

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

岩手大学大学院連合農学研究科

生物資源科学専攻 生物分子機能学連合講座

U3218010 李 帥(LI SHUAI)

目次

第1章 緒言	5
1.1 グリコサミノグリカン(GAG)の分類と機能	8
1.2 ヒアルロン酸(HA)の生物学機能性と作用	10
1.3 ヒアルロニダーゼの分類と機能	12
1.3.1 微生物由来のヒアルロニダーゼの研究について	15
1.3.2 微生物由来のヒアルロニダーゼの機能と応用	16
1.4 研究の目的と意義	18
第2章 <i>Paenarthrobacter</i> 属細菌が産生するグリコサミノグリカン分解酵	
素(PnHL)の精製と性質	22
2.1 緒言	22
2.2 実験材料と試薬	22
2.2.1 試料	22
2.2.2 試薬	23
2.3 実験方法	23
2.3.1 <i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i> 19-1 株の培養	23
2.3.2 酵素の精製	24
2.3.3 活性測定法	26
2.3.4 SDS-PAGE 及び Native-PAGE	27
2.3.6 基質特異性	30
2.3.7 PnHL タンパク質の同定	30
2.3.7.1 ゲルの洗浄	30
2.3.7.2 還元化	31
2.3.7.3 アルキル化	31
2.3.7.4 酵素処理	31
2.3.7.5 Zip-Tip 精製	31
2.3.7.6 LC/MSMS 分析	32
2.4 結果	33
2.4.1 APL の精製	33

2.4.2 分子量の測定	36
2.4.3 最適条件と安定条件	37
2.4.3 PnHL の基質特異性	41
2.4.4 PnHL タンパク質の同定	42
2.5 考察.....	43

第3章 *Paenibacillus yunnanensis* 16-6 株から精製したグリコサミノグリ

カン分解酵素 PyHL の特性分析及び大腸菌における PyHL の遺伝子

発現解析..... 45

3.1 緒言.....	45
3.2 実験材料.....	45
3.2.1 試料.....	45
3.2.2 試薬.....	46
3.3 実験方法	46
3.3.1 培養条件	46
3.3.2 酵素の精製.....	47
3.3.3 限外ろ過.....	48
3.3.4 ポリアクリルアミドゲル電気泳動.....	49
3.3.5 活性測定法.....	49
3.3.6 タンパク質の定量	49
3.3.7 HPLC による生成物の解析	50
3.3.8 PyHL タンパク質のアミノ酸配列分析	50
3.3.9 PyHL 遺伝子のクローニングと配列解析.....	50
3.3.10 組換え PyHL の発現と精製	51
3.3.11 バイオ情報解析.....	52
3.4 結果.....	52
3.4.1 酵素の精製.....	52
3.4.2 分子量の測定	55
3.4.3 最適条件と安定条件	56
3.4.4 酵素の基質特異性.....	57
3.4.5 消化産物について	58
3.4.6 <i>P. yunnanensis</i> のゲノム解読と PyHL 遺伝子の同定	60

3.4.7 PyHL 遺伝子のクローニングと配列解析.....	61
3.4.8 組換え PyHL の精製と活性測定.....	62
3.4.9 バイオインフォマティクス解析.....	63
3.5 考察.....	64
第4章 総合考察.....	68
4.1 研究の概要.....	68
4.2 今後の研究方向.....	71
謝辞.....	73
参考文献.....	74

略語表

PG : proteoglycan
GAG : glycosaminoglycan
GlcA : glucuronic acid
GalNAc : *N*-acetylgalactosamine
GlcNAc : *N*-acetylglucosamine
IdoA : iduronic acid
CS : chondroitin sulfate
DS : dermatan sulfate
HA : hyaluronic acid; Hyaluron; Hyaluronate
PL : polysaccharide lyase
HL : hyaluronate lyase
SDS : sodium dodecyl sulfate
PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis
PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride
EDTA : ethylene diamine tetraacetic acid
TCA : Tri-cellulose Acetate
PVDF : polyvinylidene fluoride

第1章 緒言

プロテオグリカンとはコア蛋白にグリコサミノグリカンが共有結合した高分子であり、細胞外基質成分として組織特有の構造と機能に関与する[1]。その中、グリコサミノグリカン(Glycosaminoglycans, GAGs)は、細胞間基質(Extracellular Matrix, ECM)を構成する重要な高分子多糖類であり、哺乳類の組織に広く存在し、様々な生理的・病的プロセスで重要な役割を果たしている。GAGs は主にウロン酸「グルクロン酸(GlcUA)またはイズロン酸(IdoUA)」とアミノ糖[グルコサミン(GlcN), N-アセチルグルコサミン(GlcNAc), または N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)]からなる二糖がGAGs の構成単位となる[2](図1)。そちらの二糖単位の異なりにより、GAGs はいくつの種類がある、例えば、コンドロイチン硫酸(Chondroitin sulfate, CS)、デルマタン硫酸(Dermatan sulfate, DS)、ヘパリン/ヘパラン硫酸(Heparin/Heparan sulfate, HS)、ヒアルロン酸(Hyaluronic acid, HA) やケラタン硫酸((Keratan sulfate, KS) などである。ECM では、GAGs が複数のタンパク質と相互作用して複雑なネットワーク構造を形成し、細胞を支え保護するだけでなく、細胞のシグナル伝達、細胞増殖や移動、組織修復などに関与している[3]。

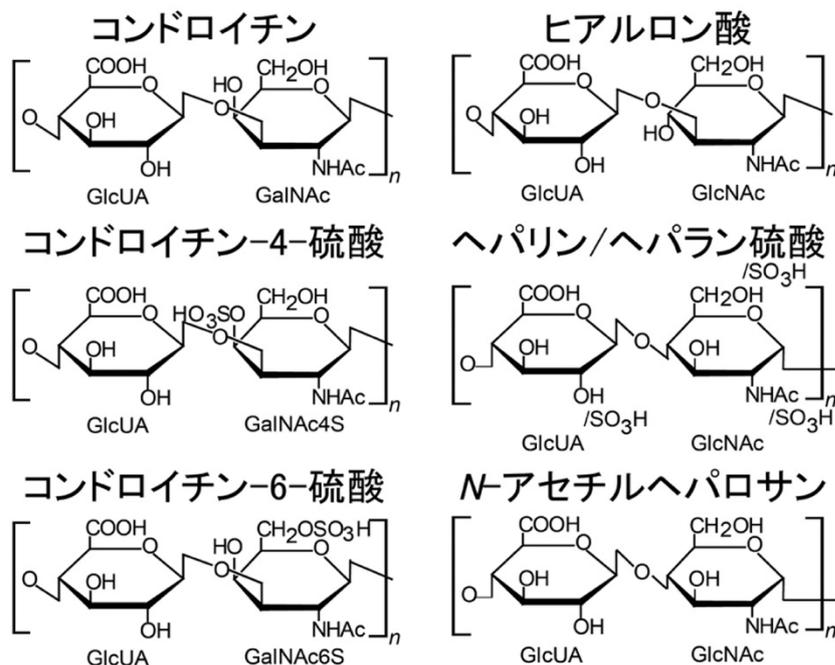


図 1 GAG の構造 GalNAc4S:N-アセチルガラクトサミン-4-硫酸, GalNAc6S:N-アセチルガラクトサミン-6-硫酸.

ヒアルロン酸(HA)は特殊 GAG の一種であり、硫酸を含まず、糖タンパクの形では存在しない。HA は、 β -1,4-グルクロン酸と β -1,3- N-アセチルグルコサミンの二糖単位から繰り返される長鎖の多糖から構成される[4]。他の GAGs とは異なり、HA は数百万ダルトンの高分子量で存在することができる[5]。HA は組織の水分保持、細胞行動の調節、炎症反応や傷の治癒に関与するなど、様々な生理的プロセスで機能している。さらに、HA の蓄積は、腫瘍の進行[6]、関節炎[7]、いくつかの線維症[8]などの様々な病的プロセスと密接に関連している。

HA の多様な生物学的機能と疾患におけるその役割を考慮すると、

HA を分解し修飾する酵素であるヒアルロニダーゼは、医学研究と治療への応用に重要な可能性を秘めている。ヒアルロニダーゼは、その起源により異なる基質特異性と作用機序を持つ異なるクラスに分けられる[9]。特に微生物由来のヒアルロニダーゼは、遺伝子工学による容易な改変と大量生産の可能性から、注目されている研究である。これらの微生物酵素は、特定のサイズと修飾パターンを持つ HA オリゴ糖の生産に使えるだけでなく、例えば薬物送達の促進、組織工学的材料の特性の改善、抗腫瘍および抗炎症療法の一部など、疾患の治療に直接応用できる治療薬としても使える。従って、微生物由来のヒアルロニダーゼの探索、精製および特性解析とバイオ医薬への応用に関する研究は、HA の生物学的機能をより深く理解するために重要であるだけでなく、新しい医療技術と治療アプローチを開発する可能性を提供する。

1.1 グリコサミノグリカン (GAG) の分類と機能

グリコサミノグリカン(GAGs)は、主に哺乳動物の細胞間マトリックスに見られる多糖の主要なクラスであり、コンドロイチン硫酸(CS)、デルマトスタチン硫酸(DS)、ヘパリン/ヘパリン硫酸(HS)、ヒアルロン酸(HA)、ケラチン硫酸(KS)などが含まれる。これらの多糖は、アミノ糖(例えば N-アセチルグ

ルコサミンまたは N-アセチルガラクトサミン)とウロン糖(例えばグルクロン酸またはラムノガラクチュロン酸)からなる二糖の繰り返し単位からなり、硫酸化によって酸性多糖とすることができる。GAG は様々なタンパク質と相互作用し、細胞外マトリックスの複雑なネットワークを形成し、構造的支持を与え、組織の弾力性を維持するだけでなく、水分保持、細胞シグナル伝達、細胞接着などの様々な生理的プロセスに関与している。また、水分保持、細胞シグナル伝達および組織修復のような様々な生理学的プロセスにも関与している。

ユニークな非硫酸化 GAG であるヒアルロン酸(HA)は、組織の水分保持、細胞挙動の制御、および炎症反応において重要な役割を果たすことを可能にする高分子量特性を持つ[10]。HA の生物学的機能により、細胞の移動、増殖および分化のサポートを含む、組織の生理および病理学において重要である。微生物由来のヒアルロニダーゼ(HAase)は、その特異的分解メカニズムと幅広い応用の可能性から、バイオメディカル研究で注目されてきた。HA を効率的に分解し、特定のサイズと修飾パターンの HA オリゴ糖を調製するこれらの酵素は、ドラッグデリバリー、組織工学、抗炎症治療などの分野に新しい戦略とツールを提供する。

1.2 ヒアルロン酸(HA)の生物学機能性と作用

HA は二糖[$\rightarrow 4$)- β -D-GlcA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow)] n の繰り返し構造からなる酸性多糖であり、細胞外マトリックスに広く存在し、軟部結合組織や体液中に一般的に分布している。

ヒアルロン酸(HA)は、脊椎動物の細胞間質に広く存在し、特に皮膚、目、関節などに豊富に含まれている。その分子は交互に配列した N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)とグルクロン酸 (GlcUA)が β -1,4 と β -1,3 のグリコシド結合によって結ばれ、直鎖状の多糖構造を形成しており、HA に高い粘性と弾力性、そして極めて高い保水能力を与えている。これらの物理化学的特性は、HA を理想的な生物学的潤滑剤とするだけでなく、細胞外マトリックスの構造的および機能的安定性を維持する上で、かけがえのない役割を果たすことを可能にしている。HA の生物学的機能は複雑で多様であり、組織の構造的完全性の維持、細胞移動と細胞増殖の制御から創傷治癒への参加や免疫反応の制御に至るまで、広範な生物学的プロセスをカバーしている。組織の水分バランスを維持し、組織の潤滑を提供する上で、HA はユニークなハイドロゲル構造を形成し、効果的に水を固定し、細胞に必要な水分補給環境を提供することができる。創傷修復を促進する上で、HA は線維芽細胞や上皮細胞を含む様々なタイプの

細胞を引きつけ、活性化し、組織の再生と修復を促進することができる [11]。さらに、HA の分解産物は特定の細胞レセプターと相互作用することにより、炎症反応と免疫反応を調節することができ、バイオシグナル分子としての機能を示す。医療とバイオテクノロジーの分野では、HA とその誘導体はそのユニークな生物学的機能と優れた生体適合性のために広く使われている。眼科手術では、HA は眼組織の保護と鮮明な手術視野を維持するための添加剤として使用され、関節炎の治療では、HA 注射は関節機能を改善するために関節液の代用として使用され、皮膚の保湿とアンチエイジングの分野では、HA はスキンケア製品に広く添加され、そして美容医療では、HA フィラーはその充填効果と整形効果で求められてきた。

さらに、HA は薬物送達システムのキャリアーとして研究されており、特定の細胞レセプターへの親和性を利用して、薬物の標的送達と制御放出を達成し、将来の医療治療とバイオエンジニアリングに大きな可能性を示している。HA とその生物学的作用機序の詳細な研究により、再生医療と組織工学への応用が徐々に検討されてきた。組織工学のための足場材料の一部として、HA は細胞の成長と分化を促進するための良好な細胞接着マトリックスを提供するだけでなく、局所微小環境を調節することによ

り組織の修復と再生を促進する。これらの研究結果は、バイオメディカル分野における HA の応用の可能性をさらに広げ、新しい治療戦略とバイオメディカル材料の開発に新しいアイデアと可能性を提供するものである。バイオテクノロジーの発展と HA の生物学的機能の深い理解により、HA とその切断酵素はバイオメディカル分野でさらに重要な役割を果たすことが期待される。

1.3 ヒアルロニダーゼの分類と機能

グリコサミノグリカン分解酵素は、主に動物や微生物が産生する酵素で、高分子のグリコサミノグリカンをオリゴ糖や不飽和二糖に分解する。グリコサミノグリカン分解酵素は、異化基質に対する特異性からヒアルロニダーゼ、コンドロイチナーゼおよびヘパリナーゼに分類できる。動物細胞では、HA、CS および DS の分解は主にグリコシドヒドロラーゼ(GH)によって行われるが、微生物ではこれらの多糖を分解できる脱リン酸化酵素(ポリサッカライドリアーゼ、PL)が存在する。国際生化学分子生物学連合(IUBMB)では、酵素を酵素反応の種類に応じて 4 桁の EC 番号に分類している。従って、微生物が産生する PL は、作用する GAG によってヒアルロナンリアーゼ(EC 4.2.2.1)、コンドロイチン AC リアーゼ(EC 4.2.2.5)、コンドロイ

チン ABC リアーゼ(EC 4.2.2.20)に分類できる。また、タンパク質の一次構造に注目した Carbohydrate-Active Enzymes Database (CAZY)では、これらの酵素はすべて多糖リアーゼ(PL)ファミリー8 に属している。

