



# Bacillus stearotheromophilus No.21の耐熱性キシラン分解酵素遺伝子群の構造と分子進化に関する研究

馬場, 知哉

---

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

1994-03-31

(Date of Publication)

2012-06-20

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1317

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3078445>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001317>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



# 博士論文

Bacillus stearothermophilus No. 21 の耐熱性キシラン  
分解酵素遺伝子群の構造と分子進化に  
関する研究

平成6年3月

神戸大学大学院自然科学研究科

馬場 知哉

博士論文

Bacillus stearothermophilus No. 21 の耐熱性キシラン  
分解酵素遺伝子群の構造と分子進化に  
関する研究

平成6年3月

神戸大学大学院自然科学研究科

馬場 知哉

# 目次

	ページ
序論	1
第 I 章 <u>Bacillus stearothermophilus</u> No. 21 のキシラン分解酵素遺伝子の クローニング	3
第 1 節 序	3
第 2 節 <u>Bacillus stearothermophilus</u> No. 21 のゲノム DNA ライブラ リーの作成	3
A. 実験方法	3
(1) 挿入 DNA 断片の調製法	3
① <u>Bacillus stearothermophilus</u> No. 21 からのゲノム DNA の抽出法	3
② アガロースゲル電気泳動法	4
③ ゲノム DNA の制限酵素 (Sau3AI) による部分分解法	5
④ シュクロースグラジエント超遠心法による DNA 断片の分画法	5
(2) プラスミドベクター (pUC19) の調製法	5
① プラスミドベクター (pUC19) の抽出法	5
② プラスミドベクター (pUC19) の制限酵素 (BamHI) による切断法	6
③ プラスミドベクター (pUC19) の脱リン酸化処理法	7
(3) 挿入 DNA 断片とプラスミドベクターのライゲーション法	7
(4) 宿主大腸菌 ( <u>Escherichia coli</u> JM109) コンピテントセルの調製法	7
(5) プラスミドの宿主大腸菌への形質転換法	7
(6) 形質転換株の選択法	8
B. 実験結果	8
第 3 節 キシラン分解酵素遺伝子クローン株の選択	8
A. 実験方法	8
B. 実験結果	9
第 4 節 サブクローニングとキシラン分解酵素遺伝子存在領域の特定	9
A. 実験方法	9
(1) キシラン分解酵素遺伝子クローン株からのプラスミドの抽出法	9
(2) クローン遺伝子の制限酵素地図の作成法	10

(3) 各種制限酵素を用いたサブクローニング法	11
(4) DNAデリション法によるサブクローニング法	11
(5) 各サブクローン株のキシラン分解酵素活性の検出法	11
B. 実験結果	11
第5節 考察	12
第II章 Maxi-cell法を用いたクローン遺伝子産物の同定	21
第1節 序	21
第2節 Maxi-cell法によるクローン遺伝子の発現	21
A. 実験方法	21
(1) キシラナーゼ活性測定法	21
① 3,5-DNS試薬の調製法	21
② 2%キシラン基質溶液の調製法	21
③ キシラナーゼ活性測定法	21
(2) $\beta$ -キシロシダーゼ活性測定法	22
① 0.02Mフェニル- $\beta$ -D-キシロシド溶液の調製法	22
② 1Nフェノール試薬の調製法	22
③ $\beta$ -キシロシダーゼ活性測定法	22
(3) タンパク質の定量法	22
(4) 宿主大腸菌 ( <i>Escherichia coli</i> CSR603) コンピテントセルの調製と プラスミドの形質転換法	22
(5) Maxi-cell法によるクローン遺伝子の発現法	22
(6) <i>Escherichia coli</i> JM109と <i>Escherichia coli</i> CSR603でのクローン 遺伝子の発現の比較検討法	23
B. 実験結果	23
第3節 電気泳動によるクローン遺伝子産物の同定	24
A. 実験方法	24
(1) 等電点電気泳動法	24
(2) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法	24
(3) タンパク質染色法	24
(4) 活性染色法	24

B. 実験結果	25
第4節 クローン遺伝子産物のN末端アミノ酸配列の決定	25
A. 実験方法	25
(1) SDS-PAGE法	25
(2) エレクトロブロットリング法	25
(3) N末端アミノ酸配列の決定法	26
B. 実験結果	26
第5節 考察	26
第III章 <u>Bacillus stearothermophilus</u> No. 21のクラスター構造を形成する	
キシラン分解酵素遺伝子群の構造解析	32
第1節 序	32
第2節 クラスター構造遺伝子の全塩基配列の決定	32
A. 実験方法	32
(1) 鋳型DNAの調製法	32
(2) DNAシーケンスゲルの作成法	33
(3) DNAシーケンス法	33
(4) DNAシーケンスの解析法	33
B. 実験結果	33
第3節 Maxi-cell法を用いたプロモーター領域の推定	34
A. 実験方法	34
B. 実験結果	35
第4節 考察	35
第IV章 <u>Bacillus stearothermophilus</u> No. 21のキシラナーゼアイソザイム	
遺伝子の構造解析	48
第1節 序	48
第2節 キシラナーゼアイソザイム遺伝子の全塩基配列の決定	48
A. 実験方法	48
B. 実験結果	48
第3節 考察	49

第 V 章	<u>Bacillus stearothermophilus</u> No. 21 のキシラン分解酵素群の遺伝子デザインと分子進化の特徴	56
第 1 節	序	56
第 2 節	クローン遺伝子の大腸菌 ( <u>Escherichia coli</u> JM109) における発現能	56
A.	実験方法	56
B.	実験結果	57
第 3 節	各キシラン分解酵素のキシラン分解特性	57
A.	実験方法	57
(1)	人工基質に対する分解特性	57
①	キシラナーゼ活性検出法	57
②	$\beta$ -キシロシダーゼ活性検出法	58
③	アラビノフラノシダーゼ活性検出法	58
④	セロビオヒドロラーゼ活性検出法	58
(2)	天然基質に対する分解特性	58
①	基質溶液の調製法	58
②	酵素液の調製法	58
③	酵素反応法	58
④	薄層クロマトグラフ (TLC) 法	59
B.	実験結果	59
第 4 節	考察	60
	要約	66
	参考文献	69
	謝辞	73

## 序論

植物細胞壁はセルロース、ヘミセルロース及びリグニンの3大成分から成り、ヘミセルロースは通常多種の複合多糖から構成されるが、陸生の草本植物においてはキシランが主成分である。特に、イネ科植物、例えば、麦わら、トウモロコシ穂軸、バガス、綿実殻などにキシランは多く含まれており、15~30%に達する。キシランはキシロースが $\beta$ -1,4結合(1,4- $\beta$ -D-キシロシド結合)した多糖であり、セルロースのグルコースをすべてキシロースに置き換えた構造に似ているが、少量のアラビノースなどの側鎖がつく場合が多い<sup>1)</sup>。

キシラン分解酵素には、キシラナーゼ(endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase; EC 3.2.1.8)と $\beta$ -キシロシダーゼ(exo-1,4- $\beta$ -D-xylosidase; EC 3.2.1.27)がある。キシラナーゼはキシラン主鎖の1,4- $\beta$ -D-キシロシド結合をランダムに加水分解してキシロオリゴ糖を生成するのに対し、 $\beta$ -キシロシダーゼはキシランの非還元性末端部に作用し、キシロースを生成する<sup>2)</sup>。キシラン分解酵素は医薬分野や、食品への農業廃棄物の高度なバイオマス利用分野において特に期待されている酵素の1つである<sup>3,4)</sup>。

