

博 士 論 文

海洋細菌 *Vibrio* sp. XY-214 株由来 β -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

平成 22 年 3 月

三重大学大学院生物資源学研究科

梅 本 善 明

目次

第 I 章	緒論	1
第 II 章	<i>Vibrio</i> sp. XY-214 株由来 β -1,3-キシロシダーゼ遺伝子 (<i>xloA</i>) のクローニングとその翻訳産物の機能解析	10
	II-1. 実験材料および実験方法	10
	II-2. 実験結果	28
	II-3. 考察	35
	図表	42
第 III 章	<i>Vibrio</i> sp. XY-214 株由来アルデヒドレダクターゼ様酵素 (AlrA) の機能解析	70
	III-1. 実験材料および実験方法	70
	III-2. 実験結果	74
	III-3. 考察	74
	図表	77
第 IV 章	<i>Vibrio</i> sp. XY-214 株由来 D-キシロースイソメラーゼ (XylA) の機能解析	81
	IV-1. 実験材料および実験方法	81
	IV-2. 実験結果	90
	IV-3. 考察	94
	図表	98
第 V 章	β -1,3-キシランからのエタノール生産	115
	V-1. 実験材料および実験方法	115
	V-2. 実験結果	119
	V-3. 考察	121
	図表	124
第 VI 章	緑色蛍光タンパク質 (GFP) 融合型糖質結合モジュール (CBM) を用いたウシケノリプロトプラスト細胞壁再生過程の観察	129
	VI-1. 実験材料および実験方法	130
	VI-2. 実験結果	139
	VI-3. 考察	141
	図表	146
第 VII 章	総括	156
文献	167

略記号

AlrA : Aldehyde reductase

ASW : Artificial sea water

bp : Base pair

BSA : Bovine serum albumin

CBM : Carbohydrate-binding module

CFW : Calcofluor White M2R

EDTA : Ethylene diamine tetraacetic acid

FPLC : Fast protein liquid chromatography

GatA : Galactoside acetyltransferase

GFP : Green fluorescent protein

GH : Glycoside hydrolase

HPLC : High performance liquid chromatography

IPTG : Isopropyl 1-thio- β -D-galactoside

Man5C : β -1,4-Mannanase 5C

MES : 2-morpholinoethanesulfonic acid

ORF : Open reading frame

PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis

PCR : Polymerase chain reaction

PNP : *p*-Nitrophenol

PVDF : Polyvinylidene difluoride

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SSC : Standard saline citrate

TAE : Tris-acetate-EDTA

TF : Trigger factor

TLC : Thin layer chromatography

Tris : Tris (hydroxymethyl) aminomethane

TxyA : β -1,3-Xylanase

XbpA : β -1,3-Xylan-binding protein

X-gal : 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

XloA : β -1,3-Xylosidase

XylA : D-Xylose isomerase

XylR : Xylose operon transcriptional regulator

XylT : Na^+ /xyloside symporter

第 I 章 緒論

I-1. 研究の背景

海藻は古くから食料や医薬用、化粧品用、工業用原料として、また肥料や飼料などとして幅広く利用されてきた。また、近年は海藻が有する様々な機能が明らかになり、健康食品としても注目を浴びるようになった。特に、海藻は第 6 番目の栄養素といわれる食物繊維を細胞壁成分として豊富に含んでおり、それらは陸上植物とは異なる海藻特有の多糖類で構成されている。食物繊維の生理機能としては腸内菌叢改善による便秘予防効果、粘性による過度な栄養素吸収の抑制、ナトリウムイオンなどの吸着排泄作用、水分吸収による膨潤作用からくる満腹感効果、唾液の分泌促進などがあり、大腸ガンや高血圧、高脂血症、糖尿病などの生活習慣病の予防、肥満や胃潰瘍、虫歯などの予防効果が報告されている（辻, 1997）。

食物繊維の定義は 1972 年に Trowell により「人の消化酵素の作用を受けない植物細胞壁の構造残渣」と定義された。その後、甲殻類の殻成分であるキチンやキトサンなどの動物性の難消化性多糖も含まれるようになり、1994 年の第五次改定日本人の栄養所要量では、食物繊維を「人の消化酵素で消化されない食物成分」と定義されている。

しかしながら、食物繊維の主な供給源は植物の細胞壁を構成しているセルロースやペクチン、 β -1,4-キシランなどの多糖である。細胞壁は、植物細胞に強度と形を与えているだけでなく、細胞の伸長や分化を制御しており、細胞間連絡や病原菌に対する防御機構にも重要な役割を果たしている（Cosgrove 2005）。

陸上植物（高等植物）では、若い成長中の細胞の細胞壁を一次細胞壁、細胞の分化に伴って一次細胞壁の内側に形成される細胞壁を二次細胞壁という。一次および二次細胞壁はともにセルロースとヘミセルロースを主成分としている。一次細胞壁はペクチンの他、構造タンパク質を含んでいるのに対し、二次細胞壁はペクチンやタンパク質はほとんど含まれず、リグニンを含んでいる。

セルロースの合成は、細胞膜上を動き回るセルロース合成酵素複合体によって行われ、細胞壁に沈着されるが、ヘミセルロースなど他の細胞外マトリックスはゴルジ体で合成され、分泌小胞により細胞外に搬出される (Lerouxel et al. 2006)。一方、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、セルロースの他、 β -1,3-キシラン、アガロース、カラギーナン、フコイダンおよびアルギン酸など、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いる。また、これら海藻多糖の合成機構に関する知見は極めて乏しいのが現状である。

細胞壁多糖分解酵素は、植物細胞壁の構造解析 (Bauer et al. 2006) やリグノセルロースからのエタノール生産 (Bayer et al. 2007)、ならびに細胞融合などによる品種改良を行う上で有用なプロトプラストの作出 (Davey et al. 2005) に必要不可欠である。これまで、陸上植物の主要細胞壁成分であるセルロースを分解するセルラーゼや、ヘミセルロースの主成分である β -1,4-キシランを分解する β -1,4-キシラナーゼに関しては、そのX線結晶構造解析や応用に関する研究が数え切れないほど報告されている。これに対し、海藻細胞壁分解酵素に関する研究はセルラーゼなどに比べると大きく立ち遅れている。陸上植物と同様に、海藻においても細胞壁の構造解析やプロトプラストの作出ならびにエタノール生産技術を確立するためには、海藻細胞壁分解酵素の研究が不可欠である。

本研究で対象とする β -1,3-キシランは、D-キシロースが β -1,3-結合で重合したホモ多糖である。本多糖は、緑藻のイワヅタ科 (Caulerpaceae) やハネモ科 (Bryopsidaceae) および原始紅藻のウシケノリ科 (Bangiaceae) の細胞壁を構成している海藻特有の多糖である (Iriki et al. 1960, Percival and McDowell 1967)。 β -1,3-キシラン分解酵素は、未利用海藻バイオマスの有効利用に不可欠である。すなわち、1984年以降、地中海において変異型緑藻イチイヅタ (Fig. 1-1, *Caulerpa taxifolia*) 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。イチイヅタは、オーストラリア原産の熱帯性の緑藻であるが、観賞用としてモナコ海洋博物館に持ち込まれ、そこで変異したものが排水溝を通じて地中海に流出した

と考えられている (Jousson et al. 1998, Olsen et al. 1998, Meusmier et al. 2001)。現在、変異型イチイヅタの繁殖はクロアチア、フランス、イタリア、モナコ、スペインおよびチュニジアの6つの国の沿岸海域にまで拡大している (Meinesz and Hesse 1991, Meinesz et al. 2001)。本有害海藻はキラー海藻とも呼ばれ、生存競争によって在来種を駆逐し、地中海沿岸域の生態系を破壊しているが、現在までに本海藻を駆除するための具体策は講じられていない。しかしながら、イワヅタ科に属するイチイヅタの主要細胞壁成分は β -1,3-キシランであるため (Iriki et al. 1960)、本多糖を β -1,3-キシラン分解酵素により糖化し、エタノール生産技術を確立すれば、変異型イチイヅタのような有害海藻の有効利用に貢献できると考えられる。

また、 β -1,3-キシラン分解酵素は、アマノリの優良品種開発のためのプロトプラスト作出にも不可欠である。すなわち、アマノリは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。しかしながら、多収穫性品種のアマノリは高い成長率を有する反面、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。このような背景の中で、プロトプラストを利用した品種改良試験に大きな期待が寄せられている (Saga et al. 1986, 藤田 1993)。プロトプラストは再生能を有しており、新たな種苗生産用の種苗としての利用や細胞融合による品種改良を行う上で重要な道具となる。スサビノリ (*Porphyra yezoensis*) やアサクサノリ (*P. tenera*) などの原始紅藻アマノリ属はウシケノリ科に属し、その細胞壁は主に β -1,4-マンナン、 β -1,3-キシラン、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 (Percival and McDowell 1967)。従って、これら海藻からプロトプラストを作出するためには β -1,4-マンナーゼやポルフィラン分解能を有する β -アガラーゼに加えて、 β -1,3-キシラナーゼが不可欠である。

以上のような背景をもとに、本論文では β -1,3-キシランの分解や代謝に関与する酵素の解析とその応用研究を中心に報告した。

β -1,3-キシランをその構成単糖であるD-キシロースにまで分解するためには、

β -1,3-キシラナーゼ (EC 3.2.1.32) と β -1,3-キシロシダーゼの2種類の酵素が必要である (Fig. 1-2)。すなわち、 β -1,3-キシラナーゼは β -1,3-キシランの内部にある β -1,3-キシロシド結合を加水分解して β -1,3-キシロオリゴ糖を生成し、 β -1,3-キシロシダーゼが、本オリゴ糖に作用してD-キシロースを遊離する。しかしながら、これら β -1,3-キシラン分解酵素に関する研究報告は極めて少ない。

β -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、カビの一種である *Irpex lactens* 由来の β -1,3-キシラナーゼについて報告し (Nishizawa et al. 1962)、また、Okada はカタツムリ (*Euhadra peliomphala*) の肝臓に含まれる β -1,3-キシラナーゼについて報告している (Okada 1972)。海産動物の内臓に含まれる β -1,3-キシラナーゼも報告されている (Anzai et al. 1991)。 β -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 β -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 (Fukui et al. 1960)。一方、エンド型 β -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 (Chen et al. 1986)。また、海洋細菌由来の β -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 (Aoki et al. 1988)、Yamaura らが海藻から単離した *Pseudomonas* sp. PT-5 株由来のもの (Yamaura et al. 1990)、Araki らによって海泥から単離された *Alcaligenes* sp. XY-234 株由来 (Araki et al. 1998a) および *Vibrio* sp. XY-214 株由来 (Araki et al. 1999) のものに関する報告がある。 β -1,3-キシラナーゼの分子生物学的な研究に関しては、Araki らが2000年に発表した *Vibrio* sp. XY-214 株由来 β -1,3-キシラナーゼ遺伝子のクローニングと塩基配列の解析が最初の報告となった (Araki et al. 2000, GenBank accession no. AB029043)。その後、*Alcaligenes* sp. XY-234 株 (Okazaki et al. 2002, AB039953)、*Vibrio* sp. AX-4 株 (Kiyohara et al. 2005, BAD51934)、*Pseudomonas* sp. ND137 株 (AB063257)、および *Thermotoga neapolitana* (U58632) 由来の β -1,3-キシラナーゼ遺伝子が登録されているが、本酵素遺伝子に関する研究報告は極めて少ない。

一方、 β -1,3-キシロオリゴ糖に作用して D-キシロースを遊離する β -1,3-キシロシダーゼに関しては、現在までに研究報告は見当たらない。 β -1,3-キシロシダーゼを単離できれば、 β -1,3-キシラナーゼとの併用により β -1,3-キシランを D-キシロースにまで糖化できるようになる。これによって、未利用海藻バイオマスである変異型イチイヅタからの D-キシロース生成が可能になり、本海藻からのエタノール生産技術確立に大きな役割を果たすことになる。

I-2. 研究の内容

海洋細菌 *Vibrio* sp. XY-214 株は、1990 年に伊勢湾内の海泥から単離された β -1,3-キシラナーゼ産生細菌である (Araki et al. 1999)。上述したように、本細菌からは既に β -1,3-キシラナーゼ遺伝子がクローニングされている (Araki et al. 2000)。また、本細菌は β -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、 β -1,3-キシラナーゼのみならず、 β -1,3-キシロシダーゼ産生能を有している可能性が高いと推測された。そこで本研究では、*Vibrio* sp. XY-214 株から β -1,3-キシロシダーゼ遺伝子をクローニングし、その翻訳タンパク質の機能を明らかにすることを第一の目的とした。

また、本 β -1,3-キシロシダーゼ遺伝子の解析を通して、*Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA 上に β -1,3-キシラン資化関連酵素遺伝子群の存在を見出した。すなわち、 β -1,3-キシラナーゼと β -1,3-キシロシダーゼ遺伝子が近接して位置しており、その周辺には D-キシロースイソメラーゼなど D-キシロースの代謝に関与すると思われる複数の遺伝子が存在していた。

β -1,3-キシランの糖化によって生じる D-キシロースは、エタノールや非う蝕性甘味料として近年注目されているキシリトールの原料となる。D-キシロースからキシリトールを生産するためには D-キシロースレダクターゼ (EC 1.1.1.21) が必要である。XY-214 株由来 β -1,3-キシラン資化関連酵素遺伝子群を解析したところ、 β -1,3-キシラナーゼ遺伝子の下流に D-キシロースレダクターゼと類似性

を示す遺伝子の存在を明らかにした。そこで、本酵素遺伝子を形質転換大腸菌において発現させ、その翻訳タンパク質の性質を明らかにし、D-キシロースからのキシリトール生成が可能かどうかを調べることを第二の目的とした。

また、 β -1,3-キシランからエタノールを生産するためには、本多糖の糖化によって生成した D-キシロースをその異性体である D-キシルロースに変換しなければならない。それはアルコール発酵の担い手である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が D-キシロースを炭素源としてエタノール発酵できないが、D-キシルロースであれば可能なためである (Gong et al. 1981)。D-キシロースの D-キシルロースへの変換は D-キシロースイソメラーゼ (EC 5.3.1.5) によって触媒されるが、上述したように、XY-214 株由来 β -1,3-キシラン資化関連酵素遺伝子群には D-キシロースイソメラーゼと類似性を示す遺伝子が含まれていた。よって、 β -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三の目的とし、本 D-キシロースイソメラーゼ遺伝子の機能解析を行った。さらに、形質転換大腸菌において発現させた XY-214 株由来の 3 種類の酵素 (β -1,3-キシラナーゼ、 β -1,3-キシロシダーゼおよび D-キシロースイソメラーゼ) を用いて、 β -1,3-キシランから D-キシルロースを生成し、これを酵母に発酵させることでエタノール生成を試みた。

最後に、糖質分解酵素の応用研究として、海藻細胞壁の構造解析を行った。すなわち、近年、我が国における重要な産業用海藻であるアマノリは、養殖環境の悪化や異常気象などに伴い、病原菌などによる被害や品質の低下が問題となっている (Fujita 1990, Fujita and Uppalapati 1997)。その中で、紅藻の細胞壁構成多糖が、病原菌に対する防御機構に重要な役割を果たしていることがわかってきた (Bouarab et al. 1999, Potin et al. 1999, Weinberger et al. 1999, Uppalapati and Fujita 2000, Vreeland and Kloareg 2000)。従って、アマノリ細胞壁の構造を理解することは、優良品種開発のために不可欠であると考えられる。先に述べたように、アマノリが属するウシケノリ科の細胞壁は、主に β -1,4-マンナン、 β -1,3-キシランおよびポルフィランの 3 種類の多糖により構成されている (Percival and

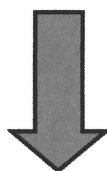
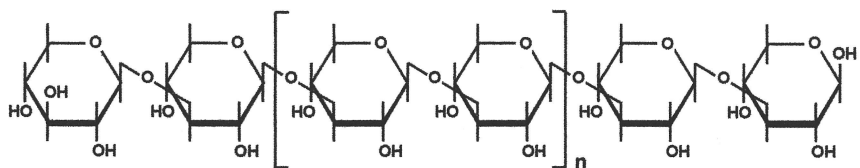
McDowell 1967, Gretz et al. 1982)。しかしながら、これら多糖がいつ、どのように形成され、どこに局在しているのかは分かっていない。そこで、海藻細胞壁多糖を解析するための技術確立を第四の目的とした。

細胞壁分解酵素の多くは、触媒モジュールと糖質結合モジュール (CBMs: Carbohydrate-Binding Modules) の 2 つの異なる機能モジュールから構成されている (Boraston et al. 2004)。CBM には基質と酵素との結合を促進し、酵素の触媒効率を高める役割がある。また、CBM は結合特異性を有しており、その種類によって結合する多糖や糖鎖の種類が異なる。そこで、CBM の結合特異性を利用して海藻細胞壁多糖を解析することにした。なお、本実験では供試海藻としてアマノリと同じウシケノリ科に属し、室内培養が容易なウシケノリ (*Bangia atropurpurea*) を用いた。当研究室ではこれまで、ウシケノリ細胞壁分解酵素である β -1,4-マンナナーゼ、 β -1,3-キシラナーゼ、および β -アガラーゼを種々の海洋細菌から単離し、それらの酵素学的ならびに分子生物学的研究を行ってきた。また、これら 3 種類の酵素を用いてウシケノリ葉体からプロトプラストを大量に作出する技術を確立した (Araki et al. 1994)。よって、ウシケノリからプロトプラストを作出後、葉体への再生過程において経時的に蛍光タンパク質融合型 CBM を作用させ、細胞壁多糖の形成時期や局在を、蛍光顕微鏡を用いて解析した。



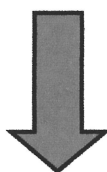
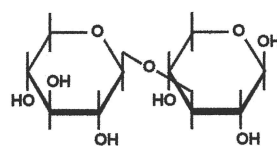
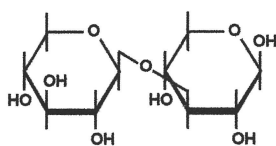
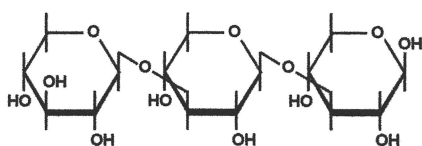
Fig. 1-1. *Caulerpa taxifolia*.

β -1,3-Xylan

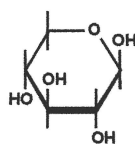


β -1,3-Xylanase (TxyA)

β -1,3-Xylooligosaccharides



β -1,3-Xylosidase (XloA)



D-Xylose

Fig. 1-2. The degradation of β -1,3-xylan with β -1,3-xylanase and β -1,3-xylosidase.

第II章 *Vibrio* sp. XY-214 株由来 β -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産物の機能解析

海洋細菌 *Vibrio* sp. XY-214 株は β -1,3-キシランを唯一の炭素源として生育可能であり、既に β -1,3-キシラナーゼ遺伝子 (*txyA*) がクローニングされている (Araki et al. 2000)。このことから、XY-214 株が β -1,3-キシラナーゼに加えて β -1,3-キシロシダーゼを産生している可能性が高いことが推測された。そこで、本章では XY-214 株から β -キシロシダーゼ遺伝子をクローニングするとともに、その翻訳タンパク質の酵素学的性質を検討した。

II-1. 実験材料および実験方法

II-1-1. 試薬

- ・ *p*-ニトロフェニル (PNP) 合成基質 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A.) [PNP- β -D-キシロピラノシド、PNP- α -D-キシロピラノシド、PNP- α -D-マンノピラノシド、PNP- β -D-マンノピラノシド、PNP- α -D-ガラクトピラノシド、PNP- α -D-グルコピラノシド、PNP- β -D-グルコピラノシド、PNP- α -L-フコピラノシド、PNP- α -L-アラビノフラノシド、PNP- α -L-アラビノピラノシド、PNP- β -D-グルクロニドおよび PNP- β -D-セロビオシド]
- ・ Birchwood キシラン (Sigma)
- ・ Oatspelt キシラン (Sigma)
- ・ ラミナリン (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan)
- ・ β -1,4-キシロオリゴ糖 (Biocon (Japan) Ltd, Aichi, Japan)
- ・ ラミナリオリゴ糖 (Biocon)

他の試薬は、特にことわらない限り Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) のものを使用した。

II-1-2. β -1,3-キシランの調製

β -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 (Iriki et al. 1960) 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。次に、1% 塩酸に 1 時間浸漬後、水洗し、得られた残査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 の酢酸を加えて 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後、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。残査を遠心分離 (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 β -1,3-キシランを沈殿させ、デ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, v/v) に懸濁させ、遠心分離した。さらにエタノール:エーテル (1:3, v/v) 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、 β -1,3-キシランを得た。

II-1-3. β -1,3-キシロオリゴ糖の調製

β -1,3-キシロオリゴ糖は、 β -1,3-キシランを酵素処理により加水分解することにより調製した。加水分解酵素には *Alcaligenes* sp. XY-234 株由来の組換え体 β -1,3-キシラーナーゼ (Okazaki et al. 2002) を用いた。すなわち、100 ml 容三角フ

ラスコに 1% β -1,3-キシランを含む 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) を 20 ml 注入した後、形質転換大腸菌において発現させた *Alcaligenes* sp. XY-234 株の β -1,3-キシラナーゼ溶液 (1.14 U/ml) を 1 ml 加え、37°C で 12 時間反応させた。

この応液をあらかじめ 15% 酢酸溶液で活性化し、蒸留水で平衡化しておいた活性炭カラム (2.2 cm i.d. \times 48 cm, Wako) に添加した。最初に蒸留水で溶出し、次いで、9、14 および 30% (v/v) の各エタノールで段階的にオリゴ糖を溶出した。蒸留水面分からは D-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 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES) -NaOH 緩衝液 (pH 7.0) に溶解させ、さらに薄層クロマトグラフィーにより分画して精製した。

II-1-4. 使用した菌株、培地およびプラスミド

β -1,3-キシラン分解細菌である *Vibrio* sp. XY-214 株は、1990 年に Araki らによって伊勢湾内の海泥から単離された (Araki et al. 1999)。XY-214 株は 0.3% β -1,3-キシランを含むペプトン培地 (Table 2-1) で培養した。また、 β -1,3-キシランを唯一の炭素源とする最小培地 (Table 2-2) において XY-214 株を選抜育種することで、 β -キシロシダーゼ産生能を高めた。その後、XY-214 株は 0.3% β -1,3-キシランを含むペプトン斜面培地で 1 ヶ月ごとに継代培養し、4°C で保存した。また同時に、保存菌を 5 ml のペプトン液体培地に接種し、25°C で 15 時間培養後、グリセロール (終濃度 20%) を添加してよく攪拌し、-80°C で凍結保存した。

クローニングには *Escherichia coli* DH5 α 株 (Stratagene, La Jolla, California, U.S.A.)、*E. coli* XL1-Blue 株 (Stratagene) と pT7Blue ベクター (Novagen, Madison, Wisconsin, U.S.A.) および pBluescript II KS (-) ベクター (Stratagene) を使用した。タンパク質の発現には *E. coli* BL21 (DE3) 株 (Novagen) と pET22b (+) ベクター (Novagen) を用いた。*E. coli* の培養には Luria-Bertani (LB) 培地 (1%

トリプトン, 0.5% 酵母エキス, 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% (w/v) になるように添加した。

Table 2-1. Composition of peptone medium

Polypepton	5.0 g
Yeast extract	1.0 g
NaCl	30.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
K ₂ HPO ₄	2.0 g
KH ₂ PO ₄	0.4 g
Water	1,000 ml
pH 7.6	

Table 2-2. Composition of basal medium

50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)	500 ml
NH ₄ Cl	1.0 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	75 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	28 mg
ASW	500 ml
ASW	
NaCl	23.4 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	24.6 g
KCl	1.5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.9 g
Water	1,000 ml

II-1-5. β-キシロシダーゼの活性測定

10 mM *p*-ニトロフェニル (PNP) -β-D-キシロピラノシド水溶液 100 μl と 50 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) の 100 μl に 100 μl の酵素液を加え、35°C で 10 分間反応させた (総量 300 μl)。2% 炭酸ナトリウム水溶液を 3 ml 加えて反応を停止した後、400 nm における吸光度を測定した。β-キシロシダーゼの 1 unit は、上記反応条件下で 1 分間に 1 μmol の *p*-ニトロフェノールを生ずる酵素量と定義した。

II-1-6. タンパク質の定量

タンパク質濃度は Lowry 法 (Lowry et al. 1951) により測定した。標準タンパク質として牛血清アルブミン (BSA, Sigma) を用いた。また、酵素精製の際にフラクションコレクターで分画した各試験管の相対タンパク質量は、280 nm における吸光度を測定することにより求めた。

II-1-7. *Vibrio* sp. XY-214 株由来 β -1,3-キシロシダーゼ (XloA) の精製

II-1-7-1. 大量培養

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接種して 25°C で 15 時間培養した (種培養)。次に、この種培養液の全量を 500 ml 容三角フラスコに入れた 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 時間培養した (本培養)。この種培養から本培養までの操作を同時に 9 回行い、合計 1,800 ml の培養液を得た。

II-1-7-2. 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 g, 20 min) し、沈殿した菌体に 45 ml の 50 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) を加えて懸濁した。次に、この懸濁液を氷上で超音波処理 (out put 3, duty 60, 1 min \times 5) に供して菌体を破碎し、破碎液を遠心分離 (14,000 g, 20 min) して得られた上澄み液を β -キシロシダーゼの粗酵素液とした。

II-1-7-3. 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-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した DEAE Toyopearl 650M カラム (2.0 cm i.d. \times 30 cm, Tosoh, Tokyo, Japan) に添加し、同緩衝液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-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) を 300 ml と 1.5 M NaCl を含む同緩衝液 300 ml を用いて連続濃度勾配溶出を行った。分画後、各試験管の 280 nm における吸光度と β -キシロシダーゼ活性を測定し、活性画分を集めた。なお、分画条件は流速 30 ml/h で分画容量を 5 ml とした。

II-1-7-4. 硫酸アンモニウムによる逆塩析での酵素濃縮

DEAE Toyopearl 650M で得られた活性画分を透析膜 (Dialysis membrane, size

27, Wako) に入れ、飽和硫酸アンモニウム (50 mM MES-NaOH 緩衝液 (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、逆塩析 (4°C) した。

II-1-7-5. Ether Toyopearl 650S による疎水クロマトグラフィー

逆塩析により沈殿したタンパク質を遠心分離 (14,000 g, 20 min) により回収し、これに 50 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) を加えて溶解させた。さらに等量の 3.0 M 硫酸アンモニウムを含む同緩衝液を加え、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 g, 20 min) して得られた上澄み液を 0.45 μ m フィルター (Advantec, Tokyo, Japan) によりろ過し、あらかじめ 1.5 M 硫酸アンモニウムを含む 50 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した Ether Toyopearl 650S (1.0 cm i.d. \times 10 cm, Tosoh) に添加した。同緩衝液で非吸着タンパク質を完全に溶出させた後、1.5 M 硫酸アンモニウムを含む 50 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) と硫酸アンモニウムを含まない 50 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) の間で逆濃度勾配溶出を行った。本クロマトグラフィーは FPLC システムを用いて行い、分画条件は流速 0.5 ml/min で分画容量を 2 ml とした。タンパク質の検出は、溶出液の 280 nm のにおける吸光度を測定することにより行った。分画後、各試験管の β -キシロシダーゼ活性を測定し、活性画分を集めた。

II-1-7-6. Mono Q による陰イオン交換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-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) で 2 日間透析し、得られた透析内液をあらかじめ同緩衝液で平衡化した Mono Q カラム (0.5 cm i.d. \times 5.0 cm, GE Healthcare, Buckinghamshire, England) に添加した。同緩衝液を用いて非吸着タンパク質を完全に溶出させた後、同緩衝液と 1.0 M NaCl を含む 50 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) の間で濃度勾配溶出を行った。本クロマトグラフィーは FPLC システムを用いて行い、分画条件は

流速 0.2 ml/min で分画容量を 1.5 ml とした。タンパク質の検出は、溶出液の 280 nm のおける吸光度を測定することにより行った。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、精製酵素は -20°C で凍結保存した。

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

SDS-PAGE は、Laemmli の方法 (Laemmli 1970) に基づいて 12.5% ゲルで分離した。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、タンパク質の染色にはクーマシーブリリアントブルー (CBB) R-250 (Sigma) を、分子量マーカーには Low-molecular-weight SDS calibration kit (GE Healthcare) を使用した。

II-1-7-8. XloA の N 末端アミノ酸配列および内部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, Co., Tokyo, Japan) を用いて PVDF 膜に電氣的にブロットした。通電は一定電流 2 mA/cm^2 で行い、ブロッティング終了後に PVDF 膜を CBB G-250 (Sigma) で 10 分間染色し、希メタノールで脱色して風乾してからバンドを切り出した。N 末端アミノ酸配列の分析は Procise 49X-cLC Protein Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A) および 140D Micro Gradient Delivery System (Applied Biosystems) を用いて行い、エドマン分解により N 末端から順にアミノ酸残基を分析した。

XloA の内部アミノ酸配列の決定は以下のようにして行った。すなわち、XloA の精製標品 20 μl に対し、リシルエンドペプチダーゼ (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Wako) を 2.5 μl 加え、 37°C で 10 分間反応させたものを SDS-PAGE により分離して PVDF 膜にブロットした。その後、酵素処理により生じたペプチド断片を切り出し、その N 末端アミノ酸配列を上記と同様の方法で分析した。

II-1-8. *Vibrio* sp. XY-214 株由来 β -1,3-キシロシダーゼ遺伝子 (*xloA*) のクローニング

II-1-8-1. ゲノム DNA の抽出

Saito-Miura らの方法 (Saito and Miura 1963) により行った。すなわち、*Vibrio* sp. XY-214 株を 5ml のペプトン培地で種培養 (25°C, 16–18 h) し、さらに 800 ml のペプトン培地で本培養 (25°C, 48 h) した後、これを遠心分離 (8,000 g, 15 min) して菌体を回収した。次に、菌体に 12 mg のリゾチームを含んだ 6 ml の saline-EDTA (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0) を加えて懸濁し、これを 37°C で 10–20 分間インキュベートし、菌体がとりもち状になり始めたところで、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 緩衝液 (0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, 1% SDS, pH 9.0) を加えて攪拌し、菌体を溶解した。さらにこれを 60°C に加温して完全に溶菌させた。次に、この溶菌液を 100 ml 容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 (フェノールの結晶を Tris-SDS 緩衝液に溶解して飽和させ、1 N NaOH で pH 7.8–8.0 に調整したもの) を加えて 10–20 分間振とうした。この懸濁液を低速遠心分離 (3,000 g, 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回収した。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ガラス棒でかき混ぜ、線維状の DNA 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% (v/v) の各エタノール 10 ml に順次 2 分間ずつ浸し DNA を洗浄した。洗浄後、これを 20 ml の希 saline-citrate (0.015 M NaCl, 0.0015 M クエン酸三ナトリウム) に 16–18 時間浸してゲノム DNA を完全に溶解させ、さらに 2 ml 濃 saline-citrate (1.5 M NaCl, 0.15 M クエン酸三ナトリウム) を加えて安定化させた。この粗ゲノム DNA 溶液を 500 μ g/ml 程度に希釈し、これに RNase A (Sigma) を 40 μ g/ml となるように加え 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て 100 ml 容共栓フラスコで 5 分間振とうした。この懸濁液を

低速遠心分離 (3,000 g, 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加え、ガラス棒で境目をかき混ぜ線維状の DNA を巻き取った。さらにこれを 70, 80 および 100% (v/v) の各エタノール 10 ml に順次 2 分間ずつ浸した後、エタノールをよく搾り取り 10 ml Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl 緩衝液, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶解した。DNA 濃度は以下の計算式から算出した。

$$\text{DNA 濃度 } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times 0.05 \times \text{希釈倍率}$$

II-1-8-2. DNA の各種処理

プラスミド DNA の抽出には Wizard Plus miniprep DNA purification system (Promega Co., Madison, WI, USA) を使用した。DNA ライゲーションは Ligation kit ver. 2 (Takara, Kyoto, Japan) を用いて行った。制限酵素は Takara の製品を使用した。アガロースゲルからの DNA 断片の抽出には Wizard gel and PCR clean-up system (Promega) を使用した。

II-1-8-3. 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 (Sambrook et al. 1989)。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 緩衝液 (0.04 M Tris, 0.04 M 酢酸, 0.001 M EDTA, pH 8.0) を用いた。サイズマーカーとして Marker 6 (Nippon gene, Tokyo, Japan) 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-1-8-4. 形質転換

大腸菌の形質転換は Inoue らの方法 (Inoue et al. 1990) に基づいて以下のようにして行った。氷上で溶解したコンピテントセル (100 μl) に、1–10 μl のプラスミド溶液、またはライゲーション反応液を加え、穏やかに混合して 30 分間氷上に静置した。次に、この混合液を熱処理 (42°C, 1 min) した後、氷上で 2

分間冷却し、アンピシリン（終濃度 50 µg/ml）を含む LB 寒天平板培地に塗布して 37°C で 16–18 時間培養した。

II-1-8-5. DNA 塩基配列の決定

シーケンス反応は GenomeLab™ DTCS-quick start kit (Beckman Coulter, Fullerton, CA, U.S.A) を用いて行い、塩基配列の解読には Beckman CEQ2000XL sequencer (Beckman Coulter) を使用した。塩基配列の解析には GENETIX-WIN computer software (Software development, Tokyo, Japan) を用いた。

II-1-8-6. *xloA* 遺伝子のクローニングのためのプローブ作製

(A) 縮重プライマーを用いた部分 *xloA* 遺伝子断片の増幅と塩基配列の解読

II-1-7-8 で決定した XloA の N 末端および内部アミノ酸配列をもとに縮重プライマー (dxlo-F プライマー: 5'-ACNACNACNATHCARAAAYCC-3' および dxlo-R プライマー: 5'-RTANARRTARTGNCKNCCYTT-3') を作製し、*Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA を鋳型に PCR を行った。PCR の反応組成および反応条件は、それぞれ Table 2-3 と Table 2-4 に示した。PCR により増幅した遺伝子断片を *dxlo* とし、これを pT7Blue ベクターにライゲーションした。その後、ライゲーション反応液をコンピテントセル *E. coli* DH5α 株と混合して形質転換させ、これを 70 µl の 100 mM IPTG 溶液と 45 µl の 20 mg/ml X-gal 溶液を塗布しておいた LB 寒天培地に接種して 37°C で 16 時間培養した。次に、寒天培地上に増殖した白色コロニーを爪楊枝でピックアップしてコロニーダイレクト PCR を行うことで、*dxlo* 断片が挿入された pT7Blue ベクター (*dxlo*/pT7Blue) によって形質転換された *E. coli* DH5α 株を選別した。さらに、得られた形質転換大腸菌から *dxlo*/pT7Blue プラスミドを抽出し、挿入断片の塩基配列を解読した。シーケンスプライマーには T7 プライマー (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') および U19 プライマー (5'-GTTTTCCCAGTCACGACGT-3') を用いた。

Table 2-3. Composition of PCR solution

Component	Volume (μl)
H ₂ O	78.5
10×ExTaq Buffer	10.0
2 mM dNTP	8.0
Genomic DNA (100 ng/μl)	1.0
dxlo-F primer (50 pmol/μl)	1.0
dxlo-R primer (50 pmol/μl)	1.0
Ex Taq Polymerase (5 unit/μl)	0.5

Table 2-4. PCR condition

94°C	0.5 min	30 cycles
94°C	0.5 min	
54.9°C	0.5 min	
72°C	2.0 min	
4°C	hold	

(B) プローブの作製

II-1-8-6 (A) において決定された *dxlo* 断片 (1,128 bp) の塩基配列に基づき、新たにプローブ作製のプライマー (*pxlo*-F プライマー : 5'-ACGACGACGATTCAGAACCCT-3' および *pxlo*-R プライマー : 5'-CCAGTTACCAACCGCGACATGA-3') を設計した。先に構築した *dxlo*/pT7Blue プラスミドを鋳型に *pxlo*-F および *pxlo*-R プライマーを用いて PCR を行い、その増幅産物を *pxlo* (300 bp) とした。その後、II-1-8-6 (A) と同様の方法で *pxlo* 断片が挿入された pT7Blue ベクター (*pxlo*/pT7Blue) を構築し、挿入断片の塩基配列を解読することで PCR による塩基置換が生じていないことを確認した。

次に、*pxlo*/pT7Blue プラスミドを鋳型に *pxlo*-F および *pxlo*-R プライマーを用いて PCR を行い、アガロースゲル電気泳動後、増幅した *pxlo* 断片をゲルから精製した。精製した *pxlo* 断片を AlkPhos direct labeling kit (GE Healthcare) を用いてラベリングし、プローブとした。すなわち、まず 20 μl のクロスリンカー原液 (キット付属) に 80 μl の純水 (キット付属) を加えて希釈し、クロスリンカー溶液とした。精製した *pxlo* 断片を純水 (キット付属) で 10 ng/μl になるように希釈後、これを 5 分間煮沸することで熱変性させた。次いで、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、これに 10 μl の Reaction Buffer (キット付属) を加えて穏やかに混和した。さらに、2 μl の Labeling reagent (キット付属) 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。また、マーカー用のプローブには Marker 6 を上記と同様の方法でアルカリフォスファターゼ標識して用いた。

II-1-8-7. サザンハイブリダイゼーション

xloA 遺伝子の全長を含む DNA 断片を単離するため、*dxlo* 断片に対して認識部位をもたない 6 塩基認識制限酵素で *Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA を消化し、II-1-8-6 で作製したプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。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]および[*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 (37°C, 12 h) し、これをアガロースゲル電気泳動で分離した。次に、ゲルを加水分解液 (0.25 M HCl) に 15 分間浸した後、蒸留水でゲルを濯ぎ、次いで変性溶液 (1.5 M NaOH, 0.5 M NaCl) に 30 分間浸して 2 本鎖 DNA を 1 本鎖 DNA に変性させた。さらに、ゲルを蒸留水で濯いだ後、中和液 (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.5) に 30 分間浸した。その後、DNA 断片をアガロースゲルから Hybond-N⁺ membrane (GE Healthcare) にブロッティングした。ブロッティングには緩衝液として 20×SSC (333 mM NaCl, 333 mM クエン酸三ナトリウム, pH 7.0) を用いた。ブロッティング終了後、Hybond-N⁺ membrane を 6×SSC に浸してアガロースゲルの破片を除去し、これを 80°C で 2 時間加熱することで DNA をメンブレンに固定させた。

次に、DNA が固定されたメンブレンをハイブリ・バッグ (Cosmo bio co., Tokyo, Japan) に入れた後、これに 55°C に温めておいたハイブリダイゼーション緩衝液 (AlkPhos direct labeling kit 付属の Hybridization buffer (0.25 ml/cm² membrane) に 4% Blocking reagent (キット付属) と 0.5 M NaCl を溶解させたもの) を注ぎ入れて 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、II-1-8-6 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させた。

ハイブリダイズ終了後、メンブレンを予め 55°C に温めておいた一次洗浄液 (Table 2-5) に浸し、55°C で 10 分間穏やかに振とうした後、一次洗浄液を交換して再度、55°C で 10 分間穏やかに振とうした。次に、一次洗浄液を捨て、二次洗浄液 (Table 2-6) をメンブレンが十分に浸る程度加えて室温で 5 分間穏やかに振とうした後、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。二次洗浄液は、使用前に 20×ストック溶液を 20 倍希釈した後、塩化マグネシウムを終濃度 2 mM となるように加えたものを用いた。

その後、メンブレンから余分な二次洗浄液を除き、DNA が固定されている面を上にしてラップの上に置いた。次に、CDP-Star detection reagent (GE Healthcare) をメンブレン全体に均一に広げて 5 分間静置した後、メンブレンをラップに包み、暗室で DNA が固定された面に X 線フィルムを密着させて一時間感光させた。その後、X 線フィルムをレンドール (Fujifilm, Tokyo, Japan) に浸して現像し、3% 酢酸 (v/v) で現像を停止してからレンフィックス (Fujifilm) に浸して定着させた。定着させた X 線フィルムからプローブとハイブリダイズした目的 DNA 断片を検出し、クローニングに適した制限酵素の組み合わせを決定した。

Table 2-5. Composition of the first washing buffer

Urea	120.0 g	(2 M)
SDS	1.0 g	(0.1%)
0.5 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)	100 ml	(50 mM)
NaCl	8.7 g	(150 mM)
1 M MgCl ₂	1 ml	(1 mM)
Blocking reagent	2.0 g	(0.2%)
Water	1,000 ml	

Table 2-6. Composition of the 20× second washing buffer

Tris	120 g	(1 M)
NaCl	112 g	(2 M)
Water	1,000 ml	

pH 10.0

II-1-8-8. 制限酵素消化断片の大腸菌への導入と塩基配列の解読

サザンハイブリダイゼーションの結果から決定した制限酵素の組み合わせによって *Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA を消化し、アガロースゲル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、プローブとハイブリダイズした DNA 断片を X 線フィルムで検出し、これをアガロースゲルと重ね合わせて目的の *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、同じ制限酵素で処理した pBluescript II KS (-) ベクターを Ligation kit ver.2 を用いてライゲーションした。その後、ライゲーション反応液をコンピテントセル *E. coli* DH5 α 株と混合して形質転換させ、これを 70 μ l の 100 mM IPTG 溶液と 45 μ l の 20 mg/ml X-gal 溶液を塗布しておいた LB 寒天培地に接種して 37°C で 16 時間培養した。次に、寒天培地上に増殖した白色コロニーを爪楊枝でピックアップしてコロニーダイレクト PCR を行うことで、*xloA* 遺伝子を含む DNA 断片が挿入された pBluescript II KS (-) ベクター (*xloA*/pBluescript) によって形質転換された *E. coli* DH5 α 株を選別した。この時、プライマーには II-1-8-6 で作製した pxlo-F および pxlo-R プライマーを用いた。その後、得られた形質転換大腸菌から *xloA*/pBluescript プラスミドを抽出し、挿入断片の塩基配列を II-1-8-5 の方法で解読した。*xloA* 遺伝子の塩基配列および推定アミノ酸配列は DDBJ/EMBL/GenBank 国際塩基配列データベースに登録した (Accession no. AB300564)。

II-1-9. 形質転換大腸菌における組換え体 XloA (rXloA) の発現と機能解析

II-1-9-1. 発現用プラスミド (*xloA*/pET22b) の構築

II-1-8 でクローニングされた *Vibrio* sp. XY-214 株由来の β -キシロシダーゼ遺伝子 (*xloA*) を大腸菌へ導入して組換え体 XloA (rXloA) を大量発現させ、その酵素学的性質を検討した。

まず初めに、決定された *xloA* 遺伝子の塩基配列をもとに *xloA* 遺伝子増幅用のプライマー (*xloA*-F プライマー: 5'-GGAATTCCCATATGACAACTACGATTTCAG-3'

および *xloA*-R プライマー:5'-AAGCGGCCGCGCATGCTCTAGGTACTCAAAGT-3') を作製し、*xloA*/pBluescript プラスミドを鋳型に PCR を行った。*xloA*-F および *xloA*-R プライマーにはそれぞれ *Nde*I および *Not*I サイトを付加した(下線)。PCR の反応組成および反応条件は、それぞれ Table 2-7 と Table 2-8 に示した。PCR による *xloA* 遺伝子の増幅をアガロースゲル電気泳動で確認した後、ゲルから *xloA* 遺伝子を精製し、これを制限酵素処理 (*Nde*I および *Not*I) した。さらに、制限酵素処理した *xloA* 遺伝子をアガロースゲル電気泳動した後、これをゲルから精製し、発現ベクターである pET22b (+) の *Nde*I-*Not*I サイトにライゲーションした。その後、ライゲーション反応液をコンピテントセル *E. coli* XL1-Blue 株と混合して形質転換させ、これを LB 寒天培地に接種して 37°C で 16 時間培養した。次に、寒天培地上に増殖したコロニーを爪楊枝でピックアップしてコロニーダイレクト PCR を行うことで、*xloA* 遺伝子断片が挿入された pET22b (+) ベクター (*xloA*/pET22b) によって形質転換された *E. coli* XL1-Blue 株を選別した。その後、得られた形質転換大腸菌から *xloA*/pET22b プラスミドを抽出し、挿入断片の塩基配列を解読することで、PCR による塩基置換が生じていないことを確認した。次に、上記で構築した *xloA*/pET22b を *E. coli* BL21 (DE3) 株に導入して形質転換させ、得られた形質転換大腸菌を rXloA 発現に用いた。なお、発現タンパク質の C 末端領域には、アフィニティーカラムによる精製が行えるようヒスチジンタグが付加されるようにした。

Table 2-7. Composition of PCR solution

Component	Volume (μl)
H ₂ O	78.5
10×ExTaq Buffer	10.0
2 mM dNTP	8.0
<i>xloA</i> /pBluescript (100 ng/μl)	1.0
<i>xloA</i> -F primer (50 pmol/μl)	1.0
<i>xloA</i> -R primer (50 pmol/μl)	1.0
Ex Taq Polymerase (5 unit/μl)	0.5

Table 2-8. PCR condition

94°C	0.5 min	30 cycles
94°C	0.5 min	
53°C	0.5 min	
72°C	2.0 min	
4°C	hold	

II-1-9-2. 形質転換大腸菌における rXloA の発現と精製

xloA/pET22b プラスミドによって形質転換された *E. coli* BL21 (DE3) を 5 ml の LB 培地 (50 µg/ml アンピシリンを含む) に接種し、37°C で 16 時間培養した (種培養)。その後、培養液の 1 ml を 500 ml 容三角フラスコに入れた 200 ml の LB 培地に接種し、37°C で培養した (本培養)。培養液の 600 nm における吸光度 (A_{600}) が 0.4–0.5 に達した後、培養液に IPTG を終濃度 1 mM となるように添加し、さらに 25°C で 20 時間培養を続けた。この種培養から本培養までの操作を同時に 4 回行い、合計 800 ml の培養液を得た。

次に、培養液を遠心分離 (12,000 g, 15 min) して菌体を回収し、これにあらかじめ冷却しておいた 30 ml の緩衝液 A (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液, 0.5 M NaCl, 10 mM イミダゾール, pH 7.4) を加えて懸濁させた。次に、この懸濁液を氷上で超音波処理 (out put 3, duty 60, 1 min×5) して菌体を破碎した。破碎液を遠心分離 (14,000 g, 15 min) して得られた上澄み液を 0.45 µm フィルター (Advantec) でろ過したものを粗 rXloA 溶液とした。

rXloA の精製には、ニッケルイオンを保持させた HiTrap chelating HP カラム (5 ml; GE Healthcare) を使用した。すなわち、rXloA 溶液をあらかじめ緩衝液 A で平衡化しておいた HiTrap chelating HP カラムに添加し、同緩衝液を用いて非吸着タンパク質を完全に溶出させた後、同緩衝液と緩衝液 B (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液, 0.5 M NaCl, 500 mM イミダゾール, pH 7.4) の間で濃度勾配溶出し、rXloA を溶出させた。本クロマトグラフィーは FPLC システムを用いて行い、分画条件は流速 1.0 ml/min で分画容量を 2.0 ml とした。タンパク質の検出は、溶出液の 280 nm における吸光度を測定することにより行った。溶出した活性画分を SDS-PAGE に供し、単一のバンドが検出された画分を集めて 4,000 ml の 50 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) に対して 16–18 時間透析 (4°C) した。これにより得られた酵素液を精製 rXloA 標品とし、以後の酵素学的性質の検討に用いた。なお、精製酵素は -20°C で凍結保存した。

