

海洋由来 *Luteolibacter algae* H18 の  
フコイダン低分子化酵素に関する研究

2019 年 7 月

長尾達彦

# 目次

第 1 章 序論.....	1
1-1. フコイダンについて.....	1
1-2. フコイダン分解微生物について.....	7
1-3. フコイダン分解酵素について.....	10
1-4. 本論文の目的および構成.....	15
第 2 章 <i>Luteolibacter algae</i> H18 からのフコイダンデアセチラーゼの精製.....	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. <i>Luteolibacter algae</i> H18 の培養.....	18
2-2-3. 無細胞抽出液 (C.F.E.) の調製.....	19
2-2-4. タンパク質濃度の定量.....	20
2-2-5. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE).....	20
2-2-6. F キットを用いた酵素活性の測定と酢酸濃度の定量.....	20
2-2-7. DEAE-Sepharose FF カラムによる酵素精製.....	21
2-2-8. Phenyl-TOYOPEARL 650M による酵素精製.....	21
2-2-9. Q-Sepharose FF カラムによる酵素精製.....	22
2-2-10. Butyl-TOYOPEARL 650M による酵素精製.....	22
2-2-11. Mono Q <sup>®</sup> <sub>HR</sub> 10/10 による酵素精製.....	22
2-2-12. Superose 6 <sup>®</sup> <sub>HR</sub> 10/30 による酵素精製.....	23
2-2-13. 精製酵素タンパク質のプロテアーゼ消化と Tricine SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Tricine SDS-PAGE).....	23
2-2-14. N 末端および内部アミノ酸シーケンス解析.....	23
2-2-15. DNA 抽出.....	24
2-3. 結果.....	26
2-3-1. 大量培養と C.F.E. の調製.....	26
2-3-2. DEAE-Sepharose FF カラムによる酵素精製.....	26
2-3-3. Phenyl-TOYOPEARL 650M による酵素精製.....	27
2-3-4. Q-Sepharose FF カラムによる酵素精製.....	28
2-3-5. Butyl-TOYOPEARL 650M による酵素精製.....	29
2-3-6. Mono Q <sup>®</sup> <sub>HR</sub> 10/10 による酵素精製.....	30
2-3-7. Superose 6 <sup>®</sup> <sub>HR</sub> 10/30 による酵素精製.....	32
2-3-8. H18 株ゲノム DNA の抽出とドラフトゲノム配列解析.....	34

2-3-9. 精製酵素のアミノ酸配列解析 .....	35
2-4. 考察.....	38

### 第 3 章 フコイダンデアセチラーゼ遺伝子クローニング、異種発現および酵素 化学的性質..... 40

3-1. 緒言.....	40
3-2. 材料および実験方法.....	41
3-2-1. コンピテントセルの調製 .....	41
3-2-2. プラスミド単離とプライマーの設計.....	42
3-2-3. PCR 増幅.....	42
3-2-4. 制限酵素消化 .....	43
3-2-5. ライゲーション .....	43
3-2-6. 組換え大腸菌による酵素タンパク質の生産検討.....	44
3-2-7. Ni Sepharose 6 Fast Flow による酵素精製 .....	44
3-2-8. HRV 3C Protease でのタグ配列の切断 .....	45
3-2-9. 至適 pH の検討 .....	45
3-2-10. 至適温度の検討.....	46
3-2-11. 熱安定性の検討.....	46
3-2-12. イオンクロマトグラフィーによる酢酸、硫酸の定量.....	46
3-2-13. 金属イオンの活性への影響検討.....	46
3-2-14. 酵素阻害剤の活性への影響検討.....	47
3-2-15. 人工基質に対する活性検討.....	47
3-2-16. オキナワモズクフコイダン分解プロセスへのデアセチラーゼの関与.....	48
3-2-17. 酵素的な脱アセチル化フコイダンの調製.....	49
3-3. 結果.....	50
3-3-1. <i>fud</i> の PCR 増幅.....	50
3-3-2. <i>E.coli</i> BL21(DE3)/pCold I/ <i>fud</i> による目的タンパク質生産検討.....	51
3-3-3. <i>E.coli</i> BL21(DE3)/pCold TF/ <i>fud</i> による目的タンパク質生産検討.....	52
3-3-4. <i>E.coli</i> BL21(DE3)/pCold TF/ <i>fud</i> 由来 C.F.E. 中のフコイダンデアセチラーゼ活性.....	53
3-3-5. Ni Sepharose 6 Fast Flow による酵素精製 (1 回目).....	54
3-3-6. HRV 3C Protease でのタグ配列の切断と Ni Sepharose 6 Fast Flow による酵素精製 (2 回目).....	55
3-3-7. 至適温度、至適 pH の検討.....	56
3-3-8. 熱安定性の検討 .....	57
3-3-9. 金属イオン、酵素阻害剤の活性への影響検討.....	58
3-3-10. 人工基質に対する活性検討.....	59

3-3-11. オキナワモズクフコイダンに対する分解プロセスへの関与についての検討 .....	59
3-3-12. 酵素的な脱アセチル化フコイダンの調製結果 .....	61
3-4. 考察 .....	63
<b>第 4 章 フコイダンデアセチラーゼの触媒残基の予測 .....</b>	<b>66</b>
4-1. 緒言 .....	66
4-2. 実験方法 .....	67
4-2-1. DNA 操作 .....	67
4-2-2. フコイダンデアセチラーゼの予測構造モデル .....	67
4-2-3. プライマーの設計 .....	67
4-2-4. PCR 増幅 .....	68
4-2-5. フコイダンに対するデアセチラーゼ活性検討 .....	68
4-2-6. 人工基質に対する活性検討 .....	69
4-3. 結果 .....	70
4-3-1. フコイダンデアセチラーゼの予測構造モデルの作成 .....	70
4-3-2. フコイダンデアセチラーゼの C 末端側欠損タンパク質をコードする発現株の構築 .....	73
4-3-3. 組み換え株の発現検討 .....	74
4-3-4. フコイダンに対する活性検討 .....	75
4-3-5. 人工基質に対する活性検討 .....	76
4-4. 考察 .....	77
<b>第 5 章 <i>Luteolibacter algae</i> H18 からのフコイダナーゼの精製 .....</b>	<b>78</b>
5-1. 緒言 .....	78
5-2. 材料および実験方法 .....	80
5-2-1. <i>Luteolibacter algae</i> H18 の培養と無細胞抽出液 (C.F.E.) の調製 .....	80
5-2-2. 酵素活性測定 .....	80
5-2-3. DEAE-Sepharose FF カラムによる酵素精製 .....	80
5-2-4. Phenyl-TOYOPEARL 650M による酵素精製 .....	80
5-2-5. Resource Q カラムによる精製 .....	81
5-3. 結果 .....	82
5-3-1. 大量培養と C.F.E. の酵素調製 .....	82
5-3-2. DEAE-Sepharose FF カラムによる酵素精製 .....	82
5-3-3. Phenyl-TOYOPEARL 650M による酵素精製 .....	83
5-3-4. Resource Q カラムによる酵素精製 .....	84
5-3-5. 精製酵素のアミノ酸配列解析 .....	87



5-4. 考察.....	89
<b>第 6 章 フコイダナーゼ遺伝子同定および異種発現、酵素化学的性質 .....</b>	<b>93</b>
6-1. 緒言.....	93
6-2. 材料および実験方法.....	94
6-2-1.DNA 実験、組換え大腸菌による酵素タンパク質の生産検討 .....	94
6-2-2.プライマーの設計 .....	94
6-2-3.PCR 増幅.....	94
6-2-4.Ni Sepharose 6 Fast Flow と Resource Q による酵素精製.....	95
6-2-5.Somogyi-Nelson 法による Fct114 の酵素化学的諸性質の検討.....	95
6-2-6.至適温度の検討 .....	97
6-2-7.熱安定性の検討 .....	97
6-2-8.至適 pH の検討 .....	97
6-2-9.pH 安定性の検討 .....	97
6-2-10. 金属イオンの活性への影響.....	98
6-2-11. 酵素阻害剤が活性に及ぼす影響検討.....	98
6-2-12. 基質特異性の検討.....	98
6-2-13. オキナワモズクフコイダン分解プロセスへのアセチル基の関与 .....	99
6-3. 結果.....	100
6-3-1.fct114 の pET-21a、pCold I、pCold TF ベクターへのクローニング .....	100
6-3-2.E. coli BL21(DE3)/pET-21a/fct114 と E. coli BL21(DE3)/pCold I/fct114 による目的タン パク質生産検討 .....	101
6-3-3.E. coli BL21(DE3)/pET-21a/fct114 と E. coli BL21(DE3)/pCold I/fct114 由来 C.F.E.中の フコイダナーゼ活性 .....	102
6-3-4.Ni Sepharose 6 FF カラムによる酵素精製.....	103
6-3-5.Resource Q による精製.....	104
6-3-6.至適温度、至適 pH の検討.....	107
6-3-7.熱安定性の検討 .....	109
6-3-8.pH 安定性の検討 .....	109
6-3-9.金属イオン、酵素阻害剤の活性への影響検討.....	110
6-3-10. 基質特異性の検討.....	112
6-3-11. オキナワモズクフコイダン分解プロセスへのアセチル基の関与 .....	112
6-4. 考察.....	114
<b>第 7 章 総括.....</b>	<b>116</b>

引用文献.....	119
謝辭.....	129
研究業績.....	130

# 第 1 章 序論

## 1-1. フコイダンについて

多糖類は非常に重要なバイオマス資源であり、そのほとんどは植物由来である。植物は、陸生の植物と海生の植物に大別でき、陸生の植物からの多糖類としてはセルロース、ヘミセルロース、リグニンが主として利用されてきている。しかし、陸生の植物と比較した場合、海生の植物からの多糖類はほとんど利用されていない。四面環海の日本では多糖類を著量含有する海藻の生育が認められる。海藻資源は無尽蔵と考えられがちであるが、これは誤りである。なぜなら、海藻の生育している場所は藻場と呼ばれる有用魚介類の棲息場と考えられており、保護、造成が積極的に行われている。このような藻場を構成している海藻を採集することは水産業関係者の理解が得られないのが現状であり、ある特定の海藻をそのまま食用として用いている以外、そのほとんどは利用されていないのである。しかしながら、近年、水産業界では、かつて獲れていたものが獲れない、かつて育ったものが育たない、というような環境の変化により水産資源の食品以外での用途の開発が注目されている。世界的な観点からすると、一部の海藻が工業原料として用いられている。例えば、*Lessonia* 属の褐藻からアルギン酸が製造されている。アルギン酸は高い粘性と種々の金属塩と特徴のあるゲルを作るため医療や食品の分野で、広く用いられており、世界での生産量は年間約 20000 トン以上と推定される。日本では、1 社が約 1500 トン程製造している [1]。褐藻に含まれる多糖類としては、アルギン酸以外に、貯蔵多糖類であるラミナラン、細胞壁多糖類であるセルロース、フコイダンなどが知られている。中でもフコイダンは、褐藻類 (オキナワモズク、ガゴメコンブ、メカブ) の成熟した成体に含まれる硫酸化多糖である [2]。フコイダンは、フコースが $\alpha$ -1, 3 結合で連結した I 型と、 $\alpha$ -1, 3 および $\alpha$ -1, 4 結合を交互に繰り返す II

型の 2 種類があるとされ、これらの基本構造以外にも側鎖や枝分かれ構造を有する複雑なヘテロ硫酸化多糖である [3]。さらに、褐藻の種類によって含有されるフコイダンは、構成糖、硫酸化度をはじめとする化学構造および、機能性が大きく異なることが報告されている [4]。

フコイダンは、1913 年にスウェーデンのウプサラ大学の Kylin らによって初めて報告され [5]、フコースを主構成糖として硫酸基やウロン酸残基が結合した多糖類と定義される。また、一般的に使用されるフコイダンという名称は、同一の構造の物質に付けられたものではなく、主成分がフコースである多糖類の総称である。従って、フコース以外に構成糖として、ガラクトース、マンノース、キシロースなどが存在する場合がある。中でも、後述するように、ガゴメコンブ由来フコイダンの構造は詳細に研究されており、グルクロン酸を含む U-フコイダン、硫酸化フコースのみからなる F-フコイダン、ガラクトースを含む G-フコイダンを含有しているとされている [6, 7]。そして、ガゴメコンブ由来の U-フコイダンががん細胞をアポトーシスさせる作用が見出され [8]、この報告以降、フコイダンの生理活性が一躍注目を浴びるようになった。

海藻由来のフコイダンの特性は広範に研究されており、近年、インフルエンザウィルス等に対する抗ウイルス作用 [9]、抗ガン作用 [10, 11]、抗凝血作用 [12, 13, 14] といった生理活性が報告されている。また、メタボリックシンドロームに対するフコイダンの生理活性も非常に多く報告されており、高脂肪食誘発肥満マウスにおける抗肥満、体重増加抑制および脂肪量の減少 [15]、抗高脂血症効果 [16]、高脂肪食誘発性のグルコース不耐性およびインスリン抵抗性を改善する抗糖尿病作用 [17] さらに、抗高血圧効果 [18, 19] などが報告されている。この抗高血圧効果の要因となるメカニズムの一つとして、血漿中のアンジオテンシン II の産生を阻害することが提唱されている。アンジオテンシン II はその受容体に結合して血管を収縮させ、血圧を上げる作用を示す。フコイダンは、アンジオテンシン II の産生を阻害し、その結果、受容体への結合する量を減少させることで、血圧の上昇を抑制してい

ると考えられている [20]。一方、マウスに経口投与したフコイダンが、免疫障害によって引き起こされるアレルギー症状を抑制するという抗アレルギー作用も報告されている [21-23]。今までに様々な抗アレルギー作用についての知見があるが、経口投与した場合の抗アレルギーメカニズムに関する報告例は少ない。この場合、フコイダンは、腸からの吸収をほとんどあるいは全く示さないことが報告されているので [14, 24, 25]、腸管免疫を賦活化することにより、アレルギーに対して多様な活性を示すと推測される。さらに、フコースと硫酸化フコースからなるマコンブ (*Saccharina japonica*) 由来の F-フコイダンが、抗血栓作用を示すものの、完全に吸収されることなく代謝されることが報告されている [14]。

フコイダンを含有する褐藻の一種であるモズク類は褐藻綱ナガマツモ目の海藻で、枝が分かれた細い糸状で粘液に富んだ体を持ち、古くから食用とされてきた。主なモズク類は、オキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus*)、モズク (*Nemacystus decipines*)、フトモズク (*Tinocladia crassa*)、キシウモズク (*Cladosiphon umezakii*) である。その中で、オキナワモズクは、主に日本で食され、もずく酢として料理される場合が多く、モズク類の中で最も生産量が多いと同時に、フコイダンの原料としても最も多く利用されている。オキナワモズクは、奄美大島を北限、八重島諸島を南限とする南西諸島固有の食用海藻であり、1970 年代に養殖技術が確立された沖縄県の主要水産物で、国内生産の 90%以上を占める [26]。オキナワモズ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 [27]、2003 年に酒井、加藤らはオキナワモズ由来フコイダ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 [28]。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) [27, 28]。さらに 2009 年に田幸らによって、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) [29]。



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。ガゴメの名前は、コンブ表面の凸凹模様の籠目 (かごめ) に由来しており、とろろ昆布や松前漬けの材料として長く食されてきた [26]。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、先にも述べたように、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 1-3) [28, 30-32]。

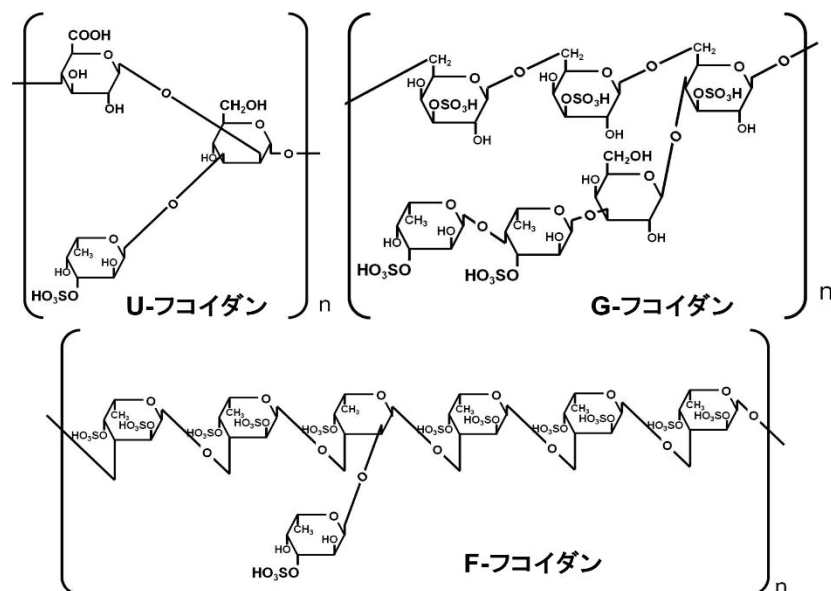


図 1-3. ガゴメコンブ由来フコイダンの構造式 [31, 32]

以下の表には、各種海藻のフコイダン含有量 (表 1-1) およびオキナワモズク由来フコイダンとガゴメコンブ由来フコイダンの構成糖、硫酸根、カチオンの分析例 (表 1-2) に関する情報を記載した。

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
<i>Ecklonia maxima</i>	40
<i>Leossonia nigrescens</i>	46
<i>Fucus vesiculosus</i>	70
<i>Ascophyllum nodosum</i>	110

表 1-2. オキナワモズクおよびガゴメコンブ由来フコイダンの構成糖、硫酸根、カチオンの分析値 [26]

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 (%)
フコース	46.8	37.7
ガラクトース	-	1.3
グルクロン酸	8.7	2.5
マンノース	-	1.8
ラムノース	-	< 0.5
キシロース	-	0.5
硫酸根	16.0	33.2
カチオン	5.7	7.2
合 計	77.2	84.2



## 1-2. フコイダン分解微生物について

フコイダンは、食物繊維の一種であり、アルギン酸、寒天、カラギーナンと同じようにヒトの体内では消化・吸収されず、そのままストレートに体外に排出される。その一方で、ある種の水産生物や、海洋環境中に存在する微生物はフコイダンを分解する酵素を有している [30]。このような酵素を生産す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 [34]。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 [34]。その後、1967 年に Thanassi らによって、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 (Fucoidanase, EC 3.2.1.44.) の存在が報告されている [35]。さらに、1992 年に古川らによって、*Vibrio* 属 5 株から、3 種のフコイダナーゼが単離された [36]。

フコイダン分解酵素について、今までに最も精力的に研究を進めたのは、オキナワモズクおよびガゴメコンブ由来フコイダンの化学構造を明らかにした酒井らのグループである。彼ら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 [37]。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 [32] 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。その後、2000 年に Bakunina らによって *Cytophaga* 属、*Alteromonas*

属、*Pseudoalteromonas* 属細菌がフコイダナーゼを有することが明らかされた [39]。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 [40]。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。

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 of fucoidan	References
<b>Bacteria</b>		
<i>Vibrio</i> sp. No. 5	<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	Furukawa <i>et al.</i> (1992) [36]
<i>Pseudoalteromonas citrea</i> KMM3296, KMM3298	<i>Fucus evanescens</i> <i>Chorda filum</i>	Bakunina <i>et al.</i> (2002) [41]
<i>Fucobacter marina</i> SA-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) [32]
<i>Mariniflexile fucanivorans</i> SW5 <sup>T</sup>	<i>Pelvetia canaliculata</i>	Descamps <i>et al.</i> (2006) [42]
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> PF-1	<i>Undaria pinnatifida</i>	Kim <i>et al.</i> (2008) [43]
<i>Flavobacterium</i> sp. F31	<i>C. okamuranus</i>	Ohshiro <i>et al.</i> (2010) [44]
<i>Flavobacteriaceae</i> CZ1127	<i>Acaudina molpadioides</i>	Chang <i>et al.</i> (2010) [45]
<i>Luteolibacter algae</i> H18	<i>C. okamuranus</i>	Ohshiro <i>et al.</i> (2012) [46]
<i>Formosa algae</i> KM3553 <sup>T</sup>	<i>F. evanescens</i>	Silchenko <i>et al.</i> (2013) [47]
<b>Invertebrates</b>		
<i>Haliotis</i> sp.	<i>F. gardneri</i>	Thanassi and Nakada (1967) [35]
<i>Patinopecten yessoensis</i>	<i>Nemacytus decipieus</i>	Kitamura <i>et al.</i> (1992) [48]
<i>Pecten maximus</i>	<i>Ascophyllum nodosum</i>	Berteau <i>et al.</i> (2002) [49]
<i>Littorina kurila</i>	<i>F. distichus</i>	Bilan <i>et al.</i> (2005) [50]
<i>Lambis</i> sp.	<i>F. evanescens</i>	Silchenko <i>et al.</i> (2014) [51]
<b>Fungi</b>		
<i>Dendryphiella arenaria</i> TM94	<i>F. vesiculosus</i>	Wu <i>et al.</i> (2011) [52]
<i>Fusarium</i> sp. LD8	<i>F. vesiculosus</i>	Wu <i>et al.</i> (2011) [53]

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経化する微生物 *Flavobacterium* sp. F31、*Luteolibacter algae* H18 が単離されている [44, 46]。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 1-4 に示すように *Luteolibacter algae* A5J-40 (AB331894-1) の配列と最も高い類似性 (97%) を示し、*Luteolibacter 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%、*Alteomonas* sp. SN-1009 (AB544005) と 73%、そして *Flavobacterium* sp. F31 (AB544005) と 71%の類似性が示された [46]。

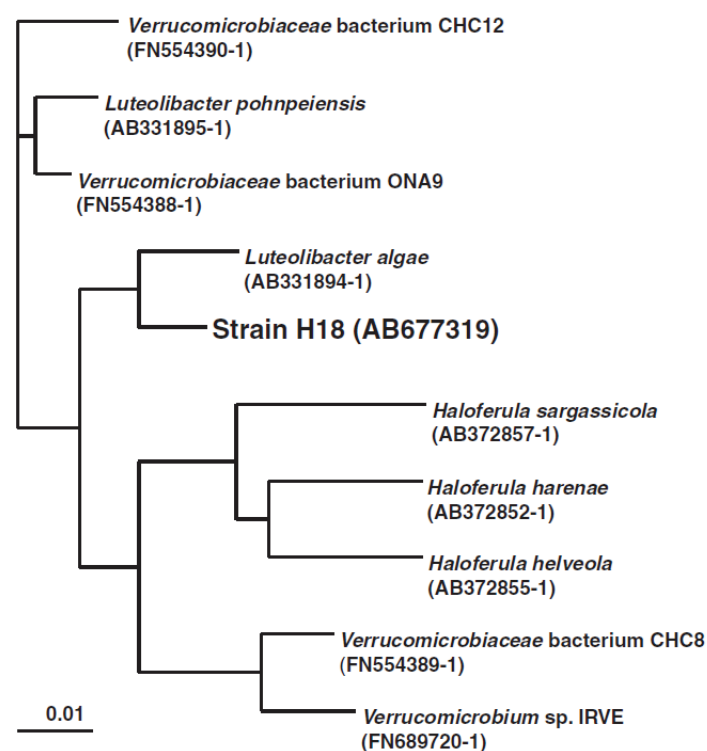


図 1-4. *Luteolibacter algae* H18 の 16S rRNA 配列に基づく系統樹 [46]

### 1-3. フコイダン分解酵素について

海藻類に含まれる多糖類の代表的なものとして、寒天、カラギーナン、フコイダン、アルギン酸がある。これら多糖類を分解する酵素はそれぞれいくつか報告されているが、その中でもアルギン酸分解酵素に関する研究が詳細に行われている。アルギン酸は褐藻類の細胞壁を構成する多糖で、構成糖として  $\beta$ -D-マンヌロン酸とその C5-epimer である  $\alpha$ -L-グルロン酸からなるブロックポリマーである。図 1-5 に示すように  $\beta$ -D-マンヌロン酸が  $\beta$ -1,4-結合した直鎖のマンヌロン酸ブロック (M ブロック) と  $\alpha$ -L-グルロン酸が  $\alpha$ -1,4-結合した捻じれたポケット構造を有する直鎖のグルロン酸ブロック (G ブロック) および、 $\beta$ -D-マンヌロン酸と  $\alpha$ -L-グルロン酸が不規則に 1,4-結合した MG ランダムブロックの存在が明らかになっている [54, 55]。M ブロックと G ブロックの比率により特性が左右され、G ブロックのポケット構造に多価イオンがトラップされると、そこを架橋点としてゲルが形成される。すなわち、G ブロックの比率が高い程、架橋点が多くなるため、より硬度の高いゲルになることがわかっている [56, 57]。

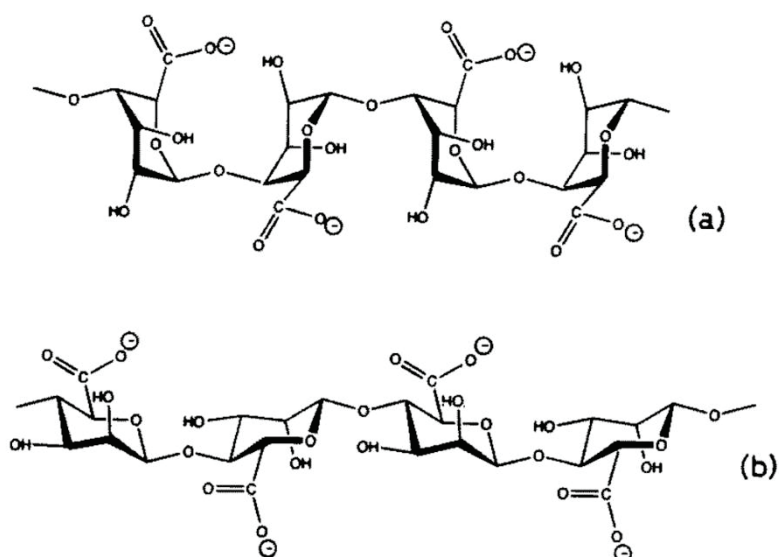


図 1-5. アルギン酸の G ブロック, M ブロックの構造 [57]

(a) G ブロック (b) M ブロック

アルギン酸を分解する酵素、アルギン酸リアーゼは、古くはアワビなどの植食動物の内臓に多く含まれていることが大島によって見出され [58]、アワビ稚貝の内臓中の分解酵素については山田らの報告がある [59]。21 世紀になり、タンパク質のアミノ酸配列情報量が飛躍的に増加した結果、相互の配列類似性が高いタンパク質の一群はファミリーと分類されるようになった。アルギン酸リアーゼは、多糖リアーゼ Family 5, 6, 7, 14, 15, 17, 18 に属することが提唱されており[60]、主にポリ G ブロックおよび MG ランダムブロックに対して特異的なポリ G リアーゼ (EC 4.2.2.11) または、M ブロックに対して特異的なポリ M リアーゼ (EC 4.2.2.3) のいずれかに分類される。さらに、これらの酵素は、エキソ型 (Family 6, 15, そして 17)、エンド型 (Family 5 と 7) に分けられるが [61, 62]、いずれも 4-*O*-グリコシド結合を切断して C-4 と C-5 の間に二重結合を形成する。アルギン酸の分解様式は、デンプン、セルロース等の他の多糖と同じく、まずエンド型アルギン酸リアーゼによってアルギン酸内部を分解してオリゴ糖とし、次にエキソ型アルギン酸リアーゼによってオリゴ糖を分解し、単糖を形成すると考えられている [62]。

一方、フコイダンは、アルギン酸と比較して構造が複雑であり、フコイダンの分解酵素としては、フコイダンの主鎖を分解するフコイダナーゼ、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[46, 63] が、未解明な部分が多いのが現状である。Furukawa らは、フコイダンの存在する培地で、*Vibrio* 属細菌と同定された N-5 株の菌体内にフコイダナーゼとフコイダンスルファターゼを誘導的に生産させた [63]。フコイダンスルファターゼは、フコイダナーゼに少し遅れて生産された。両酵素の基質特異性に関して、フコイダナーゼはガゴメコンブおよびモズクフコイダんに、フコイダンスルファターゼは、ガゴメコンブ、モズクおよびフトモズクフコイダんに作用して、それぞれ還元糖と硫酸イオンを生成することを確認した [63]。さらに、Furukawa らは、*Vibrio* 属の菌株からディスク-PAGE において単一にまで精製した 3 種のフコイダナーゼが、ガゴメコンブフコイダンを

加水分解し、主な生成物として硫酸基を有する低分子量のオリゴ糖を生成することを確認している [36]。

一方前述のように、酒井らはガゴメコンブ由来フコイダンの化学構造を明らかにしたが、その際、構造決定に貢献したのが、フコイダンをオリゴ糖単位にまで特異的に切断できるフコイダン分解酵素である。これら酵素の生産菌株は、海洋微生物をスクリーニングして得られたものである [32, 37, 38]。報告の中で *Alteromonas* sp. SN-1009 と *Fucobacter marina* SA-0082、が有する酵素は限られたフコイダンにしか作用しないのに対し [32, 64]、*Fucophilus fucoidanolyticus* SI-1234 由来の酵素は、調べた限りすべての海藻由来フコイダンにある程度資化したことから [38]、多糖類のフコイダン分解酵素生産菌として利用できる可能性が示唆された。これら酵素についてはすでに大腸菌を用いた組換え酵素としての生産系を確立し、特許を宝ヘルスケア株式会社が取得、保有している。

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 [65]。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はすべて GH ファミリー107 に分類されており、最初に GH ファミリー107 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 FcnA である [66]。この酵素遺伝子 *fcnA* はクローニングされ、大腸菌で異種発現されており、*fcnA* の塩基長は 3021 bp、FcnA の分子量は、1007 amino acids であった [66]。さらに、Silchenko らによっても *Formosa algae* KMM3553 株からフコイダナーゼ FFA2 の遺伝子がクローニング、異種発現されており、酵素化学的性質が明らかにされている [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	<i>T</i> -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) [36]
<i>Pseudoalteromonas citrea</i> KMM3296, KMM3297, KMM3298	endo	n.d.	6.5-7.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Bakunina <i>et al.</i> (2002) [41]
<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) [64]
<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) [32]
<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) [66]
<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> (2008) [43]
<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) [47]
<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 and Nakada (1967) [35]
<i>Pecten maximus</i>	endo	n.d.	5.5	n.d.	7.4	n.d.	n.d.	85	Berteau <i>et al.</i> (2002) [49]
<i>Littorina sitkana</i>	endo	n.d.	5.4	n.d.	n.d.	n.d.	0.2 M NaCl	n.d.	Bilan <i>et al.</i> (2005) [50]
<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) [51]
<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) [52]
<i>Fusarium</i> sp. LD8	endo	60	6.0	6.0	4.5	n.d.	n.d.	64	Wu <i>et al.</i> (2011) [53]

著者らのグループではオキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus*) 由来フコイダンの生理活性機構の解明を目指して、酵素的な低分子化に取り組んでいる。すでに単離しているフコイタン分解菌 *Luteolibacter algae* H18 は、フコイタ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を提唱している[46]。フコイダンの構造の多様性は、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、構成糖の種類までに及ぶため、全く別種の分子が何種類も存在する。そして、それら多様なフコイタンに対して作用する酵素については、前述の表 1-4 に示すもの報告がなされているが、これは、一部にしか過ぎず、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。すなわち、フコイタンを低分子化する酵素に関する報告例はあるものの、脱アセチル化、脱硫酸化に関与する酵素についての研究報告はほとんどないのが現状である。従って、フコイタン分解に関与する酵素を著量生産することができれば、それをフコイタンに作用させることにより、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でき、さらにはフコイタンを酵素的に分解して生成した様々な構造のフコイタン分解物の生理活性を評価することにより、フコイタ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。



## 1-4. 本論文の目的および構成

これまでの研究で、*Luteolibacter algae* H18 の細胞内酵素によってフコイダンが低分子化される際、脱アセチル化反応が起こった後に低分子化反応が進むことが示されている [46]。その一方で、H18 株のゲノム DNA 情報を明らかにすることができた。そこで本研究では、脱アセチル化反応を触媒するフコイダンデアセチラーゼ、低分子化反応を触媒するフコイダナーゼを H18 株から高度に精製し、それらのアミノ酸配列を決定後、H18 株のゲノム情報を利用して、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することにした。

本学位論文は 8 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「*Luteolibacter algae* H18 からのフコイダンデアセチラーゼの精製」では、オキナワモズクフコイダンの脱アセチル化反応を触媒するフコイダンデアセチラーゼを種々のクロマトグラフィーにより精製し、本酵素の部分アミノ酸配列を決定したうえで、本酵素遺伝子を H18 株のゲノム情報から探索し、同定した。

第 3 章「フコイダンデアセチラーゼの遺伝子同定および異種発現、酵素化学的性質」では、明らかにしたフコイダンデアセチラーゼの遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させ、酵素タンパク質の生産、酵素の諸性質検討を行った。

第 4 章「デアセチラーゼの触媒活性残基の予測」では、SWISS-MODEL を利用し、フコイダンデアセチラーゼがどのような構造、活性部位を持つことが予想されるかを調べた。

第 5 章「*Luteolibacter algae* H18 からのフコイダナーゼの精製」では、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を種々のクロマトグラフィーにより精

製し、本酵素の部分アミノ酸配列を決定した。

第 6 章 「フコイダナーゼの遺伝子同定および異種発現」では、明らかにしたフコイダナーゼのアミノ酸配列をコードする遺伝子を、H18 株のゲノム情報から探索し、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 *Luteolibacter algae* H18 からのフコイダン デアセチラーゼの精製

### 2-1. 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 [2]。中でもオキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus* TOKIDA) 由来フコイダンについては、田幸らによって詳細に研究が行われており [29, 68, 69]、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明らかにされている。さらに、酒井らの研究により、オキナワモズク由来フコイダンは、 $\alpha$ -1, 3 結合の L-フコース残基を主鎖とし、側鎖として主鎖の L-フコース残基の C-2 に D-グルクロン酸残基が置換しており、また、硫酸基が D-グルクロン酸残基が置換していない主鎖の L-フコース残基の C-4 に置換していることが明らかになっている [28]。そして、田幸らの研究により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) [29]。

一方、著者らのグループでは、オキナワモズク由来フコイダン分解菌 *Luteolibacter algae* H18 を単離しており、本菌株ではフコイダンが低分子化される際、酵素的にフコイダンの脱アセチル化反応が起こることを提唱している [46]。

そこで、本章ではオキナワモズクフコイダンの脱アセチル化反応を触媒するフコイダンデアセチラーゼを、H18 株から種々のクロマトグラフィーにより精製し、酵素のアミノ酸配列を決定した。そして、明らかにした H18 株のドラフトゲノム情報を基に、フコイダンデアチラーゼ遺伝子を特定し、明らかになった本酵素のアミノ酸配列について考察を行った。

## 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 [70] によりオキナワモズクから抽出および精製されたものを使用した。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. *Luteolibacter algae* H18 の培養

H18 株の培養には単一炭素源としてフコイダンを 0.5%含む完全合成培地 (表 2-1, 2-2, 2-3) を使用した。表 2-1 に示す完全合成培地 5 mL に継代培養している H18 株を 1%植菌し、30 °C、100 min<sup>-1</sup> で 72 h 振とうし、前培養を行った。その後、500 mL の同組成培地を含む 2 L 容量の坂口フラスコに前培養液を 2%植菌し、30 °C、100 min<sup>-1</sup> で 72 h 振とう培養を行った。

表 2-1. 0.5% フコイダン培地組成

0.5% Fucoidan Medium		
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

Metal sol.		
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

Vitamin mix.		
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. 無細胞抽出液 (C.F.E.) の調製