この地球上に生物が誕生したのは今から約35億年前、その後生物は絶え間ない進化を続けて現在に至っている。生物の進化は、その生活環境に適応するための生存戦略とも捉えられ、微生物もまた多様な環境に適応して進化を遂げてきた生物である。土壌微生物は、生態系における物質循環の分解者としての役割上、植物が出現してからは、植物体の分解、とりわけ植物細胞壁の分解への対応が重大な課題であった。それは必然的に土壌微生物に存在する植物細胞壁分解酵素の分子進化の過程に反映されたものと考えられる。

微生物は、キシラナーゼなどの植物細胞壁分解酵素を生産し、そのうちいくつかの酵素についてはその諸性質が明らかにされてきた<sup>5-17)</sup>。現在キシラナーゼ及びセルラーゼについては、その1次構造を基にしたhydrophobic cluster analysisにより、A~Iの9つのファミリーに分類されている<sup>18-20)</sup>。これらの酵素は、一般にmulti-enzyme systemを構成し、性質の異なった、あるいは類似した酵素が同一の誘導条件で同時に生産されたり、また協調的に働くことなどが知られている<sup>21,22)</sup>。しかし、これらの酵素がどのような性質を持ち、植物細胞壁の分解にあたってどのような機能分担をし、どのような分子進化の

過程を経てきたのかについては未だ明らかにされていない。

南森らは、好熱土壌細菌 Bacillus stearothermophilus No. 21 がキシランの高分解能を持つこと、それが耐熱性のキシラナーゼと  $\beta$ -キシロシダーゼによる協調的な 2 段階反応による multi-enzyme system を構成していることを好熱菌において初めて証明した<sup>23)</sup>。

本研究においては、Bacillus stearothermophilus No. 21 の耐熱性キシラン分解酵素遺伝子群の構造解析を行うとともに、それらの酵素遺伝子の分子進化の過程について例証し、遺伝子デザインを行うことによって各酵素遺伝子の発現を可能とし、さらにそれぞれの酵素の機能特性の獲得過程を明らかにすることを目的として研究を行った。

本論文は、序論、第 I 章～第 V 章および要約より構成されている。第 I 章の『Bacillus stearothermophilus No. 21 のキシラン分解酵素遺伝子のクローニング』では、Bacillus stearothermophilus No. 21 のゲノム遺伝子ライブラリーからキシラン分解酵素遺伝子の形質転換株を選択し、クローン遺伝子の存在領域の特定について記述した。第 II 章の『Maxi-cell 法を用いたクローン遺伝子産物の同定』では、Maxi-cell 法によりクローン遺伝子を選択的に発現させ、遺伝子産物の同定を 2 次元電気泳動と活性染色法によって行い、またクローン遺伝子産物の N 末端アミノ酸配列の決定について記述した。第 III 章の『Bacillus stearothermophilus No. 21 のクラスター構造を形成するキシラン分解酵素遺伝子群の構造解析』では、クラスター構造を形成する Bacillus stearothermophilus No. 21 のキシラナーゼ遺伝子と  $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子について、その全塩基配列の決定とその構造解析について記述した。第 IV 章の『Bacillus stearothermophilus No. 21 のキシラナーゼアイソザイム遺伝子の構造解析』では、Bacillus stearothermophilus No. 21 のキシラナーゼアイソザイム遺伝子について全塩基配列の決定を行い、その構造について記述した。第 V 章の『Bacillus stearothermophilus No. 21 のキシラン分解酵素群の遺伝子デザインと分子進化の特徴』では、Bacillus stearothermophilus No. 21 のキシラン分解酵素遺伝子群の構造的な特性を利用し、単一のクローンにおける各酵素遺伝子の単独あるいは複数同時発現システムのための遺伝子デザインを行い、各酵素の基質特異性に及ぼす分子進化についての考察を記述した。要約では、以上の結果についての総合的な考察を行い、それを記述した。

# 第 I 章 Bacillus stearothermophilus No. 21 のキシラン分解酵素遺伝子のクローニング

## 第 1 節 序

Bacillus stearothermophilus No. 21 が菌体外に分泌する 2 種類のキシラン分解酵素（キシラナーゼと  $\beta$ -キシロシダーゼ）の遺伝子をクローニングする目的で、本菌株のゲノム DNA ライブラリーをプラスミドベクター（pUC19）と宿主大腸菌（Escherichia coli JM109）を用いて作成した。作成した DNA ライブラリーからのキシラン分解酵素遺伝子を含む形質転換株の選択は、キシラン分解酵素に対する人工基質を用いたハローの検出により行い、さらにサブクローニングにより目的遺伝子の存在する遺伝子領域の特定を試みた。

## 第 2 節 Bacillus stearothermophilus No. 21 のゲノム DNA ライブラリーの作成

### A. 実験方法

#### (1) 挿入 DNA 断片の調製法

##### ① Bacillus stearothermophilus No. 21 からのゲノム DNA の抽出法

Bacillus stearothermophilus No. 21 の培養は、南森らの方法<sup>23)</sup>を参考に次のように行った。20% glycerol に  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存状態（グリセロールストック）にある本菌株を融解後、菌体一白金耳を培地 [2.0% polypepton, 0.25% yeast extract, 0.2%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.005%  $\text{MnSO}_4$ , pH 7.0] 3ml に接種し  $55^{\circ}\text{C}$  で 24 時間、振とう培養を行いこれを前培養液とした。500ml 容三角フラスコに同じ組成の培地 100ml を調製し、これに前培養液 1.0ml を植菌し  $55^{\circ}\text{C}$  で 24 時間 200rpm の振とう条件にて本培養を行った。得られた培養液を遠心分離 ( $10,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 分) により集菌した。

菌体からのゲノム DNA の抽出は CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY<sup>24)</sup> の記載を参考に以下の方法で行った。菌体を 17ml の TE バッファー [10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0)] に懸濁し 900  $\mu\text{l}$  の 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)、90  $\mu\text{l}$  の 20mg/ml protease K (Merck 社製) を加え混和し  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間静置した。遠心分離 ( $12,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 分) 後、上清に 2.25ml の 5M NaCl を加えた後、1.8ml の 10% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) / 0.7M NaCl を混和し、 $65^{\circ}\text{C}$  で 10 分間静置した。その後、等量のクロロホルム/イソアミルアル

