

氏 名	ひさのともひろ 久野智弘
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2316 号
学位授与の日付	平成 12 年 7 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	STUDIES ON TRANSPORT, DEPOLYMERIZATION AND ASSIMILATION OF ALGINATE IN <i>SPHINGOMONAS</i> SPE- CIES A1 (スフィンゴモナス属細菌におけるアルギン酸の輸送, 低分子化及び資化に 関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 村 田 幸 作 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 清 水 昌

論 文 内 容 の 要 旨

褐藻由来のアルギン酸は、食品業界、医薬品業界などでゲル化剤、増粘剤として広く利用されている。しかし、本多糖の強いゲル化能と粘性は、その使用範囲を強く制限しており、新機能の開発や応用分野の拡大のため、新規な低分子化法が求められている。一方、緑膿菌の生産するアルギン酸は、感染局所でバイオフィルムとして機能し、食細胞、医薬品などの除菌効果を低減させる。従って、緑膿菌感染症は難治化・慢性化となり、医療上の大きな問題となっている。これら食品科学的、医学的問題を解決するため、アルギン酸を低分子化し、低粘度のオリゴ糖を生成するアルギン酸リアーゼを利用することは、一つの有効な手段である。

本研究は、アルギン酸リアーゼ生産細菌の分類学・形態学的性質とアルギン酸リアーゼの酵素化学的性質、遺伝子構造、及び生合成機構を明らかにし、本酵素の食品、医薬、化学分野への応用を図ることを目的としている。特に、本生産菌は、細胞表層に体腔(穴)を有する細菌であり、本構造を高分子物質取り込みとの関連からも解析している。

第1章では、土壌より単離したアルギン酸リアーゼ生産菌 A1 株の分類学・形態学的性質、及びそのアルギン酸リアーゼの酵素化学的特徴を解析している。土壌細菌 A1 株の生理学的特性、細胞膜成分及び 16SrRNA を解析し、本細菌を *Sphingomonas* 属細菌と同定した。また、形態的な特徴として、大きな襷構造と体腔を有することも示した(詳細は第3章)。A1 株が産生する3種類のアルギン酸リアーゼ(A1-I, A1-II, A1-III)の諸性質を明らかにし、分子サイズ、基質特異性及びN末端アミノ酸配列から、A1-IIとA1-IIIがA1-Iよりプロセッシングを受けて生じることを推定した。さらに、これら3種類の酵素を利用して、アルギン酸リアーゼの基質特異性と活性を簡便に決定できる方法を開発した。

第2章では、アルギン酸リアーゼ遺伝子をクローニングし、酵素の生合成機構を明らかにしている。A1-Iの構造遺伝子を解析し、各酵素のN末端アミノ酸配列と比較した結果、A1-Iは前駆体(A1-0: 71 kDa)として合成された後、N末端側のペプチド(5 kDa)が除去されて成熟型 A1-I (66 kDa) となり、さらに A1-I はプロセッシングを受けて、A1-II (25 kDa) と A1-III (40 kDa) に変換されることを明らかにした。また、高純度に精製した A1-I から、A1-III 及び A1-II と同じ N 末端アミノ酸配列と分子量を持つ2種のタンパク質が生じることより、A1-I の A1-II と A1-III への転換は、A1-I 分子のセルフプロセッシングであることを示唆している。

第3章では、A1 株における高分子アルギン酸の取り込み機構を解析している。細胞内に存在するアルギン酸リアーゼが、細胞外に存在する基質アルギン酸(23 kDa)と如何にして接触し得るかを検討した。まず、A1 株の細胞表層には、アルギン酸の存在に依存して開閉する体腔が形成され、そこにアルギン酸が濃縮されること、体腔に相当した部位で細胞膜が細胞質に陥入した特殊な構造が認められることを明らかにした。次に、高分子アルギン酸は資化せず、その低分子化物(平均分子量 1.8 kDa 以下)には良好な生育を示す変異株 ALG-1 株を取得した。本変異株は、体腔形成能を欠落していた。これらの結果より、A1 株には、アルギン酸を体腔を介して直接細胞内に取り込む機構が存在していることを明らかにした。この高分子アルギン酸取り込み機構を明らかにするため、高分子アルギン酸資化欠損株(ALG-1 株)の変異を相補する遺伝

