

(様式2)

## 学位論文の概要及び要旨

氏名 荒井 良仁 印

題目 海洋細菌由来フコイダン分解酵素に関する研究

### 学位論文の概要及び要旨

古来より日本人が習慣的に食べる海藻は、ビタミンやミネラルを含む栄養分が豊富で、健康寿命の延伸に貢献すると考えられている。中でも褐藻にはそれらの栄養分だけでなく、フコイダンと呼ばれる海藻特有の粘質成分も含まれている。フコイダンは、L-フコースが主構成糖として $\alpha,1-3$ 結合、 $\alpha,1-4$ 結合で繋がっており、側鎖には硫酸基やウロン酸残基が結合した分子量100,000~1,000,000の硫酸化多糖類である。フコイダンの特性は広範に研究されており、抗ウイルス作用や、抗ガン作用、抗炎症作用といった様々な生理活性が報告されている。そのため、フコイダンは健康食品・医薬品としての期待がもたれているが、高分子化合物であるがため、構造と生理活性の関連性は不明な点が多く、未だ解明されていない。著者らのグループでは、オキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus* Tokida) 由来フコイダンを酵素を用いて特定の構造を有する化合物へ分解し、その構造活性相関を解明して、機能性食品や高付加価値物質の開発へつなげることを目指しているが、フコイダン分解酵素に関する学術的報告は少ない。著者らのグループでは、海藻を分離源としてオキナワモズクフコイダン分解菌 *Luteolibacter algae* H18を既に単離しており、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とその遺伝子 (*fud664*) 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型低分子化酵素とその遺伝子 (*fct114*) を特定し、酵素の特性解明を行っている。

本研究では、H18株とは異なるオキナワモズクフコイダン分解菌 *Flavobacterium* sp. SWを新たに単離した。そして、H18株およびSW株から新たにフコイダン分解酵素遺伝子を同定し、それら酵素の性質を明らかにすることを目的とした。2種の菌株由来の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、フコイダンの構造解明や生理活性評価の比較につながると考えた。

初めに、*L. algae* H18および *Flavobacterium* sp. SW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得られた粗酵素液では、H18株の方がSW株に比べて明らかに分解活性が強く、種々のフコイダンに由来する分解産物が見られた。

次に、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株由来の*fct114*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、クローニング、異種発現、酵素化学的性質の特徴決定を行った。Fct114とSwfctはそれぞれ、112 kDa、90 kDaと分子量が比較的大きな酵素であり、比活性を比較すると、Fct114は3.18 U/mg protein、Swfctは2.63 U/mg proteinでほぼ同じであった。

既知のフコイダナーゼ遺伝子のほとんどは、GH 107またはGH 168ファミリーに属することが報告されている。そこで、SW株とH18株のドラフトゲノムDNA情報をもとに、これらファミリーと相同性の高い酵素遺伝子を両菌株から選択した。その結果、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。どちらの酵素もGH 107に属し、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、単独で反応させた場合に比べると低分子化が促進されることがわかった。

最後に、H18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菌体からフコイダンスルファターゼの精製を行った。ドラフトゲノム情報と精製酵素のN末端アミノ酸配列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0.145 U/mg proteinと小さく、オキナワモズクフコイダンが有する硫酸基全体の約20%程度しか遊離できなかった。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おり、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ず、ホスファターゼの一種であるPhoDファミリーに分類される酵素であった。Fsut107は、*p*-nitrophenyl sulfateに対しては全く酵素活性を示さず、*p*-nitrophenyl phosphateに対して顕著な活性を有することから、今後さらなる検証が必要と考えられた。

以上のように、本研究では、オキナワモズクフコイダン分解に関与する4つの酵素遺伝子 (*swfct*, *swfcn2*, *h18fdal*, *fsut107*) を特定し、酵素の特性を明らかにした。既に見出している脱アセチル化酵素Fud664、endo型低分子化酵素Fct114と、今回見出した4種類の酵素を組み合わせることで異なるフコイダン分解産物を取得することが期待できる。そして、その構造を決定することにより、フコイダンの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。