2-2-2 の操作で得られた培養液を遠心分離 (HITACHI CR21/CR20、R10A rotor、8,000 rpm、60 min、4 °C) し、湿菌体を得た。得られた菌体を湿菌体重量の 4 倍量の 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に懸濁し、Out put 3、Duty cycle 30 、30 min にて超音波破碎 (BRANSON SONIFIER 450) 、遠心分離 (KUBOTA 3780、AF-5004Ch rotor、8,000 rpm、60 min、4 °C) を

行い、遠心上清を一晩 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)に対して透析したものを無細胞抽出液 (C.F.E.) として回収した。

#### 2-2-4. 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 倍に希釈したプロテインアッセイ液を 3 mL を試験管に分注して、試料 60  $\mu$ L を添加し、15 min 室温で反応させた。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。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 [71]。

#### 2-2-5. 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、アウルレゾルマックス二連ミニスラブ(ATTO、AE-6410)を用い 12.5%のゲルを作製し、Tris/glycine/SDS 緩衝液系で、ミニスラブ 1 枚につき 150 V で、約 2 h 電気泳動を行った。サンプルと SDS 処理緩衝液を 1:1 の割合で加え、100  $^{\circ}$ C で 3 min 熱処理を行ったものを SDS 用試料溶液とした。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 [72]。分子量マーカーは、GE Healthcare より購入した。

#### 2-2-6. F キットを用いた酵素活性の測定と酢酸濃度の定量

市販されている食品中の酢酸濃度を定量する F キット (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いてデアセチラーゼ活性の測定およびサンプル中に含まれる酢酸濃度の定量を行った。デアセチラーゼの酵素活性を測定する際は、2.5 %フコイダン溶液を 35  $\mu$ L、1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0)を 60  $\mu$ L、リンゴ酸を含む F キットの溶液 I を 180  $\mu$ L、ATP, CoA,

NAD を含む F キットの溶液 II を 36  $\mu\text{L}$ 、Citrate synthase, Malate dehydrogenase を含む F キットの溶液 III を 1.5  $\mu\text{L}$ 、Acetyl-CoA-synthetase を含む F キットの溶液 IV を 2.5  $\mu\text{L}$ 、蒸留水を 280  $\mu\text{L}$  を混合し、最後に活性を測定する酵素溶液 5  $\mu\text{L}$  添加し、30  $^{\circ}\text{C}$  で 5 min、 $A_{340}$  の吸光度の増加を測定し酵素活性値を算出した。NADH の分子吸光係数を 6220 とし、脱アセチル化活性 1 unit を、1 min に 1  $\mu\text{mol}$  の酢酸を遊離するために必要な酵素量と定義した。一方、サンプル中に含まれる酢酸濃度を定量する場合は、上記と同じ反応液組成で 340 nm の吸光度上昇が見られなくなるまで反応を行い、分析開始前との吸光度の差から酢酸の定量を行った。

## 2-2-7. DEAE-Sepharose FF カラムによる酵素精製

117.5 L の培養液から調製した H18 株 C.F.E. (タンパク質量 8622 mg) を 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で平衡化した DEAE-Sepharose FF カラム (樹脂量 900 mL, 40 $\times$ 6.0 cm) にアプライした。流速は 3.0 mL/min、分画サイズを 20 mL に設定した。20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で洗浄後、0.1, 0.2, 0.3 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で溶出を行った。280 nm の吸収を有する画分についてデアセチラーゼ活性測定を行い、活性画分を集めた。

## 2-2-8. Phenyl-TOYOPEARL 650M による酵素精製

2.0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に対して一晩透析した DEAE-Sepharose 0.2 M 溶出画分 (タンパク質量 1866 mg) を、同組成のバッファーで平衡化した Phenyl-TOYOPEARL 650M (樹脂量 200 mL, 50 $\times$ 3.0 cm) にアプライし、流速は 1.5 mL/min、分画サイズを 7 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  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で溶出を行った。280 nm の吸収を有する画分についてデアセチラーゼ活性測定を行い、活性画分を集めた。

#### 2-2-9. Q-Sepharose FF カラムによる酵素精製

20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に対して一晩透析した Phenyl-TOYOPEARL 1.0 M 溶出画分 (タンパク質量 427 mg) を、同組成のバッファーで平衡化した Q-Sepharose FF カラム (樹脂量 50 mL, 12×2.7 cm) にアプライし、流速は 2.0 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、0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で溶出を行った。280 nm の吸収を有する画分についてデアセチラーゼ活性測定を行い、活性画分を集めた。

#### 2-2-10. Butyl-TOYOPEARL 650M による酵素精製

2.0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に対して一晩透析した Q-Sepharose 0.2 M 溶出画分 (タンパク質量 54 mg) を、同組成のバッファーで平衡化した Butyl-TOYOPEARL 650M (樹脂量 6.0 mL, 30×1.0 cm) にアプライし、流速は 0.3 mL/min、分画サイズを 0.8 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  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で溶出を行った。280 nm の吸収を有する画分についてデアセチラーゼ活性測定を行い、活性画分を集めた。

#### 2-2-11. Mono Q<sup>®</sup><sub>HR</sub> 10/10 による酵素精製

限外ろ過膜を用いて脱塩し、0.76 mg/mL まで濃縮した Butyl-TOYOPEARL 1.0 M 溶出画分 (タンパク質量 1.52 mg) を、20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で平衡化した Mono Q<sup>®</sup><sub>HR</sub> 10/10 (GE Healthcare) (樹脂量 8.0 mL, 10×1.0 cm) に 2 mL ずつ 2 回アプライし、流速は 0.3 mL/min、分画サイズを 1.15 mL に設定した。同組成のバッファーで洗浄後、1 回目は 0~0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で、2 回目は 0.2~0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) でグラジエント溶出を ÄKTA システムを用いて行った。280 nm の吸収を有する画分についてデアセチラーゼ活性測定を行い、活性画分を集めた。



## 2-2-12. Superose 6<sup>®</sup><sub>HR</sub> 10/30 による酵素精製

Mono-Q による 2 回目の溶出フラクション No. 37 (タンパク質量 0.1 mg) を、20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で平衡化した Superose 6<sup>®</sup><sub>HR</sub> 10/30 (GE Healthcare) (樹脂量 24 mL, 30×1.0 cm) に濃縮せずに 0.5 mL アプライし、流速は 0.2 mL/min、分画サイズを 1.0 mL に設定した。上記 buffer で ÄKTA システムを用いて溶出を行った。280 nm の吸収を有する画分についてデアセチラーゼ活性測定を行い、活性画分を集めた。

## 2-2-13. 精製酵素タンパク質のプロテアーゼ消化と Tricine SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Tricine SDS-PAGE)

Tricine SDS-PAGE 電気泳動は、レゾルマックス二連ミニスラブ (ATTO, AE-6410) を用い、濃縮ゲル (16.2%T, 6%C)、スパーサーゲル (10%T, 3%C)、分離ゲル (4%T, 3%C) の三層からなるゲルを作製した。Tris/Tricine/SDS 緩衝液系で、150 V で 2 h 泳動を行った。

精製酵素のプロテアーゼ消化は以下の手順で行った。最終精製酵素 60 µL (70 µg) に 10% SDS 1.22 µL を加え、100 °C, 5 min 熱処理して高次構造を壊した後、V8 プロテアーゼ (1 mg/mL) を 1 µL 添加し 37 °C, 24 h 反応させた。このサンプル 10 µL に SDS 処理緩衝液を 10 µL 加え、100 °C で 3 min 熱処理を行ったものを Tricine SDS 用試料溶液とした。

## 2-2-14. N 末端および内部アミノ酸シーケンス解析

SDS-PAGE のゲルから PVDF 膜へタンパク質を転写するために、ブロットティング溶液 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 20~30 秒間浸した後、ブロットティング溶液 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、ブロットティング溶

液 A に 2 枚、B に 1 枚、C に 3 枚、約 10 min 浸した。ブロッティング溶液 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。ブロッティング溶液 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、ブロッティング溶液 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ティング溶液 B に浸した後、メンブレンに載せ、ブロッティング溶液 C に浸した 3 枚のろ紙を上積層した。全体を押しつぶすように圧着し、上からブロッティング溶液 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、膜片を鳥取大学ベンチャービジネスラボラトリーの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。

## 2-2-15. DNA 抽出

*Luteolibacter algae* H18 のドラフトゲノム配列決定は、東京農業大学の中川教授に依頼した。そのための DNA 抽出、精製は以下の通り行った。フコイタンを 0.5% 含む完全合成培地 (表 2-1) 5 mL で 30 °C、72 h 振とう培養した培養液をマイクロチューブに移し、4 °C で 12000 rpm、5 min 遠心して沈殿を回収した。DNA 抽出には Promega DNA Purification Kit を使用した。沈殿を 50 mM EDTA (pH 7.5) 480 µL に懸濁し、lytic enzyme 120 µL を加え 37 °C で 30~60 min 反応した。15,000 rpm で 2 min 遠心し、上清を捨てた沈殿に Nuclei lysis solution 600 µL を加え、懸濁し、80 °C で 5 min 保温した。RNase solution (QIAGEN) 3 µL を加えて混合し、37 °C で 15~60 min 反応し、室温まで冷やした。次に、Protein precipitation solution 200 µL を加えて混合し、氷上で 5 min 放置した。15,000 rpm で 3 min 遠心し、上清を滅菌マイク

ロチューブに移し、イソプロパノール 600  $\mu$ L 加えて混合した。15,000 rpm で 5 min 遠心して上清を捨て、70%エタノール 600  $\mu$ L を加え混合し、15,000 rpm で 2 min 遠心して上清を捨てた。最後に、デシケーターで 15 min 乾燥し、Rehydration solution 100  $\mu$ L 加え、65  $^{\circ}$ C で 1 h 保温した後の溶液を DNA サンプルとした。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. 大量培養と C.F.E. の調製

H18 株の培養液 117.5 L から 473 g の湿菌体を得られ、8622 mg のタンパク質を含む C.F.E. を調製した。

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

C.F.E. を 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 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、0.2 M NaCl 溶出画分において活性が検出され、Fraction No. 669～689 を回収した (図 2-1)。

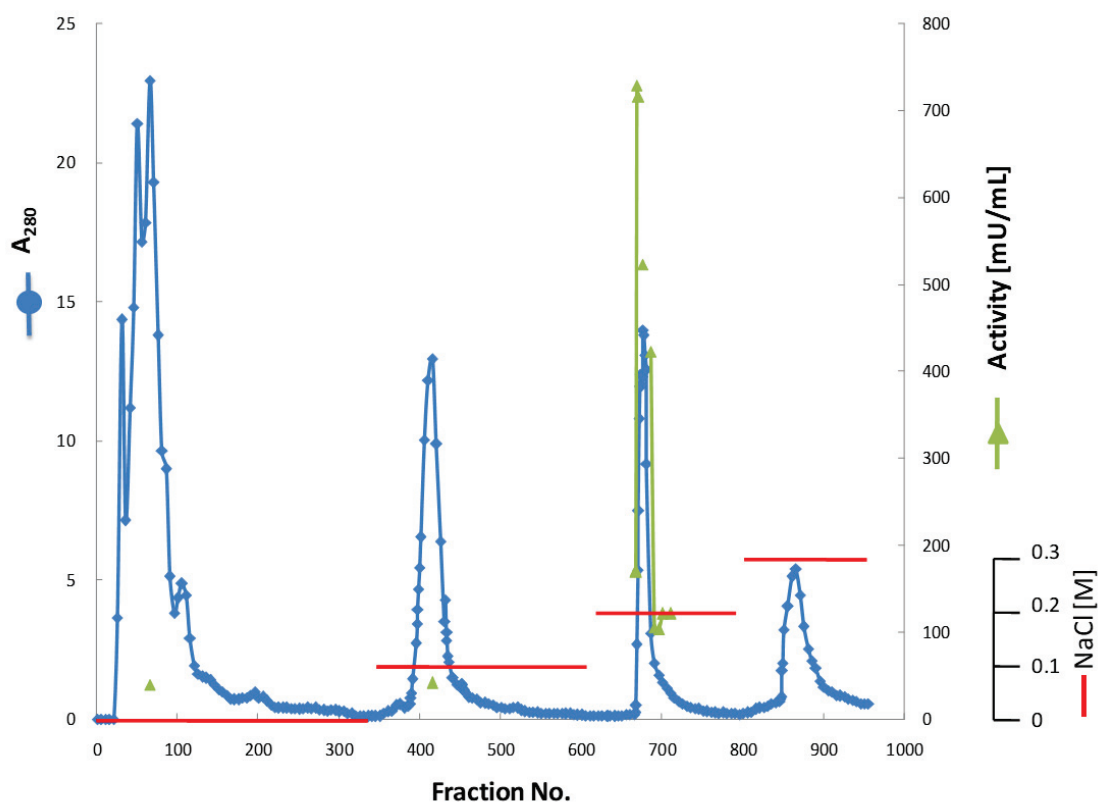


図 2-1. DEAE-Sepharose FF カラムクロマトグラフィーで分離した  
フコイダンデアセチラーゼの溶出パターン

### 2-3-3. Phenyl-TOYOPEARL 650M による酵素精製

DEAE-Sepharose 0.2 M 溶出画分を 2.0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に対して一晩透析後、Phenyl-TOYOPEARL カラムにアプライした。各 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 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、1.0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶出画分において活性が検出され、Fraction No. 412~465 を回収した (図 2-2)。

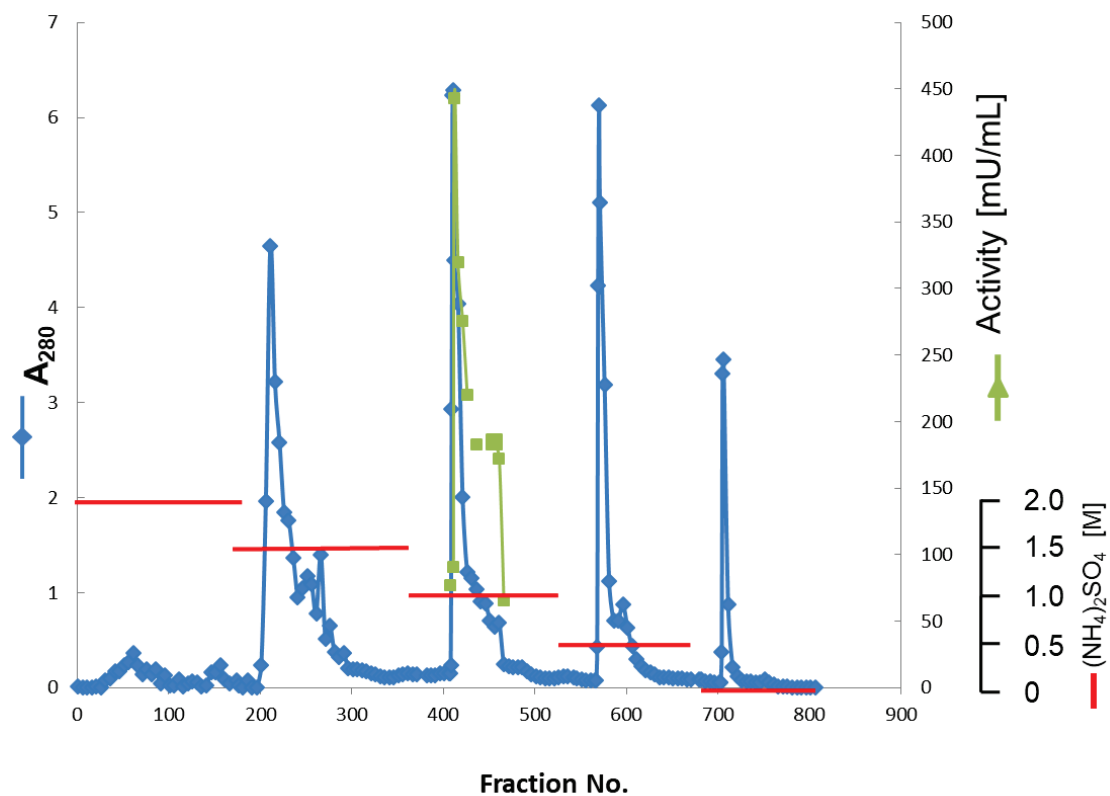


図 2-2. Phenyl-TOYOPEARL カラムクロマトグラフィーで分離した  
フコイダンデアセチラーゼの溶出パターン

#### 2-3-4. Q-Sepharose FF カラムによる酵素精製

Phenyl-TOYOPEARL 1.0 M 溶出画分を 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に対して一晩透析後、Q-Sepharose FF カラムにアプライした。各 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、0.2 M NaCl 溶出画分において活性が検出され、Fraction No. 602~666 を回収した (図 2-3)。

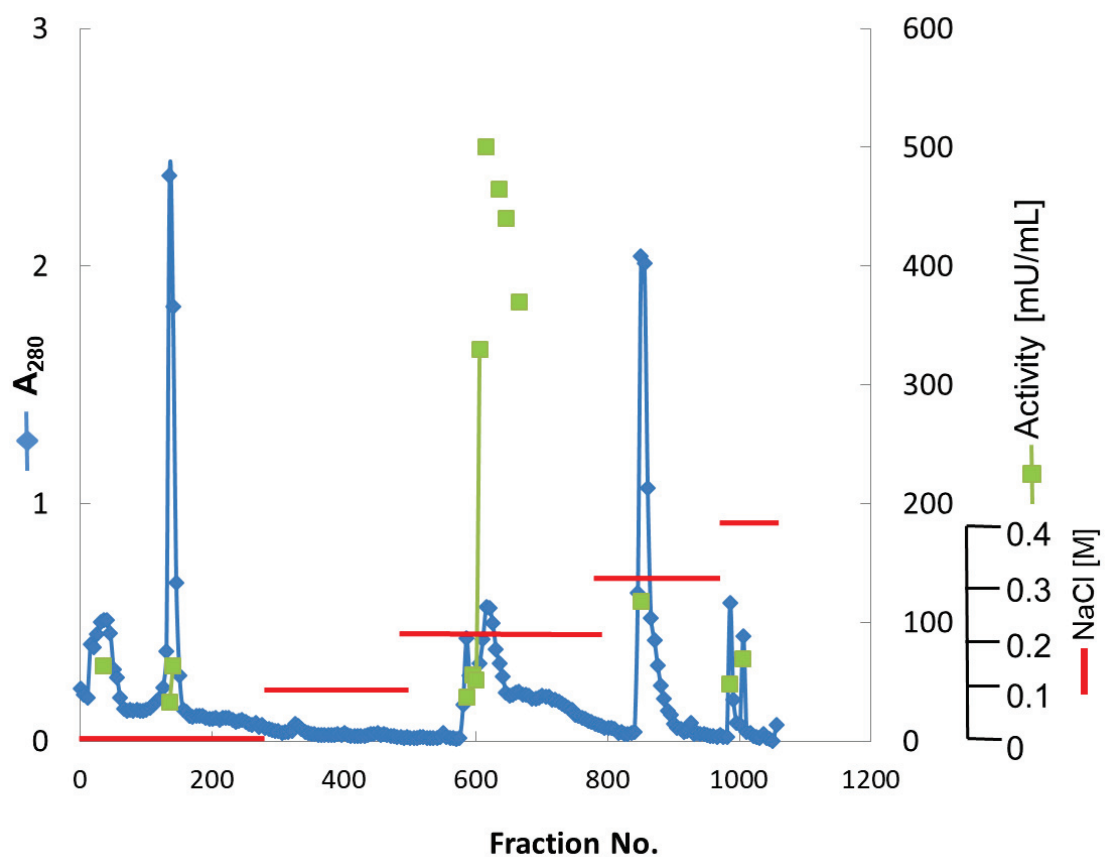


図 2-3. Q-Sepharose FF カラムクロマトグラフィーで分離した  
フコイダンデアセチラーゼの溶出パターン

### 2-3-5. Butyl-TOYOPEARL 650M による酵素精製

Q-Sepharose 0.2 M 溶出画分を 2.0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 一晚透析後、Butyl -TOYOPEARL カラムにアプライした。各 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 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、1.0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶出画分において活性が検出され、Fraction No. 386~420 を回収した (図 2-4)。

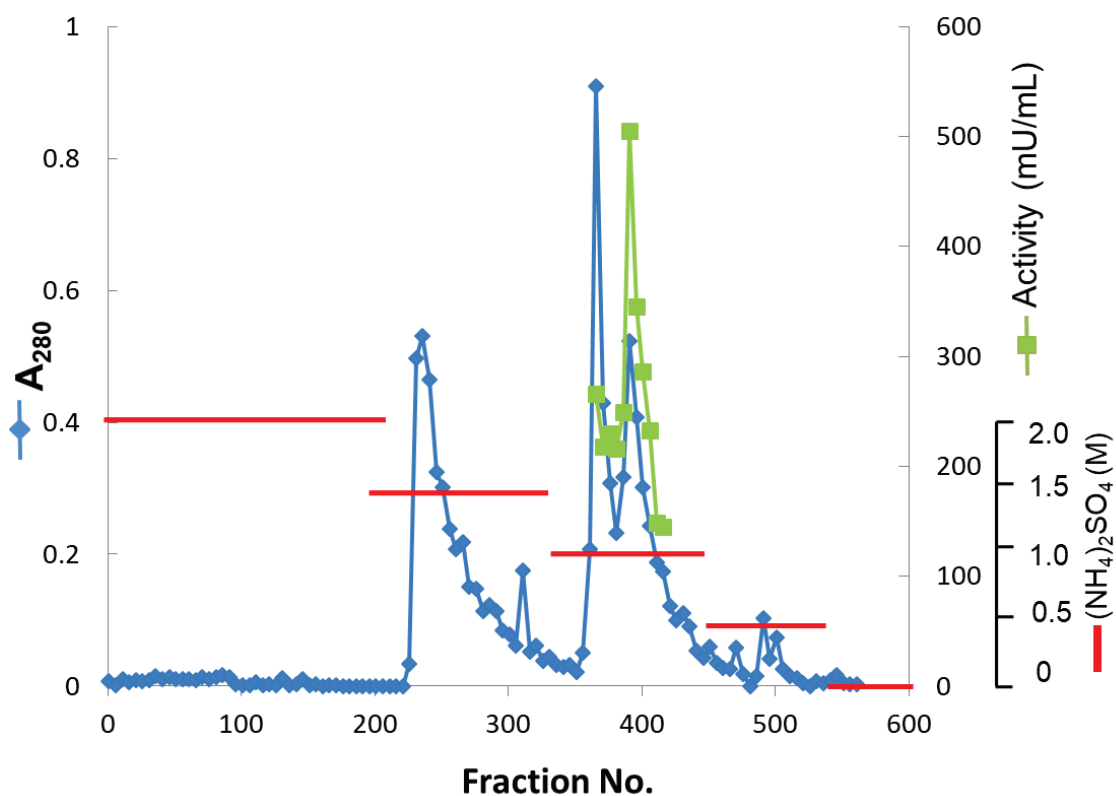


図 2-4. Butyl-TOYOPEARL カラムクロマトグラフィーで分離した  
フコイダンデアセチラーゼの溶出パターン

### 2-3-6. Mono Q<sup>®</sup> HR 10/10 による酵素精製

Butyl-TOYOPEARL 1.0 M 溶出面分を限外ろ過膜を用いて脱塩濃縮し、20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に buffer を変えたサンプルについて、Mono Q<sup>®</sup> HR 10/10 カラムにアプライした。溶出したフラクションを回収後、酵素活性測定を行った結果、1 回目は Fraction No. 44, 45、2 回目は Fraction No. 37 において活性が検出され各フラクションを回収した (図 2-5, 2-6)。

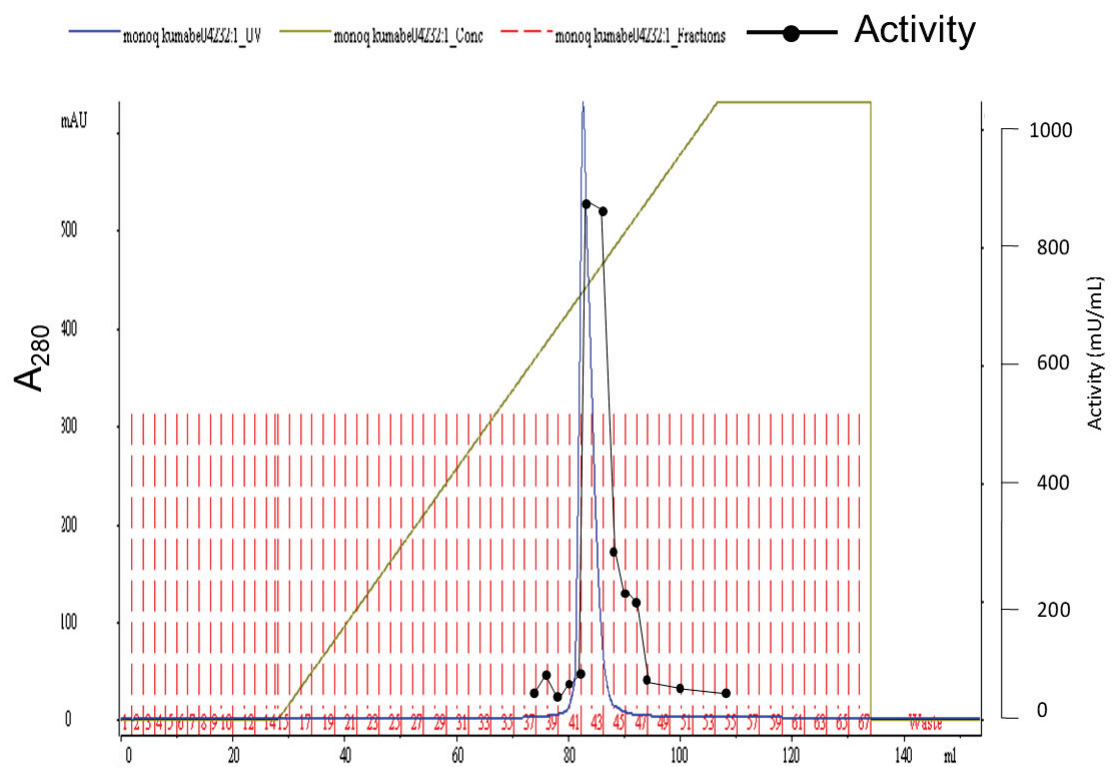


図 2-6. Mono Q<sup>®</sup> HR 10/10 カラムクロマトグラフィーで分離した  
フコイダンデアセチラーゼの 1 回目の溶出パターン



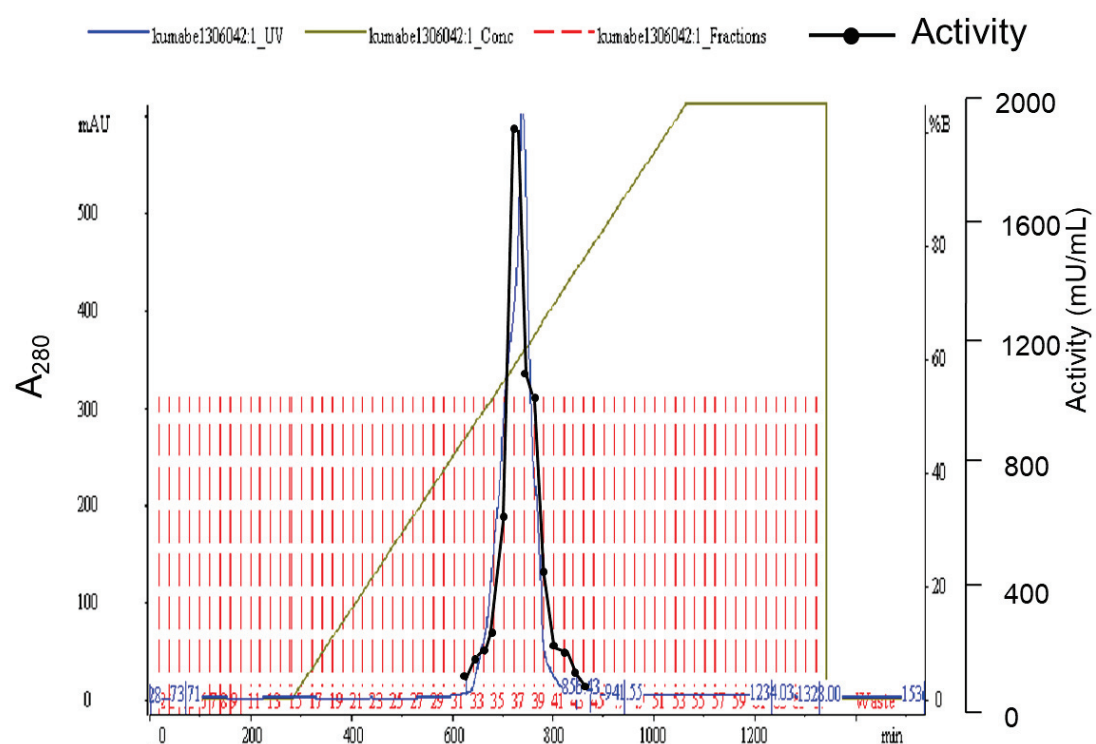


図 2-6. Mono Q<sup>®</sup> HR 10/10 カラムクロマトグラフィーで分離した  
 フコイダンデアセチラーゼの 2 回目の溶出パターン

### 2-3-7. Superose 6<sup>®</sup>HR 10/30 による酵素精製

Mono-Q 溶出フラクションのうち 2 回目の Fraction No. 37 について Superose 6<sup>®</sup>HR 10/30 カラムクロマトグラフィーを行い、溶出したフラクションを回収後、酵素活性測定を行った結果、Fraction No. 12 に活性が検出されたので回収した (図 2-7)。最終精製酵素の比活性は C.F.E. に比べ 81 倍上昇したが、活性の回収率は 0.07% であった (表 2-4)。酵素精製各段階における SDS-PAGE 分析の結果を図 2-8 に示す。

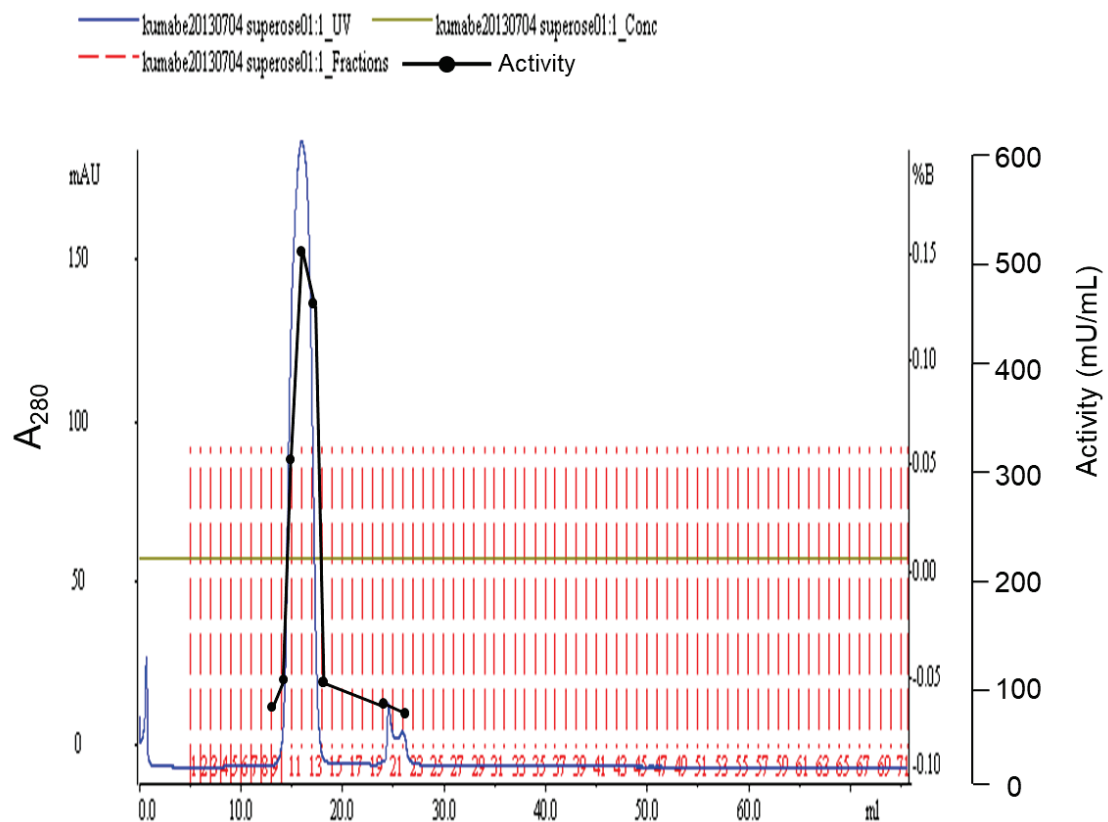


図 2-7. Superose 6<sup>®</sup>HR 10/30 カラムクロマトグラフィーで分離した  
フコイダンデアセチラーゼの溶出パターン

表 2-4. フコイダンデアセチラーゼの精製結果

Sample	Total protein [mg]	Specific activity [mU/mg]	Total activity [mU]	Purification [fold]	Yield [%]
C.F.E.	8622	55.2	476000	1.00	100
DEAE-Sepharose	2791	58.9	164395	1.07	34.5
Phenyl- TOYOPEARL	411	144	59184	2.61	12.4
Q-Sepharose	54.2	442	23956	8.01	5.03
Butyl- TOYOPEARL	3.80	1076	4090	19.5	0.859
Mono-Q	0.35	4666	1633	84.5	0.343
Superose	0.07	4686	328	84.9	0.0689

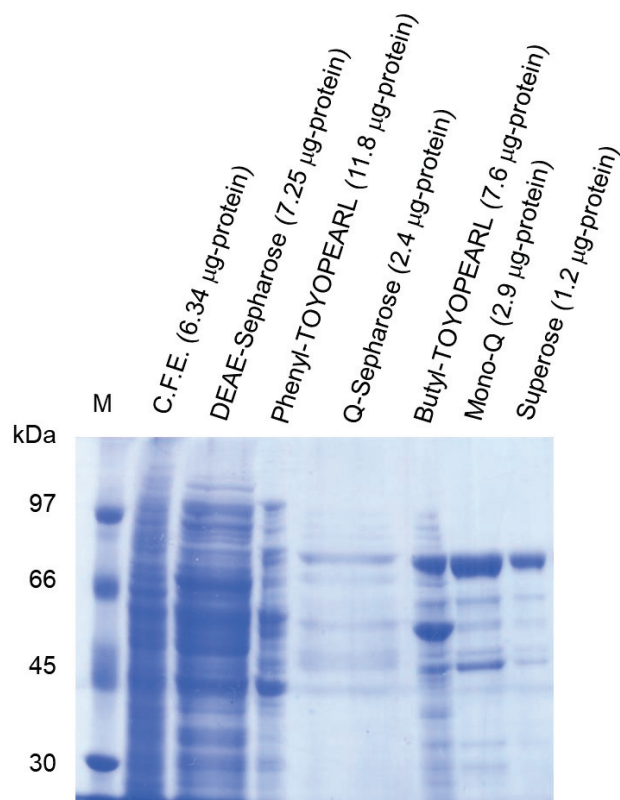


図 2-8. H18 株から精製したフコイダンデアセチラーゼの SDS-PAGE 分析

#### 2-3-8. H18 株ゲノム DNA の抽出とドラフトゲノム配列解析

抽出した H18 株 DNA の濃度と  $A_{260}/A_{280}$  値は、450  $\mu\text{g/mL}$ 、1.8 であり、ドラフトゲノム解析に適したサンプルであった。図 2-9 に DNA サンプルのアガロース電気泳動のパターンを示す(なお、ここでは同時に DNA 抽出した他の菌株の DNA サンプルも泳動している。)次世代シーケンサーによる解析の結果、H18 株の全ゲノム DNA の全長は 4155 kb であり、ゲノム解析には解析ソフト in silico Molecular Cloning を使用した。

