HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Flavobacterium sp. UMI-01株のアルギン酸分解および代謝機構の解明
Author(s)	西山, 竜士
Citation	北海道大学. 博士(水産科学) 甲第13537号
Issue Date	2019-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k13537
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/80670
Type	theses (doctoral)
File Information	Ryuji_Nishiyama.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Flavobacterium sp. UMI-01 株のアルギン酸分解および代謝機構の解明

(Study on the mechanism of alginate degradation and metabolism in *Flavobacterium* sp. strain UMI-01)

北海道大学大学院水産科学院海洋応用生命科学専攻

Graduate School of Fisheries Sciences Division of Marine Life Science

西　山　竜　士

Ryuji Nishiyama

平成 31 年 (2019)

目次

緒言 1

第 1 章　*Flavobacterium* sp. UMI-01 株のアルギン酸分解・代謝経路の解明

第 1 項　目的 9

第 2 項　実験手法

1. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株のドラフトゲノム解析

1.1. ドラフトゲノム配列の取得 9

1.2. アルギン酸分解・代謝関連酵素遺伝子の探索 10

1.3. KDG リン酸化酵素および KDPG 開裂酵素の分子系統解析 10

2. 組換えアルギン酸リアーゼおよび組換え DEH 代謝関連酵素の大腸菌発現および精製

2.1. 培地および試薬の調製

2.1.1. MS 液体培地 11

2.1.2. LB 培地・2×YT 培地 11

2.1.3. 10×TE バッファー 11

2.1.4. 50×TE バッファー 11

2.1.5. TE 飽和フェノール 11

2.1.6. フェノール・クロロホルム 12

2.2. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株由来ゲノム DNA の抽出 12

2.3. アルギン酸分解・代謝関連酵素遺伝子の PCR による増幅 12

2.4. PCR 産物の精製 13

2.5. 増幅遺伝子のライゲーションおよび大腸菌の形質転換 13

2.6. プラスミドの抽出および精製 13

2.7. 組換えタンパク質の発現および精製 14

2.8. タンパク質の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

2.8.1. ローディングバッファー 14

2.8.2. 電気泳動用バッファー 14

2.8.3. ポリアクリルアミドゲルの作成 14

2.8.4. 電気泳動ゲルの CBB 染色および脱色 15

2.8.5. ウエスタンブロッティング 15

2.9. タンパク質の定量
2.9.1. ビウレット法 15
2.9.2. ローリー法 16
2.9.3. デンシトメトリー法 16
3. 組換えアルギン酸リアーゼの機能解析
3.1. 糖の定量
3.1.1. フェノール硫酸法 16
3.1.2. カルバゾール硫酸法 16
3.1.3. チオバルビツール酸法 17
3.2. 基質の調製 17
3.3. アルギン酸リアーゼ活性の測定
3.3.1. 酵素活性の測定方法 18
3.3.2. 組換えアルギン酸リアーゼの活性評価 18
3.4. 薄層クロマトグラフィー (TLC) によるアルギン酸分解物の解析
3.4.1. 試料の調製 18
3.4.2. 展開溶媒 18
3.4.3. アルギン酸分解物の検出方法 19
3.5. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるアルギン酸分解物の解析
3.5.1. 試料の調製 19
3.5.2. 陰イオン交換クロマトグラフィーによる解析 19
3.5.3. ゲル濾過クロマトグラフィーによる解析 19
4. 組換え酵素を用いた DEH 代謝関連酵素の機能解析
4.1. DEH 還元酵素の活性評価
4.1.1. DEH の調製 19
4.1.2. DEH 還元活性の測定 20
4.1.3. TLC による酵素反応生成物の解析 20
4.1.4. 質量分析による酵素反応生成物の同定 21
4.2. KDG リン酸化酵素の活性評価
4.2.1. KDG の調製 21
4.2.2. KDG リン酸化活性の測定 21
4.2.3. TLC による酵素反応生成物の解析 22

4.2.4. 質量分析による酵素反応生成物の同定 22
4.3. KDPG 開裂酵素の活性評価
4.3.1. KDPG の調製 22
4.3.2. KDPG 開裂活性の測定 22
4.3.3. TLC による酵素反応生成物の解析 23
4.3.4. 質量分析による酵素反応生成物の同定 23
5. 組換え酵素を用いた *in vitro* におけるアルギン酸代謝経路の再構築 23
第 3 項　実験結果
1. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株のドラフトゲノム解析
1.1. アルギン酸分解・代謝関連遺伝子の探索 23
1.2. アルギン酸分解・代謝関連酵素の一次構造解析 24
2. 組換えアルギン酸リアーゼの生化学的特徴
2.1. 組換えアルギン酸リアーゼの大腸菌発現 25
2.2. 組換えアルギン酸リアーゼの基質特異性の解析 25
3. 組換え DEH 代謝関連酵素の生化学的特徴
3.1. 組換え DEH 代謝関連酵素の大腸菌発現 27
3.2. 組換え DEH 還元酵素の生化学的特徴 27
3.3. 組換え KDG リン酸化酵素の生化学的特徴 28
3.4. 組換え KDPG 開裂酵素の生化学的特徴 28
4. 組換え酵素を用いた *in vitro* におけるアルギン酸代謝経路の再構築 29
第 4 項　考察 29

第 2 章　DEH 酸化反応を触媒する酵素の同定および生化学的特徴
第 1 項　目的 58
第 2 項　実験手法
1. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株からの DEH 酸化酵素の精製
1.1. 無細胞抽出液の DEH 酸化活性の解析 58
1.2. 無細胞抽出液からの DEH 酸化酵素の精製
1.2.1. DEH 酸化活性の検出 59
1.2.2. 疎水クロマトグラフィー 59
1.2.3. 陰イオン交換クロマトグラフィー 59

1.2.4. ゲル濾過クロマトグラフィー 60
1.3. タンパク質の一次構造解析
1.3.1. N 末端アミノ酸配列解析 60
1.3.2. 内部アミノ酸配列解析 61
1.3.3. 全一次構造の決定 62
2. 組換え DEH 酸化酵素の作出
2.1. インバース PCR によるタグ配列の除去 62
2.2. 組換え DEH 酸化酵素 recFlRedΔtag の発現および精製 62
3. 組換え DEH 酸化酵素 recFlRedΔtag の機能解析
3.1. DEH 還元活性の測定 63
3.2. DEH 酸化活性の測定 63
3.3. Native-PAGE による補酵素結合能の解析 63
4. DEH の酸化反応生成物の同定
4.1. α-ケト酸の定量 64
4.2. DEH 酸化反応生成物 UP1 の調製 64
4.3. ESI-MS による UP1 の構造決定 64
5. FlRed の酵素活性に関与する酸残基の同定
5.1. インバース PCR によるアミノ酸点変異導入 65
5.2. アミノ酸点変異体の大腸菌発現および精製 65
5.3. His-tag を N 末端に付加した recFlRed (recFlRed_HisN) の作成 66
第 3 項　実験結果
1. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株由来無細胞抽出液に見出された DEH 酸化活性の解析 66
2. DEH 酸化酵素の精製および遺伝子同定 66
3. 組換え DEH 酸化酵素の生化学的特徴
3.1. 組換え DEH 酸化酵素の大腸菌発現および精製 67
3.2. 組換え DEH 酸化酵素の性状 68
3.3. 組換え DEH 酸化酵素の補酵素結合能の解析 68
3.4. DEH の酸化反応により生じる UP1 の同定 68
4. DEH の酸化反応に関与するアミノ酸残基の同定
4.1. DEH 酸化酵素と他種 DEH 還元酵素のアミノ酸配列の比較 69
4.2. DEH 酸化酵素へのアミノ酸点変異導入 69

4.3. 天然および組換え DEH 酸化酵素のキネティクス解析 70
第 4 項　考察 70

第 3 章　*Flavobacterium* sp. UMI-01 株の DEH 酸化代謝経路の解明
第 1 項　目的 93
第 2 項　実験手法
1. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株由来 KDGR 脱水酵素 FlDet の探索および精製
1.1. KDGR 脱水酵素活性の検出
1.1.1. チオバルビツール酸法による酵素活性の測定 93
1.1.2. TLC による酵素反応生成物の解析 94
1.2. 無細胞抽出液からの KDGR 脱水酵素 FlDet の精製 94
2. 大腸菌発現系を用いた組換え FlDet の作出
2.1. 組換え FlDet の大腸菌発現および精製 94
2.2. 組換え FlDet の質量分析 94
3. 組換え FlDet の機能解析
3.1. 組換え FlDet の性状解析 95
3.2. 酵素反応生成物 UP2 の同定 95
3.3. KDGR の代謝に関与する酵素の分子系統解析 95
4. KGSA 脱水素酵素 FlDeg の探索および組換えタンパク質の作出 95
5. 組換え FlDeg の機能解析
5.1. 酵素活性の測定 96
5.2. 酵素反応生成物の解析 96
5.3. 酵素反応生成物の同定
5.3.1. FlDeg 反応生成物の調製および質量分析 96
5.3.2. グルタミン酸脱水素酵素による FlDeg 反応生成物の同定 97
5.3.3. NMR による FlDeg 反応生成物の構造決定 97
5.3.4. カルボキシル基の定量法 97
6. アルギン酸代謝関連遺伝子のオペロン構造の解析
6.1. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株由来 Total RNA の調製 97
6.2. 2nd strand cDNA の合成 98
6.3. RT-PCR によるオペロン構造の解析 98

7. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株ゲノムにおけるアルギン酸代謝関連遺伝子の分布 99
第 3 項　実験結果
1. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株由来 KDGR 脱水酵素 FlDet の探索および精製
1.1. KDGR 脱水酵素 FlDet の探索 99
1.2. KDGR 脱水酵素 FlDet の精製および一次構造解析 100
1.3. 組換え FlDet の作出およびその分子量の決定 100
1.4. KDGR 脱水酵素 FlDet とその相同タンパク質のアミノ酸配列比較 101
2. 組換え FlDet の生化学的特徴
2.1. 温度依存性 101
2.2. pH 依存性 101
2.3. KCl 濃度依存性 101
2.4. 二価金属イオン要求性 102
2.5. 基質特異性 102
2.6. 酵素反応生成物の同定 102
2.7. KDGR 脱水酵素 FlDet の分子系統解析 103
3. KGSA 脱水素酵素 FlDeg の生化学的特徴
3.1. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株由来 KGSA 脱水素酵素 FlDeg の探索 103
3.2. 組換え FlDeg の大腸菌発現および精製 104
3.3. TLC による反応生成物の解析 104
3.4. 温度依存性 104
3.5. pH 依存性 104
3.6. KCl 濃度依存性 104
3.7. 補酵素および基質特異性 105
3.8. 酵素反応生成物の同定 105
3.9. DEH 酸化代謝経路の最終代謝物の構造決定 106
3.10. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株に見出された 2 つの DEH 代謝経路 107
4. アルギン酸代謝関連遺伝子のオペロン構造の解析 108
5. アルギン酸資化細菌における DEH の還元および酸化経路の分布 108
第 4 項　考察 109

第 4 章　DEH 代謝関連遺伝子の発現に及ぼす浸透圧の影響
第 1 項　目的 140
第 2 項　実験手法
1. DEH 酸化代謝関連酵素の発現誘導に及ぼす塩濃度の影響
1.1. 培地の調製 141
1.2. アルギン酸代謝関連酵素の活性測定
1.2.1. エンド型アルギン酸リアーゼ活性の測定 141
1.2.2. エキソ型アルギン酸リアーゼ活性の測定 141
1.2.3. DEH 代謝関連酵素活性の測定 142
2. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株由来 KGSA 脱水素酵素の精製および遺伝子同定 142
3. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株の代謝物解析
3.1. 代謝物の調製 142
3.2. TLC による代謝物の解析
3.2.1. カルボニル化合物の検出 143
3.2.2. アミノ酸の検出 143
3.3. 細胞内代謝物の分子同定
3.3.1. TLC による細胞内代謝物の簡易同定 143
3.3.2. TLC による細胞内代謝物の精製 143
3.3.3. 質量分析による細胞内代謝物の同定 143
4. 培養液の浸透圧変化に伴う代謝物の変化の解析 144
第 3 項　実験結果
1. DEH 酸化代謝関連酵素の発現誘導に及ぼす塩濃度の影響 144
2. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株由来 KGSA 脱水素酵素の精製および遺伝子同定 145
3. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株の代謝物解析
3.1. TLC による細胞外および細胞内代謝物の解析 146
3.2. 細胞内代謝物の分子同定 146
4. 培養液の浸透圧変化に伴う代謝産物の変化の解析 147
第 4 項　考察 148

総合考察 163

参考文献 167

謝辞 177

本論文で用いた略語を以下に記した。

AKR	Aldo-keto reductase
APS	Ammonium persulfate
ASW	Artificial sea water
ATP	Adenosine triphosphate
BLAST	Basic local alignment search tool
BPB	Bromophenol blue
BSA	Bovine serum albumin
CAZY	Carbohydrate-active enzymes
CBB	Coomassie brilliant blue
CE	Carbohydrate esterase
CHA	4-Carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate
DEH	4-Deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronate
DHDPS	Dihydrodipicolinate synthase
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNP	2,4-Dinitrophenylhydrazine
DTT	Dithiothreitol
GAP	Glyceraldehyde-3-phosphate
GH	Glycoside hydrolase
GT	Glycosyl transferase
HIBDH	3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence

HMG	4-Hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate
HPLC	High performance liquid chromatography
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside
KDG	2-Keto-3-deoxy-D-gluconic acid
KDGR	2-Keto-3-deoxy-D-glucaric acid
KDPG	2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconic acid
KGSA	α-Ketoglutarate semialdehyde
KG	α-Ketoglutarate
LDH	Lactose dehydrogenase
MALDI-TOF-MS	Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NAL	*N*-acetylneuraminate lyase
Ni-NTA	Nickel-nitrilotriacetic acid
NMR	Nuclear magnetic resonance
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Polymerase chain reaction
PL	Polysaccharide lyase
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
SDR	Short-chain dehydrogenase/reductase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBA	Thiobarbituric acid
TEMED	*N,N,N',N'*-tetramethyl-ethylenediamine
TLC	Thin-layer chromatography
Tris	Tris-hydroxymethyl aminomethane

緒言

海藻多糖およびその分解物の構造・機能・産業利用

我が国は、国土の四方を海に面した海洋国家であり、我々は古来よりその広大な海域から様々な水産資源の恩恵を享受してきた。主要な水産資源である魚類、軟体類、甲殻類、海産哺乳類、および海藻類は、我が国のみならず世界各国で食糧源として利用されているが、これらのうち、海藻類は、特に日本を含む東アジア諸国で日常的に食されてきた。近年では、海藻類に含まれるビタミン、難消化性多糖、カロテノイド、およびポリフェノールなどの様々な成分の健康機能性や生理活性が注目を集め、その利用用途が増大している[1,2]。食用とされる海藻には、緑藻類、紅藻類、および褐藻類があるが、自然界での存在量は褐藻類が最も多い。大型褐藻類では、コンブやワカメなどが広く食用とされているが、他の大型褐藻類については多糖類やカロテノイド類などの抽出源としての利用がみられるものの[3,4]、ほとんどは未利用のままである。一方、近年では海藻類に含まれる糖質を「海洋バイオマス」と位置づけ、エネルギーやバイオ資材の原料として利用しようという試みもなされるようになった[5–9]。このような海藻類の利用用途の拡大に伴い、その生産量や消費量は将来的に増大すると予想される。

海藻の構成成分の特徴として、高等植物を含む他の光合成生物にはみられない、特異な糖鎖構造をもつ多糖類の存在が挙げられる。すなわち、緑藻類では、硫酸化ラムナンおよびウルバン、紅藻類では、寒天およびカラギーナン、褐藻類では、アルギン酸、フコイダン、およびラミナリンなどがある[3] (Figure 1)。これらのうち、アルギン酸は食品添加物やゲル化剤、乳化安定剤、印象剤などとして広く利用されている。アルギン酸は褐藻類の主要構造多糖であることから存在量も多く、近年では、バイオ素材やバイオ燃料源としての開発研究も活発になっている。

アルギン酸は、1890 年代に発見された酸性多糖 (ポリウロン酸) であり、その含有量は藻体乾燥重量の約 40%に達する[10]。アルギン酸は、褐藻類だけでなく一部の細菌類 (*Azotobacter vinelandii* や *Pseudomonas aeruginosa* など) も合成することが知られている[11]。紅藻類のオオシコロにも存在が確認されているが、その生合成経路は未だ不明である[12]。褐藻類のアルギン酸は、細胞壁構成成分および細胞間充填多糖として存在しているが、細菌ではバイオフィルムの構成成分として存在する。アルギン酸を構成する単糖ユニットの β-D-マンヌロン酸 (M) および α-L-グルロン酸 (G) は、C5 エピマーの関係にある。アルギン酸の生合成時には、最初 M が β-1,4 結合により重合したポリマンヌロン酸が合成され、その後、マンヌロン酸 C5-エピメラーゼの作用により、ポリマンヌロン酸鎖中の一部の M が G へとエピマー化され、最終的に M と G から成るヘテロ多糖構造が形成される[13]。その結果、アルギン酸分子中には M が連続した領域 (M ブロック)、G が連続した領域 (G ブロック)、および M と G がランダムに配列した領域 (MG ブロック) が生じる。これらのうち、MG ブロックは、その構造的不均一性により M ブロックおよび G ブロックよりも

高い柔軟性を示し、G ブロックの柔軟性は最も低い[11]。アルギン酸の構造的柔軟性は、褐藻の生理的特性とも関連していると考えられる。すなわち、波の影響を受け易く柔軟性を必要とする葉状部ではアルギン酸の M 含量は高く、藻体を堅固に固定する仮根部では G 含量が高い傾向にある[14]。一方、細菌由来のアルギン酸では、大部分の M 残基の C2 および C3 の OH 基 (O2 および O3) の一方または両方がアセチル化されている[15]。このアセチル化はエピメラーゼやアルギン酸リアーゼの反応性を低下させること、および水分子との結合能を上昇させることが報告されており[13]、それぞれアルギン酸の生合成および乾燥環境での生存に寄与すると考えられている。このような修飾は褐藻のアルギン酸ではみられない。

アルギン酸は、Ca^{2+}、Sr^{2+}、もしくは Ba^{2+}などの二価金属イオンと結合してゲル化する性質をもつ。形成されるアルギン酸ゲルの物理的性質は M/G 比に依存しており、M を多く含むアルギン酸では、柔軟で弾力に富むゲルが形成され、G を多く含むアルギン酸では強固で脆いゲルが形成される[16]。後者が固いゲルを形成するのは、アルギン酸分子中の隣接する G ブロック間に二価金属イオンを介した”Egg box”と呼ばれる特有の折りたたみ構造が形成されるためである。

このような性質を有するアルギン酸は、食品、化学、医療、および化粧品など様々な分野で、安定剤、増粘剤、ゲル化剤、印象剤、もしくはフィルム皮膜剤などの用途で利用されてきた[11]。近年では、再生医療分野における 3D 培養時の足場基材としての利用[5]や、アルギン酸を発酵源としたバイオエタノール生産[6–9]などの新たな利用方法の開発が進められている。また、アルギン酸の限定分解により得られるオリゴ糖は、高等植物の毛根の伸長促進[17,18]、*Bifidobacterium* sp.の生育速度上昇[19]、および *Penicillium chrysogenum* のペニシリン生産促進[20]などの生物活性や、抗酸化作用[21]、抗血液凝固作用[22]、抗炎症作用[23]、および抗感染症作用[24]などの生理活性を有することが報告されている。このことは、アルギン酸の分解物には高分子のアルギン酸にはみられない機能があることを示している。

アルギン酸分解・代謝関連酵素に関する研究の現状および課題

自然界では、アルギン酸を特異的に分解する酵素、すなわちアルギン酸リアーゼ（EC 4.2.2.3、EC4.2.2.11）が、種々のアルギン酸資化性微生物や藻食性の腹足類に分布することが知られている。アルギン酸を合成する生物では、*A. vinelandii* や *P. aeruginosa* においてアルギン酸リアーゼの存在が報告されており[25]、それらの酵素は、アルギン酸生合成時に誤って合成されたポリマンヌロン酸や不要となったポリマンヌロン酸の分解除去の役割を果たしているとされている。このことから、アルギン酸リアーゼはアルギン酸生合成生物において重要な酵素と考えられるが、褐藻では未だアルギン酸リアーゼは報告されていない。一方、紅藻にも機能のあるアルギン酸リアーゼが存在することが報告されているが、その生理的な役割は不明である[26]。

アルギン酸リアーゼは、β-脱離反応によりウロン酸残基間のグリコシド結合を切断する酵素で、切

断によって生じたアルギン酸断片の非還元末端の C4-C5 位間に二重結合を導入する[27]。アルギン酸リアーゼは、その作用様式からアルギン酸分子内部のグリコシド結合をランダムに切断するエンド型リアーゼと、末端のグリコシド結合を順に切断するエキソ型リアーゼに大別される。これらの酵素の作用により最終的に生じる不飽和ウロン酸は、非酵素的もしくは酵素的に開環して、4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronate (DEH)となる[28,29]。Carbohydrate-Active enZYmes (CAZY) データベース (http://www.cazy.org/) によれば、糖質関連酵素は、基質、機能、および一次構造の疎水クラスター分析に基づき、Glycoside hydrolase (GH)、Glycosyltransferase (GT)、Polysaccharide lyase (PL)、Carbohydrate esterase (CE)、もしくは Auxiliary activity (AA) ファミリーに分類される。アルギン酸リアーゼは、ヒアルロン酸リアーゼ、ペクチン酸リアーゼ、ヘパリンリアーゼ、およびグルクロナンリアーゼなどと共に PL ファミリーに属するが、このファミリーはさらに 29 のサブファミリー (PL-1～PL-29) に細分化される。これまでに報告されたアルギン酸リアーゼは、PL-5、6、7、14、15、17、および 18 に分類され、エンド型アルギン酸リアーゼは、PL-5、6、7、14、および 18 にみられ、エキソ型アルギン酸リアーゼは、PL-6、7、14、15、および 17 にみられる。

一般的に、アルギン酸資化能をもつ生物は、エンド型およびエキソ型のアルギン酸リアーゼの両方をもち、それらの協働的酵素作用によりアルギン酸を不飽和ウロン酸単糖の DEH に分解し、この DEH を細胞内で代謝し炭素源として利用していると考えられている。アルギン酸代謝機構は、これまで細菌および藻食性軟体動物において詳細に研究されている。

アルギン酸の代謝経路は、1962 年に Preiss と Ashwell により初めて提唱された[28,30]。当時、Ashwell らは、特定の官能基を検出する種々の化学試験により、*Escherichia coli* におけるグルクロン酸およびガラクツロン酸の中間代謝物が 2-keto-3-deoxy-D-gluconate (KDG) であることを同定しており、この KDG が *Pseudomonas saccharophilia* で発見された原核生物特有の解糖系 (Entner-Doudoroff 経路)[31] に合流すると推定していた[32]。その後、Preiss と Ashwell は、アルギン酸資化性の *Pseudomonas* sp.から無細胞抽出液を調製し、それをアルギン酸に作用させることで不飽和単糖 (DEH) が生成すること[28]、および生じた DEH が NADPH 存在下で KDG に還元されること[30] を発見した。これらの結果に基づいて、以下のアルギン酸代謝経路を提唱した (Figure 2)。すなわち、アルギン酸は、まず複数種のアルギン酸リアーゼにより不飽和ウロン酸にまで分解され、この不飽和ウロン酸は非酵素的に DEH に開環する。次いで、DEH は DEH 還元酵素により NAD(P)H 存在下で KDG に還元された後、Entner-Doudoroff 経路に導入される。その後、KDG は、リン酸化酵素および開裂酵素の作用により、2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate (KDPG) を経て、最終的にピルビン酸および glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) に変換される、というものである。しかしながら、各反応段階で作用する酵素は特定されておらず、また、中間代謝物の構造情報が不足していたため、細菌におけるアルギン酸代謝経路が完全に実証されたとは言い難かった。

このような背景の下、現在までに様々な細菌由来のアルギン酸リアーゼと DEH 代謝酵素が研究されてきた。特にアルギン酸リアーゼは、資化経路の第一段階の反応を担う重要な酵素であるため最も詳細に研究されており、これまでにプロテオバクテリア (e.g. *Azotobacter* sp. [33]、*Alteromonas* sp. [34,35]、*Cobetia* sp.[36]、*Enterobacter* sp.[37]、*Falsirhodobacter* sp.[38]、*Klebsiella* sp.[39]、*Nitratiruptor* sp.[40]、*Pseudoalteromonas* sp.[41]、*Pseudomonas* sp.[42]、*Saccharophagus* sp.[43]、*Shewanella* sp.[44]、*Sphingomonas* sp.[45]、および *Vibrio* sp.[46])、バクテロイデス (e.g. *Cellulophaga* sp.[47]、*Flavobacterium* sp.[48]、および *Zobellia* sp.[49])、フィルミクテス (e.g. *Bacillus* sp.[50])、およびアクチノバクテリア (e.g. *Isoptericola* sp.[51]) などの酵素が報告されている。しかしながら、アルギン酸の分解と代謝の過程に関与する各タンパク質の性状と共に明らかにした例は、*Sphingomonas* sp. A1 株に限られている。それによれば、A1 株は細胞外膜ピット (8 種類のタンパク質から成る穴状構造) を介してアルギン酸をペリプラズム領域に輸送する。次いで、ペリプラズム領域において Alginate-binding protein (AlgQ1 および AlgQ2) によりアルギン酸を捕捉し、細胞内膜中に存在する ATP-binding cassette (ABC) transporter (AlgM1、AlgM2、および AlgS) により細胞質領域へ輸送する [52]。細胞内に輸送されたアルギン酸は、3 種類のエンド型アルギン酸リアーゼ (A1-I、A1-II、および A1-III) により不飽和 2-4 糖まで分解され [53]、その後、1 種類のエキソ型アルギン酸リアーゼ (A1-IV) により DEH まで完全分解される [54]。次いで、DEH は NADPH および NADH 依存性の 2 種類の DEH 還元酵素 A1-R [55] および A1-R' [56] によって KDG へと還元される。これらの DEH 還元酵素はいずれも short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily に属するものであり、*Saccharophagus degradans* 2-40^{T} 株 [57] や *Zobellia galactanivorans* DsijT 株 [58] においても同様の酵素の存在が報告されている。また、これらとは異なるファミリーに属する DEH 還元酵素として、aldo-keto reductase (AKR) superfamily に属するエゾアワビ (*Haliotis discus hannai*) の HdRed [59] と 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase (HIBDH) superfamily に属する *Vibrio splendidus* 12B01 株の VsRed-2 [60] が報告されている。KDG は、グルコースやグルクロン酸の代謝過程においても生じる中間代謝物であり、Entner-Doudoroff 経路により KDG リン酸化酵素 (KDG キナーゼ) および KDPG 開裂酵素 (KDPG アルドラーゼ) の作用を受けて最終的にピルビン酸と GAP に変換されることが知られており、アルギン酸資化生物においても DEH の還元によって生じた KDG は Entner-Doudoroff 経路で代謝されると考えられている [28,30,55–58]。しかしながら、アルギン酸の分解からピルビン酸の生成に至る経路に関わる全酵素を精製し、それらの生化学的特性を明らかにした例は無い。

ところで、本研究室ではエゾアワビ (*H. discus hannai*) が細菌の Entner-Doudoroff 経路を介さずにアルギン酸を代謝することを明らかにした。これまでに得られた知見によれば、エゾアワビは、摂餌した褐藻に含まれるアルギン酸を胃液中の M ブロック特異的エンド型 PL-14 アルギン酸リアーゼ HdAly[61] およびエキソ型 PL-14 アルギン酸リアーゼ HdAlex[62] により DEH と不飽和オリゴ糖に分解し、これらを肝膵臓細胞内に輸送する。次いで、DEH を AKR superfamily に属する DEH 還元酵素 HdRed[59] により KDG に還元す

る。また、トランスクリプトーム解析により、この KDG は Entner-Doudoroff 経路ではなく、古細菌由来 KDG アルドラーゼに類似の酵素 HdAld により、ピルビン酸とグリセルアルデヒドに分解されることが明らかにされた[63]。このことは、エゾアワビに KDG のリン酸化を経由しない新たなアルギン酸代謝経路が存在することを示唆している。他の藻食性腹足類では、アメフラシ (*Aplysia kurodai*) およびタマキビガイ (*Littorina brevicula*) からそれぞれ 3 種 (AkAly28[64]、AkAly30[65]、および AkAly33[64]) および 1 種 (LbAly28[66]) のエンド型 PL-14 アルギン酸リアーゼを単離されている。しかしながら、DEH 代謝関連酵素に関する研究報告は DEH 還元酵素 HdRed [59] と HdAld [63] に限られており、同様のアルギン酸代謝経路が他種の腹足類にも共通して存在するかどうかは未だ不明である。

これらアルギン酸分解・代謝関連酵素の中でも、アルギン酸リアーゼに関する知見は最も充実しており、産業や農学分野における利用が期待されている。例えば、アルギン酸リアーゼの作用によって生じる不飽和オリゴ糖は種々の生理活性を示す他 [17–24]、食品の特性向上に資すること [67] およびバイオ燃料の発酵源となること [7] が報告されている。アルギン酸リアーゼの産業用酵素としての大規模利用には、比活性や熱安定性に優れた酵素の探索や、酵素の高収率生産技術の開発が必要とされるであろう。また、アルギン酸リアーゼは、褐藻の品種改良や遺伝子改変などで必要となるプロトプラストの作出にも有用である。その際、褐藻細胞壁に含まれるアルギン酸の分解除去には、好塩性もしくは塩耐性の酵素が必要となる。Sawabe らは、海洋細菌 *Alteromonas* sp. H-4 株由来の好塩性アルギン酸リアーゼ [68,69] と市販のセルラーゼを高浸透圧条件下で *Saccharina japonica* (*Laminaria japonica*) に作用させることで、生存率の高いプロトプラストの効率的生産に成功した [70,71]。これらのアルギン酸リアーゼと共に、近年では他のアルギン酸代謝関連酵素にも関心が寄せられており、それらにより生産されるアルギン酸代謝物には様々な有用性が見出されつつある。すなわち、Entner-Doudoroff 経路の中間代謝物である KDG や KDPG は抗生物質、抗ウイルス剤、およびその他医薬品のリード化合物として [72]、その最終生成物であるピルビン酸は農薬、ポリマー製品、化粧品、および食品添加物として [73] 利用されることが期待されている。

フラボバクテリアのアルギン酸分解および代謝系の研究意義

現在、細菌のアルギン酸資化機構に関する知見は徐々に蓄積しつつあるが、それらは主にプロテオバクテリアを対象にした研究であり、バクテロイデスのアルギン酸分解・代謝関連酵素の生化学的特性に関する知見は未だ乏しい。バクテロイデスの中でもフラボバクテリア綱の細菌では、アルギン酸分解・代謝関連遺伝子の構造やそれらの発現機構が詳細に調べられてきた。*Gramella forsetii* では、アルギン酸の分解、代謝、および輸送に関与する酵素をコードする各遺伝子がゲノム上で一つの大きなクラスターを形成しており、同クラスター内の遺伝子の発現はアルギン酸の有無により

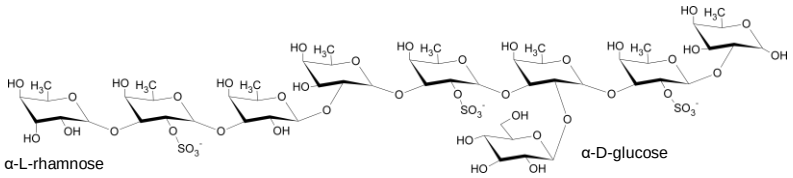
一律に制御される[74]。このような遺伝子クラスターは、*Zobellia galactanivorans* や他のアルギン酸資化性フラボバクテリアにも共通して存在しているが、プロテオバクテリアやフラボバクテリア以外のバクテロイデスにはみられない[58]。すなわち、フラボバクテリアは他の細菌と比較して、アルギン酸の資化利用に関連する各タンパク質を予測するのに適した遺伝子構造をもつと考えられる。

本研究室では、小樽市沿岸部で採集された腐敗スギモクからアルギン酸資化性フラボバクテリア *Flavobacterium* sp. UMI-01 株を単離した。また、本菌の無細胞抽出液がアルギン酸を DEH にまで完全に分解することを確認した。さらに、本菌の無細胞抽出液からエンド型の PL-7 アルギン酸リアーゼ FlAlyA[75] およびエキソ型の PL-6 アルギン酸リアーゼ FlAlex[76] がそれぞれ単離され、それらの一次構造や酵素性状の解析が行われた。しかしながら、これらの酵素をアルギン酸に作用させるとアルギン酸の一部から DEH が生じることは確認できたが、アルギン酸は完全には分解されなかった。これは、本菌でのアルギン酸の完全分解には、FlAlyA と FlAlex だけでなくそれ以外のアルギン酸リアーゼの関与も必要とする可能性を示している。また、UMI-01 株はアルギン酸を唯一炭素源として生育可能なことから、DEH を完全に代謝し炭素源として利用するための代謝経路をもつと考えられた。さらに、本菌はフラボバクテリア網に属するため、FlAlyA および FlAlex をコードする遺伝子の周辺にはアルギン酸の分解および代謝を担う一連の酵素群の候補遺伝子が存在する可能性があった。これらのことは、UMI-01 株がアルギン酸の完全分解機構とアルギン酸分解物の完全代謝機構を解明するための好材料であることを示している。

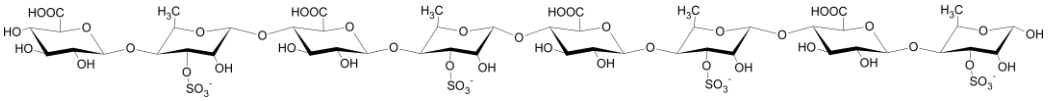
そこで本研究では、UMI-01 株のアルギン酸代謝プロセスにおけるアルギン酸分解反応と DEH 代謝反応に関する遺伝子を特定し、それらの遺伝子を用いて生産した組換え酵素の機能を *in vitro* で解析することにより、アルギン酸の分解・代謝機構を解明することとした。すなわち、先ず本菌のゲノム解析により、アルギン酸の分解および代謝に関わる酵素 (アルギン酸リアーゼ、DEH 還元酵素、KDG リン酸化酵素、および KDPG 開裂酵素) を特定し、それらの組換えタンパク質を調製した。次いで、それらの酵素特性および反応生成物を調べ、最終的に複数の組換え酵素により構築した *in vitro* の反応系でアルギン酸の分解および代謝過程が再現できるかどうかを検討した。それにより、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株のアルギン酸資化機構の全容を明らかにし、さらにその代謝経路の生理学的意義についても考察することとした。

Green algae

Rhamnan sulfate

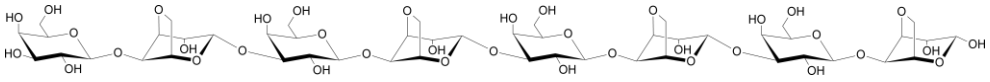


Ulvan

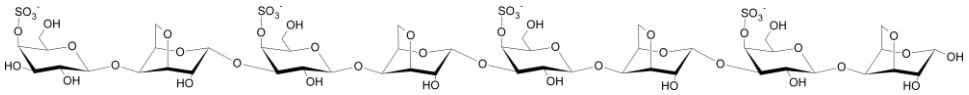


Red algae

Agar (Agarose)

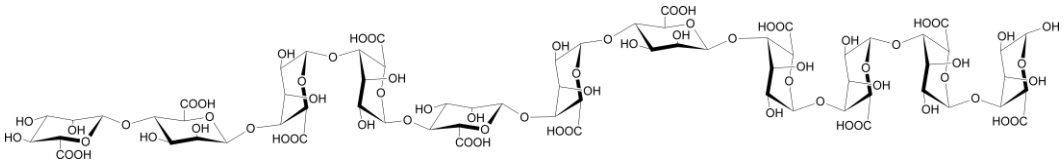


Carrageenan

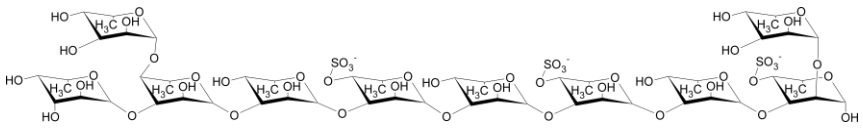


Brown algae

Alginate



Fucoidan



Laminarin

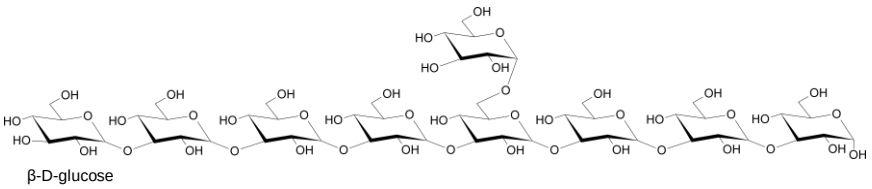


Figure 1. Chemical structures of algal polysaccharides[3].

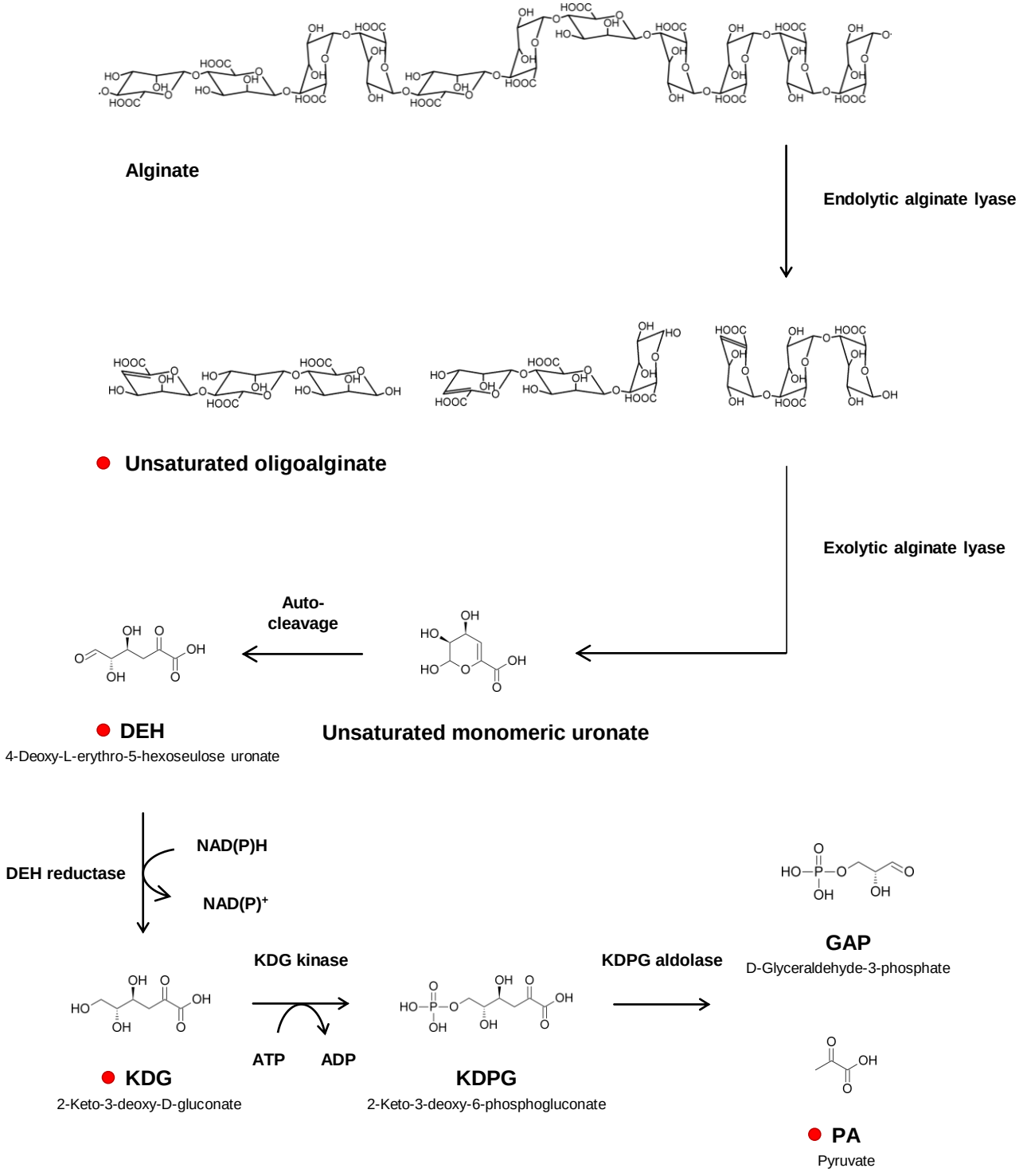


Figure 2. Predicted alginate-metabolic pathway in the alginate-assimilating *Pseudomonas* species[28,30].

This pathway was predicted by Preiss and Ashwell based on the enzymatic activities and their metabolites. Red circle indicate alginate metabolites identified in *Pseudomonas* sp.

第 1 章　*Flavobacterium* sp. UMI-01 株のアルギン酸分解・代謝経路の解明

第 1 項　目的

アルギン酸資化細菌では、アルギン酸は先ずエンド型およびエキソ型のアルギン酸リアーゼの協働作用により単糖 (DEH) レベルまで完全に分解され、生じた DEH は DEH 還元酵素の作用により NAD(P)H 存在下で KDG に還元される。この KDG は Entner-Doudoroff 経路に導入され、KDG リン酸化酵素および KDPG 開裂酵素の作用により最終的にピルビン酸と GAP にまで代謝されると推定されている[28,30]。本研究室で腐敗褐藻 (スギモク) より単離された *Flavobacterium* sp. UMI-01 株は、アルギン酸を唯一炭素源として生育可能なアルギン酸資化細菌であり、その無細胞抽出液中からエンド型アルギン酸リアーゼ FlAlyA[75] およびエキソ型アルギン酸リアーゼ FlAlex[76] が単離されている。これら 2 種類の酵素をアルギン酸に作用させると DEH を生じたが、不飽和オリゴ糖の残存がみられ、アルギン酸は完全には分解されなかった。このことは、本菌のアルギン酸の完全分解には、FlAlyA と FlAlex 以外のアルギン酸リアーゼが関与する可能性を示している。そこで、DEH 生成に寄与する他のアルギン酸リアーゼの存在を調べるために、本菌のドラフトゲノム配列を得て、アルギン酸リアーゼ候補遺伝子の探索を行った。また、アルギン酸の完全分解により生じた最終分解物の DEH がピルビン酸に変換されるまでの過程に関わる酵素の候補遺伝子についても探索した。その結果、FlAlyA と FlAlex に加えて、新たに 2 種類のアルギン酸リアーゼ (FlAlyB および FlAlyC) の遺伝子が見出され、さらに DEH の代謝に関与すると推定される DEH 還元酵素 FlRed、KDG リン酸化酵素 FlKin、および KDPG 開裂酵素 FlAld の遺伝子も見出された。

本章では、この新たに見出されたアルギン酸リアーゼ FlAlyB および FlAlyC、DEH 代謝関連酵素 FlRed、FlKin、および FlAld の生化学的特性を調べ、それらの結果に基づき、本菌におけるアルギン酸分解・代謝機構の全体像を明らかにすることとした。

第 2 項　実験手法

1. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株のドラフトゲノム解析

1.1. ドラフトゲノム配列の取得

Flavobacterium sp. UMI-01 株ゲノム塩基配列は、Illumina HiSeq 2500 (Illumina 社) により解析した。断片的に決定された塩基配列は、Velvet (https://www.ebi.ac.uk/~zerbino/velvet/) によりアセンブリし、199~716,048 bp から構成される 82 の Contig 配列を得た。得られたドラフトゲノム配列は、ゲノムアノテーションパイプライン MiGAP (http://www.migap.org/) により解析した。

1.2. アルギン酸分解・代謝関連酵素遺伝子の探索

Flavobacterium sp. UMI-01 株のアルギン酸分解・代謝関連酵素遺伝子は、BLAST+ (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast+/LATEST/) を用いて検索した。すなわち、データベース配列として *Flavobacterium* sp. UMI-01 株ドラフトゲノム配列、クエリー配列として *P. aeruginosa* 由来 PL-5 アルギン酸リアーゼ (GenBank accession number, WP_023657104)[77]、*Strenotrophomonas maltophili* 由来 PL-6 アルギン酸リアーゼ (GenBank accession number, AFC88009)[78]、*Sphingomonas* sp. A1 株由来 PL-7 アルギン酸リアーゼ A1-II’(GenBank accession number, BAD16656)[79]、*H. discus hannai* 由来 PL-14 アルギン酸リアーゼ HdAly (GenBank accession number, BAC87758)[61]、*Agrobacterium tumefaciens* 由来 PL-15 アルギン酸リアーゼ Atu3025 (GenBank accession number, WP_010972694)[80]、*S. degradans* 2-40^{T} 由来 PL-17 アルギン酸リアーゼ Alg17C (GenBank accession number, WP_011469755)[81]、*Pseudoalteromonas* sp. SM0524 由来 PL-18 アルギン酸リアーゼ (GenBank accession number, ACB87607)[82]、*Sphingomonas* sp. A1 株由来 DEH 還元酵素 A1-R’(GenBank accession number, BAP40335)[56]、*Sulfolobus solfataricus* 由来 KDG リン酸化酵素 (GenBank accession number, WP_009991690)[83]、および *E. coli* 由来 KDPG 開裂酵素 (GenBank accession number, WP_000800517)[84] を用いて BLAST+検索を行った。

なお、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株に見出された各アルギン酸分解・代謝関連遺伝子の分泌シグナル配列の有無は、SignalP 3.0 server (http://www.cbs.dtu.dk.services/SignalP-3.0/) により調べた。

1.3. KDG リン酸化酵素および KDPG 開裂酵素の分子系統解析

KDG リン酸化酵素および KDPG 開裂酵素の分子系統樹は、プロテオバクテリア、バクテロイデス、およびアーキア由来の各酵素のアミノ酸配列に基づいて作成した。なお、バクテロイデス由来の同酵素は未報告であるため、本解析では、*Gramella forsetii* KT0803 株、*Lacinutrix* sp. 5H-3-7-4 株、および *Dokdonia* sp. MED134 株のアルギン酸代謝関連遺伝子クラスター内に見出された候補遺伝子の演繹アミノ酸配列を使用した。各酵素のアミノ酸配列は、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株に見出された KDG リン酸化酵素 (FlKin) および KDPG 開裂酵素 (FlAld) と共に ClustalW プログラム (http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp) を用いて解析した。次いで、GBlocks server (http://molevol.cmima.csic.es/catresana/Gblocks_server.html) によりアライメントを編集した後、LG モデルに基づく最尤推定法により系統樹を作成した。なお、分子系統樹の作成には、Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 10 (MEGAX) (http://evolgen.biol.se.tmu.ac.jp/MEGA/) を使用した。

2. 組換えアルギン酸リアーゼおよび組換え DEH 代謝関連酵素の大腸菌発現および精製

2.1. 培地および試薬の調製

2.1.1. MS 液体培地

MS (minimal salt) 液体培地は、Na_2HPO_4、KH_2PO_4、NH_4Cl、および $MgCl_2 \cdot 5H_2O$ をそれぞれ 0.36% (*w/v*)、0.075% (*w/v*)、0.05% (*w/v*)、および 0.02% (*w/v*) となるように蒸留水に溶解し、1/10,000（*v/v*）量の Trace element 溶液 ($FeCl_3$、$CaCl_2$、$CoCl_2 \cdot 6H_2O$、$CuSO_4 \cdot 5H_2O$、$NiCl_3 \cdot 6H_2O$、および $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ をそれぞれ 0.93% (*w/v*)、0.78% (*w/v*)、0.022% (*w/v*)、0.016% (*w/v*)、0.012% (*w/v*)、および 0.011% (*w/v*) となるように 0.1 M HCl に溶解した溶液) を加えた後、121ºC で 20 分間オートクレーブすることにより調製した。

2.1.2. LB 培地・2×YT 培地

LB 培地は、Bacto Tryptone、Bacto Yeast Extract、および NaCl をそれぞれ 1% (*w/v*)、0.5% (*w/v*)、および 0.5% (*w/v*) となるように蒸留水に溶解し、121ºC で 20 分間オートクレーブすることにより調製した。また、２×YT 培地は、Bacto Tryptone、Bacto Yeast Extract、および NaCl をそれぞれ 1.6% (*w/v*)、1% (*w/v*)、および 0.5% (*w/v*) となるように蒸留水に溶解し、121ºC で 20 分間オートクレーブすることにより調製した。なお、これらの培地には、必要に応じて終濃度が 50 μg/mL となるようにアンピシリンナトリウムを加えた。

2.1.3. 10×TE バッファー

10×TE バッファーは、Tris および EDTA をそれぞれ 100 mM および 10 mM となるように蒸留水に溶解し、2 M HCl を用いて pH 8.0 に合わせることにより調製した。

2.1.4. 50×TAE バッファー

50×TAE バッファーは、Tris、酢酸、および EDTA をそれぞれ 5 M、1 M、および 50 mM となるように蒸留水に溶解することにより調製した。アガロースゲル電気泳動を行う際は、これを蒸留水で 50 倍に希釈して使用した。

2.1.5. TE 飽和フェノール

50 mL のフェノールと 50 mL の 10×TE バッファーを混合し、静置した後、水層を除去した。この操作を 3 回繰り返し、最後に 50 mL の 10×TE バッファーと混合して得たフェノール層を TE 飽和フェノールとして使用した。なお、この溶液は、酸化防止剤として 0.1% (*w/v*) ヒドロキシキノンを加えた後、4ºC で遮光保存した。

2.1.6. フェノール・クロロホルム

フェノール・クロロホルムは、TE 飽和フェノールとクロロホルムを等量ずつ混合することにより調製した。

2.2. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株由来ゲノム DNA の抽出

Flavobacterium sp. UMI-01 株由来ゲノム DNA の抽出には、ISOHAIR DNA extraction kit (Nippon Gene) を使用した。すなわち、1% (*w/v*) アルギン酸ナトリウムを含む MS 液体培地で生育した *Flavobacterium* sp. UMI-01 株の菌体をピペットチップの先端で 1.5 mL チューブに少量移し、そこに 200 μL の Extraction buffer (1% SDS を含む)、5 μL の Enzyme solution (Proteinase K を含む) および 8 μL の 1 M DTT を加え、55ºC で 20 分間インキュベートすることにより、菌体から DNA を抽出した。次いで、タンパク質を除去するため、200 μL のフェノール・クロロホルムを加え、5 分間混和した後、遠心分離により核酸を含む水層を回収した。菌体から抽出した DNA は、得られた水層に 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム、1/100 量の Ethachinmate (アクリルアミドポリマーを含む沈殿補助剤)、および 2 倍量の 100%エタノールを加えることにより沈殿させ、ピペットチップの先端で回収した。回収した DNA は、70%エタノールにより洗浄した後、37ºC で 30 分間インキュベートすることにより、残存するエタノールを揮発させた。RNA を除去するため、得られた DNA を 200 μL の 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解し、そこに 2 μL の 10 mg/mL RNase A (15 mM NaCl および 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) を含む) を加えた後、37ºC で 1 時間インキュベートした。その後、等量のフェノール・クロロホルムで処理することにより溶液中の RNase A を除去し、上記と同様の方法で DNA のエタノール沈殿を行った。得られた DNA は、200 μL の蒸留水に溶解し、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株ゲノム DNA 溶液として使用した。なお、この操作により約 10 μg の DNA が得られた。

2.3. アルギン酸分解・代謝関連酵素遺伝子の PCR による増幅

各酵素をコードする遺伝子領域は、Table 1 に示す特異プライマーを用いた Genomic PCR により増幅した。すなわち、Premix Taq™ (Ex Taq™ Version 2.0, Takara) を DNA ポリメラーゼとして用いて、5 ng の *Flavobacterium* sp. UMI-01 株由来ゲノム DNA および 0.2 μM のプライマーセットを含む 50 μL の反応混液中で、98ºC で 10 秒間、50ºC で 30 秒間、および 72ºC で 60-150 秒間の反応サイクルを 30 回繰り返すことにより PCR を行った。各 PCR 産物は、1×TAE バッファーを用いた 1% (*w/v*) アガロースゲル電気泳動で分離した後、エチジウムブロマイドにより染色することでその増幅を確認した。

2.4. PCR 産物の精製

各 PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供した後、目的のバンドを含むゲル片を切り出し、それを細かく破砕した。ここに TE 飽和フェノールを加え、凍結融解することにより DNA を抽出し、遠心分離により DNA を含む水層を回収した。水層に残存するフェノールは、クロロホルム処理により除去した。1-ブタノールにより水層を濃縮後、1/2 量の 3 M 酢酸アンモニウムおよび 2.5 倍量の 100%エタノールを加え、-20°C で 2 時間静置することにより DNA を沈殿させた。沈殿した DNA は、遠心分離により回収し、70%エタノールによる洗浄および風乾を行った後、蒸留水に溶解した。

2.5. 増幅遺伝子のライゲーションおよび大腸菌の形質転換

精製した各 PCR 産物は、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech Laboratories) を用いて pCold ベクター (Takara 社で販売されている pCold I ベクターを、C 末端に His-tag が付加されるように当研究室で改変したもの) にライゲーションした。すなわち、*Nco*I および *Bam*HI 消化により線状化した pCold ベクター、精製した各 PCR 産物、および 5×In Fusion HD Enzyme Premix を混合し、50°C で 15 分間酵素反応を行った後、9 倍量の蒸留水を加え、氷上で急冷することにより反応を停止させた。

次いで、50 μL の *E. coli* DH5α 株コンピテントセルと 5 μL の上記反応液を混合し、氷上で 30 分間静置後、42°C で 90 秒間および氷上で 2 分間インキュベートすることにより *E. coli* DH5α 株を形質転換した。そこに 1 mL の LB 培地を加え、37°C で 1 時間インキュベート後、アンピシリンを含む LB 寒天培地に塗布し、37°C で一晩培養した。

2.6. プラスミドの抽出および精製

LB 寒天培地上で培養した *E. coli* DH5α 株形質転換体から単一のコロニーを釣菌し、アンピシリンを含む 1.8 mL の 2×YT 培地に植菌後、37°C で 12 時間培養した。遠心分離により菌体を回収し、200 μL の滅菌水に懸濁した。次いで、300 μL の 0.2 M NaOH－1% (*w/v*) SDS を加え、穏やかに転倒混和後、400 μL の 5 M 酢酸カリウムおよび 20 μL のクロロホルムを加えた。遠心分離により得られた水層に、等量の 100%エタノールを加えることによりプラスミド DNA を沈殿させ、70%エタノールによる洗浄および風乾を行ったものを 100 μL の蒸留水に溶解した。

得られた粗プラスミド溶液は、実験手法 2.2.に記した方法により RNase A 処理を行った。その反応液に 1/10 量の 5 M NaCl および 2.5 倍量の 100%エタノール加え、-20°C で 30 分間静置することでプラスミド DNA を沈殿させた。70%エタノールによる洗浄および風乾の後、20 μL の蒸留水に溶解したものを精製プラスミド DNA 溶液として用いた。

2.7. 組換えタンパク質の発現および精製

各組換えタンパク質は、*E. coli* BL21 (DE3) 株を宿主として生産した。*E. coli* BL21 (DE3) 株は、実験手法 2.5.に記した方法により形質転換し、得られた組換え大腸菌の単一コロニーをアンピシリンを含む 2×YT 培地に植菌後、37ºC で 16 時間培養した。タンパク質の発現誘導を促すため、培養液を 15ºC で 30 分間インキュベートした後、終濃度で 0.1 mM となるように IPTG を加え、15ºC で 24 時間インキュベートした。遠心分離により菌体を回収し、それを 80 mL の 10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) に懸濁後、-80ºC で凍結処理および 4ºC で融解処理を行った。そこにイミダゾール-HCl (pH 8.0)、Triton X-100、卵白リゾチームをそれぞれ終濃度で 10 mM、1% (*v/v*)、および 0.5 mg/mL となるように加え、4ºC で 1 時間インキュベートした。その後、超音波処理により菌体を破砕し、終濃度で 0.5 M となるように NaCl を加えた後、遠心分離により不溶性タンパク質を除去した。

各組換え酵素は、アフィニティークロマトグラフィーにより以下の方法で精製した。得られた上清と Ni-NTA agarose (Qiagen) を混合し、30 分間穏やかに混合することにより His-tag が付加された組換えタンパク質を担体に吸着させた。遠心分離により担体を回収し、30 mM イミダゾール-HCl (pH 8.0)－0.5 M NaCl および 30 mM イミダゾール-HCl (pH 8.0)－0.1 M NaCl により順次洗浄した後、250 mM イミダゾール-HCl (pH 8.0)－0.1 M NaCl により組換えタンパク質を溶出させた。各組換えタンパク質は、10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4)－0.1 M NaCl で透析した後に使用した。

2.8. タンパク質の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

2.8.1. ローディングバッファー

ローディングバッファーは、グリセロール、BPB、2-メルカプトエタノール、SDS、および Tris-HCl (pH 6.8) をそれぞれ終濃度で 35% (*v/v*)、0.01% (*w/v*)、10% (*v/v*)、5.5% (*w/v*)、および 0.36 M となるように混合することで調製した。SDS-PAGE の際は、タンパク質試料と本溶液を 2:1 の割合で混合したものを泳動用試料として使用した。

2.8.2. 電気泳動用バッファー

電気泳動用のランニングバッファーは、Tris、グリシン、および SDS をそれぞれ終濃度で 3.0 g/L、14.4 g/L、および 1.0 g/L となるように蒸留水に溶解することで調製した。

2.8.3. ポリアクリルアミドゲルの作製

分離ゲル (10%ポリアクリルアミドゲル) は、30% (*w/v*) ポリアクリルアミド－0.8% (*w/v*) N,N'-メチレンビスアクリルアミド、1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)、蒸留水、10% (*w/v*) SDS、および 14% (*w/v*) APS をそ

れぞれ 2 mL、1.5 mL、2.4 mL、60 μL、および 30 μL ずつ混合した後、10 μL の TEMED を加えて重合させることにより作製した。

濃縮ゲルは、30% (*w/v*) ポリアクリルアミド－0.8% (*w/v*) N,N'-メチレンビスアクリルアミド、1.0 M Tris-HCl (pH 6.8)、蒸留水、10% (*w/v*) SDS、および 14% (*w/v*) APS をそれぞれ 300 μL、300 μL、1.4 mL、20 μL、および 10 μL ずつ混合した後、10 μL の TEMED を加えて重合させることにより作製した。

2.8.4. 電気泳動ゲルの CBB 染色および脱色

SDS-PAGE により分離されたタンパク質は、0.1% (*w/v*) Coomassie Briliant Blue (CBB)-R250－50% (*v/v*) メタノール－10% (*v/v*) 酢酸により染色した。また、染色したゲルのタンパク質非存在部位は、5% (*v/v*) メタノール－7% (*v/v*) 酢酸により脱色した。

2.8.5. ウエスタンブロッティング

アフィニティークロマトグラフィーにより得られたタンパク質が目的の組換え酵素であるかどうかを確認するために、以下の方法によりウエスタンブロッティングを行った。SDS-PAGE によりタンパク質を分離後、そのゲルを 50 mL の 25 mM Tris－192 mM グリシン－20% (*v/v*) メタノールで 20 分間平衡化した。次いで、泳動装置上に同溶液で平衡化した濾紙を 3 枚重ね、さらにゲルと同等の大きさのニトロセルロース膜を重ねた。その上に平衡化したゲルを載せ、再び濾紙を 3 枚重ねた。5 mM/cm^2 で 120 分間通電後、タンパク質が転写されたニトロセルロース膜を、TTBS バッファー (Tris、NaCl、および KCl をそれぞれ終濃度で 50 mM、138 mM、および 2.7 mM となるように蒸留水に溶解した後、HCl を用いて pH 7.4 に調整した TBS バッファーに、終濃度で 0.05% (*w/v*) となるように Tween 20 を溶解したもの) および TBA バッファーでそれぞれ 3 回ずつ順次洗浄した後、そこに TBS バッファー、5% (*w/v*) スキムミルク、および Horse Radish Peroxidase Anti-His tag HRP-DirecT (MBL) をそれぞれ 400 μL、100 μL、および 0.5 μL ずつ混合した溶液を滴下し、拡散させた。室温で一晩静置した後、TTBS バッファーおよび TBS バッファーでそれぞれ 3 回ずつ順次洗浄した。最後に、Western BLoT Quant Luminol/Enhancer Solution および Western BLoT Quant Peroxide Reagent (Takara) をそれぞれ 250 μL ずつ混合した溶液を膜状に滴下し、Ez-capture MG (ATTO) を用いて、抗 His-tag 抗体と基質の反応により生じる発光を検出した。

2.9. タンパク質の定量

2.9.1. ビウレット法

3.0 g のロッシェル塩および 0.75 g の $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ を別々に 125 mL の蒸留水に溶解させた。これらを混合した後、150 mL の 10% (*w/v*) NaOH 溶液を加え、蒸留水で容量を 500 mL に調整したものをビウ

レット試薬として使用した。

タンパク質の定量には、200 μL の試料と 800 μL のビウレット試薬を混合し、30ºC で 30 分間インキュベート後、540 nm における吸光度を測定した。なお、標準タンパク質には牛血清アルブミン (BSA、fraction V) を用いた。

2.9.2. ローリー法

1% (*w*/*v*) $CuSO_4$・$5H_2O$ および 2% (*w*/*v*) ロッシェル塩を等量ずつ混合し、そこに 50 倍量の 2% (*w*/*v*) Na_2CO_3－0.1 M NaOH を加えた溶液をローリー試薬として使用した。この試薬は、必要に応じて適宜調製した。

タンパク質の定量には、160 μL の試料と 800 μL のローリー試薬を混合し、30ºC で 30 分間インキュベート後、80 μL の 2 倍希釈したフェノール試薬 (富士フィルム和光純薬) を加え、再び 30ºC で 30 分間インキュベートし、750 nm における吸光度を測定した。なお、標準タンパク質には牛血清アルブミン (BSA、fraction V) を用いた。本方法は、0.2 mg/mL 以下のタンパク質濃度の定量に用いた。

2.9.3. デンシトメトリー法

試料および標準タンパク質として既知量の BSA を SDS-PAGE により分離後、CBB 染色および脱色を行った。スキャナによりゲルを画像ファイルとして取り込み、Image J (http://rsbweb.nih.gov/ij/) を用いて、各タンパク質バンドの染色強度を標準タンパク質の染色強度と比較することで、タンパク質濃度を算出した。

3. 組換えアルギン酸リアーゼの機能解析

3.1. 糖の定量

3.1.1. フェノール硫酸法

全糖はフェノール硫酸法により以下の通り定量した。1 mL の 5% (*v*/*v*) フェノールおよび 20 μL の試料を混合した後、2.5 mL の濃硫酸を加え、速やかに撹拌した。この混合液を 30ºC で 30 分間インキュベートした後、490 nm における吸光度を測定した。なお、標準物質には、試料の糖と同等あるいは類似の構造をもつ市販の単糖もしくは多糖を用いた。

3.1.2. カルバゾール硫酸法

ウロン酸はカルバゾール硫酸法により以下の通り定量した。0.5 mL の蒸留水、20 μL の試料、および 2.5 mL の濃硫酸を混合し、100ºC で 10 分間加熱した。この混合液を水道水で冷却後、100 μL の

0.125% (*w/v*) カルバゾール (エタノールに溶解) を加え、再び 100ºC で 15 分間加熱した。水道水により冷却後、540 nm における吸光度を測定した。なお、標準物質には、市販のアルギン酸ナトリウムあるいは試料の糖に類似した構造をもつ単糖を用いた。

3.1.3. チオバルビツール酸法

不飽和糖はチオバルビツール酸 (TBA) 法により以下の通り定量した。75 μL の 5.4 g/L 過ヨウ素酸ナトリウム－0.125 M H_2SO_4 と 60 μL の試料を混合し、氷上で 30 分間インキュベートすることにより不飽和糖の酸化を行った。次いで、150 μL の 2% (*w/v*) 亜ヒ酸ナトリウム－0.5 M HCl を加え、10 分間静置することにより余剰の過ヨウ素酸を除去した。最後に、600 μL の 0.3% (*w/v*) TBA を加え、100ºC で 10 分間インキュベートした後、548 nm における吸光度を測定した。なお、アルギン酸分解物の不飽和糖から過ヨウ素酸酸化により生じた β-ホルミルピルビン酸は、TBA 法により発色させた場合のモル吸光係数が ε=29.0×10^3 (M^{-1}・cm^{-1}) [42] であると報告されている。そこで、TBA 法によるアルギン酸リアーゼ分解物の定量と分解活性の測定には、この数値を用いることとした (実験手法 3.3.1 参照)。

3.2. 基質の調製

polyM、polyG、および polyMG は、アルギン酸ナトリウム (富士フィルム和光純薬製、300-400 cP) を用いて Gacesa らの方法 [85] により調製した。すなわち、50 g のアルギン酸ナトリウムを 1 L の 0.3 M HCl に懸濁し、100ºC で 20 分間加熱することにより限定加水分解した。遠心分離により得られた上清に含まれる polyMG は、2 M NaOH を用いて pH 7.0 に調整後、終濃度で 60% (*v/v*) となるようにエタノールを加えて沈殿させた。一方、遠心分離により得られた沈殿は、再び 1 L の 0.3 M HCl に懸濁し、さらに 100ºC で 24 時間加水分解した。遠心分離により得られた沈殿は、500 mL の蒸留水に懸濁し、2 M NaOH を加えることにより溶解した。次いで、1 M HCl を用いて溶液を pH 2.85 に調整し、遠心分離により上清 (polyM) と沈殿 (polyG) に分けた。上清に含まれる polyM は、0.1 M Na_2CO_3 で pH 7.0 に調整後、終濃度で 60% (*v/v*) となるようにエタノールを加えて沈殿させた。また、沈殿に含まれる polyG は 10 mM Na_2CO_3 に溶解後、終濃度で 60% (*v/v*) となるようにエタノールを加えて沈殿させた。エタノール沈殿により得られた polyM、polyG、および polyMG をそれぞれ蒸留水に溶解し、蒸留水で透析したものを酵素反応の基質として使用した。各溶液のウロン酸濃度は、アルギン酸ナトリウムを標準物質として用いたカルバゾール硫酸法により定量した。

3.3. アルギン酸リアーゼ活性の測定

3.3.1 酵素活性の測定方法

大腸菌発現系により生産した組換えアルギン酸リアーゼの酵素活性は、リアーゼ反応により生じた不飽和糖を TBA 法 (実験手法 3.1.3.) で定量することにより調べた。酵素単位 1 unit (U) は、1 分間に 1 μmol の β-ホルミルピルビン酸 (ε=29.0×10^3 (M^{-1}・cm^{-1}))[42] を生成する酵素量と定義した。

また、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株の無細胞抽出液のアルギン酸リアーゼ活性は、不飽和糖の生成に起因する 235 nm の吸光度の上昇を測定することにより調べた。1 U は、1 分間に 235 nm における吸光度を 0.01 上昇させる酵素量と定義した。

3.3.2. 組換えアルギン酸リアーゼの活性評価

組換え FlAlyA (recFlAlyA) の活性は、特記しない限り 0.1% (*w/v*) アルギン酸ナトリウム、10 mM リン酸ナトリウム (pH 8.0)、100 mM NaCl、0.1 mg/mL BSA、および 0.1 μg/mL recFlAlyA を含む 30ºC の反応混液中で TBA 法により測定した。また、組換え FlAlex (recFlAlex) の活性は、特記しない限り 0.1% (*w/v*) polyG、10 mM リン酸ナトリウム (pH 6.5)、0.1 mg/mL BSA、および 10 μg/mL recFlAlex を含む 30ºC の反応混液中で TBA 法により測定した。

リアーゼ活性は、任意の時間間隔で酵素反応液を分取し、氷冷した過ヨウ素酸との混合によりそれらの反応を停止させた後、各時間における不飽和糖の生成量を測定することにより調べた。