子を解析した。A1株の遺伝子ライブラリーをALG-1株に導入することより、ALG-1株に相補的な形質転換株ALG-1Cを得た。さらに、ALG-1相補遺伝子をサブクローニングし、2.8 kbの遺伝子断片が高分子アルギン酸取り込みに関与していることを明らかにした。

第4章では、枯草菌分泌発現系を利用して、遺伝子組換え菌によるA1-IIIの大量生産法を確立している。A1-III遺伝子を誘導分泌ベクターpISA412に連結し、枯草菌 *Bacillus subtilis* ANA-1株に導入した組換え体は、菌体外にA1-IIIを誘導生産した。酵素生産条件を検討した結果、最適条件下（炭素源：3%ガラクトース、初発pH：7.0～8.5、誘導剤：0.5 μ g/mlセファロスポリンCなど）で、A1-IIIの生産量は0.3 g/Lに達した。さらに、本酵素の緑膿菌アルギン酸に対する高い作用性を明らかにし、難治性細菌感染症治療薬への応用の可能性を示唆した。

論文審査の結果の要旨

食品・医薬品業界において、アルギン酸（褐藻由来）の新機能開発や応用分野拡大のため、その低分子化法が求められている。一方、緑膿菌の生産するアルギン酸は、難治性細菌感染症や体内留置型医療器具の汚染劣化の原因（バイオフィルム）となるため、医療上の大きな問題となっている。これら食品科学的、医学的問題を解決するため、アルギン酸低分子化酵素（アルギン酸リアーゼ）の利用が期待される。

本研究では、アルギン酸リアーゼの食品、医薬、化学分野への総合的応用を図ることを目的として、アルギン酸リアーゼ生産細菌、アルギン酸リアーゼ及び本酵素の遺伝子の諸性質を明らかにした。また、本アルギン酸リアーゼ生産細菌は、微生物学の歴史の中で初めて発見された細胞表層に体腔（穴）を形成する細菌であり、この体腔と高分子物質取り込みとの関連も明らかにした。評価すべき点は、次の通りである。

1. 土壌より分離したアルギン酸リアーゼ生産菌A1株を *Sphingomonas* 属細菌と同定し、さらに本細菌が細胞表層に体腔を形成する特殊な微生物であることを初めて明らかにした。本菌株が生産する3種類のアルギン酸リアーゼ（A1-I, A1-II, A1-III）の酵素化学的諸性質を明らかにした。

2. アルギン酸リアーゼの遺伝子を解析し、3種類のアルギン酸リアーゼ分子種が、唯一の遺伝子産物から逐次プロセッシングによって生合成されることを明らかにした。この中で、A1-IからA1-IIとA1-IIIへの転換がA1-I分子のセルフプロセッシングによることを示した。

3. A1株の細胞表層に高分子アルギン酸の有無によって開閉する体腔を見出し、本細菌はこの体腔を介して高分子アルギン酸を直接細胞内に取り込む機構を備えていることを微生物で初めて示した。さらに、高分子物質取り込みに関わる遺伝子を単離した。これらの知見に基づいて、微生物における高分子物質の取り込みと資化に関する新規な概念を提出した。

4. 組換え枯草菌によるA1-IIIの工業的生産法を確立し、医薬、食品、農業、化学分野への実用的供給を可能とした。さらに、難治性細菌感染症に対する効果を明らかにし、医薬分野への利用の可能性を示唆した。

以上のように、本論文は、アルギン酸リアーゼの酵素化学的及び遺伝学的性質を明らかにすることによって、工業レベルでの大量生産と実用化研究を可能にすると共に、体腔形成細菌の発見並びに微生物における高分子物質の取り込みと資化に関する新規な概念を提出したものであり、酵素化学、微生物生産学、及び微生物形態制御学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成12年4月13日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。