

平成 29 年度 博士論文

*Ruminiclostridium josui* の  
骨格タンパク質 CipA を中核とする  
セルラーゼ・ヘミセルラーゼ複合体  
に関する研究

(Study on cellulolytic/hemicellulolytic  
complexes formed with *Ruminiclostridium*  
*josui* scaffolding protein CipA)

三重大学大学院 生物資源学研究科 資源  
循環学専攻

織田 拓

## 目次

略号表	1
第1章 序論	2
図表	29
第2章 <i>Ruminiclostridium josui</i> の RjCel5B および RjXyn10C の 酵素特性の解析と全長骨格タンパク質 RjCipA との複合体形成	
第1節 緒言	32
第2節 実験方法	32
第3節 結果	40
第4節 考察	46
図表	55
第3章 <i>Ruminiclostridium josui</i> のアラビノキシランアラビノフラ ノヒドロラーゼ RjAxx43B の酵素特性およびキシランナーゼ RjXyn10C を含むヘミセルラーゼ複合体の活性	
第1節 緒言	72
第2節 実験方法	72
第3節 結果	76
第4節 考察	80
図表	90
第4章 総括	101
謝辞	105
参考文献	108

## 略号表

BMC: Ball-milled cellulose

CBM: Carbohydrate-binding module

CMC: Carboxymethylcellulose

HEPES: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid

IPTG: Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside

LB: Luria-Bertani

LMW: Low molecular weight marker

HMW: High molecular weight marker

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis

PCR: Polymerase chain reaction

SDS: Sodium dodecyl sulfate

## 第 1 章 序論

### 第 1 節 はじめに

近年、世界の人口は爆発的に増加し、それに伴うエネルギー需要の増加が深刻な問題を引き起こしている。20 世紀後半からは大量生産、大量消費、大量流通の経済社会構造になり、先進国のみならず中国や東南アジアにおける工業化や技術革新もこの問題に大きく関係している。この社会構造において、大量の化石燃料消費と大量の二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)排出は、地球環境を急速に悪化させている。現時点ではほとんどのエネルギー資源を化石燃料で賄っているため、今後ますます、地球温暖化や大気汚染といった問題が大きくなることが予想され、エネルギー資源の枯渇も心配されている [1, 2]。さらに、2011 年 3 月 11 日に日本で起きた未曾有の災害である東日本大震災により、福島第一原子力発電所が壊滅的な被害を受けたことをきっかけに、世界中で脱原子力発電の考えが進み、火力発電所などの稼働量が増えたことで、CO<sub>2</sub> 削減目標の達成が厳しい状況となっている [3]。石油の燃料価格も高騰しており [3]、一刻も早い代替エネルギーの開発と供給が必要と考えられている。

これらの問題を解決する為、代替エネルギーの確保、地球温暖化対策、環境にやさしい循環型社会の形成が 21 世紀の世界的重大課題と考えられ、近年、風力や太陽光、地熱などを含む様々な再生可能エネルギーが注目されている。バイオマスエネルギーもまた再生可能エネルギーの 1 つであり、生物由来のものである。2005 年の米国包括エネルギー政策法の制定からは世界各地でトウモロコシやサトウキビを栽培し、これらのデンプン質もしくは糖質からバイオエタノールを製造

している。しかし、これらのバイオマス資源は食料の栽培と競合する為、トウモロコシの価格高騰など食糧問題を新たに生み出す原因となっている。そこで、稲わらや木材などの非食部分の未利用のバイオマス資源であるリグノセルロースを利用してバイオエタノールを生み出そうとする研究がされている[4]。しかし、植物の細胞壁であるリグノセルロースは非常に強固で複雑な構造になっており、化学的もしくは生物学的な分解に非常に強い耐性を有している(図 1-1) [5, 6]。リグノセルロースは、主にセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンから構成されている[7]。セルロースはグルコースが  $\beta$ -1,4 グリコシド結合したポリマーであり、ヘミセルロースはキシランやマンナン、アラビナンなどのセルロース以外の多糖類の総称である。またリグニンは高分子フェノール化合物が高度に重合した樹枝状構造である。このように様々な高分子が多種多様な結合によりリグノセルロースを形成しているので、分解は非常に困難である[8]。しかし、分子的多様性に富んでいるため、それらの分子を単離することで多種多様な物質を生産することが出来、その利用先はエネルギー生産にとどまらず、食糧、化粧品、試薬、化学工業製品、薬剤、医療にも応用することができ、温暖化や環境と健康、その他多くの問題を解決できる可能性を持った一番身近な資源である[9-13]。

## 第 2 節 植物細胞壁の構造

植物細胞壁の構造は、まず骨格としてセルロース分子が水素結合で同じ極性を持つ 60~70 本が束になって結晶性となり数  $\mu\text{m}$  のセルロースマイクロフィブリルと呼ばれる繊維の最小単位を形成している。そして、ヘミセルロースは枝分かれ

構造を持った多糖類でセルロースマイクロフィブリルの周りを取り囲むように固く結合している。またヘミセルロース間でも相互に結合しあってセルロースマイクロフィブリル間を架橋することで複雑な編み目構造をとっている。草本類や樹木において主なヘミセルロースはキシランであり、その含有量は植物細胞壁の約 20~30%を占めている。キシランは  $\beta$ -D-キシロピラノースが  $\beta$ -1,4 結合したポリマーを主鎖として  $\alpha$ -L-アラビノフラノースや  $\alpha$ -D-グルクロン酸、アセチル基などが側鎖として結合しているものが多い[14, 15]。キシラン同士でも疎水性結合しているが、側鎖の  $\alpha$ -L-アラビノフラノースに結合しているフェルラ酸が相互にジフェルラ酸を形成することで隣り合うキシラン主鎖をより強固に結びつけている[16, 17]。ヘミセルロースの構成成分には、他にもガラクトグルコマンナン、グルコマンナン、ガラクトマンナンなどが含まれており、植物細胞壁の 10~15%を占めている[13]。その他、ペクチンの様な多糖類の編み目構造は隣接する細胞壁間をつなぐ役割を持っている。さらに植物細胞壁の構造を複雑にしている構成要素としてリグニンの存在が挙げられる。リグニンは植物細胞壁の隙間を埋める役割をもつフェニルプロパノールポリマーであり、ヘミセルロースの側鎖であるフェルラ酸やアラビノフラノース、*p*-ヒドロキシシナピン酸、*p*-クマリン酸などの分子とエーテルもしくはエステル結合を介して存在している。リグニンは *p*-ヒドロキシフェニル、グアイアシル、シリングルの 3 つの要素で構成されており、アリアルエーテル結合( $\alpha$ -O-4、 $\beta$ -O-4 結合)、ビフェニルエーテル結合(4-O-5、5-O-4 結合)、炭素結合( $\beta$ -5、 $\beta$ - $\beta$ 、5-5)などにつながっている[18-20]。これらは疎水性であるため、植物細胞壁への外からの水分の侵入を防ぎ、かつ物理的な強度の増加に大

大きく貢献している。植物細胞壁内のリグニンは 1%の水酸化ナトリウム水溶液を加え 1 時間 100℃で加熱することにより抽出することができ [21]、これらは単離リグニンとしてポリエステル・ポリウレタン化、ポリマーブレンド、炭素繊維への応用、化学肥料としての応用など様々な研究が進んでいる [22,23]。

### 第 3 節 植物細胞壁の糖化

以上のように植物体の細胞壁は非常に複雑な高次構造をとっている。これらの分解には生物学的、化学的および物理学的処理を行い、分解反応を促進させる技術が必要である。1997 年の京都議定書の策定からバイオエネルギーの認知度が高まってきており、2002 年には燃料用アルコール開発技術研究組合により木質系バイオマスの濃塩酸や希硫酸を使用した糖化技術が開発されてきた [3]。しかしながら、現状では抽出、分別、濃縮、分解などの変換処理に多大なエネルギーを必要とし、高コストで技術的にも困難で環境負荷も高いものが多い。例えば、濃塩酸を用いた糖化法では 40%塩酸、常温、常圧、8 時間で糖濃度が 28~40% (ベルギウス法) と高い効率で糖化反応を行えるが、その後のエタノールの発酵過程で酵母の生育を阻害する物質ができたり、酸の回収や再利用が難しく、装置が腐食したりするなど様々な問題を抱えていた。したがって、バイオマスの変換利用に当たっては、常温、常圧エネルギー的反応である微生物やそれらの持つ酵素反応など、生物機能を活用し効率的に分解、変換する技術の開発が重要となる。微生物の酵素を利用した糖化法ではこれらの問題を解決できる可能性が高く、様々な研究が進められている。酵素糖化法では簡単な装置で常温、常圧で処理することがで

き、エタノール発酵の阻害物質の発生も少なく、生物由来のもののみで反応させるため環境負荷も小さく抑えることができると考えられる。

#### 第 4 節 セルラーゼ

バイオマスの糖化酵素としてセルラーゼが注目されており、その性質は非常に多様である。セルラーゼはセルロースのグリコシド結合を加水分解しグルコースやセロビオースを生成する酵素の総称であり、セルロースを分解する酵素の分類は国際生化学連合酵素委員会報告 (Enzyme Nomenclature-Recommendations of Biochemistry) で厳密に定義されている [24]。これらの酵素の分類は国際生化学酵素委員会で提案された命名法で系統名と常用名および反応名が記されており各々に EC 番号が割り当てられ、データベース化されている。セルラーゼの関連酵素について例をあげると、Cellulase (EC 3.2.1.4) [Endo-1,4- $\beta$ -glucanase, (1,3-; 1,4-)  $\beta$ -D-Glucan 4-glucanohydrolase]、 $\beta$ -Glucosidase (EC 3.2.1.21) [ $\beta$ -Glucoside glucohydrolase、Gentiobiase、Cellobiase]、Cellulose 1,4- $\beta$ -cellobiosidase (non-reducing end) (EC 3.2.1.91) [1,4- $\beta$ -D-Glucan cellobiohydrolase、Exo-cellobiohydrolase]、Glucan-1,4- $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.74) [Exo-1,4- $\beta$ -glucosidase、1,4- $\beta$ -Glucan glucohydrolase]、cellulose 1,4- $\beta$ -cellobiosidase (reducing end) (EC 3.2.1.176)などが登録されている。またセルラーゼを含む糖質分解酵素は、そのタンパク質のアミノ酸配列を基に、Glycoside hydrolase (GH)ファミリーとして分類されており [25]、これらの情報はインターネット上で公開されている (CAZy: Carbohydrate-Active enZYmes database;



<http://www.cazy.org>)。このデータベースによると、2017年7月現在、糖質分解酵素は145のファミリーに分類されている。

セルラーゼ研究は古くから行われており[26]、微生物、原生動物、軟体動物さらに植物でも発見されている[27]。その中でも微生物に由来するものが圧倒的に多く、糸状菌、担子菌、細菌、古細菌、藻類や地衣類など100種を超える微生物種について研究報告がなされている。中でも糸状菌が作り出すセルラーゼは強力で、とりわけ *Trichoderma* 属の生産するセルラーゼは世界的にもよく研究されており、その研究の歴史は70年以上になり[28]、2008年にはゲノム解読も完了している[29]。1980年代に入ると、遺伝子組換えやクローニング技術が発達し、*Trichoderma reesei* から糖質分解酵素ファミリー7に属するセロビオヒドロラーゼであるCBHI (Cel7A)の遺伝子がクローニングされ[30]、そのタンパク質の立体構造も報告された[31]。近年になると、日本でこのCBHIがセルロースを分解している様子を原子間力顕微鏡(AFM)を用いて直接観測する技術も確立され[32]、セルラーゼの研究はこの30年間で劇的に進歩している。*T. reesei*のセルラーゼは工業的にも世界中で利用されており、2015年現在においてセルロース由来のバイオ燃料は世界中で年間4億8千万リットル生産されているがそのうちの80%の3億8千万リットルの生産に *T. reesei*のセルラーゼが利用されている[28]。しかし、植物の細胞壁は前述のとおりセルロースのみではなく様々な高分子が高次元に存在しているので、これを完全に分解するには各々の分子構造に合った分解酵素が必要であり、真菌類や細菌類にかかわらず、様々な酵素の組合せが重要である[33, 34]。

セルラーゼなどの糖質分解酵素はモジュラー構造をとって

いるものが多く、複数の分解酵素がモジュールとして連結しているものや、基質分解の働きを助けるモジュールを持つものなど多様性に富んでいる [35]。その他のモジュールとして糖質結合モジュール (CBM) や骨格タンパク質に結合するドックリンモジュール、ソーターゼモチーフ [36, 37]、細胞に接着する Fn3 モジュールや SLH モジュールが挙げられるが、まだ機能が解明されていないモジュールも多く存在する [38]。

糖質加水分解酵素はその触媒機能の違いからエンド型とエキソ型に分けることができ、エンド型は糖鎖の内部を切断して分解するのに対し、エキソ型は糖鎖の端から順番に分解する。またプロセッシブエンド型も存在し、これらはエンド型とエキソ型を併せ持った機能を持っており、糖鎖の途中を切断すると、その切断部位から糖鎖に沿ってセロビオース単位で分解していく性質を持つ [39, 40]。セルロースの  $\beta$ -1,4 結合を加水分解し、セロビオースを生成する酵素としての GH はファミリー 5、6、7、8、9、10、45、48、74、124 で確認されている [35]。一般的にはファミリー 6 と 7、48 はエキソ型のセロビオヒドロラーゼであり、ファミリー 5 や 9 はプロセッシブエンドもしくはエンドグルカナーゼである。面白いことにファミリー 7 のセロビオヒドロラーゼ (EC 3. 2. 1. 176) は真菌類でのみ確認されているが、細菌では主にファミリー 48 の酵素がエキソ型の分解酵素の役割を担っている。最近の報告ではファミリー 7 の糖質分解酵素は真菌類以外の他の真核生物でも発見されている [41, 42]。

## 第 5 節 銅依存性多糖分解モノオキシゲナーゼ

これまで挙げてきたセルラーゼはすべて、糖鎖を加水分解する酵素ばかりであったが、近年の研究では酸化型の分解酵

素も発見されている[43]。これらは現在、銅依存性多糖分解モノオキシゲナーゼ(Lytic polysaccharide mono-oxygenase; LPMO)として知られており、真菌類[44]や細菌類[45]で多く発見されている。LPMOはGHファミリーとは異なり、AA(auxiliary activity)ファミリーとして分類されている[46]。初めに発見されたのは真菌類のAA9だが[43]、LPMOは酸化型で、ほとんどが還元糖を生成しない為、還元糖の測定では活性が測定できなかった。しかし、他の分解酵素と混合することで相乗効果を発揮することから、当初これらの酸化型モジュールはGH61やCBM33と認識されていた[47-49]。LPMOの存在が明らかになったことでAAファミリーに属する酵素が真菌類や細菌類だけでなくウイルスでも発見され[50]、多くのファミリーに分類されており、これらはCAZyのデータベースで検索可能となっている([www.cazy.org](http://www.cazy.org))。AAファミリーの酵素はまだ不明な部分が多く残されているが、構造解析や分類、活性については比較的よく調べられている。AAファミリー9, 10, 11, 13はそれぞれ、アミノ酸配列の相同性が低いにもかかわらず、そのタンパク質の立体構造は非常によく似ており、いずれも銅イオンアクティブサイトが含まれている[46, 51, 52]。LPMOは主に結晶性の基質を分解し、セルロース[53]だけでなくキチン[45]やヘミセルロースも分解することが分かっており[54-56]、主に高度に結晶化されたフラットな基質表面に結合する性質を持つ[57-59]。その分解メカニズムは、酵素内の銅イオンアクティブサイトに結合した銅イオンから電子を受け取り、多糖のグリコシド結合を酸化還元反応で切断することである。切断された部位は酸化され、還元糖は生成しない。これは従来からよく知られているGHファミリーによる加水分解とは全く異なっている。これ

らの分解メカニズムから、LPMOは高度に結晶化されたフラットな基質表面に引っかき傷のようなものをつけ、その後のGHファミリーによる加水分解を促進させるブースターの役割を担っていると考えられている。また、LPMOはセロビオースデヒドロゲナーゼ(CDH)とも連携して働き、CDHがセロビオースを酸化反応でセロビオノラクトンを生成した時の副産物として出る2つの電子を受け取り、酸化還元反応に使用しているという報告もある[60-62]。セロビオノラクトンはその後のアルコール発酵過程にも容易に利用できる優れた生成物である[63]。この様にLPMOの発見は、バイオマスを分解する微生物の酵素戦略の解明に大きな貢献をした[64]。

## 第6節 ヘミセルラーゼ

これまで述べたように、バイオマス分解酵素の研究は、セルラーゼを中心に非常に盛んである。しかし、バイオマスとしての植物細胞壁の構造は前述のとおり、セルロースだけでなく、ヘミセルロースやリグニンを含み非常に強固な構造になっているため、セルラーゼやリグニン分解酵素だけでなく、セルロースやヘミセルロースを架橋しているアラビノフラノースやフェルラ酸などを含む様々な分子の分解酵素もこれらの分解効率に非常に深く関わっている。多くのバイオマス分解性の生物はこのような架橋分子を切断するエステラーゼなどの酵素も生成する。セルラーゼに限らず、バイオマスを効率よく分解するためのヘミセルラーゼやエステラーゼに関する研究も数多く報告されている[65]。ヘミセルロースの代表的なものとしてキシランが挙げられるが、キシランを分解するにはキシラナーゼが必要である。Endo- $\beta$ -1,4-xylanaseは主にGH10、GH11またはGH30に分類されており[66-68]、こ

の 3 つのファミリーに属する酵素はキシラン主鎖をエンド型として切断するが、それぞれ、側鎖の認識部位の違いから切断箇所が異なる [25, 66, 68, 69]。GH10 のキシラナーゼは連続した側鎖のない 2 つ以上のキシロピラノシド残基を認識し、キシラン主鎖を切断するが、メチルグルクロン酸が側鎖として結合しているキシロピラノシド残基の 1, 4 グリコシド結合も切断する能力を持っている。一方、GH11 の酵素は少なくとも 3 つ以上の側鎖のないキシロピラノシド残基を認識し、主鎖の 1, 4 グリコシド結合を切断するが、側鎖があるとそのキシロピラノシド残基から 1 つ手前の残基の 1, 4 グリコシド結合しか切断できない。また、GH5 [70] や GH8 に属する酵素の一部もキシラン主鎖を分解する酵素としての役割を担っている [71-75]。キシラン主鎖に側鎖として結合しているメチルグルクロン酸は、GH67 [76-79] や GH115 [80, 81] などに属する  $\alpha$ -グルクロニダーゼにより切断される。 $\alpha$ -グルクロニダーゼは、GH10 や GH11 のキシラナーゼの分解産物であるキシロオリゴ糖の側鎖であるグルクロン酸を切断し、側鎖がないキシロオリゴ糖を生成するので、 $\beta$ -キシロシダーゼがキシロースを生成する助けになっている。

細菌類でよくみられるエンド型キシラナーゼには他にも GH30 に分類されるものがある [82]。もともとは GH5 に分類されていたもので、CAZy で GH30 に分類される前から報告があった [83]。最近では *Trichoderma* 属などの真菌類でも発見されている [84]。この酵素はメチルグルクロン酸が側鎖として結合しているキシラン主鎖によく働く性質を持ち、アセチル化されたキシラン主鎖にも活性がある [85]。逆に側鎖のないキシランやキシロオリゴ糖では活性が低下することが知られている [86]。

アラビノキシランはキシラン主鎖のキシロピラノシド残基の 2 位と 3 位の位置のどちらか、もしくは両方にアラビノフラノースが  $\alpha$  結合している。さらにこのアラビノースにはフェルラ酸が結合しているものもあり、リグニンや別のヘミセルロースに架橋している [16]。アラビノース側鎖を取り除くには  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼが必要であり、これはアラビノキシランの他アラビナンからアラビノフラノシドを加水分解で遊離させる働きを担っている [87]。 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼは GH ファミリー 43、51、54、62 に分類されている。多くのアラビノフラノシダーゼは 2-もしくは 3-の位置に 1 つだけ結合しているものしか取り除くことができないが [88]、2 位と 3 位の両方にアラビノースが結合しているキシロピラノシド残基でも 2 位を残して 3 位のアラビノースだけ切断する酵素も存在する [89]。前者は m2,3  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ、後者は d3  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼとして区別されている [89]。この 2 種類の酵素は混合することで活性に相乗効果があることも確認されている [90,91]。

## 第 7 節 エステラーゼ

植物細胞壁中の修飾されたヘミセルロースの分解にはグリコシド結合を切断する加水分解酵素だけでなく、エステル結合を切断するエステラーゼも必要不可欠である。これらの酵素は、Carbohydrate Esterase として CE ファミリーに分類されており、キシランに結合しているアセチル基を取り除くアセチルキシランエステラーゼは CE ファミリー 1、4、5、6、16 に属している [92-95]。キシランのアセチル基修飾は酵素分解に対して抵抗を与え、アセチルキシランエステラーゼである CE ファミリー 4 の実験では、一つのキシロピラノシド残

基の 2 位もしくは 3 位に一つだけアセチル基が付いている場合においてはそのアセチル基を取り除くことができるが、2 位、3 位の両方がアセチル基で修飾されている場合は酵素が働くことが出来ないことが示された [96]。キシロピラノシド残基の 2 位の位置にメチルグルクロン酸が修飾されている場合も、その 3 位の位置にあるアセチル基を取り除くことが出来ない [94, 97]。しかし、近年 *T. reesei* で見つかった CE16 は、活性は弱いですが、2 位の位置にメチルグルクロン酸が修飾されているキシロピラノシド残基の 3 位にあるアセチル基を脱アセチル化することができる唯一の酵素だとされている [95]。この酵素はさらにキシラン主鎖非還元末端のキシロピラノシド残基 4 位の O に結合するアセチル基も取り除くことができる [95, 98, 99]。この様な複雑な構造をとるヘミセルロースの一種であるアセチルグルクロノキシランについてその分解可能性を考慮すると、少なくともキシラナーゼ、 $\beta$ -キシロシダーゼ、 $\alpha$ -グルクロニダーゼ、アセチルキシランエステラーゼの他にも非還元末端の脱アセチル化を行うアセチルエステラーゼが必要である。

その他、アラビノキシランの側鎖に結合しているフェルラ酸を取り除くにはフェルラ酸エステラーゼが必要である。この酵素は分類が難しく、現時点においては、アミノ酸配列の相同性により、タイプ A から D の 4 つのグループに分けられている [100]。タイプ A はリパーゼによく似たアミノ酸配列を持つグループで、フェルラ酸が 2 つ架橋しているジフェルラ酸を遊離する能力があり、タイプ B の酵素はアセチルキシランエステラーゼである CE1 に類似した配列を持つが、ジフェルラ酸の放出は認められない。タイプ C の酵素はクロロゲン酸エステラーゼのアミノ酸配列と相同性が高く、これもジフ

エルラ酸は取り除くことが出来ない。タイプ D はキシラナーゼに似た配列を持っており、ジフェルラ酸を遊離する能力を持っている。他にも、*Ruminiclostridium thermocellum* の CtXynZ (M22634) や CtXynY (X83269)、*Ruminococcus flavefaciens* の XynE (AJ272430) などフェルラ酸エステラーゼに相同性が高いが、タイプ A~D とは異なっておりエステラーゼ活性の報告も見られない[100]。この様に、植物細胞壁の分子の結合はグリコシド結合だけではなく、エステル結合の側鎖も数多く含まれているので、エステラーゼの存在は天然のバイオマス分解において、非常に重要な役割を果たしている。エステラーゼは他にも CE4 に属するアセチルガラクトグルコマンナンエステラーゼやキチン・ペプチドグリカン N-デアセチラーゼなども報告されている[92]。

## 第 8 節 CBM

バイオマスの分解についての研究は酵素(触媒モジュール)だけに限られない。酵素の働きを助ける糖質結合モジュールである CBM についても様々な報告がなされている[101]。CBM は多くの糖質分解酵素の中にモジュールとして存在していることが多く、それ自体には加水分解活性はないが、触媒モジュールの分解を助ける働きがあり、非常に多様性のあるタンパク質モジュールである。2017年7月現在では、その相同性による分類において、81ものファミリーが登録されている (CAZy: carbohydrate-Active enZymes Database; <http://www.cazy.org>)。CBM は各々のターゲットとする基質に吸着する能力を持っている。この能力による触媒モジュールの分解活性促進効果はターゲッティング効果と呼ばれ、触媒モジュール単体では分解が難しい疎水性かつ結晶性多糖



の表面や可溶性多糖類にも物理的に近づくことができ、その酵素の基質特異性に影響を与えることで分解効率を著しく増加させることができる[102]。CBMは繊維性結晶構造である基質表面に介入し1本の糖鎖を可溶化させて分解可能な状態にする[103]という説もあり、これはCBM33がキチン表面に介入し、キチナーゼの基質への接触力を向上させたという実験結果から説明されている[104]。しかし、この報告については後にCBM33がLPMOのAA10であることが報告された[46]。現在発見されているCBMのほとんどは、基質に吸着することで同じタンパク質内の触媒モジュールが物理的に近接することで分解活性を増加させると解釈されている[105]。

CBMは、タンパク質のフォールディングの構造から7つに分けられているが、そのほとんどが $\beta$ -sandwich構造をとっている[106]。これらの分類はすべてアミノ酸配列の相同性や構造のみが基準となっており、同じファミリーや構造であっても標的とする基質や機能が異なっていることがある。それ故、機能面についてはこれとは別にタイプAからCの3つのタイプに分類されている[107]。タイプAは結晶性多糖の表面に吸着するものが分類されており、CBM3やCBM63などがこれにあたる。タイプAのCBMの結合面は芳香族アミノ酸残基を持つ平らな構造になっており、ピラノースのCH基と芳香族環の間のCH/ $\pi$ 結合により結晶性セルロースの表面に直接作用することができるようになっている[108]。タイプBは多糖の糖鎖の間に吸着するエンドタイプのCBMで、基質が結合する為のクレフト(溝)を持っており、そのクレフトには芳香族アミノ酸と親水性のアミノ酸が配置されていることで糖鎖と疎水性、親水性結合を介して内部で結合する。タイプCは糖鎖の末端に吸着するエキソ型として分類されている。

これらの CBM には短いクレフトもしくは穴の様な構造が見られ、この部位に糖鎖の末端が結合する[107]。

CBM において一番大きな効果が期待されるターゲティング効果は、CBM についての触媒モジュールを基質表面まで案内し、その活性部位の方向を基質に向けることで分解活性を上昇することができることである。これらは CBM を人為的に取り除くと、不溶性基質に対する活性が著しく低下することや[109]、CBM を付加した触媒ドメインの基質の分解活性が数倍になるといった現象から説明されている[110-112]。

近年の研究では CBM の基質への吸着特異性を明らかにするため、蛍光タンパク質で標識する方法がよく使用されている[113]。蛍光タンパク質での標識は CBM の標的基質の特定に非常に便利であり、これを利用した *R. josui* の CBM17 と CBM28 の標的基質の違いが報告されている[114]。さらに、緑色蛍光タンパク質やシアン蛍光タンパク質、FITC といった蛍光標識と融合させた CBM は、植物細胞壁や不溶性多糖類の分子プローブとしても利用可能であり、CBM 研究だけでなく幅広い研究分野での応用が期待されている[115, 116]。

## 第 9 節 セルロソーム

現在、工業利用されているセルラーゼ製剤は *Trichoderma* 属由来のものが圧倒的に多いが、細菌類が持つバイオマス分解酵素についても多くの研究が進められている。例えば、*Thermobifida fusca*、*Thermomonospora curvata*、*Cellulomonas fimi* のような放線菌[117-119]や枯草菌[49]、嫌気性の *Clostridium* 属細菌[120]などがセルラーゼを分泌する生物として確認されている[121]。

細菌の中でも嫌気性細菌のセルラーゼ系として特に興味深

いことは、特異性の異なる様々な糖質分解酵素が複合体(セルロソーム)を形成する事である(図 1-2) [122-127]。セルロソームの存在は 1980 年代に初めて *Ruminiclostridium thermocellum* (旧 *Clostridium thermocellum*) で確認され [128-133]、その後、セルロソーム関連遺伝子のクローニングや、セルロソームを生産する細菌類のゲノム配列、セルロソーム構成成分の構造や機能の解析が進められてきた [134,135]。なお、*R. thermocellum* の他、いくつかのセルロース分解性嫌気性細菌が *Clostridium* 属から *Ruminiclostridium* 属に再分類されており [136]、本論文での細菌名もそれに従った。*R. thermocellum* の様々な酵素の研究を通して、これらのセルロソーム酵素のタンパク質の主に C 末端側に特徴的なおよそ 22 アミノ酸残基が反復してコードされているものが多く確認されており [137-140]、それは真核生物に見られるカルシウム結合タンパク質である EF-hand モチーフに類似していた [141]。その後の研究で *R. thermocellum* から 210 kDa の触媒活性をもたないセルロソーム関連サブユニットをコードする遺伝子の塩基配列が報告された [142]。また、*Clostridium cellulovorans* でも類似したサブユニットが発見されていた [143]。その後、この触媒として機能しない 210 kDa のタンパク質には約 150 のアミノ酸からなる保存された配列が 9 回繰り返して存在しており、触媒サブユニットに存在する 70 アミノ酸残基のモジュールと特異的に強く結合することが報告された [138]。触媒サブユニット中の約 70 アミノ酸残基のカルシウム結合ループ構造はドックリン、150 アミノ酸残基の繰り返しモジュールはコヘシン、そしてコヘシンを含む 210 kDa タンパク質は骨格タンパク質(スキヤフオールディン、CipA)と名付けられた [144]。現

