

(様式第3号)

学 位 論 文 要 旨

氏名: 川本 仁志

題目: Physiological activities of fucoidan and analysis of degrading enzyme of alginate, both derived from seaweed mucoid polysaccharide
(海藻由来粘性多糖フコイダンの生理活性とアルギン酸分解酵素の解析)

海藻は主に緑藻類、褐藻類、紅藻類の3つのグループに分類される。これらの海藻は主に食品産業で利用されているが、海藻の細胞間物質であるアガロース、カラゲナン、アルギン酸は食品産業のみならず、化粧品産業や繊維産業で利用されている。褐藻類には細胞間物質としてフコイダンとアルギン酸が存在し、フコイダンは褐藻類のなかでもオキナワモズク *Cladophora okamurae* に最も多く含まれている。フコイダンは主にフコースを構成糖とするヘテロ硫酸化多糖の総称で、藻種により多くの分子種がある。このフコイダンは構成糖、硫酸基量や分子量が異なり、構造が複雑であるため明確な構造の決定や研究は遅れている。フコイダンは抗凝血作用、抗ウイルス作用、抗腫瘍活性などの多くの生理活性が報告されているものの健康食品に利用されている程度でまだ広く利用されていない。アルギン酸は β -D-マンヌロン酸と α -L-グルロン酸からなる直鎖のヘテロ多糖で、マンヌロン酸残基からなるMブロックとグルロン酸残基からなるGブロック、2つの残基が交互に入り混ざったMGブロックからなる。また、アルギン酸は褐藻以外には緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* などが産生するバイオフィームとしても存在することが知られている。多くの報告例ではアルギン酸分解酵素はほとんど脱離酵素である。アルギン酸リアーゼは基質特異性により主にMブロックに働くポリマンヌロン酸リアーゼ (EC 4.2.2.3) とGブロックに働くポリグルロン酸リアーゼ (EC 4.2.2.11) に分類される。これまでに多くのアルギン酸リアーゼが報告されているが、遺伝子のクローニングや機能解析は他の多糖分解酵素よりも研究が遅れている。そこで著者はフコイダンを幅広く利用するため、フコイダンの新たな生理活性を調べ、モズクの成分であるフコイダンの胃細胞への作用を調べることを第一の目的とした。また、フコイダンを抽出する際、アルギン酸も同時に抽出されることから、その第一歩として、分解酵素を用いてフコイダンの精製に用いることを目標とした。アルギン酸分解菌をスクリーニングし、その酵素をコードする遺伝子のクローニングとその解析を第二番目の目的とした。

第一章で、著者はこの論文のバックグラウンドについて述べた。

第二章では、オキナワモズク *C. okamurae* からフコイダンを抽出、精製し、ヒト胃細胞

に対する効果をin vitroで調べた。まず、オキナワモズクから収率1.0%(w/w)で分子量約320万、硫酸基量9.8%(w/w)のフコイタンを抽出し、精製した。そしてオキナワモズク由来フコイタンがヒト正常胃細胞において抗ガン剤5-FUの作用を抑制し、フコイタン単独では正常細胞には影響を与えることなく胃ガン細胞の増殖抑制効果が見られたことを報告した。

第三章では、アルギン酸を分解する海洋細菌をスクリーニングし、単離したアルギン酸分解菌の16S rDNA解析を行い、新規のアルギン酸分解菌を選択した。さらにそのアルギン酸分解菌のアルギン酸リアーゼの遺伝子クローニングを行い、基質特異性を調べた。まず、島根県内の美保関湾の海水から単離したアルギン酸分解菌を単離し、16S rDNAを解析した結果、*Vibrio*属に属する菌であることがわかり、*Vibrio* sp. O2と命名した。この*Vibrio* sp. O2菌から2つのアルギン酸リアーゼ活性を有するクローンalyVOA、alyVOBを得て、それらの配列を決定した。アルギン酸リアーゼAlyVOA、AlyVOBを既知のアルギン酸リアーゼと比較したところ、*Photobacterium* sp. ATCC43367 由来アルギン酸リアーゼ AlxMとそれぞれ92.3%、32.6%の同一性を示した。また、既知のアルギン酸リアーゼとのコンセンサス配列が見られ、両酵素ともポリマンヌロン酸リアーゼであることがわかった。

以上、これらのことから著者は新たに次のことを解明した。(1) 高分子のオキナワモズク由来フコイタンを抽出し、精製することに成功し、正常細胞に対する抗ガン剤5-FUの副作用抑制剤になることを示唆した。(2) 新規アルギン酸分解菌*Vibrio* sp. O2を単離し、新たなアルギン酸リアーゼ遺伝子の知見を得ることに成功した。

これらの知見は、海藻由来の有効成分であるフコイタンやアルギン酸の研究やさらなる産業への応用に寄与する足がかりとなると考えられる。