

令和元年5月23日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07864

研究課題名(和文) アワビの褐藻食性を支える新しい糖質代謝系

研究課題名(英文) A novel alginate-assimilating pathway in abalone that feeds on brown seaweeds

研究代表者

尾島 孝男(Ojima, Takao)

北海道大学・水産科学研究院・教授

研究者番号：30160865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アワビなどの藻食性腹足類が、摂餌した褐藻に含まれるアルギン酸(ポリウロン酸)を、どのような糖質代謝系を用いて炭素栄養源として利用しているのかは長年不明であった。本研究では、アワビのアルギン酸分解酵素の作用によりアルギン酸から生じた不飽和ウロン酸単糖(DEH)が、DEH還元酵素(HdRed)によりケトデオキシグルコン酸(KDG)に還元されること、さらにKDGは特異的アルドラーゼHdAldにより最終的にピルビン酸とグリセルアルデヒドに分解されることを明らかにした。これらはアセチルCoAとなってTCA回路に導入されると考えられる。このような代謝系は他の藻食性腹足類にも存在すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物の解糖系としてエムデン・マイヤホフ経路がよく知られているが、この経路では褐藻のアルギン酸(ウロン酸)は代謝できない。そのため、褐藻を摂餌するアワビがどのような代謝経路でアルギン酸を栄養源としているのかは長年不明であった。申請者らは、アワビのアルギン酸代謝を可能とする酵素系を研究し、ウロン酸をピルビン酸とグリセルアルデヒドに代謝する新規の代謝経路の存在を明らかにした。この代謝系は、アワビだけでなく他の藻食性腹足類にも存在していると考えられ、藻食性腹足類がアルギン酸を栄養源として利用可能であることを新しい酵素反応系の存在により示し、長年の問題を解決した点で学術的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Herbivorous marine gastropods such as abalone and sea hare are considered to assimilate seaweed alginate using a specific alginate-metabolic enzymes. However, these enzymes had not been identified yet. In the present study, we investigated the alginate-assimilating enzymes of abalone, and have successfully identified an unsaturated alfa-keto acid (DEH) reducing enzyme HdRed and an alfa-keto-deoxygluconate (KDG) aldolase HdAld. These enzymes along with alginate lyases HdAly and HdAlex, which were previously identified by us, are considered to form an alginate-degrading and assimilating pathway as follows. 1) Alginate is degraded to DEH by HdAly and HdAlex. 2) DEH is reduced to KDG by HdRed. 3) KDG is split to pyruvate (PA) and glyceraldehyde (GA) by HdAld. 4) The thus resulted PA and GA are converted to acetyl CoA and assimilated by TCA cycle. This metabolic pathway was considered to distribute over many herbivorous gastropods.

研究分野：海洋生物学

キーワード：アワビ 藻食性 腹足類 アルギン酸 ウロン酸 代謝 酵素 解糖系

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

1. 研究開始当初の背景

藻食性腹足類のアワビ (*Haliotis discus hannai*) は、摂餌した褐藻に含まれるアルギン酸を、胃液中に分泌したエンド型およびエキソ型のアルギン酸リアーゼ (それぞれ HdAly および HdAlex) により、単糖のデオキシケトウロン酸 (4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid, DEH) に分解する。しかし、DEH は動物の主要解糖経路 (Embden-Meyerhof 経路) では代謝されないため、この DEH がアワビの炭素源として利用されているのかどうかは長年不明であった。一方、*Sphingomonas sp.* や *Pseudomonas sp.* などのアルギン酸資化細菌の場合、DEH は short-chain dehydrogenases/ reductases (SDR) スーパーファミリーに属する DEH 還元酵素により、デオキシケトグルコン酸 (2-keto-3-deoxy-D-gluconate, KDG) に変換され、次いで KDG キナーゼにより KDPG にリン酸化された後 KDPG アルドラーゼによりピルビン酸とグリセルアルデヒド-3-リン酸に分解される。KDG 以降の反応経路は Entner-Doudoroff 経路として細菌に広く分布することが知られているが、高等動物にはこのような経路は存在しない。一方、申請者らはこれまでに、アワビの肝臓から新規の DEH 還元酵素 HdRed を単離することに成功した (Mochizuki et al., *J. Biol. Chem.*, 290, 30962-30974 (2015))。さらに、この HdRed は細菌の DEH 還元酵素とは異なり、アルド-ケト還元酵素 (AKR) スーパーファミリーに属することも明らかにした。しかしながら、HdRed によって生じた KDG が、アワビにおいてその後どのように代謝されるのかは不明のままであった。また、HdRed のような DEH 還元酵素が、アメフラシやタマキビガイなどの他の藻食性腹足類にも存在するのかも不明であった。このような状況下で、申請者らはアワビのアルギン酸代謝経路の全容を明らかにするとともに、藻食性腹足類における DEH 還元酵素の分布を明らかにすべく本研究を開始した。

