

## 第 6 章 総括

本研究は、これまでに研究例の殆どない PG、PM 両基質に活性を有するアルギン酸リアーゼの構造と機能発現に関する知見を得、それらの詳細を明らかにするために行った。また、基質特異性と高比活性という点で優れている本酵素を用いて、効率良く不飽和オリゴマーを得、アルギン酸酵素分解産物の生理活性を見出すことを目的として本研究を遂行した。

第 1 章「序論」では、アルギン酸の構造、各種起源由来アルギン酸リアーゼのこれまでに報告されているものの研究例、アルギン酸リアーゼを用いて得られる不飽和オリゴマーの利用について論じ、本研究の目的と意義について述べた。

第 2 章「*Pseudoalteromonas* sp. No. 272 株由来菌体外アルギン酸リアーゼの精製と性状」では、菌の同定、精製法の確立、タンパク質化学的性質について明らかにした。第 1 節「菌同定と酵素の精製」では、菌の同定結果と精製法の検討を記した。長崎県大村湾の海底泥より単離した様々な海洋細菌のアルギン酸リアーゼのスクリーニングを行ったところ、No. 272 株が最も生存性が高く、高活性の酵素を菌体外に産生することがわかった。No. 272 株の同定を日本食品分析センターに依頼したところ、種の確定には至らなかったものの、*Pseudoalteromonas* sp. であると同定された。本菌を Davis の改良培地で大量培養し、培養上清に 80% 飽和になるように硫酸を入れ、塩析により酵素タンパク質を回収した。次にカラムクロマトグラフを行いたかったが、試料が非常に強い粘性があったため、DEAE-Cellulofine A-500 によるバッチ法、同イオン交換体によるクロマトグラフ、Sephadex G-75 superfine によるゲル濾過で電気泳動的にも単一な精製標品を得ることができた。第 2 節「酵素の一般的性状」では、精製酵素を用いて緒性質を明らかにした。分子量の推定を行ったところ、SDS-PAGE では 33.9 k、ゲル濾過では 23 k、アミノ酸組成分析では 35 k であった。等電点は 3.8 とかなりの酸性タンパク質であることが示唆された。本酵素の至適 pH は 6.5~8.0、5~11 で安定であった。また、30 分間の加

熱で 35°C まで安定であった。金属イオンの影響は特に受けず、本酵素を作用させる前後の基質の CD スペクトル変化から PG、PM 両基質に活性を有することが実験的に明らかとなった。

第 3 章「酵素タンパク質の構造解析」では、一次構造から三次構造解析までについて述べた。第 1 節「タンパク質化学的手法による一次構造解析」において、RCM 化本酵素をリジルエンドペプチダーゼ、プロテイナーゼ Asp-N、V8 プロテアーゼ消化により部分一次構造を決定した。しかし、完全に決定するには至らなかった。そこで、第 2 節「PCR 法による一次構造解析」を行った。ネイティブのタンパク質を直接プロテインシーケンサーに供して得られた N 末端アミノ酸配列と Edman 法により得られた C 末端アミノ酸配列からミックスプライマーを依託合成し、本菌ゲノム DNA を鋳型として PCR を行った。その結果、約 700 bp の PCR 産物が得られ、サザンハイブリダイゼーションで目的の塩基配列を含んでいることが分かった。DNA シーケンサーによる塩基配列決定後、第 1 節で求めた部分配列を参考に、本酵素の全一次構造を決定した。本酵素は、233 アミノ酸残基から構成されており、分子量 25549.5 であった。トリプトファン残基は 1 分子中、1 個しか存在しない他、2 個あるシステイン残基は S-S 結合していることが過ギ酸酸化、CM 化本酵素のアミノ酸分析より分かった。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」で、本酵素と既知のアルギン酸リアーゼとの一次構造のホモロジー検索を解析ソフト DNASIS を用いて行った。同じ基質特異性を示す *Pseudoalteromonas elyakovii* IAM 14594 間では 80.3% とかなり高い相同性を示したが、他とは数%しか示さなかった。しかし、コンセンサスシーケンス (Y-F-K-h-G-+Y-Q) が C 末端側に見い出された。各生物種から得られるアルギン酸リアーゼは一次構造上のホモロジーはなく、立体構造上の類似性をもつことが考えられた。第 4 節「円偏光二色性 (CD) による二次構造解析」で本酵素の二次構造を推定した。本酵素は、他の細菌由来同酵素と同様  $\beta$ -構造であり、芳香族アミノ酸の存在環境は他と類似することはなかった。アミノ酸配列のみではなく、本酵素の立体構

