

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：18001
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K07944
研究課題名(和文) 海藻細胞壁多糖フコイダンの生合成メカニズムの解明研究

研究課題名(英文) Biosynthesis mechanisms of fucoidan from algae

研究代表者

小西 照子 (Konishi, Teruko)

琉球大学・農学部・教授

研究者番号：30433098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまで全く明らかにされてこなかった海藻の細胞壁多糖の生合成メカニズムを解明することを目指し、フコイダンの生合成について研究を行った。中でもフコイダンの基質であるGDP-フコースの生合成について研究を行った。オキナワモズクのゲノム解読で明らかになったGDP-フコース生合成に関与する酵素のGDP-mannose-4,6-dehydratase、GDP-fucose synthase、およびFucokinase/GDP-fucose pyrophosphorylaseの3つの酵素の候補遺伝子をオキナワモズクより単離し、大腸菌による組換え酵素の作成及び活性試験を行い、酵素特性を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海藻の細胞壁多糖についてはその構造や種類についての報告はあるものの、生合成のメカニズムなど生理学的な知見は皆無である。そのため、海藻の細胞壁多糖が細胞内でどのような酵素によりどのように合成されているのかはほとんど解明されていない。また海藻、特に褐藻類のタンパク質の抽出方法が確立されていないことから生化学的データが少なく、細胞壁生合成にかんしては遺伝子解析結果をもとにした推察の域を超えない。本研究ではゲノム情報から得られた遺伝子情報をもとに遺伝子を単離し、細胞壁多糖の生合成に関与する酵素遺伝子の同定に成功した。この成果は、海藻の細胞壁合成研究における生化学的手法の知見として初めてのものである。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the mechanism for the fucoidan biosynthesis, especially the biosynthesis or synthesis pathway of GDP-fucose which is a precursor of fucoidan. For this objective, the recombinant enzymes for GDP-mannose-4,6-dehydratase, GDP-fucose synthase and fucokinase/GDP-fucose pyrophosphorylase derived from *Cladosiphon okamuranus* were prepared, and then these enzyme properties were characterized.

研究分野：海藻多糖

キーワード：細胞壁 糖ヌクレオチド フコイダン GDP-フコース 海藻

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フコイダンは $\alpha(1,3)$ 結合のフコースを主鎖とし、側鎖にグルクロン酸などが付加された構造を有する硫酸化多糖である。フコイダンは褐藻類に含まれる細胞壁多糖であり、特にオキナワモズクに豊富に含まれている。フコイダンには抗腫瘍活性など多くの生理機能が見出されており、その機能性はフコイダンの構造に寄るところが大きい。フコイダンの構造は海藻種によって異なるだけでなく、同じ海藻種でも生育環境や収穫時期の違いにより構造は変化するとの報告がある。しかしながら、フコイダンが海藻細胞内でどのように合成されるのか、その生合成機構は全く明らかでなかった。

2. 研究の目的

フコイダンの生合成機構を明らかにするため、まずはフコイダンの合成基質であるGDP-フコースの生合成経路について明らかにする。

3. 研究の方法

GDP-フコースの細胞内合成では、*de novo*経路またはサルベージ経路の2つの合成経路が存在する。*de novo*経路では GDP-mannose 4,6 dehydratase、GDP-fucose synthase、一方、サルベージ経路では fukokinase/GDP-fucose pyrophosphorylaseがGDP-フコース合成に関与する。近年、オキナワモズクのゲノムが解読され、ドラフトゲノム情報が公開されていたことから、これら3つの酵素の候補遺伝子をオキナワモズク盤上体から単離し、大腸菌による組換え酵素を作成し、酵素の解析を行った。また、フコイダン整合性にはアクセプターとしてフコオリゴ糖が必要であると考えられるが、市販されていないため容易に手に入らない。そこで、オキナワモズクからフコイダンを抽出し、フコオリゴ糖の調製を行った。

4. 研究成果

(1) fukokinase/GDP-fucose pyrophosphorylase (FKGP)の組換え酵素

オキナワモズク FKGP の遺伝子として登録されていた遺伝子のアミノ酸配列を単離し、組換え酵素を作成したものの、組換え FKGP の酵素活性は検出できなかった。さらに検索を行ったところ、登録されていた FKGP 候補遺伝子には、植物や動物の fucokinase および GDP-pyrophosphorylase に保存されているモチーフが欠損していることが分かった。そこで FKGP 候補遺伝子を FKGP2 として新たに単離し直したところ、FKGP2 遺伝子は GTP 結合モチーフ、フコース結合モチーフ、そして ATP 結合モチーフを有していることがわかった。オキナワモズク盤上体から FKGP 候補遺伝子を単離し、組換え酵素を作成し、酵素活性試験を行った結果、フコースから GDP-フコースの合成活性を確認した(図1)。このことより、組換え FKGP は fucokinase および GDP-pyrophosphorylase の二つの活性を保持するパイファンクショナルな酵素であることがわかった。さらに組換え FKGP の特性を調べたところ、至適温度は 37 °C、至適 pH は pH8.0 であった(図2)。これらの結果より、単離した FKGP2 遺伝子は、オキナワモズクの新しい FKGP 遺伝子であることが明らかとなり、オキナワモズクは fucokinase および GDP-pyrophosphorylase の2つの活性をもつ FKGP 酵素により、フコースからの GDP-フコースの合成を効率よく行っていることが示唆された。

