

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25660167

研究課題名(和文)二枚貝晶桿体を構成する新規タンパク質を活用したバイオリアクターシステム等の開発

研究課題名(英文)Development of a new bioreactor system based on bivalve crystalline style

研究代表者

豊原 治彦 (Toyohara, Haruhiko)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：90183079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：二枚貝の餌の種類に応じた晶桿体酵素の誘導を知る目的で、主要な糖源の分解に関わる酵素について、アサリを用いて調べた。CMセルロース及びブドウ糖を投与した場合はセルラーゼとアミラーゼ活性が強くなり、可溶性デンプンを投与した場合はアミラーゼ活性が強くなった。77kDaのセルラーゼがCMセルロースおよびブドウ糖給餌により誘導され、50kDaのセルラーゼがブドウ糖給餌により誘導された。米粉給餌個体では強いアミラーゼ活性が誘導された。以上の結果から、アサリは環境中の糖源を感知し、最適な酵素活性を誘導することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the changes of enzyme activities in the crystalline style of the clam *Venerupis philippinarum* induced by feeding of different sugar sources. Zymographic analysis revealed that a 77-kDa endo-1,3(4)- α -glucanase activity, not detected in non-feeding clams, was induced by CMC-feeding and also by glucose-feeding, while a 50-kDa endo-1,3(4)- α -glucanase activity was induced by glucose-feeding but not by CMC-feeding. An increase of a 140-kDa α -amylase activity was induced in rice flour-feeding clams compared to non-feeding clams. Reducing sugar assays revealed that only stronger α -glucosidase activity was induced at 1 day of starch-feeding, while both α -glucosidase and β -glucosidase activities were induced by 1 to 5 days of glucose-feeding. Both of these enzyme activities were also induced at 3 days of CMC-feeding.

研究分野：海洋生物機能学

キーワード：晶桿体 アサリ 酵素

1. 研究開始当初の背景

沿岸域には河川を通じて陸上植物由来の有機物や栄養塩が流入し、それらが海域にまで流入すると海水の富栄養化が起こり、赤潮の発生等による環境汚染の要因となる。干潟は天然の浄水場と言われるほど高い水質浄化機能を持ち、干潟で巨大なバイオマスを持つアサリ *Venerupis philippinarum*¹⁾ などの二枚貝類 *Bivalvia* は有機物や藻類を直接取り込むことで、干潟における環境汚染抑止効果の一端を担っている²⁾。また、干潟に生息するヤマトシジミ *Corbicula japonica* やキバウミニナ *Terebralia palustris*、その他のベントスは、環境中に消化酵素を分泌し有機物を分解することが分かっており、環境中で消化された分解物を摂餌していると考えられている³⁾。

晶桿体は、二枚貝類が主にアミラーゼやセルラーゼなどの糖類分解酵素を貯蔵する透明な棒状体組織である^{4,5)}。晶桿体は一部が胃の内部に突出し、胃楯と呼ばれるキチン質の胃壁に当たって回転することで、内部の酵素を胃内に分泌すると考えられている⁶⁻⁸⁾。晶桿体の構造は二枚貝の生息する環境の影響を強く受けることで知られ、重金属や有機性廃棄物などが存在する環境や、乾燥・貧酸素条件下に二枚貝が移ると晶桿体は消失し、生育に適した環境に二枚貝を移すと晶桿体は再度生成される⁹⁻¹¹⁾。干潟ではほかの水圏に比べて酸素の供給が少ないため微生物個体群数が変動しやすく、それに伴い各種酵素の産生量や有機物の分解量も変動すると考えられている¹²⁾。また干潟の環境は、潮汐による水位の変動や河川水の流入量の変化によって1日の内でも著しく変動し、季節によっては日射エネルギーやCO₂流入量も変化する¹³⁾。これらの特性により、干潟環境は海域や陸域の環境と比較すると流動的であると言え、干潟に生息する二枚貝類の晶桿体の長さやpH・総タンパク量は、干潟の水位の変化に

じて増減することが分かっている¹⁴⁾。現在までに干潟に生息する様々な二枚貝種において、消化器官内の消化酵素の基本的性質を解明する研究が為されており、ヨーロッパザルガイ *Cerastoderma glaucum* では、3日間絶食または給餌した個体群で消化管内の糖類分解酵素活性を比較した際に、給餌群の酵素活性が高いことが分かっている¹⁵⁾。しかし、給餌の有無や与える餌種を変えることによって晶桿体内の糖類分解酵素がどのように変化するのかについて調べた研究はこれまでに行われていない。

