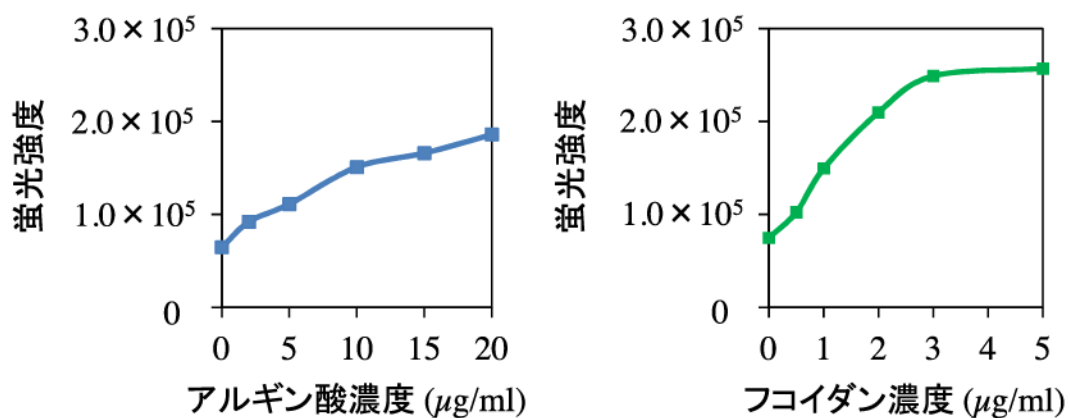


図 1-5 TBO と混合したアルギン酸とフコイダンの蛍光スキャンによる定量

(A) メンブレン上の TBO 染色したアルギン酸とフコイダンの蛍光画像. (B) 各濃度におけるドットの蛍光強度の平均値 (n=3) を画像解析ソフトにより求め、濃度 (μg/ml) に対してプロットした.

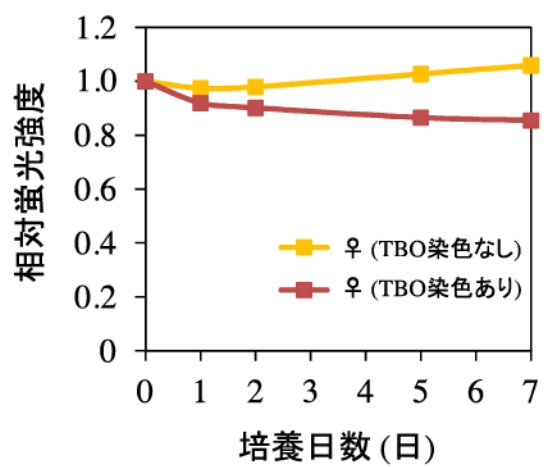
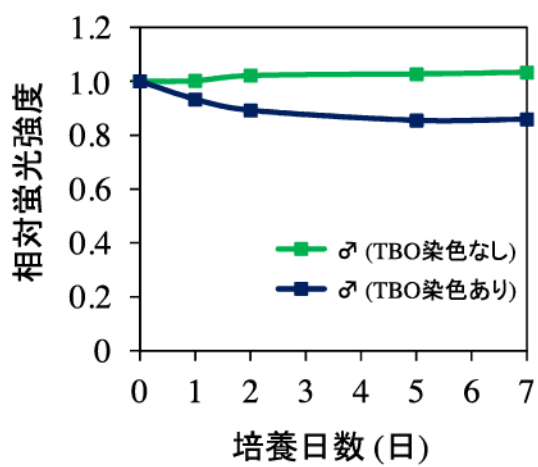


図 1-6 1 ng/ml TBO-ASP 溶液中での配偶体の生育

培養開始 0 日目の配偶体のクロロフィル蛍光の値を 1 とし、経日的に蛍光を測定した (n=3 の平均).

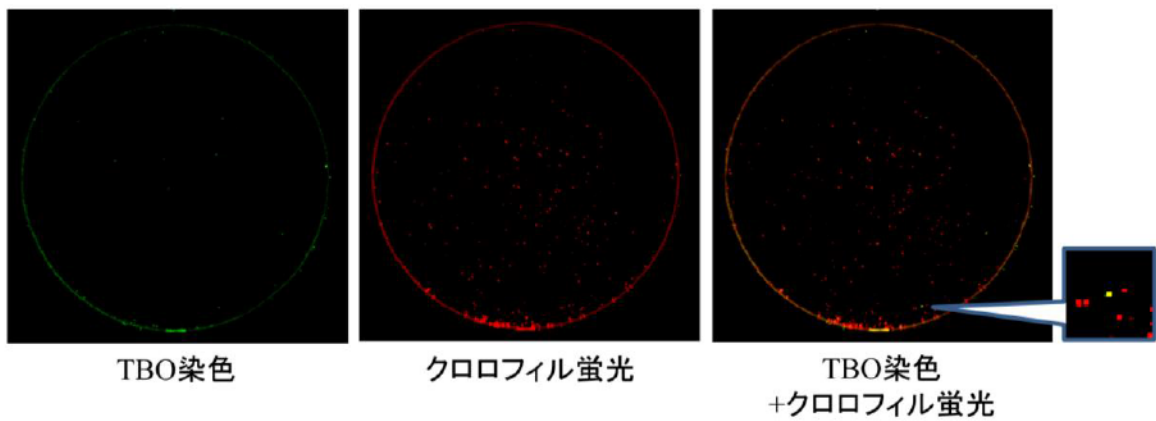


図 1-7 蛍光スキャナーを用いたスクリーニング系

TBO 染色した細胞塊の蛍光フィルター（610BP30）を用いた蛍光スキャンにより得た画像（左）、蛍光フィルター（670BP30）を用いた蛍光スキャンにより得た画像（中央）、両蛍光画像の重ね合わせ画像（右）。拡大された画像イメージは TBO に強く染まった細胞塊である。クロロフィル蛍光の画像と重ね合わせると擬似カラーが黄色に表示される。

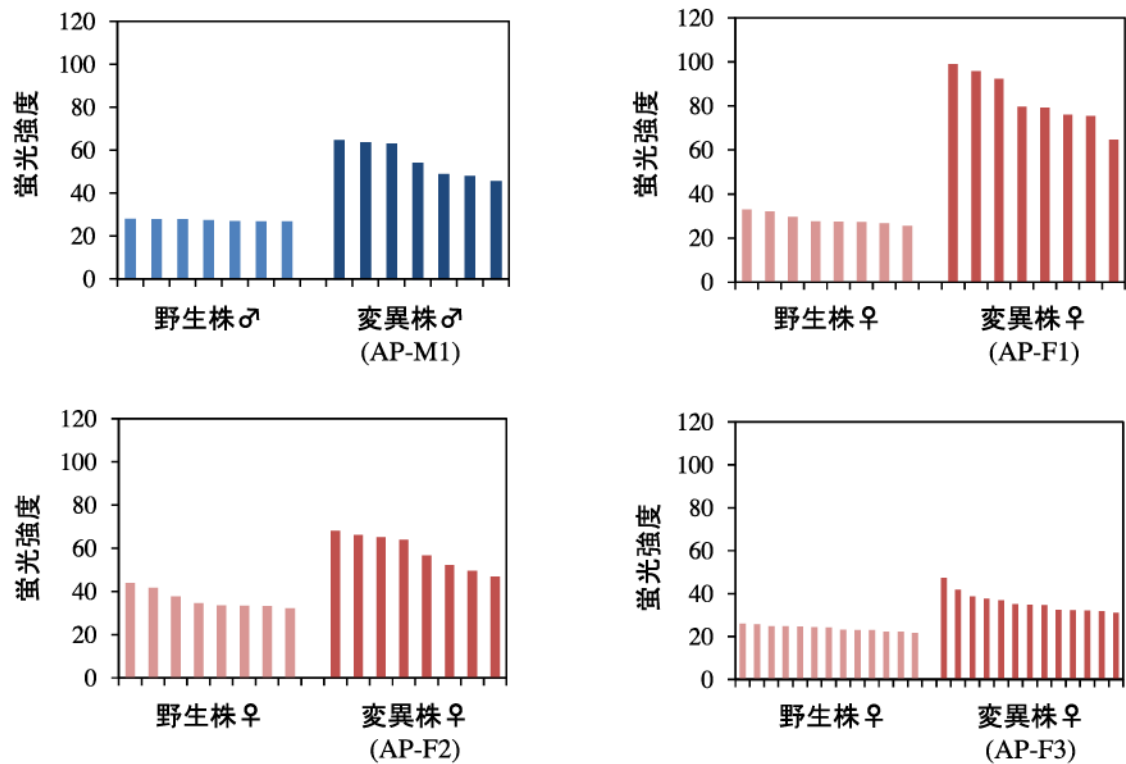


図 1-8 TBO 染色を行った突然変異株細胞塊の TBO 蛍光強度

三次スクリーニング後に得た突然変異株 (AP-M1, AP-F1, AP-F2, AP-F3) について、シャーレ中の独立した細胞塊 (7~13 個) の蛍光強度を蛍光スキャナーにより測定し、野生型株の蛍光強度と比較した。

第二章

酸性多糖の定量法の検討

2-1 序論

酸性多糖のアルギン酸やフコイダンの解析方法には、主にアガロースゲル電気泳動 (Pereira et al., 1999; Vilela-Silva et al., 2002; Aquino et al., 2011), polyacrylamide gel 電気泳動 (PAGE) (Pereira et al., 1999; Pomin et al., 2005), フーリエ変換赤外分光 (FT-IR) (Sakugawa et al., 2004; Leal et al., 2008; Fenoradosoa et al., 2010; Karmakar et al., 2010; Synytsya et al., 2010), 核磁気共鳴 (NMR) (Gomez et al., 2009; Karmakar et al., 2009; Fenoradosoa et al., 2010; Karmakar et al., 2010) が用いられている。アガロースゲル電気泳動や PAGE は、ゲル上で酸性多糖を分離して TBO 染色により定性的または半定量的な解析を行う方法である。FT-IR はアルギン酸に含まれるカルボキシル基や、フコイダンに含まれる硫酸基などの官能基を調べることができる。NMR はアルギン酸やフコイダンの分子構造の解析を行う方法である。これらの方法は、構造決定などの定性解析には有効である。また FT-IR や NMR により良好なスペクトルを得るには抽出した酸性多糖をさまざまな過程を経て精製する必要がある。第一章で単離した突然変異株について解析を行うためには、少量の細胞試料から抽出した酸性多糖を簡便に定量する系が必要と考えた。

褐藻類に含まれるフコイダンの定量については、マコンブのモノクローナル抗体による enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA 法) が報告されている (Mizuno et al., 2009) 血清や尿中のフコイダンも ELISA 法により定量されている (Tokita et al., 2010)。ELISA 法は抗マコンブ抗体を必要とするため、抗体の利用可能性が手法の汎用性を制限しているといえる。また、ヒジキ (*Hizika fusiformis*) 由来のフコイダンをカチオン性色素であるメチレンブルーにより染色する方法 (Lee et al., 2012) が報告されている。この方法は定量下限がやや高く (1 $\mu\text{g}/\text{spot}$), 検量線の範囲も 1~20 $\mu\text{g}/\text{spot}$ と限られている。そこで、褐藻類のフコイダンを定量するための新たな定量法の確立を行った。

アルギン酸の定量法としては、カルバゾール硫酸法 (Bitter and Muir, 1962; May and Chakrabarty, 1994; Ma et al., 1998; Salgado et al., 2007; Swift et al., 2014) が広く用いられている。本研究では May ら (1994) の方法に従ってアルギン酸の定量を行うこととした。この方法は本来、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) が生産するアルギン酸の定量に用いられた方法である。このため、褐藻類のアルギン酸抽出画分にも充分に応用できることの確認を行う必要がある。

さらに本研究では、マコンブから抽出されるフコイダンとアルギン酸の分解の程度が小さく、高い抽出効率を示す抽出条件を決定するための条件検討を行った。

2.2 材料と方法

2.2.1 実験材料

-20°Cで保存しておいたマコンブ (*Saccharina japonica*) の青森県産の胞子体を用いた。

2.2.2 フコイダン定量のための蛍光試薬の検討

蛍光試薬として、SYBR Gold, SYBR Green I, Midori Green Advance DNA stain (Midori Green, 日本ジェネティクス), 臭化エチジウム (EtBr, 和光純薬工業), TBOを用いた。SYBR Gold, SYBR Green I, Midori Green は 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で 5000 倍希釈した溶液を作製した。EtBr は 20 µg/ml, TBO は 1 µg/ml の溶液を 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を用いて作製した。フコイダン標準品として *Fucus vesiculosus* 由来のフコイダン (Sigma-Aldrich) を用いた。アルギン酸標準品としてアルギン酸ナトリウム 300~400 cp (和光純薬工業) を用いた。96 穴プレートの 1 穴あたり, 64 ng/µl フコイダン標準溶液を 10 µl ずつ分注し, 作製した各蛍光試薬の溶液を 200 µl 加えた。これらの励起および蛍光スペクトルを蛍光プレートリーダー-Varioskan Flash (Thermo Scientific) により測定し, 各蛍光試薬の溶液の最大励起波長 (Ex max) と最大蛍光波長 (Em max) を求めた (表 2-1)。

