

# 海洋細菌由来フコイダン分解酵素に関する研究

2024年1月

荒井良仁



# 目次

第 1 章 序論.....	1
1-1. 海藻について.....	1
1-2. フコイダンについて.....	3
1-3. フコイダン分解微生物について.....	7
1-4. フコイダン分解酵素について.....	11
1-5. 本論文の目的および構成.....	15
第 2 章 新たに単離された <i>Flavobacterium</i> sp. SW 株と <i>Luteolibacter algae</i> H18 株との生育特性と酵素生産の比較.....	17
2-1. 緒言.....	17
2-2. 材料および実験方法.....	18
2-2-1. 材料および試薬.....	18
2-2-2. オキナワモズクフコイダン分解菌のスクリーニング、菌株同定、培養条件... 18	
2-2-3. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC).....	20
2-2-4. <i>L. algae</i> H18、 <i>Flavobacterium</i> sp. SW の様々な炭素源資化.....	22
2-2-5. <i>L. algae</i> H18、 <i>Flavobacterium</i> sp. SW の無細胞抽出液による様々な基質分解確認.....	22
2-3. 結果.....	23
2-3-1. 新たに得られたオキナワモズクフコイダン資化性菌の同定.....	23
2-3-2. <i>L. algae</i> H18、 <i>Flavobacterium</i> sp. SW の様々な炭素源資化.....	23
2-3-3. <i>L. algae</i> H18、 <i>Flavobacterium</i> sp. SW の無細胞抽出液による様々な基質分解... 25	
2-3-4. ガゴメコンブフコイダンを炭素源として得られた <i>Flavobacterium</i> sp. SW の無細胞抽出液による様々な基質分解.....	26
2-3-5. LB 培地で培養して得られた <i>Flavobacterium</i> sp. SW の無細胞抽出液によるオキナワモズクおよびガゴメコンブの分解.....	28
2-3-6. ラミナラン、アルギン酸を炭素源として得られた <i>Flavobacterium</i> sp. SW の無細胞抽出液による様々な基質分解.....	29
2-4. 考察.....	31
第 3 章 <i>Flavobacterium</i> sp. SW 由来フコイダナーゼの遺伝子同定、異種発現、特性解明.....	33
3-1. 緒言.....	33
3-2. 材料および実験方法.....	34

3-2-1.	酵素的脱アセチル化オキナワモズクフコイダンの調製.....	34
3-2-2.	<i>Flavobacterium</i> sp. SW 由来フコイダナーゼ遺伝子の探索.....	34
3-2-3.	シグナル配列を削除したタンパク質をコードする <i>swfct</i> のプライマー設計および PCR 増幅.....	34
3-2-4.	制限酵素消化.....	34
3-2-5.	ライゲーション、形質転換、プラスミド単離.....	34
3-2-6.	<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pCold I/ <i>swfct</i> による目的タンパク質の生産検討.....	34
3-2-7.	タンパク質濃度の定量.....	34
3-2-8.	SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE).....	34
3-2-9.	His-trap を用いた <i>Swfct</i> の精製.....	34
3-2-10.	ゲルろ過 HPLC による酵素活性測定.....	34
3-2-11.	Somogyi-Nelson 法による <i>Swfct</i> の酵素化学的諸性質の検討.....	34
3-2-12.	至適温度の検討.....	40
3-2-13.	熱安定性の検討.....	40
3-2-14.	至適 pH の検討.....	41
3-2-15.	pH 安定性の検討.....	41
3-2-16.	金属イオン、阻害剤・キレート剤が活性に及ぼす影響.....	41
3-2-17.	基質特異性の検討.....	42
3-2-18.	ゲルろ過クロマトグラフィーによる <i>Swfct</i> の分子量測定.....	42
3-2-19.	<i>Swfct</i> による基質分解限界.....	43
3-3.	結果.....	44
3-3-1.	<i>Flavobacterium</i> sp. SW 由来フコイダナーゼ遺伝子 <i>swfct</i> について.....	44
3-3-2.	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pCold I/ <i>swfct</i> の発現検討.....	47
3-3-3.	His-trap を用いた <i>Swfct</i> の精製.....	48
3-3-4.	<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pCold I/ <i>swfct</i> C.F.E. の酵素活性評価.....	48
3-3-5.	至適温度の検討.....	50
3-3-6.	熱安定性の検討.....	50
3-3-7.	至適 pH の検討.....	50
3-3-8.	pH 安定性の検討.....	50
3-3-9.	金属イオンが活性に及ぼす影響.....	50
3-3-10.	阻害剤・キレート剤が活性に及ぼす影響.....	50
3-3-11.	基質特異性の検討.....	50
3-3-12.	ゲルろ過クロマトグラフィーによる <i>Swfct</i> の分子量測定.....	50
3-3-13.	<i>Swfct</i> による基質分解限界.....	50
3-4.	考察.....	57



<b>第 4 章</b>	<b><i>Flavobacterium</i> sp. SW 由来第 2 のフコイダナーゼの特性解明</b>	59
4-1.	緒言	59
4-2.	材料および実験方法	61
4-2-1.	<i>Flavobacterium</i> sp. SW 由来第 2 のフコイダナーゼ遺伝子の探索	61
4-2-2.	プライマーの設計	61
4-2-3.	DNA 実験、組み換え大腸菌による酵素タンパク質の生産検討、酵素精製	61
4-2-4.	ゲルろ過 HPLC を用いた <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET-21a/swfcn2 C.F.E. の酵素活性検討	61
4-2-5.	Carbohydrate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (C-PAGE) による Swfcn2 の酵素化学的性質の検討	61
4-2-6.	酵素化学的諸性質の検討	61
4-2-7.	基質特異性の検討	61
4-2-8.	Swfcn2 によるガゴメコンブフコイダン分解の経時変化	61
4-2-9.	Swfcn2 の基質分解限界	61
4-2-10.	Swfct、Swfcn2 を両方添加した場合の基質分解	61
4-3.	結果	61
4-3-1.	<i>Flavobacterium</i> sp. SW 由来第 2 のフコイダナーゼ遺伝子について	61
4-3-2.	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET-21a/swfcn2 の発現検討および酵素精製	61
4-3-3.	ゲルろ過 HPLC による <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET-21a/swfcn2 C.F.E. の酵素活性測定	61
4-3-4.	至適温度の検討	71
4-3-5.	熱安定性の検討	71
4-3-6.	至適 pH の検討	71
4-3-7.	pH 安定性の検討	71
4-3-8.	金属イオンが活性の及ぼす影響	71
4-3-9.	阻害剤・キレート剤が活性に及ぼす影響	71
4-3-10.	基質特異性の検討	71
4-3-11.	Swfcn2 によるガゴメコンブフコイダン分解の経時変化	71
4-3-12.	Swfcn2 による基質分解限界	71
4-3-13.	Swfct、Swfcn2 を両方添加した場合の基質分解	71
4-4.	考察	80
<b>第 5 章</b>	<b><i>Luteolibacter</i> algae H18 由来第 2 のフコイダナーゼの特性解明</b>	81
5-1.	緒言	81
5-2.	材料および実験方法	82
5-2-1.	<i>L. algae</i> H18 由来第 2 のフコイダナーゼ遺伝子の探索	82

5-2-2.	プライマーの設計 .....	82
5-2-3.	DNA 実験、組み換え大腸菌による酵素タンパク質の生産検討、酵素精製 .....	82
5-2-4.	<i>h18fda1</i> の C 末端領域を欠損させた <i>h18fda2</i> のクローニング .....	82
5-2-5.	ゲルろ過 HPLC を用いた <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET-21a/ <i>h18fda1</i> および <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET-21a/ <i>h18fda2</i> C.F.E. の酵素活性検討 .....	82
5-2-6.	C-PAGE を用いた H18fda1、H18fda2 の酵素化学的性質の検討 .....	82
5-2-7.	基質特異性の検討 .....	82
5-2-8.	H18fda1、H18fda2 によるガゴメコンブフコイダン分解の経時変化 .....	82
5-2-9.	H18fda1, Swfcn2 を両方添加した場合の基質分解 .....	82
5-3.	結果 .....	86
5-3-1.	<i>L. algae</i> H18 由来の第 2 のフコイダナーゼ遺伝子 <i>h18fda1</i> について .....	82
5-3-2.	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET-21a/ <i>h18fda1</i> , <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET-21a/ <i>h18fda2</i> の発現検討および酵素精製 .....	82
5-3-3.	ゲルろ過 HPLC による <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET-21a/ <i>h18fda1</i> , <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET-21a/ <i>h18fda2</i> C.F.E. の酵素活性測定 .....	90
5-3-4.	至適温度の検討 .....	90
5-3-5.	熱安定性の検討 .....	90
5-3-6.	至適 pH の検討 .....	90
5-3-7.	pH 安定性の検討 .....	90
5-3-8.	金属イオンが活性に及ぼす影響 .....	90
5-3-9.	各種阻害剤が活性に及ぼす影響 .....	90
5-3-10.	基質特異性の検討 .....	90
5-3-11.	H18fda1, H18fda2 によるガゴメコンブフコイダン分解の経時変化 .....	90
5-3-12.	H18fda1, Swfcn2 を両方添加したときの基質分解 .....	90
5-4.	考察 .....	100

## 第 6 章 *Luteolibacter algae* H18 由来フコイダンスルファターゼの精製、遺伝子同定、異種発現、特性解明 .....

6-1.	緒言 .....	102
6-2.	材料および実験方法 .....	104
6-2-1.	<i>L. algae</i> H18 の大量培養および C.F.E. の調製 .....	100
6-2-2.	イオンクロマトグラフィーによる硫酸基の定量 .....	100
6-2-3.	バリウム沈殿による硫酸基の定量 .....	100
6-2-4.	DEAE-Sepharose FF カラムによる酵素精製 .....	100
6-2-5.	Phenyl-TOYOPEARL 650M による酵素精製 .....	100
6-2-6.	Resource Q カラムによる精製 .....	100

6-2-7.	N 末端アミノ酸配列解析 .....	100
6-2-8.	プライマーの設計 .....	100
6-2-9.	DNA 実験、組み換え大腸菌による酵素タンパク質の生産検討、酵素精製 ...	100
6-2-10.	酵素活性測定 .....	100
6-2-11.	至適温度の検討 .....	100
6-2-12.	熱安定性の検討 .....	100
6-2-13.	至適 pH の検討 .....	100
6-2-14.	金属イオン、阻害剤・キレート剤が活性に及ぼす影響 .....	100
6-2-15.	基質特異性の検討 .....	110
6-3.	結果 .....	111
6-3-1.	<i>L. algae</i> H18 大量培養と C.F.E.の酵素調製 .....	111
6-3-2.	DEAE-Sepharose FF カラムによる酵素精製 .....	111
6-3-3.	Phenyl-TOYOPEARL 650M による酵素精製 .....	111
6-3-4.	Resource Q カラムによる酵素精製 .....	111
6-3-5.	精製酵素のアミノ酸配列解析 .....	111
6-3-6.	<i>fsut107</i> の発現検討と酵素精製 .....	111
6-3-7.	Fsut107 の酵素活性測定 .....	111
6-3-8.	至適温度の検討 .....	121
6-3-9.	熱安定性の検討 .....	121
6-3-10.	至適 pH の検討 .....	121
6-3-11.	金属イオンが活性に及ぼす影響 .....	121
6-3-12.	阻害剤・キレート剤に及ぼす影響 .....	121
6-3-13.	基質特異性の検討 .....	121
6-4.	考察 .....	125
<b>第 7 章 総括</b> .....		127
引用文献 .....		130
謝辞 .....		142
研究業績 .....		143

# 第 1 章 序論

## 1-1. 海藻について

日本は海に囲まれた国であり、古くから魚類、貝類、海藻などが食用として利用されてきた。海藻は、食物繊維や鉄、カルシウムなどのミネラルに富み、現代では健康食材の一つとして挙げられている。日本では縄文時代から海藻を利用していた痕跡が発見されており、岩上に生育し採取し易く、柔らかく美味しいことから、食料や製塩の道具として扱われていた。平安時代には神事や税の一部としても利用されており、経済的価値の定まった流通物資であったことも確認されている。さらには、現存する最古の歌集である「万葉集」でも取り上げられていることから、海藻は古くから日本人にとって馴染み深い食品であったことが伺える [1]。

海藻類はその色合いによって、緑藻類、褐藻類、紅藻類に分けられ、水産庁によると地球上には約 2 万種の海藻が生育していると考えられているが、食用にされているのは褐藻類に多く、全部で約 50 種類程度だといわれている。現代では、海藻を人への食品として利用しているだけでなく、家畜の飼料としても利用しており、未利用海藻を用いた豚の免疫力向上および鶏の卵黄濃化に関する研究や [2]、褐藻の一種を与えることによる牛の腸管免疫活性化に関する研究 [3]、さらには紅藻を牛など反芻動物に与えるとメタン排出量の削減が可能となった研究もあり [4]、人だけでなく動物にも有効活用できることが挙げられる。また、海藻をバイオ燃料に変える取り組みも行われており [5]、海藻のバイオ燃料化は陸生由来の植物をバイオ燃料化するのに比べると環境への悪影響が少ないとの見解も挙げられている。さらに海藻は、ブルーカーボンとも呼ばれ、海洋に吸収された CO<sub>2</sub> を、海藻が行う光合成によって吸収・貯留することで CO<sub>2</sub> 排出量削減およびカーボンニュートラルに重要な役割

を担っている [6]。

海藻、特にコンブ、ワカメ、モズクなどの褐藻類はすり潰すとトロトロとした粘性物質が見られる。これは褐藻類に含まれている、アルギン酸、カラギーナン、フコイダンなどの多糖類に起因している。アルギン酸は安定化と増粘の特性を持ち、シロップやアイスクリーム、小麦製品などへの利用に適しており [7]、またアルギン酸ナトリウムとカルシウム塩でゲル化するため、人工イクラなどの工業的利用もされている [8]。カラギーナンも同じく安定剤、増粘剤として利用されており、加工肉やミルク製品などで使用されている [9]。フコイダンについては次項に詳しく記載する。

## 1-2. フコイダンについて

フコイダンはフコースを主構成糖とし、多くの硫酸基が結合した酸性多糖であり、海藻の種類によっては、ガラクトース、キシロース、ウロン酸なども構成糖としている。一般的に、主鎖としてフコースが  $\alpha$ -1,3 結合のみでの構成または  $\alpha$ -1,3 と  $\alpha$ -1,4 結合を交互に繰り返す構成であるが、これらの基本構造以外にも上記構成糖などを側鎖に持ち、枝分かれ構造を持つ場合もあるため、非常に複雑なヘテロ硫酸化多糖である [10]。さらに、褐藻の種類、収穫時期、抽出方法によって含有されるフコイダンの硫酸化度、硫酸化パターン、分子サイズや分枝度などの化学構造が変わるため、機能性が大きく異なることが報告されている [11, 12]。

フコイダンは 1913 年にスウェーデンのウプサラ大学の Kylin らによって初めてヒバマタ (*Fucus vesiculosus*) から分離・報告され [13]、それ以降フコイダンに関する文献数は数千にまで増加している [14]。フコイダンが持つ特性は化学、生物学、医学、栄養学などの科学分野から多くの関心を集め、広範に研究されており、抗ウイルス作用 [15]、抗炎症作用 [16]、抗凝血作用 [17] といった様々な生理活性機能が報告されている [18]。さらに、フコイダン誘導体が癌細胞に対してアポトーシス誘導を行うことで抗がん作用を示すことが報告されているほか [19]、他の文献ではフコイダンをグリコシダーゼにより低分子量化させたものがアポトーシス効果を優位に示すと述べられている [20]。このような、フコイダンの生理活性は、治療薬として有用な可能性を示し、フコイダンと他の抗がん剤とを組み合わせる新薬として開発するための臨床研究がいくつか行われている [21]。

また、2019 年から現在に至るまで世界的な大流行となっている新型コロナウイルスとフコイダンに関する興味深い研究も行われている。Kwon らはヘパリン、ヘパラン硫酸、フコイダンなどの硫酸化多糖類が *in vitro* で新型コロナウイルスのスパイクタンパク質と結合し、細胞への結合を阻害することを明らかにした [22]。そして、フコイダンが持つ免疫調節機能および抗炎症作用がコロナウイルス感染リスクを低減し、ウイルス感染後の呼吸器系の

炎症を防ぐことから、栄養補助食品や医薬品としての利用もできると考えられている [23]。

褐藻の種類によってフコイダンの化学構造や生理活性が異なることは先に述べたが、含有量も褐藻の種類によって大きく異なることがわかっており、各褐藻におけるフコイタン含有量を表 1-1 に示した。表によれば、オキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus*) およびモズク (*Nemacystus decipines*) が他の褐藻類に比べて明らかにフコイタン含有量が高いことがわかる。また、表 1-2 は、オキナワモズク由来フコイタン、ガゴメコンブ (*Saccharina sculpera*) 由来フコイタン、ワカメ (*Undaria pinnatifida*) 由来フコイタン(測定箇所は孢子葉部=メカブのため、以下メカブ由来とする) における構成糖や硫酸根などの成分をまとめたものだが、ガゴメコンブ由来フコイタンが最も硫酸化度が高く、メカブ由来フコイタンはガラクトースの含有量が他に比べて明らかに多いことがわかる [24]。

オキナワモズクは日本国内の 9 割を超えるシェアを持つ沖縄県の主要水産物であり、表 1-1 からわかるようにフコイタン含有量が多いため、フコイダンの重要な原料として錠剤やジュースに加工され、健康補助食品として市販されている。オキナワモズクはナガマツ目ナガマツモ科に属する褐藻類で沖縄県本島を中心に生育し、石垣島や奄美大島など南西諸島に分布している。そのため、オキナワモズクは沖縄本島をはじめ、久米島や石垣島などで養殖され、その生産量は年間 2 万トンにのぼる。オキナワモズクの養殖は「種付け」、すなわち盤状体とよばれる発芽体を養殖網に付着させることから始まり、盤状体を付着させた養殖網は海底に設置される。養殖は海中で行われ、オキナワモズクは海底に設置された養殖網を土台として、造胞体とよばれる大型藻体に成長する。盤状体を付着させてからおよそ 100 日から 120 日後、藻体が 30 cm ほどに成長してから収穫され、藻体は 5 月下旬以降、水温が高くなるにつれて消失し始める。沖縄県で養殖されているオキナワモズクの収穫は 1 月以降に始まり、3 月から 5 月で最盛期を迎える [25]。オキナワモズク由来フコイダンの構造は 1999 年に長岡らによって推定化学構造が発表され [26]、2003 年に酒井、加藤らはオキナワモズク由来フコイタンを特異的に分解する酵素を海洋細菌から新しく発見し、これを利

用してオキナワモズク由来フコイダンの主な化学構造を決定した [27]。その構造は、フコースの  $\alpha$ -1, 3 結合の繰り返し構造を基本に、フコースの 4 位炭素の約 60%に硫酸基が結合し、フコース 6 分子に 1 個の割合でグルクロン酸が  $\alpha$ -1, 2 結合した構造である (図 1-1) [26, 27]。さらに 2009 年に照屋らによって、オキナワモズク由来フコイダンには、アセチル基が含まれていることが明らかにされた (図 1-2) [28]。オキナワモズク由来フコイダンが持つ生理活性としては、コレステロール低下作用 [29]、*Helicobacter pylori* 定着阻害作用 [30]、HTLV-1 プロウィルス量減少 [31]、便通改善効果 [32]など様々な報告がなされている。

表 1-1. 各種海藻のフコイダン含有量 [33]

褐藻類	フコイダン含有量 (g / kg 乾燥重量)
オキナワモズク	250
ガゴメコンブ	40
ワカメ (胞子葉部 (メカブ))	80
モズク	250
マコンブ	15
アラメ	70

表 1-2. 各種フコイダンの構成糖、硫酸根、カチオンの分析値 [24]

構成成分	オキナワモズク由来 フコイダン分析値 (%)	ガゴメコンブ由来 フコイダン分析値 (%)	メカブ由来 フコイダン分析値 (%)
フコース	46.8	37.7	25.7
ガラクトース	-	1.3	23.0
グルクロン酸	8.7	2.5	0.7
マンノース	-	1.8	0.6
ラムノース	-	<0.5	<0.5
キシロース	-	0.5	<0.5
硫酸根	16.0	33.2	29.0
カチオン	5.7	7.2	7.9
合計	77.2	84.2	86.9





### 1-3. フコイダン分解微生物について

ヒトの腸内細菌叢が持つ有用な役割の一つとして、ヒト自身が持たない消化酵素を供給することがある。進化の過程でヒトは陸生植物を食してきたため、腸内で陸生由来多糖を分解・吸収することができる。しかし、海藻には陸生植物には見られない多糖が存在する。そして、長年の食習慣の結果として、「海藻を利用できるのは日本人だけ」だと一部のメディアが取り上げている。これは、海洋細菌が持っているポルフィランやアガロース分解酵素遺伝子が、日本人の腸内にいる細菌 *Bacteroides plebeius* に水平伝播されたと示されたためであるとされ、かつての日本人が加熱されていない海藻類を摂食する習慣がこの伝播をもたらしたのではないかと考えられている [34]。しかし、久田氏の研究により、海藻摂取経験のない欧米人でも毎日海藻を食べれば、数日～数週間で海藻多糖分解菌が検出されるのではないかと考えられている [35]。これらの研究はアルギン酸やラミナランなどに着目しており、ヒト腸内におけるフコイダン分解については言及しておらず、食物繊維の 1 種であるフコイダンは腸内細菌では分解することができず、体外で排出されるとされている。

一方、海洋中にはフコイダンを分解・資化している微生物が多数存在している。フコイダン資化性微生物に関する研究については、1959 年に初めて Yaphe らによって報告された。この報告は、カラギーナン分解酵素生産菌として単離された *Pseudomonas* 属 2 株が、菌体外にフコイダン分解酵素を生産するというものであった [36]。さらに、酒井らのグループはガゴメコンブからフコイダンを乾燥重量で 3.8% の収率で調製し、これを用いて、ガゴメコンブ由来フコイダンを分解する海洋微生物のスクリーニングを行った結果、*Flavobacterium* に属し、16SrDNA 配列から暫定的に命名した *Fucobacter marina* SA-0082 を単離した。この株は、ワカメや *Lessonia nigrescens* 由来のフコイダンも部分的に利用することが報告されている [37]。また酒井らは、SA-0082 株以外に *Fucophilus fucoidanolyticus* SI-1234 [38]、*Alteromonas* SN-1009 [39] と命名したフコイダン分解菌株も単離しており、特に

前者は細菌分類上、*Verrucomicrobia* 門という今までほとんど培養実績のない門に属する微生物であることが示されている。その一方で、2000年に Bakunina らによって *Cytophaga* 属、*Alteromonas* 属、*Pseudoalteromonas* 属細菌がフコイダン分解酵素を有することが明らかされた [40]。以降、多くの研究者らによってフコイダン資化性細菌が報告されている [41]。フコイダン資化能のある菌類、無脊椎動物と合わせ既に報告されているフコイダン資化性細菌とその基質となるフコイダンを有する海藻名を表 1-3 にまとめた。

これまでに著者らのグループではオキナワモズクフコイダンを資化する微生物 *Flavobacterium* sp. F31、*Luteolibacter algae* H18 が単離されている [42, 43]。特に H18 株は、グラム陰性の非運動性微生物であり、そのコロニーは黄色く平滑であった。16S rRNA 配列分析の結果、図 1-3 に示すように *L. algae* A5J-40 (AB331894-1)の配列と最も高い類似性 (97%)を示し、*L. algae* H18 と命名された。更にその 16S rRNA 配列は、既知のフコイダン分解微生物である *Mariniflexile fucanivorans* SW5<sup>T</sup> (AJ628046)と 70%、*Fucobacter marina* SA-0082 (AB057592)と 71%、*Fucophilus fucoidanolyticus* SI-1234 (AB073978)と 79%、*Sphingomonas paucimobilis* PF-1 (AM237364)と 72%、*Alteomonos* sp. SN-1009 (AB544005)と 73%、そして *Flavobacterium* sp. F31 (AB544005)と 71%の類似性が示された [43]。

表 1-3. フコイダン資化性微生物と基質となるフコイダンの分離源

Organism	Origin	References
<b>【Bacteria】</b>		
<i>Vibrio</i> sp. No. 5	<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	Furukawa <i>et al.</i> (1992) [44]
<i>Pseudoalteromonas citrea</i> KMM3296, KMM3298	<i>Fucus evanescens</i> <i>Chorda filum</i>	Bakunina <i>et al.</i> (2002) [45]
<i>Fucobacter marina</i> SN-0082	<i>K. crassifolia</i>	Sakai <i>et al.</i> (2002) [37]
<i>Fucophilus fucoidanolyticus</i> SI-1234	<i>C. okamuranus</i>	Sakai <i>et al.</i> (2003) [38]
<i>Alteromonas</i> sp. SN-1009	<i>K. crassifolia</i>	Sakai <i>et al.</i> (2004) [39]
<i>Mariniflexile fucanivorans</i> SW5 <sup>T</sup>	<i>Pelvetia canaliculata</i>	Descamps <i>et al.</i> (2006) [46]
<i>Muricauda eckloniae</i> DOKDO 007 <sup>T</sup>	<i>Ecklonia kurome</i>	Bae <i>et al.</i> (2007) [47]
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> PF-1	<i>Undaria pinnatifida</i>	Kim <i>et al.</i> (2008) [48]
<i>Flavobacterium</i> sp. F31	<i>C. okamuranus</i>	Ohshiro <i>et al.</i> (2010) [42]
<i>Wenyngzhuangia fucanilytica</i> CZ1127	<i>Acaudina molpadioides</i>	Chang <i>et al.</i> (2010) [49]
<i>Luteolibacter algae</i> H18	<i>C. okamuranus</i>	Ohshiro <i>et al.</i> (2012) [43]
<i>Formosa algae</i> KMM3553 <sup>T</sup>	<i>F. evanescens</i>	Silchenko <i>et al.</i> (2013) [50]
<i>Formosa haliotis</i> MA1	<i>Haliotis gigantea</i>	Tanaka <i>et al.</i> (2016) [51]
<b>【Invertebrates】</b>		
<i>Haliotis</i> sp.	<i>F. gardneri</i>	Thanassi <i>et al.</i> (1967) [52]
<i>Patinopecten yessoensis</i>	<i>Nemacytus decipieus</i>	Kitamura <i>et al.</i> (1992) [53]
<i>Pecten maximus</i>	<i>Ascophyllum nodosum</i>	Berteau <i>et al.</i> (2002) [54]
<i>Littorina kurila</i>	<i>F. distichus</i>	Bilan <i>et al.</i> (2005) [55]
<i>Lambis</i> sp.	<i>F. evanescens</i>	Silchenko <i>et al.</i> (2014) [56]
<b>【Fungi】</b>		
<i>Dendryphiella arenaria</i> TM94	<i>F. vesiculosus</i>	Wu <i>et al.</i> (2011) [57]
<i>Fusarium</i> sp. LD8	<i>F. vesiculosus</i>	Wu <i>et al.</i> (2011) [58]

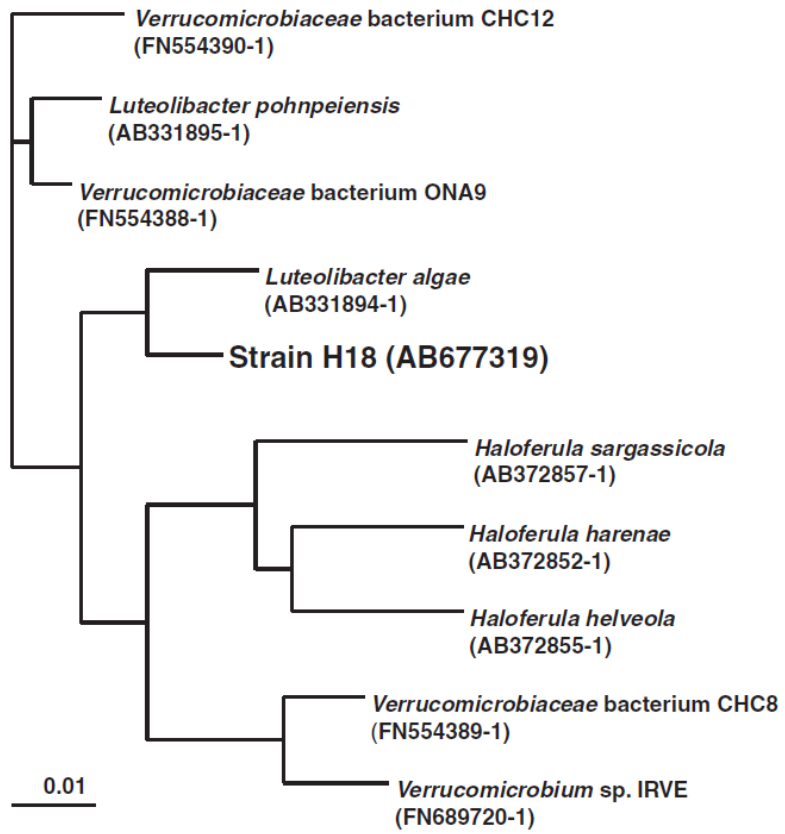


図 1-3. *L. algae* H18 の 16S rRNA 配列に基づく系統樹 [43]

## 1-4. フコイダン分解酵素について

フコイダンは先に述べたように、天然成分でありかつ様々な有用性が認められているにも関わらず、医療分野ではほとんど認知されていない。これは、フコイダンの作用機序が全く不明であり有用性を裏付ける基礎科学的知見がないことが考えられる [59]。フコイダンの作用機序が不明、すなわち構造と生理活性の相関性が不明な理由として、分子量が大きく、かつ構造の不均一性が挙げられる。この相関性を明らかにするためには、化学的処理よりも元の構造を保持し再現性のとりやすい酵素的処理が有効と考えられており [60]、フコイダン分解酵素に関する文献は近年増加している [41]。

フコイダン分解酵素は主に、フコイダンの主鎖を分解するフコイダナーゼやフコシダーゼ、側鎖の硫酸基を脱離するスルファターゼ、アセチル基を脱離するデアセチラーゼといった酵素が存在することが今までの研究で明らかにされている [43, 61]。中でも最も文献数の多いフコイダナーゼに関しては、1967年に Thanassi らが、無脊椎動物である *Haliotus* 属 (ナマコ) の肝臓中からの酵素精製に関する研究の中で、フコイダンから硫酸塩を遊離させずに  $\alpha$ -1,2-L-フコシド結合をエンド型で加水分解する酵素、フコイダナーゼの存在を報告しており [52]、1979年にはアワビ肝臓中からもフコイダナーゼの存在が確認されている [62]。さらに、1992年には Furukawa らによって、*Vibrio* 属 5 株から、3 種のフコイダナーゼが単離された [44]。

さて、Henrissat らは 170,000 を超える膨大な数の糖質加水分解酵素の配列をそれらの配列類似性をもとに、130 程度の糖質加水分解酵素ファミリー (glycoside hydrolase family; GH ファミリー) として分類している [63, 64]。この酵素分類によると、今までに報告されているフコイダナーゼ (Fucoidanase, EC 3. 2. 1.211 および 3.2.1.212) はほとんどが GH 107 ファミリーに分類されている。最初に GH 107 ファミリーに分類されたのは、海洋性細菌 *Mariniflexile fucanivorans* SW5<sup>T</sup> より分離精製されたフコイダナーゼ MfFcnA である [65]。

この MfFcnA は項目 1-2 で述べたものは異なる、ヒバマタ科 (*Pelvetia canaliculata*) 由来フコイダンを多糖からオリゴ糖単位まで分解することが確認されており、文献上初めてフコイダナーゼ酵素遺伝子のクローニング、大腸菌での異種発現が行われた。この論文以降、フコイダナーゼ遺伝子に関する文献は増え、GH 107 ファミリーに分類される酵素に関する文献数は 8 報あり、酵素遺伝子は 12 個存在する。また、近年では、GH 107 ファミリーだけでなく GH 168 ファミリーに分類された新たなフコイダナーゼ遺伝子も発見されている [66]。他にもいくつかのフコイダナーゼが同定されているが、まだ GH ファミリーに登録されていないものもある [67]。これまでに報告されているフコイダン低分子化酵素の諸性質を表 1-4 に示す。

表 1-4. フコイダン低分子化酵素の諸性質

Source	Mode of action	T-optimum °C	pH-optimum	pH-stability	pI	Inhibitors	Activators	Mr, kDa	References
<b>【Bacteria】</b>									
<i>Vibrio</i> sp. No. 5	exo	38-45	6.0	4.0-9.0	5.80	Hg <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Ag <sup>+</sup>	Co <sup>2+</sup> (2 mM)	39.5	Furukawa <i>et al.</i> (1992) [44]
<i>Pseudoalteromonas citrea</i> KMM3296, KMM3298	endo	n.d.	6.5-7.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Bakunina <i>et al.</i> (2002) [45]
<i>Fucobacter marina</i> SN-0082	endo	40	7.5	n.d.	n.d.	Ag <sup>+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	0.4 M NaCl	67	Sakai <i>et al.</i> (2003) [68]
<i>Alteromonas</i> sp. SN-1009	endo	30-35	6.5-8.0	n.d.	n.d.	Zn <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	0.4 M NaCl, Ca <sup>2+</sup>	100	Sakai <i>et al.</i> (2004) [39]
<i>Mariniflexile fucanivorans</i> SW5 <sup>T</sup>	endo	20-25	7.5	n.d.	n.d.	n.d.	Ca <sup>2+</sup>	105	Colin <i>et al.</i> (2006) [65]
<i>Formosa algae</i> KM3553 <sup>T</sup>	endo	n.d.	6.5-9.0	n.d.	n.d.	Zn <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Ba <sup>2+</sup>	96	Silchenko <i>et al.</i> (2013) [50]
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> PF-1	endo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Kim <i>et al.</i> (2015) [69]
<i>Luteolibacter algae</i> H18	endo	40	7.3	5.5-8.5	n.d.	Co <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	Ba <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Al <sup>3+</sup>	100	Nagao <i>et al.</i> (2018) [67]
<i>Wenyngzhuangia fucanilytica</i> CZ1127	endo	40	8.0	7.0-9.0	n.d.	Cu <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup>	n.d.	48	Shen <i>et al.</i> (2020) [66]
<i>Wenyngzhuangia fucanilytica</i> CZ1127	endo	24-35	6.4-7.2	6.0-7.5	4.56	Al <sup>3+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	89	Zueva <i>et al.</i> (2020) [70]
		24-40	6.0-6.8	6.0-7.8	4.86	Fe <sup>3+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Sn <sup>2+</sup>	Ba <sup>2+</sup>		
<i>Formosa haliotis</i> MA1	endo	37-40	8.0	5.0-9.0	n.d.	n.d.	Ca <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup>	71	Vuillemin <i>et al.</i> (2020) [71]
<i>Muricauda eckloniae</i> DOKDO 007 <sup>T</sup>	endo	30-37	7.0-8.0	6.0-8.0	n.d.	divalent cations	Ca <sup>2+</sup>	105	Tran <i>et al.</i> (2022) [72]
<b>【Invertebrates】</b>									
<i>Haliotis</i> sp.	endo	38	5.4	2.0-10.0	n.d.	Hg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup> (0.001 M)	Mg <sup>2+</sup> (0.01 M)	100-200	Thanassi <i>et al.</i> (1967) [52]
<i>Pecten maximus</i>	endo	n.d.	5.5	n.d.	7.4	n.d.	n.d.	85	Berteau <i>et al.</i> (2002) [54]
<i>Littorina kurila</i>	endo	n.d.	5.4	n.d.	n.d.	n.d.	0.2 M NaCl	n.d.	Bilan <i>et al.</i> (2005) [55]
<i>Lambis</i> sp.	endo	45	5.0	n.d.	n.d.	Hg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	n.d.	50	Silchenko <i>et al.</i> (2014) [56]
<b>【Fungi】</b>									
<i>Dendryphiella arenaria</i> TM94	endo	50	6.0	5.0-7.0	4.4	n.d.	n.d.	180	Wu <i>et al.</i> (2011) [57]
<i>Fusarium</i> sp. LD8	endo	60	6.0	6.0	4.5	n.d.	n.d.	64	Wu <i>et al.</i> (2011) [58]



先述したように、フコイダンは抗ガン作用等の様々な生理活性を有し、健康食品や医薬品としての応用が期待されている。しかし、フコイダンの構造は、硫酸基やアセチル基の量的、位置的な差に加えて、骨格構造、側鎖構造、構成糖の種類が異なるため、全く別種の分子が何種類も存在しており、多様性かつ不規則であることなどの理由から、生理活性と構造の相関性の解明は進んでいない。多様構造であるフコイダンに対して作用する酵素については、前述の表 1-4 に示すように、フコイダンを内側から切断する低分子化酵素に関する報告例はあるものの、側鎖を切断する脱アセチル化および脱硫酸化に関与する酵素に関する報告例は数報にとどまり [73-76]、未だ明らかになっていない酵素も存在していると考えられる。従って、フコイダン分解に関与する酵素を著量生産し、酵素が持つ基質特異性を利用することで、硫酸基を持つ種々のオリゴ糖、硫酸基を持たない種々のオリゴ糖など規則的な分解産物を調製することが可能となり、そのフコイダン分解産物の構造を決定することによって、高分子量フコイダンの構造決定が可能となる。さらには、フコイダン分解産物の生理活性を評価することにより、フコイダン構造と生理活性との相関性を明らかにすることが可能であると考えられる。

著者らのグループではオキナワモズク (*C. okamuranus*) 由来フコイダンの構造活性相関を、酵素を用いて解明することにより、機能性食品や高付加価値物質の開発を目指している。既に、海藻を分離源としてオキナワモズクフコイダン分解菌 *L. algae* H18 を単離しており、H18 株からオキナワモズクフコイダンのアセチル基を遊離する脱アセチル化酵素(以下、フコイダンデアセチラーゼ) 遺伝子 および、フコイダン分子のグリコシド結合を内側から切断する *endo* 型低分子化酵素(以下、フコイダナーゼ) 遺伝子の特定を行っている [67, 73]。その過程で、H18 株はフコイダン分解酵素を細胞内に有しており、フコイダンを脱アセチル化反応の後に低分子化反応が起こることを示している。

## 1-5. 本論文の目的および構成

本論文では、既に見出している *L. algae* H18 に加え、新たにオキナワモズクフコイダン分解菌として単離した *Flavobacterium* sp. SW からフコイダン分解酵素遺伝子および酵素を明らかにすることを目的とした。2種の菌株からフコイダン分解酵素遺伝子を明らかにすることは、酵素の比較及び特性解明につながり、異なる酵素により異なるフコイダン分解産物を取得することができれば、フコイダン構造の解明や生理活性評価の比較につながると考えた。そのため、H18 株および SW 株のゲノム情報をもとにした酵素遺伝子の探索、遺伝子発現、酵素タンパク質の特性解明を本論文の基本構成とした。初めに、今回単離した SW 株由来フコイダナーゼ遺伝子を探索するために、H18 由来フコイダナーゼ遺伝子情報をもとに相同性の高い遺伝子を選択し、酵素遺伝子のクローニングおよび大腸菌での酵素タンパク質の生産、そしてそれら酵素の諸性質を明らかにした。またこれまでの知見では、一つの菌株が複数のフコイダン分解酵素を有する可能性は示されていたものの [77]、それを実証した報告例はなかった。そこで、H18, SW 株ともに GH107 および GH168 に属しているフコイダナーゼ遺伝子の情報をもとに相同性の高い遺伝子を選択し、大腸菌による異種発現及び酵素の諸性質を明らかにした。

本学位論文は7章により構成される。

第1章「序論」では、本研究の背景として海藻、フコイダン、フコイダン資化性微生物、そしてフコイダン分解に関与する酵素について述べ、また本論文の目的および構成について述べた。

第2章「新たに単離された *Flavobacterium* sp. SW 株と *Luteolibacter algae* H18 株との生育特性と酵素生産の比較」では、オキナワモズク分解微生物として新たに SW 株を分離し、H18 株、SW 株を種々のフコイダンや海洋性多糖を炭素源とした場合の生育を比較し、それぞれの菌体が有する酵素の多糖類に対する活性を比較することにより、両菌株の多糖分解

スペクトルの違いを検証した。

第 3 章 「*Flavobacterium* sp. SW 由来フコイダナーゼの遺伝子同定、異種発現、特性解明」では、H18 株由来フコイダナーゼ遺伝子をもとに、SW 株のゲノム情報より相同性の高い遺伝子をフコイダナーゼ遺伝子として選択し、大腸菌による異種発現、活性確認および酵素の諸性質検討を行った。

第 4 章 「*Flavobacterium* sp. SW 由来第 2 のフコイダナーゼの特性解明」では、GH107 および GH168 に属するフコイダナーゼ遺伝子情報をもとに、SW 株のゲノム情報より相同性の高い遺伝子をフコイダナーゼ遺伝子として選択し、大腸菌による異種発現、活性確認および酵素の諸性質検討を行った。

第 5 章 「*Luteolibacter algae* H18 由来第 2 のフコイダナーゼの特性解明」では、GH107 および GH168 に属するフコイダナーゼ遺伝子情報をもとに、H18 株のゲノム情報より相同性の高い遺伝子をフコイダナーゼ遺伝子として選択し、大腸菌による異種発現、活性確認および酵素の諸性質検討を行った。

第 6 章 「*Luteolibacter algae* H18 由来フコイダンスルファターゼの精製、遺伝子同定、異種発現、特性解明」では、オキナワモズクフコイダンの脱硫酸化反応を触媒するフコイダンスルファターゼを種々のクロマトグラフィーにより精製し、H18 株のゲノム情報から本酵素遺伝子を探索、同定したあと、その酵素遺伝子のクローニングおよび大腸菌での酵素タンパク質の生産、酵素の諸性質検討を行った。

第 7 章 「総括」では、微生物によるフコイダン分解に関わる本研究のまとめを論じた。

## 第2章 新たに単離された *Flavobacterium* sp. SW 株 と *Luteolibacter algae* H18 株との生育特性と酵素生産 の比較

### 2-1. 緒言

当グループでは、オキナワモズクフコイダン分解菌、*L. algae* H18 を単離し、この菌株が有するオキナワモズクフコイダンの分解に関与する酵素およびその遺伝子に関する研究を行ってきた [67,73]。その一方で、H18 株以外にも、オキナワモズクフコイダンを分解できる微生物が報告されている [38]。この菌株はオキナワモズクだけにとどまらず、様々な褐藻由来のフコイダンを培養に伴って分解できることが示されている。このことは、様々な構造を有するフコイダンを分解できる微生物は複数種存在することを示唆している。そこで本研究では、H18 株以外に新たにオキナワモズクフコイダン分解菌の探索を行った。前章でも述べたが、異なる菌株から異なるフコイダン分解酵素遺伝子を明らかにできれば、酵素の特性に関して幅広い知見をもたらし、フコイダンの構造解明さらには生理活性評価につながると期待される。

本章では、オキナワモズクフコイダンを単一炭素源とする完全合成培地に生育可能な微生物菌株をスクリーニングし、得られた菌株と H18 株の培養特性、すなわち、様々なフコイダンおよび海洋多糖を炭素源とした生育について比較検討した。さらに、両菌株の無細胞抽出液を用いて酵素反応を行い、各種フコイダン、海洋多糖に対する分解活性についても比較し、2つの菌株が生産する酵素の反応特性を明らかにした。

## 2-2. 材料および実験方法

### 2-2-1. 材料および試薬

高分子オキナワモズクフコイダン (SEA ALGA-F, 株式会社海産物のきむらや, 境港市, 日本) は、川本らの研究により確立された方法 [78] により、株式会社海産物のきむらやがオキナワモズクから抽出および精製したものを使用した。アカモクフコイダンも株式会社海産物のきむらやから供与されたものを用いた。その他、本研究で用いた試薬はいずれも市販品であり、以降の本論文で述べる全ての材料も同様である。

### 2-2-2. オキナワモズクフコイダン分解菌のスクリーニング、菌株同定、培養条件

オキナワモズクフコイダン分解菌のスクリーニングには、オキナワモズクフコイダンを単一炭素源として 0.5% 含む完全合成培地 (表 2-1, 2-2, 2-3) を用い、30°C で振盪しながら集積培養を行い、平板培地上でシングルコロニーになるまで純化を繰り返した。土壌等の一般的に用いられる分離源も使用したが、フコイダンが海洋生物由来であることから海洋由来の分離源として、海藻そのもの、さらには 20 L の海水をポアサイズ 0.2  $\mu\text{m}$  でろ過した後のフィルターも分離源として用いた。SW 株と名付けた得られた菌株のゲノム DNA は Promega DNA Purification Kit を用いて調製し、全ゲノム配列解析は外注し、DNA 配列情報を得た。得られた菌株の 16S rRNA をコードする DNA 配列は、ユニバーサルプライマーを用いて目的 DNA を PCR 増幅後、得られた DNA 断片の配列を決定した。

表 2-1. フコイダン分解菌単離用培地組成

Fucoidan	5	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5	g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2	g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.41	g
Metal sol.	10	mL
Vitamin mix.	1	mL
Total	1	L

表 2-2. Metal solution 組成

NaCl	1	g
CaCl <sub>2</sub>	2	g
FeSO <sub>4</sub>	0.5	g
ZnSO <sub>4</sub>	0.5	g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.5	g
CuSO <sub>4</sub>	0.05	g
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1	g
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.05	g
Total	1	L

表 2-3. Vitamin mixture 組成

Biotin	100	mg
Thiamin-HCl (pH 8.0)	100	mg
Riboflavin	100	mg
Ca-Pantothenate	100	mg
Pyridoxal phosphate	100	mg
Nicotinamide	100	mg
Folic acid	100	mg
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	20	mg
Vitamin B12	10	mg
Lipoic acid	10	mg
Total	1	L

### 2-2-3. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

下記に示すポンプと検出器を用いて HPLC を行った。

Pump : LC-10 AS LIQUID CHROMATOGRAPH (SHIMADZU Co.)

Detector : RID-10A (SHIMADZU Co.)

カラムおよび移動相は、以下に示すとおりである。流速は 0.6 mL/min、インジェクション量は 10  $\mu$ L で HPLC を行った。

Guard Column : TSK guardcolumn PWXL (TOSOH),  $\Phi$ 6.0 $\times$ 40 mm

Column : TSK-gel GMPW<sub>XL</sub> (TOSOH)  $\Phi$ 7.8 $\times$ 300 mm, TSK-gel G3000PW<sub>XL</sub> (TOSOH)  $\Phi$ 7.8 $\times$ 300 mm (なお、特に断らない限り酵素反応による分解産物の分析は TSK-gel GMPW<sub>XL</sub> を用いた)

Mobil phase : 0.1 M NaNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O

カラムオーブン (SHIMADZU Co. CT0-10Avp) 設定は ET TEMPERATURE : 40°Cで行った。

検出器の設定は MODE : Analytical mode, AUX RANGE : 2で行った。

記録計 CDS Lite (Dell Inspiron 15 3000 シリーズ エントリー Office 付) の設定は、スロープ感度 300  $\mu$ V/mir, 最小面積 50000  $\mu$ V $\times$ sec, ドリフト 0  $\mu$ V/mirで行った。

TSK-gel GMPW<sub>XL</sub> カラムを用いる場合は、Pullulan (各分子量は 5,000, 10,000, 20,000, 50,000, 100,000, 200,000, 400,000, 800,000) を分子量マーカーとして、図 2-1 に示すような分子量検量線を作製した。TSK-gel G3000PW<sub>XL</sub> カラムを用いる場合は、Polyethylene Glycol (PEG) (各分子量は 1,000, 1,500, 2,000, 4,000, 6,000, 8,150) を分子量マーカーとして、図 2-2 に示すような分子量検量線を使用した。

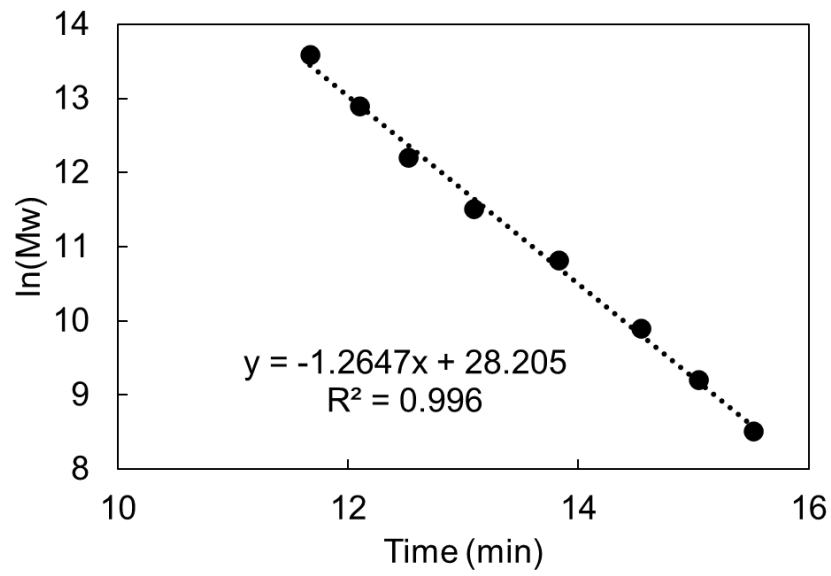


図 2-1. TSK-gel GMPW<sub>XL</sub> を用いた際の HPLC 検量線

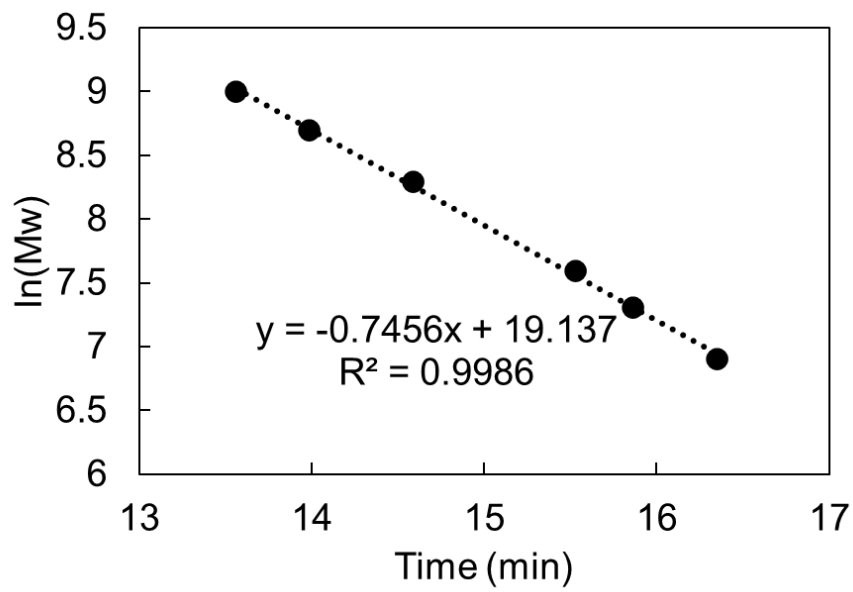


図 2-2. TSK-gel G3000PW<sub>XL</sub> を用いた際の HPLC 検量線



#### 2-2-4. *L. algae* H18、*Flavobacterium* sp. SW の様々な炭素源資化

H18 株および SW 株を 2-2-2 に示す培地組成でオキナワモズクフコイダンを単一炭素源とした完全合成培地で 30°C, 3 日間前培養を行ったあと、8 種類の起源の異なるフコイダンあるいは海洋性多糖を単一炭素源として 0.5% 添加した完全合成培地に植菌後、30°C で 3 日間振とう培養した。培養液の OD<sub>660</sub> を測定し、遠心分離 (KUBOTA 3780, AF-5004Ch rotor, 8,000 rpm, 4°C, 15 min) を行い、培養上清を 2-2-3 の方法に従ってゲルろ過 HPLC により分析した。

#### 2-2-5. *L. algae* H18、*Flavobacterium* sp. SW の無細胞抽出液による様々な基質分解確認

H18 株および SW 株をオキナワモズクフコイダンを単一炭素源とした完全合成培地で 30°C, 3 日間前培養を行ったあと、オキナワモズクフコイダン以外に、SW 株に関しては 2-2-4 で生育が確認できたガゴメコンブフコイダン、ラミナラン、アルギン酸および LB 培地で 30°C, 3 日間 (LB 培地の場合は 1 日間) 培養した。培養液の遠心分離 (12,000 rpm, 4°C, 15 min) を行い、得られた菌体を 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で懸濁、超音波破砕 (Sonifier 450, Branson Instruments, Danbury, CT, USA) (Output 1, Duty Cycle 10, 1 min×3) および遠心分離 (12,000 rpm, 4°C, 15 min) を行い、上清を無細胞抽出液 (以下、C.F.E.) とした。10 種類の起源の異なるフコイダンあるいは海洋性多糖を基質として 2% となるように添加し、得られた C.F.E. および 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を含む全量 100 μL の反応液を調製し、30°C で一晚酵素反応を行い、基質分解を 2-2-3 の方法に従ってゲルろ過 HPLC により分析した。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. 新たに得られたオキナワモズクフコイダン資化性菌の同定

オキナワモズクを分離源とした際に目的菌株が得られ、SW 株と名付けた菌株は、16S rRNA 解析の結果、*Flavobacterium* sp. と同定された。なお、*Flavobacterium* 属は *Bacteroides* 門に属しており、*Verrucomicrobia* 門に属している *L. algae* とは系統的にかなり離れた菌株であると考えられる。

### 2-3-2. *L. algae* H18、*Flavobacterium* sp. SW の様々な炭素源資化

7 種類の異なるフコイダンや海洋性多糖を単一炭素源とした培地で 3 日間培養した後の生育は、図 2-3 のようになった。H18 株、SW 株ともにオキナワモズクフコイダン培地中では良好に生育した一方、SW 株は、オキナワモズクフコイダンだけでなく、アカモクフコイダン、ラミナラン、アルギン酸を炭素源とした培地中でも良く生育した。培養上清を HPLC 分析したところ図 2-4 のような結果となり、SW 株の生育が認められたアカモクフコイダン、ラミナラン、アルギン酸を炭素源にした場合は生育に伴い多糖類の分解資化が認められた。

