

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K02344

研究課題名(和文) アルギン酸完全分解酵素を用いた新しいアルギン酸定量分析法の開発

研究課題名(英文) Development of a new method for quantitative analysis of alginate using complete alginate degrading enzyme

研究代表者

柴田 敏行 (Shibata, Toshiyuki)

三重大学・生物資源学研究所・准教授

研究者番号：50380796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEH) は、アルギン酸からエキソ型アルギン酸リアーゼの作用によって生じる唯一の単糖(アルギン酸デオキシ糖)である。この研究では、アルギン酸を含む食品の分析に適用出来るDEHをスタンダードとした新しいアルギン酸の定量分析法を開発することを目的とした。次の二つの研究成果を得た。アルギン酸分解・資化性細菌ライブラリーからアルギン酸リアーゼを選抜し、アルギン酸をDEHへと完全分解出来るベストミックス酵素を開発した。LC/MS法によるDEHの検出と分析精度の評価に関する試験し、アルギン酸の定量分析法を決定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリクロナンのアルギン酸は、増粘剤や安定剤として数多くの加工食品に利用されている。コレステロール吸収低減作用を持つことから、アルギン酸は、特定保健用食品の関与成分としても認可されている。これまで、アルギン酸の定量分析法は、ウロン酸への呈色反応を利用した方法が多く用いられてきたが、ペクチンをはじめ様々なマトリクスを含む加工食品への適用は、難しかった。この研究では、エキソ型アルギン酸リアーゼとDEHを用いたアルギン酸に特異的な定量分析法の開発を試みており、アルギン酸含む加工食品の品質管理に活用することが出来る。

研究成果の概要(英文)：4-Deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEH) is the only monosaccharide (alginate deoxysugar) produced from alginic acid by the action of exo-alginate lyases. The purpose of this study was to develop a new quantitative analysis method for alginic acid using DEH as a standard, which can be applied to the analysis of foods containing alginic acid. The following two research results were obtained:(1) alginate lyase was selected from the alginate-degrading and assimilating bacterial library, and the best-mixed enzyme capable of completely degrading alginate to DEH was developed, and (2) a quantitative analysis method for alginic acid was completed by testing the detection of DEH by the LC/MS method and the evaluation of analytical accuracy.

研究分野：食品化学

キーワード：アルギン酸 アルギン酸リアーゼ アルギン酸デオキシ糖 DEH 定量分析 LC/MS

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グリクロナンのアルギン酸は、ユニークなゲル特性を持つことから、増粘剤や安定剤として多くの食品に利用されている。一般的にアルギン酸塩を含めたアルギン酸の定量法は、カルバゾール硫酸法やナフトレゾルシノールとウロン酸の呈色反応を利用した方法が用いられている。しかしながら、これらの方法は、アルギン酸の構成糖である D-マンヌロン酸 (M) と L-グルロン酸 (G) 以外のウロン酸とも鋭敏に反応するため、それらの利用にはペクチンをはじめマトリックスの効果的な除去が鍵となる。また、L-グルロン酸の標品は市販された実績が無いため、強酸を用いた完全加水分解によって生じる構成糖の量を HPLC で定量し、アルギン酸量を算出することも困難である。このようにアルギン酸に特異的な定量分析法の開発は、いまだ未完と言える。

2. 研究の目的

アルギン酸の完全分解、すなわち単糖の生成は、酸によるグリコシド結合の加水分解とアルギン酸分解・資化性細菌が産するアルギン酸リアーゼによる分解の二つに大別される。エンド型アルギン酸リアーゼ (Endo-Aly) は、 β 脱離反応によってアルギン酸を分解し、非還元末端に不飽和ウロン酸残基を持つオリゴ糖を生成する。エキソ型アルギン酸リアーゼ (Exo-Aly) は、不飽和オリゴ糖から不飽和単糖を遊離する。生じた不飽和単糖は、非酵素的に開環し 4-Deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEH) へと変換・集約される。この DEH は、アルギン酸以外のグリクロナンからは生じないことから、アルギン酸定量分析のスタンダードとなる唯一の化合物と見なすことが出来る。

この研究では、アルギン酸リアーゼによるアルギン酸の DEH への完全分解と LC/MS を用いた DEH の定量分析をキーワードに、アルギン酸を含む全ての食品に適用できる新しいアルギン酸の定量分析法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DEH 塩の調製