3.4. 薄層クロマトグラフィー (TLC) によるアルギン酸分解物の解析

3.4.1. 試料の調製

酵素反応は、0.5% (*w/v*) アルギン酸ナトリウム、10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.0)、および 0.1 mg/mL BSA を含む反応混液に、recFlAlyA、組換え FlAlyB (recFlAlyB)、組換え FlAlyC (recFlAlyC)、および recFlAlex をそれぞれ終濃度で 10 μg/mL、1 μg/mL、1 μg/mL、および 10 μg/mL となるように様々な組み合わせで加えて、30ºC で 24 時間インキュベートすることにより行った。酵素反応は、100ºC で 3 分間加熱することにより停止させ、遠心分離により得られた上清を TLC の試料として用いた。

3.4.2. 展開溶媒

1-ブタノール、酢酸、および蒸留水をそれぞれ 2:1:1 (*v:v:v*) の割合で混合したものを TLC の展開溶媒として用いた。

3.4.3. アルギン酸分解物の検出方法

TLC により分離したアルギン酸分解物は、硫酸発色法もしくは TBA 発色法により検出した。すなわち、糖質全般の検出には 10% (*v/v*) 硫酸－90% (*v:v*) エタノールをプレートに噴霧後、130°C で 10 分間加熱することにより発色した。

一方、不飽和糖の検出には TBA 方法を用いた。すなわち、20 mM 過ヨウ素酸ナトリウム、50% (*v/v*) アセトン－50% (*v/v*) エチレングリコール－0.2% (*v/v*) 硫酸、および 4.5% (*w/v*) TBA をプレートに順次噴霧し、105°C で 5 分間加熱することにより発色した。

3.5. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるアルギン酸分解物の解析

3.5.1. 試料の調製

HPLC に供する試料は、実験手法 3.4.1.と同様の操作により調製した。なお、試料は　HPLC に負荷する前に Centrifuge Filter (Merck) を用いて濾過した。

3.5.2. 陰イオン交換クロマトグラフィーによる解析

酵素反応により生じた不飽和のアルギン酸オリゴ糖は、TSKgel DEAE-2SW (Tosoh) を用いて分離し、230 nm の吸光度を測定することにより検出した。本解析では、酵素反応物を蒸留水で平衡化した TSKgel DEAE-2SW に供し、カラムに吸着した不飽和オリゴ糖を 0-250 mM NaCl 直線濃度勾配 (計 40 mL) により溶出させた。各オリゴ糖の構造は、*Pseudoalteromonas* sp. 1786 株由来アルギン酸リアーゼが生成するアルギン酸分解物を同カラムで分離し、NMR により同定した結果 [86] を参照することにより決定した。

3.5.3. ゲル濾過クロマトグラフィーによる解析

酵素反応により生じた分解物の分子サイズは、Superdex peptide 10/300 GL (GE-Healthcare) を用いて解析した。本解析では、移動相として 100 mM 酢酸アンモニウムを使用し、溶出したアルギン酸不飽和オリゴ糖を 230 nm の吸光度を測定することにより検出した。

4. 組換え酵素を用いた DEH 代謝関連酵素の機能解析

4.1. DEH 還元酵素の活性評価

4.1.1. DEH の調製

DEH は、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株の無細胞抽出液を用いてアルギン酸ナトリウムを分解することにより調製した。UMI-01 株の無細胞抽出液は以下のように調製した。本菌を 1% (*w/v*) アルギン酸

ナトリウムを含む MS 培地中で OD_{600}=2.0 となるまで培養し、遠心分離により菌体を回収した。得られた菌体を 10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) に懸濁し、凍結融解および超音波処理により細胞を破砕した。遠心分離により沈殿を除去した後、10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) に透析したものを無細胞抽出液とした。

この無細胞抽出液によるアルギン酸の分解反応は、1% (*w/v*) アルギン酸ナトリウム、10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) 溶液に、 アルギン酸リアーゼの終濃度が 50 U/mL (アルギン酸リアーゼ濃度は紫外吸収法により測定) となるように無細胞抽出液を加え 30°C で 6 時間行った。酵素反応は、終濃度で 50 mM となるように酢酸を加えて停止した。氷上で 1 時間静置した後、不溶化したタンパク質を遠心分離により除去し、上清の pH を 2 M NaOH を用いて 6.0 に調整したものを粗 DEH 溶液とした。

DEH は、上記の粗 DEH 溶液を TOYOPEARL SuperQ-650S (2.4×22 cm) カラムクロマトグラフィーに供することで精製した。すなわち、粗 DEH 溶液を蒸留水により平衡化した TOYOPEARL SuperQ-650S カラムに供した後、カラムに吸着した化合物を 0-200 mM NaCl 直線濃度勾配 (計 500 mL) により溶出させた。溶出液は 20 mL ずつ分画し、得られた各フラクションに含まれる DEH は、TBA 法および TLC 解析により検出した。

4.1.2. DEH 還元活性の測定

DEH 還元酵素は、反応に補酵素として NADH もしくは NADPH を要求するため、DEH 還元活性は、これらの補酵素の酸化に伴う 340 nm の吸光度の減少を測定することにより調べた。なお、1 U は 1 分間に 1 μmol の NADH もしくは NADPH (ε=6.3×10^3 ($M^{-1}cm^{-1}$)) を消費する酵素量と定義した。

組換え DEH 還元酵素 (recFlRed) の活性は、特記しない限り 2.5 mM DEH、10 mM リン酸カリウム (pH 7.4)、100 mM KCl、0.2 mM NADH、および 2.5 μg/mL recFlRed を含む反応混液中、25°C で測定した。

4.1.3. TLC による DEH 還元生成物の解析

DEH の還元は、10 mM DEH、10 mM NADH、10 mM リン酸カリウム (pH 7.4)、100 mM KCl、および 2.5 μg/mL recFlRed を含む 25°C の反応混液中で 90 分間行った。100°C で 3 分間加熱することにより酵素反応を停止させ、遠心分離により得られた上清を TLC の試料として使用した。なお、試料の展開および発色は、実験手法 3.4. と同様の方法で行った。

4.1.4. 質量分析による酵素反応生成物の同定

質量分析は、前項の試料を用いて以下のように行った。アセトニトリルに溶解した 10 mg/mL の 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) と試料を 1:1 (*v:v*) で混合し、その 1 μL をサンプルプレートに負荷した後、ドライヤーにより乾燥させた。乾固させた試料は、Proteomics Analyzer 4700 (Applied Biosystems) MALDI-TOF-MS に供し、レーザーの照射により生成した質量範囲 50-500 (*m/z*) の陰イオンを解析した。

4.2. KDG リン酸化酵素の活性評価

4.2.1. KDG の調製

アルギン酸の分解および DEH の還元反応は、0.5% (*w/v*) アルギン酸ナトリウム、10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4)、10 mM NADH、およびアルギン酸リアーゼ活性 50 U/mL の無細胞抽出液を含む 30°C の反応混液中で 6 時間行った。終濃度で 80% (*v/v*) となるように 2-プロパノールを加え、-20°C で 1 時間静置することにより反応混液中に含まれるタンパク質および NADH を沈殿させた。遠心分離により得られた上清を減圧濃縮し、蒸留水に再溶解したものを粗 KDG 溶液として使用した。KDG は、粗 KDG 溶液を TOYOPEARL SuperQ-650S (2.4×22 cm) カラムクロマトグラフィーに供することにより精製した (実験手法 4.1.1.を参照)。

4.2.2. KDG リン酸化活性の測定

組換え KDG リン酸化酵素 (recFlKin) の活性は、KDG のリン酸化により生じた KDPG を本研究で調製した組換え KDPG 開裂酵素 (recFlAld) で開裂させ、生じたピルビン酸を乳酸脱水素酵素 (LDH、富士フィルム和光純薬工業) を用いて定量することにより調べた。なお、LDH は酵素反応に補酵素として NADH を要求するため、補酵素の酸化に伴う 340 nm における吸光度の減少を測定することにより、ピルビン酸を定量した。検量線を作成するための標準物質には、Sigma-Aldrich より購入した KDPG を用いた。なお、KDG キナーゼ活性 1 U は 1 分間に 1 μmol の KDPG を生成する酵素量と定義した。

recFlKin の活性は、特記しない限り 2.5 mM KDG、2.5 mM ATP、5 mM $MgCl_2$、20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、100 mM KCl、1 mM DTT、および 10 μg/mL recFlKin を含む反応混液中、30°C で調べた。任意の時間間隔で酵素反応液を 160 μL ずつ分取し、100°C で 3 分間加熱することにより反応を停止させた後、240 μL の 84 mM Tris-HCl (pH 7.4)、167 mM KCl、0.67 mM NADH、2.5 μg/mL recFlAld、および 1 U/mL LDH を含む溶液と混合し、30°C で 30 分間インキュベートした。各反応時間における KDPG の生成量は、反応混液を蒸留水で 2 倍に希釈した後、340 nm において NADH の吸光度の減少を測定することにより算出した。

4.2.3. TLC による酵素反応生成物の解析

recFlKin による KDG のリン酸化反応は、2.5 mM KDG、2.5 mM ATP、5 mM $MgCl_2$、20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、100 mM KCl、1 mM DTT、および 200 μg/mL recFlKin を含む 30°C の反応混液中で 15 分間行った。100°C で 3 分間加熱することにより酵素反応を停止させ、遠心分離により得られた上清を TLC の試料として使用した。なお、試料の展開および発色は、実験手法 3.4.と同様の方法で行った。

4.2.4. 質量分析による酵素反応生成物の解析

質量分析は、前項の試料を用いて以下のように行った。メタノールに溶解した 6.7 mg/mL 9-aminoacridine (9-AA) と試料を 3:1 の割合で混合し、その 1 μL をサンプルプレートに負荷した。乾固させた試料は、Proteomics Analyzer 4700 (Applied Biosystems) MALDI-TOF-MS に供し、レーザーの照射により生成した質量範囲 50-500 (*m/z*) の陰イオンを解析した。

4.3. KDPG 開裂酵素の活性評価

4.3.1. KDPG の調製

KDG のリン酸化反応は、2.5 mM KDG、2.5 mM ATP、5 mM $MgCl_2$、20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、 100 mM KCl、1 mM DTT、および 10 μg/mL recFlKin を含む 40°C の反応混液中で 3 時間行った。この反応混液は、凍結乾燥した後に蒸留水に溶解した。次いで、遠心分離により得られた上清を、蒸留水で平衡化した Superdex peptide 10/300 GL に供することで脱塩および ATP の除去を行った。溶出液は 0.5 mL ずつ分画し、得られた各フラクションに含まれる KDPG は、TLC 解析により検出した。KDPG を含む全てのフラクションは、凍結乾燥により濃縮した後、TSKgel DEAE-2SW に供した。カラムに吸着した化合物は、0-0.4 M 酢酸アンモニウム直線濃度勾配 (計 40 mL) により溶出させた。溶出液は 0.5 mL ずつ分画し、得られた各フラクションに含まれる KDPG は、TLC 解析により検出した。KDPG を含むフラクションは、凍結乾燥により酢酸アンモニウムを揮発させた後、蒸留水に再溶解して使用した。

4.3.2. KDPG 開裂活性の測定

recFlAld の KDPG 開裂活性は、KDPG の開裂反応により生じたピルビン酸を、反応系に共存する LDH により検出することで調べた。LDH は、酵素反応に補酵素として NADH を要求するため、NADH の酸化に伴う 340 nm における吸光度の減少を測定することにより、ピルビン酸を定量した。なお、KDPG 開裂活性 1 U は 1 分間に 1 μmol のピルビン酸を生成する酵素量と定義した。

recFlAld の活性は、特記しない限り 0.2 mM NADH および 1 U/mL LDH 存在下で、0.5 mM KDPG、20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、100 mM KCl、1 mM DTT、および 1.0 μg/mL recFlAld を含む 30°C の反応混液中で調べた。

4.3.3. TLC による酵素反応生成物の解析

KDPG の開裂反応は、5 mM KDPG、20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、100 mM KCl、1 mM DTT、および 1.0 μg/mL recFlAld を含む 30ºC の反応混液中で 15 分間行った。反応は、等量のクロロホルムと混合することにより停止し、遠心分離により得た水層を TLC の試料とした。試料を供した TLC プレートを 1-ブタノール、酢酸、および蒸留水を 2:1:1 (*v:v:v*) の割合で混合した溶媒により展開し、分離した化合物はアルデヒド基やケトン基を含むカルボニル化合物の検出に適した 2,5-dinitrophenylhydrazine (DNP) 法により検出した。すなわち、0.5% (*w/v*) DNP－20% (*v/v*) 硫酸－60% (*v/v*) エタノールを噴霧後、40ºC で 15 分間インキュベートすることによりプレート上の化合物を発色させた。

4.3.4. 質量分析による酵素反応生成物の解析

酵素反応生成物の分子量は、前項の試料を実験手法 4.2.4.と同様の方法で MALDI-TOF-MS に供し、質量範囲 50-500 (*m/z*) の陰イオンを解析することにより算出した。

5. 組換え酵素を用いた *in vitro* におけるアルギン酸代謝経路の再構築

UMI-01 株の *in vitro* におけるアルギン酸の分解・代謝経路の解析のために、組換えアルギン酸リアーゼ (recFlAlyA、recFlAlyB、および recFlAlex)、組換え DEH 還元酵素 (recFlRed)、組換え KDG リン酸化酵素 (recFlKin)、および組換え KDPG 開裂酵素 (recFlAld)を試験管内で種々の組み合わせで混合し、酵素反応を行った。すなわち、0.2% (*w/v*) アルギン酸ナトリウム、10 mM NADH、10 mM ATP、10 mM $MgCl_2$、20 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4)、1 mM DTT を含む反応混液に、recFlAlyA、recFlAlyB、recFlAlex、recFlRed、recFlKin、および recFlAld を終濃度でそれぞれ 10 μg/mL、10 μg/mL、10 μg/mL、2.5 μg/mL、10 μg/mL、および 1 μg/mL となるように加え、25ºC で 12 時間インキュベートした。再構築した酵素反応系により生じた不飽和オリゴ糖、DEH、および KDG は、TLC および TBA 法により解析した。また、KDPG およびピルビン酸は、実験手法 4.2.2.で述べたように LDH を用いて定量した。

第 3 項　実験結果

1. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株のドラフトゲノム解析

1.1. アルギン酸分解・代謝関連遺伝子の探索

BLAST+検索の結果、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株のドラフトゲノム配列中には、アルギン酸の分解・代謝に関わると推定される遺伝子群が見出された (Table 2)。本菌の主要なエンド型アルギン酸リアーゼ FlAlyA をコードする遺伝子は、ドラフトゲノム配列の Contig 6 (205,520 bp) 内に見出された。その近傍には、PL-17 アルギン酸リアーゼ (FlAlyB)、SDR (DEH 還元酵素様酵素 FlRed)、KDG リン酸化酵

素 (FlKin)、KDPG 開裂酵素 (FlAld)、糖類透過酵素、糖輸送タンパク質 (SusC および SusD)、および転写調節因子 (GntR) をコードすると予測される遺伝子が見出され、これらの遺伝子がクラスターを形成していることが明らかになった (Figure 3)。また、同コンティグ内には、そのクラスターから約 20 kb および 40 kb 離れた位置に、PL-6 アルギン酸リアーゼ FlAlyC および FlAlex をコードすると予測される遺伝子がそれぞれ見出された。

本菌のドラフトゲノム配列中には、上記以外のアルギン酸分解・代謝関連遺伝子も多数みられたが、本研究では、アルギン酸分解・代謝関連遺伝子がクラスターを形成している Contig 6 内の酵素群に着目し、組換え酵素を用いてその機能解析を行うこととした。

1.2. アルギン酸分解・代謝関連酵素の一次構造解析

Contig 6 内に見出された 4 種のアルギン酸リアーゼ (FlAlyA、FlAlyB、FlAlyC、および FlAlex)、DEH 還元酵素 (FlRed)、KDG リン酸化酵素 (FlKin)、および KDPG 開裂酵素 (FlAld) 候補タンパク質の一次構造を、既報の酵素や近縁種由来の酵素のものと比較した (Figure 4-10)。その結果、それぞれの酵素で予測されている触媒残基や基質認識残基は、全ての候補タンパク質で完全に保存されていた。しかしながら、FlRed は、*Sphingomonas* sp. A1 株由来 DEH 還元酵素 [55,56]、*E. coli* 由来 7α-ヒドロキシステロイド脱水素酵素 [87]、および *Bacillus megaterium* 由来グルコース脱水素酵素 [88] とそれぞれ 35-37%、32%、および 33%の同一性を示し、DEH ではない基質に作用する SDR に対しても DEH 還元酵素と同レベルの配列同一性を示した。すなわち、一次構造解析の結果のみから、FlRed を DEH 還元酵素と同定することは困難であった。また、FlKin および FlAld は、既報のプロテオバクテリアおよびアーキア由来の酵素と非常に低い配列相同性を示し、アミノ酸同一率はそれぞれ 15-16%および 22-25%であった。そこで、KDG リン酸化酵素と KDPG 開裂酵素のアミノ酸配列に基づいて系統樹を作成した結果、バクテロイデスに属する *Flavobacterium* sp. UMI-01 株のこれらの酵素は、アーキアおよびプロテオバクテリア由来のものとは別系統に属することが強く示唆された (Figure 11)。

上記のアルギン酸分解・代謝関連酵素のうち、FlAlyA、FlAlyB、FlAlyC、および FlAlex には N 末端に分泌シグナル配列の存在が予測されたが、FlRed、FlKin、および FlAld にはそれがみられなかった。過去の報告によれば、FlAlyA は *Flavobacterium* sp. UMI-01 株のペリプラズム領域から単離されること、また、本菌を生育させた培養液の上清にはアルギン酸リアーゼ活性が検出されないことが明らかにされている [87]。以上、本研究の一次構造解析の結果と過去の知見を考え合わせると、本菌におけるアルギン酸分解および DEH 代謝は、それぞれペリプラズム領域および細胞質領域で行われていると推定される。

2. 組換えアルギン酸リアーゼの生化学的特徴

2.1. 組換えアルギン酸リアーゼの大腸菌発現

Flavobacterium sp. UMI-01 株のドラフトゲノム配列中に見出された 4 種のアルギン酸リアーゼ (FlAlyA、FlAlyB、FlAlyC、および FlAlex) の遺伝子をクローニングし、大腸菌発現系を構築した。その際、各組換え酵素の N 末端に予測された分泌シグナル配列は除去し、C 末端には、リンカーおよびタグとして、それぞれ Gly-Ser-Gly×8 および His×8 を付加した (Figure 12)。その結果、recFlAlyA、recFlAlyB、recFlAlyC、および recFlAlex の計算分子量は、リンカーおよびタグを含めてそれぞれ 31,686、83,218、60,684、および 85,319 となった。

アフィニティークロマトグラフィーにより精製した組換えアルギン酸リアーゼを SDS-PAGE に供した。その結果、recFlAlyA および recFlAlex は、どちらも単一のバンドで検出され、それぞれ約 32 kDa および 86 kDa と見積もられた (Figure 13a, d)。一方、recFlAlyB は、約 83 kDa 付近にバンドは検出されず、複数のタンパク質の混在がみられ、調製中に部分分解している可能性が考えられた (Figure 13b)。また、recFlAlyC は、約 62 kDa と見積もられるバンドに加え、recFlAlyB と同様に他のタンパク質の混在がみられた (Figure 13c)。

次いで、抗 6×His-tag 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、各組換えアルギン酸リアーゼの発現を確認した (Figure 14)。recFlAlyA、recFlAlyC、および recFlAlex を解析した結果、それぞれの計算分子量とほぼ同位置にみられるバンドが抗体と反応性を示した。しかしながら、recFlAlyB では、約 39 kDa および 41 kDa に抗体と反応性を示すバンドが検出され、少なくともタンパク質内部 2 か所の異なる位置でプロテアーゼ分解を受けている可能性が考えられた。

大腸菌における各組換えアルギン酸リアーゼの発現が確認されたが、他のタンパク質の混在がみられた recFlAlyC、および分解の可能性が示唆された recFlAlyB については、より高純度な His タグ融合タンパク質を精製可能な TALON Metal Affinity Resin (Takara) を用いて再び精製を試みた。その結果、ウエスタンブロッティングで反応性を示したバンドと同一の分子量を示す高純度の recFlAlyB および recFlAlyC を得ることができた (Figure 13b, c)。

デンシトメトリー法により各組換えアルギン酸リアーゼのタンパク質収量を調べた結果、recFlAlyA、recFlAlyB、recFlAlyC、および recFlAlex の収量は、培養液 500 mL 当たりそれぞれ 5.1 mg、0.024 mg、0.014 mg、および 6.2 mg であった。

2.2. 組換えアルギン酸リアーゼの基質特異性の解析

polyM、polyG、および polyMG を基質に用いて、各組換えアルギン酸リアーゼの基質特異性を調べた。recFlAlyA は、上記の基質全てに作用し、2 糖以上の大きさの不飽和オリゴ糖を生成したことから、

アルギン酸の全ての領域を分解可能なエンド型アルギン酸リアーゼであることが明らかになった (Figure 15)。また、その反応生成物の分子量および構造をそれぞれゲル濾過および陰イオン交換 HPLC で解析した結果、recFlAlyA は、アルギン酸を不飽和 2-5 糖まで分解し (Figure 16a)、そのうち不飽和 2-4 糖は、ΔG、ΔGG、ΔGGG、およびΔMGG のような主に G から構成されるオリゴ糖であった (Figure 16b)。この結果は、recFlAlyA が 4 糖以上のオリゴ糖を認識し、M-M もしくは G-M の配列を切断することを示している。

一方、recFlAlyB および recFlAlex は、それぞれ polyM および polyG から DEH を生成するエキソ型アルギン酸リアーゼであった (Figure 15b, d)。recFlAlyB および recFlAlex がそれぞれ属する PL-17 および PL-6 のアルギン酸リアーゼに関する知見は未だ少ないが、どちらの酵素もエキソ型の分解活性を示すことが報告されており、本研究の結果（Figure 15）はそれらと一致する。なお、recFlAlyC は、アルギン酸および polyMG に対して作用し、それぞれ DEH および 2 糖以上のオリゴ糖を生成した (Figure 15c)。すなわち、recFlAlyC は、エキソ型およびエンド型の両方の活性を示したが、その DEH 生成量は他の組換えアルギン酸リアーゼに比べて低く、また、polyMG 特異的であるため、recFlAlyA のアルギン酸分解により生じるΔG、ΔGG、ΔGGG、ΔM、およびΔMM のような M もしくは G の一方のみから成るオリゴ糖を分解することが出来ないと推定された。

次いで、recFlAlyA を用いて調製したアルギン酸不飽和オリゴ糖に対して、基質特異性の異なる 2 種類のエキソ型アルギンリアーゼ recFlAlyB または recFlAlex を作用させ、その反応生成物を TLC により解析した。その結果、recFlAlyB および recFlAlex は、不飽和オリゴ糖から著量の DEH を生成することが明らかになった。しかしながら、残存したオリゴ糖の移動度は両酵素の間で異なっていた (Figure 17)。そこで、これらのリアーゼを同時に不飽和オリゴ糖に作用させたところ、残存していたオリゴ糖は DEH に完全分解された (Figure 17)。さらに、HPLC 解析により各リアーゼの基質特異性を調べた結果、recFlAlyB はΔM、ΔMG、ΔMM、およびその他の 4 糖以上のオリゴ糖を分解し、ΔG を蓄積することが明らかになった。このことは、recFlAlyB がオリゴ糖の非還元末端の不飽和糖と M の間の結合を切断する作用特性を有することを示している (Figure 18a)。一方、recFlAlex はΔG、ΔGG、ΔGGG、およびΔMGG を分解し、ΔMG を蓄積した。このことから、recFlAlex は還元末端に連続して G が配列するオリゴ糖に作用すると推定された (Figure 18b)。

このように、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株の無細胞抽出液によるアルギン酸の完全分解は、1 種類のエンド型アルギン酸リアーゼ recFlAlyA と 2 種類の基質特異性の異なるエキソ型アルギン酸リアーゼ recFlAlyB および recFlAlex を用いて再現可能であり、これら 3 種類の酵素が本菌のアルギン酸分解反応の中核を担っていると考えられた。なお、recFlAlyC は、アルギン酸の完全分解に必須な要素ではないが、他のアルギン酸リアーゼと共同して分解反応を促進する補助的な役割を有すると考えられた。

3. 組換え DEH 代謝関連酵素の生化学的特徴

3.1. 組換え DEH 代謝関連酵素の大腸菌発現

前項において、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株におけるアルギン酸からの DEH 生成機構が明らかになったので、次に、生じた DEH の代謝機構を明らかにすることとした。本菌のアルギン酸代謝遺伝子クラスターに見出された FlRed、FlKin、および FlAld の組換えタンパク質を大腸菌発現系により生産した。その際、それらの C 末端にはリンカーおよびタグ配列として、それぞれ Gly-Ser-Gly×8 および His×8 を付加した (Figure 12)。なお、これらの酵素の N 末端には、分泌シグナル配列は存在しない。したがって、recFlRed、recFlKin、および recFlAld の計算分子量は、リンカーおよびタグを含めて、それぞれ 28,315、39,391、および 25,808 となる。

アフィニティークロマトグラフィーにより精製した recFlRed、recFlKin、および recFlAld を SDS-PAGE に供した結果、全ての組換え酵素は、単一のバンドとして検出された (Figure 19)。また、それらの分子量は、それぞれ約 29 kDa、約 39 kDa、および約 26 kDa と見積もられ、アミノ酸配列に基づく計算分子量とおおよそ一致していた。

3.2. 組換え DEH 還元酵素の生化学的特徴

実験手法 4.1.1.の通り調製した DEH に、補酵素として NADH もしくは NADPH の存在下で recFlRed を反応させた。その結果、NADH を用いた場合に経時的な 340 nm における吸光度の減少がみられ、その比活性は 4.0 U/mg であった (Figure 20a)。また、NADPH を用いた場合、吸光度の減少はほとんどみられず、その比活性は 0.043 U/mg であった (Figure 20a)。一方、種々の単糖、α-ケト酸、アルデヒドなどを基質とした場合、recFlRed は DEH にのみ有意な活性を示し、その他の化合物には活性を示さないことが明らかとなった (Table 3)。

次いで、DEH、NADH、および recFlRed を混合し、各時間における反応生成物を TLC により解析した。硫酸発色の結果、反応時間の経過に伴う NADH の減少と KDG 様物質の生成が確認された (Figure 20b)。また、TBA 発色の結果、時間経過に伴う DEH の減少と KDG 様物質の生成が確認された (Figure 20b)。さらに、酵素反応前後の試料の質量を MALDI-TOF-MS により解析した。その結果、反応前の試料では、*m/z*=175.03 のピークが検出され、それは脱プロトン化された DEH の質量と一致した (Figure 20c)。一方、反応後の試料では、*m/z*=175.03 のピーク強度が減少し、*m/z*=177.04 に新たなピークが出現した (Figure 20d)。これは、脱プロトン化された KDG の質量と一致していた。なお、*m/z*=176.03 および 178.06 にみられる小ピークは、それぞれ ^{13}C 同位体を含む DEH および KDG に由来するものであると考えられた。以上の結果から、recFlRed は、DEH 特異的に作用する NADA 依存性の DEH 還元酵素と同定した。

3.3. 組換え KDG リン酸化酵素の生化学的特徴

実験手法 4.2.1.の通り調製した KDG に ATP 存在下で recFlKin を作用させ、実験手法 4.2.2 により KDPG の生成量を調べた。その結果、KDPG の生成に伴う経時的な 340 nm の吸光度の減少がみられ、そこから計算される比活性は 0.72 U/mg であった (Figure 21a)。なお、反応液から KDG、ATP、または recFlKin のいずれを除いても、KDPG アルドラーゼ (recFlAld) と LDH の共役反応系による NADH の吸光度の減少はみられなくなった。すなわち、本酵素系により、recFlKin と recFlAld の共役反応を、LDH によるピルビン酸定量を介して検出可能であることが確認された (Figure 21a)。

次いで、各反応時間における recFlKin の反応生成物を TLC により解析した。硫酸発色の結果、時間経過に伴う KDG と ATP の減少および KDPG 様物質の生成が確認された (Figure 21b)。また、酵素反応前後の試料を MALDI-TOF-MS により解析した。それによれば、反応後 15 分の試料にのみ脱プロトン化された KDPG およびナトリウム塩を形成した KDPG の質量と一致する *m/z*=257.0 および 279.0 のピークが検出された (Figure 21c, d)。なお、本解析の測定質量範囲には未同定のピークがいくつか検出されたが、それらのピーク強度は酵素反応前後で大きな変化がないことから、それらは反応混液中の何らかの成分もしくはマトリックスに由来するピークであると考えられた。以上の結果から、recFlKin は、ATP 存在下において KDG を KDPG に変換する KDG リン酸化酵素であると同定した。

3.4. 組換え KDPG 開裂酵素の生化学的特徴

実験手法 4.3.1.の通り調製した KDPG を基質として、recFlAld の機能を解析した。まず、recFlAld のアルドラーゼ反応により生じるピルビン酸を検出するため、LDH と NADH を含む反応混液に KDPG および recFlAld を加え、340 nm の吸光度の経時変化を調べた。その結果、KDPG および recFlAld の両方を含む場合にのみ、経時的な 340 nm の吸光度の減少がみられた (Figure 22a)。なお、recFlAld 非存在下においても若干の吸光度の減少がみられた。これは LDH が KDPG のカルボニル基に対しても弱い反応性を示すためと考えられたが、その活性はピルビン酸に対する活性の約 40 分の 1 であり、実質的に無視できると考えられた。

KDPG アルドラーゼは、バクテリアの Entner-Doudoroff 経路における最終反応を担う酵素であり、KDPG の開裂反応によりピルビン酸および GAP を生成する。そこで、まず recFlAld の各時間における反応生成物を TLC に供し、DNP 発色により反応混液中に含まれるカルボニル化合物を検出した。その結果、酵素反応によりピルビン酸および GAP と同じ移動度を示す 2 つのスポットが検出されるようになり、それらは反応時間の経過に伴い増大することが明らかとなった (Figure 22b)。なお、GAP はピルビン酸よりも強い発色を示したが、マーカーとして使用した両化合物の濃度は同一であることから、発色程度の異なる原因は DNP のアルデヒドおよびケトンに対する反応性が異なるためであると推

定された。また、KDPG の開裂反応により生じる化合物を MALDI-TOF-MS により解析した結果、酵素反応後の試料にのみ脱プロトン化されたピルビン酸および GAP の質量と一致する *m/z*=87.0 および 169.0 のピークが検出された (Figure 22c, d)。なお、ピルビン酸や GAP 以外の未同定ピークもいくつか検出されたが、それらは生成物のフラグメントや反応混液中の何らかの成分に由来するものであると考えられた。以上の結果から、recFlAld は、KDPG の開裂反応によりピルビン酸および GAP を生成する KDPG アルドラーゼと同定した。

4. 組換え酵素を用いた *in vitro* におけるアルギン酸代謝経路の再構築

これまでに機能同定を行った 3 種類の組換えアルギン酸リアーゼ (recFlAlyA、recFlAlyB、および recFlAlex) および 3 種類の組換え DEH 代謝酵素 (recFlRed、recFlKin、および recFlAld) を用いて、*in vitro* でアルギン酸からピルビン酸を直接生成することが可能かどうかを調べることとした。まず、様々な組み合わせでアルギン酸および各種組換え酵素を混合し、その反応生成物を TLC により解析した。その結果、アルギン酸は 3 種類の組換えアルギン酸リアーゼを同時に作用させることでほぼ完全に DEH まで分解され、生じた DEH も recFlRed 存在下でほぼ完全に KDG に還元されることが明らかになった (Figure 23)。さらに、大部分の KDG は、recFlKin により KDPG にリン酸化され、さらに recFlAld を加えることにより KDPG の染色強度が著しく減少した。これは KDPG が recFlAld により開裂し、ピルビン酸と GAP が生じたことを示している。

各反応ステップにおけるアルギン酸代謝物を定量した結果、酵素反応により生じた不飽和オリゴ糖、DEH、KDG、KDPG、およびピルビン酸の濃度は、それぞれ 4.2 mM、9.8 mM、9.8 mM、8.1 mM、8.1 mM、および 3.8 mM となった (Table 4)。当初の反応混液中に含まれていた 0.2% (*w/v*)のアルギン酸ナトリウムは、単糖換算で約 10 mM に相当することから、DEH、KDG、KDPG、およびピルビン酸の収率は、理論最大値の 98%、98%、81%、および 38%であった。

第 4 項　考察

本章では、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株のアルギン酸分解・代謝関連遺伝子クラスターに見出された 4 種類のアルギン酸リアーゼ (FlAlyA、FlAlyB、FlAlyC、および FlAlex) および 3 種類の DEH 代謝酵素 (FlRed、FlKin、および FlAld) 候補タンパク質を組換え酵素として作出し、それらの生化学的特徴と反応生成物の解析を行った。また、各種組換え酵素を用いることで、*in vitro* においてアルギン酸を任意の代謝物に極めて高い効率で変換可能であることが分かった。なお、DEH、KDG、および KDPG に比べてピルビン酸の収率が低かった理由は、KDPG 開裂酵素 (recFlAld) の反応が可逆的であり、その濃度で平衡に達したためである。この収率は、ピルビン酸もしくは GAP を反応平衡から除去する別

の酵素を反応系に導入することで改善されると考えられた。

FlAlyA は、幅広い基質特異性を有するエンド型リアーゼであり、アルギン酸を不飽和 2-5 糖まで完全に分解した。一方、FlAlyB、FlAlyC、および FlAlex は、それぞれ polyM、polyMG、および polyG に対して特異的に作用するエキソ型リアーゼであった。特に、FlAlyB および FlAlex は、本菌における不飽和オリゴ糖分解の中核を担う酵素と考えられ、これらを同時に使用することで、FlAlyA により生じた不飽和オリゴ糖を DEH にまで完全分解できた。さらに、この DEH に FlRed、FlKin、および FlAld が順次作用することにより、DEH は KDG および KDPG を経て、最終的にピルビン酸と GAP に変換されることが明らかとなった。これらの酵素のうち、4 種のアルギン酸リアーゼ (FlAlyA、FlAlyB、FlAlyC、および FlAlex) は、分泌シグナル配列を有しており、本菌の培養液中にアルギン酸リアーゼが検出されないことを考え合わせると、これらの酵素は本菌のペリプラズム領域に局在すると推定された。一方、DEH 代謝酵素 3 種は、分泌シグナル配列の存在が予測されず、細胞質領域に局在すると推定された。以上の結果に基づき、本菌のペリプラズム領域と細胞質領域におけるアルギン酸分解・代謝系酵素の存在状態を推定した (Figure 24)。

アルギン酸の分解・代謝機構は、*Sphingomonas* sp. A1 株において分子レベルで詳細に研究されてきたが[52]、他のアルギン酸資化細菌ではほとんど明らかにされていない。A1 株では、細胞外膜ピットおよびペリプラズム領域に存在する数種のトランスポーターを介して、細胞質領域にポリマーのアルギン酸を輸送し、そこで 3 種類のエンド型リアーゼ (A1-I、A1-II、および A1-III) および 1 種類のエキソ型リアーゼ (A1-IV) により DEH にまで完全分解すると報告されている[54]。さらに、生じた DEH は、NADPH 依存性の DEH 還元酵素 A1-R により KDG に還元されることが最近明らかにされた[55]。このことから、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株によるアルギン酸分解・代謝機構と A1 株で報告された機構とでは、アルギン酸分解に関与する酵素の種類や局在および DEH 還元酵素の補酵素特異性が異なることが分かる。このような相違点は、対象のアルギン酸資化細菌の種類や生息環境に依存すると考えられる。例えば、土壌性のプロテオバクテリアである A1 株では、分解反応を介さずアルギン酸を細胞内に輸送し、それを細胞質領域で DEH まで分解する。したがって、A1 株のアルギン酸資化機構は、全ての分解物を細胞内でエネルギーに変換できるという点で優れている[89]。一方、UMI-01 株は海洋性のフラボバクテリアであるが、海洋環境中に存在するアルギン酸は Ca^{2+} とゲルを形成している。すなわち、A1 株のようなアルギン酸輸送システムは海洋環境においては利用できない可能性がある。そのため、UMI-01 株はペリプラズム領域でアルギン酸を単糖レベルまで分解し、それを細胞内に輸送する機構を獲得したのかもしれない。なお、本菌のアルギン酸代謝関連遺伝子クラスターは、*G. forsetii*[74] や *Z. galactanivorans*[58] などのアルギン酸資化性フラボバクテリアにみられるクラスターと遺伝子構造が類似していた。このことは、他のアルギン酸資化性フラボバクテリアが Figure 24 と同様の機構でアル

ギン酸を代謝する可能性を示している。

DEH 還元酵素、KDG リン酸化酵素、および KDPG 開裂酵素は、これまで主にプロテオバクテリアで研究されてきたため、バクテロイデスにおけるそれらの酵素の知見はほとんどなかった。本研究では、これらの候補遺伝子をバクテロイデスに属する *Flavobacterium* sp. UMI-01 株のドラフトゲノム配列中に見出したが、そこから演繹される一次構造がプロテオバクテリアのものと非常に低い相同性を示したため、それらが実際に機能するかどうか不明であった。そこで我々は、組換え酵素を用いて各遺伝子産物の活性を調べ、それらが推定酵素の活性をもつことを確認した。さらに *in vitro* の実験系により、本菌の DEH 代謝関連酵素が実際に DEH からピルビン酸と GAP を生じることを明らかにした。これらの酵素の機能が同定されたことにより、今後、他種バクテロイデスにおける DEH 代謝関連酵素の同定が容易となり、それらのアルギン酸分解・代謝機構に関する知見を深めることに繋がると考えられる。

以上、本章では *Flavobacterium* sp. UMI-01 株のドラフトゲノム配列中に見出されたアルギン酸分解・代謝関連酵素遺伝子の活性を確認すると共に、Figure 24 に示すような UMI-01 株細胞におけるアルギン酸からピルビン酸を生成するまでの一連の酵素反応過程を明らかにした。なお、これまでに単一のアルギン酸資化生物でアルギン酸の完全分解および DEH の代謝に関わる個々の酵素性状を全てタンパク質レベルで明らかにした研究報告は無く、本研究が初めての例である。

一方、UMI-01 株の無細胞抽出液の DEH 還元活性を調べている中で、DEH の還元物である KDG とは異なる未知の代謝物 (Unknown product 1, UP1) が反応混液中に生成することを見出した。これは、UMI-01 株の無細胞抽出液中に DEH に作用して、UP1 を生じる未知の酵素あるいは反応経路が存在する可能性を示している。なお、予備実験によれば、UP1 は DEH の酸化物であり、これを生じる酵素は DEH の酸化を触媒する「DEH 酸化酵素」であることが強く示唆された。そこで次章では、UMI-01 株の無細胞抽出液から DEH 酸化酵素の単離を試みることとした。

Table 1. Primers for expression of recombinant proteins involved in alginate metabolism.

Primers	Nucleotide sequence (5' to 3')*
FlAlyA-F	AGGTAATACACCATGAGCAAAACTGCTAAAATTGA
FlAlyA-R	CACCTCCACCGGATCCATGAGTAACTTGTAAAGAAT
FlAlyB-F	AGGTAATACACCATGCAAGGGCATCCAAGACTAAT
FlAlyB-R	CACCTCCACCGGATCCTTTAATTAATGTATTATAAT
FlAlyC-F	AGGTAATACACCATGACTGCAATTTCCAATGCAAC
FlAlyC-R	CACCTCCACCGGATCCTTTTACTAACAACTCACTGA
FlAlex-F	AGGTAATACACCATGGCAAACAAAAGCATCAAAGT
FlAlex-R	CACCTCCACCGGATCCATACATCATCTTTTGCTTTA
FlRed-F	AGGTAATACACCATGGGTAATTTAAATGAAAAAGTTG
FlRed-R	CACCTCCACCGGATCCTATTCCTAAAGCTTGACCTCC
FlKin-F	AGGTAATACACCATGAAAAAAGTAGTCACTTTTGG
FlKin-R	CACCTCCACCGGATCCTCTTGAAACTTTTCCTGAAA
FlAld-F	AGGTAATACACCATGGCTCAATTTTCAAGAATAGA
FlAld-R	CACCTCCACCGGATCCTTGTTTTAACTCTTTAATGA

*Underlines indicate additional sequences for In-Fusion cloning.

Table 2. Alginate metabolic genes found in the draft genome of *Flavobacterium* sp. UMI-01.

Contig No.	Gene No.	Length (bp)	Predicted protein	e-value
1	62	924	KDG kinase	3e-20
6	44	2,781	PL-6 alginate lyase	6e-29
	50	669	KDPG aldolase (FlAld)	8e-16
	51	1,023	KDG kinase (FlKin)	2e-20
	52	765	DEH reductase (FlRed)	6e-29
	55	867	PL-7 alginate lyase (FlAlyA)	2e-24
	57	2,265	PL-17 alginate lyase (FlAlyB)	3e-172
	80	1,698	PL-6 alginate lyase (FlAlyC)	1e-51
	112	2,307	PL-6 alginate lyase (FlAlex)	2e-101
8	473	747	DEH reductase	3e-23
19	170	639	KDPG aldolase	4e-15
	183	780	DEH reductase	6e-20
	241	921	PL-7 alginate lyase	1e-25
20	67	744	DEH reductase	4e-27
26	110	918	KDG kinase	2e-11
35	38	795	DEH reductase	8e-16
38	191	771	DEH reductase	4e-17
	500	2,256	PL-7 alginate lyase	1e-13
72	169	774	PL-7 alginate lyase	5e-10
78	7	2,343	PL-6 alginate lyase	3e-110
	11	770	DEH reductase	9e-28

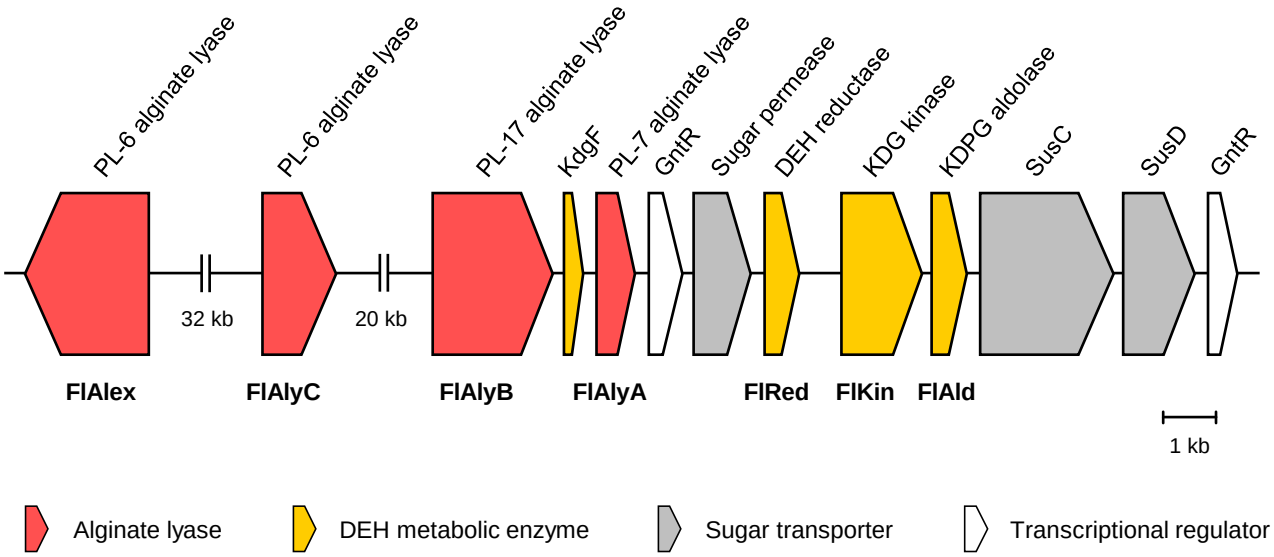


Figure 3. Alginate metabolism related gene cluster found in the draft genome of *Flavobacterium* sp. UMI-01.

The genes involved in alginate assimilation were colored on the basis of their predicted function. Red, alginate lyase; orange, DEH metabolic enzyme; gray, sugar transporter; white, transcriptional regulator.

Figure 4. Multiple amino-acid sequence alignment for FlAlyA with other PL-7 alginate lyases.

Identical amino-acid residues with FlAlyA are colored by yellow. Gray boxes and closed triangles indicate catalytic residues and substarte-recognition residues of A1-II' from *Sphingomonas* sp. A1. *Flavobacterium* sp. UMI-01, alginate lyase FlAlyA from *Flavobacterium* sp. strain UMI-01 (GenBank accession number, BAP05660); *Flavobacterium* sp. strain S20, alginate lyase Alg2A from *Flavobacterium* sp. S20 (GenBank accession number, AEB69783); Zobellia galactanivorans, alginate lyase AlyA1 from *Zobellia galactanivorans* (GenBank accession number, WP_013992548); *Pseudomonas aeruginosa*, alginate lyase PA1167 from *Pseudomonas aeruginosa* (GenBank accession number, WP_034063789); *Sphingomonas* sp. strain A1, alginate lyase A1-II' from *Sphingomonas* sp. A1 (GenBank accession number, BAD16656); *Klebsiella pneumoniae*, alginate lyase from *Klebsiella pneumoniae* (GenBank accession number, Q59478).

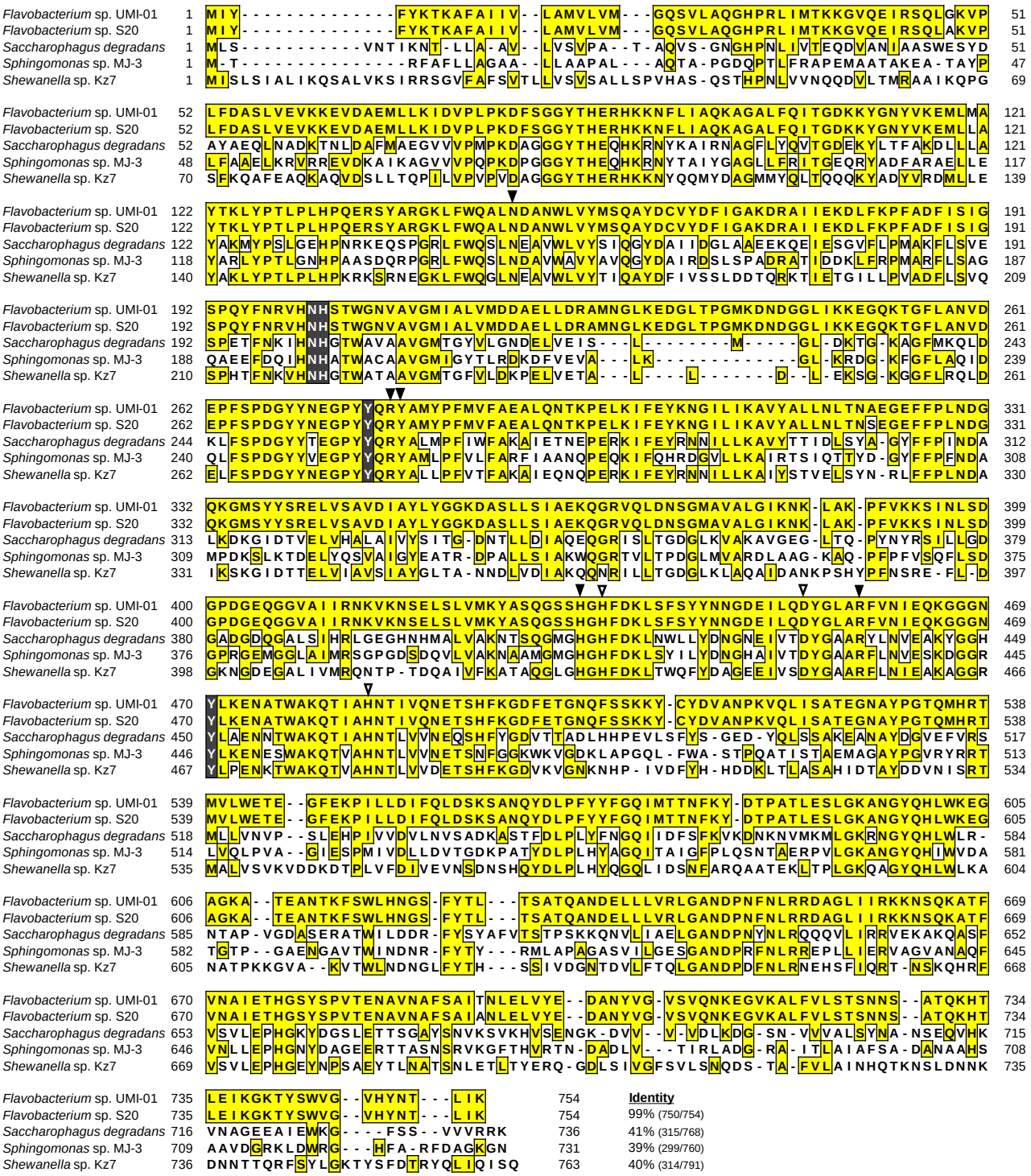


Figure 5. Multiple amino-acid sequence alignment for FlAlyB with other PL-17 alginate lyases.

Identical amino-acid residues with FlAlyB are colored by yellow. Gray boxes, closed triangles, and open triangles indicate catalytic residues, substarte-recognition residues, and Zn^{2+} binding site of Alg17C from *Saccharophagus degradans* 2-40^{T}. *Flavobacterium* sp. UMI-01, alginate lyase like protein FlAlyB from *Flavobacterium* sp. UMI-01 (GenBank accession number, BAQ25533); *Flavobacterium* sp. S20, alginate lyase like protein from *Flavobacterium* sp. S20 (GenBank accession number, AFV91542); *Saccharophagus degradans*, alginate lyase Alg17C from *Saccharophagus degradans* 2-40^{T} (GenBank accession number, WP_011469755); *Sphingomonas* sp. MJ-3, alginate lyase from *Sphingomonas* sp. MJ-3 (GenBank accession number, AEM45874); *Shewanella* sp. Kz7, alginate lyase OalS17 from *Shewanella* sp. Kz7 (GenBank accession number, AHW45238).

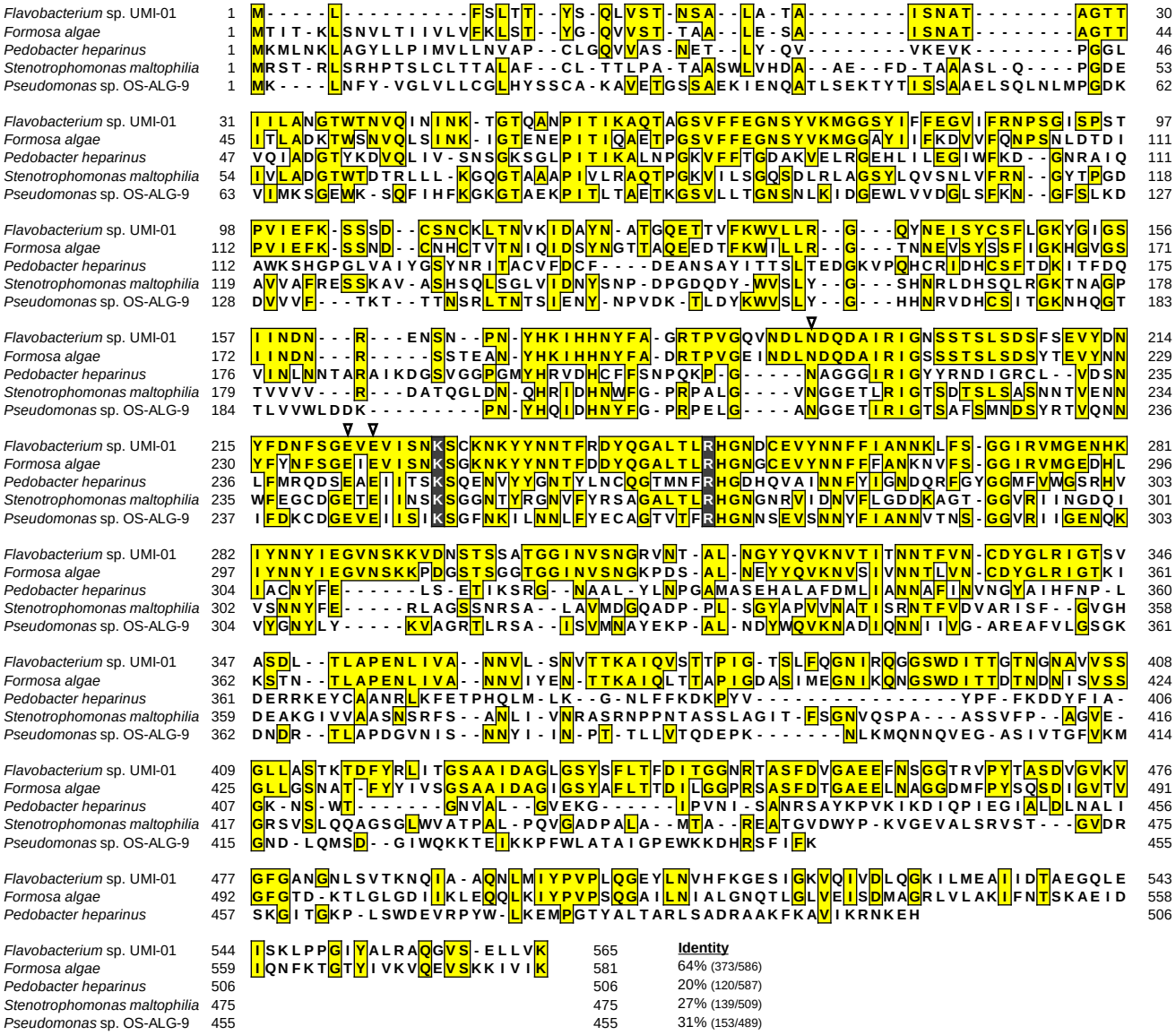


Figure 6. Multiple amino-acid sequence alignment for FlAlyC with other PL-6 alginate lyases.

Identical amino-acid residues with FlAlyC are colored by yellow. Gray boxes and opened triangles indicate catalytic residues and Ca^{2+} binding site of chondroitin lyase from *Pedobacter heparinus*. *Flavobacterium* sp. UMI-01, alginate lyase like protein FlAlyC from *Flavobacterium* sp. UMI-01 (GenBank accession number, BAS53727); *Formosa algae*, alginate lyase like protein from *Formosa algae* (GenBank accession number, WP_057781511); *Pedobacter heparinus*, chondroitin lyase from *Pedobacter heparinus* (GenBank accession number, WP_012780957); *Stenotrophomonas maltophilia*, alginate lyase from *Stenotrophomonas maltophilia* KJ-2 (GenBank accession number, AFC88009); *Pseudomonas* sp. OS-ALG-9, alginate lyase from *Pseudomonas* sp. OS-ALG-9 (GenBank accession number, BAA01182).

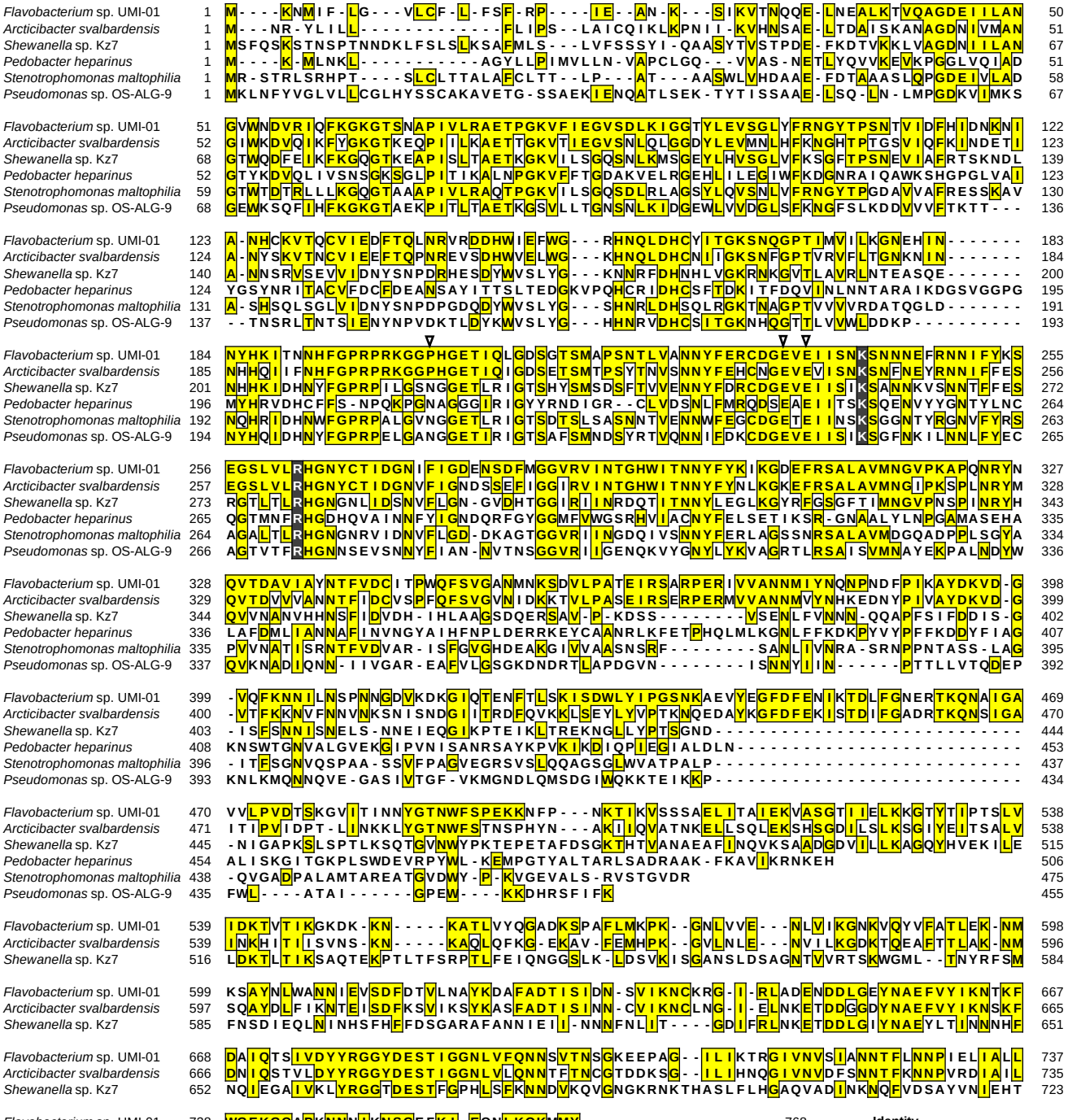


Figure 7. Multiple amino-acid sequence alignment for FlAlex with other PL-6 alginate lyases.

Identical amino-acid residues with FlAlex are colored by yellow. Gray boxes and opened triangles indicate catalytic residues and Ca^{2+} binding site of chondroitin lyase from *Pedobacter heparinus*. *Flavobacterium* sp. UMI-01, alginate lyase like protein FlAlex from *Flavobacterium* sp. UMI-01 (GenBank accession number, BAS53728); *Arcticibacter svalbardensis*, alginate lyase like protein from *Arcticibacter svalbardensis* (GenBank accession number, WP_040299601); *Shewanella* sp. Kz7, alginate lyase OalS6 from *Shewanella* sp. Kz7 (GenBank accession number, AHC69713); *Pedobacter heparinus*, Chondroitin B lyase from *Pedobacter heparinus* (GenBank accession number, WP_012780957); *Stenotrophomonas maltophilia*, alginate lyase from *Stenotrophomonas maltophilia* KJ-2 (GenBank accession number, AFC88009); *Pseudomonas* sp. OS-ALG-9, alginate lyase from *Pseudomonas* sp. OS-ALG-9 (GenBank accession number, BAA01182).

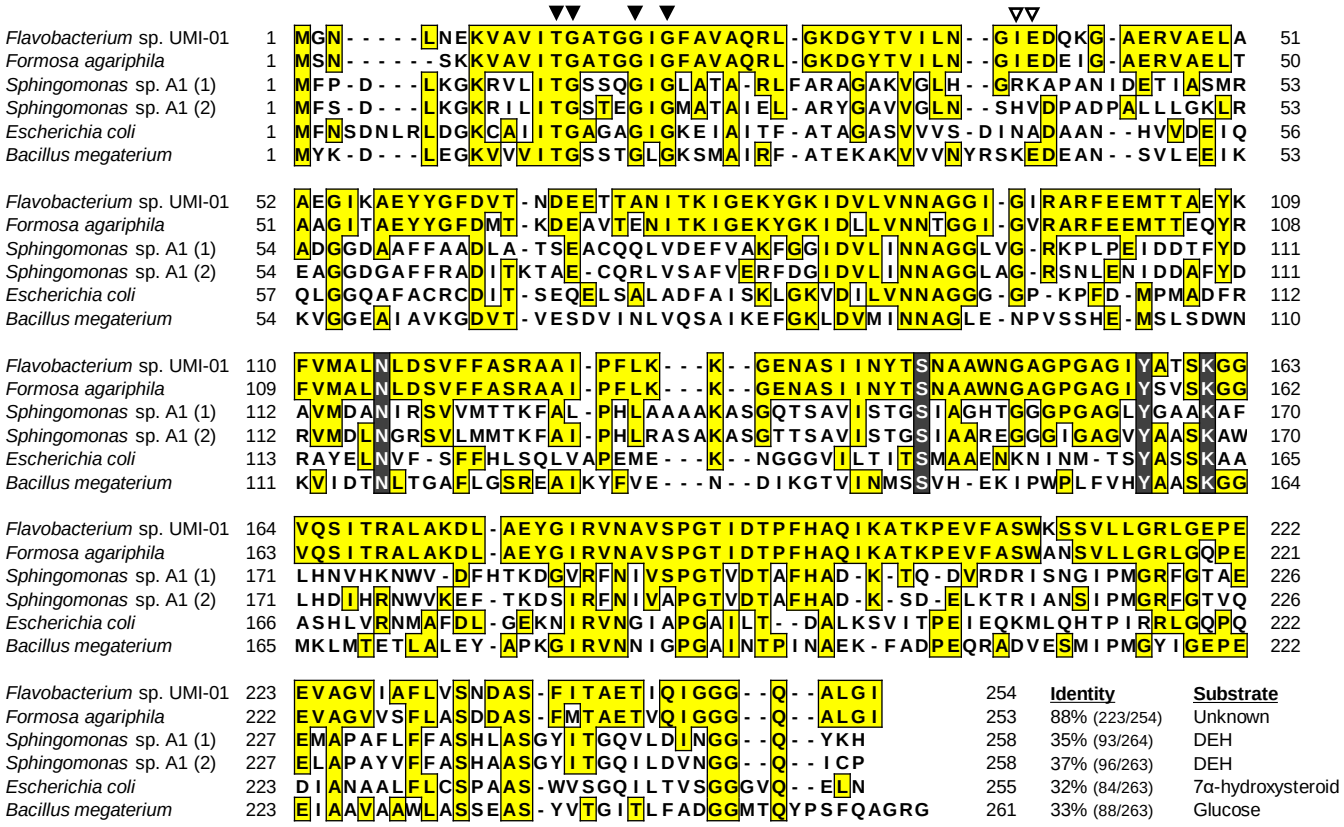


Figure 8. Multiple amino-acid sequence alignment for FlRed with other SDR.

Identical amino-acid residues with FlRed are colored by yellow. Gray boxes, closed triangels, and opened triangles indicate catalytic residues, cofactor binding motif (Rossman fold), and NADP(H)-recognition residues of A1-R from *Sphingomonas* sp. A1. *Flavobacterium* sp. UMI-01, SDR like protein FlRed from *Flavobacterium* sp. UMI-01 (GenBank accession number, BAQ25537); *Formosa agariphila*, SDR like protein from *Formosa agariphila* (GenBank accession number WP_038531544); *Sphingomonas* sp. A1 (1), DEH reductase A1-R from *Sphingomonas* sp. A1 (GenBank accession number AB537450); *Sphingomonas* sp. A1 (2), DEH reductase A1-R' from *Sphingomonas* sp. A1 (GenBank accession number AB970509); *Escherichia coli*, 7α-hydroxysteroid dehydrogenase from *Escherichia coli* (GenBank accession number BAA01384); *Bacillus megaterium*, Glucose dehydrogenase *Bacillus megaterium* (GenBank accession number WP_033578120).

Figure 9. Multiple amino-acid sequence alignment for FlKin with other KDG kinase.

Identical amino acid residues with FlKin are colored by yellow. Closed triangles indicate substrate-recognition residues of KDG kinase from *Sulfolobus solfataricus*. *Flavobacterium* sp. UMI-01, KDG kinase FlKin from *Flavobacterium* sp. UMI-01 (GenBank accession number, BAQ25538); *Lacinutrix* sp., KDG kinase like protein from *Lacinutrix* sp. 5H-3-7-4 (GenBank accession number, AEH01605); *Dokdonia* sp., KDG kinase like protein from *Dokdonia* sp. MED134 (GenBank accession number, WP_013749800); *Gramella forsetii*, KDG kinase like protein from *Gramella forsetii* KT0803 (GenBank accession number, CAL66135); *Saccharophagus degradans*, KDG kinase from *Saccharophagus degradans* 2-40^{T} (GenBank accession number, ABD82535); *Escherichia coli*, KDG kinase from *Escherichia coli* (GenBank accession number, WP_024175791); *Serratia marcescens*, KDG kinase from *Serratia marcescens* (GenBank accession number, ABB04497); *Sulfolobus solfataricus*, KDG kinase from *Sulfolobus solfataricus* (GenBank accession number, WP_009991690); *Thermus thermophilus*, KDG kinase from *Thermus thermophilus* (GenBank accession number, WP_011229211).

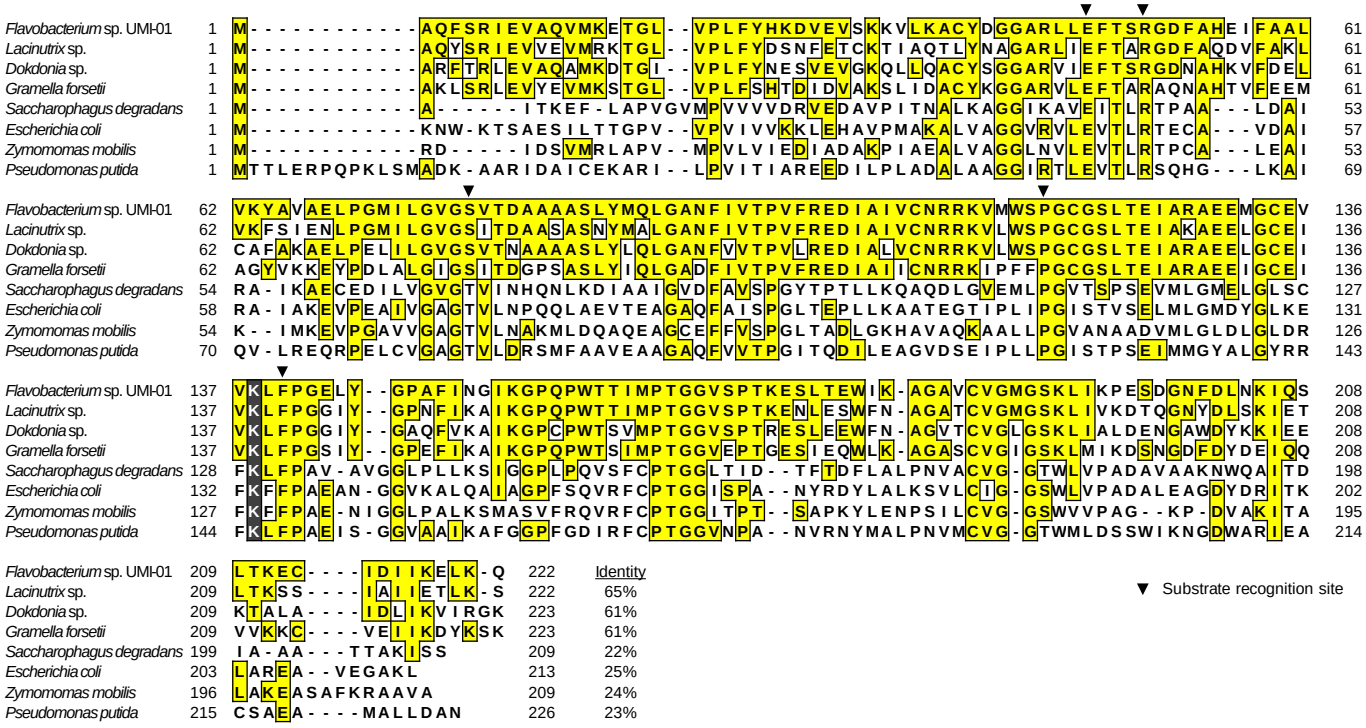


Figure 10. Multiple amino-acid sequence alignment for FlAld with other KDPG aldolase.

