

寒天分解酵素および寒天オリゴ糖の機能性

誌名	応用糖質科学
ISSN	21856427
著者	有賀, 修 岡本, 直樹 井上, 貴由 久保, 元 森山, 洋憲
巻/号	2巻2号
掲載ページ	p. 142-146
発行年月	2012年5月



Isolation of Agarolytic Enzyme and Functionality of Agarooligosaccharide*

寒天分解酵素および寒天オリゴ糖の機能性*

(2012年2月1日受付, 2012年2月20日受理)

有賀 修^{1,**}, 岡本直樹¹, 井上貴由¹, 久保 元¹, 森山洋憲²

(ありが おさむ, おかもと なおき, いのうえ たかよし, くぼ はじめ, もりやま ひろのり)

Osamu Ariga,^{1,**} Naoki Okamoto,¹ Takayoshi Inoue,¹ Hajime Kubo¹ and Hironori Moriyama²

¹ 高知工科大学環境理工学群

782-8502 高知県香美市土佐山田町宮の口 185

² 高知県工業技術センター

785-5101 高知県高知市布師田 3992-3

¹ School of Environmental Science and Engineering, Kochi University of Technology
185 Miyanokuchi, Kami, Kochi 782-8502, Japan

² Kochi Prefectural Industrial Technology Center
3992-3 Nunoshida, Kochi 782-5101, Japan

要旨: 紅藻類が生産する多糖類の中でアガロースとアガロペクチンを主成分とする寒天はゲル化剤などとして食品に利用されるだけでなく、DNA や生体関連物質の分離に使われる分子生物学には欠くことのできない材料である。アガロースはガラクトースとアンヒドロガラクトースがβ-1,4 およびα-1,3 結合で交互に結合してできる多糖類である。したがって、アガロースを分解できる寒天分解細菌はβ-アガララーゼとα-アガララーゼを生産しアガロースを唯一の炭素源として増殖できるが、その多くは海洋環境から単離されてきた。さらに、寒天分解酵素の精製や遺伝子のクローニングが行われ、遺伝子の解析も進んできた。筆者らは非海洋性の寒天分解菌を単離し、2つのβ-アガララーゼ遺伝子のクローニングに成功し、ネオアガロオリゴ糖の生産が可能となった。菌体破壊液からのα-アガララーゼの精製を行い、諸特性を調べている。寒天オリゴ糖の研究は少ないが、抗酸化作用、ビフィズス菌の増殖促進効果なども報告されてきた。この総説では寒天分解酵素や寒天オリゴ糖の最近の研究の紹介を行う。

キーワード: アガララーゼ, 寒天オリゴ糖, 抗酸化作用, prebiotic 効果***

1. はじめに

海藻は光合成により、多糖類を作り、多糖類は海洋生物の炭素源となる重要な物質である。農林水産省の平成17年のデータによれば、海藻全体の年間生産量は湿潤ベースで約61万トンであり、そのうち養殖が約51万トン、天然が約10万トンである。しかし、年間生産量は平成2年からの統計で徐々に減少傾向にある。平成19年、東京水産振興会の研究委員会はバイオエタノールを海藻から大量に生産する構想を発表し、日本の領海の1~2%を用いることにより、年間1.5億トンの海藻を養殖でき、400から500万kLのバイオエタノールを生産できるという試算を行った。これは現在の国内のガソリン使用量の約1割に相当する。平成22年にはコンブやホンダワラを酵素で液状化し、酵母と細菌を用いて、約2週間で海藻1kgから200mLのバイオエタノールを生産することに東北電力と東北大学の共同研究チームが成功した。このように海藻からの

バイオエタノール生産に関する研究は実用化に向けて進んでいる。

一方、海藻の多糖類を分解して得られるオリゴ糖の研究も寒天、ポルフィラン、アルギン酸、カラギーナンなどで進められており、さまざまな生理活性が明らかになってきた。筆者らも寒天分解菌を単離し、寒天オリゴ糖生産のため、寒天分解酵素遺伝子の遺伝子組み換えを研究している。ここでは、寒天オリゴ糖に関する研究について紹介する。

