

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00852

研究課題名(和文) 新しい希少糖アルギン酸デオキシ糖の生産と機能性の解析

研究課題名(英文) Study on production and functional analysis of alginate deoxysugars as new rare sugars

研究代表者

柴田 敏行 (Shibata, Toshiyuki)

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号：50380796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)： 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEH) および 2-keto-3-deoxy-D-gluconic acid (KDG) は、粘質多糖類のアルギン酸からリアーゼやレダクターゼの作用によって生じる生理機能が未知な希少糖である。この研究では、アルギン酸資化性細菌のゲノム解析から新規DEHレダクターゼの遺伝子配列情報を獲得し、大腸菌の発現系を用いて効率良くDEHからKDGを生産出来る方法を開発した。さらに希少糖DEHは、生理機能として、アンチエイジング活性やストレス耐性を上昇させる効果、神経変異性疾患に対して有益な効果を持つことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DEHとKDGは、食用多糖類のアルギン酸から得られる希少糖である。DEHに加えKDGについても、1ステップの工程で純度約95%以上の産物を生産出来る方法を世界に先駆けて開発した。DEHは、生理機能としてアンチエイジング活性やストレス耐性の上昇効果、神経変異性疾患の進行を抑制する効果を持つことを明らかにした。したがって、DEHとKDG、この二つのアルギン酸デオキシ糖は、薬理効果を持つ新しい機能性単糖としての利用が期待される。

研究成果の概要(英文)： 4-Deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEH) and 2-keto-3-deoxy-D-gluconic acid (KDG) are rare sugars produced from alginate by the action of lyase and reductase. In this study, we obtained sequence information of a novel DEH reductase gene from genomic DNA of alginate-utilizing bacteria, and developed a new method for producing KDG from DEH using the protein expression system in *Escherichia coli*. In addition, it was clarified that DEH has a physiological action of anti-aging effect, enhances stress tolerance and suppresses the progression of neurodegenerative diseases (polyglutamine diseases).

研究分野：食品化学

キーワード：アルギン酸デオキシ糖 DEH KDG DEHレダクターゼ *Formosa haliotis* *Caenorhabditis elegans*

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEH) および 2-keto-3-deoxy-D-gluconic acid (KDG) は、褐藻細胞間粘質多糖類のアルギン酸からリアーゼやレダクターゼの作用によって生じる単糖である。アルギン酸リアーゼは、獲得が非常に困難な酵素群であるため、アルギン酸は、難分解性の多糖類 (グリクロナン) と見なされている。特に DEH 生産に不可欠な Exo-型アルギン酸リアーゼ (Exo-Aly) の知見は極めて限られており、現状、市場からのそれらの入手は不可能であるため、Exo-Aly 生産菌の探索に関する研究が競争的に進められている。したがって、DEH と KDG、この二つのデオキシ糖は、アルギン酸由来の生理機能未知な新しい希少糖と見なすことが出来る。

2. 研究の目的

研究代表者と連携研究者の研究グループでは、メタゲノム解析の手法を用いて海洋性細菌 *Falsirohodobacter* sp. から、新規エンド型アルギン酸リアーゼ (Endo-Aly) (AlyFRA) と Exo-Aly (AlyFRB) を獲得した (PLOS ONE, 11, 2016)。さらに、AlyFRA と AlyFRB をコードする遺伝子を組み込んだ大腸菌の開発とそれらを用いたアルギン酸リアーゼ生産システムの構築に成功し、1 ステップの工程で純度約 95% 以上の DEH を生産する方法を開発した (WO2017175694A)。この研究では、開発した DEH の生産方法をコアとし、以下のテーマを目的とした

(1) アルギン酸資化性細菌のゲノム DNA から DEH レダクターゼをコードする遺伝子情報を獲得し、大腸菌の発現系を用いた効率の良い KDG の生産方法を開発する。