在では CipA に含まれるコヘシンと触媒サブユニット中のドックリンが結合し、大きなセルラーゼの複合体であるセルロソームを形成することがよく知られている。*R. thermocellum* の骨格タンパク質には 9 つのコヘシンの他にも CBM が含まれており、基質への特異的ターゲティング機能を担っている [145]。さらに C 末端側にはドックリンモジュールが含まれているが [138]、これは酵素中のドックリンとは結合特異性の異なるタイプのものであり細胞表層に局在する別の骨格タンパク質 (OlpB および SdbA) と結合する。また、これらの細胞表層骨格タンパク質の C 末端には S-Layer homology (SLH) モジュールがあり、細菌の細胞壁成分に特異的に結合する [146-149]。酵素と CipA を繋ぐコヘシンとドックリンはタイプ I に分類され、CipA と細胞表層骨格タンパク質を繋ぐコヘシンとドックリンはタイプ II に分類されている。これらの成分はその機能から 3 つの役割を果たしている。① CipA 中の 9 つのコヘシンに多様な糖質分解酵素を結合させ、酵素の複合体であるセルロソームを形成する。② CipA の C-末端側にあるタイプ II ドックリンを OlpB などの細胞表層骨格タンパク質のタイプ II コヘシンに繋ぎ合わせ、細菌の細胞表層にセルロソームを固定する。③ 細胞表層に固定されたセルロソームのターゲティング機能でセルロース系基質へ細胞全体を固定化する [133]。*R. thermocellum* の骨格タンパク質をコードしている遺伝子はクラスター化されており、骨格タンパクをコードする遺伝子が 4 種類並んでいるが、触媒モジュールを含むセルロソームコンポーネントの酵素群は染色体上に散らばっており、大きなクラスターにはなっていない [146, 150]。*R. thermocellum* のセルロソームシステムには異なる 3 種類の細胞表層骨格タンパク質遺伝子が存在し、タイプ I の

コヘシンを 1 つしか持っていないもの (OlpA) の他、タイプ II コヘシンを 2 つ持つもの (SdbA)、7 つ持つもの (OlpB) があり、そのコヘシンの数だけタイプ II ドックリンを持った骨格タンパク質を結合することが出来る [147, 149, 151]。この仕組みにより、タイプ II コヘシンが 7 つある細胞表層骨格タンパク質では 1 つの複合体につき最大で 63 個の異なる触媒サブユニットを細胞表層に配置することができる。そしてさらに興味深いことに、タイプ I のコヘシン-ドックリン相互作用はセルロソームを生成する他種の細菌のものとも親和性があるものも存在しており、異種間であってもタイプ I ドックリンを持つバイオマス分解酵素の複合体を形成することができ、天然においては状況に応じてその性質を柔軟に変えることができる。しかし、多くの場合コヘシンとドックリンの相互作用には種特異性があり、その特異性を利用したセルロソームの研究も進められている [152-155]。

また、セルロソームを生成する細菌は *R. thermocellum* だけではない。セルロソームを生成する細菌は今までに、*C. cellulovorans* [156-159]、*Rumini-clostridium cellulolyticum* [160-164]、*Ruminiclostridium papyrosolvans* [165-167]、そして当研究室では *Ruminiclostridium josui* [168, 169] が見つかっている。これらの細菌でも *R. thermocellum* とよく似た骨格タンパク質が発見されており、ドックリンモジュールを持つ酵素も多く見つかっている。しかし、これらの中温性嫌気性細菌が持つセルロソームでは *R. thermocellum* とは異なり、タイプ II のドックリンを持っていない。*R. thermocellum* では骨格タンパク質と細胞表層骨格タンパク質の遺伝子がクラスターとして存在しているのに対し、後者の *Ruminiclostridium* 属のセルロソーム遺伝子は、骨格タン

パク質遺伝子を筆頭にファミリー 9 や 5、48 などの糖質分解酵素がクラスターを形成している [170, 171]。セルロソーム構成成分については他の細菌でも様々な報告がなされている。*Acetivibrio cellulolyticus* や *Bacteroides cellulosolvens* でもセルロソームが発見されており、興味深いことにこれらの種は細胞表層骨格タンパク質を生成し、細胞表層にセルロソームを固定する機構を有している。

*A. cellulolyticus* の生産する骨格タンパク質には、タイプ I コヘシン、CBM、タイプ I ドックリンおよびタイプ II コヘシンが存在している [172, 173]。骨格タンパク質は全部で 4 種類あり、それぞれ ScaA、ScaB、ScaC、ScaD と名付けられており、ScaA には 7 つのタイプ I コヘシンと 1 つのタイプ II ドックリン、1 つの CBM、そして 1 つの GH9 が含まれている。骨格タンパク質に触媒モジュールが含まれていることも大変めずらしい構造ではあるが、特筆すべきはアダプター骨格タンパク質としての ScaB である。ScaB にはタイプ II コヘシンが 4 つ含まれているほか、タイプ I ドックリンも 1 つ含まれている。これは細胞表層に結合する SLH を持った ScaC のタイプ I コヘシンに結合することで、骨格タンパク質に骨格タンパク質を結合させるアダプターの様な働きをしている。ScaA は 1 つの触媒モジュールと 7 つのタイプ I コヘシンの他タイプ II のドックリンが 1 つあり、それが ScaB のタイプ II コヘシンに結合、ScaB には 4 つのタイプ II コヘシンと 1 つのタイプ I ドックリンがあり ScaC のタイプ I コヘシンに結合、ScaC にはタイプ I コヘシンが 3 つあり、SLH により細胞表層に結合している。以上の事から *A. cellulolyticus* のセルロソームシステムでは触媒酵素を全部で 96 個細胞表層に結合させることができる [174]。*R. thermocellum* のセルロ

ソームシステムでは細胞表層に結合できる酵素の数は最高で 63 個なので *A. cellulolyticus* ではその 1.5 倍の数に及ぶ。また *A. cellulolyticus* はアダプター構造をとらない ScaD もある。このような、アダプター骨格タンパク質の発見は既存のセルロソームシステムのコンセプトに大きな衝撃を与えた。

*B. cellulosolvens* では *A. cellulolyticus* のセルロソームシステムよりさらに多くの触媒モジュールを細胞表層に結合させることができると報告されている [175]。 *B. cellulosolvens* セルロソームシステムはいたって単純で、骨格タンパク質の遺伝子クラスターの配列からは 2 つの遺伝子しか同定されなかった。しかし、この 2 つの骨格タンパク質にはそれぞれコヘシンが 10 個と 11 個含まれており、これらはタイプ I とタイプ II のコヘシン-ドックリン相互作用で結合し、細胞表層に最高で 110 個の異なる触媒モジュールを結合することが明らかにされている。加えて、興味深いことに、これらの骨格タンパク質は既存のセルロソームシステムとはコヘシンのタイプ I とタイプ II が逆になっており、細胞表層骨格タンパク質側にタイプ 1 コヘシンがあり、一次骨格タンパク質側にタイプ II コヘシンが含まれている。これらのセルロソームシステムの多様性は一見同じような構造をとっているが、進化の過程において自然界で混合された遺伝子群の中から最適な能力を獲得しようとした結果がうかがえる [176]。

いままで発見されているセルロソームシステムでもっとも多く触媒サブユニットを結合することができるのは *Ruminiclostridium clariflavum* である。この嫌気性細菌のセルロソームシステムはコヘシンが一次骨格タンパク質に 8 つ、アダプター骨格タンパク質に 5 つ、細胞表層骨格タンパク質に 4 つ存在しているので、計算上合計 160 個ものドックリン

を持つ触媒サブユニットを複合体に取り込むことができる [177]。

セルロソームシステムの多様性はこれだけではなく、草食動物のルーメン(第一胃)や人間の胃の中にも存在する細菌からも見つかっている [178,179]。 *Ruminococcus flavefaciens* はルーメン中でセルロースを分解する細菌として知られ、そのセルラーゼも多数知られていたが、*R. flavefaciens* 17 株が生成するセルラーゼにはドックリンに類似したモジュールが含まれる事が報告された [180]。その後、コヘシンが含まれる骨格タンパク質 ScaA と ScaB が発見され、また新たなセルロソームシステムの多様性が報告された [181]。 *R. flavefaciens* は 2 つの異なる株が存在することが知られており、*R. flavefaciens* FD-1 株 のゲノム情報から骨格タンパク質の遺伝子クラスターが見つかった [182]。 *R. flavefaciens* 17 株のセルロソームはその遺伝子クラスターのシーケンスから 4 つの異なるコヘシン-ドックリン相互作用の特異性が見つかり、骨格タンパク質も ScaA、ScaB に加え ScaC、ScaE、CttA が見つかった。Xdoc を持った ScaB と CttA は細胞表層にソーターゼを媒介とした相互作用によりアンカリングしている ScaE のコヘシンに結合し、7 つのコヘシンを持った ScaB には ScaA のドックリンが結合する [183]。 ScaA には 3 つのコヘシンがあり、ドックリンを持つ様々な酵素が結合する [184, 185]。 4 つ目の骨格タンパク質の ScaC のドックリンもまた ScaA のコヘシンに結合するが、ScaC はコヘシンモジュールを 1 つしか持たない小さな骨格タンパク質である。しかし、ScaC のコヘシンと ScaA のコヘシンは特異性が異なったタイプであり、ScaA に ScaC が結合すると、特異性の異なる別のドックリンを持った酵素、例えば別種の細菌が生成した



酵素なども結合できるようになる[186]。 *R. flavefaciens* の ScaA や ScaB には *Clostridium* 属の骨格タンパク質に含まれる CBM3 は見当たらななかったが、骨格タンパク質の遺伝子クラスターにコードされている 5 つ目のタンパク質 CttA が 2 つの分類が不明な CBM を持っていることもわかっている。 CttA も細胞表層にアンカリングしている ScaE のコヘシンに結合するので、おそらく細胞表層に集めた酵素を基質に近づける働きを担っていると推測される[187]。 *R. flavefaciens* FD-1 株のセルロソームシステムは 17 株と一見似ているようにみえるが、異なった点が多くみられる。両者の骨格タンパク質の遺伝子クラスターはほぼ同じように並んでいるにも関わらず FD-1 株では ScaB のコヘシンが ScaA タイプのものと ScaB タイプのものが両方存在しており、ScaC は ScaA だけでなく ScaB とも結合することが可能である[188]。 *Ruminococcus* 属では他にも *R. albus* がセルロース分解菌として知られており、その細胞表層には非常に大きな分子量のタンパク質が吸着していることが確認されていたが[189, 190]、2000 年には当研究室でそれがセルロソームであると報告された[196, 197]。

セルロソームを形成するのは細菌だけではない。消化管内の真菌類でも 1992 年に酵素の複合体が発見されており、細菌類の類似する構造と比較実験が行われている[193]。それらはモジュール構造やコヘシン-ドックリン相互作用、骨格タンパク質に相当するものがあると信じられているが、いまだにこれらについての議論が続いている[194]。真菌類ではドックリンモジュールは触媒酵素に連なっているが、細菌類のドックリンが触媒サブユニット内にシングルコピーとして存在しているのに対し、N 末端側と C 末端側両方にタンデムリピー

トで存在している[195]。加えて、真菌類のセルロソームは 1 MDa を超えているという報告や[196]、334 kDa [197]のもの、80 MDa のものもあるとの報告もされている[198]。これらは細菌類のコヘシンの数の多様性を考えると、十分類似している点として納得できる。初めて真菌類のコヘシンが見つかったのは 20 年以上も前の事だが[194]、当時これらを実証するための有力な証拠は得られなかった。これまでの報告では、コヘシンと予想されるタンパク質が *Neocallimastix patriciarum* J11 [199]、*Piromyces equi* [200]、*Orpinomyces* sp. PC-2 株 [201]などの真菌類で、ELISA 法[200]やリコンビナントのドックリンを利用したウエスタンブロットでのアプローチ[195, 199-201]で発見されている。そして興味深いことに、マスペクトルを用いてこれらのコヘシンと予想されるタンパク質のアミノ酸配列を決定し、相同性検索を実施した結果、すでに分類が完了している GH48 や GH3 の酵素と同一であると報告された[199, 200]。この結果は、触媒能力を持たない非常に大きな骨格タンパク質をセルロソーム形成のために発現しなければならない細菌類のシステムと違い、真菌類は骨格タンパク質にも触媒活性を持たせることで、タンパク質発現の無駄を少しでも省き、効率よくバイオマスを分解する戦略をとっている事を示唆している。

80 年代にセルロソームシステムのコンセプトが発表されて以来、次々にそのシステムが解明されていき、2000 年に入ると次世代シーケンサーの導入により、ゲノム配列の探索がより迅速に容易になり、*Clostridium* 属細菌だけでなく、多くの細菌で非常に多様なセルロソームシステムが次々に同定されている。今やセルロソームの研究分野はセルロソームからセルロソミクスの時代に突入している[202]。

セルロソームが初めて発見されてから 10 年後の 1994 年、セルロソームを人工的に組換える技術がイスラエルの Bayer らによって提唱された [144]。それはデザイナーズセルロソームと呼ばれ、結合特性の異なるコヘシンを含むキメラ骨格タンパク質とそれに対応するドックリンを持つキメラ酵素を用いて、狙い通りの組合せで複合体を形成し、人工のセルロソームを使用した様々な実験が行われた [123, 203-206]。これらの人工セルロソームを用いた研究においても、セルロソームシステムが持つ様々な仕組みや構造が新たに発見されている。コヘシンの数が 1 つや 2 つの小さな骨格タンパク質と様々な分解活性や基質特異性を持つ酵素を複合体にして、それらの酵素の相乗効果や CBM のターゲッティング効果の優位性などが調べられた。そして酵素は遊離状態で混合するよりも、複合体を形成した方が高い分解活性を持つことが実証された [207-209]。相乗効果には他にも近接効果が知られており、複合体を形成することで酵素間の距離が近くなり、基質の分解活性が高くなることが報告されている [209]。遺伝子組換え技術を利用すれば、任意の酵素にドックリンを付加することにより、複合体を形成させることも可能となる。細胞内酵素である  $\beta$ -グルコシダーゼにドックリンを付加し、エンドグルカナーゼとの組合せを利用した人工セルロームの活性を測定した結果では、 $\beta$ -グルコシダーゼはセルロースなどの基質を分解する際に、エンドグルカナーゼの近くに存在している方がセロビオースからグルコースを生成する活性が高まることが報告された [206]。この結果においても近接効果が確認されている。人工セルロソームを利用すると、セルロソームを形成しない細菌でもセルロソームを形成させることができ、遊離状態と複合体形成時の酵素活性の比較に役立っている [109,

208]。その他、立体構造や機能の研究では、各モジュールを繋ぐリンカーは立体構造が崩れるのを防ぎ、柔軟に働けるようになっているという報告がある[210,211]。人工的に生成したミニセルロソームはコヘシンの数が多くないというデメリットもあったが、最近の研究では adaptor scaffoldin の構造を応用し、ミニセルロソームにミニセルロソームを結合する形で、コヘシンの数を増やし、コンポーネントの組合せを増やしている[208]。しかしデザイナーセルロソームを使用した実験では小麦わらの分解活性が、天然のセルロソームの 70%にとどまっており、まだまだ改善の余地が多い[193]。にもかかわらず、天然のセルロソームとは違い、コンポーネントの相互作用のコントロールが容易で確実なことから、これらのシステムや機能、構造を解明するための優れたツールとなっている。

## 第 10 節 本研究について

上述の様に、セルラーゼを取り巻く研究は長年にわたり実に多くの分野で行われており、その進歩は著しい。糖質分解に関わる様々な酵素や生物種も次々に発見されており、多くの機能が明らかとなってきた。しかしながら、植物細胞壁の多様性、複雑さは非常に奥深く、また自然界においてのその分解システムも同じように複雑で多様性に富んでいるので、まだ分からないことは山積みの状態である。当研究室では 1990 年にタイの堆肥から *R. josui* を単離して以来、このバクテリアのバイオマス分解システムについて様々な研究を行ってきた。

これまでのセルロソームに関する研究では、小型のキメラ骨格タンパク質を用いて、人工的に小さなセルロソームを作

製することで、酵素活性の相乗効果や、酵素同士が近接することにより活性が高まる近接効果、CBMによる標的基質へのターゲッティング効果などが報告されている。しかし、骨格タンパク質の全長を用いたセルロソームの研究例は少ない。

本研究においては、*R. josui* の RjCipA の全長を大腸菌の発現系で発現させることに成功した。また、セルロソームの構成成分であるセルラーゼ RjCel5B、キシラナーゼ RjXyn10C およびアラビノキシランアラビノフラノシダーゼ RjAxx43B を発現させ、バイオマスの分解活性や相乗効果について検討した。また、*R. josui* の骨格タンパク質 RjCipA はファミリー 3 の糖質結合モジュール (CBM3) と 6 つのコヘシンから構成されているので、RjCipA と触媒サブユニットの比率を変えて複合体を形成させることにより、酵素間の近接効果や CBM のターゲッティング効果についても検討した。

RjCel5B はセルロースには活性を示したが、ヘミセルロースには全く活性を示さなかった。また、RjXyn10C はキシランに活性を示したがセルロースには活性を示さなかった。RjAxx43B はアラビノキシランからアラビノフラノースを遊離する酵素であり、キシラン主鎖のキシロピラノシド残基の 2 と 3 の両方の位置にアラビノースを持つものから 3 の位置のアラビノースのみを遊離した。第 2 章では、RjCel5B と RjXyn10C について RjCipA との複合体を形成させ、遊離の酵素と複合体の酵素活性を比較し、近接効果やターゲッティング効果について述べた。また第 3 章では、RjAxx43B と RjXyn10C について基質分解に対する相乗効果と RjCipA との複合体形成における近接効果やターゲッティング効果について述べた。これらの結果から、バイオマス分解における複雑なセルロソームシステムの重要性や問題点などについても

考察した。

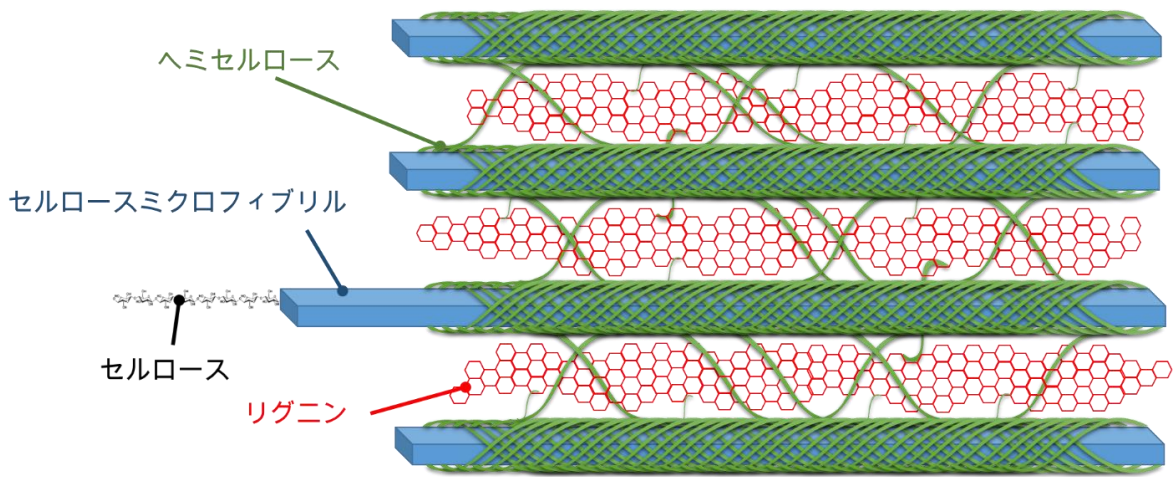


図 1-1 植物細胞壁の構造の模式図

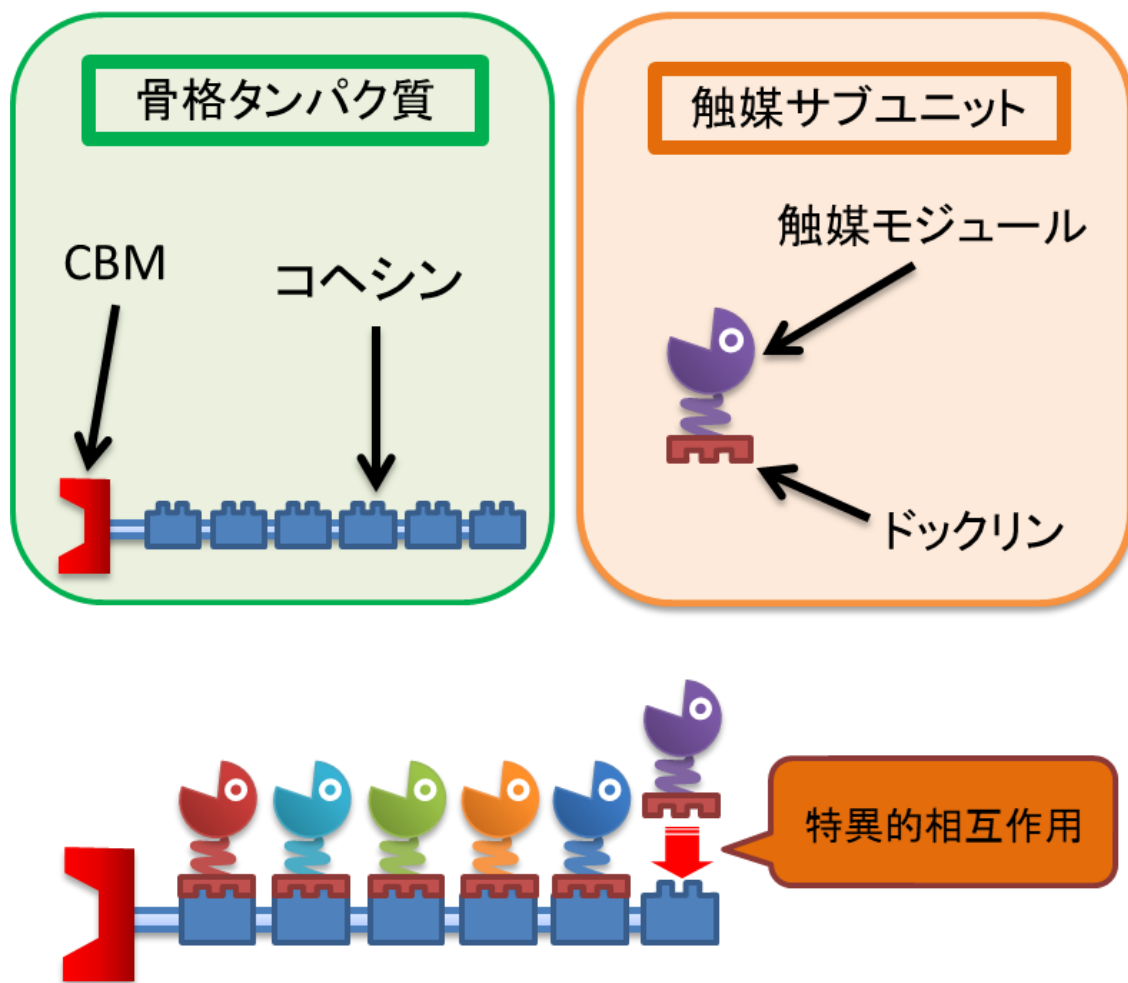


図 1-2 *Ruminiclostridium josui* のセルロソーム模式図



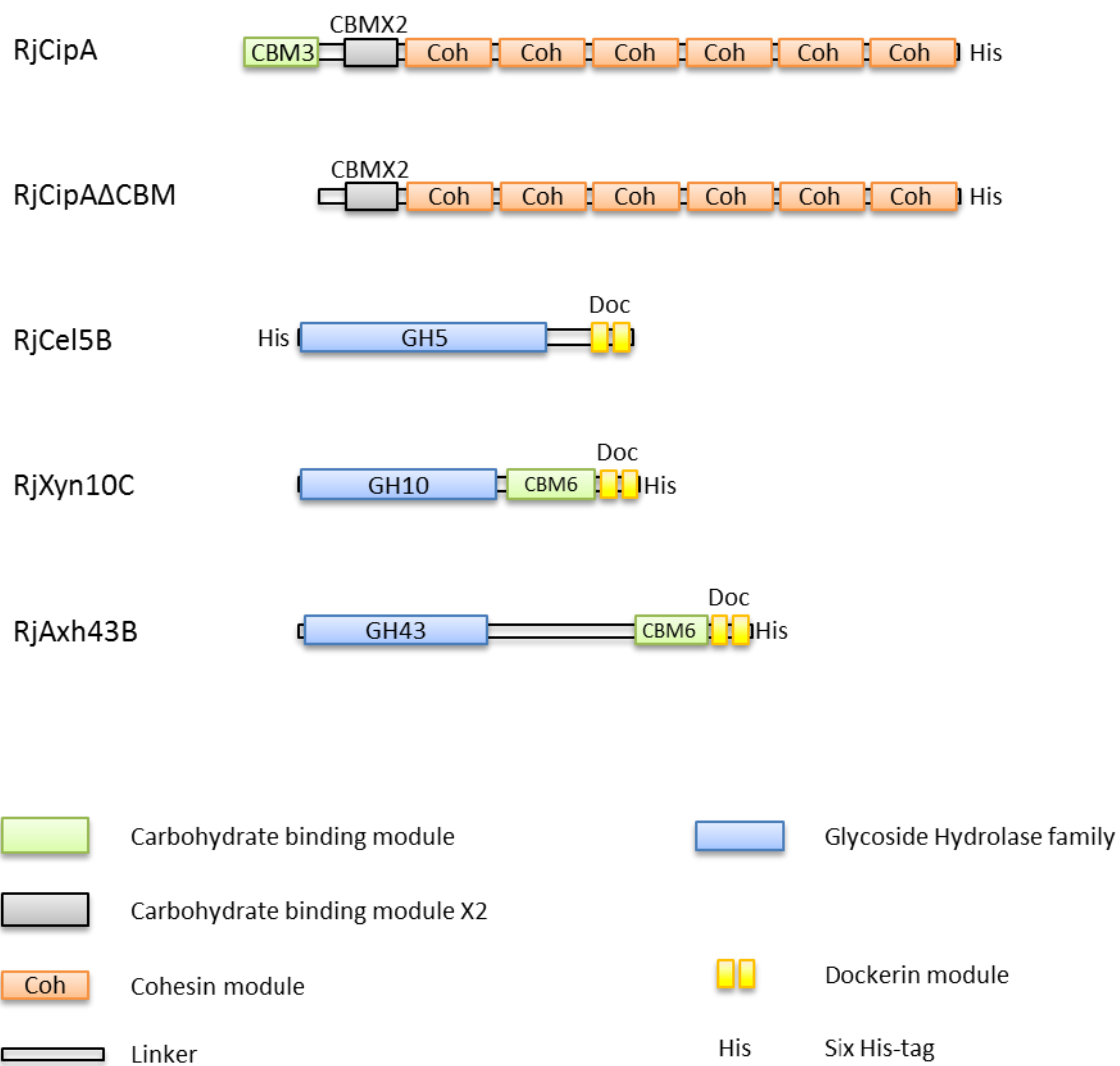


図 1-3 本研究で使用した組換えタンパク質一覧

## 第 2 章 *Ruminiclostridium josui* の RjCel5B および RjXyn10C の酵素特性の解析と全長骨格タンパク質 RjCipA との複合体形成

### 第 1 節 緒言

*Ruminiclostridium josui* は中温性のセルロース分解性嫌気性細菌であり、バイオマス分解酵素を生産し、多酵素複合体であるセルロソームを形成する[168,169]。セルロソームの機能を解析するために、*R. josui* の骨格タンパク質 RjCipA、ドックリンを持つセルラーゼ RjCel5B およびキシラナーゼ RjXyn10C を大腸菌で発現させ、これらの組換えタンパク質の単独での特性を明らかにした。さらに、これらの酵素と RjCipA との複合体の不溶性基質に対する分解能力を調べるため、酵素と RjCipA の比率を変えて複合体を形成させ、分解活性を比較した。

### 第 2 節 実験方法

#### 第 1 項 目的遺伝子のクローニング

RjCipA (Accession no. AB506688)、RjCel5B (Accession no. BAI52933)、RjXyn10C (no. LC145698) の遺伝子領域を PCR 法で増幅し、発現ベクター pET-28a(+)(Novagen) に連結した。PCR に使用したプライマーセットを表 2-1 に示す。組換えタンパク質の C 末端もしくは N 末端側に His-tag が付くようにプラスミドを構築した。RjCipA の CBM3 を欠くタンパク質 (RjCipA $\Delta$ CBM) を発現させるためのプラスミドも同時に構築した。