2. 寒天分解菌と寒天オリゴ糖

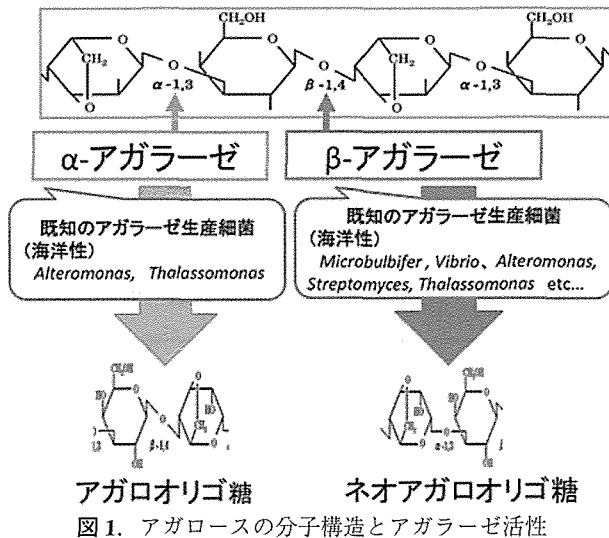
紅藻類が生産する多糖類の中でアガロースとアガロペクチンを主成分とする寒天はゲル化剤などとして、食品に利用されているだけでなく、DNA や生体関連物質の分離に使われ、分子生物学には欠くことのできない材料である。

アガロースはガラクトースとアンヒドロガラクトースが

* 本原稿は、日本応用糖質科学会平成23年度大会糖質関連酵素化学シンポジウムで一部発表された。

** 連絡先 (Tel. 0887-57-2508, Fax. 0887-57-2520. E-mail: ariga.osamu@kochi-tech.ac.jp)

*** Key words: agarase, agarooligosaccharide, antioxidant, prebiotic effect



β -1,4 および α -1,3 結合で交互に結合した多糖類である (図1)。したがって、寒天から得られるオリゴ糖では還元末端および非還元末端がガラクトースの場合とアンヒドロガラクトースの場合がある。還元末端がガラクトースの場合、得られた寒天オリゴ糖はネオアガロオリゴ糖と呼ばれ、アンヒドロガラクトースの場合、アガロオリゴ糖と呼ばれる。

最も簡単に寒天オリゴ糖を得る方法の1つは酸加水分解であり、この場合、グリコシド結合がランダムに切断され、種々のオリゴ糖が得られる。酸加水分解を温和な条件で行うことにより、主成分として還元末端がアンヒドロガラクトースであるアガロオリゴ糖が得られることはすでに知られているが、この場合でも、オリゴ糖は鎖長の異なる分子の混合物である。

寒天を唯一の炭素源として生育できる微生物は寒天を分解する酵素を生産し、その多くが海洋環境から単離されてきた。そのほとんどは細菌であり、*Pseudomonas*¹⁾, *Vibrio*²⁾, *Streptomyces*³⁾, *Pseudoalteromonas*⁴⁾, *Agarivorans*⁵⁾, *Microbulbifer*⁶⁾ 細菌などが知られている。ウニや軟体動物など海藻を食べる生物は寒天分解細菌を共生系としてもっていることがある⁴⁾。寒天分解細菌はアガロースの β -1,4 および α -1,3 結合を切断する β -アガラーゼおよび α -アガラーゼを生産するため、この酵素を使うことによって寒天オリゴ糖を効率的に生産することが可能となる。

これまでに単離精製されたり、クローニングされた寒天分解酵素のほとんどは β -アガラーゼであり、 α -アガラーゼに関する研究は *Alteromonas*⁷⁾, *Thalassomonas*⁸⁾, *Bacillus*⁹⁾ 属細菌のみに限られ、ほとんど研究されていない。これまでに知られる β -アガラーゼの多くはエンド型酵素であり、アガロースの主な加水分解産物として、ネオアガロビオースとネオアガロテトラオース混合物 (ただし、少量のネオアガロヘキサオースを含む) を生産するタイプか、ネオアガロテトラオースとネオヘキサオース混合物 (ただし、少量のネオネオアガロビオースを含む) を生産するタイプである。ネオアガロビオースのみを生産するエキソ型の β -