Identical amino-acid residues with FlAld are colored by yellow. Gray box and closed triangles indicate catalytic residue and substrate-recognition residues of KDPG aldolase from *Escherichia coli*. *Flavobacterium* sp. UMI-01, KDPG aldolase like protein FlAld from *Flavobacterium* sp. strain UMI-01 (GenBank accession number, BAQ25539); *Lacinutrix* sp., KDPG aldolase like protein from *Lacinutrix* sp. 5H-3-7-4 (GenBank accession number, AEH01606); *Dokdonia* sp., KDPG aldolase like protein from *Dokdonia* sp. MED134 (GenBank accession number, WP_013749799); *Gramella forsetii*, KDPG aldolase like protein from *Gramella forsetii* KT0803 (GenBank accession number, CAL66136); *Saccharophagus degradans*, KDPG aldolase from *Saccharophagus degradans* 2-40^{T} (GenBank accession number, ABD80644); *Escherichia coli*, KDPG aldolase from *Escherichia coli* (GenBank accession number, WP_000800517); *Zymomonas mobilis*, KDPG aldolase from *Zymomonas mobilis* (GenBank accession number, S18559); *Pseudomonas putida*, KDPG aldolase from *Pseudomonas putida* (GenBank accession number, WP_016501275).

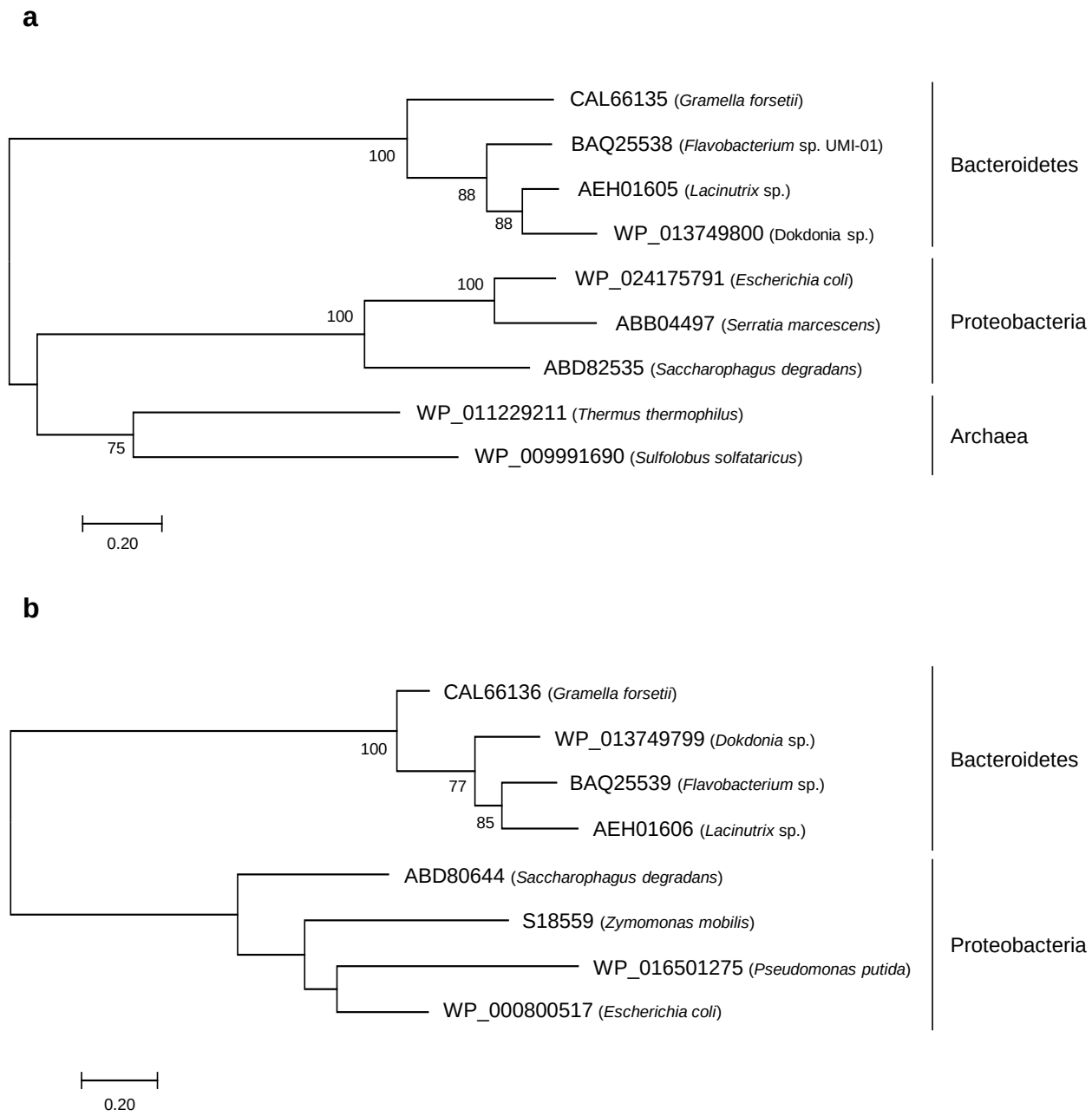


Figure 11. Phylogenetic analyses for KDG kinase and KDPG aldolase.

Phylogenetic analyses were carried out based on the amino-acid sequences of KDG kinases from Proteobacteria, Archaea, and Bacteroidetes species (a) and KDPG aldolases from Proteobacteria and Bacteroidetes species (b). Accession numbers for amino-acid sequences along with the bacterial species are indicated in the right of each branch. Bootstrap values above 50% are indicated on the root of branches. Scale bar indicates 0.20 amino-acid substitution.

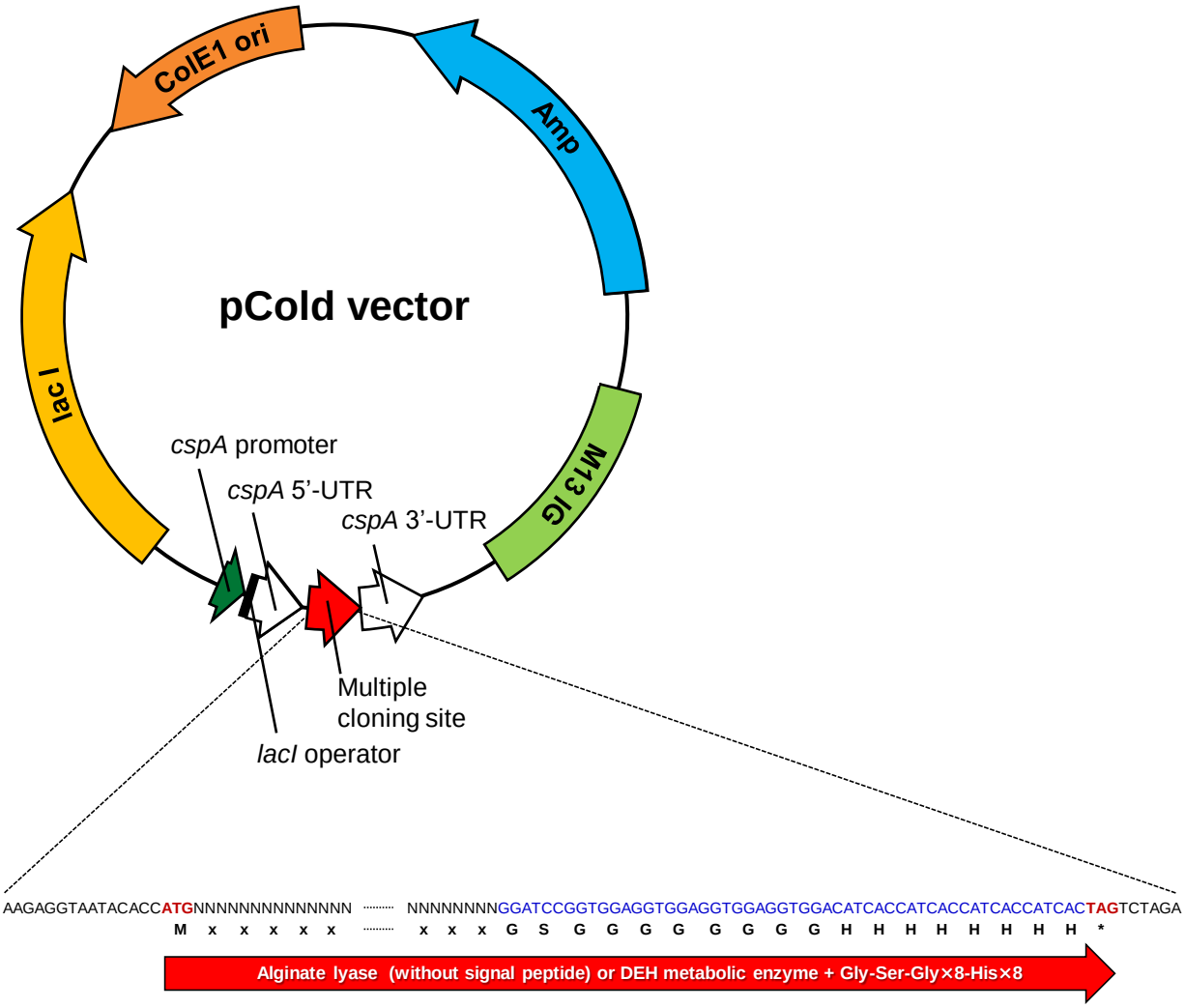


Figure 12. Construction of *Escherichia coli* expression system.

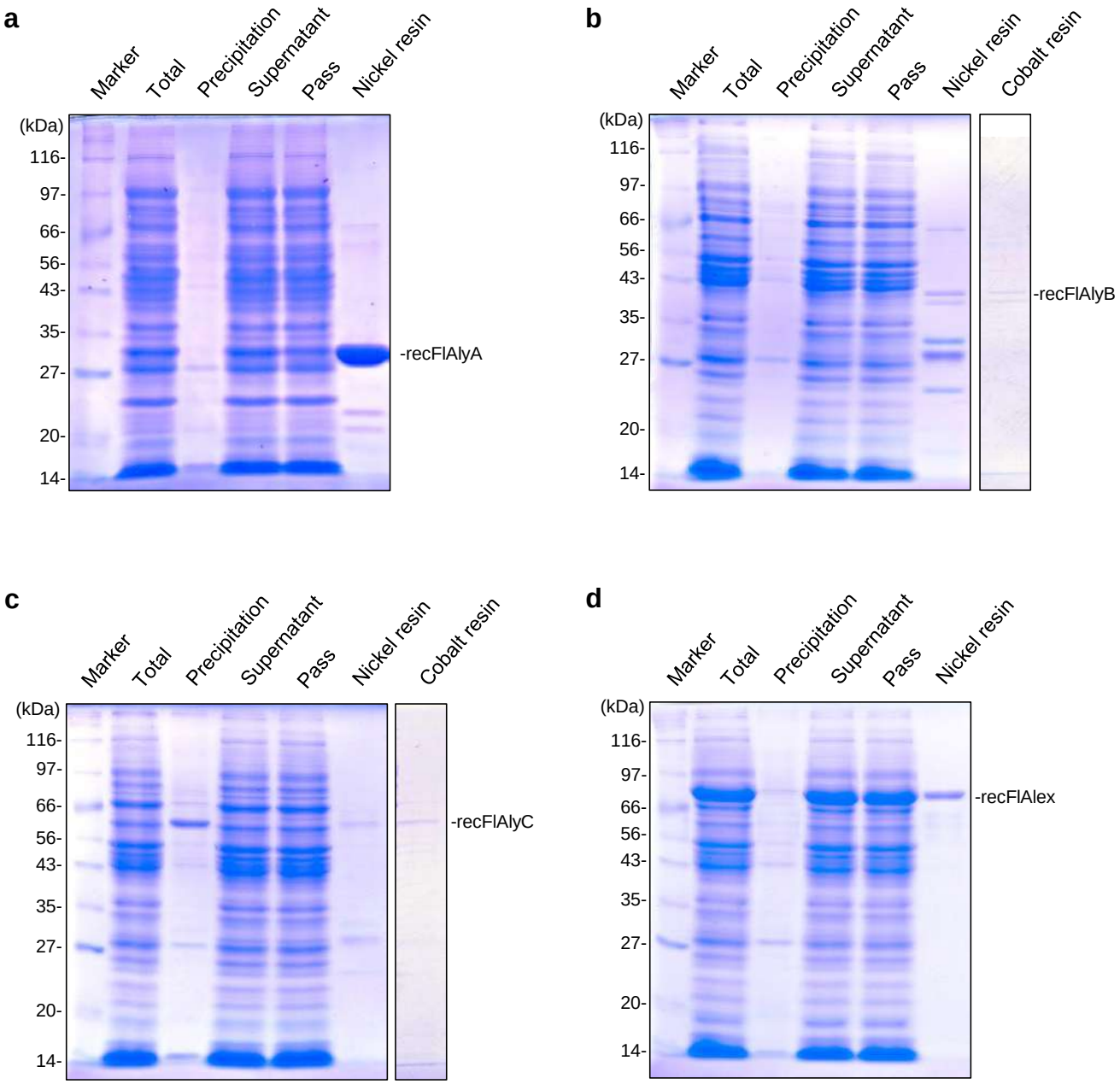


Figure 13. SDS-PAGE for recombinant alginate lyases expressed in *E. coli* BL21 (DE3).

Purification of recFlAlyA (a), recFlAlyB (b), recFlAlyC (c), and recFlAlex (d) were confirmed by SDS-PAGE. The fractions obtained in each purification steps were subjected to SDS-PAGE and the proteins were stained with CBB R-250. Marker, marker proteins; Total, homogenate of recombinant *E. coli*; Precipitation, insoluble proteins in homogenate; Supernatant, soluble proteins in homogenate; Pass, pass fraction after Ni-NTA chromatography; Nickel resin, purified protein by Ni-NTA chromatography; Cobalt resin, purified protein by TALON-resin chromatography.

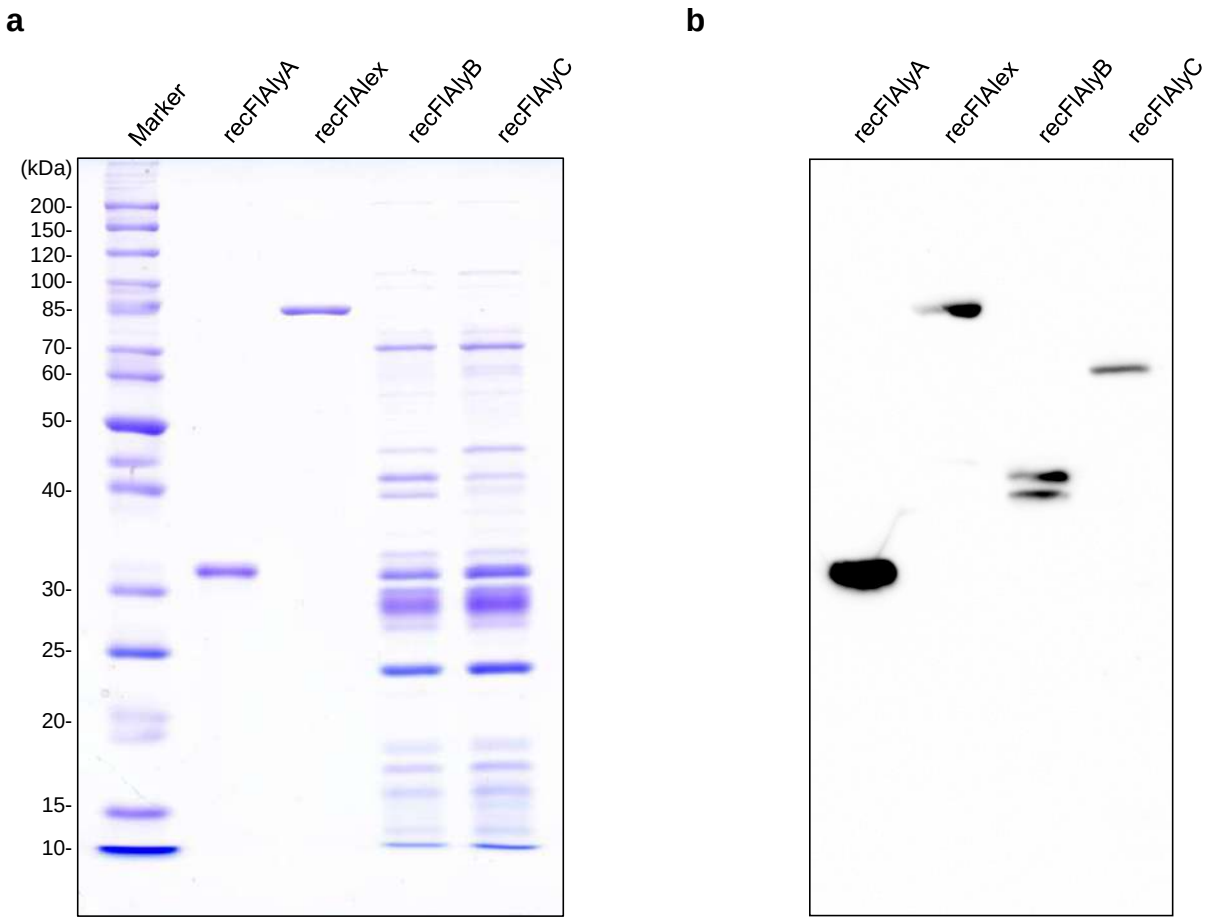


Figure 14. Western blotting for recombinant alginate lyases.

The recombinant alginate lyases purified by Ni-NTA chromatography were subjected to SDS-PAGE and the proteins were detected by CBB staining (a) and western blotting (b). The recombinant alginate lyases were detected with anti-6xHis-tag antibody labeled by peroxidase and luminescent substrate.

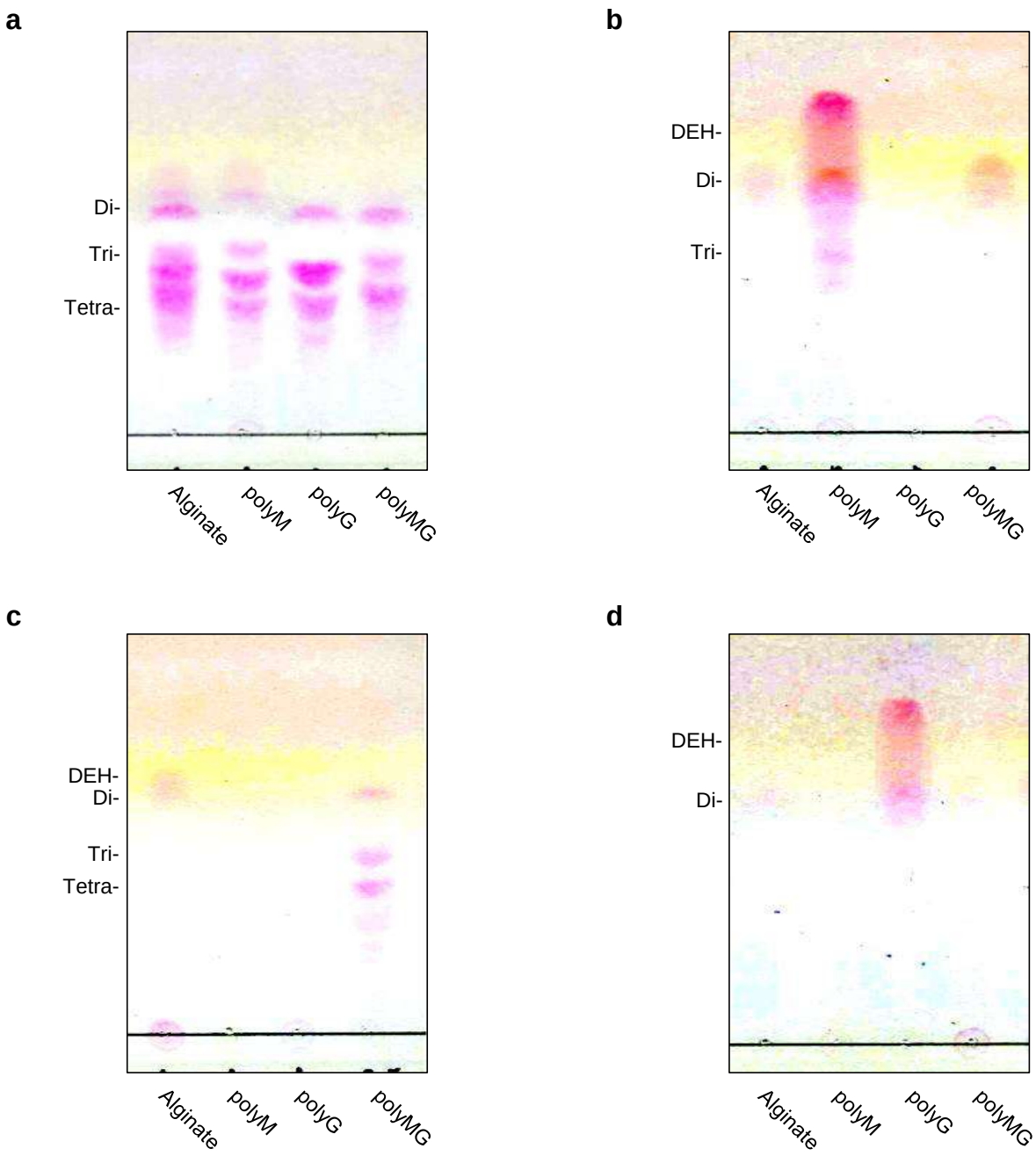


Figure 15. Analysis for the degradation products of recombinant alginate lyases by TLC.

Substrate specificities of recFlAlyA (a), recFlAlyB (b), recFlAlyC (c), and recFlAlex (d) were assayed using partially hydrolyzed alginate. The degradation products were developed on the TLC plate and stained with 4.5% (*w/v*) TBA.

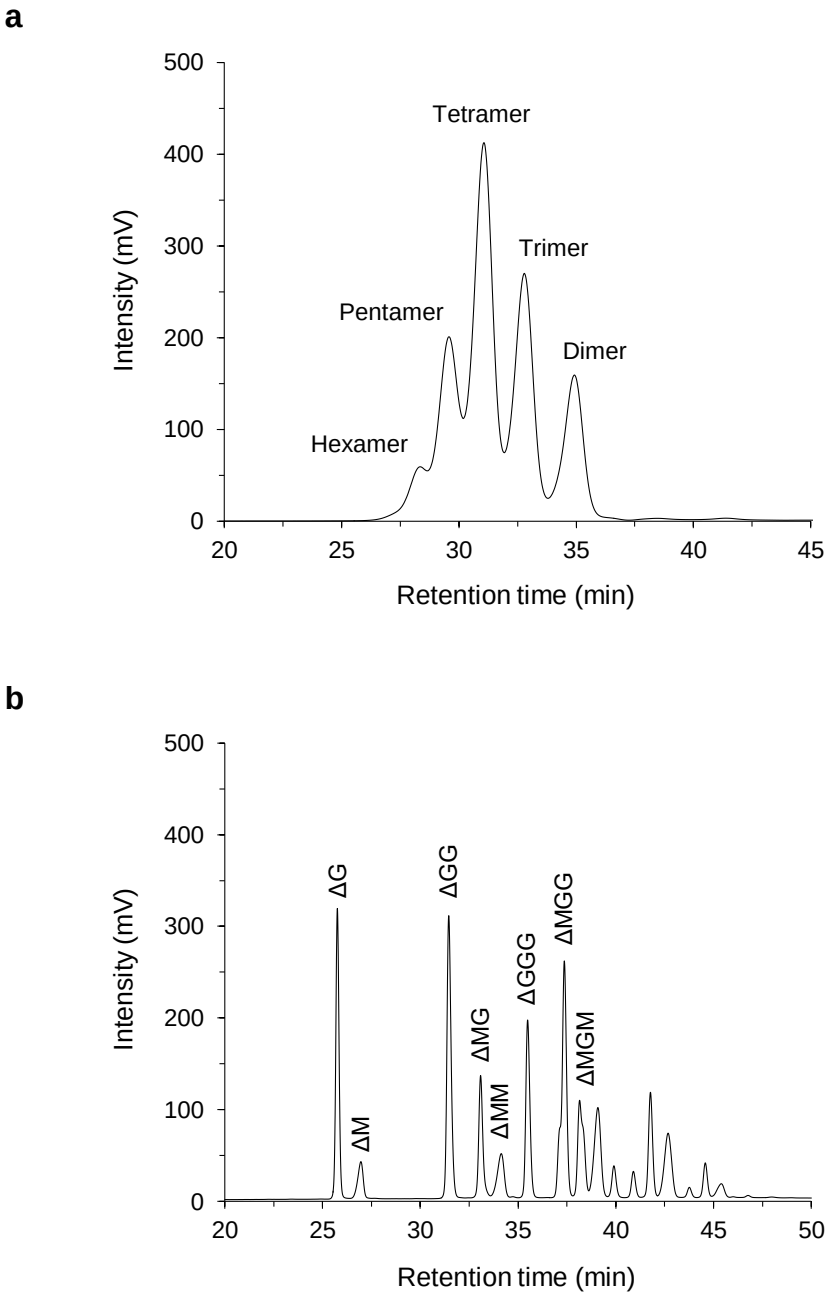


Figure 16. Determination for the molecular weights and the structures of the alginate-degradation products produced by recFlAlyA.

The degradation products of alginate were analyzed by gel-filtration (a) and anion-exchange chromatography (b). Elution of the unsaturated oligoalginates from the column were detected by measuring the absorbance at 230 nm. In this analysis, oligoalginate structures were identified by referring the Chaki's report[86] on the HPLC and NMR analysis for alginate-degradation products.

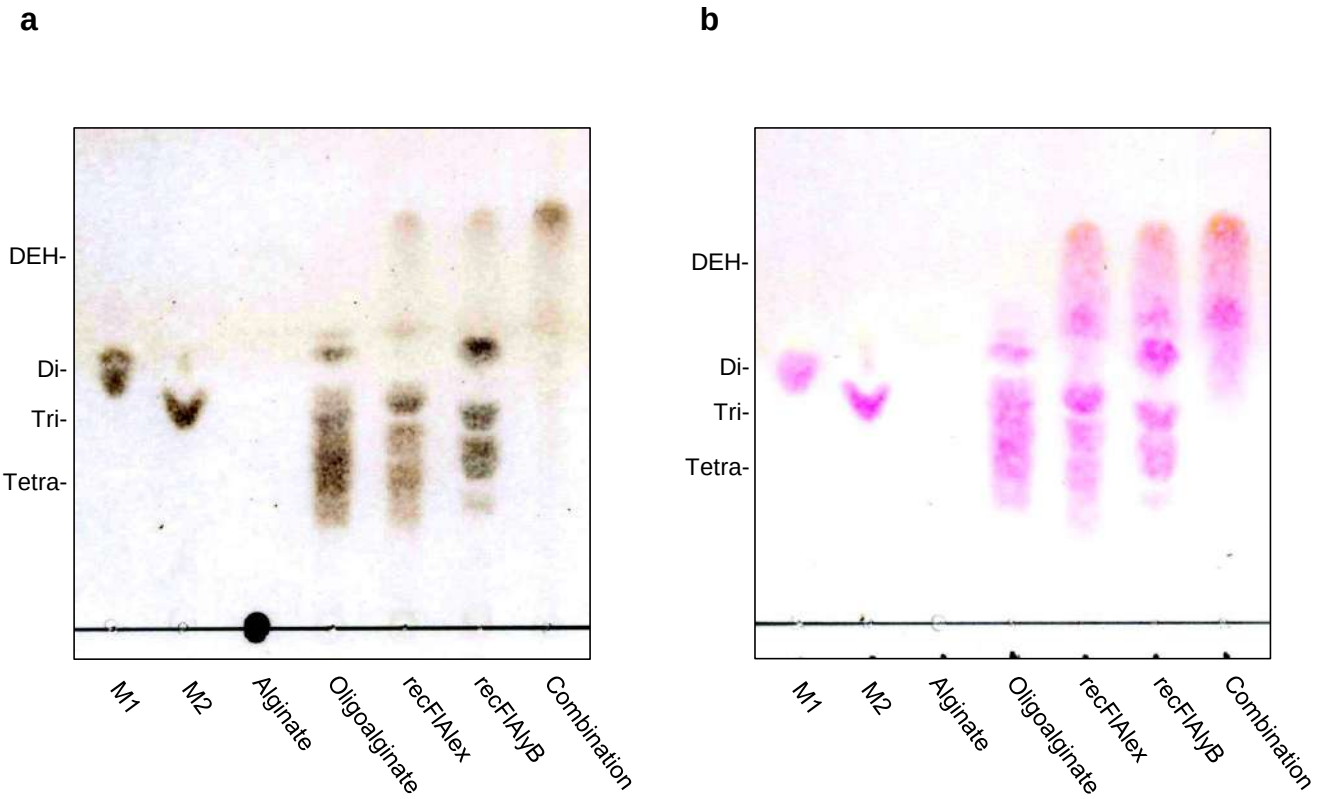


Figure 17. Complete degradation of alginate into DEH by the cooperative action of recFlAlyA, recFlAlyB, and recFlAlex.

Oligoalginates produced by recFlAlyA were mixed with recFlAlex and/or recFlAlyB, and the reaction mixtures were subjected to TLC. The reaction products were detected with 10% (*v/v*) sulfuric acid－90% (*v/v*) ethanol (a) or 4.5% (*v/v*) TBA (b). M1, dimeric oligoalginate; M2, trimeric oligoalginate; Alginate, sodium alginate before the degradation by recFlAlyA; Oligoalginate, sodium alginate after the degradation by recFlAlyA; recFlAlex, degraded oligoalginate by recFlAlex; recFlAlyB, degraded oligoalginate by recFlAlyB; Combination, degraded oligoalginate by recFlAlex and recFlAlyB.

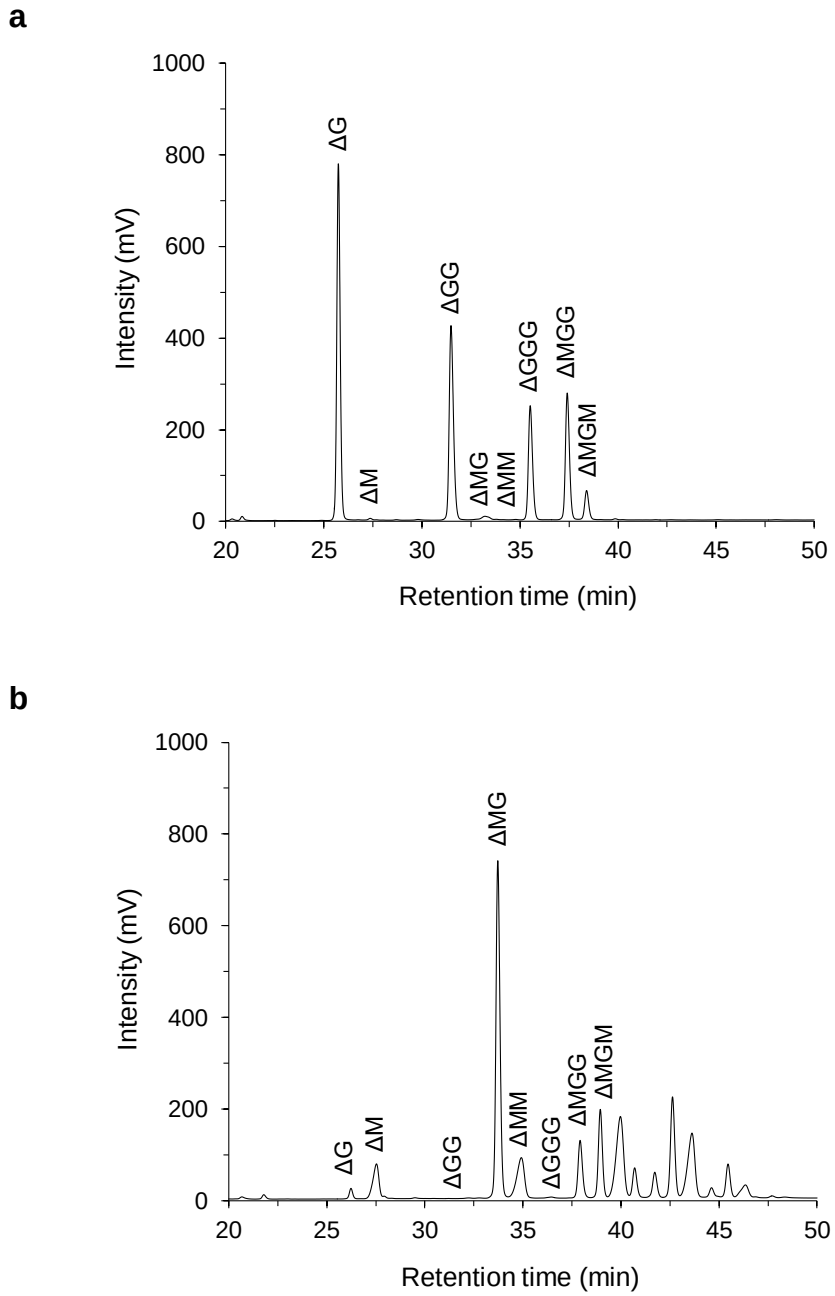


Figure 18. HPLC analysis for the degradation products produced by recFlAlyB or recFlAlex from unsaturated oligoalginates.

The degradation products produced by recFlAlyB (a) or recFlAlex (b) were analyzed by anion-exchange chromatography. The unsaturated oligoalginates were detected by measuring the absorbance at 230 nm. Their substrate specificities were assessed by comparing the chromatogram of each enzyme with that of recFlAlyA (see Figure 15b).

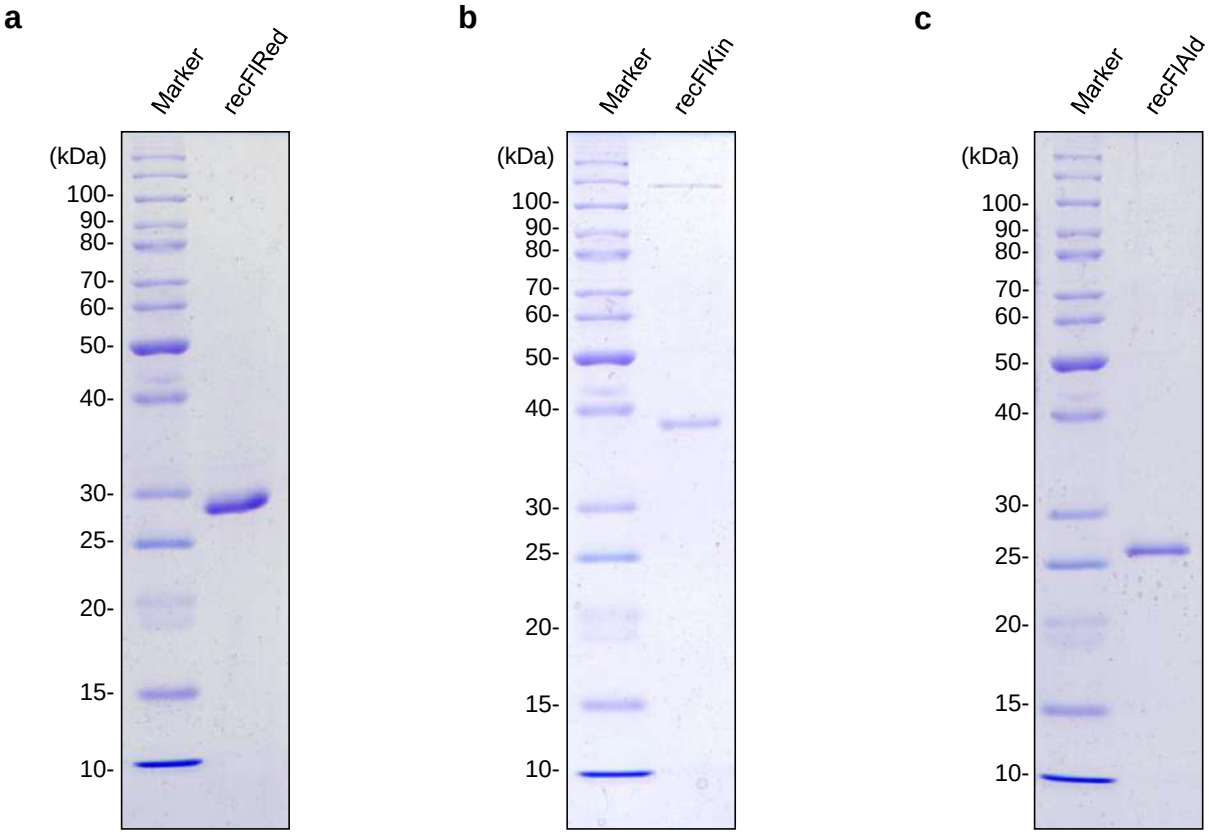


Figure 19. SDS-PAGE for recombinant enzymes involved in DEH metabolism.

recFlRed (a), recFlKin (b), and recFlAld (c) were purified by Ni-NTA affinity chromatography and subjected to SDS-PAGE. The proteins were stained with CBB R-250.

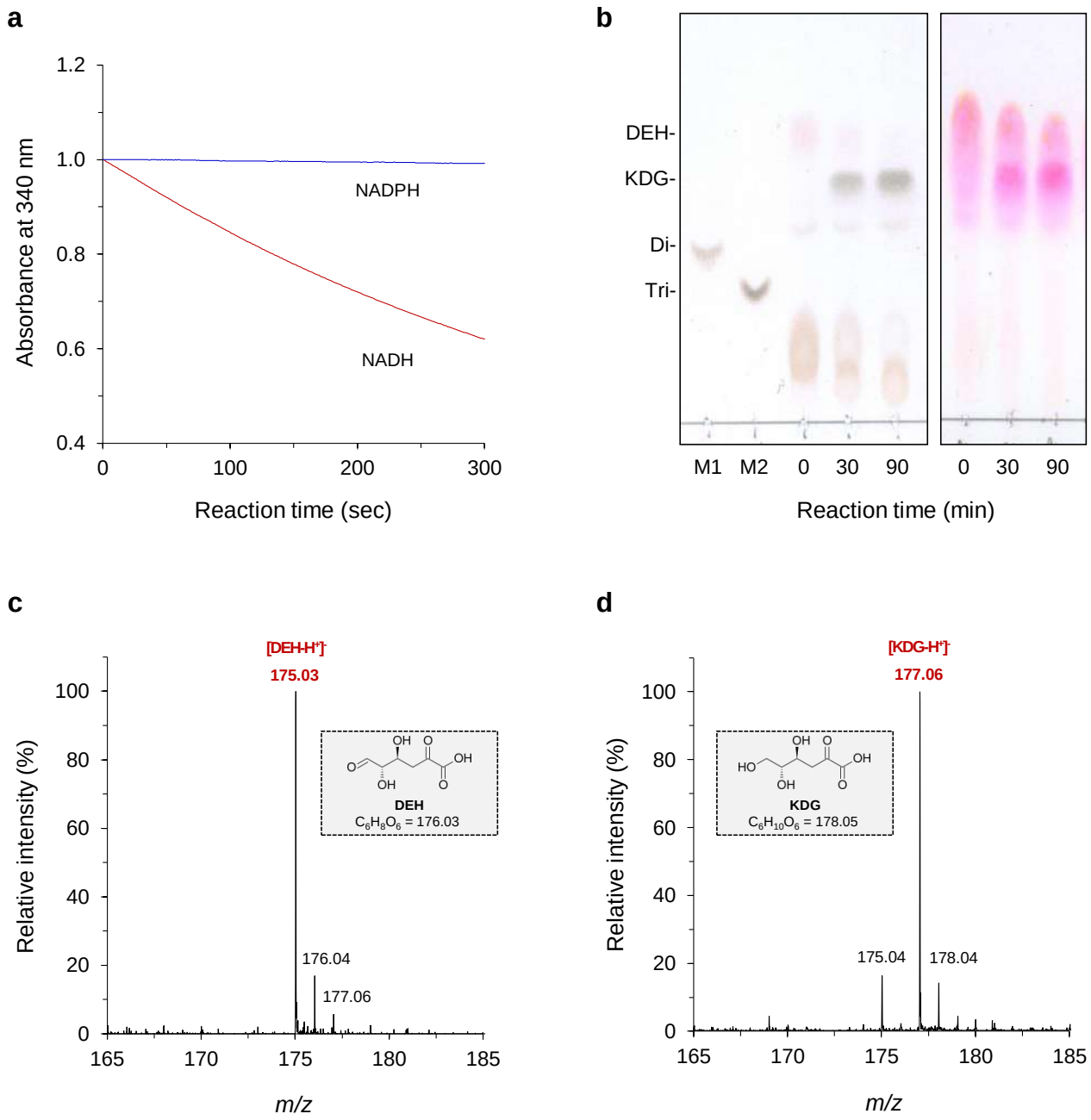


Figure 20. Functional identification of DEH reductase-like protein FlRed.

a, assay for DEH-reducing activity using NADH (Red line) or NADPH (Blue line) as a co-factor. **b**, analysis for the reaction products by TLC. The reaction products were detected with 10% (*v/v*) sulfuric acid－90% (*v/v*) ethanol (Left panel) and 4.5% (*w/v*) TBA (Right panel). M1 and M2, dimeric and trimeric oligoalginate, respectively. **c**-**d**, MALDI-TOF mass spectrometry for the reaction products. The enzymatic reactions were terminated after the incubation for 0 min (c) and 90 min (d), and the reaction mixtures were subjected to the analysis.

Table 3. Co-enzyme and substrate specificity of recFlRed.

Substrate	Specific activity (U/mg)*	Relative activity (%)*
Aldehyde		
DEH		
(NADH)	4.0±0.28	100
(NADPH)	0.043±0.002	1.1
Benzaldehyde	N.D.	N.D.
Glutaraldehyde	N.D.	N.D.
o-Phthalaldehyde	N.D.	N.D.
Ketone		
4-Methl-2-pentanone	N.D.	N.D.
2,5-Hexadione	N.D.	N.D.
3-Chloropropiophenone	N.D.	N.D.
Ethylbenzoylacetate	N.D.	N.D.
α-Keto acid		
α-Ketoglutarate	N.D.	N.D.
Aldose		
Glucose	N.D.	N.D.
Galactose	N.D.	N.D.

*N.D. means not detected.

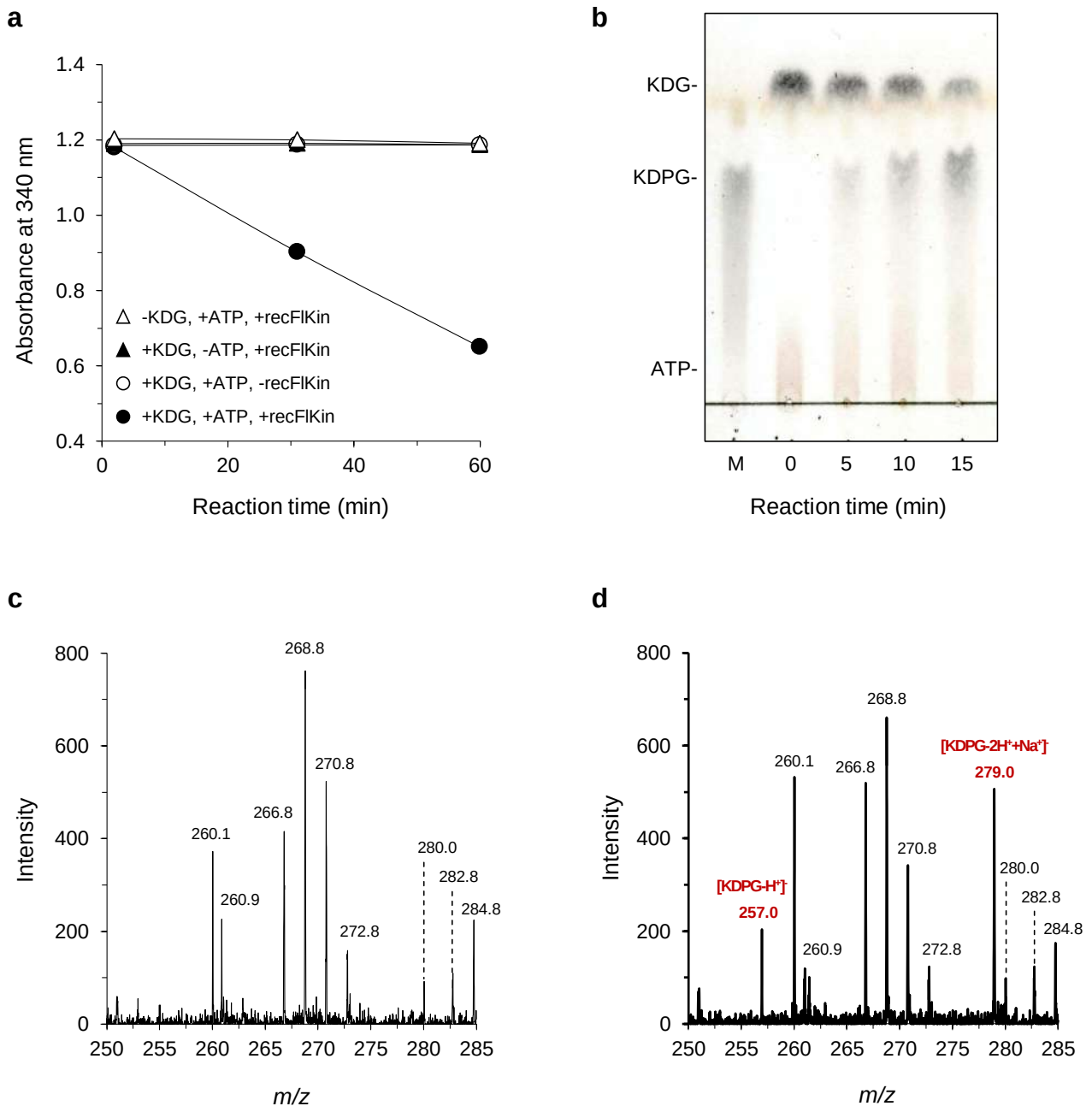


Figure 21. Functional identification of KDG kinase-like protein FlKin. a, assay for KDG-kinase activity using KDPG aldolase (recFlAld) and LDH. Closed circle, standard reaction mixture; opened circle, in the absence of recFlKin; closed triangle, in the absence of ATP; opened triangle, in the absence of KDG. **b**, Analysis for the reaction products by TLC. The reaction products were detected with 10% (*v/v*) sulfuric acid−90% (*v/v*) ethanol. M, standard KDPG purchased from Sigma-Aldrich. **c-d**, MALDI-TOF mass spectrometry for the reaction products. The enzymatic reactions were terminated after the incubation for 0 min (c) and 15 min (d), and the mixtures were used as the samples for this analysis.

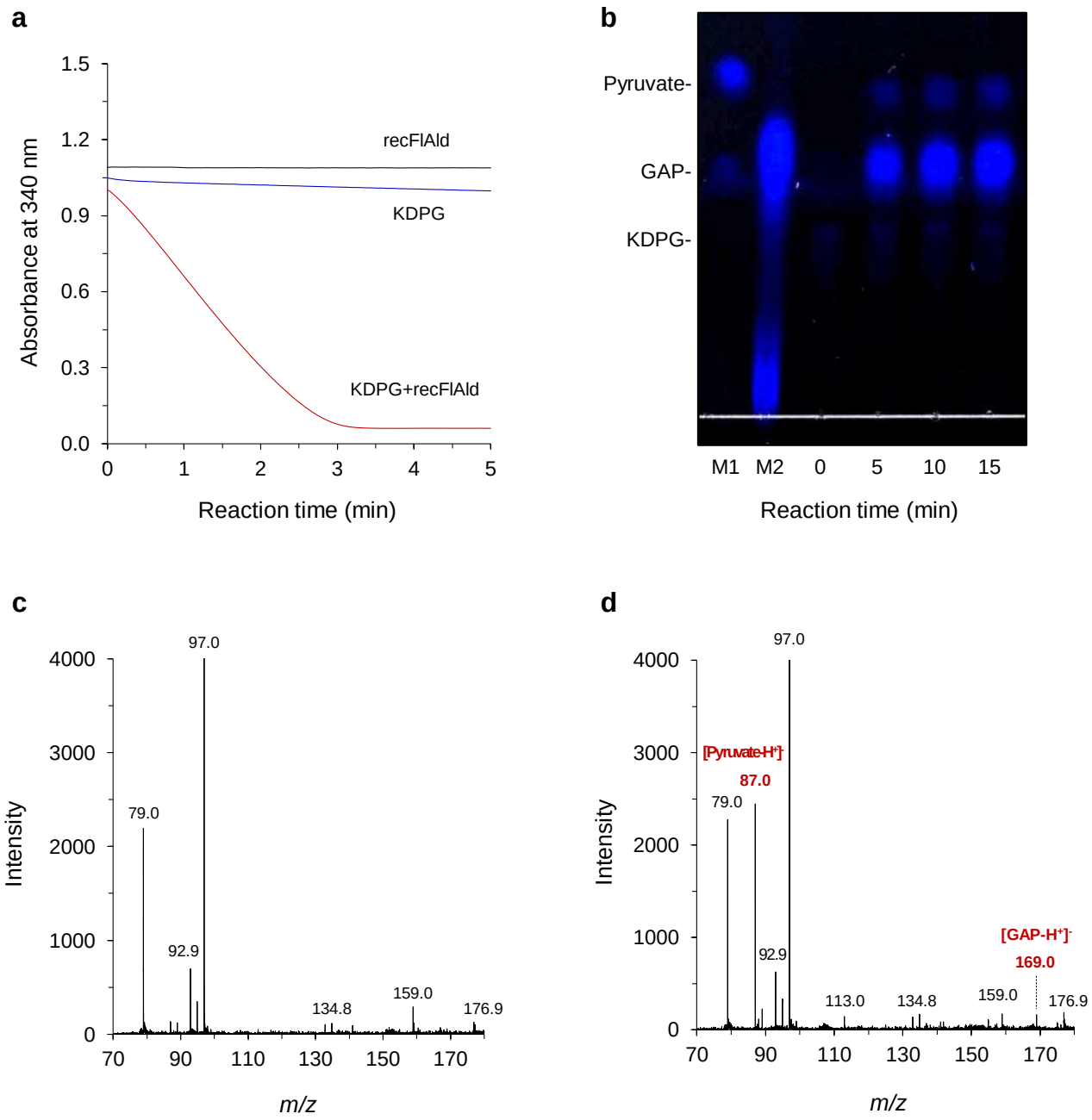


Figure 22. Functional identification of KDPG aldolase-like protein FlAld.

a, assay for KDPG-aldolase activity using LDH and NADH. Red line, standard reaction mixture; blue line, in the absence of recFlAld; black line, in the absence of KDPG. **b**, analysis for the reaction products by TLC. The reaction products were detected by DNP method. M1, standard pyruvate purchased from Wako; M2, standard GAP purchased from Sigma-Aldrich. **c-d**, MALDI-TOF mass spectrometry for the reaction products. The enzymatic reactions were terminated after the incubation for 0 min (c) and 15 min (d), and the mixtures were used as the samples for this analysis.

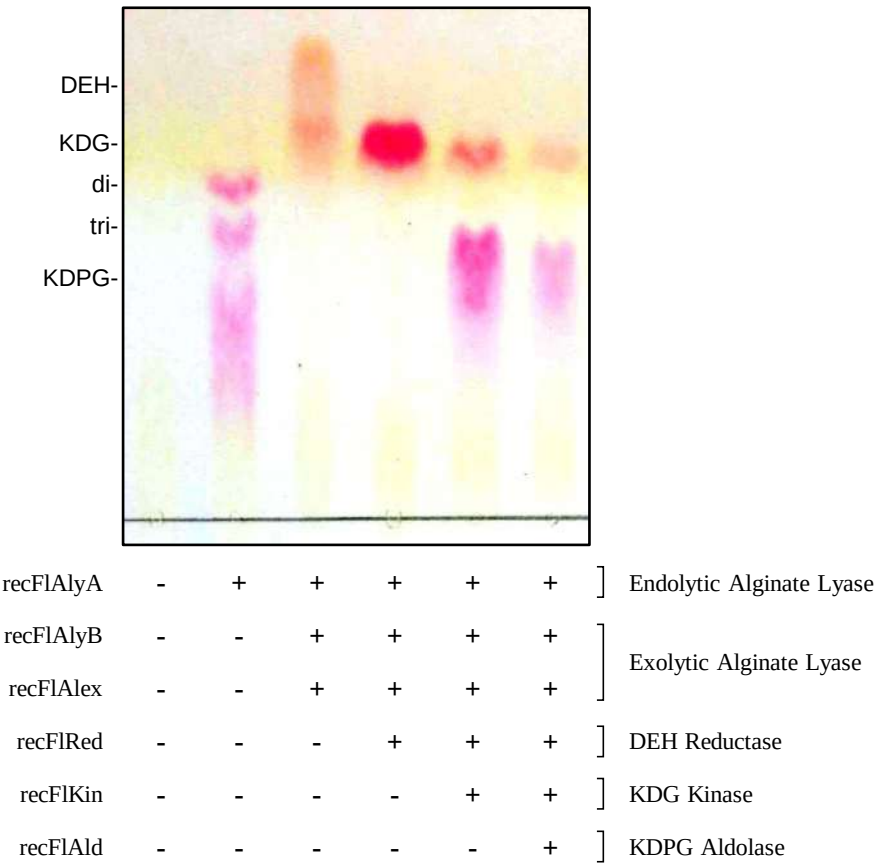


Figure 23. Reconstruction of alginate-metabolizing system in *Flavobacterium* sp. UMI-01 using recombinant enzymes.

Alginate was allowed to react with the recombinant alginate-metabolic enzymes in various combinations. The reaction products were subjected to TLC and detected with 4.5% (*w/v*) TBA. Presence and absence of each enzyme are indicated with '+' and '-', respectively.

Table 4. Quantification of the reaction products produced by the recombinant alginate-metabolic enzymes.

Enzyme	Product	Production (mM)	Yield (%)
None	Alginate*	10*	-
recFlAlyA	Oligoalginate	4.2±0.06	-
recFlAlyA, recFlAlyB, and recFlAlex	DEH	9.8±0.34	98
recFlAlyA, recFlAlyB, recFlAlex, and recFlRed	KDG	9.8±1.0	98
recFlAlyA, recFlAlyB, recFlAlex, recFlRed, and recFlKin	KDPG	8.1±0.54	81
recFlAlyA, recFlAlyB, recFlAlex, recFlRed, recFlKin, and recFlAld	Pyruvate and GAP	3.8±0.33	38

*0.2% (*w/v*) sodium alginate corresponds to 10 mM unsaturated monomeric uronate.

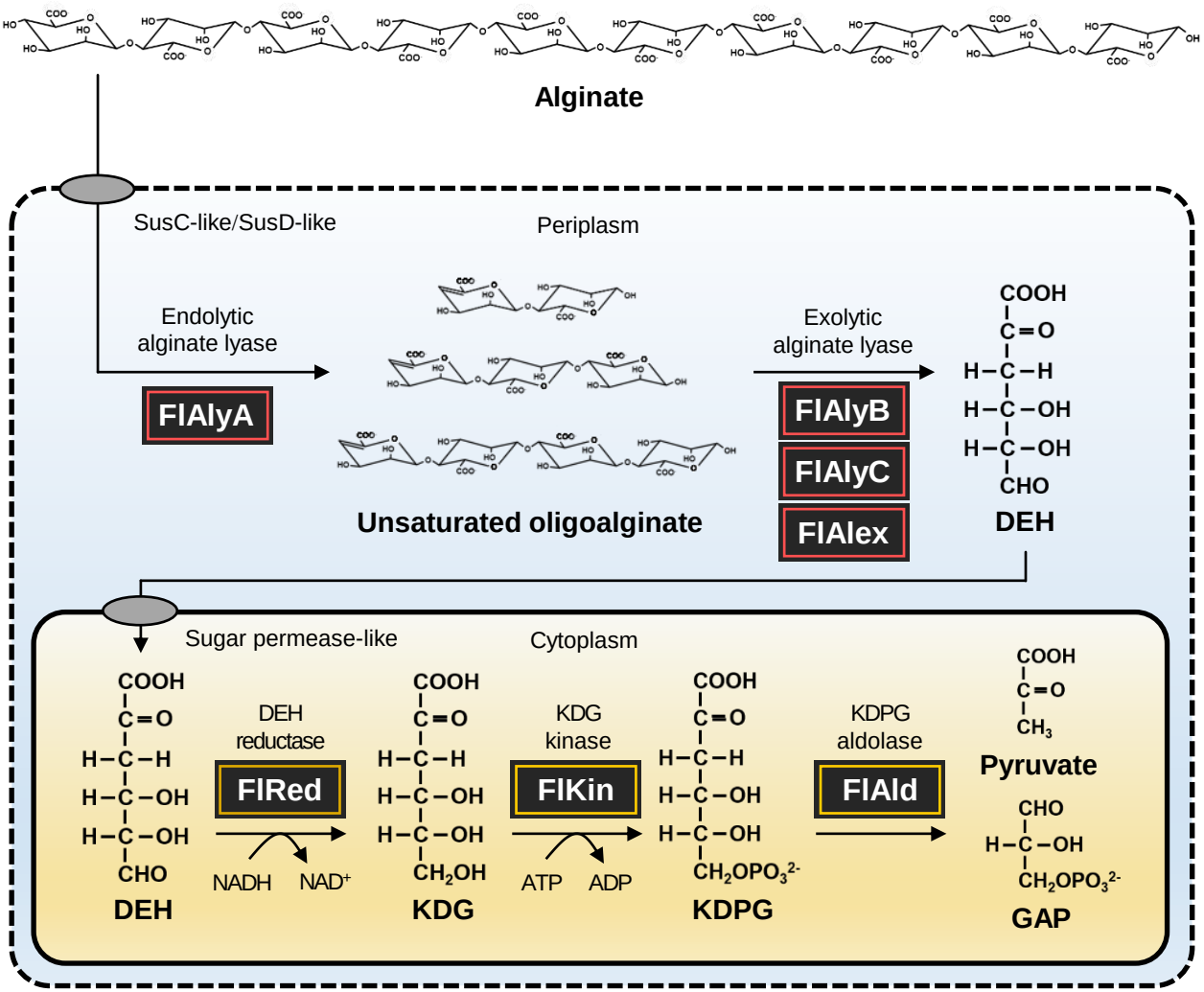


Figure 24. Whole alginate-assimilating pathway in *Flavobacterium* sp. UMI-01.

