

## 生物機能応用科学専攻

氏名	神藤 定生
学位記番号	生博 甲第 155 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 josui</i> のセルロソーム形成機構に関する研究
論文審査委員	主査 教授・大宮 邦雄 教授・荒木 利芳 教授・田中 晶善 助教授・粟冠 和郎 助教授・木村 哲哉 長岡技術科学大学工学部 教授・森川 康

## 要 旨

セルロースをグルコースに分解する嫌気性微生物としては、糸状菌のほかに堆肥などに生息する嫌気性細菌が知られている。これらの細菌は、基質特異性の異なる複数の酵素からなる複合体「セルロソーム」を形成している。セルロソームは触媒活性を持たない骨格タンパク質のコヘシンドメインにセルラーゼなどの触媒サブユニットのドックリンドメインが特異的に結合し形成される。これまでにコヘシンとドックリンの同種間および異種間における結合特性は十分な知見が得られていなかった。本研究では「この酵素分子群の相乗効果によりセルロソームは難分解性バイオマスの分解効率を高めている」という基本的理解に基づいて、*Clostridium josui* 由来の $\alpha$ -ガラクトシダーゼ (Aga27A) の酵素特性を明らかにするとともに、本酵素がセルロソーム構成成分であることを明らかにした。更に、Aga27A に見いだされたドックリンドメイン等を用いて、*C. josui* および *Clostridium thermocellum* のセルロソーム形成機構に関する研究を行った。

【1】*C. josui* 由来 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ (Aga27A) 遺伝子と翻訳産物の酵素特性

嫌気性中温細菌*C. josui*より単離した $\alpha$ -ガラクトシダーゼ (*aga27A*) 遺伝子は 1,434bp の ORF から成り、分子量 52,162 の蛋白質をコードしていた。本酵素の N 末端側には触媒ドメインを見出し、これは既報の細菌由来の $\alpha$ -ガラクトシダーゼ (ファミリー-4 あるいは 36) と異なる真核生物由来 (ファミリー-27) に属する新規な細菌由来の酵素であり、また系統樹解析も植物由来の $\alpha$ -ガラクトシダーゼに近縁であることを示していた。一方、

C 末端領域にはセルロソームへの組み込みサイトであるドックリン配列を見出したので、本酵素はセルロソーム構成成分の 1 つであると推定した。次に酵素特性の解析を目的として本触媒ドメインを、大腸菌で発現させ精製した。本酵素の pNP- $\alpha$ -ガラクトピラノシドに対する至適 pH は 5.5、至適温度は 58°C、 $K_m$  値は 3.2mM、 $V_{max}$  は 92.9  $\mu$ mole/min/mg であった。また、低分子基質 (メリビオース) のほか高分子基質 (グアーガム) に対しても活性を示し、植物由来のそれと同じ基質特異性を持つ、微生物由来では新規の酵素であった。本酵素がドックリン配列をコードしている事から本酵素がセルロソームの構成成分であると考え、精製酵素に対する抗体を作製しウェスタン解析を行った。その結果、セルロソーム蛋白質及び本酵素を発現させた大腸菌蛋白質に抗体反応が見られた。すなわち、本酵素が*C. josui*セルロソーム構成成分に組み込まれている事を明らかにした最初の報告となった。

【2】*C. josui*および*C. thermocellum* 由来のコヘシン・ドックリン結合特性の解析

本酵素中に存在するドックリンドメインのアミノ酸配列は*C. josui*に典型的なもので*C. thermocellum*のそれとは部分的に異なっていた。Aga27A 由来のドックリンドメイン等を用いて以下のセルロソーム形成機構に関する研究を行った。*C. thermocellum* からコヘシンを 7 種類、ドックリンを 4 種類、さらに*C. josui* からコヘシンを 4 種類、ドックリンを 2 種類クローニングした。それぞれ N 末端側にはヒスタグ (x6His-tag)、C 末端側にはコヘシンあるいはドックリンを持つ融合蛋白質を調製する為に、発現ベクターを構築し、大腸菌 BL21 (DE3) RIL 株で

