

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340121

研究課題名(和文) 新種の海藻分解菌Myt-1株を用いた廃棄海藻の減容化と再利用方法の開発

研究課題名(英文) Development of methods for reducing volume and reutilization of waste seaweeds with a novel species bacterium Myt-1 capable of degrading seaweeds.

研究代表者

中村 省吾 (Nakamura, Shogo)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・教授

研究者番号：60134996

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)：われわれが富山湾から単離したSaccharophagus属の新種である(My-1株)は、褐藻、紅藻、緑藻の3種類全ての藻体や、その成分であるセルロースやアルギン酸など10種類以上の多糖類を分解することができるスーパー分解菌であることが確認された。さらに、遺伝子とタンパク質の解析結果から、Myt-1株は93種類もの多糖分解酵素遺伝子を持っていることが明らかになった。これらの結果から、Myt-1株とその産生酵素は、様々な産業に応用できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have isolated a novel Saccharophagus species strain Myt-1 from Toyama bay. Myt-1 was capable of degrading 3 kinds of seaweeds thalli and 10 or more kinds of polysaccharides, such as cellulose and alginic acid. The analysis results with genes and proteins show that Myt-1 has 93 kinds of genes for degrading polysaccharides. It is expected that Myt-1 and its produced enzymes are applicable in a variety of industries.

研究分野：環境生物学

キーワード：海藻分解菌 廃棄海藻 バイオマス利活用

1. 研究開始当初の背景

世界における海藻の年間の収穫量は、天然海藻が約 105 万 t、養殖海藻が約 1,600 万 t と大量であり (FAO yearbook 2008, <http://www.fao.org/>)、食品だけでなく、機能性素材、医薬品、化粧品、バイオマス燃料、養殖用飼料など様々な分野で利用されている。しかし、そのような利用に至る過程で、色落ちした藻体、藻体断片(端材)、根、茎など、廃棄される海藻残渣が多量に発生している。その量は、日本国内のワカメだけでも年間 20 万 t 以上になると試算されている (文献 1)。一方で、海洋の富栄養化や海藻養殖域の拡大によって、沿岸域への漂着海藻やアオサなどの異常発生も増え、それらが枯死・腐敗し、悪臭を発生させる問題も増加しつつある。このような廃棄海藻の処理に、横浜市では、年間約 4,000 万円もの費用を費やしている (文献 2)。現在、これらの廃棄海藻は、そのほとんどが埋立・焼却処分されているため、その減容(量)化や海洋バイオマスとしての再活用化が期待されている。

1988 年、米国でその発見・単離が報告された *Saccharophagus degradans* 2-40 株 (文献 3) は、アルギン酸、セルロース、寒天、ラミナリン、フコイダン、カラギーナンなど、10 種類以上の多糖類を分解することができるスーパー分解菌 (文献 4) として、海洋生態系での重要性だけでなく産業への応用面でも大きな関心が持たれ、以来 30 報を超える論文が発表されている。しかし、発見された地点だけでなく、世界中で新たな種や株の探索が行われてきたが、この約 20 年間で発見・単離されたという報告は無かった。

2. 研究の目的

上述のように、1988 年に報告されて以来、*Saccharophagus* 属の新たな種や株の発見に関する報告は無かった。2009 年、我々は、この *Saccharophagus* 属の新種を、海藻分解菌として富山湾の海底堆積物から発見・単離することに成功した (文献 5)。そこで、本申請では、この新 *Saccharophagus* 属 (Myt-1 株) を用いて、廃棄海藻を、減容化するとともに海洋バイオマスとして再活用化する方法を開発することを研究の主目的とした。また、*Saccharophagus* 属の富山湾における分布調査などにも着手することにした。

本申請では、まずは廃棄海藻の減容(量)化と海洋バイオマスとしての再活用化を目指して、Myt-1 株の各種海藻藻体に対する分解能力を調べる (平成 25 年度)。つぎに、Myt-1 株が、海藻藻体そのものや海藻に含まれる各種多糖類を分解する機構を解明することや、Myt-1 株が持つ多糖分解酵素遺伝子の検出を行う (平成 25~27 年度)。また、海藻分解に伴って産生される単糖やオリゴ糖の機能性の検証 (平成 25~27 年度) や、そのような糖類からのバイオ燃料創出の可能性も探る (平成 26~27 年度)。さらには、

Saccharophagus 属の富山湾における分布調査 (平成 26~27 年度) や、海藻藻体の分解によって産生された単細胞体の養殖用飼料としての有用性も検討する (平成 26~27 年度)。