第 2 章　DEH 酸化反応を触媒する酵素の同定および生化学的特徴

第 1 項　目的

前章では、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株のドラフトゲノム解析により見出された 4 種のアルギン酸リアーゼおよび 3 種の DEH 代謝関連酵素の組換えタンパク質を作成し、本菌におけるアルギン酸分解・代謝経路を *in vitro* で再構築した (Figure 24)。DEH の還元によって生じる KDG の代謝経路は、1962 年に Ashwell と Preiss により提唱されたもの [30] (Figure 2) と同一であり、他のアルギン酸資化細菌である *Sphingomonas* sp. A1 株 [52]、*S. degradans* 2-40^{T} 株 [90]、*Z. galactanivorans* DsijT 株 [58]、および *V. splendidus* 12B01 株 [7,8] においても同様の経路により DEH が代謝されると推定されている。このように、Figure 24 で示したアルギン酸代謝経路は、多くのアルギン細菌に保存されている経路であると考えられた。一方、UMI-01 株の無細胞抽出液中には、DEH の酸化物 (UP1) を生成する「DEH 酸化酵素」の存在が見出された。このような生化学的反応を触媒する酵素の報告例は未だ無く、本菌で生じた DEH は既知のものとは異なる新規の経路により代謝される可能性があった。

そこで本章では、先ず UMI-01 株の無細胞抽出液から DEH 酸化酵素の単離を試み、その存在確認および生化学的特徴の解析を行った。その結果、この DEH 酸化酵素は、既に第 1 章で同定していた DEH 還元酵素 FlRed と同一の酵素であることが明らかになったが、前章で調製した FlRed の組換え体である recFlRed は DEH 酸化活性を示さないことも明らかになった。この原因の一つとして、recFlRed が天然酵素と異なりその C 末端に His-tag を有していることが考えられた。そこで、本章では C 末端から His-tag を除去した recFlRed (recFlRedΔtag) が酸化活性を示すかどうかを検討するとともに、FlRed の性状解析、遺伝子解析、およびアミノ酸変異導入試験を行った。さらに、DEH の酸化物である UP1 の構造を決定するとともにその酵素的生成機構を明らかにすることとした。

第 2 項　実験手法

1. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株からの DEH 酸化酵素の調製

1.1. 無細胞抽出液の DEH 酸化活性の解析

無細胞抽出液による DEH 変換反応は、TLC により解析した (第 1 章、実験手法 4.1.1.参照)。すなわち、25 mM DEH、10 mM リン酸カリウム (pH 7.4)、100 mM KCl、1 mM DTT、5 mM NAD(H)から成る反応混液に UMI-01 株の無細胞抽出液を 0.5 mg/mL になるように加え、25ºC で 120 分間反応させた。反応は、各時間に分取した反応混液を等量のクロロホルムと混合することで停止し、生じた反応物は TLC により解析した。TLC プレートに負荷した試料は、1-ブタノール、酢酸、アセトン、および水を 35:35:7:23 (*v:v:v:v*) の割合で混合した溶媒を用いて展開し、TBA 法 (第 1 章、実験手法 3.4.3.参照) により発色した。

1.2. 無細胞抽出液からの DEH 酸化酵素の精製

1.2.1. DEH 酸化活性の検出

DEH 酸化酵素の活性は、まず DEH から生じる UP1 を TLC で検出することにより、定性的に調べた。すなわち、酵素反応を 5 mM DEH、適量の無細胞抽出液 (粗酵素) あるいは精製酵素、10 mM リン酸カリウム (pH 7.4)、100 mM KCl、および 5 mM NAD^+を含む 25ºC の反応混液中で 60 分間行い、反応液を TLC プレートに供した後、実験手法 1.1.と同様の方法で反応生成物の展開および発色を行った。

1.2.2. 疎水クロマトグラフィー

粗酵素の疎水クロマトグラフィーは、TOYOPEARL Butyl-650M を用いて以下の通り行った。すなわち、試料を 10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) で透析した後、固形硫酸アンモニウムを終濃度で 1 M となるように加え溶解した。その際、試料の pH が 7.4 となるように 1 M アンモニア水を用いて調整した。その試料を 1 M 硫酸アンモニウムを含む 10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4)で平衡化した TOYOPEARL Butyl-650M カラム (2.4×20 cm) に供した後、100 mL の上記の硫酸アンモニウム溶液でカラムを洗浄した。次いで、カラムに吸着したタンパク質を、1-0 M 硫酸アンモニウムの直線濃度勾配 (計 800 mL、10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) を含む) により溶出させた。その後、カラムに残存したタンパク質を計 100 mL の 10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) で溶出させた。活性画分の溶出位置は TLC により特定し、それらの画分は 10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) で透析した後に使用した。

1.2.3. 陰イオン交換クロマトグラフィー

前項で得られた活性画分に含まれる DEH 酸化酵素は、TOYOPEARL SuperQ-650S および MonoQ 4.6/100 PE に順次供することで精製した。まず、前項の活性画分を 10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) で平衡化した TOYOPEARL SuperQ-650S カラム (2.4×20 cm) に供した後、100 mL の同バッファーでカラムを洗浄した。次いで、カラムに吸着したタンパク質を、0-0.3 M の NaCl 直線濃度勾配 (計 800 mL、10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) を含む) により溶出した。その後、カラムに残存したタンパク質を計 100 mL の 0.3 M NaCl－10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) で溶出した。得られた活性画分に含まれるタンパク質は、1 M アンモニア水で溶液の pH を 7.4 に調整しながら、固形硫酸アンモニウムを 80%飽和濃度まで加えることにより沈殿させ、それを遠心分離で集めた後、最少量の 10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) に溶解した。得られた酵素液は、10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) に透析し、遠心分離により不溶性のタンパク質を除去した後に使用した。

この酵素液は、次いで MonoQ 4.6/100 PE カラムを装着した AKTA-FPLC システム (GE Healthcare) に供した。すなわち、10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) で平衡化した MonoQ 4.6/100 PE カラムに試料を供し、3.4 mL の同バッファーで洗浄した。次いで、カラムに吸着したタンパク質を、0-0.3 M NaCl の直線濃度勾配 (計 34 mL、10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) を含む) により溶出した。その後、カラムに残存したタンパク質を 3.4 mL の 0.3 M NaCl－10 mM リン酸ナトリウムで溶出した。得られた活性画分は、0.15 M NaCl－10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) に透析した後に使用した。

1.2.4. ゲル濾過クロマトグラフィー

タンパク質の最終精製および非変性条件下における分子量推定のためにゲル濾過クロマトグラフィーを行った。すなわち、前項で得られた活性画分を VIVASPIN20 centrifugal concentrator (分画分子量 10,000、Sartorius) を用いて濃縮後、Superdex 200 10/300 GL カラムを装着した AKTA-FPLC システムに供し、24 mL の 150 mM NaCl－10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) で溶出した。SDS-PAGE により活性画分に含まれるタンパク質が単一であることを確認した後、これを精製酵素として使用した。

なお、分子量の推定のために使用した標準物質の Blue dextran (M_r=2,000,000)、conalbumin (M_r=75,000)、ovalbumin (M_r=44,000)、carbonic anhydrase (M_r=29,000)、ribonuclease (M_r=13,700)、および aprotinin (M_r=6,500) の溶出体積は、それぞれ 8.3、14.5、15.5、16.8、18.2、および 19.6 mL であり、それらの K_{av} ((溶出容量-ボイド容量)/(カラム容量-ボイド容量)) は、それぞれ 0、0.405、0.471、0.556、0.647、および 0.739 と算出された。タンパク質試料の平均分子量は、それらに基づき作成した検量線から見積もった。

1.3. タンパク質の一次構造解析

1.3.1. N 末端アミノ酸配列解析

タンパク質試料の N 末端アミノ酸配列は、SDS-PAGE により分離した後に PVDF 膜に転写した試料を用いてエドマン分解法により決定した。まず、アクリルアミドによるタンパク質 N 末端の修飾を防ぐため、作成後 20 時間以上経過させた 10%ポリアクリルアミドゲルを用いて、タンパク質試料の SDS-PAGE を行った。その後、20% (*v/v*) メタノール－300 mM Tris－0.05% (*w/v*) SDS および 20% (*v/v*) メタノール－25 mM Tris－0.05% (*w/v*) SDS で平衡化した濾紙をそれぞれ 4 枚ずつ下から順に重ね、20% (v/v) メタノール－25 mM Tris－40 mM アミノヘキサン酸－0.05% (*w/v*) SDS で平衡化した PVDF 膜、アクリルアミドゲル、および 4 枚の濾紙を下から順に重層した。ブロッティングは、定電流 (1 mA/cm^2) で 80 分間行い、通電後の PVDF 膜を蒸留水で十分に洗浄した。PVDF 膜は、0.1% (*w/v*) CBB R-250－50% (*v/v*) メタノールで 1 分間染色した後、20% (*v/v*) メタノール－10% (*v/v*) 酢酸、50%

(*v/v*) メタノール、および 90% (*w/v*) メタノールでそれぞれ 1 分間、5 分間、および 10 分間洗浄することによりタンパク質非存在部位を脱色した。PVDF 膜を十分に風乾した後、そこから目的タンパク質のバンドを切り出し、それをエドマン分解の試料として使用した。本研究では、PVDF 膜転写試料の N 末端配列を、北海道大学グローバルファシリティーセンター機器分析受託部門において Procise 492HT (Perkin Elmer) により決定した。

1.3.2. 内部アミノ酸配列解析

タンパク質の内部アミノ酸配列は、質量分析器により以下のように決定した。まず、タンパク質試料を 10 mM DTT 存在下において 100ºC で 5 分間インキュベートし、さらに終濃度で 25 mM となるようにヨードアセトアミドを加え、遮光下において 30ºC で 1 時間インキュベートすることにより還元アルキル化した。この試料を SDS-PAGE に供し、ゲルを CBB で染色した後、目的タンパク質のバンドを切り出した。このゲル片を 100 mM 重炭酸アンモニウム－50% (*v/v*) アセトニトリルで脱色し、蒸留水でゲルの脱塩処理を行った後、アセトニトリルとともに 15 分間ボルテックスすることで脱水した。アセトニトリルを除去し、ゲル片を風乾した後、10 μg/mL のブタ膵臓由来トリプシンを含む 25 mM 重炭酸アンモニウムを加え、氷上で 5 分間静置することによりゲル片を膨潤させた。余剰のトリプシン溶液を除去し、100 mM 重炭酸アンモニウムでゲルを洗浄した後、新たな 100 mM 重炭酸アンモニウムを加え、37ºC で一晩インキュベートすることにより、ゲル中のタンパク質のトリプシン消化を行った。ゲル片周囲の溶液を回収した後、ゲル片を 50% (*v/v*) アセトニトリル－0.5% (*v/v*) TFA とともに 15 分間ボルテックスすることで、トリプシン消化物をゲルから抽出した。なお、この操作は 2 回繰り返し、2 回分のトリプシン消化物を合一した。遠心エバポレーターによりアセトニトリルを揮発除去した後、0.1% (*v/v*) TFA で溶解した試料を以下の通り処理し、MALDI-TOF-MS/MS の試料とした。

上記トリプシン消化物の脱塩、グアニジノ化、および SPITC 化は、以下の手順で行った。まず、50% (*v/v*) アセトニトリル－0.1% (*v/v*) TFA で予備洗浄した Zip-Tip (Applied Biosystems) を 0.1% (*v/v*) TFA で平衡化した後、トリプシン消化物を吸引することにより担体に吸着させた。0.1% (*v/v*) TFA で洗浄した後、トリプシン消化物のグアニジノ化を行うため、Zip-tip に 0.5 M *O*-メチルイソ尿素を含む 0.25 M 炭酸ナトリウムを吸引し、37ºC で 2 時間インキュベート後、0.1% (*v/v*) TFA で洗浄した。次いで、SPITC 化を行うため、2.55 mg/mL SPITC (4-sulfophenyl isothiocyanate) を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.2) を吸引し、50ºC で 1 時間インキュベート後、0.1% (*v/v*) TFA で洗浄した。最後に、担体に吸着している SPITC 化トリプシン消化物を 70% (*v/v*) アセトニトリル－0.1% (*v/v*) TFA で溶出させた。この試料は、飽和 CHCA (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) を含む 50% (*v/v*) アセトニトリル－0.1%

(*v/v*) TFA と 1:1 (*v:v*) の割合で混合し、サンプルプレートに滴下後、乾燥させた。この SPTIC 化ペプチドフラグメントは、Proteomics Analyzer 4700 (Applied Biosystems) MALDI-TOF-MS に供し、MS/MS 解析を行うことにより、そのアミノ酸配列を決定した。

1.3.3. 全一次構造の決定

実験手法 1.3.1.もしくは 1.3.2.で決定した部分アミノ酸配列に基づいて、BLAST+検索 (第 1 章、実験手法 1.2.) によりタンパク質遺伝子を同定し、その演繹アミノ酸配列から全一次構造を推定した。すなわち、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株ドラフトゲノム配列および N 末端もしくは内部アミノ酸配列をそれぞれデータベース配列およびクエリー配列として用いて BLAST+検索を行い、目的タンパク質をコードする遺伝子を同定した。

2. 組換え DEH 酸化酵素の作出

2.1. インバース PCR によるタグ配列の除去

C 末端から His-tag を除去した recFlRed (recFlRedΔtag) は、recFlRed の発現プラスミド (pCold/FlRed) からインバース PCR により His-tag 配列を除去し、それにより形質転換された大腸菌を用いて作出した。すなわち、第 1 章の実験手法 2.で作成した C 末端にリンカーおよび His-tag 配列が付加されるように設計されている recFlRed の発現プラスミド (pCold/FlRed) (Figure 12) を鋳型としてインバース PCR を行い、リンカー配列および His-tag 配列を除くプラスミド全領域を増幅した。その際、DNA ポリメラーゼには複製の正確性に優れた KOD-Plus-Neo (TOYOBO) を用いた。PCR は、1 ng の pCold/FlRed、0.3 μM の特異プライマーセット (Table 5) を含む 50 μL の反応混液を用いて、94ºC で 2 分間のプレインキュベート後に、98ºC で 10 秒間、60ºC で 30 秒間、および 68ºC で 150 秒間の反応サイクルを 30 回繰り返すことにより行った。PCR による増幅産物の生成は、反応液をアガロースゲル電気泳動に供することで確認した。

上記の PCR 産物は、リン酸化およびセルフライゲーションを行った後に、*E. coli* DH5α 株に導入し、得られた複数の形質転換体からプラスミドを抽出した。除去したリンカー配列中には *Bam*HI サイトがあるため、この制限酵素で消化されないプラスミドを目的の変異体プラスミドとして選択した。His-tag 配列を除去したプラスミド (pCold/FlRedΔtag) は RNase 処理後に *E. coli* BL21 (DE3) 株に導入し、この組換え大腸菌を用いて recFlRedΔtag を作出した。

2.2. 組換え DEH 酸化酵素 recFlRedΔtag の発現および精製

前項で作成した pCold/FlRedΔtag を導入した形質転換大腸菌を、1 L の 50 μg/mL アンピシリンナト

リウムを含む 2×YT 培地に植菌し、37ºC で 16 時間培養した。組換えタンパク質の発現誘導のために、培養液を 15ºC で 30 分間インキュベート後、終濃度で 0.1 mM となるように IPTG を加え、15ºC で 24 時間インキュベートした。遠心分離により菌体を回収し、200 mL の 10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) に懸濁後、凍結融解およびソニケーションにより菌体からタンパク質を抽出した。遠心分離により得られた上清は、10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) に透析後、実験手法 1.2.と同様の手順で TOYOPEARL Butyl-650M および MonoQ 4.6/100 PE カラムクロマトグラフィーにより精製した。recFlRedΔtag の DEH 還元活性は第 1 章の実験手法 4.1.2.の通り検出し、その精製度は SDS-PAGE により確認した。

3. 組換え DEH 酸化酵素 recFlRedΔtag の機能解析

3.1. DEH 還元活性の測定

recFlRedΔtag の DEH 還元活性は、第 1 章の実験手法 4.1.2.と同様に NADH の酸化に伴う 340 nm の吸光度の減少を測定することにより調べた。なお、酵素反応も第 1 章の実験手法 4.1.2.と同様の条件下で行った。

3.2. DEH 酸化活性の測定

recFlRedΔtag の DEH 酸化活性は、まず、NBT (Nitro Blue Tetrazolium) -PMS (Phenazine Methyl Sulfate) 反応系を利用して、DEH の酸化反応により生じる NADH を検出することにより調べることとした。この反応系では、PMS を電子キャリアとして用いることで、NADH の酸化および NBT の還元を共役させ、生成した NBT 還元物の青色 (極大吸収波長 530 nm) を検出することで酸化活性の有無を調べることができる。しかしながら、この方法で recFlRedΔtag の DEH 酸化活性を調べた結果、530 nm における吸光度が全く上昇しなかったため、その活性を検出することは出来なかった。

このような理由から、recFlRedΔtag の DEH 酸化活性は、定性的ではあるが酵素反応により生じる UP1 を TLC で検出することにより調べることとした。酵素反応および TLC 解析は、実験手法 1.1.と同様の条件で行った。

3.3. Native-PAGE による補酵素結合能の解析

recFlRedΔtag と recFlRed の補酵素結合能は、Native-PAGE により評価した。Native-PAGE は、 基本的に実験手法 2.8.と同様の方法で行ったが、ゲル、ローディングバッファー、および泳動バッファーは以下のものを使用した。すなわち、分離ゲルには SDS を含まない 6% (*w/v*) ポリアクリルアミドゲルを使用し、濃縮ゲルは装着しなかった。また、ローディングバッファーは、グリセロール、BPB、

および Tris-HCl (pH 8.8) をそれぞれ終濃度で 35% (*v/v*)、0.01% (*w/v*)、および 0.36 M となるように混合したものを使用した。約 2 μg のタンパク質を含む試料を 5 mM NADH、NAD^+、もしくは DEH と共にゲルに供し、SDS を含まない Tris-Glycine バッファーを用いて 4°C で電気泳動を行った。

4. DEH の酸化反応生成物の同定

4.1. α-ケト酸の定量

DEH や KDG などの α-ケト酸は、セミカルバジド法により定量した[91,92]。すなわち、α-ケト酸を含む試料と 0.1 M セミカルバジド－0.11 M 酢酸ナトリウムを 1:1 (*v:v*) の割合で混合し、30°C で 30 分間インキュベートした後、そのセミカルバジド誘導体に由来する 250 nm の吸光度 (ε=7,200 (M^{-1})) を測定することにより、試料中の α-ケト酸を定量した。

4.2. DEH 酸化反応生成物 UP1 の調製

DEH の酸化反応物 (UP1) は、recFlRedΔtag を用いて以下のように調製した。25 mM DEH、10 mM リン酸カリウム (pH 7.4)、および 5 mM NAD^+を含む反応混液に終濃度で 50 μg/mL となるように recFlRedΔtag を加え、25°C で 12 時間インキュベートした。タンパク質および NAD^+を除去するため、酵素反応液に 4 倍量の 2-プロパノールを加え、-20°C で 2 時間静置した後、遠心分離によりその上清を回収した。溶液中に含まれる 2-プロパノールは、ロータリーエバポレーターを用いて蒸発除去し、得られた固形物は蒸留水に溶解した。次いで、この溶液を蒸留水で平衡化した TOYOPEARL SuperQ-650S カラム (2.4×22 cm) に供し、計 200 mL の蒸留水でカラムを洗浄した。次いで、カラムに吸着した化合物を、0-0.2 M NaCl 直線濃度勾配 (計 300 mL) により溶出させた。その後、カラムに残存した化合物を計 200 mL の 0.2 M NaCl で溶出させた。各フラクションに含まれる α-ケト酸は、セミカルバジド法および TLC 解析により検出した。

4.3. ESI-MS による UP1 の構造決定

前項で精製した UP1 は、HPLC を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより脱塩した後に、ESI-MS に供した。NaCl および僅かに残留した NAD^+を除去するため、試料を蒸留水で平衡化した Superdex peptide 3.2/300 GL カラムに供し、同溶液で UP1 を溶出させた。その際、検出波長を 210 nm に設定することで、UP1、NaCl、および NAD^+の溶出をそれぞれ確認し、セミカルバジド法により UP1 を含むフラクションを特定した。脱塩した試料の ESI-MS 分析は、北海道大学グローバルファシリティーセンター機器分析受託部門に委託した。試料は、メタノールで希釈後、Thermo Scientific Exactive (Thermo Fisher Scientific) に供し、エレクトロスプレー法により生成した質量範囲 50-1,000 (*m/z*) の

陰イオンをチューブレンズ電圧 55 V、スキマー電圧 15 V、および質量分解能 50,000 の条件下で検出した。

5. FlRed の酵素活性に関与するアミノ酸残基の同定

5.1. インバース PCR によるアミノ酸点変異導入

組換え酵素へのアミノ酸点変異導入は、実験手法 2.1.で作成した pCold/FlRedΔtag を鋳型として用いたインバース PCR により行った。すなわち、KOD-Plus-Neo (TOYOBO) を DNA ポリメラーゼとして用いて、0.1 ng の pCold/FlRedΔtag、0.3 μM の任意の塩基を置換したプライマーセット (Table 5) を含む 20 μL の反応混液中で、94ºC で 2 分間のプレインキュベートを行った後、98ºC で 10 秒間、60ºC で 30 秒間、および 68ºC で 150 秒間の反応サイクルを 10 回繰り返すことにより PCR を行った。その後、PCR 産物の *Dpn*I 処理を行うことにより、メチル化された鋳型プラスミドのみを消化した。なお、得られた PCR 産物は、ニックの入った環状プラスミドであるため、これをそのまま *E. coli* DH5α 株の形質転換に使用した。得られた形質転換体からプラスミドを抽出した後、正確に変異が導入されていることを塩基配列解析により確認した。

5.2. アミノ酸点変異体の大腸菌発現および精製

前項で作成した pCold/FlRedΔtag 変異導入プラスミドを用いて *E. coli* BL21 (DE3) 株の形質転換を行った後、得られた形質転換体を 50 mL の 50 μg/mL アンピシリンナトリウムを含む 2×YT 培地に植菌し、37ºC で 16 時間培養した。タンパク質の発現誘導を促すため、培養液を 15ºC で 30 分間インキュベート後、終濃度で 0.1 mM となるように IPTG を加え、15ºC で 24 時間インキュベートした。遠心分離により菌体を回収し、50 mL の 10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) に懸濁後、凍結融解およびソニケーションにより菌体からタンパク質を抽出した。

遠心分離により得られた上清を 10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) で透析した後、40%、60%、および 80%飽和濃度となるように硫酸アンモニウムを順次加えることでタンパク質を沈殿させ、各画分のタンパク質を最少量の 10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) に溶解した。得られた 0-40%、40-60%、および 60-80%飽和硫安画分は、10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) で透析した後、それぞれの DEH 還元活性を調べた。

最も高い活性を示す画分 (40-60%飽和硫安画分) は、AKTA-FPLC システムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより変異非導入の recFlRedΔtag と同様に精製した。

5.3. His-tag を N 末端に付加した recFlRed (recFlRed_HisN) の作成

FlRed をコードする遺伝子領域は、Table 5 に示す特異プライマーを用いた Genomic PCR により増幅した。以降の PCR、ベクターへのライゲーション、大腸菌の形質転換、およびタンパク質発現・精製の操作は、第 1 章の実験手法 2.と同様であるが、ライゲーションを行う際は、*Nde*I で線状化したオリジナルの pCold I ベクター (Takara) を使用した。それにより、recFlRed の N 末端に His-tag が導入される。

第 3 項　実験結果

1. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株由来無細胞抽出液に見出された DEH 酸化活性の解析

前章において、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株ではアルギン酸の完全分解により生じる DEH が、NADH 存在下で FlRed により KDG に還元されることを明らかにした。しかしながら、DEH と本菌の無細胞抽出液 (粗酵素) を NADH 存在下で混合した際に、KDG とは異なる反応産物 (UP1) が生じることが分かった。Figure 25a によれば、KDG は反応開始 2 分後から検出され、その量は反応時間の経過に伴って増大した。しかしながら、反応液中の NADH は、反応開始 15 分でほぼ全て消費されており、それ以降の NADH 量に変化はみられなかった (Figure 26a)。すなわち、これは DEH の還元反応で生じた NAD^+が NADH に再び還元され、この NADH がただちに DEH の還元反応に再利用されていることが考えられる。また、UP1 のスポットは、反応直後ではなく KDG の生成後に出現したため (Figure 25a)、本菌の無細胞抽出液中には、NAD^+を補酵素として DEH を酸化する酵素が存在する可能性が考えられた。

そこで、反応混液に加える補酵素を NADH ではなく NAD^+として酵素反応を行った。その結果、Figure 25a とは逆に、UP1 は KDG よりも先に出現することが分かった (Figure 25b)。また、この反応により NAD^+が還元され NADH が再生されたことが確認でき、生じた NADH 量もほとんど変化しないことも明らかになった (Figure 26b)。以上の結果は、本菌の無細胞抽出液中には NADH 存在下で DEH の還元反応を触媒する FlRed だけでなく、NAD^+存在下で DEH の酸化反応を触媒する酵素が存在することを示している。

2. DEH 酸化酵素の精製および遺伝子の同定

DEH 酸化酵素は、第 1 章の実験手法 4.1.1.で調製した *Flavobacterium* sp. UMI-01 株の無細胞抽出液を疎水クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、およびゲル濾過クロマトグラフィーに順次供することにより精製した (Figure 27)。SDS-PAGE (Figure 28a) およびゲル濾過クロマトグラフィー (Figure 27d) において、DEH 酸化酵素の分子量はそれぞれ約 27 kDa および約 102 kDa と見

積もられたことから、本酵素は非変性条件下では 4 量体を形成していると考えられた。なお、この精製酵素の反応生成物を解析した結果、UP1 のみならず KDG の生成もみられた (Figure 28b)。また、各精製過程における DEH 還元酵素の溶出位置は DEH 酸化酵素のものと一致していた (data not shown)。したがって、本酵素は DEH の酸化と還元の両反応を触媒する二機能性の酵素、すなわち DEH 酸化還元酵素であると考えられた。Table 6 には、本酵素の DEH 還元活性に基づき作成した精製結果を示した。それによれば、451 mg の粗酵素から 1.32 mg の精製酵素が得られ、その精製度および収率は、それぞれ 77 倍および 23%であった。

この酵素の一次構造に関する情報を得るために、エドマン分解および MALDI-TOF-MS/MS により、精製酵素の N 末端アミノ酸配列および内部アミノ酸配列 P1-P4 を分析した。その結果、それぞれ”MGNLNE”、”VxxxAAEGIK”、”AAIPFLK”、”DxxEYGIR”、および”VNxxSxxTIDTxxHAxxx” (x は同定できなかったアミノ酸を示す) と決定された。この部分アミノ酸配列を用いて BLAST+検索を行った結果、本酵素は、第 1 章で DEH 還元酵素として同定した FlRed と同一のものである可能性が高いことが明らかとなった (Figure 29)。

3. 組換え DEH 酸化酵素の生化学的特徴

3.1. 組換え DEH 酸化酵素の大腸菌発現および精製

前章で機能解析した組換え DEH 還元酵素 recFlRed は、Figure 20b に示すように DEH の還元反応のみを触媒し、酸化反応は起こさなかった。FlRed が属する SDR ファミリーのタンパク質では、一般的に 4 量体を形成した際、その C 末端アミノ酸約 20 残基がモノマー間の境界面に位置することが知られている。第 1 章で作出した recFlRed では、その C 末端へ His-tag を含むアミノ酸配列 (Gly-Ser-Gly×8-His×8) を付加しているので、多量体は形成するものの (Figure 30)、付加配列による立体障害などで酵素機能に影響が出る可能性がある。recFlRed が DEH に対して酸化活性を示さない原因も、この C 末端の His-tag の影響かもしれない。そこで、以前構築した recFlRed の発現プラスミドからリンカーおよび His-tag 配列を除去し、His-tag が付加されない新たな recFlRed (recFlRedΔtag) を作出し、その活性を調べることとした (Figure 31, 32a)。recFlRedΔtag を NAD^+あるいは NADH の存在下で DEH に反応させ、その反応生成物を TLC により解析した。その結果、recFlRedΔtag は野生型の FlRed (natFlRed) と同様、DEH の還元だけでなく酸化反応も触媒することが明らかとなった (Figure 32b)。さらに recFlRedΔtag の DEH 還元活性は、recFlRed の約 30 倍も高かった (Table 7)。また、natFlRed と recFlRedΔtag は、NADPH を補酵素とした場合にも高い活性を示すことが分かった (Table 7)。

3.2. 組換え DEH 酸化酵素の性状

recFlRed から His-tag を除去した recFlRedΔtag が、natFlRed と同様の活性を示すことを明らかにできたので、次に recFlRedΔtag を用いて DEH の酸化と還元がどのような条件で起こるかを調べた。まず、温度の影響を調べた結果、recFlRedΔtag は、0-40ºC では酸化と還元の両反応を触媒するが 60ºC ではいずれの活性も失うことが分かった (Figure 33a)。また、EDTA 存在下において、酸化と還元の両活性を示すことから、これらの反応には二価金属イオンは必要ないことが分かった (Figure 33c)。一方、興味深いことに、還元反応は幅広い pH 範囲 (pH 4.8-8.7) でみられたが、酸化反応は pH 5.8 以下では起こらなかった。この FlRed の pH 依存性に関しては、後の実験結果 4.で詳細に議論する。また、NADH と NAD^+の濃度比を変えて酵素反応を行った結果、反応初期では NADH および NAD^+の濃度が上昇するに従って、それぞれ KDG および UP1 の生成量は増加した。この結果は、DEH の酸化還元反応が反応系の NADH/NAD^+の初期濃度比に依存して進行することを示している。このことから、FlRed の活性は、細胞内の酸化還元バランスに応じて、還元もしくは酸化に優位度が変化すると考えられた。

3.3. 組換え DEH 酸化酵素の補酵素結合能の解析

natFlRed (天然の FlRed)、recFlRedΔtag (His-tag を付加していない recFlRed)、および recFlRed (C 末端に His-tag を付加した FlRed) の補酵素結合能を Native-PAGE により評価した。natFlRed および recFlRedΔtag は、5 mM NADH もしくは NAD^+存在下においてその移動度に変化がみられたが、recFlRed ではそれがみられなかった (Figure 34)。natFlRed および recFlRedΔtag の移動度の変化は、それらが結合した NADH もしくは NAD^+のリン酸基の負荷電によるものと考えられる。一方、recFlRed の移動度が変化しなかったことから、recFlRed においては NADH および NAD^+に対する結合能が低下していることが考えられる。また、recFlRed を供したレーンには、より分子サイズが大きい凝集体と推定されるバンドが生じていた (Figure 34)。同様の結果は、recFlRed をゲル濾過クロマトグラフィーに供した際にも確認されている (Figure 30)。このことは、recFlRed の C 末端に付加した His-tag が、補酵素に対する親和性を低下させるだけでなく、酵素間のアグリゲーションを起こり易くしていることを示している。

3.4. DEH の酸化反応により生じる UP1 の同定

FlRed による DEH の酸化反応物である UP1 の分子構造を明らかにするために、まず、recFlRedΔtag を用いて DEH から UP1 を生産し、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。Figure 35a に示したクロマトグラムでは、酵素反応によって生じた KDG および UP1 がそれぞれ 60 mM および

160 mM NaCl 付近で溶出すること、また、TLC によりそれらが単一であることを確認した (Figure 35b)。なお、本精製では、基質とした 538 mg の DEH から 169 mg の KDG と 184 mg の UP1 が得られた。この結果は、DEH の酸化および還元反応がほぼ同程度に進行したことを示している。

次に、DEH、KDG、および UP1 を ESI-MS に供し、それらの質量スペクトルを比較した。前章でも述べたように、DEH の還元により生じる KDG (*m/z*=177.04) は、DEH (*m/z*=175.02) との質量の差が+2 であったため、2 つの水素原子の付加が確認された (Figure 36a, b)。一方、酸化反応により生じる UP1 では、*m/z*=191.02 および 213.00 にピークが検出され、それぞれ脱プロトン化された UP1 およびナトリウム塩を形成した UP1 であると推定された (Figure 36c)。DEH との質量差が+16 であること、また、DEH や KDG にはみられなかったナトリウム塩のピークを生じることから、UP1 は DEH の C6 位アルデヒド基がカルボキシル基に酸化された 2-keto-3-deoxy-D-glucarate (KDGR) であると同定された。以上の結果から、FlRed は、DEH の還元と酸化の両反応を触媒し、それぞれ KDG および KDGR を生成する DEH 酸化還元酵素であると結論した。

4. DEH の酸化反応に関与するアミノ酸残基の同定

4.1. DEH 酸化酵素と他種 DEH 還元酵素のアミノ酸配列の比較

前項において、recFlRedΔtag は pH 5.8 以下において DEH 酸化活性を示さなかった。この理由のひとつとして、FlRed の有する His 残基の側鎖 (イミダゾール基、pK_a=6.04) の荷電が変わったためである可能性が考えられた。FlRed と既報の DEH 還元酵素とのアミノ酸配列を比較した結果、FlRed に唯一存在する His 残基 (His195) は、既報の全ての DEH 還元酵素において保存されているが、基質が DEH ではない他種の SDR には保存されていないことが新たに明らかになった (Figure 37)。したがって、この His195 が DEH の酸化反応において重要な役割を果たす可能性が強く示唆された。そこで、recFlRedΔtag に対してアミノ酸の変異導入を行い、その酵素活性を評価することとした。また、DEH 酸化還元反応の触媒部位が同一であるかどうかを確かめるため、SDR superfamily に共通の触媒残基である Tyr157 にも変異を導入し、活性への影響を調べた。

4.2. DEH 酸化酵素へのアミノ酸点変異導入

recFlRedΔtag の His195 および Tyr157 をそれぞれ Ala195 および Phe157 に置換した変異体の発現プラスミドをインバース PCR により作成し、各プラスミドで形質転換した大腸菌を用いて recFlRed_H195A もしくは recFlRed_Y157F を発現した。なお、これらの FlRed 変異体には、His-tag を付加していないため、精製には硫安分画および陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた (Figure 38)。本精製では、50 mL の培養液から recFlRed_H195A および recFlRed_Y157F が、それぞれ 1.2 mg

および 1.5 mg 得られた。これらの組換え酵素による反応生成物を TLC により解析した結果、recFlRed_H195A は還元活性を示すが (Figure 39a)、酸化活性を示さないことが明らかとなった (Figure 39b)。これは、His195 が DEH の酸化反応に必須のアミノ酸残基であることを強く示唆している。また、recFlRed_Y157F は酸化および還元の両活性を示さなかったため (Figure 39)、Tyr157 は酸化と還元の両反応に関与する触媒残基であることが確認された。

4.3. 天然および組換え DEH 酸化酵素のキネティクス解析

N 末端に His-tag が付加された recFlRed_HisN を新たに作成し (Figure 38)、これまで調べてきた天然および組換え FlRed およびその変異体を用いて、比活性および基質と補酵素との親和性を比較した (Table 7)。なお、FlRed の DEH 酸化活性は実験手法 3.2.の NBT-PMS 反応系により検出することが出来なかったため、本項ではその DEH 還元活性に基づいてキネティクスを調べた。それらの内、天然酵素の natFlRed と同等の比活性を示したものは、recFlRedΔtag および recFlRed_HisN であり、これらは NADPH を補酵素とした場合にも高い活性を示した。一方、C 末端に His-tag を付加した recFlRed の比活性は天然酵素にくらべて著しく低く、DEH に対する K_m は他の FlRed と同等であるものの、NADH に対する K_m が他のものよりも 20 倍以上大きいことが分かった。これは、Figure 32 で示した補酵素結合能が低いという結果と一致しており、FlRed の C 末端への His-tag の付加が、補酵素に対する親和性を低下させ、本来の酵素活性を失わせたことが確認された。一方、同じく著しい活性の低下がみられた点変異体の recFlRed_H195A では、DEH に対する K_m が他の FlRed よりも約 10 倍高かった (Table 7)。すなわち、His195 は、基質である DEH の結合に必須のアミノ酸残基であり、酸化反応だけでなく還元反応の際も何らかの機能を果たしていると考えられた。以上の結果から、recFlRed および recFlRed_H195A が酸化活性を示さなかった理由は、それぞれ補酵素および基質に対する親和性が著しく低下しているためであると考えられた。

第 4 項　考察

前章において、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株のアルギン酸分解・代謝経路を推定し、模式図として示した（Figure 24）。すなわち、本菌ではアルギン酸分解により生じた DEH を NADH 存在下で DEH 還元酵素 FlRed により KDG に還元し、生じた KDG を Entner-Doudroff 経路により最終的にピルビン酸と GAP に変換する。しかしながら、本章では、FlRed が DEH の還元反応のみならず酸化反応も触媒することを見出し、DEH 以降の代謝経路が FlRed の酸化還元反応により分岐する可能性を見出した。DEH の酸化により生じる KDGR は、果物や野菜に含まれるグルカル酸という酸性糖質の中間代謝物であり、後に開裂酵素もしくは脱水酵素により代謝されることが知られている (Figure 40)[93,94]。

しかしながら、BLAST+検索によれば本菌のドラフトゲノム配列中にそれらの候補遺伝子が存在しないことが確認された。このことから、本菌は既報の開裂酵素や脱水酵素とは一次構造の異なる酵素、もしくは機能未知の新たな酵素により KDGR を代謝している可能性が考えられた。なお、この KDGR の代謝に関与する酵素の研究結果については次章で述べる。

ESI-MS のスペクトル解析結果 (Figure 36) によれば、DEH のアルデヒド基は FlRed の還元および酸化作用により、それぞれヒドロキシメチル基およびカルボキシル基に変換されることが明らかになった。FlRed の属する SDR superfamily の酸化還元酵素は、一般的にアルデヒド基やケトン基をヒドロキシメチル基に還元する反応、またはその逆の酸化反応を触媒するのみであり、アルデヒド基およびカルボキシル基間の酸化還元反応を触媒するものは未だ報告されていない [95]。グルコース脱水素酵素およびウロン酸脱水素酵素は、ヘミアセタール C1 位のヒドロキシメチル基をケトン基に酸化する酵素であり [96,97]、生じたラクトンが酵素的もしくは非酵素的に加水分解および開環する。その結果、見かけ上 C1 位のアルデヒド基はカルボキシル基に酸化される。そこで、DEH の酸化反応も同様のプロセスで行われていると推定し、以下のような仮説を立てた (Figure 41)。Newman らの NMR 解析によれば、水溶液中の DEH の一部は、C5 位ケトン基に水分子が付加することでジェミナルジオール化 (DEH_{gem}) し、C1 位アルデヒド基と C5 位ヒドロキシメチル基でヘミアセタールを形成する [8]。それにより、C1 位にアルデヒド基をもつ開環型の DEH の一部から、C1 位にヒドロキシメチル基をもつヘミアセタール型の DEH_{gem} が生じる。FlRed はそれらを還元および酸化することによりそれぞれ KDG および KDGR を生成する。このように、SDR では稀な二機能性を FlRed が有する理由は、基質となる DEH が複数の構造を形成し得るためと推定された。

さらに、本研究ではこれまで知られていなかった DEH 還元酵素の基質認識に必須のアミノ酸残基を同定することに成功した。すなわち、FlRed の酵素性状解析 (Figure 33)、一次構造解析 (Figure 37)、および変異導入実験 (Figure 39, Table 7) によれば、His195 は FlRed の DEH 酸化還元活性に必須であり、その Ala への置換は本酵素の DEH に対する親和性を大きく低下させることが明らかになった。この His195 に相当する His 残基は、Figure 37 に示した他種の DEH 還元酵素においても保存されていた。A1-R と $NADP^+$複合体の結晶構造解析データ (PDB ID, 3AFN) によれば、FlRed の His195 に相当する A1-R の His202 は、活性部位周辺に存在するアミノ酸残基であり、$NADP^+$のニコチンアミド基 (プロトンの受容・供給に関与する領域) に近接することが分かった。この解析結果は、DEH 還元酵素で保存されている His 残基が、その酵素反応において重要な役割を果たすことを裏付けるものである。FlRed の DEH 酸化活性は、酵素反応液の pH が、His 残基側鎖のイミダゾール環が脱プロトン化される pH 条件下 ($< pK_a$) で失われた (Figure 33b)。すなわち、FlRed の His195 は、DEH 酸化反応におけるプロトン受容体として働いている可能性が考えられた。しかしながら、前述したよう

に、FlRed の酸化および還元反応には同一の触媒残基 Tyr157 が関与していた。したがって、FlRed の His195 は、DEH の酸化還元反応に直接関与するのではなく、Figure 41 に示した DEH 酸化反応の基質と推定されるヘミアセタール型 DEH_{gem} の認識に関与すると考えられた。Figure 37 によれば、FlRed の Gly93、Arg97、lys132、Gly151、Phe194、および Arg217 なども DEH 還元酵素で保存されているが、それらの機能は未だ調べられていない。これらのアミノ酸の重要性が結晶構造解析やアミノ酸変異導入試験により明らかになれば、将来的にはいずれか一方の反応のみを触媒する DHE 還元酵素の作出が可能となるかもしれない。そのような性質をもつ酵素は、*in vivo* や *in vitro* の反応系における還元力を調節する新たなツールとして産業分野で利用され得る。

以上、本章では、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株のアルギン酸代謝経路が、DEH の還元もしくは酸化反応により分岐することを明らかにした。このような DEH の酸化は、これまで他種のアルギン酸資化細菌においては全く検討されておらず、今後、他の DEH 還元酵素についても同様の検討が必要であろう。次章では、DEH の酸化によって生じる KDGR がその後どのように代謝されるか、その代謝経路の全容を明らかにすることとした。

Table 5. Primers for expression of recombinant FlRed mutants.

Primers	Nucleotide sequence (5' to 3')
FlRed_Tag-F*	TATTCCTAAAGCTTGACCTCCACC
FlRed_Tag-R*	TAGTCTAGATAGGTAATCTCTGCT
FlRed_HA-F*	GATACGCCTTTCGCCGCTCAAATTAA
FlRed_HA-R*	TTAATTTGAGCGGCGAAAGGCGTATC
FlRed_YF-F*	GAGCAGGTATTTTTGCTACATCTAA
FlRed_YF-R*	TTAGATGTAGCAAAAATACCTGCTC
FlRed_HisN-F**	ATCGAAGGTAGGCATATGGGTAATTTAAATGAAAAA
FlRed_HisN-R**	GTACCGAGCTCCATATTATATTCCTAAAGCTTGACC

*Solid underlines indicate identical nucleotide-sequences with pCold vector used as a template for inverse PCR.

**Dashed underlines indicate additional sequences for In-fusion cloning.

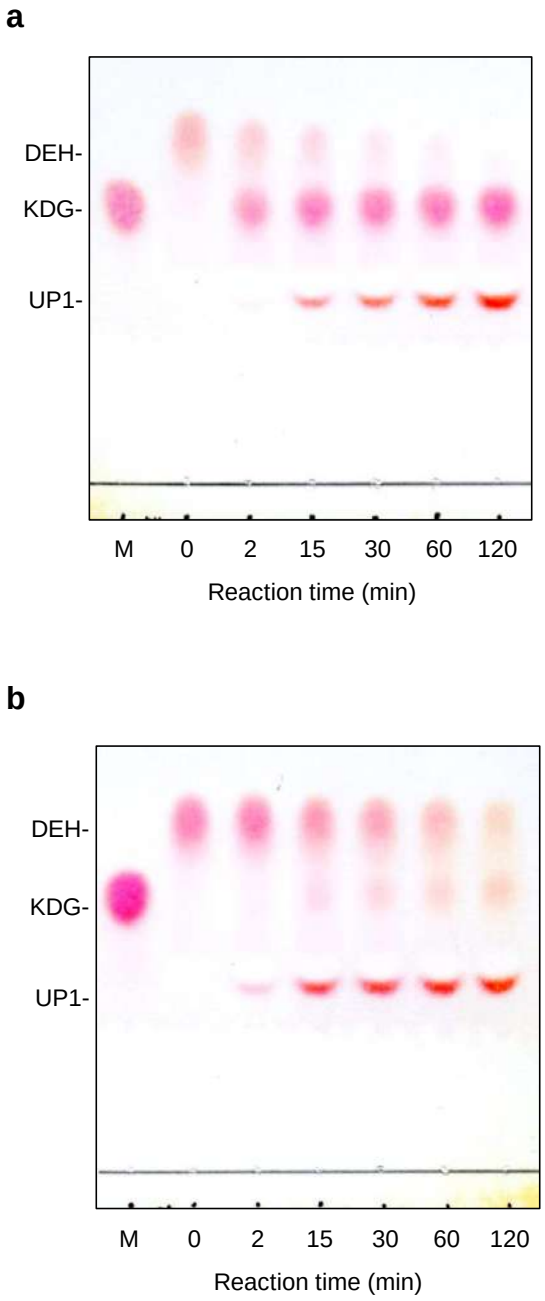


Figure 25. Discovery of DEH-oxidizing activity in cell lysate of *Flavobacterium* sp. UMI-01.

DEH-oxidized and -reduced products were detected by TLC analysis. Enzymatic reaction was conducted in a standard reaction mixture containing 5 mM NADH (a) or NAD^+ (b) for 0-120 min. M, standard KDG.

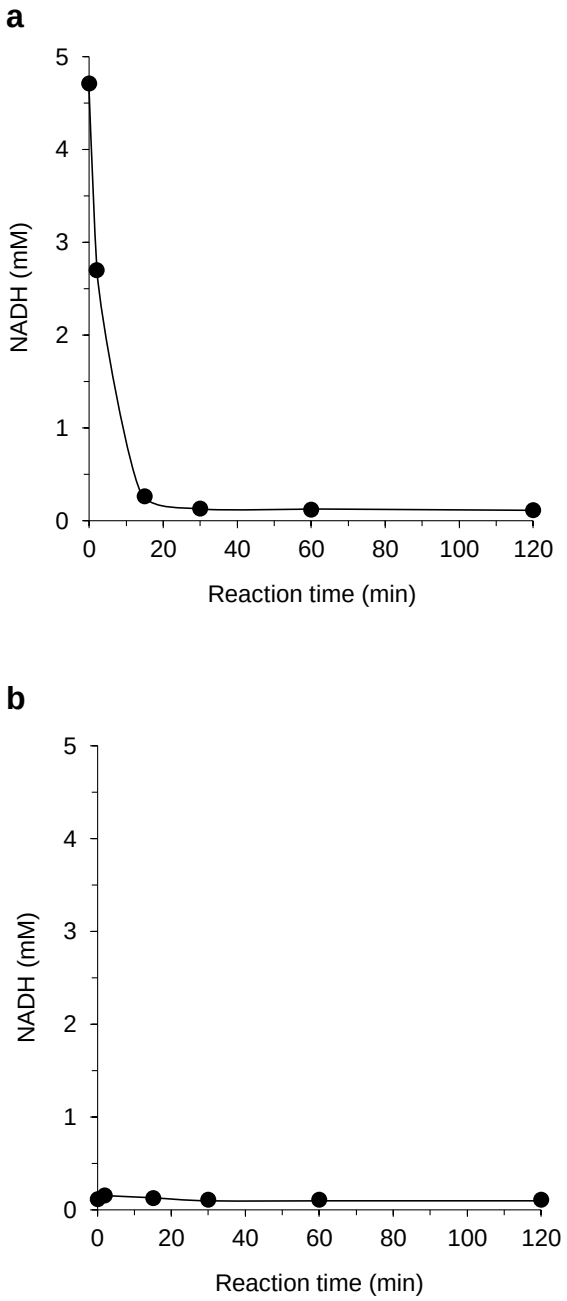


Figure 26. Time-dependent changes in the amount of NADH during DEH oxidation.

The concentration of NADH in the reaction mixture containing 5 mM NADH (a) or NAD^+ (b) was determined by measuring absorbance at 340 nm in each time.

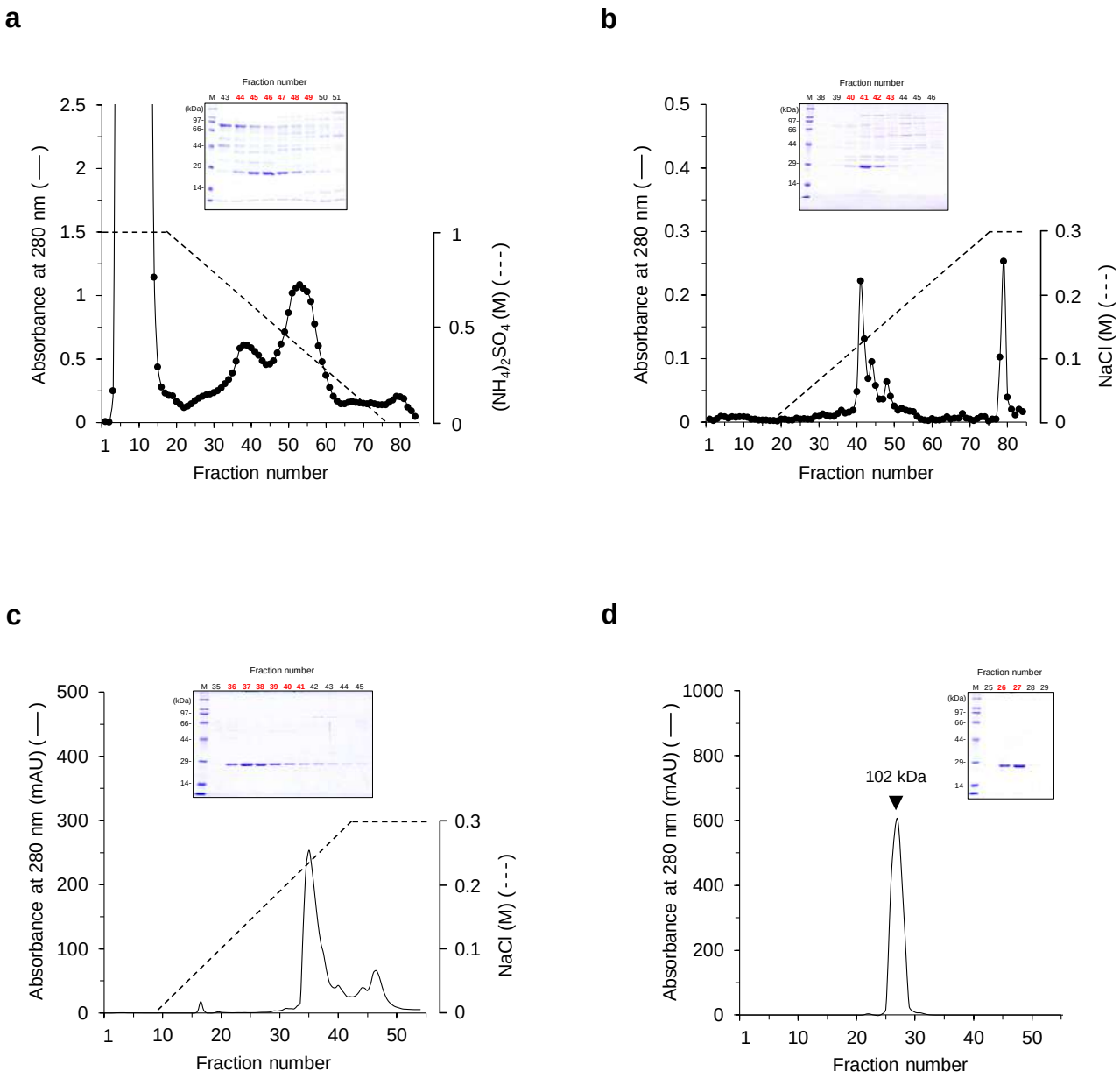


Figure 27. Purification of DEH oxidase from cell extract of *Flavobacterium* sp. UMI-01.

DEH oxidase was purified from cell extract of *Flavobacterium* sp. UMI-01 by TOYOPEARL Butyl-650M (a), TOYOPEARL SuperQ-650S (b), MonoQ 4.6/100 PE (c), and Superdex 200 10/300 GL (d) column chromatography. Active fractions were detected by TLC assay and marked with red letters on the image of SDS-PAGE. The closed triangle in Fig. 27d indicates elution position of DEH oxidase.

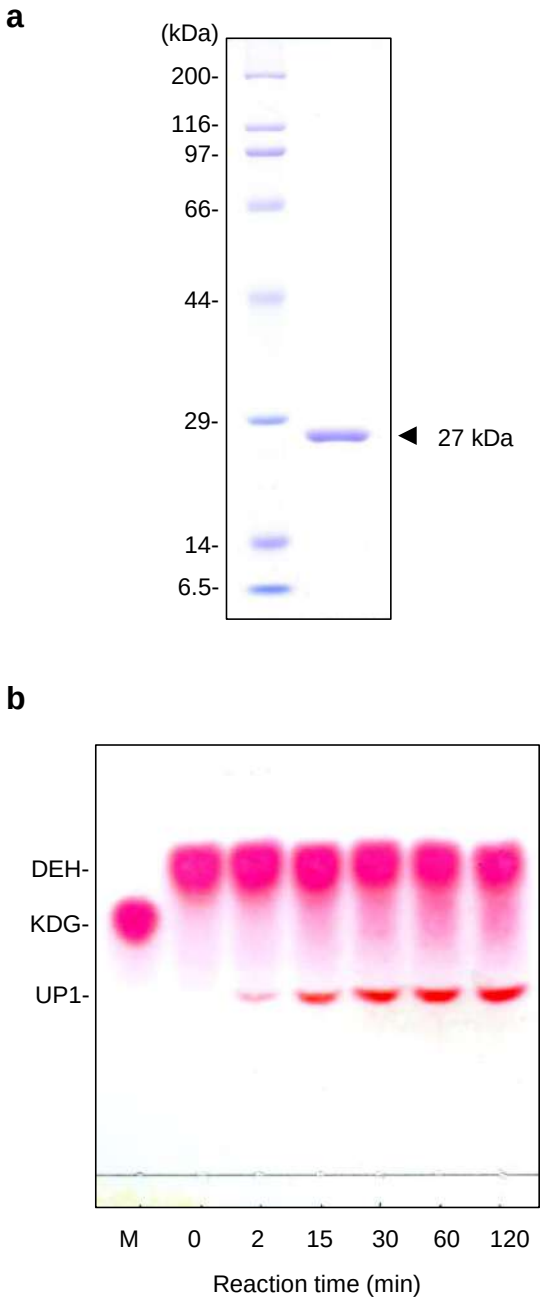


Figure 28. Purified DEH oxidase and its activity.

a, SDS-PAGE for purified DEH oxidase. **b**, activity assay for purified DEH oxidase by TLC. M, standard KDG.

Table 6. Summary for purification of DEH oxidase.

Steps	Protein (mg)	Activity* (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Cell extract	451	1,791	4.0	1	100
TOYOPEARL Butyl-650M	28.1	1,407	50	13	79
TOYOPEARL SuperQ-650S	7.65	1,275	167	42	71
MonoQ 4.6/100 PE	2.76	585	212	53	33
Superdex 200 10/300 GL	1.32	405	307	77	23

*Activity, DEH-reducing activity.

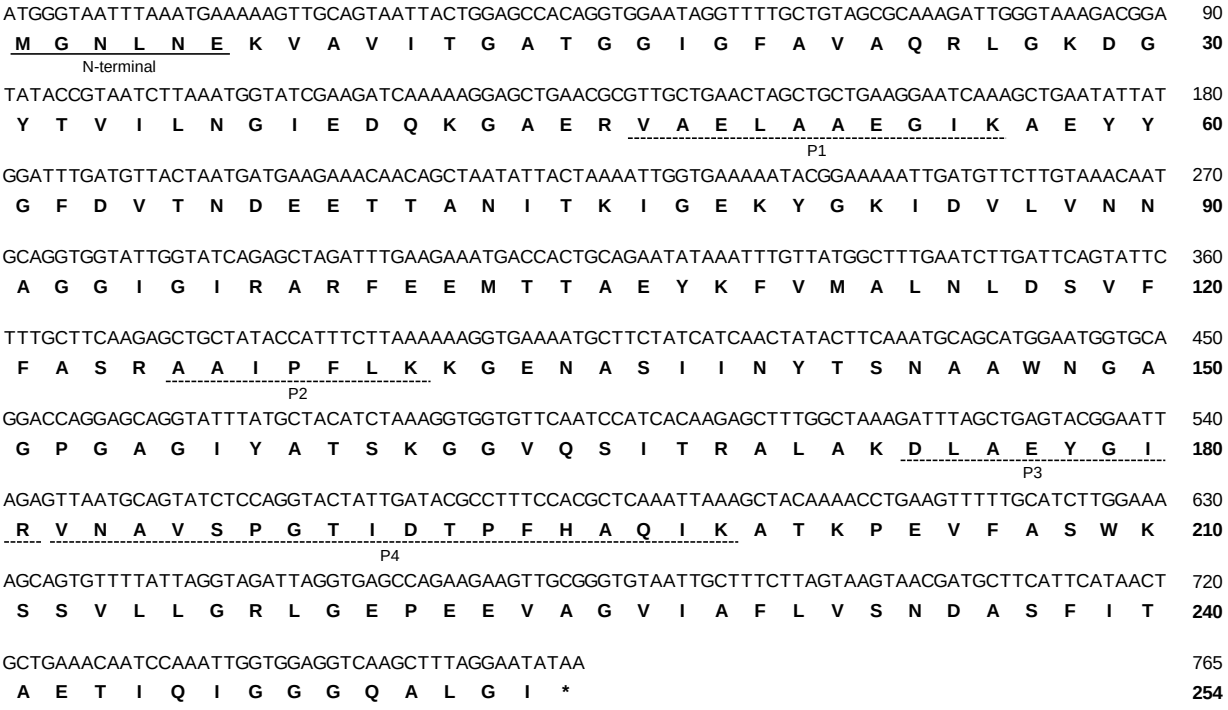


Figure 29. Primary structure of DEH oxidase.

Residue numbers of nucleotides and amino acids are shown at the right end of each line. N-terminal (solid underline) and internal (P1-P4) (dashed underline) amino acid sequences were determined by Edman degradation and MALDI-TOF-MS/MS, respectively.

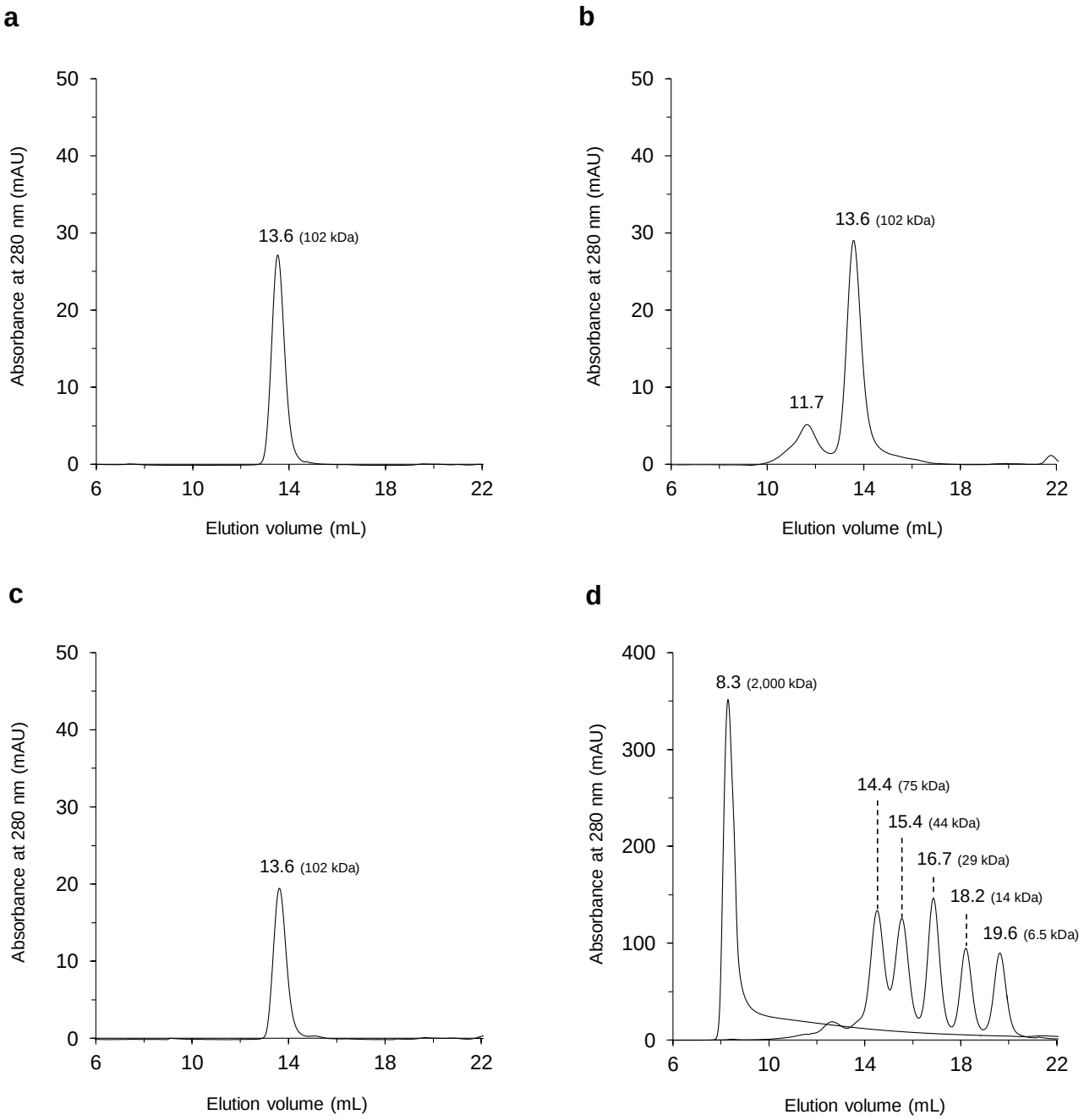


Figure 30. Gel-filtration analysis for native and recombinant FlRed.

Oligomerization states of natFlRed (a), recFlRed (b), and recFlRedΔtag (c) were analyzed by Superdex 200 10/300 GL gel-filtration chromatography. Molecular weight was estimated using the following standards (d); blue dextran (M_r=2,000,000), conalbumin (M_r=75,000), ovalbumin (M_r=44,000), carbonic anhydrase (M_r=29,000), ribonuclease A (M_r=13,700), and aprotinin (M_r=6,500).

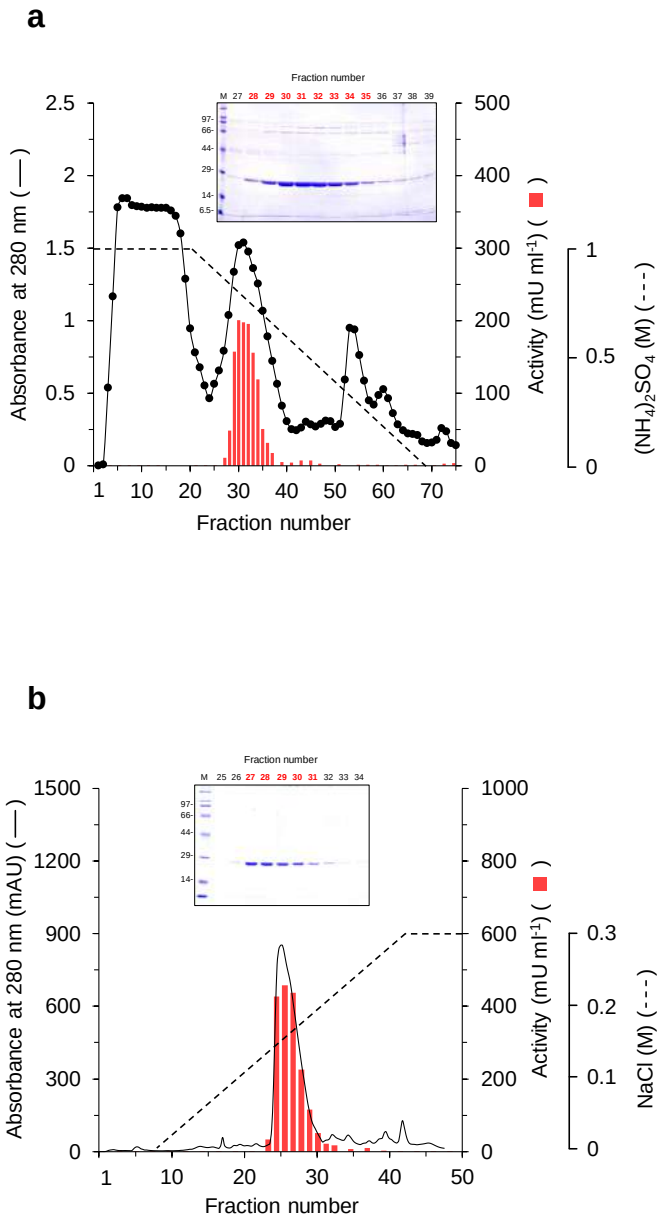


Figure 31. Purification of recFlRedΔtag.

recFlRedΔtag was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified from its extract by Butyl-650M (a) and MonoQ 4.6/100 PE (b) column chromatography. Active fractions were detected by measuring DEH-reducing activity as described previously and marked with red letters on the image of SDS-PAGE.

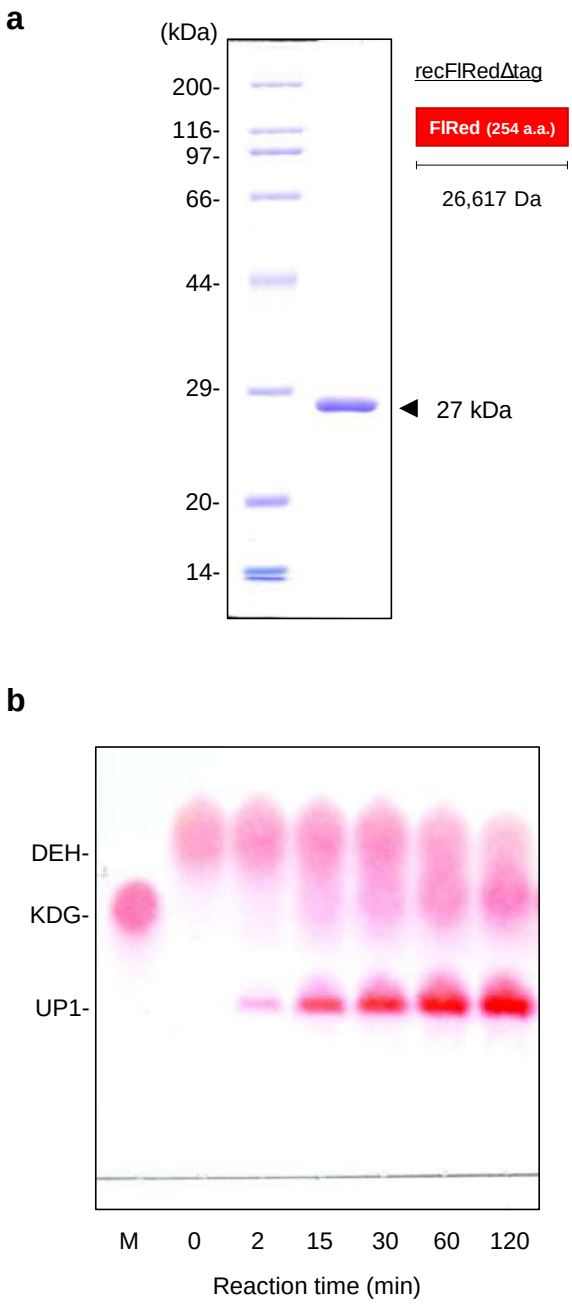


Figure 32. Purified recFlRedΔtag and its activity.

a, SDS-PAGE for purified recFlRedΔtag. A schematic diagram indicates a structure of recombinant protein. **b**, activity assay for purified recFlRedΔtag by TLC. M, standard KDG.

Table 7. DEH-reducing activity and kinetic parameter of native and recombinant FlRed.

Enzyme	DEH-reducing activity (U/mg)		K_m (mM)*		k_{cat} (s^{-1})*	
	NADH	NADPH	NADH	DEH	NADH	DEH
natFlRed	164	106	Not determined		Not determined	
recFlRed	5.7	0.11	0.68	3.2	17	7.2
recFlRedΔtag	173	117	0.031	3.7	95	318
recFlRed_HisN	176	99	0.016	4.6	101	269
recFlRed_H195A	1.3	0.14	0.051	35	1.0	15
recFlRed_Y157F	0.0095	Not detected	Not determined		Not determined	

*K_m and k_{cat} were determined by nonlinear curve-fitting analysis using GraphPad Prism software.

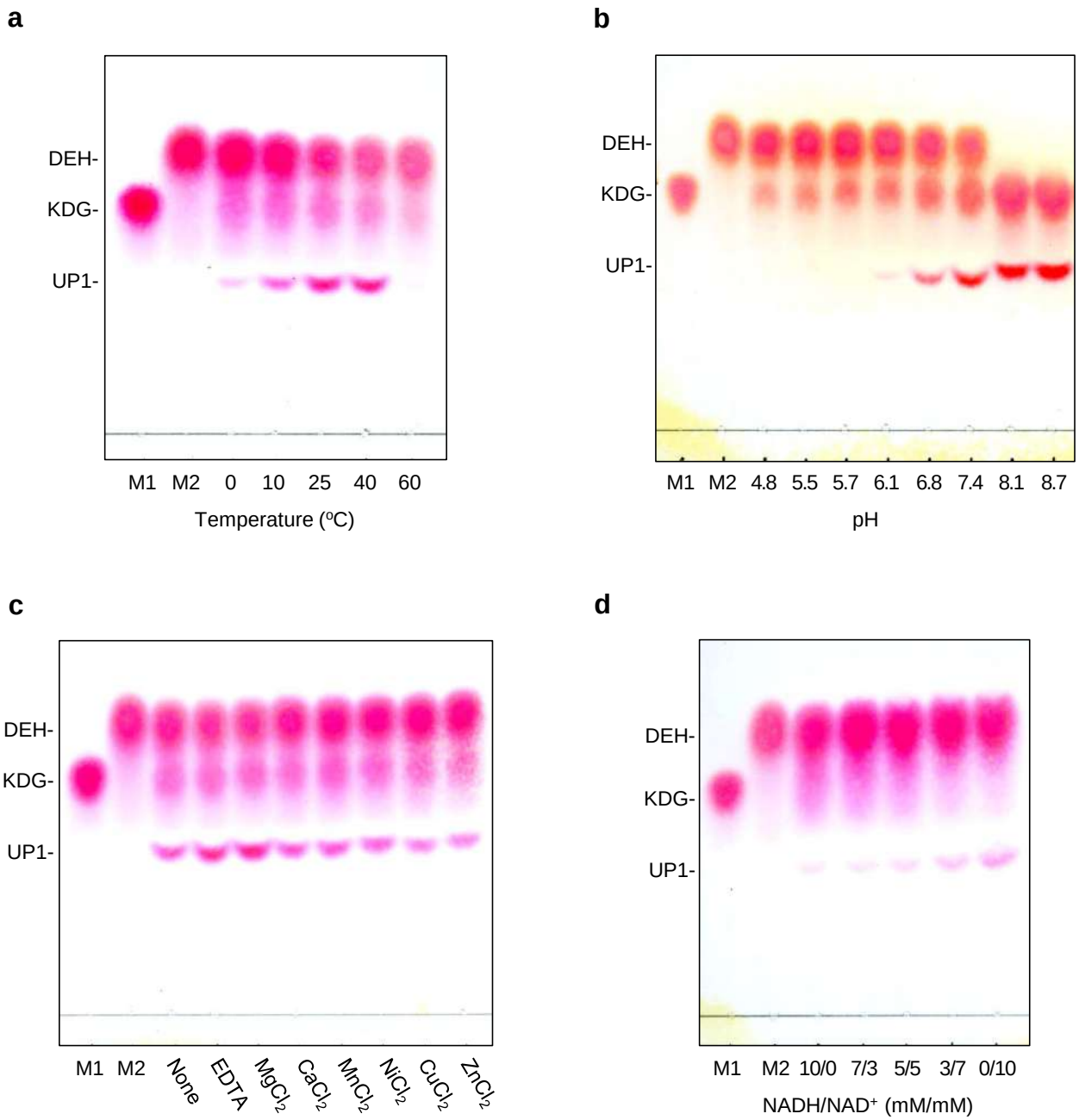


Figure 33. Enzymatic characterization of recFlRedΔtag.

DEH-reducing and oxidizing activities were assayed by TLC analysis. **a**, temperature dependence of recFlRedΔtag. Enzymatic reaction was carried out at 0-60°C. **b**, pH dependence of recFlRedΔtag. The activity was assayed in the standard reaction mixture adjusted to pH 4.8-5.5, pH 5.7-7.4, and pH 8.1-8.7 with potassium acetate, potassium phosphate, and Tris-HCl buffer, respectively. **c**, effect of metal ion for the activity of recFlRedΔtag. Enzymatic reaction was conducted in the standard reaction mixture containing 1 mM various metal salts. **d**, effect of changing co-factor ratio for the activity of recFlRedΔtag. Enzymatic reaction was conducted in the standard reaction mixture containing 10-0 mM NADH and 0-10 mM NAD^+ (total 10 mM of co-factor). M1, standard KDG. M2, standard DEH.

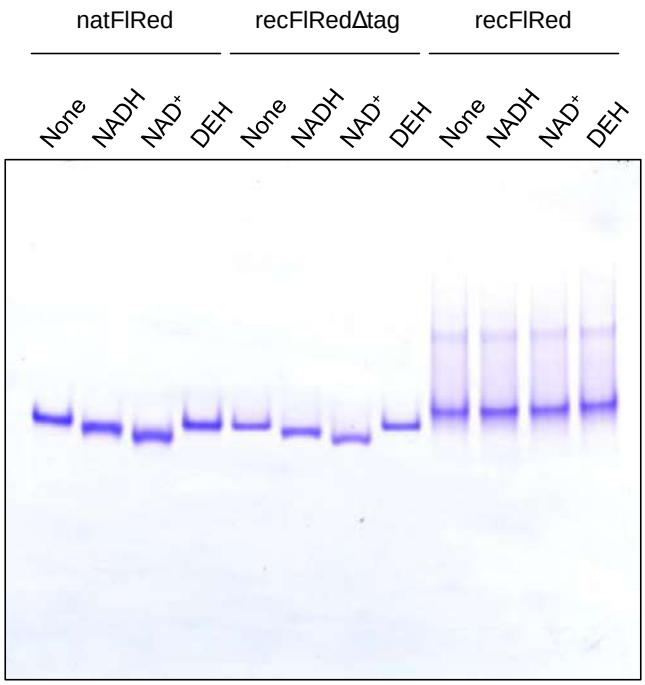


Figure 34. Native-PAGE for natFlRed, recFlRedΔtag, and recFlRed.

Native and recombinant FlRed were subjected to Native-PAGE in the presence of 5 mM NADH, NAD^+, or DEH. The proteins were stained with CBB R-250.

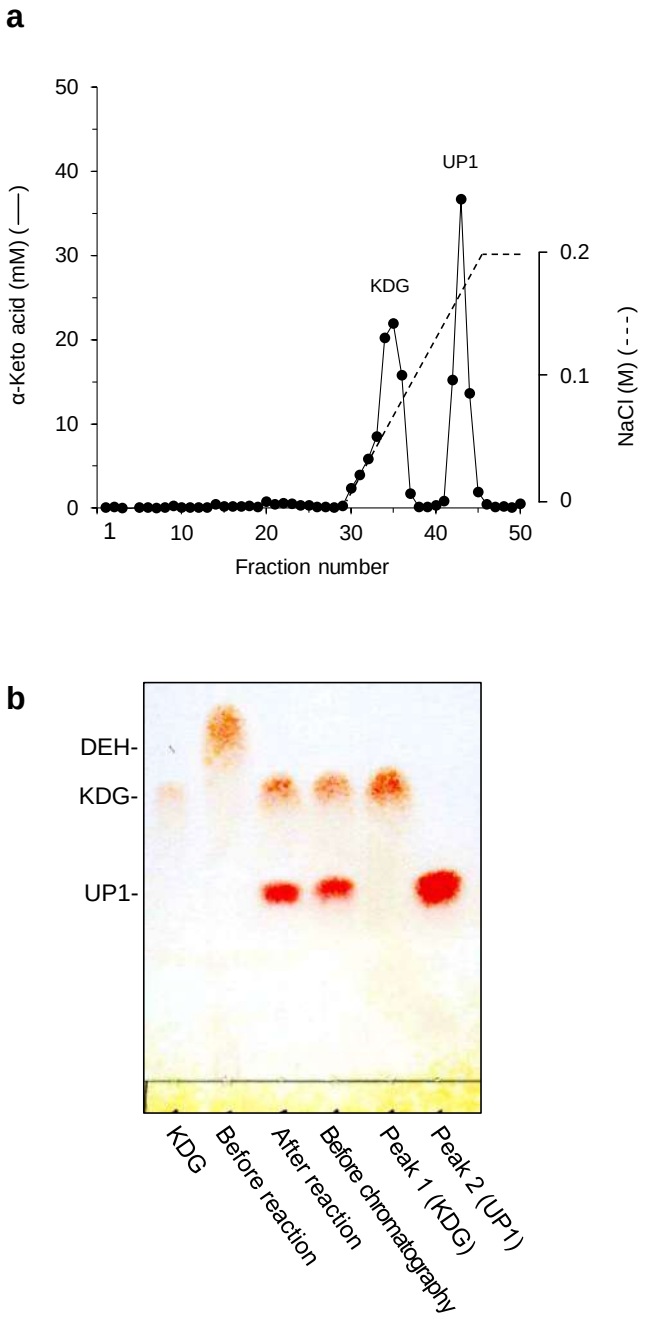


Figure 35. Purification of UP1 and KDG produced by recFlRed-tag.

a, chromatogram of SuperQ-650S column chromatography. **b**, analysis for purified products by TLC. KDG, standard KDG; Peak 1 (KDG), the first peak in Fig. 35a; Peak 2 (UP1), the second peak in Fig. 35a.

