

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450284

研究課題名(和文) 海藻バイオマス完全活用を目指した糖化酵素開発

研究課題名(英文) Development of enzymatic saccharification method for complete utilization of seaweed biomass

研究代表者

辻 明彦(Tsuji, Akihiko)

徳島大学・大学院生物資源産業学研究部・教授

研究者番号：20155360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：海藻バイオマスに含まれる多糖類を効率よく糖化できる酵素システムを開発するため、海藻を主食とするアメフラシの消化液の多糖類糖化機構について研究を行った。アメフラシ消化液中に存在するセルロース、でんぷん、ラミナラン分解に関与する酵素を同定し、これらの酵素の作用機構を解析するとともに、大量発現と応用をめざし、cDNAクローニングを行った。

また、褐藻類の海藻に多く含まれ、多糖分解酵素に強い阻害作用を示すフロロタンニンの作用を抑制することにより、褐藻類の消化作用を促進するEHEP (Eisenia Hydrolysis Enhancing Protein)を発見し、その作用機構について解析した。

研究成果の概要(英文)： Marine algae can provide a high-yield source of biofuels without compromising food supplies. The marine gastropod, the sea hare *Aplysia kurodai*, shows clear feeding preference for sea lettuce and brown algae such as *Eisenia bicyclis*. Therefore, research on the glucose production system of sea hares from seaweed polysaccharides could contribute important new insights into the development of biofuel processing technologies from seaweed. To investigate the digestive amyolytic system in marine invertebrates, comprehensive enzymatic analysis of amyolytic glucanases in *A. kurodai* was performed. Our findings provide the first example of an enzymatic process of glucose liberation from starch in the digestive fluid of invertebrates.

Furthermore, a novel 25 kDa protein that enhances *E. bicyclis* saccharification by α -glucosidases (BGLs) was purified from the digestive fluid of *A. kurodai*, and its cDNA was cloned. EHEP protects BGLs from phlorotannin inhibition by binding to phlorotannins.

研究分野：酵素化学

キーワード：海藻 セルラーゼ アミラーゼ アオサ アラメ ラミナラン フロロタンニン EHEP

1. 研究開始当初の背景

(1) 地球温暖化の防止対策として、バイオエタノールやバイオディーゼルが期待されている。現在、食糧として利用されない木材等のリグノセルロースの活用や油脂生産植物が研究の中心となっている。しかし、リグノセルロースはセルロース、ヘミセルロースとリグニンが強固に結合しているために、セルラーゼによる糖化处理前に高圧爆砕などの前処理が必要な上に、水不溶で結晶構造をとるセルロースを分解するためには大量のセルラーゼが必要で、コスト高の原因となっている。一方、油脂生産植物の栽培は従来の農業と拮抗する可能性が高く、エネルギー源としては限界がある。特に開発諸国におけるアブラヤシ等の大規模栽培は、食糧自給率を低下させる危険性が高い。リグノセルロースに比べ、海藻はリグニンを含まないためにセルロースの酵素糖化が容易であるとかんがえられている。世界で最も高度な海藻栽培技術を有し、広い経済的排他海域を有する我が国にとって、成長が早く栽培が容易な海藻は最も有望なバイオマスである。しかし、海藻はセルロース以外の多糖類も多く含むために、リグノセルロースの糖化に使われる糸状菌由来のセルラーゼでは、海藻の高効率糖化が不可能である。海藻は種によって多糖類の組成が異なり、セルロースより、ラミナランやアルギン酸等の多糖類を多く含有する。そのため、海藻をバイオマスとして有効利用するためには、セルロースに加えて全ての多糖類から発酵可能な六単糖類を効率よく獲得する方法の開発が急務である。

