

機関番号：10101

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）Study on the metabolic pathways for seaweed 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

研究成果の概要(和文):アワビやアメフラシなどの食藻性腹足類は、アルギン酸やラミナラン、マンナン、キシラン、セルロースなどの海藻多糖を特異的に分解する酵素をもつ。これらの酵素によって分解された海藻多糖は、腹足類の解糖系や TCA 回路により代謝される。本研究では、腹足類の海藻多糖代謝機構に関する理解を深めるために、消化液に含まれる一連の多糖代謝系酵素、特にアルギン酸、ラミナラン、マンナンの分解に関連する酵素の性状を解析した。

研究成果の概要（英文）: Herbivorous marine gastropods like abalone and sea hare possess various polysaccharide-degrading enzymes which can degrade seaweeds' polysaccharides such as alginate, laminaran, mannan, xylane, and cellulose to oligo- and monosaccharides. These saccharides are considered to be metabolized *via* glycolytic pathway and TCA cycle. In the present study, we isolated several polysaccharide-degrading enzymes, e.g., alginate lyase, laminarinase and mannanase, from abalone and sea hare and investigated their biological roles in the metabolism of seaweeds' polysaccharides in gastropods.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究代表者の研究分野：海洋分子生物学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：アワビ、アメフラシ、腹足類、多糖分解酵素、海藻多糖、代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) アワビやアメフラシなどの藻食性無脊椎動物（腹足類）は、摂餌した海藻に含まれる

様々な多糖、例えばアルギン酸、セルロース、ラミナラン、マンナン、キシランなどを、消化液中に含まれる多糖分解酵素（アルギン酸

リアーゼ、セルラーゼ、ラミナリナーゼ、マンナナーゼ、キシラナーゼなど)により分解し、オリゴ糖や単糖を生じる。分解により生じたオリゴ糖や単糖は、腹足類の解糖系やクエン酸回路により代謝され炭素源およびエネルギー源として利用されると考えられるが、これら腹足類の多糖分解系酵素の性状はこれまで良く分かっていなかった。

(2) アルギン酸のような酸性多糖を分解する酵素としてはアルギン酸リアーゼが知られていたが、そのほとんどは多糖をオリゴ糖に変換するエンド型の酵素で、アルギン酸オリゴ糖を単糖化あるいは α -ケト酸化する酵素は極めて稀であり、腹足類では見つかっていなかった。

(3) 腹足類の消化液中で分解されたアルギン酸が、その後どのように腹足類によって代謝利用されているかについても全く不明であった。

(4) このような状況下で、申請者らはアワビやアメフラシの消化液からアルギン酸リアーゼ、セルラーゼ、ラミナリナーゼ、マンナナーゼ、セルラーゼ、アミラーゼなどを種々の試行錯誤の後に、単離可能とした。それにより、性状が良く分かっていなかった腹足類の海藻多糖分解酵素の性状解析が可能となった。さらに、アルギン酸の代謝については、アワビの肝臓を材料とすることにより、アルギン酸代謝産物がどのように代謝されるかを研究可能であった。これらは、本研究を遂行する上で重要な基盤的知識となった。

2. 研究の目的

(1) アワビの 2 種類のアルギン酸リアーゼ (エンド型の HdAly とエキソ型の HdAlex) を単離し、それらの作用によりアルギン酸(M ブロック)が不飽和 2 糖 (ΔM) と α -ケト酸にまで分解されることを既に明らかにした。本研究では、アルギン酸の α -ケト酸までの変換ルートを解明するために、先ずこの ΔM を分解する酵素を探索する。

(2) アワビによるアルギン酸の完全分解産物は α -ケト酸 (5-ケト-4-デオキシウロン酸) である。この α -ケト酸はアワビの肝臓中でどのように代謝されるかを明らかにする。

(3) アワビ以外の腹足類としてアメフラシでも同様のアルギン酸リアーゼが存在するかを明らかにする。

(4) アルギン酸リアーゼ以外の海藻多糖分解酵素として、ラミナリナーゼおよびマンナナーゼの性状をアワビとアメフラシで解析する。

3. 研究の方法

(1) アルギン酸リアーゼをはじめとする多糖分解酵素は、いずれも硫安分画と通常のカラムクロマトグラフィーおよび FPLC により

精製した。それらの部分一次構造は、プロテインシーケンサーと MALDI-TOF/TOF 質量分析により解析し、全一次構造は cDNA クローニング法により解析した。