次に, フコイダン標準溶液 0.125~128 ng/µl を 10 µl ずつ 96 穴プレートに分注し, 各蛍光試薬の溶液 200 µl を加え, それぞれ先に求めた Ex max と Em max の条件下, 蛍光プレートリーダーにより蛍光値を測定した。また, アルギン酸標準溶液 12.5~200 ng/µl を 10µl ずつ 96 穴プレートに採り, SYBR Gold 5000 倍希釈溶液 200 µl を加えて蛍光値を測定した。

2.2.3 フコイダン定量系に用いる緩衝液と蛍光試薬の濃度の検討

SYBR Gold 1250, 2500, 5000, 10000 倍希釈溶液を, それぞれ 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0), リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8), Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5), Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0, pH 8.9) で調製した。フコイダン標準溶液 0.125~128 ng/µl を 10 µl ずつ 96 穴プレートに採り, 各緩衝液を用いて作製した SYBR Gold 溶液 200 µl を加え蛍光プレートリーダーにより蛍光値 (Ex: 470 nm, Em: 600 nm) を測定した。

2.2.4 フコイダン抽出の洗浄に用いる有機溶媒の検討

60 ng/µl フコイダン標準溶液を 1.5 ml チューブに 10 µl ずつ分注し, アセトン, クロロホルム, 100%エタノール (EtOH), 80% EtOH, n-ヘキサンをそれぞれ 1 ml 加えた。ローターで 10 分間攪拌後, 遠心分離 (12.8×10³ rpm, 4°C, 10 分間) し上層 500 µl を新しい 1.5 ml チューブに移した。上層と下層のすべての溶媒はロータリーエバポレーターを用いて留去させた後, 40 mM NaCl 300 µl を加えてチューブ内に残ったフコイダンを溶解させた。また有機溶媒を添加しないコントロールとして, 60 ng/µl フコイダン標準溶液を 1.5 ml チューブに 10 µl 入れ, 減圧乾燥させた後, 40 mM NaCl 300 µl を加え溶解した溶

液も用意した。後述の 2.2.8 のフコイダン定量方法に従って各溶液の蛍光値を測定した。

2.2.5 マコンブ胞子体からのフコイダンの抽出条件の検討

液体窒素中で凍結後、細胞破砕器 TissueLyser LT (QIAGEN) により破砕し均一な状態のマコンブ胞子体より約 10 mg を 1.5 ml チューブに分取し重量を測定した。このチューブに n-ヘキサン 1 ml を加え、ローテーターで 10 分間攪拌した。n-ヘキサン層を除いた後、抽出溶媒 (0, 5, 10, 25, 50 mM HCl) をそれぞれ 1 ml 加えた。これらのチューブは、4°C または 18°C においてローテーターで攪拌しながら、2, 4, 8, 16, 24 時間の抽出を行った。抽出後、遠心分離 (12.8×10^3 rpm, 4°C, 10 分間) し、上清 500 μ l を新しいチューブに移した。5 mM HCl で抽出した溶液は 20 mM NaOH 125 μ l で中和した。同様にして 10, 25, 50 mM HCl 抽出液はそれぞれ 40, 100, 200 mM NaOH 125 μ l で中和した。これらの中和した溶液 10 μ l を新たな 1.5 ml のサンプルチューブに採り、それぞれの溶液は 4, 8, 20, 40 mM NaCl 溶液 290 μ l を用いて希釈してフコイダン抽出画分とした。超純水で抽出した場合は超純水 290 μ l で希釈してフコイダン抽出画分とした。後述の「2.2.8 フコイダンの定量方法」に従って各フコイダン抽出画分の蛍光値を測定した (n=3)。

2.2.6 フコイダンの電気泳動

「2.2.5 マコンブ胞子体からのフコイダンの抽出条件の検討」の条件にもとづき得られたフコイダン抽出画分について PAGE とアガロースゲル電気泳動を行った。PAGE では 6% polyacrylamide gel の 1 穴につきフコイダン抽出画分 10 μ l をアプライし、泳動緩衝液 (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine) を用いて、定電圧 100 V で 50 分間泳動を行った。アガロース電気泳動では厚さ 1 mm の 1.2% agarose gel の 1 穴につきフコイダン抽出画分 5 μ l をアプライし、泳動緩衝液として 1×TAE 緩衝液を用いて、定電圧 100 V で 35 分間泳動を行った。泳動後のゲルは SYBR Gold 溶液 (20mM Tris-HCl pH 7.5 で 10000 倍希釈) 20ml 中で 30 分間染色を行った後、UV-B (302 nm) 照射下で検出を行った。

2.2.7 マコンブ胞子体からのフコイダンの抽出方法

マコンブ胞子体約 10 mg を 2 ml チューブに入れ、湿重量を測定した。直径 7 mm のステンレスビーズを 2 個入れてチューブごと液体窒素中で凍結させ、すぐに細胞破砕器で破砕 (50 Hz, 2 分間) した。チューブ内の破砕物をスピンドウンした後、再び凍結、破砕を行った。n-ヘキサン 1 ml を加えローテーターで 10 分間攪拌した。攪拌後、遠心分離 (12.8×10^3 rpm, 4°C, 10 分間) し、n-ヘキサン層を取り除いた。5 mM HCl 1 ml を 2, 3 回に分けてチューブに加えて破砕物の懸濁液を新しい 1.5 ml のサンプルチューブに移した。このチューブを 18°C, 24 時間、ローテーターで攪拌しながらフコイダンを抽出した。遠心分離 (12.8×10^3 rpm, 4°C, 10 分間) 後、上清 800 μ l を新たな 1.5 ml チューブに移し、200 mM NaOH 20 μ l を加えて中和してフコイダン抽出画分とした。

2.2.8 フコイダンの定量方法

96 穴プレートの 1 穴あたりフコイタン抽出画分またはフコイタン標準溶液 150 μl (適宜 4.88 mM NaCl で希釈した), SYBR Gold 溶液 (80 mM Tris-HCl pH 7.5 で 625 倍希釈) 50 μl を加え, 蛍光プレートリーダーにより蛍光値を測定した. 測定条件は次のとおりである: 測定温度, 30°C; 振とう, 420 rpm, 1 分間; Ex, 470 nm; Em, 600 nm.

2.2.9 フコイダンの検量線の作製

フコイタン標準溶液 0.125~3.0 ng/ μl を作製した. これらのフコイタン標準溶液の NaCl 濃度は 4.88 mM になるよう調整した. 「2.2.8 フコイダンの定量方法」に従って蛍光値を測定した. ブランクとして 4.88 mM NaCl 150 μl についても同様に操作し, 蛍光値を測定し (n=8), 定量下限 (LOQ) を求めた.

2.2.10 フコイタン抽出画分に添加したフコイタン標準品の回収率の算出

「2.2.7 マコンブ胞子体からのフコイダンの抽出方法」に従って得られたフコイタン抽出画分 (5 倍希釈) 10 μl にフコイタン標準品 (75, 300, 450 ng) を添加し, 4.88 mM NaCl で 全量 300 μl となるように調製した溶液について, 「2.2.8 フコイダンの定量方法」に従って蛍光値を測定した. フコイタン標準溶液を添加しないフコイタン抽出画分 (5 倍希釈) についても同様に操作して蛍光値を測定し, 添加したフコイタン標準品の回収率を求めた (n=8).

2.2.11 フコイタン抽出画分に含まれる DNA, RNA の確認

「2.2.7 マコンブ胞子体からのフコイダンの抽出方法」に従って得られたフコイタン抽出画分 (2 倍希釈) に DNA (pTH2, 23 ng/ μl), total RNA (イネより精製, 50 ng/ μl) を添加し, これに DNase I (Deoxyribonuclease RT Grade, ニッポンジーン) および RNase A (リボヌクレアーゼ A, ナカライテスク) を反応させ酵素分解を行った. 表 2-2 に従って各溶液を 1.5 ml チューブ中に調製した. これらの溶液のそれぞれ 10 μl を, 新たな 1.5 ml チューブに分注した (n=8). 酵素を加えたチューブは 37°C, 3 時間反応させた. すべてのチューブに 4.88 mM NaCl 290 μl を加えて混合した後, 「2.2.8 フコイダンの定量方法」に従って蛍光値を測定した. また, 750 ng/ μl フコイタン標準溶液 5 μl を 4.88 mM NaCl 50 μl で希釈した溶液に, フコイタン抽出画分と同様に DNA, RNA を添加し測定を行った (n=8). フコイタン抽出画分は同じ方法で独立して抽出した試料を 2 個用意し, それぞれフコイタン画分 1, フコイタン画分 2 とした.

2.2.12 5 mM HCl 中でのアルギン酸の分解の確認

1.5 ml チューブに 5 mM HCl 200 μl と 10 $\mu\text{g/ml}$ アルギン酸ナトリウム標準溶液 5 μl を加え, 混合した. このチューブを 18°C で 24 時間インキュベートした後, 200 mM NaOH 5

μl を加えて中和した。この溶液について後述の2.2.16に従って電気泳動を行った。またコントロールとして1.5 ml チューブに5 mM HCl 200 μl , 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アルギン酸ナトリウム 5 μl , 200 mM NaOH 5 μl を加え混合した溶液を調製し、インキュベートを行わず同様に電気泳動を行った。

2.2.13 アルギン酸の抽出条件の検討

「2.2.7 マコンブ胞子体からのフコイダンの抽出方法」の抽出条件の検討に従って、マコンブ胞子体約10 mgをそれぞれ1.5 ml チューブに分取し重さを測定した。n-ヘキサンで抽出後、5 mM HCl 1 mlを加えて18°C, 24時間攪拌した。遠心分離(12.8 \times 10³ rpm, 4°C, 10分間)後、上清(フコイタン抽出画分)を取り除いた。このチューブに1% Na₂CO₃を1 ml加え、40または60°Cで、攪拌しながら2, 4, 8, 16時間抽出を行った。抽出後、遠心分離(12.8 \times 10³ rpm, 4°C, 10分間)して、上清800 μl を新たな1.5 ml チューブに移した。この抽出液200 μl に超純水200 μl を加えて希釈し、アルギン酸抽出画分とした。後述の「2.2.14 カルバゾール硫酸法によるアルギン酸の定量」に従って各アルギン酸抽出画分の吸光度を吸光プレートリーダーにより測定した。

2.2.14 カルバゾール硫酸法によるアルギン酸の定量

カルバゾール硫酸法はMayら(1994)の方法に従った。0.1 M 四ほう酸ナトリウム(和光純薬工業)を含む濃硫酸(97%, ナカライテスク)600 μl を1.5 ml チューブに分注し、氷上で冷却した。これに、アルギン酸抽出画分70 μl をゆっくりと加え4秒間攪拌後、再び氷上で冷却した。次に、0.1%カルバゾール(和光純薬工業)を含むEtOHを20 μl 加え4秒間攪拌後、再び氷上で冷却した。これらのチューブを55°C, 30分間加熱した。放冷後、それぞれのチューブより200 μl を96穴プレートの各ウェルに入れ、吸光プレートリーダーにより530 nmの吸光度を測定した。

2.2.15 アルギン酸の検量線の作製

10~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アルギン酸ナトリウム標準溶液、それぞれ70 μl について「2.2.14 カルバゾール硫酸法によるアルギン酸の定量」に従って操作した。ブランクとして超純水70 μl についても同様に操作して吸光度を測定し(n=8)、定量下限(LOQ)を求めた。

2.2.16 アルギン酸抽出画分の電気泳動

「2.2.13 アルギン酸の抽出条件の検討」により得られたアルギン酸抽出画分についてPAGEを行った。アルギン酸抽出画分10 μl を6% polyacrylamide gelにアプライした。泳動緩衝液(25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine)を用い、定電圧100 Vで60分間泳動を行った。泳動後のゲルはTBO染色液(0.1% TBO, 1%酢酸)10 ml中で10分間染色した後、超純水中で脱色を行った。

2.2.17 アルギン酸定量系における 1% Na₂CO₃の影響

10~1000 µl/ml アルギン酸ナトリウム標準溶液を 1% Na₂CO₃ を用いて作製した。この標準溶液それぞれ 70 µl について「2.2.14 カルバゾール硫酸法によるアルギン酸の定量」に従って操作した。

2.2.18 アルギン酸の定量系におけるフコイダンとマンニトールの影響

10 µg/ml フコイダン標準溶液と 1000 µg/ml マンニトール（ナカライテスク）溶液それぞれ 70 µl について「2.2.14 カルバゾール硫酸法によるアルギン酸の定量」に従って操作して吸光度を測定した（n=3）。

2.2.19 アルギン酸抽出画分に添加したアルギン酸標準品の回収率の算出

「2.2.13 アルギン酸の抽出条件の検討」に従って 40°C, 16 時間抽出したアルギン酸抽出画分（2 倍希釈）140 µl にアルギン酸ナトリウム標準液（0.1, 0.4, 1 µg/µl）140 µl を添加し、「2.2.14 カルバゾール硫酸法によるアルギン酸の定量」に従って吸光度を測定した。コントロールとして、アルギン酸ナトリウム標準品を添加しないアルギン酸抽出画分（2 倍希釈）についても同様に測定し、添加したアルギン酸ナトリウム標準品の回収率を求めた（n=3）。