それぞれの遺伝子領域を、各プライマーセットと LA TaqDNA ポリメラーゼ(タカラバイオ)を用いて、PCR 反応によって増幅させた。得られた DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で分画し、目的の DNA 断片を切り出した。切り出したゲルから GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)を用いて DNA を回収した。抽出した DNA 断片および pET-28a(+)を制限酵素で処理し、アガロースゲル電気泳動を行い、再度 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit を用いて DNA を回収した。制限酵素処理した目的の DNA 断片と pET-28a(+)を 3:1 のモル比で混合し、DNA Ligation kit ver 2.1(タカラバイオ)を用いて 16°C で 3 時間ライゲーション反応を行った。ライゲーション反応液を大腸菌 DH5α コンピテントセルに加え、42°C で 1 分間ヒートショック処理を行った後、1 時間の回復培養を経てカナマイシン(25 µg/ml)(Meiji Seika ファルマ)を含む LB プレートに塗布した。得られたコロニーからプラスミドを抽出し、各々の制限酵素で処理し、アガロースゲル電気泳動にて目的の DNA の挿入を確認した。構築されたプラスミドの挿入断片の塩基配列を CEQ2000DNA シーケンサー (BECKMAN COULTER)を用いて決定し、目的の遺伝子に変異がないことを確認した。これらのプラスミドによりコードされるタンパク質(RjCipA、RjCipAΔCBM、RjCel5B、RjXyn10C)の C 末端もしくは N 末端側には His-tag が付加されている。それらのタンパク質のモジュラー構造を図 1-3 に示す。

## 第 2 項 目的タンパク質の発現と精製

組換えプラスミドを含む大腸菌 BL21(DE3)codon+ RIPL を 25 µg/ml のカナマイシンと 34 µg/ml のクロラムフェニコー

ル(和光純薬)を含む 5 ml の LB 液体培地へ植菌し 16 時間前培養した。2 ml の前培養液を、同じ構成物質を含む Super Broth 培地 [3.5 % Bacto Tryptone (Becton, Dickinson and Company), 2 % Bacto Yeast Extract (Becton, Dickinson and Company), 0.5 % NaCl, pH7.4] 200 ml に植菌し、37°C で振とう培養した。培養液の OD<sub>600</sub> が 1.0 になった時点で Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 1 mM となるように添加し、さらに 3 時間、37°C で振とう培養を行った後、遠心分離 (5,250×g、4°C、10 分間) により菌体を回収した。菌体に 20 ml の 10 mM イミダゾールを含む 50 mM HEPES 緩衝液 (pH7.4) を加えて懸濁し、超音波処理 (Output:3, DutyCycle:40, 20min) (UD-201 型、トミー精工) により菌体を破砕した。破砕液を 12,500×g、4°C、10 分間遠心分離し、上清を新しい遠心管に移し、さらに 25,000×g、4°C、30 分間遠心分離することにより無細胞抽出液を得た。

無細胞抽出液を His Trap<sup>TM</sup> HP カラム (GE Healthcare) に供し、タンパク質を吸着させた後、段階的な濃度のイミダゾールを含む 50 mM HEPES 緩衝液 (pH7.4) でタンパク質を溶出した。

### 第 3 項 SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli の方法 [212] に従い、コンパクト PAGE AE-7300 型装置 (アトー) を使用して行った。濃縮ゲルのアクリルアミド濃度は 4.5% (W/V) とし、分離ゲルは 7.5% とした。分子量マーカーとして HMW Calibration Kit For SDS Electrophoresis (GE Healthcare) を使用した。電気泳動後 CBB Stain One (ナカライテスク) でゲル中のタンパク質を染色した。

#### 第 4 項 タンパク質濃度の測定

Bradford の方法 [213] に従い、Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) を用いてタンパク質の濃度測定を行った。反応には 96 穴マイクロプレートを用いて標準タンパク質としてウシ血清アルブミン (BSA) を用いた。マイクロプレートリーダー 680 型 (BIO RAD) で 595 nm の吸光度を測定した。

#### 第 5 項 天然基質としての稲わら粉末の調製

三重県内の農家から入手した十分に自然乾燥した稲わらを、ハサミで小さく細断し、茶こしネットに入れて鍋で 20 分間煮沸した。その後、鍋の水を取り替え、煮沸処理を 6 回繰り返して行った。これをオートクレーブで 121°C、15 分間処理した後、60°C の乾燥機 (FC-410 型、アドバンテック) 中で 3 日間乾燥させた。乾燥した稲わらは家庭用の電動コーヒーミル機で粉碎し、その粉末を回収した。

#### 第 6 項 酵素活性の測定

基質としてコンニャクグルコマンナン (Megazyme)、大麦  $\beta$ -グルカン (Sigma-Aldrich)、カルボキシメチルセルロース (CMC) (Sigma-Aldrich)、ボールミルセルロース (BMC) (日本製紙ケミカル社の KC フロックより調製)、フナセル (アビセルに相当する微結晶セルロース; フナコシ)、バーチウッドキシラン (Sigma-Aldrich)、不溶性小麦アラビノキシラン (Megazyme)、可溶性小麦アラビノキシラン (Megazyme)、ライ麦アラビノキシラン (Megazyme)、稲わら粉末を使用した。

1% の各基質溶液または懸濁液を使用し、酵素反応液を調製した。50 mM マレイン酸緩衝液 (pH 7.0) 中に基質濃度 0.5%、

酵素濃度 0.01 mg/ml となる様に反応液を調製し、45℃で 10 分間反応させた。基質にフナセルを用いた時のみ、45℃で 16 時間反応させた。反応後、反応液を 100℃で 10 分間加熱し、酵素を失活させた後、氷中で冷却した。反応液(50  $\mu$ l) にジニトロサリチル酸(DNS)試薬(250  $\mu$ l) [214]を加え 5 分間煮沸した後に氷中で冷却し、ミリ Q 水 1.2 ml を加えた。その後、12,000 $\times$ g で 1 分間遠心分離を行い、上清の吸光度(500 nm) を測定した。還元糖の定量のための標準物質にはセルロースを基質とした場合にはグルコースを、キシランを基質とした場合にはキシロースを用いた。また、45℃、1 分間に 1  $\mu$ mol の還元糖を遊離する酵素量を 1 ユニット(U)と定義した。

#### 第 7 項 至適 pH の測定

基質として、RjCel5B には大麦  $\beta$ -グルカンを、RjXyn10C には小麦アラビノキシランを用いた。1.0%の基質溶液 25  $\mu$ l に pH 3.0~10.0 の 500 mM Britton-Robinson 緩衝液(500 mM リン酸、500 mM ホウ酸、500 mM 酢酸、pH 3.0~10.0)[215] を 5  $\mu$ l、ミリ Q 水 15  $\mu$ l と酵素液 5  $\mu$ l を加え、50  $\mu$ l の反応液を調製し、45℃、10 分間酵素反応を行った。遊離した還元糖量を測定し、最も高い活性を示した pH を至適 pH とした。

#### 第 8 項 至適温度の測定

基質として、RjCel5B には大麦  $\beta$ -グルカンを、RjXyn10C には小麦アラビノキシランをそれぞれ用いた。1.0%の基質溶液 25  $\mu$ l に 500 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)を 5  $\mu$ l、ミリ Q 水 15  $\mu$ l と酵素液 5  $\mu$ l を加え、50  $\mu$ l の反応液を調製し、30℃~80℃で 10 分間酵素反応を行った。遊離した還元糖量を測定し、最も高い活性を示した温度を至適温度とした。

#### 第 9 項 pH 安定性の測定

10 mM Britton-Robinson 緩衝液 (pH 3.0~10.0) 中で各酵素を 4℃、16 時間静置した。その後、上記の 1.0% 基質溶液 25  $\mu$ l、500 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 5  $\mu$ l、ミリ Q 水 15  $\mu$ l および各 pH で処理した酵素液 5  $\mu$ l を加え、45℃で 10 分間酵素反応を行い、遊離した還元糖量を DNS 法で測定した。残存活性を、pH 処理を行わなかった酵素液の活性を 100% として相対値で表した。

#### 第 10 項 熱安定性の測定

各酵素を 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 中で 30℃~80℃で 1 時間処理した後、上記の 1.0% 基質溶液 25  $\mu$ l に 500 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 5  $\mu$ l、ミリ Q 水 15  $\mu$ l および各温度で処理した酵素液 5  $\mu$ l を加え、45℃で 10 分間酵素反応を行い遊離した還元糖量を DNS 法で測定した。残存活性を、未処理の酵素液の遊離した還元糖量を 100% として相対値で表した。

#### 第 11 項 薄層クロマトグラフィーによる酵素分解産物の分析

オリゴ糖およびその多糖を各酵素で処理した時の分解産物を、薄層クロマトグラフィーにより調べた。オリゴ糖としてセロオリゴ糖 [グルコース (G1)、セロビオース (G2)、セロトリオース (G3)、セロテトラオース (G4)、セロペンタオース (G5)、セロヘキサオース (G6)] とキシロオリゴ糖 [キシロース (X1)、キシロビオース (X2)、キシロトリオース (X3)、キシロテトラオース (X4)、キシロペンタオース (X5)、キシロヘキサオース

(X6)]を使用し、多糖として大麦  $\beta$ -グルカン、BMC、フナセル、バーチウッドキシラン、可溶性小麦アラビノキシラン、ライ麦アラビノキシランを用いた。10 mg/ml に調製した各オリゴ糖の基質溶液 2  $\mu$ l または 5  $\mu$ l の 1.0% 多糖類の基質溶液に 500 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) を 1  $\mu$ l、酵素を 0.2 U、ミリ Q 水を全量が 10  $\mu$ l になるように加え、40°C で 16 時間反応させた。

薄層クロマトグラフィーには、シリカゲルプレート (TLC シリカゲル 60 プラスチックシート、MERCK) を使用した。展開溶媒として、セルロース系基質の分解物には、1-ブタノール：酢酸：水=2:1:1 を、キシラン系基質の分解物の場合には、ニトロエタン：エタノール：水=1:3:1 を使用した。シリカゲルプレートに反応液をスポットし、各展開溶媒を用いて 2 回展開を行った。プレートを風乾後、ジフェニルアミン-アニリン-リン酸試薬 (ジフェニルアミン 0.1 g、アニリン 0.1 ml、アセトン 5 ml、85% リン酸 0.75 ml) を噴霧し、再度風乾した後、100°C で 10 分間加熱した。プレートに現れたスポットから反応分解物を推定した。

## 第 12 項 不溶性多糖に対する吸着性

不溶性多糖としてフナセル、不溶性小麦アラビノキシラン、稲わら粉末を用いた。200  $\mu$ l の 50 mM マレイン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中に、不溶性多糖 (1.0 mg) と、各タンパク質 (20  $\mu$ g) を含むように試験溶液を調製し、氷上で 1 時間静置した。その後、5,000 $\times$ g で 1 分間遠心分離して上清画分と沈殿画分に分け、それぞれの画分を SDS-PAGE で分析した。タンパク質が基質に吸着すると沈殿画分にタンパク質のバンドが検出され、吸着しないと上清画分に検出される。



### 第 13 項 可溶性多糖に対する吸着性

可溶性多糖として大麦  $\beta$ -グルカン、CMC、バーチウッドキシラン、可溶性小麦アラビノキシラン、ライ麦アラビノキシランを用いた。各タンパク質の吸着性は Native Affinity-PAGE で分析した。終濃度が 0.5% になるように各多糖を加えた 7.5% の SDS を含まないポリアクリルアミドゲルを作製し、コントロールには基質を含まないゲルを使用した。各基質を含むゲルで、それぞれのタンパク質を電気泳動した。標準タンパク質としてウシ血清アルブミン(BSA)を同時に泳動した。ゲルの染色には CBB Stain One を用いた。

### 第 14 項 コヘシン-ドックリン相互作用の確認

20 mM Tris-HCl-10mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.5)中に、RjCel5B または RjXyn10C と RjCipA を 6:1 のモル比で含む反応液を調製し、40°C で 30 分間静置した。その後 Native-PAGE を行った。分離ゲルのアクリルアミドの濃度は 7.5% とし、泳動終了後に CBB Stain One を用いてゲルの染色を行った。

### 第 15 項 複合体の活性測定

20 mM Tris-HCl-10 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.5)中で RjCel5B と RjCipA または RjXyn10C と RjCipA のモル比が 6:0、6:1、6:3、6:6 となるよう混合した。それぞれの混合液を 40°C で 30 分間静置し、異なったモル比の複合体とした。また、RjCel5B、RjXyn10C および RjCipA の 3 者を複合体形成する場合、RjCel5B : RjXyn10C : RjCipA の割合を 3:3:0、3:3:1、3:3:3、3:3:6 とし、上記と同様の方法で複合体を作製した。これらの異なるモル比の複合体を酵素液とした。

1% 基質懸濁液 125  $\mu$ l にマレイン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 25  $\mu$ l、ミリ Q 水 70  $\mu$ l、酵素液 30  $\mu$ l を加え、40°C で 16 時間反応させた。その後、生成された還元糖量を Somogy-Nelson 法 [216] により測定した。また、RjCipA の代わりに RjCipA $\Delta$ CBM を用いた複合体の分解活性についても同様に測定した。

### 第 3 節 結果

#### 第 1 項 RjCipA、RjCipA $\Delta$ CBM、RjCel5B および RjXyn10C の発現と精製

*R. josui* が持つセルロソーム関連遺伝子の中から、骨格タンパク質 RjCipA、これより CBM を取り除いた RjCipA $\Delta$ CBM、セルラーゼ RjCel5B およびキシラナーゼ RjXyn10C の 4 つのタンパク質を大腸菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL を使用して発現させた。精製後、SDS-PAGE によりそれぞれのタンパク質のバンドを確認した(図 2-1)。RjCipA、RjCipA $\Delta$ CBM、RjCel5B、RjXyn10C の予想されるタンパク質の分子質量はそれぞれ、120.6 kDa、110.0 kDa、60.4 kDa、57.7 kDa であり、分子量マーカを参照すると精製したタンパク質の大きさは計算値とほぼ一致していた。精製したこれらのタンパク質は以下の実験で使用した。

#### 第 2 項 RjCel5B と RjXyn10C の酵素特性

RjCel5B と RjXyn10C の基質特異性を調べるために様々な基質を用いて酵素反応を行い、その活性を比較した(表 2-2)。

RjCel5B はコンニャクグルコマンナンに最も高い活性を示し(100.8 $\pm$ 3.4 U/mg-protein)、大麦  $\beta$ -グルカンにも強い活性

が認められた(97.0±2.3 U/mg-protein)。また CMC や BMC にも若干の活性が見られ、微弱だがフナセル(微結晶セルロース)にも活性が見られた。しかし、キシランに対しては全く活性が見られなかった。大麦  $\beta$ -グルカンを基質に用いて異なる pH や温度で活性を測定した結果、RjCel5B の至適 pH は 6.5 で至適温度は 55°C であった。また RjCel5B を異なる pH 条件下で 4°C、16 時間静置したところ、本酵素は pH 4.0~9.0 で安定であり、1 時間の温度安定性試験では 40°C まで活性の低下は見られなかった。

RjXyn10C はバーチウッドキシラン、可溶性の小麦アラビノキシラン、ライ麦アラビノキシランに高い活性を示し、その値はそれぞれ 326.2±25.0 U/mg-protein、238.8±2.3 U/mg-protein、148.0±9.3 U/mg-protein であった。また、本酵素は、不溶性小麦アラビノキシランを分解したが、フナセルや BMC などのセルロース系基質には全く活性を示さなかった。したがって、RjXyn10C は側鎖を持たないキシランを好むエンドキシラナーゼであると判断した。可溶性の小麦アラビノキシランを基質とした場合、RjXyn10C の至適 pH は 6.0 で、至適温度は 50°C であった。また、RjXyn10C は pH 6.0~7.0 で安定であり、40°C、1 時間の熱処理に安定であった。

### 第 3 項 TLC による分解産物の解析

RjCel5B と RjXyn10C をそれぞれセロオリゴ糖、キシロオリゴ糖を基質として 40°C で 16 時間反応させ、反応産物を TLC で分析した。RjCel5B はセロビオースを分解せず、セロトリオースからセロヘキサオースを分解した(図 2-2)。分解産物はセロトリオースを基質とした場合グルコースとセロビオースが、セロテトラオースを基質とした場合、グルコースとセロ

ビオース、セロトリオースが、セロペンタオースを基質とした場合グルコース、セロビオース、セロトリオース、セロテトラオースが、セロヘキサオースを基質とした場合、グルコース、セロビオース、セロトリオース、セロテトラオース、セロペンタオースが分解産物として確認された。BMC やフナセルを基質とした場合、分解産物はセロビオースのみが確認された。

一方、RjXyn10C はキシロビオースに対して微弱な活性を示し、薄いキシロースのスポットが検出された(図 2-3)。キシロトリオースを基質とした時、キシロースとキシロビオースが確認され、キシロトリオースはほぼ分解されていた。キシロテトラオース、キシロペンタオース、キシロヘキサオースでも同様にキシロースとキシロビオースのスポットが確認でき、その他の分解産物は見られなかった。しかしバーチウッドキシランと小麦アラビノキシランにおいては、キシロトリオースやキシロテトラオース、キシロペンタオースなどの分解産物が確認された。

#### 第 4 項 RjCipA、RjCel5B および RjXyn10C の多糖への吸着性

RjCipA、RjCel5B および RjXyn10C の様々な多糖への吸着性を調べた。不溶性多糖については SDS-PAGE で、可溶性多糖については Native Affinity-PAGE により分析した。

RjCipA は不溶性多糖ではフナセルと稲わら粉末、可溶性多糖では大麦  $\beta$ -グルカン、可溶性小麦アラビノキシランに対して吸着性を示したが、不溶性小麦アラビノキシランには吸着しなかった(図 2-4、図 2-5)。

RjCel5B はフナセルと稲わらに弱い吸着性を示し、大麦  $\beta$ -

グルカンにも吸着したが、不溶性小麦アラビノキシランには全く吸着しなかった(図 2-6、図 2-7)。

RjXyn10C ではフナセルや稲わら粉末に弱い吸着性がみられたが、不溶性小麦アラビノキシランには吸着しなかった。一方、可溶性小麦アラビノキシランには比較的強い吸着性が見られた(図 2-8、図 2-9)。

#### 第 5 項 RjCipA と RjCel5B または RjXyn10C との相互作用

RjCipA と RjCel5B または RjXyn10C がコヘシンとドックリンの相互作用を介して複合体を形成することを Native-PAGE で確認した(図 2-10)。RjCipA にはコヘシンが 6 つ含まれているため(図 1-3)、RjCipA と RjCel5B を 10 mM カルシウムイオン存在下で 1:6 のモル比で混合し、40℃で 30 分間静置した。その後、Native-PAGE を行い、電気泳動後のバンドを確認したところ、RjCipA および RjCel5B の単体のバンドは消失し、新たなバンドが出現したことから、コヘシン、ドックリン相互作用により、RjCel5B-RjCipA 複合体を形成していることが確認された(図 2-10)。RjCipA と RjXyn10C を 1:6 のモル比で混合したときにも、同様の結果が見られ、バンド位置が大きく移動していることから、RjXyn10C-RjCipA 複合体を形成していることが確認された(図 2-10)。

#### 第 6 項 RjCel5B-RjCipA 複合体のフナセルおよび稲わら粉末に対する分解活性

RjCel5B と RjCipA を 6:0、6:1、6:3、6:6 のモル比で混合し、複合体を形成させた。これらの複合体をフナセルおよび稲わら粉末を基質とし、40℃、16 時間反応させた。その後、反応液中に遊離した還元糖量を測定した。RjCel5B-RjCipA 複

合体のそれぞれの基質に対する酵素活性の値を表 2-3 に示す。RjCel5B 単体(6:0)がフナセルから生成した還元糖量を 1 とすると、6:1 の RjCel5B-RjCipA 複合体の相対的な活性は 2.8、6:3 複合体では 3.7、6:6 複合体では 6.6 となった。また、稲わら粉末を基質とした場合も同様に、RjCel5B 単体(6:0)の値を 1 とした場合、6:1、6:3、6:6 の複合体の値はそれぞれ、3.9、5.6、11.5 であった。

#### 第 7 項 RjXyn10C-RjCipA 複合体の不溶性小麦アラビノキシランと稲わら粉末に対する分解活性

RjCel5B-RjCipA 複合体と同様に 6:0、6:1、6:3、6:6 のモル比の RjXyn10C-RjCipA 複合体を作製し、不溶性小麦アラビノキシランと稲わら粉末を基質として 40℃、16 時間反応させた。その後、反応液中に遊離した還元糖量を測定し、相対活性を比較した(表 2-4)。RjXyn10C 単体(6:0)が不溶性小麦アラビノキシランから生成した還元糖量を 1 とし、複合体 6:1、6:3、6:6 の相対活性を計算した。6:1 の RjXyn10C-RjCipA 複合体では 0.45、6:3 複合体では 0.54、6:6 複合体では 1.0 となった。また、稲わら粉末から生成した還元糖量を 1 とした場合、RjXyn10C-RjCipA が 6:1 複合体では 0.28、6:3 複合体では 0.83、6:6 複合体では 1.2 という値となり、複合体を形成することで活性が低下する現象が観察された。

#### 第 8 項 RjCel5B-RjXyn10C-RjCipA 複合体の稲わら粉末に対する分解活性

RjCel5B と RjXyn10C を RjCipA と混合し、複合体を作製した。RjCel5B-RjXyn10C-RjCipA が 3:3:0、3:3:1、3:3:3、3:3:6 のモル比になる様に複合体を作製し、天然基質である稲

わら粉末を基質として、40℃、16時間反応を行い、その活性を比較した(表 2-5)。RjCel5B と RjXyn10C の混合酵素が稲わら粉末から遊離する還元糖量を 1 とし、それぞれの複合体の活性の相対活性を示した。RjCel5B-RjXyn10C-RjCipA の 3:3:1 複合体では 1.3、3:3:3 複合体では 1.5、3:3:6 複合体では 2.4 となった。

#### 第 9 項 RjCel5B-RjCipA $\Delta$ CBM 複合体のフナセルと稲わら粉末に対する分解活性

RjCel5B-RjCipA $\Delta$ CBM 複合体のフナセルと稲わらに対する分解活性を測定した。RjCel5B と RjCipA $\Delta$ CBM の比率を 6:0、6:1、6:3、6:6 とした時の複合体の分解活性値を表 2-6 に示した。RjCel5B を、RjCel5B-RjCipA 複合体にすることにより、フナセルおよび稲わら粉末に対する活性は高くなったが(表 2-3)、RjCipA から CBM を除いた RjCipA $\Delta$ CBM との複合体にした時、両基質に対する活性の上昇は低くなり、フナセルに対する 6:6 複合体の活性は RjCel5B 単体の値に比べ低下した(表 2-6)。

#### 第 10 項 RjXyn10C-RjCipA $\Delta$ CBM 複合体の不溶性小麦アラビノキシランと稲わら粉末に対する分解活性

RjCipA $\Delta$ CBM を用いて RjXyn10C との複合体を作製し、不溶性小麦アラビノキシランと稲わらに対する分解活性を測定した(表 2-7)。RjXyn10C 単体(6:0)が不溶性小麦アラビノキシランおよび稲わら粉末から遊離した還元糖量を 1 とし、6:1、6:3 または 6:6 の RjXyn10C-RjCipA $\Delta$ CBM 複合体の相対活性値を示した。不溶性小麦アラビノキシランを基質とした場合 6:1 複合体では 0.79、6:3 複合体では 0.86、6:6 複合体では

1.36 となった。また、稲わら粉末を基質とした場合、6:1 の RjXyn10C-RjCipA $\Delta$ CBM 複合体では 1.52、6:3 複合体では 1.54、6:6 複合体では 1.76 となった。これらの値は、RjXyn10C-RjCipA 複合体で得られた値よりも大きく、複合体効果が見られた(表 2-4、2-7)。

#### 第 4 節 考察

##### 第 1 項 RjCipA の発現と精製

今回精製した RjCipA の大きさは 120.6 kDa で、予想されるタンパク質の分子量と一致していた(図 2-1)。*R. josui* の CipA の大きさは 120.2 kDa であり、これは *R. thermocellum* の CipA (196.8 kDa) (Q06851.2) や *R. cellulolyticum* の CipC (158.7 kDa) (AAC28899.2)、*C. cellulovorans* の CbpA (174.6 kDa) (ADL52520.1) に比べ、やや小さい。*R. thermocellum* の骨格タンパク質全長のクローニングと発現は、大腸菌や *T. saccharolyticum* ですでに報告されているが、主として大腸菌システムを用いて研究されてきた[217-220]。近年の研究では、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成技術 (ENDEXT) でセルロソームを発現、精製して使用している例がある[221]が、研究例は少ない。本研究では、*R. josui* のセルロソーム骨格タンパク質 CipA の全長に His-tag を付与した RjCipA および、CBM3 を除去した RjCipA $\Delta$ CBM を pET-28a(+)ベクターと大腸菌 BL21(DE3)RIPL codon plus を用いて、発現精製することができた。これらは煩雑な作業を伴わず、従来通りの方法で簡単に精製、利用することができるので、セルロソームの機能の解析に有用である。



## 第 2 項 RjCel5B および RjXyn10C の酵素特性

多くの糖質分解酵素はそのアミノ酸配列の類似性により様々なファミリーに分類されている。同じファミリーに属する酵素であっても、基質特異性は非常に多様である。CAZy のデータベースによるとファミリー 5 の糖質分解酵素にはエンド- $\beta$ -1,4-グルカナーゼ、セルロース  $\beta$ -1,4-セロビオシダーゼ、エンド- $\beta$ -1,4-キシラナーゼ、マンナンエンド- $\beta$ -1,4-マンノシダーゼの他、多数の基質特異性が異なる酵素が含まれている。RjCel5B はファミリー 5 に属する酵素であり、*R. cellulolyticum* の Cel5N [222]に高い相同性を示した。Cel5N が CMC に対して高い活性を持つことが報告されていることから、*R. josui* の Cel5B はエンド型のセルラーゼであることが予想された。表 2-2 の通り、RjCel5B はコンニャクグルコマンナンと大麦  $\beta$ -グルカンに高い活性を示し、CMC や BMC にも中程度の活性が見られた。また微結晶性のセルロースであるフナセルにも微弱ではあるが活性を示した。また、TLC でのセロオリゴ糖を基質にした時の反応生成物を見ると、セロトリオースからはグルコースとセロビオースが、セロテトラオースからはセロビオースが、セロペンタオースからはグルコースとセロビオースが、セロヘキサオースからはグルコースとセロビオース、セロトリオースが生成されていることが確認された(図 2-2)。また BMC やフナセルを基質とした場合セロビオースのみが生成されることから、RjCel5B はセロトリオース以上のセロオリゴ糖に活性を持つ、エンドグルカナーゼであることが示唆された。またセロトリオースを基質とした場合にセロテトラオースのスポットが、セロテトラオースを基質とした場合にセロペンタオースのスポットが検出されたことから、糖転移活性を有する可能性が示唆された。

RjXyn10C はバーチウッドキシランに最も高い活性を示し、その他可溶性小麦アラビノキシランやライ麦アラビノキシランにも高い活性を示した(表 2-2)。不溶性小麦アラビノキシランにも中程度の活性を示したが、BMC や CMC などのセルロース系多糖には全く反応が見られず、RjXyn10C は側鎖の修飾がないキシランを好むキシラナーゼであることが分かった。

キシロオリゴ糖を基質とした時、キシロビオースを除くすべての基質でキシロースとキシロビオースが主要な反応産物として確認された(図 2-3)。また、キシランを基質とした時、キシロースとキシロビオースの他、より大きなキシロオリゴ糖も検出されたことから、RjXyn10C はキシロース残基 3 つ以上の基質を分解し、キシロースおよびキシロビオースを生成するエンドキシラナーゼであることが分かった。これらの性質は *Ruminiclostridium stercorarium* の XynC [223] や *Paenibacillus curdolanolyticus* Xyn10B [224] および Xyn10D [225] の性質に類似している。

### 第 3 項 各タンパク質の多糖への吸着性

RjCipA、RjCel5B および RjXyn10C の多糖に対する吸着性を調べた。RjCipA に含まれる CBM3 は不溶性のセルロースに親和性があることが報告されており [226]、本研究においても全長の RjCipA が稲わらやフナセルに良く吸着することが示された(図 2-4)。

RjCel5B 分子には CBM は含まれていないが、可溶性で良好な基質である、大麦  $\beta$ -グルカンに若干の親和性を示した(図 2-7)。ただし、Native Affinity-PAGE の泳動中に大麦  $\beta$ -グルカンを分解する可能性があり、親和性の大きさを正確に評価することはできない。

RjXyn10C はそのモジュール構造にファミリー 6 の CBM(CBM6)を持っており、CAZy のデータベースを参照すると、CBM6 は  $\beta$ -1,4-グルカン、 $\beta$ -1,3-グルカン、 $\beta$ -1,4-キシランに吸着する事が報告されている [227]。今回の実験では不溶性多糖ではフナセルや稲わら粉末に (図 2-8)、可溶性基質では小麦アラビノキシランに親和性を示した (図 2-9)。RjXyn10C のバンドの移動度の変化は小さかったが、RjXyn10C は可溶性小麦アラビノキシランに強い活性を持っているので、ゲル中でアラビノキシランを分解し、移動度の変化を小さくした可能性がある。

