HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	エゾアワビ・デンプン分解酵素の生化学的研究 ： α-アミラーゼとα-グルコシダーゼによる海藻からのグルコース生成［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	佐藤, 琢哉
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第11330号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55420
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Takuya_Satoh_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）　　氏名：佐藤　琢哉

学 位 論 文 題 目

エゾアワビ・デンプン分解酵素の生化学的研究

― α-アミラーゼとα-グルコシダーゼによる海藻からのグルコース生成 ―

我が国の重要な水産種であるアワビの漁獲量は、1970 年の 6,500 t をピークに減少傾向に転じ、近年では 2,000 t 程度で推移している。1980 年代以降は、種苗生産、中間育成、稚貝放流などによりアワビ資源量の回復が図られてきたが、未だ漁獲量の増大につながっていない。アワビの増養殖事業は今後も継続されると考えられるが、アワビの種苗生産コストは他の水産生物種と比較して高いため、そのコスト低減も期待されている。アワビの中間育成餌料は、稚貝の嗜好性および成長効率に基づき経験的に作出されてきたが、それは必ずしもアワビの海藻分解能や消化酵素の種類に対応した成分組成とはなっていない。従って、アワビの消化酵素の種類や性質を詳しく調べ、それらに対応させた餌料をアワビに与えることにより、中間育成がより効率的になる可能性がある。

近年、エゾアワビの消化液からセルラーゼ、アルギン酸リアーゼ、マンナナーゼ、β-1,3-グルカナーゼ等の海藻多糖分解酵素が単離され、それらの酵素特性が解析された。一方、トコブシやメガイアワビからはα-アミラーゼが単離され、さらにクロアワビでは大腸菌で発現したα-アミラーゼを用いてその性質が調べられた。また、エゾアワビの消化液にもα-アミラーゼが含まれることが知られている。これらアワビ類のα-アミラーゼは、緑藻や紅藻に含まれるデンプンの糖化に関与していると考えられるが、この点に関する詳しい研究は無い。そこで本研究では、エゾアワビにおけるデンプン分解酵素の基本的性質を調べ、これらの酵素が海藻デンプンや陸上植物のデンプンをどの程度の効率で分解するかを明らかにすると共に、エゾアワビの人工餌料設計に際してのデンプンの有用性について評価することとした。

第 1 章では、エゾアワビ消化液から分子量 58,000 および 82,000 の 2 種類のα-アミラー

ゼ、HdAmy58 および HdAmy82 を単離した。両酵素は、いずれもデンプンを分解しマルトースとマルトトリオースを生じた。一方、両酵素の水溶性デンプンに対する活性を比較した結果、HdAmy58 は HdAmy82 より約 5 倍高い活性を示し、不溶性のデンプン粒に対する活性では約 2.5 倍高いことが明らかになった。また cDNA 法により一次構造を解析した結果、HdAmy58 は他種生物のα-アミラーゼと同様、約 500 残基から成る Glycoside hydrolase family (GHF) 13 タイプの触媒ドメインのみから成るが、HdAmy82 は GHF13 触媒ドメインの C 末端側に約 190 残基から成る付属ドメインを結合していることが明らかになった。このことから、HdAmy58 および HdAmy82 の分子量の違いはこの付属ドメインの有無によるものと結論された。

第 2 章では、エゾアワビ消化液からα-グルコシダーゼ HdAgl を単離し、その酵素化学的性質を解析した。その結果、HdAgl はマルトオリゴ糖やデンプンのマルトース構造を認識し、これを分解してグルコースを生じるマルターゼ様の酵素であることが明らかとなった。α-アミラーゼの HdAmy58 および HdAmy82 はデンプンからマルトオリゴ糖を生じるので、HdAgl はそれらによって生じたマルトオリゴ糖からグルコースを生成する酵素と位置付けられる。また、cDNA 法により HdAgl の一次構造を解析した結果、本酵素は 887 残基から成り、その配列は哺乳類のデンプン消化の最終ステップを担うマルターゼ-グルコアミラーゼ (MGAM) やスクラーゼ-イソマルターゼ (SIM)、リソソーム中のグリコーゲン代謝を担うリソソーム酸性α-グルコシダーゼ (GAA) と 40–46%のアミノ酸同一率を示すことが明らかになった。また、HdAgl の N 末端には、MGAM や SIM に見られるような膜結合領域が存在しないことから、本酵素は膜結合型酵素ではなく GAA のような分泌型酵素であると考えられた。一方、HdAgl の発現部位を RT-PCR により解析した結果、HdAgl 様酵素の遺伝子が肝膵臓だけでなく貝殻筋や外套膜にも発現していることが明らかになった。この結果は、HdAgl 様酵素がリソソーム中の GAA 様酵素として発現している可能性を示唆している。この点を検証するために、肝膵臓や貝殻筋抽出物のα-グルコシダーゼ活性を調べた結果、HdAgl とは異なる NaCl 依存型のα-グルコシダーゼの存在が示された。

そこで第 3 章では、NaCl 依存型α-グルコシダーゼ HdAglhp をアワビ肝膵臓抽出物から単離し、その性質を調べた。HdAglhp は、KCl や NaCl のような中性塩の存在下および pH 6.0 以下の酸性条件下で活性化されるという点で、消化液由来の HdAgl と明らかに異なっていた。また、デンプン、グリコーゲンおよびマルトオリゴ糖 (マルトース–マルトペンタオース) に対する HdAglhp の触媒効率は、HdAgl のそれぞれ 5.14 倍、20.5 倍および 0.163–0.353

倍であった。これらの結果は、HdAglhp が HdAgl と比べてグリコーゲン分解に適した酵素であることを示している。このような HdAglhp の酵素特性は哺乳類の GAA と類似しており、本酵素もリソソーム中でグリコーゲン分解を担う酵素と考えられた。なお、cDNA 法により解析した HdAglhp の 933 残基のアミノ酸配列は HdAgl のアミノ酸配列と 46%の同一率を示した。

第 4 章では、消化液から単離したα-アミラーゼ HdAmy58、HdAmy82 およびα-グルコシダーゼ HdAgl が、海藻中のα-グルカンをどの程度の効率で分解するかを検討した。その結果、HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl は、6 種の紅藻、2 種の緑藻の粉末の各 50 mg から 0.019–0.96 mg のグルコースを遊離することが明らかになった。また、エゾアワビが好んで摂餌し成長も良いことが知られている紅藻のムカデノリ、スサビノリ、緑藻のミル、アナアオサからのグルコース収率は高く、各海藻中のα-グルカン総量の 75、68、82 および 51%に相当するグルコースが遊離することが明らかになった。また、上記 3 種の混合酵素で海藻を分解すると、グルコース遊離量は各酵素単独で分解させたときのグルコース遊離量の合計値よりも 2–4 倍程度大きくなった。この結果は、3 種の酵素が協同的にデンプンを分解した可能性を示している。一方、エゾアワビ消化液粗酵素は、陸上植物由来のデンプンを分解しグルコースを生成できることが明らかになった。特に粒子径の小さいコーンスターチおよび米粉をよく分解し、24 時間の反応により基質中のα-グルカンの約 50%をグルコースに変換した。これらの結果は、陸上植物のデンプンがエゾアワビのグルコース源として有用であることを示している。

以上のとおり、本研究ではエゾアワビにおけるデンプン分解酵素の酵素化学的特性について明らかにするとともに、海藻や陸上植物のデンプンに対する糖化能についても明らかにした。今回得られた知見は、アワビの餌料としてデンプンが有用であることを示すものであり、エゾアワビのより優れた人工餌料の開発に活用されることを期待する。