

博士 (工 学) ジンタナ・クライワタナボン

学位論文題名

Analysis of Genes and Properties of Alginate Lyases

(アルギン酸リアーゼの性質と遺伝子の解析)

学位論文内容の要旨

序論では、近年の世界的な人口増加によってもたらされる食糧危機を回避するために、未利用バイオマス資源を有効に転換する方策が考慮されている。その1つの方法として海洋開発があり、海藻に代表される海洋バイオマス資源を利用することが考えられている。褐藻類に分類される海藻の細胞間物質はアルギン酸であり、海藻の有効利用にはアルギン酸の分解が不可欠である。アルギン酸はマンヌロン酸とグルロン酸を構成糖とし高い粘性を示す酸性多糖である。さらに分解物であるアルギン酸オリゴマーは多くの動物・植物・微生物に対して様々な生理活性を有することからその利用も注目されている。

アルギン酸分解酵素 (アルギン酸リアーゼ) の研究例は他の糖質加水分解酵素に比べて非常に少なく、構造的な基礎研究は殆ど行われていない。

微生物の生産するアルギン酸分解酵素は、8種類の細菌から精製され、分子量、基質特異性などの酵素学的な性質が調べられている。一方、アルギン酸リアーゼの遺伝子の構造は13種類が知られている。ここでは上記のような研究の現状と問題点を述べた。

第1章では、アルギン酸分解酵素生産菌である *Pseudomonas* sp. OS-ALG-9株のアルギン酸分解酵素系が4種の酵素によって構成されていることを見いだした。今までに本菌株からは1つの酵素 (ALY) の性質及びそれをコードする遺伝子の構造が明らかにされた。そこでALYI以外の酵素の性質や構造を明らかにするため、アルギン酸リアーゼ (ALYII) をコードする遺伝子 (*alyII*) のクローニングを行い、その構造を明らかにした。アルギン酸リアーゼII遺伝子は1,239bpの塩基配列上に713アミノ酸をコードしていた。本遺伝子から推定されるアミノ酸配列は、今まで明らかにされているアルギン酸リアーゼのアミノ酸配列と全く相同性を示さなかった。

第2章では、前章で述べた *Pseudomonas* sp. OS-ALG-9株のアルギン酸リアーゼII遺伝子をクローニングした大腸菌から本酵素 (ALYII) を精製した。ALYIIは分子量

79kDaで、アルギン酸中のマンヌロン酸に優先的に作用するエンド型酵素であった。さらに至適反応条件などの酵素学的性質を明らかにした。ALYIIと以前に調べられたマンヌロン酸に特異性を持つALYはアルギン酸をそれぞれ重合度6.3と8.2にまで分解するが、両者を併用すると重合度3.2にまで分解した。両酵素ともマンヌロン酸に特異的であるが、その特異性が微妙に異なっていることを示唆した。

第3章では、アルギン酸を完全に単糖にまで分解することが可能となる酵素を得るため、腐敗したコンブよりアルギン酸リアーゼ生産菌N-1株を分離し、分類学的検討から*Deleya marina*と同定した。本菌株は1種類のアルギン酸リアーゼしか生産しない。次に本菌株のアルギン酸リアーゼをコードする遺伝子のクローニングを行いその塩基配列を明らかにした。アルギン酸リアーゼA遺伝子は1,122bpの塩基配列上に374アミノ酸をコードしていた。本遺伝子から予想される蛋白質のアミノ酸配列と、精製酵素のN末端アミノ酸配列との比較から、本酵素は26アミノ酸からなるシグナルペプチドが切断されて成熟型の酵素になると考えられた。さらに本酵素のアミノ酸配列は*Pseudomonas aeruginosa*及び*Azotobacter vinelandii*のアルギン酸リアーゼのアミノ酸配列と高い相同性を示した。また本遺伝子の上流及び下流には、他の遺伝子が連結して存在していた。

第4章では、アルギン酸リアーゼのアミノ酸配列は、これまでの我々の3つのアルギン酸リアーゼ (ALY, ALYII, AlgA) を含め15種のもが知られているが、アミノ酸配列のホモロジー検索程度しか行なわれていない。そこで、現在までに明らかになっているアルギン酸リアーゼのアミノ酸配列を利用して、これらのアルギン酸リアーゼの部分的な2次構造を反映した疎水性クラスター分析によって、構造的に分類する手法で比較した。その結果、アルギン酸リアーゼは5つのクラスに分類することができた。Class 1には*D. marina*のAlgAを含む3種類、Class 2には2種類、Class 3にはALYを含む2種類、Class 4には5種類のアルギン酸リアーゼがそれぞれ含まれ、さらにClass 4は3つのサブクラスに分けられ、*Pseudomonas* sp. OS-ALG-9株のALY IIはその中のClass 4Cに分類された。*Vibrio haliotocoli*のAlgVGIは上記クラスのいずれにも類似性を示さないことからClass 5に分類された。