2. 研究の目的

二枚貝は晶桿体 (crystalline style) と呼ばれる特有の消化器官を持つ。晶桿体は透明なゼラチン様棒状体であり、各種消化酵素が固定化されたものである。これが、胃内突出部分から徐々に摩耗し、消化酵素を胃内に供給する機能を有するが、これまで晶桿体における消化酵素の固定化機構は不明であった。最近、申請者らはその主要タンパク質(クリスタルタンパク質、crystal protein)が、様々なタンパク質を固定化するマルチアダプター機能を有することを見出した。

本研究では、干潟に生息する二枚貝の中でも大型で水質の浄化への寄与が大きいと考えられるアサリ *Venerupis philippinarum* に関して、餌の量を始めとした様々な環境要因が激しく変動する干潟の環境に合わせ、晶桿体内糖類分解酵素量及び活性が変化するのではないかという疑問を明らかにする目的で、アサリの晶桿体内の主要酵素であるデンプン分解酵素及びセルロース分解酵素の基本的性質を明らかにするとともに、アサリを給餌実験に供した後に上記酵素活性の変化を測定した。また晶桿体の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色によって晶桿体の構成成分を分析した。また、クリスタルタンパク質のマルチアダプター機能の分子機構を明らかにし、そのバイオリクターシス

テムやドラッグデリバリーシステムの新規な担体としての応用の可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 材料

実験には熊本県産の市販のアサリ（殻長20~30 mm）を用いた。実験室に持ち帰ってすぐに解剖を行い、アサリの晶桿体を摘出した。晶桿体の重量を測定後、重量濃度が50 mg/mLとなるように50 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）を加えてホモジェナイズし、12,000 × gで10分間遠心分離した。上清を回収し、酵素反応に供するまでの間氷上に静置した。なお、第1章でおこなったすべての実験の対照群数はn=3である。

(2) 酵素反応液

デンプン分解酵素の活性を測定する場合には、酵素抽出液20 μLと1 M酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）20 μL、基質液として可溶性デンプン溶液160 μLを混合した。セルロース分解酵素の活性を測定する場合には、酵素抽出液20 μLと1 M酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）20 μL、基質液として1%カルボキシメチル（CM）セルロース溶液160 μLを混合した。基質溶液の濃度を変えて（0~16 μg/μL）酵素反応液を調製し、20℃で20分間振盪し酵素反応を起こさせた。Jueら（1986）に基づき、反応液20 μLとテトラゾリウムブルー溶液1 mLを混合し、100℃で3分間加熱した。その後流水で冷却し、酵素反応によって生成する還元糖量を660 nmの吸光度測定により求めた¹⁶⁾。吸光はUVmini-1240紫外可視分光光度計（島津製作所）で測定した。コントロールとして酵素抽出液の代わりに蒸留水20 μLを加えた反応液の吸光度を測定し、基質液中にもともと存在していた還元糖に由来する吸光度を測定した。算出した値をもとにLineweaver-Burk plotを作成し¹⁷⁾、両酵素のミカエリス定数を算出した。

4. 研究成果

(1) デンプン分解酵素の場合、基質溶液濃度16 μg/μLまで還元糖産生量が上昇し、10 μg/μL以降は緩やかな上昇であった。セルロース分解酵素の場合、基質溶液濃度8 μg/μLまで還元糖産生量が上昇し、それ以降は一定となった。また各酵素のミカエリス定数を算出した結果、デンプン分解酵素は11.14 μg/μL、セルロース分解酵素は116.967 μg/μLであった。

(2) 活性の温度安定性の検討

デンプン分解酵素の場合、40℃以上で加熱した際、還元糖の産生量が減少した。また100℃の加熱処理の後には還元糖の産生がなかった。セルロース分解酵素の場合、20℃及び40℃の加熱処理では還元糖産生量の変化がなく、100℃の加熱処理の後には還元糖の産生がなかった。

(3) 活性の温度依存性の検討

両酵素ともに、還元糖産生量は反応温度が20℃、4℃、37℃の順に高かった。

(4) 活性のpH依存性の検討

デンプン分解酵素の最大活性はpH 6.0~7.0、一方セルロース分解酵素の最大活性はpH 5.0~7.0に見られた。また、両酵素ともにpH 3.0での酵素活性が高くなった。

