

# 修士論文

海洋細菌 *Vibrio* sp. XY-214 株由来

$\beta$ -1,3-キシラナーゼと $\beta$ -1,3-キシロシダーゼに関する研究

平成 19 年 3 月

三重大学大学院生物資源学研究科

生物圏生命科学専攻

梅本 善明

第 I 章 緒論.....	1
第 II 章 $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子のクローニングと一次構造の比較.....	8
II-1. 実験材料および実験方法.....	8
II-1-1. 使用菌株.....	8
II-1-2. 宿主大腸菌およびプラスミドベクター.....	8
II-1-3. 試薬.....	9
II-1-4. $\beta$ -1,3-キシランの調製.....	10
II-1-5. DNA の各種処理.....	11
II-1-6. アガロースゲル電気泳動.....	11
II-1-7. 形質転換.....	11
II-1-8. ゲノムの抽出.....	11
II-1-9. 16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定.....	13
II-1-9-1. PCR による 16S rRNA 遺伝子の増幅.....	13
II-1-9-2. 増幅した 16S rRNA 遺伝子の精製.....	14
II-1-9-3. 塩基配列の決定.....	14
II-1-10. $\beta$ -1,3-キシラナーゼ活性の測定と比較.....	14
II-1-10-1. 酵素液の抽出.....	14
II-1-10-2. $\beta$ -1,3-キシラナーゼ活性測定.....	14
II-1-11. $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子のクローニングと塩基配列の決定.....	15
II-1-11-1. PCR による $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子の増幅.....	15
II-1-11-2. PCR 増幅産物の塩基配列解読.....	16
II-2. 実験結果.....	16
II-2-1. 16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定と比較.....	16
II-2-2. $\beta$ -1,3-キシラナーゼ活性の比較.....	17
II-2-3. $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子のクローニングと塩基配列の決定.....	17
II-3. 考察.....	24
第 III 章 <i>Vibrio</i> sp. XY-214 株由来 $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子( <i>xloA</i> )のクローニング用プローブの作製.....	26

III-1.	実験材料および実験方法.....	26
III-1-1.	使用菌株.....	26
III-1-2.	試薬.....	28
III-1-3.	$\beta$ -キシロシダーゼの活性測定.....	28
III-1-3-1.	活性測定の基質.....	28
III-1-3-2.	酵素活性の測定.....	28
III-1-4.	タンパク質の定量.....	28
III-1-5.	<i>Vibrio</i> sp. XY-214 株由来 $\beta$ -キシロシダーゼ(XloA)の精製.....	28
III-1-5-1.	大量培養.....	28
III-1-5-2.	粗酵素液の抽出.....	29
III-1-5-3.	DEAE Toyopearl 650M による陰イオン交換クロマトグラフィー.....	29
III-1-5-4.	硫酸アンモニウムによる逆塩析での酵素の濃縮.....	29
III-1-5-5.	Ether Toyopearl 650S による疎水クロマトグラフィー.....	29
III-1-5-6.	Mono Q による陰イオンクロマトグラフィー.....	30
III-1-5-7.	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE).....	30
III-1-5-8.	XloA の N 末端アミノ酸配列、内部アミノ酸配列の決定.....	30
III-1-6.	<i>xloA</i> 遺伝子クローニング用プローブの作製.....	31
III-2.	実験結果.....	34
III-2-1.	<i>Vibrio</i> sp. XY-214 株由来 $\beta$ -キシロシダーゼ(XloA)の精製.....	34
III-2-2.	$\beta$ -キシロシダーゼ(XloA)の N 末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列の決定.....	34
III-2-3.	縮重プライマーの作製.....	34
III-2-4.	縮重プライマーを用いた PCR.....	35
III-3.	考察.....	44
第IV章	<i>Vibrio</i> sp. XY-214 株由来 $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子( <i>xloA</i> )のクローニングと塩基配列の決定.....	46
IV-1.	実験材料および実験方法.....	46
IV-1-1.	試薬.....	46
IV-1-2.	宿主大腸菌およびプラスミドベクター.....	46
IV-1-3.	DNA の各種処理.....	46

IV-1-4.	アガロースゲル電気泳動 .....	47
IV-1-5.	形質転換.....	47
IV-1-6.	$\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子( <i>xloA</i> )のクローニング .....	47
IV-2.	実験結果.....	51
IV-2-1.	サザンハイブリダイゼーションによる $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子( <i>xloA</i> )含有 DNA 断片の検出.....	51
IV-2-2.	コロニーダイレクト PCR によるスクリーニング .....	51
IV-2-3.	XY-214 <i>Xba</i> I · <i>Spe</i> I インサート遺伝子断片の塩基配列 .....	51
IV-3.	考察.....	68
第V章 大腸菌発現系による組換え体 XloA(rXloA)の発現とその酵素学的性質の検討 .....		72
V-1.	実験材料および実験方法.....	72
V-1-1.	試薬.....	72
V-1-2.	$\beta$ -1,3-キシロオリゴ糖の調製.....	72
V-1-3.	宿主大腸菌およびプラスミドベクター .....	72
V-1-4.	<i>Vibrio</i> sp. XY-214 株由来 $\beta$ -キシロシダーゼの組換え大腸菌における発現.....	73
V-1-4-1.	発現用プラスミドの構築 .....	73
V-1-4-2.	タンパク質の発現誘導.....	74
V-1-4-3.	組換え $\beta$ -キシロシダーゼ(rXloA)の精製.....	74
V-1-5.	酵素学的性質の検討 .....	75
V-1-5-1.	至適 pH の測定.....	75
V-1-5-2.	pH 安定性の測定 .....	75
V-1-5-3.	至適温度の測定 .....	75
V-1-5-4.	温度安定性の測定.....	76
V-1-5-5.	PNP- $\beta$ -D-キシロピラノシドに対する最大反応速度( $V_{max}$ )およびミカエリス定数( $K_m$ )の測定 .....	76
V-1-5-6.	基質特異性 .....	76
V-1-5-7.	重金属および化学試薬の影響 .....	77
V-1-5-8.	ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた分子量の測定 .....	77
V-1-6.	海藻細胞壁由来 $\beta$ -1,3-キシランからのキシロース生産 .....	77

V-2.	実験結果.....	78
V-2-1.	<i>Vibrio</i> sp. XY-214 株由来 $\beta$ -キシロシダーゼ(XloA)の大腸菌発現系の構築.....	78
V-2-2.	組換え体 $\beta$ -キシロシダーゼ(rXloA)の精製.....	78
V-2-3.	組換え $\beta$ -キシロシダーゼの酵素学的性質.....	78
V-2-4.	海藻細胞壁由来 $\beta$ -1,3-キシランからのキシロース生産.....	79
V-3.	考察.....	93
第VI章 総括.....		95
謝辞.....		109
参考文献.....		110

## 第 I 章 緒 論

植物細胞は動物細胞と異なり、多糖を主成分とする強固な細胞壁により包まれている。この細胞壁構成多糖を分解する糖質分解酵素は、細胞融合や遺伝子導入による品種改良を行う上で有用なプロトプラストの作製、ならびに、近年社会的問題となっている生活習慣病の予防効果が期待されているオリゴ糖の生産などに有用である。特に陸上植物の細胞壁を分解するセルラーゼや $\beta$ -1,4-キシラナーゼに関しては研究が進んでおり、その構造解析や基質結合領域の解析などに関する多数の報告がなされている。さらにこれら 2 種類の糖質分解酵素は、再生可能なエネルギーとして注目されているバイオエタノールを建築廃材などの木質系バイオマスから生産するために重要な酵素としても認識されている。

これに対して、緑藻、紅藻、褐藻と進化上異なる系統群から成る海藻の細胞壁は $\beta$ -1,3-キシラン、寒天、ポルフィラン、フコイダン、アルギン酸など陸上植物にはみられない海藻特有の多糖によって構成されており (Table 1-1)<sup>2)</sup>、これら多糖分解酵素に関する研究はセルラーゼなどに比べて、大きく立ち後れているのが現状である。従って、陸上植物と同様に海藻からプロトプラストやオリゴ糖を作出、またはバイオエタノール製造を行うためには、海藻細胞壁特有の多糖を分解する酵素の開発が必要となる。

アマノリは原始紅藻ウシケノリ科 (*Bangiasea*) アマノリ属 (*Porphyra*) に属し、古くから食用として我々日本人に親しまれ、また、養殖も盛んに行われてきた。現在では選抜育種による多収穫性品種の開発および養殖技術の発展の結果、年間約 100 億枚の生産が可能になった<sup>3)</sup>。しかしながら、多収穫性品種のアマノリは高い生長率を有する反面、病害に対する抵抗性の低下や色落ちなどさまざまな問題点を抱えることが多い<sup>4)</sup>。従って、養殖環境に適応すると同時に、消費者のニーズに応えることのできる高品質の養殖品種の開発が期待されている。このような背景の中で、バイオテクノロジーの技術を応用し、プロトプラストを利用した選抜、および細胞融合による品種改良試験が行われるようになっている<sup>5,6,7,8,9)</sup>。また近年、有明海をはじめ瀬戸内海や全国各地の内湾浅海域において、種々の原因により色落ちノリ被害やスミノリ症がアマノリ類に多発し、産業的に非常に大きな問題となっている。その中で、被害漁民の生活を救済するために、商品価値のない未利用海藻に生物資源としての付加価値

を与え、その積極利用を促進させようとする動きも出始めた<sup>10)</sup>。このような未利用海藻資源の有効利用方法の1つとして海藻多糖を酵素処理により糖化し、発酵させることにより未利用海藻資源からエネルギーを得るという方策が考えられる。そのためには海藻特有の多糖を単糖にまで分解するための酵素が必要とされる。以上のことから海藻の優良品種開発のためだけでなく、未利用海藻資源の有効利用のためにもアマノリ細胞壁分解酵素に関する研究の必要性が高まってきている。

アマノリの細胞壁は、主に $\beta$ -1,3-キシラン、 $\beta$ -1,4-マンナンおよびポルフィランの3種類の多糖から構成されている<sup>11)</sup>。従って、その細胞壁分解には $\beta$ -1,3-キシラナーゼ、 $\beta$ -1,4-マンナーゼ、ポルフィラナーゼの3種類の糖質加水分解酵素が必要である<sup>5, 12)</sup>。また、これら多糖を完全に糖化するためにはさらにキシロシダーゼやマンノシダーゼ、ガラクトシダーゼなどのグリコシダーゼが必要となる。

これら3つの多糖のうち、本研究で対象とする $\beta$ -1,3-キシランは、キシロースが $\beta$ -1,3結合したホモポリマーであり、原始紅藻アマノリ属やウシケノリ属などのウシケノリ科(*Bangiacea*)や緑藻イワツタ属などのイワツタ科(*Caulerpaceae*)、ハネモ属などのハネモ科(*Bryopsidaceae*)の細胞壁を構成している海藻特有の多糖である<sup>13, 14, 15)</sup>。なお、 $\beta$ -1,3-キシランと $\beta$ -1,4-キシランの構造をFig. 1-1に示す。

$\beta$ -1,3-キシランの完全な分解には、本多糖から $\beta$ -1,3-キシロオリゴ糖を生成する $\beta$ -1,3-キシラナーゼと生じたオリゴ糖に作用して単糖のキシロースにまで分解する $\beta$ -1,3-キシロシダーゼが必要となる(Fig. 1-2)。海藻細胞壁分解酵素のうちこれら2種類の酵素に関しては特に報告が少なく、 $\beta$ -1,3-キシロシダーゼに至ってはこれまでのところ報告は見当たらない。 $\beta$ -1,3-キシロシダーゼを単離し、大量生産が可能となれば、 $\beta$ -1,3-キシランという海藻特有の多糖からキシロースを生産できるようになり、これまで陸上植物を原料としてきたバイオエタノールやキシリトールなどの有用物質をアマノリ属など、 $\beta$ -1,3-キシランを主な細胞壁構成成分とする海藻から生産できるようになると考えられる。すなわち、近年地中海を中心に異常繁殖している変種イチヅタは、生態系を破壊し、漁業に甚大な被害を与えていることからその駆除が大きな課題となっているが、本海藻の細胞壁も $\beta$ -1,3-キシランにより構成されている。従って、 $\beta$ -1,3-キシラン糖化酵素を用いてキシロースを生産し、機能性を有するキシリトールやバイオエタノールの製造技術を確立することで除去された変種イチヅタの有効活用に貢献できる可能性がある。そこで本論文では、 $\beta$ -1,3-キシランの糖化

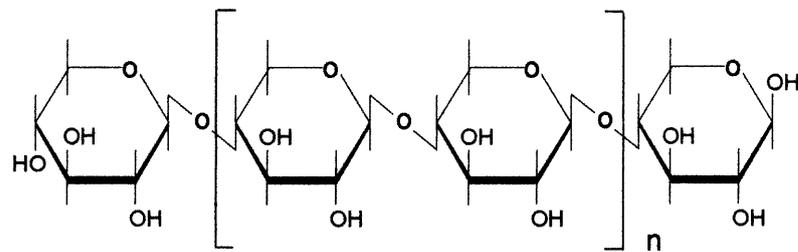
に必須な酵素である $\beta$ -1,3-キシラナーゼと $\beta$ -1,3-キシロシダーゼの基礎的知見に関する研究について報告する。

$\beta$ -1,3-キシラナーゼに関する研究が報告されたのは、比較的近年になってからである。Nishizawaらは、1962年にカビの一種である *Irpex lacters* 由来の $\beta$ -1,3-キシラナーゼについて報告している<sup>16)</sup>。細菌に関する報告としては、1970年に藤沢らが下関沿岸海域における $\beta$ -1,3-キシラン分解細菌の分布について報告しており、64株の $\beta$ -1,3-キシラン分解能を有する細菌を単離している<sup>17, 18)</sup>。また、 $\beta$ -1,3-キシラナーゼの精製および諸性質については、1960年にエキソ型 $\beta$ -1,3-キシラナーゼについて、Fukuiらが報告した、*Chaetomium globosum* A2株由来の報告があるにすぎない<sup>19)</sup>。一方、エンド型 $\beta$ -1,3-キシラナーゼに関するものでは、Chenらが土壌から単離した *Aspergillus terreus* A-07株由来の6つの酵素についての報告がある<sup>20)</sup>。また、海洋細菌由来の $\beta$ -1,3-キシラナーゼに関しては、Aokiらが海泥から単離した *Vibrio* sp. AX-4株由来のもの<sup>21)</sup>、Yamauraらが海藻から単離した *Pseudomonas* sp. PT-5株由来のもの<sup>22)</sup>、当研究室において海泥から単離された *Alcaligenes* sp. XY-234株由来<sup>23)</sup> および *Vibrio* sp. XY-214株由来<sup>24)</sup>のものに関する報告がある。 $\beta$ -1,3-キシラナーゼの分子生物学的な研究に関する報告は、2000年に最初の $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子が *Vibrio* sp. XY-214株からクローニングされ、塩基配列が決定されたが(GenBank accession no. AB029043)<sup>25)</sup>、他には *Alcaligenes* sp. XY-234株由来 *txyA*(GenBank accession no. AB039953)<sup>26)</sup>、*Vibrio* sp. AX-4株由来 *xyIA*(GenBank accession no. BAD51934)<sup>27, 28)</sup>、*Pseudomonas* sp. ND137株由来 *axnB*(GenBank accession no. AB063257)、*Thermotoga neapolitana* 由来 *xyIC*(GenBank accession no. U58632)の4つの $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子が登録されているに過ぎない。

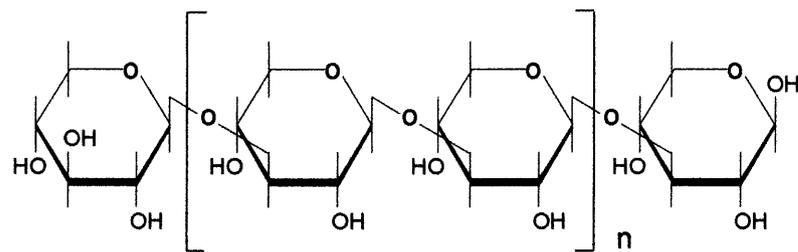
当研究室は6株の $\beta$ -1,3-キシラナーゼ産生細菌(*Vibrio* sp. XY-213、214、216、235 および AX-4株と *Alcaligenes* sp. XY-234株)を保持しており、このうち *Vibrio* sp. XY-214株、*Alcaligenes* sp. XY-234株、*Vibrio* sp. AX-4株由来の3つの $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子がクローニングされ、塩基配列が決定された。そこで本研究では、まず初めに $\beta$ -1,3-キシラナーゼに関する新たな知見を得ることを目的として、未だ塩基配列の解読がなされていない *Vibrio* sp. XY-213、XY-216 および XY-235株の $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した。

また、当研究室保存株のうち *Vibrio* sp. XY-214株<sup>25)</sup>は $\beta$ -1,3-キシランを唯一の炭

素源として生育できることから $\beta$ -1,3-キシラン資化細菌であり、さらにキシロースを添加した培地で培養した際に $\beta$ -キシロシダーゼを菌体内に産生することが確認されている<sup>29)</sup>。従って、本細菌が産生する $\beta$ -キシロシダーゼはこれまで報告のない $\beta$ -1,3-キシロシダーゼである可能性が高い。そこで、本細菌が産生する $\beta$ -キシロシダーゼの性質を解明するため、本酵素を精製してN末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列を決定すると共に $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子をクローニングし、組換え大腸菌において大量発現させ、その酵素学的性質を検討した。



$\beta$ -1,4-Xylan

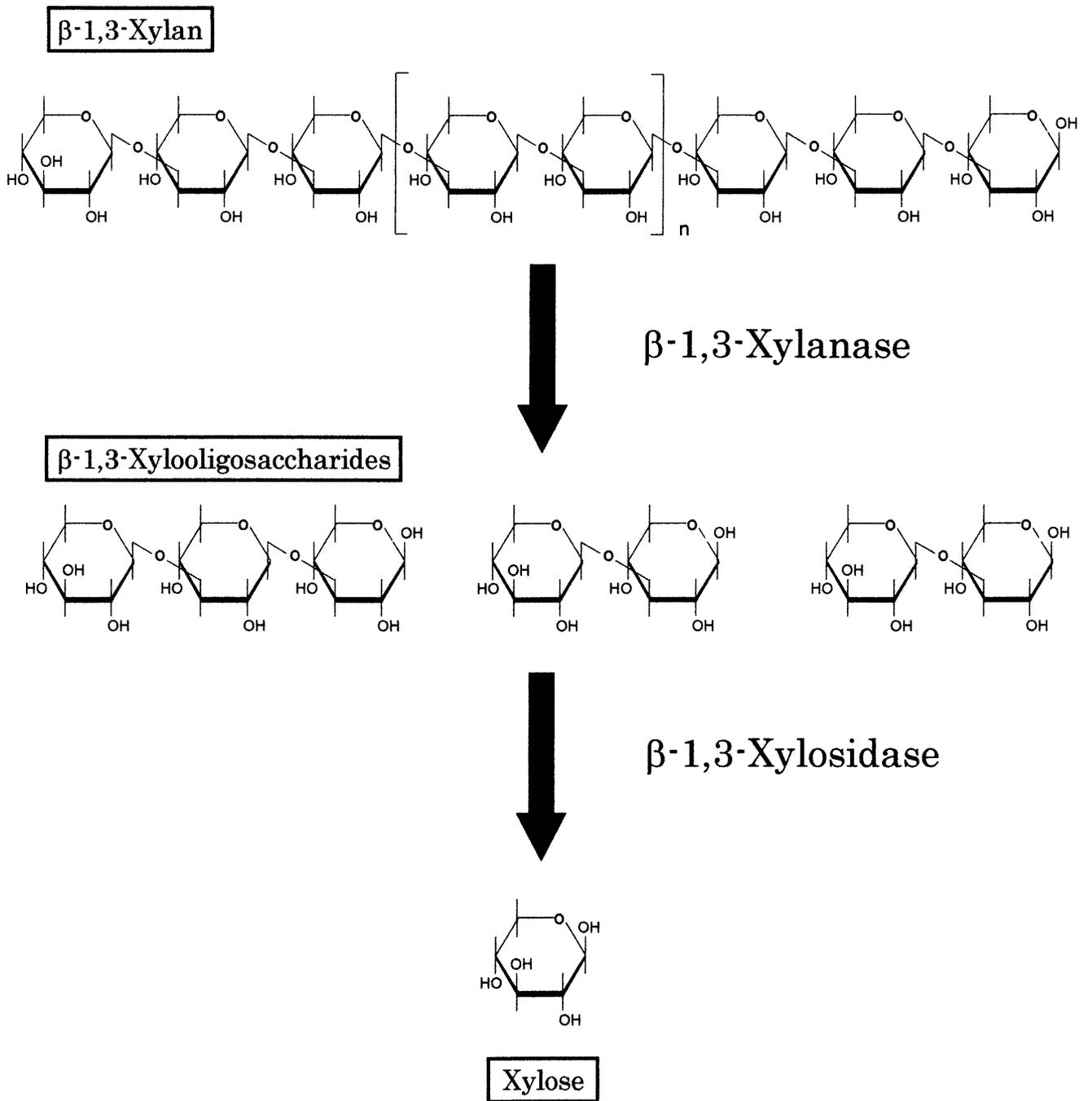


$\beta$ -1,3-Xylan

**Fig. 1-1. The structures of  $\beta$ -1,4-xylan and  $\beta$ -1,3-xylan.**

**Table 1-1. The polysaccharides produced by algae**

海藻	細胞壁骨格多糖	細胞間粘質多糖	貯蔵多糖
緑藻	セルロースⅠ (バロニア科) セルロースⅡ (アオサ属) $\beta$ -1,3-キシラン (イワツタ科、ハネモ科、ハゴロモ科、チョウチンミドロ科) $\beta$ -1,4-マンナン (ミル科、カサノリ科)	含硫酸キシロアラビノガラクトン (シオグサ属、ジュズモ属、イワツタ属、ミル属) 含硫酸グルクロノキシロナムラン (アオサ属、アオノリ属) 含硫酸グルクロノキシロラムノガラクトン (カサノリ属)	アミロース アミロペクチン
褐藻	セルロースⅡ ヘミセルロース	アルギン酸 (ワカメ属、コンブ属、アラメ属、カジメ属、マクロシスチン属) フコイダン (ヒバマタ属)	ラミナリン
紅藻	セルロースⅡ ヘミセルロース $\beta$ -1,3-キシラン (アマノリ属) $\beta$ -1,4-マンナン (アマノリ属)	寒天 (テングサ目、スギノリ目、イギス目) カラギナン (スギノリ科、ミリン科、オキツノリ科) ポルフィラン (アマノリ属)	紅藻デンプン



**Fig. 1-2. The degradation of  $\beta$ -1,3-xylan by using  $\beta$ -1,3-xylanase and  $\beta$ -1,3-xylosidase.**

## 第II章 $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子のクローニングと一次構造の比較

当研究室は、1984年から1990年にかけて海域から単離された6株の $\beta$ -1,3-キシラナーゼ産生細菌(*Vibrio* sp. XY-213、214、216、235 および AX-4 株と *Alcaligenes* sp. XY-234 株)を保持している。このうち *Vibrio* sp. XY-214 株由来の $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子については当研究室の橋川が<sup>25)</sup>、*Alcaligenes* sp. XY-234 株由来の $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子については当研究室の岡崎がクローニングし、塩基配列を決定している<sup>26)</sup>。さらに本酵素に関してはモジュール構造の解析がされており、N末端からシグナルペプチド、触媒領域、DNGGの繰り返し配列からなるリンカー、 $\beta$ -1,3-キシランと特異的に結合する糖質結合モジュール (CBM) から構成されている。また、*Vibrio* sp. AX-4 株由来の $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子に関しては、当研究室と九州大学大学院海洋資源化学研究室との共同研究によりクローニングされ、C末端領域にCBMが2つ並んで存在していることが分かっている<sup>27, 28)</sup>。そこで本章では $\beta$ -1,3-キシラナーゼに関する新たな知見を得ることを目的に、未だ塩基配列の解読がなされていない *Vibrio* sp. XY-213、XY-216 および XY-235 株の $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定するとともにモジュール構造の解析を行った。

### II-1. 実験材料および実験方法

#### II-1-1. 使用菌株

<i>Vibrio</i> sp.XY-213	1989年に伊勢湾内の海泥から単離
<i>Vibrio</i> sp.XY-214	1989年に伊勢湾内の海泥から単離
<i>Vibrio</i> sp.XY-216	1989年に伊勢湾内の海泥から単離
<i>Vibrio</i> sp.XY-235	1990年に伊勢湾内の海泥から単離
<i>Vibrio</i> sp.AX-4	1984年に福岡県沿岸の海泥から単離

#### II-1-2. 宿主大腸菌およびプラスミドベクター

クローニング用の宿主大腸菌として、*Escherichia coli* DH5  $\alpha$  と pT7Blue(Novagen)を使用した。菌体培養にはLB培地 (1% Tryptone, 0.5% Yeast

extract, 1% NaCl: pH 7.5) を使用し、固形培地として使用するときは寒天を 1.5% になるように添加した。

### II-1-3. 試薬

試薬は特にことわらない限り、和光純薬工業またはナカライテスクの特級試薬を使用した。

#### (a) Tris-EDTA (TE)

Tris-HCl(pH 8.0)            終濃度 10 mM

EDTA(pH 8.0)            終濃度 1 mM

#### (b) Tris-SDS Buffer(pH 9.0)

0.1 M Tris

1% SDS

0.1 M NaCl

#### (c) saline-EDTA(pH 8.0)

0.15 M NaCl

0.1 M EDTA

#### (d) 濃 saline-citrate

1.5 M NaCl

0.15 M Na<sub>3</sub>-クエン酸

#### (e) 希 saline-citrate

0.015 M NaCl

0.0015 M Na<sub>3</sub>-クエン酸

#### (f) 緩衝液飽和フェノール

フェノール (粒状) と Tris-SDS Buffer(1.0 M Tris, 1% SDS)を 3:2 の割合で混

合し、激しく攪拌した。その後、遠心分離 (3,000 rpm, 10 min) し、下層(フェノール層)の pH を 1 N NaOH で pH 7.8~8.0 に調整した。

(g) アルカリ性銅試薬

蒸留水 250 ml に 24 g の無水  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  と 12 g のロッシェル塩を溶解し、これに 10%  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  溶液 40 ml を混合し、さらに 16 g の  $\text{NaHCO}_3$  を加えて溶解した。別に用意した約 500 ml の沸騰水に 180 g の無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  を加え、溶解した。冷却後、1,000 ml のメスフラスコに両液を移し、蒸留水を加えて 1,000 ml とした。これを 37°C で 16-18 時間インキュベートしたものをろ過して用いた。

(h) ヒ素モリブデン酸試薬

蒸留水 450 ml に 25 g のモリブデン酸アンモニウム  $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$  を溶解し、これに濃硫酸 21 ml をかき混ぜながら加えた。別に水 25 ml に 3 g の第二ヒ酸ナトリウム  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  を溶かして、上記溶液に添加し、蒸留水を加えて 1,000 ml とし、この混合液を 37°C で 16-18 時間インキュベートし、褐色瓶で保存した。

#### II-1-4. $\beta$ -1,3-キシランの調製

最小培地に添加した  $\beta$ -1,3-キシランは、緑藻スリコギヅタ (*Caulerpa racemosa* var. *laetevirens*) から Iriki らの方法<sup>14)</sup>に基づいて当研究室で改良した方法で調製した。

すなわち、乾燥スリコギヅタ粉末を水に懸濁させ、70°C の温水中で 1 時間加温した後、十分に水洗した。次いで、1% 塩酸に 1 時間浸漬後、水洗し、得られた残渣に沸騰水浴中で加温した約 80°C の水酸化ナトリウム溶液を終濃度 1.25% になるように加え、沸騰水浴中で 1 時間加温した。次いで、塩酸で中和し、終濃度 1.25% になるように硫酸を加え、沸騰水浴中で 1 時間加温した。水洗後、80-100°C の温水を加えドラフト内で溶液を 70°C に保ちながら、溶液 350 ml 当たり 1 ml の酢酸を加え pH を 3-5 とした。イワヅタ 100 g 当たり亜塩素酸ナトリウム 5 g を加えて攪拌した。20 分毎に 1 度ずつ攪拌し、1 時間に 1 回亜塩素酸ナトリウムを同量追加しながら 3 時間加温した。イワヅタが完全に脱色されたら、デカンテーションで上澄みを除き水で充分水洗した。水洗後、終濃度が 10% になるように水酸化ナトリウムを加え、窒素ガスを注入しながら 4 時間攪拌した。残渣を遠心分離(8,000×g, 10 min)で取り除き、上澄み

に 2 倍量のエタノールを加えて $\beta$ -1,3-キシランを沈殿させ、デンカンテーションと遠心分離(8,000×g, 10 min)でキシランを分離した。ペレットを 1% 塩酸を含むエタノールに懸濁させ中和し、遠心分離した。エタノールで 2-3 回洗浄した後、エタノール・エーテル(1:1)に懸濁させ、遠心分離した。次いで、エタノール・エーテル(1:3)に懸濁させ、遠心分離した。減圧乾燥でエーテルを完全に除去して、 $\beta$ -1,3-キシランを得た。

#### II-1-5. DNA の各種処理

プラスミド DNA の抽出には Wizard Plus Minipreps DNA Purification System(Promega)を使用した。制限酵素は Takara または Toyobo の製品を使用した。DNA ライゲーションは特にこだわらない限り Ligation Kit Ver.2 (Takara)により行った。アガロースゲルからの DNA 断片の抽出には Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega)を使用した。

#### II-1-6. アガロースゲル電気泳動

DNA 断片の分画はアガロースゲル電気泳動により行った。分画する DNA 断片長に応じた濃度のアガロースゲルを用いてサブマリン型電気泳動装置で適当時間泳動した。アガロースの溶解および泳動には TAE Buffer を用いた。サイズマーカーとして Marker 6 (ニッポンジーン) を用い、泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド溶液で染色して UV 照射により DNA を確認した。

#### II-1-7. 形質転換

Inoue と Nojima の方法<sup>30, 31)</sup>を基に大腸菌への形質転換は以下のように行った。氷上で溶解したコンピテントセル (100  $\mu$ l) に、1~20  $\mu$ l のプラスミド溶液、あるいはライゲーション反応液を加え、穏やかに混合して 30 分間氷上に放置した。この混合液をヒートショック (42°C, 90 sec) 後、氷上で 2 分間冷却し、アンピシリンを含む LB 寒天平板培地 (LB-Amp) に塗布し、37°C で 16-18 時間培養した。LB 寒天平板培地 (LB-Amp) には必要に応じて IPTG および X-Gal を塗抹した。

#### II-1-8. ゲノムの抽出

Saito-Miura 法<sup>32)</sup>により行った。すなわち、供試菌を 5ml ペプトン培地(Table 2-1)

で 25°C、16-18 時間種培養、800 ml のペプトン培地で 25°C、48 時間本培養した後、遠心分離 (8,000 rpm, 15 min) した。沈殿を 12 mg のリゾチームを含んだ 6 ml の saline-EDTA に加えてよく攪拌し、これを 37°C で 10~20 分インキュベートし、菌体がとりもち状になり始めたら、あらかじめ -80°C で冷却しておいたエタノールに容器ごと浸し、そのまま -80°C で 30 分間凍結させた。その後、凍結させた菌体に 50 ml の Tris-SDS Buffer (pH 9.0) を加えて攪拌し、菌体を溶解した。これをさらに 60°C に加温して完全に溶菌させた。次に、溶菌液を共栓フラスコに移し、溶菌液と等量の緩衝液飽和フェノールを加えて 10~20 分振とうした。この懸濁液を低速遠心分離 (3,000 rpm, 10 min) して 3 層に分離させ、核酸が含まれている上層をピペットによりビーカーに移した。これに 2 倍量の冷エタノールを穏やかに加え、2 層に分離した境目をかき混ぜ、線維状の沈殿を巻き取った。次に、巻き取った DNA からエタノールをある程度除いた後、70, 80 および 100% 各エタノール 10 ml 中に順次数分ずつ浸し洗浄を行った。洗浄後、20 ml の希 saline-citrate に DNA ファイバーを完全に溶解 (16-18 時間) させ、2 ml 濃 saline-citrate を加えて安定化させた。この粗 DNA 液を 500  $\mu$  g/ml 程度に希釈して RNase を 80  $\mu$  g/ml になるように加え 37°C で 30 分間インキュベートした。これを室温にまで冷却した後、等量の緩衝液飽和フェノールを加え、共栓フラスコで 5 分間振とうした。この懸濁液を低速遠心分離 (3,000 rpm, 15 min) して得られた上層をビーカーに移し、2 倍量の冷エタノールを静かに加え、ガラス棒で境目をかき混ぜ線維状の沈殿を巻き取った。これを 70, 80 および 100% 各エタノール 10 ml に順次 2 min ずつ浸した後、エタノールをよく搾り取り 10 ml TE に溶解した。

**Table 2-1. Composition of peptone medium**

Components	(%)
Polypeptone	0.5
Yeast extract	0.1
NaCl	3.0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.05
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.04
pH	7.6

## II-1-9. 16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定

当研究室が保持している 5 つの  $\beta$ -1,3-キシラナーゼ産生細菌(*Vibrio* 属)について、その分類上の類縁関係を知るために、分類の指標となる 16S rRNA 遺伝子の解析を行った。塩基配列の決定には 16S rRNA Universal primer (Table 2-2)を用い、プライマーウォーキングにより行った。

### II-1-9-1. PCR による 16S rRNA 遺伝子の増幅

16S rRNA 遺伝子を増幅するための Universal primer である 27F primer と 1492R primer を用いて、各ゲノム DNA を鋳型に下記の条件で PCR を行った。

**Table 2-2. 16S rRNA Universal primer**

Primer name	Sequence	Length (mer)
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	20
1492R	5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'	19
530F	5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3'	18
530F	5'-GTAGCGGTGAAATGCGTAGA-3'	20
702R	5'-TCTACGCATTCACCGCTAC-3'	20

Composition of PCR solution		Reaction condition of PCR	
Components	Quantity	94°C	1 min
dH <sub>2</sub> O	78.5 $\mu$ l	94°C	1 min
10×ExTaq Buffer	10.0 $\mu$ l	55°C	45 sec
2 mM dNTP	8.0 $\mu$ l	72°C	1.5 min
Genomic DNA (100 ng/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l	4°C	hold
Primer-F (27F: 50 pmol/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l	 30 cycles	
Primer-R (1492R: 50 pmol/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l		
Ex Taq Polymerase (5 unit/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l		
Total	100 $\mu$ l		