コール (24:1;V/V) を加え混和後、遠心分離 (12,000×g, 4°C, 10分) により上清を得た (クロロホルム抽出)。この上清に等量のTNE飽和フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1;V/V) を加え混和させた。ここで用いたTNE飽和フェノールは、TNEバッファー [50mM Tris-HCl (pH 7.5), 100mM NaCl, 0.5mM EDTA (pH 8.0)] で飽和させたフェノールである。遠心分離 (12,000×g, 4°C, 10分) により上清を得た (フェノール抽出)。この上清に等量のジエチルエーテルを加え混和後、遠心分離 (12,000×g, 4°C, 5分) し上清のジエチルエーテル層を除去した (エーテル洗浄)。エーテル洗浄の操作を3回繰り返した後、60°Cで1時間攪拌し、水層中のジエチルエーテルを完全に取り除いた。水層に対し0.6倍量のイソプロピルアルコールを加え混和後、遠心分離 (13,000×g, 室温, 10分) により上清を除き、70%エタノールを加え混和し遠心分離 (13,000×g, 4°C, 5分) の後、上清を除き、減圧下でエタノールを蒸発させDNAを乾固させた (イソプロピルアルコール沈澱)。このDNAを3mlのTEバッファーに溶解し終濃度50μg/mlになるようにRNase A (Boehringer Mannheim社製) を加えた。フェノール抽出とエーテル洗浄を行い、水層に対し0.1倍量の3M 酢酸ナトリウム (pH 6.0) と、2.5倍量のエタノールを加え混和し-80°Cで15分静置後に、遠心分離 (13,000×g, 4°C, 10分) し上清を除き、70%エタノールを加え攪拌し遠心分離 (13,000×g, 4°C, 5分) の後、上清を除き、減圧下でエタノールを蒸発させDNAを乾固させた (エタノール沈澱)。得られたDNAを200μlのTEバッファーに溶解し、これを Bacillus stearothermophilus No.21のゲノムDNA溶液とした。得られたゲノムDNA溶液のDNA濃度は、260nmの紫外吸収スペクトルの測定により行い、またDNA純度は、260nm/280nmの値より検定するとともに、アガロースゲル電気泳動を行いDNAの均一性を確認した。DNA溶液の保存は-20°Cで行った。

## ② アガロースゲル電気泳動法

DNAのアガロースゲル電気泳動は、電気泳動システムMupid-2 (コスモ・バイオ社製) を使用し、以下の方法で行った。0.3gの電気泳動用アガロース (同仁社製) を30mlのTAEバッファー [40mM Tris-acetate (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0)] に懸濁した後、加熱溶解し約50°Cになるまで冷却したのち、1.5μlの ethidium bromide (10mg/ml) (和光純薬) を加えゲル作成台に注入した。ゲル硬化後、泳動槽にゲルを取り付け、TAEバッファーを泳動バッファーとして用いた。

泳動するDNA試料の溶液容に対して、1/5容量の6× Gel-loading buffer (0.25% bromophenol blue, 30% glycerol) を加えたものを泳動試料とした。DNAマーカーとしては、λファージDNAを制限酵素HindIIIで分解したλHindIIIDNAマーカーを用いた。泳動は50Vで約1時間行い、紫外線トランスイルミネーターを用いてDNAのバンドを検出した。

### ③ ゲノムDNAの制限酵素 (Sau3AI) による部分分解法

①で得られた Bacillus stearothermophilus No. 21のゲノムDNA 25μgに4塩基認識の制限酵素Sau3AI (宝酒造) 3.3 unitsと6μlの10×Hバッファー [500 mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Dithiothreitol, 1000mM NaCl] を加え、滅菌水で60μlに定容した1.5ml容チューブを4本作成した。37℃で2分間制限酵素反応をさせた後、70℃で15分間インキュベートし制限酵素を失活させた。4本のチューブを1本のチューブに集め、フェノール抽出、クロロホルム抽出、エーテル洗浄の後エタノール沈澱を行い、200μlのTEバッファーに溶解し、ゲノムDNAの部分分解によるDNA断片を調製した。一部をアガロースゲル電気泳動を行い、DNA断片の大きさを確認した。

### ④ シュクロースグラジエント超遠心法によるDNA断片の分画法

シュクロースグラジエント超遠心法は、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY<sup>25)</sup>の記載を参考に以下の方法で行った。グラジエントとペリスタポンプを用いて、SW-41Ti型スウィングローター用12ml容遠心チューブ (Beckman社製) に底部から、オートクレーブ滅菌した60%~10%(W/V)のシュクロース水溶液を重層した。グラジエントのムラをなくすため2時間室温で静置した後、③で得られたDNA断片を重層し超遠心 (190,000×g, 20℃, 15時間) を行なった。超遠心後、ペリスタポンプを用いて遠心チューブの底部から250μlずつを1.5ml容チューブに分画、エタノール沈澱をし、10μlのTEバッファーに溶解した。一部をアガロースゲル電気泳動により各画分のDNA断片のサイズを検討した。2.0~9.4kbのサイズのDNA断片の画分を回収し、これを挿入DNA断片とした。保存は-20℃で行った。

## (2) プラスミドベクター (pUC19) の調製法

### ① プラスミドベクター (pUC19) の抽出法

プラスミド (pUC19) を有する大腸菌 (Escherichia coli HB101) を、アンピシリン濃度が50μg/mlとなるLB培地 [1% bacto-tryptone (DIFCO社製), 0.5%

bacto-yeast extract (DIFCO社製), 0.8% NaCl, pH 7.0] 5mlに植菌し37℃で12時間振とう培養を行い前培養液とした。同じ組成の培地300mlを1 liter容の三角フラスコに調製し、前培養液を3ml植菌し37℃で12時間、200rpmの振とう培養を行った。培養液を遠心分離 (10,000×g, 4℃, 10分) により集菌した。菌体を5mlの50mM Tris-HClバッファー (pH 8.0)に懸濁し、50μl RNase A (10mg/ml)と1.7mlのLysozyme (10mg/ml)を加えて、氷水中で10分間混和した。2mlの0.5M EDTA (pH 8.0)を加え氷水中で10分間静置したのち、2.1mlの0.4% Triton X-100を加え氷水中で1時間混和した。遠心分離 (13,000×g, 4℃, 20分)の後、得られた上清に0.25mlの5M NaClを加え、フェノール抽出を2回とエーテル抽出を2回行った。2mlの5M NaClと4mlの30% polyethylene glycol (W/V)を加え、氷水中で12時間静置したのち遠心分離 (12,000×g, 4℃, 20分)によりDNAの沈澱を得た。沈澱を1.5mlのバッファー [20mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0)]に溶解し、1.6gの塩化セシウムと100μlの10mg/ml ethidium bromideを加え、超遠心用チューブに移し超遠心 (780,000×g, 20℃, 5時間の後、380,000×g, 20℃, 1時間)を行った。遠心後、チューブに紫外線 (365nm)を照射しプラスミドDNA (pUC19)のバンドを注射針で吸い取り、1.5ml容チューブに移しn-ブタノールで3回抽出し、エーテル洗浄を2回行い、3倍量の80%エタノールを加えてエタノール沈澱を行った。得られたDNAの沈澱を200μlのTEバッファーに溶解し、フェノール抽出、エーテル洗浄の後、再びエタノール沈澱を行った。DNAの沈澱を200μlのTEバッファーに溶解し、これをプラスミドベクター (pUC19)溶液とした。DNAの濃度と純度を第2節(1)の①と同様に検討し、アガロースゲル電気泳動によりDNAの均一性を確認した。保存は-20℃で行った。

## ② プラスミドベクター (pUC19) の制限酵素 (BamHI) による切断法

第2節(2)の①で得られたプラスミドベクター (pUC19) 20μgに制限酵素 BamHI (宝酒造) 20 unitsと10μlの10×Kバッファー [200mM Tris-HCl (pH 8.5), 100mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Dithiothreitol, 1000mM KCl]を加え、滅菌水で100μlに定容し、30℃で3時間制限酵素反応を行った後、60℃で15分間インキュベーションを行い制限酵素を失活させた。フェノール抽出、エーテル洗浄を行い、エタノール沈澱後270μlの滅菌水に溶解した。

