

Pseudoalteromonas sp. No.1786株由来

アルギン酸リアーゼによるアルギン酸オリゴ糖の生産

およびその生理機能と作用機序に関する研究

学位論文内容の要旨

アルギン酸は 1,4 結合した β -D-マンニユロン酸 (M) と C5 位エピマーである α -L-グルロン酸 (G) の 2 種類のウロン酸から構成される直鎖型多糖であり、これまで食品、医薬品、化粧品などに広く利用されている。ただし、粘度が高く扱い難いため低粘度化し、新たな生理機能を見出すことを考えた。これまでアルギン酸分解酵素については、アルギン酸多糖を β 脱離反応により分解するリアーゼ型が知られており、海藻や軟体動物などに存在するものと細菌が産生するものがある。本論文では、海洋由来の細菌が産生するアルギン酸分解酵素の探索を開始し、生産株および酵素の特徴を把握することを最初の目的とした。酵素反応で生成されるアルギン酸オリゴ糖については構造を推定するとともに、ヒトが食す軟体動物内臓中にその存在を見出し、食経験があることを確認した。本オリゴ糖の生理機能(特に血圧降下)およびその作用機序の解明を試み、最終的にヒトに対する最適用量および長期摂取に対する有効性について明らかにした。

(1) アルギン酸分解酵素産生菌の探索および諸性質

様々な生物種よりアルギン酸分解酵素産生菌の単離を試みた結果、節足動物であるカブトガニの腸内容物から菌体外に強い酵素活性を示す細菌の獲得に成功し、*Pseudoalteromonas* sp. と同定した。酵素活性の消長は菌の増殖に比例し、酵素産生に関し増殖連動型の細菌であることが明らかとなった。

(2) アルギン酸分解酵素の部分精製および諸性質

菌体外酵素について陰イオン交換カラムを用いた部分精製を行うことにより、SDS-PAGE で 32 kDa 付近に強いバンドを与える酵素標品を得た。本酵素は 50℃ および pH 7.7 に反応の至適を示した。安定域は 40℃ 以下および pH 6.3-8.9 の範囲と、これまで *Pseudoalteromonas* 属で報告されていない高温域に反応の至適温度を持つ新規な酵素であることが分かった。金属塩の添加では一部の多価イオンを除き、酵素活性を増強させる性質が認められた。特に Ca^{2+} および Mg^{2+} において 300% 以上の著しい上昇が見られ、この点からも新規な酵素であることが分かった。基質の分解反応において 230 nm の吸収(二重結合の生成)と還元力が増加することから、リアーゼ型の酵素であることが判明し、同時に粘度の急激な低下が認められていることから、エンド型の反応を触媒することが推察された。

(3) アルギン酸オリゴ糖の精製および諸性質

酵素反応後、培地に由来する塩類の除去法について検討を行った。アルギン酸オリゴ糖は、カルボン酸を有するためイオン交換樹脂による方法は適さない。そこで、Bio-Gel を用いたイオン排除法、電気透析法などを試み、塩類の除去に成功した。得られたオリゴ糖は MS により 2、3 および 4 糖から構成される主として 8 種類の混合物であることを確認し、NMR により各オリゴ糖の構造について推定した。酵素量を変化させた実験からアルギン酸 1 g あたりに必要な酵素量が 6 unit であること、また酵素を過剰量添加し反応を行っても各オリゴ糖量に増減が見られないことから、8 種類のオリゴ糖が最終生成物であることが示唆された。さらに M あるいは G が豊富な 2 種類のアルギン酸に対する作用が認められ、本酵素が両者を良好な基質と認識していることが推察され、オリゴ糖の分別製造が可能であることを見出した。