(2) 申請者は、海藻または藻類を主食とする海洋生物の消化システムを海藻糖化に利用する事を考え、アミエビや貝類の持つセルラーゼ、 β -グルコシダーゼの酵素学的性質と多糖類分解システムを解析してきた。特にアメフラシ消化液には、4種類の α -1,4-エンドグルカナーゼ、2種類の β -グルコシダーゼが同定され、糸状菌とは異なるセルロース分解系を持つことを明らかにしてきた。さらに、アメフラシ消化液による種々の海藻に対する分解活性を検討したところ、アオサや褐藻類であるアラメがよい基質になることが判明した。乾燥重量10mgあたり、アオサからは1.2 mg、アラメからは2.5-3.0 mgのグルコースが遊離することが判明した。しかし、精製セルラーゼ、 β -グルコシダーゼによる分解では、アオサでは0.4 mgのグルコースしか遊離せず、消化液ではセルロース以外の多糖類からグルコースが生産されると考えられた。アオサの糖組成からデンプンの分解が推定され、アメフラシのデンプン分解機構の解析が必要となった。一方、アラメと精製酵素を反応してもグルコースの遊離は全く見られず、褐藻類の酵素糖化法を開発するに

は、アメフラシによるアラメ分解機構の解明が必要となった。

2. 研究の目的

(1) アメフラシ消化液のデンプン分解システムの解明と応用

アメフラシ消化液に存在するアミラーゼ、 α -グルコシダーゼを全て精製し、酵素の性質を明らかにし、海藻中のデンプンをグルコースに分解する機構を解明する。

デンプン分解に関与する酵素群、およびセルロース分解に関与する酵素群のcDNAクローニングを行い、構造解析と大量発現系を構築し、アオサを効率よく糖化し、グルコースを回収できる方法を開発する。

(2) アメフラシ消化液によるアラメ分解システムの解明と応用

アラメ抽出液に存在する糖化酵素阻害物質を同定し、阻害機構を解析する。

アメフラシ消化液で分解される、アラメに含まれる多糖の同定と消化機構を解析する。

アラメ糖化に関わる糖化酵素のcDNAクローニングを行い、構造解析と大量発現系の構築により、アラメを効率よく分解可能な糖化方法を開発する。

(3) 固定化による糖化酵素の安定化と高効率分解システムの構築

3. 研究の方法

(1) アメフラシ消化液に含まれるデンプン分解酵素の精製

アメフラシ消化液より、硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲルろ過、HPLCを用いて、アミラーゼ、 α -グルコシダーゼを均一に精製し、酵素学的性質を明らかにするとともに、PCRクローニングするために必要なアミノ酸配列情報を獲得する。

(2) アラメ抽出液に含まれる糖化酵素阻害物質の同定

アラメ抽出液に含まれる糖化酵素阻害物質を同定し、各種糖化酵素に対する阻害特異性を解析する。

(3) アメフラシ消化液によってグルコースにまで分解される、アラメ中の多糖類の同定。各種多糖類含量の異なる種々の海藻をアメフラシ消化液で分解し、グルコース産生量を測定し、最も分解されやすい多糖類を推定する。この結果より精製した多糖類と糖化酵素を用いて、最終的にアラメ中の最もグルコースに変換される多糖類を同定する。

(4) アメフラシ消化液によるアラメ分解シ

システムの解明

アメフラシ消化液に含まれるタンパク質を、各種クロマトグラフィーで分画後、乾燥アラメ粉末と精製した各種糖化酵素に加え、アラメ糖化を促進するタンパク質を同定し、その作用機構を解析する。

(5) 固定化酵素の作成と糖化活性の測定

アメフラシ消化液から精製した糖化酵素の担体結合法(ポリアクリルアミド、セラミックス粒子等)、包埋法(アルギン酸Ca)による固定化を検討し、酵素を安定化するとともに、海藻糖化反応に再利用可能な固定化法を開発する。

4. 研究成果

(1) アメフラシ消化液のデンプン分解システムの解明

アメフラシ消化液より、2種類の α -アミラーゼ(59kDa, 80kDa)と2種類の α -グルコシダーゼ(74kDa, 86kDa)を精製し、酵素学的性質について明らかにした。レクチンプロットにより、59, 80kDa アミラーゼには糖鎖は検出されなかった。74kDa α -グルコシダーゼはConA, LCA レクチンと結合可能な糖鎖を有していた。N末配列とリジルエンドペプチダーゼ分解産物アミノ酸配列を比較すると、59kDa アミラーゼはアワビ58kDa アミラーゼと、80kDa アミラーゼはアワビ82kDa アミラーゼと高い相同性を示した。59kDa の α -アミラーゼは、塩素イオンと Ca^{2+} イオンで活性化された。特に塩素イオンによって20倍以上の活性化が見られた。一方、80kDa α -アミラーゼは塩素イオンと Ca^{2+} イオンによる活性化は全く見られなかった。デンプンと作用させると、59kDa α -アミラーゼは、マルトースが主要産物で、マルトトリオースとグルコースも生じた。80kDa α -アミラーゼは、グルコース、マルトース、マルトトリオースを、ほぼ同じ量生じた。 α -グルコシダーゼは、74kDa 酵素は α -1,4結合に特異性が高く、86kDa 酵素は α -1,6結合に高い特異性を示した。74kDa 酵素はマルトースを最も分解し、ショ糖も分解した。乾燥アオサ10mgは、80kD α -アミラーゼと74kDa α -グルコシダーゼと反応させると、0.8mgのグルコースを生じたが、2種類のアミラーゼと2種類のグルコシダーゼと反応させると1.2mgのグルコースが生産された。

