

- 第1章 緒言
- 第2章 伊勢湾の棘皮動物の密度と生物量の季節・年変動
- 第3章 伊勢湾のスナヒトデの個体群動態
- 第4章 伊勢湾のスナヒトデとモミジガイの食性
- 第5章 伊勢湾のクモヒトデ *Ophiura kinbergi* の二三の生態
- 第6章 考察おとび結論

1993年から1999年にかけて伊勢湾全域において採集されたスナヒトデ試料にもとづけば、スナヒトデの密度と生物量には顕著な季節・年変動が認められた。毎年、スナヒトデの新規加入は主として秋季にあるが、春季にも小規模な新規加入は認められている。スナヒトデの新規加入量の年変動は顕著であり、1996年と1997年には大規模な新規加入が認められたが、コホート解析によれば、この大規模な新規加入がとくにスナヒトデの底生個

体群の増大に結びつくことはなかった。貧酸素域の消長が伊勢湾のスナヒトデの生長や個体群構造に大きな影響を与えている。

1996年11月から1997年11月にかけて伊勢湾全域において採集されたスナヒトデ試料にもとづいて、モミジガイの食性と比較して、スナヒトデの食性を研究した。胃内容物の解析によって、次の事実が判明した。スナヒトデは主として棘皮動物、とくにクモヒトデを摂取し、それは全胃内容物の60%を占めていた。この結果は、主として湾口域と湾南部域に生息するモミジガイの食性に関する結果とは、著しく異なっていた。伊勢湾におけるスナヒトデの分布は底質特性と強い関係があり、スナヒトデの食性は環境中の餌生物の分布特性を反映していると推測された。また、環境中のクモヒトデの量と頻度は季節によって大きく変動しており、それは貧酸素域の消長と関係があった。

生物機能応用科学専攻

氏名	黒川 純司
学位記番号	生博 甲第154号
学位記授与の日付け	平成16年3月25日
学位論文題目	<i>Clostridium thermocellum</i> セルロソームの3種の触媒サブユニットに関する研究
論文審査委員	主査 教授・大宮 邦雄 教授・古市 幸生 教授・荒木 利芳 助教授・栗冠 和郎 助教授・木村 哲哉 東京工業大学大学院生命理工学研究科 教授・中村 聡

要 旨

好熱嫌気性細菌 *Clostridium thermocellum* はセルロソームと呼ばれるセルラーゼ複合体を形成する。このセルロームの形成するために本菌は強いセルロース分解能力を持つ。最近の研究により、セルロソームは、触媒能のない骨格タンパク質中に複数存在するコヘシンドメインに酵素成分のドックリンドメインが特異的結合することにより形成されることが分かってきた。この複合体に含まれる酵素成分を触媒サブユニットとよぶ。これまでに触媒

サブユニットとして多数のセルラーゼ、ヘミセルラーゼ遺伝子が報告されている。

本論文研究では *C. thermocellum* F1 株よりクローン化したマンナナーゼ遺伝子 (*man26B*) とセルラーゼ遺伝子 (*celT*) の塩基配列を決定し、両遺伝子にコードされている酵素の特性を明らかにした。また現在、ゲノム解析が *C. thermocellum* ATCC 27405 において行われており、マンナナーゼと高い相同性を示す新規の遺伝子が見いだされている。*C. thermocellum* F1 株のゲノム DNA より

PCR を用いて増幅したこの遺伝子を *man26C* として、これを大腸菌で発現させ酵素化学的特性を明らかにした。

C. thermocellum F1 株マンナナーゼ遺伝子 *man26B* は、591 アミノ酸からなる分子量 67,047 の酵素をコードする。Man26B はシグナルペプチド、マンナン結合ドメイン、糖質分解酵素ファミリー-26 の触媒ドメイン、セルロソームの中核である骨格蛋白質との結合部位であるドックリンドメインというように複数の機能ドメインから構成されているモジュラー酵素である。本遺伝子は *C. thermocellum* YS 株の *man26A* 遺伝子と同じ遺伝子であるが、触媒ドメインをコードする領域にフレームシフトが存在するため、アミノ酸置換が生じており約 30 アミノ酸が異なっている。ドックリンドメインを除去した酵素を大腸菌より精製し、酵素特性を調べた、その結果グルコマンナン、ガラクトマンナン、マンノトリオース以上のマンノオリゴ糖を分解し主としてマンノース、マンノビオース、マンノトリオースを生じた。本酵素は不溶性マンナンやセルロースに結合した。この酵素の至適温度は 75°C であり、YS 株の Man26A の 65°C と比較して 10°C 高かった。至適 pH は 7.0 であり、25°C で pH5~10 の範囲で安定であった。

このマンナナーゼ遺伝子 (*man26B*) の近傍にセルラーゼをコードする ORF (*celT*) が存在することを見出し、塩基配列を決定した。*celT* 遺伝子はアミノ酸数 611、分子量 68,500 の糖質分解酵素ファミリー-9 に属するタンパク質 CelT をコードしていた。CelT の N 末端側からシグナルペプチド、触媒ドメインが存在し、この下流にドックリンドメインが存在していた。ドッケリンを切除した酵素を構築し、大腸菌で発現させて精製を行った。この酵素はカルボキシメチルセルロースやヒドロキシエ

チルセルロース、セロテトラオース以上のセロオリゴ糖を主にセロビオースへ分解した。本酵素の至適温度は 70°C、至適 pH は 7.0 であった。細菌由来のファミリー-9 のセルラーゼのほとんどは Ig-like ドメインまたはファミリー-3c の糖質結合モジュールを持ち、これらのモジュールがないと著しくセルラーゼ活性が低下する。しかし、CelT はこれらのモジュールなしで強い活性を示す希な細菌由来のセルラーゼである。

man26C 遺伝子の ORF はアミノ酸数 590、分子量 67332 の糖質分解酵素ファミリー-26 に属するタンパク質をコードしていた。N 末端側からシグナルペプチド、マンナン結合ドメイン、触媒ドメインが存在し、C 末端側にはドックリンドメインが存在していた。相同性検索の結果、*C. thermocellum* の Mannanase26B と 40% の相同性があった。ドックリンドメインを除き大腸菌で発現させた本酵素は、グルコマンナン、ガラクトマンナンとマンノテトラオース以上のマンノオリゴ糖、*Codium fragile* 由来 β -1,4-マンナンに対して活性を示し、不溶性マンナンに結合した。至適温度は 70°C、至適 pH は 7.0 であった。

また、Man26B、CelT 及び Man26C が *C. thermocellum* F1 株のセルロソームの触媒サブユニットであることを免疫学的解析によって明らかにした。これはセルロソームがセルロースばかりでなくマンナンなどのヘミセルロースの分解にも関与することを示している。しかし、*C. thermocellum* はマンノースを資化できない。よって、これらマンナナーゼはマメ科植物の種子や針葉樹などのマンナンを含む植物細胞壁を分解する際に、マンナンを除去しセルロースを分解しやすくするために働くと考えられる。