(4) 自然界からのアルギン酸オリゴ糖の検出

これまでアルギン酸を分解する菌株および酵素、またアルギン酸を酵素により低分子化したオリゴ糖については様々な報告があるものの、自然界においてアルギン酸オリゴ糖の存在を証明した例はなかった。そこで、軟体動物（サザエとアワビ）の内臓中から過塩素酸により抽出を試みた後、HPLC、MS および MS/MS 分析に供し、アルギン酸オリゴ糖の検出を行った。その結果、HPLC 分析からはアルギン酸オリゴ糖に由来するピーク、MS および MS/MS 分析からはアルギン酸オリゴ糖に由来するシグナルが観察された。これまで自然界に存在すると考えられてきたアルギン酸オリゴ糖について、今回抽出および確認できたことは、軟体動物中にアルギン酸オリゴ糖が存在するということに加え、ヒトが長年食してきた食経験として新たな知見を提供するものであった。

(5) アルギン酸オリゴ糖の血圧に対する生理機能および作用機序

アルギン酸オリゴ糖の血圧に対する生理作用について自然発症高血圧ラットを用いた検討を行い、血圧上昇抑制作用を確認した。その作用機序についてアンギオテンシン I 変換酵素阻害活性および Ca 拮抗作用について解析したところ、後者の Ca 拮抗作用が認められ、特に電位依存性チャネルに拮抗作用を示すことで血圧低下を発現させる可能性が示唆された。また、アルギン酸オリゴ糖投与による尿および糞中への排泄結果から、大部分が糞中へ排泄されるが、一部が体内に吸収された。従って、1 つの作用機序として、アルギン酸オリゴ糖の大部分が糞中へ排泄されるが、一部は体内へ吸収され平滑筋細胞まで到達した後、電位依存性チャネルに拮抗作用を及ぼしていることが考えられた。アルギン酸オリゴ糖の吸収および排泄、またオリゴ糖の降圧作用に関する報告はこれまでなく、新規な知見であった。

(6) ヒト血圧に対する最適用量および長期摂取時の有効性及び安全性

正常高値血圧者および軽症高血圧者 69 名を対象とし、アルギン酸オリゴ糖の降圧作用に対する最適有効量についてプラセボを対照とした 4 週間無作為化並行群間試験により検証した。その結果、高用量である 1 日あたり 2.5 g の摂取で降圧効果が早期に出現し、低用量群 (1.25 g/日) との間に用量依存性を確認した。そこで 107 名に対し、プラセボを対照とし一日あたり 1.9 g、12 週間の長期摂取試験を実

施した。その結果、収縮期血圧は試験食群間比較においてアルギン酸オリゴ糖群の摂取 8、10、12 週間後、拡張期血圧においては摂取 4、12 週間後に有意な低下を示した。摂取試験の終了後、血圧は緩徐に回復し、摂取前の数値を過度に超えるようなリバウンド現象は認められなかった。この際に、脈拍数への影響も認められなかったことは、被験食群においてみられた緩やかな降圧効果は循環器系への負担を生じることなく、適度な作用であることが考えられた。以上の結果は、ヒトに対する最適用量をはじめ、長期摂取における有効性および安全性について新たな知見が得られたと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 村 淳 夫
副 査 教 授 横 田 篤
副 査 教 授 原 博

学 位 論 文 題 名

Pseudoalteromonas sp. No.1786株由来

アルギン酸リアーゼによるアルギン酸オリゴ糖の生産

およびその生理機能と作用機序に関する研究

本論文は、和文 148 頁、図 29、表 24、8 章からなり、参考論文 7 編が添えられている。

アルギン酸は 1,4 結合した β -D-マンニユロン酸 (M) と α -L-グルロン酸 (G) から成る多糖であるが、高粘度のため取扱いが難しい。従って、分解し低粘度化することで物性を改善し、かつ得られたオリゴ糖に新たな生理機能を見出し、利用拡大を図ることは重要である。本論文では、海洋由来の細菌が産生するアルギン酸分解酵素を探索し、生産株および酵素を取得した。酵素反応で生成されるアルギン酸オリゴ糖について構造を推定するとともに、ヒトが食す軟体動物内臓中にその存在を見出し、食経験があることを確認した。本オリゴ糖の生理機能（特に血圧降下）およびその作用機序の解明を試み、最終的にヒトに対する最適用量および長期摂取に対する有効性について明らかにした。