2. 研究の目的

(1) アワビは、摂餌した褐藻に含まれるアルギン酸を、胃液中に分泌した 2 種類のアルギン酸リアーゼ HdAly と HdAlex により DEH (不飽和単糖) に分解する。この DEH は消化盲嚢中の細管を通して肝臓に移行した後、DEH 特異的還元酵素である HdRed により KDG に還元される。そこで本研究では、まず、この KDG がその後どのような酵素の作用を受け、どのような産物に代謝されるかを明らかにすることとした。本研究では 2 つの酵素的 KDG 代謝経路を想定した。すなわち、細菌で知られている KDG キナーゼによる KDPG へのリン酸化反応と KDPG アルドラーゼによる KDPG の開裂反応を経る経路：これにより KDG はピルビン酸とグリセルアルデヒド-3-リン酸に代謝される。古細菌で知られている KDG アルドラーゼによる反応経路：これにより KDG はピルビン酸とグリセルアルデヒドへ開裂する。これらの反応により生じた産物は、アセチル CoA の原料となり最終的に TCA 回路で代謝される。

(2) アワビで見出された DEH 還元酵素と同様の酵素が、他の藻食性腹足類 (アメフラシおよびタマキビガイ (*Littorina brevicula*)) にも、存在するかどうかを調べる。存在が確認できたならば、その酵素の一次構造を解析し、アワビの DEH 還元酵素 HdRed と同様に AKR スーパーファミリーに属する酵素であるかどうかを明らかにする。

(3) 以上の結果に基づき、藻食性腹足類のアルギン酸分解・代謝機構の全容を模式図としてまとめ、褐藻のアルギン酸を炭素栄養源として利用可能とする酵素代謝系が藻食性腹足類に存在することを示す。

3. 研究の方法

(1) KDG が上記のと のいずれの経路で代謝されるかを明らかにするために、アワビの肝臓に上記経路を担う酵素 (あるいはその mRNA) が存在するかどうかを調べる。さらに、それらの酵素の反応産物を調べ、KDG がピルビン酸、グリセルアルデヒド-3-リン酸、あるいはグリセルアルデヒドへ代謝されることを確認する。酵素の発現を確認するために、まずアワビ肝臓から抽出した mRNA を用いて EST 解析を行い、その配列データベースを Local BLAST により検索し、KDG の変換に関与すると推定される酵素 (KDG キナーゼ、KDPG アルドラーゼあるいは KDG アルドラーゼ) の遺伝子を特定する。次いで、それらの cDNA をクローニングし、これらの cDNA を用いて大腸菌発現系を構築し、そこから候補遺伝子の産物を組換え酵素として生産する。それらの酵素により、KDG がどのような産物 (ピルビン酸やグリセルアルデヒドなど) に変換されるかを明らかにする。

(2) アワビで見出された HdRed と類似の DEH 還元酵素 (AKR スーパーファミリーに属する還元酵素) が、他のアルギン酸分解酵素をもつ藻食性腹足類にも存在することを確認する。そのために、アルギン酸リアーゼをもつことが既に確認されているアメフラシおよびタマキビガイを対象とし、その肝臓アセトンパウダーから粗酵素を抽出し、その DEH 還元活性を確認する。さらに、各種クロマトグラフィーにより酵素精製を行い、基質特異性や一次構造などの性状を解析する。一方、アルギン酸リアーゼをもたない肉食性の腹足類のエゾボラや、ホタテ貝のような二枚貝類からも粗酵素を抽出し、それらが DEH 還元

