アワビ消化管から分離された *Vibrio halioticoli* の
アルギン酸分解酵素遺伝子に関する研究

学位論文内容の要旨

海洋環境に生息する細菌から軟体動物に至る広い範囲の生物により、アルギン酸分解酵素が産生されることが認められている。これらの生物により産生される酵素は、アルギン酸を構成する2種のホモポリマー領域に対する分解特異性によってpoly M lyaseおよびpoly G lyaseに大別されているが、褐藻類に嗜好性を示すエゾアワビの消化管内からは、特に、poly Gブロックに分解特異性の強いアルギン酸分解性細菌が優占していることが見いだされている。本菌は、非運動性の通性嫌気性菌(non-motile fermentative rods: NMF)で、poly G lyase以外にも基質特異性の異なる数種類の酵素を産生しているため、摂餌した褐藻類中のアルギン酸の分解に大きく貢献していると考えられている。本菌のアルギン酸分解機構を解明することが、本菌の生態解析の鍵であると考えるが、本菌により産生される酵素を精製することは非常に困難であることが知られている。

近年、アルギン酸分解酵素は、遺伝子レベルでの解析が進み、現在までに14種のアルギン酸分解酵素遺伝子の塩基配列が決定され、アルギン酸分解酵素の種々の機能領域を解析するためのデータが蓄積され始めている。従って、本酵素の解析にも、遺伝子レベルからのアプローチが可能となっていると考える。そこで本研究では、エゾアワビ消化管由来アルギン酸分解性細菌の主体をなしているNMFの分類学的位置を明らかにするとともに、その代表株であるIAM 14596^T株のアル

ギン酸分解酵素遺伝子のクローニングを行い、アルギン酸分解酵素の機能領域の解析を分子レベルで行うことを目的とした。また、得られた遺伝子を、本菌の生態解析のための分子マーカーとして利用することを試みた。

第一章では、NMFの分類学的位置を検討した。一般性状の比較、DNA-DNA相同性の測定および16S rRNA遺伝子の塩基配列による系統解析を行った結果、NMFは、既知の*Vibrio*属の中に同種と認められるものではなく、*Vibrio*属の新種であることが明らかとなり、*Vibrio halioticoli* と命名した。

第二章では、同種の標準株である*V. halioticoli* IAM 14596^T株のアルギン酸分解酵素遺伝子のクローニングおよびその解析を行った。その結果、5株のアルギン酸分解能陽性組換え体を得られ、その中の4株で、それぞれ異なる遺伝子断片が挿入されていることが明らかとなった。各クローンに挿入されている酵素遺伝子の塩基配列を決定したところ、618bpのオープンリーディングフレーム(ORF)からなるpoly M lyaseをコードする*alyVM1*遺伝子、1,056bpのORFからなるpoly G lyaseをコードする*alyVG1*遺伝子、993bpのORFからなるpoly G lyaseをコードする*alyVG2*遺伝子および705bpのORFからなるpoly G lyaseをコードする*alyVG3*遺伝子が見いだされた。各遺伝子とも、その上流域および下流域にプロモーター、ターミネーター、リボゾームバインディングサイトと考えられる配列が認められ、*V. halioticoli* IAM 14596^T株由来のプロモーターによって発現していることが示唆された。また、各遺伝子産物(AlyVM1, AlyVG1, AlyVG2およびAlyVG3)のうち、AlyVG1, AlyVG2およびAlyVG3にはシグナルペプチドが存在すると推定され、菌体外に分泌される可能性の高い酵素であると推定された。