II-1-9-3. 至適 pH の測定

100 μ l の Britton-Robinson の広域緩衝液 (40 mM リン酸, 40 mM ホウ酸および 40 mM 酢酸の混合液に 0.2 N NaOH を適当量加えてそれぞれの pH (pH 3.0, 4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 および 12.0) に調整したもの) と 100 μ l の 10 mM PNP- β -D-キシロピラノシド水溶液に精製酵素液を加え、35°C で 20 分間反応させて活性を測定した。

II-1-9-4. pH 安定性の測定

Britton-Robinson の広域緩衝液 (pH 3.0–12.0) の各 270 μ l に、精製酵素液を 30 μ l ずつ加えて 4°C で 12 時間インキュベートした。その後、これらの各酵素液を 50 mM MES–NaOH 緩衝液 (pH 7.0) を用いてさらに 2 倍希釈したものを活性測定の酵素液として使用した。すなわち、100 μ l の 50 mM MES–NaOH 緩衝液 (pH 7.0) と 100 μ l の 10 mM PNP- β -D-キシロピラノシド水溶液に 100 μ l の酵素液を加え、35°C で 20 分間反応させて活性を測定した。

II-1-9-5. 至適温度の測定

100 μ l の 50 mM MES–NaOH 緩衝液 (pH 7.0) と 100 μ l の 10 mM PNP- β -D-キシロピラノシド水溶液に 100 μ l の酵素液を加え、各温度 (0, 10, 20, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 60, 70 および 80°C) で 20 分間反応させて活性を測定した。

II-1-9-6. 温度安定性の測定

酵素液を各温度 (0, 10, 20, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 60, 70 および 80°C) で 20 分間インキュベートした後、直ちに氷上に移して冷却した。その後、100 μ l の 50 mM MES–NaOH 緩衝液 (pH 7.0) と 100 μ l の 10 mM PNP- β -D-キシロピラノシド水溶液に各酵素液を加え、35°C で 20 分間反応させて活性を測定した。

II-1-9-7. PNP- β -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

100 μ l の 50 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) と 100 μ l の酵素液に、各濃度 (0.1, 0.125, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.5, 1.0 および 2.0 mM) の PNP- β -D-キシロピラノシドを 100 μ l 加え (終濃度 0.033, 0.042, 0.05, 0.067, 0.083, 0.1, 0.167, 0.33 および 0.667 mM)、35°C で 1 分間反応させて活性を測定した。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。

II-1-9-8. 基質特異性

(A) 各種 PNP 合成基質に対する作用

様々な種類の PNP 合成基質 (10 mM) の 100 μ l と 50 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) の 100 μ l に酵素液 100 μ l を加え、35°C で 1 時間反応させて活性を測定した。

(B) 各種多糖およびオリゴ糖に対する作用

精製酵素液 20 μ l (0.928 unit/ml) を 1%の各種多糖懸濁液 (β -1,3-キシラン、birchwood キシラン、oatspelt キシラン、カルボキシメチルセルロースおよびラミナリン) の 20 μ l、または各種オリゴ糖 (0.1% β -1,4-キシロオリゴ糖、0.1% ラミナリオリゴ糖および II-1-3 で調製した β -1,3-キシロオリゴ糖) の 20 μ l に加えて 30°C で 24 時間反応させた。その後、反応分解産物を薄層クロマトグラフィー (TLC) によって分析した。展開プレートには silica gel 60 plastic sheet (Merck, Darmstadt, Germany) 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 β -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 (Bailey and Bourne 1960) を使用し、同試薬を噴霧した後、プレートを 90°C で 10 分間加熱した。

II-1-9-9. 重金属および化学試薬の影響

II-1-5 と同様の方法で、反応液に供試化学試薬を終濃度 1 mM となるように加え、35°C で 20 分間反応させ、各化学試薬が β -キシロシダーゼ活性に及ぼす影響を調べた。

II-1-9-10. ゲルろ過クロマトグラフィーによる XloA の分子量推定

Superdex 200 HR 10/30 カラム (10 mm i.d. \times 300 mm; GE Healthcare) を用いて未変性状態の XloA の分子量を推定した。すなわち、あらかじめ 0.15 M NaCl を含む 50 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した Superdex 200 HR 10/30 カラムに、50 μ l の精製酵素液を添加し、活性画分の溶出域を測定した。分子量マーカーには Gel filtration calibration kit (GE Healthcare) のアルドラーゼ (MW 158,000)、オボアルブミン (MW 43,000)、キモトリプシノーゲン A (MW 25,000) およびビタミン B12 (MW 1,355) を使用した。本クロマトグラフィーは FPLC システムを用いて行い、分画条件は流速 0.5 ml/min で分画容量を 1.25 ml とした。タンパク質の検出は、溶出液の 280 nm のおける吸光度を測定することにより行った。

II-2. 実験結果

II-2-1. *Vibrio* sp. XY-214 株由来 β -1,3-キシロシダーゼ (XloA) の精製

XloA の N 末端および内部アミノ酸配列を決定するために、*Vibrio* sp. XY-214 から II-1-7 の方法で XloA を精製した (Fig. 2-1, 2-2)。その結果、精製標品は SDS-PAGE で単一のバンドで検出され、その分子量は約 60,000 と推定された (Fig. 2-3)。また、XloA は粗抽出液に対して 42 倍に精製され、回収率は 2.1%であった (Table 2-9)。

II-2-2. XloA の N 末端および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 G-250 で染色し、検出された分子量約 60,000 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 μ l に対しシルエンドペプチダーゼ (0.1 μ g/ μ l) を 2.5 μ l 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 (Fig. 2-4)、このうち約 22 kDa のバンドを切り出し、本ペプチド断片の N 末端アミノ酸配列を分析することで XloA の内部アミノ酸配列を決定した。

その結果、XloA の N 末端アミノ酸配列 20 残基 (TTTIQNPILKGFNPDPISVR) と内部アミノ酸配列の 20 残基 (WLSLSERPGFLRLKGRHYLY) がそれぞれ決定された。決定したアミノ酸配列を National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Basic local alignment search tool (BLAST) (Altschul et al. 1990) を用いて相同性検索したところ、XloA の N 末端アミノ酸配列は *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)、*Bacillus halodurans* C-125 株由来の β -1,4-キシロシダーゼ (GenBank accession no. AP001519) および *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 株由来の β -1,4-キシロシダーゼ (GenBank accession no. AE007842) などの N 末端領域と類似性を示した。また、XloA の内部アミノ酸配列は *Chromohalobacter salexigens* DSM 株由来 α -L-アラビノフラノシダーゼ (GenBank accession no. CP000285) の Trp345–Gly359 領域と類似性を示した。これら XloA の部分アミノ酸配列と相同性が得られた酵素の多くは、約 530 アミノ酸残基からなり、遺伝子サイズは約 1,600 bp、さらに推定分子量は約 60,000 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 β -キシロシダーゼや α -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、XloA をコードする遺伝子が約 1,600 bp 程度であること、

さらに決定された XloA の内部アミノ酸配列が N 末端から約 350 残基目付近に位置していることが推定された。

II-2-3. *xloA* 遺伝子のクローニング

決定された XloA の N 末端および内部アミノ酸配列の 20 残基から、それぞれ縮重の少ないアミノ酸配列 (TTTIQNP および KGRHYLY) を選び、縮重プライマー (dxlo-F および dxlo-R プライマー) を設計した (Fig. 2-5)。このプライマーを用いて、*Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA を鋳型に PCR を行ったところ、1,128 bp の PCR 増幅産物 (dxlo) が得られた (Fig. 2-6)。dxlo の塩基配列を解読した結果、その推定アミノ酸配列中には II-2-2 で決定された XloA の N 末端および内部アミノ酸配列の 20 残基が存在していた (Fig. 2-7)。このことから、dxlo が *Vibrio* sp. XY-214 株由来の *xloA* 遺伝子に由来する遺伝子断片であることを確認できた。そこで、さらに dxlo の塩基配列をもとにプライマー (pxlo-F および pxlo-R プライマー) を設計し、*xloA* 遺伝子の全長を単離するためのプローブを作製した。

次に、作製したプローブを用いて II-1-8-7 に記した方法でサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、*Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA を *Xba*I と *Spe*I の 2 種類の制限酵素で消化することで、*xloA* 遺伝子を含む約 4 kbp の DNA 断片を得ることができた (Fig. 2-8)。しかしながら、他の制限酵素の組み合わせでゲノム DNA を処理した場合、プローブとハイブリダイズした DNA 断片のサイズが 6 kbp 以上と大きく、pBluescript II KS (-) ベクターへのライゲーションに適していないと判断した。そこで、ゲノム DNA を *Xba*I と *Spe*I の 2 種類の制限酵素で消化して得られた約 4 kbp 付近の DNA 断片をアガロースゲルから切り出して精製し、これを pBluescript II KS (-) ベクターの *Xba*I-*Spe*I サイトにライゲーションした。その後、ライゲーション反応液をコンピテントセル *E. coli* DH5 α 株と混合して形質転換させた。これら形質転換大腸菌の中から *xloA*/pBluescript プラスミドによって形質転換された *E. coli* DH5 α 株を、Blue-White selection とコロニーダイレクト PCR によりスクリーニングした。そ

の結果、40 株の白色コロニーの中から 1 株のポジティブコロニーが得られた (Fig. 2-9)。そこで、本形質転換大腸菌から *xloA*/pBluescript プラスミドを抽出し、挿入断片の全塩基配列を解読した。

II-2-4. *xloA* 遺伝子およびその周辺領域の塩基配列

xloA/pBluescript プラスミドに挿入された DNA 断片の全塩基配列を Fig. 2-10 に示した。本 DNA 断片は 4,206 bp からなり、完全な *xloA* 遺伝子の他に 3 種類の遺伝子が含まれていた。

xloA 遺伝子は本 DNA 断片の 629 塩基目の ATG を開始コドン、2,234 塩基目の 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) から構成されており、535 アミノ酸残基をコードしていた。また、ExPASy server (Gasteiger et al. 2003) によりその翻訳タンパク質の分子量は 60,835、等電点は pH 5.16 と推定された。推定アミノ酸配列の N 末端から 2 残基目のアミノ酸 (Thr, T) から始まる 20 残基と 357 残基目のアミノ酸 (Trp, W) から始まる 20 残基のアミノ酸配列は、先に決定した XloA の N 末端および内部アミノ酸配列とそれぞれ完全に一致した。また、SignalP server (Nielsen et al. 1997) 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、XloA 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* 遺伝子の ATG 開始コドンの 6 bp 上流には Shine-Dalgarno 配列と推定される配列 (GGAA) が存在していた。さらにその上流には、17 bp 離れた TTCATA と TACCCT が存在していた。この配列は大腸菌の RNA ポリメラーゼの σ サブユニットが認識するプロモーター配列である -35 配列 (TTGACA) および -10 配列 (TATAAT) と相同性を示した (Rosenberg and Court 1979)。一方、TAA 終止コドンの 51 bp 下流には ρ 因子非依存性ターミネーターと推定される回文配列 (Sugimoto et al. 1995) が存在していた。*xloA* 遺伝子のコドン使用頻度および構成アミノ酸を Table 2-10 に示した。*xloA* 遺伝子の GC 含量は 47.02%であった。

次に、*Vibrio* sp. XY-214 株由来 XloA の推定アミノ酸配列を BLAST により相同性検索した。その結果、XloA は *Bacillus* sp. KK-1 株 (GenBank accession no. AF045479) および *B. halodurans* C-125 株 (AP001519) 由来の β -キシロシダーゼと 47%の同一性を示した。次いで、*B. clausii* KSM-K16 株由来の β -キシロシダーゼ (AP006627) と 46%、*Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 株由来の α -L-アラビノフラノシダーゼ (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 (AF040720) と 45%、*Geobacillus stearothermophilus* T-6 株由来の β -キシロシダーゼ (AY690618) と 45%の同一性を示した (Table 2-11)。これら XloA と類似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) に属していたことから、XloA は GH43 に属することが示唆された。XloA と GH43 に属する他の糖質分解酵素のアミノ酸配列を比較したところ、各酵素とも N 末端領域におけるアミノ酸配列の保存性が高いのに対し、C 末端領域のアミノ酸配列の保存性が低いことがわかった (Fig. 2-11)。

先に述べたように *xloA*/pBluescript プラスミドに挿入された 4,206 bp の DNA 断片には、*xloA* 遺伝子の他に 3 種類の遺伝子 (ORF1-3) が存在していた (Fig. 2-12A)。ORF1 は *xloA* 遺伝子の 80 bp 上流に位置しており、転写方向は同じであった。しかしながら、ORF1 の塩基配列中には *Xba*I サイトが存在していたため、遺伝子の途中で切断されていた。ORF2 と ORF3 は *xloA* 遺伝子の下流に同じ転写方向で位置していた。各 ORF の塩基配列から推定されるアミノ酸配列を BLAST により相同性検索した結果、ORF1 は *E. coli* 由来の D-キシロースイソメラーゼ (AE014075) と 72%と高い同一性を示したことから、D-キシロースイソメラーゼ遺伝子 (*xylA*) であることが推定された。また、ORF2 は *E. coli* の *lac* オペロン構成遺伝子の 1 つであるガラクトシドアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*lacA*) (GenBank accession no. CP000243) 翻訳タンパク質と 43%の同一性を示した。従って、ORF2 はガラクトシドアセチルトランスフェラーゼ様遺伝子 (*gata*) であることが推定された。一方、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%、*Candida tropicalis* 由来の D-キシロースレダクターゼ (DQ665829) と 44%の同一性を示したことから、アルデヒドレダクターゼまたは D-キシロースレダクターゼ様遺伝子 (*alrA*) であることが推定された。

さらに、*alrA* 遺伝子の後半部分の塩基配列 (574 bp) が、*Vibrio* sp. XY-214 株由来β-1,3-キシラナーゼ遺伝子 (*txyA*; Araki et al. 2000) の下流域の塩基配列と完全に一致することが判明した (Fig. 2-12B)。すなわち、*xloA* 遺伝子をクローニングするために単離した 4,206 bp のゲノム DNA 断片と *txyA* 遺伝子をクローニングするために単離した 4,409 bp のゲノム DNA 断片が部分的に重複していることが判明した。

そこで、4,206 bp と 4,409 bp のゲノム DNA 断片が互いに連続したものであること確かめるために、*alrA* 遺伝子と *txyA* 遺伝子の全長を含む DNA 断片が増幅するように設計したプライマーを作製し、XY-214 株のゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、その塩基配列を解読した。その結果、PCR 増幅産物が *alrA* 遺伝子と *txyA* 遺伝子を含む遺伝子断片であることが確認され、*Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム上において *xloA* と *txyA* 遺伝子が *gatA* と *alrA* 遺伝子を隔てて隣接していることが明らかとなった (Fig. 2-12C)。

II-2-5. 形質転換大腸菌における rXloA の発現と精製

xloA/pET22b プラスミドによって形質転換された *E. coli* BL21 (DE3) を LB 培地 (800 ml) で培養し、IPTG により rXloA の発現を誘導した。その後、菌体内抽出液を HiTrap chelating HP カラム (5 ml) を用いて精製した。精製酵素は SDS-PAGE において単一のバンドとして検出され、その分子量は約 60,000 であり、XloA のアミノ酸配列から推定された分子量 (60,835) とほぼ一致した (Fig. 2-13)。また、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 2-12)。

II-2-6. rXloA の酵素学的性質

II-2-6-1. pH と温度の影響

rXloA の酵素活性および安定性に及ぼす pH と温度の影響を、PNP- β -D-キシロピラノシドを基質に用いて検討した。その結果、rXloA の 35°C における至適 pH は 7.0 であった。pH 6.5 での相対活性は約 30%、pH 8.0 での相対活性は約 20% であった (Fig. 2-14A)。また、本酵素を pH 3.0–12.0 の各 pH で 12 時間インキュベートして pH 安定性を調べたところ、pH 6.0–9.0 の範囲で安定であったが、pH 5.0 以下、pH 10 以上では安定性が極端に低下した (Fig. 2-14B)。一方、rXloA の pH 7.0 における至適温度は 35°C であり、40°C での相対活性は約 67%、50°C での相対活性は約 7.8% であった (Fig. 2-15A)。また、本酵素を 0–80°C の各温度で 20 分間インキュベートして熱安定性を調べたところ、30°C までは安定であったが、35°C では相対活性が 21.4% にまで低下し、40°C ではほぼ完全に失活することがわかった (Fig. 2-15B)。

II-2-6-2. PNP- β -D-キシロピラノシドに対する V_{\max} および K_m

rXloA の PNP- β -D-キシロピラノシドに対する K_m および V_{\max} は、それぞれ 0.244 mM および 1.822 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であった (Fig. 2-16)。

II-2-6-3. 基質特異性

rXloA は β -1,3-キシランや β -1,4-キシラン (birchwood キシランや oat spelt キシラン)、カルボキシメチルセルロース、ラミナリン (β -1,4-グルカン) などの多糖 (Fig. 2-17) ならびにラミナリオリゴ糖 (Fig. 2-18) には作用しなかった。

一方、rXloA は β -1,3-キシロオリゴ糖 (β -1,3-キシロビオース、-トリオース および -テトラオース) を分解して D-キシロースを生じた (Fig. 2-19)。また、僅かながら β -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未分解のオリゴ糖の存在が確認された (Fig. 2-20)。数種類の PNP 合成基質に対しては、rXloA は PNP- β -D-キシロピラノシ

ドを速やかに分解したが、それ以外の PNP 合成基質に対しては作用しなかった (Table 2-13)。

II-2-6-4. 重金属および化学試薬の影響

反応液に供試化学試薬を終濃度 1 mM となるように加え、35°C で 20 分間反応させ、各化学試薬が rXloA の酵素活性に及ぼす影響を調べた。その結果、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*-クロロメルクリ安息香酸) によって活性が著しく阻害された (Table 2-14)。

II-2-6-5. ゲルろ過クロマトグラフィーによる XloA の分子量推定

HiTrap chelating HP カラムにより精製された rXloA の分子量は SDS-PAGE において約 60,000 と推定されたが、Superdex 200 HR 10/30 カラムを用いて未変性状態の XloA の分子量を測定したところ、約 251,000 と推定された (Fig. 2-21)。また、XloA のアミノ酸配列から推定された分子量は 60,835 であった。このことから、XloA がホモ 4 量体を形成していることが示唆された。

II-3. 考察

Araki らは、 β -1,3 キシラン資化細菌である *Vibrio* sp. XY-214 株から β -1,3-キシラナーゼ遺伝子 (*txyA*) をクローニングし、その翻訳タンパク質の機能解析を行った (Araki et al. 2000)。 β -1,3-キシラナーゼは β -1,3 キシランに作用して β -1,3-キシロオリゴ糖を生ずる酵素であり、第 I 章で述べたように、これまで数種類の細菌やカビなどから単離されている。一方、 β -1,3-キシロオリゴ糖を加水分解して D-キシロースを生ずる β -1,3-キシロシダーゼに関する報告はこれまで皆無である。著者は *Vibrio* sp. XY-214 株が β -1,3-キシランを唯一の炭素源として生育可能であることは、本細菌が β -1,3 キシランを D-キシロースにまで分解する

能力を有しており、 β -1,3-キシロシダーゼを産生している可能性が高いと推測した。そこで本章では、XY-214 株から β -1,3-キシロシダーゼ遺伝子 (*xloA*) をクローニングし、その翻訳タンパク質の機能解明を試みた。

まず初めに *xloA* 遺伝子をクローニングするためのプローブを作製するため、*Vibrio* sp. XY-214 株から β -キシロシダーゼ (XloA) を精製し、XloA の N 末端および内部アミノ酸配列の 20 残基を決定した。その結果、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 N 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残基は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る。従って、XloA の N 末端アミノ酸残基が Met ではなく Thr であったことは、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 XloA の N 末端および内部アミノ酸配列をもとに縮重プライマーを作製し、XY-214 株のゲノム DNA を鋳型に PCR を行った。その後、PCR 増幅産物の塩基配列をもとにしてプローブを作製し、サザンブロット法により *xloA* 遺伝子をクローニングした。*xloA* 遺伝子の推定アミノ酸配列は、糖質加水分解酵素ファミリー43 (GH43) に属する β -キシロシダーゼや α -L-アラビノフラノシダーゼと相同性を示した。このことから、XloA が GH43 に分類されることがわかった。糖質加水分解酵素は、そのアミノ酸配列に基づいて 115 のファミリーに分類されている (2009 年 12 月現在) (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>, Henrissat 1991, Henrissat and Bairoch 1996)。 β -キシロシダーゼは、このうち GH3、39、43、52 および 54 の 5 つのファミリーに分類されており、GH43 には β -キシロシダーゼの他に α -L-アラビノフラノシダーゼ (EC 3.2.1.55)、アラビナナーゼ (EC 3.2.2.99)、キシラナーゼ (EC 3.2.1.8) およびガラクトナン 1,3- β -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.145) が属している。また、GH43 に属する酵素は GH62 に属する α -L-

アラビノフラノシダーゼとともに 5-fold β -propeller 構造を形成しており、クラン GH-F に分類されている。従って、XloA は 5-fold β -propeller 構造を形成していることが示唆された。既に触媒アミノ酸残基が明らかにされている *G. stearothermophilus* T-6 株由来の β -キシロシダーゼ (XynB3) との一次構造比較により、XloA 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. 2-11)。

形質転換大腸菌により発現させた rXloA を精製し、その酵素学的性質を検討した結果、rXloA の pH 7.0 における至適温度は 35°C であり、40°C での相対活性は約 67%、50°C での相対活性は約 7.8%であった (Fig. 2-15)。また、本酵素を 0–80°C の各温度で 20 分間インキュベートして熱安定性を調べたところ、30°C までは安定であったが、35°C では相対活性が 21.4%にまで低下し、40°C ではほぼ完全に失活した (Fig. 2-15)。GH43 に属する *Clostridium stercorarium* (Suryani et al. 2004)、*G. stearothermophilus* T-6 株 (Shallom et al. 2005) および *B. halodurans* C-125 株 (Smaali et al. 2006) 由来の β -キシロシダーゼの至適温度は、それぞれ 80、65 および 60°C であることから、XloA が熱安定性の低い β -キシロシダーゼであることがわかった。また、本酵素は EDTA 処理による活性の低下がみられなかったことから、その活性に 2 価金属イオンを必要としないことが明らかとなった。

rXloA は β -1,3-キシランや β -1,4-キシラン (birchwood キシランや oatspelt 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には作用しなかった (Fig. 2-17)。また、ラミナリオリゴ糖にも作用しなかった (Fig. 2-18)。一方、rXloA は β -1,3-キシロオリゴ糖 (β -1,3-キシロビオース、-トリオースおよび-テトラオース) を分解して D-キシロースを生じた (Fig. 2-19)。また、僅かながら β -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. 2-20)。現在までに報告された β -キシロシダーゼは全て β -1,4-キシロオリゴ糖に作用して D-キシロースを生成する β -1,4-キシロシダーゼであったのに対し、*Vibrio* sp. XY-214 株

由来XloAは β -1,4-キシロオリゴ糖よりも β -1,3-キシロオリゴ糖を強力に加水分解してD-キシロースを生成することから、本酵素は新規の糖質加水分解酵素 β -1,3-キシロシダーゼであることが判明した。これまで報告された β -1,3-キシラナーゼはGH26に属し、同ファミリーの β -マンナナーゼや β -マンノシダーゼと相同性を有するが、 β -1,4-キシラナーゼとは相同性を示さず、 β -1,4-キシラン分解活性ももたない。これに対して本XloAは、既報の β -1,4-キシロシダーゼと相同性を示し、僅かながら β -1,4-キシロオリゴ糖にも作用した。このことから、既報の β -1,4-キシロシダーゼが β -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をもたれる。

GH43に属する既報の β -キシロシダーゼには、 β -キシロシダーゼ活性に加えて α -L-アラビノフラノシダーゼ活性や β -D-グルコシダーゼ活性を有するものが報告されている (Utt et al. 1991 *Butyrivibrio fibrisolvens*, Whitehead and Cotta 2001 *Selenomonas ruminantium*, Sakka et al. 1993 *Clostridium stercorarium*, Uziie et al. 1985 *Chaetomium*)。従って、XloAにおいても β -キシロシダーゼ活性以外のグリコシダーゼ活性を有している可能性があると推測し、XloAを数種類のPNP合成基質と反応させ、活性の有無を調べた。しかしながら、本酵素はPNP- β -D-キシロピラノシド以外のPNP合成基質には作用しないことが判明した (Table 2-13)。また、XloAは β -1,3-キシロオリゴ糖に作用する際に糖転移活性を示さなかった。このことはGH3、39、52および54に属する β -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 β -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 (Smaali et al. 2006)。

SDS-PAGEおよびゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量の推定により、rXloAが分子量60,835のサブユニットからなるホモ4量体を形成していることが示唆された (Fig. 2-21)。GH43に属する β -キシロシダーゼのうち、*G. stearothermophilus* T-6株 (Brüx et al. 2006)も4量体を形成していることが報告されている。一方、*B. halodurans* C-125 (Smaali et al. 2006)や*B. pumilus* IPO (Xu et al. 1991)由来の β -1,4-キシロシダーゼは、それぞれ2量体および3量体である

ことが報告されている。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推定は必ずしも正確ではないため、結晶構造解析による XloA のサブユニット構造の解明が期待される。

G. stearothermophilus T-6 由来の β -1,4-キシロシダーゼ (XynB3) は既に構造解析されており、活性部位がある N 末端領域の five-bladed β -propeller 構造 (Met1-Ser318) と C 末端領域の β -sandwich 構造 (Glu330-Leu535) の 2 つのドメインから構成されている (Fig. 6-22A, Br  x et al. 2006)。XynB3 の構造を鋳型にホモロジーモデリング法 (Peitsch 1995, Arnold et al. 2006, Kiefer et al. 2009) により XloA の立体構造を予測したところ、XloA の 535 アミノ酸残基のうち、4 番目のトレオニン (Thr4) から 534 番目のグルタミン酸 (Glu534) までの立体構造が推定された (Fig. 6-22B)。XloA の 2 次構造には α -ヘリックスが存在せず、 β -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 β -propeller 構造からなる触媒ドメインが、C 末端領域 (Pro330-Glu534) には β -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 β -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。酵素を産業分野へ応用するためには、高い熱安定性や pH 安定性が要求されることから、XloA においてはアミノ酸置換などによる熱安定性の強化が期待される。

I 章で述べたように、糖質分解酵素は触媒モジュールに加えて糖質結合モジュール (CBM) を有しているものが多い。*G. stearothermophilus* T-6 株由来 XynB3 の C 末端領域にある β -sandwich ドメインは、その一次構造はどの CBM とも相同性を示さないが、その 3 次構造が嫌気性糸状菌 *Piromyces equi* 由来のファミリー 29 に属する CBM (CBM29) 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が、現在ではその機能を失い、4 次構造の形成に必要なドメインであ

ると推測されている (Brüx et al. 2006)。また、XynB3 の β -sandwich ドメインから伸びたループが five-bladed β -propeller 構造にある触媒部位へ達しており、このループが触媒部位に進入する基質の長さ (キシロースの重合度) を制限していることが示唆されている (Brüx et al. 2006)。しかしながら、XloA と GH43 に属する他の β -キシロシダーゼや α -L-アラビノフラノシダーゼの一次構造を比較すると、N 末端領域 (five-bladed β -propeller ドメイン) 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 (β -sandwich ドメイン) の保存性は極めて低いことがわかった (Fig. 2-11)。さらに *Cellvibrio japonicus* 由来の α -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 β -propeller ドメインのみから構成されており、 β -sandwich ドメインを持たないことから (Nurizzo et al. 2002)、触媒活性における 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。

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、 β -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 (Fig. 2-12)。xloA 遺伝子上流には不完全な D-キシロースイソメラーゼ遺伝子 (xylA)、下流にはガラクトシドアセチルトランスフェラーゼ様遺伝子 (gatA) とアルデヒドレダクターゼまたはキシロースレダクターゼ様遺伝子 (alrA) が存在していた。gatA 遺伝子の終止コドンから alrA 遺伝子の開始コドンまでは 32 bp しか離れておらず、gatA 遺伝子の下流にターミネーター配列が存在しないことから、gatA と alrA 遺伝子はオペロンを形成していることが示唆された。gatA 遺伝子の推定アミノ酸配列は *E. coli* の lac オペロン構成遺伝子の 1 つであるガラクトシドアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (lacA) (GenBank accession no. CP000243) の翻訳産物と 43% の同一性を示した。lacA 遺伝子上流に位置する lacZ (β -ガラクトシダーゼ) や lacY (ラクトースパーミアーゼ) 遺伝子の翻訳産物の機能は詳細に解明されているが、lacA 遺伝子の翻訳産物の

機能は未だ不明である (Lewendon et al. 1995)。従って、*gatA* 遺伝子の詳細な機能解析が期待される。*alrA* 遺伝子のさらに下流には、Araki らによって XY-214 株からクローニングされた β -1,3-キシラナーゼ遺伝子 (*txyA*) (Araki et al. 2000) が存在していた。

また、*txyA* 遺伝子の 188 bp 上流には 755 アミノ酸残基をコードする 2,268 bp からなる機能不明タンパク質 (XbpA) をコードする遺伝子 (*xbpA*) 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。*xbpA* 遺伝子は、 β -1,3-キシラナーゼ産生細菌である *Alcaligenes* sp. XY-234 株のゲノム DNA 上においても *txyA* 遺伝子の上流に位置していることが、Okazaki らによって明らかにされている (Okazaki et al. 2002)。XY-214 株由来 XbpA のシグナルペプチドを除いた推定アミノ酸配列は、XY-234 株由来 XbpA と 76% の同一性を示した。BLAST による相同性検索の結果、XY-214 株由来 XbpA の N 末端領域 (Asp38–Asp87) は、*Alcaligenes* sp. XY-234 株由来 β -1,3-キシラナーゼ (GenBank accession no. AB039953) の C 末端側にある CBM31 (β -1,3-キシラン結合モジュール) と 36% の同一性が得られた。このことから、XbpA の N 末端領域は β -1,3-キシランまたは β -1,3-キシロオリゴ糖との結合能を有しており、本タンパク質もまた β -1,3-キシランの代謝に関与していることが示唆された。今後は、XbpA の詳細な機能解析が期待される。

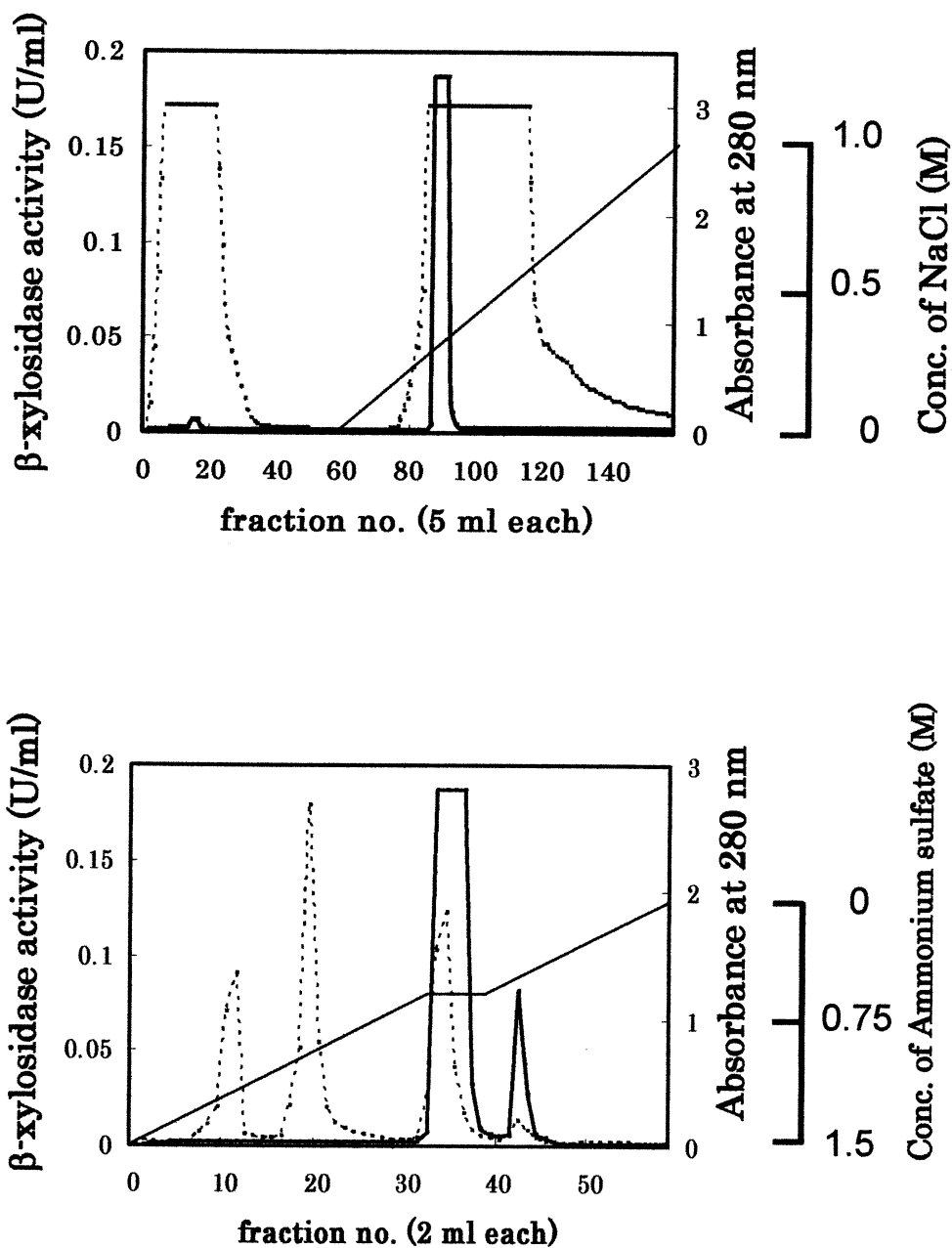


Fig. 2-1. Chromatograms of β -1,3-xylosidase from *Vibrio* sp. strain XY-214 on a DEAE Toyopearl 650M column (2.0 × 30 cm) (A) and Ether Toyopearl 650S column (1.0 × 10 cm) (B). —, β -xylosidase activity; , absorbance at 280 nm; ———, concentration of NaCl or ammonium sulfate.

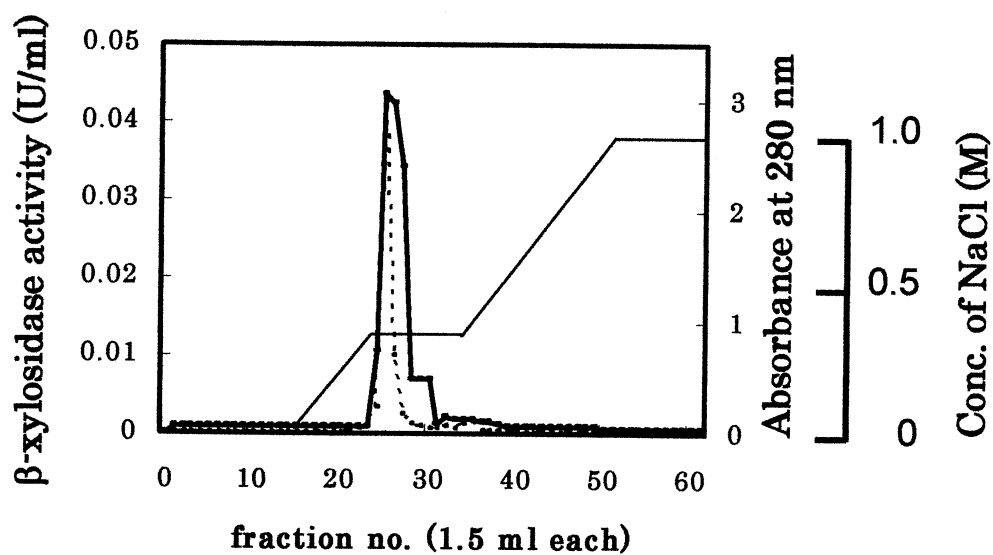


Fig. 2-2. Chromatogram of β -1,3-xylosidase from *Vibrio* sp. strain XY-214 on a Mono Q column (0.5 \times 5.0 cm). —, β -xylosidase activity ; , absorbance at 280 nm ; —, concentration of NaCl.

Table 2-9. Purification of the intracellular β -1,3-xylosidase from *Vibrio* sp. strain 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

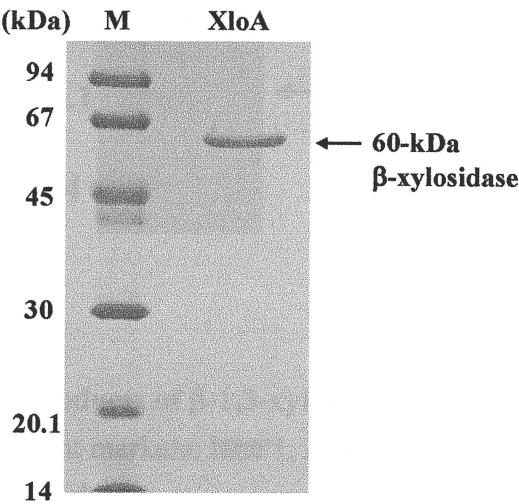


Fig. 2-3. SDS-PAGE of the purified β -1,3-xylosidase from *Vibrio* sp. strain XY-214.
Lane M, molecular weight markers.

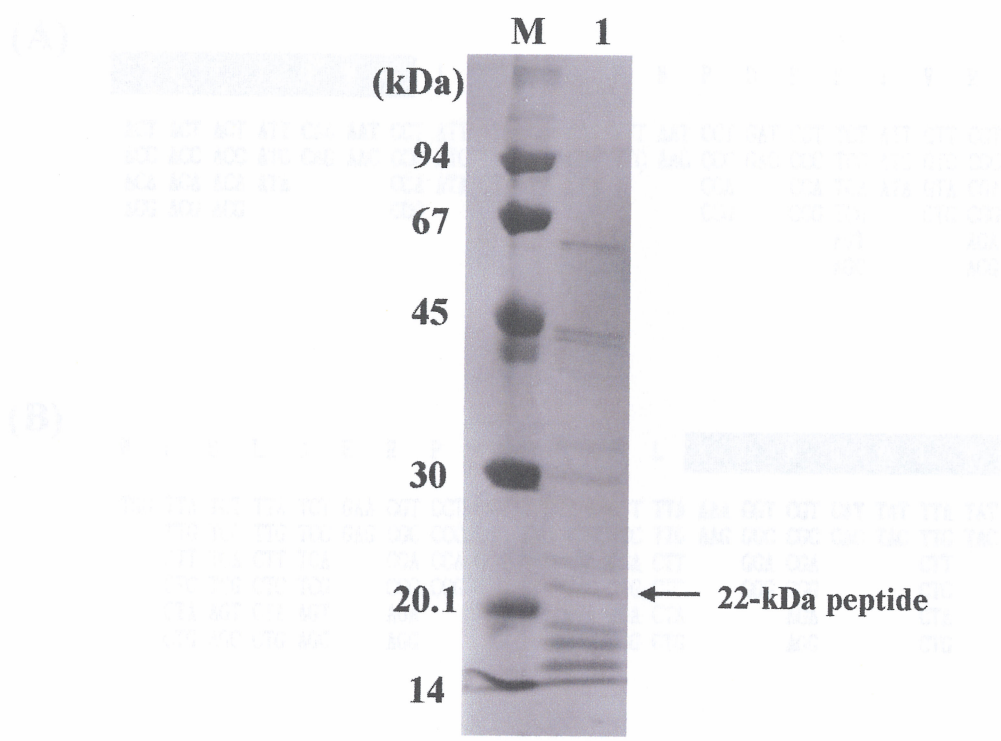


Fig. 2-5. Preparation of the degenerated primers on the basis of the N-terminal

Fig. 2-4. Enzymatic digestion products of β -1,3-xylosidase from *Vibrio* sp. strain XY-214. Lane M, molecular weight markers; lane 1; digestive products of β -1,3-xylosidase by lysylendopeptidase.

(A)

T	T	T	I	Q	N	P	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	K	G	R	H	Y	L	Y
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. 2-5. Preparation of the degenerated primers on the basis of the N-terminal amino acid sequences of XloA (A) and 22-kDa peptide obtained by lysylendopeptidase digestion of XloA (B).

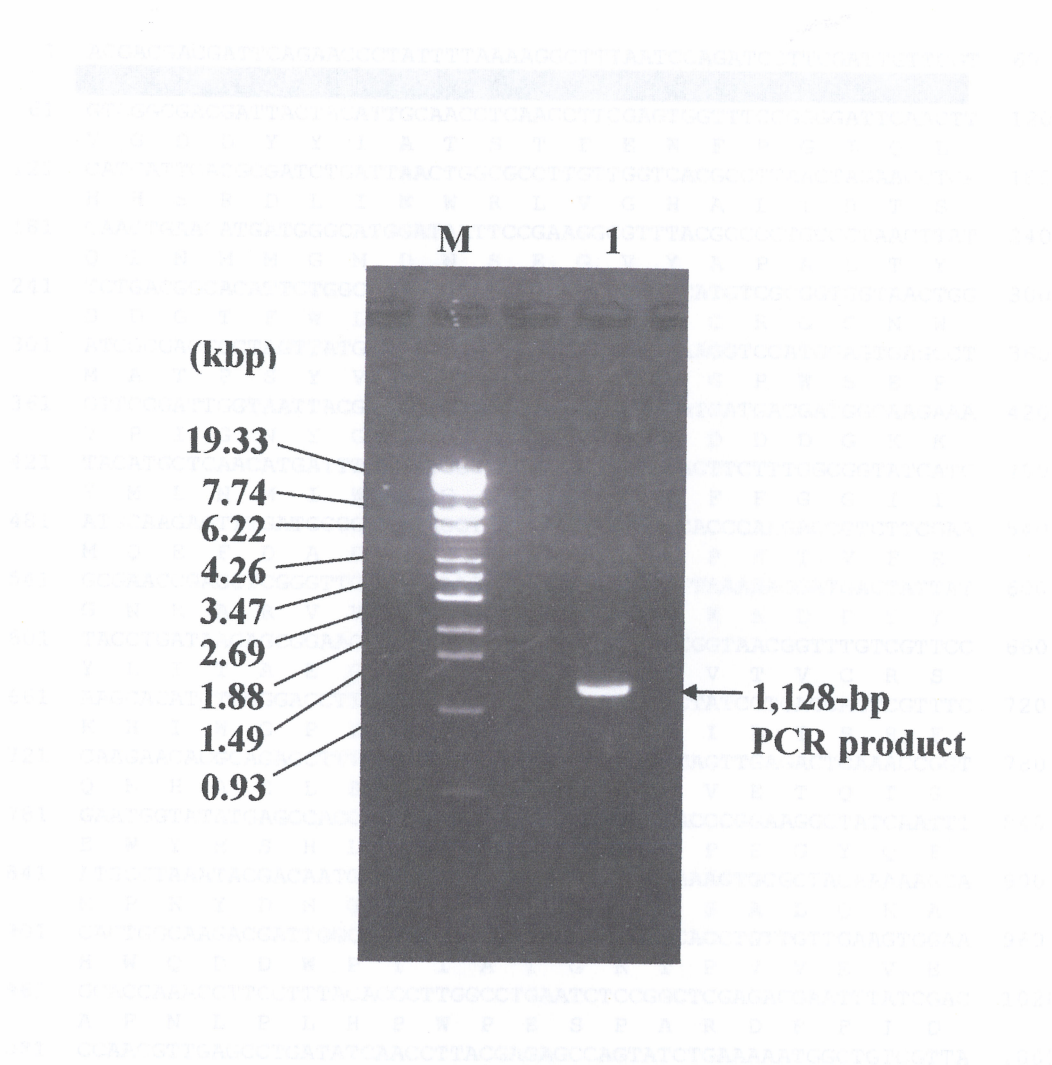


Fig. 2-6. Agarose gel electrophoresis of PCR product derived from genomic DNA of *Vibrio* sp. strain XY-214 using the degenerated primers. Lane M, molecular weight markers; lane 1; PCR product using the degenerated primers.