## II-1-9-2. 増幅した 16S rRNA 遺伝子の精製

PCR 産物を 1% アガロース S 電気泳動した後、目的の大きさのバンドをゲルから切り出し、SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)を用いて精製した。

## II-1-9-3. 塩基配列の決定

シーケンス反応は、DTCS Quick Start Master Mix (BECKMAN COULTER)を用いてジデオキシ法により行い、塩基配列の決定は CEQ2000XL DNA Analysis System により行った。塩基配列の解析には GENETIX (ソフトウェア開発)を用いた。

## II-1-10. $\beta$ -1,3-キシラナーゼ活性の測定と比較

### II-1-10-1. 酵素液の抽出

5株の $\beta$ -1,3-キシラナーゼ産生細菌 (*Vibrio* sp. XY-213, XY-214, XY-216, XY-235 および AX-4 株) を 0.3%  $\beta$ -1,3-キシランを含むペプトン斜面培地で 25°C、24 時間培養し、これを 5 ml ペプトン液体培地に接種して 25°C で 24 時間種培養した。さらにこれを 100 ml ペプトン培地に接種して 25°C で 48 時間本培養した。培養後、培養液を遠心分離(10,000 rpm, 15 min)して上澄液と沈殿とに分離した。上澄液に 80%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、4°C で 16-18 時間塩析した。その後、遠心分離 (10,000 rpm, 15 min) によりタンパク質を沈殿させ、沈殿に 5 ml の 20 mM 酢酸 Buffer(pH 6.0)を加えて溶解させた。これを 20 mM 酢酸 Buffer (pH 6.0)、20 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.5)の順で透析し、さらに遠心分離 (10,000 rpm, 15 min) して得られた上澄液を菌体外酵素液とした。

### II-1-10-2. $\beta$ -1,3-キシラナーゼ活性測定

#### (A) 活性測定用基質 (1% $\beta$ -1,3-キシラン)

0.3 g の $\beta$ -1,3-キシランを蒸留水に加え、30 ml にメスアップした。これを超音波破砕機で 15 分間処理し、防腐のためにトルエンを数滴加えたものを使用した。

#### (B) $\beta$ -1,3-キシラナーゼ活性

100 mM MES Buffer (pH 7.5)の 0.3 ml に酵素液を 0.2 ml 加えて 0.5 ml とし、37°C で 1 分間プレインキュベートした後、1%  $\beta$ -1,3-キシラン水溶液 0.5 ml を加え同温度

で一定時間反応させ、Somogy-Nelson 法<sup>33)</sup>で生じた還元糖を測定した。すなわち、アルカリ性銅試薬 1 ml を加えて反応を停止し、直ちに沸騰水浴中で 15 分間加熱した。2 分間冷水に浸けて冷却した後、ヒ素モリブデン酸試薬 2.0 ml を加えて激しく攪拌し、15 分間静置した。静置後、蒸留水 9 ml を加えて攪拌し、未反応のキシランを除去するために遠心分離(3,000 rpm, 5 min)した後、上澄液の吸光度を 500 nm で測定した。 $\beta$ -1,3-キシラナーゼの 1 unit は、上記の反応条件で 1 分間に 1  $\mu$  mol のキシロースに相当する還元糖を生ずる酵素量と定義した。

## II-1-11. $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

### II-1-11-1. PCR による $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子の増幅

既に塩基配列が決定されている *Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子<sup>25)</sup>の ORF プライマー(Table 2-3)を用いて、各供試菌株のゲノム DNA を鋳型に PCR を行うことによりクローニングした。PCR 反応液の組成および反応条件はそれぞれ Table 2-4 と Table 2-5 に示した。

**Table 2-3. XY-214ORF primers for cloning  $\beta$ -1,3-xylanase gene**

Primer name	Sequence	Length (mer)
XY-214ORF-F	5'-TCGATGAAAAAAGTAGCAAA-3'	20
XY-214ORF-R	5'-AGACTAGTTACATACTTGAT-3'	20

**Table 2-4. Composition of PCR solution**

Components	Quantity
dH <sub>2</sub> O	78.5 $\mu$ l
10 $\times$ ExTaq Buffer	10.0 $\mu$ l
2 mM dNTP	8.0 $\mu$ l
XY-214 genomic DNA (100 ng/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
Primer-F (50 pmol/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
Primer-R (50 pmol/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
Ex Taq Polymerase (5 unit/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
Total	100 $\mu$ l

**Table 2-5. Reaction condition of PCR**

94°C	30 sec		30 cycles
94°C	30 sec		
54.9°C	30 sec		
72°C	2 min		
4°C	hold		

## II-1-11-2. PCR 増幅産物の塩基配列解読

増幅した PCR 産物を 1.0% アガロース電気泳動で確認後、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)を用いてアガロースゲルから抽出し、精製した。精製した遺伝子断片と pT7Blue ベクターをエッペンドルフチューブ内で混ぜ、Ligation Kit Ver.2 (Takara)を用いてライゲーションした。

ライゲーションしたキメラプラスミドを Inoue と Nojima の方法<sup>30, 31)</sup>により大腸菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  に形質転換して、IPTG(100 mM)と X-Gal(20 mg/ml)を塗布した LB-Amp 平板培地に接種し、37°Cで 16-18 時間培養した。増殖した白いコロニーを爪楊枝で取り、PCR 反応液に懸濁させた後、LB-Amp 平板培地 (マスタープレート)に接種した。T7 と U19 プライマーを用いて PCR した後、アガロース電気泳動して目的の断片と同じ大きさのバンドを示すポジティブクローンを選び出した。

得られたポジティブクローンを LB-Amp 液体培地に接種して培養した後、Wizard Prus Minipreps DNA Purification System(Promega)を用いてプラスミドを抽出し、インサート DNA 断片の塩基配列を解析した。シーケンス反応は、DTCS Quick Start Master Mix (BECKMAN COULTER)を用いてジデオキシ法により行い、塩基配列の決定は CEQ2000XL DNA Analysis System により行った。塩基配列の解析には GENETIX(ソフトウェア開発)を用いた。

## II-2. 実験結果

### II-2-1. 16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定と比較

16S rRNA Universal primer を用いて当研究室が保持する 5 株の $\beta$ -1,3-キシラナーゼ産生細菌の 16S rRNA 遺伝子を決定し、塩基配列の相同性を比較した。その結果、これら 5 株の $\beta$ -1,3-キシラナーゼ産生海洋細菌は、極めて近い類縁関係にあることが分かった。すなわち、*Vibrio* sp. XY-214 の 16S rRNA 遺伝子を基準にして比較すると、*Vibrio* sp. XY-213、XY-216 および XY-235 の 3 株は 100%、AX-4 株は 95.7%の相同性を示した。塩基配列を決定した 2 種類の 16S rRNA 遺伝子について BLAST により相同性検索した結果、どちらも *Vibrio* 属の細菌と 98%以上の相同性が得られた。

## II-2-2. $\beta$ -1,3-キシラナーゼ活性の比較

当研究室が保持する *Alcaligenes* sp. XY-234 株以外の 5 つの保存株について  $\beta$ -1,3-キシラナーゼ活性の比較を行った。目的は、これら  $\beta$ -1,3-キシラナーゼ産生細菌が数年間凍結保存されていたことから、酵素活性が維持されているかどうかを確認するためである。活性測定の結果、すべての細菌において  $\beta$ -1,3-キシラナーゼ活性が確認された (Table 2-6)。

## II-2-3. $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

既に塩基配列が決定されている *Vibrio* sp. XY-214 株由来の  $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子<sup>25)</sup>の ORF プライマー (XY-214ORF プライマー) を用いて、*Vibrio* sp. XY-213、XY-216 および XY-235 株の各ゲノム DNA を鋳型に PCR を行った。さらにこれら増幅断片をサブクローニングし、その塩基配列を決定したところ、各供試菌から得た遺伝子断片の塩基配列はすべて *Vibrio* sp. XY-214 株由来  $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子の塩基配列と同一であることが判明した。すなわち、460 アミノ酸残基をコードする 1,383 塩基対からなる ORF から成り、その推定分子量は 51,323 Da であった。これにより当研究室が保持する  $\beta$ -1,3-キシラナーゼは、XY-214 グループ (XY-213, XY-214, XY-216 および XY-235) と XY-234 それに AX-4 の 3 つのグループに分かれることが明らかになった (Fig. 2-1)。当研究室以外の研究機関によって報告されたものを含め、現在までに *Vibrio* sp. XY-214 株由来 TxyA (GenBank accession no. AB029043)<sup>25)</sup>、*Alcaligenes* sp. XY-234 株由来 TxyA (GenBank accession no. AB039953)<sup>26)</sup>、*Vibrio* sp. AX-4 株由来 XYL4 (GenBank accession no. BAD51934)<sup>27, 28)</sup>、*Pseudomonas* sp. ND137 株由来 AxnB (GenBank accession no. AB063257)、*Thermotoga neapolitana* 由来 XylC (GenBank accession no. U58632) の 5 種類の  $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子が報告されている。*Vibrio* sp. XY-214 株由来の  $\beta$ -1,3-キシラナーゼと他の 4 つの酵素とのアミノ酸配列の相同性を Table 2-7 に示した。これら 5 種類の  $\beta$ -1,3-キシラナーゼは、すべて糖質加水分解酵素ファミリー 26 (GH26) に属する触媒モジュールを有していた。さらに、C 末端領域に糖質結合モジュールファミリー 31 (CBM31) や CBM6 などの非触媒領域を有する酵素も報告されている。しかしながら、*Vibrio* sp. XY-214 グループの  $\beta$ -1,3-キシラナーゼに関してはそのモジュール構造の解析がなされていない。そこで、これらモジュール構造を有する  $\beta$ -1,3-キシラナーゼと *Vibrio* sp. XY-214

株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼの C 末端領域のアミノ酸配列を比較し、相同性を調べた (Fig. 2-2)。その結果、*Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼの C 末端領域 (Glu368-Asn460)は *Alcaligenes* sp. XY-234 株由来 TxyA の CBM31 と 77%の相同性、*Vibrio* sp. AX-4 株由来 XYL4 の CBM31-1 と 56%、CBM31-2 と 52%の相同性、*Pseudomonas* sp. ND137 株由来 AxnB の CBM31 と 43%の相同性があり、さらに触媒モジュールと CBM をつなぐリンカー配列(DNGG の繰り返し配列)と類似した配列も存在することが判明した。相同性検索から予測されたモジュール構造を Fig. 2-3 に示す。

**Table 2-6. The comparison of  $\beta$ -1,3-xylanase activities**

<b>Strain no.</b>	<b><math>\beta</math>-1,3-xylanase (U/ml)</b>
<b>XY-213</b>	<b>0.323</b>
<b>XY-214</b>	<b>0.236</b>
<b>XY-216</b>	<b>0.426</b>
<b>XY-235</b>	<b>0.326</b>
<b>AX-4</b>	<b>0.210</b>

```

AX-4 XYL4      1: MKRRTYLSL--LAAGVMSLSVSAW-SLDGVLVPESEILVSVGQDVDSVNDYASALGIIIPAGV 58
XY-214 TxyA   1: MKK--LAKMISVATLGACAFQAHAALDGGKLVPDQSEILVSVGQDVDSVNDYSSAMGIIIPAGV 58
XY-234 TxyA   1: MKK--LAKMISVATLGACAFSAHAALDGGKLVPESEILVSVGQDVDSVNDYSSAMSTIPAGV 58

AX-4 XYL4     59: TNYVGI/VNLDGINSDDADAGAGRNNIAELAMAYPTSAIVVGVSMNGEVDVAVASGRYNANID 118
XY-214 TxyA   59: TNYVGI/VNLDGISTDADAGAGRNNIVELANQYPTSAIVVGVSMNGEVQNVANGQYNANID 118
XY-234 TxyA   59: TNYVGI/VNLDGIASNADAGAGRNNVVELANLYPTSAIVVGVSMNGQIQNVAQQYNANID 118

AX-4 XYL4    119: TLINNTLAGYDRPVYLRWAYEVDGPPWNGHSPSGIVTSEQYVHDIRIIALGHQAKISLVNQVA 178
XY-214 TxyA   119: TLIRTLGEFDRPVYLRWAYEVDGPPWNGHNTEDLKQSEHRHYQRIRELGYADNIMVWQVA 178
XY-234 TxyA   119: TLIQTGELDRPVYLRWAYEVDGPPWNGHNTEDLKQSEHRNVYQRIRELGYGDNIMTIWQVA 178

AX-4 XYL4    179: SYCPTPGQIQDQNWPGSEYVDWVGLSYFAPQDCNWDVRVNEAAQFARSKGKPLFLNESTPQ 238
XY-214 TxyA   179: SYCPTAPGQIGTWWPGDDVVDWVGLSYFAPQDCNWDVRVNEAAQWARSHNKPLFINESSPQ 238
XY-234 TxyA   179: SYCPTAPGQISSWWPGDDVVDWVGLSYFAPQDCNWDVRVNEAAQWARSHNKPLFINESSPQ 238

AX-4 XYL4    239: RYQLAALTYSDPAKGTNRQSKTSQQQLWDEWFAYYFQFMSDNSDIVKGFYINADWDSQW 298
XY-214 TxyA   239: RYQLAALTYSDPAKGTNRQAKTDQQIWSSEWFAYYFQFMDNNDQDILKGFYINADWDSQW 298
XY-234 TxyA   239: RYQLADRYSDDPAKGTNRQSKTEQQIWSSEWFAYYFQFMDNNDKQDILKGFYINADWDSQW 298

AX-4 XYL4    299: RWAAPYNEGYWGDSRVQANALIKSNWQEIAGQYINHSETLLETGLYGSTGSE--E---- 352
XY-214 TxyA   299: RWAAPYNEGYWGDSRVQVIPIYIKQKWEETLSDPKFIRHSDLEFAQLGYGNSDGN--G--- 355
XY-234 TxyA   299: RWAAPYNEGYWGDSRVQVLPYIKQKWEETLSDPKFIRHSDLEFAKLGIYVADGSDN--GDN 358

AX-4 XYL4    353: --DNGGG--D--NCG-----INPEPEPNEEFGYRVSLSSTIEVFHKNNGWSAEWNYVCLNGL 404
XY-214 TxyA   356: --DNGGDNGGDNGGE---I--PE--NCTDDENFNYSVSENEIEVYHVVDKGSAGWNYLCLDDY 409
XY-234 TxyA   359: GDNGGDNGGDNGGDNGGTEEPENCQDDENFNYSVSLQELIEMVYHVVDKGSAGWNYVCLNDY 418

AX-4 XYL4    405: LQGEIKNGEYVKQEDLQGLSTYGIKFKVAT--SES--FTTEKSVTFENKQSGSTGTPGGGD 462
XY-214 TxyA   410: LSGTKSNGAFSRSESEQLGQTYKMTFKVEEIT--QGG--QIIEKTVITFTNQVEN----- 460
XY-234 TxyA   419: LPENKSNNGAFRKTEN--VLDQDYKLTFKVEERY--QGG--QILLRNITFTTQVEN----- 469

AX-4 XYL4    463: NGSGGDNGGDNGSGGDNGSGGGTDP SQCSADFGYNYRSDTEIEVFHKDLGWSASWNYICL 522
XY-214 TxyA   461: ----- 461
XY-234 TxyA   470: ----- 470

AX-4 XYL4    523: DDYCVPGDKSGDSYNRSFNATLGSDYKITFKVEDSASQFITEKNITFVNTSCAQ 576
XY-214 TxyA   461: ----- 461
XY-234 TxyA   470: ----- 470

```

**Fig. 2-1. Sequence alignment of  $\beta$ -1,3-xylanase from *Vibrio* sp. strain AX-4 (AX-4 XYL4), *Vibrio* sp. strain XY-214 (XY-214 TxyA) and *Alcaligenes* sp. strain XY-234 (XY-234 TxyA).**

The conserved amino acid residues are highlighted. Gaps left to improve the alignment are indicated by dashes. The numbers refer to amino acid residues at the start of the respective lines; all sequences are numbered from Met-1 of the peptide. The signal peptides from amino acid 1 to 22 of each  $\beta$ -1,3-xylanase are boxed.

**Table 2-7. Sequence homology of TxyA from *Vibrio* sp. strain XY-214 with other  $\beta$ -1,3-xylanases**

Organisms	Proteins	Identity (%)	Similarity (%)	Length (a. a.)	Accession no.
<i>Alcaligenes</i> sp. strain XY-234	TxyA	82	89	469	AB039953
<i>Vibrio</i> sp. strain AX-4	XYL4	64	76	576	BAD51934
<i>Pseudomonas</i> sp. strain ND137	AxnB	54	69	817	AB063257
<i>Thermotoga neapolitana</i>	XylC	40	59	346	U58632

```

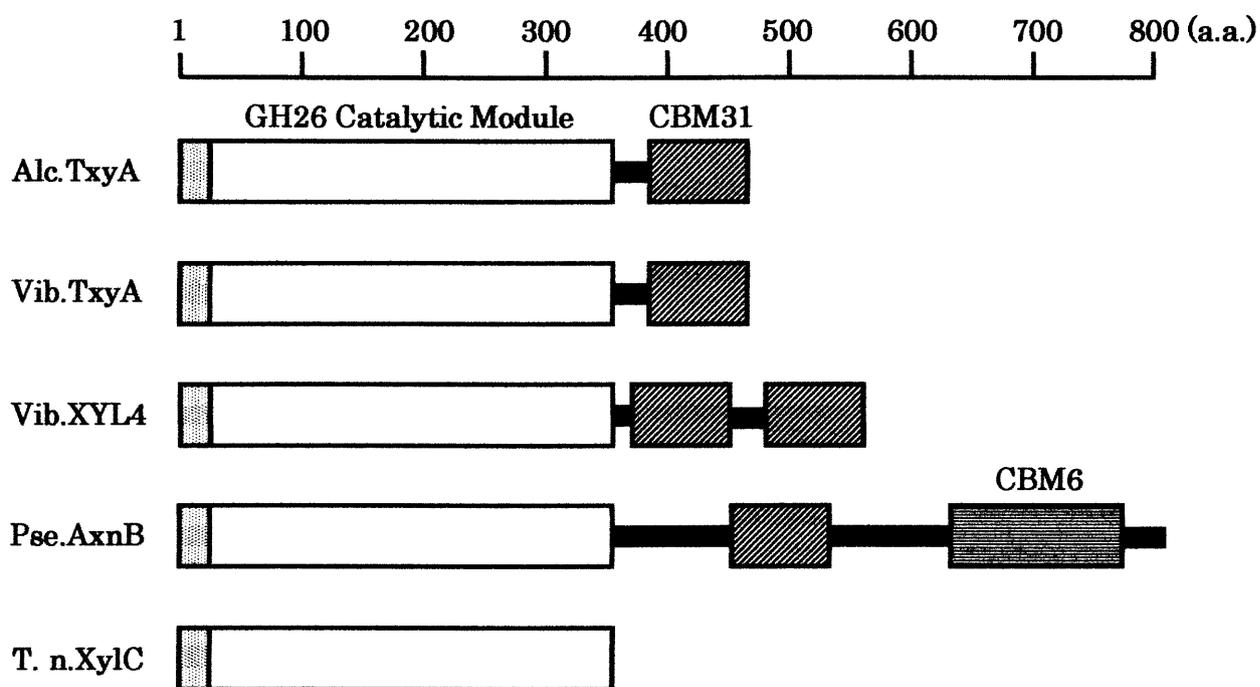
Alc.TxyA      349 :DG-GDNGGDNG-GDNG-GDNGGDNG-GDNGGTE-PPENCQDDFNFNYSIQEIEVYHVDKE-WSAGWITYVCIINDYCI PEN 422
Pse.AxnB     440 :-----VATDNDGNTDEASATKSVVADNNGGGNETPSE-E-FGIRYIDESTLQLFHQINPDWEAGFALLCLDSYCLSAT 510
Vib.TxyA     347 :-----GNSDGGN-G-GDNGGDNG-GDNGGET-PE-NCTDDFNFNYSINEIEVYHVDKE-WSAGWITYVCIINDYCISET 413
Vib.XYL4-1   350 :-----GCGDNGGGDNGGTTNPPEP-CNEEFGYRYVSDSTIEVYHVDKE-WSAGWITYVCIINDYCIQEE 408
Vib.XYL4-2   459 :-GGDNGSGGDNGGDNGSG-GDN-GSGG-GTD--PS-QCSADFGYNYRSITEIEVYHVDKE-WSASWITYVCIINDYCVPE 530

Alc.TxyA     423 :KSNCA-FRKTENAVLGGDYKLTFKVEDRYGQGQQ-ILRNITFTTQVQ----N- 469
Pse.AxnB     511 :RAEGLFTRN-FSGTLGQTYSTIEFKVQNETG-QYTVQIQAT-PTQTN----- 554
Vib.TxyA     414 :KSNCA-FSRSPSAQLGQTYKMTFKVEDITGQGQQ-IIDKTVITFTNQVQ----N- 460
Vib.XYL4-1   409 :IKNGEYV-KQFDAQLGSTYGIEFKVADGES--GF-ITDKSVITPENKQCGSTGTP 458
Vib.XYL4-2   531 :KSGDS-YNRSFNATLGS DYKITEKVEDSAS---QFITEKNIITPVNTSQ----AQ 554

```

**Fig. 2-2. Sequence alignment of the linker and CBM regions of TxyA from *Alcaligenes* sp. strain XY-234(Alc.TxyA), AxnB from *Pseudomonas* sp. strain ND237(Pse.AxnB) and XYL4 from *Vibrio* sp. strain AX-4(Vib.XYL4-1,Vib.XYL4-2) with the putative linker and CBM regions of TxyA from *Vibrio* sp. strain XY-214(Vib.TxyA).**

The conserved amino acid residues are highlighted. Gaps left to improve the alignment are indicated by dashes. The numbers refer to amino acid residues at the start of the respective lines; all sequences are numbered from Met-1 of the peptide. The linker region containing six repeats of DNGG in Alc.TxyA is boxed with a broken line.



**Fig. 2-3. Schematic representation of the modular architecture of  $\beta$ -1,3-xylanase.**

The predicted modular architecture of  $\beta$ -1,3-xylanases is shown as a schematic representation. Black bars indicate putative linkers. Putative signal peptides are shown by dots in open boxes. Abbreviations used are as follows: Alc.TxyA, TxyA of *Alcaligenes* sp. strain XY-234; Vib.TxyA, TxyA of *Vibrio* sp. strain XY-214; Vib.XYL4, XYL4 of *Vibrio* sp. strain AX-4; Pse.AxnB, AxnB of *Pseudomonas* sp. strain ND137; T.n.XylC, XylC of *Thermotoga neapolitana*.

## II-3. 考察

$\beta$ -1,3-キシラナーゼは、原始紅藻アマノリ属など $\beta$ -1,3-キシランを細胞壁構成成分とする海藻からプロトプラストを単離する際に必須な糖質加水分解酵素である。本酵素は $\beta$ -1,3-キシロシド結合を有する多糖を加水分解する酵素の総称であり、 $\beta$ -1,3-キシランに作用して種々のオリゴ糖を生ずるエンド型 $\beta$ -1,3-キシラナーゼ(EC 3.2.1.32)と、 $\beta$ -1,3-キシランおよびキシロオリゴ糖をキシロース単位で切断するエキソ型 $\beta$ -1,3-キシラナーゼ(EC 3.2.1.72)に分類される。イネ科植物や木材などに含まれる $\beta$ -1,4-キシランの分解に関与する $\beta$ -1,4-キシラナーゼに関しては、これまで数多くの報告があり、その遺伝子については 220 以上の塩基配列が決定されている。これに対して $\beta$ -1,3-キシラナーゼに関する研究報告は非常に少ないのが現状である。

そこで本章では、 $\beta$ -1,3-キシラナーゼに関する新たな知見を得ることを目的に、研究室保存株である 6 株の $\beta$ -1,3-キシラナーゼ産生細菌のうち、未だその遺伝子クローニングがなされていない *Vibrio* sp. XY-213、XY-216 および XY-235 株を供試菌とし、これら細菌由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子のクローニングを行った。

まず初めに、当研究室が保持している *Alcaligenes* sp. XY-234 株以外の 5 つの $\beta$ -1,3-キシラナーゼ産生海洋細菌(*Vibrio* 属)について分類上の類縁関係を知るために、分類の指標となる 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、比較した。その結果、*Vibrio* sp. XY-214 株の 16S rRNA 遺伝子を基準として比較すると、*Vibrio* sp. XY-213、XY-216 および XY-235 の 3 株は 100%、AX-4 株は 95.7%の相同性を示した。塩基配列を決定した 2 種類の 16S rRNA 遺伝子について BLAST により相同性検索した結果、どちらも *Vibrio* 属の細菌と 98%以上の相同性が得られた。一般的に 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は、95%以上の相同性があれば同じ属である可能性が高く、99%以上の相同性では同種の菌である可能性が高いとされている。しかしながら、あくまでも何%の相同性があるというだけであり、属レベル、種レベルの問題とは切り離して考えなければならない。すなわち、仮に 100%の相同性があったとしても属レベルで異なることもある。*Vibrio* sp. XY-213、XY-216 および XY-235 の 3 株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は *Vibrio* sp. XY-214 のものと同一であったが、いずれも細菌学的諸性質は僅かに異なっていた。

*Vibrio* sp. XY-213、XY-216 および XY-235 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子のクロ

ーニングに関しては、当研究室の橋川によって既にクローニングされ、塩基配列が決定された *Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子(*txyA*)<sup>25)</sup>の ORF プライマーを用いて行った。その結果、これら 3 株由来の $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子は XY-214 株由来 *txyA* 遺伝子の塩基配列と完全に一致し、同一のものであることが判明した。このことから当研究室が保持する $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子は XY-214 グループ(XY-213, XY-214, XY-216 および XY-235)と XY-234, AX-4 の 3 つのグループに分かれることが明らかになった(Fig. 2-1)。

また、これまでに塩基配列が報告されている 5 種類の $\beta$ -1,3-キシラナーゼのうち、*Alcaligenes* sp. XY-234 株由来 TxyA<sup>26)</sup>、*Vibrio* sp. AX-4 株由来 XYL4<sup>27, 28)</sup>および *Pseudomonas* sp. ND137 株由来 AxnB に関しては触媒モジュール以外に、糖質結合モジュール(CBM)を有することが報告されている。これら CBM は $\beta$ -1,3-キシランと特異的に結合することから、CBM ファミリー31(CBM31)に分類されている。*Vibrio* sp. AX-4 株由来 XYL4 に関しては C 末端領域に CBM31 を 2 つ、*Pseudomonas* sp. ND137 株由来 AxnB に関しては CBM31 と CBM6 の 2 種類の CBM が並んで存在していることが分かっている(Fig. 2-3)。しかしながら、*Vibrio* sp. XY-214 株由来の $\beta$ -1,3-キシラナーゼに関しては塩基配列が決定されたものの、未だそのモジュール構造の解析が行われていない。そこで、これらモジュール構造を有する $\beta$ -1,3-キシラナーゼと *Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼの C 末端領域のアミノ酸配列を比較し、相同性を調べた(Fig. 2-2)。その結果、*Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼの C 末端領域(Glu368-Asn460)は *Alcaligenes* sp. XY-234 株由来 TxyA の CBM31 と 77%の相同性、*Vibrio* sp. AX-4 株由来 XYL4 の CBM31-1 と 56%、CBM31-2 と 52%の相同性、*Pseudomonas* sp. ND137 株由来 AxnB の CBM31 と 43%の相同性があり、さらに触媒モジュールと CBM をつなぐリンカー配列(DNGG の繰り返し配列)と思われる配列も存在することが判明した。これらのことから *Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼが、 $\beta$ -1,3-キシランと特異的に結合する CBM31 を有することが示唆された。

CBM は不溶性の多糖である植物細胞壁(基質)に酵素を近づけるためのものであり、その存在によって触媒反応の効率を上げることができる。従って、今後は *Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼの推定 CBM 領域に関する詳細な機能解析が必要と思われる。

### 第Ⅲ章 *Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子(*xloA*)のクローニング用プローブの作製

当研究室の漆畑は、 $\beta$ -1,3-キシラナーゼ産生海洋細菌である *Vibrio* sp. XY-214 株がキシロースを添加した培地で培養した際に、 $\beta$ -キシロシダーゼを菌体内に産生することを報告している<sup>29)</sup>。本細菌が $\beta$ -1,3-キシランを栄養源として生育するためには、多糖である $\beta$ -1,3-キシランに自ら産生する酵素を作用させることで単糖であるキシロースを得る必要があると考えられる。従って、本株が保有する $\beta$ -キシロシダーゼは、 $\beta$ -1,3-キシラナーゼの作用によって生成された $\beta$ -1,3-キシロオリゴ糖に作用してキシロースを生成する機能を持つ $\beta$ -1,3-キシロシダーゼである可能性が高い。しかし、現在までに報告された $\beta$ -キシロシダーゼは全て $\beta$ -1,4-キシロオリゴ糖に作用する $\beta$ -1,4-キシロシダーゼであり、 $\beta$ -1,3-キシロオリゴ糖に作用する $\beta$ -1,3-キシロシダーゼに関する報告は見当たらない。そこで、*Vibrio* sp. XY-214 株が産生する $\beta$ -キシロシダーゼ(XloA)の性質を解明するため、本章では本酵素を精製し、N末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列を決定すると共に遺伝子クローニングのためのプローブを作製した。

#### Ⅲ-1. 実験材料および実験方法

##### Ⅲ-1-1. 使用菌株

###### ・ *Vibrio* sp. XY-214 株

当研究室において 1990 年に伊勢湾内から単離された $\beta$ -1,3-キシラナーゼ産生海洋細菌のうち、キシロースを添加した培地で培養した際に $\beta$ -キシロシダーゼを菌体内に産生する *Vibrio* sp. XY-214 株<sup>29)</sup>を供試菌株として用いた。

*Vibrio* sp. XY-214 株は 0.3%  $\beta$ -1,3-キシランを唯一の炭素源として含む最小培地 (Basal medium) (Table 3-1) において選抜育種し、 $\beta$ -キシロシダーゼ産生能を高めた。また、最小培地には酵素産生力の指標として終濃度 1 mM になるように *p*-ニトロフェニル(PNP)- $\beta$ -D-キシロピラノシド (シグマ社製) を添加した。さらにペプトン斜面培地 (Table 2-1) で 3 週間毎に継代培養し、4°C で保存した。凍結保存は次のように行った。1 白金耳の菌体をペプトン培地 5 ml に接種し、25°C で 16~18 時間振

とう培養した後、培養後に滅菌した 100% グリセロールを 2 ml 加えて攪拌し 1.5 ml のマイクロチューブに 1 ml ずつ分注して $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

凍結保存株から培養を開始する場合は、菌体保存液を 0.3%  $\beta$ -1,3-キシランを含むペプトン平板プレートに画線培養 ( $25^{\circ}\text{C}$ , 24 h) した。

**Table 3-1. Composition of the basal medium**

<b>Basal Medium (BM)</b>	
Tris-HCl (pH 7.5)	100 mM
$\text{NH}_4\text{Cl}$	19 mM
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.33 mM
$\text{FeCl}_2$	0.1 mM
Half-strength ASW	

<b>Artificial Sea Water (ASW)</b>	
NaCl	400 mM
$\text{MgSO}_4$	100 mM
KCl	20 mM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20 mM

These salts were dissolved separately and combined.