#### 第 4 項 RjCipA と RjCel5B または RjXyn10C との相互作用

*R. josui* の CipA にはコヘシンが 6 つ含まれており (図 1-2)、一つの骨格タンパク質にドックリンを持つ触媒サブユニットが合計 6 つ結合することができる。RjCel5B と RjCipA、RjXyn10C と RjCipA をそれぞれ 6:1 のモル比で混合し Native-PAGE で確認したところ、複合体となった RjCel5B-RjCipA と RjXyn10C-RjCipA のバンドはそれぞれのタンパク質のバンドとは異なる位置に検出され、コヘシンとドックリンの相互作用により複合体が形成されていることが確認された (図 2-10)。また、複合体形成後は RjCipA、RjCel5B、RjXyn10C いずれの位置にもバンドが確認されないため、ほぼすべてのコヘシンに RjCel5B もしくは RjXyn10C が定量的に結合していることが確認できた。神藤らは、RjCipA のコヘシン 1, 2, 5 および 6 をそれぞれ発現させ、*R. josui* の Aga27A および Cel8A のドックリンとの親和性を表面プラズモン共鳴法で測定した。その結果、コヘシン 1 と Cel8A ドックリン間の解離定数は  $4.4 \times 10^{-9}$ 、コヘシン 2 と Cel8A ドックリン間の

解離定数は  $1.3 \times 10^{-10}$  と約 30 倍の差が見られた [228]。しかし、親和性が低い組み合わせでも  $10^{-9}$  のレベルであり、RjCipA の 6 つのコヘシン全てに RjCel5B または RjXyn10C が結合することを裏付けている [228]。 *R. thermocellum* の CipA と CelD [217] または CelE [218] の報告でも、すべてのコヘシンへの酵素の結合が観察されている。

第 5 項 RjCel5B-RjCipA 複合体の不溶性基質に対する活性  
セルロソームを形成しない真菌類や好気性細菌の糖質分解酵素のほとんどは、触媒モジュールと CBM で構成されているのに対して、セルロソームを形成する嫌気性細菌の糖質分解酵素には CBM を持たないものが多数存在する。セルロソームを形成する細菌では、酵素の複合体を形成する骨格タンパク質に CBM が存在するため、各酵素のモジュラー構造の中に必ずしも CBM が必要なわけではない。RjCel5B も CBM を持たないので、可溶性多糖であるコンニャクグルコマンナンや大麦  $\beta$ -グルカンには高い活性を示したが、不溶性で結晶構造を持つフナセルに対する活性は非常に小さい値となった。しかし、RjCel5B は RjCipA と複合体を形成するとフナセルに対しての活性が著しく上昇し(表 2-3)、結晶性セルロースの分解において、RjCipA に含まれている CBM3 の重要性が確認された。

本実験では、RjCel5B-RjCipA 複合体における両成分のモル比を、RjCel5B を一定にした状態で RjCipA の割合を徐々に高くして酵素活性にどのような影響があるかを調べた。RjCel5B : RjCipA をそれぞれ 6:0、6:1、6:3、6:6 で混合し、複合体を形成したものを酵素反応に使用し、フナセルと稲わら粉末についてその酵素活性を測定した(表 2-3)。フナセルに

対しても、稲わら粉末に対しても、RjCipAの割合を高くするにつれてRjCel5Bの活性は高くなり、RjCel5B:RjCipAが6:6で最大となり、RjCel5B単体での活性と比べ、それぞれ6.6倍と11.5倍になった。このことから、RjCel5Bはフナセルや稲わら粉末に対しての吸着性を持つが(図2-6)、RjCipAに含まれるCBM3がRjCel5Bの基質へのターゲッティングを促進し、分解効率を上昇させたことを強く示唆した。

モジュラー構造を持つ酵素に含まれるCBMを人為的に除去することにより、酵素の分解活性が著しく低下するという現象が多く報告されている[225, 229, 230]。本実験においてもRjCipAからCBM3を除去したRjCipA $\Delta$ CBMを作製し(図1-1)、RjCel5B-RjCipA $\Delta$ CBMを6:0、6:1、6:3、6:6の割合で作製し酵素反応を行ったところ、RjCel5Bの活性はほとんど上昇することなく、複合体を形成することによる相乗効果は得られなかった(表2-5)。この結果は、RjCipAのCBM3の重要性を示すものである。

Garcia-Campayoらは*R. thermocellum*のCipA全長を大腸菌によるタンパク質発現システムで得ることに成功しており、CBMを取り除いたRtCel9AとRtCipA全長との複合体を作製した[217]。その報告によるとRtCel9A:RtCipAを2.9:1のモル比で複合体を形成すると、Avicelへの活性はRtCel9A単体に比べて11.3倍になり、RtCel9A:RtCipAを5.7:1とすると15.8倍になったと述べられている[217]。これとは対照的に、本研究で使用したRjCel5BではRjCipAに対して低い割合の方が活性は高くなる結果が得られた。この結果とは対照的に、RjCel5Bでは酵素同士が近接することで起こることが期待される活性増強効果、すなわち近接効果は見られなかった。*R. thermocellum*と*R. josui*でこのような違

いかなぜ起こるかは、今のところ明確ではないが、Ciruelaらの研究によると、*R. thermocellum* の RtCel5C : RtCipA を 9:1 でセルロソームを形成しても、RtCel5C 単独にくらべ 1.6 倍しか活性が上がらなかった事なども報告されており [218]、近接効果は酵素の特性に依存する可能性があると思われる。

Fierobe らはキメラ骨格タンパク質を作製し、小さな複合体で酵素活性に対する影響を調べた結果、糖質分解酵素の複合体の機能として、いくつかの触媒モジュールが近接することで分解効率が上がる近接効果と、骨格タンパク質に含まれる CBM の基質へ結合することで触媒モジュールを標的基質へ引き付けるターゲッティング効果の 2 つが挙げられると述べている [123, 207]。RjCel5B-RjCipA 複合体における稲わらへの活性測定では 6:1 と 6:6 を比べることで骨格タンパク質に含まれる CBM3 のターゲッティング効果は特に重要であることがわかり、大きな相乗効果を得られたが、RjCel5B 同士での近接効果は見られなかった(表 2-3)。稲わらを構成している主な成分はセルロースとヘミセルロース、リグニンであり、それらはそれぞれ 40%、25%、10%の含有率でセルロースが多く [231]、図 2-4 が示す通り、RjCipA の CBM3 は稲わらに良く吸着するので、RjCel5B においては CBM によるターゲッティング効果が触媒モジュールの近接効果よりも大きな影響を与えた可能性が示唆された。

#### 第 6 項 RjXyn10C-RjCipA 複合体の不溶性基質に対する分解活性

セルラーゼだけでなく、キシラナーゼにおいても CBM は不溶性基質の分解に大きな役割を果たしており、*R. stercorarium* の Xyn10B や *P. curdlanolyticus* の Xyn10D な

どでよく調べられている [229, 232]。しかし、本研究で用いた RjXyn10C と RjCipA は両者とも、不溶性の小麦アラビノキシランに吸着性を示さず (図 2-4)、可溶性の小麦アラビノキシランに対しては RjXyn10C のみが吸着した (図 2-8)。そして RjCel5B-RjCipA 複合体とは違い、RjXyn10C-RjCipA 複合体による不溶性基質の分解において、CBM3 のターゲッティング効果による相乗効果は得られなかった (表 2-4)。6:6 のモル比で混合した RjXyn10C:RjCipA 複合体を用いて不溶性小麦アラビノキシランに対する分解活性を測定したところ、RjXyn10C 単体での分解活性とほぼ同じ値となり、さらに CBM3 を除去した RjCipA $\Delta$ CBM を使用しても同様の結果が得られたため、RjCipA の CBM3 が不溶性小麦アラビノキシランには機能していないことが確認された (表 2-4)。一方、6:1 と 6:3 の RjXyn10C-RjCipA 複合体では不溶性小麦アラビノキシランに対する分解活性が RjXyn10C 単体での活性に比べて約 2 分の 1 に減少した。

また、稲わら粉末を基質として用いた場合、6:1 と 6:3 の RjXyn10C-RjCipA 複合体の活性は RjXyn10C 単体の時の活性に比べそれぞれ 28%、83% になり、不溶性小麦アラビノキシランを基質とした場合と少し異なった結果となった。また RjXyn10C-RjCipA $\Delta$ CBM 複合体を使用すると、6:1 と 6:3 複合体では 1.5 倍、6:6 複合体では 1.8 倍の複合体効果が得られた (表 2-7)。これらの結果は、RjCipA の CBM3 は稲わら粉末のセルロースに吸着するので、その標的基質 (結晶性セルロース) への吸着能力が RjXyn10C の持つ CBM6 の標的基質 (可溶性キシラン) への吸着能力に勝ることで、RjXyn10C を基質であるキシランから引き離す「隔離効果」が生じ、さらに近接効果も負に働き、それらのバランスの中で RjXyn10C が働い

た結果であると予想される。すでに述べた通り、稲わらにはセルロースとキシラン、その他さまざまな高分子構造が含まれるため、RjCipA と RjXyn10C を複合体として結合すると、セルロースに吸着しようとする力とキシランに吸着させる力が同時に働くこととなり、セルロースに吸着する力の方が強かった場合、触媒モジュールを標的基質から遠ざけてしまう「隔離効果」が生じると思われる。

#### 第 7 項 RjCel5B-RjXyn10C-RjCipA 複合体の稲わら粉末に対する分解活性

遊離状態の RjCel5B と RjXyn10C の混合酵素液(3:3:0)の稲わら粉末に対する分解活性を 1 とした場合、3:3:1 複合体および 3:3:3 複合体の値はそれぞれ 1.3 と 1.5 であり、特に大きな複合体形成効果は得られなかったが、3:3:6 複合体の場合は 2.4 倍の複合体形成効果が見られた(表 2-4)。しかし、RjCel5B-RjCipA 複合体においては 6:6 で 11.5 倍となっており(表 2-3)、RjXyn10C-RjCipA 複合体では 6:6 の場合 1.2 倍となっている(表 2-4)。これらの結果を考慮すると、RjCipA に含まれる CBM3 の結晶性セルロースへのターゲッティング効果による RjCel5B の複合体形成効果と、この CBM3 による RjXyn10C の隔離効果が同時に働くために、全体として大きな複合体形成効果を得ることができなかったと推察される。

Fierobe らは、3 つの異なる触媒サブユニットを結合させることができる小さなキメラ骨格タンパク質を作製し、複合体形成実験を行った [123]。触媒サブユニットには *R. cellulolyticum* 由来のセルラーゼを 6 種類使用し、微結晶セルロースおよび麦わらに対する分解活性を測定した結果、すべての複合体で遊離の状態より 2~6 倍の活性上昇が見られ



た。この研究で使用したキメラ骨格タンパク質は *R. thermocellum* 由来、*R. cellulolyticum* 由来および *R. flavefaciens* 由来のコヘシンで構成されているため、コヘシンとドックリンの種特異性により、1 つの骨格タンパク質に対し、3 つの異なる触媒サブユニットが結合した複合体となっていた [123]。また、平野らの研究では、稲わらなどの天然基質に対しては結合する触媒ユニットの種類が多ければ多いほど複合体における活性は高くなることが報告されている [233]。本章の実験では 2 種類の基質特性の全く異なる酵素(セルラーゼとキシラナーゼ)を触媒サブユニットとして使用しているので、ターゲッティング効果などにおいて負の要因が生じ、高い複合体形成効果が得られなかったと考えられた。

## 第 8 項 まとめ

本章の実験で、*R. josui* の骨格タンパク質 RjCipA の大腸菌の発現システムを用いた発現に成功し、His-tag を用いて簡便に精製することができた。これにより、*R. josui* のセルロソームの働きについて、全長の RjCipA を用いて検討することが可能となった。RjCipA にはコヘシンが 6 つあり、そのコヘシンとセルラーゼ RjCel5B とキシラナーゼ RjXyn10C に含まれるドックリンを結合させることにより、酵素複合体の形成にも成功した。

RjCel5B-RjCipA の複合体では、基質の分解に RjCipA に含まれる CBM3 のターゲッティング効果が重要な役割を果たし、大きな複合体形成効果をもたらしたが、RjCel5B 分子同士の近接効果は見られなかった。このことから RjCel5B においては CBM3 のターゲッティング効果の方が近接効果よりも重要であると考えられた。

RjXyn10C-RjCipA 複合体では、稲わらを基質とした時、RjCipA が持つ CBM3 のセルロースへのターゲティング効果が RjXyn10C に含まれる CBM6 の可溶性キシランへのターゲティング効果を打ち消し、RjXyn10C を基質から隔離する効果をもたらすことにより、複合体形成効果は得られず逆に負の働きをする結果となった。これらの現象をより詳細に検討する為には各 CBM の特性について解析する必要がある。

本研究において、大腸菌の発現システムを利用した *R. josui* の全長骨格タンパク質の発現と精製が可能になった。この系は、セルロソームの研究を行うための便利で利用しやすい実験材料を提供する。

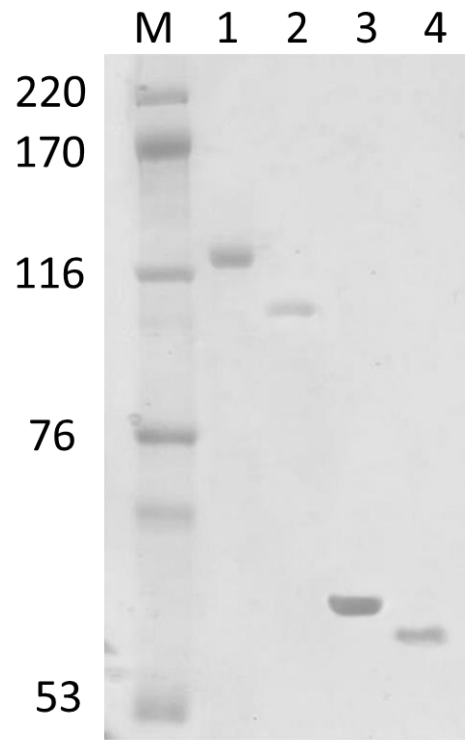


図 2-1 精製した組換えタンパク質の SDS-PAGE

レーン M: 分子量マーカー

レーン 1: RjCipA

レーン 2: RjCipA $\Delta$ CBM

レーン 3: RjCel5B

レーン 4: Rjxyn10C

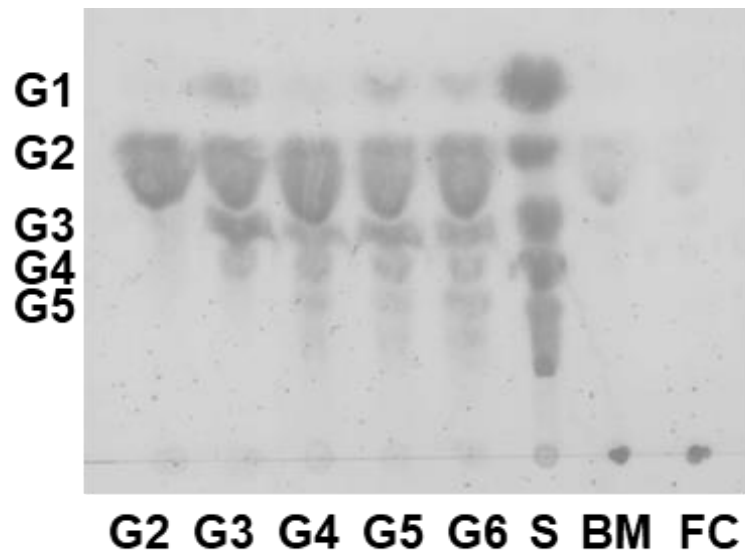


図 2-2 RjCel15B によるセロオリゴ糖、BMC およびフナセルの分解産物の TLC

反応条件： 40℃；16 時間；酵素量 0.2 U

基質

S：標準物質(グルコース～セロペンタオース)

G2：セロビオース

G3：セロトリオース

G4：セロテトラオース

G5：セロペンタオース

G6：セロヘキサオース

BM：BMC

FC：フナセル

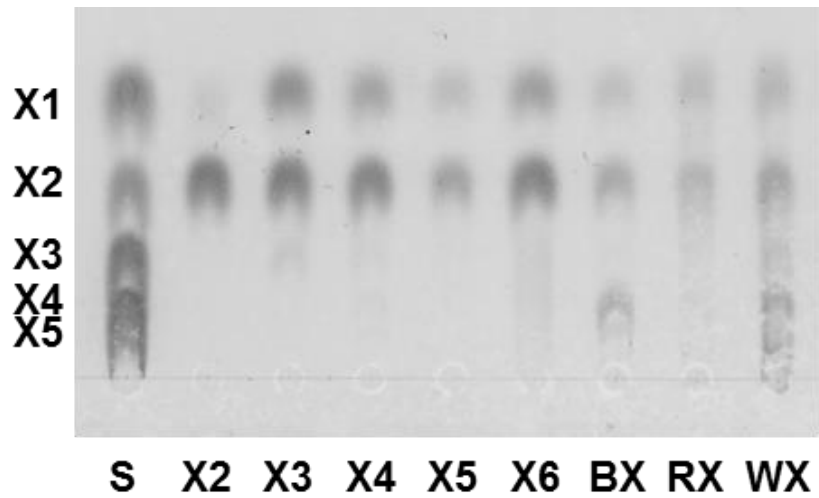


図 2-3 RjXyn10C によるキシロオリゴ糖、バーチウッドキシラン、ライ麦アラビノキシランおよび小麦アラビノキシランの分解産物の TLC

反応条件： 40℃； 16 時間； 酵素量 0.2 U

S：標準物質(キシロース～キシロペンタオース)

X1：キシロース

X2：キシロビオース

X3：キシロトリオース

X4：キシロテトラオース

X5：キシロペンタオース

X6：キシロヘキサオース

BX：バーチウッドキシラン

RX：ライ麦アラビノキシラン

WX：可溶性小麦アラビノキシラン

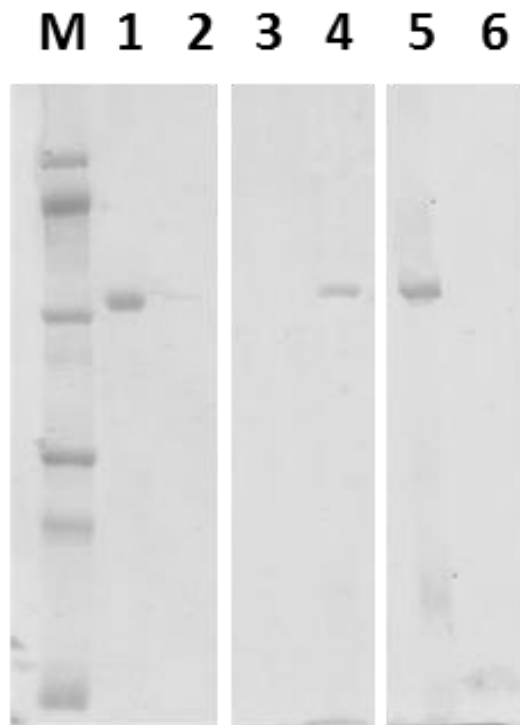


図 2-4 RjCipA の不溶性多糖に対する吸着性の SDS-PAGE による解析

RjCipA をフナセル、不溶性小麦アラビノキシランまたは稲わら粉末と混合し、氷中で 1 時間静置した後、遠心分離により上清と沈殿に分け、両画分を SDS-PAGE に供した。

- レーン 1：沈殿 フナセル
- レーン 2：上清 フナセル
- レーン 3：沈殿 不溶性小麦アラビノキシラン
- レーン 4：上清 不溶性小麦アラビノキシラン
- レーン 5：沈殿 稲わら粉末
- レーン 6：上清 稲わら粉末

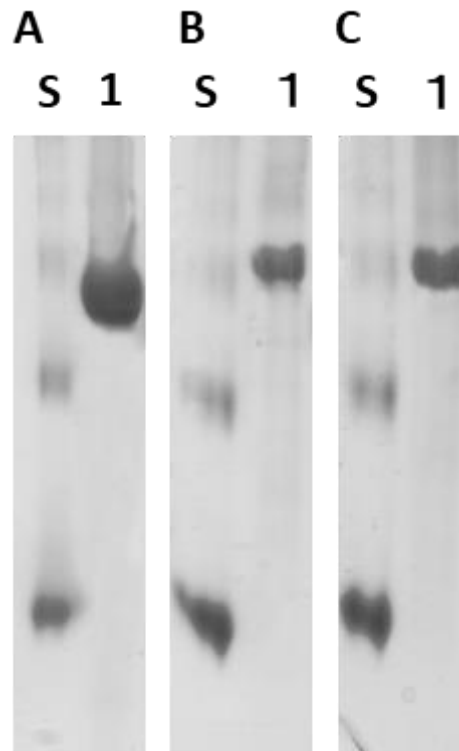


図 2-5 RjCipA の可溶性多糖に対する吸着性の Native affinity-PAGE による解析

A:コントロール B:大麦  $\beta$ -グルカン C:可溶性小麦アラビノキシラン

レーン S : BSA

レーン 1 : RjCipA

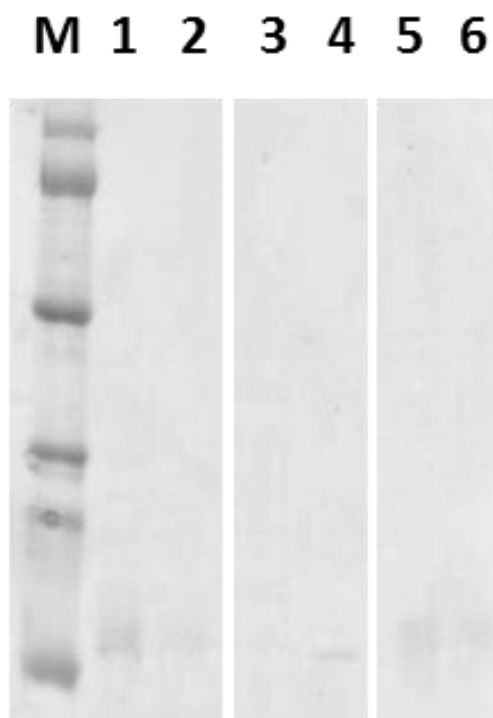


図 2-6 RjCel15B の不溶性多糖に対する吸着性の SDS-PAGE による解析

RjCel15B をフナセル、不溶性小麦アラビノキシランまたは稲わら粉末と混合し、水中で 1 時間静置した後、遠心分離により上清と沈殿に分け、両画分を SDS-PAGE に供した。

- |       |   |    |               |
|-------|---|----|---------------|
| レーン 1 | ： | 沈殿 | フナセル          |
| レーン 2 | ： | 上清 | フナセル          |
| レーン 3 | ： | 沈殿 | 不溶性小麦アラビノキシラン |
| レーン 4 | ： | 上清 | 不溶性小麦アラビノキシラン |
| レーン 5 | ： | 沈殿 | 稲わら粉末         |
| レーン 6 | ： | 上清 | 稲わら粉末         |



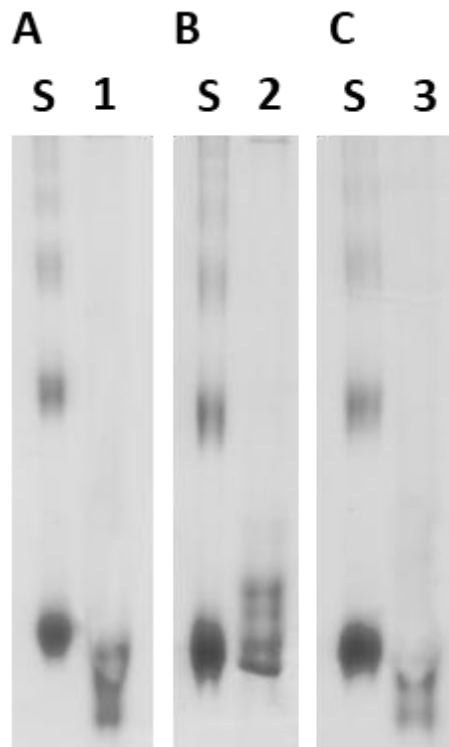


図 2-7 RjCel5B の可溶性多糖に対する吸着性の Native affinity-PAGE による解析

A:コントロール B:大麦  $\beta$ -グルカン C:可溶性小麦アラビノキシラン

レーン S : BSA

レーン 1 : RjCel5B

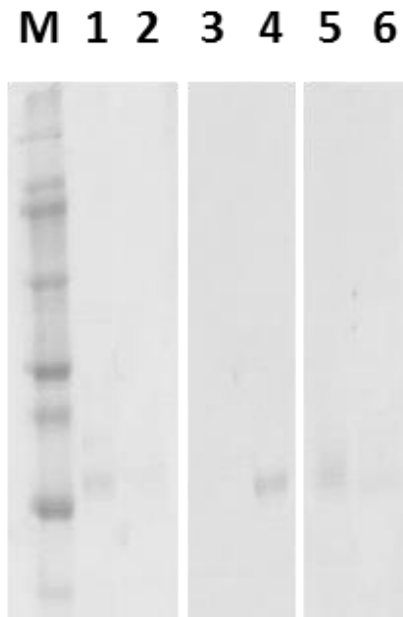


図 2-8 RjXyn10C の不溶性多糖に対する吸着性の SDS-PAGE による解析

RjXyn10C をフナセル、不溶性小麦アラビノキシランまたは稲わら粉末と混合し、氷中で 1 時間静置した後、遠心分離により上清と沈殿に分け、両画分を SDS-PAGE に供した。

- |       |   |    |               |
|-------|---|----|---------------|
| レーン 1 | ： | 沈殿 | フナセル          |
| レーン 2 | ： | 上清 | フナセル          |
| レーン 3 | ： | 沈殿 | 不溶性小麦アラビノキシラン |
| レーン 4 | ： | 上清 | 不溶性小麦アラビノキシラン |
| レーン 5 | ： | 沈殿 | 稲わら粉末         |
| レーン 6 | ： | 上清 | 稲わら粉末         |

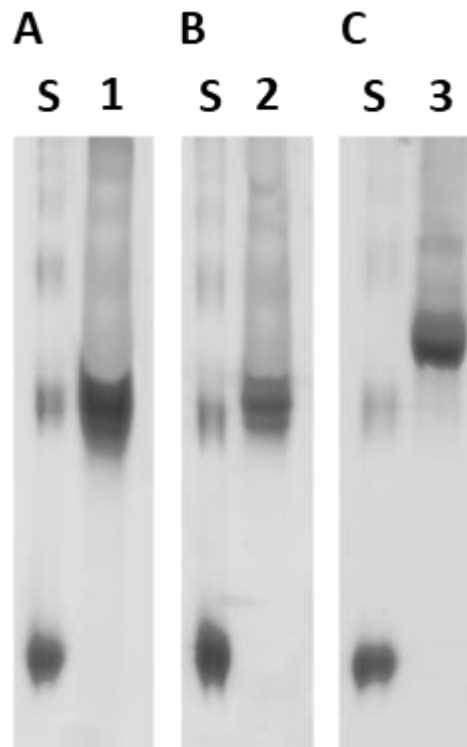


図 2-9 RjXyn10C の可溶性多糖に対する吸着性の Native affinity-PAGE による解析

A:コントロール B:大麦  $\beta$ -グルカン C:可溶性小麦アラビノキシラン

レーン S : BSA

レーン 1 : RjXyn10C

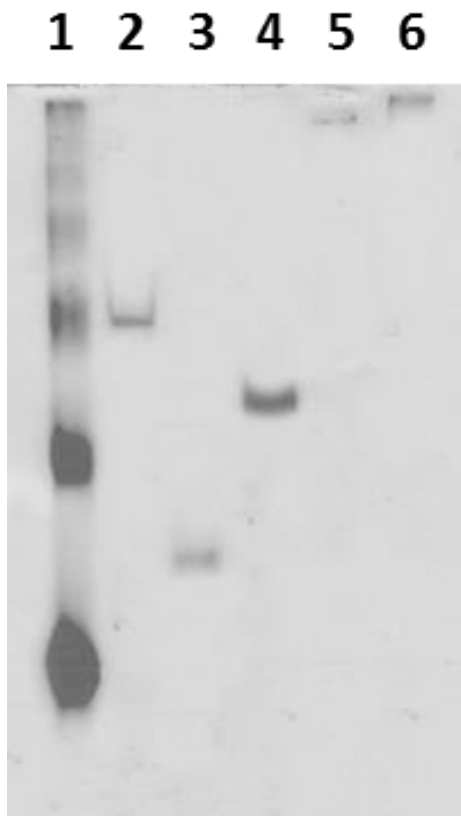


図 2-10 RjCel5B-RjCipA または RjXyn10C-RjCipA 複合体形成の Native-PAGE による確認

レーン 1 : BSA

レーン 2 : RjCipA

レーン 3 : RjCel5B

レーン 4 : RjXyn10C

レーン 5 : RjCel5B-RjCipA 複合体 (6:1)

レーン 6 : RjXyn10C-RjCipA 複合体 (6:1)

表 2-1 本研究で利用したプライマー一覧

Protein name	Primer name	Nucleotide sequence	Restriction site
RjCipA	CjCipANcoF	5'-GGGCCATGGCTGATACTGGCGTCATATC	<i>Nco</i> I
	CjCipASalR2	5'-CCCGTCGACATTAAGTTTTGCACTTCCAT	<i>Sal</i> I
RjCipA ΔCBM	CjCipAdelCBMF	5'-CCCCATGGGCTTTCATCAATCAAATGACTG	<i>Nco</i> I
	CjCipASalR2	5'-CCCGTCGACATTAAGTTTTGCACTTCCAT	<i>Sal</i> I
RjCel5B	CjCel5BBamF	5'-CCCGGATCCGCAGTAGATACAAATAATG	<i>Bam</i> HI
	CjCel5BSalR	5'-CCCGTCGACTTACTTACCCAGAACCTTTG	<i>Sal</i> I
RjXyn10C	CjXyn10CNcoF	5'-GGGGCCATGGCAATGGCTACAGGAAAACC	<i>Nco</i> I
	CjXyn10CSalR	5'-CCCGTCGACTTTGTCAGCCGAAATTTTG	<i>Sal</i> I
RjAxl43B	0591 NcoF	5'-GGGCCATGGGCTGGCAGTCAGATAATAATAACGG	<i>Nco</i> I
	0591 SalR	5'-CCCGTCGACTGTGCCTTGTCCCGAAAAAC	<i>Sal</i> I

