

新規 *Echinicola* sp. 20G 株の分離
およびウルバン分解関連遺伝子群
の特定に関する研究

令和2年度

三重大学大学院生物資源学研究科

生物圏生命科学専攻

海洋生命分子化学講座

海洋微生物学教育研究分野

栗芝 ゆう

目次

諸言	1
1. 目的	6
2. 実験方法	7
2-1. ウルバン分解細菌の分離	7
2-1-1. 粉末アオサの調製	7
2-1-2. ウルバンの抽出	7
2-1-3. 分離源の精製	8
2-1-4. 培養	9
2-1-5. 希釈培養	10
2-1-6. 純粋分離	10
2-1-7. ウルバン分解活性試験のスクリーニング法の確立	10

2-1-8. ウルバン分解細菌のスクリーニング試験	11
2-1-9. ゲノム DNA の抽出	11
2-1-10. PCR による 16S rRNA 遺伝子の増幅およびサイクルシーケンス	12
2-1-11. 16S rRNA 遺伝子を用いた系統解析	13
2-2. ウルバン分解活性試験	14
2-2-1. ウルバン分解細菌の分解能試験	14
2-2-2. 抽出画分の調製	14
2-2-3. 吸光度測定による分解活性試験	15
2-2-4. 薄層クロマトグラフィーによる分解活性試験	16
2-3. <i>Echinicola</i> sp. 20G のウルバン分解関連遺伝子群の特定	16
2-3-1. <i>Echinicola</i> sp. 20G のフルゲノム解析	16
2-3-2. RAST によるアノテーション	17
2-3-2. Local BLAST による相同性解析	17

3. 結果	29
3-1. ウルバン分解細菌の分離	29
3-1-1. ウルバン分解細菌のスクリーニング	29
3-1-2. 16S rRNA 遺伝子分子系統解析	30
3-2. 分解活性試験	30
3-2-1. ウルバン分解能試験	30
3-2-2. 吸光度測定による分解活性試験	31
3-2-3. 薄層クロマトグラフィーによる分解活性試験	31
3-3. <i>Echinicola</i> sp. 20G のウルバン分解関連遺伝子群の特定	32
3-3-1. <i>Echinicola</i> sp. 20G のフルゲノム解析	32
3-3-2. RAST によるアノテーション	32
3-3-3. Local BLAST による相同性解析	32
3-3-4. <i>Echinicola</i> sp. 20G のウルバン分解関連遺伝子群の特定	33
4. 考察	48

謝辭----- 51

参考文献----- 52

諸言

エネルギー需要の高まりにより石油資源の将来的な枯渇が懸念される今日、石油に代わる新たな資源の模索が行われている。これまで第一世代のバイオマス資源としてサトウキビやトウモロコシ、第二世代のバイオマス資源として木質系バイオマスの研究が行われてきたが、食糧との競合のほか、バイオマスを直接発酵させるには工程が複雑でエネルギー転換の効率の悪さなどの問題が存在した(1,2)。そのような現状の中、海藻が第三のバイオマス資源として近年注目を集めており、将来的に陸生バイオマスに代わる持続可能なバイオマスエネルギーやバイオマテリアルの原料になりうると言われている(3)。

海藻をバイオマス資源として用いることのメリットとして、養殖に農地や農業用水を必要としないことや、トウモロコシなどの陸上作物と比べ単位面積当たりの収量が大きいことが挙げられる(3)。海藻の食糧としての市場は日本以外では一部地域に限定しており、食糧との競合もトウモロコシなどに比べ影響はないとされている。我が国は、世界第6位の海域面積を保有している海洋資源国家であり、海藻養殖の歴史も古く技術も確立しているため今後大規模な海洋養殖の展開が可能である。

海藻のうち褐藻類や紅藻類であるワカメや昆布など大型藻類が群落を形成

する場所は海中林と呼ばれる。海洋生物に栄養と生息地を供給しているため生態学的にも価値があり、それらを収穫することはそこを住処としている海洋生物の個体数を減らしてしまう恐れがある (4)。

しかし近年、中国の青島や日本国内でも東京湾や横浜、博多などの沿岸において緑藻であるアオサの大量発生が起きている (5)。アオサはグリーンタイドを形成して海岸に打ち上げられると、①生態系を乱す、②腐敗して悪臭を放つ、③景観を損ねるなど様々な問題を引き起こす。回収して埋め立てやバイオマス、飼肥料化などが行われているが、莫大なコストがかかるためその処理方法の検討が求められている。

一方で、緑藻には機能性を示し、有効利用が求められる多糖類が含まれる。そのうちウルバンは、これらアオサなどの緑藻に含まれる水溶性の細胞間粘質多糖であり、緑藻の乾燥重量の 8-29%を占める (6)。Fig. 1 で示したように、3-硫酸化ラムノースにグルクロン酸、イズロン酸、不飽和ウロン酸が結合した二糖が繰り返し単位となり構成されている (7-9)。3-硫酸化ラムノースには、抗ウイルス性、抗腫瘍作用、血中コレステロール低下作用などがあると考えられている (10)。希少糖であるイズロン酸は、ヘパリン類似物質の合成に応用できる (11)。またウルバンは様々な二糖を構成するため、低分子化することにより機能性食品や医薬品へと活用できるとされている (12-18)。

多糖の低分子化には、酸加水分解と酵素による分解がある。現在主に行われている酸加水分解は分解力が強いため、糖自体が破壊されること、オリゴ糖や二糖、単糖など分子量が揃わないなどの欠点がある。そこで細菌がもつ酵素である、ウルバンリアーゼを用いた多糖の緩やかな分解が求められている (19)。しかしながら、ウルバンリアーゼを抽出するのに必要なウルバン分解細菌に関する研究例は未だ少ないのが現状であり、2021 年現在ウルバン分解活性が報告されているのは、*Nonlabens ulvanivorans* (20) , *Pseudoalteromonas* sp. (21) , *Alteromonas* sp. (8) , *Formosa agariphila* (22) , *Glaciecola* sp. (23) の 5 属にわたる細菌である (Table 1)。*Nonlabens ulvanivorans*, *Pseudoalteromonas* sp., *Alteromonas* sp. はそれぞれアメフラシの糞、ウミウシの糞、ヨコエビの消化管から分離されており、緑藻摂餌性生物が体内に保有していた細菌であると示唆される。

そこで本研究では、多くのウルバン分解活性をもつ細菌を網羅的に分離することを目的とし、腐敗アオサまたは濃縮海水を分離源として、その単離を試みた。分離したウルバン分解細菌は系統解析によりその多様性を確認した。続いてそれらの分解能試験を行い、3 株に選抜した。選抜した 3 株の分解活性について吸光度および TLC を用いて測定した。分離したウルバン分解細菌のうち、他の細菌と異なる分解活性がみられた *Echinicola* sp. 20G 株についてフルゲノム解析を行った後、ウルバン分解関連遺伝子群のクラスター作成をした。

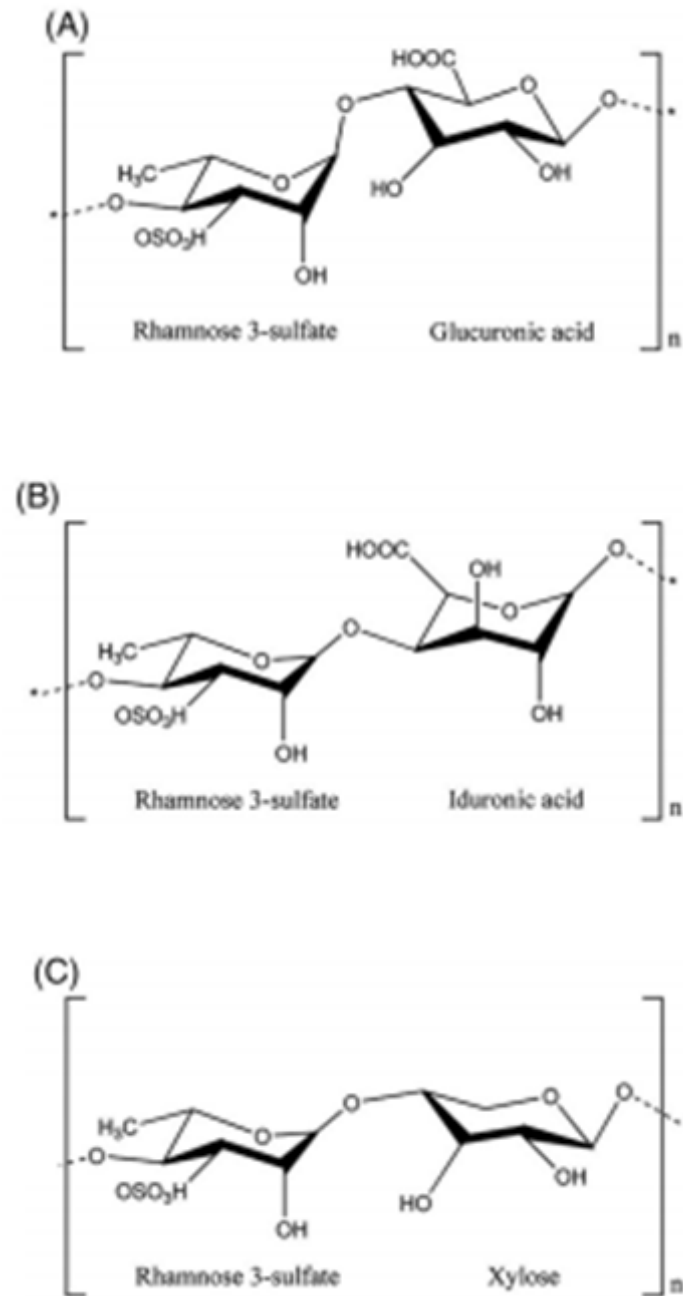


Fig. 1 The structure of 3 types of ulvans. (modified 2020, Li et al. :9)
 (A); Ulvan A3s contains rhamnose 3-sulfate and glucuronic acid. (B); Ulvan B3s contains rhamnose 3-sulfate and iduronic acid. (C); Ulvan U3s contains rhamnose 3-sulfate and xylose.

Table 1 Ulvan lyase gene. PL family, products. (modified 2020, Li et al. :9)

Source	PL family	Products	Products composition
<i>Alteromonas</i> sp. KUL17	PL24	DP2,4,6	-
<i>Glaciecola</i> sp. KUL10	PL24	-	-
<i>Alteromonas</i> sp. KUL42	PL24	-	-
<i>Alteromonas</i> sp. LOR_107	PL24	DP2,4	Δ UA-R3S、
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. PLSV_3875	PL24	DP2,4	Δ UA-R3S-IdoA-R3S、
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. PLSV_3925	PL24	DP2,4	Δ UA-R3S-Xyl-R3S
<i>Alteromonas</i> sp. LOR_61	PL24	DP2,4	
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. PLSV_3936	PL25	DP2,4	Δ UA-R3S、
<i>Alteromonas</i> sp. LOR_29	PL25	DP2,4	Δ UA-R3S-Xyl-R3S
<i>Nonlabens ulvanivorans</i> NLR_492	PL25	DP2,4	
<i>Alteromonas</i> sp. A321	PL25	DP2,4	Δ GlcA-Rha3S、 Δ GlcA-Rha3S-Xyl-Rha3S
<i>Formosa agariphila</i> KMM 3901	PL28	DP2-6	Δ -Rha3S、 R3S-xyl-R3S Δ -Rha3S-Xyl-Rha3S Δ -Rha3S-xyl-Rha3S -xyl- Rha3S
<i>Formosa agariphila</i> KMM 3901 ^T	PL28	DP2,4	-
<i>Nonlabens ulvanivorans</i> NLR48	PL28	DP2,4	Δ -Rha3S
<i>Nonlabens ulvanivorans</i> NLR42	PL28	DP2,4	Δ UA-R3S-Xyl-R3S
<i>Formosa agariphila</i> KMM 3901	PL37	DP2,4	Δ -Rha3S Δ -Rha3S-Xyl-Rha
<i>Formosa agariphila</i> KMM 3901	PL40	-	-

1. 目的

ウルバンの分解機構および利用に関する報告例は少なく、特にウルバン分解細菌の分布や、ウルバン分解酵素のファミリーや分解様式など未だ解明されていないことが多いのが現状である。未利用資源となっている緑藻を利用できる形にするには、さらに研究を深める必要がある。まずはより多くのウルバン分解活性をもつ細菌を網羅的に単離し、その多様性を確認することを目的に研究を始めた。さらに、単離したウルバン分解細菌の抽出画分とウルバン溶液の反応物を吸光度測定および TLC を用いて分解活性の確認を行った。その後 *Echinicola* sp. 20G 株についてフルゲノム解析を行い、ウルバン分解関連遺伝子群の特定を試みた。