2.3 結果と考察

2.3.1 フコイダン定量系で用いる蛍光試薬の検討

はじめに、フコイダンを定量するための蛍光試薬について検討を行った。核酸の検出に使用されている EtBr はフコイダン等の酸性多糖と相互作用して蛍光を示す (Matsuno et al., 2005) ことが知られている。そこで EtBr に加え、核酸の染色色素である SYBR Gold, SYBR Green I, Midori Green が溶液中でフコイダンと相互作用するのか検討を行った。フコイダンの染色色素である TBO についてもあわせて検討を行った。

各蛍光試薬溶液の最大励起波長と最大蛍光波長を求めて、それぞれの測定波長とした (表 2-1)。各測定波長の条件で蛍光試薬溶液のフコイダン標準溶液 0.125~128 ng/μl に対する蛍光値を測定して、フコイダン蛍光と濃度の相関を調べた (図 2-1 A)。Midori Green, EtBr, TBO ではフコイダンの濃度と蛍光値の間に比例する直線性はみられなかった。SYBR Green I はフコイダン標準溶液 0.125~16 ng/μl, SYBR Gold はフコイダン標準溶液 0.125~32 ng/μl の範囲で蛍光値に比例する直線性がみられた。SYBR Gold は SYBR Green I よりも検量線の範囲が広く、同じフコイダン濃度でも蛍光値が大きいことが示された。このことから、SYBR Gold はフコイダン定量に利用できる可能性が示唆された。もう一方の酸性多糖であるアルギン酸に対する SYBR Gold の反応性について調べたところ、SYBR Gold のアルギン酸に対する感度はフコイダンと比較するとかなり低いことが示された (図 2-1 B)。これより、マコンブ胞子体中のアルギン酸がフコイダン抽出画分のサンプル液に混入しても、フコイダンの定量にはほとんど影響しないと考えられる。以上のことより、フコイダンを定量するための蛍光試薬として、SYBR Gold を用いることにした。

2.3.2 フコイダン定量系で用いる緩衝液と SYBR Gold 濃度の検討

SYBR Gold を溶解する緩衝液や SYBR Gold の濃度によって、フコイダンに対する感度が異なることが考えられた。そこで、緩衝液と SYBR Gold の濃度についての条件検討を行った。フコイダン標準溶液 0.125~128 ng/μl を各 20 mM の酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.9)、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.9)、Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5, pH 8.0, pH 8.9) で作製した SYBR Gold 1250~10000 倍希釈溶液を加えたときの蛍光値を測定した (図 2-2)。この結果、どの緩衝液の溶液も一定の範囲 (0.125~32 ng/μl) で直線性を示した。SYBR Gold の濃度を 10000 倍希釈より増していくと感度も増加するが、フコイダン標準溶液 0.125~32 ng/μl の範囲では 1250 倍希釈と 2500 倍希釈溶液の間に特に差はみられなかった。ブランクの蛍光値は SYBR Gold の濃度の増加に伴ってやや高くなった。また、この範囲内で検量線を求めて全体を比較すると 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) で作製した 2500 倍希釈溶液の感度が若干高いことがわかった。20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液により作製した SYBR Gold 溶液は調製後、経日的に退色していくことが観察され、溶液の安定性に欠けていた。以上のことより、20 mM Tris-HCl pH7.5 緩衝液により作製した SYBR Gold 2500 倍希釈溶液中でフコイダンを定量するのが適当であると考えた。

2.3.3 酸性多糖抽出の洗浄に用いる有機溶媒の検討

フコイダンとアルギン酸の抽出条件の検討には、マコンブ胞子体を用いた。褐藻類のフコイダンを抽出する際には、脂肪分や色素を取り除く目的でアセトン、EtOH、クロロホルム等の有機溶媒を用いて洗浄を行う (Zvyagintseva et al., 1999; Ponce et al., 2003)。そこでアセトン、EtOH、80%EtOH、クロロホルム、*n*-ヘキサンの5種の有機溶媒を用いて、フコイダンの有機溶媒層への移行について検討を行った。アセトン、EtOH、80%EtOHでは上層にフコイダンが約50%移行していたが、クロロホルム、*n*-ヘキサンでは上清にはフコイダンが、ほとんど移行していなかった (図 2-3)。この結果より、アセトン、EtOH、80% EtOH のような極性の高い有機溶媒では、フコイダンの一部は有機溶媒中に溶解してしまうことがわかった。クロロホルムではフコイダンの溶解がみられなかったが、材質がポリプロピレンであるサンプルチューブの耐薬品性に大きく影響するため、本研究の実験系には適さないと考えた。このためフコイダンの有機溶媒への溶解がなく、サンプルチューブへの影響が少ない *n*-ヘキサンを酸性多糖抽出の洗浄の溶媒として用いることとした。

2.3.4 フコイダンの抽出条件の検討

マコンブ胞子体よりフコイダンを効率よく抽出するための溶媒、温度、時間について検討を行った。抽出溶媒には水 (Ponce et al., 2003; Zhang et al., 2015) および HCl 溶液 (Teruya et al., 2007; Synytsya et al., 2010) を用いた。抽出溶媒 0 mM HCl (超純水) を用い、4°C、2時間抽出して得られたフコイダン抽出画分の蛍光値を1として、各条件のフコイダン抽出画分の相対蛍光値を求め、比較した (図 2-4)。抽出溶媒 5~50 mM HCl を用いた場合、18°C での抽出効率が低い傾向にあった。このため、温度条件は 18°C が適当であると考えた。

各条件により得られたそれぞれのフコイダン抽出画分について PAGE、アガロースゲル電気泳動を行いバンドの位置や形状を比較した。PAGE を行った結果 (図 2-5)、抽出溶媒が 0 と 5 mM HCl、4°C と 18°C、2~24 時間抽出により得られたフコイダンの位置と形状は、ほぼ同じであることが確認された。10 mM HCl、18°C では経時的にフコイダンの位置がやや下方に広がっているのが見られた。25 と 50 mM HCl では 4°C と 18°C で経時的にフコイダンの位置が明らかに下方に移動していることが示された。同じフコイダン抽出画分についてアガロース電気泳動を行ったが、PAGE と同様の結果 (図 2-6) が得られた。フコイダンは酸や温度の影響により、硫酸基の一部が外れることや、糖鎖の特定の位置が切れるために、PAGE ではフコイダンのバンドが下方にスミアになる (Pomin et al., 2005)。したがって、PAGE やアガロースゲル電気泳動によりフコイダンが下方にも広がっている場合、フコイダンの分解が起きていることが考えられる。フコイダンの分解の程度を抑える目的では、抽出溶媒として 10 mM 以上の HCl は適していないと言える。PAGE とアガロースゲル電気泳動のフコイダンの位置や形状と、フコイダン抽出画分の相対蛍光値を測定した結果より、5 mM HCl、18°C、24 時間抽出が、最も適当であると考えられた。この

条件で分解が少ないであろうという判断は電気泳動の結果のみであり、また抽出されたフコイダンは、細胞壁を構成するその他の多糖やフロロタンニン、タンパク質等と複合体を形成している可能性も考えられる。そのため、詳細なフコイダンの精製や分子量の測定が必要である。しかし、本方法は簡便に、高収量で、比較的生体内の蓄積している状態に近いフコイダンを抽出できる方法であると考えられる。

2.3.5 フコイダンの定量系の確立

サンプル液採取時の誤差を抑えることや LOQ を低くするために、サンプル液の採取量は 150 μl とした。これに伴って蛍光試液は SYBR Gold 625 倍希釈溶液 (80 mM Tris-HCl pH7.5 溶液) を 50 μl 加えることとした。96 穴プレートの 1 穴あたりの SYBR Gold と Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) の終濃度は、それぞれ 2500 倍希釈と 20 mM になる。SYBR Gold 625 倍希釈溶液とフコイダン標準溶液を用いて、励起スペクトルと蛍光スペクトルを測定し、Ex max と Em max を確認したところ、Ex max は 470 nm 付近、Em max は 600 nm 付近であった (図 2-7 A)。また、DNA についてフコイダンと同様に操作して励起スペクトルと蛍光スペクトルを測定して比較した。DNA の Ex max は 495 nm 付近、Em max は 550 nm 付近でありフコイダンのスペクトルとは異なり、フコイダンに適した測定条件では DNA への感度は低下することがわかった。

確立した定量系で検量線を作製したところ、フコイダン 0.125~3.0 ng/ μl の範囲で直線性を示した ($r^2=0.99$) (図 2-7 B)。また、ブランク値より求めた LOQ は 0.1 ng/ μl であった。確立した定量系は、従来報告されているメチレンブルーを用いたフコイダンの定量法 (Lee et al., 2012) と比較すると十分に感度の高い方法であると考えられる。また、ELISA 法 (Mizuno et al., 2009; Tokita et al., 2010) のようにモノクロナール抗体の作製や入手を必要としないため、汎用性が高いという利点がある。

2.3.6 フコイダン抽出画分内の成分がフコイダン定量系に与える影響の確認

2.3.4 で決定したフコイダン抽出方法では、フコイダン以外にもさまざまな成分が含まれていると予想される。そこで抽出画分内の夾雑物がフコイダン定量系に与える影響を調べた。フコイダン抽出画分にフコイダン標準溶液を 0.25, 1.0, 1.5 ng/ μl になるように添加して、確立した定量系を用いて蛍光値を測定した。回収率の平均と標準偏差はそれぞれ 108.7 \pm 14%, 100.2 \pm 3.7%, 97.3 \pm 2.6% であった。添加したフコイダン標準品が 100% 近く検出されたことより、フコイダン抽出画分中の夾雑物により定量が影響されないことを確認した。

2.3.7 フコイダン抽出画分に含まれる DNA, RNA 量の確認

褐藻類のマコンブには DNA と RNA が 1.45~2.49 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW (乾燥重量) 含まれていることが報告されている (Mizuta et al., 2003)。一方、核酸の染色色素である SYBR Gold は

DNA, RNA と相互作用して蛍光を示すことが知られている (Tuma et al., 1999). このため, フコイダン抽出画分にマコンプ胞子体の DNA, RNA が混入すると定量値に影響してしまうことが考えられる. そこでフコイダン抽出画分の DNA, RNA 混入の有無を確認することにした.

フコイダン抽出画分または標準品に既知濃度の DNA, RNA を添加し, 酵素反応の有無による蛍光値の違いから, 抽出したフコイダン画分内にある内在性の DNA, RNA 量を半定量的に評価する実験をおこなった (図 2-8). DNA, RNA, 酵素を添加しないフコイダン標準品, フコイダン画分 1, フコイダン画分 2 の蛍光値をそれぞれ 1 とし, 相対蛍光値を算出した結果, DNA, RNA を添加したときの相対蛍光値はそれぞれ 1.74, 1.64, 1.72 であった. 酵素を反応させたときの相対蛍光値は, それぞれ 1.09, 1.02, 1.02 となり, DNA, RNA を添加していないフコイダン標準品やフコイダン抽出画分の相対蛍光値とほぼ同じとなった. またフコイダン標準品と抽出画分にそれぞれ酵素類を反応させても相対蛍光値にほとんど影響がなかった. これらの結果より, 本抽出方法によって得られるフコイダン画分への DNA, RNA 混入はほとんどないと考えられる.

2.3.8 5 mM HCl 抽出がアルギン酸与える影響

本研究では, フコイダンの抽出後に, 続いてアルギン酸の抽出を行うこととした. このため, フコイダンの抽出溶媒である 5 mM HCl 中でマコンプ胞子体のアルギン酸が分解されてしまうことも考えられる. そこで, 5 mM HCl にアルギン酸ナトリウム標準溶液を加えて 18°C, 24 時間置いた溶液について PAGE を行い, 用時調製したアルギン酸ナトリウム溶液のバンドと比較したところ, 泳動パターンに大きな変化は見られなかった(図 2-9). これにより, アルギン酸は 5 mM HCl 抽出によって分解されることはほとんどないことが確認された.

2.3.9 アルギン酸の抽出条件の検討

褐藻類のアルギン酸抽出法 (Torres et al., 2007; Zubia et al., 2008; Fenoradosoa et al., 2010) には 1 または 2% Na₂CO₃ を抽出溶媒として用い, 抽出温度 25~100°C, 抽出時間 3~12 時間と様々な抽出条件が設定されている. 本研究ではフコイダンと同様に, 抽出による分解の程度が少ない状態のアルギン酸の抽出を目指して抽出条件の検討を行った.

実験材料としてマコンプ胞子体を用いて, アルギン酸抽出の温度と時間について検討を行った. 抽出溶媒には 1% Na₂CO₃ を用いた (Zubia et al., 2008). 40°C と 60°C, 2~16 時間により得られたアルギン酸抽出画分について, カルバゾール硫酸法により吸光度を測定した. これらの吸光度を, 使用した胞子体の量で補正した値について比較したところ, 最も値の高かった抽出条件は 60°C, 4 時間抽出 (吸光度 0.16 mg⁻¹), 次いで 40°C, 16 時間抽出 (吸光度 0.15 mg⁻¹) であった (図 2-10).

