

学 位 論 文 題 名

海洋細菌 *Alteromonas* sp. の産生するアルギン酸分解酵素の  
特性とその応用に関する研究

学位論文内容の要旨

アルギン酸は褐藻類の細胞間粘質多糖成分の一つとして、あるいは粘調性集落を形成するある種の細菌の菌体外多糖として見いだされている直鎖の多糖である。アルギン酸分子は $\beta$ -D-マンニユロン酸(M)と $\alpha$ -L-グルロン酸(G)が複雑に配列した糖鎖であり、分子中にはpolyM領域、polyG領域およびMG random領域が存在する。このアルギン酸を分解・利用できる食藻動物、海洋性真菌類あるいは種々の陸性および海洋性細菌などは、それぞれ固有のアルギン酸分解酵素を分泌・産生することが確認されている。しかしながら、アルギン酸構成糖の配列が複雑であり、合成基質も利用できないことから、未だ個々のアルギン酸分解酵素の作用様式は充分解明されていない。それにもかかわらず、これら来源の異なるアルギン酸分解酵素を対象として、アルギン酸分子の構造と生合成系の解明、褐藻類のプロトプラスト化への利用、生物活性アルギン酸オリゴ糖の探索、褐藻類藻体の高度利用、肺嚢胞繊維症治療への利用など、農学・医学分野での応用研究が進行中である。

そこで、本研究では穴あき症状を呈する利尻コンブ (*Laminaria japonica* var. *ochotensis*) 藻体から分離されたアルギン酸分解性海洋細菌 *Alteromonas* sp. H-4 株の産生するアルギン酸分解酵素の酵素化学的な性状を明らかにするとともに、褐藻類のプロトプラスト系確立のための細胞壁分解酵素としての利用の可能性について検討を行った。

まず、第一章では、*Alteromonas* sp. H-4 株の分類学的位置および同株の産生する

アルギン酸分解酵素の産生条件の検討、精製、そして酵素化学的諸性状の解明を行った。初めに *Alteromonas* sp. H-4 株の分類学的位置の検討を行った。対照菌株として供試した *Alteromonas* 属 14 菌種との一般性状の比較では、H-4 株は *A. carrageenovora* NCMB 302<sup>T</sup> に最も類似していたが、*A. carrageenovora* とは DNA-DNA 相同性が 45.8% と低く、whole cell protein(WCP) 電気泳動パターンも異なり、同種とは同定できなかった。また、他の対照菌株とも一般性状、DNA-DNA 相同性、WCP 電気泳動パターンがいずれも異り、H-4 株が *Alteromonas* 属の新種であることが示唆された。

次に H-4 株のアルギン酸分解酵素の産生条件を検討した。同菌株が菌体外に産生するアルギン酸分解酵素は構成型酵素であり、アルギン酸ナトリウム (Alg-Na), polyG, polyM および MG random いずれの基質にも分解性を示し、培地中の海水濃度が 75 %, カシトン濃度が 0.5 % の時に酵素活性が最も高くなった。一方、H-4 株の菌体内からは、polyM と MG random に対してのみ分解活性を有する酵素の存在が認められ、H-4 株は菌体内外に基質特異性が異なるアルギン酸分解酵素を産生していることが明らかとなった。

そこで、上記の至適培養条件下で培養した H-4 株の培養上清から菌体外酵素の精製を行い、その特性を明らかにした。精製した菌体外アルギン酸分解酵素は各種の電気泳動 (Native-PAGE, SDS-PAGE, IEF) により単一であることが確認され、このタンパク質バンドにアルギン酸分解活性が認められた。本酵素の分子量は 32 kDa、等電点 (pI) は 4.7 と推定され、反応至適 pH は 7.5、反応至適温度は 30 °C であり、pH 5 以下および 40 °C 以上の温度では不安定であった。本酵素は海水と同程度の  $MgCl_2$ , NaCl,  $CaCl_2$  で強く賦活化され、 $MgCl_2$  あるいは海水の添加により熱安定性が上昇したことから、海水存在下でも強い活性を有する酵素であることが示された。さらに、本酵素の反応は、235 nm の吸光値の増加に伴い、還元糖量も増加し、糖鎖の切断とともにその非還元末端に 2 重結合を導入するアルギン酸リアーゼ (alginate lyase) EC[4.2.2.3.] であると考えられた。また、酵素反応開始直後に基質溶液の粘度が急激

