

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19H03039

研究課題名(和文) 褐藻類の有用多糖類およびカロテノイド類代謝関連酵素の探索と機能実証

研究課題名(英文) Functional characterization of enzymes involved in polysaccharide and carotenoid metabolism from brown algae

研究代表者

井上 晶 (Inoue, Akira)

北海道大学・水産科学研究院・教授

研究者番号：70396307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,630,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ゲノムおよび遺伝子の配列情報が先行し、タンパク質レベルでの解析がほとんど進んでいない褐藻の機能タンパク質の実証を目的とした。研究の遂行により、温帯域に生息するオキナワモズクが熱安定性に優れたマンヌロン酸C-5エピメラーゼをもつこと、褐藻自身がアルギン酸を不飽和単糖レベルに分解する酵素をもち、その還元酵素をもつことを明らかにした。また、マコンブのマンヌロン酸C-5エピメラーゼと予測されていたタンパク質が実際にはアルギン酸分解酵素であることを解明した。さらに、ゲノム解析からは存在が不明であった褐藻のβ-カロテン水酸化酵素を同定し、ゼアキサントシン変換活性をもつことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、我が国の水産業の重要種であり、海洋生態系を支える重要な役割を担う大型褐藻類のタンパク質の機能をタンパク質レベルで実証することを目的としており、学術的のみならず社会的にも遂行する意義が高い。有用褐藻類の研究は、ゲノムや遺伝子の配列情報が先行している状況にあり、高等植物や他の藻類と比較して、タンパク質に関する生化学的研究は遅れている。本研究の遂行により、配列情報から予測される機能とは異なる酵素活性をもつことを実証した成果も得られた。これは未知のタンパク質の機能をアミノ酸配列から推測するだけでは、真の生物機能を理解することができないことを示唆するものであり、高い学術的意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to demonstrate the functional proteins of brown algae, for which genome and gene sequence information has been prior and little progress has been made in analyzing them at the protein level. By conducting this research, it was revealed that the mannuronate C-5 epimerase of Okinawa mozuku is a thermostable enzyme. Additionally, it was shown that the brown alga itself has an enzyme that degrades alginate to the level of unsaturated monosaccharides and also has its reductase. Furthermore, the protein predicted to be the mannuronate C-5 epimerase of kelp is in fact an alginate-degrading enzyme. We also identified a brown alga β-carotene hydroxylase, the existence of which was unclear from genome analysis, and showed that it has zeaxanthin-converting activity.

研究分野：海洋生物学

キーワード：褐藻 多糖類 アルギン酸 マンヌロン酸C-5エピメラーゼ アルギン酸リアーゼ カロテノイド 組換え酵素

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

褐藻類は、海洋に広く分布しており、豊かな海洋生態系を維持するには欠かせない生物種である。近年では、カーボンニュートラルの観点からもその重要性が改めて評価されるなど注目されている。さらに我が国では、コンブやワカメなどは古来より食糧としても重用されており、現在でも重要な水産資源となっている。褐藻類は、他の藻類や陸上植物にはほとんど見られない構造の多糖類やカロテノイド類をもつことが知られており、それらの中には様々な産業で広く利用されているものやヒトが摂取した場合に生理活性作用を示すものが含まれている。このように褐藻類には多くの有用成分が含有されていることが良く知られているものの、それらの成分がどのように褐藻自身が生合成し、代謝しているのかについての知見は極めて乏しい。そのため、これらの化合物の選択的生産や人工的に改変する技術が待望されているが、実現には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、産業重要種であるマコンブ、ワカメ、オキナワモズク、およびヒジキを対象とした。褐藻の多糖類やカロテノイド類の生合成・代謝機構については、ゲノム解析やトランスクリプトーム解析から得られた塩基配列データに基づき提唱されている場合が多く、実際にタンパク質の機能を調べた例は少なかった。そのため、本当にそのタンパク質が機能をもっているのかについては不明なままであった。そこで本研究では、実際に個々の組換えタンパク質を作成し、それを用いて性状を詳細に調べ、機能を実証することを目的とした。

3. 研究の方法

研究対象とした各褐藻から、GM quicker2 と HULK アルギン酸分解酵素 (いずれもニッポンジーン) を使用して、既報の方法 (Inoue, A. (2018) *Methods in Enzymol.*, **605**, 499-524) により Total RNA を抽出し、mRNA を精製した。次いで、PrimeScript Double Strand cDNA Synthesis Kit (Takara) を用いて、cDNA を合成した。また、マコンブとワカメの各胞子体から抽出した Total RNA は、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq に供し、それぞれトランスクリプトームデータベースを構築した。