総括では、以上の研究結果を要約するとともに、アルギン酸リアーゼの将来の利用の可能性について論述した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 下 晋 一
副 査 教 授 高 井 光 男
副 査 教 授 棟 方 正 信
副 査 助 教 授 大 井 俊 彦

学 位 論 文 題 名

Analysis of Genes and Properties of Alginate Lyases

(アルギン酸リアーゼの性質と遺伝子の解析)

近年の世界的な人口増加によってもたらされる食糧危機を回避するために、未利用バイオマス資源を有効に転換する方策が考慮されている。その1つの方法として海洋開発があり、海藻に代表される海洋バイオマス資源を利用することが考えられている。褐藻類に分類される海藻の細胞間物質はアルギン酸であり、海藻の有効利用にはアルギン酸の分解が不可欠である。アルギン酸はマンヌロン酸とグルロン酸を構成糖とし高い粘性を示す酸性多糖である。さらに分解物であるアルギン酸オリゴマーは多くの動物・植物・微生物に対して様々な生理活性を有することからその利用も注目されているが、アルギン酸オリゴマーを製造するために必須なアルギン酸分解酵素（アルギン酸リアーゼ）の研究例は非常に少なく、構造的な基礎研究は殆ど行われていないのが現状である。本論分は、これらの背景のもとにアルギン酸リアーゼの遺伝子構造及び酵素の構造的分類に関する一連の研究成果をまとめたものである。以下に各章の概要を示す。

序論では、アルギン酸リアーゼ研究の背景、現状と問題点について論述し、アルギン酸オリゴマーを製造するために必須なアルギン酸リアーゼの遺伝子構造及び酵素学的性質を解明し、さらに酵素の構造的分類体系を確立するなど本論文の目的について述べている。

第1章では、アルギン酸分解酵素生産菌である*Pseudomonas* sp. OS-ALG-9株のアルギン酸分解酵素系が数種の酵素から構成されている。今までに本菌株からは1つの酵素（ALY）の性質及びそれをコードする遺伝子の構造が解明されたが、さらにこのALY以外の酵素の性質や構造を明らかにするため、アルギン酸リアーゼ（ALYII）をコードする遺伝子（*alyII*）のクローニングを行い、その構造を明らかにした。本遺伝子の推定されるアミノ酸配列は、今まで知られているアルギン酸リアーゼのアミノ酸配列と全く相同性を示さ

ない新規のアルギン酸リアーゼであることを明らかにした。

第2章では、前章で述べた*Pseudomonas* sp. OS-ALG-9株のアルギン酸リアーゼII遺伝子をクローニングした大腸菌から本酵素（ALYII）を精製しその特異性を調べた。ALYIIは分子量79kDaで、アルギン酸中のマンヌロン酸に優先的に作用するエンド型酵素で、ALYIIと以前に調べられたマンヌロン酸に特異性をもつALYはアルギン酸をそれぞれ重合度6.3と8.2にまで分解するが、両者を併用するとさらに重合度3.2にまで分解した。両酵素ともマンヌロン酸に特異的であるが、その特異性が微妙に異なっていると示唆した。

第3章では、*Pseudomonas* sp. OS-ALG-9株の他の酵素の分離が困難のため、分解方式の異なったアルギン酸リアーゼを得るため、腐敗したコンブより*Deleya marina* N-1を分離同定した。本菌株のアルギン酸リアーゼをコードする遺伝子(*algA*)のクローニングを行い、その塩基配列を明らかにし、さらに本遺伝子の推定アミノ酸配列は*Pseudomonas aeruginosa*及び*Azotobacter vinelandii*のアルギン酸リアーゼのアミノ酸配列と高い相同性を示した。

第4章では、アルギン酸リアーゼのアミノ酸配列は、本研究結果を含め15種知られているが、その構造的な分類体系は確立していない。そこで、これらのアミノ酸配列を利用して、これらのアルギン酸リアーゼの部分的な2次構造を反映した疎水性クラスター分析によって構造的に分類する手法で比較した結果、アルギン酸リアーゼは5つのクラスに分類できることを見だし、*AlgA*はクラス1に、ALYはクラス3に、ALYIIはクラス4Cに分類された。

総括では、以上の研究結果を要約するとともに、アルギン酸リアーゼの将来の利用の可能性について論述している。

以上のように、本論文は細菌のアルギン酸リアーゼの遺伝子構造を明らかにし、アルギン酸リアーゼを従来とは異なった新たな手法で構造的に分類する手法を確立した。これらの研究成果は生物工学の分野の研究の進展に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格あるものと認める。