

塩ストレスによる紅藻類の食味改善物質の同定と機構に関する研究

熊谷 祐也, 岸村 栄毅, 川越 力

北海道大学大学院水産科学研究院

概要 将来的な食料不足に備えた持続可能な資源の利用及び新たな資源の確保が必要とされており、海藻もその資源の一つと考えられる。これまでに種々の海藻の利用が検討されてきたが、その一つに北海道沿岸の寒帯性海域に分布する紅藻ダルスがある。北海道産ダルスの有用成分としてフィコエリスリンおよびルテインを豊富に含むことを見出し、その他にもオリゴ糖にビフィズス菌の増殖作用、ペプチドに血圧抑制作用や抗酸化作用、ビタミン、ミネラルおよび EPA などの不飽和脂肪酸を多く含むことから、北海道産ダルスがスーパーフードとなり得る新たな地域資源として有望性が明らかにされた。ダルスはアイルランドやカナダでは古くから食品とされているが、日本ではあまり馴染みのない海藻である。海苔は浸透圧ストレスなどにより美味しさを増すことから、紅藻ダルスにおいてもそれが可能であるかと考えた。そこで食味改善を目指した、塩ストレスによる成分変動および浸透圧調節に関わる遺伝子の解析を行った。

塩処理試料はコントロール試料と比較して、澱粉量が 2.2 倍に増加した。また、乾燥重量に占める全アミノ酸量は塩処理条件試料において、1.3 倍に増加した。その中でもアスパラギン酸(アスパラギン+アスパラギン酸)の増加は全体の 20% 近くを占めた。筋肉タンパク質の主原料となる分岐鎖アミノ酸や脂質代謝改善効果のある含硫アミノ酸は塩処理試料でそれぞれ 1.3 倍および 2.2 倍に増加した。また、遊離アミノ酸量は、塩処理試料で 1.2 倍に増加した。旨味に関するグルタミン酸及びアスパラギン酸量は、塩処理試料で 1.1 倍に増加した。海苔とダルスの遊離アミノ酸量を比較すると、海苔ではグルタミン酸とアラニンが約 1,000 mg/100 g 含まれているのに対し、ダルスでは塩処理後においてそれぞれ 220 mg/100g および 125 mg/100 g であり、含量に大きな違いが見られた。一方、浸透圧調節の水溶性低分子物質として、フロリドシド、トレハロース、およびスクロースが推測された。遺伝子解析の結果から、ダルスの葉緑体、細胞質内澱粉合成遺伝子およびそれから生じるフロリドシド、トレハロース、およびスクロースの代謝に関わる遺伝子を見出した。そのうち、ダルスに含まれる主要な浸透圧調節物質はフロリドシドであることが分かった。

1. 研究目的

近年、世界人口の増加に伴う将来的な食料不足に備えた持続可能な資源利用及び新たな資源の確保が必要とされており、海藻もその資源の一つと考えられる。これまでも種々の海藻の利用が検討されてきたが、その一つに寒帯性海域に分布する紅藻ダルスがある。日本においてダルスは岩手県北部以北に分布するが、1 月から 3 月にコンブ養殖のロープに繁殖するため、コンブへの日光を遮る雑海藻として扱われてきた。しかし、資源量は北海道南部地域だけでも湿重量で 1,000 t/年を超えると推算さ

れており、新たな水産資源として期待されるようになった。ダルスはアイルランドやカナダでは古くから食用とされているが¹⁾、日本ではあまりなじみのない海藻である。北海道産ダルスは、一般的な海藻と比較してタンパク質の含有率が高く、海苔や大豆のそれに匹敵する。ダルス由来タンパク質の主成分はフィコビリタンパク質であり、これまでに抗酸化作用、アンジオテンシン変換酵素阻害作用、および脳機能改善作用を有することを見出した^{2,3)}。また、ダルスは細胞壁多糖として 5 つの β -(1, 4)-結合した D-キシロースが β -(1, 3)-結合した反復構造を持つキシランを有

する⁴⁾。ダルス・キシランから調製した β -(1, 3)- β -(1, 4)-キシロトリスにはビフィズス菌 *Bifidobacterium adolescentis* への増殖作用を明らかにした⁵⁾。さらに、ダルスの低分子化合物として、紫外線吸収物質および抗酸化作用を持つマイコスポリン様アミノ酸(MAAs)が含まれることを示した⁶⁾。その他にも、ビタミン、ミネラル、およびEPAなどの不飽和脂肪酸を多く含むため、北海道産ダルスにスーパーフードとなり得る成分が含まれることを見出した。