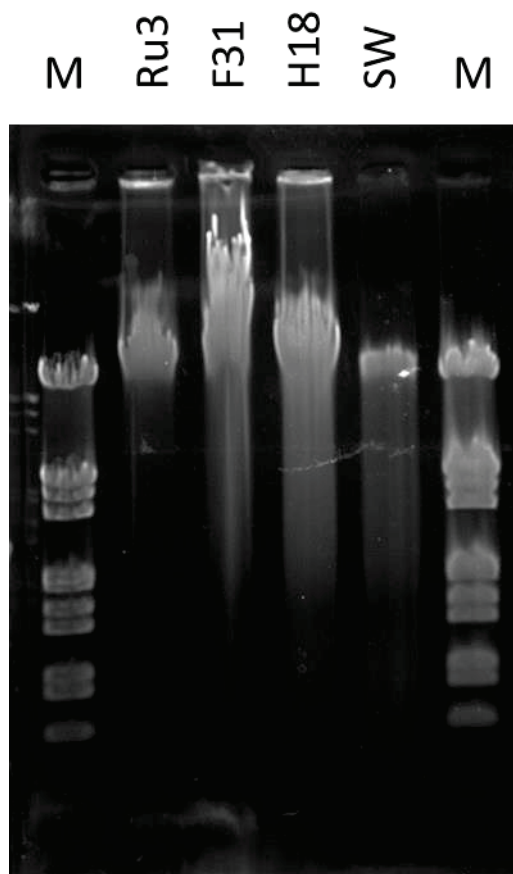


図 2-9. H18 株全 DNA のアガロース電気泳動結果

### 2-3-9. 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、そのアミノ酸配列の決定を試みたが、有意なシグナルを得ることができなかった。そこで、V8 プロテアーゼによるタンパク質を行った後に SDS-PAGE で分離し、再度、PVDF 膜へ転写し、アミノ酸配列の決定を行った。その結果、V(LS)SAEPN?MAIGL および LQLED(GE)?T の配列情報が得られた。これらの配列を H18 株のゲノム情報に対して検索した結果、1 つの ORF が見つかり、この ORF、すなわち、目的のアミノ酸配列をコードする遺伝子を *fud* と称することにした。図 2-10 には *fud* から生成するタンパク質のアミノ酸配列を、図 2-11 には、Fud のアミノ酸配列および、BLAST 検索の結果、相同性の高い酵素タンパク質としてヒットした *Rhodopirellula sallentina* 由来 Dienelactone hydrolase と *Singulisphaera acidiphila* 由来 acetyl xylan deacetylase とのアライメントを示した。

```
MKILKIPRRSLCALLPFASLCLVQAQDTLPPLEGKAAPQ
TYDELWDGYDPRAEPLDVEVLKEWEQDGVVMKVLRY
RIGMFKGQKSMMAAVYGYPKGAEKLPGLVQIHGGGQY
ADANAVLTNAKRGYATISVSWAGRINAPDYKVNPDVVK
LFWEGETEDPAYKVITDWGAVDGYHAPSRSPGNQFPK
LPKPSEWTIDPVVSPRSNGWFLCTLGMRRALTFLEQQ
PEVDADKLG VYGHSMGGKLTVLTAGSDPRVKAAAPSC
GGISDRDNEDPLFNATLGDAVYLEHITAPTIFLSPANDFH
GRIDDLQLAVREIQTDQWRVTCSPHHSHQDTAEYEVAT
QLWFDQILKGSFEIPATPETKLELARENGVPVFSVKPDA
SREILALEIYYTQQGQVDGKMDDRENTKARFWHFAKAT
KNGDAWTGELPLHSVEKPLWVYANVLYALDEPVSGAG
YYYRDYTTDRFNVSSLMSMVSAELAVAGVKPTMEKS
LLIESFGEDWKRGWFSYFPEEWPIATHKVYDPVWKAP
AGATLSLEVLSAEPNKMAIGLDGHFTEIEIAGGSEWQA
VSLSPADFESESGEKLGTWEGIRELLQLEDGKTLSDKKS
GEKKTFFGGKWQGAPPQFRNLRWIAK
```

図 2-10. Fud から生成するタンパク質のアミノ酸配列

太字は、内部アミノ酸配列解析で得られた配列と一致した配列を示す。

```

Fud 1 MKILKIPRRSLCALLPFASL-CLVQAQDTLPPL----GKA-APQTYDELWDGYDPRAEPL 55
DH 1 MLVSLC-VAASGGLKC-VTAGETLPPLSQPGNSVAPQTFDQLWNDFDPAEPL 52
AE 1 MSY 3

Fud 56 DVEVLKEWEQDGVVMKVLRYRIGMFKGQKSMMAAVYGYPKGAEKLPGLVQIHGGGQYADA 115
DH 53 DVEVLHEWEEDGVVMKVLRYRIGIFKNQKAMMAAVYGYPKGASHLPGLLQIHGGGQYADS 112
AE 4 PRRSALLVLLTTIFPGEPAKAGPPERGFTGPWNLESLEAPQATWGAESDLIREVYEG 63
* * *

Fud 116 NAVLTNAKRGYATISVSWAGRINADYKVNPDVVKLF--WEGETEDPAYKVITDWGAVDG 173
DH 113 RAVLTNAKRGYATISIAWAGRISAPDYRVNSDVVKLF--WNQQTDPDYRVTTDWGALDA 170
AE 64 ESFQKGKPTRVFAYYGKPKGEGFPFAMVLVHGGGGKAFREWAKLWAERGAAALAM--DLAG 121
* * * * *

Fud 174 YHAPSRSPGNQFPKLPKPSEWTIDPVVSPRSNGW-FLCTLGMRRALTFLEQQPEVDADKL 232
DE 171 YHAPCRNPKNFAHV-KPEEWTLDTVESPRNNPW-FLCTLGARRALTFLESQPEVDADRL 228
AE 122 -HGPDPRLDDGGPDQDDHGKFQDFADSDVGQMWTYHAVAAVIRGHSLLAARPEVDAKRI 180
* * * * *

Fud 233 GVGHSMGGKLTVLTAGSDPRVKAAP--SCGGISD-----R--DNEDPLFNA--TLGD 280
DE 229 GVGHSMGGKLTVLTAGSDPRIKAAAP--SCGGISN-----RMTDEDDQLYAD--TIAD 278
AE 181 GITGISWGGYLTCTIVAGLDDRLLKVAVPVYGCGLNDNSFWLGGFKAMSPTLRDRWLSLFD 240
* * * * * * * * * * *

Fud 281 AV-YLEHITAPTIFLSPANDFHGRIDDLQLAVREIQTD-QWRVTCSPHHSHQDTAEYEVA 338
DH 279 DV-HLKRIDCPVFLSPSNDFHGRIDDLQKAVREITTE-QFRVTCSPHHNHQDTADFEVA 336
AE 241 PSKYLGGVRCPILFVNGTNDFAYPDSYQKSYHLVPGPVDLCVTVRMPHGHSGQWTPQEI 300
* * * * * * * * * *

Fud 339 TQLWFDQILKGSFEIPATPETKLELARENGVPVFSVKPDASREILALEIYYTQQGQVDGK 398
DH 337 TQLWFDEHLKGSFQWPQTPQTRLNLQTDNHIPSLSVTPDTSQLILAVDIYYTQQGNPNAT 396
AE 301 GLFVGSVLEGGKRLARLGAPVIADGLASAAIESQTPLVQAEIAYTTDEGEWPKREWKTVE 360
*

Fud 399 MDDRENTKARFWHFAKATKNGDAWTGELPLHSVEKPLWVYANVLYALDEPVSGAGYYYRD 458
DH 397 INDRYNPRTRHWHHVPKRGEDKWTGELPLDTRPLWAYANVTYQLPEPVTGAGYYYRT 456
AE 361 ATLSEKASAMLPEKRPLVFFLTVKDDRGAVASSPHVELK 400

Fud 459 YTTDRFNVSSLSMVSAELAVAGVKPTMEKSLLESFGEDWKRWFYSYFPEEWPIATHK 518
DH 457 YQTDREFNVSSLMSTVSPDELRSVGQPTLQKSLTIETFGDWQKEWFSYKPTDWPRRTHK 516

Fud 519 VYDPVWKAPAGATLSLEVLSAEPNKMAIGLDGHFTEIEIAGGSEWQAVSLSPADFESESG 578
DH 517 INDDQWSAPTATLSIEVQSDQRNSLVIGVDAYAAVIELTGGEQWQKIELAPSDFQNDG 576

Fud 579 EKLGTWEGIRELQLEDGKTLSDKKSGEKKTFGGKWQGAPPQFRNLRWIAK 628
DH 577 ETLANWKDTAELRIGYQETLTKTK--ANRKRVRGERWQKAPQLRNLKWRAAAPEKYSTVSI 634

```

図 2-12. H18 株由来フコイダンデアセチラーゼ (LC209227, Fud)、*Rhodopirellula sallentina* 由来 dienelactone hydrolase (WP\_044303235.1, DH)、*Singulisphaera acidiphila* 由来 acetyl xylan deacetylase (WP\_015248495.1, AE) のアミノ酸配列アライメント  
 細い実線は精製タンパク質から得られた内部アミノ酸配列を、太い実線は典型的なエステラーゼモチーフである G-X<sub>1</sub>-S-X<sub>2</sub>-G を、星印は比較した 3 つのアミノ酸配列全ての間で同一であるアミノ酸残基を示す。

Fud のアミノ酸配列中には、精製酵素から決定した 2 つの内部アミノ酸配列が存在していた。そして、これら 2 つの配列の *N* 末側の隣はグルタミン酸残基であり、このことは、V8 プロテアーゼがグルタミン酸を認識して切断することと矛盾しなかった。SDS-PAGE の結果から見積もられる本酵素タンパク質のサブユニット分子量 (約 70 kDa) に関しても、図 2-10 の配列から計算されるタンパク質の分子量 (69,789 Da) と一致していることから、この ORF がフコイダンデアセチラーゼである可能性が高いことが示唆された。また、本酵素反応は酢酸の遊離を触媒するエステラーゼ反応であるが、図 2-11 に示す通り、本酵素には GHSMG という配列が存在し、これは、エステラーゼに典型的なモチーフ (G-X<sub>1</sub>-S-X<sub>2</sub>-G) であると考えられた。なお、in Silico Molecular Cloning で Fud は、Dienelactone hydrolase とアノテーションされており、*fud* 周辺に存在する ORF は 図 2-12 の通りであった。

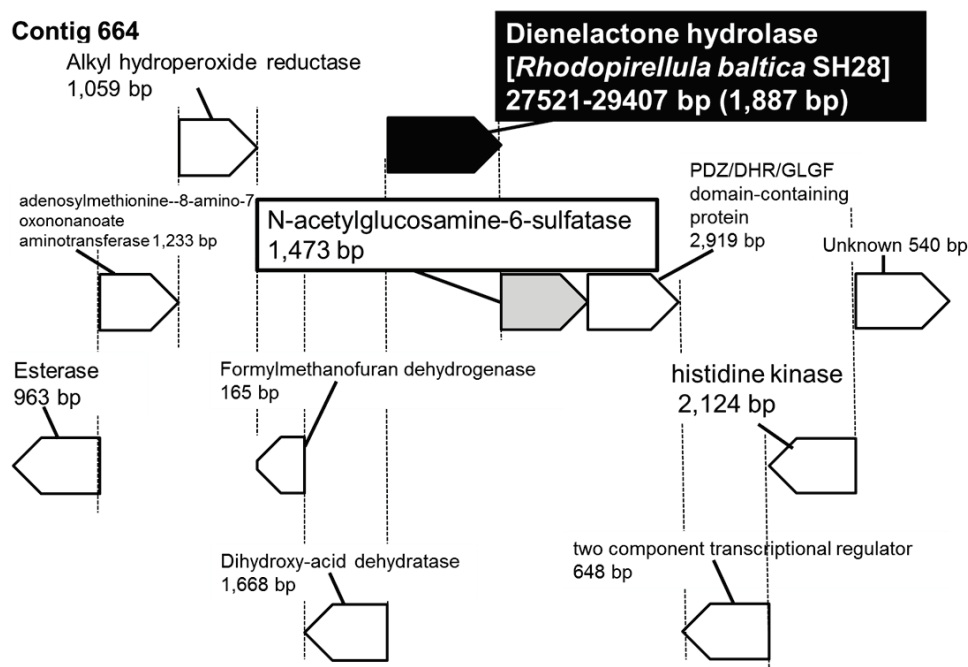


図 2-12. H18 株の全 DNA 中の *fud* 周辺の ORF



## 2-4. 考察

著者らのグループでは、オキナワモズクフコイダン資化性細菌 *L. algae* H18 株は、フコイダン分解酵素を細胞内に生産し、複数の酵素反応によりフコイダンの分解が進行することを提唱している [46]。本章では、その中で、フコイダンの脱アセチル化を触媒するフコイダンデアセチラーゼを H18 株から精製し、2 つの内部アミノ酸配列を決定することができたことを述べた。ただその過程で、精製酵素の N 末端アミノ酸配列同定には至らなかった。これは、サンプル濃度が低かったあるいは、N 末端アミノ酸が修飾されている可能性が想定される。

決定できた内部アミノ酸配列を H18 株のゲノム情報に対して検索した結果、1 つの ORF を見出すことができた。そして、そのアミノ酸配列から計算されるタンパク質の分子量 (69,789 Da) と SDS-PAGE からの分子量がほぼ一致したことから、この ORF がフコイダンデアセチラーゼである可能性が高いと考えられた。この ORF を *fud* と称することにし、BLAST 分析した結果を表 2-5 に示す。

表 2-5. *Fud* の BLAST 分析結果

Identity (%)	Definition	Origin	Accession No.
63	Dienelactone hydrolase	<i>Rhodopirellula sallentina</i> SM41	WP_044303235.1
61	Dienelactone hydrolase	<i>Rhodopirellula sp.</i> SWK7	WP_008683901
58	Hypothetical protein	<i>Planctomyces maris</i> DSM 8797	WP_002649590
58	Hypothetical protein	<i>Rubritalea marina</i>	WP_033367952
57	Hypothetical protein	<i>Verrucomicrobia bacterium</i>	WP_038143565
56	Dienelactone hydrolase	<i>Rhodopirellula baltica</i> SH28	EKK01579
54	Acetyl xylan esterase	<i>Fibrisoma limi</i> BUZ 3	WP_015248495.1

BLAST 分析では、*fud* 遺伝子産物であるフコダインデアセチラーゼが *Rhodopirellula sallentina* SM41 由来の dienelactone hydrolase と最も高い相同性 (63%の相同性) を有するこ



とを示した。この酵素は、chlorocatechol や chlorobenzoate などのハロゲン置換芳香族化合物の微生物分解に関与することが報告されている。これら芳香族化合物の微生物分解の間体である dienelactone は、dienelactone hydrolase によって加水分解されて環開裂化合物を形成する [73]。このような芳香族化合物が分解されると、cis- または trans- dienelactone 誘導体が形成されるが、dienelactone の環開裂反応に様々なタイプの dienelactone hydrolase が関与していることが明らかにされている [74]。

さらに、フコイダンデアセチラーゼとの相同性は dienelactone hydrolase ほど高くないが、acetyl xylan esterase (アセチルキシランエステラーゼ) が相同タンパク質の 1 つとして見出された (表 2-5)。アセチルキシランエステラーゼおよびフコイダンデアセチラーゼは、多糖に対して活性を示す酵素である。図 2-12 に示すように、*Singulisphaera acidiphila* 由来アセチルキシランエステラーゼも G-X<sub>1</sub>-S-X<sub>2</sub>-G モチーフを保持していたが、酵素特性は調べられていなかった。近年、ユニークなアセチルエステラーゼ遺伝子が、真菌 *Podospora anserina* におけるヘミセルロース分解酵素をコードする遺伝子群の中から同定されている [75]。その研究において、G-X<sub>1</sub>-S-X<sub>2</sub>-G モチーフを有する遺伝子産物が、アセチルグルクロノキシランの脱アセチル化を触媒することが示されている。

多糖類のデアセチラーゼに関して、いくつかの真菌株由来のキチンデアセチラーゼが広く研究されている。L(Q)T(F)F(Y)DDPG と HTW(Y)S(AD)H を含む 2 つのモチーフが多糖類のデアセチラーゼの配列に保持されており、これらのモチーフが脱アセチル化反応に重要な役割を果たしているとの報告がある [76]。しかしながら、これらの配列は *fud* 遺伝子産物であるフコイダンデアセチラーゼ中に確認することができなかった。このことから、フコイダンデアセチラーゼはキチンデアセチラーゼとは異なる触媒モチーフを有することが示唆された。

## 第3章 フコイダンデアセチラーゼ遺伝子クローニング、異種発現および酵素化学的性質

### 3-1. 緒言

第2章では、オキナワモズク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を *L. algae* H18 の無細胞抽出液から種々のクロマトグラフィーにより精製し、酵素の内部アミノ酸配列を決定した。そしてすでに明らかにしていた H18 株のドラフトゲノム情報を基に、デアセチラーゼ遺伝子を特定し、本酵素のアミノ酸配列を決定した。

現在までに報告されている脱アセチル化フコイダンの取得方法としては、田幸らによって示されている化学的処理によるものがある [29]。まず蒸留水 100 mL にオキナワモズクより抽出したフコイダン 500 mg を溶解し [68, 69]、これに終濃度が 0.1% になるように塩化ナトリウムを加え、さらに終濃度が 0.05 M になるように水酸化ナトリウム水溶液を加え、窒素気相下、室温で 13 時間攪拌する。これを塩酸で中和して、蒸留水に対して透析した後、凍結乾燥して脱アセチル化フコイダンが得られる [29]。このように、化学的処理による脱アセチル化フコイダンの調製方法は知られているが、酵素的を用いた調製法は今までに報告されていない。

そこで、本章では第2章で明らかになった、オキナワモズク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、酵素化学的性質の特徴決定を実施し、考察を行った。さらに、得られた組み換え酵素を用い、酵素的に脱アセチル化フコイダンをグラムスケールで調製した。

## 3-2. 材料および実験方法

### 3-2-1. コンピテントセルの調製

*Escherichia coli* JM109、*E. coli* DH5 $\alpha$ および *E. coli* BL21(DE3)を表 3-1 に示す LB 液体培地 5 mL で 37 °C、一晚培養し(前培養)、新たに LB 液体培地 5 mL、5 本に前培養液を 1%植菌し、37 °C、2 h 培養した (OD660 0.4~0.5 程度)。滅菌した 50 mL 遠沈管にクリーンベンチ内で培養液をまとめ、3000 rpm、10 min 遠心分離を行い、沈殿にフィルター滅菌した TFB1 (表 3-2) を 2 mL 添加し、静かに懸濁させた。その後、氷上で 30 min 静置させ、3000 rpm、10 min 遠心分離を行い、沈殿にオートクレーブ処理を行った TFB2 (表 3-3)を 0.8 mL 添加し、静かに懸濁させた。これを滅菌したエッペンに 100  $\mu$ L ずつ分注し、-80 °Cで保存されていた 100%エタノール溶液で急冷させ、-80 °Cで保存した。

表 3-1. LB 培地組成

Yeast extract	5	g
Tryptone	10	g
NaCl	10	g
Total	1	L

表 3-2. TFB1 溶液の組成

Potassium acetate	0.3	g
CaCl <sub>2</sub>	0.11	g
MnCl <sub>2</sub>	0.99	g
RbCl	1.2	g
Glycerol	15	mL
Total	100	mL

0.2 M CH<sub>3</sub>COOH で pH 5.8 に調整

表 3-3. TFB2 溶液の組成

PIPES	1.5	g
CaCl <sub>2</sub>	0.42	g
RbCl	0.06	g
Glycerol	7.5	mL
Total	50	mL

6 M NaOH で pH 6.5 に調整

### 3-2-2. プラスミド単離とプライマーの設計

プラスミド単離は、培養・集菌後に FastGene™ Plasmid mini kit を用いて付属のプロトコールに従って操作を行った。

フコイダンデアセチラーゼ遺伝子、*fud* を PCR 増幅するために、Forward プライマーを CCCGCCAT**ATG**AAAATCCTCAAAATC (*Nde* I 制限酵素認識配列は**太字**で示され、下線部が ATG 開始コドンを示す)、Reverse プライマーを AACTCT**GTCGACT**TTTGGCGATCCACCT (*Sal* I 制限酵素認識配列を**太字**で示している) と設計した。外注し、送られてきたプライマーに滅菌水を添加して 100  $\mu$ M の溶液を調製し、それを滅菌水で希釈した 1  $\mu$ M のものを PCR 実験に用いた。DNA 分析は、0.8% のアガロースを含む電気泳動によって常法に従って行い、エチジウムブロマイドで確認した。

### 3-2-3. PCR 増幅

表 3-4 に示す組成で PrimeSTAR Max DNA polymerase (TaKaRa Bio.) を含む反応液を調製後、TaKaRa Thermal Cycler Personal を用いて PCR を行った。鋳型として用いた H18 株の DNA 濃度は 450  $\mu$ g/ml であった。PCR 増幅の際の変性反応、伸長反応の温度および反応時間については、94  $^{\circ}$ C で 2 分間加熱し、次に 30 サイクル (98  $^{\circ}$ C で 10 秒間、56  $^{\circ}$ C で 5 秒間、および 72  $^{\circ}$ C で 3 分間) で行った。PCR 増幅後、アガロースゲル電気泳動と目的 DNA 断片

の切り出しを行い、QIAGEN Gel Extraction Kit を用いて付属のプロトコールに従って DNA 断片の精製を行った。

表 3-4. PCR 増幅の反応液組成

Strain H18 DNA	5	μL
10 μM Forward primer	1	μL
10 μM Reverse primer	1	μL
PrimeSTAR HS	25	μL
Sterilized water	18	μL
Total	50	μL

### 3-2-4. 制限酵素消化

目的 DNA 断片、発現用ベクター、pCold I および pCold TF は、表 3-5 に示す組成の反応液を調製後、37 °Cで一晩制限酵素消化を行った。制限酵素消化後、アガロースゲル電気泳動と目的 DNA 断片の切り出しを行い、QIAGEN Gel Extraction Kit を用いて付属のプロトコールに従って精製した。

表 3-5. 制限酵素消化における反応液組成

DNA fragment or Plasmid DNA	16	μL
<i>Nde</i> I (TaKaRa Bio.)	1	μL
<i>Sal</i> I (TaKaRa Bio.)	1	μL
H buffer	2	μL
Total	20	μL

### 3-2-5. ライゲーション

制限酵素消化処理を行ったプラスミドと目的 DNA 断片を表 3-6 で示すように Ligation High Ver. 2 (TOYOBO) を用いて 16 °Cで一晩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 10 μL を用いて *E. coli* DH5α の形質転換を行い、Ampicillin (以下、Amp.と表記する) を含んだ LB 寒天平板培地に植菌した。

表 3-6. ライゲーションにおける反応液組成

Insert DNA fragment (after restriction enzyme digestion)	5	μL
Plasmid DNA (after restriction enzyme digestion)	5	μL
Ligation High Ver. 2 (TOYOBO)	10	μL
Total	20	μL

### 3-2-6. 組換え大腸菌による酵素タンパク質の生産検討

発現ベクターに目的の長さの DNA 断片が組み込まれた組換えプラスミドを用い、*E.coli* BL21(DE3)を形質転換した。組み換え大腸菌により酵素タンパク質が生産されているかどうか確認するために、得られた組換えプラスミドを含む菌株を 100 μg/mL Amp.を含んだ LB 液体培地 1 L を入れた 2 L 容坂口フラスコを用いて TAITEC BIO-SHAKER BR-40LF で 37 °C, 160 min<sup>-1</sup>, 5 h 振とう培養した。培養開始 5 h 後、15 °C で 30 min 放置し、その後、終濃度 1 mM となるように IPTG を添加し、TAITEC BIO-SHAKER BR-40LF で 15 °C, 160 min<sup>-1</sup>, 24 h 振とう培養した。得られた培養液を遠心分離 (KUBOTA 3780、AF-5004Ch rotor、10,000 rpm、30 min、4 °C) し、菌体を得た。得られた菌体を湿菌体重量の 4 倍量の 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に懸濁し、Out put 3、Duty cycle 30、30 min にて超音波破碎 (BRANSON SONIFIER 450) した後、遠心分離 (KUBOTA 3780、AF-5004Ch rotor、15,000 rpm、30 min、4 °C) を行い、遠心上清を一晩 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に対して透析したものを C.F.E. として回収した。調製した C.F.E.を SDS-PAGE によって分析し、大腸菌の細胞内に目的酵素タンパク質の生産ができているのかについて確認した。この際、C.F.E. 調製時の遠心分離沈殿を 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に懸濁したサンプルを不溶性画分とした。

### 3-2-7. Ni Sepharose 6 Fast Flow による酵素精製

結合 Buffer として、50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0), 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole を用いた。この結合 Buffer で一晩透析した、12 L の培養液から得られた *E.coli* BL21(DE3)/pCold

TF/*fud* 由来の C.F.E. (タンパク質量 1046 mg) を結合 Buffer で平衡化した Ni Sepharose 6 FF カラム (樹脂量 25 mL, 14.7×1.2 cm) にアプライした。流速は 2.5 mL/min、分画サイズを 2 mL に設定した。結合 Buffer で洗浄後、溶出 Buffer として 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0), 500 mM NaCl, 50 mM Imidazole で溶出を行った。280 nm の吸収を有する画分について SDS-PAGE を行い、目的酵素タンパク質を含む画分を集め、20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) で一晚透析後、デアセチラーゼ活性測定を行い部分精製酵素とした。

### 3-2-8. HRV 3C Protease でのタグ配列の切断

*fud* は、pCold TF を用いてクローニングを行ったため、His-Tag、そして可溶化タグであるトリガーファクターが、目的酵素タンパク質に付加した融合タンパク質として大腸菌で生産される。従って、目的酵素タンパク質だけを得るために HRV 3C Protease (TaKaRa Bio.) によりタグの切断を表 3-7 に示す組成で反応液を調製後、4 °C、24 h 反応して行った。そして、再度、3-2-7 と同様の方法で酵素精製を行い、各フラクションを SDS-PAGE にて確認後、目的酵素タンパク質を含む画分を集めた。

表 3-7. HRV 3C Protease を含む反応液組成

Solution containing fusion protein	5.0	mL
10×HRV 3C Protease Cleavage Buffer	1.3	mL
HRV 3C Protease	0.26	mL
Sterilized water	6.44	mL
Total	13	mL

### 3-2-9. 至適 pH の検討

3-2-8 で得た精製酵素を 11 µg/ml になるように加え、フコイダン 0.25%、100 mM buffer (pH 8.0) を含む反応液 1 ml の条件で 30 °C、15 min 反応後、80 °C、5 min 処理し、2-2-6 の方法で酢酸濃度の定量を行った。なお、pH 4.5 ~ 9.0 ではリン酸カリウム buffer を用い、pH 6.0 ~ 10.0 では Tris-HCl buffer を用いて反応を行った。

### 3-2-10. 至適温度の検討

3-2-8 で得た精製酵素を 11 µg/ml になるように加え、フコイダン 0.25%、100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を含む反応液 1 ml の条件で 20~60 °C、15 min 反応後、80 °C、5 min 処理し、2-2-6 の方法で酢酸濃度の定量を行った。

### 3-2-11. 熱安定性の検討

3-2-8 で得た精製酵素を 30 分各温度で熱処理後、酵素反応を行った。フコイダン 0.25%、100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を含む反応液 1 ml の条件で 30 °C、15 min 反応後、80 °C、5 min 処理し、2-2-6 の方法で酢酸濃度の定量を行った。

### 3-2-12. イオンクロマトグラフィーによる酢酸、硫酸の定量

得られた酵素反応液を 15,000 rpm, 10 min 遠心分離した後、超純水により 10 倍希釈したサンプルを MILLEXGV Filter Unit 0.22 µm を用いてフィルターろ過し、イオンクロマトグラフィーで分析した。ポンプは LC-10 Ai (島津製作所)、検出器は電気伝導度検出器 CDD-10A SP (島津製作所)、カラムは SI-90 4E (4.0 mm x 250 mm、Shodex) を用い、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 の酢酸および硫酸を用いて作成した。

### 3-2-13. 金属イオンの活性への影響検討

3-2-8 で得られた精製酵素を 11 µg/ml になるように加え、フコイダン 0.25%、各金属イオンを 0.1 mM あるいは 1 mM、100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を含む反応液 600 µl を 30 °C、16 h インキュベート後、80 °C、5 min 熱処理し、イオンクロマトグラフィーによって酢酸の濃度を測定した。用いた化合物は、NaCl、KCl、AgNO<sub>3</sub>、MgCl<sub>2</sub>、BaCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、AlCl<sub>3</sub>、FeCl<sub>2</sub>、CuCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>2</sub>、ZnCl<sub>2</sub>、CoCl<sub>2</sub>、NiCl<sub>2</sub>、HgCl<sub>2</sub> である。



### 3-2-14. 酵素阻害剤の活性への影響検討

3-2-8 で得られた精製酵素を 11 µg/ml になるように加え、フコイダン 0.25%、各酵素阻害剤を 0.1 mM、100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を含む反応液 600 µl を 30 °C, 16 h インキュベート後、80 °C, 5 min 熱処理し、イオンクロマトグラフィーによって酢酸の濃度を測定した。用いた化合物は、EDTA、*p*-Chloromercuribenzoate (PCMB)、8-Quinolinol、*N*-Ethylmaleimide、*N*-Bromosuccinimide、2,2'-Bipyridine、1,10-Phenanthroline monohydrate、Diethyldithiocarbamic acid sodium salt trihydrate、5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB)である。

### 3-2-15. 人工基質に対する活性検討

以下の 5 種類の人工基質に対する本酵素の活性を検討した。

*p*-nitrophenyl acetate, *p*-nitrophenyl propionate, *p*-nitrophenyl butyrate, *p*-nitrophenyl hexanoate, *p*-nitrophenyl laurate

3-2-8 で得られた精製酵素を 15 µg/ml になるように加え、10 mM 基質エタノール溶液、100 mM リン酸カリウム buffer (pH 6.0) を含む反応液 1 ml を 30 °C, 30 min インキュベート後、410 nm の吸光度を測定した。酵素サンプルを添加していない反応液の吸光度をコントロールとし、その差を酵素による *p*-nitrophenol の生成量とした。1 U を 1 min に 1 µmol の *p*-nitrophenol を生成するために必要な酵素量と定義し、比活性を算出した。検量線は 100 mM リン酸カリウム buffer (pH 6.0) を含む 1 mM~10 mM の *p*-nitrophenol を用いて作成した (図 3-1)。

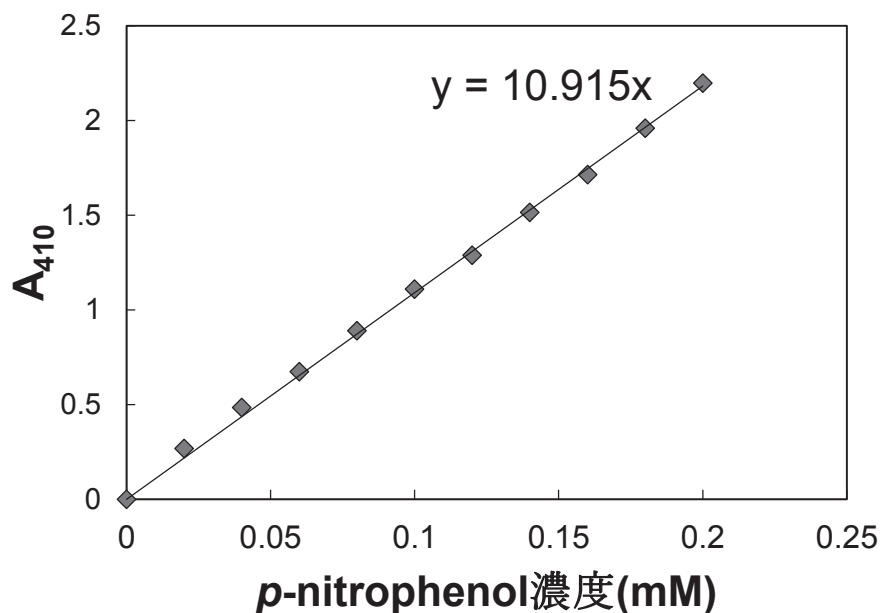


図 3-1. *p*-nitrophenol 検量線

### 3-2-16. オキナワモズクフコイダン分解プロセスへのデアセチラーゼの関与

著者らはすでに、*L. algae* H18 の C.F.E. を DEAE-Sepharose で分画し、その 0.1 M NaCl 溶出画分がフコイダン低分子化活性を有していることを確認している [46]。そこで、脱アセチル化酵素として 3-2-13 で得た精製画分を VIVASPIN (VS0102、分画分子量 10,000) で 10 倍濃縮したサンプルを 550 µg/mg、低分子化酵素として上記 DEAE-Sepharose 0.1 M NaCl 溶出画分を 840 µg/ml になるように加え、0.25%フコイダン、100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) の条件で 30 °C、60 min 反応後、80 °C、10 min 処理し、HPLC 分析を行った。脱アセチル化酵素のみ、あるいは、低分子化酵素のみを加えた反応液も調製し、HPLC 分析を行った。

次いで、脱アセチル化酵素のみ、あるいは、低分子化酵素のみで上記酵素反応を行い、熱処理をした反応液に、脱アセチル化酵素のみを加えたものには低分子化酵素を、低分子化酵素のみを加えたものには脱アセチル化酵素を添加し、30 °C、60 min 反応後、80 °C、10 min 処理し、HPLC 分析を行った。

### 3-2-17. 酵素的な脱アセチル化フコイダンの調製

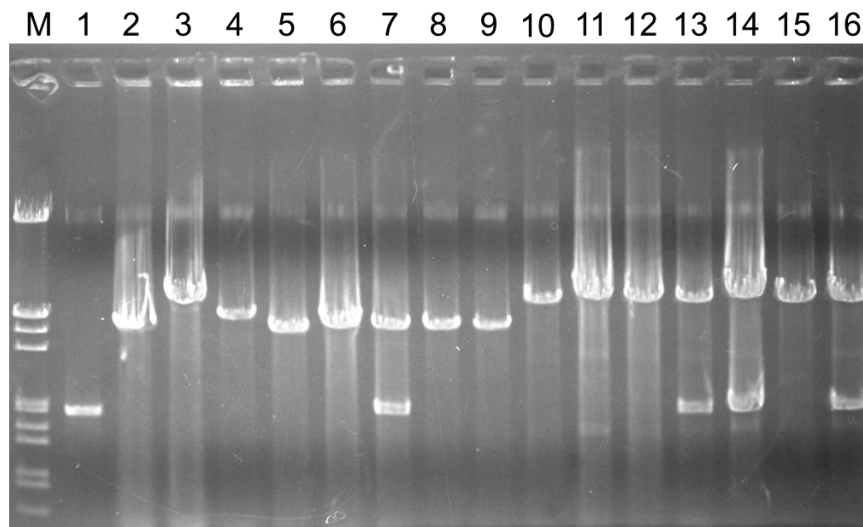
3-2-7 の方法に従って Ni-Sepharose による精製を行った、1.35 mg/ml フコイダンデアセチラーゼを 15 ml、2.5%フコイダンを 40 ml (1000 mg のフコイダン粉末を含む)、1.0 M Tris-HCl Buffer (pH 8.0)を 40 ml、蒸留水を 305 ml を含む合計 400 ml の溶液を、ビーカー内で 30 °Cで軽く攪拌しながら 24 h 反応後、同じ酵素を 15 ml 添加し、さらに 24 h 反応させ、80 °C, 10 min 熱処理した。得られた反応液を 14,000 rpm, 30 min 遠心し、上清を VIVASPIN (VS0102、分画分子量 10,000)により約 20 ml にまで濃縮し、蒸留水に対して一晚透析した後、凍結乾燥し、脱アセチル化フコイダンとした。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. *fud* の PCR 増幅