に低下したことから endo- 型の分解様式が推定された。

次いで、H-4 株菌体外アルギン酸リアーゼの基質特異性および作用様式を検討した。本酵素は Alg-Na, polyM, polyG および MG random いずれの基質に対しても分解性を示した。また IEF 後の活性染色において、polyM と polyG いずれに対する分解活性も酵素タンパクと同一位置に認められた。さらに、Alg-Na, polyM, polyG および MG random の本酵素分解物は、いずれも重合度 (DP) が 7~8, 5~6 および 3~4 と推定される 3 種の不飽和オリゴウロン酸が検出され、これら分解産物の総量は分解に用いた基質量と同等であった。以上の結果から、H-4 株菌体外アルギン酸リアーゼは polyM と polyG に分解性を示す単一の酵素タンパク質であることが示唆され、現在までに報告されていない新規な分解様式を示すアルギン酸リアーゼであると考えられた。なお、酵素反応動力学的な解析により、本酵素の  $K_m$  値は polyG (66 $\mu$ g/ml) と polyM(165 $\mu$ g/ml) では 20 倍程度の開きが認められ、homopolymeric 領域への基質親和性が異なることが示唆された。

第二章では、褐藻類細胞間粘質多糖であるアルギン酸の構成領域である polyM と polyG を強く分解できる H-4 株の菌体外アルギン酸リアーゼを用いて、コンブ細胞のプロトプラスト化を試みた。H-4 株菌体外アルギン酸リアーゼをマコンブ細胞に作用させ、プロトプラストの作出に及ぼす高張液および酵素液組成の影響を調べた。30 U/ml の H-4 株精製アルギン酸リアーゼに 1.5 % セルラーゼを添加した酵素液を用い、0.5 M マンニトール-5 mM HEPES-25 mM  $MgCl_2$ -50 % NSW を含む高張液中で、15 $^{\circ}C$ , 3~5 時間の酵素処理を行った場合に最も効率良くプロトプラストが得られた。この時、藻体 1g 当たり、 $8.0 \times 10^6$  cells のプロトプラストが得られ、これらの生存率は 97.7 % と高かった。

次に、得られたマコンブプロトプラストの培養を試みた。培地の交換頻度を高めたバッチ培養法と連続培養法において、プロトプラストは培養 1~2 日目から細胞壁が再生し、培養 15 日以降には活発に細胞分裂をくり返して細胞塊に至った。培養 30 日で葉体様形態に至ったが、バッチ培養では細菌・原生動物の増殖などにより、こ

れ以上の期間にわたる培養は継続できなかった。しかし、連続培養では再生した葉体様組織をフラスコに移し培養を継続することができ、培養3ヶ月で芽胞体様形態に生長した。さらに、培養4ヶ月後には藻体長が3cm程度に達した個体が認められた。

以上、本研究で供試した海洋細菌 *Alteromonas* sp. H-4 株が新種であることが明らかになり、かつ、本菌株が菌体外に産生するアルギン酸分解酵素が新規な分解様式を示し、海水に適応した性質を持つアルギン酸リアーゼであることを明らかにできた。その上、本酵素を利用することにより、マコンブ細胞から生物活性の高いプロトプラストを効率良く作出し、芽胞体様形態まで再生させることに成功した。

今後は *Alteromonas* sp. H-4 株の菌体内に見いだされたアルギン酸分解酵素の性状および作用機序を明らかにし、H-4株におけるアルギン酸分解代謝並びにその制御機構についても研究を進める必要があると考えている。さらに、全ての生長段階の藻体から短時間にプロトプラストの作出が可能な条件を確立するとともに、無菌のプロトプラストを作出し、マコンブの無菌実験系を確立して、これをマコンブ細胞と微生物との相互作用を含めた、発育および分化促進因子の探索へ利用したいと考えている。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 絵 面 良 男    副 査 教 授 信 濃 晴 雄  
副 査 教 授 山 本 弘 敏    副 査 助 教 授 田 島 研 一  
副 査 助 教 授 吉 水        守

## 学 位 論 文 題 名

### 海洋細菌 *Alteromonas* sp. の産生するアルギン酸分解酵素の 特性とその応用に関する研究

本論文はリシリコンブ (*Laminaria japonica* var. *ochotensis*) 穴あき症藻体から分離された海洋細菌 *Alteromonas* sp. の産生するアルギン酸分解酵素を単離・精製し、その酵素化学的特性を解明すると共に本酵素のマコンブ (*L. japonica*) プロトプラスト作出への応用を試みたものである。特に評価される成果は以下のとおりである。