このように、北海道産ダルスは様々な機能性成分を含有する新規水産資源として近年注目されており、利用されつつある。しかし、現在の北海道南部地域におけるダルス供給源はコンブ養殖ロープに自然繁殖しているもののみである(平均13 t/年)。また、コンブ養殖ロープにはダルス以外の海藻も繁殖しており、収穫後の選別作業が必要である。そのうえ、海水温の上昇や磯焼けなどの環境要因がダルスの生育に悪影響を及ぼす可能性が指摘されている。これらの背景を踏まえ、ダルス陸上栽培試験が開始された。天然環境下では、栽培条件を制御するのはほぼ困難であるが、陸上栽培では比較的容易に制御することが可能であることから、栄養成分、見た目、味の制御をできることが期待される。野菜ではストレスを与えることにより甘さが増すなどの技術があり、海苔でも干出により乾燥ストレスなどによる美味しさを増すことから、紅藻ダルスにおいてもストレスにより成分変動が可能であるかと考えられた。多くの紅藻は潮間帯に生育しており、塩分濃度の変化や太陽光などのストレスにさらされている。そのため、干出に

伴い浸透圧を調製する必要があり、紅藻ではフロリドシド、スクロース、トレハロースなどが浸透圧調節機能を担うとされている⁹⁾。

国内での紅藻の利用は主に海苔が挙げられるが、海外では食品や工業用品の増粘剤として利用されるカラギーナンを生産するために栽培されている。そのため、それらのゲノムをはじめとする遺伝子情報が蓄積されているが、ダルスにおいて葉緑体やミトコンドリアゲノムが解読されたことで日本産と海外産のダルスに違いが明らかになったが、代謝に関わる多くの遺伝子がコードされている核ゲノムの情報がほとんどない。そのため、ストレスによる成分変動を知ることができるが、それがどのように生じているかの分子メカニズムの解明が困難である。そこで、代謝に関する遺伝子を明らかにするために、ゲノムおよび代謝に関わる遺伝子情報の取得が必要であることから、代謝生成物およびその代謝に関わる遺伝子の取得を行った。

2. 研究方法

2.1 試料

ダルスは共同研究機関のある八雲町の汽水域で採取した(Fig. 1)。育成は一定温度、12時間明暗条件下でその一部を通常条件、一部を塩ストレス条件下で育成した。その後、水道水で洗浄した後、凍結乾燥したものをを用いた。ダルス微粉末は、ワンダーブレンダー(大阪ケミカル)を用いて、ダルス藻体を標準フタで15秒間粉碎し、次いで、微粉碎フタで15秒間粉碎することで調製した。遺伝子解析用の試料として一部を-80°Cで保存した。

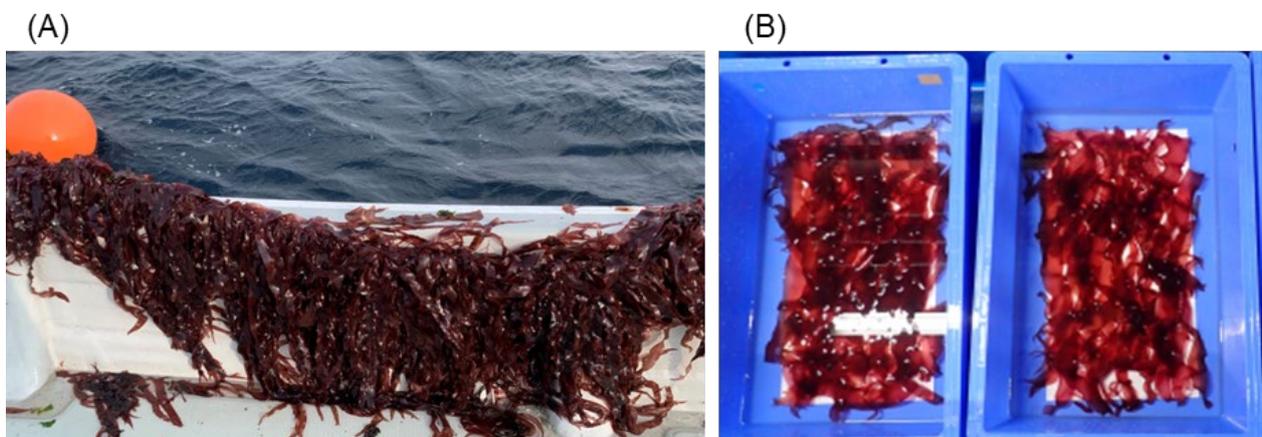


Fig. 1. Red alga dulse. (A), Dulse on kelp farming rope; (B), Dulse under test.