3-2-4 の方法で PCR を行った結果、*fud* の塩基長である 1.9 kbp 付近にバンドが確認できた。得られた *fud* と pCold I、pCold TF を *Nde* I と *Sal* I で消化し、pCold I に相当する 4407 bp のバンド、pCold TF に相当する 5769 bp のバンドおよび *fud* に相当する 1887 bp のバンドについてそれぞれ切り出しを行い、Gel Extraction Kit を用いて抽出し、15  $\mu$ L の蒸留水で溶出させた。

3-2-5 に示した操作で pCold I と *fud* あるいは、pCold TF と *fud* のライゲーションを行い、*E.coli* DH5 $\alpha$  コンピテントセルへの導入を行った。37  $^{\circ}$ C で一晩静置培養したところ、コロニーを確認できた。生じたコロニー数個ずつからプラスミド単離を行い、C 末端側を *Sal*I (pCold I をベクターとして用いたものは *Eco*RI)、N 末端側を *Nde*I で消化した後アガロース電気泳動をした結果を 図 3-2 に示す。pCold I と *fud* をライゲーションした組換えプラスミドは、*fud* と考えられる 1887 bp と pCold I と考えられる 4407 bp 付近にシングルバンドが見られるはずで、図 3-2 のレーン 7 に相当するパターンが認められた。一方、pCold TF と *fud* をライゲーションした組換えプラスミドは、*fud* と考えられる 1887 bp と pCold TF と考えられる 5769 bp 付近にシングルバンドが見られるはずで、図 3-2 のレーン 13, 14, 16 に相当するパターンが認められた。これらに目的 DNA 断片が含まれていると判断し、これらプラスミドを用いて *E.coli* BL21(DE3) を形質転換した。

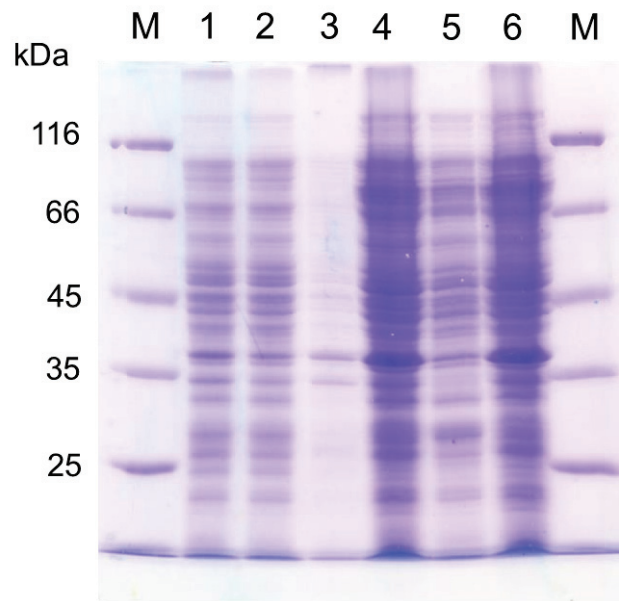


- 1. *fud*
- 2. pCold I
- 3. pCold TF
- 4-9. pCold I/*fud*
- 10-16. pCold TF/*fud*

図 3-2. 制限酵素消化により組換えプラスミドを確認したアガロース電気泳動結果

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

*E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*fud* の発現検討を 3-2-6 に従って行った。SDS-PAGE によるタンパク質の生産検討結果を図 3-3 に示す。しかしながら、この発現ベクターでは、目的タンパク質の顕著な生産が見られなかった。

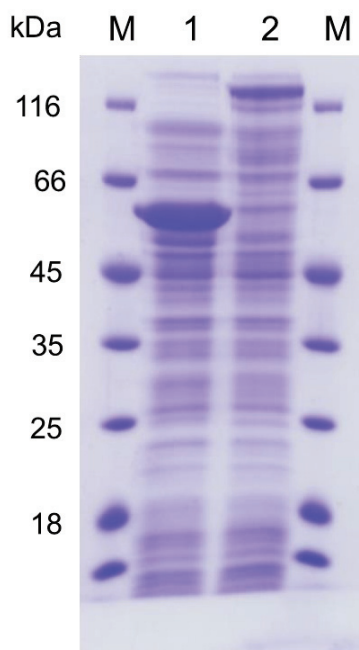


1. Sonicated *E. coli* BL21(DE3)/pCold I (20 µg-protein)
2. *E. coli* BL21(DE3)/pCold I C.F.E. (20 µg-protein)
3. Insoluble proteins from sonicated *E. coli* BL21(DE3)/pCold I (20 µg-protein)
4. Sonicated *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/fud (20 µg-protein)
5. *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/fud C.F.E. (20 µg-protein)
6. Insoluble proteins from sonicated *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/fud (20 µg-protein)

図 3-3. *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/fud 由来 C.F.E の SDS-PAGE 結果

### 3-3-3. *E. coli* BL21(DE3)/pCold TF/fud による目的タンパク質生産検討

発現ベクター pCold I による遺伝子発現がうまくいかなかったので、目的タンパク質に可用性タグを付加できる発現ベクター pCold TF を用いた検討を 3-2-6 に従って行った。SDS-PAGE によるタンパク質の生産検討結果を図 3-4 に示す。レーン 2 において約 122 kDa 付近に濃いバンドが確認でき、この大きさは、目的酵素タンパク質 (約 70 kDa) に His-Tag を含む可溶化タグ (約 52 kDa) が付加した分子量に一致していた。



1. *E. coli* BL21(DE3)/pCold TF C.F.E. (20  $\mu$ g-protein)
2. *E. coli* BL21(DE3)/pCold TF/*fud* C.F.E. (20  $\mu$ g-protein)

図 3-4. *E. coli* BL21(DE3)/pCold TF/*fud* 由来 C.F.E の SDS-PAGE 結果

### 3-3-4. *E. coli* BL21(DE3)/pCold TF/*fud* 由来 C.F.E. 中のフコイダンデアセチラーゼ活性

*E. coli* BL21(DE3)/pCold TF/*fud* より調製した C.F.E. のフコイダンデアセチラーゼ活性測定をイオンクロマトグラフィーで 3-2-12 に示す操作で行った。その結果、0 h では酢酸の検出はできなかったが、1 h 反応後には 114 mg/L の酢酸の遊離が確認できた。図 3-5 にイオンクロマトグラフィーによる分析チャートを示す。

この結果から、*E. coli* BL21(DE3)/pCold TF/*fud* の C.F.E. 中には、フコイダンデアセチラーゼが存在することが示唆された。また、2-2-6 に示す方法で酵素活性測定を行った場合でも波長 340 nm の吸光度上昇が認められ、異なる二つの手法を用いてフコイダンデアセチラーゼ活性を有していることを確認した。さらに、酵素反応を 3 日間行った後にイオンクロマトグラフィー分析を行っても、硫酸イオンは全く検出できなかった。

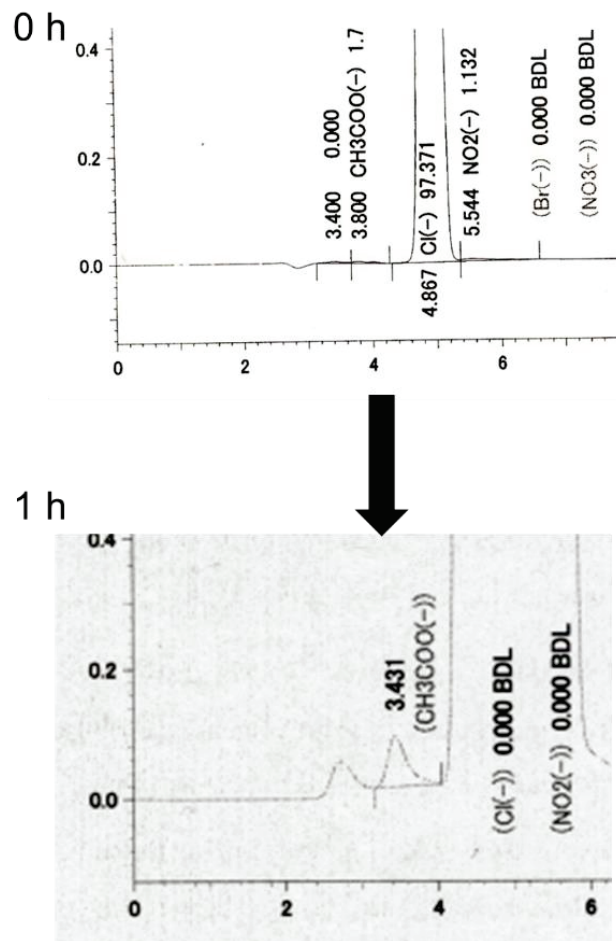


図 3-5. *E. coli* BL21(DE3)/pCold TF/*fud* C. F. E. を用いた酵素反応後のイオンクロマトグラフィー分析のチャート結果

### 3-3-5. Ni Sepharose 6 Fast Flow による酵素精製 (1 回目)

*E. coli* BL21(DE3)/pCold TF/*fud* を 12 L 培養して得られた C.F.E. (3834 mg-protein) のうち、一部の C.F.E. (1046 mg-protein) を 3-2-7 の方法に従い、目的酵素の精製を行った。各 Imidazole 濃度の buffer で溶出した画分を回収し、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に対して透析後、酵素活性測定を実施した結果、50 mM Imidazole を含む buffer で溶出した画分 (Fraction No. 127~185) においてフコイダンデアセチラーゼ活性を有する融合タンパク質 (122 kDa)を検出することができ、これらを回収した。



### 3-3-6. HRV 3C Protease でのタグ配列の切断と Ni Sepharose 6 Fast Flow による酵素精製 (2 回目)

3-3-5 で得たフコイダンデアセチラーゼ活性を有する融合タンパク質を 3-2-8 の方法で HRV 3C Protease による酵素反応を行い、His-Tag を含む可溶化タグの部分と目的酵素とを切断した。次いで反応液を Ni Sepharose 6 FF カラムクロマトグラフィーにチャージし、His-Tag を含む可溶化タグの部分樹脂に吸着させた。そして、20 mM Imidazole を含む buffer で溶出した画分 (Wash 画分、Fraction No. 11~18) にフコイダンデアセチラーゼ活性を有する目的酵素タンパク質 (70 kDa)を得ることができ、これらを回収した。SDS-PAGE の結果を図 3-6 に示す。2-2-6 の方法で酵素活性を測定した結果、最終精製酵素の比活性は C.F.E.に比べ 15 倍上昇したが、活性の回収率は 5.7%であった (表 3-12)。

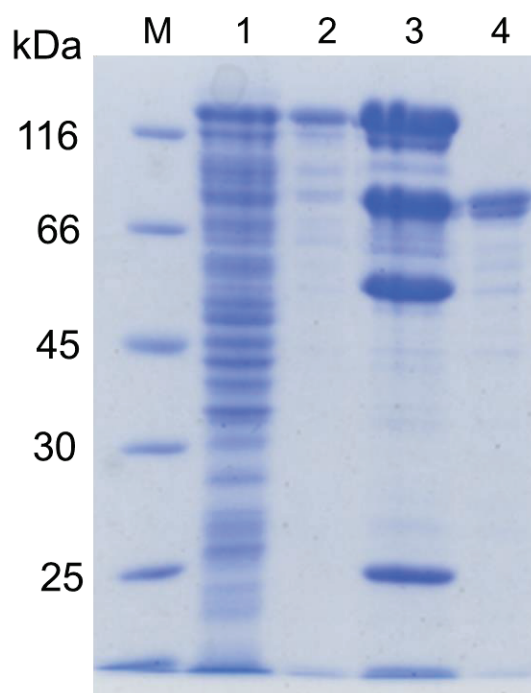


図 3-6. *E. coli* BL21(DE3)/pCold TF/*fud* の C.F.E.から精製したフコイダンデアセチラーゼの SDS-PAGE 結果

1. C. F. E. (20 µg), 2. 1<sup>st</sup> Ni-Sepharose (5.2 µg),
3. After HRC 3C protease treatment (20 µg), 4. 2<sup>nd</sup> Ni-Sepharose (1.1 µg)

表 3-8. *E. coli* BL21(DE3)/pCold TF/*fud* から精製したフコイダンデアセチラーゼの精製結果

Sample	Total protein [ mg ]	Specific activity [ mU/mg ]	Total activity [ mU ]	Yield [ % ]	Purification [ fold ]
C. F. E.	1046	30.0	31380	100	1.0
1st Ni Sepharose	61.9	467	28907	92.1	15.5
2nd Ni Sepharose	4.07	437	1779	5.7	14.6

### 3-3-7. 至適温度、至適 pH の検討

検討の結果、フコイダンデアセチラーゼの至適温度は 40 °C (図 3-7)、至適 pH は 8.0 (図 3-8) であると考えられた。なお、活性は 2-2-6 の方法により評価した。

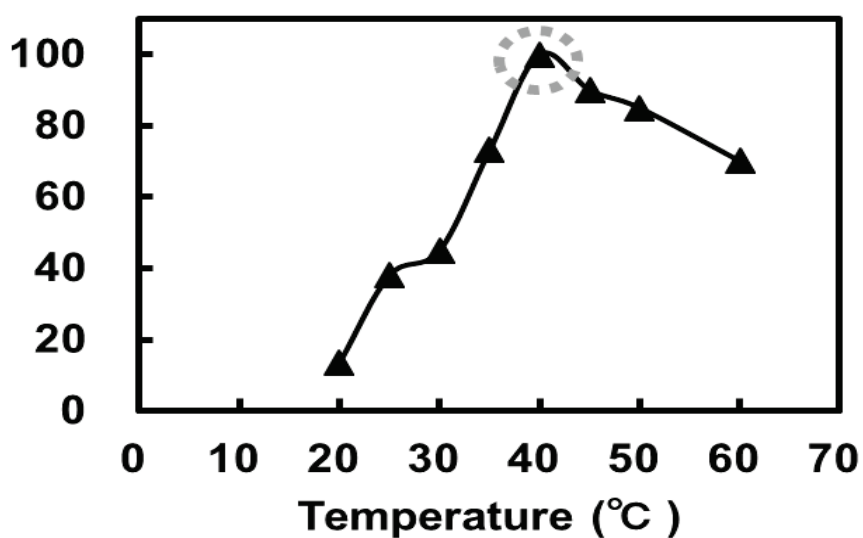


図 3-7. フコイダンデアセチラーゼの至適温度検討結果

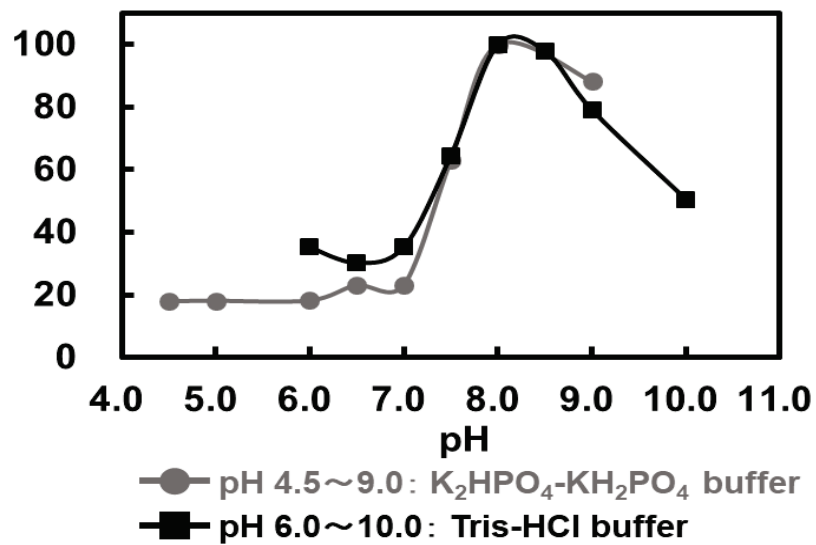


図 3-8. フコイダンデアセチラーゼの至適 pH 検討結果

### 3-3-8. 熱安定性の検討

フコイダンデアセチラーゼの熱安定性について検討した。活性は 2-2-6 の方法により評価した。30 分熱処理後の酵素溶液を用いて反応を行ったところ、未処理の酵素溶液の活性を 100%とすると、30℃までは約 80%の残存活性を保持するものの、35℃以上で顕著に活性が低下したことから、熱に対する安定性は高くないことが明らかとなった（図 3-9）。

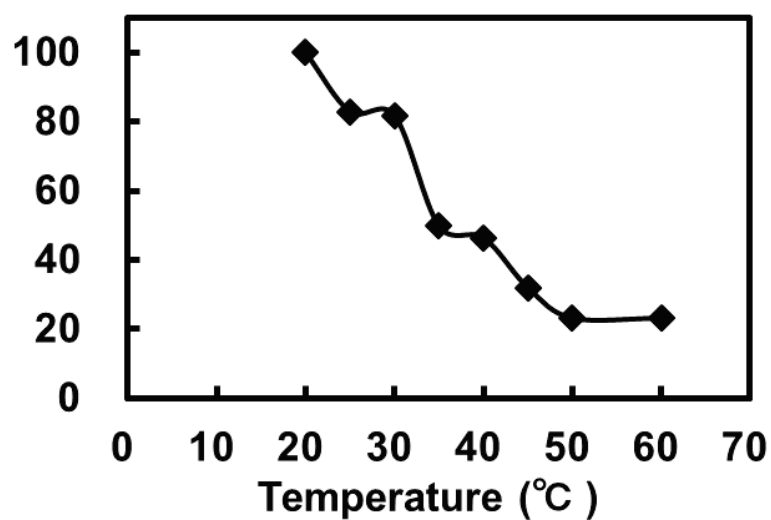


図 3-9. フコイダンデアセチラーゼの熱安定性検討結果

### 3-3-9. 金属イオン、酵素阻害剤の活性への影響検討

各種金属イオン、および酵素阻害剤のフコイダンデアセチラーゼ活性に及ぼす影響を検討した。なお、活性はイオンクロマトグラフィーにより評価した。その結果、金属に関しては銀、銅、亜鉛、コバルト、ニッケル、水銀の添加により活性の阻害が見られた (図 3-10)。

一方、阻害剤に関しては SH 阻害剤による活性の阻害が見られた (図 3-11)。

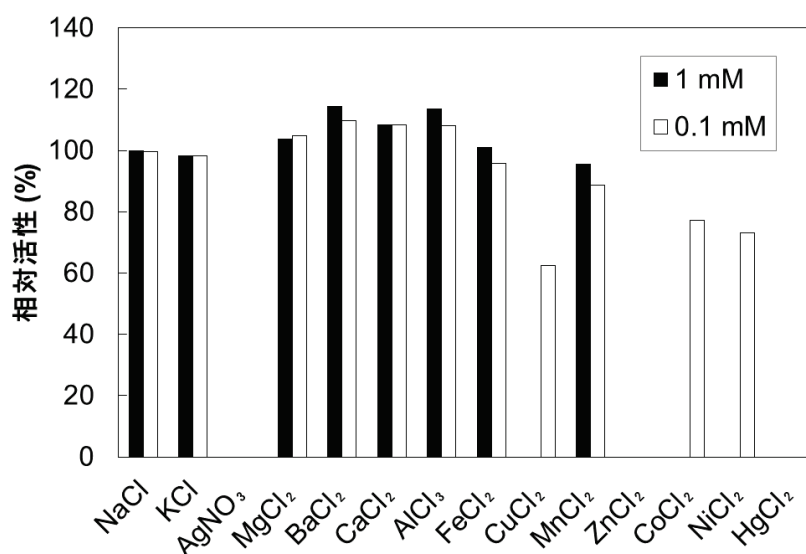


図 3-10. フコイダンデアセチラーゼ活性に及ぼす金属イオンの影響

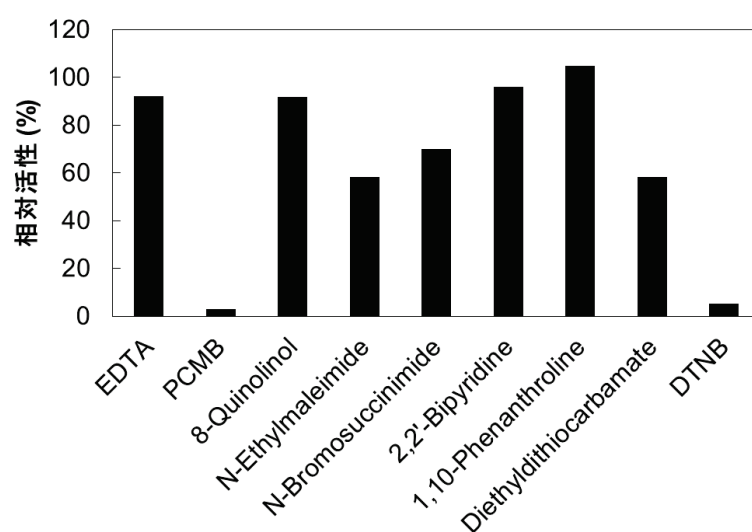


図 3-11. フコイダンデアセチラーゼ活性に及ぼす酵素阻害剤の影響

### 3-3-10. 人工基質に対する活性検討

フコイダンデアセチラーゼのアミノ酸配列について BLAST 検索を行ったところ、Dienelactone hydrolase、acetylxyln esterase などがヒットした (表 2-5)。Dienelactone hydrolase に関する論文では、有機酸の *p*-nitrophenyl エステル (人工基質) を用いて活性測定が行われていたため、本酵素の人工基質に対する活性を検討することにした [77]。その結果、*p*-nitrophenyl acetate、*p*-nitrophenyl propionate に加え、*p*-nitrophenyl butyrate、*p*-nitrophenyl hexanoate に対する活性が見られた。それぞれの基質に対する活性を図 3-12 に示す。*p*-nitrophenyl acetate で最も高い活性が見られ、基質の炭素鎖が長くなるほど活性が低くなる傾向が見られる一方、*p*-nitrophenyl laurate に対する活性は認められなかった。

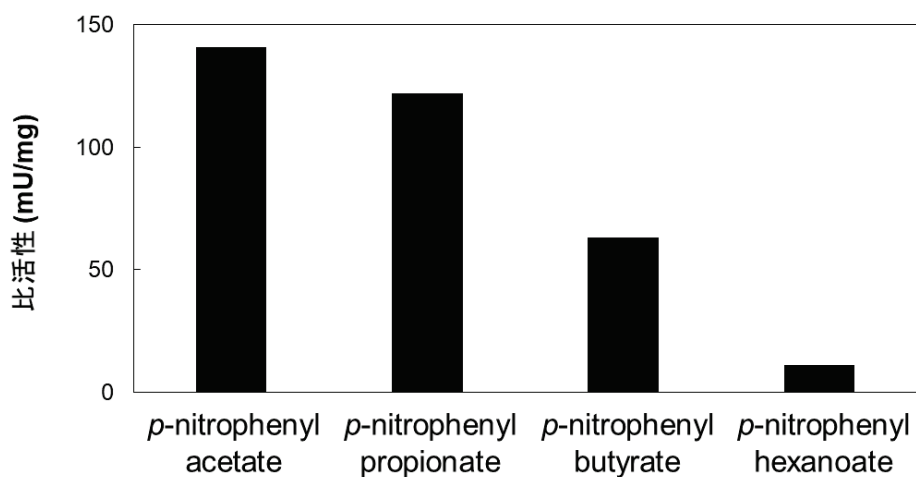


図 3-12. 人工基質に対するフコイダンデアセチラーゼの活性検討結果

### 3-3-11. オキナワモズクフコイダンに対する分解プロセスへの関与についての検討

3-2-16 で述べた、DEAE-Sepharose 0.1 M NaCl 溶出画分を部分精製フコイダン低分子化酵素として用い、項目 3-3-6 で得られた精製酵素をフコイダンデアセチラーゼとして用いて、*E. coli* BL21(DE3)/pCold TF/*fud* で生産されたフコイダンデアセチラーゼのオキナワモズクフコイダン分解プロセスへの関与を検討した。項目 3-2-16 の方法で酵素反応を行った反

反応液を用いて、HPLC 分析を行った結果、フコイダンデアセチラーゼだけを添加した反応液では、反応の前後でピークのリテンションタイムに顕著な違いはみられなかった（図 3-13 (C)）。一方、低分子化酵素だけを添加した反応液では若干の低分子化が認められ（図 3-13 (B)）、低分子化酵素とフコイダンデアセチラーゼの両方を添加した反応液では、顕著に低分子化されたフコイダンのピークを確認することができた（結果示していない）。このことから、本研究で得られたフコイダンデアセチラーゼがフコイダン低分子化に大きく関与していることが明らかとなったので、次に 2 つの酵素反応順序について検討を行った。

フコイダンデアセチラーゼを先に添加し、熱処理後、低分子化酵素を添加した場合、低分子化フコイダンのピークを確認することができた（図 3-13 (E)）。一方で、低分子化酵素を先に添加し、熱処理後、フコイダンデアセチラーゼを添加した場合では、後段の反応前後でピークのリテンションタイムに顕著な違いは見られなかった（図 3-13 (B,D)）。以上の結果から、本菌株によってフコイダンが分解される際、フコイダンデアセチラーゼが、最初にフコイダンに作用した後、フコイダン低分子化酵素によってフコイダンが低分子化されるということが明らかとなった。

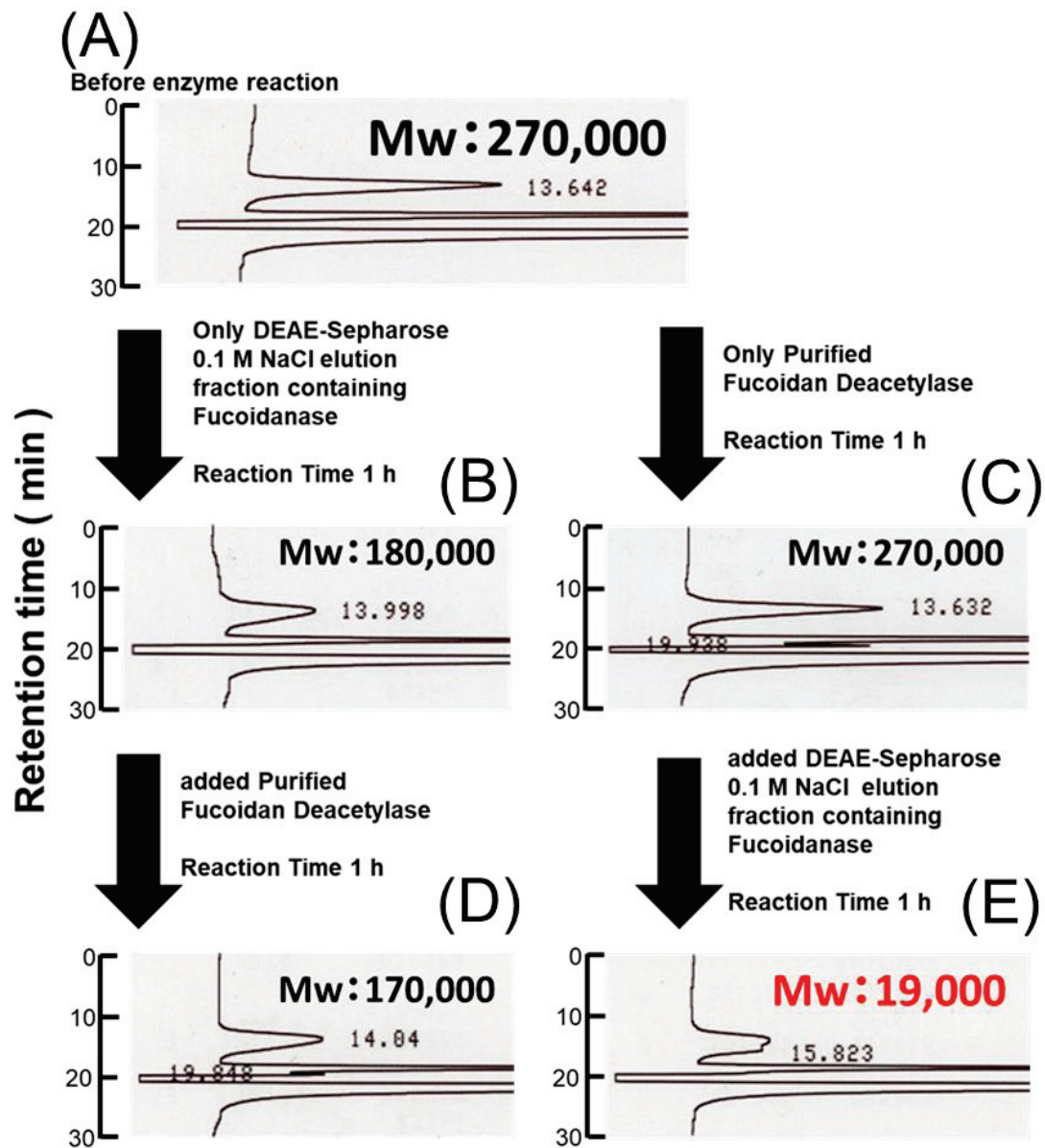


図 3-13. フコイダンデアセチラーゼと低分子化酵素を用いた酵素反応溶液の HPLC 分析

### 3-3-12. 酵素的な脱アセチル化フコイダンの調製結果

3-2-17 の方法により、1 g のオキナワモズクフコイダンを原料にして脱アセチル化フコイダンを 1 g 得ることができた。酵素反応前後のサンプルの分子量に変化はなく、保持している硫酸基も反応前後で 15%前後と変化がなかった。一方、3-2-17 の酵素反応液をイオンク

ロマトグラフィー、F キットで分析したところ、酢酸イオンの存在が明らかに認められた (図 3-14, 3-15)。

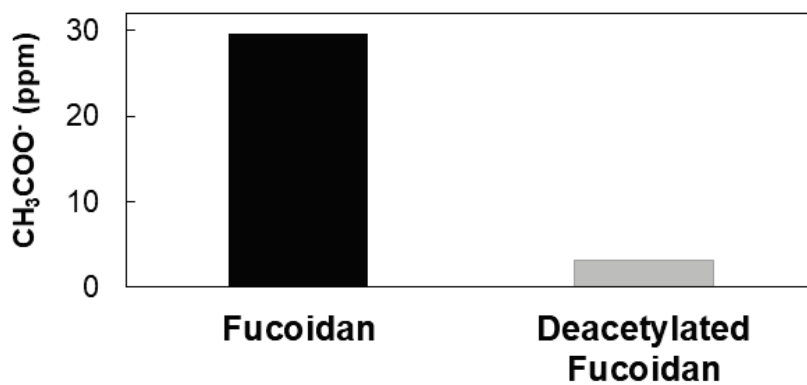


図 3-14. 酵素反応前後における酢酸イオン濃度結果

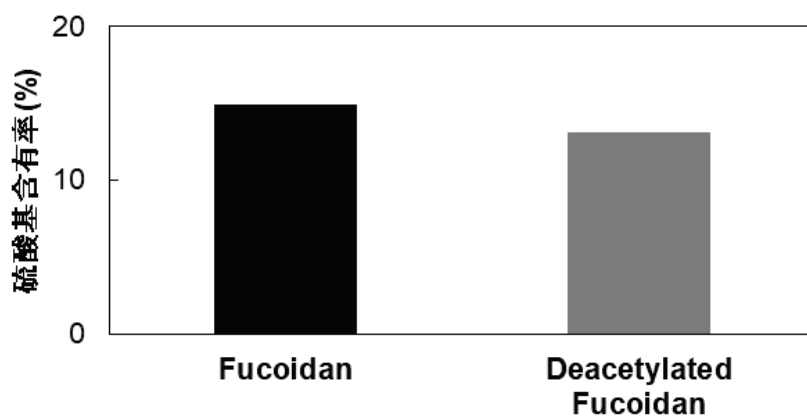


図 3-15. 酵素反応前後における硫酸基含有率



### 3-4. 考察

本章では、第 2 章で得られた遺伝子およびアミノ酸配列を基にオキナワモズク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、酵素化学的性質の特徴決定をおこなった。オキナワモズク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の遺伝子および酵素タンパク質については、調べた限りにおいて、その報告例はない。

遺伝子発現において、データを示してはいないが、pET ベクター系では発現させることができなかった。さらに、低温で効率的に発現可能である pCold ベクターを用いても遺伝子の発現は見られなかった（図 3-5）。そこでトリガーファクターとの融合タンパク質として遺伝子発現を行うことができる、pCold TF 発現ベクターを使用した。その結果、図 3-4 に示すように、融合タンパク質が無細胞抽出液中に過剰に生産され、さらにその酵素を用いてフコイダンを基質とした酵素反応を行うことにより、酢酸の遊離を確認することができた。組換え大腸菌より生産した酵素は、金属キレートカラムクロマトグラフィーにより精製し、HRV 3C Protease によりトリガーファクターの切断を行った。その結果得られた精製酵素のサブユニットの分子量は、野生株由来の酵素のものと一致していた。

今回精製標品が得られたフコイダンデアセチラーゼと部分精製フコイダン低分子化酵素を用いた酵素反応の結果より、H18 株によるフコイダン分解プロセスを図 3-16 に提唱する。すなわち、まずフコイダンの脱アセチル化反応が起こり、その後、低分子化反応が進行するものと考えられた。ただ、H18 株によるフコイダン分解の過程で硫酸の遊離も認められており、本菌株のフコイダン分解では脱硫酸化酵素も作用すると考えられるが、この酵素に関する検討は今後の課題である。

Fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* Tokida

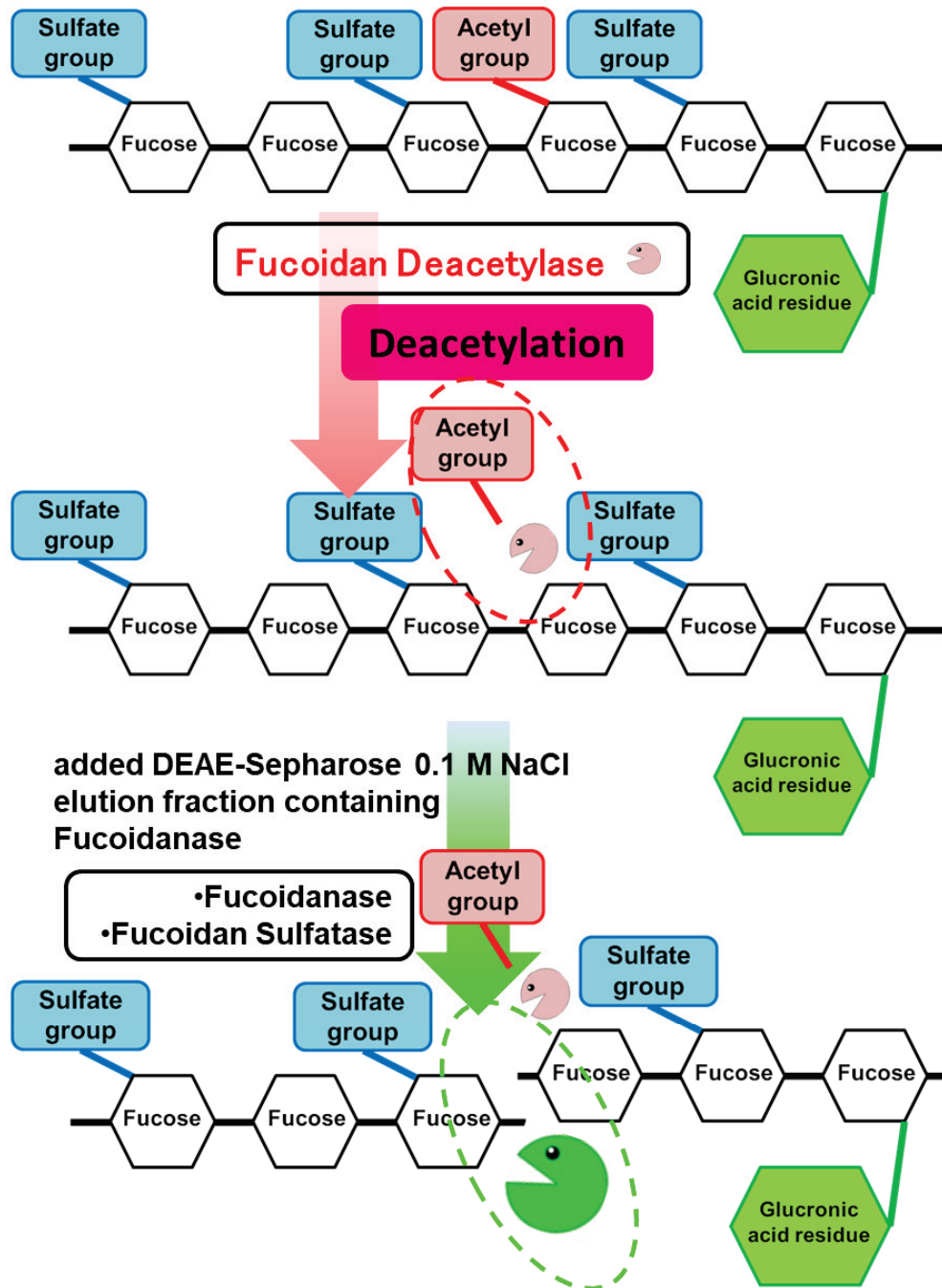


図 3-16. 想定される H18 株によるオキナワモズクフコイダン分解プロセス

部分精製したフコイダン低分子化酵素を用いた際、フコイダンの低分子化反応がわずかに進行するという現象が見られた (図 3-13 (B))。この原因として、少量のフコイダンデアセ

