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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11330
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58022
Type	doctoral thesis
File Information	Takuya_Satoh.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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―

(Biochemical Studies on Starch-Degrading Enzymes from the Pacific Abalone *Haliotis discus hannai* ―Production of Glucose from Seaweeds by the Actions of α-Amylase and α-Glucosidase―)

北海道大学大学院水産科学院

海洋応用生命科学専攻

Graduate School of Fisheries Sciences

Division of Marine Life Science

佐藤 琢哉

Takuya Satoh

平成 26 年 (2014)

本論文中で用いた略語を以下に記した

bp	base pair
BPB	bromophenol blue
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CM	carboxymethyl
DEAE	diethylaminoethyl
DNA	deoxyribonucleic acid
GHF	glycoside hydrolase family
mRNA	messenger ribonucleic acid
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PVDF	polyvinylidene difluoride
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
TLC	thin-layer chromatography
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethan

目次

緒言 1

第 1 章　エゾアワビのα-アミラーゼの酵素化学的性質と一次構造

第 1 項　目的 18

第 2 項　実験材料および方法

2-1. 実験材料 18

2-2. アワビ消化液粗酵素の調製法 19

2-3. α-アミラーゼ活性の測定法 19

2-4. タンパク質濃度の測定法 20

2-5. SDS-PAGE 20

2-6. TLC 20

2-7. アミノ酸配列の解析法 21

2-8. cDNA クローニング 21

第 3 項　結果

3-1. エゾアワビ消化液からのα-アミラーゼ HdAmy58 および HdAmy82 の精製 22

3-2. HdAmy58 および HdAmy82 の酵素化学的性質 23

3-3. HdAmy58 および HdAmy82 の基質分解産物 24

3-4. HdAmy58 および HdAmy82 の一次構造 25

第 4 項　考察

4-1. HdAmy58 および HdAmy82 の酵素特性 27

4-2. HdAmy58 および HdAmy82 の一次構造上の特徴 28

第 2 章　エゾアワビのα-グルコシダーゼの酵素化学的性質と一次構造
第 1 項　目的 48
第 2 項　実験材料および方法
2-1. α-グルコシダーゼ活性の測定法 48
2-2. アミノ酸配列の解析法 49
2-3. cDNA クローニング 49
2-4. RT-PCR 50
第 3 項　結果
3-1. エゾアワビ消化液からのα-グルコシダーゼ HdAgl の精製 50
3-2. HdAgl の酵素化学的性質 51
3-3. HdAgl の一次構造 52
3-4. HdAgl の発現部位の解析 54
第 4 項　考察
4-1. HdAgl の酵素特性 55
4-2. HdAgl の一次構造の特徴 56
4-3. エゾアワビ各組織における HdAgl 様酵素の発現 57

第 3 章　エゾアワビ肝膵臓からのα-グルコシダーゼの精製と酵素化学的性質
第 1 項　目的 74
第 2 項　実験材料および方法
2-1. アワビ肝膵臓粗酵素の調製法 74
2-2. α-グルコシダーゼ活性の測定法 75
2-3. アミノ酸配列の解析法 76

2-4. cDNA クローニング 76

第 3 項　結果

3-1. エゾアワビ肝膵臓からのα-グルコシダーゼ HdAglhp の精製 76

3-2. HdAglhp の酵素化学的性質 77

3-3. HdAglhp の基質分解産物 78

3-4. HdAglhp の基質特異性と反応速度パラメータ 79

3-5. HdAglhp の一次構造 80

第 4 項　考察

4-1. HdAglhp の酵素特性 82

4-2. HdAglhp の一次構造上の特徴 84

第 4 章　エゾアワビの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

第 1 項　目的 105

第 2 項　実験材料および方法

2-1. 試料 105

2-2. 海藻中の総グルカンの定量法 106

2-3. 海藻中のα-グルカンの定量法 106

2-4. HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl による海藻の分解法 106

2-5. エゾアワビ消化液粗酵素による高等植物デンプンの分解法 107

第 3 項　結果

3-1. 海藻中の総グルカンおよびα-グルカンの含量 108

3-2. HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl による海藻からのグルコース生成 108

3-3. エゾアワビ消化液粗酵素の高等植物デンプンの分解活性 110

第 4 項　考察

4-1. 海藻中のα-グルカン含量 112

4-2. HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl の海藻からのグルコース生成能 113

4-3. エゾアワビ消化液粗酵素の高等植物デンプンの糖化能 114

総括 120

参考文献 126

謝辞 137

緒言

我が国では、古くから魚介類や海藻類などの水産物を重要な食量資源として利用してきた。20 世紀末には、水産物に DHA や EPA のような機能性成分が豊富に含まれることが明らかになり、世界的にも健康性食品として水産物の需要が高まっている。FAO (FAOSTAT: Food balance sheet, http://faostat.fao.org) によれば、2009 年の水産物供給量は世界全体で 1 億 2285 万 t におよび、この 25 年間で 2 倍以上に増加している。この増大する水産物の需要に応えるには、水産資源の適切な管理と安定供給が必要である。しかし、クロマグロやニホンウナギ、アワビ類やウニ類のように、我が国においては乱獲や海洋環境の変化によって資源量が大幅に減少した水産生物種もある。そのような生物種は漁獲可能量 (TAC 制度) の設定や増養殖などによる資源量回復が図られている。特に、増養殖事業は水産資源量の維持と安定供給に有効であることが知られ、我が国ではそれに関連する基礎研究および技術開発が盛んに行われてきた。その結果、現在では増養殖可能な水産種は約 80 種類に上っている。これらの増養殖種の多くは市場価値が高く、アワビやウニのように資源量が減少し取引単価が高い水準にある水産種については、増養殖事業への依存度も著しく増えている。特に、アワビは日本、中国、韓国をはじめとする東アジアだけでなく、欧州や米国、豪州などでも需要が大きいため、豪州や南アフリカでは養殖業も盛んである。以下に、我が国のアワビ資源の現状について述べる。

日本のアワビ資源

アワビは世界で約 80 種類、日本には 10 種類が生息し、食用とされるものはそれらのうち 6 種類、すなわち大型種のクロアワビ *Haliotis discus discus* および

その北方亜種のエゾアワビ *Haliotis discus hannai*、マダカアワビ *Haliotis madaka* およびメガイアワビ *Haliotis gigantea*、小型種のトコブシ *Haliotis diversicolor aquatilis*、フクトコブシ *Haliotis diversicolor diversicolor* である。それらのうち大型アワビ類の漁獲量は 1970 年に 6,500 t に達した後に減少を続け、近年では 2,000 t 前後で推移している (Fig. 1)。この漁獲量減少の原因として、海水温の上昇およびそれに伴う大型海藻の枯死による餌料不足、違法漁業・密漁を含めた乱獲などが考えられる。

アワビの資源量回復のために、その生殖や生態に関する研究が活発に行われ、その成果として種苗生産のための各種技術が開発されている。例えば、親貝への紫外線照射や飼育温度の変化による採卵法が開発され、人工種苗の生産が可能となった。さらに、種苗の中間育成のために栄養効率の高い飼料の開発や陸上でのタンク養殖技術の開発なども進められている (荻野・太田, 1963; 真岡・中村, 1977; 浮ら, 1985a-b; 境, 2000)。

アワビ類の人工種苗の放流試験は 1970 年代後半に始まり、事業化された後は種苗放流量も増え、1986 年以降では 2,000 万個/年を超え、近年では 3,000 万個/年にも及んでいる (Fig. 1)。しかしながら、これらの放流事業にもかかわらず、アワビの資源量は期待したようには回復していない。その主な原因は、種苗放流事業が一代再捕型として経済的に成り立つため、自然再生産に必要な親貝の捕獲制限をしていないこと、その結果として天然稚貝発生量が少ないことなどがあげられる (河村ら, 2008)。従って、アワビ類の資源量増加のためには、放流した親貝による自然再生産量の増加を促すことも必要と考えられる。このような種苗放流事業を今後も継続するには、種苗の継続的な生産が必要であるが、コストの問題もあってその生産量は横ばいとなっている。そのため、今後は種苗生産コストの低減が期待されており、それには中間育成効率の一層の改善と

共に、安価かつ成長効率のよい人工餌料の開発も期待される。

アワビの食性

アワビの生活史は、猪野 (1952) や 関･菅野 (1977) によって研究されている。それによれば、アワビは水温 20℃の条件下において受精卵から約 12.6 時間で担輪子幼生 (Trochophore) として孵化し、その後幼殻の分泌が始まり、被面子幼生 (Veliger) となる (Fig. 2)。その後幼殻が完成し、受精後約 85.5 時間で着底･変態し、稚貝 (Post-larvae) となる。それに引き続き周口殻の分泌が開始され、殻長が 3.4~3.8 mm の時点で、呼水孔列の形成が完了する。その後 3~4 年で生殖巣が成熟して成貝となる。

一方、アワビの食性は成長に伴い 3 度変化することが報告されている。すなわち、①変態後 0.5~0.7 mm までの初期稚貝は、アワビの匍匐粘液を含めた様々な粘液物質を餌料としている (Kawamura and Takami, 1995; Takami et al., 1997)。②殻長 1 mm 前後になると一部の珪藻細胞殻を破壊できるようになり、その内容物を栄養源として利用する (Kawamura et al., 1995; Kawamura et al., 1998)。③殻長 2 mm 前後に成長して以降、褐藻類をはじめとする海藻を効率的に利用できるようになる (Takami and Kawamura, 2003)。

アワビ類は大型の褐藻を好んで摂餌するといわれているが、殻長約 25 mm のエゾアワビにおいてはコンブ類およびワカメ、アラメを餌としたとき最もよく成長することが知られている (菊池ら, 1967; Uki et al., 1986)。また、褐藻以外では、紅藻のダルス、スサビノリ、イギス、ムカデノリ、緑藻のアオサ、ミルを摂餌したときによく成長するという (菊池ら, 1967; Uki et al., 1986)。稚貝の胃の内容物に褐藻以外に紅藻が含まれている報告もあることから、アワビは大型褐藻とともに一部の紅藻を食物として利用していると考えられる (富田・田沢,

1971)。

一方、アワビの人工餌料に関する研究として、荻野・太田 (1963) によりクロアワビがアルギン酸カルシウム、デンプン加工品、セルロース粉末、フィッシュミール、ビタミン類を含む人工餌料で育成可能であるとの報告がある。また、飼育に必要なタンパク質含量は 20%以上であることも報告された (荻野・加藤, 1965)。次に、アワビはアルギン酸の代わりに小麦粉、保湿保形剤、粘結剤を添加した餌量でも育成可能なことが示された (真岡・中村, 1977)。さらに、浮ら (1985a) により、エゾアワビはカゼインをタンパク源とし、デキストリン、アルギン酸ナトリウムを炭水化物源とし、5%の脂質、4%のミネラル混合物を含む飼料をよく摂餌し、成長すると報告された。特に、炭水化物源としてアルギン酸ナトリウムは優れており、一方でセルロースは劣ることが示された。また、種々のタンパク質源を比較した結果、カゼインが有効であることが明らかにされた (浮ら, 1985b)。一方、現在市販されている人工餌料は、褐藻の粉末およびアルギン酸および魚粉を含み、投餌後に流失しにくくかつ食べやすいように板状に成形されている。この餌料は、アワビの褐藻食性および投餌した際の成長効率に基づき作出されたものであるが、アワビ自身の実際の消化能力あるいは消化酵素の種類と対応させたものではない。そのため、成長効率がより優れた餌料を開発するには、アワビの餌料消化能力と消化酵素の性質を調べ、それに対応させた新しい餌料を設計する必要がある。そのような餌料が開発できれば、アワビの中間育成コストも削減できると期待される。

アワビの消化酵素

アワビ消化器官におけるタンパク質および脂質分解酵素に関して、いくつかの報告がある。クジャクアワビ *Haliotis fulgens* では、キモトリプシン様およびト

リプシン様酵素を含む 4 種類のプロテアーゼ、アミノペプチダーゼおよびリパーゼの存在が示唆されている (Hernández-Santoyo et al., 1998; García-Carreño et al., 2003)。また、アカアワビ *Haliotis rubra* においてもキモトリプシン様酵素およびリパーゼ様酵素の活性が検出されている (Edwards and Condon, 2001; Johnston et al., 2005)。

一方、アワビの多糖分解酵素に関しては、エゾアワビの消化液からエンド型アルギン酸リアーゼ、エキソ型アルギン酸リアーゼ、セルラーゼ、マンナナーゼ、β-1,3-グルカナーゼが単離され、その酵素化学的性質および一次構造が解析されている (Suzuki et al., 2003; Shimizu et al., 2003; Suzuki et al., 2006; Ootsuka et al., 2006; Kumagai and Ojima, 2009)。他のアワビ類では、トコブシ *H. diversicolor aquatilis* およびメガイアワビ *H. gigantea* からα-アミラーゼが単離され、クロアワビでは、α-アミラーゼの cDNA がクローニングされ、組換え酵素による酵素化学的性質の解析がなされている (Tsao et al., 2003; Hsieh et al., 2008; Nikapitiya et al., 2009)。しかしながら、エゾアワビではα-アミラーゼの性質についてよく調べられていない。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わる重要な酵素と考えられ、アワビの人工餌料の設計においても考慮すべき酵素である。この点についての詳細は後述する。

成長に伴う酵素活性の変化に関しては、いくつかの報告がある。エゾアワビにおいては、殻長 0.97 mm (着底後 17 日目) でアルギン酸リアーゼ、ラミナリナーゼおよびセルラーゼが検出されるようになり、殻長 1.59 mm (着底後 37 日目) 以上になるとこれらの酵素活性が著しく増大することが報告されている (Takami et al., 1998)。一方、遺伝子解析の結果、クロアワビではキモトリプシン様酵素が殻長 0.54 mm、アルギン酸リアーゼが殻長 1.02 mm、α-アミラーゼが殻長 1.26 mm、マンナナーゼおよびセルラーゼが殻長 1.55 mm 以上になると発現

することが明らかにされている (丹羽, 2010)。従って、アワビは成長に伴い様々な消化酵素を生産するようになることがわかる。デンプン分解酵素もその一つと考えられる。

海藻に含まれるデンプン

デンプンはアミロースおよびアミロペクチンからなる多糖であり、主に陸上植物の種子や地下茎において不溶性の顆粒として存在する。アミロースは、α-1,4 結合したグルカン主鎖に 1%以下のα-1,6 結合による分岐をもつ構造をとり、その分子量は 10^5–10^6 の範囲にあるとされる。一方、アミロペクチンは、アミロース鎖中に 5–6%のα-1,6 結合による分岐をもち、その分子量は 10^7–10^9 の範囲にあるとされる。デンプン中のアミロースとアミロペクチンの量比は、デンプンの種類によって異なる。例えば、トウモロコシのデンプン、うるち米のデンプン、ジャガイモのデンプンではアミロペクチンが 70–80%を占め、もち米のデンプンでは 100%近いことが知られている。

アミロース分子およびアミロペクチン分子は高次構造を形成することが知られている。まず、アミロースは一本鎖で螺旋構造をとり、その螺旋中には脂質分子が入っている場合がある。一方、アミロペクチンはクラスター状の分岐構造がアミロース分子の軸に沿って一定間隔に連結した構造をとる (Fig. 3A)。分岐構造の隣接したアミロース鎖は二重螺旋を形成し、この領域はクリスタルラメラ (Crystalline lamellae) と呼ばれる。一方、分岐構造が少なく二重螺旋を形成していない領域はアモルファスラメラ (Amorphous lamellae) と呼ばれる。これらのアモルファスラメラとクリスタルラメラはアミロペクチン中で 9–10 nm の周期で配置する。このクリスタルラメラ中では、二重螺旋は A-type、B-type および A-type と B-type の混合した C-type の 3 通りで配置される (Fig. 3A)。

デンプン粒の構造およびその構造とアミロペクチンの高次構造の関係については部分的に解明されている (Perez and Bertoft, 2010; Zeeman et al., 2010)。デンプン粒は、100–400 nm の大きさのアモルファス殻 (Amorphous shell) と半結晶殻 (Semi-crystalline shell) が交互に重ね合わさったGrowth rings構造を形成していることが知られている (Fig. 3B)。また、デンプン粒表面や粒中には球状の Blocklets 構造が観察されており (Gallant et al., 1997)、その大きさは植物の種類によって異なるが、直径 20–500 nm の範囲にあるとされる。この Blocklets 構造は、Growth ring 中の少なくともSemi-crystalline shellを構成すると考えられ (Blocklets model と呼ばれる)、これらの Blocklets にはアミロペクチンのラメラ構造が含まれると考えられている。さらに、デンプン粒中にはクリスタルラメラの二重螺旋から形成される Superhelix 構造が観察されるが、この構造がデンプン粒中のどこに含まれるのかは明らかになっていない (Oostergetel and van Bruggen, 1993; Waigh et al., 2000) (Fig. 3C)。

陸上植物のデンプンは、葉のクロロプラストで光合成により合成される。合成されたデンプンはクロロプラスト内で一時的に貯蔵された後、グルコースに分解されて子葉、胚乳、塊茎などの貯蔵器官に転流され、そこに存在するアミロプラスト内で再びデンプンに変換され、デンプン粒として蓄積される。このデンプン粒の直径や形、サイズ分布、分岐頻度は植物の種類によって異なっている。

一方、デンプンは緑藻や紅藻にも含まれている。緑藻のデンプンは、陸上植物のものと類似の構造をとるが、紅藻のデンプンは異なる特徴をもっている (Pueschel, 1990)。すなわち、紅藻のデンプンはアミロースを含まず、アミロペクチンのみからなる。さらに、紅藻のデンプンは陸上植物とは異なり色素体ではなく、細胞質で合成される。

デンプン分解酵素

デンプンは植物において貯蔵多糖としての役割を担っているが、動物などの従属栄養生物にとっては重要な炭素栄養源である。食物のデンプンは、デンプン分解酵素によってグルコースにまで分解された後に細胞に取り込まれ、解糖系を経て代謝される。

デンプン分解酵素は反応生成物や反応様式によって、α-アミラーゼ (EC 3.2.1.1)、β-アミラーゼ (EC 3.2.1.2)、α-グルコシダーゼ (EC 3.2.1.20) およびグルコアミラーゼ (EC 3.2.1.3) に分類される (Fig. 4)。α-アミラーゼはデンプンやグリコーゲンの糖鎖内部のα-1,4 結合をランダムに加水分解し、マルトオリゴ糖を生成するエンド型の酵素である。この酵素は、細菌、真菌、植物および動物に分布する。β-アミラーゼは、デンプンやグリコーゲンの非還元末端に作用しβ-マルトースを生じるエキソ型の酵素であり、高等植物や細菌に分布する。α-グルコシダーゼは糖鎖の非還元末端のα-1,4 結合を分解してα-グルコースを産生するエキソ型の酵素であり、細菌、真菌、植物および動物に分布する。一方、グルコアミラーゼは糖鎖の非還元末端のα-1,4 結合およびα-1,6 結合を分解してβ-グルコースを産生するエキソ型の酵素であり、細菌や真菌に存在する。これらデンプン分解酵素のうちα-アミラーゼおよびα-グルコシダーゼは基質のアノマー配置を保持したα-アノマーの生成物を生じる (Retaining mechanism) (Hamazu et al., 1965; Chiba et al., 1979)。一方、β-アミラーゼおよびグルコアミラーゼは基質のアノマー配置を反転したβ-アノマーの生成物を生じる (Inverting mechanism) (Thoma and Koshland, 1960; Ono et al., 1965)。また、これらのデンプン分解酵素のうちα-アミラーゼ、β-アミラーゼ、α-グルコシダーゼは基本的にα-1,4 結合に特異的であり、α-1,6 結合には作用しない。一方、グルコアミラーゼはい

ずれの結合も切断し、デンプンをほぼ完全にグルコースにまで分解できる。そのため、グルコアミラーゼはデンプンからのグルコース製造において工業的にも利用されている。

哺乳類では、食物中のデンプンおよびグリコーゲンはα-アミラーゼおよびα-グルコシダーゼによってグルコースにまで分解される。例えば、ヒトでは、食物デンプンは唾液および膵液のα-アミラーゼの作用によりマルトオリゴ糖および限界デキストリン (α-アミラーゼによって分解されなかった結晶性に富む領域) にまで分解され、それらは小腸上皮上に存在するα-グルコシダーゼであるマルターゼ-グルコアミラーゼ (MGAM) およびスクラーゼ-イソマルターゼ (SIM) の 2 種類の酵素によってグルコースにまで分解された後、血中に取り込まれる (Grey, 1992)。唾液由来のα-アミラーゼはヒトと一部の哺乳類にしか存在しないが、それ以外のデンプン分解酵素は、哺乳類や鳥類などの高等脊椎動物に共通して存在すると考えられている。

このようなデンプン分解に関わる酵素、すなわちα-アミラーゼおよびα-グルコシダーゼの反応機構は、立体構造と関連付けながら詳細に研究されている。豚膵臓のα-アミラーゼの場合、反応速度パラメータの解析によりその基質結合サブサイトの大きさが 5 糖程度であると推定されている (Prodanov et al., 1984)。また、X 線結晶構造解析により、ヒト唾液腺α-アミラーゼ (Ramasubbu et al., 1996)、ヒト膵臓α-アミラーゼ (Brayer et al., 1995) および豚膵臓α-アミラーゼ (Qian et al., 1993) の立体構造が明らかにされている。これらのα-アミラーゼは、細菌や植物のα-アミラーゼと同様、$(\beta/\alpha)_8$ バレル構造 (TIM バレル) をとっており、ドメイン A、ドメイン B およびドメイン C の 3 つのドメインから構成される (Fig. 5A)。ドメイン A は触媒ドメインに相当し、α-ヘリックスに囲まれた 8 つの平行 β-ストランドから構成される。このドメイン A には、3 つの触媒残基およびα-

アミラーゼの活性化に必要な塩化物イオンの結合部位が含まれている。ドメイン B はβ-バレル構造をとり、立体構造の安定化に関与すると推定される Ca^{2+}結合部位を含む。ドメイン C は、C 末端領域に相当する部位であるが、その機能は未だ不明である。なお、ヒト唾液アミラーゼでは、分子表面の芳香族のアミノ酸側鎖からなる Secondary saccharide binding sites をもっており、これらは基質の結合に重要な役割を果たすと考えられている (Fig. 5B) (Ragunath et al., 2008)。

哺乳類においては、前述したようにα-グルコシダーゼの 1 種である MGAM と SIM が、デンプンの最終分解に関わる酵素である。MGAM および SIM は、小腸上皮の冊子縁に膜結合型の酵素として存在している (Galand, 1989)。これらの酵素は触媒ドメインを二つもっており、N 末端ドメイン (NtMGAM および NtSIM) および C 末端ドメイン (CtMGAM および CtSIM) にそれぞれ分けられる (Fig. 6A)。これらの 4 つのドメインは全てα-1,4 結合に対する分解活性を有するが、イソマルトースのα-1,6 結合に対する分解活性は NtSIM のみ有し、スクロースのα-1,2 結合に対する活性は、CtSIM のみが有している (Fig. 6A)。これら 4 つのドメインは、一次構造の疎水クラスター解析によればすべて GHF31 に分類されており (Cazy, http://www.cazy.org/)、アミノ酸配列は互いに 40-60%の同一性を示す。これら 4 つのドメインのうち、立体構造はヒト由来の NtMGAM (Sim et al., 2008)、NtSIM (Sim et al., 2010) および CtMGAM (Ren et al., 2011) で解析され、 $(\beta/\alpha)_8$ バレル構造の触媒ドメインを中心に 7 つのドメインから構成されることが明らかにされている (Fig. 6B)。それらの構造に基づき、NtSIM および NtMGAM の基質特異性の違いが解析されている (Sim et al., 2010)。

なお、哺乳類のα-グルコシダーゼには、デンプンの最終消化に関わる MGAM、SIM 以外に、リソソーム中でグリコーゲンの分解に関わる酸性α-グルコシダーゼ (GAA) も存在する。GAA の至適 pH は 4–5 であり、酸性オルガネラである

リソソーム中で作用する。GAA は、MGAM や SIM と異なり膜結合領域を持たず、リソソーム中に分泌される酵素で、一つの触媒ドメインからなる (Hoefsloot et al., 1989)。

一方、水産無脊椎動物のデンプン分解機構については、アワビやマガキ、ハマグリおよびホタテガイ等の軟体動物のα-アミラーゼの研究がある (Henry et al., 1993; Moal et al., 2000; Tsao et al., 2004)。これらの研究は、軟体動物においてデンプンが炭素源として重要であることを示唆している。特に、紅藻や緑藻を摂餌するアワビは、これらの海藻中のデンプンを分解し、炭素源として得ている可能性が高いと考えられる。事実、著者の予備実験によればエゾアワビの消化液はデンプンを良く分解し、グルコースを生成した。従って、アワビ消化液にはデンプンの糖化に必要な一連の酵素、すなわちα-アミラーゼやα-グルコシダーゼが含まれると考えられた。

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生物学的特性を解明し、エゾアワビの人工餌料開発に必要な知見を得ることを目的として、消化液からα-アミラーゼおよびα-グルコシダーゼを単離し、その酵素特性と一次構造を解析することとした。また、エゾアワビの肝膵臓中でグリコーゲン分解に関わると考えられるα-グルコシダーゼの性質についても調べた。さらに、消化液中に含まれるα-アミラーゼおよびα-グルコシダーゼが、海藻や陸上植物のデンプンをどの程度分解できるかについて検討し、エゾアワビの新規人工餌料開発におけるデンプンの有用性について考察することとした。

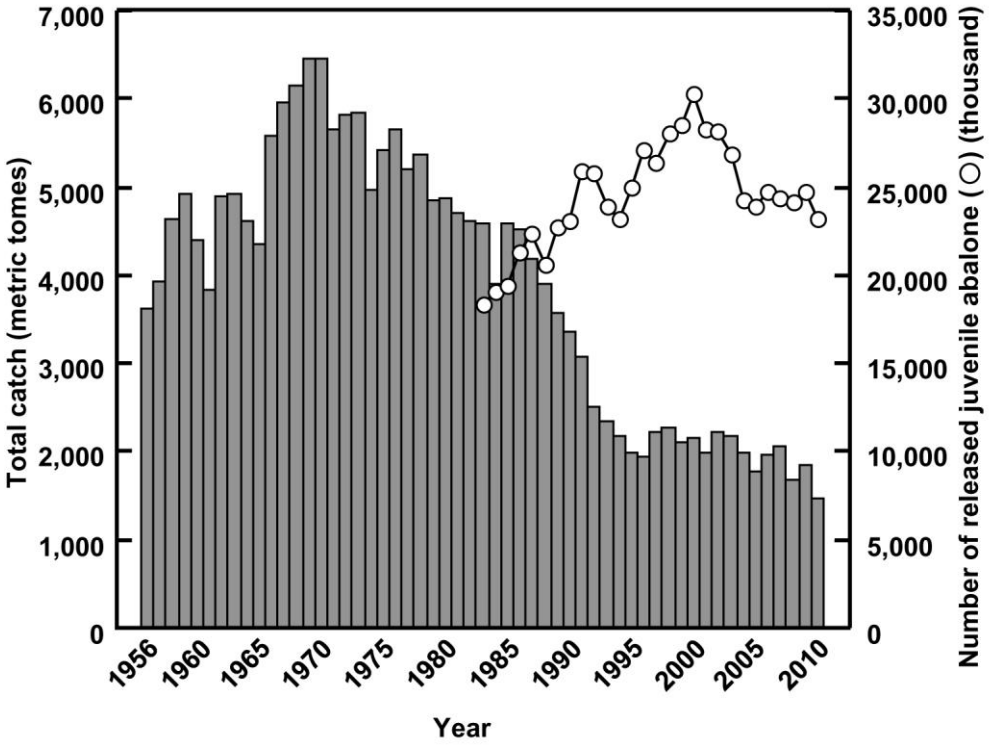


Fig. 1. Changes in numbers of total catch and release of juvenile abalone in Japan. The data of total catch and number of release of juvenile abalones were obtained from Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan (http://www.maff.go.jp/j/tokei/) and National Abundantly Productive Sea Promote Association (NAPSA) (http://www.yutakanaumi.jp/saibai/index.html), respectively.

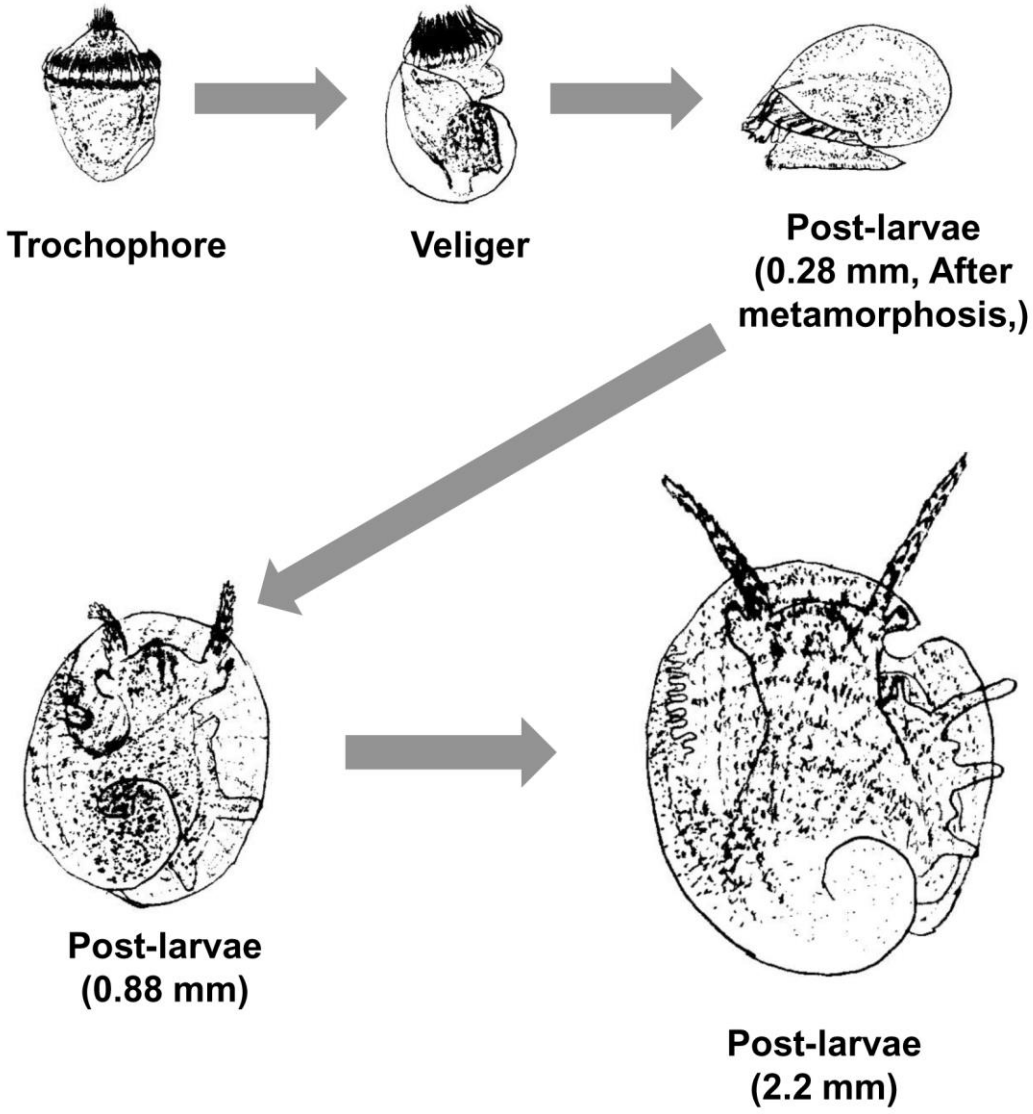


Fig. 2. Metamorphosis of the pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. These pictures are reproduced from the report of Sugawara and Seki (1995).

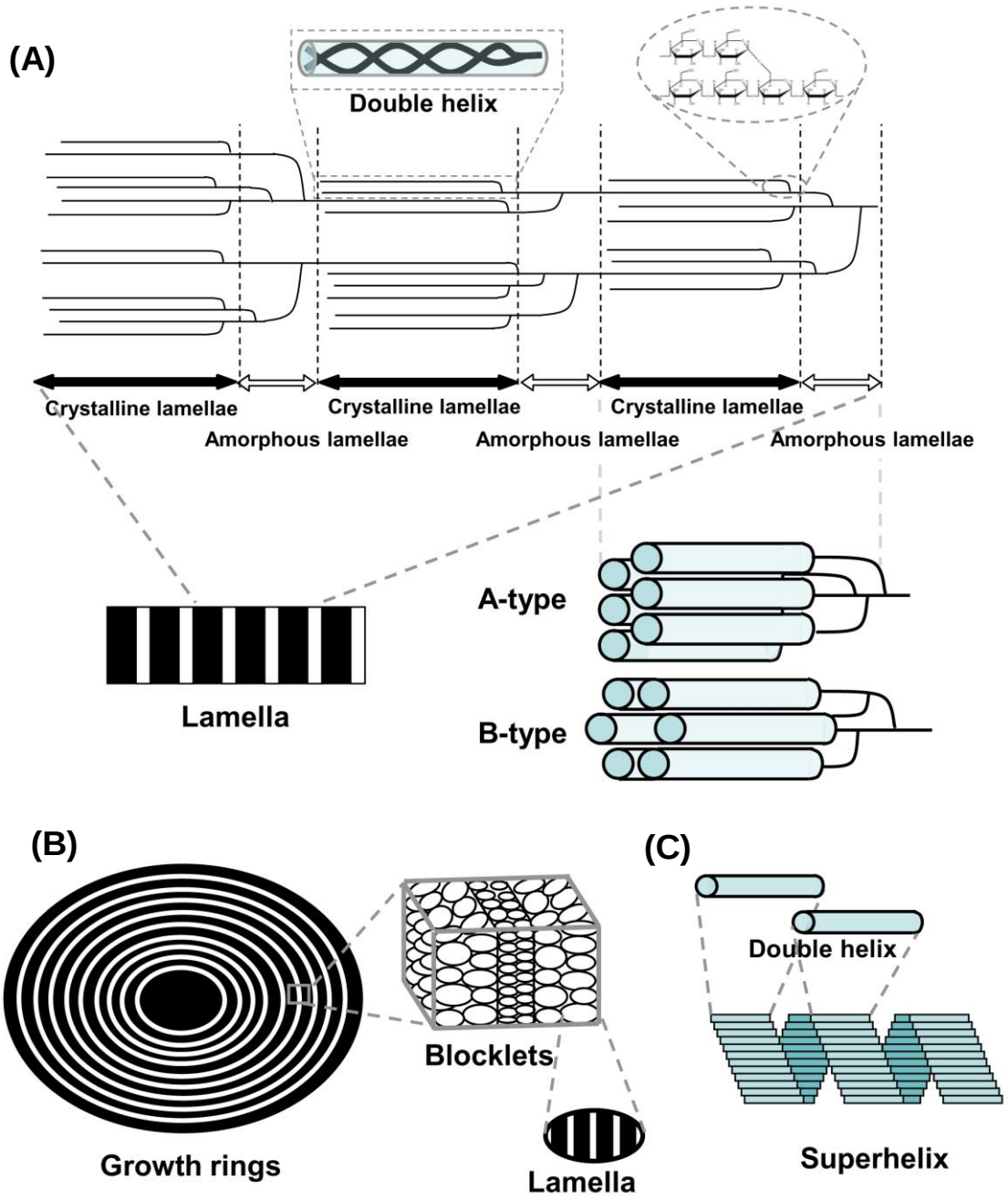


Fig. 3. Predicted models for structures of amylopectin and starch granule. (A) The structures of amylopectins. These are drawn according to the report of Zeeman et al. (2010). (B) The shematic structures for starch granlues and blocklets model. The structures for growth rings and blocklets are drawn according to the report of Gallant et al. (1997). (C) The structures of superhelix model. These are drawn according the report of Waigh et al. (2000).

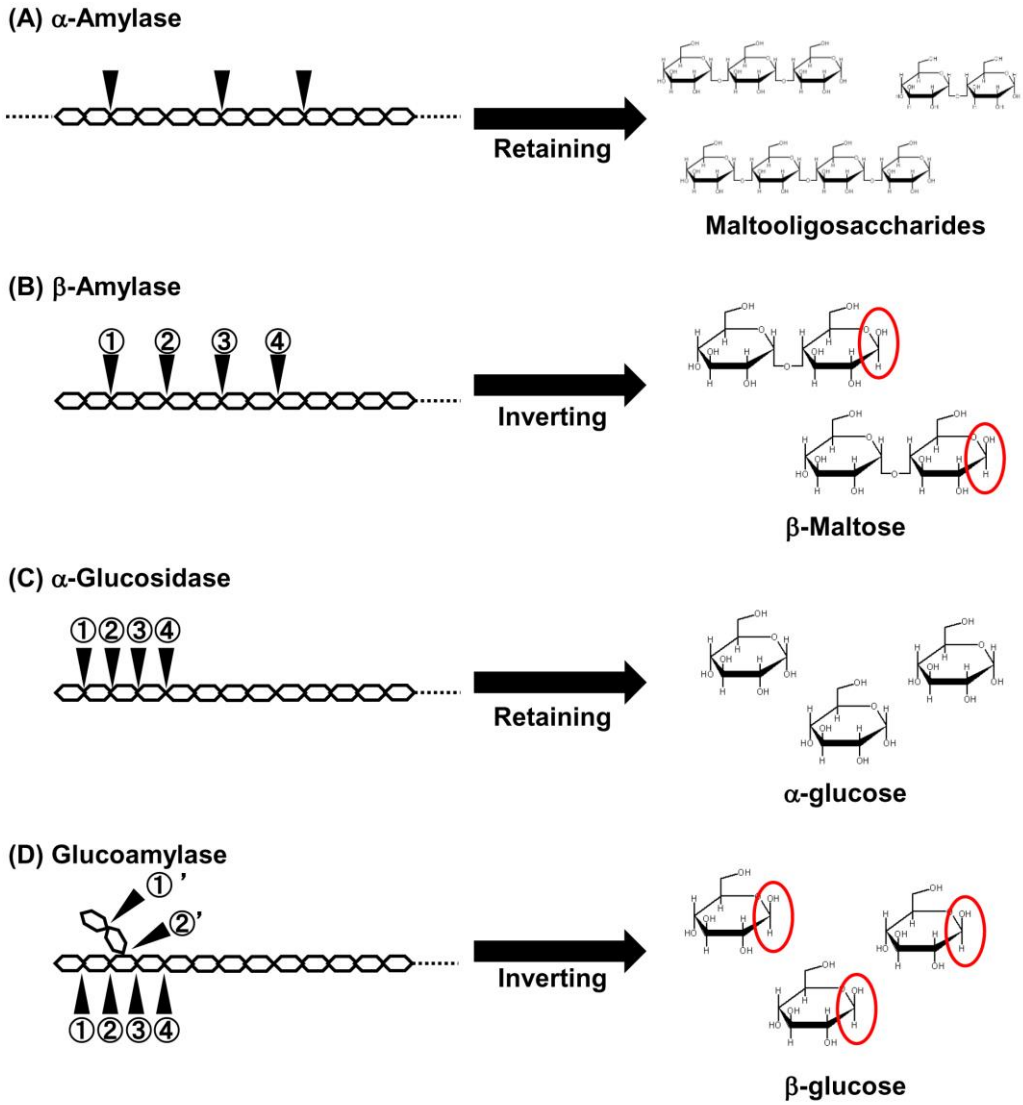


Fig. 4. Classification of starch-degrading enzymes on the basis of mode of action. Cleavage sites on starch by each enzyme are indicated by arrowheads. The orders of cleavages by exolytic enzymes are shown with the circled numbers. Since glucoamylase is able to hydrolyze both α-1,4 and α-1,6 linkage, the order of cleavages are indicated by cleaves ①② and ①'②' followed by ③④. α-Amylase and α-glucosidase act on substrate producing α-anomer products (retaining mechanism). While, β-amylase and glucoamylase act on substrate producing β-anomer product (inverting mechanism, indicated by red circles).

