

褐藻の主要多糖類アルギン酸の分解物が示す特定アミノ基との反応性

河井重幸¹、橋本 渉²

¹石川県立大学 生物資源工学研究所

²京都大学大学院 農学研究科 食品生物科学専攻

はじめに

海洋バイオマス（海藻）は近頃ブルーカーボンとも呼ばれ、潜在的に有望な未利用資源として注目を集めている。四方を海に囲まれた我が国にとってはなおさらである。著者らは、海藻の中でも特に褐藻に着目している。

最近、バイオリファイナリーの優良な宿主として知られるパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に褐藻の主要炭水化物多糖アルギン酸の分解物 DEH (4-デオキシ-L-エリスロ-5-ヘキソースウロン酸：図1) を資化する能力を、必要な4つの遺伝子の導入と適応進化実験により付与することに成功しており¹⁾、パン酵母を宿主として褐藻を原料とするバイオリファイナリーも視野に入ってきている。DEHは、エキソ型アルギン酸リアーゼによるアルギン酸の分解で生じるモノウロン酸である。

パン酵母も含めて微生物の培養には炭素源のみでなく窒素源も必要である。著者らは、アルギン酸に内在する化学特性、すなわちアルギン酸の分解物 DEH が特定のアミノ基に対して高い反応性を示すという知見を得た²⁾ので、ここに紹介する。

1. DEH と特定のアミノ基との反応性の発見

そもそもはエキソ型アルギン酸リアーゼ反応液 (Tris 緩衝液、アルギン酸、同リアーゼ) の薄層クロマトグラフィー (TLC) の分析結果と、DEH (アルギン酸水溶液に同リアーゼを作用させて調製) の TLC の分析結果が異なることに著者らが気づいたのが、ことの発端であった。

検討を重ねた結果、Tris のアミノ基が常温 (30°C)、常圧で DEH と反応していたことが分かった。他のアミノ基を持つ化合物と DEH との反応性を調べたところ、アンモニウム塩、Gly、Ser、Gln、Thr、Lys が特に高い反応性を示した結果、DEH が消滅し、TLC 上で移動度の大きい新たな化合物 (DRP-1 と仮称) が形成された。Tris との反応時の反応時間に関して言えば、DEH と Tris 混合直後に DEH は消滅し、反応 18 時間後に DRP-1 が形成された。これらの化合物とは対照的に、Ala、Pro、Leu、Ile、Phe、Val、Asp、硝酸塩は全く DEH と反応せず、Asn、Met、Glu、Arg はほとんど反応しなかった。上記の結果の一部を図 2 に示す。これらの反応性のない、または低いアミノ酸 (Asn、Glu、Ala、Pro、Phe、Asp) は、DEH を炭素源とした培養条件において、DEH 資化能を付与したパン酵母株 (DEH++株) にとって良好な窒素源として機能したが、反応性の高いアンモニウム塩、Ser、Gln、Thr は窒素源として機能しなかった。なお、酵母エキスとトリプトンの混合物も機能した。著者らは、DEH++株が DEH を炭素源とする酵母 YNB 培地 (アンモニウム塩を窒素源として含む、酵母研究で頻用される培地) で全く生育しないことを経験していたが、これで合点がいった。

2. 反応性という問題の回避手段

著者らの試算によると、褐藻そのものを炭素源として利用する場合、褐藻のアルギン酸由来 DEH の 7.8% が褐藻由来の高反応性アミノ酸と反応して消失し得る。これを回避するための手段として例えば、まず DEH++株に褐藻由来の別の炭素源 (マンニトール) を資化させ (DEH++株にはマンニトール資化能も付与¹⁾)、この間に高反応性アミノ酸も消費させた後にエキソ型アルギン酸リアーゼを投入してアルギン酸を DEH に変換する二段階反応が考えられる。勿論、DEH ではなくアルギン酸を取り込ませるような酵母の改変も手段の一つである。

3. 2-フランカルボン酸という新たな生成物

機器分析の結果、反応によって新たに生じた化合物 (DRP-1) は 2-フランカルボン酸 (FA : 図1) と同定された。メイラード反応を基に、DEH とアンモニウム塩から FA が形成される反応経路も推定した

(図3)。常温常圧で DEH から炭素 (C) 1 原子、酸素 (O) 3 原子、水素 (H) 4 原子分が外れる反応が進行していることになる。

FA は、寒天粉末に微量混入し、環境細菌の運動を阻害する化合物としても知られていたが（それゆえ寒天培地では特定の細菌のコロニー形成が阻害）³⁾、寒天中の FA の起源は不明であった。著者らは、寒天成分アガロペクチン中のグルクロン酸残基由来 Dhu (DEH の立体異性体) が、DEH から FA へと至るのと同様の反応で（同一の中間体を経て）FA が形成されるのでは無いかと推定している（図3）。