(1) アルギン酸分解酵素産生菌の探索および諸性質

カブトガニの腸内からアルギン酸分解酵素を分泌する細菌の獲得に成功し、*Pseudoalteromonas* sp. と同定した。酵素活性の消長は菌の増殖に比例することが明らかとなった。

(2) アルギン酸分解酵素の部分精製および諸性質

菌体外酵素をイオン交換法により部分精製した。本酵素は 50℃ および pH 7.7 に反応の至適を示した。安定域は 40℃ 以下および pH 6.3-8.9 の範囲と、これまで *Pseudoalteromonas* 属で報告がない高温域に反応の至適温度を持つ新規な酵素であることが分かった。金属塩の添加で、酵素活性が増加し、特に Ca^{2+} や Mg^{2+} で 300% 以上の著しい上昇を示す新規な酵素であった。基質の分解様式からエンド型のリアーゼであることが推察された。

(3) アルギン酸オリゴ糖の精製および諸性質

酵素反応後、培地に由来する塩類の除去法について検討を行い、イオン排除法と電気透析法により除去に成功した。得られたオリゴ糖は 2~4 糖から成る 8 種類のものであり、各オリゴ糖の構造を推定した。本酵素が M あるいは G が豊富な 2 種類のアルギン酸を良好な基質とし、両基質を用いることで M 型や G 型のオリゴ糖を分別製造できることを見出した。

(4) 自然界からのアルギン酸オリゴ糖の検出

自然界においてアルギン酸オリゴ糖の存在を証明した例はない。本研究で初めてヒトが長年食してきた軟体動物（サザエとアワビ）の内臓から本オリゴ糖を検出でき、アルギン酸オリゴ糖の食経験を示すことができた。

(5) アルギン酸オリゴ糖の血圧に対する生理機能および作用機序

自然発症高血圧ラットを用いてアルギン酸オリゴ糖の血圧上昇抑制作用を確認した。その作用機序を解析し、Ca 拮抗作用（特に電位依存性チャンネルに拮抗作用）を示すことで血圧低下を発現することが考えられた。経口投与されたアルギン酸オリゴ糖は、大部分が糞中へ排泄されるが、一部は体内に吸収された。従って、1 つの作用機序として吸収されたオリゴ糖が平滑筋細胞まで到達した後、電位依存性チャンネルに拮抗作用を及ぼし降圧させることが示唆された。

(6) ヒト血圧に対する最適用量および長期摂取時の有効性及び安全性

正常高値血圧者および軽症高血圧者を対象とし、アルギン酸オリゴ糖の降圧作用に対する最適有効量を調べた。1 日あたり 2.5 g の摂取（高用量）で降圧効果が早期に出現し、低用量群（1.25 g/日）との間に用量依存性を確認した。長期摂取試験（1.9 g/日、12 週間）では、収縮期血圧（摂取 8、10、12 週間後）と拡張期血圧（摂取 4、12 週間後）の有意な低下を認めた。摂取試験の終了後、血圧は緩徐に回復し摂取前の値を過度に超えるようなリバウンド現象および脈拍数への影響はなかった。アルギン酸オリゴ糖が示す緩やかな降圧効果は、循環器系への負担がなく、適度な作用であることが明らかになった。

本研究は、新規なアルギン酸分解酵素を分泌する新しい菌株を取得し、それによりアルギン酸オリゴ糖の生産法を構築することで、アルギン酸の利用を拡大した。得られたアルギン酸オリゴ糖の構造決定を行い、その食経験があること、生理作用としての血圧上昇抑制を見出し、その作用機序を推定した。ヒトに対する最適用量および長期摂取における有効性および安全性を認めた。以上のように本論文は、アルギン酸オリゴ糖に関し、学術的ならびに産業的に重要な多くの新知見を提供した。

よって審査員一同は、茶木 貴光が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。