### III-1-2. 試薬

試薬は特にことわらない限り、和光純薬工業またはナカライテスクの特級試薬を使用した。

### III-1-3. $\beta$ -キシロシダーゼの活性測定

#### III-1-3-1. 活性測定の基質

*p*-ニトロフェニル(PNP)- $\beta$ -D-キシロピラノシドを蒸留水に溶解させたものを活性測定の基質として用いた。

#### III-1-3-2. 酵素活性の測定

6 mM PNP- $\beta$ -D-キシロピラノシド水溶液 100  $\mu$ l と 50 mM MES Buffer (pH 7.0) の 100  $\mu$ l に 100  $\mu$ l の酵素液を加え、35°C で適当時間反応させた。反応後、2% 炭酸ナトリウム水溶液を 3 ml 加えて反応を停止し、400 nm における吸光度を測定した。

$\beta$ -キシロシダーゼの 1 unit は、上記反応条件下で 1 分間に 1  $\mu$ mol の *p*-ニトロフェノールを生ずる酵素量と定義した。

#### III-1-4. タンパク質の定量

酵素タンパク質は Lowry 法<sup>34)</sup>により測定した。標準タンパク質として Bovin Serum Albumin, Fraction V(ナカライテスク)を用いた。また、フラクションコレクターで分画した各試験管のタンパク質量は、280 nm の吸光度を測定して求めた。

### III-1-5. *Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -キシロシダーゼ(XloA)の精製

特に断わらない限り、精製操作は 4°C 以下で行った。FPLC で使用した試薬・溶液は、できる限り 0.45  $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過し、約 1 時間脱気した。

#### III-1-5-1. 大量培養

選抜育種により $\beta$ -キシロシダーゼ産生能を高めた *Vibrio* sp. XY-214 株の保存株をペプトン斜面培地に接種し、25°C で 15 時間培養した後、その一白金耳を 5 ml の 0.1% D-キシロースを含むペプトン培地において 25°C、15 時間で前培養した。次に、この前培養液の全量を 200 ml の 0.1% D-キシロースを含むペプトン培地に接種し、25°C

で 15 時間本培養した。この前培養から本培養までの操作を 9 回行い、合計 1,800 ml の培養液を得た。

### III-1-5-2. 粗酵素液の抽出

前段階で得られた培養液を遠心分離 (8,000 rpm, 20 min) し、沈殿した菌体に 45 ml の 50 mM MES Buffer (pH 7.0) を加えて懸濁した。次にこの懸濁液をソニケーションして菌体を破碎 (out put 3, duty 60, 1 min×5) し、破碎液を遠心分離 (15,000 rpm, 20 min) して得られた上澄液を $\beta$ -キシロシダーゼを含む粗酵素液とした。

### III-1-5-3. DEAE Toyopearl 650M による陰イオン交換クロマトグラフィー

上記の方法で得られた菌体内酵素液を、あらかじめ 50 mM MES Buffer (pH 7.0) で平衡化した DEAE Toyopearl 650M カラム(2.0×30 cm, Tosoh)に添加し、同 Buffer で非吸着タンパク質が流出しなくなるまで素通しを行った。次に、50 mM MES Buffer (pH 7.0) を 300 ml と 1.5 M NaCl を含む同 Buffer 300 ml を用いて連続濃度勾配溶出を行った。分画後、280 nm での吸光度と活性を測定し、活性画分を集めた。分画条件は、流速 30 ml/h、分画容量 5 ml で行った。

### III-1-5-4. 硫酸アンモニウムによる逆塩析での酵素の濃縮

DEAE Toyopearl 650M で得られた活性画分を半透膜に入れ、飽和硫酸アンモニウム(50 mM MES Buffer (pH 7.0)に硫酸アンモニウムを飽和させたもの)に 16-18 時間浸け、酵素を濃縮した。

### III-1-5-5. Ether Toyopearl 650S による疎水クロマトグラフィー

逆塩析で濃縮した酵素液を遠心分離(13,000 rpm, 20 min, 4°C)し、沈殿に 50 mM MES Buffer (pH 7.0)を加えて溶解させた。さらに同量の 3.0 M 硫酸アンモニウムを含む同 Buffer を加え、硫酸アンモニウムの終濃度が 1.5 M になるように酵素液を調製した。この酵素液を遠心分離(13,000 rpm, 20 min, 4°C)して得られた上澄酵素液を 0.2  $\mu$ m フィルターによりろ過し、あらかじめ 1.5 M 固形硫酸アンモニウムを含む 50 mM MES Buffer (pH 7.0)で平衡化した Ether Toyopearl 650S(1.0×10 cm, Pharmacia)に添加した。1.5 M 硫酸アンモニウムを含む 50 mM MES Buffer (pH 7.0)

で非吸着タンパク質を完全に溶出させた後、同 Buffer と 50 mM MES Buffer (pH 7.0) の間で逆濃度勾配溶出を行った。分画条件は、流速 0.5 ml/min、分画容量 2 ml で行った。

#### III-1-5-6. Mono Q による陰イオンクロマトグラフィー

Ether Toyopearl 650S カラムで得られた活性画分を 50 mM MES Buffer (pH 7.0) で 2 日間透析し、得られた透析内液をあらかじめ 50 mM MES Buffer (pH 7.0) で平衡化した Mono Q カラム(0.5×5.0 cm, Pharmacia)に添加した。同 Buffer を用いて非吸着タンパク質を完全に溶出させた後、同 Buffer と 1.0 M NaCl を含む 50 mM MES Buffer (pH 7.0)の間で濃度勾配溶出を行った。分画条件は、流速 0.2 ml/min、分画容量 1.5 ml で行った。溶出した活性画分を集めてβ-キシロシダーゼ最終精製標品とし、以後の実験に用いた。なお、酵素は-20℃で凍結保存した。

#### III-1-5-7. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は、Laemmli らの方法<sup>35)</sup>にしたがって、12.5% ゲルで分離を行った。電気泳動条件は、ゲル 1 枚あたり 20 mA 定電流で泳動した。また、タンパク質の染色は CBB R-250 を用い、分子量マーカーは Low-molecular-weight SDS calibration kit(Amersham)を用いた。

#### III-1-5-8. XloA の N 末端アミノ酸配列、内部アミノ酸配列の決定

##### ・ N 末端アミノ酸配列の決定

XloA の精製標品を SDS-PAGE により分離した後、ホライズプロット (ATTO) を用いて PVDF 膜に電氣的にプロットした。通電は一定電流 2 mA/cm<sup>2</sup>で行い、ブロッキング終了後は PVDF 膜を CBB G-250 で 10 分間染色し、希メタノール脱色して風乾してからバンドを切り出した。

ペプチドのアミノ酸配列の決定はプロテインシーケンサー (Applied Biosystems 社製 Procise®49X-cLC Protein Sequencer および ABI 社製 140D Micro Gradient Delivery System) を用いて、エドマン分解により N 末端から順にアミノ酸残基を解析した。

・ 内部アミノ酸配列の決定

XloA の精製標品 20  $\mu$ l に対し、Lysyl Endopeptidase(0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l)を 2.5  $\mu$ l 加え、37°C、10 分間反応させたものを SDS-PAGE により分離した後、PVDF 膜にブロットし、上記と同様の方法で内部ペプチド断片の N 末端アミノ酸配列を決定した。

III-1-6. *xloA* 遺伝子クローニング用プローブの作製

(A) 縮重プライマーを用いた PCR

III-1-5-8 において決定した XloA の N 末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列をもとに縮重プライマー (Table 3-2) を作製し、XY-214 株のゲノム DNA を鋳型に PCR を行った。PCR 反応液の組成および反応条件はそれぞれ Table 3-3 と Table 3-4 に示した。PCR により増幅した遺伝子断片を *dxlo* とした。

**Table 3-2. The degenerated primers designed for cloning the  $\beta$ -xylosidase gene**

Primer name	Sequence	Length (mer)	Selected sequence
dxlo-F	5'-ACNACNACNATHCARAAYCC-3'	20	TTTIQNP
dxlo-R	5'-RTANARRTARTGNCKNCCYTT-3'	21	KGRHYLY

**Table 3-3. Composition of PCR solution**

Components	Quantity
dH <sub>2</sub> O	78.5 $\mu$ l
10×ExTaq Buffer	10.0 $\mu$ l
2 mM dNTP	8.0 $\mu$ l
XY-214 genomic DNA (100 ng/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
Primer-F (50 pmol/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
Primer-R (50 pmol/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
Ex Taq Polymerase (5 unit/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
Total	100 $\mu$ l

**Table 3-4. Reaction condition of PCR**

94°C	30 sec		30 cycles
94°C	30 sec		
54.9°C	30 sec		
72°C	2 min		
4°C	hold		

## (B) PCR 増幅産物の塩基配列解読

増幅した PCR 産物 *dxlo* を 1.0% アガロース電気泳動で確認後、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いてアガロースゲルから精製した。精製した遺伝子断片と pT7Blue ベクターをエッペンドルフチューブ内で混ぜ、Ligation Kit Ver.2 (Takara) を用いてライゲーションした。ライゲーションしたキメラプラスミドを Inoue と Nojima の方法<sup>30,31)</sup>により大腸菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  に形質転換して、IPTG(100 mM)と X-Gal(20 mg/ml)を塗布した LB-Amp 平板培地に接種し、37°C で 16-18 時間培養した。増殖した白いコロニーを爪楊枝で取り、PCR 反応液に懸濁させた後、LB-Amp 平板培地 (マスタープレート) に接種した。T7 と U19 プライマーを用いて PCR した後、アガロース電気泳動して目的の断片と同じ大きさのバンドを示すポジティブクローンを選び出し、菌体に含まれるプラスミドを *dxlo*/pT7Blue と命名した。得られたポジティブクローンを LB-Amp 液体培地に接種して培養した後、Wizard Prus Minipreps DNA Purification System (Promega) を用いてプラスミドを抽出し、インサート DNA 断片の塩基配列を解析した。シーケンス反応は、DTCS Quick Start Master Mix (BECKMAN COULTER) を用いてジデオキシ法により行い、塩基配列の決定は CEQ2000XL DNA Analysis System により行った。塩基配列の解析には GENETIX (ソフトウェア開発) を用いた。

## (C) プロープの作製

III-1-6 (B) で塩基配列を解読した  $\beta$ -キシロシダーゼの部分遺伝子断片 *dxlo* 約 1.1 kb を鋳型に、Table 3-5 に示すプライマーを用いて PCR を行い、アガロース電気泳動後、ゲルから精製した PCR 産物 (*pxlo*: 約 300 bp とするよう設計した) を AlkPhos Direct Labeling Kit (Amersham) を用いてラベリングし、プローブとした。すなわち、まずクロスリンカー原液 20  $\mu$ l にキットに付属の純水 80  $\mu$ l を加えて希釈し、クロスリンカー溶液とした。PCR 産物の遺伝子断片をキット付属の純水で 10  $\mu$ g/ $\mu$ l になるように希釈後、その 10  $\mu$ l をマイクロチューブに入れ、5 分間熱変性させた。サンプルを氷中で急冷後、スピンドウンしてマイクロチューブの底に集めた。冷やしたサンプルに 10  $\mu$ l の反応緩衝液を加え、穏やかに混和した。さらに、2  $\mu$ l の Labeling reagent を加えて十分に混和し、スピンドウンしてマイクロチューブの底に集め、37°C で 30 分間インキュベートしてサザンハイブリダイゼーションに用いた。作製したプ

ローブは2時間以内に使用した。マーカーは、Marker 6 ( $\lambda$ /Sty I) 100 ng を上記と同様にして標識し、ハイブリダイゼーションの際に標識したサンプル DNA と同時に加えた。

**Table 3-5. The primers designed for probe**

Primer name	Sequence	Length (mer)
pxlo-F	5'-ACGACGACGATTCAGAACCCT-3'	21
pxlo-R	5'-CCAGTTACCACCGCGACATGA-3'	21

Composition of PCR solution		Reaction condition of PCR	
Components	Quantity	94°C	30 sec
dH <sub>2</sub> O	78.5 $\mu$ l	94°C	30 sec
10×ExTaq Buffer	10.0 $\mu$ l	57°C	30 sec
2 mM dNTP	8.0 $\mu$ l	72°C	1 min
XY-214 genomic DNA (100 ng/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l	4°C	hold
Primer-F (50 pmol/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l	 30 cycles	
Primer-R (50 pmol/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l		
Ex Taq Polymerase (5 unit/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l		
<b>Total</b>	<b>100 <math>\mu</math>l</b>		

## III-2. 実験結果

### III-2-1. *Vibrio* sp. XY-214 株由来β-キシロシダーゼ(XloA)の精製

*Vibrio* sp. XY-214 由来β-キシロシダーゼ(XloA)のN末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列を決定するために、XloA を III-1-5 に記載した方法で精製した(Fig. 3-1, 3-2)。その結果、Table 3-6 に示すように粗抽出液に対して 41 倍に精製され、回収率は 2.1% であった。また、精製標品は SDS-PAGE で単一のバンドで検出され、分子量は約 60 kDa であった(Fig. 3-3)。

### III-2-2. β-キシロシダーゼ(XloA)のN末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列の決定

精製 XloA を SDS-PAGE で分離した後、電氣的に PVDF 膜にブロッティングした。ブロッティングした PVDF 膜を CBB で染色し、検出された分子量約 60 kDa のバンドを切り出し、XloA のN末端アミノ酸配列を分析した。

次に、XloA の精製標品 20 μl に対し Lysyl Endopeptidase(0.1 μg/μl)を 2.5 μl 加え、37°C、10 分間反応させたものを SDS-PAGE で分離した後、電氣的に PVDF 膜にブロッティングした。ブロッティングした PVDF 膜を CBB で染色したところ、複数のバンドが検出され、このうち分子量約 22 kDa のバンドを切り出すことで XloA の内部ペプチド断片のN末端アミノ酸配列を分析した (Fig. 3-4)。その結果、Fig. 3-5 に示すように、XloA のN末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列の 20 残基がそれぞれ決定された。

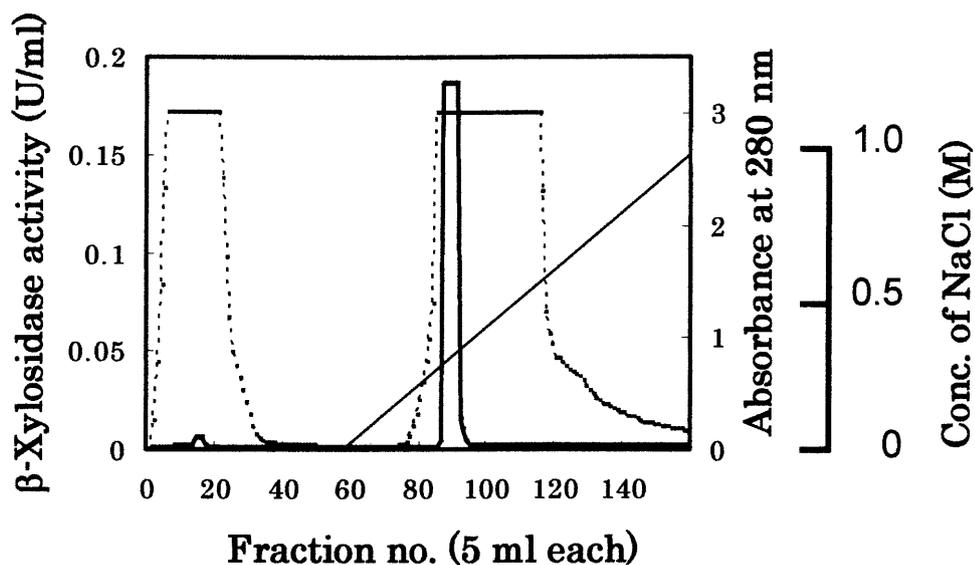
### III-2-3. 縮重プライマーの作製

III-2-2 で得られた 20 残基のアミノ酸配列をもとに縮重プライマーを設計した。すなわち、N末端アミノ酸配列の中から縮重の少ないアミノ酸配列 (Thr-Thr-Thr-Ile-Gln-Asn-Pro) を選び、Forward プライマー(dxlo-F)を設計した。また、内部アミノ酸配列の中からも同様に縮重の少ないアミノ酸配列 (Lys-Gly-Arg-His-Tyr-Leu-Tyr) を選び、Reverse プライマー(dxlo-R)を設計した (Fig. 3-6)。

#### Ⅲ-2-4. 縮重プライマーを用いた PCR

Ⅲ-1-5-8 において決定された XloA の N 末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列をもとに作製した縮重プライマー (dxlo-F、dxlo-R) を用いて、*Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA を鋳型に PCR を行った。PCR の結果、1128 bp の PCR 産物が得られた。アガロースゲル電気泳動図を Fig. 3-7 に、決定した塩基配列を Fig. 3-8 に示した。縮重プライマーにより増幅された遺伝子断片の推定アミノ酸配列中には、Ⅲ-1-5-8 において決定した XloA の N 末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列が存在した。よって、この PCR 産物は *Vibrio* sp. XY-214 株由来β-キシロシダーゼ(XloA)の遺伝子に由来することが判明した。

A



B

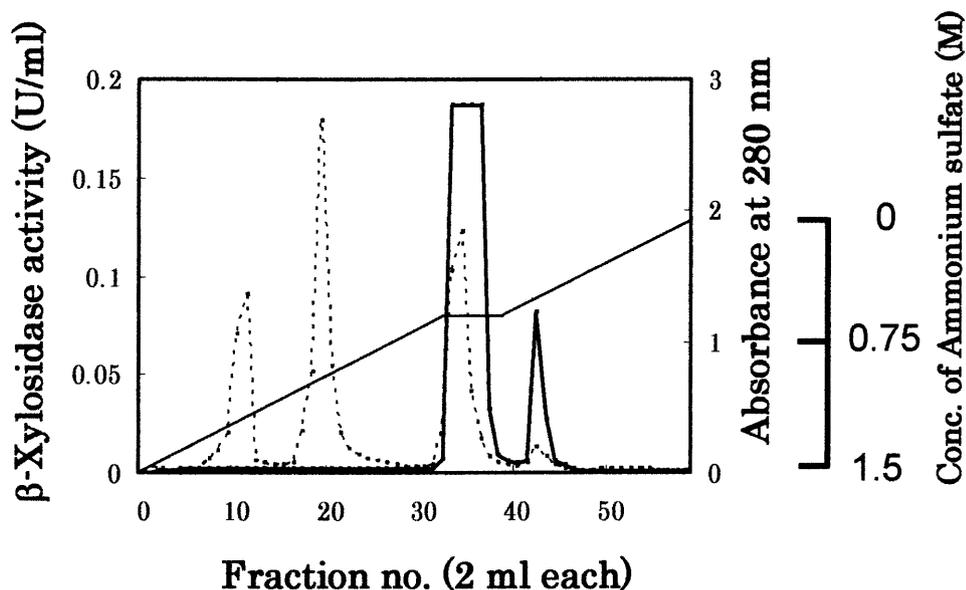


Fig. 3-1. Chromatograms of  $\beta$ -xylosidase from *Vibrio* sp. strain XY-214 on a DEAE Toyopearl 650M column (2.0 $\times$ 30 cm) (A) and an Ether Toyopearl 650S column (1.0 $\times$ 10 cm) (B).

—,  $\beta$ -xylosidase activity ; ..... , absorbance at 280 nm ; ———, concentration of NaCl or Ammonium sulfate.

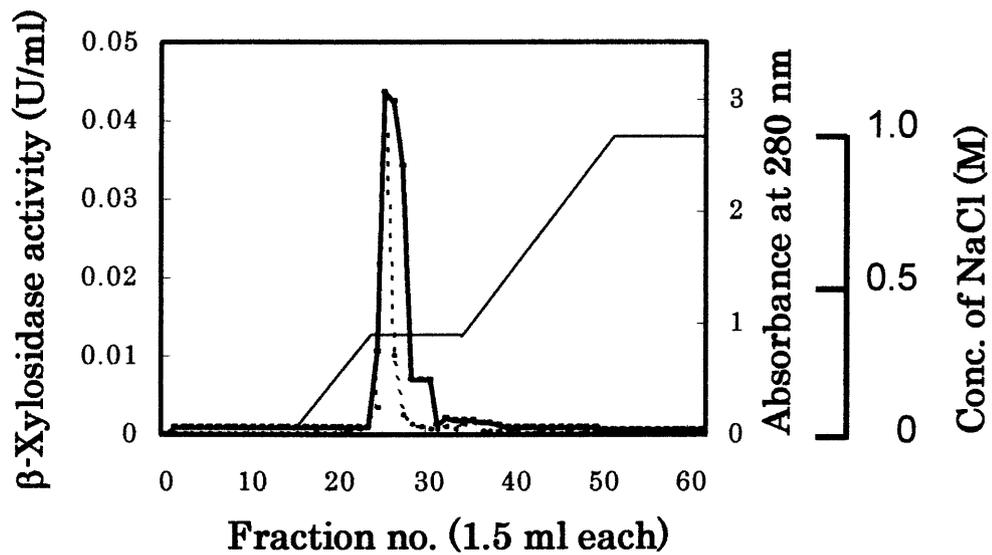
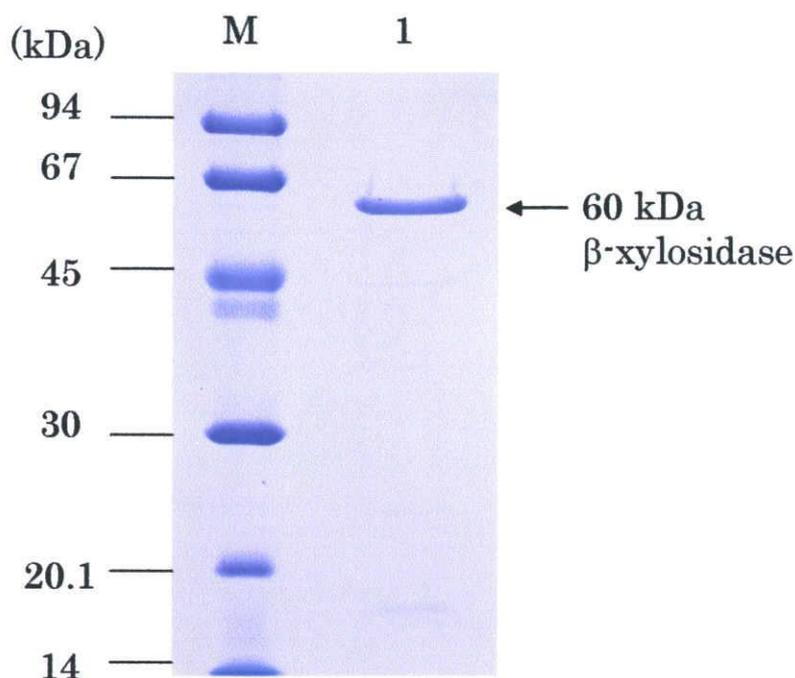


Fig. 3-2. Chromatogram of  $\beta$ -xylosidase from *Vibrio* sp. strain XY-214 on a Mono Q column (0.5  $\times$  5.0 cm).

—,  $\beta$ -xylosidase activity; .....; absorbance at 280 nm; —, concentration of NaCl.

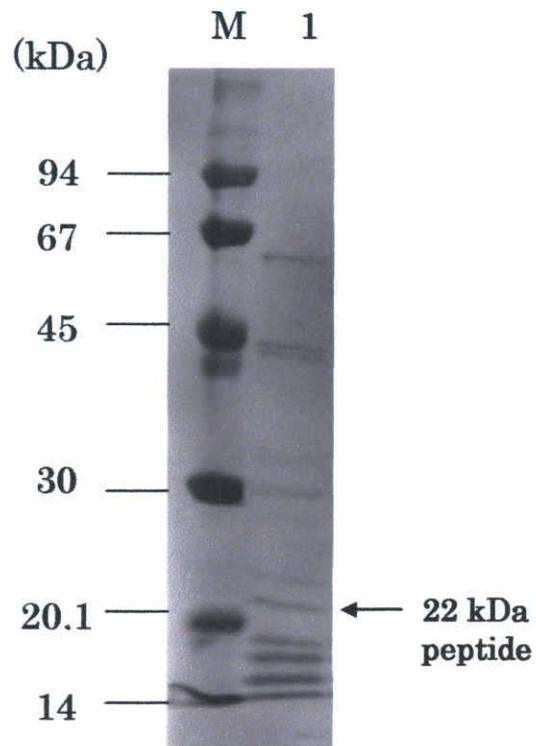
**Table 3-6. Purification of the intracellular  $\beta$ -xylosidase from *Vibrio* sp. XY-214**

Purification step	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	14.3	800	0.01	1.0	100
DEAE Toyopearl 650M	7.48	39	0.19	10.6	52.2
Ether Toyopearl 650S	1.54	3.7	0.42	23.3	10.8
MonoQ	0.30	0.4	0.76	42.2	2.11



**Fig. 3-3. SDS-PAGE of the purified native  $\beta$ -xylosidase(XloA) from *Vibrio* sp. strain XY-214.**

Lane M, standard markers (Low-Molecular Weight SDS Calibration Kit; Amersham) (phosphorylase b [94.0 kDa], albumin [67.0 kDa], ovalbumin [45.0 kDa], carbonic anhydrase [30.0 kDa], trypsin inhibitor [20.1 kDa],  $\alpha$ -lactalbumin [14.0 kDa]); lane 1, native  $\beta$ -xylosidase.



**Fig. 3-4. Enzymatic digestion products of  $\beta$ -xylosidase(XloA).**

Lane M, standard markers (Low-Molecular Weight SDS Calibration Kit; Amersham): lane 1, digestive products of  $\beta$ -xylosidase by lysylendopeptidase.

**XloA**                      TTTIQNPILKGFNPDSIVR

**22 kDa peptide**            WLSLSERPGFLRLKGRHYLY

**Fig. 3-5. N-terminal amino acid sequences of XloA and a 22-kDa peptide produced by lysylendopeptidase digestion.**

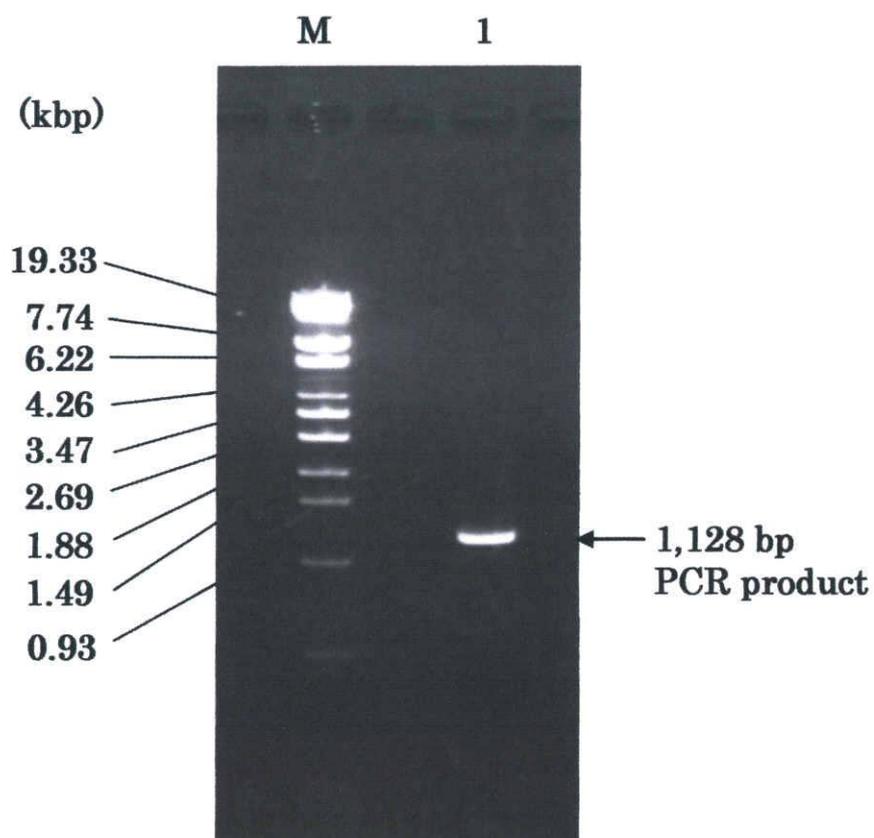
(A)

<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>Q</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	I	L	K	G	F	N	P	D	P	S	I	V	R
ACT	ACT	ACT	ATT	CAA	AAT	CCT	ATT	TTA	AAA	GGT	TTT	AAT	CCT	GAT	CCT	TCT	ATT	GTT	CGT
ACC	ACC	ACC	ATC	CAG	AAC	CCC	ATC	TTG	AAG	GGC	TTC	AAC	CCC	GAC	CCC	TCC	ATC	GTC	CGC
ACA	ACA	ACA	ATA			CCA	ATA	CTT		GGA			CCA		CCA	TCA	ATA	GTA	CGA
ACG	ACG	ACG				CCG		CTC		GGG			CCG		CCG	TCG		GTG	CGG
								CTA								AGT			AGA
								CTG								AGC			AGG

(B)

W	L	S	L	S	E	R	P	G	F	L	R	L	<b>K</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	<b>H</b>	<b>Y</b>	<b>L</b>	<b>Y</b>
TGG	TTA	TCT	TTA	TCT	GAA	CGT	CCT	GGT	TTT	TTA	CGT	TTA	AAA	GGT	CGT	CAT	TAT	TTA	TAT
	TTG	TCC	TTG	TCC	GAG	CGC	CCC	GGC	TTC	TTG	CGC	TTG	AAG	GGC	CGC	CAC	TAC	TTG	TAC
	CTT	TCA	CTT	TCA		CGA	CCA	GGA		CTT	CGA	CTT		GGA	CGA			CTT	
	CTC	TCG	CTC	TCG		CGG	CCG	GGG		CTC	CGG	CTC		GGG	CGG			CTC	
	CTA	AGT	CTA	AGT		AGA				CTA	AGA	CTA			AGA			CTA	
	CTG	AGC	CTG	AGC		AGG				CTG	AGG	CTG			AGG			CTG	

Fig. 3-6. Preparation of the degenerated primers on the basis of the N-terminal amino acid sequences of XloA (A) and a 22-kDa peptide obtained by lysylendopeptidase digestion of XloA (B).



**Fig. 3-7. Agarose gel electrophoresis of PCR product derived from genomic DNA of *Vibrio* sp. strain XY-214 by the degenerated primers.**

Lane M, standard markers (Marker 6); lane 1, PCR product of dxlo-F primer and dxlo-R primer.

```

1  ACGACGACGATTTCAGAACCCTATTTTAAAAGGCTTTAATCCAGATCCTTCGATTGTTTCGT 60
   T T T I Q N P I L K G F N P D P S I V R
61  GTCGGCGACGATTACTACATTGCAACCTCAACCTTCGAGTGGTTTCCGGGGATTCAACTT 120
   V G D D Y Y I A T S T F E W F P G I Q L
121 CATCATTACGCGATCTGATTAACCTGGCGCCTTGTGGTCACGCCTTAACCTAGAACCCTCA 180
   H H S R D L I N W R L V G H A L T R T S
181 CAACTGAACATGATGGGCATGGATAATCCGAAGGCGTTTACGCCCTGCCCTAACTTAT 240
   Q L N M M G M D N S E G V Y A P A L T Y
241 TCTGACGGCACATTCTGGCTGTGCTTCTCGAATGTCCACTCATGTGCGGGTGGTAACGG 300
   S D G T F W L C F S N V H S C R G G N W
301 ATGGCGACGCTTAGTTATGTTGTGACAGTGCACAGCATTGAAGGTCCATGGAGTGCCT 360
   M A T P S Y V V T A D S I E G P W S E P
361 GTTCCGATTGGTAATTACGGCTTTGATCCTTCTCTGTTCCATGATGACGATGGCAAGAAA 420
   V P I G N Y G F D P S L F H D D D G K K
421 TACATGCTCAACATGATTTGGGGTGGCCGTGCAAAGACTAACTTCTTTGGCGGTATCATC 480
   Y M L N M I W G G R A K T N F F G G I I
481 ATGCAAGAGTTTGATGCCGATGAAGGTAAGCTTGTGGCGCACCCAAGACCGTCTTCGAA 540
   M Q E F D A D E G K L V G A P K T V F E
541 GGAACCGAGCTCGGGTTGACTGAAGGGCCACAACCTGCTTAAAAAGGATGACTATTAT 600
   G N R A R V V L K G P Q L L K K D D Y Y
601 TACCTGATAACAGCGGAAGGTGGTACAGAGCGCAATCACGCGGTAACGGTTTGTGCGTTC 660
   Y L I T A E G G T E R N H A V T V C R S
661 AAGCACATCTGGGGACCTTATGAAGTTCACCCAGAAAATCCTATCCTGACCAGTCGTTTC 720
   K H I W G P Y E V H P E N P I L T S R F
721 CAAGAACACGCAGAGCTTTCACGTGCAGGTCACGGCTTTCTAGTTGAGACTCAAACCGGT 780
   Q E H A E L S R A G H G F L V E T Q T G
781 GAATGGTATATGAGCCACCTGTGTGGCCCGGTATTCCAAACCCGGAAGGCTATCAATTT 840
   E W Y M S H L C G R R I P N P E G Y Q F
841 ATGCCTAAATACGACAATGGCTTCTCAATCTTAGGCCGAGAAAAGTGCCTACAAAAAGCA 900
   M P K Y D N G F S I L G R E S A L Q K A
901 CACTGGCAAGACGATTGGCCATACATCGCAACAGGTAACACCTGTTGTTGAAGTGAA 960
   H W Q D D W P Y I A T G K T P V V E V E
961 GCACCAAACCTTCTTTACACCCTGGCCTGAATCTCCGGCTCGAGACGAATTTATCGAC 1020
   A P N L P L H P W P E S P A R D E F I D
1021 CCAACGTTGAGCCTGATATCAACCTTACGAGAGCCAGTATCTGAAAAATGGCTGTGCTTA 1080
   P T L S L I S T L R E P V S E K W L S L
1081 AGCGAGCGACCAGGATTCTTACGTCTGAAAGGCCGCCACTACCTCTAC 1128
   S E R P G F L R L K G R H Y L Y

```

**Fig. 3-8. Nucleotide and deduced amino acid sequences of 1,128 bp PCR product of XloA from genomic DNA of *Vibrio* sp. strain XY-214.**

The nucleotide sequence is 1128 bp. The determined N-terminal and internal amino acid sequences are indicated by a black background residues.

