

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25292113

研究課題名(和文) 干潟のメイオベントスと粘土鉱物の多様性に着目した環境修復生態学の提唱

研究課題名(英文) Proposal of the environment recovery technology focused on the variation of meiobenthos and clay minerals in the estuaries

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) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：干潟の濾過機能を参考に、酵素吸着能に優れた濾過材の作製を目的として、各種金属酸化物のアミラーゼ吸着能について調べた結果、酸化鉄、酸化アルミニウム及び酸化マンガンの吸着能が高いことが判明した。これらの金属酸化物及びこれら固化物に吸着したアミラーゼは、アルカリ性域の反応性が向上し、pH安定性や熱安定性も向上した。以上のことから、酸化鉄、酸化アルミニウム及び酸化マンガンは、優れた酵素吸着能力を有し、これらを用いることで微生物の増殖による溶存酸素濃度の低下を伴わない高機能な濾過材を作製できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found oxidized iron, aluminum and manganese retained the high enzyme activity as binding forms. We compared the pH dependency, pH stability and heat stability of amylase activities binding to oxidized iron, aluminum and manganese in addition to solidified forms of them. We found amylase binding to oxidized iron, oxidized aluminum and oxidized manganese exhibited higher activities at alkaline pH range than non-adsorbed form, while stability at acidic pH range and heat stability were enhanced. Amylase binding to solidified materials of these oxidized metals exhibited rather higher activities at alkaline pH range and more stable at acidic pH range and against heating. The findings suggest that oxidized iron, aluminum and manganese solidified with calcined plaster and olivine are suitable for preparing efficient filtering materials with high enzyme binding ability without the decrease in dissolved oxygen accompanied with the growth of bacteria

研究分野：海洋生物機能学

キーワード：干潟 酵素 吸着

1. 研究開始当初の背景

近年世界中で水産物の消費量が拡大する中で、養殖に対する関心が高まっており、FAO の報告によると 2012 年の養殖生産量は 9,040 万トンに達している。また 2011 年に養殖魚の生産量が牛肉のそれを上回り、2013 年には世界の魚消費量のうち養殖魚の占める割合が天然魚を上回ったと報告されている。現在主に行われている養殖は沿岸域で水産物を飼育する海面養殖という手法であるが、海面養殖は養殖適地の制限、管理コスト、天候や災害の影響、漁業権の問題など様々な面で今後の発展に限界がある。そのため内陸部でも飼育可能で管理が容易な閉鎖循環式陸上養殖に注目が集まっている。閉鎖循環式陸上養殖は水槽と濾過槽の間で飼育水を循環させることで浄化し、限られた水で養殖を可能にする養殖方法である。そのため飼育場所の制限が少ない、外部環境の影響を受けない、管理が容易などメリットは大きい。しかし一方で水の浄化が非常に重要になるため、効率よく水を浄化するための高機能な濾過材の開発が重要となる。

過剰給餌によって水底に有機物が堆積することは、細菌の増殖やそれに伴う溶存酸素の低下を引き起こし、飼育生物にストレスを与え疾病させることに繋がるため、陸上養殖においては特に効率よく安定的に有機物を分解し水を浄化することが重要となる。しかし水槽中の有機物分解に関する研究はバクテリアに注目したものがほとんどであり、濾過材については菌の住処として多孔質であることのみが重視され、その材料に注目した研究は進んでいない。

一方、劉らの研究により湿地帯の底泥に堆積した有機物は、生息する生物が直接体内に取り込むだけでなく、これらの生物が体外に分泌した酵素が底泥の土壌成分に吸着し、独立したバイオリアクターとして働くことによって分解されていることが明ら

かとなっている。さらに劉と西垣内らの研究により、全国各地の土壌の酵素吸着能には著しい地域差が存在すること、酵素吸着能が高い土壌には酸化アルミニウムが多く含まれていることなどが明らかとなった。またその後の研究で、酸化マンガンを多く含む土壌の酵素の吸着能も顕著に高いことが明らかとなった。これら結果は金属酸化物が酵素結合能を有し、その結果、酸化アルミニウムなどの金属酸化物を含む土壌はバイオリアクターとしての機能が強く、結果として水質浄化能が高くなることを示唆していた。しかし金属酸化物単体の酵素吸着能は測定されていないことから、金属酸化物を用いて人工的に酵素吸着能の高い濾過材を作製できるかどうかはわかっていない。