表 2-2 RjCel5B と Rjxyn10C の基質特異性

基質特異性 (U/mg-protein)					
酵素名	フナセル	CMC	BMC	大麦 β-グルカン	コンニャク グルコマンナン
RjCel5B	0.00012±0.00001	9.0±1.1	2.9±1.0	97.0±2.3	100.8±3.4
RjXyn10C	ND	ND	ND	ND	ND

基質特異性 (U/mg-protein)				
酵素名	バーチウッド キシラン	ライ麦 アラビノキシラン	可溶性小麦 アラビノキシラン	不溶性小麦 アラビノキシラン
RjCel5B	ND	ND	ND	ND
RjXyn10C	326.2±25.0	148.0±9.3	238.8±2.3	17.2±1.7

ND : 検出されず

表 2-3 RjCel5B および RjCel5B-RjCipA 複合体のフナセルと稲わら粉末に対する分解活性

n=3				
分解活性				
RjCel5B:RjCipA	フナセル		稲わら粉末	
	μg/nmol-Cel5B	相対活性値	μg/nmol-Cel5B	相対活性値
6:0	1.5 ± 0.4	1	3.2 ± 0.6	1
6:1	4.2 ± 1.9	2.8	12.1 ± 0.2	3.9
6:3	5.5 ± 0.1	3.7	17.9 ± 0.7	5.6
6:6	9.9 ± 0.5	6.6	36.8 ± 0.4	11.5

相対活性値は遊離状態の RjCel5B(6:0)が基質から生成した還元糖量を 1 とした場合の相対値を示す。活性値は 3 つの試料の値を平均したものであり、その標準誤差を ± で表した。

表 2-4 RjXyn10C および RjXyn10C-RjCipA 複合体の不溶性小麦アラビノキシランと稲わら粉末に対する分解活性

n=3				
分解活性				
RjXyn10C:RjCipA	不溶性小麦アラビノキシラン		稲わら粉末	
	μg/nmol-Xyn10C	相対活性値	μg/nmol-Xyn10C	相対活性値
6:0	33.5 ± 2.0	1	4.6 ± 0.4	1
6:1	15.0 ± 1.5	0.45	1.3 ± 0.5	0.28
6:3	18.2 ± 0.2	0.54	3.8 ± 0.1	0.83
6:6	33.6 ± 0.7	1.0	5.6 ± 0.1	1.2

相対活性値は遊離状態の RjXyn10C(6:0)が基質から生成した還元糖量を 1 とした場合の相対値を示す。活性値は 3 つの試料の値を平均したものであり、その標準誤差を ± で表した。



表 2-5 RjCel5B と RjXyn10C の混合液および RjCel5B-RjXyn10C-RjCipA 複合体の稲わら粉末に対する分解活性

RjCel5B:RjXyn10C:RjCipA	稲わら粉末に対する分解活性	
	$\mu\text{g}/\text{nmol-enzyme}$	相対活性値
3:3:0	$3.3 \pm 0.12$	1
3:3:1	$4.2 \pm 0.20$	1.3
3:3:3	$4.8 \pm 0.48$	1.5
3:3:6	$8.0 \pm 0.33$	2.4

相対活性値は遊離状態の RjCel5B-RjXyn10C(3:3:0)が基質から生成した還元糖量を 1 とした場合の相対値を示す。活性値は 3 つの試料の値を平均したものであり、その標準誤差を  $\pm$  で表した。

表 2-6 RjCel5B および RjCel5B-RjCipA $\Delta$ CBM 複合体のフナセルと稲わら粉末に対する分解活性

n=3				
分解活性				
RjCel5B:RjCipA $\Delta$ CBM	フナセル		稲わら粉末	
	$\mu\text{g}/\text{nmol-RjCel5B}$	相対活性値	$\mu\text{g}/\text{nmol-RjCel5B}$	相対活性値
6:0	2.44 $\pm$ 0.41	1	3.28 $\pm$ 0.12	1
6:1	2.76 $\pm$ 0.62	1.13	4.16 $\pm$ 0.20	1.27
6:3	2.68 $\pm$ 0.46	1.10	4.77 $\pm$ 0.48	1.46
6:6	1.60 $\pm$ 0.71	0.66	4.94 $\pm$ 1.59	1.51

相対活性値は遊離状態の RjCel5B(6:0)が基質から生成した還元糖量を 1 とした場合の相対値を示す。活性値は 3 つの試料の値を平均したものであり、その標準誤差を  $\pm$  で表した。

表 2-7 RjXyn10C および RjXyn10C-RjCipAΔCBM 複合体の不溶性小麦アラビノキシランと稲わら粉末に対する分解活性

n=3

RjXyn10C:RjCipAΔCBM	分解活性			
	不溶性小麦 アラビノキシラン		稲わら粉末	
	μg/nmol-Xyn10C	相対活性値	μg/nmol-Xyn10C	相対活性値
6:0	37.2 ± 1.8	1	4.0 ± 0.5	1
6:1	29.5 ± 1.3	0.79	6.1 ± 0.2	1.52
6:3	32.0 ± 0.3	0.86	6.2 ± 0.4	1.54
6:6	50.7 ± 6.6	1.36	7.1 ± 1.0	1.76

相対活性値は遊離状態の RjXyn10C(6:0)が基質から生成した還元糖量を 1 とした場合の相対値を示す。活性値は 3 つの試料の値を平均したものであり、その標準誤差を±で表した。

### 第 3 章 *Ruminiclostridium josui* のアラビノキシランアラビノフラノヒドロラーゼ RjAxx43B の酵素特性およびキシラナーゼ RjXyn10C を含むヘミセルラーゼ複合体の活性

#### 第 1 節 緒言

*R. josui* の持つセルロソーム関連タンパク質にはセルラーゼやキシラナーゼだけではなく、ヘミセルロース鎖の側鎖を切断・遊離する酵素も多数含まれる。アラビノキシランアラビノフラノヒドロラーゼであると予想されたファミリー GH43 に属する RjAxx43B を発現させ、キシラン主鎖からアラビノース側鎖を遊離する能力があることを確認した。さらに、本酵素とキシラン主鎖を切断するキシラナーゼ RjXyn10C の組合せによる相乗効果および両酵素と RjCipA の複合体を形成することによる活性への影響を調べた。

#### 第 2 節 実験方法

##### 第 1 項 プラスミドの構築

*R. josui* のゲノム情報を基に、ファミリー 43 の GH の 1 つである RjAxx43B をコードする遺伝子 (Accession no. LC215701) 領域を PCR 法で増幅した。遺伝子の上流側と下流側に制限酵素切断配列を人工的に付加し、目的タンパク質の C 末端側に His-tag が付くようにプラスミドを構築した。PCR に使用したプライマーセットは表 2-1 に示す。

遺伝子の増幅とプラスミドの構築は第 2 章第 2 節第 1 項と同様の方法で行った。構築したプラスミドによりコードされるタンパク質 (RjAxx43B) のモジュラー構造を図 1-3 に示す。

## 第 2 項 目的タンパク質の発現と精製

第 2 章第 2 節第 2 項と同様の方法で目的タンパク質である RjAxh43B を発現し精製した。

## 第 3 項 SDS-PAGE

第 2 章第 2 節第 3 項と同様の方法で SDS-PAGE を行い、目的タンパク質を確認した。

## 第 4 項 タンパク質濃度の測定

第 2 章第 2 節第 4 項と同様の方法を用いて、目的タンパク質の濃度を測定した。

## 第 5 項 天然基質としての稲わら粉末の調製

第 2 章第 2 節第 5 項と同様の方法で調製した。

## 第 6 項 酵素活性の測定

基質としてバーチウッドキシラン(Sigma-Aldrich)、可溶性小麦アラビノキシラン(Megazyme)、不溶性小麦アラビノキシラン(Megazyme)、ライ麦アラビノキシラン(Megazyme)、リアアラビナン(Megazyme)、テンサイアラビナン(Megazyme)、稲わら粉末を使用した。

1%の各基質溶液または懸濁液を使用し、酵素反応液を調製した。50 mM マレイン酸緩衝液(pH7.0)中に基質濃度 0.5%、酵素濃度 0.01 mg/ml となる様に反応液を調製し、45℃で 30 分間反応させた。反応後、反応液を 100℃で 10 分間加熱し、酵素を失活させた後、氷中で冷却した。反応液(50 µl) にジニトロサリチル酸(DNS)試薬(250 µl) [214]を加え 5 分間煮沸し

た後に氷中で冷却し、ミリ Q 水 1.2 ml を加えた。その後、 $12,000\times g$  で 1 分間遠心分離を行い、上清の吸光度 (500 nm) を測定した。また、 $45^{\circ}\text{C}$ 、1 分間に  $1\ \mu\text{mol}$  の還元糖を遊離する酵素量を 1 ユニット (U) と定義した。還元糖測定のための標準物質にはアラビノースを用いた。

#### 第 7 項 至適 pH の測定

第 2 章第 2 節第 7 項と同様の方法で測定した。酵素反応は  $45^{\circ}\text{C}$ 、30 分間行い、基質として可溶性小麦アラビノキシランを用いた。

#### 第 8 項 至適温度の測定

第 2 章第 2 節第 8 項と同様の方法で測定した。酵素反応は  $45^{\circ}\text{C}$ 、30 分間行い、基質として可溶性小麦アラビノキシランを用いた。

#### 第 9 項 pH 安定性の測定

第 2 章第 2 節第 9 項と同様の方法で測定した。酵素反応は  $45^{\circ}\text{C}$ 、30 分間行い、基質として可溶性小麦アラビノキシランを用いた。

#### 第 10 項 熱安定性の測定

第 2 章第 2 節第 10 項と同様の方法で測定した。酵素反応は  $45^{\circ}\text{C}$ 、30 分間行い、基質として可溶性小麦アラビノキシランを用いた。

#### 第 11 項 薄層クロマトグラフィーによる RjAxh43B の分解産物の解析

オリゴ糖およびその他の基質の RjA<sub>xh</sub>43B による酵素分解後の産物を調べるため、薄層クロマトグラフィーによる解析を行った。オリゴ糖としてアラビノオリゴ糖 [アラビノース (A1)、アラビノビオース (A2)、アラビノトリオース (A3)、アラビノテトラオース (A4)、アラビノペンタオース (A5)、アラビノヘキサオース (A6)]、キシロオリゴ糖 [キシロース (X1)、キシロビオース (X2)、キシロトリオース (X3)、キシロテトラオース (X4)、キシロペンタオース (X5)、キシロヘキサオース (X6)] を使用し、その他の基質として、バーチウッドキシラン、可溶性小麦アラビノキシラン、不溶性小麦アラビノキシラン、ライ麦アラビノキシラン、稲わら粉末を用いた。アラビノキシランの側鎖の分解位置を調べるため、3<sup>2</sup>- $\alpha$ -L-アラビノフラノシルキシロビオース (A<sup>3</sup>X) (Megazyme)、2<sup>3</sup>,3<sup>3</sup>-di- $\alpha$ -L-アラビノフラノシルキシロトリオース (A<sup>2,3</sup>XX) (Megazyme)、2<sup>3</sup>- $\alpha$ -L-アラビノフラノシルキシロトリオース (A<sup>2</sup>XX) (Megazyme)、3<sup>3</sup>- $\alpha$ -L-アラビノフラノシルキシロテトラオース (XA<sup>3</sup>XX) (Megazyme) も基質として用いた。2  $\mu$ l の各オリゴ糖溶液 10 mg/ml または 5  $\mu$ l の 1.0% 多糖類の基質溶液に 500 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) を 1  $\mu$ l と RjA<sub>xh</sub>43B (0.2 U) を加え、ミリ Q 水で全量が 10  $\mu$ l になるように調節し、40°C で 16 時間反応させた。

TLC は第 2 章第 2 節第 11 項と同様の方法で行い、展開溶媒として 1-ブタノール : 酢酸 : 水 = 5 : 2 : 3 を使用した。キシロオリゴ糖、アラビノオリゴ糖および多糖すべてにおいて同じ展開溶媒を使用した。発色液にはジフェニルアミン・アニリン・リン酸試薬 (ジフェニルアミン 0.1 g、アニリン 0.1 ml、アセトン 5 ml、85% リン酸 0.75 ml) を使用した。

#### 第 12 項 不溶性多糖に対する吸着性

RjA<sub>xh</sub>43B の不溶性多糖に対する吸着性について第 2 章第 2 節第 12 項と同様の方法で調べた。不溶性多糖として、フナセル、不溶性小麦アラビノキシラン(Megazyme)、リニアアラビナン(Megazyme)、稲わら粉末を用いた。

#### 第 13 項 可溶性多糖に対する吸着性

RjA<sub>xh</sub>43B の可溶性多糖に対する吸着性を第 2 章第 2 節第 13 項と同様の方法で調べた。可溶性基質にはバーチウッドキシラン(SIGMA)、可溶性小麦アラビノキシラン (Megazyme)、ライ麦アラビノキシラン(Megazyme)を用いた。

#### 第 14 項 コヘシン-ドックリン相互作用の確認

20mM Tris-HCl-10mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.5)中に、RjA<sub>xh</sub>43B と RjCipA を 6:1 のモル比で含む反応液を調製し、タンパク質の移動度を Native-PAGE で調べた。方法は第 2 章第 2 節第 14 項に記載した。

#### 第 15 項 複合体の活性測定

20 mM Tris-HCl-10 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.5)中に RjA<sub>xh</sub>43B-RjCipA のモル比が 6:0、6:1、6:3、6:6 となるよう調製した。それぞれの反応液を 40℃で 30 分間静置し、異なったモル比の複合体を得た。また、触媒モジュールとして RjA<sub>xh</sub>43B と RjXyn10C を複合体にする場合、RjA<sub>xh</sub>43B : RjXyn10C : RjCipA の割合を 3:3:0、3:3:1、3:3:3、3:3:6 とし、同様の方法で複合体を作製した。これらの異なったモル比の複合体を酵素液とし、不溶性小麦アラビノキシランおよび稲わら粉末を基質として 45℃、16 時間反応を行った。生成した還元糖は



Somogy-Nelson 法 [216] により測定した。

### 第 3 節 結果

#### 第 1 項 RjAxx43B の発現と精製

*R. josui* が持つセルロソーム関連遺伝子の中から、アラビノキシランアラビノフラノヒドロラーゼと予想された RjAxx43B を大腸菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL を宿主として使用し発現させた。精製後、SDS-PAGE により RjAxx43B のバンドを確認した(図 3-1)。RjAxx43B の予想される分子量は 81.3 kDa であり、分子量マーカーを参照すると、精製したタンパク質の分子量はほぼ一致していた。精製したこのタンパク質を以下の実験で使用した。

#### 第 2 項 RjAxx43B の基本的な性質

RjAxx43B の基質特異性を調べるために、さまざまな基質を用いて酵素反応を行い、その活性を比較した(表 3-1)。RjAxx43B は可溶性小麦アラビノキシランに最も高い活性 ( $62.3 \pm 8.6$  U/mg-protein) を示し、ライ麦アラビノキシラン ( $20.0 \pm 1.3$  U/mg-protein) にも高い活性が認められ、不溶性小麦アラビノキシランには中程度の活性を示した ( $6.6 \pm 5.1$  U/mg-protein)。またテンサイアラビナンにも活性があったが ( $1.47 \pm 0.11$  U/mg-protein)、リニアアラビナンにはごく弱い活性しか示さなかった ( $0.35 \pm 0.04$  U/mg-protein)。その他、稲わら粉末やバーチウッドキシラン、ビーチウッドキシランには全く活性が見られなかった。活性の高かった可溶性小麦アラビノキシランを基質として RjAxx43B の性質を調べた結果、至適 pH は 6.0、至適温度は 50°C であった。また、各 pH

で 4℃、16 時間保存した時、本酵素は pH 6.5~8.0 で安定であった。pH 6.5 で各温度 1 時間処理した時、40℃までは活性の低下は見られなかった。

### 第 3 項 RjAxh43B によるオリゴ糖および多糖の分解産物の解析

RjAxh43B の分解産物や切断部位を調べるために TLC を行った。RjAxh43B を天然基質、キシロオリゴ糖およびアラビノオリゴ糖を基質として 40℃、pH 7.0 で 16 時間反応させ、反応液を TLC プレートにスポットし、展開を行った。基質として可溶性小麦アラビノキシラン、不溶性小麦アラビノキシラン、ライ麦アラビノキシラン、テンサイアラビナン、リニアアラビナン、バーチウッドキシラン、オートスペルトキシラン、稲わら粉末を使用した結果を図 3-2 に示した。可溶性小麦アラビノキシラン、不溶性小麦アラビノキシラン、ライ麦アラビノキシラン、テンサイアラビナンを基質とした時、分解産物としてアラビノースのみがスポットとして現れたが、リニアアラビナン、バーチウッドキシラン、オートスペルトキシラン、稲わら粉末からは分解産物は確認できなかった。キシロオリゴ糖(図 3-3)およびアラビノオリゴ糖(図 3-4)を基質とした時、どの基質からも分解産物は検出されなかった。

A<sup>3</sup>X、A<sup>2,3</sup>XX、A<sup>2</sup>XX、XA<sup>3</sup>XX をそれぞれ基質とした反応では、A<sup>2,3</sup>XX にのみ活性が見られた(図 3-5)。酵素処理を行っていないネガティブコントロールと比べると、A<sup>2,3</sup>XX ではアラビノースと A<sup>2</sup>XX または A<sup>3</sup>XX が分解産物として現れている。しかしその他の A<sup>3</sup>X や A<sup>2</sup>XX、XA<sup>3</sup>XX では分解産物は確認できなかった。

前項の結果と本項の結果により、RjAxh43B はアラビノキ

シランアラビノフラノヒドロラーゼであることが確かめられた。

#### 第 4 項 多糖への吸着性

RjA<sub>xh</sub>43B の不溶性多糖に対する吸着性は SDS-PAGE で (図 3-6)、可溶性多糖については Native Affinity-PAGE により調べた (図 3-7)。不溶性多糖であるフナセル、小麦アラビノキシラン、リニアアラビナン、稲わら粉末に対しては、吸着性は見られなかった (図 3-6)。一方、可溶性基質では小麦アラビノキシラン、テンサイアラビナン、バーチウッドキシランにほぼ同じ程度の微弱な吸着性が確認された (図 3-7)。

#### 第 5 項 RjCipA と RjA<sub>xh</sub>43B のコヘシン-ドックリン相互作用

RjCipA と RjA<sub>xh</sub>43B をカルシウムイオン存在下で 1:6 のモル比で混合した後、Native-PAGE で電気泳動した結果 (図 3-8)、RjCipA-RjA<sub>xh</sub>43B 混合溶液では RjCipA と RjA<sub>xh</sub>43B のバンドは消失し、新たな位置にバンドが現れたため、コヘシン-ドックリン相互作用によって、複合体を形成していることが確認された。

#### 第 6 項 不溶性小麦アラビノキシランに対する RjA<sub>xh</sub>43B-RjCipA 複合体の分解活性

RjA<sub>xh</sub>43B と RjCipA をそれぞれ、6:1、6:3、6:6 のモル比で混合して形成させた複合体を不溶性小麦アラビノキシランと 40°C、16 時間反応させた。その後、Somogy-Nelson 法を用いて反応液の還元糖量を測定した。その結果を表 3-2 に示す。不溶性小麦アラビノキシランに対して、遊離の

RjAxx43B(6:0)が生成した還元糖量を1とすると、RjAxx43B-RjCipA(6:1)複合体の相対的な活性は1.05、6:3複合体では1.21、6:6複合体では1.59となった。

#### 第7項 不溶性小麦アラビノキシランと稲わら粉末に対するRjAxx43B-RjXyn10C-RjCipA複合体の分解活性

キシラン側鎖を切断する能力は天然の基質に含まれるキシラン主鎖を分解する助けになる。RjAxx43Bはキシランの側鎖であるアラビノースを遊離する活性を持つことが解ったため、キシラン主鎖分解するRjXyn10Cとの組み合わせにより、どのような相乗効果が表れるかを調べた(表3-3)。

RjAxx43B、RjXyn10CおよびRjCipAをそれぞれ、モル比3:0:0、0:3:0、3:3:0、3:3:1、3:3:3、3:3:6で混合し各割合の複合体を得た。RjCipAの割合が0の混合液は酵素が遊離状態である。不溶性小麦アラビノキシランを基質としてpH 7.0、40℃で16時間反応させた後、反応液の還元糖量を測定した。還元糖の測定値を基に、これらの複合体の相対的な活性値を比較した。RjAxx43B:RjXyn10C:RjCipAが3:0:0では還元糖が $3.1 \pm 0.3 \mu\text{g}$ 、0:3:0では $16.8 \pm 1.0 \mu\text{g}$ 生成された。稲わら粉末を基質とした場合3:0:0では還元糖は検出されず、0:3:0では $2.3 \pm 0.2 \mu\text{g}$ 生成された。RjAxx43BとRjXyn10Cの酵素反応に関連性や相乗効果がないと考えると、3:0:0と0:3:0の還元糖量の和を導くと、3:3:0の酵素混合液では不溶性小麦アラビノキシランが基質の時、 $19.9 \mu\text{g}$ の還元糖が、稲わら粉末を基質とした場合、 $2.3 \mu\text{g}$ の還元糖が生成されると予想される。この計算上の値を1とし、実際の複合体がどの程度相乗効果を発揮するかを調べた。

酵素が遊離状態のRjAxx43B-RjXyn10C-RjCipAが3:3:0の

時、不溶性小麦アラビノキシランでは計算値に比べ 1.36 倍、稲わら粉末では 1.74 倍となり、両酵素は 2 つの基質に対して相乗的に働くことが示された。また、RjCipA のコヘシン全てに酵素が結合した複合体である 3:3:1 複合体では不溶性小麦アラビノキシランの場合は 1.31 倍、稲わら粉末が基質の場合 1.48 倍となり、遊離状態よりも相乗効果が低かった。3:3:3 の複合体の時、不溶性小麦アラビノキシランでは 1.84 倍、稲わら粉末では 1.96 倍の相乗効果が得られ、さらに 3:3:6 の時には不溶性小麦アラビノキシランでは 2.81 倍、稲わら粉末では 3.04 倍の相乗効果が得られた。

#### 第 4 節 考察

##### 第 1 項 RjAxx43B の酵素特性

ファミリー GH43 にはキシラナーゼやアラビナーゼ、 $\beta$ -キシロシダーゼ、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼのようなヘミセルロース分解に関わる酵素が含まれることが知られており、最近ではそれらの酵素のアミノ酸配列の相同性を基に GH43\_1 から GH43\_37 まで 37 のサブファミリーに分類されている [14]。その中で、本研究で使用した RjAxx43B は GH43\_10 の酵素と相同性が高く、GH43\_10 に関する酵素特性の知見から RjAxx43B は  $\beta$ -キシロシダーゼもしくは  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼであると予想された [14]。実際に、RjAxx43B はアラビノキシランに強い活性を示し、側鎖のないキシランには活性を示さなかったことから(表 3-1)、本酵素はキシランからアラビノース残基を遊離する性質を持つ  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼであることが示唆された。

TLC を用いて、様々な基質に対する RjAxx43B の反応を定

性的に調べた(図 3-2~図 3-5)。可溶性小麦アラビノキシラン、不溶性小麦アラビノキシラン、ライ麦アラビノキシラン、テンサイアラビナンに対する活性は還元糖の定量分析でも示され(表 3-1)、TLC においてもアラビノースを産生することが明らかとなった(図 3-2)。一方、リニアアラビナンについては還元糖が微量に検出されたが、TLC ではアラビノースの遊離は確認できなかった(図 3-2)。キシロオリゴ糖やアラビノオリゴ糖に対しても活性が見られなかったことから(図 3-3および図 3-4)、RjAxx43B はキシロオリゴ糖の  $\beta$ -1,4 結合やアラビノオリゴ糖の  $\alpha$ -1,5 結合には作用できないことが示された。

アラビノキシロオリゴ糖である A<sup>3</sup>X、A<sup>2,3</sup>XX、A<sup>2</sup>XX および XA<sup>3</sup>XX を基質とした場合、A<sup>2,3</sup>XX のみアラビノースと A<sup>2</sup>XX または A<sup>3</sup>XX に分解された(図 3-5)。アラビノキシランアラビノフラノヒドロラーゼは C2 と C3 の位置にそれぞれアラビノース側鎖があるキシロース残基から C3 のアラビノースのみを切断するアラビノフラノヒドロラーゼ D3 (AXHd3)と、キシロース残基の C2 もしくは C3 に 1 つだけ存在するアラビノースを切断するアラビノキシランアラビノフラノヒドロラーゼ m23 (AXHm23)の 2 つのグループに分けられている[88]。RjAxx43B はキシラン残基の 2 と 3 の位置両方にアラビノースが結合している場合のみ、アラビノースを遊離することから本酵素は AXHd3 に属する可能性が高い。

RjAxx43B は GH43\_10 に属し、*R. stercorarium* の Xyl143B に対して高い相同性を示したが、RsXyl143B は  $\beta$ -キシロシダーゼであり  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼではないと報告されている[234]。一方、*Bacteroides ovatus* や *Bifidobacterium adolescentis* の GH43\_10 は AXHd3 と同定されており[235, 236]、RjAxx43B の性質と類似している。RjAxx43B がテンサ

イアラビナンに対して弱い活性を持つことや、アラビノキシランからアラビノースのみを遊離することも GH43\_10 に属する AXHd3 の酵素の特徴に一致している [235,236]。また、GH43\_12 も GH43\_10 と相同性が高いグループであるが、GH43\_12 の酵素は単離されていない細菌由来のもので、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ活性と  $\beta$ -キシロシダーゼ活性の両方の能力を持つ deAFc [237]と deAX [238]が知られている。前者は合成キシロピラノシドからキシロースを、アラビノキシランや側鎖のあるアラビナンからアラビノースを遊離する活性を持ち [237]、後者はテンサイアラビナンや  $\alpha$ -L-アラビノトリオース、ライ麦アラビノキシランからアラビノースを、キシロオリゴ糖やバーチウッドキシランからはキシロースを遊離する働きを持つ [238]と報告されており、RjAxx43B とは性質が異なっている。

RjAxx43B のモジュラー構造は、GH43 と CBM6 とドックリンで構成されている (図 1-1)。RjXyn10C と同様に RjAxx43B も CBM6 を持ち、RjXyn10C に比べ吸着性は低いものの、可溶性の小麦アラビノキシラン、テンサイアラビナンおよびバーチウッドキシランに吸着性が認められた (図 3-7)。RjAxx43B はバーチウッドキシランには活性がなかったが、吸着性があり、キシランの主鎖に結合すると思われる。CBM6 の中には、キシロオリゴ糖に吸着性を持つものがあることが報告されていることから [239]、RjAxx43B の場合もファミリー 6 の CBM のキシランへの吸着特性が作用していると考えられる。ただし、RjAxx43B は、アラビノキシランからアラビノースを遊離する活性を持つことから Native Affinity- PAGE の結果に影響を与える可能性は否定できず、タンパク質の移動度と吸着性の大きさは必ずしも一致しない

可能性がある。また、不溶性の基質には全く吸着性を示さなかった(図 3-6)。

## 第 2 項 不溶性小麦アラビノキシラン分解に与える RjCipA と RjAxx43B の複合体形成の影響

RjAxx43B と RjCipA の複合体を作製し、不溶性の小麦アラビノキシランに対する活性を調べた(表 3-2)。前章で述べた通り、セルロソームを形成する利点として、第一に骨格タンパク質の持つ CBM による基質へのターゲッティング効果、第二に触媒モジュールが近接することで相乗効果が起こる近接効果が挙げられる[123, 204, 207]。しかし、前章での実験結果より、RjCipA に含まれる CBM3 には不溶性小麦アラビノキシランへの吸着性はなかったにもかかわらず、RjAxx43B-RjCipA が 6:6 の複合体では、不溶性小麦アラビノキシランへの活性が遊離状態の RjAxx43B よりも 1.59 倍高くなった(表 3-2)。Native-PAGE 上では RjAxx43B は少しスメア状になっていた(図 3-7 および 3-8)。これは RjAxx43B の分子間に何らかの非特異的な相互作用が生じ、本来の酵素が持つ能力を低下させている可能性を示唆する。RjAxx43B-RjCipA 複合体を形成することで、これらの非特異的な相互作用を減少させ、RjAxx43B が持つ本来備わっている能力を発揮することができるようになった可能性がある。前章で述べたように、RjXyn10C-RjCipA(6:6)複合体の不溶性小麦アラビノキシランへの活性が、遊離状態の RjXyn10C の活性とほぼ同じ値になったことから、RjCipA の CBM3 は小麦アラビノキシランに対して効果がないことが示唆された。一方、RjAxx43B-RjCipA 複合体では、RjAxx43B が遊離状態の時よりも複合体の方が、不溶性小麦アラビノキシランへの分解活性が高まっ



