

機関番号：82706
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20500701
 研究課題名 (和文) 新規酵素群を用いたカラギーナン組成分析と内因性GAG攪乱因子としてのリスク評価
 研究課題名 (英文) Analysis of carrageenan compositions by new enzymes and risk assessment of carrageenans as GAG-like molecules
 研究代表者
 大田 ゆかり (OHTA YUKARI)
 独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・主任研究員
 研究者番号：40399572

研究成果の概要 (和文)：

カラギーナンはゼラチン様の食感を与える海藻由来のゲル化剤であり、食品添加物としての使用が認可されている。しかし、カラギーナンがヒトに対しどのような作用を及ぼすかについてはこれまで明確にされてはいなかった。飲食品に添加されたカラギーナンを検出することは困難であったため、新しい分析方法の開発が求められていた。本研究では、深海微生物由来の酵素を用いて、飲食品中のカラギーナンを容易にかつ特異的に分析する手法を開発し、さらにヒト細胞への影響も評価した。

研究成果の概要 (英文)：

Carrageenans are seaweed polysaccharides and widely used as food additives for gelling, stabilizing, and viscosity-building. However, the effects on human have not been clarified. It has been required to develop a suitable analytical method for carrageenans added to foods. In this study, we adopted the new enzymes from deep-sea microbes for the specific carrageenan analyses for this purpose. Further, we evaluated the effects of carrageenans on human cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：酵素、深海微生物、カラギーナン、食品分析、食品安全性、オリゴ糖

1. 研究開始当初の背景

カラギーナンはゼラチン様の良好な食感をもつ食品添加物であり、増粘・安定化剤として多用されている。その一方で、研究現場においてはマウスなどの実験動物に急性炎症や浮腫を起こさせるための代表的な“毒物”である。カラギーナンは海藻由来硫酸化多糖であり、硫酸基、アセチル基、ピルビン

酸基等による種々の置換パターンを持つ硫酸化ガラクトースの複合体からなるハイブリッド硫酸化多糖の総称である。食品添加物としては主要構成糖含量に基づいて大まかに分類された3タイプ(カップ型、イオタ型、ラムダ型)のカラギーナンが用いられている。しかしながら、天然高分子であるカラギーナンの構造は原料品種、採取地、採取時期によ

り、その置換基パターンが多種多様に変化する。非常にヘテロな構造であることに加え、粘度が高いために、高分子のままでは精密な構造解析は困難であり、また酸加水分解やメタノリシスによる低分子化を行っても、一部の構造が不安定で本来の糖構造を反映することができない。そのため、詳細な構造は実際には明らかでなく、その生理作用（毒性）の評価も一定の結果が得られていない。

カラギーナンは硫酸化多糖であり、動物細胞間質に存在するグリコサミノグリカン（GAG）と呼ばれる硫酸化糖と構造が類似している。GAG は生命にとって重要な機能に関与することが知られているが、GAG 類似物質であるカラギーナンに関しては、分子量が一定値以上である場合、ヒト消化管で吸収されないことを前提に、使用制限を定めない食品添加物として認可されている。しかし高分子カラギーナンが、加熱や胃酸によって容易に低分子化され、オリゴ糖と変化することは必至である。近年、腸管タイトジャンクションなどからオリゴ糖がそのまま吸収される経路が存在することが発見され、また腸管に存在する免疫細胞が全身の健康に与える影響の大きさが重要視されており、カラギーナン由来の硫酸化オリゴ糖がヒトに対して予期せぬ生理作用を発揮する危険性が危惧される。すなわち、カラギーナン構造の正確な分析法の確立とそれらの生理機能の評価は急務の課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高分子のまま、あるいは化学的手法によっては正確な構造の解析が困難なヘテロな構造を有する硫酸化多糖「カラギーナン」の構造を、生理活性の最小単位であるオリゴ糖の単位で、迅速かつ正確に決定する手法を確立することである。本研究では、構造特異的分解酵素によって、ある一定の固有構造を持つオリゴ糖配列を認識させ、その位置で限定的に切断して得られるオリゴ糖の構造を決定する。このオリゴ糖を3次元 HPLC 分析でマッピングすることにより、未知の組成を持つカラギーナンの迅速分析を可能とする。さらにカラギーナンの生理活性とカラギーナンオリゴ糖構造の相関関係の解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) カラギーナン分解酵素の解析と大量生産