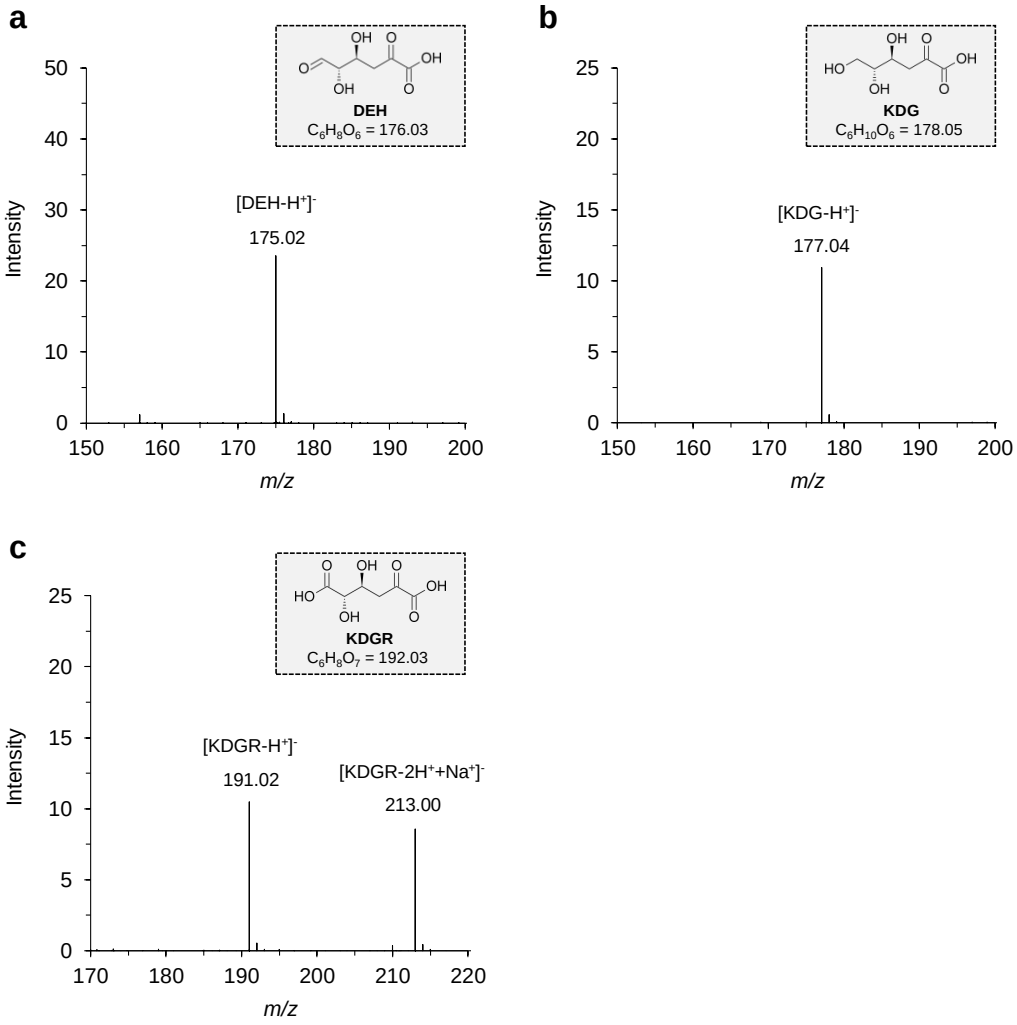


Figure 36. ESI-MS spectrum of alginate metabolites.

Purified DEH (a), KDG (b), and UP1 (c) were desalted by gel-filtration chromatography and analyzed by ESI-MS. Predicted structures of the compounds were shown in the upper right corner of each figure.

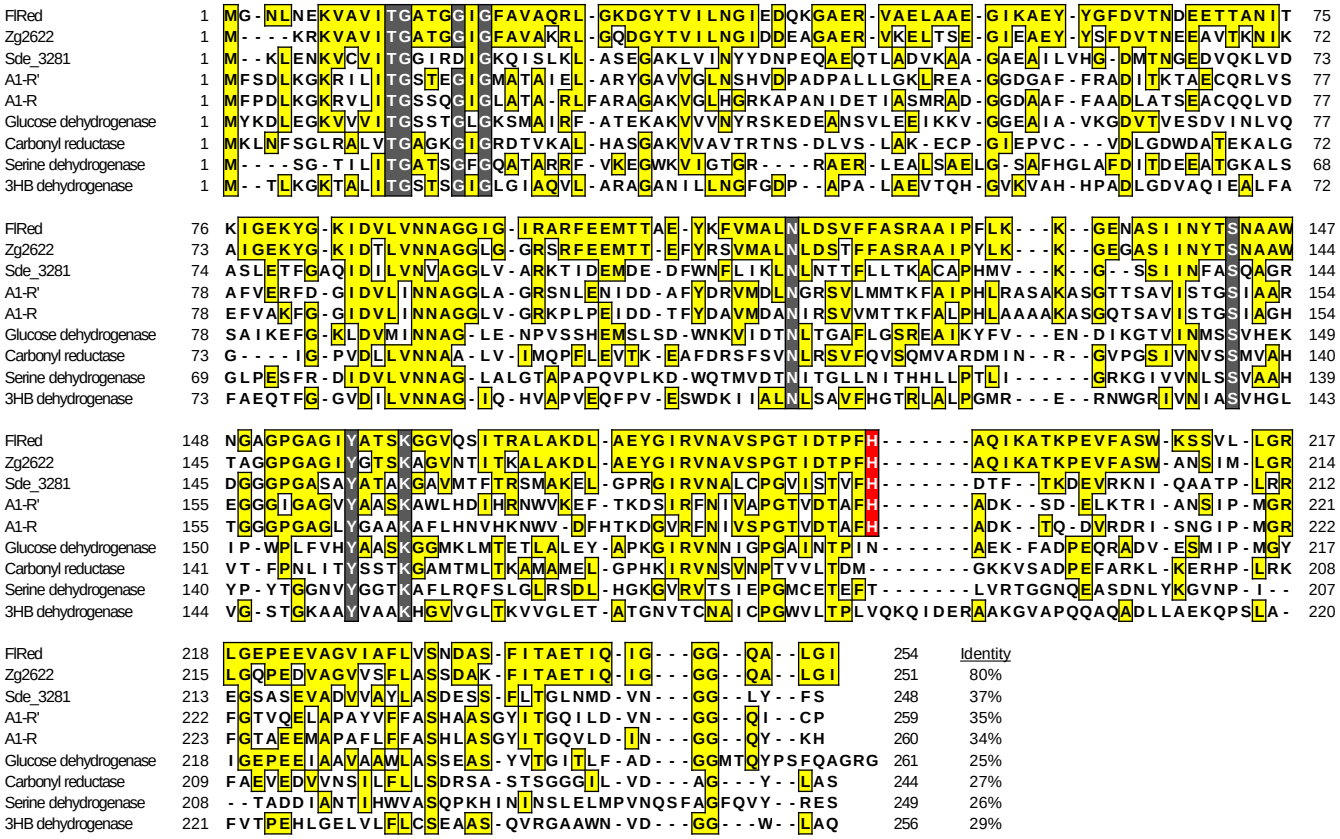


Figure 37. Multiple amino-acid sequence alignment for FlRed with other DEH reductases and SDRs.

Identical amino-acid residues with FlRed are colored by yellow. Gray box indicates cofactor-recognition and catalytic residues conserved in SDR enzymes. A histidine residue possessed in FlRed was marked with the red box. FlRed, DEH oxidoreductase FlRed from *Flavobacterium* sp. UMI-01 (GenBank accession number, BAQ25537); Zg2622, DEH reductase Zg2622 from *Zobellia galactanivorans* (GenBank accession number, CAZ96765); Sde_3281, DEH reductase Sde_3281 from *Saccharophagus degradans* 2-40^{T} (GenBank accession number, ABD82536); A1-R', DEH reductase A1-R' from *Sphingomonas* sp. strain A1 (GenBank accession number, AB970509); A1-R, DEH reductase A1-R from *Sphingomonas* sp. strain A1 (GenBank accession number, AB537450); Glucose dehydrogenase, glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium* (GenBank accession number, WP_014461456); Carbonyl reductase, carbonyl reductase from *Mus musculus* (GenBank accession number, NP_031647); Serine dehydrogenase from *Agrobacterium tumefaciens* (GenBank accession number, AVH44276); 3HB dehydrogenase, 3-hydroxybutyrate dehydrogenase from *Pseudomonas putida* (GenBank accession number, KHL75726)

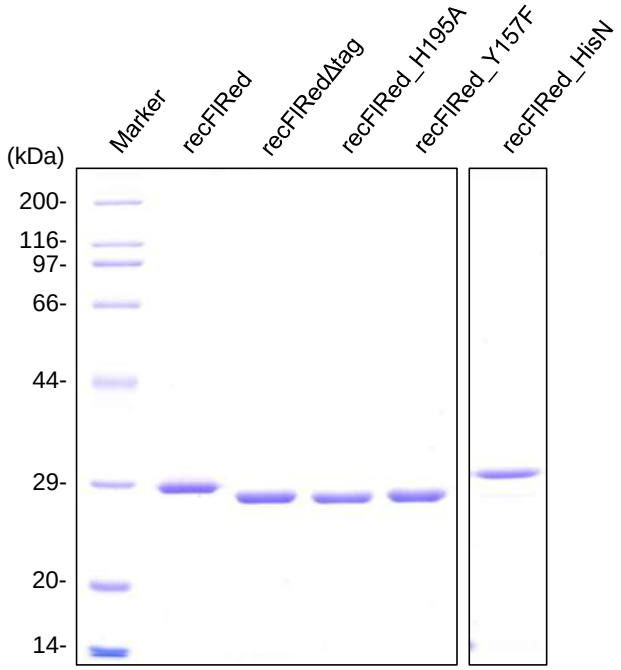


Figure 38. Purification result of FlRed mutants.

Purities of recFlRed_H195A, recFlRed_Y157F, and recFlRed_HisN were confirmed by SDS-PAGE.

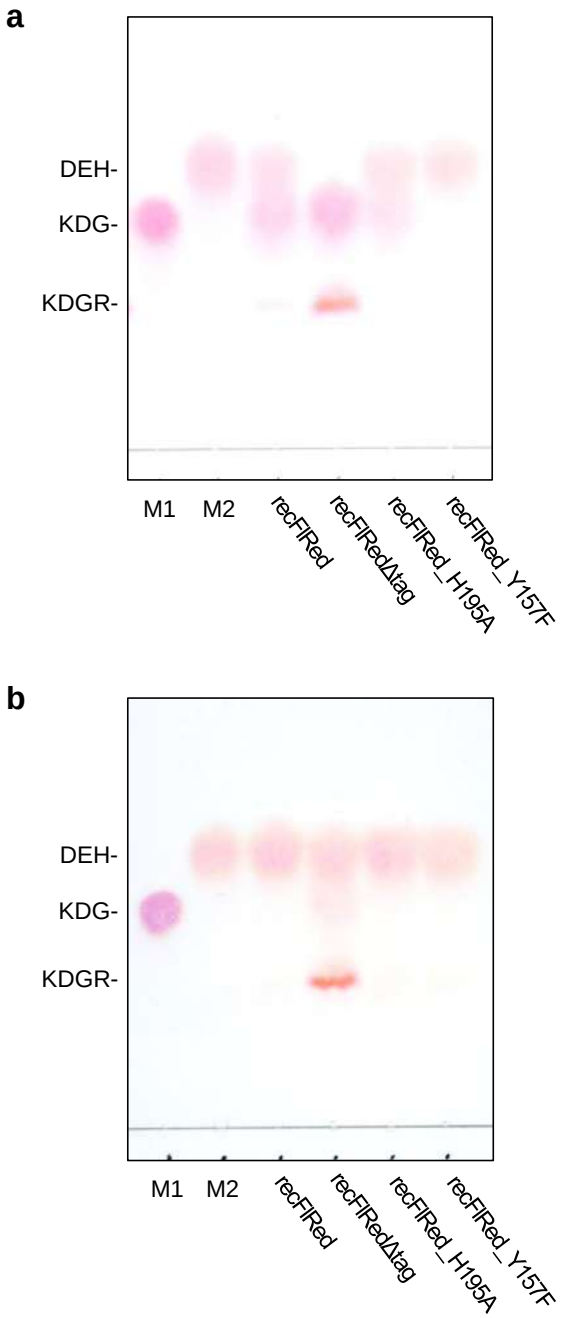


Figure 39. Assay for DEH oxidase activity of FlRed mutants.

The reaction products produced by FlRed mutant were analyzed by TLC and detected by TBA method. Enzymatic reaction was conducted in a standard reaction mixture containing 5 mM NADH (a) or NAD^+ (b). M1, standard KDG; M2, standard DEH.

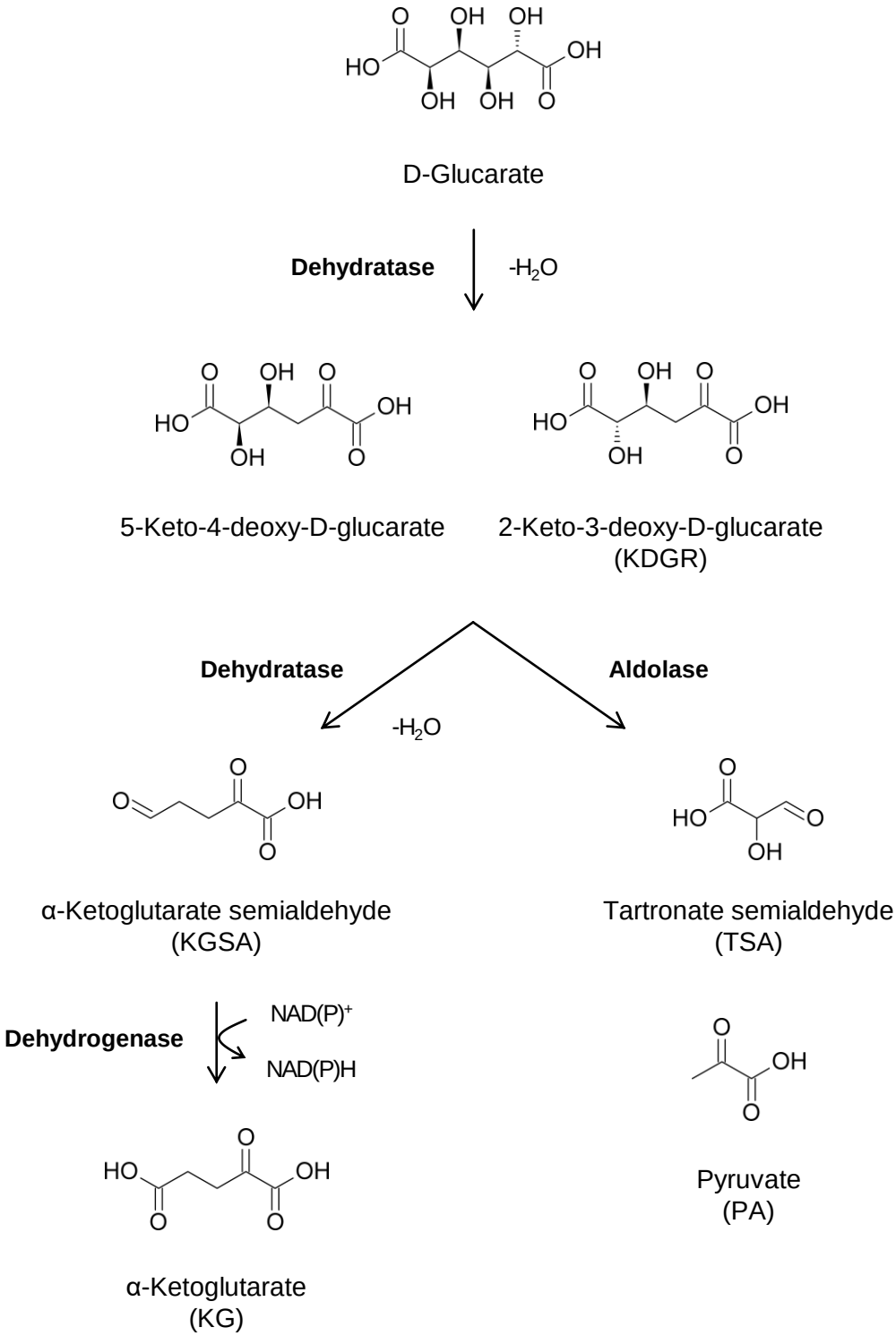


Figure 40. Glucarate metabolic pathway in bacteria[91,92]**.**

Formation of germinal diol from DEH (Newman *et al*., *Nature*, 2014)[8]

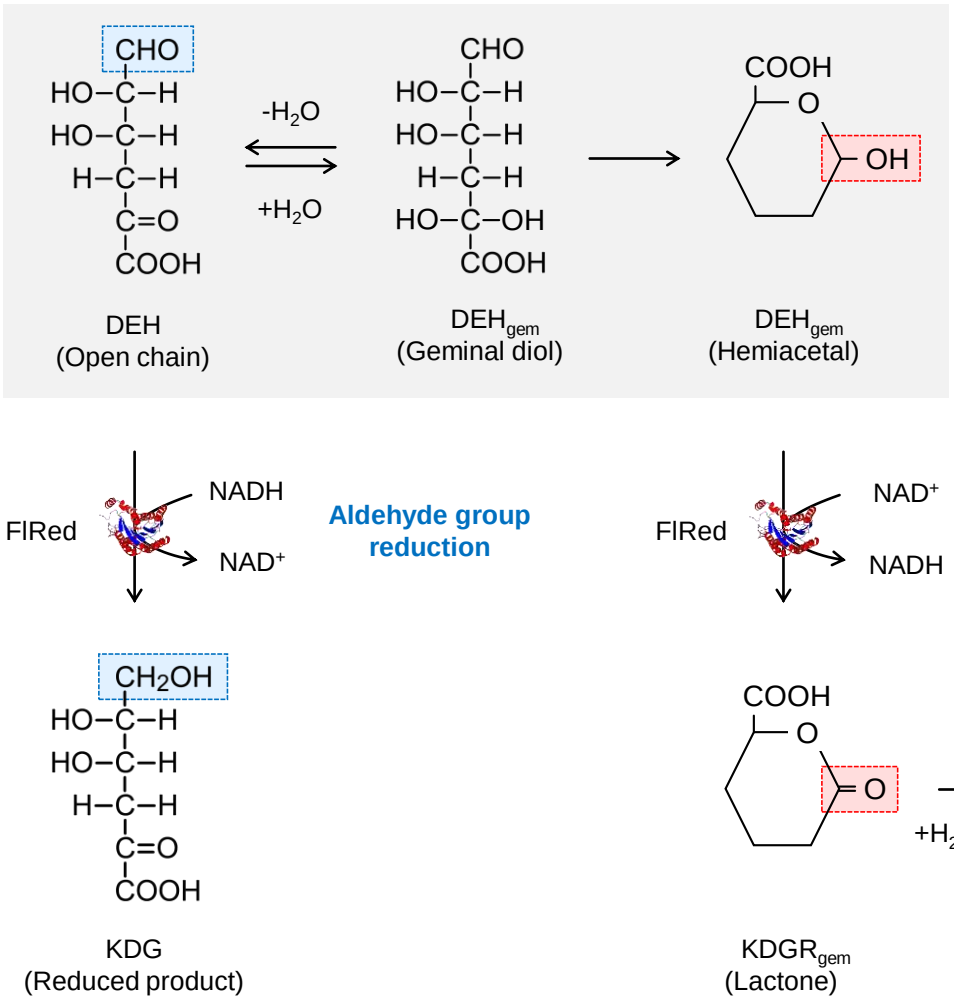


Figure 41. Schematic representation for putative reaction mechanism of FlRed.

第 3 章　*Flavobacterium* sp. UMI-01 株の DEH 酸化代謝経路の解明

第 1 項　目的

前章では、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株の DEH 還元酵素 FlRed が、DEH の還元反応だけでなく酸化反応も触媒すること、それにより構造が異なる 2 種類の反応産物を生じることを明らかにした。DEH の還元によって生じる KDG は、第 1 章で述べたように最終的にピルビン酸と GAP へと変換される。一方、DEH の酸化により生じる KDGR は、アルギン酸から生じることはこれまでに知られておらず、アルギン酸資化細菌における代謝経路も不明である。*B. megaterium*[93] や *Pseudomonas acidovorans*[94] などの土壌細菌では、KDGR は陸上植物由来の酸性糖質であるグルカル酸の中間代謝物であることが知られており、その代謝経路も明らかにされている (Figure 40)。そこで、土壌細菌の KDGR 代謝関連酵素のホモログ遺伝子を UMI-01 株のドラフトゲノム配列中に探索したが、有意な相同性を示す遺伝子は見つからなかった。

DEH の酸化生成物である KDGR の代謝系を明らかにする過程で、UMI-01 株の無細胞抽出液と KDGR を混合すると新たな代謝物 (Unknown product 2, UP2) を反応液中に生じることが確認された。この結果は、UMI-01 株が既知の KDGR 代謝酵素とは異なる一次構造をもつ酵素、もしくは全く別の KDGR 代謝酵素をもつ可能性を示している。

そこで本章では、UMI-01 株の無細胞抽出液中から KDGR を UP2 に変換する酵素を単離し、その一次構造および酵素性状を調べることとした。結果として、この酵素および UP2 はそれぞれ KDGR 脱水酵素 (KDGR dehydratase) (以下、FlDet と称する) および α-ketoglutarate semialdehyde (KGSA) と同定されたが、このことは FlDet に次いで作用する酵素が KGSA 脱水素酵素であることも示唆していた。また、KGSA 脱水素酵素は NAD(P)$^+$存在下において KGSA を α-ケトグルタル酸に酸化することが知られている。そこで本章では、さらに UMI-01 株のドラフトゲノム配列から KGSA 脱水素酵素 (KGSA dehydrogenase) (以下、FlDeg と称する) を探索し、その組換えタンパク質の機能同定を行い、本菌の DEH 酸化反応以後の反応経路の全容を明らかにすることとした。

第 2 項　実験手法

1. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株由来 KDGR 脱水酵素 FlDet の探索および精製

1.1. KDGR 脱水酵素活性の検出

1.1.1. チオバルビツール酸法による酵素活性の測定

KDGR 脱水酵素の活性は酵素反応の基質として用いた KDGR の減少量を TBA 法で測定することにより算出した。酵素反応は、1 mM KDGR (第 2 章、実験手法 4.2.で調製)、10 mM リン酸カリウム (pH 7.4)、100 mM KCl、1 mM $MgCl_2$、および 1 mM DTT を含む 25ºC の反応混液中で行った。酵素反

応液は任意の時間毎に分取し、その反応は等量のクロロホルムと混合することにより停止させた。なお、KDGR 脱水酵素活性 1 U は、1 分間に 1 μmol の KDGR を減少させる酵素量と定義し、KDGR の減少量は β-ホルミルピルビン酸 (ε=29.0×10^3 (M^{-1}・cm^{-1})) の減少量から求めた。

1.1.2. TLC による酵素反応生成物の解析

酵素反応は、5 mM KDGR を含む上記の反応混液中で行い、酵素反応生成物は TLC プレートに負荷した後、1-ブタノール、アセトン、酢酸、および水を 35:35:7:23 (*v:v:v:v*) の割合で混合した溶媒を用いて展開した。分離された化合物は、0.5% (*w/v*) DNP－20% (*v/v*) 硫酸－60% (*v/v*) エタノールを噴霧後、40^{o}C で 15 分間インキュベートし、さらに 120^{o}C で 5 分間加熱することにより発色させた。

1.2. 無細胞抽出液からの KDGR 脱水酵素 FlDet の精製

FlDet は、第 2 章の実験手法 1.2.と同様の手順で *Flavobacterium* sp. UMI-01 株の無細胞抽出液を TOYOPEARL Butyl-650M、MonoQ 4.6/100 PE、および Superdex 200 10/300 GL クロマトグラフィーに順次供することにより精製した。精製 FlDet の N 末端アミノ酸配列および全一次構造は、第 2 章の実験手法 1.3.の手順に従って決定した。

2. 大腸菌発現系を用いた組換え FlDet の作出

2.1. 組換え FlDet の大腸菌発現および精製

FlDet をコードする遺伝子領域は、Table 8 に示す特異プライマーを用いた Genomic PCR により増幅した。遺伝子クローニングと組換え FlDet (recFlDet) の大腸菌発現は、第 1 章の実験手法 2.と同様の方法で行い、recFlDet の純度は SDS-PAGE により確認した。

2.2. 組換え FlDet の質量分析

recFlDet の分子量は質量分析により以下のように調べた。蒸留水で透析した recFlDet (50 μg/μL) を 3 倍量の飽和 α-CHCA－70% (*v/v*) アセトニトリル－0.1% (*v/v*) TFA と混合し、その 1μL をサンプルプレートに負荷した。乾固させた試料は、Proteomics Analyzer 4700 (Applied Biosystems) MALDI-TOF-MS に供し、レーザー照射により生成した質量範囲 10,000-50,000 (*m/z*)の陽イオン化したタンパク質分子をリニアモードにより検出した。

3. 組換え FlDet の機能解析

3.1. 組換え FlDet の性状解析

recFlDet の活性は、特記しない限り 2.5 mM KDGR、10 mM リン酸カリウム (pH 7.4)、100 mM KCl、1 mM $MgCl_2$、1 mM DTT、および 3.0 μg/mL recFlDet を含む 25ºC の反応混液中で TBA 法により KDGR の減少速度を測定することにより調べた。recFlDet の二価金属イオン要求性および基質特異性は、酵素反応生成物を TLC で解析することにより調べた。

3.2. 酵素反応生成物 UP2 の同定

FlDet を KDGR に作用させることで生じる UP2 は、recFlDet を用いて以下のように調製した。20 mM KDGR、10 mM リン酸カリウム (pH 7.4)、および 1 mM $MgCl_2$ を含む反応混液に終濃度で 50 μg/mL となるように recFlDet を加え、30ºC で 2 時間インキュベートした。酵素反応は、1/5 量のクロロホルムと混合することにより停止させ、その水層を蒸留水で 10 倍に希釈した後、それを蒸留水で平衡化した TOYOPEARL SuperQ-650S カラム (2.4×22 cm) に供した。UP2 の精製、脱塩、および質量分析は、第 2 章の実験手法 3.と同様の方法で行った。

3.3. KDGR の代謝に関与する酵素の分子系統解析

KDGR の代謝に関与する酵素の分子系統樹は、KDGR 脱水酵素 FlDet、土壌細菌由来 KDGR 代謝酵素、土壌細菌由来 KDGR 開裂酵素、およびそれらの相同タンパク質のアミノ酸配列に基づいて、第 1 章の実験手法 1.4.に示す手順で作成した。本解析には、Table 9 に示す GenBank™ および UniProtKB から取得した各タンパク質のアミノ酸配列を使用した。

4. KGSA 脱水素酵素 FlDeg の探索および組換えタンパク質の作出

KGSA 脱水素酵素 FlDeg の候補遺伝子は、3 種の既知 KGSA 脱水素酵素のアミノ酸配列を用いた BLAST+検索により探索した。すなわち、データベース配列として *Flavobacterium* sp. UMI-01 株のドラフトゲノム配列、クエリー配列として *Azospirillum brasilense* 由来 Type I KGSA 脱水素酵素 [98]、*A. brasilense* 由来 Type II KGSA 脱水素酵素 [98]、および *S. solfataricus* 由来 Type III KGSA 脱水素酵素 [99] を用いて BLAST+検索を行った。FlDeg をコードする遺伝子領域は、Table 9 に示す特異プライマーを用いた Genomic PCR により増幅し、組換え FlDeg (recFlDeg) の大腸菌発現および精製は、第 1 章の実験手法 2.と同様の方法で行った。

5. 組換え FlDeg の機能解析

5.1. 酵素活性の測定

KGSA 脱水素酵素は、酵素反応に補酵素として NAD^+もしくは $NADP^+$を要求するため、その活性は、補酵素の還元反応により生じる NADH もしくは NADPH に由来する 340 nm の吸光度上昇を測定することにより調べた。なお、KGSA 脱水素酵素活性 1 U は 1 分間に 1 μmol の NADH もしくは NADPH (ε=6.3×10^3 ($M^{-1}cm^{-1}$)) を生成する酵素量と定義した。

recFlDeg の活性は、特記しない限り 1 mM KGSA、10 mM リン酸カリウム (pH 7.4)、100 mM KCl、1 mM $MgCl_2$、1 mM DTT、0.5 mM NAD^+、および 10 μg/mL recFlDeg を含む 25ºC の反応混液中で測定した。

5.2. 酵素反応生成物の解析

酵素反応は、1.5 mM KGSA、10 mM リン酸カリウム (pH 7.4)、100 mM KCl、1 mM $MgCl_2$、1 mM DTT、2.5 mM NAD^+、および 20 μg/mL recFlDeg を含む 25ºC の反応混液中で行った。recFlDeg の反応生成物 (以下、α-ケトグルタル酸様化合物と称する) は、以下に示す手順で 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNP) により誘導体化した後に TLC で検出した。

酵素反応液 50 μL に 1/6 量の 6.3 mM DNP－3 M HCl を加え、50ºC で 45 分間インキュベートすることにより、反応液中に含まれる KGSA および α-ケトグルタル酸様化合物を誘導体化 (ヒドラゾン化) した。生じたヒドラゾンは、等量の酢酸エチルを用いて 3 回抽出し、得られた抽出液を真空乾燥した。得られた黄色の固体は 15 μL の酢酸エチルに溶解し、その 3 μL を TLC プレートに供した。試料は、1-ブタノール、エタノール、および 0.5 M 酢酸を 7:1:2 (*v:v:v*) の割合で混合した溶媒を用いて展開した。

5.3. 酵素反応生成物の同定

5.3.1. FlDeg 反応生成物の調製および質量分析

recFlDeg の反応生成物 (α-ケトグルタル酸様化合物) は以下のように調製した。1.5 mM KGSA、10 mM リン酸カリウム (pH 7.4)、1 mM $MgCl_2$、および 5 mM NAD^+を含む反応混液に、終濃度で 25 μg/mL となるように recFlDeg を加え、25ºC で 16 時間インキュベートした。タンパク質および NAD^+を除去するため、酵素反応液に 4 倍量の 2-プロパノールを加え、-20ºC で 2 時間静置した後、遠心分離によりその上清を回収した。得られた上清は、ロータリーエバポレーターを用いて 1/10 量に濃縮した後、蒸留水で 20 倍に希釈し、それを蒸留水で平衡化した TOYOPEARL SuperQ-650S カラム (2.4×22 cm) に供した。得られた α-ケトグルタル酸様化合物の精製、脱塩、および質量分析は、第 2 章の実験手法 3.と同様の方法で行った。

5.3.2. グルタミン酸脱水素酵素による FlDeg 反応生成物の同定

α-ケトグルタル酸様化合物はグルタミン酸脱水素酵素 (GDH) により酵素的に同定した。GDH は、アンモニウムイオンおよび NADH 存在下で α-ケトグルタル酸をグルタミン酸に変換する酵素である。その際、補酵素 NADH が NAD^+に酸化されるので、それに伴う 340 nm の吸光度の減少を測定することにより、α-ケトグルタル酸様化合物が実際に α-ケトグルタル酸であるかどうかを調べた。なお、酵素反応は、0.5 mM の α-ケト酸 (DEH、KDGR、KGSA、α-ケトグルタル酸様化合物、および市販 α-ケトグルタル酸 (富士フィルム和光純薬))、20 mM リン酸カリウム (pH 7.4)、100 mM KCl、20 mM NH_4Cl、0.2 mM NADH、および 1 U/mL ウシ肝臓由来 GDH (Sigma-Aldrich) を含む 25ºC の反応混液中で 5 分間行った。

5.3.3. NMR による FlDeg 反応生成物の構造決定

α-ケトグルタル酸様化合物および α-ケトグルタル酸標準品の ^{1}H-NMR、^{13}C-NMR、および ^{1}H-^{13}C HMBC スペクトルを測定し、得られた各スペクトルを α-ケトグルタル酸の化学構造に基づいて帰属した。本論文では、試料の NMR 解析を北海道大学理学院 高分解能核磁気共鳴装置研究室に委託した。

5.3.4. カルボキシル基の定量

アルギン酸代謝物の 1 分子あたりのカルボキシル基の数は、4-ニトロフェナシルブロミド法を改変した Endo の方法 [100] により定量した。本方法は、カルボキシル基に 4-ニトロフェナシルブロミドを作用させることで、カルボン酸エステルを生成させ、残存した 4-ニトロフェナシルブロミドを酸化剤 (クロラミン T) およびフェノールレッドで比色定量するものである。

まず、200 μL の 0-5 mM カルボン酸を含む試料、600 μL の 50 mM KH_2PO_4、および 400 μL の 7.5 mM 4-ニトロフェナシルブロミドを混合し、30ºC で 15 分間インキュベートした。次いで、40 μL の 2.5 mg/mL クロラミン T および 40 μL の 0.2 mg/mL フェノールレッドを加え、さらに 30ºC で 10 分間インキュベートした。その後、4-ニトロフェナシルブロミド誘導体を 598 nm における吸光度を測定することで定量した。なお、標準物質には、アルギン酸代謝物に類似の構造をもつグルクロン酸、α-ケトグルタル酸、およびピルビン酸を使用した。

6. アルギン酸代謝関連遺伝子のオペロン構造の解析

6.1. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株由来 Total RNA の調製

Flavobacterium sp. UMI-01 株由来 Total RNA の抽出には、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を使用した。本菌を 1% (*w/v*) アルギン酸ナトリウムを含む MS 液体培地で対数増殖期 (OD_{600}=0.6-1.2) まで培養し、

その培養液 500 μL から遠心分離により菌体を回収した。そこに、400 μg/mL のリゾチームを含む TE バッファーを 500 μL 加え、ボルテックスした後に 5 分間室温で静置した。そこに 350 μL の Buffer RLT (グアニジンチオシアン酸を含む) を加え、ボルテックスで撹拌後、250 μL の 100% (*v/v*) エタノールを加え、ピペッティングで激しく撹拌した。次いで、2 mL チューブに RNeasy mini column を設置し、試料をフィルター上に移した後、それを遠心分離によりパスさせた。そこに、700 μL の Buffer RW1 (グアニジンチオシアン酸を少量含む) を滴下し、再び遠心分離によりパスさせた後、500 μL の Buffer RPE (80% (*v/v*) エタノールを含む) をパスさせる操作を 2 回繰り返した。最後に、新しい 2 mL チューブにカラムを移した後、30 μL の RNase-free water を滴下し、遠心分離により RNA を溶出させる操作を 2 回繰り返した。なお、ここで得られた Total RNA にはゲノム DNA も混入していたため、DNase I で分解した後、同様の操作により Total RNA を精製した。

6.2. 2nd strand cDNA の合成

Total RNA からの cDNA 合成には、PrimeScript Double Strand cDNA Synthesis Kit (Takara) を使用した。1st strand cDNA の合成は、2 μg の Total RNA、10 μg の dNTP、および 0.6 μg のランダムプライマー (9 mer) を含む 10 μL の溶液を 65°C で 5 分間加熱し、氷上で急冷した後、1st Strand Synthesis Buffer、RNase inhibitor、および PrimeScript RTase を加えた計 20μL の反応液を 42°C で 1 時間インキュベートすることにより行った。次いで、前述した反応液に、2nd Strand Synthesis Buffer、30 μg の dNTP、*E. coli* 由来 DNA polymerase、および *E. coli* 由来 RNase H/*E.coli* 由来 DNA Ligase を加え、16°C で 2 時間および 70°C で 10 分間順次インキュベートした後、T4 DNA polymerase を加え、37°C で 10 分間インキュベートすることにより、2nd strand cDNA を合成した。酵素反応は、EDTA (pH 8.0) および SDS を加えることにより停止させ、クロロホルム処理によりタンパク質を反応液から除去した。その水層と 1/3 量の 10 M 酢酸アンモニウムを混合した後、2.5 倍量の 100% (*v/v*) エタノールを加えることで cDNA を沈殿させた。回収した沈殿は、70% (*v/v*) エタノールで洗浄し、37°C で 1 時間風乾した後、50 μL の蒸留水に溶解した。以後の RT-PCR では、アルギン酸ナトリウムもしくはグルコースで培養した菌体から調製した 2nd strand cDNA 溶液を鋳型として使用した。

6.3. RT-PCR によるオペロン構造の解析

アルギン酸代謝関連酵素遺伝子クラスターのオペロン構造は、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株の total RNA から合成した cDNA を鋳型として RT-PCR を行い、隣接する 2 つの遺伝子間の非翻訳領域が増幅されるかどうかにより確認した。RT-PCR は、DNA ポリメラーゼとして *Premix Taq*™ (*Ex Taq*™ Version 2.0) を用い、25 ng の 2nd strand cDNA および 0.2 μM のプライマーセット (Table 10) を含む

25 μL の反応混液中で、98ºC で 10 秒間、52ºC で 30 秒間、および 72ºC で 60-150 秒間の反応サイクルを 35 回繰り返すことにより行った。各 PCR 産物の増幅は、1×TAE バッファーを用いた 1% (*w/v*) アガロースゲル電気泳動により確認した。

7. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株ゲノムにおけるアルギン酸代謝関連酵素遺伝子の分布

本菌のゲノムに見出されたアルギン酸代謝関連酵素遺伝子の分布は、他種のアルギン酸資化細菌における各遺伝子の存在を BLAST 検索することで調べた。BLAST 検索のクエリー配列には、本菌で同定された DEH 代謝関連酵素 FlRed (GenBank accession number, BAQ25537)、FlKin (GenBank accession number, BAQ25538)、FlAld (GenBank accession number, BAQ25539)、FlDet、および FlDeg の他に、*S. degradans* 由来 KDG リン酸化酵素 (GenBank accession number, ABD82535)[90]、*S. degradans* 由来 KDPG 開裂酵素 (GenBank accession number, ABD80664)[90]、*A. brasilens* 由来 Type I KGSA 脱水素酵素 (GenBank accession number, BAF94276)[98]、および *S. solfataricus* 由来 Type III KGSA 脱水素酵素 (GenBank accession number, AAK43220)[99] を使用した。また、データベース配列として、アルギン酸資化細菌として知られるバクテロイデス 10 種、プロテオバクテリア 9 種、およびフィルミクテス 3 種のホールゲノム配列もしくはドラフトゲノム配列を使用した。

本菌のアルギン代謝関連酵素は、他のフラボバクテリア種のものと非常に高いアミノ酸配列同一性を示し、その遺伝子構造も類似している。そこで、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株由来ドラフトゲノム配列、*Flavobacterium frigidarium* DSM17623 株由来ドラフトゲノム配列 (GenBank accession number, AUDO01000003, AUDO01000004, and AUDO01000010)、*Cellulophaga baltica* 18 株由来ホールゲノム配列 (GenBank accession number, NZ_CP009976)、*Maribacter* sp. 1_2014MBL_MicDiv 株由来ホールゲノム (GenBank accession number, NC_CP011318)、および *Z. galactanivorans* DsiJT 株由来ホールゲノム配列 (GenBank accession number, NC_015844) を基に、各アルギン酸代謝関連遺伝子クラスターの模式図を作成し、それらの構造を比較した。

第 3 項　実験結果

1. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株由来 KDGR 脱水酵素 FlDet の探索および精製

1.1. KDGR 脱水酵素 FlDet の探索

Flavobacterium sp. UMI-01 株の無細胞抽出液と KDGR を混合し、25ºC で 12 時間インキュベート後、その反応生成物を TBA 法および TLC により解析した。その結果、基質の KDGR は反応時間の経過に伴い減少し、反応 8 時間後にはほぼ全て消失した (Figure 42)。一方、反応開始から 2 時間で KDGR のスポットの上方に新たな代謝物 (UP2) のスポットが出現し、その生成量は時間経過に伴い

増加した (Figure 42b)。これらの結果は、KDGR の代謝に関与する酵素 (KDGR 脱水酵素 FlDet) が UMI-01 株の無細胞抽出液中に存在することを示している。

1.2. KDGR 脱水酵素 FlDet の精製および一次構造解析

KDGR 脱水酵素 FlDet は、第 1 章の実験手法 4.1.1.で調製した本菌の無細胞抽出液を疎水、陰イオン交換、およびゲル濾過クロマトグラフィーに順次供することにより精製した (Figure 43, Table 11)。SDS-PAGE (Figure 43d) およびゲル濾過クロマトグラフィー (Figure 43c) により、FlDet はそれぞれ約 34 kDa および約 156 kDa と見積もられたため、本酵素は非変性条件において 4-5 量体を形成していると考えられた。エドマン分解により決定された N 末端アミノ酸配列は”MTTLSxSTKExLKTVxTPT”であり、UMI-01 株のドラフトゲノムデータに対する BLAST+検索により、FlDet の遺伝子が特定され、その全一次構造が明らかになった (Figure 44)。しかしながら、演繹アミノ酸配列から計算される分子量は 25,696 であり、SDS-PAGE により見積もられた分子量の約 34 kDa よりも約 8.3 kDa 小さかった。この結果は、FlDet が SDS-PAGE において異常な移動度を示す可能性を示している。

1.3. 組換え FlDet の作出およびその分子量の決定

Figure 44 に示した FlDet の一次構造が、実際に KDG 脱水酵素のものであるかどうかを調べるために、その遺伝子と大腸菌発現系を用いて組換え FlDet (recFlDet) を作成した。recFlDet は、His-tag を利用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製した結果、200 mL の 2×YT 培地から 7.9 mg 得られた。この recFlDet を KDGR に作用させ、その反応生成物を TLC により解析した結果、経時的な KDGR の減少および UP2 の生成がみられた (Figure 47a)。この結果より、先に推定した FlDet 遺伝子のコードするタンパク質が、実際に KDGR 脱水酵素として機能することを確認できた。また、recFlDet は SDS-PAGE 上で約 36 kDa と見積もられ、その分子量は His-tag を含むアミノ酸配列から計算された分子量 (27,394 Da) よりも約 10 kDa 大きかった (Figure 45a)。すなわち、recFlDet は、天然の FlDet と同様に SDS-PAGE において異常な移動度を示すことが分かった。なお、recFlDet を 4 M 尿素、5 mM DTT、もしくは 5 mM EDTA 存在下において 100°C で 10 分間加熱し、高次構造を十分に破壊したものと非加熱のものとを SDS-PAGE に供したが、それらの移動度に違いはみられなかった (data not shown)。したがって、recFlDet が SDS-PAGE 上で異常な移動度を示す理由は、立体構造以外の何らかの要因に依るものと考えられた。

次いで、MALDI-TOF-MS により recFlDet の正確な分子量を調べた。recFlDet のピークは、*m/z*=27,260 周辺に検出され、アミノ酸配列から計算される分子量 (27,394 Da) とおおよそ一致した (Figure 45b)。これらの結果より、SDS-PAGE により見積もられる FlDet の分子量が、実際の分子量よりも約 10 kDa

大きく見積もられることが確認され、Figure 44 に示した FlDet の一次構造が正しいことを明らかにできた。なお、前述したゲル濾過クロマトグラフィーで推定された分子量が約 156 kDa であるとの結果から、本酵素は非変性条件下で 6 量体を形成していると推定された。

1.4. KDGR 脱水酵素 FlDet とその相同タンパク質のアミノ酸配列の比較

既報の KDGR 脱水酵素および開裂酵素は、それぞれ Class I および Class II アルドラーゼに大別されるが、FlDet はこれらとは有意なアミノ酸配列相同性を示さなかった。そこで、FlDet の相同タンパク質を BLAST 検索により調べた結果、FlDet は Class II アルドラーゼの RraA family に属する *Streptomyces coelicolor* A3 株由来 RraAS2 (GenBank accession number, NP_631222)[101] および *Pseudomonas putida* F1 株由来 4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate (HMG)/4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate (CHA) アルドラーゼ (GenBank accession number, WP_012051563) [102] とそれぞれ 25%および 23%のアミノ酸同一率を示した。なお、これら Class II アルドラーゼの活性に必須のアミノ酸残基は、FlDet においても保存されていた (Figure 46)。

2. 組換え FlDet の生化学的特徴

Flavobacterium sp. UMI-01 株の無細胞抽出液から得られる FlDet の量は少なく、種々の酵素性状の解析には不十分であったため、本項では、組換え酵素の recFlDet を用いて酵素性状を解析することとした。

2.1. 温度依存性

recFlDet の KDGR 脱水活性は、0-50ºC の間では温度の上昇とともに増大し、60ºC で最大となった (Figure 47b)。なお、60ºC における recFlDet の比活性は、9.1 U/mg であった。また、70ºC 以上では著しい活性の低下がみられ、酵素の失活が起きていると考えられた。

2.2. pH 依存性

recFlDet の至適 pH は 7.9 であり、pH 7.1-8.3 における活性は最大活性の 60%以上と、弱塩基性条件下で高い活性を維持した (Figure 47c)。また、至適 pH における比活性は 2.8 U/mg であった。一方、pH 7.1 以下の酸性条件下ではその活性が低下し、pH 5.1 における活性は最大活性の 24%であった。

2.3. KCl 濃度依存性

recFlDet は、KCl の非存在下で最大の活性を示し、その比活性は 2.2 U/mg であった (Figure 47d)。その活性は、KCl 濃度の上昇とともに 0-500 mM の間では減少したが、500-1,000 mM の間ではほと

んど変化しなかった。

2.4. 二価金属イオン要求性

recFlDet の酵素反応を行う際には、通常、反応液に二価金属塩として終濃度 1 mM の $MgCl_2$ を添加している。一方、$MgCl_2$ を添加せずに酵素反応を行ったところ、KDGR の消費はみられず UP2 の生成も起こらなかった (Figure 48e)。そこで、種々の二価金属イオン存在下で酵素反応を行い、反応におけるそれらの要求性を調べた (Figure 48e)。その結果、recFlDet は $MgCl_2$、$CoCl_2$、もしくは $NiCl_2$ 存在下で KDGR をほぼ完全に消費し、UP2 を生成した。なお、UP2 は $MnCl_2$ 存在下でもわずかに生成した。一方、$CaCl_2$、$CuCl_2$、もしくは $ZnCl_2$ 存在下では UP2 の生成はみられなかった。

2.5. 基質特異性

recFlDet を種々の α-ケト酸に作用させ、その反応生成物を TLC により解析した。その結果、recFlDet は KDGR にのみ特異的に作用し、DEH、KDG、および KDPG のようなアルギン酸代謝物由来の α-ケト酸には反応性を示さないことが明らかになった (Figure 48b)。また、KDGR と同様に α-ケト酸構造とカルボキシル基の両方を有する 4-hydroxy-2-oxoglutarate (HOD) に対しても、recFlDet は作用しなかった。したがって、recFlDet は、C1 位にカルボキシル基および C2-C3 位にヒドロキシル基をもつ α-ケト酸に対して特異的に作用すると推定された。

2.6. 酵素反応生成物の同定

recFlDet の酵素反応により生じる UP2 の分子種を同定するため、まず、KDGR から recFlDet を用いて UP2 を生産し、それを陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。Figure 49a に示すクロマトグラムにおいて、UP2 は 60 mM NaCl 付近で溶出し、それが純粋な UP2 であることを TLC により確認した (Figure 49b)。なお、本精製では、60 mg の KDGR から 27 mg の UP2 が得られた。

ゲル濾過クロマトグラフィーにより脱塩した UP2 を ESI-MS に供し、そのスペクトルを得た。Figure 49c によれば、脱プロトン化された UP2 のピークは、*m/z*=129.02 に検出されたため、UP2 は分子量 130 の化合物であると考えられた。この分子量と従来のグルカル酸代謝に関する知見 (Figure 40) に基づき、UP2 は α-ketoglutarate semialdehyde (KGSA) と同定できた。KGSA は、KDGR の脱水および脱炭酸反応により生じる α-ケト酸であり、グルカル酸のみならずキシロースやアラビノースの代謝経路にもみられるバクテリアに共通の中間代謝物である [103]。Figure 49c の構造から、KGSA は TBA 法およびセミカルバジド法においてそれぞれ陰性および陽性を示すと推定され、これは各検出方法に対する UP2 の反応性と矛盾しなかった。また、陰イオン交換クロマトグラフィーにおいて、

UP2 はカルボキシル基を一つもつ KDG と同等の NaCl 濃度で溶出した (Figure 49a) ことから、分子内に 1 つのカルボキシル基を有すると考えられた。以上の結果から、FlDet は KDGR の脱水および脱炭酸反応を触媒し、KGSA を生成する KDGR 脱水酵素であると結論した。

2.7. KDGR 脱水酵素 FlDet の分子系統解析

ここでは、KDGR 脱水酵素 FlDet、土壌細菌由来 KDGR 脱水酵素、および土壌細菌由来 KDGR 開裂酵素の類縁関係を分子系統解析により明らかにするため、Class I および Class II アルドラーゼのアミノ酸配列に基づいて Figure 50 に示す系統樹を作成した。その結果、Class I アルドラーゼに属する dihydrodipicolinate synthase (DHDPS)、*N*-acetylneuraminate lyase (NAL)、KDG 開裂酵素、KDG/KDPG 開裂酵素、および土壌細菌由来 KDGR 脱水酵素は、互いの進化距離が比較的近い近縁なタンパク質と推定された。一方、Class II アルドラーゼに属する土壌細菌由来 KDGR 開裂酵素は、FlDet、RNase E 阻害タンパク質、および HMG/CHA 開裂酵素との進化距離が遠く、ほとんど類縁性はみられなかった。これらの結果は、FlDet が報告例のない KDGR 脱水酵素であることを示している。

3. KGSA 脱水素酵素 FlDeg の生化学的特徴

3.1. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株由来 KGSA 脱水素酵素 FlDeg の探索

BLAST+検索により、KDGR 脱水酵素 FlDet をコードする遺伝子の *Flavobacterium* sp. UMI-01 株ゲノム上における位置を調べた。その結果、FlDet をコードする遺伝子は、以前にエキソ型アルギン酸リアーゼとして同定した FlAlex をコードする遺伝子に隣接することが分かった (Figure 51)。さらに、その隣には KGSA 脱水素酵素 (以下、FlDeg と称する) をコードする遺伝子が見出された。KGSA 脱水素酵素は、KGSA を NAD(P)$^+$存在下で酸化し、α-ケトグルタル酸を生成する (Figure 40)。これらの知見は、FlDet により生じた KGSA が次いで KGSA 脱水素酵素 FlDeg により α-ケトグルタル酸に代謝される可能性を示している。

FlDeg は、Type I-III に分類される KGSA 脱水素酵素のうち、Type II に属する *A. brasilense* 由来 KGSA 脱水素酵素 (GenBank accession number, BAF33385) [98] と一次構造が類似しており、そのアミノ酸同一率は 51%であった (Figure 52)。なお、この Type II KGSA 脱水素酵素は、他の Type I および Type III のものに比べて基質特異性が狭く、より KGSA 特異的であることが報告されている [98]。

以上の結果から、本菌のアルギン酸代謝関連遺伝子クラスターから約 40 kb 離れた場所には、KDGR 代謝関連遺伝子から構成されるもう一つのアルギン酸代謝クラスターが存在していることが明らかとなり、アルギン酸代謝で生じた KDGR は、FlDet および FlDeg の作用により最終的に α-ケトグルタル酸まで代謝されると考えられた。そこで、大腸菌発現系により FlDeg の組換えタンパク質を作

成し、その酵素特性を調べることとした。

3.2. 組換え FlDeg の大腸菌発現および精製

大腸菌発現系により、C 末端に His-tag を付加した組換え FlDeg (recFlDeg) を生産し、それをアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。recFlDeg は、SDS-PAGE 上で約 56 kDa と見積もられ、それはアミノ酸配列から計算された分子量 (57,142 Da) とおおよそ一致していた (Figure 53)。なお、recFlDeg は、200 mL の 2×YT 培地から約 4.9 mg 得られた。

3.3. TLC による反応生成物の解析

精製した recFlDeg を KGSA に作用させ、その反応生成物 (α-ケトグルタル酸様化合物) を TLC により解析した。なお、反応液中に含まれる KGSA および α-ケトグルタル酸様化合物は、DNP で誘導体化した後に TLC に供し、有色スポットとして検出した。Figure 54a に示すように、基質の KGSA は、反応開始から 30 分でほぼ全て消費された。一方、KGSA の上方には、標準品の α-ケトグルタル酸と同じ移動度を示す α-ケトグルタル酸様化合物が出現し、その量は時間経過に伴って増加した。これらの結果は、recFlDeg が KGSA の酸化により α-ケトグルタル酸を生成する KGSA 脱水素酵素様の活性をもつ酵素であることを示している。

3.4. 温度依存性

recFlDeg の KGSA 酸化活性は、0-25ºC の間では温度の上昇とともに増大し、25-30ºC で最大となった (Figure 54b)。なお、25ºC における recFlDeg の比活性は、1.6 U/mg であった。また、35ºC 以上では酵素活性の低下がみられ、50ºC ではその相対活性は 6.7%となった。

3.5. pH 依存性

recFlDeg の至適 pH は 8.2 であり、その比活性は 2.5 U/mg であった。また、recFlDet と同様に弱塩基性条件下で高い活性を示し、pH 7.2-8.2 における活性は最大活性の 60%以上であった (Figure 54c)。一方、pH 7.2 以下もしくは pH 8.2 以上では、その活性が大きく減少した。

3.6. KCl 濃度依存性

recFlDeg は、50-250 mM KCl で最大活性を示し、その比活性は 1.6 U/mg であった。また、広い KCl 濃度において高活性を示し、0-1,000 mM KCl 存在下において最大活性の 70%以上を維持した (Figure 54d)。

3.7. 補酵素および基質特異性

まず、KGSA を基質とした場合の recFlDeg の補酵素特異性を調べた (Table 12)。その結果、recFlDeg は、補酵素として NAD^+を用いた場合に高い活性を示し、その比活性は、$NADP^+$を用いた場合よりも約 12 倍高いことが明らかになった。なお、補酵素として NADH もしくは NADPH を用いた場合には recFlDeg は酵素活性を示さなかった。

次いで、NAD^+を補酵素とした場合の recFlDeg の基質特異性を調べた (Table 12)。その結果、recFlDeg は、KGSA に対して最も高い特異性を示したが、他の基質に対してはほとんど作用せず、その活性は最大でも KGSA に対する活性の 10%以下であった。この特徴は、KGSA に対する高い特異性を示す Type II KGSA 脱水素酵素の性状 [99] と一致していた。なお、recFlDeg は、DEH、アルドース、およびウロン酸に全く作用しないが、グルタルアルデヒド、*o*-フタルアルデヒド、およびベンズアルデヒドに低い活性 (それぞれ 8.5%、1.2%、および 1.3%) を示した。これは、recFlDeg がヒドロキシル基の付加された主鎖をもつアルデヒド化合物に作用しないことを示唆している。また、構造類似性をもつ KGSA とグルタルアルデヒドに対する活性の違いから、recFlDeg は α-ケト酸に対して特異的に作用すると考えられた。Type I および Type III KGSA 脱水素酵素は、KGSA だけでなくグルタルアルデヒドに対しても比較的高い活性を示すことが報告されている [99]。このように、recFlDeg を含む Type II KGSA 脱水素酵素は、α-ケト酸構造をもつアルデヒド化合物に対して高い特異性を示すことが分かった。

3.8. 酵素反応生成物の同定

recFlDeg の酵素反応により生じた α-ケトグルタル酸様化合物の分子構造を明らかにするため、先ず、KGSA から recFlDeg を用いて α-ケトグルタル酸様化合物を生産し、それを陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。陰イオン交換クロマトグラフィーに供した α-ケトグルタル酸様化合物は、200 mM NaCl 付近で溶出し (Figure 55a)、それが高純度に精製されていることを TLC により確認した (Figure 55b)。なお、本精製では、22 mg の KGSA から 19 mg の α-ケトグルタル酸様化合物が得られた。

まず、得られた α-ケトグルタル酸様化合物をグルタミン酸脱水素酵素により酵素的に同定した。その結果、グルタミン酸脱水素酵素は、α-ケトグルタル酸様化合物と α-ケトグルタル酸標準品の両方に活性を示し (Figure 56a)、他のアルギン酸代謝物である DEH、KDGR、および KGSA に対しては作用しなかった (Figure 56b)。すなわち、α-ケトグルタル酸様化合物と α-ケトグルタル酸標準品の構造が同一であることが酵素的に示された。

次いで、α-ケトグルタル酸様化合物と α-ケトグルタル酸標準品の ESI-MS スペクトルを解析した。その結果、どちらでも *m/z*=145.01 および 167.00 にピークが検出され、それぞれ脱プロトン化された

α-ケトグルタル酸およびナトリウム塩を形成した α-ケトグルタル酸の分子量と一致した (Figure 57)。なお、このようなナトリウム塩のピークは、α-ケトグルタル酸と同様にカルボキシル基を 2 つ有する KDGR においても検出された (Figure 36c)。以上の結果から、FlDeg は NAD^+存在下において KGSA の酸化反応を触媒し、α-ケトグルタル酸を生成する酵素であると結論した。

3.9. DEH 酸化代謝経路の最終代謝物の構造決定

KDGR および KGSA については、質量分析の結果に基づいて構造を同定してきたが、一般的には、NMR スペクトル測定による構造決定も同様の目的で使用される場合が多い。しかしながら、Figure 41 が示すように、アルギン酸代謝物のような分子内にヒドロキシル基を有する α-ケト酸は、ジェミナルジオール化、エノール化、およびヘミアセタール化などにより複数の構造を形成する可能性があるため、複雑な NMR スペクトルが観測されると推定された。実際に、KDG の ^{1}H-NMR スペクトルは、Figure 58 に示すように多数のシグナルから構成されており、そのシグナルに基づいて分子構造を帰属することが困難であった。また、KDGR や KGSA についても同様の解析を試みたが、同じ理由で解析可能なスペクトルを得ることができなかった。一方、α-ケトグルタル酸については、以下のように NMR スペクトル測定により構造を決定することができた。

標準物質として使用した市販 α-ケトグルタル酸の ^{1}H-^{13}C HMBC スペクトル (Figure 59) によれば、2.42 ppm および 2.99 ppm 周辺にみられた ^{1}H-NMR のシグナルは、それぞれ C4 位および C3 位のメチレン基 (-CH_2-) に由来するものであり、それらは C4 位メチレン基 (-CH_2-)、C3 位メチレン基 (-CH_2-)、C5 位カルボキシル基 (-COOH)、および C2 位カルボニル基 (-CO-) に由来するそれぞれ 37 ppm、39 ppm、182 ppm、および 203 ppm の ^{13}C-NMR のシグナルと相関を示した。なお、C4 位メチレン基の水素原子 (2.42 ppm) および炭素原子 (37 ppm) 間、また、C3 位メチレン基の水素原子 (2.99 ppm) および炭素原子 (39 ppm) 間にはクロスピークがみられなかった。一般的に、^{1}H-^{13}C HMBC は、当該炭素から 1~3 原子分離れた炭素原子とそれに結合する水素原子との間に生じるクロスピークを観測するものであり、当該炭素とそれに直接結合する水素原子との間にクロスピークは生じない。このように、標準物質として使用した α-ケトグルタル酸の化学構造と、その ^{1}H-NMR、^{13}C-NMR、および ^{1}H-^{13}C HMBC スペクトルの帰属結果は矛盾しなかった。

次いで、アルギン酸由来 α-ケトグルタル酸の ^{1}H-NMR、^{13}C-NMR、および ^{1}H-^{13}C HMBC を解析した (Figure 60)。アルギン酸由来 α-ケトグルタル酸の ^{1}H-NMR スペクトルは、標準物質の α-ケトグルタル酸のものと一致していたが、その ^{13}C-NMR スペクトルには、標準物質のものに加えて、いくつか他のシグナルもみられた。これらのシグナルは、ジェミナルジオール化などにより生じた α-ケトグルタル酸の平衡化合物もしくは試料中にわずかに混入している可能性のある NAD(H)に由来する

ものであると推定された。このように、標準物質の α-ケトグルタル酸とは異なるシグナルも一部検出されたが、その ^{1}H-^{13}C HMBC スペクトルは、標準物質のものと同様であった。以上より、アルギン酸由来 α-ケトグルタル酸の化学構造は、標準物質の α-ケトグルタル酸のものと同一であることが確認された。

α-ケトグルタル酸以外のアルギン酸代謝物に関しては、酵素反応により生成もしくは消失するカルボキシル基を化学的に定量することで、間接的にその構造を同定した。すなわち、4-ニトロフェナシルブロミドによるカルボン酸のエステル化を利用した方法を用いて、対象化合物の分子内のカルボキシル基を比色定量することとした。まず、標準物質としてグルクロン酸、ピルビン酸、および α-ケトグルタル酸を用いて、それらのカルボキシル基を定量した。その結果、分子内のカルボキシル基は、本方法により定量可能であったが、α-ケト酸のカルボキシル基は同方法により検出することが出来なかった (Figure 61)。次いで、アルギン酸由来 DEH、KDG、KDGR、KGSA、および α-ケトグルタル酸のカルボキシル基を定量した。先に述べたように、α-ケト酸のカルボキシル基は検出されないため、KDGR および α-ケトグルタル酸のみが反応性を示すと予想されたが、実際は、α-ケトグルタル酸のみが 4-ニトロフェナシルブロミドに反応性を示した (Figure 61)。これは、KDGR のカルボキシル基が、分子内でラクトンを形成するためであると推定された。一般的に、ラクトン化反応は酸性条件下において進行しやすく、本方法における 4-ニトロフェナシルブロミドとのエステル化反応も同様に酸性条件下で行うため、本方法により KDGR のカルボキシル基を定量することは困難であると考えられた。

このように本研究では、α-ケトグルタル酸の化学構造を NMR により決定することに成功し、他のアルギン酸代謝物の構造については、質量分析、TBA 法 (デオキシ糖の検出)、およびセミカルバジド法 (α-ケト酸の検出) により決定できた。

3.10. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株に見出された 2 つの DEH 代謝経路

これまでの結果に基づいて、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株に見出された新たな DEH 代謝経路の全容を Figure 62 に要約した。本菌の代謝経路は、アルギン酸分解により生じた DEH を FlRed により還元もしくは酸化することで 2 つに分岐する。DEH 還元経路では、NADH および ATP を 1 分子ずつ消費することにより、DEH からピルビン酸と GAP が生成する。その際、失われた還元力 NADH は、GAP が一般的な解糖系により代謝されることで補填される。一方、DEH 酸化経路では、NADH を 2 分子生成することにより、DEH から α-ケトグルタル酸を生成する。このように、本菌に新たに見出された DEH 酸化経路は細胞内還元力を高めるもしくは調節する役割を有していると推定された。

4. アルギン酸代謝関連遺伝子のオペロン構造の解析

本菌のアルギン酸代謝調節機構に関する新たな知見を得るため、本菌に見出されたアルギン酸代謝関連遺伝子クラスターのオペロン構造を RT-PCR により解析することとした。すなわち、アルギン酸を含む培養液で生育した菌体から Total RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて 2nd strand cDNA を合成した後、これを鋳型に用いて RT-PCR を行い、隣接する 2 つの遺伝子が一つの mRNA として発現しているかどうかを調べた。

Figure 63a は、Table 10 のプライマーを用いて RT-PCR を行い、その増幅産物をアガロース電気泳動に供した結果を示す。なお、本試験では 3 kb を超える領域を増幅することが出来なかったため、より短い増幅産物が得られるようにプライマーを設計している。RT-PCR により増幅産物がみられなかった領域は、GDH1-GDH2、GDH2-OXR、OXR-GK、FlDeg-ASPK、HYP2-FlAlyB、FlAld-SusC、および HYP3-PL6AL であり、それ以外の隣接する 2 つの遺伝子は、一つの mRNA 上に共存することが分かった。この結果に基づいて、本菌のアルギン酸代謝関連遺伝子が Figure 63b に示すようなオペロン構造を形成していると推定した。これらのオペロン構造のうち、operon B と operon C は、アルギン酸の分解、代謝、および輸送に関与する遺伝子から構成されており、両オペロンには転写調節因子 GntR をコードする遺伝子も含まれていた。これは、両オペロンの遺伝子発現が共通の物質により調節されていることを示唆している。一方、operon A には、そのような転写調節因子はみられず、アルギン酸の分解や DEH の酸化代謝に関与する遺伝子から構成されていた。なお、operon A の遺伝子のうち、FlDet をコードする遺伝子のみが逆ストランドに存在していたため、FlDet の遺伝子発現は独立して制御される可能性があった。

5. アルギン酸資化細菌における DEH の還元および酸化経路の分布

Flavobacterium sp. UMI-01 株に見出された新たなアルギン酸代謝経路、すなわち DEH の酸化経路が、他のアルギン酸資化細菌にも存在している可能性について、各細菌の遺伝子データベース上に登録されている配列を解析することにより調べた。すなわち、本菌で同定した DEH 代謝関連遺伝子をクエリー配列に用いた BLAST 検索により、アルギン酸資化性のバクテロイデス、プロテオバクテリア、およびフィルミクテスにそれらの遺伝子が存在するかどうかを確認した (Figure 64)。なお、アルギン酸資化機構が詳細に研究されている *Sphingomonas* sp. A1 株は、全ゲノムが解読されているものの、そのデータが公開されていないため、ここでは検索対象に含めていない。

先ず、DEH 還元経路の遺伝子であるが、これは検索対象とした全てのバクテロイデスにみられ、それらは本菌の遺伝子とそれぞれ高い相同性を示した。すなわち、DEH 還元経路は、アルギン酸資化性のバクテロイデスにおいて完全に保存されていることが明らかとなった。また、*F. frigidarium*、

C. baltica、*Maribacter* sp. 1_2014MBL_MicDiv 株、および *Z. galactanivorans* においては、酸化経路の酵素である FlDet および FlDeg と高い相同性を示す遺伝子の存在が確認され、これらの細菌は DEH の還元経路だけでなく酸化経路も有していると考えられた。なお、*Flavobacterium tegetincola* では、FlDeg に相同性を示す遺伝子が見出されなかったが、*A. brasilense* 由来 Type I KGSA 脱水素酵素 [98] および *S. solfataricus* 由来 Type III KGSA 脱水素酵素 [99] と相同性を示す遺伝子を有していた。したがって、*F. tegetincola* は、FlDeg とは異なるタイプの KGSA 脱水素酵素を用いて DEH を酸化的に代謝している可能性が考えられた。

さらに、上記のバクテロイデスでは、本菌と同様にアルギン酸分解・代謝関連遺伝子が Figure 65 に示すようなクラスターを形成していた。これらのうち、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株、*Maribacter* sp. 1_2014MBL_MicDiv 株および *Z. galactanivorans* では、KDGR 脱水酵素が、PL-6 や PL-17 のようなエキソ型アルギン酸リアーゼの近隣に存在していた。これは、KDGR 脱水酵素が、それら細菌の DEH 代謝において重要な役割を担っていることを強く示唆している。さらに、KGSA 脱水素酵素は、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株においてのみ、アルギン酸分解・代謝関連遺伝子の近隣に存在していた。したがって、本菌は他種のバクテロイデスと比べて、よりアルギン酸代謝に特化した遺伝子構造を有していると考えられた。

一方、プロテオバクテリアやフィルミクテスの多くは、FlKin もしくは FlAld と相同性を示す遺伝子を有していなかった (Figure 64)。そこで、γ-プロテオバクテリア *S. degradans* 2-40^{T} 株で同定されている KDG リン酸化酵素および KDPG 開裂酵素の配列を用いて再び BLAST 検索を行った結果、ほぼ全てのプロテオバクテリアが DEH 還元経路の遺伝子を有することが分かった。また、*Cobetia marina* および *Falsirhodobacter* sp. alg1 株には、FlDet および FlDeg に高い相同性を示す遺伝子が見出されたため、DEH 酸化経路の存在も示唆された。さらに、その他のプロテオバクテリアおよびフィルミクテスにおいても、それらの酵素と低い相同性を示す遺伝子が見出された。なお、土壌細菌のグルカル酸代謝に関与する *A. tumefaciens* 由来 KDGR 脱水酵素 (GenBank accession number, KJX87147)[104] および *E. coli* 由来 KDGR 開裂酵素 (GenBank accession number, NP_417595)[105] は、検索対象としたほとんどのアルギン酸資化細菌において見出されなかった。このことは、これらのグルカル酸代謝関連酵素がアルギン酸代謝には関与しないことを示唆している。以上の結果から、UMI-01 株に見出された DEH 酸化経路は、フラボバクテリアのみならず一部のプロテオバクテリアにも分布すると推定された。

第 4 項　考察

第 2 章において、アルギン酸の最終分解物である DEH が、DEH 酸化還元酵素 FlRed により KDG だけでなく KDGR に変換されることを見出し、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株では DEH の酸化およよ

び還元の 2 つに分岐した代謝経路が存在すると予測された。そのうち、KDG を生成する既知の DEH 還元経路は、第 1 章で述べたように、バクテリアの主要な解糖系の一つである Entner-Doudroff 経路を介して、最終的にピルビン酸を生成する (Figure 24)。一方、KDGR を生成する DEH 酸化経路は、本菌で新たに発見された経路である。本章では、KDGR の代謝に関与する酵素およびその反応生成物の分子同定を行うことにより、本菌のアルギン酸代謝経路の全容を明らかにした (Figure 62)。アルギン酸代謝により生じた KDGR は、*B. megaterium*[93] などで知られているグルカル酸代謝 (Figure 40) と共通の経路で代謝されることが分かったが、その脱水反応に関与する UMI-01 株の酵素の一次構造は同様の触媒能をもつ既知酵素と比較して同一性が低く、アミノ酸配列に基づいて分類されるファミリーも異なっていた (Figure 50)。本菌の KDGR 脱水酵素 FlDet は、アルギン酸の代謝に関わる酵素のひとつとして、既知のものとは異なる祖先タンパク質から独自に進化したのかもしれない。なお、一部のバクテロイデスやプロテオバクテリアが UMI-01 株の同酵素と高い相同性を示す遺伝子を有していたことから、本菌の DEH 酸化経路は他種アルギン酸資化細菌にも共通して存在する可能性が高いと考えられた (Figure 64)。

アルギン酸資化機構が詳細に研究されている *Sphingomonas* sp. A1 株では、アルギン酸を炭素源とした場合のメタボローム解析が行われている。Kawai らは、乳酸脱水素酵素遺伝子を欠損させた A1 株をアルギン酸存在下において通常よりも遅い振盪速度で培養することで、培養液中に高濃度のピルビン酸が蓄積することを報告したが [106]、その際、培養液中には α-ケトグルタル酸が他の TCA サイクル中間代謝物よりも約 10 倍以上高い濃度で蓄積していた。当時、DEH の酸化代謝に関する知見は全くなかったため、著者らはこの現象に関してほとんど議論していなかったが、これは培養液中に蓄積された α-ケトグルタル酸が TCA サイクルとは異なる別の経路、すなわち DEH 酸化経路で生成された可能性を示している。したがって、*Sphingomonas* sp. A1 株には、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株と同様の最終代謝物として α-ケトグルタル酸を生じる DEH 酸化経路が存在する可能性がある。ただし、*Sphingomonas* sp. A1 株の全ゲノムデータは残念ながら非公開であるため、現時点では DEH 酸化代謝関連遺伝子の有無は確認できない。

このように、遺伝子レベルでは DEH 酸化経路の存在が UMI-01 株だけでなく他種のアルギン酸資化細菌でも示唆された。分岐する 2 つの DEH の代謝経路の存在は、それぞれ NADH の消費と再生を伴うことから細胞内の還元力の調節に寄与するものと推定されたが、それらの最終代謝物 (ピルビン酸または α-ケトグルタル酸) は異なる化合物である。そのため、これら 2 つの経路は UMI-01 株の生理的な化合物要求に応じて使い分けられている可能性が考えられた。そこで、次章では DEH の還元および酸化代謝に関わる酵素の活性と最終産物を指標として、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株の培養条件、特に浸透圧が DEH の酸化還元代謝に及ぼす影響について調べることとした。

Table 8. Primers for expression of recombinant protein involved in KDGR metabolism.

