

ネバネバの主成分，アルギン酸の酸化的代謝経路を発見

～新しいコンセプトに基づくアルギン酸の高度利用技術開発に期待～

ポイント

- ・アルギン酸分解物の DEHU を還元する酵素が酸化反応も触媒することを初めて発見。
- ・細胞の還元力を消費せずにアルギン酸を α -ケトグルタル酸に代謝する未知の経路の全容を解明。
- ・アルギン酸を高度利用するための新しいコンセプトとなる知見を提供。

概要

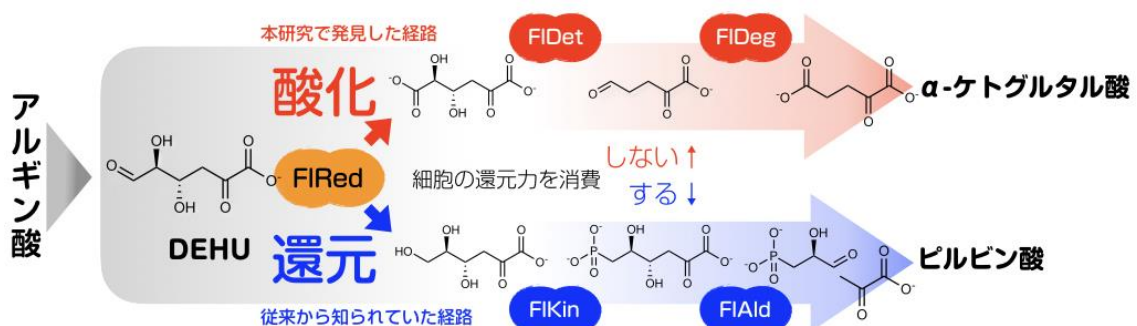
北海道大学大学院水産科学研究院の井上 晶教授，尾島孝男教授，同水産科学院博士後期課程（当時）西山竜士氏の研究グループは，微生物がアルギン酸¹の酵素分解によって生じる不飽和単糖由来 DEHU²を酸化的に代謝する経路をもつことを初めて明らかにしました。

アルギン酸は，コンブやワカメなどの褐藻に最も多く含まれている多糖類です。ヒトは，アルギン酸の分解酵素をもたないため，これらの海藻を食べてもアルギン酸は体内に吸収されず排出されます。一方，自然界には，アルギン酸の分解酵素をもつ生物（一部の細菌やアワビなどの海産軟体動物）が存在しています。これらは多糖リアーゼ³という酵素によってアルギン酸を分解し，DEHU と呼ばれる化合物を生み出します。DEHU については，細胞内で還元反応を受けた後，最終的にピルビン酸に変換される還元的代謝経路が 1962 年に米国の研究者によって提唱されました。提唱から現在まで，アルギン酸を栄養源として利用する生物は，細胞の還元力を消費しながらこの経路で DEHU を代謝すると考えられてきました。

研究グループは，単離した褐藻分解菌の抽出液中に DEHU を還元だけでなく，酸化する酵素も存在することに気付きました。その酸化酵素を同定した結果，興味深いことに DEHU の還元を担う酵素と同一のものであることが明らかになりました。さらに，DEHU 酸化物を変換する新規酵素も発見し，細胞の還元力を消費しない DEHU の酸化的代謝経路の全容を解明しました。

アルギン酸は多くの分野で利用されている有用多糖です。近年では，食糧と競合しない褐藻から大量に得られるため，新しい利用法の開発が注目されています。例えば，アルギン酸をバイオエタノールに変換する能力をもつ酵母や大腸菌の開発が進められましたが，DEHU 代謝時に生じる細胞の還元力不足の克服が最重要課題でした。本研究の知見は，この問題解決に新しいアイデアを提供するものであり，新技術の開発を加速するものと期待されます。

なお本研究成果は，2021 年 11 月 2 日（火）公開の *Communications Biology* 誌にオンライン掲載されました。



【背景】

アルギン酸は、日本人に馴染みが深いコンブやワカメなどの褐藻に多く含まれているネバネバの主成分であり、1881年に英国の化学者 Stanford によって発見された多糖類です(図1)。褐藻を餌とする生物は、アルギン酸を分解する酵素をもつと考えられてきましたが、その存在についてはアルギン酸の発見以降、約50年間不明なままでした。本学農学部を卒業し水産学者として活躍した大島幸吉博士は、コンブを食べるアワビに着目して研究に取り組み、1931年に初めてアルギン酸分解酵素を発見しました。その後、一部の細菌類も同酵素をもつことが他の研究者により報告され、自然界にはアルギン酸を分解する生物が広く存在することが明らかになりました。

