

海洋細菌 *Pseudoalteromonas* sp. No. 272 株由来
両基質に活性を有するアルギン酸リアーゼに関する研究

Studies on Extracellular Bifunctional Alginate Lyase from a Marine
Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272.



2002 年 12 月

長崎大学大学院
生産科学研究科

岩本 佳子

目次

第1章 序論	1
第2章 <i>Pseudoalteromonas</i> sp. No. 272 株由来	
菌体外アルギン酸リアーゼの精製と性状	10
緒言	10
第1節 菌同定と酵素の精製	12
実験材料	12
実験方法	12
1. 酵素活性の測定法	12
2. タンパク質量の測定法	12
3. <i>Pseudoalteromonas</i> sp. の培養	12
4. 酵素の精製	13
4.1 DEAE-Cellulofine (陰イオン交換体) を担体としたバッチ法	13
4.2 2nd DEAE-Cellulofine による陰イオン交換クロマトグラフィー	14
4.3 Sephadex G-75 superfine によるゲル濾過	14
5. 電気泳動	14
結果および考察	15
1. 菌の同定	15
2. アルギン酸リアーゼの精製	17
第2節 酵素の一般的性状	21
実験材料	21
実験方法	21
1. 分子量の測定法	21
a) SDS-PAGE による分子量測定法	21
b) ゲル濾過 (Sephadex G-75 superfine) による分子量測定法	21
c) アミノ酸分析による分子量推定	21
2. 等電点電気泳動	21
3. pH 及び温度の影響	22
4. 金属イオンに対する影響	23
5. 基質特異性	23
結果および考察	25
1. 分子量の測定	25
2. 等電点電気泳動	28

3. pH 及び温度の影響	29
4. 金属イオンに対する影響	32
5. 基質特異性.....	33
第3章 酵素タンパク質の構造解析	35
緒言.....	35
第1節 タンパク質化学的手法による一次構造解析.....	36
実験材料.....	36
実験方法	36
1. タンパク質の還元カルボキシメチル化 (RCM 化).....	36
2. RCM 化タンパク質のリジルエンドペプチダーゼ消化と ペプチドの分離.....	36
3. RCM 化タンパク質のエンドプロテイナーゼ Asp-N 消化と ペプチドの分離.....	37
4. RCM 化タンパク質の V8 プロテアーゼ消化とペプチドの分離.....	37
5. 酵素消化ペプチドの酸加水分解とアミノ酸組成分析	38
6. 酵素消化ペプチドのアミノ酸配列分析	38
結果および考察.....	39
1. RCM 化タンパク質のリジルエンドペプチダーゼペプチドマップ および各ペプチドのアミノ酸配列	39
2. RCM 化タンパク質のエンドプロテイナーゼ Asp-N ペプチドマップ および各ペプチドのアミノ酸配列	41
3. RCM 化タンパク質の V8 プロテアーゼペプチドマップ および各ペプチドのアミノ酸配列.....	43
4. Edman 法による一次構造解析	45
第2節 PCR 法による一次構造解析	46
実験材料	46
実験方法	46
1. オリゴヌクレオチド (プライマー、プローブ) のデザイン	46
2. オリゴヌクレオチド (プローブ) の 3' 末端ラベル.....	46
3. PCR 法による目的断片の増幅	47
4. サザンハイブリダイゼーションによる目的 DNA 断片の検出	47
5. 目的断片の回収.....	48
6. プラスミドベクターへのライゲーションと形質転換	48

