

ルーメン細菌 *Ruminococcus albus* 由来の
糖質結合モジュールの特性

平成 18 年度

三重大学大学院生物資源学研究科
博士前期課程 資源循環学専攻

青山洋平

修 士 論 文

ルーメン細菌 *Ruminococcus albus* 由来の
糖質結合モジュールの特性

平成 19 年 3 月

三重大学大学院生物資源学研究科

青 山 洋 平

目次	1
略号一覧	2
使用した試薬組成	4
使用した培地組成	7
第1章 緒論	9
第2章 糖質結合モジュールファミリー4の発現と精製	
1節 目的	13
2節 実験方法	14
3節 結果	21
4節 考察	23
図表	24
第3章 精製タンパク質の結合特性の測定	
3-1 アフィニティー電気泳動による測定	
1節 目的	28
2節 実験方法	28
3節 結果	29
4節 考察	30
図表	32
3-2 SDS-PAGE 電気泳動を用いた結合部位の比較	
1節 目的	34
2節 実験方法	34
3節 結果	34
4節 考察	35
図表	36
3-3 遊離タンパク質の吸光度測定による結合力の測定	

1 節	目的	3 7
2 節	実験方法	3 7
3 節	結果	3 9
4 節	考察	3 9
	図表	4 0
3-4 マクロアレイ法による結合基質の比較		
1 節	目的	4 4
2 節	実験方法	4 4
3 節	結果	4 5
5 節	考察	4 6
	図表	4 8
第 4 章 <i>R.albus</i> におけるリケナン結合タンパク質の測定とそのプロテインシ		
ークエンス		
1 節	目的	5 2
2 節	実験方法	5 2
3 節	結果	5 3
4 節	考察	5 4
	図表	5 5
第 5 章 総合考察		
	総合考察	5 6
	引用文献	5 9
	謝辞	

【略号一覧】

APS ; ペルオキシ二硫酸アンモニウム

BMC ; ボールミルセルロース (Ball Milled Cellulose)

BMS ; ボールミルストロー (Ball Milled Straw)

CBM ; 糖質結合モジュール (Carbohydrate-binding module)

CMC ; カルボキシメチルセルロース

EDTA ; エチレンジアミンテトラ酢酸二水和物

HRP ; ホースラディッシュペルオキシダーゼ

IPTG ; イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド

KPB ; リン酸カリウム緩衝液

MOPS ; 3-モルホリノプロパンスルホン酸

PCR ; ポリメラーゼ連鎖反応

PVDF ; ポリフッ化ビニリデン

SDS ; ドデシル硫酸ナトリウム

SDS-PAGE ; ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

TBS ; トリス緩衝生理食塩水

TEMED ; N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン

Tris ; 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール

VFA ; 揮発性脂肪酸 (Volatile Fatty Acids)

X-gal ; 5-ブロモ-3-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド

【調製試薬組成】

0.5M EDTA (pH8.0)	0.5M EDTA を水酸化ナトリウムで pH8.0 に調整し 15 分 121°C で滅菌した。
1 M Tris-HCl	1 M Tris を HCl で pH8.0 に調整し 15 分 121°C で滅菌した。
6 × ローディング緩衝液	0.25% ブロモフェノールブルー、0.25% キシレンシアノール FF、15% グリセリンを含む。
TAE 緩衝液	40mM Tris 20mM 酢酸、1mM EDTA (pH8.0) を含む。
TE 緩衝液	10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA (pH8.0) 15 分 121°C で滅菌したもの。
VFA 混合液	酢酸 17ml、プロピオン酸 6 ml、酪酸 4 ml、イソ酪酸 1 ml、n-吉草酸 1 ml、イソ吉草酸 1 ml、DL- α -methyl-酪酸 1 ml 以上を混合したものを VFA 混合液とした。

タンパク質精製に使用した試薬組成

超音波破碎液 (pH8.0)	50mM リン酸二水素ナトリウム、10mM イミダゾール、300mM 塩化ナトリウムを含む。
----------------	--

洗浄液(pH8.0) 50mM リン酸二水素ナトリウム、20mM イミダゾール、300mM 塩化ナトリウムを含む。

溶出液(pH8.0) 50mM リン酸二水素ナトリウム、250mM イミダゾール、300mM 塩化ナトリウムを含む。

プラスミド抽出に使用した試薬組成

Solution 1 50mM グルコース、25mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM EDTA(pH8.0)を含む。

Solution 2 0.2N 水酸化ナトリウム、1.0% SDS を含む。

Solution 3 3.0M 酢酸カリウム、2.0M 酢酸を含む。

SDS-PAGE 電気泳動に使用した試薬組成

30%アクリルアミド溶液 29.2% アクリルアミド、0.8% N,N'-メチレンビスアクリルアミドを含む

濃縮ゲル用緩衝液 0.5M Tris、0.5% SDS を含み、HClにより pH6.8 に調整した。

分離ゲル用緩衝液 1.5M Tris、0.4% SDS を含み、HClにより pH8.8 に調整した。

サンプル用緩衝液 50mM Tris-HCl(pH6.8)、5% β-メルカプトエタノール、2.0% SDS、0.1% ブロモフェノールブルー、10% グリセロールを含む。

泳動用緩衝液 25mM Tris、192mM グリシン、0.01% SDS を含む。

アフィニティー電気泳動に使用した試薬

30%アクリルアミド溶液	SDS-PAGE 電気泳動法の項目と物と同様
ゲル緩衝液	1.5M Tris を含み、HCl により pH8.8 に調整した。
泳動用緩衝液	25mM Tris、グリシン 192mM を含む。
サンプル用緩衝液	50mM Tris-HCl(pH6.8) 0.1%プロモフェノールブルー、10%グリセロールを含む。

マクロアレイに使用した試薬組成

TBS 緩衝液	10mM Tris-HCl(pH7.5)、150mM NaCl を含む。
TBS Tween/Triton 緩衝液	20mM Tris-HCl(pH7.5)、500mM NaCl、0.05% Tween-20、0.2% TritonX-100 を含む。
Blocking 緩衝液 (20ml)	Qiaexpress Anti-his-HRP coniugate キット付属 BlockingReagent 0.1 g、0.1%の Tween-20 を含む。
DAB (3,3'-ジアミノベンジジン) 染色液 (10ml)	DAB 5mg、0.005%過酸化水素水を含む。。

タンパク質ブロッキングに使用した試薬組成

A 液	300mM Tris、メタノール 5%を含む。
B 液	25mM Tris、メタノール 5%を含む。
C 液	25mM Tris、40mM 6-アミノヘキサン酸、5%メタノールを含む。
PVDF 膜染色液	0.1% クマシーブルー (R-250)、40% メタノール、1% 酢酸を含む。
PVDF 膜脱色液	50% メタノールを含む。

活性染色に使用した試薬

リフォールディング緩衝液	50mM Tris 、 5 mM EDTA、 5 mM メルカプトエタノールを含む。
コンゴレッド染色液	1 %コンゴレッド水溶液含む。
コンゴレッド脱色液	1 M 塩化ナトリウム水溶液含む。

【使用培地組成】

・ LB 培地

ポリペプトン 10 g、酵母エキス 5 g、塩化ナトリウム 10g。※1リットル中これらに水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH 7.0 になるよう調製した。

これらを使用目的に応じた容器に分注し、121℃、15 分間に設定したオートクレーブを用いて滅菌した。

寒天培地とする際は重量比 1.5% となるよう培地用寒天を添加した。

必要に応じてアンピシリン (50 μg/ml)、IPTG (50 μg/ml)、X-gal (50 μg/ml) を添加した。

・ SOC 培地

ポリペプトン 20 g、酵母エキス 15 g、塩化ナトリウム 0.5 g、塩化カリウム 18.6 g。※1リットル中

これらに水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH 7.0 になるよう調製した。

121℃、15 分間に設定したオートクレーブを用いて滅菌した。

塩化マグネシウム 19 g、グルコース 180g を加え、無菌操作により所定容器に分注した。

・ GS 改変培地 (1)

リン酸 2 水素カリウム 1.5 g、リン酸水素 2 カリウム 2.9g、硫酸アンモニウム 1.3 g、MOPS 20.9g、VFA 混合液 3.1ml。※ 1 リットル中

以上を水道水に溶かし水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH6.8 に調製した。

酵母エキス 4.5 g、L-システイン HCl 3 g、3% レサズリン溶液 200 μ l、炭素源 1%(用途に応じて変更した。)を加えメスアップした。その後ねじつき試験管に分注し、窒素ガスによる脱気を行い密封。121°C、15 分間オートクレーブを用いて滅菌した。

第1章 緒論

近年、化石燃料の枯渇問題及び、排出される二酸化炭素の増加などにより、持続可能であり尚且つ環境負荷の少ないバイオマス資源が注目されている。特に植物の主成分の一つであるセルロース系物質は地球上で最も生成量が多いバイオマス資源であり、食料などと競合しない点で有利とされその研究が進められてきた。セルロース系物質を単糖にまで分解すれば、アルコールなどのエネルギー物質や、生分解性プラスチックなどといった工業物質などに転換することが期待できる。

セルロースの分解には、酸加水分解法などの化学的手法、あるいは微生物が生産するセルラーゼと呼ばれる酵素加水分解による手法が知られている。化学的手法は硫酸など、化学物質の生産エネルギー、および廃液等の環境負荷が高いことから最初にあげた問題の根本的な解決に至らないと考えられる。その点微生物を利用した手法は、それらの問題を解決し、持続的な発展を可能にすると考えられている。

そういった微生物がセルロース系物質を分解する際、生成する酵素がセルラーゼである。セルラーゼ遺伝子を持つ生物は、アーキア、好気性糸状菌、嫌気性細菌、嫌気性糸状菌、シロアリや植物など多岐にわたる。近年では遺伝子解析などから比較した相同性により、遺伝子それぞれが水平伝播し(2)、進化の過程で多様性を獲得していったと考えられている。本研究で扱う *Ruminococcus albus* F-40 株は、ウシのルーメン内から単離されたセルロース分解性を示す微生物である。ルーメンとはウシ、ヤギ、ヒツジといった反芻動物として分類される動物が持つ、発達した胃を指す。反芻動物が牧草等の植物を摂食した場合、固形分を吐き戻し咀嚼する行為を反芻と呼び、この行為により摂食された植物などの難消化性の食物が細かく粉碎される。ルーメンに戻された食物は、ルーメン内に生育する共生細菌、原生動物などによって分解、代謝される。代謝過程で産生する単

鎖脂肪酸、菌体等が反芻動物の栄養源として利用される。

共生細菌の内、嫌気性繊維分解細菌としては、*Fibrobacter succinogenes*、*R.albus*、*Ruminococcus flavefaciens*、等がよく知られている。これらの菌は植物繊維を分解する事からセルラーゼ遺伝子を持つことが示唆されてきた。

1980年頃までのセルラーゼの研究は主に好気性糸状菌と細菌によるものが主流であったが、1982年に、*Clostridium thermocellum*の結晶性セルロース分解能が、*Trichoderma reesei*などの分解能と比べ、50~100倍と極めて効率的であることが報告された(3)。それは、*C.thermocellum*が作り出すセルロソームと名付けられた高分子の酵素複合体によるものであると報告され(4)、その高効率の分解能から急速にセルロソームの研究が発展した。

セルラーゼの研究は従来生化学的手法により研究がなされてきたが、近年遺伝子組み換え技術をはじめとする分子生物学の発展に伴い、それらの手法を取り入れた研究が進み、その遺伝子の塩基配列や、立体構造、酵素分解機能も明らかにされ、セルラーゼ、セルロソームに対する理解が急速に進んだ。その中でセルロソームは幾つかの機能性タンパク質の複合体であることが明らかとされ、触媒活性をもつ触媒モジュールとそれ以外の機能をもつ機能モジュールに分けられ、個々のドメインから成り立っているのでモジュラー酵素とも呼ばれている(5-6)。それらは個々に分離していても独立した機能を有する。触媒モジュールは基質特異性の異なる様々な酵素がみつかっており、中には異なる複数の触媒モジュールを持つ酵素も見つかっている。(7)、機能モジュールの中には、基質結合モジュールである糖質結合モジュール(CBM)、細菌表層タンパク質と相同性のある表層相同モジュール(SLH)(8-9)、リンカー、コヘシン、ドックリンといったモジュールが知られている。*R.albus*のセルラーゼDNAからもドックリンタンパク質が見つかっており、セルロソームを構築していると報告されている(10-12)。また、同じくルーメン細菌である*R. flavefaciens*からセルロソーム

の骨格タンパク質の遺伝子がクローニングされていることから、繊維分解性のルーメン細菌がセルロソームを産生していると考えられている (13)。

本研究では主に *R.albus* のもつセルラーゼ遺伝子 *Cel5D* に含まれ、ファミリー 4 に分類される CBM を対象とした (以下 CBM 4 と表記する)。CBM の機能については、それをもつ触媒ドメインを目標の基質表面に集める効果により繊維類の分解に貢献しているというものが主としてあげられる。セルロースや、ヘミセルロースなどといった多糖類は基本的に水に対して不溶性なため、触媒ドメインと基質が効率的に反応できるよう、CBM のような基質結合モジュールを獲得していったと考えられる。また、CBM は、それ自体に植物細胞壁を破壊する作用があると報告されている (14-15)。一方で、そういった効果はないとする報告もあり (16)、ファミリー間、あるいは同一ファミリー内においても、機能が異なると考えられている。

現在 CBM はアミノ酸の相同配列の比較により 48 を超えるファミリーに分類されている。

(CAZy: http://www.cazy.org/CAZY/fam/acc_CBM.html より)