Fig. 3-3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of 1,128-bp PCR product from genomic DNA of *Vibrio* sp. strain XY-214. The nucleotide sequence is 1,128 bp. The deduced N-terminal and internal amino acid sequences are indicated by black background residues.

```

1  ACGACGACGATTTCAGAACCCCTATTTTAAAAGGCTTTAATCCAGATCCTTCGATTGTTTCGT 60
   T T T I Q N P I L K G E 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 CATCATTCACGCGATCTGATTAACCTGGCGCCTTGTGGTACAGCCTTAAC TAGAACCTCA 180
   H H S R D L I N W R L V G H A L T R T S
181 CAACTGAACATGATGGGCATGGATAATTCGGAAGGCGTTTACGCCCCTGCCCTAACTTAT 240
   Q L N M M G M D N S E G V Y A P A L T Y
241 TCTGACGGCACATTCTGGCTGTGCTTCTCGAATGTCCACTCATGTCGCGGTGGTAAC TGG 300
   S D G T F W L C F S N V H S C R G G N W
301 ATGGCGACGCCTAGTTATGTTGTGACAGCTGACAGCATTGAAGGTCCATGGAGTGAGCCT 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 E G K L V G A P K T V F E
541 GGGAACCGAGCTCGGGTTGTACTGAAGGCCCACTGCTTAAAAAGGACTATTAT 600
   G N R A R V V L K G P Q L L K K D D Y Y
601 TACCTGATAACAGCGGAAGGTGGTACAGAGCGCAATCACGCGGTAACGTTTGTCTGTTCC 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 GAATGGTATATGAGCCACCTGTGTGGCCGCGGTATTCCAAACCGGAAGGCTATCAATTT 840
   E W Y M S H L C G R R I P N P E G Y Q F
841 ATGCCTAAATACGACAATGGCTTCTCAATCTTAGGCCGAGAAAGTGCCTACAAAAAGCA 900
   M P K Y D N G F S I L G R E S A L Q K A
901 CACTGGCAAGACGATTGGCCATCGCAACAGGTAACACCTGTTGTTGAAGTGGAA 960
   H W Q D D W P Y I A T G K T P V V E V E
961 GCACCAAACCTTCCTTTACACCCTTGGCCTGAATCTCCGGCTCGAGACGAATTTATCGAC 1020
   A P N L P L H P W P E S P A R D E F I D
1021 CCAACGTTGAGCCTGATATCAACCTTACGAGAGCCAGTATCTGAAAAATGGCTGTCGTTA 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. 2-7. Nucleotide and deduced amino acid sequences of 1,128-bp PCR product from genomic DNA of *Vibrio* sp. strain XY-214. The nucleotide sequence is 1,128 bp. The determined N-terminal and internal amino acid sequences are indicated by black background residues.

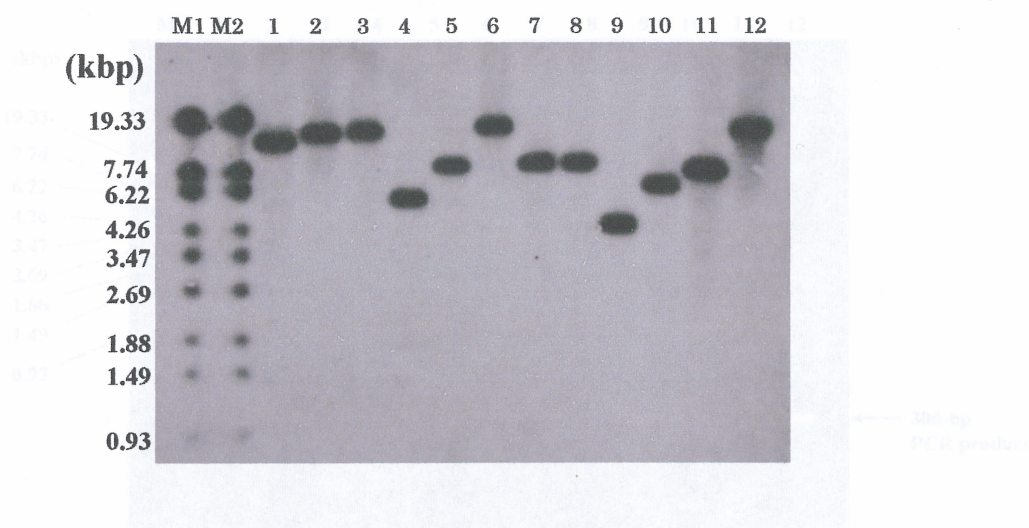


Fig. 2-8. Southern blot analysis of genomic DNA of *Vibrio* sp. XY-214 with *pxlo* DNA probe. Genomic DNA was digested by restriction enzymes. Sample of DNA (4 μ g) were electrophoresed in 1.0 % agarose gel. After separated by agarose gel electrophoresis, the DNA fragments were transferred to a Hybond-N⁺ membrane and hybridized with *pxlo* DNA probe. Lane M1 and 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.

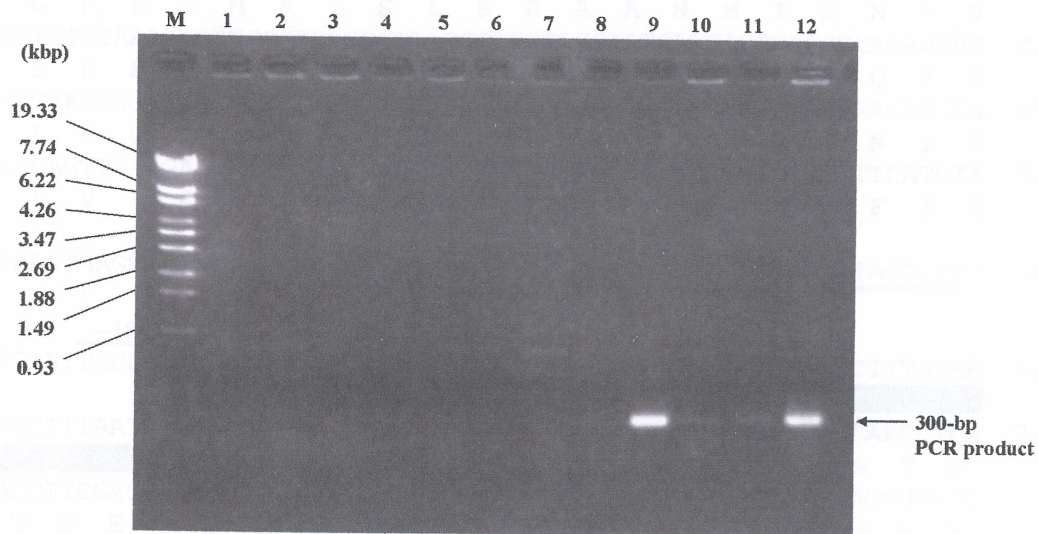


Fig. 2-9. Agarose gel electrophoresis of the products of colony direct PCR.

Lane M, standard markers (Marker 6); lane 1~11, PCR product amplified with pxlo-F and pxlo-R primers; lane 12, Positive control (Genomic DNA of *Vibrio* sp. strain XY-214 was used as a template).

XbaI

1 TCTAGAGAACGAGATCAAAGTAAACATTGAAGCAAACCACGCAACGCTTGCGGGTCACAG 60
L E N E I K V N I E A N H A T L A G H S
61 CTTCCACCATGAAGTTGCAACCGCTACATCACTTGGCTTATTTGGTTCAATCGATGCTAA 120
F H H E V A T A T S L G L F G S I D A N
121 CCGTGGTGACCCACAACCTAGGTTGGGATACTGACCAATTCCCGAACAGCGTTGAAGAAAA 180
R G D P Q L G W D T D Q F P N S V E E N
181 CACGTTAGTTATGTACGAAATCCTAAAAGCTGGCGGCTTTACAACAGGTGGCTTCAACTT 240
T L V M Y E I L K A G G F T T G G F N F
241 TGATGCTCGTGTTCGTCTCTTCTACAGAATTAGAAGACTTGTTCACGGTCACATCGG 300
D A R V R R P S T E L E D L F H G H I G
301 CGGCATGGATACTATGGCACTATCGCTAGAGCGTGCAGCTAACATGATCGAAAATGATGT 360
G M D T M A L S L E R A A N M I E N D V
361 GCTGTCTAAAAACATCGCTGAGCGTTACGCAGGTTGGAATGATGACCTAGGTCAGAAGAT 420
L S K N I A E R Y A G W N D D L G Q K I
421 CCTAAAAGGTGACCTTTCTCTTGCTGGTCTAGCGGCGTTTACTGAAGAGACGAACATCAA 480
L K G D L S L A G L A A F T E E T N I N
481 CCCAGTTAAAGAATCTGGTCGTCAAGAATACTTAGAGAACGTTGTAAATGGCTTCATCTA 540
P V K E S G R Q E Y L E N V V N G F I Y

541 CAAGTAAGTGATGATGTCTTGAACAAAGCCCAAGTATACTAATTCATATACTTAGGCTTT 600
K * -35
Stem and loop

601 TTTATTACCCTACCGTCTGGAAAAATTATGACAACCTACGATTTCAGAACCTATTTTAAAA 660
-10 SD M T T T T I Q N P I L K
661 GGCTTTAATCCAGATCCTTCGATTGTTCTGTGTCGGCGACGATTACTACATTGCAACCTCA 720
G F N P D P S I V R V G D D Y Y I A T S
721 ACCTTCGAGTGGTTTCCGGGGATTCAACTTCATCATTCACGCGATCTGATTAAGTGGCGC 780
T F E W F P G I Q L H H S R D L I N W R
781 CTTGTTGGTCACGCCTTAAGTAACTCACAACCTGAACATGATGGGCATGGATAATTCC 840
L V G H A L T R T S Q L N M M G M D N S
841 GAAGGCGTTTACGCCCTGCCCTAAGTATTCTGACGGCACATTCTGGCTGTGCTTCTCG 900
E G V Y A P A L T Y S D G T F W L C F S
901 AATGTCCACTCATGTGCGGTGGTAACTGGATGGCGACGCTAGTTATGTTGTGACAGCT 960
N V H S C R G G N W M A T P S Y V V T A
961 GACAGCATTGAAGGTCCATGGAGTGAGCCTGTTCCGATTGGTAATTACGGCTTTGATCCT 1020
D S I E G P W S E P V P I G N Y G F D P
1021 TCTCTGTTCCATGATGACGATGGCAAGAAATACATGCTCAACATGATTTGGGGTGGCCGT 1080
S L F H D D D G K K Y M L N M I W G G R
1081 GCAAAGACTAACTTCTTTGGCGGTATCATCATGCAAGAGTTTGATGCCGATGAAGGTAAG 1140
A K T N F F G G I I M Q E F D A D E G K
1141 CTTGTTGGCGCACCCAAGACCGTCTTCGAAGGGACCGAGCTCGGTTGTACTGAAGGCCCA 1200
L V G A P K T V F E G T E L G C T E G P
1201 CAACTGCTTAAAAAGGATGACTATTATTACCTGATAACAGCGGAAGGTGGTACAGAGCGC 1260
Q L L K K D D Y Y Y L I T A E G G T E R
1261 AATCACGCGGTAACGGTTTGTCTTCCAAGCACATCTGGGGACCTTATGAAGTTACCCA 1320
N H A V T V C R S K H I W G P Y E V H P
1321 GAAAATCCTATCCTGACCAGTCGTTTCCAAGAACACGCAGAGCTTTCACGTGCAGGTCAC 1380
E N P I L T S R F Q E H A E L S R A G H
1381 GGCTTTCTAGTTGAGACTCAAACCGGTGAATGGTATATGAGCCACCTGTGTGGCCGCCGT 1440
G F L V E T Q T G E W Y M S H L C G R R
1441 ATTCCAAACCCGGAAGGCTATCAATTTATGCCTAAATACGACAATGGCTTCTCAATCTTA 1500
I P N P E G Y Q F M P K Y D N G F S I L

1501 GGCCGAGAAAGTGCCTACAAAAAGCACACTGGCAAGACGATTGGCCATACATCGCAACA 1560
G R E S A L Q K A H W Q D D W P Y I A T
1561 GGTA AACACCTGTTGTTGAAGTGAAGCACCAAACCTTCCTTTACACCCTTGGCCTGAA 1620
G K T P V V E V E A P N L P L H P W P E
1621 TCTCCGGCTCGAGACGAATTTATCGACCCAACGTTGAGCCTGATATCAACCTTACGAGAG 1680
S P A R D E F I D P T L S L I S T L R E
1681 CCAGTATCTGAAAAATGGCTGTCGTTAAGCGAGCGACCAGGATTCTTACGTCTGAAAGGA 1740
P V S E K W L S L S E R P G F L R L K G
1741 CGCCACTATTTATATTCCCGTTACGAACAAAGCATGGTTGCTCGCCGATTCCAAGCGCAC 1800
R H Y L Y S R Y E Q S M V A R R F Q A H
1801 AATGCAACAGTAGAAACCAAGCTTGAGTTCAAGCCGAACACACCTTATGAAATGGCAGGG 1860
N A T V E T K L E F K P N T P Y E M A G
1861 TTATGTGCTTATTACGCACGTAATGGGCACTACTTTCTAAAAATGACTGCCAATGATCTA 1920
L C A Y Y A R N G H Y F L K M T A N D L
1921 GGCGAACGTGTTTTACAAGTTGTCGGTAACATCAATGATGTTTACGGTGAATACTCTAAC 1980
G E R V L Q V V G N I N D V Y G E Y S N
1981 GATGTCGTTATCGGTGATGCAGATACGGTCTACATGAGATTAGAGCTCAAACTCAATGG 2040
D V V I G D A D T V Y M R L E L K T Q W
2041 TATCAATATAGTTACTCACTGGATGGCGTCGACTGGTATGAGATTGGCCAGCCTTAAAC 2100
Y Q Y S Y S L D G V D W Y E I G P A L N
2101 AGCACACCGCTGTCAGATGAAGGCGGTCTGATATTTTCCGTTTCACAGGAAGCTTCGCA 2160
S T P L S D E G G P D I F R F T G S F A
2161 GCACTATTTGTTGCTGATATCACAGGGCAGAAACGCCATGCTGATTTTGACTACTTTGAG 2220
A L F V A D I T G Q K R H A D F D Y F E
2221 TACCTAGAGCATTAAGCTCTTGTTAATACTCTACCTTATCGGTTTCGCTCTCGCGATAAAT 2280
Y L E H *
2281 TAATCCCCTCATACTGCACATTCAATTTGCTGCGGTATGAGGTTTTCTTCAATTTATTAT 2340
Stem and loop
2341 TCAAATAACAAAGAGCCAAACCATACTTTGGTCACCATCATATCGGGTCAAATACCTCCC 2400
-35
2401 CCCTTAATATCAAACCCTCCATCAAATTTACGATTTTCTTGACCCATTAACCTAATTT 2460
-10
2461 AGCTTTTAAATGAGTTGTCACGTTACGCTACGTCACCTCGATATACTGGTTAAAAATTT 2520
2521 ATAGAGGGACAGACATGGCGGAACAGTTTCAGAAGATGATAAAGGGTGAACGTTTTAACG 2580
SD M A E Q F Q K M I K G E R F N
2581 TCTGGGACGAGGATTTAAAATCACGTCGCTTGATAACACGACAAATCACACATCAATTCA 2640
V W D E D L K S R R L I T R Q I T H Q F
2641 ACCAAACCCTCCCTACAGAACAAGGCTTACGAAGCACATTATTAGACCAACTATTTCTAA 2700
N Q T L P T E Q G L R S T L L D Q L F L
2701 ACGTTGGCAAAACTTAGAGGTATCACCGCCACTCACGGTCGATTACGGGGAACGTTCA 2760
N V G K N L E V S P P L T V D Y G E N V
2761 CCATTGGCGACGATGTGTTCACTAATACTTACCTTGGTGAACAGTGGGCCTATCC 2820
T I G D D V F I N S N F T L V N S G P I
2821 GTATTGGCTCTCGTGTAATGATTGCGCCCAACGTGAGTCTGTTCTCTATCAATCATGGCT 2880
R I G S R V M I A P N V S L F S I N H G
2881 TGTGCCCTGAACTCGAAAAACACACAGTGGCGTTTCGGCTTGATTACCCAGCCCCTATCA 2940
L C P E T R K T H S G V R L D Y P A P I
2941 CGATTGAAGACGACGTTTGGATTGGCGGTACACCGTTGTCTTGGCGGGAGTCACTATCG 3000
T I E D D V W I G G H T V V L A G V T I

3001	GAGCGGGTTGCGTCATCGGCGCTGGCTCTGTCGTGACCAAAGATATTTCCAAAACTGTA	3060
	G A G C V I G A G S V V T K D I P K N C	
3061	TTGCGTAGGCAACCCAGCTACCGTCATCCGAGAAATTGAACCCGGTGAATTACCTAAAG	3120
	I A V G N P A T V I R E I E P G E L P K	
3121	TTTTTTAAACGACTAATGGACACACGAACAAGGAGAACTCATGTCTAACATTACCGATAT	3180
	G F * M S N I T D I	
3181	CGCACTTCAATCTGGAGCAACCATTTCCTCAAGTAGGGCTTGGAACCTTGAAAGCGGATGA	3240
	A L Q S G A T I P Q V G L G T W K A D E	
3241	ACCCGGACAAACTTACGAAGCGGTTTCGTAGCGCCATCAAGCTTGGCTACAGACATTTTGA	3300
	P G Q T Y E A V R S A I K L G Y R H F D	
3301	CTGTGCCCCTGGCTACGGCAATGAAAAGAGATTGGCGATGCTCTAGTCGATGCTATGCA	3360
	C A P G Y G N E K E I G D A L V D A M H	
3361	CGATGAGGAAGTAACACGTGAAGAACTGTTTATAACTTCGAAACTCTGGAATGCCACCA	3420
	D E E V T R E E L F I T S K L W N A H H	
3421	TTTTCCAGAAGATGTAATGCCTAGCCTCAAGCAGACATTGGCTGATCTTAAATTGGACTA	3480
	F P E D V M P S L K Q T L A D L K L D Y	
3481	TCTCGACCTCTATTTAATGCACTGGCCTGTGCGCTTAAAAAGGTGTTGGATTTCCAGA	3540
	L D L Y L M H W P V A L K K G V G F P E	
3541	GAAAGGGGATGATTTTGTGTCGTTAGACGACCTTCCTTTGGAAAAGACATGGGAAGCAAT	3600
	K G D D F V S L D D L P L E K T W E A M	
3601	GGAAGAAGCACACATCAAAGGTTGGTAAAAGATCTTGGTGTCTCCAATTTTCAGTGCTAA	3660
	E E A H I K G L V K D L G V S N F S A K	
3661	AAAGCTGCACCATTTAAAAGGCAACTGTTTAATCCAACCGATAATGAACCAAGTTGAGAT	3720
	K L H H L K G N C L I Q P I M N Q V E M	
3721	GCACCCCTACCTACAGCAGCAAGAGCTTATCGACTACTGCCACTCACAAGGAATTGCGGT	3780
	H P Y L Q Q Q E L I D Y C H S Q G I A V	
3781	AACCGCTTATGCGCCGTTAGGATCTGGAGACCGACCTGAACTGCTCACAAGTGAGAATGA	3840
	T A Y A P L G S G D R P E L L T S E N E	
3841	GCCAACCCTCCTAGATCACCTCTTATCCAATCCATTGCCAATGAGCATTCACTGACTCC	3900
	P T L L D H P L I Q S I A N E H S V T P	
3901	GGCACAAGTGTTGATTGCATGGGGTTTACAGCGAAACATTGTCATGATCCCTAAGTCTGC	3960
	A Q V L I A W G L Q R N I V M I P K S A	
3961	AAACCCAGAGCGACAGCAGCTTAACCTCAACGCTCAGGAAGTGAACCTGACAACGGAAAA	4020
	N P E R Q Q L N L N A Q E V N L T T E N	
4021	CATGGCTGATATACAGAAGCTAGACCTTAACCTACCGCTACCTAGCTGGCGAATTCTGGGC	4080
	M A D I Q K L D L N Y R Y L A G E F W A	
4081	ATTAGAAGGCAGCCCTTATACGCTAGAAAACCTATGGGATGAACCTGTCGCTTAATCATT	4140
	L E G S P Y T L E N L W D E P V A *	
4141	AATCCAAGAAAAACCCGGCAACTATAGCCGGGTTTTTATTTGTCGTAACGAAACCCGGAG	4200
	Stem and loop	
4201	ACTAGT	4206
	<u>Spel</u>	

Fig. 2-10. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the 4,206-bp DNA fragment obtained from the genomic DNA of *Vibrio* sp. strain XY-214.

The sequence of the *xyIA* is incomplete. The *xyIA* coding region, nucleotide 1 to 547; The *xloA* coding region, nucleotide 628 to 2,235; The *gata* coding region, nucleotide 2,535 to 3,128; The *alrA* coding region, nucleotide 3,161 to 4,135. The putative promoter (−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. Regions corresponding to PCR primers used for amplification of *xloA* are shown in the boxes.

Table 2-10. Codon usage of the *xloA* gene

Codon	Number of codon	Codon	Number of codon	Codon	Number of codon	Codon	Number of codon
TTT-Phe	12 (2.24)	TCT-Ser	5 (0.93)	TAT-Tyr	14 (2.61)	TGT-Cys	5 (0.93)
TTC-Phe	14 (2.61)	TCC-Ser	3 (0.56)	TAC-Tyr	17 (3.17)	TGC-Cys	1 (0.19)
TTA-Leu	12 (2.24)	TCA-Ser	9 (1.68)	TAA-***	1 (0.19)	TGA-***	0 (0.00)
TTG-Leu	1 (0.19)	TCG-Ser	3 (0.56)	TAG-***	0 (0.00)	TGG-Trp	14 (2.61)
CTT-Leu	7 (1.31)	CCT-Pro	15 (2.80)	CAT-His	5 (0.93)	CGT-Arg	11 (2.05)
CTC-Leu	3 (0.56)	CCC-Pro	1 (0.19)	CAC-His	13 (2.43)	CGC-Arg	8 (1.49)
CTA-Leu	7 (1.31)	CCA-Pro	11 (2.05)	CAA-Gln	14 (2.61)	CGA-Arg	5 (0.93)
CTG-Leu	13 (2.43)	CCG-Pro	6 (1.12)	CAG-Gln	2 (0.37)	CGG-Arg	0 (0.00)
ATT-Ile	12 (2.24)	ACT-Thr	8 (1.49)	AAT-Asn	11 (2.05)	AGT-Ser	5 (0.93)
ATC-Ile	10 (1.87)	ACC-Thr	9 (1.68)	AAC-Asn	12 (2.24)	AGC-Ser	7 (1.31)
ATA-Ile	2 (0.37)	ACA-Thr	12 (2.24)	AAA-Lys	11 (2.05)	AGA-Arg	2 (0.37)
ATG-MET	14 (2.61)	ACG-Thr	5 (0.93)	AAG-Lys	8 (1.49)	AGG-Arg	0 (0.00)
GTT-Val	17 (3.17)	GCT-Ala	6 (1.12)	GAT-Asp	21 (3.92)	GGT-Gly	18 (3.36)
GTC-Val	7 (1.31)	GCC-Ala	6 (1.12)	GAC-Asp	11 (2.05)	GGC-Gly	20 (3.73)
GTA-Val	3 (0.56)	GCA-Ala	14 (2.61)	GAA-Glu	23 (4.29)	GGA-Gly	4 (0.75)
GTG-Val	2 (0.37)	GCG-Ala	5 (0.93)	GAG-Glu	14 (2.61)	GGG-Gly	5 (0.93)

Table 2-11. Identities of the XloA with other enzymes

Family numbers	Enzymes	Organisms	Length	Accession numbers	Identity (%)
GH43	β -Xylosidase	<i>Bacillus</i> sp. KK-1	533	AF045479	47
GH43	β -Xylosidase	<i>Bacillus halodurans</i> C-125	528	AP001519	47
GH43	β -Xylosidase	<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16	555	AP006627	46
GH43	α -L-Arabinofuranosidase	<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043	523	CP000285	46
GH43	β -Xylosidase and arabinofuranosidase	<i>Selenomonas ruminantium</i> GA192	583	AF040720	45
GH43	β -Xylosidase	<i>Geobacillus steurothermophilus</i> T-6	535	AY690618	45

B.h-Xyl	1: NVNRQNIIPPEHHDPSTVAVGDDYYIAISTFEWFFGVRIHHSRDLKHWFVSSSTTTTSQIDDKGNMNSGGIWAFCLS	80
B.k-Xyl	1: MKIIN--SVIKGFNPDPSTCRVGEDYYIAVSTFEWFFGVQIHHSKDLVNWPLIAHPIQVVSQIDMKGNPDSCGVWAPCLS	78
C.s-Arb	1: MAI-ITNEVLPPEYHDPSTMLRUDDDYYIAVSTFEWFFGVQIHHSRDLVHWRLLTYELTATTQIDMVGNIDSCGVWAPCLS	79
G.s-Xyl	1: MSKIK--NELLTGFHDPSTCRVGEDYYIAVSTFEWFFGVRIYFSKDLKNWRLVAREINRLSQINMIGNPDSCGVWAPCLS	79
V.s-Xlo	1: NTTTIQNIILKGFNPDPSTVAVGDDYYIAISTFEWFFGIQLHHSRDLINWRLVGHATTTTSQINMMMDNDEGVYAPAT	80
B.h-Xyl	81: SHDGTLYLIYTDVQWHEAFADAN--NYLVTAQNIETPSDFTYLNSSGDFSLFHDHDCRRWLVNNTIDYFKGNHFPAGI	159
B.k-Xyl	79: KSEKFWLIYTDVQVVDCAWKTCH--NYLVTCETVDEGGEIQINSSGDFSLFHDVQGRFYLLMLWHDHIGRHSFGGI	157
C.s-Arb	80: HAPGVYLIYTDVSRKCAFRNTH--NYLVTAENTETPSDFTYLNSSGDFSLFHDHDCGSSWLLNINIDFQGENAFAGI	158
G.s-Xyl	80: MSCKFWLIYTDVQVVEGWDGCH--NYLVTCETVDEGASDIYINSSGDFSLFHDHDCGRFYVIMYTLHFVDHHPFYGI	158
V.s-Xlo	81: NSDGTWLCFSNHSRCRGNMATPSVVTADSNESGPTSEVPIGNYGDFSLFHDHDCCKRYMLNINIGGAKTNFEGGI	160
B.h-Xyl	160: ILPEYSEAEQKIVGPVENYKGGDIQLTEGPHLYRKDGTYLILVAEGGTEHEHAATLARSQSIDGPFYETDSYELVSTG	239
B.k-Xyl	158: VMSEFVSREKRRIHQPMIIEESDIDKLTPAPHLYHIGDNYLITAEGGTRHEHAATLARSKHIEGVEYIHDNIELTTSWH	237
C.s-Arb	159: ALGRYDRISQSTSPVHNLEKCFRLGVTEAPHLYRNGTYLITAEGGTGTHAVTVARSASLLGPEYVDNDNFVLTSDP	238
G.s-Xyl	159: VLEYSVEQKKIVGEPHILKGGDLRIETGPHLYKNGTYLITAEGGTRNHAATLARSSTLYGPEYVHDNIELTTSWP	238
V.s-Xlo	161: IMPEFDADEGKIVCAPFTVTEGTELGCTEGGQLKDDTYLITAEGGTERNHAVTVCRSKHIWGPYEVHEDNIELTTSRF	240
B.h-Xyl	240: --QPELALCKAPHGSLVETQNEEWLAHICRRELK-----K---Y--CTLGRETATQRVNTEDEWLRIDEKGNHPLR	306
B.k-Xyl	238: EPRNPL--CKCGHASTVEIHTGEWLAHITGRRIHPADDSVIHQ---GYEPLGRETAIQKLEKCD--GWPYVAGCKEGRVE	312
C.s-Arb	239: GOAGQ--LCKASHASLVETQNEEWMAHICAREVVED-----K-----CTLGRETATQKCHTQDGLVRVMDSPHSIN	305
G.s-Xyl	239: YPRNPL--CKASHASTIHHITDEFLVHITGRRLPREGQPLEHR---GYEPLGRETAIQKLEKCD--GWPYVVGNGPSLE	313
V.s-Xlo	241: QEHAELSR--SHGFLAEQTGEWIMSHICGGRIPNPEGYQFMPKYDNGFSILGRESLCKRAHQDD--PYIATKTPVVE	318
B.h-Xyl	307: EVTA--DLPEHPFEKEPELDD--DAPO--HHQWNTLRI--ADPSWCSTIEERFCHDRIRGMESLTVHS--SLVAPRQ--SFHCEV	385
B.k-Xyl	313: VEA--PRISETKFPSTYQEVDCADRT--NMNFQTLRIETFKELGSTIERENHLRIYGRESLITFTFAFVARRWSLRFTA	391
C.s-Arb	306: --VEAPKLPPHPMPMENDRDE--SSPEKGYWNSTIERFEGEDWISTSEREGFLRIKGGESMQMHRSLILAPRLTDFHVEI	383
G.s-Xyl	314: IDG--SSVEEVSWEKDYDEKDD--DGDTONHHFQTLRIELGEDIAT--KAPFGHLRIYGRESLITRFTFAFVARRWPHFHVA	392
V.s-Xlo	319: VEA--NLPLHPWPESPARDEFIDP--TSLIST--LPEVSEKWLTSIEREGFLRIKGRHYLYRYEYSMTVAREFAHNAIV	395
B.h-Xyl	386: EKLELYQES--FHMAGVITDDEHDVYHIVTWHBEK--KCIQIIQTKGGNYDELLASPIPLAEEK--AVYLKG--IHRETM	463
B.k-Xyl	392: ETAVDFNEET--EQAGGVVNTNENNTALQVYDLDLGHIEDVTICDNFTFSQPIKDKIVI--PRD--IQYVYL--VNVEWE	468
C.s-Arb	384: EQLEYSFEN--FQMAGSIIITDNTDYAY--CVVHHARGNC--GIIESRHGQYDELLTERVALPEGP--IRLM--ATIHNRL	460
G.s-Xyl	393: ETKVSFRPTT--EQSAGGVVNTNQNWTTLQI--VHBEKGIIEMLTCDHLVDQPLRGREIVVPDD--IEYVYL--VTVQAT	470
V.s-Xlo	396: EKLEFKNTPYE--MAGCA--FARNGHYFKMTANDLGEV--VQVGNINDVYGEYSNDVVIGDA--DTV---YMLELKTQ	470
B.h-Xyl	464: HLYFKQEGEAE--QPVGPTIDVTHMSDLSAKQV--R--FTCTEVMATQ--LSGTTKPPADEFDYERKSIDQ	528
B.k-Xyl	469: TYYYSYFNKKDYKIEIPLESKKSDPYVRGG--GFTCAEVGMQCQTSSAHQHADFDEYMKBE--	533
C.s-Arb	461: QFHVASVDEA--RTIGVIDIRHLSIDIAADYI--R--FTCTEVLCAQLGCRRAADFDYDRPFP--	523
G.s-Xyl	471: TYKYSYSFDGMNIDLPVTFESYKISDIYIKSR--AAFTCAEVGMHCRGSSQNNYADFDEYLYKEL--	535
V.s-Xlo	471: WYQYSYSLDGVDTYEIGPALNSTPLSDIEGGPDIFRF--TSEAFALFVALITGQRHADFDYEEYLEH--	535

Fig. 2-11. Sequence alignment of the amino acid sequences of several GH43 enzymes. The sequences are identified as follows: B.h-Xyl, *Bacillus halodurans* C-125 β -xylosidase (AP001519); B.k-Xyl, *Bacillus* sp. KK-1 β -xylosidase (AF045479); C.s-Arb, *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 α -L-arabinofuranosidase (CP000285); G.s-Xyl, *Geobacillus stearothermophilus* T-6 β -xylosidase (AY690618); V.s-Xlo, *Vibrio* sp. strain XY-214 β -1,3-xylosidase (AB300564). 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.

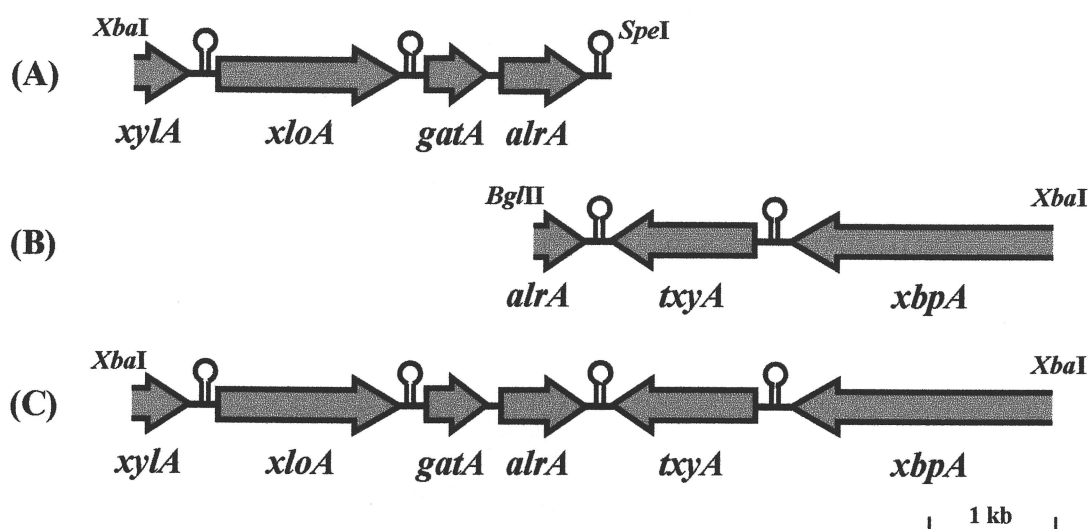


Fig. 2-12. Organization of the *xloA* and *txyA* loci on the genomic DNA of *Vibrio* sp. strain XY-214. The sequence of the *xylR* and *xbpA* genes are incomplete. Hairpin like marks indicate putative transcription terminators. (A) The 4,206-bp DNA fragment obtained in the cloning process of the *xloA* gene. (B) The 4,409-bp DNA fragment obtained in the cloning process of the *txyA* gene. (C) 8,041-bp β -1,3-xylan utilization gene cluster. The *xylA* gene encodes a D-xylose isomerase; *xloA* encodes a β -1,3-xylosidase; *gatA* encodes a putative galactoside acetyltransferase; *alrA* encodes an aldehyde reductase; *txyA* encodes a β -1,3-xylanase; *xbpA* encodes a putative β -1,3-xylan-binding protein.

Table 2-12. Purification of rXloA expressed in the recombinant *E. coli*.

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 HP	23.2	15.3	1.52	2.92	37

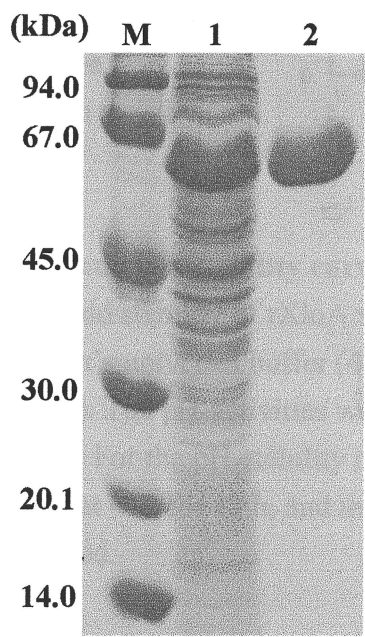


Fig. 2-13. SDS-PAGE of the purified rXloA. Lane M, molecular weight markers; lane 1, the crude extract; lane 2, the purified rXloA.

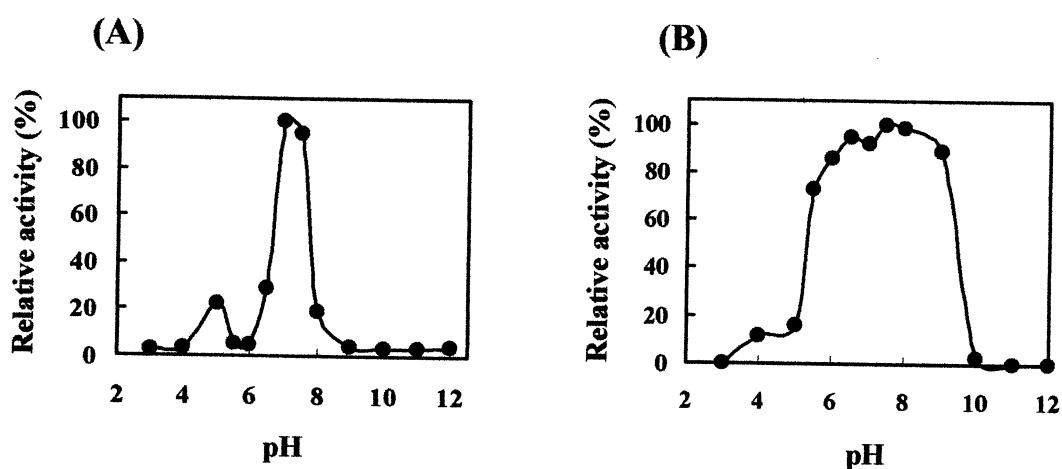


Fig. 2-14. pH-activity curve (A) and pH-stability curve (B) of the purified rXloA. The effects of pH on the activity and stability of rXloA were examined at various pHs (3.0–12.0) in Britton and Robinson's universal buffer (40 mM phosphoric acid, 40 mM boric acid, and 40 mM acetic acid). The pH-activities were assayed under the conditions described for the standard method. For the pH-stability measurements, the enzymes were preincubated at various pHs at 4°C for 12 h, and the residual activity was then measured using the standard method.

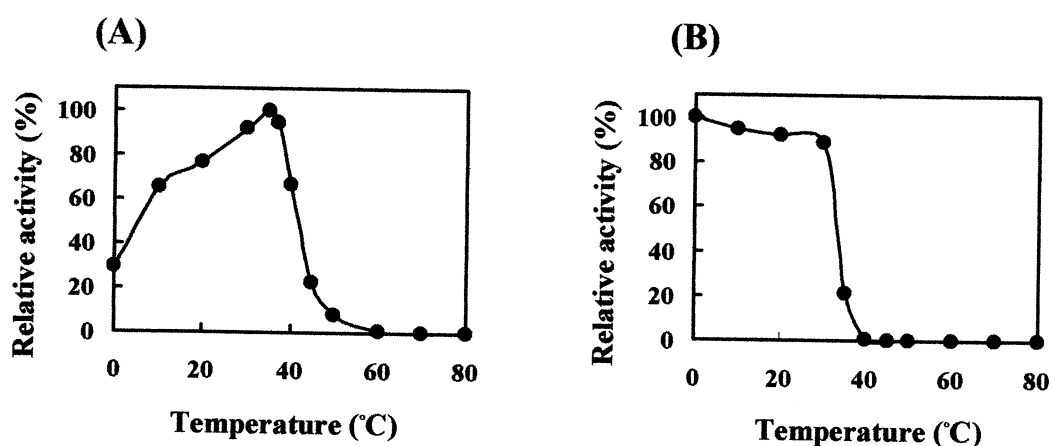


Fig. 2-15. Temperature-activity curve (A) and temperature-stability curve (B) of the purified rXloA. The effects of temperature on the activity of rXloA were determined for a range between 0°C to 80°C. With the exception of temperature, the assay conditions were the same as those described for the standard method. For the temperature-stability measurements, the enzymes were preincubated at various temperatures at pH 7.0 for 20 min, and the residual activity was measured using the standard method.

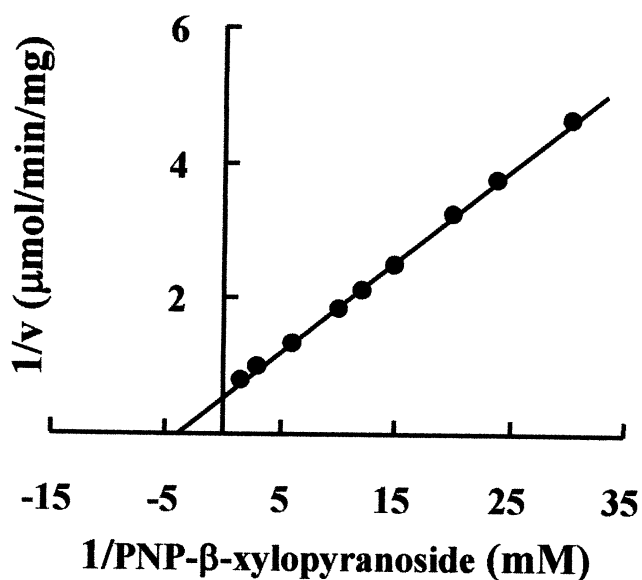


Fig. 2-16. Lineweaver-Burk plot for the purified rXloA with PNP- β -xylopyranoside as a substrate. To determine the kinetic parameters, enzyme assays were performed in 50 mM MES-NaOH (pH 7.0) containing 0.1–2.0 mM PNP- β -xylopyranoside. The reaction mixtures were incubated for 1 min at 35°C. The apparent K_m (mM) and V_{max} ($\mu\text{mol/min/mg}$) were calculated from Lineweaver-Burk plots.

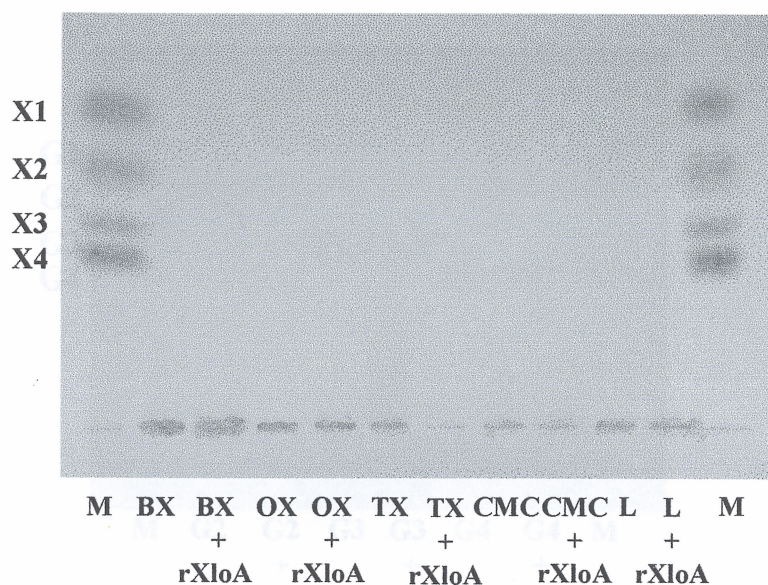


Fig. 2-17. Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of several polysaccharides with rXloA. The reaction mixture contained 20 μ l of rXloA (0.928 U/ml) and 20 μ l of each polysaccharide in 50 mM MES-NaOH (pH 7.0). The reaction was carried out at 30°C for 12 h. Lane M, β -1,4-xylooligosaccharides (X1~X4); lane BX, birchwood xylan; lane OX, oat spelt xylan; lane TX, β -1,3-xylan; lane CM, carboxymethylcellulose; lane L, laminaran.

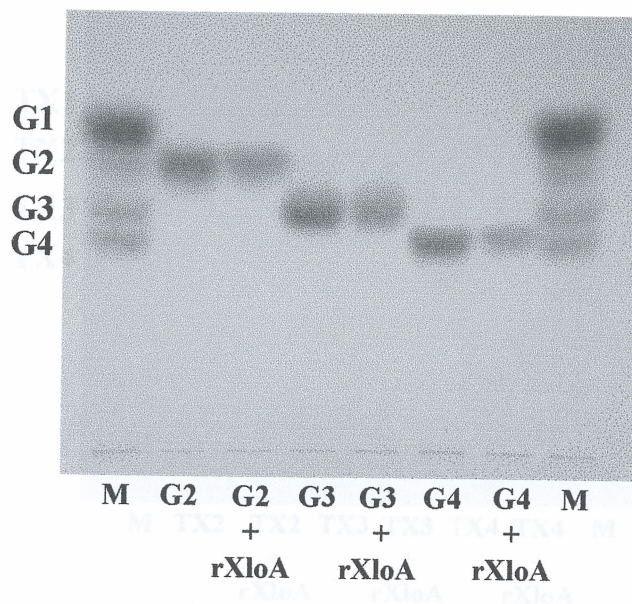


Fig. 2-18. Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of laminarioligosaccharides with rXloA. The reaction mixture contained 20 μ l of rXloA (0.928 U/ml) and 20 μ l of each laminarioligosaccharide in 50 mM MES NaOH (pH 7.0). The reaction was carried out at 30°C for 12 h. Lane M, laminarioligosaccharides (G1~G4); lane G1, D-glucose; lane G2, laminaribiose; lane G3, laminaritriose; lane G4, laminaritetraose.

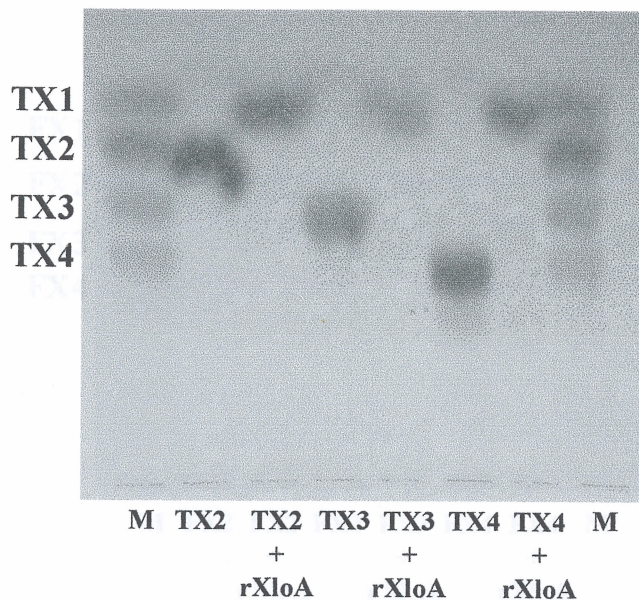


Fig. 2-19. Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of β -1,3-xylooligosaccharides with rXloA. The reaction mixture contained 20 μ l of rXloA (0.928 U/ml) and 20 μ l of each β -1,3-xylooligosaccharide in 50 mM MES NaOH (pH 7.0). The reaction was carried out at 30°C for 12 h. Lane M, β -1,3-xylooligosaccharides (TX1~TX4); lane TX1, D-xylose; lane TX2, β -1,3-xylobiose; lane TX3, β -1,3-xylotriose; lane TX4, β -1,3-xylotetraose.

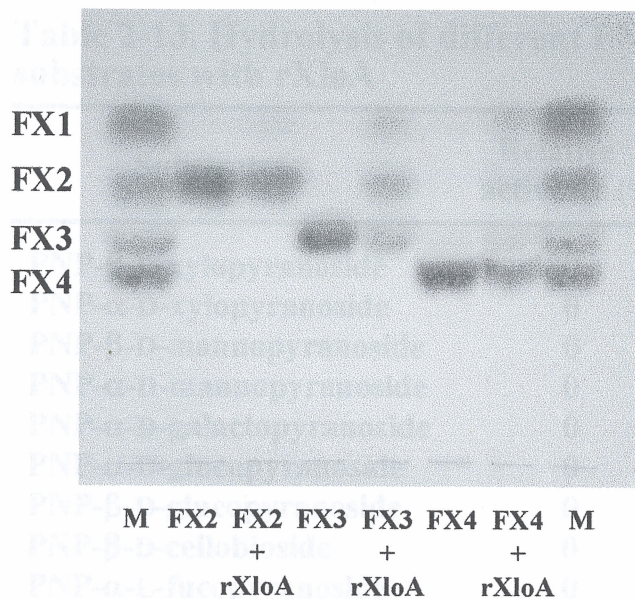


Fig. 2-20. Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of β -1,4-xylooligosaccharides with rXloA. The reaction mixture contained 20 μ l of rXloA (0.928 U/ml) and 20 μ l of each β -1,4-xylooligosaccharide in 50 mM MES NaOH (pH 7.0). The reaction was carried out at 30°C for 12 h. Lane M, β -1,3-xylooligosaccharides (FX1~FX4); lane FX1, D-xylose; lane FX2, β -1,3-xylobiose; lane FX3, β -1,3-xylotriose; lane FX4, β -1,3-xylotetraose.

Table 2-13. Hydrolysis of different PNP-substrates with rXloA

Substrates	Relative activities (%)
PNP-β-D-xylopyranoside	100
PNP-α-D-xylopyranoside	0
PNP-β-D-mannopyranoside	0
PNP-α-D-mannopyranoside	0
PNP-α-D-galactopyranoside	0
PNP-α-D-glucopyranoside	0
PNP-β-D-glucopyranoside	0
PNP-β-D-cellobioside	0
PNP-α-L-fucopyranoside	0
PNP-α-L-arabinofuranoside	0
PNP-α-L-arabinopyranoside	0
PNP-β-D-glucuronide	0

Table 2-14. Effect of various metal ions and chemical reagents on rXloA activity

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

* 1 NBS : *N*-Bromosuccinimide

* 2 DTT : (±)-Dithiothreitol

* 3 EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

* 4 NEM : *N*-Ethylmaleimide

* 5 PCMB : *p*-Chloromercuribenzoic acid

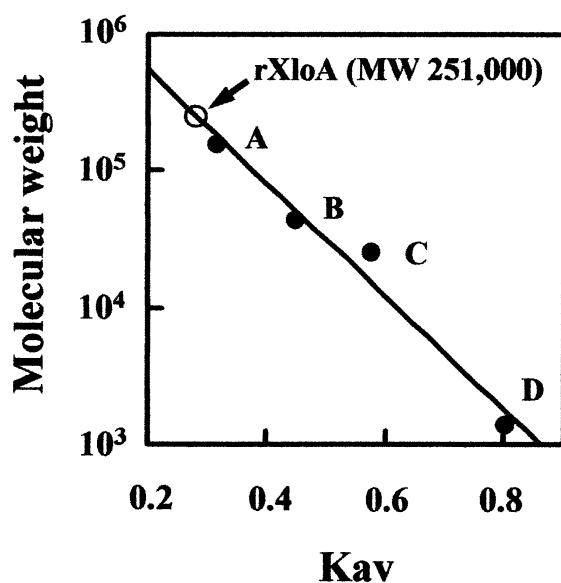
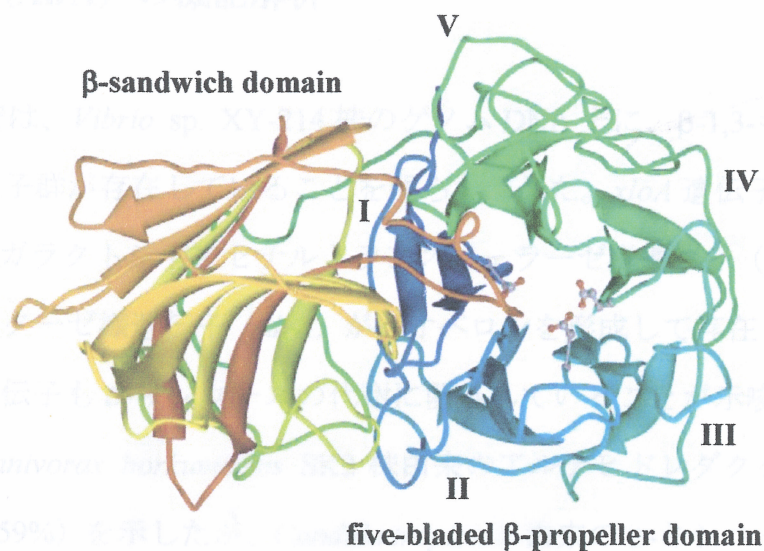


Fig. 2-21. Estimation of the molecular weight of rXloA by a Superdex 200 HR 10/30 column (GE Healthcare). For the determination of native molecular mass, rXloA were applied to a Superdex 200 HR 10/30 column equilibrated with 50 mM MES-NaOH (pH 7.5) containing 0.15 M NaCl. Molecular mass standards included aldolase (A, MW 158,000), ovalbumin (B, MW 43,000), chymotrypsinogen A (C, MW 25,000), and vitamine B₁₂ (D, MW 1,355).

(A)



(B)

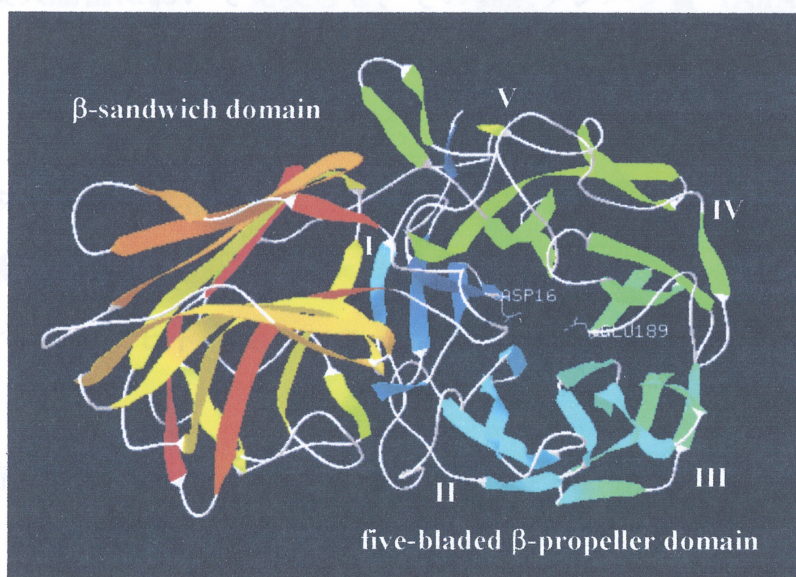


Fig. 2-22. Comparison of the three-dimensional structure of XloA and XynB3.

(A) A ribbon representation of the monomeric unit of β -1,4-xylosidase (XynB3) from *G. stearothermophilus* T-6. (B) Predicted model of monomeric XloA from *Vibrio* sp. strain XY-214. The three-dimensional structure of a monomeric XloA was predicted by SWISS-MODEL with the XynB3 of *G. stearothermophilus* T-6 as a template. The peptide chain is denoted in blue (N-terminal) to red (C-terminal). The blades of the catalytic domain are numbered I–V.

第 III 章 *Vibrio* sp. XY-214 株由来アルデヒドレダクターゼ様酵素 (AlrA) の機能解析

第 II 章では、*Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA 上に、 β -1,3-キシラン資化関連酵素遺伝子群が存在していることを明らかにした。*xloA* 遺伝子と *txyA* 遺伝子の間には、ガラクトシドアセチルトランスフェラーゼ様遺伝子 (*gatA*) とアルデヒドレダクターゼ様遺伝子 (*alrA*) が、オペロンを形成して存在しており、これら 2 つの遺伝子も D-キシロースの代謝に関与していることが示唆された。*alrA* 遺伝子は *Alcanivorax borkumensis* SK2 株由来のアルデヒドレダクターゼと最も高い同一性 (59%) を示したが、*Candida tropicalis* 由来の D-キシロースレダクターゼとも 44% の同一性を示した。このことから、*alrA* 遺伝子が D-キシロースレダクターゼをコードしている可能性が高いと推測された。本章では、*alrA* 遺伝子を形質転換大腸菌において発現させ、その翻訳タンパク質 (AlrA) の機能解明を試みた。

III-1. 実験材料および実験方法

III-1-1. 試薬

p-ニトロベンズアルデヒド (Nacalai Tesque)

他の試薬は特にことわらない限り、Wako の試薬を用いた。

IV-1-2. 使用した菌株、培地およびプラスミド

形質転換用の宿主として *E. coli* XL1-Blue 株 (Stratagene) および *E. coli* BL21 (DE3) 株 (Novagen) を使用した。タンパク質の発現には pCold TF DNA ベクター (Takara) を用いた。*E. coli* の培養には LB 培地 (1% トリプトン, 0.5% 酵母エキス, 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% (w/v) になるように添加した。

III-1-3. アルデヒドレダクターゼの活性測定

800 μ l の 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に 500 μ l の 1 mM NADPH (Wako) と 200 μ l の精製酵素液を加え、これに基質として 500 μ l の 4 mM *p*-ニトロベンズアルデヒド (100% エタノールに溶解後、蒸留水で希釈) を添加することで反応を開始した。その後、NADPH の酸化による A_{340} 値の減少を吸光度計により測定した。

III-1-4. 形質転換大腸菌における組換え体 AlrA (rAlrA) の発現と機能解析

III-1-4-1. 発現用プラスミド (*alrA*/pCold) の構築

Vibrio sp. XY-214 株由来 β -1,3-キシロシダーゼ遺伝子 (*xloA*) の下流に位置している推定アルデヒドレダクターゼ遺伝子 (*alrA*) の機能を明らかにするために、形質転換大腸菌により rAlrA を発現させ、その酵素学的性質を検討した。

まず初めに、第 II 章で決定された *alrA* 遺伝子の塩基配列をもとに *alrA* 遺伝子増幅用のプライマー (*alrA*-F プライマー : 5'-GGCATTCCATATGTCTAACATTACCGAT-3', *alrA*-R プライマー : 5'-TATACTCGAGTTAAGCGACAGGTTCATCCC-3') を作製し、XY-214 株のゲノム DNA を鋳型に PCR を行った。*alrA*-F および *alrA*-R プライマーにはそれぞれ *Nde*I および *Xho*I サイトを付加した(下線)。PCR の反応組成および反応条件は、それぞれ Table 3-1 と Table 3-2 に示した。PCR による *alrA* 遺伝子の増幅をアガロースゲル電気泳動で確認した後、ゲルから *alrA* 遺伝子を精製し、これを制限酵素処理 (*Nde*I および *Xho*I) した。さらに、制限酵素処理した *alrA* 遺伝子をアガロースゲル電気泳動した後、これをゲルから精製し、発現ベクターである pCold TF DNA ベクターの *Nde*I-*Xho*I サイトにライゲーションした。その後、ライゲーション反応液をコンピテントセル *E. coli* XL1-Blue 株と混合して形質転換させ、これを LB 寒天培地に接種して 37°C で 16 時間培養した。次に、寒天培地上に増殖したコロニーを爪楊枝でピックアップしてコロニーダイレクト PCR を行うことで、*alrA* 遺伝子断片が挿入された pCold TF DNA ベクター (*alrA*/pCold) によ

って形質転換された *E. coli* XL1-Blue 株を選別した。その後、得られた形質転換大腸菌から *alrA*/pCold プラスミドを抽出し、挿入断片の塩基配列を解読することで、PCR による塩基置換が生じていないことを確認した。なお、発現タンパク質の N 末端領域には、ヒスチジントグと発現タンパク質の可溶化を助ける分子シャペロン (Trigger factor: TF) が付加されるように設計した。

Table 3-1. Composition of PCR solution

Component	Volume (μl)
H ₂ O	78.5
10×ExTaq Buffer	10.0
2 mM dNTP	8.0
Genomic DNA (100 ng/μl)	1.0
<i>alrA</i> -F primer (50 pmol/μl)	1.0
<i>alrA</i> -R primer (50 pmol/μl)	1.0
Ex Taq Polymerase (5 unit/μl)	0.5

Table 3-2. PCR condition

94°C	0.5 min	30 cycles
94°C	0.5 min	
59°C	0.5 min	
72°C	1.1 min	
4°C	hold	

III-1-4-2. 形質転換大腸菌における rAlrA の発現と精製

III-1-4-1で構築した*alrA*/pColdプラスミドを、*E. coli* BL21 (DE3) 株に導入して形質転換した。得られた形質転換大腸菌を5 mlのLB培地 (100 μg/ml アンピシリンを含む) に接種し、37°Cで16時間培養した (種培養)。その後、培養液の1 mlを500 ml容三角フラスコに入れた160 mlのLB培地に接種し、37°Cで培養した (本培養)。培養液の600 nmにおける吸光度 (A_{600}) が0.4–0.5に達した後、培養液にIPTGを終濃度1 mMとなるように添加し、さらに15°Cで20時間培養を続けた。この種培養から本培養までの操作を同時に5回行い、合計800 mlの培養液を得た。次に、培養液を遠心分離 (12,000 g, 15 min) して菌体を回収し、これにあらかじめ冷却しておいた30 mlの緩衝液A (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液, 0.5 M NaCl, 10 mM イミダゾール, pH 7.4) を加えて懸濁させた。この懸濁液を氷上で超音波処理 (out put 3, duty 60, 1 min×5) に供して菌体を破碎し、破碎液を遠心分離 (14,000 g, 15 min) した。得られた上清を0.45 μmフィルター (Advantec) でろ過したものを粗rAlrA溶液とした。

次に、粗 rAlrA 溶液をあらかじめ緩衝液 A で平衡化しておいた HiTrap chelating HP カラム (5 ml; GE Healthcare) に添加し、同緩衝液を用いて非吸着タンパク質を完全に溶出させた後、同緩衝液と緩衝液 B (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液, 0.5 M NaCl, 500 mM イミダゾール, pH 7.4) の間で濃度勾配溶出し、rAlrA を溶出させた。溶出条件は II-1-9-2 に示した条件と同様に行った。分画後、SDS-PAGE で単一のバンドが検出された画分を集めて 4,000 ml の 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して透析 (4°C) した。さらに、トロンビン処理により精製タンパク質の N 末端側に付加された TF とヒスチジントグを除去した。すなわち、精製タンパク質 1 mg 当たり 10 unit のトロンビン (Nacalai Tesque) を加えて 19°C で 16 時間反応させた。その後、遊離した TF およびヒスチジントグから rAlrA を分離するために、反応液を緩衝液 A で透析した後、再度 HiTrap chelating HP カラムに添加した。

素通した rAlrA 溶液を 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して透析した後、さらにこれをあらかじめ 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した Resource Q カラム (1 ml; GE Healthcare) に添加し、同緩衝液を用いて非吸着タンパク質を完全に溶出させた。その後、同緩衝液と 1.0 M NaCl を含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) の間で濃度勾配溶出を行った。本クロマトグラフィーは FPLC システムを用いて行い、分画条件は流速 1.0 ml/min で分画容量を 2.0 ml とした。タンパク質の検出は、溶出液の 280 nm における吸光度を測定することにより行った。溶出画分を集め、20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して透析したサンプルを rAlrA 精製標品とし、以後の実験に用いた。なお、精製酵素は氷上で保存した。

III-1-4-3. rAlrA の基質特異性

III-1-3 に示した方法で、基質として *p*-ニトロベンズアルデヒド (終濃度 1 mM) の他に D-キシロース、L-アラビノース、D-グルコース、D-マンノース、D-フルクトースおよびマルトース (終濃度 20 mM) を使用し、活性を比較した。

III-2. 実験結果

第 II 章において単離された *alrA* 遺伝子は、975 bp からなる ORF から構成されており、324 アミノ酸残基をコードしていた。また、ExPASy server (Gasteiger et al. 2003) によりその翻訳タンパク質の分子量は 36,367、等電点は pH 4.75 と推定された。本章では、*alrA* 遺伝子の機能を明らかにするために、形質転換大腸菌において rAlrA を発現させ、その基質特異性を調べた。精製 rAlrA は SDS-PAGE において分子量約 32,000 のバンドとして検出された (Fig. 3-1)。rAlrA の基質特異性を調べた結果、基質として *p*-ニトロベンズアルデヒド (終濃度 1 mM) を使用した場合、NADPH の酸化による A_{340} 値の減少がみられた (Fig. 3-2)。しかしながら、D-キシロース、L-アラビノース、D-グルコース、D-マンノース、D-フルクトースおよびマルトース (終濃度 20 mM) を基質とした場合、 A_{340} 値の減少はわずかなものであった。

III-3. 考察

アルデヒドレダクターゼ (EC 1.1.1.2) は、アルドースレダクターゼ (EC 1.1.1.21) およびカルボニルレダクターゼ (EC 1.1.1.184) とともにアルド・ケトレダクターゼ (AKR) スーパーファミリーに属している (Bohren et al. 1989)。また、アルデヒドレダクターゼとアルドースレダクターゼのアミノ酸配列は互いに類似性を示すことが知られている。

Vibrio sp. XY-214 株由来 *alrA* 遺伝子は、ガラクトシドアセチルトランスフェラーゼ様遺伝子 (*gatA*) とオペロンを形成しており、本オペロンは *xloA* と *txyA* 遺伝子の間に位置していた (Fig. 2-12)。*alrA* 遺伝子の翻訳タンパク質である AlrA の推定アミノ酸配列は、*Alcanivorax borkumensis* SK2 株、*Cyanothece* sp. CCY0110 株、*Salinibacter ruber* DSM 13855 株、*Mus musculus* および *Homo sapiens* 由来のアルデヒドレダクターゼとそれぞれ 59、52、51、46 および 46% の同一性を示した (Table 3-3)。これら AlrA と高い類似性を示したタンパク質はすべて

AKR ファミリー1 (AKR1) に属していたことから、本酵素が AKR1 に属することが示唆された。また、AlrA は AKR2 に属する *Candida tropicalis*、*Pichia guilliermondii* および *Candida shehatae* 由来の D-キシロースレダクターゼとも、それぞれ 44、43 および 43% の同一性を示した。このことは、アルデヒドレダクターゼとアルドースレダクターゼのアミノ酸配列が互いに類似性を有するという事実と一致していた。AKR スーパーファミリーに属する酵素において高度に保存されている触媒アミノ酸残基が、AlrA においても Asp47、Tyr51、Lys81 および His114 として保存されていた (Fig. 3-3, Tarle et al. 1993, Bohren et al. 1994)。また、NADPH との結合に関与する IPKS モチーフも保存されていた (Bohren et al. 1991)。

alrA 遺伝子の機能を明らかにするために、形質転換大腸菌において rAlrA を発現させ、その基質特異性を調べた。その結果、アルデヒドレダクターゼの典型的な基質である *p*-ニトロベンズアルデヒドを基質として使用した場合、NADPH の酸化による A_{340} 値の減少がみられた (Fig. 3-2)。しかしながら、D-キシロース、L-アラビノース、D-グルコース、D-マンノース、D-フルクトースおよびマルトースを基質とした場合、 A_{340} 値の減少はわずかなものであった。このことから、*alrA* 遺伝子がコードする AlrA が、AKR1 に属するアルデヒドレダクターゼであることが明らかとなった。*alrA* 遺伝子は *xloA* と *txyA* 遺伝子の間に存在しており (Fig. 2-12)、さらに、*alrA* 遺伝子がコードする AlrA の推定アミノ酸配列が D-キシロースレダクターゼとも類似性を示した。このことから、実験開始当初は AlrA が D-キシロースレダクターゼをコードしており、D-キシロースの代謝に関与していることが推測された。しかしながら、本実験結果から AlrA が D-キシロースレダクターゼではないことが明らかとなった。

微生物による D-キシロース代謝では、まず D-キシロースをその異性体である D-キシルロースに変換する必要がある。D-キシロースの D-キシルロースへの変換には 2 種類の経路が知られている。*Candida shehatae*、*Pachysolen tannophilus* および *Pichia stipitis* などの D-キシロース資化性酵母の場合、まず D-キシロース

を D-キシロースレダクターゼによりキシリトールに変換し、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リトールを D-キシルロースに変換する 2 段階反応によって行われる。一方、主に細菌では、D-キシロースイソメラーゼの作用により D-キシロースは直接 D-キシルロースに変換される。従って、D-キシロースレダクターゼが主に真核生物に特徴的な酵素であることから、AlrA が D-キシロースレダクターゼではないことが支持された。しかしながら、AlrA がアルデヒドレダクターゼであることが明らかとなったが、本酵素の細胞内での機能は不明である。

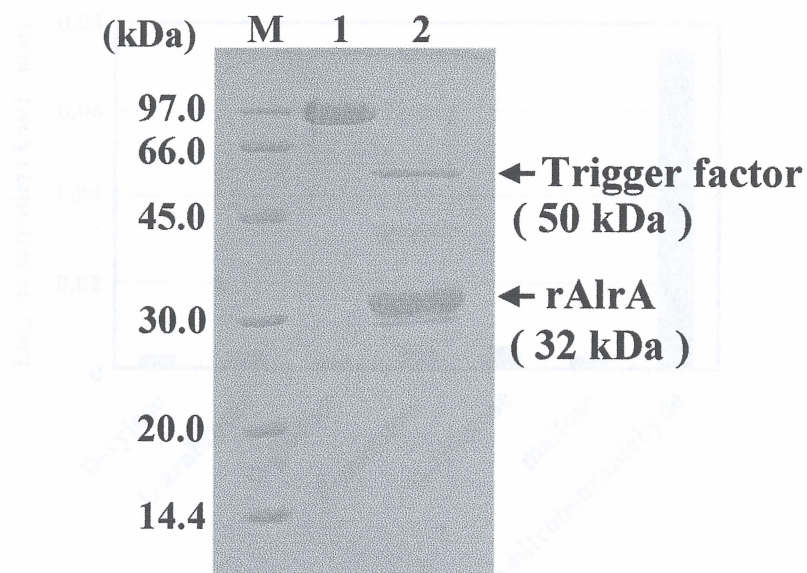


Fig. 3-1. SDS-PAGE of the rAlrA. Lane M, standard markers; lane 1, rAlrA fused with a Trigger factor (TF) and a six-His tag which was purified with HiTrap chelating HP column; lane 2, rAlrA which was purified with HiTrap chelating and Resource Q columns after the removal of a TF and a six-His tag by thrombin protease.

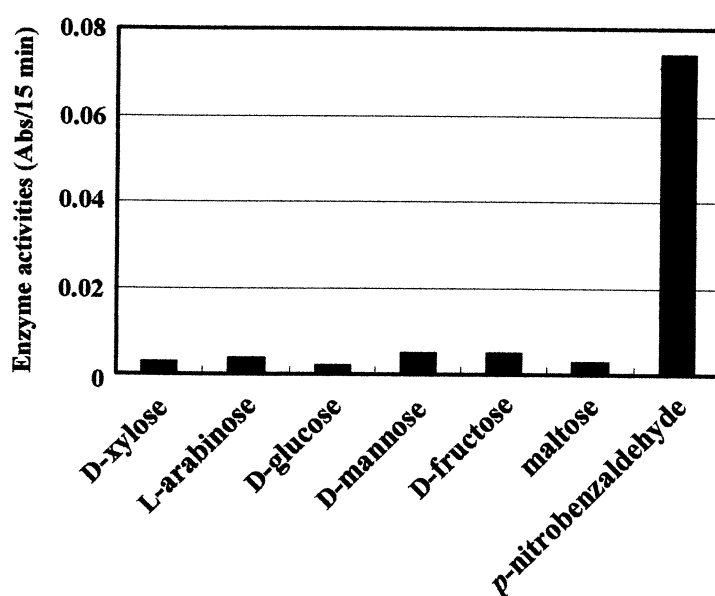


Fig. 3-2. The NADPH-dependent reduction of various carbonyl compounds by rAlrA. The purified enzyme was assayed in the standard assay condition for reduction with various substrates. Each value represents the mean of triplicate measurements.

Table 3-3. Identities of the AlrA with other enzymes

Organisms	Enzymes	Identities (%)
<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	Aldehyde reductase	59
<i>Cyanothece</i> sp. CCY0110	Aldehyde reductase	52
<i>Salinibacter ruber</i> DSM 13855	Aldehyde reductase	51
<i>Mus musculus</i>	Aldehyde reductase	46
<i>Homo sapiens</i>	Aldehyde reductase	46
<i>Candida tropicalis</i>	D-Xylose reductase	44
<i>Pichia guilliermondii</i>	D-Xylose reductase	43
<i>Candida shehatae</i>	D-Xylose reductase	43

