

研究種目：基盤研究 (B)  
研究期間：2007～2010  
課題番号：19380117  
研究課題名 (和文) アワビの海藻多糖代謝機構の解明

研究課題名 (英文) Studies on the metabolic mechanism for algal polysaccharides in abalone

#### 研究代表者

尾島 孝男 (OJIMA TAKAO)  
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授  
研究者番号：30160865

研究代表者の専門分野：海洋生物工学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：アワビ、海藻、多糖、アルギン酸、多糖分解酵素、代謝、 $\alpha$ -ケト酸

#### 1. 研究計画の概要

アワビなどの藻食性無脊椎動物は、海藻に含まれる様々な多糖を分解する酵素をもつ。例えばアルギン酸、セルロース、マンナン、ラミナラン、キシランなどを分解するアルギン酸リアーゼ、セルラーゼ、マンナーゼ、キシラナーゼである。アワビはこれらの酵素を消化液中に分泌し、それらにより海藻の多糖を分解して生じたオリゴ糖や単糖を炭素源およびエネルギー源として利用していると考えられる。それらのうち、セルロースやマンナンなどの分解によって生じるグルコースやマンノースは通常解糖系によって代謝可能であるが、アルギン酸分解物であるウロン酸や $\alpha$ -ケト酸は直接解糖系に導入されないため、どのように代謝利用されるか不明である。本研究は、アワビ消化液から各種の多糖分解酵素を単離し、その生化学的性状を解析すると共に、アルギン酸のような酸性多糖の代謝に関連する一連の酵素系の性状を解析することにより、アワビがどのように海藻酸性多糖を代謝利用しているかの全体像を明らかにするものである。

#### 2. 研究の進捗状況

これまでに申請者らは、褐藻に含まれる様々な多糖を分解する酵素をアワビから単離し、その基本性状を明らかにしてきた。特に興味深い酵素として、ラミナラン分解酵素である $\beta$ -1,3-グルカナーゼについては詳しく調べた。それによると、本酵素は糖転移反応を介した特異なグルコース生産機構を有することが明らかになった。この機構は、他の軟体動物の $\beta$ -1,3-グルカナーゼにも認められ、糖質栄養源の乏しい海藻から効率的に

グルコースを獲得するために適していると考えられた。

一方、アルギン酸分解に関しては、エンド型とエキソ型の2種類のアルギン酸リアーゼを単離し、それらがアルギン酸に協同的に作用して、非還元末端に不飽和糖をもつオリゴ糖と 2-keto-3-deoxy-gluconaldehyde ( $\alpha$ -ケト酸)を生じることを明らかにした。さらに、飼育アワビに対する摂餌および絶食試験を行い、アワビ消化管中のアルギン酸分解物が肝臓中に移行すること、また一定時間の後に代謝消失することを見出した。次いで肝臓抽出物に含まれる $\alpha$ -ケト酸転換因子の性状を調べ、この因子が選択分子量 14,000の透析膜を通過する程度の大きさをもつ、熱や酸に安定な成分であることを明らかにした。また、この因子による $\alpha$ -ケト酸の代謝産物はピルビン酸とグリセルジアルデヒドであることを明らかにした。このことから、アルギン酸分解物はアワビの肝臓においてピルビン酸を経て TCA 回路に導入されていると推定した。また、グリセルジアルデヒドも何らかの段階で解糖系に導入されることが考えられるがその機構は未だ不明である。一方、アワビの肝臓中には共生微生物の存在が示唆される結果が得られ、その作用によりアルギン酸分解物がさらに有機酸などの低分子に転換されている可能性が示唆された。以上のように、アワビによる海藻多糖の分解代謝メカニズムは代謝産物の同定とともに明らかになりつつある。

#### 3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している

アワビがアルギン酸分解酵素をもつこと

は古くから知られていたが、アワビが摂餌した褐藻のアルギン酸がその後どのように代謝されるかについては全く不明であった。本研究では、アルギン酸が消化液中で不飽和 2 糖と  $\alpha$ -ケト酸に分解されること、それらが肝臓に移行しそこでピルビン酸とグリセルジアルデヒドに代謝されることを見出した。これらの発見は、従来知られていない新知見であり、この反応に関与する様々な因子についての研究展開を強く促すものである。当初、このような機構の存在は予想しておらず、極めて意義の大きい発見と考えられるので、計画以上に発展していると評価した。

#### 4. 今後の研究の推進方策

アルギン酸がアルギン酸リアーゼにより不飽和オリゴ糖や  $\alpha$ -ケト酸に分解された後、肝臓中の何らかの因子によりピルビン酸とグリセルジアルデヒドに代謝されるという研究成果をさらに進展させるために、この反応を触媒している因子（複数を想定）を同定する。それにより、アルギン酸の代謝経路の全容を明らかにできる。それにより、これまで不明であったアワビにおけるアルギン酸の栄養源としての意義を明らかにできる。また、アルギン酸は酵母や乳酸菌の発酵源とならないため、褐藻をエタノールやバイオプラスチックとするのは極めて困難であるが、本研究で得られたアルギン酸代謝に関する知見を生かして、アルギン酸を有用発酵源に転換する技術の開発にも取り組む。一方、軟体動物の  $\beta$ -1,3-グルカナーゼは高い糖転移活性を有し、効率的にラミナリンをグルコース化できることを明らかにしたが、この糖転移活性を利用すると様々なアグリコンを導入したヘテロオリゴ糖（配糖体）を合成可能である。今後は、軟体動物の  $\beta$ -1,3-グルカナーゼを利用した新規の機能性オリゴ糖やリーディング化合物の作出技術の開発につなげる。

#### 5. 代表的な研究成果

(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 6 件)

1. Y. Kumagai and T. Ojima. Enzymatic properties and cDNA cloning of a  $\beta$ -1,3-glucanase from the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 154B, 113-120 (2009). 査読有
2. M. Hata, Y. Kumagai, M. M. Rahman, S. Chiba, H. Tanaka, A. Inoue, and T. Ojima. Comparative study on general properties of alginate lyases from some marine gastropod mollusks. *Fish.*

*Sci.*, 75, 755-763 (2009). 査読有

3. S. Yamamoto, T. Sahara, D. Sato, K. Kawasaki, S. Ohgiya, A. Inoue, and T. Ojima. Catalytically important amino-acid residues of abalone alginate lyase HdAly assessed by site-directed mutagenesis. *J. Enzym. Microbiol. Tech.*, 43, 396-402 (2008). 査読有

[学会発表] (計 20 件)

1. 木本雄太、熊谷祐也、井上晶、田中啓之、澤辺智雄、尾島孝男、エゾアワビ肝臓におけるアルギン酸代謝に関する研究、平成 22 年度日本水産学会春季大会、平成 22 年 3 月 27 日、日大生物資源科学部、藤沢
2. Takao Ojima and Yuya Kumagai. Utilization of a  $\beta$ -1,3-glucanase from mollusks for the production of novel heterooligosaccharides. The 4<sup>th</sup> international symposium on the marine biotechnology and advanced materials. June 12-13, 2008. Kangnung National University, Korea.
3. 長畑雄也、熊谷祐也、井上晶、田中啓之、澤辺智雄、尾島孝男、エゾアワビ・アルギン酸リアーゼによるアルギン酸分解機構の解析、平成 20 年度日本水産学会春季大会、平成 20 年 3 月 28 日、東海大学海洋学部 (清水)