さらに、本学水産学部の辻野 勇博士と斎藤恒行博士は、1961年に酵素によるアルギン酸分解が、当初考えられていた加水分解反応ではなく脱離反応によりグリコシド結合を切断することを初めて明らかにし、分解物の独特な構造を提案しました。このように北海道大学の先学たちは、アルギン酸分解酵素の発見とその作用機構の解明に多大な貢献を果たしています。

後に、これらの成果は米国の研究者 Preiss and Ashwell による1962年のアルギン酸の還元的代謝経路の提唱につながりました。この経路は広く受け入れられ、今日までこの説に基づいてアルギン酸の分解・代謝関連酵素の研究が国内外で進められてきました。研究グループは、2014年に褐藻分解菌として *Flavobacterium* sp. UMI-01 株を単離し、アルギン酸の分解と代謝に関わる一連の酵素を用いた研究を進めてきました。2017年には、この菌がもつ6種類の酵素とアルギン酸を試験管内で混合すると、アルギン酸が分解し、4-デオキシ-L-エリスロ-5-ヘキソセウロースウロン酸(DEHU)が生じ、最終的にピルビン酸に変換されることを実証しました。これは、1962年に発表されたアルギン酸の還元的代謝経路を単一の生物由来の精製酵素を用いて試験管内で再現した初めての報告です。

また、本菌が非常に高いアルギン酸分解能力をもつことに着目し、それを担う分解酵素を同定しました。この酵素は「HULK アルギン酸分解酵素」として、株式会社ニッポンジーンから販売されています。同酵素は、市販のアルギン酸分解酵素の中では最も分解活性が高く、従来の酵素では分解が困難なケースにも対応できることから広く利用されています。これらの研究の過程で、研究グループは UMI-01 株が DEHU を還元ではなく酸化する酵素をもつことに偶然気付きました。これをきっかけに従来の知見では想定されていないアルギン酸の酸化的代謝経路の解明を目指しました。

【研究手法】

UMI-01 株の細胞抽出液を DEHU と補酵素^{*4}の NADH を含む溶液に加えると、従来から知られている DEHU の還元化合物が生じた後に、未知の化合物(RP1)が検出されました(図2)。反応液の NADH を NAD⁺に置換すると RP1 は反応初期に生じ、生成量も増加したため、DEHU が酸化された化合物と推定されました。そのため、RP1 への変換を担う酵素を精製し、その機能を調べると共に RP1 の構造を決定しました。さらに、UMI-01 株が RP1 をどのように利用しているのかを明らかにするために、その代謝に関わる2つの酵素も同定し、機能を解析すると共に生成物を調べました。

【研究成果】

DEHU 酸化酵素を精製しアミノ酸配列を調べた結果、驚くべきことに既知の DEHU 還元酵素と同一のものでした。その組換えタンパク質を用いて酵素性状を調べると、本酵素は DEHU の還元も酸化も触媒可能であり、その活性は主に補酵素 NADH と NAD⁺の濃度比によって制御されることがわかりました。また、酸化反応により DEHU はアルデヒド基がカルボキシ基に変換された 2-ケト-3-デオキシ-D-グルカル酸(KDGR)に変換されることが明らかになりました。

さらに、KDGR を代謝する酵素を探索し、新規酵素 FIDet を発見しました。この酵素の作用により、KDGR は脱水・脱炭酸され α -ケトグルタルセミアルデヒド (α -KGSA) へと変換されることを示しました。さらに、KGSA は別の酵素 FIDeg の作用により α -ケトグルタル酸へと酸化されることがわかりました。以上の結果から、アルギン酸分解によって生じた DEHU は、従来から知られている還元的経路でピルビン酸へと代謝されるだけでなく、酸化的経路によって細胞の還元力を消費せずに α -ケトグルタル酸へと変換されることが明らかになりました。このような DEHU の二重代謝経路(図 3)の存在は、細胞のレドックスバランス(酸化還元平衡)の維持に必要不可欠なものと考えられます。また、 α -ケトグルタル酸の生成は、クエン酸回路を活性化し、細胞内の効率的なエネルギー生産にも寄与すると考えられます。他のアルギン酸分解細菌にも、酸化代謝に関与すると推定される各酵素の存在が遺伝子レベルで予測されたことから、これらの菌も同様の酸化経路をもつことが示唆されました。