次に、各条件により得られたアルギン酸抽出画分について、PAGE を行いバンドの位置や形状を比較した(図 2-11)。60°C で抽出したアルギン酸抽出画分は、経時的にスミアなバンドの位置がやや下方に広がっているのが確認された。抽出温度を 60°C に上げることで経時的にアルギン酸の一部が分解している可能性が考えられる。図 2-11 でアルギン酸の抽出効率のよかった 60°C, 4 時間抽出と 40°C, 16 時間抽出では後者の方が、アルギン酸の泳動パターンが下方に広がっておらず、分解が少ないと考えられるため、1% Na₂CO₃ を用いたアルギン酸抽出は 40°C, 16 時間が適当であると考えられる。

2.3.10 カルバゾール硫酸法におけるアルギン酸検量線の作製と 1% Na₂CO₃ の影響

カルバゾール硫酸法においてアルギン酸の検量線を作製したところ、アルギン酸ナトリウム標準溶液 10~1000 µg/ml の範囲で直線性を示した ($r^2=0.99$) (図 2-12 A)。ブランク値より求めた LOQ は 10 µg/ml であった。この検量線の範囲と LOQ は、孢子体や配偶体中のアルギン酸の解析を行うには充分であった。

1% Na₂CO₃ を用いて作製したアルギン酸ナトリウム 10~1000 µg/ml についても検量線を作製したところ、検量線の傾きはほぼ一致した (図 2-12 B)。このため、1% Na₂CO₃ 抽出液や 1% Na₂CO₃ 抽出液の希釈液をカルバゾール硫酸法によるアルギン酸の定量に用いても、特に問題はないと考えられる。

2.3.11 フコイダンとマンニトールがアルギン酸の定量系に与える影響の検証

マコンブ孢子体にはフコイダン、アルギン酸等の酸性多糖の他に、マンニトールが 10~20% (乾燥重量) 含まれている (Shao et al., 2014)。そこで、10 µg/ml フコイダン標準溶液および 1000 µg/ml マンニトールについて、カルバゾール硫酸法に従って吸光度を測定し、ブランクの値と比較した。フコイダン、マンニトールおよびブランクの吸光度はいずれも 0.04 であったため、フコイダンとマンニトールはアルギン酸の定量に影響しないことがわかった。マコンブ孢子体を用いた抽出では、5 mM HCl によるフコイダン抽出過程を経て、アルギン酸抽出を行う。そのためアルギン酸抽出画分にはほとんどフコイダンは残っていないと考えられ、アルギン酸の定量には影響しないといえる。また、マンニトールも 5 mM HCl に可溶であるためアルギン酸抽出画分には含まれないと考えられる。

2.3.12 アルギン酸抽出画分の成分がアルギン酸定量系に与える影響の確認

2.3.9 で決定したマコンブ孢子体からのアルギン酸抽出方法では、アルギン酸以外にもさまざまな成分が含まれていると予想される。そこで抽出画分内の夾雑物がカルバゾール硫酸法によるアルギン酸定量系に与える影響を調べた。

アルギン酸抽出画分にアルギン酸ナトリウム標準溶液を 50, 200, 500 µg/ml になるように添加して、カルバゾール硫酸法に従って操作し定量を行った。回収率の平均と標準偏差はそれぞれ 82.7±16.2%, 90.1±6.7%, 92.2±7.9% であった。添加したアルギン酸の回収率

は良好であったため、アルギン酸抽出画分中の夾雑物により定量は影響されないことを確認した。

以上の結果より、本研究のアルギン酸の定量法として、Mayら（1994）のカルバゾール硫酸法は適当であることが確認された。従来法（Bitter and Muir, 1962）と比較すると、使用する硫酸量が少なく、1.5 ml のサンプルチューブ内で調製することができる。カルバゾール硫酸はウロン酸と反応することにより発色する。このため、アルギン酸の構成糖であるグルクロン酸（G）やマンヌロン酸（M）以外にもガラクトツロン酸と反応して発色する（Knutson and Jeanes, 1968; Filisetti-Cozzi and Carpita, 1991）。これらの発色の程度は必ずしも同一ではないため、定量値はアルギン酸を構成する M/G 比やガラクトツロン酸の存在により影響されることが考えられる。しかし、カルバゾール硫酸法は簡便な操作で定量が出来ることが利点であり、配偶体の野生株や突然変異株中のアルギン酸量を比較するために有用であると言えるだろう。

2.4 表, 図

表 2-1 各染色液の蛍光測定条件

染色液		最大励起波長 (nm)	最大蛍光波長 (nm)
SYBR Gold	5000 倍希釈	470	600
SYBR Green I	5000 倍希釈	460	610
Midori Green	5000 倍希釈	490	530
EtBr	20 µg/ml	480	630
TBO	1 µg/ml	630	660

表 2-2 フコイダン画分に含まれる DNA, RNA を確認するための各溶液

	ブランク (μl)	フコイダン画分 (μl)	フコイダン画分 +DNA, RNA (μl)	フコイダン画分 +DNA, RNA + 酵素 (μl)
胞子体フコイダン画分 (2倍希釈)	—	55	55	55
4.8 mM NaCl	55	—	—	—
10 × DNase 緩衝液	10	10	10	10
DNA (plasmid 23 ng/ μl)	—	—	10	10
Total RNA (イネ由来 50 ng/ μl)	—	—	10	10
DNase I (1 unit/ μl)	—	—	—	2
RNase A (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	—	—	—	10
TE 緩衝液 pH7.5	30	30	10	—
超純水	5	5	5	3
Total	100	100	100	100

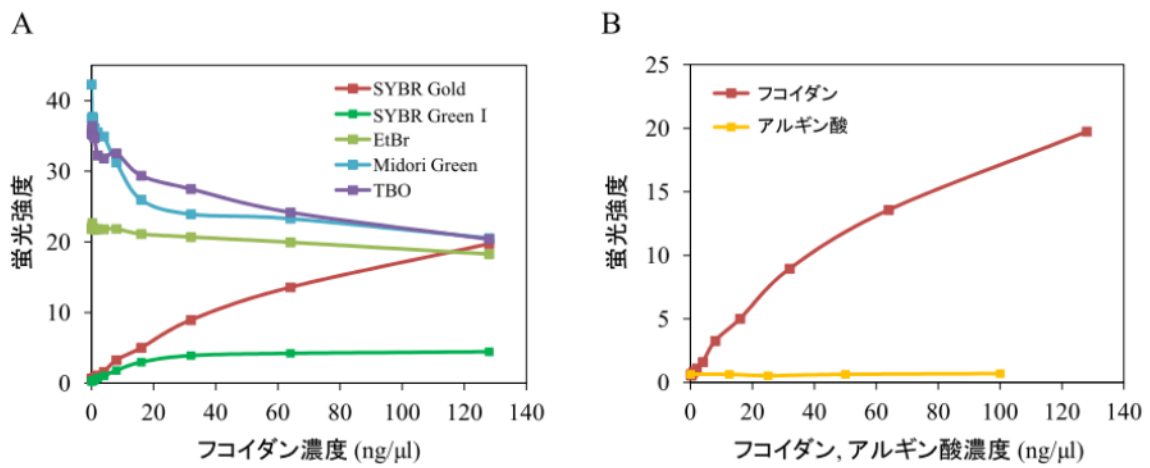


図 2-1 フコイダン定量系で用いる蛍光試薬の検討

(A) フコイダン標準溶液 0.125~128 ng/μl に各蛍光試薬溶液を加えたときの蛍光強度. (B) アルギン酸ナトリウム 12.5~200 ng/μl とフコイダン 0.125~128 ng/μl に SYBR Gold 溶液を加えたときの蛍光強度.

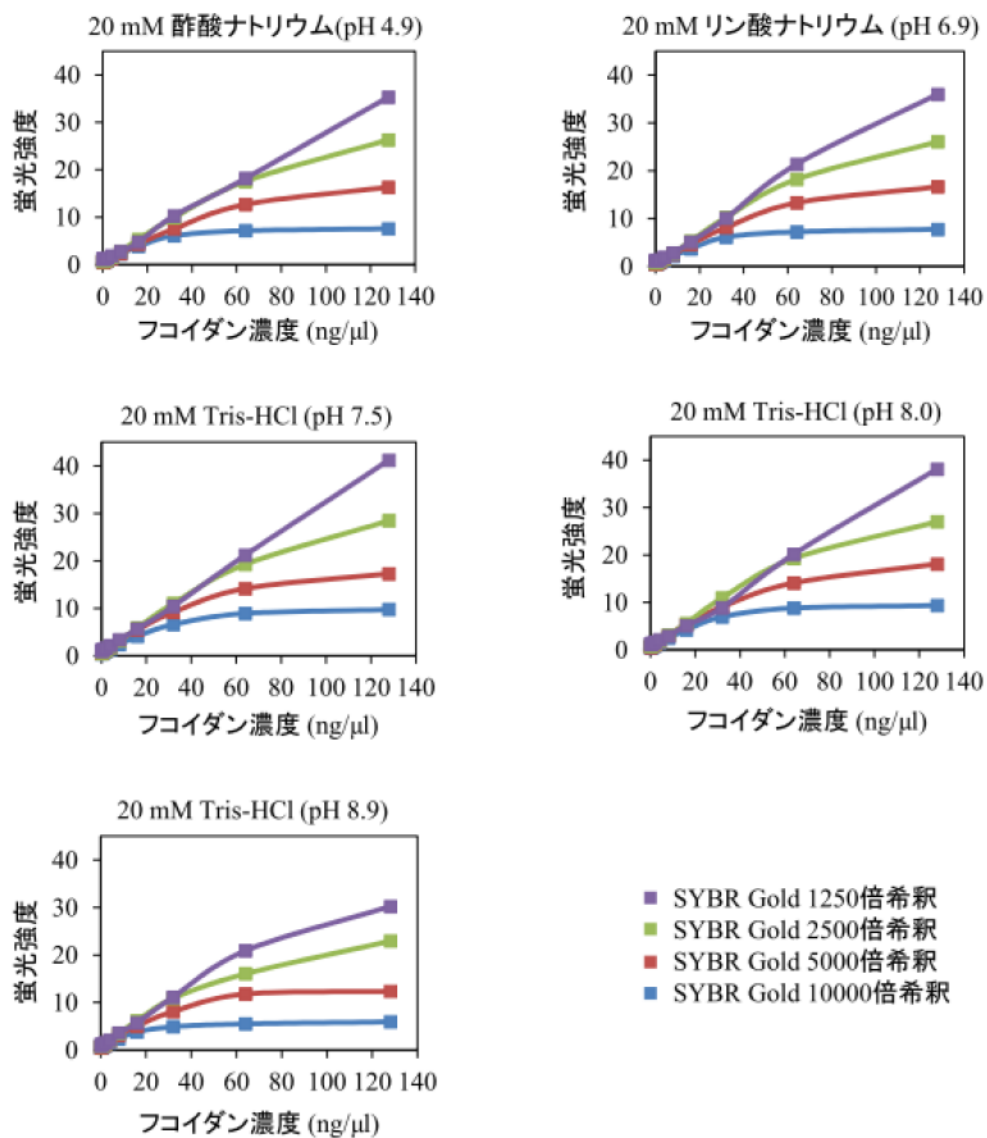


図 2-2 フコイタン定量系で用いる SYBR Gold 濃度と緩衝液の検討

フコイタン標準溶液 0.125~128 ng/μl を各 20 mM 緩衝液中で SYBR Gold と反応させて蛍光強度を測定した。また SYBR Gold は 1250~10000 倍希釈を用いた。

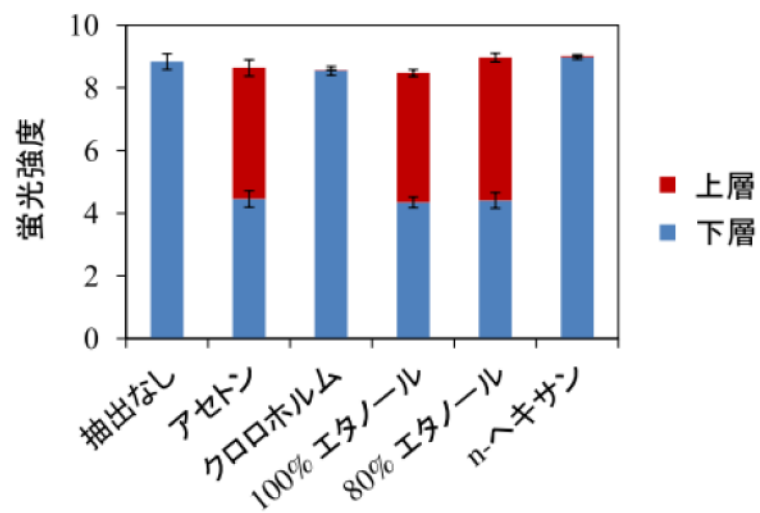


図 2-3 フコイダン抽出の洗浄に用いる有機溶媒の検討

フコイダン標準溶液にアセトン、クロロホルム、100%エタノール、80%エタノール、n-ヘキサンを添加し抽出後、それぞれ上層と下層に含まれるフコイダンの蛍光強度を測定した。有機溶媒を添加しない抽出なしのフコイダンについても同様に測定した。

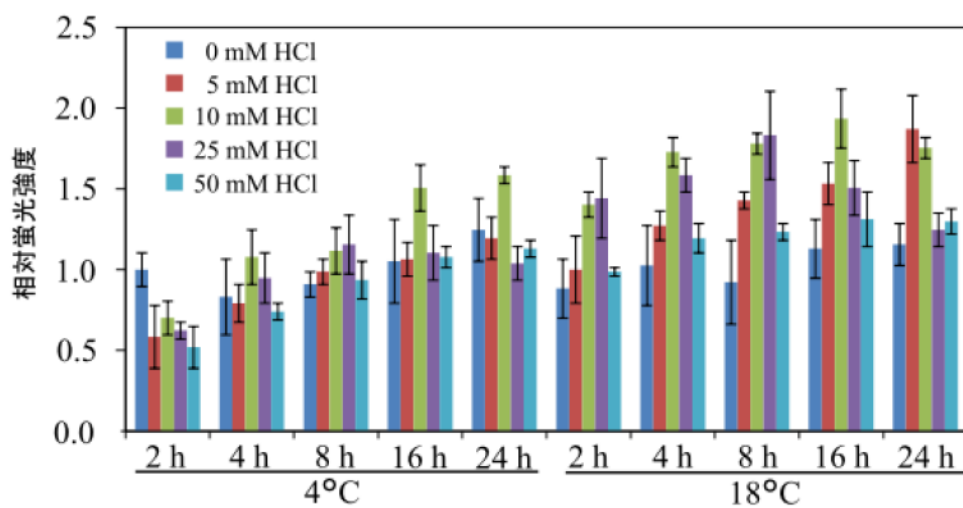


図 2-4 マコンブ胞子体からのフコイダン抽出条件の検討

マコンブ配偶体からフコイダンを抽出するために HCl 濃度, 抽出温度, 抽出時間を検討し, 各抽出画分のフコイダン蛍光を測定した. 各データは平均±標準偏差を示した (n=3).

