

ガラクトフラノース特異的な微生物由来エキソ-β-D-ガラクトフラノシダーゼの同定および諸性質の解析

松永, 恵美子

<https://hdl.handle.net/2324/4475229>

出版情報：九州大学, 2020, 博士（農学）, 論文博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏名	松永 恵美子			
論文名	ガラクトフラノース特異的な微生物由来エキソ-β-D-ガラクトフラノシダーゼの同定および諸性質の解析			
論文調査委員	主査	九州大学	教授	竹川 薫
	副査	九州大学	教授	酒井 謙二
	副査	九州大学	教授	中山 二郎

論文審査の結果の要旨

自然界において、ガラクトースは水溶液中で六員環のガラクトピラノースと五員環のガラクトフラノース(Galf)構造として存在している。Galfは細菌・真菌や線虫が生産する多糖や複合糖鎖中に含まれているが、植物や哺乳類の糖鎖中には存在しない。そのため、Galf含有糖鎖はヒトに対して強い抗原性を示す。β-D-ガラクトフラノシダーゼ(Galf-ase)は、Galfのグリコシド結合を加水分解し、Galf含有糖鎖の機能および構造解析を行うための重要な酵素である。これまでに糸状菌の培養上清中に Galf-ase 活性が存在することが報告されていたが、本酵素をコードする遺伝子の同定など詳細な解析は行われていなかった。そこで本研究では微生物が生産する Galf 特異的な Galf-ase の探索を行い、その諸性質について解析を行っている。

まず、新たに Galf-ase 活性を有する微生物を取得するため、土壌より単離した細菌の培養上清について、パラニトロフェニル(pNP)-β-Galfを基質に用いて Galf-ase 活性を測定した。その結果、3 株の細菌(JHA19, JHA26, EMA216)の培養上清中から Galf-ase 活性を検出している。単離した細菌について 16S rRNA 解析を行ったところ、3 株とも *Streptomyces* 属の放線菌であることを明らかにしている。

次に、単離した Galf-ase 生産放線菌 3 株のうち、JHA19 株の全ゲノム塩基配列の決定を試みている。その結果、本菌のゲノム中には 7,091 の推定遺伝子が存在する。推定グリコシダーゼ遺伝子の中から機能未知の 4 遺伝子を選抜して、各遺伝子を PCR で増幅させて大腸菌ベクターに組み込んだ。大腸菌内で発現・精製後、Galf-ase 活性を測定したところ、ORF1110 のみが Galf-ase 活性を特異的に示すことを見出した。さらに各種 pNP 化基質を用いて活性を測定したところ、ORF1110 は Galf 特異的に活性を示す新奇な酵素であることを明らかにしている。本酵素は Glycoside Hydrolase (GH) ファミリー2に属し、至適 pH は pH 5.5、pNP-Galf に対する K_m 、 V_{max} はそれぞれ 4.4 mM、0.35 mM/min であった。さらに、*Aspergillus fumigatus* 細胞壁から調製したガラクトマンナン(GM)に本酵素を作用させたところ、ガラクトース単糖が遊離したことから、本酵素は天然基質である GM にも作用するエキソ型の酵素であることを明らかにしている。

さらに JHA26 株の全ゲノム塩基配列を決定し、6,748 の推定遺伝子の中から、GH2 ファミリーに属する酵素を探索した結果、1 遺伝子(ORF0643)が存在することがわかった。本遺伝子を JHA19 株 ORF1110 と同様に大腸菌で発現・精製を行い、諸性質の解析を行っている。本酵素の至適 pH は pH 4.5、pNP-Galf に対する K_m 、 V_{max} はそれぞれ 6.8 mM、0.52 mM/min であった。JHA26 株の ORF0643 は JHA19 株の ORF1110 と異なり、N 末端付近に PA14 機能未知ドメインを持つ。PA14 ドメインを削除すると pNP-Galf に対する酵素活性は変化しないが、天然基質である GM に対する分解活性が低下することがわかり、ORF0643 の PA14 ドメインは多糖基質の認識に関与することを示唆している。

Streptomyces sp.由来 Galf-ase のアミノ酸配列情報をもとに、*Aspergillus* 属糸状菌の Galf-ase 遺伝子の探索を行っている。その結果、*A. nidulans* ゲノム中には2つのホモログ AN2395 (GfgA) および AN3200 (GfgB) が存在した。大腸菌で発現・精製した GfgA、GfgB 両酵素はいずれも Galf 特異的な Galf-ase であることを明らかにしている。両酵素の基質特異性について調べた結果、GfgA は β -(1, 6)結合の Galfオリゴ糖を、GfgB は β -(1, 5)結合のオリゴ糖を優先的に分解することを見出している。さらに、GfgA、GfgB と相同性の高い *A. fumigatus* の Galf-ase 遺伝子の探索を行った結果、候補1遺伝子(Afu2g14520)が存在した。その酵素活性を調べた結果、Galf-ase 活性は示すが、 α -L-アラビノフラノシダーゼ活性の方が約2倍高いことがわかり、同じ GH2 ファミリーの相同性の高い酵素であっても、すべてが Galf 特異的な Galf-ase ではないことを見出している。

以上、本研究によりこれまで報告のなかった Galf 特異的なエキソ型の β -D-Galf-ase を初めて同定し、その酵素学的諸性質を明らかにしている。これらの研究内容は応用微生物学及び糖鎖工学分野の発展に寄与する価値ある業績と認める。

よって、本研究者は博士(農学)の学位を得る資格を有するものと認める。