

令和元年6月7日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07852

研究課題名(和文) ホンダワラ属の海藻におけるD-アスパラギン酸の役割および起源

研究課題名(英文) Physiological function and biosynthetic pathway of D-aspartate in marine macroalgae genus Sargassum

研究代表者

横山 雄彦 (YOKOYAMA, TAKEHIKO)

北里大学・海洋生命科学部・講師

研究者番号：60296431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：生物学的に稀なアミノ酸であるD-アスパラギン酸(D-Asp)の存在について、38種の海藻の分析を行った。遊離L-アスパラギン酸が全ての海藻に普遍的に存在していたのに対し、遊離D-Aspは褐藻綱ホンダワラ科に属する5種の海藻のみに認められた。緑藻、紅藻およびホンダワラ科を除く褐藻には遊離D-Aspは含まれていなかった。また、ホンダワラ科に属する種でも、テレティア節に属する3種には遊離D-Aspが含まれていなかった。以上より、海藻の遊離D-Aspの存在はホンダワラ科の海藻に限られることが示唆されたが、ホンダワラ科の海藻であっても例外的にテレティア節には存在しないことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般に生物に認められるL-アスパラギン酸というアミノ酸の鏡像異性体がD-アスパラギン酸(D-Asp)である。動物のD-Aspに対して、海藻のD-Aspの研究はまったく進んでいなかったが、本研究によって、海藻のD-Aspはホンダワラ科の海藻に限って存在していることが明らかになった。海藻のD-Aspの分布は環境的要因ではなく、進化の系統樹に沿った遺伝的な要因であることが示された。Aspはうま味成分の一つであることから、本研究は栄養学的な価値を有している。

研究成果の概要(英文)：The presence of D-aspartate (D-Asp), a biologically rare amino acid, was evaluated in 38 species of marine macroalgae (seaweeds). Despite the ubiquitous presence of free L-Asp, free D-Asp was detected in only 5 species belonging to the Sargassaceae family of class Phaeophyceae (brown algae) but not in any species of the phyla Chlorophyta (green algae) and Rhodophyta (red algae). All other members of Phaeophyceae, including 3 species classified into the section Teretia of Sargassaceae did not contain D-Asp. These results indicate that the presence of free D-Asp in marine macroalgae is restricted only to the Sargassaceae family, excluding the species in the section Teretia.

研究分野：海洋生命科学

キーワード：ヒジキ 海藻 ホンダワラ D-アスパラギン酸

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

D-アミノ酸は L-アミノ酸の鏡像異性体であり、真核生物には存在しないとされてきた。しかし、近年、遊離 D-アスパラギン酸(Asp, 以下全て遊離)がヒトを含む哺乳類の脳から検出され、医療分野での注目を集めている。申請者らは三陸周辺の藻類における D-アミノ酸の分布を調べ、ヒジキには D-Asp が他の海藻の 200 倍以上含まれていることを明らかにし、また、Asp 中の D 型の割合は多くの海藻が 1%未満であったのに対し、ヒジキには季節に関わらず 50%程度存在しているという興味深い結果も得ている。ところが、ヒジキと同じホンダワラ属の海藻で、潮間帯というヒジキと同じ環境に生育しているウミトラノオという海藻には D-Asp は全く認められない。したがって、ホンダワラ属の海藻の全ての種に D-Asp が存在している訳ではなく、ごく限られた種に特有の現象であると推察される。また、D-Asp が付着細菌由来ではなく、ヒジキ自身の中心部に局在していることを申請者らは明らかにしている。

陸上植物では D-Asp が多量に存在しているという報告はなく、ヒジキなどホンダワラ属の一部の海藻は、本来なら真核生物が利用しないはずの D-Asp を蓄積している極めて稀な種である。したがって、これらの海藻は植物における D-Asp の役割および起源を研究するうえで、極めて有利な実験材料と考えられる。

### 2. 研究の目的

真核生物に含まれるアミノ酸は L 型が一般的である。ところが海藻には、L-アスパラギン酸(Asp)のみならず、その鏡像異性体である D-Asp を多量に蓄積している稀な種が存在する。このような事象は陸上植物には認められず、水圏植物と陸上植物とは様相が全く異なると言える。もちろん全ての海藻に D-Asp が存在している訳ではなく、ヒジキなどホンダワラ属に属する種に限って、他の海藻の 200 倍以上の D-Asp が蓄積されている。本来なら真核生物が利用できないはずの D-Asp を、なぜこれらの海藻のみが蓄積しているのか不明であり、その起源も未解明である。本研究では、ホンダワラ属の海藻における D-Asp の役割および起源を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