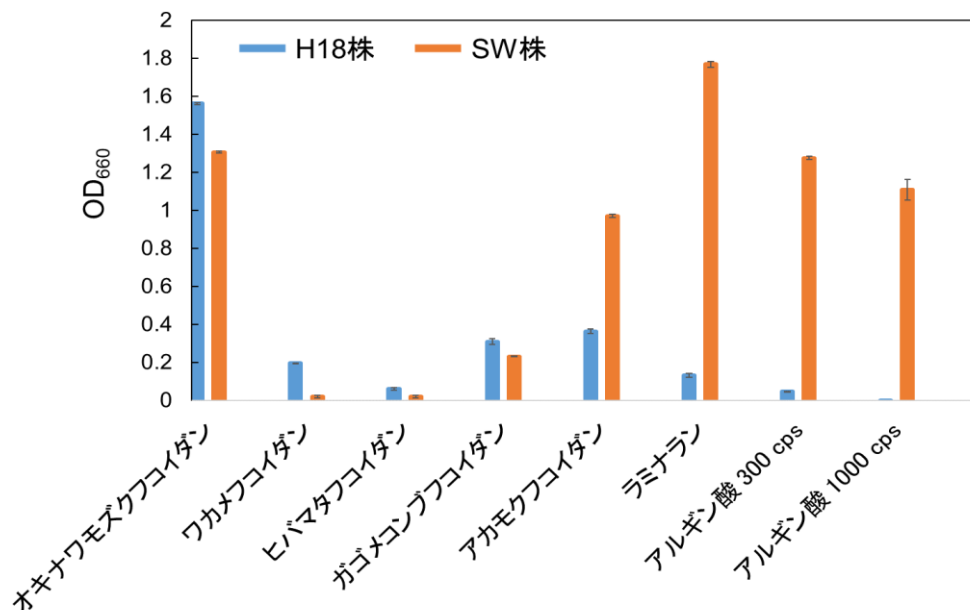
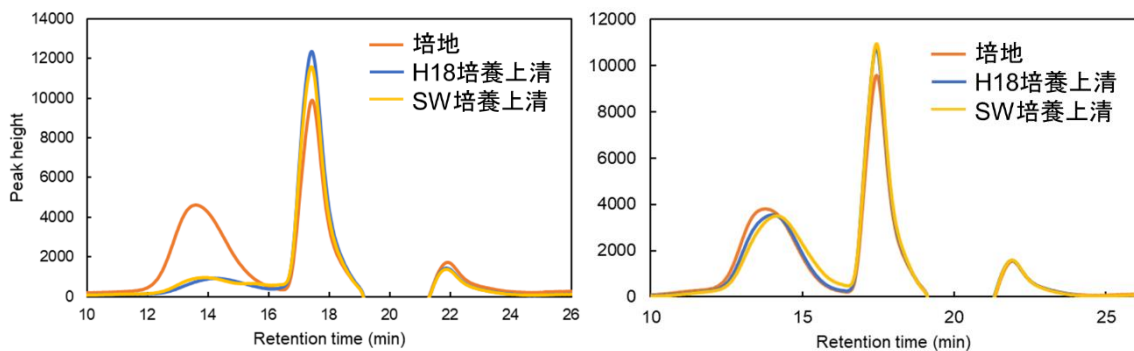
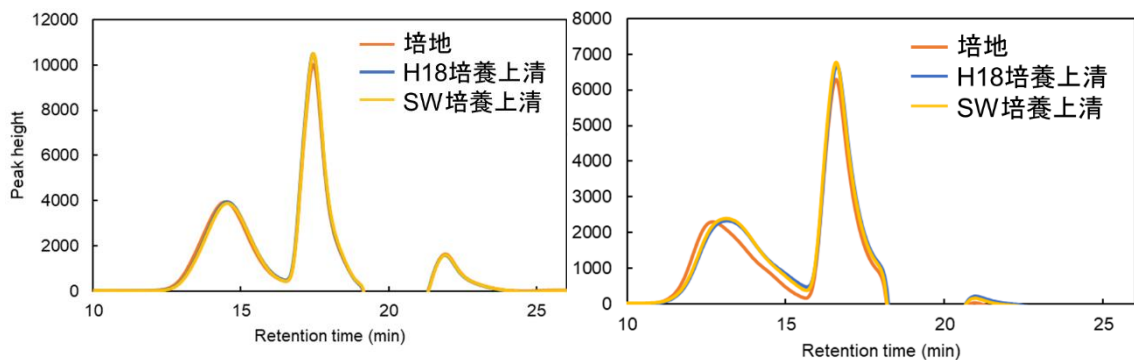


図 2-3. 各フコイダンおよび海洋性多糖を炭素源として培養した際の H18 株、SW 株の生育



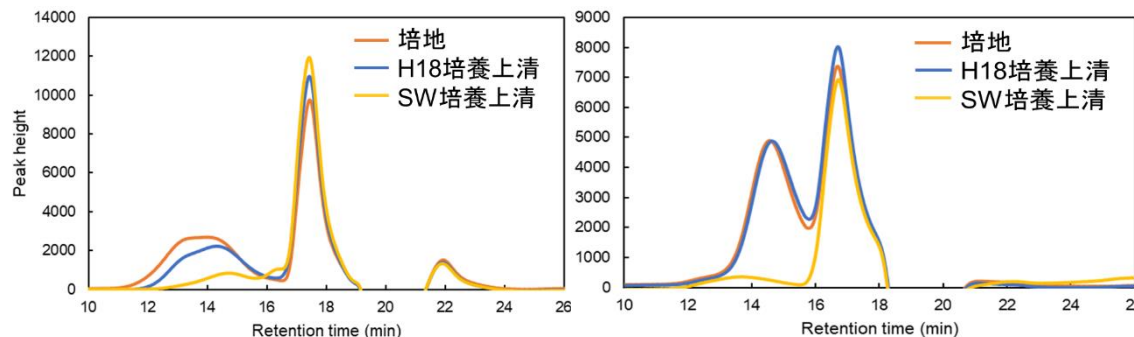
オキナワモズクフコイダン

ワカメフコイダン



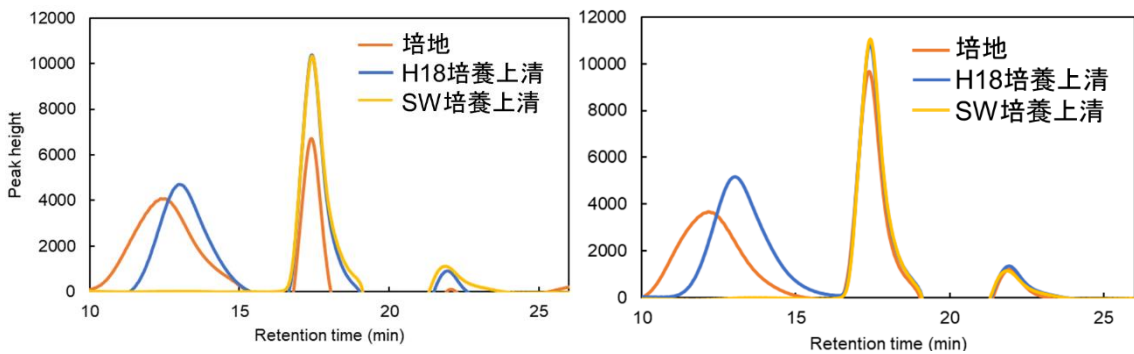
ヒバマタフコイダン

ガゴメコンブフコイダン



アカモクフコイダン

ラミナラン



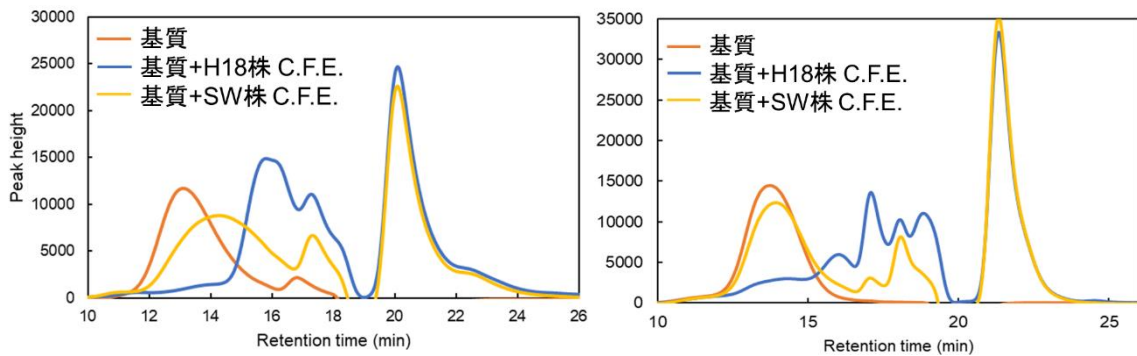
アルギン酸 300 cps

アルギン酸 1000 cps

図 2-4. H18 株, SW 株を各基質を炭素源として生育させた培養上清の HPLC による分析

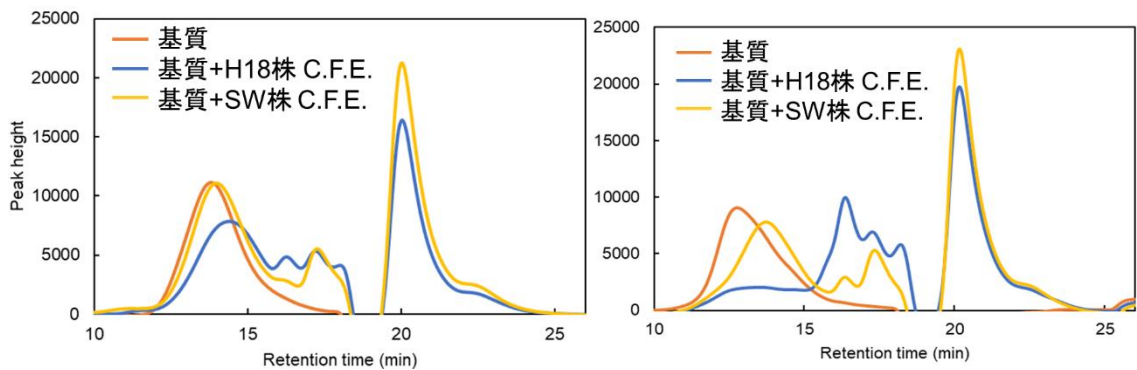
### 2-3-3. *L. alga* H18、*Flavobacterium* sp. SW の無細胞抽出液による様々な基質分解

オキナワモズクフコイダンを単一炭素源とする完全合成培地で生育させた H18 株, SW 株の C.F.E.を用いて、様々なフコイダンや海洋性多糖を基質として酵素反応を行い、HPLC 分析により評価したところ、H18 株, SW 株いずれも様々な基質を分解でき、フコイダンに対する分解度は H18 株の方が高かった (図 2-5)。一方、SW 株はフコイダンだけでなくラミナラン、アルギン酸も分解でき、特にアルギン酸に対する分解活性は高かった。



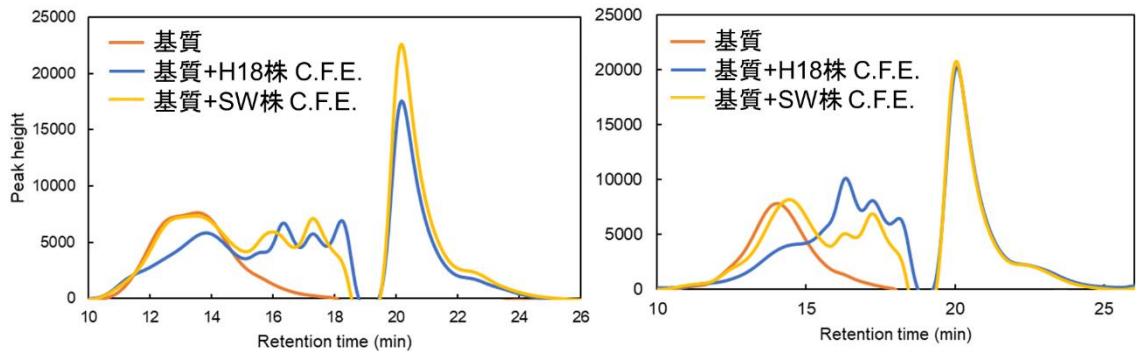
オキナワモズクフコイダン

ワカメフコイダン



ヒバマタフコイダン

ガゴメコンブフコイダン



アカモクフコイダン

オオウキモフコイダン

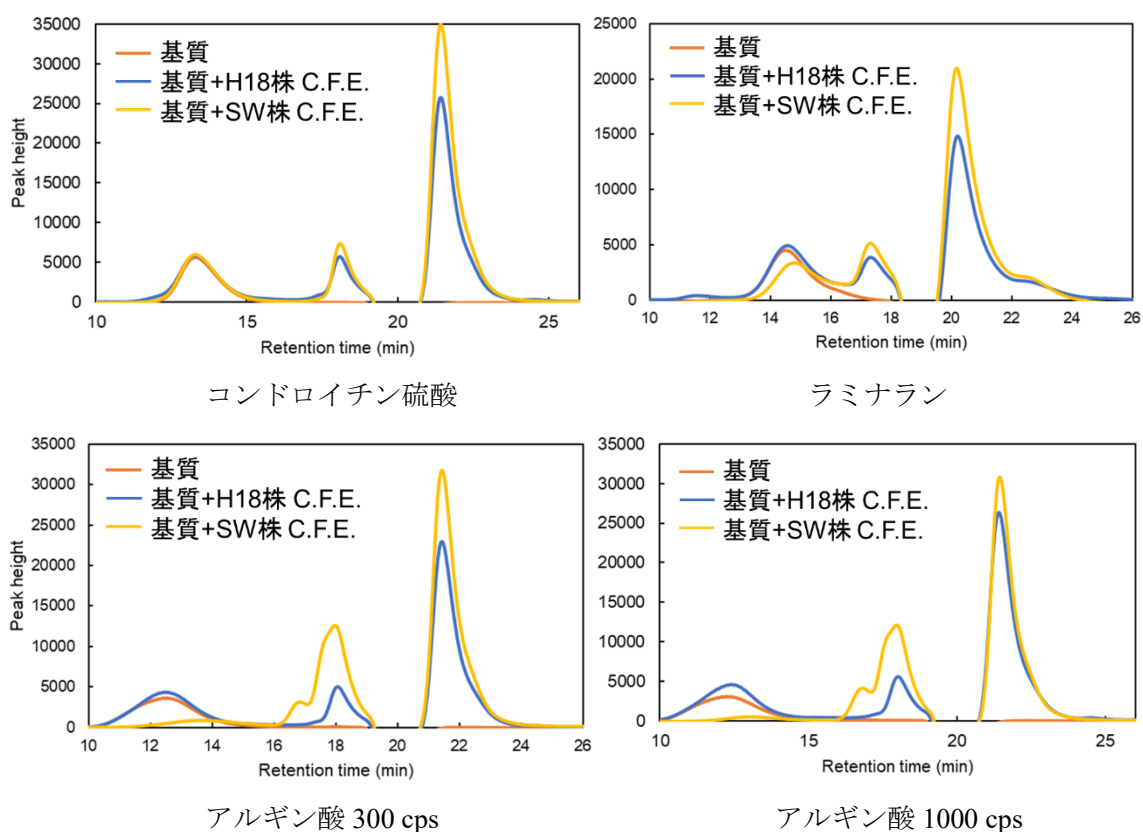


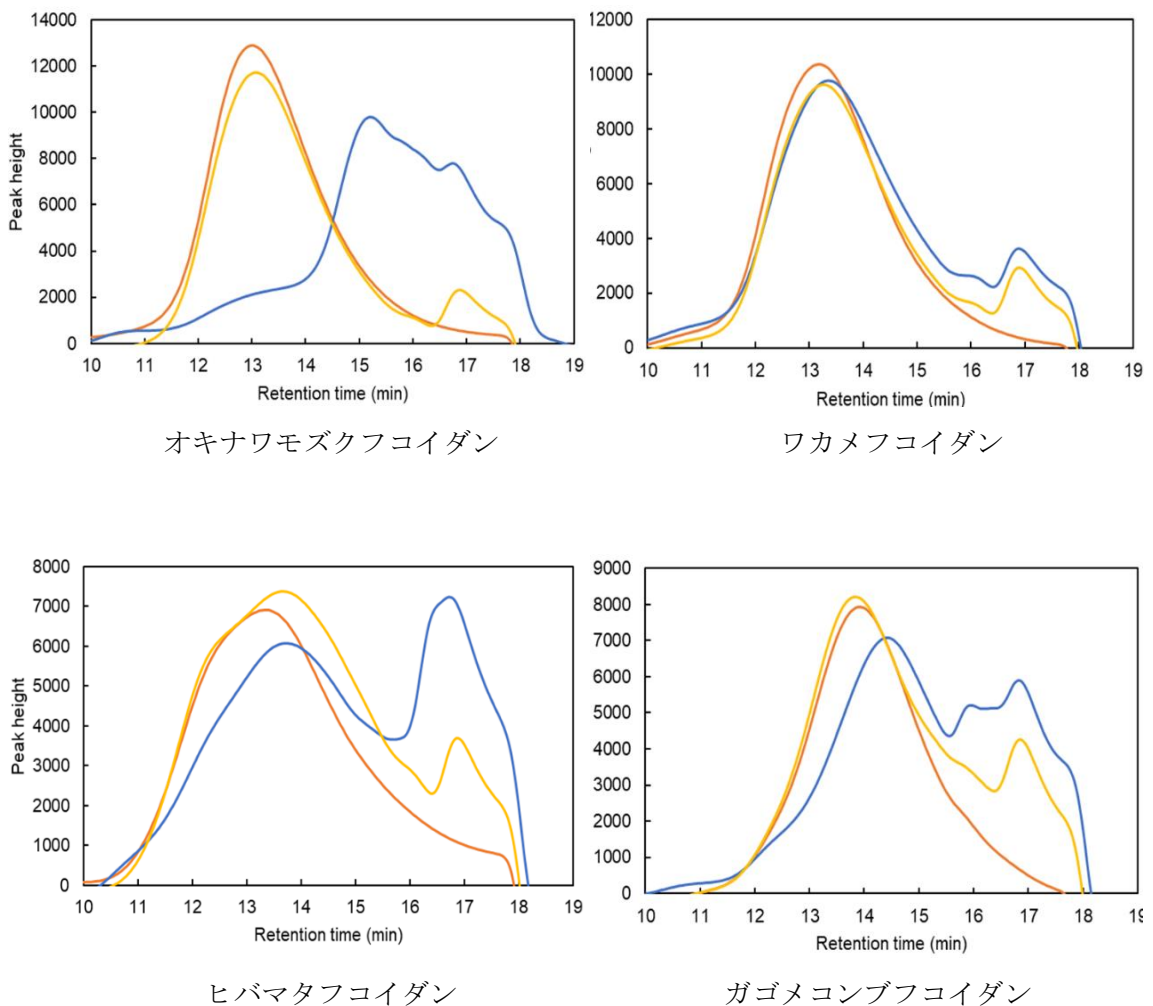
図 2-5. オキナワモズクフコイダンを炭素源として得られた H18 株および SW 株 C.F.E.を用い、各フコイダンまたは海洋性多糖を基質とした酵素反応液の HPLC 分析

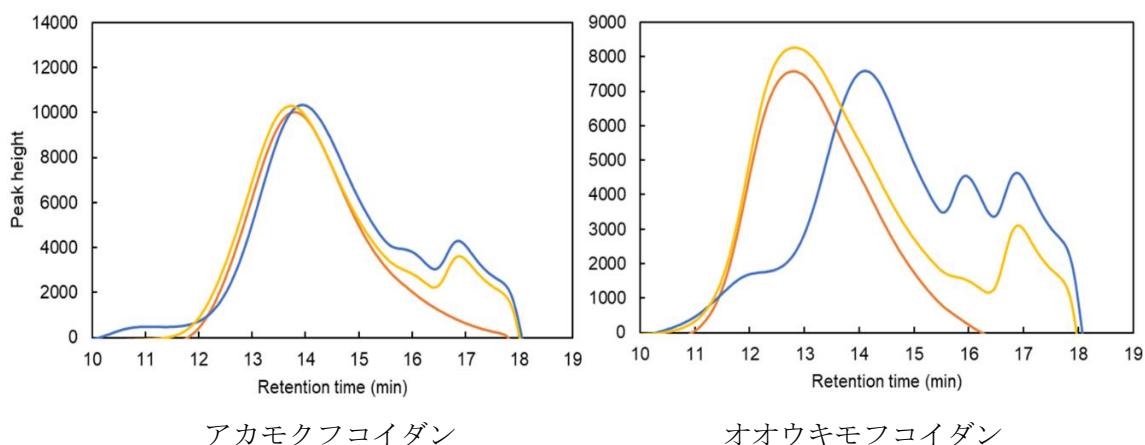
#### 2-3-4. ガゴメコンブフコイダンを炭素源として得られた *Flavobacterium* sp. SW の無細胞抽出液による様々な基質分解

今回新たに見出された SW 株は、2-3-3 の結果において C.F.E.がオキナワモズクフコイダン以外にガゴメコンブフコイダンに対する低分子活性を有していることが示された。また後の 4 章には、SW 株にガゴメフコイダン分解に関与する遺伝子が見出されたことを述べる。そこで、SW 株をガゴメコンブフコイダンを単一炭素源として培養し、得られた C.F.E.を用いて酵素反応を行い、オキナワモズクフコイダンを炭素源とした場合と比較した。図 2-3 に示すように、オキナワモズクフコイダンを炭素源とする場合に比べて、ガゴメコンブフコイダンを炭素源にした生育はかなり低かった。これは、SW 株の単離源がオキナワモズクフコ

イダンであるため、オキナワモズクフコイダンを資化する代謝経路が優位であるためと類推された。

ガゴメコンブフコイダンあるいはオキナワモズクフコイダンを単一炭素源として得られた C.F.E.を用いて、6 種類の起源の異なるフコイダンを基質として酵素反応を行った結果、オキナワモズクフコイダンを炭素源として得られた C.F.E.ではオキナワモズク、ヒバマタ、ガゴメコンブ、オオウキモ由来のフコイダンを分解できたが、ガゴメコンブフコイダンを炭素源として得られた C.F.E.ではどの基質に対しても分解活性が低いことが分かった (図 2-6)。





青：オキナワモズクフコイダンを単一炭素源として得られた SW 株 C.F.E. + 各基質

黄：ガゴメコンブフコイダン培地を単一炭素源として得られた SW 株 C.F.E. + 各基質

橙：各基質のみ

図 2-6. オキナワモズクフコイダンまたはガゴメコンブフコイダンを炭素源として得られた SW 株 C.F.E.を用いた酵素反応液の HPLC 分析

### 2-3-5. LB 培地で培養して得られた *Flavobacterium* sp. SW の無細胞抽出液によるオキナワモズクおよびガゴメコンブの分解

LB 培地で培養した SW 株の C.F.E.は、ガゴメコンブフコイダン、オキナワモズクフコイダンともに分解しないことが分かった (図 2-7)。

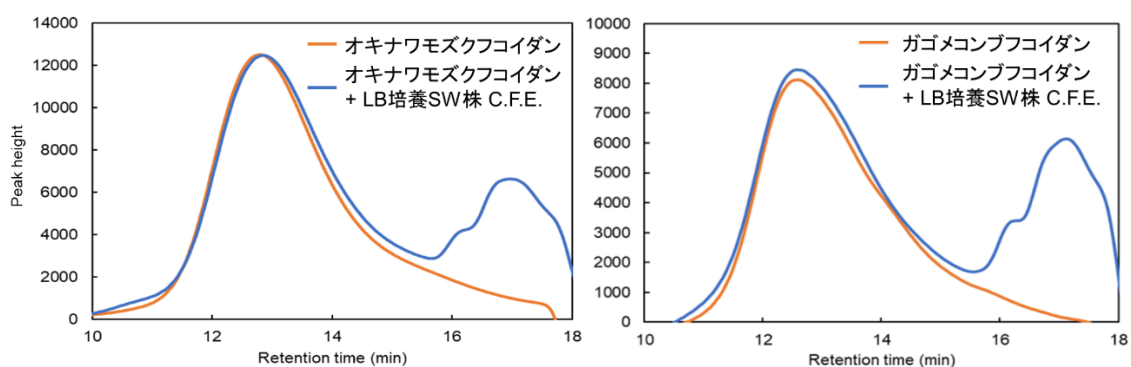


図 2-7. LB 培地で培養した SW 株 C.F.E.を用いた酵素反応液の HPLC 分析



## 2-3-6. ラミナラン、アルギン酸を炭素源として得られた *Flavobacterium sp.* SW の無細胞抽出液による様々な基質分解

2-3-3の結果より、SW株はラミナランまたはアルギン酸 300 cps, 1000 cps を炭素源として生育できることが分かったため、ラミナラン、アルギン酸 1000 cps を単一炭素源とする培地で培養した際の SW 株の C.F.E.を用いた酵素反応を行った。

ラミナラン、アルギン酸を単一炭素源として得られた C.F.E.(ラミナラン培地 C.F.E.、アルギン酸培地 C.F.E.と称す)を用いてラミナラン、アルギン酸、オキナワモズクフコイダンを基質として酵素反応を行い、HPLC 分析した結果、ラミナラン培地 C.F.E.はラミナラン、アルギン酸、オキナワモズクフコイダンを分解できたが(図 2-8)、アルギン酸 C.F.E. はアルギン酸を顕著に分解でき、ラミラナンもある程度分解できるが、オキナワモズクフコイダンは分解できないことが分かった(図 2-9)。

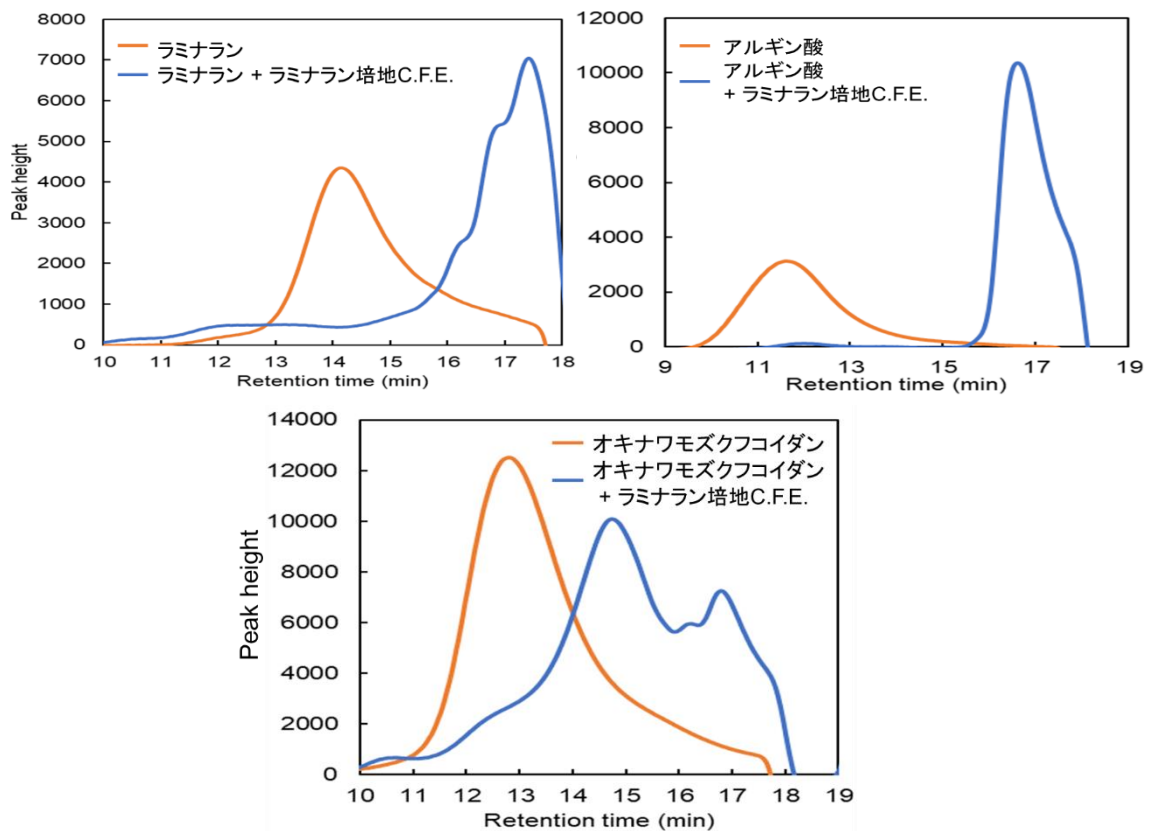


図 2-8. ラミナラン培地 C.F.E.を用いた酵素反応液の HPLC 分析



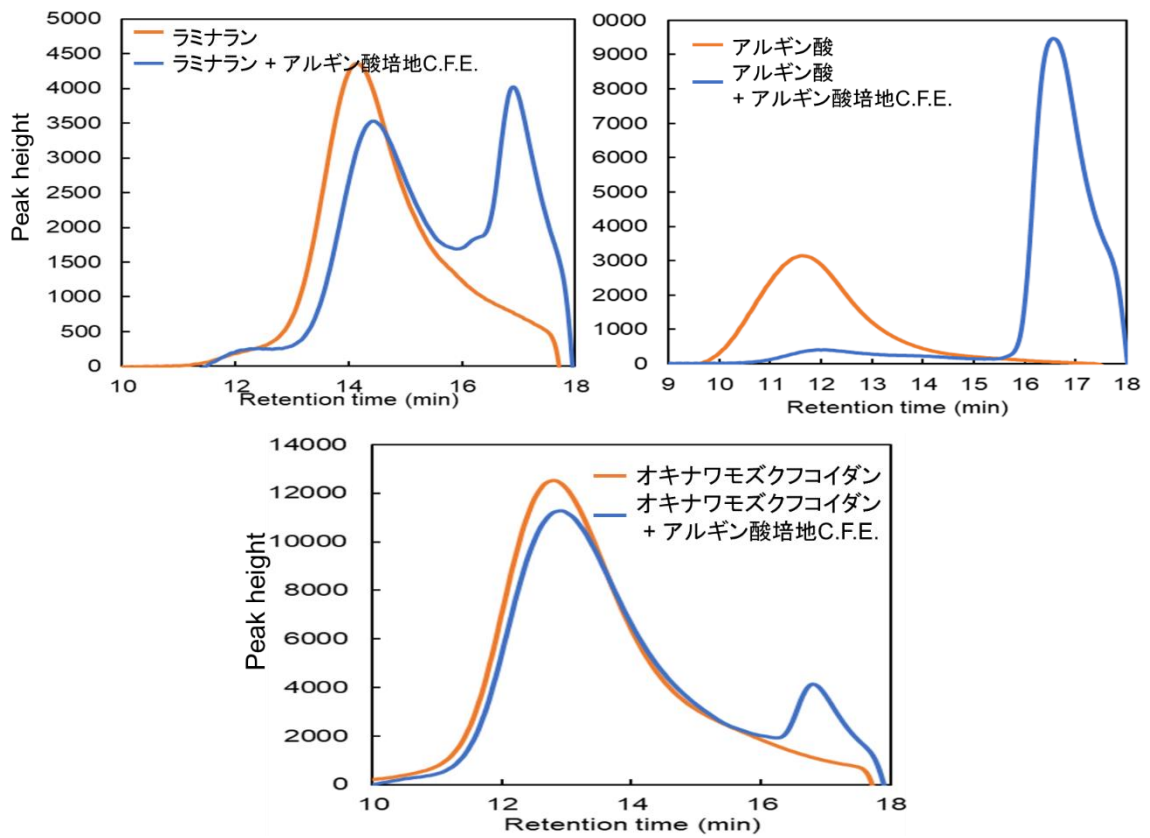


図 2-9. アルギン酸培地 C.F.E.を用いた酵素反応液の HPLC 分析

## 2-4. 考察

今回新たにオキナワモズクフコイダン資化性微生物として単離した *Flavobacterium* sp. SW 株は、すでに、同じくオキナワモズクフコイダン資化性微生物として単離されていた *L. algae* H18 株と比較すると、培養特性ならびに粗酵素によるフコイダンをはじめとする海洋多糖に対する分解様式が、両者の間で大きく異なることが明らかになった。培養特性に関しては、SW 株は分離源であるフコイダン以外に海藻に含まれている多糖、ラミナラン、アルギン酸も炭素源として利用可能であり、H18 株よりも資化できる炭素源のレパートリーが豊富であることが分かった (図 2-3)。このことは、同じフコイダン分解微生物のなかでも、海藻のほかの成分を幅広く利用できる菌株と、培養基質が限定される菌株が存在することを意味する。その一方、粗酵素による分解様式については、オキナワモズクフコイダンを炭素源として培養した場合、両菌株の生育はほぼ同じであるにもかかわらず (図 2-3)、得られた粗酵素は、H18 株の方が SW 株に比べて明らかに分解活性が強く (図 2-5)、低分子化された酵素反応産物が多く見られた。ただ、すでに報告されている H18 株由来オキナワモズクフコイダン低分子化酵素 Fct114 はオキナワモズクフコイダン以外のフコイダンに対してほとんど分解活性を示さない [67] ことから、オキナワモズクフコイダンによって異なるフコイダンに対する低分子化酵素遺伝子が強く発現されていると判断でき、この発現機構については興味を持たれる。なお、図 2-5 の酵素反応液を分析した HPLC チャートでは Retention time 20~22 分に大きなピークが見られ、図 2-4 の培養液上清を分析した HPLC チャートでは見られないが、これは酵素反応に添加した Tris-HCl 由来のピークであり、以降も、酵素反応液を分析した HPLC チャートには共通してみられる。また、培養液を分析した際、生育が認められた場合に添加した多糖のピークはほぼ消失しているのに対し、酵素反応の場合は、Retention time 15~20 分に分解産物と思われるピークが認められる。これは培養液の場合は分解産物が菌の生育に使われるため検出できなくなるのに対し、酵素反応の場合、ある程度

分解された化合物をさらに代謝する酵素反応にエネルギーが必要であることが推察され、その結果、ある分子量サイズの分解産物が酵素反応液中に残存するものと考えられた。

炭素源としてガゴメコンブフコイダンを用いて得られた SW 株の C.FE をガゴメコンブフコイダンに作用させたところ、図 2-6 に示すように、フコイダンの分解は見られず、後に述べるガゴメコンブフコイダン低分子化酵素 Swfun2 による低分子化パターンとは大きく異なっていた。このことから、SW 株はガゴメコンブフコイダンを分解・資化する代謝酵素遺伝子を有してはいるが、それはガゴメコンブフコイダンによって発現されていないと類推される。その一方、オキナワモズクフコイダンの分解代謝遺伝子は SW 株においてもオキナワモズクフコイダンにより発現され、H18 株ほどではないものの、明らかな酵素活性を発揮していると思われる。先にも述べたが、今後、それぞれの分解酵素遺伝子の発現メカニズムの解明が必要であると考えている。

## 第3章 *Flavobacterium* sp. SW 由来フコイダナーゼの遺伝子同定、異種発現、特性解明

### 3-1. 緒言

褐藻類におけるフコイダンの構造は、分離源となる種類に依存する [79]。中でもオキナワモズク由来フコイダンについては、他のフコイダンには見られないアセチル基が含まれていることが特徴である [28, 80, 81]。当グループでは *L. algae* H18 から、オキナワモズクフコイダンのアセチル基を脱離するデアセチラーゼ Fud664 [73] および、オキナワモズクフコイダンを *endo* 型に低分子化するフコイダナーゼ Fct114 [67] を見出し、詳細な解明を既に行っている。また、これら2つの酵素を見出す過程で、H18 株はフコイダン分解酵素を細胞内に有しており、フコイダンの脱アセチル化反応の後に低分子化反応が起こることが示されている [43]。このような2段階の酵素反応によってフコイダンが分解されるという知見の報告例はないが、他のオキナワモズク由来フコイダン資化性微生物においても同様の反応が起こる可能性が考えられる。そこで、2章に示した H18 株とは異なるオキナワモズクフコイダン資化性微生物、*Flavobacterium* sp. SW 株についてゲノム情報を明らかにし、SW 株が有するフコイダナーゼ遺伝子を見出すことで、H18 株による低分子化反応との比較、酵素の特性解明を行うことにした。このことにより、異なる分解酵素を用いることによって、異なるフコイダン分解産物を取得することが可能となると考えた。

本章では、SW 株のゲノム情報をもとに H18 株由来 *fct114* との相同性探索を行い、フコイダナーゼ遺伝子を特定し、本酵素のアミノ酸配列を決定した。さらに、クローニング、および大腸菌での酵素タンパク質の生産、酵素化学的性質の特徴決定を実施した。

## 3-2. 材料および実験方法

### 3-2-1. 酵素的脱アセチル化オキナワモズクフコイダンの調製

Nagao ら [73] の方法を参考に、酵素的に脱アセチル化したフコイダンを調製した。500 mL ビーカーに、0.25%オキナワモズクフコイダン、100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)、精製した脱アセチル化酵素 (Fud664) 0.05 mg/mL 含む全量 400 mL の反応液を調製し、30°C、1 日、酵素反応を行った。翌日、さらに Fud664 を 20.3 mg 添加し、30°C、1 日、酵素反応を行った。その後、50 mL コーニング管に移し、ウォーターバスで 80°C、10 min 熱処理を行った。熱処理後、遠心 (14,000 rpm, 30 min) し、500 mL ビーカーに上清を回収した。

得られた酵素反応液を、VIVA FLOW 50 (Sartorius, UK) を用いて約 40 mL まで濃縮し、1 L の蒸留水に対して透析した。透析後のサンプルを凍結乾燥し、これを脱アセチル化オキナワモズクフコイダンとした。1 g のオキナワモズクフコイダン粉末から 1 g の脱アセチル化オキナワモズクフコイダン粉末が得られた。

### 3-2-2. *Flavobacterium* sp. SW 由来フコイダナーゼ遺伝子の探索

ソフトウェア in silico MolecularCloning (In Silico Biology, Inc., Yokohama, Japan) を用いて、本研究で得られた SW 株のドラフトゲノム DNA 情報をもとに、*L. algae* H18 由来フコイダナーゼ遺伝子 *fct114* [67] の DNA 配列と相同性の高い遺伝子を探索し、目的の候補遺伝子を *swfct* と名付けた。

### 3-2-3. シグナル配列を削除したタンパク質をコードする *swfct* のプライマー設計および PCR 増幅

*Swfct* のシグナル配列を SignalP により検索し、推定のシグナル配列を排除したタンパク質をコードする *swfct* を pCold I ベクターに組み込むため、表 3-1 に示すように *EcoR* I, *Sal* I 認識配列を持たせてプライマーを設計した。

表 3-2 に示す組成で反応液を調製後、PrimeSTAR HS (TAKARA Bio.) を用いて PCR 増幅を行った。PCR 増幅の際の変性反応、伸長反応の温度および反応時間は、98 °C で 1 分間加熱後、30 サイクル (98 °C で 10 秒間、55 °C で 5 秒間、および 72 °C で 2 分 45 秒) で行った。得られた PCR 産物を QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) を用いて精製した。

表 3-1. *swfct* 増幅用のプライマー配列

Forward primer	TATCAGGAATTCATGCAAAAGAGTTTACCCCCT <i>EcoRI</i> 認識部位
Reverse primer	GCTCGGTCGACATTATCCAAAGGCATAGAAAAT <i>SalI</i> 認識部位

表 3-2. PCR 増幅の反応液組成

Strain SW DNA	5	μL
10 mM Forward primer	1	μL
10 mM Reverse primer	1	μL
PrimeSTAR HS	25	μL
Sterilized water	18	μL
Total	50	μL

#### 3-2-4. 制限酵素消化

インサート、発現用ベクターpCold I は表 3-3 に示す組成で反応液を調製後、37°Cで一晩制限酵素消化を行った。制限酵素消化後は、常法に従いアガロースゲル電気泳動と切り出しを行い、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (TAKARA Bio.) を用いて付属のプロトコールに従って目的 DNA を精製した。

表 3-3. 制限酵素消化における反応液組成

DNA fragment or Plasmid DNA	34	μL
<i>EcoR</i> I (TaKaRa Bio.)	1	μL
<i>Sal</i> I (TaKaRa Bio.)	1	μL
10 × H buffer	4	μL
Total	40	μL

#### 3-2-5. ライゲーション、形質転換、プラスミド単離

制限酵素消化後の遺伝子とベクターを DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (TaKaRa Bio.) を用いて、16°C, 30 min ライゲーションした。その後、得られたライゲーション溶液を用いて *E. coli* BL21 (DH5a)の形質転換を行い、遺伝子工学実験で汎用的に用いられる LB 培地にアンピシリン (Amp) を終濃度が 100 μg/mL になるように添加した LB + Amp 培地に植菌した。生じたコロニーをピックアップし、LB + Amp 培地で 37°C, 一晩培養後、Plasmid EasyPure kit (TaKaRa Bio.L) を用いて付属のプロトコールに従いプラスミド単離をし、*EcoR* I, *Sal* I で制限酵素消化を行い、アガロース電気泳動でインサートが正しく挿入されているか確認を行った。

#### 3-2-6. *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*swfct* による目的タンパク質の生産検討

インサートが正しく挿入されていた pCold I/*swfct* で、*E. coli* BL21 (DE3) を形質転換し、LB + Amp.プレートに塗布、37°Cで一晩培養を行った。回収したプレートのコロニーを終濃度 100 μg/mL の Amp.を含む LB 液体培地 5 mL につまようじ植菌し、37°Cで一晩前培養を

行った。その後、終濃度 100 µg/mL の Amp.を含む液体培地 5 mL に 1%植菌し、37°C, 5 h 振とう培養を行った。培養液の OD<sub>600</sub> が 0.5 程度になったところで氷水によって急速冷却し、30 min 静置したのち、IPTG を終濃度 1 mM になるように添加し、15°Cで一晩振とう培養した。培養液を遠心分離 (12,000 rpm, 2 min, 4 °C) した後、得られた菌体を 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 400 µL で懸濁し、超音波破碎 (Output 1, Duty Cycle 10, 1 min×3)、遠心分離 (12,000 rpm, 4°C, 15 min) を行い、上清を可溶性画分とした。沈殿は、20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 100 µL で懸濁した。回収したサンプルを SDS-PAGE にて確認した。

### 3-2-7. タンパク質濃度の定量

タンパク質濃度は Bio-Rad のプロテインアッセイ法で定量した。蒸留水で 5 倍希釈したプロテインアッセイ液 3 mL を試験管に分注し、試料 60 µL を添加、15 min 室温で反応後、紫外可視分光光度計 (SHIMADZU、UV-1700) を用いて 595 nm の波長の吸収を測定した [82]。また、0.1~0.8 mg/mL の標準アルブミン溶液を用いて作成した検量線によりタンパク質濃度を算出した。

### 3-2-8. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE 電気泳動は、ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 (ATTO、AE-6500, Japan) を用いてアクリルアミドゲル (30%アクリルアミド溶液) を作製した。サンプルと SDS 処理緩衝液を 1:1 の割合で加え、100°Cで 3 min 熱処理を行ったものを SDS 用試料溶液とした。Tris/glycine/SDS 緩衝液系で、ミニスラブ 1 枚につき 130 V で、約 2 h 電気泳動を行った。泳動後のゲルは、50%メタノール-10%酢酸に溶解したクーマシーブリリアントブルー-G-250 で染色することによりタンパク質バンドを可視化し、30%メタノール-10%酢酸で脱色し、乾燥させた [83]。タンパク質分子量マーカーには、タンパク質マーカー (CLEARLY Protein Ladder (Unstained), TAKARA Bio.) を用いた。



### 3-2-9. His-trap を用いた Swfct の精製

*E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*swfct* の培養を 1 L スケールで行い、得られた培養液から菌体を回収し、超音波破碎後の可溶性画分 14 mL を得た。その可溶性画分を 13 mL 用いて His-trap (5 mL, cytiva, Sweden) による酵素精製を行った。Buffer は 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に 20, 50, 100, 200, 500 mM, 1 M のイミダゾールを含むものを用いた。20 mM イミダゾールを含む buffer で平衡化したカラムに可溶性画分をアプライし、20 mM イミダゾールを含む buffer は 50 mL、その他の buffer は 25 mL ずつ流し、5 mL ずつ分画した画分を SDS-PAGE で確認した。

得られた精製酵素を、VIVASPIN (Sartorius) を用いて濃縮・脱塩した。VIVASPIN に精製酵素を入れ、遠心 (3,000 rpm, 4°C, 30 min) し、液量が少なくなったら新たに 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を加えて再び遠心 (3,000 rpm, 4°C, 30 min) した。サンプルが 1 万倍希釈になるまで繰り返し、イミダゾールを取り除いた。得られたサンプルを、SDS-PAGE で確認した。また、この濃縮後サンプルを用いてタンパク質濃度の定量を行った。

### 3-2-10. ゲルろ過 HPLC による酵素活性測定

目的酵素遺伝子の発現が確認できた *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*swfct* C.F.E.あるいは精製した Swfct に、終濃度 2% のオキナワモズクフコイダンあるいは脱アセチル化オキナワモズクフコイダンを基質とし、100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を含む全量 100  $\mu$ L の酵素反応液を用いて、30°C、一晚酵素反応を行った。80°C, 5 min 熱処理後、遠心分離 (13,000 rpm, 10 min) を行い、2-2-3 の方法に従いゲルろ過 HPLC による分析を行った。

### 3-2-11. Somogyi-Nelson 法による Swfct の酵素化学的諸性質の検討

酵素的に調製した脱アセチル化フコイダンを基質とし、糖の還元末端濃度を比色測定することができる Somogyi-Nelson 法 [84] を用いて、Swfct で酵素反応させた後の還元末端濃

度を算出し、酵素活性を定量的に測定した。なお、本論文で酵素活性を定量的に評価する場合は、3連で実験を行い、エラーバーのピークは最大値と最小値とした。Somogyi-Nelson 法では、銅試薬 (表 3-4, 表 3-5) と Nelson 試薬 (表 3-6) を用いた。銅試薬の (a) 試薬 100  $\mu$ L と (b) 試薬 2.5 mL の混合液を調製した後、そこから 100  $\mu$ L 採取し、酵素反応液 100  $\mu$ L を混ぜ、沸騰湯浴中 (100°C) で 10 min の熱処理を行った。その後急冷し、Nelson 試薬 100  $\mu$ L を混ぜ加え、20 min 室温で放置した。そして、その溶液を 2.5 mL の MilliQ で希釈した後、 $A_{660}$  で吸光度を測定した。検量線は 0.5 ~ 3 mM の L-フコースを用いて作成した (図 3-1)。

表 3-4. 銅試薬 (a) 試薬組成

15% 硫酸銅(II)五水和物	15	g
Total	100	mL

表 3-5. 銅試薬 (b) 試薬組成

無水炭酸ソーダ	12.5	g
酒石酸ナトリウムカリウム四水和物	12.5	g
炭酸水素ナトリウム	10	g
無水硫酸ソーダ	100	g
Total	500	mL

表 3-6. Nelson 試薬組成

七モリブデン酸六アンモニウム四水和物	6.25	g
ひ素水素二ナトリウム七水和物	0.75	g
濃硫酸	10.5	g
Total	250	mL

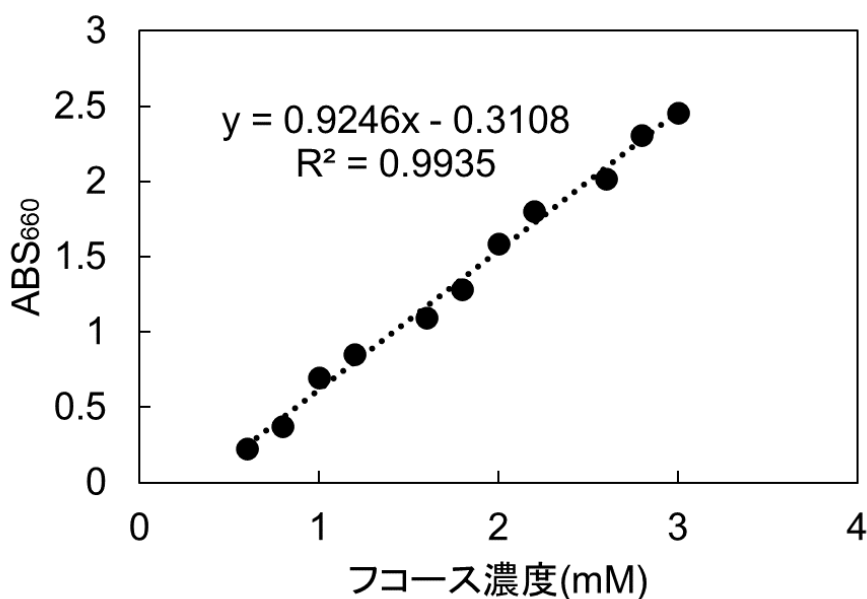


図 3-1. Somogyi-Nelson 法における L-フコースの検量線

### 3-2-12. 至適温度の検討

表 3-7 に示した全量 200  $\mu$ L の酵素反応液を用いて、10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70 $^{\circ}$ C で 10 min インキュベートし酵素反応後、80 $^{\circ}$ C, 5 min 熱処理を行った。その酵素反応液を用いて Somogyi-Nelson 法により、図 3-1 の検量線を基に、脱アセチル化オキナワモズクフコイダンから生じる還元末端を測定し Swfct の至適温度を検討した。

表 3-7. Swfct の酵素反応液組成 (至適温度、熱・pH 安定性検討時)

Swfct	0.05	mg/mL
リン酸 Buffer (pH 7.7)	50	mM
脱アセチル化オキナワモズクフコイダン	2	%

### 3-2-13. 熱安定性の検討

Swfct (0.05 mg/mL) を 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 $^{\circ}$ C で 30 min プレインキュベートした後、表 3-7 に示した全量 200  $\mu$ L の酵素反応液を用いて、40 $^{\circ}$ C, 10 min インキュベートし酵素反応後、80 $^{\circ}$ C, 5 min 熱処理を行った。その酵素反応液を用いて Somogyi-Nelson 法により、

図 3-1 の検量線を基に、脱アセチル化オキナワモズクフコイダンから生じる還元末端を測定し Swfct の熱安定性を検討した。

### 3-2-14. 至適 pH の検討

表 3-8 に示した全量 120  $\mu$ L の pH が異なる酵素反応液を用いて、40°C, 5 min インキュベートし酵素反応後、80°C, 5 min 熱処理を行った。その酵素反応液を用いて Somogyi-Nelson 法により、図 3-1 の検量線を基に、脱アセチル化オキナワモズクフコイダンから生じる還元末端を測定し Swfct の至適 pH を検討した。

表 3-8. Swfct の酵素反応液組成 (至適 pH 検討時)

Swfct	0.09	mg/mL
リン酸 buffer (pH 5.0 ~ pH 8.0)	100	mM
ホウ酸/NaOH buffer (pH 8.5 ~ pH 10.0)	100	mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaOH buffer (pH 11.0 ~ pH 11.5)	100	mM
脱アセチル化オキナワモズクフコイダン	2	%

### 3-2-15. pH 安定性の検討

0.09 mg/ml の Swfct 12 mL に pH 3.5 ~ pH 10.5 の 500 mM buffer を 6 mL 添加し、30 min プレインキュベートした後、表 3-7 に示した全量 120  $\mu$ L の酵素反応液を用いて、40°C, 10 min インキュベートし酵素反応後、80°C, 5 min 熱処理を行った。その酵素反応液を用いて Somogyi-Nelson 法により、図 3-1 の検量線を基に、脱アセチル化オキナワモズクフコイダンから生じる還元末端を測定し Swfct の pH 安定性を検討した。

### 3-2-16. 金属イオン、阻害剤・キレート剤が活性に及ぼす影響

酵素活性に影響を及ぼす金属イオン、阻害剤・キレート剤について検討した。酵素反応液に添加する各化合物の濃度を 1 mM とし、2% 脱アセチル化オキナワモズクフコイダン、

0.09 mg/mL Swfct、50 mM リン酸 buffer (pH 7.5) を含む全量 120  $\mu$ L の酵素反応液を用いて、40°C, 5 min インキュベートし酵素反応後、80°C, 5 min 熱処理を行った。その酵素反応液を用いて Somogyi-Nelson 法により、図 3-1 の検量線を基に、脱アセチル化オキナワモズクフコイダンから生じる還元末端を測定し、各化合物の Swfct に対する影響を検討した。

### 3-2-17. 基質特異性の検討

起源の異なるフコイダンあるいは海洋性多糖に対する Swfct の活性を検討した。フコイダンは 2%、海洋性多糖の場合は 0.5%、0.09 mg/mL Swfct、50 mM リン酸 buffer (pH 7.5) を含む全量 120  $\mu$ L の酵素反応液を用いて、40°C, 5 min インキュベートし酵素反応後、80°C, 5 min 熱処理を行った。その酵素反応液を用いて Somogyi-Nelson 法により、図 3-1 の検量線を基に、基質から生じる還元末端を測定し Swfct の基質特異性を検討した。

### 3-2-18. ゲルろ過クロマトグラフィーによる Swfct の分子量測定

Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare : ベッド体積、24 mL) をカラムに用いた。クロマトグラフィーは、AKTA pure 25 (GE Healthcare) を用いて行った。溶離液は、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) と 500 mM NaCl を含む Buffer を用いた。流速 0.2 mL/min で平衡化したカラムに、500  $\mu$ L の精製酵素をアプライし、定組成溶離によって溶出した。タンパク質分子量マーカールには、Blue Dextran (Mw : 2,000,000)、Thyroglobulin (Mw : 669,000)、Ferritin (Mw : 440,000)、Aldolase (Mw : 158,000)、Conalbumin (Mw : 75,000)、Ovalbumin (Mw : 44,000) を含む Gel Filtration Calibration Kit HMW (GE Healthcare. Co.) を用いた。これらマーカールの溶出液量から図 3-2 の検量線 ( $K_{av} \text{ ml} = -0.135 \times \ln(\text{分子量}) + 1.8813$ 、 $K_{av} = (\text{溶出体積} - \text{排除体積}) / (\text{ベッド体積} - \text{排除体積})$ ) を作成し、それに基づき Swfct の分子量を算出した。

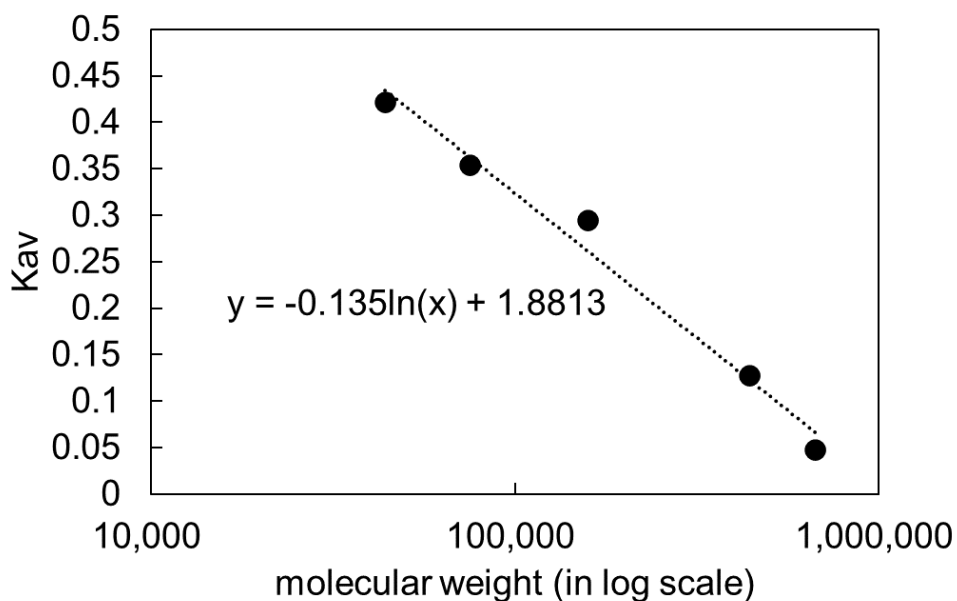


図 3-2. ゲルろ過クロマトグラフィーによるタンパク質の検量線

### 3-2-19. Swfct による基質分解限界

反応時間や酵素の添加量を変更することにより、Swfct が脱アセチル化オキナワモズクフコイダンをどれだけ分解するかを HPLC Column (TSKgel GMPW<sub>XL</sub>) により定性的に確かめた。2%脱アセチル化オキナワモズクフコイダン、100 mM リン酸 buffer (pH 7.5) を含む反応液に Swfct (4.5 mg/mL) を 100  $\mu$ L 添加し、30°C, 7 days 酵素反応を行った。このとき、1, 2, 3, 7 日目に同量の酵素を添加した。図 2-1 の検量線を使用して各ピークにおける分解産物の分子量を測定した。ちなみに、TSKgel GMPW<sub>XL</sub> の分画範囲は 1,000 ~ 8,000,000 Mw である。この反応液を詳細に解析するため、TSKgel GMPW<sub>XL</sub> より低分子用の HPLC column (TSKgel G3000PW<sub>XL</sub>) にもアプライし、図 2-2 の検量線を使用して各ピークにおける分解産物の分子量を測定した。TSKgel G3000PW<sub>XL</sub> の分画範囲は 40,000 Mw 以下である。



```

MTKITPIRLVIVFFFTTVLFSGAQKSLPPSFWNNVADYTFMY
FPESLKNGTDFHIQTNTHFLAFDYANLNLKDLRLIDKPLAEEKA
VRQNLDLFLPLKLNQDLLKISMVYKQGEYKLTGKASKPSECMLI
ESGKFFQRRNIINLKFEEGAPNVNTALEVVSADWDRISFVLKVD
SKENLEPIILNMECKFPTKYATQILKDKNAILSLDKNNNGFMYQ
SLATIKSNTKGVLVSNFVKSKEKQQLELIIPVNSFDKKEVINPV
TYNPIEIKAHQLNPIISKVLTIDFDPIYGWHKINLANDLKDKNAIE
NVNIVLENKSNQPETVRLNFNKEKVNAITGISAIIRDIDNNPTGL
PIQLSKNWHNEVDVEFKGPWYRGLTMLTIPAKTKIEFVYTSVN
AYWGELPAASHSQLCLAGWGKSWGNNQLWEQSAIGAFGESI
CYEPDGGQAQTMITDQRPLMVESTDPAVKKPTKWGWTGNV
GGADFFRFYNEKGVKMDIKRIKTFHKKSCP NLTEV TYAGVTPK
NEGSYELTTSIYRSDDYVRGIYKIKLNVEDTLKFSRLAIVQIGSQ
TYSYTSDDKFAFGDENGLIEEWNTQWGGNQYKKTALKTNGN
RPWISLHDNVNQPKKEWGTAAACRGVIVKKWNAVIAGKVTPPE
FSEFGVNIHSTKSSLVEINVPNEVKMLLPGDYIEAEIEQIILPSS
YESYYGPNVLFKSALKENANSWQLVYREALGNTLKVSASVGE
VLHKFPVVIKANENNEATVVEGGIGYVPITITGIKDYKKNINIY
KNGKKINVNQEVHKGKDYWQTDYNSTTRTWDITFSMPLDN

