HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on alginate lyases from an alginolytic bacterium Hydrogenophaga sp.strain UMI-18 that produces poly(3-hydroxybutylate) [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Joemark, T. Narsico
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第14151号
Issue Date	2020-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78949
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Joemark_Narsico_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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：Joemark Narsico

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

Studies on alginate lyases from an alginolytic bacterium *Hydrogenophaga* sp. strain UMI-18 that produces poly(3-hydroxybutylate)

（ポリヒドロキシ酪酸合成アルギン酸資化細菌 *Hydrogenophaga* sp. UMI-18 株のアルギン酸リアーゼに関する研究）

アルギン酸は、β-D-マンヌロン酸とα-L-グルロン酸から構成される褐藻の主要構造多糖で、増粘剤やゲル化剤として食品、医薬品、バイオテクノロジー分野で広く利用されているが、近年ではバイオ燃料やバイオ素材生産のためのバイオマスとして注目されている。最近、アルギン酸資化性細菌である *Hydrogenophaga* sp. strain UMI-18 が単離され、これがバイオプラスチックの一つであるポリヒドロキシ酪酸（PHB）を、アルギン酸を唯一炭素源として合成することが明らかにされた。UMI-18 株は、アルギン酸をアルギン酸リアーゼにより 4-deoxy-L-*erthro*-5-hexoseulose uronic acid (DEH)に分解し、これを PHB 合成に利用していると考えられるが、本菌株のアルギン酸リアーゼの酵素特性や DEH の生成機構は不明であった。本研究は、UMI-18 株による褐藻バイオマスからのバイオプラスチック生産の可能性を示すとともに、アルギン酸分解機構をアルギン酸リアーゼ遺伝子の同定と組換え酵素を用いた機能解析の観点から研究したものである。その内容は、以下の通りである。

１．石油系プラスチックを代替するバイオプラスチックとして、細菌の合成する PHB が注目されているが、現状では細菌 PHB はデンプンや植物油などの陸上植物の食料系バイオマスを利用して生産されている。そのため、PHB 生産の大規模化はかつてバイオエタノール生産において経験した食料との競合、すなわち食料 vs バイオプラスチックの競合を起こすことが危惧される。本研究では、アルギン酸資化性 PHB 合成細菌 *Hydrogenophage* sp. UMI-18 株を用いた、食料と競合しないバイオプラスチック生産の

可能性を示すとともに、本菌株による未利用褐藻を原料としたバイオプラスチック生産の実用可能性および本菌株のもつアルギン酸分解酵素遺伝子の有用性を示した。

２．UMI-18 株を、アルギン酸をはじめとする様々な糖質を唯一炭素源として含む液体培地で培養し、PHB の合成収率を調べた。それにより、アルギン酸を含む培地での PHB 収率は 1.1 ± 0.15 g/L であることを明らかにした。これは、ブドウ糖や果糖を含む培地の 2.03 – 2.24 g/L よりも少ないがガラクトースやショ糖と同程度であること、また乳糖の 0.15 g/L よりも高いことを明らかにした。また、合成された PHB のガラス転移温度および融点はそれぞれ 4℃および 175℃、平均分子質量は 860 kDa であり、従来知られている PHB と同等の物理化学的特性をもつことを明らかにした。

３．UMI-18 株のゲノムを解析し、本菌株が 4 つのアルギン酸リアーゼ遺伝子 *HyAly-I,-II,-III,* および-*IV* を持つことを明らかにした。それらの演繹アミノ酸配列に基づき、HyAly-I と HyAly-III がエキソ型のアルギン酸リアーゼ、HyAly-II と HyAly-IV がエンド型のアルギン酸リアーゼであると推定した。次いで、大腸菌発現系を用いてこれらの組換え酵素を作出し、それらの作用特性を確認し、これらの組換え酵素のうち、エキソ型の HyAly-I とエンド型の HyAly-IV が大腸菌で発現可能なこと、HyAly-I は最も高収率で生産できることを明らかにした。また、HyAly-I は 713 アミノ酸残基から成り、その N-末端側の 73-270 残基部分は AlgLyase superfamily ドメイン、C-末端側の 359-621 残基部分は Heparinase II/III-like protein ドメインに相当することを明らかにした。

４．HyAly-I の組換え酵素を作出し、そのアルギン酸分解機構を詳細に解析した。それにより、本酵素がアルギン酸のポリ（β-D-マンヌロン酸）ブロックを好適基質とすること、その至適温度および至適 pH はそれぞれ 40℃および pH6.0 であること、基質の非還元末端に作用し、オリゴ糖中間体を経ずに直接不飽和単糖（DEH）を生成することを明らかにした。また、HyAly-I の反応生成物を薄層クロマトグラフィーと質量分析により詳細に解析し、本酵素が DEH だけでなく、その 2 量体（diDEH）も生成することを発見した。この diDEH は環状 DEH の C1 ヒドロキシ基と開環状 DEH の C5 ケト基の間でβ1，5 結合した構造をとる、これまで知られていない新規の 2 糖であることを明らかにした。

以上、申請者の研究成果は、アルギン酸を唯一炭素源としてバイオプラスチックを生産する *Hydrogenophaga* sp. UMI-18 株の PHB 合成能と、同菌株の生産するアルギン酸リアーゼの酵素特性を解析し、さらに新規化合物を同定したものであり、水産学、海洋応用生命科学、ならびに海洋生物工学分野に大きく貢献するものとして高く評価できる。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。