酵素と担体の吸着は、主に固定化酵素として工業的に利用されている。工業的な酵素の固定化は、不溶性の担体に酵素を結合させる担体結合法、酵素を 2 個以上の官能基を有する試薬と反応させて架橋する架橋法、酵素のゲル格子内への格納や半透膜性のポリマーでの被覆のような包括法の 3 つの方法で行われている。一般的に固定化されると酵素の活性は低下するが、熱、タンパク質分解酵素、阻害剤やタンパク質変性剤などに対する安定性が増し、至適 pH などが変化するため、安定的で継続利用可能な酵素利用法として使用されている。固定化酵素は実際に分析化学、食品加工、廃液処理などに利用されているが、水産養殖現場への利用はまだなされていない。

2. 研究の目的

養殖現場において、おもに食べ残しの餌に由来する有機物は濾過槽において分解されるが、その際に好氣的細菌の増殖を誘発するため溶存酸素の低下につながりやすい。しかし、あらかじめバイオリアクター化された濾過材を用いることで新たな細菌の増殖を誘発することなしに、つまり溶存酸素

の低下を招くことなしに、速やかに有機物を分解することが可能となる。

デンプンは餌に含まれる主要な有機物であることから、本研究ではバイオリアクター化した濾材を用いることにより、微生物の増殖、つまり底泥の低酸素化を伴わないデンプン分解を目指してアミラーゼを試験酵素として選び、各種金属酸化物に吸着したアミラーゼの活性を調べた。また金属酸化物に吸着したアミラーゼの pH 依存性や安定性、熱に対する安定性を測定し、金属酸化物を用いて安定的に飼育水を浄化する高機能濾過材の開発の可能性を検討した。

3. 研究の方法

吸着アミラーゼの活性と変化率の算出 実測値（実際に担体に吸着したアミラーゼの活性）を測定した結果、酸化鉄 0.96 units/g、酸化アルミニウム 1.58 units/g、酸化マンガ ン 1.78 units/g であり、これは酸化マグネシウム 0.29 units/g、市販濾過材であるサブストラ ットプロ 0.22 units/g やメガリング 0.18 units/g、モンモリロナイト 0.57 units/g やカオリ ナイト 0.55 units/g に比べて著しく高い活性であった。理論値（非吸着活性から算出さ れる吸着したと予想されるアミラーゼの活 性）を求めたところ、酸化鉄 1.89 units/g、酸化アルミニウム 1.87 units/g、酸化マンガ ン 2.01 units/g であり、酸化マグネシウムの 2.10 units/g、市販濾過材であるサブストラ ットプロ 1.65 units/g やメガリング 1.74 units/g、モンモリロナイト 2.18 units/g やカオリ ナイト 2.14 units/g とほとんど差がみられなかつ た。吸着したことによる活性の変化率（実測 値/理論値）は、酸化鉄は 50.5%、酸化アルミ ニウムは 84.3%、酸化マンガンは 88.7% であり、酸化マグネシウムの 13.9%、市販濾過材 であるサブストラットプロ 12.9% やメガリン グ 10.0%、粘土であるモンモリロナイト 26.0% やカオリナイト 25.9% に比べて顕著に 高い値であった。

変化率が高かった酸化鉄、酸化アル ミニウム及び酸化マンガ ンについて、焼石膏 と橄欖岩を用いて固化し、その固化物の実測 値を調べた。その結果、固化酸化鉄は 0.50 units/g、固化酸化アルミニウムは 0.52 units/g、固化酸化マンガ ンは 0.59 units/g と、 対照として用いた焼石膏と橄欖岩のみの場 合の実測値である 0.1 units/g と比べて高い値 を示した。理論値は固化酸化鉄 1.88 units/g、 固化酸化アルミニウム 1.88 units/g、固化酸 化マンガ ン 1.90 units/g であった。焼石膏と 橄欖岩のみの場合の実測値は 1.68 units/g で あった。このことから各種固化物の変化率は 固化酸化鉄 26.7%、固化酸化アルミニウムは 27.8%、固化酸化マンガ ンは 30.8%、焼石膏 と橄欖岩のみの場合は 6.0% と算出された。