ヒアルロン酸分解酵素(HAase)は、ヒアルロン酸(HA)の分解に特化した酵素群として、その作用機序により主に加水分解酵素と β -脱離反応によるリアーゼの 2 つの主要なグループに分類される。加水分解酵素、具体的には EC 3.2.1.35 と EC 3.2.1.36 は、特定のグリコシド結合を加水分解することにより HA 分子の鎖を直接切断し、より小さな多糖またはオリゴ糖断片を放出する。このクラスの酵素は、その作用点によって β -1,4 グリコシド結合を標的とするものと、 β -1,3 グリコシド結合を標的とするものに分けられ、それぞれ GlcNAc と GlcUA 間の結合、あるいは GlcUA と次の GlcNAc 間の結合を標的とする。対照的に、脱離酵素である EC4.2.2.1、ヒアルロン酸リアーゼは、HA 鎖を切断するために β -脱離反応を用いるが、このプロセスは水分子の直接関与には頼らず、むしろ特定のグリコシド結合の切断点で不飽和二重結合を形成し、ユニークな化学的性質を持つ不飽和オリゴ糖をもたらす。ヒアルロン酸リアーゼの生物学的供給源は、動物組織と細菌や真菌のような広範な微生物集団を含めて非常に豊富である。動物由来の HAase は主にヒドロラーゼのクラスに属し、これらの酵

素は細胞外マトリックスの再編成、創傷治癒、炎症反応の制御など、動物の様々な生理学的および病理学的プロセスにおいて重要な役割を果たしている。動物由来の HAase は通常高い基質特異性を持ち、その活性と機能は様々な細胞シグナルと生理的条件によって制御されている[12]。

対照的に、微生物由来の HAase はほとんどがリアーゼであり、そのユニークな安定性、高効率、環境条件への幅広い適応性から科学的、工業的に注目されている。微生物由来 HAase は広い pH と温度範囲で安定した活性を維持し、この性質は工業的生産において特に貴重である。特にこれらの酵素は、不飽和 HA オリゴ糖のような特異的構造と機能を持つ HA フラグメントの生産、HA の生物学的役割の研究、および薬剤、医療およびバイオマテリアル開発への応用の可能性において大きな可能性を示している。動物組織から微生物まで、HAase の多様性と複雑性は、生物界におけるこの重要な生体分子であるヒアルロン酸の微細な制御と利用を反映している。異なる供給源から得られるヒアルロン酸切断酵素の分類、その触媒機構、および生体における特異的役割に関する詳細な研究は、生体における HA の生物学的機能を理解する上で極めて重要であるばかりでなく、HA をベースとしたバイオテクノロジー応用、および新薬と治療アプローチの開発に重要な基礎を提供する。分子生物学、生化学および生

物工学技術の急速な発展により、HAase の研究は、生命科学と生物医学におけるその新しい機能と応用を明らかにし続けると期待できる。

1.3.1 微生物由来のヒアルロニダーゼの研究について

ヒアルロニダーゼの研究は、酵素を産生する細菌集団の同定と分離から始まった 20 世紀初頭以来、基礎科学から応用技術へと包括的な発展を遂げてきた。当初、研究はヒアルロニダーゼを産生する細菌を同定することを目的とした伝統的な微生物学的、生化学的手法に頼っており、これは比較的原始的な段階であったが、その後の詳細な研究の基礎を築いた。その後 1950 年代には、技術の進歩が生化学的および微生物学的手法の革新をもたらし、研究者は特に *Streptococcus* 属のような細菌が産生する酵素について、ヒアルロナンリアーゼの精製、活性測定および作用機序に焦点を当て始めた。この時期の研究により、ヒアルロナンリアーゼが分子レベルでどのようにヒアルロン酸分子を認識し、触媒するかが明らかになり、その生化学的性質と作用原理が解明された。ヒアルロン酸リアーゼの特性と作用原理は 21 世紀に入り、分子生物学と遺伝子工学の急速な発展は、ヒアルロナンリアーゼ研究のさらなる深化を大いに促進した。科学者たちは、遺伝子クローニング、発現系構築、タンパク質工学技術を

通して、ヒアルロン酸リアーゼの遺伝子構造とタンパク質配列の解明に成功しただけでなく、遺伝子編集技術を通して、触媒効率、特異性、熱安定性を向上させるなど、これらの酵素の酵素特性を最適化し、ヒアルロン酸リアーゼの工業的、医学的応用の新たな可能性を開拓してきた。応用レベルでは、ヒアルロン酸分解酵素の構造と機能の理解が深まるにつれて、関節炎の治療、薬物送達の促進、眼科手術のための医薬品などの分野での使用、アンチエイジング製品の開発のための化粧品業界での使用、バイオマテリアル分野での重要な成分としての使用など、これらに限定されない、いくつかの分野での応用が実現し、拡大してきた。

これらの応用の実現は、科学研究と産業におけるヒアルロナンリアーゼの偉大な価値を証明するだけでなく、基礎研究から応用開発までの完全な科学的プロセスを示している。全体として、細菌由来 HA リアーゼの研究の歴史は、伝統的な技術から近代的な分子バイオテクノロジーへの歴史であり、そして実用的な応用の発展への歴史であり、専門分野の発展を促進する科学技術の進歩の役割を反映すると同時に、将来の研究と応用の広い展望を指し示している[13]。

1.3.2 微生物由来のヒアルロニダーゼの機能と応用

重要な生体触媒として、ヒアルロニダーゼは医薬、食品および化粧品

の分野で広い応用範囲を持っている。その研究価値は多様性と応用可能性の両方に反映されている。第一に、微生物由来のヒアルロニダーゼは多様である。微生物群集の幅広い分布により、ヒアルロニダーゼの供給源は、細菌、真菌、古細菌などを含むがこれらに限定されない、豊富で多様なものとなる。この多様性は研究者に広範な採掘空間を提供し、新しい酵素種と優良株の発見に役立ち、ヒアルロニダーゼの応用範囲を広げる。異なる微生物源からのヒアルロニダーゼの研究を通して、異なる環境におけるその適応性と生合成のメカニズムが明らかになり、酵素の工業的生産と応用のための理論的指針を与えることができる。第二に、微生物由来のヒアルロニダーゼは幅広い応用が可能である。これらの酵素は生物学分析、医薬品調製、食品加工の分野で重要な応用がある。医薬の分野では、ヒアルロニダーゼは医療用ゼラチン、コンドロイチンおよび他の生体材料の調製に使用でき、これは重要な臨床的意義がある。食品工業では、ヒアルロニダーゼはオリゴ糖の調製に使用でき、食品の味と食感を改善し、製品の付加価値を高める。化粧品分野では、ヒアルロニダーゼは抗シワ、保湿および他の機能性化粧品原料の製造に使用でき、これは広く注目されている。

したがって、微生物由来のヒアルロニダーゼの特性を深く研究すること

は、新しい応用シナリオを開発し、関連産業の発展を促進するのに役立つ。微生物由来のヒアルロニダーゼの発見と特性解析のために、研究者は通常、環境サンプルのスクリーニング、遺伝子のクローニングと発現、酵素学的特性解析を通してそれらを探索する。酵素の単離と精製、触媒活性と基質特異性の決定、そして生合成経路の研究により、我々はヒアルロニダーゼの構造と機能についての洞察を得ることができ、工業的生産と応用における最適化のための理論的基礎を提供することができる。さらに、分子生物学、タンパク質工学およびその他の技術によるヒアルロニダーゼの修飾と最適化は、その適用性と経済性を向上させる重要な方法である [14]。

1.4 研究の目的と意義

近年、バイオテクノロジーの急速な発展に伴い、細菌由来のグリコサミノグリカン分解酵素は、バイオ医薬品の分野で幅広い応用の可能性を示している。例えば、グリコサミノグリカン分解酵素による基質の特異的な分解を利用して、バイオ医薬品における多糖類医薬品の合成や修飾に応用し、医薬品の効果や安定性を向上させることができる。一方、細菌のグリコサミノグリカン分解酵素の特異的な基質結合特性と組み合わせることで、バ

イオセンサーや酵素センサーの調製にも利用でき、センサーの感度と精度を向上させることができる。

さらに、細菌由来のグリコサミノグリカン分解酵素は、環境分野への応用が期待されている。例えば、細菌のグリコサミノグリカン分解酵素を用いたグリコサミノグリカン廃棄物の分解は、廃棄物の効率的な分解と資源の利用を達成し、環境汚染を低減することができる。一方、グリコサミノグリカンの加水分解生成物は、グリコサミノグリカン分解酵素によってバイオ燃料やバイオマスエネルギーの生産にさらに利用することもできる[15]。結論として、細菌由来のグリコサミノグリカン分解酵素の関連特性と応用可能性を研究することは、細菌株の代謝特性を深く理解し、バイオテクノロジー応用の新たな道を発見するために、非常に重要である。専門知識の深化とバイオテクノロジー分野の急速な発展により、細菌由来グリコサミノグリカン分解酵素の研究展望はさらに広がることを期待されている。

細菌由来のグリコサミノグリカン分解酵素の研究は、新規バイオマテリアル開発のための知見を提供することもできる。グリコサミノグリカンは重要な生体高分子であるため、その加水分解生成物は天然の生体適合性と生理活性を有し、生物医学材料や生物分解性材料などの分野で利用することができる。したがって、細菌由来のグリコサミノグリカン分解酵素の研

究は、新規バイオマテリアルの開発にとって重要である[16]。また、抗菌薬の使用や薬剤耐性菌の増加に伴い、細菌感染症への対応と予防が重要となっている。細菌由来のグリコサミノグリカン切断酵素を研究することにより、新規抗菌薬の設計・開発に理論的根拠を与えることが可能となり、抗菌薬耐性菌問題への対応が可能となる。このことは、公衆衛生と人々の健康を維持するために重要である。

結論として、細菌由来グリコサミノグリカン分解酵素の研究は、重要な生物学的意義、応用価値および社会的意義を有しており、生命科学および生物医学分野における現在の研究ホットスポットの一つである。細菌由来グリコサミノグリカンリアーゼの構造、機能、応用および関連メカニズムの詳細な研究を通じて、細菌の生存および病原メカニズムの詳細な理解、ならびにバイオテクノロジーおよび生物医学分野の発展に重要な貢献をすることができる。

動物由来のヒアルロニダーゼは、薬物の拡散と吸収を促進するために臨床的に使用されているが、動物組織からのヒアルロニダーゼ抽出の製造法はコストが高く、大規模な調製は困難である。対照的に微生物由来のヒアルロニダーゼは、抽出源の心配がなく、実績のある異種遺伝子発現技術を組み込んでいるため、応用研究が進んでいる。細菌ヒアルロニダーゼ

の発見以来、いくつかの微生物がヒアルロニダーゼを生産することが知られている。しかしながら、これらの微生物が産生する酵素活性と収率は通常低く、分解産物も十分に定義されていない。これらの因子は、酵素法を用いたヒアルロン酸オリゴ糖の調製における技術的限界となっており、今後取り組む必要がある[17]。

我々の研究室では、青森県周辺の自然界からグリコサミノグリカン (GAG) を分解できる菌株をスクリーニングし、*Paennarthrobacter nicotinovorans* 19-1 株と *Paenibacillus yunnanensis* 16-6 株と命名した。本論文では *P. nicotinovorans* 19-1 株、及び *P. yunnanensis* 16-6 株の生産する2種類の GAG リアーゼ(それぞれ PnHL、PyHL と称する)の精製と酵素的性質の分析、さらに後者については大腸菌宿主による遺伝子発現について報告する。

第2章 *Paenarthrobacter* 属細菌が産生するグリコサミノグリカン分解酵素 (PnHL) の精製と性質

2.1 緒言

本研究の目的は、微生物由来のグリコサミノグリカンリアーゼの精製と酵素的性質を調べることである。まず、自然界からグリコサミノグリカンを分解できる細菌株をスクリーニングし、この細菌が産生するグリコサミノグリカンリアーゼを一連の精製工程を経て精製することに成功した[18]。本研究では、*Paenarthrobacter* 属の細菌が産生する酵素 (PnHL) を用いて精製と特性分析を行った。

2.2 実験材料と試薬

2.2.1 試料

本菌は青森県十和田湖水より分離され、16S rRNA 解析により *Paenarthrobacter nicotinovorans* と同定された(川村未鳩、2019年度弘前大学農学生命科学部卒業研究)。この菌は当初、*Arthrobacter nicotinovorans* と呼ばれたが、その後 *Arthrobacter* 属は *Paenarthrobacter* 属の synonym である事がわかり、以後、本論文では *Paenarthrobacter nicotinovorans* と称する。

P. nicotinovorans 19-1 株について single colony isolation を繰り返して純化した後、全ゲノム解析を行った (Macrogen Japan Corp.)

2.2.2 試薬

・プロテオグリカン (PG): (サケ由来、分子量約 100 万) はグライコスモ研究所の児島薫氏から寄贈していただいたものを使用した。

・ヒアルロン酸 (HA): ヒアルロン酸ナトリウム鶏冠由来 Lot No: DPP3327
和光純薬株式会社

・コンドロイチン硫酸 A (CSA): Bovine Trachea 由来 Lot No: B27594 メルク株式会社

・コンドロイチン硫酸 C (CSC): Lot No: PKK7665 和光純薬株式会社

・デルマトン硫酸 (DS): Lot No: QWMYC-GJ 東京化成工業株式会社

・Extract Yeast Dried : Lot No.M9A2647 ナカライテスク株式会社

・Toyopearl HW55F: 東ソー株式会社

・ポリペプトン、酵母エキス (Lot No : M9A2647) : 和光純薬工業

2.3 実験方法

2.3.1 *Paenarthrobacter nicotinovorans* 19-1 株の培養

<PG 寒天培地>

サケ由来プロテオグリカン(PG)粉末を終濃度 0.1%、ポリペプトンを終濃度 0.6%、Yeast Extract を終濃度 0.02%を取り、寒天を加え 1.5%とした。滅菌蒸留水(DW) 100 ml に溶解し、pH 7.0 に調整した後、均一的にプレートに入れる。*P. nicotinovorans* 19-1 株を PG 寒天培地に接種し、27°Cで 48 時間を静置培養を行った。

<PG 液体培地(ポリペプトン含有)>

サケ由来プロテオグリカン(PG)粉末を終濃度 0.1%、ポリペプトンを終濃度 0.6%、Yeast Extract を終濃度 0.02%となるように、滅菌蒸留水(DW) 100 ml に溶解し、pH 7.0 に調整した。これを 10 ml ずつ分注した後、オートクレーブ(120°C、15 min)で滅菌した。前培養は 27°Cで 48 時間、135 rpm で振とう培養を行った。その後、上記の処方で 500 ml の PG 液体培地を作り、前培養した懸濁液(菌培養液)を全部入れ、27°Cで 48 時間、135 rpm で振とう培養を行った。

2.3.2 酵素の精製

PG 液体培地(ポリペプトン含有)を 48 時間、27°Cで培養した液を遠心分離し、沈殿(菌体)は捨て、上清液(500 ml)に 75%飽和になるよう硫酸を加えてスターラーで攪拌(4°C、一晚)し、遠心分離(8000 rpm、15 min、

4°C)した。上清液は捨て、沈殿は 10 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) 7.0 ml に溶かし、粗酵素液とした。