保有する特許技術 (第 6954644 号) に従って、アルギン酸塩から DEH 塩を調製した。アルギン酸水溶液に、海洋細菌 *Falsirhodobacter* sp. alg1 株から獲得した Endo-Aly (AlyFRA), Exo-Aly (AlyFRB) のリコンビナントタンパク質を加え酵素反応させた。限外ろ過により、酵素反応液から酵素タンパク質と未分解のアルギン酸不飽和オリゴ糖を除去した。ろ液を凍結乾燥し、得られた乾燥物を DEH 塩とした。尚、AlyFRA は、アルギン酸塩を基質として、25℃、pH7.5 において反応初期の 1 分間に 3.17 μ M のアルギン酸不飽和オリゴ糖に相当するチオバルビツール酸 (TBA) 呈色物質を増加させるタンパク質 0.079 mg の活性を 1 U とした。rAlyFRB は、アルギン酸塩を基質として、25℃、pH7.5 において反応初期の 1 分間に 5.36 μ M の DEH に相当する TBA 呈色物質を増加させるタンパク質 0.045 mg の活性を 1 U とした。

(2) TLC 分析

TLC プレート (Silicagel 60 F₂₅₄) は、使用前に 180℃ で加熱を行い活性化させたものを用いた。展開溶媒には、1-ブタノール : 水 : 酢酸 = 2 : 1 : 1 (v/v) を使用した。呈色試薬には、ナフトレゾルシノール試薬を用いた。酵素反応液を展開させた後の TLC プレートについてスキャナー画像を作成し、JustTLC を用いてアルギン酸分解物を解析した。

(3) LC/MS 分析

LC-MS は、アジレントテクノロジー製 1260HPLC システムと 6120 シングル四重極質量分析計から構成される装置を用いた。分析用カラムには、Shodex IC NI-424 を、移動相には、0.1% ギ酸アンモニウムを含むギ酸アンモニウム緩衝液を使用した。質量分析装置の選択的イオンモニタリング測定 (SIM) では、 m/z 175 (DEH の脱プロトン化分子の質量数に相当) に設定した。(1) で調製した DEH 塩を用いて検量線を作成した。各試験で得られた酵素反応液について、SIM 測定により DEH の定量分析を行った。

(4) アルギン酸を完全分解可能な新規アルギン酸リアーゼの探索

環境微生物のサンプルからゲノム DNA を抽出し、PCR 法を用いて新規 Exo-Aly 遺伝子と同等の配列をコードする遺伝子情報の獲得を試みた。新規 Exo-Aly 遺伝子を増幅するために、既存の AlyFRB 遺伝子の全長を目的領域とするプライマーと AlyFRB 遺伝子の保存領域とするプライマーを設計し、PCR を行った。NCBI/DBJ DNA データベース上より AlyFRB 類似遺伝子の探索も行った。得られた遺伝子情報について、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碎し、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。得られた酵素タンパク質について、その性状を解析した。

(5) アルギン酸分解試験

基質のアルギン酸には、High M タイプ、High G タイプ、アルギン酸ピロピレングリコールエステル (PGA) をそれぞれ用いた。食品のマトリクス成分として、増粘多糖類のペクチン (かんきつ類由来)、 γ -カラジナン、カルボキシメチルセルロース塩を使用した。アルギン酸リアーゼを加え酵素反応を行った後、(2) の TLC 分析と (3) の LC/MS 分析より反応生成物を解析した。得られた結果からアルギン酸の完全分解に必要な酵素反応の条件をまとめた。

4. 研究成果

(1) 新たなアルギン酸リアーゼの獲得と得られた酵素の性質の解析

アルギン酸完全分解酵素の候補となるアルギン酸リアーゼのライブラリーを構築するために、NCBI/DDBJ DNA データベース上より AlyFRB 類似遺伝子の探索を行った。その結果、*Puniceibacterium sediminis* が保有する DUF4962 domain-containing protein (DDBJ No. WP089269910) および *Paracoccus* sp. JM45 株が保有する DUF4962 domain-containing protein (DDBJ No. WP220475169) の 2 つについて、AlyFRB 遺伝子との相同が 80% と比較的高い値を示した。これら 2 つの AlyFRB 類似遺伝子について人工遺伝子の作製を行い、得られた人工遺伝子から大腸菌を用いた発現組み換え体を構築した。*Paracoccus* sp. JM45 株が生産する AlyPC の合成遺伝子を挿入した大腸菌発現系を構築し、精製酵素 rAlyPC を得ることに成功した。rAlyPC とアルギン酸水溶液を反応させ TLC 分析を行った結果、DEH を示す単一のバンドを検出した。よって、rAlyPC は、Exo-Aly であることが確認出来た。rAlyPC の酵素活性について、温度と pH の影響を調べた結果、至適温度は 40°C、至適 pH は 8 であることが分かった。これは、*Falsirhodobacter* sp. alg1 株の AlyFRB と同様の値であった。rAlyPC の反応速度論的解析を行ったところ、 k_{cat} は 0.962 sec^{-1} 、 K_m は 0.194 mg/mL と算出され、触媒効率を示す k_{cat}/K_m の値は、AlyFRB の値と比べ 8 倍高いことが分かった。