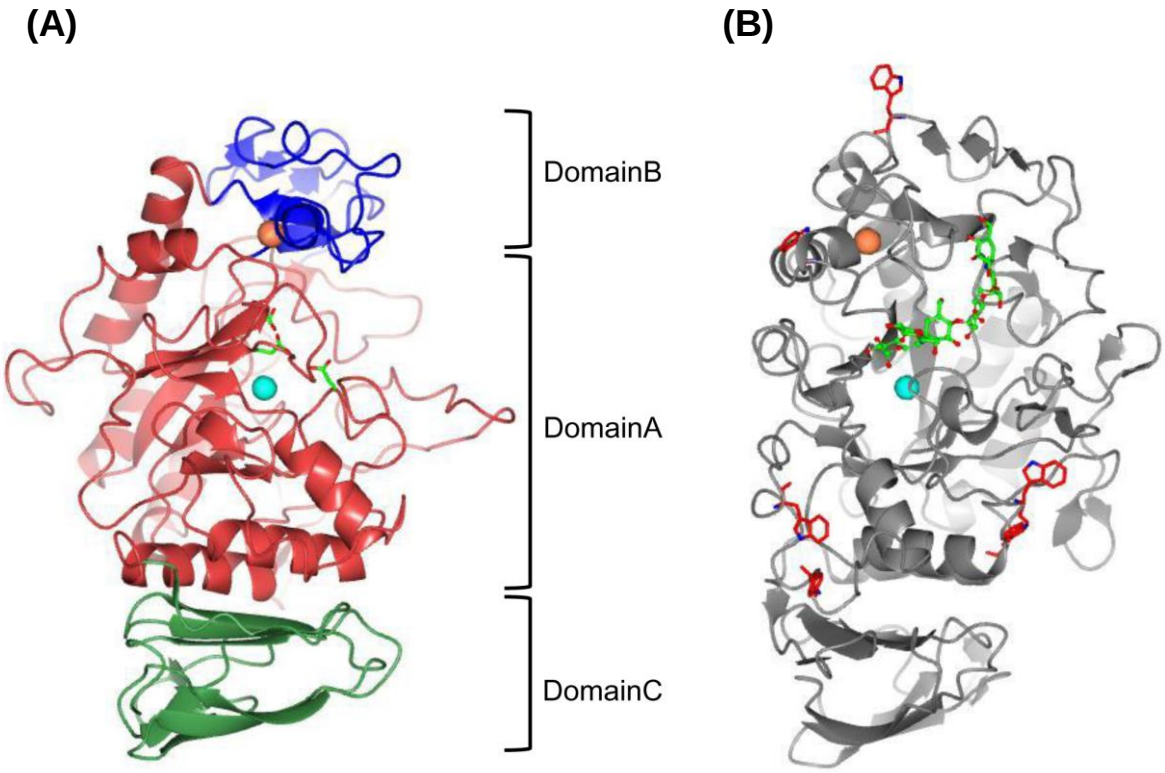


Fig. 5. Three dimensional structure of human α-amylase. (A) Domain structure of human salivary α-amylase (PDB ID: 1SMD). Individual domains are colored as red (Domain A), blue (Dmain B) and green (DomainC). Chloride ion and calcium ion are shown as light blue and orange sphere, respectively. Amino acid residues participating in the catalytic action indicated with light green sticks. (B). Secondary saccharide binding sites of human salivary α-amylase (PDB ID: 1MVF). The amino acid residues for secondary saccharide binding sites are shown with red sticks. The substrate analogue in subsites is indicated with light green. These schematic structures were drawn with CCP4MG Ver. 2.7.3 software (http://www.ccp4.ac.uk/MG/).

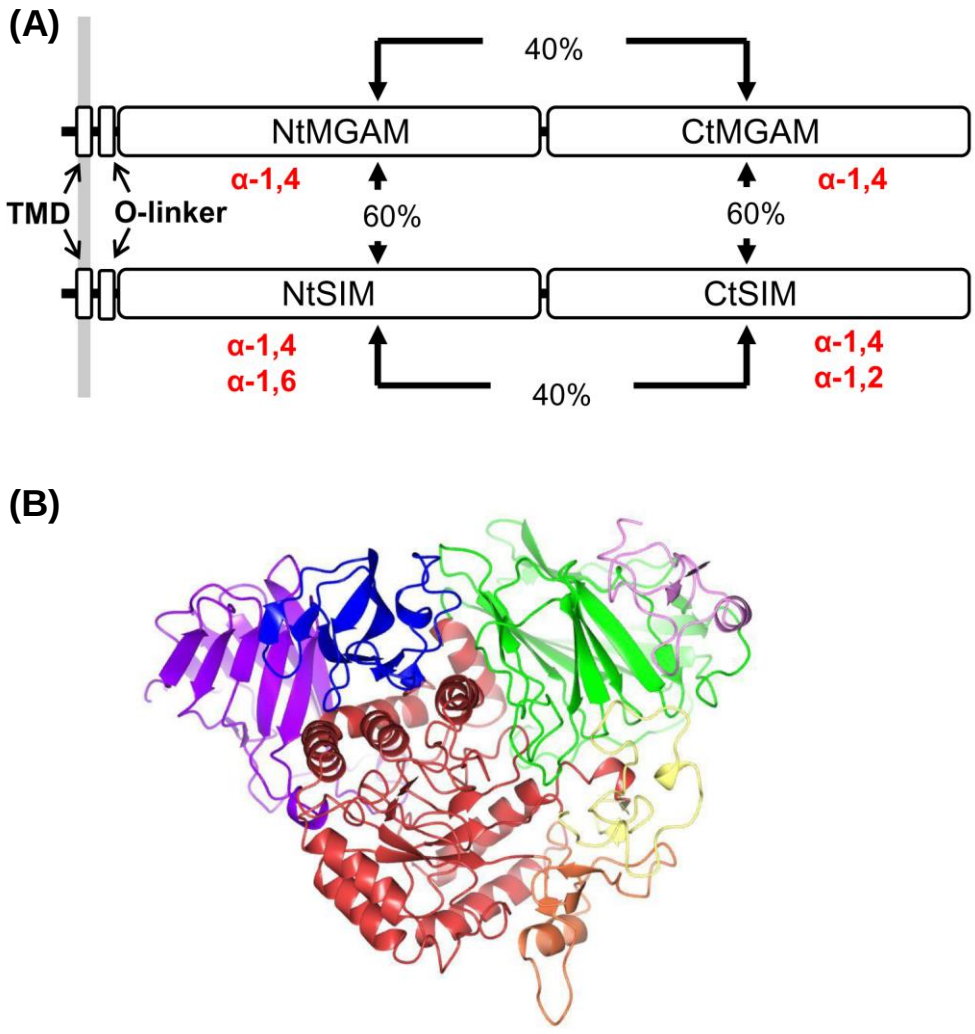


Fig. 6. Schematic models for the primary structures of human maltase-glucoamylase and sucrase-isomaltase and a three dimensional structure for the N-terminal domain of the maltase-glucoamylase. (A) Schematic models for the primary structure of maltase-glucoamylase (MGAM) and sucrase-isomaltase (SIM) (Sim et al., 2008). Two units of MGAM and SIM are linked to the N-terminal transmembrane domain (TMD) by O-glycosylated linker (O-link). The amino-acid identities between respective catalytic domains are indicated by percentage values. The specificities of each catalytic domain to glycosidic bonds are indicated with red letters. (B) Three dimensional structure of NtMGAM (PDB ID: 2QLY). Individual domains are colored as follows: trefoil Type-P domain (pink), N-terminal domain (lilght green), catalytic $(\beta/\alpha)_8$ domain (red), catalytic domain insert 1 (yellow),catalytic domain insert 2 (orange), proximal C-terminal domain (blue), distal C-terminal domain (purple).This structures was drawn with CCP4MG Ver. 2.7.3 software (http://www.ccp4.ac.uk/MG/).

第 1 章　エゾアワビα-アミラーゼの酵素化学的性質と一次構造の解析

第 1 項　目的

アワビ類のα-アミラーゼの研究報告には、メガイアワビおよびトコブシで単離されたとの報告、クロアワビでクローニングおよび大腸菌発現系による酵素化学的性質が解析されたとの報告がある (Tsao et al., 2003; Hsieh et al., 2008; Nikapitiya et al., 2009)。一方、エゾアワビのα-アミラーゼについては、詳細な酵素化学的性質は報告されていない。そこで、本章ではエゾアワビ消化液からα-アミラーゼを単離し、酵素特性および一次構造の解析をすることとした。

第 2 項　実験材料および方法

2-1. 実験材料

エゾアワビは、北海道函館市の魚市場から生きているものを購入した。水溶性デンプン、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオースおよびマルトヘキサオースは和光純薬工業 (Osaka, Japan) から購入した。TOYOPEARL Phenyl-650M、TOYOPEARL CM-650M は東ソー (Tokyo, Japan) から、ハイドロキシアパタイト (Fast Flow type) は和光純薬工業から、Mono-S 5/50 GL は GE ヘルスケアサイエンス (Little Chalfont, Buckinghamshire, England) から購入した。Oligotex-dT30 <super> mRNA Purification kit、TaKaRa premix Taq DNA polymerase、5’-Full RACE Core Set、3’-Full RACE Core Set、および制限酵素はタカラバイオ (Tokyo, Japan) より購入した。クローニングベクターDyna Express TA PCR cloning kit (pTAC-1 vector) は BioDynamics Labolatory Inc. (Tokyo, Japan) から購入した。そのほかの試薬は特に記述が無いかぎり和光純薬工業の特級試薬を用いた。

2-2. アワビ消化液粗酵素の調製法

アワビ 10 個の胃腔内から駒込ピペットで吸引することにより消化液を集め、これを 10,000×g で 10 分間遠心分離した。上清を 10 mM リン酸ナトリウム (pH 6.0) に 6 時間透析し、10,000×g で 10 分間遠心分離したものを粗酵素とした。以上の操作は全て 4℃で行った。

2-3. α-アミラーゼ活性の測定法

α-アミラーゼ活性の測定には、0.2% (w/v) の水溶性デンプンを含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) を基質溶液として使用した。基質溶液は使用前に 100℃で 10 分間加熱し、デンプンを均一化した。この基質溶液 950 µl を 30℃で 5 分間プレインキュベートした後、ここに 50 µl の酵素液を加え、反応を開始させた。反応によって生じた還元糖は Park and Johnson 法 (1949) によって定量した。アミラーゼ活性 1 unit は 1 分間に 1 µmol のグルコースに相当する還元糖を遊離させる酵素量と定義した。

酵素活性の温度依存性は 10–60℃で測定した。酵素活性の pH 依存性は、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液を用いて pH 4.5–8.0 に調整した反応液により、30℃で測定した。

デンプン粒の分解活性の測定には、10 mg のコーンスターチに 10 mM リン酸ナトリウム (pH 6.0)、100 mM NaCl を 950 µl 加えたものを基質溶液として使用した。この基質溶液を 30℃で 5 分間プレインキュベートした後、ここに 50 µl の酵素液を加え、反応を開始させた。反応中はデンプン粒の沈降を防ぐため、3 分毎に撹拌した。反応によって生じた還元糖は Park and Johnson 法の検出感度を高めた Slaughter et al. (2001) の方法によって定量した。

基質特異性の測定にはマルトオリゴ糖、デンプン、グリコーゲン、プルラン、CMC (カルボキシメチルセルロース)、ラミナランおよびアガロースを使用した。マルトオリゴ糖、プルラン、CMC の濃度は 5 mg/ml、デンプン、グリコーゲンの濃度は 2 mg/ml、ラミナラン、アガロースの濃度は 1 mg/ml とした。これら基質の分解産物は TLC により分析した。また、マルトオリゴ糖以外の基質を使用した場合、反応によって生じた還元糖は Park and Johnson 法 (1949) によって定量した。

2-4. タンパク質濃度の測定法

タンパク質濃度は、牛血清アルブミン・フラクション V を標準タンパク質として Lowry 法 (1951) により測定した。

2-5. SDS-PAGE

SDS-PAGE は Porzio and Pearson の方法 (1977) に従い、10 cm × 10 cm × 0.1 cm のポリアクリルアミド平板ゲルを用いて行なった。電気泳動用のタンパク質試料は等量の 5 M 尿素、0.5% SDS、25 mM Tris-HCl (pH 8.9) 、0.01% BPB、および 5% 2-メルカプトエタノールと混合した後、電気泳動に供した。電気泳動後のゲルは 0.1% CBB、10% 酢酸、50% メタノールで染色し、7% 酢酸、5% メタノールで脱色した。

2-6. TLC

TLC は TLC-60 plate (10 cm × 20 cm, MERCK KGaA, Darmstadt, Germany) を用いて行なった。試料は 1 μl ずつスポットし、乾燥後 n-ブタノール：酢酸：蒸留水 (2:1:1, v/v/v) により展開した。プレート上の糖質は、10% (v/v) 硫酸-エタ

ノール溶液を噴霧し、120℃で 10 分間加熱することにより検出した。

2-7. アミノ酸配列の解析法

タンパク質の N 末端配列は、SDS-PAGE 後 PVDF 膜にエレクトロブロットした試料を用いて、ABI Procise 492 sequencer (Applied Biosystems, California, USA) により分析した。

2-8. cDNA クローニング

エゾアワビの全 RNA は肝膵臓 1 g からグアニジンチオシアン酸フェノール法 (Chomczynski and Sacchi, 1987) により調製した。mRNA は Oligotex-dT30<super> を用いて全 RNA より選択回収した。cDNA は 3'-Full RACE Core Set を用いて合成した。縮重プライマーは、アワビα-アミラーゼの N 末端配列および Glycoside hydrolase family (GHF) 13 に属するα-アミラーゼにおいて高度に保存されている触媒部位の配列に基づき合成した (Table 2)。目的の cDNA は TaKaRa Premix Taq polymerase を用いた PCR によって増幅した。PCR は、エゾアワビ肝膵臓 cDNA をテンプレートとし、95℃で 30 sec、50℃で 30 sec、72℃で 90 sec の反応サイクルを計 30 サイクル行い、PCR 産物は pTAC-1 vector と大腸菌 DH5αを用いてクローン化した。DNA の塩基配列は ABI 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により分析した。cDNA の 3'-末端および 5'-末端領域は、それぞれ 3'-Full RACE Core Set および 5'-Full RACE Core Set (タカラバイオ) を用いた RACE 法により増幅した。演繹されたアミノ酸配列の相同性検索は、National Center for Biotechnology Information の BLAST tool (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) を用いて行った。

第 3 項　結果

3-1. エゾアワビ消化液からのα-アミラーゼ HdAmy58 および HdAmy82 の精製

エゾアワビ 10 個分の粗酵素を硫安分画し、活性が検出された 0–60%飽和硫安画分を集めた。次いで、この画分を 50%飽和硫安溶液に溶解し、同溶液で平衡化した TOYOPEARL Phenyl-650M (2.5×24.5 cm) に供した。吸着したタンパク質は 40、30、20、0%飽和硫安溶液を用いたステップワイズにより溶出した。その結果、デンプン分解活性は 20%飽和硫安溶出画分のフラクション番号 102–105 (ピーク 1) と 0%飽和溶出画分のフラクション番号 134–136 (ピーク 2) に検出された (Fig. 7)。ピーク 1 画分のデンプン分解産物を TLC で解析すると、主にグルコースであった。このことから、この画分に含まれる酵素はα-グルコシダーゼであると推定された (本酵素の精製については第 2 章で述べる)。一方、ピーク 2 画分のデンプン分解産物には、主にマルトオリゴ糖が検出され、ほとんどグルコースが含まれないことから、この画分に含まれる酵素は主にα-アミラーゼであると考えられた。そこで、アワビα-アミラーゼの精製にはこのピーク 2 画分を用いることとした。このピーク 2 画分は 10 mM リン酸ナトリウム (pH 6.0) に透析後、同溶液で平衡化した TOYOPEARL CM-650M カラム (2.5×34 cm) に供した。吸着したタンパク質は 0–0.3 M の塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出した。その結果、活性画分はフラクション番号 33–41 (ピーク A) とフラクション番号 50–57 (ピーク B) に溶出した (Fig. 8)。A 画分は、10 mM リン酸ナトリウム (pH 6.0) に透析後、同溶液で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム (1.2×20 cm) に供した。吸着したタンパク質は 0.01–0.3 M のリン酸ナトリウム (pH 6.0) の直線濃度勾配により溶出した (Fig. 9)。その結果、フラクション番号 23–25 に活性が検出された。これらの画分を合一し、10 mM リン酸ナトリウム (pH 6.0) に透析し VIVASPIN 20 (Sartorius AG) を用いて 1 ml まで遠心濃縮した。

この試料を同溶液で平衡化した Mono-S 5/50 GL カラム (AKTA システム) に供した。吸着したタンパク質は 0–0.15 M の塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出した (Fig. 10)。その結果、フラクション番号 6 および 7 に活性が検出された。それらの画分は、SDS-PAGE において分子量約 82 kDa の単一のバンドを示した (Fig. 12)。そこで、このフラクション 6 および 7 を合一し、精製α-アミラーゼ (HdAmy82) として以後の分析に用いた。HdAmy82 は最終的に 109 倍まで精製され、収率は 0.9%だった (Table 1)。

一方、TOYOPEARL CM-650M のピーク B 画分は、1 mM リン酸ナトリウム (pH 6.0) に透析した後に凍結乾燥した。この試料を 2 ml の冷蒸留水に溶解し、10 mM リン酸ナトリウム (pH 6.0) で平衡化した Mono-S カラムに供した。吸着したタンパク質は 0–0.15 M の塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出した (Fig. 11)。その結果、活性はフラクション番号 15 に検出された。この画分は SDS-PAGE において分子量 約 58 kDa の単一のバンドを示した (Fig. 12)。そこで、このフラクション 15 を精製α-アミラーゼ HdAmy58 とした。HdAmy58 は最終的に 150 倍まで精製され、収率は 0.3%であった (Table 1)。以上の操作によりエゾアワビ消化液から 2 種類のα-アミラーゼ、HdAmy58 および HdAmy82 を得ることができた。

3-2. HdAmy58 および HdAmy82 の酵素化学的性質

HdAmy58 および HdAmy82 の至適温度は共に 30℃であったが、至適 pH はそれぞれ 6.7 および 6.1 であった (Fig.13 and 14)。HdAmy58 および HdAmy82 は活性に NaCl の存在を必要とし、25 mM 以上の NaCl 存在下で最大活性の約 80%以上の活性を示し、100–200 mM で最大活性を示した (Fig. 15)。HdAmy58 および HdAmy82 はマルトトリオースより重合度の高いオリゴ糖、デンプンおよびグリコーゲンを分解した。しかし、プルラン (マルトトリオースがα-1,6 結合した多

糖)、CMC (セルロースのヒドロキシル基をカルボキシメチル基に化学的に置換した多糖)、ラミナラン (グルコースがβ-1,3 結合した主鎖にβ-1,6 結合の分岐をもつ多糖) およびアガロース (D-アガロースと 3,6-アンヒドロガラクトースがβ-1,4 結合した多糖) を分解しなかった。これらの結果から、HdAmy58 および HdAmy82 はグルコースのα-1,4 結合を特異的に切断する典型的なα-アミラーゼ (EC 3.2.1.1) と考えられた。

また、100 mM の NaCl 存在下における HdAmy58 のデンプン溶液およびグリコーゲンの分解活性は、ともに 7.5 mU/mol であり、HdAmy82 の値と比べて約 5 倍の値を示した (Fig. 16)。一方、HdAmy58 のデンンプン粒に対する活性は 0.028 mU/mol であり、HdAmy82 の約 2.5 倍の値であった。これらの結果から、これらの基質に対する活性は HdAmy82 より HdAmy58 の方が高いことが明らかになった。一方、HdAmy82 と HdAmy58 の活性の差異は、水溶性デンプンおよびグリコーゲンを基質としたときよりデンプン粒を基質としたときの方が小さいことが示された。

3-3. HdAmy58 および HdAmy82 の基質分解産物

HdAmy58 および HdAmy82 によりマルトオリゴ糖、デンプンおよびグリコーゲンを分解し、生じた分解産物を TLC により分析した。その結果、両酵素ともにマルトトリオースより重合度の高いマルトオリゴ糖をよく分解し、主にマルトトリオースおよびマルトースを生じることが明らかになった (Fig. 17)。しかしながら、両酵素のマルトテトラオースの分解速度は明らかに異なっていた。すなわち、HdAmy58 は 24 時間の反応でマルトテトラオースを完全に分解できなかったが、HdAmy82 は 5 時間の反応でマルトテトラオースを完全に分解した。このような分解速度の違いは、マルトペンタオースおよびヘキサオースの分解

では見られなかった。これらの結果より、HdAmy82 は HdAmy58 と比較して、マルトテトラオースに対する親和性が高い可能性が示唆された。また、両酵素はグリコーゲンおよびデンプンを分解し、マルトース、マルトトリオースおよびグルコースを生じた。この性質はヒトのα-アミラーゼと同様である。

3-4. HdAmy58 および HdAmy82 の一次構造

HdAmy58 および HdAmy82 の N 末端アミノ酸配列は、プロテインシーケンサーによりそれぞれ SMYSDPHXSS および EFTDPHXNG と解析された (X は同定できなかった残基)。HdAmy58 の N 末端アミノ酸配列はクロアワビのα-アミラーゼ (Nikapitiya et al., 2009; GenBank accession number, ABO26610) と 90%の同一性を示した。一方、HdAmy82 の N 末端アミノ酸配列はヨーロッパザルガイ *Cerastoderma edule* のα-アミラーゼ (GenBank accession number, ACA34380)と 67%の同一性を示した。

次に、HdAmy58 をコードする cDNA を肝膵臓 cDNA から PCR により増幅した。まず、HdAmy58 の N 末端配列に基づき縮重プライマー58Fw1 を合成し、一方、既報の軟体動物α-アミラーゼの間で高度に保存されている領域 (Nikapitiya et al., 2009; GenBank accession number, EF103352, Le Moine et al., 1997; GenBank accession number, X99729, Moal et al., 1997; GenBank accession number, AF320668) から 58Rv1 を合成した (Table 2)。これらのプライマーを用いた PCR により、エゾアワビの肝膵臓 cDNA から約 0.9 kbp の cDNA (58-cDNA) を増幅できた。塩基配列の分析によれば、58-cDNA は 920 bp からなり、306 残基のアミノ酸配列をコードしていた。次に、この配列に基づき合成した特異プライマー (Table 2) を用いて 3'-RACE および 5'-RACE を行うことにより、3'-末端領域をコードする 58-3Race-cDNA (791 bp) および 5'-末端領域をコードする 58-5Race-cDNA (630

bp) を増幅した。これら 58-cDNA、58-3Race-cDNA および 58-5Race-cDNA の塩基配列を重ね合わせることにより、HdAmy58 の翻訳領域全体 551 アミノ酸残基を含む 1,648 bp の配列を決定した (Fig. 18)。この配列の信頼性は新たに合成した 5’-および 3’-非翻訳領域に相当する特異プライマー58FullFw および 58FullRv を用いて増幅した 58Full-cDNA により確認した (Fig. 18) (Table 2)。

HdAmy82 をコードする cDNA の塩基配列は Table 2 のプライマーを用いて HdAmy58 と同様の方法で解析した。縮重プライマーによって増幅した 82-cDNA (1,264 bp)、3’-末端領域をコードする 82-3RACE-cDNA (949 bp) および 5’-末端領域をコードする 82-5RACE (382 bp) の塩基配列を重ね合わせることにより、HdAmy82 の翻訳領域全体 694 アミノ酸残基を含む 2,197 bp の配列を決定した (Fig. 19)。この配列の信頼性は新たに合成した 5’-および 3’-非翻訳領域に相当する特異プライマー82FullFw および 82FullRv を用いて増幅した 82Full-cDNA により確認した (Fig. 19) (Table 2)。HdAmy58 および HdAmy82 の塩基配列および演繹アミノ酸配列は DNA Data Bank of Japan (http://www.ddbj.nig.ac.jp/) にそれぞれ Accession number AB748934 および Accession number AB748935 として登録した。

成熟型の HdAmy58 および HdAmy82 の N 末端アミノ酸配列は各 cDNA の演繹アミノ酸配列の 17-26 番目および 19-27 番目と一致していた。それより N 末端側の 15 残基および 17 残基の演繹アミノ酸配列は SignalP 3.0 software (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) により分泌シグナルと予測され、成熟酵素では除去されると考えられた。従って、成熟体の HdAmy58 および HdAmy82 はそれぞれ 551 残基および 686 残基からなると推定された。

成熟体 HdAmy58 の 17–511 番目の演繹アミノ酸配列は HdAmy82 の 19-500 番目の演繹アミノ酸配列と 50%の同一性を示し (Fig. 20A)、GHF13 に属する軟体類のα-アミラーゼと 99–62%の同一性を示した。この結果から、HdAmy58 の 495

残基および HdAmy82 の N 末端側の 480 残基はそれぞれ GHF13 の触媒ドメインであると考えられた。一方、HdAmy82 の C 末端の約 190 残基は、HdAmy58 や哺乳類のα-アミラーゼには見られない特有の領域であることが明らかとなった。この領域はいくつかの海洋軟体動物や線虫、細菌のα-アミラーゼの C 末端に存在する付属ドメインと 56–37%の同一性を示した (Fig. 21)。従って、HdAmy82 の C 末端の約 190 残基からなる領域もそれらと同様の付属ドメインと考えられる (Fig. 20B)。なお、この付属ドメインの機能は細菌α-アミラーゼにおいて細胞外分泌に関与するとの推定があるものの (Feller et al., 1998) 未だ良く分かっていない。

第 4 項　考察

4-1. HdAmy58 および HdAmy82 の酵素特性

本章では、エゾアワビ消化液から 2 種類のα-アミラーゼ HdAmy58 および HdAmy82 を精製した。HdAmy58 および HdAmy82 の至適温度は共に 30℃であったが、至適 pH はそれぞれ 6.1 および 6.7 を示した。また両酵素の活性化にはともに NaCl が必須であった。このような NaCl 依存性は動物および海洋細菌のα-アミラーゼにおいても見られ、活性化が塩化物イオンによって起こるとされている (Levitzki and Steer, 1974; Feller et al., 1996)。

HdAmy58 および HdAmy82 はデンプンやグリコーゲンをよく分解し、プルラン、CMC、ラミナリンおよびアガロースを分解しなかった。従って HdAmy58 および HdAmy82 はα-グルカン主鎖のα-1,4 結合を加水分解する典型的なα-アミラーゼ (EC 3.2.1.1) であると考えられた。HdAmy58 および HdAmy82 はマルトトリオースより大きいマルトオリゴ糖を分解した。しかしながら、マルトテトラオースについては、HdAmy82 の方が HdAmy58 より良く分解した。HdAmy82

には HdAmy58 に存在しない C 末端付属ドメインがあることから、この領域がマルトテトラオースへの高い分解能と関連するのかもしれない。

4-2. HdAmy58 および HdAmy82 の一次構造上の特徴

cDNA 法によって HdAmy58 および HdAmy82 の 511 残基および 694 残基のアミノ酸配列が演繹された。成熟型 HdAmy58 の演繹アミノ酸配列は成熟型 HdAmy82 の GHF13 触媒ドメインの演繹アミノ酸配列 (19–500 番目) と 50%の同一性を示した。HdAmy82 の GHF13 触媒ドメインの後に続く約 190 残基は付属ドメインとみなされた。従って、SDS-PAGE による HdAmy58 および HdAmy82 の分子量の差は HdAmy82 の付属ドメインの存在によるものと結論された。成熟体の HdAmy58 の演繹アミノ酸配列は GHF13 に属する軟体類のα-アミラーゼと 99-62%の同一性を示し、HdAmy82 の触媒ドメインは 73-68%の同一性を示した。これら両酵素の触媒ドメインには GHF13 酵素の触媒残基として知られているアミノ酸残基 (HdAmy58 では Asp214, Glu250 および Asp315, HdAmy82 では Asp215, Glu246 および Asp309)、Ca イオン結合部位として知られているアミノ酸残基 (HdAmy58 では Gln118, Arg175, Asp184 および His218, HdAmy82 では Gln119, Arg176, Asp185 および His219) および Cl イオン結合部位として知られているアミノ酸残基 (HdAmy58 では Arg212, Gln313 および Arg351, HdAmy82 では Arg213, Gln307 および Arg345) が保存されていた (Fig. 20A)。従って HdAmy58 および HdAmy82 は GHF13 に属するα-アミラーゼであると結論付けられた。

HdAmy58 の演繹アミノ酸配列はクロアワビ由来のα-アミラーゼのもの (Nikapitiya et al., 2009; GenBank accession number, EF103352) と、ほとんど同一であった。すなわち、この 2 種のα-アミラーゼの演繹アミノ酸配列間では、HdAmy58 の 433 番目の Leu がクロアワビのα-アミラーゼでは Phe に置換されて

いるのみであった。

一方、HdAmy82 には GHF13 触媒ドメインの C 末端に約 190 残基からなる付属ドメインが存在した (Fig. 20B)。このような付属ドメインは基質親和性を上昇させる糖鎖結合モジュール (CBM) として機能する場合がある。GHF13 のα-アミラーゼでは、CBM20 の存在が知られている (Kaneko et al., 1996; Dauter et al., 1999)。そこで、HdAmy82 の付属ドメインの機能推定のために、このドメインと相同性を示すタンパク質を検索した。その結果、このドメインは既報の CBM とは高い相同性を示さなかったが、タイワンシジミ *Corbicula fluminea* のα-アミラーゼ (GenBank accession number, AAO17927)、 ムラサキイガイ *Mytilus edulis* のα-アミラーゼ (GenBank accession number, ACA34372) および海洋細菌 *Pseudoalteromonas haloplanktis* のα-アミラーゼの付属ドメイン (GenBank accession number, CCA41481)とそれぞれ 56%、51%および 37%の同一性を示すことが明らかになった (Fig. 21)。これらのうち *P. haloplanktis* のα-アミラーゼの付属ドメインは、シグナルペプチドによりペリプラズムに輸送されたアミラーゼの細胞外分泌に関与していると報告されている (Feller et al., 1998)。一方、HdAmy82 のような真核生物のタンパク質は細菌のものと異なり、シグナルペプチドのみで細胞外分泌が可能となるため、HdAmy82 の付属ドメインは *P. haloplanktis* のα-アミラーゼのものと異なる機能を持っていると考えられる。なお、HdAmy82 は、マルトテトラオースに対する分解活性が高く、この基質との親和性が高い可能性が示唆された。そうであれば、HdAmy82 の C 末端に存在する付属ドメインは、マルトテトラオースの認識と結合に関与している可能性が考えられる。

以上のように、HdAmy58 および HdAmy82 はデンプンやマルトオリゴ糖を分解し、マルトオリゴ糖を生じるα-アミラーゼであり、一次構造解析の結果から

は GHF13 に属する酵素であることが明らかになった。一方、両酵素はデンプンを分解した際、グルコースをほとんど生じなかったが、アワビの消化液はデンプンを分解しグルコースをよく生じる (著者の予備実験)。これらの結果は、アワビ消化液中にはα-アミラーゼだけでなくα-グルコシダーゼ様の酵素が含まれていることを示している。そこで、第 2 章ではアワビ消化液からのα-グルコシダーゼの単離、酵素特性および一次構造の解析を試みることとした。

Table 1. Summary for the purification of HdAmy58 and HdAmy82

Samples	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude[a]	945	251	0.3	1	100
Phenyl[b]	157	82	0.4	1.3	33
HdAmy58					
CM[c]	6.4	17	23	77	6.8
Mono-S[d]	0.01	0.5	45	150	0.2
HdAmy82					
CM[c]	15	44	3.0	11	18
Hydroxyl[e]	0.9	6.0	6.7	25	2.4
Mono-S[f]	0.08	2.3	29	109	0.9

[a] Crude enzyme after the dialysis against 10 mM sodium phosphate (pH 6.0)

[b] Active fraction obtained by TOYOPEARL Phenyl-650M chromatography.

[c] Active fraction obtained by TOYOPEARL CM-650M chromatography.

[d] HdAmy58 purified by Mono-S chromatography.

[e] Active fraction obtained by hydroxylapatite chromatography.

[f] HdAmy82 purified by Mono-S chromatography.

Table 2. DNA primers used for the amplification of abalone α-amylase cDNAs

Name	Sequence[a]
HdAmy58	
58Fw1	5’-TCNATGTAYAGYGARCCNCA-3’
58Rv1	5’-CCNCCNCCNTGNCCNCG-3’
58Fw2	5’-TGGCTCAAGTCTTCAGGAAG-3’
5race58RT	5’-CCAAGGTACTGG-3’
5race58F1	5’-ACCATATGGCTACTGTGGAG-3’
5race58F2	5’-CCAATGAGAACCGTGTAGTCAC-3’
5race58R1	5’-TTTCGCAATGTCCGACCGTC-3’
5race58R2	5’-GGGTGATGGCACTCCTACC-3’
58FullFw	5’-TGTTTAGCGTTCCTGCTGCC-3’
58FullRv	5’-AGATTACAGCTCCTGACC-3’
HdAmy82	
82Fw1	5’-GARTTYACNGAYCCNCA-3’
82Rv1	5’-GGCTGGCAGCCCTGTTCGG-3’
82Fw2	5’- TTTGCCAGAGGTAACAAGGGC -3’
5race82RT	5’-TCTGAATTGCGC-3’
5race82F1	5’-AACAGGAACGGGCAGGTAGC-3’
5race82F2	5’-GTACCATACAGGAGAGAGC-3’
5race82R1	5’-GATCCTCATTACCGCACCTG-3’
5race82R2	5’-CCTGTACAGCACAGTAACC-3’
82FullFw	5’-TGGTCCTGTCGGCGAGCGC -3’
82FullRv	5’-TCCTTCACACAACACTGGGG -3’

[a]N = A/C/G/T; R = A/G; Y = C/T.

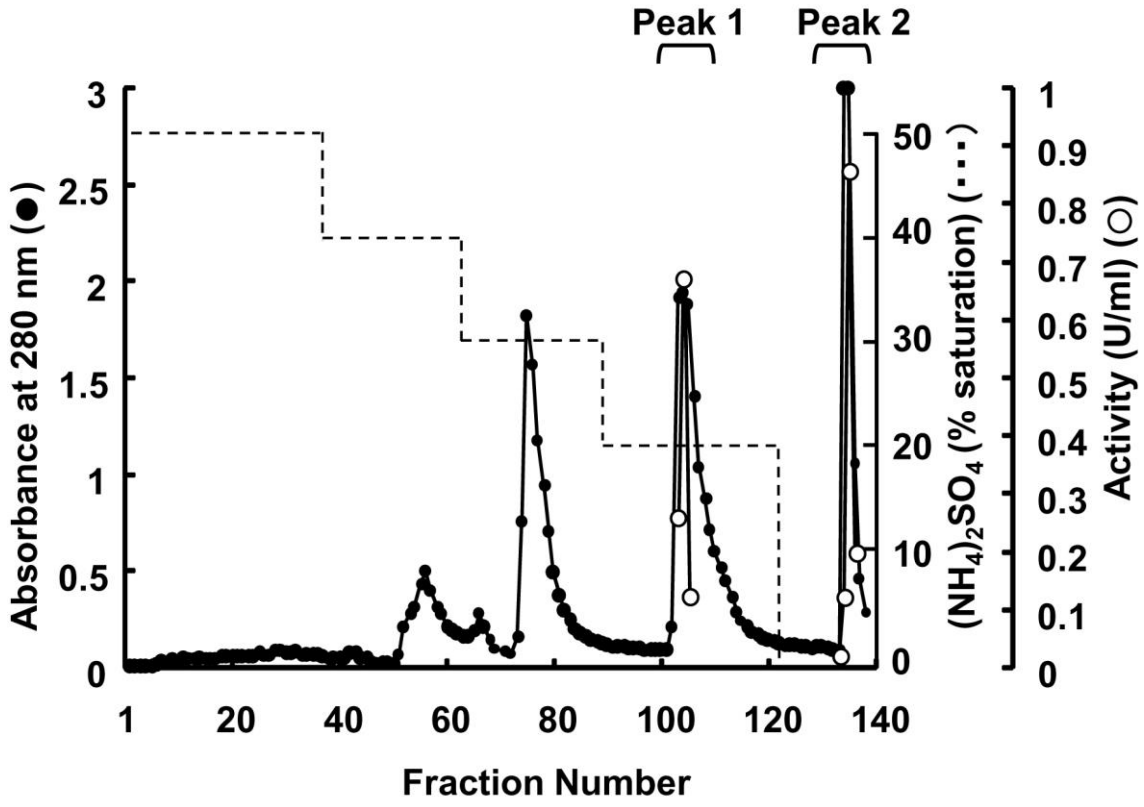


Fig. 7. Purification of α-amylase isozymes from the digestive fluid of abalone by TOYOPEARL Phenyl-650M column chromatography. The proteins precipitated between 0 and 60% saturation of ammonium sulfate were applied to a column of TOYOPEARL Phenyl-650M (2.5×24.5 cm). Proteins absorbed to the column were eluted by a stepwise elution system with different concentrations of $(NH_4)_2SO_4$.

