

生物機能応用科学専攻

氏名	田口 秀典
学位記番号	生博 甲第 157 号
学位記授与の日付け	平成 16 年 7 月 14 日
学位論文題目	嫌気性細菌の植物繊維分解酵素の特性と遺伝子発現に関する研究
論文審査委員	主査 教授・栗冠 和郎 教授・荒木 利芳 教授・古市 幸生 助教授・木村 哲哉 名城大学農学部特任教授 大宮 邦雄

要 旨

嫌気性ルーメン細菌は反芻家畜の第一胃（ルーメン）に定着し、摂取された飼料（植物繊維成分）を分解利用し、菌体タンパク質や脂肪酸に変換することにより、家畜に栄養源やエネルギー源を供給する重要な役目を担っている。これら微生物の粗飼料分解機能力、特にセルロース性物質の分解能力は家畜の肥育速度を支配することから、きわめて重要である。この観点から、ルーメン細菌の植物繊維分解酵素遺伝子およびその翻訳産物の特性を解析した。さらに、嫌気性細菌の分子育種を目指した基礎研究として、嫌気性細菌における異種微生物由来の植物繊維分解酵素遺伝子の発現を試みた。

I. *Eubacterium ruminantium* のキシラナーゼ遺伝子 xynA とその翻訳産物の解析

ヘミセルロース分解性ルーメン細菌 *E. ruminantium* 由来のキシラナーゼ遺伝子を大腸菌にクローニングした。得られた 5.7kb の *EcoRI* DNA 断片の塩基配列を決定し、遺伝子構造を解析した。その結果、本キシラナーゼ遺伝子 XynA は糖質加水分解酵素ファミリー 10 に属する触媒ドメイン、その C 末端側のファミリー 9 の糖質結合モジュールおよび N 末端側のファミリー 22 の糖質結合モジュールから構成されていることが予想された。大腸菌で翻訳された全長のキシラナーゼは、キシランとキシロオリゴ糖に特異的に作用し、キシロビオースとキシロトリオースを生成し、その至適の pH と温度は各々 7.0 および 50°C であった。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動から、翻訳産物の分子量は約 91,000 と推定され、アミノ酸配列から算定した分子量 (91,042) とよく一致した。C または N 末端側モジュールを欠失させた変異

型キシラナーゼクローンを作成して、各モジュールの多糖類への結合性を定性的に測定したところ、ファミリー 9 の糖質結合モジュールはリン酸膨潤セルロースと不溶性キシランに結合する機能を持つが、N 末端側モジュールは糖質結合機能を持たないことが判明した。

II. *Ruminococcus albus* F-40 株由来のセルラーゼ遺伝子 *cel5D* とその翻訳産物の解析

R. albus 染色体 DNA の *EcoRI* 分解物を用いてセルラーゼ遺伝子をクローニングし、セルラーゼ遺伝子のコードされている領域を同定した。その領域の塩基配列を決定した結果、ファミリー 5 に属するセルラーゼ遺伝子が存在することを確認し、さらにその下流にファミリー 9 に属するセルラーゼが逆向きにコードされていることを見いだした。前者を *cel5D*、後者を *cel9A* と命名した。*Cel5D* は触媒ドメインの C 末端側に 2 つのファミリー 4 糖質結合モジュールを持つモジュラー酵素であった。

Cel5D の触媒ドメインの C 末端側に His-tag を付けた酵素を構築し、これを *Cel5D-His* と命名した。大腸菌で分泌発現させた酵素の N 末端アミノ酸配列を決定した結果、全長の *Cel5D* の N 末端側 24 アミノ酸はシグナルペプチドであることを確認した。次に *Cel5D* からシグナル配列を除いた触媒領域の C 末端側に His-tag を付けた酵素を構築し、この酵素を His-*Cel5D* と命名した。これを精製し酵素特性について検討した。反応至適温度は 30–50°C で、温度安定性は 40–50°C であった。至適 pH は 5.0–7.0 で、pH 4.0–10.0 で安定であった。カルボキシメチルセルロースに対する K_m 値は 3.9g/l、 V_{max} 値は 37.2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であった。セロオリゴ糖に対する分解特性を薄層クロマトグラフィーで分析し