### III-3. 考察

本章では $\beta$ -1,3-キシラナーゼ産生海洋細菌である *Vibrio* sp. XY-214 株由来の $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子(*xloA*)をクローニングするために、 $\beta$ -キシロシダーゼを精製し、そのN末端アミノ酸配列 20 残基と内部アミノ酸配列 20 残基から作成した縮重プライマーを用いて PCR を行い、プローブを作製した。

精製酵素標品は、粗抽出液に対して 41 倍に精製され、回収率は 2.1%であった(Table 3-6)。また、SDS-PAGE による解析では約 60 kDa の単一のバンドで検出された (Fig. 3-3)。N 末端分析の結果、XloA の N 末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列の 20 残基がそれぞれ決定された。XloA の N 末端アミノ酸残基は Met (メチオニン)ではなく、Thr (トレオニン)であった。一般に原核生物の翻訳過程では AUG 開始コドンと AUG 非開始コドンを区別するため、開始コドンが指定する Met 残基はホルミル化されて *N*-ホルミルメチオニンとなっており、合成途上のタンパク質はすべてアミノ末端に *N*-ホルミルメチオニンをもっている。しかし、この *N*-ホルミルメチオニンはしばしば修飾や切断などのプロセッシングを受け、成熟タンパク質では除去されている<sup>36)</sup>。従って XloA の N 末端アミノ酸残基が Thr (トレオニン)から始まっていることは、プロセッシングにより *N*-ホルミルメチオニンが除去されたためであると考えられた。

決定したアミノ酸配列を NCBI(National Center for Biotechnology Information) の BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)<sup>37)</sup>によって他のタンパク質との相同性を検索したところ、XloA の N 末端アミノ酸配列は *Caulobacter* sp. K31 株由来の  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ (Accession no. AATH01000006) や *Selenomonas ruminantium* GA192 由来のキシロシダーゼ/アラビノシダーゼ (Accession no. AF040720)、*Sinorhizobium meliloti* 由来の $\beta$ -キシロシダーゼ (Accession no. AL591788)などの N 末端領域と高い相同性を示した。また、内部アミノ酸配列は *Chromohalobacter salexigens* DSM 株由来  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ (Accession no. CP000285) の Trp345-Gly359 領域と相同性を示した。これら相同性が得られた酵素はすべて 530 アミノ酸残基程度から構成されており、その遺伝子の長さは約 1,600 塩基程度、単一サブユニットの分子量は約 60 kDa であった。以上の結果より、*Vibrio* sp. XY-214 株から抽出、精製された XloA が、少なくとも既報の $\beta$ -キシロシダーゼや  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼと相同性があることが判明した。また、本細菌

由来のβ-キシロシダーゼ遺伝子 (*xloA*) が約 1,600 塩基程度であること、さらに決定された内部アミノ酸配列が XloA の N 末端から約 350 残基目付近に位置していることが示唆された。

次に、XloA の N 末端アミノ酸配列 20 残基と内部アミノ酸配列 20 残基をもとに、それぞれ縮重の少ないアミノ酸配列 (Thr·Thr·Thr·Ile·Gln·Asn·Pro)、(Lys·Gly·Arg·His·Tyr·Leu·Tyr) を選び、Forward プライマー(dxlo-F)および Reverse プライマー(dxlo-R)を設計した(Fig. 3-6)。この縮重プライマー (dxlo-F、dxlo-R)を用いて、*Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA を鋳型に PCR を行ったところ、1128 bp の PCR 産物(*dxlo*)が得られた(Fig. 3-7)。*dxlo* の塩基配列を決定した結果、その推定アミノ酸配列中にはⅢ-1-5-8 において決定した XloA の N 末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列が存在した(Fig. 3-8)。これにより *dxlo* が *Vibrio* sp. XY-214 株由来β-キシロシダーゼ遺伝子(*xloA*)に由来することが判明した。よって、*dxlo* の塩基配列をもとにプローブを作製し、*xloA* 遺伝子のクローニングに用いることにした。

## 第IV章 *Vibrio* sp. XY-214 株由来β-キシロシダーゼ遺伝子(*xloA*)のクローニングと塩基配列の決定

前章において XloA のN末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列をもとに作製したプローブを用いて、サザンブロット法により *Vibrio* sp. XY-214 株由来β-キシロシダーゼ遺伝子(*xloA*)を含むゲノム DNA 断片のクローニングを行い、塩基配列を決定した。

### IV-1. 実験材料および実験方法

#### IV-1-1. 試薬

試薬は特にことわらない限り、和光純薬工業またはナカライテスクの特級試薬を使用した。

#### IV-1-2. 宿主大腸菌およびプラスミドベクター

クローニングには *Escherichia coli* DH5  $\alpha$ 、*E. coli* XL1-Blue と pT7Blue(Novagen)、pBluescript II KS(-)(Stratagene)を使用した。菌体培養には LB 培地 (1% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 1% NaCl: pH 7.5) を使用し、固形培地として使用するときは寒天を 1.5 %になるように添加した。

#### 宿主大腸菌の遺伝子型

Strain	Genotype
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>deo R, end A1, gyr A96, hsd R17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>), rec A1, rel A1, sup E44, thi-1, <math>\Delta</math> (lac ZYA-arg F)U169, <math>\phi</math> 80lac Z <math>\Delta</math> M15,F, <math>\lambda</math><sup>-</sup></i>
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>D(mcrA)183D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F<sup>+</sup> proAB lacI<sup>q</sup> ZDM15 Tn10(Tet)]</i>

#### IV-1-3. DNA の各種処理

II-1-5 と同様の方法で行った。

#### IV-1-4. アガロースゲル電気泳動

II-1-6 と同様の方法で行った。

#### IV-1-5. 形質転換

II-1-7 と同様の方法で行った。

#### IV-1-6. $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子(*xloA*)のクローニング

##### (A) サザンハイブリダイゼーション

*xloA* 遺伝子を含む DNA 断片を単離するために、III-1-6 において作製したプローブヌクレオチドに対して認識部位をもたない 6 塩基認識制限酵素でゲノム DNA を消化し、サザンハイブリダイゼーションによって目的断片を検出した。すなわち、[*Nde* I·*Pst* I]、[*Sca* I·*Sph* I]、[*Spe* I·*Kpn* I]、[*Nde* I·*Spe* I]、[*Nde* I·*Sph* I]、[*Pst* I·*Sph* I]、[*Xba* I·*Nde* I]、[*Xba* I·*Pst* I]、[*Xba* I·*Spe* I]、[*Xba* I·*Kpn* I]、[*Kpn* I·*Nde* I]、[*Kpn* I·*Pst* I] の 12 種類の制限酵素の組み合わせによってゲノム DNA を消化し、アガロース電気泳動後、分離された DNA 断片を Hybond·N<sup>+</sup> membrane (Amersham) にアルカリトランスファーし、洗浄後、80°C でベイクングした。

次に、メンブレンを水になじませた後、ハイブリ・バッグ (コスモ・バイオ) に入れ、事前に 55°C に温めておいたハイブリダイゼーション緩衝液を注ぎ 55°C で 15 分間プレハイブリダイズした。ハイブリダイゼーション緩衝液を交換し、III-1-6 で作製したプローブを緩衝液 1 ml 当たり 10 ng になるように加えて 55°C で 16-18 時間ハイブリダイズした。

ハイブリダイズの終わったメンブレンを予め 55°C に温めておいた一次洗浄液 (Table 4-1) に浸し、55°C で 10 分間穏やかに振蕩した後、一次洗浄液を交換して再度、55°C で 10 分間穏やかに振蕩した。一次洗浄液を捨て、二次洗浄液 (Table 4-2) をメンブレンが十分に浸る程度加えてから、5 分間室温で穏やかに振蕩した後、二次洗浄液を交換し、再度室温で穏やかに振蕩しながら 5 分間洗浄した。

メンブレンから余分な二次洗浄液を除き、ラップの上に DNA が固定されている面を上にして置いた。次に、Detection 試薬 (CDP-Star) をメンブレン全体に均一に広げ 5 分間放置した。その後、余分な Detection 試薬を除き、メンブレンを皺ができないように注意してラップに包み、暗室において DNA を固定した面に X 線フィルムを

密着させて一時間感光させた。現像定着し、プローブがハイブリダイズした DNA 断片の検出を行い、クローニング用 DNA 断片を作製するために適した制限酵素の組み合わせを決定した。

### (B) 制限酵素消化断片の大腸菌への組み込み

サザンハイブリダイゼーションの結果から求められた制限酵素を用いて、*Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA を完全に分解し、アガロース電気泳動により分離した。同時にサザンハイブリダイゼーションを行い、プローブがハイブリダイズした DNA 断片を検出し、アガロースゲルと重ね合わせることで目的の *xloA* 遺伝子を含む DNA 断片をアガロースゲルから切り出し、精製した。この *xloA* 遺伝子を含む DNA 断片と、同制限酵素で処理した pBluescript II KS(-)(Stratagene)を 10  $\mu$ l を超えないように混合し、Ligation Kit Ver.2 (Takara)を等量加え、16°Cで 1.5 時間インキュベートし、キメラプラスミドを構築した。得られたキメラプラスミドを II-1-7 に示した方法により、*E. coli* XL1-Blue へ導入した。

スクリーニングは、Blue-White selection 法とプライマーに pxlo-Forward primer と pxlo-Reverse primer (Table 3-5) を用いたコロニーダイレクト PCR により行った。すなわち、形質転換した *E. coli* XL1-Blue を Blue-White selection 法により X-Gal 分解能のない白色コロニーを選別し、保存プレートに接種した後、Table 4-3 に示す PCR 反応溶液(鑄型プラスミドを省いた)に懸濁して PCR を行い、アガロース電気泳動で分析した。ポジティブコントロールと同じ位置にバンドを示す株を選び出した (Fig. 4-2)。スクリーニングにより得られたポジティブクローンが保持するプラスミドを *xloA/pBluescript(Xba I -Spe I)* と命名した。

### (C) 形質転換大腸菌の凍結保存

アンピシリン (50  $\mu$ g/ $\mu$ l) を含む LB 培地 5 ml に形質転換大腸菌を 1 白金耳接種し、37°Cで 12-16 時間振とう培養した。培養液に 70% グリセロールを 2 ml 加えて攪拌し、1.5 ml のエッペンドルフチューブに 1 ml ずつ分注して-80°Cで凍結保存した。この凍結保存菌株から菌を培養する場合、菌体保存液をなるべく融解させないようにしてアンピシリン (50  $\mu$ g/ $\mu$ l) を含む LB プレートに画線培養 (37°C, 16-18h) し、シングルコロニーを選び適当な培地に接種した。

**Table 4-1. Composition of first washing buffer**

Components	Quantity	Final conc.
Urea	120 g	2 M
SDS	1 g	0.1%
0.5 M phosphate buffer (pH 7.0)	100 ml	50 mM
NaCl	8.7 g	150 mM
1 M MgCl <sub>2</sub>	1 ml	1 mM
Blocking reagent	2 g	0.2%
Total volume	1,000 ml	

※ 0.5 M phosphate buffer pH 7.0 は、0.5 M リン酸二水素ナトリウム溶液を 1 N NaOH で pH 7.0 に調整した。

**Table 4-2. Composition of 20× second washing buffer**

Components	Quantity	Final conc.
Tris	120 g	1 M
NaCl	112 g	2 M
Total volume	1,000 ml	

※ HCl で pH 10.0 に調整し、使用時は 20×ストックを 20 倍希釈し、1,000 ml 当たり 1 M MgCl<sub>2</sub> 溶液 2 ml (終濃度 2 mM) を加えた。

**(D) PCRによる *xloA/pBluescript(Xba I · Spe I)*内のインサート挿入方向の決定**

pBluescript II KS(-)に挿入されたβ-キシロシダーゼ遺伝子を含むDNA断片の挿入方向を確認するために、プライマーpxlo-F、pxlo-R、dxlo-R、T7およびT3を組み合わせ、*xloA/pBluescript(Xba I · Spe I)*を鋳型にして Table 4-3 に示す反応系および Table 4-4 に示す反応条件でPCRを行った。

**Table 4-3. Composition of PCR solution**

Components	Quantity
dH <sub>2</sub> O	78.5 μl
10×ExTaq Buffer	10.0 μl
2 mM dNTP	8.0 μl
<i>xloA/pBluescript(Xba I · Spe I)</i>	1.0 μl
Primer-F (50 pmol/μl)	1.0 μl
Primer-R (50 pmol/μl)	1.0 μl
Ex Taq Polymerase (5 unit/μl)	0.5 μl
Total	100 μl

**Table 4-4. Reaction condition of PCR**

94°C	30 sec	
94°C	30 sec	
54°C	30 sec	
72°C	3 min	
4°C	hold	

**(E) *xloA/pBluescript(Xba I · Spe I)*内のインサート DNA の塩基配列の決定**

プライマーウォーキング法により *xloA/pBluescript(Xba I · Spe I)*に含まれるインサート DNA の全塩基配列の解析を試みた。シーケンス反応は、DTCS Quick Start Master Mix (BECKMAN COULTER)を用いてジデオキシ法により行い、塩基配列の決定は CEQ2000XL DNA Analysis System により行った。塩基配列の解析には GENETIX(ソフトウェア開発)を用いた。

## IV-2. 実験結果

### IV-2-1. サザンハイブリダイゼーションによるβ-キシロシダーゼ遺伝子(*xloA*)含有 DNA 断片の検出

クローニングに必要なβ-キシロシダーゼ遺伝子(*xloA*)をコードした DNA 断片を作製するために、III-1-6 で調製したプローブに対して認識部位を有しない 6 塩基認識制限酵素 ([*Nde* I · *Pst* I]、[*Sca* I · *Sph* I]、[*Spe* I · *Kpn* I]、[*Nde* I · *Spe* I]、[*Nde* I · *Sph* I]、[*Pst* I · *Sph* I]、[*Xba* I · *Nde* I]、[*Xba* I · *Pst* I]、[*Xba* I · *Spe* I]、[*Xba* I · *Kpn* I]、[*Kpn* I · *Nde* I]、[*Kpn* I · *Pst* I])の 12 種類の組合せ) でゲノム DNA を消化し、サザンハイブリダイゼーションを行った。一般にクローニングのためのプラスミド挿入断片としては 4 kbp 付近のヌクレオチドが適していると言われていたが、二重消化で生じたヌクレオチドの中で 4 kbp 付近にポジティブなバンドが検出された組合せは *Xba* I · *Spe* I であった(Fig. 4-1)。

*Xba* I · *Spe* I の 2 種類の制限酵素の組合せによって得られた消化産物(XY-214 *Xba* I · *Spe* I インサート遺伝子断片)を、同制限酵素の組合せにより消化した pBluescript II KS(-)に挿入し、*xloA* 遺伝子のクローニングに用いた。

### IV-2-2. コロニーダイレクト PCR によるスクリーニング

*Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA を制限酵素 (*Xba* I · *Spe* I) で二重消化して得られた遺伝子断片を、pBluescript II KS(-)の *Xba* I · *Spe* I サイトにライゲーションしてキメラプラスミドを作製し、これを宿主大腸菌(*E. coli* XL1-Blue)に導入することによって形質転換大腸菌を得た。これら形質転換大腸菌の中からβ-キシロシダーゼ遺伝子含有 DNA 断片を保持する大腸菌をスクリーニングするために、Blue-White selection とプライマーに pxlo-Forward primer と pxlo-Reverse primer を用いたコロニーダイレクト PCR を行った。その結果、40 株の白色コロニーから 1 株のポジティブクローン *xloA*/pBluescript(*Xba* I · *Spe* I)を得ることができた(Fig. 4-2)。

### IV-2-3. XY-214 *Xba* I · *Spe* I インサート遺伝子断片の塩基配列

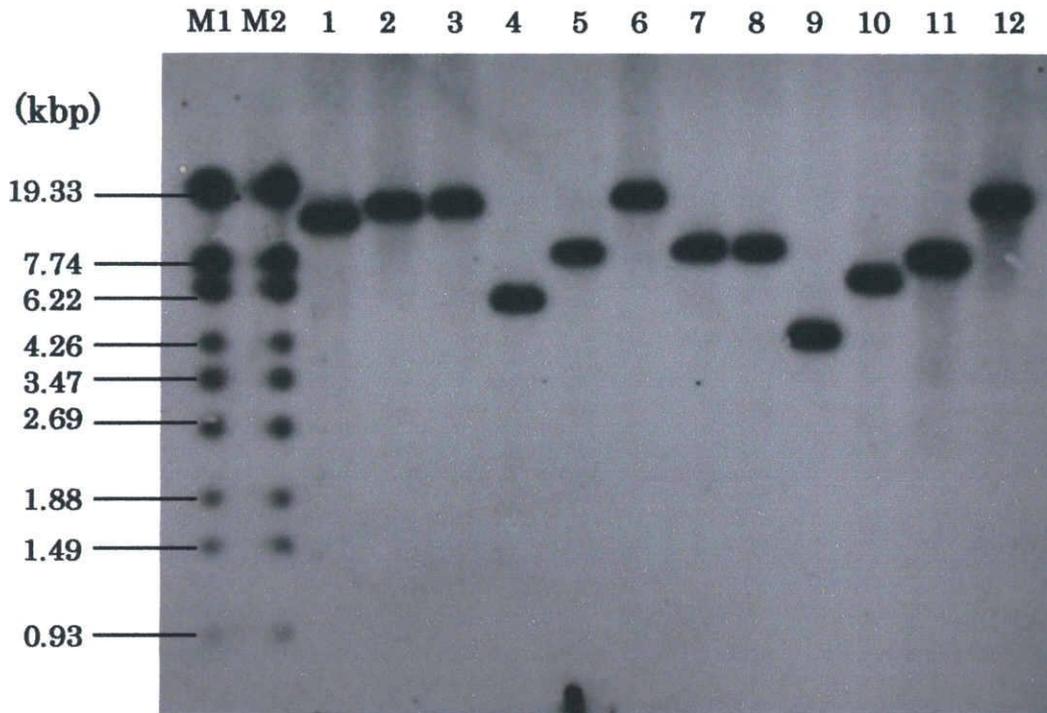
*Vibrio* sp. XY-214 株由来β-キシロシダーゼ遺伝子(*xloA*)の塩基配列を解読するために、プライマーウォーキング法により *xloA*/pBluescript(*Xba* I · *Spe* I)に含まれるイ

ンサート DNA の全塩基配列を解析した。その結果、解読された *xloA* 遺伝子とその周辺領域の塩基配列を Fig. 4-3 の黒枠内に示す。

*xloA* は 629 番目の ATG を開始コドンとし、2,234 番目の TAA を終止コドンとする 1,608 bp からなるオープンリーディングフレーム(ORF)から構成されていた。この ORF は 535 残基のアミノ酸をコードしており、予想されるタンパク質の推定分子量は 60,835 Da、推定等電点は 5.16 であった。さらに、ORF の 2 番目のアミノ酸 (Thr・T) から始まる 20 残基の配列は *Vibrio* sp. XY-214 株由来β-キシロシダーゼ(XloA)の N 末端アミノ酸配列と、また、ORF の 357 残基のアミノ酸 (Trp・W) から始まる 19 残基のアミノ酸配列は、本酵素の内部アミノ酸配列と完全に一致した。終止コドンの 51 塩基下流には自立ターミネーターと推定される回文配列<sup>38)</sup>が存在した。*xloA* 遺伝子のコドン使用頻度および構成アミノ酸を Table 4-5 に示した。*xloA* の GC 含量は 47.02%であった。次に、*xloA* 遺伝子から推定されるアミノ酸配列を他のタンパク質のアミノ酸配列と比較するために BLAST<sup>37)</sup>による相同性検索を行った。その結果、XloA は、*Bacillus* sp. KK-1 株由来のβ-キシロシダーゼ(GenBank accession no. AF045479)、*Bacillus halodurans* C-125 株由来のβ-キシロシダーゼ(GenBank accession no. AP001519)と最も高い相同性 47%を示した。次いで、*Bacillus clausii* KSM-K16 株由来のβ-キシロシダーゼ(GenBank accession no. AP006627)と 46%、*Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 株由来のα-L-アラビノフラノシダーゼ(GenBank accession no. CP000285)と 46%、*Selenomonas ruminantium* GA192 株由来のキシロシダーゼ/アラビノシダーゼ(GenBank accession no. AF040720)と 45%、*Geobacillus stearothermophilus* T-6 株由来のβ-キシロシダーゼ(GenBank accession no. AY690618)と 45%の相同性を示した(Table 4-6)。これら相同性が得られたタンパク質はすべて糖質加水分解酵素ファミリー43(GH43)に分類されていることから、XloA は GH43 に分類されることが示唆された。XloA と GH43 に属する他の酵素のアミノ酸配列のアライメント図を Fig. 4-4 に示した。本酵素遺伝子をクローニングするために、pBluescript のマルチクローニングサイトの *Xba* I と *Spe* I サイトに組み込まれた XY-214 *Xba* I -*Spe* I インサートゲノム DNA 断片は 4,206 bp であった。その全塩基配列を決定したところ、*xloA* 遺伝子の他に 1 種類の不完全な ORF1 と 2 種類の完全な ORF (ORF2 および ORF3) の存在が見出された。各 ORF の塩基配列から推定されるアミノ酸配列を BLAST<sup>37)</sup>により相同性検索した結果、ORF 1 は、

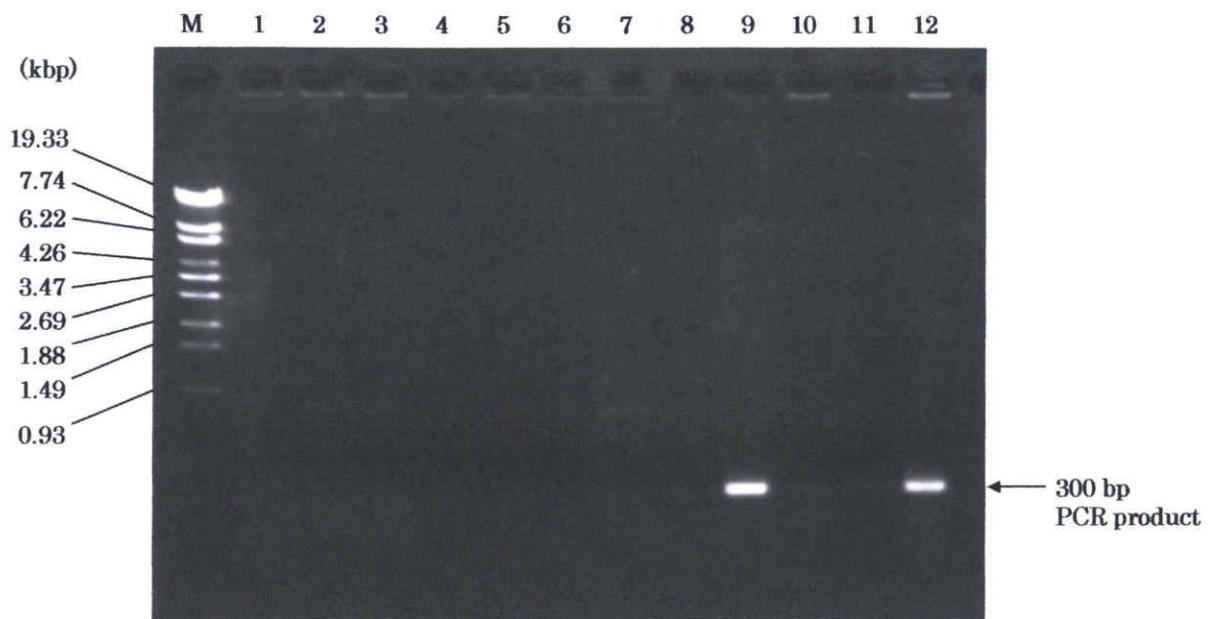
*Photobacterium profundum* SS9 株由来のキシロースイソメラーゼ (GenBank accession no. CR378664) と 86% の相同性、*Escherichia coli* 536 株由来のキシロースイソメラーゼ (GenBank accession no. CP000247) と 75% の相同性が確認されたことから、キシロースイソメラーゼ遺伝子であると推定した。また、ORF2 は *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 23K 株由来のマルトース-O-アセチルトランスフェラーゼ (GenBank accession no. CR936503) と 41% の相同性、*Bacillus halodurans* C-125 株由来のマルトース-O-アセチルトランスフェラーゼ (GenBank accession no. BA000004) と 39% の相同性が確認されたことから、アセチルトランスフェラーゼに類似した遺伝子であると推定した。ORF3 は *Alcanivorax borkumensis* SK2 株由来のアルデヒドレダクターゼ (GenBank accession no. AM286690) と 59% の相同性、*Candida tropicalis* 由来のキシロースレダクターゼ (GenBank accession no. DQ665829) と 44% の相同性が確認されたことから、キシロースレダクターゼ遺伝子であると推定した (Table 4-7)。

さらに、本研究においてクローニングされた 4,206 bp の XY-214 *Xba* I · *Spe* I インサート遺伝子断片 (4,206 bp *xloA* fragment) の 3' 末端領域、すなわちキシロースレダクターゼ遺伝子と推定される遺伝子をコードする ORF3 の遺伝子領域 574 bp が、当研究室の橋川によってクローニングされた *Vibrio* sp. XY-214 株由来  $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子 (*txyA*)<sup>25)</sup> (GenBank accession no. AB029043) の下流に位置する推定アルデヒドレダクターゼ遺伝子の塩基配列 (未発表データ) と完全に一致することが判明した。これにより、橋川が *txyA* 遺伝子のクローニングの際に単離した *txyA* 遺伝子を含むゲノム DNA 断片 (4,409 bp *txyA* fragment) (Fig. 4-3 の点線で囲った領域：塩基配列を Fig. 4-5 に示した) と 4,206 bp *xloA* fragment が部分的に重複していることが示唆された。そこで、*Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA を鋳型に ORF3 と *txyA* 遺伝子の全長が含まれるように設計したプライマーを用いて PCR を行い、さらに増幅した遺伝子断片の塩基配列を解析した。その結果、PCR 増幅産物が ORF3 と *txyA* 遺伝子を含む遺伝子断片であることが判明したことから、*Vibrio* sp. XY-214 株の *xloA* 遺伝子と *txyA* 遺伝子がゲノム上において ORF2 と ORF3 を隔てて隣接していることが明らかになった (Fig. 4-6)



**Fig. 4-1. Southern blot analysis of genomic DNA of *Vibrio* sp. strain XY-214 with a *pxlo* DNA probe.**

Sample of DNA (4  $\mu$ g) were electrophoresed in 1.0 % agarose gel. Genomic DNA was digested by restriction enzymes. After separated by agarose gel electrophoresis, the DNA fragments were transferred to a Hybond-N<sup>+</sup> membrane and hybridized with *pxlo* DNA probe. Lane M1, M2, standard markers (Marker 6); lane 1, *Nde* I - *Pst* I digestion; lane 2, *Sca* I - *Sph* I digestion; lane 3, *Spe* I - *Kpn* I digestion; lane 4, *Nde* I - *Spe* I digestion; lane 5, *Nde* I - *Sph* I digestion; lane 6, *Pst* I - *Sph* I digestion; lane 7, *Xba* I - *Nde* I digestion; lane 8, *Xba* I - *Pst* I digestion; lane 9, *Xba* I - *Spe* I digestion; lane 10, *Xba* I - *Kpn* I digestion; lane 11, *Kpn* I - *Nde* I digestion; lane 12, *Kpn* I - *Pst* I digestion.



**Fig. 4-2. Agarose gel electrophoresis of colony direct PCR product.**

Lane M, standard markers (Marker 6); lane 1~11, PCR product of pxlo-F and pxlo-R primers from transformed *E. coli* XL1-Blue; lane 12, Positive control (Template DNA is genomic DNA of *Vibrio* sp. strain XY-214).

**Xba I**

1 CTAGAGAACGAGATCAAAGTAAACATTGAAGCAAACCACGCAACGCTTGCGGGTCACAGC 60  
L E N E I K V N I E A N H A T L A G H S

61 TTCCACCATGAAGTTGCAACCGCTACATCACTTGGCTTATTTGGTTCAATCGATGCTAAC 120  
F H H E V A T A T S L G L F G S I D A N

121 CGTGGTGACCCACAACACTAGGTTGGGATACTGACCAATTCCCGAACAGCGTTGAAGAAAAC 180  
R G D P Q L G W D T D Q F P N S V E E N

181 ACGTTAGTTATGTACGAAATCCTAAAAGCTGGCGGCTTTACAACAGGTGGCTTCAACTTT 240  
T L V M Y E I L K A G G F T T G G F N F

241 GATGCTCGTGTTTCGTGCTCCTTCTACAGAATTAGAAGACTTGTTCACGGTCACATCGGC 300  
D A R V R R P S T E L E D L F H G H I G

301 GGCATGGATACTATGGCACTATCGCTAGAGCGTGCAGCTAACATGATCGAAAATGATGTG 360  
G M D T M A L S L E R A A N M I E N D V

361 CTGTCTAAAACATCGCTGAGCGTTACGCAGGTTGGAATGATGACCTAGGTCAGAAGATC 420  
L S K N I A E R Y A G W N D D L G Q K I

421 CTAAAAGGTGACCTTTCTCTTGTGGTCTAGCGGCGTTTACTGAAGAGACGAACATCTAA 480  
L K G D L S L A G L A A F T E E T N I \*

481 CCCAGTTAAGAATCTGGTCGTCAAGAATACTTAGAGAACGTTGTAATGGCTTCATACT 540

541 ACAAGTAAGTGATGATGTCTTGAACAAAGCCCAAGTATACTAATTCATATACTTAGGCTT 600

-35  
→ ←  
Stem and Loop

601 TTTTATTACCCTACCGTCTGGAAAAATTATGACAACACTACGATTTCAGAACCCCTATTTTAAA 660  
M T T T I Q N P I L K

661 AGGCTTTAATCCAGATCCTTCGATTGTTTCGTGTCGGCGACGATTACTACATTGCAACCTC 720  
G F N P D P S I V R V G D D Y Y I A T S

721 AACCTTCGAGTGGTTTTCCGGGGATTCAACTTCATCATTACGCGATCTGATTAACCTGGCG 780  
T F E W F P G I Q L H H S R D L I N W R

781 CCTTGTGGTTCACGCCTTAAGTAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTG 840  
L V G H A L T R T S Q L N M M G M D N S

841 CGAAGGCGTTTACGCCCTGCCCTAACTTATTCTGACGGCACATTCTGGCTGTGCTTCTC 900  
E G V Y A P A L T Y S D G T F W L C F S

901 GAATGTCCACTCATGTGCGGGTGGTAACTGGATGGCGACGCTAGTTATGTTGTGACAGC 960  
N V H S C R G G N W M A T P S Y V V T A

961 TGACAGCATTGAAGGTCCATGGAGTGAGCCTGTTCCGATTGGTAATTACGGCTTTGATCC 1020  
D S I E G P W S E P V P I G N Y G F D P

1021 TTCTCTGTTCCATGATGACGATGGCAAGAAATACATGCTCAACATGATTTGGGGTGGCCG 1080  
S L F H D D D G K K Y M L N M I W G G R

1081 TGCAAAGACTAACTTCTTTGGCGGTATCATCATGCAAGAGTTTGATGCCGATGAAGGTAA 1140  
A K T N F F G G I I M Q E F D A D E G K

1141 GCTTGTGGCGCACCCAAGACCGTCTCGAAGGGACCGAGCTCGGTTGTACTGAAGGCC 1200  
L V G A P K T V F E G T E L G C T E G P

1201 ACAACTGCCTAAAAGGATGACTATTATTACCTGATAACAGCGGAAGGTGGTACAGAGCG 1260  
Q L L K K D D Y Y Y L I T A E G G T E R

1261 CAATCACGCGGTAACGGTTTGTGCTTCCAAGCACATCTGGGGACCTTATGAAGTTCACCC 1320  
N H A V T V C R S K H I W G P Y E V H P

1321 AGAAAAATCCTATCCTGACCAGTCGTTTCCAAGAACACGCAGAGCTTTCACGTGCAGGTCA 1380  
E N P I L T S R F Q E H A E L S R A G H

1381 CGGCTTTCCTAGTTGAGACTCAAACCGGTGAATGGTATATGAGCCACCTGTGTGGCCGCCG 1440  
G F L V E T Q T G E W Y M S H L C G R R

1441 TATTCCAAACCCGGAAGGCTATCAATTTATGCCTAAATACGACAATGGCTTCTCAATCTT 1500  
I P N P E G Y Q F M P K Y D N G F S I L

1501 AGGCCGAGAAAGTGGCTACAAAAAGCACACTGGCAAGACGATTGGCCATACATCGCAAC 1560  
G R E S A L Q K A H W Q D D W P Y I A T  
1561 AGGTAAAACACCTGTTGTTGAAGTGAAGCACCAAACCTTCTTTACACCCTTGGCCTGA 1620  
G K T P V V E V E A P N L P L H P W P E  
1621 ATCTCCGGCTCGAGACGAATTTATCGACCCAACGTTGAGCCTGATATCAACCTTACGAGA 1680  
S P A R D E F I D P T L S L I S T L R E  
1681 GCCAGTATCTGAAAAATGGCTGTCGTTAAGCGAGCGACCAGGATTCTTACGTCTGAAAGG 1740  
P V S E K **W L S L S E R P G F L R L K G**  
1741 ACGCCACTATTTATATTCCCGTTACGAACAAAGCATGGTTGCTCGCCGATTCCAAGCGCA 1800  
**R H Y L Y** S R Y E Q S M V A R R F Q A H  
1801 CAATGCAACAGTAGAAACCAAGCTTGAGTTCAAGCCGAACACACCTTATGAAATGGCAGG 1860  
N A T V E T K L E F K P N T P Y E M A G  
1861 GTTATGTGCTTATTACGCACGTAATGGGCACTACTTTCTAAAAATGACTGCCAATGATCT 1920  
L C A Y Y A R N G H Y F L K M T A N D L  
1921 AGGCGAACGTGTTTTACAAGTTGTCGGTAACATCAATGATGTTTACGGTGAATACTCTAA 1980  
G E R V L Q V V G N I N D V Y G E Y S N  
1981 CGATGTCGTTATCGGTGATGCAGATACGGTCTACATGAGATTAGAGCTCAAACTCAATG 2040  
D V V I G D A D T V Y M R L E L K T Q W  
2041 GTATCAATATAGTTACTCACTGGATGGCGTCGACTGGTATGAGATTGGCCAGCCTTAA 2100  
Y Q Y S Y S L D G V D W Y E I G P A L N  
2101 CAGCACACCGCTGTCAGATGAAGGCGTCTGATATTTTCCGTTTCACAGGAAGCTTCGC 2160  
S T P L S D E G G P D I F R F T G S F A  
2161 AGCACTATTTGTTGCTGATATCACAGGGCAGAAACGCCATGCTGATTTTACT**ACTTTGA** 2220  
A L F V A D I T G Q K R H A D F D Y F E  
2221 **GTACCTAGAGCAT**TAAGCTCTTGTTAATACTCTACCTTATCGGTTTCGCTCTCGCGATAAA 2280  
Y L E H \*  
2281 TTAATCCCCTCATACTGCACATTCAATTTGCTGCGGTATGAGGTTTTCTTCAATTTATTA 2340  

  
Stem and Loop  
2341 TTCAAATAACAAAGAGCCAAACCATACTTTGGTCACCATCATATCGGGTCAAATACCTCC 2400  
 -35  
2401 CCCCTTAATATCAAACCCTCCATCAAATTTACGATTTTCTTGACCCATTAACCTAATT 2460  
 -10  
2461 TAGCTTTTAAATGAGTTGTCACGTTACGCTACGTCACCTCGATATACTGGTTAAAAATT 2520  
2521 TATAGAGGGACAGACATGGCGGAACAGTTTCAGAAGATGATAAAGGGTGAACGTTTAAAC 2580  
SD M A E Q F Q K M I K G E R F N  
2581 GTCTGGGACGAGGATTTAAAATCACGTGCTTGATAACACGACAAATCACACATCAATTC 2640  
V W D E D L K S R R L I T R Q I T H Q F  
2641 AACCAAACCCTCCCTACAGAACAAGGCTTACGAAGCACATTATTAGACCAACTATTTCTA 2700  
N Q T L P T E Q G L R S T L L D Q L F L  
2701 AACGTTGGCAAAAACCTTAGAGGTATCACCGCCACTCACGGTTCGATTACGGGGAAAACGTC 2760  
N V G K N L E V S P P L T V D Y G E N V  
2761 ACCATTGGCGACGATGTGTTTCATTAACCTCTAACTTTACCTTGGTGAACAGTGGGCCTATC 2820  
T I G D D V F I N S N F T L V N S G P I  
2821 CGTATTGGCTCTCGTGAATGATTGCGCCCAACGTGAGTCTGTTCTCTATCAATCATGGC 2880  
R I G S R V M I A P N V S L F S I N H G  
2881 TTGTGCCCTGAAACTCGAAAAACACACAGTGGCGTTCGGCTTGATTACCCAGCCCCTATC 2940  
L C P E T R K T H S G V R L D Y P A P I  
2941 ACGATTGAAGACGACGTTTGGATTGGCGGTACACCGTTGTCTTGGCGGGAGTCACTATC 3000  
T I E D D V W I G G H T V V L A G V T I