たことから、上記の理由の他に RjCipA が RjAxx43B に分解反応を助けるなんらかの影響を与えている可能性も考えらる。

近接効果に関しては、過去に幾つかの報告がある。*R. thermocellum* の CelD は 9 つのコヘシンを持つ骨格タンパク質と 2.9:1 で複合体を形成させた場合、アビセルへの分解活性が遊離状態の酵素に比べ 11.3 倍になった。また、5.7:1 の RtCelD-RtCipA 複合体では、遊離状態の RtCelD に比べ Avicel への分解活性は更に上昇し、15.8 倍になったと報告されている [217]。しかしながら RjAxx43B においては、これに類似する相乗効果は見られず、不溶性小麦アラビノキシランへの活性は RjAxx43B-RjCipA(6:1)複合体でも遊離状態の RjAxx43B と殆ど同じ値となった。この結果は前章で述べた RjXyn10C-RjCipA 複合体の結果と同様に、RjAxx43B においても近接効果はないと判断した。

### 第 3 項 不溶性小麦アラビノキシランおよび稲わら粉末の分解における RjAxx43B と RjXyn10C の相乗効果と複合体形成の影響

天然基質に含まれるキシランには様々な置換基が側鎖として存在しており、これらを切断することがキシラン分解の大きな鍵となっている。 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼはこれらの側鎖を切断する酵素のひとつであり、キシラナーゼと組み合わせることにより、キシラン分解に大きな相乗効果をもたらすことが多数報告されている [91, 240-243]。本章で精製した RjAxx43B もキシランの側鎖となるアラビノースを遊離する働きを示したことから、前章で用いたキシラナーゼである RjXyn10C と組み合わせ、またそれらの組合せと RjCipA との複合体作製により、不溶性小麦アラビノキシランと稲わら粉

末に対してどのような相乗効果が表れるかを調べた(表 3-3)。

RjCipA 非存在下で RjAxx43B と RjXyn10C を組み合わせることで、この 2 つの酵素単体で精製する還元糖量の和よりも多くの還元糖が検出され、これらの相乗効果は不溶性小麦アラビノキシランを基質とした場合には 1.36 倍、稲わら粉末を基質とした場合 1.74 倍になった。 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼとキシラナーゼの組合せによるヘミセルロース分解については、他にも別の GH ファミリーを含む多数の微生物種での報告がある。*Bacillus* sp. BP-7 由来の Abf43A はサブファミリー GH43\_16 のアラビノフラノシダーゼだが、同種由来のキシラナーゼである Xyn10A と組み合わせても相乗効果はなかったが、Xyn11E との組合せでは 2.54 倍も分解活性が増加したと報告されている [91]。今回の実験では RjAxx43B と RjXyn10C で相乗効果が観察されたことを考慮すると、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼとキシラナーゼの組合せによる相乗効果は、単純に GH ファミリーの分類だけでは推測できないことが分かった。*Alicyclobacillus* sp. A4 株由来の Abf51A はエクソ型  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼとエンド型キシラナーゼ活性の両方の能力を持つファミリー 51 の酵素で、*Paenibacillus* sp. E-18 株由来の GH10 に属するキシラナーゼである XynBE-18 と組み合わせることにより可溶性小麦アラビノキシランに対しての分解活性が 2.92 倍に上昇した [240]。さらに、*R. thermocellum* の Araf51A は *Thermobifida fusca* の Xyn11A と Xyn11B、*Streptomyces lividans* の XlnB (GH11) と XlnC (GH11)、*R. thermocellum* の Xyn10Z と組み合わせた結果、不溶性小麦アラビノキシランに対し 1.22~1.40 倍の相乗効果が認められた [241]。これらの酵素の組合せによる分解活性の相乗効果は、今回 RjAxx43B と RjXyn10C

の組み合わせにおいて得られた不溶性小麦アラビノキシランに対する相乗効果(1.36倍)と類似している(表 3-3)。RjAxx43B 単独では稲わら粉末に対する活性は見られなかったが(表 3-1)、RjXyn10C と組み合わせることにより相乗効果(1.74倍)が見られた(表 3-3)。糸状菌由来のアラビノフラノシダーゼ AbfB(GH54)とキシラナーゼ XynC(GH11)も植物バイオマスの分解において相乗的に作用し[242]、*Clostridium cellulovorans*のアラビノフラノシダーゼ AbfA(GH51)とキシラナーゼ XynA(GH11)もまたトウモロコシの繊維に対し相乗的な分解活性を示している[243]。*C. cellulovorans*はセルロソーム形成細菌であるが、XynA はセルロソーム構成成分ではなく、複合体形成の実験は行われなかった。

本研究では、RjAxx43B と RjXyn10C の二つの酵素の組合せを、RjCipA 存在下と非存在下に分け、不溶性小麦アラビノキシランと稲わら粉末に対する分解活性の相乗効果を調べた。RjAxx43B-RjXyn10C-RjCipA(3:3:1)複合体では、不溶性小麦アラビノキシランと稲わら粉末両方の基質に対して相対的な活性がそれぞれ 1.31、1.48 となり、遊離状態の RjAxx43B-RjXyn10C よりも活性が低下した(表 3-3)。これは RjAxx43B と RjXyn10C の組合せにより近接効果が負の方向に働いた可能性が考えられる。RjAxx43B-RjXyn10C-RjCipA(3:3:6)複合体では不溶性小麦アラビノキシランと稲わら粉末のどちらにおいても高い相対活性が得られ、2 つの酵素の組合せと複合体を形成することによる相乗効果が確認できた。また RjAxx43B-RjXyn10C-RjCipA(3:3:3)複合体では、2 つの基質に対する相対活性値は、ともに他の 3:3:1 と 3:3:6 複合体の間の値となっており、これらのことから、RjAxx43B と RjXyn10C の組合せでは RjCipA 上で分子的に過密になると

それぞれの触媒モジュールの特異的反応の効率が低下することが予想される。これと類似した現象は前章の RjXyn10C-RjCipA 複合体でも観察された。セルロソーム構成成分の酵素は骨格タンパク質と複合体を形成する上で、適切な密度を保つことと個々の酵素の組合せや、基質との相性が揃わないと最大の能力を発揮できないと思われる。*R. thermocellum* のプロテオーム解析によると、セルロソームの構成成分の多くはセルラーゼであり、キシラナーゼやアラビノフラノシダーゼなどのヘミセルラーゼは少ないと報告されており [244]、それは *R. josui* でも同じである [未発表データ]。このことから、自然状態でのセルロソームの環境では高濃度でキシラナーゼやアラビノフラノシダーゼなどのヘミセルラーゼが存在していることは考えにくく、これらの酵素が複合体形成時に負の近接効果を引き起こす可能性は低い。J. Sun らは糸状菌由来のエンドキシラナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、 $\beta$ -キシロシダーゼの 3 つの酵素の C 末端側に *R. thermocellum* のドックリンを付加し、3 つのコヘシンを持つミニ骨格タンパク質と  $\alpha$ -アグルチニン接着レセプターと共に遺伝子組換え酵母に発現させ、酵母の細胞表層にミニセルロソームを接着させた [227]。3 つの能力を持つ複合体はアラビノキシランの分解を促進し、ミニセルロソーム上で触媒モジュールが互いに分子間の距離が近くなり、近接効果を発揮したと考察されている。しかし、遊離状態での評価がなされていないため、これらの結果や報告から最適に作用する触媒モジュールの組合せを選び出し、設計することはまだ難しい。

## 第 6 項 まとめ

本章では、*R. josui* 由来の糖質加水分解酵素ファミリー 43

の、サブファミリーGH43\_10に属する $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ RjAxx43B の特性解析とともに、キシラーナーゼである RjXyn10C との組合せによるヘミセルロース分解における相乗効果と複合体形成の影響について述べた。RjAxx43B は C2 と C3 両方にアラビノース側鎖が付いたキシロース残基から C3 に付いたアラビノースを遊離する AXHd3 であることが分かった。さらに、RjXyn10C との組合わせは、不溶性小麦アラビノキシランと稲わら粉末の分解において相乗効果を示すことが確認できた。また、これらの酵素の組合せを RjCipA を用いて複合体とした時、RjAxx43B-RjXyn10C-RjCipA(3:3:6) 複合体は、不溶性小麦アラビノキシランと稲わら粉末に対して最大の活性を示し、3者の比率を 3:3:3、3:3:1 と RjCipA の割合を下げると、活性は減少した。このことから、RjAxx43B と RjXyn10C の組み合わせは不溶性小麦アラビノキシランと稲わら粉末の分解に相乗効果を発揮するが、触媒モジュールが密集しすぎると負の近接効果が表れることが確認できた。これらの結果は、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼは適度な割合でセルロソーム中に存在することでアラビノキシランの分解に有効に働くことを示唆した。

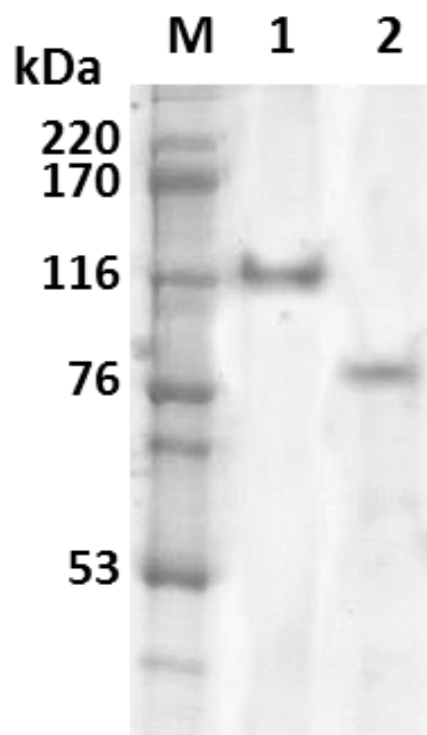


図 3-1 精製した組換えタンパク質の SDS-PAGE

M: 分子量マーカー

1 : RjCipA

2 : RjAxx43B

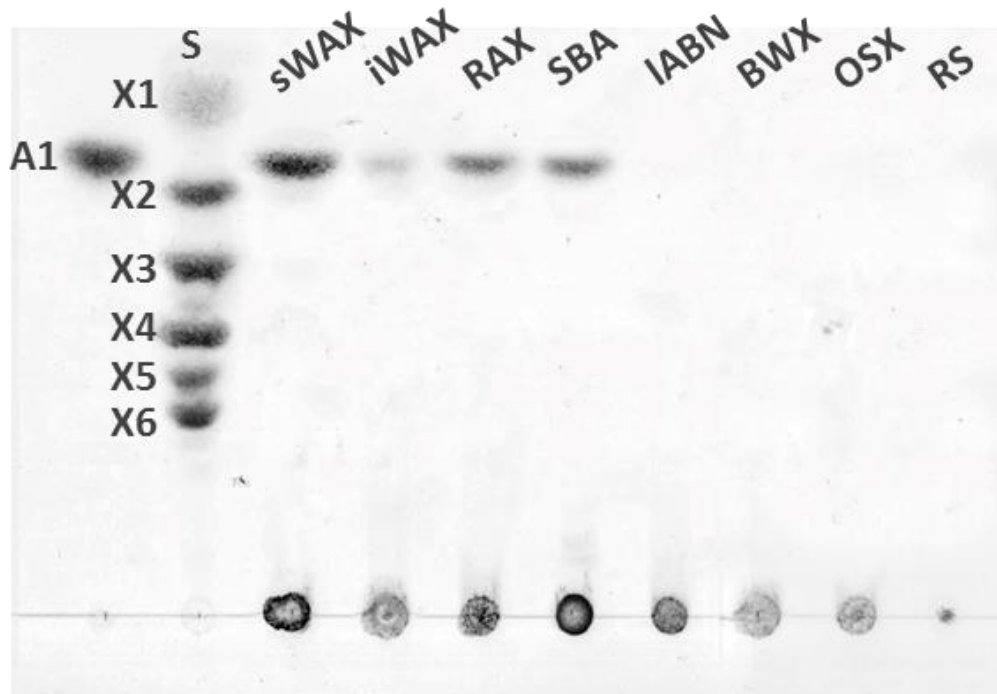


図 3-2 RjAxh43B による各種多糖の分解産物の TLC  
 反応条件： 40℃；16 時間；酵素 0.2 U

sWAX：可溶性小麦アラビノキシラン

iWAX：不溶性小麦アラビノキシラン

RAX：ライ麦アラビノキシラン

SBA：テンサイアラビナン

IABN：リニアアラビナン

BWX：バーチウッドキシラン

OSX：オートスペルトキシラン

RS：稲わら粉末

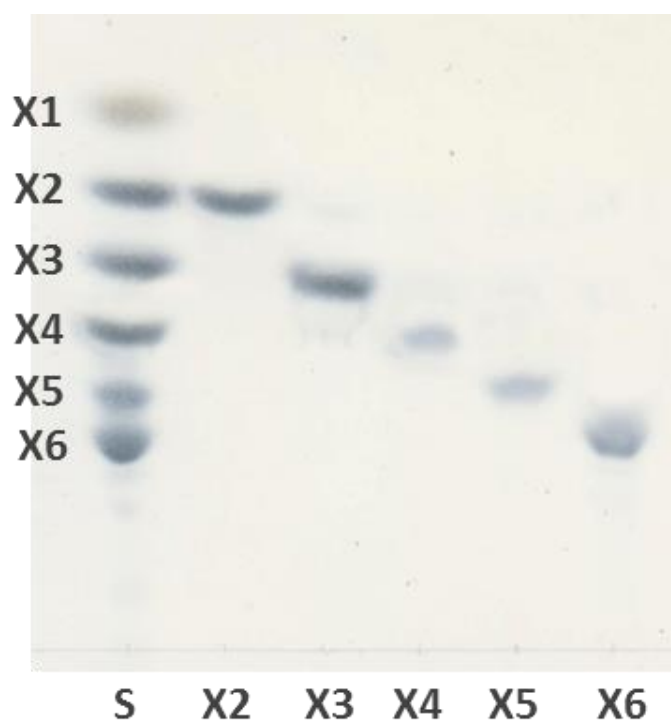


図 3-3 RjAxh43B によるキシロオリゴ糖の分解産物の TLC

反応条件： 40℃；16 時間；酵素 0.2 U

基質

S：スタンダード(キシロース～キシロペンタオース)

X2：キシロビオース

X3：キシロトリオース

X4：キシロテトラオース

X5：キシロペンタオース

X6：キシロヘキサオース



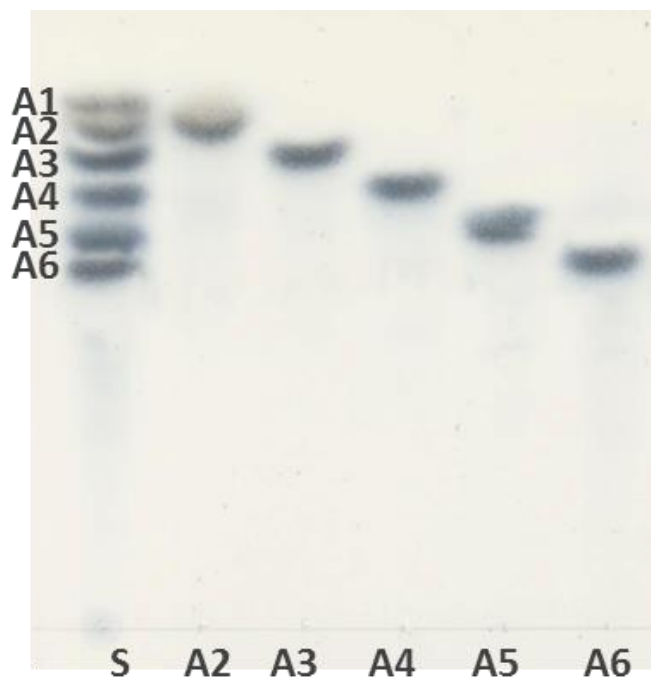


図 3-4 RjAxxh43B によるアラビノオリゴ糖の分解産物の TLC

反応条件： 40℃；16 時間；酵素 0.2 U

基質

S：スタンダード(アラビノース～アラビノヘキサオース)

A2：アラビノビオース

A3：アラビノトリオース

A4：アラビノテトラオース

A5：アラビノペンタオース

A6：アラビノヘキサオース

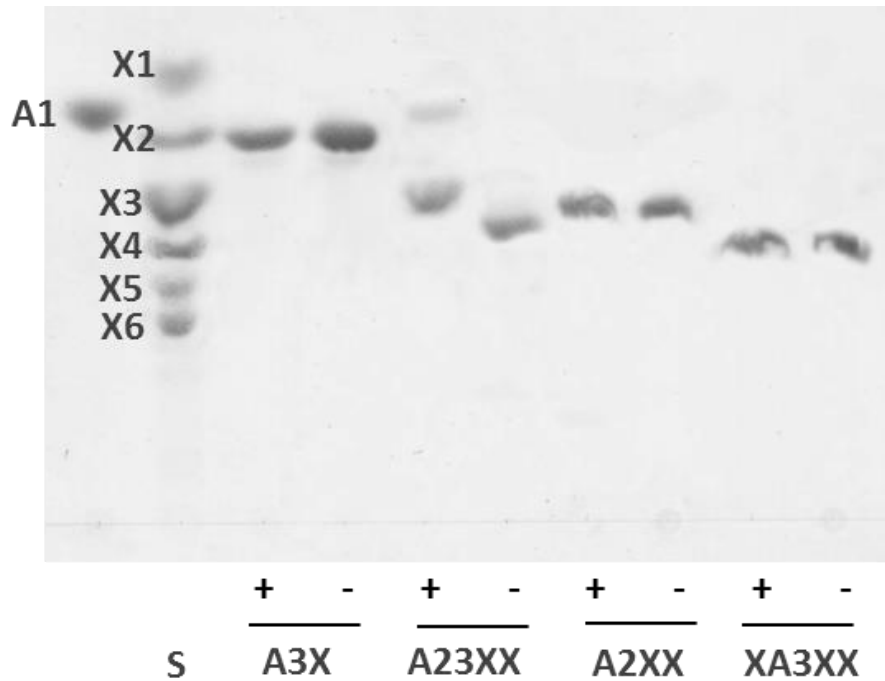


図 3-5 RjAxh43B によるアラビノキシロオリゴ糖の分解産物の TLC

反応条件： 40℃；16 時間；酵素 0.2 U

S：スタンダード(キシロース～キシロペンタオース)

＋：酵素あり

－：酵素なし

A3X：3<sup>2</sup>-α-L-アラビノフラノシルキシロビオース

A23XX：2<sup>3</sup>,3<sup>3</sup>-di-α-L-アラビノフラノシルキシロトリオース

A2XX：2<sup>3</sup>-α-L-アラビノフラノシルキシロトリオース

XA3XX：3<sup>3</sup>-α-L-アラビノフラノシルキシロテトラオース

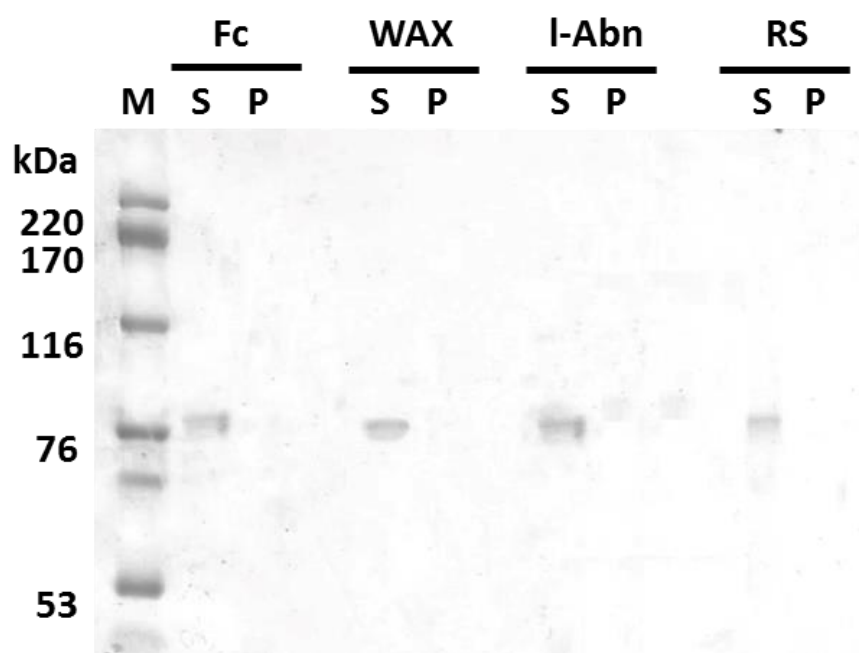


図 3-6 RjAxx43B の不溶性多糖に対する吸着性の SDS-PAGE による解析

Fc : フナセル

WAX : 不溶性アラビノキシラン

l-Abn : リニアアラビナン

RS : 稲わら粉末

M : 分子量マーカー

S : 上清

P : 沈殿

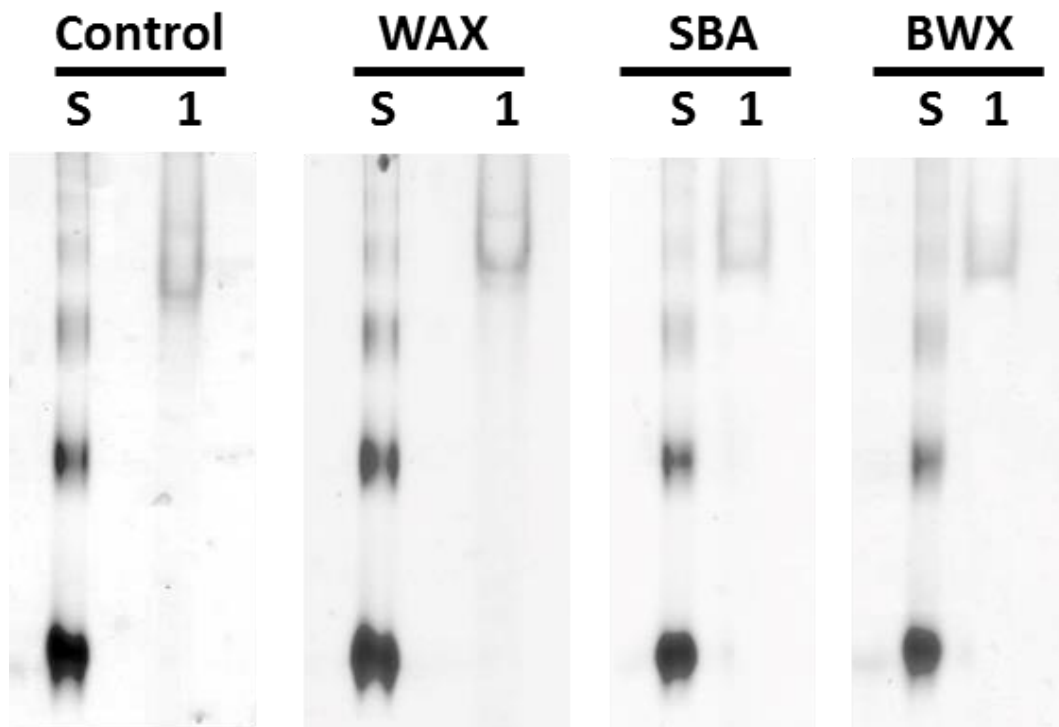


図 3-7 RjA<sub>xh</sub>43B の可溶性基質に対する吸着性の Native-PAGE による解析

control : コントロール(基質なし)

WAX : 可溶性小麦アラビノキシラン

SBA : テンサイアラビナン

BWX : バーチウッドキシラン

S : BSA

1 : RjA<sub>xh</sub>43B

1 2 3 4



図 3-8 RjAxx43B-RjCipA 複合体形成の Native-PAGE による確認

レーン 1 : スタンダード (BSA)

レーン 2 : RjCipA

レーン 3 : RjAxx43B

レーン 4 : RjAxx43B-RjCipA 複合体 (6:1)

表 3-1 RjA<sub>xh</sub>43B の基質特異性

基質特異性 (U/mg-protein)				
酵素名	テンサイ アラビナン	リニア アラビナン	ビーチウッド キシラン	バーチウッド キシラン
RjA <sub>xh</sub> 43B	1.47 ± 0.11	0.35 ± 0.04	ND	ND

基質特異性 (U/mg-protein)			
酵素名	ライ麦 アラビノキシラン	可溶性小麦 アラビノキシラン	不溶性小麦 アラビノキシラン
RjA <sub>xh</sub> 43B	20.0 ± 1.3	62.3 ± 8.6	6.6 ± 5.1

ND : 検出されず

表 3-2 RjA<sub>xh43B</sub>-RjCipA 複合体の不溶性小麦アラビノキシランに対する分解活性

RjA <sub>xh43B</sub> : RjCipA	不溶性小麦アラビノキシランへの活性値	
	μg/nmol-RjA <sub>xh43B</sub>	相対活性値
6:0	40.6 ± 4.0	1
6:1	42.6 ± 6.0	1.05
6:3	49.3 ± 6.0	1.21
6:6	64.6 ± 12.7	1.59

相対活性値は遊離状態の RjA<sub>xh43B</sub> (6:0)が基質から生成した還元糖量を 1 とした場合の相対値を示す。活性値は 3 つの試料の値を平均したものであり、その標準誤差を ± で表した。

表 3-3 RjAxx43B-RjXyn10C-RjCipA 複合体による不溶性小麦アラビノキシランおよび稲わらに対する分解活性

n=3				
分解活性				
RjAxx43B:RjXyn10C:RjCipA	不溶性小麦アラビノキシラン		稲わら粉末	
	μg/nmol-RjAxx43B	相対活性値	μg/nmol-RjAxx43B	相対活性値
3:0:0	3.1 ± 0.3	0.16	ND	0.00
0:3:0	16.8 ± 1.0	0.84	2.3 ± 0.2	1.00
3:3:0 (calculated)	19.9	1	2.3	1
3:3:0	27.0 ± 3.55	1.36	4.0 ± 0.37	1.74
3:3:1	26.0 ± 2.99	1.31	3.4 ± 0.33	1.48
3:3:3	36.6 ± 0.45	1.84	4.5 ± 0.39	1.96
3:3:6	56.0 ± 1.77	2.81	7.0 ± 0.69	3.04

ND：検出されず

相対活性値は RjAxx43B および RjXyn10C が単独で基質から生成した還元糖量の和を 1 とした場合の相対値を示す。活性値は 3 つの試料の値を平均したものであり、その標準誤差を ± で表した。



## 第 4 章 総括

現在、セルロソームに関する研究は小型のキメラ骨格タンパク質を使用したものが多く、触媒モジュールの近接効果や、CBM によるターゲッティング効果について数多く報告されているが、骨格タンパク質の全長を用いたセルロソームの研究例は少ない。本研究では *R. josui* のセルロソームに着目し、その骨格タンパク質 RjCipA の全長を大腸菌で発現させ、精製することに成功した。また、セルラーゼ RjCel5B、キシラナーゼ RjXyn10C およびアラビノキシランアラビノフラノヒドラーゼ RjAxh43B を組換え酵素として発現させ、それらの酵素特性を明らかにするとともに、RjCipA と複合体を形成させることにより、酵素間の近接効果や CBM のターゲッティング効果についても検討した。

第 2 章では、セルラーゼ RjCel5B とキシラナーゼ RjXyn10C の酵素特性について調べ、さらに、RjCipA との複合体形成時における各基質への分解活性の影響を調べた結果について述べた。RjCel5B は大麦  $\beta$ -グルカンやコンニャクグルコマンナンに高い活性が見られたことから(表 2-2)、エンドグルカナーゼであると考えられた。RjXyn10C はキシランに活性を示したがセルロースには活性を示さなかった(表 2-2)。RjXyn10C はキシロオリゴ糖からキシロースとキシロビオースを、キシランからはキシロースとキシロビオースの他、より大きなキシロオリゴ糖が分解産物として検出されたことから(図 2-3)、キシロースおよびキシロビオースを生成するエンドキシラナーゼであることが分かった。

RjCel5B と RjCipA のモル比を 6:1、6:3、6:6 として複合体を形成させ、フナセルおよび稲わら粉末に対する分解活性を

調べた。RjCipA 非存在下(6:0)の RjCel5B の基質に対する活性値を 1 とし、各割合の RjCel5B-RjCipA 複合体(6:1、6:3、6:6)の相対活性値を算出すると、RjCipA の割合を高めるにつれ活性値は増加した(表 2-3)。しかし RjCipA から CBM を除去した RjCipA $\Delta$ CBM との複合体では、どの割合においても活性に変化は見られなかった(表 2-6)。RjCel5B は CBM を持たず、また RjCipA には結晶性セルロースに結合する CBM3 が含まれているため、複合体を形成することで不溶性セルロースへの結合が可能となり、そのターゲッティング効果により、RjCel5B では酵素活性が増加したと考えられる。また、RjCel5B-RjCipA(6:1)複合体の活性は RjCel5B-RjCipA(6:6)複合体の活性よりも低かったことから、複合体形成による酵素の近接効果は負の方向に働いたことが示された。

一方、RjXyn10C-RjCipA(6:1)複合体では、不溶性小麦アラビノキシランに対する酵素活性は低下した(表 2-4)。RjCipA の CBM3 は、この基質には吸着せず、酵素活性には直接影響を与えることはないと考えられるので、6:1 複合体で見られた活性の低下は、RjCel5B-RjCipA(6:1)複合体の場合と同様に近接効果が負の方向に働いたと思われる。RjXyn10C-RjCipA(6:1)複合体の稲わら粉末に対する分解活性は、不溶性小麦アラビノキシランに対する活性よりもさらに低下した。この結果は、RjXyn10C の CBM6 が持つキシランへの結合力より RjCipA が持つ CBM3 の結晶性セルロースに結合する力の方が大きく、RjXyn10C を標的基質から遠ざけてしまう隔離効果を生じさせた可能性がある。RjCel5B-RjXyn10C-RjCipA 複合体では、RjCipA に含まれる CBM3 の結晶性セルロースへのターゲッティング効果による RjCel5B の複合体形成効果と、この CBM3 による RjXyn10C の隔離効果が同時に