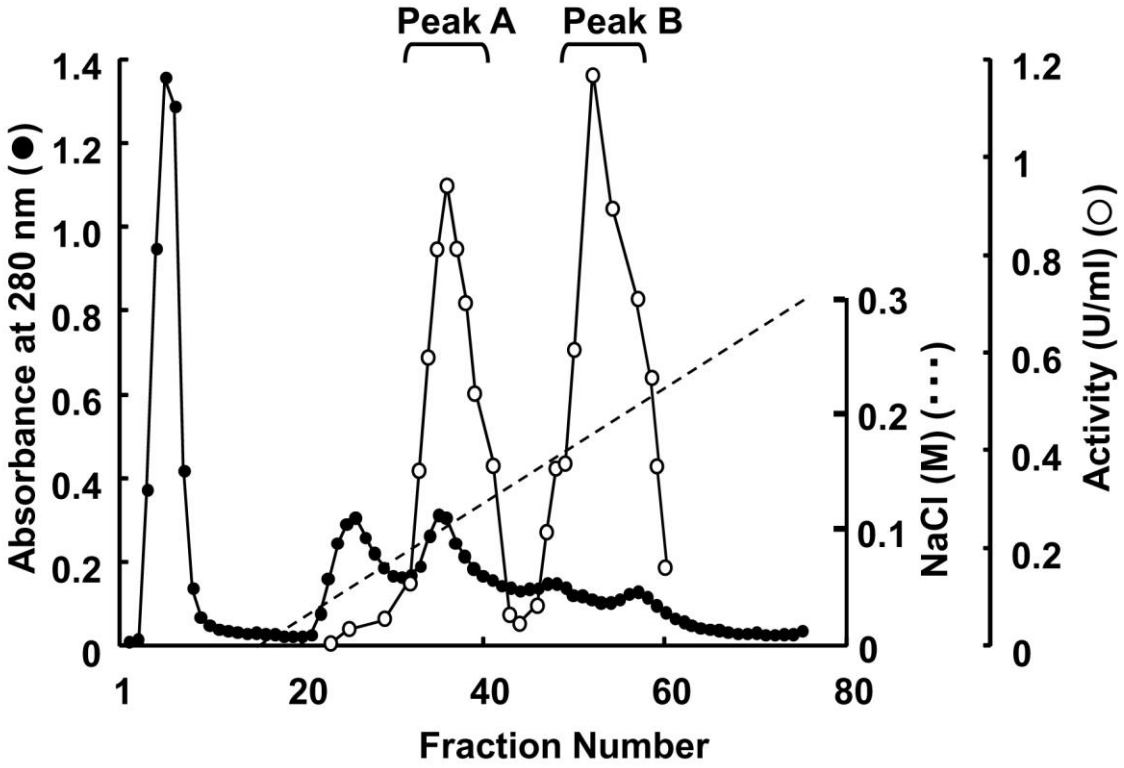


Fig. 8. Purification of abalone α-amylase isozymes by TOYOPEARL CM-650M column chromatography. An α-amylase fraction (peak 1) obtained by TOYOPEARL Phenyl-650M column chromatography was applied to a column of TOYOPEARL CM-650M (2.5×34 cm). Proteins absorbed to the column were eluted by a linear gradient of 0–0.3 M NaCl.

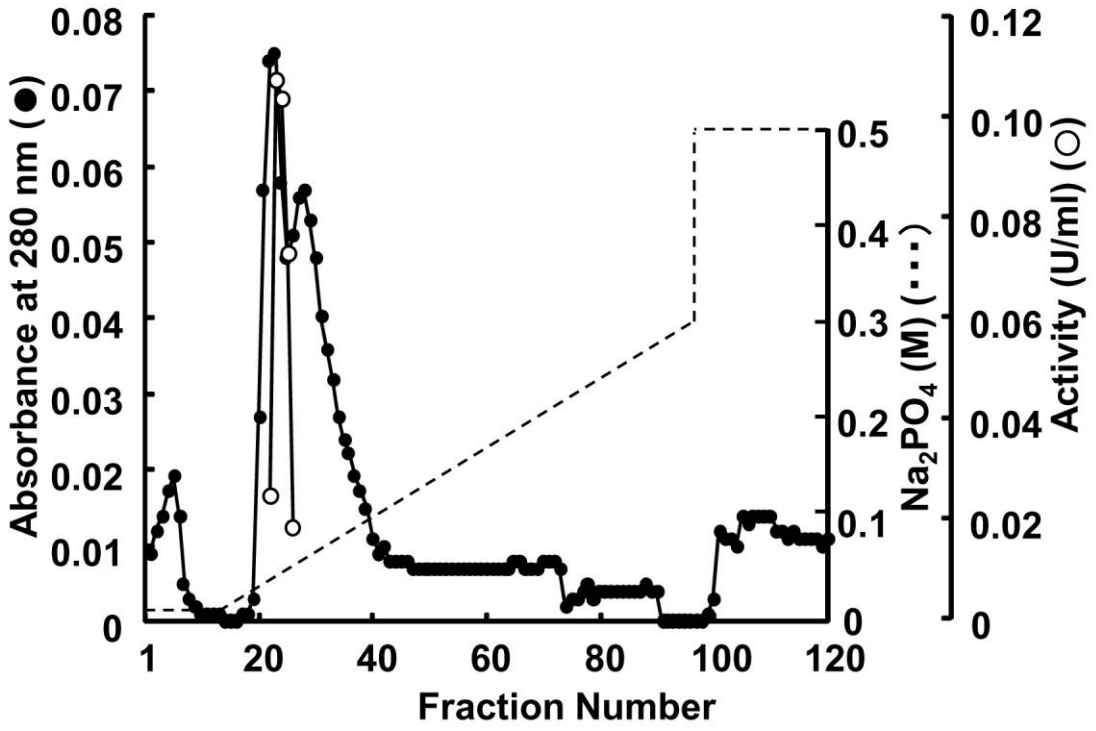


Fig. 9. Purification of an α-amylase from abalone by hydroxylapatite column chromatography. An α-amylase fraction (peak A) obtained by TOYOPEARL CM-650M column chromatography was applied to a column of hydroxylapatite (1.2×20 cm). Proteins absorbed to the column were eluted by a linear gradient of 0.01–0.3 M Na_2PO_4 followed by 0.5 M Na_2PO_4.

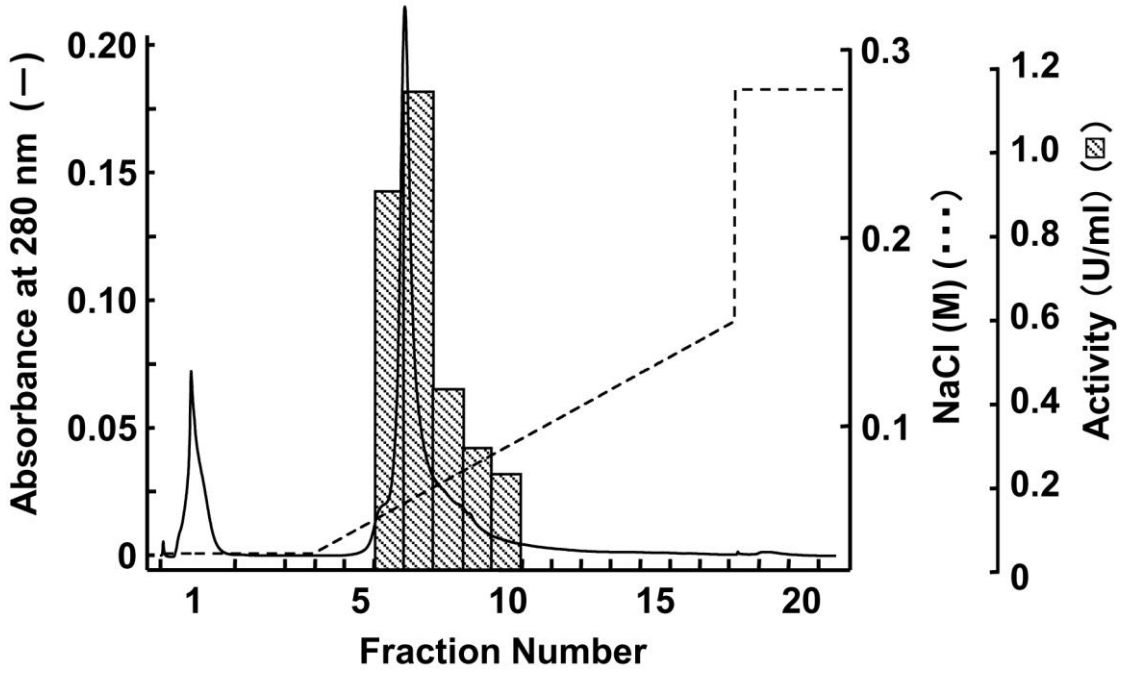


Fig. 10. Purification of an α-amylase isozyme of abalone by Mono-S 5/50GL column chromatography. The α-amylase fraction obtained by hydroxylapatite column chromatography was applied to a column of Mono-S 5/50GL. Proteins absorbed to the column were eluted by a linear gradient of 0–0.15 M NaCl followed by 0.3 M NaCl.

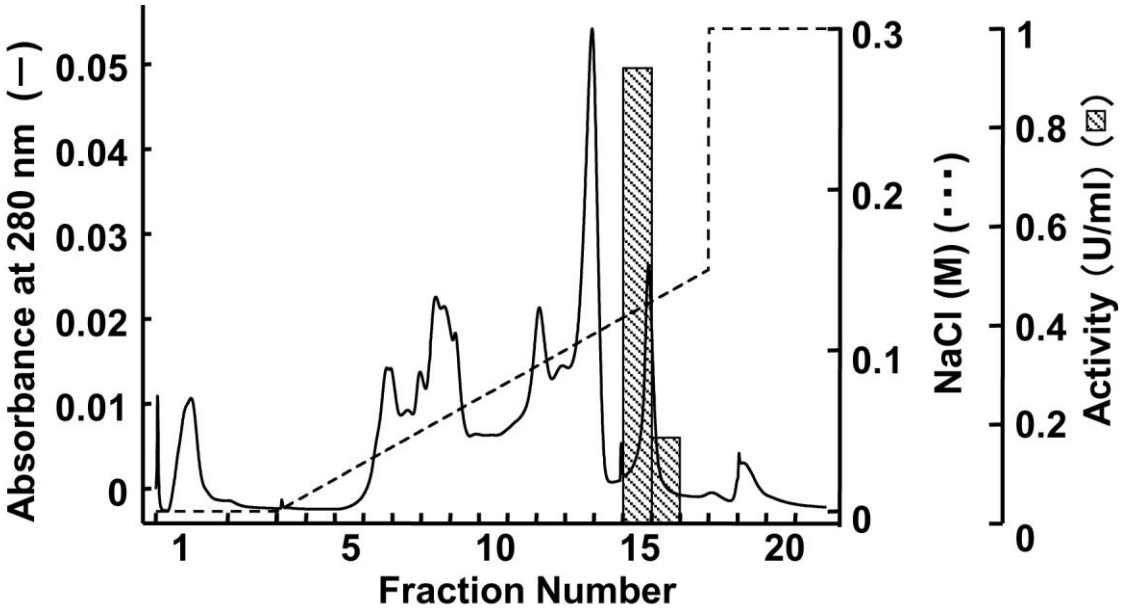


Fig. 11. Purification of an α-amylase from abalone by Mono-S 5/50GL column chromatography. An α-amylase fraction (peak B) obtained by TOYOPEARL CM-650M column chromatography was applied to a column of Mono-S 5/50GL. Proteins absorbed to the column were eluted by a linear gradient of 0–0.15 M NaCl followed by 0.3M NaCl.

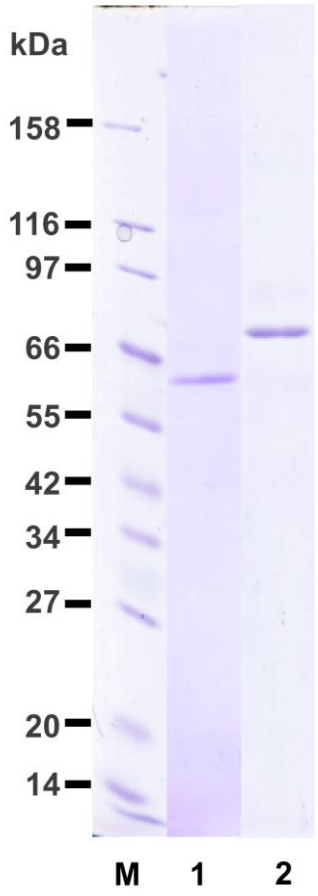


Fig. 12. SDS-PAGE for the purified abalone α-amylases, HdAmy58 and HdAmy82. M, marker protein; 1, HdAmy58; 2, HdAmy82.

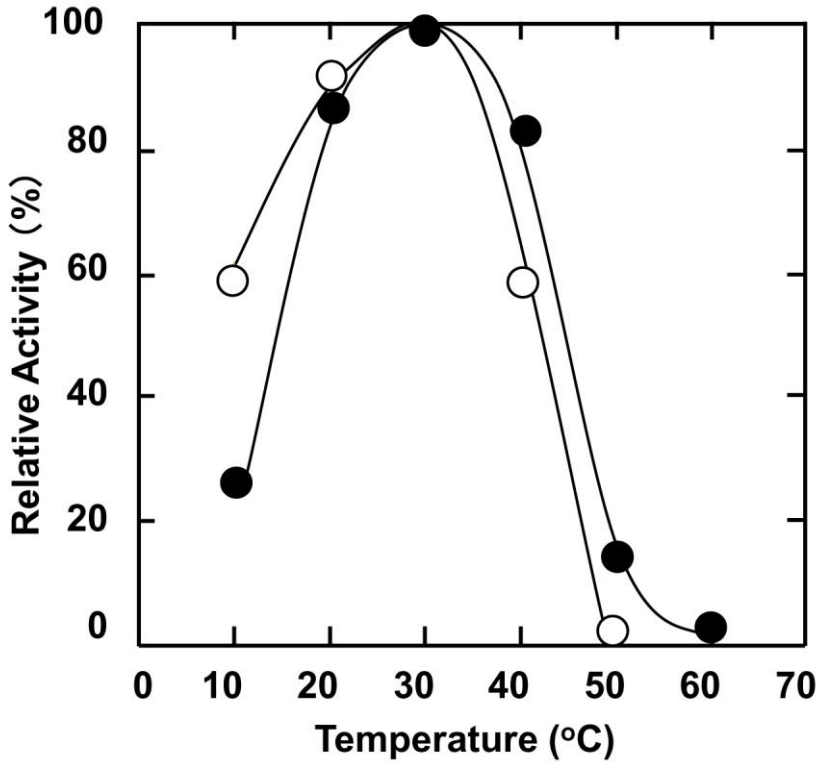


Fig. 13. Temperature dependence of HdAmy58 and HdAmy82. Temperature dependence of α-amylase was measured at 10–60°C in a reaction mixture containing 0.2% starch and 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0). ●, HdAmy58; ○, HdAmy82.

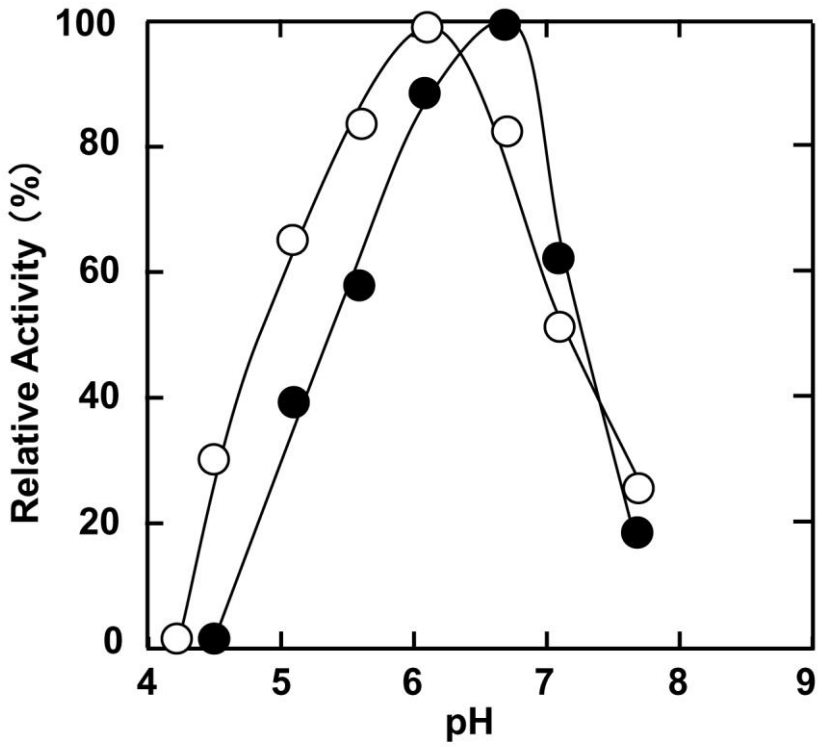


Fig. 14. pH dependence of HdAmy58 and HdAmy82. pH dependence of α-amylase was measured at 30 ^{o}C in reaction mixtures adjusted to pH 4.5–8.0 with 10 mM sodium phosphate buffer. ●, HdAmy58; ○, HdAmy82.

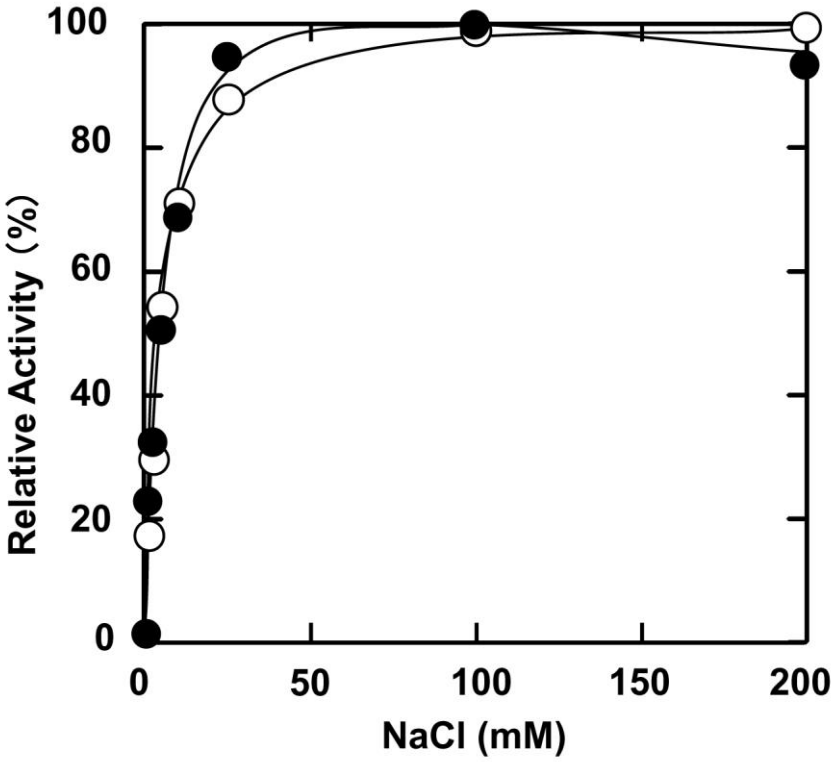


Fig. 15. NaCl dependence of HdAmy58 and HdAmy82. NaCl dependence of α-amylase was examined with reaction mixtures containing 0.2% (w/v) starch, 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0), and 0–200 mM NaCl. ●, HdAmy58; ○, HdAmy82.

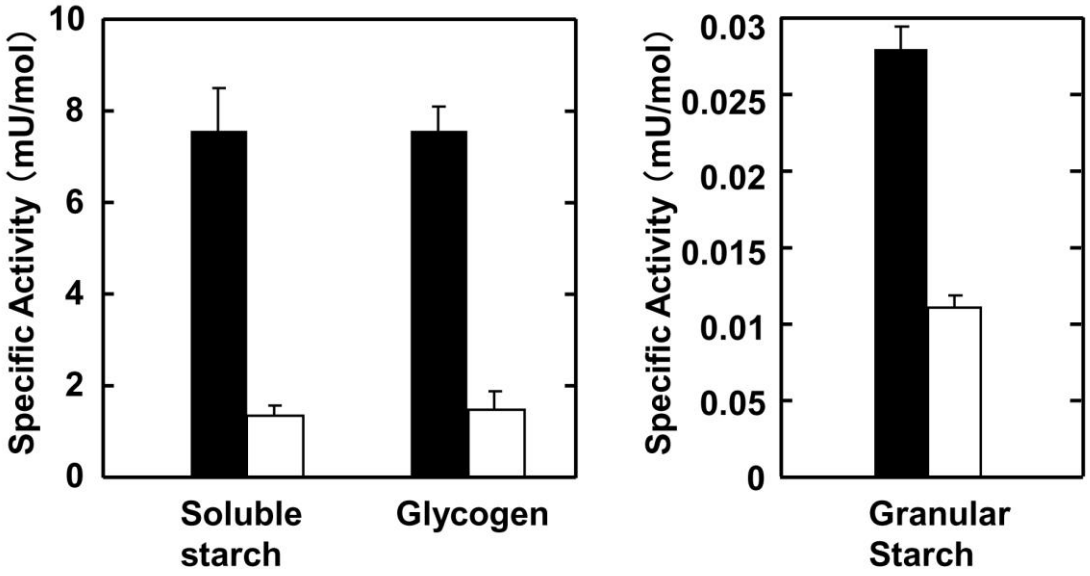


Fig. 16. Activities of HdAmy58 and HdAmy82 toward soluble starch, glycogen and granular starch. Specific activities were determined with soluble starch, glycogen and granular starch. Black and white boxes are activities of HdAmy58 and HdAmy82, respectively. All measurements were performed in triplicate and the activity values are shown as the mean values ± S.D.

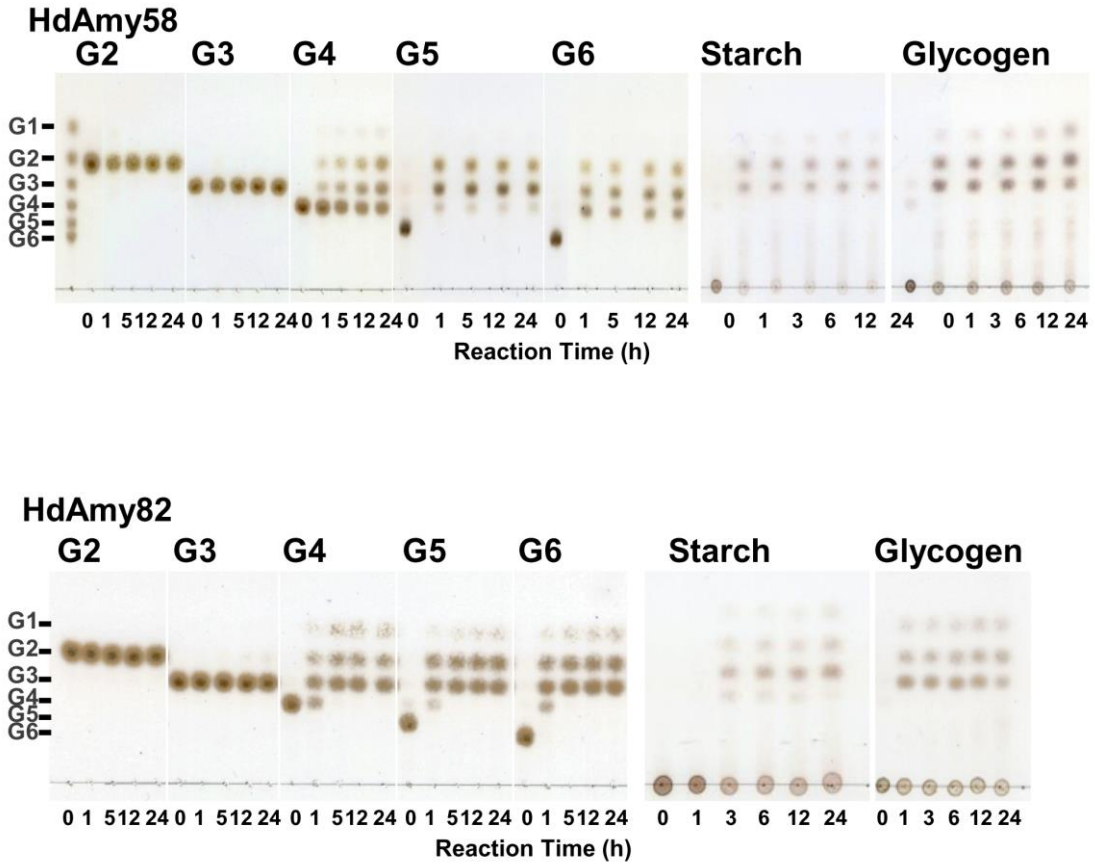


Fig. 17. TLC for the degradation products of maltooligosaccharides, starch, and glycogen produced by HdAmy58 and HdAmy82. Five mg/mL maltooligosaccharides, 2 mg/mL starch and 2 mg/mL glycogen in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) were degraded with 0.01 U/mL HdAmy58 and HdAmy82 at 30^{o}C. The reaction was terminated at appropriate times by mixing with an equal volume of 10% (w/v) trichloroacetic acid and 1 μL of the mixture was applied to TLC plate. M, marker sugers comprising G1– G6. G1, glucose; G2 – G6, maltose to maltohexaose.

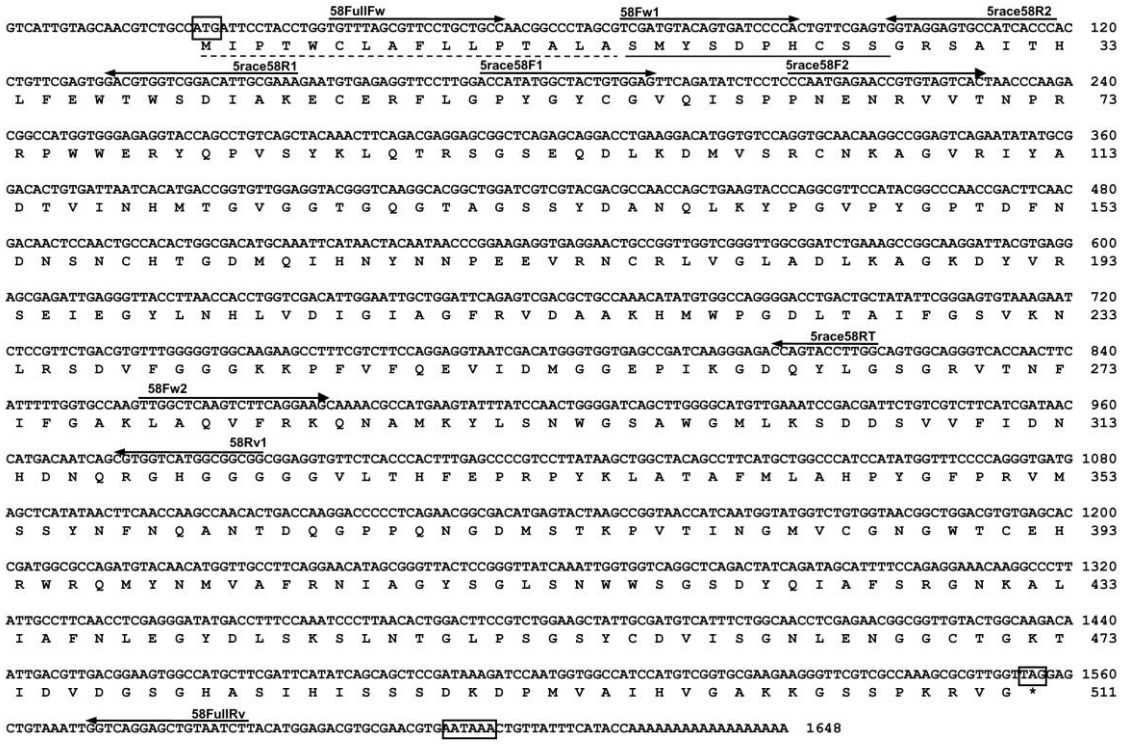


Fig. 18. Nucleotide and deduced amino-acid sequences of HdAmy58 cDNA. The translational initiation codon ATG, the termination codon TAG and putative polyadenylation signal AATAAA are boxed. A putative signal peptide for secretion is indicated by a dotted underline. The amino-acid sequences determined with intact HdAmy58 (N-terminus) are indicated by the underline. The annealing sites of PCR primers (see Table 2) are indicated by arrows above the nucleotide sequence.

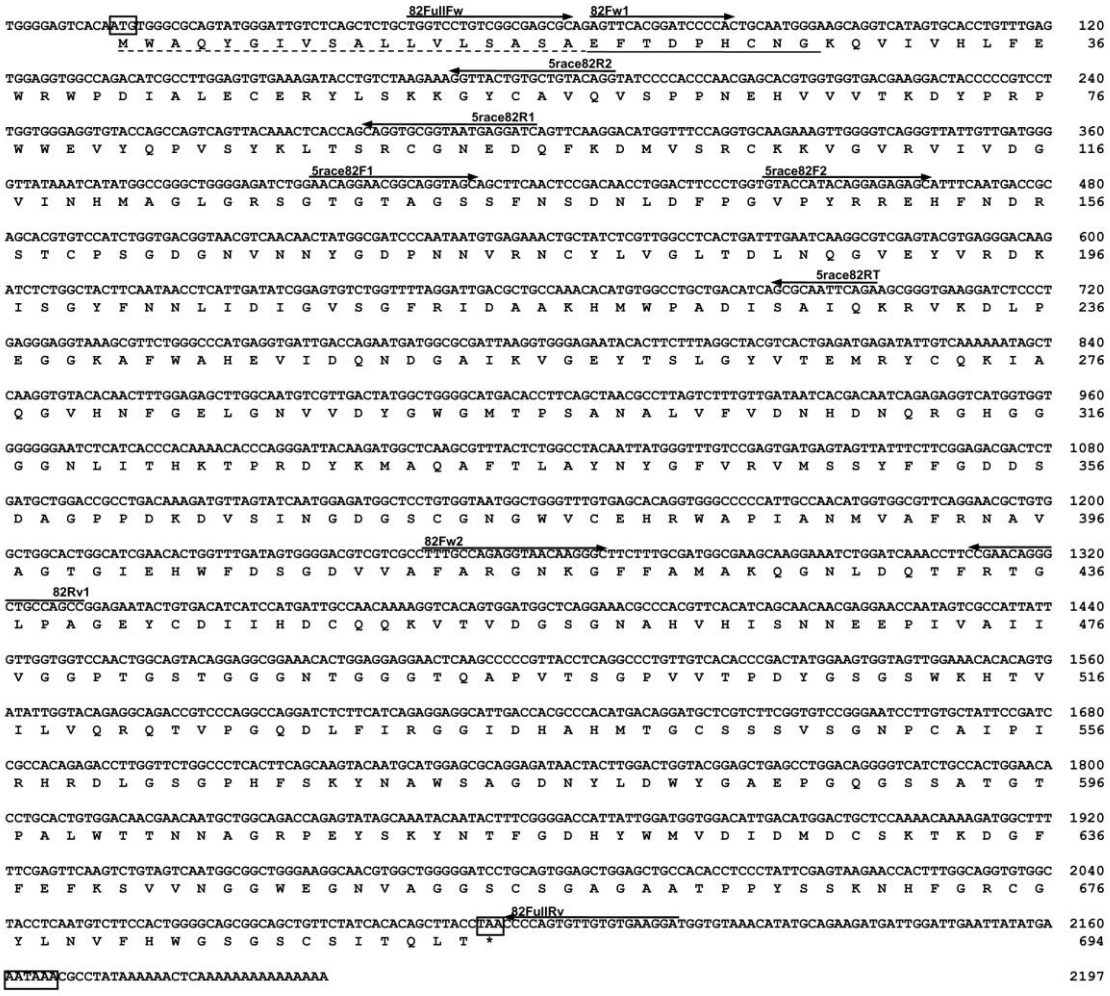


Fig. 19. Nucleotide and deduced amino-acid sequences of HdAmy82 cDNA. The translational initiation codon ATG, the termination codon TAA and putative polyadenylation signal AATAAA are boxed. A putative signal peptide for secretion is indicated by a dotted underline. The amino-acid sequences determined with intact HdAmy82 (N-terminus) are indicated by the underline. The annealing sites of PCR primers (see Table 2) are indicated by arrows above the nucleotide sequence.

(A)

```
HdAmy58  MIPTW-CLAFLLPTALASMYSDPHCSSGRSAITHLFEWTWSDIAKECERFLGPYGYCGVQISPPNENRVVTNPR-RPWWERYQPVSYKLQTRSGSEQDLK    98
HdAmy82  MWAQYGIVSALLVLSASAEFTDPHCN-GKQVIVHLFEWRWPDIALECERYLSKKGYCAVQVSPPNEHVVVTKDYPRPWWEVYQPVSYKLTSRCGNEDQFK    99
         *         **         ****  *   * ***** * *** **** *   *** ** *****  ***    ***** ********  * * *   *

HdAmy58  DMVSRCNKAGVRIYADTVINHMTGVGGTGQGTAGSSYDANQLKYPGVPYGPTDFNDNSNCHTGDMQIHNYNNPEEVRNCRLVGLADLKAGKDYVRSEIEG   198
HdAmy82  DMVSRCKKVGVRVIVDGVINHMAGLGRSGTGTAGSSFNSDNLDFPGVPYRREHFNDRSTCPSGDGNVNNYGDPNNVRNCYLVGLTDLNQGVEYVRDKISG   199
         ****** * ***   * ***** * *  * ******     *  *****    *** * *  **    **  *  ******** **  *  ***  * *

HdAmy58  YLNHLVDIGIAGFRVDAAKHMWPGDLTAIFGSVKNLRSDVFGGGKKPFVFQEVIDMGGEPIKGDQYLGSGRVTNFIFGAKLAQVFRKQNAMKYLSNWGSA   298
HdAmy82  YFNNLIDIGVSGFRIDAAKHMWPADISAIQKRVKDLP-----EGGKAFWAHEVIDQNDGAIKVGEYTSLGYVTEMRYCQKIAQGVHNFGELGNVVDYG--   292
         * * * ***  *** ******** *  **   ** *       * * *   ****     **   *   * **      * **            *

HdAmy58  WGMLKSDDSVVFIDNHDNQRGHGGGGGVLTHFEPRPYKLATAFMLAHPYGFPRVMSSYNFNQANTDQGPPQNGDMSTKPVTING-MVCGNGWTCEHRWRQ   397
HdAmy82  WGMTPSANALVFVDNHDNQRGHGGGGNLITHKTPRDYKMAQAFTLAYNYGFVRVMSSYFFGDD-SDAGPPD------KDVSINGDGSCGNGWVCEHRWAP   385
         ***  *    ** **************   **  ** ** * ** **  *** ****** *     * ***       * * ***   ***** *****

HdAmy58  MYNMVAFRNIAGYSGLSNWWSGSDYQIAFSRGNKALIAFNLEGYDLSKSLNTGLPSGSYCDVISGNLENGGCTGKTIDVDGSGHASIHISSSDKDPMVAI   497
HdAmy82  IANMVAFRNAVAGTGIEHWFDSGD-VVAFARGNKGFFAMAKQG-NLDQTFRTGLPAGEYCDIIHD-------CQQKVTVDGSGNAHVHISNNE-EPIVAI   475
           *******     *   *    *   ** ****   *    *  *     **** * *** *              ***** *  ***     * ***

HdAmy58  HVGAKKGSS-----------PKRVG                                                                            511
HdAmy82  IVGGPTGSTGGGNTGGGTQAPVTSGPVVTPDYGSGSWKHTVILVQRQTVPGQDLFIRGGIDHAHMTGCSSSVSGNPCAIPIRHRDLGSGPHFSKYNAWSA   575
          **   **           *   *

HdAmy82  GDNYLDWYGAEPGQGSSATGTPALWTTNNAGRPEYSKYNTFGDHYWMVDIDMDCSKTKDGFFEFKSVVNGGWEGNVAGGSCSGAGAATPPYSSKNHFGRC   675
HdAmy82  GYLNVFHWGSGSCSITQLT                                                                                694
```

(B)

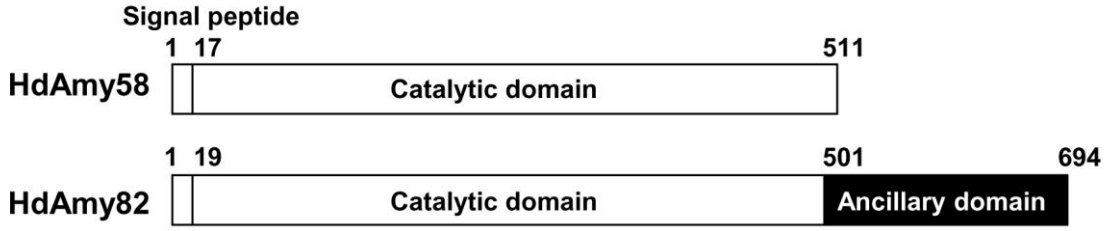


Fig. 20. Comparison of primary structure between HdAmy58 and HdAmy82. (A) Alignment for amino-acid sequences of HdAmy58 and HdAmy82. The amino-acid sequences were aligned by Clustal X software. The positions of identical residues and gaps are indicated by asterisks (*) and dashes (–), respectively. The catalytic amino-acid residues of GHF13 were marked by white on black shades. The amino-acid residues of the Ca^{2+} binding site and the Cl^{-} binding site were shaded on gray and boxed. (B) Schematic representation for the domain structures of HdAmy58 and HdAmy82.