```

図 3-4. Swfct のアミノ酸配列

```

Fct114 1 ---MHEPRLFPITPEKLPALGAALVLSLFAATAPLKAAEVSELMPLPEDYTSMMWAQGFQPVVDGAPWLRRTCTGHYSMIIDTEALRITHL 87
Swfct 1 MTKITPIRLVIVFFFTTVLFSGAQKSLPPSFWNNVADYTFMYFPESLKNGTDFHIQTNTHFLAFDYANLNLKDLRLIDKPLAEEKA 76

Fct114 88 GPVAKGTDYVESFVKSAPP-LPEKINPVDLHLGITVNGKSYRKTAGEKWTYDGPRLVESGRFFQKGDVGTGVFTAEDEGSVLNAETRFETC 176
Swfct 77 RLIDKPLAEEKAVRQNLDLFLPLKLNQDLLKISMVYKQGEYKLTGKASKPSECMLIESGKFFQRRNIINLKFEEGAPNVNTALEVVS 161

Fct114 177 AMPERLGLIDAAKPGEKALAGGEASFVKIGGGFGFDKADLEIPHAPSLDTEQFTLGFWAFFPRNYSHQDGASPWLVCKNRNEARDGNYG 266
Swfct 162 SWADRISFVLKVD-----D-SKENLE-PIILNME-----CK----- 189

Fct114 267 MLLRQGGKLEARLNIGGGKDGQEVVNSSSDVKRRWNHILAMSYDGEVLRIFLNGKNVGEKKIGRVRKPGADPLVFGRRADSNVSHYVFERGA 356
Swfct 190 -----RPTKYATQILKDKNAILSL-----DKNNNGFMYQ-- 218

Fct114 357 MDEIQYFDKALDKPLIGRMAMRPGESLPAAKPAHAWAFKVDGASSETPMEDWKNASMEVVRVSAEGSALSLNESWSLDPGARWADGEWKQ 446
Swfct 219 -----SLATIKSNTKGVLVSNF-----FKSKKQQ 243

Fct114 447 VGLAMFPA-TFEEAPETSSEISVKVSEKDKQGGERPVT-----FDAAQCCHLIDINGVRAQAPANGDKNDATERYKLVFSNPTDRVEVADL 529
Swfct 244 LELIIEEVNSFDKKEVINETYNPIEIKAHQLNPIISKVLTIDFDPIYGVHRIINLAN-----DLKDKNAIENVNIVLENKSNQPETVRL 326

Fct114 530 KPVKDSGIQSIITGVSAMLRDADENPTGHPVQISKNWHNDEESGVYRGSWLHALTHLRALPPGSTTELELVISYGHVWGVAASHAQCLLIG 619
Swfct 327 NFNKBEK-VNAITGHSALTRDIDNNPTGLPIQLSKNWHNEVDVE-FKGEWYRGLTMLTIPAKTKIEFVYTSVNAAYWGLEPAASHSQLCLAG 414

Fct114 620 ---WGSNQHWSBSALGSWGESICYEPEQGOANTITVDVRFVMVNGG---KDDKKGWTSNVGGADFRRFDPAGKRIASHAMQPAYLK 701
Swfct 415 WKSWGNNQLWEQSAIGAFGESICYEPEQGOAQTMITDQRPLMVESTDPAVKKPTKWGWTGNVGGADFRRFVNEKGVKMDIKRIKTFHKK 504

Fct114 702 HGPCLSEVVFSGRV--GEGIRHSSIVSHARIDDIHVRGIYRLRMDVDKAMDFSRFVIEQVGSITYNFTQEKKMAVGDAGLKKEWNTTWGG 789
Swfct 505 SCENLPEVTYAGVTPKNEG-SYELTTSIYRSDDYVRGIYKIKLNVEDTLKFSRLAIVQIGSQTYSYTSDDKFAFGDENGLIEEWNTQWGG 593

Fct114 790 NNYRTEPIVMDGAPWVSLHEGSHFGGHKLMGAWANRGLVVRSMARLGGKASAWMAEHHGVKRCSESTSTADVFVEPPGVTRLEPGDFIE 879
Swfct 594 NQYKKTALKTNGNRPWISLHDNVNQPKKEW-GTAAACRGVIVKKWNAVIAGKVTPPEFSEFGVNIHSTKSSLVEINVPNEVKMLLPGDYIE 682

Fct114 880 ADFEHIIVMPQTAEVYGGPNEALRSALAKDGNTRMIRREBSAGNKIEVNVVSGSLEHPIYDVRIQTSGGAAAFTLKGGLAIVLVEVTFGLAS 969
Swfct 683 AEIEQLILPSSYSSYGGPNVLFKSALKENANSWQLVYREALGNTLKVSASVGEVLHKFPVVIKANENNEATVVEGGIGYVPITITGIKDY 772

Fct114 970 ND--GVELLVDGKPL--DQSVHGKDEWQTDPEVPSRTWRSRTYNIIEAQAQKTPGVNLQPKP 1025
Swfct 773 YKKNINIYKNGKKNVNQEVHKGKDYWQTDYNSTTRTWDITFSMPLDN----- 820

```

図 3-5. Swfct と Fct114 のアミノ酸配列の比較





### 3-3-2. *E. coli* BL21 (DE3)/pCold I/*swfct* の発現検討

目的長の PCR 断片を増幅し、これらを用いて pCold I にライゲーションしたところ、*swfct* のクローニングが確認できた。加えて、*E. coli* BL21 (DE3) を用いて *swfct* の発現を検討した結果、*E. coli* BL21 (DE3)/pCold I/*swfct* により、可溶性画分に Swfct と同じ分子量 (約 90 kDa) を有するタンパク質が著量生産されているのが確認できた (図 3-7, レーン 9)。なお、図 3-7 は詳細を述べていない *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*swfct* についての結果を示しているが、目的遺伝子が発現しなかったため言及しない。

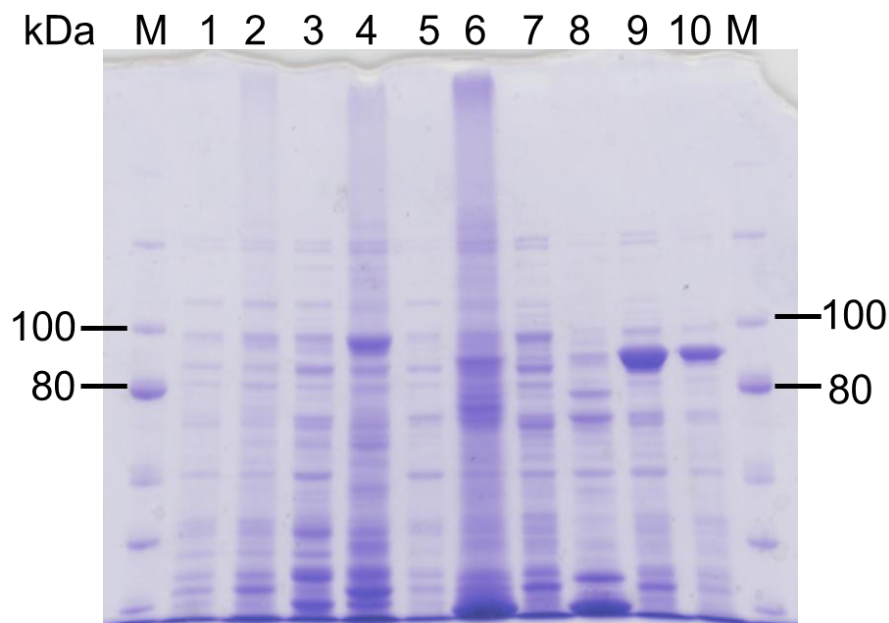


図 3-7. SDS-PAGE による *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*swfct* の発現検討

M: サイズマーカー

1: *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a 上清

2: *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a 沈殿

3: *E. coli* BL21(DE3)/pCold I 上清

4: *E. coli* BL21(DE3)/pCold I 沈殿

5: *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*swfct* 37°C 上清

6: *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*swfct* 37°C 沈殿

7: *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*swfct* 15°C 上清

8: *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*swfct* 15°C 沈殿

9: *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*swfct* 上清

10: *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*swfct* 沈殿

Swfct: 90 kDa

### 3-3-3. His-trap を用いた Swfct の精製

His-trap による酵素精製の結果、100 mM ~ 200 mM イミダゾールを含む buffer で目的タンパク質が溶出した。これらの画分 40 mL を集めて脱塩・濃縮操作を行ったところ、図 3-8 に示すような精製酵素を 5 ml 調製でき、タンパク質濃度は 13.1 mg/ml であった。

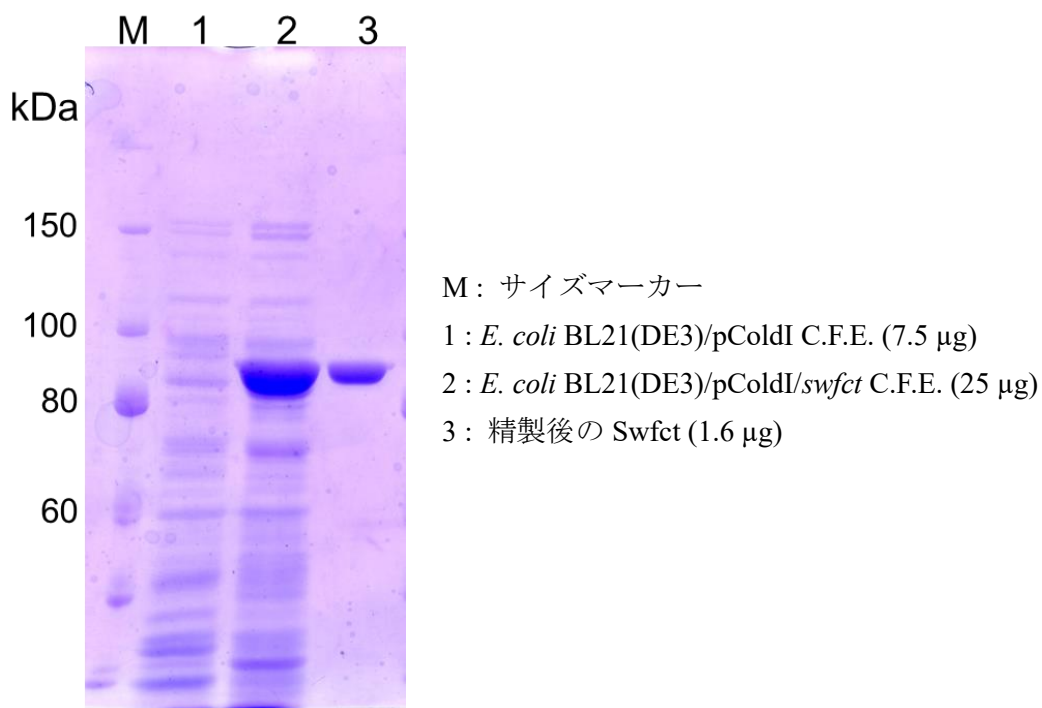
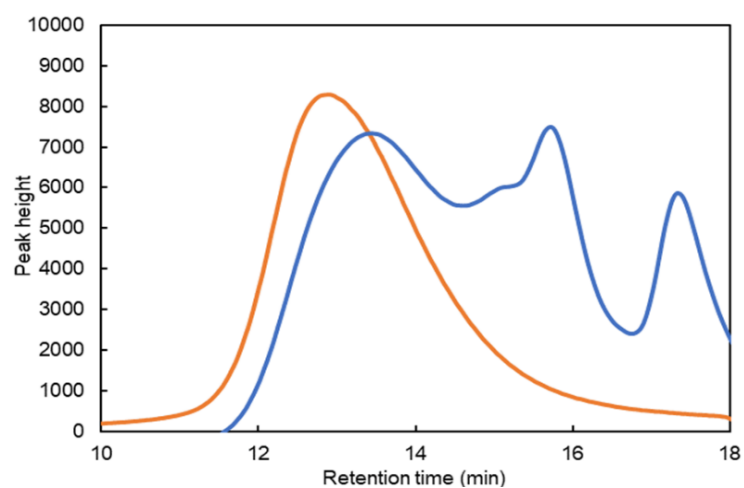


図 3-8. 精製後 Swfct の SDS-PAGE 結果

### 3-3-4. *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/swfct C.F.E. の酵素活性評価

*swfct* を発現する組換え大腸菌培養して得られた C.F.E.を用いて酵素反応を行った。その結果、脱アセチル化オキナワモズクフコイダンを基質にすると、明らかな低分子化が HPLC により確認できた (図 3-9)。一方、オキナワモズクフコイダンを基質とした場合では、Retention Time にズレが見られたので、わずかではあるが低分子化反応は進行していると考えられた (図 3-10)。精製酵素を用いても同様の活性が見られたので、脱アセチル化オキナワモズクフコイダンを基質とした反応を行い、酵素化学的特性を生じる還元末端量を定量することにより検討することにした。

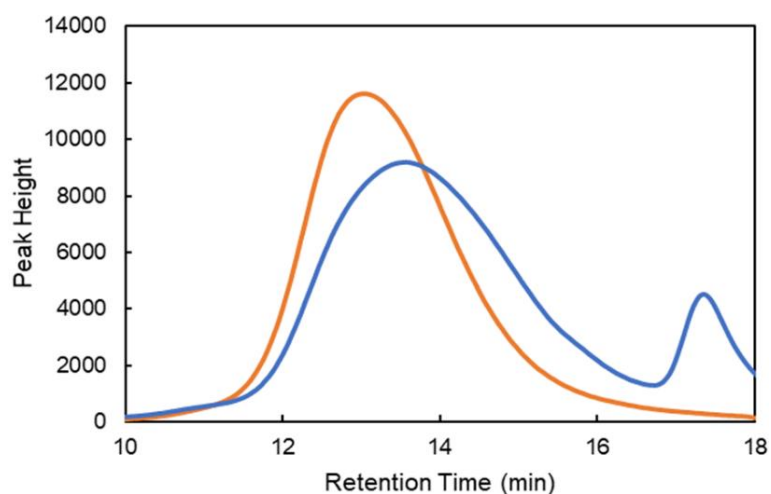


青 : *E. coli* BL21(DE3) / pCold I /swfct C.F.E. + 脱アセチル化オキナワモズクフコイダン

橙 : 脱アセチル化オキナワモズクフコイダンのみ

図 3-9. 脱アセチル化オキナワモズクフコイダンを基質とした *E. coli* BL21(DE3)/pCold

I/swfct 由来 C.F.E.を用いた酵素反応後の HPLC チャート結果



青 : *E. coli* BL21(DE3) / pCold I /swfct C.F.E. + オキナワモズクフコイダン

橙 : オキナワモズクフコイダンのみ

図 3-10. オキナワモズクフコイダンを基質とした *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/swfct

由来 C.F.E.を用いた酵素反応後の HPLC チャート結果

### 3-3-5. 至適温度の検討

各温度で酵素反応後、検量線に基づいて糖の還元末端濃度を算出し、相対活性をみることによりフコイダナーゼ Swfct の至適温度を検討した。検討の結果、Swfct の至適温度は 40°C (図 3-11) であると考えられた。

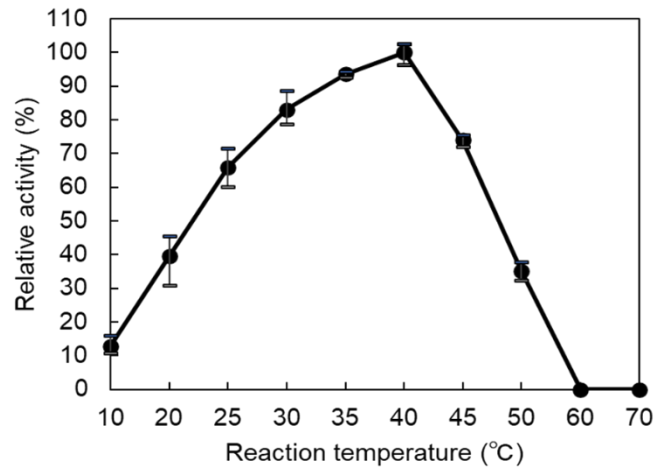


図 3-11. Swfct の至適温度

### 3-3-6. 熱安定性の検討

各温度で酵素をプレインキュベートした後に酵素反応を行い、検量線に基づいて糖の還元末端濃度を算出し、相対活性をみることにより Swfct の熱安定性を検討した。この結果より、Swfct は 25°C まで安定であるが、30°C で 30 分間処理すると残存活性は約半分にまで減少することが分かった (図 3-12)。

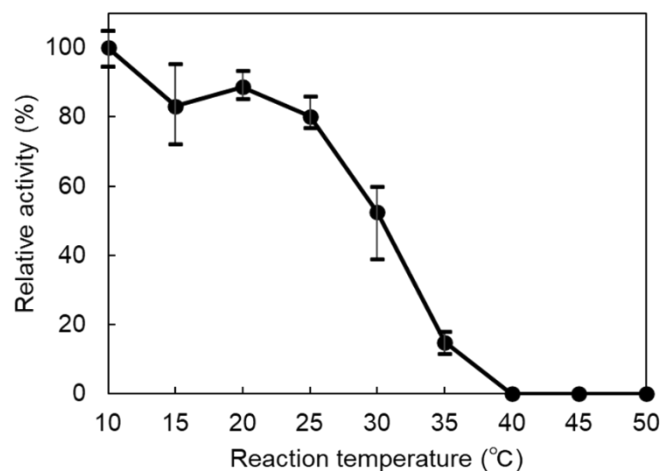


図 3-12. Swfct の熱安定性

### 3-3-7. 至適 pH の検討

各 pH で酵素反応後、検量線に基づいて糖の還元末端濃度を算出し、相対活性をみることにより Swfct の至適 pH を検討した。この結果より、Swfct の至適 pH は pH 7.3 であることが分かった (図 3-13)。

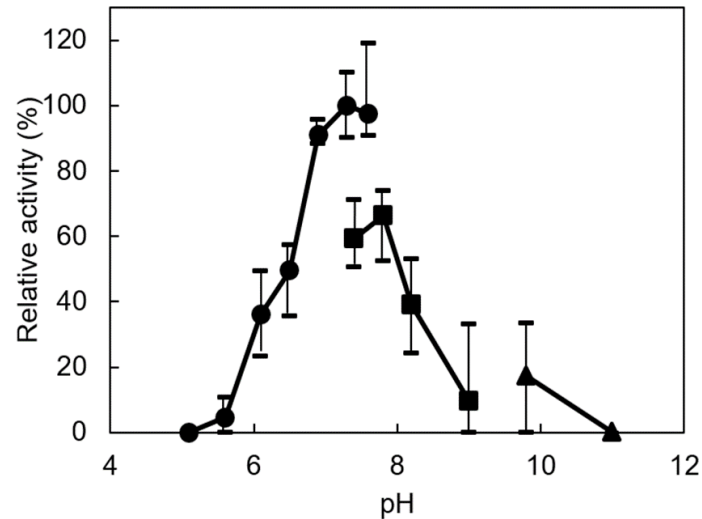


図 3-13. Swfct の至適 pH

● : リン酸 Buffer    ■ : ホウ酸 Buffer    ▲ : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaOH Buffer

### 3-3-8. pH 安定性の検討

各 pH で酵素をプレインキュベートした後に酵素反応を行い、検量線に基づいて糖の還元末端濃度を算出し、相対活性をみることにより Swfct の pH 安定性を検討した。この結果より、Swfct は pH 6.0~pH 8.4 で安定であることが分かった (図 3-14)。また、至適反応条件下で、本酵素の脱アセチル化オキナワモズクフコイダンに対する比活性は、2.63 mmol/min/mg と見積もられた。

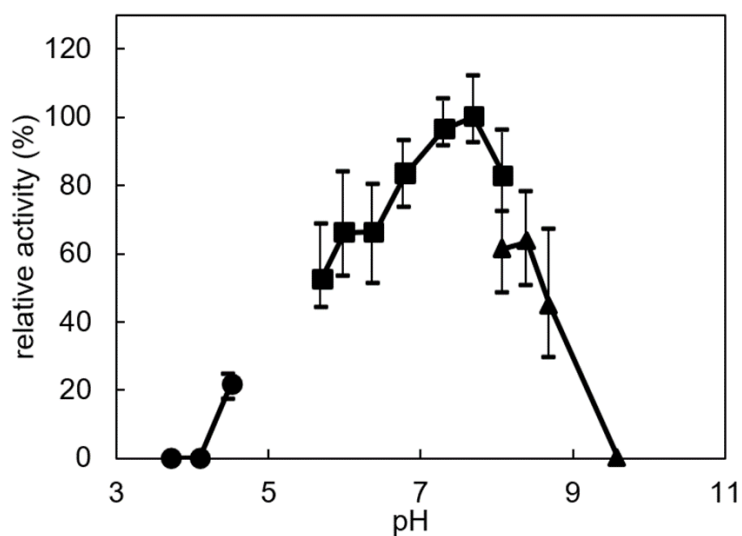


図 3-14. Swfct の pH 安定性

● : リン酸 Buffer    ■ : ホウ酸 Buffer    ▲ : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaOH Buffer

### 3-3-9. 金属イオンが活性に及ぼす影響

反応液に 1 mM 各金属イオンを添加して酵素反応を行い、検量線に基づいて糖の還元末端濃度を算出し、相対活性をみることにより Swfct の金属イオンによる影響を検討した。この結果より、Swfct は Co<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>によりわずかに酵素活性が増加し、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup>による活性阻害が見られた (図 3-15)。

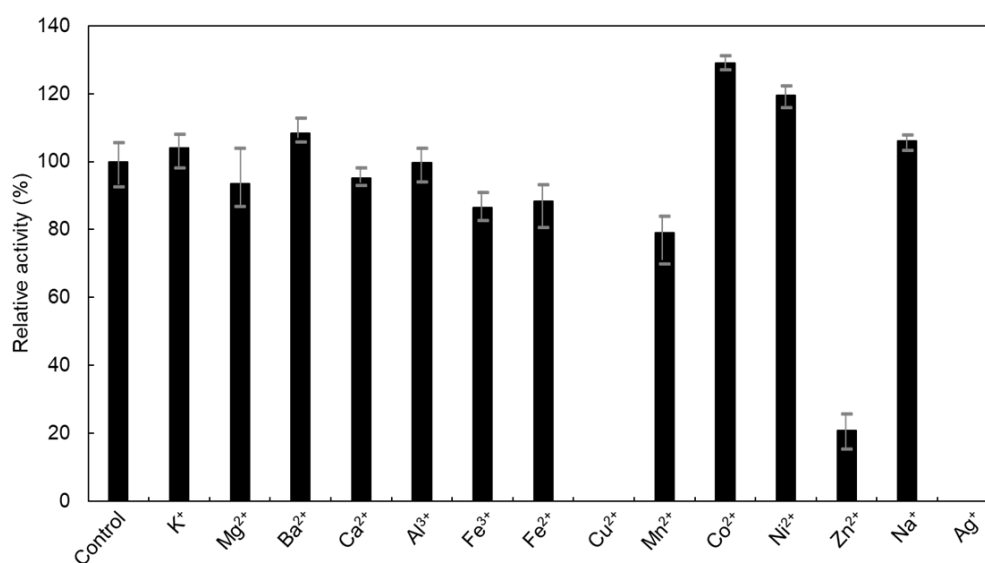


図 3-15. 金属イオンが Swfct の活性に及ぼす影響

### 3-3-10. 阻害剤・キレート剤が活性に及ぼす影響

反応液に 1 mM の各阻害剤を添加して酵素反応を行い、検量線に基づいて糖の還元末端濃度を算出し、相対活性をみることにより Swfct の阻害剤、キレート剤による影響を検討した。この結果より、Swfct は PCMB、DTNB で活性の低下が見られ、活性への SH 基の関与が示唆された (図 3-16)。

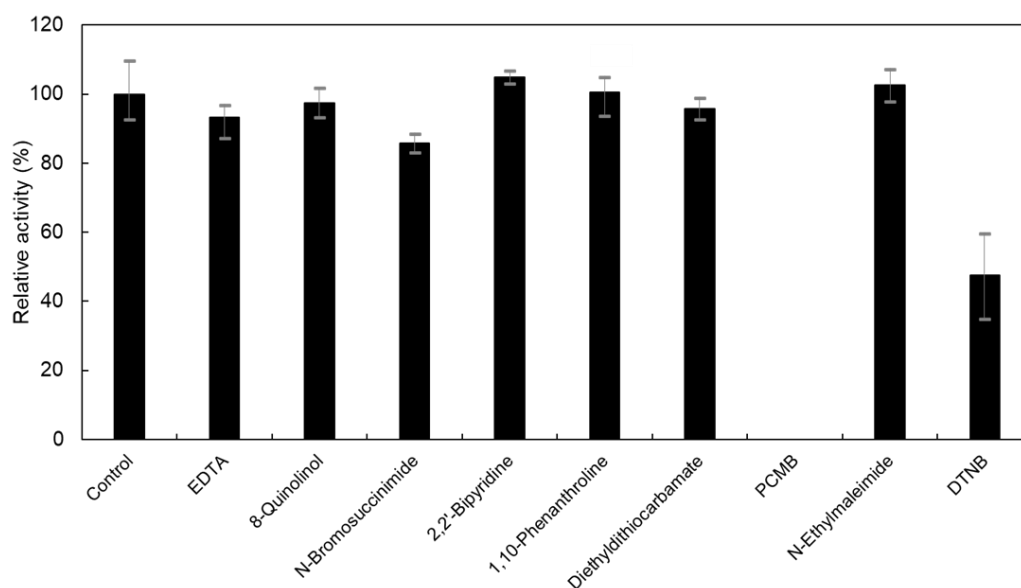


図 3-16. 阻害剤・キレート剤が Swfct の活性に及ぼす影響

### 3-3-11. 基質特異性の検討

起源の異なるフコイダンやフコイダン以外の多糖を用いて酵素反応を行い、検量線に基づいて糖の還元末端濃度を算出し、相対活性をみることにより Swfct の基質特異性を検討した。この結果より、Swfct は脱アセチル化オキナワモズクフコイダンに対する特異性が高く、アセチル基を有するオキナワモズクフコイダンやヒバマタ、アカモク由来のフコイダン、ラミナランを基質にした場合、わずかな還元末端の生成が確認された (図 3-17)。



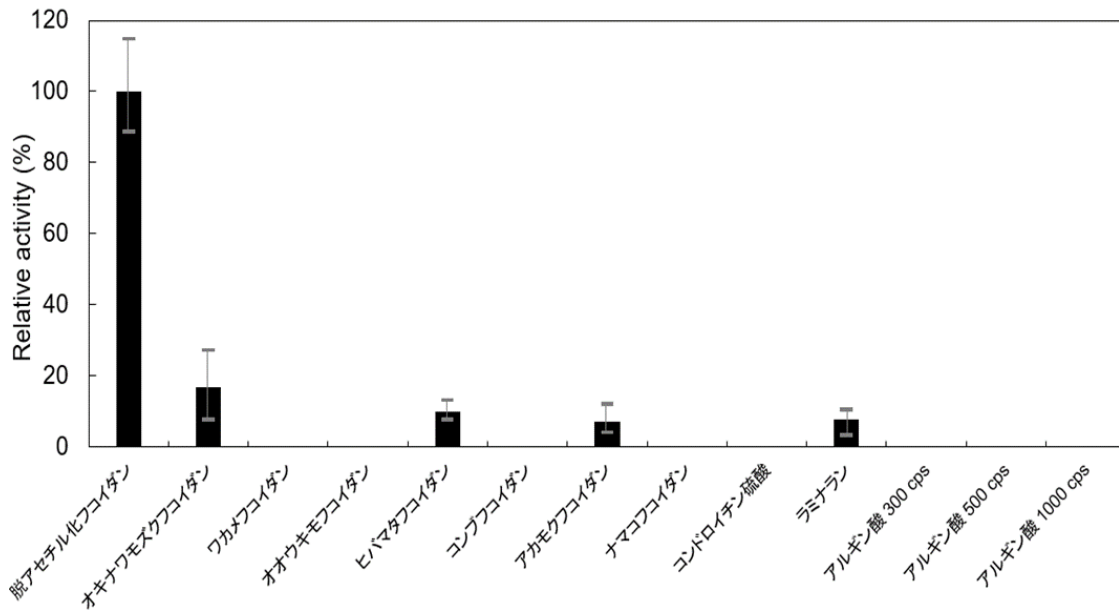


図 3-17. Swfct の基質特異性

### 3-3-12. ゲルろ過クロマトグラフィーによる Swfct の分子量測定

Swfct をゲルろ過クロマトグラフィーにより分析し、図 3-2 の検量線に基づいて分子量を算出すると、分子量は 82 kDa であり、Swfct はモノマーであることが分かった (図 3-18)。

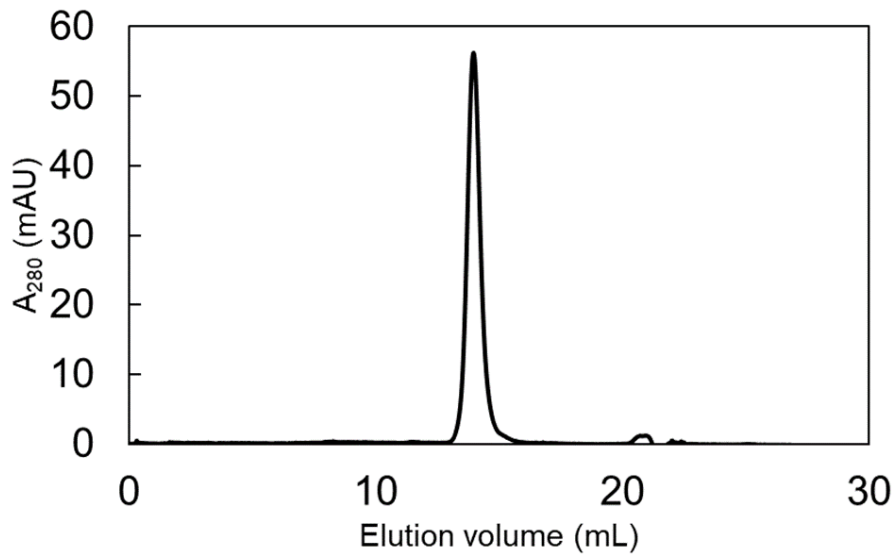


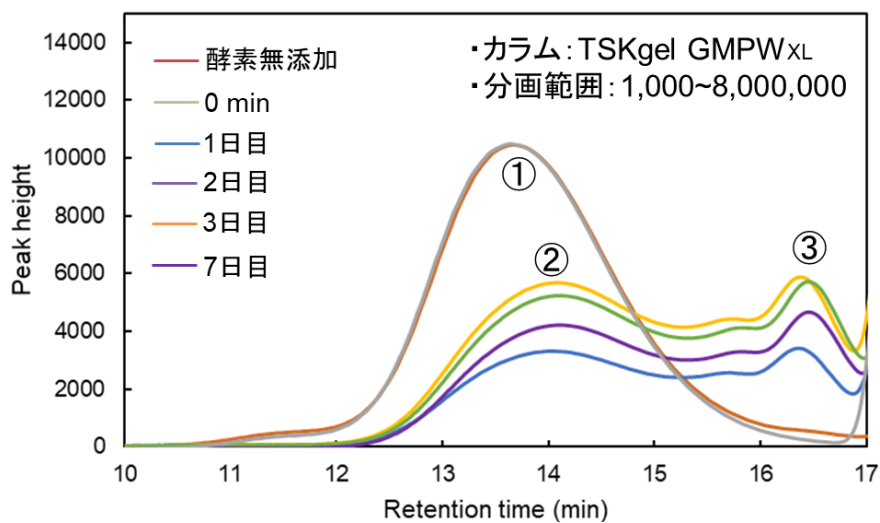
図 3-18. ゲルろ過クロマトグラフィーによる Swfct の分子量測定

### 3-3-13. Swfct による基質分解限界

長時間反応したり、酵素を過剰量添加しても、脱アセチル化オキナワモズクフコイダンの低分子化パターンに変化は見られなかった (図 3-19)。また、各ピークに番号をつけ、図 2-1 の TSKgel GMPW<sub>XL</sub> の検量線をもとに低分子化物の分子量を算出した結果、Swfct は脱アセチル化オキナワモズクフコイダンを低分子化し、分子量約 32,000、1,600 の分解産物が生成していることが分かった。今回の分析系で Retention time 16.5 min を示す (ピーク③)、分子量約 1,600 の産物までの分解にとどまった。しかし、分子量 1,600 はこのカラムの分画限界 (1,000 ~ 8,000,000 Mw) に近いと、正しく測定できていないと考えられる。

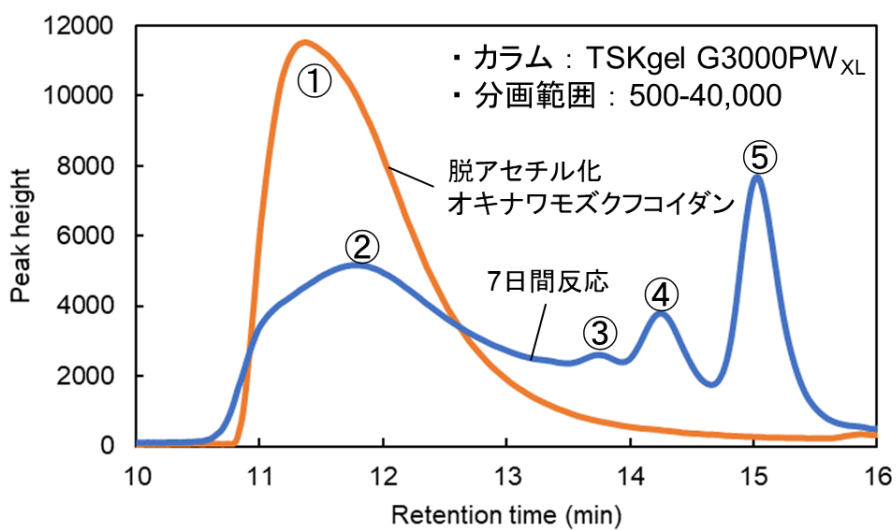
今まで用いてきたゲルろ過カラム、TSKgel GMPW<sub>XL</sub> では 2,000 前後と想定される分解産物の分子量が正しく評価できないため、分画範囲が 40,000 以下と、TSKgel GMPW<sub>XL</sub> よりも低分子量側の TSKgel G3000PW<sub>XL</sub> を用いて改めて分析することにした。

7日間反応させたサンプルを、TSKgel G3000PW<sub>XL</sub> にアプライし、分析した (図 3-20)。ピークに番号をつけ、図 2-2 の検量線をもとに、低分子化物の分子量を算出した。その結果、Swfct は脱アセチル化オキナワモズクフコイダンを低分子化し、その際高分子量の物質も残存するものの、分子量約 5,000、2,800 に相当する分解産物が生じることが明らかになった。



【各ピークの分子量】 ①55,000 ②32,000 ③1,600

図 3-19. 反応時間・酵素量を変えた場合の TSKgel GMPW<sub>XL</sub> を用いた Swfct によるフコイダンの低分子化パターンの分析



【各ピークの分子量】 ①42,000 ②31,000 ③7,200 ④5,000 ⑤ 2,800

図 3-20. 反応時間・酵素量を変えた場合の TSKgel G3000PW<sub>XL</sub> を用いた Swfct によるフコイダンの低分子化パターンの分析

### 3-4. 考察

本章では、新たにオキナワモズクフコイダン分解菌として分離した *Flavobacterium* sp. SW からオキナワモズクフコイダンの低分子化反応を触媒するフコイダナーゼ遺伝子を見出すために、既にオキナワモズクフコイダン分解菌として得られていた *L. algae* H18 由来フコイダナーゼ遺伝子 *fst114* との相同性検索を行うことにより、フコイダナーゼ遺伝子 *swfct* を見出した。*swfct* の発現検討を行った結果、*E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*swfct* の可溶性画分に目的タンパク質の生産が著量確認され、その無細胞抽出液を用いて脱アセチル化フコイダンを基質とした酵素反応を行ったところ、ゲルろ過 HPLC により低分子化活性が確認された。

序論や本章の緒言でも述べたように、H18 株はオキナワモズクフコイダンが分解される際、脱アセチル化反応の後に低分子化反応が起こることを提唱している [42]。その理由として、H18 株由来フコイダナーゼ Fct114 は天然のオキナワモズクフコイダンよりも脱アセチル化されたオキナワモズクフコイダンを良質な基質として認識し分解を行っており、認識の差異はアセチル基による立体障害が考えられる [67]。*Flavobacterium* sp. SW 由来フコイダナーゼ *Swfct* においても同様な結果が得られたため、オキナワモズクフコイダン資化性微生物は共通して、脱アセチル化反応を行った後にフコイダンを分解・資化していることが推察される。しかしながら、*Swfct* を用いて長時間酵素反応を行っても図 3-20 に見られるように、依然高分子量の化合物が存在している。これは、アセチル基が遊離してもなお、グルクロン酸等の立体障害により、主鎖を切断する *Swfct* が切断部位に近づけないためと推察される。

Fct114 と *Swfct* はどちらも分子量が比較的大きな酵素で、それぞれ 112 kDa と 90 kDa となっている。比活性を比較すると、Fct114 は 3.18 U/mg protein、*Swfct* は 2.63 U/mg protein となっており、ほぼ同じである。しかし、天然のオキナワモズクフコイダンに対する活性は異なり、脱アセチル化オキナワモズクフコイダンとの活性に比べて、Fct114 は約 50%の活性

を示したが [67]、Swfct は約 20%しか示さず、Swfct はアセチル基の立体障害の影響をより受けることが考えられる。活性が異なる理由をアミノ酸配列の観点から考えると、二つの酵素の相同性は約 40%であるが、C 末端領域における相同性が N 末端領域の相同性よりも高く (図 3-5)、このような基質特異性の違いは N 末端領域によって生じることが考えられる。

序論でも述べたが、今までに報告されている endo 型でフコイタンを分解するフコイダーゼのほとんどは GH107 ファミリーに属し、最近、GH168 ファミリーに分類される酵素も見出されている。2023 年 4 月の現時点では、GH 107 ファミリーは 34 種類の遺伝子が登録され、そのうち特許情報 2 種類および文献情報 12 種類の計 14 種類について遺伝子の機能が解明されている。GH 168 ファミリーは 50 種類の遺伝子が登録され、そのうち 1 種類の遺伝子しか機能が解明されていない。GH 107 ファミリーに属する酵素には、225 位に求核剤としてアスパラギン酸が、293 位に酸塩基触媒としてヒスチジンが特定の共通領域として同定され [12, 87]、GH 107 ファミリーに属する酵素同士の相同性も比較的高いことが伺える。しかし、当グループが見出した Swfct は、GH107 および GH168 との相同性はどれも 25%以下と低く、上記触媒残基を見出すことはできない。

さらに、SWISS-MODEL (SWISS-MODEL, <https://www.expasy.org>)や

AlphaFold2(<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/>

AlphaFold2.ipynb) を用いての 3 次元構造の立体構造予測を行ったが、結果は得られなかったため、Swfct は新たな糖加水分解酵素である可能性が考えられる。

## 第4章 *Flavobacterium* sp. SW 由来第2のフコイダナーゼの特性解明

### 4-1. 緒言

高分子量フコイダンおよび化学的処理によって産生したフコイダンオリゴ糖は、医薬用途としても大変優れた可能性を持ち合わせている [88, 89]。そのため、すでにフコイダン抽出物として様々な機能性食品や栄養補助食品が売り出されているが [90]、高分子量フコイダンは複雑な化学構造を持ち合わせているため、臨床医薬品としての使用は困難となっている。一方、フコイダンオリゴ糖の調製法として、フコイダナーゼなどのフコイダン分解酵素が注目されており、酵素を用いて均一なフコイダンオリゴ糖を産生し、その構造活性相関の解明を行うことで、医薬品としての使用に期待を持つことができる [10, 70, 91]。

糖質関連酵素のデータベースである CAZy ([ww.cazy.org](http://www.cazy.org)) において [63, 64]、現在報告されているフコイダナーゼのほとんどは GH 107 または GH 168 ファミリーに分類されていることはすでに述べたが、酵素活性が明らかになっているものを表 4-1 に示した。GH 107 ファミリーに初めて分類されたのは、海洋性細菌 *Mariniflexile fucanivorans* SW5 から見出された MfFcnA である [65]。しかし、それよりも先に特許情報ではあるが、Takayama ら [85] によって海洋性細菌 *Alteromonas* sp. SN-1009 からフコイダナーゼ遺伝子 *fda1*, *fda2* が解明されている。Fda1, Fda2 を除く GH 107 ファミリーに属しているフコイダナーゼは、フコイダンの  $\alpha$ -1,4 グリコシド結合を特異的に切断し (EC 3.2.1.212)、Fda1, Fda2 および GH 168 ファミリーに分類される FunA ではフコイダンの  $\alpha$ -1,3 グリコシド結合を特異的に切断する (EC 3.2.1.211)。しかし、自然界には多種多様な構造を有するフコイダンが存在し、様々な構造に特異的なフコイダナーゼが多数存在すると考えられている。ただ、フコイダン分解酵素の研

究はまだまだ発展途上で、現在までに発見されているのはほんのわずかであり [72]、分解機構や分解する基質についてはほとんどわかっていないのが現状である。

Zueva ら [70] や Trang ら [92] は 1 つの菌株が複数のフコイダナーゼを有することを報告している。しかし、これらのフコイダナーゼは全て GH 107 ファミリーに属していることから、いわばアイソザイムの形で複数のフコイダナーゼを同一の菌株が有していると考えられる。その一方、Sichert らは、1 つの菌株がフコイダン分解のために多くの酵素が関与していると報告しているが [77]、個々の酵素について詳細な解析は実施されていない。第 3 章では *Flavobacterium* sp. SW 由来で、GH 107, GH 168 ファミリーのいずれにも属さない、オキナワモズクフコイダン低分子化酵素 Swfct の詳細な解析を行った。しかし SW 株は、GH 107 または GH 168 ファミリーと相同性のあるフコイダナーゼを有する可能性がある。そこで、SW 株から表 4-1 に示す既知のフコイダナーゼと相同性の高い遺伝子産物を選択し、その性質を検討することにした。

表 4-1. GH 107 あるいは GH 168 ファミリーに属する既知のフコイダナーゼ

タンパク質	菌株名	主な分解基質 (フコイダン)	Mw (kDa)	GH Family
Fda1	<i>Alteromonas</i> sp.	ガゴメコンブ	88	
Fda2	<i>Alteromonas</i> sp.	ガゴメコンブ	95	
MfFcnA	<i>Mariniflexile fucanivorans</i> SW5	ヒバマタ	105	
FFA2	<i>Formosa algae</i> KMM 3553	ヒバマタ	101	
P19DFcnA	<i>Psychromonas</i> sp. SW19D	オオウキモ、マコンブ	45	
P5AFcnA	<i>Psychromonas</i> sp. SW5A	オオウキモ、マコンブ	45	107
FWf1	<i>Wenyingzhuangia fucanilytica</i> CZ1127	ヒバマタ、アカモク	88	
FWf2	<i>Wenyingzhuangia fucanilytica</i> CZ1127	ヒバマタ、アカモク	98	
Fhf1	<i>Formosa haliotis</i>	ヒバマタ	122	
Fhf2	<i>Formosa haliotis</i>	ヒバマタ	100	
Mef2	<i>Muricauda eckloniae</i>	ヒバマタ、カラフトコンブ	113	
FunA	<i>Wenyingzhuangia fucanilytica</i> CZ1127	ナマコ	48	168

## 4-2. 材料および実験方法

### 4-2-1. *Flavobacterium* sp. SW 由来第 2 のフコイダナーゼ遺伝子の探索

ソフトウェア in silico MolecularCloning を用いて、SW 株のドラフトゲノム DNA 情報から、GH107 に属するフコイダナーゼ遺伝子(*mffcnA* [65], *fda1* [85], *fda2* [85], *ffa2* [86], *P5AfcnA* [87]) および GH168 に属するフコイダナーゼ遺伝子 (*funA* [66]) を表 4-1 から選択し、これらをもとに *swfct* とは異なる第 2 のフコイダナーゼ遺伝子の探索を行った。

### 4-2-2. プライマーの設計

フコイダナーゼ遺伝子を検索した結果、後述するように (4-3-1 を参照) 5 つの相同性の高い遺伝子が見いだされた。そのうち、*swfcn2* と名付けた遺伝子のみ、クローニング、および発現検討、活性評価を行った。*Swfcn2* のシグナル配列を SignalP により検索し、推定のシグナル配列を排除したタンパク質をコードする *swfcn2* を pET-21a ベクターに組み込むため、表 4-2 に示すように *Nde* I, *Sal* I 認識配列を持たせてプライマーを設計した。PCR 増幅の際の変性反応、伸長反応の温度および反応時間は、98 °C で 1 分間加熱後、30 サイクル (98 °C で 10 秒間、55 °C で 5 秒間、および 72 °C で 2 分 45 秒) で行った。得られた PCR 産物を QIAquick PCR Purification kit を用いて精製した。

表 4-2. *swfcn2* 増幅用のプライマー配列

Forward primer	GGCCAGCATATGGAAGCACAATATATATGGTAT <i>Nde</i> I 認識部位
Reverse primer	GGCCGCGTCGACTTCTTTTACAAATTTAAAAAGA <i>Sal</i> I 認識部位



#### 4-2-3. DNA 実験、組み換え大腸菌による酵素タンパク質の生産検討、酵素精製

DNA を扱う実験方法、すなわち、形質転換、プラスミド単離、制限酵素消化、ライゲーションに関する実験方法ならびに、大腸菌による酵素タンパク質の生産検討に関する実験は第 3 章に記載した方法と同じである。

#### 4-2-4. ゲルろ過 HPLC を用いた *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/swfcn2 C.F.E. の酵素活性検討

目的酵素遺伝子の発現が確認できた *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/swfcn2 C.F.E. に終濃度 2% のオキナワモズクフコイダン、3-2-1 で得た脱アセチル化オキナワモズクフコイダン、ならびにアカモクフコイダン、ヒバマタフコイダン、ワカメフコイダン、オオウキモフコイダン、ナマコフコイダン、ガゴメコンブフコイダンの 8 種類のフコイダンをそれぞれ基質とし、100 mM Tris-HCl (pH 8.0) を含む全量 100  $\mu$ L の酵素反応液を用いて、30°C、一晩酵素反応を行った。そして、80°C、5 min 熱処理後、遠心分離 (13,000 rpm, 10 min) を行い、2-2-3 の方法に従いゲルろ過 HPLC による分析を行った。

#### 4-2-5. Carbohydrate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (C-PAGE) による Swfcn2 の酵素化学的性質の検討

フコイダナーゼにおける定量的な酵素化学的性質の検討方法として一般的なのは第 3 章記載の Somogyi-Nelson 法であるが、Swfcn2 の場合ではフコイダンと反応させても還元末端の遊離が見られなかった。また、リアーゼ活性の可能性を想定し、酵素反応液を 232 nm の波長で吸光度測定を行ったが、酵素の有無による変化は見られなかった (結果は記載しない)。そこで、C-PAGE [93] と呼ばれる方法で Swfcn2 のフコイダン分解を定性的に確認した。

C-PAGE は、硫酸基を側鎖として持つことで負に帯電したフコイダンのような酸性多糖を、pH 中性下において分子量に依存した移動度の差を利用した分析方法である。C-PAGE では、

通常の SDS-PAGE とはゲルの組成が異なる。表 4-3, 4-4 に分離ゲル(30%)、濃縮ゲル (5.7%) を 1 枚作成する際の組成を示す。電気泳動後、アルシアンブルーでアニオン性の物質を染色すると、低分子化されたところにスメアが見られ活性を評価できる。レゾルマックス二連ミニスクラブ (ATTO, AE-6410) を用いてゲルを作製し、後に示す反応液を 4 倍希釈した酵素反応液 16  $\mu$ L に 50%スクロース溶液を 4  $\mu$ L 加えて混合し、ウェルにアプライした。200 V、約 2 h 電気泳動を行い、0.5%の Alcian blue を含む染色液で暗所にて 45 min 染色した。

表 4-3. C-PAGE 分離ゲル組成

50% Acrylamide+1% Piperazine diacrylamide	3.6	mL
10 mM EDTA+250 mM Tris-HCl (pH 8.7)	1.2	mL
1% Ammonium persulfate	0.3	mL
TEMED	0.015	mL
H <sub>2</sub> O	0.9	mL
Total	6	mL

表 4-4. C-PAGE 濃縮ゲル組成

50% Acrylamide+1% Piperazine diacrylamide	0.23	mL
10 mM EDTA+250 mM Tris-HCl (pH 8.7)	0.4	mL
1% Ammonium persulfate	0.1	mL
TEMED	0.015	mL
H <sub>2</sub> O	1.27	mL
Total	2	mL

#### 4-2-6. 酵素化学的諸性質の検討

温度、pH が酵素活性、安定性に及ぼす影響ならびに、金属イオン、阻害剤が活性に及ぼす影響を検討する際は、3-2-12 ~ 3-2-16 に準じた方法を用いた。ただし、基質としては、2%ガゴメコンブフコイダン、酵素としては 1.50 mg/mL の Swfcn2、緩衝液には 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を使用し、C-PAGE で酵素活性を評価した。また、至適温度、pH の検討の際は、ゲルろ過 HPLC でも評価した。

#### 4-2-7. 基質特異性の検討

起源の異なるフコイダンに対する Swfcn2 の活性を検討した。2%各種フコイダン、1.50 mg/mL Swfcn2、100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を含む全量 30  $\mu$ L の酵素反応液を用いて、40°C, 30 min インキュベートし酵素反応後、80°C, 5 min 熱処理を行った。その酵素反応液を用いて、C-PAGE により Swfcn2 の基質特異性を検討し、バンドが見られたものをゲルろ過 HPLC Column (TSKgel GMPW<sub>XL</sub>) にアプライし、分子量変化の確認を行った。

#### 4-2-8. Swfcn2 によるガゴメコンブフコイダン分解の経時変化

2%ガゴメコンブフコイダン、1.50 mg/mL Swfcn2、100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) の組成の全量 50  $\mu$ L の酵素反応液を、40°Cで 5, 30, 60, 120, 300 min および 24 h インキュベートし酵素反応後、80°C, 5 min 熱処理を行った。その酵素反応液を用いて、C-PAGE により Swfcn2 によるガゴメコンブフコイダン分解における経時変化の確認を行った。このとき、7 days 酵素反応させた反応液もアプライし、同時に比較した。

#### 4-2-9. Swfcn2 の基質分解限界

TSKgel GMPW<sub>XL</sub> の分画範囲は 1,000 ~ 8,000,000 Mw であるため、酵素反応液の分解産物の分子量を詳細に解析するには、分画範囲をより絞ったカラムで解析する必要があった。そこで、反応時間や酵素の添加量を変更することにより、Swfcn2 がガゴメコンブフコイダンおよびオオウキモフコイダンをどれだけ分解するかを、分画範囲 40,000 Mw 以下の HPLC Column TSKgel G3000PW<sub>XL</sub> により定性的に確かめた。2%ガゴメコンブフコイダンおよびオオウキモフコイダン、100 mM リン酸 buffer (pH 7.5) を含む反応液に、1 日毎に Swfct (3.74 mg/mL) を添加し、7 日目には Swfct の最終濃度が 14.8 mg/mL となるよう酵素反応を行った。図 2-1、2-2 の検量線を使用して各ピークにおける分解産物の分子量を測定した。

#### 4-2-10. Swfct、Swfcn2 を両方添加した場合の基質分解

SW 株で見いだされたフコイダナーゼ Swfct および Swfcn2 を同時添加することによって基質分解がさらに促進され、より低分子化が見られるのではないかと考え、2%ガゴメコンブフコイダン、オオウキモフコイダンあるいは脱アセチル化オキナワモズクフコイダンに、4.5 mg/mL Swfct または 5.2 mg/mL Swfcn2 またはその両方を添加し、100 mM リン酸 buffer (pH 7.5) を含む全量 100  $\mu$ L で酵素反応を行った。また、H18 株あるいは SW 株の C.F.E.を用いた酵素反応も実施した。それぞれの C.F.E.は、2-2-2 に示したオキナワモズクフコイダンを単一炭素源とした培地で培養した菌体から調製した。酵素液を 40°C, 30 min インキュベートし酵素反応後、80°C, 5 min 熱処理を行った。その酵素反応液を用いて、基質の分解をゲルろ過 HPLC により分析を行った。

## 4-3. 結果

### 4-3-1. *Flavobacterium* sp. SW 由来第 2 のフコイダナーゼ遺伝子について

4-2-1 に記載した既知の 5 種類のフコイダナーゼ遺伝子のアミノ酸配列に対して、SW 株のゲノム DNA 情報から相同性探索を行った結果、MfFcnA, P5AFcnA, FunA のアミノ酸配列をもとに探索したものについて、相同性の高い ORF が 5 つ見つかった。MfFcnA のアミノ酸配列をもとに見つかったものを *swfcn1*、P5AFcnA のアミノ酸配列をもとに見つかったものを *swfcn2*、FunA のアミノ酸配列をもとに見つかったものを *swfun1*, *swfun2*, *swfun3* と命名し、クローニングと異種発現を行った。各遺伝子産物の特徴を表 4-5 に示す。