(2) DEH を中心にアルギン酸デオキシ糖の生理機能について、抗酸化性、アンチエイジング活性、ストレス耐性や神経変異性疾患に及ぼす作用を解析する。

3. 研究の方法

(1) DEH の調製

以前に報告した方法 (WO2017175694A) に従って、アルギン酸から DEH を調製した。アルギン酸塩の水溶液に、海洋性細菌 *Falsirohodobacter* sp. alg1 株から獲得した Endo-Aly のリコンビナントタンパク質 (rAly-FRA) を加えてアルギン酸不飽和オリゴ糖 (AUOs) を調製した後、Exo-Aly のリコンビナントタンパク質 (rAlyFRB) を AUOs に加え酵素反応させた。限外濾過により酵素反応液から酵素タンパク質と未分解のオリゴ糖を除去した。濾液を凍結乾燥し、得られた乾燥物を DEH 塩とした。調製した DEH の純度は、ブタノール-酢酸-水 (3:2:2, v/v) の展開溶媒と噴霧試薬に DPA (ジフェニルアミン/アニリン/リン酸) 試薬を組み合わせた TLC を用いて確認した。

(2) アルギン酸資化性細菌からの DEH レダクターゼの獲得

Formosa haliotis MA1 株のゲノム DNA から short-chain dehydrogenase/reductase (sdr) 遺伝子をクローニングした。sdr1 遺伝子について、pET 発現システムを用いてタンパク質発現プラスミドを構築した。構築したプラスミドを大腸菌 BL21 株に形質転換し、その形質転換体を培養した。得られた菌体を超音波破砕し、可溶性画分をニッケルアフィニティークロマトグラフィーに供し、単一になるまで精製した。これを DEH レダクターゼ (SDR1) として酵素の性状解析と DEH からの KDG 生産の実験に用いた。

(3) HPLC-ELSD を用いたアルギン酸デオキシ糖の分析法の開発

HPLC は、アジレントテクノロジー製 1260 Series HPLC system を用いた。蒸発光散乱検出器 (ELSD) (アジレントテクノロジー製 1260 Infinity ELSD) は、エバポレーターとネプライザーの温度を 30°C、ネプライザーガス (窒素) の流速を 1.6 L/min の条件にそれぞれ設定した。分析用カラムには、Shodex I-524A を、移動相には、0.1% ギ酸を含むギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 3.5) を用いた。

(4) ラジカル捕捉活性の測定

以前に報告した方法 (Am. J. Plant Sci., 6, 2015) に従って、アルギン酸デオキシ糖の DPPH ラジカル捕捉活性を測定した。MES 緩衝液等を用いて調製した DPPH working solution と水に溶解させたサンプルを暗所で反応させた後、517 nm における吸光度を測定した。陽性対照には、DEH と同様 α -ケト酸である α -ケトグルタル酸とビタミン E の水溶性アナログである Trolox をそれぞれ用いた。DPPH ラジカル捕捉活性は、サンプル 1 g あたりの Trolox 当量 ($\mu\text{M-TE/g}$) として表した。

(5) MTT 試験

RIKEN BRC から入手したマウス脂肪前駆細胞株 3T3L-1、ラット副腎褐色細胞腫由来細胞株 PC-12、ヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 をそれぞれ用いて、アルギン酸デオキシ糖の細胞毒性についてその有無を評価した。以前に報告した方法 (Nat. Prod. Commun., 12, 2017) に準じて MTT 試験を行った。ミトコンドリアの脱水素酵素による MTT からホルマザンへの還元を指標に細胞生存率へ及ぼすサンプルの影響を解析した。

(6) モデル生物 *Caenorhabditis elegans* を用いた生理機能の評価

Caenorhabditis Genetics Center から入手した *C. elegans* の野生型 (N2) と遺伝子改変株の TJ375 (hsp-16.2p::GFP) ならびに AM141 (Q40::YFP) を用いてアルギン酸デオキシ糖の生理機能を解析した。すべての株は、ストレプトマイシンを添加した nematode growth medium (NGM) 寒天培地上で培養を行い、餌には大腸菌 OP50 を用いた。同調培養により年齢を揃えたそれぞれの線虫株を用いて、Life span assay, 熱ショックタンパク質 (HSP) の発現誘導, ポリグルタミン凝集体の形成抑制に関するアルギン酸デオキシ糖の生理機能を解析・評価した。Life span assay では、サンプル添加群と対照群との比較に log-rank test を用いた。

