

	リ ス イ
氏 名	李 帥
本籍（国籍）	中華人民共和国
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連論第193号
学位授与年月日	令和6年9月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当論文博士
学位論文題目	細菌の生産するグリコサミノグリカン分解酵素に関する研究 (Research on glycosaminoglycan-degrading enzymes produced by bacteria)
学位審査委員	主査 弘前大学准教授 濱田 茂樹 副査 弘前大学准教授 坂元 君年 副査 山形大学教授 小関 卓也 副査 岩手大学教授 山田 美和 副査 弘前大学名誉教授 吉田 孝

論 文 の 内 容 の 要 旨

動物の軟骨部などの細胞外空間（細胞外マトリックス）には、繊維状タンパク質であるコラーゲンを架橋する様にグリコサミノグリカン（GAG）と呼ばれる酸性多糖類が存在している。GAG はウロン酸（UA）とヘキシサミンからなる二糖が直鎖状に交互に配列した繰り返し構造を有している。構成単位となる二糖のうち、UA ユニットは β -D-グルクロン酸（GlcA）またはその C5 エピマーである α -L-イズロン酸（IdoA）のいずれかであり、アミノ糖は α -D-、または β -D-グルコサミン（GlcN）、或いは N-アセチル- β -D-ガラクトサミン（GalNAc）のいずれかである。それぞれの単糖には 0 から 2 残基の硫酸基が結合し、糖鎖の多様性を高めている。GAG はこれらの二糖の構成により、GlcN を含有するヘパラン硫酸（HS）やヘパリン（Hp）、GalNAc を含有するコンドロイチン硫酸（CS）およびデルマトン硫酸（DS）などの異なる GAG ファミリーが生じる。ケラタン硫酸（KS）はウロン酸を含んでおらず、代わりに D-ガラクトースと N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）が交互に連結している。ヒアルロン酸（HA）は GlcNAc と GlcA の繰り返し構造から成り、タンパク質部分を持たない多糖類である。

GAG はグリコシドヒドロラーゼ（EC 3.2.1 群、Glycoside Hydrolase、GH）による加水分解的切断、または多糖類リアーゼ（EC 4.2.2 群、Polysaccharide Lyase；略して PL）による脱離的切断のいずれかによって酵素的に分解される。GAG の分解は動物細胞においては通常、リソソームに局在する加水分解酵素により行われる。エンドサイトーシス作用により細胞内に取り込まれた GAG（あるいはプロテオグリカン）は、エンドソーム内あるいは初期リソソーム内でエ

ンド型加水分解酵素によって分子内切断を受ける。ある程度低分子化されたグリコサミノグリカンは、リソソーム内でさらに加水分解酵素の作用を受けてオリゴ糖となり、その後エキソ型グリコシダーゼの協調的な作用によって非還元末端側から順次加水分解されることが報告されている。

一方、微生物には GAG を分解する脱離酵素 (PL) を産生するものが知られている。微生物がつくる PL は主たる基質となる GAG の種類により、HA lyase (EC 4.2.2.1)、CS AC lyase (EC 4.2.2.5)、CS ABC lyase (EC 4.2.2.20) などに分けられている。タンパク質の一次構造上の相同性に重点を置く CAZY (Carbohydrate-Active Enzymes Database) では、それらはいずれも PL family 8 に属している。

本研究では、青森県内の自然界から GAG を基質とした集積培養により GAG 資化性細菌を分離し、その中から *Paenarthrobacter nicotinovorans* 19-1 株、及び *Paenibacillus yunnanensis* 16-6 株の産生する GAG リアーゼ (それぞれ PnHL、PyHL と称する) について酵素の精製を行い、分子量、最適作用条件及び GAG に対する基質特異性などを明らかにした (従来 *Arthrobacter* 属は *Paenarthrobacter* 属の synonym であり、本論文では後者を採用した)。HA を炭素源とする液体培地で各菌を培養後、遠心分離後の上清液から硫酸沈澱処理、カラムクロマトグラフィーにより酵素を均一に精製した。PnHL と PyHL の分子量は電気泳動的にそれぞれ 70 kDa 及び 74 kDa と求められ、pH5 付近の弱酸性条件下で HA を最もよく分解した。PnHL については HA の他に硫酸化 GAG である CSA、CSC に対しても有意に高い分解活性を示した。LC/MSMS により PnHL のアミノ酸配列分析を行い、その結果を *P. nicotinovorans* 19-1 株全ゲノムデータと照合した結果、PnHL は PL family 8 に属する GAG lyase (HA lyase または CS AC lyase) であると同定された。一方、PyHL は HA を優先的に分解するが CSA や CSC の分解活性が低く、従来の HA lyase に比べて珍しい基質特異性を有していた。HA を基質として PyHL と酵素反応させ、経時的に反応生成物をゲルろ過 HPLC にて分析した結果、ヒアルロン酸 4 糖が主要な最終生成物であると示された。近年、ゲノム解析からの GAG/HA lyase の登録は増加しているが、*Paenibacillus* 属菌の HA lyase の酵素的な性質に関する情報は無く、本研究が新規な報告となった。

論文審査の結果の要旨

グリコサミノグリカン (GAG) は動物軟骨部などの細胞外マトリックスに含まれる酸性多糖類であり、ウロン酸 (UA) とヘキソサミンからなる二糖の繰返し構造を有する。基本的な二糖の構成によりコンドロイチン硫酸 (CS)、デルマトン硫酸 (DS) などの GAG ファミリーが存在する。GAG の多くはタンパク質と結合したプロテオグリカンとして存在するが、ヒアルロン酸 (HA) はタンパク質部分を持たず、GlcNAc と GlcA の繰返し構造から成る多糖類である。一般に GAG は動物細胞では加水分解酵素群により分解されるが、細菌には脱離反応により GAG を分解するリアーゼ (Polysaccharide Lyase; PL) をつくるものが報告されている。本研究では青森県内の自然界から GAG 資化性細菌を分離し、その中から *Paenarthrobacter nicotinovorans* 19-

1株、及び *Paenibacillus yunnanensis* 16-6株の産生する GAG リアーゼ（それぞれ PnHL、PyHL と称する）について精製及び酵素の特性解析を行った。PnHL と PyHL はいずれも弱酸性で最大活性を示し、PnHL は HA を最もよく分解する他に硫酸化 GAG である CSA、CSC に対しても高い分解活性を示した。微生物がつくる PL は HA lyase (EC 4.2.2.1)、CS AC lyase (EC 4.2.2.5)、CS ABC lyase (EC 4.2.2.20) などに分けられるが、*P. nicotinovorans* 19-1 株の全ゲノム解析データをもとに LC/MSMS によるアミノ酸配列分析を行った結果、PnHL は PL family 8 に属する HA lyase または CS AC lyase であると同定された。一方、PyHL は HA を優先的に分解するが CSA や CSC の分解が非常に遅く、従来の GAG リアーゼに比べて珍しい基質特異性を示した。PyHL による HA 分解物を経時的に HPLC にて分析した結果、ヒアルロノ 4 糖が主要な最終生成物であると示された。近年、ゲノム情報からの GAG/HA lyase の登録は増加しているが、*Paenibacillus* 属菌の HA lyase の酵素的な性質に関する情報は無く、本研究が新規な報告となった。

以上より、本審査委員会は「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

Shuai Li*, Xinhui Wang, Yota Tatara, Shigeki Hamada, Takuya Kozeki, Kaoru Kojima, and Takashi Yoshida (2023) Purification and characterization of hyaluronate lyases produced by two types of bacteria. *Agricultural Biotechnology*, **12** (4), 99-104.