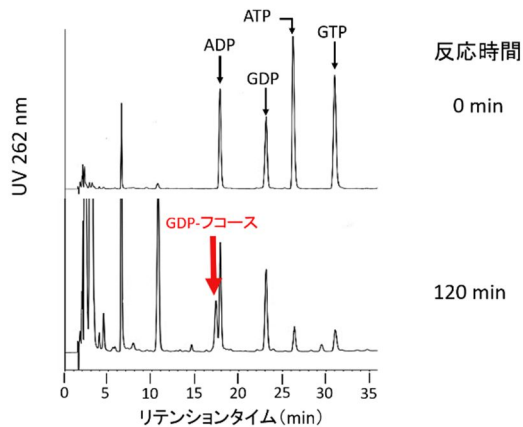


図1. オキナワモズク由来組換え FKGP の酵素活性

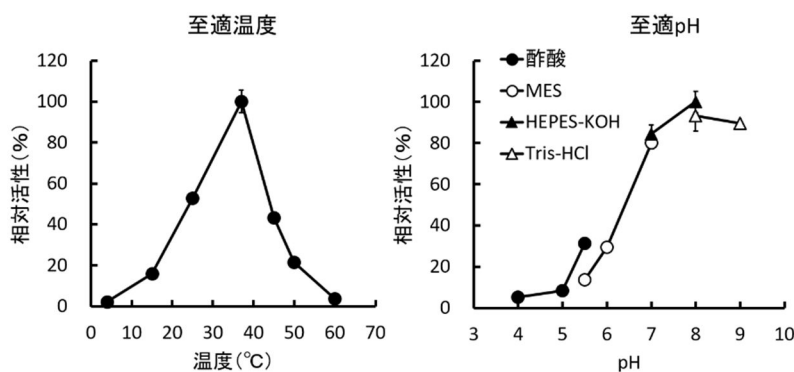


図2. オキナワモズク由来組換え FKGP の至適温度および至適 pH

(2) GDP-mannose 4,6 dehydratase (GM4,6D)および GDP-fucose synthase (GFS)の組換え酵素
 オキナワモズク盤上体から GM4,6D および GFS 候補遺伝子を単離し、それぞれ大腸菌による組換え酵素を作成した。しかし、組換え GM4,6D の酵素活性は確認できたものの、組換え GFS については酵素活性を検出できなかった。これは、GFS 候補遺伝子が他の生物由来の GFS 遺伝子に保存されたモチーフを有していないことが原因と考え、新たに GFS の候補遺伝子を単離し直し、組換え酵素を作成した。酵素活性については現在解析を行っている。

(3) フコイダンオリゴ糖

オキナワモズクから常法によりフコイダンを抽出した。抽出したフコイダンを濃度の異なる TFA で処理し、フコオリゴ糖の条件検討を行った。その結果、5 種類の分子量の異なる画分が得られ、それぞれの画分の修了は TFA の濃度により変化することがわかった (表 1.2)。

現在、それぞれの画分を精製し、NMR による構造を決定している。今後はフコイダン生合成のアクセプターに適した構造のオリゴ糖を大量に精製する予定である。

表1. HF-oligoの分子量分布

	分子量分布	c.a
1	2,500~1,300	1,900
2	1,300~1,000	1,150
3	1,000~ 900	950
4	900~ 700	800
5	700~ 400	550

表2. オリゴ糖の収量

TFA	1	2	3	4	5
0.5 M	20.5	35.4	7.6	14.7	21.9
0.2 M	22.4	35.2	7.3	13.3	21.8
0.03 M	38.4	28.3	7.2	5.4	20.7

(%)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米村真菜、小西照子
2. 発表標題 オキナワモズク (Cladosiphon okamuranus)由来フコイダンオリゴ糖調製法の確立
3. 学会等名 日本応用糖質科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇茂佐真夏、小西照子
2. 発表標題 オキナワモズク (Cladpsophon okamuranus) 由来細胞壁多糖の構造解析
3. 学会等名 日本藻類学会第42回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平山朝登, 小西照子
2. 発表標題 オキナワモズク (Cladosiphon okamuranus) 由来GDP-フコース合成酵素の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2019 年度 西日本・中四国支部合同沖縄大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Teruko Konishi: Structure and bioactivities of fucoidan as a functional algal polysaccharide	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 397
3. 書名 Glycoscience: Basic Science to Applications Naoyuki Taniguchi et al. (Ed.),	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----