

学 位 論 文 題 名

エゾアワビ β -1,4-マンナナーゼの単離と
cDNA クローニングおよび大腸菌発現系の確立

学位論文内容の要旨

近年、海藻には血圧低下作用、抗腫瘍活性、コレステロール低下作用などを示す有用な生理活性物質が含まれることが明らかにされるとともに、海藻を医薬品や高機能素材の原料として利用しようという試みが盛んになっている。このような海藻の新たな利用方法の広がりに対応するためには、原料となる高品質の海藻を安定に生産・供給できる新たな育種技術を整備することが必要となる。そのためには、従来の選抜育種法に加え、細胞工学や遺伝子工学といったバイオテクノロジーに基づく新たな種苗生産や品種改良法の開発も必要と考えられる。しかしながら、陸上植物と比較して海藻のバイオテクノロジーは基盤技術の開発および整備が立ち遅れているのが現状である。一般に植物において細胞融合や遺伝子導入を行う際には、常法として細胞壁を多糖分解酵素で消化・除去したプロトプラストが用いられる。植物のバイオテクノロジーにおいて、このプロトプラストの作出法の確立は最重要課題の一つといえる。

本研究でプロトプラストの作出の材料として用いた紅藻スサビノリ (*Porphyra yezoensis* Ueda) においても、プロトプラストの作出の報告はなされているが、高品質のプロトプラストを高収率で安定に調製する方法は確立されていないのが現状である。現在、スサビノリのプロトプラストの作出では、アワビなど海産軟体動物の内臓をアセトン処理して得られた粉末、あるいは各種の微生物由来の酵素が用いられている。アワビの消化液のアセトン粉末（アワビ粗酵素）中には、様々な多糖分解酵素が含まれているが、各酵素の力価はアワビの採取時期やアワビ粗酵素の品質などで変化することが知られ、結果としてアワビ粗酵素を用いて作出したプロトプラストの収量が不安定となる傾向がある。また、近年、海洋細菌由来のアガラーゼ、マンナナーゼ、キシラナーゼを混合して用いることによりスサビノリのプロトプラストの作出が行われているが、この場合、プロトプラストの収量は比較的高いが、その再生率が著しく低いことがしばしば経験される。このように、スサビノリのプロトプラストの作出方法には、その後のプロトプラストの培養法を含め未だ改善の余地があると考えられる。また、現在市販されている酵素では、高品質なスサビノリのプロトプラストを大量に作出するには不十分であり、今後、さらにスサビノリのプロトプラストの作出に適した酵素を開発する必要があると考えられる。そこで、本研究では、スサビノリのプロトプラストの作出のための酵素として、以前より有効性が認められているアワビ粗酵素中に含まれる Endo-1,4- β -D-mannanase（マンナナーゼ）に着目し研究を進めた。

まず、エゾアワビ消化液よりマンナナーゼの単離と、その基本性状の分析および部分アミノ酸配

列の決定を試みた。その結果、TOYOPEARL CM-650M、ハイドロキシアパタイトおよび TOYOPEARL HW-50F カラムクロマトグラフィーにより 1 種類のエンド型 β -マンナーゼ (HdMan) が単離できた。HdMan の至適温度は 45℃であり、他の軟体動物由来のマンナーゼの至適温度 50~55℃に比べてやや低く、至適 pH は弱アルカリ性の pH 7.5 付近であった。また、実際にスサビノリの葉状の配偶体を HdMan で処理したところ、HdMan を長時間 (4 日間) 藻体に作用させてもプロトプラストは全く得られなかったが、藻体は断片化され、10~20 細胞から成る細胞塊が生じた。

次に、組換え DNA 技術を用いた HdMan の大量生産を目的として、cDNA クローニングと塩基配列の決定によって HdMan の全アミノ酸配列を推定した。その結果、HdMan の翻訳領域全体をコードする cDNA を得ることができた。この cDNA は 1,232 塩基対からなり、その 15 番塩基から 1,148 番塩基までの 1,134 塩基対が翻訳領域で、377 アミノ酸をコードしていた。

最後に、HdMan をコードしている cDNA を組み込んだ pET-101 プラスミドベクターと宿主大腸菌 BL21 (DE3) を用いて発現系を構築し、HdMan の発現を試みた。その結果、1,000 ml の大腸菌培養液から比活性 2.12 U/mg の組換え HdMan が 0.66 mg 得られた。組換え HdMan はエゾアワビ天然 HdMan と比較して至適温度、至適 pH、温度安定性に若干の違いが見られたが、エゾアワビ天然 HdMan と同様スサビノリを細胞塊に分散することが確認された。

植物細胞のプロトプラストの作出は、細胞融合、DNA や細胞小器官の細胞からの抽出ならびにそれらの細胞への導入、細胞の観察、変異体の作出など利用価値の高い基礎技術であり、研究のみならず育種の分野にも利用可能である。アマノリ属植物においても、プロトプラストは、形質転換、細胞融合、*in situ* ハイブリダイゼーションなどの実験に利用されている。また、プロトプラストをストレス下で再生させ藻体の選抜を繰り返すことでストレス耐性の品種を選抜育種することが報告されている。海苔養殖で扱われているアマノリ属植物の葉状の配偶体は単相世代であり、交雑の効果は顕著に現れてこないため、このようなプロトプラストを用いた選抜育種は重要な技術である。