次に、AlyVM1, AlyVG1, AlyVG2およびAlyVG3のアミノ酸配列と現在までに報告されているアルギン酸分解酵素のアミノ酸配列を比較し

たところ、AlyVG1は同じpoly G lyaseであるAlyAと相同性および類似性が高く、相同性が46.3%、類似性に至っては93.8%であった。また、AlyVG1およびAlyVG2については、*Klebsiella pneumoniae*のAlyA、*Photobacterium* sp.のAlxM、*Corynebacterium* sp.のAlyPGおよび*Pseudoalteromonas elyakovii*のAlyPEECとの間でC末端側に9アミノ酸残基からなる高い相同性を示す領域が認められた。この領域は、様々な菌種の遺伝子に見いだされ、しかも、基質特異性と関係がないことから、アルギン酸の分解において基質特異性とは関係なく機能的、構造的に重要な役割を担っているものと考えられる。なお、AlyVM1, AlyVG1, AlyVG2, AlyVG3間に、相同性の高い領域を見いだすことはできなかった。

さらに、*V. haliotocoli* IAM 14596^T株の菌体内粗酵素液、菌体外粗酵素液および各アルギン酸分解能陽性クローン体の菌体内抽出液を調製し、native-PAGE、SDS-PAGE、等電点電気泳動(IEF)および活性染色を行った結果、AlyVG2およびAlyVG3は、各種電気泳動処理を施した後もアルギン酸分解酵素活性を保持していた。そこでnative-PAGE、SDS-PAGEおよびIEFで分離し、*V. haliotocoli* IAM 14596^T株の菌体内および菌体外粗酵素液に含まれる酵素との比較を試みた。AlyVG2およびAlyVG3は、*V. haliotocoli* IAM 14596^T株の菌体外粗酵素液に検出された酵素の一つに、基質特異性および分子量が類似していた。両遺伝子産物にはシグナルペプチドの存在が示唆されたことから、この酵素をコードする遺伝子である可能性が考えられた。しかし、AlyVG2およびAlyVG3はIEFによる分離が難しく、pIの比較はできなかった。

第三章では、*alyVG2*遺伝子を、*V. haliotocoli*特異検出のための分子マーカーとして利用することを試みた。特異検出法には、非培養細胞をシングルセルレベルで検出するためのprokaryotic *in situ* PCR(PI-PCR)法を用いた。本菌と性状の類似する*V. pelagius*を対照としてPI-PCRを試み、two stage PI-PCR法を行うことにより、*V.*

*halioticoli*細胞の特異検出が可能であることが示唆された。

以上、本研究では、*Vibrio*属の新種であることを明らかにした*V. halioticoli*から、4種の異なるアルギン酸分解酵素遺伝子をクローニングすることができた。また、これらの遺伝子が本菌の生態解析のための分子マーカーとなりうる可能性を示した。

今後は、得られた4種のアルギン酸分解酵素遺伝子と*V. halioticoli* IAM 14596^T株の産生するアルギン酸分解酵素群との対応を解明し、本菌株におけるこれらの酵素の役割を明らかにする必要がある。また、AlyVG1, AlyVG2, AlyA, AlxM, AlyPGおよびAlyPEECのアルギン酸分解酵素遺伝子に存在したC末端側の相同性の高い領域の機能を解明するとともに、4種の遺伝子の*V. halioticoli*染色体上での位置関係と遺伝子発現制御の仕組みを検討しなければならないと考える。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 絵 面 良 男

副 査 教 授 吉 水 守

副 査 助 教 授 田 島 研 一

学 位 論 文 題 名

アワビ消化管から分離された *Vibrio halioticoli* の アルギン酸分解酵素遺伝子に関する研究

海藻摂餌性海洋動物であり、褐藻類を好むエゾアワビは固有の消化管内細菌相を有し、アルギン酸分解性で非運動性通性嫌気性細菌が優先することが知られている。本菌は、多種類のアルギン酸分解酵素を産生することから、エゾアワビが摂餌した海藻成分の分解に大きく貢献している可能性が指摘されている。この関係は、ルーメン微生物やシロアリ消化管内微生物の共生関係と類似していることから、海洋生物と消化管内微生物間での栄養共生の例として注目されている。本論文では、本菌がエゾアワビ消化管内でアルギン酸分解酵素を産生するメカニズムを解明するため、本菌からアルギン酸分解酵素遺伝子をクローン化し、得られた遺伝子の特性を明らかにしたものである。特に評価される点は以下の通りである。

