博士（水産科学）　鈴　木　賢　一

学位論文題名

アワビ・セルラーゼ HdEG66および HdEG53の一次構造と機能に関する研究

学位論文内容の要旨

セルラーゼ（EC 3.2.1.4）は、セルロース鎖のβ-1,4-グルコシド結合を加水分解する酵素で、セルロースの糖化や発酵源化、食品加工、洗剤工業、環境エネルギー産業など様々な分野での活用が期待されている。本研究では、未だ研究例の少ない水産動物セルラーゼに関する生化学的性質や一次構造に関する知見を得るために、北海道の主要水産増殖種の一つであるエゾアワビ（*Haliotis discus hannai*）のセルラーゼの単離と性状解析を行った。アワビの消化酵素の一つであるセルラーゼの作用特性を解明することにより、動物セルラーゼに関する生化学的理解を深めるだけでなく、増養殖用の高品質飼料の開発において必要となるアワビの糖質分解機構に関する知見が得られるものと期待される。

第１章ではアワビの消化器官中におけるセルラーゼ活性の分布を調べ、胃から採取した消化液に高いセルラーゼ活性が認められた。このセルラーゼはアワビが摂餌した海藻中のセルロースの分解に関与していると考えられた。そこで、この消化液から CM-Toyopearl カラムクロマトグラフィーによりセルラーゼを分画したところ、非吸着画分と溶出画分のいずれにもセルラーゼ活性が検出された。これらの画分に含まれるセルラーゼの分子量は、活性染色と SDS-PAGE の結果から 66,000、53,000 および 100,000 と推定された。これらのセルラーゼはハイドロキシアパタイト等のカラムクロマトグラフィーで単離し、それらの分子量に基づき、HdEG66、HdEG53 および HdEG100 と命名した。

HdEG66 をトリプシン消化すると HdEG53 と同じ電気泳動移動度を示し、同一の N-末端アミノ酸配列を有する消化断片（53K 断片）が得られた。その消化断片をさらに V8 プロテアーゼによって消化して得られた小断片の電気泳動パターンも、HdEG53 の消化物の電気泳動パターンと同一であった。以上のことから、HdEG53 は HdEG66 の 53K 断片と共通の一次構造を有すると考えられた。一方、HdEG66 と HdEG53 は、CMC の粘度を急激に低下させるエンド型の反応様式を示し、かつ、不溶性のセルロース基質の結晶領域も分解可能であった。また、その場合の主たる生成物はセロビオースで

あった。このような性質は、"processive"にセルロースを分解するセロビオハイドロラーゼのものと同様である。すなわち、HdEG66 と HdEG53 はいずれもエンド型の酵素でありながら、セロビオハイドロラーゼ様の反応特性を併せもつ酵素であると考えられた。一方、HdEG100 は、分子量が約 100,000 とかなり大きい点で特徴的であった。これまでの報告によれば、動物セルラーゼの分子量は一般に 55,000 程度が最大であり、100,000 に達するものは無い。また、HdEG100 は 3-6 糖のセロオリゴ糖からグルコースを遊離させることから、β-グルコシダーゼ様の反応特性を有することが明らかになった。さらに、本酵素は CMC も分解可能であり、エンド型セルラーゼとしての作用も有していた。このような性質は酢酸菌などで数例報告されているエキソグルコシダーゼ（グルカングルコハイドロラーゼ EC 3.2.1.74）のものと良く類似している。なお HdEG100 の部分アミノ酸配列は酢酸菌の酵素のアミノ酸配列と相同性を示さないことから、本酵素は従来知られていない新規のセルラーゼであると考えられる。