粗酵素を 0.1 M NaCl を含む 10 mM 酢酸バッファー (pH6.0) で平衡化した Toyopearl HW 55 Fine カラム (r=1.25 cm, l=97 cm, V=476 ml) にアプライした後、同バッファーで溶出し、溶出液をフラクションコレクターで回収した。フラクションの一部は、タンパク質量の定量や酵素活性試験、SDS-PAGE に用いた。全ての精製操作は 4°C で行なった。回収した酵素液を次のステップに使った。

10 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) 200 ml で DEAE Toyopearl 650M (r=1.2 cm, l=5 cm, V=22.6 ml) を洗浄した。酵素液をアプライした後、同バッファー (pH 6.0) で洗浄した。酵素アプライ時のカラム非吸着液、バッファーによる洗浄液をまとめて非吸着画分としてビーカーに回収し、限外ろ過にて濃縮した。その後、0~0.3 M NaCl グラジエントを含む 10 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) にて吸着タンパク質を溶出した。NaCl グラジエントによる溶出液はフラクションコレクターで試験管(フラクション)に回収した。非吸着画分および溶出・回収したフラクションについてタンパク質定量や酵素活性試験などに供した。全ての精製工程は 4°C の条件で行った。

回収した酵素液は限外ろ過にて濃縮した。手順は下記のように行った。

<マクロセップによる限外ろ過>

遠心濾過ユニット (Macrosep® Advance Centrifugal Devices 30 K : Pall Corporation) を用いた。専用のファルコンチューブに限外ろ過膜をセットし、初めに 10 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) 8 ml を加えて 4°C、4000×g、20 min で遠心分離して洗浄した。次にバッファーを捨ててサンプルを 7 ml 加え、同様に遠心分離した。膜上に残ったサンプルを濃縮液として回収した。

<ナノセップによる限外ろ過>

遠心濾過ユニット (Nanosep® Advance Centrifugal Devices 30 K: Pall Corporation) 専用のファルコンチューブに限外ろ過膜をセットし、DEAE 後の濃縮液 0.2 ml を加えて 4°C、4000×g、20 min で遠心分離して洗浄した。膜上に残ったサンプルを濃縮液として回収した。

2.3.3 活性測定法

0.5 M 酢酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) を 100 μ l、0.1% PG を 100 μ l、DW を 700 μ l、酵素液を 100 μ l をそれぞれ試験管に加え、試験管ミキサーにて混合した。30°C で一定の時間インキュベート後、1 M NaOH を 0.5

ml 加えて反応停止した[19]。酵素反応により生成した不飽和二糖を吸光度計(波長 232 nm)により測定した[20]。

酵素活性の 1 単位(U)は、基質を脱離的に切断して1分当たり不飽和二重結合 1 μmol 相当の UV 吸収物質を生成するために必要な酵素量と定義した。1 mmol の吸収係数 5.5 をすべての計算に用いた。

2.3.4 SDS-PAGE 及び Native-PAGE

- ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)は Laemli の方法に従って行った[21]。

ゲルの組成は下記のように作られた。

➤ 分離ゲル

30% アクリルアミド	3.3 ml
DW	1.5 ml
0.75 M Tris-HCl バッファー (pH 8.8)	5.0 ml
10% SDS	100 μl
<i>N, N, N', N'</i> -テトラメチルエチレンジアミン	8 μl
ペルオキシニ硫酸アンモニウム	薬さじ小 1 杯

➤ 濃縮ゲル

30% アクリルアミド	0.38 ml
Dw	1.45 ml
0.25 M Tris-HCl バッファー (pH 6.8)	1.88 ml
10% SDS	37.5 μ l
<i>N, N, N', N'</i> -テトラメチルエチレンジアミン	5 μ l
ペルオキソニ硫酸アンモニウム	薬さじ小 1/4 杯

<CBB 染色液>

クマシーブリリアントブルー	0.5 g
エタノール	10 ml
酢酸	15 ml

Dw で 200 ml にメスアップした。

<4×サンプルバッファー>

0.25 M Tris-buffer	25 ml
スクロース	10 g
ブロムフェノールブルー	4 mg

<サンプル調製法>

酵素液を限外ろ過膜(Nanosep 30 K)で遠心濃縮した後、回収液 10 μ l

に 4×サンプルバッファー 5 μ l、10% SDS 5 μ l を加え、5 分煮沸し室温で冷却してからゲルにアプライした。

● Native-PAGE

未変性ポリアクリルアミド電気泳動 (Native-PAGE) はゲル、バッファー等に SDS を含めない系にて行った。

< サンプル調製法 >

酵素液を限外ろ過膜 (Nanosep 30 K) で遠心濃縮した後、回収液 10 μ l に 4 × サンプルバッファー 5 μ l、泳動バッファー 5 μ l を加えてからゲルにアプライした。

2.3.5 タンパク質の定量 (Bradford 法)

Bradford 法によりタンパク質定量を行った[22]。Bradford 試薬 1 ml と酵素液 100 μ l 混合後、5～30 分以内に 595 nm の吸光度を測定した。

< Bradford 試薬 >

クマシーブリリアントブルー G-250	100 mg
エタノール	50 ml
85% リン酸	100 ml

DW で 1 L にメスアップしてろ過(ろ紙 No. 2)後、褐色ビンで保存した。

2.3.6 基質特異性

HA、CSA、CSC、DS の 0.1%水溶液を基質溶液としてそれぞれ作成した[23]。各基質溶液 100 μ l に PnHL 酵素液 50 μ l を加えてインキュベート(30°C, 30 min)を行った。酵素反応後、UV232 nm で吸光度を測定した。また、0 time control として酵素液 100 μ l を 5 min 煮沸し、そこから 50 μ l をとり 0.1% PG 水溶液 100 μ l に加え同様の手順で吸光度を測定した。

2.3.7 PnHL タンパク質の同定

10%アクリルアミド分離ゲルにて Native-PAGE を行い、蛍光染色液 (Oriole fluorescence Gel Stain、Bio-Rad 社) 50 ml にて染色した。タンパク質のバンドをゲルから切り出し、後の分析に使用した。

2.3.7.1 ゲルの洗浄

ゲル断片は 25 mM NH_4HCO_3 /50% Acetonitrile (ACN) を 100 μ l を加えてインキュベート(30 min、室温)を行った。反応後溶液を取り除き、これを 3 回繰り返した。A CN を 100 μ l でゲルを 5 min 脱水後、遠心乾固を行った。

2.3.7.2. 還元化

10 mM Dithiothreitol (DTT) 30 μ l を加えてインキュベート(30 min、室温)を行った。

2.3.7.3. アルキル化

DTT 溶液を取り除き、55 mM Iodoacetamide (IAA) 30 μ l を加えてインキュベート(45 min、室温、遮光)を行った。IAA 溶液を取り除き、25 mM NH_4HCO_3 (pH 8.0) 100 μ l 加え攪拌してインキュベート(10 min、室温)した。反応後溶液を取り除き、ACN 100 μ l でゲルを 5 min 脱水後、遠心乾固を行った。

2.3.7.4. 酵素処理

0.1 mg/ml トリプシン溶液 25 μ l を加えてインキュベート(4 °C、10 min)を行った。トリプシン溶液を取り除き、25 mM NH_4HCO_3 (pH 8.0) 30 μ l を加えてインキュベート(37°C、一晩)後、5% Trifluoroacetic acid (TFA) を 0.5 μ l 加えて遠心分離(1500 rpm、10 min)して反応停止した。

2.3.7.5. Zip-Tip 精製

•A 液: 50% ACN

•B 液:1% TFA

Zip-Tip は 200 μ L のピペットチップに C18 樹脂が充填されたものである (Merck Millipore Corporation)。

Zip-Tip を用い、A 液による吸引・排出を三回繰り返した (湿潤化)。

Zip-Tip に対し、B 液による吸引・排出を三回繰り返した (平衡化)。

Zip-Tip に対し、酵素反応液による吸引・排出を三回繰り返した (吸着)。

Zip-Tip に対し、A 液による吸引・排出を三回繰り返した。溶出したものを新しいチューブに回収し、遠心乾固した (約 2 時間)。

2.3.7.6. LC/MSMS 分析

精製サンプルは 0.1% ギ酸 20 μ l に溶かし、うち 5 μ l をバイアルに移した。LC の条件は A 液:0.1% ギ酸、B 液:0.1% ギ酸 + ACN として行った。サンプル 2 μ l をアプライして分析 (45°C、135 min) を行った。LC/MSMS 装置は AB Sciex 社の TripleTOF6600 で、Q-TOF タイプの質量分析装置を用いた。

得られた個々のアミノ酸シグナルから、19-1 株のゲノム情報データベースを参照しながら、目的のタンパク質のアミノ酸配列を決定することができる。*P. nicotinovorans* 19-1 株のゲノム配列の分析は MacroGen Corp. に依

頼した。このようにして、実験的に精製されたタンパク質が既知のタンパク質と一致するかどうかを判定し、APL タンパク質を同定することができる [23]。

2.4 結果

2.4.1 APL の精製

PG 液体培地 (Yeast Nitrogen Base w/o Amino 含有) で *Paenarthrobacter nicotinovorans* を 27°C で 48 時間培養し、遠心分離後の培養上清について硫酸沈殿処理を行った。沈殿は 0.1 M NaCl を含む 10 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) 2.0 ml に溶かし、粗酵素液 7.0 ml を得た。粗酵素液を 0.1 M NaCl を含む 10 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) で平衡した後、Toyopearl HW 55Fine カラムに注入し、カラムクロマトグラフィーにて溶出した (図 2A)。溶出液のうち Fraction No.23~32 (約 50 ml) において酵素活性が検出された。活性画分を回収し限外濾過 (MacroSep 30 K) を行った。濃縮した酵素液を 10 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) で平衡化済の DEAE Toyopearl 650 M カラムに注入し、次いで 10 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) によりカラムを洗浄した (サンプルアプライからここまでを非吸着画分としてまとめて回収した)。カラムに吸着したタンパク質は、0~0.3 M

NaCl の濃度勾配により溶出した。非吸着画分および吸着・溶出画分について活性測定を行った結果、吸着画分に酵素活性は無く、非吸着画分に PG 分解活性が検出された(図 2B)。非吸着画分を集めて限外ろ過にて濃縮し、ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)に供したところ単一バンドが示されたので精製酵素(PnHL)とした。PnHL の精製について、表1に示した。

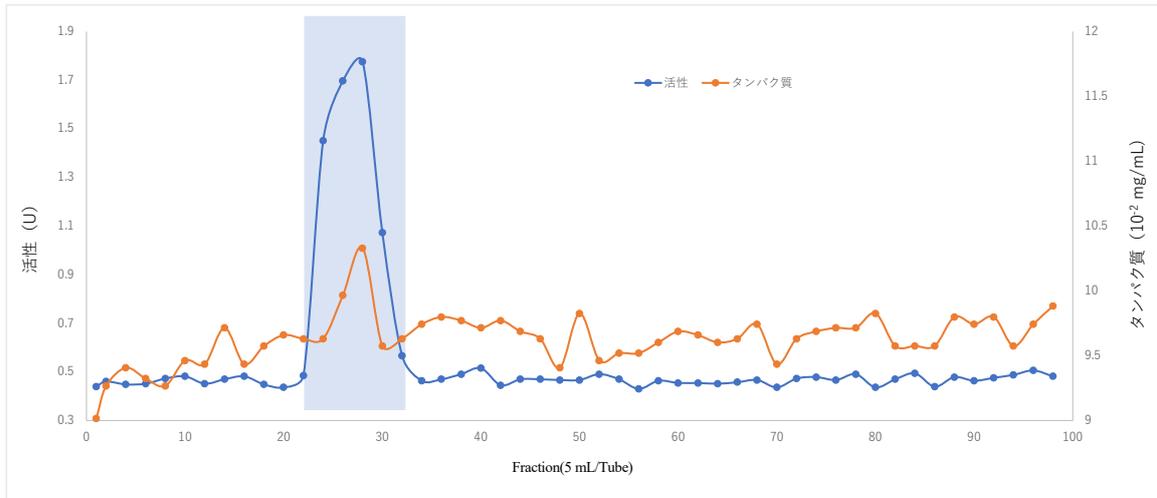


図 2A. PnHL の Toyopearl HW 55F カラムクロマトグラフィー

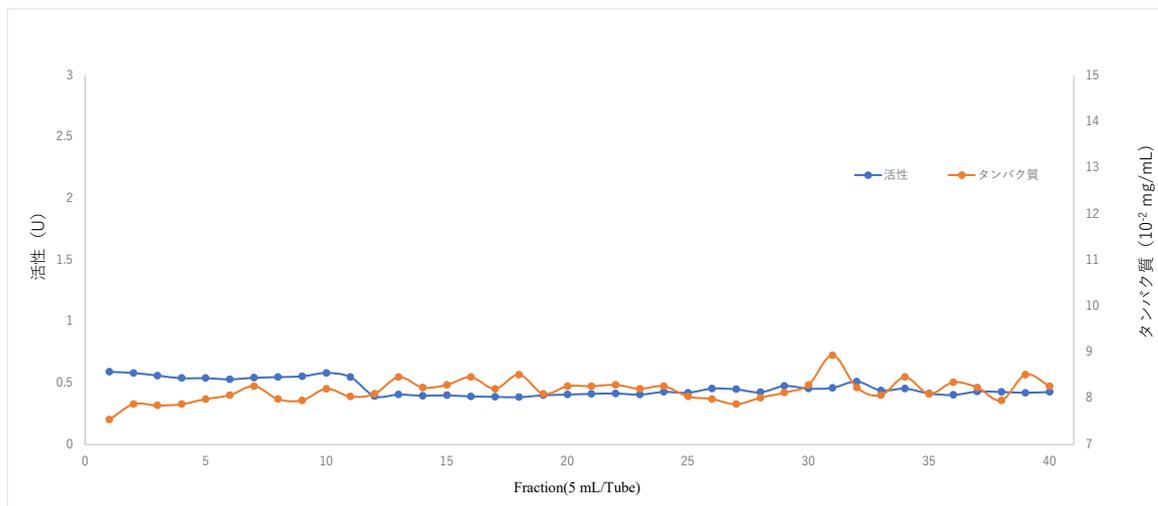


図 2B. DEAE Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィー (吸着画分のみ)

表 1. PnHL の精製表

	全量 (ml)	総タンパク質 (mg)	総活性 (U)	比活性 (U/mg)	収率 (%)	精製率
粗酵素	9.5	2.84	406.77	143.48	100	1
Toyopearl HW 55 Fine	10	1.83	179.09	97.72	44.03	0.68
DEAE Toyopearl 650M	8	1.16	144.00	123.68	35.40	0.86