酵素をもたないことを確認する。それにより、DEH 還元酵素の存在がアルギン酸リアーゼの存在と密接に関連することを明らかにする。

(3) 以上の研究成果に基づき、藻食性腹足類におけるアルギン酸分解・代謝経路の全体像を示す概略図を作成し、解明された点と未解明の点を説明する。

4. 研究成果

(1) アワビ肝臓の EST 解析：アワビ肝臓から調製した mRNA を鋳型として cDNA を合成し、Illumina HiSeq シーケンサーにより 111,139 contigs から成る EST データライブラリーを作成した。このライブラリーから Local BLAST により、アルギン酸分解・代謝に関連する配列データを検索した。その結果、多糖リアーゼファミリー-14 (PL-14) に属するアルギン酸リアーゼの遺伝子配列が 4 つ (それらのうち 2 つは既知の HdAly と HdAlex で、残り 2 つはそれらのアイソザイム)、DEH 還元酵素が 2 つ (それらの一つは既知の HdRed で、もう一つはそのアイソザイム)、それと古細菌で知られている KDG アルドラーゼと類似の酵素が 3 種類特定された (表 1)。なお、KDG を KDPG にリン酸化する KDG キナーゼと KDPG を開裂する KDPG アルドラーゼと相同性を示す酵素遺伝子の発現は検出できなかった。これらの結果は、アワビの KDG 代謝は細菌とは異なり、KDG のリン酸化を経ずに直接 KDG アルドラーゼによってピルビン酸とグリセルアルデヒドに開裂する経路をとる可能性を示唆している。そこで、KDG アルドラーゼと推定された 3 種類の候補遺伝子 (Contig 番号に基づき、Hd18197, Hd30883, Hd34619 と命名) の演繹アミノ酸配列を、古細菌 (*Sulfolobus solfataricus*, *Sulfolobus tokodaii*, *Thermoproteus tenax*) のものと比較した (図 1)。その結果、アワビの KDG アルドラーゼと推定された酵素の一次構造は、古細菌の KDG アルドラーゼのものとは 24~29% 程度のアミノ酸同一率を示すことが分かった。なお、古細菌 KDG アルドラーゼで明らかにされている触媒残基や基質認識残基はアワビの推定アルドラーゼでもよく保存されていた。この EST 解析によって推定された 3 種類アワビの KDG アルドラーゼ遺伝子 (Hd18197, Hd30883, Hd34619) の産物が、KDG 開裂活性を有するかどうかを組換え酵素を用いて調べた。その結果、3 種類の遺伝子のうち Hd30883 の翻訳産物 (HdAld と命名) のみが強い KDG アルドラーゼ活性を示すことが明らかになった (図 2)。また、KDG から生じた産物はピルビン酸とグリセルアルデヒドであることが確認された。これらの結果は、アワビの肝臓ではアルギン酸由来の DEH は KDG に還元された後、HdAld によって直接ピルビン酸とグリセルアルデヒドに分解される可能性が強く示唆された。これらの分解産物は、既知の反応経路でアセチル CoA を経て TCA 回路に導入されると考えられる。この経路は、細菌で知られている Entner-Doudoroff 経路とは異なり、古細菌で知られている KDG アルドラーゼが関与する経路に類似している。

表 1. アワビ肝臓 EST 解析で発現が推定されたアルギン酸分解・代謝関連遺伝子

Contig番号	タンパク質 (同定済酵素名)	アミノ酸残基数
10827	アルギン酸リアーゼ (HdAlex)	273 a.a.
30632	アルギン酸リアーゼ (HdAly)	273 a.a.
33951	アルギン酸リアーゼ	275 a.a.
36829	アルギン酸リアーゼ	282 a.a.
34519	DEH還元酵素 (HdRed)	371 a.a.
37016	DEH還元酵素	368 a.a.
18197	KDGアルドラーゼ	234 a.a.
30883	KDGアルドラーゼ	302 a.a.
34619	KDGアルドラーゼ	320 a.a.