造を第 5 節「酵素タンパク質の結晶化による三次元構造解析」で求めた。各種塩で結晶化をマイクロバッチ法で行い、位相決定は、 $K_2PtCl_4$  を用いて重原子同相置換法にて行った。その結果、 $4^\circ C$  にて 0.1 M クエン酸ナトリウム、17.5% トレハロース、30% PEG 8000、0.1 M  $MgSO_4$ 、pH 5.5 において六方晶系 (hexagonal) の単結晶が得られた。格子定数は、 $a=b=46.2 \text{ \AA}$   $c=387.2 \text{ \AA}$   $\alpha=\beta=90^\circ$   $\gamma=120^\circ$ 、空間群は  $P6_122$  非対称単位中に本酵素分子が 1 分子であった。プログラム CNS を用いて位相決定及び精密化を解析したところ、分解能  $2 \text{ \AA}$  で R-factor=19.4%  $R_{free}$ -factor=24.8% であった。本酵素を構成する 233 アミノ酸残基のうち、ゆらぎに基づく N 末端の 5 残基を除くアミノ酸に関して立体配位を構築できた。また、硫酸イオン 1 つとカルシウムイオン 1 つ、水分子約 300 が見られた。二次構造は  $3_{10}$ -helix が 4 つ、 $\alpha$ -helix が 1 つ、 $\beta$ -strand が 14 本から構成されており、二次構造を構成しているアミノ酸の 87% が  $\beta$ -構造であった。この  $\beta$ -構造は 2 層から成り、活性クレフトを形成していた。

第 4 章「酵素の活性中心に関する知見」では、PG、PM 両基質に活性を有する本酵素の活性発現に関わる実験を行った。第 1 節「タンパク質の化学修飾」では、各種化学修飾試薬を用いて本酵素を修飾し、活性の変化から活性に関与するアミノ酸残基を検討した。本酵素は、NBS による酸化で活性が 100% 低下した。よって、酵素分子中 1 つしか存在しないトリプトファン残基が活性に深く関わっていることが強く示唆された。これは、これまでに実験報告のある他起源由来アルギン酸リアーゼと同様の結果であった。X 線結晶構造解析の結果からこの唯一のトリプトファン残基は活性部位を形成すると考えられるクレフト内にあり、活性発現に関わっていることを示唆している。しかし、このトリプトファン残基の側鎖は直接クレフトに面しているのではなくクレフト面に対して外側に配向しているが、基質の接近により配向がシフトするかもしれない。詳細は本酵素と基質の結合状態における X 線結晶構造解析を待たねばならない。この他、TNBS、TNM、CMC、BD でも程度の差はあるものの活性の低下が認められたことから、リジン残基、チロシン残

基、アスパラギン酸残基若しくはグルタミン酸残基、アルギニン残基の活性への関与が推察された。これらのアミノ酸残基は酵素分子中に複数存在することから活性に関与するその数を反応速度論的に求めたところ、リジン残基、チロシン残基がそれぞれ 1 個活性に関与する結果が得られた。これらの結果から、酵素と基質との結合にトリプトファン残基が、触媒反応にチロシン残基やリジン残基が関与するのではないかと現段階では推測している。第 3 章 第 2 節 Fig. 14 の全アミノ酸配列中にみられるコンセンサスシーケンス YFKhG+Y-Q (残基数 180-188) 中には Tyr 180 と Lys 182 が存在し、しかも第 3 章 第 5 節で示した本酵素の立体構造解析結果でも Tyr 180 と Lys 182 の側鎖がクレフト側を向いていることが分かった。更なる詳細な検討は、酵素-基質複合体の X 線結晶構造解析により解明していきたい。基質の保護効果を活性の低下したもので行ったところ、チロシン残基を修飾する TNM のみ効果が見られた。この効果に G と M 間で差はなかった。第 2 節「反応動力学的研究」では、本酵素の活性部位 (サブサイト構造) に関する知見を明らかにした。PG、PM の両基質に活性を有するアルギン酸リアーゼの反応動力学的研究を詳細に行ったのは本実験が初めてである。まず始めに、低分子基質である直鎖飽和オリゴマーを調製した。市販アルギン酸から塩酸加水分解により、PG、PM を得、各ポリマー体を塩酸加水分解し、Bio-Gel P-6 によるゲル濾過により重合度 3~10 の飽和オリゴマーを得た。高分子アルギン酸に本酵素を作用させると溶液の急激な粘度低下が見られ、同時に還元糖が反応時間に対して直線的に遊離された。このことから本酵素はエンド型のアルギン酸リアーゼであることが明らかとなった。次に、低分子であるアルギン酸オリゴマーに対する重合度依存性を調べたところ、本酵素は見かけ上 G よりも M に対しての方が活性が強く、重合度 5 以上を速やかに分解した。しかし、重合度 4 に対しても非常に弱い活性を示した。詳細な知見を得るために短鎖の基質を用いた反応速度論的解析を行った。Michaelis-Menten 型曲線から Line-weaver Burk プロットを得、この式から各種定数を求めた。その結果、本酵素の  $K_m$  は G の方が小さく、 $k_{cat}$  は M の方が大きかった。ゆえに反応効率を示す  $k_{cat}/K_m$  は G の方が大きかった。分子活性