2. 実験方法

2-1. ウルバン分解細菌の分離

2-1-1. 粉末アオサの調製

2018年4月三重県尾鷲市にてミナミアオサを採取した。扇風機で乾燥後、適当な大きさにちぎり乾燥材（シリカゲル）と共に箱入れ一週間乾燥させた。その後ミルサーで粉末状にして粉末アオサとして冷凍庫で保存した。

2-1-2. ウルバンの抽出

ウルバンは粉末状にしたアオサをエタノール沈殿法により抽出した。粉末アオサ 10g と蒸留水 120 ml を温熱スターラーで1時間攪拌した。混合させたアオサ溶液を 50 ml ファルコンチューブに4等分し、分離（ $3,300\times g$ 5 min）した。上清を新しい 50 ml ファルコンチューブ 4本にそれぞれ移し、上清の1%量 3M 酢酸ナトリウムと2倍量エタノールを添加した。ゆっくり転倒させ、白いウルバンを析出させた。遠心分離（ $3,300\times g$ 10 min）によりウルバンをペレット化させて上清は捨てた。ペレットを回収し、乾燥させた。乾燥方法は加温乾燥と凍結乾燥がある。加温乾燥は回収したペレットを $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で1時間乾燥させた後、細かく切り刻み保管した。凍結乾燥は、ペレットを再度蒸留水に溶かし凍結させた。

2-1-3. 分離源の精製

腐敗アオサ（2018年5月16日伊勢湾で採取）および濃縮海水（2018年9月18日伊勢湾の表面海水（サンプル名：m）、2019年5月14日三河湾内地点MK1の底泥（サンプル名：D）、2019年5月14日三河湾内地点MK1深水20mの直上水（サンプル名：1）、2019年5月15日三河湾内地点MK4深水20mの直上水（サンプル名：4）、2019年5月15日三河湾内地点MK6深水20mの直上水（サンプル名：6）、2019年5月16日町屋海岸の表面海水（サンプル名：M）を単離源とした。

腐敗アオサは、葉状体をちぎりそのまま入れたサンプル（サンプル名：ul）と、アオサの葉状部を2.0 ml チューブ（アシスト社, Japan）に3.0 mm 鉄球及び滅菌人工海水と共に入れビーズクラッシャー（TAITEC, Japan）に供し、4,000 rpm 30秒で破碎したサンプル（サンプル名：mix）を用意した。濃縮海水は、海水1 LをGFCフィルターと0.2 μm Nuclepore membrane フィルターを用いて濾過を行った。GFCフィルターで濾過したのち（サンプル名：G）、0.2 μm Nuclepore membrane フィルターで濾過を行った。2018年9月18日町屋海岸の表面海水（サンプル名：m）は、0.2 μm Nuclepore membrane フィルターは途中でフィルターが詰まったので、交換して計2枚用いた（サンプル名：N1, N2）。

2-1-4. 培養

精製した腐敗アオサ（サンプル ul, mix）は 0.5 %ウルバン添加 1/10 Zobell2216E 液体培地（Table 2）に接種し、25℃で 5 日、9 日、20 日培養した（サンプル名：ul5, ul9, ul20, mix5, mix9, mix20）。さらに滅菌人工海水にアオサをそのまま入れ 25 °C で 33 日間の集積培養後、0.5 %ウルバン添加 1/10 Zobell2216E 液体培地で 25 °C, 4 日間培養した。

濃縮海水サンプルは、濾過に用いた 2 枚または 3 枚のフィルターをそれぞれ 0.5%ウルバン添加 1/10 Zobell2216E 液体培地に入れた。2018 年 9 月 18 日町屋海岸の表面海水（サンプル名：m）は、25 °C で 10 日、20 日、30 日間培養を行った（サンプル名：mG-10, mG-20, mG-30, mN1-10, mN1-20, mN1-30, mN2-10, mN2-20, SWN2-30）。また、34 日目まで培養した上記の培養液を 0.5 %ウルバン添加 1/10 Zobell2216E 液体培地に接種し、25 °C で 15 日間培養した（サンプル名：SWG-2, SWN1-2, SWN2-2）。その他のサンプル（サンプル名：M, D, 1, 4, 6）は 25 °C で 10 日、20 日間培養を行った。（サンプル名：MG-10, MG-20, MN-10, MN-20, DG-10, DG-20, DN-10, DN-20, 1G-10, 1G-20, 1N-10, 1N-20, 4G-10, 4G-20, 4N-10, 4G-20, 6G-10, 6G-20, 6N-10, 6N-20）

2-1-5. 希釈培養

規定の培養期間が経過した時点で随時、希釈培養法により培養した。細菌コンソーシアである培養液を滅菌人工海水で 100 倍、1000 倍および 10000 倍の希釈液列を作製し、希釈液 100 μ l を Marine agar 平板培地 (Difco, Marine Broth 2216, Table 3) に滴下し、コンラージ棒で塗り広げ培養した (25 $^{\circ}$ C, 2~3 日)。

2-1-6. 純粋分離

ランダムに生えたコロニーを白金耳で Marine agar 平板培地に分離し、培養した (25 $^{\circ}$ C, 2~3 日)。このとき色や形状、サイズから別物と予想されるコロニーを数種類選択した。後日新しいコロニーを確認したとき、追加で純粋分離を行った。Marine agar 平板培地に継代、培養後 (25 $^{\circ}$ C, 2~3 日)、Marine agar 斜面培地に継代し分離株として保存した。

2-1-7. ウルバン分解活性試験のスクリーニング法の確立

スクリーニングには、CPC (塩化セチルピリジニウム) を用いた。CPC は酸性多糖と反応して白濁することがわかっている (8)。0.5 %ウルバン添加 Zobell2216E 平板培地 (Table 4) と Zobell2216E 平板培地 (Table 5) に 5 % CPC 溶液を 2 ml ずつ滴下した。浸漬後、それぞれの培地の変化を確認した。

2-1-8. ウルバン分解細菌のスクリーニング

分離株を 0.5 %ウルバン添加 Zobell2216E 平板培地に点滴培養した (25 °C, 6~10 日)。培養後、菌体を蒸留水で洗浄し、5 % CPC 溶液を 2 ml 滴下ししばらく待った。このとき透明体が確認できたものをウルバン分解活性ありとして、分子系統解析を行った。

2-1-9. ゲノム DNA の抽出

ウルバン分解活性があった分離株の DNA 抽出を熱抽出法と Promega 法の 2 種類で行った。

熱抽出法は、分離株を Zobell2216E 液体培地 (Table 6) で前培養した (25 °C, 2 日)。培養液 1000 μ l をエッペンチューブに移し、遠心分離 (17,800 \times g 2 min) を行った。上清を捨て、滅菌ミリ Q を 200 μ l 入れてよく懸濁した。懸濁液を 100 °C で 5 min インキュベートしたのち、遠心分離 (17,800 \times g 10 min) を行った。

Promega 法では、分離株を Zobell2216E 液体培地で振盪培養した。(25 °C, 1 日) 培養液 1000 μ l をエッペンチューブに移し、遠心分離 (17,800 \times g 2 min) を行った。上清を捨て、菌体に対し Nuclei Lysis Solution を 600 μ l 加えピペッティングした。80 °C 5 min でインキュベートし、室温に戻した。RNase Solution を 3 μ l

加え、37 °C 60 min でインキュベートした。Protein Precipitation Solution を 200 μ l 加え、ピペッティングし、氷中で 5 min 静置後、遠心分離 (17,800 \times g 10 min) でタンパク質画分を落とした。上清を新しいエッペンチューブに移し、isopropanol を 600 μ l 入れた。遠心分離を行い (17,800 \times g 30 min)、上清をピペッターで除去した。ペレット化した沈殿物へ 70 % エタノールを 600 μ l 入れピペッティングした後、遠心分離 (17,800 \times g 30 min) を行った。エタノールを捨て、乾燥させた。そこに 100 μ l の DNA Rehydration を加え、インキュベートを行った。(65 °C, 1 h) 得られた DNA 抽出液を PCR のテンプレートとした。

2-1-10. PCR による 16S rRNA 遺伝子の増幅およびサイクルシーケンス

PCR 試薬を混合し、PCR 用エッペンチューブに 19 μ l ずつ分注した (Table 7)。プライマーには 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') と 1492R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3') を用い、ポリメラーゼには TaKaRa Ex Taq (TaKaRa, Japan) を用いた。それぞれに DNA 抽出したサンプルを 1 μ l ずつ加えサーマルサイクラーで PCR 反応を行った。サーマルサイクラーは i-Cycler (Bio-Rad, USA) を使用し、温度条件は以下の通りに設定した。95 °C 4 分間の熱変性 1 サイクル後、95 °C 30 秒間の熱変性、55 °C 30 秒間のアニーリング、72 °C 1.5 分間の伸長反応を 25 サイクル行った。得られた PCR 産物を 1.5 %アガロースゲ

ル電気泳動に供し、約 1.5 kbp の単一バンドの出現を確認した。

16S rRNA 遺伝子の増幅の確認後、プライマーに 8F または 1492R を使用し、BigDye Terminator Kit v 3.1. (Applied Biosystems) によるサイクルシーケン法を行った (Table 8)。サーマルサイクラーの温度条件は以下の通りに設定した。96 °C, 1 分間の熱変性 1 サイクル後、96 °C, 10 秒間の熱変性、55 °C, 5 秒間のアニーリング、60 °C, 4 分間の伸長反応を 25 サイクル行った。

エッペンチューブに 2 μ l の 3M Sodium Acetate を入れ、そこにサイクルシーケン後のサンプル 20 μ l を加えた。50 μ l の 100% エタノールを加え、20 秒間ボルテックスを行った。4 °C で 15 分間静置した後、遠心分離 (4 °C, 17,800 \times g 15 min) を行った。ピペッターでエタノールを除去し、100 μ l の 70% エタノールを加え、タッピングした。遠心分離を行い (4 °C, 17,800 \times g 15 min)、ピペッターでエタノールを除去した。その後遮光しエッペンチューブの口を開け、一晚風乾させた。

2-1-11. 16S rRNA 遺伝子を用いた系統解析

シーケンサにより得られた塩基配列を遺伝子解析ソフト Chromas で編集し、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した。その配列を基に National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

を用いて塩基配列相同性検索を行い、近縁種の塩基配列を取得した。その後、マルチプルアライメントソフト MEGA version 7.0 を用いて系統樹を作製した。この際マルチプルアライメントを行い、Neighbour Joining (NJ) 法を用いて 1000 回のブートストラップ検定を行った。

2-2. ウルバン分解活性試験

2-2-1. ウルバン分解細菌の分解能試験

ウルバン分解活性がみられた 13 株の分解能を測定した。CPC 法を用いた分解斑のサイズは分解能を示すことがわかっている (23)。分解活性がみられた 13 株を 0.5%ウルバン添加 1/10 Zobell2216E 平板培地に点滴培養した (25°C, 120 h)。菌体を蒸留水で洗い流し、CPC 溶液 2 ml を滴下した。分解斑が確認できた場合は、その直径を測定した。以後の実験では、既存ウルバン分解細菌として *Alteromonas* sp. UI20-2、新規ウルバン分解細菌として *Echinicola* sp. 20G、*Vibrio* sp. 10N の 3 株を用いた。*Echinicola* sp. 20G に関しては、分解活性試験において著しく分解斑のサイズが小さく、様式が異なることが予想されたため選定した。

2-2-2. 抽出画分の調製

Alteromonas sp. UI20-2、*Echinicola* sp. 20G、*Vibrio* sp. 10N の 3 株を Zobell2216E

液体培地で前培養した (25°C, 24h)。前培養した培養液 100 μ l を 10 ml の 0.5 % ウルバン含有 1/10 Zobell2216E 液体培地に接種し、 旋回培養を行った (25 °C, 72 h)。培養液全量を 15 ml ファルコンチューブに移し、遠心分離 (5,800 \times g 10 min) を行い分離した。上清をフィルター (Amicon Ultra – 15 Centrifugal Filter Devices, Merck 社) で 10 倍に濃縮し、これを菌体外濃縮液とした。また沈殿物である菌体に PBS を 600 μ l 加え、氷で冷やしながら超音波破碎 (THU-80 ASONE 社, 28 kHz 30 sec \times 10) を行った。遠心分離 (5,800 \times g 10 min) により分離した上清を菌体内破碎液とした。

2-2-3. 吸光度測定による分解活性試験

基質 0.05 %ウルバン溶液 95 μ l に調製した抽出画分 (菌体外濃縮液または菌体内破碎液) を 5 μ l 添加したものをサンプルとして測定した。継時的変化を見るために吸光度測定を kinetics (infinite 200 PRO Configurations, TECAN 社) により吸光度 235 nm で 1 分おきに 30 分間測定を行った。ここで測定した吸光度 235 nm とは、Fig. 2 で示したようにウルバンがウルバンリアーゼにより分解されたときに生成する不飽和ウロン酸が持つ二重結合に吸収ピークを示す値である (22)。