(2) *Falsirhodobacter* sp. alg1 株由来アルギン酸リアーゼの酵素活性の評価

大腸菌発現系を用いて *Falsirhodobacter* sp. alg1 株由来 Endo-Aly (AlyFRA) と Exo-Aly (AlyFRB) のリコンビナントタンパク質 (rAly-FRA, rAlyFRB) を調製し、酵素活性の評価を行った。加工食品に添加されるアルギン酸塩は、アイスクリームとミルクコーヒーの場合、0.36wt%、寒天ゲル食品の場合、0.3wt% が食品添加物として効果を発揮する濃度とされる。そこでアルギン酸塩濃度を 0.5wt% に設定した水溶液を調製し、基質として用いた。アルギン酸リアーゼは、rAlyFRA (10 U) のみ、rAlyFRB (10 U) のみ、rAlyFRA (10 U) + rAlyFRB (10 U) の 3 つの条件で酵素反応試験を行った。rAlyFRA の反応液からは不飽和オリゴ糖 (二糖から四糖) が、rAlyFRB の反応液からは DEH の生成を確認出来た。一方、rAlyFRA+rAlyFRB の反応液では、DEH に加え未分解の不飽和オリゴ糖が生じていた。またアルギン酸 PGA に対して、rAlyFRA と rAlyFRB は作用しないことも確認出来た。次に基質 500 μL に rAlyFRB を 10 U、40 U、80 U 加えたものを調製し、反応時間 (2 時間、3 日間) と温度 (25、37、40) の条件を検討した。TLC と LC/MS 分析の結果、80 U の rAlyFRB を加えた場合、反応時間と温度に関わらずアルギン酸の DEH への分解率は、90% を超えており、25 で 2 時間反応または 3 日間反応が最も高いことが明らかになった。High M タイプと High G タイプのアルギン酸の間で rAlyFRB による分解に差は見られなかった。以上の結果、基質のアルギン酸濃度が 0.5wt% の場合、rAlyFRB は 80 U、酵素反応温度は 25、反応時間は 2 時間の条件で DEH へと完全に分解出来ると結論付けた。ペクチン、 γ -カラジナン、カルボキシメチルセルロース塩を添加した酵素反応試験では、得られた DEH の定量値をコントロールの値と比較した結果、約 97% 以上の値が得られた。この結果より、rAlyFRB は、共存する増粘多糖類の影響を受けずにアルギン酸を DEH へと完全分解出来ることが分かった。

(3) 市販のアルギン酸含有食品を用いた試験

市販のアルギン酸塩入り飲料 (レモン果汁 1% 含有、アルギン酸塩濃度の仕様値 2.7wt%) をモデルの加工食品とし、AlyFRB によるアルギン酸の分解と生じた DEH の定量分析を試みた。最初に、レモン果汁入り飲料水を用いて、添加回収試験を行った (1) で調製した DEH 塩を 0.1wt%、0.5wt% となるように飲料水へ加えた。(3) で記した LC/MS 分析の SIM 測定により定量分析を行った結果、平均 98.7%、98.9% の回収率が得られた。

飲料の pH を 7.5 に調整した後、仕様値に基づいてアルギン酸塩の終濃度が 0.5wt% となるように超純水を加え希釈した。希釈した飲料水 500 μL に対して rAlyFRB を 80 U 添加し 25°C にて 2 時間、酵素反応を行った。生じた DEH 量を定量した結果、24.13 mg の値 (試料三本の平均値) が得られた。AlyFRB によるアルギン酸塩からの DEH の生成率を 95% とした場合、この定量値はアルギン酸塩 25.34 mg に相当すると考えられる。製品の仕様値が 26.67 mg であることから、rAlyFRB による酵素反応と (3) に記した LC/MS 法の組み合わせは、モデルとして用いた飲料に含まれるアルギン酸の定量分析に対して適応出来たと判断した。

アルギン酸リアーゼは、獲得が非常に困難な酵素群であり、DEH の生産に必須な Exo-Aly についての知見は限られている。この研究により、現状、*Falsirhodobacter* sp. alg1 の AlyFRB がア