(2) 海藻多糖の分解産物は、シリカゲル 60 プレートを用いた薄層クロマトグラフィー (TLC) により分析した。

(3) アワビ肝臓におけるアルギン酸代謝機構の解析のために、殻径 1 x 2 cm の稚貝を水槽で飼育し、アルギン酸を含む餌の摂餌と絶食によりアルギン酸分解物の代謝と消失を解析した。

4. 研究成果

(1) アワビ消化液中でのアルギン酸の糖化機構を、申請者らが既に単離しているエンド型およびエキソ型のアルギン酸リアーゼ、すなわち HdAly と HdAlex を用いて解析した。それによれば、アルギン酸は、先ず HdAly により不飽和の 3 糖~4 糖に分解され、次いでこれらのオリゴ糖が HdAlex により不飽和 2 糖および α -ケト酸 (2-ケト 3-デオキシグルコンアルデヒド) に分解されることが明らかになった。一方、これらの酵素反応によって生じた不飽和アルギン酸オリゴ糖の内臓組織中での分布を調べた結果、それらは肝臓組織中に蓄積していることを見出した。この肝臓中のアルギン酸オリゴ糖は、アワビを絶食させると 2~3 日で消失し、再度摂餌させると出現した。これらの結果から、アルギン酸オリゴ糖はアワビの肝臓中で代謝利用されていることが強く示唆された。

(2) アルギン酸とラミナランの酵素分解および代謝に関する研究を進め、これら海藻多糖の代謝に関連する重要な新知見を得た。すなわち、アルギン酸はアワビの前胃において 2 種類のアルギン酸リアーゼ、すなわち HdAly (エンド型) および HdAlex (エキソ型) の作用により、最終的に不飽和のアルギン酸オリゴ糖と α -ケト酸に分解されるが、これらの分解物はいったん肝臓細胞に移行した後数日かけて代謝されることを発見した。アワビ肝臓中の α -ケト酸代謝因子はホモジェネートの可溶性画分に回収され、熱や酸によって失活し易く、緩衝液に透析して低分子成分を除去すると活性が失われた。また低下した活性は透析外液に含まれる低分子成分を再度ホモジェネートに添加すると回復することを見出した。これらの結果より、 α -ケト酸代謝因子が高分子成分と低分子成分から成る複合酵素系であることが推定された。一方、褐藻の β -グルカンであるラミナランを分解する β -グルカナーゼ (HdLam33) をアワビの消化液中から単離することに成功した。さらに、本酵素の一次構造を cDNA 法により決定した。本酵素はラミナランを分解してラ

ミナリビオースとグルコースを生じた。また、本酵素はラミナリトリオースとラミナリビオースとの間の糖転移反応を触媒し、そこからラミナリテトラースを経てグルコースを生成した。これはアワビにおける新たなβ-グルカン分解機構の存在を示す重要な新知見であった。

(3) エゾアワビの前胃においてアルギン酸から生じたα-ケト酸 (5-keto-4-deoxy-uronic acid) は、肝臓組織中のα-ケト酸転換因子により代謝される。そこで、このα-ケト酸転換因子がどのようなものかを知るために、アワビ肝臓ホモジェネートからこの因子を部分精製した。さらに、この因子によってα-ケト酸を分解した際に生じる分解産物の性状を解析し、以下の知見を得た。①肝臓由来のα-ケト酸転換因子は、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物質であった。②この因子をα-ケト酸に作用させた際に生じる分解産物は、HPLC, MS, および誘導体化法により、ピルビン酸とグリセルジアルデヒドであることが明らかになった。このことから、α-ケト酸転換因子はアルドラーゼ様の活性をもつ物質であると推定された。③アルギン酸オリゴ糖を唯一の炭素源とする最小培地を用いた培養試験により、エゾアワビ肝臓中には不飽和2糖を分解可能な種の微生物が存在し、その代謝作用により不飽和オリゴ糖がα-ケト酸に代謝される可能性が考えられた。これら①~③の結果より、アワビの消化液中で生じたアルギン酸オリゴ糖肝臓に移行後、最終的に微生物作用によりα-ケト酸に転換されると考えられた。