また Boraston らは結晶性セルロースに結合するタイプ A、非結晶性セルロース、キシランなどに結合するタイプ B、セルロース鎖の末端に結合するタイプと、結合様式の違いにより CBM を A、B、C、の 3 タイプに分類する提案をしている (17)。CBM 4 はこれのうちファミリー 4、タイプ B に分類されている。

CBM 4 は、様々な菌種で、エンドグルカナーゼ、キシラナーゼといった触媒モジュール等と並んでコードされている。*R.albus* の CBM 4 は *cel5D* と呼ばれる遺伝子に、ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼの後に 2 つ並んで確認されている (21)。このように CBM 4 が二つ並んでいる構造は、*Rhodothermus marinus* における Xyn10A とよばれるキシラナーゼ酵素にも同様に見ることが出来る (18)。この外にも、触媒モジュールをコードする遺伝子と同一方向に、

同じファミリー、あるいは異なるファミリーの CBM が 2 つ並んでコードされている事例が知られている。こういったことから、二つの CBM が並列する理由について興味をもたれている。荒木ら (19) や、Boraston ら (20) は、これらの CBM が単独の時、あるいは 2 つが同時に存在する時の結合特性について研究している。

本研究で用いる CBM 4 は、*R.albus* より田口らがクローニングした *cel5D* 遺伝子に含まれるものである。この CBM が実際どのような性質を持つかはまだ明らかになっていない。CBM の研究を行う際は、その結合特性が重要となり、それらを決定付ける方法として基質特異性と結合力を評価する必要がある。そこで以上の事を踏まえ、第 2 章では 2 つ並列する CBM 4 を個別、結合状態で発現、精製した。第 3 章では、前章で精製した組み換えタンパク質を使用して、アフィニティー電気泳動による結合基質の測定、マクロアレイ法による結合部位の比較、リケナンへの結合における動力学的性質の測定を行った。また第 4 章では、実際に *R.albus* の培養液からリケナンに吸着するタンパク質を集積し、プロテインシーケンシング解析を行った。

第2章 糖質結合モジュールファミリー4の発現と精製

1節 目的

Ruminococcus albus F-40 株は繊維分解性を示すルーメン内細菌として知られている。この菌は繊維分解性を示すことからセルラーゼに関する研究が進められてきた。田口ら (21) によってクローニングされたエンドグルカナーゼ遺伝子 *cel5D* はファミリー5に属する触媒ドメインと、ドックリン、ファミリー4の分類される CBM が2つ並んでコードされていることが知られている。

CBM4 の特性を知るために、これらのタンパク質を発現させ、それを用いて比較、実験する必要がある。そのため本章では目的のタンパク質を得るために遺伝子操作を行い大腸菌による組換えタンパク質を精製することを目的とした。

2節 方法と材料

染色体 DNA の精製

R.albus を GS-改変培地（炭素源として 1% のセロビオースを用いた）を用いて培養した。インキュベーターを使用し 37°C で 20 時間培養した 100ml の培養液を遠心分離（15000rpm、1 分）し集めた菌体を緩衝液 I（25mM Tris-HCl[pH8.0] 50mM グルコース 10mM EDTA[pH8.0] をオートクレーブしたもの）を 2ml に懸濁した後、リゾチーム（和光純薬）を 0.1g、プロテアーゼ K Invitrogen 社）を 0.01g、RNase（和光純薬）を 1 μ l 加え 37°C で一時間処理をした。さらに、SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）を最終濃度が 0.5% になるように添加して溶菌を促し、溶菌を確認した時点で 5 ml のエタノールを加えガラス棒で攪拌した。ガラス棒に巻き取ったものを染色体 DNA として 2 ml の TE 緩衝液に溶解した。さらにこれに 0.1M Tris-HCl 緩衝液[pH8.0] で飽和したフェノールを加え攪拌後遠心分離（15000rpm、10 分）し上層を回収した。さらにこれと同量のクロロホルムを添加し、同様に攪拌後遠心分離し（15000rpm、10 分）上澄み液を回収した。これに容積比で 1/10 の 3 M 酢酸ナトリウム溶液[pH5.2] を加え、さらに容積比で 2.5 倍量のエタノールを添加した後、-80°C で 30 分インキュベートしてこれを遠心分離（15000rpm、15 分）で沈澱を回収した。これに -20°C で冷却した特級エタノール（70%）で沈澱を洗浄し、沈澱を再回収した。これを減圧乾燥した後に TE 緩衝液に溶解し染色体 DNA 試料とした。

PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法による遺伝子の増幅

5'側、3'側双方ともプライマー濃度を最終 1 μ M とし、rTaq（TaKaRa 社）に添付される試薬を指示に従い、PCR チューブに添加し、全量が 50 μ l になるように滅菌ミリ Q 水で調節した。サーマルサイクラーにより反応させた。反応サイクルは(95°C 10 秒、X（任意）°C 10 秒、72°C 30 秒)を 1 サイクルとし、

これを35サイクル繰り返した。

PCR産物のアガロースゲル電気泳動

泳動緩衝液は1×TAEを用い、アガロース（Agar S 和光純薬）は目的に応じて濃度を調節して使用した。上記の緩衝液にアガロースを加えた後、加熱により溶解させ臭化エチジウムを1μg/mlになるよう添加した。これを放冷して固めたものを泳動用のゲルとした。サンプルは6×ローディング緩衝液とTAE緩衝液に混合し、ゲル穴に供した。電気泳動の電圧は100Vで行った。

アガロースゲルからのPCR産物の回収

泳動後のゲルを紫外線照射下において目的のバンドを確認しゲルをスパーテルの背で切り出した。その後これをQIAquick Gel Extraction Kit（Qiagen社）を使用し、メーカーの指示に従いPCR産物を回収した。

PCR断片のTAクローニング

TAクローニングするためにTA Cloning Kit（Invitrogen社）を用いた。回収したPCR産物と、キットに添付されているTAベクター（pCR2.1）の割合は濃度比で1:1とした。さらに添付されている緩衝液、T4リガーゼをメーカーの指示に従い調製し、14℃で一晩インキュベートした。形質転換にはこの反応液2μlをキット付属のコンピタントセル（One shot competent cell kit INVα株）もしくは大腸菌JM109株のコンピタンとセルに混ぜ、氷上で30分インキュベートし、42℃で30秒間処理した後に再び氷上において冷却した。その後SOC培地を200μl加え、37℃でこれを1時間振とう培養をした。それを5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド(X-gal)とアンピシリンを50μg/ml含むLB培地のプレートに培養液を塗布して37℃で一晩インキュベートした。

プラスミド抽出

目的のプラスミドを保有する大腸菌株をアンピシリン ($50 \mu\text{g/ml}$) を含む LB 液体培地で一晚 37°C にて培養した。この培養液を適当な容器に移し菌体と培養液に遠心分離した (12000rpm 、1 分間)。この菌体部分に、 $100 \mu\text{l}$ の Solution 1 を加え、菌体ペレットを懸濁した。次に Solution 2 を $200 \mu\text{l}$ 加え、懸濁した菌体の溶菌を促した。次に $150 \mu\text{l}$ の Solution 3 を加え、析出物と上澄みを遠心分離させた (15000rpm 、5 分間)。そこから上澄み液を別の容器に移し、上澄みの 2.5 倍量特級エタノール (99.5%) を加えこれをさらに遠心分離した (15000rpm 、15 分間)。この後上澄み液を除去し、減圧乾燥機にて乾燥し、エタノールが完全に揮発したことを確認した。

乾燥した析出物に $200 \mu\text{l}$ の TE 緩衝液を加え溶解させた、さらに $1 \mu\text{l}$ の RNase(和光純薬)を添加し、 50°C で 30 分間インキュベートした。これに 0.1M Tris-HCl [pH8.0]に飽和させたフェノールを $200 \mu\text{l}$ 加え懸濁した。これを遠心分離し (15000rpm 、1 分間)、上層を別の容器に移し替えた。続いて上層と等量のクロロホルムを添加して懸濁した。これをさらに遠心分離した (15000rpm 、1 分間)。再び上層を別の容器に移し替え、上層の体積の 10 分の 1 量にあたる 3M 酢酸ナトリウム [pH5.2]を加えさらに 2.5 倍量の特級エタノールを加えよく混合した。この混合液を遠心分離した (15000rpm 、15 分間)。上層を取り除いた後、70%に希釈し、 -20°C に冷却した特級エタノールをこれに適量加え沈殿を洗浄した。エタノールを吸引除去した後、減圧乾燥機にて完全にエタノールを揮発させ、TE 緩衝液に溶解したものを精製プラスミドとした。

塩基配列の決定

鋳型となる DNA サンプルを PCR チューブにとり、 $1 \mu\text{M}$ シークエンス用プライマーを $4 \mu\text{l}$ 、DNA シークエンスキットプレミックス (Amersham

Pharmacia Biotech 社 DYEnamic™ ET terminator kit Cycle Sequencing kit) を 8 μ l 加え、全体量が 20 μ l になるようミリ Q 水で調節した。サーマルサイクラーを用い、(96°C 20 秒、50°C 15 秒、60°C 1 分) を 1 サイクルとし、これを 3 5 回繰り返し反応させた。反応後直ちに反応液に 3 M 酢酸ナトリウムを 2 μ l、エタノール 80 μ l を加え攪拌し、遠心分離し (15000rpm、15 分)、DNA を沈澱させた。上澄み液を除き、沈澱に対して 70% 冷却エタノールを 200 μ l 加え再度速やかに上澄み液を除去し、減圧乾燥した。その沈澱に対して脱イオン化ホルムアミドを 20 μ l 加え十分に溶解し、95°C で 1 分間インキュベートした。その後直ちに氷中で冷却し、この溶液を DNA シークエンサー (ABI3100) で解析し、プラスミド DNA の塩基配列を確認した。

制限酵素処理

目的断片をもつプラスミド DNA と、該当する制限酵素を用いた。プラスミド DNA 水溶液 4 μ l、制限酵素緩衝液 1 μ l、制限酵素 1 μ l、ミリ Q 水 4 μ l をそれぞれ混合し 10 μ l とし、37°C で一時間インキュベートした。複数の制限酵素サイトを処理しなければならない場合は、制限酵素メーカーの指示書に従い、加える制限酵素緩衝液の種類を変更し、2 種類の制限酵素を混合したもので処理した。

ライゲーション

連結させたいサンプルを混合し、T4 リガーゼ (Invitrogen 社) を用いて 22°C で一晩インキュベートし反応させた。

タンパク質精製

タンパク質発現を確認したコロニーを、アンピシリンを含む (50 μ l/ml) LB

液体培地に植菌し、37℃にインキュベートしながら一晩培養したものを前培養液とした。前培養液をアンピシリンが含まれる(50 μ l/ml) 1 l の LB 液体培地に 200 μ l 添加し、波長 600nm における吸光度 O.D が 0.5 程度になった時、IPTG を (50 μ l/ml) になるよう添加し、37℃でインキュベートしながら 3 時間培養した。

培養液を遠心分離し(8000rpm、5 分間)上澄みと菌体に分離した。この菌体に超音波破碎液を 20ml 加え、超音波破碎機にて 15 分間、氷上で冷却しながら菌体の破碎を行った(Astrason W-380 Heat Systems-Ultrasonics を用い Output レベル 5、1 秒間隔に設定)。これをさらに遠心分離し(15000rpm、30 分間)上澄み液を菌体破碎液とした。これに Ni-NTA アガロースレジン(Qiagen 社)を培養液量に対して 1/1000 量添加し、氷上で冷却しながら 1 時間振とうした。10 分ほど氷上で放置し、沈殿してきた Ni-NTA アガロースレジンを残し上澄みを除去した。これに Ni-NTA アガロースレジン洗浄液を 10ml 加えよく混合した後、さらに 10 分氷上で放置し、沈殿を残して上澄みを除去した。これを計 3 回繰り返した。洗浄液をよく除去した沈殿に、タンパク質溶出液を 1ml 加えよく混合し、この上澄み液を得た。これを透析膜(三光純薬)に移し、1 l の蒸留水で透析した。蒸留水は 2 時間に一度、2 回新しいものに交換した。最後に 10mM リン酸ナトリウム緩衝液で 4℃にて一晩インキュベートしながら透析した。この作業を経たサンプルを精製タンパク質とした。

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

Laemmli らの方法(22)に従って行った。分離ゲルの作成は 30%のアクリルアミドを用いて終濃度が 12.5%になるように蒸留水と分離ゲル緩衝液を加えた。これに TEMED を分離ゲル 5ml 中 8 μ l、10%APS を 21 μ l 加え、よく攪拌したものをゲル作成用のガラス板に注ぎ込み、濃縮ゲルとの境界を水平にするため

にその上に蒸留水を適量注いだ。これがゲル化したあと、蒸留水を取り除き、濃縮ゲルを注いだ。濃縮ゲルは、30%アクリルアミド溶液を用いて終濃度が4.5%となるように蒸留水と濃縮ゲル緩衝液を加えた。濃縮ゲル 1.68ml 中、TEMED を $5\ \mu\text{l}$ 、10%APS を $10\ \mu\text{l}$ 加え、よく攪拌したものである。このあとウェル作成のためのコームをガラス板の間に挿入し、完全にゲル化したものを SDS-PAGE 用ゲルとした。これを電気泳動装置 (Compact PAGE AE7300, ATTO 社) に固定し、泳動用緩衝液で満たした。目的のタンパク質サンプルはサンプル用緩衝液を加え、沸騰水で5分インキュベートしたものを使用した。このサンプルをウェルに供し、電圧 100V で電気泳動した。SDS-PAGE を行う際のタンパク質マーカーは LMW Calibration Kit Protein Standard (Pharmacia Biotec 社) を利用した。