ホンダワラ属の海藻における D-アスパラギン酸(Asp)の生理機能および代謝機構の解明のために以下の項目を行う。

- ホンダワラ属の海藻における D-Asp の分布。
- 低酸素下における D-Asp の変動を調べ、再現性を確認。
- 海水から D-Asp を直接取り込む可能性について検討。
- D-Asp の代謝経路の探索。
- D-Asp 代謝関連酵素の精製。
- D-Asp 代謝関連酵素の性状解析およびアミノ酸配列解析。

### 4. 研究成果

約 40 種類の海藻において真核生物に稀な遊離 D-アスパラギン酸(Asp)含量を調べた結果、緑藻(5種)および紅藻(15種)からは D-Asp が全く検出されなかった。しかし、調べた褐藻 18 種のうち 5 種から D-Asp が検出された。この 5 種は全てホンダワラ属に属する海藻であったが、ホンダワラ属の海藻であっても D-Asp が検出されない種も 3 種あった。ホンダワラ属に属する海藻の生育環境や生育時期は似通っているため、生育環境や生育時期と D-Asp との相関は低いと考えた。そこで、ホンダワラ属の海藻を進化の系統樹に従い、属と種の間のカテゴリーである「節」に従って分類したところ、ホンダワラ属テレティア節に属する種からは D-Asp が検出されなかった。したがって、「ホンダワラ属に属する海藻には、基本的に真核生物に稀な D-Asp が含まれているが、例外的にテレティア節に属する海藻には D-Asp が存在しない」ということが示唆された。

D-アスパラギン酸(Asp)の生理的役割については、アカガイで低酸素条件下における補助エネルギーとしての役割が提案されている。ヒジキを暗条件下で低酸素人工海水に浸したところ、実験開始 12 時間後まで L-Asp とともに D-Asp が減少した。24 時間後に暗条件下で低酸素条件からエアレーションを入れて通常の条件に戻したところ、エアレーションを開始してから 12 時間後にはコントロールと同様のレベルまで D-Asp が増加した。以上の結果からヒジキにおいても D-Asp が低酸素と関係があることが示唆された。

テレティア節を除くホンダワラ科に属する海藻に D-Asp が存在しているものの、海藻の D-Asp 合成酵素は未解明である。D-Asp を合成する可能性のある酵素としては、Asp ラセマーゼ[EC 5.1.1.13]、アスパラギナーゼ[EC 3.5.1.1]、D-アミノ酸トランスアミナーゼ[EC 2.6.1.21]などがあげられる。これらの酵素を標的としヒジキの粗酵素液と、基質としてそれぞれ L-Asp、D-アスパラギン(Asn)または L-Asn、D-グルタミン酸+オキサロ酢酸を用いて酵素反応させて D-Asp の生成を調べた。アカガイなどの動物では、D-Asp 合成酵素としてアスパラギン酸ラセマーゼの存在が知られており、実際にアスパラギン酸ラセマーゼにより D-Asp が生成されている。し

かし、ホンダワラ科の海藻であるヒジキでは、D-Asn を基質としたときに D-Asp の生成が認められたため、アスパラギナーゼで生成されている可能性が示唆された。しかし、基質である D-Asn がヒジキから確認されないためアスパラギナーゼによる生成かどうかは慎重に判断する必要がある。

ヒジキを用いて D-Asp 代謝関連酵素であるアスパラギナーゼの精製に挑戦したが、採取したヒジキからはアスパラギナーゼ活性が出たり出なかったりと不安定であったため精製は困難であった。時期的には 12 月から 1 月と寒い時期に採取した時に活性が認められ、これはヒジキが最も成長する時期に一致している。寒い時期に酵素活性が高いと推測されたので、サンプルを採取する時期を考慮する必要があるようだ。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

**Takehiko Yokoyama**, Masaharu Tokuda, Masafumi Amano, Koji Mikami.

The presence of free d-aspartate in marine macroalgae is restricted to the Sargassaceae family.

Biosci. Biotechnol. Biochem., 82, 268-273 (2018) 査読有

**Takehiko Yokoyama**, Masaharu Tokuda, Masafumi Amano, Koji Mikami

Simultaneous determination of primary and secondary D- and L-amino acids by reversed-phase high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization with two-step labelling method.

Biosci. Biotechnol. Biochem., 81, 1681-1686 (2017) 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

**横山雄彦**, 山口峰生, 徳田雅治

*Asterionellopsis glacialis* の D-アスパラギン酸

H30 年度日本水産学会秋季大会, 2018

**横山雄彦**

なぜ D-アスパラギン酸がヒジキに存在してウミトラノオに存在しないのか?

第 12 回 D-アミノ酸学会学術講演会, 2016

**横山雄彦**, 高田洸輔, 戸田航洋, 難波信由, 徳田雅治, 三上浩司

ホンダワラ属海藻の D-アスパラギン酸

平成 28 年度日本水産学会秋季大会, 2016

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。