おわりに

以上のアルギン酸に内在する化学特性は、DEH を炭素源とするバイオリファイナリーで窒素源を選定する上で不可欠の知見である。つまり、微生物を用いて DEH から化成品や燃料を生産する際にどんな窒素源を用いる必要があるか、用いてはいけないかが明らかとなった。スフィンゴモナス属細菌のようなアルギン酸資化性の細菌がアルギン酸のまま細胞内に取り込むのは、この反応性を考えると合理的である。一方、アルギン酸資化性の海洋性真菌 *Asteromyces cruciatus* は DEH 取り込み体 (Ac_DHT1) を有するため、細胞外 DEH を取り込むと推定される (Ac_DHT1 を DEH++株に導入している¹⁾)。なぜ、アルギン酸資化性の真菌は、DEH の高反応性というリスクにも拘わらず、アルギン酸で無く DEH を取り込むように進化したのか？アルギン酸を取り込む真菌は、いまだ見つかっていない。

参考文献

- 1) Matsuoka, F. *et al.*: Crucial role of 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronate reductase for alginate utilization revealed by adaptive evolution in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.*, 7(1), 4206 (2017)
- 2) Nakata, S. *et al.*: Uncovering the reactive nature of 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronate for the utilization of alginate, a promising marine biopolymer. *Sci.*

Rep., 9(1), 17147 (2019)

- 3) Hara, S. *et al.*: Trace amounts of furan-2-carboxylic acids determine the quality of solid agar plates for bacterial culture. *Plos One*, 7(7), e41142 (2012)

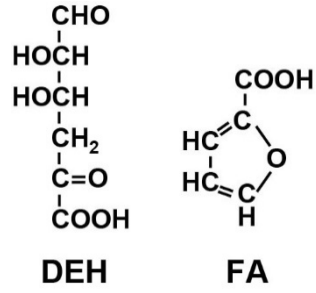


図1 DEHと2-フランカルボン酸 (FA)

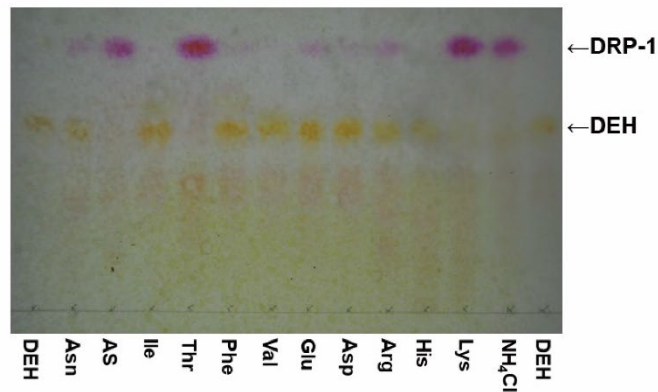


図2 DEHとアンモニウム塩、アミノ酸との反応性

反応液 (30°C、24時間) のTLCの結果。AS:硫酸アンモニウム。(文献²⁾より転載改変)。

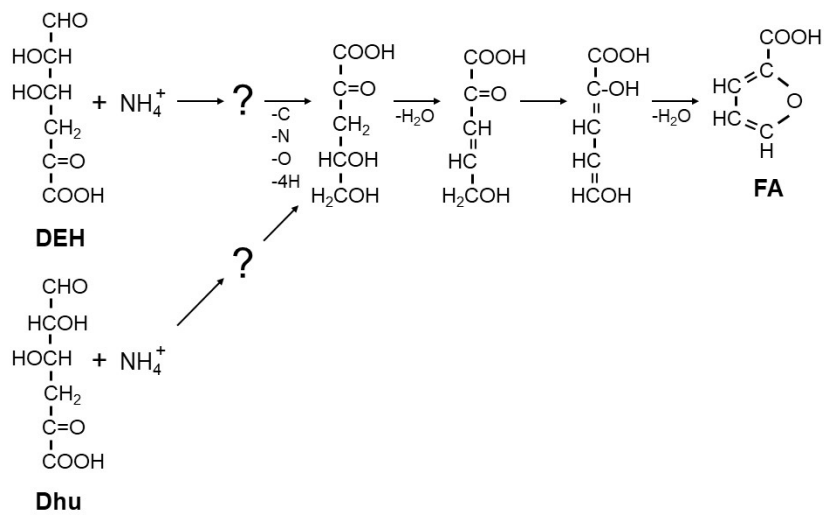


図3 DEHまたはDhuからFAの合成経路 (推定)

(文献²⁾より改変転載)。