### ③ プラスミドベクター (pUC19) の脱リン酸化処理法

第2節(2)の②で得られたpUC19のBamHI切断断片に、30 $\mu$ lの10 $\times$ CIPバッファー [100mM Tris-HCl (pH 8.3), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM ZnCl<sub>2</sub>] と30 unitsの脱リン酸化酵素Calf intestine phosphatase (宝酒造) を加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベート後、56 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートした。35 $\mu$ lの10 $\times$ TNE バッファー [500mM Tris-HCl (pH 7.5), 1M NaCl, 5mM EDTA (pH 8.0)]、8.75 $\mu$ lの20% SDSと6.25 $\mu$ lの滅菌水を加え混和した後、68 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートを行い酵素を失活させた。フェノール抽出、エーテル洗浄を行った後、エタノール沈澱を行い100 $\mu$ lのTEバッファーに溶解し、これをDNAライブラリー作成用のベクターとして用いた。DNA濃度を260nmの紫外吸収スペクトルで測定し、一部をアガロースゲル電気泳動により確認した。保存は-20 $^{\circ}$ Cで行った。

### (3) 挿入DNA断片とプラスミドベクターのライゲーション法

第2節(1)で得られた挿入DNA断片100ngと第2節(2)で得られたpUC19ベクター 100ngのライゲーション反応を、これらのDNAに1.0 $\mu$ lの10 $\times$ T<sub>4</sub> DNA Ligase バッファー [660mM Tris-HCl (pH 7.6), 66mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM Dithiothreitol]、0.5 $\mu$ lの10mM ATP (Sigma社製)、100 unitsのT<sub>4</sub> DNA Ligase (宝酒造) を加え滅菌水で10 $\mu$ lに定容し、16 $^{\circ}$ Cで12時間のインキュベートにより行った。

### (4) 宿主大腸菌 (*Escherichia coli* JM109) コンピテントセルの調製法

*Escherichia coli* JM109を一白金耳、グリセロールストックから5mlのLB培地に接種し、37 $^{\circ}$ Cで12時間振とう培養し前培養液とした。300ml容三角フラスコにLB培地50mlを調製し、前培養液0.5mlを植菌した。37 $^{\circ}$ C、200rpmの条件で650nmで測定される培養液の濁度の値が0.6になるまで菌体を振とう培養した。培養液を氷水中で30分間静置し、菌体を遠心分離 (8,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 5分) した後25mlの50mM CaCl<sub>2</sub>溶液に懸濁させ氷水中で1時間混和させた。遠心分離 (8,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 5分) 後、菌体を5mlの50mM CaCl<sub>2</sub>/20% glycerol溶液に懸濁し、1.5ml容チューブに350 $\mu$ lずつ分注した後-80 $^{\circ}$ Cで保存したものを*Escherichia coli* JM109のコンピテントセルとした。

### (5) プラスミドの宿主大腸菌への形質転換法

第2節(4)で調製した宿主大腸菌のコンピテントセル150 $\mu$ lに20 $\mu$ lの10 $\times$ TCMバッファー (100mM Tris-HCl (pH 7.5), 100mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM CaCl<sub>2</sub>) とプラス

ミドDNAを加え、滅菌水で200 $\mu$ lに定容し、水中で30分間静置後、42 $^{\circ}$ Cで90秒間インキュベートをした。再び水中で2分間静置し、LB培地を1ml加え37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした後、300 $\mu$ lずつをLB培地プレート [LB培地中に以下を含む、1.5% agar, 50 $\mu$ g/ml ampicillin, 40ng/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal), 48ng/ml isopropyl- $\beta$ -D-thio-galactopyranoside (IPTG)] に広げ37 $^{\circ}$ Cで12時間培養した。

#### (6) 形質転換株の選択法

第2節(5)のLB培地プレート上に生育した大腸菌コロニーのうち、青色を呈さない白色コロニーのみを、オートクレーブ滅菌した爪楊枝を用いてピックアップし、50 $\mu$ g/mlのampicillinを含むLB培地を入れた96穴マイクロタイタープレートに接種し、37 $^{\circ}$ Cで12時間培養した後、glycerolを終濃度20%になるように加えて-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。

### B. 実験結果

120 $\mu$ gの Bacillus stearothermophilus No. 21のゲノムDNAを得た。DNA純度は260nm/280nm値が1.778であり、アガロースゲル電気泳動においても均一なDNAのバンドであることを確認した。ゲノムDNAの制限酵素Sau3AIによる部分分解の後、シュクロースグラジエント超遠心により6.9 $\mu$ gの挿入DNA画分(2.0~9.4kb)を得た。

913 $\mu$ gのプラスミドDNA(pUC19)を得、DNA純度は260nm/280nm値が1.809で、アガロースゲル電気泳動でも均一なプラスミドであることを確認した。制限酵素BamHIで切断し脱リン酸化処理を行い作成したプラスミドベクター18 $\mu$ gのDNA濃度は0.3 $\mu$ g/ $\mu$ lであり、アガロースゲル電気泳動で均一なDNAバンドを確認した。

挿入DNA断片とプラスミドベクターのライゲーションと宿主大腸菌への形質転換を繰り返し、得られた白色コロニー2,600株を Bacillus stearothermophilus No. 21のゲノムDNAライブラリーとして-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。

### 第3節 キシラン分解酵素遺伝子クローン株の選択

#### A. 実験方法

第2節で得られたゲノムDNAライブラリーの各形質転換株を、96穴マイク

ロタイタープレートからオートクレーブ滅菌した爪楊枝を用いてピックアップし、選択LB培地プレート [LB培地中に以下を含む、1.5% agar, 50  $\mu$ g/ml ampicillin, 48ng/ml IPTG, 800ng/ml 4-o-methyl-D-glucurono-D-xylan-remazol brilliant blue R (RBB-xylan), 20ng/ml 4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-xyloside (4MU- $\beta$ -xyloside)] に接種し、37°Cで12時間培養した後、60°Cで8時間インキュベートし、宿主大腸菌の溶菌とキシラン分解酵素の酵素反応を行った。RBB-xylanはキシラナーゼに対する人工基質であり、キシラナーゼによる分解作用を受けると青色から無色に変化するため、選択LB培地プレート上で形質転換株のコロニーの周辺に透明なハローを生じたものをキシラナーゼ遺伝子クローン株とした。また、4MU- $\beta$ -xylosideは $\beta$ -キシロシダーゼに対する人工基質であり、 $\beta$ -キシロシダーゼによる分解作用を受けると360nmの紫外線照射により蛍光を発するため、選択LB培地プレート上ではコロニーの周囲に360nmの紫外線照射により蛍光のハローを生じたものを $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子クローン株とした。なお、各酵素はそれぞれの人工基質に対し特異的に作用する<sup>26,27)</sup>。

## B. 実験結果

DNAライブラリー中より、RBB-xylanに対しハローを形成した株を3株を得、そのうち2株については4MU- $\beta$ -xylosideに対してもハローを形成したが、4MU- $\beta$ -xylosideに対してのみハローを形成するものは得られなかった。両方の基質に作用した形質転換株を2F株と13E株とし、RBB-xylanにのみ作用した株を17B株とした。