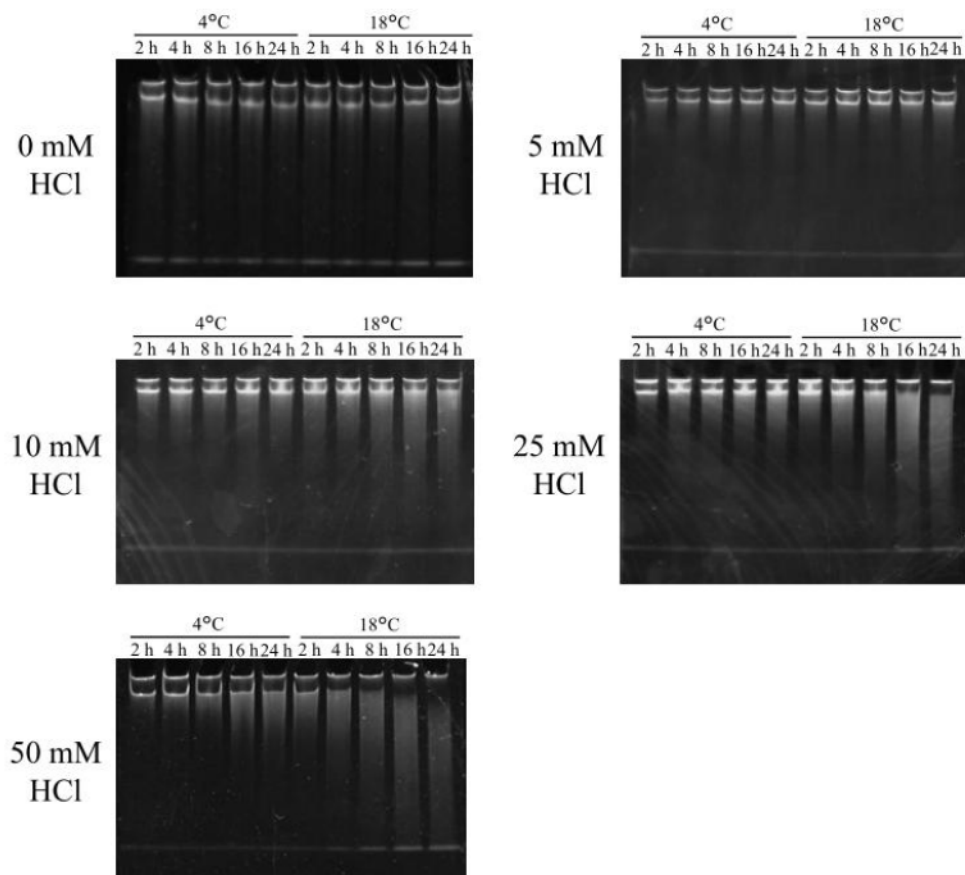


図 2-5 マコンブ胞子体から抽出したフコイダン抽出画分の PAGE

HCl 濃度，抽出温度，抽出時間を検討したマコンブ胞子体のフコイダン抽出画分で PAGE を行い，SYBR Gold で染色後，UV トランスイルミネーターで検出した。

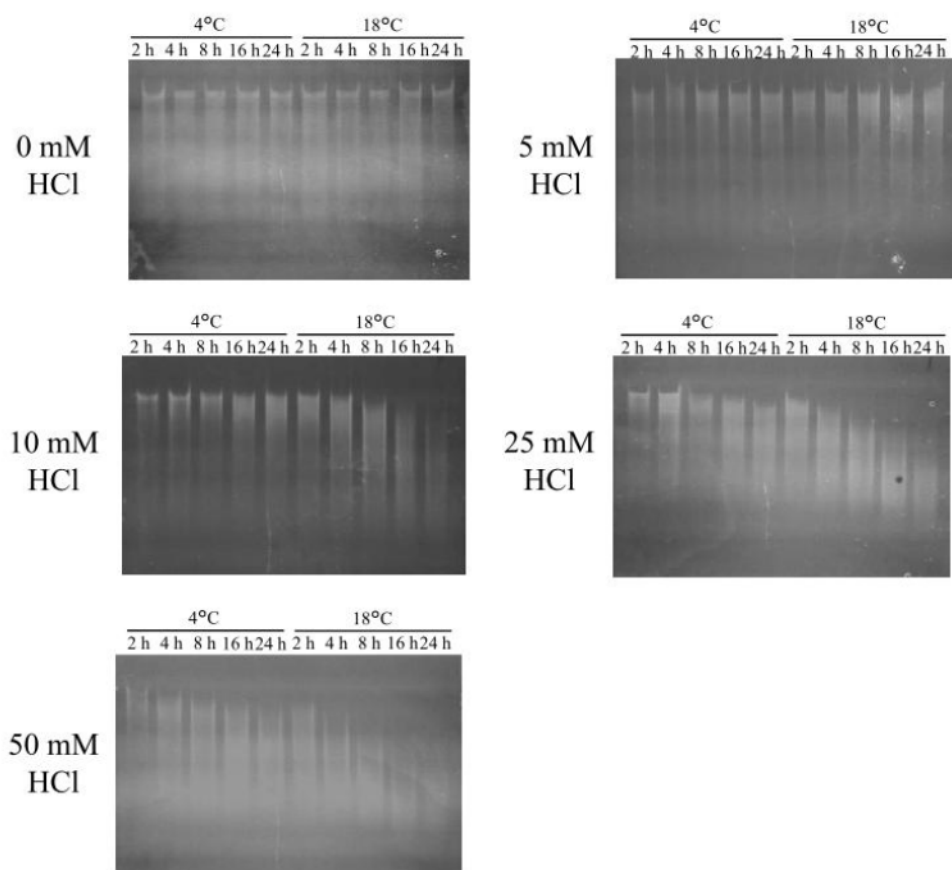


図 2-6 マコンブ胞子体から抽出したフコイダン抽出画分のアガロースゲル電気泳動
HCl 濃度，抽出温度，抽出時間を検討したマコンブ胞子体のフコイダン抽出画分でアガロースゲル電気泳動を行い，SYBR Gold で染色後，UV トランスイルミネーターで検出した。

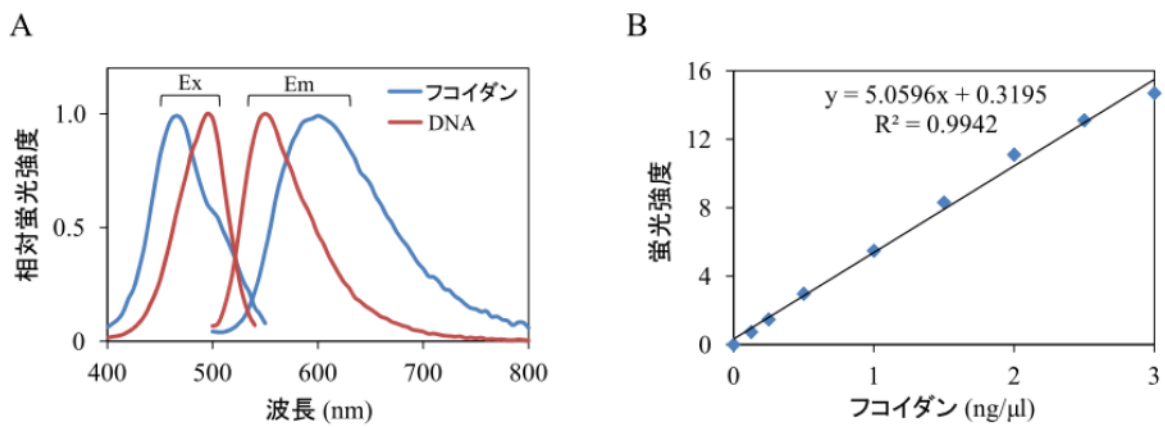


図 2-7 フコイタン定量系における SYBR Gold 蛍光スペクトルと検量線

(A) フコイタンと DNA の励起波長スペクトルと蛍光波長スペクトル. (B) フコイタン標準溶液と SYBR Gold を混合し、蛍光測定により作製した検量線. Ex 470 nm, Em 600 nm.

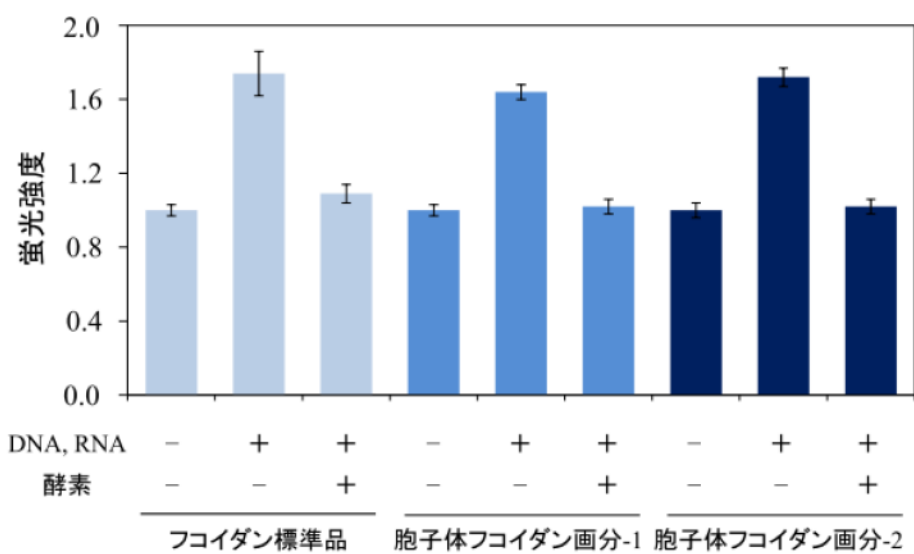


図 2-8 フコイダン抽出画分内の残留 DNA, RNA 量の評価

フコイダン標準品と胞子体から抽出したフコイダン抽出画分に既知量の DNA, RNA を添加した場合, 酵素 (DNase, RNase) を添加した場合のそれぞれの溶液を SYBR Gold を用いた定量系を用いて蛍光強度を測定した. 各データは平均±標準偏差を示した (n=8).

アルギン酸
無処理

アルギン酸
5 mM HCl, 18°C,
24時間処理

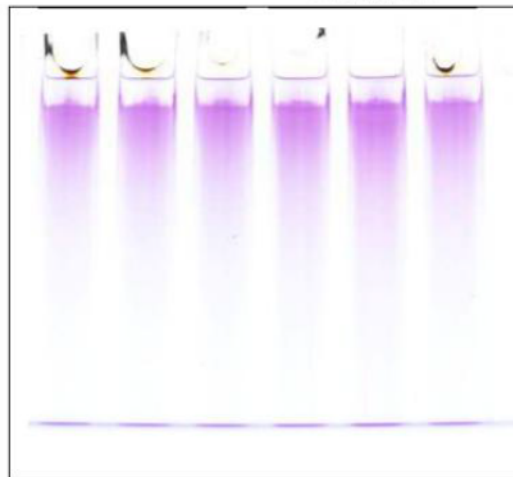


図 2-9 アルギン酸の PAGE

アルギン酸標準溶液と、5 mM HCl で 18°C, 24 時間処理したアルギン酸標準溶液について PAGE を行い、TBO 染色を行った (n=3).

