

(様式 2)

学位論文の概要及び要旨

氏 名 長尾 達彦 印

題 目 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

学位論文の概要及び要旨

フコイダンとは、褐藻類や棘皮類の粘質物に含まれ、主鎖であるフコースに硫酸基やウロン酸が結合したヘテロ多糖である。海藻由来のフコイダンの生理活性は、抗血液凝固作用や抗ウイルス作用、抗ガン作用など多岐にわたり、これらの性質を利用した医療や健康食品への応用が期待されている。しかしながら、褐藻の種類によってフコイダンの構造は大きく異なり、フコイダンが関与する生理活性がフコイダン分子中のどの構造に起因するかについては不明な点が多いのが現状である。本研究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だ。すでに単離していたフコイダン分解菌 *Luteolibacter algae* H18 株は、フコイダン分解酵素を細胞内に有しており、フコイダンの脱アセチル化反応の後に低分子化反応が起こることが提唱されている。本研究では、*L. algae* H18 から 2 種類の酵素、フコイダンデアセチラーゼとフコイダナーゼを精製し、それらの遺伝子を特定したうえで、遺伝子の異種発現、酵素の諸性質解明を実施した。

まず初めに、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た。その後、V8 プロテアーゼを用いて消化し、SDS-PAGE で分離した後に内部アミノ酸配列の解析を行い、酵素に含まれる 2 つの内部アミノ酸配列を決定した。そして、明らかにしていた H18 株のドラフトゲノム情報を基に、フコイダンデアセチラーゼ遺伝子を特定し、*fud* と称することにした。*fud* を PCR 増幅し、種々の発現ベクターにライゲーションした結果、pCold TF に組み込んだ際、目的タンパク質が大腸菌で生産され、フコイダンの脱アセチル化活性も確認できた。次に、Ni Sephase 6 Fast Flow による精製を実施後、HRV 3C Protease により可溶化タグを切断し、再度、Ni Sepharose 6 Fast Flow による精製を行い、70 kDa の酵素標品 Fud を調製し、酵素化学的諸性質を決定した。Fud は、フコイダンの脱アセチル化活性を有しているが、低分子化活性、脱硫酸化活性を示さないため、Fud を用いることにより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。また、本酵素は一般的にエステラーゼ活性測定に用いられる *p*-Nitrophenyl acetate 等の低分子量人工基質の加水分解反応も触媒できた。一方、BLAST 検索の結果、Fud と最も相同性の高いタンパク質は Dienelactone hydrolase で、その相同性は 63%であり、多糖に作用する酵素の中で最も相同性が高かったのは Acetylxylylan esterase (25%) であった。

次に *L. algae* H18から脱アセチル化フコイダンの低分子化を触媒する酵素、フコイダナーゼをH18株から種々のクロマトグラフィーにより精製し、N末端アミノ酸配列を決定した。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同定し、*fct114*と称することにした。*fct114*を pCold I にクローニングし、大腸菌で発現させたところ、目的タンパク質 (112 kDa) が生産され、さらに、Ni Sepharose 6 Fast Flowにより精製酵素標品を調製し、酵素化学的諸性質を決定した。その結果、本酵素は他の海藻由来のフコイダンに対して全く活性を示さない一方、脱アセチル化していないフコイダンの低分子化も触媒できることが明らかになった。本酵素の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 *Sphingomonas sanguinis* 由来のGlycosyl hydrolase (相同性26%)であった。今までに明らかにされているフコイダン低分子化酵素は、すべてGH family 107 に属しているが、Fct114 はこの family に属する酵素との相同性は25%以下と低く、本酵素は新規なフコイダン低分子化酵素であると考えられた。

以上のように、本研究では、フコイダンデアセチラーゼ、フコイダナーゼの遺伝子を特定し、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化低分子化フコイダン、オキナワモズク由来の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。酵素処理をしていないフコイダンも含め、4種類の構造を持つフコイダンを調製できるようになったことで、フコイダンの生理活性と構造との相関性の解明へとつながると考えられる。