Primers	Nucleotide sequence (5' to 3')*
FlDet-F	AGGTAATACACCATGACAACACTATCAGCTTCTACAA
FlDet-R	CACCTCCACCGGATCCTTTATTTTTTTTCCAGTTTTC
FlDeg-F	AGGTAATACACCATGAGCACTCCTCAACAATTTCATG
FlDeg-R	CACCTCCACCGGATCCAGCGAGAGCTTTCTTTGAAAA

*Underlines indicate additional sequences for In-Fusion cloning.

Table 9. List for amino-acid sequences of KDGR metabolic enzymes used for phylogenetic analysis.

Protein	Organism	Accession number
KDGR dehydratase	*Flavobacterium* sp. UMI-01	In this study
KDGR dehydratase-like	*Cellulophaga baltica*	WP_024480494
KDGR dehydratase-like	*Cobetia marina*	WP_077377604
KDGR dehydratase-like	*Falshirhodobacter* sp. alg1	WP_062762610
KDGR dehydratase-like	*Flavobacterium frigidarium*	WP_026708034
KDGR dehydratase-like	*Flavobacterium tegetincola*	WP_026978740
KDGR dehydratase-like	*Maribacter* sp. 1_2014MBL_MicDiv	WP_071340317
KDGR dehydratase-like	*Zobellia galactanivorans*	WP_013993973
KDGR dehydratase	*Acinetobacter baylvi*	WP_004930673
KDGR dehydratase	*Agrobacterium tumefaciens*	KJX87147
KDGR dehydratase	*Comamonas teststeroni*	WP_003059546
KDGR dehydratase	*Polaromonas naphthalenivorans*	WP_011800997
KDGR dehydratase	*Sulfolobus solfataricus*	Q97UA0
RNase E inhibitor	*Streptomyces coelicolor*	NP_631222
RNase E inhibitor	*Escherichia coli*	CQR83325
RNase E inhibitor	*Mycobacterium tuberculosis*	WP_057125593
RNase E inhibitor	*Pseudomonas aeruginosa*	WP_033977273
RNase E inhibitor	*Vibrio vulnificus*	WP_045629539
RNase E inhibitor	*Vibrio cholera*	WP_001889635
HMG/CHA aldolase	*Pseudomonas putida*	WP_012051536
HMG/CHA aldolase	*Saccharomyces cerevisiae*	NP_010926
HMG/CHA aldolase	*Thermus thermophilus*	WP_011228595
KDGR aldolase	*Escherichia coli*	NP_417595
KDGR aldolase-like	*Cuproavidus* sp. USMAA1020	WP_071071866
KDGR aldolase-like	*Pedobacter himalayensis*	WP_077580063
KDGR aldolase-like	*Pseudomonas* sp. NAFCC02	WP_092407512
KDGR aldolase-like	*Vibrio vulnificus*	WP_080526347
KDRham aldolase	*Escherichia coli*	WP_000992954
KDG aldolase	*Picrophilus torridus*	AAT43864
KDG aldolase-like	*Thermoplasma acidophilum*	WP_010901564
KDG aldolase-like	*Thermoplasma volcanium*	WP_010917486
KDG/KDPG aldolase	*Sulfolobus acidocaldarius*	WP_011277145
KDG/KDPG aldolase	*Sulfolobus solfataricus*	CAA11866
KDG/KDPG aldolase	*Sulfolobus tokodaii*	WP_010980564
KDG/KDPG aldolase	*Thermoproteus tenax*	CAF18463
KDG/KDPG aldolase-like	*Metallosphaera sedula*	WP_012021241
KDG/KDPG aldolase-like	*Pyrobaculum arsenaticum*	WP_011900856
DHDPS	*Bacillus anthracis*	WP_098666580

Table 10. Primers for RT-PCR.

Target	Primers	Nucleotide sequence (5' to 3')*
1. FlAlyA-SGP	FlAlyA-F	CTAACGGTTCTAGCAACTGC
	SGP-R	TGTCAACGGTGCTAATACAGC
2. FlAlyA-GntR1	FlAlyA-F	CTAACGGTTCTAGCAACTGC
	GntR1-R	CAATTGTGGATCCTGAGCAAC
3. GntR1-SGP	GntR1-F	AGAGCCACAAGACAAGCTTC
	SGP-R	TGTCAACGGTGCTAATACAGC
4. SGP-FlRed	SGP-F	AATCTGTCTCGCAACGGTG
	FlRed-R	GCTTGACCTCCACCAATTTG
5. FlRed-FlAld	FlRed-F	TGGAGCCACAGGTGGAATAG
	FlAld-R	TTACCATCTGATTCTGGCTTG
6. FlAlyB-KdgF	FlAlyB-F	TTCGAATAATTCGGCAAC
	KdgF-R	AAATCTTCACGAATTGGAC
7. KdgF-FlAlyA	KdgF-F	AGTTTTGGAGCAAGTAAAG
	FlAlyA-R	TTTGCAAAGGTCCCTGGTG
8. FlAld-SusC	FlAld-F	GAAACAGGTCTTGTACCGTTG
	SusC-R	TGTAGATTGTGTAGGCACTC
9.SusC-SusD	SusC-F	ACAGGAACTGCTAATACCAC
	SusD-R	TAGGATTTCTTACAAGCTCG
10. SusD-GntR2	SusD-F	TCAATTATGGGATGCTCAG
	GntR2-R	TTAATTGGAACAAAACTCCAC
11. GK-FlAlex	FlAlex-F	AATTGATTGCGCTTTTATG
	GK-R	TGGATGGCATCAGCTATAGTG
12. FlAlex-FlDet	FlAlex-R	AGCAGAGCGAATTTCTGTAG
	FlDet-R	TTCGTTAGTTGGAGGATAAAGC
13. FlDeg-ASPK	ASPK-F	TGAAAACTGTATCGTCAATTG
	FlDeg-R	ATGCTTCAGGAAGTAAGAACG
14. GK-FlAlex	FlAlex-F2	TTCCTTCCGTCCTATTGAGG
	GK-R	TGGATGGCATCAGCTATAGTG
15. FlAlex-FlDet	FlDet-R	TTCGTTAGTTGGAGGATAAAGC
	FlAlex-R2	TTGTTATTCTTAGGTGCCTGAC
16. FlDet-FlDeg	FlDet-F	ACGCCCACAATTGCTACATG
	FlDeg-F	TCATGCTTTCAATCCTGCAAC
17. HYP2-FlAlyB	HYP2-R	TGTCTTAAGGAATCGATTC
	FlAlyBR	TAGACAACAATGAAGCATC
18. GntR2-HYP3	GntR2-F	AAATTTAGAACCTGGCGAC
	HYP3-R	AAATCCATCCAAACATAG
19. HYP3-PL6AL	HYP3-F	ATTGTTGGCTTTTTACGC
	PL6AL-R	TTCTGGTCTGTAATGTTTG
20. HYP1-GDH1	HYP1-R	ATTATCCCCAATGAAATAAG
	GDH1-F	ATCACCAATTTCATAGAAAC
21. GDH1-GDH2	GDH1-R	ATAGCATCGGCTACTTTTAC
	GDH2-R	AACCTACGTTAAACCAAAC
22. GDH2-OXR	GDH2-F	GAATGCAATCAATGCTCA
	OXR-F	TGCAACAGTTGCAACATC
23. OXR-GK	OXR-R	TAAGATTTGCTCCAATACC
	GK-F	GTTCACTCTCAGCAATGGAAG

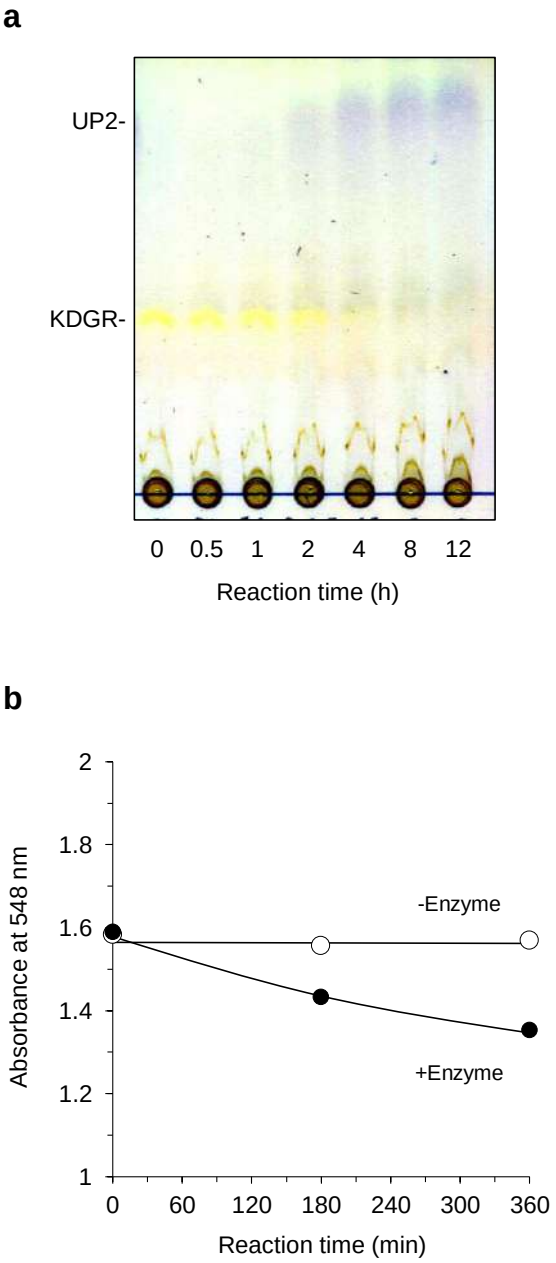


Figure 42. Discovery for the enzyme involved in KDGR metabolism in cell extract of *Flavobacterium* sp. UMI-01.

a, TLC analysis for the reaction products from KDGR produced by cell extract of strain UMI-01. UP2, unknown product 2. **b**, determination of KDGR in the reaction mixture in each time by TBA method. In this method, KDGR could be detected by measuring increase in the absorbance at 548 nm due to the formation of a derivative with TBA. -Enzyme, KDGR with denatured cell lysate by heating; +Enzyme, KDGR with cell extract.

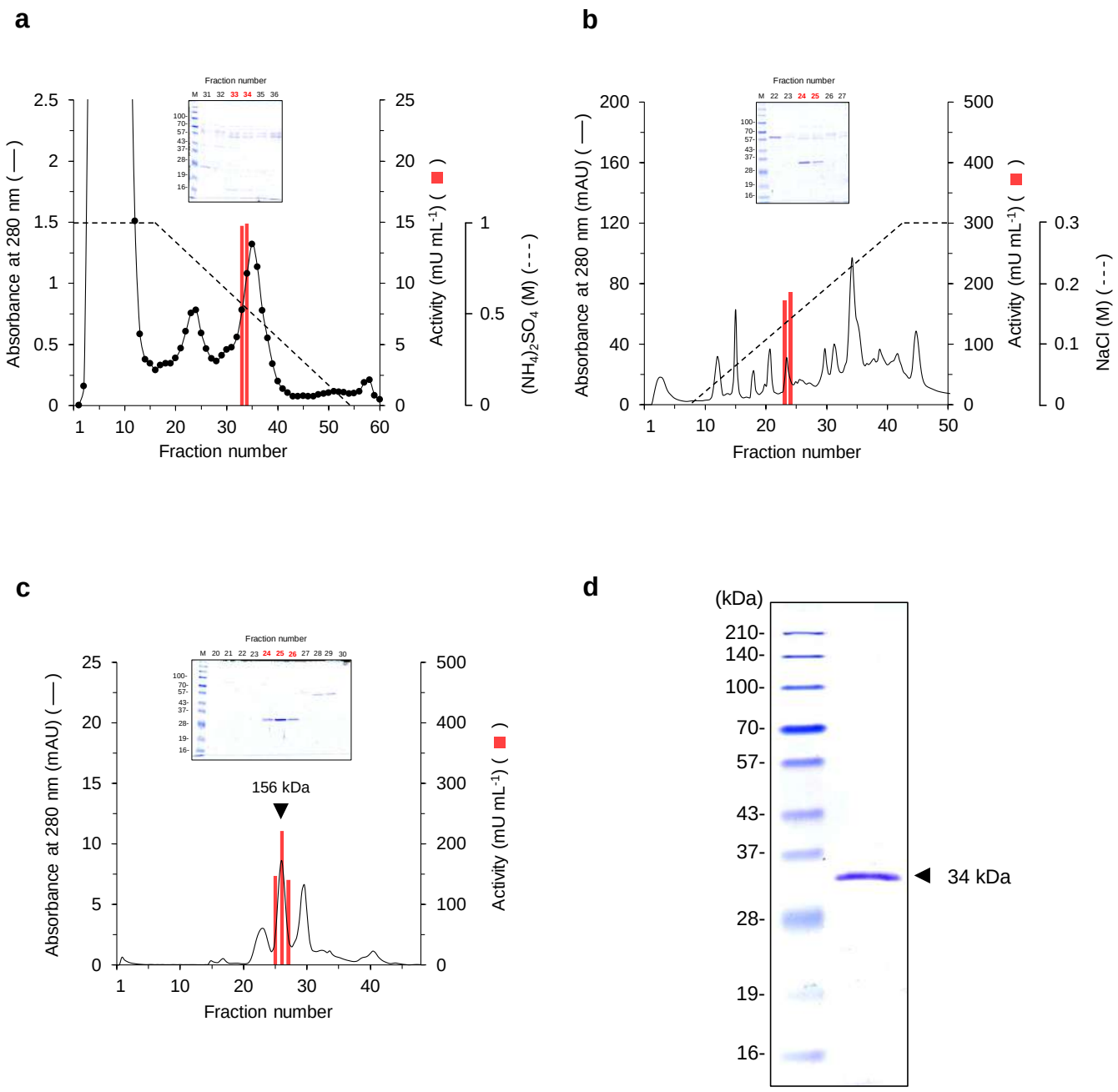


Figure 43. Purification of FlDet from cell extract of *Flavobacterium* sp. UMI-01.

a-c, KDGR metabolic enzyme (FlDet) was purified from cell extract of *Flavobacterium* sp. UMI-01 by TOYOPEARL Butyl-650M (a), MonoQ 4.6/100 PE (b), and Superdex 200 10/300 GL (c) column chromatography. Enzymatic activity was determined by TBA method and the active fractions were marked with red letters on the image of SDS-PAGE. The closed triangle in Fig. 43c indicates elution position of FlDet; its molecular weight was estimated to be 156 kDa. mAU, milli absorbance unit. **d**, SDS-PAGE for purified native FlDet.

Table 11. Summary for purification of FlDet.

Steps	Protein (mg)	Activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Cell extract	456	0.437	0.000959	-	-
TOYOPEARL Butyl-650M	5.13	1.03	0.200	1	100
MonoQ 4.6/100 PE	0.174	0.910	5.23	26	87
Superdex 200 10/300 GL	0.033	0.280	8.48	42	27

Figure 44. Primary structure of FlDet.

Residue numbers of nucleotides and amino acids are shown to the right end of each line. N-terminal amino acids were determined by Edman degradation and underlined with solid line.

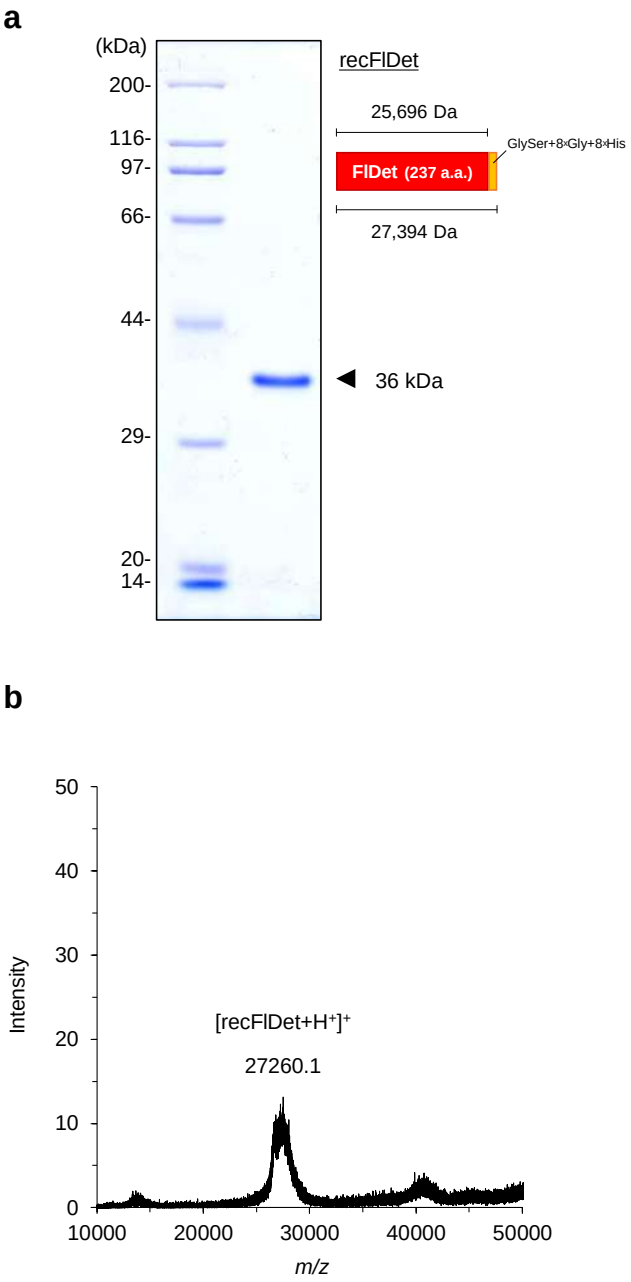


Figure 45. Confirmation for the molecular weight of FlDet.

a, SDS-PAGE for purified recombinant FlDet (recFlDet). recFlDet was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified by affinity chromatography. A schematic diagram indicates a structure of recombinant enzyme. **b**, determination for accurate molecular mass of recFlDet by MALDI-TOF-MS.

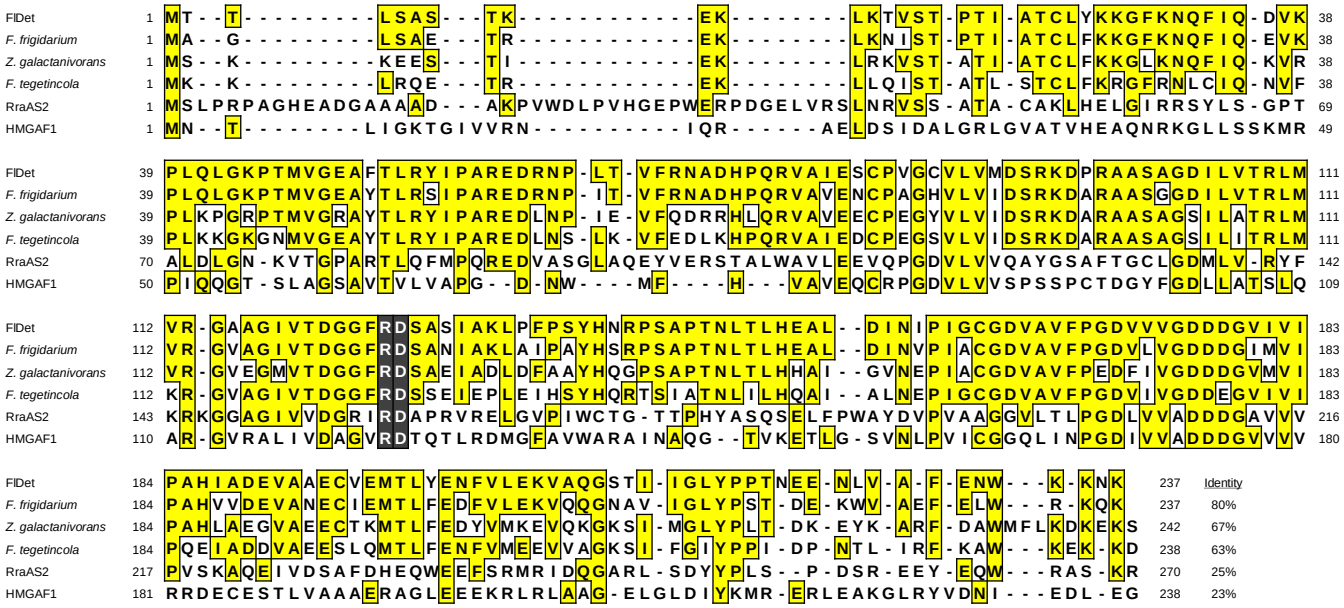


Figure 46. Comparison of amino acid sequences between FlDet and other RraA family proteins.

The amino acid sequences of FlDet and other RraA family proteins were aligned with ClastalW program. Identical residues between FlDet and other proteins were colored with yellow. Black box indicated necessary residues for the enzymatic activity in the putative active site of RraAS2 and HMGAF1. FlDet, KDGR metabolic enzymes from *Flavobacterium* sp. UMI-01 (In this study); *F. frigidarium*, ribonuclease activity regulator RraA-like protein from *Flavobacterium frigidarium* (GenBank accession number, WP_026708034); *Z. galactanivorans*, ribonuclease activity regulator RraA-like protein from *Zobellia galactanivorans* (GenBank accession number, WP_013993973); *F. tegetincola*, ribonuclease activity regulator RraA-like protein from *Flavobacterium tegetincola* (GenBank accession number, WP_026978740); RraAS2, RNase E inhibitor from *Streptomyces coelicolor* A3 (GenBank accession number, NP_631222); HMGAF1, 4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate (HMG)/4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate (CHA) aldolase from *Pseudomonas putida* F1 (GenBank accession number, WP_012051563).

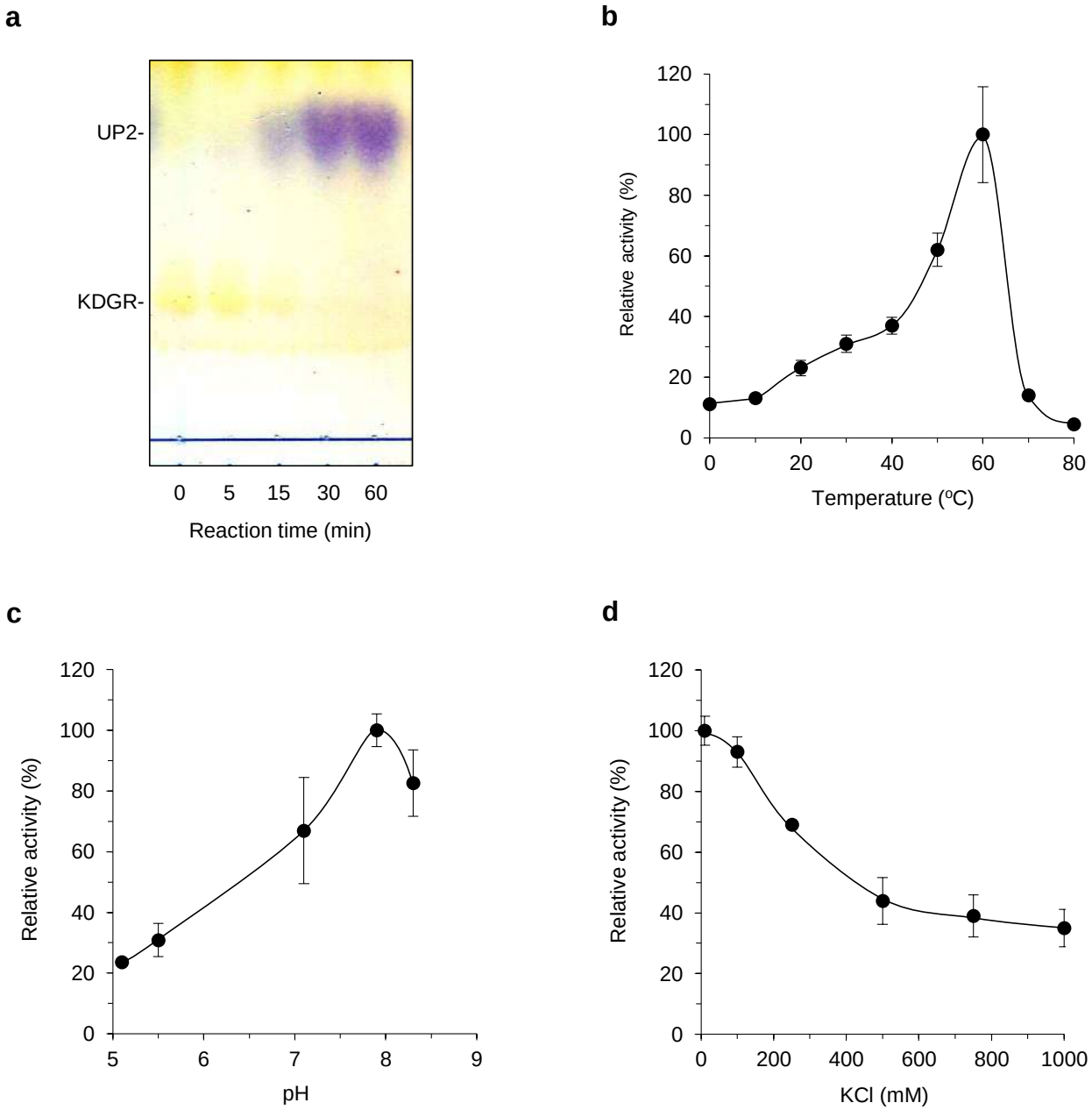


Figure 47. Enzymatic characterization of recFlDet.

a, analysis for the reaction products produced by recFlDet. UP2, unknown product 2. **b**, temperature dependence of recFlDet. Enzymatic reaction was carried out at 0-80°C. Activity at 60°C was taken as the relative activity of 100%. **c**, pH dependence of recFlDet. The activity was assayed in the standard reaction mixture adjusted to pH 5.1-8.3 with potassium phosphate buffer. Activity at pH 7.9 in potassium phosphate buffer was taken as the relative activity of 100%. **d**, effect of KCl for the activity of recFlDet. Enzymatic reaction was conducted in the standard reaction mixture containing 0-1 M KCl. Activity in the presence 10 mM KCl was taken as the relative activity of 100%. Error bars in Fig.47b-d represent s.d. (*n*=3).

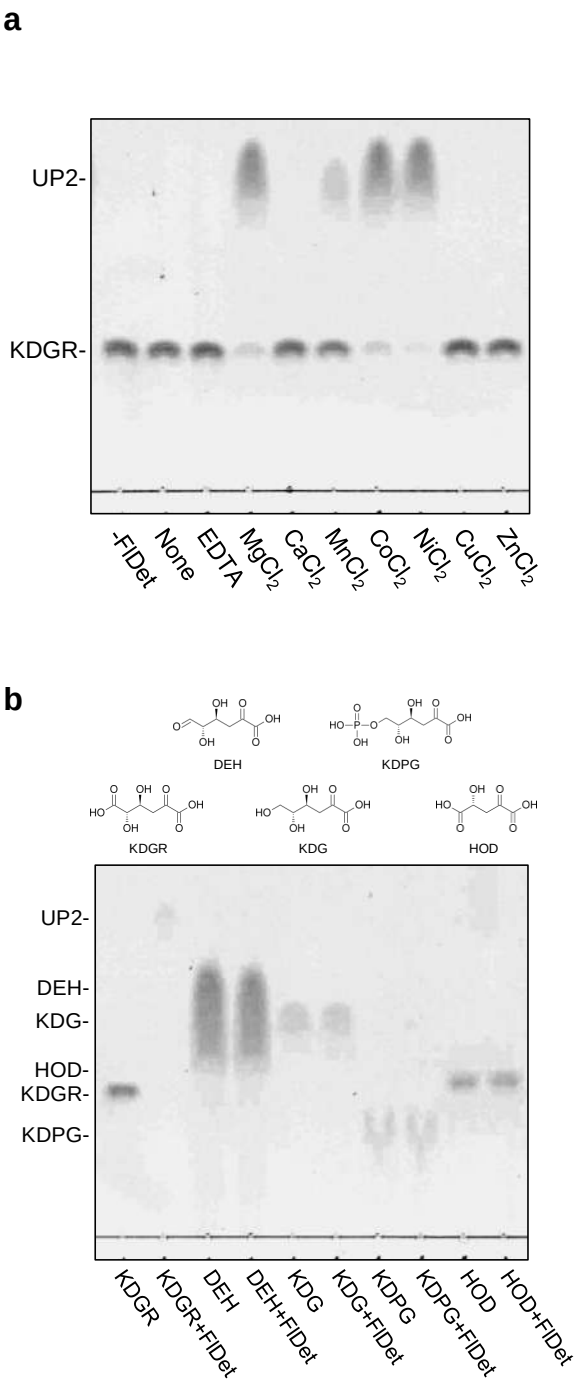


Figure 48. Enzymatic characterization of recFlDet.

a, effect of metal ion for the activity of recFlDet. The activity was assessed by TLC analysis in the standard mixture containing 1 mM various metal salts instead of 1 mM $MgCl_2$. **b**, substrate specificity of recFlDet. Substrate specificity was assessed by TLC analysis in the standard mixture containing 2.5 mM various α-keto acid instead of 2.5 mM KDGR. The structures of each substrate are shown above the TLC. KDGR, 2-keto-3-deoxy-D-glucarate; DEH, 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronate; KDG, 2-keto-3-deoxy-D-gluconate; 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate; HOD, 4-hydroxy-2-oxoglutarate.

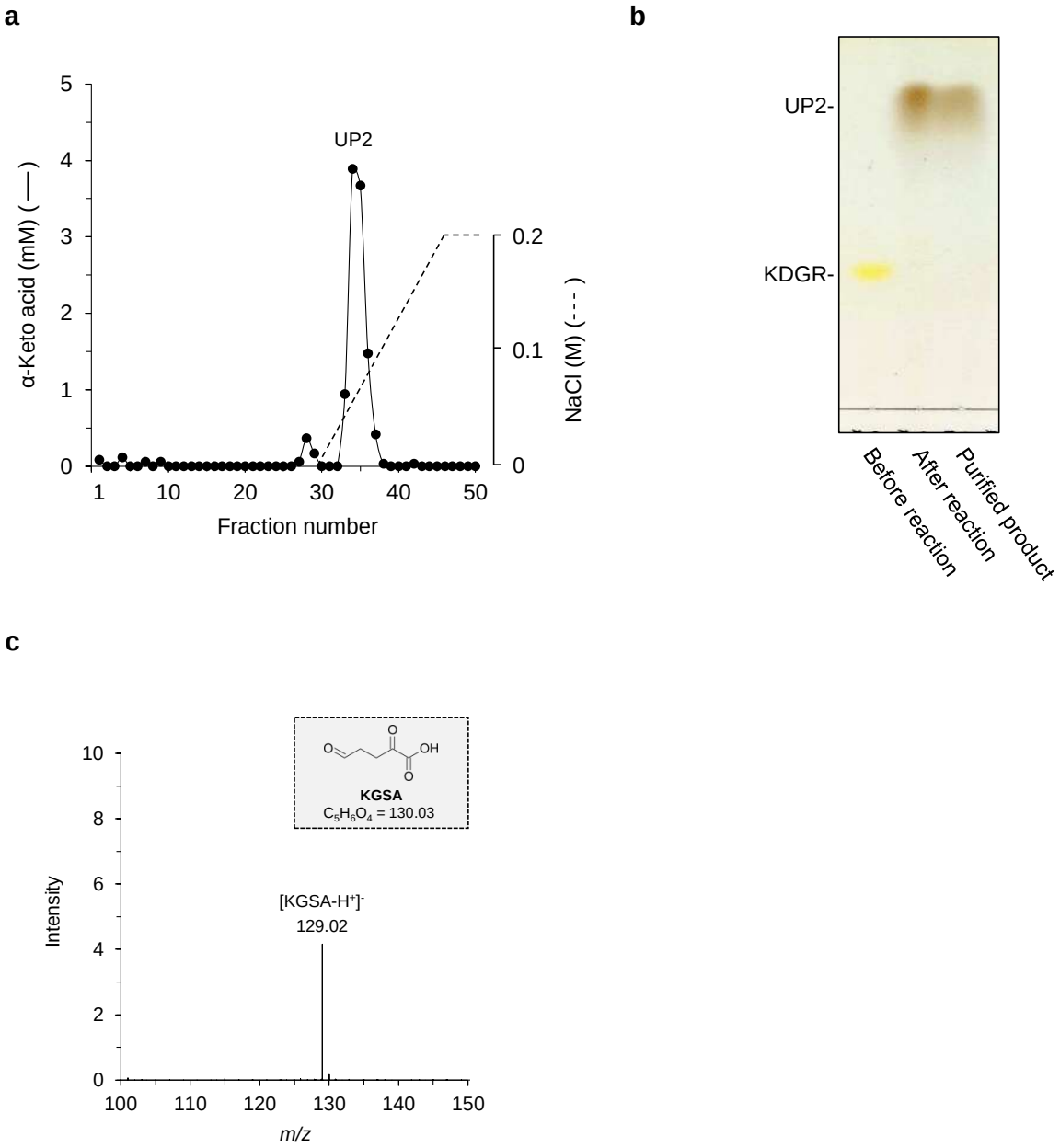


Figure 49. Purification and identification of UP2 produced by recFlDet.

a, chromatogram of SuperQ-650S column chromatography. **b**, analysis for purified products by TLC. UP2, unknown product 2. **c**, ESI-MS spectrum of UP2. Purified UP2 were desalted by gel-filtration chromatography and analyzed by ESI-MS. Predicted structure was shown in the upper right corner.

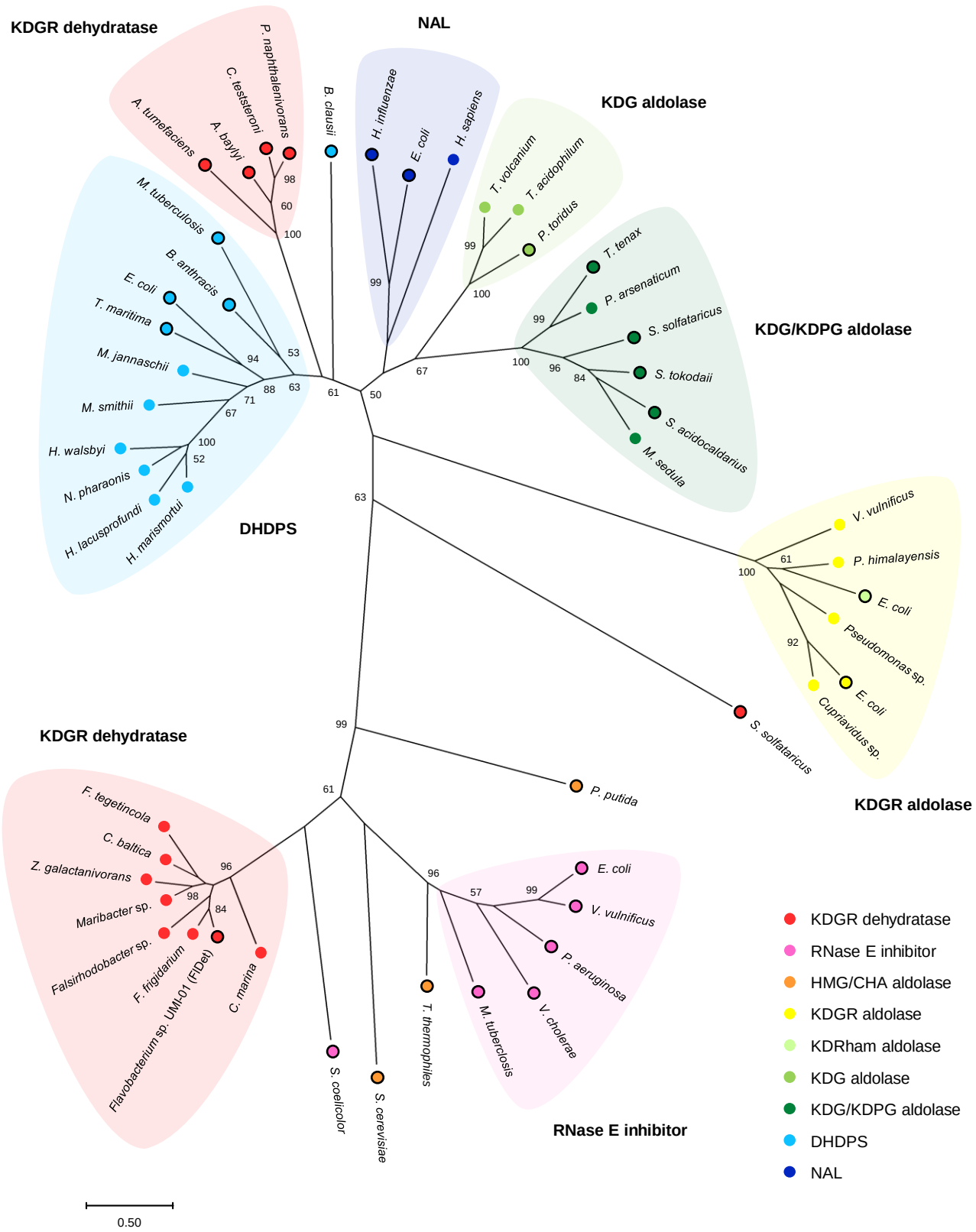


Figure 50. Phylogenetic analysis for FlDet with other KDGR metabolic enzymes.

An unrooted phylogenetic tree was constructed with the amino-acid sequences of FlDet and other proteins listed in Table 9 using MEGA-X. KDGR dehydratase, RNase E inhibitor, 4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate (HMG)/4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate (CHA) aldolase, KDGR aldolase, 2-keto-3-deoxy-L-rhamnonate (KDRham) aldolase, KDG aldolase, KDG/KDPG aldolase, dihydrodipicolinate synthase (DHDPS), and *N*-acetylneuraminate lyase (NAL)-like proteins were colored by red, pink, orange, pale green, light green, green, light blue, and blue, respectively. Characterized proteins were marked with black circles. Bootstrap values are indicated on the branches. Scale bar indicates 0.50 amino acid substitutions.

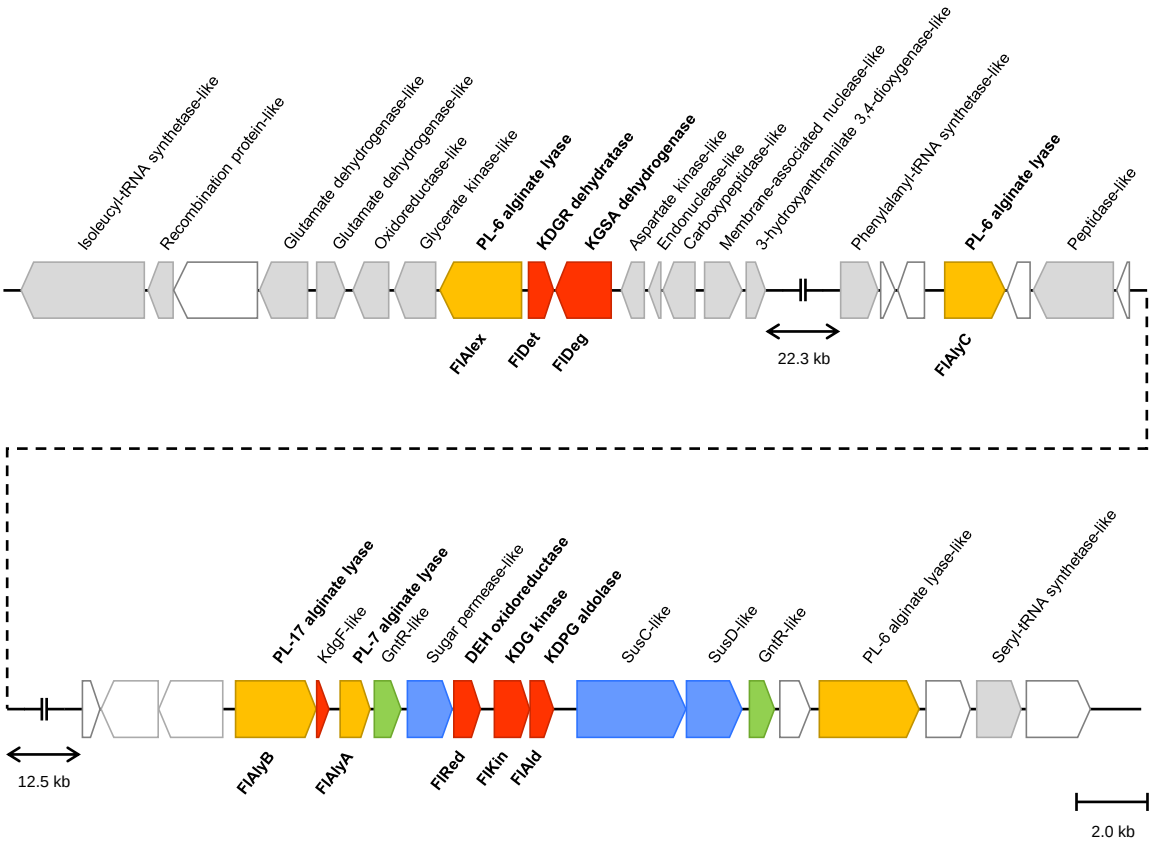


Figure 51. Alginolytic gene clusters found in the draft genome of strain UMI-01.

Genes encoding alginate lyases, DEH metabolic proteins, sugar transporters, transcriptional regulators, and other functional proteins are colored with orange, red, blue, green, and gray, respectively. While, function unknown genes are colored with white. Genes which were functionally identified using recombinant proteins previously are marked in bold.

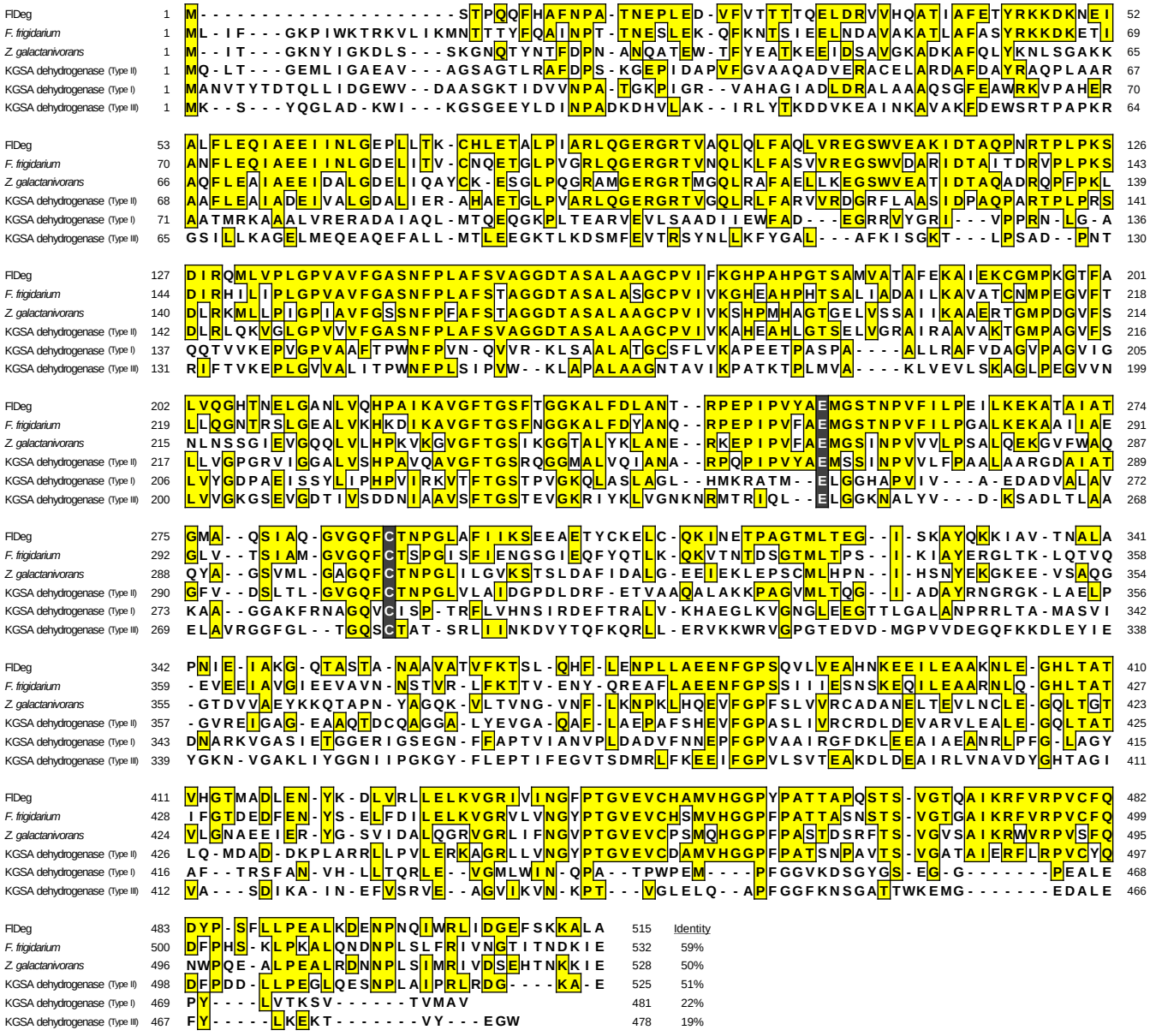


Figure 52. Multiple sequence alignment for KGSA dehydrogenases from strain UMI-01 and other bacteria.

The amino acid sequences of FlDeg and other KGSA dehydrogenase-like proteins were aligned using ClastalW program. Identical residues between FlDeg and other proteins were colored with yellow. Black box indicates catalytic residues conserved in KGSA dehydrogenase. FlDeg, KGSA dehydrogenase-like protein from *Flavobacterium* sp. UMI-01 (In this study); *F. frigidarium*, KGSA dehydrogenase-like protein from *Flavobacterium frigidarium* (GenBank accession number, WP_026708994); *Z. galactanivorans*, KGSA dehydrogenase-like protein from *Zobellia galactanivorans* (GenBank accession number, WP_013995335); KGSA dehydrogenase (Type II), KGSA dehydrogenase (Type II) from *Azospirillum brasilense* (GenBank accession number, BAF33385); KGSA dehydrogenase (Type I) from *A. brasilense* (GenBank accession number, BAF94276); KGSA dehydrogenase (Type III) from *Sulfolobus solfataricus* (GenBank accession number, AAK43220).

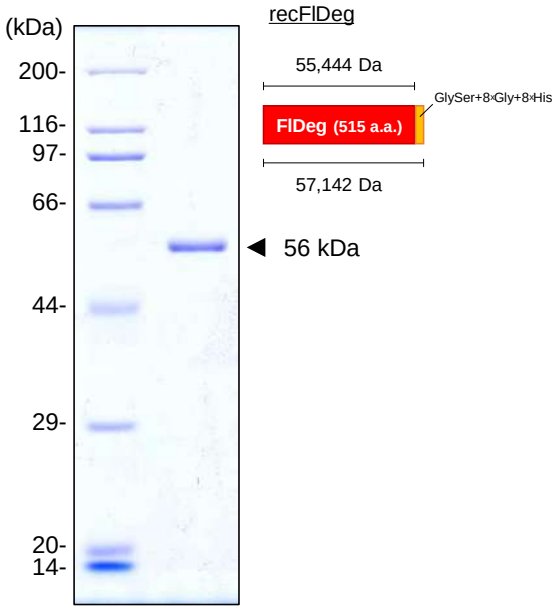


Figure 53. SDS-PAGE for purified recFlDeg.

Recombinant FlDeg (recFlDeg) was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified by affinity chromatography. A schematic diagram indicates a structure of recombinant enzyme.

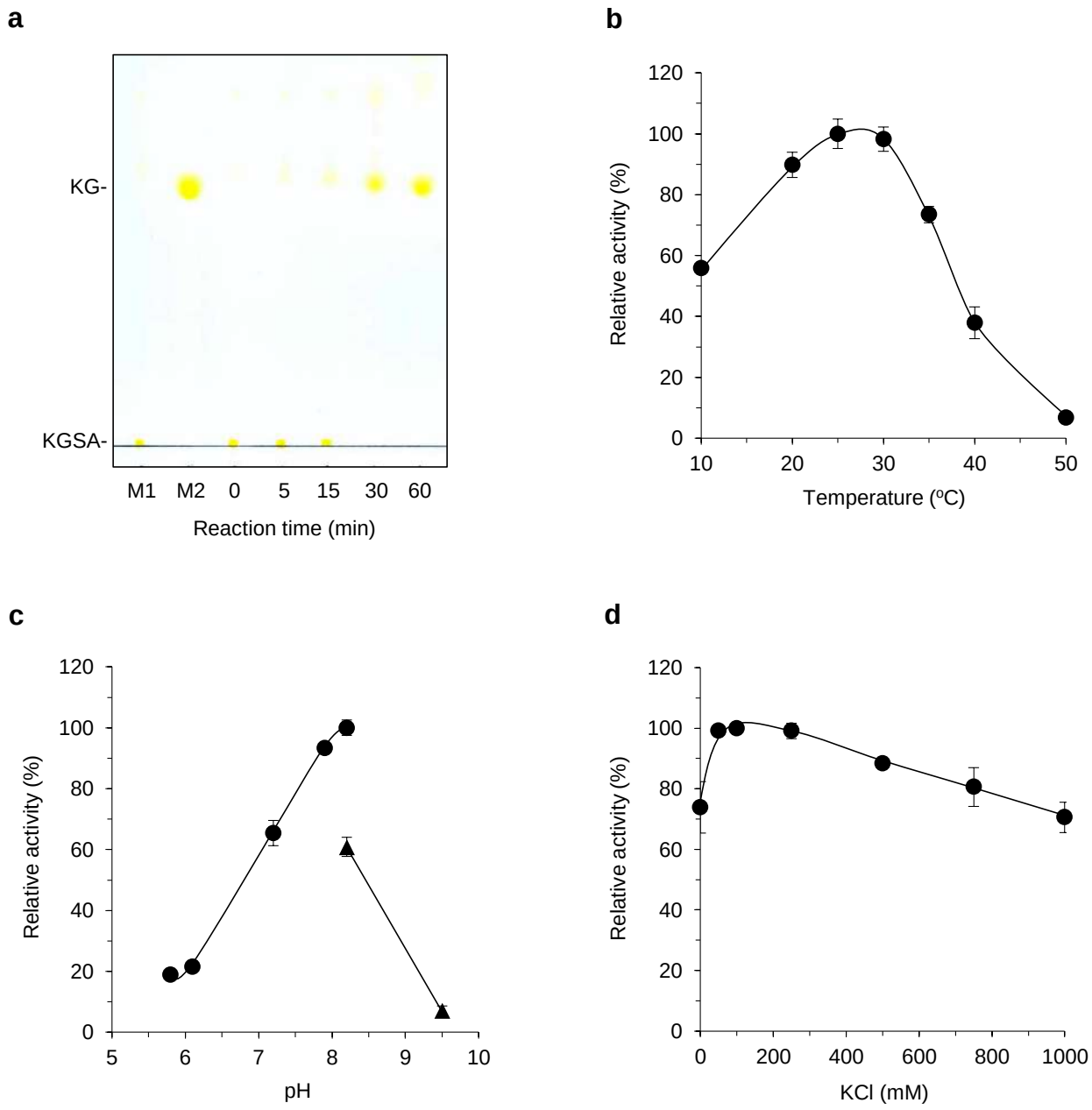


Figure 54. Enzymatic characterization of recFlDeg.

a, analysis for the reaction products produced by recFlDeg. **b**, temperature dependence of recFlDeg. Enzymatic reaction was carried out at 10-50°C. Activity at 25°C was taken as the relative activity of 100%. **c**, pH dependence of recFlDeg. The activity was assayed in the standard reaction mixture adjusted to pH 5.8-8.2 and pH 8.2-9.5 with potassium phosphate and Tris-HCl buffer, respectively. Activity at pH 8.2 was taken as the relative activity of 100%. **d**, effect of KCl for the activity of recFlDeg. Enzymatic reaction was conducted in the standard reaction mixture containing 0-1 M KCl. Activity in presence of 150 mM KCl was taken as the relative activity of 100%. Error bars in Fig. 54b-d represent s.d. (*n*=3).

Table 12. Co-enzyme and substrate specificity of recFlDeg.

Substrate / cofactor	Relative activity (%)
Cofactor	
NAD^+	100 ± 3.3
$NADP^+$	8.2 ± 2.2
NADH	N.D.*
NADPH	N.D.
Substrate	
α-Keto acid	
KGSA (C5)	100 ± 3.3
DEH (C6)	N.D.
Aldehyde	
Glutaraldehyde (C5)	8.5 ± 0.44
o-Phthalaldehyde	1.2 ± 0.13
Benzaldehyde	1.3 ± 0.44
Aldose	
Glucose (C6)	N.D.
Galactose (C6)	N.D.
Arabinose (C5)	N.D.
Xylose (C5)	N.D.
Uronic acid	
Glucuronic acid (C6)	N.D.
Deoxy sugar	
2-Deoxy-D-glucose (C6)	N.D.

*N.D., not detected.

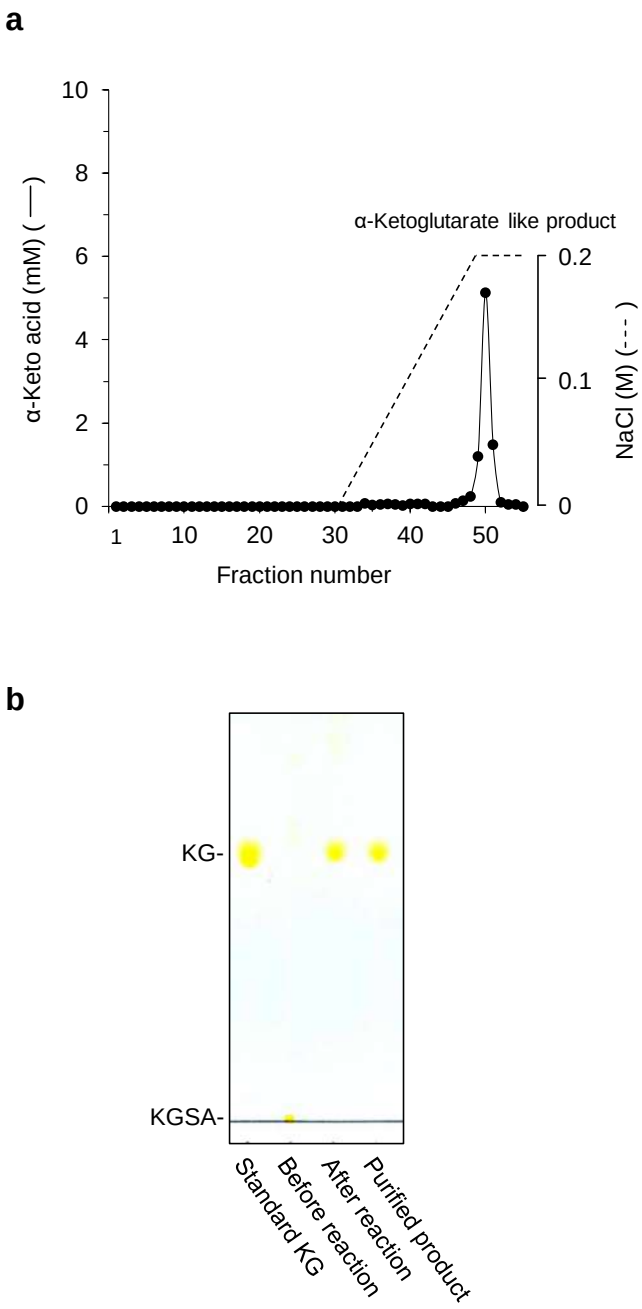


Figure 55. Purification of α-ketoglutarate like product produced by recFlDeg.

a, SuperQ-650S column chromatography of the product. **b**, purified products analyzed by TLC.

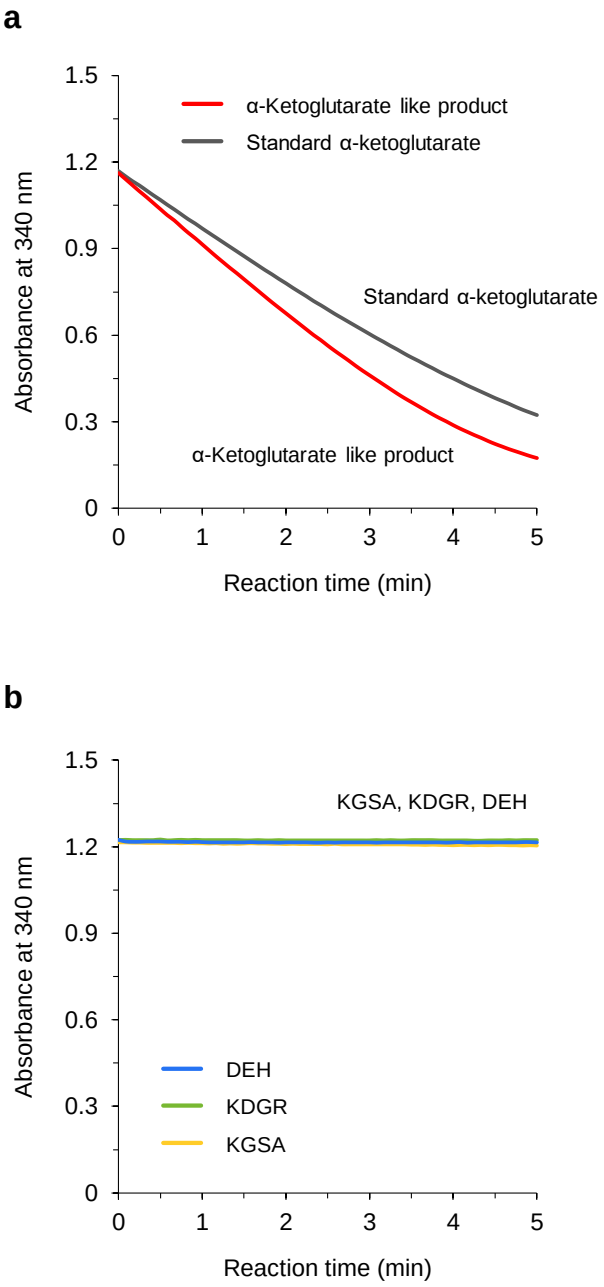


Figure 56. Identification of α-ketoglutarate like product using glutamate dehydrogenase.

The reaction was conducted in the mixture containing 0.5 mM various substrate, i.e., standard α-ketoglutarate (gray line) (a), α-ketoglutarate like product (red line) (a), DEH (blue line) (b), KDGR (green line) (b), and KGSA (yellow line) (b). The glutamate dehydrogenase activity was detected by measuring the decrease of absorbance at 340 nm due to the oxidation of NADH.

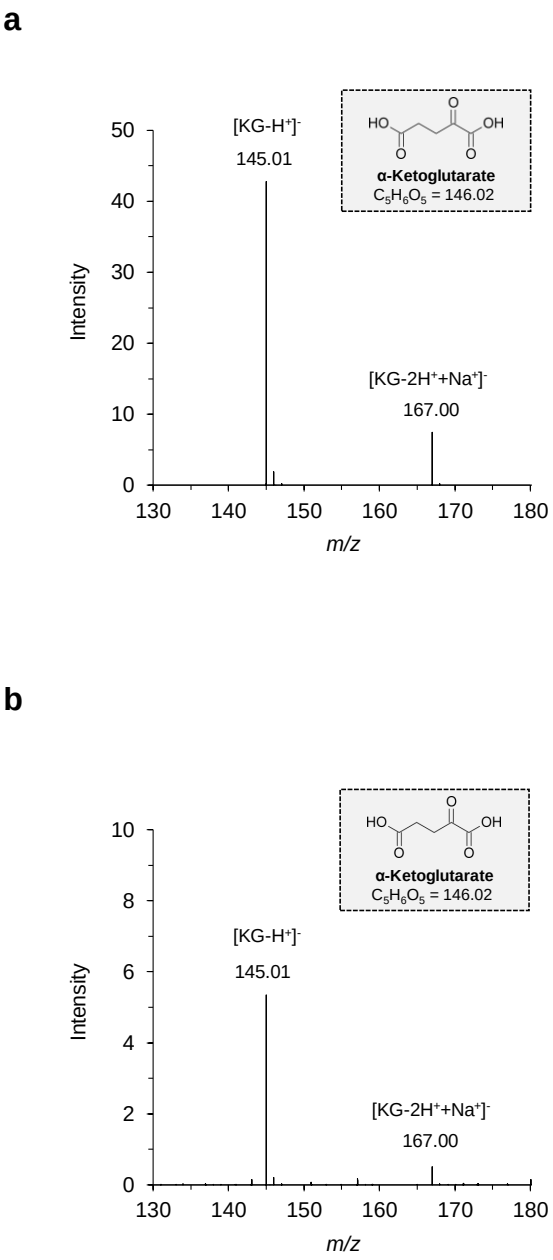


Figure 57. ESI-MS spectrum of α-ketoglutarate like product derived from KGSA.

Standard α-ketoglutarate (KG) and KG-like product were desalted by gel-filtration chromatography and analyzed by ESI-MS. Predicted structures were shown in the upper right corner of the spectrogram.

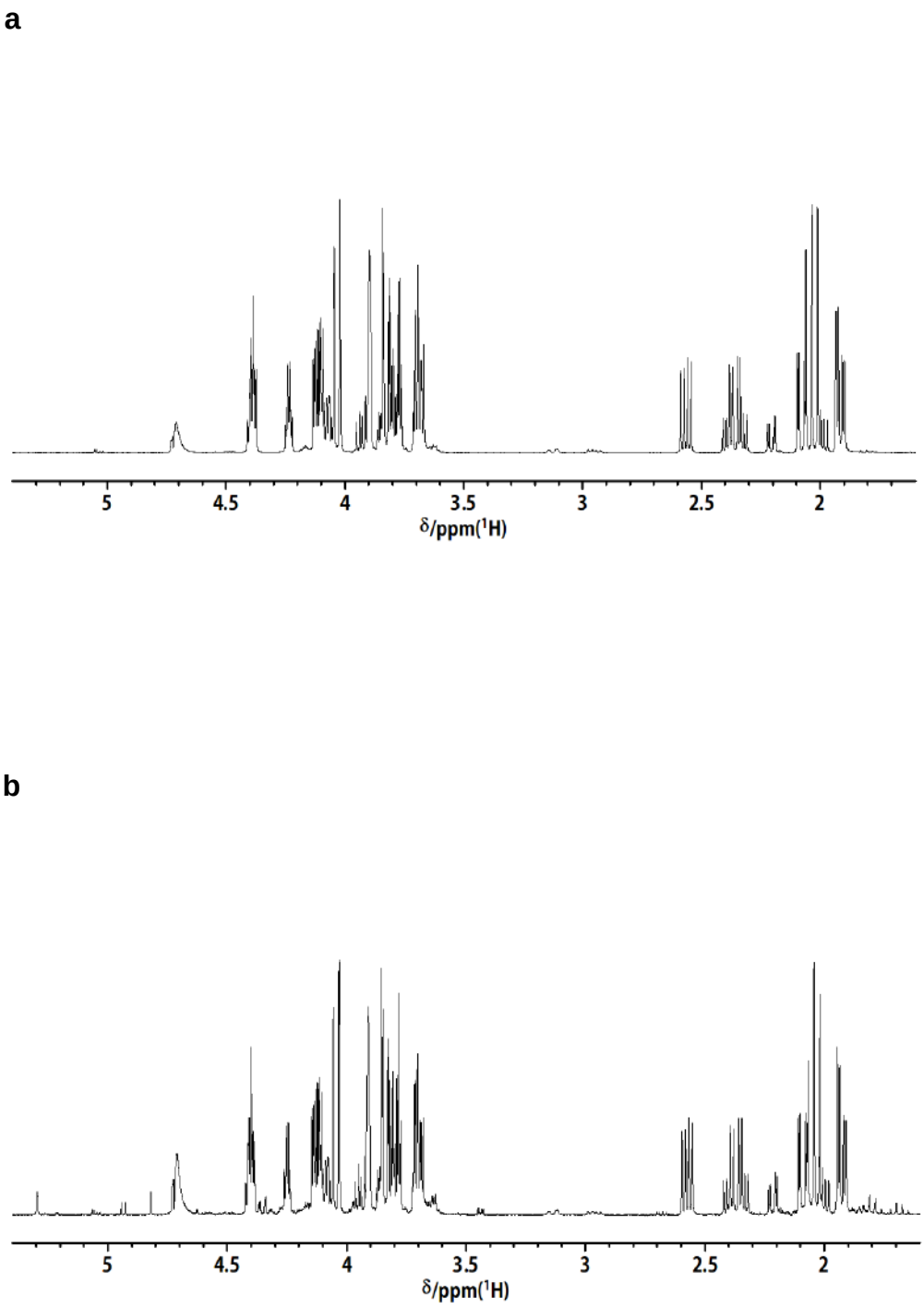


Figure 58. Determination for the chemical structure of alginate-derived KDG by NMR analysis.

a, ^{1}H-NMR spectrum of standard KDG. **b,** ^{1}H-NMR spectrum of alginate-derived KDG.