```

A.b-ALR : ---MRTLTFENGDTLEMLSLGTWHSAP-GEVYNAVRSEIEMGYRHIDCAHIYGNEDIEIRALSDVLSAGTVTR-EQLWIT 75
C.s-ALR : MKTLT--LNNGNII-POFGLGTWRSEPGVKNAV-KYLSVGYRHIDCAPIYGNREVESEGLTESFQENVVK-RENIFIT 75
H.s-ALR : MAASCVLHTGQKM-ELIGLGTWSEPGQVKAIV-KYLSVGYRHIDCAAIYGNBEIEEALKEDVGPGKAVERBELFVT 78
H.m-ALR : MTASSVLHTGQKM-ELIGLGTWSEPGQVKAIV-KHALSASGRHIDCASVYGNBETIEEALKESVSGSKAVERBELFVT 78
V.s-AlrA : MSNITDIALQSGATIEQVGLGTWKADEPGQTYEAVRSIKLSYRHFDCAPIYGNBEIEEDALVDAMHDEEVTR-BELFIT 79

A.b-ALR : SKLWNSDIAPEDVCEAMETTERNLQ---EDYLDLYLMHNEVVLKPGVS-FEESADDMVSLNDLPVETMAAMEALVDNML 151
C.s-ALR : SKLMNRRYKKQVIEAHKKTIQDLQLLQDLYLDLYLIHNEVAFKPNVN-FEDTSGLVPLSEVPLIETMQGMEQAIDEG 154
H.s-ALR : SKLMNTKHEPDEVVEAHKKTIADLQ---EDYLDLYLMHNEVYFERGDNPEEKKNADGTICVDSTHYKETWKALEALVAK 155
H.m-ALR : SKLMNTKHEPDEVVEAHKKTIADLQ---EDYLDLYLMHNEVYFERGDNPEEKKNADGTVRYDSTHYKETWKALEALVAK 155
V.s-AlrA : SKLWNAHEPDEVMESEKQTIADLK---EDYLDLYLMHNEVVLKKGVS-FEEKGDDFVSLDDLPLEKTMEAMEEAHIKGL 155

A.b-ALR : TRQIEVSNFVSVKKLQDLIGKAQRKEAMNQVELHEYLQEQSMLDFQQQGGIHLTAYAE LSGSDRPAGLRAEGEAEALLEDPI 231
C.s-ALR : VKNIEVSNFSEIKKLENIKANSRIQESMNQVECHEYLOQDELLTYCKKNNTAFATSEPLGSKRDPDFVKNNDNEEILHENEV 234
H.s-ALR : VQAEISNENSRQIDDLISVASVREAVLQVECHEYLAQNELIAHQARGLEVTAENSELGSSEDRWRDPD-E-EVLLDEEPV 233
H.m-ALR : VKAEISNENSRQIDDLISVASVREAVLQVECHEYLAQNELIAHQARGLEVTAENSELGSSEDRWRHFD-E-EVLLDEEPV 233
V.s-AlrA : VKDIEVSNFSAKKLHLHKGNCILQETIMNQVEMHEYLQEQELIDYCHSQQIAVTAYAE LSGSDRPELLTSENEETLIDHPL 235

A.b-ALR : IHEIADRHRAAPQVITISALHENTAVIEPKSVNREHLKCNLAEEELTSLSDMDAIRSDKHRVYVDGGFWAQPQGSYTV 311
C.s-ALR : IKNLIAQKHQATTACILIQMAIEBGTVVIEKSVSEERTIQENFEAQNVLDVDEMEQIKNENQNYRYVDGSFFALPNSSYTV 314
H.s-ALR : VLADAEEKYGRSPACILRLNQVQKVICIEKSIETSPHLCNIKVFDFTFSPSEMKQLNAENKNWRY----- 298
H.m-ALR : VLADAEEKHGRSPACILRLNQVQKVICIEKSIETSPHLCNIKVFDFTFSPSEMKQLDAENKNWRY----- 298
V.s-AlrA : IQSIANEHSVTPACVITAMGLQPNIVMIEKSAHEEQQLNLNAQEVNLTENMADIQKDLNRYLLAGEFWALEGSPYTL 315

A.b-ALR : ANLWDD----- 317
C.s-ALR : ESIWA----- 319
H.s-ALR : ---IV--PMLTVDGKRVPRDAGHPLYPFNDPY 325
H.m-ALR : ---IV--PMITVDGKRVPRDAGHPLYPFNDPY 325
V.s-AlrA : ENLWDEPVA----- 324

```

Fig. 3-3. Comparison of the deduced amino acid sequences of aldehyde reductases. The sequences of ALR from *Alcanivorax borkumensis* SK2 (A.b-ALR), *Cyanotheca* sp. CCY0110 (C.s-ALR), *Homo sapiens* (H.s-ALR), *Mus musculus* (M.m-ALR), and *Vibrio* sp. strain XY-214 (V.s-AlrA) are aligned. The amino acid residues conserved in the five sequences are highlighted. The putative active site residues are indicated by triangles. Dots represent the predicted NADPH-binding motifs, IPKS.

第 IV 章 *Vibrio* sp. XY-214 株由来 D-キシロースイソメラーゼ (XylA) の機能解析

1984 年以降、地中海沿岸域において変異型緑藻イチヅタ (*Caulerpa taxifolia*) が異常繁殖し、漁業や生態系に大きな被害をもたらしている (Meinesz and Hesse 1991)。 *C. taxifolia* の主要細胞壁成分は β -1,3-キシランである。そこで著者は、本海藻に β -1,3-キシラナーゼと β -1,3-キシロシダーゼを作用させて D-キシロースにまで糖化し、エタノール発酵する技術を確立すれば、本海藻の有効利用に貢献できるのではないかと考えた。しかしながら、エタノール発酵の担い手である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、D-キシロースを炭素源としてエタノール発酵することができない。これに対して、D-キシロースの異性体である D-キシルロースであれば発酵できるため、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を作用させて D-キシルロースに変換する必要がある。第 II 章では、*Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA 上において *xloA* 遺伝子の上流に D-キシロースイソメラーゼ (XylA) をコードしていると思われる不完全な ORF (*xylA*) の存在を明らかにした。そこで、この D-キシロースイソメラーゼ様遺伝子が大腸菌で発現させ、得られた発現タンパク質が D-キシロースを D-キシルロースに変換する能力があるかどうかを調べるために、本章では XY-214 株から *xylA* 遺伝子の全長をクローニングし、その翻訳タンパク質の酵素学的性質を検討した。

IV-1. 実験材料および実験方法

IV-1-1. 試薬

- ・ D-キシルロースは Sigma から購入した。

他の試薬は、特にことわらない限り Wako のものを使用した。

IV-1-2. 使用した菌株、培地およびプラスミド

クローニングには宿主として *E. coli* XL1-Blue 株 (Stratagene)、ベクターとして pT7Blue ベクター (Novagen) および pBluescript II KS(-) ベクター (Stratagene) を使用した。タンパク質の発現には *E. coli* BL21 (DE3) 株 (Novagen) と pET22b (+) ベクター (Novagen) を用いた。*E. coli* の培養には LB 培地 (1% トリプトン, 0.5% 酵母エキス, 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% (w/v) になるように添加した。

IV-1-3. D-キシロースイソメラーゼの活性測定

D-キシロースイソメラーゼの活性測定はシステイン-カルバゾール-硫酸法 (Dische and Borenfreund 1951) により行った。すなわち、200 μ l の 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) と 50 μ l の 40 mM D-キシロース溶液 (終濃度 5 mM) および 50 μ l の 40 mM MgSO₄ 溶液 (終濃度 5 mM) の混合液に、100 μ l の酵素液を加えて 40°C で 10 分間反応させた。その後、反応液に 80 μ l の 1.5% システイン塩酸塩溶液を加え、氷上で冷却することにより反応を停止した。次に氷上で冷却しながら 2.4 ml の硫酸 (硫酸 : 蒸留水 = 90 : 38, v/v) を加えてよく混合した (ボルテックス)。さらに 80 μ l の 0.12% カルバゾール試薬 (無水アルコールに溶解) を加えて混合し (ボルテックス)、これを 20°C で 20 分間インキュベートして赤紫色に発色させた。発色後、540 nm における吸光度を測定した。D-キシロースイソメラーゼの 1 unit は、上記反応条件下で 1 分間に 1 μ mol の D-キシロースを生ずる酵素量と定義した。

IV-1-4. タンパク質の定量

II-1-6 に示した方法で行った。

IV-1-5. *Vibrio* sp. XY-214 株由来 D-キシロースイソメラーゼ遺伝子 (*xyIA*) の
クローニング

IV-1-5-1. *xyIA* 遺伝子のクローニングのためのプローブ作製

II-1-8-8 において解読された *xyIA* 遺伝子の部分塩基配列をもとにプライマー (pxylA-F プライマー: 5'-CTAGAGAACGAGATCAAAGT-3' および pxylA-R プライマー: 5'-CTCTAGCGATAGTGCCATAG-3') を作製し、*xloA*/pBluescript プラスミド (II-1-8-8 参照) を鋳型に PCR を行った。PCR の反応組成および反応条件は、それぞれ Table 4-1 と Table 4-2 に示した。PCR により増幅した遺伝子断片 (330 bp) を *pxylA* とし、これを pT7Blue ベクターにライゲーションした。その後、ライゲーション反応液をコンピテントセル *E. coli* XL1-Blue 株と混合して形質転換させ、これを 70 μ l の 100 mM IPTG 溶液と 45 μ l の 20 mg/ml X-gal 溶液を塗布しておいた LB 寒天培地に接種して 37°C で 16 時間培養した。次に、寒天培地上に増殖した白色コロニーを爪楊枝でピックアップしてコロニーダイレクト PCR を行うことで、*pxylA* 断片が挿入された pT7Blue ベクター (*pxylA*/pT7Blue) によって形質転換された *E. coli* XL1-Blue 株を選別した。さらに、得られた形質転換大腸菌から *pxylA*/pT7Blue プラスミドを抽出し、挿入断片の塩基配列を解読することで、PCR による塩基置換が生じていないことを確認した。次に、II-1-8-6 (B) と同様の方法で *pxylA* 断片を AlkPhos direct labeling kit (GE Healthcare) を用いてラベリングし、これをプローブとした。

Table 4-1. Composition of PCR solution

Component	Volume (μ l)
H ₂ O	78.5
10×ExTaq Buffer	10.0
2 mM dNTP	8.0
<i>xloA</i> /pBluescript (100 ng/ μ l)	1.0
pxylA-F primer (50 pmol/ μ l)	1.0
pxylA-R primer (50 pmol/ μ l)	1.0
Ex Taq Polymerase (5 unit/ μ l)	0.5

Table 4-2. PCR condition

94°C	0.5 min	30 cycles
94°C	0.5 min	
53°C	0.5 min	
72°C	1.0 min	
4°C	hold	

IV-1-5-2. サザンハイブリダイゼーション

xylA 遺伝子の全長を含む DNA 断片を単離するため、*pxylA* 断片に対して認識部位をもたない制限酵素で *Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA を消化し、IV-1-5-1 で作製したプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。実験方法は II-1-8-7 と同様の方法で行い、ゲノム DNA の制限酵素処理には [XhoI-EcoRI]、[XhoI-NotI]、[XhoI-KpnI]、[XhoI-SalI]、[XhoI-SpeI]、[XhoI-SacI]、[XhoI-HindIII]、[SacI-SalI]、[SacI-SpeI]、[SacI-HindIII]、[SacI-EcoRI]、[SacI-NotI] および [HindIII] の 13 種類の組み合わせを用いた。

IV-1-5-3. 制限酵素消化断片の大腸菌への導入

サザンハイブリダイゼーションの結果から決定した制限酵素の組み合わせによって *Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA を消化し、アガロースゲル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、プローブとハイブリダイズした DNA 断片を X 線フィルムで検出し、これをアガロースゲルと重ね合わせて目的の *xylA* 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 *xylA* 遺伝子を含む DNA 断片と、同じ制限酵素で処理した pBluescript II KS (-) ベクターを Ligation kit ver.2 を用いてライゲーションした。その後、ライゲーション反応液をコンピテントセル *E. coli* XL1-Blue 株と混合して形質転換させ、これを 70 μ l の 100 mM IPTG 溶液と 45 μ l の 20 mg/ml X-gal 溶液を塗布しておいた LB 寒天培地に接種した。これを 37°C で 16 時間培養して白色コロニーを選別した。

IV-1-5-4. コロニーハイブリダイゼーション

IV-1-5-3 で得られた白色コロニーを爪楊枝でピックアップし、新たに準備した LB 寒天培地（角型シャーレ）に接種して 37°C で 16 時間培養した。これに角型シャーレと同じ大きさに切断した Hybond-N⁺ membrane（GE Healthcare）を重ね合わせ、コロニーと密着（数分間）させた。その後、メンブレンを培地から

剥がし、変性溶液 (1.5 M NaOH, 0.5 M NaCl) で十分に湿らせたろ紙の上にコロニーが付着した面を上にしてのせ、室温で 15 分間静置した。この操作により 2 本鎖 DNA を 1 本鎖 DNA に変性させた。次に、メンブレンを新しいろ紙の上にのせて水分を除去した後、中和液 (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.5) で十分に湿らせたろ紙の上にコロニーが付着した面を上にしてのせ、室温で 15 分間静置した。続いて、メンブレンを新しいろ紙の上にのせて水分を取り除いた後、2×SSC (20×SSC を希釈したもの) で十分に湿らせたろ紙の上にコロニーが付着した面を上にしてのせ、室温で 10 分間静置した。次に、メンブレンを新しいろ紙の上にのせて水分を除去した後、これを 80°C で 2 時間加熱することで DNA をメンブレンに固定させた。

その後、メンブレンに付着した余分な細胞の破片を除去した。すなわち、DNA が固定されたメンブレンを 0.1% SDS を含む 6×SSC (20×SSC を希釈したもの) に浸し、室温で 15 分間穏やかに振とうした。この際、溶液中で脱脂綿を用いてメンブレン上の細胞破片を除去した。次に、メンブレンを 6×SSC が入った別の容器に移し、室温で 10 分間穏やかに振とうした後、ろ紙の上に置いて乾燥させた。以後、IV-1-5-1 で作製したプローブを用いて II-1-8-7 と同様の方法でハイブリダイゼーションを行い、目的 DNA 断片を保持するコロニーを X 線フィルム上に検出し、選別した。*xyIA* 遺伝子を含む DNA 断片が挿入された pBluescript II KS (−) ベクターを *xyIA*/pBluescript とした。

IV-1-5-5. インサート DNA 断片の塩基配列解読

IV-1-5-4 で選別された形質転換大腸菌から *xyIA*/pBluescript プラスミドを抽出し、挿入断片の塩基配列を II-1-8-5 の方法で解読した。*xyIA* 遺伝子の塩基配列および推定アミノ酸配列は DDBJ/EMBL/GenBank 国際塩基配列データベースに登録した (Accession no. AB519447)。

IV-1-6. 形質転換大腸菌における組換え体 XylA (rXylA) の発現と機能解析

IV-1-6-1. 発現用プラスミド (*xylA*/pET22b) の構築

IV-1-5 でクローニングされた *Vibrio* sp. XY-214 株由来 *xylA* 遺伝子が大腸菌へ導入して組換え体 XylA (rXylA) を発現させ、その酵素学的性質を検討した。

まず初めに、決定された *xylA* 遺伝子の塩基配列をもとに *xylA* 遺伝子増幅用のプライマー (*xylA*-F プライマー: 5'-AGGGCCCCATATGACTGAATTTTCAAA-3' および *xylA*-R プライマー: 5'-AGCTCGAGCTTGTAGATGAAGCCATTTA-3') を作製し、*xylA*/pBluescript プラスミドを鋳型に PCR を行った。*xylA*-F および *xylA*-R プライマーにはそれぞれ *Nde*I および *Xho*I サイトを付加した(下線)。PCR の反応組成および反応条件は、それぞれ Table 4-3 と Table 4-4 に示した。PCR による *xylA* 遺伝子の増幅をアガロースゲル電気泳動で確認した後、ゲルから *xylA* 遺伝子を精製し、これを制限酵素処理 (*Nde*I および *Xho*I) した。さらに、制限酵素処理した *xylA* 遺伝子をアガロースゲル電気泳動した後、これをゲルから精製し、発現ベクターである pET22b (+) の *Nde*I-*Xho*I サイトにライゲーションした。その後、ライゲーション反応液をコンピテントセル *E. coli* XL1-Blue 株と混合して形質転換させ、これを LB 寒天培地に接種して 37°C で 16 時間培養した。次に、寒天培地上に増殖したコロニーを爪楊枝でピックアップしてコロニーダイレクト PCR を行うことで、*xylA* 遺伝子断片が挿入された pET22b (+) ベクター (*xylA*/pET22b) によって形質転換された *E. coli* XL1-Blue 株を選別した。その後、得られた形質転換大腸菌から *xylA*/pET22b プラスミドを抽出し、挿入断片の塩基配列を解読することで、PCR による塩基置換が生じていないことを確認した。次に、上記で構築した *xylA*/pET22b を *E. coli* BL21 (DE3) 株に導入して形質転換させ、得られた形質転換大腸菌を rXylA の発現に用いた。なお、発現タンパク質の C 末端領域には、アフィニティーカラムによる精製が行えるようヒスチジンタグが付加されるようにした。

Table 4-3. Composition of PCR solution

Component	Volume (μl)
H ₂ O	78.5
10×ExTaq Buffer	10.0
2 mM dNTP	8.0
<i>xylA</i> /pBluescript (100 ng/μl)	1.0
<i>xylA</i> -F primer (50 pmol/μl)	1.0
<i>xylA</i> -R primer (50 pmol/μl)	1.0
Ex Taq Polymerase (5 unit/μl)	0.5

Table 4-4. PCR condition

94°C	1.0 min	30 cycles
94°C	0.5 min	
52°C	0.5 min	
72°C	1.7 min	
4°C	hold	

IV-1-6-2. 形質転換大腸菌における rXylA の発現と精製

xylA/pET22b プラスミドによって形質転換された *E. coli* BL21 (DE3) を 5 ml の LB 培地 (50 μg/ml アンピシリンを含む) に接種し、37°C で 16 時間培養した (種培養)。その後、培養液の 1 ml を 500 ml 容三角フラスコに入れた 160 ml の LB 培地に接種し、37°C で培養した (本培養)。培養液の A_{600} が 0.4–0.5 に達した後、培養液に IPTG を終濃度 1 mM となるように添加し、さらに 25°C で 20 時間培養を続けた。この種培養から本培養までの操作を同時に 5 回行い、合計 800 ml の培養液を得た。

以後、組換えタンパク質の抽出および精製は II-1-9-2 と同様の方法で行った。HiTrap chelating HP カラムによる分画後、活性画分を SDS-PAGE に供し、単一のバンドが検出された画分を集めて 4,000 ml の 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) に対して透析 (4°C) した。これにより得られた酵素液を精製 rXylA 標品とし、以後の酵素学的性質の検討に用いた。なお、精製酵素は氷上で保存した。

IV-1-6-3. 至適 pH の測定

200 μl の Britton-Robinson の広域緩衝液 (40 mM リン酸, 40 mM ホウ酸および 40 mM 酢酸の混合液に 0.2 N NaOH を適当量加えてそれぞれの pH (pH 3.0, 4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 および 12.0) に調整したもの) と 50 μl の 40 mM D-キシロース溶液 (終濃度 5 mM) および 50 μl の 40 mM MgSO₄ 溶液

(終濃度 5 mM) の混合液に、100 μ l の酵素液 (適宜 Britton-Robinson の広域緩衝液で希釈したもの) を加えて 40°C で 20 分間反応させて活性を測定した。

IV-1-6-4. pH 安定性の測定

Britton-Robinson の広域緩衝液 (pH 3.0–12.0) の各 270 μ l に、精製酵素液を 30 μ l ずつ加えて 4°C で 12 時間インキュベートした。その後、これらの各酵素液を 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) を用いてさらに 10 倍希釈したものを活性測定の酵素液として使用した。すなわち、200 μ l の 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) と 50 μ l の 40 mM D-キシロース溶液 (終濃度 5 mM) および 50 μ l の 40 mM MgSO₄ 溶液 (終濃度 5 mM) の混合液に、100 μ l の酵素液を加えて 40°C で 20 分間反応させて活性を測定した。

IV-1-6-5. 至適温度の測定

200 μ l の 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) と 50 μ l の 40 mM D-キシロース溶液 (終濃度 5 mM) および 50 μ l の 40 mM MgSO₄ 溶液 (終濃度 5 mM) の混合液に、100 μ l の酵素液を加え、各温度 (0, 10, 20, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 60, 70 および 80°C) で 20 分間反応させて活性を測定した。

IV-1-6-6. 温度安定性の測定

酵素液を各温度 (0, 10, 20, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 60, 70 および 80°C) で 20 分間インキュベートした後、直ちに氷上に移して冷却した。その後、200 μ l の 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) と 50 μ l の 40 mM D-キシロース溶液 (終濃度 5 mM) および 50 μ l の 40 mM MgSO₄ 溶液 (終濃度 5 mM) の混合液に、100 μ l の酵素液を加え、40°C で 20 分間反応させて活性を測定した。

IV-1-6-7. D-キシロースおよび D-グルコースに対する K_m および V_{max} の測定

IV-1-3 に示した方法で、精製酵素液を各濃度の D-キシロース溶液 (終濃度

1, 1.5, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0 および 64 mM) または D-グルコース溶液 (終濃度 25, 50, 100, 200 および 300 mM) と 40°C で 10 分間反応させ、活性を測定した。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。

IV-1-6-8. rXylA の活性に及ぼす 2 価金属イオンの影響

まず、酵素液を 10 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) で処理することで、金属イオンをキレートした。すなわち、18 ml の精製酵素液に 2 ml の 100 mM EDTA 溶液 (50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解) を加えて混合し、4°C で 1 時間インキュベートした。その後、EDTA を完全に除去するために酵素液を 2,000 ml の 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) に対して 4°C で 24 時間透析した。この間、緩衝液を 3 回交換した。rXylA の活性に及ぼす 2 価金属イオンの影響は、透析後の酵素液を用いて調べた。200 μ l の 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) と 50 μ l の 40 mM D-キシロース溶液 (終濃度 5 mM) および 50 μ l の 40 mM の各種金属塩水溶液 (MgSO_4 , CoCl_2 , MnCl_2 , CaCl_2 , ZnSO_4 , FeSO_4 および CuSO_4 ; 終濃度 5 mM) の混合液に、100 μ l の酵素液を加え、40°C で 10 分間反応させて活性を測定した。

IV-1-6-9. ゲルろ過クロマトグラフィーによる rXylA の分子量推定

Superdex 200 HR 10/30 カラム (10 mm i.d. \times 300 mm; GE Healthcare) を用いて未変性状態の XylA の分子量を推定した。すなわち、あらかじめ 0.15 M NaCl を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した Superdex 200 HR 10/30 カラムに、100 μ l の精製酵素液を添加し、活性画分の溶出域を測定した。分子量マーカーには Gel filtration calibration kit (GE Healthcare) のフェリチン (MW 440,000)、アルドラーゼ (MW 158,000)、オボアルブミン (MW 43,000) およびキモトリプシノーゲン A (MW 25,000) を使用した。本クロマトグラフィーは FPLC システムを用いて行い、分画条件は流速 0.5 ml/min で分画容量を 1.25 ml

とした。タンパク質の検出は、溶出液の 280 nm のにおける吸光度を測定することにより行った。

IV-2. 実験結果

IV-2-1. *Vibrio* sp. XY-214 株由来 *xylA* 遺伝子のクローニング

II 章で解読された不完全な *xylA* 遺伝子断片の塩基配列をもとにプローブを作製し、*xylA* 遺伝子の全長を単離するためにサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、*Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA を *SacI* と *EcoRI* の 2 種類の制限酵素で消化することで、*xylA* 遺伝子を含む約 4.2 kbp の DNA 断片を得ることができた (Fig. 4-1)。そこで、XY-214 株のゲノム DNA を *SacI* と *EcoRI* の 2 種類の制限酵素で消化して得られた約 4.2 kbp 付近の DNA 断片をアガロースゲルから切り出して精製し、これを pBluescript II KS (-) ベクターの *SacI*-*EcoRI* サイトにライゲーションした。その後、ライゲーション反応液をコンピテントセルと混合して形質転換させ、*xylA*/pBluescript プラスミドによって形質転換された大腸菌を、Blue-White selection とコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。その結果、123 株の白色コロニーの中から 1 株のポジティブコロニーが得られた (Fig. 4-2)。そこで、本形質転換大腸菌から *xylA*/pBluescript プラスミドを抽出し、挿入断片の全塩基配列を解読した。

IV-2-2. *xylA* 遺伝子およびその周辺領域の塩基配列

xylA/pBluescript プラスミドに挿入された DNA 断片の全塩基配列を示した。本 DNA 断片は 4,242 bp からなり、完全な *xylA* 遺伝子 (Fig. 4-3) の他に 2 種類の遺伝子 (*xylT* と *xylR*) が含まれていた (Fig. 4-4, 4-5)。*xylA* 遺伝子は *xloA* 遺伝子の上流に同じ転写方向で位置しており、*xylA* 遺伝子の TAA 終止コドンと *xloA* 遺伝子の ATG 開始コドンの間は 80 bp で隔てられていた (Fig. 4-6)。

xylA 遺伝子は 1,320 bp からなる ORF から構成されており、439 アミノ酸残

基をコードしていた。また、ExPASy server (Gasteiger et al. 2003) によりその翻訳タンパク質の分子量は 49,264、等電点は pH 5.06 と推定された。SignalP server (Nielsen et al. 1997) 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明らかになり、XylA が菌体内酵素であることが確認された。*xylA* 遺伝子の ATG 開始コドンの 8 bp 上流には Shine-Dalgarno 配列と推定される配列 (GGAA) が存在していた。さらにその上流には、15 bp 離れた TTGATG と TAAAAT が存在していた。この配列は大腸菌の RNA ポリメラーゼの σ サブユニットが認識するプロモーター配列である -35 配列 (TTGACA) および -10 配列 (TATAAT) と相同性を示した (Rosenberg and Court 1979)。一方、TAA 終止コドンの 17 bp 下流には ρ 因子非依存性ターミネーターと推定される回文配列 (Sugimoto et al. 1995) が存在していた。*xylA* 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。*xylA* 遺伝子の GC 含量は 45.51% であった。

次に、*Vibrio* sp. XY-214 株由来 XylA の推定アミノ酸配列を BLAST により相同性検索した。その結果、XylA は *E. coli* (GenBank accession no. AE014075)、*Klebsiella pneumoniae* 342 株 (CP000964)、*Thermotoga maritima* MSB8 株 (AE000512)、*Bacillus licheniformis* DSM 13 株 (AE017333) および *Lactococcus lactis* (AF092042) 由来の D-キシロースイソメラーゼとそれぞれ 72、70、52、51 および 46% の同一性を示した (Table 4-6)。D-キシロースイソメラーゼは、そのアミノ酸配列に基づいてグループ I と II の 2 つに分類される (Park and Batt 2004)。XY-214 株由来 XylA と高い同一性を示した酵素はすべてグループ II に属していたことから、XylA がグループ II に属する D-キシロースイソメラーゼであることが明らかになった。また、XylA はグループ I に属する *Streptomyces rubiginosus* (GenBank accession no. M73789)、*Actinoplanes missouriensis* (X16042) および *Arthrobacter* sp. B-5-MG-1 株 (AY937238) 由来の D-キシロースイソメラーゼともそれぞれ 28%、25% および 25% と低い同一性を示した (Table 4-6)。XylA とグループ II に属する他の D-キシロースイソメラーゼとの一次構造のアライメン

トを Fig. 4-7 に示した。

先に述べたように *xylA*/pBluescript プラスミドに挿入された 4,242 bp の DNA 断片には、*xylA* 遺伝子の他に 2 種類の遺伝子 (*xylT* と *xylR*) が存在していた。*xylT* と *xylR* 遺伝子は *xylA* 遺伝子上流に逆向きの転写方向で位置していた (Fig. 4-6)。*xylR* 遺伝子は不完全であり、3' 領域が欠如していたが、その推定アミノ酸配列の N 末端領域 (1-137) は *Klebsiella pneumoniae* 342 株 (GenBank accession no. CP000964) や *Yersinia pestis* KIM 株 (AALD02000013) 由来のキシロースオペロン転写制御因子とそれぞれ 31 および 30% の同一性を示した。一方、*xylT* 遺伝子は 462 アミノ酸残基をコードする 1,389 bp の ORF から構成されており、翻訳タンパク質の推定分子量は 50,483 と推定された。*xylT* 遺伝子の推定アミノ酸配列は *Saccharophagus degradans* 2-40 株由来の Na⁺/melibiose symporter (GenBank accession no. CP000282) と 38%、*Lactobacillus brevis* ATCC 367 株由来の Na⁺/xyloside symporter (CP000416) と 31% の同一性を示した。従って、*xylR* と *xylT* 遺伝子も *xylA* 遺伝子と同様に D-キシロースの代謝に関与していることが示唆された。

IV-2-3. 形質転換大腸菌における rXylA の発現と精製

xylA/pET22b プラスミドによって形質転換された *E. coli* BL21 (DE3) を LB 培地 (800 ml) で培養し、IPTG により rXylA の発現を誘導した。その後、菌体内抽出液を HiTrap chelating HP カラムを用いて精製した。精製酵素は SDS-PAGE において単一のバンドとして検出され、その分子量は約 49,000 であり、XylA のアミノ酸配列から推定された分子量 (49,264) とほぼ一致した (Fig. 4-8)。

IV-2-4. rXylA の酵素学的性質

IV-2-4-1. pH と温度の影響

rXylA の酵素活性および安定性に及ぼす pH と温度の影響を、D-キシロースを基質に用いて検討した。その結果、rXylA の 40℃ における至適 pH は 7.5 であ

った。pH 5.0、6.5 および 8.0 での相対活性はそれぞれ 0、47 および 86%であった (Fig. 4-9A)。また、本酵素を pH 3.0–12.0 の各 pH で 12 時間インキュベートして pH 安定性を調べたところ、pH 6.0–11.0 の範囲で 86%以上の相対活性を示したが、pH 4.0 以下、pH 11 以上では安定性が極端に低下した (Fig. 4-9B)。一方、rXylA の pH 7.5 における至適温度は 60°C であり、40°C での相対活性は約 62%、70°C での相対活性は約 18%であった (Fig. 4-10A)。また、本酵素の熱安定性を調べたところ、50°C で 20 分間処理した場合、約 97%の相対活性が得られたが、60°C で 20 分間処理すると相対活性が約 34%にまで低下した。(Fig. 4-10B)。

IV-2-4-2. D-キシロースおよび D-グルコースに対する K_m および V_{max}

rXylA の D-キシロースに対する K_m および V_{max} は、それぞれ 7.93 mM および 14.3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であった (Fig. 4-11A)。一方、D-グルコースに対する K_m および V_{max} は、それぞれ 186.9 mM および 1.38 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であった (Fig. 4-11B)。

IV-2-4-3. XylA の活性に及ぼす 2 価金属イオンの影響

D-キシロースイソメラーゼは、その活性および安定性に Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、または Mn^{2+} などの 2 価金属イオンを必要とする。しかしながら、最も賦活される金属イオンの種類は酵素によって異なる (Carrell et al. 1989)。そこで、XylA の活性に及ぼす 2 価金属イオンの影響について調べた。その結果、本酵素は Mg^{2+} によって最も賦活され、 Co^{2+} および Mn^{2+} では Mg^{2+} の 59% および 41% の相対活性が得られた。一方、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} および Cu^{2+} は XylA の賦活化にほぼ関与していないことがわかった (Table 4-7)。反応液に 2 価金属イオンが存在しない場合、XylA は活性を示さなかった。

IV-2-4-4. ゲルろ過クロマトグラフィーによる XylA の分子量推定

HiTrap chelating HP カラムにより精製された rXylA の分子量は SDS-PAGE では約 49,000 と推定されたが、Superdex 200 HR 10/30 カラムを用いて未変性状

態の XylA の分子量を測定したところ、約 190,000 と推定された (Fig. 4-12) 。また、XylA のアミノ酸配列から推定された分子量は 49,264 であった。このことから、XylA がホモ 4 量体を形成していることが示唆された。

IV-3. 考察

本章では、 β -1,3-キシランを原料としたエタノール生産技術確立のための基盤研究として、*Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA 上において β -1,3-キシロシダーゼ遺伝子 (*xloA*) の上流に位置する D-キシロースイソメラーゼ遺伝子 (*xylA*) の全長をクローニングし、その翻訳タンパク質の酵素学的性質を検討した。

D-キシロースイソメラーゼ (EC 5.3.1.5) は、微生物における D-キシロース代謝の第一段階を担う酵素であり、D-キシロースの D-キシルロースへの可逆的な異性化反応を触媒する。生成した D-キシルロースは、D-キシルロースキナーゼ (EC 2.7.1.17) の作用によって D-キシルロース 5-リン酸に変換されてペントースリン酸回路に入り、代謝される。また、D-キシロースイソメラーゼは、D-グルコースの D-フルクトースへの異性化反応も触媒することから、D-グルコースイソメラーゼとも呼ばれるが、一般的には本酵素の D-グルコースに対する K_m 値は D-キシロースに対する K_m 値よりも高いことが知られている。本酵素は、産業的にはトウモロコシからの高果糖コーンシロップ (HFCS: High-Fructose Corn Syrup) の生産に用いられている (Bhosale et al. 1996) 。異性化反応を高温条件で行うことで、D-グルコース→D-フルクトース反応が促進され、高濃度 (50%以上) の D-フルクトースを得ることができる (Bhosale et al. 1996) 。このため、耐熱性の D-キシロースイソメラーゼに関する研究が数多く報告されている (Kitada et al. 1989, Brown et al. 1993, Vieille et al. 1995, Liu et al. 1996, Chang et al. 1999) 。しかしながら、これまで *Vibrio* 属細菌由来 D-キシロースイソメラーゼに関する研究報告は見当たらない。

D-キシロースイソメラーゼは、そのアミノ酸配列に基づいてグループ I と II

の2つのグループに分類され、グループIIはグループIよりもN末端領域が50残基程度余分に長いという特徴を持っている (Park and Batt 2004)。グループIには *Streptomyces griseofuscus* S-41 株 (Kikuchi et al. 1990)、*Actinoplanes missouriensis* (Lambeir et al. 1992)、*Arthrobacter* (Varsani et al. 1993)、*Thermus caldophilus* および *T. thermophilus* (Chang et al. 1999) などに由来する D-キシロースイソメラーゼが属しており、グループIIには *E. coli* (Lawlis et al. 1984)、*Lactobacillus brevis* (Bor et al. 1992)、*Bacillus coagulans* (Rasmussen et al. 1994)、*Clostridium thermosaccharolyticum* (Meaden et al. 1994)、*Thermotoga neapolitana* (Vieille et al. 1995)、*Thermoanaerobacterium* JW/SL-YS 489 株 (Liu et al. 1996) および *Lactococcus lactis* (Park and Batt 2004) などに由来する D-キシロースイソメラーゼが属している。*Vibrio* sp. XY-214 株由来 XylA は、その推定アミノ酸配列からグループIIに属することが明らかとなった。XylA と他の D-キシロースイソメラーゼの一次構造を比較したところ、触媒アミノ酸残基やサブユニット構造形成に関与するアミノ酸残基 (Park and Batt 2004) が XylA においても高度に保存されていることがわかった (Fig. 4-7)。

形質転換大腸菌により発現させた rXylA の 40°C での至適 pH は 7.5 であった (Fig. 4-9A)。既報の D-キシロースイソメラーゼのほぼすべてが pH 7.0–9.5 に至適 pH をもつことから、XylA もその例外ではないことが明らかとなった。一方、*Lactobacillus brevis* (Yamanaka 1968) や *Thermoanaerobacterium* JW/SL-YS 489 株 (Liu et al. 1996) 由来 D-キシロースイソメラーゼは 6.0–7.0 に至適 pH をもつことが報告されている。D-キシロースイソメラーゼは、その活性および安定性に Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、または Mn^{2+} などの 2 価金属イオンを必要とするが、最も賦活される金属イオンの種類は酵素によって異なる (Carrell et al. 1989)。XylA は Mg^{2+} によって最も賦活された (Table 4-7)。また、EDTA 処理により完全に失活したことから、その活性に 2 価金属イオンが不可欠であることが確認できた。一方、*Bacillus* TX-3 株由来の D-キシロースイソメラーゼは Mg^{2+} ではなく、 Mn^{2+} で最も賦活されることが報告されている (Kitada et al. 1989)。

SDS-PAGE およびゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量推定の結果、rXylA が分子量約 49,264 のサブユニットからなるホモ 4 量体を形成していることが示唆された (Fig. 4-12)。XylA と同様に *Arthrobacter* B3728 株 (Henrick et al. 1989)、*C. thermosaccharolyticum* (Meaden et al. 1994)、*Thermoanaerobacterium* JW/SL-YS 489 株 (Liu et al. 1996)、*T. neapolitana* (Vieille et al. 1995)、*T. caldophilus* および *T. thermophilus* (Chang et al. 1999) 由来の D-キシロースイソメラーゼも 4 量体を形成していることが報告されている。これに対し、*E. coli* 由来の D-キシロースイソメラーゼは 2 量体であることが報告されている (Batt et al. 1990)。これまで、D-キシロースイソメラーゼの X 線結晶構造解析については多数の報告があり (Carrell et al. 1984, Rey et al. 1988, Varsani et al. 1993, Allen et al. 1994, Chang et al. 1999)、各サブユニットは N 末端領域の $(\beta/\alpha)_8$ バレル構造と C 末端領域のループ構造から形成されている。既に構造解析されている *T. neapolitana* 由来 D-キシロースイソメラーゼ (Chayen et al. 1997) の構造を鋳型にホモロジーモデリング法 (Peitsch 1995, Arnold et al. 2006, Kiefer et al. 2009) により XylA サブユニットの立体構造を予測したところ、XylA の 439 アミノ酸残基のうち、2 番目のトレオニン (Thr2) から 439 番目のリジン (Lys439) までの立体構造が推定された (Fig. 4-13)。配色は N 末端を青色、C 末端を赤色で示した。N 末端領域 (Thr2-Asn376) には $(\beta/\alpha)_8$ バレル構造を、C 末端領域 (Ser380-Lys439) にはループ構造を得ることができた。

II 章では、*Vibrio* sp. XY-214 株のゲノム DNA 上に β -1,3-キシラン資化関連酵素遺伝子クラスターが存在することを明らかにした (Fig. 2-12)。本章ではさらに、*xylA* 遺伝子上流に *xylR* や *xylT* 遺伝子といった D-キシロースの代謝に関与すると思われる遺伝子群が存在していることを明らかにした (Fig. 4-6)。*xylR* および *xylT* 遺伝子は、それぞれキシロースオペロン転写制御因子および Na^+ /xyloside symporter をコードしていることが相同性検索の結果から推定された。このことから、XY-214 株のゲノム DNA 上に存在する β -1,3-キシラン資化関連遺伝子クラスターは、少なくとも 8 つの遺伝子 (*xylR*, *xylT*, *xylA*, *xloA*, *gatA*, *alrA*,

txyA および *xbpA*) から構成されており、その長さは 11 kbp 以上におよぶことが明らかとなった。これまで、 β -1,4-キシランの資化に關与する遺伝子クラスターの単離については幾つかの報告があるが (Shulami et al. 1999, Erlandson et al. 2001, Tsujibo et al. 2004, Chow et al. 2007)、 β -1,3-キシランの資化に關与する遺伝子クラスターの単離は、本研究が初めてである。XY-214 株由来 β -1,3-キシラン資化關連遺伝子クラスターと既報の遺伝子クラスターの遺伝子構成および配置を比較した (Fig. 4-14)。その結果、他の多くの細菌では、*xylA* 遺伝子は D-キシルロースキナーゼをコードする *xylB* 遺伝子と隣接して 1 つのオペロンを形成しているのに対し (Hastrup 1988, Lokman et al. 1991, Scheler et al. 1991, Song et al. 1997, Erlandson et al. 2001)、XY-214 株由来 *xylA* 遺伝子の周辺には *xylB* 遺伝子が見当たらないことがわかった。このことから、本細菌では *xylA* と *xylB* 遺伝子が別々に転写されることが明らかとなった。XY-214 株と同様に *T. neapolitana* 由来の D-キシルロースキナーゼ遺伝子もまた、*xylB* 遺伝子と隣接していないことが報告されている (Vieille et al. 1995)。細菌にとって多糖の代謝には多種類の遺伝子が不可欠であり、多くの場合、それら遺伝子はゲノム DNA 上でクラスターを形成しているが、もし仮にクラスター内のある 1 つの關連遺伝子が欠如した場合、恐らく細菌はその多糖を代謝する能力を失うと思われる。従って、これら細菌がどのようにして遺伝子クラスターを獲得したのか、また、多糖代謝關連遺伝子クラスターがどのようにして形成されたのかについて、大きな興味を持たれる。

XY-214 株由来 β -1,3-キシラン資化關連遺伝子クラスターに関しては、*xylR* 遺伝子の下流域や *xbpA* 遺伝子の上流域に、さらに關連遺伝子が存在していることが予想される。従って、今後は本遺伝子クラスターの全領域を単離し、構成遺伝子の詳細な機能解析を行うとともに本遺伝子クラスターの転写制御機構の解明が期待される。

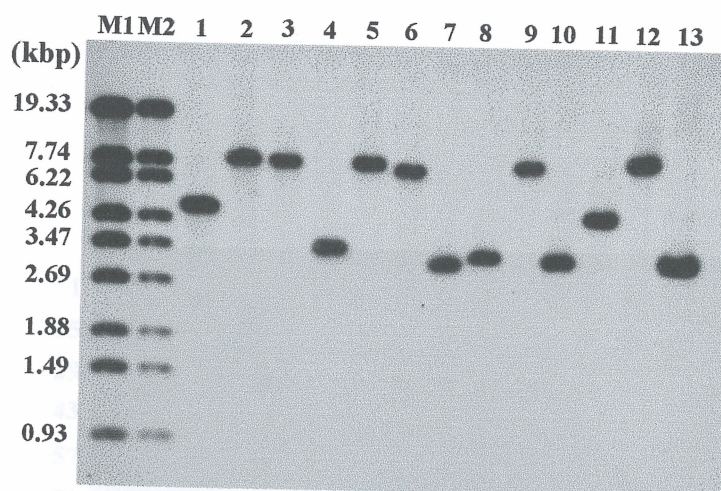


Fig. 4-1. Southern blot analysis of the genomic DNA of *Vibrio* sp. strain XY-214 with a *pxyLA* DNA probe. Genomic DNA was digested by restriction enzymes. Sample DNA (4 μ g) were electrophoresed in 1.0% agarose gel. After separated by agarose gel electrophoresis, the DNA fragments were transferred to a Hybond-N⁺ membrane and hybridized with *pxyLA* DNA probe. Lane M1 and M2, standard markers (Marker 6); Lane 1, *XhoI-EcoRI*; Lane 2, *XhoI-NotI*; Lane 3, *XhoI-KpnI*; Lane 4, *XhoI-SalI*; Lane 5, *XhoI-SpeI*; Lane 6, *XhoI-SacI*; Lane 7, *XhoI-HindIII*; Lane 8, *SacI-SalI*; Lane 9, *SacI-SpeI*; Lane 10, *SacI-HindIII*; Lane 11, *SacI-EcoRI*; Lane 12, *SacI-NotI*; Lane 13, *HindIII*.

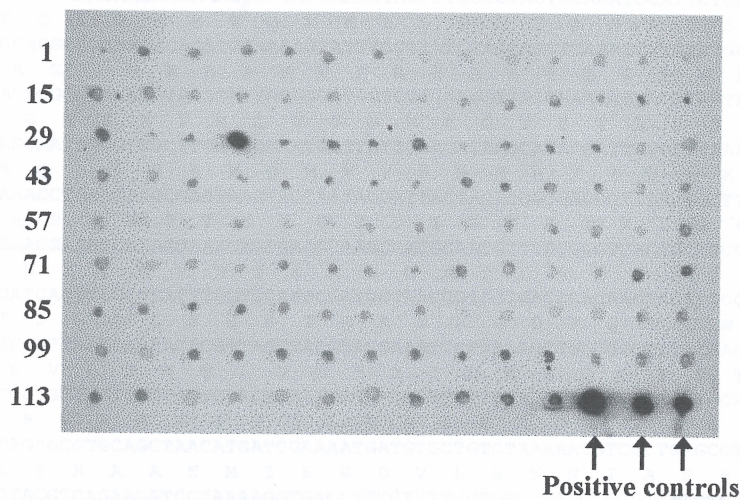


Fig. 4-2. Colony hybridization of *E. coli* transformants carrying *xytA*/pBluescript plasmid. *E. coli* carrying the *pxylA* probe was used as positive controls.

Fig. 4-3. The nucleotide and deduced amino acid sequence of the *xytA* gene from *Hydrolytic* sp. strain XY-214. The putative promoter (-35 and -10 regions), a Shine-Dalgarno sequence (SD), and potential termination signals are indicated under the nucleotide sequence. The *xytA* gene contained a 1320-bp nucleotide encoding a protein of 439 amino acids with a predicted molecular weight of 49.76 kDa.