4. 研究成果

(1) DEH レダクターゼの性状解析と KDG の生産

補酵素の NADH または NADPH の存在下で、SDR1 と DEH を反応させた。その結果、NADH では、酸化型 NAD⁺ への変換が観測されたが、NADPH の場合、NADP⁺ への変換は見られなかった。よって SDR1 は、DEH を基質とすることが出来る NADH 依存型レダクターゼであることが分かった。DEH と SDR1 の反応液について、LC/MS 分析を行った。陰イオンクロマトグラフィーカラムとギ酸緩衝液を用いて負イオン測定を行った結果、トータルイオンクロマトグラム上の保持時間約 3.2 分に単一のピークが検出された。マススペクトルの解析から、*m/z* 177 に KDG の脱プロトン化分子に相当するイオンがこのピークに確認された。以上の結果から、獲得した SDR1 によって NADH の存在下で DEH から KDG へと完全に変換出来ることが分かった。

この成果について、「不飽和ウロン酸還元酵素とアルギン酸誘導体の製造方法」の名称で知財申請を行った (特願 2018-034178)。

(2) 新しいアルギン酸デオキシ糖の分析法の開発

DEH と KDG は光吸収性に乏しいため、ELSD による検出は有効な手段の一つである。これらアルギン酸デオキシ糖の新しい分析法として、陰イオンクロマトグラフィー用カラムとギ酸緩衝液を用いた HPLC-ELSD 法を開発した。約 10 分間の分析時間で DEH と KDG に加え、アルギン酸不飽和二糖から四糖を分離・検出可能な条件を確立した (Nat. Prod. Commun., 14, 2019)。従来の条件 (Nat. Prod. Commun., 12: 941, 2017) と比較して、分析時間の短縮化をはかることが出来た。DEH の場合、検出限界 (S/N=3) は、37.5 µg/mL、定量限界 (S/N=10) は、124.9 µg/mL とそれぞれ算出された。確立した HPLC 条件は、移動相にギ酸緩衝液を用いるため、LC/MS 分析にも適用出来る。

(3) DEH のラジカル捕捉活性

DPPH は、生体内にはない有機ラジカルであるが、測定が容易であるため抗酸化性評価の指標として幅広く用いられている。DEH, AUOs (アルギン酸不飽和二糖から四糖の混合物), α -ケトグルタル酸の DPPH ラジカル捕捉活性は、それぞれ 3.88×10^{-4} µM-TE/g, 3.15×10^{-4} µM-TE/g, 1.03×10^{-4} µM-TE/g と算出された。DEH は、AUOs に対して約 12 倍、 α -ケトグルタル酸に対して約 3 倍の DPPH ラジカル消去活性を有しており、これらを上回る抗酸化性を持つことが強く示唆された。

(4) MTT 試験を用いた DEH の細胞毒性の評価

それぞれの動物培養細胞を播種した 96well マイクロプレートに、D-PBS に溶解させたサンプルを添加し培養を行った。MTT 試験の結果、1 µM から 100 µM の範囲において、DEH 添加区の細胞生存率 (%) は、全て 80% を上回っていた。この結果から、試験した濃度範囲で DEH は、3T3L-1, PC-12, Caco-2 の各細胞に対して毒性は無いと結論出来た。