候補タンパク質の探索は、既知の酵素との相同性検索によって行い、対象タンパク質をコードする遺伝子は RT-PCR により cDNA をクローニングした。各組換えタンパク質の発現は、ホストとして大腸菌、枯草菌、酵母、または昆虫細胞を用いて行った。昆虫細胞を除く 3 種のホストでは組換えプラスミドの導入、昆虫細胞では組換えバキュロウィルスの感染により目的タンパク質を発現した。可溶性タンパク質として組換えタンパク質が発現した場合には、大量培養を行い、非変性条件下でタンパク質の末端に付加したタグ (His-tag または Twin-Strep-tag) に対応する担体を用いたクロマトグラフィーにより精製した。また、カロテノイド生合成関連酵素については、組換えタンパク質を発現したホストの細胞内に蓄積したカロテノイドをメタノール/クロロホルム溶液で抽出し、それを高速液体クロマトグラフィーに供することにより生成物を調べ、酵素活性を評価した。

4. 研究成果

(1) 褐藻のマンヌロン酸 C-5 エピメラーゼ

マンヌロン酸 C-5 エピメラーゼは、褐藻の主要多糖であるアルギン酸生合成の最終段階で作用する酵素と考えられている (図 1)。アルギン酸は、2 種類のウロン酸、すなわち β -D-マンヌロン酸 (M) と α -L-グルロン酸 (G) から構成されている酸性多糖であり、自然界では褐藻と一部の細菌が生合成することが知られている。アルギン酸分子の M と G の配列とそれらの比率は、アルギン酸溶液の物理化学特性に密接に関連することから、本酵素のアルギン酸配列制御技術への応用が期待されてきた。しかしながら、褐藻は細菌類に比べて数十倍以上の数の同酵素候補タンパク質をもつとゲノム解析から推定されているにもかかわらず、酵素活性が調べられたものは、これまでにマコンブで 2 種類、シオミドロで 1 種類しかなく、これらのうち、エピマー化パターンまで解明されたものはマコンブの SjC5-VI と名付けられた 1 種類のものに限られる (Inoue, A. *et al.* (2016) *Algal Res.*, **16**, 282-291)。

本研究では、これまでにマンヌロン酸 C-5 エピメラーゼ候補タンパク質が遺伝子レベルで 20 個以上見出されているにもかかわらず、それらの機能が全く調べられていない温帯性褐藻のオキナワモズクに着目し、マコンブの SjC5-VI と最も高いアミノ酸配列相同性を示すタンパク質 CoC5-1 の cDNA をクローニングした。この DNA を用いて組換えタンパク質の生産を試みた結果、昆虫細胞-バキュロウィルス分泌発現系を用いると、目的タンパク質が分泌生産できる

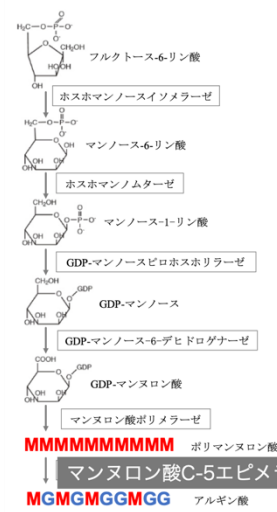


図1. 褐藻のアルギン酸の推定生合成経路

ことが分かった。そこで、His-tag を C 末端に融合した CoC5-1 を発現、精製し、その機能を調べた。PolyM (アルギン酸を酸加水分解することによって得られる M を主要構成糖とする画分) を基質として、CoC5-1 反応前後の Ca^{2+} によって生じるゲルの量を調べた結果、反応後のゲル生成量は反応前と比較して上昇することが明らかになった。この生成量は、既報のマコンブ Sjc5-VI と比較して、約 1.8 倍高かった。ゲル生成量の変化を指標として、CoC5-1 の各至適条件を調べた結果、至適温度、同 pH、および同 NaCl は、それぞれ 40°C 、8.0、および 100 mM と決定された。特徴的な性状として、CoC5-1 は Sjc5-VI よりも熱安定性に優れていることが分かった。すなわち、Sjc5-VI は、 50°C で 60 分間処理することにより完全に失活するのに対して、CoC5-1 は同条件下でも失活せず、エピメラーゼ活性を示した。この違いは、マコンブとオキナワモズクの生息温度と密接に関連していると考えられた。また、至適条件下で反応した基質の $^1\text{H-NMR}$ 解析により、CoC5-1 は 10 残基中に約 3 個の連続した G を生じる活性をもつことが分かった。これは、Sjc5-VI が M と G が交互に並ぶようにエピマー化するパターンとは異なっていた。また、本研究では、ヒジキ由来のマヌロン酸 C-5 エピメラーゼ Hjc5-1 の機能解析にも成功し、同酵素はマコンブの Sjc5-VI と同様のエピマー化パターンを示すことを明らかにした。