2. 2 成分分析

2. 2. 1 澱粉量

微粉末に含まれる紅藻デンプン量は、20 mg の試料を用いて、アミロース/アミロペクチンアッセイキット(メガザイム)の protocols に従いグルコース量を定量して測定した。

2. 2. 2 アミノ酸量

微粉末に含まれるアミノ酸量は、タンパク質をメルカプトエタンスルホン酸で加水分解し、得られたアミノ酸をニンヒドリン・ポストカラム発色法で修飾し、HPLC で分析した。遊離アミノ酸の抽出は、1 g の微粉末に 60%エタノールで 85°C、15 分間加熱し、遠心分離により上清を回収し、その操作を 2 度行った。エバポレータでエタノールを除去した後、ジエチルエーテルで脂溶性成分を除去したものを遊離アミノ酸とし、ニンヒドリン・ポストカラム発色法で修飾し、HPLC で分析した。

2. 2. 3 薄層クロマトグラフィー

TLC シリカゲル 60(Merck Millipore)に 10 mg/mL に溶解した試料を 1.0 μ L ずつスポットし、展開溶媒に n-ブタノール:アセトン:蒸留水=4:5:1 (v/v/v)を用いて薄層版上端 0.5 cm まで展開した。検出は発色試薬(ジフェニルアミン:アニリン:アセトン:80%リン酸=2:2:100:15 (w/v/v/v))を噴霧し、薄層板を加熱して行った。

2. 3 配列決定

2. 3. 1 cDNA クローニング

ダルス全 RNA は、藻体を凍結粉砕し、RNeasy[®] Mini キット(Qiagen)を用いて調製した。cDNA ライブラリーは、PrimeScript[™] 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)を用いて調製し、3'末端のライブラリーを 3'-Full RACE Core Set (TaKaRa)を用いて調製した。プライマーは他種紅藻の各酵素遺伝子情報を元に、Blast で保存性の高い部分を選択肢して作成した。

2. 3. 2 ゲノム解析

ゲノム DNA は、NucleoBond[®] HMW DNA (TaKaRa)を用いて調製した。Total RNA はダルス藻体を液体窒素で凍結破碎後、RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて調製した。全配列は PacBio Sequel II 次世代シーケンサーにより解析した。mRNA の解析は Iso-Seq により解析した。

3. 研究結果

3. 1 成分分析

3. 1. 1 紅藻澱粉量

コントロール試料と塩処理試料における澱粉量を比較した。まず、試料中に含まれるグルコース量はコントロール試料と塩処理試料それぞれ 1.5 mg/g 乾燥重量と 2.2 mg/g 乾燥重量であった。アミラーゼ等の酵素処理により得られた澱粉量はそれぞれ 9.9 mg/g 乾燥重量および 21.5 mg/g 乾燥重量で塩処理試料において 2.2 倍増加した。大型の紅藻種によっては、細胞体積の最大 80%を紅藻澱粉が占めると報告があるが⁷⁾、本試験での増加はそれに比べて僅かであった。

3. 1. 2 アミノ酸組成の比較

コントロール試料と塩処理試料におけるアミノ酸組成を比較した (Table 1)。乾燥重量に占めるアミノ酸量は塩処理条件下において測定したすべてのアミノ酸が増加し、全体として 1.3 倍増加した。中でもアスパラギン酸(アスパラギン+アスパラギン酸)は 10 mg 近く増加し、増加分の 20%近くを占めた。相対値として少ないシステインやメチオニンが大きく増加したのに対し、アラニンおよびトリプトファンはほとんど変化しなかった。筋肉運動による末梢性疲労や中枢性疲労の緩和効果等がある分岐鎖アミノ酸 (BCAA) や脂質改善効果がある含硫アミノ酸はコントロール試料と塩処理試料でそれぞれ 1.3 倍および 2.2 倍増加した。