これまでも、海藻が含有する多糖類や、海藻藻体そのものを分解することができる細菌を単離したとの報告があるが、いずれもその数は少ない。また、褐藻、紅藻、緑藻の 3 種全ての海藻藻体を分解できる細菌の報告例に至っては全く無い。そのような中、我々は、採集した富山湾海底堆積物から 3 種すべての海藻藻体を分解できる細菌 (Myt-1 株) の単離に成功した。したがって、この Myt-1 株を用いて本研究を推進すること自体が、廃棄海藻の減容化と再活用化において、特色ある独創的な研究になると思われる。さらには、Myt-1 株が持つ各種多糖類の分解酵素やそれらの遺伝子を検出することによって、これまでに無い新たな分解酵素や酵素遺伝子が見出される可能性も高い。そして、Myt-1 株が発現・分泌する酵素を用いた廃棄海藻の減容(量)化や、その際に産生される糖類を活用した機能性物質・医薬品・バイオ燃料などの創出に繋がることも容易に想定される。なお、褐藻、紅藻、緑藻の 3 種類の海藻藻体には、共通する多糖類に加えて特有な有用多糖類 (ラミナラン、フコイダン、カラギーナンなど) が含まれている。そのような多糖類は難分解性のものが多く、そのままでは機能性素材や医薬品などとしての活用には困難な面を持っている。また、海藻藻体や有用多糖類を、機械、高温、薬品などの物理的・化学的処理で分解することもできるが、そうすると、機能性の低下や損失が生じる。そこで、海藻藻体やそれが含有する多糖類を、Myt-1 株が発現・分泌する酵素を用いた、生理的条件下で分解・小分子化することによって、機能性の低下や損失を抑えた有用多糖類やオリゴ糖類の産生を行うことが出来るものと思われる。

3. 研究の方法

(1) Myt-1 株の、褐藻 (ワカメ、コンブ)、紅藻 (マクサ)、緑藻 (アオサ) の 3 種類の海藻藻体に対する分解能を調べる。各種藻体断片を入れた培養液に Myt-1 株を植菌し、その後、一定時間毎に培養液の一部を採取し、その粒度分布や乾燥重量の変化から分解率や分解速度を求める。また、分解に最適な培地、温度、塩分濃度、pH などを調べる。

(2) (1) の実験結果から得られた最適培養条件下で、各種海藻藻体を基質として培養した際に、細胞体内と培養液中に発現・分泌される多糖分解酵素を、SDS-PAGE とザイモグラムによって解析する。今回の申請では、バイオ燃料の創出に繋がる、セルラーゼ、アミラーゼ、アガラーゼ、アルギナーゼなどについて調べる。

(3) キチン、フコイダン、ラミナラン、カラギーナンなど、機能性オリゴ糖の産生に繋がる

る各種多糖の分解酵素を, Myt-1 株が発現・分泌できるかどうかを調べる。各種多糖を基質として入れた培養液に Myt-1 株を植菌し, その後, 一定時間毎に培養液の一部を採取し, Somogyi-Nelson 法でその中の還元糖量を測定し, 各分解酵素の発現・分泌の有無を検証する。

(4) ショットガン・クローニング法や Primer Walking 法などで, 各多糖分解酵素遺伝子の検出・同定を行う。プラスミドベクター-pUC118 と大腸菌 DH5 を用いたショットガン・クローニング法と Primer Walking 法で各種多糖類分解酵素遺伝子の検出・同定を行い, BLAST 検索によって酵素の新規性も探る。この方法で, 既に, アルギナーゼ遺伝子を 2 種 (*algMytA*, *algMytB*) 同定することに成功している。

(5) 同定した遺伝子と発現用 pET ベクター, そして発現用大腸菌 BL21 を用いて形質転換体を作製し, 各酵素を大量発現させたものを, Ni-アフィニティカラムなどで精製する。

(6) 得られた各酵素の至適温度や至適 pH, 金属イオンやキレート剤の活性への影響, さらには各種藻類藻体や各種多糖に対する分解活性を調べる。これらの結果を, 既報の酵素の活性や特性と比較し, Myt-1 株の酵素の優位性を検証する。

(7) 得られた各酵素を用いて, 海藻藻体や多糖類を分解させ, 薄層クロマトグラフィーや液体クロマトグラフィーを用いて, 産生されたオリゴ糖の解析を行う。

(8) 各種海藻藻体や多糖の分解から産生された, 各種オリゴ糖を含む溶液をメタボ発症マウス (TSOD マウス) に投与し, 糖尿病, 高脂血症, 肝腎障害などの発症の抑制や軽減などの効果を観察する。

(9) *Saccharophagus* 属の分布域を調べるために, ワカメ藻体を含んだ人工海水 (ASW) 培地による培養法と 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR-DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 法によって, 富山湾沿岸域の海水や海底堆積物などの試料中から *Saccharophagus* 属の検出・分離を試みる。