(2) 褐藻の新規アルギン酸分解酵素

マコンブのトランスクリプトーム解析から、9 個のマヌロン酸 C-5 エピメラーゼ候補タンパク質をコードする遺伝子を見出し、それらのうち、8 個のものについて cDNA クローニングを行った。そのうちのひとつである Sjc5E と名付けたタンパク質は、昆虫細胞で可溶性タンパク質として分泌発現が可能であったことから、C 末端に Twin-Strep-tag を融合し、Strep-Tactin アガロースを用いて目的タンパク質を精製した。PolyM を基質として活性を評価したところ、上記の CoC5-1、Sjc5-VI、および Hjc5-1 とは異なり、酵素反応後にゲル生成量が減少した。そこで、反応産物を薄層クロマトグラフィーで調べた結果、不飽和単糖由来 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEHU) が生じることが明らかになった (図 2)。チオバルビツール酸法で性状を調べた結果、Sjc5E はアミノ酸配列から推測されたエピメラーゼではなく脱離反応で PolyM を分解するエキソ型リアーゼであることが分かった。これまでに、褐藻のアルギン酸分解酵素としてタンパク質レベルで機能が明らかにされているものはマコンブ由来エンド型リアーゼの Sja1y (Inoue, A. and T. Ojima (2019) *Sci. Rep.* **9**, 4937) だけであり、Sjc5E は 2 例目の発見である。なお、細菌を含むアルギン酸生合成生物がエキソ型アルギン酸分解酵素をもつことは、これまでに報告が無く、本タンパク質が初めての発見となった。

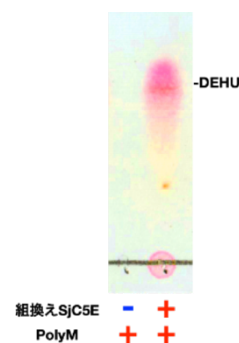


図2. Sjc5Eによるアルギン酸分解物の薄層クロマトグラフィー

チオバルビツール酸法により発色

(3) 褐藻の DEHU 還元酵素

これまでに、アルギン酸生合成生物が DEHU を生じる報告は無かったが、本研究の遂行により褐藻自身がアルギン酸を分解し、DEHU を酵素反応により生産できることが明らかになった。アルギン酸を炭素源として利用できるアルギン酸資化生物では、DEHU は酵素により 2-keto-3-deoxy-D-gluconate (KDG) へと還元され、最終的にピルビン酸へと変換されることが知られている。しかしながら、アルギン酸生合成生物において、DEHU 還元酵素に関する研究は全く無かった。褐藻の同酵素の候補タンパク質についても検討されていなかったため、本研究では初めにエゾアワビの DEHU 還元酵素 HdRed と相同性を示すマコンブの 4 つのタンパク質に着目し、それらの cDNA クローニングを行った。次いで、大腸菌発現系を用いて、各組換え酵素を生産し、精製酵素を用いて NADH または NADPH を補酵素、DEHU を基質として酵素活性を評価した。反応産物について薄層クロマトグラフィーで調べた結果、SjRed と名付けたタンパク質が NADPH を補酵素として、DEHU を還元することが明らかになった (図 3)。至適条件を決定したところ、至適温度、同 pH、および同 NaCl は、それぞれ 25°C 、7.2、および 100 mM であった。また、反応産物を精製し、ESI-MS に供した結果、KDG が生じることを明らかにした。このように、アルギン酸生合成生物の褐藻では、生合成したアルギン酸を必要に応じて自ら分解し、それを炭素源として利用する可能性が示唆された。

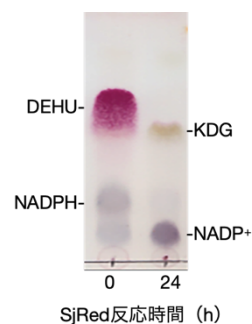


図3. SjRedによるDEHUの還元
硫酸/1,3-ナフタレンジオールにより発色

反応産物について薄層クロマトグラフィーで調べた結果、SjRed と名付けたタンパク質が NADPH を補酵素として、DEHU を還元することが明らかになった (図 3)。至適条件を決定したところ、至適温度、同 pH、および同 NaCl は、それぞれ 25°C 、7.2、および 100 mM であった。また、反応産物を精製し、ESI-MS に供した結果、KDG が生じることを明らかにした。このように、アルギン酸生合成生物の褐藻では、生合成したアルギン酸を必要に応じて自ら分解し、それを炭素源として利用する可能性が示唆された。

