

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Chuan He
審 査 委 員	主査 大西 浩平 副査 渡邊 誠也 副査 渡邊 彰 副査 加藤 伸一郎 副査 村松 久司

論 文 名

Studies on Ulvan-Degrading Enzymes from *Alteromonas* sp.

(アルテロモナス属由来ウルバン分解酵素に関する研究)

審査結果の要旨

大型藻類は、褐藻、紅藻、緑藻に大別される。褐藻のワカメやコンブは食用として利用されるが、多くは未利用である。特に、緑藻のアオサ類は大量繁殖し、グリーンタイドを引き起こすことが知られている。回収されたアオサ類は、埋め立て、焼却などにより処理されている。一方、大型海藻を陸上養殖する試みも行われている。天然、養殖を問わず、大型藻類を未利用資源として捉え、有効に利用することを本論文では目指している。特にアオサ類の持つ硫酸化多糖ウルバンを微生物酵素によりオリゴ糖・単糖に変換し、利用されやすい形にすることを目的としている。

ウルバンは3位が硫酸化されたラムノースにグルクロン酸やそのC5エピマーであるイズロン酸、あるいはキシロースが結合した二糖を繰り返し単位とする構造をしている。ウルバンの微生物分解酵素は、繰り返し単位を切断するウルバンリアーゼと、リアーゼによって生じたオリゴ糖の非還元末端側に位置する不飽和ウロン酸を分解する加水分解酵素の2種類が生化学的に解析されている。それ以外にも硫酸基を除去するスルファターゼや糖のトランスポーターなどのウルバンの完全分解に関与する遺伝子が、ウルバンリアーゼ遺伝子の近傍に存在し、いわゆる *ulvan utilization loci* を構成していることが明らかとなっている。本論文では新規ウルバン分解細菌の探索と細菌が持つウルバン分解酵素の機能解析を行った。

まず、アオサ類の一種ミナミアオサを高知県浦ノ内湾から採取し、実験室内において人工海水で栽培した。採取したミナミアオサに付着していた貝やエビ、別に採取した貝を材料として、ミナミアオサをエサとして食する小動物の糞をミナミアオサウルバンの分解細菌の単離源とした。糞を回収し、ミナミアオサウルバンを唯一の炭素源とする人工海水中で集積培養を行い、ウルバン資化細菌のスクリーニングを行った。その後、ウルバン含有寒天培地と塩化セシルピリジニウムを利用して、ウルバン分解活性を評価することで、最も分解活性の高い2株、KUL17とKUL42を単離した。いずれの菌株も *Alteromonas* 属と同定された。ウルバン分解活性は、両株をウルバンを含む 1/2 marine broth 培地で培養したときのみ検出され

たことから、ウルバン分解酵素は誘導酵素であることが判明した。そこで、以降の実験には培地中に 0.05% のウルバンを添加して行った。培養上清中に含まれるタンパク質を硫酸沈殿によって回収したのち、強陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーの 2 段階の精製過程によりウルバン分解酵素を粗精製した。

ウルバン含有アガロースゲルを用いた活性染色では、複数のタンパク質がウルバン分解性を示したが、最も活性の高い分子量 55kDa のタンパク質に着目した。当該タンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定した。KUL17 および KUL42 株のドラフトゲノム解析を別途実施しており、N 末端アミノ酸配列を用いて Blast 解析を行ったところ、いずれも 999 アミノ酸からなるタンパク質をコードする遺伝子が同定され *ulla* と名付けた。*ulla* はこれまでに報告されているウルバンリアーゼと高い相同性を示した。糖鎖のグリコシド結合の分解は加水分解かリアーゼのいずれかで行われるが、精製酵素を用いた反応でリアーゼであることが実験的にも示された。ウルバン分解細菌は long 型と short 型の 2 種類のウルバンリアーゼを持つ場合が多いことが示されており、UllA は long 型ウルバンリアーゼと相同であった。ドラフトゲノム解析から KUL17 と KUL42 には short 型も存在していたが、ウルバン分解に主体的な働きをするのは菌対外に分泌される long 型であると推測された。

UllA の分子量と分泌された分解酵素の分子量は大きく異なっていた。Long 型のウルバンリアーゼの C 末端側には反復配列が存在し、基質ウルバンへの結合に関係しているとの報告がある。そこで、UllA の C 末端側から連続的に欠失を行ったところ、分泌タンパク質と同じ分子量になるまで欠失しても活性は維持されていたことから、少なくともウルバンリアーゼとしての酵素活性には C 末端領域は必要ないことが明らかとなった。C 末端を欠失したウルバンリアーゼを大腸菌で発現、精製し速度論的解析に用い、 K_m と V_{max} を決定した。

同定した遺伝子を pET ベクターにクローニングし大量発現させた際、培養条件によっては封入体を形成する場合があった。封入体は翻訳されたタンパク質が正常に折りたたまれないことでおこり活性を示さない。封入体はグアニジン塩酸塩や尿素などの変性剤で可溶化したのち、透析でゆっくりと変性剤を除去してリフォールディングすることで活性を回復させるのが一般的であるが、時間がかかることや再び活性を失うなどの欠点がある。そこで、封入体を SDS で可溶化し、低温で KCl を用いて SDS を除去することで活性型の酵素を回収する簡便な方法を開発した。この方法で、封入体を形成したウルバンリアーゼを活性型として回収することができた。現段階ではすべてのタンパク質封入体に応用可能であるか不明であるため、今後適用例を増やす必要がある。

本論文に関する公開審査会は平成 29 年 8 月 5 日、高知大学農林海洋科学部で開催され、申請者の論文発表と適切な質疑応答が行われた。引き続いて行われた学位論文審査会で本論文の内容を慎重に審議し、審査委員全員一致して博士（学術）の学位を授与するに値するものと判定した。