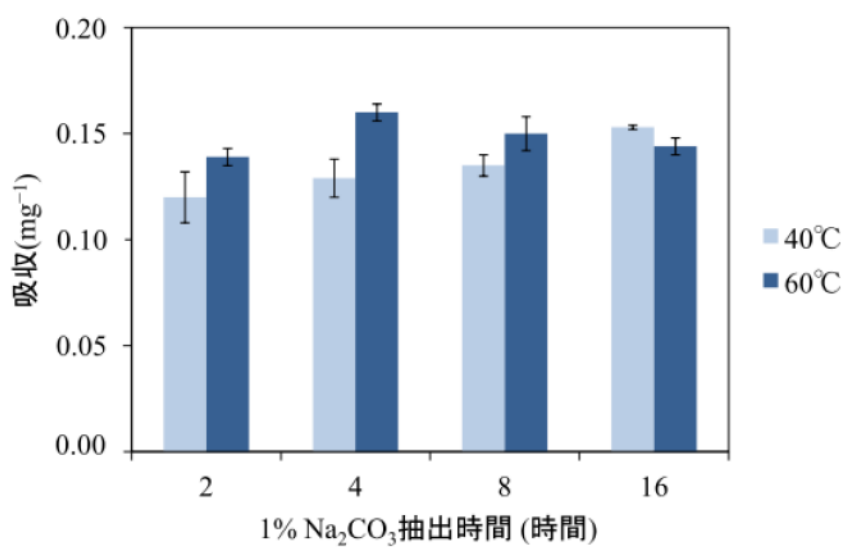


図 2-10 マコンブ孢子体からのアルギン酸抽出の条件検討

フコイダン抽出を終えたマコンブ孢子体を用いて1% Na₂CO₃によるアルギン酸抽出時の温度と抽出時間の検討を行った。カルバゾール硫酸法によりアルギン酸の吸光度を測定した。吸光度は使用した孢子体の湿重量で補正した。データは平均±標準偏差を示した (n=3)。

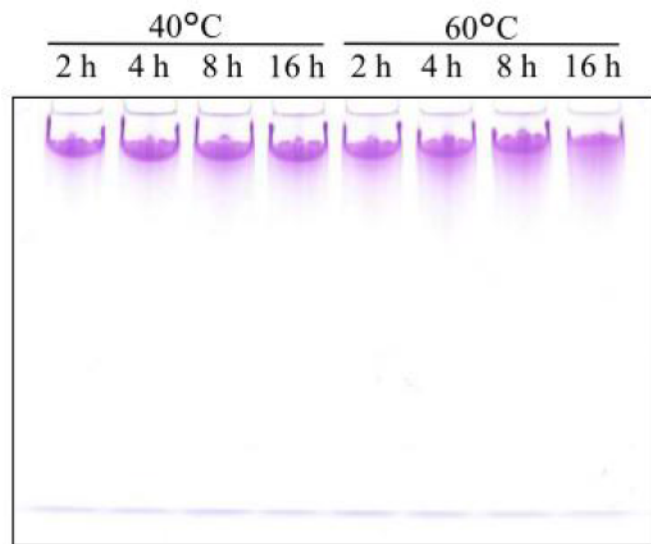


図 2-11 PAGE によるアルギン酸抽出条件の検討

図 2-10 と同条件で抽出したマコンブ胞子体の PAGE を行い，TBO で染色した．

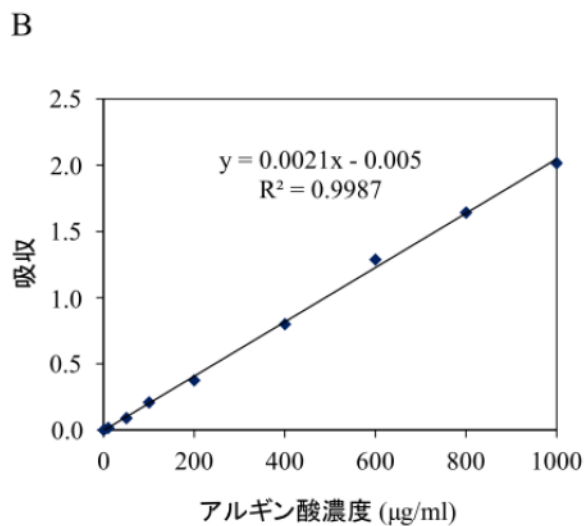
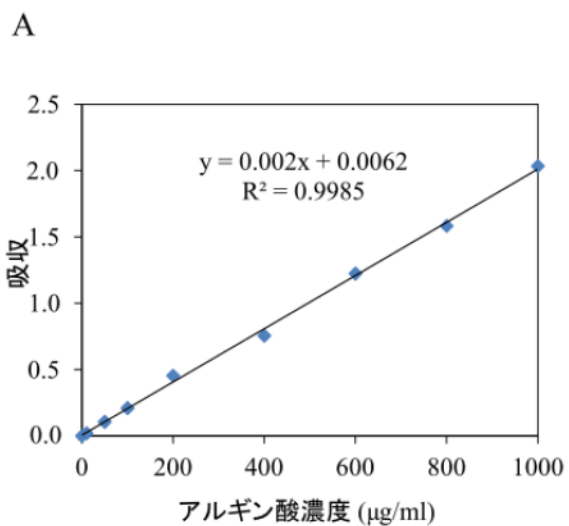


図 2-12 カルバゾール硫酸法によるアルギン酸の検量線と 1% Na_2CO_3 の影響
超純水で調製したアルギン酸標準溶液 (A) と 1% Na_2CO_3 で調製したアルギン酸標準溶液 (B) の検量線.

第三章

細胞壁酸性多糖に関する突然変異株の解析

3.1 序論

本章では、突然変異株 4 株 (AP-M1, AP-F1, AP-F2, AP-F3) のアルギン酸とフコイダンの蓄積に関する解析を行った。第一章で、これらの突然変異株は、TBO 染色により配偶体細胞と比較して強い蛍光を示したが、この TBO 由来の蛍光が何によるものかを明確にする必要がある。このために、雌雄配偶体と突然変異株よりフコイタン抽出画分とアルギン酸抽出画分の調製を行った。抽出は第二章で確立した抽出方法に従った。フコイタン抽出画分については、第二章で新たに確立した SYBR Gold によるフコイダンの定量系を用いて解析を行った。アルギン酸抽出画分については、カルバゾール硫酸法による定量と電気泳動を用いて解析を行った。また、突然変異株を顕微鏡により観察して、雌雄配偶体と形態の比較を行った。さらに、突然変異株のクロロフィル蛍光を測定することにより、増殖曲線を求め、雌雄配偶体の増殖と比較した。これらの結果より、本研究により得られた突然変異株の評価を行った。

3.2 材料と方法

3.2.1 実験材料

実験には無菌状態のマコンブの雌雄配偶体の野生株と、突然変異株の AP-M1, AP-F1, AP-F2, AP-F3 を用いた。無菌的に通気ができるように作製されたポリプロピレン性の培養容器中に人工海水 ASP 約 200 ml を注ぎ、この中にカミソリで細切した無菌株を入れた。この容器を 18°C, 短日条件 (明 10 時間, 暗 12 時間), 光の強さ 30~40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に設定した人工気象器 MIR-553 (SANYO) 内に置いて培養を行った。容器内の ASP 培地は 1~2 カ月ごとに交換した。

3.2.2 12 穴プレートを用いた培養

野生株と AP-M1, AP-F1, AP-F2, AP-F3 の細胞塊約 0.1 g (湿重量) をそれぞれ別のガラスシャーレに採り、カミソリで細切した。ASP 1 ml を加えて細切した細胞を懸濁させた後、30 μm のナイロンフィルターに通した。12 穴プレートの各ウェルに ASP 3 ml を注いだ後、このフィルターに通した液を 2~4 滴、滴下した。この 12 穴プレートを、人工気象器内に置いて培養を行った。

3.2.3 顕微鏡による突然変異株の形態の観察

「3.2.2 12 穴プレートを用いた培養」に従って作製したプレートを人工気象器内で 15~20 日間培養した。このプレート内の野生株と AP-M1, AP-F1, AP-F2, AP-F3 の細胞を顕微鏡により明視野観察した。

3.2.4 配偶体のクロロフィル蛍光測定による増幅曲線の作成

「3.2.2 12 穴プレートを用いた培養」に従って培養した野生株と AP-M1, AP-F1, AP-F2, AP-F3 の細胞塊のクロロフィル蛍光を、蛍光スキャナーにより経日的に測定した ($n=3$)。バックグラウンドとして ASP 3 ml を入れたウェルの蛍光値 ($n=3$) を、それぞれの細胞塊のクロロフィル蛍光の値より差し引いて補正した。プレート作製後、1 日目のクロロフィル蛍光値を 1 として 3 日目以降のクロロフィル蛍光値と比較して増殖曲線を求めた。培養 20 日目にクロロフィル蛍光を測定した後、プレートの各ウェルの ASP を取り除き、新たに ASP 3 ml を加えて培養を続け、クロロフィル蛍光の測定を 40 日目まで続けた。蛍光スキャナーの測定条件は次のとおりである: laser, Green 532 nm; filter, 670BP30; PMT, 400 V; pixel size, 200 microns; focal plane, +3 mm.

3.2.5 フコイダン抽出画分とアルギン酸抽出画分の調製

培養日数 14 日の野生株と AP-M1, AP-F1, AP-F2, AP-F3 の細胞塊を培養容器より取り出し、各シャーレ上に採取した。この細胞塊を 30 μm のナイロンフィルター上に集めて水で軽く洗った。細胞塊に付着した水分はろ紙片を用いて吸い取った。あらかじめ重さを

測った 2 ml チューブに細胞塊約 100 mg (湿重量) を採り (n=3), -80°C 中で凍結させた。減圧乾燥器 VC-36N (TAITEC) を用いて, 減圧下, 一夜置いて各チューブ内の細胞塊を乾燥させた。乾燥の始めの 1 時間は, 減圧乾燥器内を冷却水循環装置 CCA-1111 (東京理化学器械) により-10°C に冷却した。乾燥後, チューブ内の細胞塊の重さを求めた。チューブに 5 mm のステンレスビーズを 1 個入れて, -80°C 中で 30 分間インキュベートした後, 細胞破砕器 TissueLyser LT (QIAGEN) を用いて破砕 (50 Hz, 1 分間) した。チューブ内の破砕物をスピンドウンさせた後, 「2.2.7 フコイダンの抽出方法」に従って抽出を行いフコイタン抽出画分を調製した。n-ヘキサンによる洗浄操作は 2 回繰り返した。

次に, 「2.2.13 アルギン酸の抽出条件の検討」に従って抽出を行いアルギン酸抽出画分を調製した。

3.2.6 フコイダンの定量

「3.2.5 フコイタン抽出画分とアルギン酸抽出画分の調製」に従って得られたフコイタン抽出画分 19.5 μ l に 1 unit/ μ l DNase I (Deoxyribonuclease RT Grade, ニッポンジーン) 0.5 μ l, 1 μ g/ μ l RNase A (リボヌクレアーゼ A, ナカライテスク) 2.5 μ l, 10 \times DNase buffer (10 \times DNase RT Grade Buffer II, ニッポンジーン) 2.5 μ l を加えて 37°C, 3 時間反応させ酵素分解を行った。これに 4.88 mM NaCl 125 μ l を加えて全量を 96 穴プレートの 1 穴に移した。4.88 mM NaCl 19.5 μ l をブランクとして「2.2.8 フコイダンの定量方法」に従って蛍光値を測定し, 乾燥重量 (DW)あたりのフコイタン含量を算出した (n=6)。

3.2.7 アルギン酸の定量

「3.2.5 フコイタン抽出画分とアルギン酸抽出画分の調製」に従って得られたアルギン酸抽出画分について「2.2.14 カルバゾール硫酸法によるアルギン酸の定量」に従って定量を行い, 乾燥重量 (DW) あたりのアルギン酸含量を算出した (n=6)。

3.2.8 アルギン酸抽出画分の電気泳動

アルギン酸抽出画分について「2.2.16 アルギン酸抽出画分の電気泳動」に従って PAGE を行った。

3.3 結果と考察

3.3.1 突然変異株の培養容器中での生育の観察

野生株と AP-M1, AP-F1, AP-F2, AP-F3 それぞれの細胞塊を細切後、培養容器中で約 4 カ月培養して、それぞれの生育の状態を目視で観察した (図 3-1). 野生株 (雄性) と AP-M1 の細胞塊では、生育の状態に違いは見られなかった. AP-F1 は培養容器に細胞塊の一部が付着する傾向にあった. AP-F2 と AP-F3 の細胞塊では、AP-F1 の細胞塊のような培養容器への付着は見られなかった.

3.3.2 顕微鏡による突然変異株の形態の明視野観察

12 穴プレート内の野生株と AP-M1, AP-F1, AP-F2, AP-F3 の細胞を顕微鏡により明視野観察を行い形態を比較した (図 3-2, 図 3-3). AP-M1 は野生株 (雄性) と比較すると、分枝が多く観察された. AP-F1 は野生株 (雌性) と比較して形態には特に大きな変化は見られなかったが、野生株 (雌性) や AP-F2, AP-F3 と比較すると、細胞が 12 穴プレートの底面に付着して広がる傾向にあった. AP-F2 と AP-F3 は野生株と比較して、放射状に広がりにくい形態を示した.