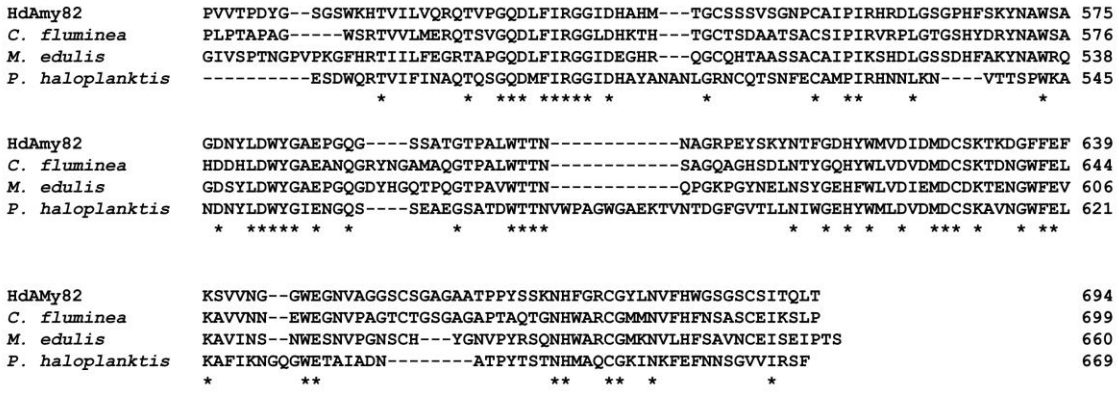


Fig. 21. Alignment for amino-acid sequences of ancillary domains from HdAmy82 and several other α-amylases. The amino-acid sequence of ancillary domain of HdAmy82 is aligned with those of α-amylases from *Corbicula fluminea* (GenBank accession number, AAO17927), *Mytilus edulis* (GenBank accession number, ACA34372) and *Pseudoalteromonas haloplanktis* (GenBank accession number, CCA41481). The positions of identical residues and gaps are indicated by asterisks (*) and dashes (–), respectively.

第 2 章　エゾアワビα-グルコシダーゼの酵素化学的性質と一次構造の解析

第 1 項　目的

第 1 章においてエゾアワビの消化液から単離した 2 種類のα-アミラーゼは、デンプンからマルトオリゴ糖を生じるがグルコースはほとんど生じなかった。一方、デンプンにエゾアワビの消化液を反応させるとグルコースが生じることから、この消化液中にはα-アミラーゼの他にα-グルコシダーゼも含まれると考えられた。そこで、本章ではエゾアワビの消化液からα-グルコシダーゼを単離し、酵素特性および一次構造の解析をすることとした。

第 2 項　実験材料および方法

下記方法以外は第 1 章第 2 項に準ずる。

2-1. α-グルコシダーゼ活性の測定法

α-グルコシダーゼ活性は、基質溶液として 0.2% (w/v) の水溶性デンプンを含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) を用いて測定した。すなわち、950 µl の基質溶液を 30℃で 5 分間プレインキュベートした後、50 µl の酵素液を加え反応を開始させ、酵素反応によって生じたグルコースをグルコース CII-テストワコー (グルコース測定キット) を用いて定量した。α-グルコシダーゼ活性の 1 unit は 1 分間に 1 µmol のグルコースを遊離する酵素量と定義した。

基質特異性の測定にはマルトオリゴ糖、イソマルトース、スクロース、トレハロース、*p*-nitrophynyl-α-D-glucopyranoside (α-*p*NPG)、デンプンおよびグリコーゲンを使用した。オリゴ糖基質の濃度は 5 mg/ml、グリコーゲンおよびα-*p*NPG の濃度はそれぞれ 2 mg/ml および 2.5 mM とした。マルトオリゴ糖、イソマルトース、スクロース、トレハロース、デンプンおよびグリコーゲンの分解活性は、

反応によって生じたグルコース量を定量することにより求めた。α-*p*NPG の分解反応は、基質溶液 475 µl に酵素 25 µl を加えることにより開始し、0.1 M 炭酸ナトリウム 1ml を添加することによって停止した。反応によって生じた *p*-nitrophenol の量は、波長 410 nm の吸光度を測定することにより定量した。α-*p*NPG 分解活性 1 unit は 1 分間に 1 µmol の *p*-nitrophenol を遊離させる酵素量と定義した。

酵素活性の温度依存性は、終濃度 5 mg/ml のマルトースを基質として用い、10–60℃で測定した。酵素活性の pH 依存性は、終濃度 5 mg/ml のマルトースを基質として用い、pH 2.0–2.5 の間では 10 mM グリシン塩酸緩衝液、pH 2.5–6.0 の間では 10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0–8.0 の間では 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液を用いて 30℃で測定した。また、酵素の熱安定性は、10–60℃の間で 30 分間プレインキュベートした後の残存活性を pH 6.0、30℃で測定することにより評価した。

2-2. アミノ酸配列の解析法

α-グルコシダーゼの N 末端アミノ酸配列は、20%アセトニトリル-0.1%トリフルオロ酢酸に透析後、ガラスフィルターに吸着させた試料を ABI Procise 492 sequencer (Applied Biosystems) に供することにより分析した。内部アミノ酸配列は、0.4%リジルエンドペプチダーゼにより 37℃、20 分消化した試料を SDS-PAGE に供し、これを PVDF 膜に転写した後、よく分離している断片をはさみで切り取り、これを ABI Procise 492 sequencer に供することにより分析した。

2-3. cDNA クローニング

α-グルコシダーゼの cDNA は、部分アミノ酸配列および GHF31 の特徴配列領

域 1 の配列 (Frandsen and Svensson, 1998) に基づき合成した DNA プライマーを用いて PCR により増幅した。その他の基本操作は、第 1 章に示した通りである。

2-4. RT-PCR

エゾアワビの肝膵臓、貝殻筋 (Shell muscle)、外套膜から RNAiso Plus (タカラバイオ) を用いて全 RNA を抽出した。各組織の cDNA は Primescript 1st strand cDNA Synthesis kit を用いて全 RNA より逆転写した。HdAgl cDNA に相同の cDNA は、各部位より調製した cDNA をテンプレートとして FullRv プライマーと Fw2 プライマー (Table 5) を用いた PCR により増幅した。PCR は、95℃で 30 sec、58℃で 30 sec、72℃で 60 sec の反応サイクルを計 30 サイクル行った。これらのプライマーを用いた PCR により 549 bp の cDNA が増幅されると予想される。

また、RT-PCR のポジティブコントロールとして、エゾアワビβ-アクチンの cDNA を増幅した。なお、β-アクチンの増幅用のプライマーはエゾアワビβ-アクチンの塩基配列 (Ma et al., 2004; GenBank Accesion no. AY380809.1) に従って作成した (Table 5)。この PCR により 509 bp のβ-アクチン cDNA の断片が増幅されると予想される。

第 3 項　結果

3-1. エゾアワビ消化液からのα-グルコシダーゼ HdAgl の精製

エゾアワビ 10 個分の粗酵素を硫安分画し、活性が検出された 0–60%飽和硫安画分を集めた。次いで、この画分を 40%飽和硫安溶液に溶解し、同溶液で平衡化した TOYOPEARL Phenyl-650M カラム (2.5×19.0 cm) に供した。吸着したタンパク質は、30、20、10、0%飽和硫安溶液を用いたステップワイズにより溶出した。その結果、最も高い活性は、20%飽和硫安溶液で溶出したフラクション番

号 59–65 画分に検出された (Fig. 22)。そこで、これらのフラクションを合一し、10 mM リン酸ナトリウム (pH 6.0) に透析した後、同溶液で平衡化した TOYOPEARL CM-650M カラム (2.5×23.3 cm) に供した。吸着したタンパク質は、0–0.3 M の塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出した。その結果、活性はフラクション番号 63–68 に検出された (Fig. 23)。そこで、これらのピーク画分を合一し、10 mM リン酸ナトリウム (pH 6.0) に透析した後、同溶液で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム (1.2×16.5 cm) に供した。吸着したタンパク質は、0.01–0.3 M のリン酸ナトリウム直線濃度勾配により溶出した。その結果、フラクション番号 58–66 に活性が検出された (Fig. 24)。これらの活性画分を合一し、VIVASPIN 20 を用いて 5 ml まで遠心濃縮し、10 mM リン酸ナトリウム (pH 6.0) に透析した後、同溶液で平衡化した Mono-S カラムに供した。吸着したタンパクは、0–0.15 M の塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出した。その結果、フラクション 14 に活性が検出された (Fig. 25)。この画分には、SDS-PAGE において約 97 kDa の単一のバンドを示すタンパク質が含まれていた (Fig. 26)。そこで、本研究では、このフラクションをエゾアワビの精製α-グルコシダーゼ (HdAgl) とし、酵素特性の解析に用いることとした。なお、本酵素は、本調製法により粗酵素から 33.4 倍にまで精製され、その収率は 0.3%だった。

3-2. HdAgl の酵素化学的性質

HdAgl の至適温度および至適 pH は、約 50℃および 3.8–5.5 であった (Fig. 27 and 28)。30 分間のインキュベートにより活性が半減する温度は、約 48℃であった (Fig. 29)。HdAgl はアミラーゼと異なり、NaCl 濃度依存性を示さなかった (Fig. 30)。

HdAgl をデンプンに作用させると、中間生成物としてオリゴ糖を生成せずに

直接グルコースを遊離した (Fig. 31)。また、マルトオリゴ糖に作用させると、それらの重合度を 1 残基分低下させながらグルコースを遊離した (Fig. 31)。このことから本酵素は、基質末端をグルコース単位で切断するエキソ型のα-グルコシダーゼであると考えられた。また、全てのオリゴ糖基質の分解反応において、10 分から 60 分間の反応時間で基質としたオリゴ糖よりも分子量の大きな糖の生成が見られた (Fig. 31)。これは、HdAgl により基質間の糖転移反応が起こっていることを示しており、反応様式が既報のα-グルコシダーゼと同様、Retaining であることが推定された。

HdAgl は、マルトースを最もよく分解し、その分解活性を 100%としたとき、3 糖以上の大きさのマルトオリゴ糖の相対活性は 70–100%の範囲にあった (Table 4)。また、HdAgl は、デンプンやグリコーゲンのような多糖基質もよく分解し、その相対活性は、それぞれ 36.5、13.5%であった。一方、合成アリールα-グリコシドのα-*p*NPG やイソマルトースをほとんど分解せず、それらに対する相対活性は、それぞれ 1.6%および 2.7%であった。なお、HdAgl はスクロースやトレハロースを全く分解しなかった。これらの結果から HdAgl は、高等脊椎動物の小腸上皮に見られるマルターゼ様のα-グルコシダーゼと類似の性質を示すことが明らかとなった。

3-3. HdAgl の一次構造

HdAgl の N 末端 19 残基のアミノ酸配列は DSSQXHLKPEHRSDXYPET と決定された (下線で示した 3 アミノ酸残基および 5、15 番目の X は同定が困難であったが、後に示す cDNA 解析により下線部の配列は DSS であること、また X は Cys であることを確認した)。次に、リジルエンドペプチダーゼ消化によって調製した断片の N 末端配列を分析したところ、STNSVLFDASLAPLIFSDQM (P1: 25

kDa の断片)、TADGSAPIVGEVWPGKTVFP (P2: 42 kDa の断片) の 2 つの部分アミノ酸配列が決定された。相同性検索の結果、前者の配列は GHF31 に属するヒトのマルターゼ-グルコアミラーゼ (MGAM) (Nichols et al., 1998; GenBank Accesion no. AAC39568.2) のアミノ酸配列の一部 (231–250 番目のアミノ酸) と 60%の同一性を示し、後者は 65% (480–499 番目のアミノ酸) の同一性を示した。

次に、エゾアワビ肝膵臓の cDNA から PCR によって HdAgl の翻訳領域をコードする cDNA を増幅した。まず、HdAgl の部分アミノ酸配列に基づき Fw1、Rv1 を、また GHF31 保存領域のアミノ酸配列に基づき 31Rv プライマーを合成した (Table 5)。これらのプライマーを用いた PCR により、756 bp の cDNA (Agl-cDNA) を増幅した。次に、この配列に基づき合成した特異プライマー (Table 5) を用いて 3'-RACE および 5'-RACE を行うことにより、3'-末端領域をコードする Agl-3Race-cDNA (1,463 bp) および 5'-末端領域をコードする Agl5Race-cDNA (643 bp) を増幅した。これら Agl-cDNA、Agl3Race-cDNA および Agl5Race-cDNA の塩基配列を重ね合わせることにより、HdAgl の翻訳領域全体 887 アミノ酸残基を含む 2,759 bp の配列を決定した (Fig. 32)。この配列の信頼性は新たに合成した 5'-および 3'-非翻訳領域に相当する特異プライマーFullFw および FullRv (Table 5) を用いて増幅した AglFull-cDNA により確認した。

精製した HdAgl の N 末端アミノ酸配列は、演繹アミノ酸配列の 43–61 番目の配列、すなわち DSSQCHLKGEHRSDCYPET に相当した。また、タンパク質の配列分析で未同定であった残基 X は Cys であることが明らかとなった。従って、成熟体 HdAgl は、845 残基からなると推定され、その分子量は 94,821 と計算された。また、SignalP 3.0 software によれば、25 番目の Gly までがシグナルペプチドであると予測された。従って、それ以降の 17 残基、FGVHGNGTGRVFVKRDQ は、HdAgl の成熟の過程で切除されるプロペプチドであると推定された。なお、

HdAgl-cDNA の 3’-末端領域にはポリアデニレーションシグナル配列 AATAAA および poly(A) tail が見られ、真核生物由来の構造をもつことが確認された。

成熟型 HdAgl の演繹アミノ酸配列は、部分アミノ酸配列で同一性の示されたヒト由来のマルターゼ-グルコアミラーゼ (MGAM) (GenBank accession no. AAC39568.2)、リソソーマル酸性α-グルコシダーゼ (Hoefsloot et al., 1998; GenBank accession no. CAA68763.1) 、スクラーゼ-イソマルターゼ (SIM) (Chantret et al., 1992; GenBank accession no. AAT18166.1)、ウズラのリソソーマル酸性α-グルコシダーゼ I (Kunita et al., 1998; GAA I, GenBank accession no. BAA25884.1) などの GHF31 に属する酵素と 40–46%の同一性を示した。従って、HdAgl も GHF31 に属する酵素であると考えられた。

3-4. HdAgl の発現部位の解析

HdAgl は、リソソームに分泌される GAA と類似した一次構造を示すため、消化液中だけでなくリソソームにも分泌されている可能性が考えられた。そこで RT-PCR により発現部位を解析した。エゾアワビ各組織の mRNA から合成した cDNA を鋳型とし、HdAgl-cDNA の塩基配列に対応させた特異的プライマー (Table 5) を用いて RT-PCR を行った結果、肝膵臓の他に貝殻筋、外套膜にて増幅産物が確認され (Fig. 33)、また、その塩基配列も HdAgl のものと一致していた (data not shown)。なお、コントロールとしてエゾアワビのβ-アクチン特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った結果、全組織の cDNA から増幅産物が得られた。これらの結果は、HdAgl 様の酵素の遺伝子が肝膵臓だけでなく貝殻筋、外套膜においても発現していることを示している。これらの組織で発現しているα-グルコシダーゼ遺伝子は、組織細胞中に貯蔵多糖として含まれるグリコーゲンの代謝酵素として存在するα-グルコシダーゼである可能性が考えられる。

第 4 項　考察

4-1. HdAgl の酵素特性

本章では、エゾアワビの消化液から SDS-PAGE により分子量 97 kDa と見積られるα-グルコシダーゼ HdAgl を精製した。HdAgl の至適温度は 50℃で、至適 pH は 3.8–5.5 であった。また、HdAgl は NaCl 依存性を示さなかった。

HdAgl は、多糖であるデンプンから直接グルコースを遊離したことから、グルコアミラーゼ様の酵素である可能性も考えられる。しかし、マルトオリゴ糖を分解した際には、糖転移反応産物と推定される元の基質よりも大きなオリゴ糖が生成した。糖転移反応は、Retaining mechanism でグリコシド結合を加水分解するα-グルコシダーゼの特性として知られ (Chiba, 1997)、Inverting mechanism で作用するグルコアミラーゼには見られない活性である。このことから、HdAgl はα-グルコシダーゼである可能性が高いと考えられた。

また、HdAgl はマルトースをはじめとするオリゴ糖に対して高い活性を示し、多糖であるデンプンに対してもマルトースと比較して 30%の活性を示した。一方、アリールα-グリコシドであるα-*p*NPG をほとんど分解せず、スクロースやトレハロースを全く分解しなかった。これらの結果は、HdAgl がマルトシド構造を認識して、その構造中のα-グリコシド結合を切断するタイプのα-グルコシダーゼ、すなわちマルターゼであることを示している (Chiba, 1988)。

このような HdAgl の性質は、海産軟体動物で唯一報告例のあるアメフラシ *Aplysia fasciata* のα-グルコシダーゼ (Andreotti et al., 2006) とはかなり異なっていた。すなわち、HdAgl はデンプンやグリコーゲンなどの多糖を分解できるが、アメフラシの酵素はこれらを分解できない。一方、HdAgl はα-*p*NPG を分解しないが、アメフラシの酵素はよく分解した。また、SDS-PAGE によって推定され

た分子量も HdAgl では 97,000 であったが、アメフラシの酵素は 69,000 であった。従って、本研究で単離したアワビの HdAgl はアメフラシのα-グルコシダーゼとは異なる新しいタイプの酵素であると結論された。

4-2. HdAgl の一次構造の特徴

cDNA 法により HdAgl のアミノ酸配列 887 残基が演繹された。HdAgl の演繹アミノ酸配列は、哺乳類や鳥類のマルターゼ-グルコアミラーゼ (MGAM)、リソソーマル酸性α-グルコシダーゼ (GAA)、スクラーゼ-イソマルターゼ (SIM) と 46–40%の同一性を示した。これら酵素は GHF31 に属しており、GHF31 には二つの特徴配列領域 (signature sequence region1: WIDMNE および 2: GADICGXXXXXEELCXRWXQLGAFYPFXRNH, X は保存されていない残基) が存在することが知られている (Frandsen and Svensson, 1998)。HdAgl にも GHF31 特徴配列領域 1 が演繹アミノ酸配列の 476–481 番目に完全に保存されていた。この特徴配列領域 1 中には求核触媒残基 (Asp478) が存在する。また、演繹アミノ酸配列の 604–636 番領域は、ヒトの GAA、MGAM および SIM の特徴配列領域 2 と 70–75%の同一性を示し、酸塩基触媒残基の Asp は、HdAgl では Asp576 として保存されていた。これらの配列上の特徴から、HdAgl は GHF31 に属するα-グルコシダーゼであると結論された。

HdAgl と高い同一性を示した哺乳類や鳥類の MGAM および SIM は、小腸上皮の刷子縁に存在する膜結合タンパク質であり、N 末端には膜結合領域様の構造、すなわち 21 アミノ酸中に 16 残基の疎水アミノ酸を含む領域が存在する (Hunziker et al., 1986; Nichols et al., 1998)。これらの酵素は、デンプンから生じたマルトオリゴ糖や限界デキストリンをグルコースにまで分解する酵素で、デンプン消化における最終ステップを担う (Galand, 1989)。一方、GAA はリソソー

ム酵素の一つであり、リソソーム内腔に分泌され、細胞質からリソソームへ取り込まれたグリコーゲンを分解する (Lejeune et al., 1963 ; Jeffrey et al., 1970)。HdAgl の N 末端には膜結合領域様の構造が見られず、消化液中に分泌されることから、HdAgl は、MGAM や SIM のような膜結合酵素よりもむしろ GAA のような分泌型の酵素であると考えられた。また、MGAM や SIM は二つの触媒ドメインをもつが、HdAgl や GAA は一つの触媒ドメインしかもたない。従って、HdAgl の一次構造は、MGAM や SIM より GAA に類似しているといえる。

以上のように、エゾアワビのα-グルコシダーゼ HdAgl は消化液中でマルトオリゴ糖やデンプンを分解しグルコースを遊離することが明らかとなった。このことは、エゾアワビのα-グルコシダーゼの作用部位が哺乳類のような高等動物と異なることを示している。すなわちヒトの場合、小腸上皮のα-グルコシダーゼ、MGAM および SIM は、唾液腺由来および膵臓由来のα-アミラーゼで生じた限界デキストリンやマルトオリゴ糖を分解し、グルコースを生じる。しかしながら、エゾアワビにおいてα-グルコシダーゼ HdAgl は、消化液にて HdAmy58 および HdAmy82 とともにデンプンからグルコースを生成させると考えられた。

4-3. エゾアワビ各組織における HdAgl 様酵素の発現

HdAgl は、リソソームに分泌される GAA と類似した一次構造を示すため、消化液中だけでなくリソソームにも分泌されている可能性が考えられた。そこで RT-PCR により発現部位を解析した結果、HdAgl 様酵素は、肝膵臓だけでなく貝殻筋、外套膜にも発現していることが示された。この結果より、HdAgl 様酵素が貯蔵多糖のグリコーゲンを代謝する GAA 様酵素として発現している可能性も考えられた。この可能性を検証するには、実際に GAA 様の酵素をアワビ組織から単離し、消化液由来の HdAgl との差異を明らかにする必要がある。予備実験

として、貝殻筋および肝膵臓ホモジェネートのマルトース分解活性の性質を調べた結果、pH 5.0 の条件下で 200 mM の NaCl の添加により活性がそれぞれ約 7 倍および約 2 倍に増大することを見出した。このような NaCl によって活性化される性質は、消化液由来の HdAgl には見られないものであり、HdAgl とは異なるα-グルコシダーゼの存在を示唆している。なお、NaCl による活性化は、数種の動物の GAA で報告されている (Jeffrey et al., 1971; Palmer, 1971; Mehrani and Storey, 1993)。そこで、次章ではエゾアワビ肝膵臓からこの NaCl 依存型α-グルコシダーゼを単離し、基本的性質の解析を行なうこととした。

Table 3. Summary for the purification of HdAgl

Samples	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude[a]	913	256	0.28	1	100
Phenyl[b]	59.3	20	0.33	1.2	7.8
CM[c]	1.66	6.1	3.7	13.3	2.4
Hydroxyl[d]	0.49	2.5	5.1	18.1	1.0
Mono-S[e]	0.08	0.76	9.3	35.4	0.3

[a] Crude enzyme after the dialysis against 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0).

[b] Active fraction obtained by TOYOPEARL Phenyl-650M chromatography.

[c] Active fraction obtained by TOYOPEARL CM-650M chromatography.

[d] Active fraction obtained by hydroxylapatite chromatography.

[e] HdAgl purified by Mono-S chromatography.

Table 4. Substrate specifity of HdAgl

Substrates	Relatve Activity (%)
Maltose*[1]	100
Maltotriose	99.9
Maltotetraose	75.6
Maltopentaose	74.1
Maltohexose	73.5
Isomaltose*[2]	2.7
α-*p*NPG	1.6
Trehalose*[3]	0
Sucrose	0
Starch	36.5
Glycogen	13.5

*[1-3] One unit of α-glucosidase was defined as the amount of enzyme that released 2.0 μmol glucose per min since one split of maltose produces two glucoses. Relative activity 100% corresponded to 25.7 U/mg.

Table 5. DNA primers used for the amplification of HdAgl cDNAs and RT-PCR

Names	Sequences[a]
Fw1[b]	5’-CCNYTNATHTTYWSNGAYCA-3’
Rv1[b]	5’-GTYTTNCCNGGCCANACYTC-3’
31Rv[b]	5’-TCRTTCATRTCDATCCANA-3’
3raceF1[b]	5’-GTCCCGTGACAATTCGCTACC -3’
3raceF2[b]	5’-CATGGTCAATGAGATGGACTGG -3’
3raceF3[b]	5’-GGATCTGCTCCTATAGTTGGGG -3’
5raceRT[b]	5’-GTAGAGCATTGCTG-3’
5raceF1[b]	5’-ACACGAATATGTACGGCAGC -3’
5raceF2[b]	5’-GGTCGGAATAGAACCAAACGG -3’
5raceR1[b]	5’-CGTACAAGTTGGTAGTTGGC -3’
5raceR2[b]	5’-CACTGAGATCTGTAGCATGTGG -3’
FullFw[b]	5’-ACTCCAAGCAACTCCACACC -3’
FullRv[b c]	5’-CTACCAAGTCATAACGAACGGC-3’
Fw2[c]	5’-GACTCGCTGCTCATAAGTCC-3’
HdActinF[c]	5’-GGAATCTGCTGGTATCCATG-3’
HdActinR[c]	5’-TTGATCGATATGACAGCCAGC-3’

[a] D = A/G/T; H = A/C/T; N = A/C/G/T; R = A/G; S = C/G; W = A/T; Y = C/T.

[b] These primers were used for the amplification of HdAgl cDNAs.

[c] These primers were used for the analysis of tissue-specific expression by RT-PCR.

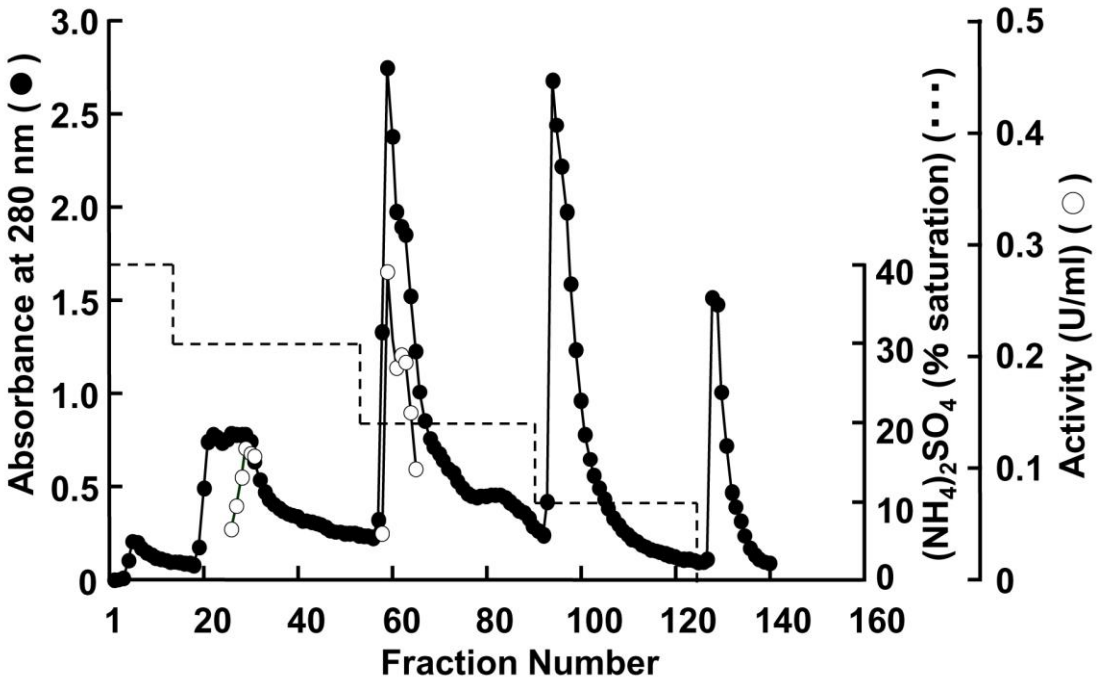


Fig. 22. Purification of an α-glucosidase from the digestive fluid of abalone by TOYOPEARL Phenyl-650M column chromatography. The proteins precipitated between 0 and 60% saturation of ammonium sulfate were applied to a column of TOYOPEARL Phenyl-650M (2.5×19.0 cm). Proteins absorbed to the column were eluted by a stepwise elution with different concentrations $(NH_4)_2SO_4$.

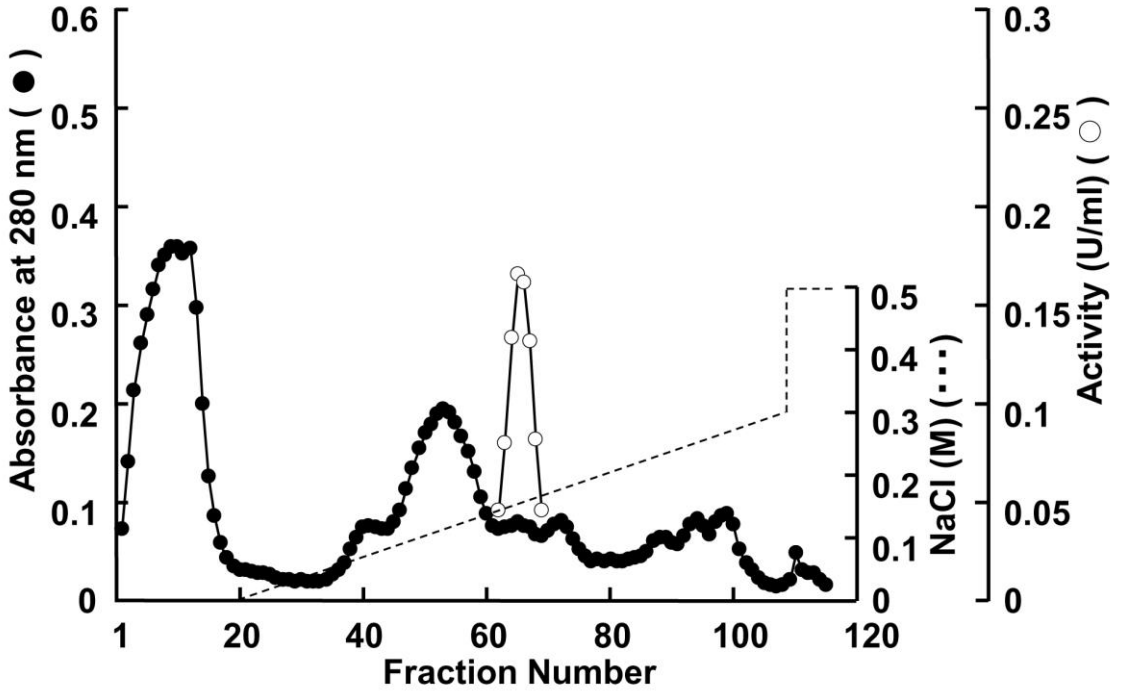


Fig. 23. Purification of the α-glucosidase from abalone by TOYOPEARL CM-650M column chromatography. The α-glucosidase fraction obtained by TOYOPEARL Phenyl-650M column chromatography was applied to a column of TOYOPEARL CM-650M (2.5×23.3 cm). Proteins absorbed to the column were eluted by a linear gradient of 0–0.3 M NaCl followed by 0.5 M NaCl.

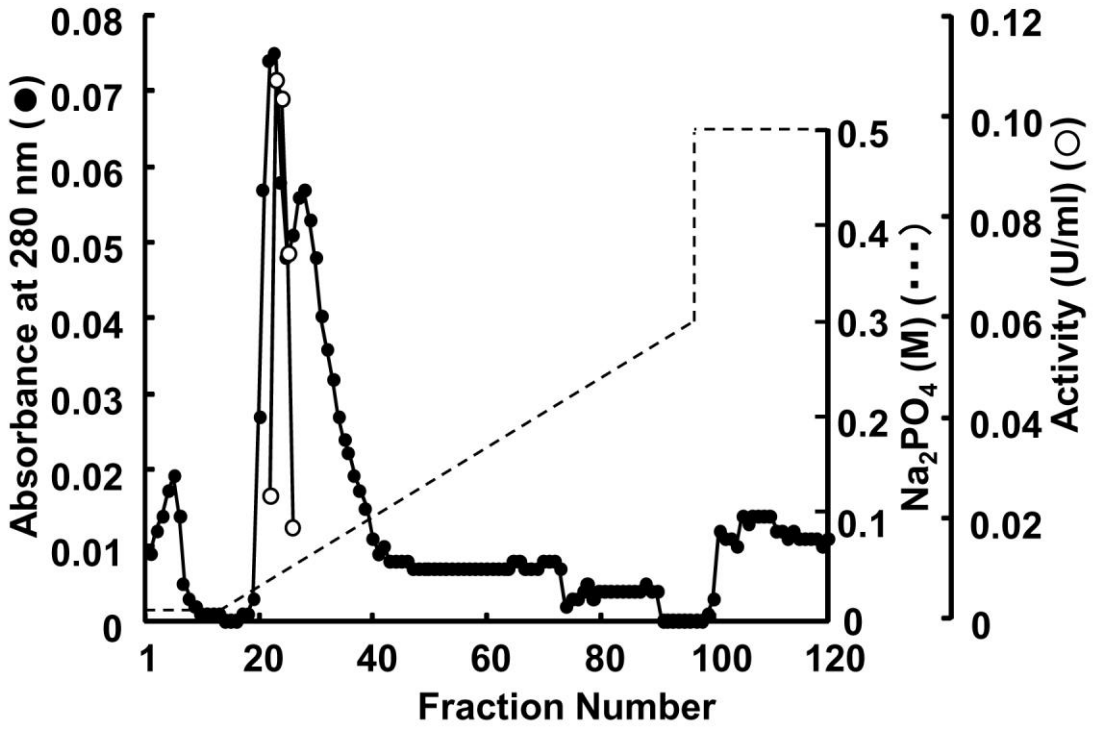


Fig. 24. Purification of the α-glucosidase from abalone by hydroxylapatite column chromatography. The α-glucosidase fraction obtained by TOYOPEARL CM-650M column chromatography was applied to a column hydroxylapatite (1.2×16.5 cm). Proteins absorbed to the column were eluted by a linear gradient of 0.01–0.3 M Na_2PO_4 followed by 0.5 M Na_2PO_4.

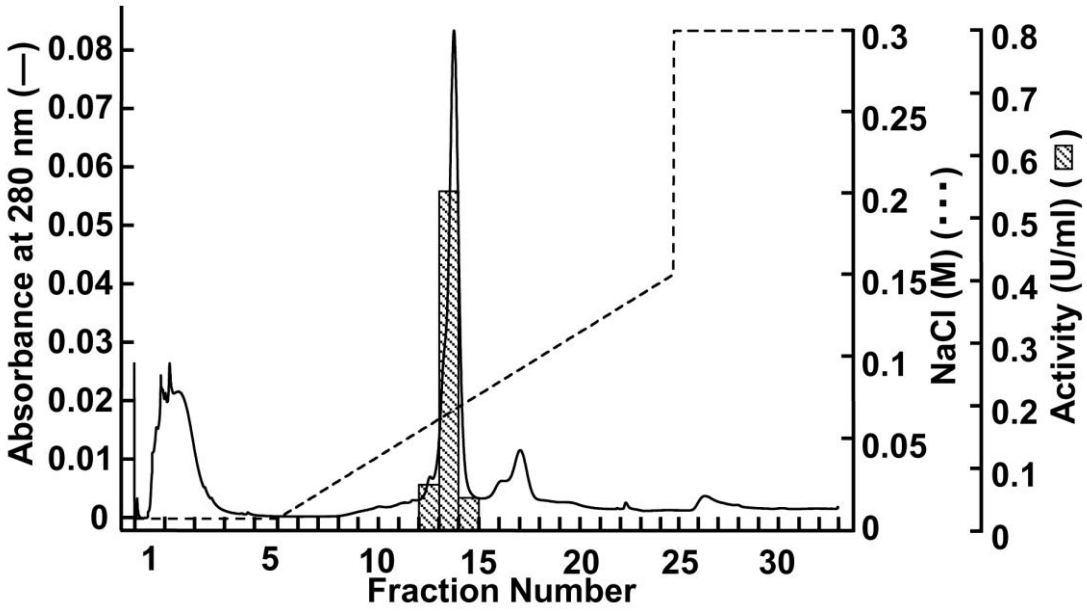


Fig. 25. Purification of the α-glucosidase from abalone by Mono-S 5/50GL column chromatography. The α-glucosidase fraction obtained by hydroxylapatite column chromatography was applied to a column of Mono-S 5/50GL. Proteins absorbed to the column were eluted by a 0–0.15 M NaCl linear gradient followed by 0.3 M NaCl.

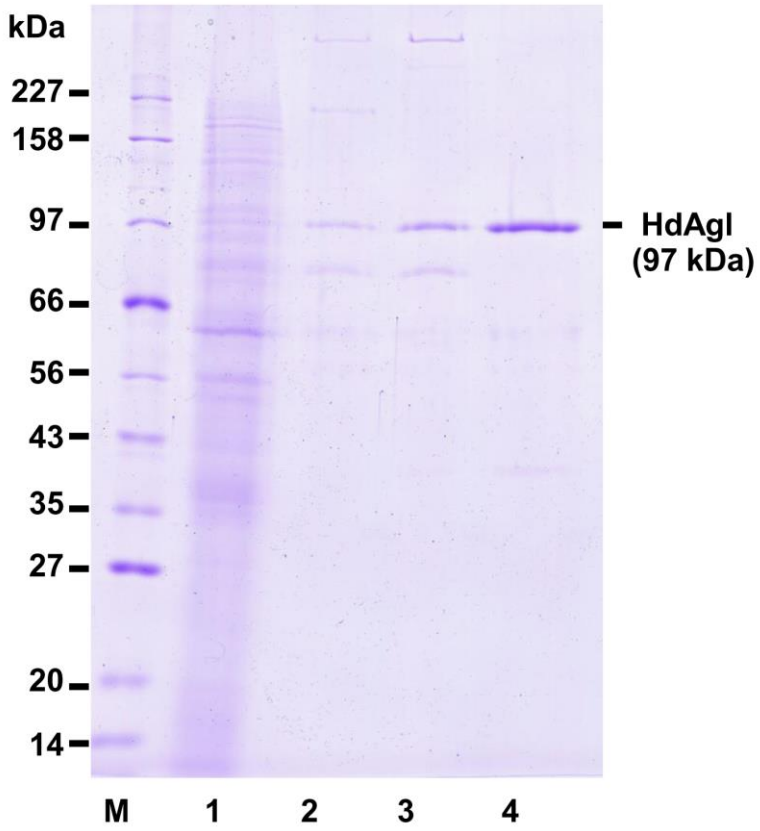


Fig. 26. Monitoring of purification of the α-glucosidase from the digestive fluid of abalone by SDS-PAGE. M, marker proteins; lanes 1-4, active fractions obtained by TOYOPEARL Phenyl-650M chromatography, TOYOPEARL CM-650M chromatography, hydroxylapatite chromatography, and Mono-S 5/50GL chromatography (HdAgl), respectively.