3. 1. 3 遊離アミノ酸の比較

コントロール試料と塩処理試料における遊離アミノ酸組成を比較した (Table 2)。20 種類の遊離アミノ酸総量は、コントロール試料 951 mg/100 g に対して、塩処理試料で 1,115 mg/100 g と 1.2 倍に増加した。主要な遊離アミノ酸としてアスパラギン酸、グルタミン酸、プロリン、およびアラニンであった。アミノ酸の中でもグルタミン酸およびアスパラギン酸は旨味に関するもので、塩処理試料で 1.1 倍であった。甘味に関するアミノ酸として、アラニン、グリシン、セリン、スレオニン、グルタミン、プロリン、およびアスパラギンが分類されるが、それらの総量変化として塩処理試料で 1.2 倍に増加した。一方、苦味に関するアミノ酸であるトリプトファン、フェニルアラニン、イソロイシン、ロイシン、アルギニン、バリン、チロシン、リシン、およびヒスチジンは、塩処理試料においてそれらの総量が 1.6 倍に増加した。

塩処理試料の甘味および苦味に関するアミノ酸総量はそれぞれ 428 mg/100 g および 91.0 mg/100 g であり、総量として甘味に関与するアミノ酸の方が多かった。その他の遊離アミノ酸は全体的に総量が少なかった。塩処理試料においてエタノールアミンが 2.7 倍と大きく増え、タウリンも

1.4 倍となった。アンセリンやバレンニンなどの特異なペプチドを構成する β -アラニンの増加やコントロール試料において検出されなかった 1-メチルヒスチジンが検出された。一方、 α -アミノアジピン酸、 α -アミノ酪酸、 γ -アミノ酪酸、エタノールアミンリン酸、およびサルコシンは僅かに減少した。

Table 1. Amino acid composition of control and stressed dulse

		Ala	Arg	Asp*	Cys	Glu**	Gly	His	Ile	Leu	Lys
Control	mg/100 g	1,344	789	1,562	121	1,749	852	207	489	925	825
Stress	mg/100 g	1,374	1,010	2,568	317	1,977	1,130	283	618	1,124	1,232
Stress/Control	(fold)	1.02	1.27	1.64	2.62	1.13	1.33	1.37	1.26	1.21	1.49
		Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	NH ₃	Sum
Control	mg/100 g	156	584	919	681	621	53	508	698	293	13,385
Stress	mg/100 g	284	779	1,277	930	864	62	737	933	400	17,900
Stress/Control	(fold)	1.82	1.33	1.39	1.36	1.39	1.16	1.45	1.34	1.37	1.34

*, Asp + Asn; **, Glu + Gln

Table 2. Free amino acid analysis composition of control and stressed dulse

	Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Gln	Glu	Gly	His
Control (mg/100g)	118	3.2	10.7	340	N.D.*	22	195	7.1	1.8
Stress (mg/100g)	126	3.4	13.3	377	N.D.	29	219	9.7	2.1
Stress/Control (fold)	1.1	1.1	1.2	1.1	N.D.	1.3	1.1	1.4	1.2
	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp
Control (mg/100g)	8.2	10.9	8.6	N.D.	8.8	182	8.8	10.2	1.4
Stress (mg/100g)	14.9	20.4	10.6	N.D.	13.6	222	14.9	13.9	2.4
Stress/Control (fold)	1.8	1.9	1.2	N.D.	1.5	1.2	1.7	1.4	1.7
	Tyr	Val	α -AAA	α -ABA	γ -ABA	β -Ala	EOH-NH ₂	Hypro	1Mehis
Control (mg/100g)	4.3	9.3	0.60	1.01	0.22	3.48	0.34	35.91	N.D.
Stress (mg/100g)	6.6	17.1	0.54	0.92	0.18	3.77	0.90	39.72	0.37
Stress/Control (fold)	1.5	1.8	0.9	0.9	0.8	1.1	2.7	1.1	N.D.
	Orn	PEA	Sar	P-Ser	Tau	NH ₃	Urea		
Control (mg/100g)	2.31	1.93	0.44	91	3.15	4.13	3.38		
Stress (mg/100g)	2.34	1.66	0.33	99	4.27	5.38	6.03		
Stress/Control (fold)	1.0	0.9	0.8	1.1	1.4	1.3	1.8		

3-Methyl histidine, anserine, carnosine, cystathionine, and hydroxylysine are not detected.