3001 GGAGCGGGTTGCGTCATCGGGCGCTGGCTCTGTGCGTGACCAAAGATATCCCAAAAAGTGT 3060  
 G A G C V I G A G S V V T K D I P K N C  
 3061 ATTGCACTAGGCAACCCAGCTACCGTCATCCGAGAAATTGAACCCGGTGAATTACCTAAA 3120  
 I A V G N P A T V I R E I E P G E L P K  
 3121 GGTTTTTAAACGACTAATGGACACACGAACAAGGAGAACTCATGTCTAACATTACCGATA 3180  
 G F \* M S N I T D I  
 3181 TCGCACTTCAATCTGGAGCAACCATTCCCTCAAGTAGGGCTTGGAACCTGGAAAGCGGATG 3240  
 A L Q S G A T I P Q V G L G T W K A D E  
 3241 AACCCGGACAAACTTACGAAGCGGTTTCGTAGCGCCATCAAGCTTGGCTACAGACATTTTG 3300  
 P G Q T Y E A V R S A I K L G Y R H F D  
 3301 ACTGTGCCCTGGCTACGGCAATGAAAAGAGATTGGCGATGCTCTAGTCGATGCTATGC 3360  
 C A P G Y G N E K E I G D A L V D A M H  
 3361 ACGATGAGGAAGTAACACGTGAAGAACTGTTTATAACTTCGAAACTCTGGAATGCCACC 3420  
 D E E V T R E E L F I T S K L W N A H H  
 3421 ATTTTCCAGAAGATGTAATGCCTAGCCTCAAGCAGACATTGGCTGATCTTAAATTGGACT 3480  
 F P E D V M P S L K Q T L A D L K L D Y  
 3481 ATCTCGACCTCTATTTAATGCACTGGCCTGTGCGCTTAAAAAAGGTGTTGGATTTCCAG 3540  
 L D L Y L M H W P V A L K K G V G F P E  
 3541 AGAAAGGGGATGATTTTGTGTCGTTAGACGACCTTCCTTTGGAAAAGACATGGGAAGCAA 3600  
 K G D D F V S L D D L P L E K T W E A M  
 3601 TGGAAGAAGCACACATCAAAGGGTTGGTAAAGATCTTGGTGTCTCCAATTTTCAGTGCTA 3660  
 E E A H I K G L V K D L G V S N F S A K  
 3661 AAAAGCTGCACCATTTAAAAGGCAACTGTTTAAATCCAACCGATAATGAACCAAGTTGAGA 3720  
 K L H H L K G N C L I Q P I M N Q V E M  
 3721 TGCACCCCTACCTACAGCAGCAAGAGCTTATCGACTACTGCCACTCACAAGGAATTGCGG 3780  
 H P Y L Q Q Q E L I D Y C H S Q G I A V  
 3781 TAACCGCTTATGCGCCGTTAGGATCTGGAGACCGACCTGAACTGCTCACAAGTGAGAATG 3840  
 T A Y A P L G S G D R P E L L T S E N E  
 3841 AGCCAACCCTCCTAGATCACCCCTCTTATCCAATCCATTGCCAATGAGCATTTCAGTGACTC 3900  
 P T L L D H P L I Q S I A N E H S V T P  
 3901 CGGCACAAGTGTGATTGCATGGGGTTTACAGCGAAACATTGTCATGATCCCTAAGTCTG 3960  
 A Q V L I A W G L Q R N I V M I P K S A  
 3961 CAAACCCAGAGCGACAGCAGCTTAACCTCAACGCTCAGGAAGTGAACCTGACAACGGAAA 4020  
 N P E R Q Q L N L N A Q E V N L T T E N  
 4021 ACATGGCTGATATACAGAAGCTAGACCTTAACTACCGCTACCTAGCTGGCGAATTCTGGG 4080  
 M A D I Q K L D L N Y R Y L A G E F W A  
 4081 CATTAGAAGGCAGCCCTTATACGCTAGAAAACCTATGGGATGAACCTGTCGCTTAATCAT 4140  
 L E G S P Y T L E N L W D E P V A \*  
 4141 TAATCCAAGAAAACCCGGCAACTATAGCCGGTTTTTTATTTGTGTAACGAAACCCGGA 4200  
 Spe I Stem and Loop  
 4201 GACTAGTTACATACTTGATTTGTGAACGTCCTGTTTTGTCTATGATCTGCTGACCTTGT 4260  
 4261 CCCGTGATGTCTTTTACCTTAAATGTCATCTTGTAGGTTTGCCTAACTGGGCAGAAAA 4320  
 4321 GAGCGGCTGAACGCACCGTTTACTTAGTTCC .....  
 .....  
 5461 TCTACGTCTTGACCGACAGAAACCAGGATTCCTTGGTCTGGTACAAGTTTTCCATCAAGG 5520  
 5521 GCATGAGCCTGAAATGCACAGGCACCTAACGTTGCAACAGAGATCATTTTTGCTAGTTTT 5580  
 5581 TTCATCGAATTTCTTCTTATGAGTATCGACGATTAATAATCGAGCTTTTTAGAACACG 5640



**Fig. 4-3. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *xloA*, ORF1, ORF2 and ORF3 genes of *Vibrio* sp. strain XY-214.**

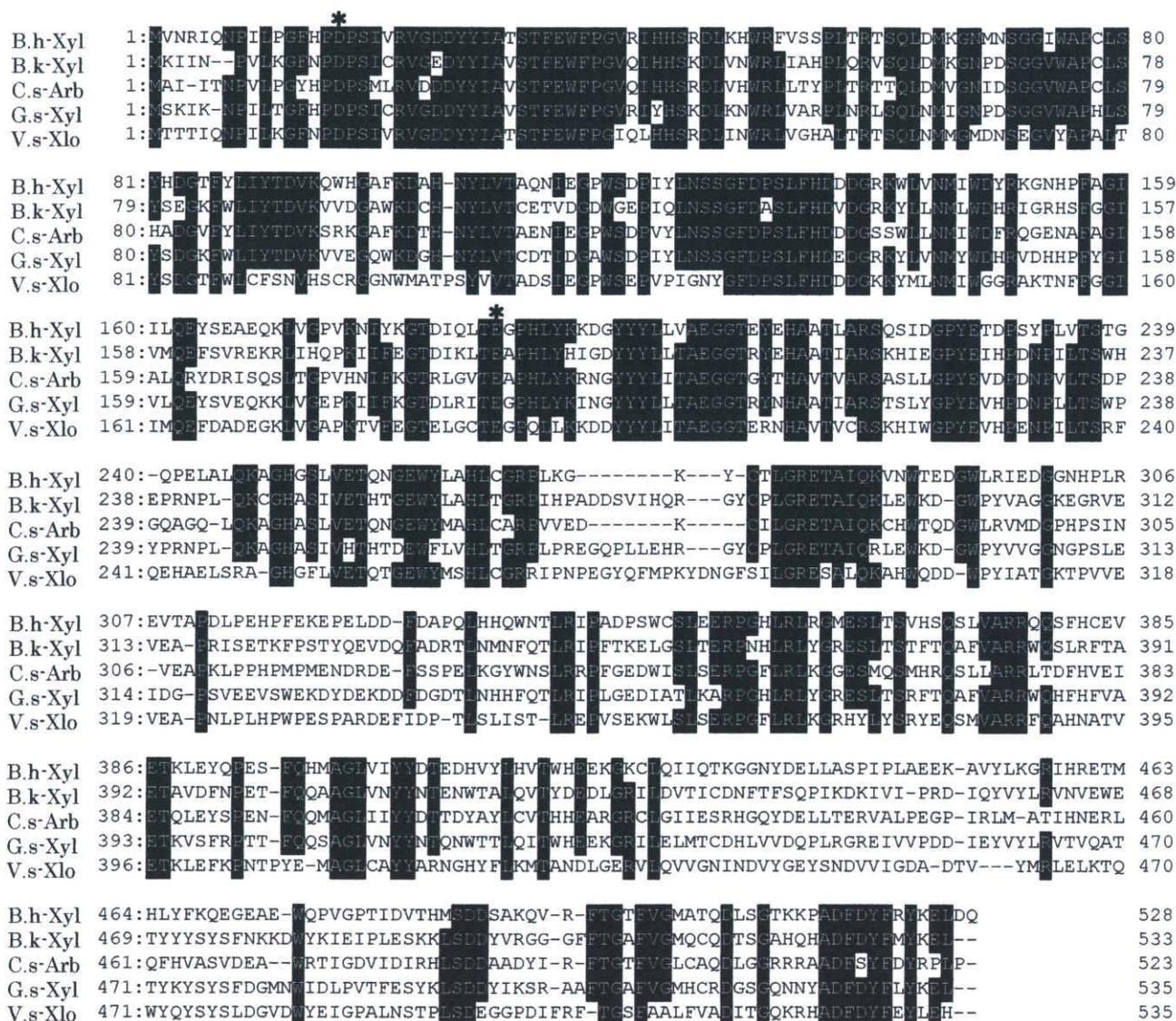
The 4,206 bp *xloA* fragment cloned for the *xloA* gene is boxed in the bold black line. The 4,409 bp *txyA* fragment cloned for the *txyA* gene is boxed in the broken line. The *xloA* coding region starts at nucleotide 629 and ends at nucleotide 2,236. The ORF1 coding region starts at nucleotide 1 and ends at nucleotide 480. The ORF2 coding region starts at nucleotide 2,536 and ends at nucleotide 3,129. The ORF3 coding region starts at nucleotide 3,162 and ends at nucleotide 4,136. The putative promoter sequences (– 35 and – 10 regions), a Shine-Dalgarno sequence (SD), and potential termination signals are indicated above or under the nucleotide sequence. The determined N terminal and internal amino acid sequence of XloA are indicated by a black background residues. *Xba* I and *Spe* I recognition sites used for yielding *xloA*/pBluescript(*Xba* I · *Spe* I) were double underlined. Regions corresponding to PCR primers used for amplification of *xloA* are shown in the boxes. The *txyA* gene is boxed in red, and ORF4 is boxed in blue.

**Table 4-5. Codon usage in the *xlaA* gene**

Codon	Number of codon						
TTT-Phe	12	TCT-Ser	5	TAT-Tyr	14	TGT-Cys	5
TTC-Phe	14	TCC-Ser	3	TAC-Tyr	17	TGC-Cys	1
TTA-Leu	12	TCA-Ser	9	TAA-***	1	TGA-***	0
TTG-Leu	1	TCG-Ser	3	TAG-***	0	TGG-Trp	14
CTT-Leu	7	CCT-Pro	15	CAT-His	5	CGT-Arg	11
CTC-Leu	3	CCC-Pro	1	CAC-His	13	CGC-Arg	8
CTA-Leu	7	CCA-Pro	11	CAA-Gln	14	CGA-Arg	5
CTG-Leu	13	CCG-Pro	6	CAG-Gln	2	CGG-Arg	0
ATT-Ile	12	ACT-Thr	8	AAT-Asn	11	AGT-Ser	5
ATC-Ile	10	ACC-Thr	9	AAC-Asn	12	AGC-Ser	7
ATA-Ile	2	ACA-Thr	12	AAA-Lys	11	AGA-Arg	2
ATG-MET	14	ACG-Thr	5	AAG-Lys	8	AGG-Arg	0
GTT-Val	17	GCT-Ala	6	GAT-Asp	21	GGT-Gly	18
GTC-Val	7	GCC-Ala	6	GAC-Asp	11	GGC-Gly	20
GTA-Val	3	GCA-Ala	14	GAA-Glu	23	GGA-Gly	4
GTG-Val	2	GCG-Ala	5	GAG-Glu	14	GGG-Gly	5

**Table 4-6. Homologies of the XloA from *Vibrio* sp. XY-214**

Family numbers	Enzymes	Organisms	Length	GenBank accession numbers	Identity (%)
GH43	$\beta$ -xylosidase	<i>Bacillus</i> sp. KK-1	533	AF045479	47
GH43	$\beta$ -xylosidase	<i>Bacillus halodurans</i> C-125	528	AP001519	47
GH43	$\beta$ -xylosidase	<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16	555	AP006627	46
GH43	$\alpha$ -L-arabinofuranosidase	<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043	523	CP000285	46
GH43	$\beta$ -xylosidase and arabinofuranosidase	<i>Selenomonas ruminantium</i> GA192	583	AF040720	45
GH43	$\beta$ -xylosidase	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> T-6	535	AY690618	45



**Fig. 4-4. Sequence alignment of selected family GH43  $\beta$ -xylosidase and arabinofuranosidase.**

The sequences are identified as follows: B.h-Xyl, *Bacillus halodurans* C-125  $\beta$ -xylosidase (BAB07402); B.k-Xyl, *Bacillus* sp. KK-1  $\beta$ -xylosidase (AAC27699); C.s-Arb, *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (ABE58499); G.s-Xyl, *Geobacillus stearothermophilus* T-6  $\beta$ -xylosidase (ABI49959); V.s-Xlo, *Vibrio* sp. XY-214  $\beta$ -xylosidase . Amino acids that are conserved in four of the five sequences are highlighted. Asp and Glu residues that may be involved in general acid-base catalysis are marked with asterisks.

**Table 4-7. Homologies of the ORFs in the 4,206 bp chromosomal segment**

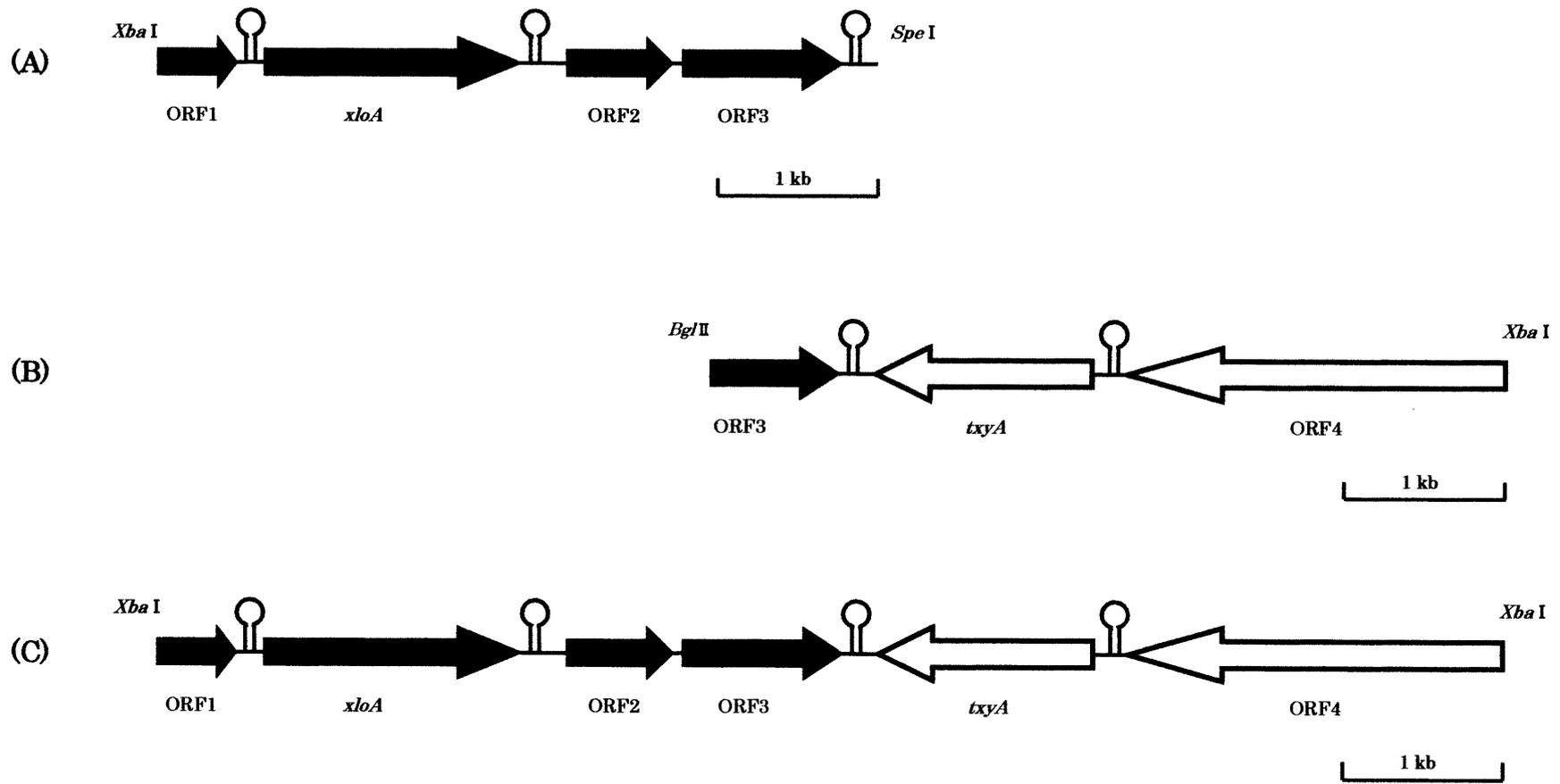
ORFs	Enzymes	Organisms	GenBank accession numbers	Identity (%)
ORF1	xylose isomerase	<i>Photobacterium profundum</i> SS9	CR378664	86
	xylose isomerase	<i>Escherichia coli</i> 536	CP000247	75
ORF2	maltose- <i>O</i> -acetyltransferase	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K	CR936503	41
	maltose- <i>O</i> -acetyltransferase	<i>Bacillus halodurans</i> C-125	BA000004	39
ORF3	aldehyde reductase	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	AM286690	59
	xylose reductase	<i>Candida tropicalis</i>	DQ665829	44

Xba I

1 TCTAGATTGCATGGAATAGCTCTATTGTCTTTTTTCGTTATTTTCCGCCATGGCGAGTGCC 60  
S R L H G I A L L S F S L F S A M A S A  
61 GAGATCACCACCTTCAATTGCAAGTGGCAGTCCCGGGACAGTTATGGCAGAAGATGGTGGC 120  
E I T T S I A S G S P G T V M A E D G G  
121 TGGACCGGTAATTGGAGTTACCTATGTGTTGATGACCACTGTGCGTCGGCGCAGCTAGTC 180  
W T G N W S Y L C V D D H C A S A Q L V  
181 AACGGTTTTTGGCAAAGGCAAGTGACTGAAAAAATGTCATTTTCAGGTCAAACGTACAAA 240  
N G F W Q R Q V T E K N V I S G Q T Y K  
241 GTCCAATTGAAAGTGCAAGATAACACACTGTCACAATACATTTCTCCAGAGTACCTCTTA 300  
V Q L K V Q D N T L S Q Y I S P E Y L L  
301 ACAGCCGACGAGGGCTCATCTGGCGGTGGTGGTACTGAACCACCCGTTGATGGCCAAGCG 360  
T A D E G S S G G G G T E P P V D G Q A  
361 CCGACCGTCGATATCTCCATCACACCAAGCTCACCAAGAGTGGGTGAAACGGTACAAGTC 420  
P T V D I S I T P S S P R V G E T V Q V  
421 TCGGTTCAAGCAGGCAGTGAATCGAACGCAATTAACCAACTAATTCCTCAGATAACAGCA 480  
S V Q A G S E S N A I N Q L I L Q I T A  
481 CCATCTGGGCAAGTTATTTTCGACTACCGACTACCCGAATGCGAGCGCACAGCAGTCGTTT 540  
P S G Q V I S T T D Y P N A S A Q Q S F  
541 GTAGCGGAAGAGCAAGGCGGGTACCAAGTGCTTGCAACGGCAACCGATACTCAAGGTGAG 600  
V A E E Q G G Y Q V L A T A T D T Q G E  
601 AGCACGCAAAGAGTCGCAACCGTTAATGTAAGGCAGGACGTGGTTGCTGGTAATGGTGT 660  
S T Q R V A T V N V R Q D V V A G N G V  
661 GTCACGCATGAAATTGCAGAGCGTTATCGTGTGCGTCACGAACTTTCTACTAATGACTTT 720  
V T H E I A E R Y R V R H E L S T N D F  
721 AATAATTTCAATATTGAATACTGGGAAGTTCGTTTTGGCTCTTTTCGTATTGCAAGACTAT 780  
N N F N I E Y W E G R F G S F V L Q D Y  
781 ACGTTACAGGAAGCAGCAAGCTTAAGACAGCAAGCGTGTGGGACAACCGAACCTTGTGTT 840  
T L Q E A A S L R Q Q A C G T T E P C V  
841 GTCGTACGTTATCAAGTGCCATTCCAATGGCTATGACAGATTCCGCGGGCAGCGAAAAG 900  
V V T L S S A I P M A M T D S A G S E K  
901 TCGTGTAATCAACAGTCGCCTAACTGGCGGTATCATAAATATTATGGTGACGAGACGAAT 960  
S C N Q Q S P N W R Y H K Y Y G D E T N  
961 TTCGAATATGGCTATGTAATGGATGTAGTTTTGCCTGATGGTTCGAATCGTACCTGCTTGT 1020  
F E Y G Y V M D V V L P D G R I V P A C  
1021 GAAGCAAGTCGTTTCGAGCGTGCTTCGGCAACCCTTGGCGTGCAGTGATGCAGCGTTGG 1080  
E A S R S Q R A S A T T W R A V M Q R W  
1081 CCACATATTAACCGTCCTTTCTCGGCCGGTGAGCAGATTGAGTTCGAGACCACGATAAGC 1140  
P H I N R P F S A G E Q I E F E T T I S  
1141 TTTAATCGAGCGCAAACGACAGGCGATAATGTCAACTACTACGGACAGACTTTTAAAGTAT 1200  
F N R A Q T T G D N V N Y Y G Q T F K Y  
1201 GTTCTGGGGCAAGTTTTAACGGTCAATAATGGTGATTCCGGCCTCTGGGCCTACGGGCATC 1260  
V L G Q G L T V N N G D S A S G P T G I  
1261 AATGATAGCTTTGCGCAATTAGGCGGGTATAACAACGGTGCCTCAGCTCTCAGCAACGGGC 1320  
N D S F A Q L G G Y T T V P Q L S A T G  
1321 GGGCAACAGCAACGTCTAAGCTTCATGCAGCATGCCTATAACCTCGACCAGAAATAACGTT 1380  
G Q Q Q R L S F M Q H A Y N L D R N N V  
1381 CAGCCTTGGTTAGATGGCCGCCGCTGATTCATACAGATTTTAATACGGGTAACCACGTG 1440  
Q P W L D G R R L I H T D F N T G N H V  
1441 GAAGAGTTTTTACCAGGCCACAAGCGATAAACGGAAATCTCCCTTTTCTGAGCTTGCT 1500  
E E F L P G P Q A I N G N L P F P E L A







**Fig. 4-6. Organization of the *xloA* and *txyA* loci in *Vibrio* sp. strain XY-214.**

The sequence of the N terminus of the ORF1 and ORF4 gene product are incomplete. Hairpin like marks indicate transcription terminators. (A) The 4,206 bp *xloA* fragment cloned for the *xloA* gene. (B) The 4,409 bp *txyA* fragment cloned for the *txyA* gene. (C) Genetic cluster of the 8,041 bp segment containing  $\beta$ -1,3-xylan utilization genes.

### IV-3. 考察

本章では $\beta$ -1,3-キシラン資化細菌である *Vibrio* sp. XY-214 株が産生する $\beta$ -キシロシダーゼ(XloA)の性質を解明することを目的に、前章で作製したプローブを用いてサザンブロット法により $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子(*xloA*)のクローニングを行い、塩基配列を決定した。

*Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA からクローニングされた $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子(*xloA*)は、535 アミノ酸残基をコードする 1,608 bp の ORF により構成されており、その推定分子量は 60,835 Da、推定等電点は 5.16 であった。また SignalP server<sup>39)</sup> による解析の結果、タンパク質の局在に關与するシグナルペプチドを保有しないことが確認され、本酵素が細胞外に分泌されない菌体内酵素であることが裏付けられた。*xloA* 遺伝子から推定されるアミノ酸配列を他のタンパク質の配列と比較するために BLAST<sup>37)</sup> による相同性検索を行った結果、XloA は *Bacillus* sp. KK-1 株由来の $\beta$ -キシロシダーゼ(GenBank accession no. AF045479)、*Bacillus halodurans* C-125 株由来の $\beta$ -キシロシダーゼ(GenBank accession no. AP001519)と最も高い相同性 47%を示した。次いで、*Bacillus clausii* KSM-K16 株由来の $\beta$ -キシロシダーゼ(GenBank accession no. AP006627)と 46%、*Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 株由来の $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ(GenBank accession no. CP000285)と 46%、*Selenomonas ruminantium* GA192 株由来のキシロシダーゼ/アラビノシダーゼ(GenBank accession no. AF040720)と 45%、*Geobacillus stearothermophilus* T-6 株由来の $\beta$ -キシロシダーゼ(GenBank accession no. AY690618)と 45%の相同性を示した。これら相同性が得られたタンパク質はすべて糖質加水分解酵素ファミリー43 (GH43)に分類されていることから XloA は GH43 に分類されることが推定された (Table 4-6)。

糖質加水分解酵素はそのアミノ酸配列に基づいて 108 のファミリーに分類されている(2007年3月現在)(<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>)<sup>40, 41)</sup>。このうち GH3、39、43、52、54 の 5 つのファミリーにおいて $\beta$ -キシロシダーゼ活性が確認されており、さらに本研究において遺伝子クローニングされた XloA のような GH43 に分類される $\beta$ -キシロシダーゼは、GH62 に分類されている $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼと共に 5-fold  $\beta$ -propeller 構造を形成していることから clan GH-F に属している。従って、本酵素

は 5-fold  $\beta$ -propeller 構造を形成していることが示唆された。GH43 に属する $\beta$ -キシロシダーゼのうち、既に立体構造が明らかにされている *Geobacillus stearothermophilus* T-6 株由来の $\beta$ -キシロシダーゼ(XynB3)<sup>42)</sup>とのアミノ酸配列の比較により、本酵素の Asp16 と Glu189 が一般酸塩基触媒として機能するアミノ酸残基であることが示唆された(Fig. 4-4)。

*xloA* 遺伝子のクローニングにおいてサザンブロット法により単離された *xloA* 遺伝子を含むゲノム DNA 断片は 4,206 bp であった。その全塩基配列を解析した結果、*xloA* 遺伝子の ORF 以外に 1 種類の不完全な ORF1 と 2 種類の完全な ORF (ORF2, ORF3) の存在が見出された。各 ORF の塩基配列から推定されるアミノ酸配列を BLAST<sup>37)</sup> により相同性検索した結果、ORF 1 は *Photobacterium profundum* SS9 株由来のキシロースイソメラーゼ(GenBank accession no. CR378664)と 86%の相同性、*Escherichia coli* 536 由来のキシロースイソメラーゼ(GenBank accession no. CP000247)と 75%の相同性が確認されたことから、キシロースイソメラーゼ遺伝子であると推定した。また、ORF2 は *Lactobacillus sakei subsp. sakei* 23K 株由来のマルトース-O-アセチルトランスフェラーゼ(GenBank accession no. CR936503)と 41%の相同性、*Bacillus halodurans* C-125 株由来のマルトース-O-アセチルトランスフェラーゼ(GenBank accession no. BA000004)と 39%の相同性が確認されたことから、アセチルトランスフェラーゼに類似した遺伝子であると推定した。ORF3 は *Alcanivorax borkumensis* SK2 株由来のアルデヒドレダクターゼ(GenBank accession no. AM286690)と 59%の相同性、*Candida tropicalis* 由来のキシロースレダクターゼ(GenBank accession no. DQ665826)と 44%の相同性が確認されたことから、キシロースレダクターゼ遺伝子であると推定した(Table 4-7)。

さらに、本研究においてクローニングされた 4,206 bp の XY-214 *Xba* I · *Spe* I ゲノム DNA 断片(*xloA* fragment 4,206 bp)の 3' 末端領域、すなわちキシロースレダクターゼ遺伝子と推定される遺伝子をコードする ORF3 の遺伝子領域 574 bp が、当研究室の橋川によってクローニングされた *Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子(*txyA*)(GenBank accession no. AB029043)<sup>25)</sup>の下流に位置する推定アルデヒドレダクターゼ遺伝子の塩基配列(未発表データ)と完全に一致することが判明した。これにより、橋川が *txyA* 遺伝子のクローニングの際に単離した *txyA* 遺伝子を含むゲノム DNA 断片(4,409 bp *txyA* fragment) (Fig. 4-3 の点線で囲った領域：塩基配列を

Fig. 4-5 に示した)と 4,206 bp *xloA* fragment が部分的に重複していることが示唆された。そこで、*Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA を鋳型に ORF3 と *txyA* 遺伝子の全長が含まれるように設計したプライマーを用いて PCR を行い、さらに増幅した遺伝子断片の塩基配列を解析した。その結果、PCR 増幅産物が ORF3 と *txyA* 遺伝子を含む遺伝子断片であることが判明したことから、*Vibrio* sp. XY-214 株の *xloA* 遺伝子と *txyA* 遺伝子がゲノム上において ORF2 と ORF3 を隔てて隣接していることが明らかになった(Fig. 4-6)。

また、*txyA* 遺伝子の 188 塩基対上流には 755 アミノ酸残基をコードする 2,268 塩基対からなる ORF4 が存在しており、その推定アミノ酸配列は N 末端に典型的なシグナルペプチドを有していた。シグナルペプチドを除いた推定アミノ酸配列を、*Alcaligenes* sp. XY-234 株由来の  $\beta$ -1,3-キシラナーゼ上流遺伝子産物の推定アミノ酸配列(未発表データ)と比較した結果、およそ 76% と高い相同性を示した<sup>43)</sup>。BLAST<sup>37)</sup> による相同性検索の結果、本タンパク質の N 末端領域(Asp38 - Asp87)は、*Alcaligenes* sp. XY-234 株由来  $\beta$ -1,3-キシラナーゼのファミリー 31 糖質結合モジュール(CBM31) (GenBank accession no. AB039953)と 36%、*Pseudomonas* sp. ND137 株由来  $\beta$ -1,3-キシラナーゼのファミリー 6 糖質結合モジュール(CBM6) (GenBank accession no. AB063257)と 28% の相同性が確認されたことから、本タンパク質の N 末端領域は  $\beta$ -1,3-キシラン関連物質との結合に関与することが推測された。また Asp103 - Thr169 領域は *Mycobacterium smegmatis* str. MC2 155 株の ABC-type トランスポーター(GenBank accession no. NC008596)と 31% の相同性が確認され、さらに Gly521 - Leu755 領域は *Saccharophagus degradans* 2-40 株の GTP 結合タンパク質 (GenBank accession no. NC007912)と 34% の相同性が確認された。以上のことから、ORF4 がコードするタンパク質は細胞膜に局在し、細胞外環境におけるキシロオリゴ糖の存在を細胞内に伝達する受容体タンパク質として、またはキシロオリゴ糖を細胞内に取り込む輸送タンパク質として機能していることが示唆された。

糖質加水分解酵素を産生する微生物では、関連遺伝子がクラスターを形成しており、発現した関連酵素遺伝子群が効率的に基質を分解、代謝することが明らかになっているが、上記のように *Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA においても、 $\beta$ -1,3-キシランを効率よく分解し、代謝するための遺伝子クラスターの存在が明らかになった。GH43 に属する  $\beta$ -キシロシダーゼを産生するその他複数の細菌においても、キシロース代謝

関連遺伝子クラスターの存在が確認されている<sup>44, 45, 46)</sup>。 *G. stearothermophilus* T-6 に関してはキシランの分解、キシロオリゴ糖やキシロビオースの細胞内への取り込み、細胞内でのキシロオリゴ糖からキシロースの遊離、分解産物の代謝などに関する 12 種類もの遺伝子が 1 つのオペロンを形成しており、一組のプロモーターとターミネーターによってその発現が調節されている。しかしながら、本研究によりクローニングされた *Vibrio* sp. XY-214 株のキシロース代謝関連遺伝子クラスターの場合、オペロンを形成しているのは ORF2 と ORF3 のみであり、クラスター内の他の遺伝子に関しては終止コドンの下流に推定ターミネーター配列が存在していた。

## 第V章 大腸菌発現系による組換え体 XloA(rXloA)の発現とその酵素学的性質の検討

第IV章では *Vibrio* sp. XY-214 株由来の *xloA* 遺伝子をクローニングし、その塩基配列を決定した。本章では、大腸菌発現系により組換え体 XloA(rXloA)を発現させ、その酵素学的性質を検討した。

### V-1. 実験材料および実験方法

#### V-1-1. 試薬

試薬は特にことわらない限り、和光純薬工業またはナカライテスクの特級試薬を使用した。

#### V-1-2. $\beta$ -1,3-キシロオリゴ糖の調製

$\beta$ -1,3-キシロオリゴ糖の調製には、当研究室の岡崎によりその大腸菌発現系が構築された *Alcaligenes* sp. XY-234 株由来の $\beta$ -1,3-キシラナーゼ<sup>26)</sup>を用いた。すなわち、100 ml 容三角フラスコに1%  $\beta$ -1,3-キシランを含む20 mM 酢酸 Buffer (pH 6.0)を20 ml 注入した後、組換え大腸菌において発現させた *Alcaligenes* sp. XY-234 株の $\beta$ -1,3-キシラナーゼ溶液(1.14 unit/ml)を1 ml 加え、37°C、12 時間反応させた。

この反応液をあらかじめ15% 酢酸溶液で活性化し、蒸留水で平衡化した活性炭カラム(2.2×48 cm)に添加した。最初に蒸留水で溶出し、次いで、9、14、30%の各エタノールで段階的にオリゴ糖を溶出した。蒸留水画分からはキシロース、9% エタノール画分からはキシロビオース、14% エタノール画分からはキシロトリオース、30% エタノール画分からはキシロテトラオースが得られた。各画分はエバポレーターにより完全に脱水して50 mM MES Buffer (pH 7.0)に溶解させ、さらに薄層クロマトグラフィにより分画して精製した。

#### V-1-3. 宿主大腸菌およびプラスミドベクター

タンパク質の発現には *E. coli* BL21(DE3)[*E. Coli B, F, dcm, omp T, hsd S(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>)*,

*gal*,  $\lambda$  (DE3) ] と pET22b(+)(Novagen)を用いた。菌体培養には LB 培地 (1% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 1% NaCl: pH 7.5) を使用し、固形培地として使用するときは寒天を 1.5%になるように添加した。

#### V-1-4. *Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -キシロシダーゼの組換え大腸菌における発現

##### V-1-4-1. 発現用プラスミドの構築

IV-1-6 においてクローニングされた *Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子(*xloA*)を大腸菌へ導入して大量発現させ、その酵素学的性質を解明することを目的に、高発現ベクター-pET Expression System (Novagen)を用いて大腸菌発現系を構築した。

まず初めにIV-1-6 (E)において決定された *xloA*/pBluescript(*Xba* I -*Spe* I)内のインサート DNA の塩基配列をもとに、下に示した *xloA* 遺伝子の全長を増幅させるためのプライマーを設計し、*xloA*/pBluescript(*Xba* I -*Spe* I)プラスミドを鋳型にして以下の条件で PCR を行った。それぞれのプライマーには *Nde* I および *Not* I 制限酵素サイトを付加し、発現産物の C 末端側にヒスチジンタグが付加されるように設計した。PCR 増幅産物を制限酵素処理し、アガロース電気泳動による分画後、ゲルより精製して pET22b(+)*Nde* I - *Not* I サイトにライゲーションした。このライゲーション反応液を *E.coli* XL1-Blue に形質転換した。DNA ポリメラーゼには EX Taq(Takara)を使用し、さらに構築したプラスミドの挿入断片の塩基配列を解析し、変異が生じていないことを確認した。これにより得られたキメラプラスミドを XY-214*xloA*-ORF/pET22b と命名した。