最終的な収率は 35.4%で、精製率は 0.86 倍となった。

2.4.2 分子量の測定

PnHL について SDS-PAGE を行ったところ、分子量約 70 kDa の位置にシングルバンドが示された(図 3)。

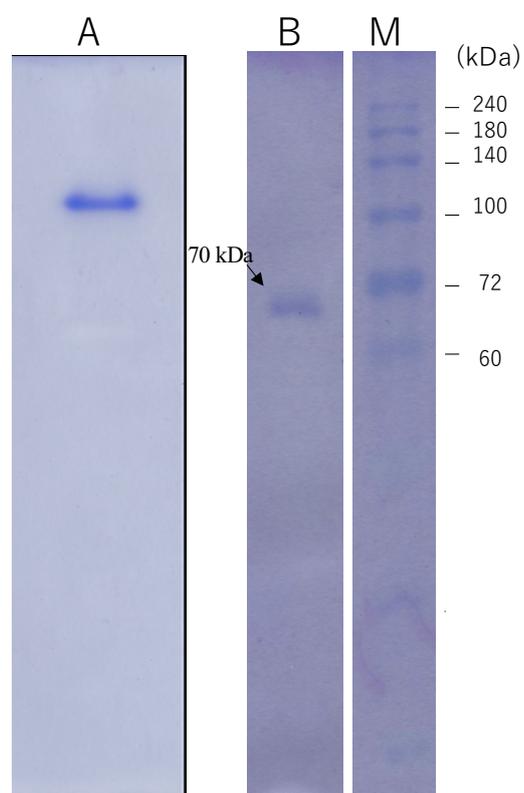


図 3. PnHL の Native-PAGE と SDS-PAGE について

A: PnHL の Native-PAGE

B: PnHL の SDS-PAGE

M: マーカー

染色: CBB

2.4.3 最適条件と安定条件

PnHL の酵素活性に対する pH と温度の影響について、プロテオグリカン (PG) を基質として解析した。酵素の最適 pH は、pH 5.0 であり、最適温度は 35°C であった (図 4&5)。また、酵素の安定 pH は 5.0-7.0 であり、酵素は 40 °C まで安定であった (図 6&7)。50°C 以上の温度では、酵素の失活が観察された。

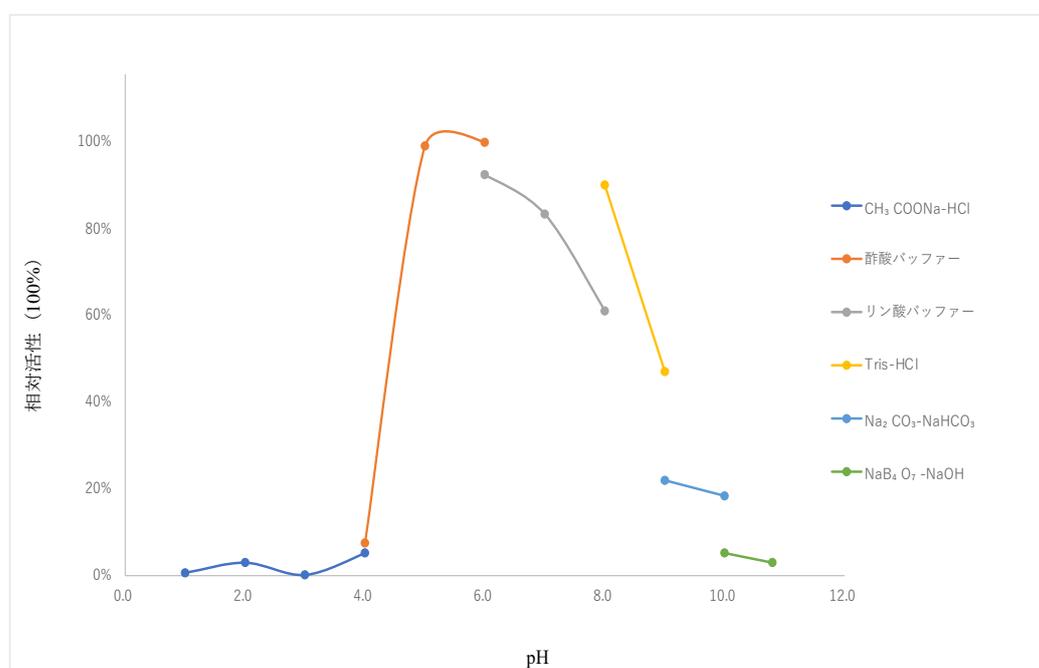


図 4. PnHL の最適 pH の測定

0.1% PG 水溶液 100 μ l、0.2 M バッファー (pH 1.0~12.0) 100 μ l、酵素液 50 μ l、Dw 750 μ l を含む反応液を 30°C で 30 min インキュベート後、1 M NaOH 0.5 ml を加えて反応停止し、OD 232 nm を測定した。酵素活性は最も高い測定値を 100% とした相対活性で示す[25]。

使用したバッファー: CH₃COONa-HCl (pH 1.0-4.0)、酢酸バッファー (pH 4.0-6.0)、リン酸 (pH 6.0-8.0)、Tris-HCl (pH 8.0-9.0)、Na₂CO₃-NaHCO₃ (pH 9.0-10.0)、Na₂B₄O₇-NaOH (pH 10.0-11.0)。

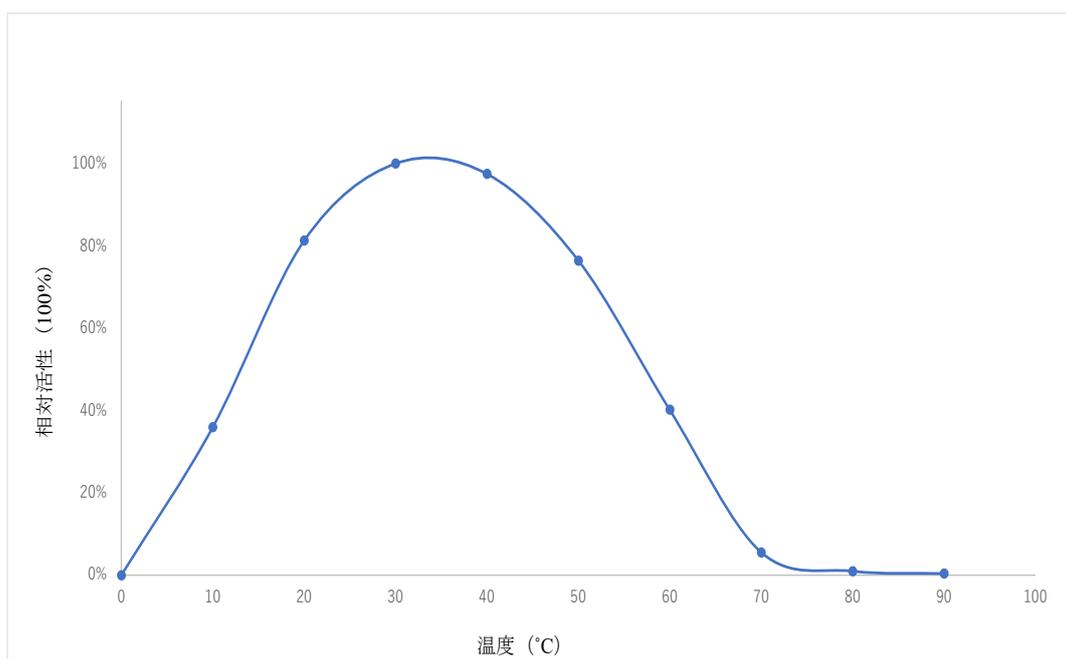


図 5. PnHL の最適温度の測定

0.1% PG 水溶液 100 μ l、0.2 M 酢酸-酢酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) 100 μ l、酵素液 50 μ l、Dw 750 μ l を含む反応液を各温度 (10~70°C) にて 30 min インキュベートした後、1 M NaOH 0.5 ml を加えて反応停止し、OD 232 nm を測定した。酵素活性は最も高い測定値を 100%とした相対活性で示す。

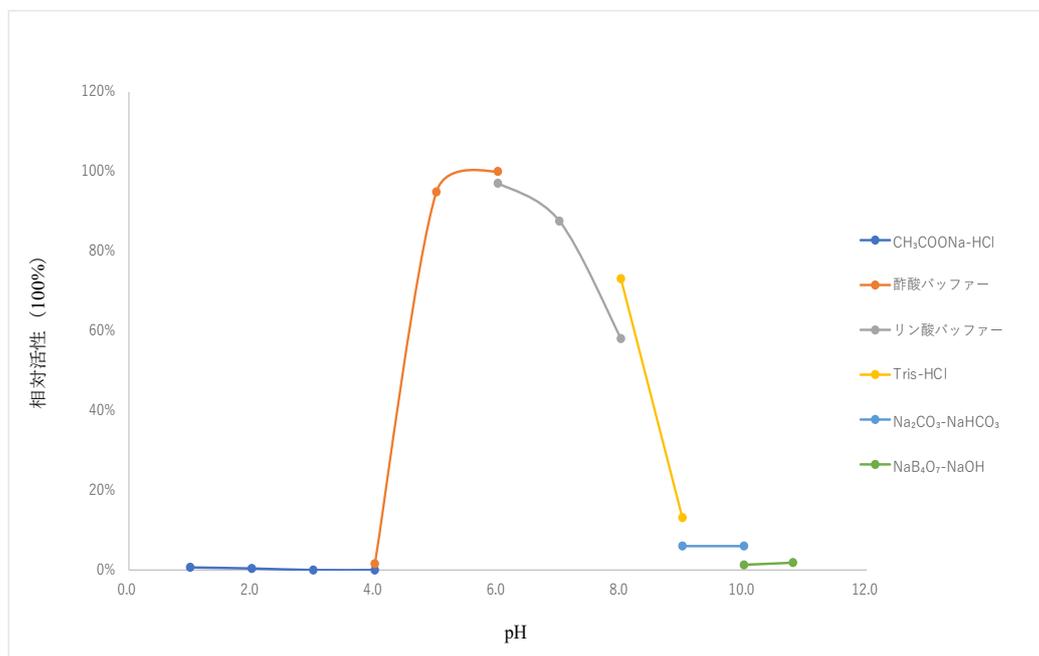


図 6. PnHL の安定 pH の測定

酵素液 80 μ l に各 0.2 M バッファー (pH 1.0~12.0) 80 μ l を加えプレインキュベート (40°C, 1 h)した。0.1% PG 水溶液 100 μ l、0.2 M 酢酸-酢酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) 100 μ l、各 pH 酵素液 50 μ l、Dw 750 μ l を含む反応液を 30°Cで 1 h インキュベート後、1 M NaOH 0.5 ml 加えて反応停止し、A 232 nm を測定した。酵素活性は最も高い測定値を 100%とした相対活性で示す。

使用したバッファー: CH₃COONa-HCl (pH 1.0-4.0)、酢酸バッファー (pH 4.0-6.0)、リン酸 (pH 6.0-8.0)、Tris-HCl (pH 8.0-9.0)、Na₂CO₃-NaHCO₃ (pH 9.0-10.0)、Na₂B₄O₇-NaOH (pH 10.0-11.0)。

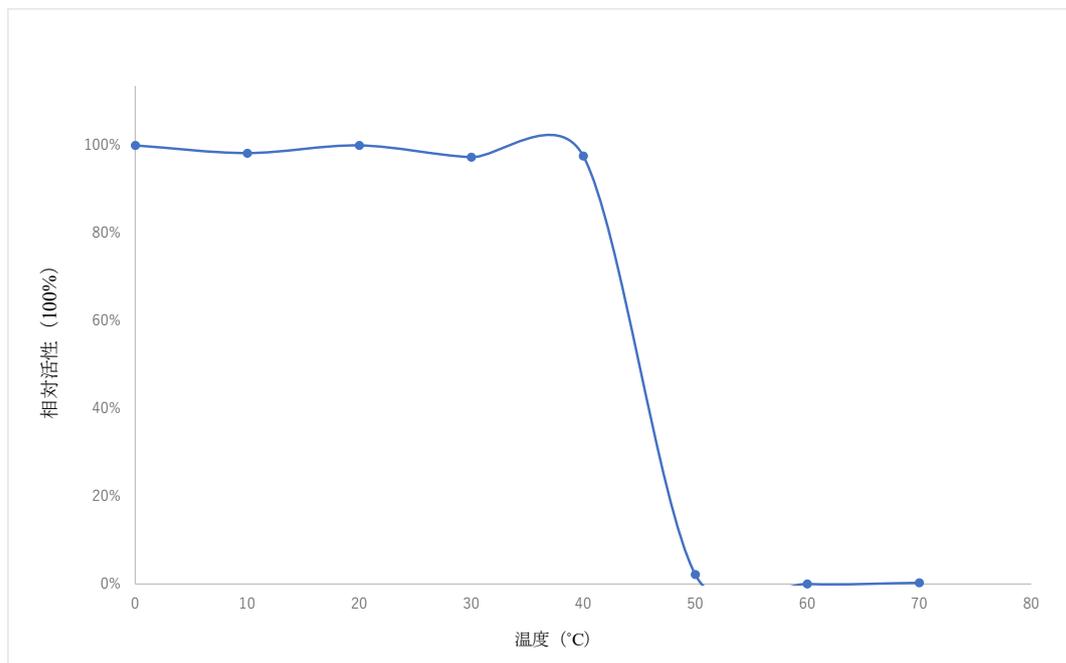


図 7. PnHL の安定温度の測定

初めに酵素液 110 μl を含む 1.5 ml チューブを各温度(10~70°C)で 30 min プレインキュベートした。0.1% PG 水溶液 100 μl 、0.2 M 酢酸-酢酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) 100 μl 、各温度酵素液 50 μl 、Dw 750 μl を含む反応液を 30°Cで 1 h をインキュベート後、1 M NaOH 0.5 ml 加えて反応停止し、OD 232 nm を測定した。酵素活性は最も高い測定値を 100%とした相対活性で示す。

2.4.3 PnHL の基質特異性

PnHL の基質特異性について、いくつかの GAG 基質を用いて解析した(図 8)。

GAG に対する基質特異性を調べたところ、PnHL は HA に対する分解活性が最も大きく、次いで CSC、CSA も分解したが、DS に対しては作用しなかった。

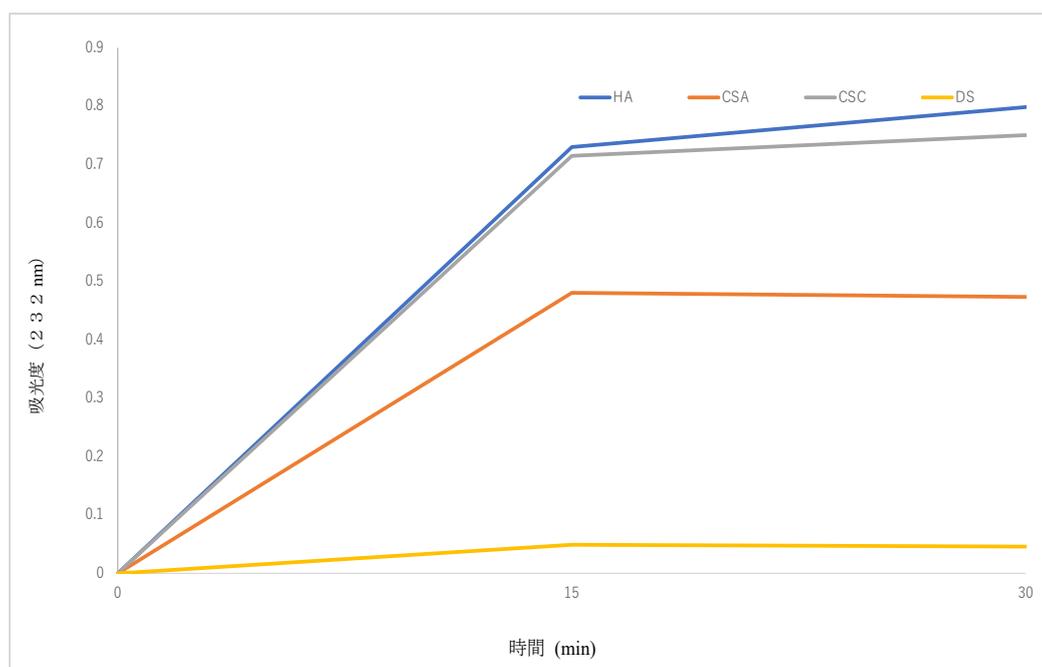


図 8 PnHL の基質特異性の測定

0.5 M 酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.0) 100 μ l、0.1% HA 100 μ l、Dw 750 μ l、酵素液 50 μ l を含む反応液を 30°C で 0、15、30、45、60 min をインキュベート後、1 M NaOH 0.5 ml で反応停止し、OD 232 nm を測定した。0.1% CSA、0.1% CSC、0.1% DS、0.1% PG の各基質については加熱失活した酵素液を加えたものを作成し、ブランクとして測定した。