*, not detected.

α -AAA, α -amino adipic acid; α -ABA, α -amino-n-butylric acid; γ -ABA, γ -Aminobutyric acid; EOH-NH₂, ethanolamine; Hypro, hydroxyproline; 1Mehis, 1 methyl histidine; Orn, ornithine; PEA, o-phosphoethanolamine; Sar, sarcosine; P-Ser, o-phosphoserine; Tau, taurine.

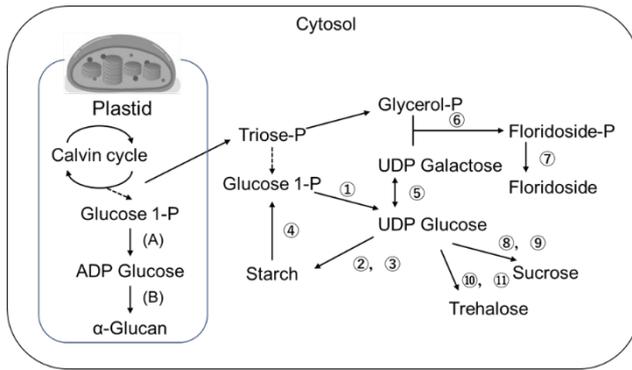


Fig. 2. Carbon metabolic pathway in red alga.

Metabolic enzyme in plastid: (A), ADP-glucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.27); (B), Starch synthase (EC 2.4.1.21, EC 2.4.1.242). Metabolic enzyme in cytosol: ①, UDP-glucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9); ②, Starch synthase (EC 2.4.1.11, EC 2.4.1.242); ③, Branching enzyme (EC 2.4.1.18); ④, Glycogen phosphorylase (EC 2.4.1.1); ⑤, Galactose-phosphate UDP-transferase (EC 2.7.7.12); ⑥, Floridoside phosphate synthase; ⑦, Floridoside phosphate phosphatase; ⑧, Sucrose-phosphate synthase (EC 2.4.1.14); ⑨, Sucrose-phosphate phosphatase (EC 3.1.3.24); ⑩, Trehalose-phosphate synthase (EC 2.4.1.15); ⑪, Trehalose-phosphatase (EC 3.1.3.12).

3. 1. 4 糖の検出

乾燥粉末試料から水抽出した成分を TLC に供した。フロリドシドと予想される単一のスポットが得られ、スポット強度から 3.8 mg/g 乾燥粉末が含まれることが分かった。

3. 2 紅藻ダルスにおける炭素代謝に関わる酵素

3. 2. 1 葉緑体における α -グルカンの合成

紅藻における光合成で生産される糖質として、Fig. 2 のような代謝産物および経路が考えられる。紅藻ダルスにこれらを生合成する酵素があるか検討した (Table 3)。葉緑体にはグルコース 1 リン酸を ADP グルコースに変換する ADP グルコースピロホスホリラーゼを 1 つ見出した。また、それを α -グルカンに伸長するスターチシンターゼとして、その触媒能を有する遺伝子ファミリー GT4 および GT5 に分類される 6 種のうち、GT5 に分類される 1 つに ADP グルコース合成活性を有することを見出した。

3. 2. 2 細胞質における α -グルカンの合成

細胞質には、葉緑体で合成された 3 炭糖リン酸からグルコース 1 リン酸ができる。それを UDP グルコースへと変換する UDP グルコースピロホスホリラーゼが見出された。それを基質として紅藻澱粉を合成するスターチシンターゼ、 α -(1,6)-グルカン側鎖を作る 1,4- α -グルカン分枝酵素、