2-2-4. 薄層クロマトグラフィーによる分解活性試験

ブタノール：酢酸：H₂O=2：1：1 で混合した展開溶媒（Table 9）を展開槽に入れ、蓋をして一晩放置した。標準品には未分解ウルバン、イズロン酸以外のウルバンの構成単糖であるグルクロン酸、キシロース、ラムノースを使用した。基質 0.5 %ウルバン溶液 10 ml に調整した抽出画分（菌体外濃縮液または菌体内破砕液）を 10 μ l 添加し、37 $^{\circ}$ C で 3 日間反応させた最終産物をサンプルとして測定した。標準品およびサンプルを TLC 板（TLC Silica gel 60 F₂₅₄ 25 Glass plates 200 \times 200 mm MERCK 社）にスポットし、その都度ホットプレート上で乾燥させた。乾燥させた TLC 板を展開槽に入れ約 20 分間展開した後、展開槽から取り出し十分に乾燥させた。5 %ナフタレンジオール添加エタノール溶液：リン酸=9：1 を混合した呈色試薬（Table 10）をドラフト内で噴霧後、ホットプレートに乗せ約 130 $^{\circ}$ C で焼成した。

2-3. *Echinicola* sp. 20G のウルバン分解関連遺伝子群の特定

2-3-1 *Echinicola* sp. 20G のフルゲノム解析

Echinicola sp. 20G についてフルゲノム解析を行った。promega 法により抽出した DNA 溶液を使用し、シーケンスライブラリーの作成を行った。ロングリードを GridION X5（Oxford Nanopore Technologies 社）で取得し、ショートリードを

DNBSEQ-400 (MGI) により取得した。GridION および DNBSEQ で取得したシーケンシング解析の結果を Unicycler のデフォルト条件でハイブリッドアセンブルを行った。

2-3-2. RAST によるアノテーション

アセンブル結果を RAST (Rapid Annotations using Subsystems Technology) でアノテーションを行い、SEED Viewer でアノテートされたゲノムを確認した。

2-3-3. Local BLAST による相同性解析

Echinicola sp. 20G のフルゲノムと既知のウルバンリアーゼの配列を Local BLAST により相同性解析を行った。BLASTN および BLASTP を行った。Local BLAST に用いた既存ウルバンリアーゼの GenBank を Table 11 に示した。

Table 2 Contents of 1/10 ZoBell 2216E + 0.5 % ulvan medium (1000 ml)

Ulvan	5 g
Polypepton	0.5 g
Yeast extract	0.1 g
Artificial seawater	750 ml
Distilled water	250 ml

pH 7.3~7.5

Table 3 Contents of Marine Broth 2216 medium (1000 ml)

Marine Broth 2216	37.4 g
Distilled water	1000 ml

pH 7.3~7.5

Table 4 Contents of 1/10 ZoBell 2216E+0.5 % ulvan agar medium (1000 ml)

Ulvan	5 g
Polypepton	0.5 g
Yeast extract	0.1 g
Artificial seawater	750 ml
Distilled water	250 ml
Agar	15 g

pH 7.3~7.5

Table 5 Contents of ZoBell 2216E agar medium (1000 ml)

Polypepton	5 g
Yeast extract	1 g
Artificial seawater	750 ml
Distilled water	250 ml
Agar	15 g

pH 7.3~7.5

Table 6 Contents of ZoBell 2216E medium (1000 ml)

Polypepton	5 g
Yeast extract	1 g
Artificial seawater	750 ml

pH 7.3~7.5

Table 7 Composition of reaction mixture in PCR for amplified 16S rRNA gene

Primer (5 pmol)	
Forward primer : 8F	0.5 μ m
Reverse primer : 1492R	0.5 μ m
10 \times Ex Taq Buffer	2.0 μ m
dNTP Mixture	1.0 μ m
TaKaRa Ex Taq	0.2 μ m
Template	1.0 μ m
DW	14.8 μ m
<hr/>	
Total	20.0 μ m

Table 8 Composition of reaction mixture in PCR for cycle sequencing

Big Dye Terminator ver. 3.1	0.5 μm
Primer : 8F or 1492R	1.0 μm
5 \times Sequencing Buffer	4.0 μm
Template	1.0 μm
DW	13.5 μm
Total	20.0 μm

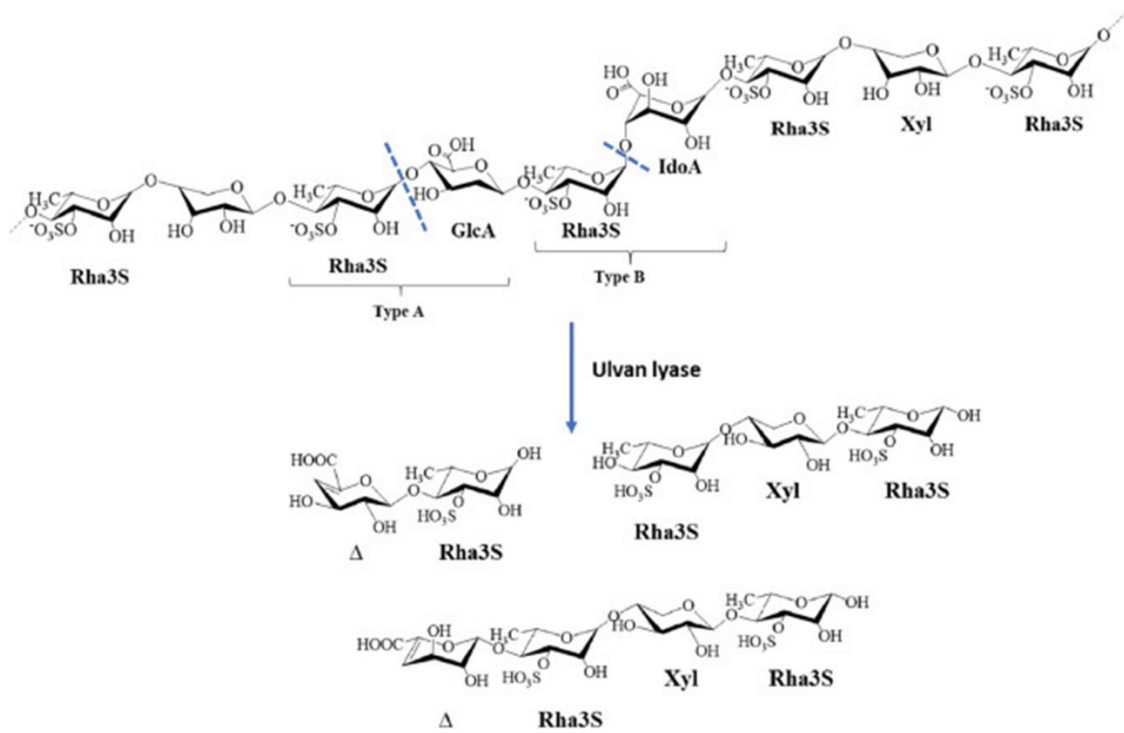


Fig. 2 The structure of ulvan and each restriction mode of ulvan lyase. The dotted blue lines indicate the points of restriction site of the ulvan lyase. (modified 2018, Konasani et al. :22)

Table 9 Developing solvent for Thin Layer Chromatography

1-Butanol	50 ml
Acetic acid	25 ml
DW	25 ml
Total	100 ml

Table 10 Color reagent for Thin Layer Chromatography

Ethanol	90 ml
Phosphoric Acid	10 ml
1,3- Naphthalenediol	5 mg
<hr/>	
Total	100 ml

Table 11 List of used gene for homology search (blastn and blastp)

Strain	GenBank	PL family
(Blastn)		
<i>Alteromonas</i> sp. KUL17	LC278382.1	PL24
<i>Alteromonas</i> sp. KUL42	LC278383.1	PL24
<i>Alteromonas</i> sp. LOR107	KU168251.1	PL24
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. PLSV_3875	KU168252.1	PL24
<i>Glaciecola</i> sp. KUL10	LC278381.1	PL24
<i>Alteromonas</i> sp. A321	MN347032.1	PL25
<i>Nonlabens ulvanivorans</i> PLR	JN104480.1	PL28
(Blastp)		
<i>Alteromonas</i> sp. KUL17	BAY00694.1	PL24
<i>Alteromonas</i> sp. KUL42	BAY00695.1	PL24
<i>Alteromonas</i> sp. LOR107	AMA19991.1	PL24
<i>Alteromonas</i> sp. LOR61	WP_032096165.1	PL24
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. PLSV_3925	WP_033186955.1	PL24
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. PLSV_3875	AMA19992.1	PL24
<i>Glaciecola</i> sp. KUL10	BAY00693.1	PL24
<i>Alteromonas</i> sp. A321	QFR04505.1	PL25
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. PLSV_3936	WP_033186995.1	PL25
<i>Formosa agariphila</i> KMM3901	WP_038530530.1	PL28
<i>Nonlabens ulvanivorans</i> PLR	AEN28574.1	PL28
<i>Formosa agariphila</i> KMM3901	CDF79930.1	PL37
<i>Formosa agariphila</i> KMM3901	CDF79911.1	PL40

3. 結果

3-1. ウルバン分解細菌の分離

3-1-1. ウルバン分解細菌のスクリーニング試験

0.5 %ウルバン添加 Zobell2216E 平板培地と Zobell2216E 平板培地に 2 ml ずつ 5 % CPC 溶液を滴下した。浸漬後、それぞれの培地の変化を確認したところ、Fig. 3 で示すように、0.5 %ウルバン添加 Zobell2216E 平板培地では白濁したのに対し、Zobell2216E 平板培地では変化が見られなかった。培地組成の差異はウルバンの有無のみであることから、CPC はウルバンと反応し白濁したということがわかった。これによりウルバン分解細菌のスクリーニング試験法を確立することができた。

分離株数およびスクリーニング試験の結果を Table 12 に示す。株名も Table 12 に示し、以後は記載した株名で呼ぶこととする。濃縮海水において培養期間 10 日と 20 日では一度純粋分離を行ったのち、数日後に新しく別と思われるコロニーが確認できたので追加で純粋分離を行った。

ウルバン分解細菌のスクリーニング試験の結果を Fig. 4 に示す。腐敗アオサからは 44 株中 1 株、濃縮海水からは 135 株中 12 株にウルバン分解細菌を分離することができた。合計 179 株中 13 株ウルバン分解細菌を分離した。

3-1-2. 16S rRNA 遺伝子分子系統解析

分離したウルバン分解細菌 13 株の 16S rRNA 遺伝子を用いて作製した系統樹を Fig. 5 に示す。赤文字が分離した 13 株のウルバン分解細菌で、*Alteromonas* sp. N2, ul20-2, N3, *Pseudoalteromonas* sp. DN-1, DN-3, 6G-2, *Nonlabens* sp. DG-3 の 3 属 7 株は既知のウルバン分解細菌である。黄色で網掛した *Paraglaciecola* sp. MN-1, MN-2, *Vibrio* sp. 10N, *Echinicola* sp. 20G, *Algibacter* sp. 1G-1, 1G-1-2 の 4 属 6 株は未報告であり新規ウルバン分解細菌であるということがわかった。分離したウルバン分解細菌は、プロテオバクテリア綱から CFB 門細菌群に属していた。

3-2. 分解活性試験

3-2-1. ウルバン分解能試験

ウルバン分解活性がみられた 13 株の分解能を測定した。結果を Fig. 6 に示す。概ね 20~30 mm と同様の分解斑のサイズを示したが、*Echinicola* sp. 20G は 9 mm と他と比べ少し分解斑が小さかった。また本研究室で保有していた *Pseudoalteromonas* AR06 株も CPC 試験を行ったところ、ウルバン分解活性を有することがわかった。

3-2-2. 吸光度測定による分解活性試験

菌体外濃縮液の結果を Fig. 7 に示す。*Alteromonas* sp. U120-2 および *Vibrio* sp. 10N が経過時間とともに吸光度の増加が見られたのに対し、*Echinicola* sp. 20G では時間が経過しても吸光度はほぼ横ばいであった。

一方、Fig. 8 に示した菌体内破砕液では、*Alteromonas* sp. U120-2 および *Vibrio* sp. 10N は時間が経過しても吸光度はほぼ横ばいであったのに対し、*Echinicola* sp. 20G では経過時間とともに吸光度の増加が見られた。

3-2-3. 薄層クロマトグラフィーによる分解活性試験

未分解ウルバン溶液はスポットした位置に残留していることが確認できた。

菌体外濃縮液の結果を Fig. 9 に示す。*Alteromonas* sp. U120-2、*Vibrio* sp. 10N、*Echinicola* sp. 20G において分解産物も確認できたが、その多くが依然として二糖以上として残っていることがわかった。