本研究では、カラギーナンを構成する、ある一定のオリゴ糖構造とその配列を正確に識別して、正確に切断することが可能な深海微生物由来酵素3種（カップパ、イオター、ラムダ-カラギナーゼ）を用いて、多糖カラギーナンをオリゴ糖サイズへの低分子化を

行う（図1）。まず、これらの3種の酵素のなかで、これまで生化学的諸性質や大量生産条件の検討が進んでいなかったイオター-カラギーナン分解酵素の解析を行った。

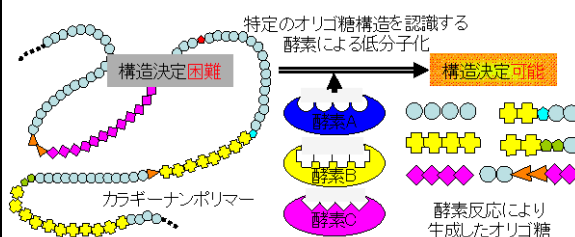


図1. 酵素によるカラギーナンポリマーの構造特異的オリゴ糖化

(2) カラギーナンオリゴ糖の3次元 HPLC 分析

深海微生物由来カラギーナン分解酵素3種を用いてカラギーナンポリマーを分解し、各酵素の反応により生成したカラギーナンオリゴ糖を分離モードの異なるカラム（陰イオン交換カラム、カーボングラファイトカラム、ゲルろ過カラム）で分析する条件を検討した（図2）。未標識カラギーナンの高感度検出を可能とするため、検出にはエバポレーティブ光散乱検出器（ELSD）を用いた。

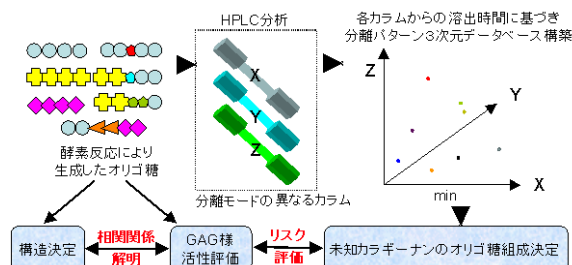


図2. 本研究におけるカラギーナン分析の概略

(3) 構造の異なるカラギーナンオリゴ糖がヒト細胞に与える影響評価

低分子カラギーナンのヒトに対する影響を評価するためには、それらの分子構造を厳密に区別した条件での試験を行う必要がある。そこで本研究では、構造の異なる主要3タイプのカラギーナンポリマー（カップパ、イオター、ラムダ型）に、深海微生物に由来する3種の酵素を作用して得られる各カラギーナンオリゴ糖を、陰イオン、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて単一構造を持つ画分として調製した。本画分を用いて、ヒト血球培養細胞に対する各オリゴ糖が与える影響を評価した。

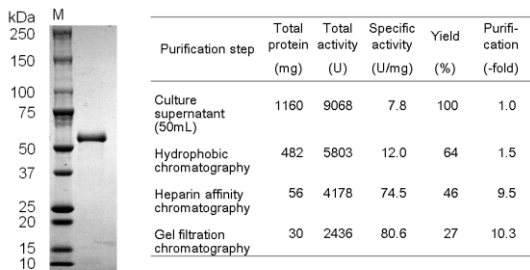
(4) 飲食品に含まれる未知カラギーナンの分析

本研究で開発したカラギーナン分析手法が実際の飲食品に食品添加物として添加されたカラギーナンの分析に適応できるかについて諸検討を行った。試料前処理条件、生じたオリゴ糖の抽出条件を検討し、市販飲料品に含まれる未知カラギーナンの検出・組成分析を試みた。

4. 研究成果

(1) カラギーナン分解酵素の解析と大量生産

イオタカラギーナン分解酵素について、組換え酵素大量生産条件、酵素精製条件(表1)の検討を行った。本酵素の組換え酵素(図3)を、枯草菌を宿主として培養上清中に大量生産し(2.3g/L)、既報生産量100倍以上の高生産を達成した。