(4) アワビの好適餌料である紅藻に含まれるβ-マンナン分解に関連する酵素の性状を解析した。アワビの消化液には、マンナンを分解する酵素としてβ-マンナーゼ HdMan が含まれていることを既に申請者らは明らかにした (J. Biotech., 2006. 著者ら)。ただし、この酵素は海藻のマンナンを2糖や3糖に分解するものの、単糖 (マンノース) にまでは分解できなかった。一方、アワビの消化液ではマンナンからマンノースが生じた。従って、この消化液にはマンナンの単糖化に関わる酵素が含まれると推定された。そこで、マンノオリゴ糖を基質としてこれをマンノースに変換する酵素の単離を試みた。その結果、分子量約11万の酵素を単離することに成功した。この酵素は、p-nitrophenyl-β-D-mannopyranoside およびβ-マンノオリゴ糖を特異的に分解することから、β-マンノシダーゼと同定された。このことから、アワビは海藻のマンナンをβ-マンナーゼとβ-マンノシダーゼによりマン

ノースに変換し、これを代謝利用していると推定された。マンナーゼとマンノシダーゼの協同作用によるマンノースの生成は、アメフラシにおいても確認でき、これら腹足類の消化液中で生じたマンノースは、肝臓へ移行後フルクトース-6-リン酸への異性化を経て、解糖系で代謝されると推定された。

(5) アワビと同様の酵素が他の腹足類にも分布するかを調べるために、アメフラシ *Aplysia kurodai* の消化液を材料として多糖分解酵素の単離と性状解析を行った。それによれば、アメフラシからは、2種類のエンド型アルギン酸リナーゼ、2種類のラミナリナーゼ、1種類のマンナーゼおよびマンノシダーゼが得られた。それらの性質はアワビのものとはやや異なっていた。特に、温度安定性や酸性 pH での安定性が高く、それらはアメフラシの生息温度が比較的高い (夏季には30℃近くなる) ことや、消化液の pH が低い (pH 5 以下) ことと関係していると考えられる。

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14件) (全て査読有り)

1. U. A. Zahura, M. M. Rahman, A. Inoue, H. Tanaka, and T. Ojima. cDNA cloning and bacterial expression of an endo-β-1,4-mannanase, AkMan, from *Aplysia kurodai*. *Comp. Biochem. Physiol.*, part B, in press (2011).
2. A. Inoue, C. Mashino, T. Kodama, and T. Ojima. Protoplast preparation from *Laminaria japonica* with recombinant alginate lyase and cellulase. *Mar. Biotech.*, 13(2), 256-263 (2010) (DOI: 10.1007/s10126-010-9290-2).
3. M. M. Rahman, A. Inoue, H. Tanaka, and T. Ojima. Isolation and characterization of two alginate lyase isozymes, AkAly28 and AkAly33, from the common sea hare *Aplysia kurodai*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 157B, 317-25 (2010).
4. U. A. Zahura, M. M. Rahman, A. Inoue, H. Tanaka, and T. Ojima. An endo-β-1,4-mannanase, AkMan, from the common sea hare *Aplysia kurodai*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 157B, 137-143 (2010).
5. F. Okumura, H. Kameda, T. Ojima, S. Hatakeyama. Expression of recombinant sea urchin cellulase SnEG54 using mammalian cell lines. *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun.*, 395, 352-355 (2010).
6. Y. Kumagai and T. Ojima. Isolation and characterization of two types of β -1,3-glucanases from the common sea hare *Aplysia kurodai*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 155B, 138-144 (2010).
 7. Y. Kumagai and T. Ojima. Enzymatic properties and cDNA cloning of a β -1,3-glucanase from the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 154B, 113-120 (2009).
 8. C. Nagasato, A. Inoue, M. Mizuno, K. Kanazawa, T. Ojima, K. Okuda, and T. Motomura. Membrane fusion process and assembly of cell wall during cytokinesis in the brown alga, *Silvetia babingtonii* (Fucales, Phaeophyceae), *Planta*, 232:287-298 (2010).