た結果、本酵素はエンド型のグルカナーゼであると結論した。また、ファミリー4の糖質結合モジュールを単独で発現させ、実際にボールミルセルロースに結合する機能を持つことを確認した。

Ⅲ. キシラナーゼおよびセルラーゼ遺伝子の嫌気性細菌での発現

ルーメン細菌 *Butyrivibrio fibrisolvens* 49 や *R. albus* F-40 からキシラナーゼ (*xynA*) やセルラーゼ (*egl*) 遺伝子が単離された結果、これらを原株や他の嫌気性菌で発現させ、ルーメン内の飼料分解能を改良する発想が生まれ、嫌気性菌のホスト・ベクター系が開発されてきている。これを利用して、*B. fibrisolvens* OB156C へ *xynA* 遺伝子

を導入し、*XynA* のシグナル配列がタンパク質の細胞外への分泌に機能することを確認した。このシグナル配列を *R. albus* F-40 由来セルラーゼ遺伝子 (*egl*) の上流に連結して発現させることにより、*B. fibrisolvens* で発現するセルラーゼ活性の93%以上を分泌させることに成功した。

また、本学土壌から単離した嫌気性細菌 *Clostridium paraputrificum* M-21 株に *R. albus* F-40 のセルラーゼ遺伝子 (*egl*) 導入することにより *C. paraputrificum* ヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター制御下で *R. albus* の *egl* 遺伝子を発現させることに成功した。

生物機能応用科学専攻

氏名	岩崎 誠二
学位記番号	生博 甲第 158 号
学位記授与の日付け	平成 16 年 9 月 15 日
学位論文題目	三重県の水環境におけるエストロゲン様物質の挙動に関する研究
論文審査委員	主査 教授・粟冠 和郎 教授・古市 幸生 助教授・木村 哲哉 京都大学大学院地球環境学 教授・松井 三郎

要 旨

目的・方法

水環境の化学物質汚染のリスク管理を目的として、ヒトエストロゲン（女性ホルモン）受容体遺伝子組換え体酵母（以下、hER）によるバイオアッセイ（以下、酵母法）を利用したエストロゲン様物質の測定及び挙動解析を行った。hERには、エストロゲンに対する生体反応機構が組み込まれていて、その反応量に応じて酵素を生産する仕組みになっている。それゆえ、酵素活性を測定することによって、エストロゲン様物質の活性強度を定量することができる。また、測定試料の総括的な濃度の測定ができることから、環境試料のような混合系のエストロゲン様物質の測定手段として有用である。さらに、酵母法とHPLCと組み合わせた分析法では、定性分析も可能である。なお、本研究ではエストロゲン様物質の活性量は、17 β -エストラジオール（E2）等量として表した。

結 果

三重県内 18 河川の調査結果では、最大値は 14.7ng/L であり、6 割近い検体が 1ng/L を上回っていた。また、水試料をろ過液とろ過残さに分離してエストロゲン様物質を分析したところ、平均で 83% がろ過液に含まれていた。伊勢湾湾奥の四日市港地先海域で 6 地点 12 回調査した結果、すべての検体からエストロゲン様物質が検出された。最大値は 2.3ng/L であり、5 割の検体が 1ng/L を下回っていた。平均でエストロゲン様物質の 72% がろ過液に含まれていた。伊勢湾の湾奥から湾口にかけて 4 地点の上下層を測定したところ、上層で 0.1~2.3 ng/L、下層で N.D.~0.9ng/L であり、湾奥から湾口に向かうに従って値が減少する傾向があった。伊勢湾 8 地点における底質のエストロゲン様物質は、大部分が E2 及びエストロン（E1）であり、それらの合計値は、伊勢湾の最奥部では 6.5ng/g、湾口部では 1.1ng/g であった。前川から英虞湾湾口まで 8 地点の水質のエストロゲ