1. 供試した *Alteromonas* sp. H-4 株の形態、生化学的性状を詳細に調べると共に DNA-DNA 相同性および全菌体タンパク電気泳動パターンの解析結果から、本菌株が新種の海洋細菌であることを明らかにした。

2. H-4 株のアルギン酸分解酵素の産生条件を検討し、カシトン 0.5%、アルギン酸ナトリウム (Alg-Na) 0.1% および海水濃度 75% の培地で 25°C, 96 時間培養することにより高い分解活性が得られた。また、H-4 株は菌体内と菌体外にそれぞれ基質特異性の異なるアルギン酸分解酵素を有していることを明らかにした。すなわち、菌体外酵素は Alg-Na、ポリマンニュロン酸ブロック (polyM)、ポリグルロン酸ブロック (polyG)、MG ランダムブロック (MG random) いずれの基質にも分解性を示し、一方、菌体内酵素は Alg-Na を全く分解せず、polyG をほとんど分解しないが polyM と MG random に対しては強い分解活性を示した。

3. 上記の至適培養条件下で培養した H-4 株培養上清から限外濾過濃縮、ゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィーにより菌体外アルギン酸分解酵素の精製に成功した。

4. 本酵素は分子量 32kDa、等電点 4.7 で、反応至適 pH が 7.5、反応至適温度が 30°C であり、pH 5 以下および 40°C 以上の温度で不安定であった。また本酵素は海水とほぼ同濃度の  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Na^{+}$ 、 $K^{+}$  で強く賦活化され、 $MgCl_2$  あるいは海水添加により熱安定性が上昇したことから、海水に適応した性質を有することを明らかにした。

5. 本酵素はアルギン酸を構成する polyM、polyG および MG random の各ブロックのいずれをも基質として分解し、基質分解に伴い 235 nm の吸光値と還元糖量の増加および粘度の急激な低下を示した。以上の性質から本酵素が新規の endo- 型アルギン酸リアーゼであることを明らかにした。

6. 本アルギン酸リアーゼの基質分解特性を検討し、Alg-Na、polyM、polyG および MG random いずれの基質の分解物も重合度 (DP) が 7~8、5~6、3~4 と推定される 3 種の不飽和オリゴ糖からなり、これらの分解物の総量が使用した基質量と同等であることを確認した。また、本酵素の  $K_m$  値は  $\text{polyG} < \text{MG random} < \text{Alg-Na} < \text{polyM}$  の順であった。以上の結果は本酵素が新規な分解様式を示すアルギン酸リアーゼであることを裏付けている。

7. 本精製アルギン酸リアーゼを用いてマコンブ細胞のプロトプラスト化を試みた。その結果、本酵素 30 U/ml と 1.5 % セルラーゼを添加した高張液 (0.5 M マンニトール-5 mM HEPES-25 mM  $\text{MgCl}_2$ -50 % 天然海水) 中で 15°C、3~5 時間の酵素処理により、生存性の高いマコンブプロトプラストを効率良く作出することに成功した。

8. 作出したマコンブプロトプラストの培養には連続培養法を考案し、プロトプラストの再生実験を行なった。その結果、プロトプラストは培養 1~2 日間で細胞壁を再生し、15 日以降には活発に細胞分裂をくり返し、培養 30 日で葉体様形態を示すに至った。さらに、培養 3 ヶ月で芽胞体に生長し、培養 4 ヶ月後には藻体長約 3 cm に達する個体が観察された。以上のようにマコンブプロトプラストの再生に成功した。

以上、本論文では、まず、供試した *Alteromonas* sp. H-4 株が新種であることを明らかにした。次に本菌株が菌体外に産生するアルギン酸分解酵素の精製を行い、その性状と作用機序を検討し、本酵素が新規な分解様式を示し、海水に適応したアルギン酸リアーゼであることを明らかにした。さらに、本酵素を利用して、マコンブ細胞から効率良くかつ生存性の高いプロトプラストを作出し、芽胞体様形態にまで再生させることに成功した。

以上の成果は海洋細菌の産生する有用酵素の特性を解明すると共に本酵素が褐藻類の形態形成機序の解明、藻体の有効利用並びに褐藻の育種に応用可能であり、水産学に貢献するところ大であることから、審査員一同は本論文が博士 (水産学) の学位論文として十分な内容を有するものと判定した。