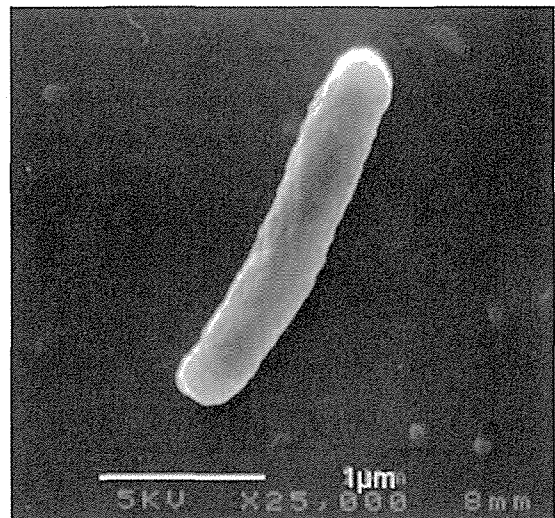


図2. *Cellvibrio* sp.の電子顕微鏡写真 (株NCIMB JAPAN 依頼)。

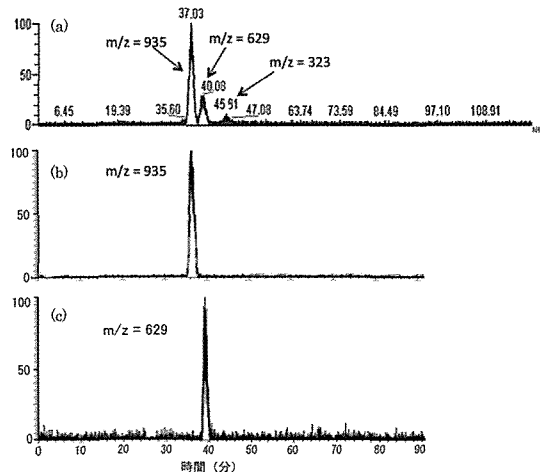


図3. アガロース分解産物およびネオアガロオリゴ糖のLC-MSクロマトグラム

(a) AgaA によるアガロース分解産物, (b) ネオアガロヘキサオース標準物質, (c) ネオアガロテトラオース標準物質。

アガラーゼについてもわずかに報告されている。また、ネオアガロオクタオースやネオアガロデカオースを生産する酵素についても1報¹⁰⁾報告されているが、エンド型の酵素の場合、分解の初期にはこれらの鎖長の長いネオアガロオリゴ糖も生産される。

これら海洋性細菌由来の寒天分解酵素については多数報告されているが、非海洋性の寒天分解細菌に関する研究報告¹¹⁾はきわめて少ない。筆者らは活性汚泥から寒天分解菌を単離し、遺伝子解析、形態学的解析などから *Cellvibrio* sp. (図2) と同定した。この微生物から寒天分解遺伝子 *agaA* および *agaB* を大腸菌にクローニングすることに成功した。また、アガロースの分解産物を質量分析 (図3) および核磁気共鳴分析を行い、これらの寒天分解酵素が β -アガラーゼ遺伝子であることを確認した。薄層クロマトグラフおよび高速液体クロマトグラフ (図4) を用いて分析したところ、AgaA はアガロースをネオアガロビオースとネオアガロテトラオース (ただし、少量のネオアガロヘキサオースを含む) に分解し、AgaB はアガロースをネオア

ガロテトラオースとネオアガロヘキサオース (ただし、少量のネオアガロビオースを含む) に分解することが分かった。これは市販の *Pseudomonas atlantica* 由来のアガラーゼと同じであった。また、寒天分解菌の菌体破壊液からの α -アガラーゼの精製を行い、種々の特性を調べた。本菌の

α -アガラーゼはネオアガロビオースをガラクトースとアンヒドロガラクトースに分解するとともに、ネオアガロテトラオースとネオアガロヘキサオースを非還元末端側からアンヒドロガラクトースを切断し、それぞれ3糖、5糖にすることが分かった。現在、 α -アガラーゼ遺伝子のクローニングを検討中である。