さらに、 α -アミラーゼとアメフラシ74kDa-グルコシダーゼとの相乗作用は、アメフラシ α -アミラーゼが麹菌 α -アミラーゼより約2.5倍高く、59, 80kDa α -アミラーゼと β -グルコシダーゼとの相乗作用によって効率よくデンプンからグルコースが生産されることが判明した。これらの結果は、雑誌論文2 (FEBS, Open Bio 4 560-571, 2014)に発表した。

(2) アラメ抽出液に含まれる糖化酵素阻害物質の同定

アラメに含まれる阻害物質は、特に β -グルコシダーゼを強力に阻害し、アラメから水、またはメタノールで同様に抽出されることが判明した。各種褐藻類で抽出液の阻害活性を比較すると、アラメ、クロメ、サガラメに阻害活性が高く、ワカメやコンブの阻害活性は非常に低かった。阻害活性の強さは、海藻ポリフェノールとも呼ばれるフロロタンニンの含量と関連していることが判明し、精製したフロロタンニンやフロログルシノールによっても β -グルコシダーゼが強く阻害されたことより、フロロタンニンが阻害物質の本体であると考えられた。

(3) アメフラシ消化液によってグルコースにまで分解される、アラメ中の多糖類の同定。

ラミナランは β -1,3結合でグルコースがつながった多糖で、 β -1,6結合の分岐を有し、特に褐藻類に貯蔵多糖として多く含まれる。我々は、既にラミナランはアメフラシ消化液に含まれる β -グルコシダーゼによって効率よくグルコースに分解されることを証明している。また、ラミナランはアラメやサガラメに多く含まれる。以上の結果と(2)の結果より、 β -グルコシダーゼでグルコースが生産される、アラメ中の多糖類としてラミナランが推定された。

(4) アメフラシ消化液によるアラメ分解システムの解明

EHEP(Eisenia hydrolysis enhancing protein)の発見

アメフラシ消化液をSephacryl S-100にかけ、溶出液と β -グルコシダーゼを乾燥アラメと反応すると、分子質量20kDaの位置に、アラメ分解を著しく促進する活性が検出され、アメフラシ消化液中には、フロロタンニンによる β -グルコシダーゼ活性を抑制するタンパク質の存在が示唆された。次に、以下に示す方法により、EHEPの大量精製を行った。アメフラシ消化液(250 ml)を硫酸分画(0-30%飽和)し、得られた沈殿を20mM酢酸緩衝液、pH 6.0に溶解後、終濃度1モルになるように硫酸を加えた。遠心後、得られた沈殿を0.5M硫酸を含む20mM酢酸緩衝液、pH 6.0に溶解後、同緩衝液で平衡化したPhenyl-Sepharoseカラムにかけ、硫酸0.5Mから0モルの濃度勾配によって溶出した。アラメ分解促進活性のある画分を集め、濃縮後、Sephacryl S-100カラムにかけた。アラメ分解促進活性は、分子質量25kDのシングルピークとして溶出された。二次元電気泳動によって、等電点7.0の高純度のタンパク質であることが証明された。250mlの消化液より約25mgの精製標品が得られ、このタンパク質(EHEP)の消化液中の濃度は、0.1 mg/ml以上であることが判明した。