働いていたことが推察され、全体として大きな複合体形成効果を生じなかった(表 2-5)。

第 3 章では、*R. josui* のセルロソーム構成成分である RjAxx43B の酵素特性、RjAxx43B と RjXyn10C との相乗作用、さらに RjCipA との複合体形成の分解活性について調べた結果を述べた。RjAxx43B はアラビノキシロオリゴ糖 A<sup>2,3</sup>XX からアラビノースと A<sup>2</sup>XX または A<sup>3</sup>XX に分解したことから(図 3-5)、本酵素は、アラビノキシランの主鎖に含まれるキシロースの C2 と C3 の位置にそれぞれアラビノース側鎖があるキシロース残基から C3 のアラビノースのみを切断するアラビノフラノヒドロラーゼ D3 (AXHd3)に属することが示唆された。

RjAxx43B-RjCipA 複合体の不溶性小麦アラビノキシランに対する活性は、RjAxx43B 単独の活性と比べて大きな差はなく(表 3-2)、近接効果はみられなかった。RjXyn10C と RjAxx43B を混合すると不溶性小麦アラビノキシランに対して相乗的に作用し、酵素活性は計算で予想された値に比べて 1.7 倍に上昇した(表 3-3)。さらに、RjAxx43B-RjXyn10C-RjCipA(3:3:6)複合体では、稲わらに対して約 3 倍の酵素活性が得られた(表 3-3)。この結果は、ヘミセルラーゼがセルロソーム成分として含まれることの有意性を示唆している。しかし、触媒モジュールが密集しすぎると近接効果が負の方向に表れることから、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼは適度な割合でセルロソームにすることでアラビノキシランの分解に有効に働くことが示唆された。

本研究において、大腸菌の発現システムを利用して *R. josui* の全長骨格タンパク質の発現、精製が可能になり、RjCel5B などの酵素との複合体形成の実験結果から、セルロ

ソームの多様性や機能研究を推進する上で、RjCipA が非常に便利で使用しやすい実験材料であることが示された。RjCel5B、RjXyn10C および RjAxx43B を RjCipA と複合体を形成させ様々な基質に対する分解活性への影響を調べた結果、分解活性が増加する効果と低下する効果が見られたことから、セルロソーム構成成分としての糖質分解酵素は、適切な密度を保つこと、個々の酵素の組合せ、基質との相性などが揃わなければ最大の能力を発揮できないと考えられた。これらの現象をより詳細に検討するためには各 CBM の特性についてより深く解析すること、より多くの酵素について解析することが今後の重要な課題である。

なお、本博士論文研究の一部は、2 報の原著論文として既に発表済みである。

1. Orita T, Sakka M, Kimura T, Sakka K, 2017 Recombinant cellulolytic or xylanolytic complex comprising the full-length scaffolding protein RjCipA and cellulase RjCel5B or xylanase RjXyn10C of *Ruminiclostridium josui*. *Enzyme Microb. Technol.* 97; 63-70

2. Orita T, Sakka M, Kimura T, Sakka K, 2017 Characterization of *Ruminiclostridium josui* arabinoxylan arabinofuranohydrolase, RjAxx43B, and RjAxx43B-containing xylanolytic complex. *Enzyme Microb. Technol.* 104; 37-43

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始熱心かつ親切なご指導、ご助言を賜りました栗冠和郎教授ならびに木村哲哉教授、本論文の審査をして頂きました荻田修一教授、田丸浩教授に心からお礼申し上げます。また、実験を行うにあたって多くのご指摘、ご助言等頂きました栗冠真紀子博士に深く感謝いたします。その他、本研究に関して数々のご協力をいただきました応用微生物学研究室の皆様にお礼申し上げます。

## 参考文献

- [1] IPCC, 2012 Summary for policymakers. In: Managing the risks of extreme events and disasters to advance climate change adaptation. [Field CB, Barros V, Stocker TF, Qin D, Dokken DJ, Ebi KL, Mastrandrea MD, Mach KJ, Plattner G-K, Allen SK, Tignor M, Midgley PM (eds.)]. A special report of working groups I and II of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-19
- [2] Knutti R, Rogelj J, Sedlacek J, Fischer EM, 2016 A scientific critique of the two-degree climate change target. Nat. Geosci. 9; 13-19
- [3] White paper of energy. 2017 Agency for Natural Resources and Energy Japan.
- [4] Lynd LR, Zyl WH, McBride JE, Laser M, 2005 Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. Curr. Opin. Biotechnol. 16; 577-583
- [5] Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, Foust TD, 2007 Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. Science 315; 804-807
- [6] Nishiyama Y, Langan P, Chanzy H, 2002 Crystal

structure and hydrogen-bonding system in cellulose I $\beta$  from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* 124; 9074-9082

[7] Huang GL, Anderson TD, Clubb RT, 2013 Engineering microbial surfaces to degrade lignocellulosic biomass. *Bioengineered* 5; 96-106

[8] Zhao X, Zhang L, Liu D, 2012 Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. *Biofuels Bioprod. Biorefin.* 6; 561-579

[9] Gallage NJ, Moller BL, 2015 Vanillin-bioconversion and bioengineering of the most popular plant flavor and its de novo biosynthesis in the vanilla orchid. *Mol. Plant* 8; 40-57

[10] Okai N, Miyoshi T, Takeshima Y, Kuwahara H, Ogino C, Kondo A, 2016 Production of protocatechuic acid by *Corynebacterium glutamicum* expressing chorismate-pyruvate lyase from *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100; 135-145

[11] Thompson B, Machas M, Nielsen DR, 2016 Engineering and comparison of non-natural pathways for microbial phenol production. *Biotechnol. Bioeng.* 113; 1745-1754

[12] Lee J-H, Wendisch VF, 2016 Biotechnological production of aromatic compounds of the extended shikimate pathway from renewable biomass. *J. Biotechnol.* ISSN 0168-1656

[13] Hatfield RD, Rancour DM, Marita JM, 2017 Grass cell walls: A story of cross-linking. *Front. Plant Sci.* 7; 2056, 1-15

[14] Mewis K, Lenfant N, Lombard V, Henrissat B, 2016 Dividing the large glycoside hydrolase family 43 into subfamilies: a motivation for detailed enzyme characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 82; 1686-1692

[15] Bacic A, Stone BA, 1980 A (1→3)- and (1→4)-linked  $\beta$ -D-glucan in the endosperm cell-walls of wheat. *Carbohydr. Res.* 82; 372-377

[16] Pauly M, Keegstra K, 2008 Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant J.* 54; 559-568

[17] Aspinall GO, 1959 Structural chemistry of the hemicelluloses. *Adv. Carbohydr. Chem.* 14; 429-468

[18] Ralph J, Guillaume S, Grabber JH, Lapierre C, Barriere Y, 2004 Genetic and molecular basis of grass cell wall biosynthesis and degradability. *Comptes Rendus*



Biol. 327; 467-479

[19] Dodd D, Cann IKO, 2009 Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy* 1; 2-17

[20] Carpita NC, Defernez M, Findlay K, Wells B, Shoue DA, Catchpole G, Wilson RH, McCann MC, 2001 Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. *Plant Physiol.* 127; 551-565

[21] Toyama N, Ogawa K, 1977 Sugar production from rice straw by saccharification with *Trichoderma viride* cellulase. *Proc. Bioconversion Symp. IIT, New Delhi* 372-386

[22] Gandini A, Belgacem MN, Guo ZX, Montanari S, 2002 Lignins as macromonomers for polyesters and polyurethanes. In: *Chemical modification properties and usage of lignin.* [Thomas QH (eds.)]. Kluwer Academic Plenum, New York, pp. 57-80

[23] Mikame K, Funaoka M, 2006 Polymer structure of lignophenol I structure and function of fractionated lignophenol. *Polymer J.* 38; 585-591

[24] Webb EC, 1983 *Enzyme nomenclature*, executive committee of the international union of biochemistry, Academic Press. Inc., New York, pp. 347-358

- [25] Fujimoto Z, Kaneko S, Kuno A, Kobayashi H, Kusakabe I, Mizuno H, 2004 Crystal structures of decorated xylooligosaccharides bound to a family 10 xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *J. Biol. Chem.* 279; 9606-9614
- [26] Reese ET, Ray DL, 1959 Marine boring and fouling organisms. University of Washington Press, Seattle, pp. 265-300
- [27] Cragg SM, Beckham GT, Bruce NC, Bugg TD, Distel DL, Dupree P, Etxabe AG, Goodell BS, Jellison J, McGeehan JE, McQueen-Mason SJ, Schnorr K, Walton PH, Watts JE, Zimmer M, 2015 Lignocellulose degradation mechanisms across the tree of life. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 29; 108-119
- [28] Bischof RH, Ramoni J, Seiboth B, 2016 Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microb. Cell Fact.* 10; 15; 106. 1-13
- [29] Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, Chapman J, Chertkov O, Coutinho PM, Cullen D, Danchin EG, Grigoriev IV, Harris P, Jackson M, Kubicek CP, Han CS, Ho I, Larrondo LF, de Leon AL, Magnuson JK, Merino S, Misra M, Nelson B, Putnam N, Robbertse B, Salamov AA, Schmoll M, Terry A, Thayer N,

Westerholm-Parvinen A, Schoch CL, Yao J, Barabote R, Nelson MA, Detter C, Bruce D, Kuske CR, Xie G, Richardson P, Rokhsar DS, Lucas SM, Rubin EM, Dunn-Coleman N, Ward M, Brettin TS, 2008 Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). Nat. Biotechnol. 26; 553-560

[30] Shoemaker S, Schweickart V, Ladner M, Gelfand D, Kwok S, Myambo K, Innis M. 1983 Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase I derived from *Trichoderma reesei* strain L27. Nat. Biotech. 1; 691-696.

[31] Divne C, Stahlberg J, Reinikainen T, Ruohonen L, Pettersson G, Knowles JK, Teeri TT, Jones TA, 1994 The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. Science 265; 524-528

[32] Igarashi K, Uchihashi T, Koivula A, Wada M, Kimura S, Okamoto T, Penttilä M, Ando T, Samejima M, 2011 Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface. Science 333; 1279-1282

[33] Bayer EA, Shoham Y, Lamed R, 2013 Lignocellulose-decomposing bacteria and their enzyme systems. In: The Prokaryotes. Rosenberg E, DeLong EF, Stackebrandt E, Lory S, Thompson F (eds.) Springer-Verlag pp. 215-266

- [34] Himmel ME, Xu Q, Luo Y, Lamed R, Bayer EA, 2010 Microbial enzyme systems for biomass conversion : emerging paradigms. *Biofuels* 1; 323-341
- [35] White BA, Lamed R, Bayer EA, Flint HJ, 2014 Biomass utilization by gut microbiomes. *Annu. Rev. Microbiol.* 68; 279-296
- [36] Mazmanian SK, Liu G, Ton-That H, Schneewind O, 1999 *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* 285; 760-763
- [37] Cossart P, Jonquières R, 2000 Sortase, a universal target for therapeutic agents against gram-positive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97; 5013-5015
- [38] Bayer EA, Chanzy H, Lamed R, Shoham Y, 1998 Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8; 548-557
- [39] Jalak J, Kurasin M, Teugjas H, Valjamae P, 2012 Endo-exo synergism in cellulose hydrolysis revisited. *J. Biol. Chem.* 287; 28802-28815
- [40] Wilson DB, Kostylev M, 2012 Cellulase processivity. *Methods Mol. Biol.* 908; 93-99

- [41] Eichinger L, Pachebat JA, Glockner G, Rajandream MA, Sugang R, Berriman M, Song J, Olsen R, Szafranski K, Xu Q, 2005 The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 435; 43-57
- [42] King AJ, Cragg SM, Li Y, Dymond J, Guille MJ, Bowles DJ, Bruce NC, Graham IA, McQueen-Mason SJ, 2010 Molecular insight into lignocellulose digestion by a marine isopod in the absence of gut microbes *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107; 5345-5350
- [43] Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn SJ, Liu ZL, Zhai H, Sorlie M, Eijsink VGH, 2010 An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science* 330; 219-222
- [44] Kohler A, 2015 Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nat. Genet.* 47; 410-415
- [45] Vaaje-Kolstad G, 2010 An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science* 330; 219-222
- [46] Levasseur A, Drula E, Lombard V, Coutinho PM, Henrissat B, 2013 Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes.

Biotechnol. Biofuels 6; 41, 1-14

[47] Vaaje-Kolstad G, Houston DR, Riemen AH, Eijsink VGH, Aalten DMF, 2005 Crystal structure and binding properties of the *Serratia marcescens* chitin-binding protein CBP21. *J. Biol. Chem.* 280; 11313-11319

[48] Karkehabadi S, Hansson H, Kim S, Piens K, Mitchinson C, Sandgren M, 2008 The first structure of a glycoside hydrolase family 61 member, Cel61B from *Hypocrea jecorina*, at 1.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 383; 144-154

[49] Harris PV, Welner D, McFarland KC, Re E, Poulsen JCN, Brown K, Salbo R, Ding HS, Vlasenko E, Merino S, 2010 Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. *Biochemistry* 49; 3305-3316

[50] Chiu E, Hijnen M, Bunker RD, Boudes M, Rajendran C, Aizel K, Oliéric V, Schulze-Briese C, Mitsuhashi W, Young V, Ward VK, Bergoin M, Metcalf P, Coulibaly F, 2015 Structural basis for the enhancement of virulence by viral spindles and their in vivo crystallization *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112; 3973-3978

[51] Hemsworth GR, Henrissat B, Davies GJ, Walton PH,

2014 Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases. *Nat. Chem. Biol.* 10; 122-126

[52] Leggio LL, Simmons TJ, Poulsen JC, Frandsen KE, Hemsworth GR, Stringer MA, von Freiesleben P, Tovborg M, Johansen KS, De Maria L, Harris PV, Soong CL, Dupree P, Tryfona T, Lenfant N, Henrissat B, Davies GJ, Walton PH, 2015 Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monooxygenase. *Nat. Commun.* 6; 5961, 1-9

[53] Quinlan RJ, Sweeney MD, Leggio LL, Otten H, Poulsen JC, Johansen KS, Krogh KB, Jørgensen CI, Tovborg M, Anthonsen A, Tryfona T, Walter CP, Dupree P, Xu F, Davies GJ, Walton PH, 2011 Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108; 15079-15084

[54] Agger JW, Isaksen T, Várnai A, Vidal-Melgosa S, Willats WG, Ludwig R, Horn SJ, Eijsink VG, Westereng B, 2014 Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111; 6287-6292

[55] Borisova AS, Isaksen T, Dimarogona M, Kognole AA, Mathiesen G, Várnai A, Røhr ÅK, Payne CM, Sørli M,

Sandgren M, Eijsink VG, 2015 Structural and functional characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase with broad substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 290; 22955-22969

[56] Bennati-Granier C, Garajova S, Champion C, Grisel S, Haon M, Zhou S, Fanuel M, Ropartz D, Rogniaux H, Gimbert I, Record E, Berrin JG, 2015 Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenases secreted by *Podospora anserine*. *Biotechnol. Biofuels* 8; 90, 1-14

[57] Aachmann FL, Sørli M, Skjåk-Bræk G, Eijsink VGH, Vaaje-Kolstad G, 2012 NMR structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109; 18779-18784

[58] Courtade G, Wimmer R, Røhr AK, Preims H, Felice AK, Dimarogona M, Vaaje-Kolstad G, Sørli M, Sandgren M, Ludwig R, 2016 Interactions of a fungal lytic polysaccharide monooxygenase with  $\beta$ -glucan substrates and cellobiose dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113; 5922-5927

[59] Frandsen KEH, Simmons TJ, Dupree P, Poulsen JCN, Hemsworth GR, Ciano L, Johnston EM, Tovborg M, Johansen KS, Freiesleben P, 2016 The molecular basis of



polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases Nat. Chem. Biol. 12 ; 298-303

[60] Langston JA, Shaghasi T, Abbate E, Xu F, Vlasenko E, Sweeney MD, 2011 Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61. Appl. Environ. Microbiol. 77; 7007-7015

[61] Phillips CM, Beeson WT, Cate JH, Marletta MA, 2011 Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. ACS. Chem. Biol. 6; 1399-1406

[62] Tan TC, Kracher D, Gandini R, Sygmund C, Kittl R, Haltrich D, 2015 Structural basis for cellobiose dehydrogenase action during oxidative cellulose degradation. Nat. Commun. 6; 7542, 1-11

[63] Johansen KS, 2016 Lytic polysaccharide monooxygenases: the microbial power tool for lingo-cellulose degradation. Trends Plant Sci. 11; 926-936

[64] Vaaje-Kolstad G, Forsberg Z, Loose SMJ, Bissaro B, Eijsink GHV, 2017 Structural diversity of lytic polysaccharide monooxygenases. Curr. Opin. Struct. Biol. 44; 67-76

[65] Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B, 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 42; D490-D495

[66] Biely P, Vršanská M, Tenkanen M, Kluepfel D, 1997 Endo- $\beta$ -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J. Biotechnol.* 57; 151-166

[67] Collins T, Gerday C, Feller G, 2005 Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29; 3-23

[68] Pollet A, Delcour JA, Courtin CM, 2010 Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30; 176-191

[69] Pell G, Taylor EJ, Gloster TM, Turkenburg JP, Fontes CMGA, Ferreira LMA, Nagy T, Clark SJ, Davies GJ, Gilbert HJ, 2004 The mechanisms by which family 10 glycoside hydrolases bind decorated substrates. *J. Biol. Chem.* 279; 9597-9605

[70] Brás JL, Correia MA, Romão MJ, Prates JA, Fontes CM, Najmudin S, 2011 Purification, crystallization and preliminary X-ray characterization of the pentamodular

arabinoxylanase CtXyl5A from *Clostridium thermocellum*.  
Struct. Biol. Cryst. Commun. 67; 833-836

[71] Honda Y, Kitaoka M, 2004 A family 8 glycoside  
hydrolase from *Bacillus halodurans* C-125 (BH2105) is a  
reducing end xylose-releasing exo-oligoxylanase. J. Biol.  
Chem. 279; 55097-55103

[72] Hong PY, Iakiviak M, Dodd D, Zhang M, Mackie RI,  
Cann I, 2014 Two new xylanases with different substrate  
specificities from the human gut bacterium *Bacteroides*  
*intestinalis* DSM 17393. Appl. Environ. Microbiol. 80;  
2084-2093

[73] Juturu V, Wu JC, 2014 Microbial exo-xylanases: a mini  
review. Appl. Biochem. Biotechnol. 174; 81-92

[74] Lagaert S, Van S, Campenhout A, Pollet TM, Bourgois  
JA, Delcour CM, Courtin G, 2007 Recombinant expression  
and characterization of a reducing-end xylose-releasing  
exo-oligoxylanase from *Bifidobacterium adolescentis*. Appl.  
Environ. Microbiol. 73; 5374-5377

[75] Valenzuela SV, Lopez S, Biely P, Sanz-Aparicio J,  
Pastor FIJ, 2016 The GH8 reducing end xylose-releasing  
exo-oligoxylanase Rex8A from *Paenibacillus barcinonensis*  
BP-23 is active on branched xylooligosaccharides. Appl.  
Environ. Microbiol. 82; 5116-5124

- [76] Biely P, Vries RP, Vršanská M, Visser J, 2000 Inverting character of  $\alpha$ -glucuronidase A from *Aspergillus tubingensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1474; 360-364
- [77] Nagy T, Nurizzo D, Davies GJ, Biely P, Lakey JH, Bolam DN, Gilbert HJ, 2003 The  $\alpha$ -glucuronidase, GlcA67A, of *Cellvibrio japonicus* utilizes the carboxylate and methyl groups of aldobiouronic acid as important substrate recognition determinants. *J. Biol. Chem.* 278; 20286-20292
- [78] Nurizzo D, Nagy T, Gilbert HJ, Davies GJ, 2002 The structural basis for catalysis and specificity of the *Pseudomonas cellulosa*  $\alpha$ -glucuronidase, GlcA67. *Structure* 10; 547-556
- [79] Zaide G, Shallom D, Shulami S, Zolotnitsky G, Golan G, Baasov T, Shoham G, Shoham Y, 2003 Biochemical characterization and identification of catalytic residues in  $\alpha$ -glucuronidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Eur. J. Biochem.* 268; 3006-3016
- [80] Ryabova O, Vršanská M, Kaneko S, Zyl WH, Biely P, 2009 A novel family of hemicellulolytic  $\alpha$ -glucuronidase. *FEBS Lett.* 583; 1457-1462
- [81] Tenkanen M, Siika-Aho M, 2000  $\alpha$ -Glucuronidase of *Schizophyllum commune* acting on polymeric xylan. *J.*

Biotechnol. 78; 149-161

[82] St John FJ, Dietrich D, Crooks C, Pozharski E, Gonzalez JM, Bales E, Smith K, Hurlbert JC, 2014 A novel member of glycoside hydrolase family 30 subfamily 8 with altered substrate specificity. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 70; 2950-2958

[83] Nishitani K, Nevins DJ, 1991 Glucuronoxylan xylanohydrolase. A unique xylanase with the requirement for appendant glucuronosyl units. *J. Biol. Chem.* 266; 6539-6543

[84] Biely P, Puchart V, Stringer MA, Mørkeberg Krogh KBR, 2014 *Trichoderma reesei* XYN VI – a novel appendage-dependent eukaryotic glucuronoxylan hydrolase. *FEBS J.* 281; 3894-3903

[85] Busse-Wicher M, Gomes TCF, Tryfona T, Nikolovski N, Stott K, Grantham NJ, Bolam DN, Skaf MS, Dupree P, 2014 The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a two fold helical screw in the secondary plant cell wall of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 79; 492-506

[86] Gallardo O, Fernández-Fernández M, Valls C, Valenzuela SV, Roncero MB, Vidal T, Díaz P, Pastor FIJ, 2010 Characterization of a family GH5 xylanase with

activity on neutral oligosaccharides and evaluation as a pulp bleaching aid. *Appl. Environ. Microbiol.* 76; 6290-6294

[87] Lagaert S, Pollet A, Courtin CM, Volckaert G, 2014  $\beta$ -Xylosidases and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases: accessory enzymes for arabinoxylan degradation. *Biotechnol. Adv.* 32; 316-332

[88] Van Laere KMJ, Voragen CHL, Kroef T, Broek LAM, Beldman G, Voragen AGJ, 1999 Purification and mode of action of two different arabinoxylan arabinofuranohydrolases from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51; 606-613

[89] Van Laere KMJ, Beldman G, Voragen AGJ, 1997 A new arabinofuranohydrolase from *Bifidobacterium adolescentis* able to remove arabinosyl residues from double-substituted xylose units in arabinoxylan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47; 231-235

[90] Sørensen HR, Pedersen S, Meyer AS, 2007 Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble wheat arabinoxylan. *Enzym. Microb. Technol.* 40; 908-918

[91] Valls A, Diaz P, Pastor FIJ, Valenzuela SV, 2016 A newly discovered arabinoxylan-specific arabinofurano-

hydrolase. Synergistic action with xylanases from different glycosyl hydrolase families. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100; 1743-1751

[92] Biely P, 2012 Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 30; 1575-1588

[93] Biely P, Czigarova M, Uhliarikova I, Agger JW, Li XL, Eijsink VGH, Westereng B, 2013 Mode of action of acetylxylo-esterases on acetyl glucuronoxylan and acetylated oligosaccharides generated by a GH10 endoxylanase. *Biochim. Biophys. Acta* 1830; 5075-5086

[94] Neumuller KG, Carvalho de Souza A, vanRijn JHJ, Streekstra H, Gruppen H, Schols HA, 2015 Positional preferences of acetyl esterases from different CE families towards acetylated 4-O-methyl glucuronic acid-substituted xylo-oligosaccharides. *Biotechnol. Biofuels* 8; 7, 1-14

[95] Puchart V, Agger JW, Berrin JG, Varnai A, Westereng B, Biely P, 2016 Comparison of fungal carbohydrate esterases of family CE16 on artificial and natural substrates. *J. Biotechnol.* 233; 228-236

[96] Biely P, Mastihubova M, Puchart V, 2007 The vicinal hydroxyl group is prerequisite for metal activation of

*Clostridium thermocellum* acetylxylan esterase. Biochim. Biophys. Acta 1770; 565-570

[97] Uhliarikova I, Vrsanska M, McCleary BV, Biely P, 2013 Positional specificity of acetylxylan esterases on natural polysaccharide: An NMR study. Biochim. Biophys. Acta 1830; 3365-3372

[98] Puchart V, Berrin JG, Haon M, Biely P, 2015 A unique CE16 acetyl esterase from *Podospira anserina* active on polymeric xylan. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99; 10515-10526

[99] Koutaniemi S, Gool MP, Juvonen M, Jokela J, Hinz SW, Schols HA, Tenkanen M, 2013 Distinct roles of carbohydrate esterase family CE16 acetyl esterases and polymer-acting acetyl xylan esterases in xylan deacetylation. J. Biotechnol. 168; 684-692

[100] Crépin VF, Faulds CB, Connerton IF, 2004 Functional classification of the microbial feruloyl esterases. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63; 647-652

[101] Gilbert HJ, Knox JP, Boraston AB, 2013 Advances in understanding the molecular basis of plant cell wall polysaccharide recognition by carbohydrate-binding modules. Curr. Opin. Struct. Biol. 23; 669-677



- [102] Tomme P, Van Tilbeurgh H, Pettersson G, Van Damme J, Vandekerckhove J, Knowles J, Teeri T, Claeysens M, 1988 Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. Analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis. Eur. J. Biochem. 170; 575-581
- [103] Knowles J, Lehtovaara P, Teeri T, 1987 Cellulase families and their genes. Trends Biotechnol. 5; 255-261
- [104] Vaaje-Kolstad G, Horn SJ, van Aalten DM, Synstad B, Eijsink VG, 2005 The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. J. Biol. Chem. 280; 28492-28497
- [105] Bolam DN, Ciruela A, McQueen-Mason S, Simpson P, Williamson MP, Rixon JE, Boraston A, Hazlewood GP, Gilbert HJ, 1998 *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. Biochem. J. 331; 775-781
- [106] Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B, 2009 The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. Nucleic Acids Res. 37; D233-D238
- [107] Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ, 2004 Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysacchari-

de recognition. *Biochem. J.* 382; 769-781

[108] Asensio JL, Arda A, Canada FJ, Jimenez-Barbero J, 2013 Carbohydrate aromatic interactions. *Acc. Chem. Res.* 46; 946-954

[109] Caspi J, Barak Y, Haimovitz R, Irwin D, Lamed R, Wilson DB, Bayer EA. 2009 Effect of linker length and dockerin position on conversion of a *Thermobifida fusca* endoglucanase to the cellulosomal mode. *Appl. Environ. Microbiol.* 75; 7335-7342

[110] Hervé C, Rogowski A, Blake AW, Marcus SE, Gilbert HJ, Knox JP 2010 Carbohydrate-binding modules promote the enzymatic deconstruction of intact plant cell walls by targeting and proximity effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107; 15293-15298

[111] Ravalson H, Herpoel-Gimbert I, Record E, Bertaud F, Grisel S, Weert S, van den Hondel CAMJJ, Asther M, Petit-Conil M, Sigoillot JC, 2009 Fusion of a family 1 carbohydrate binding module of *Aspergillus niger* to the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase for efficient softwood kraft pulp biobleaching. *J. Biotechnol.* 142; 220-226

[112] Koseki T, Mochizuki K, Kisara H, Miyanaga A, Fushinobu S, Murayama T, Shiono Y, 2010 Characterization of a chimeric enzyme comprising feruloyl

esterase and family 42 carbohydrate-binding module. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86; 155-161

[113] Karita S, 2016 Carbohydrate-binding modules in plant cell wall-degrading enzymes. Trends Glycosci. Glycotechnol. 28; E49-E53

[114] Araki Y, Karita S, Tanaka A, Kondo M, Goto M, 2009 Characterization of family 17 and family 28 carbohydrate-binding modules from *Clostridium josui* Cel5A. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73; 1028-1032.