【左】図3. イオタ-カラギーナン分解酵素精製酵素の SDS-PAGE

【右】表1. イオタ-カラギーナン分解酵素精製要約

本酵素の生化学的諸性質の解析を行ったところ、本酵素の最適反応温度は約 50 °C であり、一般に粘度の高い多糖類混合物を、粘度が低下する高温域で処理することが可能であることが分かった(表2)。

反応最適温度	50 °C
反応最適 pH	pH 7.0
一価イオン要求性	Na ⁺ > K ⁺ > Cs ⁺ > Li ⁺
反応最適食塩濃度	100 mM
阻害金属イオン	Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Ni ²⁺ , Pb ²⁺ , Zn ²⁺ , Al ³⁺ , Fe ³⁺

表2. イオタ-カラギーナン分解酵素諸性質

続いて酵素反応により得られた主生成物の構造を NMR により構造解析し、イオタカラギーナンオリゴ糖に特徴的なピークの帰属を行った(図4)。また NMR 解析および質量分析結果に基づき、主成分として得られたオリゴ糖はイオタ-カラギーナン4糖(図5)であることが明らかになった。

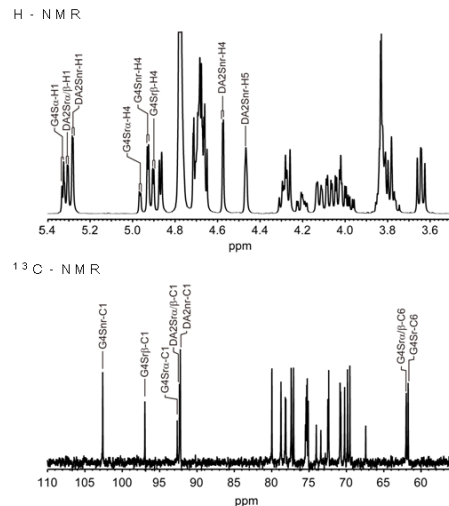


図4. イオタ-カラギーナン分解酵素による主反応生成物の NMR 構造解析

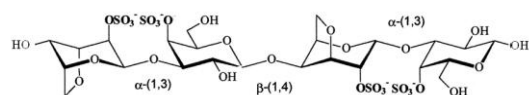


図5. イオタ-カラギーナン分解酵素による主反応生成物の構造

さらに、本イオタ-カラギーナーゼによって生じるイオタ-カラギーナンオリゴ糖の生成パターンを解析した(図6)。その結果、生成物全体に占める主生成物(イオタ-カラギーナン4糖)の割合が約75%と、非常に高いことが明らかになった。

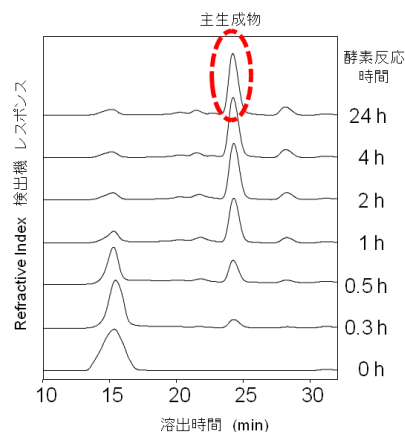


図6. イオタ-カラギーナン分解酵素によるオリゴ糖生成パターンの HPLC 解析

(2) カラギーナンオリゴ糖のHPLC分析

検出器にELSDを利用し、グラジエント溶出を行うことで、イオン交換、カーボングラファイトカラムにおいて、電荷の大きく異なる3タイプのオリゴ糖の一斉分析が可能となり、各オリゴ糖が固有の溶出時間を示す条件を見出すことができた。前述のカラムに加え、ゲルろ過カラムにより得られるクロマトグラムでの分析を行い、3つの異なるモードのクロマトグラフィーを利用して、未知の組成を持つカラギーナンの組成を簡便に求めることが可能となった。

(3) 構造の異なる各カラギーナンオリゴ糖のヒト細胞に与える影響評価

カラギーナンオリゴ糖がヒト血球細胞の自然免疫関連因子に与える影響を評価した。その結果、カラギーナンの構造に依存して、その作用の強度と作用点が異なることを初めて見出した。ラムダ型の構造を持つカラギーナンオリゴ糖が最も強い作用を持つことを明らかにした。この結果は、ヒト血球細胞が、各カラギーナンの構造を区別して認識する機構を有していることを示している。