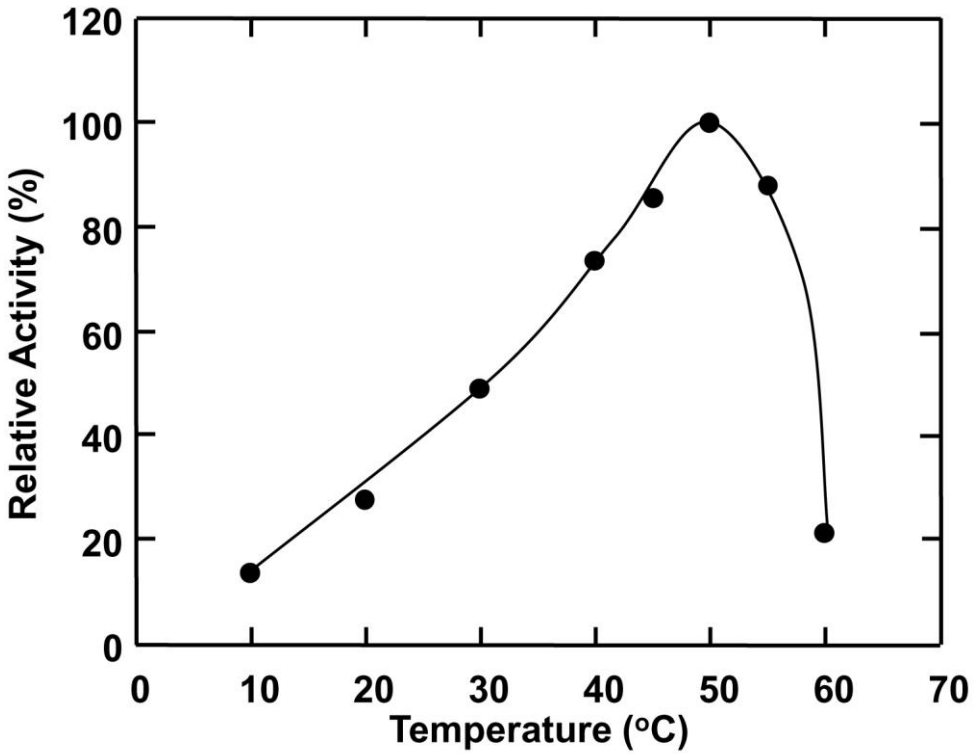


Fig. 27. Temperature dependence of HdAgl. Temperature dependence of HdAgl was examined at 10–60^{o}C in a reaction mixture containing 5 mg/ml maltose and 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0).

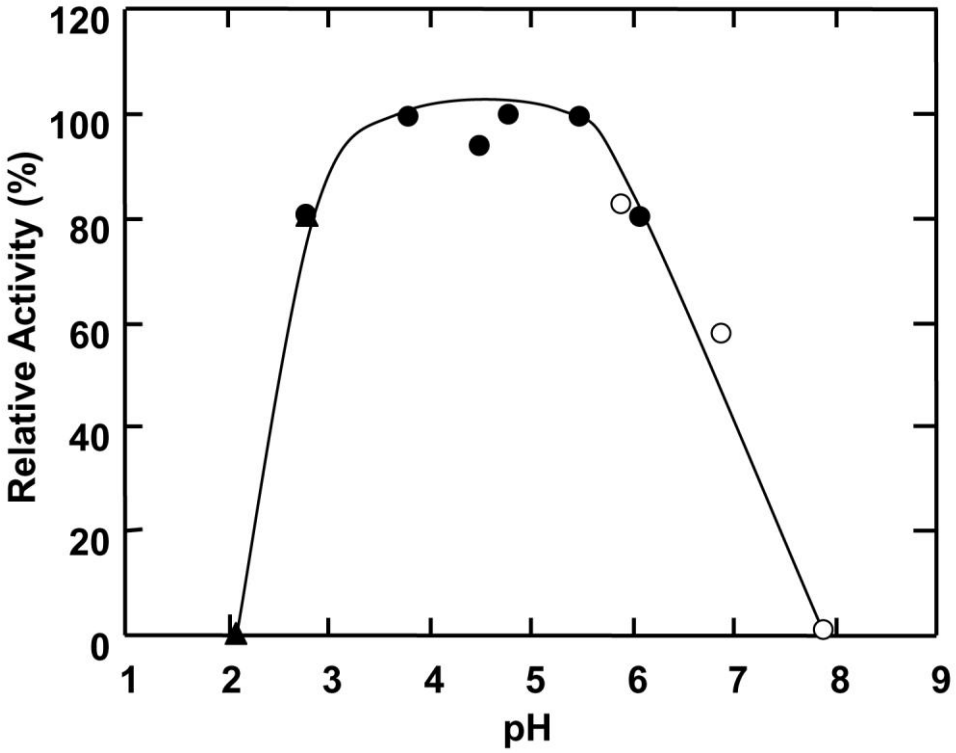


Fig. 28. pH dependence of HdAgl. pH dependence of HdAgl was examined at 30°C in the following reaction mixtures adjusted to pH 2.0–2.9 with 10 mM glycine-HCl buffer (▲), pH 2.9–6.0 with 10 mM sodium citrate buffer (●), and pH 6.0–8.0 with 10 mM sodium phosphate buffer (○).

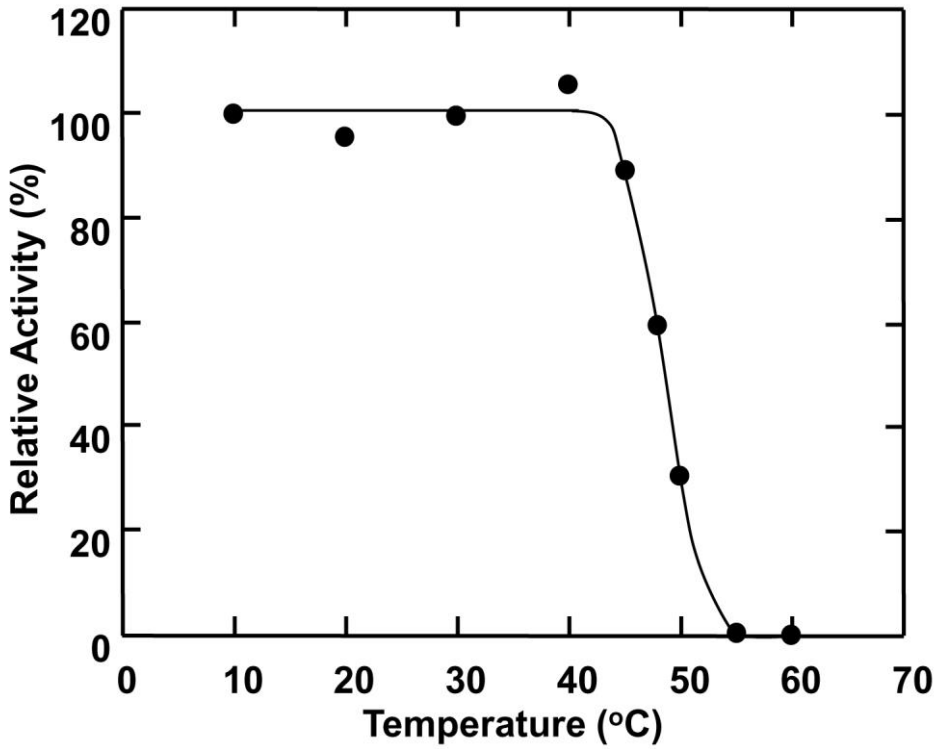


Fig. 29. Thermostability of HdAgl. Thermostability of HdAgl was examined by measuring the activity remaining after heat treatment at 10–60^{o}C for 30 min.

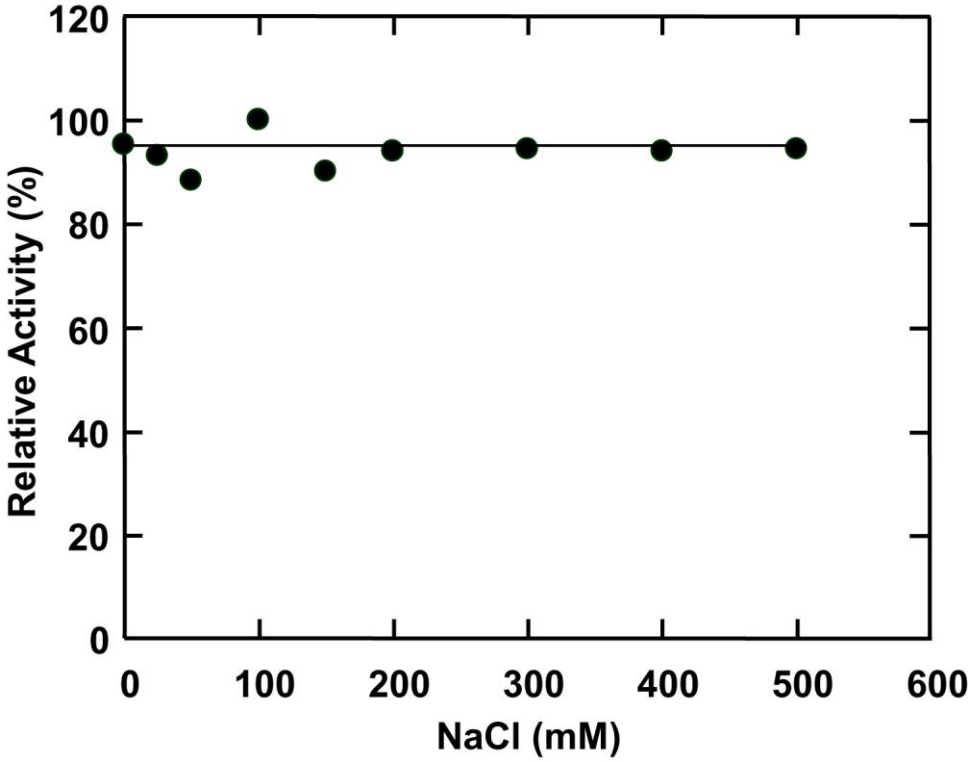


Fig. 30. NaCl dependence of HdAgl. NaCl dependence of HdAgl was examined with reaction mixtures containing 5 mg/ml maltose, 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0), and 0–500 mM NaCl.

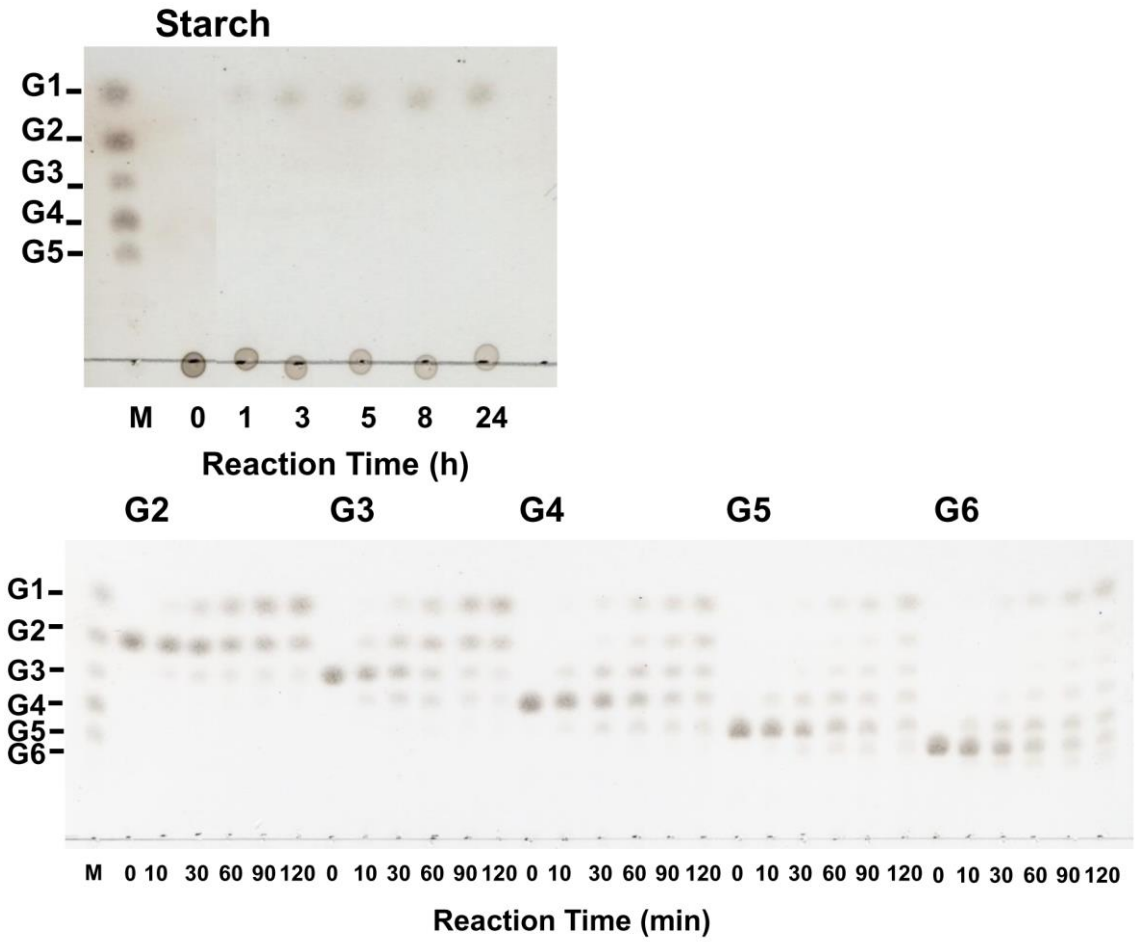


Fig. 31. TLC for the degradation products of starch and maltooligosaccharides produced by HdAgl. Two mg/mL starch and 5 mg/mL maltooligosaccharides in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) were degraded with 0.1 U/mL HdAgl at 30^{o}C. The reaction was terminated at appropriate times by heating at 100^{o}C for 3 min and 1 μL of the reaction mixture was applied to TLC plate. M, marker sugers comprising G1–G6. G1, glucose; G2–G6, maltose to maltohexaose.

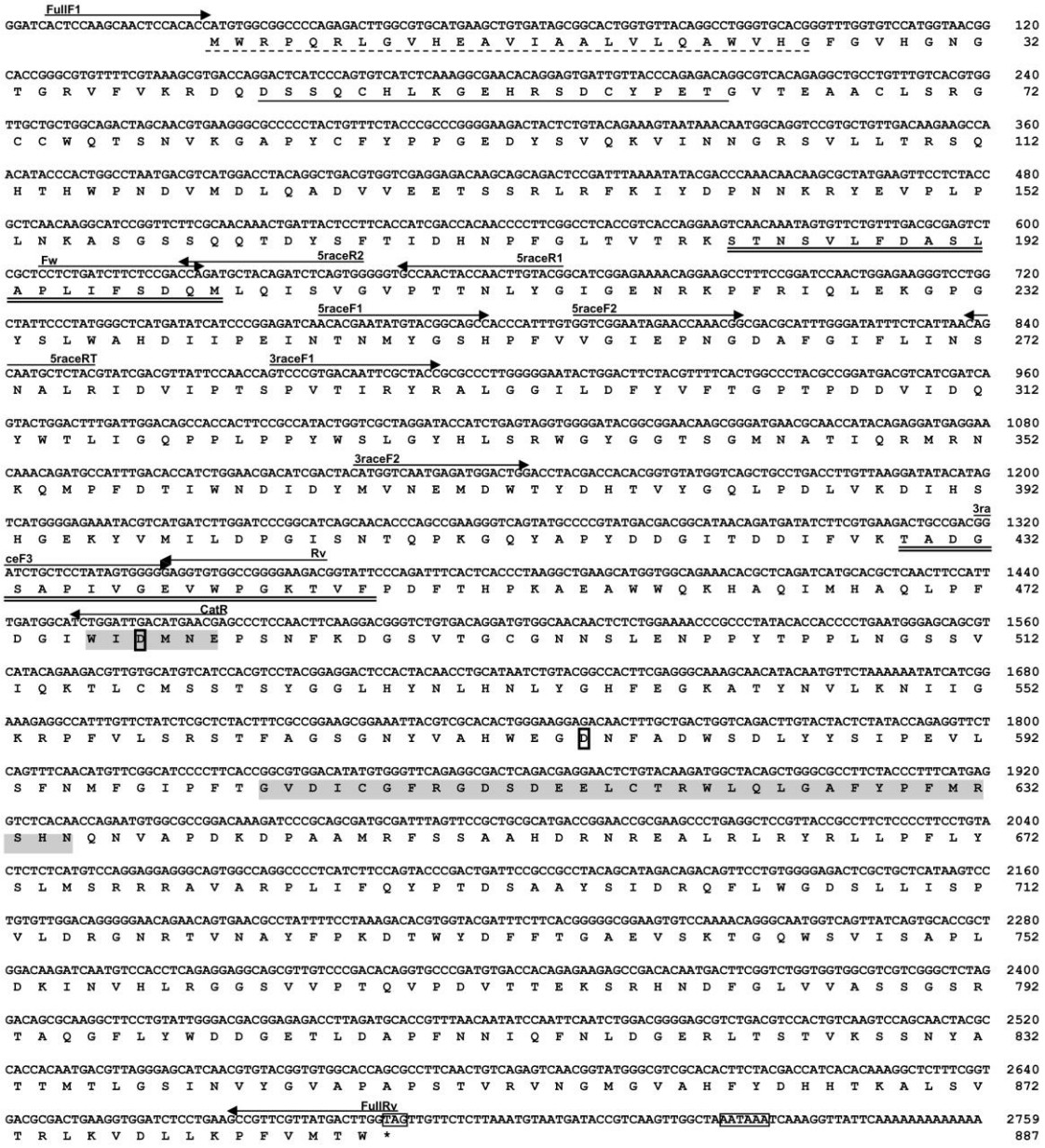


Fig. 32. Nucleotide and deduced amino-acid sequences of cDNA encoding HdAgl. The translational initiation codon ATG, the termination codon TAG and the putative polyadenylation signal AATAAA are boxed. The putative signal peptide for secretion is indicated by a dotted underline. The amino-acid sequences determined with intact HdAgl (N-terminus) and peptide fragments obtained by lysylendopeptidase digestion are indicated by the underline and the double underline, respectively. The catalytic amino acid residues in GHF31 are marked with bold letters and boxes. The signature sequences of GHF31 are shaded. The annealing sites of PCR primers (see Table 5) are indicated by arrows above the nucleotide sequence.

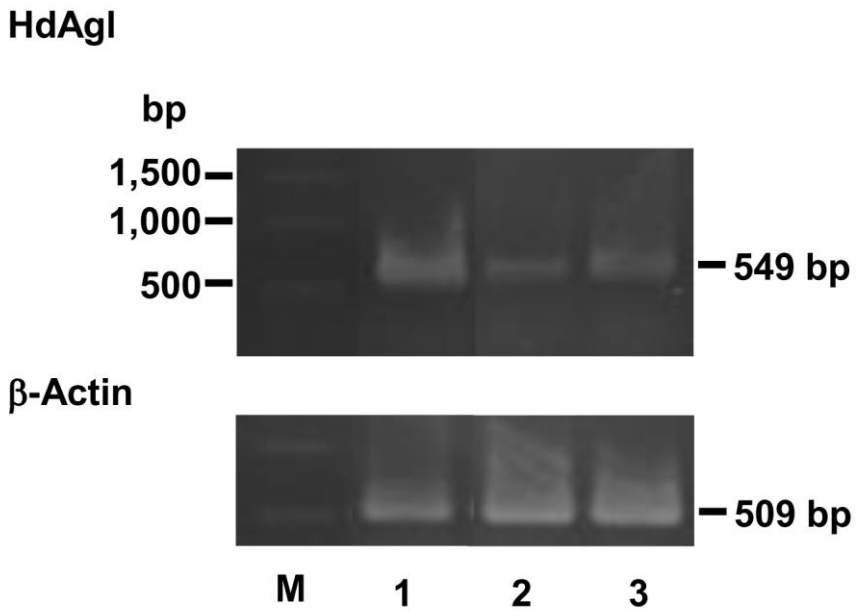


Fig. 33. Tissue-specific expression of HdAgl mRNA analyzed by RT-PCR. M, marker DNA; lane 1, hepatopancreas; lane 2, shell mucsle; lane 3, mantle. Expression of β-actin mRNA was also analyzed as a control gene expression.

第 3 章　エゾアワビ肝膵臓からのα-グルコシダーゼの精製と酵素化学的性質

第1項　目的

第 2 章でエゾアワビの消化液から単離したα-グルコシダーゼ HdAgl は、第 1 章で単離した 2 種類のα-アミラーゼ HdAmy82 および HdAmy58 とともに消化液中でデンプンを分解し、グルコースを生成すると考えられた。一方、アワビ肝膵臓ホモジェネート中には、HdAgl と異なる NaCl 依存型α-グルコシダーゼの存在が示された。そこで、本章ではエゾアワビの肝膵臓からこの酵素を単離し、その基本的性質を解析し HdAgl との差異を明らかにすることとした。

第2項　実験材料および方法

下記方法以外は第 1 章第 2 項に準ずる。

2-1. アワビ肝膵臓粗酵素の調製法

エゾアワビ 10 個から得た肝膵臓に 2 倍量の 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) を加え、はさみで細切した後にポッター型ホモジナイザーを用いて 800 rpm でペッスルを上下させながら氷冷下で 30 秒間ホモジナイズした。1 分間の静置の後この操作をさらに 4 回繰り返した後、得られたホモジェネートを 40,000×g で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。沈殿には、等量の 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) を加え再度上記のホモジナイズを行い、40,000×g で 10 分間遠心分離し、その上清を回収した。この上清を一回目の遠心分離の上清と合一した後、100,000×g で 30 分間遠心分離した。得られた上清を 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) に透析し、これをアワビ肝膵臓粗酵素とした。

2-2. α-グルコシダーゼ活性の測定法

α-グルコシダーゼ活性は、5 mg/ml マルトース、10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0)、200 mM NaCl を含む基質溶液を用いて以下の通り測定した。すなわち、基質溶液 475 µl を 37℃で 5 分間プレインキュベートした後、25 µl の酵素液を加えることにより反応を開始し、100℃で 3 分間加熱することにより反応を停止した。マルトースの分解によって生じたグルコースの濃度は、グルコース CII-テストワコーを用いて測定し、α-グルコシダーゼ活性の 1 unit は、1 mol のマルトースの分解により 2 mol の濃度のグルコースが生じるので、1 分間に 2 µmol のグルコースを遊離する酵素量と定義した。

酵素活性の温度依存性は上記の反応混液を用いて 10–70℃で測定した。pH 依存性は、200 mM NaCl の存在下で pH 2.5–6.0 の間では 10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0–8.0 の間では 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液を用いて 37℃で測定した。熱安定性は、10 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.0) に溶解した酵素を、10–70℃で 30 分間プレインキュベートした後の残存活性を pH 4.0、37℃で測定することにより評価した。酵素の pH 安定性は、200 mM NaCl の存在下で pH 2.5–6.0 の間では 10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0–7.7 の間では 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.7–8.6 の間では 10 mM Tris-HCl 緩衝液中で、20℃で 3 時間プレインキュベートした後の残存活性を、pH 4.0、37℃で測定することにより評価した。

マルトース、デンプンおよびグリコーゲンに対するα-グルコシダーゼの反応速度パラメータは、それぞれの基質を含む 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0)、200 mM KCl の基質溶液を用いて測定した。マルトース分解活性は 1–50 mM のマルトース、マルトトリオース分解活性は 0.5–20 mM のマルトトリオース、マルトテトラオース分解活性は 0.25–20 mM のマルトテトラオース、マルトペン

タオース分解活性は 0.25–40 mM のマルトペンタオース、デンプン分解活性は 0.3–7.5 mg/ml の水溶性デンプン、グリコーゲン分解活性は 1.5–40 mg/ml のグリコーゲンを用いて測定し、得られたデータは Origin 7.0 software (ライトストーン, Tokyo) を用いて解析した。

2-3. アミノ酸配列の解析法

酵素の N 末端アミノ酸配列は、SDS-PAGE 後に PVDF 膜に転写した試料を用いて ABI Procise 492 sequencer により分析した。内部領域のアミノ酸配列は、SDS-PAGE 後にトリプシンもしくはリジルエンドペプチダーゼを用いたゲル内消化で得たペプチド断片を 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems) に供し、MS/MS 法により解析した。

2-4. cDNA クローニング

肝膵臓由来α-グルコシダーゼの cDNA は、部分アミノ酸配列に基づき合成した DNA プライマーを用いて PCR により増幅した。その他の基本操作は、第 1 章に示した通りである。

第3項　結果

3-1. エゾアワビ肝膵臓からのα-グルコシダーゼ HdAglhp の精製

エゾアワビ肝膵臓粗酵素を硫安分画し、40–70%飽和硫安画分を集めた。この画分を 10 mM MOPS-NaOH (pH 6.8) に透析し、同溶液で平衡化した TOYOPEARL DEAE-650M カラム (2.6×16.0 cm) に供した。吸着したタンパク質は 0–0.3 M NaCl の直線濃度勾配により溶出した。その結果、α-グルコシダーゼ活性はフラクション 33–46 に検出された (Fig. 34)。各フラクションを SDS-PAGE

により分析したところ、フラクション 33–38 に比較的純度の高い酵素タンパク質が溶出していた。これらを回収し、1 mM リン酸ナトリウム (pH 6.8) に透析した。これを凍結乾燥した後、3 ml の 0.3 M NaCl に溶解し、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8)、0.3 M NaCl で平衡化した Sephacryl S-200 カラム (2.0×90.0 cm) に供した。その結果、活性画分はフラクション 53–69 に検出された (Fig. 35)。SDS-PAGE によれば活性画分には、単一成分として約 100 kDa と 20 kDa のタンパク質成分が含まれており、両者の比が溶出画分に関わらずほぼ同一であることからサブユニットからなる複合体を形成している可能性が示された (Fig. 36)。なお、多くのタンパク質はフラクション番号 20–40 に溶出しているが、活性画分はそれらに比べて著しく遅延して溶出している。このような遅延溶出は、哺乳類の酸性α-グルコシダーゼのゲルろ過でも観察されており (Nakasone et al., 1991)、その原因が酵素とゲル濾過担体のデキストランとの相互作用によるものとされている。したがって、エゾアワビの肝膵臓α-グルコシダーゼもデキストランとの相互作用能があると推定される。そこで、遅延溶出し精製された活性画分を合一し、VIVASPIN20 を用いて 3 ml にまで濃縮した。本研究では、この濃縮物を肝膵臓α-グルコシダーゼ (HdAglhp) とし、酵素特性の解析に用いることとした。HdAglhp は最終的に 327 倍まで精製され、収率は 13.9%であった (Table 6)。

3-2. HdAglhp の酵素化学的性質

HdAglhp の至適温度は 45℃であり、30 分間のインキュベートにより活性が半減する温度は 55℃であった (Fig. 37 and 38)。至適 pH は 3.9 で、pH 6.0 以上では活性を示さなかった (Fig. 39)。一方、pH 4.1–7.7 において 20℃で 3 時間インキュベートしても、85%の活性が残存した (Fig. 40)。また、100 mM NaCl の添加で

活性は 116 倍に増大した (Fig. 41)。これらの性質を消化液由来の酵素である HdAgl のものと比較すると、至適温度は同様であるが、pH 依存性および NaCl 依存性が大きく異なっていた。すなわち、HdAgl の至適 pH は 3.8–5.5 で pH 6.0 以上でも活性を示し、活性に NaCl を必要としなかった。特に、NaCl の要求性については HdAglhp を特徴づける性質と思われた。そこで、本酵素の塩濃度依存性についてさらに詳細に検討することとした。

塩による酵素の活性化は、陽イオン、陰イオンもしくはイオン強度のいずれかによって生じると考えられる。そこで、まず様々な塩を反応混液に 10 mM になるように添加した際の HdAglhp の活性化の程度を調べた。その結果、活性化の程度は、塩化物塩においては $K^+ > NH_4^+ > Na^+ = Cs^+ = Ca^{2+} > Mg^{2+} > Li^+$の順に大きく、ナトリウム塩においては $Cl^- > Br^- > I^-$の順に大きかった (Fig. 42)。これらのうち一価の陽イオンからなる塩は同じ濃度であればイオン強度も同じであるが、活性は異なっていた。従って、HdAglhp の活性化は、イオン強度の増大によるものではなく、陽イオンもしくは陰イオンの濃度の増大によって生じたと考えられた。

3-3. HdAglhp の基質分解産物

HdAglhp をデンプンおよびグリコーゲンに作用させると、マルトオリゴ糖を生じずにグルコースを生じた (Fig. 43)。また、マルトオリゴ糖に作用させると、もとの基質よりグルコース 1 残基分小さいオリゴ糖とグルコースが生じた (Fig. 43)。これらの結果より、HdAglhp は、HdAgl と同様に基質末端のグルコース残基を遊離する酵素であると考えられた。また、全てのオリゴ糖基質の反応産物において、基質としたオリゴ糖よりも重合度の大きい糖の生成が見られた。これは HdAglhp による糖転移反応産物であると推定される。これら HdAglhp の基

質分解産物の特性は、基本的に HdAgl のものと同様であった。

3-4. HdAglhp の基質特異性と反応速度パラメータ

HdAglhp の基質特異性は、マルトオリゴ糖、デンプン、グリコーゲン、スクロース、イソマルトース、トレハロースおよびα-*p*NPG を基質に用いて検討した。それらの基質の分解活性は、マルトース分解活性を 100%とした際の相対活性で表わし、HdAgl のものと比較した (Table 7)。その結果、HdAglhp の 3 糖および 4 糖に対する分解活性は、マルトースに対する活性のそれぞれ 135%および 159%となり、それ以上の重合度のオリゴ糖では減少し 6 糖では 46%となった。一方、HdAgl のマルトオリゴ糖に対する分解活性は 3 糖で 99%であり、それ以上の重合度のオリゴ糖で 73–75%に低下した。また HdAglhp のデンプンおよびグリコーゲンに対する分解活性は、それぞれ 78%および 100%であり、HdAgl の 37%および 14%とは著しく異なっていた。

そこで、HdAglhp および HdAgl の基質に対する酵素活性の違いの原因を明らかにするために、HdAghp および HdAgl のマルトオリゴ糖およびデンプン、グリコーゲン解活性の反応速度パラメータを解析した。その結果、HdAglhp のマルトオリゴ糖 (マルトース–マルトペンタオース) に対する K_m 値は 9.79–25.2 mM であり、HdAgl の K_m 値、0.698–2.93 mM と比較して高いことが明らかになった (Table 8)。一方、HdAglhp のデンプンおよびグリコーゲンに対する K_m 値は、それぞれ 0.802 および 4.14 mg/ml を示し、HdAgl の K_m 値、3.00 および 20.6 と比較して低かった。また、HdAglhp の触媒定数 (k_{cat}) はデンプン以外の基質で 275–438 s^{-1} で HdAgl の 2.5 倍以上の値を示した。さらに、HdAglhp のマルトオリゴ糖に対する触媒効率 (k_{cat}/K_m) は、13.3–45.5 $mM^{-1}\cdot s^{-1}$ であり、HdAgl の触媒効率 81.8–138 $mM^{-1}\cdot s^{-1}$ と比較して低かった。一方、HdAglhp のデンプンおよびグリコ

ーゲンに対する触媒効率は、それぞれ 115 および 67.9 ml/mg･s^{-1} であり、HdAgl の 21.2 および 3.31 ml/mg･s^{-1} と比較して高かった。これらの結果から、HdAglhp は、HdAgl と比較してデンプンやグリコーゲンに対する親和性および触媒効率が高く、逆にマルトオリゴ糖に対して親和性および触媒効率が低いことが明らかとなった。従って、HdAglhp と HdAgl の間で見られた基質特異性の違いの原因は、オリゴ糖基質とポリマー基質に対する反応性の違いによるものであることが強く示唆された。

なお、HdAglhp のα-*p*NPG およびイソマルトースに対する分解活性は、マルトース分解活性の 1.7%および 0.7%であった (Table 7)。また、スクロースおよびトレハロースは全く分解しなかった。これらの結果から、HdAglhp は HdAgl と同様、合成アリールグリコシドやα-1,4 グリコシド結合以外のオリゴ糖基質を分解しないマルターゼ様の酵素であると考えられた。

3-5. HdAglhp の一次構造

HdAglhp の N 末端 18 残基のアミノ酸配列は、プロテインシーケンサーにより SYQEFDIKLARNPFGII と決定された。一方、ゲル内消化によって得られたペプチド断片のうち 5 つの断片について質量分析器によって配列を解析した (Fig. 44)。それらのうち L-3 および T-2 の配列は、MPYDVQWND(L/I)DYMK および WMQVGAFYPFMR と同定され、それらは HdAgl の演繹アミノ酸配列の 355–368 番目および 630–641 番目とそれぞれ 71%および 67%の同一性を示すことが明らかとなった。また、L-2 の配列は、YGYNNAEE(L/I)K と同定され、HdAgl の演繹アミノ酸配列の 335–344 番目と 20%、ヒト由来スクラーゼ-イソマルターゼの 1231–1240 番目のアミノ酸配列と 60%の同一性を示した。なお、L-1 の配列は、SYQEFD(L/I)K と同定され、プロテインシーケンサーにより解析した N 末端ア

ミノ酸配列と一致した。T-1 の配列は MVFWNR と同定されたが、明らかな相同性を示すタンパク質は見つからなかった。

次に、これらの部分アミノ酸配列に基づき合成した縮重プライマー (Table 9) を用いた PCR、3'-RACE および 5'-RACE により、HdAglhp をコードする cDNA 断片を増幅した。それらの断片の塩基配列を重ね合わせることにより、HdAglhp の 933 アミノ酸残基の翻訳領域全体をコードする 3,124 bp の塩基配列が決定された (Fig. 45)。この HdAglhp の演繹アミノ酸配列は HdAgl のものと 46%の同一性を示した (Fig. 46)。

精製した HdAglhp の N 末端アミノ酸配列 (SYQEFDIKLARNPFGII) は、演繹アミノ酸配列の 202–219 番目の配列と一致した。このことから、演繹アミノ酸配列の N 末端から 201 番目までのアミノ酸領域は、HdAglhp の成熟の過程で除去されると考えられた。一方、精製した HdAglhp の SDS-PAGE を詳細に解析した結果、約 100 kDa の主たるバンドの他に約 20 kDa の副バンドの存在が示された (Fig. 36)。この副バンドの N 末端アミノ酸配列および内部領域のアミノ酸配列をプロテインシーケンサーおよび質量分析器により解析したところ、SSQXDISKGSDR 、 SDCWPEYR 、 GCCWSPGVEQGAPYCYYPR および TSTGV(L/I)GH(L/I)ER という配列が明らかとなった (Fig. 47)。それらは、それぞれ演繹アミノ酸配列の 78–89 番目、90–97 番目、108–126 番目および 140–150 番目と一致した。これらの結果から、約 20 kDa の副バンドは、HdAglhp の演繹アミノ酸の N 末端に相当するタンパク質断片であると推定された。従って、この断片は HdAglhp の翻訳後、成熟する過程においてプロテアーゼ分解によって生じたと考えられた。また、この断片は精製した HdAglhp に含まれており、Native PAGE において HdAglhp が単一のバンドを示すことから、成熟型の HdAglhp は、100 kDa および 20 kDa のポリペプチドで複合体を形成している可能性が示され

た。すなわち、成熟型の HdAglhp は、少なくとも 78–150 番目のアミノ酸領域を含む 20 kDa の断片と 202–933 番目のアミノ酸残基領域を含む 100 kDa の断片から構成されると考えられた。なお、HdAglhp の 100 kDa 断片のアミノ酸配列は、HdAgl のアミノ酸配列と相当する領域と 50%の同一性を示した。また、哺乳類のα-グルコシダーゼとは 44–50%の同一性を示した。

SignalP 3.0 software によれば、HdAglhp の演繹アミノ酸配列には、シグナルペプチドの存在が予測されなかった。一方、SOSUI (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/) によれば、演繹アミノ酸配列の 27–49 番目は膜結合領域であると推定された。しかしながら、この領域は成熟型 HdAglhp では除去されている。従って、HdAglhp の初期翻訳産物は膜結合領域をもつが、成熟の過程でその領域が切断されると考えられた。

第 4 項　考察

4-1. HdAglhp の酵素特性

本章では、エゾアワビの肝膵臓から SDS-PAGE により約 100 kDa と見積られるα-グルコシダーゼ HdAglhp を精製した。HdAglhp の至適温度は 45℃で、消化液から単離した HdAgl と同様であった。一方、HdAglhp の pH 依存性は HdAgl のものと異なっていた。すなわち、HdAglhp は pH 3.9 で最大活性を示し、pH 6.0 以上では活性を示さなかったが、HdAgl は pH 3.8–5.5 で最大活性を示し、pH 7.7 においても活性を示した。さらに、HdAglhp は 20℃、3 時間のインキュベート後においても pH 4.1–7.7 で 85%以上の残存活性を示し、HdAgl と同程度に安定であった。これらの結果から、HdAglhp は中性よりも pH 6.0 以下の酸性条件で活性を示す酵素であることが明らかである。一般に、リソソームに局在する酵素の多くは酸性条件に至適 pH を示す。哺乳類などの脊椎動物のリソソーム由来

のα-グルコシダーゼも酸性で至適 pH を示すことが知られている (Lejeune et al., 1963)。このことから、HdAglhp もリソソーム由来の酵素である可能性が考えられた。

HdAglhp の活性の発現には塩の存在が必要であった。この性質は消化液由来の HdAgl のものと明らかに異なっていた。HdAglhp は、10 mM の濃度では KCl を添加したとき最も高い活性を示した。また、HdAglhp の塩による活性化は、陰イオンおよび陽イオン共に影響を与えることが示された。このような塩の添加によるα-グルコシダーゼの活性化は、ネズミ肝臓由来の GAA (Jeffrey et al., 1971) 、ウサギ筋肉由来の GAA (Palmer, 1971) およびニジマス肝臓由来の GAA (Mehrani and Storey, 1993)で報告されており、これら動物の GAA は、Na^+や K^+など陽イオンによって活性化するといわれている。α-アミラーゼの場合には、塩化物イオンが活性化に必要であり、そのイオン結合残基も明らかにされているが、α-グルコシダーゼにおける陽イオンの結合部位は未だわかっていない。

HdAglhp は、デンプン、グリコーゲンおよびマルトオリゴ糖の糖鎖末端のグリコシド結合を分解しグルコースを生じた。また、マルトオリゴ糖を分解した際には、糖転移反応産物と推定される元の基質よりも大きなオリゴ糖を生じた。また、HdAglhp は、アリールα-グリコシドであるα-*p*NPG やイソマルトースをほとんど分解せず、スクロースやトレハロースを全く分解しなかった。これらの性質は、HdAglhp がマルターゼ様の酵素であることを示しており、HdAglhp は基本的に HdAgl と同様の特性をもつ酵素であることが明らかとなった。

一方、HdAghp のマルトオリゴ糖、デンプンおよびグリコーゲンに対する基質親和性および触媒効率は、HdAgl のものと異なっていた。すなわち、HdAglhp のグリコーゲンやデンプンに対する基質親和性および触媒効率は HdAgl のものよりも高く、マルトオリゴ糖に対しては逆に低かった (Table 8)。これらの結果

から、HdAglhp は、HdAgl に比べ多糖基質であるデンプンやグリコーゲンをオリゴ糖基質よりもよく分解することが明らかとなった。すでに述べたようにHdAglhp は pH 6.0 以下の酸性条件で活性を示すが、細胞内では pH 6.0 以下の環境はリソソーム中に存在する。また、グリコーゲンは細胞内の貯蔵多糖であり、その分解経路として細胞質での加リン酸分解とリソソームに取り込まれた後の加水分解が知られている。これらを考え合わせると、HdAglhp はリソソーム中でのグリコーゲンの加水分解に関与すると推定される。

4-2. HdAglhp の一次構造上の特徴

精製した HdAglhp は、SDS-PAGE において 100 kDa と 20 kDa のバンドを示した。cDNA 法により HdAglhp の一次構造を解析した結果、933 残基からなるアミノ酸配列が演繹された。このアミノ酸配列は、C 末端側に 100 kDa および N 端側に 20 kDa の断片の配列を含んでいた。HdAglhp の 100 kDa の断片の演繹アミノ酸配列は、HdAgl のものと 50%の同一性を示し、哺乳類の GAA および MGAM、SIM のものと 44–50%の同一性を示した。また、HdAglhp の演繹アミノ酸配列には HdAgl と同様、二つの GHF31 特徴配列領域が保存されており、GHF31 に属する酵素であると考えられた。すなわち、求核触媒残基 (Asp519) を含む特徴配列領域 1 は HdAgl の領域 1 と 83%のアミノ酸同一率を示し、特徴配列領域 2 である 645–677 番目の演繹アミノ酸配列は、ヒトの GAA および MGAM、SIM と 60–70%の同一率を示した。さらに、酸塩基触媒残基の Asp も HdAglhp では Asp625 として保存されていた。

HdAglhp の 100 kDa および 20 kDa のバンドは一本の cDNA の演繹アミノ酸配列上に存在した。それらバンドの N 末端アミノ酸配列は、それぞれ演繹アミノ酸配列の 202–219 番目および 78–89 番目の配列と一致した。これらの結果から、

HdAglhp は翻訳後の成熟過程で分子内切断を受け、100 kDa と 20 kDa のポリペプチドからなる複合体となる可能性が考えられた。このような分子内切断によるプロセシングは、ヒトの GAA で見られ、シグナルペプチドの切除、N 末端プロペプチドの切除、114–121 番残基領域の除去、782–791 番残基領域の除去、201–203 番残基領域の除去、の計 5 回の分子内切断を経て 4 つのポリペプチドからなる複合体に成熟すると報告されている (Moreland et al., 2005) (Fig. 48)。HdAglhp の成熟機構は不明であるが、ヒト GAA と同様に複数回の分子内切断を経て、2 つのポリペプチドからなる複合体を形成していると考えられた (Fig. 48)。

以上のように、肝膵臓由来のα-グルコシダーゼ HdAglhp は、塩存在下および pH 6.0 以下の酸性条件下で活性を示し、グリコーゲンを良く分解する点で明らかに HdAgl と異なった性質を示す酵素であった。また、これらの性質から、HdAglhp はリソソームでのグリコーゲン分解に関与すると推定された。このような性質は脊椎動物の GAA と類似しており、HdAglhp はエゾアワビのリソソーム酸性α-グルコシダーゼであると強く示唆された。

Table 6. Summary for the purification of HdAglhp

Samples	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude[a]	1430	158	0.11	1.1	100
AS40-70[b]	1135	135	0.12	1.2	85.4
DEAE[c]	101	45	0.44	4.0	28.5
Sephacryl[d]	0.62	22	36	327	13.9

[a] Crude enzyme after the dialysis against 10 mM sodium phosphate (pH 6.8)

[b] Active fraction obtained by ammonium sulphate precipitation.