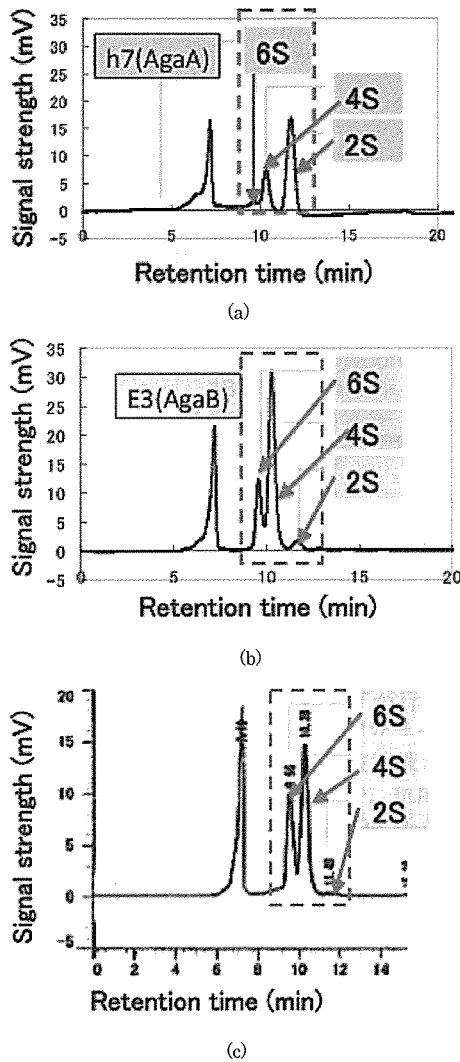
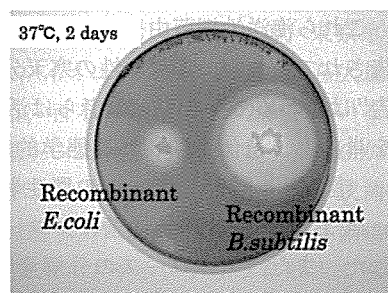
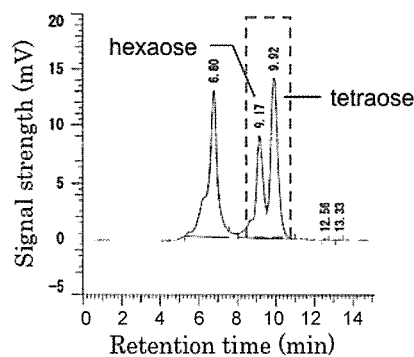


図4. アガロース分解産物のHPLCクロマトグラム

(a) AgaAによるアガロース分解産物, (b) AgaBによるアガロース分解産物, (c) *Pseudomonas atlantica* の β -アガラーゼによるアガロース分解産物。



(a)



(b)

図5. 遺伝子組換え枯草菌のプレート写真と寒天分解産物のHPLCクロマトグラム

(a) 遺伝子組換え枯草菌のプレート写真 (ヨウ素染色後), (b) 培養上清液によるアガロース分解産物のHPLCクロマトグラム。

3. 寒天分解酵素遺伝子の解析

これまでに知られる β -アガラーゼの中で、アミノ酸配列や塩基配列が明らかとなっているタンパク質はそれほど多くないので、今後変わるかもしれないが、CAZY databaseによれば、 β -アガラーゼはGlycoside Hydrolase family (GH family) の中でGH16, GH50, GH86のどれかに分類される。筆者らの寒天分解酵素ではagaBにはGH16に特徴的に表れるアミノ酸配列5'-ADWDSVPAPI-3'が見られ、agaAはGH86に分類されることが分かった。これに対して、 α -アガラーゼについては研究報告が少なく、*Alteromonas agarilytica*の生産する α -アガラーゼがGH96に分類されるという報文が1報¹³⁾あるのみである。

セルロースやキシランのような多糖類を分解する場合、多糖分解細菌は菌体外酵素を分泌した後、オリゴ糖を取り込み、細胞内でさらに分解すると思われ、菌体外酵素遺伝子にはシグナル配列が見られる。塩基配列の明らかになった β -アガラーゼの幾つかもシグナル配列をもっていることが報告されている。筆者らのAgaBもSignalP server等で調べたところ、シグナル配列をもっていることが明らかとなり、agaB遺伝子を*Bacillus*, *Brevibacillus*に遺伝子組み換えしたところ、大腸菌では組み換え酵素が培地にほとんど分泌されなかったのに対して、酵素タンパク質の90%以上が菌体外に分泌されることが分かった (図5)。これに対して、AgaAにはシグナル配列は見られなかった。