7. 目的断片を含むプラスミドの抽出と サザンハイブリダイゼーション	48
8. DNA のシーケンシング	48
結果および考察	50
1. PCR 増幅断片の解析	50
2. アルギン酸リアーゼの全一次構造解析	52
第3節 他起源由来アルギン酸リアーゼとの一次構造の比較	54
第4節 円偏光二色性 (CD) による二次構造解析	56
実験方法	56
1. CD スペクトル測定	56
結果および考察	57
1. CD スペクトル	57
第5節 酵素タンパク質の結晶化による三次元構造解析	58
実験方法	58
結果および考察	59
第4章 酵素の活性中心に関する知見	65
緒言	65
第1節 タンパク質の化学修飾	66
緒言	67
実験材料	67
実験方法	67
1. 種々の化学修飾試薬の活性に及ぼす影響	67
2. リジン残基の TNBS による修飾	68
3. チロシン残基の TNM による修飾	68
4. NBS、TNBS、CMC、TNM、BD 不活性化に対する 基質の保護効果	69
結果および考察	70
1. 種々のアミノ酸側鎖化学修飾試薬の活性に及ぼす影響	70
2. リジン残基の TNBS による修飾	72
3. チロシン残基の TNM による修飾	75
4. NBS、TNBS、CMC、TNM、BD 不活性化に対する 基質の保護効果	77
第2節 反応動学的研究	79
緒言	79

実験材料.....	81
実験方法.....	81
1. PG、PM の調製法.....	81
2. 飽和アルギン酸オリゴマーの調製法.....	83
3. 不飽和アルギン酸オリゴマーの調製法.....	83
4. 高分子の基質 (アルギン酸ナトリウム) への作用様式.....	83
5. 反応速度に対する基質の重合度依存性.....	84
6. 各オリゴマーに対する酵素反応速度.....	84
7. 酵素分解産物の HPLC による酵素の作用様式解析.....	85
結果および考察.....	86
1. グルロン酸、マンヌロン酸のポリマー体およびオリゴマーの調製... 86	
2. 高分子の基質 (アルギン酸ナトリウム) への作用様式.....	89
3. 反応速度に対する基質の重合度依存性.....	91
4. 酵素反応速度論的解析.....	92
5. 酵素分解産物の HPLC による酵素の作用様式解析.....	98
6. <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 由来アルギン酸リアーゼと他起源由来 同酵素とのサブサイト構造の比較.....	103
第3節 酵素の活性中心構造.....	105
緒言.....	105
実験材料.....	106
実験方法.....	106
1. 活性中心の数の推定.....	106
2. アルギン酸プロピレングリコールを基質として用いたときの アルギン酸リアーゼ活性について.....	107
3. トリプトファン残基の固有の蛍光に基づく酵素と基質の相互作用... 107	
結果および考察.....	109
1. 活性中心の数の推定.....	109
2. アルギン酸プロピレングリコールを基質として用いたときの アルギン酸リアーゼ活性.....	111
3. トリプトファン残基の固有の蛍光に基づく酵素と基質の相互作用... 115	
 第5章 アルギン酸酵素分解産物の生理活性について.....	 118
緒言.....	118
第1節 アルギン酸オリゴマーの高等植物幼根の成長促進作用.....	120
実験材料.....	120

実験方法.....	120
1. ニンジンの種子の滅菌.....	120
2. ニンジンの種子の播種と成長試験.....	120
3. イネの種子の滅菌.....	121
4. イネの種子の成長試験.....	121
結果および考察.....	122
1. ニンジン、イネの成長促進効果.....	122
2. G オリゴマー効果の濃度依存性について.....	125
3. G オリゴマー効果の重合度依存性について.....	125
第2節 アルギン酸オリゴマーの癌細胞増殖抑制効果.....	128
実験材料.....	128
実験方法.....	128
1. ヒト末梢血からの白血球 (単球) の分離と mononuclear cells- conditioned medium (MNC-CM) の調製.....	128
2. MNC-CM の U937 細胞に対する細胞毒性.....	129
3. 核の形態変化.....	129
4. Caspase-3 様活性測定.....	129
5. G オリゴマーによって誘導されたサイトカインの 熱安定性と透析による分子量推定.....	130
6. 抗 TNF- α 抗体による毒性中和実験.....	130
結果および考察.....	131
1. 酵素処理、未処理のアルギン酸から調製した MNC-CM の U937 細胞に対する毒性と毒性物質の性状.....	131
2. アルギン酸オリゴマーから調製した MNC-CM の U937 細胞に対する アポトーシスによる核の形態変化と caspase-3 様活性.....	136
3. 抗 TNF- α 抗体による毒性中和実験.....	138
 第6章 総括.....	 140
 文献.....	 146
 謝辞.....	 157