チラーゼが部分精製酵素標品に混入しており、その結果、生成した脱アセチル化フコイダンに低分子化酵素が作用した可能性が示唆された。また、*Formosa algae* 由来のフコイダン低分子化酵素は、*Fucus evanescens* 由来の天然フコイダンよりもその脱アセチル化フコイダンを効率的に分解したという報告例もある [47]。このことから、フコイダンの低分子化に関与する酵素をコードする遺伝子クローニングが必須であると考えられた。

本研究により得られたフコイダンデアセチラーゼは、フコイダンに対して脱アセチル化活性を有しているが、脱硫酸化活性を示さないため、フコイダンデアセチラーゼを用いることで、硫酸基の含有量および分子量の減少をさせることなく脱アセチル化オキナワモズクフコイダンを調製することができた。オキナワモズクフコイダンのアセチル基と生理活性との相関性は明らかにされていないのが現状であり、本研究で得られた脱アセチル化フコイダンと天然フコイダンとを比較することにより種々の生理活性の違いを検討することが可能となったと考えられる。

## 第 4 章 フコイダンデアセチラーゼの触媒残基の予測

### 4-1. 緒言

第 3 章では、オキナワモズク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遺伝子のクローニング及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。その結果、大腸菌においてフコイダンデアセチラーゼの生産が可能であることが示唆され、さらに生産されたフコイダンデアセチラーゼを用いることでオキナワモズクフコイダンの分子量を減少させることなく脱アセチル化フコイダンを調製することが可能になった。また、このデアセチラーゼは高分子量のフコイダンから酢酸を遊離させるだけではなく、低分子量の *p*-ニトロフェニルアセテート等の人工基質の加水分解も触媒できた。一方第 2 章では、フコイダンデアセチラーゼのアミノ酸配列中に G-X<sub>1</sub>-S-X<sub>2</sub>-G モチーフや L(Q)T(F)F(Y)DDPG と HTW(Y)S(AD)H を含む 2 つのモチーフを確認することが出来なかったことから、本酵素がアセチルグルクロキシランの脱アセチル化を触媒する酵素 [75] やキチンデアセチラーゼ [76]とは異なる触媒モチーフを有することが示唆された。

そこで、本章では第 2 章で得られたアミノ酸配列を基にフコイダンデアセチラーゼの予測構造の作成、触媒残基の予測およびデアセチラーゼ活性に必要な領域の探索をおこなった。

## 4-2. 実験方法

### 4-2-1. DNA 操作

DNA を対象とする実験方法は 2 章、3 章に記載した方法と同じである。

### 4-2-2. フコイダンデアセチラーゼの予測構造モデル

SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) にフコイダンデアセチラーゼのアミノ酸配列を入力し、ヒットしたテンプレートをを用いて予測構造モデルの作成を行った。

### 4-2-3. プライマーの設計

pCold TF ベクターに C 末端配列を削除したフコイダンデアセチラーゼをコードする遺伝子をクローニングする際、目的 DNA 断片を PCR 増幅するために、Forward プライマーおよび Reverse プライマーの設計を行った。それぞれのプライマーの塩基配列を表 4-1 にを示す。Forward プライマー fudF1 には *Nde* I 制限酵素認識配列を、Reverse プライマー fudR1 ~fudR6 には *Sal* I 制限酵素認識配列を持たせ、それぞれを太字で示した。外注し、送られてきたプライマーに滅菌水を添加して 100  $\mu$ M の溶液を調製し、それを滅菌水で希釈した 1  $\mu$ M のものを PCR 実験に用いた。

表 4-1. 各プライマー配列

プライマー	配列
fudF1 (Forward プライマー)	CCACGGCAT <b>ATG</b> AAAATCCTCAAAATC
fudR1	CAACAC <b>GTCGACT</b> CAGATCTCGAAGCTACC
fudR2	AATTAAG <b>TCTGACT</b> CACTCCCTCGAGGCATC
fudR3	AATTAC <b>GTCGACT</b> CAATGCCAGAAACGCG
fudR4	ACAG <b>TCTGACT</b> CAATTGAAGCGATCCGTG
fudR5	AAT <b>GTCGACT</b> CAGACCTTGTGGGTCCG
fudR6	ACAG <b>TCTGACT</b> CAGCTTTCGAAGTCTGC

プライマーの組み合わせは【Fud664-1】fudF1 - fudR1、【Fud664-2】fudF1 - fudR2、  
【Fud664-3】fudF1 - fudR3、【Fud664-4】fudF1 - fudR4、【Fud664-5】fudF1 - fudR5、  
【Fud664-6】fudF1 - fudR6

#### 4-2-4. PCR 増幅

表 3-4 に示す組成で PrimeSTAR Max DNA polymerase (TaKaRa Bio.)を含む反応液を調製後、  
TaKaRa Thermal Cycler Dice® *Touch* を用いて PCR を行った。PCR 増幅ではまず、94 °Cで 2  
分間加熱し、次に 30 サイクル (98 °Cで 10 秒間、63 °C (または 65 °C) で 5 秒間、および  
72 °Cで 1.5 分間) の伸長反応を行った。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 を用いて付属のプロトコールに従って精製した。

#### 4-2-5. フコイダンに対するデアセチラーゼ活性検討

2 mg/ml 無細胞抽出液、0.25% フコイダン、100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を含む反応液  
400 µl を 30°C, 24 h インキュベート後、80 °C, 5 min 熱処理し、イオンクロマトグラフィー  
によって酢酸濃度を測定した。

#### 4-2-6. 人工基質に対する活性検討

0.1 mg/ml 無細胞抽出液、1 mM 人工基質、100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) を含む反応液 1 ml を 30 °C でインキュベート (*p*-nitrophenyl acetate の場合は 20 min、その他の基質、*p*-nitrophenyl propionate, *p*-nitrophenyl butyrate, *p*-nitrophenyl hexanoate の場合は 60 min) 後、410 nm の吸光度を測定し、活性を求めた。検量線は 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) を含む 0.02 mM~0.2 mM の *p*-nitrophenol を用いて作成した。

## 4-3. 結果

### 4-3-1. フコイダンデアセチラーゼの予測構造モデルの作成

SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) でフコイダンデアセチラーゼのアミノ酸配列を検索したところ、テンプレートとして acetyl xylan esterase、cephalosporin C deacetylase などがヒットした。その中の acetyl xylan esterase とアノテーションされている TM0077 をテンプレートとし、フコイダンデアセチラーゼの構造モデルを作成した (図 4-1)。

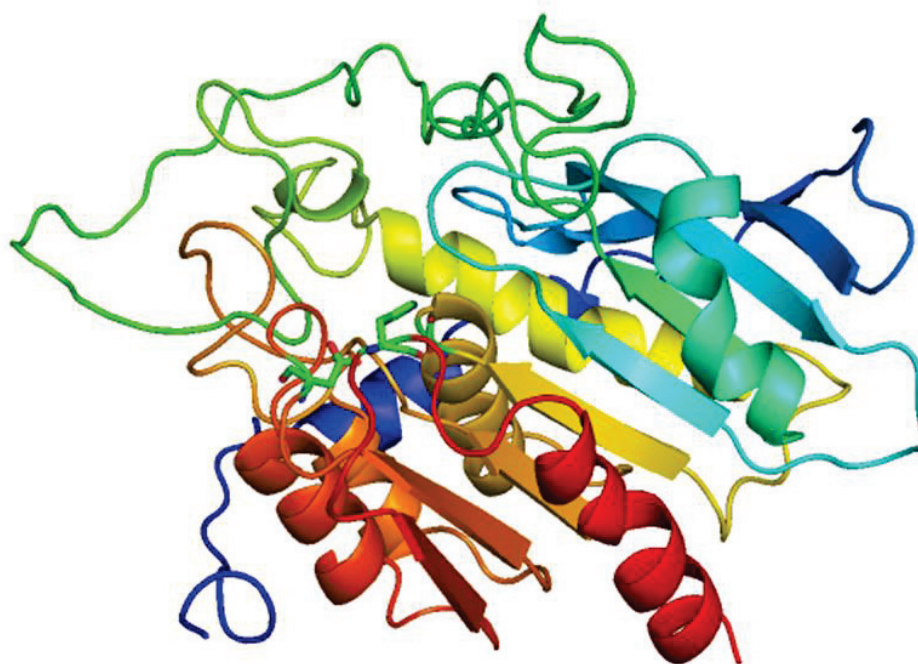
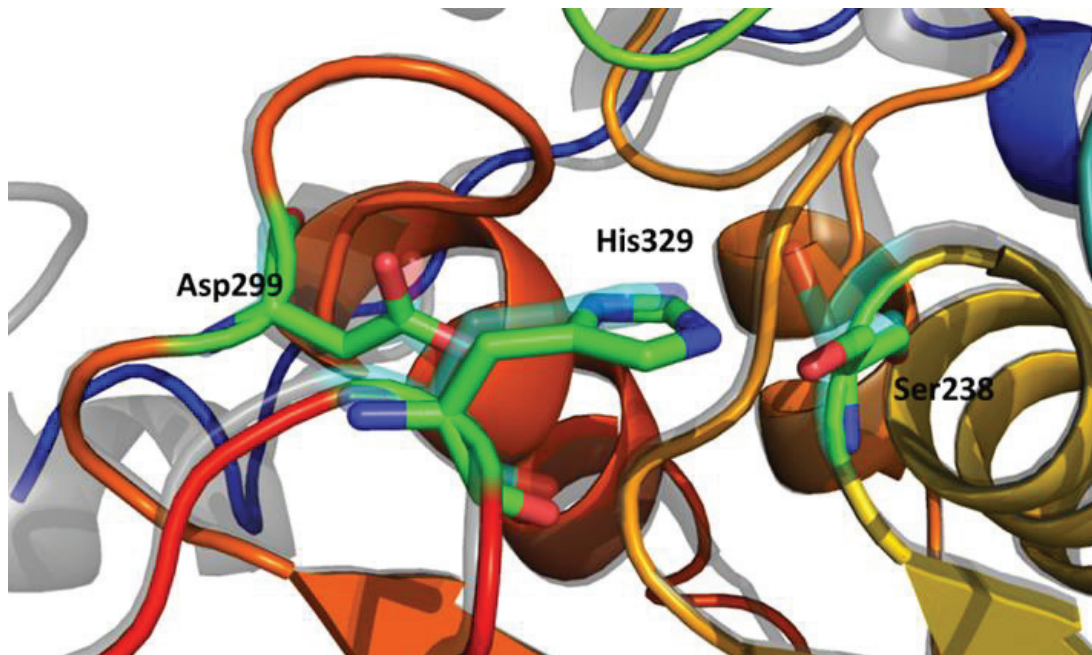


図 4-1. SWISS-MODEL によるフコイダンデアセチラーゼの予測構造モデル

TM0077 は、acetyl xylan esterase とアノテーションされているが、アセチルキシランに対する活性は持たないと報告されている [78]。フコイダンデアセチラーゼの *N* 末端領域が、TM0077 の全長と立体構造が類似しており、この部分の構造モデルを作成した。C 末端側はテンプレートが見つからなかったため、構造を予測することができなかった。TM0077 とフ



コイダンデアセチラーゼの構造を重ね合わせたところ、TM0077 の触媒残基と想定されている Ser、Asp、His の位置がフコイダンデアセチラーゼと一致しており、これらの残基がフコイダンデアセチラーゼの触媒残基であると予想された (図 4-2)。



半透明の部分：TM0077 (テンプレート)

図 4-2. フコイダンデアセチラーゼの想定される触媒残基

Fud と称したフコイダンデアセチラーゼと TM0077 のアミノ酸配列の比較を図 4-3 に示すが、その相同性は 16% である。Fud の *N* 末端側と TM0077 に存在する 3 つの推定触媒残基の位置を赤字で示している。

```

Fud      1: MKILKIPRRSLCALLPFASLCLVQAQDTLPPLEGKAAPQTYDELWDGYDPRAEPLDVE-V 59
TM0077   1: MGSDKIHFFF--HHMAFFDLPLEELKKYRPE---RYEEKDFDEFWEETLAESEKFPLDPV 55
          *  **          *  *  *          *          *  *  *          *  *

Fud      60: LKEWEQDGVVMKVLRYRIGMFKGQKSMMAAVYGY---PK-GAEKLPGLVQIHGGGQYADA 115
TM0077   56: FERMESHLKTVEAYDVTFSGYRGQR-----IKGWLLVPKLEEEKLPCVVQYIG----- 103
          *          **          *  **  ****  **  *

Fud     116: NAVLTNAKRGYATISVSWAGRINAPDYKVNPDVVKLFWEGETEDPAYKVIITDWGAVDGYH 175
TM0077  104: ----YNGGRGFPHDWLFWPSMGYICFVMDTRGQGSGLKGDTPDYEGPVDP----- 151
          *  **          *          *  *  *

Fud     176: APSRSPGNQFPKLPKPSEWTIDPVVSPRSNGWFLCTLGMRRALTFLEQQPEVDADKLGVI 235
TM0077  152: -----QYP-----GFMTRGILDPRYYYYRRVFTDAVRAVEAAASFPQVDQERIVIA 197
          *  *          **          **          *  **

Fud     236: GHSMGGKLTVLTAGSDPRVKAAAPSCGGIS-DR-----DNEDP 272
TM0077  198: GGSGGGIALAVSALSKKAKALLCDVPFLCHFRRVQLVDTHPYAEITNFKTHRDKE-E 256
          *  *  **          **          *          *  *

Fud     273: LFNATL--GDAV-YLEHITAPTIFLSPANDFHGRIDDLQLAVREIQTDQWRVTCSPHHS 329
TM0077  257: IVFRTLSTYFDGVNFAARAKIPALFSVGLMDN-ICPPSTVFAAYNYYAGPKERIYPYNNH 315
          **  *  *          *  *          *          *          *  *

Fud     330: QDTAEYEVATQLWFDQILKGSFEIPATPETKLELARENGVPVFSVKPDASREILALEIYY 389
TM0077  316: EGGGSFQAVEQVKFLKKLFEKG 337
          *  *  *

Fud     390: TQGGQVDGKMDDRENTKARFWHFAKATKNGDAWTGELPLHSVEKPLWVYANVLYALDEPV 449

Fud     450: SGAGYYYYRDYTTDRFNVSSLMSMVSAELAVAGVKPTMEKSLLESFGEDWKRWFSYFP 509

Fud     510: EEWPIATHKVYDPVWKAPAGATLSLEVLSAEPNKMAIGLDGHFTEIEIAGGSEWQAVSL 569

Fud     570: PADFESESGEKLGTEWEGIRELQLEDGKTLSDKKSGEKKTFGGKWQGAPPQFRNLRWIAK 628

```

図 4-3. フコイダンデアセチラーゼ (Fud) と TM0077 のアミノ酸配列比較

#### 4-3-2. フコイダンデアセチラーゼの C 末端側欠損タンパク質をコードする発現株の構築

フコイダンデアセチラーゼの C 末端側には、TM0077 には見られない領域 (図 4-3 の青色の点線で囲まれた部分) が存在する。この領域を欠損させたタンパク質を生産し、C 末端領域が活性に及ぼす影響を検討した。今回、図 4-4 に示すように、C 末端側の長さを変えた 6 種類のタンパク質を Fud-1 ~ Fud-6 について検討した。

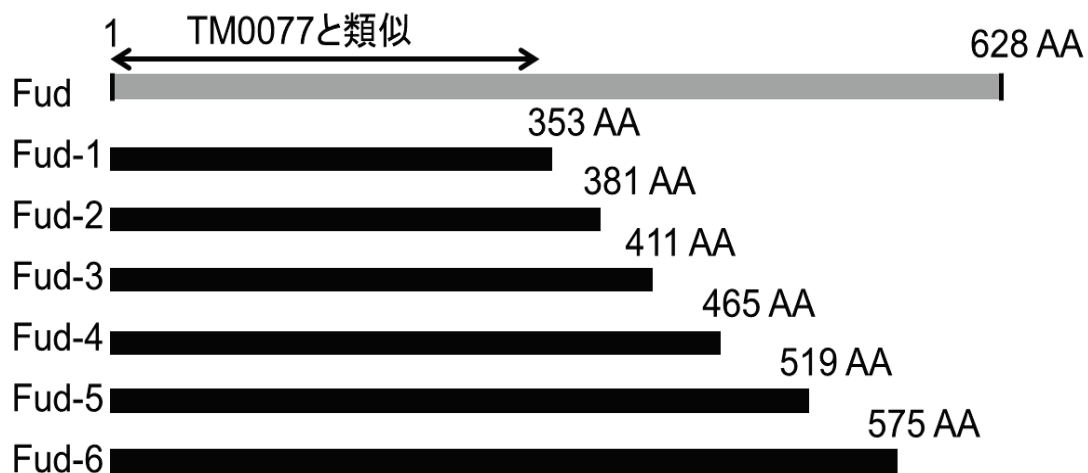
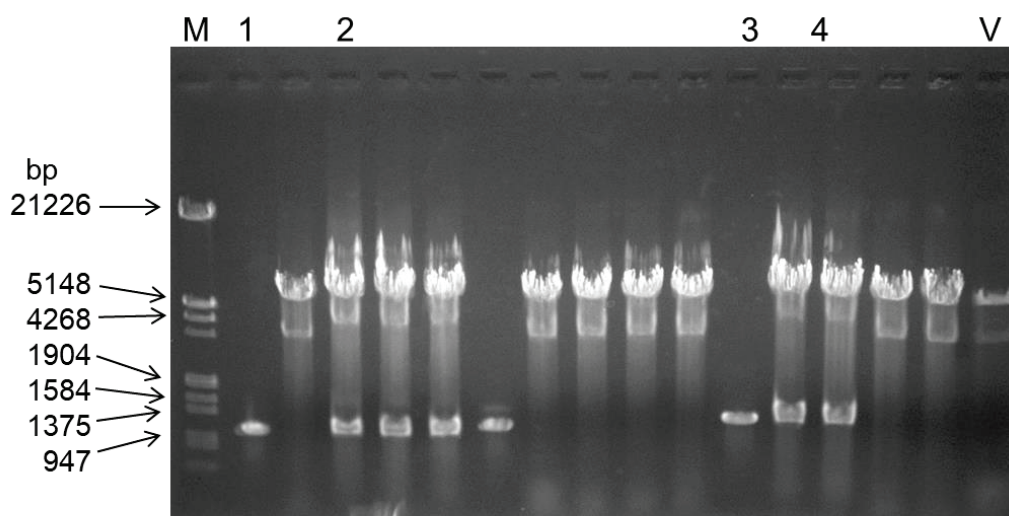
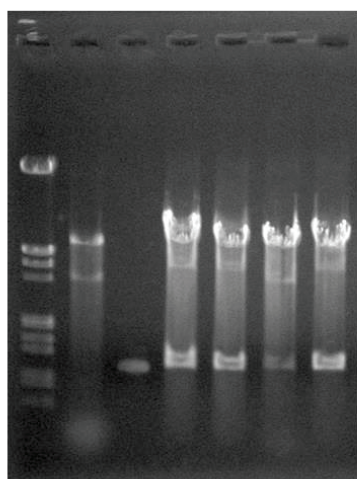


図 4-4. C 末端側を欠損させたフコイダンデアセチラーゼのアミノ酸残基数

表 4-1 のプライマーを用いて、項目 4-2-4 の通りに PCR を行った結果、*fud-1* ~ *fud-6* の塩基長である 1059 bp、1143 bp、1233 bp、1395 bp、1557 bp、1725 bp 付近にバンドが確認された。得られた DNA 断片と pCold TF ベクターを *Nde*I と *Sal*I で制限酵素消化し、ライゲーションを行い、*E. coli* DH5 $\alpha$  を形質転換した。37°C で一晚静置培養し、生じたコロニーからプラスミド単離を行い、制限酵素で消化した後アガロース電気泳動をした。そのうち、*fud-1* ~ *fud-3* の結果を図 4-5 に示す。*fud-1* ~ *fud-6*、pCold TF の塩基長付近にシングルバンドが見られたので、得られたプラスミド中に目的 DNA 断片が含まれていると判断し、このプラスミドを用いて *E. coli* BL21(DE3) を形質転換した。



M V 5 6

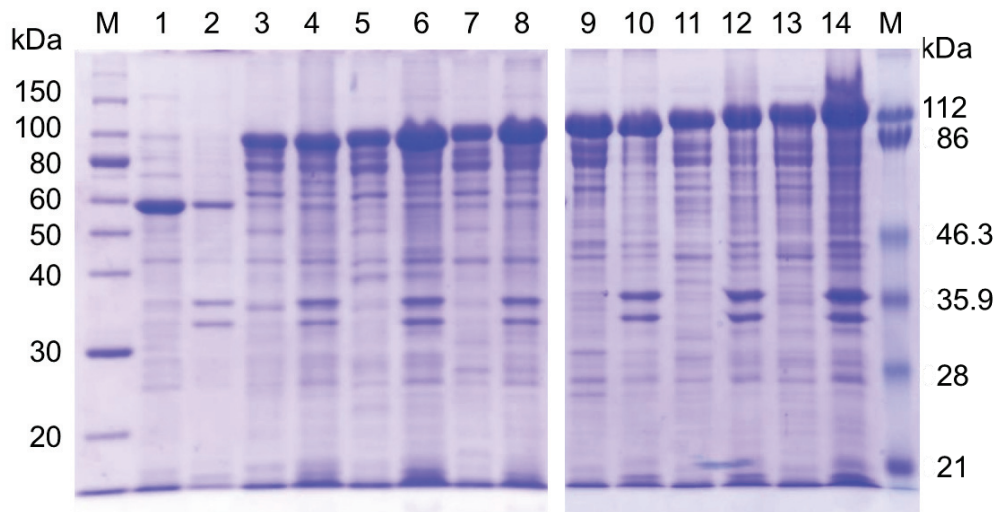


M : マーカ  
V : ベクター (pCold TF)...5769 bp  
1 : *fud-1*...1059 bp  
2 : pCold TF/*fud-1*  
3 : *fud-3*...1233 bp  
4 : pCold TF/*fud-3*  
5 : *fud-2*...1143 bp  
6 : pCold TF/*fud-2*

図 4-5. *fud-1*～*fud-3* をクローニングしたプラスミドを制限酵素消化した後のアガロース電気泳動結果

#### 4-3-3. 組み換え株の発現検討

組み換え株による目的遺伝子の発現について、SDS-PAGE により検討した (図 4-6)。可溶性、不溶性どちらも目的タンパク質の分子量である 91 kDa、94 kDa、98 kDa、104 kDa、110 kDa、116 kDa 付近にすべての遺伝子の高発現が確認できた。



- M : マーカ―  
 1 : *E. coli* BL21/pCold TF 上清  
 2 : *E. coli* BL21/pCold TF 沈殿  
 3 : *E. coli* BL21/pCold TF/*fud-1* 上清  
 4 : *E. coli* BL21/pCold TF/*fud-1* 沈殿  
 5 : *E. coli* BL21/pCold TF/*fud-2* 上清  
 6 : *E. coli* BL21/pCold TF/*fud-2* 沈殿  
 7 : *E. coli* BL21/pCold TF/*fud-3* 上清  
 8 : *E. coli* BL21/pCold TF/*fud-3* 沈殿  
 9 : *E. coli* BL21/pCold TF/*fud-4* 上清  
 10 : *E. coli* BL21/pCold TF/*fud-4* 沈殿  
 11 : *E. coli* BL21/pCold TF/*fud-5* 上清  
 12 : *E. coli* BL21/pCold TF/*fud-5* 沈殿  
 13 : *E. coli* BL21/pCold TF/*fud-6* 上清  
 14 : *E. coli* BL21/pCold TF/*fud-6* 沈殿

図 4-6. *fud-1* ~ *fud-6* を有する組み換え株の無細胞抽出液の SDS-PAGE 結果

#### 4-3-4. フコイダンに対する活性検討

項目 4-3-3 で得られた無細胞抽出液を用いて、フコイダンを経質とした酵素反応を行い、酢酸濃度を測定したところ、Fud-1~4 では酢酸が検出されず、Fud-5, 6 ではわずかに酢酸が検出されたが、全長の Fud と比較すると、活性はほとんど無いと考えられた（データは示さない）。

#### 4-3-5. 人工基質に対する活性検討

項目 4-3-3 で得られた無細胞抽出液を用いて、人工基質に対する活性を測定した結果を図 4-7 に示す。C 末端を削ったフコイダンデアセチラーゼの中で最も長い Fud-6 でも Fud に比べてわずかな活性しか見られず、C 末端領域は活性に必要であることが示唆された。

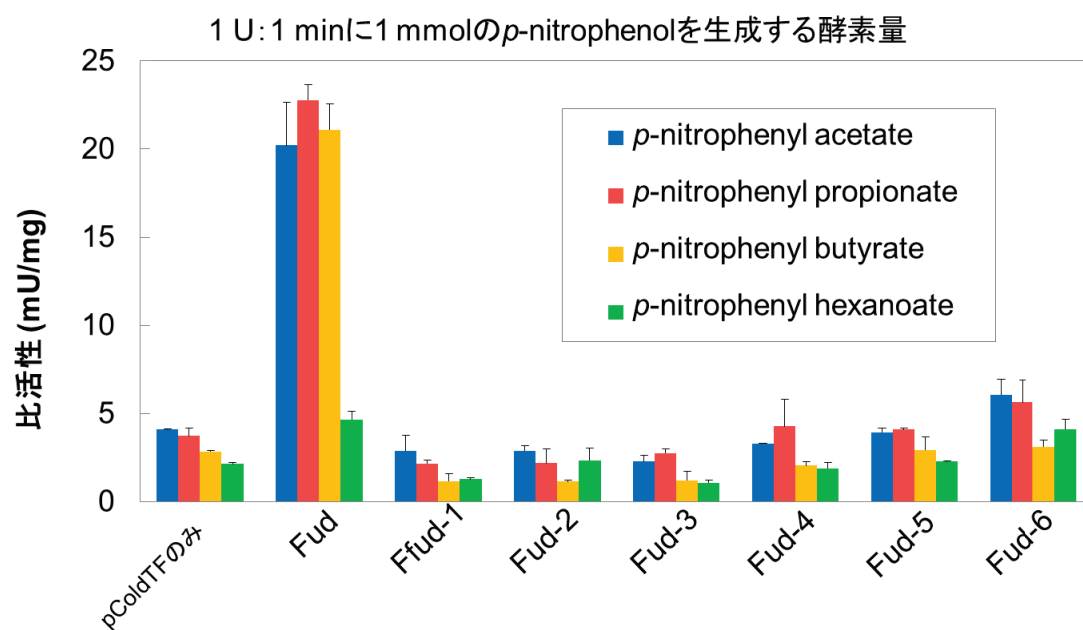


図 4-7. Fud1~6 の人工基質に対する比活性



## 4-4. 考察

本章では第 2 章で得られたフコイダンデアセチラーゼのアミノ酸配列を SWISS-MODEL により解析し、ヒットした TM0077 の立体構造をテンプレートとして、3 次構造の予測をおこなった。TM0077 は、CE7 ファミリーに属しているアセチルエステラーゼであり、acetyl xylan esterase とアノテーションされているものの、アセチルキシランに対する活性は見られず、セファロスポリンの脱アセチル化活性を有することが報告されている [78]。両者のアライメントを取ると、フコイダンデアセチラーゼの C 末端領域約 300 アミノ酸残基は TM0077 には存在せず、N 末端部分と TM0077 の一次配列の相同性は 16%であったが、加水分解酵素の典型的な触媒部位であるセリン、アスパラギン酸、ヒスチジンは保存されていた。さらに、構造モデルにおいてこれら 3 つの残基の空間的な位置は、フコイダンデアセチラーゼと TM0077 の間で一致していた。従ってこれらの残基が触媒残基である可能性が高いと想定されたため、TM0077 には存在しないフコイダンデアセチラーゼの C 末端領域の削除を行ってみた。しかし、C 末端領域を削除したタンパク質には活性がほとんど見られなかった。フコイダンデアセチラーゼの C 末端領域は、触媒残基を含まないと予想されたにも関わらず、酵素活性に影響を及ぼしたことから、基質のアセチル基を取り込む際に C 末端領域が必要であると考えられた。

## 第 5 章 *Luteolibacter algae* H18 からのフコイダナーゼの精製

### 5-1. 緒言

フコイダンの硫酸化フコース残基間のグリコシド結合の開裂を触媒する酵素はフコイダナーゼと呼ばれグリコシダーゼに属している (EC 番号 3.2.1.)。天然のフコイダンは、ヘテロ硫酸化多糖類であり、複雑な構造を有しているため、フコイダンに対し触媒活性を有する酵素を分類することは非常に難しいとされている。フコイダンの構造に関する情報が乏しいうえに、酵素活性に関するデータが不正確なため、これらの酵素を分類する上で混乱を招く場合がある。例えば、*Fucus vesiculosus* から単離されたフコイダンの構造は、1→2- $\alpha$ -L-フカンと誤って決定され、それがフコイダナーゼの誤分類 EC 番号 3.3.1.44.をもたらした。後にこの構造は、 $\alpha$ -1→3- および  $\alpha$ -1→4-結合のフコース残基として修正された [35]。しかしながら、酵素の分類はまだ変更されてはいない。フコース残基のみから構築された多糖類であるフカン中のグリコシド結合の加水分解を触媒する酵素は、フカナナーゼとして命名されるべきであり、フコイダナーゼとして命名されるべきではないということに留意したい。

Henrissat らによって構築された糖質関連酵素のデータベースである CAZy ([www.cazy.org](http://www.cazy.org))は [65, 79, 80]、未知の特性を持つペプチドを分類することもでき、時には CAZy によって酵素の触媒的および分子的性質の決定 [81]、開裂されるべきグリコシド結合の形状を予測することに利用されている [82]。CAZy では糖質加水分解酵素を筆頭に、糖転移酵素、多糖類リアーゼ、糖質エステラーゼがそれぞれ分類されており、なかでも糖質加水分解酵素は 2019 年 1 月現在、156 の糖質加水分解酵素ファミリー (glycoside hydrolase family; GH ファミリ



一) に分類されている。いくつかの糖質加水分解酵素は複数のファミリーに属し、それぞれ少なくとも 1 つ以上の糖質結合モジュールを有している。

この分類によれば、序論でも述べたように、フコイダナーゼは GH 107 ファミリーに属している。このファミリーに最初に登録されたのは、海洋性細菌 *Mariniflexile fucanivorans* SW5<sup>T</sup> 由来の FcnA (CAI47003.1) である。フコイダナーゼ FcnA の酵素反応について、*Pelvetia canaliculata* 由来フコイダンを経験として詳細な検討が行われた結果、FcnA は多糖リアーゼではなく、エンド型加水分解であることが明らかになった [66, 83]。さらに近年、本酵素について、X 線結晶構造解析と NMR によって構造決定がなされた [84]。GH 107 ファミリーには FcnA 以外に、*Alteromonas* sp. SN-1009 由来の Fda1 (AAO00508.1) と Fda2 (AAO00509.1) [85]、*Shewanella violacea* DSS12<sup>T</sup> 由来遺伝子 SVI\_0379 (BAJ00350.1) [40] など、2019 年 1 月現在、合計 16 個のデータが登録されている。

著者らのグループではオキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus*) 由来フコイダンを経験を分解し、炭素源として利用できる *Luteolibacter algae* H18 を単離し、分解に関与する酵素についての研究を進めている。第 4 章までに、H18 株が有する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について述べてきたが、本章では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言及する。まず、H18 株からフコイダナーゼを種々のクロマトグラフィーにより精製し、酵素のアミノ酸配列を決定した。そして、明らかにした H18 株のドラフトゲノム情報を基に、フコイダナーゼ遺伝子を特定し、明らかになった本酵素のアミノ酸配列について考察を行った。

## 5-2. 材料および実験方法

### 5-2-1. *Luteolibacter algae* H18 の培養と無細胞抽出液 (C.F.E.) の調製

H18 株の培養および C.F.E.の調製に関する実験方法は 2 章に記載した方法と同じである。

### 5-2-2. 酵素活性測定

脱アセチル化フコイダンは 3-2-19 の方法に従って、酵素的に調製した。0.25% 脱アセチル化フコイダン、100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)、そして部分精製酵素を含む酵素反応液を全量 200  $\mu$ l 調製し 30  $^{\circ}$ C、24 h でインキュベート後、85  $^{\circ}$ C、5 min 熱処理によって反応停止させた。その反応液を用いて、3-2-18 に示すポンプと検出器を用いて HPLC を行い、基質の低分子化を評価した。

### 5-2-3. DEAE-Sepharose FF カラムによる酵素精製

42 L の培養液から調製した H18 株 C.F.E.(タンパク質量 6250 mg) を 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で平衡化した DEAE-Sepharose FF カラム (樹脂量 800 mL, 40 $\times$ 6.0 cm) にアプライした。流速は 3.0 mL/min、分画サイズを 18.5 mL に設定した。20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で洗浄後、0.1, 0.2 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で溶出を行い、0.1 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で溶出された画分のうち、280 nm の吸収が 0.5 以上の画分についてフコイダン低分子化酵素の活性測定を行い、活性画分を集めた。

### 5-2-4. Phenyl-TOYOPEARL 650M による酵素精製

2.0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で DEAE-Sepharose 0.1 M 溶出画分 (タンパク質量 3460 mg) を一晩透析したところ、沈殿が生じた。沈殿を取り除いた上澄み液を 2.0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で平衡化した Phenyl-

TOYOPEARL 650M (樹脂量 350 mL, 12.5×3.0 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。2.0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で洗浄後、2.0, 1.0, 0.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)で溶出を行った。1.0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶出画分では 280 nm の吸収が 0.2 以上の画分について、0.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶出画分では 280 nm の吸収が 0.05 以上の画分についてフコイダン低分子化酵素の活性測定を行い、活性画分を集めた。