各形質転換株が形成するハローの様子を、外来の挿入DNAを含まないプラスミドpUC19のみを形質転換した株と対比させてFig. 1-1に示した。

## 第4節 サブクローニングとキシラン分解酵素遺伝子存在領域の特定

### A. 実験方法

#### (1) キシラン分解酵素遺伝子クローン株からのプラスミドの抽出法

形質転換株からのプラスミドの抽出は以下の方法で行った。凍結保存されている形質転換株を、5mlのLB培地 (50  $\mu$ g/ml ampicillinを含む) で37°Cで12時間振とう培養し、遠心分離 (10,000 $\times$ g, 4°C, 5分) で集菌した。菌体を100  $\mu$ lのSol. I (50mM glucose, 25mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM EDTA) に懸濁し、200  $\mu$ lの

Sol. II (0.2N NaOH, 1% SDS) を加え混和した後5分間水中に静置した。150 $\mu$ lの Sol. III (3M potassium acetate buffer (pH 4.8)) を加え混和し5分間水中に静置した後、遠心分離 (13,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 10分) し上清に対しフェノール抽出、エーテル洗浄を行いエタノール沈澱した。得られたDNAの沈澱を200 $\mu$ lのTEバッファーに溶解し、終濃度50 $\mu$ g/mlになるようにRNase Aを加え、プラスミド溶液とした。保存は-20 $^{\circ}$ Cで行った。

## (2) クローン遺伝子の制限酵素地図の作成法

形質転換株から抽出されたプラスミドに挿入されている外来DNA断片の制限酵素地図を、制限酵素 (宝酒造) HindIII、PstI、XbaI、BamHI、SmaI、KpnI、SacI、EcoRI、PveIIについて作成した。各制限酵素反応に用いた10 $\times$  bufferは、PstI、EcoRIについては10 $\times$  H buffer [500mM Tris-HCl (pH 7.5), 100mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM dithiothreitol, 1000mM NaCl]、HindIII、XbaI、PveIIについては10 $\times$  M buffer [100mM Tris-HCl (pH 7.5), 100mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM dithiothreitol, 500mM NaCl]、KpnI、SacIについては10 $\times$  L buffer [100mM Tris-HCl (pH 7.5), 100mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM dithiothreitol]、BamHIについては10 $\times$  K buffer [200mM Tris-HCl (pH 8.5), 100mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM dithiothreitol, 1000mM KCl]、SmaIについては10 $\times$  T buffer [330mM Tris-acetate (pH 7.9), 100mM Mg-acetate, 5mM dithiothreitol, 660mM K-acetate] である。各制限酵素反応は、プラスミド溶液1 $\mu$ lに制限酵素10 unitsとその制限酵素の10 $\times$  buffer 2 $\mu$ lを加え、滅菌水で20 $\mu$ lに定容し反応溶液とした。XbaIとSmaIについては、Bovine serum albumin (BSA) を終濃度0.01%となるように加え、KpnIについてはTriton X-100を終濃度0.01%となるように加えた。BamHIとSmaIについては30 $^{\circ}$ Cで、その他については37 $^{\circ}$ Cで3時間反応させた。反応後TEバッファーで100 $\mu$ lに定容した後、フェノール抽出、エーテル洗浄、エタノール沈澱を行い、10 $\mu$ lのTEバッファーに溶解した。2種以上の制限酵素で反応させる場合は、この後に、以上の操作を繰り返して行った。制限酵素での処理の後、アガロースゲル電気泳動を行い、 $\lambda$  HindIII-DNAマーカーの移動度との比較により各DNAバンドのサイズを推定した。用いた制限酵素のプラスミドpUC19における制限サイトは確定されているため、挿入DNAの制限酵素地図が推定された。

### (3) 各種制限酵素を用いたサブクローニング法

第4節(2)で作成された各挿入DNAの制限酵素地図をもとに、第4節(2)で得られた各DNA断片に対し、pUC19およびpUC18プラスミドを用いてサブクローニングを行った。pUC18プラスミドの抽出は第2節(2)でのpUC19プラスミドの抽出と同様に行い、プラスミドの制限酵素反応は第4節(2)の方法に従った後、脱リン酸化処理を第2節(2)の脱リン酸化処理に従い行った。ライゲーション反応と宿主大腸菌への形質転換、形質転換株の選択も第2節の方法に従い、得られた形質転換株からのプラスミドの抽出と、挿入DNAの制限酵素地図の作成を第4節(1)(2)の方法に従い行った。なお、挿入DNAのPveII断片の平滑末端については、プラスミド側の平滑末端のSmaIサイトにライゲーションを行った。

### (4) DNAデリション法によるサブクローニング法

2本鎖DNA断片の5'突出末端あるいは平滑末端に対してExonucleaseIIIは、3'から5'に向かって末端からのDNA鎖の分解反応を行い、5'突出の1本鎖DNA断片を生成する。Mung Bean Nucleaseは1本鎖DNAを末端から分解し、2本鎖DNAに対しては作用しない。Klenow Fragmentは突出末端を2本鎖に修復する機能を持つ。これらの酵素を組み合わせることにより、挿入DNA断片を末端から削っていくことが可能となる(DNAデリション法)。DNAデリション法を、Kilo-Sequence用Deletion Kit(宝酒造)を用いてサブクローニングを行った。

### (5) 各サブクローン株のキシラン分解酵素活性の検出法

第4節(3)(4)で得られた各種サブクローン株のキシラン分解酵素活性の有無は、第3節で用いた方法に従い検出した。

## B. 実験結果

2F株、13E株および17B株の各形質転換株より抽出されたプラスミドの挿入DNA断片の大きさは、それぞれ10.6 kb、4.2 kbおよび4.0 kbであった。本論文では以後の記述において、特に断らない場合はプラスミドを表し、その大きさは挿入DNA断片の大きさを表すことにする。2F、13Eおよび17Bの制限酵素地図をFig. 1-2に示す。2Fにおいては、BamHI、PstI、EcoRIおよびHindIIIに関してのみ示し、その他の制限酵素についてはその位置の特定までには至らなかった。

た。13EのBamHI、PstI、EcoRIの制限サイトのパターンは、2Fの一部に一致した。17Bの制限サイトのパターンは2F、13Eとは一致しなかった。

サブクローニングにおいて得られたサブクローン株の挿入DNA断片の制限地図とキシラン分解酵素活性の有無を、2FについてはFig. 1-3に、13EについてはFig. 1-4に、17BについてはFig. 1-6にそれぞれ示した。DNAデリション法によるサブクローニングは13Eと13E-PPについて行い、得られたサブクローン（デリションクローン）のうちいくつか（13E-1~13E-7, 13E-PP-R1~13E-PP-R3）について挿入DNA断片の制限地図とキシラン分解酵素活性を調べ Fig. 1-5に示した。なお、制限酵素地図の作成において挿入DNA断片に対するpUCプラスミドベクターのlacZプロモーターの向きを確認し矢印で示した（Fig. 1-3~1-6）。

2F（10.6kb）のサブクローン株（Fig. 1-3）のうち、2F-PEE（3.7kb）はβ-キシロシダーゼ活性とキシラナーゼ活性を示したが、2F-PE（2.7kb）はβ-キシロシダーゼ活性のみしか示さず、2F-EE（1.0kb）は両酵素活性とも示さなかった。