```

1  CGTTTGATAAATAGAAGAATTTTGGTATCAAAAAACGTAATTGATGGCGAACGTGAAAACATAAAATATAGATAGCGAAC 80
                                     -35          -10
81  GAGGTCCACTACATTAATCGGAATTTTGGATATGACTGAATTTTCAAAAACATCAATAAAATCAACTTTGAAGGCCTG 160
                                     SD          M T E F F K N I N K I N F E G A
161 AGTCTACAAACCCACTTGGCTTTCCGTCCTACTACGACGCAGACAAAATGATTCTGGGTAAGAGCATGGCAGAGCACCTACGC 240
E S T N P L A F R H Y D A D K M I L G K S M A E H L R
241 TTTGCTGCATGTTATTGGCACAACCTCCGCTGGGGCGGTGCCGATATCTTTGGTGATGGTACATTGCAACACGCTTGTT 320
F A A C Y W H N F R W G G A D I F G D G T F E H A W L
321 AAATGCTGCGGATCCAATGGAGCAAGCACTCATGAAGGCTGACGCGGCATTGAGTTCTTTACTAAGCTCGGCGTACCTT 400
N A A D P M E Q A L M K A D A A F E F F T K L G V P
401 ACTACTGCTTCCAGTACTGACGTTGCGCCTGAAGGCAATTCAATCAAGAGTACATCAACAACCTCCAAACAATGGTT 480
Y Y C F H D T D V A P E G N S I K E Y I N N F Q T M V
481 GATGTTCTGGAGCAGAAACAAGAAGAACTGGCATGAAGCTACTTTGGGGTACTGCAATGCATTCTCAACGCTCGTTA 560
D V L E Q K Q E E T G M K L L W G T A N A F S N A R Y
561 CATGGCTGGTGCAGGCACAAACCCAGATCCAAAAGTATTGCTTATGCAGCAACTCAAATCTTCAATGCTATGGGTGCAA 640
M A G A G T N P D P K V F A Y A A T Q I F N A M G A
641 CGCAACGTTTAGCGGGGAAAACCTACGTATTATGGGGTGGTCGTGAAGGTTACGAAACATTACTCAATACCGACCTTCGT 720
T Q R L G G E N Y V L W G G R E G Y E T L L N T D L R
721 CAAGAGCGTGAGCAATTGGGTGCTTGTATGCAATGGTTGTTGAACATAAGCATAGATTGGCTTTAAAGGTTTCGATTCT 800
Q E R E Q L G R L M Q M V V E H K H K I G F K G S I L
801 TATTGAACCAAAACCTCAAGAGCCGACTAAGCACCAATACGATTACGACACCGCGACCGTTTACGGCTTCTTGAAGCAGT 880
I E P K P Q E P T K H Q Y D Y D T A T V Y G F L K Q
881 TTGGTCTAGAGAACGATCAAAGTAAACATTGAAGCAAACCCAGCAACGCTTGCGGGTCACAGCTTCCACCATGAAGTT 960
F G L E N E I K V N I E A N H A T L A G H S F H H E V
961 GCAACCGCTACATCACTTGGCTTATTTGGTTCAATCGATGCTAACCGTGGTGACCCACAACCTAGGTTGGGATACTGACCA 1040
A T A T S L G L F G S I D A N R G D P Q L G W D T D Q
1041 ATTCCCGAACAGCGTTGAAGAAAACACGTTAGTTATGTACGAAATCCTAAAAGCTGGCGGCTTTACAACAGGTGGCTTCA 1120
F P N S V E E N T L V M Y E I L K A G G F T T G G F
1121 ACTTTGATGCTCGTGTTCGTCGCTCTTCTACAGAATTAGAAGACTTGTTCACGGTCACATCGGCGGCATGGATACTATG 1200
N F D A R V R R P S T E L E D L F H G H I G G M D T M
1201 GCACTATCGCTAGAGCGTGCAGCTAACATGATCGAAAATGATGTGCTGTCTAAAACATCGCTGAGCGTTACGCAGGTTG 1280
A L S L E R A A N M I E N D V L S K N I A E R Y A G W
1281 GAATGATGACCTAGGTGAGAAGATCCTAAAAGGTGACCTTTCTCTTGCTGGTCTAGCGGCGTTTACTGAAGAGACGAACA 1360
N D D L G Q K I L K G D L S L A G L A A F T E E T N
1361 TCAACCCAGTTAAAGAATCTGGTCGTCAAGAATACTTAGAGAACGTTGTAAATGGCTTCATCTACAAGTAAGTGATGATG 1440
I N P V K E S G R Q E Y L E N V V N G F I Y K *
1441 TCTTGAACAAAGCCCAAGTATACTAATTCATATACTTAGGCTTTTTTATTACCTACCGTCTGGAAAAATTATGACAACT 1520
                                     Stem and loop

```

Fig. 4-3. The nucleotide and deduced amino acid sequence of the *xylA* gene from *Vibrio* sp. strain XY-214. The putative promoter (–35 and –10 regions), a Shine-Dalgarno sequence (SD), and potential termination signals are indicated under the nucleotide sequence. The *xylA* gene consisted of 1,320-bp nucleotides encoding a protein of 439 amino acids with a predicted molecular weight of 49,264.

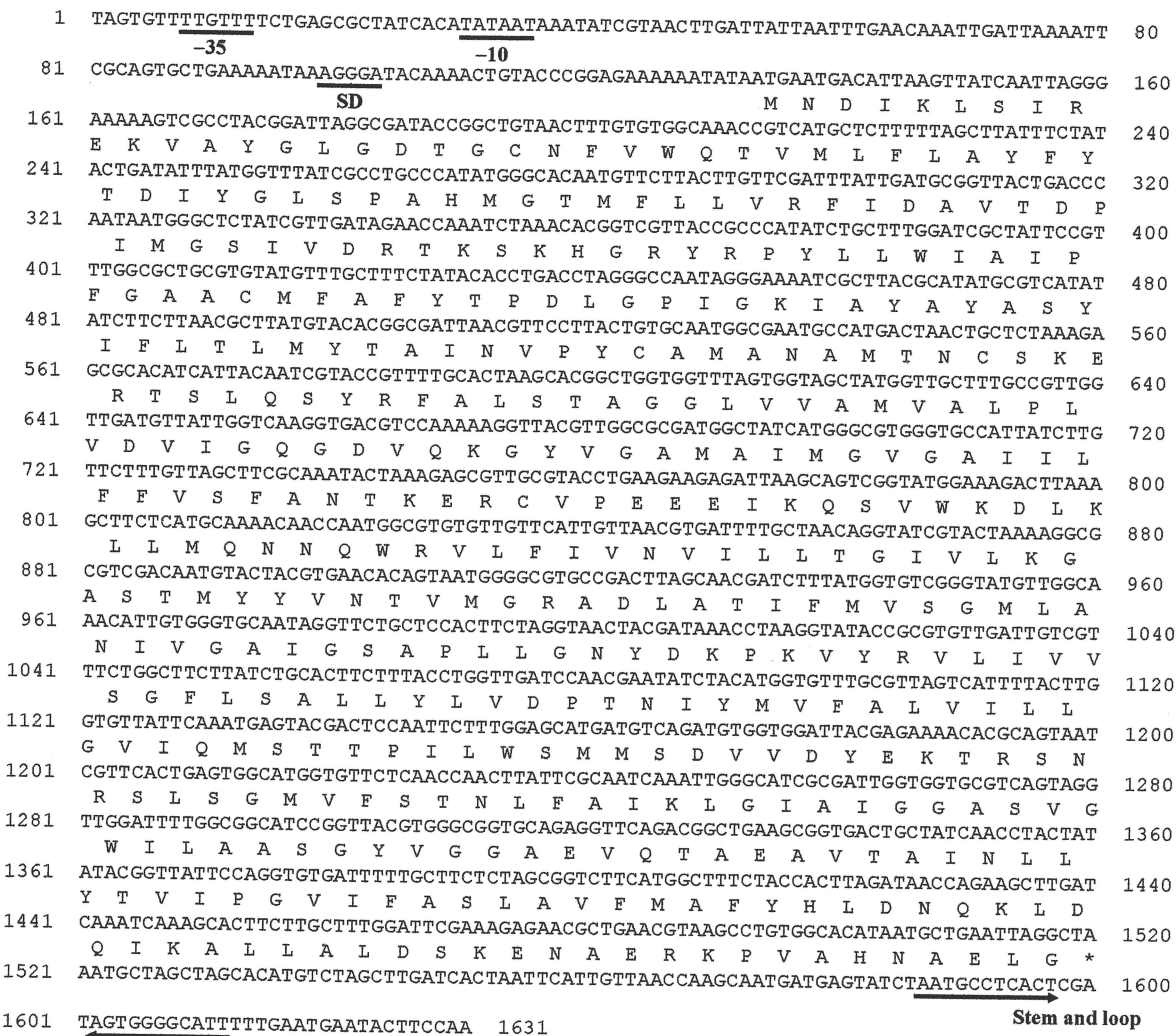


Fig. 4-4. The nucleotide and deduced amino acid sequence of the *xyfT* gene from *Vibrio* sp. strain XY-214. The putative promoter (–35 and –10 regions), a Shine-Dalgarno sequence (SD), and potential termination signals are indicated under the nucleotide sequence. The *xyfT* gene consisted of 1,389-bp nucleotides encoding a protein of 462 amino acids with a predicted molecular weight of 50,483.