さらに多糖をグルコース 1 リン酸へと低分子化するスターチホスホリラーゼが見出された。

3. 2. 3 細胞質における浸透圧物質の合成

UDP グルコースから多糖に加えてトレハロースやスクロースが合成される。一方、フロリドシドの構成糖はガラクトースであり、UDP グルコースから UDP ガラクトースへの変換が必要である。ダルスからそれを触媒するガラクトース 1 リン酸ウリジルトランスフェラーゼの遺伝子を見出した。Pade ら⁸⁾は単細胞紅藻イデユコゴメ綱のトレハロース 6 リン酸合成酵素様の酵素 (Gasu_10960: EME31717) がフロリドシドの合成に関わることを報告した。本遺伝子は GT20 に分類される酵素であり、紅藻ダルスから 3 つの遺伝子が見出された。相同性検索から 3 つのうち、1 つの遺伝子が 46% の高い相同性を示したことから、ダルスにおけるフロリドシド合成酵素遺伝子である推測された。イソフロリドシド合成酵素として Gasu_26940 (AN, EME29908) が示されているが、ダルスにおいて相同性のある遺伝子を見出すことができなかった。一方、トレハロース 6 リン酸合成酵素として Gasu_01890 (EME32832) および Gasu_22110 (EME30539) の 2 つが報告されている。そのうち、Gasu_22110 と 41% の相同性を示したことから、本遺伝子がダルスにおけるトレハロース 6 リン酸合成酵素と推測された。もう一つの遺伝子はイデユコゴメ綱の遺伝子と相同性を示さず、Blast 検索において、大型紅藻の GT20 と高い相同性を示したが、その機能性は不明である。

スクロース合成酵素は GT4 に分類され、それにはスクロース 6 リン酸合成酵素およびスクロース合成酵素に加えて、多種多様な触媒活性を有する酵素が含まれる。ダルスから 5 つの GT4 遺伝子が得られたが、それらはいずれもスクロース合成に関わる遺伝子と低い相同性であった。一方、スクロース 6 リン酸からスクロースを合成する酵素遺伝子を 2 つ見出した。これらは 77% の相同性であった。スクロース 6 リン酸合成酵素を見出せなかったが、ダルスは UDP グルコースとフルクトース 6 リン酸からスクロース 6 リン酸を合成し、スクロースリン酸ホスファターゼによりスクロースを生成する可能性が示された。

また、多糖からマルトースを生成する β -アミラーゼの遺伝子、マルトースからトレハロースを生成する合成酵素および澱粉からトレハロースを生成するマルトシルトレハラーゼを見出した。

Table 3. List of carbon metabolism genes

No.	Gene Number	Gene	Amino acid	CAZy database*	EC number
A	FUN_008319	ADP-glucose pyrophosphorylase	408	—	2.7.7.27
B	FUN_008320	Starch synthase	444	GT5**	2.4.1.21
①	FUN_027452	UDP-glucose pyrophosphorylase	449	—	2.7.7.9
②	FUN_003156	Starch synthase	1656	GT5	2.4.1.11
③	FUN_008318	Branching enzyme	735	GH13***	2.4.1.18
	FUN_036317	4- α -Glucanotransferase	963	GH77; CBM20****	2.4.1.25
④	FUN_036036	Starch phosphorylase	868	GT35	2.4.1.1
⑤	FUN_021772	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase	362	—	2.7.7.12
⑥	FUN_032299	Trehalose-phosphatase	1123	GT20; CBM20	
⑦	—	—	—	—	—
⑧	FUN_032056	Sucrose synthase	400	GT4	2.4.1.14
⑨	FUN_012138	Sucrose-phosphate phosphatase	396	—	3.1.3.24
	FUN_036628	Sucrose-phosphate phosphatase	396	—	3.1.3.24
⑩	FUN_003046	Trehalose-phosphatase	1203	GT20	2.4.1.15
	FUN_014951	β -Amylase	457	GH14	3.2.1.2

*, <http://cazy.org>

***, GlycosylTransferase family*

****, Glycoside Hydrolase family*

*****, Carbohydrate-Binding module family*

4. 考察

4.1 味への影響

食用紅藻の代表格として海苔が挙げられる。海苔の旨味成分として遊離アミノ酸, 5'-ヌクレオチド類, 遊離糖類とされている。遊離アミノ酸ではグルタミン酸とアラニンが, イノシン酸およびグアニル酸との共存により旨味を増すとされている¹⁰⁾。海苔とダルスの遊離アミノ酸量を比較すると, 海苔ではグルタミン酸とアラニンが約 1,000 mg/100 g 含まれているのに対し, ダルスでは塩処理後においてそれぞれ 220 mg/100 g および 125 mg/100 g であり, 大きな違いが見られた。海外産ダルスの遊離アミノ酸量と比較すると, グルタミン酸とアラニンはそれぞれ 430 および 120 mg/100 g であった¹¹⁾。北海道産および海外産ダルスのいずれにおいても海苔よりグルタミン酸が少ないことから, 海藻種または繰返しの干出による影響であると考えられた。また, 海苔ではタウリンが約 1,000 mg/100 g とアラニンと同程度含まれているのに対し, ダルスでは 4 mg/100 g