一方、Fig. 10 に示した菌体内破砕液では、*Alteromonas* sp. U120-2、*Vibrio* sp. 10N がほぼウルバンが未分解のままとしてスポットした位置に残留していたのに対し、*Echinicola* sp. 20G では単糖であるラムノースと同じ位置にバンドが確認できた。

3-3. *Echinicola* sp. 20G のウルバン分解関連遺伝子群の特定

3-3-1. *Echinicola* sp. 20G のフルゲノム解析

GridION では 2,026,697,233 シークエンスリード、DNBSEQ では 2,779,128,000 シークエンスリードであった。GridION の平均解析長は 9048.9 bp であった。DNBSEQ と GridION のハイブリッドアッセンブルの結果、コンティグ数は 1 になった。GC 含量は 39.9 % であった。

3-3-2. RAST によるアノテーション

アッセンブル結果を RAST によりアノテーションを行い、Fig. 11 に示した SEED Viewer でアノテートされた遺伝子を観察した。ゲノムサイズは、5,785,879 bp、コーディング領域 (CDSs) は 4,915 であった。そのうち 928 領域 (19 %) の遺伝子は 269 の機能に分類された。糖分解に関わる C 代謝関連遺伝子数は 193 と多く存在していることがわかった。また、rRNA 遺伝子と tRNA 遺伝子がそれぞれ 12 遺伝子 (SSU:4, LSU:4, 5S:4)、および 40 遺伝子がアノテーションされた。

3-3-3. Local BLAST による相同性解析

既知ウルバンリアーゼと *Echinicola* sp. 20G のフルゲノムを Local BLAST により相同性解析を行ったが、*Echinicola* sp. 20G は既知のウルバンリアーゼと相同

性を示す遺伝子を保持していなかった。そのため、新たにウルバン分解関連遺伝子群を特定することにした。

3-3-4. *Echinicola* sp. 20G のウルバン分解関連遺伝子群の特定

まず Fig. 12 の既知ウルバン分解遺伝子群の一次構造を比較した (8)。それらをもとにアノテーションにより取得した *Echinicola* sp. 20G の遺伝子情報から、ウルバンリアーゼに関係するクラスターを異なる 2 つの領域から発見した。

Fig. 13 に示すクラスター1 では、GH ファミリーである Glycoside Hydrolase, GH43 (CDS no.431, 442, 443) を保有していた。さらにいくつかのウルバン分解に関わる遺伝子 Maltodextrin glucosidase (EC 3.2.1.20) (CDS no.432) , Glucronyl hydrolase (CDS no.433) , Laminarinase (EC 3.2.1.39) (CDS no.436) , 2 つの Xylan 1,4- β -xylosidase (EC 3.2.1.37) (CDS no.441, 444) , β -galactosidase (EC 3.2.1.23) (CDS no.445) , TonB-dependent transporter (CDS no.439,446) , lipoprotein (CDS no.438, 447) の保有を確認した。

Fig. 14 で示すクラスター2 では、CDS no.1735 に Rhamnogalacturonan lyase を保有していた。このリアーゼの周囲に GH ファミリーである Glycoside Hydrolase, GH88 (CDS no.1736) , GH2 (CDS no.1760) の保有を確認した。さらにいくつかのウルバン分解に関わる遺伝子 Rhamnogalacturonides degtadation protein RhiN

(CDS no.1716) , 2 つの α -L-rhamnosidase (EC.3.2.1.40) (CDS no.1743, 1751) , 5 つの β -galactosidase (EC.3.2.1.23) (CDS no.1741, 1746, 1752, 1758, 1759) , α -L-arabinofuranosidase (EC.3.2.1.55) (CDS no.1740) , 2 つの oxidoreductase (CDS no.1749, 1753) , reductase (CDS no.1789) , TonB-dependent transporter (CDS no.1728, 1732) , lipoprotein (CDS no.1729, 1733) の保有を確認した。

両者の遺伝子群には Glycoside hydrolase を多く保有していたが、Sulfatase を確認することができなかった。今回確認した 2 つのウルバン分解関連遺伝子群のうちクラスター2 の CDS no. 1735 がリアーゼ類似配列であることからウルバンリアーゼである可能性が高いことが考えられた。

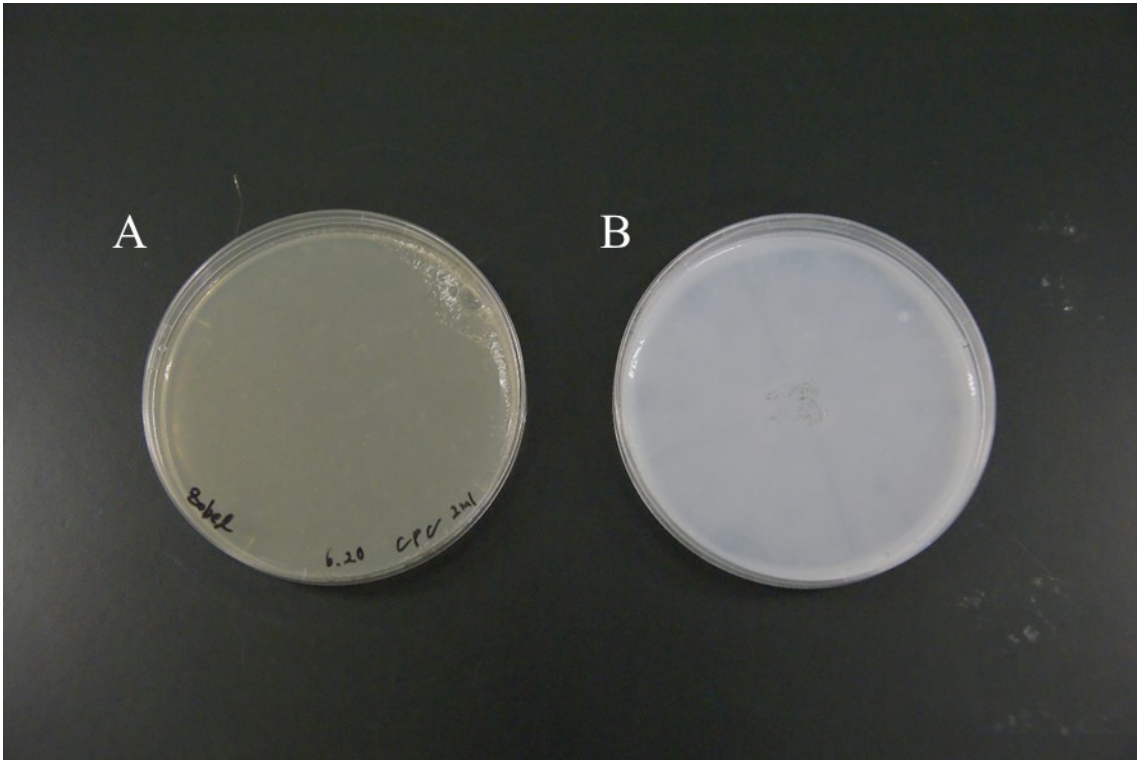


Fig. 3 Establishment of ulvan degradation activity test. Medium A and B were immersed in 2 ml of CPC solution. No change in color was observed in medium A. White color indicates appearance of ulvan (B). (A; Zobell2216E, B; 0.5 % ulvan 1/10 Zobell2216)

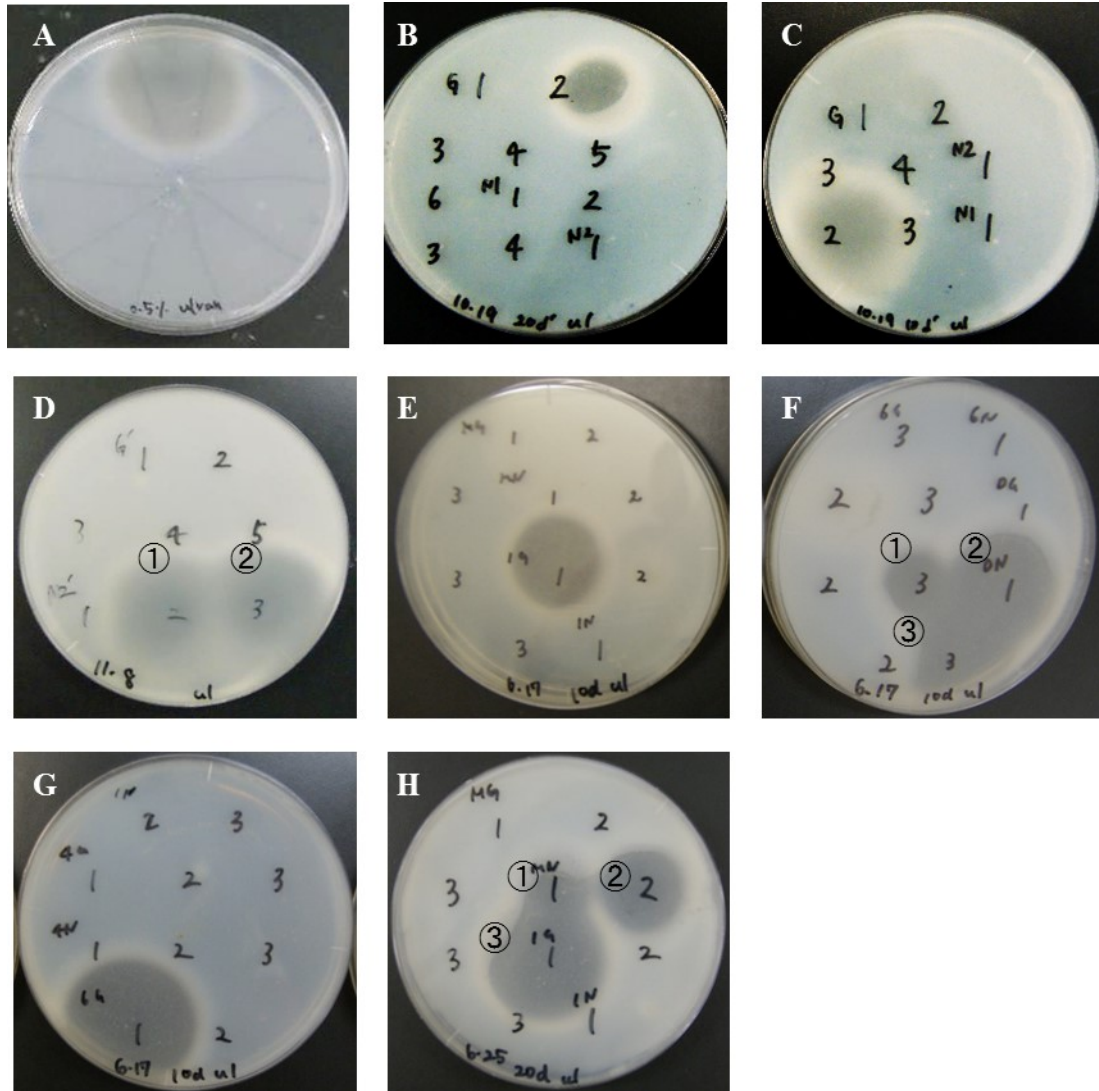


Fig. 4 The result of ulvan degradation reaction test of each isolates. Each isolates were cultured in ulvan containing medium and then immersed in 2 ml of CPC solution. The strains that made the halo were designated as ulvan degrading bacteria. Totally, 13 strains of ulvan degrading bacteria could be isolated.