```

1  AATTCATTGTTAACCAAGCAATGATGAGTATCTAATGCCTCACTCGATAGTGGGGCATTTTGAATGAATACTTCCAAAT 80
   -35
81 TAGAGGTATCAACTTGAAAACTCTATTGTTACTACTTGATAGTATGATTATTACGACCGCCAAATATTGAAGGGTATTA 160
   -10
   SD
161 AGGCCAAACTGGATGAAACGAACCTCAATGTGGAGCTTCATTTAGAGTGCTCTTCAAACCTAGATTACATTCTTTCAAGG 240
    K A K L D E T N L N V E L H L E C S S N L D Y I L S R
241 TCGTGGGATTACGTTATAGCTGATTATGACAAGCCTAACATCAACCATATTGTAGATAGCTTATCGGCTAAAACCGTGGT 320
    S W D Y V I A D Y D K P N I N H I V D S L S A K T V V
321 CTTTAGTAATCATCAACTCACTTCATTTCCGTCAACGTCGTCGATAGTGTCTCGACAACCGAGGTTTGGCTCAAACGG 400
    F S N H Q L T S F P S H V S S I V L D N R G L A Q T
401 CTTTGCAAGGTCTGAAAAAGCCGGATTTAGTCGAGTGGCGTATTACTCTAATCAGCAAGATAGTGTGTCTCCTTGGAGT 480
    A L Q G L K K A G F S R V A Y Y S N Q Q D S V S P W S
481 AAAGAGCGCCATATTGGCTTTAAGCATAGCGCGTCATCTTTCGGGTTAGAATTC 534
    K E R H I G F K H S A S S F G L E F

```

Fig. 4-5. The nucleotide and deduced amino acid sequence of the *xyIR* gene from *Vibrio* sp. strain XY-214. The putative promoter (−35 and −10 regions), a Shine-Dalgarno sequence (SD), and potential termination signals are indicated under the nucleotide sequence. The 3' region of the *xyIR* gene is incomplete.

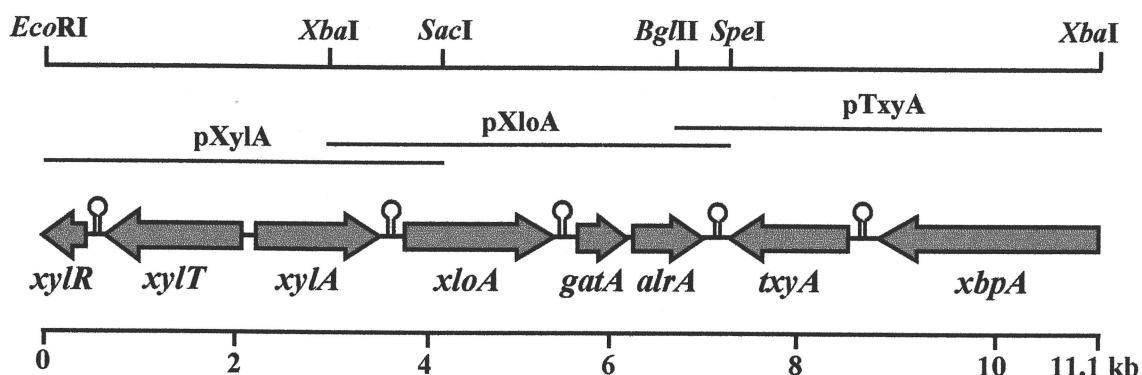


Fig. 4-6. Organization of the β -1,3-xylan utilization gene cluster in *Vibrio* sp. strain XY-214. The sequence of the *xylR* and *xbpA* gene are incomplete. Hairpin like marks indicate putative transcription terminators. pXylA, pXloA, and pTxyA are the DNA fragments obtained in the cloning process of *xylA*, *xloA*, and *txyA* genes, respectively. The *xylR* gene encodes a putative xylose operon transcriptional regulator; *xylT* encodes a Na^+ /xyloside symporter; *xylA* encodes a D-xylose isomerase; *xloA* encodes a β -1,3-xylosidase; *gatA* encodes a putative galactoside acetyltransferase; *alrA* encodes a aldehyde reductase; *txyA* encodes a β -1,3-xylanase; *xbpA* encodes a putative β -1,3-xylan-binding protein.

Table 4-5. Codon usage of the *xylA* gene

Codon	Number of codon	Codon	Number of codon	Codon	Number of codon	Codon	Number of codon
TTT-Phe	13 (2.95)	TCT-Ser	5 (1.14)	TAT-Tyr	2 (0.45)	TGT-Cys	1 (0.23)
TTC-Phe	15 (3.41)	TCC-Ser	0 (0.00)	TAC-Tyr	14 (3.18)	TGC-Cys	1 (0.23)
TTA-Leu	8 (1.82)	TCA-Ser	4 (0.91)	TAA-***	1 (0.23)	TGA-***	0 (0.00)
TTG-Leu	4 (0.91)	TCG-Ser	2 (0.45)	TAG-***	0 (0.00)	TGG-Trp	7 (1.59)
CTT-Leu	8 (1.82)	CCT-Pro	4 (0.91)	CAT-His	3 (0.68)	CGT-Arg	13 (2.95)
CTC-Leu	3 (0.68)	CCC-Pro	0 (0.00)	CAC-His	11 (2.50)	CGC-Arg	3 (0.68)
CTA-Leu	10 (2.27)	CCA-Pro	7 (1.59)	CAA-Gln	13 (2.95)	CGA-Arg	0 (0.00)
CTG-Leu	3 (0.68)	CCG-Pro	2 (0.45)	CAG-Gln	3 (0.68)	CGG-Arg	0 (0.00)
ATT-Ile	5 (1.14)	ACT-Thr	10 (2.27)	AAT-Asn	9 (2.05)	AGT-Ser	0 (0.00)
ATC-Ile	15 (3.41)	ACC-Thr	4 (0.91)	AAC-Asn	21 (4.77)	AGC-Ser	3 (0.68)
ATA-Ile	0 (0.00)	ACA-Thr	9 (2.05)	AAA-Lys	13 (2.95)	AGA-Arg	0 (0.00)
ATG-MET	15 (3.41)	ACG-Thr	4 (0.91)	AAG-Lys	10 (2.27)	AGG-Arg	0 (0.00)
GTT-Val	12 (2.73)	GCT-Ala	17 (3.86)	GAT-Asp	13 (2.95)	GGT-Gly	24 (5.45)
GTC-Val	0 (0.00)	GCC-Ala	1 (0.23)	GAC-Asp	11 (2.50)	GGC-Gly	17 (3.86)
GTA-Val	5 (1.14)	GCA-Ala	17 (3.86)	GAA-Glu	22 (5.00)	GGA-Gly	0 (0.00)
GTG-Val	1 (0.23)	GCG-Ala	7 (1.59)	GAG-Glu	15 (3.41)	GGG-Gly	0 (0.00)

Table 4-6. Identities of the XylA with other D-xylose isomerases

Organisms	Group	Accession no.	Identities (%)
<i>E. coli</i>	II	AE014075	72
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342	II	CP000964	70
<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	II	AE000512	52
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	II	AE017333	51
<i>Lactococcus lactis</i>	II	AF092042	46
<i>Streptomyces rubiginosus</i>	I	M73789	28
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	I	X16042	25
<i>Arthrobacter</i> sp. B-5-MG-1	I	AY937238	25

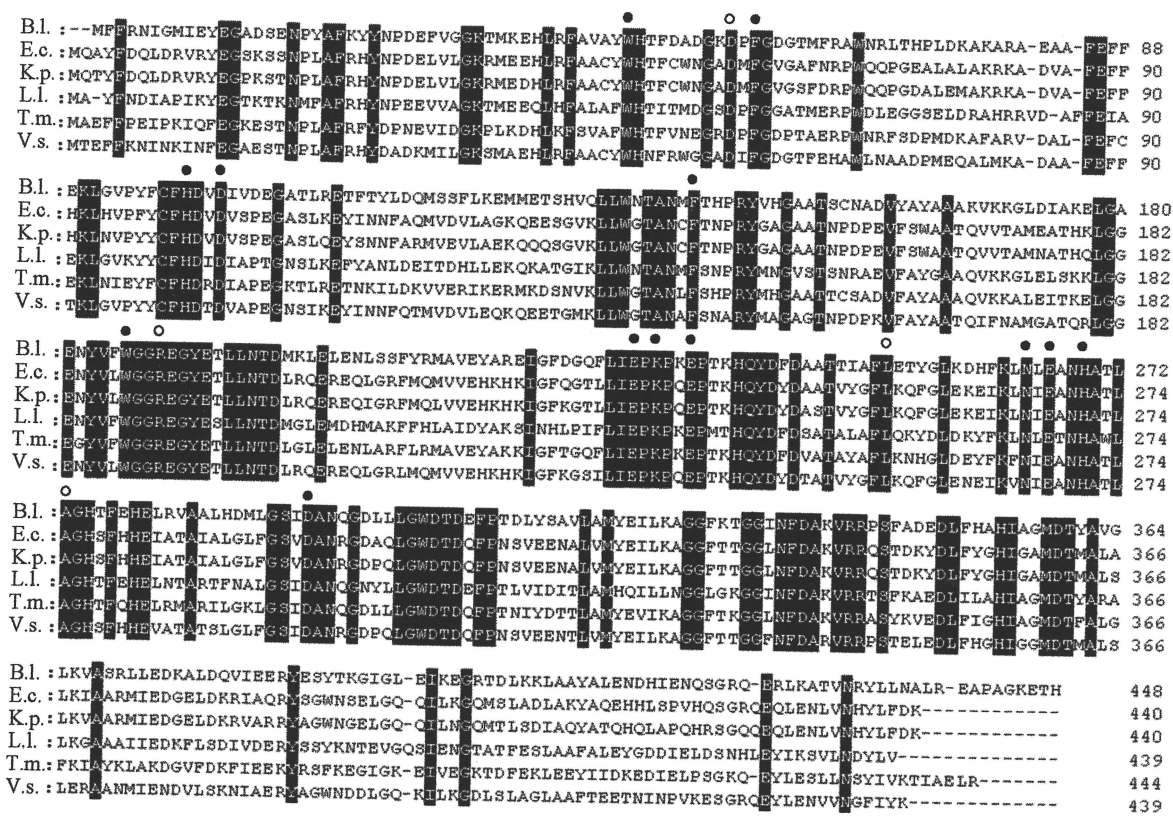


Fig. 4-7. Sequence alignment of the amino acid sequences of several D-xylose isomerases. From top to bottom: *Bacillus licheniformis* DSM 13 (B.l.); *E. coli* (E.c); *Klebsiella pneumoniae* 342 (K.p.); *Lactococcus lactis* (L.l.); *Thermotoga maritima* MSB8 (T.m.) *Vibrio* sp. strain XY-214 (V.s.). Conserved amino acid residues are highlighted. The conserved active-site residues and residues mediating subunit interactions are indicated by closed and open circles, respectively.

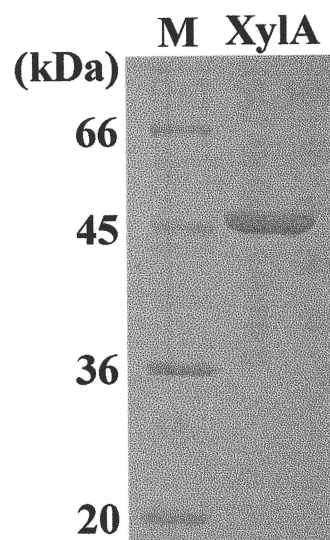


Fig. 4-8. SDS-PAGE of the purified rXylA. Lane M, molecular weight markers.

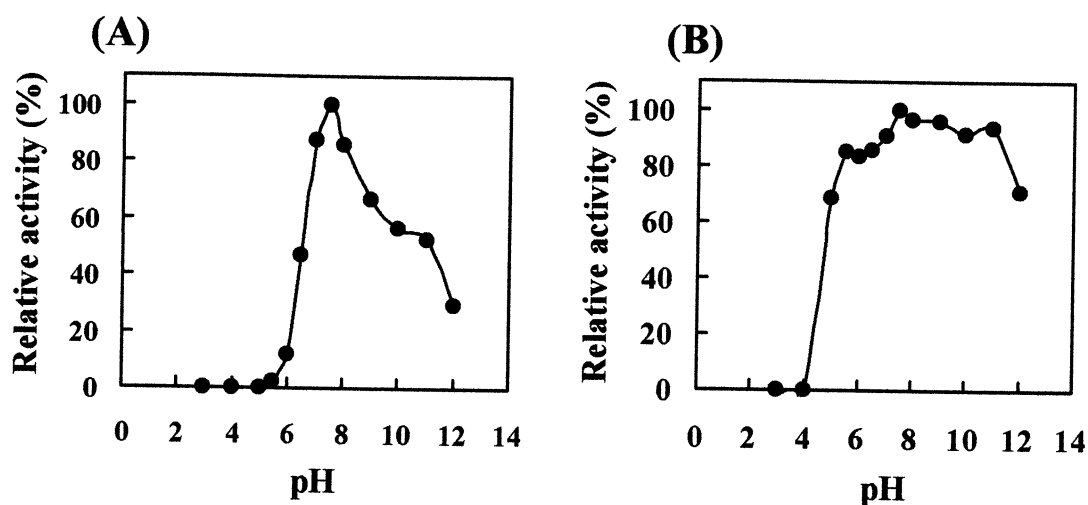


Fig. 4-9. pH-activity curve (A) and pH-stability curve (B) of the purified rXylA. The effects of pH on the activity and stability of rXylA were examined at various pHs (3.0–12.0) in Britton and Robinson's universal buffer (40 mM phosphoric acid, 40 mM boric acid, and 40 mM acetic acid). The pH-activities were assayed under the conditions described for the standard method. For the pH-stability measurements, the enzymes were preincubated at various pHs at 4°C for 12 h, and the residual activity was then measured using the standard method.

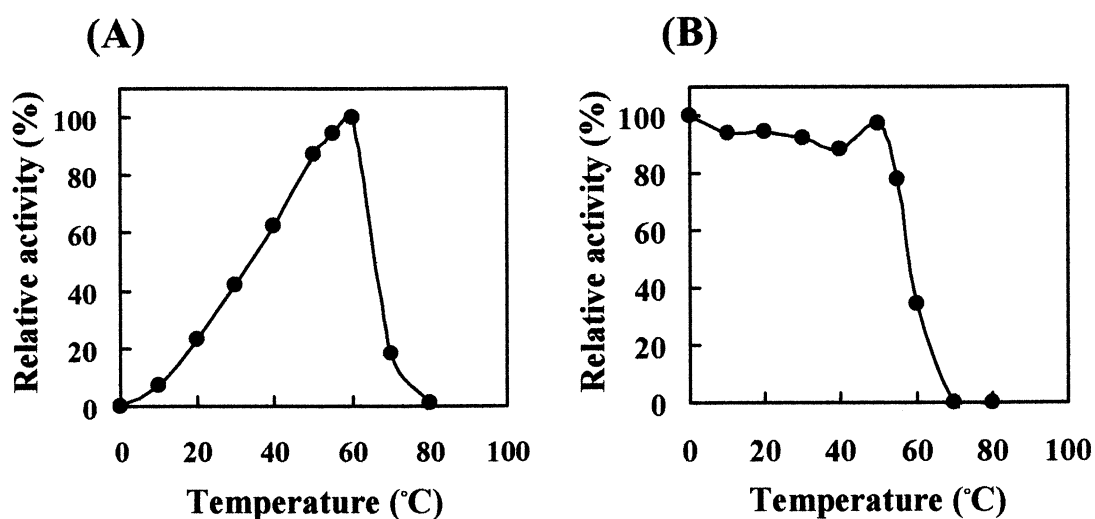


Fig. 4-10. Temperature-activity curve (A) and temperature-stability curve (B) of the purified rXylA. The effects of temperature on the activity of rXylA were determined for a range between 0°C to 80°C. With the exception of temperature, the assay conditions were the same as those described for the standard method. For the temperature-stability measurements, the enzymes were preincubated at various temperatures at pH 7.5 for 20 min, and the residual activity was measured using the standard method.

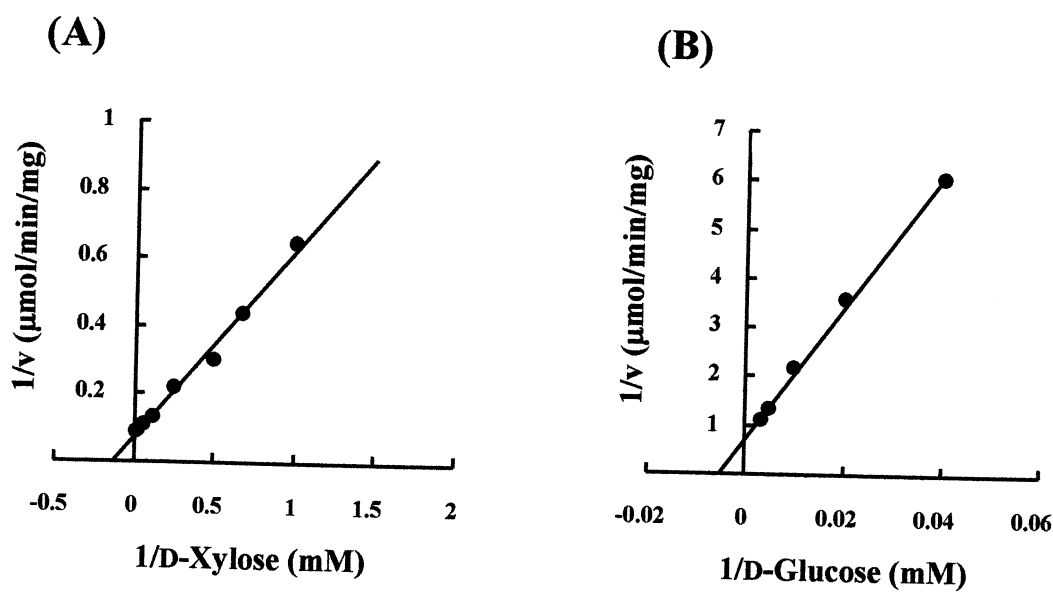


Fig. 4-11. Lineweaver-Burk plot for the purified rXylA with D-xylose (A) and D-glucose (B). To determine the kinetic parameters, enzyme assays were performed in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) containing 5 mM MgSO_4 and 1–64 mM D-xylose (25–300 mM for D-glucose). The reaction mixtures were incubated for 10 min at 40°C, and then reactions were stopped by cooling the tubes in ice. The D-xylulose and D-fructose formed were quantified by cysteine-carbazole-sulfuric acid method, and the absorbance at 540 nm and 560 nm were measured, respectively. The apparent K_m (mM) and V_{\max} ($\mu\text{mol/min/mg}$) were calculated from Lineweaver-Burk plots.

Table 4-7. Metal ion requirement for XylA activity

Metal ion (5 mM)	Relative activity (%)
None	0
MgSO ₄	100
CoCl ₂	59
MnCl ₂	41
FeSO ₄	15
CuSO ₄	3
ZnSO ₄	1
CaCl ₂	0

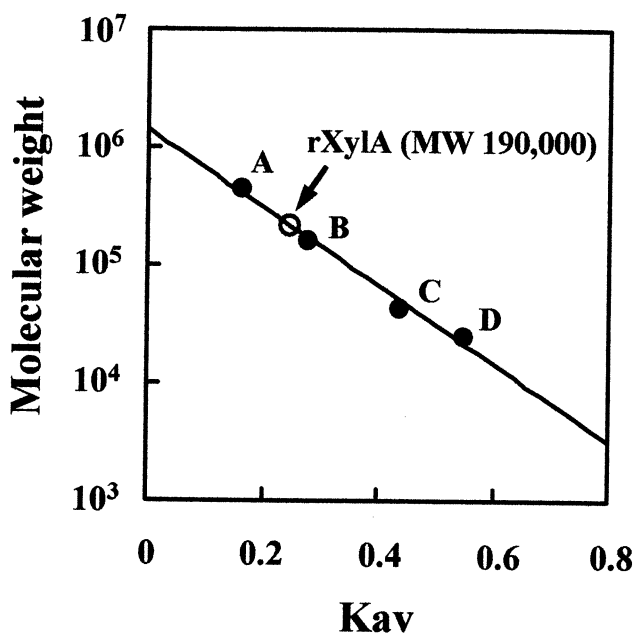


Fig. 4-12. Estimation of the molecular weight of rXylA by a Superdex 200 HR 10/30 column (GE Healthcare). For the determination of native molecular mass, rXylA were applied to a Superdex 200 HR 10/30 column equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) containing 0.15 M NaCl. Molecular mass standards included ferritin (A, MW 440,000), aldolase (B, MW 158,000), ovalbumin (C, MW 43,000), and chymotrypsinogen A (D, MW 25,000).

Vibrio sp. strain XY-214

xylR *xylT* *xylA* *xylB* *galT* *aldA* *galP* *aldB*

Lactococcus lactis sp. *lactis*

xylR *xylA* *xylB* *xylC* *xylD* *xylE*

Lactobacillus pasteurii

xylR *xylA* *xylB* *xylC* *xylD*

Neapopolitana sp.

Bacillus subtilis

E. coli K-12

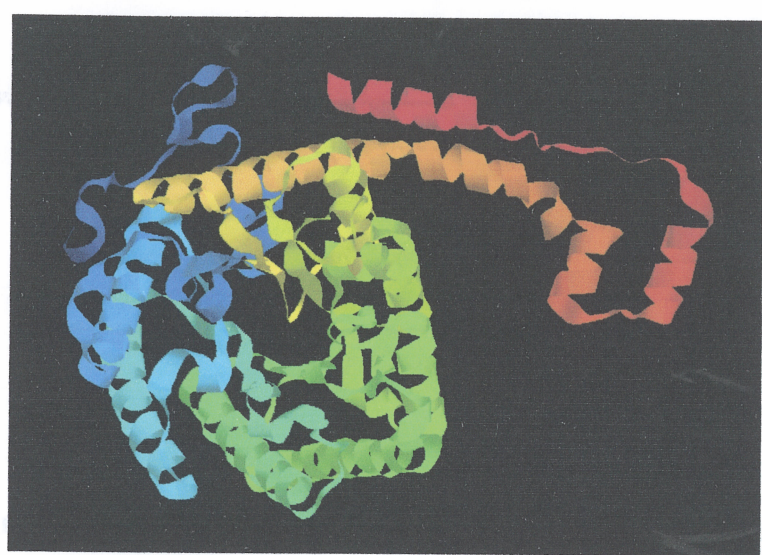


Fig. 4-14. Organisms encoding *xyl* genes. *Vibrio* sp. strain XY-214; *Lactococcus lactis* sp. *lactis*; *Lactobacillus pasteurii*; *Neapopolitana* sp.; *Bacillus subtilis*; *E. coli* K-12.

The *xylR* gene encodes a regulatory protein; *xylA* encodes a β -1,3-xylosidase; *galT* encodes a putative galactoside α -xylosyltransferase; *aldA* encodes an aldehyde reductase; *galP* encodes a galactose-1-phosphate 4-epimerase; *aldB* encodes an aldehyde dehydrogenase.

Fig. 4-13. Predicted model of monomeric XylA from *Vibrio* sp. strain XY-214. The three-dimensional structure of a monomeric XylA was predicted by SWISS-MODEL with the D-xylose isomerase of *T. neapolitana* as a template. The peptide chain is denoted in blue (N-terminal) to red (C-terminal).

xylR encodes an isopropylpyruvate synthase; *xylQ* encodes an α -xylosidase; *xylB* encodes a membrane-bound protein; *xylC* encodes a D-xylose-binding protein; *xylD* encodes an ATP-binding protein; and *xylE* encodes a membrane transporter (ABC-type D-xylose transport).

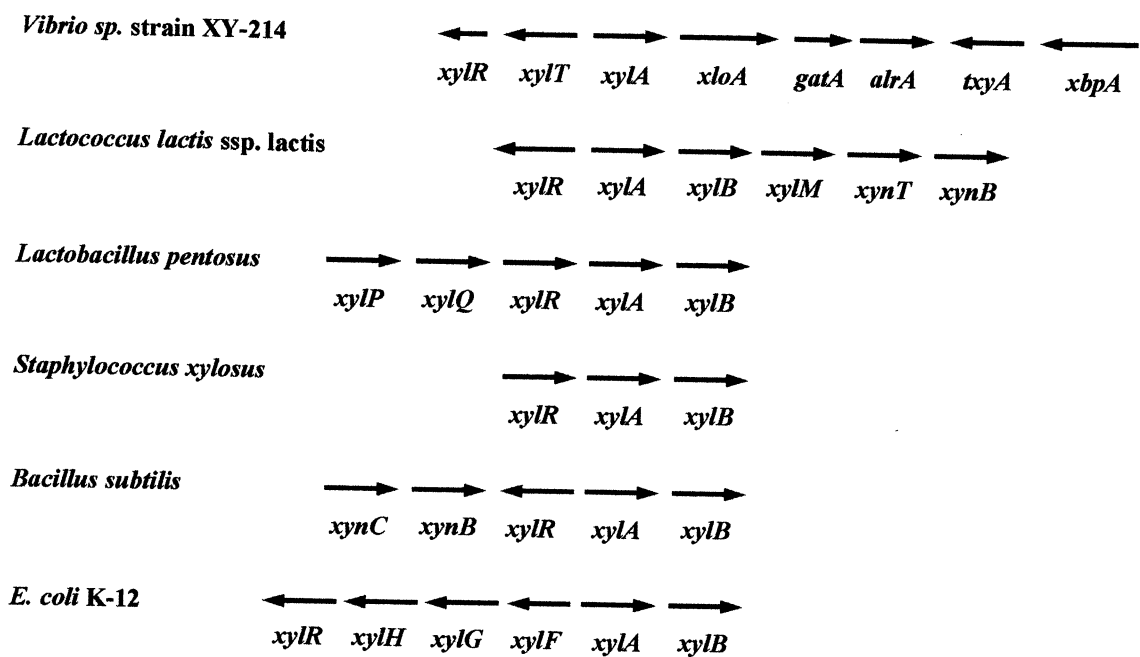


Fig. 4-14. Organization of the D-xylose utilization gene cluster in various bacteria.

The *xylR* gene encodes a regulatory protein; *xloA* encodes a β -1,3-xylosidase; *gatA* encodes a putative galactoside acetyltransferase; *alrA* encodes an aldehyde reductase; *txyA* encodes a β -1,3-xylanase; *xbpA* encodes a putative β -1,3-xylan-binding protein; *xylA* encodes a D-xylose isomerase; *xylB* encodes a D-xylulose kinase; *xylM* encodes a mutarotase; *xynT* encodes a putative xylo-oligomer transporter; *xynB* encodes a β -1,4-xylosidase; *xylT* encodes a D-xylose symporter; *xylP* encodes an isoprimeverose symporter; *xylQ* encodes an α -xylosidase; *xynC* encodes a membrane-bound protein; *xylF* encodes a D-xylose-binding protein; *xylG* encodes an ATP-binding protein; and *xylH* encodes a membrane transporter (ABC-type D-xylose transport).

第 V 章 β -1,3-キシランからのエタノール生産

β -1,3-キシランからエタノールを生産するためには、まず β -1,3-キシラナーゼ (TxyA) と β -1,3-キシロシダーゼ (XloA) を用いて本多糖を単糖である D-キシロースにまで糖化する必要がある。さらに生成した D-キシロースに D-キシロースイソメラーゼ (XylA) を作用させてエタノール発酵の炭素源となる D-キシルロースに変換しなければならない。これまでの研究で、海洋細菌 *Vibrio* sp. XY-214 株から TxyA、XloA および XylA をコードする 3 種類の酵素遺伝子がクローニングされ、その翻訳タンパク質の機能解析が行われた。本章では、実際にこれら 3 種類の酵素を用いて β -1,3-キシランから D-キシルロースを生成し、これを酵母に発酵させることでエタノール生成を試みた。

V-1. 実験材料および実験方法

V-1-1. 試薬

・ β -1,3-キシラン

II-1-2 に示した方法で調製した。

・D-キシルロース (Sigma)

・D-キシロース (Wako)

・エタノール (Wako)

・ホウ酸ナトリウム (Wako)

・アセトニトリル (Kanto chemical Co., Inc., Tokyo, Japan)

他の試薬は、特にことわらない限り Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) のものを使用した。

V-1-2. 使用した菌株および培地

エタノール発酵には酵母 *Saccharomyces cerevisiae* NBRC 0249 株 (NITE

Biological Resource Center, Chiba, Japan) を使用した。酵母は YM 斜面培地 (1.0% グルコース, 0.5% ペプトン, 0.3% 酵母エキス, 0.3% 麦芽エキス, 1.5% アガロース) で 1 ヶ月ごとに継代培養し、4°C で保存した。また同時に、保存菌を 5 ml の YM 液体培地に接種し、30°C で 30 時間培養後、グリセロール (終濃度 20%) を添加してよく攪拌し、-80°C で凍結保存した。

V-1-3. β -1,3-キシラン糖化酵素および D-キシロース異性化酵素の調製

Vibrio sp. XY-214 株由来の 3 種類の酵素遺伝子 (*txyA*、*xloA* および *xylA*) を形質転換大腸菌に発現させた後、得られた組換え酵素 (rTxyA、rXloA および rXylA) を精製して β -1,3-キシランからの D-キシロース生成に使用した。rXloA および rXylA の発現および精製は、それぞれ II-1-9 および IV-1-6 に示した方法で行った。rTxyA の発現および精製は、Araki らの方法 (Araki et al. 2000) で行った。各酵素の至適 pH および至適温度を Table 5-1 にまとめた。

Table 5-1. Properties of TxyA, XloA, and XylA

Enzymes	Optimum temp (°C)	Optimum pH
TxyA	40	7.5
XloA	35	7.0
XylA	60	7.5

V-1-4. β -1,3-キシランの糖化

rTxyA と rXloA を用いて β -1,3-キシランを糖化した。すなわち、1.0% β -1,3-キシランを含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) の 150 μ l を 1.5 ml 容エッペンドルフチューブに入れ、これに 10 U/ml の rTxyA 溶液および 0.6 U/ml の rXloA 溶液をそれぞれ 75 μ l 加えて 37°C で 12 時間反応させた (全量 300 μ l)。次に、反応液を 5 分間煮沸することで反応を停止した後、これを遠心分離 (14,000 g, 2 min) して得られた上澄み液に含まれる還元糖量を Somogyi-Nelson 法

(Somogyi 1952) により測定した。また、糖化により生成した反応分解産物を TLC により分析した。展開プレートには silica gel 60 plastic sheet (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 (Bailey and Bourne 1960) を使用し、同試薬を噴霧した後、プレートを 90°C で 10 分間加熱した。

V-1-5. D-キシロースの D-キシルロースへの異性化

β-1,3-キシランの糖化により生成した D-キシロースに、D-キシロースイソメラーゼを作用させて D-キシルロースに変換した。しかしながら、D-キシロースイソメラーゼによる異性化反応は可逆的であり、一般的に D-キシロース : D-キシルロースが 80:20 で平衡状態に達してしまう (Chandrakant and Bisaria 2000)。しかし、反応液にホウ酸ナトリウムを添加することで、D-キシロース→D-キシルロース変換効率を高めることができる (Hsiao et al. 1982)。すなわち、ホウ酸イオンは pH 7.5 付近では D-キシルロースと強く結合し、ホウ酸イオン-D-キシルロース複合体を形成する。これにより遊離 D-キシルロース濃度が減少するため、D-キシロースイソメラーゼによる D-キシロース→D-キシルロース変換反応が促進され、反応液中にホウ酸イオン-D-キシルロース複合体が蓄積される。このホウ酸イオンと D-キシルロースとの結合は pH に依存しているため、pH を 5.0 付近にまで低下させると複合体は解離し、D-キシルロースを遊離させることができる。このことから、本実験では異性化反応における D-キシルロース生成効率を高めるために、反応液にホウ酸ナトリウムを添加することにした。

反応液は 1.5 ml 容エッペンドルフチューブに 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5)、1.5% D-キシロース、10 mM MgSO₄、4 mM ホウ酸ナトリウムおよび 0.25 U rXylA を含むように調製した (全量 1 ml)。反応は 40°C で 2 時間行なった。次いで、反応液を 2 分間煮沸することで反応を停止し、これを遠心分離 (14,000 g, 2 min) して得られた上澄み液に含まれる D-キシロースおよび D-キシルロースを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分析した。ただし、分

析前に上澄み液の pH を 1 M 酢酸により 5.0 に調整し、0.2 μm フィルター (Advantec) でろ過した。糖の検出には示差屈折率 (RI) 検出器 (Shodex RI-72; Showa Denko, Tokyo, Japan) を使用し、カラムには Shodex Asahipak NH2P-50 4E カラム (4.6 mm i.d. \times 250 mm; Showa Denko) を用いた (カラム温度; 40°C)。移動相にはアセトニトリル-水 (75:25, v/v) を使用し、流速は 1.0 ml/min とした。また、試料添加量は 30 μl とした。標準物質 (D-キシロースおよび D-キシルロース) のクロマトグラムを Fig. 5-1 に示した。

V-1-6. D-キシルロースを炭素源としたエタノール発酵

異性化反応により生成した D-キシルロースをエバポレーターにより濃縮し、これを酵母 *S. cerevisiae* NBRC 0249 株に与えてエタノール発酵させた。まず初めに、*S. cerevisiae* NBRC 0249 株の保存株 (YM 斜面培地) の一白金耳を 5 ml の YPD 培地 (1.0% 酵母エキス, 2.0% ペプトン, 2.0% グルコース) に接種して 30°C で 16 時間培養した (種培養)。次に、この種培養液の 1 ml を 500 ml 容坂口フラスコに入れた 200 ml の YPD 培地に接種し、30°C で 48 時間振とう培養 (160 rpm) した (本培養)。この種培養から本培養までの操作を同時に 6 回行い、合計 1,200 ml の培養液を得た。その後、培養液を遠心分離 (4,000 g, 15 min) して菌体を回収し、これにオートクレーブ滅菌した MilliQ 水を適量加えて懸濁させ、さらに遠心分離 (4,000 g, 15 min) した。次いで、上澄み液を捨て、再度オートクレーブ滅菌した MilliQ 水を適量加えて懸濁し、遠心分離 (4,000 g, 15 min) することで菌体を洗浄した。洗浄した菌体に、オートクレーブ滅菌した発酵用培地 (Table 5-2) を適量加えて懸濁させた後、この懸濁液の 1 ml を、あらかじめ 30 ml 容三角フラスコに調製した 3.0% D-キシルロースを含む 10 ml 発酵用培地に添加した。この時、培養液の 600 nm における吸光度が 15 となるように酵母濃度を調整した。D-キシルロースは、オートクレーブ滅菌後の発酵用培地に 0.2 μm フィルター (Advantec) でろ過滅菌して加えた。その後、三角フラスコにシリコ栓をしてアルミホイルを被せた。

エタノール発酵は 30℃ で 48 時間、穏やかに振とう (130 rpm) しながら行った。発酵終了後、培養液を遠心分離 (14,000 g, 2 min) して得られた上澄み液に含まれるエタノールを HPLC により分析した。ただし、分析前に上澄み液を 0.2 μm フィルター (Advantec) でろ過した。エタノールの検出には RI 検出器 (Shodex RI-72; Showa Denko) を使用し、カラムには Develosil RPAQUEOUS C30-UG-5 カラム (4.6 mm i.d. × 250 mm; Nomura Chemical Co., Ltd., Aichi, Japan) を用いた (カラム温度; 40℃)。移動相には MilliQ 水を使用し、流速は 1.0 ml/min とした。試料添加量は 30 μl とした。標準物質 (エタノール、メタノールおよび 2-プロパノール) のクロマトグラムを Fig. 5-2 に示した。

Table 5-2. Composition of the fermentation medium

Yeast extract	0.5%
Peptone	0.5%
KH ₂ PO ₄	0.5%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2%
pH 5.0	

V-2. 実験結果

V-2-1. β-1,3-キシランの糖化

β-1,3-キシランの酵素糖化による還元糖生成の経時変化を Fig. 5-3A に示した。β-1,3-キシランに rTxyA を単独で作用させるよりも、rTxyA と rXloA を同時に作用させることで効率的に還元糖を生成することができた。反応 12 時間後には、5.0 g/l のβ-1,3-キシランから rTxyA 単独では 1.39 g/l、rTxyA と rXloA を同時に作用させた場合は 2.62 g/l の還元糖が生成した。さらに、TLC により反応 12 時間後の加水分解産物を分析した結果、β-1,3-キシランに rTxyA を単独で作用させた場合、主にβ-1,3-キシロビオースが生成され、わずかながら D-キシロースと β-1,3-キシロトリオースの生成が確認された。一方、rTxyA と rXloA を同時に作用させた場合、D-キシロースが最終分解産物として生成していることが明らか

となった (Fig. 5-3B)。

V-2-2. D-キシロースの D-キシルロースへの異性化

S. cerevisiae は D-キシロースを炭素源としてエタノール発酵できないが、その異性体である D-キシルロースであれば可能なので、 β -1,3-キシランの糖化によって生成した D-キシロースに rXylA を作用させて D-キシルロースに変換した。異性化反応による D-キシルロース生成の経時変化を Fig. 5-4 に示した。上述したように、D-キシロースイソメラーゼによる異性化反応は可逆的であり、D-キシロース:D-キシルロースがおおよそ 80:20 で平衡状態に達してしまう (Chandrakant and Bisaria 2000)。これと一致して、反応液にホウ酸ナトリウムを加えない場合、rXylA の D-キシロース→D-キシルロース変換効率は約 15% で平衡状態に達した。一方、反応液に 4 mM ホウ酸ナトリウムを添加することにより、変換効率を約 40% にまで高めることができた。ただし、反応液に 4 mM 以上のホウ酸ナトリウムを添加した場合、反応液の pH を 5.0 に下げてもホウ酸イオンと D-キシルロースの複合体が解離しにくくなる傾向がみられた。

V-2-3. D-キシルロースを炭素源としたエタノール発酵

β -1,3-キシランに 3 種類の酵素を作用させて調製した D-キシルロースを、*S. cerevisiae* NBRC 0249 株に与えてエタノール発酵させた。Fig. 5-5 に D-キシルロースの発酵によるエタノール生成の経時変化を示した。発酵開始後、培養液中のエタノール濃度が徐々に増加し、発酵 30 時間後にはプラトーに達した。発酵 48 時間後には約 4.7 g/l (エタノールの比重 ; 0.789 g/ml) のエタノールの生成が確認できた。一方、D-キシルロースの代わりに D-キシロースを炭素源とした場合、エタノール生成は確認できなかった。

V-3. 考察

本章では、*Vibrio* sp. XY-214 株から単離された 3 種類の酵素 (TxyA、XloA および XylA) の応用研究として、海藻特有の多糖である β -1,3-キシランからのエタノール生成を試みた。地中海沿岸域において異常繁殖し、漁業や生態系に大きな被害をもたらしている変異型緑藻イチイヅタ (*C. taxifolia*) の主要細胞壁成分は、 β -1,3-キシランである (Iriki et al. 1960)。従って、本多糖を原料としたエタノール生産技術を確立することは、変異型イチイヅタの有効利用に貢献するものと思われる。先に述べたように、 β -1,3-キシランからエタノールを生産するためには、「 β -1,3-キシランの糖化」、「D-キシロースの異性化」および「D-キシルロースからのエタノール発酵」の 3 つの工程が必要である。本研究では、これら 3 つの工程をそれぞれ独立させて行った。

β -1,3-キシランの糖化では、rTxyA を単独で作用させるよりも、rTxyA と rXloA を同時に作用させることで効率的に D-キシロースを生成することができた (Fig. 5-3)。反応 12 時間後には、5.0 g/l の β -1,3-キシランから 2.62 g/l の D-キシロースに相当する還元糖が得られた。しかし、反応液の底には β -1,3-キシランの沈殿がわずかに残存しており、糖化が未だ不十分であることを示していた。また、還元糖は主に反応開始後 3 時間に生成され、それ以降の生成量はわずかなものであった。このことから、反応が進行するにつれて rTxyA と rXloA が熱により失活していることが示唆された。今後は、耐熱性を有する TxyA および XloA の開発が必要である。

D-キシロースイソメラーゼによる D-キシロースの異性化反応は、一般的に D-キシロース : D-キシルロースが 80:20 で平衡状態に達してしまう (Chandrakant and Bisaria 2000)。このことは、糖化によって生成した D-キシロースのおよそ 20%がエタノール発酵の炭素源となることを意味している。IV-3 で述べたように、異性化反応を高温で行うことで、D-キシルロース生成効率を高めることができる (Bhosale et al. 1996)。しかしながら、*Vibrio* sp. XY-214 株由来の XylA は熱安定性が低く、60°C で 20 分間処理すると相対活性が約 34%にまで低下して

しまう (Fig. 4-10B)。このため、本実験では異性化反応を 40°C で行った。D-キシルロース生成効率を高めるためのもう 1 つの手段として、反応液にホウ酸ナトリウムを添加する方法がある (Hsiao et al. 1982)。V-1-5 で述べたように、ホウ酸イオンは pH 7.5 付近では D-キシルロースと強く結合し、ホウ酸イオン-D-キシルロース複合体を形成する。これにより D-キシロース→D-キシルロース変換反応が促進され、ホウ酸イオン-D-キシルロース複合体が蓄積される。複合体形成は pH 依存的であり、酸性条件では解離するため、煮沸による反応停止後、pH を 5.0 付近にまで低下させると複合体は解離し、多量の D-キシルロースを得ることができる。そこで、本実験では異性化反応の際、反応液にホウ酸ナトリウムを添加することにした。その結果、反応液にホウ酸ナトリウムを加えない場合、D-キシルロース生成効率は約 15% に留まったが、4 mM ホウ酸ナトリウムを添加することで約 40% にまで高めることができた (Fig. 5-4)。

異性化反応により生成した D-キシルロースを濃縮し、終濃度 30 g/l となるように発酵培地に加えて酵母にエタノール発酵させた。その結果、発酵 48 時間後には約 4.8 g/l のエタノールが生成した。一方、D-キシロースを炭素源とした場合、エタノールは生成しなかった。このことから、YPD 培地に含まれていた D-グルコースが、MilliQ 水による酵母の洗浄によって完全に除去されたこと、さらに D-キシルロースがエタノール発酵の炭素源として利用されたことが明らかとなった。エタノール生成量は多くないが、 β -1,3-キシランからのエタノール生成としては本研究が初めての報告となった。また、*Vibrio* sp. XY-214 株由来の 3 種類の酵素が β -1,3-キシランからのエタノール生成に有用であることが明らかになった。

本研究では、 β -1,3-キシランからエタノールを生成することに重点を置き、その生成量は重視しなかった。従って、今後エタノール生成量を増加させるためには幾つかの条件検討が必要である。Gong らは (Gong et al. 1981)、*S. cerevisiae* 24860 株を用いて 30 g/l の D-キシルロースから 10.8 g/l のエタノールを生成している (発酵条件: 26°C, pH 5.6, 48 時間)。また、Chandrakant と Bisaria は (Chandrakant

and Bisaria 2000) *S. cerevisiae* NRRL 2358 株を用いて 50 g/l の D-キシロースから 18.5 g/l のエタノールを生成している（発酵条件：30°C, pH 5.0, 56 時間）。このことから、発酵に用いる酵母の種類、発酵温度、発酵容器ならびに D-キシロース濃度などを検討することで、エタノール生産量を高めることは十分可能であると考えられる。

さらに、異性化反応とエタノール発酵を同時に行えば、異性化反応により生成した D-キシロースがエタノール発酵に消費され、連続的に D-キシロース→D-キシロース反応が進むので、効率的に D-キシロースをエタノールに変換できる。しかし、既報の D-キシロースイソメラーゼのほぼすべてが pH 7.0–9.5 に至適 pH を有するのに対し、酵母によるエタノール発酵の至適 pH が 4.5–5.5 であるため、各工程を至適 pH で行えないという問題がある（Rao et al. 2008）。*Vibrio* sp. XY-214 株由来の XylA に至っては、pH 5.0、5.5 および 6.0 での相対活性は、それぞれ 0、2.48 および 11.58%にまで低下してしまう（Fig. 4-7A）。従って、異性化反応とエタノール発酵を同時に行い、効率的にエタノールを生成するためには、酸性条件（pH 4.5–5.5）で活性を示す D-キシロースイソメラーゼの開発が必要である。

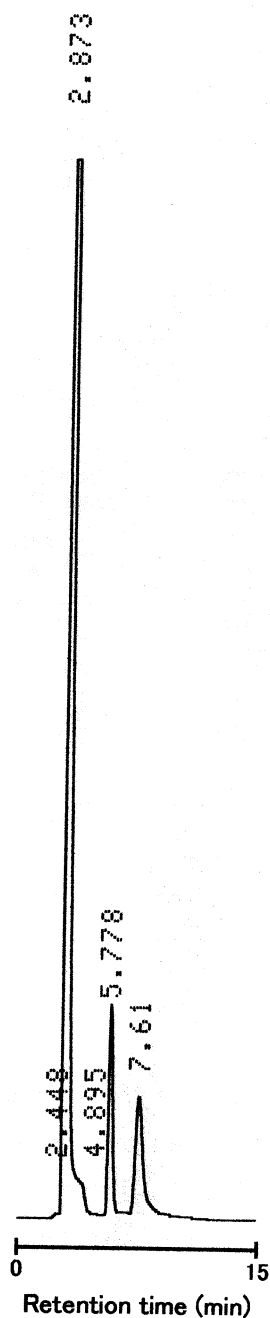


Fig. 5-1. Chromatogram of standard D-xylose and D-xylulose solution analyzed on a Shodex Asahipak NH2P-50 4E column (4.6 mm i.d. × 250 mm; Showa Denko). 30 μ l of D-xylose (5 mg/ml) and D-xylulose (5 mg/ml) were injected into the column. Retention times of D-xylose and D-xylulose were 7.61 and 5.778 min, respectively. Mobile phase, acetonitrile-water (75:25, v/v); Flow rate, 1.0 ml/min; Detector, Shodex RI-72; Column temperature, 40°C.

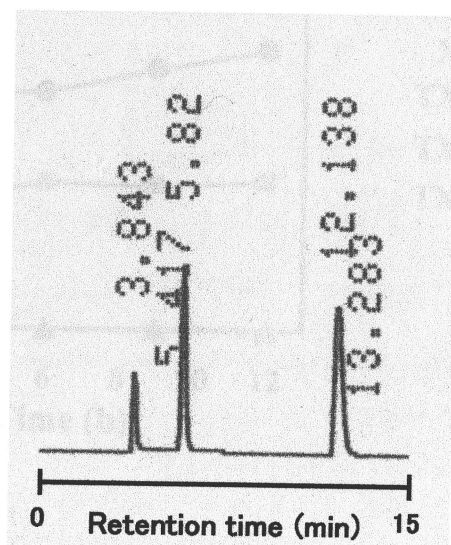


Fig. 5-2. Chromatogram of standard ethanol, methanol, and 2-propanol analyzed on a Develosil RPAQUEOUS C30-UG-5 column (4.6 mm i.d. \times 250 mm; Nomura Chemical). 30 μ l of 1 % (v/v) ethanol, methanol, and 2-propanol were injected into the column. Retention times of ethanol, methanol, and 2-propanol were 5.82, 3.843 and 12.138 min, respectively. Mobile phase, water; Flow rate, 1.0 ml/min; Detector, Shodex RI-72; Column temperature, 40°C.

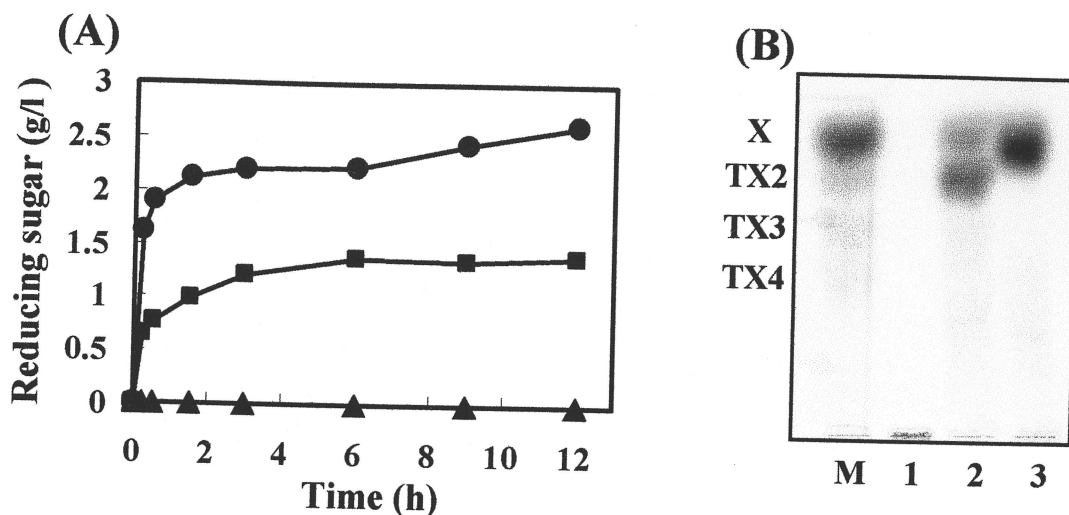


Fig. 5-3. The time course of hydrolysis of β -1,3-xylan. (A) The amount of reducing sugar released was measured by the Somogyi-Nelson method. 0.5% β -1,3-xylan in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) were placed in Eppendorf tubes in the presence of 2.5 U/ml rTxyA and 0.15 U/ml rXloA either alone or in combination (total volume: 0.3 ml). The reaction was assayed at 37°C. Each value represents the averages of at least duplicate measurements. Symbols: circles, co-action of rTxyA and rXloA; squares, action of rTxyA alone; triangles, action of rXloA alone. (B) TLC analysis of hydrolysis products released from β -1,3-xylan. The reaction was carried out at 37°C for 12 h. Lane M, Standard oligosaccharides; lane 1, hydrolysis products by the action of rXloA; lane 2, rTxyA; lane 3, rTxyA and rXloA. X, D-xylose; TX2, β -1,3-xylobiose; TX3, β -1,3-xylotriose; TX4, β -1,3-xylotetraose.

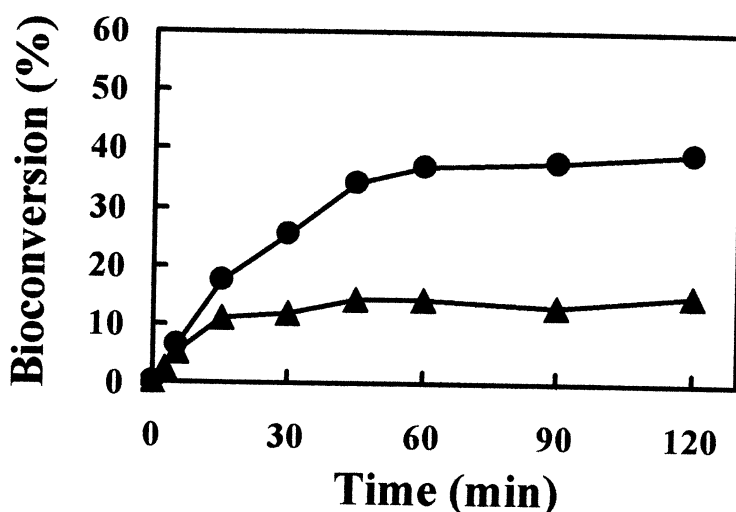


Fig. 5-4. The time course of D-xylulose production from D-xylose by rXylA.

The reaction mixture containing 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5), 1.5% D-xylose, 10 mM MgSO₄, 4 mM sodium tetraborate, and 0.25 U rXylA in Eppendorf tubes (total volume: 1 ml) were incubated at 40°C. Symbols: triangles, isomerization in the absence of sodium tetraborate; circles, isomerization in the presence of 4 mM sodium tetraborate. Each value represents the mean of duplicate measurements

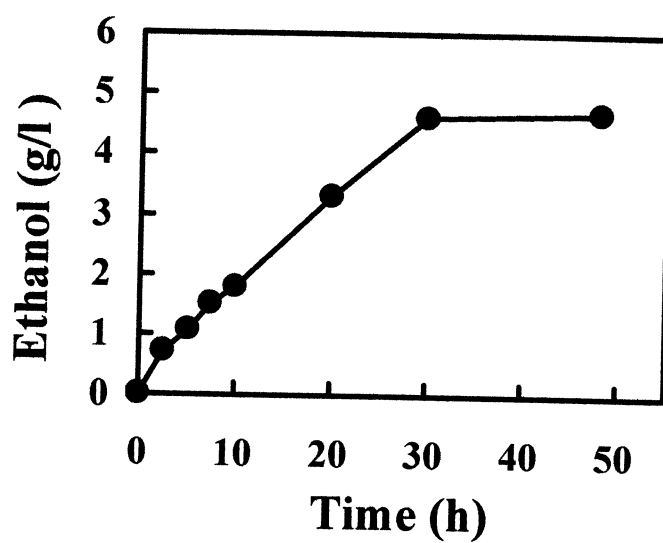


Fig. 5-5. The time course of ethanol production from D-xylulose by *S. cerevisiae* NBRC 0249. Each value represents the averages of at least duplicate measurements.

第 VI 章 緑色蛍光タンパク質 (GFP) 融合型糖質結合モジュール (CBM) を用いたウシケノリプロトプラスト細胞壁再生過程の観察

近年、我が国における重要な産業用海藻であるアマノリ (*Porphyra*) は、養殖環境の悪化や異常気象などに伴い、病原菌などによる被害や品質の低下が問題となっている (Fujita 1990, Fujita and Uppalapati 1997)。その中で、紅藻の細胞壁構成多糖が、病原菌に対する防御機構に重要な役割を果たしていることがわかってきた (Bouarab et al. 1999, Potin et al. 1999, Weinberger et al. 1999, Uppalapati and Fujita 2000, Vreeland and Kloareg 2000)。従って、アマノリ細胞壁の構造を理解することは、優良品種開発のために不可欠であると考えられる。しかし、アマノリが属するウシケノリ科の細胞壁は、主に β -1,4-マンナン、 β -1,3-キシランおよびポルフィランの 3 種類の多糖により構成されていることは知られているが (Percival and McDowell 1967, Gretz et al. 1982)、これら多糖がいつ、どのように形成され、どこに局在しているのかは不明である。そこで、本章では海藻細胞壁多糖を解析するための技術を確立することを目的とした。

セルラーゼやヘミセルラーゼなどの糖質分解酵素の多くは、糖質結合モジュール (CBMs: Carbohydrate-Binding Modules) を有している (Boraston et al. 2004)。CBM には基質と酵素との結合を促進し、酵素の触媒効率を高める役割がある。また、CBM は結合特異性を有しており、その種類によって結合する多糖や糖鎖の種類が異なる。本実験では、この CBM の結合特異性を利用して細胞壁多糖を解析した。

先に Tanaka らは、海洋細菌 *Vibrio* sp. MA-138 株から β -1,4-マンナーゼ (Man5C) を解析し、本酵素が C 末端領域に非結晶性マンナンと特異的に結合するファミリー 27 CBM (CBM27) を有していることを明らかにした (Tanaka et al. 2009)。そこで、CBM27 と緑色蛍光タンパク質 (GFP) の融合タンパク質を構築し、本蛍光プローブを用いて細胞壁多糖の解析を試みた。本実験では、供試海藻としてアマノリと同じウシケノリ科に属し、室内培養が容易なウシケノ

リ (*Bangia atropurpurea*) を用いた。

VI-1. 実験材料および実験方法

VI-1-1. 試薬

- ・ Calcofluor White M2R (CFW) は Sigma から購入した。

- ・ β -1,3-キシラン

II-1-2 に示した方法で調製した。

- ・ β -1,4-マンナン

緑藻ミル (*Codium fragile*) (Fig. 6-1) から Love と Percival の方法 (Love et al. 1964) に準拠して調製した。すなわち、乾燥ミル粉末を十分に水道水で洗浄後、少量の氷酢酸を含む 70°C の温湯に投入し、亜塩素酸ナトリウムによって脱色した。布袋を用いて圧搾、ろ過した残さを 4% 水酸化ナトリウム溶液中に投入し、窒素ガスを吹き込みながら室温で 4 時間攪拌した。布袋でろ過後、残さを 20% 水酸化ナトリウム溶液中に投入し、窒素ガスを吹き込みながら 80°C で 5 時間攪拌して β -マンナンを抽出し、遠心分離して得た上澄み液にフェーリング溶液を加えて青色の銅-マンナン複合体を沈殿させた。遠心分離して集めた沈殿を 1% 塩酸を含む 85% エタノールで洗浄し、減圧乾燥して白色の β -マンナン粉末を得た。

- ・ グライコール β -1,4-マンナン

Yamaura らの方法 (Yamaura et al. 1990) に準拠して β -マンナンから調製した。

VI-1-2. 供試海藻およびその培養方法

ウシケノリ (*Bangia atropurpurea* strain FA-90) (Fig. 6-2) は 1990 年に福岡県の沿岸海域で採集した。本海藻の葉状体は Provasoli の ASP₁₂ (NTA) 培地 (Provasoli et al. 1957) で 17°C、明期 9 時間／暗期 15 時間の光周期で穏やかに振とう (30 strokes/min) しながら培養した。培養器にはペトリ皿 (直径 9 cm) を使用し、1 枚当たり 50 ml の培地を入れた。培養液表面の光の強度は 48 μ mol

photons \cdot m⁻² \cdot s⁻¹ となるように調節した。本海藻は多数の単胞子を放出するので、これら単胞子を上記条件で培養し、葉状体を繰り返し継代培養することにより今日まで維持されている。なお、培地は一週間毎に交換した。

VI-1-3. プロトプラスト作出用酵素の調製

ウシケノリの細胞壁はアマノリと同様に β -1,4-マンナン、 β -1,3-キシランおよびポルフィランで構成されているので、プロトプラストを作出するためには、 β -1,4-マンナナーゼ、 β -1,3-キシラナーゼおよびポルフィラン分解能を有する β -アガラーゼの3種類の細胞壁分解酵素が必要である (Araki et al. 1994)。各酵素は以下に示す方法で調製した。また、 β -1,4-マンナナーゼ、 β -1,3-キシラナーゼおよび β -アガラーゼの1 unit は、それぞれ1分間に1 μ mol のD-マンノース、D-キシロースおよびD-ガラクトースに相当する還元糖を生ずる酵素量と定義した (Somogyi 1952)。

・ β -1,4-マンナナーゼ

研究室保存株である海洋細菌 *Vibrio* sp. MA-138 株由来の β -1,4-マンナナーゼ遺伝子 (*man5C*) を形質転換大腸菌において発現させ、得られた組換え酵素 (rMan5C) を用いた。rMan5C の大腸菌発現系は Tanaka らによって構築された (Tanaka et al. 2009)。組換え酵素の発現および抽出は IV-1-6-2 と同様の方法で行った。

・ β -1,3-キシラナーゼ

研究室保存株である海洋細菌 *Alcaligenes* sp. XY-234 株由来の β -1,3-キシラナーゼ遺伝子 (*txyA*) を形質転換大腸菌において発現させ、得られた組換え酵素 (rTxyA) を用いた。rTxyA の大腸菌発現系は Okazaki らによって構築された (Okazaki et al. 2002)。組換え酵素の発現および抽出は IV-1-6-2 と同様の方法で行った。

・ β -アガラーゼ

研究室保存株である海洋細菌 *Vibrio* sp. PO-303 株由来の β -アガラーゼを用いた (Araki et al. 1998b)。すなわち、PO-303 株の 1 白金耳を、100 ml 容三角フラスコに入れた 20 ml の 0.3% アガロースを含むペプトン培地 (Table 2-1) に接種し、25°C で 2 日間振とう培養した (種培養)。この培養液を 3,000 ml 容三角フラスコに入れた 1000 ml のペプトン培地に投入し、25°C で 4 日間振とう培養した (本培養)。次に、培養液を遠心分離 (7,000 g, 20 min) して上澄み液を回収し、これに 80% 飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、4°C で一晚塩析した。塩析後、沈殿したタンパク質を遠心分離 (7,000 g, 20 min) により回収し、少量の 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解させた。これを同緩衝液で透析後、透析内液を酵素液として用いた。

VI-1-4. ウシケノリからのプロトプラスト作出

ウシケノリからのプロトプラスト作出は下記のように行った (Araki et al. 1994)。VI-1-3 において調製した 3 種類の酵素はすべて 0.45 μ m フィルター (Advantec) でろ過滅菌し、プロトプラスト作出の過程で必要な器具 (ペトリ皿、ビーカー、三角フラスコ、駒込ピペットおよびガラス製遠心管など) は、可能な限りすべて乾熱滅菌 (150°C, 60 min) して使用した。

葉長 1~3 cm のウシケノリを、100 ml 容ビーカーに入れた 30 ml のパパイン液 (5% パパインと 0.5 M マンニトールを含む ASP₁₂ (NTA)) に浸し、22°C で 30 分間振とう (30 strokes/min) した。次いで、葉状体を 0.5 M マンニトールを含む ASP₁₂ (NTA) で数回洗浄後、メスを使って数 mm 片に切断した。次に、8 ml の細胞壁分解酵素液 (20 unit の β -1,4-マンナーゼ、10 unit の β -1,3-キシラーゼ、10 unit の β -アガラーゼおよび 0.5 M マンニトールを含む ASP₁₂ (NTA)) を入れた 50 ml 容三角フラスコに、切断した葉状体 (湿重量約 200 mg) を投入し、22°C で 90 分間振とうした。その後、懸濁液を 40 μ m のナイロンネットでろ過することでプロトプラストを分離した。次に、プロトプラストを洗浄するた

めにネット通過液を遠心分離 (1,000 g, 5 min) し、沈殿したプロトプラストに 6 ml の 0.5 M マンニトールを含む ASP₁₂ (NTA) を加えて懸濁させ、さらに遠心分離 (1,000 g, 5 min) した。プロトプラストを再生する際、培地にマンニトールが残存しているとカビなどの雑菌が繁殖しやすくなるため、培地からマンニトールを除去する必要がある。そこで、プロトプラスト洗浄用の ASP₁₂ (NTA) に含まれるマンニトール濃度を徐々に減少させることで (0.5→0.25→0.125→0 M)、プロトプラスト懸濁液からマンニトールを除去した。プロトプラスト作出後、細胞壁が完全に除去されたことを 0.01% Calcofluor White M2R (CFW) を用いた染色試験により確認した (Maeda and Ishida 1967)。

VI-1-5. ウシケノリプロトプラストの培養方法

VI-1-4 で作出したウシケノリプロトプラストは、以下の 2 通りの方法で培養した (Fig. 6-3)。

①試験管での培養

ウシケノリプロトプラストを乾熱滅菌したガラス製の小型試験管に入れ、17°C で 12 時間、暗所に静置した。その後、光の強度 $48 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ で明期 9 時間／暗期 15 時間の光周期で静置培養した。

②カバーガラス上での培養

30 ml の ASP₁₂ (NTA) が入ったペトリ皿 (直径 9 cm) にカバーガラス (18 × 18 mm, Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan) を沈め、これに駒込ピペットを用いてウシケノリプロトプラストを適当量滴下し、試験管培養と同様の方法で培養した。

VI-1-6. GFP と CBM27 の融合タンパク質 (GFP-CBM27) の発現ベクター構築

・ GFP-CBM27 発現ベクターの構築