2.4.4 PnHL タンパク質の同定

PnHL について SDSPAGE 後にポリアクリルアミドゲルから酵素タンパク質を回収し、LC/MSMS によってアミノ酸配列分析を行った。同定されたアミノ酸を 19-1 株のゲノムデータに合わせて配列化し、得られたタンパク質を BLAST により相同性検索した(図 9)。その結果、PnHL は *Paenarthrobacter nicotinovorans* polysaccharide lyase family 8 protein (hyaluronate lyase) と非常に高い相同性を持つことが明らかになった。

```
LSLQFPRRTLLQGAGALSLAAVVSSMFAQNAWAEAEPGAAEFAALRNRWVDQITGRN
VIQAGDPDFAKAITSLNNKAADSLAKLNTSSGRTSVFTDLSLAKDAEMVTTYTRLSQLA
TAWATPTAAVFGDAAVLAAIKAGLADANTLCYNDRKEEVGNWWSWEIGVPRALADA
MVLHAELSAAERTAYCAAIDHFVPDPWLQFPPKRGKITSVGANRVDLCQGIIRSLAG
EDPAKLNHAVAGLSQVWQYVTSGDGIFRDGSFIQHSTTPYTGSYGVLLTGLSKLFSL
GGTAFEVSDPTRSIFDAVEGSFAPVMINGAMADAVRGRSISREANTGYDLGASAIEAIL
LLARAMDPATAARWRGLCAGWISRNTYRPILNSASVPRTALVKELQATGVAPVAEATG
HKLFPAMDRTMHRGPGWALSLSMSSNRIAWYECGNGENNRGYHTGSGMTYFYTSDL
GQYDDAFWATANYNRLPGTTVDTMPLPKVEGEWGAAVPANEWSGATTLGEVAAV
GQHLVGPGRTMTGLTARTMKSWFVSGDVTTMCLGADISTASGARTMVETIVDHRNLHQGSNTLT
TAAGTIAGTAGTVEVLGDGRWVHLEGFGGYAMLDDSPHLVLRTMRETRSGSWSGVNINGS
ATVQQRNFATIIYVDHGVGPVAGSYAYMVAPGASVDLTMTRKLLQGTMNKYRTMVIRNDTTAQS
VEFKTMTAKTTAATFWKPGMAGDLGASGPACVTMFSRHGNELSLAVSEPTQKAAGLTLTL
PEGTWSSVLEGAGTLGTDADGRSTLTLDTTGLSGQTKLIKTMLRR
```

図 9 PnHL のアミノ酸配列分析

LC/MSMS 分析により同定されたアミノ酸を緑色で示す。信頼度がやや低いものを黄色、赤色で示す。

2.5 考察

19-1 株の産生する酵素 (PnHL) を菌の培養上清からカラムクロマトグラフィーにより精製することに成功した。19-1 株の産生する酵素 (PnHL) は pH 6.0、30°C で最大活性を示し、電気泳動 (SDS-PAGE) にて 70 kDa のタンパク質バンドを示した。GAG に対する基質特異性を調べたところ、PnHL は HA に対する分解活性が最も大きく、次いで CSC、CSA も分解したが、DS に対しては作用しなかった。PnHL について LC/MSMS によってアミノ酸配列分析を行い、その結果を 19-1 株の全ゲノム解析データと照合した。その結果、95% の信頼性で同定されたアミノ酸は 377 残基であり、PnHL タンパク質配列の 82.9% を占めていた。相同性解析により同定されたタンパク質は *Paenarthrobacter nicotinovorans* polysaccharide lyase family 8 protein (hyaluronate lyase、WP_189076633.1) と高い相同性を示した[24]。PnHL は基質特異性において HA に対して最も高い分解活性を示すことから hyaluronate lyase (EC 4.2.2.1) に分類されると考えられる[25]。しかし CSC、CSA の分解活性も相当に高いことから chondroitin AC lyase (EC 4.2.2.5) に含める議論も完全には消去できない。よって本論文では敢えてグリコサミノグリカン分解酵素と称することにした。

グリコサミノグリカン分解酵素の 1 つであるヒアルロニダーゼは、近年、

関節の治療・病態改善を目的として製薬業界や臨床医学での使用が注目されており、バイオテクノロジー研究でこれから重要な役割を果たすと思われる[26][27][28]。関節部に多い PG であるアグリカンは CSA と CSC に富むため、それらに対して高い分解活性を示す PnHL は、関節部のヘルニア治療・改善を目的とした酵素療法に適していると言える。その他に、低分子ヒアルロン酸オリゴ糖の生物活性は天然高分子ヒアルロン酸よりも優れているという情報もあり、ヒアルロニダーゼはヒアルロン酸オリゴ糖を調製するための主要なツールになると考えられる。自然界からさまざまな特性の新しいグリコサミノグリカン分解酵素を発見し、その機能と特性をより深く理解することは、基礎研究のみならず応用的な視点からも重要な事であると思われる。

本研究では細菌の生産するグリコサミノグリカン分解酵素を精製し、酵素的な性質を明らかにする事ができたが、酵素の構造についてはまだ不明のままとなっている。これら様々なグリコサミノグリカンに作用する酵素の基質認識の差を明らかにするには、遺伝子クローニングならびにその発現系を構築し、活性中心近傍のアミノ酸残基を置換するなどの、タンパク質工学的なアプローチが今後の展開に望まれる。

第3章 *Paenibacillus yunnanensis* 16-6 株から精製したグリコサミノグリカン分解酵素 PyHL の特性分析及び大腸菌における PyHL の遺伝子発現解析

3.1 緒言

当研究室ではこれまでに青森県周辺の陸水界から GAG 分解細菌のスクリーニングを行い、*Paenibacillus yunnanensis* 16-6 株を分離した。今までに様々な微生物から GAG lyase が報告されており[29]、*Arthrobacter* 属菌からは *A. aurescens* を始めとして幾つかの酵素の性質が報告されている。一方、*Bacillus* 属菌からの報告は少なく[30]、さらに近縁である *Paenibacillus* 属菌から酵素として報告された例は未だにない。

本論文では PyHL について、酵素の精製、諸性質の解析を行い、さらに消化産物の分析、大腸菌における PyHL の遺伝子発現解析を行った。それらの結果について報告する。

3.2 実験材料

3.2.1 試料

津軽国定公園「十二湖」鶏頭場ノ池からサンプリングした淡水を

メンブレンフィルターにて濾過後、フィルター上の菌を PG 含有液体培地にて集積培養した。さらに PG 寒天培地にて単一コロニーになるまで継代培養を繰り返した。この菌株（16-6 株）は弘前大学農学生命科学部殿内暁夫教授らによる 16S rRNA 系統解析により、*Paenibacillus yunnanensis* と同定された。

3.2.2 試薬

Toyopearl HW55F は東ソー株式会社から購入した。ポリペプトン、酵母エキス（Lot No : M9A2647）は和光純薬工業から購入した。プロテオグリカン（PG:サケ由来、分子量 約 100 万）はグライコスモ研究所の児島薫氏から寄贈いただいた。

3.3 実験方法

3.3.1 培養条件

HA 液体培地

HA	(終濃度 0.1%)
Yeast Nitrogen Base (w/o) Amino Acid	(終濃度 0.67%)
Yeast Extract	(終濃度 0.02%)

上記通りに各々の成分を滅菌蒸留水 (Dw) 100 ml に溶解し、pH7.0 に調整した後、オートクレーブ (120°C、15 min) で滅菌した。滅菌後の培地に *Paenibacillus yunnanensis* 16-6 株の単一コロニーを植菌し、それらを 27°C で 48 時間振盪培養 (135 rpm) した。培養した後の培養液の濁度を OD 600 nm にて測定した。

3.3.2 酵素の精製

3.3.2.1 硫酸沈殿

HA 液体培地で培養した培養液を遠心分離して得た上清液 (1000 ml) に 70% 飽和となるように硫酸を加、スターラーで攪拌 (4°C、一晚) した。その後、遠心分離 (8000 rpm, 20 min, 4°C) を行い、沈殿を得た。6 ml の 0.1 M NaCl を含む 10 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) に沈殿を溶かし、粗酵素液とした。

3.3.2.2 ゲル濾過カラムクロマトグラフィー

カラム: Toyopearl HW55 Fine カラム (r=0.9 cm, l=85 cm, V= 216 mL)

溶出バッファー: 10 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) + 0.1 M NaCl

操作手順: 全ての精製工程は 4°C の条件で行った。0.1 M NaCl を含む

10 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) でカラムを平衡化した。粗酵素液をアプライした後、同バッファー (pH 6.0) で溶出し、溶出液をフラクションコレクターで回収した。回収したフラクションの一部は、タンパク質定量や酵素活性試験、SDS-PAGE に用いた。

3.3.2.3 陰イオンカラムクロマトグラフィー

カラム: DEAE Toyopearl 650M (r=1.2 cm, l=5 cm, V=22.6 ml)

溶出バッファー: 10 mM 酢酸バッファー (pH 6.0), 0→0.3 M NaCl

操作手順: 全ての精製工程は 4°C の条件で行った。10 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) 200 ml でカラムを洗浄した。粗酵素液をカラムにアプライした後、同バッファー (pH 6.0) で洗浄した。次に 0~0.3 M NaCl グラジエントを含む 10 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) にて溶出し、溶出液をフラクションコレクターで回収した。回収したフラクションの一部は、タンパク質定量や酵素活性試験、SDS-PAGE に用いた。

3.3.3 限外ろ過

< 限外ろ過膜 (100 K) >

遠心濾過ユニット (Nanosep 100 K Omega 24/pk : Pall Corporation) を用いた。専用のファルコンチューブに限外ろ過膜をセットし、初めに Dw 1.5 ml

を加えて 4°C、4000×g、20 min で遠心分離して洗浄した。次に Dw を捨てた後サンプルを 1.5 ml 加え、同様に遠心分離した。膜上に残ったサンプルを濃縮液として回収した。

< 限外ろ過膜(100 K) >

遠心濾過ユニット(Macrosep® Advance Centrifugal Devices 100 K : Pall Corporation) 専用のファルコンチューブに限外ろ過膜をセットし、初めに Dw 15 ml を加えて 4°C、4000×g、20 min で遠心分離して洗浄した。次に Dw を捨てた後サンプルを 15 ml 加え、同様に遠心分離した。膜上に残ったサンプルを濃縮液として回収した。

3.3.4 ポリアクリルアミドゲル電気泳動

第二章の実験方法 2.3.4 を参照。

3.3.5 活性測定法

第二章の実験方法 2.3.3 を参照。0.1% PG は 0.1% HA に差し替えた。

3.3.6 タンパク質の定量

第二章の実験方法 2.3.5 を参照。

3.3.7 HPLC による生成物の解析

0.01%の HA、0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) および酵素からなる反応混合液を 30°C で 30 分から 12 時間インキュベートした。HA のサイズの変化は、TOSOH TSK-gel G5000PWXL カラム (東ソー株式会社、日本) を用い、0.2M NaCl 溶液 (0.5 ml/min) 中でゲルろ過 HPLC により分析した。流出液は示差屈折検出器 (Model RID-10A, Shimazu Co.) にてモニターした。

3.3.8 PyHL タンパク質のアミノ酸配列分析

P. yunnanensis 16-6 株のゲノム配列分析は、Macrogen Corp. に依頼した。PyHL タンパク質を SDS-PAGE から回収し、リシルエンドペプチダーゼ (トリプシン) で処理した。PyHL の内部アミノ酸配列は MALDI-TOF MS (Triple TOF 6600 Plus System, AB Sciex Co.) にて分析した。

3.3.9 PyHL 遺伝子のクローニングと配列解析

P. yunnanensis 16-6 株のゲノム配列をもとに、Nde I および Xho I 制限部位を含むプライマー (フォワード/リバース) Py-03 (ATCATATGACGATGAAGAAAAAACTG) および Py-04

(CCCTCGAGTTTATTCAACAGACGATA) を設計・合成した。 *P. yunnanensis* のゲノム DNA を鋳型として標的遺伝子を増幅し、プラスミド pET-21a にライゲーションした。組換えプラスミドの塩基配列は、マクロジェン・ジャパン株式会社(日本、京都)で決定した。PyHL のアミノ酸配列は ExPASy の translate ツールで行い、類似性は Clustal W で行った。タンパク質の理論分子量と等電点は ExPASy サーバーの Compute pI/Mw ツールで推定した。

3.3.10 組換え PyHL の発現と精製

組換えプラスミドを大腸菌 BL21 (DE3)に形質転換し、アンピシリン(200 µg/ml)を添加した LB 中で 37°C培養した。OD600 が 0.4-0.6 になった時点で、組換え株を 1 mM IPTG で誘導し、組換え PyHL を 25°Cで 24 時間発現させた。

遠心分離で細胞を回収し、超音波処理で破碎した。上清を遠心分離して粗酵素液とし、Ni-セファロースアフィニティーカラムを用いて目的タンパク質を精製した。カラムから溶出した組換え PyHL は、抗 His タグ抗体を用いたイムノブロットイングにより検出した。発現タンパク質の酵素活性は、0.05 M 酢酸バッファー (pH 5.0) 中 0.01%(w/v)の HA 90 µl に組換え PyHL

10 μ l を加え、30°Cで一晩反応させた。10 μ l の 0.1% Biopraxe (Nagase Chemtex Co., Japan)を加え、さらに 150 分間インキュベートした後、その少量を酢酸セルロース電気泳動で展開した。

3.3.11 バイオ情報解析

分子量(MW)、等電点(pI)の予測は、ExPaSy (<http://www.expasy.org>)を用いて行った。

3.4 結果

3.4.1 酵素の精製

HA 液体培地(Yeast N Base w/o a.a 含)で *P. yunnanensis* 16-6 株を培養し、遠心分離後の培養上清について硫酸沈殿処理を行った、沈殿は 0.1 M NaCl を含む 10 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) 2.0 ml で溶かし、粗酵素液 2.0 ml を得た。粗酵素液を 0.1 M NaCl を含む 10 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) で平衡した Toyopearl HW 55Fine カラム (V=216 ml) に注入し、カラムクロマトグラフィーを行った (図 10)。溶出液のうち Fraction No.18~22 (約 25 ml) において酵素活性が検出された。活性画分を回収し、限外濾過 (MacroSep 30 K) により濃縮した。濃