電気泳動後はクマシー染色液 (nacalai tesque 社 Rapid stain CBB kit) で十分染色した後、蒸留水で洗浄しバンドの検出を行った。

タンパク質の濃度測定

タンパク質濃度の測定は紫外線吸光を示すタンパク質中に含まれるアミノ酸基、トリプトファン、チロシン、システインの数の合計を利用して求めた (23)。

まず、タンパク質溶液における 280nm における吸光度を測定した。

さらに次の式にそれぞれのタンパク質に含まれる該当アミノ酸基数を当てはめた。

$$\varepsilon = \text{トリプトファン基数} \times 5550 + \text{チロシン基数} \times 1340 + \text{システイン基数} \times 150$$

※ ε は分子吸光係数

また、塩基配列から推定されるアミノ酸基数の合計からそれぞれタンパク質全

体の相対分子量 (Da) を求めた。

実際のタンパク質濃度は 280nm における吸光度の値を吸光係数で除した値に Da 値の積を与える式より求めることが出来る。つまり

$$(A_{280}/\epsilon) \times \text{Da 値} = X \text{ (mg/ml)} \quad \text{※X は目的のタンパク質濃度}$$

の式が成り立つ。

測定により得られた吸光度値と、それぞれの塩基配列から推定される該当アミノ酸基数、分子量を算出し、以上の式に当てはめて計算したものをタンパク質濃度として利用した。

3 節 結果

R. albus 染色体 DNA をテンプレートとして PCR 法により目的となる DNA 断片を増幅した。PCR に用いるために設計したプライマー配列は図 1 に示す。

増幅された断片はアガロースゲル電気泳動によって確認した。

RaCBM4-1、*RaCBM4-2*、*RaCBM4* をコードしている遺伝子の塩基配列はそれぞれ 486bp、483bp、957bp（プライマー領域を含む）であり、それに近似するサイズの増幅断片を単一のバンドとして確認することが出来た。（図 2）

確認後直ちに、増幅断片と pCR2.1 ベクターとをリガーゼを使用して連結した。

大腸菌 JM109 株のコンピタントセルをそのベクターを用いて形質転換した。形質転換後の菌株を含む SOC 培地を LB 寒天培地（X-gal、アンピシリンを含む）に塗布し 37°C で一晩インキュベートした。白色のコロニーをいくつか選択し、コロニー PCR 法により目的の断片を含むコロニーをさらに選択した。液体 LB 培地に植菌し 37°C で一晩培養した培養液からプラスミドを抽出、精製した。

そのプラスミドよりシーケンス反応を経て、塩基配列を決定し、目的の制限酵素サイトが挿入されているか、内部塩基配列が NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) のデータベースに登録されている *cel5D* の塩基配列と相違ない事を確認した。

確認した後、プラスミドを制限酵素 *KpnI* と *BamHI* で処理した。アガロースゲル電気泳動で確認後、アガロースゲルより目的サイズの DNA 断片をスパーテルで切り出し、ゲル抽出キットを用いて DNA 断片を回収した。回収したサンプルは再度アガロースゲル電気泳動にて確認した。

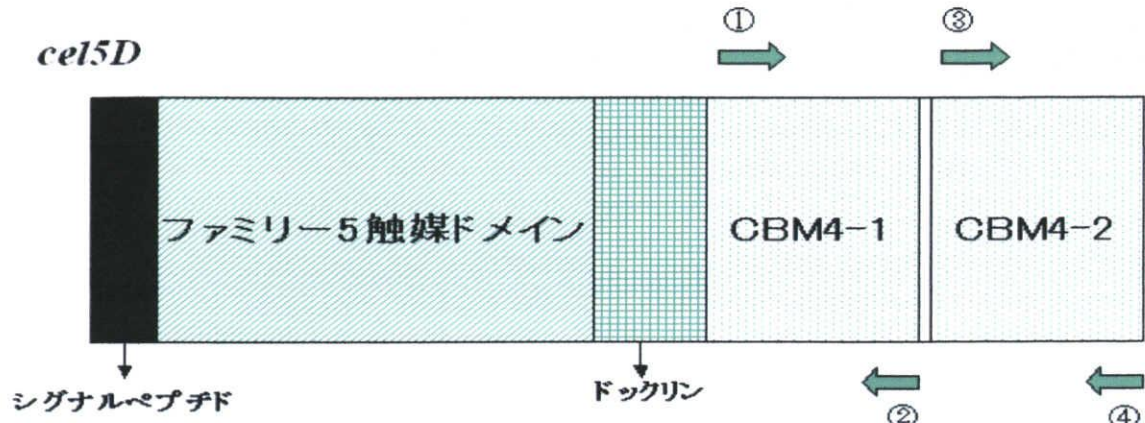
同様に処理したタンパク質発現用ベクターである pQE-30 (Qiagen 社) と、回収した断片を混合し、リガーゼを用いて 22°C で一晩反応させそれぞれを連結させた。ライゲーションサンプルは大腸菌 JM109 株の形質転換へと供した。形質転換後の大腸菌を含む SOC 培地を、アンピシリンを含む LB 寒天プレート培地に塗布し、37°C で一晩インキュベートした。現れたコロニーをいくつか選択し、コロニー PCR

法により、インサートを持つコロニーを選択した。選択したコロニーを LB 液体培地（アンピシリン、IPTG 含む）に植菌し 37℃で一晩培養した。培養液 40 μ l をチューブに移し、遠心分離し（15000rpm、1 分間）、上澄みを取り除いた。そこへ SDS-PAGE 用ローディングバッファーを 10 μ l 添加し、適度に攪拌した後に沸騰した湯で 5 分間サンプルを煮沸し、これを SDS-PAGE サンプルとした。12.5%のアクリルアミドゲルにてサンプルを電気泳動し、発現を確認した（図 3）。発現が確認できたコロニーを、再度 LB 液体培地にて同様に培養し、前培養液とした。1 l の LB 液体培地が満たされた三角フラスコに前培養液を 200 μ l 添加し、37℃にインキュベートしながら波長 600nm における吸光度が 0.5 になるまで培養し、IPTG を添加し 3 時間培養した。その培養液に遠心分離し、菌体と培地に分離した後、菌体に超音波破碎液を適量加え、超音波破碎機によって菌体を破碎した。菌体破碎液は遠心分離し（15000rpm で 30 分間）、目的タンパク質を含む破碎液を得た。これに Ni-NTA アガロースレジン（Qiagen 社）を加え、吸着させた後、洗浄液で 3 回洗浄した後、溶出液を加えてタンパク質を溶出させた。溶出液は透析膜に移して透析し、精製タンパク質とした。精製したタンパク質は SDS-PAGE によって確認した（図 4）。さらに、タンパク質の濃度を計算するために吸光計による測定を行った。精製したタンパク質を 30 倍に希釈した際の吸光度はそれぞれ *RaCBM4-1* 0.624、*RaCBM4-2* 0.242、*RaCBM4* 0.514 であり、それぞれのタンパク質の分子量は塩基配列より *CBM4-1* 17510Da、*CBM4-2* 16743.5Da、*CBM4* 34235.8Da であった。さらにそれぞれの吸光係数 ϵ は *RaCBM4-1* 34260、*RaCBM4-2* 21720、*RaCBM4* 55980、となった。これらの数値を先に上げた計算式（19-20 ページ）により算出したところそれぞれのタンパク質濃度は、*RaCBM4-1* 9.56(mg/ml)、*RaCBM4-2* 5.62(mg/ml)、*RaCBM4* 9.44(mg/ml)となった。

4 節 考察

田口ら (21) がクローニングに成功した *cel5D* 遺伝子の報告から、図 1 に示した位置にプライマーを設計した。利用した制限酵素サイトは、*Kpn* I、*Bam* H I である。*cel5D* 内の目的部位には *Eco*RV、*Eco*R I、*Hind*III、*Pst* I といった制限酵素サイトがあったため、発現用ベクター pQE-30 (Qiagen 社) のマルチクローニングサイトに利用できる *Kpn* I、*Bam* H I をプライマーに組み込んだ。TA クローニングした菌株プラスミドをシーケンスにより塩基配列を決定し、報告にある配列と差異が無いことを確認し、pQE-30 に組み込んだ。それぞれの遺伝子を組み込んだ pQE-30 を用いて大腸菌 JM109 株の形質転換を行い、発現を確認したが、培養時に IPTG 添加の操作を行わなくても、IPTG 添加時とほぼ同程度のタンパク質の発現が確認できた。しかし、精製時には必ず IPTG を添加するようにしたが、特に問題は見られなかった。

精製後のタンパク質濃度だが、*RaCBM4-1* 9.56(mg/ml)、*RaCBM4-2* 5.62(mg/ml)、*RaCBM4* 9.44(mg/ml)と一定した精製で安定した量を得ることが出来た。CBM4-2 の精製量が他の 2 つと比べて若干低いのは、その菌株の生育だけが非常に遅く、他に比べて菌量が確保出来なかった為と考えることができる。また超音波破碎後の破碎菌体の沈殿に *RaCBM4-2* と思われるタンパク質が SDS-PAGE にて確認できた為、*RaCBM4-2* は幾らかの不溶性を示すと考えられる。



設計したプライマー

① *Ra*CBM4-1

GGATCCCCTGATCCTGCATCTGACCCG

*Bam*H I サイト

② *Ra*CBM4-2

GGTACCTGAGGACGAAGATCCTCCGCC

*Kpn*I サイト

③ *Ra*CBM4-3

GGATCCTCATCTTCTTCGACTCAGTCCGGAA

*Bam*H I サイト

④ *Ra*CBM4-4

GGTACCTCAGGAGATCTTTTGGATGACCA

*Kpn*I サイト

図 1. Cel5D 及びプライマー配列とその位置

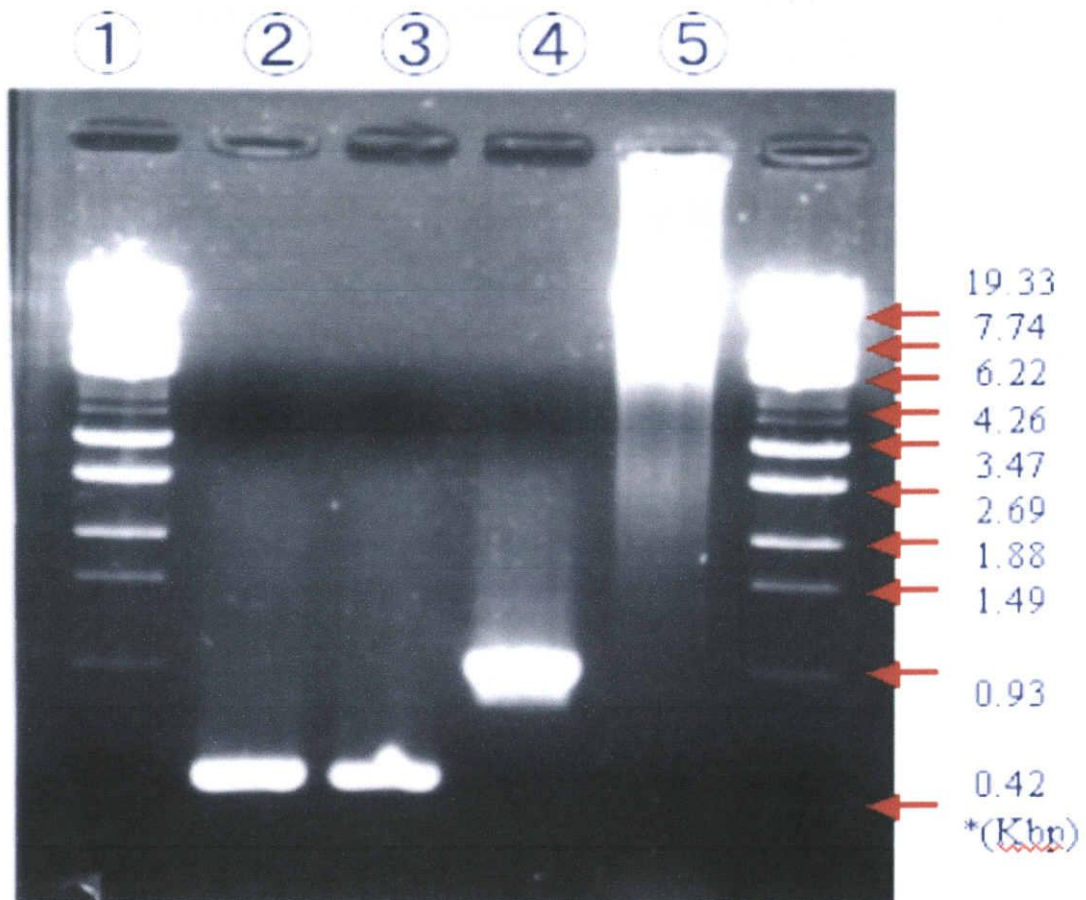


図 2. PCR により増幅 DNA 断片および *R.albus* 染色体 DNA の電気泳動写真
 0.8%アガロースゲル
 ①マーカー 6 ② *RaCBM4-1* ③ *RaCBM4-2* ④ *RaCBM4* ⑤ *R.albus* 染色体
 DNA