Lineweaver-Burk plotから決定係数を算出すると、デンプン分解酵素は $R^2 = 0.9834$ 、セルロース分解酵素は $R^2 = 0.9597$ となったため、データ間の相関は十分強いと判断できる。また各酵素のミカエリス定数を算出した結果、デンプン分解酵素は11.14 μg/μL、セルロース分解酵素は116.967 μg/μLであった。ミカエリス定数は酵素と基質の親和性を表し、その値が低いほど基質と酵素の親和性が高いことを示す。そのためアサリ晶桿体内に

関しては、セルロース分解酵素と比較してデンプン分解酵素の活性が強いことが示された。

安定同位体比分析により、アサリは主に植物プランクトンや底生微細藻類を主に摂餌し、セルロースを主成分とする陸上由来有機物の摂餌量は少ないことが分かっている¹⁸⁾。緑藻類 *Chlorophyceae* は裸子植物と同様に光合成によってデンプンを貯蔵し、一方紅藻類 *Rhodophyta* は独自の同化産物である紅藻デンプンを細胞質内に貯蔵する¹⁹⁾。そのため、アサリは主要な餌種である植物プランクトンや底生微細藻類がもつデンプンを効率よく分解するために、高いデンプン分解酵素活性を有していると推測される。

今後はアサリが有する高いデンプン分解酵素活性が、(1) 酵素の数量が多いことに由来するのか、(2) 酵素そのものの活性が強いことに由来するのかを、より詳細に分析する必要がある。しかし、ミカエリス定数の算出は本来1つの基質分子から1つの生成物を作り出す単一の酵素に関しておこなうべきであり、今回の実験のように1つの高分子多糖類を複数の糖類に分解するデンプン分解酵素及びセルロース分解酵素では算出するべきではない数値である。そのため本実験で算出した両酵素のミカエリス定数は、あくまで目安の数値として扱うべきであろう。

酵素活性の温度安定性を調べた結果、デンプン分解酵素の場合、20 で加熱後の酵素反応による還元糖産生量と比較し、40 で加熱後の酵素反応による還元糖産生量が大幅に減少した。また100 の加熱処理の後には還元糖の産生がなかった。これらのことから、デンプン分解酵素は20 から40 間の温度での10 分間の加熱処理により失活し、100 ・10 分間の加熱で完全に失活することが示された。

セルロース分解酵素の場合、20 及び40 の加熱処理では還元糖産生量の変化がなか

ったため、酵素活性は変化していなかったと考えられる。一方60 以上の加熱処理で還元糖産生量は減少し始め、100 の加熱処理の後には還元糖の産生がなかったことから、セルロース分解酵素は40 以上・10 分間の加熱で失活を始め、100 ・10 分間の加熱で完全に失活することが示された。

これらの結果から、自然界でのアサリの生息水温は季節にもよるが20 前後であることが多いため、晶桿体内糖類分解酵素の熱変性は引き起こされないことが推測できる。

酵素活性の温度依存性を調べた結果、デンプン分解酵素及びセルロース分解酵素ともに、還元糖産生量は反応温度が20、4、37 の順に高かった。上述したデンプン分解酵素は20 から40 間で失活するという結果と、37 の反応条件での還元糖産生量が減少したという結果から、デンプン分解酵素は20 から37 で失活し始めると判断できる。両酵素による4 条件での還元糖産生量が20 条件での還元糖産生量より減少したのは、アサリの生息水温によるところが大きいだろう。先述のとおりアサリの生息水温は20 前後である。そのためアサリ晶桿体内の糖類分解酵素は20 前後の環境において最大活性を示すように適応したことが推測できる。

本実験によりアサリ晶桿体内のデンプン分解酵素及びセルロース分解酵素の反応最適温度は20 であることが示されたため、第2章での酵素反応実験は20 条件でおこなうこととした。

酵素活性のpH 依存性を調べた結果、デンプン分解酵素の最大活性はpH 6.0 7.0、一方セルロース分解酵素の最大活性はpH 5.0

7.0 に見られた。また、両酵素ともにpH 3.0 での酵素活性が高くなった。マゼランツキヒガイ *Lacopecten magellanicus* では、デンプン分解酵素の1種である α -グルコシダーゼ及びセルロース分解酵素の1種である β -

ルコシダーゼの最大活性は pH 4.0 前後に見られる⁴⁾。アサリに関しては α -グルコシダーゼ及び β -グルコシダーゼの最大活性が pH 3.0 に表れ、このような結果が得られたと推測される。またマゼランツキヒガイの晶桿体内 α -アミラーゼやヨーロッパザルガイの中腸腺内アミラーゼ及びセルラーゼの最大活性が弱酸性条件で見られるのと同様に、アサリ晶桿体内のデンプン及びセルロース分解酵素の最大活性も弱酸性条件で見られることが確認できた^{4,15)}。