(10) 次世代シーケンサーで Myt-1 株の全ゲノム配列の解読とその解析を行う。これによって, 得られた配列を基にして, 既に同定した遺伝子の再確認やまだ同定されていない酵素の探索を行う。(次世代シーケンサーによる解析とアノテーションなどの情報解析は, 専門の業者に依頼する。)

(11) セルロースやデンプンなどを分解して産生したグルコースの利用を想定して, 海産の酵母を単離する。それら酵母を用いた発酵で, 産生されたアルコール量を定量する。現在, 既に 3 株の海産酵母を富山湾から単離することに成功しているが, さらなる単離もやりたい。

(12) 海藻藻体を分解して得られる海藻の単細胞体を, ウニのプルテウス幼生に投与し, 餌料としての効果を検証する。

4. 研究成果

セルロースやアルギン酸など 10 種類以上の多糖類を分解することができるスーパー分解菌 *Saccharophagus degradans* 2-40 株については, 海洋生態系での機能だけでなく産業への応用面でも大きな関心が持たれ, 多数の論文が発表されている。我々は, この *Saccharophagus* 属の 2 番目となる新種を, 海藻分解菌として単離することに成功した。そこで, 本研究では, この新 *Saccharophagus* 属 (Myt-1 株) を用いて, 廃棄海藻を減容化するとともに, 海洋バイオマスとして再活用化する方法を開発することを研究の主目的とした。

まず, Myt-1 株の, 褐藻 (ワカメ, コンブ), 紅藻 (マクサ), 緑藻 (アオサ) の 3 種類の海藻藻体に対する分解能を調べた。その結果, 3 種類全てを分解することができたが, 中でも褐藻に対する分解活性が最も高いことが再確認された。そして, 各種海藻藻体を基質として培養した際に発現・分泌される多糖分解酵素を, SDS-PAGE とザイモグラムによって解析した結果, セルラーゼ, アガラーゼ, アルギナーゼなどが各々複数発現することが見出された。さらに, 基質とする藻種によって, 発現強度や発現数が異なる傾向も見られた。また, キチン, フコイダン, ラミナラン, カラギーナンなど, 機能性オリゴ糖の産生に繋がる各種多糖を基質として培養すると, 各種多糖に応じた分解酵素が発現・分泌されることを示唆する結果も得られた。

プラスミドベクター-pUC118 と大腸菌 DH5 を用いたショットガン・クローニング法と Primer Walking 法で各種多糖分解酵素遺伝子の検出・同定を行った結果, アルギナーゼ遺伝子 *algMytC* とセルラーゼ遺伝子 *celMytB* を同定することができた。そこで, 同定した遺伝子と発現用 pET ベクター, そして発現用大腸菌 BL21 を用いて形質転換体を作製し, 各酵素を大量発現させたものを Ni-アフィニティカラムなどで精製し, 各酵素の至適温度や至適 pH などを調べた。これら同定した *algMytC* と *celMytB* について, その発現産物のさらなるキャラクタリゼーションを行った。その結果, 産物 AlgMytC は, 至適 pH が 9.0 と非常に高く, 至適温度も 40 と高温で, 様々な界面活性剤に対して高い安定性を示した。また, TLC で解析した結果, AlgMytC はアルギン酸を単糖, 二糖, 三糖に分解することが明らかとなった。一方, 産物 CelMytB は, 至適 pH は 7.5 で, 至適温度が 55 と高く, 様々な界面活性剤に対して高い耐性を示した。また, TLC の分析結果より, セルロースをグルコースとセロビオースにまで分解することが判った。

次世代シーケンサー-Miseq による解析から, Myt-1 株はそのゲノム DNA 中に, 93 種類もの多糖分解酵素遺伝子を持っていることが示唆された。そして, その内のアルギン酸

リアーゼ (*algMytD*) の, 大量発現系の構築と精製で得られた産物 (AlgMytD) を分析した結果, これまでに4報しか報告例がないPL (Polysaccharide Lyase) family17 に属し, 至適温度が 55 と高い酵素であることが判った。同様に, これまでの報告例が4報と少ない(Polysaccharide Lyase) family18 に属しているアルギン酸リアーゼ (*algMytE*) についても, 大腸菌 BL21 による大量発現系を構築し, その発現産物 (AlgMytE) の特性を解析した。その結果, 至適温度と至適 pH はそれぞれ 45 と 8.0 だった。また, 30 で 90 分間インキュベートしても 40%以上の活性を保持していたことから, 既報の PL family18 のアルギン酸リアーゼよりも熱安定性が高いことが示唆された。さらに, 2 価の金属イオンやキレート剤, 変性剤など, 様々な化学物質に対しても高い耐性を示した。