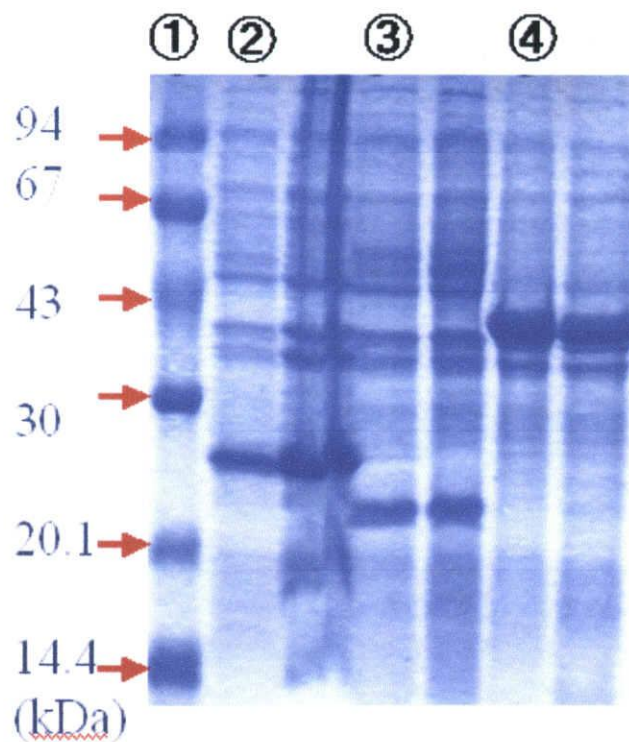


図 3. 大腸菌 JM109 株で発現した各タンパク質の SDS-PAGE 電気泳動図

※12.5%ポリアクリルアミドゲル

①分子量マーカー ② *RaCBM4-1* が発現している大腸菌全タンパク質 (以下同)

③ *RaCBM4-2* ④ *RaCBM4*

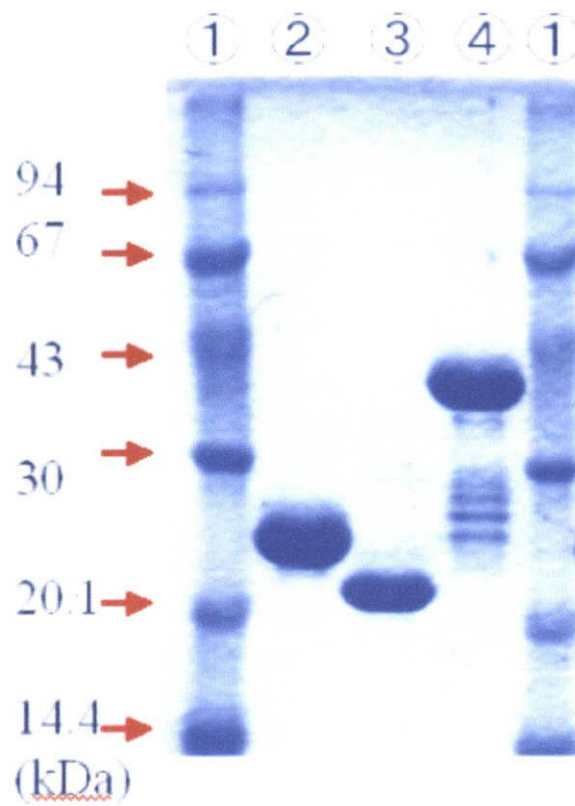


図 4. 精製した各タンパク質の SDS-PAGE 電気泳動図

※12.5%ポリアクリルアミドゲル

① 分子量マーカー ① *RaCBM4-1* ② *RaCBM4-2* ③ *RaCBM4*

3 章 精製タンパク質の結合特性の測定

3-1 アフィニティー電気泳動による測定

1 節 目的

前章では目的とするそれぞれの形状の *RaCBM* 4 群を精製することが出来た。本章では精製した各タンパク質を用いて、それぞれのタンパク質がどのような基質に結合するかといった特徴や、各タンパク質の間で結合様式に差が現れるかを明らかにするために、その方法の一つとしてアフィニティー電気泳動による測定を試みた。この電気泳動方法は、タンパク質を変性させることなくその活性を保ったまま挙動を観察出来ることが一般的に知られている。本実験では電気泳動に用いるゲル中に各種の基質を混合させる手法をとった。電気泳動中に CBM がゲル内の基質と結合した場合、タンパク質の移動に影響を及ぼすと考えられる。その影響により精製タンパク質の特徴を決定する目的で実験を行った。

2 節 実験と方法

添加する基質の調製

カラス麦由来キシラン（以下オートスペルトキシラン）、シラカバ由来キシラン（以下バーチウッドキシラン）、リケナン、ラミナリン、マンナン、を体積/重量比で 1% になるよう、ミリ Q 水で溶解あるいは懸濁させた。さらに 3% BMC も用意した。ただし、オートスペルトキシラン、バーチウッドキシラン、リケナンは不溶性であるため、なるべく微細化するために超音波破碎機を用いてそれぞれ 1 分間、処理をした。ただしリケナンは、熱を加えることにより完全に溶解することが出来るため不溶性の状態と、溶解した状態のものを用意した。

BMC の作成方法は下記に示した。

ボールミルに 30 g の KC フロック（日本製紙）と蒸留水 700ml を加えて専用容器封入し、回転装置を用いて 3 日間回転させ、KC フロックを微細化した。試

料を取り出した後、ボールミルを 300ml の蒸留水で洗浄し、これを先ほどの試料に加えた。これを 3 % ボールミルセルロース (BMC) として利用した。

アフィニティー電気泳動

アクリルアミド濃度が 12.5%になるよう、30%アクリルアミド、ゲル緩衝液を混合し、さらにゲル中に基質が 0.05%含まれるよう添加したのち蒸留水を用いて調節した。これに TEMED をこの溶液 5ml 中 8 μ l の割合で添加し、さらに 10%APS 溶液を 21 μ l 添加してよく混合して、ゲル作成機のガラス板の間に注ぎ、ゲル穴を作るためのコームを差し込んでゲル化させたものを使用した。

電気泳動の作業以降は、2章2節の操作と同じである。マーカはウシ血清アルブミン (SIGMA 社) を使用した。

3 節 結果

オートスペルトキシラン、バーチウッドキシラン、リケナン、溶解リケナン、ラミナリン、マンナンのうち、結合が確認できたのは、リケナン、熱溶解させたリケナン、マンナンであった。ここ泳動図では **RaCBM4** が、スミア状に引っ張られている現象が確認できた。リケナンは、熱を加えると完全に溶解するので、その状態でアフィニティー電気泳動した。これをみると、不溶性の状態のリケナンを混合した時よりも **RaCBM4** 群は強く結合しているように見えた。さらに、**RaCBM-4-1**、**RaCBM4-2** においても移動度が遅くなっていることが確認できた為、結合が起こったと考えられる (図 5)。

他の基質とタンパク質の組み合わせは殆どコントロールと差が見られなかったなのでここでは示さない。ただし BMC を混合したゲルにおいてはそれぞれのタンパク質の移動度がいくらか早くなった (図 6)。

4 節 考察

リケナンはアイルランドコケなどの地衣類に含まれる熱水に可溶、冷水に不溶の β -グルカンであり、D-グルコース残基が β -1,4、 β -1,3結合で直鎖状の構造をなしていると考えられている基質である。ラミナリンは海藻類に含まれる貯蔵多糖で、殆どがD-グルコースから出来ており、小単位では β -1,3結合、その間に β -1,6結合などで主鎖、側鎖などに枝分かれし、還元末端にマンニトールを含むと考えられている。マンナンは、 β -1,4結合したマンノピラノースが直鎖を成していると考えられる。キシランは、陸上植物のヘミセルロースに代表される多糖であり、 β -1,4結合 β -1,3結合のD-キシロースからなると考えられている。今回利用したバーチウッドキシランが95%のD-キシロースを含み、オートスペルトキシランは5%のD-グルコース、アラビノースを含んでいる。CMCはパルプをアルカリ処理し、モノクロル酢酸を反応させた水溶性のセルロースである。

今回特に目立った結合が確認できた基質はリケナンのみであった。CBMファミリー4は、不溶性の基質や、非結晶性のセルロースに結合するtypeBと呼ばれるCBMに分類されており、アフィニティー電気泳動による実験では、キシランや、 β -グルカン、リケナン、ラミナリンなどに結合するという報告がある。本件ではリケナン、マンナンに結合が見られた事からその点について類似が確認できた。また、***RaCBM4-1***、***RaCBM4-2***、***RaCBM4***における結合力の違いについて、アフィニティー電気泳動における移動度が純粋に結合強度を反映できるとするならば、アフィニティー電気泳動(図5)を見て、***RaCBM4-1***、***RaCBM4-2***は同程度の弱い結合。***RaCBM4***が強い結合をしている事が見ることが出来る。また、熱溶解させたリケナンを含むポリアクリルアミドゲルにおけるアフィニティー電気泳動では、さらにはっきりとした強い結合が見られる。リケナンが可溶化する事により、ゲル中におけるリケナンの分布や構造変化がCBMとの結合をより強めたのではないかと考えられる。

RaCBM 4 は *RaCBM4-1* と *RaCBM4-2* が直列した構造の CBM をもつが、個々の結合よりも直列した状態での結合が強く見られたため、この実験の結果では CBM ファミリー 4 が 2 つ並んで存在することによって、より強い結合力を得ている可能性が確認できた。

また BMC を基質として添加したアフィニティー電気泳動 (図 6) ではタンパク質の移動度がコントロールよりも増加している事が確認できた。BMC を遠心分離し (15000rpm、5 分)、上澄み液をゲルに加えた実験では CBM の移動が早くなる現象は確認できなかった。BMC は比較的大きな分子量の多糖から小分子の糖鎖などを含むと考えられる。この事から、15000rpm の遠心分離では沈殿しない程度の糖鎖の影響あるいは、BMC 溶液中に含まれる不純物、イオン等は作用していないのではないかと考えられる。糖鎖と結合し、構造変化を起こしたか、あるいは糖鎖と結合することにより CBM の電荷が変化し、電気泳動に変化を与えたのではないかと考えられ興味深い。

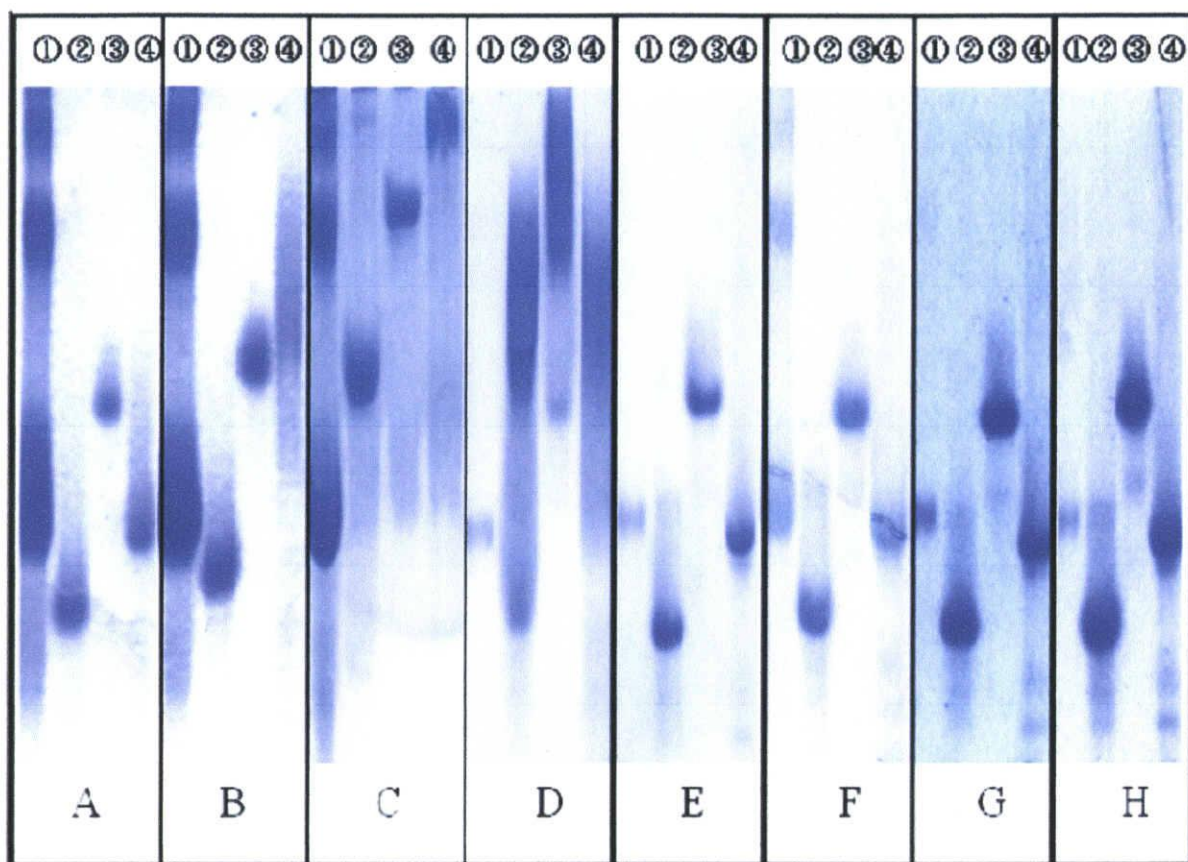


図5. 各基質を含むアフィニティー電気泳動による結合確認

①ウシ血清アルブミン ② *RaCBM4-1* ③ *RaCBM4-2* ④ *RaCBM4*

A コントロール B リケナン C 熱処理リケナン
 D マンナン E CMC F オートスペルトキシラン
 G バーチウッドキシラン H ラミナリン

※各基質 0.5% を含む 12.5% ポリアクリルアミドゲル

① ② ③ ④

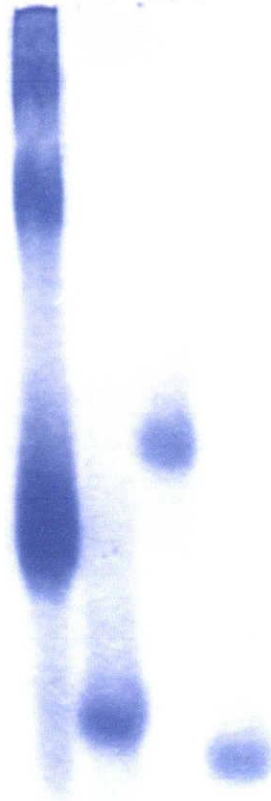


図 6 BMC を含んだアクリルアミドゲル・アフィニティー電気泳動図

※BMC0.5%を含む 12.5%ポリアクリルアミドゲル

ウシ血清アルブミンマーカー ② *RaCBM4-1* ③ *RaCBM4-2* ④ *RaCBM4*

3-2 SDS-PAGE を用いた結合部位の比較

1 節 目的

RaCBM4-1、**RaCBM4-2**、**RaCBM4**において、それぞれがリケナンに対して結合する部位に違いがあるかを知るために、実験を行った。各 CBM 群が基質に対して結合できる部位数には限界がある事を利用した。それぞれのタンパク質を順番に飽和させていき、基質に結合した CBM を確認する事によって、**RaCBM**群の特性を確かめた。