第２章ではアワビ肝膵臓 cDNA ライブラリーから PCR によって、HdEG66 の 5' 端非翻訳領域と翻訳領域および 3' 端非翻訳領域を含む計 1,898 bp の塩基配列を決定した。その翻訳領域 1,785 bp の塩基配列は 594 残基のアミノ酸配列をコードしていた。その開始コドン Met から 15 残基目までの領域は、タンパク質を用いて分析した HdEG66 の N-末端配列には存在していなかった。この領域は真核生物の分泌タンパク質のシグナルペプチドの特徴を満たしていることから、HdEG66 の分泌シグナルとして機能する領域と考えられた。それに続く N-末端 103 残基部分は糖質結合モジュール-2（CBM-2）と相同性を示し、不溶性基質に対する結合能を有していることから、本酵素の CBM であると考えられた。この HdEG66 の CBM-2 類似領域には 3 つの Trp のうち 2 つが保存されていた。ただし、CBM-2 においてジスルフィド結合を形成すると考えられている Cys は本酵素では保存されていなかった。

一方、HdEG66 の C-末端 447 残基部分は *Nastitermes takasagoensis* NtEG、*Thermobifida fusca* E4、*Clostridium cellulolyticum* CelM、*C. thermocellum* CbhA、*C. thermocellum* CelD などの代表的な GHF9 セルラーゼの触媒ドメインと、47.5、47.0、42.7、21.9 および 20.5%の同一性を示した。また、GHF9 active site signatures もおおむね保存されていた。これらのことから、本酵素の C-末端側 447 残基領域は GHF9 セルラーゼの触媒ドメインに相当する領域であると結論付けられた。以上のことから、HdEG66 は動物で初めての N-末端に CBM をもつ GHF9 セルラーゼであることが明らかになった。

一方、アワビ染色体 DNA を鋳型として PCR を行い、約 10k bp の DNA（*HdCel*-DNA）を増幅した。この *HdCel* は 10,511 bp からなり 11 個のイントロンによって分断された 12 個のエキソンで構成される HdEG66 の構造遺伝子であると同定された。このことから、HdEG66 は消化管内に存在する共生微生物起源ではなく、アワビ自身を起源とするものであることが明らかになった。*HdCel* のイントロンと、他の GHF9 動物セルラーゼ遺伝子（シ

ロアリ *NtEG*、ホヤ *CipCEL*、ザリガニ *EG-A*) のイントロンの位置を比較した結果、これらの遺伝子間で多くのイントロンが同一の位置に存在することが明らかになった。このことから、これらの動物セルラーゼ遺伝子が共通のセルラーゼ遺伝子を起源とすることが強く示唆された。

以上のように、本研究ではエゾアワビから GHF9 セルラーゼ HdEG66 および HdEG53 を精製することに成功し、それらの基本的な性質と一次構造を明らかにした。HdEG66 は N-末端に CBM 様の伸張領域をもっており、これまでに報告のない新規構造のセルラーゼであることが明らかになった。さらに、遺伝子構造の解析により、このセルラーゼがシロアリやザリガニなど他の動物セルラーゼと共通の遺伝子起源を有することが示された。本研究により、動物セルラーゼに関する多くの生化学的知見と分子進化上の類縁関係に関する知見を得ることが出来た。

学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　尾　島　孝　男

副　査　　教　授　　都　木　靖　彰

副　査　　助教授　　澤　辺　智　雄

副　査　　助教授　　井　上　　晶

学 位 論 文 題 名

アワビ・セルラーゼ HdEG66および HdEG53の一次構造と機能に関する研究

セルラーゼ（エンド-1,4-β-グルカナーゼ、EC 3.2.1.4）は、セルロース鎖のβ-1,4-グルコシド結合を加水分解する酵素で、食品工業、洗剤工業、環境エネルギー産業など様々な分野で有用な酵素である。本研究は、北海道の主要水産増殖種の一つであるエゾアワビ（*Haliotis discus hannai*）が消化酵素としてもつセルラーゼの単離と性状解析を行い、その反応特性や一次構造に関する知見を得たものである。本研究により、未だ不明な点が多い動物セルラーゼの構造と機能に関する理解が深まり、アワビのセルロース糖化能に関する基礎知見が得られた。研究成果は以下のように要約される。