一方, 海洋における炭素循環に大変重要な役割を担っていると考えられている海藻・多糖類分解菌の分布域を, ワカメ藻体を含んだ人工海水培地による培養法と 16S rDNA を標的とした PCR-DGGE 法を用いて調べた。その結果, 培養法で, *Tenacibaculum* sp., *Saccharophagus* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Microbulbifer* sp., *Vibrio* sp., *Gilvmarinus* sp., *Photobacterium* sp. の 7 属に分類される海藻・多糖分解菌が検出された。また, DGGE では, 培養法では検出されなかった *Zobellia galactanivorans* や *Winogradskyella* sp. などの海藻・多糖分解菌も検出された。そして, このように検出された分解菌の菌種の分布が緩やかに季節変動していることも推察された。

なお, Myt-1 株によるワカメ藻体の分解産物が抗酸化能を有するかどうかを, DPPH ラジカル消去活性によって検証したところ, 培養 2 日目の試料で約 40%のラジカル消去活性が示され, ワカメ分解産物の機能性素材としての利用に期待が持たれた。

<引用文献>

1. Fujii, S, and Korenaga, T. Analysis of material flow and design zero-emission technology in production process of Wakame (*Undaria pinnatifida*). (in Japanese), *Environ Sci* **13**, 2000, 586-592.
2. Hiraoka, M *et al.* Crossing test among floating *Ulva thalli* forming 'green tide' in Japan. *Hydrobiologia* **512**, 2004, 239-245.
3. Andrykovitch, G. & Marx, I. isolation of a new polysaccharide-digesting bacterium from a salt marsh. *Appl Environ Microbiol* **54**, 1988, 1061-1062.
4. Ekborg, *et al.* (*Saccharophagus degradans* gen. nov., a versatile marine decomposer of complex polysaccharides. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2005,

1545-1549.

5. Sakatoku, A. *et al.* Isolation of a novel *Saccharophagus* species (Myt-1) capable of degrading a variety of seaweeds and polysaccharides. *MicrobiologyOpen* **1**, 2012, 2-12.

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3件)

- Takahashi, T., Nshida, T., Baba, H., Hatta, H., Imura, J., Sutoh, M., Toyohara, S., Hokao, R., Watanabe, S., Ogawa, H., Uehara, H. and Tsuneyama, K. Histopathological characteristics of glutamine synthetase positive hepatic tumor lesions in a mouse model of spontaneous metabolic syndrome (TSOD mouse). *Mol. Clin. Oncol.*, 2016, 査読有, DOI: 10.3892/mco.2016.924
- Tawara, M., Sakatoku, A., Tiodjio, R. E., Tanaka, D. and Nakamura, S. Cloning and characterization of a novel agarase from a newly isolated bacterium *Simiduia* sp. strain TM-2 able to degrade various seaweeds. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 177, 2015, 610-623. 査読有, DOI: 10.1007/s12010-015-1765-1
- Sakatoku, A., Tanaka, D., Kamachi, H. and Nakamura, S. Cloning and characterizing the thermophilic and detergent stable cellulose CelMytB from *Saccharophagus* sp. Myt-1. **54**, 2014, 査読有, 20-26. DOI* 10.1007/s12088-013-0421-0

[学会発表](計5件)

- 高橋明弘, 田中大祐, 中村省吾, 酒徳昭宏 (2016年6月) PL family18 に属する新規アルギン酸リアーゼ AlgMytE の特性解析. 環境バイオテクノロジー学会 2016 年度大会, 広島県民文化センター.
- 青山拓生, 田中大祐, 中村省吾, 酒徳昭宏 (2016年5月) 海藻分解菌は富山湾に広く分布している? 第18回マリンバイオテクノロジー学会大会, 北海道大学.
- 酒徳昭宏, 田中大祐, 中村省吾 (2015年5月) 海藻分解菌 *Saccharophagus* sp. Myt-1 株によるワカメ分解産物の抗酸化活性とアルギン酸リアーゼ (AlgMytC) の特性解析. 第17回マリンバイオテクノロジー学会大会, 東京海洋大学 (東京).
- Tsuneyama, K., Baba, H., Nishida, T. and Imura, J. (2015年3月) Daily moderate coffee intake inhibits pancreatic beta-cell damage and nonalcoholic steatohepatitis without improving obesity

in a mouse model of spontaneous metabolic syndrome. 24th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL), Istanbul, Turkey.

酒徳昭宏、田中大祐、中村省吾 (2014年3月) 多 種 類 の 海 藻 を 分 解 す る 細 菌 *Saccharophagus* sp. Myt-1 株の好温・界面活性剤耐性セルラーゼ (CelMytB) のキャラクターゼーション. 第 48 回日本水環境学会年会, 東北大学 (宮城).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 省吾 (NAKAMURA, Shogo)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・教授

研究者番号：60134996

(2) 研究分担者

常山 幸一 (TSUNEYAMA, Koichi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：10293341

田中 大祐 (TANAKA, Daisuke)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・教授

研究者番号：40360804