次に、XY-214*xloA*-ORF/pET22b プラスミドを II-1-7 に示した方法で *E.coli* BL21(DE3)に形質転換した。

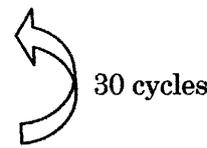
**xlo-F** : 5' -GGAATTCCATATGACAACACTACGATTCAG -3'

*Nde* I

**xlo-R** : 5' -AAGCGGCCGCATGCTCTAGGTACTCAAAGT -3'

*Not* I

Composition of PCR solution		Reaction condition of PCR	
Components	Quantity	94°C	30 sec
dH <sub>2</sub> O	78.5 $\mu$ l	94°C	30 sec
10×ExTaq Buffer	10.0 $\mu$ l	53°C	30 sec
2 mM dNTP	8.0 $\mu$ l	72°C	2min
<i>xloA</i> /pBluescript( <i>Xba</i> I - <i>Spe</i> I)	1.0 $\mu$ l	4°C	hold
Primer-F (50 pmol/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l		
Primer-R (50 pmol/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l		
Ex Taq Polymerase (5 unit/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l		
Total	100 $\mu$ l		



#### V-1-4-2. タンパク質の発現誘導

組換えタンパク質を発現させるために XY-214*xloA*-ORF/pET22b プラスミドを保持する *E.coli* BL21(DE3)をアンピシリン (50  $\mu$ g/ $\mu$ l) を含む 5 ml の LB 培地に接種し、37°Cで 16 時間種培養した。培養後、培養液の 1 ml を 800 ml (200 ml×4 本) の LB 培地に接種し、37°Cで本培養した。 $A_{600}$  が 0.4–0.5 に達したら直ちに 25°Cに温度を下げ、終濃度 1 mM になるように IPTG を添加し、さらに 25°Cで 20 時間培養を続けた。

#### V-1-4-3. 組換え $\beta$ -キシロシダーゼ(*rXloA*)の精製

##### (A) 酵素液の抽出

培養液を遠心分離 (12,000 rpm, 15 min) して集菌し、上澄液を捨て、沈殿した菌体に 30 ml の 20 mM Phosphate Buffer (pH 7.4)を加えて懸濁させた。この懸濁液を超音波破碎 (out put 3, duty 60, 1 min×3) し、遠心分離 (14,000 rpm, 10 min) して得られた上澄液を粗抽出液とした。

##### (B) HiTrap Chelating column (Amersham) を用いた組換えタンパク質の精製

遺伝子組み換え体 $\beta$ -キシロシダーゼ(*rXloA*)の精製には FPLC(Pharmacia LKB)を

用いた。FPLC で使用した試薬や溶液は、出来る限り 0.45  $\mu\text{m}$  メンブレンフィルター (ADVANTEC) で濾過し、約 1 時間脱気した。また、カラムに添加する前には遠心分離を行い、沈殿物を取り除いた。

ヒスチジンタグを付加した組換えタンパク質の精製は HiTrap Chelating column(5 ml) (Amersham) を用いて、マニュアルに基づき以下のように行った。

すなわち、培養液から調製した粗抽出液を 0.45  $\mu\text{m}$  メンブレンフィルターで濾過し、ニッケルイオンを結合させて平衡化した HiTrap Chelating column(5 ml) に供した。Starting Buffer (10 mM imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Phosphate Buffer pH 7.4) で 280 nm の吸収が十分に下がるまで洗浄した。次いで、10 mM–500 mM イミダゾールのリニアグラジェントにステップワイズグラジェントを組み合わせて溶出を行った。流速は 0.5 ml/min で行った。溶出画分は SDS-PAGE および活性測定により検出した。SDS-PAGE でシングルバンドを示した画分を集め、50 mM MES Buffer (pH 7.0) に対して透析した。精製酵素標品を酵素学的性質の検討に用いた。

#### V-1-5. 酵素学的性質の検討

##### V-1-5-1. 至適 pH の測定

Ⅲ-1-3 の方法で緩衝液に Britton-Robinson の広域緩衝液(酸混合液 : 40 mM phosphoric acid, 40 mM boric acid, 40 mM acetic acid に 0.2 N NaOH を適当量加えて pH を調整したもの) pH 3、4、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、9、10、11 および 12 を用いて PNP- $\beta$ -D-キシロピラノシドに対して 20 分間反応させた。

##### V-1-5-2. pH 安定性の測定

Britton-Robinson の広域緩衝液 pH 3、4、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、9、10、11 および 12 の各 270  $\mu\text{l}$  に酵素液 30  $\mu\text{l}$  ずつを加え、4°C で 24 時間インキュベートした。さらにこれらの各酵素液 250  $\mu\text{l}$  に 50 mM MES Buffer pH 7.0 を 250  $\mu\text{l}$  加えて酵素液を希釈した後、Ⅲ-1-3 の方法で 20 分間反応させて PNP- $\beta$ -D-キシロピラノシドに対する残存活性を測定した。

##### V-1-5-3. 至適温度の測定

Ⅲ-1-3 の方法で 0、10、20、30、35、37、40、45、50、60、70 および 80°C の各

温度で、PNP- $\beta$ -D-キシロピラノシドに対して 20 分間反応させた。

#### V-1-5-4. 温度安定性の測定

酵素液を 0、10、20、30、35、40、45、50、60、70 および 80°C の各温度に 20 分間インキュベートした後、すぐに氷冷した。III-1-3 の方法で 20 分間反応させ、PNP- $\beta$ -D-キシロピラノシドに対する残存活性を測定した。

#### V-1-5-5. PNP- $\beta$ -D-キシロピラノシドに対する最大反応速度( $V_{max}$ )およびミカエリス定数( $K_m$ )の測定

反応の基質である PNP- $\beta$ -D-キシロピラノシドの終濃度を 0.1、0.125、0.15、0.2、0.25、0.3、0.5、1.0、および 2.0 mM になるように設定して活性測定を行った。反応は至適温度および至適 pH にて行い、反応時間を 1 分とした。速度論的パラメーター ( $V_{max}$  および  $K_m$ ) は、Lineweaver-Burk プロットにより算出した。

#### V-1-5-6. 基質特異性

##### (A) PNP 合成基質に対する作用

III-1-3 の方法で基質として PNP- $\beta$ -D-キシロピラノシド以外の様々な種類の PNP 合成基質を用いて、37°C で 1 時間反応させ活性を測定した。

##### (B) 各種多糖およびオリゴ糖に対する作用

精製酵素液 20  $\mu$ l (0.928 unit/ml) を 1% の各種多糖懸濁液すなわち、 $\beta$ -1,3-キシラン、 $\beta$ -1,4-キシラン (birchwood xylan、oatspelt xylan)、カルボキシメチルセルロース、ラミナリン、または各種オリゴ糖 (0.1%  $\beta$ -1,4-キシロオリゴ糖、0.1% ラミナリオリゴ糖、V-1-2 において調製した  $\beta$ -1,3-キシロオリゴ糖) 20  $\mu$ l に加えて 30°C で 24 時間反応させ、反応後 TLC によって反応分解産物を解析した。展開プレートには TLC plastic sheet, silica gel 60 F<sub>254</sub>(Merck) を用いた。展開溶媒の組成は *n*-ブタノール : 酢酸 : 水 = 2 : 1 : 1 (V/V) で行った。ただし、基質として  $\beta$ -1,3-キシロオリゴ糖を用いた際は、*n*-ブタノール : 酢酸 : 水 = 10 : 5 : 1 (V/V) で行った。プレート上の糖の検出にはジフェニルアミン - アニリン - リン酸試薬<sup>47)</sup> を使用し、同試薬を吹き付けた後 90°C で 10 分間加熱した。

#### V-1-5-7. 重金属および化学試薬の影響

III-1-3の方法で供試化学試薬を終濃度 1 mM になるように反応液に加え、37°Cで 20 分間反応させ、各化学試薬が $\beta$ -キシロシダーゼ活性に及ぼす影響を調べた。

#### V-1-5-8. ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた分子量の測定

Superdex 200 ゲルろ過クロマトグラフィーカラムと FPLC システムを用いて分子量を測定した。すなわち、予め 0.15 M NaCl を含む 50 mM MES Buffer (pH 7.0) で平衡化した Superdex 200 カラム (1.0×30 cm, Pharmacia) に精製酵素液を添加し、活性画分の溶出域を確認した。標準タンパク質として Gel Filtration Calibration Kit (Pharmacia) を使用した。酵素液および標準タンパク質の溶出における吸光値 280 nm の溶出域ならびに酵素の活性の溶出域より分子量を決定した。分画条件は、流速 0.5 ml/min、分画容量 1.25 ml で行った。

#### V-1-6. 海藻細胞壁由来 $\beta$ -1,3-キシランからのキシロース生産

当研究室の岡崎によってクローニングされ、その酵素学的性質が解明された *Alcaligenes* sp. XY-234 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼ(TxyA) (GenBank accession no. AB039953)<sup>26)</sup>と精製 $\beta$ -キシロシダーゼ(rXloA)を $\beta$ -1,3-キシランに作用させることで、 $\beta$ -1,3-キシランからのキシロース生産を試みた。

すなわち、*Alcaligenes* sp. XY-234 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子組換え *E. coli* BL21(DE3)において大量発現した $\beta$ -1,3-キシラナーゼ(rTxyA)粗抽出液 10  $\mu$ l (5.0 unit/ml) と精製 rXloA 溶液 10  $\mu$ l (0.928 unit/ml)を 1%  $\beta$ -1,3-キシラン 20  $\mu$ lに加えて 30°Cで 15 分反応させ、反応後 TLC によって反応分解産物を解析した。展開プレートには TLC plastic sheet, silica gel 60 F<sub>254</sub>(Merck)を用いた。展開溶媒の組成は *n*-ブタノール：酢酸：水=10：5：1 (V/V) で行った。プレート上の糖の検出にはジフェニルアミン-アニリン-リン酸試薬<sup>47)</sup>を使用し、同試薬を吹き付けた後 90°Cで 10 分間加熱した。

## V-2. 実験結果

### V-2-1. *Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -キシロシダーゼ(XloA)の大腸菌発現系の構築

*xloA*/pBluescript(*Xba*I·*Spe*I)プラスミドを鋳型に、*xloA* 遺伝子の全長を増幅するための PCR を行い、アガロース電気泳動で増幅バンドを確認した(Fig. 5-1)。PCR 増幅産物を *Nde*I と *Not*I で制限酵素処理し、pET22b(+)*Nde*I - *Not*I サイトにライゲーションした。次に、得られたキメラプラスミド XY-214*xloA*-ORF/pET22b にライゲーションされた遺伝子断片の塩基配列を決定し、導入された $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子に PCR によるいかなるアミノ酸置換をおこす変異もないことを確認した。こうして構築された XY-214*xloA*-ORF/pET22b を *E. coli* BL21(DE3)に導入することで形質転換し、組換え $\beta$ -キシロシダーゼの発現を V-1-4-2 に示した方法で誘導した。その結果、組換え大腸菌から抽出された粗抽出液に $\beta$ -キシロシダーゼ活性が得られ、*Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -キシロシダーゼ(XloA)の大腸菌発現系の構築を確認した。

### V-2-2. 組換え体 $\beta$ -キシロシダーゼ(rXloA)の精製

アンピシリン(50  $\mu$ g/ $\mu$ l)を含む 800 ml (200 ml $\times$ 4本)の LB 培地において、*Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -キシロシダーゼ(XloA)組換え体大腸菌を培養し、IPTG による発現誘導後、菌体内画分を調製して 0.45  $\mu$ m のメンブレンフィルターでろ過した粗抽出液を HiTrap Chelating column(5 ml)を用いて精製した。SDS-PAGE に供し、シングルバンドを示した画分を集めて精製酵素標品とした(Fig. 5-2)。精製酵素標品は粗抽出液画分に対して 2.92 倍に精製され、回収率は 37%であった(Table 5-1)。精製 rXloA は XloA と同様に約 60 kDa と推定された。

### V-2-3. 組換え $\beta$ -キシロシダーゼの酵素学的性質

rXloA の PNP- $\beta$ -D-キシロピラノシドに対する酵素学的性質は以下ようになった。すなわち、至適 pH は 7.0 付近であり、pH 6.0-9.0 の範囲で安定であったが、pH 5.0 以下、pH 10 以上では活性が極端に低下した(Fig. 5-3)。pH 7.0 における至適温度は 30 $^{\circ}$ C であり、30 $^{\circ}$ C まで安定であった(Fig. 5-4)。また、ミカエリス定数( $K_m$  値)、最大反応速度( $V_{max}$ )はそれぞれ 0.244 mM、1.822  $\mu$ mol/min/mg であった(Fig. 5-5)。さらに本酵素は重金属イオンでは  $Ag^+$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$  および  $Zn^{2+}$ 、化学試

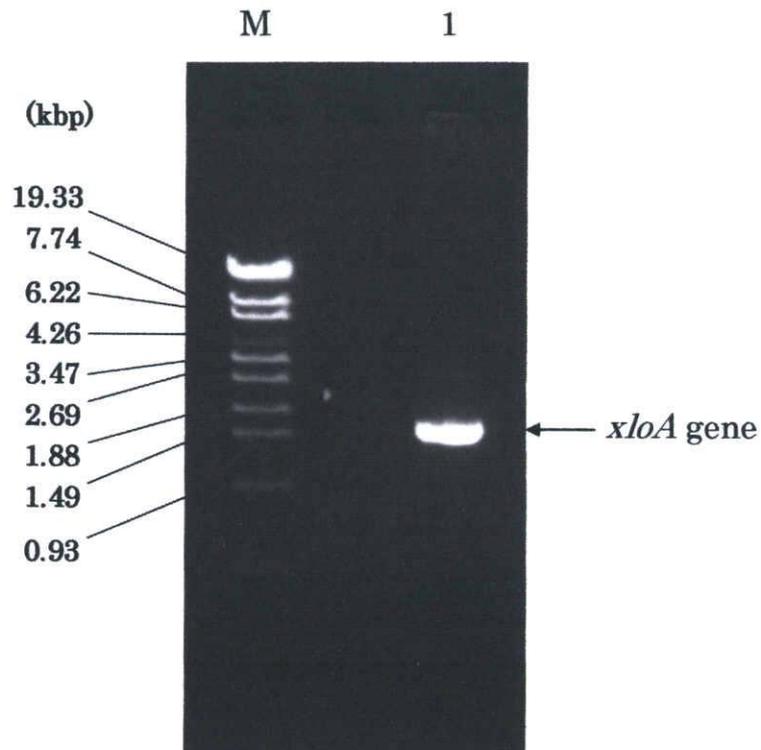
薬では PCMB(*p*-Chloromercuri benzoic acid)によって活性が著しく阻害された (Table 5-2)。rXloA は $\beta$ -1,4-キシラン(birchwood xylan、oatspelt xylan)、 $\beta$ -1,3-キシラン、カルボキシメチルセルロース、ラミナリンなどの多糖やラミナリオリゴ糖には作用せず(Fig. 5-6, 7)、 $\beta$ -1,3-キシロオリゴ糖に作用してキシロースを生じた(Fig. 5-8)。また、僅かながら $\beta$ -1,4-キシロオリゴ糖にも作用したが、完全な分解には至らず、反応 12 時間後においても反応液中にオリゴ糖の存在が確認された(Fig. 5-9)。さらに数種類の PNP 合成基質に対して rXloA を反応させた結果、PNP- $\beta$ -D-キシロピラノシド以外の PNP 合成基質に対しては作用しなかった(Table 5-3)。

HiTrap Chelating column(5 ml)により精製された rXloA は SDS-PAGE において約 60 kDa と推定されたが、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量の測定では 251 kDa と推定されたことから、本酵素は約 60 kDa の単一サブユニットからなるホモ 4 量体を構成していることが示唆された(Fig. 5-10)。

#### V-2-4. 海藻細胞壁由来 $\beta$ -1,3-キシランからのキシロース生産

*Alcaligenes* sp. XY-234 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼ(TxyA)(GenBank accession no. AB039953)<sup>26)</sup>と rXloA を $\beta$ -1,3-キシランに作用させることで、 $\beta$ -1,3-キシランからのキシロース生産を試みた。

その結果、それぞれ単独の酵素では $\beta$ -1,3-キシランからキシロースを生成することができなかったが、rTxyA と rXloA を同時に反応液に添加することにより、 $\beta$ -1,3-キシランからキシロースを生成することが可能となった(Fig. 5-11)。

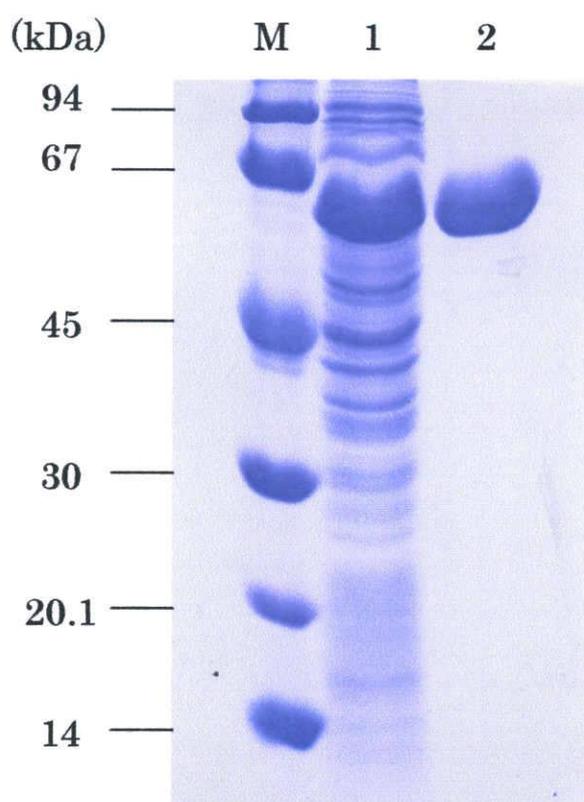


**Fig. 5-1. Agarose gel electrophoresis of PCR product with *xlo-F* and *xlo-R* primers derived from *xloA/pBluescript*(*Xba* I -*Spe* I).**

Lane M, standard markers (Marker 6); lane 1, PCR product of *xlo-F* and *xlo-R1* primers.

**Table 5-1. Purification of rXloA expressed by *E.coli* BL21(DE3) transformant**

Purification step	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Intracellular fraction	62.7	120	0.52	1	100
Hi Trap Chelating	23.2	15.3	1.52	2.92	37

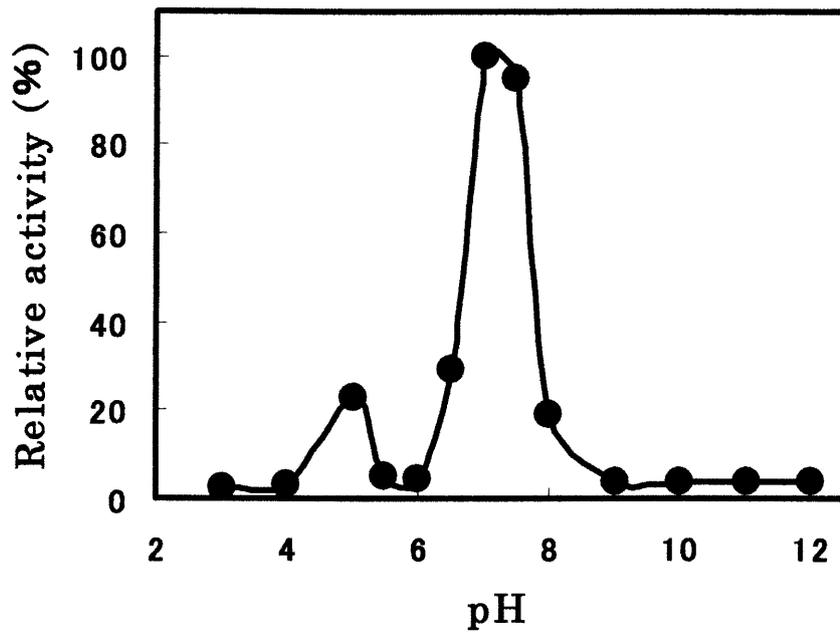


**Fig. 5-2. SDS-PAGE of the purified rXloA.**

Lane M, standard markers (Low-Molecular Weight SDS Calibration Kit; Amersham)

(phosphorylase b [94.0 kDa], albumin [67.0 kDa], ovalbumin [45.0 kDa], carbonic anhydrase [30.0 kDa], trypsin inhibitor [20.1 kDa],  $\alpha$ -lactalbumin [14.0 kDa]); lane 1, crude extract; lane 2, rXloA after a Hi Trap Chelating column.

A



B

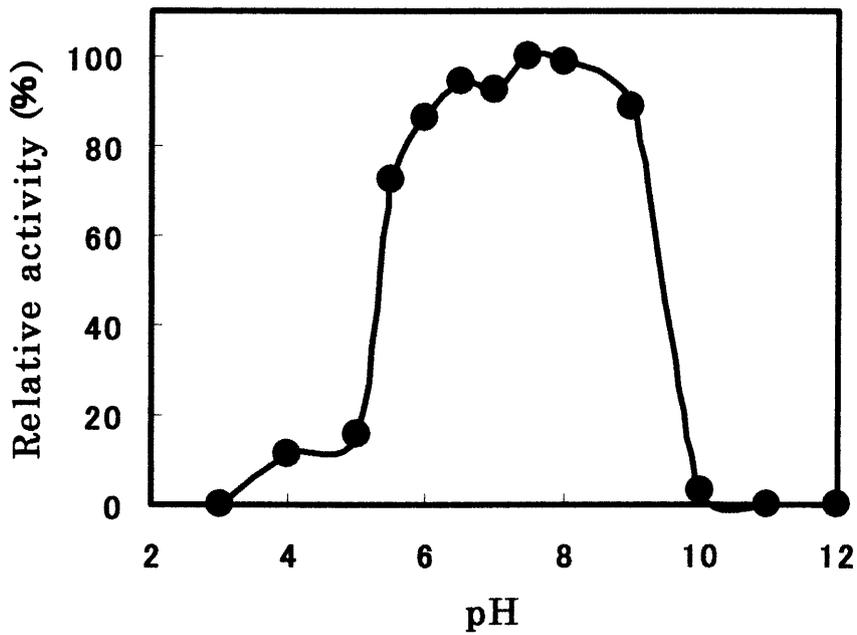
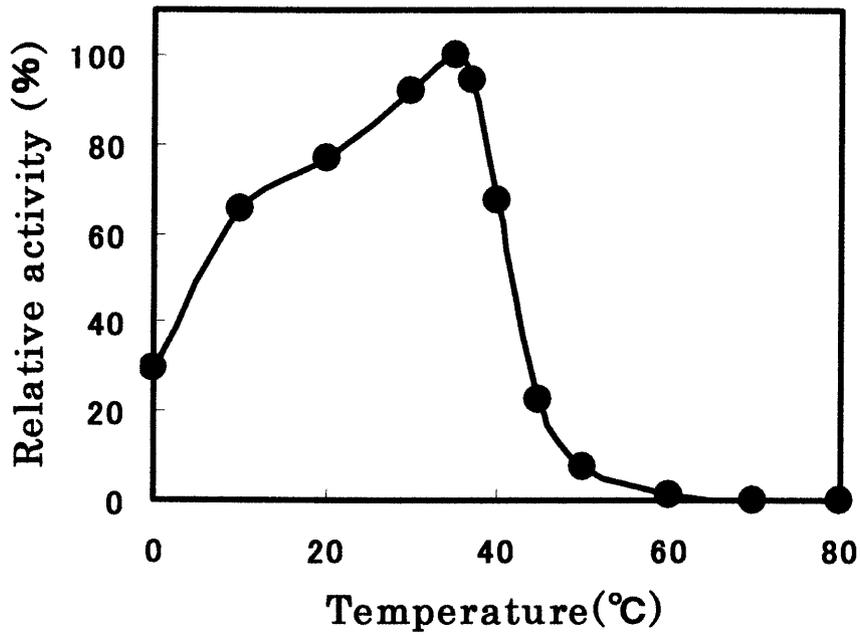


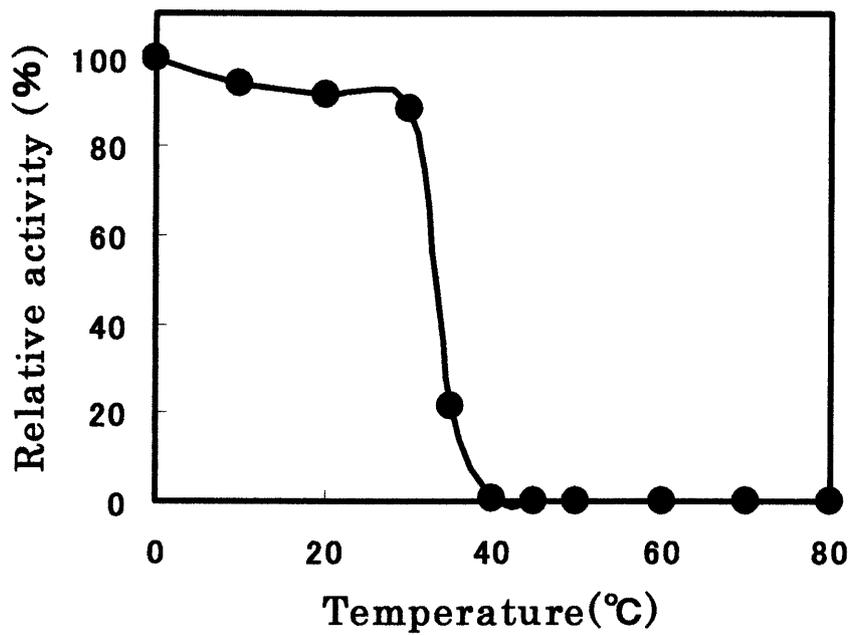
Fig. 5-3. Effects of pH on  $\beta$ -xylosidase activity and stability.

(A) Enzyme activity was assayed at 35°C for 20 min in Britton-Robinson buffers of the indicated pH. (B) pH stability was assayed at pH 7.0 after a 24-h incubation at 4°C

A

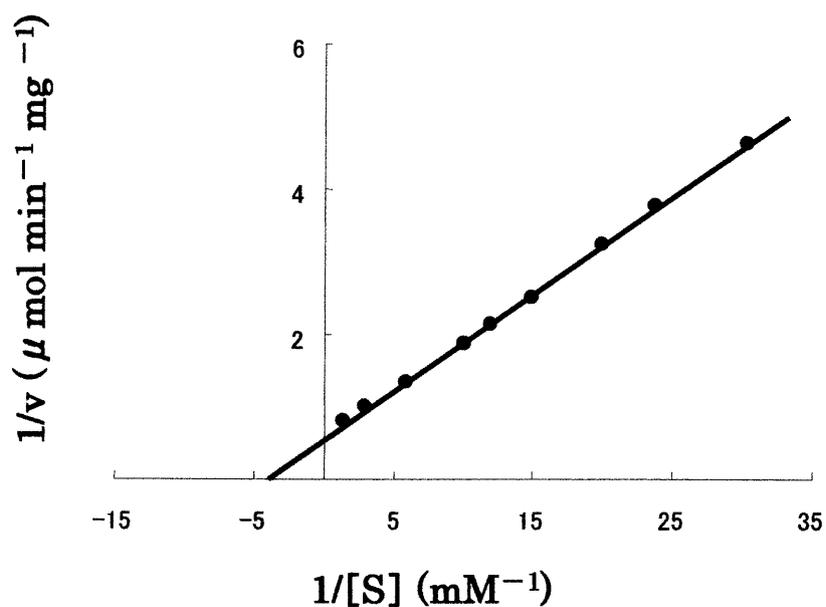


B



**Fig. 5-4. Effects of temperature on  $\beta$ -xylosidase activity and stability.**

(A) Enzyme activity was assayed in 50 mM MES Buffer pH 7.0 at the different temperatures for 20 min. (B) Temperature stability was assayed at 35°C after incubation for 20 min at the different temperatures followed by chilling on ice.



**Fig. 5-5. Lineweaver-Burk plots for rXloA with PNP- $\beta$ -xylopyranoside as a substrate.**

Each point represents the mean of three determinations. Concentration of PNP- $\beta$ -D-xylopyranoside was 0.1, 0.125, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.5, 1.0 and 2.0 mM.

Table 5-2. Effect of various metal ions and chemical reagents of  $\beta$ -xylosidase activity

Reagents (1mM)	Residual activity (%)
None	100
AgNO <sub>3</sub>	0
AlCl <sub>3</sub>	98
BaCl <sub>2</sub>	95
Ca(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	80
CaCl <sub>2</sub>	68
CuCl <sub>2</sub>	0
CuSO <sub>4</sub>	2
FeCl <sub>3</sub>	68
HgCl <sub>2</sub>	3
KCl	102
MgCl <sub>2</sub>	85
MnCl <sub>2</sub>	18
NaCl	93
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	0
ZnCl <sub>2</sub>	0
ZnSO <sub>4</sub>	0
NBS *1	81
DTT *2	98
EDTA *3	104
NEM *4	88
Iodoacetoamide	71
PCMB *5	1

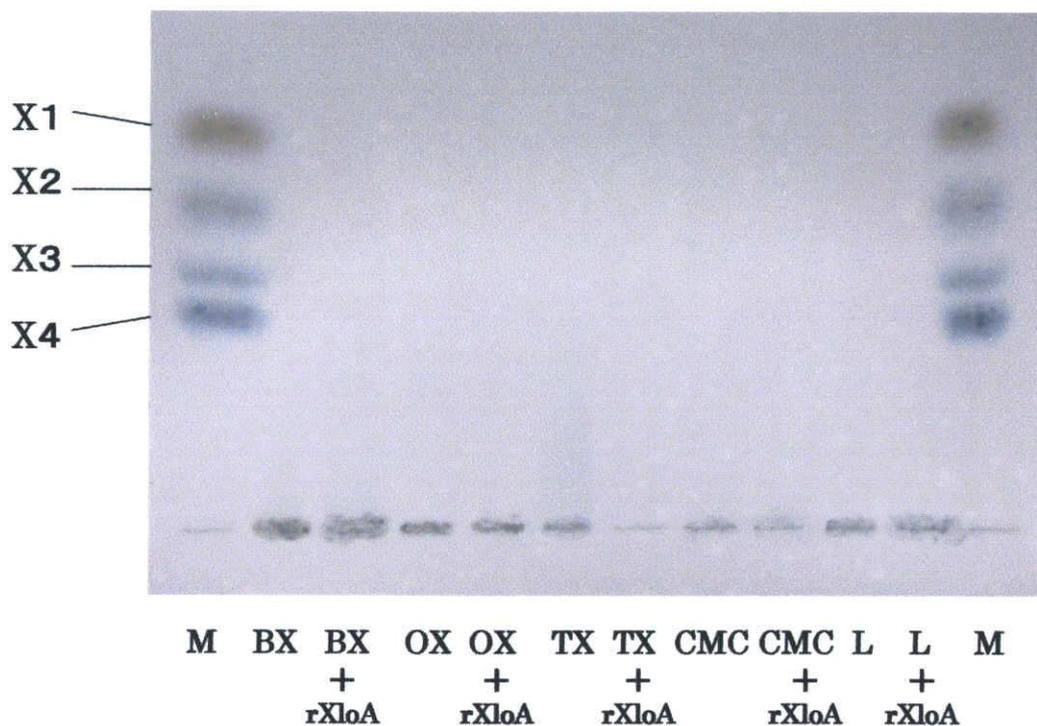
\* 1 NBS : *N*-Bromosuccinimide

\* 2 DTT : ( $\pm$ )-Dithiothreitol

\* 3 EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

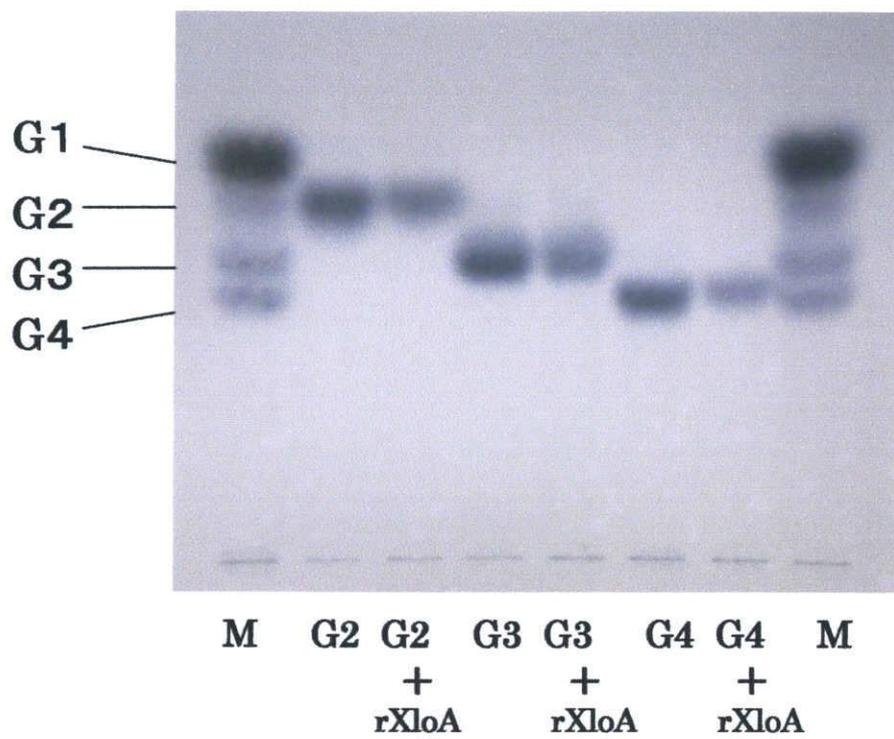
\* 4 NEM : *N*-Ethylmaleimide

\* 5 PCMB : *p*-Chloromercuribenzoic acid



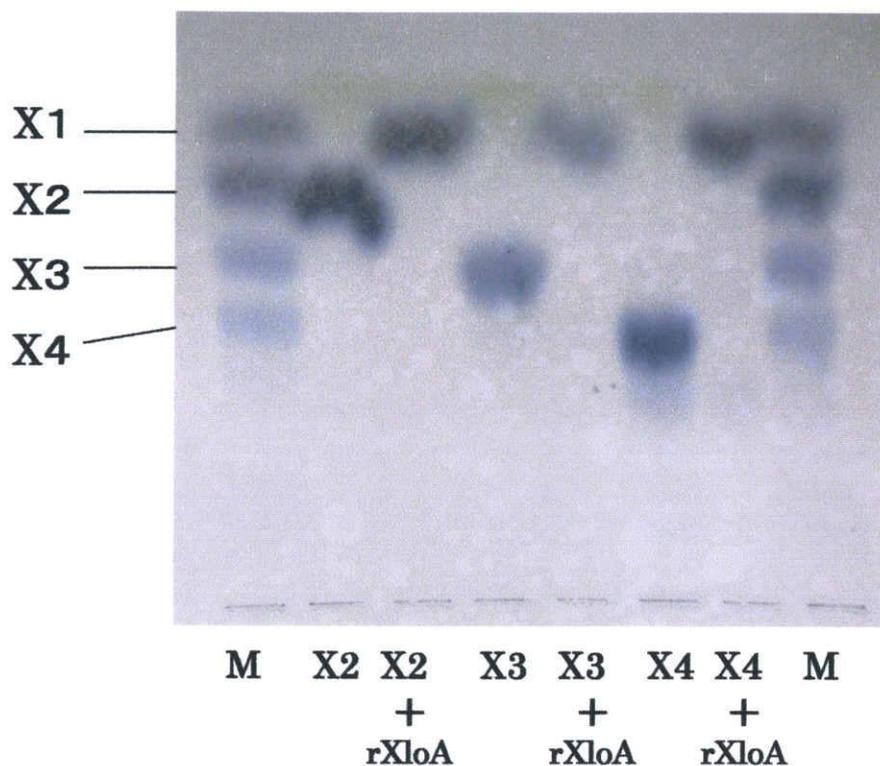
**Fig. 5-6. Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of several polysaccharides with purified rXloA.**

The reaction mixture contained 20  $\mu$ l of rXloA(0.928 U/ml) and 20  $\mu$ l of each polysaccharide in 50 mM MES buffer pH (7.0). The reaction was carried out at 30°C for 12 h. Lane M,  $\beta$ -1,4-xylooligosaccharides(X1~X4); lane BX, birchwood xylan; lane OX, oat spelt xylan; lane TX,  $\beta$ -1,3-xylan; lane CMC, carboxymethylcellulose; lane L, laminaran.