(A; ul20-2, B; 20G, C; 10N, D①; N2, D②; N3, E; 1G-1, F①; DG-3, F②; DN-1, F③; DN-3, G; 6G-1, H①; MN-1, H②; MN-2, H③; 1G-1-2)

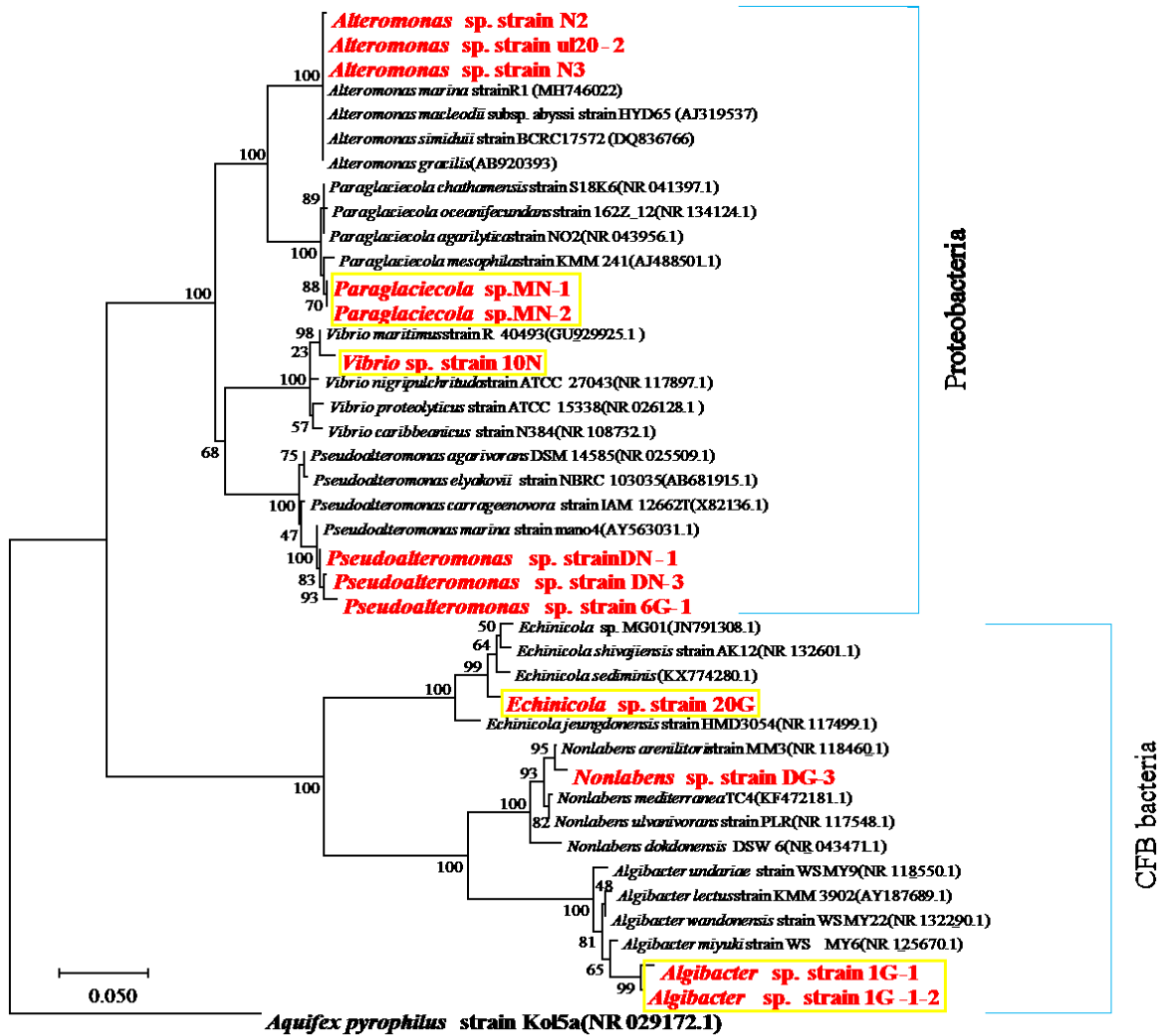


Fig. 5 Maximum Parsimony tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationship between ulvan degrading bacteria and other members of each genus. Bootstrap values (%) based on 1000 replications are shown at the nodes of the tree. Sequence from this study shown in bold red text. Novel ulvan degrading bacteria are shown in yellow lines.

Table 12 Isolated number of the ulvan degrading bacteria from each samples

Source	Sample	Isolates	degradation activity	Sample name
Ulva	ul-5	4	0	
	ul-9	3	0	
	ul-20	5	1	UI20-2
	ul-4	4	0	
	ul2-9	4	0	
	ul-sw	2	0	
	mix-5	4	0	
	mix-9	3	0	
	mix-20	5	0	
	mix2-4	6	0	
	mix2-9	4	0	
	Sea water	mG-10	8	0
mG-20		11	1	20G
mG-30		4	0	
mN1-10		5	1	10N
mN1-20		9	0	
mN1-30		6	0	
mN2-10		7	0	
mN2-20		5	0	
mN2-30		5	0	
mG-2		5	0	
mN1-2		7	0	
mN2-2		3	2	N2, N3
MG-10		3	0	
MG-20		3	0	
MN-10		3	0	
MN-20		3	2	MN-1, MN-2
DG-10		3	1	DG-3
DG-20		3	0	
DN-10		3	2	DN-1, DN-3
DN-20		3	0	
1G-10		3	1	1G-1
1G-20		3	1	1G-1-2
1N-10		3	0	
1N-20		3	0	
4G-10		3	0	
4G-20		3	0	
4N-10		3	0	
4N-20		3	0	
6G-10		3	1	6G-1
6G-20		3	0	
6N-10	3	0		
6N-20	3	0		

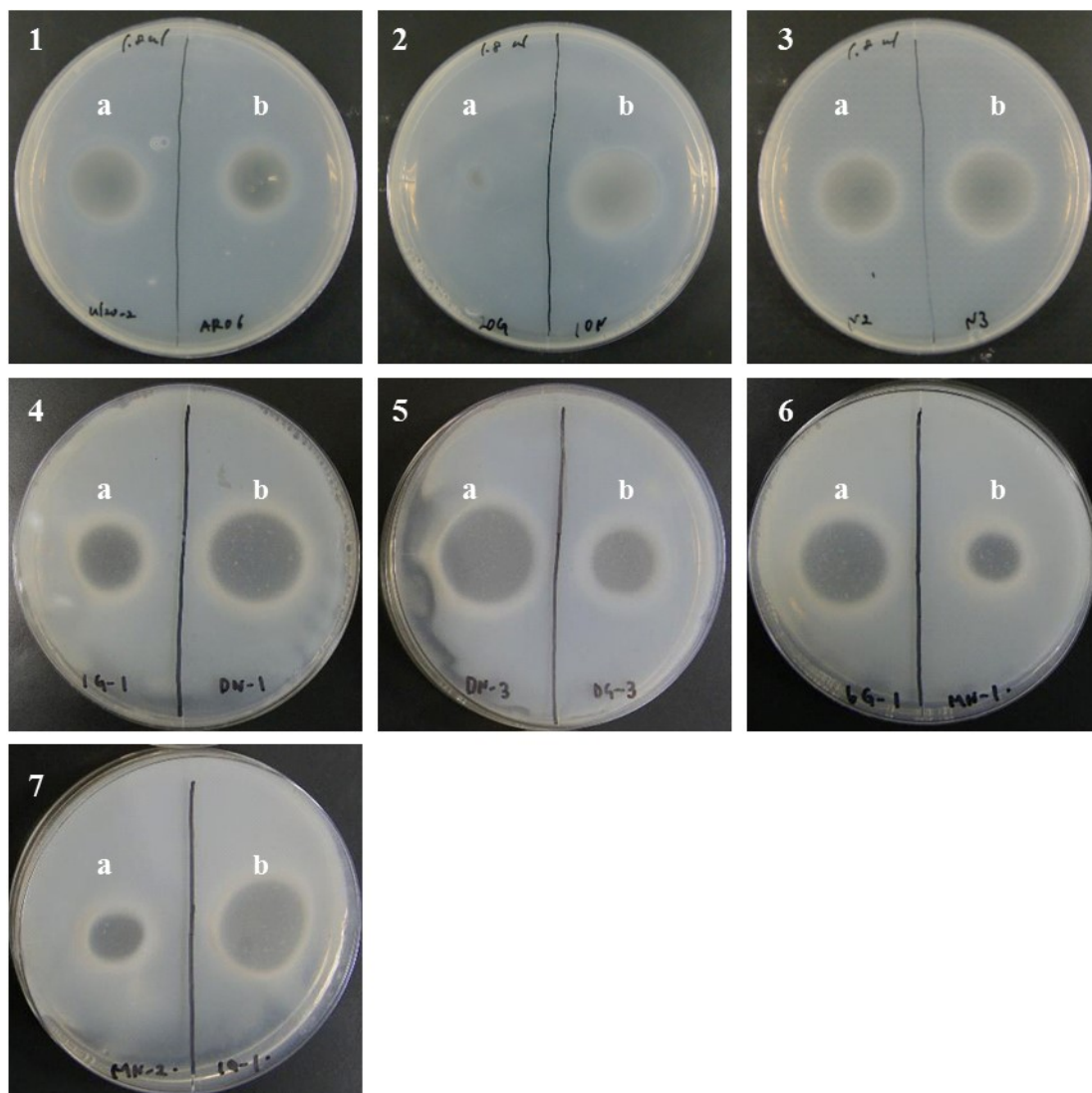


Fig. 6 The result of ulvan degradation ability test. 13 strains of ulvan degrading bacteria were cultured in ulvan containing medium for five days, and then immersed in CPC solution. Diameter of halo were measured and described below. (1a; ul20-2: 24 mm, 1b; AR06: 18 mm, 2a; 20G: 9 mm, 2b; 10N: 26 mm, 3a; N2: 25 mm, 3b; N3: 25 mm, 4a; 1G-1: 22 mm, 4b; DN-1: 30 mm, 5a; DN-3: 32 mm, 5b; DG-3: 26 mm, 6a; 6G-1: 24 mm, 6b; MN-1: 19 mm, 7a; MN-2: 19 mm, 7b; 1G-1-2: 29 mm)

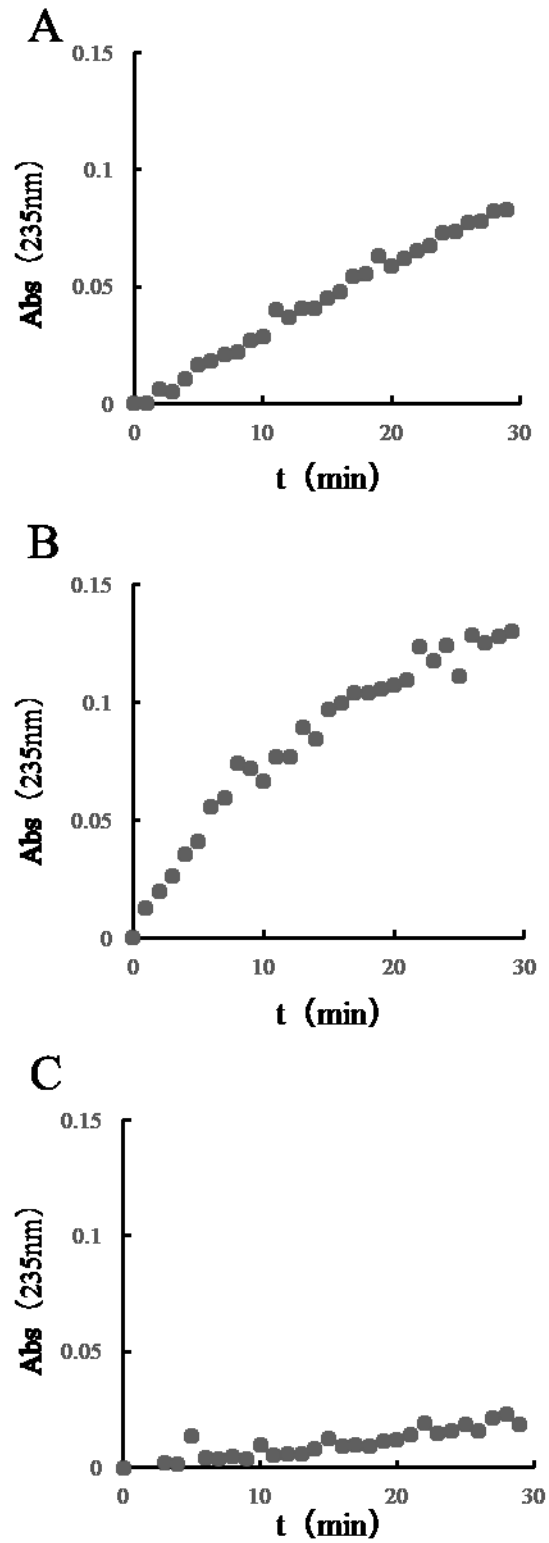


Fig. 7 Kinetics curves of ulvan and concentrate products of supernatant. (A; *Alteromonas* sp. U120-2, B; *Vibrio* sp. 10N, C; *Echinicola* sp. 20G)