3.3.3 突然変異株の細胞増殖速度の比較

クロロフィル蛍光の増加を細胞増殖の指標として、増殖曲線を作成した. 野生株をコントロールとして AP-M1, AP-F1, AP-F2, AP-F3 を 12 穴プレート中で培養し経日的にクロロフィル蛍光を測定した (図 3-4). 野生株 (雄性) と AP-M1 に関しては培養日数 15~25 日目は AP-M1 の方が増殖は早かったが、その後 40 日目までは野生株 (雄性) とほぼ同じ増殖の傾向を示した. 野生株 (雌性), AP-F1, AP-F3 は同程度の増殖速度を示し、AP-F2 は最も増殖が遅いことが分かった. これまでの実験から AP-F1 は野生株と比較して接着程度に違いが示されているが、この形質は生育には影響していないと考えられる. また、AP-F2 については 40 日目まで増殖が野生株 (雌性) より遅いことから、これは何らかの原因で細胞の増殖に負担がかかっていることが考えられる.

3.3.4 突然変異株のフコイダン含量の定量

突然変異株が蓄積しているフコイダン含量を定量するにあたり、核酸の混入による定量の阻害を防ぐために、DNase と RNase による DNA, RNA の分解を行った後、SYBR Gold によるフコイダンの定量を行った.

野生株と AP-M1, AP-F1, AP-F2, AP-F3 それぞれのフコイダン抽出画分についてフコイダンの含量を求めた. 突然変異株の中には野生株よりもフコイダン含量が高い傾向を示した系統もあったが、採取した細胞塊によってフコイダン含量にばらつきが大きく野生株と有意な差は観察されなかった. フコイダン蓄積に変化があるかどうかを明確にするためには、それぞれの系統において細胞塊が均一なフコイダン含量を示すような培養条件など

の検討を行い、慎重にフコイダン蓄積を解析する必要がある。

3.3.5 突然変異株のアルギン酸含量の定量

野生株と突然変異株のアルギン酸抽出画分について、カルバゾール硫酸法によりアルギン酸の蓄積量を求めた（図 3-5A）。野生株（雄性）と AP-M1 のアルギン酸蓄積量は、ほとんど同程度であることがわかった。よって AP-M1 についてはアルギン酸の蓄積量に関する突然変異株ではないことが示唆された。

野生株（雌性）のアルギン酸蓄積量に対して AP-F1, AP-F2, AP-F3 での蓄積量は高くなる傾向があった。特に AP-F1 のアルギン酸蓄積量については野生株と比較して 3 割程度高かったことからアルギン酸蓄積量に関わる突然変異株であることが示された。

3.3.6 アルギン酸抽出画分の電気泳動

野生株と突然変異株のアルギン酸抽出画分について PAGE を行った（図 3-5B）。野生株（雄性）と AP-M1 の泳動パターンを比較すると、AP-M1 の TBO 染色されたバンドの色調はやや薄かったが大きな差は見られなかった。

野生株（雌性）と AP-F2, AP-F3 の泳動パターンを比較すると、バンドの位置には大きな変化が見られなかったが、AP-F2 と AP-F3 は野生株（雌性）よりもややスミアなバンドであった。また、野生株（雌性）と AP-F1 の泳動パターンを比較すると、AP-F1 ではスミアなバンドが下方に広がっていた。これら AP-F1, AP-F2, AP-F3 のバンドの形状の変化から、アルギン酸の平均分子量が減少したことなどが考えられる。AP-F1, AP-F2, AP-F3 はアルギン酸蓄積量が野生株（雌性）と比較して多くなったことや、電気泳動のバンドの状態が変化したことより、アルギン酸の蓄積量やアルギン酸の構造に関する突然変異株であると考えられる。また AP-F1 については、容器に付着する傾向とアルギン酸の蓄積との関係や、アルギン酸の構造の詳細等について調べる必要がある。

3-4 図

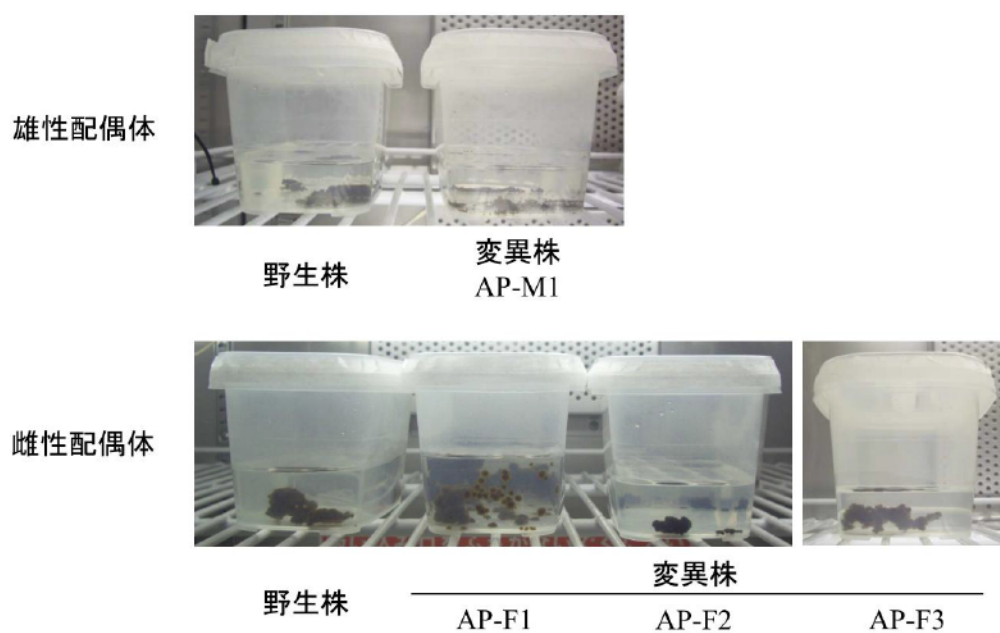
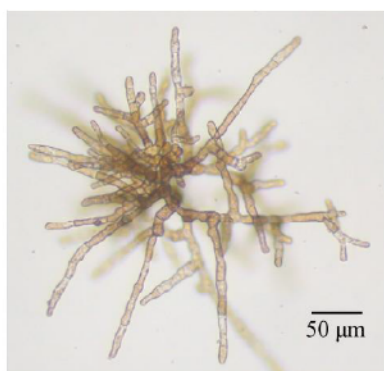


図 3-1 野生株と突然変異株の培養

雌雄配偶体の野生株と AP-M1, AP-F1, AP-F2, AP-F3 のそれぞれの細胞塊を細切後, 培養容器中で約 4 カ月培養した.

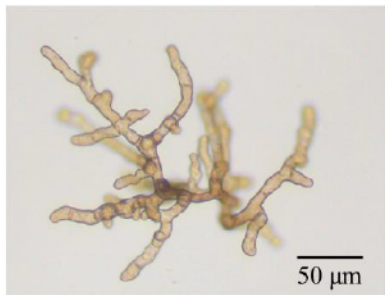


野生株



変異株
AP-M1

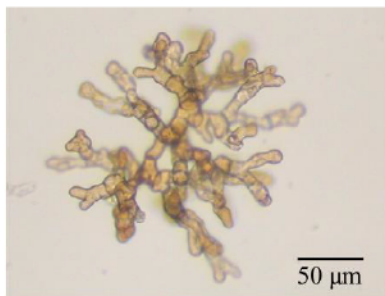
図 3-2 雄性配偶体の野生株と AP-M1 の明視野顕微鏡観察
細切後, 30 μm のフィルターに通して 20 日間培養した野生株と AP-M1 の写真.



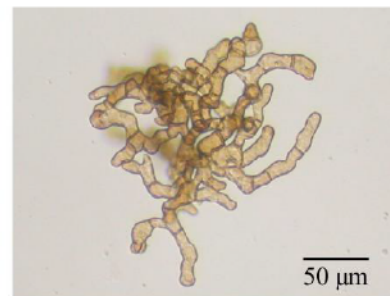
野生株



変異株
AP-F1



変異株
AP-F2



変異株
AP-F3

図 3-3 雌性配偶体の野生株と AP-F1, AP-F2, AP-F3 の明視野顕微鏡観察
細切後, 30 μm のフィルターに通して 15 日間培養した野生株と AP-F1, AP-F2, AP-F3
の写真.

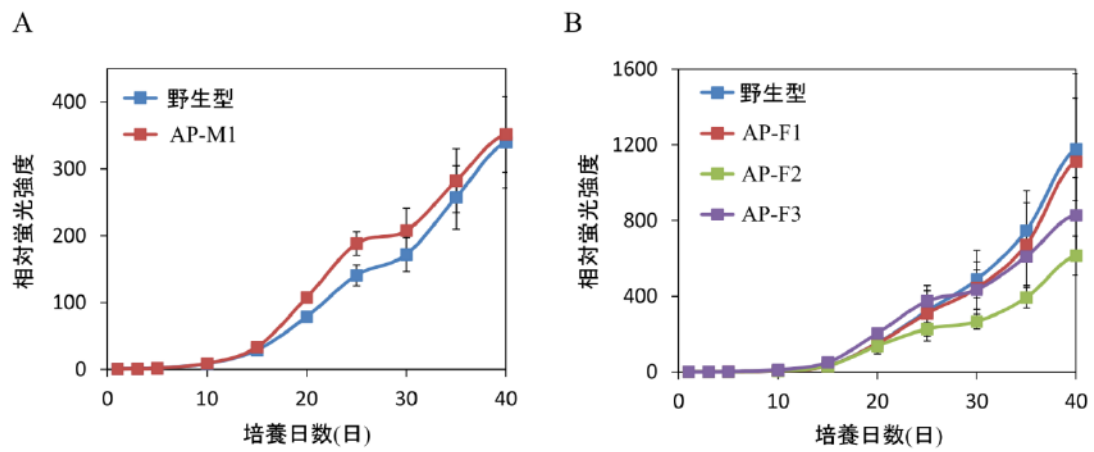


図 3-4 クロロフィル蛍光の相対値を用いた野生株と突然変異株の増殖曲線
 (A) 野生型 (雄性) と AP-M1 の増殖曲線 (n=3). (B) 野生型 (雌性) と AP-F1, AP-F2, AP-F3 の増殖曲線

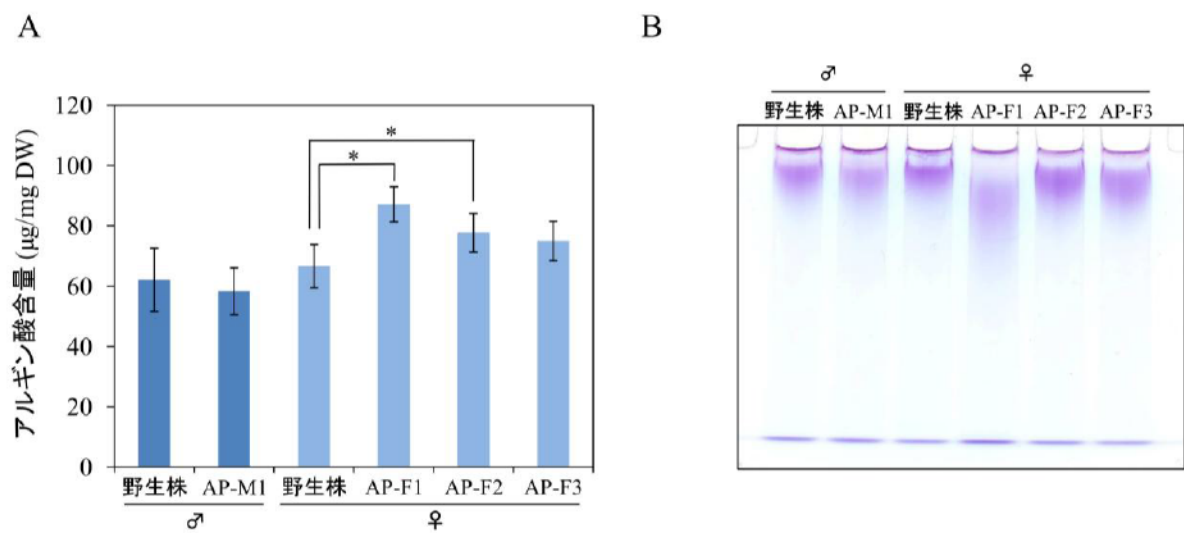


図 3-5 雌雄配偶体の野生型と突然変異株のアルギン酸の比較

(A) 野生株と突然変異株からアルギン酸の抽出を行い、乾燥重量あたりのアルギン酸含量を定量した (n=6, *P < 0.05, Student's t-test). (B) 各系統から抽出したアルギン酸について PAGE を行い、TBO 染色した。

総括

褐藻類にはアルギン酸、フコイダン等の細胞壁酸性多糖が多く含まれており、それらは様々な生理活性をもつことが知られている。本研究ではマコンブ配偶体をモデルとし、アルギン酸やフコイダンの生合成機構や生理的役割に関する知見を得るために突然変異株を作製し、解析を行うことを目的とした。変異原処理したマコンブ配偶体細胞について酸性多糖を染色する TBO 染色をおこない、蛍光スキャナーを用いて蛍光強度を半定量的に評価する方法を確立した。この方法を用いてスクリーニングを行い、変異原処理した配偶体細胞のなかから酸性多糖を多く蓄積するマコンブの突然変異株の単離をめざした。一次スクリーニングで観察した細胞塊の総数 10 万個以上より、単離とスクリーニングを繰り返した結果、TBO 染色で強い蛍光を示す突然変異株が 4 株得られ、それぞれ AP-M1, AP-F1, AP-F2, AP-F3 と命名した。