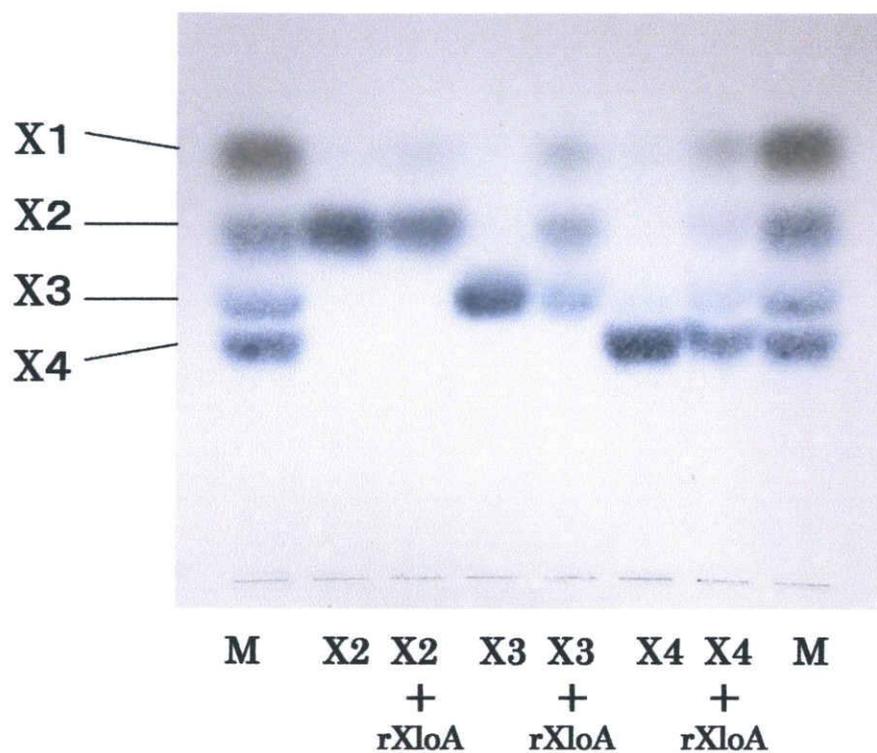
**Fig. 5-7. Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of laminarioligosaccharides with purified rXloA.**

The reaction mixture contained 20  $\mu$  l of rXloA(0.928 U/ml) and 20  $\mu$  l of each laminarioligosaccharide in 50 mM MES buffer pH (7.0). The reaction was carried out at 30°C for 12 h. Lane M, laminarioligosaccharides(G1~G4); lane G2, laminaribiose; lane G3, laminaritriose; lane G4, laminaritetraose.



**Fig. 5-8. Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of  $\beta$ -1,3-xylooligosaccharides with purified rXloA.**

The reaction mixture contained 20  $\mu$  l of rXloA(0.928 U/ml) and 20  $\mu$  l of each  $\beta$ -1,3-xylooligosaccharide in 50 mM MES buffer (pH 7.0). The reaction was carried out at 30°C for 12 h. Lane M,  $\beta$ -1,3-xylooligosaccharides(X1~X4); lane X2,  $\beta$ -1,3-xylobiose; lane X3,  $\beta$ -1,3-xylotriose; lane X4,  $\beta$ -1,3-xylotetraose.

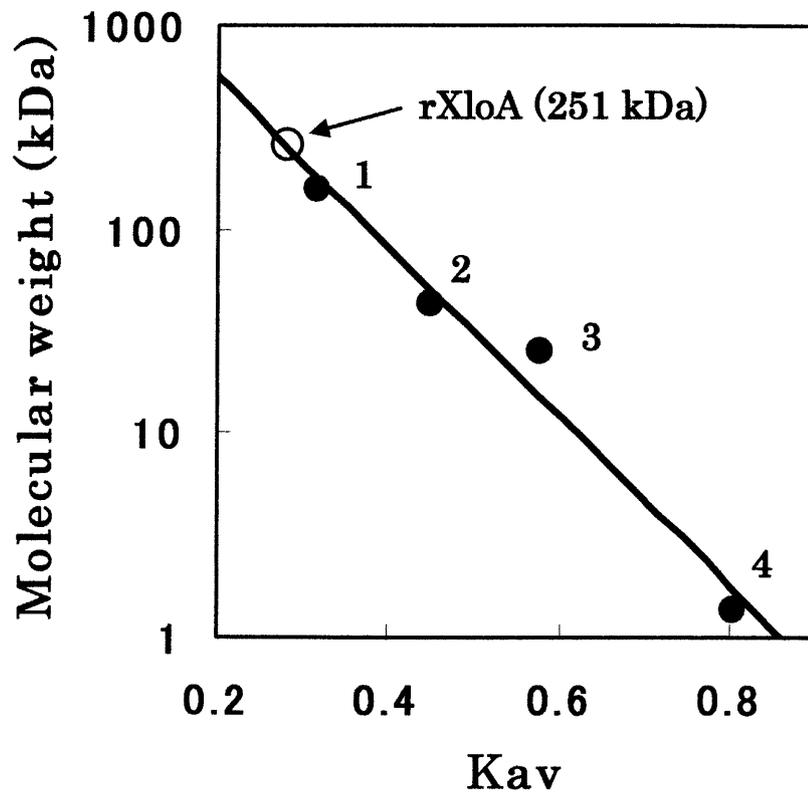


**Fig. 5-9. Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of  $\beta$ -1,4-xylooligosaccharides with purified rXloA.**

The reaction mixture contained 20  $\mu$  l of rXloA(0.928 U/ml) and 20  $\mu$  l of each  $\beta$ -1,4-xylooligosaccharide in 50 mM MES buffer pH (7.0). The reaction was carried out at 30°C for 12 h. Lane M,  $\beta$ -1,4-xylooligosaccharides(X1~X4); lane X2,  $\beta$ -1,4-xylobiose; lane X3,  $\beta$ -1,4-xylotriose; lane X4,  $\beta$ -1,4-xylotetraose.

**Table 5-3. Hydrolysis of different nitrophenyl-glycosides by the rXloA**

<b>Substrates</b>	<b>Relative activities (%)</b>
PNP- $\beta$ -D-xylopyranoside	100
PNP- $\alpha$ -D-xylopyranoside	0
PNP- $\beta$ -D-mannopyranoside	0
PNP- $\alpha$ -D-mannopyranoside	0
PNP- $\alpha$ -D-galactopyranoside	0
PNP- $\alpha$ -D-glucopyranoside	0
PNP- $\beta$ -D-glucopyranoside	0
PNP- $\beta$ -D-cellobioside	0
PNP- $\alpha$ -L-fucopyranoside	0
PNP- $\alpha$ -L-arabinofuranoside	0
PNP- $\alpha$ -L-arabinopyranoside	0
PNP- $\beta$ -D-glucuronide	0



**Fig. 5-10.** Estimation of the molecular weight of rXloA by gel filtration chromatography.

Markers: 1, Aldolase (158 kDa); 2, Ovalbumin (43 kDa); 3, Chymotrypsinogen A (25 kDa); 4, Vitamine B<sub>12</sub> (1.355 kDa).



### V-3. 考察

形質転換大腸菌において大量発現させた組換え体 $\beta$ -キシロシダーゼ(rXloA)を精製し、活性測定の基質として PNP- $\beta$ -D-キシロピラノシドを用いて酵素学的性質を検討した。その結果、XloA の至適 pH は 7.0 付近であり、pH 6.0-9.0 の範囲で安定であったが、pH 5.0 以下、pH 10 以上では活性が極端に低下した(Fig. 5-3)。pH 7.0 における至適温度は 35°C であり、30°C まで安定であった(Fig. 5-4)。また、ミカエリス定数( $K_m$  値)、最大反応速度( $V_{max}$ )はそれぞれ 0.244 mM、1.822  $\mu$  mol/min/mg であった(Fig. 5-5)。さらに本酵素は重金属イオンでは  $Ag^+$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$  および  $Zn^{2+}$ 、化学試薬では PCMB(*p*-Chloromercuri benzoic acid)によって活性が著しく阻害された(Table 5-2)。どの金属イオンによっても反応が顕著に促進されることはなかったことから、本酵素は活性に金属性の補酵素を必要としないことが示唆された。

rXloA は $\beta$ -1,3-キシラン、 $\beta$ -1,4-キシラン(birchwood xylan、oatspelt xylan)、カルボキシメチルセルロース、ラミナリンなどの多糖やラミナリオリゴ糖には作用せず(Fig. 5-6, 7)、 $\beta$ -1,3-キシロオリゴ糖に作用してキシロースを生じた(Fig. 5-8)。また、僅かながら $\beta$ -1,4-キシロオリゴ糖にも作用したが、完全な分解には至らず、反応 12 時間後においても反応液中にオリゴ糖の存在が確認された(Fig. 5-9)。しかしながら、現在までに報告された $\beta$ -キシロシダーゼ(EC 3.2.1.37)は全て $\beta$ -1,4-キシロオリゴ糖に作用してキシロースを生成する $\beta$ -1,4-キシロシダーゼであることに対し、*Vibrio* sp. XY-214 株由来 XloA は、 $\beta$ -1,3-キシロオリゴ糖を加水分解してキシロースを生成することから、本酵素が新規の糖質加水分解酵素 $\beta$ -1,3-キシロシダーゼであることが明らかになった。

GH43 に属する $\beta$ -キシロシダーゼは、 $\beta$ -キシロシダーゼ活性に加えて $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ活性や $\beta$ -D-グルコシダーゼ活性を有することが知られていることから、数種類の PNP 合成基質に対して活性測定を試みた。しかしながら、本酵素は PNP- $\beta$ -D-キシロピラノシド以外の PNP 合成基質に対しては作用しないことが判明した。また、 $\beta$ -1,3-キシロオリゴ糖に対して反応する際に糖転移反応は確認されなかった。このことは、GH3、39、52 および 54 に属する $\beta$ -キシロシダーゼがアノマー保持型酵素であるのに対し、GH43 に属する $\beta$ -キシロシダーゼがアノマー反転型酵素であり、糖転移活性をもたないという事実と一致していた<sup>48)</sup>。

精製された rXloA は SDS-PAGE において約 60 kDa と推定されたが、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量の測定では約 251 kDa と推定されたことから、本酵素は約 60 kDa の単一サブユニットからなるホモ 4 量体を構成していることが示唆された(Fig. 5-10)。このように 4 量体を構成している $\beta$ -キシロシダーゼは、*Bacillus subtilis* 由来の $\beta$ -1,4-キシロシダーゼ(PDB 1Y1F)や *Clostridium acetobutylicum* 由来の $\beta$ -1,4-キシロシダーゼ(PDB 1Y7B)においても確認されており、上述した 2 種類の $\beta$ -1,4-キシロシダーゼと *Vibrio* sp. XY-214 株由来 XloA との相同性はそれぞれ 46%、44%であった。

最後に、本章では *Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -1,3-キシロシダーゼ(XloA)の応用として、 $\beta$ -1,3-キシランからのキシロース生産を試みた。すなわち、当研究室の岡崎によってクローニングされ、その酵素学的性質が解明された *Alcaligenes* sp. XY-234 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼ(TxyA)と rXloA を $\beta$ -1,3-キシランに作用させ、その分解産物を薄層クロマトグラフィーにより分析した。その結果、それぞれ単独の酵素では $\beta$ -1,3-キシランからキシロースを生成することができなかったが、rTxyA と rXloA を同時に反応液に添加することにより、 $\beta$ -1,3-キシランからキシロースを生成することが可能となった(Fig. 5-11)。以上の結果から、本研究により単離された *Vibrio* sp. XY-214 株由来 XloA を用いることで、緑藻イワヅタや原始紅藻アマノリなど $\beta$ -1,3-キシランを細胞壁構成成分とする海藻からキシロースを生産できるようになると考えられる。

## 第VI章 総括

イネ科植物や広葉樹などの陸上植物細胞壁に含まれている $\beta$ -1,4-キシランは、D-キシロースが $\beta$ -1,4結合で重合した主鎖にアセチル基やL-アラビノフラノース、グルクロン酸などが側鎖として結合したヘテロ多糖であり、自然界に広く存在している。近年、本多糖の加水分解に関わるエンド-1,4- $\beta$ -キシラナーゼ(EC 3.2.1.8)と $\beta$ -キシロシダーゼ(EC 3.2.1.37)は、キシロオリゴ糖やキシリトールなどの健康食品の生産に利用されており、さらに建築廃材などの木質系バイオマスからバイオエタノールを生産するための重要な酵素としても認識されている。従ってこれら酵素に関する酵素学的、生物工学的研究に関しては多くの研究報告がなされている。

一方で、海藻、特に原始紅藻アマノリ属や緑藻イワツタ属などの細胞壁には D-キシロースが $\beta$ -1,3結合で重合した $\beta$ -1,3-キシランという海藻特有の多糖が存在している。これら $\beta$ -1,3-キシランを細胞壁構成成分とする海藻にも陸上植物の建築廃材などのように廃棄処分されるべき未利用のバイオマスがある。例えば養殖環境の悪化などによってその商品価値を失った色落ちノリや地中海における変種イチイツタのように異常繁殖し、漁業や生態系に重大な被害を及ぼす海藻などである。これら未利用海藻資源を陸上植物バイオマスと同様に有効利用するためには、 $\beta$ -1,3-キシランのような海藻特有の多糖を分解する酵素が必要となる。本多糖の完全な分解には $\beta$ -1,3-キシラナーゼと $\beta$ -1,3-キシロシダーゼの2種類の酵素が必要であるが、これら酵素に関する研究報告は極めて少ない。すなわち、 $\beta$ -1,3-キシラナーゼはアマノリなどの海藻からプロトプラストを単離する際に必須な糖質加水分解酵素であるにもかかわらず、その遺伝子に関する報告は *Vibrio* sp. XY-214 株由来 TxyA(GenBank accession no. AB029043)<sup>25)</sup>、*Alcaligenes* sp. XY-234 株由来 TxyA(GenBank accession no. AB039953)<sup>26)</sup>、*Vibrio* sp. AX-4 株由来 XYL4(GenBank accession no. BAD51934)<sup>27)</sup>、*Pseudomonas* sp. ND137 株由来 AxnB(GenBank accession no. AB063257)、*Thermotoga neapolitana* 由来 XylC(GenBank accession no. U58632)の5種類に過ぎない。さらに、 $\beta$ -1,3-キシロシダーゼに至っては現在までのところ報告はみあたらない。 $\beta$ -1,3-キシロシダーゼを単離し、大量生産が可能となれば、 $\beta$ -1,3-キシランからのキシロース生産が可能となり、さらにこれを原料としてキシリトールやバイオエタノールなどの有用物質を生産できるようになると考えられる。

そこで本論文では、 $\beta$ -1,3-キシラン分解酵素に関する新たな基礎的知見を得るため、 $\beta$ -1,3-キシラナーゼと $\beta$ -1,3-キシロシダーゼに関する研究を行った。すなわち、当研究室保存株である6株の $\beta$ -1,3-キシラナーゼ産生細菌のうち、未だその遺伝子クローニングがなされていない *Vibrio* sp. XY-213、XY-216 および XY-235 株を供試菌とし、これら細菌由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子のクローニングを行った。まず初めに、当研究室が保持している *Alcaligenes* sp. XY-234 株以外の5株の $\beta$ -1,3-キシラナーゼ産生海洋細菌について分類上の類縁関係を知るため、各細菌株の16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定して比較した。その結果、*Vibrio* sp. XY-214 株の16S rRNA 遺伝子を基準にして比較すると、*Vibrio* sp. XY-213、XY-216、XY-235 の3株は100%、AX-4 株は95.7%の相同性を示した。これら16S rRNA 遺伝子についてBLAST<sup>37)</sup>により相同性検索した結果、どちらも *Vibrio* 属の細菌と98%以上の相同性が得られた。一般的に16S rRNA 遺伝子の塩基配列は、95%以上の相同性があれば同じ属である可能性が高く、99%以上の相同性では同種の菌である可能性が高いとされているが、仮に100%の相同性があったとしても属レベルで異なることもある。すなわち、*Vibrio* sp. XY-213、XY-216 および XY-235 株の3株の16S rRNA 遺伝子の塩基配列は *Vibrio* sp. XY-214 株のものと同であったが、いずれも細菌学的諸性質は僅かに異なっていた。

*Vibrio* sp. XY-213、XY-216 および XY-235 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子のクローニングに関しては、当研究室の橋川によって既にクローニングされ、塩基配列が決定された *Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子(*txyA*)<sup>25)</sup>のORFプライマーを用いて行った。その結果、これら3株由来の $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子はXY-214 株由来 *txyA* 遺伝子の塩基配列と完全に一致し、同一のものであることが判明した。このことから当研究室が保持する $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子はXY-214 グループ(XY-213, XY-214, XY-216 および XY-235 株)とXY-234 および AX-4 の3つのグループに分かれることが明らかになった(Fig. 2-1)。これまでに塩基配列が報告されている5種類の $\beta$ -1,3-キシラナーゼのうち、*Alcaligenes* sp. XY-234 株由来 TxyA、*Vibrio* sp. AX-4 株由来 XYL4 および *Pseudomonas* sp. ND137 株由来 AxnB に関しては触媒モジュール以外に、糖質結合モジュール(CBM)を有することが知られている。これらCBMは $\beta$ -1,3-キシランと特異的に結合することから、CBMファミリー31(CBM31)に分類されている。*Vibrio* sp. AX-4 株由来 XYL4 に関してはC末端領域にCBM31を2つ、*Pseudomonas* sp. ND137 株由来 AxnB に関してはCBM31とCBM6の2

種類の CBM が並んで存在していることが明らかになっている(Fig. 2-3)。しかしながら、*Vibrio* sp. XY-214 株由来の $\beta$ -1,3-キシラナーゼに関しては塩基配列が決定されたものの、未だそのモジュール構造の解析が行われていなかった。そこで、これらモジュール構造を有する $\beta$ -1,3-キシラナーゼと *Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼの C 末端領域のアミノ酸配列を比較し、相同性を調べた(Fig. 2-2)。その結果、*Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼの C 末端領域(Glu368-Asn460)は *Alcaligenes* sp. XY-234 株由来 TxyA の CBM31 と 77%の相同性、*Vibrio* sp. AX-4 株由来 XYL4 の CBM31-1 と 56%、CBM31-2 と 52%の相同性、*Pseudomonas* sp. ND137 株由来 AxnB の CBM31 と 43%の相同性があり、さらに触媒モジュールと CBM をつなぐリンカー配列(DNGG の繰り返し配列)と思われる配列も存在することが明らかになった。これらのことから *Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼにおいても、 $\beta$ -1,3-キシランと特異的に結合する CBM31 を有することが示唆された。CBM は不溶性の多糖である植物細胞壁(基質)に酵素を近づけるためのものであり、その存在によって触媒反応の効率を上げることができる。従って、今後は *Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼの推定 CBM 領域に関する詳細な機能解析が期待される。

当研究室保存株である 6 つの $\beta$ -1,3-キシラナーゼ産生細菌のうち、*Vibrio* sp. XY-214 株は $\beta$ -1,3-キシランを唯一の炭素源とした最小培地において生育可能なことから $\beta$ -1,3-キシラン資化細菌であり、これまで報告のない $\beta$ -1,3-キシロシダーゼを保有している可能性が高いと推測できた。また、本細菌が産生する $\beta$ -1,3-キシラナーゼは既にその遺伝子がクローニングされ、塩基配列が決定されている(GenBank accession no. AB029043)<sup>25)</sup>。そこで、本細菌が産生する $\beta$ -キシロシダーゼ(XloA)の性質を解明することを目的に、*xloA* 遺伝子のクローニングとその塩基配列の決定、ならびに大腸菌で発現させた組換え体酵素を用いてその酵素学的性質の検討を行った。

まず初めに、*xloA* 遺伝子クローニング用のプローブを作製するために *Vibrio* sp. XY-214 株由来 XloA の精製を行った。すなわち、キシロースを誘導物質として XY-214 株を培養後、菌体内画分を調製して粗酵素液とし、これを DEAE Toyopearl 650M カラム、Ether Toyopearl 650S カラム、MonoQ カラムを用いて SDS-PAGE において単一のバンドで検出されるまで精製した。精製酵素標品は、粗抽出液に対して 41 倍に精製され、回収率は 2.1%であった(Table 3-6)。また、SDS-PAGE による解析では約 60 kDa の単一のバンドで検出された(Fig. 3-3)。次に、遺伝子クローニングのため

の縮重プライマーを作製するため、本酵素のN末端アミノ酸配列 20 残基とリシルエンドペプチダーゼ処理により生じた内部ペプチド断片のN末端アミノ酸配列 20 残基を決定した。決定したアミノ酸配列を BLAST<sup>37)</sup>により相同性検索したところ、XloA の N 末端アミノ酸配列は *Caulobacter* sp. K31 株由来の  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ (GenBank accession no. AATH01000006) や *Selenomonas ruminantium* GA192 由来のキシロシダーゼ/アラビノシダーゼ (GenBank accession no. AF040720)、*Sinorhizobium meliloti* 由来の  $\beta$ -キシロシダーゼ (GenBank accession no. AL591788) などの N 末端領域と高い相同性を示した。また、内部アミノ酸配列は *Chromohalobacter salexigens* DSM 株由来  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ (GenBank accession no. CP000285) の Trp345-Gly359 領域と相同性を示した。これら相同性が得られた酵素はすべて 530 アミノ酸残基程度から構成されており、その遺伝子の長さは約 1,600 塩基程度、単一サブユニットの分子量は約 60 kDa であった。これらの結果から、*Vibrio* sp. XY-214 から精製された XloA が、既報の  $\beta$ -キシロシダーゼや  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼと相同性があることが判明した。また、本細菌由来の  $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子 (*xloA*) が約 1,600 塩基程度であること、さらに決定された内部アミノ酸配列が XloA の N 末端から約 350 残基目付近に位置していることが推測できた。XloA の N 末端アミノ酸残基は Met(メチオニン)ではなく、Thr(トレオニン)であった。これは原核生物においてしばしば観察されることであり、AUG 開始コドンと AUG 非開始コドンを区別するためにホルミル化された N-ホルミルメチオニンが、修飾や切断などのプロセッシングを受け、成熟タンパク質から除去されたためであると推測された<sup>36)</sup>。次に、決定したアミノ酸配列の中から縮重の少ない配列 (Thr-Thr-Thr-Ile-Gln-Asn-Pro)、(Lys-Gly-Arg-His-Tyr-Leu-Tyr) を選び、Forward プライマー(dxlo-F)および Reverse プライマー(dxlo-R)を設計した(Fig. 3-6)。得られた縮重プライマーを用いて *Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、増幅した PCR 産物の塩基配列をもとにプローブ作製した。

次に、作成したプローブを用いて、サザンブロット法により *xloA* 遺伝子をクローニングしてその塩基配列を決定した。 $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子(*xloA*)は、535 アミノ酸残基をコードする 1,608 bp の ORF により構成されており、その推定分子量は 60,835 Da、推定等電点は 5.16 であった。SignalP server<sup>39)</sup>による解析の結果、タンパク質の局在に關与するシグナルペプチドを保有しないことが確認され、本酵素が細

胞外に分泌されない菌体内酵素であることが裏付けられた。*xloA* 遺伝子から推定されるアミノ酸配列を他のタンパク質の配列と比較するために BLAST<sup>37)</sup>による相同性検索を行った結果、本遺伝子がコードするβ-キシロシダーゼは、*Bacillus* sp. KK-1 株由来のβ-キシロシダーゼ(GenBank accession no. AF045479)、*Bacillus halodurans* C-125 株由来のβ-キシロシダーゼ(GenBank accession no. AP001519)と最も高い相同性 47%を示した。次いで、*Bacillus clausii* KSM-K16 株由来のβ-キシロシダーゼ(GenBank accession no. AP006627)と 46%、*Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 株由来のα-L-アラビノフラノシダーゼ(GenBank accession no. CP000285)と 46%、*Selenomonas ruminantium* GA192 株由来のキシロシダーゼ/アラビノシダーゼ(GenBank accession no. AF040720)と 45%、*Geobacillus stearothermophilus* T-6 株由来のβ-キシロシダーゼ(GenBank accession no. AY690618)と 45%の相同性を示した。これら相同性が得られたタンパク質はすべて糖質加水分解酵素ファミリー 43(GH43)に分類されていたことから *Vibrio* sp. XY-214 株由来 XloA は GH43 に分類されることが示唆された(Table 4-6)。

糖質加水分解酵素はその触媒領域のアミノ酸配列によって 108 のファミリーに分類されており(2007年3月現在)(<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>)<sup>40, 41)</sup>、このうち GH3、39、43、52 および 54 の 5 つのファミリーにおいてβ-キシロシダーゼ活性が確認されている。さらに本研究において、遺伝子クローニングされた XloA のような GH43 に属するβ-キシロシダーゼは GH62 に属するα-L-アラビノフラノシダーゼと共に 5-fold β-propeller 構造を形成しており、clan GH-F に属している。このことから本酵素は 5-fold β-propeller 構造を形成していることが示唆された。GH43 に属するβ-キシロシダーゼのうち、既に立体構造が明らかにされている *Geobacillus stearothermophilus* T-6 株由来のβ-キシロシダーゼ(XynB3)とのアミノ酸配列の比較により、本酵素の Asp16 と Glu189 が一般酸塩基触媒として機能するアミノ酸残基であることが示唆された<sup>42)</sup>。また、*G. stearothermophilus* T-6 株由来のβ-キシロシダーゼ(XynB3)は 4 量体を形成しており、各サブユニットは、N-terminal five-bladed β-propeller 触媒ドメイン(1 - 318 アミノ酸残基)と C-terminal β-sandwich ドメイン(330 - 535 アミノ酸残基)の 2 つのドメインから構成されていることが報告されている(Fig. 6-1)。β-sandwich ドメインはその 3 次構造が糖質結合モジュール(CBM)と類似していることから、かつては CBM の機能を有していたことが予測されたが、現在

ではその機能を失い、各サブユニットどうしが4次構造を形成するために必要なドメインであると推測されている<sup>42)</sup>。GH43に属する $\beta$ -キシロシダーゼや $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼとの一次構造比較の結果、N末端領域のアミノ酸配列が高度に保存されているのに対し、C末端領域( $\beta$ -sandwichドメイン)に関してはその保存性が低いことが判明した(Fig. 4-4)。さらに *Cellvibrio japonicus* 由来の $\alpha$ -L-アラビナナーゼ(Arb43A) (GenBank accession no. Y10458)が347アミノ酸残基からなる five-blade  $\beta$ -propeller ドメインのみから構成されており、C-terminal  $\beta$ -sandwich ドメインを持たないことから<sup>49)</sup>、触媒機構におけるC末端領域の役割が必ずしも重要ではないことが示唆された。以上のことから XloA においても、各サブユニットが N-terminal five-bladed  $\beta$ -propeller 触媒ドメインや C-terminal  $\beta$ -sandwich ドメインの2つのドメインから構成されており、 $\beta$ -sandwich ドメインが4次構造の形成に関与していることが推測される。

次に、大腸菌発現系によって取得した *xloA* 遺伝子由来の組換え体 $\beta$ -キシロシダーゼ(rXloA)を HiTrap Chelating column を用いて精製し、その酵素学的性質を検討した。精製酵素標品は SDS-PAGE において約 60 kDa 付近に単一のバンドとして検出された。rXloA の至適 pH は 7.0 付近であり、pH 6.0-9.0 の範囲で安定であったが、pH 5.0 以下、pH 10 以上では活性が極端に低下した(Fig. 5-3)。至適温度は 35°C であり、30°C まで安定であった(Fig. 5-4)。また、ミカエリス定数( $K_m$  値)、最大反応速度( $V_{max}$ )はそれぞれ 0.244 mM、1.822  $\mu$  mol/min/mg であった(Fig. 5-5)。さらに本酵素は重金属イオンでは  $Ag^+$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$  および  $Zn^{2+}$ 、化学試薬では PCMB(*p*-Chloromercuri benzoic acid)によって活性が著しく阻害された(Table 5-2)。どの金属イオンによっても反応が顕著に促進されることはなかったことから、本酵素が活性に金属性の補酵素を必要としないことが示唆された。

rXloA は $\beta$ -1,3-キシラン、 $\beta$ -1,4-キシラン(birchwood xylan、oatspelt xylan)、カルボキシメチルセルロース、ラミナリンなどの多糖やラミナリオリゴ糖には作用せず(Fig. 5-6, 7)、 $\beta$ -1,3-キシロオリゴ糖に作用してキシロースを生じた(Fig. 5-8)。また、僅かながら $\beta$ -1,4-キシロオリゴ糖にも作用したが、完全な分解には至らず、反応 12 時間後においても反応液中にオリゴ糖の存在が確認された(Fig. 5-9)。しかしながら、現在までに報告された $\beta$ -キシロシダーゼ(EC 3.2.1.37)は全て $\beta$ -1,4-キシロオリゴ糖に作用してキシロースを生成する $\beta$ -1,4-キシロシダーゼであることに対し、*Vibrio* sp.