2 節 実験方法

RaCBM4-1、**RaCBM4-2**、**RaCBM4**の精製たんぱくと1%リケナン懸濁液を用いた。1%のリケナン懸濁液5 μ l(リケナン50 μ g)に対して、**RaCBM**溶液(500 μ g/ml)を100 μ l加え、よく攪拌し、室温で3分間反応させた。これを遠心分離し(15000rpm、5分)沈殿をKPB溶液でよく洗浄し、さらに次の**RaCBM**溶液を同量加え、同様に操作をし、遠心分離、洗浄し、さらに**RaCBM**溶液を加え同様の操作を行った。最後にKPBで2回洗浄したものを、12.5%のSDS-PAGEゲルで電気泳動した。尚、タンパク質を飽和させていく順番で違いが出る可能性があったので、**RaCBM4-1**、**RaCBM4-2**、**RaCBM4**から考えられる6通りの順番で以上の実験を行った。

3 節 結果

電気泳動した結果図14のようになった。精製したタンパク質の電気泳動図と比較してそれぞれのタンパク質が**RaCBM4-1**、**RaCBM4-2**、**RaCBM4**、である事が確認できる。全ての組み合わせにおいて、3つのバンドが確認できた。飽和順3段階において、最後に添加した**RaCBM**のバンドがそれぞれ濃いように見て取れる。

4 節 考察

RaCBM4-1、*RaCBM4-2*、*RaCBM4* を 3 段階の組み合わせ順序で飽和させたが、該当する分子量の位置にそれぞれの *RaCBM* のバンドを確認できた。このことから、*RaCBM* がそれぞれ、リケナンに対して違う部位に結合している事が確かめられた。ただ *RaCBM* 群は同濃度に調製したが、*RaCBM4-2* の結合が強いように思われた。この事は、3 章－1、3 章－3、3 章－4 それぞれの 3 節の結果からは確かめられなかったが、*RaCBM4-1*、*RaCBM4-2*、*RaCBM4* の 3 種類を反応させている事から、それぞれのタンパク質による相互間の影響があったかもしれない。

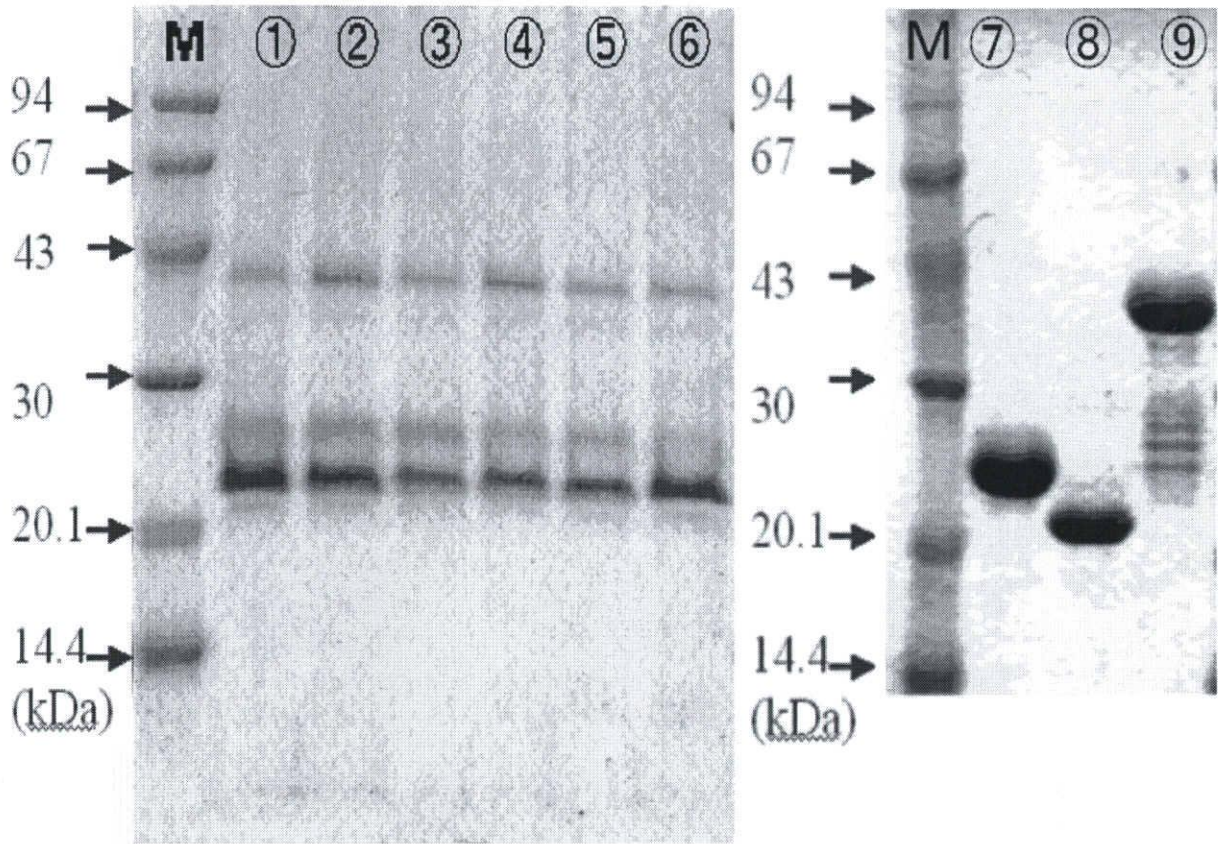


図 14. 各 *RaCBM* を順に飽和した時の SDS-PAGE 電気泳動結果

※12.5%ポリアクリルアミドゲル

M 分子量マーカー

- ①A→C→Bの順に飽和したサンプル ②A→B→Cの順に飽和したサンプル
 ③B→C→Aの順に飽和したサンプル ④B→A→Cの順に飽和したサンプル
 ⑤C→A→Bの順に飽和したサンプル ⑥C→B→Aの順に飽和したサンプル
 ⑦*RaCBM4-1* (A) ⑧*RaCBM4-2* (B) ⑨*RaCBM4* (C)

3-3 遊離タンパク質の吸光度測定による結合力の測定

1 節 目的

前章では、*RaCBM4* がリケナンに結合することが確認できたので、今章ではその結合力を吸光度測定することにより数値化することを目的とした。また、逢坂 (24)、Hachem ら (18) によって報告されるように、イオン、塩類の存在下において CBM の結合力が向上する現象が知られている。そのため塩化カルシウム、塩化ナトリウムを一定量存在させた上での結合力と、存在しない状態での結合力を比較、検討した。

2 節 実験と方法

リケナン懸濁液の調製

波長 280nm においてリケナン懸濁液遠心分離後の上澄み液を測定したところ、それ自身に若干の吸光が認められた。そのため、超音波破碎したリケナンを吸光度が確認できなくなるまで KPБ (20mM) で洗浄した。洗浄済みのリケナンの質量を正しく計測するために、凍結乾燥機を用いて洗浄済みリケナンを完全に乾燥させた上で計量し、KPБ に溶かし、2% のリケナン懸濁液とした。ただし、リケナンは不溶性部分と上澄みに分かれるため、分注する際や結合過程において毎回ボルテックスを用いてよく混濁させた上で正しく計量できるように図った。

結合方法

タンパク質 *RaCBM4-1*、*RaCBM4-2*、*RaCBM4*、基質リケナン、*RaCBM* 群、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、蒸留水、KPБ を測定項目によって混合した。実験ではタンパク質以外の材料を混合した溶液をあらかじめ用意し、目的のタンパク質を添加しボルテックスにより混合した。その後室温で 10 分間基質とタンパク質を結合させ、遠心分離しを (15000rpm、10 分)、不溶性基質を上澄みと

分離した。この上澄み液を吸光度測定サンプルとした。

計算方法について

結合 CBM 濃度を算出するために、総タンパク質濃度 $[P]_t$ から遊離の CBM 濃度 $[P]$ を差し引いた量がセルロースに結合している CBM 濃度 $[PC]$ として次の式に求められる。

$$[PC] = [P]_t - [P] \quad (1)$$

CBM のセルロースへの結合は次のようなラングミュアの吸着等温式で表される。



つまり遊離の CBM 濃度を $[P]$ 、セルロース上のサイトの濃度を $[C]$ 、セルロースに結合した CBM 濃度を $[PC]$ とする (2) 式のような平衡が成り立つ。そこで以下のような結合定数 Ka が求められる。

$$Ka = \frac{k1}{k-1} = \frac{[PC]}{[P][C]} \quad (3)$$

(3) の式において CBM が存在しない場合のセルロース上のサイト濃度、すなわち CBM が結合できる潜在的サイトに CBM が結合した最大結合濃度 $[PC]_{max}$ とすると次の式が成り立つ。

$$[C] = [PC]_{max} - [PC] \quad (4)$$

(4) の式を (3) に代入して $[PC]_{max}$ について解くと次の式が得られる。

$$\frac{1}{[PC]} = \frac{1}{Ka[PC]_{max}} \times \frac{1}{[P]} + \frac{1}{[PC]_{max}} \quad (5)$$

この式からセルロースに結合した CBM 濃度 $[PC]$ と、遊離の CBM 濃度 $[P]$ から最大結合濃度 $[PC]_{max}$ と結合定数 Ka を算出した (25-27)。

3 節 結果

測定から得られたデータを元とした近似直線グラフと、そこから与えられるそれぞれの結合定数 Ka 、最大結合濃度 $[PC]_{max}$ の一覧は（図 7～9、表 1）に示した。

表 1 の様に Ka 値にそれぞれ大きな差は見られず、これは塩化ナトリウム、塩化カルシウムを添加した場合も同様だった。しかし $[PC]_{max}$ の値は塩化ナトリウム、塩化カルシウム添加時で、2～10 倍の増加が見られた。

4 節 考察

結果から **RaCBM** 群の結合量は塩類の影響が大きい事が分かった。このことは塩類の存在により、**RaCBM** 群が結合できる部位が増加したことを示す。ただし、塩化ナトリウム、塩化カルシウム添加においてその間に $[PC]_{max}$ の値が 2 倍程度異なった事から、ナトリウムイオン、カルシウムイオンとしての影響がある可能性もある。考えた影響の一つは、塩類の添加により **RaCBM** における表面電荷が中性化され、**RaCBM** 同士の電氣的反発が緩和された結果、**RaCBM** がより密にリケナンに対して結合する事が出来たとするものである。この概念は塩溶と呼ばれ、その静電遮断力は様々なイオン類により異なる事が知られており、そういった違いが今回の結果に現れたのではないかと推察した。もう一つは塩類添加による親水性の向上による影響である。これによりリケナンと溶質間で水和が進み、リケナンの繊維構造が緩まり結果 **RaCBM** の結合部位が増えたのではないかと考えた。

Ka 値については **RaCBM** 群の間、塩類の添加によって大きな差異が見られなかった事から、塩類に左右されず、それぞれが同等の結合力を持つことを示している。