 9. M. Mizuno, Y. Nishitani, T. Tanoue, Y. Matoba, T. Ojima, T. Hashimoto, and K. Kanazawa. Quantification and localization of fucoidan in *Laminaria japonica* using a novel antibody. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 73, 335-338 (2009).
 10. 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).
 11. 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).
 12. Y. Kumagai, A. Inoue, H. Tanaka, and T. Ojima. Preparation of β -1,3-glucanase from scallop mid-gut gland drips and its use for production of novel heterooligosaccharides. *Fish. Sci.*, 74, 1127-1136 (2008).
 13. A. Inoue, M. Kagaya, and T. Ojima. Preparation of protoplasts from *Laminaria japonica* using native and recombinant abalone alginate lyases. *J. Appl. Phycol.* 20, 663-640 (2008).
 14. Y. Nishida, K. Suzuki, Y. Kumagai, H. Tanaka, A. Inoue, and T. Ojima. Isolation and primary structure of a cellulase from the Japanese sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Biochimie*, 89, 1002-1011 (2007).
- [学会発表] (計 28 件)
1. 佐藤琢哉・井上晶・田中啓之・尾島孝男「エゾアワビ α -グルコシダーゼの一次構造」平成 23 年度日本水産学会春季大会 (講演要旨集による学会発表) (2011 年 3 月 28 日) 東京海洋大学 (東京都品川区)
 2. M. M. Rahman, A. Inoue, H. Tanaka, and T. Ojima. “cDNA cloning and bacteria expression of an alginate lyase isozyme from *Littorina brevicula*” 平成 23 年度日本水産学会春季大会 (講演要旨集による学会発表) (2011 年 3 月 28 日) 東京海洋大学 (東京都品川区)
 3. L. Wang, M. M. Rahman, H. Tanaka, A. Inoue, and T. Ojima. “Primary structure analysis of *Littorina brevicula* alginate lyase LbAly35” 平成 23 年度日本水産学会春季大会 (講演要旨集による学会発表) (2011 年 3 月 28 日) 東京海洋大学 (東京都品川区)
 4. M. M. Rahman, A. Inoue, H. Tanaka, and T. Ojima. “cDNA cloning and bacteria expression of an alginate lyase isozyme from *Littorina brevicula*” 平成 23 年度日本水産学会春季大会 (講演要旨集による学会発表) (2011 年 3 月 28 日) 東京海洋大学 (東京都品川区)
 5. 安部秀昭・井上晶・田中啓之・尾島孝男「エゾアワビ・アルギン酸リアーゼの作用特性に関するタンパク質工学的研究」平成 23 年度日本水産学会春季大会 (講演要旨集による学会発表) (2011 年 3 月 28 日) 東京海洋大学 (東京都品川区)
 6. U. A. Zahura, M. M. Rahman, A. Inoue, H. Tanaka, and T. Ojima. “Mannan-degrading enzymes from *Aplysia kurodai*” 平成 23 年度日本水産学会春季大会 (講演要旨集による学会発表) (2011 年 3 月 28 日) 東京海洋大学 (東京都品川区)
 7. A. Inoue, M. Anraku, S. Nakagawa, T. Sawabe, and T. Ojima. “Alginate lyase from a deep-sea hydrothermal vent bacterium *Nitratiruptor* sp.” The 9th International Marine Biotechnology Conference October 8-12, 2010. Huanghai Hotel, Qingdao, China.
 8. 木本雄太・熊谷祐也・澤辺智雄・田中啓之・井上晶・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 (2010 年 3 月 27 日) 日大生物資源科学部 (藤沢市)