13E（4.2kb）のサブクローン株（Fig. 1-4）のうち、13E-PP（3.4kb）は両酵素活性を示したが、13E-PE（2.7kb）はβ-キシロシダーゼ活性のみしか示さず、13E-EP（0.7kb）は両酵素活性とも示さなかった。また、13E-VP（2.4kb）はキシラナーゼ活性のみを示した。

13E（4.2kb）のデリションクローン株（Fig. 1-5）のうち、13E-1（3.5kb）は両酵素活性を示したが、13E-2（3.1kb）・13E-3（2.5kb）・13E-4（2.1kb）はキシラナーゼ活性のみしか示さず、13E-5（2.0kb）・13E-6（1.4kb）・13E-7（1.1kb）は両酵素活性とも示さなかった。また、13E-PP（3.4kb）のデリションクローンにおいて、13E-PP-R1（3.1kb）は両酵素活性を示したが、13E-PP-R2（2.6kb）はβ-キシロシダーゼ活性のみしか示さず、13E-PP-R3（2.1kb）は両酵素活性とも示さなかった。

17B（4.0kb）のサブクローン株（Fig. 1-6）のうち、17B-PE（2.0kb）はキシラナーゼ活性のみを示したが、17B-PH（1.4kb）と17B-HE（0.6kb）は共に両酵素活性とも示さなかった。

## 第5節 考察

得られた Bacillus stearothermophilus No. 21のゲノムDNAとプラスミド

DNA (pUC19)のDNA純度は260nm/280nm値が1.778と1.809であり、共に純粋な2本鎖DNAである場合の260nm/280nm値1.800に近い値であり、RNAやタンパク質などの不純物を含まないDNAサンプルであると考えられる。

作成された Bacillus stearothermophilus No. 21のゲノムDNAライブラリーのライブラリーとしての完成度は、ClarkeとCarbonが提唱したゲノムDNAライブラリーの理論計算式<sup>28)</sup>に従うと、約4,000kbのゲノムDNAに対して平均5kbの挿入DNA断片を含む形質転換株(2,600株)のライブラリーでは約96.1%のゲノムをカバーしていることになる。

得られたキシラン分解酵素遺伝子の形質転換株2F株、13E株および17B株の挿入DNA断片の制限酵素地図(Fig. 1-2)におけるBamHI、PstI、EcoRIの制限サイトのパターンより、13Eは2Fの一部に一致すると考えられるが、17Bは制限サイトのパターンが2Fや13Eとは一致しないことから別のDNAであると考えられる。

2F(10.6kb)においては、 $\beta$ -キシロシダーゼとキシラナーゼの両酵素遺伝子は2F-PEE(3.7kb)上に存在し、キシラナーゼ遺伝子中にはEcoRIサイトが存在すると考えられる。また、 $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子は2F-PE(2.7kb)上に存在すると考えられる(Fig. 1-3)。

13E(4.2kb)においては、両酵素遺伝子は13E-PP(3.4kb)上に、 $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子は13E-PE(2.7kb)上に存在すると考えられ、キシラナーゼ遺伝子中にはEcoRIサイトが存在すると考えられる。また、13E-VP(2.4kb)上にキシラナーゼ遺伝子が存在し、 $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子中にPveIIサイトが存在すると考えられる(Fig. 1-4)。

2Fと13Eにおけるサブクローン遺伝子のBamHI、PstI、EcoRIの制限サイトのパターンと、その形質転換株のキシラン分解酵素活性から、2Fと13Eの $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子とキシラナーゼ遺伝子は同一のものであり、両酵素遺伝子は13E-PPのDNA断片(3.4kb)上に存在すると考えられる。

デリーションクローン株の結果から、キシラナーゼ遺伝子は13E-4(2.1kb)上に、 $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子は13E-PP-R2(2.6kb)上にそれぞれ存在し、両酵素遺伝子は13E-PP-R1(3.1kb)上に存在すると考えられる(Fig. 1-5)。

17B(4.0kb)において、キシラナーゼ遺伝子は17B-PE(2.0kb)上に存在し、キシラナーゼ遺伝子中にはHindIIIサイトが存在すると考えられる。サブクロー

ン遺伝子の BamHI、PstI、EcoRI、HindIII の制限サイトのパターンと、その形質転換株のキシラン分解酵素活性から、17B のキシラナーゼ遺伝子は 2F や 13E のキシラナーゼ遺伝子とは異なるアイソザイム遺伝子であると考えられる (Fig. 1-6)。

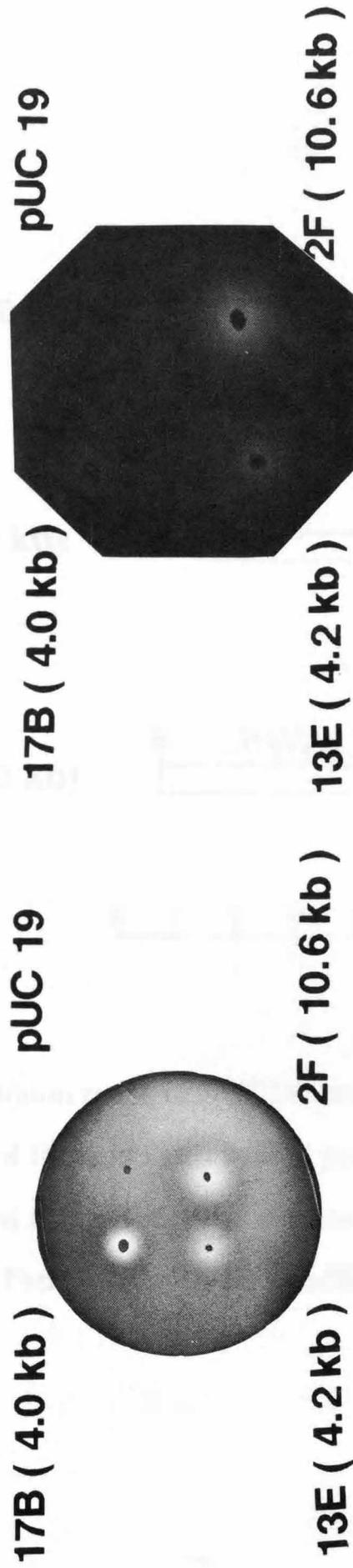


Fig.1-1. Detection of xylanase and  $\beta$ -xylosidase producing clones of *E. coli* JM109. LB agar plate contains RBB-xylan (800ng/ml) and 4MU-xyloside (20ng/ml). Xylanase positive clones formed a clear halo and  $\beta$ -xylosidase positive clones showed a bright spot. The pUC19 plasmid was used as a control without inserted fragment of *B. stearrowthermophilus* No.21 genomic DNA.