しかし、*swfcn1*, *swfun2*, *swfun3* はクローニングを行うことができず、*swfun1* はタンパク質の生産は確認されたが、酵素活性が見られなかったため、本論文においては目的タンパク質の生産および酵素活性が確認された *Swfcn2* に焦点を置いた。図 4-1 に *Swfcn2* のアミノ酸配列を示し、基になった P5AFcnA と *Swfcn2* のアミノ酸配列を比較したものを図 4-2 に示した。

表 4-5. SW 株中のフコイダナーゼ候補遺伝子産物の情報

候補遺伝子	GH family	Molecular weight (kDa)	Homology with MfFcnA, P5AFcnA or FunA (%)
<i>swfcn1</i>	107	88	76
<i>swfcn2</i>	107	69	53
<i>swfun1</i>	168	45	72
<i>swfun2</i>	168	44	57
<i>swfun3</i>	168	42	32

```

MEAQYIWYENSSNTANIVFNSATRGTFTTNVSNPETS GINTNA
TVSKFVRDGGQTSPTIQFTLPKPITNLSSYTISLKAYTSIKTTDLN
TQNSRIRVYFRNSTIGASSNIYKQLNFSAGETWESFSFNFDGT
VIPSDVALAGGYNQIMIGFASGDTTGLTSTYYIDTISGSTIQLVA
NAAF LSGSWGVRFNLPGGYYLDNESSSNWVAGVQQIVDNLP
AVGHVMTNFTHPAHGYYT LRDNPYVDVASEIHPAMVPSLEN
EKIILDIINVLKNSGKKVILYINGGGPSNIQGSSDATEAAITVAWK
NYCDTKFGGDQALGWRTLARGYFERFKGLADGYWVDNLSTL
NAAEVAPFIAMIREVDPNVAIATNLDKSYLVDSNGNQIKVDSGD
INDPPTDYNVFFLEANDPYMDFTAGHPTPLGQGAPPNSWAY
EEFTFPLITQNPWSSYNGSKQTLKHYFIPIREQWSVARAALVF
EVEQAYRFVRTFTDVGATLTWSTTITGGAITPDEMTIMKEINNR
MLQSPKPNYIPYARPEGAYLVGETLSVKSNIILENILLFPNPV
KQSFQLSRDIDSGIYSLTGQKILEFNSNQVSYDVSLVDGIYV
LKTISSNGQGHLFKFVKE

```

図 4-1. Swfcn2 のアミノ酸配列

FcnA	1	-----MLISVTVLVGGSSSDEV--	18
Swfcn2	1	MEAQYIWYENSSNTANIVFNSATRGTFTTNVSNPETS GINTNATVSKFVRDGGQTSPTIQF	60
FcnA	18	-----	18
Swfcn2	61	TLPKPITNLSSYTISLKAYTSIKTTDLNTQNSRIRVYFRNSTIGASSNIYKQLNFSAGET	120
FcnA	19	-----ESTNTTDSYNINNTEATGTEY--NASW	43
Swfcn2	121	WESFSFNFDGTVIPSDVALAGGYNQIMIGFASGDTTGLTSTYYIDTISGSTIQLVANAAF	180
FcnA	44	MAGTWGITQRVDGGYKLDNSADSSNWQAGAEIIVINIPAAEYVITSFTHPAHGHLFTLRT	103
Swfcn2	181	LSGSWGVRFNLPGGYYLDNES-SSNWVAGVQQIVDNLPVGHVMTNFTHPAHGYYT LRD	239
FcnA	104	NNNVDV-SAIHPDMVPTLENEKIILDVINIYRAAGKKVILYLN SAGPSMAEERGD TD---	159
Swfcn2	240	NPYVDVASEIHPAMVPSLENEKIILDIINVLKNSGKKVILYINGGGPSNIQGSSDATEAA	299
FcnA	160	IQAAWDEYYINEWDGDEAAWRNLARGYVERFDGLVDGYWLDNSRNL-PGEVSDFFVAMLR	218
Swfcn2	300	ITVAWKNYCDTKFGGDQALGWRTLARGYFERFKGLADGYWVDNLSTLNAAEVAPFIAMIR	359
FcnA	219	SWDPELTIAVNYDQHYFTDDNGEYLYVDS DGLDDEDES DYKIVKHVV TNEYMDFTNGHVT	278
Swfcn2	360	EVDPNVAIATNLDKSYLVDSNGNQIKVDS DGINDEDP TDYNVFFLEANDPYMDFTAGHPT	419
FcnA	279	PLGRGAPPNSWAYE EYTIIPDMIEVPWET YDGSKYALKHGWFP I RNSW S GSKAELMFDVEQ	338
Swfcn2	420	PLGQGAPPNSWAYE EFTFPLITQNPWSSYNGSKQTLKHYFIPIREQWSVARAALVFEVEQ	479
FcnA	339	AYRFVRTFTDGGAA MTWSTTQDNGYMTADEMSIMIEISNRMTQTPKPDYSVYBRPKGAYL	398
Swfcn2	480	AYRFVRTFTDVGATLTWSTTITGGAITPDEMTIMKEINNRMLQSPKPNYIPYARPEGAYL	539
FcnA	399	VSEI-----	402
Swfcn2	540	VGETLSVKSNIILENILLFPNPVKQSFQLSRDIDSGIYSLTGQKILEFNSNQVSYDVS	599
FcnA	403	-----E	403
Swfcn2	600	GLVDGIYVLKTISSNGQGHLFKFVKE	625

図 4-2. Swfcn2 と P5A FcnA のアミノ酸配列の比較

#### 4-3-2. *E. coli* BL21 (DE3)/pET-21a/swfcn2 の発現検討および酵素精製

*E. coli* BL21 (DE3) を用いて *swfcn2* の発現を検討した結果、20°Cで培養することによって *E. coli* BL21 (DE3)/pET-21a/*swfcn2* の可溶性画分に Swfcn2 と同じ分子量 (約 69 kDa) を有するタンパク質が著量生産されていることが確認された (図 4-3, レーン 2)。また、1 L の培養液から調製した C.F.E. を His-trap により酵素精製した結果、100 mM ~ 200 mM イミダゾールを含む buffer で目的タンパク質が溶出したため、これらの画分 55 mL を集めて脱塩・濃縮操作を行った。その結果、図 4-3 のレーン 3 に示すような精製酵素を 2 mL 調製でき、タンパク質濃度は 5.53 mg/ml であった。

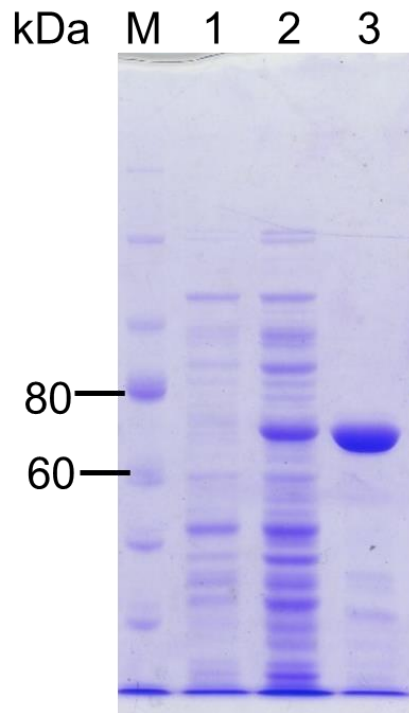


図 4-3. 精製後 Swfcn2 の SDS-PAGE 結果

M: サイズマーカー

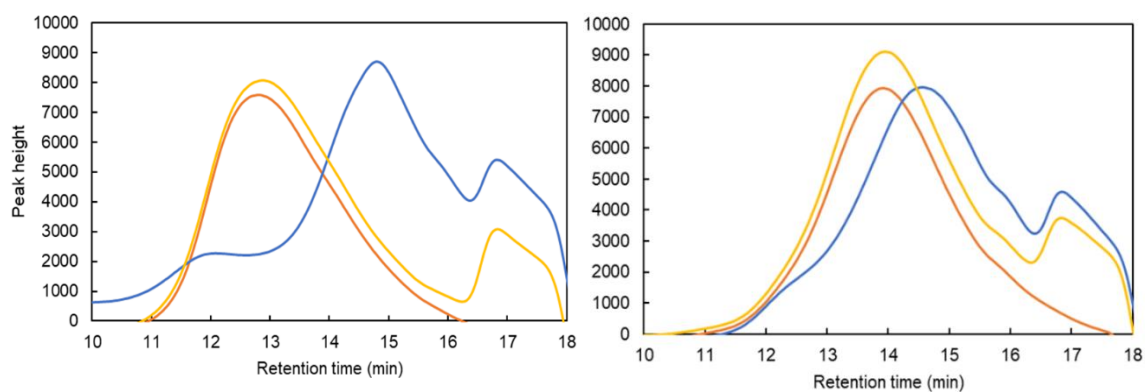
1: *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a C.F.E. (7.4  $\mu$ g)

2: *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*swfcn2* C.F.E. (20  $\mu$ g)

3: 精製後の Swfcn2 (5.5  $\mu$ g)

### 4-3-3. ゲルろ過 HPLC による *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/swf<sub>cn</sub>2 C.F.E. の酵素活性測定

目的酵素遺伝子の発現が確認できた *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a I/swf<sub>cn</sub>2 C.F.E.を用いて 4-2-4 で示した 8 種類のコイダンを基質とした酵素反応を行った。その結果、Swf<sub>cn</sub>2 はガゴメコンブコイダンを基質にした場合は明らかな低分子化が確認でき、オオウキモコイダンに対しても低分子活性が認められたが (図 4-4)、それ以外のコイダンに対しては低分子化活性が認められなかった (図 4-5)。なお、黄色のパターンは 4-3-1 で述べた、目的タンパク質の発現が確認されたが酵素活性は見られなかった Swf<sub>un</sub>1 を酵素として用いた結果であり、Swf<sub>cn</sub>2 との比較のため同時に示した。また、酵素活性を定量的に評価するために第 3 章で述べた Somogyi-Nelson 法による還元末端遊離量の測定を試みたが、HPLC で低分子化が見られた反応液でも還元末端の生成は認められなかった。そこで、酵素化学的性質を調べる際、酵素活性を評価する方法として既知のコイダナーゼで活性評価に用いられている [86] C-PAGE を行うことにした。



ガゴメコンブコイダン

オオウキモコイダン

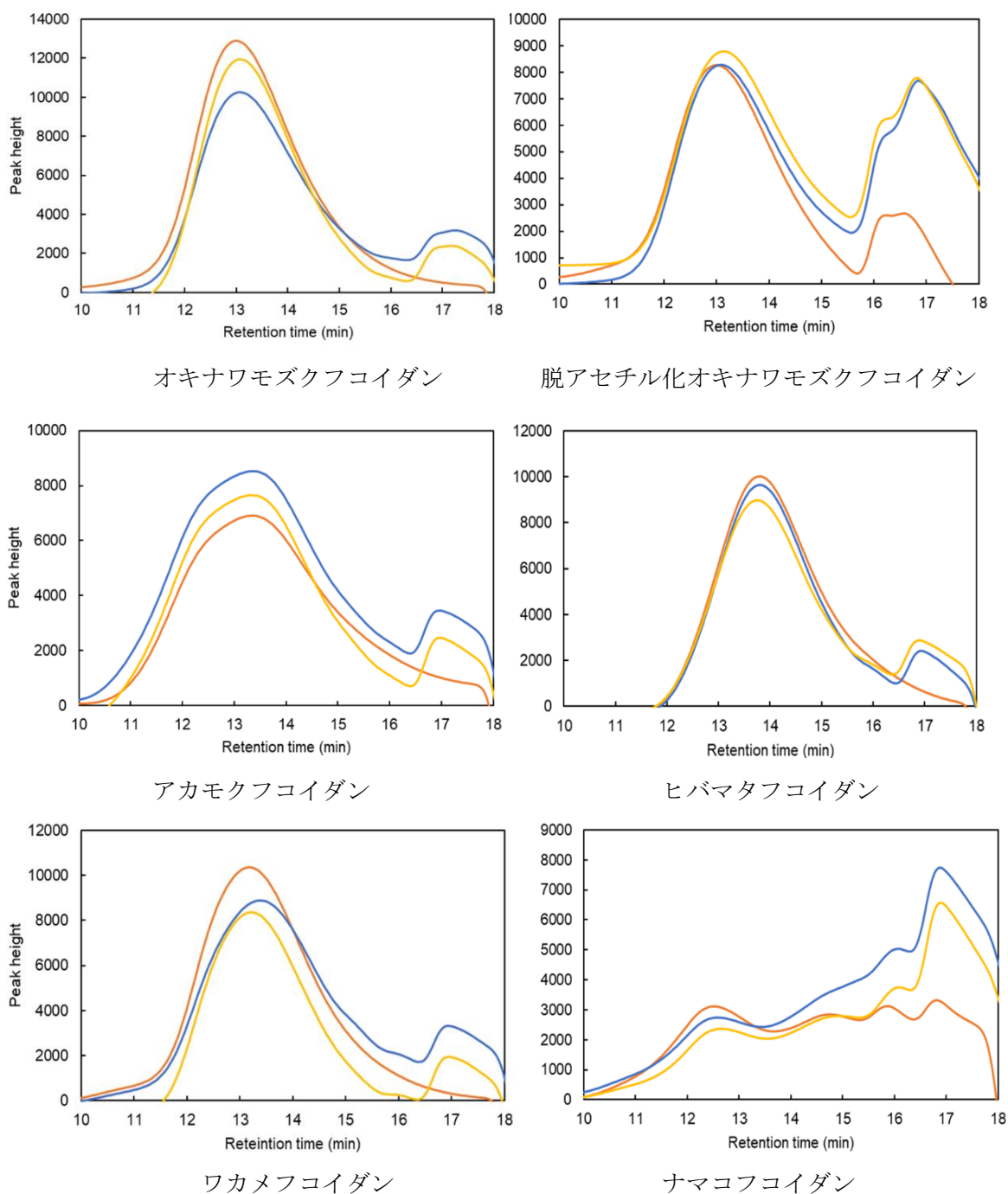
青 : *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/swf<sub>cn</sub>2 C.F.E. + 各基質

黄 : *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/swf<sub>un</sub>1 C.F.E. + 各基質

橙 : 各基質のみ

図 4-4. *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/swf<sub>cn</sub>2 由来 C.F.E.を用い、ガゴメコンブコイダンまたはオオウキモコイダンを基質とした酵素反応後の HPLC 結果





青 : *E.coli* BL21(DE3)/pET-21a/swf $cn$ 2 C.F.E. + 各基質

黄 : *E.coli* BL21(DE3)/pET-21a/swf $un$ 1 C.F.E. + 各基質

橙 : 各基質のみ

図 4-5. その他フコイダンを基質とした *E.coli* BL21(DE3)/pET-21a/swf $cn$ 2 由来 C.F.E.を用いた酵素反応後の HPLC 結果

#### 4-3-4. 至適温度の検討

以降、精製酵素を用いて酵素化学的性質について検討を加えた。各温度で酵素反応後、C-PAGE およびゲルろ過 HPLC により Swfcn2 の至適温度を検討した。この結果より、Swfcn2 の至適温度は 45~50°C であることが分かった (図 4-6、図 4-7)

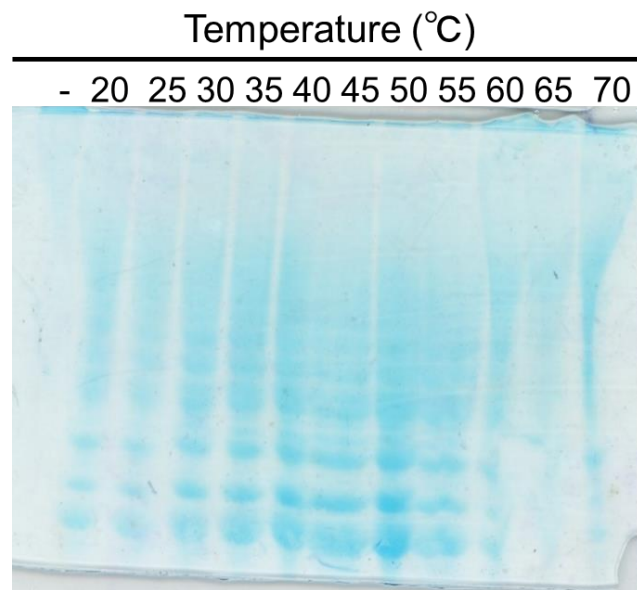


図 4-6. Swfcn2 の至適温度(※-は酵素無添加)

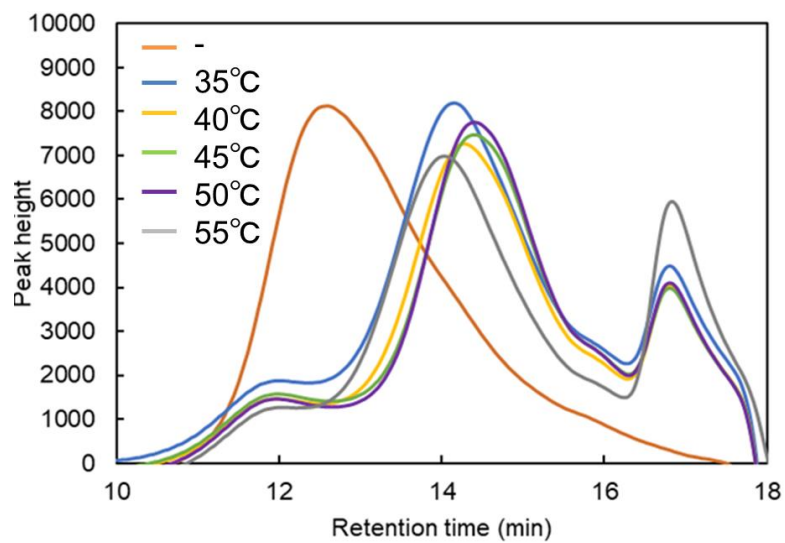


図 4-7. Swfcn2 の各温度における酵素反応後の HPLC 結果

#### 4-3-5. 熱安定性の検討

各温度で酵素を 30 分間プレインキュベート後、酵素反応を行い、C-PAGE により Swfcn2 の熱安定性を検討した。結果、Swfcn2 は 40°Cまで安定であることが分かった (図 4-8)。

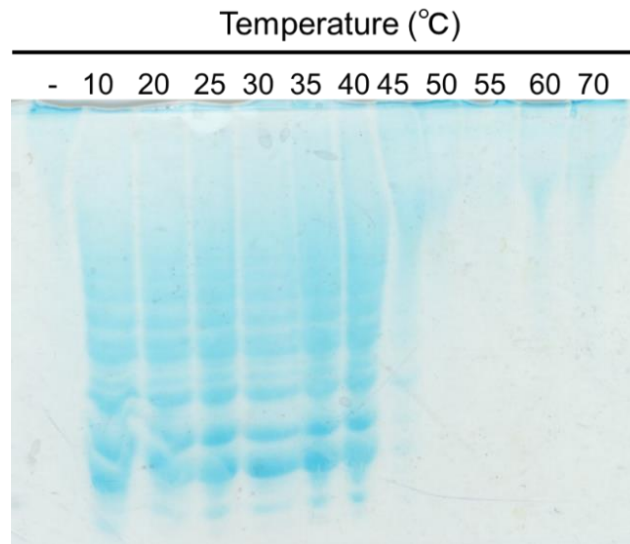


図 4-8. Swfcn2 の熱安定性

#### 4-3-6. 至適 pH の検討

各 pH で酵素反応後、C-PAGE およびゲルろ過 HPLC により Swfcn2 の至適 pH を検討した。この結果より、Swfcn2 の至適 pH は pH 6.0 であることが分かった (図 4-9、図 4-10)。

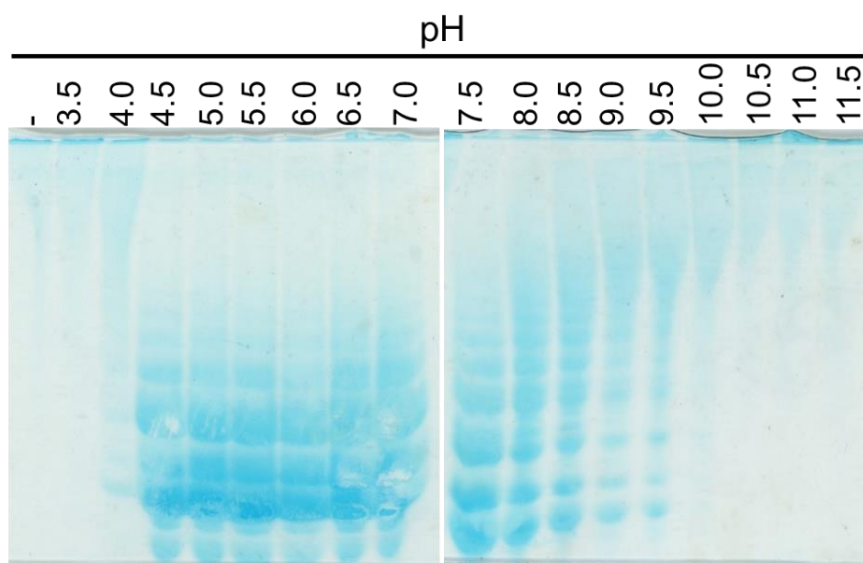


図 4-9.-Swfcn2 の至適 pH

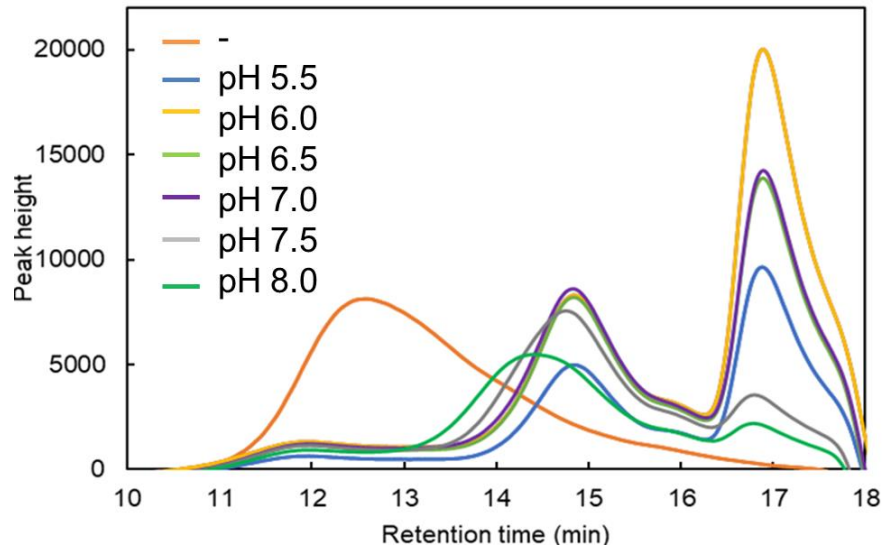


図 4-10. Swfcn2 の各 pH 下における酵素反応後の HPLC 結果

#### 4-3-7. pH 安定性の検討

各 pH で 30 分間酵素をプレインキュベート後、酵素反応を行い、C-PAGE により Swfcn2 の pH 安定性を検討した。この結果、Swfcn2 は pH 5.5 ~ 9.5 で安定であることが分かった (図 4-11)。

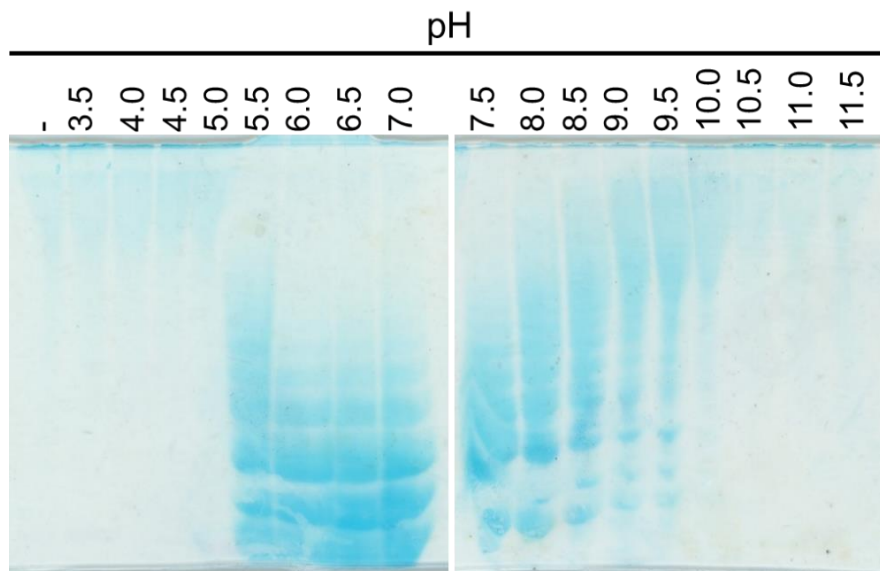


図 4-11. Swfcn2 の pH 安定性

#### 4-3-8. 金属イオンが活性の及ぼす影響

酵素反応液に 1 mM 各金属イオンを添加して酵素反応後、C-PAGE により Swfcn2 の金属イオンによる影響を検討した。この結果、Swfcn2 は  $Zn^{2+}$  で活性阻害が見られた (図 4-12)。

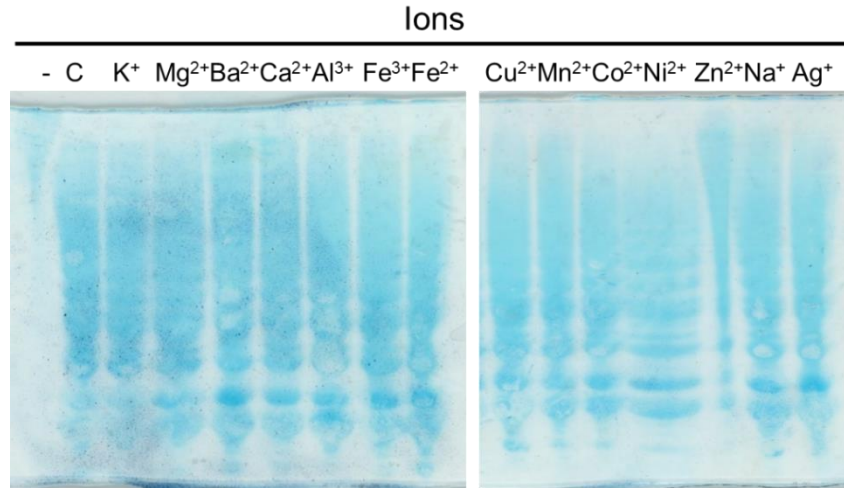


図 4-12. 金属イオンが Swfcn2 に及ぼす影響 (C : Control)

#### 4-3-9. 阻害剤・キレート剤が活性に及ぼす影響

酵素反応液に 1 mM の各阻害剤を添加して酵素反応を行い、C-PAGE により Swfcn2 の阻害剤・キレート剤による影響を検討した。この結果より、Swfcn2 は阻害剤・キレート剤の影響を受けないことが分かった (図 4-13)。

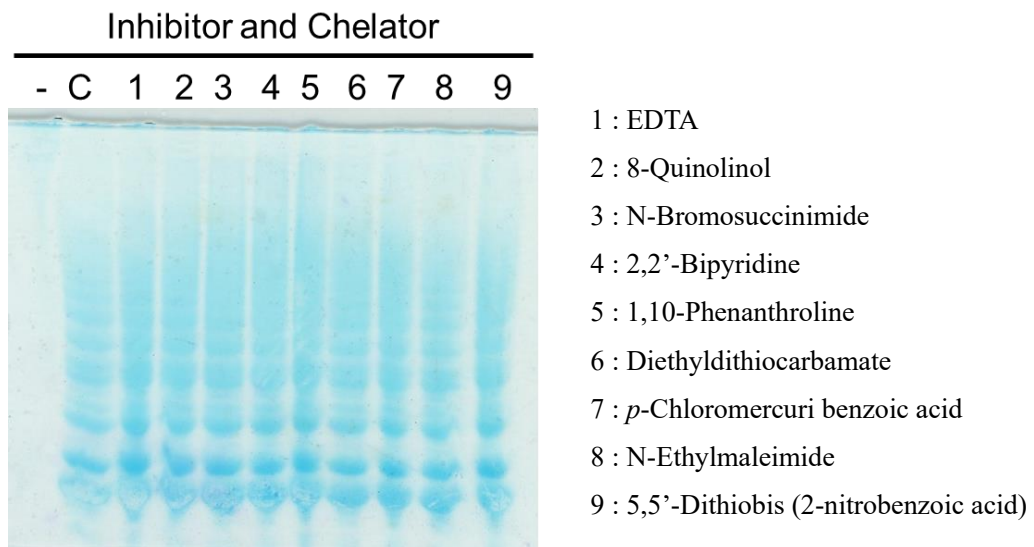


図 4-13. 阻害剤・キレート剤が Swfcn2 の活性に及ぼす影響

#### 4-3-10. 基質特異性の検討

起源の異なるフコイダンやフコイダン以外の多糖を用いて酵素反応を行い、C-PAGE により Swfcn2 の基質特異性を検討した。その結果より、Swfcn2 はガゴメコンブフコイダンだけでなく、4-3-3 の結果と同様、オオウキモフコイダンに対しても低分子化活性を有していることが分かった (図 4-14)。そこで、活性が見られた 2 つのサンプルをゲルろ過 HPLC にアプライすると、酵素反応前後のピークの移動量から、*E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/swfcn2 C.F.E. を用いた酵素反応 (図 4-4) と同様、Swfcn2 はガゴメコンブフコイダンに対してより特異的に働くことがわかった (図 4-15)。

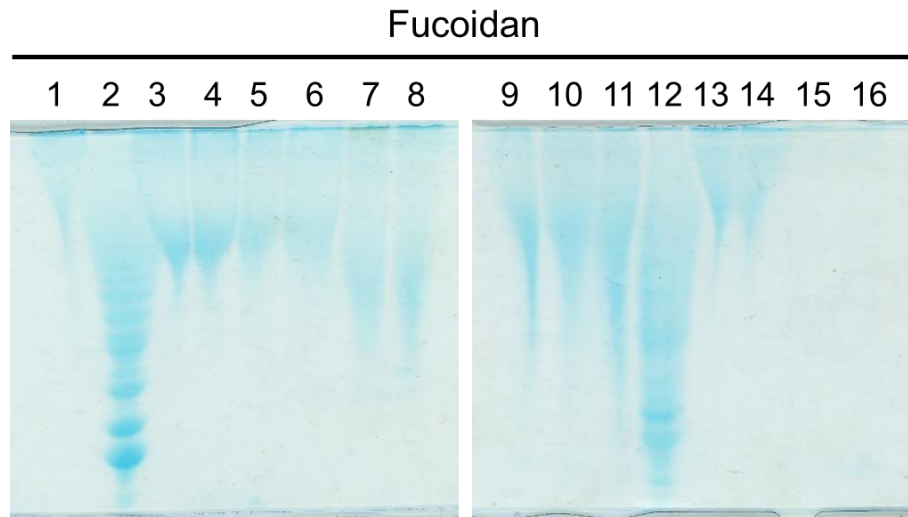
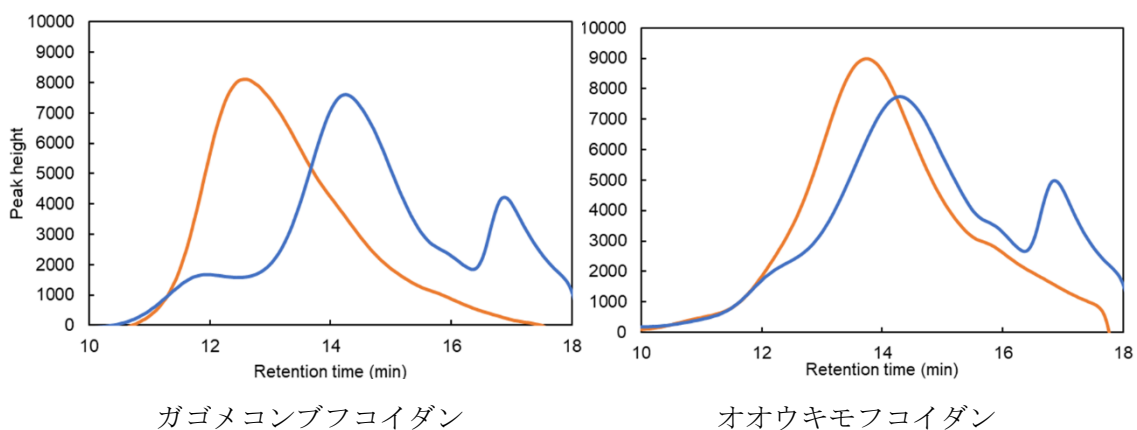


図 4-14. 各種フコイダンに対する Swfcn2 の低分子化活性

- |                                |                         |
|--------------------------------|-------------------------|
| 1: ガゴメコンブフコイダン                 | 9: ヒバマタフコイダン            |
| 2: ガゴメコンブフコイダン + Swfcn2        | 10: ヒバマタフコイダン + Swfcn2  |
| 3: オキナワモズクフコイダン                | 11: オオウキモフコイダン          |
| 4: オキナワモズクフコイダン + Swfcn2       | 12: オオウキモフコイダン + Swfcn2 |
| 5: 脱アセチル化オキナワモズクフコイダン          | 13: ワカメフコイダン            |
| 6: 脱アセチル化オキナワモズクフコイダン + Swfcn2 | 14: ワカメフコイダン + Swfcn2   |
| 7: アカモクフコイダン                   | 15: ナマコフコイダン            |
| 8: アカモクフコイダン + Swfcn2          | 16: ナマコフコイダン + Swfcn2   |





青：各フコイダン + Swfcn2

橙：各フコイダンのみ

図 4-15. ガゴメコンブフコイダンまたはオオウキモフコイダンを基質として Swfcn2 を用いた酵素反応後の HPLC チャート結果

#### 4-3-11. Swfcn2 によるガゴメコンブフコイダン分解の経時変化

ガゴメコンブフコイダンの Swfcn2 による酵素反応経時変化を C-PAGE により評価したところ、反応時間が長いほど低分子化が進行していることが分かった (図 4-16)。

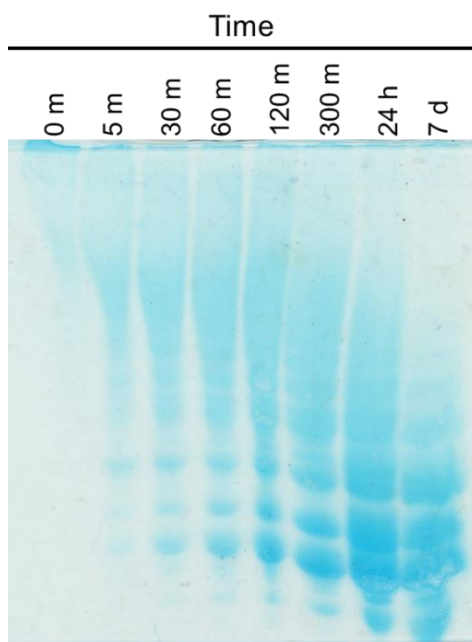
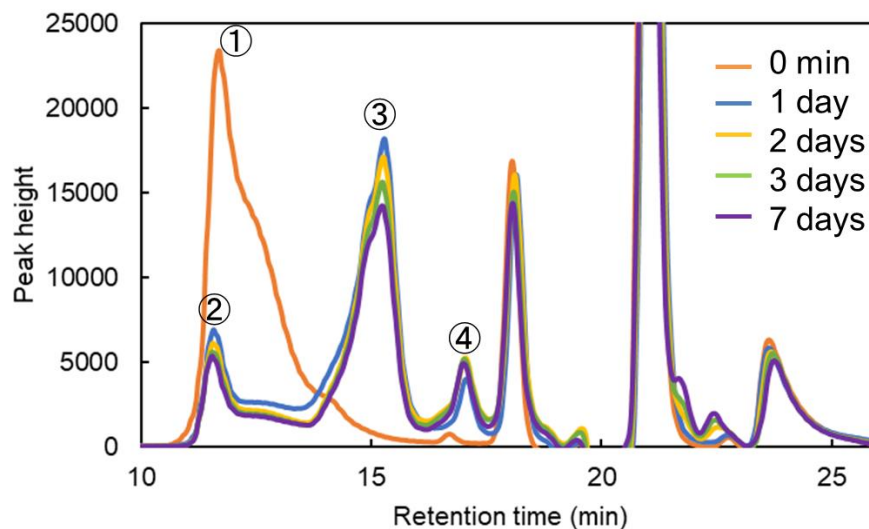


図 4-16. Swfcn2 によるガゴメコンブフコイダン分解の経時変化

#### 4-3-12. Swfcn2 による基質分解限界

酵素の過剰量添加や長時間反応を行ったところ、ガゴメコンブフコイダンおよびオオウキモフコイダンのどちらも低分子化パターンに変化は見られなかった (図 4-17、図 4-18)。また、各ピークに番号をつけ、図 2-2 の TSKgel G3000PW<sub>XL</sub> の検量線をもとに低分子化物の分子量を算出した結果、Swfcn2 はガゴメコンブフコイダンを低分子化し、分子量約 4,800、1,400 に相当する分解産物が生成していることが分かった (図 4-17)。このとき、酵素無添加のピーク①より酵素反応後のピーク②の分子量が高くなっているのは、分画範囲外を測定しているためズレが生じているのだと考えられる。

Swfcn2 はオオウキモフコイダンにおいても低分子化反応を示し、高分子量の物質も残存するものの、分子量約 13,000、5,000、1,500 に相当する分解産物が生じることが明らかになった (図 4-18)。

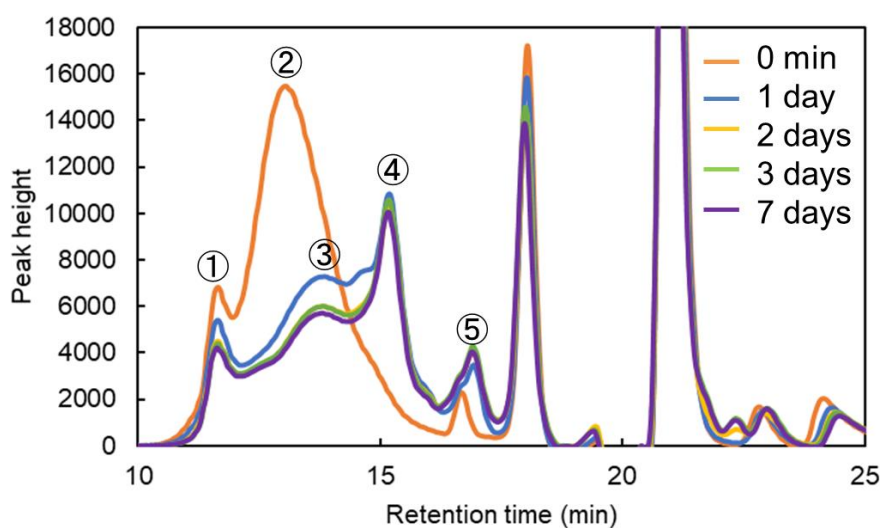


【各ピークの分子量】 ①54,000 (分画範囲外) ②59,000 (分画範囲外) ③4,800 ④1,400

図 4-17. 反応時間・酵素量を変えた場合の TSKgel G3000PW<sub>XL</sub> を用いた Swfcn2 による

ガゴメコンブフコイダンの低分子化パターン分析





【各ピークの分子量】 ①55,000 (分画範囲外) ②21,000 ③13,000 ④5,000 ⑤1,500

図 4-18. 反応時間・酵素量を変えた場合の TSKgel G3000PW<sub>XL</sub> を用いた Swfcn2 によるオオウキモフコイダンの低分子化パターンの分析

#### 4-3-13. Swfct、Swfcn2 を両方添加した場合の基質分解

基質に Swfct, Swfcn2 を両方添加したときの基質分解と、SW 株あるいは H18 株 C.F.E.による基質分解の HPLC 分析の結果を比較したところ、ガゴメコンブフコイダンでは Swfct, Swfcn2 を両方添加しても分解物に相当するピークのリテンションタイムは約 15 分であり、基質分解が促進されることはなかった (図 4-19)。しかし、SW 株 C.F.E.を用いた際に生じる分解物に相当するピークに比べて Swfcn2 を添加したときの方が、ピークが若干右にシフトしており、分解促進されていることが分かった (図 4-19)。オオウキモフコイダンを基質にした場合は、SW 株 C.F.E.と Swfcn2 の間で低分子化度合いに違いはあまり見られなかった (図 4-20)。また、Swfct が分解可能な脱アセチル化オキナワモズクフコイダンを基質にした場合では Swfcn2 を添加しても基質分解が促進されることはなかった (図 4-21)。なお、第 2 章でも言及したが、SW 株と H18 株の C.F.E.によるフコイダンの分解を比較すると、図 4-19、4-20 が示すように、明らかに H18 株 C.F.E.による分解活性の方が高いことがわかる。

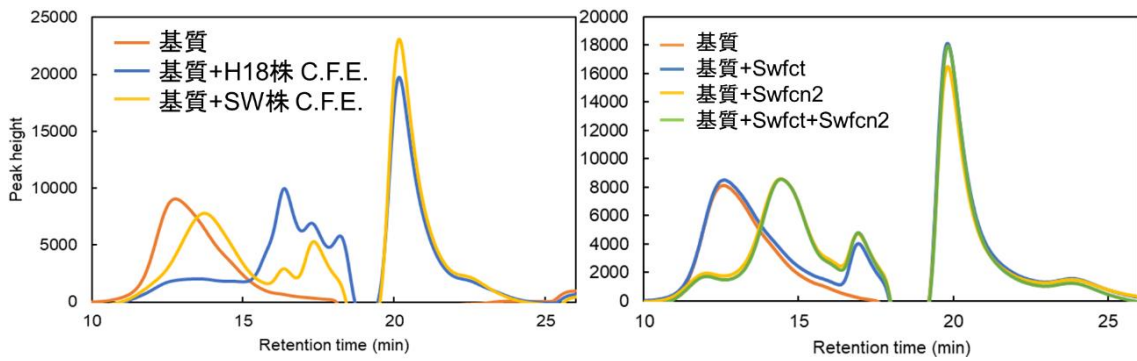


図 4-19. ガゴメコンブフコイダンを基質として SW 株由来 C.F.E.または Swfct, Swfcn2 を用いた酵素反応後の HPLC 結果

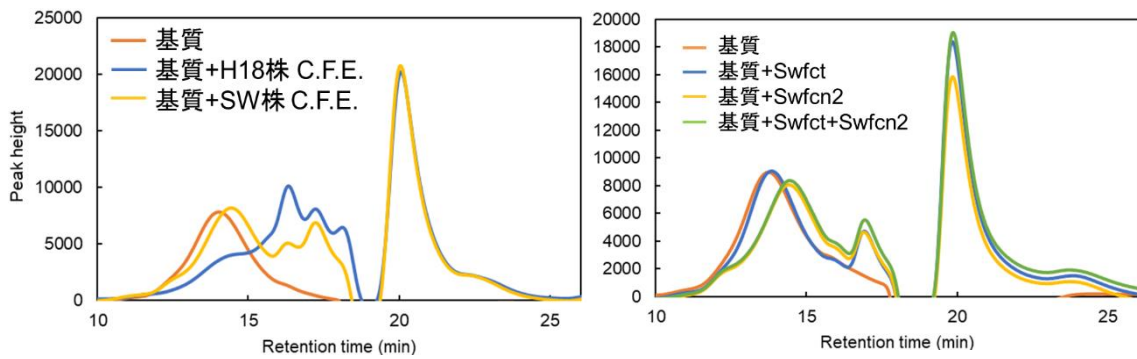


図 4-20. オオウキモフコイダンを基質として SW 株由来 C.F.E.または Swfct, Swfcn2 を用いた酵素反応後の HPLC 結果

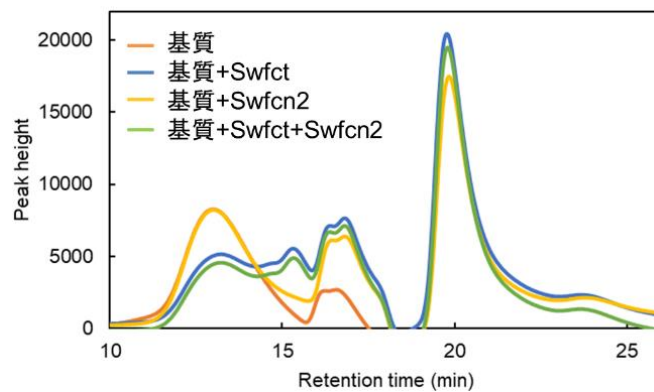


図 4-21. 脱アセチル化フコイダンを基質として Swfct, Swfcn2 を用いた酵素反応後の HPLC 結果

#### 4-4. 考察

本章では、既に明らかにしている *Flavobacterium* sp. SW のドラフトゲノム情報をもとに、既知のフコイダン分解酵素遺伝子が属している GH 107 から相同性の高い酵素遺伝子を選択し、新たなフコイダナーゼ遺伝子 *swfcn2* を見出した。*L. algae* H18 由来フコイダン低分子化酵素 Fct114 [67] および第 3 章記載の SW 株由来フコイダン低分子化酵素 Swfct はオキナワモズクフコイダンを基質として分解を行うが、Swfcn2 はガゴメコンブフコイダンを分解することがわかった。また、Fct114 と Swfct はオキナワモズクフコイダン以外のフコイダンをほとんど分解することはできないが、Swfcn2 はガゴメコンブフコイダンだけでなくオオウキモフコイダンも分解することが可能であった。一方、Swfcn2 と相同性の高いフコイダナーゼ P5AFcnA [87] も、ガゴメコンブフコイダンとオオウキモフコイダンを分解する。これらフコイダンはいずれも、 $\alpha$ -1,3 結合でフコース残基が結合しており、分解活性を有する酵素も GH 107 ファミリー特有の 225 位のアスパラギン酸および 293 位のヒスチジンを共通領域として持ち合わせている。また、SW 株はオキナワモズクフコイダンを単一炭素源とした場合、図 2-5 に示したように、オキナワモズク以外に、ガゴメコンブをはじめとする他のフコイダン分解酵素も生産することから、*swfcn2* と *swfct* はオキナワモズクフコイダンにより同時に発現していると推察される。2 章考察でも言及したが、これら酵素遺伝子の発現機能の解明が必要と思われる。

Swfcn2 は、酵素反応の進行に伴う還元末端の遊離が見られず、Fct114 や Swfct と異なる反応様式が考えられる。GH 107 ファミリーに属する酵素の活性測定は、分光光度計による方法 [68] や電気泳動法 [50,86] により定性的に評価され、還元末端の遊離は測定されていない。この違いは、基質として使用されるフコイダンの化学構造が分離源の海藻によって異なることに起因している、もしくは、Fct114 と Swfct は endo 型ではなく、むしろ exo 型に基質を切断しているため多量の還元末端が遊離されているのではないかと推察される。

## 第5章 *Luteolibacter algae* H18 由来第2のフコイダナーゼの特性解明

### 5-1. 緒言

第3章において、*Flavobacterium* sp. SW のドラフトゲノム情報から *L. algae* H18 由来オキナワモズクフコイダン低分子化酵素 Fct114 [67] と相同性の高いフコイダナーゼ遺伝子 *swfct* を見出し、オキナワモズクフコイダンに対して特異的な分解活性を示すことを明らかにした。また、第4章においては、GH 107 ファミリーに属する P5AFcnA と相同性の高いフコイダナーゼ遺伝子 *swfcn2* を SW 株から見出し、*Swfcn2* はガゴメコンブフコイダンおよびオオウキモフコイダンに対する分解活性を有することを示した。このことから、海洋性のフコイダン分解菌には、主鎖に対して特異性が異なる酵素が複数種存在していることが示唆され、Sichert ら [77] が、“1つの菌株がフコイダン分解のために多くの酵素が関与している”と述べていることに対するの信憑性も伺える。一方、第2章の結果から、*L. algae* H18 および *Flavobacterium* sp. SW 間での培養特性ならびに粗酵素による海洋多糖に対する分解様式を比較すると、両者の間で大きく異なることが明らかとなった。特に、オキナワモズクフコイダンを炭素源として培養し、得られた粗酵素では、H18 株の方が SW 株に比べて分解活性が強く、多種類のフコイダンを分解することが可能であった。このことから、H18 株はオキナワモズクフコイダンを炭素源として培養することによって、種類の異なるフコイダン低分子化酵素遺伝子が発現されることが強く示唆された。

本章では、第4章でのアプローチを *L. algae* H18 に対しても実施し、ドラフトゲノム情報から GH 107 または GH 168 ファミリーから相同性の高い遺伝子を選択し、Fct114 とは異なるフコイダナーゼ遺伝子の解明を行った。

## 5-2. 材料および実験方法

### 5-2-1. *L. alga* H18 由来第 2 のフコイダナーゼ遺伝子の探索

ソフトウェア in silico MolecularCloning を用いて、H18 株のドラフトゲノム DNA 情報から、4-2-1 に記載した GH107 および GH168 に属するフコイダナーゼ遺伝子をもとに、H18 株由来フコイダナーゼ遺伝子 *fmt114* [67] とは異なる第 2 のフコイダナーゼ遺伝子の探索を行い、見出された目的候補酵素遺伝子を *h18fdal* と名付けた。

### 5-2-2. プライマーの設計

H18fdal のシグナル配列を SignalP により検索し、推定シグナル配列を排除したタンパク質をコードする *h18fdal* を pET-21a ベクターに組み込むため、表 5-1 に示すように *Bam*H I, *Hind* III 認識配列を持たせてプライマーを設計した。PCR 増幅の際の変性反応、伸長反応の温度および反応時間は、98 °C で 1 分間加熱後、30 サイクル (98 °C で 10 秒間、60 °C で 5 秒間、および 72 °C で 3 分 50 秒) で行った。得られた PCR 産物を QIAquick PCR Purification kit を用いて精製した。

表 5-1. *h18fdal* 増幅用のプライマー配列

Forward primer	ATAGGATCCATGTCCGAAAATGGGGCATC <i>Bam</i> H I 認識部位
Reverse primer	GCGAAGCTTGGGTTTGATTGCGATGGTGATC <i>Hind</i> III 認識部位

### 5-2-3. DNA 実験、組み換え大腸菌による酵素タンパク質の生産検討、酵素精製

DNA を扱う実験方法、すなわち、形質転換、プラスミド単離、制限酵素消化、ライゲーションに関する実験方法ならびに、大腸菌による酵素タンパク質の生産検討に関する実験は第 3 章に記載した方法と同じである。

#### 5-2-4. *h18fda1* の C 末端領域を欠損させた *h18fda2* のクローニング

H18fda1 と GH107 に属するフコイダナーゼ Fda1 [85] とのアライメントをとった結果、H18fda1 の N 末端から 533 番目 (Arg) までのアミノ酸配列が、Fda1 のもつ GH107 に特徴的なドメインと相関性が高いことが明らかとなった。図 5-1 に Fda1 と H18fda1 のドメインを模式化した図を示す。なお、Fda1 のラミニン G ドメインは低分子化活性には不要であるとされている。そこで H18fda1 の N 末端から 533 番目までをコードする DNA 配列を *h18fda2* と命名し、クローニングを行った。表 5-2 にプライマー設計を示し、PCR 増幅の際の変性反応、伸長反応の温度および反応時間は、98 °C で 1 分間加熱後、30 サイクル (98 °C で 10 秒間、60 °C で 5 秒間、および 72 °C で 1 分 40 秒) で行った。

表 5-2. *h18fda2* 増幅用のプライマー配列

Forward primer	ATAGGATCCATGTCCGGAAAATGGGGCATC <i>Bam</i> HI 認識部位
Reverse primer	GCGAAGCTTCCGGTCCGTCACAAACCG <i>Hind</i> III 認識部位

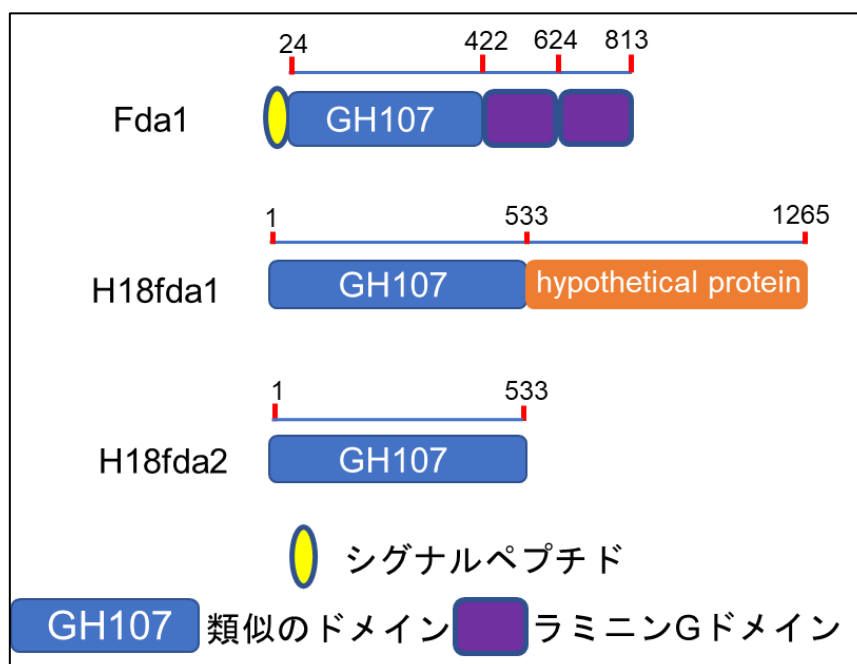


図 5-1. Fda1 と H18fda1 のドメイン模式図

#### 5-2-5. ゲルろ過 HPLC を用いた *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*h18fda1* および *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*h18fda2* C.F.E. の酵素活性検討

目的酵素遺伝子の発現が確認できた *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*h18fda1* および *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*h18fda2* C.F.E. に終濃度 2% のオキナワモズクフコイダン、アカモクフコイダン、ヒバマタフコイダン、ワカメフコイダン、オオウキモフコイダン、ナマコフコイダン、ガゴメコンブフコイダンの 7 種類のフコイダンをそれぞれ基質とし、100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を含む全量 100  $\mu$ L の酵素反応液を用いて、30°C、一晩酵素反応を行った。そして、80°C、5 min 熱処理後、遠心分離 (12,000 rpm, 10 min) を行い、2-2-6 の方法に従いゲルろ過 HPLC による測定を行った。

#### 5-2-6. C-PAGE を用いた H18fda1、H18fda2 の酵素化学的性質の検討

温度、pH が酵素活性、安定性に及ぼす影響ならびに、金属イオン、阻害剤が活性に及ぼす影響を検討する際は、4-2-6 に準じた方法を用いた。ただし、基質としては 2% ガゴメコンブフコイダン、酵素としては 0.2 mg/mL の H18fda1, H18fda2、緩衝液には 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を使用し、C-PAGE で酵素活性を評価した。

#### 5-2-7. 基質特異性の検討

起源の異なるフコイダンあるいは海洋性多糖に対する H18fda1, H18fda2 の活性を検討した。フコイダンは 2%、海洋性多糖の場合は 1%、0.09 mg/mL H18fda1, H18fda2、50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を含む全量 30  $\mu$ L の酵素反応液を用いて、30°C、60 min インキュベートし酵素反応後、80°C、5 min 熱処理を行った。その酵素反応液を用いて、C-PAGE により両酵素の基質特異性を検討した。