このようなプロトプラストを用いた研究や育種を可能にするためには、高品質のプロトプラストを高収率で安定に調製するための方法を確立しなければならない。そのためには、プロトプラストの作出に用いる酵素の種類や、最適濃度などについて、純化した酵素を用いた詳細な検討が必要であり、このような実験に、本研究で得られた HdMan は応用できると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 嵯 峨 直 恆

副 査 教 授 尾 島 孝 男

副 査 教 授 川 合 祐 史

副 査 助 教 授 井 上 晶

エゾアワビ β -1,4-マンナナーゼの単離と cDNA クローニングおよび大腸菌発現系の確立

植物細胞のプロトプラストの作出は、細胞融合、DNA や細胞小器官の細胞からの抽出ならびにそれらの細胞への導入、細胞の観察、変異体の作出など利用価値の高い基礎技術であり、研究のみならず育種の分野にも利用可能である。しかし、海産紅藻スサビノリでは、高品質のプロトプラストを高収率で安定に調製する方法は確立されていない。そこで本研究では、スサビノリのプロトプラスト作出に利用できる酵素としてマンナナーゼをエゾアワビの消化液より単離した。また、そのcDNA をクローニングし、大腸菌での発現を試みた。その結果、エゾアワビ由来天然マンナナーゼおよび大腸菌由来組換えマンナナーゼ共に、スサビノリのプロトプラスト作出に適していることが明らかとなった。

本論文において、緒言では、全体における緒言を示し、第1章ではエゾアワビの消化液よりマンナナーゼの精製法を示し、得られたマンナナーゼの基本性状およびスサビノリのプロトプラストの作出におけるマンナナーゼの役割、意義、重要性について論じた。第2章ではエゾアワビのマンナナーゼのcDNA のクローニング法を示し、得られたcDNA の構造について論じた。第3章ではエゾアワビのマンナナーゼの大腸菌による発現系の構築法を示し、得られた組換えマンナナーゼの基本性状について論じた。最後に総合考察では、上記研究の結果に基づき、スサビノリのプロトプラストの作出におけるマンナナーゼの有用性を総合的に考察した。

第1章では、エゾアワビ消化液よりマンナナーゼの単離と、その基本性状の分析および部分アミノ酸配列の決定を試みた。その結果、1種類のエンド型 β -マンナナーゼ(HdMan)が単離できた。HdManの至適温度は45℃であり、他の軟体動物由来のマンナナーゼの至適温度50～55℃に比べてやや低く、至適pHは弱アルカリ性のpH 7.5付近であった。海水のpHはおおよそpH 8であることが知られているので、本酵素が弱アルカリ域に至適pHを示すことは、スサビノリのプロトプラストの作出に適した特性と言える。また、実際にスサビノリの葉状の配偶体をHdManで長時間(4日間)処理したところ、プロトプラストは全く得られなかったが、藻体は断片化され、10～20細胞から成る細胞塊が生じた。また、スサビノリのプロトプラストの作成にHdManをキシラナーゼと組み合わせる用いることが有効であることが示された。

第2章では、組換え DNA 技術を用いた HdMan の大量生産を目的として、cDNA クローニングと塩基配列の決定によって HdMan の全アミノ酸配列を推定した。その結果、HdMan の翻訳領域全体をコードする cDNA を得ることができた。この cDNA は 1,232 塩基対からなり、その 15 番塩基から 1,148 番塩基までの 1,134 塩基対が翻訳領域で、377 アミノ酸をコードしていた。そのうち、翻訳領域の 5' 末端 15 番塩基から 68 番塩基までの 54 塩基対は翻訳開始メチオニンを含む 18 残基からなるシグナルペプチドをコードしていた。3' 末端には 6 塩基からなる poly(A) とその 13 塩基上流には AATAAA の poly(A) 付加シグナル配列が認められた。また、推定アミノ酸配列中には、既知の GHF5 に保存されているアミノ酸配列が認められた。このことより本酵素も GHF5 に属するものであるということが示された。

第3章では、HdMan をコードしている cDNA を組み込んだ pET-101 プラスミドベクターと宿主大腸菌 BL21 (DE3) を用いて発現系を構築し、HdMan の発現を試みた。その結果、1,000 ml の大腸菌培養液から比活性 2.12 U/mg の組換え HdMan が 0.66 mg 得られた。組換え HdMan はエゾアワビ天然 HdMan と比較して至適温度、至適 pH、温度安定性に若干の違いが見られたが、エゾアワビ天然 HdMan と同様スサビノリを細胞塊に分散することが確認された。

主論文は平成 18 年 1 月 26 日 11 時から 12 時まで第二研究棟特別講義室において、審査員および関連教官 13 名および一般聴講 20 名出席のもと発表された。一般聴講においては、アワビ由来 HdMan と組換え HdMan の酵素特性の違いについて、および、HdMan を用いて作出したプロトプラストの再生率についての質疑・応答がなされた。また、審査員および関連教官においては、酵素単離にエゾアワビを選んだ理由について、プロトプラストの再生について、既知のプロトプラスト作出法について、HdMan の一次構造について、および、組換え HdMan の比活性についての質疑・応答がなされた。本研究で単離されたマンナナーゼは、スサビノリのプロトプラスト作出に利用できるものであり、スサビノリの研究に貢献すると判断し、博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。