

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ト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・ドックリン結合の解離定数 (KD) は、*C. thermocellum* 由来の場合は 1.4×10^{-10} ~ 2.4×10^{-11} (M), *C. josui* 由来の場合は 4.4×10^{-9} ~ 1.3×10^{-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 *Clostridium stercorarium* F-9 (*Clostridium stercorarium* 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 α -ガラクトシダーゼお

よび β -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 *Bam*HI 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- α -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、

60℃で酵素反応を行わせ、紫外線照射下で蛍光を発するコロニーを α -ガラクトシダーゼ生産菌として選択した。組換え体よりプラスミドを単離し、挿入されていたDNA断片の塩基配列を決定したところ、この遺伝子は2,208塩基対からなり、736アミノ酸、推定分子量84,786の酵素をコードしていることが明らかとなった。推定アミノ酸配列をアミノ酸配列データベースと比較した結果、糖質分解酵素のファミリー36に属し*Geobacillus stearothermophilus*の α -ガラクトシダーゼGalA (57%)およびAgaN (52%)と高い相同性を持っていたので、本遺伝子をaga36Aと命名した。本遺伝子の周辺の塩基配列を決定したところ、その上流側に輸送タンパク質をコードする遺伝子が見いだされた。その相同性から、この遺伝子クラスターが*Clostridium perfringens*のそれと進化的に関連性があることが示唆された。本酵素 (Aga36A) を大腸菌により発現させ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で単一になるまで精製したが、その分子量は約70,000と計算され、アミノ酸配列から予想された値に比べ小さかった。精製酵素のN末端アミノ酸配列を決定したところ、塩基配列から推定されたアミノ酸配列と一致していたため、Aga36AのC末端側が大腸菌のプロテアーゼにより除去されたものと推定された。精製酵素の性質について検討した。本酵素は70℃、pH 6.0で最も高い活性を示した。また、本酵素は低分子基質であるラフィノース (3.0U/mg) の他、高分子ガラクトマンナンの一つであるグアーガム (0.46U/mg) を分解した。高分子の基質に対しても活性が見られたことから、グアーガムなどのガラクトマンナンの改質に有効であることが示唆された。

次に、上記と同様の方法を用いて*C. stercorarium* F-9株より β -キシロシダーゼをコードする遺伝子を単離した。ただし、寒天平板培地上における組換え体の β -キシロシダーゼ活性の検出用基質として、4-メチルウンベリフェリル- β -D-キシロシドを使用した。得られた組換え体よりプラスミドを調製し、挿入DNA断片の塩基配列を決定したところ、この遺伝子のオープンリーディングフレームは1,479塩基対からなり、493アミノ酸からなる推定分子量56,355のタンパク質をコードすることが分かった。このタンパク質の推定アミノ酸配列をアミノ酸配列データベースと比較した結果、糖質分解酵素のファミリー43に属することが分かり、本遺伝子をxyl43Bと命名した。Xyl4Bは*Bacteriodes thetaiotaomicron* (57%), *Prevotella ruminicola* (45%), *Streptomyces coelicolor* (40%) および*Clostridium acetobutylicum* (36%) 由来の β -キシロシダーゼと相同性を示した。本遺伝子のコーディング領域をPCR法で増幅し、発現ベクターpET-28aに連結した後、大腸菌BL21 (DE3) 株に導入し、発現させた。大腸菌組換え体から精製した酵素票標品はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一バンドを示し、その分子量はアミノ酸配列から推定された分子量と一致した。本酵素はp-ニトロフェニル- β -D-キシロシド (10.8 U/mg) やキシラン (0.1 U/mg) を分解した。本酵素は約80℃、pH 3.5で最も高い活性を示した。

*C. stercorarium*はヘミセルロース分解活性が強い好熱嫌気性細菌として知られており、本研究で明らかにしたAga36AやXyl43Bなど多くのヘミセルラーゼの共同作用によりヘミセルロースを効率的に分解すると考えられる。