(2) アメフラシおよびタマキビガイの DEH 還元酵素：アワビ以外の藻食性腹足類としてアメフラシとタマキビガイに着目し、それらの肝臓粗酵素に DEH 還元活性があるかどうかを調べた。その結果、両者とも DEH を KDG に還元する酵素をもつことが明らかとなった。そこで、これらの粗酵素から DEH 還元酵素を精製し、それらの基本性状を解析することとした。その結果、タマキビガイからは DEH 還元酵素を約 80% の純度で精製できたが、アメフラシからは純度 20% 以下と精製が困難であった。これはアメフラシの粗酵素に含まれる大量の褐色色素がクロマト精製を妨害すること、本酵素がタマキビガイの酵素に比べてかなり不安定であることが原因と考えられた。なお、タマキビガイの DEH 還元酵素の基質特異性はアワビの HdRed と同様であり、その部分アミノ酸配列も HdRed と高い類似性を示すことが分かった。アメフラシ DEH 還元酵素の粗酵素からの精製は困難であったので、この酵素 (AkRed と称する) の性状解析には大腸菌で生産した組換え酵素を用いることとした。すなわち、アワビの HdRed および既存の配列データベース上の類似の AKR 酵素のアミノ酸配列に基づき縮重プライマーを合成し、アメフラシの肝臓の cDNA を鋳型として RT-PCR を行い、AkRed をコードする cDNA を取得した。さらに 5'-RACE および 3'-RACE を行い AkRed の全長をコードする cDNA を取得し、そこからアミノ酸配列を翻訳した。このアミノ酸配列と相同性を示すタンパク質を BLAST により検索し、アミノ酸配列を比較した。それによれば、AkRed のアミノ酸配列は、データベース上の *Aplysia californica* (ジャンボアメフラシ) の norsolorinic acid reductase A-like (GenBank accession number; XP_012936025) および *Biomphalaria glabrata* (ヒラマキガイ) の uncharacterized oxidoreductase YajO-like (GenBank accession number;

XP_013069996)をはじめとする複数の軟体動物の AKR 酵素と 89%および 62%という高い相同性を示し、エゾアワビの HdRed と 60%の相同性を示すことが明らかとなった。これらは AKR サブファミリー-17 としてまとめられる。一方、HdRed とは別のサブファミリーに属する細菌や哺乳類の AKR 酵素とは、総じて低い相同性を示した。例えば、*Haloflex volcanii* (好塩古細菌) の aldo/keto reductase (GenBank accession number; WP_004041159) とは 30%, *Homo sapiens* (ヒト) の alcohol dehydrogenase [NADP(+)] (GenBank accession number; NP_006057) とは 20%, *Homo sapiens* の aldose reductase isoform 1 (GenBank accession number; NP_001619) とは 17%, *Rattus norvegicus* (ネズミ) の 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (GenBank accession number; NP_612556) とは 15%であった。以上の結果より、AkRed は HdRed と同じ AKR サブファミリー-17 に属する酵素であると結論された。なお、AkRed を組換え酵素として発現してその DEH 還元活性を測定したが、可溶性酵素としての発現量は極めて少なく、薄層クロマトグラフィーや質量分析により DEH からの KDG 変換を定性的できたが、それ以上の詳細な解析はできなかった。アワビの HdRed は大腸菌での発現生産が可能であったことから (Mochizuki et al., *J. Biol. Chem.*, 290, 30962-30974 (2015)、AkRed の大腸菌発現が難しいのは熱安定性が低いなど、何らかの構造的な原因があると考えられる。この点については、今後の研究課題である。一方、アルギン酸リアーゼをもたない肉食性の腹足類のエゾボラや、ホタテ貝のような二枚貝類から抽出した粗酵素には、DEH 還元酵素が見られなかった。この結果は、DEH 還元酵素の存在が腹足類の褐藻食性 (アルギン酸消化性) と強く相関していること、すなわち DEH 還元酵素が腹足類におけるアルギン酸代謝の鍵酵素であることが示された。