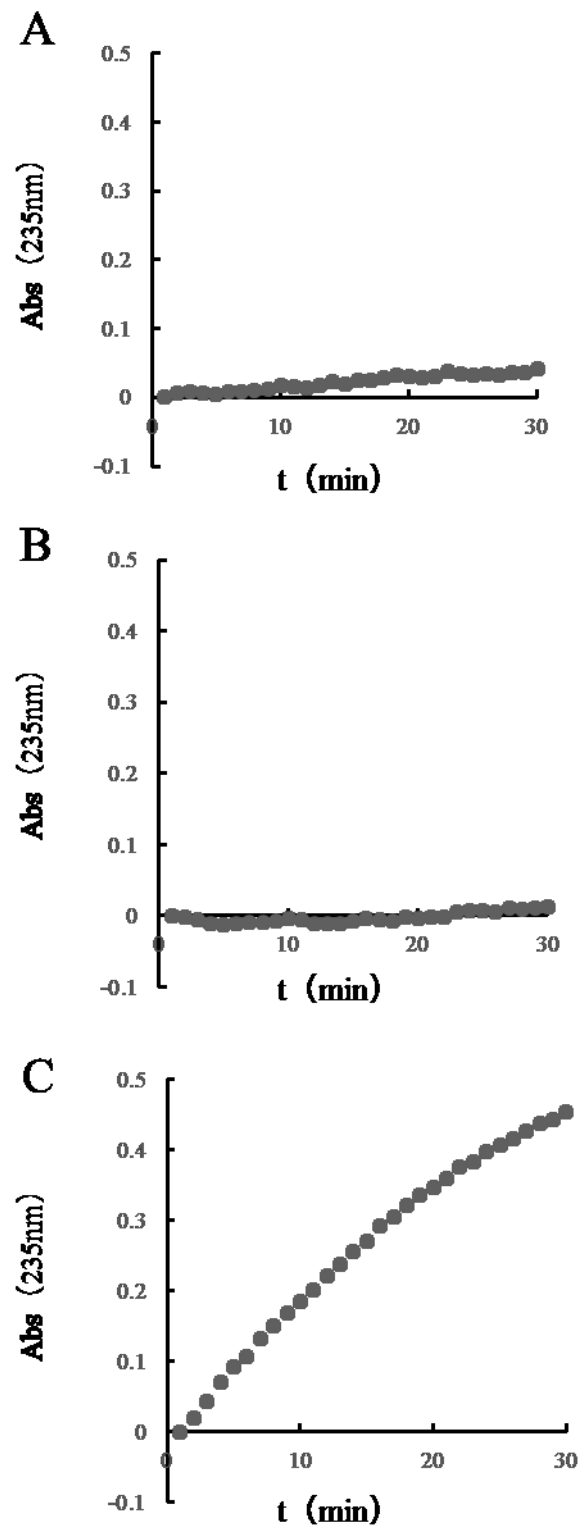


Fig. 8 Kinetics curves of ulvan and cell lysate.
 (A; *Alteromonas* sp. U120-2, B; *Vibrio* sp. 10N, C; *Echinicola* sp. 20G)

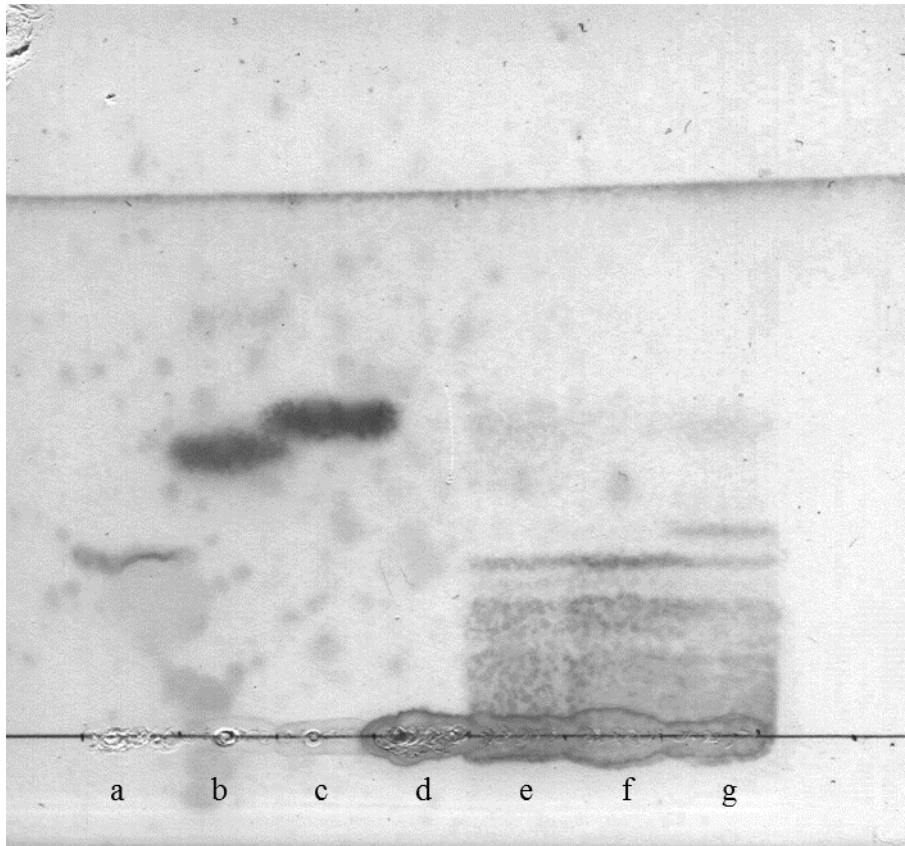


Fig. 9 TLC image of each standard samples or conjugate samples ulvan and concentrate products of supernatant. (a; glucuronic acid, b; xylose, c; rhamnose, d; ulvan, e; ulvan+*Alteromonas* sp. UI20-2, f; ulvan+*Vibrio* sp. 10N, g; ulvan+*Echinicola* sp. 20G)

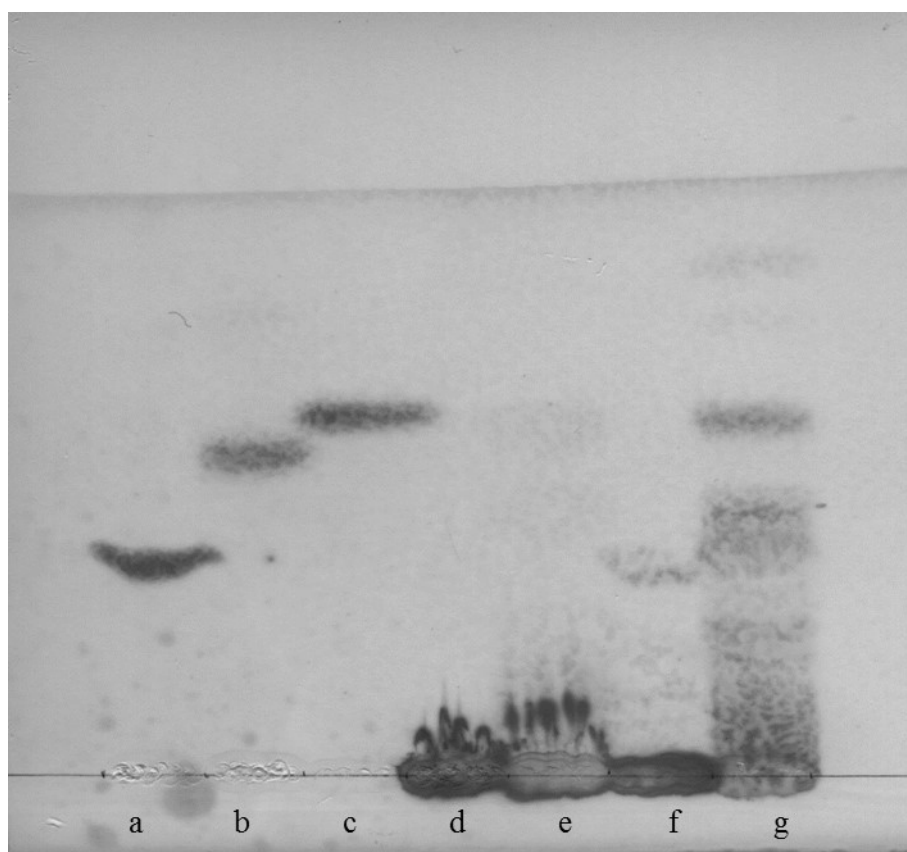


Fig. 10 TLC image of each standard samples or conjugate samples of ulvan and cell lysate. Sample G was observed monosaccharide same as rhamnose standard. (a; glucuronic acid, b; xylose, c; rhamnose, d; ulvan, e; ulvan+*Alteromonas* sp. UI20-2, f; ulvan+*Vibrio* sp. 10N, g; ulvan+*Echinicola* sp. 20G)

Organism Overview for *Echinicola* sp. 20G (6666666.693533)

Genome	<i>Echinicola</i> sp. 20G
Domain	Bacteria
Taxonomy	Bacteria; <i>Echinicola</i> sp. 20G
Neighbors	View closest neighbors
Size	5,785,879
GC Content	39.9
L50	1
Number of Contigs (with PEGs)	1
Number of Subsystems	269
Number of Coding Sequences	4915
Number of RNAs	44

For each genome we offer a wide set of information to browse, compare and download.

[Browse](#) [Compare](#) [Download](#) [Annotate](#)

Browse through the features of [Echinicola](#) sp. 20G both graphically and through a table. Both allow quick navigation and filtering for features of your interest. Each feature is linked to its own detail page.

Click [here](#) to get to the Genome Browser

Subsystem Information

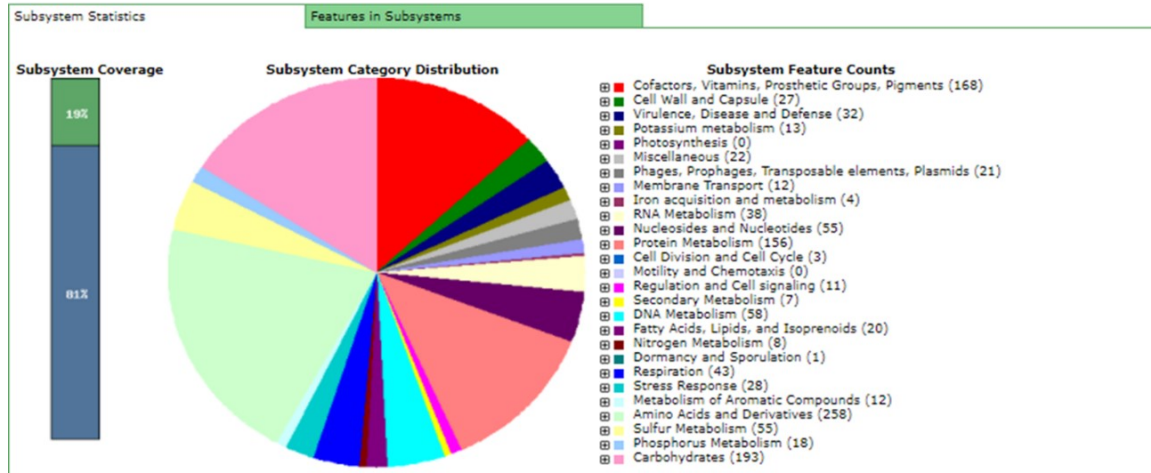
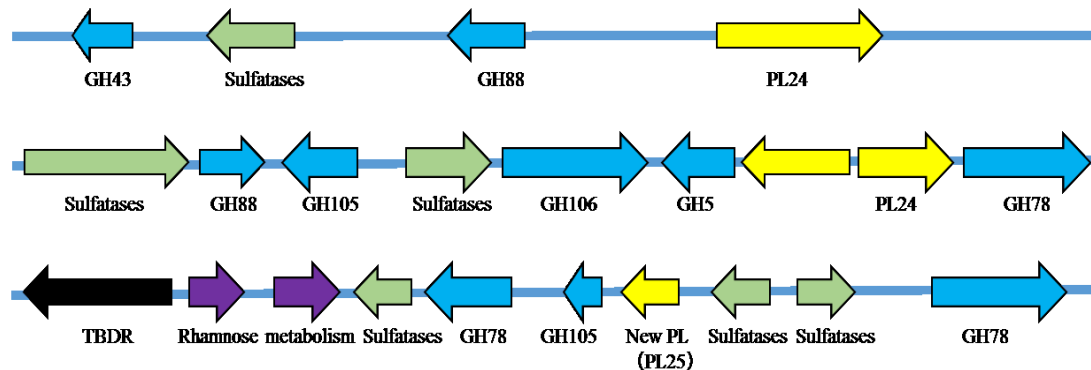
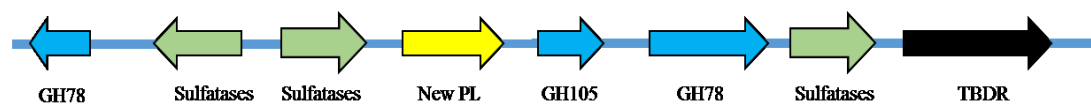


Fig. 11 Over view of the gene composition of strain *Echinicola* sp. 20G from RAST server.