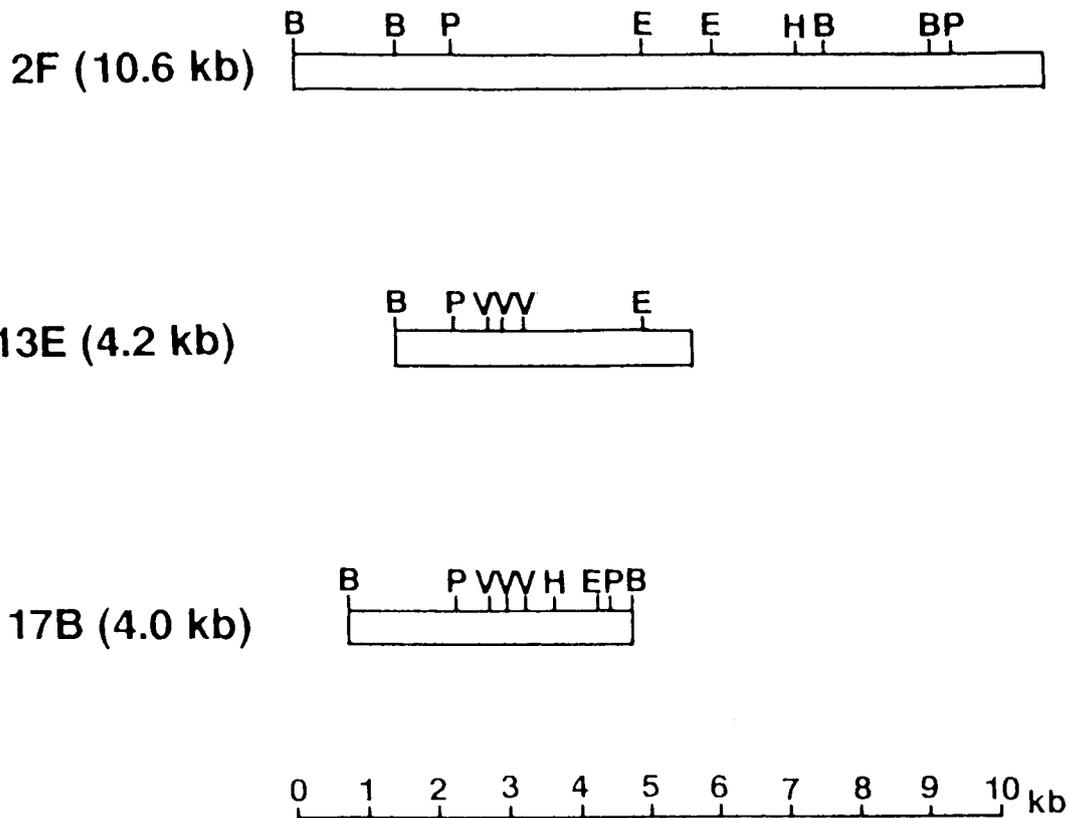


Fig.1-2. Restriction maps of pUC19 recombinants. The location of restriction sites in the inserts of three isolates from a genomic library of B. stearrowthermophilus No.21 prepared using pUC19 as a vector plasmid.

B; BamHI, P; PstI, E; EcoRI, H; HindIII, V; PveII.

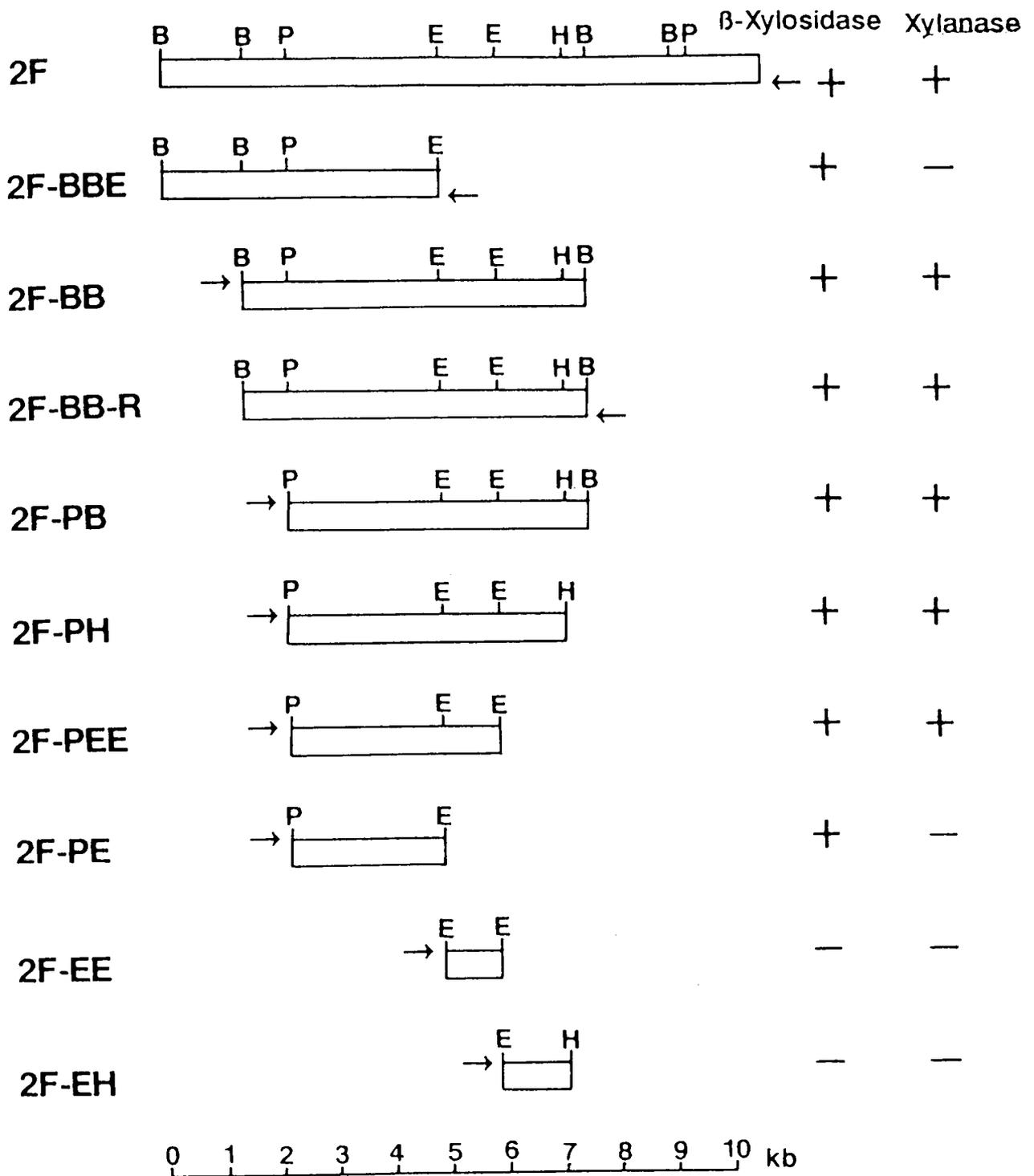


Fig.1-3. Production of  $\beta$ -xylosidase and xylanase in *E. coli* JM109 clones and restriction maps of inserted fragments on their plasmids. The plasmids of original clone (2F) and subclones were transformed into *E. coli* JM109 strain.

→ ; Direction of *lacZ* promoter, B; BamHI, P; PstI, E; EcoRI, H; HindIII.

