

クローニングされた2種のフコイダナーゼ及び2種の sulfated fucoglucuronomannan lyase の1次構造と反応機構の関連

【背景】褐藻類に含まれている、硫酸化フコース含有多糖（画分）には、抗癌作用、癌転移抑制作用、癌細胞に対するアポトーシス誘発作用等の活性がある。これまでに、構造と活性の関係を解明するため様々な化学的検討がなされてきたが、硫酸化フコース含有多糖には様々な分子種があり、分子量が数十万もあるため化学的手法のみによる構造解析には限界があった。しかしながら硫酸化フコース含有多糖を、酵素消化により断片化して、その構造を解明するため、新たに単離した2種の海洋細菌 (*Alteromonas sp* 及び *Flavobacterium sp*) から、2種の新規な硫酸化フコース含有多糖分解酵素 (fucoidanase 及び sulfated fucoglucuronomannan lyase (SFGML-ase)) を精製し、そのクローニングにも成功した。その過程において、それぞれの細菌の遺伝子上から、homology の高い2種の fucoidanase 及び2種の SFGMLase の遺伝子をクローニングできた。なお、硫酸化フコース含有多糖分解酵素が、精製、クローニングされたのは初めてのことであるが、これらの遺伝子のなかに既報告の遺伝子と homology の高いものは検索しても見出されなかった。本発表では、2種の fucoidanase 及び2種の SFGMLase それぞれの基質特異性の差と一次構造の差との関連について報告する。

【方法】 *Alteromonas sp* から 2646bp 及び 2445bp の open reading frame (ORF) を持つ2種類の遺伝子 (fdaI および fdaII) が単離され、ともに fucoidanase 遺伝子である事を、大腸菌に発現させた蛋白質の酵素活性を測定する事により確認した。

FdaI (881AA) 及び FdaII (814AA) が比較的 homology が高いが、とりわけ C 末端から 795AA に関しては 71.4% と高い。また、C 末端側に 44AA からなる homology を示す2領域がある等2種の酵素は非常に似ているが、FdaI は FdaII の N 末端付近に PEPEVE 配列が7回繰り返されている構造を含む68AAの挿入配列があるという点が大きく異なる。FdaI は FdaII に比べて硫酸化21糖に作用して硫酸化7糖を生産する速度が速い。つまり、この挿入配列により低分子性フコイダンに対する反応速度が上昇している。なお、海洋細菌 (*Alteromonas sp*) から精製した fucoidanase の主成分は、FdaII であることがアミノ酸配列より解明された。このことは以下の点からも矛盾がない。すなわち FdaI 及び FdaII は N 末端にそれぞれ 17AA 及び 22AA のシグナルペプチドを持つが、FdaI の N 末端は典型的な lipoprotein のシグナル配列となっているため、おそらく FdaI はペリプラズムに膜酵素として存在し、菌体外には分泌されないと考えられる。

*Flavobacterium sp* から 2094bp 及び 2115bp の ORF を持つ2種類の遺伝子 (fdlA 及び fdlB) が単離され、ともに SFGMLase 遺伝子である事を、大腸菌に発現させた蛋白質の酵素

活性を測定する事により確認した。FdlA(697AA)及び FdlB(704AA)は分子量がほぼ等しく、全体の homology も 56.2%と高いが、とりわけ N 末端付近の 324AA に関しては 90%以上と高い。一方、C 末端側の 347AA に関しては homology は、27.7%と低く、この部分の一次構造の差により基質特異性に差が出た可能性がある。

FdlA は FdlB に比べて硫酸化 6 糖に作用して硫酸化 3 糖を生産する速度が速い。つまり、C 末端部分の一次構造の差により低分子性フコイダンに対する反応速度に差が出たと考えられる。FdlA 及び FdlB は N 末端にそれぞれ 25AA 及び 24AA のシグナルペプチドを持つので共に菌体外酵素と考えられるが、海洋細菌 (*Flavobacterium sp*) から精製した SFGMLase の主成分は、FdlA であることがアミノ酸配列より解明された。