

所 属 生物圏生命科学 専攻 氏 名 梅本 善明

審査委員 荒木 利芳, 田中 晶善, 今井 邦雄, 奥村 克純,

論文題目 海洋細菌 *Vibrio* sp. XY-214 株由来 $\beta$ -1,3-キシラン資化関連酵素  
遺伝子群の解析とその応用に関する研究

(要旨本文)

$\beta$ -1,3-キシランは、原始紅藻アマノリ属や緑藻イワツタ属の細胞壁を構成する海藻特有の多糖である。本多糖の加水分解酵素や異性化酵素はアマノリ細胞壁の構造研究や $\beta$ -1,3-キシランの有効利用を行う上で有用な酵素である。例えば、近年地中海において変異型イチイツタが異常繁殖し漁業や生態系に大きな被害を及ぼしているが、これら酵素群を用いることにより、この変異型イチイツタに含まれる $\beta$ -1,3-キシランからのエタノール生産技術確立への可能性に期待が寄せられる。エタノール発酵に必要な $\beta$ -1,3-キシランの糖化には $\beta$ -1,3-キシラナーゼと $\beta$ -1,3-キシロシダーゼという 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乏しく、 $\beta$ -1,3-キシロシダーゼに至ってはこれまで報告がないのが現状である。そこで本研究では、 $\beta$ -1,3-キシロシダーゼを単離し、機能解析することを第 1 の目的とした。次に、 $\beta$ -1,3-キシロシダーゼの応用研究として $\beta$ -1,3-キシランからエタノールを生産するための技術確立を第 2 の目的とした。また、我が国で広く養殖されている重要な産業用海藻であるアマノリの細胞壁構造に関する基礎的知見を得るために、細胞壁形成過程を解析するための技術確立を第 3 の目的とした。

当研究室で海域から単離された海洋細菌 *Vibrio* sp. XY-214 株は $\beta$ -1,3-キシラン資化細菌であり、既に $\beta$ -1,3-キシラナーゼ (TxyA) が単離精製され、その遺伝子 (*txyA*) がクローニングされている。申請者は本細菌がキシロオリゴ糖加水分解酵素である $\beta$ -1,3-キシロシダーゼも保持している可能性が高いと予測し、本酵素遺伝子 (*xloA*) のクローニングを試み、その翻訳産物 (XloA) の機能解析を行った。その結果、XloA は $\beta$ -1,3-キシロオリゴ糖に作用して D-キシロースを生成したが、 $\beta$ -1,4-キシロオリゴ糖に対しては僅かに作用したものの 12 時間反応でも完全な分解には至らなかった。これまで報告された $\beta$ -キシロシダーゼはすべて $\beta$ -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ることから、XloA が新規の糖質分解酵素である $\beta$ -1,3-キシロシダーゼであることが明らかとなった。

次いで、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて $\beta$ -1,3-キシランからのエタノール生産を試みた。本酵母は D-キシロースを炭素源としたエタノール発酵できないため、糖化によって生成した D-キシロースに D-キシロースイソメラーゼ (XylA) を作用させて D-キシロースに変換する必要がある。よって、まず供試細菌 XY-214 株から *xylA* 遺伝子をクローニングし、その翻訳タンパク質を機能解析した。その結果、XylA の至適 pH は 7.5 であり、至適温度は 60°C であった。また、XY-214 株のゲノム DNA 上に $\beta$ -1,3-キシランの分解や代謝に関与する遺伝子クラスターの存在が明らかとなった。

次に、XY-214 株由来の 3 種類の酵素 (TxyA, XloA および XylA) を用いて $\beta$ -1,3-キシランから D-キシロースを調製し、これを酵母 *S. cerevisiae* NBRC 0249 株に与えてエタノール発酵させた。その結果、発酵 48 時間後には 30 g/L の D-キシロースから 4.7 g/L のエタノールの生成が確認された。以上のことから、XY-214 株由来の 3 種類の酵素が $\beta$ -1,3-キシランからのエタノール生産に有用であることが示された。

最後に、アマノリと同じ科に属するウシケノリの細胞壁形成過程を解析した。本研究では $\beta$ -1,3-キシラナーゼが有する $\beta$ -1,3-キシラン結合モジュール (CBM31) と研究室保存株である *Vibrio* sp. MA-138 株由来の $\beta$ -マンナーゼが有するマンナン結合モジュール (CBM27) を用いた。両結合モジュールを緑色蛍光タンパク質 (GFP) と融合させて GFP-CBM31 ならびに GFP-CBM27 を構築した。これら蛍光プローブをウシケノリプロトプラストの再生過程において経時的に作用させ、細胞壁の形成時期や局在を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、再生 12 時間後に細胞表層の一部にマンナンが形成され始め、再生が進むにつれてマンナンが細胞全体を覆っていく様子が観察された。しかしながら、GFP-CBM31 の細胞壁への結合は観察されなかった。このことから、ウシケノリ細胞壁中に $\beta$ -1,3-キシランが微量にしか存在していないか、または他の成分に覆われて検出されにくい状態にあることが示唆された。このようにウシケノリの細胞壁多糖合成過程の解析技術を開発したことにより、アマノリなどの海藻の病原菌に対する抵抗力や品質に大きく関与している細胞壁の構造研究に大きく貢献するものと思われる。