( $k_{cat}=V_{max}/E_0$ ) は重合度 6 以上で一定の値を示した。よって本酵素のサブサイト数は 6 であると示唆された。なお、分解産物の HPLC による解析結果から触媒部位は、サブサイトの中央に位置すると考えられた。第 3 節「酵素の活性中心構造」で本酵素と PG、PM 両基質との相互作用に関する実験を行った。活性中心の数の推定を基質の CD スペクトルより楕円率の時間的変化で求めた。その結果、一つの活性中心で二つの基質を分解するのではないかと考えられた。つぎに、アルギン酸リアーゼ反応には、基質のカルボキシル基が必要であるかどうかを調べる実験を市販アルギン酸プロピレングリコールを精製して行った。その結果、活性が全く見られなかった。また HPLC による酵素-基質複合体の解析を行ったところ、結合そのものが起こっていなかった。よって、酵素が基質に結合する際にはカルボキシル基が必須であることが示唆された。最後に、本酵素分子中に 1 つしか存在しない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について Stern-Volmer の関係式より求めた。その結果、G、M オリゴマーには若干の差はあるものの、基質の重合度が増すにつれて  $K_{sv}$  が減少したが、その差は小さかった。よって、活性に深く関わりとされるトリプトファン残基の側鎖は、基質オリゴマーに大きくマスクされることはなく、消光剤であるアクリルアミドとの接触を許すような位置にあることが推察された。このことは、第 3 章の立体構造解析からトリプトファン残基がクレフトの  $\beta$ -strand にあるものの、側鎖は外側に配向しており、溶媒とは部分的に接触可能な位置にあることからわかる。

第 5 章「アルギン酸酵素分解産物の生理活性について」では、本酵素を用いて得られる不飽和アルギン酸オリゴマーの生理活性について検討した。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」でニンジンとイネを用いて実験を行った。その結果、PG、PM では全く促進効果は認められなかったが、酵素消化によりオリゴマーにすることで、効果が認められた。特に、M オリゴマーよりも G オリゴマーの方がその効果は明らかで、0.75 mg/ml で最大の効果を示した。また重合度依存性を調べたところ、G5 を頂点とした Bell-shape を示した。第 2 節

「アルギン酸オリゴマーの癌細胞増殖抑制効果」で免疫賦活作用を調べた。アルギン酸オリゴマーをヒト末梢血から得た白血球に作用させ、ある種のサイトカイン放出を誘導させた。そのサイトカインを含んだ溶液をヒト骨髓性白血球由来 U937 細胞に作用させ、癌細胞増殖抑制効果について調べた。その結果、PG、PM では全く効果が認められなかったが、酵素消化で得られた G、M オリゴマーでは抑制効果が認められた。この効果は G オリゴマーの方が M オリゴマーよりも強く、濃度依存的であった。また核がアポトーシス様形態変化をし、caspase-3 様活性も認められた。直接 U937 にオリゴマーを作用させても毒性を示さなかった。透析、熱処理よりタンパク質性のリンフォカインであることが示唆された。白血球をさらに精製し、単球で同様の実験を行ったところ毒性を示した。単球から放出されるサイトカインは TNF- $\alpha$  である可能性が高い。そこで、抗 TNF- $\alpha$  抗体を用いて毒性の中和実験を行ったところ、毒性が中和されたことよりアルギン酸オリゴマーの作用によってヒト白血球から TNF- $\alpha$  が放出されたと考えられた。

これらの研究成果は、PG、PM 両基質に活性を有する新規なアルギン酸リアーゼの構造と機能等の関係を初めて詳細に明らかにしたもので、さらに酵素の応用利用について研究を進めたものである。これらの知見は、海洋の生物の生化学的研究分野に大きく貢献できるものと考えられる。