1. エゾアワビ消化液から、TOYOPEARL CM-650M、ハイドロキシアパタイト、およびSephacryl S-200を用いたカラムクロマトグラフィーにより、分子量100,000、66,000および53,000の3種類のセルラーゼを単離することに成功した。それらのセルラーゼは、アワビの学名と分子量に基づき、HdEG100、HdEG66、および HdEG53 と命名された。それらのうち、主要成分である HdEG66 と HdEG53 の作用特性を解析し、いずれも至適 pH6.3、至適温度 40°C を示すこと、また 3 糖以上のセロオリゴ糖をセロビオースとグルコースに分解することを明らかにした。一方、高分子セルロースからはセロビオースとグルコースを生成することを明らかにした。さらに、p-nitrophenyl cellooligosaccharide を HdEG66 で分解した際の生成物を分析し、本酵素の作用部位がセロテトラオース単位の中央部のグリコシド結合であることを明らかにした。
2. HdEG66 と HdEG53 の部分アミノ酸配列を分析し、両者は共通の触媒ドメインを有するが、HdEG66 はその N 末端に carbohydrate-binding module (CBM)を有することを明らかにした。また、この CBM は HdEG66 を限定トリプシン消化すると切断除去され、HdEG53 相当の触媒ドメインが生成することを明らかにした。このことから、

両者が翻訳後修飾の違いによって生じたアイソザイムである可能性を示した。

3. アワビ・セルラーゼの一次構造に関する知見を得るために、肝膵臓から cDNA ライブラリーを作製し、そこから polymerase chain reaction (PCR)により HdEG66 をコードする cDNA を増幅した。クローン化された cDNA の塩基配列を解析し、その 1898bp の塩基配列中の翻訳領域 1,785bp の塩基配列から、594 残基のアミノ酸配列を演繹した。演繹アミノ酸配列の N 末端 16 残基は HdEG66 の分泌シグナルに相当し、それに続く 103 残基部分は CBM と同定された。一方、残りの C 末端側 447 残基部分は *Nastitermes takasagoensis* NtEG、*Thermobifida fusca* E4、*Clostridium cellulolyticum* CelM、*C. thermocellum* CbhA、*C. thermocellum* CelD などの GHF9 セルラーゼの触媒ドメインと、47.5、47.0、42.7、21.9 および 20.5%の同一性を示し、glycoside hydrolase family 9 の active site signatures を有していたことから、GHF9 様セルラーゼの触媒ドメインと同定された。このことは、HdEG66 が動物で初めての N 末端に CBM を有する GHF9 セルラーゼであることを示している。

4. 一方、アワビ染色体 DNA を鋳型として PCR を行い、約 10k bp の HdEG66 の構造遺伝子（HdCel-DNA）を増幅することに成功した。HdCel-DNA は 10,511 bp からなり 11 個のイントロンによって分断された 12 個のエキソンで構成されていた。このことから、HdEG66 は消化管内に存在する共生微生物起源ではなく、アワビ自身のゲノムにコードされていることが証明された。HdCel のイントロンと、他の GHF9 動物セルラーゼ遺伝子（シロアリ NtEG、ホヤ CipCEL、ザリガニ EG-A）のイントロンの位置を比較し、これらの遺伝子間で多くのイントロンが同一の位置に存在することを明らかにした。このことから、これらの動物セルラーゼ遺伝子が共通のセルラーゼ遺伝子から派生した可能性を示した。

以上のように、本研究は、エゾアワビから GHF9 セルラーゼ HdEG66 および HdEG53 を精製し、それらの基本的な性質と一次構造を明らかにするとともに、遺伝子構造の解析を通じて、本セルラーゼがシロアリやザリガニなど他の動物セルラーゼと共通の遺伝子起源を有することを明らかにしたものである。本研究により、動物セルラーゼの構造・機能に関する新知見、および分子進化に関する重要な知見が得られた。これらの研究成果は、水産生物の機能タンパク質に関する研究を大きく進展させるものである。よって審査員一同は、本論文が博士（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。