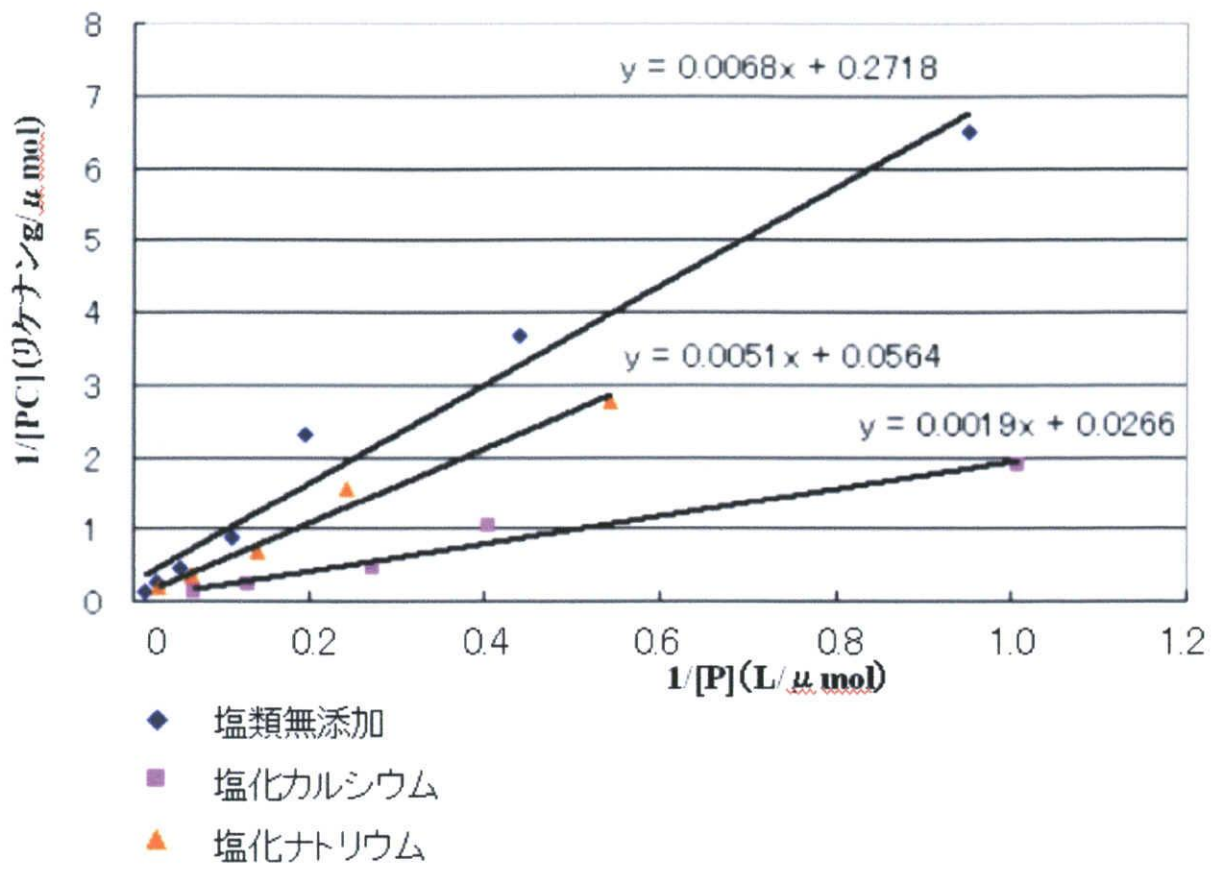


図 7. *RaCBM 4-1* のリケナンへの結合における動学的性質

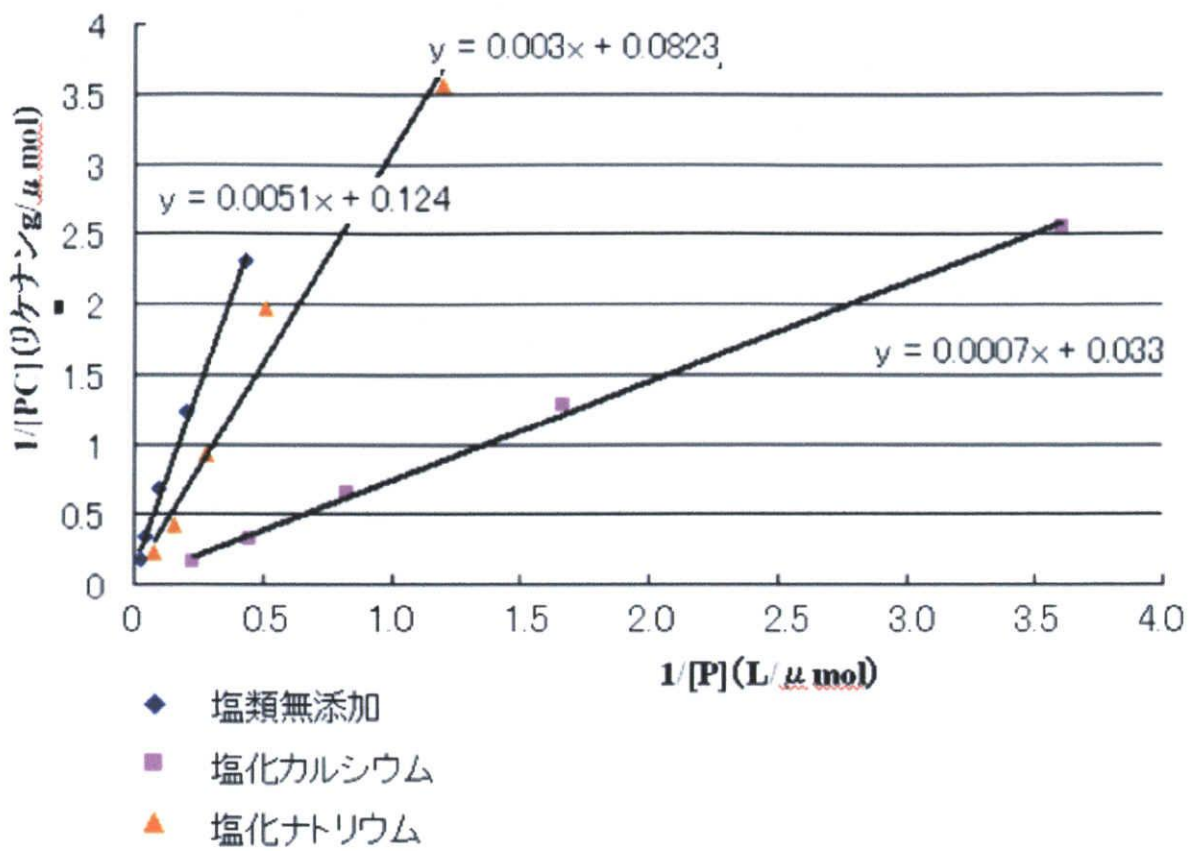


図 8. *RaCBM 4-2* のリケナンへの結合における動力学的性質

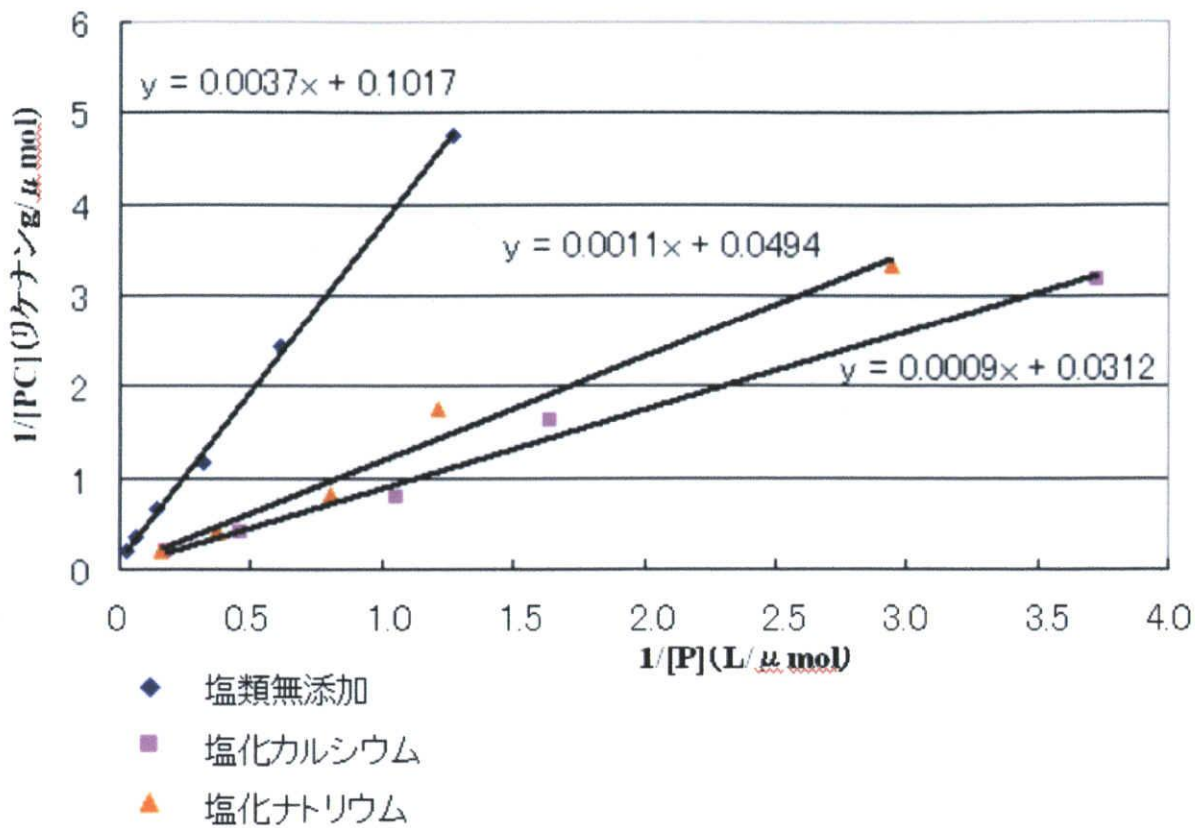


図 9. *RaCBM 4-2* のリケナンへの結合における動力的性質

表 1 *RaCBM* 群のリケナンに対する結合定数と最大結合量

CBM	近似式	結合定数 $Ka (M^{-1})$	最大結合濃度[PC]max (μ mol/リケナン)	添加塩の有無
<i>RaCBM</i> -1	$y = 0.0063x + 0.2718$	4.0×10^4	3.7	
	$y = 0.0051x + 0.0564$	1.1×10^4	177	塩化ナトリウム
	$y = 0.0013x + 0.0266$	1.4×10^4	385	塩化カルシウム
<i>RaCBM</i> -2	$y = 0.0051x + 0.124$	2.4×10^4	81	
	$y = 0.0030x + 0.0823$	2.7×10^4	122	塩化ナトリウム
	$y = 0.0007x + 0.033$	4.7×10^4	303	塩化カルシウム
<i>RaCBM</i>	$y = 0.0037x + 0.1017$	2.7×10^4	98	
	$y = 0.0011x + 0.0494$	4.5×10^4	202	塩化ナトリウム
	$y = 0.0009x + 0.0312$	3.0×10^4	321	塩化カルシウム

3-4 マクロアレイ法による結合基質の比較

1節 目的

様々な種類の結合確認にマクロアレイを用いる方法は一般的によく用いられている。McCartney ら (28) は、基質水溶あるいは懸濁液をニトロセルロース膜にスポットしたものをを用いて CBM と結合させ、抗ヒスチジンタグタグ HRP (ホースラディッシュペルオキシダーゼ) を用いて CBM の結合を視覚化した実験を行った。この実験の利点は一度に多くの基質との結合を比較観察できる事と、スポットする基質の量を変化させる事によりある程度の結合力を評価することが出来る点にある。3章-1 ではアフィニティー電気泳動にて結合する基質を選別したが、より詳細な CBM の性質を評価する上で、このマクロアレイを利用した実験を行った。

2節 実験方法

基質の調製

基質はリケナン、マンナン、ペクチン、ラミナリン、バーチウッドキシラン、オートスペルトキシラン、CMC を用意した。各基質を蒸留水で溶解させた。不溶性を示す基質については超音波破碎機により可能な限り微細化したものを利用した。それぞれの基質を $1 \mu\text{l}$ に対して $10 \mu\text{g}$ 、 $1 \mu\text{g}$ 、 $0.2 \mu\text{g}$ 、 $0.04 \mu\text{g}$ 、 8ng 、 1.6ng が含まれるよう、6段階に希釈したものを用意した。不溶性、沈殿性を示す基質については分注作業中常に攪拌した状態から計量した。

マクロアレイシートの作成

シートにはニトロセルロース膜 (Millipore 社) を使用した。これに市販のインクジェットプリンターを用いて 5mm 角の方眼目を印字した。これに希釈した基質をそれぞれ升目と希釈倍率、基質の種類にそって $1 \mu\text{l}$ づつスポットした。

このときも不溶性、沈殿性を示す基質については常に攪拌した状態で計量した。全てをスポットした後、室温で 30 分乾燥させたものをマクロアレイシートとした。

CBM の結合、および抗体反応による検出

マクロアレイシートを TBS 緩衝液に浸し、10 分間洗浄した。さらに TBS 緩衝液を入れ替え、再度 10 分間洗浄した。さらにマクロアレイシートをブロッキング緩衝液に浸し、室温で 1 時間インキュベートした。その後シートを TBS-Tween/Triton 緩衝液に移し、10 分間 2 回洗浄し、さらに 10 分間 TBS 緩衝液で洗浄した。精製した CBM タンパク質を PBS にて希釈した反応液にシートを浸し 1 時間、室温でインキュベートした。この反応後、さらに TBS-Tween/Triton 緩衝液で 10 分間、2 回洗浄し、さらに 10 分間 TBS 緩衝液で洗浄した。Anti-His-Conjugate (Qiagen 社) をブロッキング緩衝液で 1000 倍に希釈した抗体反応液に洗浄したシートを浸し、室温で 1 時間インキュベートした。

シートを TBS-Tween/Triton 緩衝液で 10 分間、2 回洗浄した。シートの水気を切り、最後に DAB 染色液を加え発色させた。適度な発色が確認できたら水を加えて発色反応を停止させた。

3 節 結果

まず、それぞれのリケナンの結合状況を見てみると、***RaCBM4-1***、***RaCBM4-2*** において強い結合が確認できたが、***RaCBM4*** においてはとても弱い結合しか確認できていない (図 10~図 13)。また、他にこの実験で結合が確認できた基質は、マンナン、オートスペルトキシラン、バーチウッドキシラン、CMC である。特にオートスペルトキシランは、リケナンと同程度の強いシグナルが観察できた。