1. エゾアワビ消化管に優先するアルギン酸分解性の非運動性通性嫌気性細菌の同定を行い、本菌が *Vibrio* 属の新種であることを明らかにし、*Vibrio halioticoli* と命名した。
2. *V. halioticoli* IAM 14596^T株からアルギン酸分解酵素遺伝子のクローン化を試み、4種のアルギン酸分解能陽性クローン体を得た。各クローン体に挿入されている遺伝子断片の制限酵素地図および各クローン体が発現する酵素の性質を比較した結果、クローン化した遺伝子がそれぞれ異なることを示した。また、各遺伝子の塩基配列を決定し、*alyVM1* 遺伝子が 618bp のオープンリーディングフレーム (ORF) からなる poly M lyase をコードすること、および *alyVG1* 遺伝子、*alyVG2* 遺伝子および *alyVG3* 遺伝子がそれぞれ、1,056bp、993bp、および 705bp の ORF からなる poly G lyase をコードすることを明らかにし、*V. halioticoli* が少なくとも4種のアルギン酸分解酵素遺伝子を有することを示した。なお、*AlyVG1*、*AlyVG2* および *AlyVG3* にはシグナル

ペプチドが存在すると推定され、菌体外に分泌される可能性の高い酵素であると推定された。

3. 4種の酵素 AlyVM1, AlyVG1, AlyVG2 および AlyVG3 のアミノ酸一次構造を既報のアルギン酸酵素のものと比較し、AlyVG1が *Klebsiella pneumoniae* の AlyA と高い相同性 (46.3%) を示すこと、AlyVG1 および AlyVG2 が AlyA、AlxM (*Photobacterium* sp.)、AlyPG (*Corynebacterium* sp.)、および AlyPEEC (*Pseudoalteromonas elyakovii*) にも見いだされているC末端側の相同な9アミノ酸残基からなる領域を持つことを示した。しかし、AlyVM1, AlyVG1, AlyVG2, AlyVG3 間に、相同性の高い領域は認められなかった。
4. クローン化した各遺伝子が、*V. haliotocoli* IAM 14596^T株の産生する酵素のいずれと対応するのかを検討するために、native-PAGE および SDS-PAGE と活性染色を組み合わせ、電気泳動的性質の比較を行った結果、AlyVG2 および AlyVG3 が *V. haliotocoli* IAM 14596^T株の菌体外粗酵素液に検出された酵素の一つに基質特異性および分子量が類似していることを示した。両遺伝子産物にはシグナルペプチドの存在が予測されたことから、この酵素をコードする遺伝子である可能性を示した。なお、AlyVG2 および AlyVG3 は IEF による分離が難しく、pI の比較はできなかった。
5. エゾアワビ消化管内での *V. haliotocoli* の挙動および餌料分解に果たす役割を解明するために、alyVG2 遺伝子を分子マーカーとして本菌の非培養細胞をシングルセルレベルで検出できる prokaryotic *in situ* PCR 法を検討した。その結果、two stage PI-PCR 法により *V. haliotocoli* 細胞が本菌に性状の類似する *V. pelagius* 細胞から区別できることを示し、本法が本菌による本遺伝子の発現解析に利用できる可能性を示唆した。

以上の結果は、エゾアワビ消化管に新規のアルギン酸分解性細菌が存在し、これらが多種のアルギン酸分解酵素を産生し、エゾアワビの餌料分解に貢献していることを分子レベルで示したものである。また、エゾアワビ消化管内での本菌の生態を調べるために PI-PCR 手法が応用できることも示唆した。これらの成果は、海産食藻性動物の消化管内細菌の役割を解明する基礎的知見として、水産学に貢献するところ大であり、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。