[c] Active fraction obtained by TOYOPEARL DEAE-650M chromatography.

[d] Active fraction obtained by Sephacryl S-200 chromatography.

Table 7. Substrate specifity of HdAglhp

Substrates	Relative activity of HdAglhp (%)	Relatve Activity of HdAgl (%)
Maltose*[1]	100	100
Maltotriose	135	99.9
Maltotetraose	159	75.6
Maltopentaose	69.6	74.1
Maltohexose	47.6	73.5
Isomaltose*[2]	0.7	2.7
α -*p*NPG	1.7	1.6
Trehalose*[3]	0	0
Sucrose	0	0
Starch	78.7	36.5
Glycogen	100	13.5

*[1-3] One unit of α-glucosidase was defined as the amount of enzyme that released 2.0 μmol glucose per min since one split of maltose produces two glucose. Relative activity 100% corresponded to 37.1 U/mg.

Table 8. Kinetic parameters of HdAglhp and HdAgl

Substrate	HdAghp			HdAgl		
	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($mM^{-1}\cdot s^{-1}$)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($mM^{-1}\cdot s^{-1}$)
Maltose	25.1	322	13.2	2.92	92.4	81.2
Maltotriose	10.1	342	34.5	1.18	116	97.3
Maltotetraose	9.69	438	45.5	0.732	101	138
Maltopentaose	18.6	373	20.1	0.698	83.7	120
Starch	0.82[a]	93.1	116[b]	3.00[a]	83.3	21.7[b]
Glycogen	4.14[a]	275	67.9[b]	20.6[a]	103	3.31[b]

[a] $mg\cdot ml^{-1}$

[b] $ml\cdot mg^{-1}\cdot s^{-1}$

Table 9. DNA primers used for the amplification of HdAglhp cDNAs

Names	Sequences[a]
Fw1	5’-GGNTAYAAYAAYGCNGARGA-3’
Fw2	5’-ATGCCNTAYGAYGTNCARTGG-3
Fw3	5’-GARTTYGAYATHAARYTNGC-3’
Rv1	5’-RAANGCNCCNACYTGCATCCA-3’
Rv2	5’-CTTGCCAACCAGATTTGAC-3’
3raceF1	5’-AAGGTCACCAGCAGTGTGTTG-3’
3raceF2	5’-ATCGTGTTGTCTCGGTCAAC-3’
5raceRT	5’-CATACACATTGGAG-3’
5raceF1	5’-CCTCTGATATTTGCTGACCAG-3’
5raceF2	5’-CAGATTGGGACAGCACTGAC-3’
5raceR1	5’-CGCCAGTTGTGTCAAACAG-3’
5raceR2	5’-GTCCTGTTGACATCCTTCTG-3’
FullFw	5’-CCTAGACAGTCTTCCAGACAAG-3’
FullRv	5’-CATTCTCTCTGTTACCCATAAGAC-3’

[a] H = A/C/T; N = A/C/G/T; R = A/G; Y = C/T.

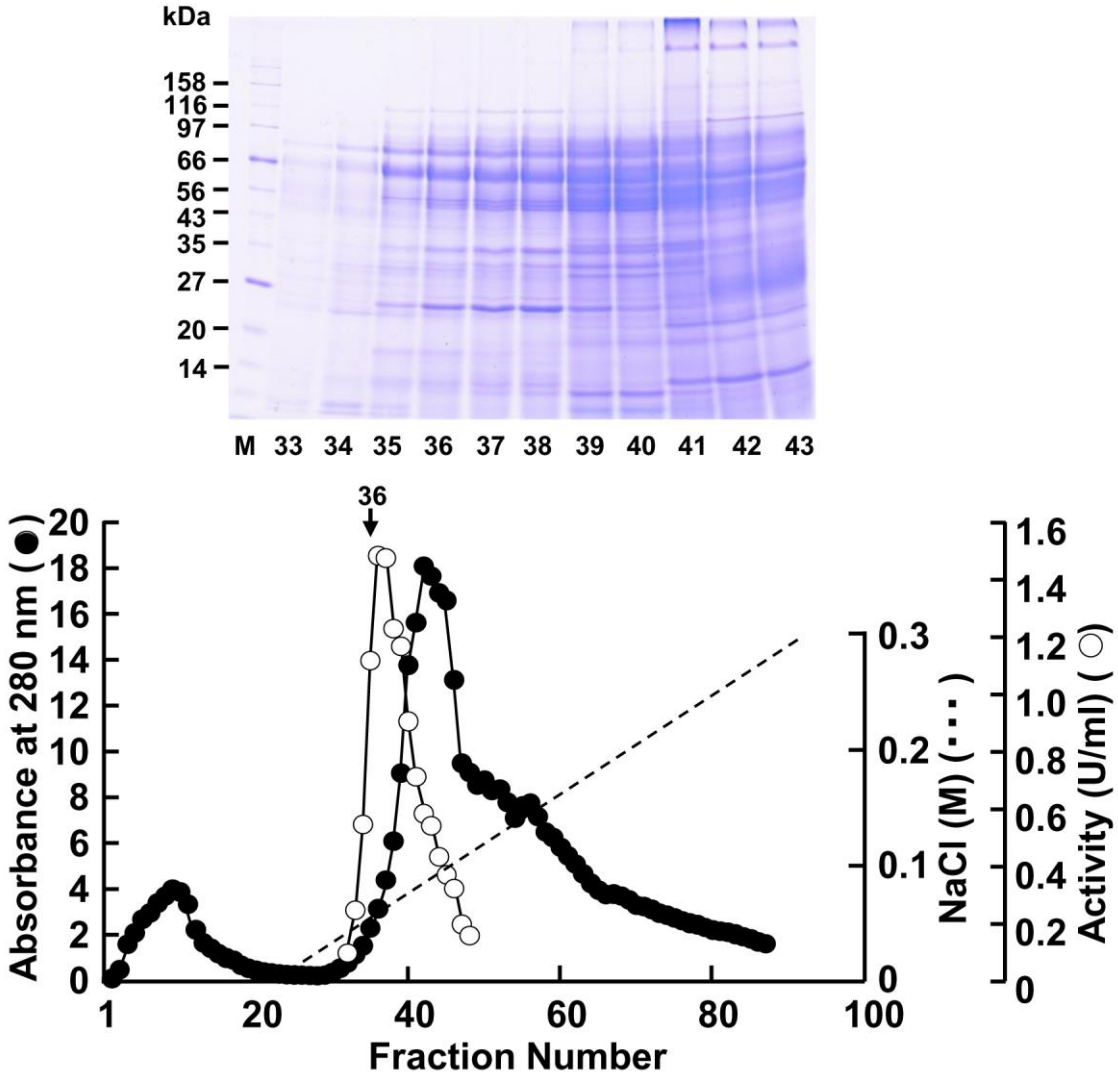


Fig. 34. Purification of an α-glucosidase from the heptatopancreas of abalone by TOYOPEARL DEAE-650M column chromatography. The proteins precipitated between 40 and 70% saturation of ammonium sulfate were applied to a column of TOYOPEARL DEAE-650M (2.6×16 cm). Proteins absorbed to the column were eluted by a linear gradient of 0–0.3 M NaCl.

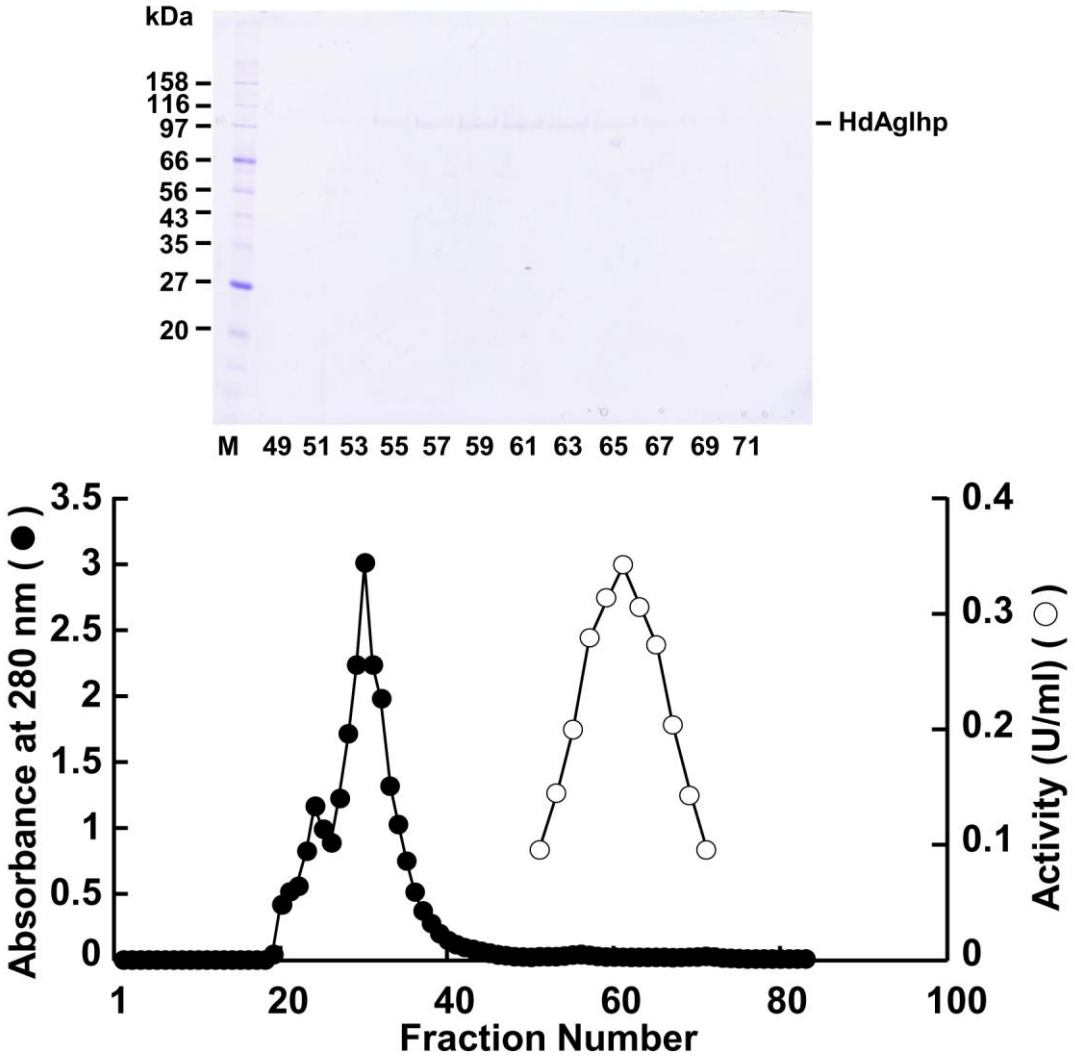


Fig. 35. Purification of an α-glucosidase from the heptatopancreas of abalone by Sephacryl S-200 column chromatography. The α-glucosidase fraction obtained by TOYOPEARL DEAE-650M column chromatography was applied to a column Sephacryl S-200 (2.0×90 cm). Elution of the α-glucosidase was found to be delayed possibly because of the interaction between enzyme and dextran moiety of Sephacryl S-200 resin.

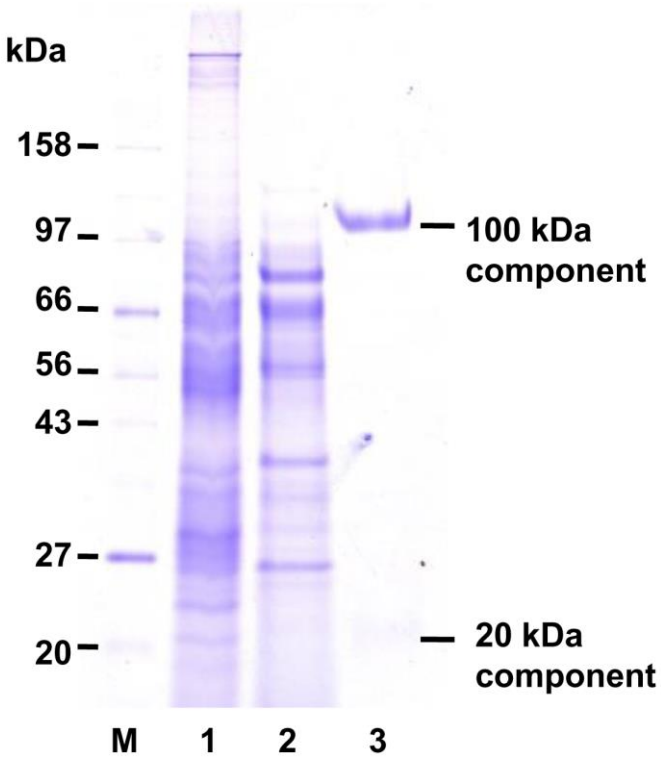


Fig. 36. Monitoring of purification of an α-glucosidase from the heptatopancreas of the abalone by SDS-PAGE. M, marker proteins; lane 1, fractions obtained fraction between 0 and 60% saturation of ammonium sulfate; lanes 2-3, active fractions obtained by TOYOPEARL DEAE-650M chromatography and Sephacryl S-200 chromatography (HdAglhp), respectively.

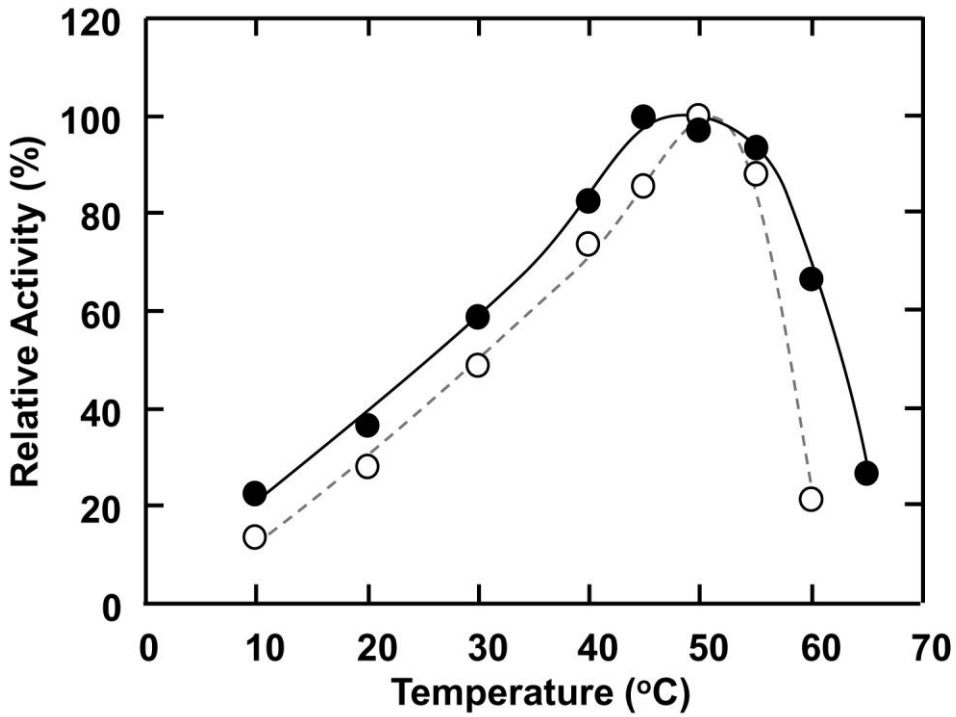


Fig. 37. Temperature dependence of HdAglhp. Temperature dependence of HdAglhp was examined at 10–65^{o}C in a reaction mixture containing 5mg/ml maltose, 200 mM NaCl and 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0). Data for HdAgl are also shown with open circles and a dotted line as a comparison.

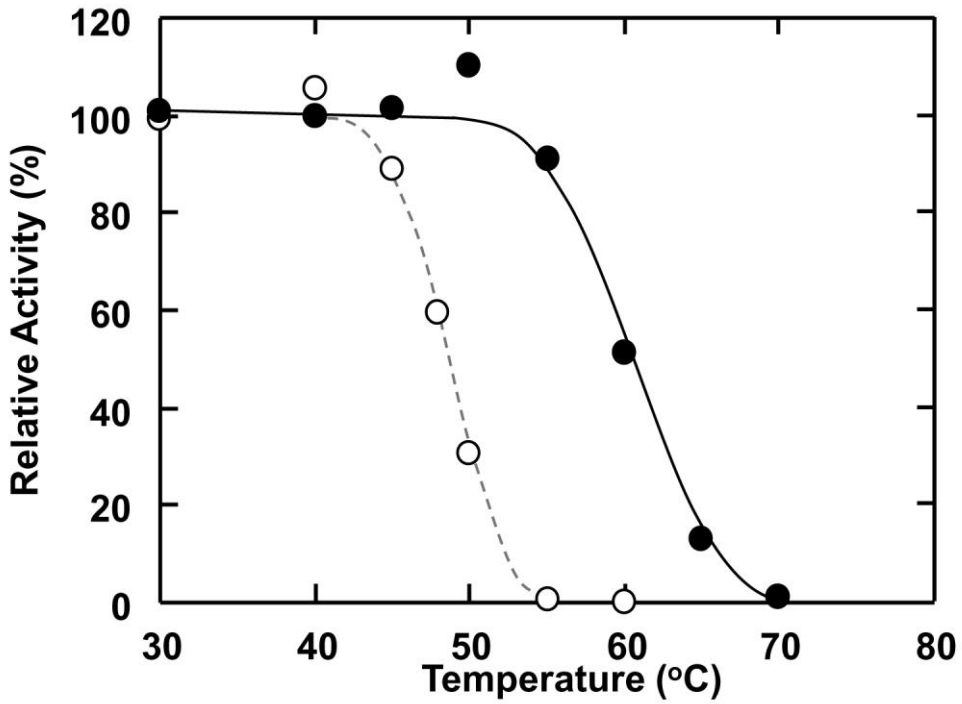


Fig. 38. Thermostability of HdAglhp. Thermostability of HdAglhp was examined by measuring the remaining activity in the reaction mixture 200 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) after heat treatment at 10–70^{o}C for 30 min. Data for HdAgl are also shown with open circles and a dotted line as a comparison.

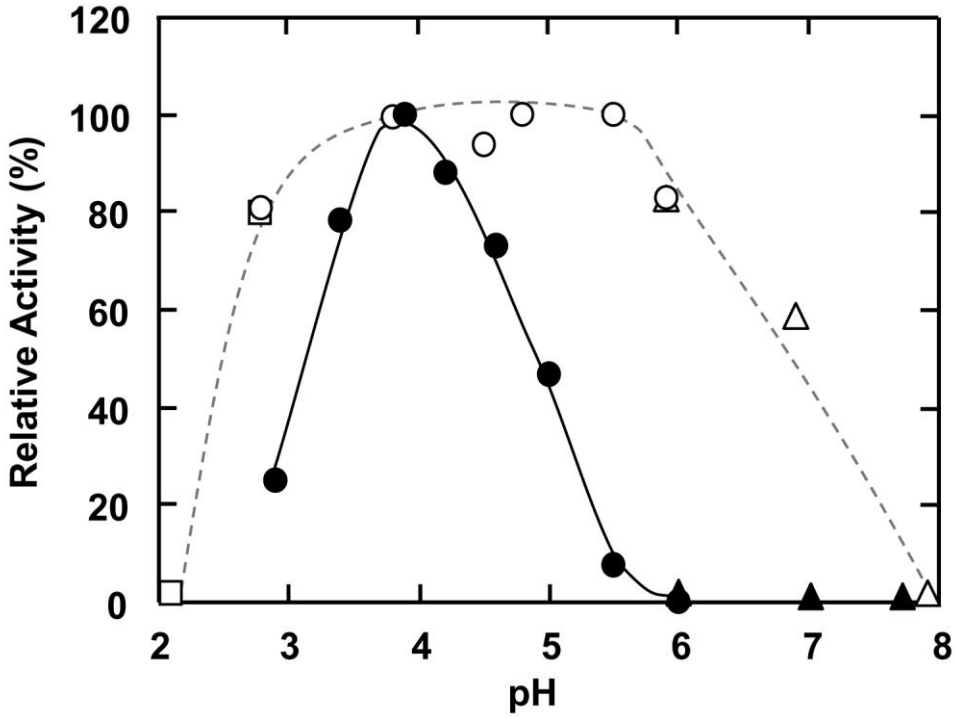


Fig. 39. pH dependence of HdAglhp. pH dependence of HdAglhp was examined at 37^{o}C in the following reaction mixtures adjusted to pH 2.8–6.0 with 10 mM sodium citrate buffer (●), and pH 6.0–8.0 with 10 mM sodium phosphate buffer (▲). Data for HdAgl are also shown with open circles and a dotted line as a comparison.

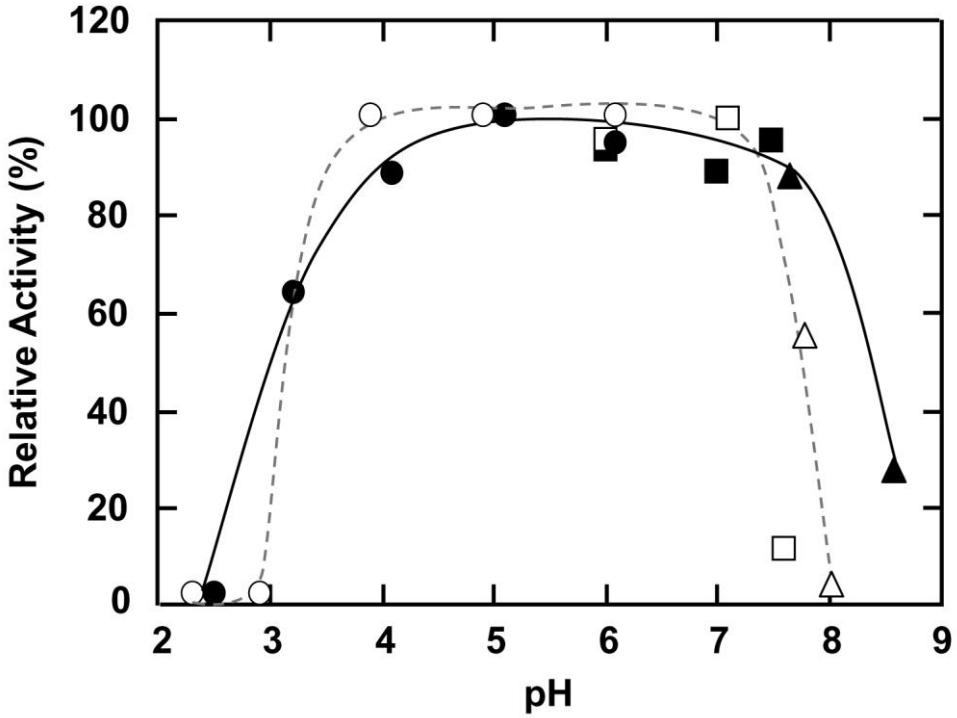


Fig. 40. Stability of HdAglhp in various pH conditions. HdAglhp was incubated at 20^{o}C for 3 h in reaction mixtures adjusted to pH 2.5–6.0 with 10 mM sodium citrate buffer (●), pH 6.0–7.7 with 10 mM sodium phosphate buffer(■), pH 7.7–8.7 with 10 mM Tris-HCl buffer(▲). The activity of HdAglhp was measured in the reaction mixture containing 5 mg/ml maltose, 200 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) and 200 mM NaCl, Data for HdAgl are also shown with open circles and a dotted line as a comparison.

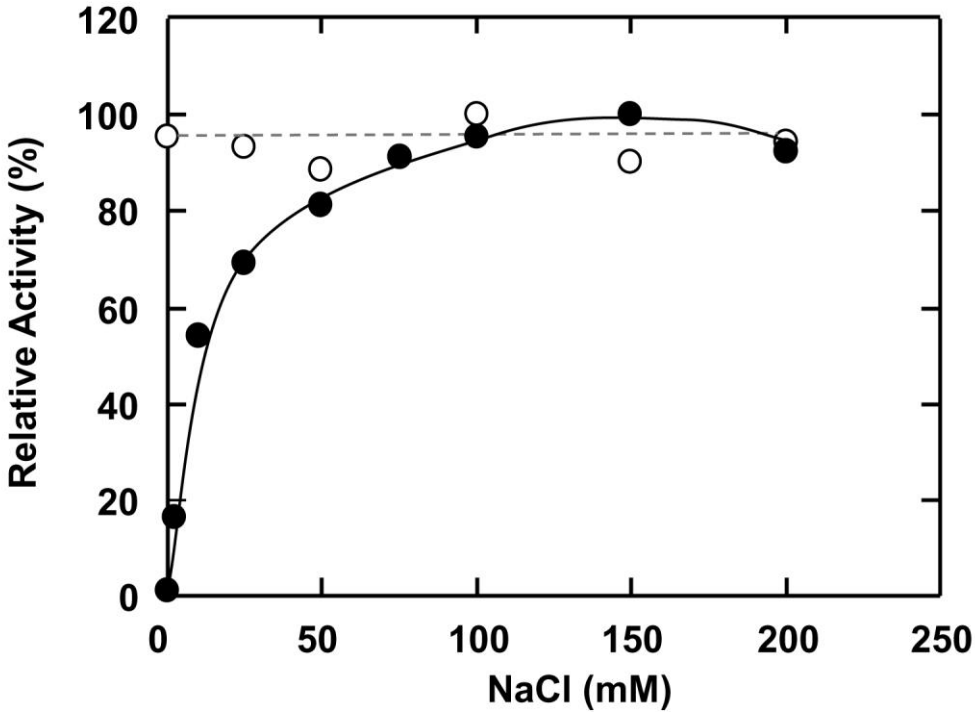


Fig. 41. NaCl dependence of HdAglhp. NaCl dependence of HdAglhp was examined with reaction mixtures containing 5 mg/ml maltose, 10 mM sodium acetate buffer (pH 4.0), and 0–200 mM NaCl. Data for HdAgl are also shown with open circles and a dotted line as a comparison.

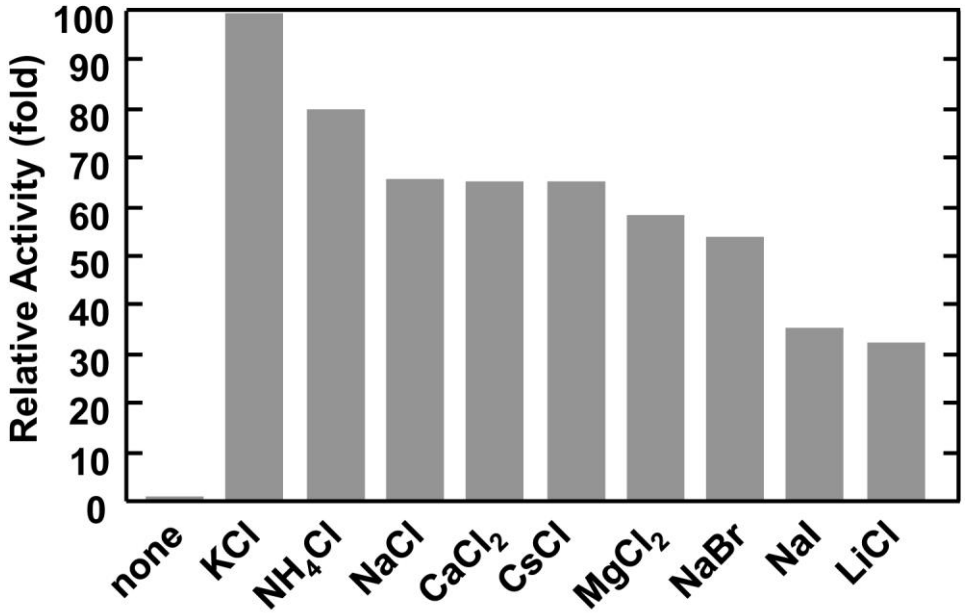


Fig. 42. Activation of HdAglhp by various salts. Activation of HdAglhp by salts was examined with reaction mixtures containing 5 mg/ml maltose, 10 mM sodium acetate buffer (pH 4.0), and 10 mM various salts indicated in the bottom.

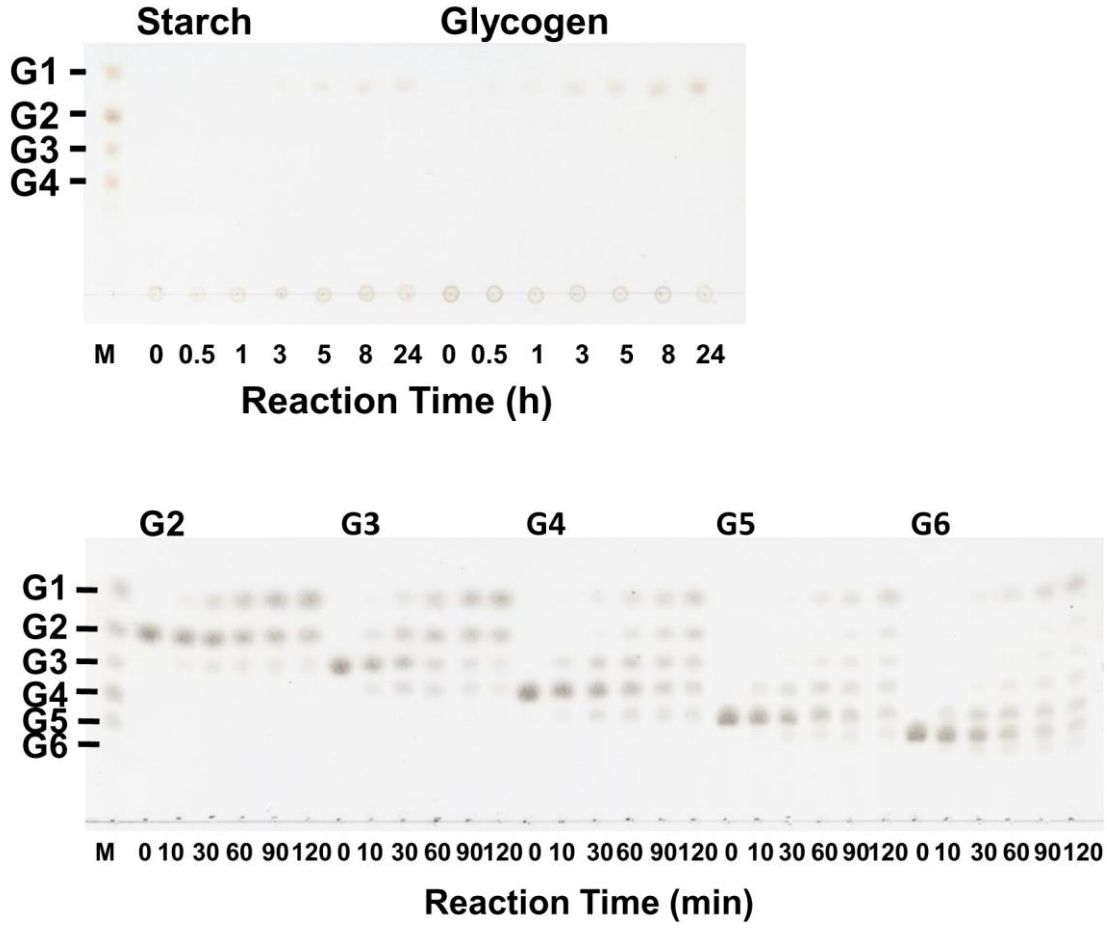


Fig. 43. TLC for the degradation products of starch, glycogen and maltooligosaccharides produced by HdAglhp. Two mg/mL starch, glycogen and 5 mg/mL maltooligosaccharides in 10 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) were degraded with 0.08 U/mL HdAglhp at 37^{o}C. The reaction was terminated at appropriate times by heating at 100^{o}C for 3 min and 1 μL of the reaction mixture was applied to TLC plate. M, marker sugars comprising G1–G6. G1, glucose; G2–G6, maltose to maltohexaose.