CBM 4 は全体的に結合度合いが低めだが、オートスペルトキシランについては他の 2 つに比べ、結合が最も強く確認できた。*RaCBM4-1*、*RaCBM4-2* を比較しても、バーチウッドキシラン等の基質でそれぞれ違いが確認できる。

4 節 考察

アフィニティー電気泳動方では、リケナン、マンナンに結合することが確認できたが、加えて本実験ではあらたにオートスペルトキシラン、バーチウッドキシラン、CMC の 3 つについて結合を確認した。オートスペルトキシランについては、マクロアレイ法の結果、リケナンと同程度の強度で結合した。また特にリケナンに注目すると、アフィニティー電気泳動法では *RaCBM 4* がもっとも強く結合しているよう確認できたが、マクロアレイでは *RaCBM4-1*、*RaCBM4-2* のがリケナンにより強く結合する結果となった。本実験では *RaCBM4-1*、*RaCBM4-2* に比べ、*RaCBM 4* は、オートスペルトキシランを除く基質には全体的に非常に弱い結合を示した。

マクロアレイ法では、精製したタンパク質のもつヒスチジンタグ領域に特異的に結合する HRP 標識抗体を用いて検出する。従って検出されるシグナルは、CBM の結合する分子の量ではなく、分子の数に比例する。すなわち、3 章-3 における $[PC]_{\max}$ の値と比較する事が出来ると考えた。3 章-3 においてリケナンに結合する分子の数は *RaCBM* 間において大きな差が見られなかった。このことかはこのデータ結果と異なった。これについては、*RaCBM* 群において基質との結合の有無及び強度は、対象となる基質の状態に大きく左右されるのではないかと予想した。本実験ではニトロセルロース膜に基質水溶液をしみ込ませ、乾燥させた状態で *RaCBM* 群と反応させた。一方、3 章-3 ではリケナンを水和した状態で反応させた。3 章-1 の実験ではポリアクリルアミドゲル中に、基質を混合している状態であった。それぞれの状態において、各基質がどのような形態

で存在しているか詳細は不明であるが、それぞれの実験方法によって基質の形態に違いが生じ、結合力や特性に差が生じるのではないかと考えた。











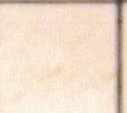



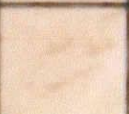







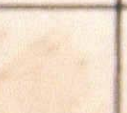



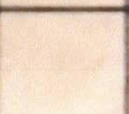

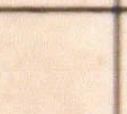




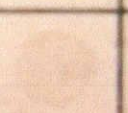
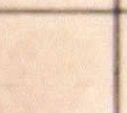

	10 μ g	1 μ g	0.2 μ g	0.04 μ g	8 ng	1.6 ng
リケナン						
ラミナリン						
マンナン						
オートスペルト キシラン						
バーチウッド キシラン						
CMC						

図 10. *RaCBM4-1* のマクロアレイ反応後シート

	10 μ g	1 μ g	0.2 μ g	0.04 μ g	8 ng	1.6 ng
リケナン						
ラミナリン						
マンナン						
オートスペルトキシラン						
バーチウッドキシラン						
CMC						

図 1 1 . *RaCBM4-2* のマクロアレイ反応後シート

	10 μ g	1 μ g	0.2 μ g	0.04 μ g	8 ng	1.6 ng
リケナン						
ラミナリン						
マンナン						
オートスベルト キシラン						
バーチウッド キシラン						
CMC						

図 1 2 . *RaCBM4* のマクロアレイ反応後シート

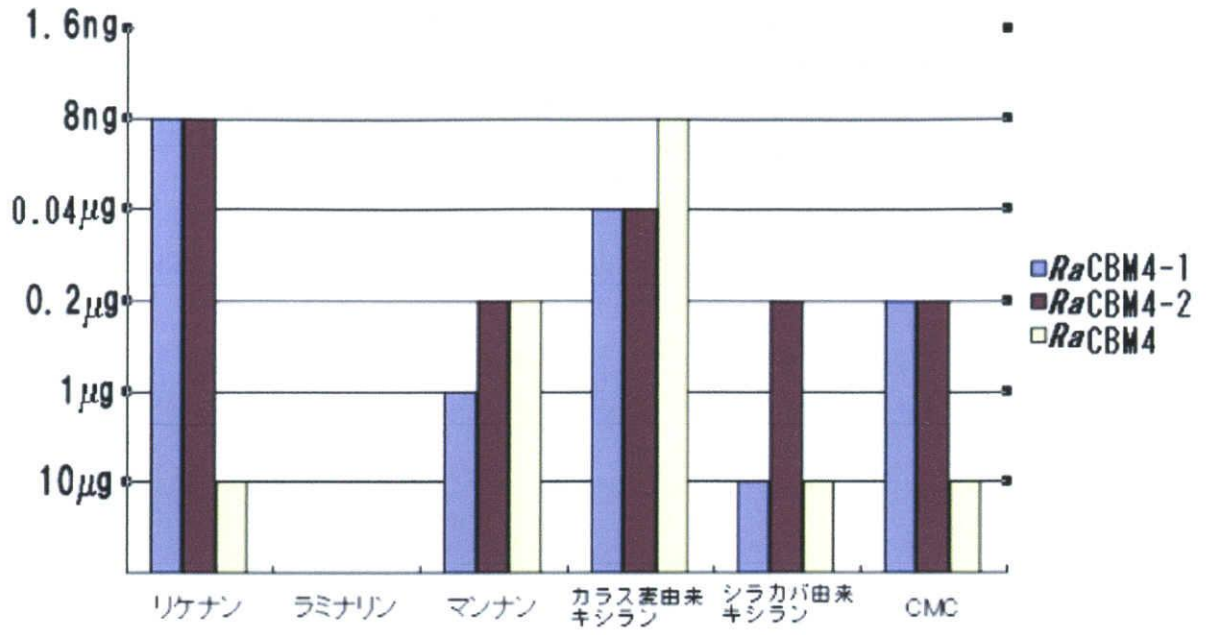


図 1 3. マクロアレイ法による全体の結果

※縦軸の値は、シグナルが確認できた閾値、横軸に基質の種類を並べた

4章 *R.albus*におけるリケナン結合タンパク質の測定とそのプロテインシー クエンス

1節 目的

RaCBM4 群にリケナン結合性が確認できたことから、実際に *R.albus* の菌体外につくられるタンパク質のうち、リケナン結合性をしめすセルラーゼを収集し、それが *RaCBM4* 群に関係するタンパク質であるかどうかを確かめるため以下の実験を行った。

2節 実験方法

リケナン結合性タンパク質の単離

炭素源として BMC を 1% 加えた GS 改変培地において *R.albus* を 5 日間培養し、その培養液を遠心分離 (8000rpm、10 分) した上澄み液を培養濾液とした。全量 100ml の培養濾液対して、0.15 g のリケナンを加え攪拌し、10 分後再度遠心分離 (12000rpm、5 分) し、沈殿と上澄みに分けた。沈殿を KPB で 3 回洗浄、その後凍結乾燥し、SDS-PAGE サンプル緩衝液を 200 μ l 加えて 95 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱したものを SDS-PAGE に供した。

エレクトロトランスブロッティング

12.5% の SDS-PAGE ゲルにサンプルを供し、電気泳動した。このゲル中タンパク質を PVDF 膜に転写するため以下の操作を行った。

PVDF 膜を 100% メタノール液に 20 秒浸し、B 液で 30 分間振とう洗浄した。ろ紙 2 枚を A 液に、1 枚を B 液に、3 枚を C 液に浸した。SDS-PAGE が終了した目的のゲルを B 液に 5 分間浸した。ブロッティングマシーン (AE-7500P コンパクトブロット) の陽極に、A 液に浸したろ紙を 2 枚重ねて置き、B 液に浸したろ紙を 1 枚重ねた。その上に PVDF 膜を重ね、その上にゲルを乗せた。その上にさらに

C 液に浸したろ紙を 3 枚重ねた。ゲル、ろ紙、PVDF 膜を重ねる操作は、ろ紙がずれず、気泡が入らないように注意して行った。その上に陽極と電源ユニットを重ね、100mA で 60 分間通電した。通電が終了した PVDF 膜を、クマシー染色液で染色し、脱色液で処理した。

活性染色

12.5%の SDS-PAGE ゲルに 0.05% CMC を含むように調製し、サンプルタンパク質を供し、電気泳動した。このゲルをリフォールディング緩衝液 1 に浸し、30 分間、2 回室温で振とうした。この後、リフォールディング緩衝液 2 に浸し、30 分間、2 回室温で振とうした。この後 10mM KPB 液に浸し、37°C で 90 分間インキュベートした。これを 1% コンゴレッド溶液に浸して染色後、1 M の塩化ナトリウム水溶液で脱色した。

プロテインシーケンス

エレクトロトランスブロットした PVDF 膜から、目的のタンパク質のバンドを切り取りプロテインシーケンサー (ABI 社、Procise protein sequencer) に供した。指示書に従い、転写された目的のタンパク質バンドから 15 アミノ残基の配列を決定した。

3 節 結果

R. albus を培養した GS 改変培地 (炭素源 1% BMC を含む) から得られた培地上澄より、リケナンに吸着させて集めたタンパク質を SDS-PAGE に供したところ (図 15) のようなタンパク質を検出した。67 kDa 付近に太い単一のバンドが得られた。またこのタンパク質を用いて活性染色を行った。SDS-PAGE 電気泳動で確認できたバンドの位置の染色が抜けた。この事から CMC を分解してい

る事が分かった。

集めたタンパク質を SDS-PAGE し、エレクトロトランスブロットにより得られた PVDF 膜から同タンパク質サイズ付近のバンドを切り出し、プロテインシーケンスを行った結果、読み取れた配列は、N'末側から SSGLDAKGIVSQMGI であった。

4 節 考察

リケナンを用いて吸着させたタンパク質は、一番目立つ 67 k Da 付近のバンドと、その上にいくらか複数のバンドが確認できた (図 15)。菌体タンパク質の SDS-PAGE 電気泳動の結果と比較すると、菌体タンパク質の一部が得られている事が分かった。この事から培養上澄み液からリケナンに吸着するタンパク質が集められたと判断した。次に、これがセルラーゼとしての活性を持つかを確認するために活性染色を行ったが、CMC 分解活性を確認する事が出来たため、セルラーゼ活性を持つ酵素である可能性が非常に高いと考えた。リケナンに吸着したタンパク質だったため、Cel5D である可能性もあり (但し、塩基配列から推定される Cel5D のサイズは 84kDa である。) プロテインシーケンスを行ったが、NCBI BLAST Protein, Search for short, nearly exact matches

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を用いて結果を検索した結果、相同性の高い順にしめされたデータベース上のアミノ酸配列に、*R.albus* 由来の Cel5D をはじめセルラーゼ関連のタンパク質は該当しなかった。分子サイズの違いを含め、これらの結果からリケナンに吸着したタンパク質は、新規のセルラーゼである可能性が高いと考えた。

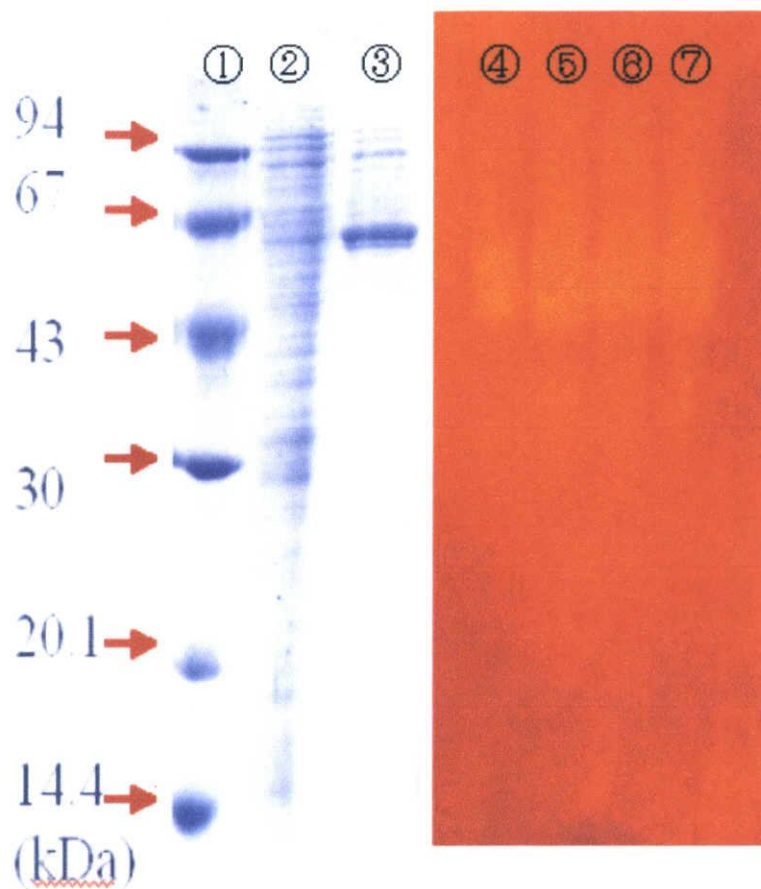


図 15. リケナン吸着タンパク質の SDS-PAGE と活性染色結果

- ① 分子量マーカー ② 菌体タンパク質 ③ リケナンに吸着したタンパク質
- ④ リケナンに吸着したタンパク質 SDS-PAGE 後の活性染色 (サンプル量 $0.5 \mu\text{l}$)
- ⑤ リケナンに吸着したタンパク質 SDS-PAGE 後の活性染色 (サンプル量 $1 \mu\text{l}$)
- ⑥ リケナンに吸着したタンパク質 SDS-PAGE 後の活性染色 (サンプル量 $2 \mu\text{l}$)
- ⑦ リケナンに吸着したタンパク質 SDS-PAGE 後の活性染色 (サンプル量 $4 \mu\text{l}$)