結晶セルロース・米粉を投与した場合、給餌後 3 日間、無給餌・給餌個体間で酵素活性に有意差は見られなかった (t -test, $p > 0.1$)。CM セルロースを投与した場合、給餌後 2 日間は活性に有意差が見られなかったが ($p > 0.1$)、給餌後 3 日目に、デンプン分解酵素 ($p < 0.1$) 及びセルロース分解酵素 ($p < 0.05$) 活性が有意に上昇した ($p > 0.1$)。可溶性デンプンを投与した場合、給餌後 1 日目においてのみデンプン分解酵素活性が上昇した ($p < 0.1$)。ブドウ糖を投与した場合、セルロース分解酵素に関しては給餌後 5 日間、活性が有意に上昇し ($p > 0.1$)、デンプン分解酵素に関しては給餌後 1・2・4・5 日目に活性が有意に上昇した ($p < 0.05$)。

本稿ではクリスタルタンパク質の構造・機能ならびにその応用については詳述しなかった。これらについては知的権利化の可能性の検討を含め、今後さらに研究を進めて行く予定である。

<引用文献>

- 1) Dame RF. *Ecology of marine bivalves: an ecosystem approach*. CRC Press, London. 2011.
- 2) Beukema J. Cadée G. Growth rates of the bivalve *Macoma balthica* in the Wadden Sea during a period of eutrophication: Relationships with concentrations of pelagic diatoms and flagellates. *Mar Ecol Prog Ser*. 1991; **68**: 249-256.
- 3) Yamada K. Maegawa S. Toyohara H. Benthic animal contribution to cellulose breakdown in sediments of mangrove estuaries in the southwestern islands of Japan. *Plankton and Benthos Research*. 2013; **8**: 96-101.
- 4) Wojtowicz M. Carbohydrases of the digestive gland and the crystalline style of the Atlantic deep-sea scallop (*Placopecten magellanicus*, Gmelin). *Comp Biochem Physiol A mol integr physiol*. 1972; **43**: 131-141.
- 5) Ju SM. Kwon O. Lee JS. Digestive Enzymatic Compositions and Activities of the Digestive Diverticula in Three Species of Bivalves. *The Korean Journal of Malacology*. 2011; **27**: 371-376.
- 6) Yonge CM. On the structure and adaptations of the Tellinacea, deposit-feeding Eulamellibranchia. *Phil Trans R Soc*. 1949; **234**: 29-76.
- 7) Bedford JJ. Reid MS. Gel electrophoresis of proteins in the crystalline style of certain mollusca. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1969; **29**: 659-664.
- 8) Morton BS. The tidal rhythm and rhythm of feeding and digestion in *Cardium edule*. *J Mar Biol Ass U.K.* 1970; **50**: 499-512
- 9) Alyakrinskaya O. The dimensions, characteristics and functions of the crystalline style of molluscs. *Biol Bull*. 2001; **28**: 523-535

- 10) Bailey K. Betty D. The lamellibranch crystalline style. *Biochem J* . 1960; **76**: 487.
- 11) Yonge M. The disappearance of the crystalline style. *Nature* .1926; **117**: 691-692.
- 12) McLatchey. George P. Reddy KR. Regulation of organic matter decomposition and nutrient release in a wetland soil. *J Environ Qual*. 1998; **27**: 1268-1274.
- 13) Peter M. Harry J. David W. Paul A. Dennis E. Seasonal trends in energy, water, and carbon dioxide fluxes at a northern boreal wetland. *Jour Geophys Res*. 1997; **102**: 29,009-29,020.
- 14) Langton RW. Digestive rhythms in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biol*. 1977; **41**: 53-58.
- 15) Ibarrola I. Larretxea X. Iglesias J. Urrutia M. Navarro E. Seasonal variation of digestive enzyme activities in the digestive gland and the crystalline style of the common cockle *Cerastoderma edule*. *Comp Biochem Physiol A mol integr physiol*. 1998; **121**: 25-34.

5. 主な発表論文

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊原 治彦 (TOYOHARA, Haruhiko)
京都大学・農学研究科・准教授
研究者番号 : 90183079

(2) 研究分担者

前川 真吾 (MAEGAWA, Shungo)
京都大学・情報学研究科・助教