#### 5-2-8. H18fda1、H18fda2 によるガゴメコンブフコイダン分解の経時変化

2%ガゴメコンブフコイダン、0.2 mg/mL H18fda1, H18fda2、50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) の組成の全量 50  $\mu$ L の酵素反応液を、30°Cで 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 min および 24 h インキュベートし酵素反応後、80°C, 5 min 熱処理を行った。その酵素反応液を用いて、C-PAGE により H18fda1, H18fda2 によるガゴメコンブフコイダン分解における経時変化の確認を行った。

#### 5-2-9. H18fda1, Swfcn2 を両方添加した場合の基質分解

第4章で見出された *Flavobacterium* sp. SW 由来フコイダナーゼ Swfcn2 および、本章で見出された *L. algae* H18 由来フコイダナーゼ H18fda1 はガゴメコンブフコイダンとオオウキモフコイダンを分解することが明らかになった。そこで、ガゴメコンブフコイダンまたはオオウキモフコイダンに Swfcn2 および H18fda1 の酵素両方を添加することで、基質のさらなる分解促進が行われ、2-3-3 に示す H18 株または SW 株の C.F.E. を添加したような挙動が見られるのか検証を行った。

2%のガゴメコンブフコイダンまたはオオウキモフコイダン、0.6 mg/mL H18fda1 および Swfcn2、100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を含む全量 100  $\mu$ L の酵素反応液を用いて、30°C、一晚インキュベートし酵素反応後、80°C, 5 min 熱処理を行った。その酵素反応液を用いて、基質の分解をゲルろ過 HPLC により分析を行った。また、ガゴメコンブフコイダン酵素反応液は TSKgel G3000PW<sub>XL</sub> を使用してさらなる低分子化活性評価を行った。



## 5-3. 結果

### 5-3-1. *L. algae* H18 由来の第 2 のフコイダナーゼ遺伝子 *h18fda1* について

4-2-1 に記載した既知の 5 種類のフコイダナーゼ遺伝子のアミノ酸配列に対して、H18 株のゲノム DNA 情報から相同性探索を行った結果、Fda1, FunA のアミノ酸配列をもとに探索したものについて、相同性の高い ORF が 3 つ見つかった。Fda1 のアミノ酸配列をもとに見つかったものは *h18fda1*、FunA のアミノ酸配列をもとに見つかったものは *h18fun1*, *h18fun2* と命名し、クローニングと異種発現を行った。各遺伝子産物の特徴を表 5-3 に示す。

しかし、*h18fun1*, *h18fun2* はタンパク質の生産は確認されたが、酵素活性が見られなかったため、本論文においては目的タンパク質の生産および酵素活性が確認された *h18fda1* に焦点を置いた。図 5-2 に H18fda1 のアミノ酸配列を示し、Fda1 と H18fda1 のアミノ酸配列を比較したものを図 5-3 に示した。また、5-2-4 で行った、*h18fda1* の C 末端領域を欠損させた *h18fda2* のアミノ酸配列を図 5-4 に示し、Fda1 と H18fda2 のアミノ酸配列を比較したものを図 5-5 に示した。

表 5-3. H18 株中のフコイダナーゼ候補遺伝子産物の情報

候補遺伝子	GH family	Molecular weight (kDa)	Homology with Fda1 or FunA (%)
<i>h18fda1</i>	107	131	44
<i>h18fun1</i>	168	40	37
<i>h18fun2</i>	168	42	30

```

MSGKWGIGWRFNADNKTEIANWNVANTVAQVKAIPGVTVYLF
NLSDAAHGDAYIAPHSVLTAITPAATPNNDRLDFLEMATAFQAE
GIKVIAYVATQGPAMLKHGAEKAFDSVEVSPGWVTSQAMDNW
EAYVLSEYGNTTVETYKQAFAEVIIDEYAARYGLIDGWVFDHS
GLGNIPLLDHDTVTAHNPNVVI AFNQGQKIPLTNNNPDYEDYTFG
HPTPVANAPASTQQNLPMLTSIEATPDGFFDDAGRKSLGHMFM
PMGETWNSGAIWWTVAQADWQERCLKAGGAWTWNVVDVAP
SSSSLRADTVAFMNDVIAEMAQPNTAPAFSLSNIAAGGVTMNT
AYSGSLAGLATDADAHTLSFTKATGPDWLVNADDGTLSGTPDN
FAVGMNRFLIVVSDGHGDDIDLAELIYVQNDLGTGKAYLKL PFS
DLRPNLSAGSIYGLGLSDPNVSMVAADGNDVMSLSISNQNF
DGIGGSNDTLSWDVVRVKGYSGGSYTLNGNNSAAQLGASVPV
GMIDNEFGVSGTDLRFVDDRESIRYSVENVVLTDAVATAQFD
GFDGLWATAGSYVLGTGPGGLESKTLAANGELSLSAATVLTLS
TGKERLRDLGDFTIYPNNAPYFVASSIQVNGTEGIAFSDTLAN
LAAAATDPDGDPLTYSKAAGPAWLTAVAGDGLSGTPGAADVGL
NTFTIRVEDPSDATDSL VVKVSVDPSTPPAAPTGLSALANISKV
DLWSDNSEDLDSYTVYRSTTSGSGYSAIASGLSSSDYTDTS
VTNHTVYYYYVTASNIHDKESAMSNEVSARPGFVASVADSEVA
VLGVSVGAFANMNASDNTYQTITEVVNGGTSALEHKWVFNVA
SAELATFYVEAFRSANAEGDDMVFAYSTDGVNYTDMVTVTKTA
DDDQAQYFALPSGTS GTVYVRLMDANRVGGNTQLDSV SIDQLL
IIAEESTVAPSI AAPSADTATNVEVNALLSWTAGHQSGSHDV
YFGTTPSPAFQGNQSGTSFNPGLVLAGNTTYVAVDEVNNSGT
TTGNLWSFTTADTTPGFVASGGISSGSGTITPALPAGLASGDILL
LFVETANQAVSISNPNNGGTWAEVSGSPQGTGTAAASSSTRLTA
FWSRYNGTQGNPTVSDSGDHQIARMI AIRGAAASGNPWNVTA
GGIESSPDTSASIPGVTTTVPNTLVVAVAGSLPDANGTANFSG
WSNPNTGLTERTDDTRNPGNGGALGIATGKATAGATGNTAA
THASSAVKGMITIAIKP

```

図 5-2. H18fda1 のアミノ酸配列

```

Fda1      1 MRIRNVCRSVLLGLMSLNTYAEETADWCGVNGTSMRI PGGDINYSGSHVFEVNRRAAEFCISATPGKRWQINLNCASGCRFTEVTEVPAIPLSAPNSINDLYDP 110
H18fda1  1 -----MSGKWGIGWRFNADN-----KTEIANNVANTVAQVKAIPGVTVYLFNLSDAAHGDAYIAPHSVLTAITPAATPNNDRLDFLEMATAFQAE 71

Fda1     111 TLPGRDLPEQIADAFKRSITVFAHHTQGGPMLKHGAEKAFDSVDDSDTCKRSKPLVLDLDTQVYCSANMNRFDVLEQCFSSSLYRSFELMVNVTETLSLRYGST 219
H18fda1  72 ---DRDLPEQIADAFKRSITVFAHHTQGGPMLKHGAEKAFDS-----VEVSPGWVTSQAMDNWVFAADGNDVMSLSISNQNFDEYARRYGL 163

Fda1     220 IDGWVFDHSGGSDSELLHAAALASNDAAVAFNCGDRWPLVNNPETLDDVTFGHPTPIGSEVSSDDKNLPMLESIEATDGLTGSDDVGSVGHMFMPCESWNSGTVW 329
H18fda1  164 IDGWVFDHSGGSDSELLHAAALASNDAAVAFNCGDRWPLVNNPETLDDVTFGHPTPIGSEVSSDDKNLPMLESIEATDGLTGSDDVGSVGHMFMPCESWNSGTVW 271

Fda1     330 FSEKRGSDWLNRLKAGGAGRW-----ALSCDSN----- 358
H18fda1  272 WTVVQADWQERCLKAGGAGRWVNDVAPSSSLRADTVAFMNDVIAEMAQPNTAPAFSLSNIAAGGVTMNTAYSGSLAGLATADAHTLSFTKATGPDWLVNADDGTL 381

Fda1     359 -----DLGSGSARI-----ISEPCVRLM-----EMSFNLSKLLHMNLDGSDGTAYDDSVNQC 408
H18fda1  382 TPDNFVGMNRFLIVVSDGHGDDIDLAELIYVQNDLGTGKAYLKL PFSDLRPNLSAGSIYGLGLSDPNVSMVAADGNDVMSLSISNQNFDPGIGSNDTLSWDVVRV 491

Fda1     409 TA---LVNGAN-----FVDDVTRSKVASFTDDQ-----ELDNYCGI-----SGG-NARPTMAWIKRSCSKGDIIDWG 468
H18fda1  492 SGGSYDENGNSAAQLGASVFGMIDNEFGVSGTDLRFVDD---RESIRYSVENVVLTDAVATAQFDGFDGLWATAGSYVLGTGPGGLESKTLAANGELSLSAATV 598

Fda1     469 NNTPSERRWRLVQGRKLIK-----GP-----NNGSTTLANDQWHHIAVVASNVVAVN---I 520
H18fda1  599 TSTKRR---LRDLOGGFTIYFNNAPEYFVASSIQVNGTEGIAFSDTLANLAAAATDPDGDPLTYSKAAGPAWLTAVAGDGLSGTPGAADVGLNTFTIRV 706

Fda1     521 KVIYD-----SVLETAV-----NNASTTPTD---TGGNIQIGSAA---TGLIDKVLVHDRALDESEIEFYVNSN-----ADLDLAVLDDVREESANSTKV 604
H18fda1  707 KIVSDPSTPPAAPPLSALANISKVLDLWSDNSEDLDSYTVYRSTTSGSGYSAIASGLSSSDYTDTSVTNHTVYYYYVTASNIHDKESAMSNEVSARPGFVASVADSE 816

Fda1     605 TD-NRIYERHGTNRGA-----ITVFTAEKNSNYSLDGVD-----SDFD---NLRDSDIYEHETVMTDNRSRSGV-----SGVNG----- 674
H18fda1  817 AVLGSVSGAFANMNASDNTYQTITEVVNGGTSALEHKWVFNVASAELATFYVEAFRSANAEGDDMVFAYSTDGVNYTDMVTVTKTADDDQAQYFALPSGTS 926

Fda1     675 -----RFF-----RTVMAIHK-----DFEGGAVHDC-----WV-----KNSVDEEQ 706
H18fda1  927 ANRVGGNTQLDSV SIDQLLIIAEESTVAPSI AAPSADTATNVEVNALLSWTAGHQSGSHDVYFGTTPSPAFQGNQSGTSFNPGLVLAGNTTYVAVDEVNNSG 1036

Fda1     707 YEVRKNGALRLDITGGIRGTTIS-----NDGEWHHIA-----VVSEDEQLANT--- 751
H18fda1  1037 WFTTADTTPFGVAVSGGSSSGTITPALPAGLASGDILLLFVETANQAVSISNPNNGGTWAEVSGSPQGTGTAAASSSTRITAFWSRYNGTQGNPTVSDS 1146

Fda1     752 -----KLYVDGLETATSSSQATIDKTLN-----GDSRWVYIGSFTVG-----EMDDFIIHQRALRQFEVNSAGL 814
H18fda1  1147 IRGAAASGNPWNVTAGSIESSPDTSASIPGVTTTVPNTLVVAVAGSLPDANGTANFSGWSNPNTGLTERTDDTRNPGNGGALGIATGKATAGATGNTAA 1256

Fda1     814 ----- 814
H18fda1  1257 GMITIAIKP 1265

```

図 5-3. H18fda1 と Fda1 のアミノ酸配列の比較

```

MSGKWGIGWRFNADNKTEIANWNVANTVAQVKAIPGVT
YVLFNLSDAAHGDAYIAPHSVLTAITPAATPNNDRDLFLEM
ATAFQAEGIKVIAYVATQGPAMLKHGAEKAFDSVEVSPGV
WTSQAMDNWEAYVLSEYGNTTVETYKQAFAEVIIDEYAA
RYGTLIDGWWFDHSGLGNIPLLDHDTVTAHNPVVI AFNQ
GQKIPLTNNNPDYEDYTFGHPTPVANAPASTQQNLPLMT
SIEATPDGFFDDAGRKSLGHMFMPMGETWNSGAIWTV
AQAADWQERCLKAGGAWTWNVDVAPSSSSLRADTVAF
MNDVIAEMAQPNTAPAFSLSNIAGGTVTMNTAYSGSLAGL
ATDADAHTLSFTKATGPDWLVNADDGTLSTGTPDNFAVGM
NRFLIVVSDGHGDIDLAELEIYVQNDLGTGKAYLKL PFSDL
RPNLSAGSIYGLGLSDPNVSMVAADGNDAVMSLSISNQ
NFDGIGGSNDTLSWDVVRVKGYSGGSYTLNGNNSAAQLG
ASVPVGMIDNEFGVSGTDLRFVDDR

```

図 5-4. H18fda2 のアミノ酸配列

```

tFda1B 1 MKIRNVCRAVLLGLMSLNTYAETKADWMOGNGWGISYRIPGGDINYSGSHVAEYNVRAAVEQISAIPGLKVVQINLENGA 80
H18fda2 1 -----MSGKWGIGWRFNADN-----KTEIANWNVANTVAQVKAIPGVTYVLFNLSDAA 48

tFda1B 81 SGDRFIWPEVTEVEPAINPLSAPNSINDLYDPTLPGRDLFEQLALAFKAKGIRVWAYIATQGPMLKHGAENSMOEDDSITD 160
H18fda2 49 HGDAYIAPHSVLTAITPAATENN-----DRDLFLEMATAFQAEGIRVVIAYVATQGPMLKHGAEKAFDS----- 112

tFda1B 161 CKSSKPLVTDLDTQVYCSANMNRWDYVLECYPSFSLYRSFELAMVN-IVETLSLRYGSTIDGWWFDHSGEGDSELLHAA 239
H18fda2 113 -----VEVSPGVWTSQAMDNWEAYVLSEYGNTTV-ETYKQAFAEVIIDEYAAARYGTLIDGWWFDHSGGLGNIPLLDHDT 183

tFda1B 240 ALASNNDAAVAFNEGDKWPLVNNPETLDDYTFGHPTPIGSEVSSDDKNLPLMTSIEATLDGILTGSDDVGSVGHMFMPPL 319
H18fda2 184 VTAHNPVVI AFNQGQKIPLTNNNPDYEDYTFGHPTPVANAPASTQQNLPLMTSIEATPDGFFDDAGRK--SLGHMFMPM 261

tFda1B 320 QESWNSGTVWFSEAKGSDWLNRLKAGGATW----- 351
H18fda2 262 GETWNSGAIWTVVAQAADWQERCLKAGGAWTWNVDVAPSSSSLRADTVAFMNDVIAEMAQPNTAPAFSLSNIAGGTVTMN 341

tFda1B 352 -----ALSQDSN-----DELGEGG 365
H18fda2 342 TAYSGSLAGLATA DADAHTLSFTKATGPDWLVNADDGTLSTGTPDNFAVGMNRFLIVVSDGHGDIDLAELEIYVQNDLGTGK 421

tFda1B 366 ARL-----ISEPQVRML-----ERMSFNIGKQLHMNLGSDGDTAIDDSVNOYTA---TUNGA 415
H18fda2 422 AYELKLPFSDLRPNLSAGSIYGLGLSDPNVSMVAADGNDAVMSLSISNQNFDGIGGSNDTLSWDVVRVKGYSGGSYTLNGN 501

tFda1B 416 N-----FVDDVTR 423
H18fda2 502 NSAAQLGASVPVGMIDNEFGVSGTDLRFVDD--R 533

```

図 5-5. H18fda2 と Fda1 のアミノ酸配列の比較

### 5-3-2. *E. coli* BL21 (DE3)/pET-21a/*h18fda1*, *E. coli* BL21 (DE3)/pET-21a/*h18fda2* の 発現検討および酵素精製

*E. coli* BL21 (DE3) を用いて、pET ベクターに連結した *h18fda1*, *h18fda2* の発現を検討した結果、20°Cでの培養で *E. coli* BL21 (DE3)/pET-21a/*h18fda1*, *E. coli* BL21 (DE3)/pET-21a/*h18fda2* の可溶性画分に H18fda1 と同じ分子量 (約 131 kDa)、H18fda2 と同じ分子量 (約 56 kDa) を有するタンパク質が、少ないながら生産されていることが確認された (図 5-6)。1 L の培養液から調製した C.F.E. を His-trap により酵素精製した結果、50 mM ~ 200 mM イミダゾールを含む buffer で目的タンパク質が溶出したため、これらの画分を集めて脱塩・濃縮操作を行った。結果、図 5-6 に示すような精製酵素を 2 mL ずつ調製でき、精製できた H18fda1 および H18fda2 のタンパク質濃度はそれぞれ、0.61 mg/ml、0.58 mg/ml であった。

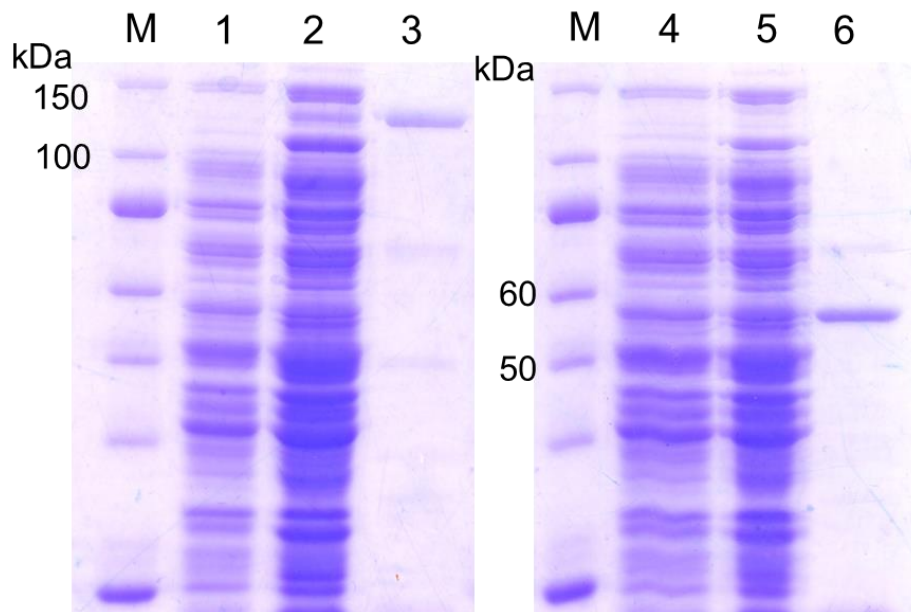


図 5-6. 精製後 H18fda1, H18fda2 の SDS-PAGE 結果

M: サイズマーカー

1: *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a C.F.E. (7.4  $\mu$ g)

2: *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*h18fda1* C.F.E. (18.2  $\mu$ g)

3: 精製後の H18fda1 (6.0  $\mu$ g)

4: *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a C.F.E. (7.4  $\mu$ g)

5: *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*h18fda2* C.F.E. (19.4  $\mu$ g)

6: 精製後の H18fda2 (2.5  $\mu$ g)

5-3-3. ゲルろ過 HPLC による *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/h18fda1, *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/h18fda2 C.F.E. の酵素活性測定

目的酵素遺伝子の発現が確認できた *E. coli* BL21 (DE3)/pET-21a/h18fda1, *E. coli* BL21 (DE3)/pET-21a/h18fda2 C.F.E.を用いて 5-2-5 で示した 7 種類のコイダンを基質とした酵素反応を行った。その結果、H18fda, H18fda2 はガゴメコンブコイダンを基質にした場合は明らかな低分子化が確認でき、オオウキモコイダンに対してもわずかに低分子活性が認められたが (図 5-7)、それ以外のコイダンに対しては低分子化活性が認められなかった (4-3-3 と同様のパターンのため活性が認められなかったデータは示さない)。

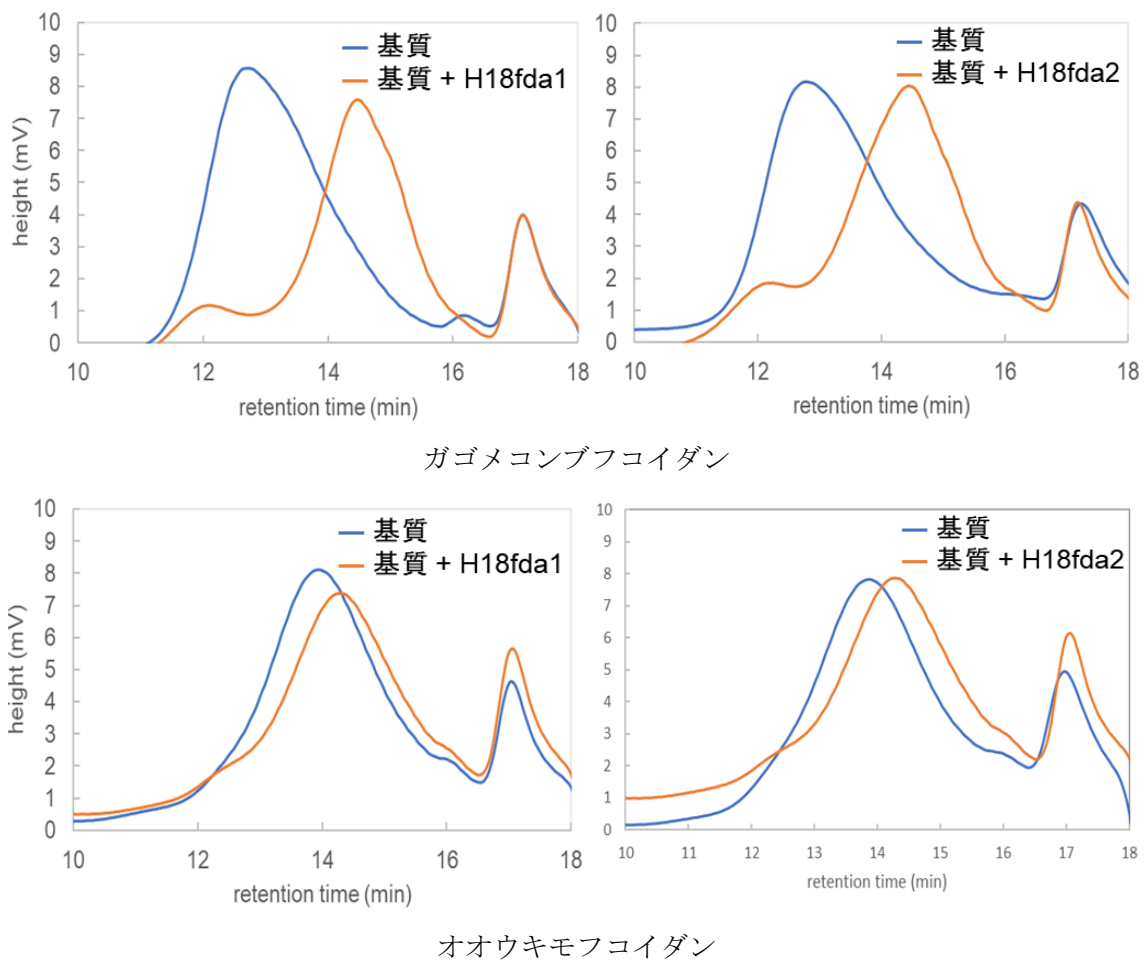


図 5-7. *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/h18fda1, *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/h18fda2 C.F.E.を用い、ガゴメコンブコイダンまたはオオウキモコイダンを基質とした酵素反応後の HPLC 結果



#### 5-3-4. 至適温度の検討

以降、H18fda1、H18fda2 の酵素化学的性質について、Swfcn2 同様、C-PAGE で評価した。各温度で酵素反応後、C-PAGE により H18fda1、H18fda2 の至適温度を検討した。この結果より、どちらも至適温度は 30~35°C であることが分かった (図 5-8)。

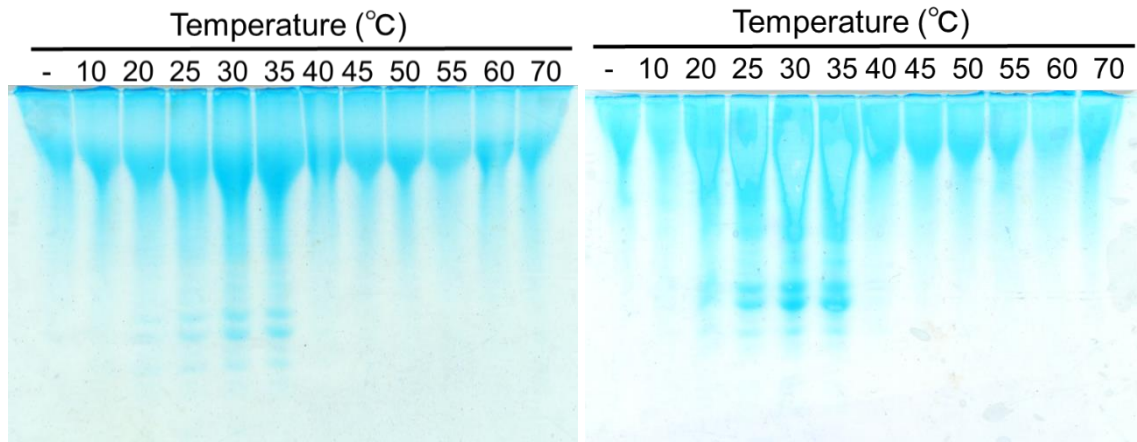


図 5-8. H18fda1 (図左)、H18fda2 (図右) の至適温度 (※-は酵素無添加)

#### 5-3-5. 熱安定性の検討

各温度で 30 分間酵素をプレインキュベート後、酵素反応を行い、C-PAGE により H18fda1、H18fda2 の熱安定性を検討した。この結果より、どちらも 35°C まで安定であることが分かった (図 5-9)。

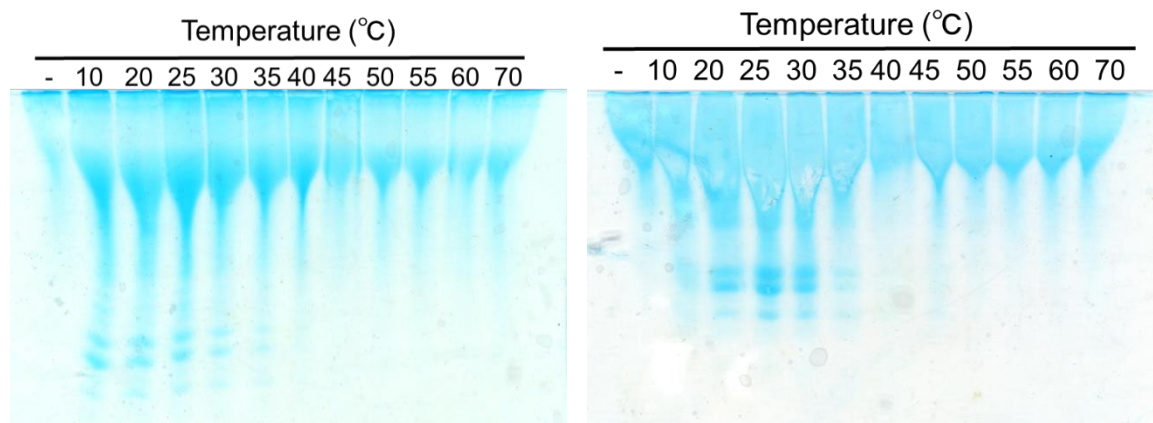


図 5-9. H18fda1 (図左)、H18fda2 (図右) の至適温度 (※-は酵素無添加)

### 5-3-6. 至適 pH の検討

各 pH で酵素反応後、C-PAGE により H18fda1, H18fda2 の至適 pH を検討した。この結果より、H18fda1 の至適 pH は pH 8.5、H18fda2 の至適 pH は pH 7.5 であることが分かった (図 5-10、5-11)。

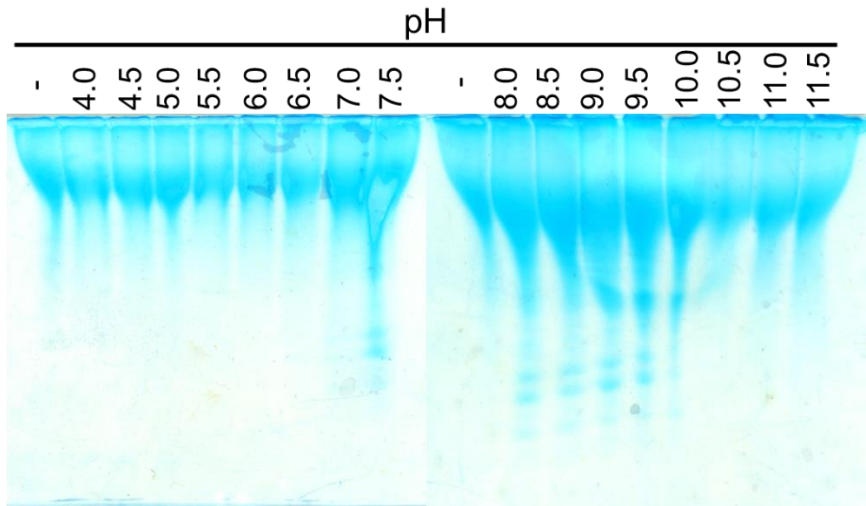


図 5-10. H18fda1 の至適 pH (※-は酵素無添加)

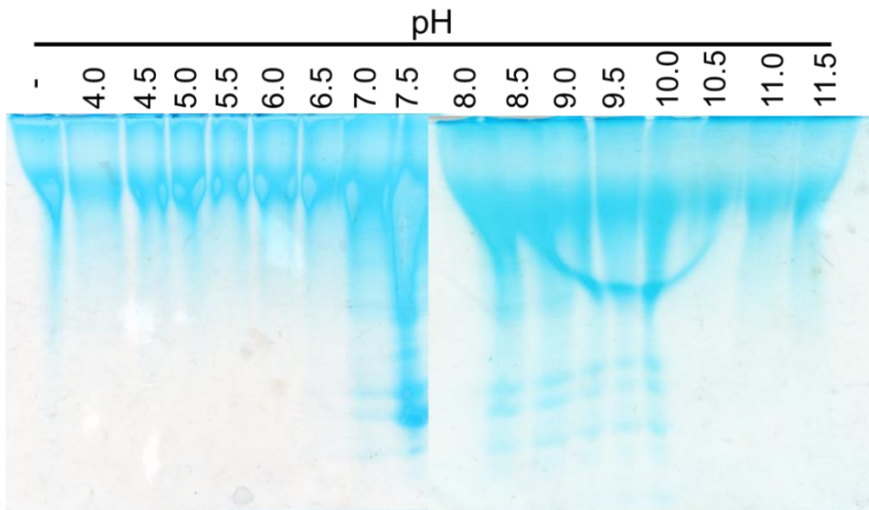


図 5-11. H18fda2 の至適 pH (※-は酵素無添加)

### 5-3-7. pH 安定性の検討

各 pH で 30 分間酵素をプレインキュベート後、酵素反応を行い、C-PAGE により H18fda1, H18fda2 の pH 安定性を検討した。この結果より、H18fda1 は pH 7.0 ~ 10.0 で安定であり、H18fda2 は pH 7.5 ~ 10.0 で安定であることが分かった (図 5-12、5-13)。

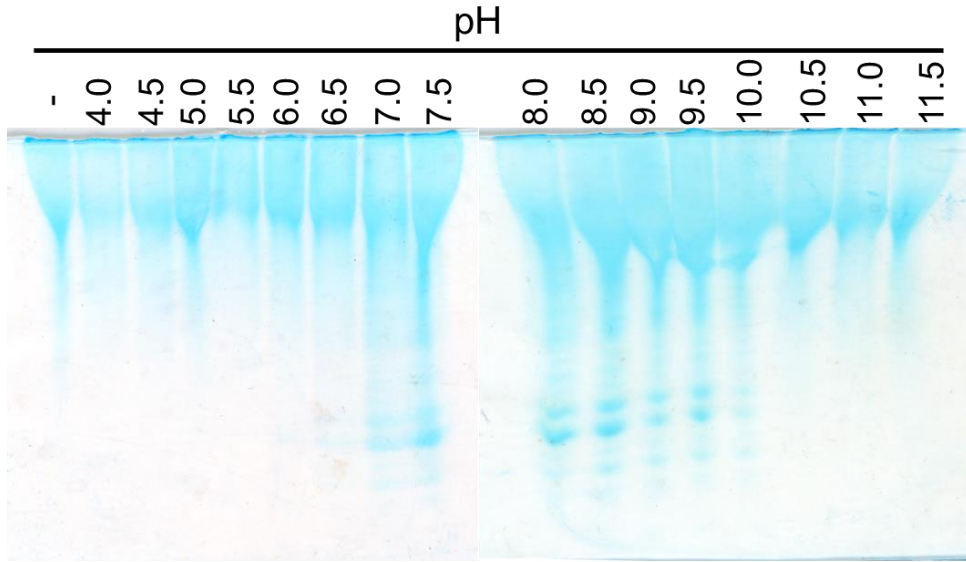


図 5-12. H18fda1 の pH 安定性 (\*-は酵素無添加)

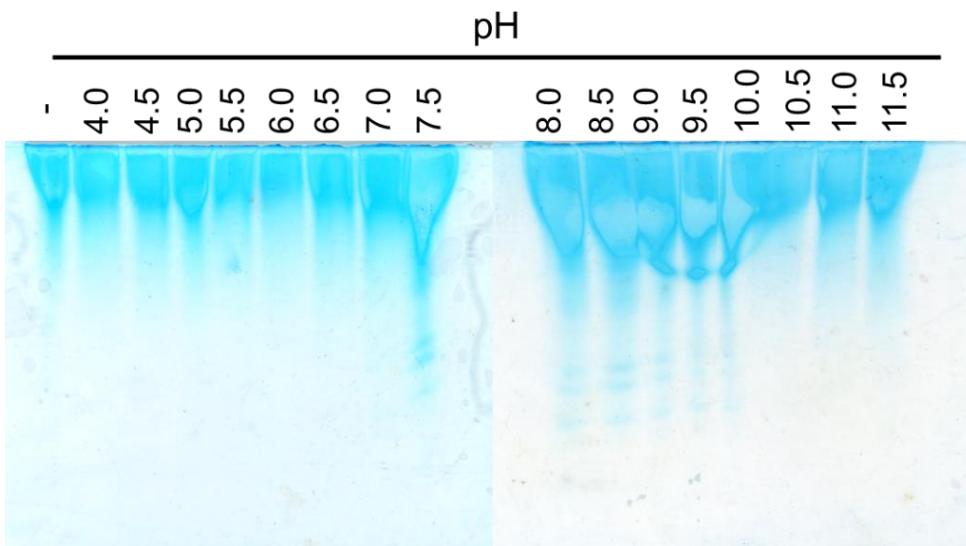


図 5-13. H18fda2 の pH 安定性 (\*-は酵素無添加)



### 5-3-8. 金属イオンが活性に及ぼす影響

酵素反応液に 1 mM 各金属イオンを添加して酵素反応後、C-PAGE により H18fda1, H18fda2 の金属イオンによる影響を検討した。この結果、H18fda1 は  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  で、H18fda2 は  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  で活性阻害が見られた (図 5-14、5-15)。

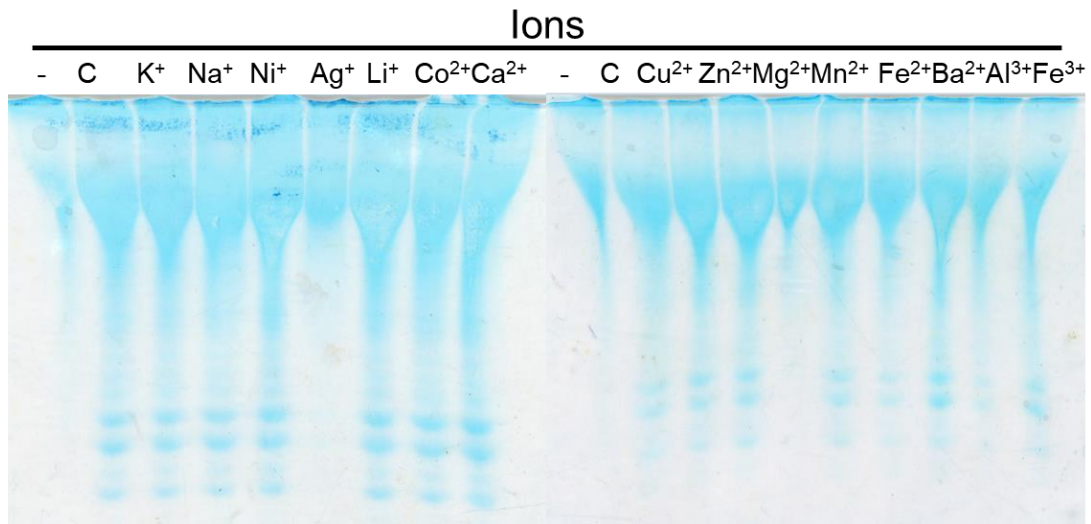


図 5-14. 金属イオンが H18fda1 に及ぼす影響 (※-は酵素無添加、C はコントロール)

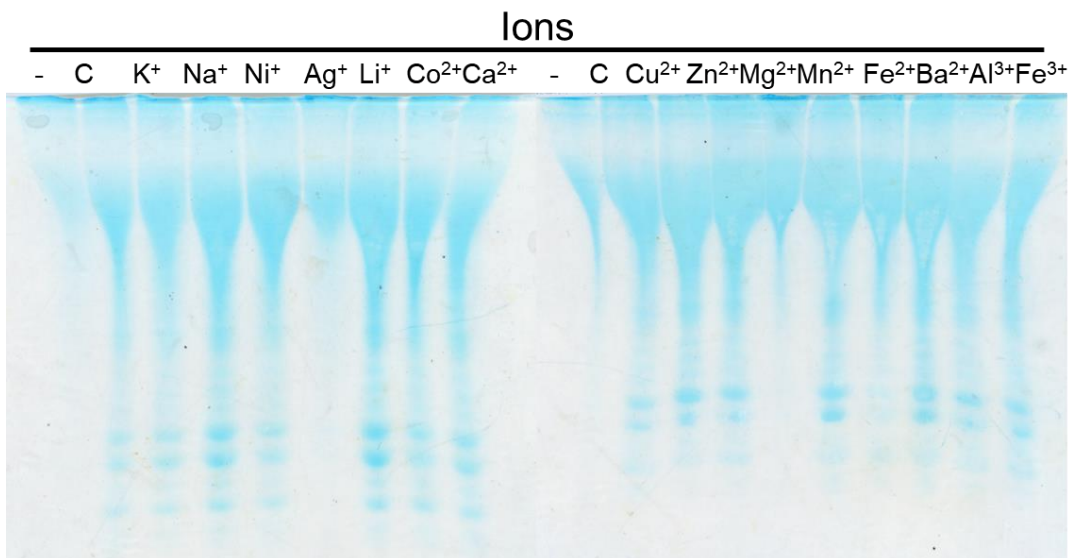


図 5-15. 金属イオンが H18fda2 に及ぼす影響 (※-は酵素無添加、C はコントロール)

### 5-3-9. 各種阻害剤が活性に及ぼす影響

酵素反応液に 1 mM の各阻害剤を添加して酵素反応を行い、C-PAGE により H18fda1, H18fda2 の阻害剤・キレート剤による影響を検討した。この結果より、どちらもキレート剤の影響を受けないことが分かった (図 5-16、5-17)。しかし *p*-Chloromercuri benzoic acid をはじめとする SH 阻害剤による活性阻害は見られた。

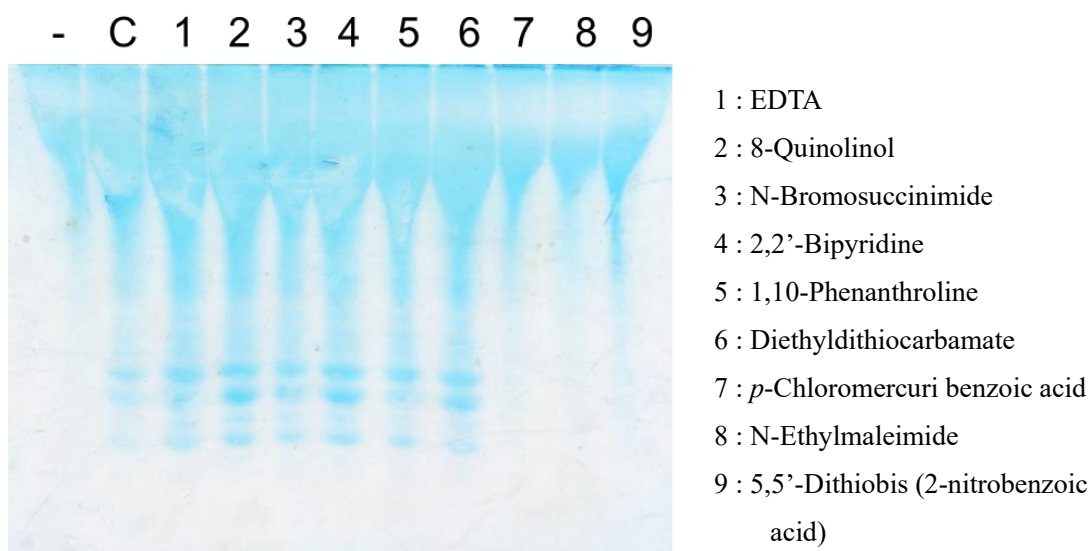


図 5-16. 阻害剤・キレート剤が H18fda1 の活性に及ぼす影響

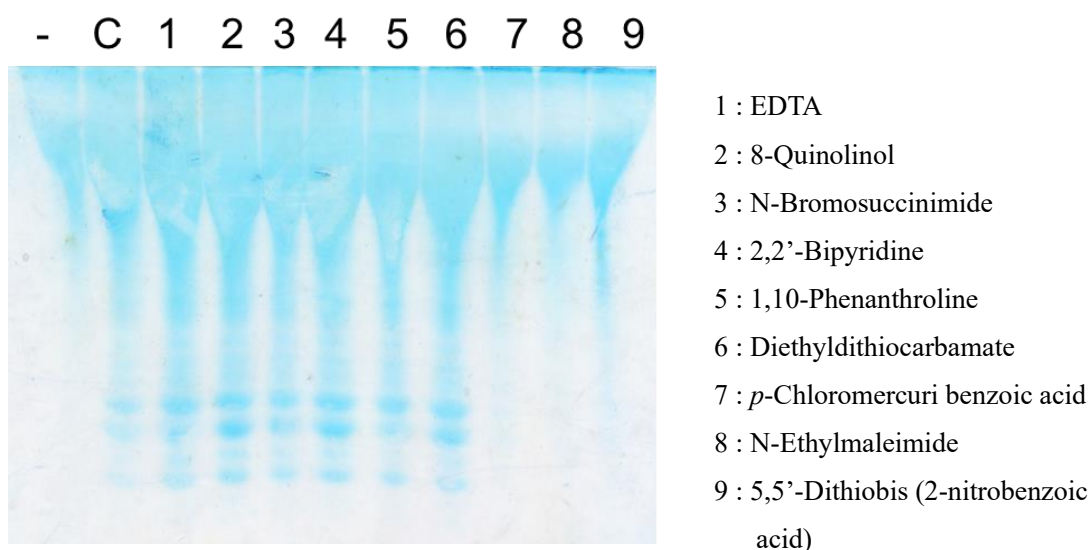


図 5-17. 阻害剤・キレート剤が H18fda2 の活性に及ぼす影響

### 5-3-10. 基質特異性の検討

起源の異なるフコイダンやフコイダン以外の多糖を用いて酵素反応を行い、C-PAGE により H18fda1, H18fda2 の基質特異性を検討した。その結果より、どちらもガゴメコンブフコイダンだけでなく、5-3-3 の結果と同様、オオウキモフコイダンに対しても低分子化活性を有していることが分かった (図 5-18、5-19)。

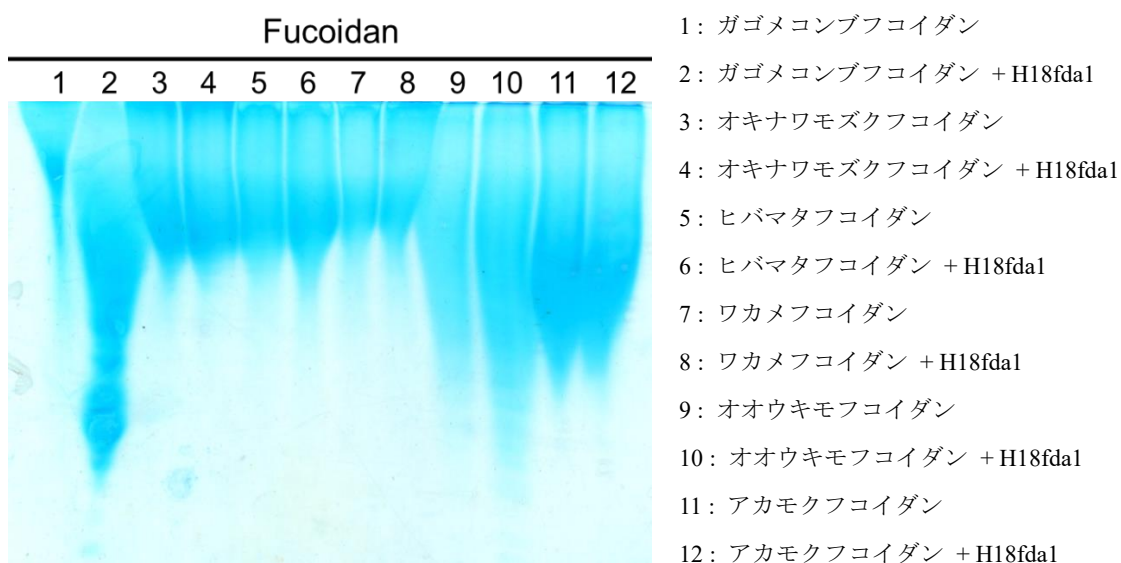


図 5-18. 各種フコイダンに対する H18fda1 の低分子化活性

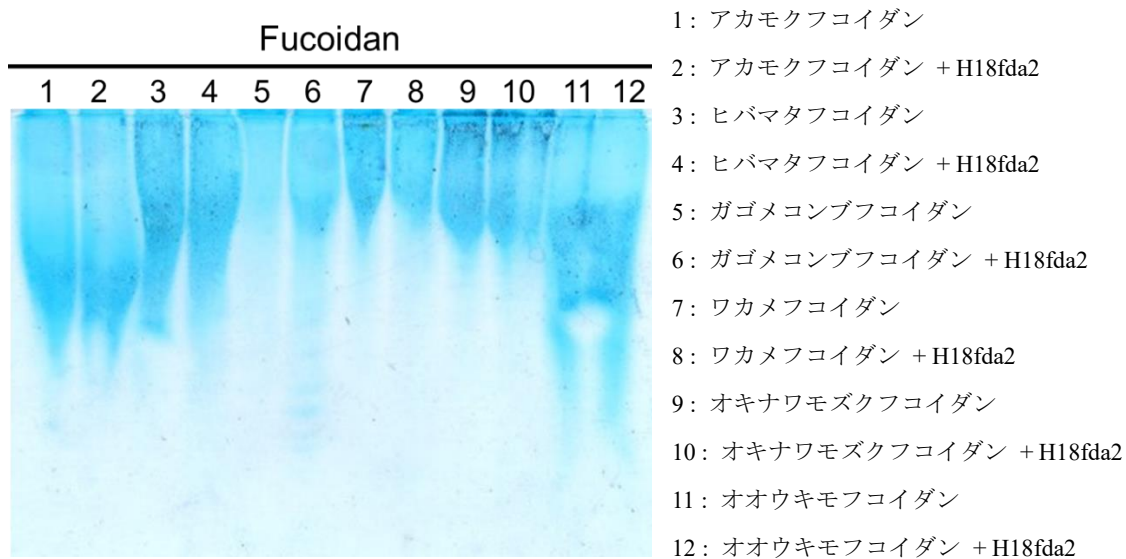


図 5-19. 各種フコイダンに対する H18fda2 の低分子化活性

### 5-3-11. H18fda1, H18fda2 によるガゴメコンブフコイダン分解の経時変化

ガゴメコンブフコイダンの H18fda1, H18fda2 による酵素反応経時変化を C-PAGE により評価したところ、反応時間が長いほど低分子化が進行していることが分かった (図 5-20)。

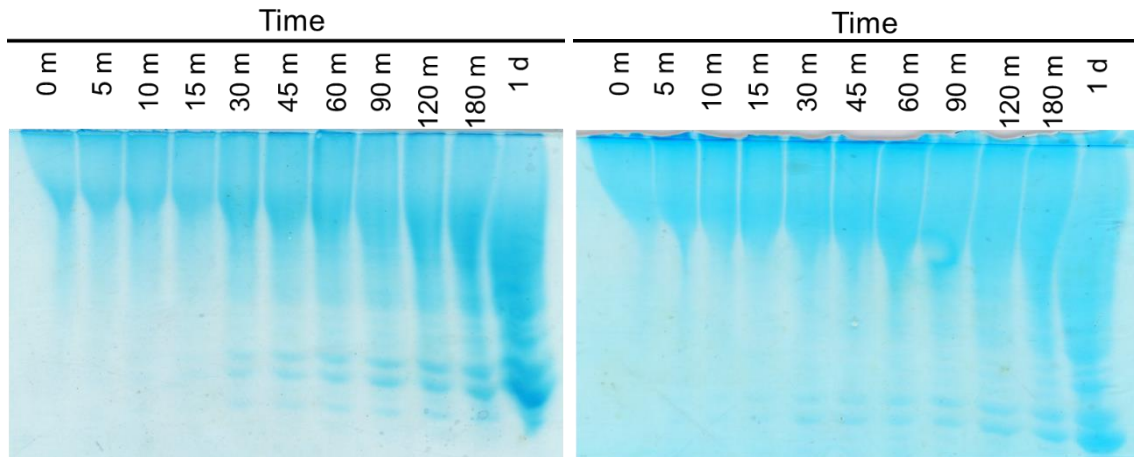


図 5-20. H18fda1 (図左)、H18fda2 (図右) によるガゴメコンブフコイダン分解の経時変化

### 5-3-12. H18fda1, Swfcn2 を両方添加したときの基質分解

H18fda1 または Swfcn2 を単独で酵素反応させた場合、同じ HPLC パターンが見られたが、両方添加するとガゴメコンブフコイダン、オオウキモフコイダンどちらもさらなる低分子化が見られた (図 5-21、図 5-22)。このことから、2 つの酵素の基質に対する作用点が異なることが考えられた。ガゴメコンブフコイダン酵素反応液を TSKgel G3000PW<sub>XL</sub> にアプライし、各ピークに番号をつけ、図 2-2 の検量線をもとに低分子化物の分子量を算出した結果、分子量約 7000, 5000 に相当する分解産物が生成していることが分かった (図 5-23)。

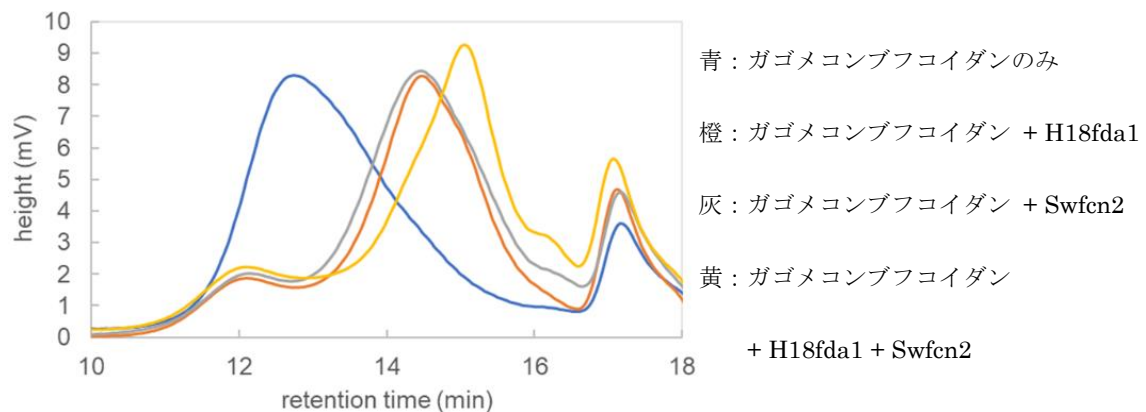


図 5-21. ガゴメコンブフコイダンを基質として H18fda1, Swfcn2 またはその両方を用いた酵素反応後の HPLC 結果

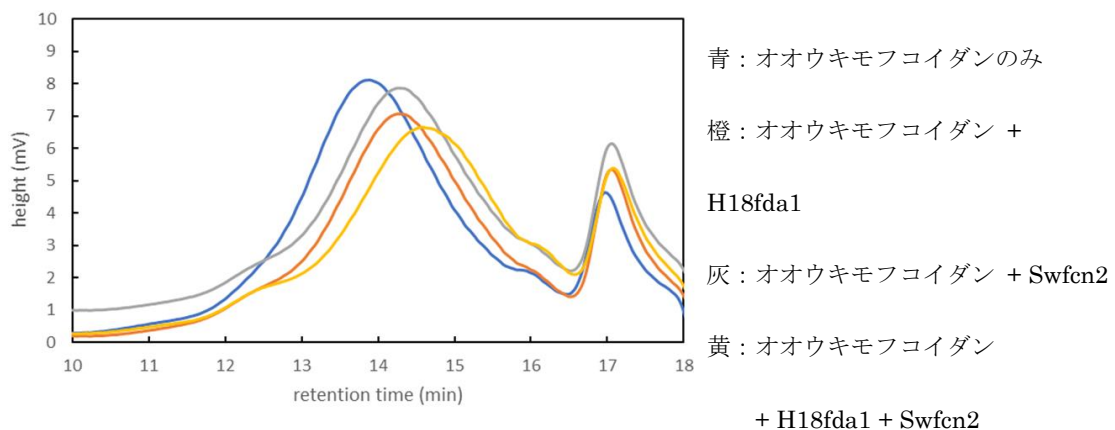
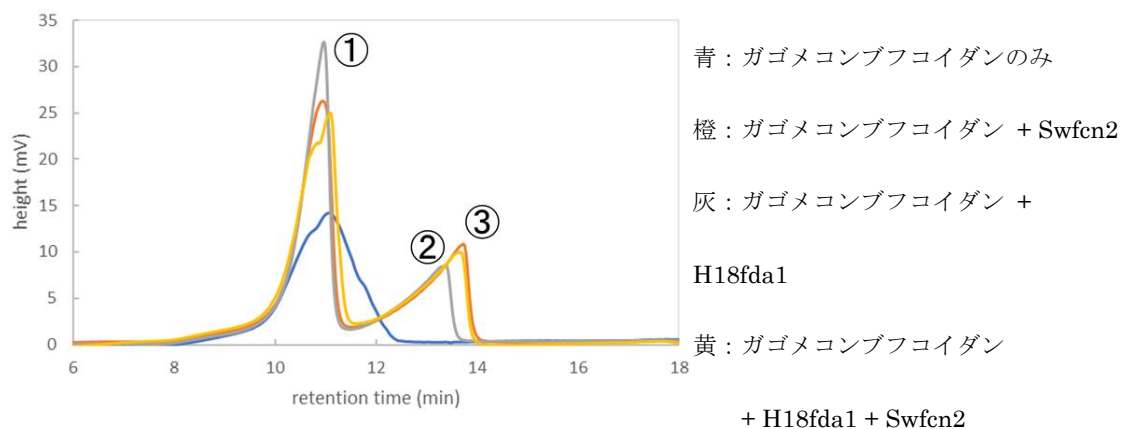