#### 5-2-5. Resource Q カラムによる精製

5-2-4 で得られた 0.5, 1.0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶出画分を Vivaspin Turbo15 (Sartorius) を用いて 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) により、別々に脱塩処理と濃縮処理を同時に行った。それぞれの溶出画分から調製した部分精製酵素 (0.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶出画分はタンパク質量 4.22 mg、1.0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶出画分はタンパク質量 4.21 mg) を、20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 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 0.2 mL/min、分画サイズを 2 mL に設定した。20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で洗浄後、グラジエント濃度は 0 M から 0.15 M NaCl に設定し、ÄKTA システムを用いて溶出を行った。各フラクションのフコイダン低分子化酵素の活性測定を行い、活性画分を集めた。得られた精製酵素の N 末端アミノ酸配列は 2-2-15 の方法で決定した。

## 5-3. 結果

### 5-3-1. 大量培養と C.F.E. の酵素調製

H18 株の培養液 42 L から 120 g の湿菌体を得られ、6250 mg のタンパク質を含む C. F. E. を調製した。

### 5-3-2. DEAE-Sepharose FF カラムによる酵素精製

C.F.E. (3460 mg-protein) を 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 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 M NaCl 溶出画分において活性が検出され、Fraction No. 420~437 を回収した (図 5-1)。

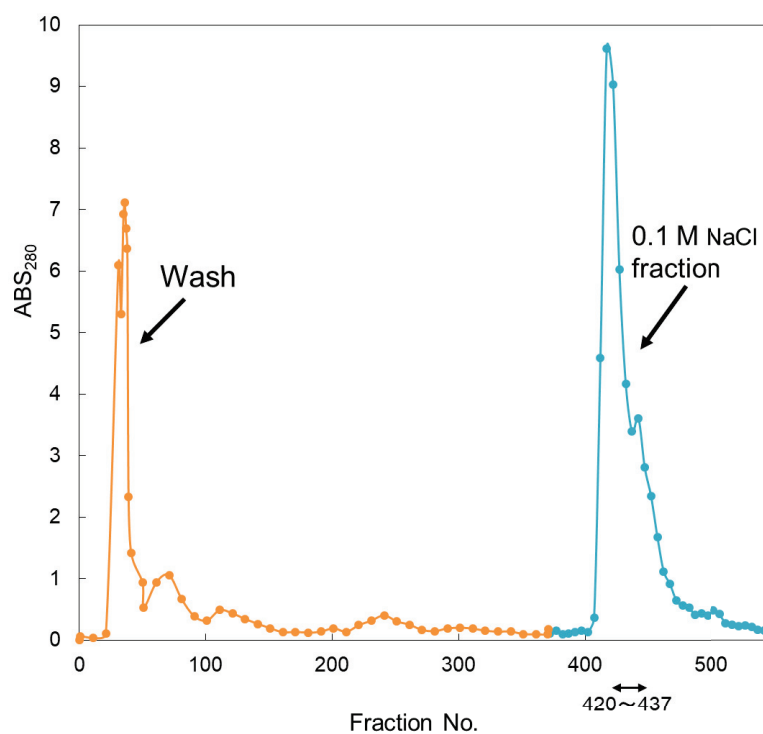


図 5-1. DEAE-Sepharose FF カラムクロマトグラフィーで分画したタンパク質の溶出パターン

なお、酵素活性については、基質である高分子量フコイダンの低分子化を HPLC のリテンションタイム変化で評価するために酵素活性を数値化できず、本章のクロマトグラフィーの溶出パターン中には示していない。

### 5-3-3. Phenyl-TOYOPEARL 650M による酵素精製

DEAE-Sepharose 0.1 M NaCl 溶出画分を 2.0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に対して一晚透析後、Phenyl-TOYOPEARL カラムにアプライした。各  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  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、1.0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶出画分の両方に活性が検出されたので、Fraction No. 157~191、Fraction No. 218~233 をそれぞれ回収した (図 5-2)。

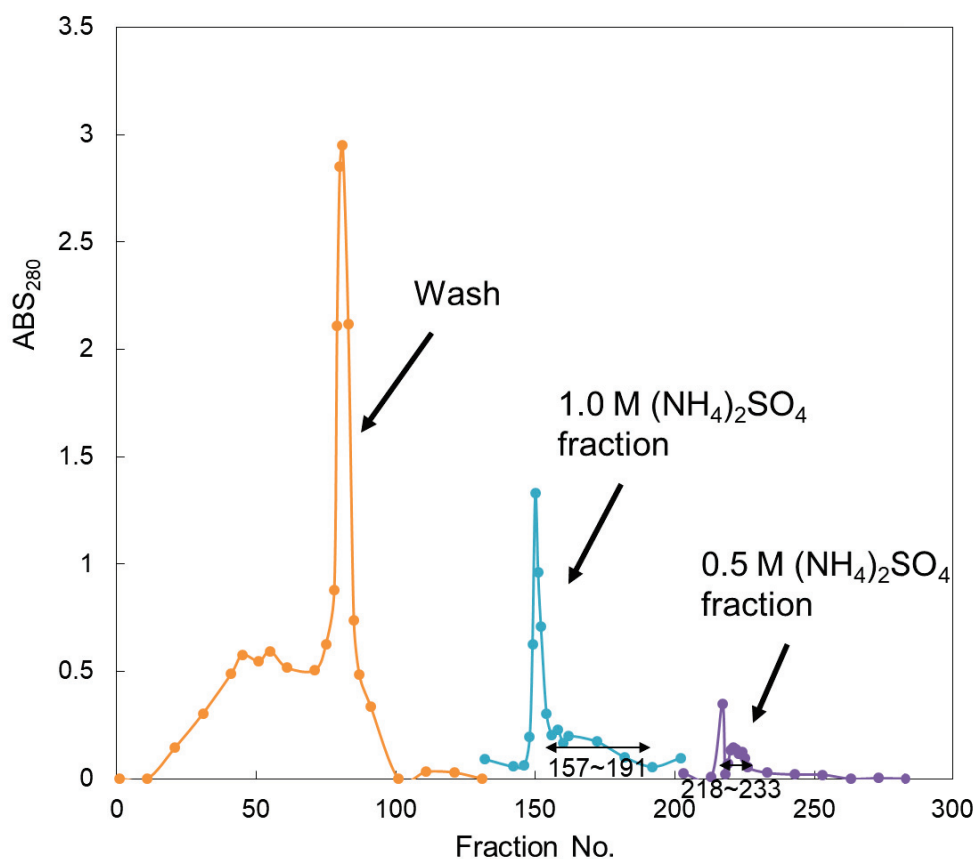


図 5-2. Phenyl-TOYOPEARL カラムクロマトグラフィーで分画したタンパク質の溶出パターン

#### 5-3-4. Resource Q カラムによる酵素精製

Phenyl-TOYOPEARL 0.5, 1.0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶出面分を、それぞれ Vivaspin spin Turbo15 (Sartorius)を用いて 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)により、脱塩処理と濃縮処理後、Resource Q カラムにアプライした。各 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、どちらも Fraction No. 28~35 を回収した (図 5-3, 5-4)。

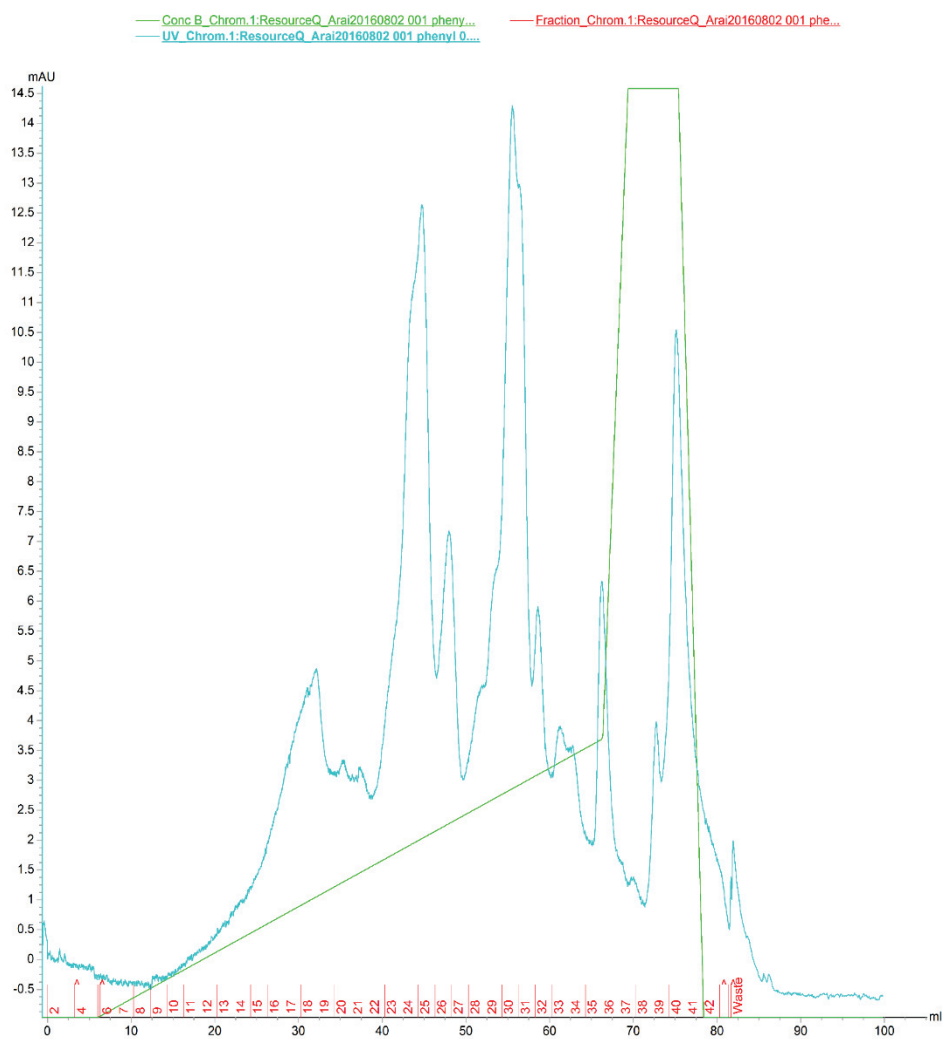


図 5-3. Phenyl-TOYOPEARL 0.5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶出面分をチャージした Resource Q カラムクロマトグラフィーのタンパク質の溶出パターン

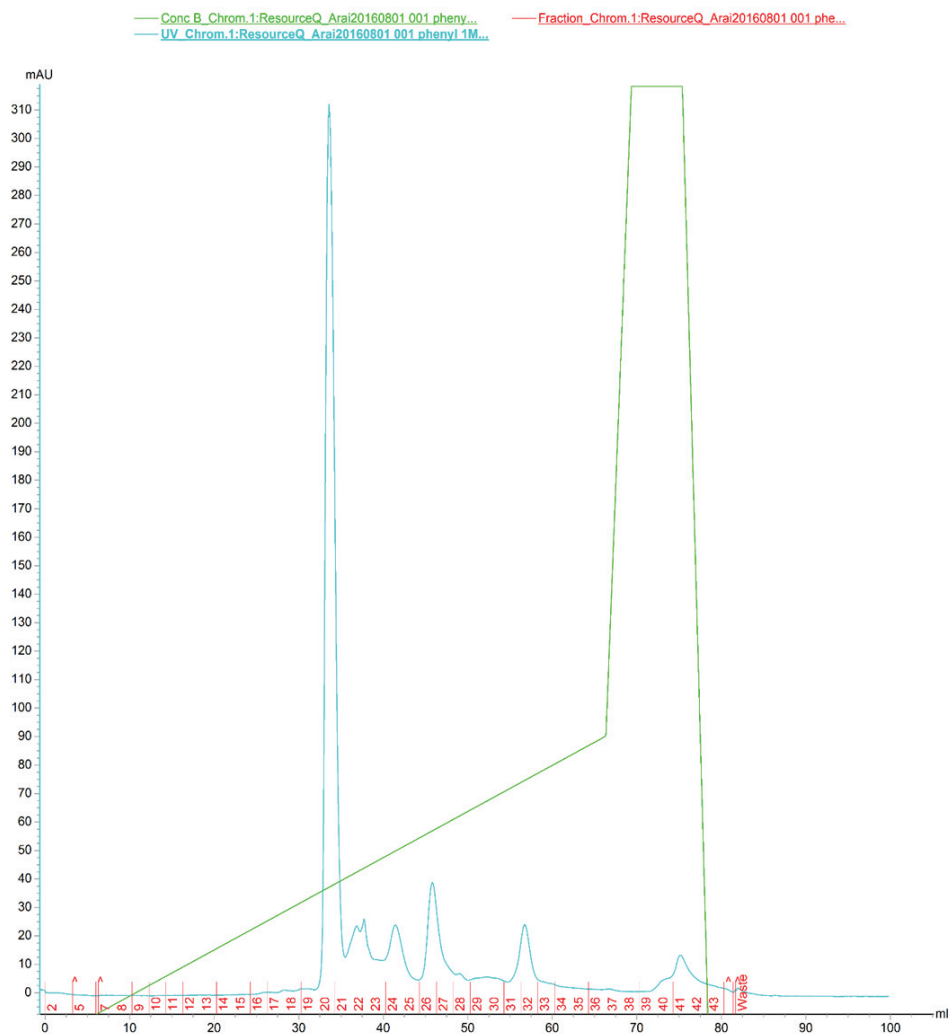


図 5-4. Phenyl-TOYOPEARL 1.0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶出画分をチャージした Resource Q カラムクロマトグラフィーのタンパク質の溶出パターン

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 分析を行った(図 5-5, 5-6)。フコイダン低分子化活性と SDS-PAGE の結果を比べると、Phenyl-TOYOPEARL 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶出画分をチャージした、Resource Q 後の溶出画分では、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(図 5-4, 5-6)、どのバンドが目的タンパク質であるか特定できなかった。一方、Phenyl-TOYOPEARL 0.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶出画分をチャージした、Resource Q 後の溶出画分では、活性の強い



Fraction No. 30~32 には、100 kDa 付近に赤丸で示した、特有のバンドが見られることから  
 (図 5-3, 5-5) 、このバンドを切り出し、N 末端アミノ酸配列を決定した。

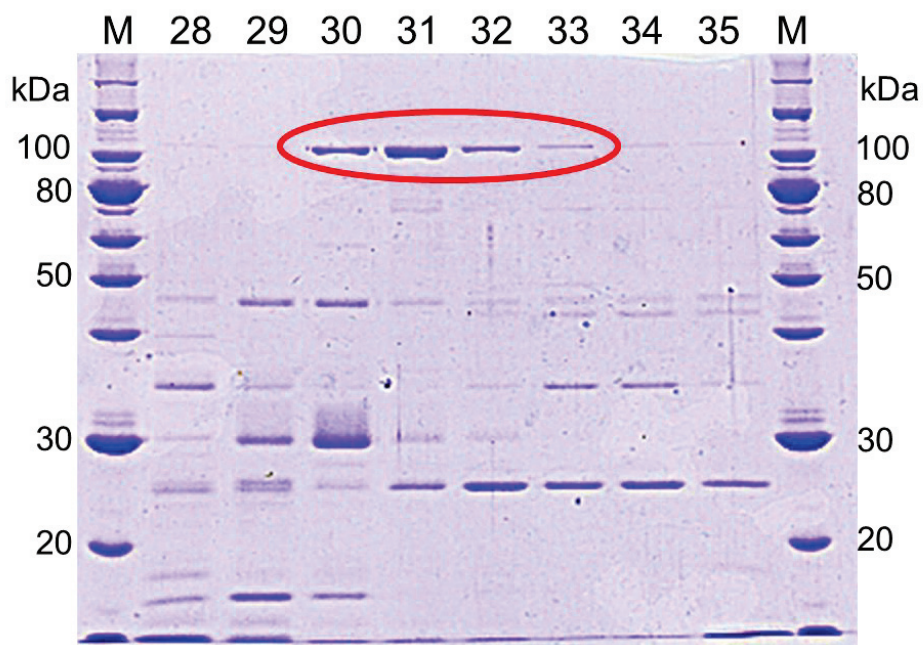


図 5-5. Phenyl-TOYOPEARL 0.5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶出画分をチャージし、Resource Q カラムクロマトグラフィーで分画したフラクションの SDS-PAGE 結果

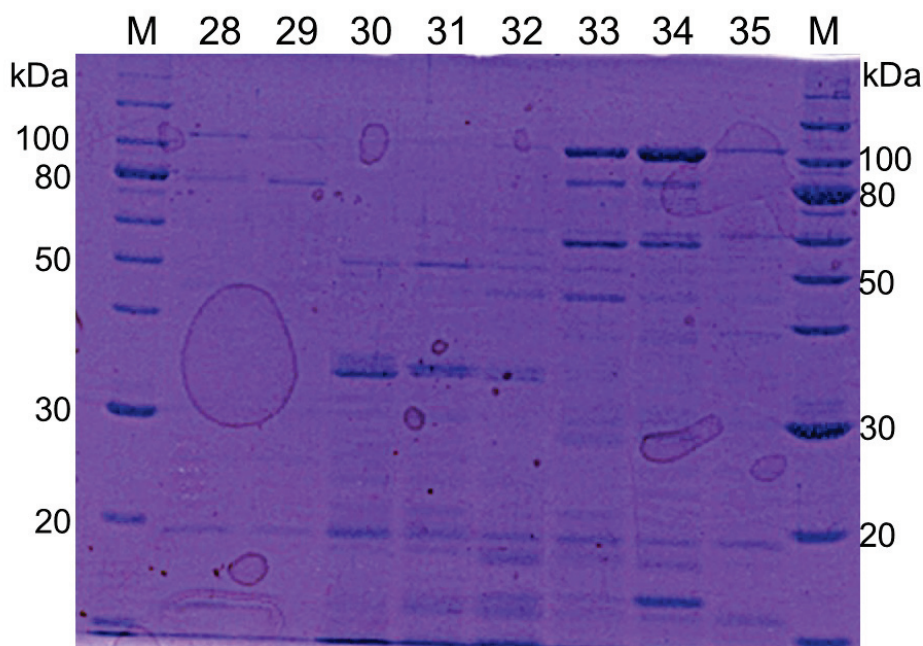


図 5-6. Phenyl-TOYOPEARL 1.0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶出画分をチャージし、Resource Q カラムクロマトグラフィーで分画したフラクションの SDS-PAGE 結果



### 5-3-5. 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、AEVSELMPLP という配列が得られた。目的遺伝子の同定には解析ソフト in silico Molecular Cloning を用いた。その結果、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 3078 bp、コードするタンパク質の分子量は 112 kDa であった (図 5-7)。ここで、見出された ORF 全長を *fct114full* と称することとし、エドマン分解法により検出されたアミノ酸配列より下流をコードする DNA 断片を *fct114* とした。そして、*fct114full* 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機能未知であり、アノテーションされているタンパク質の中で最も相同性が高いのは glycosyl hydrolase [*Sphingomonas sanguinis*] (相同性 26%) であった (表 5-1)。

MHPLRFPITFPKLPALGAALVLSLLAATAPLKAA**AEVSELMPLP**EDYTSMW~~WAQ~~  
GFPQVVDGAPWLRRIQTGHYSMILDTEALRITHLGVPVAKGTDYESFVK~~SAPPL~~  
PEKTNPVDLHLGITVNGKSYRCTAGGKWTRYDGPRLVESGRFFQKGDVTGLV  
FTAEDGSVLNAETRFETCAWPERLGLILAAKPGEKALAGGEASFGKIGGGFGF  
DGKADLEIPHAPSLDTEQFTLGFWAFIPRNYSHQDGASPWLVCKNRNEARDG  
NYGMLLRQGKLEARLNIGGGKDGQFVVNSSSDVKRDRWNHLAMS~~YDGEVLR~~  
IFLNGKNVGEKKIGRVRKPGADPLVFGRRADSN~~SGHYVFRGAMDEIQYFDKAL~~  
DPKLIGRMAMRPGESLPAAKPAHAWAFKVDGASSETMPMEDWKNASMEVRV  
SAEGGALSLSNESWSLPGARWADGEWKQVGLAMFPATFEEAPETSPISVKVS  
EKDQGGGERPVTFDAAQGCHLIDLNGVRAQAPANGDKND~~AIERYKLVSNTPTD~~  
RVEVADLKFVKDSGISITGVSAMLRDADGNPTGIPVQISKNWHNDEESGVYR  
GSWLHALTHLRLPPGSTTELELVISYGHWWGGVAAASHAQLCLIGWGSNQHWS  
ESALGSWGESICYEPEQGGQANTTVTDVRPVMVNGGKDDKKWGWTSNVGGA  
DFFRFFDPAGKRIASAMQTAYLKHGPCLSEVVFSGRVGE~~GIRHSSTVSLART~~  
DDIVRGIYRLRMDVDKAMDFSRFVIFQVGS~~DTYNFTQEKKMAVG~~DAGGLKKE  
WNTTWGGNTYRTEPIVMDGTAPWVSLHEGSHFGGHKLMGAWANRGIVVRS  
WKARLGKGDASAWMAEHGVKRG~~SSETSTAD~~FVPPPGVTRLEPGDFIEATFEH  
IVMPQTAESYYGPNEALRSALAKDGNTWRMIRRESAGNKLEVNVSQGSLEHT  
YPDVRIQTSGGAAFTLKGG~~LAYLPVFTFTGLASNDG~~VELLVDGKPLDQSVHGK  
DFWQTD~~FD~~PVSKTWSRTYNIPAQAGKTPGVNLQPKP

図 5-7. H18 株由来フコイダナーゼのアミノ酸配列

N 末端アミノ酸配列の解析で得られた配列を太字で示す。

表 5-1. Fct114 full の BLAST 検索結果

タンパク質	菌株	相同性 (%)	Accession No
hypothetical protein	<i>Rubritalea marina</i>	50	WP_018970822.1
hypothetical protein	<i>Formosa agariphila</i>	40	WP_038529980.1
hypothetical protein	<i>Lentisphaera araneosa</i>	39	WP_007280829.1
hypothetical protein	<i>Parabacteroides timonensis</i>	38	WP_075559901.1
hypothetical protein	<i>Sunxiuqinia elliptica</i>	34	WP_093919541.1
hypothetical protein	<i>Rhodopirellula sallentina</i>	32	WP_008689565.1
glycosyl hydrolase (GH family 2)	<i>Sphingomonas sanguinis</i>	26	WP_058717281.1

## 5-4. 考察

著者らのグループでは、オキナワモズクフコイダン資化性細菌 *L. algae* H18 株は、フコイダン分解酵素を細胞内に生産し、複数の酵素反応によりフコイダンの分解が進行することを明らかにしている [46]。本章では、その中で、フコイダンの低分子化を触媒するフコイダナーゼを H18 株から精製し、*N* 末端アミノ酸配列を決定することができたことを述べた。

これまで、4 種類のフコイダン分解酵素が、*Fucobacter marina* SA-0082 [64]、*M. fucanivorans* SW5 [66]、*Formosa algae* KM3553 [47]、および *Sphingomonas paucimobilis* PF-1 [86] からほぼ均一になるまで精製されている。さらに加えて、KM3553 株由来の FFA2 が、ゲノム情報に基づいて組換え大腸菌を用いて調製されている [67]。ただ、FFA2 をコードする遺伝子 (WP\_057784219.1) は、それまでに報告されていたフコイダナーゼ遺伝子と比較することによって決定されており、野生株 KM3553 から調製された酵素についてはアミノ酸配列が決定されていないため、KM3553 株の両酵素が同一であるかどうかは明らかではない [47, 67]。またこれ以外にも、フコイダン分解酵素の部分精製酵素が、*Alteromonas* sp. SN-1009 から得られている [32]。本論文で扱っている H18 株を含むこれら細菌はいずれも海洋環境から分離されたものである。フコイダンは褐藻類に特徴的な多糖類であるため、フコイダンの低分子化酵素を海洋環境由来の微生物が有することは妥当であると考えられる。これらの中で、H18 株および KMM3553 株の酵素は細胞内酵素として微生物株の無細胞抽出物から精製されたのに対して、他の酵素は培養上清から調製された。おそらく前者の 2 株には、高分子化合物であるフコイダン細胞内に取り込むための特別なシステムがあるものと推察される。これらの酵素について、酵素化学的性質は研究されており、H18 株由来の酵素と他の酵素との間には、詳細はここでは述べないが、いくつかの類似点、相違点がある。例えば、H18 株由来のフコイダナーゼ (Fct114) の分子量は、今までに報告されているフコイダン分解酵素の分子量とほぼ同じ 100 kDa であり、SA-0082 由来の酵素 (67 kDa) よりも大きい。

一方、*M. fucanivorans* SW5 [66] と *F. algae* KMM3553 [67] 由来のフコイダナーゼ遺伝子 *fcaA* (AJ877239) および *ffa2* はクローニングされ、大腸菌内で発現されている。さらに、3つのフコイダナーゼ、Fda1 (AAO00508.1)、Fda2 (AAO00509.1)、および SVI\_0379 (BAJ00350.1) のアミノ酸配列が DDBJ データベースに公開されている。Fct114 も含め、これら 6 つのアミノ酸配列の N 末端領域のアライメントを取ったのが図 5-8 である。Fct114 以外、すべて序論でも触れた GH107 ファミリーに属しており、これら 5 つの配列には図 5-8 に示すようないくつかの保存されたモチーフが N 末端領域に観察される。しかしながら、Fct114 はそのようなモチーフを欠いている。また、Fct114 のアミノ酸配列は、他の 5 つのフコイダン分解酵素の配列と 25%未満の相同性しか示さなかった。BLAST 検索の結果、表 5-1 に示すように、最も相同性の高いタンパク質は hypothetical protein であり、アノテーションされているタンパク質の中で最も相同性が高いタンパク質は、*S. sanguinis* 由来で GH ファミリー 2 に属する glycoside hydrolase であった。以上のことより、本酵素は新しいタイプのグリコシドヒドロラーゼであると考えられた。

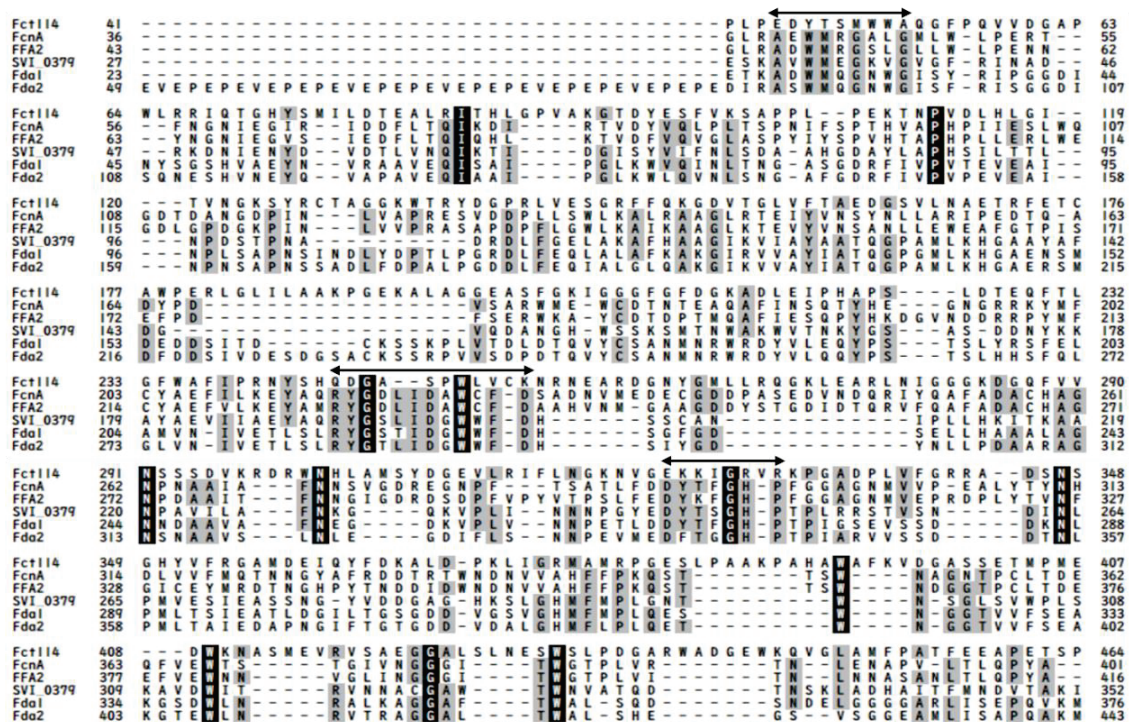


図 5-8. *L. algae* H18 (Fct114)、*M. fucanivorans* SW5 (FcnA)、*F. algae* KMM3553 (FFA2)、*Schewanella violacea* DSS12 (SVI\_0379)、および *Alteromonas* sp. SN-1009 (Fda1, Fda2)由来フコイダナーゼの N 末端領域のアミノ酸配列のアライメント  
矢印は、Fct114 を除いてフコイダナーゼの間で保存されているモチーフを示す。

なお、今回見出された ORF には、N 末端アミノ酸配列の解析結果によって得られた AEVSELMPLP という配列の上流に、MHPLRFPITFPKLPALGAALVLSLLAATAPLKA という配列が示された。この配列が SignalP 4.1 Server によりシグナル配列であるか調べたところ、図 5-9 に示すようにシグナル配列であることが示唆されている。

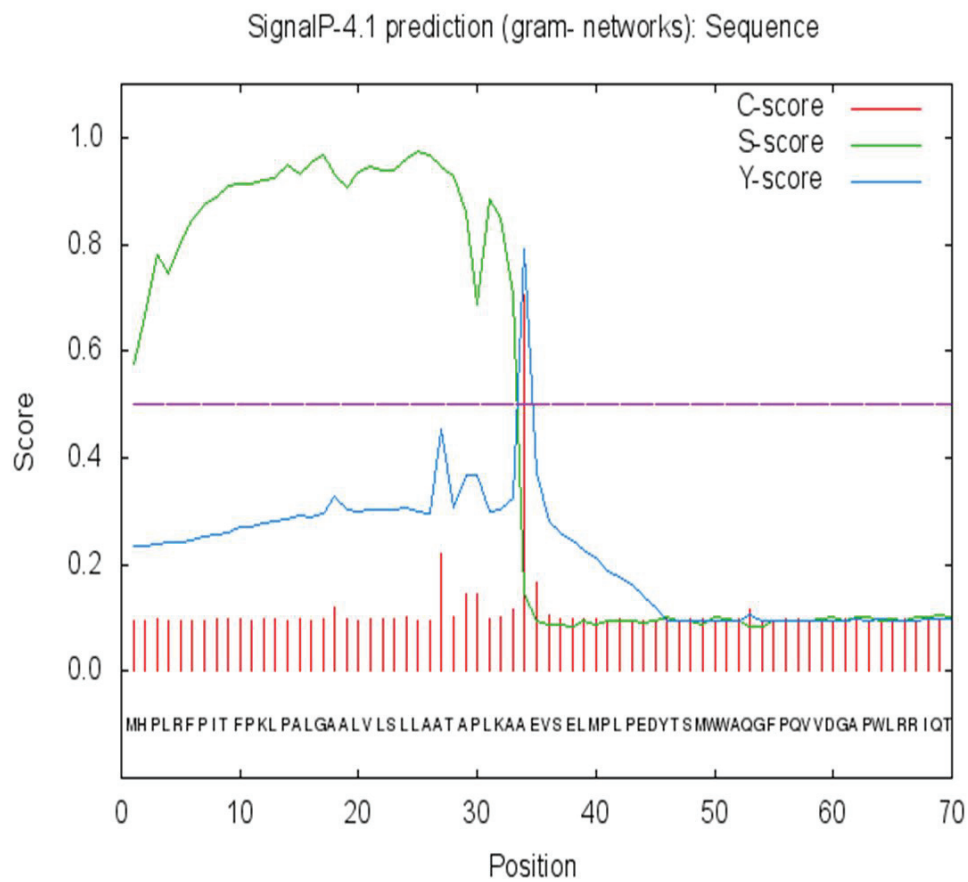


図 5-9. Fct114full のシグナル配列の検討結果

Cleavage site between pos. 33 and 34: LKA-AE D=0.831 D-cutoff=0.570 Networks=SignalP-noTM



## 第 6 章 フコイダナーゼ遺伝子同定および異種発現、酵素化学的性質

### 6-1. 緒言

第 5 章では、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を *L. algae* H18 の無細胞抽出液から種々のクロマトグラフィーにより精製し、酵素の *N* 末端アミノ酸配列を決定した。そしてすでに明らかにしていた H18 株のドラフトゲノム情報を基に、フコイダナーゼ遺伝子 (*fct114*) を特定し、本酵素のアミノ酸配列を決定した。さらに本酵素とすでにアミノ酸配列が報告されている *M. fucanivorans* SW5 由来の FcnA、*F. algae* KMM3553 由来の FFA2、*Schewanella violacea* DSS12 由来の SVI\_0379、および *Alteromonas* sp. SN-1009 由来の Fda1 と Fda2 の 6 つの *N* 末端領域のアミノ酸配列を比較したところ、Fct114 以外の 5 種の間に配列の相同性は見られたものの、Fct114 との相同性はいずれも認められなかった。

これまで表 1-4 にこれまでに報告されているフコイダン分解酵素の諸性質をまとめた。細菌由来の酵素の多くが  $\text{Zn}^{2+}$  や  $\text{Cu}^{2+}$  によって酵素活性が阻害されているほか、至適温度や至適 pH などが異なっている。そこで、本章では、第 5 章で明らかになった、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 *fct114* 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実施し、既知のフコイダナーゼとの比較検討を行った。

## 6-2. 材料および実験方法

### 6-2-1. DNA 実験、組換え大腸菌による酵素タンパク質の生産検討

DNA を扱う実験方法、すなわち、コンピテントセルの調製、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方法は、3 章に記載した方法と同じである。

### 6-2-2. プライマーの設計

フコイダナーゼ遺伝子、*fct114* を PCR 増幅するために、Forward プライマーを ATTATGCTCAT**ATG**GCGGAGGTTTCCGAGCTG (*Nde* I 制限酵素認識配列は**太字**で示され、下線部が ATG 開始コドンを示す)、Reverse プライマーを GTGAGGTAGA**ATTC**GGGTTTTGGCTGAAGGTTG (*Eco* RI 制限酵素認識配列を**太字**で示している) と設計した。外注し、送られてきたプライマーに滅菌水を添加して 100  $\mu$ M の溶液を調製し、それを滅菌水で希釈した 1  $\mu$ M のものを PCR 実験に用いた。

### 6-2-3. PCR 増幅

PCR 増幅の際の変性反応、伸長反応の温度および反応時間については、94°C で 2 分間加熱し、次に 30 サイクル (98 °C で 10 秒間、68 °C で 3 分間) で行った。アガロースゲル電気泳動と切り出しを行い、QIAGEN Gel Extraction Kit を用いて付属のプロトコールに従って精製した。発現ベクターは pET-21a、pCold I、pCold TF を用い、*Eco* RI、*Nde* I で消化し、PCR 産物とライゲーションした。



#### 6-2-4. Ni Sepharose 6 Fast Flow と Resource Q による酵素精製

結合 Buffer として、50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole を用いた。この結合 Buffer で一晚透析した、9 L の培養液から得られた *E.coli* BL21(DE3)/pCold I/*fct114* 由来の C.F.E. (タンパク質量 901 mg) を、結合 Buffer で平衡化した Ni Sepharose 6 FF カラム (樹脂量 25 mL, 16.0×1.8 cm) にアプライした。流速は 0.5 mL/min、分画サイズを 5 mL に設定した。結合 Buffer で洗浄後、溶出 Buffer として 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0), 500 mM NaCl, 50 mM Imidazole で溶出を行った。280 nm の吸収を有する画分について SDS-PAGE を行い、目的酵素タンパク質を含む画分を集め、Vivaspin Turbo 15 を用いて結合 Buffer により、脱塩処理と濃縮処理を同時に行った。その後、20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 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 0.2 mL/min、分画サイズを 2 mL に設定した。20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で洗浄後、グラジエント濃度は 0 M から 0.175 M NaCl に設定し、ÄKTA システムを用いて溶出を行った。