(4) アルギン酸資化生物の新規 DEHU 代謝経路

上記 (3) の DEHU 還元酵素の研究過程で、対照実験としてアルギン酸資化細菌 *Flavobacterium* sp. UMI-01 株の既報の DEHU 還元酵素 F1Red を含む菌体抽出物を使用した。その酵素反応物を薄層クロマトグラフィーに供したところ、従来から知られていた DEHU が還元された KDG とは

異なる移動度を示すスポットが検出された。そこで、この化合物について精製し、構造解析を進めた結果、DEHUが酸化された構造をもつ 2-keto-3-deoxy-D-glucarate (KDGR) であることを明らかにした。DEHU の酸化反応は全く知られていなかったため、この反応を担う酵素の同定を進めた。その結果、KDGR は、DEHU 還元酵素として知られている F1Red と同一のタンパク質によって生じることが分かった。すなわち、F1Red はこれまでに報告された DEHU を還元するだけでなく、酸化も触媒する二機能性酵素であることを見出した。さらに、生じた KDGR の代謝経路の解明を進め、これまでに知られていなかった 2 種類の酵素 F1Det と F1Deg が関与することを明らかにした。F1Det は、KDGR を α -ketoglutaric semialdehyde に変換し、次いで F1Deg の作用により、最終的に α -ケトグルタル酸が生じることが分かった。これまではアルギン酸は還元経路でのみ代謝されると考えられてきたが、本成果によりアルギン酸の新しい酸化経路の存在が明らかになった (図 4)。

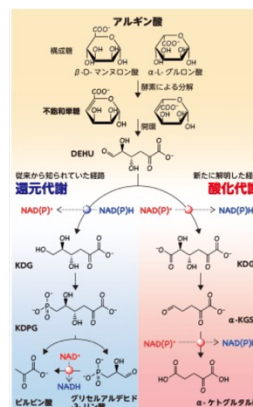


図4. アルギン酸産生細菌の新しい酸化代謝経路

(5) 褐藻の β -カロテン水酸化酵素

褐藻のカロテノイド生合成関連酵素の機能実証については、リコペンを β -カロテンへと変換するリコペン β -シクラーゼがワカメ由来のもの (UpLCYB) で報告 (Inoue, A., *et al.* (2019) *Fish. Sci.* **85**, 717-729) されているにすぎなかった。また、 β -カロテンを基質とすると考えられる β -カロテン水酸化酵素候補タンパク質の遺伝子が、各種褐藻の大規模なゲノム解析を経ても見つかっていなかった。本研究では、ワカメのトランスクリプトーム解析を行い、シアノバクテリアの β -カロテン水酸化酵素と相同性は低いものの、局所的に共通なアミノ酸配列をもつタンパク質 UpR を見出し、これに着目して研究を進めた。クローン化した cDNA を用いて、 β -カロテンを蓄積するように組換えタンパク質を発現した昆虫細胞を用いて解析を進めた結果、細胞の色が濃黄色から淡黄色へと変化し (図 5)、抽出したカロテノイドの主成分がゼアキサンチンであることを高速液体クロマトグラフィーで明らかにした。これらの結果から、UpR は褐藻では未同定の β -カロテン水酸化酵素であることが分かった。

