



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）

氏名：西山竜士

審査委員	主査 教 授	澤 辺 智 雄
	副査 教 授	尾 島 孝 男
	副査 准教授	井 上 晶

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、海洋環境に豊富に存在する褐藻類と一部の細菌類が生合成する酸性多糖類である。1890年代に発見されて以来、食品、化学工業、繊維、医療などさまざまな分野で利用されてきた。近年では、アルギン酸分解によって得られるオリゴ糖が植物の根の生長促進、多剤耐性菌の成長阻害、嚢胞線維症の症状緩和などポリマーのものには見られないさまざまな生理活性作用をもつことが報告され、注目されている。さらに、それ自体やその分解物である不飽和単糖のバイオリファイナリーも進展している。このように、アルギン酸の効率的な分解手法の確立は、アルギン酸の高度利用には欠かせない。

自然界には、アルギン酸を分解および代謝する酵素をもち、アルギン酸資化能を有する細菌が存在している。小樽市沿岸で採取した腐敗褐藻から単離された *Flavobacterium* sp. UMI-01 株は、そのひとつであり、これまでにアルギン酸を唯一炭素源として増殖し、アルギン酸をオリゴ糖に分解するアルギン酸分解酵素のひとつが単離されてきた。しかしながら、本菌がどのような酵素を用いて、アルギン酸を分解・代謝しているのかについては不明なままであった。また、完全分解によって生じる不飽和単糖の代謝に関わる酵素についてもドラフトゲノム解析により、それらの存在は予測されているものの実際に酵素活性は調べられていない。本研究では UMI-01 株のアルギン酸の分解と代謝に関わる一連の酵素の機能を生化学的手法により調べることで、アルギン酸分解および代謝機構の全容解明を目的とした。本研究の評価される点は以下のとおりである。

1. UMI-01 株は、アルギン酸分解のために、それぞれ基質特異性が異なる 4 種類のアルギン酸リアーゼをもつことを明らかにした。これらの協働作用により、アルギン酸は不飽和単糖へと完全分解されることを示した。
2. アルギン酸由来不飽和単糖は、それを基質とする酵素により還元された後、リン酸化酵素と開裂酵素が順次作用することにより、ピルビン酸とグリセルアルデヒド 3 リン酸へと変換されることを明らかにした。すなわち、UMI-01 株は他種のアルギン酸資化細菌で推定されている場合と同様に、不飽和単糖を還元し、エントナー・ドウドロフ経路により代謝することをタンパク質レベルで示した。
3. UMI-01 株の粗酵素液中に不飽和単糖を酸化する酵素の存在を発見し、本酵素を単離した。この酵素は、還元酵素として同定したタンパク質と同一のものであった。その結果、不飽和単糖は、補酵素 NADH および NAD^+ の濃度に依存して還元だけでなく酸化され、異なる構造をもつ 2 種類の化合物へと変換されることを示した。
4. 不飽和単糖の酸化物は、還元物とは異なる代謝経路によって変換されることを明らかにした。すなわち、酸化物を特異的に基質として認識する酵素により脱水および脱炭酸された後、脱水素酵素の作用により α -ケトグルタル酸へと変換されることを明らかにした。また、これらの酵素をコードする遺伝子は、ゲノム上のアルギン酸分解オペロンとは離れた位置に存在しているが、エキソ型アルギン酸リアーゼの遺伝子と共に別のクラスターを形成していることが分かった。
5. UMI-01 株は、海水のような高浸透圧条件下だけでなく、低浸透圧下でもアルギン酸を唯一炭素源として増殖可能であることを示した。前者の条件では細胞内にグルタミン酸が蓄積しており、不飽和単糖酸化物代謝に関わる酵素活性も高いことを見出した。グルタミン酸は、オスモライトとして機能すると予測され、高浸透圧下では低浸透圧の場合に比べて、酸化経路が活性化し、グルタミン酸の前駆体である α -ケトグルタル酸を積極的に生合成する可能性を提案した。

以上、本研究は、アルギン酸資化細菌のアルギン酸分解および代謝に関わる各酵素の機能をタンパク質レベルで解明することで、アルギン酸由来不飽和単糖が還元経路で代謝されるだけでなく、報告例のない酸化経路の存在を明らかにした。さらに、これらの反応に関わる一連の組換え酵素の生産にも成功し、アルギン酸の有用化合物への変換技術にも応用可能である。このように、アルギン酸資化生物に関する新知見を得たのみならず、それらの知見を活用した新たなアルギン酸の高度利用の可能性を示した点が高く評価された。よって審査員一同は申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。