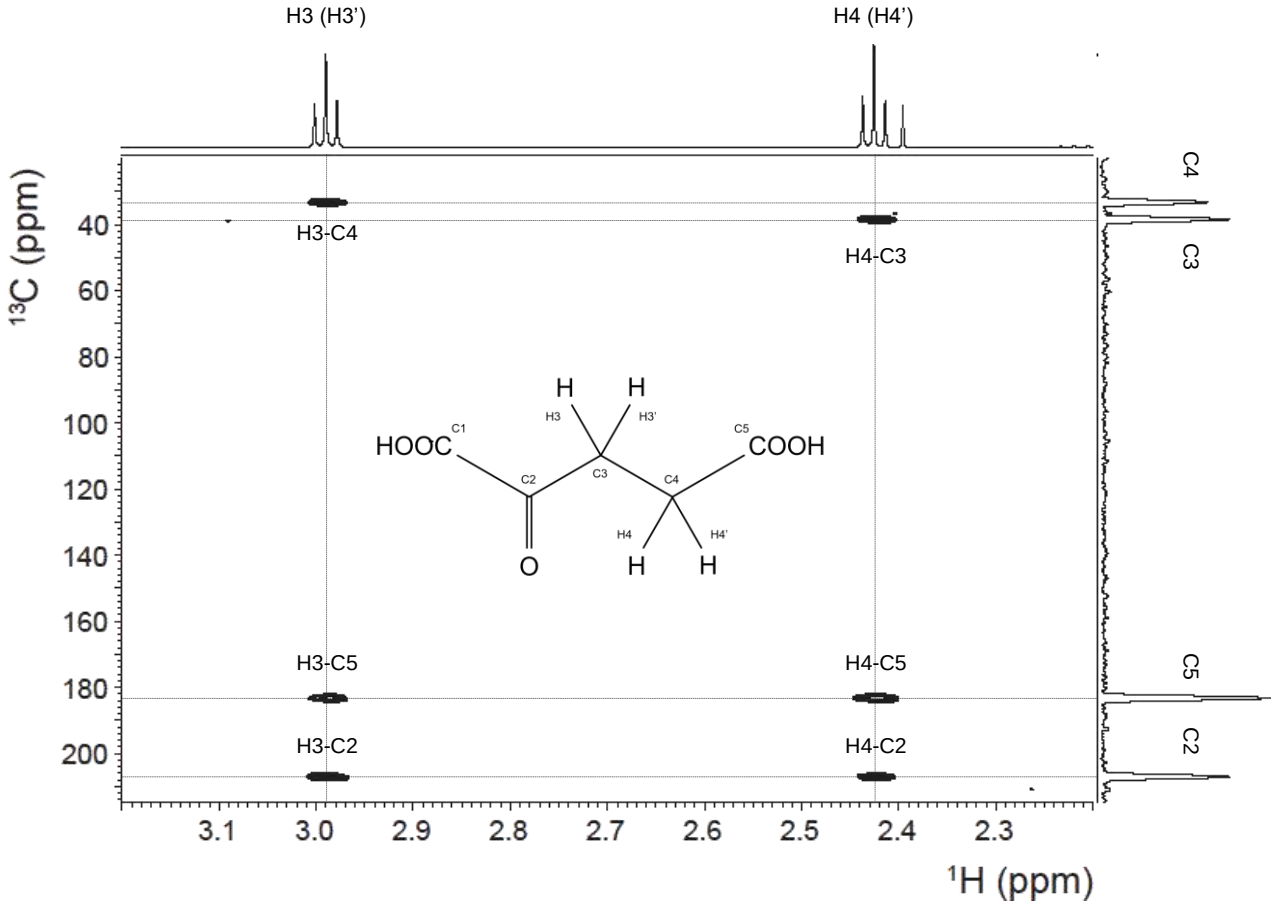


Figure 59. ^{1}H-^{13}C HMBC spectrum of standard KG.

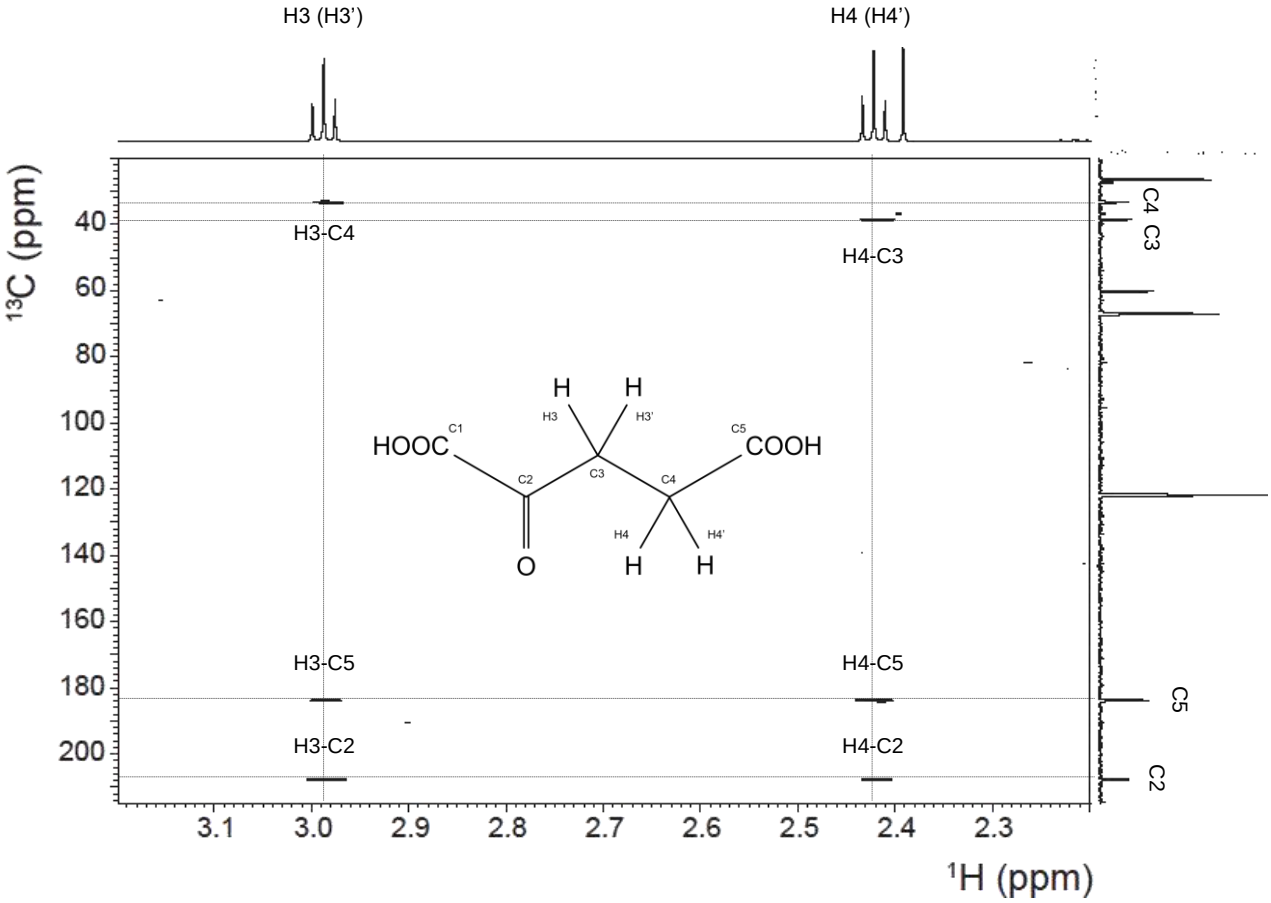


Figure 60. ^{1}H-^{13}C HMBC spectrum of alginate-derived KG.

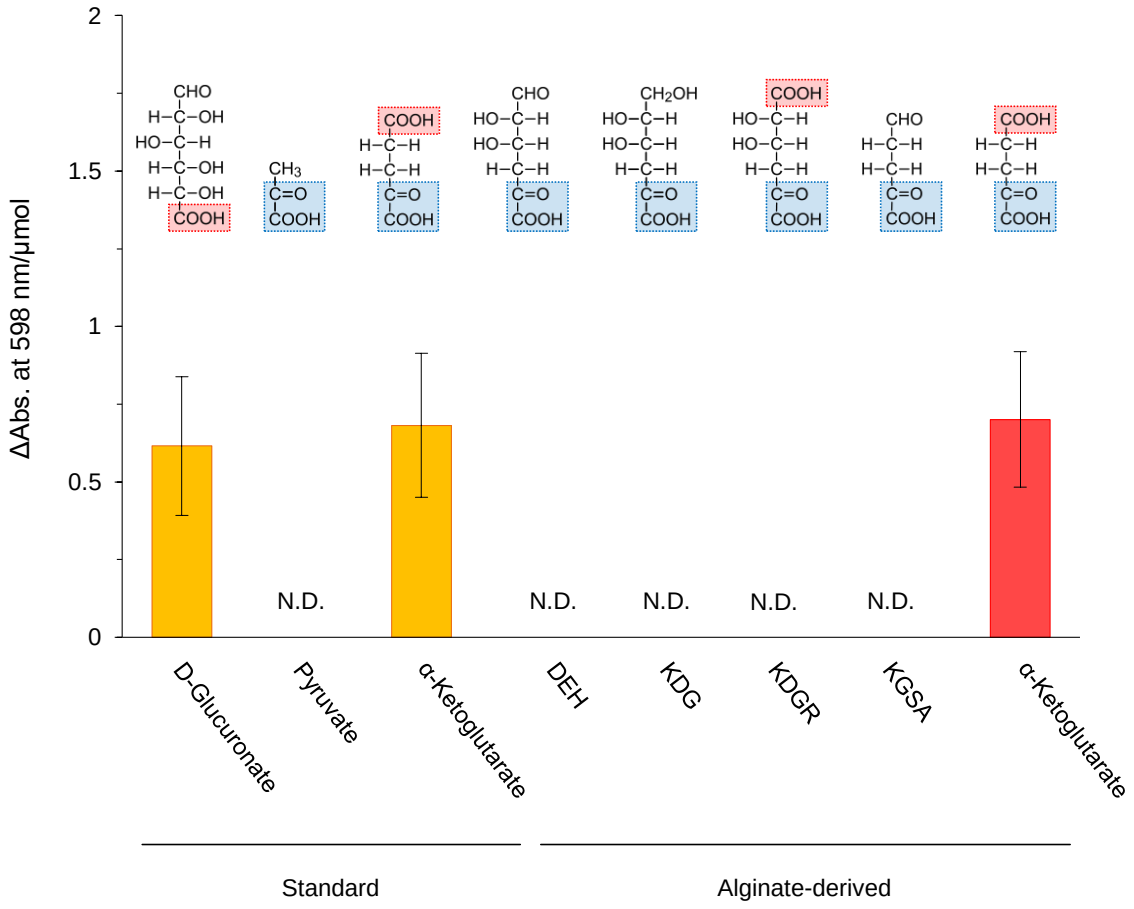


Figure 61. Detection of carboxylate group by 4-nitrophynacyl bromide method.

Various carboxylate compounds were assayed by 4-nitrophynacyl bromide method. The error bars are standard deviations (*n*=*3*). Red squares and blue squares indicate carboxylate and α-keto acid, respectively. N.D., not detected.

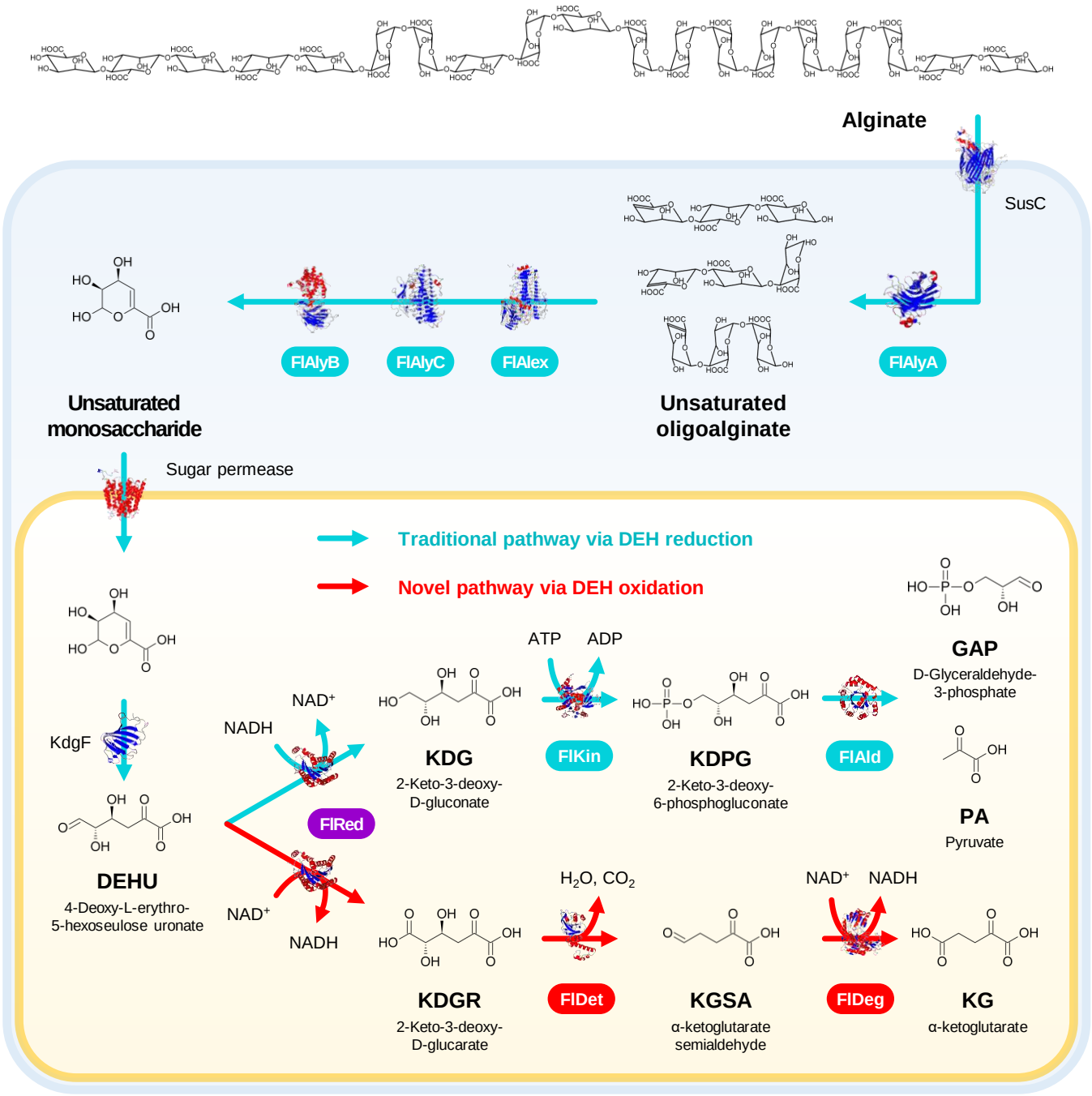
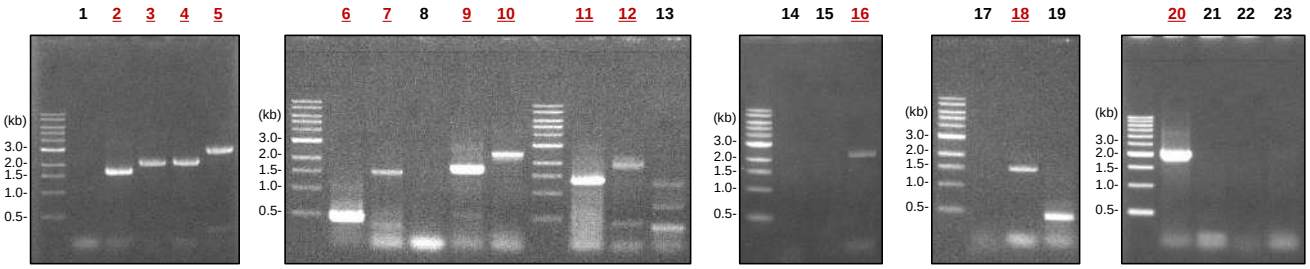


Figure 62. Schematic representation of alginate assimilation pathway in *Flavobacterium* sp. UMI-01 via DEH reduction and oxidation.

Blue and red arrows represent a conventional DEH-reducing pathway and a novel DEH-oxidizing pathway.

a



b

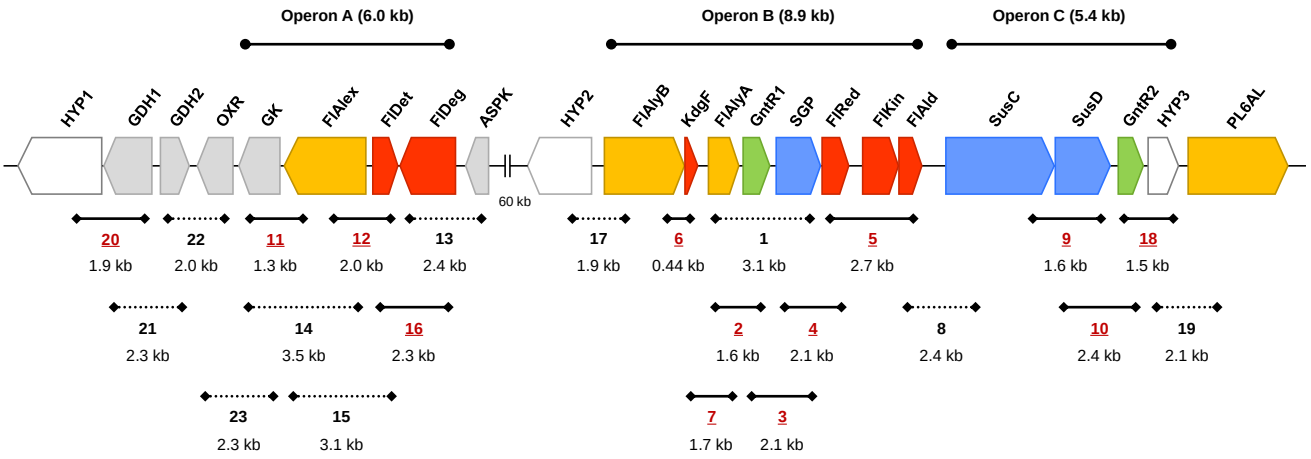


Figure 63. Operon analysis for alginolytic gene cluster found in *Flavobacterium* sp. UMI-01.

a, agarose-gel electrophoresis for RT-PCR products. **b**, schematic representation for three alginolytic operons of *Flavobacterium* sp. UMI-01. Solid lines and dashed lines indicate amplified and non-amplified regions, respectively. Primers used for RT-PCR (see Table 10) are represented under the solid or dashed lines.

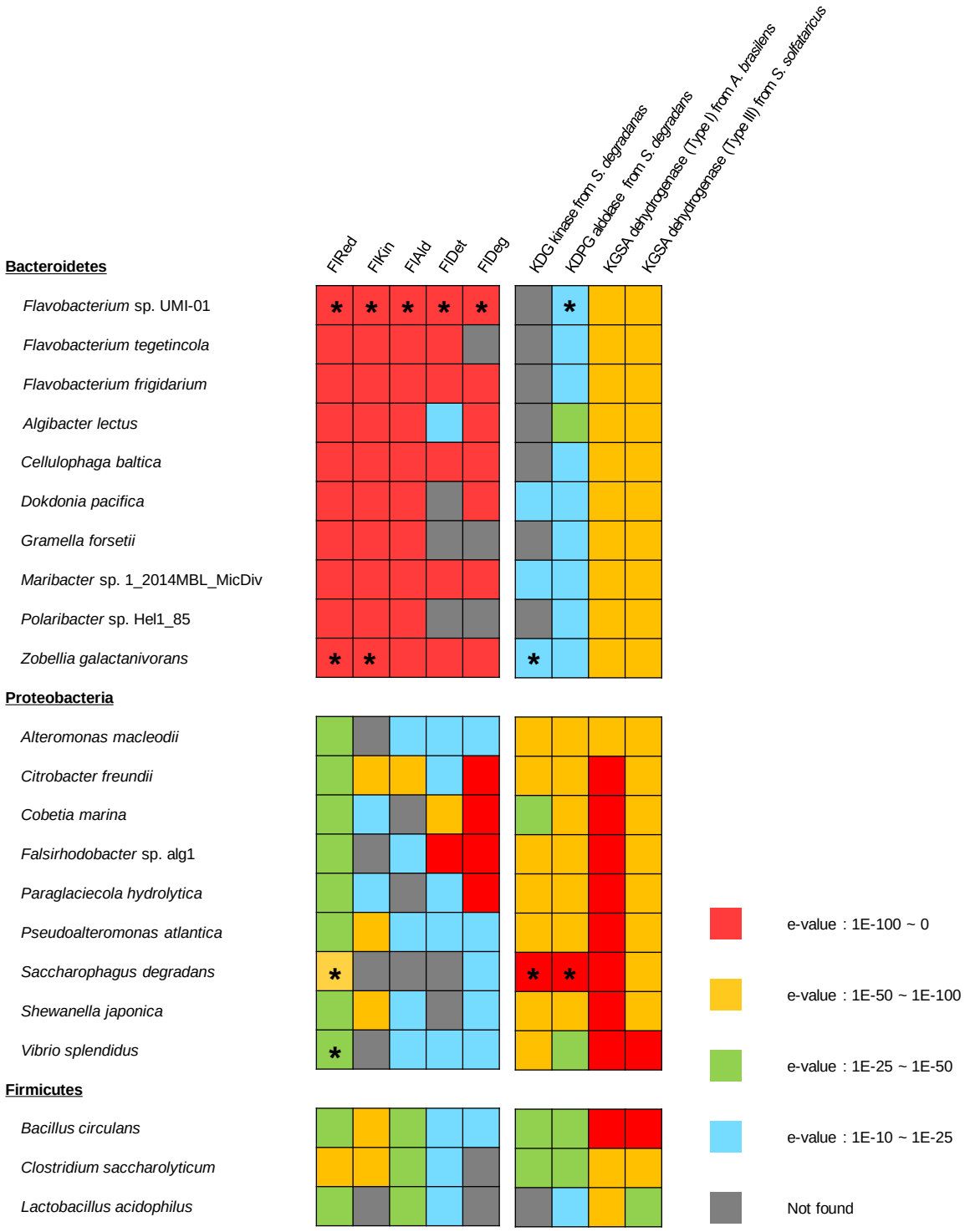


Figure 64. Distribution of genes involved in alginate metabolism among alginate-assimilating bacteria.

The map represents homology of deduced amino-acid sequences between identified genes (top) and candidate genes found in various alginate-assimilating bacteria (left). Asterisk (*) represents functional identified genes using recombinant enzymes.

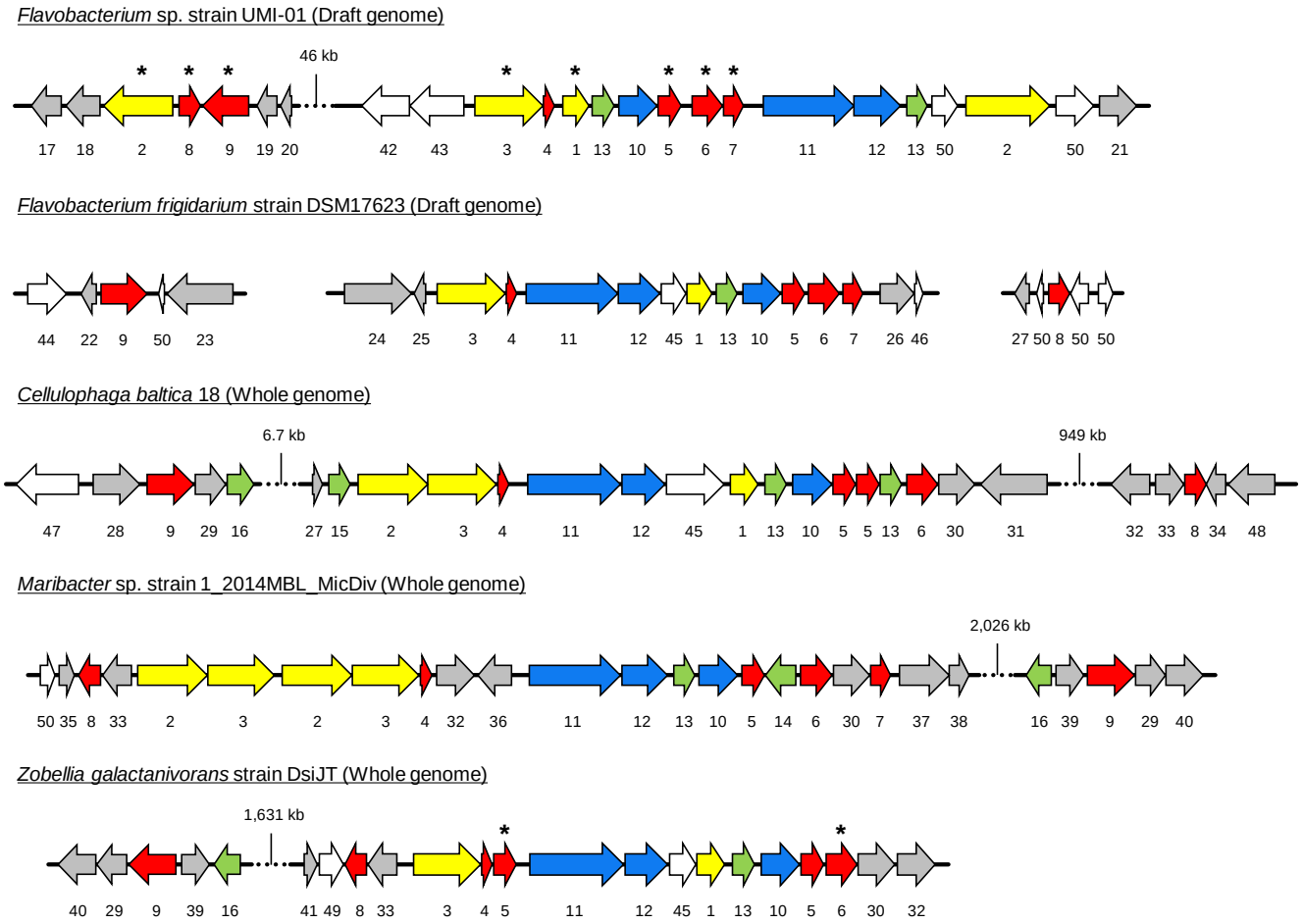


Figure 65. Location of KDGR dehydratase and KGSA dehydrogenase in the alginolytic gene clusters found in Flavobacteria.

Genes encoding alginate lyases, DEH metabolic enzymes, sugar transporters, transcriptional regulators, other functional proteins are colored with yellow, red, blue, green, and gray, respectively. While, function unknown genes are colored with white. Asterisk (*) represents functional identified genes using recombinant enzymes.

第 4 章　DEH 代謝関連遺伝子の発現に及ぼす浸透圧の影響

第 1 項　目的

前章では本研究で見出した新規の DEH 酸化経路によって生じる KDGR が、2 種類の酵素、すなわち FlDet と FlDeg により最終的に α-ケトグルタル酸へと変換されることを明らかにした。このことから、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株は DEH を既に知られていた還元を介する経路に加え、酸化を介する経路により代謝可能であることが明らかになった。ただし、この DEH の酸化と還元経路が、バクテリアのどのような生理的要求に応じて変化するかについては不明である。そこで本研究では、酸化経路で生じる α-ケトグルタル酸がグルタミン酸の前駆物質である点に着目し、これが必要となる高浸透圧環境への適応との関連について検討することとした。

フラボバクテリア科細菌は水圏環境に広く分布しており、淡水および海水の両環境にみられることが知られている。予備実験によれば、同科に属する UMI-01 株は淡水または海水環境を模したアルギン酸含有培地で生育可能であること、すなわち高い塩耐性 (浸透圧耐性) をもつことが確認されている。一般的に、細菌は高塩濃度条件下では細胞内にオスモライトを蓄積することで細胞内外浸透圧のバランスを保持している [107,108]。オスモライトは細胞内浸透圧の調節を担うアミノ酸や糖アルコールなどの化合物の総称であり、細胞外からの取り込みもしくは細胞内での生合成を介して蓄積される [107,108]。乾燥や降雨などの環境変化による浸透圧ストレスを受け易い土壌細菌は、このような浸透圧調節機構を利用することで自然界における自身の生存率を高めている [109]。

Makemson と Hastings は、海洋細菌 *Beneckea harveyi* (現在の *Vibrio harveyi*) が 0.5% (*w/v*) ペプトンおよび 0.5-4.0% (*w/v*) NaCl を含む最少培地で生育可能であり、3.0%-4.0% (*w/v*) NaCl 存在下においては細胞内に多量のグルタミン酸 (0.5% (*w/v*) NaCl 存在時の約 20 倍) を蓄積することを報告した [110]。これは *B. harveyi* が培地に添加されたペプトンに含まれるグルタミン酸を細胞内に取り込んだこと、およびグルタミン酸が細菌のオスモライトに成り得ることを示している。なお、グルタミン酸は α-ケトグルタル酸を基質として生合成されるアミノ酸である。

以上の知見に基づき、著者は、UMI-01 株が DEH の酸化代謝で生じた α-ケトグルタル酸を基にグルタミン酸を合成し、それをオスモライトとして利用することで高い塩耐性を獲得している可能性を考えた。そこで本章では、この仮説を検証するために、先ず低～高塩濃度のアルギン酸含有培地で生育した UMI-01 株の無細胞抽出液を用いて、その DEH 酸化代謝関連酵素の活性を調べることとした。また、UMI-01 株の KGSA 脱水素酵素が高塩濃度条件下で誘導発現されるかどうかを調べ、さらに、同条件下で細胞内に蓄積されるオスモライトを同定し、本菌の浸透圧調節機構と DEH の酸化代謝との関連性を明らかにすることとした。

第 2 項　実験手法

1. DEH 酸化代謝関連酵素の発現誘導に及ぼす塩濃度の影響

1.1. 培地の調製

Flavobacterium sp. UMI-01 株は、1% (*w/v*) アルギン酸ナトリウムを唯一炭素源として含む minimal salt (MS) 培地もしくは artificial sea water (ASW) 培地 (組成は以下に示す) を用いて生育させた。MS 培地は第 1 章の実験手法 2.1.1.で述べた通りに調製した。なお、この方法により調製された MS 培地の pH は 7.5 であった。

ASW 培地：K_2HPO_4、NaCl、KCl、NH_4Cl、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$、および $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ をそれぞれ 0.1 g/L、25 g/L、1 g/L、0.5 g/L、5 g/L、および 0.02 g/L となるように蒸留水に溶解し、1 M NaOH により MS 培地と同等の pH に調整した後、121ºC で 20 分間オートクレーブすることにより調製した。なお、通常の ASW 培地は上記の成分の他に 0.2 g/L $CaCl_2$ を含んでいるが、Ca^{2+}が炭素源として添加したアルギン酸とゲルを形成するため、本章では $CaCl_2$ を加えていない。

また、アルギン酸代謝関連酵素の発現誘導に及ぼす炭素源の影響を調べるため、グルコースを唯一炭素源としたグルコース-MS 培地も調製した。なお、UMI-01 株は 1% (*w/v*) グルコースを含む MS 培地もしくは ASW 培地では生育しなかったが、0.1% (*w/v*) Bacto Yeast Extract の添加により増殖可能となった。そこで、グルコースを唯一炭素源として用いる際には、培地に 0.1% (*w/v*) Bacto Yeast Extract を添加することとした。

1.2. アルギン酸代謝関連酵素の活性測定

1.2.1. エンド型アルギン酸リアーゼ活性の測定

エンド型アルギン酸リアーゼ活性は、第 1 章の実験手法 3.3.1.で述べた紫外吸収法により、不飽和オリゴ糖の生成を検出することにより調べた。エンド型アルギン酸リアーゼ 1 U は、25ºC において 1 分間に 235 nm における吸光度を 0.1 上昇させる酵素量と定義した。

1.2.2. エキソ型アルギン酸リアーゼ活性の測定

エキソ型アルギン酸リアーゼ活性は、酵素反応により生じた DEH を反応系に共存させた DEH 還元酵素 FlRed により NADH 存在下で還元し、その 340nm の吸光度減少に基づき定量することにより調べた。酵素反応の基質として用いたアルギン酸オリゴ糖は、1% (*w/v*) アルギン酸ナトリウムを 0.1 mg/mL recFlAlyA で分解した後、クロロホルム処理を行うことにより調製した。

酵素反応は、0.1% (*w/v*) アルギン酸オリゴ糖、10 mM リン酸カリウム (pH 7.4)、0.1 mg/mL recFlRedΔtag、および 0.2 mM NADH を含む 25ºC の反応液中で行い、エキソ型アルギン酸リアーゼ 1

U は 1 分間に 1 μmol の DEH を生成する酵素量と定義した。

1.2.3. DEH 代謝関連酵素活性の測定

DEH 還元活性、KDG リン酸化活性、および KDPG 開裂活性は、第 1 章の実験手法 4.で述べた方法により調べた。また、KDGR 脱水酵素活性および KGSA 脱水素酵素活性は、それぞれ第 3 章の実験手法 3.1.および 5.1.と同様の手法で調べた。

2. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株由来 KGSA 脱水素酵素の精製および遺伝子同定

Flavobacterium sp. UMI-01 株由来 KGSA 脱水素酵素は、本菌を 1% (*w/v*) アルギン酸ナトリウムおよび 0.5 M NaCl を含む 4 L の MS 培地中で OD_{600}=2.4 まで培養し、その菌体から得た無細胞抽出液を第 2 章の実験手法 1.2.と同様の方法で、TOYOPEARL Butyl-650M、MonoQ 4.6/100 PE、および Superdex 200 10/300 GL カラムクロマトグラフィーに供することにより精製した。溶出した各フラクションの酵素活性は、第 3 章の実験手法 5.1.に示す方法により測定し、活性を示す画分を精製酵素として回収した。精製酵素の N 末端アミノ酸配列および全一次構造は、第 2 章の実験手法 1.3.に従って決定した。

3. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株の代謝物解析

3.1. 代謝物の調製

Flavobacterium sp. UMI-01 株を各種炭素源を含む MS 培地もしくは ASW 培地中で OD_{600}=1.8-2.4 まで培養し、そのうちの 40 mL を遠心分離した。細胞外に放出された代謝物 (細胞外代謝物) は、その上清を真空乾燥し、得られた固形物を 20 mL のメタノールに懸濁後、遠心分離により得られた上清を再び真空乾燥し、そこに 1 mL の蒸留水を加えることで調製した。

一方、細胞内に蓄積された代謝物 (細胞内代謝物) は、遠心分離により得た菌体から過塩素酸抽出法により抽出した。菌体を 20 mL の蒸留水に懸濁し、2.2 mL の 50% (*v/v*) 過塩素酸と混合後、氷上で 20 分間静置した。次いで、遠心分離により得られた上清に 1,260 μL の 15 M KOH を加え、生じた沈殿を遠心分離により除去した。その上清を真空乾燥し、残留した固形物を 20 mL のメタノールに懸濁後、遠心分離により得られた上清を再び真空乾燥し、それを 1 mL の蒸留水で溶解した。

以上の手順により調製した細胞外代謝物および細胞内代謝物は、菌体回収時の OD_{600} の値に応じて適宜希釈し、同一量の菌体あたりの抽出物として解析に使用した。

3.2. TLC による代謝物の解析

3.2.1. カルボニル化合物の検出

前項で調製した試料に含まれるカルボニル化合物は、DNP により誘導体化した後に TLC で解析した。試料と 5 mM DNP－2 M HCl を 1:4 (*v:v*) の割合で混合し、30ºC で 30 分間インキュベートした後、1/2 量 (*v/v*) の酢酸エチルで DNP 誘導体を抽出した。TLC プレートに供した DNP 誘導体は、1-ブタノール、エタノール、および 0.5 M アンモニア水を 7:1:2 (*v:v:v*) の割合で混合した溶媒により展開した。分離された誘導体は、トランスイルミネーター (波長 312 nm) を用いて検出した。

3.2.2. アミノ酸の検出

試料中に含まれるアミノ酸は、試料を TLC プレート上で 1-ブタノール、アセトン、酢酸、および蒸留水を 35:35:7:23 (*v:v:v:v*) の割合で混合した溶媒を用いて展開後、Ninhydrin Spray Reagent (Sigma-Aldrich) を噴霧し、100ºC で 3 分間加熱することにより検出した。

3.3. 細胞内代謝物の分子同定

3.3.1. TLC による細胞内代謝物の簡易同定

高塩濃度条件下の ASW 培地における細胞内代謝物中のアミノ酸様物質は、TLC により簡易的に同定した。すなわち、試料と 20 種類の標準アミノ酸との TLC 上における移動度を比較することにより、アミノ酸様物質を同定した。標準のアミノ酸は、終濃度で 5 mM となるように蒸留水に溶解して使用したが、チロシンは蒸留水に不溶であったため、0.5 M HCl に溶解して使用した。

3.3.2. TLC による細胞内代謝物の精製

細胞内代謝物中に含まれるアミノ酸様物質は、TLC により以下のように精製した。まず、100 μL の試料を 5 μL ずつ 20 レーンに分けて TLC プレートに負荷し、実験手法 3.2.2.と同様の溶媒を用いて展開した。次いで、TLC プレート端の 1 レーンを切り離し、それを ninhydrin で発色させた後、残りの 19 レーンから目的物質と同じ移動度のシリカゲル層を削り取った。シリカゲルに含まれるアミノ酸様物質は、1 mL の蒸留水により 2 回抽出し、得られた抽出液を凍結乾燥により 100 μL に濃縮した。得られたアミノ酸様物質は、精製度を TLC により確認した後、以降の実験に使用した。

3.3.3. 質量分析による細胞内代謝物の同定

前項で精製したアミノ酸様物質の質量および分子種は、Superdex peptide 3.2/300 GL を用いて脱塩した後、第 2 章の実験手法 4.3.1.と同様の方法で ESI-MS により解析した。

4. 培養液の浸透圧変化に伴う代謝産物の変化の解析

Flavobacterium sp. UMI-01 株を低浸透圧下 (MS 培地) から高浸透圧下 (ASW 培地) に移した際に、その細胞外および細胞内代謝物がどのように変化するかを調べた。すなわち、先ず本菌を 1% (w/v) アルギン酸ナトリウムを含む 25ºC の MS 培地中で OD_{600}=1.2 (対数増殖期) まで生育させ、その菌体を遠心分離により回収した。得られた菌体を MS 培地で 2 回洗浄し、これを 2 分割して新たな MS 培地と ASW 培地に移した後、25ºC で 12 時間培養した。培養液は 2 時間毎に 1 mL ずつ分取し、それらの細胞内外の代謝物を実験手法 3.1.で述べた方法により調製した。

得られた試料中のピルビン酸および α-ケトグルタル酸は、それぞれ第 1 章の実験手法 4.2.2.および第 3 章の実験手法 5.3.2.で述べた方法により定量した。また、同試料中のグルタミン酸は、L-グルタミン酸定量キット「ヤマサ」NEO (ヤマサ醤油) により定量した。本キットでは、まず、試料中のグルタミン酸を L-グルタミン酸オキシダーゼにより酸化させ、過酸化水素を発生させる。次いで、その過酸化水素と同キットに含まれるペルオキシダーゼの作用により、TOOS (*N*-ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methoxyaniline) および 4-aminoantipyrine が酸化縮合し、過酸化水素の濃度に依存して紫色色素が生成する。試料中のグルタミン酸は、この色素に由来する 555 nm の吸光度を測定することで定量した。

第 3 項　実験結果

1. DEH 酸化代謝関連酵素の発現誘導に及ぼす塩濃度の影響

本菌を、アルギン酸を含む ASW 培地で培養すると、その無細胞抽出液 (粗酵素) は MS 培地で生育した場合よりも高いエンド型アルギン酸リアーゼ活性、KDG リン酸化活性、KDPG 開裂活性、KDGR 脱水酵素活性、および KGSA 脱水素酵素活性を示すことが明らかになった (Figure 66, Table 13)。KGSA 酸化活性は特に顕著に変化し、その活性は、ASW 培地で培養した方が約 7.8 倍も高かった。一方、グルコース存在下で培養した場合、アルギン酸分解・代謝関連酵素の活性は ASW 培地と MS 培地のいずれにおいても総じて低く、アルギン酸存在下で培養した場合の約 1/4 以下であった (Figure 66, Table 13)。ただし、KDG リン酸化活性および KDPG 開裂活性は、グルコース存在下においても比較的高く Entner-Doudroff 経路を介する代謝経路が作動していることが示唆された。

先に述べたように、本菌はアルギン酸を含む ASW 培地中において著しく高い KGSA 脱水素酵素活性を示した (Figure 66, Table 13)。すなわち、本菌における KGSA 脱水素酵素の発現は、培地の浸透圧の高低により調節される可能性が考えられた。そこで、0、100、250、および 500 mM の NaCl を添加したアルギン酸-MS 培地中で本菌を培養し、その無細胞抽出液の KGSA 脱水素酵素活性の変化を調べた。その結果、本菌の KGSA 脱水素酵素活性は、概ね NaCl 濃度依存的に上昇し、500 mM

NaCl 存在下で最大となり、その活性は NaCl を添加していない場合の約 7.6 倍となった (Figure 67)。また、750 mM NaCl 存在下においては菌の増殖がみられなかった (data not shown)。しかしながら、100 mM NaCl 存在下での培養においては KGSA 酸化活性が低下し、NaCl を添加していない場合の約 0.27 倍であった。この原因は不明であるが、少なくとも本菌の KGSA 酸化活性は、培地の NaCl 濃度の高低に応じて変化すること、また高張条件下 (250-500 mM NaCl) で最大となることは明らかである。

以上より、本菌では、KGSA 脱水素酵素がアルギン酸存在下において発現誘導され、その発現量は高浸透圧条件下で著しく上昇すると考えられた。一方、Figure 51 に示したクラスター内のアルギン酸代謝関連酵素の発現は、KGSA 脱水素酵素と同様、アルギン酸の存在により誘導されたが、KGSA 脱水素酵素遺伝子とは異なり、高浸透圧条件下において増大しなかった (Figure 66)。これらの結果は、高浸透圧により発現誘導される KGSA 脱水素酵素遺伝子が、アルギン酸により発現誘導されるアルギン酸分解・代謝関連酵素遺伝子と離れた位置に存在することにも関連していると考えられる。そこで、この高浸透圧誘導性の KGSA 脱水素酵素が前章において同定された FlDeg と同一であるかどうかを、酵素の精製および一次構造解析により明らかにすることとした。

2. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株由来 KGSA 脱水素酵素の精製および遺伝子同定

Flavobacterium sp. UMI-01 株における高浸透圧誘導性の KGSA 脱水素酵素を同定するため、0.5 M NaCl 存在下で培養した本菌の無細胞抽出液を各種クロマトグラフィーに供し、その精製を試みた。すなわち、本菌を 1% (*w/v*) アルギン酸ナトリウムおよび 0.5 M NaCl を含む MS 培地で培養し、その無細胞抽出液を疎水クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、およびゲル濾過クロマトグラフィーに順次供することにより KGSA 脱水素酵素を精製した (Figure 68, Table 14)。SDS-PAGE (Figure 68d) およびゲル濾過クロマトグラフィー (Figure 68c) により、精製 KGSA 脱水素酵素の分子量はそれぞれ約 60 kDa および約 366 kDa と見積もられたことから、本酵素は非変性条件において 6 量体を形成していると考えられた。エドマン分解により決定された N 末端アミノ酸配列は”MLKGF”であり、この配列に基づきその全一次構造をコードする遺伝子を BLAST+検索により決定した (Figure 69)。本酵素をコードする遺伝子は、アルギン酸代謝関連遺伝子の見出されたドラフトゲノム配列の Contig 6 ではなく、Contig 19 内に見出された。なお、そのアミノ酸配列から計算される分子量は 59,942 であり、SDS-PAGE により見積もられた分子量と一致した。

高浸透圧誘導性の KGSA 脱水素酵素 (本酵素は前章で決定した FlDeg と区別するために FlDeg II と称する) の一次構造は、先に同定した FlDeg のものとは大きく異なっており、Type I-III の KGSA 脱水素酵素とも 16-27%の低いアミノ酸配列同一性しか示さなかった (Figure 70)。一方、この新たな

KGSA 脱水素酵素 FlDeg II は、*Mycobacterium tuberculosis* のプロリン代謝に関与する γ-グルタミン酸セミアルデヒド脱水素酵素 (GenBank accession number, EF075557)[111] と 48%と比較的高いアミノ酸配列同一率を示すことが明らかになった。なお、*M. tuberculosis* では上記の酵素をコードする遺伝子を含むプロリン代謝関連遺伝子がクラスターを形成していたが、それらの遺伝子は UMI-01 株ゲノムの FlDeg II をコードする遺伝子の周辺にはみられなかった (Figure 71)。したがって、FlDeg II は、本菌においてはプロリン代謝とは異なる役割を担っている可能性が高い。

3. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株の代謝物解析

3.1. TLC による細胞外および細胞内代謝物の解析

前項において、我々は *Flavobacterium* sp. UMI-01 株の DEH 酸化経路の一端を担う KGSA 脱水素酵素 (FlDeg II) が、高浸透圧条件下で誘導発現されることを見出した。そこで、本菌を高浸透圧環境に曝した際に、メタボロームにどのような変化が起こるのかを調べることとした。

1% (*w/v*) アルギン酸ナトリウムを含む MS 培地 (低浸透圧培地) もしくは ASW 培地 (高浸透圧培地) を用いて本菌を培養し、得られた菌体および培養上清から、それぞれ細胞内および細胞外代謝物を調製した。それらに含まれるカルボニル化合物を TLC により解析した結果、どちらの培地を用いた場合にも、細胞内代謝物中にカルボニル化合物はほとんど検出されなかった (Figure 72a)。一方、MS 培地で生育した本菌の細胞外代謝物中には、ピルビン酸の蓄積がみられたため、本菌は低浸透圧条件下において主に DEH 還元経路を利用してアルギン酸分解物を代謝し、その産物を細胞外に排出していると考えられた。一方、ASW 培地で培養した本菌の細胞外代謝物中には、ピルビン酸に加えて α-ケトグルタル酸も検出された。このことから、高浸透圧条件下で本菌を培養すると、DEH 還元経路と DEH 酸化経路の両方でアルギン酸分解物が代謝され、それらの産物が細胞外に排出されると推定された。これらの結果は、高浸透圧条件下における FlDeg II の発現量の上昇が、本菌の DEH 酸化経路の活性化と相関していることを示している。

3.2. 細胞内代謝物の分子同定

先に述べたように、海洋細菌 *V. harveyi* は高塩濃度条件下において細胞内外からグルタミン酸を取り込み、それを細胞内に蓄積することが報告されている。前項で、UMI-01 株の DEH 酸化経路が高塩濃度条件下で活性化されることが明らかになったことから、その最終生成物である α-ケトグルタル酸はグルタミン酸合成に利用される可能性がある。そこで、UMI-01 株の細胞内アミノ酸の組成が、培養時の浸透圧の変化に伴い変動するかどうかを調べることとした。

アルギン酸を含む MS 培地もしくは ASW 培地で本菌を培養し、その細胞内代謝物のアミノ酸組成

を TLC により解析した。本菌は、MS 培地で培養した場合には、アミノ酸を蓄積しなかったが、ASW 培地で培養した場合には、グルタミン酸もしくはスレオニン様物質を蓄積した (Figure 72b)。一方、炭素源としてグルコースを使用した場合には、アミノ酸の蓄積はほとんどみられなかった。すなわち、本菌の細胞内に蓄積されたアミノ酸様物質は、アルギン酸代謝に伴って特異的に生産される代謝産物の一つと推定された。

次いで、アルギン酸を含む ASW 培地中において細胞内に蓄積されたアミノ酸様物質の種類を TLC により簡易的に同定した。20 種類のアミノ酸を TLC の標準物質として使用した結果、アミノ酸様物質の移動度はグルタミン酸に最も類似していた (Figure 73a)。次いで、このアミノ酸様物質を TLC により分離・精製し、それを ESI-MS に供した。その結果、ネガティブイオンモード下で *m/z*=146.04 にピークが検出され、それは脱プロトン化されたグルタミン酸の分子量と一致した (Figure 73b)。したがって、本菌が細胞内に蓄積したアミノ酸様物質はグルタミン酸と同定された。

4. 培養液の浸透圧変化に伴う代謝産物の変化の解析

これまでの実験結果から、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株は、高浸透圧条件下において細胞内にグルタミン酸を蓄積し、また、細胞外にはピルビン酸および α-ケトグルタル酸を排出することが分かった。次に、これらの化合物の培養時間依存的な変化を調べた。

アルギン酸を含む MS 培地中で本菌を対数増殖期まで生育させた後、菌体を新たな MS 培地もしくは ASW 培地に再植菌し、その細胞内外のピルビン酸、α-ケトグルタル酸、およびグルタミン酸を経時的に定量した。MS 培地に移した本菌は、植菌から 4 時間後に定常期にまで増殖したが、その細胞内には、アルギン酸代謝物がほとんど蓄積されなかった (Figure 74a)。一方、細胞外へのピルビン酸およびケトグルタル酸の排出量は、培養時間の経過に伴って増加し、12 時間後におけるそれらの濃度は、それぞれ 72 μg/mL および 28 μg/mL となった (Figure 74b)。

一方、ASW 培地に移した場合、MS 培地に移した場合よりも生育速度が低下し、定常期に達するまでに倍の 8 時間を要したが、細胞内の α-ケトグルタル酸およびグルタミン酸量は植菌から 4 時間後の対数増殖期において著しく増加し、乾燥菌体重量 1 mg 中に占めるそれらの量は、それぞれ 21 μg および 37 μg となった (Figure 74c)。すなわち、本菌は、高浸透圧条件に移してから 4 時間以内に、自身の DEH 酸化経路を活性化し、その代謝物を細胞内に蓄積するようになることが分かった。なお、細胞内グルタミン酸の蓄積量は、4 時間以降も高いレベルで維持されたが、α-ケトグルタル酸は、植菌から 8 時間以降には細胞内にほとんどみられなくなった。これは、本菌が、α-ケトグルタル酸をオスモライトとしてのグルタミン酸の合成に利用するが、α-ケトグルタル酸自体はオスモライトとして利用しないことを示唆している。なお、細胞外に排出された代謝物は、MS 培地に移した場

合よりも全て高い濃度で検出され、植菌から 12 時間後におけるピルビン酸、α-ケトグルタル酸、およびグルタミン酸の濃度は、それぞれ 191 μg/mL、84 μg/mL、および 41 μg/mL であった (Figure 74d)。また、培養液 1 mL 当たりのそれら代謝物の総量は、それぞれ 2,196 nmol、595 nmol、および 539 nmol であり (Table 15)、TCA サイクルに導入された代謝物を考慮しなければ、DEH 還元経路および酸化経路は、おおよそ 2:1 の割合で稼働したと推定された。MS 培地で培養した場合、細胞外に排出されるピルビン酸および α-ケトグルタル酸の総量は、それぞれ 855 nmol および 197 nmol であったことから (Table 15)、DEH 還元経路および酸化経路は、おおよそ 4:1 の割合で稼働したと推定された。これらの結果は、本菌の DEH 還元経路および酸化経路の両方が、高浸透圧条件下において活性化されることを示唆しており、本菌における KGSA 脱水素酵素 (FlDeg II) および KDG リン酸化酵素の発現量が、同条件下において上昇したこと (Figure 66) と一致していた。

以上より、本菌の DEH 代謝経路は細胞外浸透圧の上昇に伴って速やかに変化し、DEH 還元経路は低および高浸透圧の両条件で優勢であり、DEH 酸化経路は高浸透圧条件で稼働率が上昇することが分かった。また、DEH 酸化経路の最終代謝物である α-ケトグルタル酸は、低浸透圧および高浸透圧のどちらの条件下においても検出されることから、本菌は、浸透圧の変化にかかわらず、常時 DEH 還元経路および酸化経路の両方を利用してアルギン酸を代謝していると推定された。

第 4 項　考察

本章では、2 つの DEH 代謝経路の優勢度の変化により制御されるユニークな浸透圧調節システムを *Flavobacterium* sp. UMI-01 株に見出し、その優勢度の制御に関与する KGSA 脱水素酵素の遺伝子同定および本菌の細胞内浸透圧を調節する化合物の分子同定を行った。その結果、本菌は、高浸透圧条件下において、FlDeg とは異なる新規の KGSA 脱水素酵素 FlDeg II を発現させることにより (Figure 66-70)、自身の DEH 代謝経路を活性化させ、最大 37 μg/mg (乾燥菌体重量の 3.7% (*w*/*w*)) のグルタミン酸を細胞内に蓄積することが明らかとなった (Figure 74)。このことは、高浸透圧条件で生じたグルタミン酸がオスモライトとして高浸透圧ストレスに対する耐性獲得に関与することを示唆している。

グルタミン酸は、*V. harveyi* のみならず細菌全般における主要なオスモライトであることが知られており、一般的には細胞外からの取り込み、もしくは TCA サイクルの中間体である α-ケトグルタル酸からの生合成を通じて細胞内に蓄積される [112]。後者の生合成反応には、グルタミン酸脱水素酵素が関与しており、この酵素は NAD(P)H 存在下で α-ケトグルタル酸を還元することによりグルタミン酸を生成する。すなわち、グルタミン酸の生合成には、α-ケトグルタル酸および細胞内還元力が必要となる。

以上の結果に基づいて、アルギン酸存在下における本菌の細胞内浸透圧調節機構を以下の通り推定した。高浸透圧条件下に曝された本菌は、初めに、浸透圧誘導性の KGSA 脱水素酵素 FlDeg II を発現させることにより、自身の DEH 酸化経路を活性化させる。次いで、本菌は、アルギン酸を DEH 酸化経路で代謝することにより α-ケトグルタル酸を生成し、同時に細胞内還元力を高める。次いで、この還元力を利用して細胞内においてグルタミン酸を合成し、それを蓄積することにより細胞内の浸透圧を高め、周囲の高浸透圧環境に対する耐性を獲得する、と考えられる。なお、本章ではアルギン酸代謝過程で生じるピルビン酸、α-ケトグルタル酸、およびグルタミン酸にのみ着目していたが、今後、^{13}C 同位体を用いた代謝解析および本菌メタボロームの網羅的な解析を行うことにより、本菌の細胞外に放出された α-ケトグルタル酸が TCA サイクルとは異なる経路 (DEH 酸化経路) で生じたものであるかどうか、そして菌体内で生じたアルギン酸代謝物がグルタミン酸の他にどのような代謝物の合成に利用されるのかを明らかに出来るであろう。ところで、本菌は、小樽市沿岸部で採取された腐敗褐藻より単離されており、海洋から陸上に打ち上げられた褐藻は、降雨、乾燥、もしくは河川の流入などの浸透圧環境の変化に曝される。したがって、そこに付着している細菌には、浸透圧ストレスへの耐性が要求される。UMI-01 株は、褐藻のアルギン酸からオスモライトとしてグルタミン酸を生産することにより、このような浸透圧変化の大きい海岸環境へ適応しているのかもしれない。

オスモライトの種類は生物種によって異なっており、これまでにアミノ酸 (e.g. グルタミン酸、グルタミン、およびプロリン)、アミノ酸誘導体 (e.g. ベタインおよびエクトイン)、多価アルコール (e.g. グリセロールおよびマンニトール)、およびオリゴ糖 (e.g. トレハロース) などが報告されてきた[107,112]。UMI-01 株のオスモライトは、グルタミン酸であると同定されたが、オスモライトに成り得る化合物は他にも存在する可能性がある。Figure 72 によれば、本菌はグルコースを含む ASW 培地中においても生育可能であったが、その際、細胞内にグルタミン酸などのアミノ酸を蓄積しなかった。すなわち、本菌は生育環境に存在する炭素源に応じてオスモライトを使い分けていると推定された。このように、本菌は、特定のオスモライトを蓄積することにより、周囲の浸透圧変化に適応することが明らかになったが、浸透圧ストレスの感受機構や浸透圧制御に関与する遺伝子の発現機構などは不明である。

細菌における細胞内浸透圧の制御システムは、これまで土壌細菌 *Corynebacterium glutamicum* において詳細に研究されてきた[109]。土壌細菌は、乾燥や降雨などの環境変化による浸透圧ストレスを受け易く、細胞外への水の流出もしくは細胞内への水の流入により、細胞の膨張性は容易に変化し得る。細菌は、細胞の膨張性を駆動力として細胞分裂を行うため、それを適正に維持することが、細菌の生育には非常に重要である。*C. glutamicum* の浸透圧制御システムは、細胞外浸透圧の上昇による

細胞膜の構造変化を刺激として、細胞膜結合型のヒスチジンリン酸化酵素 MtrB が活性化されることを起点とする。次いで、転写調節因子 MtrA は、活性化された MtrB によりリン酸化されることで特定の DNA 領域への結合能を獲得し、一部の遺伝子の転写を促進もしくは抑制する。なお、*C. glutamicum* では、オスモライトとなるベタイン、プロリン、およびベタインを細胞外から取り込むための輸送タンパク質の発現が促進される。

このような *C. glutamicum* の浸透圧制御に関与する MtrA および MtrB の候補遺伝子は、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株のドラフトゲノム配列中にそれぞれ 3 種 (Contig 71、Contig 7、および Contig 19 に 1 つずつ) および 2 種 (Contig 7 および Contig 19 に 1 つずつ) 見出された。したがって、本菌に見出された高浸透圧誘導性の KGSA 脱水素酵素 FlDeg II は、それら MtrA および MtrB 様タンパク質により転写が制御されている可能性がある。しかしながら、高浸透圧誘導性の FlDeg II は、アルギン酸存在下においてのみ発現したため (Figure 66)、その遺伝子の転写は、アルギン酸代謝遺伝子の発現制御とも関連したより複雑な機構によりコントロールされていると考えられた。

以上、本章の結果から、本菌の DEH 酸化経路は実際に細胞内で機能する生理的にも意義のあるものであることが強く示唆された。また、この酸化経路は浸透圧ストレス応答と密接に関わっており、浸透圧調節物質の一つであるグルタミン酸の合成にも関与していると考えられた。このような浸透圧調節機構は、潮間帯や海岸域にみられる褐藻付着性のアルギン酸資化細菌や、天候による環境変化の影響を受け易い土壌性のアルギン資化細菌に共通してみられる可能性がある。今後の研究により、アルギン酸代謝と関連した浸透圧調節メカニズムの全容やその微生物界での分布が解明されることを期待する。

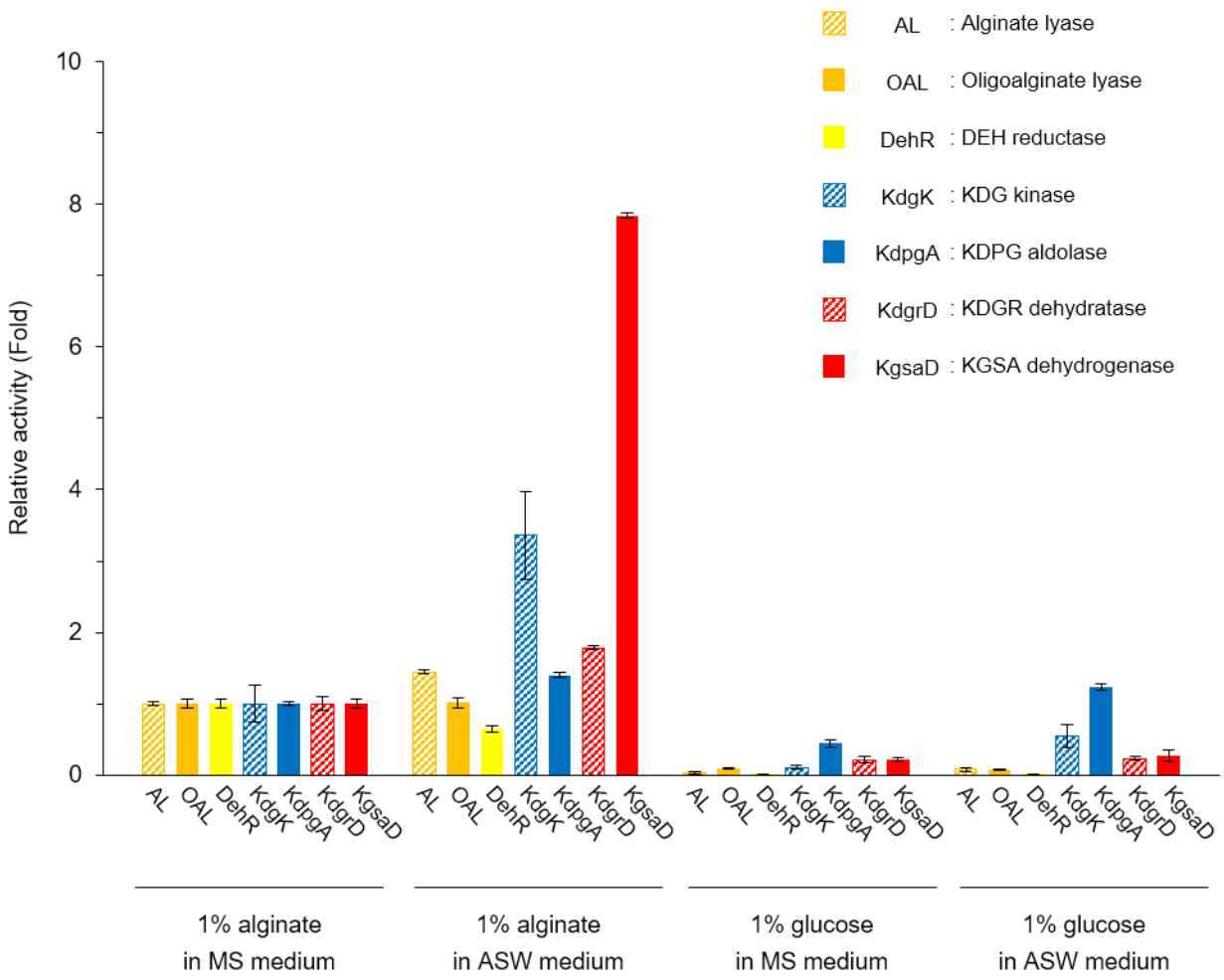


Figure 66. Expression of alginate-metabolic enzymes in *Flavobacterium* sp. UMI-01.

Flavobacterium sp. UMI-01 was grown on MS or ASW medium containing 1% (*w/v*) sodium alginate or glucose. The bacterial cells were homogenized and its enzymatic activities were assayed as described in Experimental Method 1.2. The relative activity of crude extract of *Flavobacterium* sp. UMI-01 cells grown on MS medium containing 1% (*w/v*) sodium alginate was represented as 1 and the error bars are standard deviations (*n=3*). AL, alginate lyase; OAL, oligoalginate lyase; DehR, DEH reductase; KdgK, KDG kinase; KdpgA, KDPG aldolase; KdgrD, KDGR dehydratase; KgsaD, KGSA dehydrogenase.

Table 13. Activity of alginate-metabolic enzymes

Enzyme	Carbon source	Activity (mU/1 mg protein)	Relative activity (Fold)*
Endolytic alginate lyase	Alginate in MS medium	610 ± 12	1.0 ± 0.13
	Alginate in ASW medium	882 ± 16	1.4 ± 0.17
	Glucose in MS medium	19 ± 14	0.031 ± 0.15
	Glucose in ASW medium	45 ± 16	0.074 ± 0.17
Exolytic alginate lyase	Alginate in MS medium	67 ± 4.5	1.0 ± 0.067
	Alginate in ASW medium	68 ± 4.8	1.0 ± 0.072
	Glucose in MS medium	6.6 ± 0.59	0.10 ± 0.0088
	Glucose in ASW medium	5.1 ± 0.63	0.076 ± 0.0094
DEH reductase	Alginate in MS medium	1,500 ± 90	1.0 ± 0.060
	Alginate in ASW medium	970 ± 58	0.65 ± 0.039
	Glucose in MS medium	11 ± 2.5	0.0073 ± 0.0017
	Glucose in ASW medium	12 ± 7.5	0.0080 ± 0.0050
KDG kinase	Alginate in MS medium	14 ± 3.7	1.0 ± 0.26
	Alginate in ASW medium	47 ± 8.6	3.4 ± 0.61
	Glucose in MS medium	1.5 ± 0.40	0.11 ± 0.029
	Glucose in ASW medium	7.6 ± 2.2	0.54 ± 0.16
KDPG aldolase	Alginate in MS medium	335 ± 9.2	1.0 ± 0.027
	Alginate in ASW medium	467 ± 12	1.4 ± 0.036
	Glucose in MS medium	148 ± 18	0.44 ± 0.054
	Glucose in ASW medium	415 ± 16	1.2 ± 0.048
KDGR dehydratase	Alginate in MS medium	5.6 ± 0.53	1.0 ± 0.095
	Alginate in ASW medium	10 ± 0.18	1.8 ± 0.032
	Glucose in MS medium	1.2 ± 0.27	0.21 ± 0.048
	Glucose in ASW medium	1.3 ± 0.11	0.23 ± 0.020
KGSA dehydrogenase	Alginate in MS medium	3.7 ± 0.23	1.0 ± 0.062
	Alginate in ASW medium	29 ± 0.13	7.8 ± 0.035
	Glucose in MS medium	0.83 ± 0.10	0.22 ± 0.027
	Glucose in ASW medium	1.0 ± 0.27	0.27 ± 0.017

*The activity of the crude extract of *Flavobacterium* sp. UMI-01 cells grown on MS medium containing 1% (*w/v*) sodium alginate was represented as 1 and the error bars are standard deviations (*n*=3).

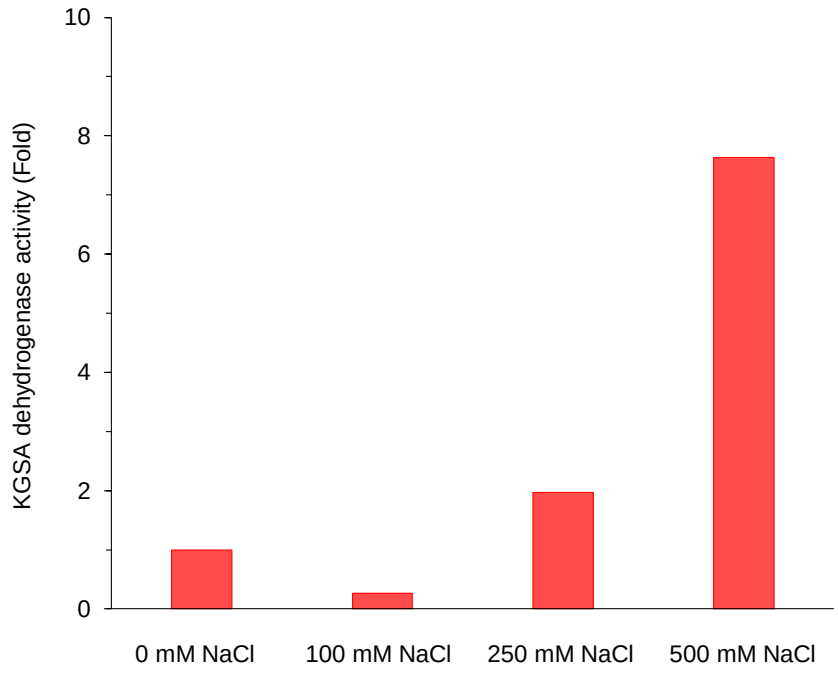


Figure 67. Effect of NaCl concentration in culture medium for the expression of KGSA dehydrogenase.

Flavobacterium sp. UMI-01 was grown on MS medium containing 1% (*w/v*) sodium alginate and 0-500 mM NaCl. The bacterial cells were homogenized and its enzymatic activities were assayed as described in Experimental Method 1.2.3. The relative activity of crude extract of *Flavobacterium* sp. UMI-01 cells grown on MS medium containing 1% (*w/v*) sodium alginate was represented as 1.