【今後への期待】

アルギン酸は、褐藻類に最も多く含まれる多糖類であり、最大で乾重量の約 40~50%にも達する場合があります。また、褐藻は食糧と競合せず、海洋に豊富に存在することから、そこに含まれる成分の有効利用が期待されています。アルギン酸は、現在でも食品、パルプ、繊維、化学、医薬品、及び化粧品など様々な分野で広く使用されています。また、アルギン酸オリゴ糖には様々な生理活性作用も認められ、例えば植物の生長促進剤としての利用や難病である嚢胞性線維症の治療薬としての臨床試験が欧米で進められるなど、その用途は拡大しています。

近年では、バイオエネルギー資源としての利用が模索され、アルギン酸分解及び代謝能力をもつ組換え大腸菌や同酵母が創出されました。これらの組換え微生物がエタノールを産生するためには、細胞の還元力である NADH を利用する必要があります。従来の還元的代謝経路の知見に従えば、DEHU 代謝時に NADH は一方的に消費されるため、グルコースやマンニトールなどの糖を同時に取り込ませ、細胞内の NADH 濃度を上昇させる工夫が必要でした。本研究で解明された NADH を消費しない DEHU の酸化的代謝の知見を応用することにより、この問題は従来とは異なる視点で解決できる可能性があります。

論文情報

論文名	An oxidative metabolic pathway of 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEHU) from alginate in an alginate-assimilating bacterium (アルギン酸資化細菌におけるアルギン酸由来 DEHU の酸化代謝経路)
著者名	西山竜士 ¹ , 尾島孝男 ² , 大西裕季 ³ , 熊木康裕 ⁴ , 相沢智康 ³ , 井上 晶 ² (¹ 北海道大学大学院水産科学院, ² 北海道大学大学院水産科学研究院, ³ 北海道大学大学院先端生命科学研究院, ⁴ 北海道大学大学院理学研究院)
雑誌名	Communications Biology (生物学の専門誌)
DOI	10.1038/s42003-021-02786-8
公表日	2021年11月2日(火)(オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院水産科学研究院 教授 井上 晶 (いのうえ あきら)

T E L 0138-40-8591 メール inouea21@fish.hokudai.ac.jp

配信元

北海道大学総務企画部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北 8 条西 5 丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