図 5-22. オオウキモフコイダンを基質として H18fda1, Swfcn2 またはその両方を用いた酵素反応後の HPLC 結果



【各ピークの分子量】 ①57,000 (分画範囲外) ②7000 ③ 5000

図 5-23. TSKgel G3000PW<sub>XL</sub> を用いた H18fda1, Swfcn2 またはその両方を添加したガゴメコンブフコイダンの低分子化パターンの分析

## 5-4. 考察

本章では、*L. algae* H18 のドラフトゲノム情報をもとに、GH 107 および GH 168 ファミリーから相同性の高い酵素遺伝子を選択し、Fct114 とは異なるフコイダナーゼ遺伝子 *h18fdal* を特定し、クローニング及び異種発現を行った。第 4 章において SW 株から見いだされたフコイダナーゼ Swfcn2、本章において見いだされたフコイダナーゼ H18fdal はどちらもガゴメコンブフコイダンおよびオオウキモフコイダンを分解できることがわかった。これまで、GH 107 ファミリーと相同性の高いフコイダナーゼを同一菌株中に 2 種類見出されたことはあったが [12, 92]、Swfct と Swfcn2 または Fct114 と H18fdal のような相同性の全く異なるフコイダナーゼが同一菌株中に 2 種類見出されたことは報告されていない。4 章の考察でも述べたが、H18 株もオキナワモズクフコイダンを単一炭素源とした場合、オキナワモズク以外のフコイダン分解酵素を生産することから (図 2-5)、*h18fdal* と *fct114* もオキナワモズクフコイダンにより同時に発現していると推察され、これら酵素遺伝子の発現機能の解明が必要と思われる。

ガゴメコンブは、褐藻類トロロコンブ属の食用の海藻であり、その生育は北海道函館周辺の地域に限られている。北からの寒流が南からの暖流の支流と交差する限られた海域の水深 10 メートル以上のところに生育する希少なコンブであり、粘りが強いことが特徴である。ガゴメコンブは、コンブの中でもフコイダンを豊富に含み、硫酸化フコースを主成分とする F-フコイダン、グルクロン酸を含む U-フコイダン、ガラクトースを含む G-フコイダンの 3 種類の化学構造が明らかにされている (図 5-24) [39, 94, 95]。5-3-12 において、Swfcn2 と H18fdal を同時に添加すると、ガゴメコンブフコイダンおよびオオウキモフコイダンの低分子化が促進されることがわかった。そこで、Swfcn2 と H18fdal のアライメントを行うと (図 5-25)、両者とも GH 107 ファミリー特有の触媒残基を持ち合わせているが、全体の相同性はとても低く、両酵素の分子量にも大きな差があるため、双方の基質認識部



位が異なると推察された。

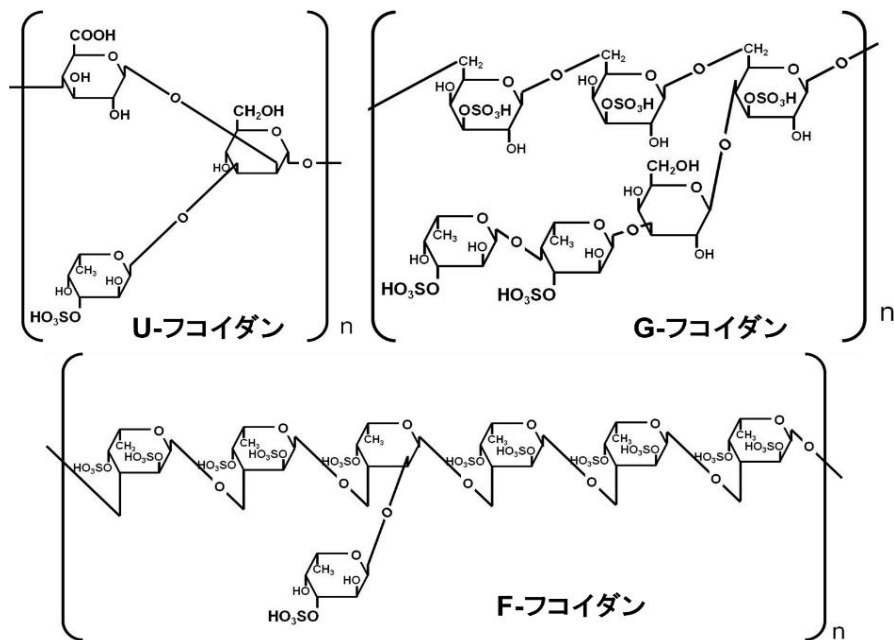


図 5-24. ガゴメコンブ由来フコイダンの構造式 [39, 95]

H18fda2	0	-----	0
Swfcn2	1	MEAQIWIYENSNTANIVFNSATRGTFTTNVSNPETSGINTNATVSKFVRDQTSPTIQFTLTKPKITNLSSTYISLKYAT	80
H18fda2	0	-----	0
Swfcn2	81	SIKTTDLNTQNSRIRVYFRNSTIGASSNIYKQLNFSAGETWESFSEFNFDGTVIPSDVALAGGYNQIMIGFASGDTTGLTS	160
H18fda2	1	-----MSGRWGIGWR-----FNADNKTEIAMNWNVANTVAQVKATPSVYVLFNLSDAAHGDAYIAP	56
Swfcn2	161	TYIIDTISGSTIQLVANAAFLSGSWGVRFNLPGGYYLDNESS-SNW-VAGVQQIYDNLIPVSHVMTNFTHPAHGYYYTLR	238
H18fda2	57	HS---VLTATTPARTFNDRD-LFLEMATAFOAEGHKVIAVWATCGPRLMKHGAEKAFDSVEVSPGVWTSQAMDNWEAY	131
Swfcn2	239	DNPYVDVASELHPAMVPSLENEKIILDIINVLKNSGRKRVITLYINGGGPSNIQGSSEDATEAAITVA-----WKNY	307
H18fda2	132	VLSEYGNNTTVETYKQAFAEVIIDEYAFRYGTLIDGTFEDHSGL---GNIPLLHDTVTAHNPVVIATFN-----QGG	199
Swfcn2	308	CDTKFGSDQALGWR----TLARGYFERFKGLADGGLWVDLSTLNAAEVAPFIAMIREVDPNVVAIADNLDKSYLVDSNGN	382
H18fda2	200	KIPLTN---NNPD-----VEDYTFGHTEVA---NADASTQQNLPMITSIATPDGFFDDAGRKSLGEM	257
Swfcn2	383	QIKVDSGGINDDPPTDYNVVFLEANDPYDFTAGHTEPLGGGAPENSWAYEFTFELITQ---NEMSSYNGS-KQTLRHY	458
H18fda2	258	FMPMGETWN---SGAIVWTVQAADWQERCLKAGGAWTVNVDVAPSSSLRADTVAFMNDVIAEMAQPNAPAFSLSNIAQ	335
Swfcn2	459	FIEIREFWVARAALVFEVQAYRFVRTFTDVGATLWSTTI--TGGAITPEEMTIMKEINNRMLQSPKPNYIPYARPEG	536
H18fda2	336	GTVTMNTAYSGLAGLATDADAHTLSFTKATGPDWLNVAADDGTLSGTPEDNFAVGMNRFILIVSDGHGDDIDLAELIYVQN	415
Swfcn2	537	AYLV-----GETLSVKS-----NILEENILLEFNP-----	562
H18fda2	416	DLGTGKAYLLPFSDLRPNLSAGSIYCHLSLSDPNVSMVVAADGNDVAVMSLSISNQNFDSIGGSNDTLSDVDRVKGYSGGS	495
Swfcn2	563	-----VKQSE-QLSRDIDSCHLYSH-----TGQKILEFNSNQVSYD-----VSGLVDSGI	605
H18fda2	496	YTLNGNNSAAQLGASVPVGMIDNEFGVSGTDLRFVDDR	533
Swfcn2	606	YVLRATISSNGQ-----GHLEKRVKE-	625

GH 107ファミリーに共通する配列

RXXXXDXXXXD      DXXXGH

相同性：19%  
同様の推定触媒残基を保持

図 5-25. Swfcn2 と H18fda1 のアミノ酸配列の比較



## 第6章 *Luteolibacter algae* H18 由来フコイダンスルファターゼの精製、遺伝子同定、異種発現、特性解明

### 6-1. 緒言

フコイダンとはフコースに硫酸基が付加した硫酸化多糖体であり、フコイダンが有する幅広い生理活性は硫酸基による要因が大きいとされている [96,97]。近年、Silchenko らは、海洋性細菌 *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127 からヒバマタ由来フコイダンを endo 型で主鎖を加水分解するフコイダナーゼおよび硫酸基を遊離する酵素スルファターゼを見出し、ヒバマタ由来フコイダンの主鎖を部分分解し、側鎖の硫酸基を位置選択的に加水分解したフコイダン誘導体の調製および同定を行った [74]。さらに、得られたフコイダン誘導体を用いて乳がん細胞に対して生理活性評価を行ったところ、硫酸基を遊離させた低分子化フコイダンに比べて未処理のフコイダンの方が乳がん細胞の活性を低下させることがわかった。一般的にフコイダンは、低分子した方が生理活性が大きいとされているのに対し [98]、上述した Silchenko らの論文では、酵素的に低分子化した方が生理活性が弱くなったと示されている。このように、フコイダンの種類によって分子量や硫酸化度と多様な生理活性の相関が逆になるケースもあり、今後さらなる検証が必要とされている。また、フコイダン分解に関わる酵素も未だ明らかになっていない部分も多く、脱硫酸化酵素に至っては報告されている例が3報であり [74, 75, 76]、しかもこれらの報告では遊離硫酸基の定量は行われていない。

序論でも述べたように、著者らのグループではオキナワモズク由来フコイダンを分解し炭素源として利用できる海洋性細菌を単離し、フコイダン分解に関与する酵素についての

研究を進めている。第 5 章までに、*L. algae* H18 および *Flavobacterium* sp. SW からフコイダンの低分子化反応を触媒するフコイダナーゼについて述べてきており、以前には H18 株からフコイダンの脱アセチル化反応を触媒するデアセチラーゼ [73] についても報告している。しかしこれまで、脱硫酸反応を触媒するフコイダンスルファターゼは見出してはいなかった。そこで、本章では H18 株のフコイダンスルファターゼを、酵素反応によって遊離する硫酸基を定量することにより、種々のクロマトグラフィーを用いて H18 株から精製し、酵素のアミノ酸配列を決定した。そして、H18 株のドラフトゲノム情報を基に、フコイダンスルファターゼ遺伝子を特定し、クローニングおよび大腸菌での酵素タンパク質の生産、酵素化学的性質の特徴決定を実施し、考察を行った。

## 6-2. 材料および実験方法

### 6-2-1. *L. algae* H18 の大量培養および C.F.E. の調製

2章に示した方法により、オキナワモズクフコイダンを単一炭素源として *L. algae* H18 を培養し、C.F.E. を調製した。

### 6-2-2. イオンクロマトグラフィーによる硫酸基の定量

15,000 rpm, 10 min 遠心分離により不純物を取り除いた酵素反応後のサンプルを超純水により 30 倍希釈し、そのサンプルを MILLEXGV Filter Unit 0.22  $\mu\text{m}$  を用いてろ過後、イオンクロマトグラフィーにより分析した。ポンプは LC-10 Ai (SHIMADZU)、検出器は電気伝導度検出器 (SHIMADZU, CDD-10A SP)、カラムは SI-90 4E (4.0 mm x 250 mm, Shodex) を使い、1.8 mM 炭酸ナトリウム + 1.7 mM 炭酸水素ナトリウムを溶離液とし、流速 1 ml/min で行った。検量線は、12 ppm, 30 ppm, 60 ppm の  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  を用いて作成した。

### 6-2-3. バリウム沈殿による硫酸基の定量

超純水 100 ml に Gelatin 0.5 g を加えてホットスターラーで溶解し、4°C, 4 h 冷却したあと、 $\text{BaCl}_2$  0.5 g を添加し、再び 4°C, 6 h 冷却して  $\text{BaCl}_2$ -Gelatin 試薬を調製した。15,000 rpm, 10 min 遠心分離により不純物を取り除いた酵素反応後のサンプル 100  $\mu\text{l}$  と  $\text{BaCl}_2$ -Gelatin 試薬 700  $\mu\text{l}$  を混合し、室温で 1 h 反応させたあと、紫外可視分光光度計 (SHIMADZU, UV-2600) を用いて 500 nm の吸光度を測定した。検量線は、0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.75, 1.0 mg/ml の  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  を標準液として作成した(図 6-1)。6-2-2, 6-2-3 の方法で酵素活性を定量する場合、1 ユニットの硫酸を 1 min あたりに遊離させる酵素量として定義した。

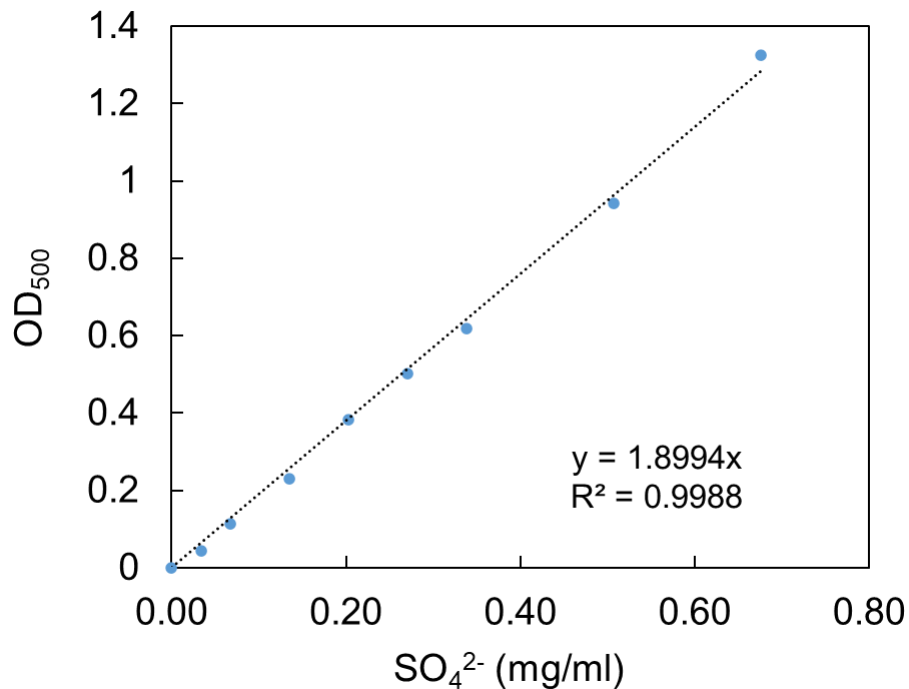


図 6-1. バリウム沈殿法における BaSO<sub>4</sub> の検量線

#### 6-2-4. DEAE-Sepharose FF カラムによる酵素精製

20 L の培養液から調製した H18 株 C.F.E. (タンパク質量 1318 mg) を 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7) で平衡化した DEAE-Sepharose FF カラム (樹脂量 200 mL, 50×3.0 cm) にアプライした。流速は 2.5 mL/min、分画サイズを 10 mL に設定した。20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7) で洗浄後、0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7) で溶出を行った。280 nm の吸収を有する画分についてスルファターゼ活性測定を行い、活性画分を集めた。

#### 6-2-5. Phenyl-TOYOPEARL 650M による酵素精製

2.0 M NH<sub>4</sub>Cl を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7) に対して一晩透析した DEAE-Sepharose において 0.1 M および 0.2 M NaCl で溶出した画分を一つにしたサンプル (タンパク質量 480 mg) を、同組成のバッファーで平衡化した Phenyl-TOYOPEARL 650M (樹脂量 50 mL,

12.5×3.0 cm) にアプライし、流速は 2.5 mL/min、分画サイズを 3 mL に設定した。同組成のバッファーで洗浄後、2.0, 1.5, 1.0, 0.5 M NH<sub>4</sub>Cl を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7) で溶出を行った。280 nm の吸収を有する画分についてスルファターゼ活性測定を行い、活性画分を集めた。通常、Phenyl-TOYOPEARL カラムによる精製には(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を溶出に用いるが、酵素反応において硫酸基の遊離を定量するため(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を用いることができず、その代わりに NH<sub>4</sub>Cl を用いている。

#### 6-2-6. Resource Q カラムによる精製

6-2-5 で得られた Phenyl-TOYOPEARL 2.0 M 溶出画分 (タンパク質量 82 mg) を Vivaspin Turbo15 (Sartorius) を用いて、20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7) による脱塩処理と濃縮処理を同時に行った。同組成のバッファーで平衡化した Resource Q (樹脂量 6 mL, 3.9×2.2 cm) にアプライし、流速は 1.5 mL/min、分画サイズを 3 mL に設定した。20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7) で洗浄後、グラジエント濃度を 0 M から 0.25 M NaCl に設定し、AKTA システムを用いて溶出を行った。280 nm の吸収を有する各フラクションについて活性測定を行い、活性画分を集めた。さらに、本操作で得られた部分精製酵素 (タンパク質量 1.5 mg) を同様の操作で、グラジエント濃度を 0.1 M から 0.18 M NaCl に設定してもう一度行い、活性が見られる画分を再び集めた。

#### 6-2-7. N 末端アミノ酸配列解析

SDS-PAGE のゲルから PVDF 膜へタンパク質を転写するために、ブロットニング溶液 A 溶液 (300 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)、5% メタノール)、B 溶液 (25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)、5% メタノール)、C 溶液 (25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)、40 mM 6-アミノヘキサン酸、5%メタノール) を調製した。SDS-PAGE のゲルと同じサイズの PVDF メンブレン (Millipore、Immobilon) を 100%メタノールに 20 秒間浸した後、ブロットニング溶液 B に沈め、30 min

以上振とうした。ゲルと同じサイズのろ紙を 6 枚用意し、ブロットイング溶液 A に 2 枚、B に 1 枚、C に 3 枚、約 10 min 浸した。ブロットイング溶液 A に浸した 2 枚のろ紙をトランスファー装置 (ATTO、AE-6675) の下部電極板の上に積層した。ブロットイング溶液 B に浸したろ紙を 1 枚その上に積層し、その上にメンブレンを載せ、ブロットイング溶液 B を少量たらした。最終精製サンプルを泳動した SDS-PAGE のゲルを一瞬ブロットイング溶液 B に浸した後、メンブレンに載せ、ブロットイング溶液 C に浸した 3 枚のろ紙を上に積層した。全体を押しつぶすように圧着し、上からブロットイング溶液 C を少量たらした。トランスファー装置の蓋を閉め、上部電極板を静かにろ紙に密着させ、100 mA 定電流の通電条件で 4 °C、2 h、転写した。その後メンブレンを取り出し、クーマシーブリリアントブルー染色 (染色液は通常の SDS-PAGE と同じ) を 10 min 行った。次に、通常の SDS-PAGE とは組成の異なる脱色液 (メタノール : 酢酸 = 9 : 1) で脱色し、メンブレンをアルミホイルの上で乾かした。目的のバンドをカッターで切り出し、膜片をプロテインシーケンス解析装置 (PPSQ-31A Protein Sequencer, Shimadzu) で解析を行った。

#### 6-2-8. プライマーの設計

*fsut107* と名付けた目的候補遺伝子を pCold I ベクターに組み込むため、表 6-1 に示すように *Nde* I、*Hind* III 認識配列を持たせてプライマーを設計した。PCR 増幅の際の変性反応、伸長反応の温度および反応時間は、98 °C で 1 分間加熱後、30 サイクル (98 °C で 10 秒間、55 °C で 5 分間、および 72 °C で 2 分) で行った。得られた PCR 産物を QIAquick PCR Purification kit を用いて精製した。

表 6-1. *fsut107* 増幅用のプライマー配列

Forward primer	CGTAGC <u>CATATG</u> AAAGACAAAACCCACCT <i>Nde</i> I 認識部位
Reverse primer	GCGA <u>AAGCTT</u> TCAAACCCAGTGGAATGG <i>Hind</i> III 認識部位

#### 6-2-9. DNA 実験、組み換え大腸菌による酵素タンパク質の生産検討、酵素精製

DNA を扱う実験方法、すなわち、形質転換、プラスミド単離、制限酵素消化、ライゲーションに関する実験方法ならびに、大腸菌による酵素タンパク質の生産検討、His-trap による酵素精製に関する実験は第 3 章に記載した方法と同じである。

#### 6-2-10. 酵素活性測定

目的酵素遺伝子の発現が確認できた *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*fsut107* C.F.E.あるいは精製した *Fsut107* を酵素とし、終濃度 2%オキナワモズクフコイダンを経質とし、100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を含む全量 100  $\mu$ l の酵素反応液を用いて 30°C、一晚酵素反応を行った。80°C、5 min 熱処理後、遠心分離 (13,000 rpm, 10 min) を行い、6-2-2 記載のイオンクロマトグラフィーと 6-2-3 記載のバリウム沈殿法によって遊離硫酸濃度を測定した。なお、酵素精製の過程では終始バリウム沈殿法を用いて、酵素活性を測定した。

#### 6-2-11. 至適温度の検討

表 6-2 に示した全量 150  $\mu$ L の酵素反応液を用いて、20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 75, 80°C で 30 min インキュベートし酵素反応後、80°C、5 min 熱処理を行った。その酵素反応液をバリウム沈殿法により図 6-1 の検量線を基に、オキナワモズクフコイダンから生じる遊離硫酸濃度を測定し、*Fsut107* の至適温度を検討した。

表 6-2. *Fsut107* の酵素反応液組成 (至適温度、熱安定性検討時)

<i>Fsut107</i>	0.37	mg/mL
Tris-HCl Buffer (pH 8.0)	100	mM
オキナワモズクフコイダン	2	%

#### 6-2-12. 熱安定性の検討

Fsut107 (0.37 mg/mL) を 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55°C で 30 min プレインキュベートした後、表 6-2 に示した全量 150  $\mu$ L の酵素反応液を用いて、30°C、4 h インキュベートし酵素反応後、80°C、5 min 熱処理を行った。その酵素反応液をバリウム沈殿法により図 6-1 の検量線を基に、オキナワモズクフコイダンから生じる遊離硫酸濃度を測定し、Fsut107 の熱安定性を検討した。

#### 6-2-13. 至適 pH の検討

表 6-3 に示した全量 150  $\mu$ L の酵素反応液を用いて、30°C、4 min インキュベートし酵素反応後、80°C、5 min 熱処理を行った。その酵素反応液をバリウム沈殿法により図 6-1 の検量線を基に、オキナワモズクフコイダンから生じる遊離硫酸濃度を測定し、Fsut107 の至適 pH を検討した。

表 6-3. Fsut107 の酵素反応液組成 (至適 pH 検討時)

Fsut107	0.37	mg/mL
酢酸/酢酸 Na Buffer (pH 4.5 ~ pH 5.0)	100	mM
or MES Buffer (pH 5.5 ~ pH 7.0)	100	mM
or Tris-HCl Buffer (pH 7.5 ~ pH 8.5)	100	mM
or ホウ酸/NaOH Buffer (pH 9.0 ~ pH 10.0)	100	mM
脱アセチル化オキナワモズクフコイダン	2	%

#### 6-2-14. 金属イオン、阻害剤・キレート剤が活性に及ぼす影響

酵素活性に影響を及ぼす金属イオン、阻害剤・キレート剤について検討した。酵素反応液に添加する各化合物の濃度を 1 mM とし、2%オキナワモズクフコイダン、0.37 mg/mL Fsut107、100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を含む全量 150  $\mu$ L の酵素反応液を用いて、30°C、10 min インキュベートし酵素反応後、80°C、5 min 熱処理を行った。その酵素反応液をバリウム沈殿法により図 6-1 の検量線を基に、オキナワモズクフコイダンから生じる遊離硫酸濃度を測定



し、各化合物の Fsut107 に対する影響を検討した。

#### 6-2-15. 基質特異性の検討

起源の異なるフコイダンあるいは海洋性多糖に対する Fsut107 の活性を検討した。フコイダンは 2%、海洋性多糖は 0.5%、0.37 mg/mL Fsut107、100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を含む全量 100  $\mu$ L の酵素反応液を用いて、40°C、5 min インキュベートし酵素反応後、80°C、5 min 熱処理を行った。その酵素反応液をバリウム沈殿法により図 6-1 の検量線を基に、基質から生じる遊離硫酸濃度を測定し、Fsut107 の基質特異性を検討した。

また、人工基質に対する酵素活性を評価する際は、1 mM *p*-nitrophenyl sulfate あるいは *p*-nitrophenyl phosphate、0.37 mg/ml Fsut107、20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)、1 mM CaCl<sub>2</sub> あるいは FeCl<sub>2</sub> あるいは金属無添加の全量 1 mL の酵素反応液を用いて、30°C、60 min インキュベートし酵素反応後、410 nm の吸光度を測定することにより遊離する *p*-nitrophenol の濃度を測定した。*p*-nitrophenol の検量線は 1~10 mM の範囲で作成した (データは示さない)。酵素活性 1 unit は 1 分間に 1 mmol の *p*-nitrophenol を遊離させる酵素量と定義した。

## 6-3. 結果

### 6-3-1. *L. algae* H18 大量培養と C.F.E.の酵素調製

H18 株の培養液 20 L から 62.6 g の湿菌体が得られ、1318 mg のタンパク質を含む C.F.E. を調製した。

### 6-3-2. DEAE-Sepharose FF カラムによる酵素精製

C.F.E.を 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7) に対して透析後、DEAE-Sepharose FF カラムにアプライした。各 NaCl 濃度で溶出した画分を回収後、酵素活性測定を実施した結果、0.1, 0.2 M NaCl 溶出画分において活性が検出され、Fraction No.191~246, No. 336~366 を回収した (図 6-2, 図 6-3)。

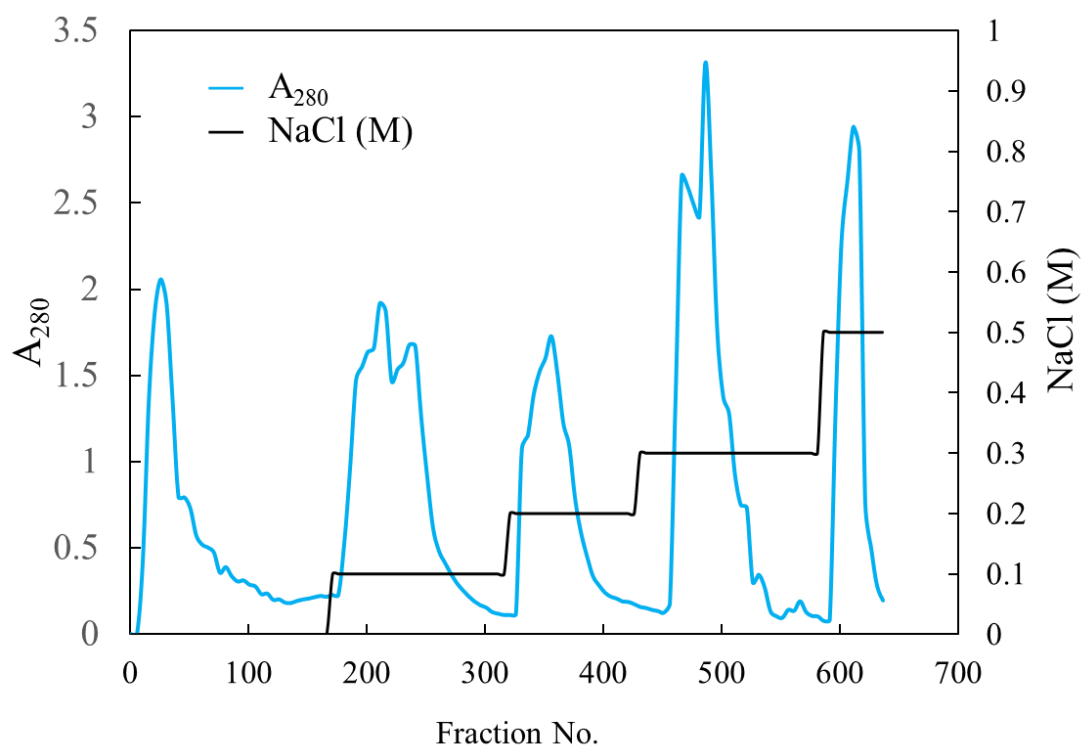


図 6-2. DEAE-Sepharose FF カラムクロマトグラフィーで分離した  
フコイダンスルファターゼの溶出パターン

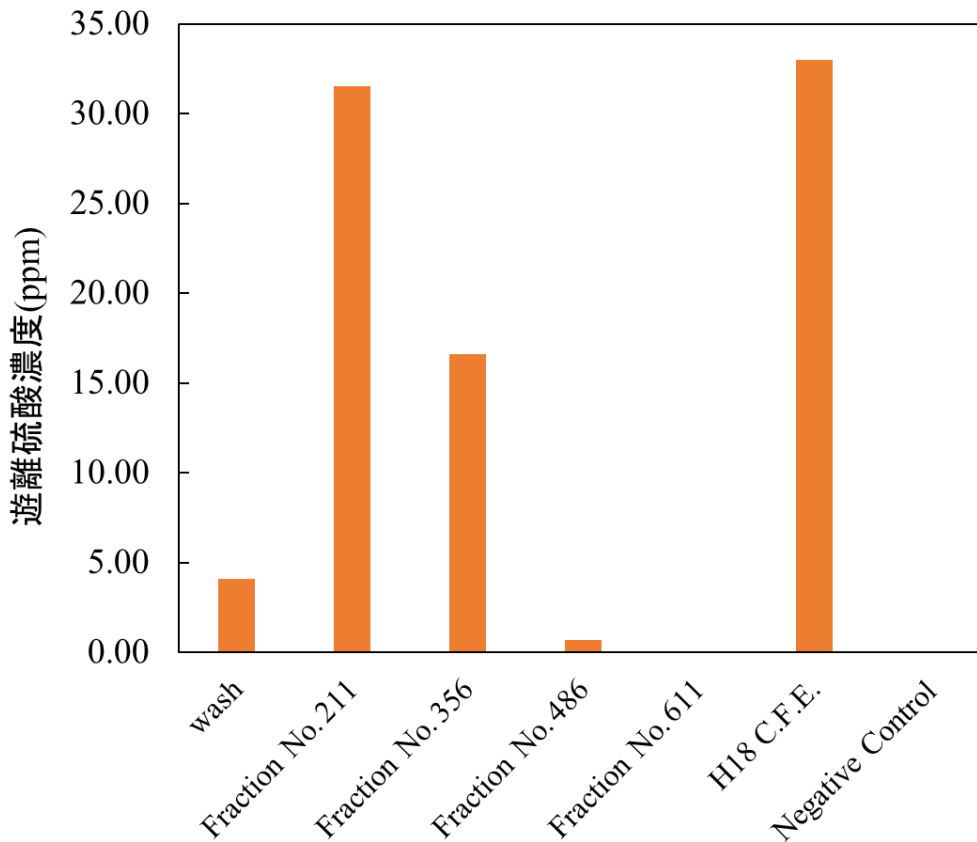


図 6-3. DEAE-Sepharose 分画溶液による遊離硫酸濃度測定結果

### 6-3-3. Phenyl-TOYOPEARL 650M による酵素精製

DEAE-Sepharose 0.1, 0.2 M 溶出画分を 2.0 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7) に対して一晚透析後、Phenyl-TOYOPEARL カラムにアプライした。各  $\text{NH}_4\text{Cl}$  濃度で溶出した画分を回収後、酵素活性測定を行った結果、どの Fraction No. においても酵素活性が見られなかった。これは、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  が活性を阻害しているのではないかと考えられ、各  $\text{NH}_4\text{Cl}$  濃度で溶出された画分を集め、これらを 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7) に対して透析を行ったあと、酵素活性測定を行った。その結果、2.0 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶出画分において活性が検出されたので、Fraction No. 8~37 を回収した (図 6-4, 図 6-5)。

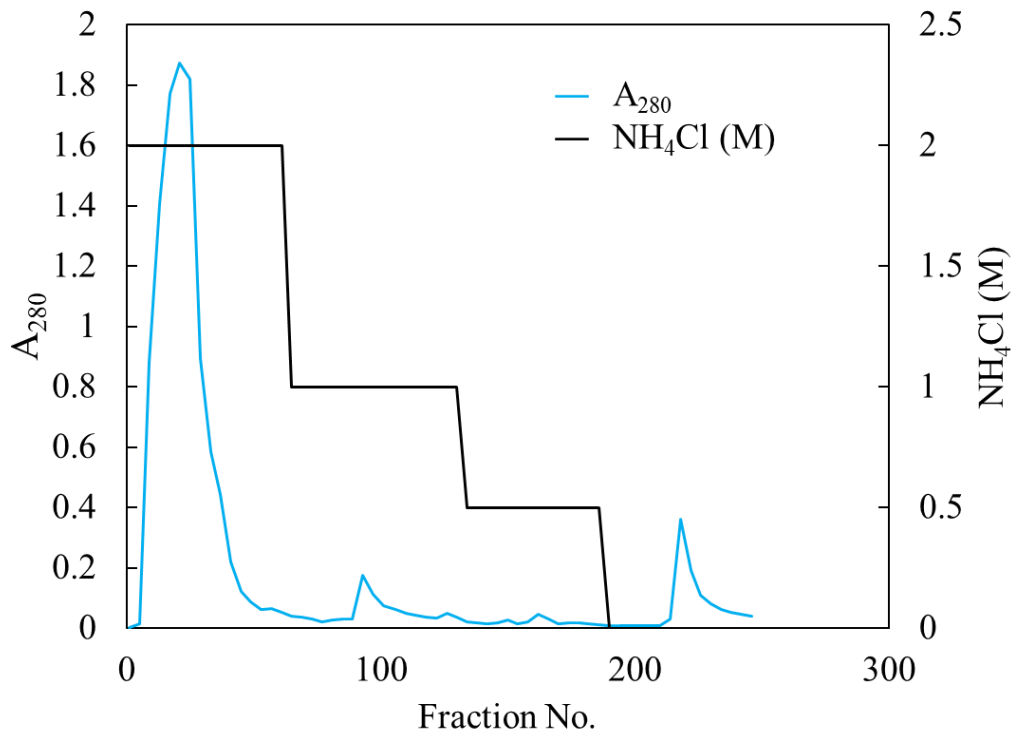


図 6-4. Phenyl-TOYOPEARL カラムクロマトグラフィーで分離した  
フコイダンスルファターゼの溶出パターン

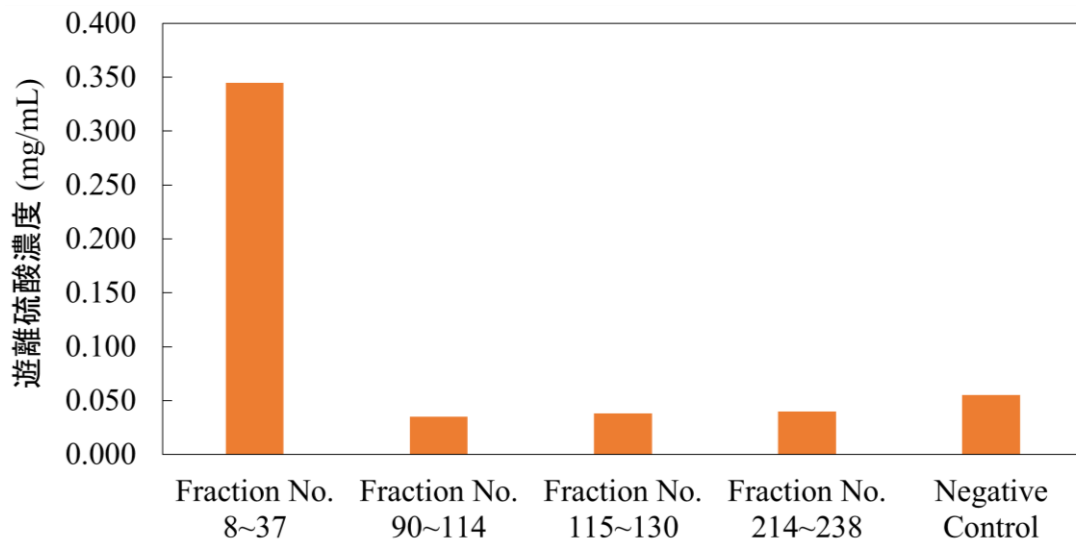


図 6-5. Phenyl-TOYOPEARL 分画溶液による遊離硫酸濃度測定結果

#### 6-3-4. Resource Q カラムによる酵素精製

Phenyl-TOYOPEARL 2.0 M NH<sub>4</sub>Cl 溶出画分を、Vivaspin spin Turbo15 (Sartorius) を用い、20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7) による脱塩処理と濃縮処理後、Resource Q カラムにアブライした。0 M から 0.25 M NaCl 濃度で溶出した各分を回収後、酵素活性測定を行った結果、Fraction No. 19~20 に酵素活性が見られた (図 6-6)。Resource Q カラムクロマトグラフィー後のフラクションを用いて SDS-PAGE 分析を行い (図 6-7)、フコイダン脱硫酸化活性と SDS-PAGE の結果を比べてみたが、酵素活性の強さと SDS-PAGE における特定のバンドの濃さが一致しなかったため、目的バンドを特定することは出来なかった。

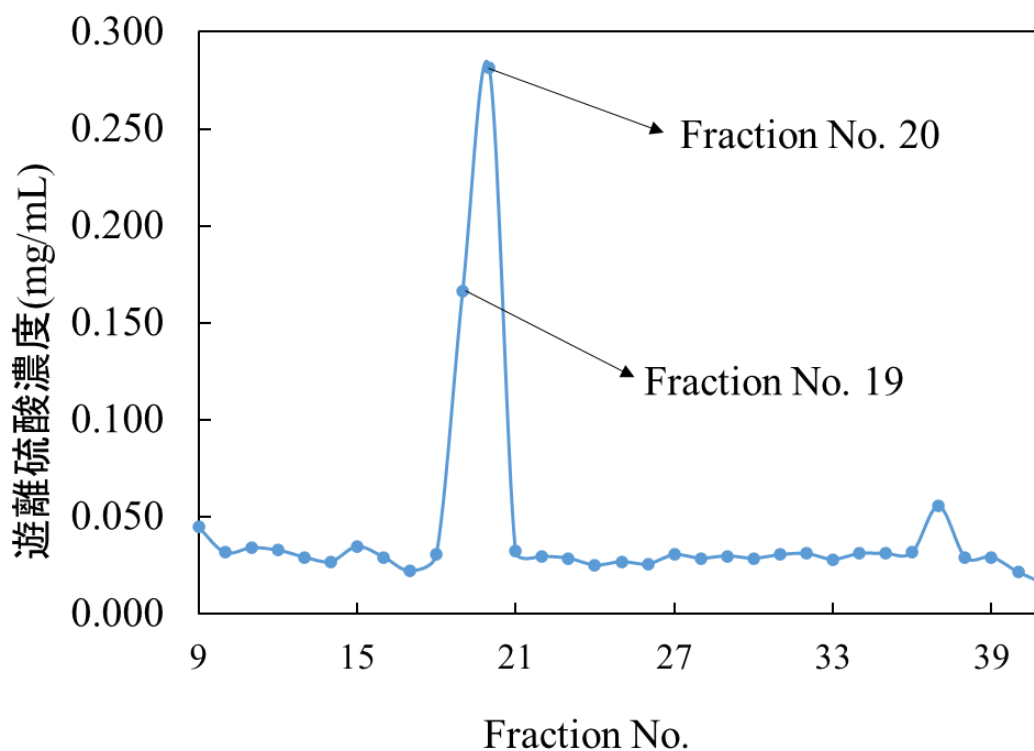


図 6-6. Resource Q 分画 (1 回目) 溶液による遊離硫酸濃度測定結果

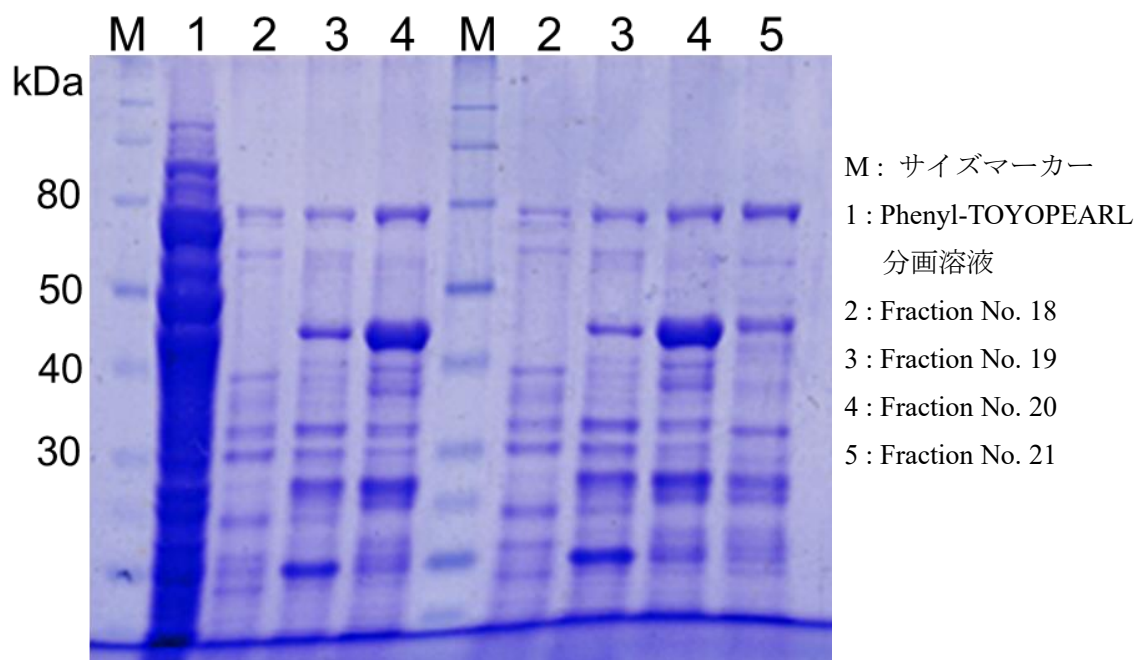


図 6-7. Resource Q カラムクロマトグラフィー (1 回目) で分画したフラクションの SDS-PAGE 結果

そのため、1 回目の Resource Q カラム溶出後の Fraction19 と 20 をまとめ、再び脱塩・濃縮処理後、NaCl のグラジエント濃度を 0.1 M~0.18 M と細かく設定し、2 回目の Resource Q カラムによる精製を行った。溶出した各画分を回収後、酵素活性測定を行った結果、Fraction No. 15~16 に酵素活性が見られた (図 6-8)。2 回目の Resource Q カラムクロマトグラフィー後のフラクションを用いて SDS-PAGE 分析を行い (図 6-9)、フコイダン脱硫酸化活性と SDS-PAGE の結果を比べると、50 kDa 付近に特有のバンドが見られたことから、このバンドを切り出し N 末端アミノ酸配列を決定した。

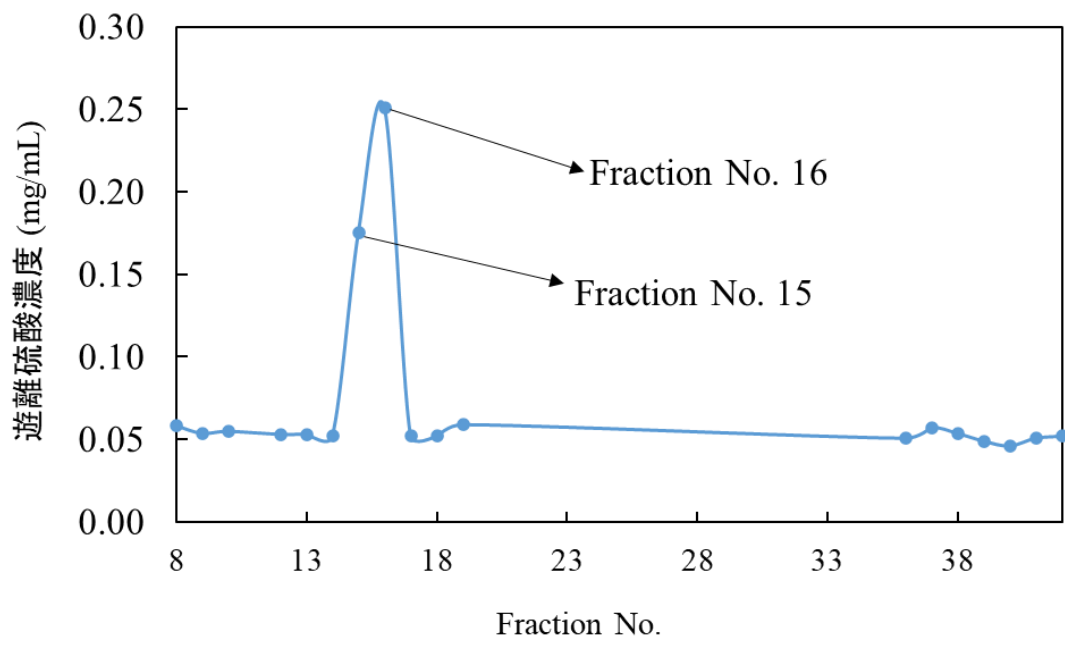


図 6-8. Resource Q 分画 (2 回目) 溶液による遊離硫酸濃度測定結果

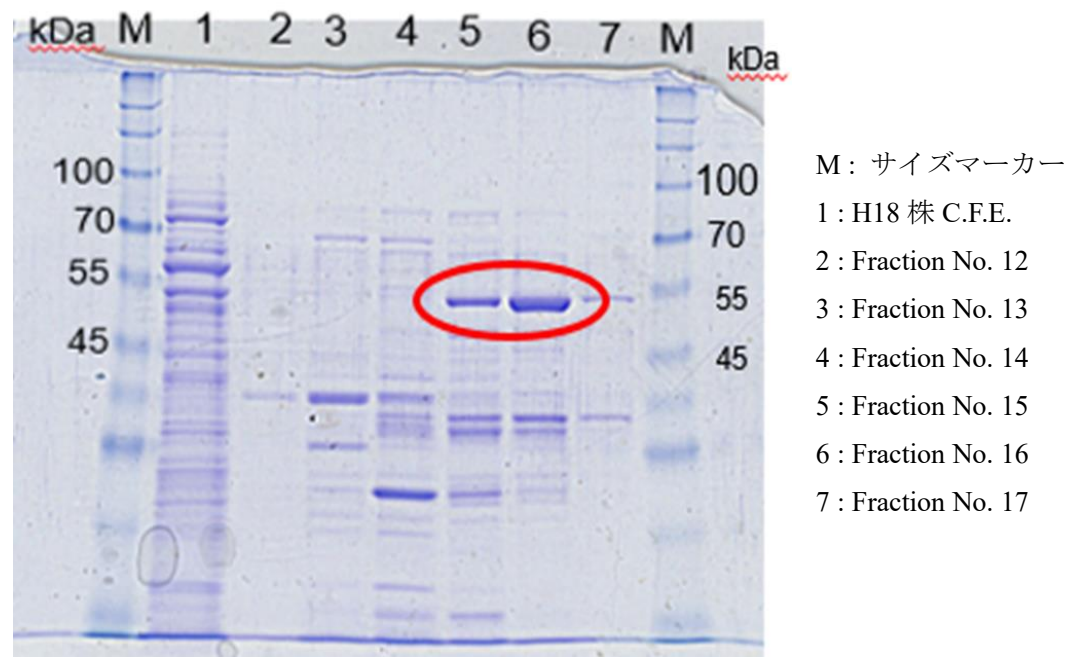


図 6-9. 2 回目における Resource Q カラムクロマトグラフィーで分画したフラクションの SDS-PAGE 結果

### 6-3-5. 精製酵素のアミノ酸配列解析

精製酵素を SDS-PAGE のゲルから PVDF 膜に転写し、プロテインシーケンス解析装置でエドマン分解法による N 末端アミノ酸配列の解析を行った結果、ADPRIVSLKD という配列が得られた。解析ソフト *in silico* MolecularCloning を用いて目的遺伝子を同定した結果、すでに明らかにしている H18 株のドラフトゲノム上にこの N 末端アミノ酸配列をコードする ORF を見出し、その全長は 1512 bp、コードするタンパク質の分子量は 55.4 kDa であった (図 6-10)。ここで、見出された ORF 全長を *fsut107* と称することとし、PCR 増幅した。なお、*fsut107* がコードするアミノ酸配列に対して BLAST 検索を行ったところ、相同性が高いタンパク質の多くはアルカリホスファターゼに属する PhoD ファミリーであり、その起源は全て海洋由来細菌だった (表 6-4)。

```
MKDKTTLSDPSECHLLDGTTSTRRRFLISTGTFVAGLA
AGSAFAADPRIVSLKDAHKGSLEIDLRIMNQYETQPQ
EVQDFYVACREALTGPDPTALAGVCKKFGRNKVGG
PLLGDLTTTSAVWVNLPEADKIDVEVTPKAGGSAAK
YSSKDTERFHSVLCEGLSPDTHYVYRISDSQGRDLG
GGEFATAPEALSEKPFKIAFGTCYHKVGMYPPELMKLI
RERNNRSMVLVLGDSAVDGRRDDFGLIQSDYLLRNLS
PHWQRLAAHVPVSATWDDHDYYGDDTSGTLTNGKK
PINVDGLRQAWRKNWNNPERDVEREGIYFSTRIGPV
QHIALDTRSCRVNLERGKLNSFLGAEQMTWLKEQIAE
STAPFILLSSGTMWTDYISDGKDSWGTWDTEGREEIF
QAIDAKADTKVILLSGDRHGARGFAIPRPGGKKIYEF
AATLGGVPGPGPFGEEDRSAQLFGLPSNSWAFGEFTF
RSSNGAPEATFRLLNERGEELETIPLV
```

図 6-10. H18 株由来 *Fsut107* のアミノ酸配列



表 6-4. Fsut107 の BLAST 結果

タンパク質	菌株 (海洋細菌)	相同性 (%)
PhoD-like protein	<i>Rhodopirellula</i> sp.	71
PhoD family protein	<i>Rhodopirellula</i> sp.	71
PhoD family protein	<i>Pontiella desulfatans</i>	69
Metallophosphoesterase family protein	<i>Pontiella desulfatans</i>	67
PhoD family protein	<i>Rhodopirellula rubra</i>	67
PhoD-like phosphatase	<i>Planctomycetes bacterium</i>	63
PhoD family protein	<i>Planctomycetes bacterium</i>	63
PhoD family protein	<i>Rhodopirellula solitaria</i>	56
PhoD family protein	<i>Draconibacterium</i> sp.	45
PhoD family protein	<i>Verrucomicrobiaceae bacterium</i>	45

### 6-3-6. *fsut107* の発現検討と酵素精製

目的長の PCR 断片を増幅し、pCold I にライゲーションしたところ、*fsut107* のクローニングが確認できた。*E. coli* BL21(DE3) を用いて *fsut107* の発現を検討した結果、可溶性画分に Fsut107 と同じ分子量 (約 55.4 kDa) を有するタンパク質が生産されているのが確認できた (図 6-11, レーン 2)。また、His-Trap により精製酵素を得ることができた (図 6-11, レーン 3)。

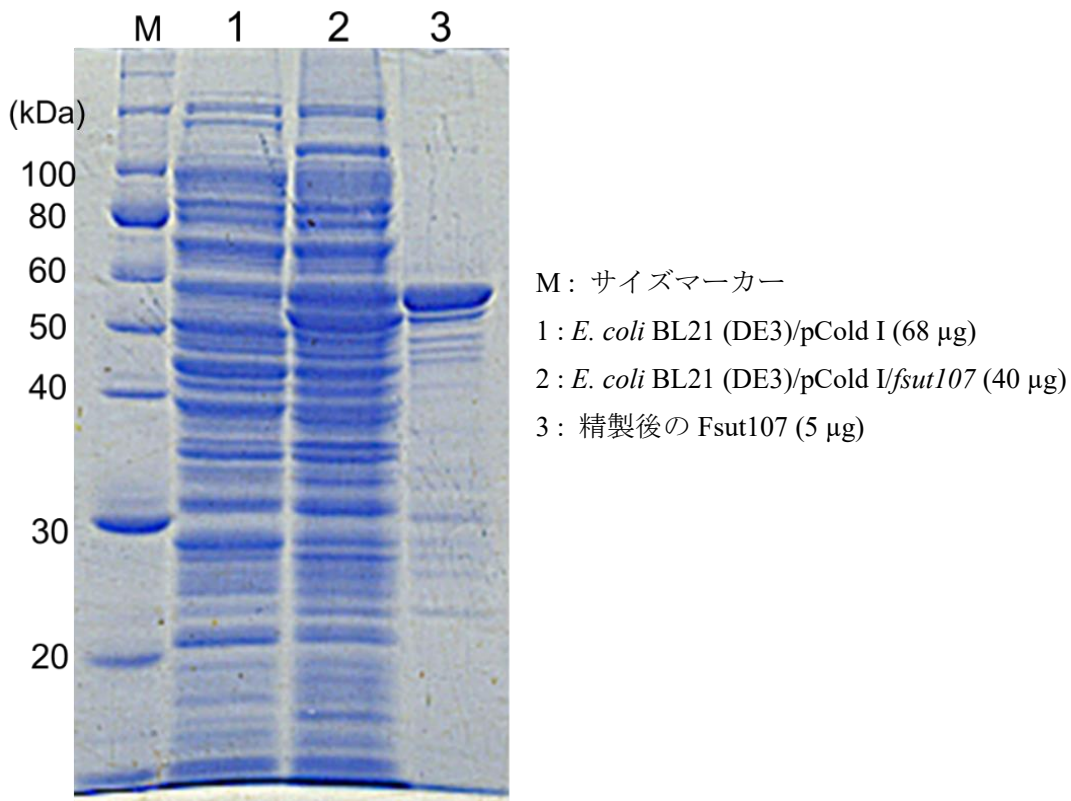


図 6-11. 精製後 Fsut107 の SDS-PAGE 結果

### 6-3-7. Fsut107 の酵素活性測定

*E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*fsut107* を培養して得られた C.F.E.あるいは精製した Fsut107 を用いてオキナワモズクフコイダンを基質として一晚酵素反応を行い、バリウム沈殿法またはイオンクロマトグラフィーによる活性の確認を行った。その結果、どちらの方法においてもオキナワモズクフコイダンの明らかな脱硫酸化が確認でき (図 6-12、図 6-13)、バリウム

沈殿法では 4.3 mM の硫酸の遊離を、イオンクロマトグラフィーでは 2.2 mM の硫酸の遊離が認められた。なお、酵素化学的性質検討においてはバリウム沈殿法を用いることとした。また、この反応液を HPLC 分析しても基質のピークに変化は見られず (データは示してない)、Fsut107 による主鎖の切断はないと考えられた。