多糖分解酵素にある特徴的なアミノ酸配列として、Carbohydrate Binding Module (CBM) がよく知られるが、 β -アガラーゼにおいてはCBM6をもつ酵素が報告されており、CBM6を1つもつ場合と2つタンデムでもつ場合がある。

現在は Web 上の Interproscan のホームページへアミノ酸配列データを送信するだけで、CBM 等の解析結果が得られる。筆者らが寒天分解菌から得た *agaB* を含む DNA 断片には Open Reading Frame (ORF) が 2 つあり、ORF1 を *agaB* としたが、CBM6 が 2 つタンデムに並んでいた。これに対して、ORF2 にもシグナル配列があり、CBM6 は 1 つだけであった。一方、*agaA* には CBM は見られなかった。

CBM に関して興味深い研究が Dong ら¹³⁾により、*Vibrio* sp. PO-303 の *agaD* 遺伝子で報告されている。彼らは CBM をもつ全長の遺伝子と CBM 部分を切断した遺伝子を調製し、大腸菌にクローニングした。得られた酵素タンパク質の比活性を調べたところ、CBM 部分を切断した場合、比活性が高まることを見出した。通常、CBM が多糖への結合に関わると考えられてきたが、まだ実験検討の必要があると思われる。また、Michel ら¹⁴⁾はこれまでに CBM6 をもつと知られるアガラゼに関して、CBM と触媒モジュールそれぞれについてアミノ酸配列から系統樹を作成し、CBM と触媒モジュールの進化が平行して起こっていると報告した。このように、アガラゼの CBM についてはまだ解明されていないことがあり、より多くのアガラゼ遺伝子の解析を待たなければならない。

4. 寒天オリゴ糖の生理活性

アガロースを分解して得られる寒天オリゴ糖に生理活性があることは最近になって知られてきた。以前はネオアガロビオースも試薬として購入可能であったが、現在試薬としても入手できず、寒天オリゴ糖の生理活性の研究では自ら寒天分解物から精製する以外に方法はない。したがって、寒天オリゴ糖の生理活性の研究報告は非常に少なく、追実験を行った研究もほとんどない。

抗酸化作用、ラジカル消去活性等の研究報告は非常に興味深い。Ajisawa ら¹⁵⁾はコンドロイチン硫酸、フコイダン、アガロオリゴ糖、グルクロン酸、キトビオース、ガラクトサミン、グルコサミン等の 12 種類の炭水化物の抗酸化作用・活性を調べ、抗酸化物質として機能するため、単独で十分ではないが、アミノ基、カルボキシル基、カルボニル基、サルフォニル基の少なくとも 1 つが必要であると結論づけているが、置換基をもたないアガロオリゴ糖も抗酸化作用をもつことを述べている。アガロースと基本骨格は同じで側鎖に硫酸基、ピルビン酸基、メトキシ基などが結合した多糖類として、ポルフィランが知られているが、これを分解して得られるオリゴ糖に切断の仕方により、抗酸化作用やラジカル消去活性が異なることが報告されている¹⁶⁾。すなわち、 β -アガラゼで切断するより、 α -アガラゼで切断した方が抗酸化作用やラジカル消去活性が大きいことが実験により明らかになった。また、Chen ら¹⁷⁾は重合度の異なるアガロオリゴ糖を調製し、rat を用いた *in vivo* およびヒト肝細胞 L-02 を用いた *in vitro* 実験により、重合度の違いによる抗酸化作用の違いを明らかにした。

美白効果については 2 つの重要な報告がある。早稲田大学とノエビアとの共同研究において、ネオアガロビオースの美白効果を調べ、ネオアガロビオースのチロシナーゼ活性阻害とメラノーマ細胞によるメラニン生成の抑制効果が見出された¹⁸⁾。また、美白作用で知られるコウジ酸やアルブチンと同等であると報告されている。さらに保湿性をヒアルロン酸や糖類と比較し、優れていると述べ、この結果から、ネオアガロビオースが美白と保湿効果を併せもつ材料であると結論づけた (表 1)。また、Jang ら¹⁹⁾は B16F10 メラノーマ細胞を使ってネオアガロオリゴ糖の効果を調べ、チロシナーゼ活性がネオアガロテトラオースにより強く阻害されたことを報告した。また、メラノーマ細胞のメラニン生成の抑制効果がネオアガロテトラオースにおいてネオアガロビオースより強く、反対にネオアガロヘキサオースで効果が低下すると述べた。これらの美白効果はアルブチンやコウジ酸に匹敵するほどであると報告した。しかし、このような報告例は非常に少なく、さらなる研究が必要である。