担体結合酵素の pH 依存性の測定 吸着によ るアミラーゼの pH 依存性の変化を調べるた め、20°C、pH 3.0-11.0 の条件下における酵素 の活性を測定した。なおここではアミラーゼ の活性の変化に注目して考察するために、活 性は相対値で示した。非吸着アミラーゼは pH 7.0 における活性を 100% とすると、pH 3.0 で 3%、pH 5.0 で 69%、pH 9.0 で 27%、pH 11.0 で 3% に変化していた。酸化鉄吸着アミラーゼは pH 7.0 における活性を 100% とすると、pH 3.0 で 6%、pH 5.0 で 50%、pH 9.0 で 47%、 pH 11.0 で 16% に変化しており、非吸着アミ ラーゼと比べて pH 5.0 において低い活性を、 pH 9.0、11.0 において高い活性を示した。酸 化アルミニウム吸着アミラーゼは pH 7.0 にお ける活性を 100% とすると、pH 3.0 で 11%、 pH 5.0 で 78%、pH 9.0 で 54%、pH 11.0 で 18% に変化しており、全体的に非吸着アミラーゼ より高い活性を示した。酸化マンガ ン吸着アミラーゼは pH 7.0 における活性を 100% とす ると、pH 3.0 で 5%、pH 5.0 で 47%、pH 9.0 で 59%、pH 11.0 で 9% に変化しており、非吸 着アミラーゼと比べて pH 5.0 において低い 活性を、pH 9.0 と 11.0 において高い活性を示

した。

焼石膏と橄欖岩を用いて固化させた各種金属酸化物に吸着したアミラーゼ活性は、pH 7.0 における活性を 100% とすると、固化酸化鉄吸着アミラーゼが pH 3.0 で 9%、pH 5.0 で 37%、pH 9.0 で 76%、pH 11.0 で 33%、固化酸化アルミニウム吸着アミラーゼが pH 3.0 で 20%、pH 5.0 で 62%、pH 9.0 で 96%、pH 11.0 で 42%、固化酸化マンガン吸着アミラーゼが pH 3.0 で 11%、pH 5.0 で 41%、pH 9.0 で 86%、pH 11.0 で 36% に変化しており、3 種類全てにおいて金属酸化物単体に吸着したアミラーゼと比べて pH 9.0 と pH 11.0 における活性が高い結果となった。

担体結合酵素の pH 安定性の測定 吸着によるアミラーゼの pH 安定性の変化を調べるため、20°C、pH 3.0-11.0 の条件下でブレインキュベーションした場合の酵素の活性を測定した。なおここではアミラーゼの活性の変化に注目して考察するために、活性は相対値で示した。非吸着アミラーゼは pH 7.0 でブレインキュベーションした場合の活性を 100% とすると、pH 3.0 で 5%、pH 5.0 で 73%、pH 9.0 及び pH 11.0 で約 100% であった。酸化鉄吸着アミラーゼは、pH 7.0 でブレインキュベーションした場合の活性を 100% とすると、pH 3.0 で 80%、pH 5.0、9.0 及び 11.0 で約 100% だった。酸化アルミニウム吸着アミラーゼは、pH 7.0 でブレインキュベーションした場合の活性を 100% とすると、pH 3.0 で 63%、pH 5.0、9.0 及び 11.0 で約 100% だった。酸化マンガン吸着アミラーゼは、pH 7.0 でブレインキュベーションした場合の活性を 100% とすると、pH 3.0 で 67%、pH 5.0、9.0 及び 11.0 で約 100% であった。いずれの場合においても金属酸化物に吸着したアミラーゼは、非吸着の場合に比べて、酸性条件下における安定性が増加していることが判明した。

固化酸化鉄、固化酸化アルミニウム及び固化酸化マンガンを吸着したアミラー

ゼはすべて、pH 7.0 でブレインキュベーションした場合の活性を 100% とすると pH 3.0、5.0、9.0 及び 11.0 すべての条件で約 100% の活性を示した。いずれの場合においても固化金属酸化物に吸着したアミラーゼは、金属酸化物単体に吸着した場合に比べて、酸性条件下におけるアミラーゼの安定性が増加していた。

担体結合酵素の熱安定性の測定 吸着によるアミラーゼの熱に対する安定性の変化を調べるため、0-90 分間、30°C、pH 7.0 の条件下でブレインキュベーションした場合の活性を測定した。なおここではアミラーゼの活性の変化に注目して考察するために、活性は相対値で示した。ブレインキュベーションしない場合のアミラーゼの活性を 100% としたとき、非吸着アミラーゼ 15-90 分後の活性は 84.0%-14.6% であった。一方吸着したアミラーゼの 15-90 分後の活性は、酸化鉄吸着が 70.3% -58.9%、酸化アルミニウム吸着が 78.3% -62.4%、酸化マンガン吸着が 75.5% -55.5%、固化酸化鉄吸着が 96.7%-55.1%、固化酸化アルミニウム吸着が 88.1%-60.7%、固化酸化マンガン吸着が 80.0%-51.3% であった。これらの値は全て非吸着アミラーゼに比べて高いものであった。