1 *Alteromonas* sp. LOR



2 *Pseudoalteromonas* sp. PLSV



3 *Nonlabens ulvanivorans*

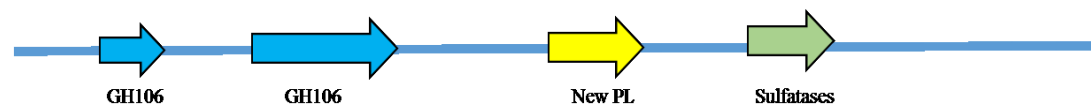
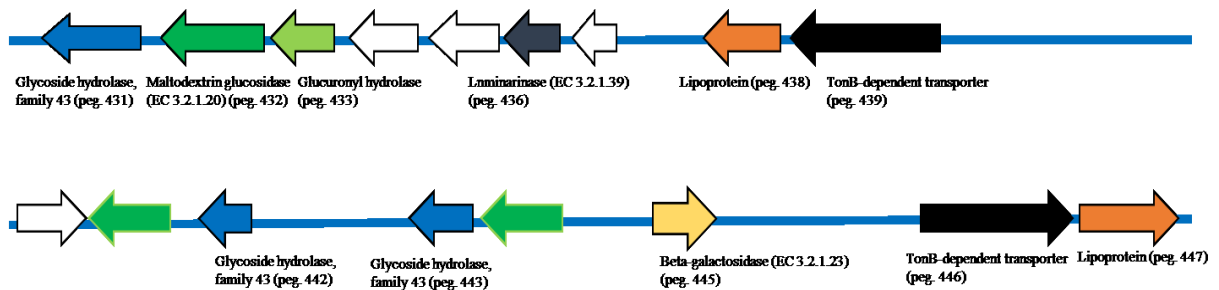
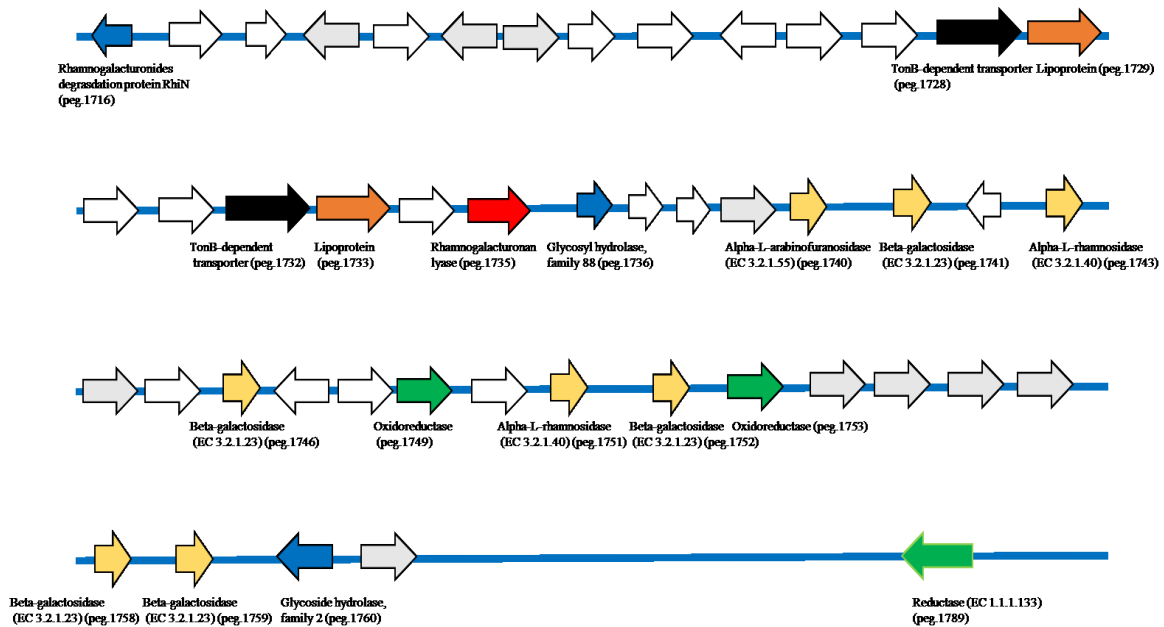


Fig. 12 The gene cluster of ulvan degrading related genes from already reported 3 strains. (1; *Alteromonas* sp. LOR, 2; *Pseudoalteromonas* sp. PLSV, 3; *Nonlabens ulvanivorans*.) (modified 2017, Foran E et al. :8)



Feature ID	Function
fig6666666.558775.peg.431	Hypothetical glycoside hydrolase, family 43, similar to arabinosidase
fig6666666.558775.peg.432	Maltodextrin glucosidase (EC 3.2.1.20)
fig6666666.558775.peg.433	Glucuronyl hydrolase
fig6666666.558775.peg.434	hypothetical protein
fig6666666.558775.peg.435	hypothetical protein
fig6666666.558775.peg.436	Laminarinase (EC 3.2.1.39)
fig6666666.558775.peg.437	hypothetical protein
fig6666666.558775.peg.438	Cell surface glycan-binding lipoprotein, utilization system for glycans and polysaccharides (PUL), SusD family
fig6666666.558775.peg.439	Outer membrane TonB-dependent transporter, utilization system for glycans and polysaccharides (PUL), SusC family
fig6666666.558775.peg.440	hypothetical protein
fig6666666.558775.peg.441	Xylan 1,4-beta-xylosidase (EC 3.2.1.37)
fig6666666.558775.peg.442	Hypothetical glycoside hydrolase, family 43, similar to arabinosidase
fig6666666.558775.peg.443	Hypothetical glycoside hydrolase, family 43, similar to arabinosidase
fig6666666.558775.peg.444	Xylan 1,4-beta-xylosidase (EC 3.2.1.37)
fig6666666.558775.peg.445	beta-galactosidase (EC 3.2.1.23)
fig6666666.558775.peg.446	Outer membrane TonB-dependent transporter, utilization system for glycans and polysaccharides (PUL), SusC family
fig6666666.558775.peg.447	Cell surface glycan-binding lipoprotein, utilization system for glycans and polysaccharides (PUL), SusD family

Fig. 13 The gene cluster 1 of a putative ulvan degrading related gene of strain *Echinicola* sp. 20G.



Feature ID	Function
fig 6666666.558775.peg.1716	Rhamnogalacturonides degradation protein RhiN
fig 6666666.558775.peg.1717	hypothetical protein
fig 6666666.558775.peg.1718	hypothetical protein
fig 6666666.558775.peg.1719	Exopolysaccharuronase precursor
fig 6666666.558775.peg.1720	hypothetical protein
fig 6666666.558775.peg.1721	Periplasmic ligand-binding sensor domain COG3292/ BaeS-type histidine kinase / OmpR-type DNA-binding response regulator
fig 6666666.558775.peg.1722	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (EC 1.1.1.44)
fig 6666666.558775.peg.1723	hypothetical protein
fig 6666666.558775.peg.1724	hypothetical protein
fig 6666666.558775.peg.1725	hypothetical protein
fig 6666666.558775.peg.1726	hypothetical protein
fig 6666666.558775.peg.1727	hypothetical protein
fig 6666666.558775.peg.1728	Outer membrane TonB-dependent transporter, utilization system for glycans and polysaccharides (PUL), SusC family
fig 6666666.558775.peg.1729	Cell surface glycan-binding lipoprotein, utilization system for glycans and polysaccharides (PUL), SusD family
fig 6666666.558775.peg.1730	hypothetical protein
fig 6666666.558775.peg.1731	hypothetical protein
fig 6666666.558775.peg.1732	Outer membrane TonB-dependent transporter, utilization system for glycans and polysaccharides (PUL), SusC family
fig 6666666.558775.peg.1733	Cell surface glycan-binding lipoprotein, utilization system for glycans and polysaccharides (PUL), SusD family
fig 6666666.558775.peg.1734	hypothetical protein
fig 6666666.558775.peg.1735	Rhamnogalacturonan lyase
fig 6666666.558775.peg.1736	Glycosyl hydrolase, family 88
fig 6666666.558775.peg.1737	hypothetical protein
fig 6666666.558775.peg.1738	FIG01125695: hypothetical protein
fig 6666666.558775.peg.1739	rhamnogalacturonan acetylsterase
fig 6666666.558775.peg.1740	alpha-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)
fig 6666666.558775.peg.1741	Beta-galactosidase (EC 3.2.1.23)
fig 6666666.558775.peg.1742	hypothetical protein
fig 6666666.558775.peg.1743	alpha-L-rhamnosidase (EC 3.2.1.40)
fig 6666666.558775.peg.1744	Xylose isomerase domain protein TIM barrel
fig 6666666.558775.peg.1745	FIG00654050: hypothetical protein
fig 6666666.558775.peg.1746	beta-galactosidase (EC 3.2.1.23)
fig 6666666.558775.peg.1747	hypothetical protein
fig 6666666.558775.peg.1748	FIG00909075: hypothetical protein
fig 6666666.558775.peg.1749	Oxidoreductase, Gfo/Ith/MocA family
fig 6666666.558775.peg.1750	hypothetical protein
fig 6666666.558775.peg.1751	alpha-L-rhamnosidase (EC 3.2.1.40)
fig 6666666.558775.peg.1752	beta-galactosidase (EC 3.2.1.23)
fig 6666666.558775.peg.1753	Oxidoreductase, Gfo/Ith/MocA family
fig 6666666.558775.peg.1754	similar to ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, Type III
fig 6666666.558775.peg.1755	Candidate type III effector Hop protein
fig 6666666.558775.peg.1756	Glutamate racemase (EC 5.1.1.3)
fig 6666666.558775.peg.1757	Sodium-dependent transporter
fig 6666666.558775.peg.1758	beta-galactosidase (EC 3.2.1.23)
fig 6666666.558775.peg.1759	beta-galactosidase (EC 3.2.1.23)
fig 6666666.558775.peg.1760	glycoside hydrolase family 2, sugar binding
fig 6666666.558775.peg.1761	Sialic acid-specific 9-O-acetylsterase
fig 6666666.558775.peg.1789	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase (EC 1.1.1.133)

Fig. 14 The gene cluster 2 of a putative ulvan degrading related gene of strain *Echinicola* sp. 20G.

4. 考察

本研究は、はじめにウルバン分解細菌の分布を網羅的に探ることを目的に、腐敗アオサと濃縮海水からウルバン分解細菌を単離することを試みた。既知のウルバン分解細菌は主に緑藻摂餌性生物から単離されているが、ウルバンを栄養源として利用しているアオサに付着した細菌の可能性から腐敗アオサを、また網羅的単離を行うために異なる地点や時期の濃縮海水を用いた。

後日追加で純粋分離を行った分離株からウルバン分解活性が見られたことから、純粋分離に用いた培地である Marine agar にはウルバンが含まれていないため、一度目に純粋分離を行った 2, 3 日の培養期間では増殖できなかったと考えられる。今後も分離を行う際には培地中にウルバン成分を入れる等の何らかの策が必要であると考えられる。また濃縮海水では、GFC フィルターからも分離できたことから、フィルターを通過できない砂などに付着していた細菌であると考えられる。緑藻だけでなく、このような付着面分からウルバン分解菌が分離されることは新知見であった。

分子系統解析の結果、初のウルバン分解細菌である *Paraglaciecola* 属 (24) , *Vibrio* 属 (25) , *Echinicola* 属 (26) , *Algibacter* 属 (27) から分離に成功した。プロテオバクテリア綱細菌から CFB 門細菌群に渡っており、多様な細菌群におい

てウルバン分解細菌は分布することが示唆された。

分解活性試験では、*Alteromonas* sp. UI20-2 株および *Vibrio* sp. 10N 株の菌体外濃縮液とウルバンの反応物が、吸光度 235 nm の増加を示し TLC 解析でも分解の様子が確認できたことから、これら 2 つの株は菌体外に分泌するエンド型のウルバン分解酵素を有することが考えられる。一方 *Echinicola* sp. 20G 株の菌体内破碎液とウルバンの反応物が吸光度 235 nm の増加および薄層クロマトグラフィーにて単糖への分解を確認できたことから、本菌はウルバンを単糖に分解できるウルバン分解酵素を有する可能性があると考えられた。また *Echinicola* sp. 20G 株のウルバン分解能測定の結果が他の細菌に比べ弱いことから、菌体外でウルバンを分解する既存の分解様式とは異なる分解様式をもつことが考えられる。

続いて *Echinicola* sp. 20G 株のフルゲノムを取得し、Local BLAST で既知ウルバンリアーゼとの相同性解析を行ったが、ウルバンリアーゼは存在しなかった。そこで 2 つのウルバン分解遺伝子クラスターの一次構造を作成した。既知のウルバン分解遺伝子クラスターと比較すると、3-硫酸化ラムノースの切断に関わる Sulfatase をもたないことから、3-硫酸化ラムノースを直接、中間代謝物質として利用することが考えられた。この知見は既知のウルバン分解細菌とは違った代謝機構を持つことが考えられる。

既知のウルバンリアーゼは carbohydrate-active enzymes (CAZy) データベース (www.cazy.org) に 13 個の遺伝子が登録されている。それらは 5 つの polysaccharide lyase (PL24, PL25, PL28, PL37, PL40) に分類される (8, 20, 28-32)。