発現させ精製した。

コヘシンとドックリンの結合特異性をファウウェスタ  
ンブロッティング解析およびネイティブ PAGE で網羅  
的に検討し, *C. josui* のドックリンは *C. josui* のコヘシン  
にのみに種特異的に結合することを明らかにした。この  
種特異性は今までに報告された *C. cellulolyticum* 由来のコ  
ヘシン・ドックリン結合と類似していた。一方, *C.*  
*thermocellum* のコヘシン・ドックリン結合には 2 組の結  
合対を見だし, *C. josui* のものとあわせて 3 対の結合特  
異性の異なるコヘシンおよびドックリンを確保した。

さらに, *C. thermocellum* 由来 XynA ドックリンは同種  
のコヘシンのみならず *C. josui* のコヘシンにも結合でき  
るという知見を見いだした。現在まで報告されたドックリ  
ンは全て同種間における結合のみが報告されており, 種  
特異性の広いドックリンを初めて見出した。表面プラズ

モン共鳴センサー (BIAcore) により測定したコヘシンー  
ドックリン結合の解離定数 (KD) は, *C. thermocellum* 由  
来の場合は  $1.4 \times 10^{-10}$   $2.4 \times 10^{-11}$  (M), *C. josui* 由来の  
場合は  $4.4 \times 10^{-9}$   $\sim$   $1.3 \times 10^{-10}$  (M) と非常に高い親和性  
があった。

### 【3】人工的に設計したキメラ骨格タンパク質の構築

人工セルロソームの構築を目的として, 上記の結果か  
ら得られた結合特異性の異なる 3 対のコヘシンおよびドッ  
クリンのうち, 2 種類のコヘシンを遺伝子操作で一分子  
に結合し, これを発現ベクターへ組み込み, 大腸菌  
BL21 (DE3) RIL 株で発現させキメラ骨格タンパク質  
を調製した。対応するドックリン 2 種類 (【2】で調製)  
がキメラ骨格タンパク質 (2 種のコヘシン) へ, それぞ  
れ 1:1 のモル比で結合することを表面プラズモン共鳴  
センサー (BIAcore) により確認した。

## 生物機能応用科学専攻

氏名	Suryani
学位記番号	生博 甲第 156 号
学位記授与の日付け	平成 16 年 3 月 25 日
学位論文題目	Studies on thermophilic hemicellulases from <i>Clostridium stercorarium</i> F-9 ( <i>Clostridium stercorarium</i> F-9 の好熱性ヘミセルラーゼに関する研究)
論文審査委員	主査 教授・大宮 邦雄 教授・荒木 利芳 教授・久松 眞 助教授・栗冠 和郎 助教授・木村 哲哉 岐阜大学農学部 教授・高見澤一裕

### 要 旨

キシランなどのヘミセルロースは, セルロースに次い  
で 2 番目に多く自然界に存在する多糖類であり, リグノ  
セルロース性バイオマスの 20 から 35% を占める。近年,  
バイオマスの有効利用の必要性が強く認識されてきてい  
るが, ヘミセルロースをバイオエネルギーや化学原料な  
どに変換するためにはキシラナーゼなどのヘミセルラー  
ゼの働きが必須である。本研究ではヘミセルロース分解  
性好熱嫌気性細菌 *Clostridium stercorarium* F-9 株由来の 2  
種のヘミセルラーゼ, すなわち  $\alpha$ -ガラクトシダーゼお

よび  $\beta$ -キシロシダーゼの遺伝子とその翻訳産物の特性  
について明らかにした。

まず, *C. stercorarium* F-9 株の染色体 DNA を単離・精  
製し, それを制限酵素 Sau3A1 で部分分解することによ  
り約 5~10kb の断片を調製した。その DNA 断片をクロ  
ーニング用プラスミドベクター pBluescript の BamHI 部  
位に連結した後, 大腸菌 XL1-Blue 株に導入し, 遺伝子  
ライブラリーを構築した。形質転換体を寒天平板培地上  
に生育させた後, 4-メチルウンベリフェリル- $\alpha$ -D-ガラ  
クトシドを含む軟寒天を重層した。寒天を固化させた後,