(5) *C. elegans* を用いた DEH の生理機能の評価

Lifespan assay を行った結果、特定の濃度下で DEH 添加群 (*n*=50) は、対照群 (*n*=50) と比較して N2 株の平均寿命が約 8 ポイント、AM141 株の平均寿命が約 17 ポイント有意に延長した。AM141 株について、Lifespan assay と同時に蛍光実体顕微鏡を用いて経過観察を行った結果、線虫の筋肉において加齢のマーカーでもあるポリグルタミン凝集体の形成が DEH 添加群で著しく抑制されていることが分かった。熱ストレス耐性試験では、Hsp-16.2 の発現を示す GFP 蛍光は明確に観察されなかったが、TJ375 株の平均寿命の延長は DEH 添加群で確認出来た。AM141 株は、神経変異性疾患ハンチントン病のモデルともされている。この結果から、DEH は、生理機能としてアンチエイジング活性に加え、ストレス耐性を上昇させる効果や神経変異性疾患 (ポリグルタミン病) への有益な効果を持つ可能性が強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Toshiyuki Shibata, Reona Fujii, Yoshihiko Nishioka, Hideo Miyake, Tetsushi Mori, Reiji Tanaka	4. 巻 14
2. 論文標題 A simple analysis method for 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid by HPLC-ELSD with column for anion analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Natural Product Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1934578X19850990	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 柴田 敏行, 田中 礼士, 三宅 英雄	4. 巻 223
2. 論文標題 大型藻類を対象としたマリンバイオリファイナー研究の成果と展望 - 食品化学分野での新展開を目指して	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Foods & Food Ingredients Journal of Japan	6. 最初と最後の頁 355-366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 柴田 敏行	4. 巻 88
2. 論文標題 アルギン酸リアーゼ及び当該酵素を用いる不飽和ウロン酸単糖の製造法	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bio Tech Tokai	6. 最初と最後の頁 78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 三宅 英雄, 柴田 敏行	4. 巻 35
2. 論文標題 大型海藻からの希少糖およびマリンポリフェノールの生産	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 月刊バイオインダストリー	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 三宅 英雄, 柴田 敏行, 田中 礼士	4. 巻 63
2. 論文標題 大型海藻からの希少糖およびマリンポリフェノールの生産 - 大型海藻を原料としたバイオリファイナリーを目指して -	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ケミカルエンジニアリング	6. 最初と最後の頁 22-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 柴田 敏行
2. 発表標題 大型藻類を対象としたマリンバイオ研究
3. 学会等名 日本薬学会東海支部特別講演会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三宅 英雄, 村瀬 祥光, 濱地 野乃香, モリ テツシ, 田中 礼士, 植田 充美, 柴田 敏行
2. 発表標題 海藻多糖由来の新しい希少糖であるアルギン酸デオキシ糖の製造方法
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井 玲央奈, 三宅 英雄, 田中 礼士, モリ テツシ, 高橋 真美, 植田 充美, 柴田 敏行
2. 発表標題 LC-ESI-MSを用いた4-Deoxy-L-erythro-5 hexoseulose uronic acidの検出法の開発
3. 学会等名 日本食品化学会第23回総会・学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村瀬 祥光, 柴田敏行, モリ テツシ, 田中 礼士, 植田 充美, 三宅 英雄
2. 発表標題 海藻由来の希少糖4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acidの製造方法
3. 学会等名 2017年度日本生物工学会中部支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 濱地 野乃香, 田中 礼士, モリ テツシ, 柴田 敏行, 三宅 英雄
2. 発表標題 Formosa haliotis MA1株由来4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid還元酵素の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前原 伸哉, 柴田 敏行, 田中 礼士, モリ テツシ, 三宅 英雄
2. 発表標題 Falsirhodobacter sp. alg1が生産するエキソ型アルギン酸リアーゼの生成物の特徴
3. 学会等名 第83回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前原 伸哉, 柴田 敏行, 田中 礼士, モリ テツシ, 三宅 英雄
2. 発表標題 Falsirhodobacter sp. alg1が生産するエキソ型アルギン酸リアーゼの生成物の特徴
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前原 伸哉, 柴田 敏行, 田中 礼士, モリ テツシ, 三宅 英雄
2. 発表標題 エキソ型アルギン酸リアーゼの生成物の特徴と触媒機構に関する研究
3. 学会等名 日本応用糖質科学会中部支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhito Yokoi, Toshiyuki Shibata, Reiji Tanaka, Hideo Miyake, Tetsushi Mori
2. 発表標題 Elucidation of macroalgae-microbe relationships via macroalgae related bacterial isolates.
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019, Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田 敏行
2. 発表標題 三重大学海藻バイオリファイナー研究センター
3. 学会等名 第8回生物資源学研究所オープンラボ「基礎研究から地域貢献・共同研究を考える」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前原 伸哉, 柴田 敏行, 田中 礼士, モリ テツシ, 三宅 英雄
2. 発表標題 Falsirhodobacter sp. alg1が生産するエキソ型アルギン酸リアーゼAlyFRBの生成物の特徴とその触媒機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 不飽和ウロン酸還元酵素とアルギン酸誘導体の製造方法	発明者 三宅 英雄, 柴田 敏行, 田中 礼士, 濱地野乃香	権利者 三重大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-034178	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

三重大学 大学院生物資源学研究所 海洋食糧化学教育研究分野ホームページ http://mfc.bio.mie-u.ac.jp/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	田中 礼士 (Tanaka Reiji)		
連携研究者	三宅 英雄 (Miyake Hideo) (50362364)	三重大学・生物資源学研究所・准教授 (14101)	
連携研究者	モリ テツシ (Mori Tetsushi) (00590100)	東京農工大学・工学研究科・准教授 (12605)	