4. 研究成果

土壤に固定化された酵素は一般的に活性が低下するとされている。これは固定化の際に、活性の発現に関わる高次構造が変化することが原因と考えられている。そこで本実験では、まず各種金属酸化物、市販濾過材、粘土鉱物に吸着したことによるアミラーゼの活性の変化を測定した。その結果、金属酸化物と市販濾過材、粘土鉱物で吸着の理論値に大きな差は見られなかった。つまり、これらの担体間に吸着量の差はなかったものと考えられた。しかし実測値では、酸化鉄、酸化アルミニウム及び酸化マンガンを吸着したアミラーゼの活性が他と比べて著しく

高かった。理論値と実測値の値をもとに吸着による変化率を測定したところ、酸化鉄、酸化アルミニウム及び酸化マンガンに吸着した場合に高い値を示すことがわかった。このことから、土壌や市販濾過材に吸着したアミラーゼは活性が著しく低下するが、酸化鉄、酸化アルミニウム及び酸化マンガンに吸着したアミラーゼは高い活性を保つことが判明した。この結果は、アミラーゼと酸化鉄、酸化アルミニウム及び酸化マンガンの結合は、粘土や市販濾過材に対する結合に比べて活性中心以外の構造を介した結合が多く、活性中心の高次構造を保ったまま吸着している可能性を示唆していた。また、酸化鉄の実測値が酸化アルミニウムや酸化マンガンの値に比べて低い値となった。これは、酸化アルミニウムや酸化マンガンが溶液中でも粉体であったことに対し、酸化鉄はアミラーゼ溶液やデンプン溶液と攪拌している間に重合反応を起こして粘性を帯び、デンプン溶液と接する表面積が低下したことが原因だと考えられた。

固化物中の金属酸化物含量は 1/2 であり、残りの 1/2 が焼石膏と橄欖岩によって構成されている。しかし固化酸化鉄、固化酸化アルミニウム及び固化酸化マンガンの実測値は、各種金属酸化物の実測値と焼石膏と橄欖岩の複合体の実測値を合計して 1/2 を乗じた値よりも低下していた。これは固化したことにより表面積が低下したことが原因であると考えられる。また単体の場合、酸化アルミニウムや酸化マンガンの実測値に比べて酸化鉄の実測値が低かったのに対し、固化酸化鉄、固化酸化アルミニウム及び固化酸化マンガンの実測値に大きな差は認められなかった。これは、酸化鉄は単体だと重合反応を起こして表面積が低下するが、固化した場合は重合反応による表面積の低下は起こらなかったためと考えられる。

一方酵素は土壌に固定されること

で、至適 pH の変化や、pH や熱に対する安定性を増すことがあると報告されている。そこで、酸化鉄、酸化アルミニウム及び酸化マンガンの吸着したアミラーゼについて、pH 依存性の変化と pH 安定性の変化及び熱に対する安定性の変化を測定した。その結果、遊離状態のアミラーゼはアルカリ性域において安定ではあるが、活性は著しく低下することがわかった。このことから、アルカリ性域においてアミラーゼは活性中心の高次構造が損なわれているわけではなく、酵素と基質の相互作用が阻害されていると考えられた。しかし金属酸化物と結合することにより、遊離状態よりもアルカリ性域での活性が上昇したことから、金属酸化物と結合したことによりアルカリ性域での酵素と基質との相互作用が起こりやすくなっていることが示唆された。一方、固化金属酸化物に吸着した場合は、アルカリ域における活性が金属酸化物単体に吸着した場合に比べてさらに上昇した。このことから固化金属酸化物では、金属酸化物単体に吸着した場合に比べてさらにアルカリ性域において酵素と基質との相互作用が起こりやすくなっていることが示唆された。

酸性域において遊離状態のアミラーゼは著しく安定性を損なっていた。しかし金属酸化物と結合することにより、遊離状態よりも酸性域における安定性が向上していたことから、酸性域において金属酸化物と結合することによりアミラーゼの高次構造は安定化することが示唆された。また固化金属酸化物に吸着した場合は、酸性域における安定性が金属酸化物単体に吸着した場合に比べてさらに向上していた。このことから、固化物では金属酸化物単体に結合する場合に比べて、さらに酸性域においてアミラーゼの高次構造を安定化させるような結合が形成されていると推測された。しかし、酸化鉄や酸化マンガンならびに固化酸化鉄や固化酸