GFP-CBM27 の発現系は以下の方法で構築した。まず初めに、pRSET/EmGFP プラスミド (Invitrogen Co., Carlsbad, California, U.S.A.) を鋳型に gfp-F プライマー

(5'-ATTAGAGCTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3') および *gfp*-R プライマー (5'-GTGAATTCCTTGTACAGCTCGTCCAT-3') を用いて、PCR により *gfp* 遺伝子を増幅した。*gfp*-F および *gfp*-R プライマーにはそれぞれ *Sac*I および *Eco*RI サイトを付加した (下線)。PCR 反応の組成および反応条件はそれぞれ Table 6-1 と Table 6-2 に示した。次に、*Vibrio* sp. MA-138 株由来のβ-1,4-マンナナーゼ遺伝子 (*man5C*) のうち、リンカー領域と CBM27 をコードする領域 (Gly466–Tyr669) を増幅させた (Fig. 6-4A)。すなわち、Tanaka らが形質転換大腸菌における rMan5C の発現のために構築した *man5C*/pCold プラスミド (Tanaka et al. 2009) を鋳型に、CBM27-F プライマー (5'-ACGAATTCGGCTATGGTTTTCGAACAC-3') および CBM27-R プライマー (5'-AGGGACTCGAGTTAGTAGATAGGTTTTAAG-3') を用いて、PCR により CBM27 をコードする領域 (CBM27) を増幅させた。CBM27-F および CBM27-R プライマーにはそれぞれ *Eco*RI および *Xho*I サイトを付加した (下線)。PCR 反応の組成および反応条件はそれぞれ Table 6-3 と Table 6-4 に示した。

Table 6-1. Composition of PCR solution

Component	Volume (μl)
H ₂ O	78.5
10×ExTaq Buffer	10.0
2 mM dNTP	8.0
pRSET/EmGFP(100 ng/μl)	1.0
<i>gfp</i> -F primer (50 pmol/μl)	1.0
<i>gfp</i> -R primer (50 pmol/μl)	1.0
Ex Taq Polymerase (5 unit/μl)	0.5

Table 6-2. PCR condition

94°C	1.0 min	
94°C	0.5 min	30 cycles
60°C	0.5 min	
72°C	1.2 min	
4°C	hold	

Table 6-3. Composition of PCR solution

Component	Volume (μl)
H ₂ O	78.5
10×ExTaq Buffer	10.0
2 mM dNTP	8.0
<i>man5C</i> /pCold (100 ng/μl)	1.0
CBM27-F primer (50 pmol/μl)	1.0
CBM27-R primer (50 pmol/μl)	1.0
Ex Taq Polymerase (5 unit/μl)	0.5

Table 6-4. PCR condition

94°C	1.0 min	
94°C	0.5 min	30 cycles
60°C	0.5 min	
72°C	1.0 min	
4°C	hold	

次に、増幅させた *gfp* および *CBM27* 断片をライゲーションした。すなわち、各 DNA 断片をアガロースゲル電気泳動後、ゲルから抽出・精製し、これを制限酵素 (*EcoRI*) で処理した。次に、*EcoRI* 処理した遺伝子断片を DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (Takara) を用いて互いに連結させた。ライゲーション反応後、反応液の 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウムを加えてボルテックスし、さらに 2 倍量の 100% エタノールを加えてボルテックスした。これを遠心分離 (14,000 g, 10 min) して上澄み液を除去し、500 μ l の 70% エタノールを加え、さらに遠心分離 (14,000 g, 5 min) した。次いで、上澄み液を除去して沈殿を乾燥させた後、10 μ l の MilliQ 水を加えて溶解させた。このようにして濃縮された DNA 溶液を鋳型に、*gfp*-F プライマーと *CBM27*-R プライマーを用いて、PCR により *gfp* 遺伝子と *CBM27* が融合した DNA 断片 (*gfp*-*CBM27*) を増幅させた。アガロースゲル電気泳動後、増幅断片をゲルから精製し、これを制限酵素 (*SacI* と *XhoI*) で処理した。

次に、*gfp*-*CBM27* を発現ベクターである pCold TF DNA ベクター (Takara) の *SacI*-*XhoI* サイトにライゲーションした。その後、ライゲーション反応液をコンピテントセル *E. coli* XL1-Blue 株 (Stratagene) と混合して形質転換させ、これを LB 寒天培地に接種して 37°C で 16 時間培養した。寒天培地上に増殖したコロニーを爪楊枝でピックアップしてコロニーダイレクト PCR を行うことで、*gfp*-*CBM27* 断片が挿入された pCold TF DNA ベクター (GFP/*CBM27*/pCold) によって形質転換された *E. coli* XL1-Blue 株を選別した。その後、得られた形質転換大腸菌から GFP/*CBM27*/pCold プラスミドを抽出し、挿入断片の塩基配列を解読することで、PCR による塩基置換が生じていないことを確認した。GFP/*CBM27*/pCold プラスミドは、融合タンパク質 GFP-*CBM27* の N 末端側に、ヒスチジンタグと発現タンパク質の可溶化を助ける分子シャペロン (Trigger factor: TF) が付加されるように設計した (Fig. 6-4B)。

・ GFP 発現ベクターの構築

本実験では GFP-*CBM27* のコントロールとして GFP を用いた。GFP 発現系

は以下のようにして構築した。すなわち、pRSET/EmGFP プラスミドを鋳型に gfp-F プライマーおよび gfp-R プライマーを用いて、PCR により *gfp* 遺伝子を増幅させた。アガロースゲル電気泳動後、*gfp* 遺伝子をゲルから抽出・精製し、制限酵素 (*Sac*I と *Eco*RI) で処理した。次に、これを発現ベクターである pCold TF DNA ベクター (Takara) の *Sac*I-*Eco*RI サイトにライゲーションした。その後、ライゲーション反応液をコンピテントセル *E. coli* XL1-Blue 株 (Stratagene) と混合して形質転換させ、これを LB 寒天培地に接種して 37°C で 16 時間培養した。*gfp* 遺伝子が挿入された pCold TF DNA ベクター (GFP/pCold) によって形質転換された *E. coli* XL1-Blue 株は、増殖したコロニーをダイレクト PCR することで選別した。その後、得られた形質転換大腸菌から GFP/pCold プラスミドを抽出し、挿入断片の塩基配列を解読することで、PCR による塩基置換が生じていないことを確認した。GFP/pCold プラスミドは、GFP の N 末端側にヒスチジンタグと発現タンパク質の可溶化を助ける TF が付加されるように設計した。

VI-1-7. 融合タンパク質 GFP-CBM27 と GFP の形質転換大腸菌における発現

VI-1-6で構築したGFP/CBM27/pColdプラスミドを、*E. coli* BL21 (DE3) 株 (Novagen) に導入して形質転換した。得られた形質転換大腸菌を5 mlのLB培地 (50 µg/ml アンピシリンを含む) に接種し、37°Cで16時間培養した (種培養)。その後、培養液の1 mlを500 ml容三角フラスコに入れた160 mlのLB培地に接種し、37°Cで培養した (本培養)。培養液の600 nmにおける吸光度 (A_{600}) が0.4–0.5に達した後、培養液にIPTGを終濃度1 mMとなるように添加し、さらに15°Cで20時間培養を続けた。この種培養から本培養までの操作を同時に5回行い、合計800 mlの培養液を得た。次に、培養液を遠心分離 (12,000 g, 15 min) して菌体を回収し、これにあらかじめ冷却しておいた30 mlの緩衝液A (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液, 0.5 M NaCl, 10 mM イミダゾール, pH 7.4) を加えて懸濁させた。次に、この懸濁液を氷上で超音波処理 (out put 3, duty 60, 1 min×5) して菌体を破碎した。破碎液を遠心分離 (14,000 g, 15 min) して得られた上澄み液を0.45 µmフィ

ルター (Advantec) でろ過したものを粗GFP-CBM27溶液とした。

GFP-CBM27の精製はII-1-9-2と同様の方法で行った。HiTrap chelating HPカラムによる分画後、蛍光を発する画分をSDS-PAGEに供し、単一のバンドが検出された画分を集めて4,000 mlの50 mM MES-NaOH緩衝液 (pH 7.0) に対して16-18時間透析 (4°C) した。こうして得られた透析内液を精製GFP-CBM27標品とし、以後の実験に用いた。なお、精製標品は-20°Cで保存した。タンパク質濃度はII-1-6の方法で測定した。

GFPに関しては、VI-1-6で構築したGFP/pColdプラスミドを*E. coli* BL21 (DE3) 株に導入して形質転換した後、GFP-CBM27と同様の方法で発現させ、精製した。

VI-1-8. アフィニティー電気泳動

GFP-CBM27 が、非結晶性マンナンとの結合能を維持していることをアフィニティー電気泳動により確認した。電気泳動はLaemmliの方法 (Laemmli 1970) に基づいて7.5% ポリアクリルアミドゲルで行った。ただし、ゲルや電気泳動用緩衝液にSDSが含まれないようにした。また、ゲルにグライコール β -1,4-マンナンを終濃度0.1% (w/v) となるように加えた。電気泳動はゲル1枚あたり20 mA定電流で行った。タンパク質の染色にはCBB R-250 (Sigma) を用いた。結合実験のコントロールとしてGFPおよびBSA (Sigma) を使用した。

GFP-CBM27 のグライコール β -1,4-マンナンに対する解離定数 (K_d) は、Bolamらの方法 (Bolam et al. 2004) に基づいて算出した。すなわち、異なる濃度 (終濃度0, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 および 500 μ g/ml) のグライコール β -1,4-マンナンを含むゲルを作製し、これに GFP-CBM27 およびコントロールとしてBSAを添加し、上記と同じ条件で泳動した。その後、各ゲルにおける GFP-CBM27 のBSAに対する相対移動度を算出して求めた。

VI-1-9. GFP-CBM27 を用いたプロトプラスト細胞壁再生過程の観察

ウシケノリプロトプラストは 3 日目ほど培養すると仮根を形成し始め、ガラス製試験管の側壁やカバーガラスの表面に付着する。従って、本実験ではプロトプラストを 2 通りの方法で培養した。ガラス製試験管で培養したプロトプラストは、再生 60 時間以内の細胞の細胞壁を観察するために用いた。一方、カバーガラス上で培養したプロトプラストは、再生 3 日目以降の細胞の細胞壁を観察するために用いた。

試験管で培養されたプロトプラストの細胞壁は、以下に示す方法で染色した。試験管から 0.5 ml のプロトプラスト溶液をとり、1.5 ml 容エッペンドルフチューブに入れ、これに 0.1 ml の GFP-CBM27 溶液 (5 mg/ml) を加えて混合し、4°C で 1 時間静置した。その後、混合液を遠心分離 (2,000 g, 2 min) して上澄み液を除去し、これに適量の ASP₁₂ (NTA) を加えて懸濁した。この操作 (懸濁と遠心分離) を 3 回繰り返すことでプロトプラストを洗浄した。最後に 0.1 ml の ASP₁₂ (NTA) でプロトプラストを懸濁させ、これを蛍光顕微鏡 (Nikon OPTIPHOT, Nikon Instech Co., Tokyo, Japan) により観察した。蛍光 CBM による染色操作および蛍光顕微鏡による観察は、プロトプラスト作出後、経時的 (作出後 0, 12, 24, 36, 48 および 60 時間) に行った。また、各再生段階において蛍光 CBM により細胞壁が染色された細胞の割合を測定した。すなわち、ランダムに 5 つの観察画面を選択し、各観察画面内において細胞壁が染色されている細胞の割合を測定し、平均値を算出した。

カバーガラス上で培養したプロトプラストの細胞壁は、以下に示す方法で染色した。ウシケノリプロトプラストをカバーガラス上で培養すると、培養 3 日後には多くの細胞が仮根を通してカバーガラスの表面に付着する。細胞が付着したカバーガラスを別のペトリ皿に置き、これに 0.1 ml の GFP-CBM27 溶液 (5 mg/ml) を滴下して 4°C で 1 時間静置した。その後、ピンセットを使ってカバーガラスを 80 ml の ASP₁₂ (NTA) が入った 100 ml 容ビーカーに浸し、スターラーを用いて溶液を 2 分間攪拌することで、カバーガラスの表面に残存してい

る余分な蛍光 CBM を除去した。洗浄後、これに新しいカバーガラスを被せ、上述した方法で蛍光観察した。

本実験では GFP-CBM27 による染色実験のコントロールとして、プロトプラストに GFP (5 mg/ml) および 0.01% (w/v) Calcofluor White M2R (CFW) を作用させ、GFP-CBM27 と同様の方法で蛍光観察した。CFW はセルロースやキチンの他、様々な多糖を染色する (Fig. 6-5, Wood 1980, Estevez et al. 2009)。

VI-2. 実験結果

VI-2-1. GFP-CBM27 の非結晶性マンナンへの結合能

本実験では、ウシケノリプロトプラストの再生過程における細胞壁多糖の合成や局在を、GFP 融合型 CBM を用いて観察した。CBM には *Vibrio* sp. MA-138 株由来 β -1,4-マンナーゼ (Man5C) の C 末端側にあるファミリー 27 に属するマンナン結合 CBM (CBM27) を用いた。本 CBM27 は、水に可溶性な非結晶性マンナン (グライコール β -1,4-マンナン、コンニャクグルコマンナンおよびグアガムガラクトマンナンなど) には特異的に結合するが、水に不溶性な結晶性の β -1,4-マンナン (ミルマンナン) には結合しなかった。一方、マンナン以外の可溶性多糖 (カルボキシメチルセルロース、オオムギの β -グルカン、グライコール β -1,3-キシランおよびアガロースなど) や結晶性多糖 (アビセル、カードランおよび β -1,3-キシランなど) には結合しなかった (Tanaka et al. 2009)。本 CBM27 の N 末端側に GFP を付加した融合タンパク質を構築し、ウシケノリ細胞壁再生過程の観察に用いた。

まず初めに、GFP-CBM27 が非結晶性マンナンとの結合能を維持していることをアフィニティー電気泳動により確認した (Fig. 6-6)。すなわち、GFP-CBM27 をグライコール β -1,4-マンナンを含むゲルとそれを含まないゲルに添加して電気泳動し、その移動距離を比較した。その結果、マンナンを含むゲルにおいてその移動距離が著しく短くなり、GFP-CBM27 が非結晶性マンナンとの結合能を

維持していることが明らかとなった。一方、コントロールとして用いた GFP はどちらのゲルにおいてもその移動距離に違いは見られなかった。このことから、GFP がマンナン結合能を有していないことが確認できた。

次に、GFP-CBM27 のグライコール β -1,4-マンナンに対する解離定数 (K_d) を算出した (Fig. 6-7)。非マンナン存在下での相対移動度を R 、マンナン存在下での相対移動度を r とした。その結果、GFP-CBM27 のグライコール β -1,4-マンナンに対する K_d は 46.95 $\mu\text{g/ml}$ であることがわかった。

VI-2-2. GFP-CBM27 を用いたプロトプラスト細胞壁再生過程の観察

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 GFP-CBM27 を作用させ、本海藻細胞壁の主要構成多糖である β -マンナンの合成や局在を蛍光顕微鏡により解析した。プロトプラスト作出直後 (再生 0 時間) では、光合成色素による赤色の自家蛍光のみが観察され、GFP-CBM27 の結合を示す緑色の蛍光は検出されなかった (Fig. 6-8)。また、CFW でも細胞は染色されなかった。このことから、作出したプロトプラストから細胞壁が完全に除去されていることが確認できた。GFP-CBM27 のコントロールとして用いた GFP はプロトプラスト再生過程のどの時期においても細胞壁への結合は確認できなかった。

これに対し、GFP-CBM27 は細胞の表面に結合し、マンナンの存在を示す緑色の蛍光を発することがわかった。再生 12 時間後には、ガラス製試験管で培養したプロトプラストの約 3% が細胞表面の一部にマンナンの存在を示す蛍光を発し始め、さらに再生が進行するにつれて蛍光が細胞全体を覆っていくように観察された (Fig. 6-8)。細胞表面に緑色の蛍光が確認された細胞の割合は、再生 0、12、24、36、48 および 60 時間でそれぞれ 0、3、12、17、29 および 25% であった (Fig. 6-9)。

カバーガラス上で培養されたプロトプラストのいくつかは、再生 72 時間後に仮根を形成し始めた。この時点では、ほぼ全ての細胞の表面に GFP-CBM27 が結合し、強い緑色の蛍光を発していた (Fig. 6-8)。最初の細胞分裂は再生 5

日目にいくつかの細胞において観察されたが、GFP-CBM27 の細胞分裂した細胞や成熟葉体への結合は観察されなかった。

本実験ではコントロールとして CFW を使用し、ウシケノリ細胞壁への結合特性を GFP-CBM27 と比較した。その結果、CFW はプロトプラスト再生 24 時間目までは、細胞表面への結合は確認できなかったが、再生 36 時間経過後にようやく細胞表面に結合し始めた。再生 60 時間目の時点では GFP-CBM27 による染色の場合と比較すると CFW の蛍光は弱く、不鮮明であった。しかしながら、GFP-CBM27 は分裂細胞や成熟葉体の細胞壁には結合しなかったのに対し、CFW はこれらの細胞壁にも結合した (Fig. 6-8)。

VI-3. 考察

ウシケノリ (*Bangia atropurpurea*) は、アマノリ (*Porphyra*) と同じウシケノリ科 (Bangiaceae) に属しており、その細胞壁は主に β -1,4-マンナン、 β -1,3-キシラ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 (Percival and McDowell 1967, Gretz et al. 1982)。近年、紅藻の細胞壁構成多糖が、病原菌に対する防御機構に重要な役割を果たしていることが明らかとなった (Bouarab et al. 1999, Potin et al. 1999, Weinberger et al. 1999, Uppalapati and Fujita 2000, Vreeland and Kloareg 2000)。従って、ウシケノリ科の細胞壁構造を理解することは、病原菌に対して抵抗力のある優良品種の開発のために不可欠であると考えられる。しかし、これら海藻の詳細な細胞壁構造、すなわち、細胞壁を構成する各種多糖がいつ、どのように形成され、どこに局在しているのかは不明である。そこで、本章では海藻細胞壁構成多糖を解析するための技術確立を目的とした。

糖質結合モジュール (CBM) は、多くの糖質分解酵素にみられる非触媒モジュールであり、酵素と基質との結合を促進することで酵素の触媒効率を高める機能がある (Boraston et al. 2004)。CBM は結合特異性を有し、その種類によって結合する基質の種類が異なっている。現在、CBM はそのアミノ酸配列に基

づいて 53 ファミリーに分類されており (http://www.cazy.org/fam/acc_CBM.html)、またその結合様式の違いによって 3 つのタイプに分けられている (Boraston et al. 2004)。タイプ A は平らな結合面で結晶性の多糖と結合し、タイプ B は非結晶性多糖の糖鎖と結合する。一方、タイプ C は単糖、2 糖および 3 糖といった短い糖鎖と結合する。近年、CBM の結合特異性を利用した植物細胞壁の構造研究が多数報告されている (Hildén et al. 2003, McCartney et al. 2004, Daniel et al. 2006, Ding et al. 2006, McCartney et al. 2006, Filonova et al. 2007a, b, Porter et al. 2007)。しかしながら、これまで海藻細胞壁の構造解析に CBM が用いられた例はない。そこで本研究では、アマノリ細胞壁の構造に関する基礎的知見を得るために、蛍光タンパク質融合型 CBM を用いてウシケノリプロトプラストの細胞壁再生過程を観察することにした。

ウシケノリ細胞壁の主要成分は β -マンナンであるため、研究室保存株である *Vibrio* sp. MA-138 株由来 Man5C の C 末端側にある CBM27 を用いた。CBM27 はタイプ B に属する CBM であり、非結晶性の β -マンナンと特異的に結合する (Tanaka et al. 2009)。まず、CBM27 に GFP を融合させた後、本融合タンパク質が非結晶性マンナンへの結合能を維持していることをアフィニティー電気泳動により確認した。次に、ウシケノリプロトプラスト作出後、その再生過程において GFP-CBM27 を作用させ、細胞表面における β -マンナンの局在や形成過程を観察した。プロトプラスト作出 12 時間後には、試験管で培養した細胞の約 3% が細胞表面の一部に β -マンナンの存在を示す蛍光を発し始め、再生が進むにつれて蛍光が細胞全体を覆っていくように観察された (Fig. 6-8)。再生 72 時間後には、ほぼ全ての細胞の表面に GFP-CBM27 が結合し、強い緑色の蛍光を発していた (Fig. 6-8)。この時点では様々な再生段階の細胞が観察され、いくつかの細胞は仮根を形成し始めていた。GFP-CBM27 の結合が仮根の部分に集中している細胞もみられた。また、再生 72 時間後のプロトプラストに GFP-CBM27 と β -1,4-マンナナーゼ (Man5C) を同時に作用させたところ、細胞表面に緑色の蛍光は検出されなかった (Fig. 6-10)。

上述したように、プロトプラストをカバーグラス上で培養した場合、再生 72 時間後にはほぼすべての細胞が蛍光を発した。しかし、プロトプラストを試験管で培養した場合、細胞表面に蛍光が確認された細胞の割合は、再生 48 時間後に約 30%でプラトーに達した (Fig. 6-9)。これは、プロトプラストを試験管で培養した場合、細胞壁を再生した細胞は試験管内壁に付着できるが、細胞壁を再生していない細胞は付着できず、サンプル採集の際に浮遊してしまうためであると考えられた。プロトプラストが仮根を形成し、細胞分裂するためには、試験管内壁やカバーグラスなどの物体に付着することが不可欠であるように思われた。

植物細胞壁の染色に用いられる CFW は、セルロースやキチンの他、結晶性 β -マンナンや β -1,3-キシラン、アガロースなどの様々な多糖を染色する (Fig. 6-5, Wood 1980, Estevez et al. 2009)。CFW は細胞壁再生初期段階のプロトプラストだけでなく、分裂細胞や成熟葉体の細胞壁も染色した。これに対し、GFP-CBM27 は分裂細胞や成熟葉体の細胞壁には結合しなかった (Fig. 6-8)。このことから、ウシケノリ細胞が葉体へと再生を進行するにつれて、細胞壁における β -マンナンの結晶度が高くなることが示唆された。なぜならば CBM27 は非結晶性の β -マンナンと特異的に結合するが、結晶性 β -マンナンには結合しないためである (Tanaka et al. 2009)。また、ウシケノリ葉体をメスで切断してから β -マンナーゼを加えると細胞壁が膨張し、葉体の切り口から個々の細胞が遊離してプロトプラストができる。一方、切断処理をしていない葉体に β -マンナーゼを作用させても葉体の細胞壁は分解されず、その形態に変化はみられない (Araki et al. 1994)。このことから、GFP-CBM27 が分裂細胞や成熟葉体の細胞壁に結合しなかった他の理由として、分裂細胞や成熟葉体では細胞壁の β -マンナンが別の多糖に覆われている可能性が考えられた。もし、 β -マンナンが他の多糖に覆われているとすれば、それはウシケノリ細胞壁成分の 1 つである β -1,3-キシランである可能性が高いと考えられた。そこで、海洋細菌 *Alcaligenes* sp. XY-234 株由来の β -1,3-キシラナーゼ (TxyA) が有する β -1,3-キシラン結合 CBM (CBM31, Okazaki et al.

2002) を用いて、細胞壁解析を試みた。すなわち、CBM27 の場合と同様に、CBM31 の N 末端側に GFP を融合させて GFP-CBM31 を構築し、これを蛍光プローブとしてウシケノリ細胞壁再生過程を観察した。しかしながら、GFP-CBM31 はプロトプラスト再生過程のどの時期においても細胞壁への結合は観察されなかった。このことから、 β -マンナンを覆っているのは少なくとも β -1,3-キシランではないこと、さらにウシケノリ細胞壁中には β -1,3-キシランが微量にしか含まれていないことが示唆された。

陸上植物の主要細胞壁成分であるセルロースは、細胞膜上を動き回るセルロース合成酵素複合体によって細胞表面に紡ぎだされる。セルロースが幾本も束ねられてできるセルロースミクロフィブリルは、細胞の伸長方向に対して垂直に配向していることが知られている (Lerouxel et al. 2006)。再生 4 日目のウシケノリ細胞に GFP-CBM27 を作用させたところ、いくつかの細胞の仮根部分において β -マンナンの存在を示す蛍光が帯状に観察された (Fig. 6-11)。この蛍光の帯は、仮根の伸長に方向に対して垂直であったことから、ウシケノリ細胞壁ではセルロースの代わりに β -マンナンが細胞の伸長方向に対して垂直に配向していることが示唆された。

McCartney らは、異なるファミリーに属する β -1,4-キシラン結合 CBM を植物細胞壁に作用させ、それらの細胞壁に対する結合様式を比較した。そして、同じ β -1,4-キシラン結合 CBM でもファミリーが異なると細胞壁の異なる部位に結合することを明らかにした (McCartney et al. 2006)。このことから、非結晶性 β -マンナンに結合する CBM は、現在 CBM23、27、29 および 35 の 4 つのファミリーに分類されているが (Stoll et al. 2000, Freelove et al. 2001, Sunna et al. 2001, Bolam et al. 2004)、もし CBM27 の代わりに他のファミリーに属するマンナン結合 CBM をウシケノリ細胞壁に作用させた場合、異なる結合特性を示す可能性がある。

CFW は植物細胞壁を簡便に染色できる優れた染色試薬であるが (Nagata and Takebe 1970, Galbraith 1981, Hahne et al. 1983)、細胞壁を構成する各種多糖を区

別できない。これに対し、CBMは結合特異性を有しており、個々の多糖を区別することができる。本研究ではCBM27を用いてウシケノリ細胞壁再生過程を解析し、 β -マンナンの形成時期や局在を明らかにした。CBMを利用した海藻細胞壁の構造研究としては初めての報告となった。今後、ウシケノリ細胞壁の詳細構造を明らかにするためには、結晶性 β -マンナンに結合するCBMの他、レクチンや抗体など結合様式の異なるプローブを組合せて使用し、細胞壁構成多糖の形成過程や局在を解析する必要がある。また、細胞壁合成酵素の単離も期待される。



Fig. 6-1. *Codium fragile*.



Fig. 6-2. *Bangia atropurpurea* strain FA-90.

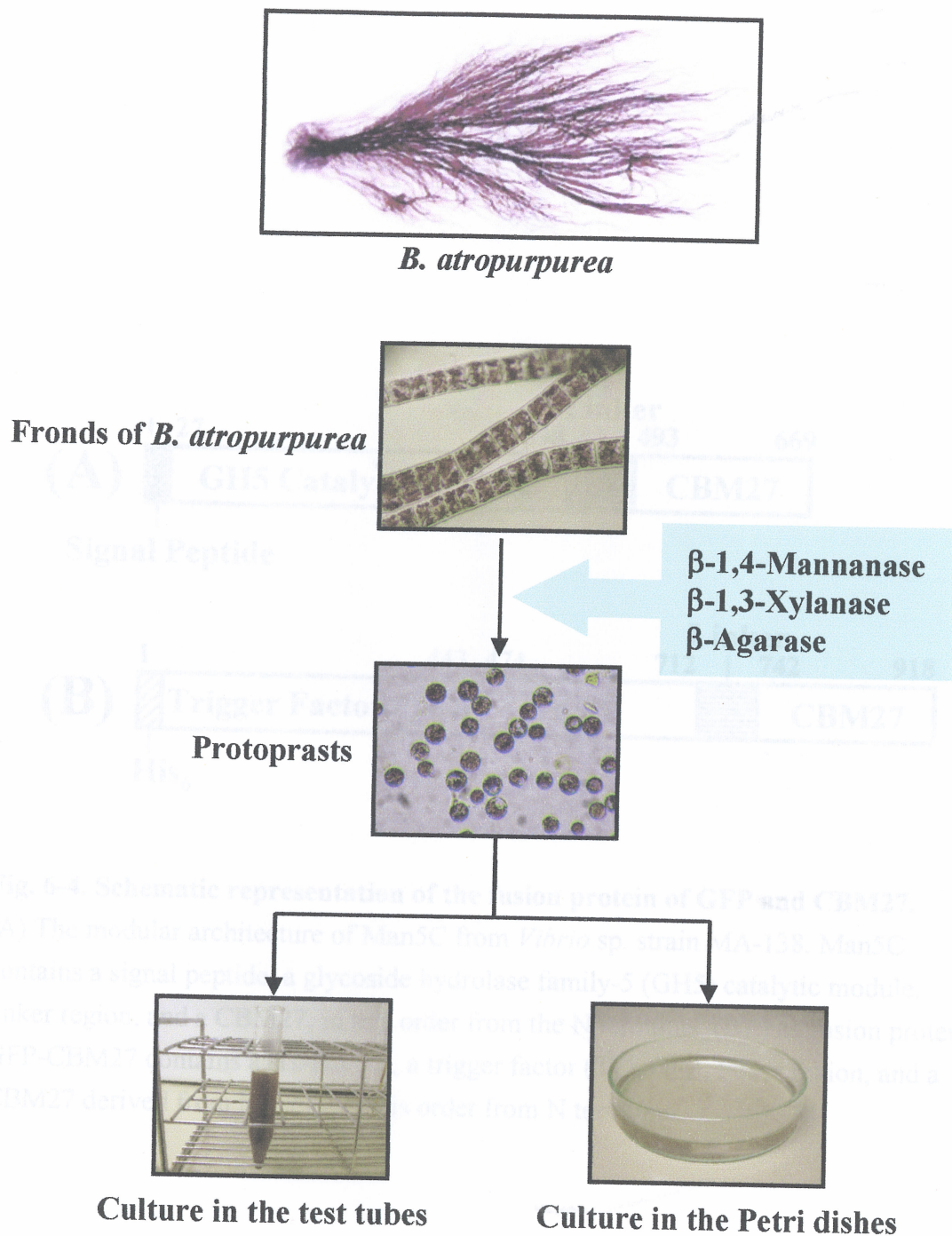


Fig. 6-3. Two types of methods for protoplasts cultivation.

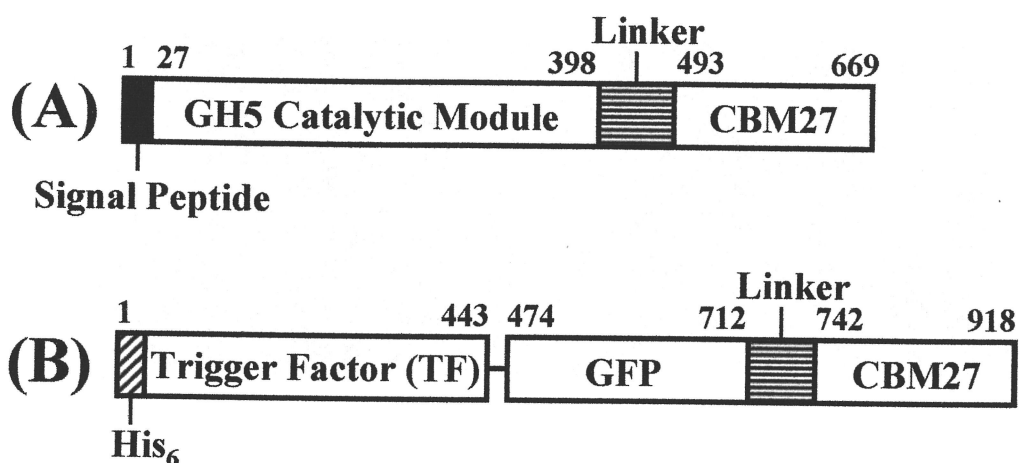


Fig. 6-4. Schematic representation of the fusion protein of GFP and CBM27.
 (A) The modular architecture of Man5C from *Vibrio* sp. strain MA-138. Man5C contains a signal peptide, a glycoside hydrolase family-5 (GH5) catalytic module, linker region, and a CBM27, in this order from the N terminus. (B) The fusion protein GFP-CBM27 contains a six-His tag, a trigger factor (TF), GFP, linker region, and a CBM27 derived from Man5C, in this order from N terminus.

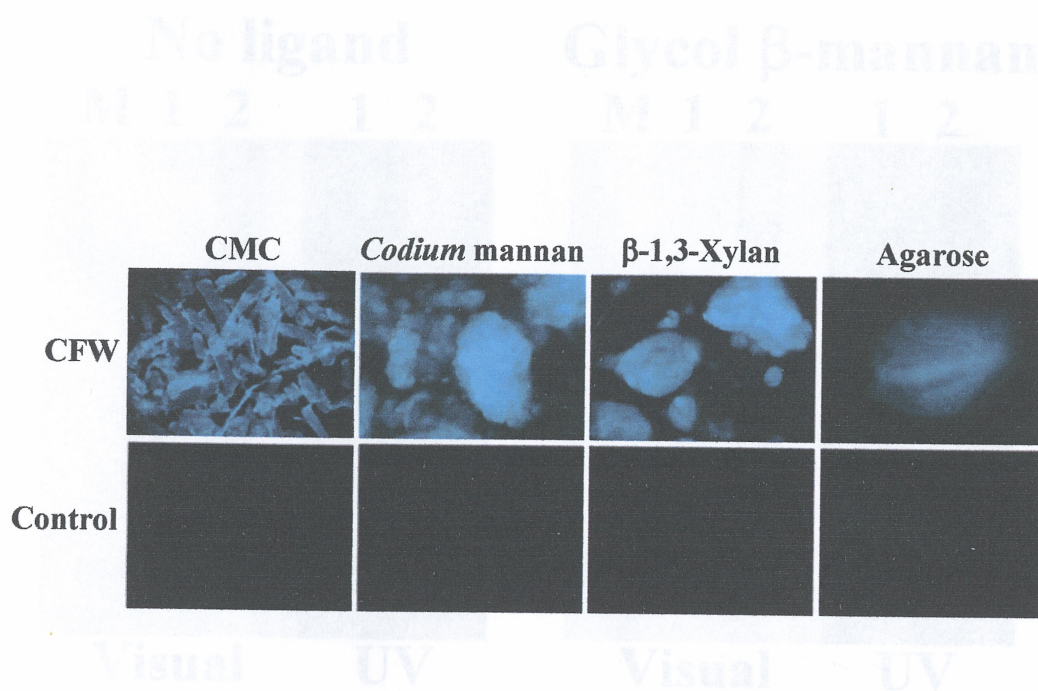


Fig. 6-5. Bindings of Calcofluor white (CFW) to various polysaccharides.

The polysaccharides tested were carboxymethyl cellulose (CMC), *Codium mannan*, β -1,3-xylan, and agarose. 100 μ l of each polysaccharide (5 mg) was mixed with 500 μ l of 0.01% CFW and incubated 30 min at room temperature. After centrifugation, the precipitate was washed twice with 500 μ l of 50 mM MES-NaOH (pH 7.0). The final pellet was suspended in 500 μ l of same buffer. These samples were observed and photographed through fluorescence microscope. As a control of binding assay, 50 mM MES-NaOH (pH 7.0) was mixed with each polysaccharide instead of CFW.

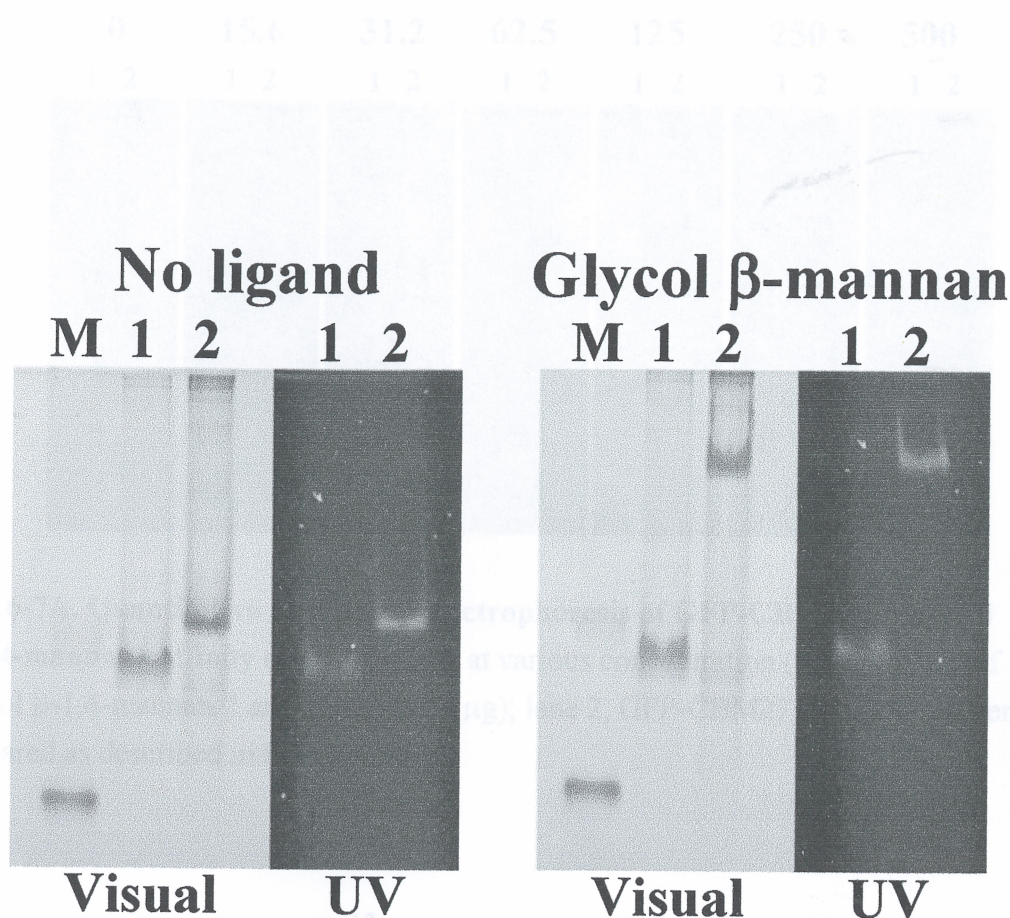


Fig. 6-6. Adsorptions of GFP-CBM27 to soluble β -mannan. The affinity of GFP-CBM27 to soluble β -mannan was examined using native affinity gel electrophoresis. Non-denaturing continuous polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed using gels containing 7.5% (w/v) acrylamide. Soluble ligand-containing gels were prepared by adding of glycol β -1,4-mannan to the gels to give a final concentration of 0.1% (w/v) before polymerization. Native gels without ligand were run simultaneously under the same conditions. Protein samples were loaded onto gels in a standard loading buffer without SDS. Electrophoresis was performed at 4°C and 20 mA per gel for 1–2 h. BSA was used as the non-binding protein control. Proteins were visualized by Coomassie brilliant blue R-250. Lane M, bovine serum albumin; lane 1, GFP; lane 2, GFP-CBM27.

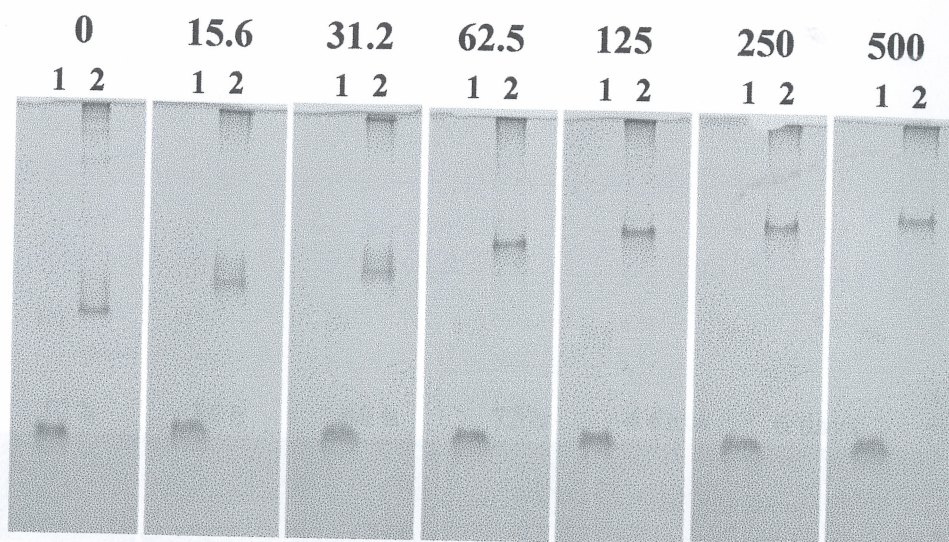


Fig. 6-7A. Quantitative affinity gel electrophoresis of GFP-CBM27 for glycol β -1,4-mannan. Affinity electrophoresis at various concentration (0-500 $\mu\text{g/ml}$) of glycol β -1,4-mannan. Lane 1, BSA (2.5 μg); lane 2, GFP-CBM27 (5 μg). Gels were prepared as described in the manuscript.

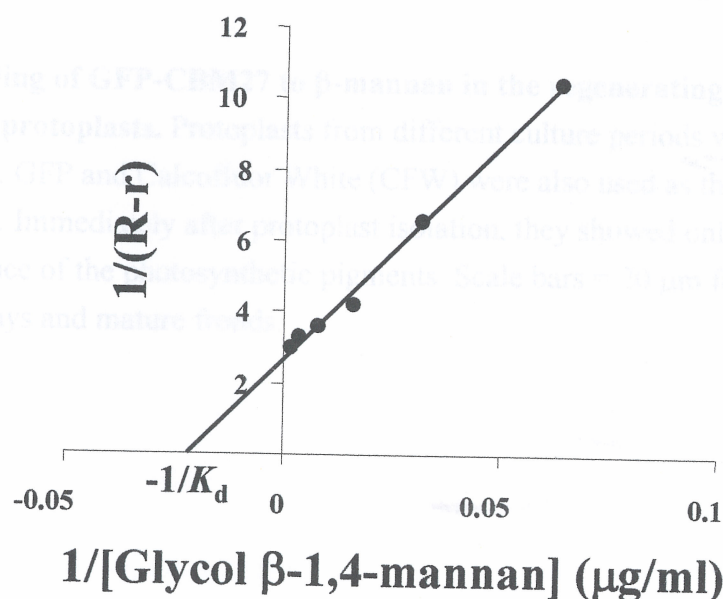


Fig. 6-7B. Plots of the affinity gel electrophoresis data used to determine the affinity of GFP-CBM27 for glycol β -1,4-mannan. R , relative mobility of GFP-CBM27 compared with BSA in the absence of the ligand; r , relative mobility of GFP-CBM27 compared with BSA in the presence of the ligand.

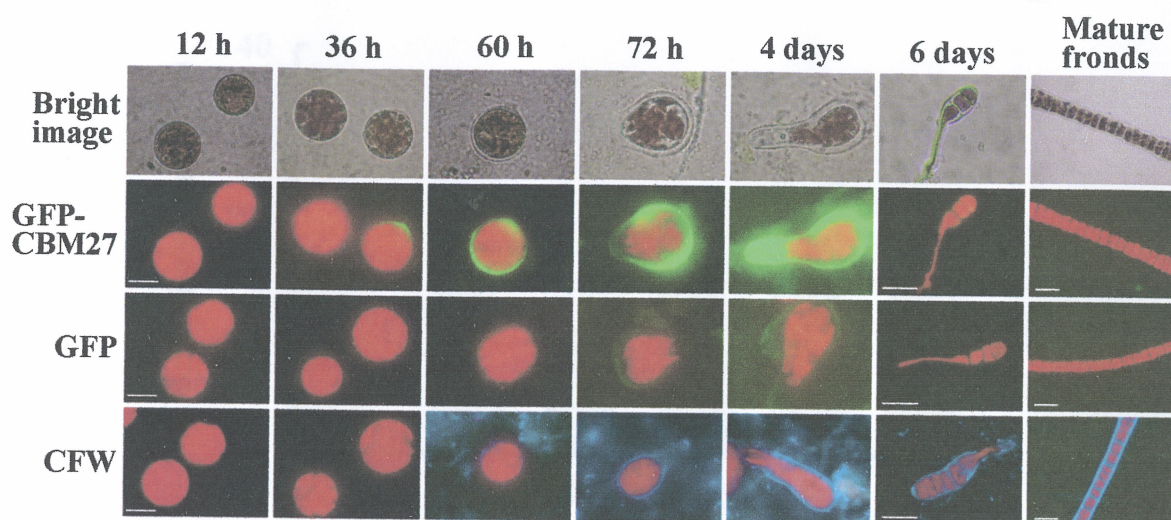


Fig. 6-8. Binding of GFP-CBM27 to β -mannan in the regenerating cell walls of *B. atropurpurea* protoplasts. Protoplasts from different culture periods were used for CBM labeling. GFP and Calcofluor White (CFW) were also used as the controls for CBM labeling. Immediately after protoplast isolation, they showed only the red autofluorescence of the photosynthetic pigments. Scale bars = 20 μ m for 12 h–4 days, 50 μ m for 6 days and mature fronds.

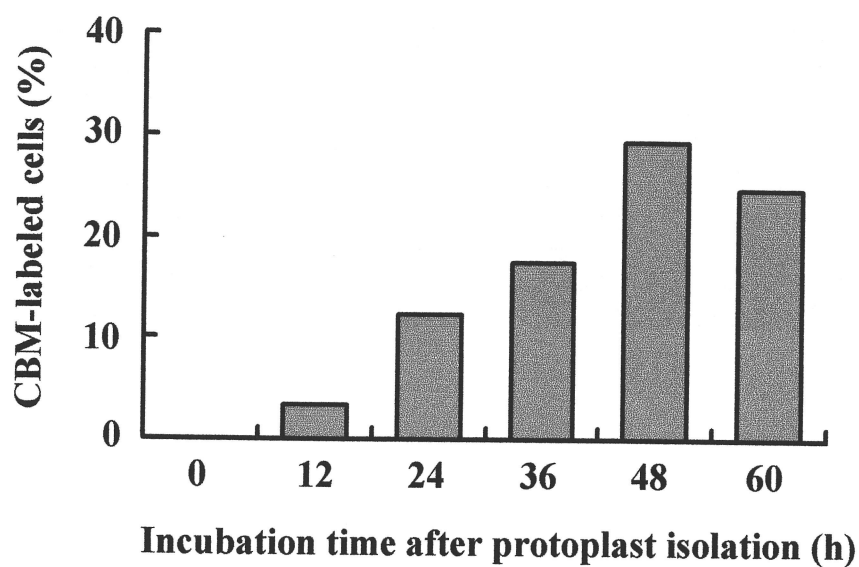
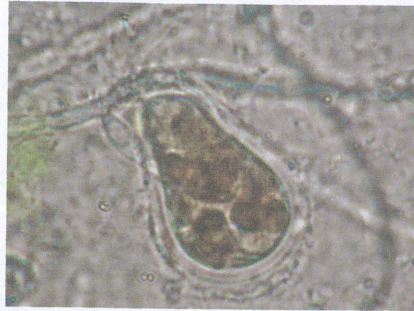
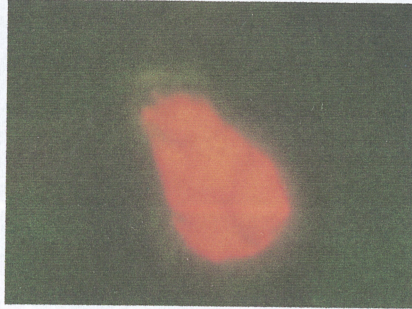


Fig. 6-9. The ratio of cells that showed fluorescence on the cell surfaces.

The number of protoplasts bound to GFP-CBM27 at different growth stages was counted in 5 randomly selected areas through fluorescence microscope, and the average was evaluated.



Visual



UV

Fig. 6-10. Binding of the GFP-CBM27 to the regenerating *B. atropurpurea* protoplast, which was treated with a β -1,4-mannanase (Man5C) from *Vibrio* sp. strain MA-138. 100 μ l of Man5C (20 U/ml) was mixed with 100 μ l of GFP-CBM27 (5 mg/ml), and the mixture was used for the CBM labeling of the cell-wall-regenerating protoplasts after 72 h of cultivation.

本論文では、糖質加水分解酵素である β -1,3-キシランナーゼの遺伝子の塩基配列とその応用研究について報告した。また、

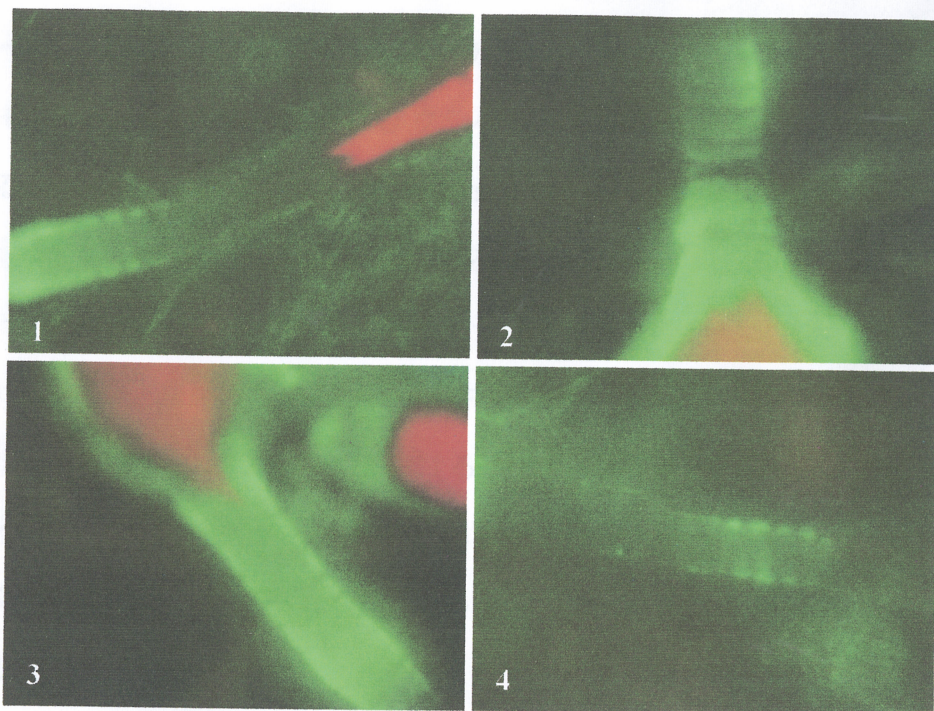


Fig. 6-11. Binding of the GFP-CBM27 to the rhizoid region of *B. atropurpurea*.

が推測である。そこで本研究では、これまで報告例のない β -1,3-キシランナーゼを産生することを目指して、XY-214株から β -キシランナーゼ遺伝子(*xloA*)をクローニングし、その塩基配列を決定し、糖質加水分解酵素

として、*Vibrio* sp. XY-214株から β -キシランナーゼ(*XloA*)をクローニングし、*XloA*のN末端および内部アミノ酸配列を決定した。次に、決定された*XloA*のN末端および内部アミノ酸配列をもとにプローブを作成し、サザンブロット法により*xloA*遺伝子をクローニングした。*xloA*遺伝子は、1,608 bpからなるORFから構成されており、535塩基の開始基をコードしていた。また、その塩基配列は、糖質加水分解酵素ファミリー43 (GH43)に属する既知の β -1,3-キシランナーゼや α -L-アラビノフラクトナーゼと47%以下の相同性を

第 VII 章 総括

本論文では、海藻特有の多糖である β -1,3-キシランの分解や代謝に関与する酵素遺伝子の機能解析とその応用研究について論述した。 β -1,3-キシランは、D-キシロースが β -1,3-結合したホモ多糖であり、緑藻のイワヅタ科 (Caulerpaceae) やハネモ科 (Bryopsidaceae) およびウシケノリ科 (Bangiaceae) の細胞壁を構成している海藻特有の多糖である (Iriki et al. 1960, Percival and McDowell 1967)。

β -1,3-キシランをその構成単糖である D-キシロースにまで分解するには、 β -1,3-キシラナーゼと β -1,3-キシロシダーゼの 2 種類の酵素が必要である。これら酵素は、アマノリ細胞壁の構造研究やアマノリ優良品種開発のためのプロトプラスト作出、ならびに地中海における変異型緑藻イチヅタのような未利用海藻バイオマスからのエタノール生産に不可欠である。しかしながら、 β -1,3-キシラン分解酵素に関する研究報告は極めて少なく、特に β -1,3-キシロシダーゼに至ってはこれまで報告がなかった。

研究室保存株である *Vibrio* sp. XY-214 株は、1990 年に伊勢湾内の海泥から単離された β -1,3-キシラナーゼ産生細菌である。本細菌は β -1,3-キシランを唯一の炭素源として生育できたため、 β -1,3-キシロシダーゼ産生能を有していることが推測できた。そこで本研究では、まずこれまで報告例のない β -1,3-キシロシダーゼを単離することを目的として、XY-214 株から β -キシロシダーゼ遺伝子 (*xloA*) をクローニングし、その翻訳産物 (XloA) を機能解析した。

まず初めに、*Vibrio* sp. XY-214 株から β -キシロシダーゼ (XloA) を精製し、XloA の N 末端および内部アミノ酸配列の 20 残基を決定した。次に、決定された XloA の N 末端および内部アミノ酸配列をもとにプローブを作製し、サザンブロット法により *xloA* 遺伝子をクローニングした。*xloA* 遺伝子は、1,608 bp からなる ORF から構成されており、535 アミノ酸残基をコードしていた。また、その推定アミノ酸配列は、糖質加水分解酵素ファミリー43 (GH43) に属する既報の β -1,4-キシロシダーゼや α -L-アラビノフラノシダーゼと 47%以下の相同性を

示した。このことから、XloA が GH43 に分類されることが明らかとなった。GH43 に属する酵素は GH62 に属する α -L-アラビノフラノシダーゼとともに 5-fold β -propeller 構造を形成しており、クラン GH-F に分類されている。従って、XloA は 5-fold β -propeller 構造を形成していることが示唆された。さらに、既に触媒アミノ酸残基が明らかにされている *G. stearothermophilus* T-6 株由来の β -キシロシダーゼ (XynB3) との一次構造比較により、XloA 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. 2-11)。

形質転換大腸菌により発現させた XloA を精製し、その酵素学的性質を検討した結果、XloA の至適 pH は 7.0 であり (Fig. 2-14A)、至適温度は 35°C であった (Fig. 2-15A)。また、XloA の基質特異性を調べた結果、本酵素は、 β -1,3-キシロオリゴ糖 (β -1,3-キシロビオース、-トリオースおよび-テトラオース) を分解して D-キシロースを生じた (Fig. 2-19)。また、僅かながら β -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. 2-20)。さらに、本酵素は β -1,3-キシラン、 β -1,4-キシラン (birchwood キシランや oat spelt キシラン)、カルボキシメチルセルロースおよびラミナリンなどの多糖には作用しなかった (Fig. 2-17)。以上の結果から、XloA が新規の糖質加水分解酵素 β -1,3-キシロシダーゼであることが明らかとなった。

現在までに報告された β -1,4-キシロシダーゼは、そのアミノ酸配列に基づいて GH3、39、43、52 および 54 の 5 つのファミリーに分類されている (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>, Henrissat 1991, Henrissat and Bairoch 1996)。このうち GH43 に属する酵素は、幅広い基質特異性を有することが知られている。すなわち、本ファミリーには β -1,4-キシロシダーゼ (EC 3.2.1.37) の他、 α -L-アラビノフラノシダーゼ (EC 3.2.1.55)、エンド-アラビナーゼ (EC 3.2.1.99)、 β -1,4-キシラナーゼ (EC 3.2.1.8) およびエキソ- β -1,3-ガラクタナーゼ (EC 3.2.1.145) が分類されている。さらに、 α -L-アラビノフラノシダーゼ活性や β -D-グルコシダーゼ活性を有する β -1,4-キシロシダーゼも分類されている (Utt et al.

1991, Whitehead and Cotta 2001, Sakka et al. 1993, Uziie et al. 1985)。従って、GH43 に XloA が分類されたことは、本ファミリーの特徴を考慮すると十分に納得できた。

また、XloA は β -1,3-キシロオリゴ糖に作用して効率的に D-キシロースを生成したが、 β -1,4-キシロオリゴ糖にも僅かながら作用した。このことから、既報の β -1,4-キシロシダーゼが β -1,3-キシロオリゴ糖に作用する可能性も推測される。今後は、XloA と β -1,4-キシロシダーゼの触媒機構に関する比較研究を行うためにも、XloA の X 線結晶構造解析が期待される。また、*Alcaligenes* sp. XY-234 株 (Okazaki et al. 2002) や *Vibrio* sp. AX-4 株 (Kiyohara et al. 2005) など、他の β -1,3-キシラナーゼ産生細菌からも β -1,3-キシロシダーゼを単離し、その一次構造を比較すれば、 β -1,3-キシロシダーゼに特徴的なアミノ酸残基を特定できる可能性がある。先に述べたように、XloA は GH43 分類され、既報の β -1,4-キシロシダーゼと一次構造レベルで類似性を示した。このことから、XloA が GH43 に属する β -1,4-キシロシダーゼと共通の祖先となる酵素を起源としていることが考えられ、各酵素の系統関係の解明も興味深いものがある。

XY-214 株由来 *xloA* 遺伝子の周辺領域の塩基配列を解析した結果、 β -1,3-キシランの資化に関連する酵素遺伝子がクラスターを形成していることが明らかとなった (Fig. 4-6)。本遺伝子クラスターは、少なくとも 8 つの遺伝子 (*xylR*, *xylT*, *xylA*, *xloA*, *gatA*, *alrA*, *txyA* および *xbpA*) から構成されており、その長さは 11 kbp 以上におよんだ。 β -1,4-キシランの資化に関与する遺伝子クラスターについては幾つかの報告があるが (Shulami et al. 1999, Erlandson et al. 2001, Tsujibo et al. 2004, Chow et al. 2007)、 β -1,3-キシランの資化に関する遺伝子クラスターの単離としては初めての報告となった。他の β -1,3-キシラナーゼ産生細菌である *Alcaligenes* sp. XY-234 株や *Vibrio* sp. AX-4 株も、本遺伝子クラスターに類似したものを保有している可能性が高いと思われた。

多糖の代謝には複数の遺伝子が必要であり、多くの場合、それら遺伝子はゲノム DNA 上でクラスターを形成している。しかし、クラスター内の 1 つの関

連遺伝子が欠如した場合、細菌はその多糖を代謝する能力を失うと思われる。従って、XY-214 株がどのようにして β -1,3-キシラン資化関連酵素遺伝子クラスターを獲得したのか、また、本遺伝子クラスターがどのようにして形成されたのかについて、大きな興味を持たれる。*xylR* 遺伝子の下流域や *xbpA* 遺伝子の上流域には、さらに関連遺伝子が存在していることが予想される (Fig. 4-6)。従って、今後は本遺伝子クラスターの全領域を単離し、構成遺伝子の詳細な機能解析を行うとともに本遺伝子クラスターの転写制御機構の解明が期待される。

Vibrio sp. XY-214 株から β -1,3-キシラナーゼおよび β -1,3-キシロシダーゼを単離したことによって、海藻特有の多糖である β -1,3-キシランから D-キシロースを生成できるようになった。D-キシロースはキシリトールやエタノールの原料となる。そこで、 β -1,3-キシラン資化関連酵素遺伝子群の応用研究として、 β -1,3-キシランからのキシリトール生産およびエタノール生産を試みた。

D-キシロースからキシリトールを生成するためには、D-キシロースレダクターゼが必要である。XY-214 株由来 *xloA* 遺伝子のクローニングの過程で、本遺伝子の下流に D-キシロースレダクターゼと類似性を示す遺伝子 (*alrA*) が存在していることが判明した。そこで、 β -1,3-キシランからキシリトールを生産するための技術確立を目的とし、*alrA* 遺伝子の翻訳産物 (AlrA) を機能解析した。その結果、AlrA は合成基質である *p*-ニトロベンズアルデヒドには作用したが、D-キシロースなどの単糖に対する還元力は微弱であったため、本酵素は D-キシロースレダクターゼではなく、アルデヒドレダクターゼであることが判明した。この結果から、本酵素が *Vibrio* sp. XY-214 株において酸化還元に関する代謝に関与していることが推測されたが、本酵素の細胞内における詳細な機能については現在のところ不明である。また、*alrA* 遺伝子とオペロンを形成していた *gata* 遺伝子は、*E. coli* の *lac* オペロンの構成遺伝子である *lacA* 遺伝子 (ガラクトシドアセチルトランスフェラーゼ) と 43%の同一性を示した。*lacA* 遺伝子の upstream 位置する *lacZ* や *lacY* 遺伝子の翻訳産物の機能は詳細に解明されているが、*lacA* 遺伝子の翻訳産物の機能は未だ不明である (Lewendon et al. 1995)。XY-214 株

において、*lacA* 遺伝子と相同性を示す *gatA* 遺伝子が、*alrA* 遺伝子とオペロンを形成していることは、*lacA* 遺伝子の機能を解明するための手掛かりになる可能性もある。

β -1,3-キシランを主要細胞壁成分とする緑藻イワヅタは熱帯—亜熱帯の海域に生息する海藻であるが、近年地中海において従来は成育していなかった変異型緑藻イチヅタが異常繁殖し、生態系の破壊や漁業に対する被害が大きな問題となっている。そこで著者は、本海藻に β -1,3-キシラナーゼと β -1,3-キシロシダーゼを作用させて D-キシロースにまで糖化し、エタノール発酵する技術を確認すれば、本海藻の有効利用に貢献できるのではないかと考えた。しかしながら、エタノール発酵の担い手である *S. cerevisiae* は、D-キシロースを炭素源としてエタノール発酵することができない。これに対して、D-キシロースの異性体である D-キシルロースであれば発酵できるため、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を作用させて D-キシルロースに変換する必要がある。XY-214 株由来 *xloA* 遺伝子の周辺領域を解析したところ、本遺伝子上流に D-キシロースイソメラーゼと類似性を示す遺伝子 (*xyIA*) が存在していることが判明した。そこで、 β -1,3-キシランからのエタノール生産に XY-214 株由来の D-キシロースイソメラーゼ (XylA) を利用するため、*xyIA* 遺伝子の全長をクローニングし、その翻訳産物を機能解析した。

その結果、*xyIA* 遺伝子は 1,320 bp からなる ORF から構成されており、439 アミノ酸残基をコードしていた。XylA の推定アミノ酸配列を相同性検索した結果、XylA は *E. coli* (GenBank accession no. AE014075)、*Klebsiella pneumoniae* 342 株 (CP000964)、*Thermotoga maritima* MSB8 株 (AE000512)、*Bacillus licheniformis* DSM 13 株 (AE017333) および *Lactococcus lactis* (AF092042) 由来の D-キシロースイソメラーゼとそれぞれ 72、70、52、51 および 46% の同一性を示した (Table 4-6)。D-キシロースイソメラーゼは、そのアミノ酸配列に基づいてグループ I と II の 2 つに分類される (Park and Batt 2004)。XY-214 株由来 XylA と高い同一性を示した酵素はすべてグループ II に属していたことから、XylA がグループ

II に属する D-キシロースイソメラーゼであることが明らかになった (Table 4-6)。

形質転換大腸菌により発現させた rXylA を精製し、その酵素学的性質を検討した結果、rXloA の至適 pH は 7.5 であり (Fig. 4-9A)、至適温度は 60°C であった (Fig. 4-10A)。また、D-キシロースイソメラーゼは、その活性および安定性に Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、または Mn^{2+} などの 2 価金属イオンを必要とするが、XylA は Mg^{2+} によって最も賦活された (Table 4-7)。XylA の D-キシロースおよびに対する K_m および V_{max} は、それぞれ 7.93 mM および 14.3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であり (Fig. 4-11A)。D-グルコースに対する K_m および V_{max} は、それぞれ 186.9 mM および 1.38 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であった (Fig. 4-11B)。このことから、XylA が D-グルコースよりも D-キシロースを効率的に触媒することが明らかとなった。SDS-PAGE およびゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量推定の結果、XylA は他の多くの D-キシロースイソメラーゼと同様にホモ 4 量体を形成していることが示唆された (Fig. 4-12)。これまで D-キシロースイソメラーゼに関する報告は多数あるが、*Vibrio* 属由来のものとしては初めての報告となった。

さらに、*Vibrio* sp. XY-214 株由来の 3 種類の酵素 (TxyA、XloA および XylA) を用いて β -1,3-キシランから D-キシロースを生成し、これを *S. cerevisiae* NBRC 0249 株に発酵させることでエタノールを生成した。エタノール生成量は多くないが、 β -1,3-キシランからのエタノール生成としては初めての報告となった。今後、エタノール生産効率を高めるためには、考察で述べたように各酵素の耐熱化や酸性条件 (pH 4.5–5.5) で活性を示す D-キシロースイソメラーゼの開発、ならびにエタノール発酵条件の検討が必要である。

上述のような種々の条件検討により、 β -1,3-キシランから効率的にエタノールを生産することは技術的には可能であると思われる。しかしながら、変異型緑藻イチイヅタから工業的規模でエタノールを生産するためには課題も多く、特に大きな問題としては 2 つある。1 つ目は、コストの問題である。変異型緑藻イチイヅタは水深 1–100 m に生息しており (Hill et al. 1998)、これらを回収するためには莫大な労力とコストが要求される。また 2 つ目の問題は、緑藻イチ

イヅタの繁殖形態にある。本海藻は多核嚢状体と呼ばれる単細胞生物であり、藻体を断片化させて無性生殖により繁殖する。また、藻体の一部が外部刺激により切断されると、例えば 1 cm の断片からでも藻体にまで再生することができる (West et al. 2007)。このことから、イチイヅタの回収作業を通してさらにその繁殖域が拡大してしまう可能性が憂慮される。以上のように、変異型イチイヅタから工業的規模でエタノールを生産するためには、解決しなければならない課題は大きいものと思われる。従って、変異型イチイヅタの有効利用に関しては、エタノール生産だけを目的とするのではなく、本有害海藻を除去することによる生態系の回復ならびに漁業被害の抑制など多面的な観点から国策としての対応が必要であろう。

近年、我が国における重要な産業用海藻であるアマノリ (*Porphyra*) は、養殖環境の悪化や異常気象などに伴い、病原菌などによる被害や品質の低下が問題となっている (Fujita 1990, Fujita and Uppalapati 1997)。その中で、紅藻の細胞壁構成多糖が、病原菌に対する防御機構に重要な役割を果たしていることがわかってきた (Bouarab et al. 1999, Potin et al. 1999, Weinberger et al. 1999, Uppalapati and Fujita 2000, Vreeland and Kloareg 2000)。従って、アマノリ細胞壁の構造を理解することは、優良品種開発のために不可欠であると考えられる。しかし、アマノリが属するウシケノリ科の細胞壁は、主に β -1,4-マンナン、 β -1,3-キシランおよびポルフィランの 3 種類の多糖により構成されていることは知られているが (Percival and McDowell 1967, Gretz et al. 1982)、これら多糖がいつ、どのように形成され、どこに局在しているのかは不明である。そこで、本論文では最後に、アマノリ細胞壁多糖を解析するための技術確立を試みた。