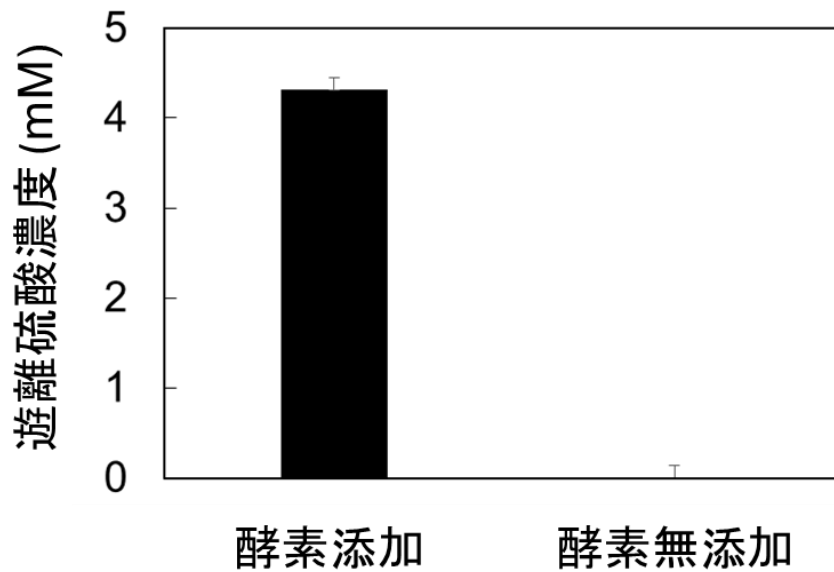


図 6-12. バリウム沈殿法を用いた Fsut107 酵素反応後の遊離硫酸濃度測定結果

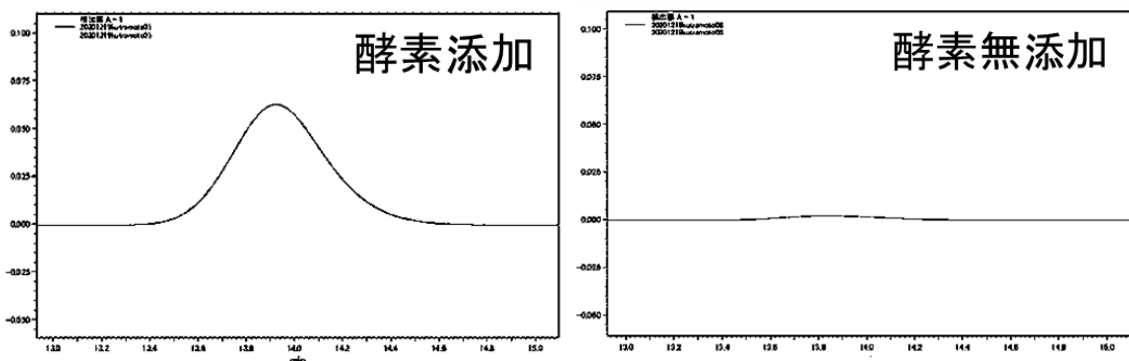


図 6-13. イオンクロマトグラフィーを用いた Fsut107 酵素反応後の遊離硫酸濃度測定結果

### 6-3-8. 至適温度の検討

各温度で酵素反応後、検量線に基づいて遊離硫酸濃度を算出し、Fsut107の至適温度を検討した。検討の結果、Fsut107の至適温度は45°C(図6-14)であった。

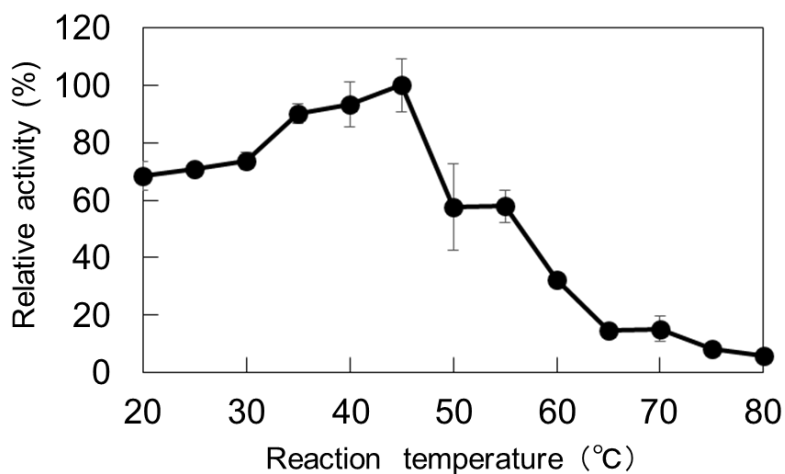


図 6-14. Fsut107 の至適温度

### 6-3-9. 熱安定性の検討

各温度で酵素を30分間プレインキュベートした後に酵素反応を行い、検量線に基づいて遊離硫酸濃度を算出し、Fsut107の熱安定性を検討した。この結果より、Fsut107は30°Cまで安定であるが、35°Cで30分間処理すると残存活性は約半分までに減少することが分かった(図6-15)。

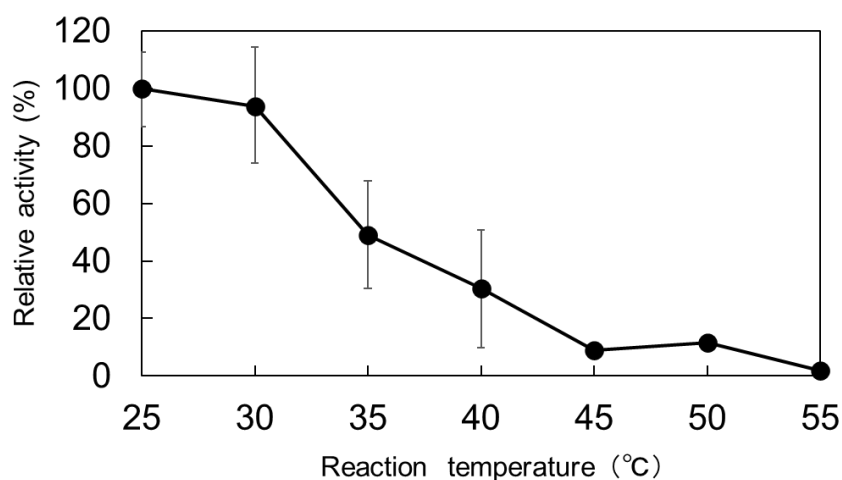


図 6-15. Fsut107 の熱安定性

### 6-3-10. 至適 pH の検討

各 pH で酵素反応後、検量線に基づいて遊離硫酸濃度を算出し、Fsut107 の至適 pH を検討した。この結果より、Fsut107 の至適 pH は pH 8.5 であることが分かった (図 6-16)。

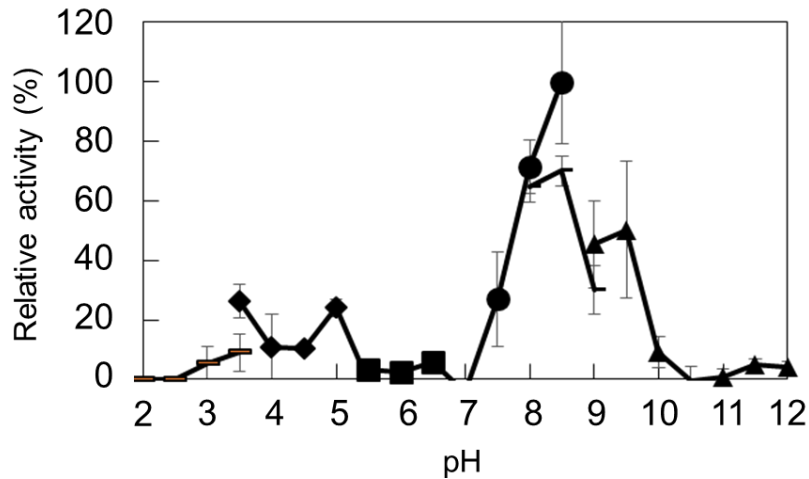


図 6-16. Fsut107 の至適 pH

### 6-3-11. 金属イオンが活性に及ぼす影響

反応液に 1 mM 各金属イオンを添加して酵素反応を行い、検量線に基づいて遊離硫酸濃度を算出し、Fsut107 の金属イオンによる影響を検討した。この結果、Fsut107 は  $\text{Ca}^{2+}$  を除く金属イオンにより活性が阻害された (図 6-17)。

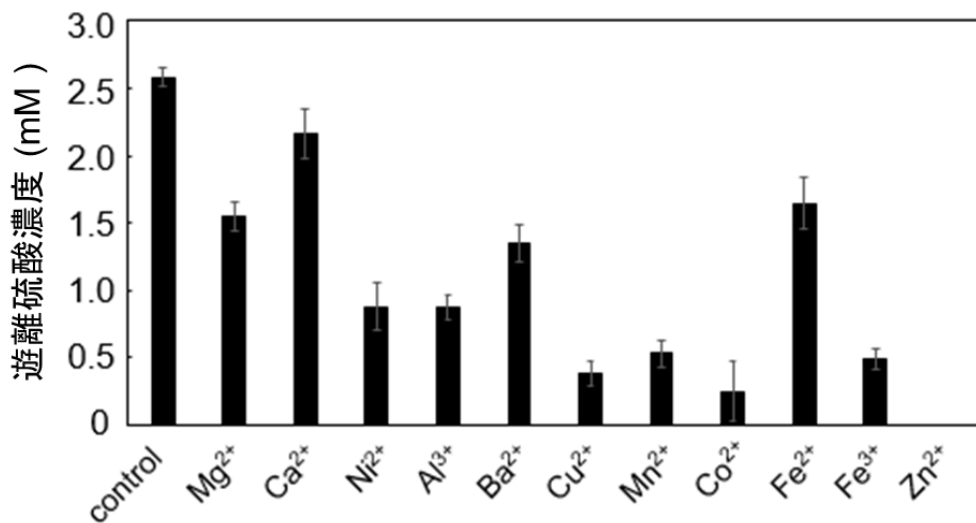


図 6-17. 金属イオンが Fsut107 の活性に及ぼす影響

### 6-3-12. 阻害剤・キレート剤に及ぼす影響

反応液に 1 mM の各阻害剤を添加して酵素反応を行い、検量線に基づいて遊離硫酸濃度を算出し、Fsut107 の阻害剤、キレート剤による影響を検討した。この結果より、EDTA により明らかな活性阻害が見られ、Fsut107 は金属イオンが大きく影響することが示唆された (図 6-18)。

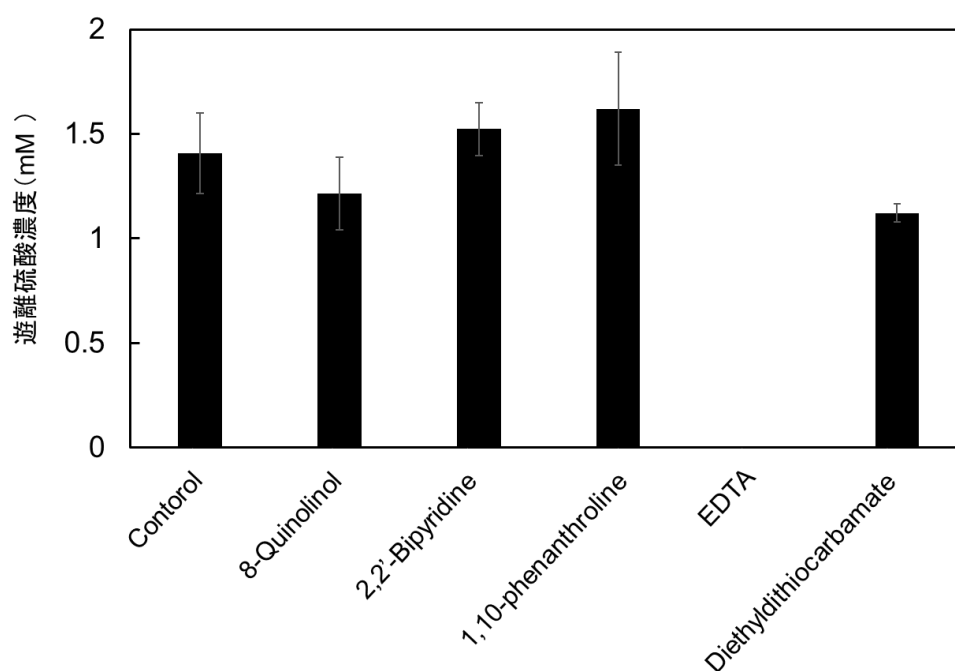


図 6-18. 阻害剤・キレート剤が Fsut107 の活性に及ぼす影響

### 6-3-13. 基質特異性の検討

起源の異なるフコイダンやフコイダン以外の多糖を用いて酵素反応を行い、検量線に基づいて遊離硫酸濃度を算出し、Fsut107 の基質特異性を検討した。この結果より、オキナワモズクフコイダンに対して最も高い活性を示したが、ジャイアントケルプとも呼ばれる褐藻オオウキモ由来のフコイダンに対する脱硫酸化活性も認められ、オキナワモズクフコイダンを基質としたときの 65%程度であった (図 6-19)。

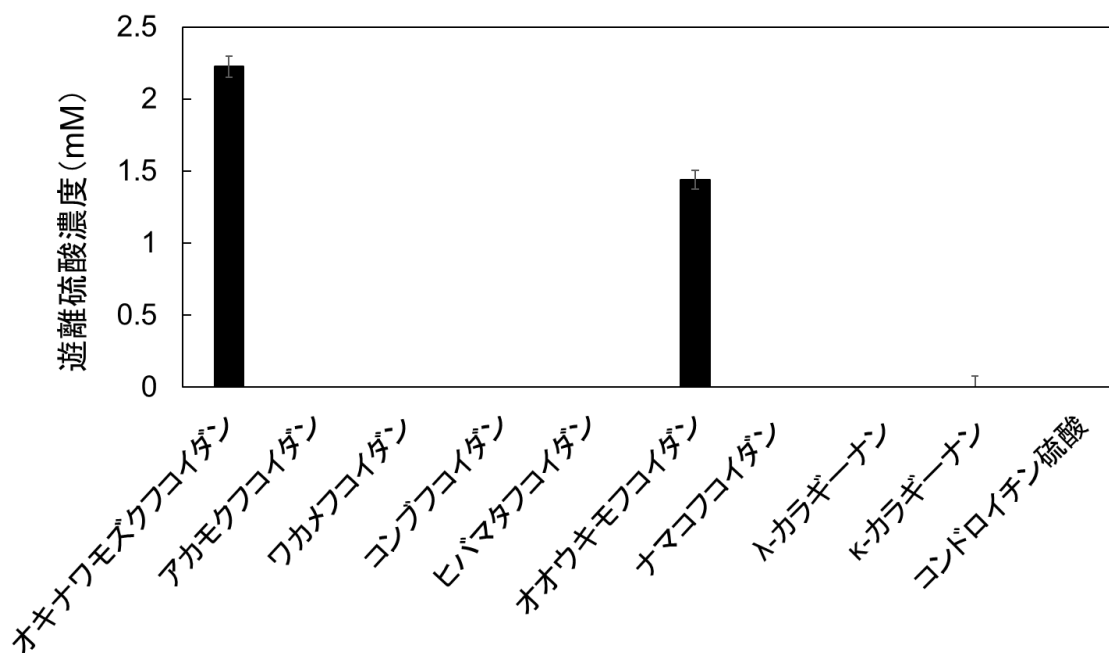


図 6-19. Fsut107 の基質特異性

表 6-4 に示した BLAST 検索の結果、Fsut107 はアルカリホスファターゼに高い相同性を有していたので、スルファターゼ活性に用いられる人工基質 *p*-nitrophenyl sulfate だけでなく、*p*-nitrophenyl phosphate を用いた酵素反応を行った。また、既知のホスファターゼは活性に二価カチオンを要求するとの報告があったので [99, 100]、Ca<sup>2+</sup>と Fe<sup>2+</sup>の添加効果も検討した。その結果、Fsut107 は *p*-nitrophenyl sulfate に対する酵素活性は全く示さなかった一方、*p*-nitrophenyl phosphate に対する活性を示した。さらに、金属無添加では *p*-nitrophenyl phosphate に対する活性も認められなかったが、Ca<sup>2+</sup>を添加した際に 0.145 units/mg、Fe<sup>2+</sup>を添加した際に、0.0622 units/mg の酵素活性を示した。

## 6-4. 考察

本章では、*L. algae* H18 株の菌体から、硫酸基の遊離を測定することによりオキナワモズクフコイダン脱硫酸化酵素の精製を行い、ドラフトゲノム情報をもとにフコイダンスルファターゼ遺伝子 *fsut107* のクローニングおよび大腸菌での酵素タンパク質の生産、酵素化学的性質の特徴決定を行った。なお、これまでにフコイダンスルファターゼに関する論文は3例知られているが [74, 75, 76]、遊離硫酸基を定量的に測定して酵素化学的性質を解明した報告例は無い。また、興味深いことに今回見出した *Fsut107* は、オキナワモズクフコイダンだけでなくオオウキモフコイダンに対しても活性を有していた。オオウキモフコイダンの化学構造は一部解明されているが [101]、その全貌は明らかになっていない。オオウキモフコイダンの化学構造が、オキナワモズクフコイダンと同一であるとは考えづらいが、*Fsut107* が脱硫酸化酵素活性を有していることから基質として認識される領域が類似していると推定される。

本酵素の相同性解析を行うと、表 6-4 のように相同性の高いタンパク質のほとんどが海洋由来細菌の *PhoD* ファミリーに分類される酵素であった。*PhoD* とはアルカリホスファターゼの一種であり、リン酸ジエステル結合を加水分解する酵素である。アルカリホスファターゼは3つの大きなファミリーに分類され、*PhoD* の他に *PhoA* や *PhoX* ファミリーも存在する [100, 102]。*PhoD* ファミリーの特徴として、ホスホモノエステラーゼとしての活性を持つことや、活性に  $\text{Ca}^{2+}$  または  $\text{Fe}^{2+}$  を要求することが知られている [99, 100]。*Fsut107* を高分子量のフコイダンではなく、低分子量の人工基質に対して活性評価を行うと、*p*-nitrophenyl sulfate に対しては全く酵素活性を示さなかった一方、*p*-nitrophenyl phosphate に対して顕著な活性を有し、さらに、 $\text{Ca}^{2+}$  または  $\text{Fe}^{2+}$  を添加しなければ活性が著しく下がることがわかった。

*Fsut107* はオキナワモズクフコイダンから硫酸基を遊離することができるが、その量はオ



キナワモズクフコイダンが有する硫酸基の約 20%程度にすぎず、H18 株の無細胞抽出液が遊離できる硫酸基の量に比べて、半分に満たない（データは示していない）。これは、H18 株が *exo* 型または *endo* 型フコイダン分解酵素で多糖をオリゴ糖や単糖まで分解・資化する際、Fsut107 以外のフコイダン脱硫酸化酵素が存在することを示唆しており、H18 株ゲノム DNA 中には第 2、第 3 のフコイダンスルファターゼ遺伝子を有すると推察される。加えて、アセチル基やグルクロン酸基などの立体障害により脱硫酸化が起きづらくなることも考えられ、これらを脱離させることで遊離硫酸量も増えることも考えられるため、今後これらの検証を行う必要がある。

## 第7章 総括

本研究では、今回新たに単離したオキナワモズクフコイダン資化性微生物 *Flavobacterium* sp. SW および、著者らのグループでかつて単離した *Luteolibacter algae* H18 由来のフコイダン分解酵素について、遺伝子同定および異種発現、酵素化学的性質の評価を行った。

第2章では、*Flavobacterium* sp. SW および *L. algae* H18 の培養特性ならびに、粗酵素によるフコイダンをはじめとする海洋多糖に対する分解様式の比較を行った。SW 株は分離源であるフコイダンだけでなく、海藻由来の他の多糖も炭素源として利用でき、H18 株よりも資化できる炭素源のレパートリーが豊富であった。しかし、両菌株をオキナワモズクフコイダンを単一炭素源として培養して得られた粗酵素液を用いると、H18 株の方が SW 株に比べて明らかに分解活性が強く、種々のフコイダンからの分解産物が見られた。

第3章では、SW 株からオキナワモズクフコイダンの低分子化反応を触媒する新たなフコイダナーゼ遺伝子を見出すために、H18 株由来フコイダナーゼ遺伝子 *fct114* との相同性検索を行うことにより、*swfct* を見出し、クローニングおよび異種発現、酵素化学的性質の特徴決定を行った。脱アセチル化フコイダンに対する *Swfct* の比活性は 2.63 U/mg protein であり、*Fct114* の 3.18 U/mg protein と比較するとほぼ同じであるが、天然のオキナワモズクフコイダンに対する活性に関しては、*Fct114* は約 50%の活性に対して *Swfct* は約 20%しか示さず、*Swfct* はアセチル基の立体障害の影響をより受けることが考えられる。両酵素における相同性が C 末端領域において高いため、このような基質特異性の違いは N 末端領域によって生じることが考えられる。

第4章と第5章では、既知のフコイダナーゼ遺伝子のほとんどが属する GH 107 または GH 168 ファミリーから相同性の高い酵素遺伝子を選択し、SW 株と H18 株のドラフトゲノム DNA 情報をもとに、SW 株からは *swfcn2*、H18 株からは *h18fdal* を見出し、クローニングおよび異種発現、酵素化学的性質の特徴決定を行った。その結果、どちらの酵素もガゴメ

コンブフコイダンおよびオオウキモフコイダンに対して分解活性を示した。また、両酵素を混合してガゴメコンブフコイダンまたはオオウキモフコイダンに対して酵素反応を行うと、混合前に比べると低分子化が促進されることがわかった。ガゴメコンブフコイダンに関しては F-フコイダン、U-フコイダン、G-フコイダンの 3 種類の化学構造が明らかにされており、両酵素を混合することによって低分子化が促進される原因として、2つの酵素の基質認識部位がこれら 3 種類のフコイダンのどれかに特異的であることから、異なる分解産物が生じるものと推察された。

第 6 章では、H18 株の菌体からフコイダンスルファターゼの精製を行ったあと、ドラフトゲノム情報をもとにフコイダンスルファターゼ遺伝子 *fsut107* を見出し、クローニングおよび異種発現、酵素化学的性質の特徴決定を行った。Fsut107 の比活性は小さく、オキナワモズクフコイダンが有する硫酸基の約 20%程度しか遊離できていなかった。しかし興味深いことに、本酵素はオキナワモズクフコイダンだけでなくオオウキモフコイダンに対しても活性を有していること、相同性解析を行うとスルファターゼとアノテーションされるのではなく、PhoD ファミリーに分類される酵素であり、*p*-nitrophenyl sulfate に対しては全く酵素活性を示さなかった一方、*p*-nitrophenyl phosphate に対して顕著な活性を有していることなどから、今後さらなる検証が必要と考えられた。6-1 でも述べたように、フコイダンスルファターゼについての報告はほとんどないため、本酵素を見出したことはフコイダンにおける硫酸基の役割を見出すツールとして有効である。

今までの研究結果から、フコイダンにフコイダナーゼやデアセチラーゼ、スルファターゼなどを組み合わせることによって、アセチル基も硫酸基も持つ種々のオリゴ糖、アセチル基も硫酸基も持たない種々のオリゴ糖、硫酸基だけを持たない種々のオリゴ糖などを調製することが可能となり、その構造を決定することにより、フコイダンの構造及び酵素の基質特異性を明らかにすることができ、さらにはフコイダンを酵素的に分解して生成した様々な構造のフコイダン分解物の生理活性を評価することにより、フコイダン構造と生理活性との

相関性を明らかにすることが可能であると考えられる。多糖の酵素的分解は、多糖の工業的利用や医薬品の開発などにおいて有用であると考えられるが、まだまだ発展途上のため、今後、多糖の構造と生理活性との相関性について更なる研究が必要であると考えられる。最後に、本研究がオキナワモズクフコイダンの用途開発や需要拡大への一助となることを期待する。

## 引用文献

1. Tomizuka, T., Masahiko, M., *Seaweeds on wooden tablets, with special reference to five ancient sites in the Asuka-Nara era*. Jpn. J. Phycol., 2011, 59: 145-153.
2. 中田 真一、上田 浩三、武田 昌弘、三木 正夫、鈴木 啓一、未利用海藻の飼料原料化調査. Hitz 技報, 2011, 72: 137-142.
3. 山中 麻、浅野 桂吾、林 英明、河井 重幸、平山 琢二、市販海藻飼料の添加給与が黒毛和種繁殖牛の糞中 IgA および VFA 濃度ならびに糞便性状に与える影響. 日本畜産学会報, 2020, 91: 375-379.
4. Roque, B.M., Venegas, M., Kinley, R.D., Nys, R., Duarte, T.L., *et al. Red seaweed (Asparagopsis taxiformis) supplementation reduces enteric methane by over 80 percent in beef steers*. PLoS ONE, 2021, 16: e0247820.
5. Yanagisawa, M., Nakamura, K., Ariga, O., Nakasaki, K., *Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides*. Process Biochem., 2011, 46: 2111-2116.
6. Chung, I.K., Beardall, J., Mehta, S., Sahoo, D., Stojkovic, S., *Using marine macroalgae for carbon sequestration: A critical appraisal*. J. Appl. Phycol., 2011, 23: 877-886.
7. Glicksman, M., *Utilization of seaweed hydrocolloids in the food industry*. Hydrobiologia., 1987, 151-152: 31-47.
8. 宮島 千尋、アルギン酸類の概要と応用. 繊維学会誌. 2009, Vol. 65, No12.
9. 林 良純、カラギナンの特性と利用法. 繊維と工業. 2009, Vol. 65, No11.
10. Ale, M.T., Meyer, A.S., *Fucoidans from brown seaweeds: An update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation*. RSC. Adv., 2013, 3: 8131-8141

11. Shan, X., Liu, X., Hao, J., Cai, C., Fan, F., Dun, Y., Zhao, X., Liu, X., Li, C., Yu, G., *In vitro and in vivo hypoglycemic effects of brown algal fucoidans*. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82: 249-255.
12. Vuillemin, M., Silchenko, A.S., Cao, H.T.T., Kokoulin, M.S., Trang, V.T.D., Holec, J., Ermakova, S.P., Meyer, A.S., Mikkelsen, A.D., *Functional characterization of a new GH107 endo- $\alpha$ -(1,4)-fucoidanase from the marine bacterium Formosa haliotis*. Mar. Drugs, 2020, 18: 562.
13. Kylin, H., *Analysis of the biochemistry of the seaweed*. H.Z. Physiol. Chem., 1913, 83: 171-197.
14. Ale, M.T., Mikkelsen, J.D., Meyer, A.S., *Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds*. Mar. Drugs, 2011, 9: 2106–2130.
15. Ueno, M., Nogawa, M., Siddiqui R., Watashi K., Wakita T., Kato, N., Ikeda, M., Okimura T., Isaka S., Oda T., Ariumi Y., *Acidic polysaccharides isolated from marine algae inhibit the early step of viral infection*. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 124: 282-290.
16. Phull, A.R., JaKim, S., *Fucoidan as bio-functional molecule: Insights into the anti-inflammatory potential and associated molecular mechanisms*. Journal of Functional Foods, 2017, 38: 415-426.
17. Jin, W., Zhang, Q., Wang, J., Zhang, W., *A comparative study of the anticoagulant activities of eleven fucoidans*. Carbohydrate Polymers, 2013, 91: 1-6.
18. Zayed, A., Avila-Peltroche, J., El-Aasr, M., Ulber R., *Sulfated galactofucans: An outstanding class of fucoidans with promising bioactivities*. Mar. Drugs, 2022, 20: 412.
19. Wang, Z.J., Xu, W., Liang, J.W., Wang, C.S., Kang, Y., *Effect of fucoidan on B16 murine melanoma cell melanin formation and apoptosis*. Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med., 2017, 14: 149–155.
20. Kasai, A., Arafuka, S., Koshiha, N., Takahashi, D., Toshima, K., *Systematic synthesis of low-molecular weight fucoidan derivatives and their effect on cancer cells*. Org. Biomol. Chem., 2015,

- 13: 10556–10568.
21. Luthuli, S., Wu, S., Cheng, Y., Zheng, X., Wu, M., Tong, H., *Therapeutic effects of fucooidan: A review on recent studies*. Mar. Drugs, 2019, 17: 487.
  22. Kwon, P.S., Oh, H., Kwon, S.J., Jin, W., Zhang, F., Fraser, K., Hong, J.J., Linhardt, R.J., Dordick, J.S., *Sulfated polysaccharides effectively inhibit SARS-CoV-2 in vitro*. Cell Discovery, 2020, 6: 50.
  23. Pradhan, B., Nayak, R., Patra, S., Bhuyan, P.P., Behera, P.K., Mandal, A.K., Behera, C., Ki, J.S., Adhikary, S.P., MubarakAli, D., Jena, M., *A state-of-the-art review on fucooidan as an antiviral agent to combat viral infections*. Carbohydrate Polymers, 2022, 291: 119551.
  24. 大槻 功、三木 康成：JHFA 品解説書：フコイダン食品。公益財団法人 日本健康・栄養食品協会, 2009.
  25. 辻 真喜、須藤 裕介、榎 牧子、田幸 正邦、小西 照子、*収穫時期の異なるオキナワモズク (Cladosiphon okamuranus Tokida) に含まれるフコイダン含量の変動と構造の変化*. 応用糖質科学, 2013, 3: 248-252
  26. Nagaoka, M., Shibata, H., Kimura-Takagi, I., Hashimoto, S., Kimura, K., Makino, T., Aiyama, R., Ueyama, S., Yokokura, T., *Structural study of fucooidan from Cladosiphon okamuranus Tokida*. Glycoconj. J., 1999, 16: 19–26.
  27. Sakai, T., Ishizuka, K., Shimanaka, K., Ikai, K., Kato, I., *Structures of oligosaccharides derived from Cladosiphon okamuranus fucooidan by digestion with marine bacterial enzymes*. Mar. Biotechnol., 2003, 5: 536–544.
  28. Teruya, T., Tatemoto, H., Konishi, T., Tako, M., *Structural characteristics and in vitro macrophage activation of acetyl fucooidan from Cladosiphon okamuranus*. Glycoconj. J., 2009, 26: 1019–1028.
  29. 上原 めぐみ、田幸 正邦、川島 由次、福永 隆生、尚 弘子、知念 功、*沖縄モズクから*

- 分離したフコイダンが高コレステロール食給与ラットの血清コレステロール濃度に及ぼす影響. 応用糖質科学, 1996, 43: 149-153.
30. Shibata, H., Kimura, I., Takagi, I., Nagaoka, M., Hashimoto, S., Sawada, H., Ueyama, S., Yokokura, T., *Inhibitory effect of Cladosiphon fucoïdan on the adhesion of Helicobacter pylori to human gastric cell*. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 1999, 45: 325-336.
31. Araya, N., Takahashi, K., Sato, T., Nakamura, T., Sawa, C., Hasegawa, D., Ando, H., Aratani, S., Yagishita, N., Fujii, R., Oka, H., Nishioka, K., Nakajima, T., Mori, N., Yamano, Y., *Fucoïdan therapy decreases the proviral load in patients with human T-lymphotropic virus type-1-associated neurological disease*. Antivir. Ther., 2011, 16: 89-98.
32. 山本 佳洋、鈴木 剛、平野 正憲、長岡 正人、橋本 秀介、柴田 英之、モズク由来フコイダンを添加したお茶による Helicobacter pylori 低減作用および NUD (不定愁訴) 改善効果の検討. 薬理と治療, 2000, 28: 937-942.
33. 酒井 武、佐川 裕章、加藤 郁之進、機能性食品としてのフコイダン: その構造と生物活性. 藻類, 2003, 51: 19-25.
34. Hehemann, J.H., Correc, G., Barbeyron, T., Helbert, W., Czjzek M., & Michel, G., *Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota*. Nature, 2010, 464: 908–912.
35. 久田 孝、海藻中の水溶性多糖類と腸内菌－海藻利用菌は日本人の腸にだけ？－. Functional Food Research, 2021, 17: 13-18.
36. Yaphe, W., & Morgan, K., *Enzymic hydrolysis of fucoïdin by Pseudomonas atlantica and Pseudomonas carrageenovora*. Nature, 1959, 183: 761–762.
37. Sakai, T., Kimura, H., Kato, I., *A Marine Strain of Flavobacteriaceae Utilizes Brown Seaweed Fucoïdan*. Mar. Biotechnol., 2002, 4: 399-405.
38. Sakai, T., Ishizuka, K., Kato, I., *Isolation and characterization of a fucoïdan-degrading marine*



- bacterium*. Mar. Biotechnol., 2003, 5: 409-416.
39. Sakai, T., Kawai, T., Kato, I., *Isolation and Characterization of a Fucoidan-Degrading Marine Bacterial Strain and Its Fucoidanase*. Mar. Biotechnol., 2004, 6: 335-346.
  40. Bakunina, I.Y., Shevchenko, L.S., Nedashkovskaya, O.I., Shevchenko, N.M., Alekseeva, S.A., Mikhailov, V.V., Zvyagintseva, T.N., *Screening of marine bacteria for fucoidan hydrolases*. Mikrobiologiya, 2000, 69: 370–376.
  41. Kusaykin, M.I., Silchenko, A.S., Zakharenko, A.M., Zvyagintseva, T.N., *Fucoidanases*. Glycobiology, 2016, 26: 3-12.
  42. Ohshiro, T., Ohmoto, Y., Ono, Y., Ohkita, R., Miki, Y., Kawamoto, H., Izumi, Y., *Isolation and characterization of a novel fucoidan-degrading microorganism*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2010, 74: 1729–1732.
  43. Ohshiro, T., Harada, N., Kobayashi, Y., Miki, Y., Kawamoto, H., *Microbial fucoidan degradation by Luteolibacter algae H18 with deacetylation*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2012, 76: 620-623.
  44. Furukawa, S., Fujikawa, T., Koga, D., Ide, A., *Purification and some properties of exo-type fucoidanases from Vibrio sp. N-5*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1992, 56: 1829–1834.
  45. Bakunina, I.Y., Nedashkovskaya, O.I., Alekseeva, S.A., Ivanova, E.P., Romanenko, L.A., Gorshkova, N.M., Isakov, V.V., Zvyagintseva, T.N., Mikhailov, V.V., *Degradation of fucoidan by the marine proteobacterium Pseudoalteromonas citrea*. Mikrobiologiya, 2002, 71: 49–55.
  46. Descamps, V., Colin, S., Lahaye, M., Jam, M., Richard, C., Potin, P., Barbeyron, T., Yvin, J-C., Kloareg, B., *Isolation and culture of a marine bacterium degrading the sulfated fucans from marine brown algae*. Mar. Biotechnol., 2006, 8: 27–39.
  47. Bae, S.S., Kwon, K.K., Yang, S-H., Lee, H-S, Kim, S-J, Lee, J-H, *Flagellimonas eckloniae gen. nov., sp. nov., a mesophilic marine bacterium of the family Flavobacteriaceae, isolated from the rhizosphere of Ecklonia kurome*. International Journal of Systematic and Evolutionary

- Microbiology, 2007, 57: 1050–1054.
48. Kim, W-J, Kim, S-M., Lee, Y-H., Kim, H. G., Kim., H-K., Moon, S. H., Suh, H-H, Jang, K-H., Park, Y., *Isolation and characterization of marine bacterial strain degrading fucoïdan from Korean Undaria pinnatifida sporophylls*. J. Microbiol. Biotechnol., 2008, 18: 616–623.
  49. Chang, Y., Xue, C., Tang, Q., Li, D., Wu, X., Wang, J., *Isolation and characterization of a sea cucumber fucoïdan-utilizing marine bacterium*. Letters in Applied Microbiology, 2010, 50: 301-307.
  50. Silchenko, A.S., Kusaykin, M.I., Kurilenko, V.V., Zakharenko, A.M., Isakov, V.V., Zaporozhets, T.S., Gazha, A.K., Zvyagintseva, T.N., *Hydrolysis of fucoïdan by fucoïdanase isolated from the marine bacterium, Formosa algae*. Mar. Drugs, 2013, 11: 2413–2430.
  51. Tanaka, R., Mizutani, Y., Shibata, T., Miyake, H., Iehata, S., Mori, T., Kuroda, K., Ueda, M., *Genome Sequence of Formosa haliotis Strain MA1, a Brown Alga-Degrading Bacterium Isolated from the Gut of Abalone Haliotis gigantea*. Genome Announc., 2016, 4: e01312-16.
  52. Thanassi, N.M, Nakada, H.I., *Enzymatic degradation of fucoïdan by enzymes from the hepatopancreas of abalone Haliotis species*. Arch. Biochem. Biophys., 1967, 118: 172–177.
  53. Kitamura, K., Matsuo, M., Yasui, T., *Enzymatic degradation of fucoïdan by fucoïdanase from the hepatopancreas of Patinopecten yessoensis*. Biosci. Biotech. Biochem., 1992, 56: 490–494.
  54. Berteau, O., McCort, I., Goasdoue, N., Tissot, B., Daniel, R., *Characterization of a new alpha-L-fucosidase isolated from the marine mollusk Pecten maximus that catalyzes the hydrolysis of alpha-L-fucose from algal fucoïdan (Ascophyllum nodosum)*. Glycobiology, 2002, 12: 273–282.
  55. Bilan, M.I., Kusaykin, M.I., Grachev, A.A., Tsvetkova, E.A., Zvyagintseva, T.N., Nifantiev, N.E., Usov, A.I., *Effect of enzyme preparation from the marine mollusk Littorina kurila on fucoïdan from the brown alga Fucus distichus*. Biochemistry (Mosc), 2005, 70: 1321–1326.
  56. Silchenko, A.S., Kusaykin, M.I., Zakharenko, A.M., Menshova, R.V., Khanh, H.H.N., Dmitrenok,

- P.S., Isakov, V.V., Zvyagintseva, T.N., *Endo-1,4-fucoidase from Vietnamese marine mollusk Lambis sp. which producing sulphated fucooligosaccharides*. J. Mol. Catal. B Enz., 2014, 102: 154–160.
57. Wu, Q., Zhang, M., Wu, K., Liu, B., Cai, J., Pan, R., *Purification and characteristics of fucoidase obtained from Dendryphiella arenaria TM94*. J. Appl. Phycol., 2011, 23: 197–203.
58. Wu, Q., Shung, M., Hourong, X., H, Min, Z., Jingmin, C., *Purification and the secondary structure of fucoidase from Fusarium sp. LD8*. Evid. Based Complement. Alternat. Med., 2011, Article ID 196190.
59. 岡 俊哉、海藻由来薬効成分フコイダンのオーラルヘルスケアへの新たな応用. 日本歯科大学紀要, 2022, 51: 11-19.
60. Ohmes, J., Mikkelsen, M.D., Nguyen, T.T., Tran, V.H.N., Meier, S., Nielsen, M.S., Ding, M., Seekamp, A., Meyer, A.S., Fuchs, S., *Depolymerization of fucoidan with endo-fucoidase changes bioactivity in processes relevant for bone regeneration*. Carbohydrate Polymers, 2022, 286: 119286.
61. Furukawa, S., Fujikawa, T., Koga, D., Ide, A., *Production of fucoidan-degrading enzymes, fucoidase, and fucoidan sulfatase by Vibrio sp. N-5*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 1992, 58: 1499-1503.
62. 富士川 龍郎、小藪 浩二郎、和田正太、アワビ肝臓中のフコイダン分解酵素について. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 1979, 6: 197-202.
63. Henrissat, B., *A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities*. Biochemical Journal, 1991, 280: 309-316.
64. Lombard, V., Ramulu, H. G., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B., *The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013*. Nucleic Acids Research, 2014, 42(D1): D490-D495.
65. Colin, S., Deniaud, E., Jam, M., Descamps, V., Chevolut, Y., Kervarec, N., Yvin, J-C., Barbeyron,

- T., Michel, G., Kloareg, B., *Cloning and biochemical characterization of the fucanase FcnA: Definition of a novel glycoside hydrolase family specific for sulfated fucans*. *Glycobiology*, 2006, 16: 1021–1032.
66. Shen, J., Chang, Y., Zhang, Y., Mei, X., Xue, C., *Discovery and Characterization of an Endo-1,3-Fucanase From Marine Bacterium Wenyingzhuangia fucanilytica: A Novel Glycoside Hydrolase Family*. *Front. Microbiol.*, 2020, 11: 1674.
67. Nagao, T., Arai, Y., Yamaoka, M., Komatsu, F., Yagi, H., Suzuki, H., Ohshiro, T., *Identification and characterization of the fucoidanase gene from Luteolibacter algae HI8*. *J. Biosci. Bioeng.*, 2018, 126(5): 567-572.
68. Sakai, T., Kimura, H., Kato, I., *Purification of sulfated fucoglucuronomannan lyase from bacterial strain of Fucobacter marina and study of appropriate conditions for its enzyme digestion*. *Mar. Biotechnol.*, 2003, 5: 380-387.
69. Kim, W. J., Park, J. W., Park, J. K., Choi, D. J., Park, Y. I. *Purification and characterization of a fucoidanase (FNase S) from a marine bacterium Sphingomonas paucimobilis PF-1*. *Mar. Drugs*, 2015, 13: 4398-4417.
70. Zueva, A.O., Silchenko, A.S., Rasin, A.B., Kusaykin, M.I., Usoltseva, R.V., Kalinovskiy, A.I., Kurilenko, V.V., Zvyagintseva, T.N., Thinh, P.D., Ermakova, S.P., *Expression and biochemical characterization of two recombinant fucoidanasases from the marine bacterium Wenyingzhuangia fucanilytica CZ1127<sup>T</sup>*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164: 3025–3037.
71. Vuillemin, M., Silchenko, A.S., Cao, H.T.T., Kokoulin, M.S., Trang, V.T.D., Holck, J., Ermakova, S.P., Meyer, A.S., Mikkelsen, M.D., *Functional Characterization of a New GHI07 Endo- $\alpha$ -(1,4)-Fucoidanase from the Marine Bacterium Formosa haliotis*. *Mar. Drugs*, 2020, 18: 562.
72. Tran, V.H.N., Ngyuyen, T.T., Meier, S., Holck, J., Cao, H.T.T., Van, T.T.T., Meyer, A.S.,

- Mikkelesen, M.D., *The Endo- $\alpha$ (1,3)-Fucoidanase Mef2 Releases Uniquely Branched Oligosaccharides from *Saccharina latissima* Fucoidans*. *Mar. Drugs*, 2022, 20: 305.
73. Nagao, T., Kumabe, A., Komatsu, F., Yagi, H., Suzuki, H., Ohshiro, T., *Gene identification and characterization of fucoidan deacetylase for potential application to fucoidan degradation and diversification*. *J. Biosci. Bioeng.*, 2017, 124: 277-282.
74. Silchenko, A.S., Rasin, A.B., Zueva, A.O., Kusaykin, M.I., Zvyagintseva, T.N., Rubtsov, N.K., Ermakova, S.P., *Discovery of a fucoidan endo-4O-sulfatase: Regioselective 4O-desulfation of fucoidans and its effect on anticancer activity in vitro*. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 271: 118449.
75. Silchenko, A.S., Rasin, A.B., Zueva, A.O., Kusaykin, M.I., Zvyagintseva, T.N., Kalinovsky, A.I., Kurilenko, V.V., Ermakova, S.P., *Fucoidan Sulfatases from Marine Bacterium *Wenylingzhuangia fucanilytica* CZ1127<sup>T</sup>*. *Biomolecules*, 2018, 8: 98.
76. Mikkelesen, M.D., Cao, H.T.T., Roret, T., Knudsen, N.R., Holck, J., Tran, V.T.T., Ngyuyen, T.T., Tran, V.H.N., Lezyk, M.J., Muschiol, J., Pham, T.D., Czjzek, M., Meyer, A.S., *A novel thermostable prokaryotic fucoidan active sulfatase *PsFucS1* with an unusual quaternary hexameric structure*. *Scientific Reports*, 2021, 11: 19523.
77. Sichert, A., Corzett, C.H., Schechter, M.S., Unfried, F., Markert, S., Becher, D., Fernandez-Guerra, A., Liebeke, M., Schweder, T., Polz, M.F., Hehemann, J-H., *Verrucomicrobia use hundreds of enzymes to digest the algal polysaccharide fucoidan*. *Nature Microbiol.*, 2020, 5: 1026-1039.
78. Kawamoto, H., Miki, Y., Kimura, T., Tanaka, K., Nakagawa, T., Kawamukai, M., and Matsuda, H., *Effects of fucoidan from Mozuku on human stomach cell lines*. *Food Sci. Technol. Res.*, 2006, 12: 218-222.
79. Li, B., Lu, F., Wei, X., Zhao, R., *Fucoidan: Structure and bioactivity*. *Molecules*, 2008, 13: 1671–

1695.

80. 田幸 正邦、上原 めぐみ、川島 由次、知念 功、本郷 富士弥、オキナワモズクからフコイダンの分離・同定. 応用糖質科学, 1996, 43: 143-148.
81. Tako, M., Yoza, E., and Thoma, S., *Chemical characterization of acetyl fucoidan and alginate from commercially cultured Cladosiphon okamuranus*. Botanica Marina, 2000, 43: 393-398.
82. Bradford, M. M., *A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem., 1976, 72: 248-254.
83. Laemmli, U. K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4*. Nature, 1970, 227: 680-685.
84. Nelson, N. *A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. 1976, 72: 248-254.
85. Takayama, M., Koyama, N., Sakai, T., Kato, I. *Enzyme capable of degrading a sulfated -fucose - containing polysaccharide and their encoding genes*. US Patent 6489155B1.
86. Silchenko, A. S., Ustyuzhanina, N. E., Kusaykin, M. I., Krylov, V. B., Shashkov, A. S., Dmitrenok, A. S., Usoltseva, R. V., Zueva, A. O., Nifantiev, N. E., Zvyagintseva, T. N., *Expression and biochemical characterization and substrate specificity of the fucoidanase from Formosa algae*. Glycobiology, 2017, 27: 254-263.
87. Vickers, C., Liu, F., Abe, K., Salama-Alber, O., Jenkins, M.L., Springate, C.M.K, Burke, J.E., Withers, S.G., Boraston, A.B., *Endo-fucoidan hydrolases from glycoside hydrolase family 107 (GH107) display structural and mechanistic similarities to  $\alpha$ -L-fucosidases from GH29*. J. Biol. Chem., 2018, 293: 18269-18308.
88. Fitton, J.H., Stringer, D.N., Karpinić, S.S., *Therapies from Fucoidan: An Update*. Mar. Drugs, 2015, 13: 5920–5946.
89. Fitton, J.H., Stringer, D.N., Park, A.Y., Karpinić, S.S. *Therapies from Fucoidan: New*

- Developments*. Mar. Drugs, 2019, 17: 571.
90. Flórez-Méndez, J., González, L. *Role of the consumption of fucoidans and beta-glucans on human health: An update of the literature*. Rev. Chil. Nutr., 2019, 46: 768–775.
  91. Silchenko, A.S., Rasin, A.B., Kusaykin, M.I., Alinovsky, K., Miansong, Z., Changheng, L., Malyarenko, O., Zueva, A.O., Zvyagintseva, T.N., Ermakova, S.P., *Structure, enzymatic transformation, anticancer activity of fucoidan and sulphated fucooligosaccharides from Sargassum horneri*. Carbohydrate Polymers, 2017, 175: 654–660.
  92. Trang, V.T.D., Mikkelsen, M.D., Vuillemin, M., Meier, S., Cao, H.T.T., Muschiol, J., Perna, V., Nguyen, T.T., Tran, V.H.N., Holck, J., Van, T.T.T., Khanh, H.H.N., Meyer, A.S., *The Endo- $\alpha$ (1,4) Specific Fucoidanase Fhf2 from Formosa haliotis Releases Highly Sulfated Fucoidan Oligosaccharides*. Front. Plant Sci., 2022, 13: 823668.
  93. Zablackis, E., Perez, J., *A partially pyruvated carrageenan from Hawaiian Grateloupia filicina (Cryptonemiales Rhodophyta)*. Botanica Marina, 1990, 33: 273–276.
  94. 酒井 武、加藤 郁之進、*海藻由来フコイダンとそのオリゴ糖の構造と生物活性*. バイオサイエンスとインダストリー, 2002, 60: 377-380.
  95. Sakai, T., Kimura, H., Kojima, K., Shimanaka, K., Ikai, K., Kato, I., *Marine bacterial sulfated fucoglucuronomannan (SFGM) lyase digests brown algal SFGM into trisaccharides*. Mar. Biotechnol., 2003, 5: 70-78.
  96. Kim, H-J., Choi, J-I., *Preparation of low molecular weight fucoidan by gamma-irradiation and its anticancer activity*. Carbohydrate Polymers, 2013, 97: 358–362.
  97. Zayed, A., El-Aasr, M., Ibrahim, A-R.S., Ulber, R., *Fucoidan Characterization: Determination of Purity and Physicochemical and Chemical Properties*. Mar. Drugs, 2020, 18: 571.
  98. Barzkar, N., Rungsardthong, V., Jahromi, S.T., Laraib, Q., Das, R., Babich, O., Sukhikh, S., *A recent update on fucoidonase: source, Isolation methods and its enzymatic activity*. Front. Mar.

- Sci., 2023, 10: 1129982.
99. Yamane, K., Maruo, B., *Purification and characterization of extracellular soluble and membrane-bound insoluble alkaline phosphatases possessing phosphodiesterase activities in Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 1978, 134: 100–107.
  100. Rodriguez, F., Lillington, J., Johnson, S., Timmel, C.R., Lea, S.M., Berks, B.C., *Crystal structure of the Bacillus subtilis phosphodiesterase phoD reveals an iron and calcium-containing active site*. J. Biol. Chem., 2014, 289: 30889-30899.
  101. Zou, P., Yang, X., Yuan, Y., Jing, C., Cao, J., Wang, Y., Zhang, L., Zhang, C., Li, Y., *Purification and characterization of a fucoidan from the brown algae Macrocystis pyrifera and the activity of enhancing salt-stress tolerance of wheat seedlings*. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 180: 547–558.
  102. Noskova, Y., Likhatskaya, G., Terentieva, N., Son, O., Tekutyeva, L., Balabanova, L., *A Novel Alkaline Phosphatase/Phosphodiesterase, CamPhoD, from Marine Bacterium Cobetia amphilecti KMM 296*. Mar. Drugs, 2019, 17: 657.



## 謝辞

本研究を進めるにあたり、長期にわたり終始ご指導、ご助言を頂きました、大城 隆 教授、鈴木 宏和 准教授、八木 寿梓 准教授に心より感謝いたします。

また、入学前から面倒を見て頂き、博士課程においてのご指導・ご鞭撻までして頂きました長尾 達彦 氏をはじめ、共同研究者である倉本 弥栄 氏、新宮 由奈子 氏、高橋 陽太 氏、吉田 優里 氏、藤田 太洋 氏、村上 ひかる 氏および、生物機能開発工学研究室の先輩・同期・後輩の皆様に重ねて御礼申し上げます。

さらに社会人入学に関し、ご理解いただき、様々なご助言下さいました雪印メグミルク株式会社の上司・同僚・同期・後輩に心より御礼申し上げます。

最後に、長年にわたり支えてくださった両親、家族、そしてパートナーに心より感謝申し上げます。

## 研究業績

### 主論文

題 目 Occurrence of different fucoidanase genes in *Flavobacterium* sp. SW and enzyme characterization.  
著 者 名 Yoshihito Arai, Yunako Shingu, Hisashi Yagi, Hirokazu Suzuki, and Takashi Ohshiro  
学術雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering  
( 卷, 号, 頁 ) ( Volume 134, Issue 3, Pages 187 ~ 194 )  
発行年月日 2022 年 6 月 29 日

### 学術講演

題 目 *Luteolibacter algae* H18 フコイダンスルファターゼの酵素化学的性質  
著 者 名 荒井 良仁、倉本 弥栄、八木 寿梓、鈴木 宏和、大城 隆  
学術雑誌名 日本農芸化学会 2021 年度 西日本・中四国・関西支部合同大会  
( 卷, 号, 頁 ) ( \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ )  
発行年月日 2021 年 9 月 25 日

題 目 *Flavobacterium* sp. SW 由来の特性の異なる 2 つのフコイダン低分子化酵素  
著 者 名 新宮 由奈子、荒井 良仁、八木 寿梓、鈴木 宏和、大城 隆  
学術雑誌名 日本農芸化学会 2021 年度 中四国支部 第 61 回講演会  
( 卷, 号, 頁 ) ( \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ )  
発行年月日 2022 年 1 月 22 日

題 目 Luteolibacter algae H18 フコイダン低分子化酵素遺伝子の探索と異種発現  
著 者 名 高橋 陽太、荒井 良仁、八木 寿梓、鈴木 宏和、大城 隆  
学術雑誌名 日本農芸化学会 2022 年度 中四国支部 第 63 回講演会  
( 巻, 号, 頁 ) ( \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ )  
発行年月日 \_\_\_\_\_ 2022 年 9 月 22 日

題 目 アカモクフコイダン資化性菌の単離と特性解明  
著 者 名 吉田 優里、荒井 良仁、八木 寿梓、鈴木 宏和、大城 隆  
学術雑誌名 日本農芸化学会 2022 年度 中四国支部 第 63 回講演会  
( 巻, 号, 頁 ) ( \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ )  
発行年月日 \_\_\_\_\_ 2022 年 9 月 22 日

題 目 海洋性細菌が持つ様々な海藻多糖に対する分解能検討  
著 者 名 荒井 良仁、新宮 由奈子、八木 寿梓、鈴木 宏和、大城 隆  
学術雑誌名 日本農芸化学会 2022 年度 中四国支部 第 63 回講演会  
( 巻, 号, 頁 ) ( \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ )  
発行年月日 \_\_\_\_\_ 2022 年 9 月 22 日

題 目 2 種のフコイダン資化性微生物が有するフコイダン低分子化酵素の特性解明  
著 者 名 高橋 陽太、荒井 良仁、新宮 由奈子、八木 寿梓、鈴木 宏和、大城 隆  
学術雑誌名 日本農芸化学会 2022 年度 中四国支部 第 64 回講演会  
( 巻, 号, 頁 ) ( \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ )  
発行年月日 \_\_\_\_\_ 2023 年 1 月 21 日

題 目 Luteolibacter algae H18 由来の複数の酵素によるフコイダン分解  
著 者 名 荒井 良仁、村上 ひかる、八木 寿梓、鈴木 宏和、大城 隆  
学術雑誌名 日本農芸化学会 2023 年度 中四国・西日本支部合同大会  
( 巻, 号, 頁 ) ( \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ )  
発行年月日 \_\_\_\_\_ 2023 年 9 月 22 日

題 目 Luteolibacter algae H18 株の第二のフコイダン脱アセチル化酵素

著 者 名 吉田 優里、荒井 良仁、八木 寿梓、鈴木 宏和、大城 隆

学術雑誌名 日本農芸化学会 2023 年度 中四国・西日本支部合同大会

( 巻, 号, 頁 ) ( \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ )

発行年月日 \_\_\_\_\_ 2023 年 9 月 22 日

題 目 Luteolibacter algae H18 アカモクフコイダン脱硫酸化酵素の精製と  
遺伝子同定

著 者 名 藤田 太洋、松村 直哉、荒井 良仁、八木 寿梓、鈴木 宏和、大城 隆

学術雑誌名 日本農芸化学会 2023 年度 中四国・西日本支部合同大会

( 巻, 号, 頁 ) ( \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ )

発行年月日 \_\_\_\_\_ 2023 年 9 月 22 日

## Occurrence of different fucoidanase genes in *Flavobacterium* sp. SW and enzyme characterization

Yoshihito Arai,<sup>1,‡</sup> Yunako Shingu,<sup>2,‡</sup> Hisashi Yagi,<sup>1</sup> Hirokazu Suzuki,<sup>1</sup> and Takashi Ohshiro<sup>1,\*</sup>

Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, Tottori University, Tottori 680-8552, Japan<sup>1</sup> and Department of Engineering, Graduate School of Sustainability Science, Tottori University, Tottori 680-8552, Japan<sup>2</sup>

Received 16 March 2022; accepted 7 June 2022

Available online 29 June 2022

**Fucoidans are hetero-sulfated polysaccharides that are widely distributed in brown algae and have been extensively studied for their various biological activities. The structure–function relationship of fucoidans remains unclear but can be studied using fucoidan-degrading enzymes (fucoidanases). Here, we isolated and identified *Flavobacterium* sp. SW as a microbial strain that can grow on fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* as the sole carbon source. Genomic analysis of this strain revealed the presence of two genes, *swfct* and *swfcn2*, that are homologous to *fct114* from *Luteolibacter algae* H18 and *fcnA* from *Psychromonas* sp. SW5A, respectively. The gene products were produced in *Escherichia coli* and showed significantly different specificities for fucoidan. *Swfct* catalyzed the degradation of deacetylated fucoidan from *C. okamuranus*, and *Swfcn2* degraded fucoidans from *Saccharina sculpera* and *Macrocystis pyrifera*. The general properties of *Swfct* were examined by measuring the amounts of reducing ends produced by the enzymatic reaction, and the enzyme properties of *Swfcn2* were evaluated by carbohydrate–polyacrylamide gel electrophoresis. Our findings indicate that one microbial strain can harbor genes encoding two different types of fucoidanases.**

© 2022, The Society for Biotechnology, Japan. All rights reserved.