XY-214 株由来 XloA は、 $\beta$ -1,3-キシロオリゴ糖を加水分解してキシロースを生成することから、本酵素が新規の糖質加水分解酵素 $\beta$ -1,3-キシロシダーゼであることが示された。ここで注目すべき点は、これまで報告された $\beta$ -1,3-キシラナーゼは $\beta$ -マンナナーゼやマンノシダーゼと相同性を示し、 $\beta$ -1,4-キシラナーゼとは相同性がないということである。また、 $\beta$ -1,4-キシランには作用しない。にもかかわらず XloA は既報の $\beta$ -1,4-キシロシダーゼと相同性を示し、かつ僅かながら $\beta$ -1,4-キシロオリゴ糖に作用した。このことから、本研究により XloA が $\beta$ -1,3-キシロオリゴ糖を好んで触媒することが解明されたのは事実であるが、既報の $\beta$ -1,4-キシロシダーゼが $\beta$ -1,3-キシロオリゴ糖に作用するか否かの確認実験に大きな興味もたれる。

GH43 に属する既報の $\beta$ -キシロシダーゼは、 $\beta$ -キシロシダーゼ活性に加えて $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ活性や $\beta$ -D-グルコシダーゼ活性を有することが知られていることから、数種類の PNP 合成基質に対して活性測定を試みた。しかしながら、本酵素は PNP- $\beta$ -D-キシロピラノシド以外の PNP 合成基質に対しては作用しないことが判明した。また、 $\beta$ -1,3-キシロオリゴ糖に対して反応する際に糖転移反応は確認されなかった。このことは GH3、39、52 および 54 に属する $\beta$ -キシロシダーゼがアノマー保持型酵素であるのに対し、GH43 に属する $\beta$ -キシロシダーゼがアノマー反転型酵素であり、糖転移活性をもたないという事実と一致していた<sup>48)</sup>。

rXloA は SDS-PAGE において約 60 kDa と推定されたが、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量の測定では 251 kDa と推定されたことから、本酵素は約 60 kDa の単一サブユニットからなるホモ 4 量体を構成していることが示唆された(Fig. 5-10)。このように 4 量体を構成している $\beta$ -キシロシダーゼは、*Bacillus subtilis* 由来の $\beta$ -1,4-キシロシダーゼ(PDB 1Y1F)や *Clostridium acetobutylicum* 由来の $\beta$ -1,4-キシロシダーゼ(PDB 1Y7B)においても確認されており、上述した 2 種類の $\beta$ -1,4-キシロシダーゼと XloA との相同性はそれぞれ 46%および 44%であった。しかしながら、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量の測定は必ずしも正確ではない。本酵素が実際にいくつのサブユニットから構成されているかを解明するためには結晶構造解析を行う必要がある。

また、SWISS-MODEL<sup>50, 51, 52)</sup>を用いた XloA の 3 次構造予測を行った結果、XloA の 535 アミノ酸残基のうち、4 番目のトレオニン(Thr, T)から 534 番目のグルタミン酸(Glu, E)までの立体構造が推定された(Fig. 6-2)。XloA の 2 次構造には $\alpha$ -ヘリックス

スが存在せず、 $\beta$ -ストランドのみから構成されていた。配色はN末端を青色、C末端を赤色で示した。N末端領域(Thr4-Glu320)にはGH43に特徴的な five-bladed  $\beta$ -propeller 構造からなる触媒ドメインが、C末端領域(Pro330-Glu534)には  $\beta$ -sandwich ドメインが見出された。XloA と *G. stearothermophilus* T-6 株由来の XynB3 の 3 次構造を比較したところ、両酵素の  $\beta$ -propeller 構造における 5 番目の羽根から伸びたループの形状が大きく異なっていることが明らかになった。しかしながら、各酵素の至適温度(XloA は 35°C、XynB3 は 65°C)の違いを考慮すると、両酵素の 3 次構造は酷似しているということは興味深いと思われる。酵素を産業的に利用するためには、高い熱安定性や pH 安定性などが必要とされることから、XloA においてはアミノ酸置換などによる構造安定性の強化が期待される。

*xloA* 遺伝子のクローニングにおいてサザンブロット法により単離された *xloA* 遺伝子を含むゲノム DNA 断片は 4,206 bp であった。その全塩基配列を解析した結果、*xloA* 遺伝子の ORF 以外に 1 種類の不完全な ORF1 と 2 種類の完全な ORF (ORF2、ORF3) の存在が見出された。各 ORF の塩基配列から推定されるアミノ酸配列を BLAST<sup>37)</sup> により相同性検索した結果、ORF 1 は *Photobacterium profundum* SS9 株由来のキシロースイソメラーゼ (GenBank accession no. CR378664) と 86% の相同性、*Escherichia coli* 536 株由来のキシロースイソメラーゼ (GenBank accession no. CP000247) と 75% の相同性が確認されたことから、キシロースイソメラーゼ遺伝子であると推定した。また、ORF2 は *Lactobacillus sakei subsp. sakei* 23K 株由来のマルトース-O-アセチルトランスフェラーゼ (GenBank accession no. CR936503) と 41% の相同性、*Bacillus halodurans* C-125 株由来のマルトース-O-アセチルトランスフェラーゼ (GenBank accession no. BA000004) と 39% の相同性が確認されたことから、アセチルトランスフェラーゼに類似した遺伝子であると推定した。ORF3 は *Alcanivorax borkumensis* SK2 株由来のアルデヒドレダクターゼ (GenBank accession no. AM286690) と 59% の相同性、*Candida tropicalis* 由来のキシロースレダクターゼ (GenBank accession no. DQ665826) と 44% の相同性が確認されたことから、キシロースレダクターゼ遺伝子であると推定した (Table 4-7)。

さらに、本研究においてクローニングされた 4,206 bp の XY-214 *Xba* I-*Spe* I ゲノム DNA 断片 (4,206 bp *xloA* fragment) の 3' 末端領域、すなわちキシロースレダクターゼ遺伝子と推定される遺伝子をコードする ORF3 の遺伝子領域 574 bp が、当研究

室の橋川によってクローニングされた *Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子(*txyA*) (GenBank accession no. AB029043)<sup>25)</sup>の下流に位置する推定アルデヒドレダクターゼ遺伝子の塩基配列(未発表データ)と完全に一致することが判明した。これにより、橋川が *txyA* 遺伝子のクローニングの際に単離した *txyA* 遺伝子を含むゲノム DNA 断片(4,409 bp *txyA* fragment) (Fig. 4-3 の点線で囲った領域：塩基配列を Fig. 4-5 に示した)と 4,206 bp *xloA* fragment が部分的に重複していることが示唆された。そこで、*Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA を鋳型に ORF3 と *txyA* 遺伝子の全長が含まれるように設計したプライマーを用いて PCR を行い、さらに増幅した遺伝子断片の塩基配列を解析した。その結果、PCR 増幅産物が ORF3 と *txyA* 遺伝子を含む遺伝子断片であることが判明したことから、*Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム上において *xloA* 遺伝子と *txyA* 遺伝子が ORF2 と ORF3 を隔てて隣接していることが明らかになった(Fig. 4-6)。この事実からも *xloA* 遺伝子がコードする翻訳タンパク質が、 $\beta$ -1,3-キシロシダーゼとして機能する可能性がうかがえた。

また、*txyA* 遺伝子の 188 塩基対上流には 755 アミノ酸残基をコードする 2,268 塩基対からなる ORF4 が存在しており、その推定アミノ酸配列は N 末端に典型的なシグナルペプチドを有していた。シグナルペプチドを除いた推定アミノ酸配列を、*Alcaligenes* sp. XY-234 株由来の $\beta$ -1,3-キシラナーゼ上流遺伝子産物の推定アミノ酸配列(未発表データ)と比較した結果、およそ 76%と高い相同性を示した<sup>43)</sup>。BLAST<sup>37)</sup>による相同性検索の結果、本タンパク質の N 末端領域(Asp38 - Asp87)は、*Alcaligenes* sp. XY-234 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼのファミリー31 糖質結合モジュール(CBM31) (GenBank accession no. AB039953)と 36%、*Pseudomonas* sp. ND137 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼのファミリー6 糖質結合モジュール(CBM6) (GenBank accession no. AB063257)と 28%の相同性が確認されたことから、本タンパク質の N 末端領域は $\beta$ -1,3-キシラン関連物質との結合に関与することが推測された。また、Asp103 - Thr169 領域は *Mycobacterium smegmatis* str. MC2 155 株の ABC-type トランスポーター(GenBank accession no. NC008596)と 31%の相同性が確認され、さらに Gly521 - Leu755 領域は *Saccharophagus degradans* 2-40 株の GTP 結合タンパク質 (GenBank accession no. NC007912)と 34%の相同性が確認された。これらのことから、ORF4 がコードするタンパク質は細胞膜に局在し、細胞外環境におけるキシロオリゴ糖の存在を細胞内に伝達する受容体タンパク質として、またはキシロオリゴ糖を

細胞内に取り込む輸送タンパク質として機能していることが示唆された。今後は本遺伝子の翻訳タンパク質の詳細な機能解析が期待される。

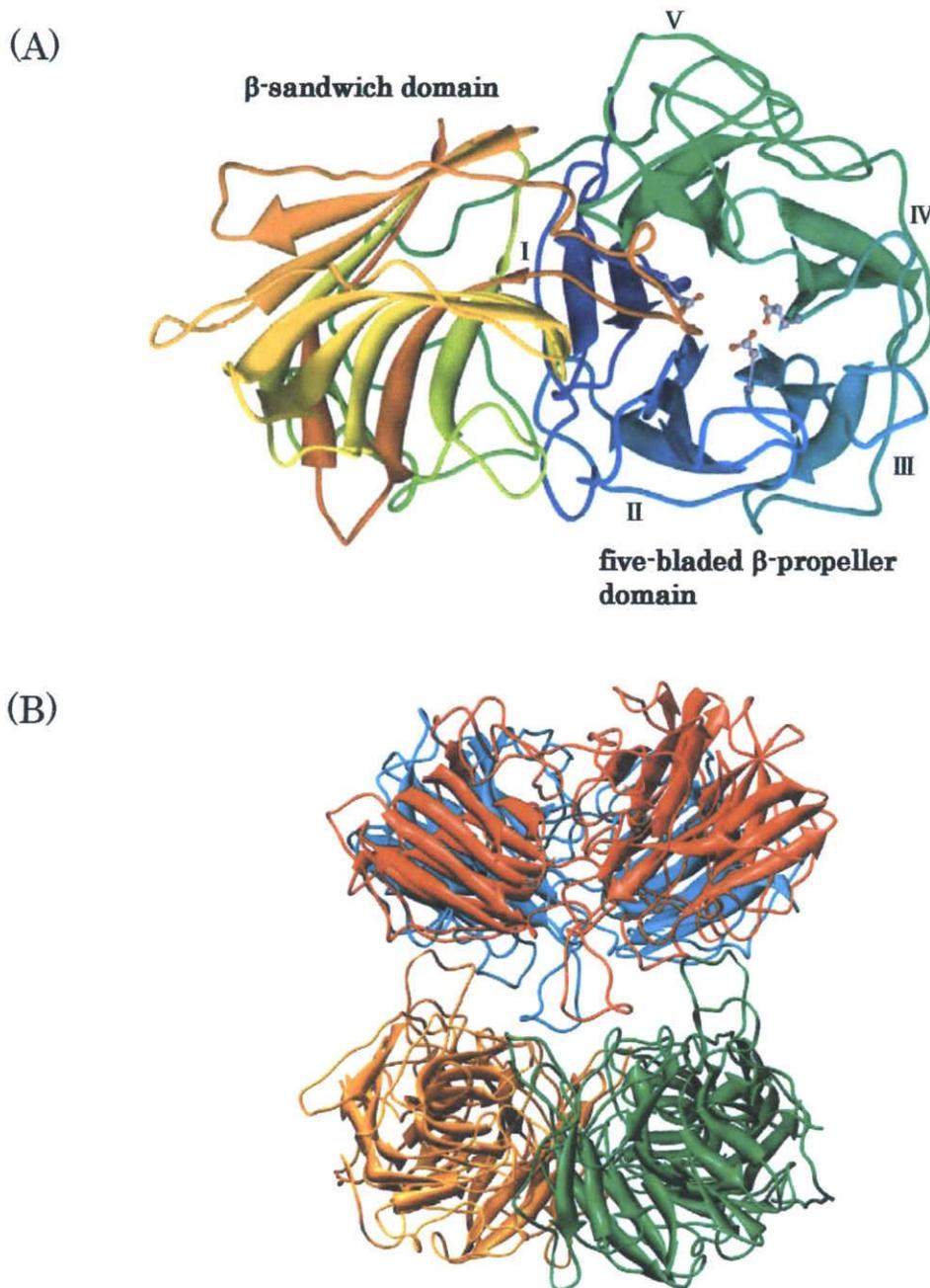
糖質加水分解酵素を産生する微生物では、関連遺伝子がクラスターを形成しており、発現した関連酵素遺伝子群が効率的に基質を分解、代謝することが明らかになっているが、*Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA においても、 $\beta$ -1,3-キシランを効率よく分解し、代謝するための遺伝子クラスターの存在が明らかになった。GH43 に属する $\beta$ -キシロシダーゼを産生するその他複数の細菌においても、キシロース代謝関連遺伝子クラスターの存在が確認されている<sup>44, 45, 46)</sup>。*G. stearothermophilus* T-6 株に関してはキシランの分解、キシロオリゴ糖やキシロビオースの細胞内への取り込み、細胞内でのキシロオリゴ糖からキシロースの遊離、分解産物の代謝などに関する 12 種類もの遺伝子が 1 つのオペロンを形成しており、一組のプロモーターとターミネーターによってその発現が調節されている。しかしながら、本研究によりクローニングされた *Vibrio* sp. XY-214 株のキシロース代謝関連遺伝子クラスターの場合、オペロンを形成しているのは ORF2 と ORF3 のみと推定され、クラスター内の他の遺伝子に関しては終止コドンの下流に推定ターミネーター配列が存在していた。

本研究では最後に、*Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -1,3-キシロシダーゼ(XloA)の応用として $\beta$ -1,3-キシランからのキシロース生産を試みた。すなわち、当研究室の岡崎によってクローニングされ、その酵素学的性質が解明された *Alcaligenes* sp. XY-234 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼ(TxyA)と rXloA を $\beta$ -1,3-キシランに作用させ、その分解産物を薄層クロマトグラフィーにより分析した。その結果、それぞれ単独の酵素では 24 時間反応させても $\beta$ -1,3-キシランからキシロースを生成することができなかったが、rTxyA と rXloA を同時に反応液に添加することにより、15 分間の反応で $\beta$ -1,3-キシランが完全にキシロースにまで分解された(Fig. 5-11)。現在、キシロースは「虫歯の原因になりにくい食品」、「歯の健康維持に役立つ食品」として特定保健用食品に認可されているキシリトールの原料となっており、さらには再生可能なエネルギーとして注目されているバイオエタノールの原料となりうることから産業上重要な糖質として認識されている。しかしながら、これまで消費されてきたキシロースはすべて陸上植物細胞壁由来の $\beta$ -1,4-キシランを原料としてきた。本研究により、 $\beta$ -1,3-キシロシダーゼが単離され、その遺伝子がクローニングされたことにより、陸上植物だけでなく現在地中海を中心に異常な繁殖を続け、海の生態系を破壊するとともに、漁業に甚大な被害を

与えている変種イチイツタからキシロースを生産することが可能となった。

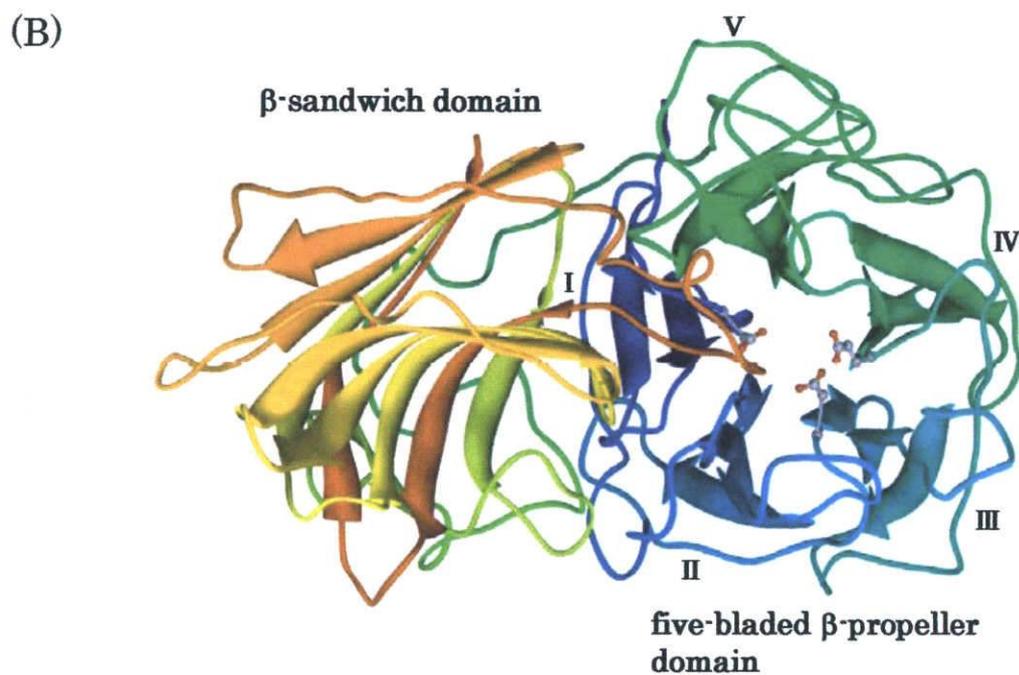
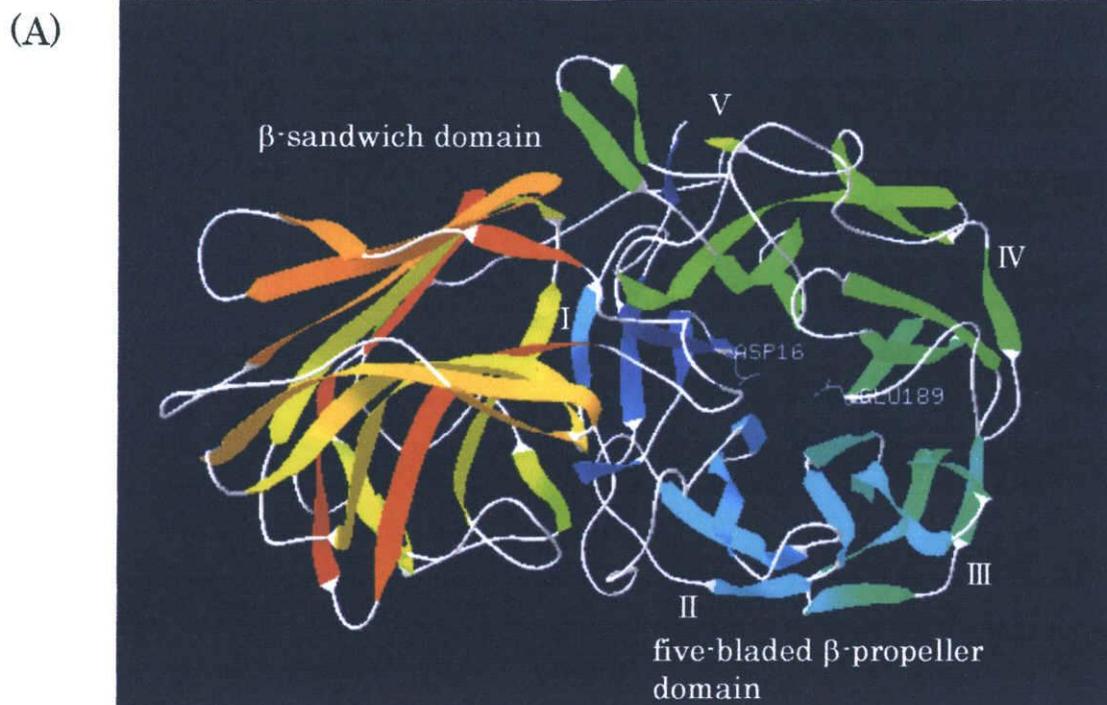
以上、本研究では $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子のクローニングとそのモジュール構造の解析および *Vibrio* sp. XY-214株由来 $\beta$ -1,3-キシロシダーゼ遺伝子(*xloA*)のクローニングとその翻訳タンパク質(rXloA)の機能解析を行った。また、rTxyAとrXloAを併用することにより $\beta$ -1,3-キシランからキシロースを生産する方法を確立した。さらに $\beta$ -1,3-キシロシダーゼ遺伝子周辺の塩基配列を解析し、 $\beta$ -1,3-キシラナーゼやキシロースイソメラーゼ、キシロースレダクターゼなどの $\beta$ -1,3-キシラン資化関連遺伝子がクラスターを形成していることを明らかにした。

今後の課題としては、酵素処理により $\beta$ -1,3-キシランから生成したキシロースを原料としてエタノールを生産することが挙げられる。しかしながら、アルコール発酵の担い手である酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)はキシロースを利用してアルコール発酵を行うことができない。従って、キシロースレダクターゼやキシリトールデヒドロゲナーゼなどのキシロース代謝関連遺伝子を酵母に導入し、キシロース発酵能を付加する必要がある。すなわち、酵母はキシロースを代謝できないがキシロースの異性体であるキシルロースであれば代謝してアルコール発酵できるので、キシロースをキシルロースに変換するための代謝経路を外部から導入する必要がある。キシロースのキシルロースへの変換には2種類の代謝経路が知られている。1つはキシロースレダクターゼの作用によりまずキシロースをキシリトールに還元し、さらにキシリトールデヒドロゲナーゼの作用によりキシルロースに変換する経路であり(Fig. 6-3 pathway I)、もう1つはキシロースイソメラーゼの作用によりキシロースを直接キシルロースに変換する経路である(Fig. 6-3 pathway II)。そこで、*Vibrio* sp. XY-214株のゲノムDNA上に存在するキシロース代謝関連遺伝子を酵母に導入することでキシロース発酵性酵母を構築したいと考えている。すなわち、まずキシロースイソメラーゼ、キシロースレダクターゼおよびキシリトールデヒドロゲナーゼをそれぞれコードする遺伝子をクローニングし、大腸菌に導入して各翻訳タンパク質の機能解析を行う。次に、キシロースレダクターゼ遺伝子とキシリトールデヒドロゲナーゼ遺伝子の組合せ、またはキシロースイソメラーゼ遺伝子を単独で酵母に導入し、組換え体酵母を構築する。この組換え体酵母に $\beta$ -1,3-キシラナーゼと $\beta$ -1,3-キシロシダーゼの作用によって $\beta$ -1,3-キシランから生じたキシロースを与えることで、エタノールを生産したいと考えている。



**Fig. 6-1. The structures of XynB3 from *Geobacillus stearothermophilus* T-6.**

(A) A ribbon representation of the monomeric unit of *G. stearothermophilus*  $\beta$ -xylosidase. The polypeptide chain is denoted in blue (N-terminal) to red (C-terminal). The three active-site carboxylic acids are shown in a ball and stick representation and are colored by element (carbon, gray; oxygen, red). The blades of the catalytic domain are numbered I - V. (B) The tetrameric structure of XynB3. ribbon illustration of the four XynB3 monomers that form a tetramer. The four monomers are colored red, green, orange, and azure. The tetramerization is formed by a  $90^\circ$  twist of the dimers.



**Fig. 6-2. Comparison of the three-dimensional structure of XloA and XynB3.**

(A) Putative three-dimensional structure of XloA subunit from *Vibrio* sp. XY-214 predicted with SWISS-MODEL. The polypeptide chain is denoted in blue (N-terminal) to red (C-terminal). The blades of the catalytic domain are numbered I - V. (B) A ribbon representation of the monomeric unit of *G. stearothermophilus* XynB3.

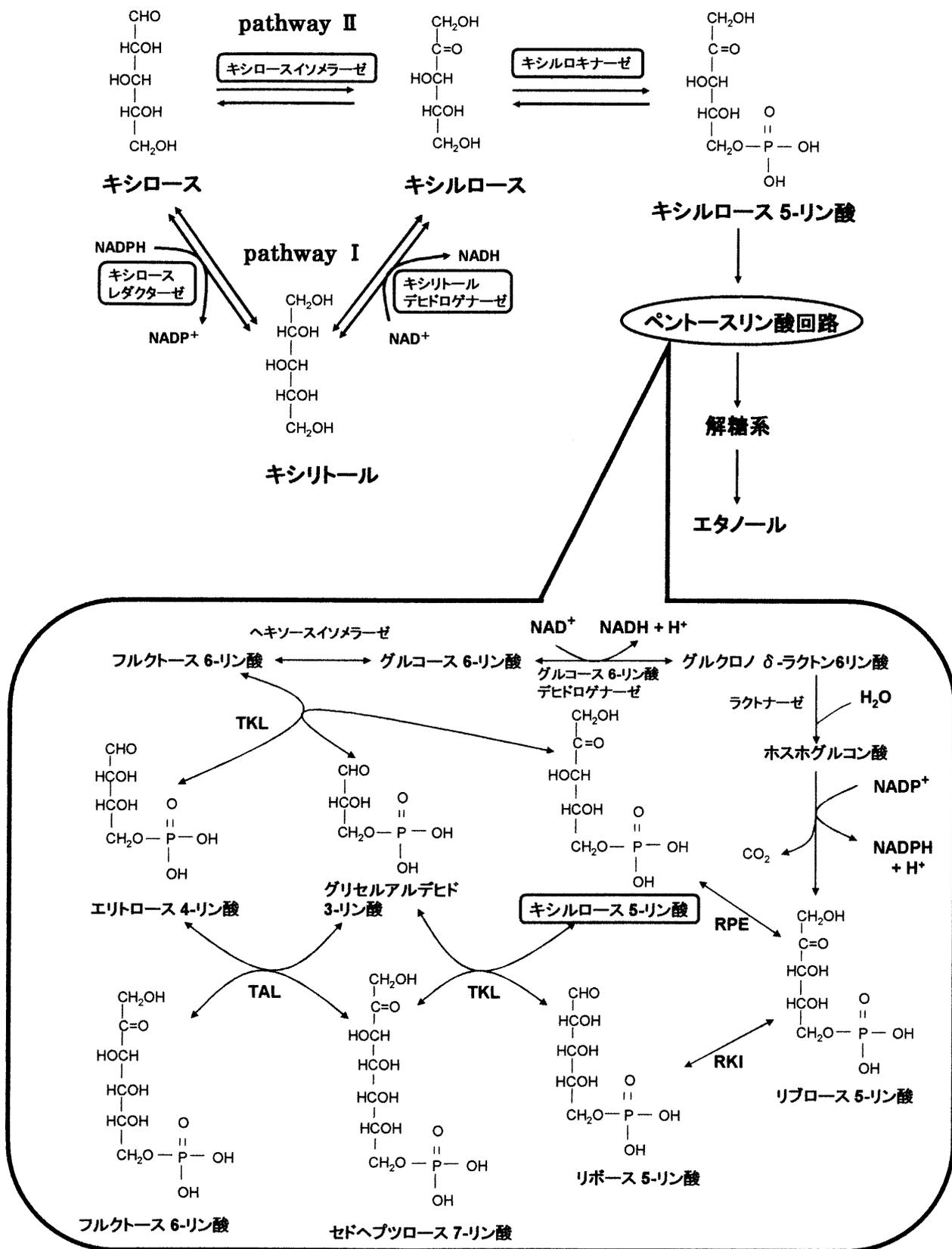


Fig. 6-3. The metabolic pathways for xylose.

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜った三重大学大学院生物資源学研究科水圏生物利用学研究分野の荒木利芳教授、および田丸浩助教授に心から謝意を表します。また、本論文の審査に加わって下さいました三重大学大学院生物資源学研究科水産物品質学研究分野の青木恭彦助教授にお礼申し上げます。最後に、常に適切にご指導および激励をして下さいました董金華先輩、大西良介先輩、常に好意的にご協力頂きました同期の渡部正利喜君、山本高弘君ほか水圏生物利用学研究室の皆様に心より感謝するとともに今後のご活躍をお祈りいたします。

## 参考文献

1. 齊木 隆. 2003. セルロース系バイオマスを原料とする新規なエタノール醗酵技術などにより燃料用エタノールを製造する技術開発, 太陽エネルギー, **29**:36-41.
2. 山田信夫. 2000. 海藻利用の科学. 成山堂 **85-89**.
3. 財団法人 農林統計協会. 2001. 第 75 次農林水産省統計表.
4. 水産庁研究部研究課. 1989-1994. ノリのプロトプラスト種苗の利用による地域に適合した新品種の作出(福岡県・佐賀県・愛知県・兵庫県). 地域バイオテクノロジー実用化技術研究開発促進事業(水産業関係). 昭和 63 年～平成 5 年度成果概要.
5. **Araki, T., T. Aoki, and M. Kitamikado.** 1987. Isolation and identification of a  $\beta$ -1,3-xylanase-producing bacterium. *Nippon suisan gakkaisi*. **53**:2077-2081.
6. 藤田雄二. 1990. 海洋. **22**:737-742.
7. **Fujita, Y., and S. Migita.** 1987. *Japan J. Phycol.* **35**:201-208.
8. **Saga, N., M. Polne-Fullar and A. Gibor.** 1986. *Beih Nova Hedwigia*. **83**:37-43.
9. 谷川圭亮, 増田恵一. 1992. プロトプラストを利用した養殖ノリ選抜品種の野外養殖試験. 兵庫県水産試験場研究報告. **30**:49-53
10. 吉松隆夫, 荒木利芳, 酒本秀一. 2007. 酵素処理によるアマノリ無利用資源の有効活用に関する研究. 平成 18 年度先端技術を活用した農林水産研究高度化事業報告書
11. **Percival, E., and R. H. McDowell.** 1967. *Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides*. Academic Press, London. pp. 88-98, 129-137.
12. **Hatate, H., T. Aoki, T. Araki, and M. Kitamikado.** 1986. Preparation of bacterial enzyme capable of degrading the cell wall of red alga *Porphyra yezoensis*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **52**:545-548.
13. 入来義彦. 1965. 藻類のキシランとマンナン. 蛋白質核酸酵素. **14**:59-65.
14. **Iriki, Y., T. Suzuki, K. Nishizawa, and T. Miwa.** 1960. Xylan of Siphonaceous green algae. *Nature* **187**:82-83.
15. **McDowell, R. H.** 1967. *Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides*, p. 88-96, 134-137. Academic Press, London, United Kingdom.
16. **Nisizawa, K., I. Morimoto, N. Handa, and Y. Hashimoto.** 1962. Cellulose-splitting enzymes IV. Starch zone electrophoresis of cellulose and other carbohydrases from

- Irpex lacteus*. Arch. of Biochem. Biophys. **96**:152-157.
17. **Okada, G.** 1972. Starch-Zone Electrophoresis of cellulase and other carbohydrases from a land snail, *Euhadra periomphala*. J.Fac. Edu. Shizuoka University. **57**:57-66.
  18. **Anzai, H., H. Asada, A. Koshiba, S. Yoshida, H. Kobayashi, N. Uchida, and E. Nishide.** 1991. Distribution of polysaccharide digestive enzyme in marine gastropod *Dolabella auicularia*. Nippon suisan gakkai. **57**:2077-2081.
  19. 山口邦子, 荒木利芳, 青木恭彦, 曾 照, 北御門学. 1989. 海産動物内臓の海藻細胞壁溶解酵素. 日本水産学会誌. **55**:105-110.
  17. **藤沢浩明, 村上正忠.** 1970. 海洋中のキシラン分解細菌に関する研究-V. 沿岸海域における $\beta$ -1,3-キシラン分解細菌の分布について. 日本水産学会誌. **36**:741-747.
  18. **藤沢浩明, 村上正忠.** 1970. 海洋中のキシラン分解細菌に関する研究-V. P.S.値の測定による $\beta$ -1,3-キシラン分解細菌のキシラン分解能の格付けについて. 日本水産学会誌. **37**:119-123.
  19. **Fukui, S., T. Suzuki, K. Kitahara, and T. Miwa.** 1960. Studies on $\beta$ -1,3-xylanase I. Existence of a new enzyme,  $\beta$ -1,3-xylanase. Gen. Appl. Microbiol. **6**:70-282.
  20. **Chen, W. P., M. Matsuo, and T. Yasui.** 1986. Purification and some properties of  $\beta$ -1,3-xylanase from *Aspergillus terreus* A-07. Agric. Biol. Chem. **50**:1183-1194.
  21. **Aoki, T., T. Araki, and M. Kitamikado.** 1988. Purification and characterization of an endo- $\beta$ -1,3-xylanase from *Vibrio* sp. Nippon suisan gakkaisi. **54**:277-281.
  22. **Yamaura, I., T. Matsumoto, M. Funatsu, and E. Mukai.** 1990. Purification and some properties of endo-1,3- $\beta$ -D-xylanase from *Pseudomonas* sp. PT-5. Agric. Biol. Chem. **54**:921-926.
  23. **Araki, T., N. Inoue, and T. Morishita.** 1998. Purification and characterization of  $\beta$ -1,3-xylanase from a marine bacterium, *Alcaligenes* sp. XY-234. J. Gen. Appl. Microbiol. **44**:269-274.
  24. **Araki, T., S. Tani, K. Maeda, S. Hashikawa, H. Nakagawa, and T. Morishita.** 1999. Purification and Characterization of  $\beta$ -1,3-Xylanase from a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. XY-214. Biosci. Biotechnol. Biochem. **63**:2017-2019.

25. **Araki, T., S. Hashikawa, and T. Morishima.** 2000. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the new gene encoding  $\beta$ -1,3-xylanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain XY-214. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1741-1743.
29. **Okazaki, F., Y. Tamaru, S. Hashikawa, Yu-Teh Li, and T. Araki.** 2002. Novel Carbohydrate-binding module of  $\beta$ -1,3-xylanase from a marine bacterium, *Alcaligenes* sp. strain XY-234. *J. Bacteriol.* **184**:2399-2403.
27. **Kiyohara, M., K. Sakaguchi, K. Yamaguchi, T. Araki, T. Nakamura and M. Ito.** 2005. Molecular cloning and characterization of novel  $\beta$ -1,3-xylanase possessing two putative carbohydrate-binding modules from a marine bacterium *Vibrio* sp. strain AX-4. *Biochem. J.* **388**:949-957.
28. **Sakaguchi, K., M. Kiyohara, N. Watanabe, K. Yamaguchi, M. Ito, T. Kawamura, and I. Tanaka.** 2004. Preparation and preliminary X-ray analysis of the catalytic module of  $\beta$ -1,3-xylanase from the marine bacterium *Vibrio* sp. AX-4. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **60**:1470-1472.
29. **漆畑晶子.** 2000. 海洋細菌 *Vibrio* sp. XY-235 の産生する $\beta$ -1,3-キシランナーゼおよび $\beta$ -1,3-キシロシダーゼに関する研究. 三重大学大学院生物資源学研究科修士論文. **14-21**.
30. **Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* **96**:23-28.
31. **野島 博.** 1991. 遺伝子工学ハンドブック. 実験医学. 羊土社. **46-51**.
32. **Saito, H., and K. Miura.** 1963. Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol-treatment. *Biochim. Biophys. Acta.* **72**:619-629.
33. **Somogyi, M.** 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**:19-23.
34. **Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
35. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
36. **George, M. Malacinski, David Freifelder.** 1999. 分子生物学の基礎 第3版, 川喜田正夫 訳. 東京化学同人. **218-223**.

37. **Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
38. **Rosenberg, M., and D. Court.** 1979. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* **13**:319-353.
39. **Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak and G. von Heijne.** 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering.* **10**:1-6.
40. **Henrissat, B.** 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **280**:309-316.
41. **Henrissat, B, Bairoch A.** 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl-hydrolases. *Biochem J.* **316**:695-696.
42. **Brux, C., A. Ben-David, D. Shallom-Shezifi, M. Leon, K. Niefind, G. Shoham, and Y. Shoham.** 2006. The structure of an inverting GH43  $\beta$ -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* with its substrate reveals the role of the three catalytic residues. *J. Mol. Biol.* **359**:97-109.
43. **岡崎文美.** 2006. 海洋細菌 *Alcaligenes* sp.XY-234 株由来 $\beta$ -1,3-キシラナーゼの構造と機能に関する研究. 北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科博士論文. **75-87**.
44. **Qian, Y., L. P. Yomano, J. F. Preston, H. C. Aldrich, and L. O. Ingram.** 2003. Cloning, Characterization, and Functional Expression of the *Klebsiella oxytoca* Xylodextrin Utilization Operon(*xynTB*) in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5957-5967.
45. **Shulami, S., O. Gat, A. L. Sonenshein, and Y. Shoham.** 1999. The Glucuronic Acid Utilization Gene Cluster from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *J. Bacteriol.* **181**:3695-3704.
46. **Karn, A. Erlandson, Soazig C. Delamarre, and Carl A. Batt.** 2001. Genetic Evidence for a Defective Xylan Degradation Pathway in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1445-1452.
47. **Bailey, R. W., and E. J. Bourne.** 1960. Colour reagents given by sugars and diphenylamineaniline spray reagents on paper chromatograms. *J. Chromatogr.* **4**:206-213.

48. **Smaali, I., C. Remond, Michael J. O'Donohue.** 2006. Expression in *Escherichia coli* and characterization of  $\beta$ -xylosidase GH39 and GH43 from *Bacillus halodurans* C-125. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**:582-590.
49. **Didier Nurizzo, Johan P. Turkenburg, Simon J. Charnock, Shirley M. Roberts, Eleanor J. Dodson, Vincent A. Mckie, Edward J. Taylor. Harry J. Gilbert and Gideon J. Davies.** 2002. *Cellvibrio japonicus*  $\alpha$ -L-arabinanase 43A has a novel five-blade  $\beta$ -propeller fold. *Nat. Struct. Biol.* **9**:665-668.
50. **Schwede, T., J. Kopp, N. Guex, and MC. Peitsch** 2003. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* **31**: 3381-3385.
51. **Guex, N., and MC. Peitsch** 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* **18**:2714-2723.
52. **Peitsch, MC.** 1995. Protein modeling by E-mail *Bio/Technology.* **13**: 658-660.