縮液を 10 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) で平衡化した DEAE Toyopearl 650 M カラム (V=22.6 ml) に注入し、カラムクロマトグラフィーを開始した。まず、10 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) により洗浄画分を回収した後、吸着したタンパク質は、0~0.3 M NaCl の濃度勾配により溶出した (図 11)。得られた Fraction No.28~32 に HA 分解活性が検出された。活性画分 (各 Fr 28~32、酵素液 Fr.28,Fr.30,Fr.32) を回収し、精製酵素とした。

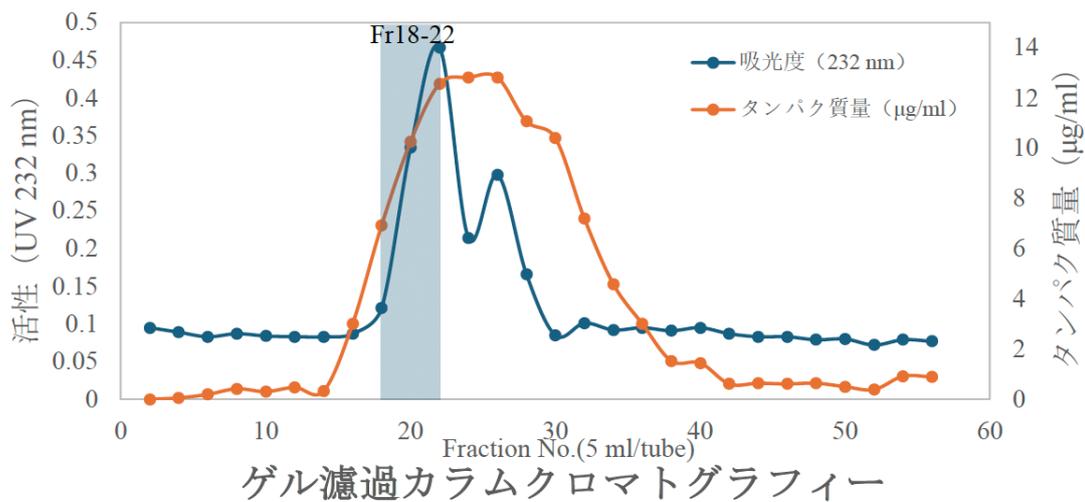


図 10. Toyopearl HW 55F カラムを用いた PyHL のゲル濾過クロマトグラフィー

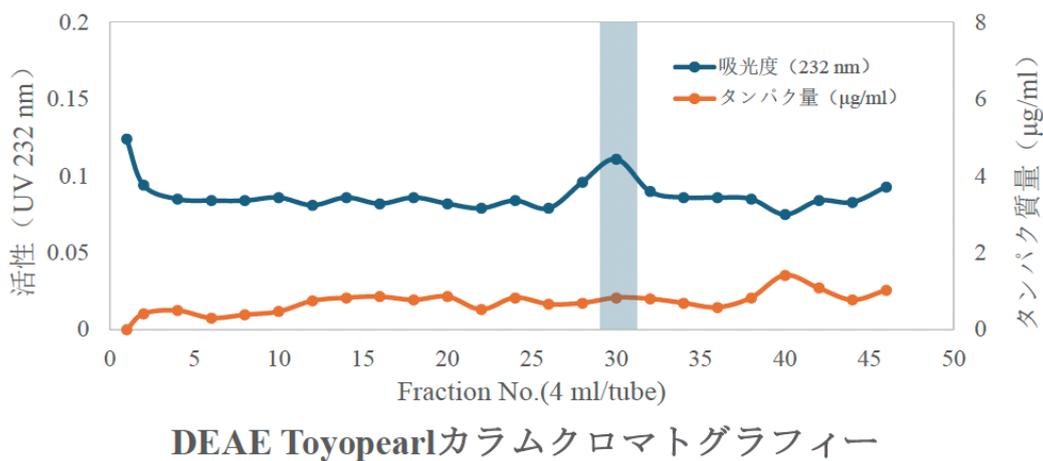


図 11. DEAE Toyopearl 650M カラムを用いた PyHL の陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

3.4.2 分子量の測定

Fr.30 の試料についてポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ったところ、分子量約 74 kDa の位置にシングルバンドが示された (図 12)。

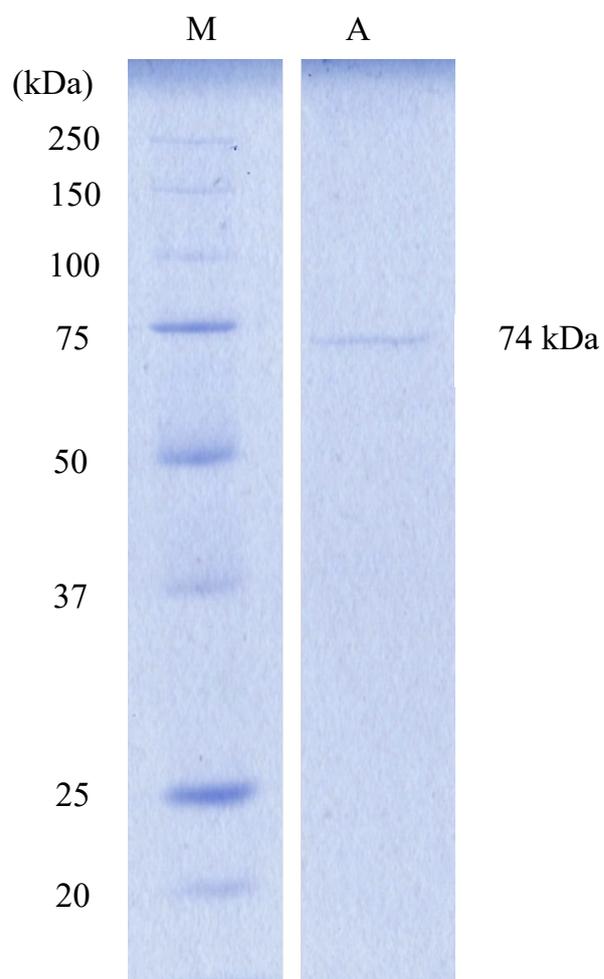


図 12. *Peanibacillus yunnanensis* が産生するヒアルロン酸リアーゼの SDS-PAGE

M: マーカー

A: 精製した PyHL

染色: CBB

3.4.3 最適条件と安定条件

P. yunnanensis から精製した酵素 PyHL の活性に対する pH と温度の影響について、ヒアルロン酸 (HA) を基質として解析した。酵素の最適 pH は、pH 5.0 であり、最適温度は 35°C であった (Fig.13a&13b.)。また、酵素の安定 pH は 5.0-7.0 であり、酵素は 45°C まで安定であった (Fig.13c&13d.)。50°C 以上の温度では、酵素の失活が観察された。

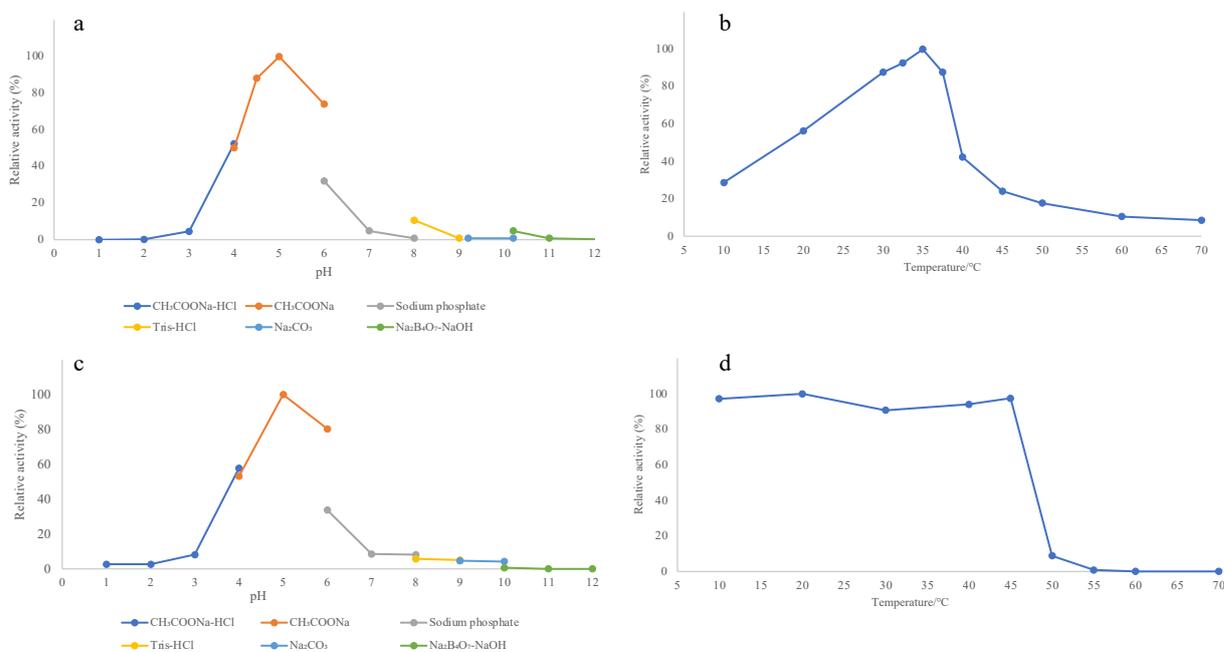


図 13. PyHL の活性と安定性に対する pH と温度の影響

a) ヒアルロン酸リアーゼ活性に対する pH の影響。c) ヒアルロン酸リアーゼの pH 安定性。様々な pH の緩衝液で 30°C、30 分間インキュベートした後、30°C の酢酸バッファ一中 (0.5 M、pH 5.0) で残存活性を測定した。b) ヒアルロン酸リアーゼ活性に対する温度の影響。d) ヒアルロン酸リアーゼの安定性に対する温度の影響。

3.4.4 酵素の基質特異性

PyHL の基質特異性について、いくつかの GAG 基質を用いて解析した (図 14)。PyHL はヒアルロン酸に対する分解活性が最も高く、コンドロイチン硫酸 A と C も少し分解したが、デルマトン硫酸は分解しなかった。

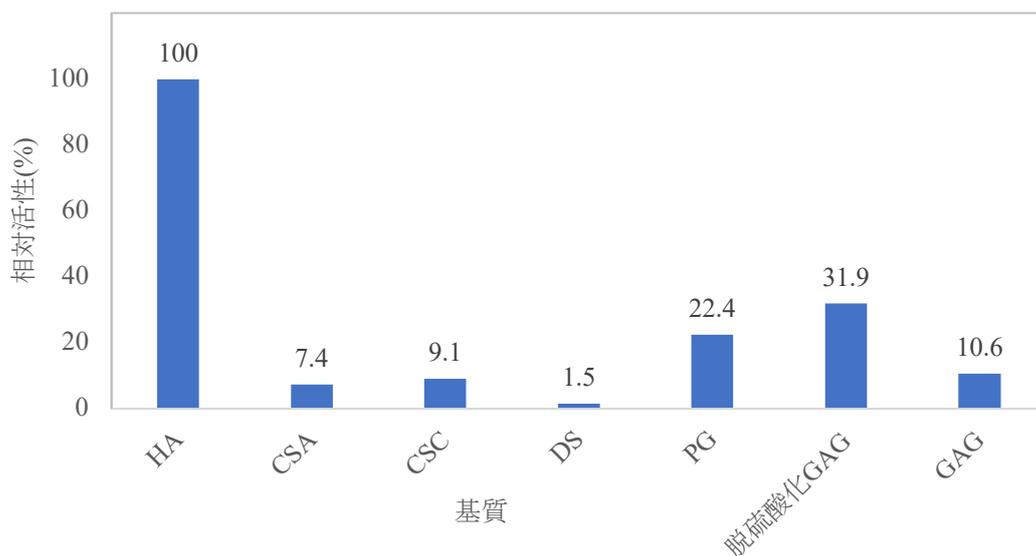


図 14. 様々な GAG に対する PyHL の基質特異性

0.5 M 酢酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) 100 μ l、0.1% HA 100 μ l、Dw 750 μ l、酵素液 50 μ l を含む反応液を 30°C で 30 min をインキュベート後、1 M NaOH 0.5 ml で反応停止し、OD 232 nm を測定した。0.1% CSA、0.1% CSC、0.1% DS、0.1% PG、0.1% GAG、0.1% 脱硫酸化 GAG の各基質については加熱失活した酵素液を加えたものを作成し、ブランクとして測定した。

3.4.5 消化産物について

反応混合物をゲルろ過 HPLC にて分析した。溶出液は不飽和バンドに特異的な 232 nm でモニターした。ヒアルロン酸オリゴ糖を基質として用いた時の生成物の変化を経時的にモニターしたところ、十糖と四糖は検出されたが、二糖は検出されなかった(図 15)。

細菌のヒアルロン酸リアーゼはその基質特異性によって 3 つのタイプの酵素に分けられる。*Streptomyces hyalurolyticus* のヒアルロン酸リアーゼは HA に厳密に特異的であるが、*Streptococcus dysgalactiae* の HL は C4S と C6S に少し活性を示す[33, 34]。*Arthrobacter* のヒアルロン酸リアーゼは CS を分解し、その割合は HA に対する活性のほぼ 3 分の 1 である[35]。この背景から、PyHL は *Streptococcus* ヒアルロン酸リアーゼと同様の特異性を持つと考えられた。

研究では、ヒアルロン酸オリゴ糖には、血管新生の促進[36]、免疫調節、抗腫瘍[37] など、医学の分野で重要な応用の可能性があることが示されている[38]。PyHL で HA を消化した生成物を HPLC で分析した結果により、最終生成物は 4 糖、10 糖であると推定された。PyHL は酵素生産菌と酵素の作用特性の点から非常に珍しい酵素だと考えられる。

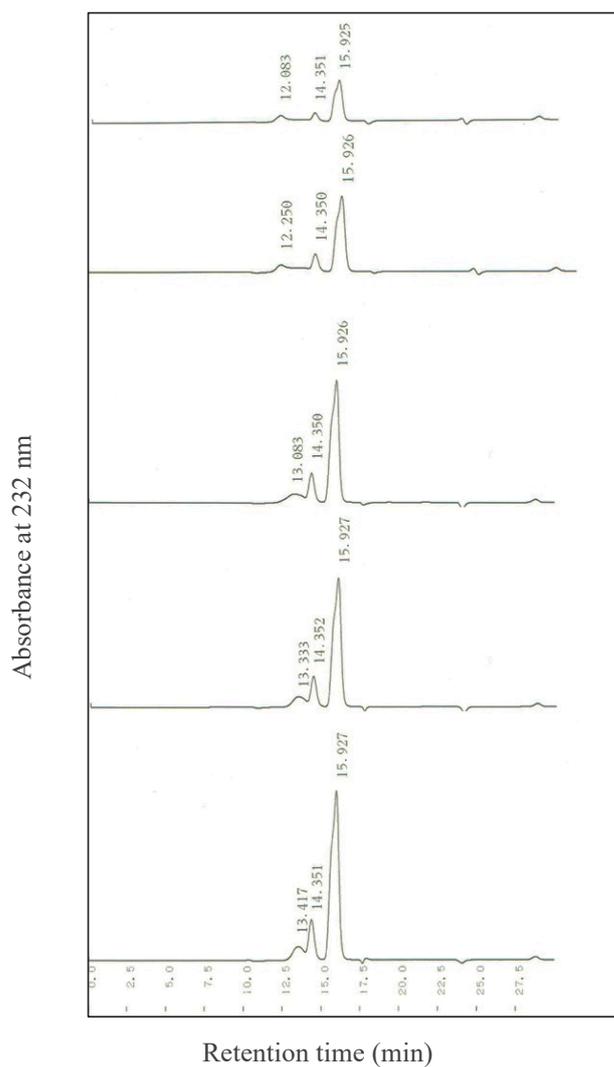


図 15. PyHL による HA の分解産物の HPLC 分析

反応混合物を 0.5 M 酢酸緩衝液 (pH 5) と 0.1% HA 中、30°C で 30 分から 12 時間酵素とともにインキュベートした。反応生成物はヒドロキシル化ポリメタクリレートカラム (7.8 x 300 mm) を用いた HPLC で分析した。カラム溶媒は 0.2 M NaCl で 0.5 mL・min⁻¹ の流速で溶出した。オリゴ糖は 232 nm の UV 吸光度で検出した。

3.4.6 *P. yunnanensis* のゲノム解読と PyHL 遺伝子の同定

43 コンテイング、8,050,114 bp、平均 187,211 bp (最大 725,856 bp、最小 827 bp) のゲノム配列が得られた。N50 contig length は 364,163 bp であった。総 G+C 含量は 53.21% であった。

Whole genome de novo sequencing of *Paenibacillus yunnanensis*

Project Information

Client Name	Macrogen Japan
Company/Institute	Macrogen Corp. Japan
Order Number	HN00104241
Sample	PY02
Species	Prokaryote
Type of Analysis	De novo assembly
Type of Sequencer	PacBio RSII

Table 1. Stats of Filtered Subreads.