と有意に少ないことから, ダルスの特徴を生かす栽培方法の確立が求められることが示唆された。また, 旨味に関してアミノ酸の他に浸透圧物質としてフロリドシドの含有が示された。トレハロースやスクロースの合成経路が見出されたが, それらはほとんど生産されていないことが分かった。フロリドシドは爽やかな甘味を呈すると知られているが, 近年ではグルタミン酸と 5'-イノシン酸の相乗効果が旨味の決定に大きく影響するとされている⁹⁾。

4.2 紅藻のゲノム

紅藻は環境により形態が大きく異なることから種の分類が困難であるため, 葉緑体やミトコンドリアの遺伝子を用いた分類が行われるようになった。一方, 代謝遺伝子をコードする核ゲノムの解読はウシケノリ綱やオゴノリ属やツノマタ属の数種類のみである。ダルスはそれらと進化的に離れている(**Fig. 3**)。

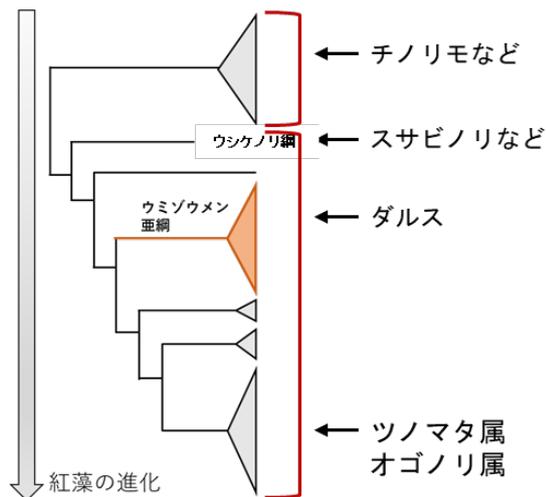


Fig. 3. Evolution of red algae.

Red algae are mainly classified into two groups, Proteorhodophytina and Eurhodophytina. The nuclear genome of red algae is determined by several Proteorhodophytina, Bangiophyceae and few Gigartinales and Gracilariopsis. The genome of dulse is evolutionarily far from the previously reported.

そのため、澱粉代謝関連酵素の中でも、澱粉ホスホリラーゼがツノマタ属の *Chondrus crispus* の酵素と82%と高い相同性を示したのに対し、他の酵素は原始紅藻綱またはツノマタ属のものと同様 50~60%台の相同性と低値であった。また、トレハロース合成酵素様の酵素がフロリドシドを合成するなど詳細な機能が分かっていないものも多い⁸⁾。このことは真正紅藻綱の中でもダルスをはじめとする亜綱由来の紅藻類のゲノム解読により、構造の多様性を有する新規の酵素、それをはじめとする代謝経路の解明により、紅藻が美味しくなるメカニズムの解明を進める。

5. 今後の課題

本研究では、紅藻澱粉合成に関する遺伝子の発現解析を行う予定であったが、核ゲノム解析が進んだことから、当初予定していた遺伝子数よりも多くの代謝関連酵素が明らかになり、その解析に注力および解析する遺伝子の再検討することが適切と考えられたため、期間内に終わることができなかった。サンプルは保管してあるため、今後速やかに発現解析を行い、塩ストレスによる影響を評価する予定である。

6. 文献

1. Yuan V Y, Bone E D, Carrington F M (2005) Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated in vitro. *Food Chemistry* 91: 485–494.

2. Furuta T, Miyabe Y, Yasui H, Kinoshita Y, Kishimura H (2016) Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from phycobiliproteins of dulse *Palmaria palmata*. *Marine Drugs* 14: 32.

3. Sato Y, Furuta T, Takeda T, Miyabe Y, Ura Y, Takagi Y, Yasui H, Kumagai Y, Kishimura H (2018) Antioxidant activity of proteins extracted from red alga dulse harvested in Japan. *Journal of Food Biochemistry* 43: 12709.

