

(第5号様式)

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Ratna Mondal	
審 査 委 員	主 査	大西 浩平
	副 査	渡辺 誠也
	副 査	渡邊 彰
	副 査	加藤 伸一郎
	副 査	村松 久司

論 文 名

Study on the enzymes involved in the later steps of degradation pathway of ulvan extracted from green algae *Ulva* sp.

(緑藻ウルバ属から抽出したウルバン分解経路における後期反応をつかさどる酵素についての研究)

審査結果の要旨

緑藻 *Ulva* 属は細胞壁に硫酸化多糖ウルバンを持つ。*Ulva* 属はグリーンタイドの原因藻類であり、いわゆる未利用資源と考えられる。ウルバンを有効に利用することができれば、*Ulva* 属の効率的な利用につながると期待される。ウルバンは3位が硫酸化されたラムノースにイズロン酸、グルクロン酸、もしくは少量であるがキシロースのいずれが結合した2糖を基本骨格とする多糖である。ウルバンそのものの利用に加えて、酵素的に分解したオリゴ糖、単糖も利用可能である。そのために、研究室ではウルバンを唯一の炭素源とするウルバン資化海洋細菌を多数単離している。これら資化菌の保有する酵素を同定し、酵素活性について研究してきた。ウルバンは巨大であり、細菌細胞内に直接取り込む系は知られていないことから、細胞外に分解酵素を分泌してウルバンをオリゴウルバンに分解した後に、取り込む必要がある。そのための酵素がウルバンリアーゼである。本研究はオリゴウルバンが細菌細胞内に取り込まれたのち、どのように分解されていくのかについて調べたものである。

ウルバンは市販されていないため、*Ulva* 属から抽出・精製する必要がある。2種類の *Ulva* 属、ミナミアオサ (*Ulva ohnoi*) とミナミアオノリ (*Ulva meridionalis*) 抽出ウルバンを唯一の炭素源として単離したウルバン資化細菌、4種類、7種類についてドラフトゲノム配列解析を行った。ウルバンなどの多糖分解に関連する酵素群はゲノム上にクラスターを形成して存在しており polysaccharide utilization locus (PUL) と呼ばれている。ドラフトゲノム解析からそれぞれの資化細菌ゲノムに3種類のウルバンリアーゼ遺伝子を見出した。Polysaccharide lyase (PL)24 ファミリーに属する *ulla*、*ullB* 遺伝子、PL25 ファミリーに属する

ullC 遺伝子である。これらウルバンリアーゼ遺伝子の近傍にオリゴウルバンの分解に関与する遺伝子を複数見出し、PUL を同定した。

ドラフトゲノム解析を行ったウルバン資化細菌のうち、ミナミアオノリウルバン資化細菌 KUL106 を選んだ。KUL106 は 2 種類の *ulla* 遺伝子と 3 種類の *ullB* 遺伝子、1 種類の *ullC* 遺伝子を持つ。これまでの研究で UIIA は菌体外に分泌されるウルバンリアーゼであることが分かっていたことから、*ullB*, *ullC* をクローニングし、大腸菌で異種発現し、精製を行った。比較のために、UIIA1 の精製も行った。精製酵素をウルバンとオリゴウルバン (degree of polymerization (DP)6、DP4、DP2) と反応させた。UIIA はウルバンに対する反応性は高いが、オリゴウルバンに対しては反応しなかった。一方、3 種類ある UIIB のうち、UIIB1 の活性が最も高く、UIIB2、UIIB3 はウルバンリアーゼ活性は有するものの、非常に低いものであった。UIIB1 はウルバン、オリゴウルバンのいずれにも良好な反応性を示した。また UIIC も同様にウルバン、オリゴウルバンと良く反応した。KUL106 をウルバンを含む培地で培養し、菌体外酵素と細胞内可溶性酵素のそれぞれについて、陰イオン交換カラムを用いて粗精製し、ウルバンリアーゼ活性のあるタンパク質を特定した。ペプチドマスフィンガープリント (PMF) 法を用いて、活性のあるタンパク質を同定したところ、菌体外からは UIIA1, UIIA2 のみが検出され、菌体内からは UIIB1 が検出された。これらの結果を総合すると、UIIA は分泌されてウルバンをオリゴウルバンに分解する一方で、菌体内に取り込まれたオリゴウルバンは UIIB1 によってさらに分解されるという役割分担が強く示唆された。UIIC は高い分解活性を持つものの、菌体内外のいずれからも検出されないことから、その役割については不明である。

ミナミアオサウルバン資化細菌 KUL10 に着目した。本株は *ulla*, *ullB*, *ullC* をそれぞれ 1 種類ずつしか保有していない。オリゴウルバンの非還元末端と硫酸化ラムノースの間を切断する酵素 *unsaturated glucuronyl hydrolase* をコードする遺伝子の探索を PUL 内で行った。その結果、候補遺伝子として 2 種類の *glycoside hydrolase (GH)105* 遺伝子と 1 種類の *GH88* 遺伝子を見出した。それぞれをクローニングし、大腸菌で異種発現、精製を行った。オリゴウルバンを基質としたところ、*GH105* の一つ KUL10_26540 が高い酵素活性を示した。また KUL10_26770 も活性は有していたが、低いものであった。一方 *GH88* は酵素活性を示さなかった。この結果はこれまでに知られているオリゴウルバンを基質とする *unsaturated glucuronyl hydrolase* がいずれも *GH105* であることとよく一致している。硫酸化ラムノースがキシロースと結合している場合には、ウルバンリアーゼでは切断することができない。ラムノシダーゼが必要である。KUL10 株の PUL に 4 種類のラムノシダーゼ候補遺伝子を見出した。それぞれをクローニングし、大腸菌で異種発現、精製を行った。人工基質を用いた場合には、弱いながらも活性を示した。一方でウルバンを基質とした際には、全く反応しなかった。ラムノシダーゼは 3 位に硫酸基が付加された状態では反応性を示さないという報告があることから、今後はスルファターゼを用いて硫酸基を除去したのちに、反応するかどうか調べる必要がある。

本論文に関する公開発表会は令和 2 年 2 月 8 日、愛媛大学農学部で開催され、申請者の論文発表と適切な質疑応答が行われた。引き続き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。