総合考察

本研究ではまず **RaCBM4** がどのような基質と結合するか、という性質を明らかにするため、第 3 章-1、第 3 章-4 において親和性電気泳動及びマクロアレイ法による検討を行った。その実験結果から、*R. albus* 由来 Cel5D の CBM4 は、リケナン、マンナン、パーチウッドキシラン、オートスペルトキシラン、CMC、それぞれの基質に結合する事が分かった。この CBM4 は、他菌種の CBM4 と比較してアミノ酸レベルにおける相同性が低い事から、ファミリー 4 に分類されているものの若干疑問が残っていた。しかし今回の結果は、ファミリー 4、タイプ B に分類される CBM の特徴である、不溶性多糖、非結晶性セルロースに結合するという性質に準ずるものと言えた。第 3 章-3 の 3 節において二つの CBM4 (**RaCBM4-1**、**RaCBM4-2**) はよく似た結合力、結合量を示した(塩類の添加によるそれらの数値変化もよく似ていた)、また、それぞれの実験において **RaCBM4-1**、**RaCBM4-2** の基質に対する結合、非結合のデータはよく類似していた。*R. albus* の Cel5D における CBM4-1、CBM4-2 はその構造や、相同性から進化の過程で遺伝子が倍加したものと考えられる為、このように相互間で似たような性質を持つことは考えられた。しかし第 3 章-2 の 3 節ではそれぞれの **RaCBM** がリケナンに対して認識している部位、つまり結合する部位が異なるという結果も出た。そのため、どういった違いからそのような差が生まれるのか非常に興味深いものであった。

CBM はアミノ酸配列によるファミリー分類、または結合様式の違いによりタイプ A、タイプ B、タイプ C のような分類方法が提案されているが、同一菌種から得た同一ファミリーの CBM であっても基質に対して異なった部位を認識している可能性から、基質の種類や結合様式という観点より進めた、基質の形態、結合部位などの知見をより広げる事が必要ではないだろうかと考えた。また、基質の形態という観点で本研究を見た場合、第 3 章-1 の 3 節より、不溶性の状態

のリケナンと、熱を加えて溶解させたリケナンとの **RaCBM** 群の結合力は異なっていたし、第3章-4における3節からみても、アフィニティー電気泳動で結合が確認できた基質よりも多くの結合基質を見つける事が出来た。こういった違いは、基質の状態変化、つまり構造変化に起因しているのではないだろうかと考えた。例えば多糖類が水溶する場合、繊維束間に水分子が入り水和し、その結合が解れる事象が知られている。こういった基質に対してクレフト構造をとるタイプBのCBMはより結合力は向上する。ポリアクリルアミド分子間に固定されている状態、あるいは今回マクロアレイに用いたニトロセルロース上に滴下、乾燥させた状態では、その形状に違いがあることが十分予想できた。CBMの結合基質への性格を分析する上で、アフィニティー電気泳動を用いて結合基質を評価する報告は多いが、より正確な特性を知る為には、基質の状態が結合に影響を与える事を含め、様々な角度から検討する必要があると思われた。

タイプBのCBMが結合基質の種類に幅があるのは、基質特異的というよりはむしろ基質の構造特異的な性質を持っているからなのではないかと考えた。またCel5Dはファミリー5の触媒酵素の後にCBM4が2つ並んで存在している。このように複数のCBMを持つセルラーゼは他にもあり、そういった構造を持つことで、タンパク質としての構造上の安定性をもたらし、結合に関する多様性の獲得、また触媒部分の分解性の向上に寄与しているという報告がある(29)。しかし本研究では**RaCBM4**が二つ並んで存在している事による利点は、第3章-2における結果の他、見つけるに至らなかった。ただ、**RaCBM4-1**、**RaCBM4-2**が非常によく似た性質を示した事に対して、**RaCBM4**はその性質が異なった。この事より何らかの意味を持ってCBM4が並列しているように思われた。

現在CBMは48を超えるファミリーに分類され、新規のCBMも多く報告されている。CBM間の組み合わせによるその性質変化に加え、触媒部分との組み合わせにより、その性質を変える。Arakiらの報告(30)によると、*Clostridium*

stercorarium の Xyn10A における触媒部分 GH10 は、 β -1,3-1,4-グルカンに対して結合特性を持つ CBM22 と合わせて存在する時、 β -1,3-1,4-グルカナーゼとしての活性を持つが、触媒部分単独ではその活性を失うとされている。本研究においても、Cel5D の触媒部分はファミリー 5 の β -1,4 エンドグルカナーゼに分類されるが、**RaCBM 4** 群は β -1,3-1,4-グルカンに結合特性を持つということが分かった。このことから CBM 4 の有無による触媒部分の性質に非常に興味を持たれる。

そういった CBM の獲得した多様性の一方、植物細胞壁も、植物の種類から多糖類の割合、組み合わせ等、非常に多岐に渡る。多種類の CBM や触媒が存在し、その組み合わせにより複雑な植物細胞壁に対応する多様性を獲得するという事は、繊維分解性の微生物が進化の過程を辿る上で、有利に働いたと考えられる。

こういった CBM を始めとする触媒部分の理解、また同時にそれらが目標とする植物細胞壁の構造の両面で研究が進む事が出来れば、植物の種類を選ばず、高効率で分解可能な酵素を構築できるのではないかと期待できた。

引用文献

- (1) Karita, S., K. Morioka, T. Kajino, K. Sakka, and K. Ohmiya. 1993. Cloning and sequencing of a novel endo-1,4- β -glucanase gene from *Ruminococcus albus*. *J. Ferment. Bioeng.*, **76**:439-444.
- (2) Bork, P., and R. F. Doolittle. 1992. Proposed acquisition of an animal protein domain by bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**: 8990-8994.
- (3) Johnson, E. A., M. Sakajoh, G. Halliwell, A. Madia, and A. L. Demain. 1982. Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulase system from *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**: 1125-1132.
- (4) Lamed, R., E. Setter, and E. A. Bayer. 1983. Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.*, **156**: 828-836.
- (5) Bayer, E. A., E. Morag, and R. Lamed. 1994. The cellulosome — a treasure-trove for biotechnology. *Trends. Biotechnol.*, **12**:379-386
- (6) Bayer, E. A., L. J. W. Shimon, Y. Shoham and R. Lamed. 1998. Cellulosomes—structure and ultrastructure. *J. Struc. Biol.*, **124**: 221-234.
- (7) Shimada, K., S. Karita, K. Sakka, and K. Ohmiya. 1994. Cellulases xylanases, and their genes from bacteria. *Bioprocess. Technol.* **19**:

395-429.

(8)Lupas, A., H. Engelhardt, J. Peters, U. Santarius, S. Volker, and W. Baumeister. 1994. Domain structure of the *Acetogenium kivui* surface layer revealed by electron crystallography and sequence analysis.

J. Bacteriol., 176: 1224-1233.

(9)Lemaire, M., H. Ohayon, P. Gounon, T. Fujino, and P. Beguin. 1995.

OlpB, a new outer layer protein of *Clostridium thermocellum*, and binding of its S-layer-like domains to components of the cell envelope. J. Bacteriol., 177: 2451-2459.

(10)Ohara, H., S. Karita, T. Kimura, K. Sakka, and K. Ohmiya. 2000.

Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) from *Ruminococcus albus*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 64: 254-260.

(11)Kim, Y. S., A. P. Singh, S. G. Wi, K. H. Myung, S. Karita and K. Ohmiya.

2001. Cellulosome-like structures in ruminal cellulolytic bacterium *Ruminococcus albus* F-40 as revealed by electron microscopy.

Asian-Aust. J. Anim. Sci., 14: 1429-1433.

(12)Wood, T. M., C. S. Wilson, and C. S. Stewart. 1982. Preparation of the cellulase from the cellulolytic anaerobic rumen bacterium *Ruminococcus albus* and its release from the bacterial cell wall. Biochem. J., 105:129-137.

(13)Ding, S. Y., M. T. Rincon, R. Lamed, J. C. Martin, S. I. McCrae, V. Aurilia, Y. Shoham, E. A. Bayer, and H. J. Flint. 2001. Cellulosomal scaffoldin-like proteins from *Ruminococcus flavefaciens*. *J. Bacteriol.* **183**: 1945-1953.

(14)Din, N., N. R. Gilkes, B. Tekant, R. C. Miller Jr., R. A. J. Warren, and D. G. Kilburn. 1991. Non-hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulase. *Bio/Technology.*, **9**: 1096-1099.

(15)Teeri, T. T., T. Reinikainen, L. Ruohonen, T. A. Jones, and J. K. C. Knowles. 1992. Domain function in *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases. *J. Biotechnol.*, **24**: 169-176.

(16)Nidetzky, B., W. Steiner, M. Claeysens. 1994. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: adsorptions of two cellobiohydrolases, two endocellulases and their core proteins on filter paper and their relation to hydrolysis. *Biochem. J.*, **303**: 817-823.

(17)Boraston, A. B., N. B. David, H. J. Gilbert and G. J. Davies. 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.*, **382**: 769-781.

(18)Hachem, M. A., E. N. Karlsson, E. Bartonek-Roxâ, S. Raghothama, P. J. Simpson, H. J. Gilbert, M. P. Williamson, and O. Holst. 2000. Carbohydrate-binding modules from a thermostable *Rhodothermus marinus* xylanase: cloning, expression and binding studies. *Biochem. J.*, **345**: 53-60.

(19)荒木裕子. 2006. 三重大学大学院生物資源学研究科. 「糖質結合モジュールファミリー17と28の結合特性.」

(20)Boraston, A. B., M. Ghaffari, R. A. J. Warren, and D. G. Kilburn. 2002. Identification and glucan-binding properties of a new carbohydrate-binding module family. *Biochem. J.*, **361**: 35-40.

(21)Taguchi, H., D. Hagiwara, T. Genma, S. Karita, T. Kimura, K. Sakka and K. Ohmiya. 2004. Cloning of the *Ruminococcus albus cel5D* and *cel9A* genes encoding dockerin module-containing endoglucanases and expression of *cel5D* in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**: 1557-1564.

(22)Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.

(23)Wetlaufer D. B. 1962. Ultraviolet spectra of proteins and amino acids. *Adv. Prot. Chem.*, **17**: 303-390.

(24)逢坂英和.1997.三重大学大学院生物資源学研究科. 「*Clostridium josui* エンドグルカナーゼAの新規セルロース結合ドメインに関する研究.」

(25)Gilkes, N. R., E. Jervis, B. Henrissat, B. Tekant, R. C. Miller, Jr, R. A. Warren, and D. G. Kilburn. 1992. The adsorption of a bacterial cellulase and its two isolated domains to crystalline cellulose. *J. Biol. Chem.*, **267**:

6743-6749.

(26)Goldstein, M. A., M. Takagi, S. Hashida, O. Shoseyov, R. H. Doi, and I. H. Segel. 1993. Characterization of the cellulose-binding domain of the *Clostridium cellulovorans* cellulose-binding protein A. *J. Bacteriol.*, **175**: 5762-5768.

(27)Jung, H., D. B. Wilson, and L. P. Walker. 2002. Binding mechanisms for *Thermobifida fusca* Cel5A, Cel6B, and Cel48A cellulose-binding modules on bacterial microcrystalline cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, **80**: 380-392.

(28)McCartney L., H. J. Gilbert, D. N. Bolam, A. B. Boraston, J. P. Knox. 2004. Glycoside hydrolase carbohydrate-binding modules as molecular probes for the analysis of plant cell wall polymers. *Anal. Biochem.* **326**: 49-54.

(29)Boraston, A.B., E.Kwan, P.Chiu, R. A. Warren, and D. G. Kilburn. 2003. Recognition and hydrolysis of noncrystalline cellulose. *J. Biol. Chem.*, **278**: 6120-6127.

(30)Araki,R., M. K. Ali, M.Sakka, T. Kimura, K. Sakka, K. and Ohmiya. 2004. Essential role of the family-22 carbohydrate-binding modules for beta-1,3-1,4-glucanase activity of *Clostridium stercorarium* Xyn10B. *FEBS Letters.*, **561**:155-158.

(31) Sambrook, J., and D. W. Russell. Cold Spring Harbor., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual

セルロース学会,.2000:セルロースの辞典 朝倉出版

阿武貴美子,瀬野信子,.1984:糖科学の基礎 講談社

日本木材学界.,1993:木材の科学と利用技術Ⅲ-2. 糖質の化学

村尾沢夫,荒井基夫,阪本禮一郎,.1987:セルラーゼ 講談社

堀尾武一,山下仁平,.1983:蛋白質・酵素の基礎実験法 南江堂

謝辞

この度本研究の追行にあたり、大変ご親切にご指導賜りました三重大学大学院生物資源学研究科の後藤正和教授、荻田修一助教授には深く感謝を申し上げます。また、シーケンサーを使用するにあたりご協力頂いた、三重大学生命科学研究支援センターの近田登美子様、並びに同施設の関係者の方々に恩礼申し上げます。また、快く実験機器を使用させていただいた土壌圏生物機能学教育研究分野の皆様にも深くお礼申し上げます。最後になりましたが、研究を進める上で様々なアドバイス、協力をいただいた本研究室の皆様に深くお礼申し上げます。