4. Yamamoto Y, Kishimura H, Kinoshita Y, Saburi W, Kumagai Y, Yasui H, Ojima T (2019) Enzymatic production of xylooligosaccharides from red alga dulse (*Palmaria* sp.) wasted in Japan. *Process Biochemistry* 82: 117–122.

5. Kobayashi M, Kumagai Y, Yamamoto Y, Yasui H, Kishimura H (2020) Identification of a key enzyme for the hydrolysis of β -(1→3)-xylosyl linkage in red alga dulse xylooligosaccharide from *Bifidobacterium adolescentis*. *Marine Drugs* 18: 174.

6. Nishida Y, Kumagai Y, Michiba S, Yasui H, Kishimura H (2020) Efficient extraction and antioxidant capacity of mycosporine-like amino acids from red alga dulse *Palmaria palmata* in Japan. *Marine Drugs* 18: 502.

7. Yu S, Blennow A, Bojko M, Madsen F, Olsen C E, Engelsen S B (2002) Physico-chemical characterization of floridean starch of red algae. *Starch* 54: 64–74.

8. Pade N, Linka N, Ruth W, Weber A P M, Hagemann M (2014) Floridoside and isofloridoside are synthesized by trehalose 6-phosphate synthase-like enzymes in the red alga *Galdieria sulphuraria*. *New Phytologist* 205: 1227–1238.

9. Araki S, Izumino Y, Sakurai T, Takahashi K (1997) Taste evaluation of toasted Nori, *Porphyra yezoensis*, a red alga by warm water-extract. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 44: 430–437.

10. Machre H K, Edvinsen G K, Eilertsen I K E, Elvevoll E O (2016) Heat treatment increases the protein bioaccessibility in the red seaweed dulse (*Palmaria palmata*), but not in the brown seaweed winged kelp

(*Alaria esculenta*). *Journal Applied Phycology* 28: 581–590.

11. Gadberry B A, Colt J, Maynard D, Boratyn D C, Webb K, Johnson R B, Saunders G W, Boyer R H (2018) Intensive land-based production of red and green

macroalgae for human consumption in the Pacific Northwest: an evaluation of seasonal growth, yield, nutritional composition, and contaminant levels. *Algae* 33: 109–125.

Study on Mechanism and Identification of Taste Improvement Compounds of Red Algae by Salt Stress

Yuya Kumagai, Hideki Kishimura, Chikara Kawagoe

Faculty of Fisheries Science, Hokkaido University

Summary

Seaweed is considered to be one of the sustainable resources for future food shortages. Red algae dulse is mainly distributed in the cold waters along the coast of Hokkaido. Hokkaido dulse contains useful ingredients for human health such as abundant phycoerythrin and lutein. In addition, it also contains the growth effect of oligosaccharides on *Bifidobacterium* sp., bioactive peptides with antihypertensive and antioxidant activity, unsaturated fatty acids such as EPA, vitamins, and minerals. Therefore, Hokkaido dulse has been revealed a new regional resource containing useful ingredients. Dulse is a familiar food in Irish and Canadian, but not in Japanese.

For the potential of dulse as a food, we attempted to improve the taste by salt stress and elucidated the genes involved in starch synthesis and osmotic pressure regulation compounds. The amount of floridian starch in the salt-treated sample increased 2.2 times compared to the control sample. In addition, the total amount of amino acids in the dry weight increased 1.3 times in the salt-treated sample. Among them, the increase in aspartic acid (asparagine + aspartic acid) accounted for nearly 20% of the total. Branched-chain amino acids, which are the main raw materials for muscle proteins, and sulfur-containing amino acids, which have the effect of improving lipid metabolism, increased 1.3-fold and 2.2-fold in salt-treated samples, respectively. In addition, the amount of free amino acids increased 1.2 times in the salt-treated sample. The amounts of umami-related amino acids, glutamic acid and aspartic acid, increased 1.1-fold in the salt-treated sample. Comparing the amount of free amino acids in Nori and salt-treated dulse, Nori contains about 1,000 mg/100 g of glutamic acid and alanine, whereas dulse contained 220 mg/100 g and 125 mg/100 g, respectively. Water-soluble small molecules such as floridoside, trehalose, and sucrose are thought as osmolyte. Dulse genome contained the genes involved in the starch synthesis in chloroplast and cytoplasmic, osmolyte productions floridoside, trehalose, and sucrose. Among them, it was found that the main osmolyte in dulse was floridoside.