#### 6-2-5. Somogyi-Nelson 法による Fct114 の酵素化学的諸性質の検討

3-2-19 の方法に従って、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 [87] を用いて、Fct114 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。Somogyi-Nelson 法では、銅試薬 (表 6-2, 表 6-3) と Nelson 試薬 (表 6-4) 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 (表 6-4) 100  $\mu$ L を混ぜ加え、30 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 L-フコースを用いて作成した (図 6-1)。

表 6-2. 銅試薬 (a) 試薬組成

15% 硫酸銅(II)五水和物	15	g
Total	100	mL

表 6-3. 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 6-4. Nelson 試薬組成

七モリブデン酸六アンモニウム四水和物	12.5	g
ひ素水素二ナトリウム七水和物	12.5	g
濃硫酸	10	g
Total	500	mL

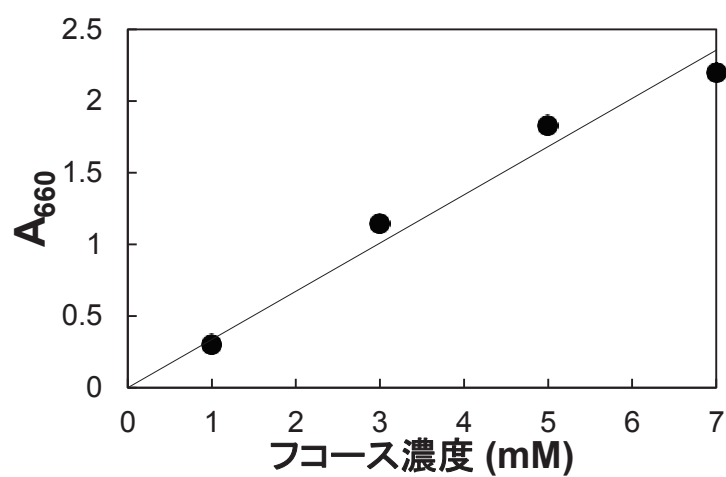


図 6-1. Somogyi-Nelson 法における L-フコースの検量線

#### 6-2-6. 至適温度の検討

6-2-4 で得た精製酵素を 11.7 µg/ml になるように加え、脱アセチル化フコイダン 2%、100 mM リン酸 buffer (pH 7.4) を含む反応液 200 µl の条件で 10~70 °C、10 min 反応後、85°C、5 min 処理し、6-2-5 の方法で生成した還元末端を定量し Fct114 の至適温度を検討した。

#### 6-2-7. 熱安定性の検討

6-2-4 で得た精製酵素 (11.7 µg/ml) を 25~60 °C で 30 min プレインキュベートした後、脱アセチル化フコイダン 2%、100 mM リン酸 buffer (pH 7.4) を含む反応液 200 µl の条件で 30 °C、10 min 反応後、85 °C、5 min 処理し、6-2-5 の方法で生成した還元末端を定量し Fct114 の熱安定性を検討した。

#### 6-2-8. 至適 pH の検討

6-2-4 で得た精製酵素を 11.7 µg/ml になるように加え、脱アセチル化フコイダン 2%、100 mM buffer を含む反応液 200 µl の条件で 30 °C、10 min 反応後、85°C、5 min 処理し、6-2-5 の方法で生成した還元末端を定量し Fct114 の至適 pH を検討した。なお、pH 5.0 ~ 7.3 ではリン酸カリウム buffer、pH 7.7, pH 8.2 ではホウ酸 buffer、pH 9.9 では NaHCO<sub>3</sub>/NaOH buffer、そして、pH 10.5 では Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaOH buffer を用いて反応を行った。

#### 6-2-9. pH 安定性の検討

6-2-4 で得た精製酵素 (11.7 µg/ml) を pH 4.5 ~ pH 10.0 の範囲で 30 min プレインキュベートした後、脱アセチル化フコイダン 2%、100 mM リン酸 buffer (pH 7.4) を含む反応液 200 µl の条件で 30 °C、10 min 反応後、85 °C、5 min 処理し、6-2-5 の方法で生成した還元末端を定量し Fct114 の pH 安定性を検討した。

#### 6-2-10. 金属イオンの活性への影響

6-2-4 で得た精製酵素を 11.7  $\mu\text{g/ml}$  になるように加え、脱アセチル化フコイダン 2%、100 mM リン酸 buffer (pH 7.4)、各金属イオンを 1 mM を含む反応液 200  $\mu\text{l}$  を 30  $^{\circ}\text{C}$  で 10 min インキュベート後、85  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 熱処理し、6-2-5 の方法で生成した還元末端を定量した。用いた化合物は、NaCl、KCl、AgNO<sub>3</sub>、MgCl<sub>2</sub>、BaCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、AlCl<sub>3</sub>、FeCl<sub>2</sub>、CuCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>2</sub>、ZnCl<sub>2</sub>、CoCl<sub>2</sub>、NiCl<sub>2</sub> である。

#### 6-2-11. 酵素阻害剤が活性に及ぼす影響検討

6-2-4 で得た精製酵素を 23.4  $\mu\text{g/ml}$  になるように加え、脱アセチル化フコイダン 2%、100 mM リン酸 buffer (pH 7.4)、各酵素阻害剤を 1 mM を含む反応液 200  $\mu\text{l}$  を 30  $^{\circ}\text{C}$  で 10 min インキュベート後、85  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 熱処理し、6-2-5 の方法で生成した還元末端を定量した。用いた化合物は、EDTA、*p*-Chloromercuribenzoate (PCMB)、8-Quinolinol、*N*-Ethylmaleimide、*N*-Bromosuccinimide、2,2'-Bipyridine、1,10-Phenanthroline monohydrate、Diethyldithiocarbamic acid sodium salt trihydrate、5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) である。

#### 6-2-12. 基質特異性の検討

6-2-4 で得た精製酵素を 177  $\mu\text{g/ml}$  になるように加え、100 mM リン酸 buffer (pH 7.4)、各フコイダンあるいは海洋由来多糖 2% を含む反応液 200  $\mu\text{l}$  を 30  $^{\circ}\text{C}$  で 10 min インキュベート後、85  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 熱処理し、6-2-5 の方法で生成した還元末端を定量した。用いた化合物は、フコイダンに関しては、脱アセチル化オキナワモズク (*C. okamuranus*) フコイダン、オキナワモズク (*C. okamuranus*) フコイダン、アカモク (*Sargassum horneri*) フコイダン、ヒバマタ (*Fucus vesiculosus*) フコイダン、ワカメ (*Undaria pinnatifida*) フコイダン、オオウキモ (*Macrocystis pyrifera*) フコイダン、コンブ (*Kjellmaniella crassifolia*) フコイダン、ナマコ

(*Holothuroidea* sp.) フコイダンである。海洋由来多糖に関しては、アルギン酸、ラミナリン、カラギーナン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸である。

#### 6-2-13. オキナワモズクフコイダン分解プロセスへのアセチル基の関与

6-2-4 で得た精製酵素を 117  $\mu\text{g/ml}$  になるように加え、100 mM リン酸 buffer (pH 7.4)、脱アセチル化フコイダンあるいはフコイダン 2% を含む反応液 200  $\mu\text{l}$  を 30  $^{\circ}\text{C}$  で 10 min インキュベート後、85  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min 熱処理し、HPLC 分析を行った。

## 6-3. 結果

### 6-3-1. *fct114* の pET-21a、pCold I、pCold TF ベクターへのクローニング

6-2-2 および 6-2-3 の方法で PCR を行った結果、*fct114* の塩基長である 3.0 kbp 付近にバンドが確認できた。得られた *fct114* と pET-21a、pCold I、pCold TF を *Nde* I と *Eco*RI で消化し、pET-21a に相当する 5443 bp のバンド、pCold I に相当する 4407 bp のバンド、pCold TF に相当する 5769 bp のバンドおよび *fct114* に相当する 3078 bp のバンドについてそれぞれ切り出しを行い、Gel Extraction Kit を用いて抽出し、25  $\mu$ L の付属の buffer で溶出させた。

*fct114* と pET-21a、pCold I あるいは pCold TF とのライゲーションを行い、*E.coli* DH5 $\alpha$  コンピテントセルへの導入を行った。37°Cで一晩静置培養したところ、コロニーを確認できた。生じたコロニー数個ずつからプラスミド単離を行い、C 末端側を *Eco*RI、N 末端側を *Nde*I で消化した後アガロース電気泳動をした結果を 図 6-2 に示す。pET-21a と *fct114* をライゲーションした組換えプラスミドは、*fct114* と考えられる 3078 bp と pET-21a と考えられる 5443 bp 付近にシングルバンドが見られるはずで、図 6-2 のレーン 1 に相当するパターンが認められた。そして、pCold I と *fct114* をライゲーションした組換えプラスミドは、*fct114* と考えられる 3078 bp と pCold I と考えられる 4407 bp 付近にシングルバンドが見られるはずで、図 6-2 のレーン 2 に相当するパターンが認められた。一方、pCold TF と *fct114* をライゲーションした組換えプラスミドは、*fct114* と考えられる 3078 bp と pCold TF と考えられる 5769 bp 付近にシングルバンドが見られるはずだったが、図 6-2 のレーン 3 に示す通り、相当するパターンが認めらなかった。pCold TF 以外の pET-21a および pCold I に目的 DNA 断片が含まれていると判断し、これらプラスミドを用いて *E.coli* BL21(DE3) を形質転換した。

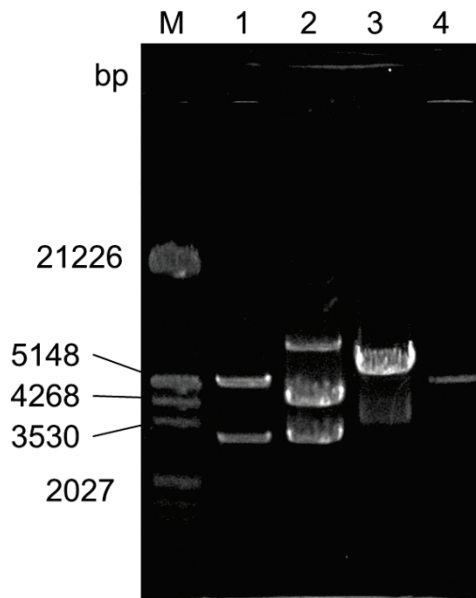


図 6-2. 制限酵素消化により組換えプラスミドを確認したアガロース電気泳動結果  
M. Markers, 1. pET-21a/*fct114*, 2. pCold I/*fct114*, 3. pCold TF/*fct114*, 4. pET-21a.

### 6-3-2. *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*fct114* と *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*fct114* による目的タンパク質生産検討

*E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*fct114* と *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*fct114* による目的遺伝子の発現検討を行った。SDS-PAGE によるタンパク質の生産検討結果を図 6-3 に示す。目的タンパク質である Fct114 の分子量は、108 kDa であり、その付近の分子量のバンドを見るとベクターのみを形質転換した大腸菌 (レーン 5, 6) には無いバンドが存在したため (レーン 1, 3)、Fct114 が生産されていることが SDS-PAGE の結果より示唆された。また、*E. coli* BL21 (DE3)/pET-21a/*fct114* の C.F.E. より *E. coli* BL21 (DE3)/pCold I/*fct114* の C.F.E. のほうが目的タンパク質遺伝子を多く発現していることが明らかであったため、Fct114 を大量に得るため *E. coli* BL21 (DE3)/pCold I/*fct114* を大量培養することとした。

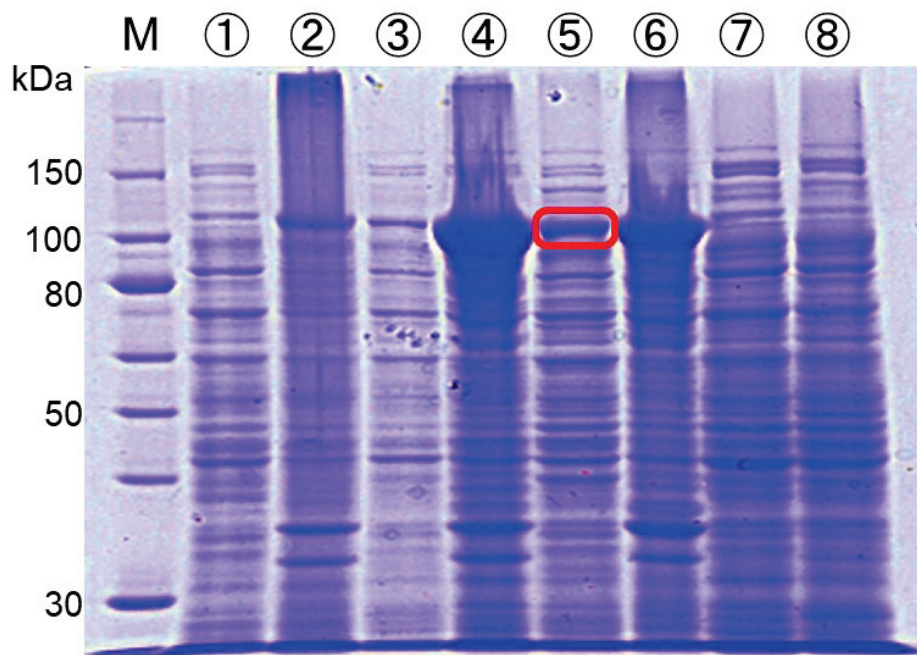


図 6-3. *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*fct114* および *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*fct114* 由来 C.F.E の SDS-PAGE 結果

M. Markers,

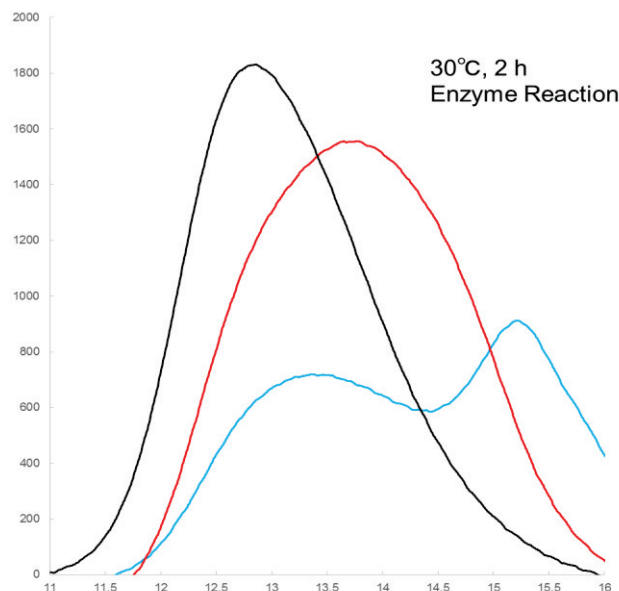
1. *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*fct114* cell-free extracts,
2. *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*fct114* insoluble fraction,
3. *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*fct114* cell-free extracts,
4. *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*fct114* insoluble fraction,
5. *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*fct114* cell-free extracts,
6. *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*fct114* insoluble fraction,
7. *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a cell-free extracts,
8. *E. coli* BL21(DE3)/pCold I cell-free extracts

### 6-3-3. *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*fct114* と *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*fct114* 由来 C.F.E.中のフコイダナーゼ活性

*E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*fct114* と *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*fct114* より調製した C.F.E.のフコイダナーゼ活性の有無を検討した。脱アセチル化フコイダンを基質とし、HPLC を用いて 5-2-2 に示す操作と同様の方法で行った。その結果を図 6-4 に示す。*E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*fct114* より調製した C.F.E.においてフコイダナーゼ活性を確認すること



が出来た。一方で、*E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*fct114* より調製した C.F.E.ではフコイダナーゼ活性が見られなかった。



Black : Negative control

Red : *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*fct114* cell-free extracts  
(Including substrate)

Blue : *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*fct114* cell-free extracts  
(Including substrate)

図 6-4. *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a/*fct114* と *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*fct114* 由来 C.F.E を用いた酵素反応後の HPLC のチャート結果

#### 6-3-4. Ni Sepharose 6 FF カラムによる酵素精製

*E. coli* BL21(DE3)/pCold I/*fct114* を 9 L 培養して得られた C.F.E. (900.9 mg-protein) を 6-2-4 の方法に従い、目的酵素の精製を行った。各 Imidazole 濃度の buffer で溶出した画分を回収し、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に対して透析後、酵素活性測定を実施した結果、100 mM Imidazole を含む buffer で溶出した画分 (Fraction No. 1~40) においてフコイダナーゼ活性を有するタンパク質 (100 kDa 付近) を検出することができ、これらを回収した。



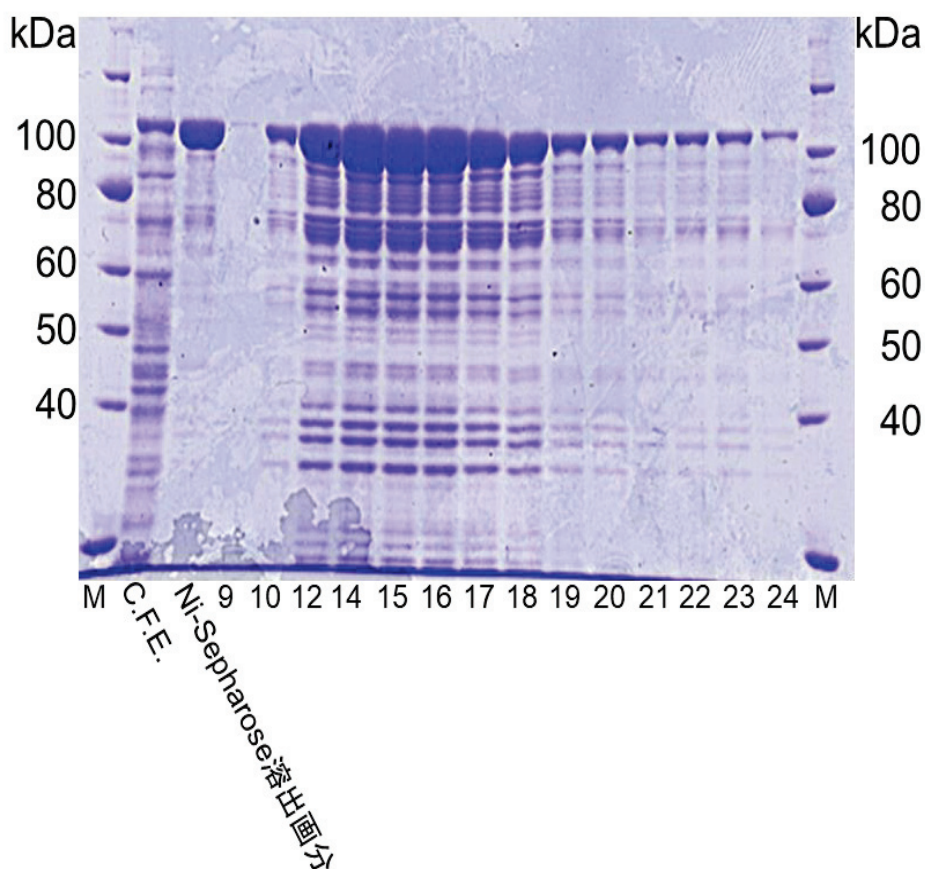


図 6-6. Resource Q で溶出された各フラクションの SDS-PAGE 結果

図 6-6 で見られるように Resource Q カラムを通すことにより、Ni-Sepharose で精製したときよりもバンドが汚くなるという現象が見られた。この際、どのフラクションも同じようなバンドパターンを示し 100 kDa 付近のバンドの濃度に依存しているかのように他のバンドの濃度も薄くなっていることから、これは、Fct114 が SDS-PAGE 前の熱処理によって熱分解されているのではないかと考え、熱処理時間を変更して再度 SDS-PAGE を行った (図 6-7)。この結果、Fct114 は熱処理によって分解されていることがわかった。そこで、熱処理時間を 15 sec にし、Resource Q 後の Fraction No. 10~22 を回収して、SDS-PAGE を行ったところ、ほぼ単一に精製されている (図 6-8) ことがわかったため、この酵素溶液を用いて今後の実験を行うことにした。このサンプルのタンパク質濃度は 1.77 mg/mL であった。

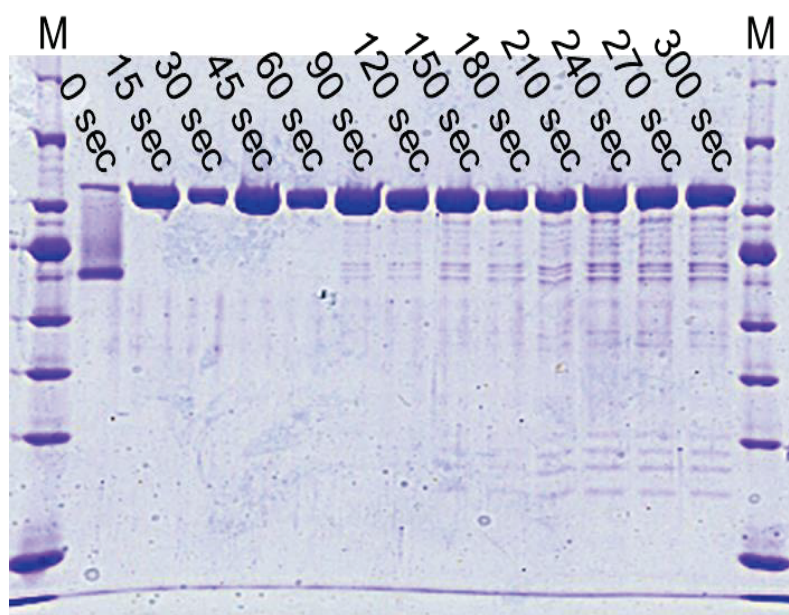


図 6-7. 熱処理時間を変更した Fraction No. 15 の溶出画分の SDS-PAGE 結果

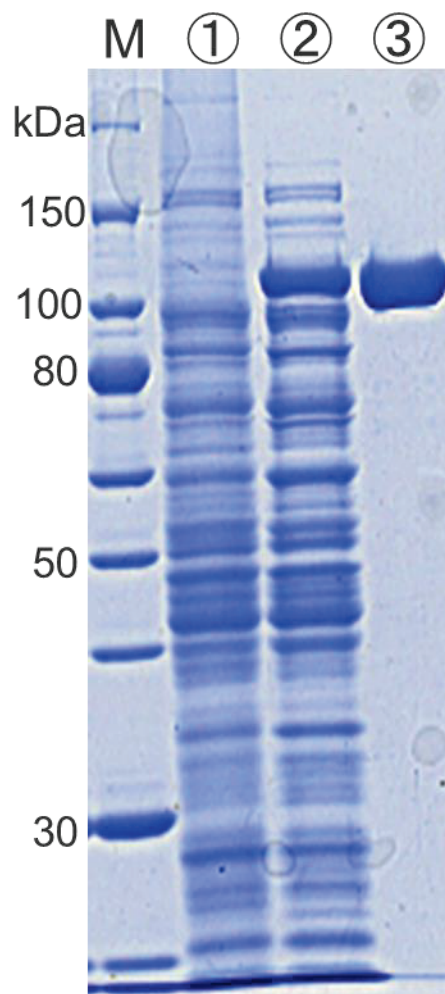


図 6-8. *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/fct114 の C.F.E.から精製したフコイダナーゼの SDS-PAGE 結果

1. C. F. E. of *E. coli* BL21(DE3)/pCold I (23.5  $\mu$ g),
2. C. F. E. of *E. coli* BL21(DE3)/pCold I/fct114 (5.0  $\mu$ g),
3. Pooled fractions after Resource Q chromatography (1.8  $\mu$ g).

#### 6-3-6. 至適温度、至適 pH の検討

検討の結果、フコイダナーゼ Fct114 の至適温度は 40℃ (図 6-9)、至適 pH 7.3 (図 6-10) であると考えられた。なお、活性は 6-2-5 の方法により評価した。

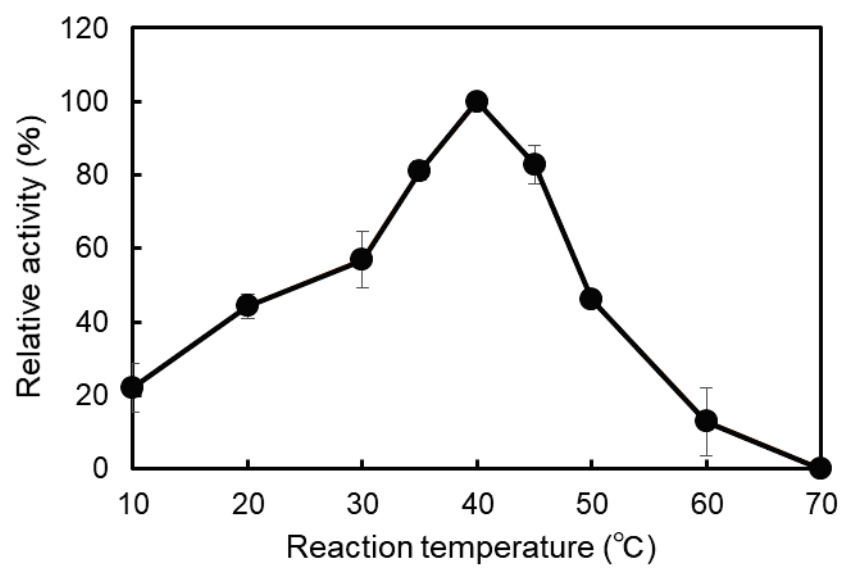


図 6-9. フコイダナーゼ Fct114 の至適温度検討結果

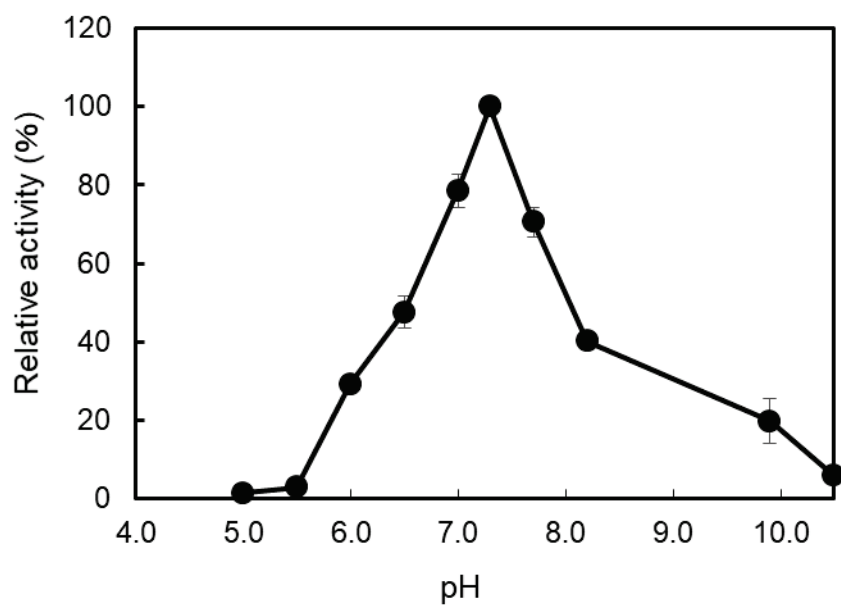


図 6-10. フコイダナーゼ Fct114 の至適 pH 検討結果

### 6-3-7. 熱安定性の検討

フコイダナーゼ Fct114 の熱安定性について検討した。活性は 6-2-5 の方法により評価した。未処理の酵素溶液の活性を 100%とすると、40 °Cまでは約 80%の残存活性を保持するものの、40 °C以上で顕著に活性が低下した (図 6-11)。

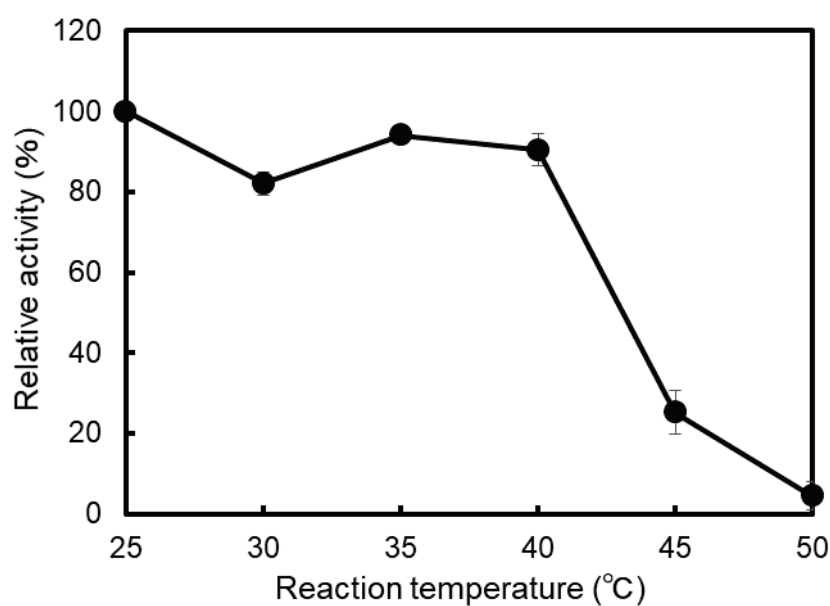


図 6-11. フコイダナーゼ Fct114 の熱安定性検討結果

### 6-3-8. pH 安定性の検討

フコイダナーゼ Fct114 の pH 安定性について検討した。活性は 6-2-5 の方法により評価した。pH 7.0 の酵素溶液の活性を 100%とすると、Fct114 は pH 6.0~8.5 の間で安定であることが示唆された (図 6-12)。

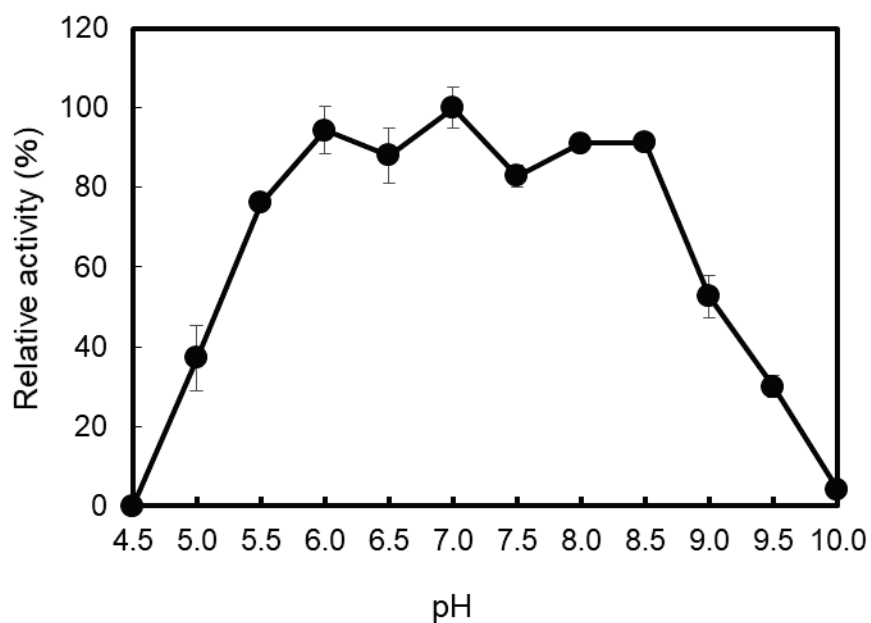


図 6-12. フコイダナーゼ Fct114 の pH 安定性検討結果

#### 6-3-9. 金属イオン、酵素阻害剤の活性への影響検討

各種金属イオン、および酵素阻害剤のフコイダナーゼ活性に及ぼす影響を検討した。なお、活性は 6-2-5 の方法により評価した。その結果、 $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  で酵素活性が上昇した。このことから、本酵素は金属酵素であることがわかった (図 6-13)。一方、阻害剤に関しては SH 阻害剤による活性の阻害が見られた (図 6-14)。



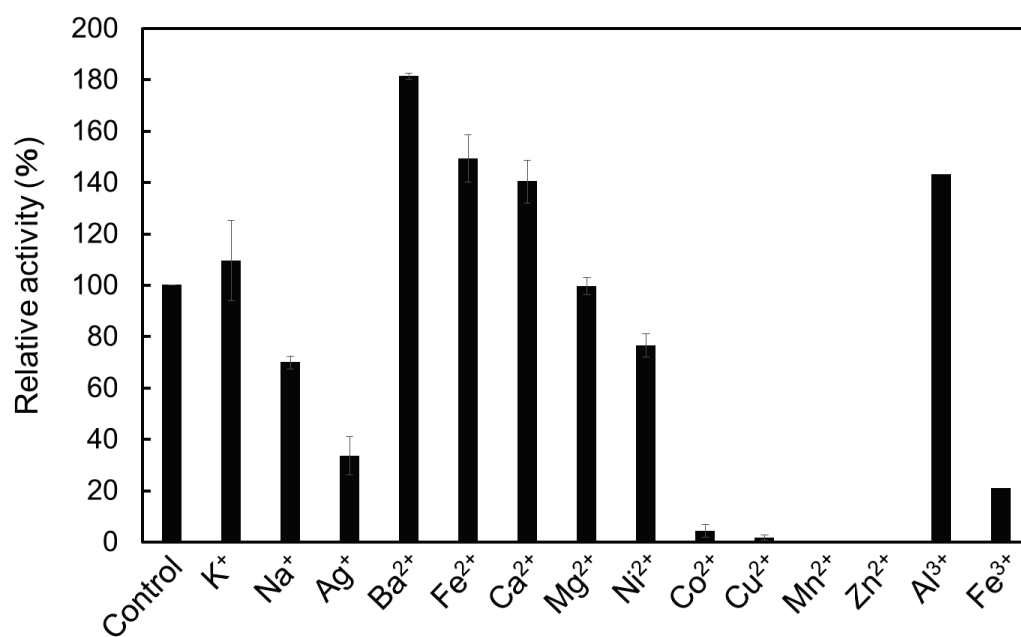


図 6-13. フコイダーゼ活性に及ぼす金属イオンの影響

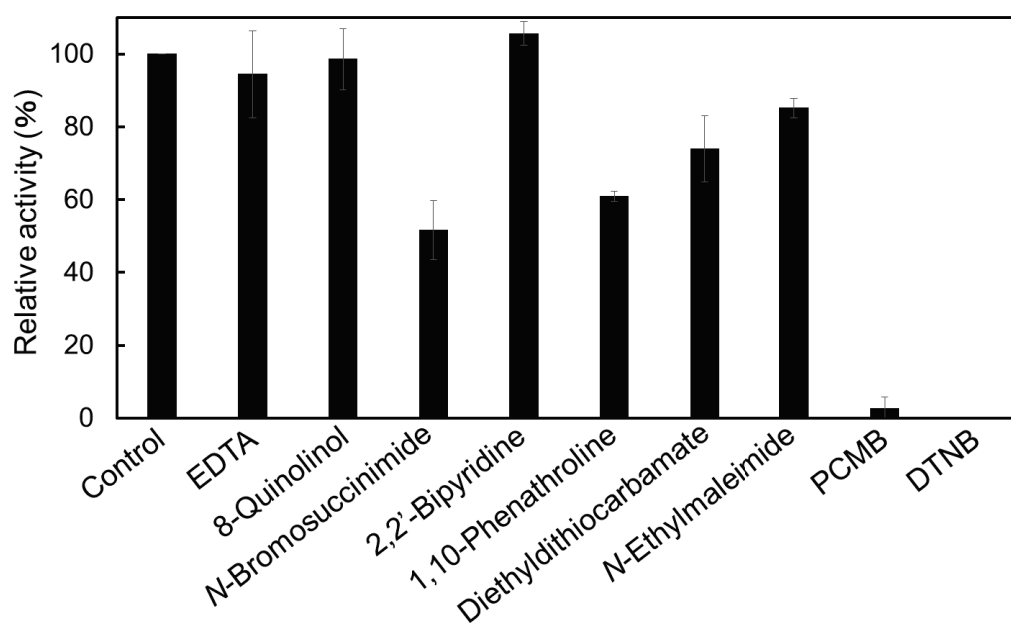


図 6-14. フコイダンデアセチラーゼ活性に及ぼす酵素阻害剤の影響

### 6-3-10. 基質特異性の検討

検討の結果、フコイダナーゼ Fct114 は、オキナワモズク由来の脱アセチル化フコイダンに対して最も高い活性を示したが、オキナワモズクフコイダンに対しても 50%の活性を示した。対照的に本酵素は他の海藻種由来のフコイダンに対しては活性を示さず、今回試した海洋性多糖であるアルギン酸、ラミナラン、カラギーナン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸に対しても活性を示さなかった (図 6-15)。