Hu ら²⁰⁾はビフィズス菌の増殖促進すなわち prebiotic 効果に対する寒天オリゴ糖の効果についても報告した。彼らによれば、アガロースの酵素分解により得られたネオアガ

表 1. ネオアガロビオースの美白効果と保湿性¹⁸⁾

(a) 美白効果と細胞毒性

	濃度 (mg/L)			
	0.1	1	10	100
ネオアガロビオース	-	-	-	+
	100	98	94	83
コウジ酸	-	-	-	++
	101	100	101	102
アルブチン	-	-	++	++
	99	96	95	70
グルコサミン	-	-	-	++
	102	99	99	99
マルトース	-	-	-	-
	99	102	105	104
スクロース	-	-	-	-
	99	103	101	102
トレハロース	-	-	-	-
	96	100	98	101

上段：美白効果，下段：細胞生存率。

(b) 保湿性

	保湿性 (mgH ₂ O/100 mg 乾燥重量)
ネオアガロビオース	32
ヒアルロン酸ナトリウム	21
グリセロール	27
グルコサミン	0.22
ラクトース	0.52
マルトース	0.22
スクロース	0
トレハロース	1.1
グルコース	1.0
マンニトール	0

Neogarobiose as a novel moisturizer with whitening effect: R. Kobayashi et al. KOSE Corporation and Waseda Univ.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 162-163 (1997)¹⁸⁾より引用。

ロオリゴ糖はビフィドバクテリアやラクトバチルス属細菌の増殖を高め、エサに寒天オリゴ糖を混ぜ、マウスに与えたところ、糞便中の有用微生物群の割合が増加したことを報告した。

タカラバイオは以前から寒天オリゴ糖に抗炎症作用を見出し、学会等で発表してきた。寒天オリゴ糖がヘムオキシゲナーゼ-1生産を誘導ことによって、前炎症メディエーターの放出を抑制することをRAW264.7マウスマクロファージと単球を使った *in vitro* 実験で見出した²¹⁾。このように、寒天オリゴ糖の生理活性作用のメカニズムを詳しく調べた研究は現在でもほとんどない。

5. 最後に

ガラクトースの3位と6位のOH基から脱水され、分子内架橋しているアンヒドロガラクトースは寒天を分解すると半分得られ、身近なはずであるが、筆者らも研究を始めるまで全く知らなかった。文献探索をしてもアンヒドロガラクトースについてはこれまで生理活性に関する研究報告を見つけることができず、全く未知である。また、寒天分解菌では培地への寒天の添加により酵素生産が誘導されている可能性があるが、寒天オリゴ糖が誘導物質であるかなど、まだ研究を必要とするテーマが多く残されている。寒天オリゴ糖に関する報告は非常に少なく、未だ未知の材料ともいえ、研究も道半ばである。

文献

- 1) L.M. Morrice, M.W. McLean, W.F. Long and F.B. Williamson: β -Agarases I and II from *Pseudomonas atlantica*. Substrate specificities. *Eur. J. Biochem.*, **137**, 149-154 (1983).
- 2) Y. Sugano, T. Matsumoto, H. Kodama and M. Noma: Cloning and sequencing of *agaA*, a unique agarase 0107 gene from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT 0107. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3750-3756 (1993).
- 3) M.J. Buttner, I.M. Fearnley and M.J. Bibb: The agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3 (2): nucleotide sequence and transcriptional analysis. *Mol. Gen. Genet.*, **209**, 101-109 (1987).
- 4) Y.H. Oh, C. Jung and J. Lee: Isolation and characterization of a novel agarase-producing *Pseudoalteromonas* spp. bacterium from the guts of spiny turban shells. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 818-821 (2011).
- 5) D.G. Lee, M.K. Jang, O.H. Lee, N.Y. Kim, S.A. Ju and S.H. Lee: Over-production of a glycoside hydrolase family 50 β -agarase from *Agarivorans* sp. JA-1 in *Bacillus subtilis* and the whitening effect of its product. *Biotechnol. Lett.*, **30**, 911-918 (2008).
- 6) Y. Ohta, Y. Hatada, Y. Nogi, Z. Li, S. Ito and K. Horikoshi: Cloning, expression, and characterization of a glycoside hydrolase family 86 β -agarase from a deep-sea *Microbulbifer*-like isolate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 266-275 (2004).
- 7) I. Hassairi, B.R. Amar, M. Nonus and B.B. Gupta: Production and separation of α -agarase from *Alteromonas agarlyticus* strain GJ1B. *Bioresour. Technol.*, **79**, 47-51 (2001).
- 8) Y. Ohta, Y. Hatada, M. Miyazaki, Y. Nogi, S. Ito and K.