Mean Subread length	9,667	N50	13,448
Total Subread Bases	1,441,545,955	Total Subreads	149,105

- Mean Subread Length : The mean length of the subreads that passed filtering.
- N50 : 50% of all bases come from subreads longer than this value.
- Total Subread Bases : The total number of bases in the subreads that passed filtering.
- Total Subreads : The total number of subreads that passed filtering.

Contigs	Total Contig Bases	N50	Max Length	Min Length	Mean Length
43	8,050,114	364,163	725,856	827	187,211

- Contigs : The number of contigs assembled.
- Total Contig Bases : The total length of contigs.
- N50 : 50% of all bases come from contigs longer than this value.
- Max Length : The length of maximum contig.
- Min Length : The length of minimum contig.
- Mean Length : The average length of contigs assembled.

図 16. *Paenibacillus yunnanensis* の全ゲノム de novo 配列決定

3.4.7 PyHL 遺伝子のクローニングと配列解析

ゲノム配列解析の結果、*P. yunnanensis* strain 16-6 にはヒアルロン酸リアーゼをコードする遺伝子が 1 つだけ見つかリ、それは 826 アミノ酸をコードする 2481 bp のオープンフレームからなる。このタンパク質の理論分子量は 87.2 kDa、等電点は 5.07 であった。しかし、NCBI 配列アラインメントの結果、報告されている HL との類似性は低かった。ExPASy の Prosite (<http://prosite.expasy.org/>) を用いてアミノ酸配列からタンパク質の機能を予測したところ、C 末端側に 3 つの S 層相同ドメインが並んでいることがわかった(図 17)。

```
MTMKKKLVSTVAASLVFSSLAGLPVSTKGLLEKLGVGAEVAQAATPGLNTIVNELNKVHSYVWTDDEKASISQ  
ARAQLNNGNAEDTALVSEVTTRINSKLSAVEDPSEFDQLSDANILKLFSAALNVFFTV E AIEENTEEGTSLADALV  
SKELRPVIKQLAKLGGSSKEDLSVQDAADF A IAVEAALKAQLADKDFDNLAKLATDVQAMKDIIKAAVDSVMN  
KALKFSTVLSNIGITVDDVA AVTNKIVA AVDPKREAATTIALALLRSEANTTFARTSDYIENSQTQNYQFTILGKTL  
NILVWTSSNANIAVAYVEDSGKIKTTQTGTGSVTTTLEGGKIVAPGTLDDNKVLRQTVTSAYNPVKNNNKGGGG  
GGGGGIVTSPVNQASNNAQSTLSSIKDQLKNASEEKRQQLIEQARA AVAETIAQITKIDLSSIAANGDKGVAKLDT  
AALVQQIQEIAAESQKLF DALKEIDPDAAPSKLELTLNLGDITVKLEIPLAKELLAAAKDNGIDKIAVSIKGVTLAL  
DPRTFSADTTLTIGKKDADAATSVTQLPVASGVFEFEFSSNGAAVTNFSSPVEVRLAVADPSKFDTEKLV LAKIVDG  
KLEFYGGKYNAKDRQFNGKRKSFSTYTVVENNVVFNDTASVKAWAGRQIEVAAAKGILEGRGDNEFVPNGTV  
TRAEFAKMIVKTFGLEDSATENFSDVNDNDWFKPYVAAAVKSGLVNGREEGKFDPNGQITRAEMATIAAR  
ALOSVNGAKAASDVDAALKAFTDADSIHESLKAGVALSVGEGHIVGEDNNKFNPNADSTRAQAAVVIYRLLN  
K
```



図 17. ExPASy (<http://prosite.expasy.org/>) の Prosite により PyHL のアミノ酸配列からタンパク質の機能を解析した。

3 つの S-layer homology ドメインが C-末端側に並んでいる。

3.4.8 組換え PyHL の精製と活性測定

組換え発現用プラスミドを構築し、大腸菌 BL21 (DE3)で発現させることに成功した。組換え体タンパク質はウェスタンブロッティングにより推定分子量 87 kDa を示した(図 18)。HA を基質として、未精製および精製した組換え体 PyHL 活性を酢酸セルロース電気泳動で示した(図 19)。

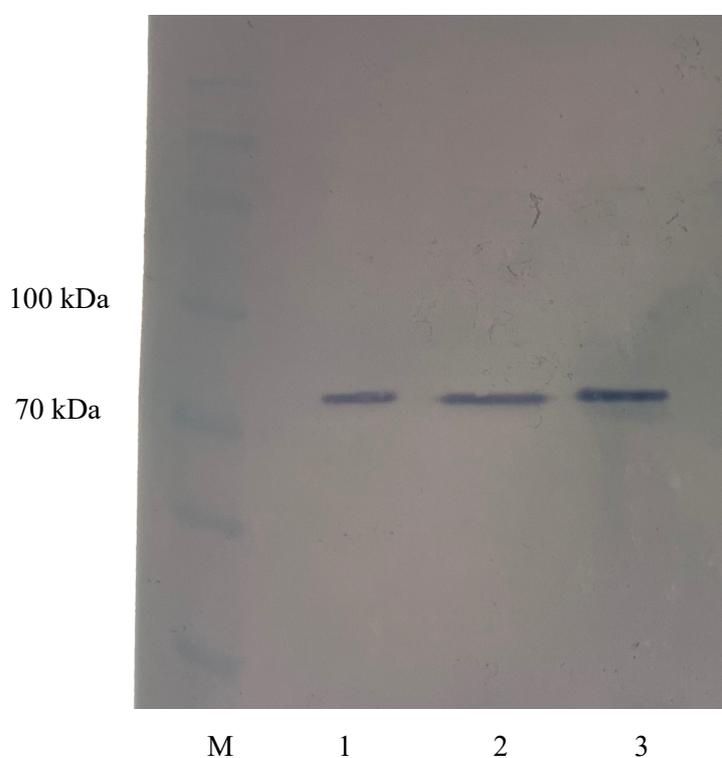


図 18. ウェスタンブロッティングによる標的タンパク質の検討

M:タンパク質分子量マーカー

レーン 1-3:PyHLを発現する組換え株の細胞溶解液の遠心上清(各濃度:それぞれ 5、15、10 μ l)

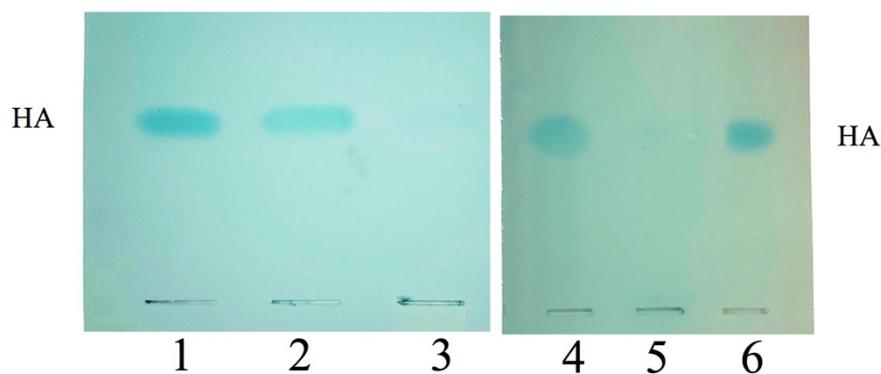


図 19. 組換え PyHL の活性アッセイ。

反応は 0.5 M 酢酸バッファー(pH 5.0)中 0.1%(w/v)の HA ナトリウムを用いて 30°C、一晩で行い、0.1%バイオプレーゼを 10 μ l 加えて停止させた。反応液を酢酸セルロース電気泳動で調べた。

レーン 1,6 : 標準溶液 (0.01% HA),

レーン 2 : Control (不活性化粗 PyHL)

レーン 3 : 粗 PyHL

レーン 4 : Control (不活性化 PyHL)

レーン 5 : PyHL

3.4.9 バイオインフォマティクス解析

分子量(MW)と等電点(pI)の予測値はそれぞれ 87,237 Da と 5.07 であった。

3.5 考察

本研究では、*Paenibacillus yunnanensis* の発酵ブロスから細胞外ヒアルロン酸リアーゼを均質に精製することに成功した。この酵素は SDS-PAGE でおおよそ 74 kDa の分子量を示し、既知の HL、例えば 73.7 kDa (*Arthrobacter globiformis* A152) [39]、77 kDa (*Streptomyces hyalurolyticus*) [40]などの HL と類似していたが、120 kDa (*Bacillus niacini* strain JAM F8) [41]、50 kDa (group A type 4 *Streptococcus*) [42]、107 kDa (*Streptococcus pneumoniae*) [43]、114 kDa (*Clostridium perfringens*) [44]などの HL とは異なっていた。この酵素の特性についても検討した結果、PyHL は 35°C、pH 5 で最大の活性を示すことが明らかになった。

様々な生物種のヒアルロン酸リアーゼは GAG 基質に対して異なる特異性を示す[45]。PyHL は HA に対して最も高い基質特異性を示した。一般に、ヒアルロン酸リアーゼ(EC 4.2.2.1)は通常 HA を分解し、CS に対してもある程度の分解活性を示す。例えば、HCLaseM (*Microbacterium* 属菌) は HA と種々の CS を分解し、CS-A、CS-B、CS-C と HA に対してほぼ同じ酵素活性を示したが(それぞれ 98, 97, 96, 100%)、PyHL は CS に対して最も低い活性を示し、HA に対して相対的に高い基質特異性を示した(表 2)[46][47][48][49][50]。PyHL は機能性ヒアルロノオリゴ糖の調製や HA

の機能相関を調べるための有効なツールとなる可能性がある。

PyHL で HA を消化した生成物を HPLC で分析した結果から、最終生成物は 4 糖、10 糖フラグメントであると推定された。PyHL は酵素生産菌と酵素の作用特性の点から非常に珍しい酵素であると考えられる。*P. yunnanensis* 16-6 株の全ゲノム解析を行い、ゲノムデータを取得した。次に、精製した PyHL タンパク質について LC-MS/MS 分析を行い、得られたデータからアミノ酸配列を予想し、BLAST プログラムにより相同性解析を行った。その結果、S-layer homology domain containing protein が高いスコアでヒットした。ExPASy の Prosite と Proparam などのプログラムにより予想されたタンパク質の機能を予測したところ、このタンパク質は C 末端側に S-layer homology domain が三つ並んでいる、機能は未知の 826 アミノ酸残基からなるタンパク質(分子量は約 87.2 kDa、等電点 5.07)であると推定された。

P. yunnanensis の菌体をテンプレートとして PCR を行い、PCR 産物を精製し、T-ベクターに組み込み、1 次クローニングを行った。次に、目的の遺伝子断片を切り出して、発現用 pET21a ベクターに組み込み、大腸菌を形質転換した。その後、大腸菌を培養し、培養液から菌体を回収した。SDS-PAGE で発現タンパク質を確認し、次に、His-tag を含む組換え

PyHL を Ni-カラムクロマトグラフィーで精製し、HA 分解活性の測定を行った。その結果 rPyHL が HA を分解したことが示された。

配列類似性の検索によれば、PyHL は様々な HL に対する相同性が低い(20%以下)と示されたが、大腸菌で発現した rPyHL が HA 分解活性を持っていることが示された。

PyHL は、HA を特異的に消化するために、機能性オリゴ糖の調製と HA の分析に効果的なツールとなる可能性があり、薬学と生化学的研究で使用される可能性がある。本研究では、PyHL の遺伝子発現実験から、遺伝子レベルでの新規な HA リアーゼの存在を確認した。将来的には遺伝子工学によってそのような酵素を大規模に生産できる可能性が示唆された。

表 2. 異なる微生物由来のヒアルロン酸リアーゼとPyHLの基質特異性の比較

酵素	由来	基質				参考文献
		HA	CSA	CSC	DS	
PyHL	<i>Paenibacillus yunnanensis</i> strain 16-6	100	7.4	9.1	0	本論文
HCLaseM	<i>Microbacterium</i> sp. H14	100	98	96	97	[46]
BniHL	<i>Bacillus niacin</i>	100	44	30	0	[47]
HAase-B	<i>Bacillus</i> sp. A50	100	39	14	0	[48]
HCLase	<i>Vibrio</i> sp. FC509	100	45	43	0	[49]
HL	<i>Arthrobacter globiformis</i> strain A152	100	24.7	-	0	[50]