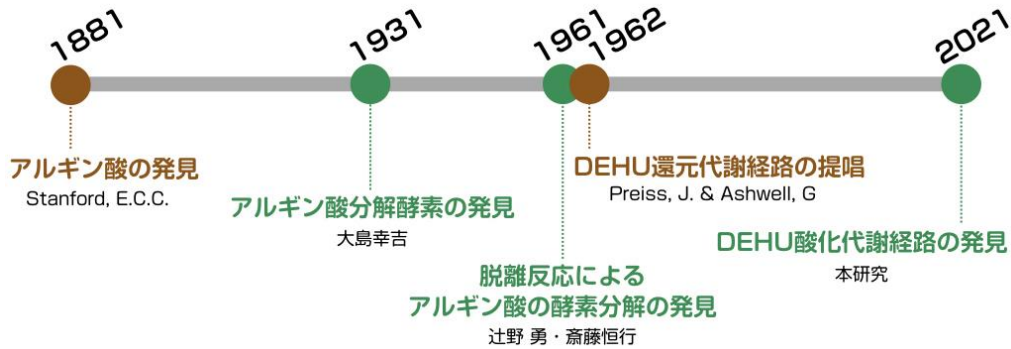


図 1. アルギン酸とその分解酵素及び代謝に関する研究の歴史

緑色の文字は、北海道大学関係者による研究業績を示す。

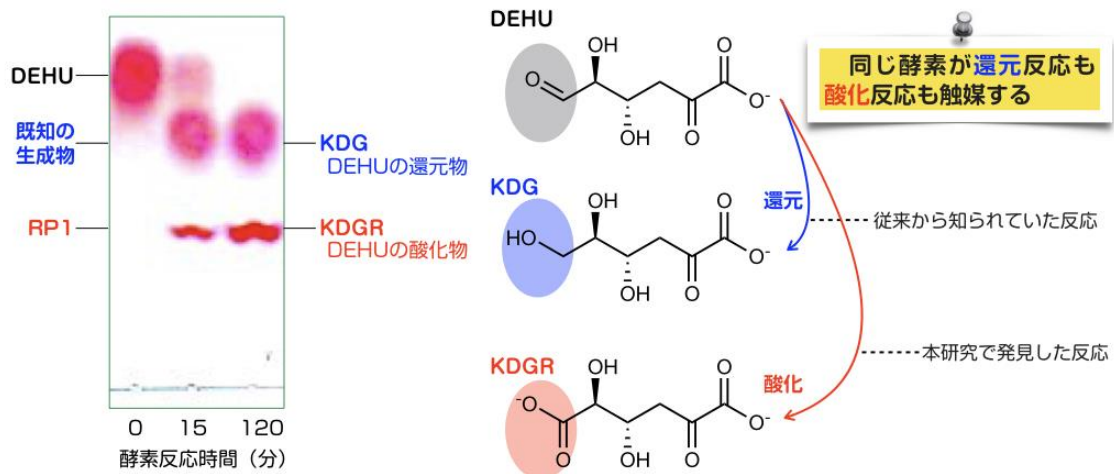


図 2. 単一の酵素による DEHU の還元と酸化

DEHU と精製酵素 F1Red を補酵素 NADH と共に混合し、25°C で反応した。反応時間毎の生成物の薄層クロマトグラフィー解析結果 (左) と DEHU 及び生成物の各化学構造 (右)。

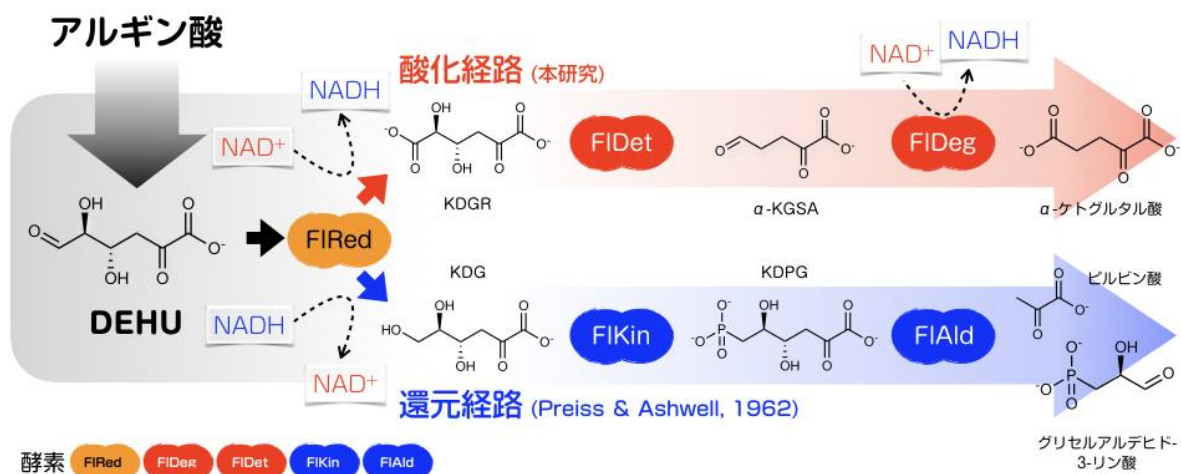


図 3. アルギン酸の二重代謝経路

【用語解説】

- *1 アルギン酸 … 自然界では褐藻と一部の細菌で生合成される多糖のこと。β-D-マンヌロン酸とα-L-グルロン酸の2種類の酸性多糖（ウロン酸）から構成されており、その水溶液は高い粘性を示し、2価金属イオンの存在下でゲルを形成するなどの特徴をもつ。
- *2 DEHU … アルギン酸が酵素で分解された際の最終生成物の4-デオキシ-L-エリスロ-5-ヘキソセウロースウロン酸のこと。アルギン酸分解酵素はリアーゼ（脱離酵素）であるため、アルギン酸を完全分解した場合、不飽和単糖を生じる。この単糖は環状の構造であるが、自己開環または酵素の作用により直鎖状の構造をもつDEHUとなる。
- *3 多糖リアーゼ … アルギン酸などのポリウロン酸の構成糖間のグリコシド結合をβ脱離反応で切断する多糖分解酵素のこと。分解物として不飽和糖を生じる。なお、代表的な多糖分解酵素であるセルラーゼは加水分解によりグリコシド結合を切断し、分解物は飽和糖を生じる。
- *4 補酵素 … 酵素の触媒反応の補助因子のこと。ここでは還元型及び酸化型電子伝達体としてのNADH及びNAD⁺を指す。

【参考リンク】

・HULK アルギン酸分解酵素（株式会社ニッポンジーン Web サイト）

<https://www.nippongene.com/siyaku/product/extraction/alginate-lyase/hulk-alginate-lyase.html>