



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 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	西山, 竜士
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第13537号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74273
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryuji_Nishiyama_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称： 博士（水産科学）

氏名： 西 山 竜 士

学 位 論 文 題 目

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

アルギン酸は褐藻や一部の細菌で生合成される酸性ヘテロ多糖であり、 β -D-マンヌロン酸と α -L-グルロン酸から構成される。自然界にはアルギン酸を分解・代謝し炭素源として利用する生物が存在しており、その資化機構は微生物や藻食性の腹足類において詳細に研究されてきた。アルギン酸の代謝経路は、1962 年に Preiss と Ashwell により *Pseudomonas* 属細菌で初めて提唱された。それによれば、アルギン酸は複数種のアルギン酸リアーゼの協働作用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 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronate (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 2-keto-3-deoxy-D-gluconate (KDG) に還元された後、Entner-Doudoroff (ED) 経路に導入される。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。しかしながら、当時は各反応段階で作用する酵素は特定されておらず、また、中間代謝物の構造解析も不十分であり、細菌におけるアルギン酸代謝経路が完全に解明されたとは言い難かった。

ところで、本研究室では、小樽市沿岸部で採集された腐敗褐藻スギモクからアルギン酸資化細菌 *Flavobacterium* sp. UMI-01 株を単離した。本菌はアルギン酸を唯一炭素源として増殖可能であり、その無細胞抽出液はアルギン酸を DEH に完全分解するための複数の酵素を含むことを明らかにした。UMI-01 株が属するフラボバクテリア網の細菌では、アルギン酸の資化利用に関与する各タンパク質の遺伝子がゲノム上で一つのクラスターを形成していることが知られているため、同網のアルギン酸資化細菌はアルギン酸の分解および代謝機構を分子生物学および生化学的手法を用いて解明するための好材料と考えられる。そこで本研究では、初めに UMI-01 株のアルギン酸資化プロセスにおけるアルギン酸分解と DEH 代謝に関与するタンパク質をコードする各遺伝子を本菌のゲノム配列から推定し、組換え酵素を用いてそれらの性状を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。さらに、UMI-01 株にアルギン酸の中間代謝産物である DEH を酸化するバイパス経路を触媒する酵素が存在することを見出し、その一連の酵素の生化学的特性を明らかにすると共に、この経路の生理学的意義について高浸透圧環境への適応との関連から考察した。

第1章では、UMI-01株のゲノム解析を行い、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 (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)) の候補遺伝子を見出し、それらの組換え酵素を大腸菌発現系により作出した。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を用いた *in vitro* 反応系により、アルギン酸がリアーゼにより単糖レベルまで分解され、生じた不飽和ウロン酸 (DEH) が ED 経路を介して代謝され得るかについて検討した。その結果、UMI-01 株は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) によりアルギン酸を DEH まで完全分解した後、それを DEH 還元酵素 FlRed により KDG に還元し、ED 経路でピルビン酸にまで代謝することが明らかになった。このような DEH 還元代謝経路は、本菌だけでなく他のアルギン酸資化細菌にも共通して存在すると考えられた。

第2章では、UMI-01株の無細胞抽出液中に NAD⁺ の存在下で 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、補酵素の種類に依存して 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ったが、その一次構造を解析した結果、本酵素は先に DEH 還元酵素として同定した FlRed と同一のタンパク質であることが明らかになった。興味深いことに、FlRed の組換え酵素における C 末端の His-tag の有無は、その酵素活性に大きく影響することが明らかになった。すなわち、同配列を C 末端に融合した組換え FlRed は酸化活性を示さないが、融合していない組換え FlRed は天然の FlRed と同等の DEH 酸化還元活性を示した。また、His-tag を付加した FlRed の還元活性は、天然型の約 30 分の 1 であった。FlRed による酸化反応生成物は、DEH の C1 位の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) であった。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としても知られており、細菌のグルカル酸代謝経路では、開裂酵素または脱水酵素の作用を受ける。しかしながら、UMI-01 株のドラフトゲノム配列中には、そ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なかったため、本菌における KDGR の代謝には、未同定の酵素が関与している可能性が強く示唆された。そこで次章では、KDGR を基質とする代謝酵素の探索を進めることとした。

第3章では、UMI-01株の無細胞抽出液から、KDGR を α -ketoglutarate semialdehyde (KGSA) に変換する報告例のない KDGR 脱水酵素 FlDet を単離した。FlDet の一次構造は、同様の触媒能をもつ既知の KDGR 脱水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。すなわち、FlDet および既知の KDGR 脱水酵素はそれぞれ Class II および Class I アルドラーゼにそれぞれ属することが明らかになった。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) 候補遺伝子が新たに見出された。これらの組換え酵素を大腸菌発現系により作出し、それらの活性を調べた結果、FlDet は KDGR の脱水および脱炭酸により KGSA を生成し、FlDeg はこの KGSA を

NAD⁺存在下において酸化し、 α -ケトグルタル酸を生じることが確認された。

以上の結果から、UMI-01 株ではアルギン酸の最終分解物である DEH が 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代謝されることが明らかになった。また、還元経路の最終産物はピルビン酸であり、酸化経路の最終産物は α -ケトグルタル酸であることも明らかになった。なお、DEH 1 分子が代謝される場合、還元経路では 1 分子の NADH が消費され、酸化経路では 2 分子の NADH が生じる。このことから、これら 2 つの経路は同時かつ協働的に機能することで、細胞内の還元力バランスの維持に寄与していると推定された。また、FIDet および FIDeg 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、DEH の酸化経路は UMI-01 株だけでなく、他種の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、DEH 酸化経路が UMI-01 株の浸透圧調節にも関与する可能性を見出した。すなわち、本菌は培地の浸透圧上昇に伴って FIDeg のアイソザイムである KGSA 脱水素酵素 FIDegII を新たに発現し、DEH 酸化経路を活性化することが明らかになった。また、それに伴い本菌は細胞内に高濃度のグルタミン酸 (最大で乾燥菌体重量の 3.7% (w/w)) を蓄積することが明らかになった。グルタミン酸は細菌の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。この点を考慮すると、本菌は高浸透圧環境下で DEH 酸化経路を活性化し、そこで生じた α -ケトグルタル酸を基質としてグルタミン酸を合成し、それを蓄積することで細胞内浸透圧を高め、高浸透圧ストレスに抗している可能性が考えられる。

以上、本研究では腐敗褐藻より単離された *Flavobacterium* sp. UMI-01 株が、アルギン酸分解で生じた DEH を既知の還元経路および新たに見出された酸化経路により、それぞれピルビン酸および α -ケトグルタル酸にまで代謝することを明らかにした。なお、この DEH 酸化経路は浸透圧調節物質の 1 つであるグルタミン酸の合成にも関与し、浸透圧ストレス応答と密接に関わっていると考えられた。この浸透圧適応機構の利点は、アルギン酸存在下であれば細胞外から浸透圧調節物質を取り込まずに、細菌自身で細胞内にそれを蓄積することで高浸透圧環境に適応できる点にある。すなわち、本菌は褐藻のようなアルギン酸を含む基質に付着し、アルギン酸を分解して資化利用するだけでなく、これを原料として浸透圧調節物質を合成し、高浸透圧環境に適応していると推定された。DEH 酸化経路に関わる各酵素の相同遺伝子は、他種のアルギン酸資化細菌にも見出されるため、同様の浸透圧調節機構は、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、降雨や乾燥などによる浸透圧環境変化の影響を受け易い土壌性の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。