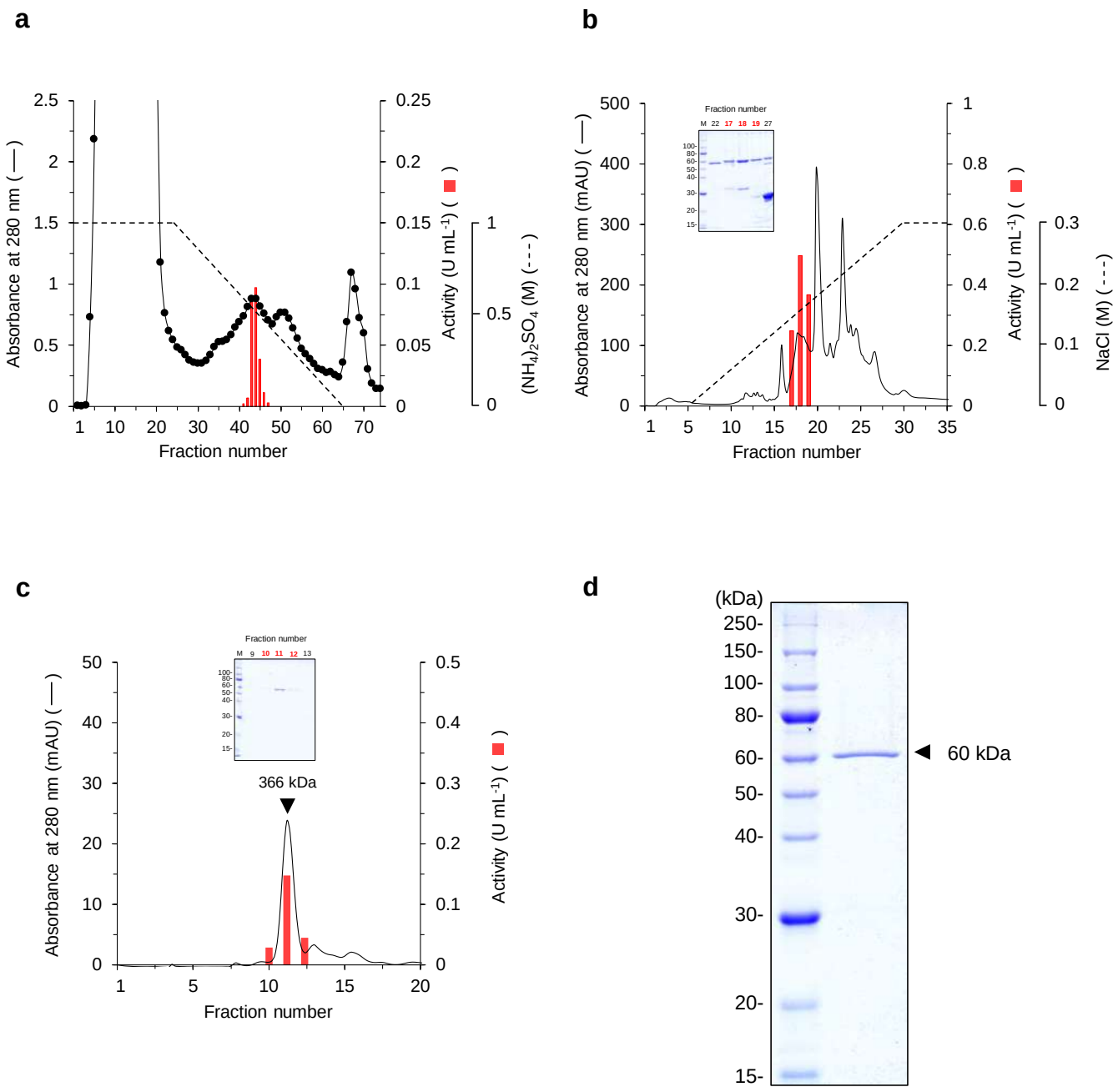


Figure 68. Purification of KGSA dehydrogenase from cell extract of *Flavobacterium* sp. UMI-01.

a-c, KGSA dehydrogenase was purified from cell extract of *Flavobacterium* sp. UMI-01 by TOYOPEARL Butyl-650M (a), MonoQ 4.6/100 PE (b), and Superdex 200 10/300 GL (c) column chromatography. Enzymatic activity was determined by measuring the consumption of NADH and the active fractions were marked with red letters on the image of SDS-PAGE. Closed triangle indicates elution point of native KGSA dehydrogenase; its molecular weight was estimated to be 366 kDa. mAU, milli absorbance unit. **d**, SDS-PAGE for purified native KGSA dehydrogenase.

Table 14. Summary for purification of KGSA dehydrogenase.

Steps	Protein (mg)	Activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Cell extract	517	2.0	0.0039	1	100
TOYOPEARL Butyl-650M	11	1.8	0.16	41	88
MonoQ 4.6/100 PE	0.74	1.2	1.6	398	57
Superdex 200 10/300 GL	0.24	0.72	3.0	757	35

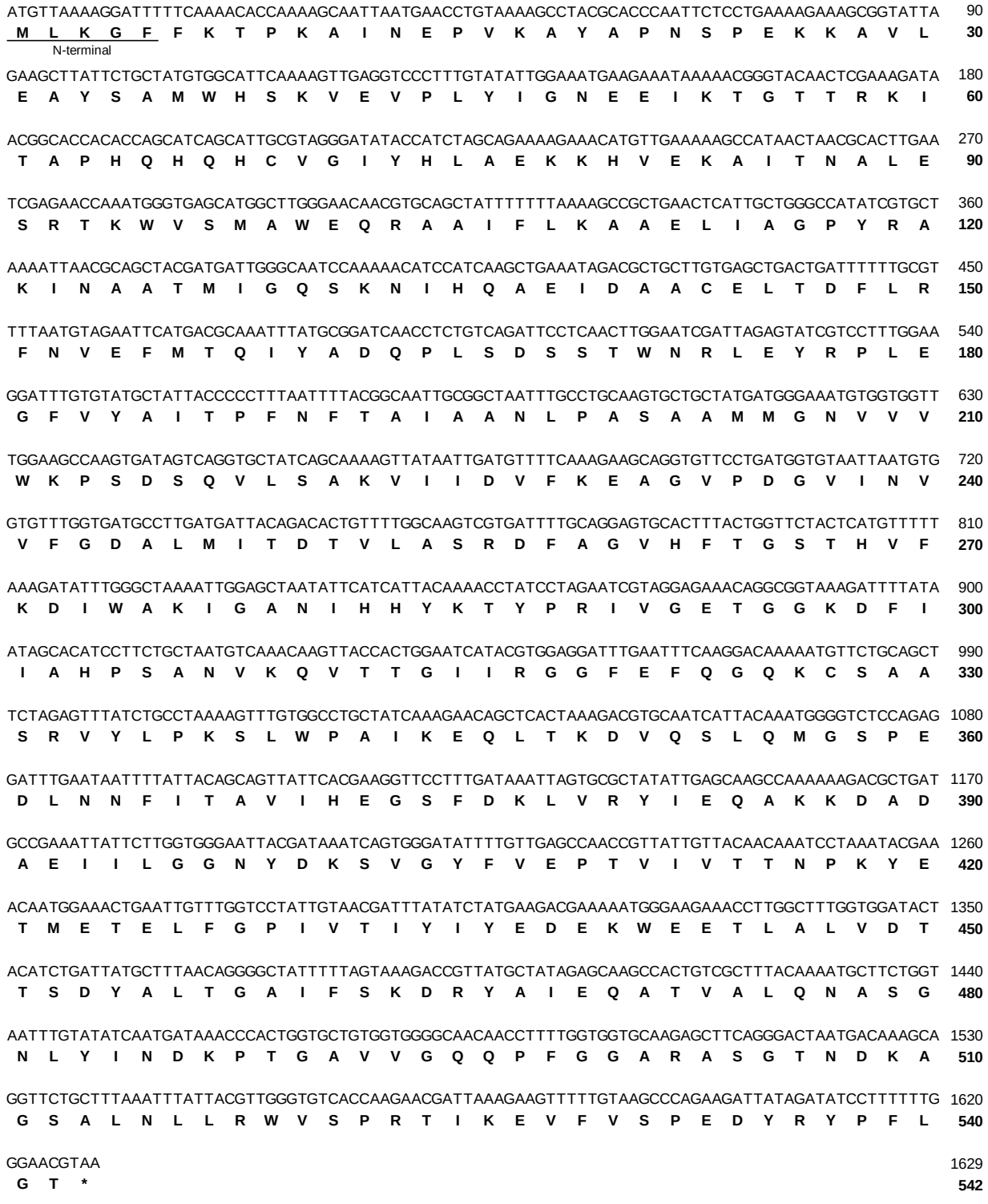


Figure 69. Primary structure of native KGSA dehydrogenase.

Residue numbers of nucleotides and amino acids are shown at the right end of each line. N-terminal amino acids determined by Edman degradation were underlined.

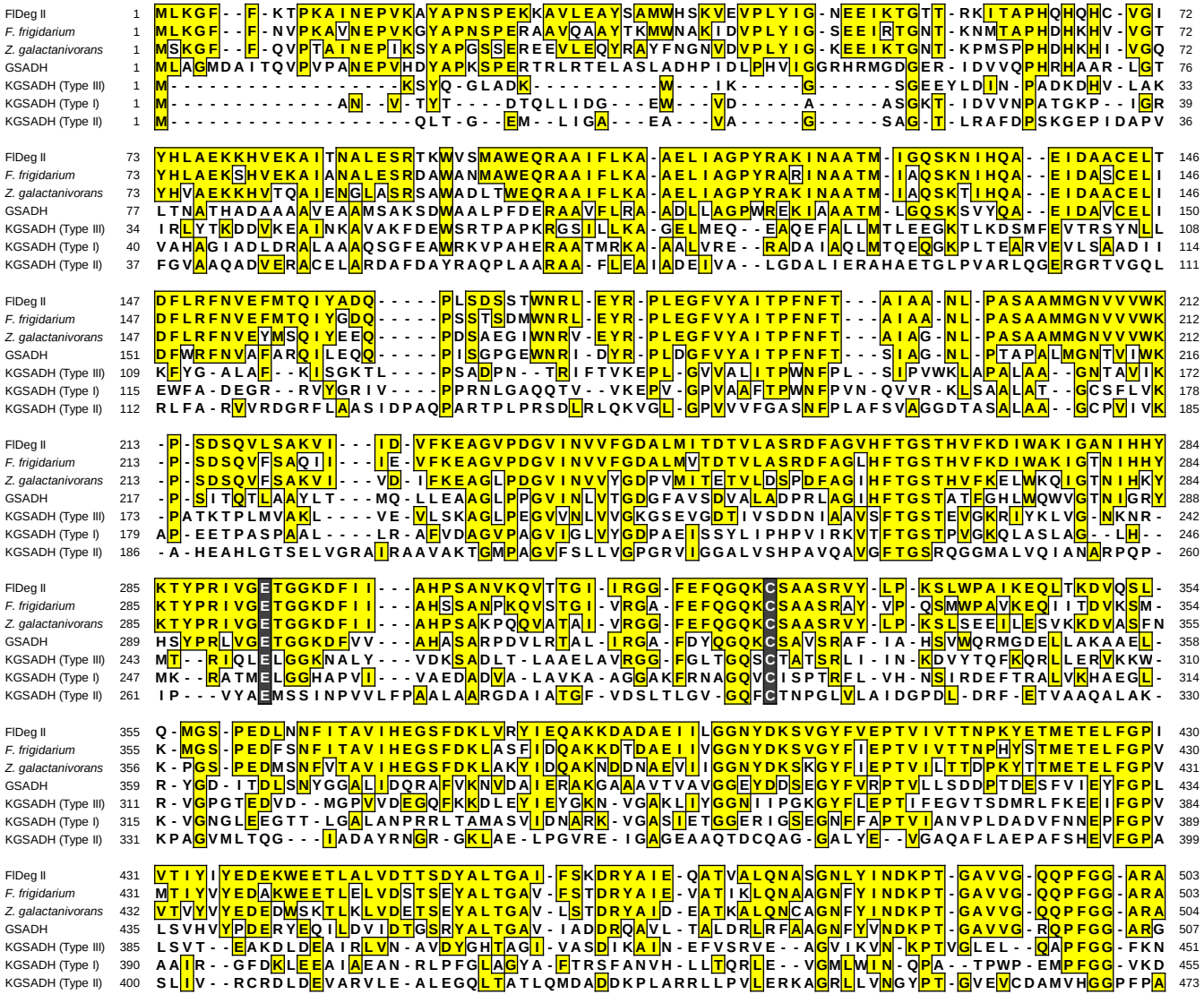


Figure 70. Multiple sequence alignment for KGSA dehydrogenases from *Flavobacterium* sp. UMI-01 and other bacteria.

The amino acid sequences of FlDeg II and other KGSA dehydrogenase-like proteins were aligned using ClastalW program. Identical residues between FlDeg II and other proteins were colored with yellow. Black box indicates catalytic residues conserved in KGSA dehydrogenase. FlDeg II, KGSA dehydrogenase from *Flavobacterium* sp. UMI-01 (In this study); *F. frigidarium*, γ-glutamate semialdehyde dehydrogenase-like from *Flavobacterium frigidarium* (GenBank accession number, WP_026707661); *Z. galactanivorans*, γ-glutamate semialdehyde dehydrogenase-like from *Zobellia galactanivorans* (GenBank accession number, WP_013992130); GSADH, γ-glutamate semialdehyde dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis* (GenBank accession number, EF075557); KGSA dehydrogenase (Type III) from *Sulfolobus solfataricus* (GenBank accession number, AAK43220); KGSA dehydrogenase (Type I) from *A. brasilense* (GenBank accession number, BAF94276); KGSA dehydrogenase (Type II), KGSA dehydrogenase (Type II) from *Azospirillum brasilense* (GenBank accession number, BAF33385).

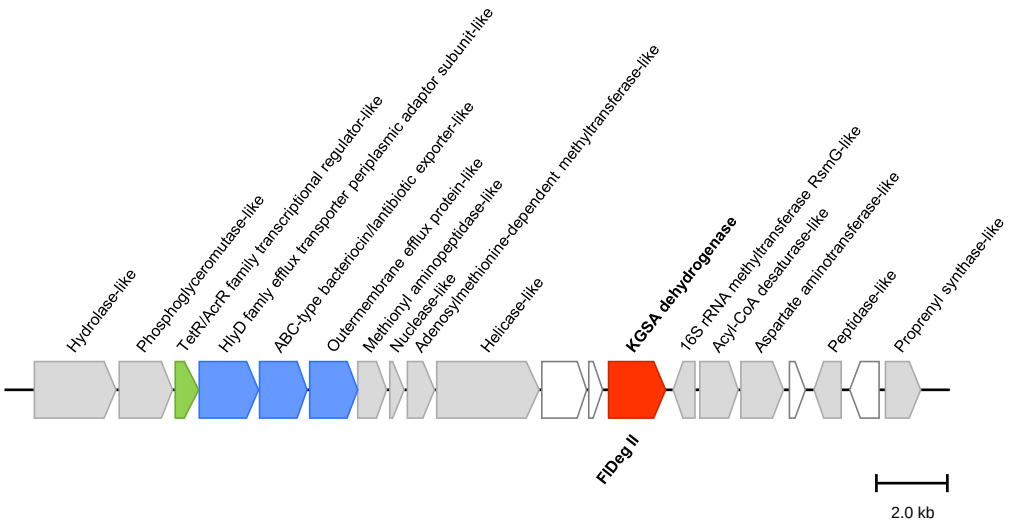


Figure 71. Location of the gene encoding KGSA dehydrogenase FlDeg II in the draft genome of *Flavobacterium* sp. UMI-01.

Genes encoding KGSA dehydrogenase, transporters, transcriptional regulators, and other functional proteins are colored with red, blue, green, and gray, respectively. While, function unknown genes are colored with white. The functionally identified genes are marked in bold.

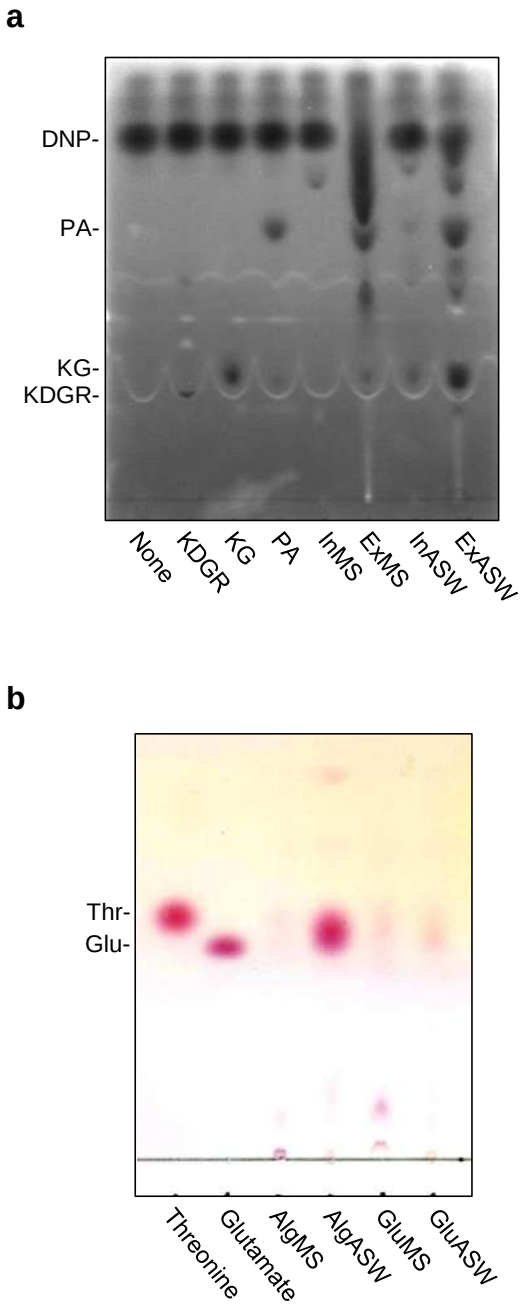


Figure 72. Intercellular and extracellular metabolites detected by TLC.

a, detection for alginate metabolites from cell extract (intercellular metabolites) and culture medium (extracellular metabolites). *Flavobacterium* sp. UMI-01 was grown in MS or ASW medium containing 1% (*w/v*) sodium alginate until the OD_{600} reached 1.6-2.0. The cell extract and culture medium containing alginate metabolites were analyzed by TLC after DNP derivatization. InMS, intercellular metabolites in MS medium; ExMS, extracellular metabolites in MS medium; InASW, intercellular metabolites in MS medium; ExASW, extracellular metabolites in ASW medium. **b**, analysis for amino-acid accumulation by TLC. *Flavobacterium* sp. UMI-01 was grown on MS or ASW medium containing 1% (*w/v*) sodium alginate or glucose until the OD_{600} reached 1.6-2.0. The metabolites were extracted with 5% perchloric acid and analyzed by TLC. AlgMS, metabolites in MS medium containing alginate; AlgASW, metabolites in ASW medium containing alginate; GluMS, metabolites in MS medium containing glucose; GluASW, metabolites in ASW medium containing glucose.

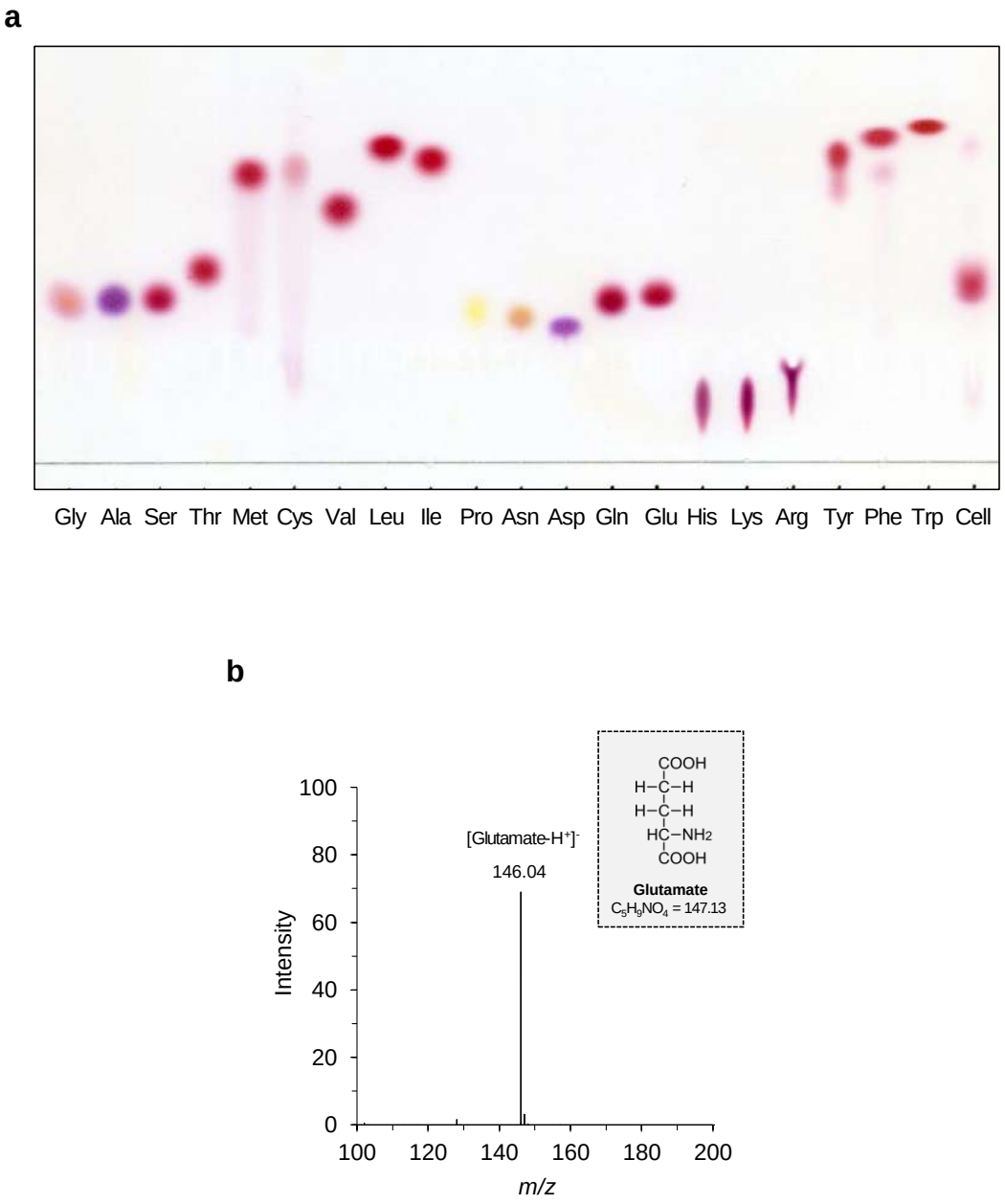


Figure 73. Identification of the amino-acid accumulated in the cell of *Flavobacterium* sp. UMI-01 grown in alginate-containing ASW medium.

a, TLC analysis for the intercellular metabolites. The metabolites were extracted from *Flavobacterium* sp. UMI-01 grown in ASW medium containing 1% (*w/v*) sodium alginate and analyzed by TLC along with 20 kinds of standard amino-acids. Cell, cell extract from *Flavobacterium* sp. UMI-01. **b**, ESI-MS spectrum of glutamate-like metabolite. Intercellular metabolites from *Flavobacterium* sp. UMI-01 were subjected to TLC, and the major metabolite was analyzed by ESI-MS after purification from the silica-gel plate. Predicted structure was shown in the upper right corner of the spectrogram.

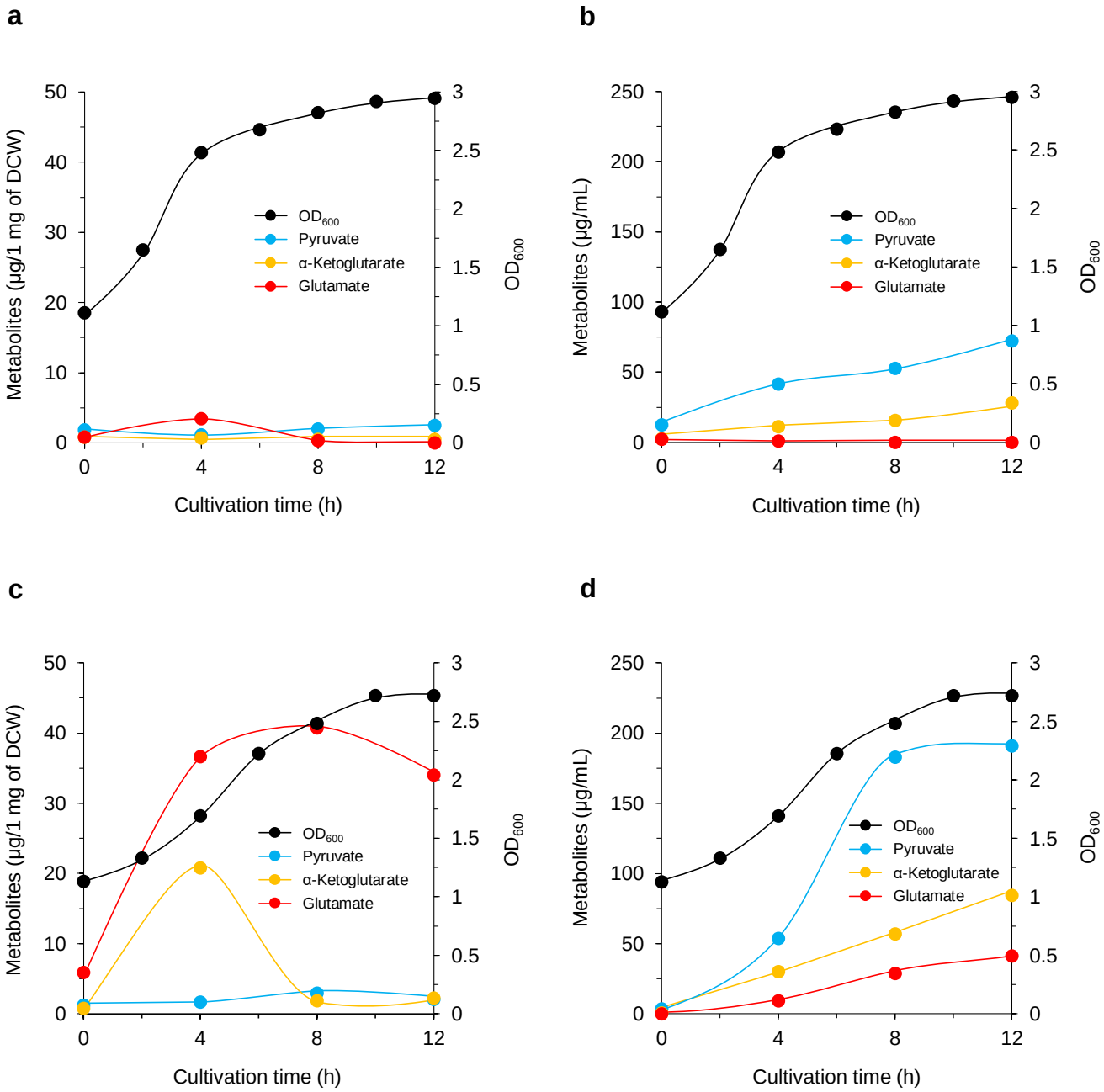


Figure 74. Effect of osmotic shock for glutamate accumulation of *Flavobacterium* sp. UMI-01.

Flavobacterium sp. UMI-01 was grown in 1% (*w/v*) sodium alginate-containing MS medium until OD_{600} reached 1.2. Then, the bacterial cells were transferred to new alginate-containing MS or ASW medium, and the intercellular and extracellular pyruvate, α-ketoglutarate, and glutamate were determined every 2 h. **a**, extracellular metabolites after transferring the cells into MS medium. **b**, intercellular metabolites after transferring the cells into MS medium. **c**, extracellular metabolites after transferring the cells into ASW medium. **d**, intercellular metabolites after transferring the cells into ASW medium. DCW, dry cell weight.

Table 15. Accumulation of intercellular and extracellular alginate metabolites after 12-hours cultivation.

Metabolites	Intercellular metabolites (nmol/1 mL of medium)	Extracellular metabolites (nmol/1 mL of medium)	Total (nmol/1 mL of medium)
MS medium			
Pyruvate	35	820	855
α-Ketoglutarate	4.0	193	197
Glutamate	N.D.*	N.D.	N.D.
ASW medium			
Pyruvate	26	2,170	2,196
α-Ketoglutarate	17	578	595
Glutamate	258	281	539

*N.D., not detected.

総合考察

本研究の概要

本論文では、腐敗褐藻スギモクから単離されたアルギン酸資化細菌 *Flavobacterium* sp. UMI-01 株に着目し、そのアルギン酸分解・代謝関連酵素の機能解析を進め、以下の新たな知見を得た。

第 1 章では、UMI-01 株のドラフトゲノム解析により見出されたアルギン酸分解・代謝関連遺伝子の機能を調べ、本菌が既知のアルギン酸資化細菌と同様のアルギン酸代謝経路をもつことを明らかにした。すなわち、ドラフトゲノム配列中に 4 種類のアルギン酸リアーゼ (FlAlyA (PL-7)、FlAlyB (PL-17)、FlAlyC (PL-6)、および FlAlex (PL-6))、DEH 還元酵素 (FlRed)、KDG リン酸化酵素 (FlKin)、および KDPG 開裂酵素 (FlAld) をコードする遺伝子を見出し (Figure 2)、それら全ての酵素について、大腸菌発現系により活性をもつ組換えタンパク質を調製できた (Figure 12, Figure 18)。次いで、各組換え酵素の機能および反応生成物を解析し、それらの結果に基づいて、本菌におけるアルギン酸の完全分解経路および DEH の代謝経路を構築した (Figure 23)。すなわち、本菌では、アルギン酸はペリプラズム領域において 1 種類のエンド型アルギン酸リアーゼ (FlAlyA) および 3 種類のエキソ型アルギン酸リアーゼ (FlAlyB、FlAlyC、および FlAlex) により DEH まで完全に分解され、生じた DEH は、細胞質領域において、DEH 還元酵素 FlRed、KDG リン酸化酵素 FlKin、および KDPG 開裂酵素 FlAld の作用により、KDG および KDPG を経て最終的にピルビン酸と GAP まで代謝されると考えられる。DEH 以降の代謝経路は、1962 年に Preiss and Ashwell が提唱した *Pseudomonas* sp.の経路 (Figure 1) [28,30] と同一であり、本菌においても他のアルギン酸資化細菌 *Sphingomonas* sp. A1 株 [106]、*S. degradans* 2-40^{T} 株 [90]、*Z. galactanivorans* DsiJT 株 [58]、および *V. splendidus* 12B01 株 [7,8] のものと同様の DEH 代謝経路の存在が明らかになった。

第 2 章では、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株の無細胞抽出液中に DEH の酸化反応を触媒する酵素を見出した。単離された DEH 酸化酵素は、DEH の還元反応と酸化反応の両方を触媒可能な二機能性の酵素であり (Figure 27)、その一次構造は、DEH 還元酵素 FlRed と同一であることが明らかになった (Figure 28)。興味深いことに、His-tag 配列の有無は組換え FlRed の酵素活性に影響を及ぼすことが明らかになり、同配列を C 末端に融合されていない天然型の組換え FlRed は天然の FlRed と同等の DEH 酸化還元活性を示すが、融合タンパク質では酸化活性を示さず、還元活性も天然型のものと比較して約 30 分の 1 に低下した (Figure 30)。酸化反応による生成物は、DEH の C1 位アルデヒド基がカルボキシル基に酸化された KDGR であった (Figure 34)。KDGR は、果物や野菜に含まれるグルカル酸の中間代謝物としても知られており、グルカル酸代謝経路においては、開裂酵素または脱水酵素が作用する (Figure 38)[93,94,113]。しかしながら、本菌のドラフトゲノム配列中には、これらと相同

のタンパク質をコードする遺伝子は見出されず、未知の酵素の存在が示唆されたため、さらに KDGR を基質とする酵素の探索を進めた。

第 3 章では、報告例のない KDGR 脱水酵素 FlDet を単離し、同酵素が KDGR を KGSA に変換することを明らかにした (Figure 40, Figure 45)。また、UMI-01 株のゲノム配列中には FlDet をコードする遺伝子に隣接して、KGSA 脱水素酵素 (FlDeg) 候補遺伝子が見出された (Figure 47)。組換え FlDeg は、KGSA を基質として、これを α-ケトグルタル酸に変換することを実証した (Figure 53)。

以上の結果から、UMI-01 株ではアルギン酸の最終分解物として生じた DEH は、2 種類の代謝経路、すなわち KDG に変換される還元経路および KDGR に変換される酸化経路により、それぞれピルビン酸および α-ケトグルタル酸に代謝されることが明らかになった。アルギン酸資化細菌が、2 つの DEH 代謝経路をもつことは他の同資化細菌では知られておらず、本研究で初めて示された知見である。なお、DEH 1 分子が代謝される場合、還元経路では NADH の収支はゼロであるが、酸化経路では 2 分子の NADH が生じる。そのため、DEH 酸化経路は細胞内の還元力の調節に寄与するものと推定された。また、FlDet および FlDeg の相同遺伝子は、アルギン酸資化能を有する一部のバクテロイデスやプロテオバクテリアにも見出されたことから (Figure 60)、DEH 酸化経路は、UMI-01 株特有なものでは無く、他種アルギン酸資化細菌にも分布すると考えられた。

第 4 章では、*Flavobacterium* sp. UMI-01 株における DEH の酸化は、浸透圧調節に関与する可能性が示唆された。高浸透圧条件下では、本菌は FlDeg だけでなく、そのアイソザイムである KGSA 脱水素酵素 FlDeg II を発現し (Figure 62-66)、自身の DEH 酸化経路を活性化することを明らかにした (Figure 68a)。また、本菌は、同条件下において高濃度のグルタミン酸を細胞内に蓄積することにより浸透圧を高め、細胞外への水の流出を防ぐことによって浸透圧ストレスに抗していると考えられた (Figure 68-70)。なお、グルタミン酸は、細菌における主要なアミノ酸系の浸透圧調節物質として知られている [110,114]。本菌では、海水域だけでなく、それよりも低い浸透圧下 (汽水域や降雨の影響など) での生息を可能とするため、このような浸透圧調節機構をもつと推定された。

生体内における DEH 酸化代謝経路の機能および役割

本研究で明らかになった DEH 酸化経路の存在は、外来遺伝子導入によりアルギン酸および DEH からのエタノール生産能を付与した組換え微生物内での代謝物質の理解を進めることを可能とした。これまでの報告によれば、アルギン酸資化能をもたない大腸菌にアルギン酸分解、代謝関連タンパク質とピルビン酸デカルボキシラーゼ (PDC) およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ADH) の遺伝子群を導入した場合、アルギン酸からエタノールを効率的に生産するためには、マンニトールの添加が必要であった [7]。これは、マンニトール代謝時に生じる NADH により、エタノール生産で必要

とされる細胞内還元力を補填するためと考えられており、同様の効果は DEH 代謝能を付与した酵母を用いた場合にもみられた[8]。一方、アルギン酸資化細菌である *Sphingomonas* sp. A1 株に PDC および ADH を導入した場合には、マンニトールを含まないアルギン酸を唯一炭素源で培養した場合でも 13.0 g/L のエタノールの生産が報告されている[6]。従来の知見では、このような条件下では A1 株内の還元力が低下し、効率的なエタノール生産は困難と予測されるが、A1 株が UMI-01 株と同様の DEH 酸化経路をもつと仮定した場合、この酸化経路を作動させることにより不足した還元力を補っている可能性も考えられる。今後、A1 株を含む他種細菌においても DEH 還元酵素の DEH 酸化能の有無と遺伝子レベルで見出された KDGR 代謝関連酵素の相同タンパク質の機能解析を進めることで、DEH 酸化経路が UMI-01 株だけでなくアルギン酸資化細菌に共通の代謝機構であることを示すことができるであろう。

また、DEH 酸化経路は *Flavobacterium* sp. UMI-01 株では細胞内浸透圧の調節に関与すると考えられた。フラボバクテリアは、水圏環境に広く生息することが知られており、その生育環境は、気候や潮流によりしばしば変化することが予想される。本研究では、海水レベルの高浸透圧条件下において UMI-01 株の DEH 酸化経路が活性化し、それがグルタミン酸の蓄積を伴う細胞内浸透圧の調節に関与している可能性を見出した。この調節機構の利点は、アルギン酸存在下であれば細胞外からオスモライトを取り込まずに、細胞内の浸透圧を調節可能な点にある。すなわち、本菌は、褐藻のようなアルギン酸を含む物質に付着することで、高浸透圧環境に適応する能力を得ていると推定された。このような知見は、本菌を含めた褐藻付着性アルギン酸資化細菌の生態や進化への理解を深めることに繋がると考えられる。

アルギン酸代謝関連酵素およびその代謝物の産業的利用価値

DEH 還元経路で生じる KDG や KDPG は、抗生物質、抗ウイルス剤、およびその他医薬品のリード化合物としての利用が期待されている[72]。しかしながら、これらは中間代謝物であるため、天然のアルギン酸資化細菌から抽出することが困難である。また、これらの化合物は、化学合成も可能であるが、その反応ステップは非常に長く煩雑である[115]。一方、本研究では、*in vitro* においてアルギン酸から KDG および KDPG をそれぞれ 98%および 81%の収率で生産できることを明らかにした。なお、現在のところ一部の組換え酵素の大量発現が困難であり、そのスケールアップは実現していない。また、Allen らは、KDPG 開裂酵素をピルビン酸および GAP に作用させることにより、アルドール縮合物として KDPG を合成した[116]。このような KDPG 開裂酵素の逆反応に着目した研究は、他にも数多く報告されている。すなわち、Shelton らは、ピルビン酸などの求核試薬および GAP などの求電子試薬を KDPG 開裂酵素によりアルドール縮合させることで、KDG や KDPG を含む様々な

化合物を合成し、およびその基質特異性が生物種間で異なることを明らかにした[117]。また、Fong らは、*E. coli* 由来 KDPG 開裂酵素の活性部位周辺にアミノ酸変異を導入し、求電子試薬への特異性を改変することに成功した[84]。このように、KDPG 開裂酵素は KDG や KDPG を始めとする医薬品の候補物質を合成するための有用なツールに成り得る。

また、アルギン酸代謝により生じるアルダル酸やグルタミン酸は、国立再生可能エネルギー研究所 (Golden, CO, USA) の Werpy と Petersen により定められた”Top value added chemicals from biomass” の上位 12 種に選抜された[118]。これら 12 種は、種々のアルコール、ラクトン、アミン、もしくは高機能性ポリマーの合成原料としてのポテンシャルを有する低分子化合物であり、様々な産業分野での利用が期待されている。これらの化合物は、外来遺伝子の導入により任意のバイオマスの資化能が付与された組換え微生物を用いて生産されるが、解糖系や TCA サイクルを利用する場合、その調節機構は複雑であるため、代謝フラックスを改変することが困難であった。最近では、解糖系を経由しないペントース代謝経路 (ペントース酸化経路) を大腸菌に導入し、アラビノースもしくはキシロースを従来の約 4 分の 1 の反応ステップでアルダル酸やグルタミン酸に変換するプラットフォームが構築された[103,119]。これにより、ボトルネックとなる酵素の特定や代謝フラックスの効率化が比較的容易になった。このペントース酸化経路は DEH 酸化経路と KGSA 以降の反応ステップが共通している。これはアルギン酸が高価値物質を生産するための新たなバイオマスになる可能性を示している。

以上、本研究では、腐敗褐藻より単離された *Flavobacterium* sp. UMI-01 株のアルギン酸資化機構に関する新たな生化学的知見を獲得した。ここで得られた知見は、自然界に広く分布するアルギン酸資化細菌の糖質代謝システムおよび生態への理解を深めるとともに、海洋バイオマスであるアルギン酸に新たな産業的価値を付与するものである。将来、当該分野の研究の進展により、未利用海藻に新たな利用用途が見出されることを期待する。

参考文献

1. Bocanegra, A., Bastida, S., Benedi, J., Rodenas, S., and Shanchez-Muniz, F. J. (2009) Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *J. Med. Food*, **12**, 236-258

2. Cornish, M. L. and Garbary, D. J. (2010) Antioxidants from macroalgae: Potential applications in human health and nutrition. *Algae*, **25**, 155-171

3. Patil, N. P., Le, V., Sligar, A. D., Mei, L., Chavarria, D., Yang, E. Y., and Baker, A. B. (2018) Algal polysaccharides as therapeutic agents for atherosclerosis. *Front. Cardiovasc. Med*., **5**, 153

4. Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., and Florou-Paneri, P. (2013) Functional properties of carotenoids originating from algae. *J. Sci. Food Agric.*, **15**, 5-11

5. Sun, J. and Tan, H. (2013) Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. *Materials*, **6**, 1285-1309

6. Takeda, H., Yoneyama, F., Kawai, S., Hashimoto, W., and Murata, K. (2011) Bioethanol production from marine biomass alginate by metabolically engineered bacteria. *Energy Environ. Sci*., **4**, 2575–2581

7. Wargacki, A. J., Leonard, E., Win, M. N., Regitsky, D. D., Santos, C. N. S., Kim, P. B., Cooper, S. R., Rainsner, R. M., Herman, A., Sivitz, A. B., Lakshmanaswamy, A., Kashiyama, Y., Baker, D., and Yoshikuni, Y. (2012) An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. *Science*. **335**, 308–314

8. Newman, M. E., Faust, A. M. E., Bravo, D. D., Santos, C. N. S., Raisner, R. M., Hanel, A., Sarvabhowman, Le, C., Regitsky, D. D., Cooper, S. R., Peereboom, L., Clark, A., Martinez, Y., Goldsmith, J., Cho, M. Y., Donohoue, P. D., Luo, L., Lamberson, B., Tamrakar, P., Kim, E. J., Villari, J. L., Gill, A., Tripathi, S. A., Karamchedu, P., Paredes, C. J., Rajgarhia, V., Kotlar, H. K., Bailey, R. B., Miller, D. J., Ohler, N. L., Swimmer, C., and Yoshikuni, Y. (2014) Efficient ethanol production from brown macroalgae sugars by a synthetic yeast platform. *Nature*, **505**, 239–243

9. Ji, S. Q., Wang, B., Lu, M., and Li, F. L. (2016) Direct bioconversion of brown algae into ethanol by thermophilic bacterium *Defluviitalea phaphyphila*. *Biotechnol. Biofuels*, **9**, 81

10. Kim, H. S., Lee, C. G., and Lee, E. Y. (2011) Alginate lyase: Structure, property, and application. *Biotechnol. Bioprocess Eng*., **16**, 843–851

11. Gacesa, P. (1988) Alginates. *Carbohydr. Polym*., **8**, 161–182

12. Okazaki, M. and Tazawa, K. (1989) Alginic acid in *Corallinaceae* (Cryptonemiales, Rhodophyta). *Korean J. Phycol*., **4**, 213–219

13. Remminghorst, U. and Rehm, B. H. A. (2006) Bacterial alginates: From biosynthesis to applications. *Biotechnol. Lett.*, **28**, 1701–1712

14. Mckee, J. W. A., Kavalieris, L., Brasch, D. J., Brown, M. T., and Melton, L. D. (1992) Alginate content and composition of *Macrocystis pyrifera* from New Zealand. *J. Appl. Phycol*., **4**, 357–369

15. Skjk-Bræk, G., Grasdalen, H., and Larsen, B. (1986) Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates. *Carbohydr. Res*., **154**, 239–250

16. Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C., and Thom, D. (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model." *FEBS Lett.*, **32**, 195–198

17. Tomoda, Y., Umemura, K., and Adachi, T. (1994) Promotion of barley root elongation under hypoxic conditions by alginate lyase-lysate (A.L.L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **58**, 202–203

18. Xu, X., Iwamoto, Y., Kitamura, Y., Oda, T., and Muramatsu, T. (2003) Root growth-promoting activity of unsaturated oligomeric uronates from alginate on carrot and rice plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **67**, 2022–2025

19. Akiyama, H., Endo, T., Nakakita, R., Murata, K., Yonemoto, Y., and Okayama, K. (1992) Effect of Depolymerized Alginates on the Growth of Bifidobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **56**, 355–356

20. Ariyo, B., Tamerler, C., Bucke, C., and Keshavarz, T. (1998) Enhanced penicillin production by oligosaccharides from batch cultures of *Penicillium chrysogenum* in stirred-tank reactors. *FEMS Microbiol. Lett*., **166**, 165–170

21. Zhu, Y., Wu, L., Chen, Y., Ni, H., Xiao, A., and Cai, H. (2016) Characterization of extracellular biofunctional alginate lyase from marine *Microbulbifer* sp. ALW1 and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates. *Microbiological Research*, **182**, 49-58

22. Khodagholi, F., Eftekharzadeh, B., and Yazdanparast, R. (2008) A new artificial chaperone for protein refolding: Sequential use of detergent and alginate. *Protein J*., **27**, 123–129

23. Mo, S. J., Son, E. W., Rhee, D. K., and Pyo, S. (2003) Modulation of TNF-α-induced ICAM-1 expression, NO and H_2O_2 production by alginate, allicin and ascorbic acid in human endothelial cells. *Arch. Pharm. Res*., **26**, 244–251

24. An, Q. D., Zhang, G. L., Wu, H. T., Zheng, G. S., Luan, L., Murata, Y., and Li, X. (2009) Alginate-deriving oligosaccharide production by alginase from newly isolated *Flavobacterium* sp. LXA and its potential application in protection against pathogens. *J. Appl. Microbiol*., **106**, 161–170

25. Wong, T. Y., Preston, L. A., and Schiller, N. L. (2000) Alginate lyases: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annu. Rev. Microbiol*. **54**, 289–340

26. Inoue, A., Mashino, C, Uji, T., Saga, N., Mikami, K., and Ojima, T. (2015) Characterization of an eukaryotic PL-7 alginate lyase in the marine red alga *Pyropia yezoensis. Curr. Biotechnol*., **4**, 240–248

27. Gacesa, P. (1992) Enzymic degradation of alginates. *Int. J. Biochem*., **24**, 545–552

28. Preiss, J. and Ashwell, G. (1962) Alginic acid metabolism in bacteria. I. Enzymatic formation of unsaturated oligosaccharides and 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid. *J. Biol. Chem*., **237**, 309–316

29. Hobbs, J. K., Lee, S. M., Robb, M., Hof, F., Barr, C., Abe, K. T., Hehemann, J. H., McLean, R., Abbott, D. W., and Boraston, A. B. (2016) KdgF, the missing link in the microbial metabolism of uronate sugars from pectin and alginate" *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **113**, 6188–6193

30. Preiss, J. and Ashwell, G. (1962) Alginic acid metabolism in bacteria. II. The enzymatic reduction of 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid to 2-keto-3-deoxy-D-gluconic acid. *J. Biol. Chem.*, **237**, 317–321

31. Entner, N. and Doudoroff, M. (1952) Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila. J. Biol. Chem*., **196**, 853–862

32. Ashwell, G., Wahba, A. J., and Hickman, J. (1960) Uronic acid metabolism in bacteria. I. Purification and properties of uronic acid isomerase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **235**, 1559–1565

33. Jang, C. H., Piao, Y. L., Huang, X., Yoon, E. J., Park, S. H., Lee, K. L., Zhan, C. G., and Cho, H. (2016) Modeling and re-engineering of *Azotobacter vinelandii* alginate lyase to enhance its catalytic efficiency for accelerating biofilm degradation. *PLoS One*, **11**, e0156197

34. Sawabe, T., Ohtsuka, M., and Ezura, Y. (1997) Novel alginate lyases from marine bacterium *Alteromonas* sp. strain H-4. *Carbohydr. Res*., **304**, 69–76

35. Iwamoto, Y., Araki, R., Iriyama, K., Oda, T., Fukuda, H., Hayashida, S., and Muramatsu, T. (2001) Purification and characterization of bifunctional alginate lyase from *Alteromonas* sp. strain No. 272 and its action on saturated oligomeric substrates. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **65**, 133–142

36. Yagi, H., Fujise, A., Itabashi, N., and Ohshiro, T. (2016) Purification and characterization of a novel alginate lyase from the marine bacterium *Cobetia* sp. NAP1 isolated from brown algae. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **80**, 2338–2346

37. Nibu, Y., Satoh, T., Nishi, Y., Takeuchi, T., Murata, K., and Kusakabe, I. (1995) Purification and characterization of extracellular alginate lyase from *Enterobacter cloacae* M-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **59**, 632–637

38. Mori, T., Takahashi, M., Tanaka, R., Miyake, H., Shibata, T., Chow, S., Kuroda, K., Ueda, M., and Takeyama, H. (2016) *Falsirhodobacter* sp. alg1 harbors single homologs of endo and exo-type alginate lyases efficient for alginate depolymerization. *PLoS One*, **11**, e0155537

39. Baron, A. J., Wong, T. Y., Hicks, S. J., Gacesa, P., Willcock, D., and McPherson, M. J. (1994) Alginate lyase from *Klebsiella pneumoniae*, subsp. *aerogenes*: gene cloning, sequence analysis and high-level production in *Escherichia coli*. *Gene*, **143**, 61–66

40. Inoue, A., Anraku, M., Nakagawa, S., and Ojima, T. (2016) Discovery of a novel alginate lyase from *Nitratiruptor* sp. SB155-2 thriving at deep-sea hydrothermal vents and identification of the residues responsible for its heat stability. *J. Biol. Chem.*, **291**, 1551–15563

41. Matsushima, R., Danno, H., Uchida, M., Ishihara, K., Suzuki, T., Kaneniwa, M., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., and Tsuda, M. (2010) Analysis of extracellular alginate lyase and its gene from a marine bacterial strain, *Pseudoalteromonas atlantica* AR06. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **86**, 567–576

42. Yamasaki, M., Moriwaki, S., Miyake, O., Hashimoto, W., Murata, K., and Mikami, B. (2004) Structure and function of a hypothetical *Pseudomonas aeruginosa* protein PA1167 classified into family PL-7. *J. Biol. Chem*., **279**, 31863–31872

43. Kim, H. T., Ko, H. J., Kim, N., Kim, D., Lee, D., Choi, I. G., Woo, H. C., Kim, M. D., and Kim, K. H. (2012) Characterization of a recombinant endo-type alginate lyase (Alg7D) from *Saccharophagus degradans*. *Biotchnol. Lett*., **34**, 1087-1092

44. Li, S., Wang, L., Han, F., Gong, Q., and Yu, W. (2016) Cloning and characterization of the first polysaccharide lyase family 6 oligoalginate lyase from marine *Shewanella* sp. Kz7. *J. Biochem*., **159**, 77–86

45. Miyake, O., Ochiai, A., Hashimoto, W., and Murata, K. (2004) Origin and diversity of alginate lyases of families PL-5 and -7 in *Sphingomonas* sp. strain A1. *J. Bacteriol*., **186**, 2891–2896

46. Badur, A. H., Jagtap, S. S., Yalamanchili, G., Lee, J. K., Zhao, Huimin, and Rao, C. V. (2015) Alginate lyases from alginate-degrading *Vibrio splendidus* 12B01 are endolytic. *Appl. Environ. Microbiol*., **81**, 1865–1873

47. Zhu, B., Chen, M., Yin, H., Du, Y., and Ning, L. (2016) Enzymatic hydrolysis of alginate to produce oligosaccharides by a new purified endo-type alginate lyase. *Mar. Drugs*, **14**, 108

48. Huang, L., Zhou, J., Li, X., Peng, Q., Lu, H., and Du, Y. (2013) Characterization of a new alginate lyase from newly isolated *Flavobacterium* sp. S20. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*., **40**, 113–122

49. Thomas, F., Lundqvist, L. C. E., Jam, M., Jeudy, A., Barbeyron, T., Sandstrom, C., Michel, G., and Czjzek, M. (2013) Comparative characterization of two marine alginate lyases from *Zobellia galactanivorans* reveals distinct modes of action and exquisite adaptation to their natural substrate. *J. Biol. Chem*., **288**, 23021–23037

50. Chen, P., Zhu, Y., Men, Y., Zeng, Y., and Sun, Y. (2018) Purification and characterization of a novel alginate lyase from the marine bacterium *Bacillus* sp. Alg07. *Mar. Drugs*, **16**, 86

51. Dou, W., Wei, D., Li, H., Li, H., Rahman, M. M., Shi, J., Xu, Z., and Ma, Y. (2013) Purification and characterisation of a bifunctional alginate lyase from novel *Isoptericola halotolerans* CGMCC 5336. *Carbohydr. Polym*., **98**, 1476–1482

52. Hayashi, C., Takase, R., Momma, K., Maruyama, Y., Murata, K., and Hashimoto, W. (2014) Alginate-dependent gene expression mechanism in *Sphingomonas* sp. strain A1. *J. Bacteriol.*, **196**, 2691–2700

53. Hisano, T., Nishimura, M., Yamashita, T., Sakaguchi, K., and Murata, K. (1994) On the self-processing of bacterial alginate lyase. *J. Ferment. Bioeng*., **78**, 109–110

54. Hashimoto, W., Miyake, O., Momma, K., Kawai, S., and Murata, K. (2000) Molecular identification of oligoalginate lyase of *Sphingomonas* sp. strain A1 as one of the enzymes required for complete depolymerization of alginate. *J. Bacteriol*., **182**, 4572–4577

55. Takase, R., Ochiai, A., Mikami, B., Hashimoto, W., and Murata, K. (2010) Molecular identification of unsaturated uronate reductase prerequisite for alginate metabolism in *Sphingomonas* sp. A1. *Biochim. Biophys. Acta*., **1804**, 1925–1936

56. Takase, R., Mikami, B., Kawai, S., Murata, K., and Hashimoto, W. (2014) Structure-based conversion of the coenzyme requirement of a short-chain dehydrogenase/reductase involved in bacterial alginate metabolism. *J. Biol. Chem*., **289**, 33198–33214

57. Takagi, T., Morisaka, H., Aburaya, S., Tatsukami, Y., Kuroda, K., and Ueda, M. (2016) Putative alginate assimilation process of the marine bacterium *Saccharophagus degradans* 2-40 based on quantitative proteomic analysis. *Mar. Biotechnol*., **18**, 15–23

58. Thomas, F., Barbeyron, T., Tonon, T., Genicot, S., Czjzek, M. and Michel, G. (2012) Characterization of the first alginolytic operons in a marine bacterium: From their emergence in marine *Flavobacteriia* to their independent transfers to marine *Proteobacteria* and human gut *Bacteroides. Environ. Microbiol.*, **14**, 2379–2394

59. Mochizuki, S., Nishiyama, R., Inoue, A., and Ojima, T. (2015) A novel aldo-keto reductase, HdRed, from the pacific abalone *Haliotis discus hannai*, which reduces alginate-derived 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid to 2-keto-3-deoxy-d-gluconate" *J. Biol. Chem*., **290**, 30962–30974

60. Lee, E. J., Lee, O. K., and Lee, E. Y. (2018) Identification of 4-deoxy-L-etychro-hexoseulose uronic acid reductases in an alginolytic bacterium *Vibrio splendidus* and their uses for L-lactate production in an *Escherichia coli* cell-free system. *Mar. Biotechnol*., **20**, 410–423

61. Shimizu, E., Ojima, T., and Nishita, K. (2003) cDNA cloning of an alginate lyase from abalone, *Haliotis discus hannai*. *Carbohydr. Res.*, **338**, 2841–2852

62. Suzuki, H., Suzuki, K. ichi, Inoue, A., and Ojima, T. (2006) A novel oligoalginate lyase from abalone, *Haliotis discus hannai*, that releases disaccharide from alginate polymer in an exolytic manner. *Carbohydr. Res*., **341**, 1809–1819

63. Ojima, T., Nishiyama, R., and Inoue, A. (2019) Production of value-added materials from alginate using alginate lyases and 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid metabolic enzymes from alginolytic bacteria and marine gastropods. In: *Enzymatic Technologies for Marine Polysaccharides*, CRC Press, NY, U.S.A., chapter 22

64. Rahman, M. M., Inoue, A., Tanaka, H., and Ojima, T. (2010) Isolation and characterization of two alginate lyase isozymes, AkAly28 and AkAly33, from the common sea hare *Aplysia kurodai*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, **157**, 317–325

65. Rahman, M. M., Inoue, A., Tanaka, H., and Ojima, T. (2011) cDNA cloning of an alginate lyase from a marine gastropod *Aplysia kurodai* and assessment of catalytically important residues of this enzyme. *Biochimie*, **93**, 1720–1730

66. Rahman, M. M., Wang, L., Inoue, A., and Ojima, T. (2012) cDNA cloning and bacterial expression of a PL-14 alginate lyase from a herbivorous marine snail *Littorina brevicula*. *Carbohydr. Res*., **360**, 69–77

67. Sato, R., Sawabe, T., Kishimura, H., Hayashi, K., and Saeki, H. (2000) Preparation of neoglycoprotein from carp myofibrillar protein and alginate oligosaccharide: Improved solubility in low ionic strength medium. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 17-21

68. Sawabe, T., Oda, Y., Shiomi, Y., and Ezura, Y. (1995) Alginate degradation by bacteria isolated from the gut of sea urchins and abalones. *Microb. Ecol*., **30**, 193–202

69. Sawabe, T., Ezura, Y., and Kimura, T. (1992) Purification and characterization marine of an alginate lyase from *Alteromonas* sp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 521–527

70. Sawabe, T., Ezura, Y., and Kimura, T. (1993) Application of an alginate lyase from *Alteromonas* sp. for isolation of protoplasts from a brown algae *Laminaria japonica*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 705–709

71. Sawabe, T. and Ezura, Y. (1996) Regeneration from *Laminaria japonica* areschoug (*Laminariales, Phaeophyceae*) protoplasts isolated with bacterial alginase. *Plant Cell Rep*., **15**, 892–895

72. Miyake, H., Yamaki, T., Okikawa, T., Nakamura, T., Ishibashi, H., Fukuiri, Y., Sakuma, A., Komatsu, H., Ando, T., Togashi, K., and Umetani, H. (2006) Gluconate dehydratase. *US Patent*, 7125704B2

73. Li, Y., Chen, J., and Lun, S. Y. (2001) Biotechnological production of pyruvic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **57**, 451-459

74. Kabisch, A., Otto, A., Konig, S., Becher, D., Albrecht, D., Schuler, M., Teeling, H., Amann, R. I., and Schweder, T. (2014) Functional characterization of polysaccharide utilization loci in the marine *Bacteroidetes* '*Gramella forsetii*' KT0803. *The ISME Journal*, **8**, 1492-1502

75. Inoue, A., Takadono, K., Nishiyama, R., Tajima, K., Kobayashi, T., and Ojima, T. (2014) Characterization of an alginate lyase, FlAlyA, from *Flavobacterium* sp. strain UMI-01 and its expression in *Escherichia coli*. *Mar. Drugs*, **12**, 4693–4712

76. Ikeda, Y. (2013) Study for the purification and characterization of FlAlex from *Flavobacterium* sp. UMI-01. *Bachelor thesis*, Hokkaido University

77. Schiller, N. L., Monday, S. R., Boyd, C. M., Keen, N. T., and Ohman, D. E. (1993) Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* alginate lyase gene (algL): Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*. **175**, 4780–4789

78. Lee, S. I., Choi, S. H., Lee, E. Y., and Kim, H. S. (2012) Molecular cloning, purification, and characterization of a novel polyMG-specific alginate lyase responsible for alginate MG block degradation in *Stenotrophomas maltophilia* KJ-2. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **95**, 1643–1653

79. Yamasaki, M., Ogura, K., Hashimoto, W., Mikami, B., and Murata, K. (2005) A structural basis for depolymerization of alginate by polysaccharide lyase family-7. *J. Mol. Biol*., **352**, 11–21

80. Ochiai, A., Yamasaki, M., Mikami, B., Hashimoto, W., and Murata, K. (2010) Crystal structure of exotype alginate lyase Atu3025 from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Biol. Chem*., **285**, 24519–24528

81. Park, D., Jagtap, S., and Nair, S. K. (2014) Structure of a PL17 family alginate lyase demonstrates functional similarities among exotype depolymerases. *J. Biol. Chem*., **289**, 8645–8655

82. Li, J. W., Dong, S., Song, J., Li, C. B., Chen, X. L., Xie, B. B., and Zhang, Y. Z. (2011) Purification and characterization of a bifunctional alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524. *Mar. Drugs*, **9**, 109–123

83. Potter, J. A., Kerou, M., Lamble, H. J., Bull, S. D., Hough, D. W., Danson, M. J., and Taylor, G. L. (2008) The structure of *Sulfolobus solfataricus* 2-keto-3-deoxygluconate kinase. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **64**, 1283–1287

84. Fong, S., Machajewski, T. D., Mak, C. C., and Wong, C. H. (2000) Directed evolution of D-2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase to new variants for the efficient synthesis of D- and L-sugars. *Chem. Biol*., **7**, 873–883

85. Gacesa, P. and Wusteman, F. S. (1990) Plate assay for simultaneous detection of alginate lyases and determination of substrate specificity. *Applied and Envitonmental Microbiology*, **56**, 2265-2267

86. Chaki, T., Kajimoto, N., Ogawa, H., Baba, T., and Hiura, N. (2007) Metabolism and calcium antagonism of sodium alginate oligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **71**, 1819–1825

87. Tanaka, N., Nonaka, T., Tanabe, T., Yoshimoto, T., Tsuru, D., and Mitsui, Y. (1996) Crystal structures of the binary and ternary complex of 7α-hydroxysteroid dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **35**, 7715–7730

88. Yamamoto, K., Kurisu, G., Kusunoki, M., Tabata, S., Urabe, I., and Osaki, S. (2001) Crystal structure of glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium* IWG3 at 1.7 Å resolution. *J. Biochem.*, **129**, 303–312

89. Hashimoto, W., Kawai, S., and Murata, K. (2010) Bacterial supersystem for alginate import/metabolism and its environmental and bioenergy applications., *Bioengineered Bugs*, **1**, 97-109

90. Kim, D. H., Wang, D., Yun, E. J., Kim, S., Kim, S. R., and Kim, K. H. (2016) Validation of the metabolic pathway of the alginate-derived monomer in *Saccharophagus degradans* 2-40^{T} by gas chromatography–mass spectrometry. *Process Biochem*., **51**, 1374–1379

91. MacGee, J. and Doudoroff, M. (1954) A new phosphorylated intermediate in glucose oxidation. *J. Biol. Chem*., **210**, 617–626

92. Aghaie, A., Lechaplais, C., Sirven, P., Tricot, S., Besnard-Gonnet, M., Muselet, D., Berardinis, V. D., Kreimeyer, A., Gyapay, G., Salanoubat, M., and Perret, A. (2008) New insights into the alternative D-glucarate degradation pathway. *J. Biol. Chem*., **283**, 15638–15646

93. Sharma, B. S. and Blumenthal, H. J. (1973) Catabolism of D-glucaric acid to α-ketoglutarate in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol*., **116**, 1346–1354

94. Jeffcoat, R., Hassall, H., and Dagley, S. (1969) The metabolism of D-glucarate by *Pseudomonas acidovorans*. *Biochem. J*., **115**, 969–76.

95. Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B., and Jornvall (2003) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): The 2002 update. *Chem. Biol. Interact*., **143–144**, 247–253

96. Yamamoto, K., Kurisu, G., Kusunoki, M., Tabata, S., Urabe, I., and Osaki, S. (2001) Crystal structure of glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium* IWG3 at 1.7 Å resolution. *J. Biochem*., **129**, 303–312

97. Roth, T., Beer, B., Pick, A., and Sieber, V. (2017) Thermostabilization of the uronate dehydrogenase from *Agrobacterium tumefaciens* by semi-rational design. *AMB Express*, **7**, 103

98. Watanabe, S., Kodaki, T., and Makino, K. (2006) A novel α-ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase: Evolutionary insight into an alternative pathway of bacterial L-arabinose metabolism. *J. Biol. Chem.*, **281**, 28876–28888

99. Watanabe, S., Yamada, M., Ohtsu, I., and Makino, K. (2007) α-Ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase isozymes involved in metabolic pathways of D-glucarate, D-galactarate, and hydroxy-L-proline: Molecular and metabolic convergent evolution. *J. Biol. Chem.*, **282**, 6685–6695

100. Endo, M. (2005) Measuring method for carboxylic acid and its measuring kit. *JP Patent*, 2005331465A

101. Park, N., Heo, J., Song, S., Jo, I., Lee, K., and Ha, N. C. (2017) Crystal structure of *Streptomyces coelicolor* RraAS2, an unusual member of the RNase E inhibitor RraA protein family. *J. Microbiol.*, **55**, 388–395

102. Mazurkewich, S. and Seah, S. Y. K. (2016) Investigation into the mode of phosphate activation in the 4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate/4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate aldolase from *pseudomonas putida* F1. *PLoS One*, **11**, e0164556

103. Tai, Y. S., Xiong, M., Jambunathan, P., Wang, J., Wang, J., Stapleton, C., and Zhang, K. (2016) Engineering nonphosphorylative metabolism to generate lignocellulose-derived products. *Nat. Chem. Biol.*, **12**, 247–253

104. Taberman, H., Andberg, M., Parkkinen, T., Janis, J., Penttila, M., Hakulinen, N., Koivula, A., and Rouvinen, J. (2014) Structure and function of a decarboxylating *Agrobacterium tumefaciens* keto-deoxy-D-galactarate dehydratase. *Biochemistry*, **53**, 8052–8060

105. Izard, T., and Blackwell, N. C. (2000) Crystal structures of the metal-dependent 2-dehydro-3-deoxy-galactarate aldolase suggest a novel reaction mechanism. *EMBO J.*, **19**, 3849–3856

106. Kawai, S., Ohashi, K., Yoshida, S., Fujii, M., Mikami, S., Sato, N., and Murata, K. (2014) Bacterial pyruvate production from alginate, a promising carbon source from marine brown macroalgae. *J. Biosci. Bioeng.*, **117**, 269–274

107. Wood, J. M. (2006) Osmosensing by bacteria. *Sci. STKE.*, **357**, pe43

108. Wood, J. M. (2015) Bacterial responses to osmotic challenges. *J. Gen. Physiol.*, **145**, 381–388

109. Krämer, R. (2009) Osmosensing and osmosignaling in *Corynebacterium glutamicum. Amino Acids*, **37**, 487–497

110. Makemson, J. C. and Hastings, J. W. (1979) Glutamate functions in osmoregulation in a marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 178–180

111. Shen, H. T., Lu, P., Zhang, X. H., Xing, X., Xing, L. X., Yan, X., and Wang, J. L. (2007) Characterization of the proline-utilization pathway in *Mycobacterium tuberculosis* through structural and functional studies. *Chinese J. Pharmacol. Toxicol.*, **21**, 99–106

112. Kempf, B. and Bremer, E. (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.*, **170**, 319–330

113. Dagrey, S. and Trudgill, P. (1965) The metabolism of galactarate, D-glucarate and various pentose by species of *Pseudomonas*. *Biochem. J.*, **95**, 48–58

114. Welsh, D. T. (2000) Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: From single cells to global climate. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**, 263–290

115. Shimizu, M., Yoshida, A., and Mikami, K. (1996) Carbonyl-ene approach to the asymmetric synthesis of 2-keto-3-deoxy-D-gluconic acid (KDG): A combinatorial sequence using sharpless epoxidation. *Synlett*, 1112–1114

116. Allen, S. T., Heintzelman, G. R., and Toone, E. J. (1992) Pyruvate aldolases as reagents for stereospecific aldol condensation. *J. Org. Chem.*, **57**, 426–427

117. Shelton, M. C., Cotterill, I. C., Novak, S. T. A., Poonawala, R. M., Sudarshan, S., and Toone, E. J. (1996) 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolases as catalysts for stereocontrolled carbon-carbon bond formation. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2117–2125

118. Werpy, T., Petersen, G., Aden, A., Bozell, J., Elliot, D., Lasure, L., Jones, S., Gerber, M., Ibsen, K., Lumberg, L., and Kelley, S. (2004) Top Value Added Chemicals from Biomas. Volume I: Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. *National Renewable Energy Laboratory*

119. Bai, W., Tai, Y. S., Wang, J., Wang, J., Jambunathan, P., Fox, K. J., and Zhang, K. (2016) Engineering nonphosphorylative metabolism to synthesize mesaconate from lignocellulosic sugars in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.*, **38**, 285–292

謝辞

本研究の遂行と本論文の作製に当たり、懇篤なる御指導・御鞭撻を賜りました北海道大学大学院水産科学研究院 尾島孝男教授に心から感謝申し上げます。ならびに、本研究への御助力および本論文の御校閲を賜りました同研究院 澤辺智雄教授に厚くお礼申し上げます。また、本研究の指導教官として、研究遂行と論文作製に多大なる御指導・御鞭撻を賜りました同研究院 井上晶准教授に心よりお礼申し上げます。最後に、本研究をご支援して頂いた同研究院の諸先生方および海洋生物工学講座の諸兄姉に感謝の意を表します。