[**Key words:** Fucoidan; Fucoidanase; *Flavobacterium*; *Cladosiphon okamuranus*; Glycosyl hydrolase]

Fucoidan is an anionic polysaccharide produced by brown algae, and is characterized by fucose and sulfated fucose moieties as its main constituent sugars, as well as xylose, mannose, uronic acid, and acetyl groups. Fucoidan has a wide variety of beneficial physiological activities for humans, such as anticoagulant, anti-diabetic, antiviral, and antitumor effects, and is therefore attracting attention as a health food material (1–4). The chemical structure of fucoidan is extremely diverse, with the composition and binding modes of the monosaccharides and the content of sulfate groups differing among algal species (5), making it difficult to elucidate the relationship between fucoidan's structure and its bioactivity. This relationship can be clarified by treating fucoidan with enzymes.

Many microbial enzymes that degrade fucoidan to lower molecular weight compounds have been reported. The first reported example was an enzyme from *Mariniflexile fucanivorans* SW5, which degrades fucoidan from *Pelvetia canaliculata*. The gene encoding this enzyme, *mffcna*, was cloned (6), and Sakai et al. (7,8) investigated enzymes from two types of marine bacteria that can degrade *Saccharina sculpera* fucoidan. Recently, Silchenko et al. (9) isolated and characterized the enzyme fucoidanase (FFA) from the marine bacterium *Formosa algae* KMM3553. FFA degrades fucoidan from *Fucus evanescens*. Silchenko et al. (10) also cloned the gene *ffa2* from the KMM3553 genome and revealed the biochemical characteristics of the gene product. MfFcnA and FFA2 are classified into

glycoside hydrolase family 107 (GH107) of the carbohydrate-active enzymes (CAZY) based on their amino acid sequence. Sequence information led to the identification of two fucoidanase genes (*fwf1* and *fwf2*) from *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127<sup>T</sup> and one gene (*fhf1*) from *Formosa haliotis*, and their gene products belonging to GH107 were also examined (11,12). More recently, the novel fucoidanase gene *funA* was identified via transcriptomics in *W. fucanilytica* CZ1127<sup>T</sup>. The gene product (FunA) is a novel carbohydrate-degrading enzyme that not to the GH107 family but to the GH168 family (13).

We previously isolated two bacterial strains, *Flavobacterium* sp. F31 (14) and *Luteolibacter algae* H18 (15), that grow on fucoidan derived from *Cladosiphon okamuranus* (16) as the sole carbon source. The enzymes involved in the degradation of this fucoidan, namely, fucoidan deacetylase (Fud) and fucoidanase (Fct114), were purified from the H18 strain. The genes were identified from the genomic information, expression was confirmed in *Escherichia coli*, and various properties of the enzymes were clarified (17,18). Since Fct114 is more active towards deacetylated fucoidan from *C. okamuranus* than to native fucoidan (18), fucoidan may be converted to a degradation intermediate susceptible to Fct114 by the action of Fud in fucoidan degradation by this strain. Furthermore, although most fucoidanases reported to date can be classified into either the GH107 or GH168 family, as described above, Fct114 cannot be assigned to any GH family based on its amino acid sequence (18).

In this study, we isolated another *Flavobacterium* sp. called the SW strain, that can degrade fucoidan from *C. okamuranus*. First, we searched for genes encoding proteins similar to Fct114, or that are

\* Corresponding author.

E-mail address: ohshiro@bio.tottori-u.ac.jp (T. Ohshiro).

‡ The first two authors contributed equally to this work.

highly homologous to the GH107 or GH168 families, in the genomic DNA of the SW strain. The identified candidate genes were cloned and expressed in *E. coli*. Two protein products, called Swfct and Swfcn2, exhibited fucoidan-degrading activities similar to those of Fct114 and the GH107 family. The substrate specificities of Swfct and Swfcn2 were different: the former catalyzed the degradation of fucoidans from *C. okamuranus* and the latter fucoidan from *S. sculpera*. The enzymatic properties of Swfct and Swfcn2 were estimated by measuring the reducing ends generated by the enzyme reaction for Swfct, and by carbohydrate-polyacrylamide gel electrophoresis (C-PAGE) for Swfcn2.

**MATERIALS AND METHODS**

**Materials** The high-molecular-weight fucoidan (SEA ALGA-F, Marine Products Kimuraya, Co., Ltd., Sakaiminato, Japan) used in this study was prepared from *C. okamuranus* using the method of Kawamoto et al. (19). Fucoidan from *S. sculpera* was obtained from Takara Bio (Kusatsu, Japan). Deacetylated fucoidan was prepared using fucoidan deacetylase as described previously (18). Other fucoidans were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

**Isolation and identification of the SW strain** The fucoidan-degrading microbial strain was isolated using a previously reported procedure (15). Enrichment cultures were done using medium containing fucoidan from *C. okamuranus* as the sole carbon source. Whole DNA was prepared from cells of the isolated SW strain, and the DNA coding 16 S rRNA was amplified by PCR using the universal primers 27f (5'-AGAGTTTGATCTGCTCAG-3') and 1525r (5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3'). The amplified DNA fragment was purified using a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and then sequenced using universal 16 S rDNA primers. The sequence obtained was compared against those deposited in the DNA Data Bank of Japan and was identified as belonging to the SW strain.

**Identifying the genes involved in fucoidan degradation in the SW strain** The entire nucleotide sequence of the draft genome of the SW strain was determined (HiSeq 2500, Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Genes presumed to be involved in fucoidan degradation were searched using an in silico molecular cloning software package (In Silico Biology, Inc., Yokohama, Japan) based on the

*fct114* sequence (LC378584) of *L. algae* H18; fucoidanase gene (*mffcA*, *fcnA*, *ffa2*, and *fdA1*) sequences (CAI47003, AYF59291, WP\_057784219.1, and AA000508.1) belonging to the GH107 family of *M. fucanivorans* SW5, *Psychromonas* sp. SW5A, *F. algae* KMM3553, and *Alteromonas* sp. SN-1009; and a fucoidanase gene (*funA*) sequence (ANW96599) belonging to the GH168 family of *W. fucanilytica* CZ1127<sup>1</sup>.

**Cloning and expression of the fucoidanase genes** Before cloning the target genes *swfct* and *swfcn2*, the signal peptides were predicted using SignalP. For *swfct*, a DNA fragment encoding the protein following the signal peptide was amplified with PCR using the forward primer TATCAGGAATTCATGCAAAAGAGTTACCCCT (the EcoRI restriction site is shown in bold) and the reverse primer GCTCCGTCGCA-CATTATCCAAGGCATAGAAAAT (the Sall restriction site is shown in bold). For *swfcn2*, the sequence of the forward primer was GGCAGCATATGGAAGCACAA-TATATGGTAT (the NdeI restriction site is shown in bold) and the sequence of the reverse primer was GCCCGCTCGACTTCTTTACAAATTTAAAAGA (the Sall restriction site is shown in bold). PCR was performed with PrimeSTAR Max DNA polymerase (Takara Bio): the PCR mixture was heated at 98 °C for 2 min and then subjected to 30 cycles of amplification (98 °C for 10 s and 68 °C for 3 min). The resultant *swfct* fragment and pColdI plasmid vector were digested using EcoRI and Sall, the *swfcn2* fragment and pET-21a plasmid vector were digested using NdeI and Sall, and then the fragments were ligated to construct pColdI/*swfct* and pET-21a/*swfcn2*, respectively. Both plasmids were introduced into *E. coli* BL21 (DE3).

The recombinant *E. coli* strain harboring pColdI/*swfct* was cultured in LB medium with 100 µg/ml ampicillin. The medium was agitated at 200 strokes/min for 5 h at 37 °C, rapidly cooled to 15 °C; then, 1 mM IPTG was added and the cells were cultured for 24 h. The recombinant *E. coli* strain harboring pET-21a/*swfcn2* was cultivated in the same manner except that the cells were cultured at 20 °C after the addition of IPTG. The cultured cells were harvested by centrifugation (10,000 × g, 30 min), suspended in 20 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0), and disrupted using an ultra-oscillator at 20 kHz (Sonifier 450, Branson Instruments, Danbury, CT, USA). After centrifugation (15,000 × g, 30 min), the supernatant was used as the cell-free extract.

**Purification of fucoidanases and SDS-PAGE analysis** Cell-free extracts prepared from 1 L of culture broth were applied to a His-Trap HP column (1.6 × 2.5 cm, Cytiva, Uppsala, Sweden) equilibrated with 50 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0) containing 300 mM NaCl and 20 mM imidazole. Unbound proteins were removed thoroughly with the same buffer, and then with 50 mM imidazole. The target proteins were eluted with 50 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0) containing 300 mM NaCl and 100 mM imidazole. The eluted fractions were collected, concentrated, and desalted by ultrafiltration using a Vivaspin turbo 15 centrifugal concentrator (Sartorius, Gottingen, Germany).

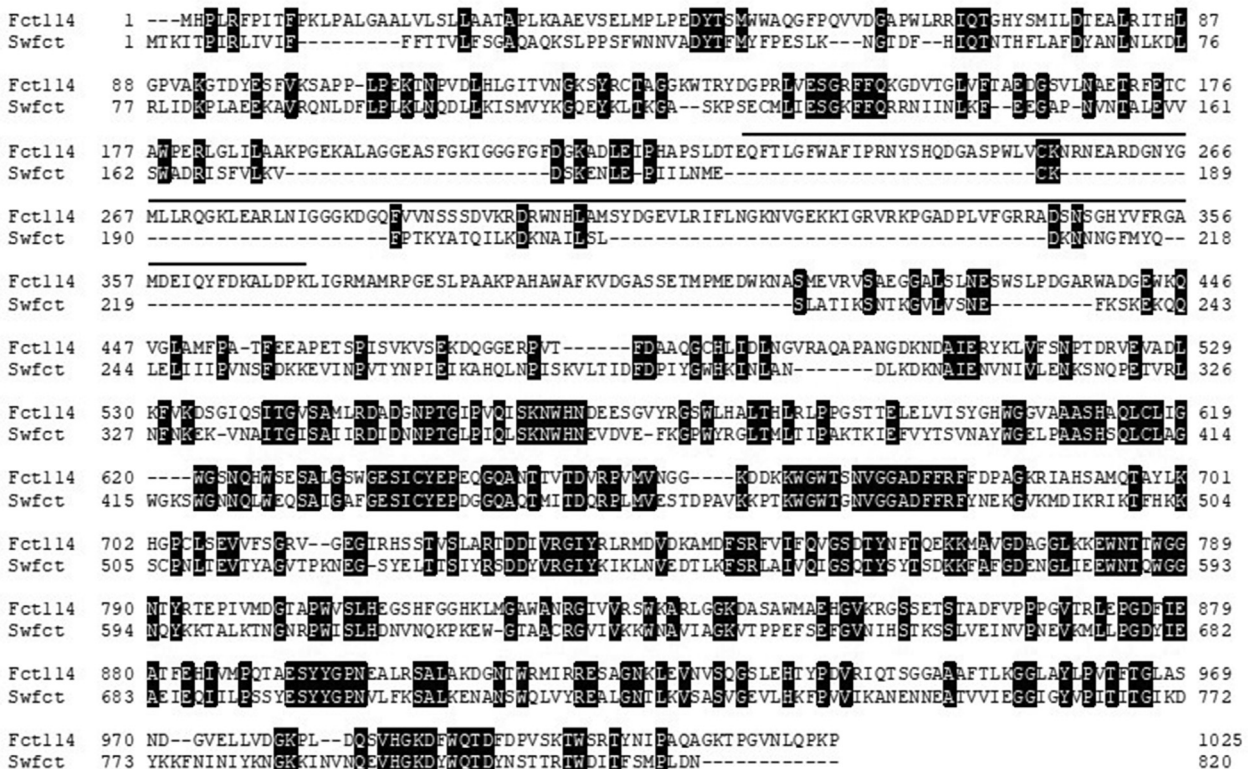


FIG. 1. Alignments of the amino acid sequences of fucoidanases from *L. algae* H18 (Fct114) and *Flavobacterium* sp. SW (Swfct). A bold line above the Fct114 sequence indicates the region of Lam-G like domain in Fct114.



SDS-PAGE was performed by the method of Laemmli (20) using a 12.5% gel for separation. Protein bands were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue G-250 dissolved in 50% methanol-10% acetic acid, and destained in 30% methanol-10% acetic acid. CLEARLY Protein Ladder molecular weight marker (Takara Bio) was used as calibration proteins.

**Enzyme assay** The enzyme reaction mixtures contained enzyme, 2% substrate and 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), typically in a total volume of 100 µl. The solution was incubated at 30 °C during the reaction and heated at 85 °C for 5 min to stop the reaction. After centrifugation to remove the precipitate (12,000 × g, 5 min), the supernatant was injected onto an HPLC system and analyzed as described previously (18). The HPLC system was equipped with an RID10A refractive detector (Shimadzu, Kyoto, Japan), and a size-exclusion TSKgel GMPW<sub>XL</sub> column (7.8 mm × 300 mm, Tosoh, Tokyo, Japan). The mobile phase was 0.1 M sodium nitrate and a flow rate was 0.6 ml/min. The enzymatic properties of Swfct were investigated by measuring the amount of reducing ends released from deacetylated fucoidan, as described previously (18). Reducing sugars were quantified by measuring the absorbance at 660 nm using a copper reagent with according to Nelson's method (21). Fucose was used for the calibration line. The enzymatic properties of Swfcn2 were estimated by C-PAGE as described previously (10) with modification. An aliquot after the enzyme reaction (4 µl) was mixed with 4 µl of loading buffer containing 10% sucrose, 0.4 mM EDTA, and 10 mM Tris-HCl (pH 8.7) and applied onto a stacking gel comprising 5.7% acrylamide, 0.11% piperazine diacrylamide, 2 mM EDTA, and 50 mM Tris-HCl (pH 8.7). The sample was electrophoresed through a separating gel 1 mm thick and 7 cm long comprising 30% acrylamide, 0.6% piperazine diacrylamide, 2 mM EDTA, and 50 mM Tris-HCl (pH 8.7) for 2 h at 200 V and then stained in 0.5% Alcian blue 8GX in 2% acetic acid for 45 min and rinsed with distilled water.

**RESULTS**

**Isolation and identification of the SW strain** We used the algae *C. okamuranus* as the screening source and isolated the SW

strain by growing in a medium containing fucoidan from *C. okamuranus* as the sole carbon source. Sequence analysis of the DNA coding 16 S rRNA showed that the sequence of the SW strain (accession no. LC697042) had the highest similarity (99%) with that of *Flavobacterium* sp. F31 (AB544005). Thus, the SW strain was identified as *Flavobacterium* sp.

**Search for fucoidanase genes in the SW strain and comparison of fucoidanase amino acid sequences** We searched the sequence of SW strain for genes encoding proteins similar to proteins belonging to the GH107 or GH168 families, in addition to Fct114. The gene designated as *swfct* (accession no. LC697043) was identified as a homologous gene of *fct114* and the gene designated as *swfcn2* (accession no. LC697044) was identified as encoding a protein belonging to the GH107 family, based on the sequence of *fcnA* from *Psychromonas* sp. SW5A. The genes *swfct* and *swfcn2* comprise 2460 and 1878 bp, and encode 93 kDa and 69 kDa proteins, respectively. The amino acid sequence homology between Swfct and Fct114 was 40%, and their alignment is shown in Fig. 1. The amino acid sequence homology between Swfcn2 and FcnA was 53%, and their alignment is shown in Fig. 2.

**Expression of *swfct* and *swfcn2*, confirmation of enzyme activity, and enzyme purification** A signal peptide composed of 25 amino acids was encoded in *swfct*. The protein with the signal peptide could not be heterologously produced in *E. coli* and thus we produced the protein without the signal peptide. The recombinant *E. coli* strains harboring pColdI/*swfct* and pET-21a/*swfcn2* were cultured at 15 °C and 20 °C to produce the target enzyme proteins, respectively. Both recombinant proteins were overproduced in the

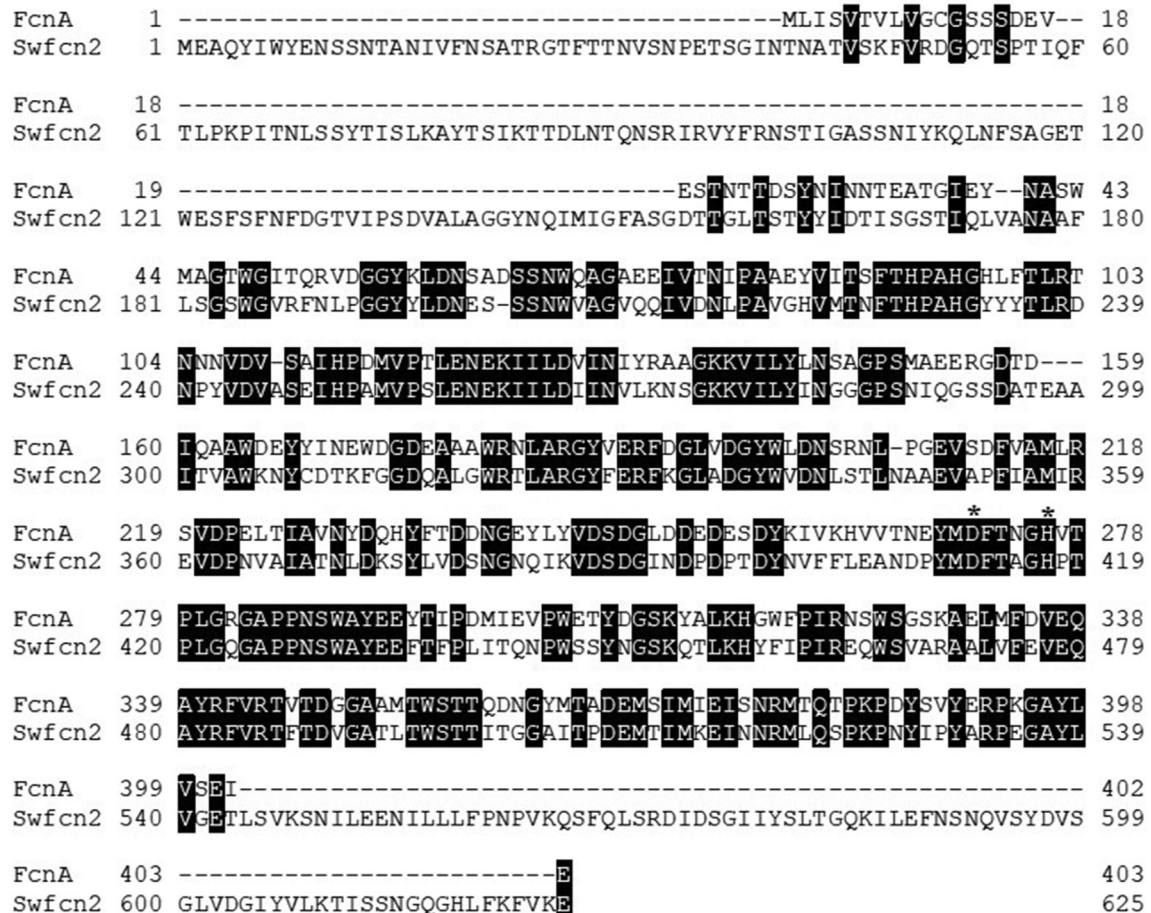


FIG. 2. Alignments of the amino acid sequences of fucoidanases from *Psychromonas* sp. SW5A (Fcn) and *Flavobacterium* sp. SW (Swfcn2). Asterisks indicate the catalytic amino acid residues proposed by three-dimensional structure analysis (22).

cell-free extracts, and their molecular weights were approximately 90 and 70 kDa (Fig. 3, lanes 2 and 5). Examination of their enzymatic activities using various fucoidans as substrates showed that Swfct and Swfcn2 utilized deacetylated fucoidan from *C. okamuranus* and fucoidan from *S. sculpera* as good substrates, respectively (Fig. 4A and B). Highly purified enzymes were obtained using an affinity column packed with Ni-Sepharose (Fig. 3, lanes 3 and 6).

**Enzymatic properties of Swfct** The enzymatic properties of Swfct were investigated by measuring the amounts of reducing ends released from deacetylated fucoidan, as previously reported (18). Purified Swfct generated 2.63  $\mu\text{mol}$  reducing sugars per min per mg-enzyme protein using 2% deacetylated fucoidan from *C. okamuranus*. The optimal temperature and pH were 40 °C (Fig. 5A) and pH 7.3 (Fig. 5C). The enzyme retained more than 80% activity after incubation at 25 °C for 30 min but enzyme activity was lost above 35 °C (Fig. 5B). The enzyme showed stability at pH 6–8.5 after incubation at 30 °C for 30 min (Fig. 5D). Enzyme activities were significantly inhibited in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , and  $\text{Ag}^{+}$ . Conducting the enzyme reactions using various fucoidans as substrates resulted in a small amount of reducing sugar released from fucoidans from *C. okamuranus*, *Fucus vesiculosus*, and *Sargassum horneri*. When the activity for deacetylated fucoidan was 100, the relative activity for each of the three normal fucoidans was 17, 8, and 7. A decrease in the molecular weight of fucoidan from *C. okamuranus* was observed by HPLC (Fig. 4C) but not for the other two fucoidans. When the enzyme reaction was done using the purified Swfct and the deacetylated fucoidan from *C. okamuranus* as a substrate, the result of HPLC analysis was almost the same as that when the cell-free extracts was used as shown in Fig. 4A. This indicated the degradation pattern by Swfct differs on the presence or absence of the acetyl group of fucoidan.

**Enzymatic properties of Swfcn2** We initially attempted to examine the enzymatic properties of Swfcn2 by measuring reducing sugars but could not detect any and thus we evaluated activity qualitatively using C-PAGE, previously used by another group to measure fucoidanase activity (10). A decrease in the molecular weight of fucoidan from *S. sculpera* in the enzyme reaction mixture was observed on acrylamide gels. Fig. 6 shows the optimal temperature and pH, and the stability of the enzyme toward temperature and pH. The optimal temperature and pH were 45–50 °C (Fig. 6A) and pH 6.0 (Fig. 6C). The enzyme remained stable below 40 °C (Fig. 6B) and at pH 5.5–9.5 (Fig. 6D) after incubation for 30 min. Activity was significantly inhibited in the presence of  $\text{Zn}^{2+}$ . The use of various fucoidans as substrates, followed by HPLC analysis, showed that the molecular weight of fucoidan from *Macrocystis pyrifera* was reduced (Fig. 4D) in addition to that from *S. sculpera*. When the enzyme reaction was done using the purified Swfcn2 and the fucoidan from *S. sculpera* as a substrate, the result of HPLC analysis was almost the same as that when the cell-free extracts was used as shown in Fig. 4C. Enzymatic properties of Swfct and Swfcn2 are shown in Table 1, and both of enzymes were monomeric proteins.

#### Examination of algal polysaccharides as sole carbon sources for strains SW and H18

We cultivated *Flavobacterium* sp. SW and *L. algae* H18 with five types of fucoidan, or with laminarin or alginic acid, each as the sole carbon source in a synthetic medium previously used (15). As shown in Table 2, *Flavobacterium* sp. SW grew well on fucoidans from *C. okamuranus* and *S. horneri*, and on alginic acid and laminarin. Little growth was observed on fucoidans from *M. pyrifera* and *S. sculpera*. Fucoidans from *Undaria pinnatifida* and *F. evanescens* were not utilized as carbon sources. In contrast, *L. algae* H18 grew well only on fucoidan from *C. okamuranus*, little growth was observed on fucoidans from

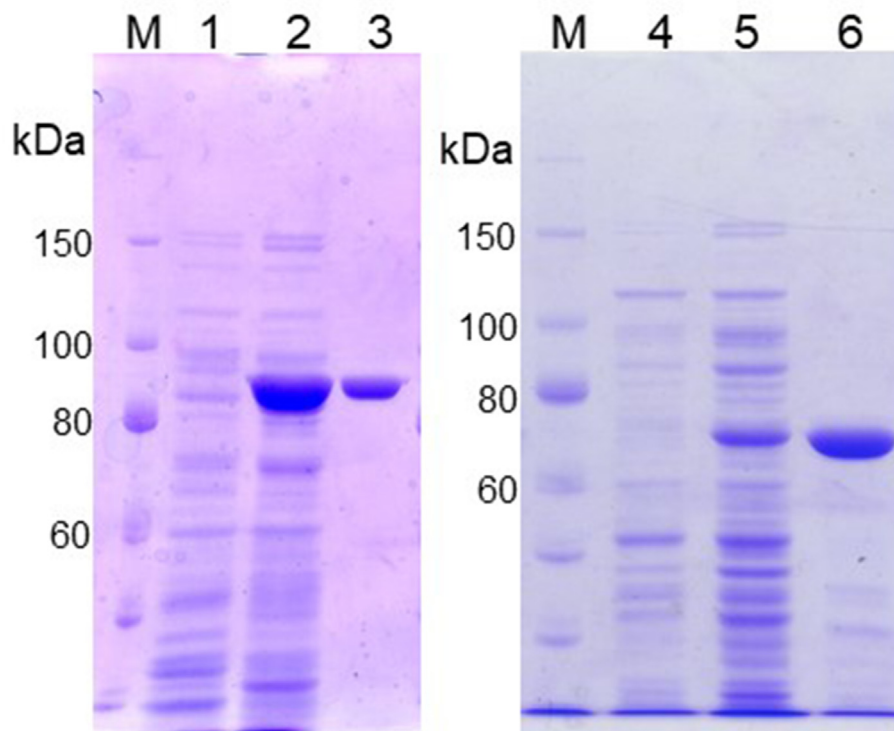


FIG. 3. SDS-PAGE of the fucoidanases Swfct and Swfcn2. Lane M, marker proteins; lane 1, cell-free extract (7.5  $\mu\text{g}$ ) of *E. coli* BL21 (DE3)/pCold I; lane 2, cell-free extract (25  $\mu\text{g}$ ) of *E. coli* BL21 (DE3)/pCold I/swfct; lane 3, purified Swfct (1.6  $\mu\text{g}$ ); lane 4, cell-free extract (7.4  $\mu\text{g}$ ) of *E. coli* BL21 (DE3)/pET-21a; lane 5, cell-free extract (20  $\mu\text{g}$ ) of *E. coli* BL21 (DE3)/pET-21a/swfcn2; lane 6, purified Swfcn2 (5.5  $\mu\text{g}$ ).



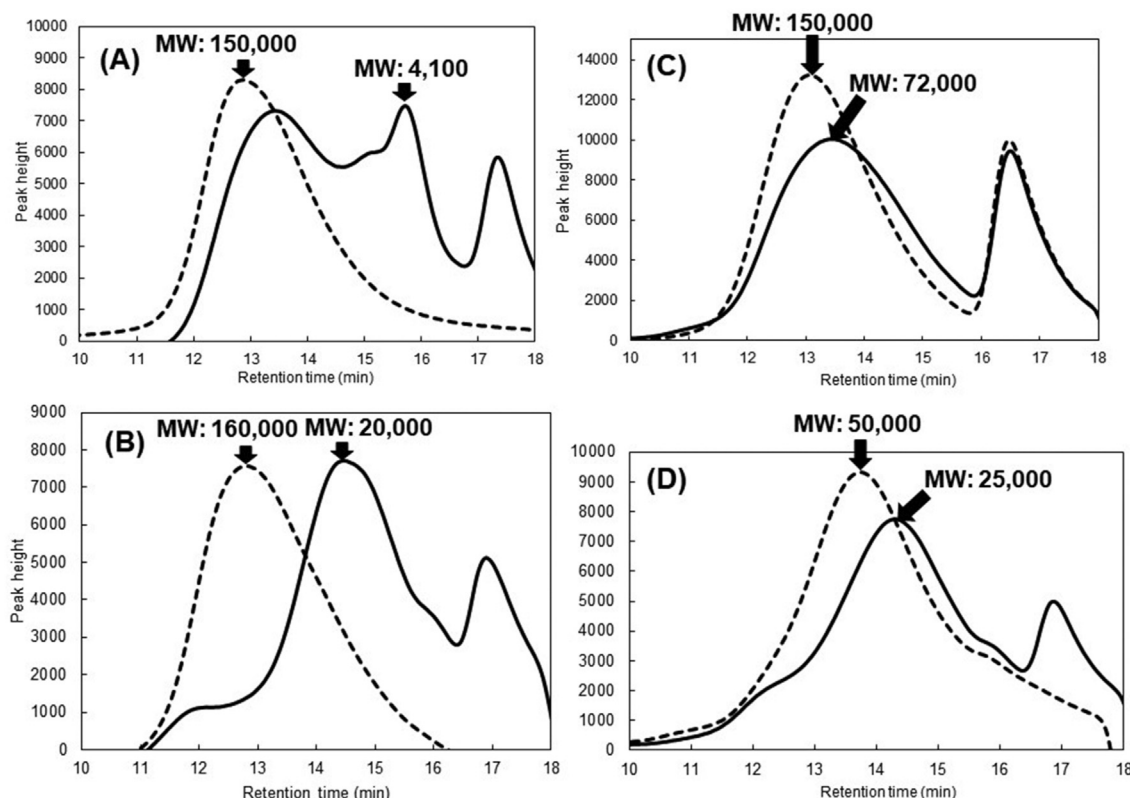


FIG. 4. HPLC elution patterns after the enzyme reactions. The solid lines and dashed lines show the elution patterns with or without enzyme. (A) The reaction mixture contained 2% deacetylated fucoidan from *C. okamuranus* and the cell-free extract of *E. coli* pColdI/swfct. The enzyme reaction was run for 24 h. (B) The reaction mixture contained 2% fucoidan from *S. sculpera* and the cell-free extract of *E. coli* pET-21a/swfcn2. The enzyme reaction was run for 24 h. (C) The reaction mixture contained 2% fucoidan from *C. okamuranus* and purified Swfct. The enzyme reaction was run for 15 min. (D) The reaction mixture contained 2% fucoidan from *M. pyrifera* and purified Swfcn2. The enzyme reaction was run for 30 min.

*S. horneri* and *S. sculpera*, and no growth was detected on the other algal polysaccharides tested.

## DISCUSSION

Most fucoidan degrading enzymes, called fucoidanases, are classified as belonging to the GH107 family. Currently 27 genes are classified in this family, of which the functions of six have been clarified. The family GH168 was created in 2020 to encompass other fucoidan-degrading enzymes. However, the amino acid sequence of fucoidanase Fct114 from our isolated *L. algae* H18 is not homologous to members of either the GH107 or GH168 family. In this study, we isolated *Flavobacterium* sp. SW, which can grow using fucoidan from *C. okamuranus* as the sole carbon source. A search of the SW strain genome for genes similar to *fct114* or genes encoding proteins belonging to the GH107 or GH168 families identified *swfct* and *swfcn2*, which have high homology with *fct114* and GH107 family members, respectively.

Fct114 and Swfct are relatively large enzymes, with masses of 112 and 90 kDa, respectively. Deacetylated fucoidan from *C. okamuranus* was the best substrate for both enzymes. The specific activities of Fct114 and Swfct were 3.18 and 2.63  $\mu\text{mol}$  reducing sugars formed per min per mg-enzyme protein, respectively, and were considered to be almost the same. Other enzymatic properties were similar. However, the activities against normal fucoidan were different, Fct114 showed about 50% activity towards normal fucoidan as compared to deacetylated fucoidan (18), while Swfct had only one-third of Fct114's activity. This means that Fct114 is more active for normal fucoidan than Swfct. Amino acid sequence alignment of Fct114 and Swfct (Fig. 1) showed that the homology of the C-terminal

regions is higher than those of the N-terminal regions, so the difference in substrate specificity may be due to the N-terminal regions. When searching conservative protein domains in Fct114 and Swfct by the software, PROSITE (ExPASy - PROSITE), Lam-G like domain was found in the N-terminal region of Fct114 from residues 228 to 370, and Swfct did not have such a domain. Although the function of Lam-G like domain has not been clarified, it is possible that the domain influences the difference in substrate specificity between Fct 114 and Swfct. Furthermore, we attempted to predict the three-dimensional structures of the two enzymes but no appropriate template was identified by SWISS-MODEL software (SWISS-MODEL, <https://www.expasy.org>) and no predicted structure was obtained by AlphaFold2 software (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>). These facts may suggest that the structures of Fct114 and Swfct may be novel.

Detailed structural analyses are available for fucoidanases belonging to the GH107 family, including MfFcnA from *M. fucanivorans* SW5 and FcnA from *Psychromonas* sp. SW5A (22). We identified Swfcn2 based on the sequence of FcnA. Although the molecular weight of Swfcn2 is larger than that of FcnA, the amino acid sequences of both enzymes are similar (Fig. 2), and the proposed catalytic amino acid residues of the GH107 enzyme, D<sup>412</sup> and H<sup>417</sup>, are conserved in Swfcn2. FcnA catalyzes the degradation of fucoidan from *M. pyrifera* but not from *C. okamuranus* (22), and exhibits limited activity towards fucoidan from *Saccharina japonica*; its activity for fucoidan from *S. sculpera* has not been assessed (22). This trend in substrate specificity is the same as that of Swfcn2, suggesting that Swfcn2 and FcnA have similar enzymatic properties.

The enzyme activity of Swfct in comparison to Fct114 was evaluated by measuring the amount of reducing sugar ends

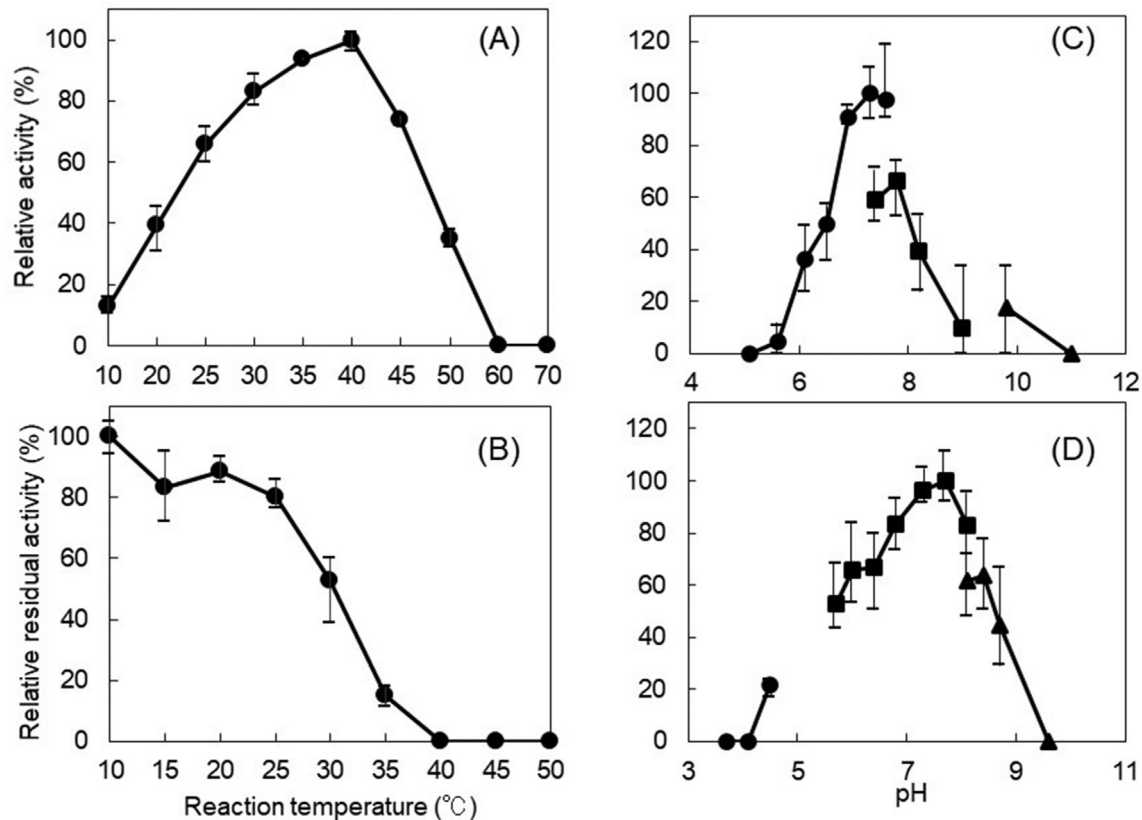


FIG. 5. Effects of temperature and pH on Swfct activity and stability. Enzyme reactions were carried out using 2% deacetylated fucoidan and purified Swfct for 10 min at 40 °C in 50 mM potassium-phosphate buffer (pH 7.7), except that the reaction temperature (A) or the reaction buffer (C) was varied. (A) Enzyme activities were measured at the indicated temperature. (B) Enzyme activities were measured after the purified enzyme was preincubated for 30 min at the indicated temperature in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). (C) Enzyme activities were measured in buffers of various pH. (D) Enzyme activities were measured after the purified enzyme was preincubated for 30 min at the indicated pH in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). (C, D) The buffers used were potassium phosphate (circles), borate-NaOH (squares), and NaHCO<sub>3</sub>-NaOH (triangles).

released during the enzyme reaction but no reducing sugars could be detected using Swfnc2. We therefore qualitatively evaluated activity by C-PAGE, used previously to investigate fucoidanases belonging to the GH107 family (9–12,21). The HPLC results of the Swfct and Swfnc2 reaction mixtures are shown in Fig. 4. The Swfnc2 mixture provided a peak corresponding to 20,000 Da (Fig. 4B), which is much lower than that of the fucoidan substrate (160,000 Da). In contrast, the Swfct reaction mixture provided a peak with a slightly lower molecular weight than that of the substrate, and a peak at 4100 Da (Fig. 4A), which is much lower than that of the fucoidan substrate (150,000 Da). Thus, high molecular weight compounds remained in the Swfct reaction mixture but not in the Swfnc2 mixture. Reducing end sugars were observed when using Swfct, suggesting that Swfct catalyzes an exo-reaction and substantial amounts of glycoside bonds might be cleaved. On the contrary, since Swfnc2 catalyzes an endo-reaction, it is presumed that the amounts of reduced sugar formed is small. However, source of the peak at 4100 Da in the Swfct reaction mixture remains unclear. A peak at the same position was also detected in the enzymatic reaction using the purified enzyme, and it is certain that the peak was not derived from impurities in the cell-free extracts.

Table 2 shows the algal polysaccharides utilized by strains SW and H18. Although both fucoidan-degrading bacterial strains were isolated using the same method, the bacteria grew on different polysaccharide carbon sources. Strain H18 grew vigorously only on fucoidan from *C. okamuranus* whereas strain SW grew well on fucoidan from *S. horneri* and *C. okamuranus*, and on alginic acid and laminarin. Thus, strain SW can utilize a wider variety of

polysaccharides than can strain H18. Although the chemical structure of fucoidan is unclear in detail, it has been shown that there are differences in the glycoside linkages between fucose residues among brown algae with different orders (23). In order Fucales such as *S. horneri*, fucoidan is composed of alternating  $\alpha$ -(1–4) and  $\alpha$ -(1–3) linked fucose backbone. On the contrary, in orders Chordariales such as *C. okamuranus* and Laminariales such as *M. pyrifera* and *S. sculpera*, fucoidan is composed of only  $\alpha$ -(1–3) linked fucose backbone. Since the strain SW can grow using fucoidan from *S. horneri* as a carbon source, it is considered that it has another fucoidan-degrading enzyme different from Swfct. In addition, although strain SW carries a fucoidan-degrading gene, its growth on fucoidans from *S. sculpera* and *M. pyrifera* as sole carbon sources was slower than that of *C. okamuranus*. This suggests that the promoter activity of the SW gene may be weak, but we did not measure the expression level of the gene and so the reason remains unclear.

Sichert et al. (24) reported that *Lentimonas* sp. CC4 can utilize six kinds of fucoidan as carbon sources, and used proteomics analysis to show that each fucoidan is catalyzed by hundreds of copies of fucoidanases. They identified or predicted multiple operons with unique combinations of different enzymes for a high diversity of fucoidan structures, and suggested that the diverse operon arrangement and specific regulation may target different structure motifs (24). SW strain was isolated as a microorganism that grows on fucoidan from *C. okamuranus* as a sole carbon source and has two different genes: one involved in the degradation of fucoidans from *C. okamuranus*, and one for fucoidan from *S. sculpera*.

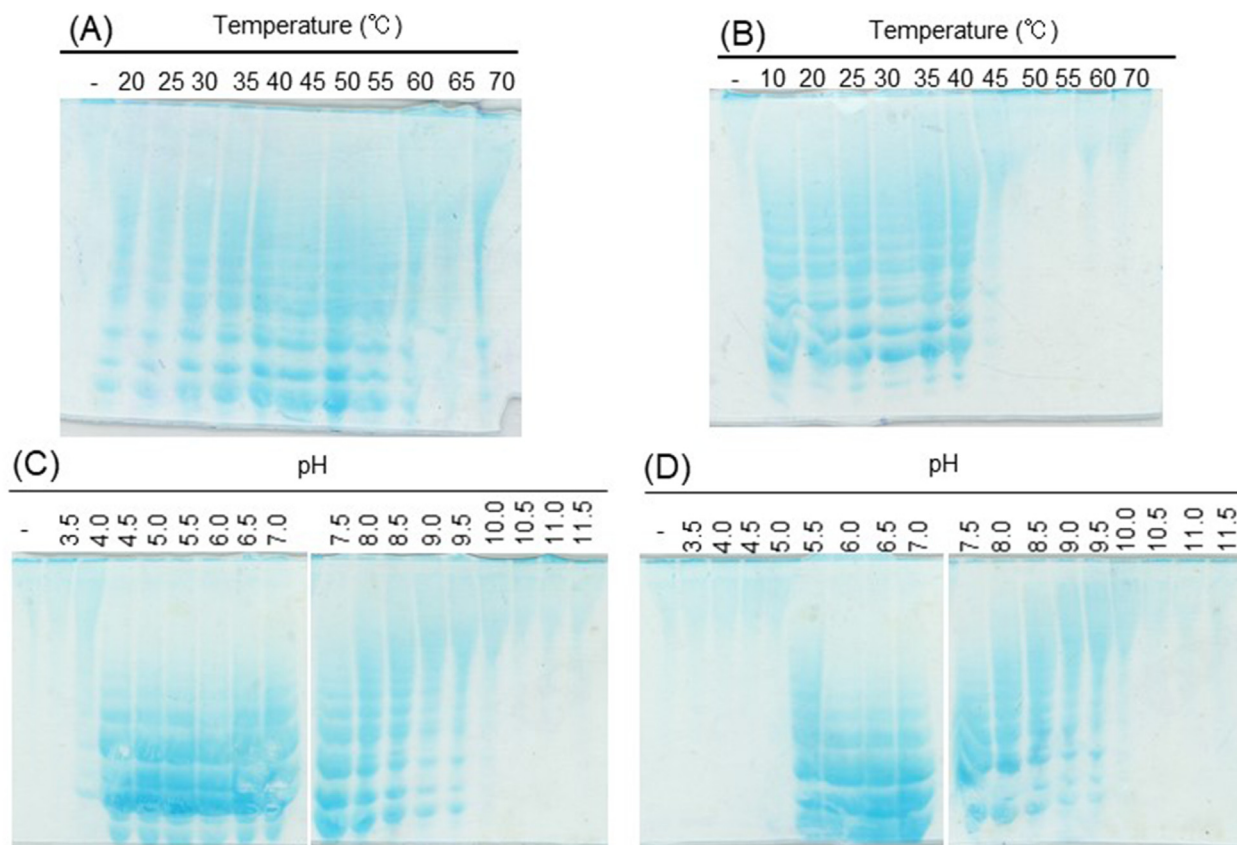


FIG. 6. Effects of temperature and pH on Swfctn2 activity and stability. Enzyme reactions were carried out using 2% fucoidan from *S. sculpera* and purified Swfctn2 for 30 min at 40 °C in 100 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0), except that the reaction temperature (A) or the reaction buffer (C) was varied. (A) Enzyme activities were measured at the indicated temperature. (B) Enzyme activities were measured after the purified enzyme was preincubated for 30 min at the indicated temperature in 20 mM Tris–HCl buffer (pH 7.4). (C) Enzyme activities were measured in buffers of various pH. (D) Enzyme activities were measured after the purified enzyme was preincubated for 30 min at the indicated pH in 20 mM Tris–HCl buffer (pH 7.4). (C, D) Acetate buffers were used at pH 3.5–5, MES buffers were used at pH 5.5–7, Tris–HCl buffers were used at pH 7.5–8.5, borate–NaOH buffers were used at pH 9–10, and bicarbonate–NaOH buffers were used at pH 3.5–5.

TABLE 1. Comparison of enzyme properties of two fucoidanases, Swfct and Swfctn2.

	Swfct	Swfctn2
Molecular weight	90	70
Optimal temp. (°C)	40	45–50
Optimal pH	7.3	6.0
Thermal stability <sup>a</sup>	25	40
pH stability <sup>a</sup>	6–8.5	5.5–9.5
Substrate specificity	<i>C. okamuranus</i> <sup>b</sup>	<i>S. sculpera</i> <sup>b</sup> <i>M. pyriferia</i> <sup>b</sup>
Reducing end formation	+	-
Inhibition by metal ions	Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup>	Zn <sup>2+</sup>

<sup>a</sup> Remaining activities were estimated after incubation for 30 min at each temperature and pH.

<sup>b</sup> Algae from which fucoidan was derived.

TABLE 2. Effects of algal polysaccharides on the growth of *Flavobacterium* sp. SW and *L. algae* H18

Polysaccharide	Growth (OD <sub>660</sub> )	
	SW	H18
<i>C. okamuranus</i> <sup>a</sup>	1.31 ± 0.02	1.56 ± 0.01
<i>F. evanescens</i> <sup>a</sup>	N.D.	N.D.
<i>M. pyriferia</i> <sup>a</sup>	0.173 ± 0.013	0.146 ± 0.016
<i>S. sculpera</i> <sup>a</sup>	0.231 ± 0.001	0.309 ± 0.030
<i>S. horneri</i> <sup>a</sup>	0.970 ± 0.015	0.363 ± 0.019
<i>U. pinnatifida</i> <sup>a</sup>	N.D.	0.195 ± 0.002
Laminarin	1.33 ± 0.01	N.D.
	1.77 ± 0.02	0.131 ± 0.016

Each strain was cultivated at 30°C for 3 d in the medium previously reported (15), and each polysaccharide was added to 2%. N.D., not detected.

<sup>a</sup> Algae from which fucoidan was derived.

Moreover, SW strain grew well using fucoidan from *S. horneri*, and on alginic acid and laminarin. The degrading enzyme system in SW strain can thus likely degrade various marine polysaccharides in addition to fucoidan. We will investigate the enzymes involved in the degradation in the future. In addition, we will use the enzymes found in the SW strain to lower the molecular weight of fucoidan and examine the biological activity of the reduced molecular weight products.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) KAKENHI Grant Number JP18K05392 (TO), and by the Institute for Fermentation, Osaka (IFO).

## References

- Wang, Y., Xing, M., Cao, Q., Ji, A., Liang, H., and Song, S.: Biological activities of fucoidan and the factors mediating its therapeutic effects: a review of recent studies, *Mar. Drugs*, **17**, 183 (2019).
- Daub, C. D., Mabate, B., Malgas, S., and Pletschke, B. I.: Fucoidan from *Ecklonia maxima* is a powerful inhibitor of the diabetes-related enzyme,  $\alpha$ -glucosidase, *Int. J. Bio. Macromol.*, **151**, 412–420 (2020).
- Oliveira, C., Neves, N. M., Reis, R. L., Martins, A., and Silva, T. H.: A review on fucoidan antitumor strategies: from a biological active agent to a structural component of fucoidan-based systems, *Carbohydr. Polym.*, **239**, 116131 (2020).
- Torres, M. D., Florez-Fernandez, N., Simon-Vazquez, R., Gimenez-Abian, J. F., Diaz, J. F., Gonzalez-Fernandez, A., and Dominguez, H.: Fucoidan: The importance of processing on their anti-tumoral properties, *Alga Res.*, **45**, 101748 (2021).

5. Zayed, A., El-Aasr, M., Ibrahim, A.-R. S., and Ulber, R.: Fucoidan characterization: Determination of purity and physicochemical and chemical properties, *Mar. Drugs*, **18**, 571 (2020).
6. Colin, S., Deniaud, E., Jam, M., Descamps, V., Chevolut, Y., Kervarec, N., Yvin, J. C., Barbeyron, T., Michel, G., and Kloareg, B.: Cloning and biochemical characterization of the fucanase FcnA: Definition of a novel glycoside hydrolase family specific for sulfated fucans, *Glycobiology*, **16**, 1021–1032 (2006).
7. Sakai, T., Kimura, H., and Kato, I.: Purification of sulfated fucoglucuronomannan lyase from bacterial strain of *Fucobacter marina* and study of appropriate conditions for its enzyme digestion, *Mar. Biotechnol.*, **5**, 380–387 (2003).
8. Sakai, T., Kawai, T., and Kato, I.: Isolation and characterization of a fucoidan-degrading marine bacterial strain and its fucoidanase, *Mar. Biotechnol.*, **6**, 335–346 (2004).
9. Silchenko, A. S., Kusaykin, M. I., Kurulenko, V. V., Zakharenko, A. M., Isakov, V. V., Zaporozhets, T. S., Gazha, A. K., and Zvyagintseva, T. N.: Hydrolysis of fucoidan by fucoidanase isolated from the marine bacterium, *Formosa algae*, *Mar. Drugs*, **11**, 2413–2430 (2013).
10. Silchenko, A. S., Ustyuzhanina, N. E., Kusaykin, M. I., Krylov, V. B., Shashkov, A. S., Dmitrenok, A. S., Usoltseva, R. V., Zueva, A. O., Nifantiev, N. E., and Zvyagintseva, T. N.: Expression and biochemical characterization and substrate specificity of the fucoidanase from *Formosa algae*, *Glycobiology*, **27**, 254–263 (2017).
11. Zueva, A. O., Silchenko, A. S., Rasin, A. B., Kusaykin, M. I., Usoltseva, R. V., Kalinovskiy, A. I., Kurilenko, V. V., Zvyagintseva, T. N., Thinh, P. D., and Ermakova, S. P.: Expression and biochemical characterization of two recombinant fucoidanases from the marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica* CA1127<sup>T</sup>, *Int. J. Biol. Macromol.*, **164**, 3025–3037 (2020).
12. Vuillemin, M., Silchenko, A. S., Cao, H. T. T., Kokoulin, M. S., Trang, V. T. D., Holck, J., Ermakova, S. P., Meyer, A. S., and Mikkelsen, M. D.: Functional characterization of a new GH107 endo- $\alpha$ -(1,4)-fucoidanase from the marine bacterium *Formosa haliotis*, *Mar. Drugs*, **18**, 562 (2020).
13. Shen, J., Chang, Y., Zhang, Y., Mei, X., and Xue, C.: Discovery and characterization of an endo-1,3-fucanase from marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica*: a novel glycoside hydrolase family, *Front. Microbiol.*, **11**, 1674 (2020).
14. Ohshiro, T., Ohmoto, Y., Ono, Y., Ohkita, R., Miki, Y., Kawamoto, H., and Izumi, Y.: Isolation and characterization of a novel fucoidan-degrading microorganism, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1729–1732 (2010).
15. Ohshiro, T., Harada, N., Kobayashi, Y., Miki, Y., and Kawamoto, H.: Microbial fucoidan degradation by *Luteolibacter algae* H18 with deacetylation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 620–623 (2012).
16. Nagaoka, M., Shibata, H., Kimura, I., Hashimoto, S., Kimura, K., Makino, T., Aiyama, R., Ueyama, S., and Yokokura, T.: Structural study of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* Tokida, *Glycoconjugate J.*, **16**, 19–26 (1999).
17. Nagao, T., Kumabe, A., Komatsu, F., Yagi, H., Suzuki, H., and Ohshiro, T.: Gene identification and characterization of fucoidan deacetylase for potential application to fucoidan degradation and diversification, *J. Biosci. Bioeng.*, **124**, 277–282 (2017).
18. Nagao, T., Arai, Y., Yamaoka, M., Komatsu, F., Yagi, H., Suzuki, H., and Ohshiro, T.: Identification and characterization of the fucoidanase gene from *Luteolibacter algae* H18, *J. Biosci. Bioeng.*, **126**, 567–572 (2018).
19. Kawamoto, H., Miki, Y., Kimura, T., Tanaka, K., Nakagawa, T., Kawamukai, M., and Matsuda, H.: Effects of fucoidan from Mozuku on human stomach cell lines, *Food Sci. Technol. Res.*, **12**, 218–222 (2006).
20. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680–685 (1970).
21. Nelson, N.: A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose, *J. Biol. Chem.*, **153**, 375–380 (1944).
22. Vickers, C., Liu, F., Abe, K., Salama-Alber, O., Jenkins, M., Springate, C. M. K., Burke, J. E., Withers, S. G., and Boraston, A. B.: Endo-fucoidan hydrolases from glycoside hydrolase family 107 (GH107) display structural and mechanistic similarities to  $\alpha$ -L-fucosidases from GH29, *J. Biol. Chem.*, **293**, 18296–18303 (2018).
23. Zayed, A. and Ulber, R.: Fucoidan production: Approval key challenges and opportunities, *Carbohydr. Polym.*, **211**, 289–297 (2019).
24. Sichert, A., Corzett, C. H., Schechter, M. W., Unfried, F., Markert, S., Becher, D., Fernandez-Guerra, A., Liebeke, M., Schweder, T., Polz, M. F., and Hehemann, J.-H.: *Nat. Microbiol.*, **5**, 1026–1039 (2020).