アマノリには有性世代と無性世代があり、室内培養が容易ではない。そこで、本研究ではアマノリと同じウシケノリ科に属し、細胞壁構成成分がアマノリと同じ 3 種類の多糖から構成されているウシケノリ (*B. atropurpurea*) を用いた。1990 年以来、当研究室において室内で継代培養しているウシケノリ FA-90 株は、不稔性であるため有性生殖を必要とせず、単孢子による無性生殖で継代培養が

可能であり、室内培養が容易であるという利点がある。

また、細胞壁多糖を解析する手段としては、一般に細胞壁染色試薬である Calcofluor White (CFW) や抗体が用いられる。しかしながら、CFW は結合特異性を持たず、セルロースやマンナン、キシラン、キチンなど複数の多糖を染色してしまう。一方、抗体を用いる場合、目的の多糖ごとに抗体を作製する必要がある。そこで本研究では、セルラーゼやヘミセルラーゼなどの糖質分解酵素の多くが有している糖質結合モジュール (CBM: Carbohydrate-Binding Module) に着目した。CBM は基質と酵素との結合を促進し、酵素の触媒効率を高める役割がある。また、CBM は結合特異性を有しており、その種類によって結合する基質が異なる。Tanaka らは、海洋細菌 *Vibrio* sp. MA-138 株から β -1,4-マンナーゼ (Man5C) を単離し、本酵素が C 末端領域に非結晶性マンナンと特異的に結合するファミリー27 CBM (CBM27) を有していることを明らかにした (Fig. 6-4A, Tanaka et al. 2009)。そこで、本 CBM27 と GFP を融合させて GFP-CBM27 を構築し (Fig. 6-4B)、細胞壁を解析するための蛍光プローブとして用いた。

まず、GFP-CBM27 が非結晶性マンナンへの結合能を維持していることをアフィニティー電気泳動により確認した。次に、ウシケノリからプロトプラストを作出し、その再生過程において GFP-CBM27 を作用させ、細胞表面における β -マンナンの局在や形成過程を観察した。プロトプラスト作出 12 時間後には、試験管で培養した細胞の約 3% が細胞表面の一部に β -マンナンの存在を示す蛍光を発し始め、再生が進むにつれて蛍光が細胞全体を覆っていくように観察された (Fig. 6-8)。再生 72 時間後には、ほぼ全ての細胞の表面に GFP-CBM27 が結合し、強い緑色の蛍光を発していた (Fig. 6-8)。この時点では様々な再生段階の細胞が観察され、いくつかの細胞は仮根を形成し始めていた。GFP-CBM27 の結合が仮根の部分に集中している細胞もみられた。コントロールとして用いた CFW は、細胞壁再生初期段階のプロトプラストだけでなく、分裂細胞や成熟葉体の細胞壁も染色した。これに対し、GFP-CBM27 は分裂細胞や成熟葉体の細胞壁には結合しなかった (Fig. 6-8)。このことから、ウシケノリ細胞が葉体へと

再生を進行するにつれて、細胞壁における β -マンナンの結晶度が高くなることが示唆された。それは CBM27 が非結晶性 β -マンナンと結合できる、結晶性 β -マンナンには結合できないためである (Tanaka et al. 2009)。また、ウシケノリ葉体をメスで切断してから β -マンナーゼを加えると細胞壁が膨張し、葉体の切り口から個々の細胞が遊離してプロトプラストができる。一方、切断処理をしていない葉体に β -マンナーゼを作用させても葉体の細胞壁は分解されず、その形態に変化はみられない (Araki et al. 1994)。このことから、GFP-CBM27 が分裂細胞や成熟葉体の細胞壁に結合しなかった他の理由として、分裂細胞や成熟葉体では細胞壁の β -マンナンが別の多糖に覆われている可能性が考えられた。もし、 β -マンナンが他の多糖に覆われているとすれば、それはウシケノリ細胞壁成分の 1 つである β -1,3-キシランである可能性が高いと考えられた。そこで、海洋細菌 *Alcaligenes* sp. XY-234 株由来の β -1,3-キシナーゼ (TxyA) が有する β -1,3-キシラン結合 CBM (CBM31, Okazaki et al. 2002) を用いて、細胞壁解析を試みた。すなわち、CBM27 の場合と同様に、CBM31 の N 末端側に GFP を融合させて GFP-CBM31 を構築し、これを蛍光プローブとしてウシケノリ細胞壁再生過程を観察した。しかしながら、GFP-CBM31 はプロトプラスト再生過程のどの時期においても細胞壁への結合は観察されなかった。このことから、 β -マンナンを覆っているのは少なくとも β -1,3-キシランではないこと、さらにウシケノリ細胞壁中には β -1,3-キシランが微量にしか含まれていないことが示唆された。

陸上植物の主要細胞壁成分であるセルロースは、細胞膜上を動き回るセルロース合成酵素複合体によって細胞表面に紡ぎだされる。セルロースが幾本も束ねられてできるセルロースミクロフィブリルは、細胞の伸長方向に対して垂直に配向していることが知られている (Lerouxel et al. 2006)。再生 4 日目のウシケノリ細胞に GFP-CBM27 を作用させたところ、いくつかの細胞の仮根部分において β -マンナンの存在を示す蛍光が帯状に観察された (Fig. 6-11)。この蛍光の帯は、仮根の伸長に方向に対して垂直であったことから、ウシケノリ細胞壁ではセルロースの代わりに β -マンナンが細胞の伸長方向に対して垂直に配向し

ていることが示唆された。

今後、ウシケノリ細胞壁の詳細構造を明らかにするためには、結晶性 β -マンナンに結合する CBM の他、レクチンや抗体など結合様式の異なるプローブを組合せて使用し、細胞壁構成多糖の形成過程や局在を解析する必要がある。さらに、細胞壁の構成成分と培養条件の関係を明らかにし、どのような細胞壁を持った海藻が病原菌に対して抵抗性を持つのかを解明することも重要であろう。

以上、本論文では *Vibrio* sp. XY-214 株由来 β -1,3-キシラン資化関連酵素遺伝子群を解析した。さらに、その応用研究として β -1,3-キシラナーゼ、 β -1,3-キシロシダーゼ、および D-キシロースイソメラーゼを用いて β -1,3-キシランから D-キシロースを生成し、これを炭素源としてエタノールを生成する技術を確立した。これにより、地中海で異常繁殖している変異イチイヅタの有効利用への寄与が期待される。また、CBM を利用した海藻細胞壁多糖の解析技術に関する基礎的知見を提供した。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご懇篤なるご鞭撻を賜りました三重大学大学院生物資源学研究科水圏生物利用学教育研究分野の荒木利芳教授に心から謝意を表します。また、本論文を審査して頂きました三重大学大学院生物資源学研究科分子生物情報学教育研究分野の田中晶善教授、生物機能化学教育研究分野の今井邦雄教授および分子細胞生物学教育研究分野の奥村克純教授に心から御礼申し上げます。また、終始適切な研究指導と貴重なご助言を賜りました大西良介先輩ならびに中村敬至先輩に御礼申し上げます。

文献

- Allen KN, Lavie A, Glasfeld A, Tanada TN, Gerrity DP, Carlson SC, Farber GK, Petsko GA, Ringe D (1994) Role of the divalent metal ion in sugar binding, ring opening, and isomerization by D-xylose isomerase: replacement of a catalytic metal by an amino acid. *Biochemistry* 33:1488–1494
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
- Anzai H, Asada H, Koshiba A, Yoshida S, Kobayashi H, Uchida N, Nishide E (1991) Distribution of polysaccharide digestive enzyme in marine gastropod *Dolabella auicularia*. *Nippon Suisan Gakkaisi* 57:2077–2081
- Aoki T, Araki T, Kitamikado M (1988) Purification and characterization of an endo- β -1,3-xylanase from *Vibrio* sp. *Nippon Suisan Gakkaisi* 54:277–281
- Araki T, Hayakawa M, Tamaru Y, Yoshimatsu K, Morishita T (1994) Isolation and regeneration of haploid protoplasts from *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta) with marine bacterial enzymes. *J Phycol* 30:1040–1046
- Araki T, Inoue N, Morishita T (1998a) Purification and characterization of β -1,3-xylanase from a marine bacterium, *Alcaligenes* sp. XY-234. *J Gen Appl Microbiol* 44:269–274
- Araki T, Hayakawa M, Lu Z, Karita S, Morishita T (1998b) Purification and characterization of agarases from a marine bacterium, *Vibrio* sp. PO-303. *J Mar Biotechnol* 6:260–265
- Araki T, Tani S, Maeda K, Hashikawa S, Nakagawa H, Morishita T (1999) Purification and characterization of β -1,3-xylanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. XY-214. *Biosci Biotechnol Biochem* 63:2017–2019
- Araki T, Hashikawa S, Morishita T (2000) Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the new gene encoding β -1,3-xylanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain XY-214. *Appl Environ Microbiol* 66:1741–1743
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006) The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics* 22:195–201
- Bailey RW, Bourne EJ (1960) Colour reagents given by sugars and diphenylamineaniline spray reagents on paper chromatograms. *J Chromatogr* 4:206–213
- Batt CA, Jamieson AC, Vandeyar MA (1990) Identification of essential histidine residues in the active site of *Escherichia coli* xylose (glucose) isomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:618–622
- Bauer S, Vasu P, Persson S, Mort AJ, Somerville CR (2006) Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11417–11422
- Bayer EA, Lamed R, Himmel ME (2007) The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. *Curr Opin Biotechnol* 18:237–245
- Bhosale SH, Rao MB, Deshpande VV (1996) Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol Rev* 60:280–300
- Bohren KM, Bullock B, Wermuth B, Gabbay KH (1989) The aldo-keto reductase superfamily. cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases. *J Biol Chem* 264:9547–9551
- Bohren KM, Page JL, Shankar R, Henry SP, Gabbay KH (1991) Expression of human aldose and aldehyde reductases. Site-directed mutagenesis of a critical lysine 262. *J Biol Chem* 266:24031–24037
- Bohren KM, Grimshaw CE, Lai CJ, Harrison DH, Ringe D, Petsko GA, Gabbay KH (1994) Tyrosine-48 is the proton donor and histidine-110 directs substrate stereochemical selectivity in the reduction reaction of human aldose reductase: enzyme kinetics and crystal structure of the Y48H mutant enzyme. *Biochemistry* 33:2021–2032
- Bolam DN, Xie HF, Pell G, Hogg D, Galbraith G, Henrissat B, Gilbert HJ (2004) X4 modules represent a new family of carbohydrate-binding modules that display novel properties. *J Biol Chem* 279:22953–22963
- Bor YC, Moraes C, Lee SP, Crosby WL, Sinskey AJ, Batt CA (1992) Cloning and sequencing the *Lactobacillus brevis* gene encoding xylose isomerase. *Gene* 114:127–132
- Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ (2004) Carbohydrate-binding modules: fine tuning polysaccharide recognition. *Biochem J* 382:769–781

- Bouarab K, Potin P, Correa J, Kloareg B (1999) Sulfated oligosaccharides mediate the interaction between a marine red alga and its green algal pathogenic endophyte. *The Plant Cell* 11:1–17
- Brown SH, Sjöholm C, Kelly RM (1993) Purification and characterization of a highly thermostable glucose isomerase produced by the extremely thermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. *Biotechnol Bioeng* 41:878–886
- Bruce C, Ben-David A, Shallom-Shezifi D, Leon M, Niefind K, Shoham G, Shoham Y, Schomburg D (2006) The structure of an inverting GH43 β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* with its substrate reveals the role of the three catalytic residues. *J Mol Biol* 359:97–109
- Carrell HL, Rubin BH, Hurley TJ, Glusker JP (1984) X-ray crystal structure of D-xylose isomerase at 4-Å resolution. *J Biol Chem* 259:3230–3236
- Carrell HL, Glusker JP, Burger V, Manfre F, Tritsch D, Biellmann JF (1989) X-ray analysis of D-xylose isomerase at 1.9 Å: native enzyme in complex with substrate and with a mechanism-designed inactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:4440–4444
- Chandrakant P, Bisaria VS (2000) Simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of xylose isomerase. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:301–309
- Chang C, Park BC, Lee DS, Suh SW (1999) Crystal structure of thermostable xylose isomerases from *Thermus caldophilus* and *Thermus thermophilus*: possible structural determinants of thermostability. *J Mol Biol* 288:623–634
- Chayen NE, Conti E, Vieille C, Zeikus JG (1997) Crystallization and initial X-ray analysis of xylose isomerase from *Thermotoga neapolitana*. *Acta Crystallogr D* 53:229–230
- Chen WP, Matsuo M, Yasui T (1986) Purification and some properties of β -1,3-xylanase from *Aspergillus terreus* A-07. *Agric Biol Chem* 50:1183–1194
- Chow V, Nong G, Preston JF (2007) Structure, function, and regulation of the aldouronate utilization gene cluster from *Paenibacillus* sp. strain JDR-2. *J Bacteriol* 189:8863–8870
- Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:850–861
- Daniel G, Filonova L, Kallas AM, Teeri TT (2006) Morphological and chemical characterisation of the G-layer in tension wood fibres of *Populus tremula* and *Betula verrucosa*: Labelling with cellulose-binding module CBM 1_{HjCel7A} and fluorescence and FE-SEM microscopy. *Holzforchung* 60:618–624
- Davey MR, Anthony P, Power JB, Lowe KC (2005) Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnol Adv* 23:131–171.
- Ding SY, Xu Q, Ali MK, Baker JO, Bayer EA, Barak Y, Lamed R, Sugiyama J, Rumbles G, Himmel ME (2006) Versatile derivatives of carbohydrate-binding modules for imaging of complex carbohydrates approaching the molecular level of resolution. *Biotechniques* 41:435–436
- Dische Z, Borenfreund EA (1951) A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. *J Biol Chem* 192:583–587
- Erlanson KA, Delamarre SC, Batt CA (2001) Genetic evidence for a defective xylan degradation pathway in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 67:1445–1452
- Estevez JM, Fernández PV, Kasulin L, Dupree P, Ciance M (2009) Chemical and in situ characterization of macromolecular components of the cell walls from the green seaweed *Codium fragile*. *Glycobiology* 19:212–228
- Filonova L, Gunnarsson LC, Daniel G, Ohlin M (2007a) Synthetic xylan-binding modules for mapping of pulp fibres and wood sections. *BMC Plant Biol* 7:54
- Filonova L, Kallas AM, Greffe L, Johansson G, Teeri TT, Daniel G (2007b) Analysis of the surfaces of wood tissues and pulp fibers using carbohydrate-binding modules specific for crystalline cellulose and mannan. *Biomacromolecules* 8:91–97
- Freelove AC, Bolam DN, White P, Hazlewood GP, Gilbert HJ (2001) A novel carbohydrate-binding protein is a component of the plant cell wall-degrading complex of *Piromyces equi*. *J Biol Chem* 276:43010–43017
- Fujita Y (1990) Diseases of cultivated *Porphyra* in Japan. In Akatsuka, I., (*Introduction to Applied Phycology*, SPB Academic Publishing bv, the Netherlands, 177–190
- 藤田雄二 (1993) 『月刊海洋』、大型藻類のバイオテクノロジー、海洋出版、690–695
- Fujita Y, Uppalapati SR (1997) Genetic improvement of *Porphyra* through cell culture techniques: Present status and future prospects. *Nat His Res* 3:71–81
- Fukui S, Suzuki T, Kitahara K, Miwa T (1960) Studies on β -1,3-xylanase I. Existence of a new enzyme, β -1,3-xylanase. *Gen Appl Microbiol* 6:270–282

- Galbraith DW (1981) Microfluorimetric quantitation of cellulose biosynthesis by plant protoplasts using Calcofluor White. *Physiol Plant* 53:111–116
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31:3784–3788
- Gong CS, Chen LF, Flickinger MC, Chiang LC, Tsao GT (1981) Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. *Appl Environ Microbiol* 41:430–436
- Gretz MR, Sommerfeld MR, Aronson JM (1982) Cell wall composition of the genetic phase of *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta). *Bot Mar* 25:529–535
- Hahne G, Herth W, Hoffmann F (1983) Wall formation and cell division in fluorescence-labelled plant protoplasts. *Protoplasma* 115:217–221
- Hastrup S (1988) Analysis of the *Bacillus subtilis* xylose regulon. pp. 79–83. In: Ganesan AT, Hoch JA (ed.) *Genetics and biotechnology of Bacilli* vol. 2, Academic Press, Inc New York
- Henrik K, Collyer CA, Blow DM (1989) Structures of D-xylose isomerase from *Arthrobacter* strain B3728 containing the inhibitors xylitol and D-sorbitol at 2.5 Å and 2.3 Å resolution, respectively. *J Mol Biol* 208:129–147
- Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280:309–316
- Henrissat B, Bairoch A (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J* 316:695–696
- Hildén L, Daniel G, Johansson G (2003) Use of a fluorescence labelled, carbohydrate-binding module from *Phanerochaete chrysosporium* Cel7D for studying wood cell wall ultrastructure. *Biotechnol Lett* 25:553–558
- Hill D, Coquillard P, de Vaugelas J, Meinesz A (1998) An algorithmic model for invasive species: Application to *Caulerpa taxifolia* (Vahl) C. Agardh development in the North-Western Mediterranean Sea. *Ecol Model* 109:251–266
- Hsiao HY, Chiang L, Chen L, Tsao GT (1982) Effect of borate on isomerisation and yeast fermentation of high xylulose solution and acid hydrolysate of hemicellulose. *Enzyme Microb Technol* 4:25–31
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23–28
- Iriki Y, Suzuki T, Nisizawa K, Miwa T (1960) Xylan of siphonaceous green algae. *Nature* 187:82–83
- Jousson O, Pawlowski J, Zaninetti L, Meinesz A, Boudouresque CF (1998) Molecular evidence for the aquarium origin of the green alga *Caulerpa taxifolia* introduced to the Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series* 172:275–280
- Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T (2009) The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res* 37:D387–D392
- Kikuchi T, Itoh Y, Kasumi T, Fukazawa C (1990) Molecular cloning of the *xylA* gene encoding xylose isomerase from *Streptomyces griseofuscus* S-41: primary structure of the gene and its product. *Agric Biol Chem* 54:2469–2472
- Kitada M, Dobashi Y, Horikoshi K (1989) Enzymatic properties of purified D-xylose isomerase from a thermophilic alkalophile, *Bacillus* YX-3. *Agric Biol Chem* 53:1461–1468
- Kiyohara M, Sakaguchi K, Yamaguchi K, Araki T, Nakamura T, Ito M (2005) Molecular cloning and characterization of a novel β -1,3-xylanase possessing two putative carbohydrate-binding modules from a marine bacterium *Vibrio* sp. strain AX-4. *Biochem J* 388:949–957
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Lambeir AM, Lauwereys M, Stanssens P, Mrabet NT, Snauwaert J, van Tilbeurgh H, Matthyssens G, Lesters I, de Maeyer M, Wodak SJ (1992) Protein engineering of xylose (glucose) isomerase from *Actinoplanes missouriensis*. 2. Site-directed mutagenesis of the xylose binding site. *Biochemistry* 31:5459–5466
- Lawlis VB, Dennis MS, Chen EY, Smith DH, Henner DJ (1984) Cloning and sequencing of the xylose isomerase and xylulokinase genes of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 47:15–21
- Lerouxel O, Cavalier DM, Liepman AH, Keegstra K (2006) Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process. *Curr Opin Plant Biol* 9:621–630
- Lewendon A, Ellis J, Shaw WV (1995) Structural and mechanistic studies of galactoside acetyltransferase, the *Escherichia coli* LacA gene product. *J Biol Chem* 270:26326–26331

- Liu SY, Wiegel J, Gherardini FC (1996) Purification and cloning of a thermostable xylose (glucose) isomerase with an acidic pH optimum from *Thermoanaerobacterium* strain JW/SL-YS 489. *J Bacteriol* 178:5938–5945
- Lokman BC, Santen PV, Verdoes JC, Kruse J, Leer RJ, Posno M, Pouwels PH (1991) Organization and characterization of the three genes involved in D-xylose catabolism in *Lactobacillus pentosus*. *Mol Gen Genet* 230:161–169
- Love J, Percival E (1964) The polysaccharides of green seaweed *Codium fragile*. Part III. A β -linked mannan. *J Chem Soc* 3345–3350
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Maeda H, Ishida N (1967) Specificity of binding of hexapyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener. *J Biochem* 62:276–278
- McCartney L, Gilbert HJ, Bolam DN, Boraston AB, Knox JP (2004) Glycoside hydrolase carbohydrate-binding modules as molecular probes for the analysis of plant cell wall polymers. *Anal Biochem* 326:49–54
- McCartney L, Blake AW, Flint J, Bolam DN, Boraston AB, Gilbert HJ, Knox JP (2006) Differential recognition of plant cell walls by microbial xylan-specific carbohydrate-binding modules. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4765–4770
- Meaden PG, Aduse-Opoku J, Reizer A, Lanceman YA, Martin MF, Mitchell WJ (1994) The xylose isomerase-encoding gene (*xylA*) of *Clostridium thermosaccharolyticum*: cloning, sequencing and phylogeny of XylA enzymes. *Gene* 141:97–101
- Meinesz A, Hesse B (1991) Introduction et invasion de l'algue tropicale *Caulerpa taxifolia* en Méditerranée nord-occidentale. *Oceanologica Acta* 14:415–426
- Meinesz A, Belsher T, Thibaut T, Antolić B, Ben Mustapha K, Boudouresque CF, Chiaverini D, Cinelli F, Cottalorda JM, Djellouli A, El Abed A, Orestano C, Grau AM, Ivesa L, Jaklin A, Langar H, Massuti-Pascual E, Peirano A, Tunesi L, de Vaugelas J, Zavodnik N, Zúljjević A (2001) The introduced green alga *Caulerpa taxifolia* continues to spread in the Mediterranean. *Biological Invasions* 3:201–210
- Meusnier I, Olsen JL, Stam WT, Destombe C, Valero M (2001) Phylogenetic analyses of *Caulerpa taxifolia* (Chlorophyta) and of its associated bacterial microflora provide clues to the origin of the Mediterranean introduction. *Molecular Ecology* 10:931–946
- Nagata T, Takebe I (1970) Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. *Planta* 92:301–308
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10:1–6
- Nisizawa K, Morimoto I, Handa N, Hashimoto Y (1962) Cellulose-splitting enzymes IV. Starch zone electrophoresis of cellulose and other carbohydrases from *Irpex lacteus*. *Arch Biochem Biophys* 96:152–157
- Nurizzo D, Turkenburg JP, Chamock SJ, Roberts SM, Dodson EJ, McKie VA, Taylor EJ, Gilbert HJ, Davies GJ (2002) *Cellvibrio japonicus* α -L-arabinanase 43A has a novel five-blade β -propeller fold. *Nat Struct Biol* 9:665–668
- 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
- Okazaki F, Tamaru Y, Hashikawa S, Li YT, Araki T (2002) Novel carbohydrate-binding module of β -1,3-xylanase from a marine bacterium, *Alcaligenes* sp. strain XY-234. *J Bacteriol* 184:2399–2403
- Olsen JL, Valero M, Meusnier I, Boele-Bos S, Stam WT (1998) Mediterranean *Caulerpa taxifolia* and *C. mexicana* (Chlorophyta) are not conspecific. *J Phycol* 34:850–856
- Park JH, Batt CA (2004) Restoration of a defective *Lactococcus lactis* xylose isomerase. *Appl Environ Microbiol* 70:4318–4325
- Peitsch MC (1995) Protein modeling by E-mail Bio/Technology 13:658–660
- Percival E, McDowell RH (1967) Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. Academic Press (London) 88–96, 134–137
- Potin P, Bouarab K, Küpper F, Kloareg B (1999) Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interactions. *Curr Opin Microbiol* 2:276–283
- Provasoli L, McLaughlin JJA, Droop MR (1957) The development of artificial media for marine algae. *Arch Microbiol* 25:392–428
- Rao K, Chelikani S, Relue P, Varanasi S (2008) A novel technique that enables efficient conduct of

- simultaneous isomerization and fermentation (SIF) of xylose. *Appl Biochem Biotechnol* 146:101–117
- Rasmussen H, la Cour T, Nyborg J, Schülein M (1994) Crystallization and preliminary investigation of xylose isomerase from *Bacillus coagulans*. *Acta Crystallogr D* 50:231–233
- Rey F, Jenkins J, Janin J, Lasters I, Alard P, Claessens M, Matthysens G, Wodak S (1988) Structural analysis of the 2.8 Å model of xylose isomerase from *Actinoplanes missouriensis*. *Proteins Struct Funct Genet* 4:165–172
- Rosenberg M, Court D (1979) Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu Rev Genet* 13:319–353
- Saga N, Polne-Fuller M, Gibor A (1986) Protoplasts from seaweeds: production and fusion. *Beih Nova Hedwigia* 83:37–43
- Saito H, Miura K (1963) Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol-treatment. *Biochem Biophys Acta* 72:619–629
- Sakka K, Yoshikawa K, Kojima Y, Karita S, Ohmiya K, Shimada K (1993) Nucleotide sequence of the *Clostridium stercoarium* xylA gene encoding a bifunctional protein with β -D-xylosidase and α -L-arabinofuranosidase activities, and properties of the translated product. *Biosci Biotechnol Biochem* 57:268–272
- Sambrook H, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd. edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Scheler A, Rygus T, Allmansberger R, Hillen W (1991) Molecular cloning, structure, promoters and regulatory elements for transcription of the *Bacillus licheniformis*-encoded regulon for xylose utilization. *Arch Microbiol* 155:526–534
- Shallom D, Leon M, Bravman T, Ben-David A, Zaide G, Belakhov V, Shoham G, Schomburg D, Baasov T, Shoham Y (2005) Biochemical characterization and identification of the catalytic residues of a family 43 β -D-xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6. *Biochemistry* 44:387–397
- Shulami S, Gat O, Sonenshein AL, Shoham Y (1999) The glucuronic acid utilization gene cluster from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *J Bacteriol* 181:3695–3704
- Smaali I, Remond C, O'Donohue MJ (2006) Expression in *Escherichia coli* and characterization of β -xylosidases GH39 and GH43 from *Bacillus halodurans* C-125. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:582–590
- Somogyi M (1952) Notes on sugar determination. *J Biol Chem* 195:19–23
- Song S, Park C (1997) Organization and regulation of the D-xylose operons in *Escherichia coli* K-12: XylR acts as a transcriptional activator. *J Bacteriol* 179:7025–7032
- Stoll DB, Stalbrand H, McLean BW, Kilburn DG, Warren RAJ (2000) Mannanase Man26A from *Cellulomonas fimi* has a mannan-binding module. *FEMS Microbiol Letters* 183:265–269
- Sugimoto N, Nakano S, Katoh M, Matsumura A, Nakamura H, Ohmichi T, Yoneyama M, Sasaki M (1995) Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes. *Biochemistry* 34:11211–11216
- Sunna A, Gibbs MD, Bergquist PL (2001) Identification of novel β -mannan- and β -glucan-binding modules: evidence for a superfamily of carbohydrate-binding modules. *Biochem J* 356:791–798
- Suryani, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K (2004) Sequencing and expression of the gene encoding the *Clostridium stercoarium* β -xylosidase Xyl43B in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:609–614
- Tanaka M, Umemoto Y, Okamura H, Nakano D, Tamaru Y, Araki T (2009) Cloning and characterization of a β -1,4-mannanase 5C possessing a family 27 carbohydrate-binding module from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain MA-138. *Biosci Biotechnol Biochem* 73:109–116
- Tarle I, Borhani DW, Wilson DK, Quirocho FA, Petrash JM (1993) Probing the active site of human aldose reductase. Site-directed mutagenesis of Asp-43, Tyr-48, Lys-77, and His-110. *J Biol Chem* 268:25687–25693
- 辻 啓介、森 文平 (1997) 食品成分シリーズ、『食物繊維の科学』、朝倉書店、1–15
- Tsujibo H, Kosaka M, Ikenishi S, Sato T, Miyamoto K, Inamori Y (2004) Molecular characterization of a high-affinity xylobiose transporter of *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 and its transcriptional regulation. *J Bacteriol* 186:1029–1037
- Uppalapati SR, Fujita Y (2000) Carbohydrate regulation of attachment, encystment, and appressorium formation by *Pythium porphyrae* (Oomycota) zoospores on *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *J Phycol* 36:359–366

- Utt EA, Eddy CK, Keshav KF, Ingram LO (1991) Sequencing and expression of the *Butyrivibrio fibrisolvens* *xylB* gene encoding a novel bifunctional protein with β -D-xylosidase and α -L-arabinofuranosidase activities. *Appl Environ Microbiol* 57:1227–1234
- Uziie M, Matsuo M, Yasui T (1985) Possible identity of β -xylosidase and β -glucosidase of *Chaetomium trilaterale*. *Agric Biol Chem* 49:1167–1173
- Varsani L, Cui T, Rangarajan M, Hartley BS, Goldberg J, Collyer C, Blow DM (1993) *Arthrobacter* D-xylose isomerase: protein-engineered subunit interfaces. *Biochem J* 291:575–583
- Vieille C, Hess JM, Kelly RM, Zeikus JG (1995) *xylA* cloning and sequencing, and biochemical characterization of xylose isomerase from *Thermotoga neapolitana*. *Appl Environ Microbiol* 61:1867–1875
- Vreeland V, Kloareg B (2000) Cell wall biology in red algae: divide and conquer. *J Phycol* 36:793–797
- Weinberger F, Friedlander M, Hoppe HG (1999) Oligoagars elicit a physiological response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *J Phycol* 35:747–755
- West EJ, Barnes PB, Wright JT, Davis AR (2007) Anchors aweigh: Fragment generation of invasive *Caulerpa taxifolia* by boat anchors and its resistance to desiccation. *Aquat Bot* 87:196–202
- Whitehead TR, Cotta MA (2001) Identification of a broad-specificity xylosidase/arabinosidase important for xylooligosaccharide fermentation by the ruminal anaerobe *Selenomonas ruminantium* GA192. *Curr Microbiol* 43:293–298
- Wood PJ (1980) Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydr Res* 85:271–287
- Xu WZ, Shima Y, Negoro S, Urabe I (1991) Sequence and properties of β -xylosidase from *Bacillus pumilus* IPO. Contradiction of the previous nucleotide sequence. *Eur J Biochem* 202:1197–1203
- Yamanaka K (1968) Purification, crystallization and properties of the D-xylose isomerase from *Lactobacillus brevis*. *Biochim Biophys Acta* 151:670–680
- Yamaura I, Matsumoto T, Funatsu M, Mukai E (1990) Purification and some properties of endo-1,3- β -D-xylanase from *Pseudomonas* sp. PT-5. *Agric Biol Chem* 54:921–926