HA を基質とする活性は 100%とした。データはリファレンスの比活性または相対活性から計算した。

- :データは未詳。

第4章 総合考察

4.1 研究の概要

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）とヘキソ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）およびデルマタン硫酸（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、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、HAlyase (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動性に重点を置く 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、さらに *Paenibacillus yunnanensis* 16-6 株の産生する GAG 分解酵素(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い、分子量、最適作用条件及び各 GAG に対する分解活性などを明らかにした(従来の *Arthrobacter* 属は *Paenarthrobacter* 属の synonym であるため、本論文では後者を採用する)。HA を炭素源とする液体培地で各菌を培養後、遠心分離により得た上清液からカラムクロマトグラフィーにより精製酵素を得た。PnHL と PyHL の分子量は電気泳動的に 70 kDa と 74 kDa と求められ、基質特異性はいずれも HA を最もよく分解し、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。PnHL について LC/MSMS によりアミノ酸配列分析を行い、その結果を *P. nicotinovorans* 19-1 株の全ゲノム解析データと照合した結果、PL family 8 に属する GAG lyase (HA

lyase または CS AC lyase) と同定された。一方、PyHL は HA やコンドロイチン無硫酸を優先的に分解するが、CSA や CSC の分解活性が低いことから、従来の HA lyase に比べて珍しい基質特異性を有する酵素であると考えられた。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分析した結果から、PyHL は HA に対しエンド型に作用することが推定された。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。

4.2 今後の研究方向

細菌由来のグリコサミノグリカン分解酵素は、バイオエンジニアリングの分野で大きな可能性を秘めているが、その触媒機構や基質特異性についての現在の理解は非常に限られている。したがって、生化学、分子生物学、構造生物学を組み合わせることで、細菌由来グリコサミノグリカン分解酵素の触媒機構と基質特異性を包括的に解明することが今後の課題である。さらに、細菌のグリコサミノグリカン分解酵素の触媒効率と特異性は、その基質構造に大きく依存する。従って、基質特異性の異なる

細菌のグリコサミノグリカン分解酵素を単離・精製し、遺伝子工学的手法を用いてタンパク質工学的に解析することにより、基質特異性の異なる細菌のグリコサミノグリカン分解酵素の認識能や触媒活性をさらに向上させることが可能であり、生物医学や産業分野への応用が期待される。また、バイオインフォマティクスの発展に伴い、バイオインフォマティクスの手法を用いて多数の細菌のグリコサミノグリカン分解酵素遺伝子をスクリーニング・解析することで、新たなグリコサミノグリカン分解酵素遺伝子の資源を掘り起こし、さらなる機能研究を行うことができる。一方、メタゲノミクスなどの手法により細菌の構造多様性を研究することで、より多くの触媒能を有するグリコサミノグリカン分解酵素を掘り起こすことができる。

さらに、細菌のグリコサミノグリカン分解酵素は、重要な生体触媒の一種として、生化学および製薬産業における広範な応用が期待されている。今後の研究では、酵素工学、レトロウイルス、CRISPR-Cas9 を組み合わせ、酵素の基質特異性や触媒特性を改変することで、生物医学や産業における応用をよりよくサポートし、発展させることができる。

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々にご協力頂きました。

指導教員である吉田孝教授には、豊富な知識および経験の下、熱心なご指導と適切なお助言、ご指導賜りました。心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、多くのご指導をいただきました濱田茂樹准教授、多々羅洋太博士(弘前大学医学部)、本学位論文の副査を担当していただき、適切なお意見ご助言をいただきました小関卓也教授、山田美和教授、坂元君年准教授に厚く感謝いたします。

私が研究室にいる間、共に実験を行い、助けてくださった研究室の皆様、有難うございました。

最後に、博士後期課程への進学を可能にし、進学後も不自由なく研究に集中できるようサポートしつつ、私を見守り続けてくれた家族に感謝します。

参考文献

- [1] 山本英治,川畑仁克,孔 祥忠,川井甲午郎,谷口真佐人,鷹取 司,今井健二,白木雅文,岩山幸雄 (1998). 硫酸化グリコサミノグリカンのアルシアンブルー染色による微量分析—生体粗試料直接測定時における陰性荷電高分子物質の影響—. 日歯周誌 40(1):44-51.
- [2] 老木 紗予子, 中道 優介, 丸山 如江, 村田 幸作, 橋本 渉 (2017). 病原細菌による宿主細胞外グリコサミノグリカンの断片化・輸送・分解・代謝に関わる分子機構. 生化学 第 89 卷第 6 号, pp. 866-871.
- [3] Beckmann C., Rattke J., Oldham N J., et al. (2022). Characterization of a Delta(8)-sphingolipid desaturase from higher plants: A stereochemical and mechanistic study on the origin of E,Z isomers. *Angewandte Chemie International Edition* 43(13): 2298-2230.
- [4] Kakizaki I., Ibori N., Kojima K., Yamaguchi M. and Endo M. (2010). Mechanism for the hydrolysis of hyaluronan oligosaccharides by bovine testicular hyaluronidase. *The FEBS Journal* 277 (7): 1776-1786.
- [5] 寺下隆夫,白坂憲章,楠田瑞穂,若山祥夫. 鶏冠由来低分子ヒアルロン酸の化学組成とヒト肌への臨床試験による保湿効果. 近畿大宇農学部紀要第 14 号 1~ 8.
- [6] Sugahara Kazuki N., Hirata T., Murai T. and Miyasaka M. (2004). Hyaluronan Oligosaccharides and Tumor Progression ヒアルロン酸オリゴ糖と腫瘍の進展. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 16(89): 187-197.
- [7] Cardoneanu A., Macovei LA., Burlui AM., Mihai IR., Bratoiu I., Rezus II., Richter P., Tamba BI., and Rezus E. (2022). Temporomandibular Joint Osteoarthritis: Pathogenic Mechanisms Involving the Cartilage and Subchondral Bone, and Potential Therapeutic Strategies for Joint Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences* 24(1): 171.

- [8] Papakonstantinou E., Bonovolias I., Roth M., Tamm M., Schumann D., Baty F., Louis R., Milenkovic B., Boersma W., Stieltjes B., Kostikas K., Blasi F., Aerts JG., Rohde GGU., Lacombe A., Torres A., Welte T and Stolz D. (2019). Serum levels of hyaluronic acid are associated with COPD severity and predict survival. *European Respiratory Journal* 53(3): 1801183 [[https://doi.org/ 10.1183/13993003.01183-2018](https://doi.org/10.1183/13993003.01183-2018)].
- [9] Wang W, Wang J and Li F. (2017). Hyaluronidase and Chondroitinase. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 925: 75-87. [doi: 10.1007/5584_2016_54].
- [10] Tyng-Rong Roan. (2014). Developing an agent-based evacuation simulation model based on the study of human behaviour in fire investigation reports. Thesis submitted for the Degree of Doctor of Philosophy (PhD).
- [11] Liu Z., Masuko S., Solakyildirim K., Pu D., Linhardt RJ. and Zhang F. (2010). Glycosaminoglycans of the porcine central nervous system. *Biochemistry* 49(45): 9839-47.
- [12] Crainic A M., Callisti M., Veelen A V., et al. (2020). A comparative study on the physicochemical characteristics of nanoparticles released in vivo from CoCrMo tapers and cement-stem interfaces of total hip replacements. *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials* 108(8): 3311-3322.
- [13] PAttrick W. (2015). The origin of effective elementary geography instruction: A multiple-case study of exemplars. In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Doctor of Philosophy Curriculum and Instruction.
- [14] Carnevale D., Mascio G., D'Andrea I., Fardella V., Bell RD., Branchi I., Pallante F., Zlokovic B., Yan SS. and Lembo G. (2012). Hypertension induces brain β -amyloid accumulation, cognitive impairment, and memory deterioration through activation of receptor for advanced glycation end products in brain vasculature. *Hypertension* 60(1): 188-97.

- [15] Guangmou Y., Jianfang L., Qiang M., Rining Z., Zhimin G., Chencheng G., Shuang W., Ling Y., Jingmin G., Dongliang H., Wenyu H., Rui D., Junling Y. and Liancheng L. (2017). The N-terminal and central domain of colicin A enables phage lysin to lyse *Escherichia coli* extracellularly. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110(12): 1627–1635.
- [16] Barzkar N., Sheng R., Sohail M., Jahromi ST., Babich O., Sukhikh S. and Nahavandi R. (2022). Alginate Lyases from Marine Bacteria: An Enzyme Ocean for Sustainable Future. *Molecules* 27(11):3375.
- [17] Aprea G., Zocchi L., Di Fabio M., De Santis S., Prencipe VA. and Migliorati G. (2018). The applications of bacteriophages and their lysins as biocontrol agents against the foodborne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter*: An updated look. *Veterinaria Italian* 54(4): 293–303.
- [18] Hill, J. (1976). Purification and properties of Streptococcal Hyaluronate lyase. *Infection and Immunity* 14(3): 726–735
- [19] Andrew P.M., Joshu D.S. and Erin E.C. (2020). Enzyme-targeted fluorescent small-molecule probes for bacterial imaging. *Current Opinion in Chemical Biology* 57:155–165.
- [20] Shengwen D., Bingrong X., Lifeng C., Xiangyuan F., Qi Y., Ke Z., Mingqiang G., Zhiyuan L., Chunjie L. and Yuande P. (2021). Bacterial strain for bast fiber crops degumming and its bio-degumming technique. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 44(12): 2503–2512.
- [21] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227; 680–685.
- [22] Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding 1976.

Analytical Biochemistry 72: 248–254.

[23] Schmelcher M., Shabarova T., Eugster MR., Eichenseher F., Tchang VS., Banz M. and Loessner MJ. (2010). Rapid multiplex detection and differentiation of *Listeria* cells by use of fluorescent phage endolysin cell wall binding domains. *Applied and Environmental Microbiology* 76(17): 5745–56.

[24] Lin B., Hollingshead S.K., Coligans J.E., Egan M.L., Baker J.R. and Pritchard D.G. (1994). Cloning and expression of the gene for group B *Streptococcus*/hyaluronate lyase. *The Journal of Biological Chemistry* 269(48): 30113–30116.

[25] Jing M., Xiaomeng S., Shuaishuai L et al. (2017). Draft Genome Sequence of *Paenarthrobacter nicotinovorans* Hce-1. *Genome Announc.*5(30): e007–17.

[26] Valcarcel J., García MR., Sampayo LF. and Vázquez JA. (2020). Marine chondroitin sulfate of defined molecular weight by enzymatic depolymerization. *Carbohydrate Polymers* 229:115450.

[27] Delbarre-Ladrat C., Salas ML, Siquin C., Zykwinska A. and Collicec-Jouault S. (2017). Bioprospecting for Exopolysaccharides from Deep-Sea Hydrothermal Vent Bacteria: Relationship between Bacterial Diversity and Chemical Diversity. *Microorganisms* 5(3):63.

[28] Bettina BA., Schrupf H., Hoff PN., Bölke E., Hilton S. and Gerber AP. (2016). Hyaluronidase: from clinical applications to molecular and cellular mechanisms. *European Journal of Medical Research* 21(1): 201–205.

[29] Keiichiro H. and Shigetaka O. (1974). Crystallization and Some Properties of Chondroitinase from *Arthrobacter aurescens*. *The Journal of Biological Chemistry* 250(5): 1824–1828.

[30] Atsushi K., Mioko M. and Tohru K. (2015). Hyaluronate Lyase of a Deep-Sea *Bacillus niacin*. *Marine Biotechnology* 17(3): 277–284.

- [31] Yasuyuki K., Takaichi O., Genichi A., Aichi P., Hitoshi O. and Saitama P. (1968). Production of Hyaluronidase from a strain of *Streptomyces*. Continuation of abandoned application Ser. No.784,460.
- [32] 李帥.二種類の細菌の生産するグリコサミノグリカン分解酵素の精製と性質. 2018 弘前大学大学院農学生命科学研究科 修士論文
- [33] T. Ohya and Y. Kaneko (1970). Novel hyaluronidase from *Streptomyces*. *Biochimica et Biophysica Acta-Enzymology* 198(3): 607-609.
- [34] YC. Tam and EC. Chan (1985). Purification and characterization of hyaluronidase from oral *Peptostreptococcus* species. *Infection and Immunity* 47(2): 508-513.
- [35] Hiyama K. and Okada S. (1975). Crystallization and some properties of chondroitinase from *Arthrobacter aurescens*. *The Journal of Biological Chemistry* 250(5): 1824-1828.
- [36] West D.C. and Kumar S. (1989). The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Experimental Cell Research* 183(1): 179-196.
- [37] Benitez A., Yates T.J., Lopez L.E., Cerwinka W.H., Bakkar A. and Lokeshwar V.B. (2011). Targeting hyaluronidase for cancer therapy: Antitumor activity of sulfated hyaluronic acid in prostate cancer cells. *Cancer Research* 71(12): 4085-4095.
- [38] Karbownik, M.S. and Nowak, J.Z. (2013). Hyaluronan: Towards novel anti-cancer therapeutics. *Pharmacol Reports* 65(5): 1056-1074.
- [39] Changliang Z., Jingliang Z., Liyan L., Jing Z., Yanhui J., Zhaopeng S., Huashi G. and Xiaolu J. (2017). Purification and characterization of hyaluronate lyase from *Arthrobacter globiformis* A152. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 182(1): 216-228.

- [40] OHYA T, KANEKO Y. (1970). Novel hyaluronidase from *streptomyces*. *Biochimica et Biophysica Acta* 198(3): 607–609.
- [41] KURATA A, MATSUMOTO M, KOBAYASHI T, et al. Hyaluronate lyase of a deep-sea *Bacillus niacin*. *Marine Biotechnology* 17(3): 277–284.
- [42] WEST DC. and KUMAR S. (1989). The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Experimental Cell Research* 183(1): 179–196.
- [43] BENITEZ A, YATES TJ, LOPEZ LE, et al. (2011). Targeting hyaluronidase for cancer therapy: Antitumor activity of sulfated hyaluronic acid in prostate cancer cells. *Cancer Research* 71(12): 4085–4095.
- [44] CANARD B, GARNIER T, JOAINS BS, COLE ST. (1994). Molecular genetic analysis of the nagH gene encoding a hyaluronidase of *Clostridium perfringens*. *Molecular Genetics and Genomics* 243(2): 215–224.
- [45] MISHRA P, KUMAR RP, ETHAYATHULLA AS, et al.(2009). Polysaccharide binding sites in hyaluronate lyase-crystal structures of native phage-encoded hyaluronate lyase and its complexes with ascorbic acid and lactose. *FEBS Journal* 276(12): 3392–3402.
- [46] Junhao S., Han X., Guanrui S., Qianhong G. and Wengong Y. (2019) Cloning, expression, and characterization of a new glycosaminoglycan lyase from *Microbacterium* sp.H14. *Marine Drugs* 17(12): 681.
- [47] Kurata A., Matsumoto M., Kobayashi T., Deguchi S. and Kishimoto N. (2015). Hyaluronate lyase of a deep-sea *Bacillus niacin*. *Marine Biotechnology* 17(3): 277–284.
- [48] Xueping G., Yanli S., Juzheng S. and Fengshan W. (2014). A novel hyaluronidase produced by *Bacillus* sp. A50. *PLoS ONE* 9(4): e94156.

[49] Han W., Wang W., Zhao M., Sugahara K. and Li F. (2019) A novel eliminase from a marine bacterium that degrades hyaluronan and chondroitin sulfate. *Journal of Biological Chemistry* 289(40): 27886–27898.

[50] Zhu, C., Zhang, J.L., Li, L.Y., Zhang, J., Jiang, Y.H., Shen, Z.P., Guan, H.S. and Jiang, X.L. (2017) Purification and characterization of hyaluronate lyase from *Arthrobacter globiformis* A152. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 182: 216–228.