9. Mohammad Matiur Rahman, Akira Inoue, Hiroyuki Tanaka, and Takao Ojima. “cDNA cloning and bacterial expression of *Aplysia kurodai* alginate lyase” 平成 22 年度日本水産学会春季大会 (2010 年 3 月 27 日) 日大生物資源科学部 (藤沢市)
10. Umme Afsari Zahura, Mohammad Matiur Rahman, Hiroyuki Tanaka, Akira Inoue, and Takao Ojima. “Primary structure of an endo- β -1,4-mannanase from *Aplysia kurodai*” 平成 22 年度日本水産学会春季大会 (2010 年 3 月 27 日) 日大生物資源科学部 (藤沢市)
11. 熊谷祐也・井上晶・尾島孝男「ホタテガイ β -1,3-グルカナーゼの点変異体を用いたサブサイト+1 の機能解析」平成 22 年度日本水産学会春季大会 (2010 年 3 月 27 日) 日大生物資源科学部 (藤沢市)
12. 木本雄太、熊谷祐也、澤辺智雄、尾島孝男「エゾアワビ肝臓に含まれるアルギン酸分解物由来 α -ケト酸の転換因子」平成 21 年度日本水産学会秋季大会 (2009 年 10 月 1 日) いわて県民情報センター (盛岡市)
13. 佐藤琢哉・熊谷裕也・井上晶・田中啓之・尾島孝男「エゾアワビ・エキソ型アミラーゼ様酵素の単離と性状解析」平成 21 年度日本水産学会秋季大会 (2009 年 10 月 1 日) いわて県民情報センター (盛岡市)
14. Umme Afsari Zahura, Mohammad Matiur Rahman, Yuya Kumagai, Akira Inoue, Takao Ojima. “Purification and characterization of an endo- β -1,4-mannanase from the common sea hare *Aplysia kurodai*” 平成 21 年度日本水産学会秋季大会 (2009 年 10 月 1 日) いわて県民情報センター (盛岡市)
15. 熊谷祐也・井上晶・尾島孝男「ホタテガイ β -1,3-グルカナーゼ PyLam38 の点変異体を用いた機能解析」平成 21 年度日本水産学会秋季大会 (2009 年 10 月 1 日) いわて県民情報センター (盛岡市)
16. Mohammad Matiur Rahman and Takao Ojima. “Purification and properties of alginate lyase from *Aplysia kurodai*” The 7th International Symposium. “Innovative Marine Life Science for Three Es, Edible, Environment and Education, in 21st Century, November 18, 2008. Conference Hall, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
17. Yuya Kumagai, Akira Inoue, and Takao Ojima. “Enzymatic properties of laminarinase from abalone, *Haliotis discus hannai*” The 7th International Symposium. “Innovative Marine Life Science for Three Es, Edible, Environment and Education, in 21st Century. November 18, 2008. Conference Hall, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
18. Akira Inoue, Chieko Mashino, Teina Kodama, and Takao Ojima. “Isolation of protoplasts from *Laminaria japonica* utilizing recombinant cellulase and alginate lyase” The 7th International Symposium “Innovative Marine Life Science for Three Es, Edible, Environment and Education, in 21st Century November 18, 2008. Conference Hall, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
19. Yuya Kumagai and Takao Ojima. “Purification and cDNA cloning of a β -1,3-glucanase from the pacific abalone, *Haliotis discus hannai*” The 8th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference November 13, 2008, Bexco, Busan, Korea.
20. Takao Ojima. “Bioconversion of algal polysaccharides by polysaccharide-degrading enzymes from marine organisms” The 5th World Fisheries Congress. October 23, 2008, Pacifico Yokohama, Kanagawa, Japan.
21. Yuya Kumagai and Takao Ojima. “Preparation of β -1,3-glucanase from scallop mid-gut gland and its utilization for production of novel heterooligosaccharides” The 5th World Fisheries Congress October 23, 2008, Pacifico Yokohama, Kanagawa, Japan.
22. Mohammad Matiur Rahman and Takao Ojima. “Comparative study on alginate lyases from *Aplysia kurodai* and *Haliotis discus*” The 5th World Fisheries Congress October 23, 2008, Pacifico Yokohama, Kanagawa, Japan.
23. Takao Ojima and Yuya Kumagai. “Utilization of a β -1,3-glucanase from scallop visceral waste for the production of novel heterooligosaccharides” The 4th International Symposium on the Marine Biotechnology and Advanced Materials. June 12, 2008, Kangnung National University, Gangneung, Korea
24. 長畑雄也、木本雄太、澤辺智雄、井上晶、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 (静岡県清水市)
25. Md. Matiur Rahman and Takao Ojima
“Characterization of alginate lyase from *Aplysia kurodai*” 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 (静岡県清水市)
26. 熊谷祐也、井上晶、尾島孝男「エゾアワビβ-1,3-グルカナーゼの単離と性状解析」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 (静岡県清水市)
27. 加藤史顕、熊谷雄也、井上晶、尾島孝男「エゾアワビα-グルカン分解酵素の基本性状」(平成20年3月28日) 東海大学海洋学部 (静岡県清水市)
28. 井上晶・児玉貞奈・尾島孝男「組み換え多糖類分解酵素を用いたマコンブ・プロトプラストの作出」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 (静岡県清水市)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

①名称：アメフラシ由来キシログルカナーゼ

発明者：尾島孝男

権利者：国立大学法人北海道大学
三菱レイヨン株式会社

種類：特許

番号：特願 2010-033922

出願年月日：平成22年2月18日

国内外の別：国内

②名称：アメフラシ由来マンナナーゼ

発明者：尾島孝男

権利者：国立大学法人北海道大学
三菱レイヨン株式会社

種類：特許

番号：特願 2009-214412

出願年月日：平成21年9月16日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://mmb.fish.hokudai.ac.jp/MMB/TOP.html>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

井上 晶 (INOUE AKIRA)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教

授

研究者番号：70396307

田中 啓之 (TANAKA HIROYUKI)

北海道大学・大学院水産科学研究院・助教
研究者番号：90241372

澤辺 智雄 (SAWABE TOMOO)

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
研究者番号：30241376

(3)連携研究者

なし