EHEP のクローニング

EHEP のリジルエンドペプチダーゼ分解ペプチドの部分アミノ酸配列からプライマーを設計し、PCR クローニングによって、アメフラシ肝臓 cDNA より EHEP cDNA を得た。5' および 3' 末端は、RACE 法によってクローニングし、完全長 cDNA の塩基配列を決定した。EHEP は、229 アミノ酸から構成され、N 末にシグナルペプチド(1-17)を有する。分子内にペリトロフィン A に存在する配列と類似した、システインが規則正しく並んだ配列があるのが配列上の特色である。この配列は、ペリトロフィンにおいてはキチン結合に重要であることが示唆され、また抗菌性ペプチドにも類似配列が存在することが報告されている。しかし、EHEP にはキチン結合活性や抗菌作用は認められなかった。

EHEP の作用機構

アラメ抽出液より有機溶媒抽出したフロロタンニンと EHEP と反応させると、EHEP はフロロタンニンと結合し不溶性となった。またフロロタンニンの β -グルコシダーゼ阻害活性は EHEP との反応によって消失した。さらに、フロロタンニンを構成しているフロログルシノールとも EHEP は反応し、不溶性の沈殿となった。タンニン酸は、EHEP と BSA に対して同じように不溶性の沈殿を形成したが、フロロタンニンは BSA とはほとんど反応することなく、EHEP と特異的に反応したことより、EHEP はフロロタンニンに高い選択性を持った結合タンパク質であることが判明した。また、pH 4 以下で強く反応することがわかった。

EHEP の発現

シグナルペプチドを削除した EHEP をグルタチオン S-トランスフェラーゼの下流に融合させたタンパク質を大腸菌に発現させたところ、予想サイズに一致したタンパク質が IPTG で誘導された。しかし、超音波処理後、不溶性のタンパク質として回収された。そこで、不溶性画分を 8M 尿素で可溶化後、順次尿素濃度を下げた溶液で透析した。8M から 6M, 4M, 3M, 2M, 1M, 0M と尿素濃度を減じることにより、融合タンパク質を可溶性のタンパク質として回収することができた。この融合タンパク質は、フロロタンニンによる β -グルコシダーゼ活性阻害を抑制し、活性のある状態で、EHEP の大腸菌発現に成功した。

(5) 固定化酵素の作成と糖化活性の測定

アメフラシ消化液より精製したセルラーゼ(21, 45kDa)、アミラーゼ(59, 80kDa)、 α -グルコシダーゼ(74 kDa)、 β -グルコシダーゼ(21, 110 kDa)を固定化し、その有用性について調べた。固定化様担体としては、BrCN- 活性化 Sepharose, Toyonite を用いた。また、包埋材としてはアルギン酸ビーズを用いた。固定化後、活性を示したのは α 、 β -グルコシダーゼのみ

であり、セルラーゼとアミラーゼは、固定化によってセルロースやデンプンに対する活性が著しく減少した。一方、グルコシダーゼはアルギン酸ビーズに包埋したものは、5-6 回使用可能であった。以上、グルコシダーゼはアルギン酸ビーズに包埋することによって、酵素のコストダウンができる可能性が示された。

(6) 糖化酵素の大量発現と応用

これまでに、アメフラシ消化液から精製された酵素の内、45kDa β -1,4-エンドグルカナーゼ、21kDa β -1,4-エンドグルカナーゼ、110kDa β -グルコシダーゼ、59kDa α -アミラーゼの完全長 cDNA をクローニングし、大腸菌や酵母での発現を試みているが、まだ成功していない。今後、発現ベクターや宿主細胞の検討を行いたいと考えている。

(7) 成果のまとめ

海洋生物の海藻分解機構の研究は、主に特定のセルラーゼ、グルコシダーゼなどの酵素タンパクレベルでのキャラクタリゼーション、または遺伝子の発現解析やトランスクリプトーム解析による糖化酵素群の網羅的解析が行われ、海藻の多糖類がどのような酵素の作用を受けて、最終的に単糖類にまでの過程を明らかにした生化学的な研究はほとんど行われていない。その原因として、消化酵素を大量に得ることができないために、酵素レベルの研究ができなかったことが最大の原因であると考えられる。私は、この点を打破すべく、比較的酵素が大量に得られやすく、海藻を主食とする大型の海産軟体動物であるアメフラシを用いて、全消化酵素の同定と分解過程の解明を目指した研究を行ってきた。活性のある酵素を使って初めて判明する、酵素の特異性や各酵素の相乗作用について、世界で初めて明らかにすることができた。