これらの突然変異株については、酸性多糖の蓄積に関わる変異株であることを確認する必要があるため、アルギン酸とフコイダンの抽出定量方法の検討を行った。本研究ではマコンブからの酸性多糖の抽出方法として、まず試料を有機溶媒で洗浄し、HCl によるフコイダン抽出後、残渣から Na_2CO_3 によるアルギン酸抽出を行うこととした。フコイダンの定量については SYBR Gold を用いた定量系を新たに確立した。この定量系は従来の ELISA 法 (Mizuno et al., 2009) のようにモノクロナール抗体の調製を必要としないことから、より汎用性が高い方法であると言えるだろう。さらにフコイダンの検出の感度も高く、少量の胞子体や配偶体から抽出したフコイダン画分を用いた解析でも、利用可能であると考えられる。アルギン酸の定量についてはカルバゾール硫酸法 (May and Chakrabarty, 1994) による定量が本研究での解析に適していることが確認された。

決定したフコイダンとアルギン酸の抽出定量法を用いて変異株の解析を行った。野生株と AP-M1, AP-F1, AP-F2, AP-F3 それぞれのフコイダン抽出画分についてフコイダンの含量を求めた。突然変異株の中には野生株よりもフコイダン含量が高い傾向を示した系統もあったが、採取した細胞塊によってフコイダン含量にばらつきが大きく野生株と有意な差は観察されなかった。フコイダン蓄積に変化があることを明確にするためには、培養条件の検討等を行ったうえで慎重にフコイダン蓄積を解析する必要がある。AP-F1, AP-F2, AP-F3 はアルギン酸の定量結果や電気泳動の結果より、アルギン酸の蓄積や構造に関する突然変異株であることが示された。明視野顕微鏡観察により、突然変異株では野生型と異なる細胞形態が観察されたことから、細胞形態と細胞壁酸性多糖との関連が示唆された。

以上の結果より、本研究により確立した細胞壁酸性多糖に関する突然変異株の単離法が有効であることが示され、今後のアルギン酸やフコイダンの生合成機構や生理的役割の解明に役立つ突然変異株を単離することができた。

謝辞

本研究の遂行と博士論文の執筆にあたり，横浜国立大学大学院環境情報学府 中村達夫准教授には，終始熱心な御指導，御鞭撻を頂きました。ここに深謝の意を表します。

有益な御助言と御指導を賜りました横浜国立大学環境情報学府の平塚和之教授，松本真哉教授，尾形信一准教授，本田清准教授に感謝申し上げます。

中村達夫研究室の中村祐子博士研究員ならびに学生の方々に，多大なる御協力を頂きました。ここに感謝の意を表します。

引用文献

- Aquino RS, Landeira-Fernandez AM, Valente AP, Andrade LR, Mourão PAS** (2005) Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. *Glycobiology* **15**: 11–20
- Aquino RS, Grativol C, Mourão PAS** (2011) Rising from the sea: correlations between sulfated polysaccharides and salinity in plants. *PLoS ONE* **6**: e18862
- Ale MT, Mikkelsen JD, Meyer AS** (2011) Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Mar Drugs* **9**: 2106–2130
- Bail AL, Billoud B, Panse SL, Chenivresse S, Charrier B** (2011) *ETOILE* regulates developmental patterning in the filamentous brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Plant Cell* **23**: 1666–1678
- Bitter T, Muir HM** (1962) A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem* **4**: 330–334
- Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM** (2008) Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci* **97**: 2892–2923
- Burns AR, Oliveira L, Bisalputra T** (1982) A histochemical study of bud initiation in the brown alga *Sphacelaria furcigera*. *New Phytol* **92**: 297–307
- Coelho SM, Godfroy O, Arun A, Corguillé GL, Peters AF, Cock JM** (2011) *OUROBOROS* is a master regulator of the gametophyte to sporophyte life cycle transition in the brown alga *Ectocarpus*. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 11518–11523
- Cumashi A, Ushakova NA, Preobrazhenskaya ME, D’Incecco A, Piccoli A, Totani L, Tinari N, Morozevich GE, Berman AE, Bilan MI, et al** (2007) A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* **17**: 541–552
- Fenoradosoa TA, Ali G, Delattre C, Laroche C, Petit E, Wadouachi A, Michaud P** (2010) Extraction and characterization of an alginate from the brown seaweed

- Sargassum turbinarioides* Grunow. *J Appl Phycol* **22**: 131–137
- Filisetti-Cozzi TMCC, Carpita NC** (1991) Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal Biochem* **197**: 157–162
- Ghosh T, Chattopadhyay K, Marschall M, Karmakar P, Mandal P, Ray B** (2009) Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure–activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology* **19**: 2–15
- Godfroy O, Peters AF, Coelho SM, Cock JM** (2015) Genome-wide comparison of ultraviolet and ethyl methanesulphonate mutagenesis methods for the brown alga *Ectocarpus*. *Mar Genomics* **24, Part 1**: 109–113
- Gomez CG, Pérez Lambrecht MV, Lozano JE, Rinaudo M, Villar MA** (2009) Influence of the extraction–purification conditions on final properties of alginates obtained from brown algae (*Macrocystis pyrifera*). *Int J Biol Macromol* **44**: 365–371
- Ilancheilian M, Ramaraj R** (2011) Binding interactions of Toluidine Blue O with *Escherichia coli* DNA: formation of bridged structure. *J Fluoresc* **21**: 1439–1453
- Jintang S, Alei F, Yun Z, Shanzhen S, Weixu H, Meixiang Y, Fengcai W, Xun Q** (2009) Fucoidan increases TNF- α -induced MMP-9 secretion in monocytic cell line U937. *Inflamm Res* **59**: 271–276
- Karmakar P, Ghosh T, Sinha S, Saha S, Mandal P, Ghosal PK, Ray B** (2009) Polysaccharides from the brown seaweed *Padina tetrastromatica*: characterization of a sulfated fucan. *Carbohydr Polym* **78**: 416–421
- Karmakar P, Pujol CA, Damonte EB, Ghosh T, Ray B** (2010) Polysaccharides from *Padina tetrastromatica*: structural features, chemical modification and antiviral activity. *Carbohydr Polym* **80**: 513–520
- Knutson CA, Jeanes A** (1968) A new modification of the carbazole analysis: application to heteropolysaccharides. *Anal Biochem* **24**: 470–481
- Kömerik N, Curnow A, MacRobert AJ, Hopper C, Speight PM, Wilson M** (2002) Fluorescence biodistribution and photosensitising activity of toluidine blue o on rat buccal mucosa. *Lasers Med Sci* **17**: 86–92
- Le Bail A, Charrier B** (2013) Culture methods and mutant generation in the

- filamentous brown algae *Ectocarpus siliculosus*. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **959**: 323–332
- Leal D, Matsuihiro B, Rossi M, Caruso F** (2008) FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydr Res* **343**: 308–316
- Lee JM, Shin Z-U, Mavlonov GT, Abdurakhmonov IY, Yi TH** (2012) Solid-phase colorimetric method for the quantification of fucoidan. *Appl Biochem Biotechnol* **168**: 1019–1024
- Ma S, Selvaraj U, Ohman DE, Quarless R, Hassett DJ, Wozniak DJ** (1998) Phosphorylation-independent activity of the response regulators AlgB and AlgR in promoting alginate biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **180**: 956–968
- Matsuno Y, Kinoshita M, Kakehi K** (2005) Fast analysis of glycosaminoglycans by microchip electrophoresis with in situ fluorescent detection using ethidium bromide. *J Pharm Biomed Anal* **37**: 429–436
- May TB, Chakrabarty AM** (1994) Isolation and assay of *Pseudomonas aeruginosa* alginate. *In* B-M in Enzymology, ed, Academic Press, pp 295–304
- Michel G, Tonon T, Scornet D, Cock JM, Kloareg B** (2010) The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *New Phytol* **188**: 82–97
- Mizuno M, Nishitani Y, Tanoue T, Matoba Y, Ojima T, Hashimoto T, Kanazawa K** (2009) Quantification and localization of fucoidan in *Laminaria japonica* using a novel antibody. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 335–338
- Mizuta H, Ogawa S, Yasui H** (2003) Phosphorus requirement of the sporophyte of *Laminaria japonica* (Phaeophyceae). *Aquat Bot* **76**: 117–126
- Nyvall P, Corre E, Boisset C, Barbeyron T, Rousvoal S, Scornet D, Kloareg B, Boyen C** (2003) Characterization of mannuronan C-5-epimerase genes from the brown alga *Laminaria digitata*. *Plant Physiol* **133**: 726–735
- Pawar SN, Edgar KJ** (2012) Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials* **33**: 3279–3305

- Pereira MS, Mulloy B, Mourão PAS** (1999) Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. *J Biol Chem* **274**: 7656–7667
- Pomin VH, Pereira MS, Valente A-P, Tollefsen DM, Pavão MSG, Mourão PAS** (2005) Selective cleavage and anticoagulant activity of a sulfated fucan: stereospecific removal of a 2-sulfate ester from the polysaccharide by mild acid hydrolysis, preparation of oligosaccharides, and heparin cofactor II-dependent anticoagulant activity. *Glycobiology* **15**: 369–381
- Ponce NMA, Pujol CA, Damonte EB, Flores ML, Stortz CA** (2003) Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydr Res* **338**: 153–165
- Remminghorst U, Rehm BHA** (2006) Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnol Lett* **28**: 1701–1712
- Retamales HA, Scharaschkin T** (2014) A staining protocol for identifying secondary compounds in Myrtaceae. *Appl Plant Sci*. doi: 10.3732/apps.1400063
- Rowbotham JS, Dyer PW, Greenwell HC, Selby D, Theodorou MK** (2013) Copper(II)-mediated thermolysis of alginates: a model kinetic study on the influence of metal ions in the thermochemical processing of macroalgae. *Interface Focus* **3**: 20120046
- Sakugawa K, Ikeda A, Takemura A, Ono H** (2004) Simplified method for estimation of composition of alginates by FTIR. *J Appl Polym Sci* **93**: 1372–1377
- Salgado LT, Tomazetto R, Cinelli LP, Farina M, Filho A, Menezes G** (2007) The influence of brown algae alginates on phenolic compounds capability of ultraviolet radiation absorption in vitro. *Braz J Oceanogr* **55**: 145–154
- Shao Z, Zhang P, Li Q, Wang X, Duan D** (2014) Characterization of mannitol-2-dehydrogenase in *Saccharina japonica*: Evidence for a new polyol-specific long-chain dehydrogenases/reductase. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0097935
- Swift SM, Hudgens JW, Heselpoth RD, Bales PM, Nelson DC** (2014) Characterization of

AlgMsp, an alginate lyase from *Microbulbifer* sp. 6532A. PLoS ONE **9**: e112939

Synytsya A, Kim W-J, Kim S-M, Pohl R, Synytsya A, Kvasnička F, Čopíková J, Il Park Y (2010) Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*. Carbohydr Polym **81**: 41–48

Torres M R, Sousa A P A, Silva Filho E A T, Melo D F, Feitosa J P A, de Paula R C M, Lima M G S (2007) Extraction and physicochemical characterization of *Sargassum vulgare* alginate from Brazil. Carbohydr Res **342**: 2067–2074

Teruya T, Konishi T, Uechi S, Tamaki H, Tako M (2007) Anti-proliferative activity of oversulfated fucoidan from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA in U937 cells. Int J Biol Macromol **41**: 221–226

Tokita Y, Nakajima K, Mochida H, Iha M, Nagamine T (2010) Development of a fucoidan-specific antibody and measurement of fucoidan in serum and urine by sandwich ELISA. Biosci Biotechnol Biochem **74**: 350–357

Tuma RS, Beaudet MP, Jin X, Jones LJ, Cheung C-Y, Yue S, Singer VL (1999) Characterization of SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain: a dye optimized for use with 300-nm ultraviolet transilluminators. Anal Biochem **268**: 278–288

Vilela-Silva A-CES, Castro MO, Valente A-P, Biermann CH, Mourao PAS (2002) Sulfated fucans from the egg jellies of the closely related sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis* and *Strongylocentrotus pallidus* ensure species-specific fertilization. J Biol Chem **277**: 379–387

Wijesinghe WAJP, Athukorala Y, Jeon Y-J (2011) Effect of anticoagulative sulfated polysaccharide purified from enzyme-assistant extract of a brown seaweed *Ecklonia cava* on Wistar rats. Carbohydr Polym **86**: 917–921

Wijesinghe WAJP, Jeon Y-J (2012) Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: a review. Carbohydr Polym **88**: 13–20

Zhang Z, Till S, Knappe S, Quinn C, Catarello J, Ray GJ, Scheiflinger F, Szabo CM, Dockal M (2015) Screening of complex fucoidans from four brown algae species as procoagulant agents. Carbohydr Polym **115**: 677–685

Zubia M, Payri C, Deslandes E (2008) Alginate, mannitol, phenolic compounds and

biological activities of two range-extending brown algae, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fucales), from Tahiti (French Polynesia) . J Appl Phycol **20**: 1033–1043

Zvyagintseva TN, Shevchenko NM, Popivnich IB, Isakov VV, Scobun AS, Sundukova EV, Elyakova LA (1999) A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds. Carbohydr Res **322**: 32–39