化マンガンに吸着した場合は、遊離状態に比べて活性が低下していたことから、酸化鉄や酸化マンガンに吸着した場合は、酸性域において活性中心と基質間の相互作用が妨げられると考えられた。酸化鉄、酸化アルミニウム、酸化マンガン及びそれらの固化物に吸着したアミラーゼは熱安定性が向上していた。このことから、金属酸化物及び固化金属酸化物に吸着することによりアミラーゼは高次構造が安定化することが示唆された。

土壌による酵素吸着能の地域差は、干潟の濾過機能の違いの一因となっていると考えられ、酸化アルミニウムなどの金属酸化物を多く含む地域の土壌が高いバイオリアクター - 機能を示すことは、金属酸化物が濾過材として優れた材質である可能性を示唆していた。本研究の結果、バイオリアクター化された濾過剤を用いることで、閉鎖循環式陸上養殖において溶存酸素濃度の低下を誘発せずに水質浄化できる可能性が示された。また、海水の pH は 8.0 付近とややアルカリ性であり、そのためアルカリ性域における酵素の反応性が向上することは、陸上養殖を行う上で非常に大きな利点であると考えられる。また pH や熱に対する安定性が向上することも濾過システムの安定的な運用を行う上でメリットとなる。したがって酸化鉄、酸化アルミニウム及び酸化マンガンをを用いた濾過材は今後の陸上養殖の発展に寄与することが期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- Tetsuya Ogino, Wen Liu, Haruhiko Toyohara, Degradation of plant-derived carbohydrates in wetlands, Aqua-Bioscience monographs, 査読あり, 2018, Vol.11, pp. 1-46
劉文、西垣内裕太、李学広、渡邊哲弘、Wituspong Salikupt, 汐見浩二、豊原治彦、有機物分解能に優れた高機能土壌バイオリアクターの開発、Nippon Suisan Gakkaishi, 2015, 81, 81-89 査読あり
Wen Liu, Aya Tanimura, Kyohei Yamada, Haruhiko Toyohara, Lilee Chew, Yukio Hamamura, Tomoyuki Okutsu, Katushisa

Tanaka, Occurrence of cellulase activities in planktonic crustacean inhabiting mangrove areas in Malaysia, JARQ49, 2015, 49, 293-299 査読あり

W. Liu, A. Tanimura, T. Imai, G. Kanaya, T. Niiyama, S. Maegawa, A. Kohzu, T. Kimura, H. Toyohara, Distribution of gastropods in a tidal flat in association with digestive enzyme activities. 2014, *Plank. Benth. Res.* Vol.9 pp. 156-167 査読あり

A. Tanimura, T. Niiyama, K. Yamada, Y. Hanamura, T. Okutsu, H. Toyohara, K. Tanaka and A. Man. Distribution of cellulase activities among the Acetes shrimps living in the Matang Mangrove Forest Reserve, Malaysia. 2013, *Mal. J. Sci.*, Vol. 32, pp. 1-10

〔学会発表〕(計6件)

1. 佐橋菜太、豊原治彦、セタシジミの人為的栄養強化、日本ベントス学会(2018)
2. 豊原治彦、セルラーゼと環境酵素、平成29年度日本水産学会春季大会(招待講演)(2017)
3. 荻野哲也、滋野修一、前川真吾、西村大希、小倉淳、滋野修一、藤倉克則、豊原治彦、熱水噴出孔適応動物から探る新規バイオセンサー、第17回マリンバイオテクノロジー学会大会(2015)
4. 劉文、豊原治彦、バイオリアクターとしての干潟浅海域、の動物種と適応進化、第16回日本進化学会、ワークショップ(招待講演)(招待講演)(2014)
5. Wen Liu, Shingo Maegawa, Haruhiko Toyohara, Sediment bioreactor hypotheses - Binding of bivalve cellulose to sediment organ matters, SPS-NRCT Asian Core Program Symposium(招待講演)(2013)
6. Wen Liu, Haruhiko Toyohara, Taro Masuda, Piti Amparyup, Anchalee Tassanakajon, Novel phenoloxidase in plasma of black tiger prawn, *Penaeus monodon*. SPS-NRCT Asian Core Program Symposium (2013)

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： 9 0 1 8 3 0 7 9

(2)研究分担者

渡邊 哲弘 (WATANABE, Tetsuhiro)
京都大学・大学院地球環境学堂・助教
研究者番号： 6 0 4 5 6 9 0 2