(4) 飲食品に含まれる未知カラギーナンの分析

本研究では、飲料に含まれる未知カラギーナンに対し、飲料サンプルに対し直接カラギーナン分解酵素を作用させた後、生じたカラギーナンオリゴ糖を、陰イオン交換樹脂にて抽出した。抽出したオリゴ糖をHPLC分析した結果、飲料中に含まれる10ppm以上のカラギーナンを特異的に検出できることを明らかにした。飲食品に含まれる未知カラギーナンに対しては、食品に含まれる糖質に代表される多量の夾雑物からの妨害を受けるため、有効な特異的分析手段がこれまで無かった。本研究の成果により、特異的酵素群を用いた飲食品中のカラギーナンの検出・組成分析法が極めて有効であることを明らかにした。

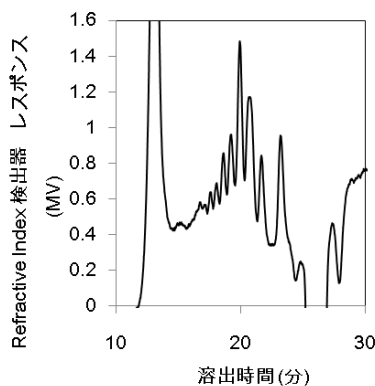


図7. 飲料サンプルから検出されたカラギーナンオリゴ糖の特徴的なゲルろ過クロマトグラム

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2件)

① Hatada Y, Mizuno M, Li Z, Ohta Y, Hyper-production and characterization of the ι -carrageenase useful for ι -carrageenan oligosaccharide production from a deep-sea bacterium, *Microbulbifer thermotolerans* JAMB-A94^T and insight into the unusual catalytic mechanism. Mar Biotechnol, 査読有, 2010, Aug 5,

② 大田 ゆかり, 秦田 勇二、過酷な環境を生きる深海微生物の新規な難分解性多糖分解酵素、高圧力の科学と技術、査読有、20巻、2010、354-361

[学会発表] (計7件)

① 大田 ゆかり, 秦田 勇二 ら (8人中1、8番目)、過酷な環境を生きる深海微生物から取得した新規有用酵素とその応用、日本高圧力学会、2010年10月20日、仙台市戦災復興記念館 (宮城県)

② 大田 ゆかり、水野 正浩、Li Zhijun, 小西 正朗、長野 由梨子、森 梢、嶋根 康弘、秦田 勇二、深海微生物由来新規イオタカラギーナーゼの解析とその応用、マリンバイオテクノロジー学会、2010年5月30日 広島大学 (広島県)

③ 秦田 勇二、深海環境から見出された新規微生物の生産する有用酵素、第44回緑膿菌感染症研究会、2010年2月13日、東邦大学

④ 秦田 勇二、深海微生物由来の有用酵素、極限環境微生物学会 第10回シンポジウム、2009年6月9日、東京大学

⑤ 秦田 勇二、長野 由梨子、森 梢、小西 正朗、大田 ゆかり、深海の微生物に有用酵素を求めて、第12回マリンバイオテクノロジー学会、2009年5月31日、早稲田大学

⑥ Hatada Y, Ohta Y, Industrially relevant enzymes from the deep-sea and the host-vector system for their hyper-production, BIT Life Sciences 2nd Annual World Congress of Industrial Biotechnology 2009 (ibio-2009), 2009年4月6日, Seoul, South Korea

⑦ Ohta Y, Hatada Y, Discovery of agarases from the deep-sea BIT Life Sciences' 2nd Annual World Congress of Industrial Biotechnology 2009 (ibio-2009), 2009年4月6日, Seoul, South Korea

6. 研究組織

(1)研究代表者

大田 ゆかり (OHTA YUKARI)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限
環境生物圏領域・主任研究員

研究者番号：40399572

(2)研究分担者

秦田 勇二 (HATADA YUJI)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限
環境生物圏領域・チームリーダー

研究者番号：20399562