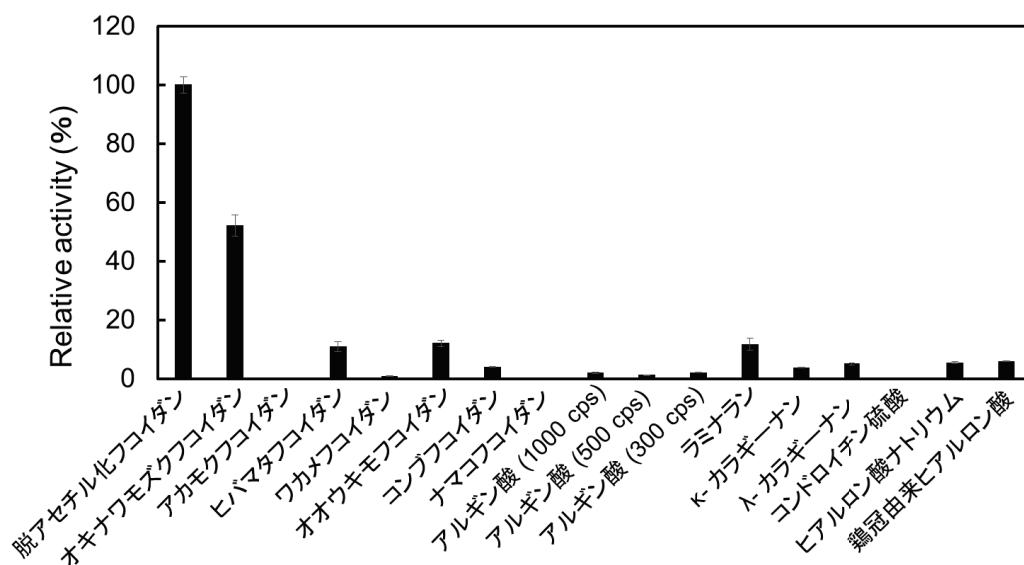


図 6-15. 他の基質に対するフコイダナーゼ Fct114 の活性検討結果

### 6-3-11. オキナワモズクフコイダン分解プロセスへのアセチル基の関与

6-2-13 の方法で 10 分間酵素反応を行った反応液を用いて、HPLC 分析を行った結果、脱アセチル化しているオキナワモズクフコイダンの方が、脱アセチル化していないものに比べ、低分子化を促進していることがわかった (図 6-16, 6-17)。そして、脱アセチル化していないフコイダンを用いた酵素反応を 3 日間行っても、図 6-16 のパターンは図 6-17 のパターンに変わることはなかった。

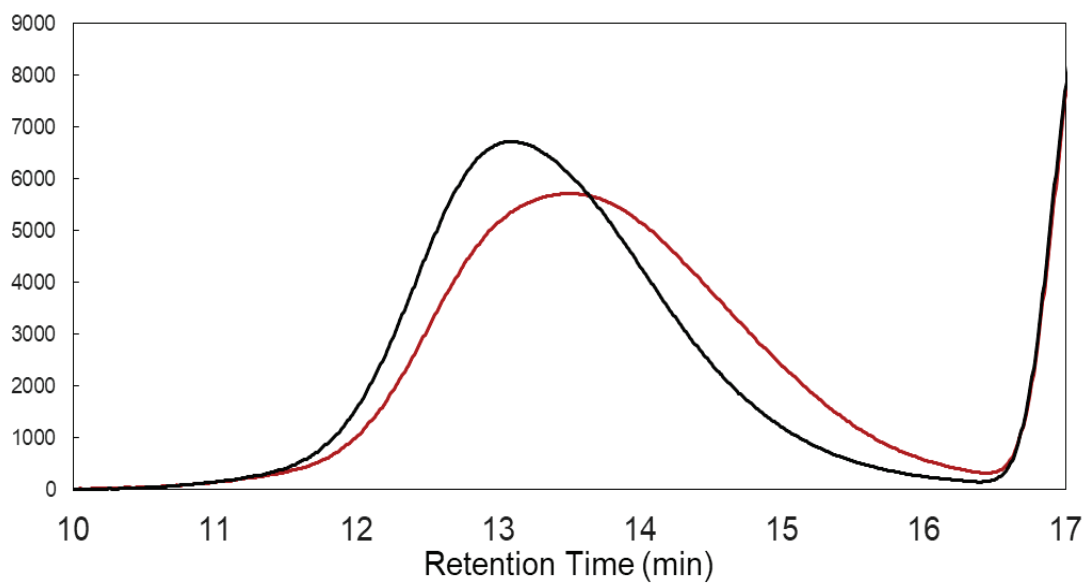


図 6-16. 脱アセチル化していないオキナワモズクフコイダンを経質とした際の HPLC のパターン (黒線：酵素無添加、赤線：酵素添加)

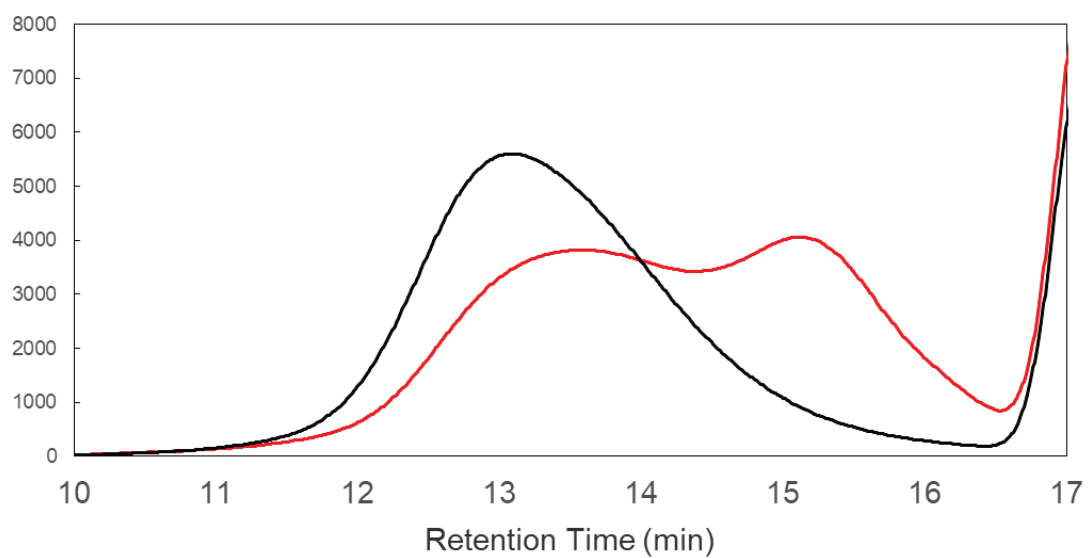


図 6-17. 脱アセチル化したオキナワモズクフコイダンを経質とした際の HPLC のパターン (黒線：酵素無添加、赤線：酵素添加)

## 6-4. 考察

本章では、第 5 章で得られた塩基配列を基に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おこなった。今までにフコイダンの微生物酵素による分解についてはいくつかの研究が行われているが、デアセチラーゼによって脱アセチル化された後、低分子化酵素によって低分子化が促進されるといった分解プロセスについては、調べた限りにおいて、報告例はない。

糖加水分解酵素の活性の多くは、基質の加水分解によって生産される還元末端濃度を比色測定することによって推定される。したがって本研究においても同様に Somogyi-Nelson 法 [87] を用いて Fct114 の酵素活性を決定した。しかしながら、このような還元末端濃度を利用した活性測定方法は、*Fucobacter marina* SA-0082 由来フコイダン分解酵素 [64]、*M. fucanivorans* SW5 由来 Fcn A [66]、*Formosa algae* KM3553 由来 FFA2 [47, 67]、といったフコイダン分解酵素には適用できなかった。従って、これらの酵素活性は、分光光度計による方法 [64] や電気泳動法 [47, 66, 67] により評価されている。このように酵素活性を定量するために異なる手順や手法を用いるのは、基質として使用されるフコイダンの化学構造が分離元となる海藻によって異なることに起因していると推察される。

Fct114 は、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、および  $\text{Ca}^{2+}$  などの二価カチオンによって酵素活性が増強されたが、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、および  $\text{Zn}^{2+}$  は抑制効果を示した。*F. algae* KMM3553 と *Alteromonas* sp. 由来フコイダナーゼは、活性を有するためには金属イオンを必要とすることが明らかになっている [32, 47, 67]。これらの結果は、金属イオンが基質結合または触媒活性に影響を与える可能性があることを示唆していると考えられる。

Fct114 は、脱アセチル化されたオキナワモズクフコイダンのみならず、天然のオキナワモズクフコイダンも加水分解できることが明らかになった。序論でも述べたように著者らのグループでは、H18 株によりオキナワモズク由来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たが、今回精製酵素を用いた検討の結果、*F. algae* KMM3553 [47] 由来の酵素と同様に天然のフコイダンもゆっくりと分解することができることが確認できた。しかし、図 6-16, 6-17 が示すように、恐らくはアセチル基による立体障害のため、Fct114 はアセチル基が付加した構造に対して作用できないことが推察された。

オキナワモズク (*C. okamuranus*)、アカモク (*Sargassum horneri*)、ヒバマタ (*Fucus vesiculosus*)、ワカメ (*Undaria pinnatifida*)、オオウキモ (*Macrocystis pyrifera*)、コンブ (*Kjellmaniella crassifolia*)、ナマコ (*Holothuroidea* sp.) 由来の7種のフコイダンに対する Fct114 の活性を調べたところ、オキナワモズクフコイダンにのみ特異的に活性を示した。少なくともオキナワモズクフコイダンの構造は、他の海藻由来フコイダンとは異なっていると考えられている。同様に *F. algae* KMM3553 と *Alteromonas* sp. SN-1009 から精製された酵素は、それぞれの菌株が単離された海藻のフコイダンに対してのみ活性を示した。従って、これらの基質特異性は、各酵素が、フコイダン資化性微生物が付着していた環境に応じて、特定のフコイダン構造を特異的に分解するように進化したのではないかと考えられる。

## 第 7 章 総括

本研究では第 2 章で *Luteolibacter algae* H18 からのフコイダンデアセチラーゼの精製、第 3 章でフコイダンデアセチラーゼの遺伝子同定および異種発現、酵素化学的性質の評価し、第 4 章でデアセチラーゼの触媒残基の予測、さらに第 5 章で *Luteolibacter algae* H18 からのフコイダナーゼの精製、第 6 章でフコイダナーゼの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。本章では、以上を踏まえて、*Luteolibacter algae* H18 由来のデアセチラーゼ Fud およびフコイダナーゼ Fct114 について述べ、さらに *Luteolibacter algae* H18 のオキナワモズクフコイダンについての分解プロセスについて述べる。

第 2 章から第 4 章の結果より、*Luteolibacter algae* H18 由来のデアセチラーゼ Fud は以下に示す性質を有することが明らかとなった。アミノ酸配列から計算されるタンパク質の分子量は 69,789 Da であり、これは SDS-PAGE からの分子量とほぼ一致していた。そしてそのアミノ酸配列をコードする ORF を基にオキナワモズクフコイダンの脱アセチル化を触媒するデアセチラーゼ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、酵素化学的性質の特徴決定を行った。その結果、Fud は、至適温度は 40 °C、至適 pH 8.0 であり、熱安定性については、35 °C 以上で顕著に活性が低下したため、熱に対する安定性は高いことが示唆された。金属イオンの活性に対する影響は、 $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  に対して活性阻害が見られ、阻害剤については、SH 阻害剤による活性が見られた。一方で、SWISS-MODEL による予測構造モデルにおいて触媒残基としては、Asp299, His329, Ser238 が想定された。Fud の C 末端領域約 300 アミノ酸残基は、立体構造のテンプレートとした TM0077 には存在しないため、この C 末端領域を削除し活性検討を行ったところ、触媒残基を含まないにも関わらず、酵素活性に影響を及ぼした。基質のアセチル基を取り込む際に C 末端領域が必要であると考えられた。

第 5 章と第 6 章の結果より、*Luteolibacter algae* H18 由来のフコイダナーゼ Fct114 は以下

に示す性質を有することが明らかとなった。アミノ酸配列から計算されるタンパク質の分子量は 112 kDa であり、これは SDS-PAGE からの分子量とほぼ一致していた。なお、今回見出された ORF には、N 末端アミノ酸配列の解析結果によって得られた AEVSELMPLP という配列の上流に、MHPLRFPITFPKLPALGAALVLSLLAATAPLKA という配列が示された。この配列が SignalP 4.1 Server によりシグナル配列であるか調べたところ、シグナル配列であることが示唆された。そしてそのアミノ酸配列をコードする ORF を基にオキナワモズク由来の脱アセチル化フコイダンの低分子化を触媒するフコイダナーゼ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、酵素化学的性質の特徴決定を行った。その結果、Fct114 は、至適温度は 40 °C、至適 pH 7.3 であり、熱安定性については、40 °C 以上で顕著に活性が低下した。pH 安定性は、pH 7.0 の活性を 100% とすると、pH 6.0~8.5 の間で安定であることが示唆された。金属イオンの活性に対する影響は、 $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  で酵素活性が上昇し、特に二価のカチオンにより活性が増強されたが、 $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  および  $\text{Zn}^{2+}$  を添加した場合は活性が抑制された。このことから、本酵素は金属酵素であることがわかった。一方、阻害剤に関しては、SH 阻害剤による活性が見られた。また、基質特異性の検討を行った結果、Fct114 は他の海藻由来のフコイダンや海洋性多糖類であるアルギン酸、ラミナラン、カラギーナン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸に対して活性を示さず、オキナワモズクモズクフコイダンに対して特異的に低分子化することが示唆された。さらにオキナワモズク由来の脱アセチル化フコイダンとオキナワモズクフコイダンの両方に活性を示したが、脱アセチル化したフコイダンの方が、より低分子化を促進することがわかった。

以上のように、本研究ではフコイダンデアセチラーゼ、フコイダナーゼの酵素特性を明らかにした。これら 2 つの酵素を用いることで、オキナワモズクフコイダン、オキナワモズク由来の脱アセチル化フコイダン、オキナワモズク由来の脱アセチル・低分子化フコイダン、オキナワモズク由来低分子化フコイダンを調製することが可能となった。特に酵素的に脱アセチル化フコイダンを調製する方法は、現在までに報告例がない。これら 4 種類の構造の

フコイダンを調製できるようになったことで、今までに報告例のあるインフルエンザウィルス等に対する抗ウイルス作用 [9]、抗ガン作用 [10, 11]、抗凝血作用 [12, 13, 14]といったフコイダンの生理活性と構造との相関性の解明へと繋がると考えられる。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、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. 西出英一、海藻工業、堀輝三・大野正夫・堀口健雄編「21世紀初頭の藻学の現況」、日本藻類学会、山形、2002、123-125.
2. Li, B., Lu, F., Wei, X., & Zhao, R., *Fucoidan: Structure and bioactivity*. *Molecules*, 2008, **13**: 1671–1695.
3. Cumashi, A., Ushakova, N. A., Preobrazhenskaya, M. E., D'incecco, A., Piccoli, A., Totani, L., Nicola, N., Morozovich, G. E., Berman, A. E., Bilan, M. I., Usov, A. I., Ustyuzhanina, N. E., Grachev, A. A., Sanderson, C. J., Kelly M., Rabinovich, G. A., Iacobelli, S., & Nifantiev, N. E., *A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds*. *Glycobiology*, 2007, **17**: 541–552.
4. 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.
5. Kylin, H., *Analysis of the biochemistry of the seaweed*. *H. Z. Physiol. Chem.*, 1913, **83**: 171-197.
6. 加藤郁之進、酒井武、佐川裕章、*海藻の抗がん作用*. 有用海藻誌、大野正夫編著、内田老鶴圃、2004、477-490.
7. 加藤郁之進、佐川裕章、*海草食物繊維による癌リスク軽減*. 藻類、2000、**48**: 13-19.
8. Yu, F., Kitano, H., Sakai, T., Katayama, K., Nakanishi, Y., Ikai, K., & Kato, I., *Apoptosis of human carcinoma cell lines induced by fucoidan (sulfated fucose-containing polysaccharide) and its degraded fragments by fucoidanase and endo-fucoidan-lyase*. *Abstracts of XVIIIth Jap. Carbohydr. Sympo.*, 1996, 93-94.
9. Jung-Bum, L., Hayashi, K., Hashimoto, K., Nakano, M., & Hayashi, T., *Novel antiviral fucoidan from Sporophyll of Undaria pinnatifida (Mekabu)*. *Chem. Pharm. Bull.*, 2004, **52**: 1091-1094.

10. Ermakova, S., Sokolova, R., Kim, S-M., Um, B-H., Isakov, V., & Zvyagintseva, T., *Fucoidans from brown seaweeds Sargassum hornery, Eclonia cava, Costaria costata: Structural characteristics and anticancer activity*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, **164**: 841-850.
11. Vishchuk, O. S., Ermakova, S. P., & Zvyagintseva, T. N., *Sulfated polysaccharides from brown seaweeds Saccharina japonica and Undaria pinnatifida: Isolation, structural characteristics, and antitumor activity*. Carbohydrate Research, 2011, **346**: 2769-2776.
12. Jin, W., Zhang, Q., Wang, J., & Zhang, W., *A comparative study of the anticoagulant activities of eleven fucoidans*. Carbohydrate Polymers, 2013, **91**: 1-6.
13. Athukorala, Y., Jung, W-K., Vasanthan, T., & Jeon, Y-J., *An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of Ecklonia cava*. Carbohydrate Polymers, 2006, **66**: 184–191.
14. Ren, R., Azuma, Y., Ojima, T., Hashimoto, T., Mizuno, M., Nishitani, Y., Yoshida, M., Azuma, T., & Kanazawa, K., *Modulation of platelet aggregation-related eicosanoid production by dietary F-fucoidan from brown alga Laminaria japonica in human subjects*. Br. J. Nutr., 2013, **110**: 880–890.
15. Kim, M-J., Jeon, J., & Lee, J-S., *Fucoidan prevents high-fat diet-induced obesity in animals by suppression of fat accumulation*. Phytotherapy Research, 2014, **28**: 137-143.
16. Lee, S-J., Kim, C-W., Jang, H-J., Cho, S-Y., & Choi, J-W., *Anti-hyperlipidemia and anti-arteriosclerosis effects of Laminaria japonica in Sprague-Dawley rats*. Fisheries and Aquatic Sciences, 2011, **14**: 235-241.
17. 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.
18. Li, X., Li, J., Li, Z., Sang, Y., Niu, Y., Zhang, Q., Ding, H., & Yin, S., *Fucoidan from Undaria pinnatifida prevents vascular dysfunction through PI3K/Akt/eNOS-dependent mechanisms in the*

- L-NAME-induced hypertensive rat model*. Food & Function, 2016, 7: 2398-2408.
19. Fu, X., Xue, C., Ning, Y., Li, Z., & Xu, J., *Acute antihypertensive effects of fucoidan oligosaccharides prepared from Laminaria japonica on renovascular hypertensive rats*. Journal of Ocean University of China (Natural Science), 2003, **34**: 560-564.
  20. Bissell, B. D., Browder, K., McKenzie, M., & Flannery, A. H., *A blast from past: Revival of angiotensin II for vasodilatory shock*. Annals of Pharmacotherapy, 2018, **52**: 920-927.
  21. Vo, T-S., Ngo, D-H., Kang, K-H., Jung, W-K., & Kim, S-K., *The beneficial properties of marine polysaccharides in alleviation of allergic responses*. Mol. Nutr. Food Res., 2015, **59**: 129–138.
  22. Oomizu, S., Yanase, Y., Suzuki, H., Kameyoshi, Y., & Hide, M., *Fucoidan prevents Cε germline transcription and NFκB p52 translocation for IgE production in B cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, **350**: 501–507.
  23. Yanase, Y., Hiragun, T., Uchida, K., Ishii, K., Ooizumi, S., Suzuki, H., Mihara, S., Iwamoto, K., Matsuo, H., Onishi, N., Kameyoshi, Y., & Hide, M., *Peritoneal injection of fucoidan suppresses the increase of plasma IgE induced by OVA-sensitization*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2009, **387**: 435–439.
  24. Tokita, Y., Nakajima, K., Mochida, H., Iha, M., & Nagamine, T., *Development of a fucoidan-specific antibody and measurement of fucoidan in serum and urine by sandwich ELISA*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2010, **74**: 350–357.
  25. Tanino, Y., Hashimoto, T., Ojima, T., & Mizuno, M. *F-fucoidan from Saccharina japonica is a novel inducer of galectin-9 and exhibits anti-allergic activity*. J. Clin. Biochem. Nutr., 2016, **59**: 25-30.
  26. 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.
  27. Nagaoka, M., Shibata, H., Kimura-Takagi, I., Hashimoto, S., Kimura, K., Makino, T., Aiyama, R.,

- Ueyama, S., & Yokokura, T., *Structural study of fucoidan from Cladosiphon okamuranus Tokida*. Glycoconj. J., 1999, **16**: 19–26.
28. Sakai, T., Ishizuka, K., Shimanaka, K., Ikai, K., & Kato, I., *Structures of oligosaccharides derived from Cladosiphon okamuranus fucoidan by digestion with marine bacterial enzymes*. Mar. Biotechnol., 2003, **5**: 536–544.
29. Teruya, T., Tatemoto, H., Konishi, T., & Tako, M., *Structural characteristics and in vitro macrophage activation of acetyl fucoidan from Cladosiphon okamuranus*. Glycoconj. J., 2009, **26**: 1019–1028.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
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. Yaphe, W., & Morgan, K., *Enzymic hydrolysis of fucoidin by Pseudomonas atlantica and Pseudomonas carrageenovora*. Nature, 1959, **183**: 761–762.
35. Thanassi, N. M., & Nakada, H. I., *Enzymatic degradation of fucoidan by enzymes from the hepatopancreas of abalone Haliotis species*. Arch. Biochem. Biophys., 1967, **118**: 172–177.
36. 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.
37. Sakai, T., Kimura, H., & Kato, I., *A marine strain of flavobacteriaceae utilizes brown seaweed*

- fucoidan*. Mar. Biotechnol., 2002, **4**: 399-405.
38. Sakai, T., Ishizuka, K., & Kato, I., *Isolation and characterization of a fucoidan-degrading marine bacterium*. Mar. Biotechnol., 2003, **5**: 409-416.
39. 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.
40. Kusaykin, M. I., Silchenko, A. S., Zakharenko, A. M., & Zvyagintseva, T. N., *Fucoidanases*. Glycobiology, 2016, **26**: 3-12.
41. 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.
42. 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.
43. 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 fucoidan from Korean Undaria pinnatifida sporophylls*. J. Microbiol. Biotechnol., 2008, **18**: 616-623.
44. 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.
45. Chang, Y., Xue, C., Tang, Q., Li, D., Wu, X., & Wang, J., *Isolation and characterization of a sea cucumber fucoidan-utilizing marine bacterium*. Letters in Applied Microbiology, 2010, **50**: 301-307.
46. 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.
47. 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 fucoidan by fucoidanase isolated from the marine bacterium, Formosa algae*. Mar. Drugs, 2013, **11**: 2413–2430.
  48. Kitamura, K., Matsuo, M., & Yasui, T., *Enzymatic degradation of fucoidan by fucoidanase from the hepatopancreas of Patinopecten yessoensis*. Biosci. Biotech. Biochem., 1992, **56**: 490–494.
  49. 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 fucoidan (Ascophyllum nodosum)*. Glycobiology, 2002, **12**: 273–282.
  50. 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 fucoidan from the brown alga Fucus distichus*. Biochemistry (Mosc), 2005, **70**: 1321–1326.
  51. 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-fucoidanase from Vietnamese marine mollusk Lambis sp. which producing sulphated fucooligosaccharides*. J. Mol. Catal. B Enz., 2014, **102**: 154–160.
  52. Wu, Q., Zhang, M., Wu, K., Liu, B., Cai, J., & Pan, R., *Purification and characteristics of fucoidanase obtained from Dendryphiella arenaria TM94*. J. Appl. Phycol., 2011, **23**: 197–203.
  53. Wu, Q., Shung, M., Hourong, X., H, Min, Z., & Jingmin, C., *Purification and the secondary structure of fucoidanase from Fusarium sp. LD8*. Evid. Based Complement. Alternat. Med., 2011, Article ID 196190.
  54. Haug, A., Larsen, B., & Smidsrød, O., *A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis*. Acta Chem. Scand., 1966, **20**: 183–190.
  55. Haug, A., Larsen, B., & Smidsrød, O., *Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic*

- acid*. Acta Chem. Scand., 1966, **21**: 691-704.
56. 中根俊彦、タラソテラピーを起源とした海洋由来成分の開発動向と化粧品への活用.  
Fragrance Journal, 1999, **221**: 58.
57. 佐藤貴哉、寺松泰英、中根俊彦、アルギン酸カルシウム微粒子の開発と化粧品への展開.  
繊維と工業、1996, **52**: 20-26.
58. 大島幸吉、鮑内臓中の酵素類. 日本農芸化学会誌、1931, **7**: 328-331.
59. 山田信夫、安田敦、山崎美紹、人工ふ化アワビ稚貝のアルギナーゼ出現時期. 東海大学  
海洋研究所研究報告、1999, **20**: 93-98.
60. Garron, M-L. & Cygler, M., *Structural and mechanistic classification of uronic acid-  
containing polysaccharide lyases*. Glycobiology, 2010, **20**: 1547–1573.
61. Wong, T. Y., Preston, L. A., & Schiller, N. L., *Alginate lyase: Review of major sources and  
enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications*.  
Annu. Rev. Microbiol., 2000, **54**: 289–340.
62. Hashimoto, W., Miyake, O., Momma, K., Kawai, S., & Murata, K., *Molecular identification of  
oligoalginate lyase of Sphingomonas sp. strain A1 as one of the enzymes required for complete  
depolymerization of alginate*. J. Bacteriol., 2000, **182**: 4572–4577.
63. Furukawa, S., Fujikawa, T., Koga, D., & Ide, A., *Production of fucoidan-degrading enzymes,  
fucoidanase, and fucoidan sulfatase by Vibrio sp. N-5*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 1992, **58**:  
1499-1503.
64. 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**: p. 380-387.
65. 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.

66. Colin, S., Deniaud, E., Jam, M., Descamps, V., Chevolot, 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.
67. 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.
68. 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.
69. Tako, M., Yoza, E., & Thoma, S., *Chemical characterization of acetyl fucoidan and alginate from commercially cultured Cladosiphon okamuranus.* Botanica Marina, 2000, **43**: 393-398.
70. Kawamoto, H., Miki, Y., Kimura, T., Tanaka, K., Nakagawa, T., Kawamukai, M., & Matsuda, H., *Effects of fucoidan from Mozuku on human stomach cell lines.* Food Sci. Technol. Res., 2006, **12**: 218-222.
71. 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.
72. Laemmli, U. K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4.* Nature, 1970, **227**: 680-685.
73. Bruckmann, M., Blasco, R., Timmis, K. N., & Pieper, D. H., *Detoxification of protoanemonin by dienelactone hydrolase.* J. Bacteriol., 1998, **180**: 400-402.
74. Schlomann, M., Schmidt, E., & Knackmuss, H. J., *Different types of dienelactone hydrolase in 4-fluorobenzoate-utilizing bacteria.* J. Bacteriol., 1990, **172**: 5112-5118.
75. Puchart, V., Berrin, J. G., Haon, M., & Biely, P., *A unique CE16 acetyl esterase from Podospora*



- anserine active on polymeric xylan. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2015, **99**: 10515-10526.
76. Wang, Y., Song, J. Z., Yang, Q., Liu, Z. H., Huang, X. M., & Chen, Y., *Cloning of a heat-stable chitin deacetylase gene from Aspergillus nidulans and its functional expression in Escherichia coli*. Appl. Biochem. Biotechnol., 2010, **162**: 843-854.
  77. Park, S. Y., Kim, J. T., Kang, S. G., Woo, J. H., Lee, J. H., Choi, H. T., & Kim, S. J., *A new esterase showing similarity to putative dienelactone hydrolase from a strict marine bacterium, Vibrio sp. GMD509*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007, **77**: 107-115.
  78. Levisson, M., Han, G. W., Deller, M. C., Xu, Q., Biely, P., Hendriks, S., Ten Eyck, L. F., Flensburg, C., Roversi, P., Miller, M. D., McMullan, D., von Delft, F., Kreusch, A., Deacon, A. M., van der Oost, J., Lesley, S. A., Elsliger, M. A., Kengen, S. W., & Wilson, I. A., *Functional and structural characterization of a thermostable acetyl esterase from Thermotoga maritima*, Proteins, 2012, **80**: 1545-1559.
  79. Henrissat, B. *A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities*. Biochemical Journal, 1991, **280**: 309-316.
  80. Henrissat, B. & Davies, G., *Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases*. Current Opinion in Structural Biology, 1997, **7** : 637-644.
  81. Gebler, J., Gilkes, N., Claeysens, M., Wilson, D., Beguin, P., Wakarchuk, W., Kilburn, D., Miller, R., Warren, R., & Withers, S., *Stereoselective hydrolysis catalyzed by related beta-1,4-glucanases and beta-1,4-xylanases*. J. Biol. Chem., 1992, **267**: 12559–12561.
  82. Henrissat, B., Callebaut, I., Fabrega, S., Lehn, P., Mornon, J., & Davies, G., *Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1995, **92**: 7090–7094.
  83. Barbeyron, T., L'Haridon, S., Michel, G., & Czjzek, M., *Mariniflexile fucanivorans sp. nov., a marine member of the Flavobacteriaceae that degrades sulphated fucans from brown algae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2008, **58**: 2107-2113.

84. Vickers, C., Liu, F., Abe, K., Salama-Alber, O., Jenkins, M., 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**: 18296-18303.
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. 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.
87. 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.

## 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、共同研究者である隈部 絢子 氏、山岡 美花 氏、小松 史佳 氏、荒井 良仁 氏をはじめ、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深江化成株式会社 木村 昌一 社長、営業本部 本 真 部長をはじめ、様々な面で支えてくださった深江化成株式会社の同僚・同期・後輩に心より御礼申し上げます。

そして、博士後期課程在学に関してご理解いただき、様々なご助言下さいました日本ジッコウ株式会社 佐藤 武司 会長、佐藤 匡良 社長、技術企画部 井上 敬介 部長、技術研究所 藤澤 健一 所長をはじめ、様々な面で支えて下さり応援して下さいました日本ジッコウ株式会社の先輩・同僚・後輩の皆様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、そして妻に心より感謝申し上げます。



題 目 海洋由来 *Luteolibacter algae* H18 のフコイダン低分子化酵素：精製とクローニング

著 者 名 荒井良仁、長尾達彦、小松史佳、八木寿梓、鈴木宏和、大城 隆  
学術雑誌名 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大会  
( 巻, 号, 頁 ) ( \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ )  
発行年月日 \_\_\_\_\_ 2017 年 9 月 22 日

題 目 フコイダンデアセチラーゼの触媒活性に関する領域

著 者 名 長尾達彦、小松史佳、八木寿梓、鈴木宏和、大城 隆  
学術雑誌名 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大会  
( 巻, 号, 頁 ) ( \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ )  
発行年月日 \_\_\_\_\_ 2017 年 9 月 22 日

題 目 海洋由来 *Luteolibacter algae* H18 のフコイダン低分子化酵素における一次構造の新規性

著 者 名 荒井良仁、長尾達彦、小松史佳、八木寿梓、鈴木宏和、大城 隆  
学術雑誌名 日本農芸化学会中四国支部第 50 回記念講演会 (例会)  
( 巻, 号, 頁 ) ( \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ )  
発行年月日 \_\_\_\_\_ 2018 年 1 月 27 日

題 目 *Luteolibacter algae* H18 のフコシダーゼについて

著 者 名 長尾達彦、山岡美花、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 2018 年度大会  
( 巻, 号, 頁 ) ( \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ )  
発行年月日 \_\_\_\_\_ 2018 年 3 月 16 日

題 目 海洋由来 *Luteolibacter algae* H18 のフコイダン低分子化酵素：異種発現と諸性質検討

著 者 名 荒井良仁、長尾達彦、小松史佳、八木寿梓、鈴木宏和、大城 隆  
学術雑誌名 日本農芸化学会 2018 年度大会  
( 巻, 号, 頁 ) ( \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ )  
発行年月日 \_\_\_\_\_ 2018 年 3 月 16 日

題 目 Gene identification and characterization of fucoidan deacetylase and fucoidanase for potential application to fucoidan degradation and diversification

著 者 名 Tatsuhiko Nagao, Yoshihito Arai, Fumika Komatsu, Ayako Kumabe, Mika Yamaoka, Hisashi Yagi, Hirokazu Suzuki and Takashi Ohshiro  
学術雑誌名 The 15th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering  
( 巻, 号, 頁 ) ( \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ )  
発行年月日 \_\_\_\_\_ 2018 年 7 月 1 日

題 目 *Luteolibacter algae* SW 由来フコイダナーゼ遺伝子のクローニングと異種発現

著 者 名 荒井良仁、長尾達彦、藤原卓人、八木寿梓、鈴木宏和、大城 隆  
学術雑誌名 第 70 回 日本生物工学会大会  
( 巻, 号, 頁 ) ( \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ )  
発行年月日 \_\_\_\_\_ 2018 年 9 月 6 日

題 目 酵素的に脱アセチル化したフコイダンによるアミロイド線維形成抑制の検討

著 者 名 荒井良仁、長尾達彦、荊尾美奈子、八木寿梓、鈴木宏和、大城 隆  
学術雑誌名 日本生物工学会西日本支部 第 4 回講演会  
( 巻, 号, 頁 ) ( \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ )  
発行年月日 \_\_\_\_\_ 2018 年 12 月 1 日

題 目 フコイダン分解細菌 *Luteolibacter algae* H18 のスルファターゼについて

著 者 名 長尾達彦、小松史佳、八木寿梓、鈴木宏和、大城 隆

学術雑誌名 日本生物工学会西日本支部 第4回講演会

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

発行年月日 \_\_\_\_\_ 2018 年 12 月 1 日

題 目 *Luteolibacter algae* H18 由来フコイダン低分子化酵素によって生成するフコイダン分解産物の解析

著 者 名 荒井良仁、長尾達彦、八木寿梓、鈴木宏和、大城 隆

学術雑誌名 日本農芸化学会 2019 年度大会

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

発行年月日 \_\_\_\_\_ 2019 年 3 月 27 日

題 目 海洋由来 *Luteolibacter algae* H18 のフコイダン脱硫酸化酵素の精製とクローニング

著 者 名 倉本弥栄、小谷悠輔、山岡美花、長尾達彦、八木寿梓、鈴木宏和、大城 隆

学術雑誌名 日本農芸化学会中四国支部第 54 回講演会 (例会)

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

発行年月日 \_\_\_\_\_ 2019 年 6 月 1 日