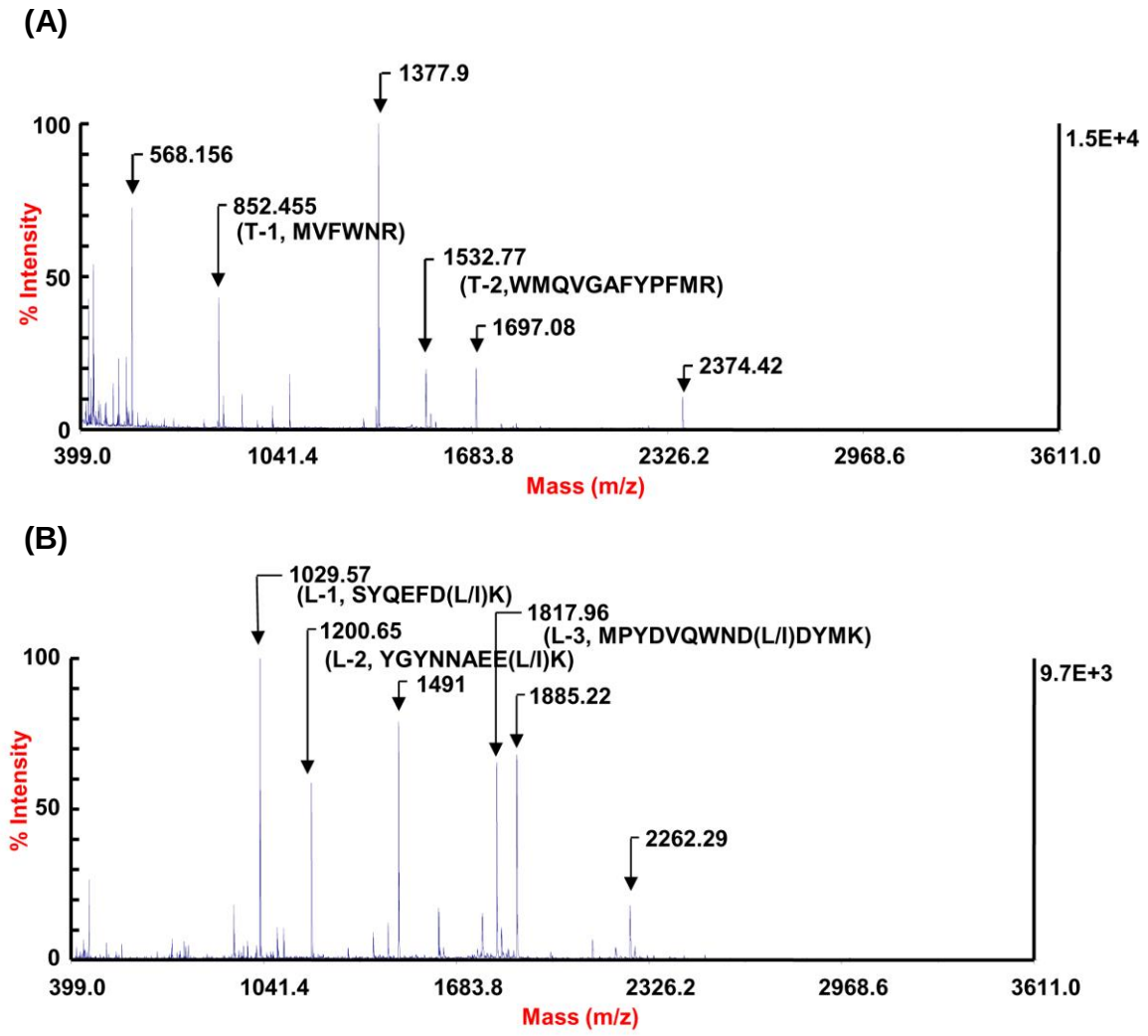


Fig. 44. Mass spectrometry for the HdAglhp fragments. The peptide fragments of HdAglhp were prepared by in-gel-digestion with trypsin and lysylendopeptidase and subjected to MALDI-TOF MS. (A) Mass spectrogram for tryptic fragments. (B) Mass spectrogram for lysylendopeptidyl fragments. Molecular masses for the fragment peaks indicated by arrows are shown on the right hand sides of the arrows and their amino acid sequences were shown in the parentheses.

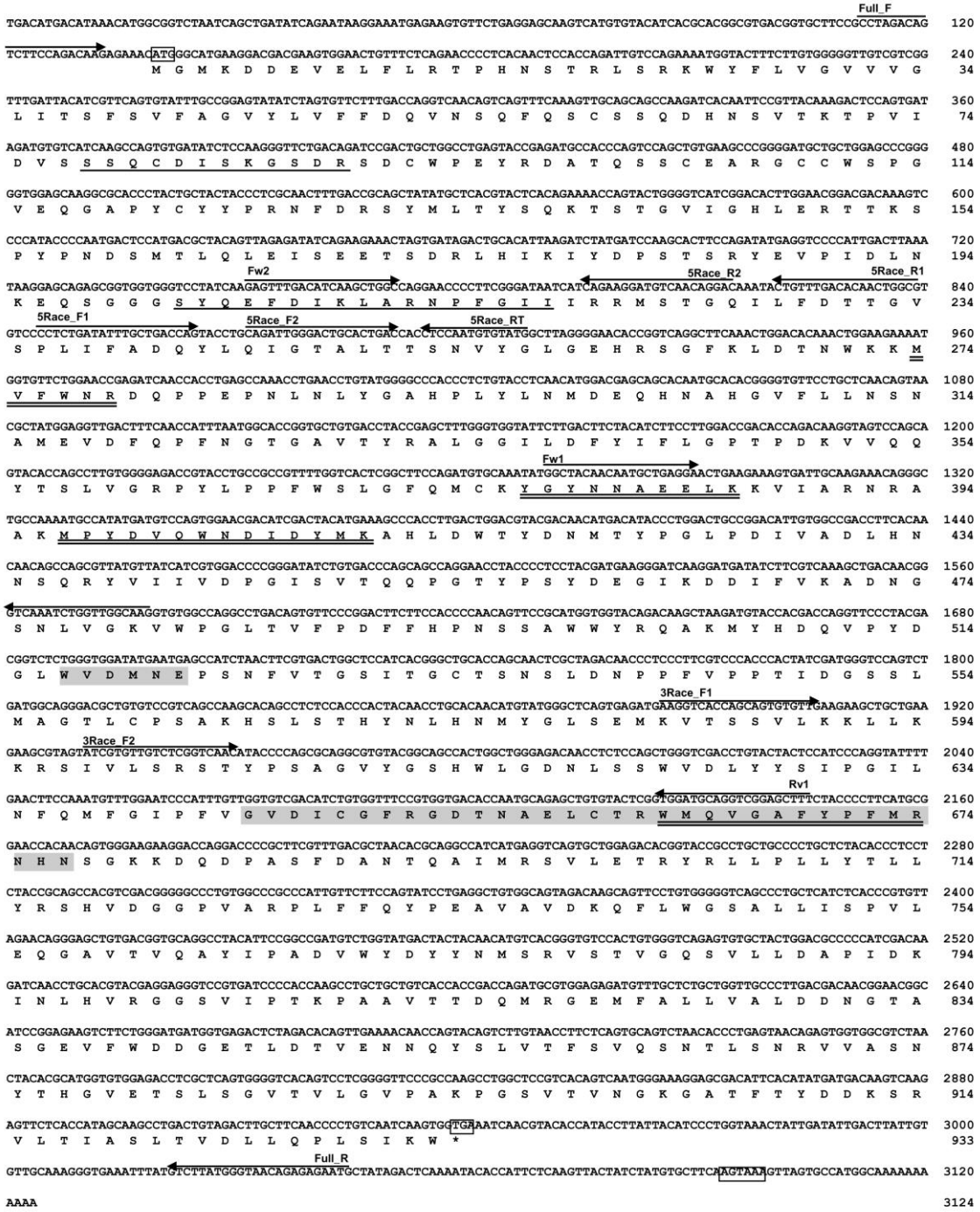


Fig. 45. Nucleotide and deduced amino-acid sequences of cDNA encoding HdAglhp. The translational initiation codon ATG, the termination codon TGA and the putative polyadenylation signal AGTAAA are boxed. The amino-acid sequences determined with intact HdAglhp (N-terminus) and peptide fragments obtained by lysylendopeptidase digestion are indicated by the underline and double underline. The signature sequences of GHF31 are shaded. The annealing sites of PCR primers (see Table 9) are indicated by arrows above the nucleotide sequence.



Fig. 46. Alignment for amino-acid sequences of HdAglhp and HdAgl. The amino-acid sequences were aligned by Clustal X software. The positions of identical residues and gaps are indicated by asterisks (*) and dashes (–), respectively.

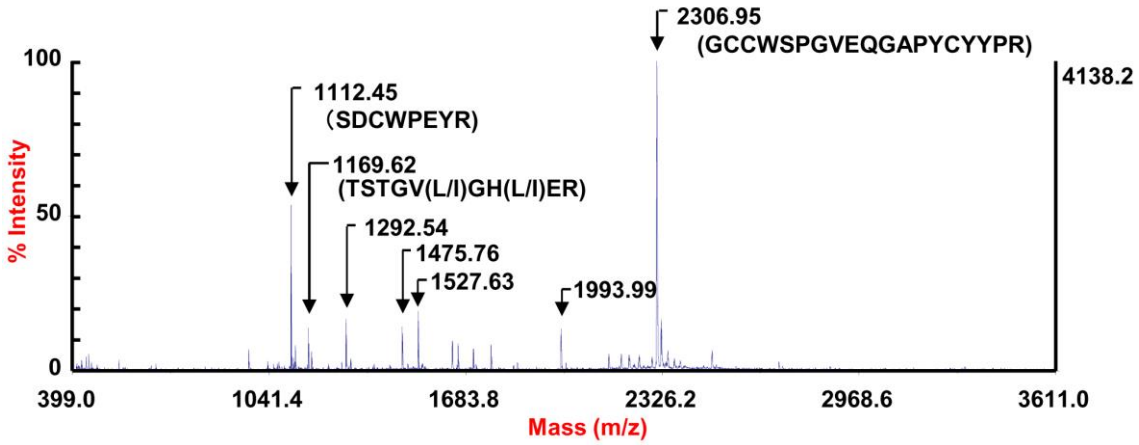


Fig. 47. Mass spectrometry for 20 kDa components of HdAglhp. Molecular masses of the peak fragments indicated by arrows are shown on the right side of the arrows and the determined amino acid sequences of fragments were shown in the parentheses.

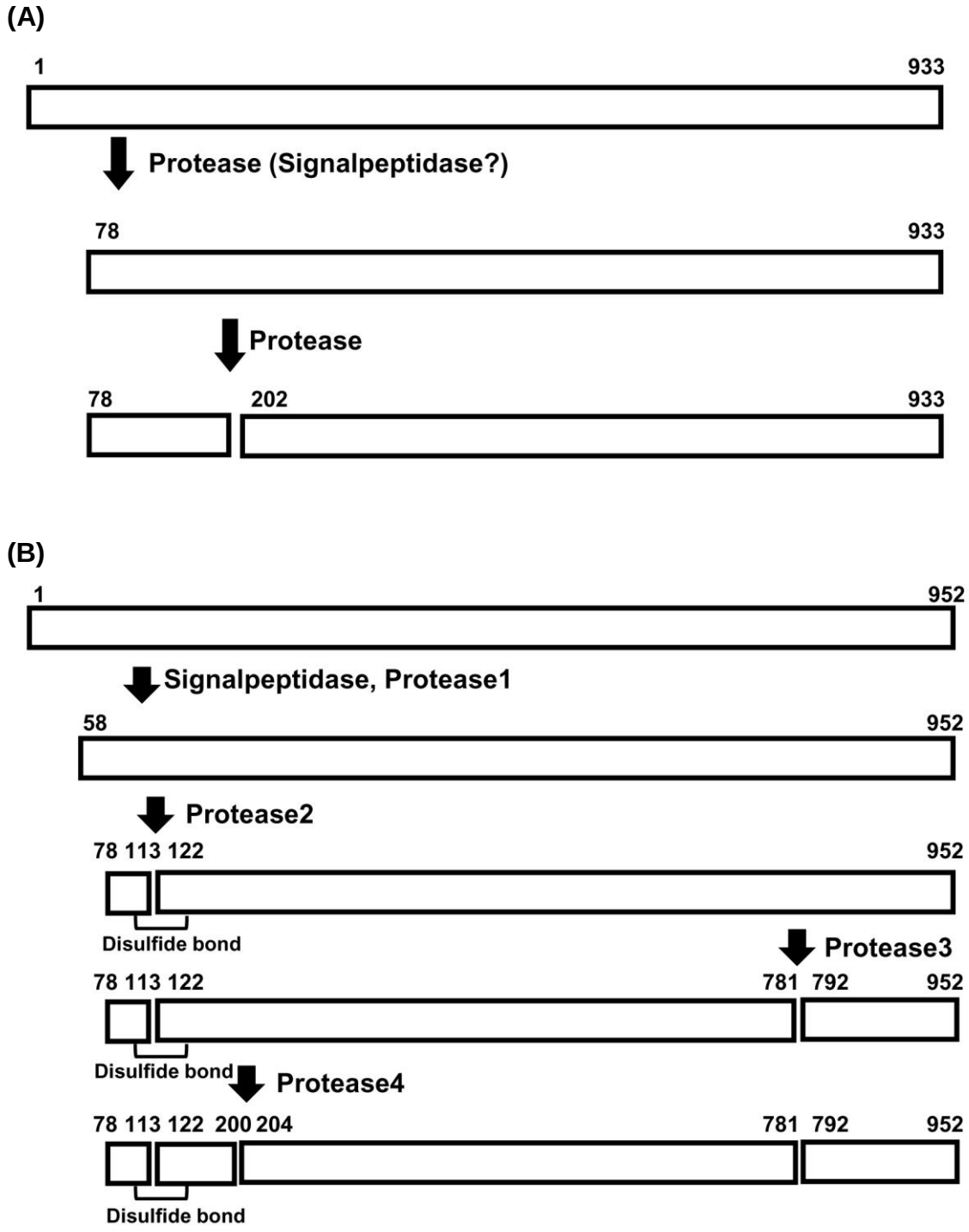


Fig. 48. Schematic representation for maturation process of HdAglhp and Human GAA. (A) Possible maturation process of HdAglhp. (B) Known maturation process of Human GAA (Moreland et al., 2005).

第 4 章　エゾアワビの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

第 1 項　目的

第 1 章および第 2 章で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 は、摂餌した海藻中のデンプンをグルコースに分解する役割を担っていると考えられる。そこで、本章では、これらの酵素が一般にアワビが摂餌すると考えられる紅藻および緑藻中のデンプンをどの程度分解しグルコースを生成するかについての知見を得ることとした。すなわち、数種の紅藻および緑藻試料にアワビの上記酵素を作用させ、生じるグルコース量を調べた。

第 2 項　実験材料および方法

2-1. 試料

紅藻のタンバノリ *Pachymeniopsis elliptica*、アカバ *Neodilsea yendoana*、ムカデノリ *Grateloupia asiatica*、ツルシラモ *Gracilaria chorda*、クロバギンナンソウ *Chondrus yendoi*、スサビノリ *Pyropia yezoensis*、緑藻のアナアオサ *Ulva pertusa* は七重浜海岸近郊で採取し、ミル *Codium fragile* は三重県伊勢市の漁家から購入した。これら海藻試料は水道水で洗浄し、乾燥させた後、粉砕機 (ミルサー, Iwatani IMF-77) により粉末化した。ジャガイモデンプン (片栗粉)、トウモロコシデンプン (コーンスターチ)、コメ粉 (上新粉) および小麦粉 (薄力粉) は、市内の食料品店で購入した。

2-2. 海藻粉末中の総グルカン量の定量法

海藻にはグルコースのポリマーとしてデンプン (α-グルカン) とセルロース (β-グルカン) が含まれる。これらの総量を総グルカン量として定量した。すなわち、海藻粉末試料 0.1 g に 80%硫酸を 1 ml 加えて均一化し、1 時間静置した。次にこの溶液を蒸留水で 40 倍に希釈し、その 3 ml を分取した。分取液を 100℃で 6 時間加熱することによって糖質を単糖に分解した。この分解液に 0.2 g の炭酸カルシウムを加えて中和させた後、12,000×g で 3 分間遠心分離し、得られた上清中のグルコース濃度を CII-テストワコーにより定量した。

2-3. 海藻粉末中のα-グルカン量の定量法

海藻粉末中のα-グルカン量は、Prosky 法に従って定量した (倉沢, 2007)。すなわち、海藻粉末試料 0.2 g に 80 mM リン酸ナトリウム (pH 6.0) を 10 ml 加え、318 U/ml の *Bacillus licheniformis* 由来耐熱性α-アミラーゼ (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) を 20 µl 加え、90℃で 30 分間加熱した。加熱後、冷却し、1N NaOH で pH 7.3 に調整しプロテナーゼ E 10 mg を加え 60℃で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、1 N HCl で pH 4.5 に調整し、56.8 U/ml の *Aspergillus oryzae* 由来グルコアミラーゼ (Sigma-Aldrich) 20 µl を加え、60℃で 30 分間インキュベートした。この反応液を 25 ml にメスアップし、12,000×g で 3 分間遠心分離し、得られた上清中のグルコース濃度を CII-テストワコーにより定量した。

2-4. HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl による海藻の分解法

エゾアワビ消化液粗酵素中にはα-グルカン分解酵素の他にセルラーゼ (Suzuki et al., 2003) やβ-グルコシダーゼ (加藤, 2008*) が含まれている。これら

*加藤史明 (2008) エゾアワビのグルカン分解酵素の性状とそれらによる海藻グルカンの糖化. 北海道大学修士論文.

は海藻のセルロースからグルコースを生じるため、海藻中のα-グルカン分解によって生じたグルコースの定量を困難にする。そのため、本研究では精製したHdAmy58、HdAmy82 および HdAgl を用いて海藻粉末試料を分解し、生じたグルコースをα-グルカン由来のグルコースとして定量することとした。なお、その際に添加する各酵素の相対量は、著者の予備実験から求めた粗酵素中のα-アミラーゼおよびα-グルコシダーゼの活性比に合わせ、α-アミラーゼ ：α-グルコシダーゼ ≒ 9.2 ： 1 とした。また、HdAmy58 と HdAmy82 の相対量は、それらの活性比が 1 : 1 となるようにした。分解反応は以下のように行った。すなわち、海藻粉末試料 50 mg に、10 mM リン酸ナトリウム (pH 6.0), 100 mM NaCl を 950 µl で懸濁した後、精製した HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl を種々の組み合わせで全量が 1 ml になるように加え分解反応を開始した。反応混液は、30℃に設定した回転撹拌式インキュベーター (MHS-1000, TOKYO RIKAKIKAI, Tokyo) 内で 15 rpm で回転しながら反応させた。所定の時間に反応液の 80 µl を分取し、100℃で 5 分間加熱することで反応を停止させた。これを 12,000×g で 3 分間遠心分離し、得られた上清中のグルコース量を CII-テストワコーを用いて測定した。

2-5. エゾアワビ消化液粗酵素による高等植物デンプンの分解法

市販のデンプン粉末試料 (コーンスターチ、米粉、小麦粉および片栗粉) 150 mg に 10 mM リン酸ナトリウム (pH 6.0) 1 ml を加え懸濁し、15,000×g で遠心分離した後、沈殿を回収した。この沈殿にアワビ消化液を 750 µl 添加し、30℃に設定した回転撹拌式インキュベーター (MHS-1000) 内で 15 rpm で撹拌しながら反応させた。所定の時間毎に反応液の 30 µl 分取し、100℃で 5 分間加熱することによって停止させた。これを 10,000×g、10 分間遠心分離し、上清中のグルコース濃度を CII-テストワコーによって定量した。一方、デンプン粒子の分解によ

る形状の変化は、試料デンプン粒をヨウ素で染色した後に光学顕微鏡 (Diaphot, Nikon, Tokyo) によって観察した。

第 3 項　結果

3-1. 海藻中の総グルカンおよびα-グルカンの含量

まず、海藻粉末中の総グルカン量を酸加水分解法によって分析した結果、海藻粉末中には 1.9–6.5 % (w/w) の総グルカンが含まれることが明らかとなった (Fig. 49A)。次に、α-グルカン量を Prosky 法によって分析した結果、紅藻で 1.8–4.8% (w/w) であり、緑藻のアナアオサおよびミルで 1.2% (w/w) および 2.2% (w/w) であった。紅藻は乾燥重量の 1–2%のデンプンを含むとされる (野田, 1992) が 、タンバノリおよびアカバでは 3%以上であり、デンプン含量が比較的多いことが明らかになった。なお、総グルカン中のα-グルカンの割合は、紅藻で 46–96%であり、緑藻のアナアオサおよびミルでそれぞれ 20%および 43%であった。これらの結果より、構造多糖であるセルロースに対する貯蔵多糖のデンプンの相対量は紅藻に多く、緑藻ではやや低いと考えられた。

3-2. HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl による海藻からのグルコース生成

エゾアワビの HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl により海藻粉末試料を分解した (Fig. 49B)。紅藻の分解では、50 mg のムカデノリおよびスサビノリからそれぞれ 0.96 mg および 0.62 mg のグルコースを遊離し、そのグルコース量はそれぞれの海藻に含まれるα-グルカンの 75%および 68%に相当した。また、タンバノリ、ツルシラモ、クロバギンナンソウからは 0.49 mg、0.41 mg、0.27 mg のグルコースが遊離し、α-グルカンの 29%、32%、20%に相当した。一方、アカバではグルコース遊離量が 0.019 mg であり、アワビの酵素はアカバのα-グルカンを

ほとんど分解できないことが明らかとなった。また緑藻では、50 mg のミルおよびアオサから 0.88 mg および 0.30 mg のグルコースが遊離し、それぞれに含まれるα-グルカンの 51%および 82%に相当した。これらの結果から、アワビ消化液に含まれるα-グルカン分解酵素は、海藻中に含まれるα-グルカンからグルコースを遊離できることが明らかとなった。ただし、グルコースの遊離量は、海藻の種類によって異なり、例えばアカバではほとんど遊離しないことが明らかになった。この理由については、アカバのデンプンの結晶性が高い、藻体中で酵素作用を受けにくい局在性をとっている、あるいは酵素の阻害剤が含まれているなどの可能性が考えられる。

次に、エゾアワビの混合酵素によってよくグルコースを生じたムカデノリ、スサビノリ、ミルおよびアナアオサの 4 種類の海藻粉末を、各酵素単独および様々な組み合わせで混合した酵素の計 6 通りの条件で分解した (Fig. 50)。その結果、HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl 単独で分解した場合のグルコース遊離量は総じて低く、概ね藻体に含まれる全α-グルカンの 10%以下であった。一方、2 種類の酵素の組み合わせ、すなわち HdAmy58 と HdAgl、HdAmy82 と HdAgl の混合酵素で分解した場合、スサビノリからはいずれの混合酵素でも同程度のグルコースが遊離したが、ムカデノリ、ミル、アナアオサからのグルコース遊離量は、HdAmy82 と HdAgl の混合酵素で分解した場合の方が HdAmy58 と HdAgl の混合酵素で分解した場合よりも 1–2 割程度大きかった。最後に、HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl の混合酵素で 8 時間分解した場合のグルコース遊離量を定量した。それによれば、グルコース遊離量はムカデノリで全α-グルカン量の 38%、スサビノリで 60%、ミルで 33%、アナアオサで 27%であった。これらの値は、各酵素単独で分解した場合の遊離グルコース量の合計値 (ムカデノリで 3 + 5 + 1 = 9%、スサビノリで 9 + 14 + 14 = 37%、ミルで 3 + 9 + 1 =13%、アナアオ

サで 3 + 7+ 5 = 15%) よりも 2–4 倍程度大きかった。これらの結果は、HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl が海藻のデンプンを協同的に分解し、効率的にグルコースを生じていることを示唆している。

ところで、HdAgl と共存させた場合、HdAmy82 と HdAmy58 の海藻粉末からのグルコース遊離量に差が生じた。その原因として、HdAmy82 と HdAmy58 のデンプン粒に対する比活性の違いが考えられる。第 1 章に示した通り、HdAmy82 のデンプン溶液に対する比活性は、HdAmy58 の 5 分の 1 であり、HdAmy82 のデンプン粒に対する比活性は、HdAmy58 の 5 分の 2 である。海藻分解試験では HdAmy82 と HdAmy58 のデンプン溶液に対する活性量が 1 : 1 になるように加えているため、デンプン粒に対する HdAmy82 の活性量は HdAmy58 の 2 倍となる。海藻中のデンプンは粒子状と考えられるので、HdAgl と HdAmy82 を用いた方が HdAmy58 を用いるよりもグルコース遊離量が多くなったと考えられた。

3-3. エゾアワビ消化液粗酵素の高等植物デンプンの分解活性

天然のデンプンは一般に結晶性粒子の形態をとっているが、エゾアワビの消化液によりデンプン粒子がどのように崩壊するかを検討することとした。なお、海藻のデンプンは含量が少なく、この実験に使用するのは困難であった。そこで、デンプン粒の分解試験には陸上植物由来のデンプン (あるいはデンプンを主体とする粉末試料) を用いることとした。なお、陸上植物由来のデンプン粒の分解能が明らかになれば、アワビの人工餌料に陸上植物デンプンを添加する意義も明らかになると考えられる。

まず、アワビ消化液粗酵素をコーンスターチ、片栗粉、小麦粉および米粉に加え 24 時間反応させた。その結果、24 時間の反応でコーンスターチからは全グルカン量の 48%、米粉からは 46%、小麦粉からは 16%、片栗粉からは 14%のグ

ルコースを遊離した (Fig. 51A)。一方、分解後に反応混液を遠心分離し、沈殿量の減少を調べた。その結果、コーンスターチおよび米粉において明らかな沈殿量の減少が見られたが、小麦粉や片栗粉ではあまり変化が見られなかった (Fig. 51B)。これらの結果は、グルコース遊離量と相関している。さらに、分解に伴うデンプン粒の形状変化を顕微鏡で観察した (Fig. 51C)。それによれば、コーンスターチと米粉においてはデンプン粒の粒子径の減少および粒子の崩壊が観察され、小麦粉および片栗粉の場合は粒子の変形あるいは表面剥離が観察された。なお、デンプン粒子のサイズは、片栗粉が最も大きく約 50 μm で、次に小麦粉で約 35 μm であり、一方コーンスターチは約 15 μm であり、米粉は最も小さく約 5 μm であった。このデンプン粒子のサイズの順はグルコース遊離量と相関が見られた。グルコース遊離量はデンプン粒サイズが小さいコーンスターチや米粉で多く、サイズの大きい片栗粉や小麦粉で少なかった。従って、デンプン粒からのグルコース遊離量はデンプンの粒子径に密接に関連していると考えられた。これは、α-アミラーゼによってデンプン粒を分解させた場合、粒子径が小さいほど加水分解しやすいという報告 (Tahir et al., 2010) と一致している。この傾向は、1 時間の反応において顕著にみられる。すなわち、グルコース遊離量はコーンスターチからは 30%、米粉からは 38%、小麦粉および片栗粉からは 13% であった。これらの結果より、アワビの人工餌料にデンプンを添加する場合、粒子径の小さいコーンスターチや米粉の添加が望ましいと考えられる。

第 4 項　考察

本章では、α-アミラーゼ HdAmy58、HdAmy82 およびα-グルコシダーゼ HdAgl を、一般にアワビが摂餌すると考えられる紅藻および緑藻に作用させた際にどの程度グルコースが生じるかを検討した。また、市販のデンプン試料に作用さ

せた場合のグルコースの生成量についても検討した。それによれば、アワビの上記酵素はいずれのデンプン試料に対しても高い糖化能を有することが明らかとなった。ここでは、海藻中のα-グルカン含量、HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl の海藻からのグルコース生成能およびエゾアワビ消化液粗酵素の高等植物デンプンの糖化能について考察する。

4-1. 海藻中のα-グルカン含量

海藻粉末中の総グルカン量を酸加水分解法によって分析した結果、海藻粉末中には 1.9–6.5 % (w/w) の総グルカンが含まれることが明らかとなり、Prosky 法によってα-グルカン量を分析した結果、1.2–4.8% (w/w) であった。これらの数値は従来の報告と概ね一致している。なお、本研究では、タンバノリおよびアカバでは 3%以上であり、デンプン含量が比較的多いことが明らかになった。総グルカン中のα-グルカンの割合は、紅藻で 46–96%であり、緑藻のアナアオサおよびミルでそれぞれ 20%および 43%であることから、構造多糖であるセルロースに対する貯蔵多糖のデンプンの相対量は紅藻に多く、緑藻ではやや低いと考えられた。生鮮海藻の水分含量が約 90%とすると、乾燥試料から見積られたα-グルカン量は、生鮮海藻では 0.1–0.5%に相当すると考えられた。なお、ジャガイモに含まれるデンプンの量は乾燥重量当たり約 75% (湿重量あたり 15%)であるが、葉部では 3–11% (湿重量あたり 0.3–1%)とされる (大崎ら, 1988)。従って、海藻中のデンプン量は高等植物の葉部のものに近いと考えられる。ただし、キヌイトグサ科の紅藻の 1 種である *Seirospora griffithsiana* の胞子 (生殖細胞) では、細胞体積の 80%をデンプン粒が占め (Sheath et al., 1981)、アワビの稚貝はこのような胞子を摂餌しているとの報告もある (富田・田沢, 1971)。これらを考慮すると、アワビにおいて紅藻デンプンは炭素・エネルギー源として重要であると考

えられる。

4-2. HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl の海藻からのグルコース生成能

エゾアワビの HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl を海藻粉末に作用させたところ、24 時間の反応で 50 mg のムカデノリ、スサビノリおよびミルから 0.96 mg、0.62 mg および 0.88 mg のグルコースが遊離し、そのグルコース量は各海藻に含まれるα-グルカン量の 75%、68%および 82%に相当した。また、タンバノリ、クロバギンナンソウ、アナアオサおよびツルシラモでは 0.49 mg、0.41 mg、0.30 mg および 0.27 mg がグルコースとして遊離し、α-グルカン量の 29%、32%、51%および 20%に相当した。一方、アカバからは 0.019 mg しかグルコースが遊離しなかった。これらの結果から、海藻の種類によってグルコース遊離量が異なることが明らかとなった。陸上植物のデンプン粒の酵素分解においても、植物種の違いによってグルコース遊離量が異なることが知られており、その原因として、デンプン粒の直径や形、サイズ分布、分岐頻度などの違いがあげられる。こういった点を考慮すると、海藻の種類によってデンプンの分解程度が異なる原因の一つとして、デンプン粒の構造の違いが考えられる。また別の可能性として、ある種の紅藻の中にはグルコシダーゼ阻害剤が存在することが知られており、それによって分解が阻害されていることも考えられる。さらに、細胞内のデンプン粒に対する酵素の接触しやすさが、紅藻種間の細胞壁構造の違いによって異なる可能性も考えられる。

また、HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl で分解した際のα-グルカン量あたりのグルコース遊離量が高かったムカデノリ、スサビノリ、ミルおよびアナアオサは、エゾアワビがよく摂餌し成長もよいという報告 (Uki, 1986) がある。一方、α-グルカン量あたりのグルコース遊離量が低かったアカバおよびタンバノリは、

エゾアワビがほとんど摂餌せず成長もよくないとされている。このように、海藻分解した際のα-グルカン含量あたりのグルコース遊離率の高さは、餌料としての有効性と良く相関しているといえる。特に、ムカデノリ、スサビノリ、ミルはグルコース遊離量も 0.6 mg 以上と比較的高いので、これらの海藻粉末は今後のアワビの人工餌料の設計において使用すべきであると考える。

デンプン分解におけるα-アミラーゼおよびα-グルコシダーゼの役割を明らかにするために、各酵素を種々の組み合わせで混合し、海藻粉末に作用させたときのグルコース遊離量を分析した。それによれば、HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl の混合酵素で分解した場合のグルコース遊離量は、各酵素単独で分解した場合の遊離グルコース量の合計値よりも 2–4 倍程度大きかった。これらの結果は、HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl が海藻のデンプンを協同的に分解し、効率的にグルコースを生じていることを示唆している。

また、HdAgl と共存させた場合、HdAmy82 と HdAmy58 の海藻粉末からのグルコース遊離量に差が生じた。その原因として、HdAmy82 の方がデンプン粒に対する活性が HdAmy58 より高く、デンプン粒の分解効率が高くなった可能性が考えられた。

4-3. エゾアワビ消化液粗酵素の高等植物デンプンの糖化能

エゾアワビの人工餌料にデンプンを添加することを想定する場合、海藻のデンプンの利用は困難であり、代替デンプンとしては、高等植物のデンプンの利用が考えられる。そこで、高等植物デンプン試料として、片栗粉やコーンスターチを選び、それらに対するエゾアワビ消化液粗酵素の糖化能を調べた。それによれば、24 時間の反応でコーンスターチからは全グルカン量の 48%、米粉からは 46%、小麦粉からは 16%、片栗粉からは 14%のグルコースが遊離した。こ

れらのグルコース遊離量は、粒子サイズと相関が見られ、特に 1 時間の反応でそれが顕著であった。これは、α-アミラーゼが、粒子径の小さいデンプン粒ほど加水分解しやすいという報告 (Tahir et al., 2010) と一致していた。従って、アワビの人工餌量に添加するデンプンも粒子径の小さいコーンスターチや米粉が望ましいと考えられた。

また、これらデンプン粒の分解において、反応初期の 4 時間までよくグルコースを遊離したが、8 時間以降あまりグルコース遊離量は増大しなかった。これは、エゾアワビの消化液が陸上植物由来のデンプン粒をすべて分解できないことを示している。このような不完全なデンプン分解は哺乳類でも報告されており、この場合、分解され残ったデンプンは、主に小腸で腸内細菌の作用により発酵されると考えられている。アワビの腸内細菌が海藻糖質の分解や発酵に関与していることが既に報告されているので (Erasmus et al., 1997; Sawabe et al., 1998)、分解され残ったデンプンが腸内細菌により発酵される可能性は高いと考えられる。

エゾアワビの餌料の炭水化物源として分解率の高かったコーンスターチや米粉の使用を考えると、これらの価格は約 400 円/kg であり、アルギン酸ナトリウムの約 10,000 円/kg と比べて安価である。そのため、アルギン酸ナトリウムよりもコーンスターチや米粉を炭水化物源とした人工餌料の方が安価になると考えられる。ただし、アルギン酸ナトリウムはカルシウムの添加により保形剤としての役割も果たせるので、炭水化物源としてデンプンのみを使用する場合は餌料の保形性について考える必要がある。なお、アワビがデンプン粒のみを含む餌料で飼育可能かという点に関して、アルギン酸を含まず小麦粉を含む餌料でアワビが飼育可能だった (真岡・中村, 1977) ことから、コーンスターチや米粉を炭水化物源とした餌料でも飼育できると思われる。

以上のように、アワビ消化液に含まれる HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl は、紅藻や緑藻の粉末からグルコースを遊離した。この結果は、アワビが紅藻や緑藻中のα-グルカンを酵素的に分解し、生じたグルコースを栄養源として利用していることを示している。また、エゾアワビ消化液粗酵素は、陸上植物由来のデンプン粒も分解できることから、エゾアワビの人工餌料として陸上植物のデンプンの添加は有用と考えられた。本研究で得られた知見は、より安価で成長効率の優れた餌料の開発につながると期待される。

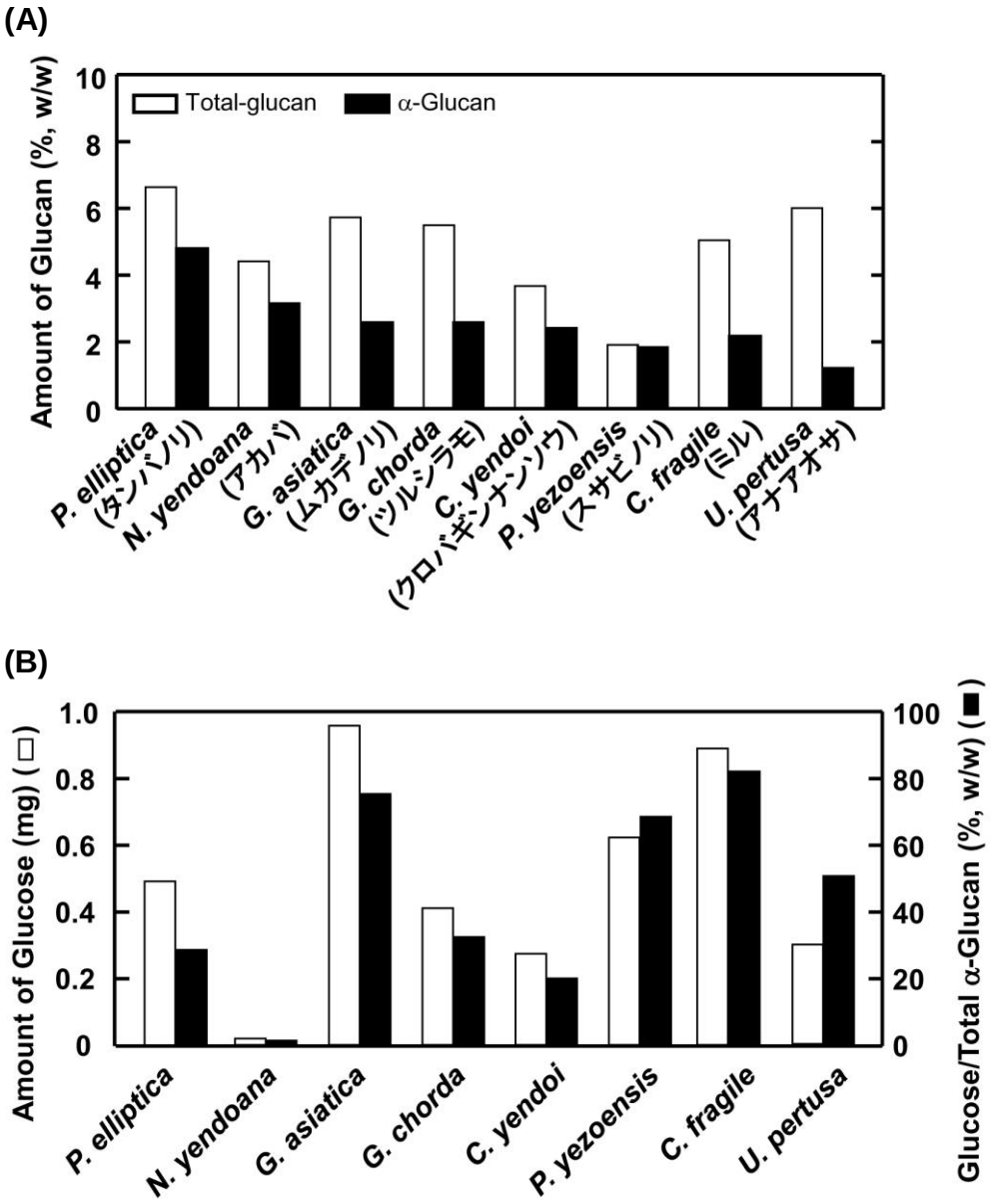


Fig. 49. Glucan contens in seaweeds. (A) Amount of total-glucan and α-glucan in various seaweeds. (B) Release of glucose from seaweed by the actions of HdAmy58, HdAmy82 and HdAgl. Fifty mg/ml seaweed powder in 100 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) were degraded in the presence of 0.085 U/ml HdAmy58, HdAmy82 and 0.019 U/mL HdAgl at 30^{o}C.