[115] 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. 7; 553-558

[116] Paës G, von Schantz L, Ohlin M, 2015 Bioinspired assemblies of plant cell wall polymers unravel the affinity properties of carbohydrate-binding modules. Soft Matter. 33; 6586-9654

[117] Stutzenberger FJ, 1972 Cellulolytic activity of *Thermomonospora curvata*: nutritional requirements for cellulase production. Appl. Microbiol. 24; 77-82

[118] Wilson DB, 1992 Biochemistry and genetics of actinomycete cellulases. Crit. Rev. Biotechnol. 12; 45-63

- [119] Lin E, Wilson DB, 1987 Regulation of  $\beta$ -1,4-endoglucanase synthesis in *Thermomonospora fusca*. Appl. Environ. Microbiol. 53; 1352-1357
- [120] Garcia-Martinez D, Shinmyo A, Madia A, Demain A, 1980 Studies of cellulase production by *Clostridium thermocellum*. Eur. J. Appl. Microbiol. 9; 189-197
- [121] Yan S, Wu G, 2013 Secretory pathway of cellulase: a mini-review. Biotechnol. Biofuels 6; 177
- [122] Pages S, Belaich A, Tardif C, Reverbel-Leroy C, Gaudin C, Belaich JP, 1996 Interaction between the endoglucanase CelA and the scaffolding protein CipC of the *Clostridium cellulolyticum* cellulosome. J. Bacteriol. 178; 2279-2286
- [123] Fierobe HP, Bayer EA, Tardif C, Czjzek M, Mechaly A, Belaich A, Lamed R, Shoham Y, Belaich JP, 2002 Degradation of cellulose substrates by cellulosome chimeras - substrate targeting versus proximity of enzyme components. J. Biol. Chem. 277; 49621-49630
- [124] Morais S, Barak Y, Lamed R, Wilson DB, Xu Q, Himmel ME, Bayer EA, 2012 Paradigmatic status of an endo- and exoglucanase and its effect on crystalline cellulose degradation. Biotechnol. Biofuels 5; 78, 1-9

[125] Fontes C, Gilbert HJ, 2010 Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. *Annu. Rev. Biochem.* 79; 655-681.

[126] Xu Q, Ding SY, Brunecky R, Bomble YJ, Himmel ME, Baker JO, 2013 Improving activity of minicellulosomes by integration of intra- and intermolecular synergies. *Biotechnol. Biofuels* 6; 126

[127] Huang GL, Anderson TD, Clubb RT, 2014 Engineering microbial surfaces to degrade lignocellulosic biomass. *Bioengineered* 5; 96-106.

[128] Bayer EA, Setter E, Lamed R, 1985 Organization and distribution of the cellulosome in *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* 163; 552-559

[129] Bayer EA, Lamed R, 1986 Ultrastructure of the cell surface cellulosome of *Clostridium thermocellum* and its interaction with cellulose. *J. Bacteriol.* 167; 828-836

[130] Lamed R, Kenig, R, Setter E, Bayer EA, 1985 Major characteristics of the cellulolytic system of *Clostridium thermocellum* coincide with those of the purified cellulosome. *Enzyme Microb. Technol.* 7; 37-41

- [131] Lamed E, Bayer EA, 1986 Contact and cellulolysis in *Clostridium thermocellum* via extensile surface organelles. *Experientia* 2; 72-73
- [132] Lamed R, Bayer EA, 1988 The cellulosome concept: exocellular/ extracellular enzyme reactor centers for efficient binding and cellulolysis. In: *Biochemistry and genetics of cellulose degradation*. [Aubert J-P, Béguin P, Millet J. (eds.)]. Academic Press, London, pp. 101-116
- [133] Lamed R, Bayer EA, 1988 The cellulosome of *Clostridium thermocellum*. *Adv. Appl. Microbiol.* 33; 1-46
- [134] Millet J, Petre D, Béguin P, Raynaud O, Aubert JP, 1985 Cloning of ten distinct DNA fragments of *Clostridium thermocellum* for cellulases. *FEBS Lett.* 29; 145-149
- [135] Joliff G, Béguin P, Aubert JP, 1986 Nucleotide sequence of the cellulase gene *celD* encoding endoglucanase D of *Clostridium thermocellum*. *Nucleic Acids Res.* 14; 8605-8613
- [136] Yutin N, Galperin MY, 2013 A genomic update on clostridia phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environ. Microbiol.* 15; 2631-2641
- [137] Tokatlidis K, Salamitou S, Béguin P, Dhurjati P,

Aubert J, 1991 Interaction of the duplicated segment carried by *Clostridium thermocellum* cellulases with cellulosome components. FEBS Lett. 291; 185-188

[138] Salamitou S, Tokatlidis K, Béguin P, Aubert JP, 1992 Involvement of separate domains of the cellulosomal protein S1 of *Clostridium thermocellum* in binding to cellulose and in anchoring of catalytic subunits to the cellulosome. FEBS Lett. 304; 89-92

[139] Tokatlidis K, Dhurjati P, Béguin P, 1993 Properties conferred on *Clostridium thermocellum* endoglucanase CelC by grafting the duplicated segment of endoglucanase CelD. Protein Eng. 6; 947-952

[140] Salamitou S, Raynaud O, Lemaire M, Coughlan M, Béguin P, Aubert J, 1994 Recognition specificity of the duplicated segments present in *Clostridium thermocellum* endoglucanase CelD and in the cellulosome-integrating protein CipA. J. Bacteriol 176; 2822-2827

[141] Chauvaux S, Béguin P, Aubert JP, Bhat KM, Gow LA, Wood TM, Bairoch A, 1990 Calcium-binding affinity and calcium-enhanced activity of *Clostridium thermocellum* endoglucanase D. Biochem. J. 265; 261-265

[142] Gerngross UT, Romaniec MPM, Kobayashi T, Huskisson NS, Demain AL, 1993 Sequencing of a

*Clostridium thermocellum* gene (*cipA*) encoding the cellulosomal S<sub>L</sub>-protein reveals an unusual degree of internal homology. Mol. Microbiol. 8; 325-334

[143] Shoseyov O, Takagi M, Goldstein MA, Doi RH, 1992 Primary sequence analysis of *Clostridium cellulovorans* cellulose binding protein A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89; 3483-3487

[144] Bayer EA, Morag E, Lamed R, 1994 The cellulosome -a treasure-trove for biotechnology. Trends Biotechnol. 12; 379-386

[145] Poole DM, Morag E, Lamed R, Bayer EA, Hazlewood GP, Gilbert HJ, 1992 Identification of the cellulose-binding domain of the cellulosome subunit S1 from *Clostridium thermocellum* YS. FEMS Microbiol. Lett. 99; 181-186

[146] Fujino, T, Béguin P, Aubert JP, 1993 Organization of a *Clostridium thermocellum* gene cluster encoding the cellulosomal scaffolding protein CipA and a protein possibly involved in attachment of the cellulosome to the cell surface. J. Bacteriol. 175; 1891-1899

[147] Leibovitz, E, Ohayon, H, Gounon, P, Béguin P, 1997 Characterization and subcellular localization of the *Clostridium thermocellum* scaffoldin dockerin binding



protein SdbA. J. Bacteriol, 179; 2519-2523

[148] Lemaire M, Miras I, Gounon P, Béguin P, 1998 Identification of a region responsible for binding to the cell wall within the S-layer protein of *Clostridium thermocellum*. Microbiology 144; 211-217

[149] Lemaire M, Ohayon H, Gounon P, Fujino T, Béguin P, 1995 OlpB, a new outer layer protein of *Clostridium thermocellum*, and binding of its S-layer-like domains to components of the cell envelope. J. Bacteriol. 177; 2451-2459

[150] Guglielmi G, Béguin P, 1998 Cellulase and hemicellulase genes of *Clostridium thermocellum* from five independent collections contain few overlaps and are widely scattered across the chromosome. FEMS Microbiol. Lett. 161; 209-215

[151] Leibovitz E, Béguin P, 1996 A new type of cohesin domain that specifically binds the dockerin domain of the *Clostridium thermocellum* cellulosome-integrating protein CipA. J. Bacteriol. 178; 3077-3084

[152] Yaron S, Morag E, Bayer EA, Lamed R, Shoham Y, 1995 Expression, purification and subunit-binding properties of cohesins 2 and 3 of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. FEBS Lett. 360; 121-124

[153] Pagès S, Belaich A, Belaich JP, Morag E, Lamed R, Shoham Y, Bayer EA, 1997 Species-specificity of the cohesin-dockerin interaction between *Clostridium thermocellum* and *Clostridium cellulolyticum*: prediction of specificity determinants of the dockerin domain. *Proteins* 29; 517-527

[154] Lytle B, Myers C, Kruus K, Wu JHD, 1996 Interactions of the CelS binding ligand with various receptor domains of the *Clostridium thermocellum* cellulosomal scaffolding protein CipA. *J. Bacteriol.* 178; 1200-1203

[155] Sakka K, Sugihara Y, Jindou S, Sakka M, Inagaki M, Kimura T, Sakka K, 2011 Analysis of cohesion-dockerin interactions using mutant dockerin proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 314; 75-80

[156] Shoseyov O, Doi RH, 1990 Essential 170-kDa subunit for degradation of crystalline cellulose by *Clostridium cellulovorans* cellulase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87; 2192-2195

[157] Shoseyov O, Hamamoto T, Foong F, Doi RH, 1990 Cloning of *Clostridium cellulovorans* endo-1,4- $\beta$ -glucanase genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 169; 667-672

- [158] Foong F, Hamamoto T, Shoseyov O, Doi RH, 1991 Nucleotide sequence and characteristics of endoglucanase gene *engB* from *Clostridium cellulovorans*. J. Gen. Microbiol. 137; 1729-1736
- [159] Doi RH, Goldstein M, Hashida S, Park JS, Takagi M, 1994 The *Clostridium cellulovorans* cellulosome. Crit. Rev. Microbiol. 20; 87-93
- [160] Faure E, Bagnara C, Belaich A, Belaich JP, 1988 Cloning and expression of two cellulase genes of *Clostridium cellulolyticum* in *Escherichia coli*. Gene 65; 51-58
- [161] Giallo J, Gaudin C, Belaich JP, 1985 Metabolism and solubilization of cellulose by *Clostridium cellulolyticum* H10. Appl. Environ. Microbiol. 49; 1216-1221
- [162] Fierobe HP, Gaudin C, Belaich A, Loutfi M, Faure F, Bagnara C, Baty D, Belaich JP, 1991 Characterization of endoglucanase A from *Clostridium cellulolyticum*. J. Bacteriol. 173; 7956-7962
- [163] Belaich JP, Tardif C, Belaich A, Gaudin C, 1997 The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum*. J. Biotechnol. 57; 1-3
- [164] Bagnara-Tardif C, Gaudin C, Belaich A, Hoest P,

Citard T, Belaich JP, 1992 Sequence analysis of a gene cluster encoding cellulases from *Clostridium cellulolyticum*. Gene 21; 17-28

[165] Cavendon K, Leschine SB, Canale-Parola E, 1990 Cellulase system of a free-living, mesophilic *Clostridium* (strain C7). J. Bacteriol. 172; 4222-4230

[166] Pohlschröder M, Leschine SB, Canale-Parola E, 1993 Regulation of the multicomplex cellulase-xylanase system of *Clostridium papyrosolvans*. In: Genetics biochemistry and ecology of lignocellulose degradation [Shimada K, Hoshino S, Ohmiya K, Sakka K, Kobayashi Y, Karita S (eds.)]. Eds. Uni Publishers Co., Ltd. Tokyo; pp. 86-94

[167] Pohlschröder M, Leschine SB, Canale-Parola E, 1994 Multicomplex cellulase-xylanase system of *Clostridium papyrosolvans* C7. J. Bacteriol. 176; 70-76

[168] Fujino T, Karita S, Ohmiya K, 1993 Nucleotide sequences of the *celB* gene encoding endo-1,4- $\beta$ -glucanase-2, ORF1 and ORF2 forming a putative cellulase gene cluster of *Clostridium josui*. J. Ferment. Bioeng. 76; 243-250

[169] Kakiuchi M, Isui A, Suzuki K, Fujino T, Fujino E, Kimura T, Karita S, Sakka K, Ohmiya K, 1998 Cloning and DNA sequencing of the genes encoding *Clostridium josui*

scaffolding protein CipA and cellulase CelD and identification of their gene products as major components of the cellulosome. *J. Bacteriol.* 180; 4303-4308

[170] Bayer EA, Belaich JP, Shoham Y, Lamed R, 2004 The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* 58; 521-554

[171] Doi RH, 2008 Cellulases of mesophilic microorganisms: cellulosome and noncellulosome producers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125; 267-279

[172] Ding SY, Bayer EA, Steiner D, Shoham Y, Lamd R, 1999 A novel cellulosomal scaffoldin from *Acetivibrio cellulolyticus* that contains a family 9 glycosyl hydrolase. *J. Bacteriol.* 181; 6720-6729

[173] Xu Q, Gao W, Ding SY, Kenig R, Shoham Y, Bayer EA, Lamed R, 2003 The cellulosome system of *Acetivibrio cellulolyticus* includes a novel type of adaptor protein and a cell surface anchoring protein. *J. Bacteriol.* 185; 4548-4557

[174] Xu Q, Barak Y, Kenig R, Shoham Y, Bayer EA, Lamed R, 2004 A novel *Acetivibrio cellulolyticus* anchoring scaffoldin that bears divergent cohesins. *J. Bacteriol.* 186; 5782-5789

[175] Ding SY, Bayer EA, Steiner D, Shoham Y, Lamed RA, 2000 Scaffoldin of the *Bacteroides cellulosolvens* cellulosome that contains 11 type II cohesins. J. Bacteriol. 182; 4915-4925

[176] Xu Q, Bayer EA, Goldman M, Kenig R, Shoham Y, Lamed R, 2004 Architecture of the *Bacteroides cellulosolvens* cellulosome: description of a cell surface-anchoring scaffoldin and a family 48 cellulase. J. Bacteriol. 186; 968-977

[177] Artzi L, Dassa B, Borovok I, Shamshoum M, Lamed R, Bayer EA, 2014 Cellulosomics of the cellulolytic thermophile *Clostridium clariflavum*. Biotechnol. Biofuels 7; 100, 1-14

[178] Flint HJ, 1997 The rumen microbial ecosystem - some recent developments. Trends Microbiol. 5; 483-488

[179] Robert C, Bernalier-Donadille A, 2003 The cellulolytic microflora of the human colon: evidence of microcrystalline cellulose-degrading bacteria in methane excreting subjects. FEMS Microbiol. Ecol. 46; 81-89

[180] Kirby J, Martin JC, Daniel AS, Flint HJ 1997 Dockerin-like sequences in cellulases and xylanases from the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus*

*flavefaciens*. FEMS Microbiol. Lett. 149; 213-219

[181] Ding SY, Rincon MT, Lamed R, Martin JC, McCrae SI, Aurilia V, Shoham Y, Bayer EA, Flint HJ, 2001 Cellulosomal scaffoldin-like proteins from *Ruminococcus flavefaciens*. J. Bacteriol. 183; 1945-1953

[182] Antonopoulos DA, Nelson KE, Morrison M, White BA, 2004 Strain-specific genomic regions of *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 as revealed by combinatorial random-phase genome sequencing and suppressive subtractive hybridization. Environ. Microbiol. 6; 335-346

[183] Rincon MT, Cepeljnik T, Martin JC, Lamed R, Barak Y, Bayer EA, Flint HJ, 2005 Unconventional mode of attachment of the *Ruminococcus flavefaciens* cellulosome to the cell surface. J. Bacteriol. 187; 7569-7578

[184] Rincon MT, Ding SY, McCrae SI, Martin JC, Aurilia V, Lamed R, Shoham Y, Bayer EA, Flint HJ, 2003 Novel organization and divergent dockerin specificities in the cellulosome system of *Ruminococcus flavefaciens*. J. Bacteriol. 185; 703-713

[185] Rincon MT, McCrae SI, Kirby J, Scott KP, Flint HJ, 2001 EndB, a multidomain family 44 cellulase from *Ruminococcus flavefaciens* 17, binds to cellulose via a novel cellulose-binding module and to another *R.*

*flavefaciens* protein via a dockerin domain. Appl. Environ. Microbiol. 67; 4426-4431

[186] Rincon MT, Martin JC, Aurilia V, McCrae SI, Rucklidge G, Reid M, Bayer EA, Lamed R, Flint HJ, 2004 ScaC an adaptor protein carrying a novel cohesin that expands the dockerin-binding repertoire of the *Ruminococcus flavefaciens* 17 cellulosome. J. Bacteriol. 186; 2576-2585

[187] Rincon MT, Cepeljnik T, Martin JC, Barak Y, Lamed R, Bayer EA, Flint HJ, 2007 A novel cell surface-anchored cellulose-binding protein encoded by the sca gene cluster of *Ruminococcus flavefaciens*. J. Bacteriol. 189; 4774-4783

[188] Jindou S, Borovok I, Rincon MT, Flint HJ, Antonopoulos DA, Berg ME, White BA, Bayer EA, Lamed R, 2006 Conservation and divergence in cellulosome architecture between two strains of *Ruminococcus flavefaciens*. J. Bacteriol. 188; 7971-7976

[189] Wood TM, Wilson CS, Stewart CS, 1982 Preparation of the cellulase from the cellulolytic anaerobic bacterium *Ruminococcus albus* and its release from the bacterial cell wall. Biochem. J. 105; 129-137

[190] Lamed R, Naimark J, Morgenstern E, Bayer EA, 1987 Specialized cell surface structures in cellulolytic bacteria.



J. Bacteriol. 169; 3792-3800

[191] Ohara H, Karita S, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K, 2000 Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) from *Ruminococcus albus*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64; 254-260

[192] Ohara H, Noguchi J, Karita S, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K, 2000 Sequence of *egV* and properties of EgV, a *Ruminococcus albus* endoglucanase containing a dockerin domain. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64; 80-88

[193] Wilson CA, Wood TM, 1992 The anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* - isolation and properties of a cellulosome-type enzyme fraction with the capacity to solubilize hydrogen-bond-ordered cellulose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37; 125-129

[194] Fanutti C, Ponyi T, Black GW, Hazlewood GP, Gilbert HJ, 1995 The conserved noncatalytic 40-residue sequence in cellulases and hemicellulases from anaerobic fungi functions as a protein docking domain. J. Biol. Chem. 270(49); 29314-29322

[195] Steenbakkens PJM, Li XL, Ximenes EA, Arts JG, Chen HZ, Ljungdahl LG, Op Den Camp HJ, 2001 Noncatalytic docking domains of cellulosomes of anaerobic fungi. J. Bacteriol. 183; 5325-5333

- [196] Dijkerman R, Vervuren MBF, DenCamp H, vanderDrift C, 1996 Adsorption characteristics of cellulolytic enzymes from the anaerobic fungus *Piromyces* sp strain E2 on microcrystalline cellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* 62; 20-25
- [197] Ali BRS, Zhou LQ, Graves FM, Freedman RB, Black GW, Gilbert HJ, Hazelwood GP, 1995 Cellulases and hemicellulases of the anaerobic fungus *Piromyces* constitute a multiprotein cellulose-binding complex and are encoded by multigene families. *FEMS Microbiol. Lett.* 125; 15-21
- [198] Ljungdahl LG, 2008 The cellulase/hemicellulase system of the anaerobic fungus *Orpinomyces* PC-2 and aspects of its applied use. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125; 308-321
- [199] Wang HC, Chen YC, Hseu RS, 2014 Purification and characterization of a cellulolytic multienzyme complex produced by *Neocallimastix patriciarum* J11. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451; 190-195
- [200] Nagy T, Tunnicliffe RB, Higgins LD, Walters C, Gilbert HJ, Williamson MP, 2007 Characterization of a double dockerin from the cellulosome of the anaerobic fungus *Piromyces equi*. *J. Mol. Biol.* 373; 12-22

[201] Fillingham IJ, Kroon PA, Williamson G, Gilbert HJ, Hazlewood GP, 1999 A modular cinnamoyl ester hydrolase from the anaerobic fungus *Piromyces equi* acts synergistically with xylanase and is part of a multiprotein cellulose-binding cellulase-hemicellulase complex. *Biochem. J.* 343; 215-224

[202] Bayer EA, Lamed R, White BA, Flint HJ, 2008 From cellulosomes to cellosomics. *Chem. Rec.* 8; 364-377

[203] You C, Zhang XZ, Zhang YHP, 2012 Mini-scaffoldin enhanced mini-cellulosome hydrolysis performance on low-accessibility cellulose (Avicel) more than on high-accessibility amorphous cellulose. *Biochem. Eng. J.* 63; 57-65

[204] Morais S, Barak Y, Hadar Y, Wilson DB, Shoham Y, Lamed R, Bayer EA. 2011 Assembly of xylanases into designer cellulosomes promotes efficient hydrolysis of the xylan component of a natural recalcitrant cellulosic substrate. *mBio* 2; e00233-00241

[205] Tsai SL, DaSilva NA, Chen W. 2013 Functional display of complex cellulosomes on the yeast surface via adaptive assembly. *ACS Synth. Biol.* 2; 14-21

[206] Gefen G, Anbar M, Morag E, Lamed R, Bayer EA.

2012 Enhanced cellulose degradation by targeted integration of a cohesin-fused  $\beta$ -glucosidase into the *Clostridium thermocellum* cellulosome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109; 10298-10303

[207] Fierobe HP, Mingardon F, Mechaly A, Bélaïch A, Pagès S, Lamed R, Tardif C, Bélaïch JP, Bayer EA, 2005 Action of designer cellulosomes on homogeneous versus complex substrates: controlled incorporation of three distinct enzymes into a defined trifunctional scaffoldin. J. Biol. Chem. 280; 16325-16334

[208] Morais, S, 2012 Deconstruction of lignocellulose into soluble sugars by native and designer cellulosomes. mBio 3, e00508-00512

[209] Jeon SD, Yu KO, Kim SW, Han SO, 2011 A cellulolytic complex from *Clostridium cellulovorans* consisting of mannanase B and endoglucanase E has synergistic effects on galactomannan degradation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90; 565-572

[210] Vazana Y, 2013 A synthetic biology approach for evaluating the functional contribution of designer cellulosome components to deconstruction of cellulosic substrates. Biotechnol. Biofuels 6; 182, 1-18

[211] Molinier AL, 2011 Synergy, structure and

conformational flexibility of hybrid cellulosomes displaying various inter-cohesins linkers. *J. Mol. Biol.* 405; 143-157

[212] Leammli, UK, 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 277; 680-685

[213] Bradford MM, 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72; 248-254

[214] Miller GL, 1959 Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31; 426-428

[215] Britton HTK, Robinson RA, 1931 Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *J. Chem. Soc.* 1931; 1456-1462

[216] Somogyi M, 1954 Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195; 19-23

[217] Garcia-Campayo V, Beguin P, 1997 Synergism between the cellulosome-integrating protein CipA and endoglucanase CelD of *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* 57; 39-47

[218] Ciruela A, Gilbert HJ, Ali BRS, Hazlewood GP, 1998 Synergistic interaction of the cellulosome integrating protein (CipA) from *Clostridium thermocellum* with a cellulosomal endoglucanase. FEBS Lett. 422; 221-224

[219] Krauss J, Zverlov VV, Schwarz WH, 2012 *In vitro* reconstitution of the complete *Clostridium thermocellum* cellulosome and synergistic activity on crystalline cellulose. Appl. Environ. Microbiol. 78; 4301-4307

[220] Currie DH, Herring CD, Guss AM, Olson DG, Hogsett DA, Lynd LR, 2013 Functional heterologous expression of an engineered full length CipA from *Clostridium thermocellum* in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. Biotechnol. Biofuels 434; 32, 1-14

[221] Hirano K, Nihei S, Hasegawa H, Haruki M, Hirano N, 2015 Stoichiometric assembly of the cellulosome generates maximum synergy for the degradation of crystalline cellulose as revealed by *in vitro* reconstitution of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. Appl. Environ. Microbiol. 81; 4756-4766

[222] Blouzard, JC, Bourgeois C, Philip P, Valette O, Belaïch A, Tardif C, Belaïch JP, Pages S, 2007 Enzyme diversity of the cellulolytic system produced by *Clostridium cellulolyticum* explored by two-dimensional

analysis: identification of seven genes encoding new dockerin-465 containing proteins. *J. Bacteriol.* 189; 2300-2309

[223] Ali MK, Fukumura M, Sakano K, Karita S, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K, 1999 Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding the *Clostridium stercorarium* xylanase C in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63; 1596-1604

[224] Sudo M, Sakka M, Kimura T, Ratanakhanokchai K, Sakka K, 2010 Characterization of *Paenibacillus curdlanolyticus* intracellular xylanase Xyn10B encoded by the *xyn10B* gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74; 2358-2360

[225] Tomme P, Driver DP, Amandoron EA, Miller Jr RC, Warren RAJ, Kilburn DG, 1995 Comparison of a fungal (family I) and bacterial (family II) cellulose-binding domain. *J. Bacteriol.* 177; 4356-4363

[226] Ichikawa S, Karita S, Kondo M, Goto M, 2014 Cellulosomal carbohydrate-binding module from *Clostridium josui* binds to crystalline and non-crystalline cellulose, and soluble polysaccharides. *FEBS Lett.* 588; 3886-3890

[227] Fernandes AC, Fontes CM, Gilbert HJ, Hazlewood GP,

Fernandes TH, and Ferreira LM. 1999 Homologous xylanases from *Clostridium thermocellum*: evidence for bi-functional activity, synergism between xylanase catalytic modules and the presence of xylan-binding domains in enzyme complexes. *Biochem. J.* 342; 105-110

[228] Jindou S, Soda A, Karita S, Kajino T, Béguin P, Wu JH, Inagaki M, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K, 2004 Cohesin-dockerin interactions within and between *Clostridium josui* and *Clostridium thermocellum* *J. Biol. Chem.* 279; 9867-9874

[229] Coutinho JB, Gilkes NR, Kilburn DG, Warren RAJ, Miller Jr RC, 1993 The nature of the cellulose-binding domain effects the activities of a bacterial endoglucanase on different forms of cellulose. *FEMS Microbiol. Lett.* 113; 211-217

[230] McGavin M, Forsberg CW, 1989 Catalytic and substrate-binding domains of endoglucanase from *Bacteroides succinogenes*. *J. Bacteriol.* 171; 3310-3315

[231] Rahnama N, Mamat S, Shah UKM, Ling FH, Rahman NAA, Ariff AB, 2013 Effect of alkali pretreatment of rice straw on cellulase and xylanase production by local *Trichoderma harzianum* SNRS3 under solid state fermentation. *BioResources* 8; 2881-2896



[232] Ali MK, Hayashi H, Karita S, Goto M, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K, 2001 Importance of the carbohydrate-binding module of *Clostridium stercorarium* Xyn10B to xylan hydrolysis. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65; 41-47

[233] Hirano K, Kurosaki M, Nihei S, Hasegawa H, Shinoda S, Haruki M, Hirano N. 2016 Enzymatic diversity of the *Clostridium thermocellum* cellulosome is crucial for the degradation of crystalline cellulose and plant biomass. Sci. Rep. 6; 35709-35716

[234] Suryani, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K, 2004 Sequencing and expression of the gene encoding the *Clostridium stercorarium*  $\beta$ -xylosidase Xyl43B in *Escherichia coli*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68; 609-614

[235] Rogowski A, Briggs JA, Mortimer JC, Tryfona T, Terrapon N, Lowe EC, Baslé A, Morland C, Day AM, Zheng H, Rogers TE, Thompson P, Hawkins AR, Yadav MP, Henrissat B, Martens EC, Dupree P, Gilbert HJ, Bolam DN, 2015 Glycan complexity dictates microbial resource allocation in the large intestine. Nat. Commun. 6; 7481, 1-16

[236] Broek LAM, Lloyd RM, Beldman G, Verdoes JC, McCleary BV, Voragen AGJ, 2005 Cloning and characterization of arabinoxylan arabinofuranohydrolase-D3 (AXHd3) from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083,

Appl. Microbiol. Biotechnol. 67; 641-647

[237] Wagschal K, Franqui-Espiet D, Lee CC, Kibblewhite-Accinelli RE, Robertson GH, Wong GWS, 2007 Genetic and biochemical characterization of an  $\alpha$ -L arabinofuranosidase isolated from a compost starter mixture, *Enzyme Microb. Technol.* 40; 747-753

[238] Wagschal K, Heng C, Lee CC, Wong GWS, 2009 Biochemical characterization of a novel dual-function arabinofuranosidase/xylosidase isolated from a compost starter mixture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81; 855-863.

[239] Sakka K, Nakanishi M, Sogabe M, Arai T, Ohara H, Tanaka A, Kimura T, Ohmiya K, 2003 Isothermal titration calorimetric studies on the binding of a family 6 carbohydrate-binding module of *Clostridium thermocellum* XynA with xyloligosaccharides. *Biosci Biotechnol Biochem.* 67; 406-409

[240] Yang W, Bai Y, Yang P, Luo H, Huang H, Meng K, Shi P, Wang Y, Yao B, 2015 A novel bifunctional GH51 exo- $\alpha$ -(L-arabinofuranosidase/endo-xylanase from *Alicyclobacillus* sp. A4 with significant biomass-degrading capacity. *Biotechnol. Biofuels* 8; 197, 1-14

[241] Jia L, Budinova GALG, Takasugi Y, Noda S, Tanaka T, Ichinose H, Goto M, Kamiya N, 2016 Synergistic

degradation of arabinoxylan by free and immobilized xylanases and arabinofuranosidase, *Biochem. Eng. J.* 114; 268-275.

[242] Gonçalves TA, Damásio ARL, Segato F, Alvarez TM, Bragatto J, Brenelli LB, Citadini APS, Murakami MT, Ruller R, Paes Leme AF, Prade RA, Squina FM, 2012 Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. *Bioresource Technol.* 119; 293-299

[243] Koukiekolo R, Cho HY, Kosugi A, Inui M, Yukawa H, Doi RH, 2005 Degradation of cofiber by *Clostridium cellulovorans* cellulases and hemicellulases and contribution of scaffolding protein CbpA. *Appl. Environ. Microbiol.* 71; 3504-3511

[244] Gold ND, Martin VJJ, 2007 Global view of the *Clostridium thermocellum* cellulosome revealed by quantitative proteomic analysis, *J. Bacteriol.* 189; 6787-6795