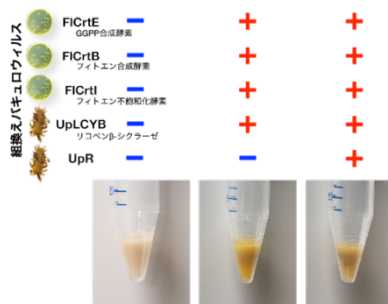


図5. 昆虫細胞によるUpRの機能同定

左から、野生型昆虫細胞、 β -カロテン産生昆虫細胞、およびゼアキサンチン産生昆虫細胞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakagami Miu, Ohnishi Yuki, Kumaki Yasuhiro, Aizawa Tomoyasu, Inoue Akira	4. 巻 89
2. 論文標題 Enzymatic characterization of a mannuronan C5-epimerase from the subtropical brown alga <i>Cladosiphon okamuranus</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 823-835
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12562-023-01720-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 井上晶, 西山竜士	4. 巻 80
2. 論文標題 アルギン酸分解における新しい酸化代謝機構の発見	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 314-315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishiyama Ryuji, Ojima Takao, Ohnishi Yuki, Kumaki Yasuhiro, Aizawa Tomoyasu, Inoue Akira	4. 巻 4
2. 論文標題 An oxidative metabolic pathway of 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEHU) from alginate in an alginate-assimilating bacterium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1254
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02786-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Inoue Akira, Ojima Takao	4. 巻 545
2. 論文標題 Functional identification of the 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronate reductase from a brown alga, <i>Saccharina japonica</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 112-118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.01.090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Akira, Kudo Masataka, Werner Elisa, Ojima Takao	4. 巻 254
2. 論文標題 Identification and characterization of cellouronate (-1,4-linked polyglucuronic acid) lyase from the scallop Mizuhopecten yessoensis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Carbohydrate Polymers	6. 最初と最後の頁 117306-117306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carbpol.2020.117306	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上晶
2. 発表標題 高機能アルギン酸分解酵素の発見とそれを利用した有用褐藻類の機能タンパク質に関する生化学的研究
3. 学会等名 令和6年度日本水産学会春季大会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 井上晶, 池田直幸, 尾島孝男
2. 発表標題 褐藻マコンブの新規アルギン酸分解酵素
3. 学会等名 令和6年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 井上晶
2. 発表標題 アルギン酸を分解・代謝する海洋生物 -酵素に学ぶアルギン酸の自然リサイクル-
3. 学会等名 日本分析化学会北海道支部公開セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊裕大, 井上晶
2. 発表標題 深海性巻貝由来多糖リアーゼの熱安定性に関わるアミノ酸残基の同定
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂上美卯, 大西裕季, 熊木康裕, 相沢智康, 尾島孝男, 井上晶
2. 発表標題 熱安定性に優れた褐藻由来マンヌロン酸C-5エピメラーゼの組換え酵素の生産と機能解析
3. 学会等名 第23回マリンバイオテクノロジー学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上晶, 高谷直己, 細川雅史, 尾島孝男
2. 発表標題 バキュロウィルスを用いた褐藻カロテノイド生合成関連酵素の機能実証
3. 学会等名 第23回マリンバイオテクノロジー学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂上美卯, 大西裕季, 熊木康裕, 相沢智康, 尾島孝男, 井上晶
2. 発表標題 温帯性褐藻由来マンヌロン酸C-5エピメラーゼの酵素性状解析
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上晶, 高谷直己, 細川雅史, 尾島孝男
2. 発表標題 昆虫細胞を用いた褐藻類 -カロテン水酸化酵素の同定
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊裕大, 尾島孝男, 井上 晶
2. 発表標題 深海性巻貝由来多糖リアーゼのセロウロン酸分解能
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊池慶作, 大津留美, 美野さやか, 澤辺智雄, 田中啓之, 井上 晶, 尾島孝男
2. 発表標題 フコイダン分解菌Flavobacterium sp. Fdn-01株のフカナーゼ遺伝子の同定
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松尾のどか, 井上 晶, 尾島孝男
2. 発表標題 褐藻フコイダンのアルギン酸リアーゼ阻害作用
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊裕大, 尾島孝男, 井上 晶
2. 発表標題 深海性巻貝の多糖リアーゼ候補タンパク質の大腸菌発現と性状解析
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 工藤真隆、尾島孝男、井上 晶
2. 発表標題 ホタテガイのポリウロン酸分解酵素
3. 学会等名 令和元年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山竜士、尾島孝男、井上 晶
2. 発表標題 アルギン酸由来不飽和単糖の酸化代謝
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 尾島孝男、西山竜士、井上晶	4. 発行年 2020年
2. 出版社 恒星社厚生閣	5. 総ページ数 334
3. 書名 水圏生物タンパク質科学の新展開	

1. 著者名 井上 晶	4. 発行年 2020年
2. 出版社 恒星社厚生閣	5. 総ページ数 334
3. 書名 水圏生物タンパク質科学の新展開	

1. 著者名 Akira Inoue	4. 発行年 2020年
2. 出版社 WILEY	5. 総ページ数 3248
3. 書名 Encyclopedia of Marine Biotechnology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ネバネバの主成分アルギン酸の酸化代謝経路を発見 https://www.hokudai.ac.jp/news/2021/11/post-931.html 半合成多糖セロウロン酸の海洋生分解性を初めて証明～ホタテガイから分解酵素を発見～ https://www.hokudai.ac.jp/news/2020/11/post-754.html</p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------