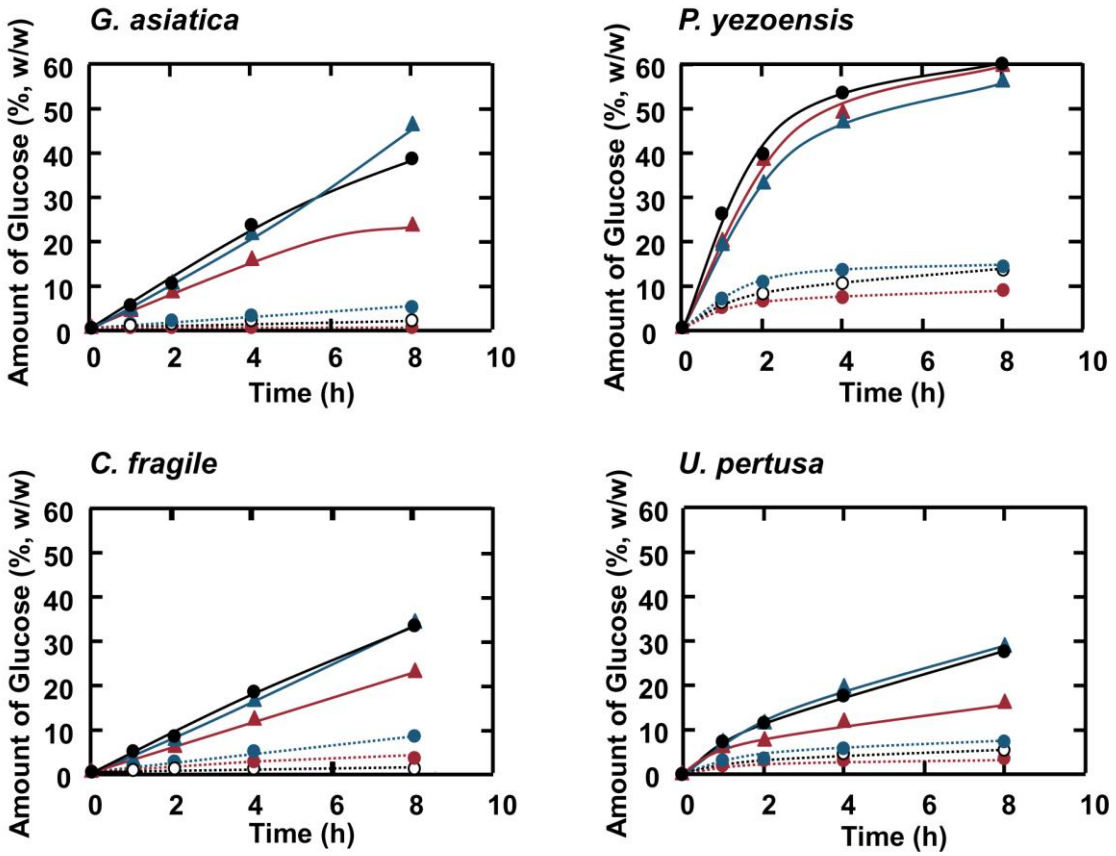


Fig. 50. Improvement of degradation of seaweed' α-glucan by coexistence of HdAmy58, HdAmy82 and HdAgl. Fifty mg/ml seaweed powder in 100 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) were degraded by HdAmy58 alone (●), HdAmy82 alone (●), HdAgl alone (○), HdAmy58 + HdAgl (▲), HdAmy82 + HdAgl (▲), and HdAmy58+HdAmy82 + HdAgl (●) at 30°C. Enzyme concentrations were 0.17U /ml for HdAmy58, 0.17 U/ml for HdAmy82 and 0.019 U/ml for HdAgl. In case of the three enzyme mixture, their concentrations were 0.085 U/ml, 0.085 U/ml and 0.019 U/ml for HdAmy58, HdAmy82 and HdAgl, respectively. Amount of glucose released was expressed as a relative values for glucose/total α-glucan (%, w/w).

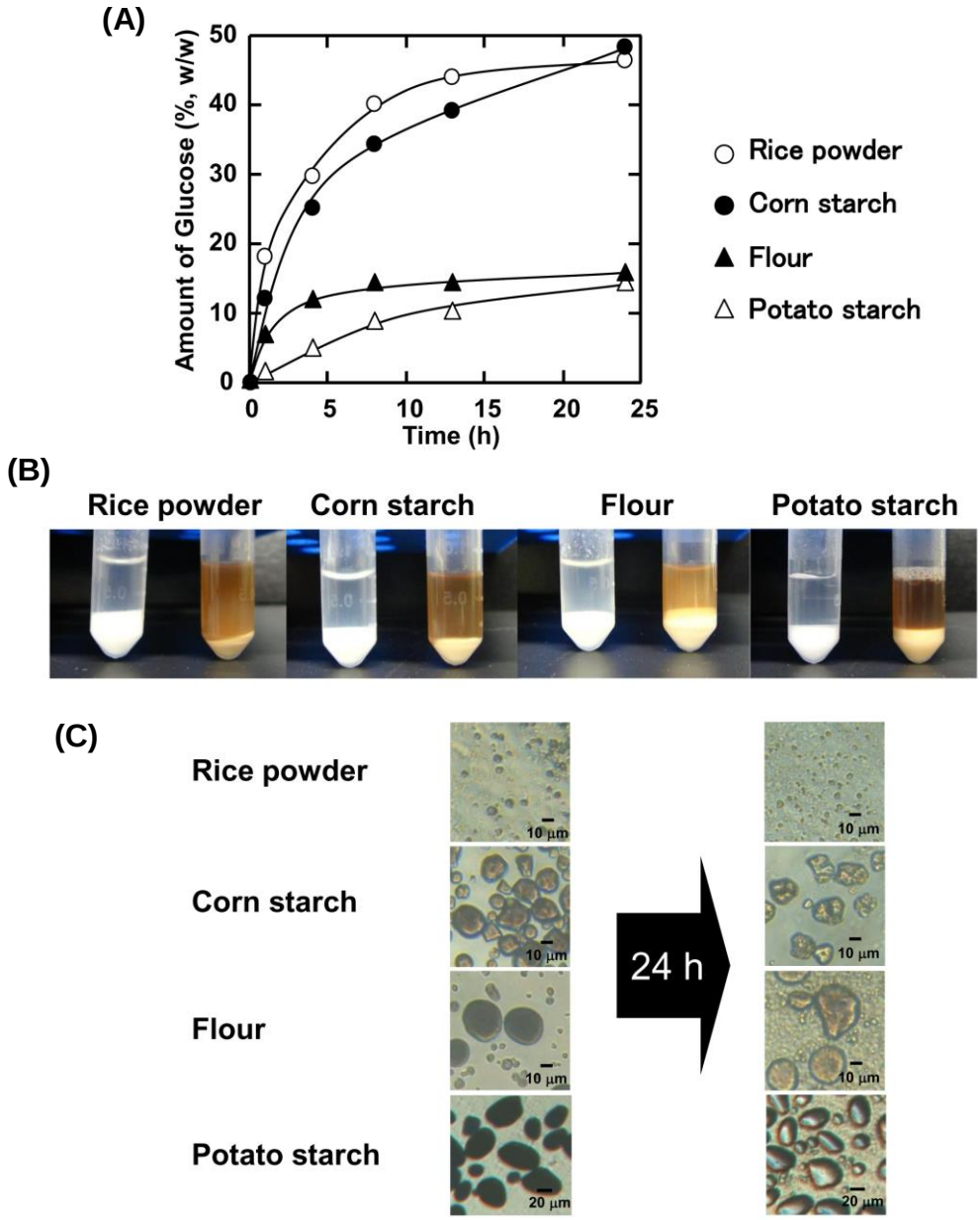


Fig. 51. Degradation of plant's starches by the abalone crude enzyme. (A) Amount of glucose released from various starches by the crude enzyme. The amount of glucose was expressed as a relative values for glucose/total-glucan (%, w/w). (B) Changes in the volumes of starches by the reaction with the crude enzyme for 24h. (C) Changes in the microscopic images of starch granules by the digestion with the crude enzyme. The granules were stained with 0.01% KI-0.001% I_2 before obsevation.

総括

エゾアワビは世界的にも重要な増殖対象水産生物種の 1 種であるが、我が国における漁獲量は 1970 年の 6,500 t をピークに 2,000 t 程度まで減少して未だ回復していない。資源量の回復のために、1980 年代以降は種苗生産や稚貝放流などの事業が盛んに行われているが、残念ながらその効果はあまり見られない。資源量を増大するには、放流した親貝による自然再生産量の増加の促進が必要であると考えられる。種苗放流事業は今後も継続する必要があるが、アワビ種苗生産のコストは他の水産種と比較して高い。そのため、今後は種苗生産にかかるコストの低減が必要と考えられ、安価で成長効率のよい人工餌料の開発が期待されている。

エゾアワビは、コンブやワカメ、アラメといった大型の褐藻を好んで摂餌するといわれており、実際に市販されているアワビ用の餌料中にも褐藻の粉末やアルギン酸が添加されている。また、エゾアワビは紅藻や緑藻も摂餌するといわれているが、その餌料価値は褐藻ほどではないとされる (菊池ら, 1967; Uki, 1986)。そのため、それらの貯蔵多糖であるデンプンが餌料に添加されることはほとんどないようである。一方、デンプン分解酵素であるα-アミラーゼがトコブシやメガイアワビ、ハマグリ、ホタテガイで単離され (Henry et al., 1993; Tsao et al., 2003; Tsao et al., 2004; Hsieh et al., 2008)、これらの生物においてデンプンが炭素源として重要であることが示唆されている。このことから、紅藻や緑藻を摂餌するエゾアワビもこれらの海藻中のデンプンを分解し、炭素源として利用している可能性が高いと考えられた。

そこで本研究では、エゾアワビ消化液中におけるデンプン分解酵素の酵素化学的性質を解析すると共に、これらの酵素が海藻中に含まれるα-グルカンの分

解にどの程度寄与しているのかについて検討した。

第 1 章では、エゾアワビ消化液から 2 種類のα-アミラーゼ、HdAmy58 および HdAmy82 を単離した。HdAmy58 および HdAmy82 は、ともにデンプンを分解しマルトース、マルトトリオース、マルトテトラオースなどのマルトオリゴ糖を生じた。一方、これらの 2 種類のα-アミラーゼの作用特性の違いとして、HdAmy58 は HdAmy82 よりデンプン溶液に対する活性が約 5 倍高く、不溶性のデンプン粒に対する活性は約 2.5 倍高かった。また一次構造解析によれば、HdAmy58 は GHF13 触媒ドメインのみから構成されたが、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もっていた。このことから、HdAmy58 および HdAmy82 の分子量の違いは、この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、その性質を解析した。その結果、HdAgl はマルトオリゴ糖を分解し、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。HdAmy58 および HdAmy82 はデンプンを分解しマルトオリゴ糖を生じる酵素なので、HdAgl は、それらの作用によって生じたマルトオリゴ糖をグルコースに分解する役割を果たしていると考えられた。

HdAgl の一次構造は、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%の同一性を示した。しかし、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、膜結合型の酵素ではなく分泌型の酵素であると考えられた。

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、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 様酵素が貯蔵多糖のグリコーゲンを代謝するリソソーム中の GAA 様酵素としても発現している可能性を示唆している。この可能性を検証するにために、肝膵臓や貝殻筋におけるα-グルコシダーゼ活性について調べた結果、HdAgl と明らかに異なる NaCl 依存型のα-グルコシダーゼの存在が明らかとなった。

第 3 章では、第 2 章により存在が明らかとなった NaCl 依存性α-グルコシダーゼ HdAglhp を実際に肝膵臓から単離し、その性質を解析した。その結果、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、グリコーゲンを良く分解するという、HdAgl と明らかに異なる性質を示す酵素であることが明らかとなった。この HdAglhp の至適条件は、リソソームのような酸性オルガネラ中の条件に近い。このような酵素特性は哺乳類の GAA (リソソーム酸性α-グルコシダーゼ) と類似することから、HdAglhp も GAA と同様、リソソーム中でのグリコーゲンの加水分解を担う酵素である可能性が強く示唆された。

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、海藻中のデンプンをどの程度糖化するかについての知見を得ることとした。それによれば、HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl は、紅藻や緑藻の粉末に協同的に作用し、グルコースを遊離することが明らかになった。このことから、これら 3 種の酵素はエゾアワビにおいて海藻デンプンの分解とグルコース化を担う重要な酵素であると考えられた。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粒も分解可能であった。特に、粒子径の小さい米粉やコーンスターチの分解能は高かった。これらの結果は、陸上植物のデンプンもエゾアワビの人工餌料の成分として有用であることを示

している。

このように、本研究では、エゾアワビ消化液中の HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl が海藻および陸上植物のデンプンをグルコースにまで分解できることを明らかにした。なお、本研究で明らかにしたエゾアワビのデンプン糖化機構はヒトのものと明らかに異なっている。すなわち、エゾアワビでは消化液中でデンプンからグルコースが生じるが、ヒトでは唾液および膵液のα-アミラーゼでデンプンがオリゴ糖に分解され、小腸上皮の MGAM、SIM によりそのオリゴ糖がグルコースに分解されることが知られている (Fig. 52)。従って、エゾアワビによるデンプンの糖化機構は、ヒトのものと比較して単純であると考えられた。

なお、これらデンプン分解酵素によってエゾアワビ消化液中に生じたグルコースの代謝に関しては、以下の 3 通りの経路が考えられる。まず一つ目の経路として、胃腔中で生じたグルコースが消化盲嚢中の肝膵臓細胞に吸収される経路が考えられる。軟体動物は哺乳類と異なり、食物消化によって得た栄養成分を主に中腸線 (アワビでは消化盲嚢あるいは肝膵臓に相当) で吸収するとされている (波部ら, 1999)。クロアワビでは、胃が 3 本の導管を通して消化盲嚢内部の細管と通じており、細管の末端周辺には栄養吸収の役割を果たす細胞が観察されることから、他の軟体動物と同様に肝膵臓で栄養成分を吸収していると考えられている (山元ら, 2005)。この構造はクロアワビの北方亜種であるエゾアワビでも同様であると考えられる。実際、エゾアワビのアルギン酸の分解物は、消化盲嚢に吸収された後に代謝されていることが示唆されている (木本, 2010*)。このことから、消化液中に生じたグルコースも同様に肝膵臓に吸収され代謝されると考えられる。二つ目の経路は、消化液中で生じたグルコースが腸管の上皮細胞で吸収される経路である。アワビは長い腸管をもっており、腸管上皮に

*木本雄太 (2010) エゾアワビ肝膵臓におけるアルギン酸代謝に関する研究. 北海道大学修士論文.

は多数の繊毛が観察されている (猪野, 1952)。そのため、哺乳類と同様の機構でグルコースを血中に吸収し、代謝している可能性が考えられる。三つ目の経路は、消化管内細菌の発酵作用を経て栄養源として吸収される経路である。これまでエゾアワビ消化管内には海藻多糖分解細菌の存在が報告されている (Erasmus et al., 1997; Sawabe et al., 1998)。そのため、消化液中に生じたグルコースはそれらの消化管内細菌によって代謝され、生じた酢酸や乳酸のような有機酸をアワビが利用している可能性も考えられる。

以上、本研究によりエゾアワビ消化液中にはデンプン分解酵素として HdAmy58、HdAmy82 および HdAgl が存在し、それらが海藻中のα-グルカンを協同的に分解し糖化することを明らかにした。また、エゾアワビ消化液は陸上植物由来のデンプンも分解できることを明らかにした。これら本研究で得られた知見は、エゾアワビにおけるデンプン分解酵素の生化学的性質の理解を深めるとともに、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る。これらの知見が、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。

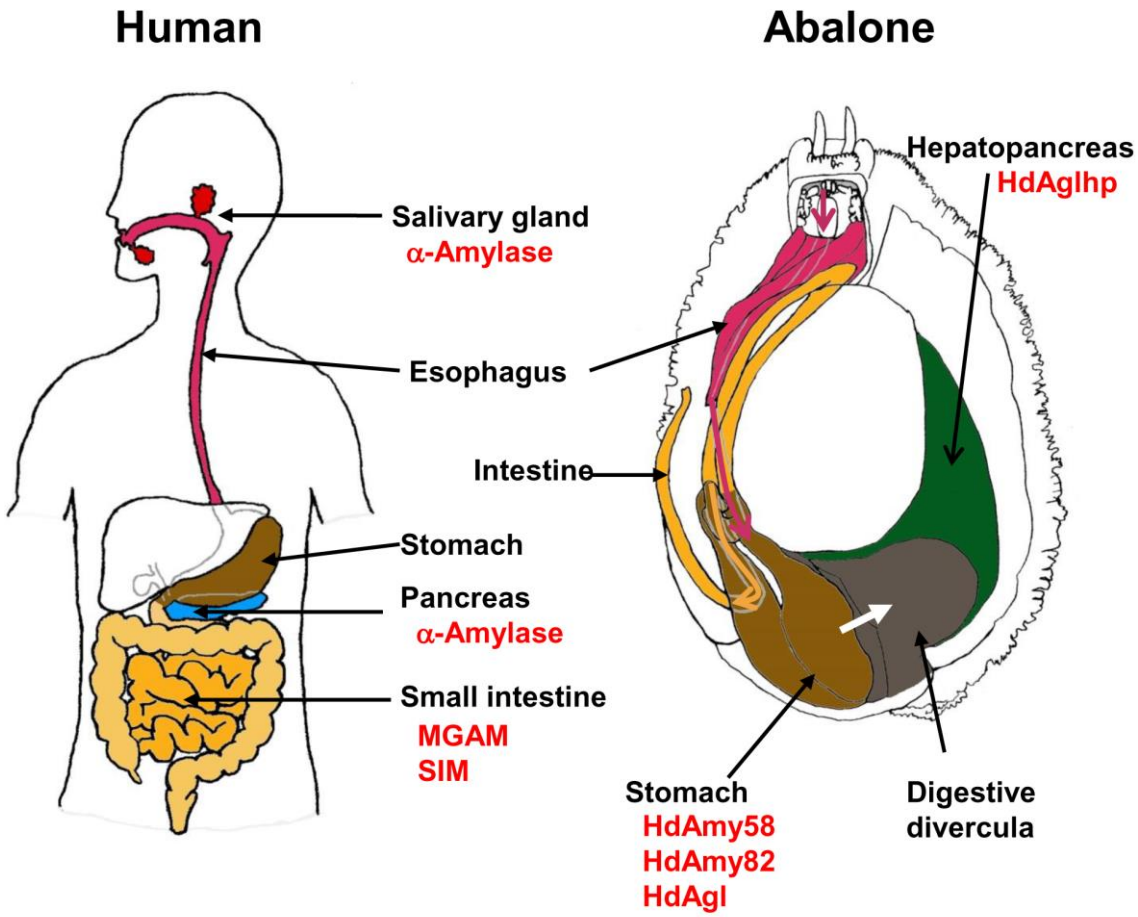


Fig. 52. Comparison of digestive systems between human and abalone. α-Glucan-degrading enzyemes of human and abalone are indicated with red letters. These pictures are drawn according to those reported by Terui (2009) and Ino (1951).

参考文献

Andreotti, G., Giordano, A., Tramice, A., Mollo, E., Trincone, A. (2006) Hydrolyses and transglycosylations performed by purified α-D-glucosidase of the marine mollusc *Aplysia fasciata*. J. Biotechnol. 122, 274-284.

Brayer, G. D., Luo, Y., Withers, S. G. (1995) The structure of human pancreatic α-amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. Protein Sci. 4, 1730-1742.

Chantret, I., Lacasa, M., Chevalier, G., Ruf, J., Islam, I., Mantei, N., Edwards, Y., Swallow, D., Rousset, M. (1992) Sequence of the complete cDNA and the 5' structure of the human sucrase-isomaltase gene. Possible homology with a yeast glucoamylase. Biochem. J. 285, 915-923.

Chiba, S. (1997) Molecular mechanism in α-glucosidase and glucoamylase. Biosci. Biotechnol. Biochem. 61, 1233-1239.

Chiba, S. (1988) α-Glucosidases, In Amylase Research Society of Japan (ed), Handbook of amylases and related enzymes, 1st ed. Pergamon Press, Oxford, United Kingdom. pp. 104-116.

Chiba, S., Hiromi, K., Minamiura, N., Ohnishi, M., Shimomura, T., Suga, K., Suganuma, T., Tanaka, A., Tomioka, S., Yamamoto, T. (1979) Quantitative study on anomeric forms of glucose produced by α-glucosidases. J. Biochemistry 85, 1135-1141.

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156-159.

Dauter, Z., Dauter, M., Brzozowski, A. M., Christensen, S., Borchert, T. V., Beier, L., Wilson, K. S., Davies, G. J. (1999) X-ray structure of Novamyl, the five-domain

"maltogenic" α-amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7 Å resolution. Biochemistry. 38, 8385-8392.

Edwards, S., Condon, C. (2001) Digestive protease characterization, localization and adaptation in blacklip abalone (*Haliotis rubra* Leach). Aquac. Res. 32, 95-102.

Erasmus, J. H., Cook, P. A., Coyne, V. E. (1997) The role of bacteria in the digestion of seaweed by the abalone *Haliotis midae*. Aquaculture 155, 377-386.

Feller, G., D'Amico, S., Benotmane, A. M., Joly, F., Van Beeumen, J., Gerday, C. (1998) Characterization of the C-terminal propeptide involved in bacterial wall spanning of α-amylase from the psychrophile *Alteromonas haloplanctis*. J. Biol. Chem. 273, 12109-12115.

Feller, G., Bussy, O., Houssier, C., Gerday, C. (1996) Structural and functional aspects of chloride binding to *Alteromonas haloplanctis* α-amylase. J. Biol. Chem. 271, 23836-23841.

Frandsen, T. P., Svensson, B. (1998) Plant α-glucosidases of the glycoside hydrolase family 31. Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. Plant Mol. Biol. 37, 1-13.

Galand, G. (1989) Brush-border membrane sucrase-isomaltase, maltase-glucoamylase and trehalase in mammals – comparative development, effects of glucocorticoids, molecular mechanisms, and phylogenetic implications. Comp. Biochem. Physiol. B 94, 1-11.

Gallant, D. J., Bouchet, B., Baldwin, P. M. (1997) Microscopy of starch: Evidence of a new level of granule organization. Carbohydr. Polym. 32, 177-191.

García-Carreño, F. L., Navarrete del Toro M. A., Serviere-Zaragoza E. (2003) Digestive enzymes in juvenile green abalone, *Haliotis fulgens*, fed natural food. Comp.

Biochem. Physiol. B 134, 143-150.

Gray, G. M. (1992) Starch digestion and absorption in nonruminants. J. Nutr. 122, 172-177.

波部忠重・奥谷喬司・西脇三郎. (1999) 第 11 章 摂自と消化. 軟体動物学概説 (下巻) (波部忠重・奥谷喬司・西脇三郎編) サイエンティスト社, 東京, pp. 80-88.

Hamauzu, Z., Hiromi, K., Ono, S. (1965) Quantitative determination of anomeric forms of sugar produced by amylases. 3. taka-amylase – phenyl-α-maltoside system. J. Biochemistry 57, 42-44

Henry, M., Benlimame, N., Boucaud-Camou, E., Mathieu, M., Donval, A., Van Wormhoudt, A. (1993) The amylase-secreting cells of the stomach of the scallop, *Pecten maximus*: ultrastructural, immunohistochemical and immunocytochemical characterizations. Tissue Cell 25, 537-548.

Hernández-Santoyo, A., Hernández-Arana, A., Arreguín-Espinoza, R., Rodríguez-Romero, A. (1998) Purification and characterization of several digestive proteases from the blue abalone, *Haliotis fulgens*. Aquaculture 159, 203-216.

Hoefsloot, L. H., Hoogeveen-Westerveld, M., Kroos, M. A., van Beeumen, J., Reuser, A. J., Oostra, B. A. (1988) Primary structure and processing of lysosomal α-glucosidase; homology with the intestinal sucrase-isomaltase complex. EMBO J. 7, 1697-1704.

Hsieh, M.S., Yin, L.J., Jiang, S.T. (2008) Purification and characterization of the amylase from a small abalone *Haliotis sieboldii*. Fisheries Sci. 74, 425-432.

Hunziker, W., Spiess, M., Semenza, G., Lodish, H. F. (1986) The sucrase-isomaltase complex: primary structure, membrane-orientation, and evolution of a stalked, intrinsic brush border protein. Cell 46, 227-234.

猪野 峻. (1952) 邦産アワビ属の増殖に関する生物学的研究. 東海区研報, 5, 1-102.

Jeffrey, P. L., Brown, D. H., Brown, B. I. (1970) Studies of lysosomal α-glucosidase. I. purification and properties of rat liver enzyme. Biochemistry 9, 1403-1415.

Johnston, D., Moltschaniwskyj, N., Wells, J. (2005) Development of the radula and digestive system of juvenile blacklip abalone (*Haliotis rubra*): Potential factors responsible for variable weaning success on artificial diets. Aquaculture 250, 341-355.

Kaneko, A., Sudo, S., TakayasuSakamoto, Y., Tamura, G., Ishikawa, T., Oba, T. (1996) Molecular cloning and determination of the nucleotide sequence of a gene encoding an acid-stable α-amylase from *Aspergillus kawachii*. J. Ferment. Bioeng. 81, 292-298.

Kawamura, T., Saido, T., Takami, H., Yamashita, Y. (1995) Dietary value of benthic diatoms for the growth of post-larval abalone *Haliotis discus hannai*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 194, 189-199.

Kawamura, T., Takami, H. (1995) Analysis of feeding and growth rate of newly metamorphosed abalone *Haliotis discus hannai* fed on 4 species of benthic diatom. Fisheries Sci. 61, 357-358.

Kawamura, T., Roberts, R. D., Nicholson, C. M. (1998) Factors affecting the food value of diatom strains for post-larval abalone *Haliotis iris*. Aquaculture 160, 81-88.

河村知彦・堀井豊充・高見秀輝. (2008) アワビ類栽培漁業の検証と今後の展望―総論―. 月刊海洋 総特集 アワビ類栽培漁業―検証と今後の展望― (桜井識人編) 海洋出版, 東京, pp. 485-489.

菊池省吾・桜井保雄・佐々木実・伊藤富夫. (1967) 海藻 20 種のアワビ稚貝に対

する餌料効果. 東北水研研報. 27, 93-100.

Kumagai, Y., Ojima, T. (2009) Enzymatic properties and the primary structure of a β-1,3-glucanase from the digestive fluid of the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. Comp. Biochem. Physiol. B 154, 113-120.

Kunita, R., Nakabayashi, O., Wu, J. Y., Hagiwara, Y., Mizutani, M., Pennybacker, M., Chen, Y. T., Kikuchi, T. (1997) Molecular cloning of acid α-glucosidase cDNA of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) and the lack of its mRNA in acid maltase deficient quails. Biochim. Biophys. Acta 1362, 269-278.

倉沢新一. (2007) 食物繊維の定量法-定義と定量法の変遷. 日本食物繊維学会誌. 11, 1-14.

Lejeune, N., Thines-Sempoux, D., Hers, H. G. (1963) Tissue fractionation studies. 16. Intracellular distribution and properties of α-glucosidases in rat liver. Biochem. J. 86, 16-21.

Le Moine, S., Sellos, D., Moal, J., Daniel, J. Y., San Juan Serrano, F., Samain, J. F., Van Wormhoudt, A. (1997) Amylase in *Pecten maximus* (Mollusca, bivalves): protein and cDNA characterization; quantification of the expression in the digestive gland. Mol. Marine Biol. Biotechnol. 6, 228-237.

Levitzki, A., Steer, M. L. (1974) Allosteric activation of mammalian α-amylase by chloride. Eur. J. Biochem. 41, 171-180.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-75.

Ma, H, Xu, W, Mai, K, Liufu, Z, Chen, H. (2004) Cloning and characterisation of an abalone (Haliotis discus hannai) actin gene. J. Ocean Univ. China 3, 145-149.

真岡東雄・中村　烈 (1977) アワビ稚貝人工飼料の実用化に関する研究―I. 人工

飼料の作成と稚貝の飼育. 茨城水試試験報. 21, 1-8.

Mehrani, H., Storey, K. B. (1993) Characterization of α-glucosidases from rainbow trout liver. Arch. Biochem. Biophys. 306, 188-194.

Moal, J., Daniel, J. Y., Sellos, D., Van Wormhoudt, A., Samain, J. F. (2000) Amylase mRNA expression in *Crassostrea gigas* during feeding cycles. J. Comp. Physiol. B. 170, 21-26.

Moreland, R. J., Jin, X., Zhang, X. K., Decker, R. W., Albee, K. L., Lee, K. L., Cauthron, R. D., Brewer, K., Edmunds, T., Canfield, W. M. (2005) Lysosomal acid α-glucosidase consists of four different peptides processed from a single chain precursor. J. Biol. Chem. 280, 6780-6791.

Nakasone, S., Ohshita, T., Iwamasa, T. (1991) Heterogeneity of pig lysosomal acid α-glucosidase. Affinity to Sephacryl S-200 gel and tissue distribution. Biochem. J. 279, 719-726.

Nichols, B. L., Eldering, J., Avery, S., Hahn, D., Quaroni, A., Sterchi, E. (1998) Human small intestinal maltase-glucoamylase cDNA cloning. Homology to sucrase-isomaltase. J. Biol. Chem. 273, 3076-3081.

Nikapitiya, C., Oh, C., Whang, I., Kim, C. G., Lee, Y. H., Kim, S. J., Lee, J. (2009) Molecular characterization, gene expression analysis and biochemical properties of α-amylase from the disk abalone, *Haliotis discus discus*. Comp. Biochem. Physiol. B 152, 271-281.

丹羽健太郎. (2010) クロアワビ *Haliotis discus discus* における消化酵素の特性と微生物の初期餌料効果に関する研究. 北海道大学博士論文.

野田宏行. (2000) 第 IV 章海藻の化学 2. 多糖類. 海藻利用の化学. (鴻巣章二・橋本周久編) 恒星社厚生閣, 東京, pp. 292-311.

荻野珍吉・太田頴亮 (1963) アワビの栄養に関する研究―I. 人工餌料によるクロの飼育. 日水誌, 29, 691-694.

荻野珍吉・加藤紀子 (1963) アワビの栄養に関する研究―II. タンパク質要求量について. 日水誌, 30, 523-526.

Ono, S., Hiromi, K., Hamauzu, Z. (1965) Quantitative determination of anomeric forms of sugar produced by amylases. I. Glucoamylase – phenyl-α-maltoside or maltose system. J. Biochem. 57, 34-38.

大崎 満・小松里香・田中 明. (1987) バレイショの茎葉から塊茎への物質転流に伴う炭素・窒素化合物の再編成. 日本土壌肥料学雑誌. 59, 266-271.

Oostergetel, G. T., van Bruggen, E. F. J. (1993) The crystalline domains in potato starch granules are arranged in a helical fashion. Carbohydr. Polym. 21, 7-12.

Ootsuka, S., Saga, N., Suzuki, K., Inoue, A., Ojima, T. (2006) Isolation and cloning of an endo-β-1,4-mannanase from Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. J. Biotechnol. 125, 269-280.

Palmer, T. N. (1971) Substrate specificity of acid α-glucosidase from rabbit muscle. Biochem. J. 124, 701-711.

Park, J. T., Johnson, M. J. (1949) A submicrodetermination of glucose. J. Biol. Chem. 181, 149-51.

Perez, S., Bertoft, E. (2010) The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. Starch-Starke. 62, 389-420.

Porzio, M. A, Pearson, A. M. (1977) Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Biochim. Biophys. Acta 490, 27-34.

Prodanov, E., Seigner, C., Marchis-Mouren, G. (1984) Subsite profile of the active-center of porcine pancreatic α-amylase. Kinetic studies using maltooligosaccharides as substrates. Biochem. Biophys. Res. Commun. 122, 75-81.

Pueschel, C. M. (1990) Cell structure. In Biology of the red algae (ed. K. M. Cole & R. Sheath), pp. 7-41. New York: Cambridge University Press.

Qian, M., Haser, R., Payan, F. (1993) Structure and molecular-model refinement of pig pancreatic α-amylase at 2.1 Å resolution. J. Mol. Biol. 231, 785-799.

Ragunath, C., Manuel, S., Venkataraman, V., Sait, H., Kasinathan, C., Ramasubbu, N. (2008) Probing the role of aromatic residues at the secondary saccharide-binding sites of human salivary α-amylase in substrate hydrolysis and bacterial binding. J. Mol. Biol. 384, 1232-1248.

Ramasubbu, N., Paloth, V., Luo, Y., Brayer, G. D., Levine, M. J. (1996) Structure of human salivary α-amylase at 1.6 angstrom resolution: Implications for its role in the oral cavity. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 52, 435-446.

Ren, L., Qin, X., Cao, X., Wang, L., Bai, F., Bai, G., Shen, Y. (2011) Structural insight into substrate specificity of human intestinal maltase-glucoamylase. Protein Cell 2, 827-836.

境　一郎 (2000) 一個 52 万円のアワビ文化―環境立国日本をめざす海からの提言―. 成山堂書店, 東京, pp. 91-109.

Sawabe, T., Sugimura, I., Ohtsuka, M., Nakano, K., Tajima, K., Ezura, Y., Christen, R. (1998) *Vibrio halioticoli* sp. nov., a non-motile alginolytic marine bacterium isolated from the gut of the abalone *Haliotis discus hannai*. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 573-580.

関 哲夫・菅野 尚. (1978) エゾアワビの初期発生と水温による発生速度の制御.

東北水研研報, 38, 143-153.

Sheath, R. G., Hellebust, J. A., Sawa, T. (1981) Ultrastructure of the floridean starch granule. Phycologia 20, 292-297.

Shimizu, E., Ojima, T., Nishita, K. (2003) cDNA cloning of an alginate lyase from abalone, *Haliotis discus hannai*. Carbohydr. Res. 338, 2841-2852.

Sim, L., Quezada-Calvillo, R., Sterchi, E. F., Nichois, B. L., Rose, D. R. (2008) Human intestinal maltase-glucoamylase: Crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity. J. Mol. Biol. 375, 782-792.

Sim, L., Willemsma, C., Mohan, S., Naim, H. Y., Pinto, B. M., Rose, D. R. (2010) Structural basis for substrate selectivity in human maltase-glucoamylase and sucrase-isomaltase N-terminal domains. J. Biol. Chem. 285, 17763-17770.

Slaughter, S. L., Ellis, P. R., Butterworth, P. J. (2001). An investigation of the action of porcine pancreatic α-amylase on native and gelatinised starches. Biochim. Biophys. Acta 1525, 29-36.

菅原義夫・関　哲夫. (1995) 第 1 章増養殖技術の進歩 1-3 エゾアワビ (鴻巣章二・森　勝義・竹内昌昭・沼地憲一・松谷武成編、野村 正監修) カキ・ホタテガイ・アワビ―生産技術と関連研究領域―. 恒星社厚生閣, 東京, pp. 28-61.

Suzuki, H., Suzuki, K., Inoue, A., Ojima, T. (2006) A novel oligoalginate lyase from abalone, *Haliotis discus hannai*, that releases disaccharide from alginate polymer in an exolytic manner. Carbohydr. Res. 341, 1809-1819.

Suzuki, K., Ojima, T., Nishita, K. (2003) Purification and cDNA cloning of a cellulase from abalone *Haliotis discus hannai*. Eur. J. Biochem. 270, 771-778.

Tahir, R., Ellis, P. R., Butterworth, P. J. (2010) The relation of physical properties of native starch granules to the kinetics of amylolysis catalysed by porcine pancreatic

α-amylase. Carbohydr. Polym. 81, 57-62.

Takami, H., Kawamura, T. (2003) Dietary changes in the abalone, *Haliotis discus hannai*, and relationship with the development of the digestive organ. Jpn. Agric. Res. Q. 37, 89-98.

Takami, H., Kawamura, T., Yamashita, Y. (1997) Contribution of diatoms as food sources for post-larval abalone *Haliotis discus hannai* on a crustose coralline alga. Moll. Res. 18, 143–151.

Takami, H., Kawamura, T., Yamashita, Y. (1998) Development of polysaccharide degradation activity in postlarval abalone *Haliotis discus hannai*. J. Shellfish Res. 17, 723-727.

照井直人. (2012) はじめの一歩のイラスト生理学 改訂第 2 版. 羊土社, 東京.

Thoma, J. A., Koshland, D. E. Jr. (1960) Stereochemistry of enzyme, substrate, and products during β-amylase action. J. Biol. Chem. 235, 2511-2517.

富田恭司・田沢伸雄. (1971) 礼文島産エゾアワビ稚貝の胃内容物. 北海道立水産試験場報告. 13, 31-38.

Tsao, C. Y., Pan, Y. Z. Jiang, S. T. (2003) Purification and characterization of amylases from small abalone (*Sulculus diversicolor aquatilis*). J. Agric. Food Chem. 51, 1064-70.

Tsao, C., Hsu, Y., Chao, L., Jiang, S. (2004) Purification and characterization of three amylases from viscera of hard clam *Meretrix lusoria*. Fisheries Sci. 70, 174-182.

Uki, N., Sugiura, M., Watanabe, T. (1986) Dietary value of seaweeds occurring on the pacific coast of Tohoku for growth of the abalone *Haliotis discus hannai*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 52, 257-266.

浮 永久・煙山 彰・渡辺 武. (1985) アワビ用試験飼料の基本組成の検討. 日水誌,

51, 1825-1833.

浮 永久・煙山 彰・渡辺 武. (1985) エゾアワビに対する数種飼料タンパク質の栄養価. 日水誌, 51, 1835-1839.

Waigh, T. A., Donald, A. M., Heidelbach, F., Riekel, C., Gidley, M. J. (1999) Analysis of the native structure of starch granules with small angle X-ray microfocus scattering. Biopolymers 49, 91-105.

山元憲一・半田岳志・近藤昌和. (2005) クロアワビの中腸線の構造. 水産大学校研究報告, 53, 105-116.

Zeeman, S. C., Kossmann, J., Smith, A. M. (2010) Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. Annu Rev Plant Biol. 61, 209-34.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、懇切な御指導、御助言ならび御校閲を賜りました北海道大学 大学院水産科学研究院　尾島孝男教授に心から感謝申し上げます。主査の労を賜りました同研究院 澤辺智雄教授に心から感謝申し上げます。また、副査の労を賜りました同研究院 都木靖彰教授、御助言ならび副査の労を賜りました同研究院 井上晶准教授に深く感謝申し上げます。

研究遂行にあたり御協力をいただいた田中啓之助教ならびに海洋分子生物学研究室の皆様に感謝の意を表すとともに、素晴らしい研究環境を与えてくださった諸先生方に重ねて深く感謝いたします。