- Horikoshi: Purification and characterization of a novel α -agarase from a *Thalassomonas* sp. *Curr. Microbiol.*, **50**, 212-216 (2005).
- 9) H. Suzuki, Y. Sawai, T. Suzuki and K. Kawai: Purification and characterization of an extracellular α -neogaroooligosaccharide hydrolase from *Bacillus* sp. MK03. *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 456-463 (2002).
- 10) C. Ma, X. Lu, C. Shi, J. Li, Y. Gu, Y. Ma, Y. Chu, F. Han, Q. Gong and W. Yu: Molecular cloning and characterization of a novel β -agarase, AgaB, from marine *Pseudoalteromonas* sp. CY 24. *J. Biol. Chem.*, **282**, 3747-3754 (2007).
- 11) A. Hosoda, M. Sakai and S. Kanazawa: Isolation and characterization of agar-degrading *Paenibacillus* spp. associated with the rhizosphere of spinach. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 1048-1055 (2003).
- 12) D. Flament, T. Barbeyron, M. Jam, P. Potin, M. Czjzek, B. Kloareg and G. Michel: Alpha-agarases define a new family of glycoside hydrolases, distinct from beta-agarase families. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4691-4694 (2007).
- 13) J. Dong, Y. Tamaru and T. Araki: Molecular cloning, expression, and characterization of a β -agarase gene, *agaD*, from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain PO-303. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 38-46 (2007).
- 14) G. Michel, T. Barbeyron, B. Kloareg and M. Czjzek: The family 6 carbohydrate-binding modules have coevolved with their appended catalytic modules toward similar substrate specificity. *Glycobiology*, **19**, 615-623 (2009).
- 15) K. Ajisawa, S. Agawa, S. Nagumo, K. Kurato, T. Yokoyama, K. Arai and T. Miyazaki: Evaluation and comparison of the antioxidative potency of various carbohydrates using different methods. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 3102-3107 (2009).
- 16) Y. Hatada, Y. Ohta and K. Horikoshi: Hyperproduction and application of α -agarase to enzymatic enhancement of antioxidant activity of porphyrin. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 9895-9900 (2006).
- 17) H. Chen, X. Yan, P. Zhu and J. Lin: Antioxidant activity and hepatoprotective potential of agaro-oligosaccharides *in vitro* and *in vivo*. *Nutr. J.*, **5**, 31-43 (2006).
- 18) R. Kobayashi, M. Takisada, T. Suzuki, K. Kirimura and S. Usami: Neogaroobiose as a novel moisturizer with whitening effect. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 162-163 (1997).
- 19) M.K. Jang, D.G. Lee, N.Y. Kim, K.H. Yu, H.J. Jang, S.W. Lee, H.J. Jang, Y.J. Lee and S.H. Lee: Purification and characterization of neogaro-tetraose from hydrolyzed agar. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 1197-1200 (2009).
- 20) B. Hu, Q. Gong, Y. Wang, Y. Ma, J. Li and W. Yu: Prebiotic effects of neogaro-oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis of agarose. *Anaerobe*, **12**, 260-266 (2006).
- 21) T. Enoki, S. Okuda, Y. Kudo, F. Takashima, H. Sagawa and I. Kato: Oligosaccharides from agar inhibit pro-inflammatory mediator release by inducing heme oxygenase 1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 766-770 (2010).

質疑応答

[質問] 北大先端生命 山田

検出できた α -アガラーゼ活性はエンド型ではなく、エキソ型の酵素活性ではないでしょうか？

[回答]

ネオアガロテトラオースやネオアガロヘキサオースの非還元末端側のアンヒドロガラクトースを切断するので、エキソ型かも知れません。