Table 1 で示した現在作用機構が判明しているウルバンリアーゼは、全て菌体外に分泌されたエンド型リアーゼであり六糖～二糖までしか分解できない(8, 9, 20, 23, 28, 30-37)。本研究で分離された *Ecinicola* sp. 20G 株は菌体内にウルバン分解活性をもつことから、初のエキソ型ウルバンリアーゼであることが示唆される。

今後、決定したウルバン分解関連遺伝子群のうち、ウルバンリアーゼの遺伝子配列をタンパク質発現、活性試験により特定することが望まれる。

謝辞

本論文を終えるにあたり、暖かく見守っていただくとともに多くの支援を賜りました三重大学大学院 生物資源学研究科 生物圏生命科学専攻 教授 福崎智司博士に心から感謝申し上げます。また、論文の作製および研究遂行上終始適切なるご指導を賜りました三重大学大学院 生物資源学研究科 生物圏生命科学専攻 准教授 田中礼士博士 および 准教授 柴田敏行博士 最後に、論文執筆および研究遂行にあたり数々のご協力を頂いた海洋微生物学研究室の大学院生の方々、学部生諸氏に深謝申し上げます。

参考文献

1. John RP, Anisha GS, Nampoothiri KM, Pandey A. (2011) . Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*. 102: 186-93. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.139.
2. Singh A, Nigam PS, Murphy JD. (2011) . Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology*. 102: 10-6. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.032.
3. Jung KA, Lim SR, Kim Y, Park JM. (2013) . Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery. *Bioresource Technology*. 135: 182-90. doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.025.
4. Reisky L, Prechoux A, Zuhlke MK, Baumgen M, Robb CS, Gerlach N, Roret T, Stanetty C, Larocqe R, Michel G, Song T, Markert S, Unfried F, Mihovilovic MD, Trautwein-Schult A, Becher D, Schweder T, Bornscheuer UT, Hehemann JH. (2019) . A marine bacterial enzymatic cascade degrades the algal polysaccharide ulvan. *Nature Chemical Biology*. 15:803-812. doi: 10.1038/s41589-019-0311-9.
5. Hiroaka M, Ohno M, Kawaguchi S, Yoshida G. (2004) . Crossing test among floating *Ulva thalli* forming “green tide” in Japan Asian Pacific Phycology in the 21st Century: Propects and Challenges. 239-245. doi: 10.1023/B:HYDR.0000020332.12641.a2.
6. Lahaye M, Robic A. (2007) . Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*. 8: 1765–1774. doi: 10.1021/bm061185q.
7. Lahaye M, Ray B. (1996) . Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva “rigida”* (Ulvales, Chlorophyta)-NMR 287 analysis of ulvan oligosaccharides. *Carbohydrate Research*. 283:161–173. doi: 10.1016/0008-6215(95)00407-6.

8. Foran E, Buravenkov V, Kopel M, Mizrahi N, Shoshani S, Helbert W, Banin E. (2017) . Functiol characterization of a novel “ulvan utilization loci” found in *Alteromonas* sp. LOR genome. *Algal Research*. 25: 39-46. doi: 10.1016/j.algal.2017.04.036.
9. Li Q, Hu F, Zhu B, Ni F, Yao Z. (2020) . Insights into ulvan lyase: review of source, biochemical characteristics, structure and catalytic mechanism. *Critical Reviews in Biotechnology*. 40: 432-441. doi: 10.1080/32/07388551.2020.1723486.
10. Kidgell JT, Magnusson M, Nys R, Glasson CRK. (2019) . Ulvan: a systematic review of extraction, composition and function *Algal Research*. 39: 101422. doi: 10.1016/j.algal.2019.101422.
11. Petitou M, Duchaussoy P, Lederman I, Choay J, Sinaÿ P, Jacquinet JC, Torri G. (1986) . Synthesis of heparin fragments. A chemical synthesis of the pentasaccharide O-(2-deoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo-alpha-D-glucopyranosyl)-(1-4)-O-(beta-D-glucopyranosyluronicacid)-(1-4)-O-(2-deoxy-2-sulfamido-3,6-di-O-sulfo-alpha-D-glucopyranosyl)-(1-4)-O-(2-O-sulfo-alpha-L-idopyranosyluronicacid)-(1-4)-2-deoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo-D-glucopyranose decasodium salt, a heparin fragment having high affinity for antithrombin III. *Carbohydrate research*. 147: 221–236. doi: 10.1016/s0008-6215(00)90633-5.
12. Vlachou M, Tragou K, Siamidi A, Kikionis S, Chatzianagnostou AL, Mitsopoulos A, Ioannou E, Roussis V, Tsotinis A. (2017) . Modified in vitro release of the chronobiotic hormone melatonin from matrix tablets based on the marine sulfated polysaccharide ulvan. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 44: 41-48. doi: 10.1016/j.jddst.2017.11.019.
13. Leiro JM, Castro R, Arranz JA, Lamas J. (2007) . Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *International immunopharmacology*. 7: 879–888, doi: 10.1016/j.intimp.2007.02.007.
14. Mao W, Zang X, Li Y, Zhang H. (2006) . Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. *Journal of Applied phycology*. 18: 9–14. doi: 10.1007/s10811-005-9008-4.

15. Jaulneau V, Lafitte C, Jacquet C, Fournier S, Salamagne S, Briand X, Esquerré-Tugayé MT, Dumas B. (2010) . Ulvan, a sulfated polysaccharide from green algae, activates plant immunity through the jasmonic acid signaling pathway. *BioMed Research International*. 525291. doi: 10.1155/2010/525291.
16. Paulert R, Talamini V, Cassolato JEF, Duarte MER, Nosedá MD, Smania A, Stadnik MJ. (2009) . Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) . *Journal of Plant Diseases and Protection*. 116: 263–270. doi: 10.1007/bf03356321.
17. Kamimura Y, Hashiguchi K, Nagata Y, Saka Y, Yoshida M, Makino Y, Amano H. (2010) . Inhibitory Effects of Edible Green Algae *Monostroma nitidum* on Glycemic Responses. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. 57: 441-445. doi: 10.3136/nskkk.57.441.
18. Ivanova V, Rouseva R, Kolarova M, Serkedjieva J, Rachev R, Manolova N. (1994) . Isolation of a polysaccharide with antiviral effect from *Ulva lactuca*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 24: 83-97. doi: 10.1080/10826069408010084.
19. Yip VLY, Varrot A, Davies GJ, Rajan SS, Yang X, Thompson J, Anderson WF, Withers SG. (2004) . An unusual mechanism of glycoside hydrolysis involving redox and elimination steps by a family 4 beta-glycosidase from *Thermotoga maritima*. *Journal of the American Chemical Society*. 126: 8354–8355. doi: 10.1021/ja047632w.
20. Collen PN, Sassi JF, Rogniaux H, Marfaing H, Helbert W. (2011) . Ulvan lyases isolated from the Flavobacteria *Persicivirga ulvanivorans* are the first members of a new polysaccharide lyase family. *The Journal of biological chemistry*. 286: 42063-42071. doi: 10.1074/jbc.M111.271825.
21. Kopel M, Helbert W, Henrissat B, Doniger T, Banin E. (2014) . Draft Genome Sequence of *Pseudoalteromonas* sp. Strain PLSV, an Ulvan-Degrading Bacterium. *Genome Announcement*. 2: e00793-14. doi: 10.1128/MRA.01254-19.

22. Salinas A, French CE. (2017) . The enzymatic ulvan depolymerisation system from the alga-associated marine flavobacterium *Formosa agariphila*. *Algal Research*. 27: 335-344. doi: 10.1016/j.algal.2017.09.025.
23. He C, Muramatsu H, Kato S, Ohnishi K. (2017) . Characterization of an *Alteromonas* long-type ulvan lyase involved in the degradation of ulvan extracted from *Ulva ohnoi*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 81: 2145–2151. doi: 10.1080/09168451.2017.1379352.
24. Shivaji, S, and Reddy GS. (2014) . "Phylogenetic analyses of the genus *Glaciecola*: emended description of the genus *Glaciecola*, transfer of *Glaciecola mesophila*, *G. agarilytica*, *G. aquimarina*, *G. arctica*, *G. chathamensis*, *G. polaris* and *G. psychrophila* to the genus *Paraglaciecola* gen. nov. as *Paraglaciecola mesophila* comb. nov., *P. agarilytica* comb. nov., *P. aquimarina* comb. nov., *P. arctica* comb. nov., *P. chathamensis* comb. nov., *P. polaris* comb. nov. and *P. psychrophila* comb. nov., and description of *Paraglaciecola oceanifecundans* sp. nov., isolated from the Southern Ocean." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64: 3264-3275. doi: 10.1099/ijs.0.065409-0.
25. Thompson CC, Thompson FL, Vicente AC, Swings J. (2007) . "Phylogenetic analysis of *vibrios* and related species by means of *atpA* gene sequences." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57: 2480-2484. doi: 10.1099/ijs.0.65223-0.
26. Nedashkovskaya OI, Kim SB, Vancanneyt M, Lysenko AM, Shin DS, Park MS, Lee KH, Jung WJ, Kalinovskaya NI, Mikhailov VV, Bae KS, Swings J. (2006) . *Echinicola pacifica* gen. nov., sp. nov., a novel flexibacterium isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56(Pt5):953-958. doi: 10.1099/ijs.0.64156-0.
27. Nedashkovskaya OI, Kim SB, Han SK, Rhee MS, Lysenko AM, Rohde M, Zhukova, NV, Frolova GM, Mikhailov VV, Bae KS. (2004) . "*Algibacter lectus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from green algae." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 1257-1261. doi: 10.1099/ijs.0.02949-0.

28. Ulaganathan T, Boniecki MT, Foran E, Buravenkov V, Mizrachi N, Banin E, Helbert W, Cygler M. (2017) . New ulvan-degrading polysaccharide lyase family: structure and catalytic mechanism suggests convergent evolution of active site architecture. *ACS Chemical Biology*. 12: 1269–1280. doi: 10.1021/acscchembio.7b00126.
29. Coste O, Malta EJ, Lopez JC, Catalina FD. (2015) . Production of sulfated oligosaccharides from the seaweed *Ulva* sp. using a new ulvan-degrading enzymatic bacterial crude extract. *Algal Research*. 10: 224–231. doi: 10.1016/j.algal.2015.05.014.
30. Qin HM, Xu P, Guo Q, Cheng X, Gao D, Sun D, Zhu Z, Lu F. (2018) . Biochemical characterization of a novel ulvan lyase from *Pseudoalteromonas* sp strain PLSV. *RSC Advances*. 8: 2610–2615. doi: 10.1039/C7RA12294B.
31. Reisky L, Stanetty C, Mihovilovic MD, Schweder T, Hehemann JH, Bornscheuer UT. (2018) . Biochemical characterization of an ulvan lyase from the marine flavobacterium *Formosa agariphila* KMM 3901T. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102: 6987–6996. doi: 10.1007/s00253-018-9142-y.
32. Ulaganathan T, Banin E, Helbert W, Cygler M. (2018) . Structural and functional characterization of PL28 family ulvan lyase NLR48 from *Nonlabens ulvanivorans*. *Journal of Biological Chemistry*. 293: 11564–11573. doi: 10.1074/jbc.RA118.003659.
33. Konasani VR, Jin C, Karlsson NG, Albers E. (2018) . A novel ulvan lyase family with broad-spectrum activity from the ulvan utilisation loci of *Formosa agariphila* KMM 3901. *Scientific reports*. 8: 1-11. doi: 10.1038/s41598-018-32922-0.
34. Ulaganathan TS, Helbert W, Kopel M, Banin E, Cygler M. (2018) . Structure–function analyses of a PL24 family ulvan lyase reveal key features and suggest its catalytic mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. 239: 4026–4036. doi: 10.1074/jbc.RA117.001642.
35. Qi HM, Zhao TT, Zhang QB, Li Z, Zhao Z, Xing R. (2005) . Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*. 17: 527–534. doi: 10.1007/s10811-

005-9003-9.

36. Mann AJ, Hahnke RL, Huang S, Werner J, Xing P, Barbeyron T, Huettel B, Stüber K, Reinhardt R, Harder J, Glöckner FO, Amann RO, Teeling H. (2013) . The genome of the alga-associated marine flavobacterium *Formosa agariphila* KMM 3901T reveals a broad potential for degradation of algal polysaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*. 79: 6813–6822. doi: 10.1128/AEM.01937-13.
37. Gao J, Du C, Chi Y, Zuo S, Ye H, Wang P. (2019) . Cloning, expression, and characterization of a new PL25 family ulvan lyase from marine bacterium *Alteromonas* sp.: A321. *Marine Drugs*. 17:pii: E568. doi: 10.3390/md17100568.