これまで、海藻は陸上植物と比較し、リグニンを含まないため、海藻の酵素による糖化は陸上植物より容易であると考えられてきた。しかし、本研究で判明したように、海藻は食害を防ぐための防御機構を有している。また、海藻から得られる重量あたりのグルコース量は陸上植物に比べ、かなり少ないため、次のアルコール発酵を効率良く行うためには、高濃度で海藻の糖化処理を行う必要があり、その場合、海藻由来の阻害物質によって酵素糖化が抑制される可能性が高い。本研究では、褐藻類の糖化を抑制する物質の同定するとともに、特に褐藻類がウニや貝類による摂食を防ぐために持つ摂食阻害物質に対して、アメフラシがどのような戦略を持って、それに対処しているか、明らかにすることができた。この研究成果は、大型海藻が多い褐藻類の有効利用に向けて、多大な貢献をされると考えられる。今後、酵素の大量発現系の構築を進め、糖化酵素のコストダウンを図ることが求められる。

5. 主な発表論文等
(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Akihiko Tsuji, Shuji Kuwamura, Akihiro Shirai, Keizo Yuasa
Identification and characterization of a 25 kDa protein that is indispensable for the efficient saccharification of *Eisenia bicyclis* in the digestive fluid of *Aplysia kurodai*. PLOS ONE 査読有 Vo.12(1):e0170669 (DOI:10.1371/journal.pone.0170669) January 27, 2017

Akihiko Tsuji, Nami Nishiyama, Miki Ohshima, Saori Maniwa, Shuji Kuwamura, Masataka Shiraishi, Keizo Yuasa
Comprehensive enzymatic analysis of the amylolytic system in the digestive fluid of the sea hare, *Aplysia kurodai*: Unique properties of two α -glucosidases and two α -glucosidases. FEBS Open Bio 査読有 Vol. 4, 2014, 560-570

[学会発表](計 8 件)

辻 明彦, 桑村修司, 湯浅恵造: アメフラシ消化液より単離したフロロタンニン結合蛋白質, EHEPの特性解析
日本生物工学会2016.9.28, 富山国際会議場 (富山県富山市)

桑村修司, 湯浅恵造, 辻 明彦
アメフラシ消化液に含まれるフロロタンニン結合タンパク質の機能解析
第57回日本生化学会中国・四国支部例会, 2016.5.28, 高知大学医学部 (高知県高知市)

川端 友里恵, 桑村 修司, 澤田 茉菜, 湯浅 恵造, 辻 明彦:
褐藻類に含まれる摂食阻害物質に対する巻貝の戦略,
日本農芸化学会中四国支部第44回講演会, 2016.1.23, 岡山県立大学 (岡山県総社市)

桑村 修司, 白石 将孝, 佐藤 仁昭, 湯浅 恵造, 辻 明彦:

アメフラシ消化液由来アラメ糖化促進タンパク質の特性解析,
第67回日本生物工学会, 2015. 10.27, 城山観光ホテル (鹿児島県鹿児島市)

白石 将孝, 桑村 修司, 大島 美紀, 馬庭 沙織, 湯浅 恵造, 辻 明彦:
アメフラシ β -グルコシダーゼのクローニング, 第66回日本生物工学会大会, 2014.9.10, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

桑村 修司, 白石 将孝, 大島 美紀, 馬庭 沙織, 湯浅 恵造, 辻 明彦:
アメフラシ消化液由来 β -グルコシダーゼのラミナランの完全分解,
第66回日本生物工学会大会, 2014.9.10, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

白石 将孝, 桑村 修司, 馬庭 沙織, 大島 美紀, 湯浅 恵造, 辻 明彦:
アメフラシ β -グルコシダーゼの構造解析,
第55回日本生化学会中国・四国支部例会, 2014.6.6, 愛媛大学 (愛媛県松山市)

桑村 修司, 白石 将孝, 大島 美紀, 馬庭 沙織, 湯浅 恵造, 辻 明彦:
アメフラシのラミナリン分解システム,
第55回日本生化学会中国・四国支部例会, 2014.6.6, 愛媛大学 (愛媛県松山市)

[図書](計 0 件)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
辻 明彦 (Tsuji Akihiko)
徳島大学・大学院生物資源産業学
研究部・教授
研究者番号: 20155360