ルギン酸を完全分解出来るベストな酵素であることが分かった。Exo-Aly の AlyFRB は、単独の仕様で、アルギン酸を直接 DEH へと分解出来るユニークな酵素である。市販のアルギン酸含有食品は、この研究で試験した多糖類以外の糖質やその他の夾雑成分を含むものもある。今後は、前処理法についての検討を行い、rAlyFRB による酵素反応と LC/MS による DEH の定量分析を組み合わせた本法のブラッシュアップを図る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 柴田 敏行, 三宅 英雄, 田中 礼士	4. 巻 2020年9月号
2. 論文標題 海藻多糖アルギン酸からの希少な単糖類の生産	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 874, 876
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 Yuzuki Tanaka, Yoshihiro Murase, Toshiyuki Shibata, Reiji Tanaka, Tetsushi Mori, Hideo Miyake	4. 巻 27
2. 論文標題 Production of 4-Deoxy-L-erythro-5-Hexoseulose Uronic Acid Using Two Free and Immobilized Alginate Lyases from <i>Falsirhodobacter</i> sp. Alg1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 olecules	6. 最初と最後の頁 3308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27103308	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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栗芝 ゆう, 柴田 敏行, 三宅 英雄, 田中 礼士
2. 発表標題 新規Echinicola sp. 20G株の分離およびウルバン分解関連遺伝子群の特定
3. 学会等名 第21回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 礼士, 三宅 英雄, 柴田 敏行
2. 発表標題 ウルバン分解細菌の網羅的単離および分解関連遺伝子群の特定
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 優月, 赤松 佳織, 柴田 敏行, 田中 礼士, 三宅 英雄
2. 発表標題 固定化酵素技術を用いた希少糖DEH生産システムの開発
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部第190回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 優月, 赤松 佳織, 柴田 敏行, 田中 礼士, 三宅 英雄
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生産
3. 学会等名 日本応用糖質科学会中部支部例会
4. 発表年 2021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PL15とPL17の生成物の特徴と触媒機構
3. 学会等名 第84回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2020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の触媒機構に関する研究
3. 学会等名 2020年度(第69回)日本応用糖質科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田 敏行, 三宅 英雄, 田中 礼士, 山本 康介
2. 発表標題 大型海藻類からの有用成分の生産技術の開発 ~マリンポリフェノールと機能性糖質の生産~
3. 学会等名 BioJapan (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田 敏行, 三宅 英雄, 田中 礼士, 山本 康介
2. 発表標題 非食用海藻を用いた完全利用型バイオリファイナリー
3. 学会等名 サステナブルマテリアル展
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宅 英雄, 柴田 敏行, 田中 礼士, 山本 康介
2. 発表標題 バイオリファイナリーのための新しい基幹物質:アルギン酸デオキシ糖の生産技術の紹介
3. 学会等名 長浜ビジネスマッチング会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋村 夢芽, 濱地 野々香, 田中 礼士, 柴田 敏行, 三宅 英雄
2. 発表標題 Formosa haliotis MA1株由来のDEH還元酵素の特性と触媒に関与するアミノ酸残基の推定
3. 学会等名 日本応用糖質科学会中部支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 礼士, 三宅 英雄, 柴田 敏行
2. 発表標題 ビブリオ属細菌を用いた海藻バイオリファイナリーの試みー緑藻由来多糖「ウルバン」の分解を例としてー
3. 学会等名 第54回ビブリオシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野田 祐亮, 柴田 敏行, 田中 礼士, 三宅 英雄
2. 発表標題 褐藻類を原料とした4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEH) の生産
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 優月, 村瀬 祥光, 柴田 敏行, 田中 礼士, モリ テツシ, 三宅 英雄
2. 発表標題 藻多糖由来の新しい希少糖アルギン酸デオキシ糖の生産
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋村 夢芽, 濱地 野々香, 田中 礼士, 柴田 敏行, 三宅 英雄
2. 発表標題 Formosa haliotis MA1株由来の4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid還元酵素の反応速度論的解析と触媒に関与するアミノ酸残基の推定
3. 学会等名 第86回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 4 - デオキシ - L - エリスロ - 5 - ヘキソセウロース・ウロン酸の新規用途	発明者 柴田 敏行, 三宅 英雄, 田中 礼士	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-041247	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

Moleculesにてspecial issue on Seaweed Biorefinery and Related Technologiesのゲストエディターをつとめた(2021年4月~2022年4月)。
--

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 分担者	田中 礼士 (Tanaka Reiji) (80447862)	三重大学・生物資源学研究科・准教授 (14101)	

	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	三宅 英雄 (Miyake Hideo) (50362364)	三重大学・生物資源学研究科・准教授 (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------