(3) 図 3 に、腹足類におけるアルギン酸分解・代謝経路の全体像：本研究の結果から推定される藻食性腹足類のアルギン酸分解・代謝経路の全体像を、アワビを例にとって示す。まず、アワビが摂餌した褐藻に含まれるアルギン酸 (M ブロックと MG ブロック) は、胃液中でエンド型とエキソ型のアルギン酸リアーゼ (HdAly と HdAlex (HdAlex-II は HdAlex のアイソザイム)) により DEH にまで分解される。この DEH は消化盲嚢内の細管を通して肝臓に移行する。肝臓では、DEH はまず HdRed により NADPH 存在下で KDG に還元される。次いでこの KDG は HdAld の作用によりグリセルアルデヒドとピルビン酸に開裂する。それらはアセチル CoA となって TCA 回路に流入し完全代謝される。なお、ここで示した経路では、DEH の胃液から肝臓への移行を担うトランスポーターを明示していない。このトランスポーターは未同定であるが、胃液で生じた DEH が肝臓に移行する過程を明らかにするための重要因子である。DEH の肝臓への移行機構の解明には、今後、このトランスポーターの同定が必要である。

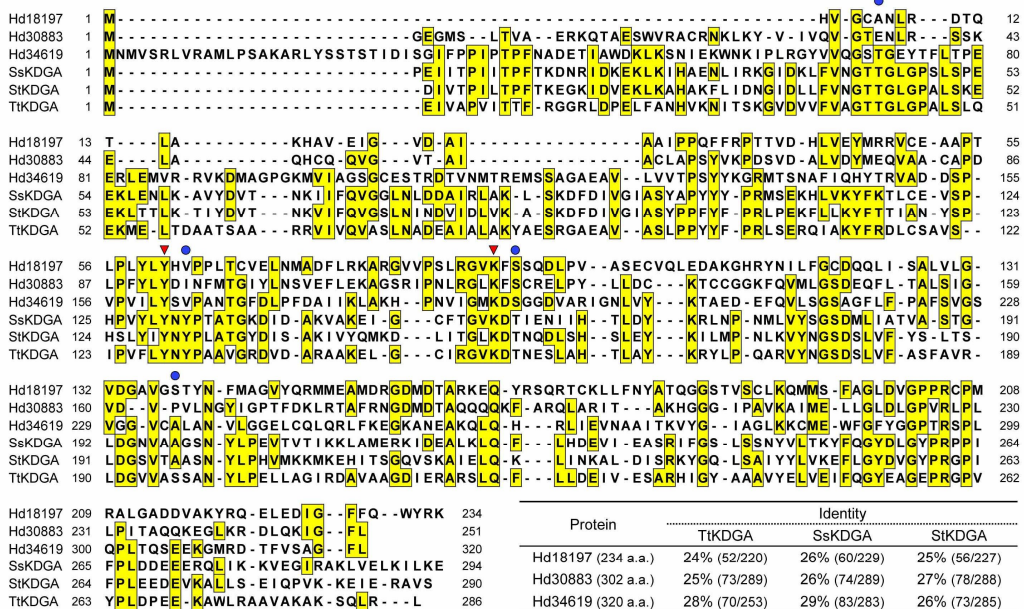


図 1. アワビの推定KDGアルドラーゼと古細菌KDGアルドラーゼの一次構造の比較

Hd18197, KDG alsolase-like protein from *Haliothis discus*; Hd30883, KDG aldolase-like protein from *H. discus*; Hd34619, KDG aldolase-like protein from *H. discus*; SsKdga, KDG aldolase from *Sulfolobus solfataricus* (GenBank accession number Q97U28); SsKdga, KDG aldolase from *Sulfolobus tokodaii* (GenBank accession number BAK54808); Tkdga, KDG aldolase from *Thermoproteus tenax* (GenBank accession number Q704D1).

495-510, in CRC Book Enzymatic Technologies for Marine Polysaccharides. CRC Press, USA (2019). (査読あり)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：井上 晶

ローマ字氏名：Akira Inoue

所属研究機関名：北海道大学

部局名：水産科学研究院

職名：准教授

研究者番号(8桁): 70396307

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。