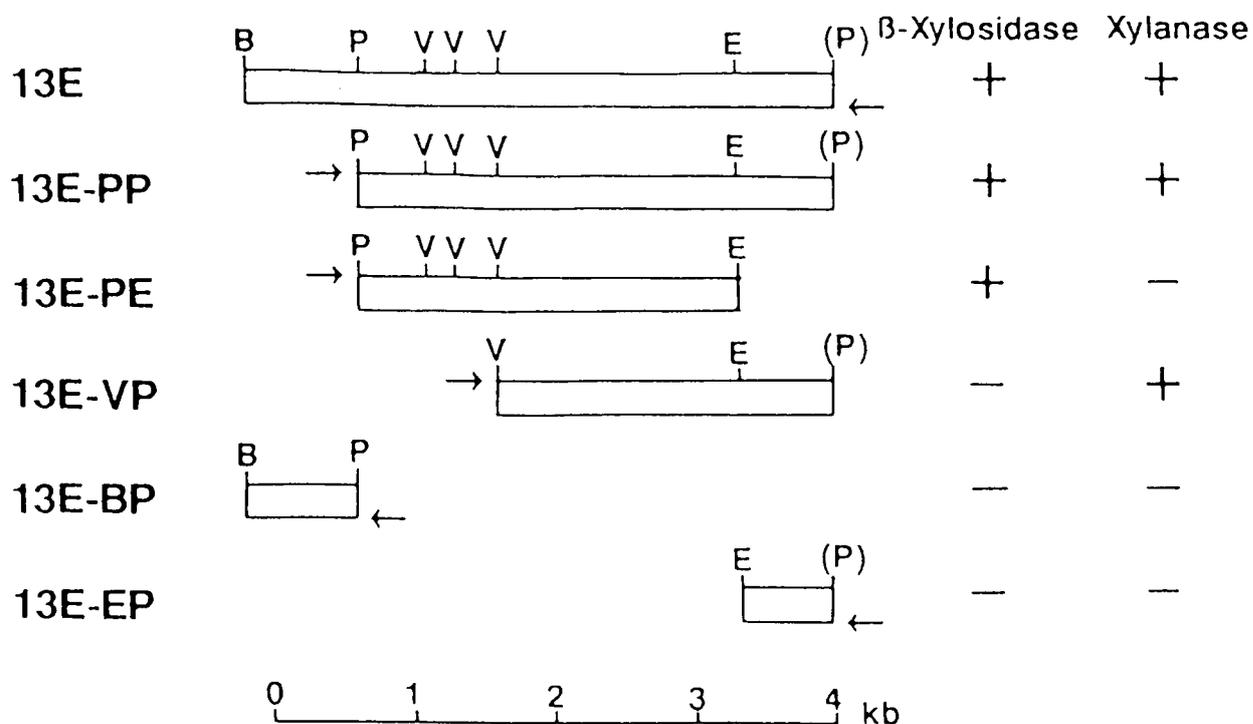


Fig.1-4. Production of  $\beta$ -xylosidase and xylanase in *E. coli* JM109 clones and restriction maps of inserted fragments on their plasmids. The plasmids of original clone (13E) and subclones were transformed into *E. coli* JM109 strain.

→ ; Direction of *lacZ* promoter, B; BamHI, P; PstI, E; EcoRI, V; PvuII.  
 ( ); pUC multi-cloning site.

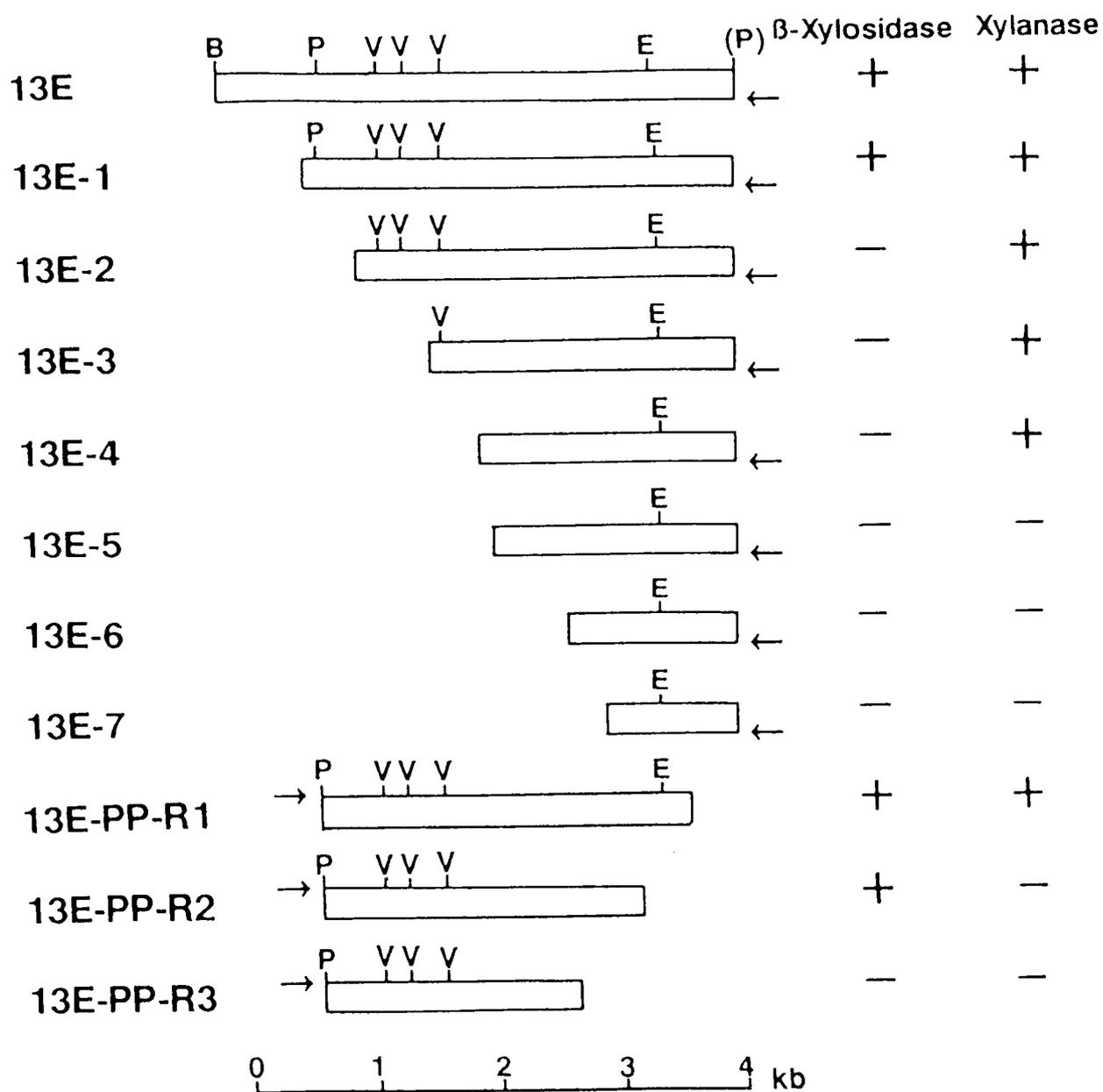


Fig.1-5. Production of  $\beta$ -xylosidase and xylanase in *E. coli* JM109 clones and restriction maps of inserted fragments on their plasmids. The plasmids of original clone (13E) and deletion clones were transformed into *E. coli* JM109 strain.

← ; Direction of *lacZ* promoter, B; BamHI, P; PstI, E; EcoRI, V; PveII.

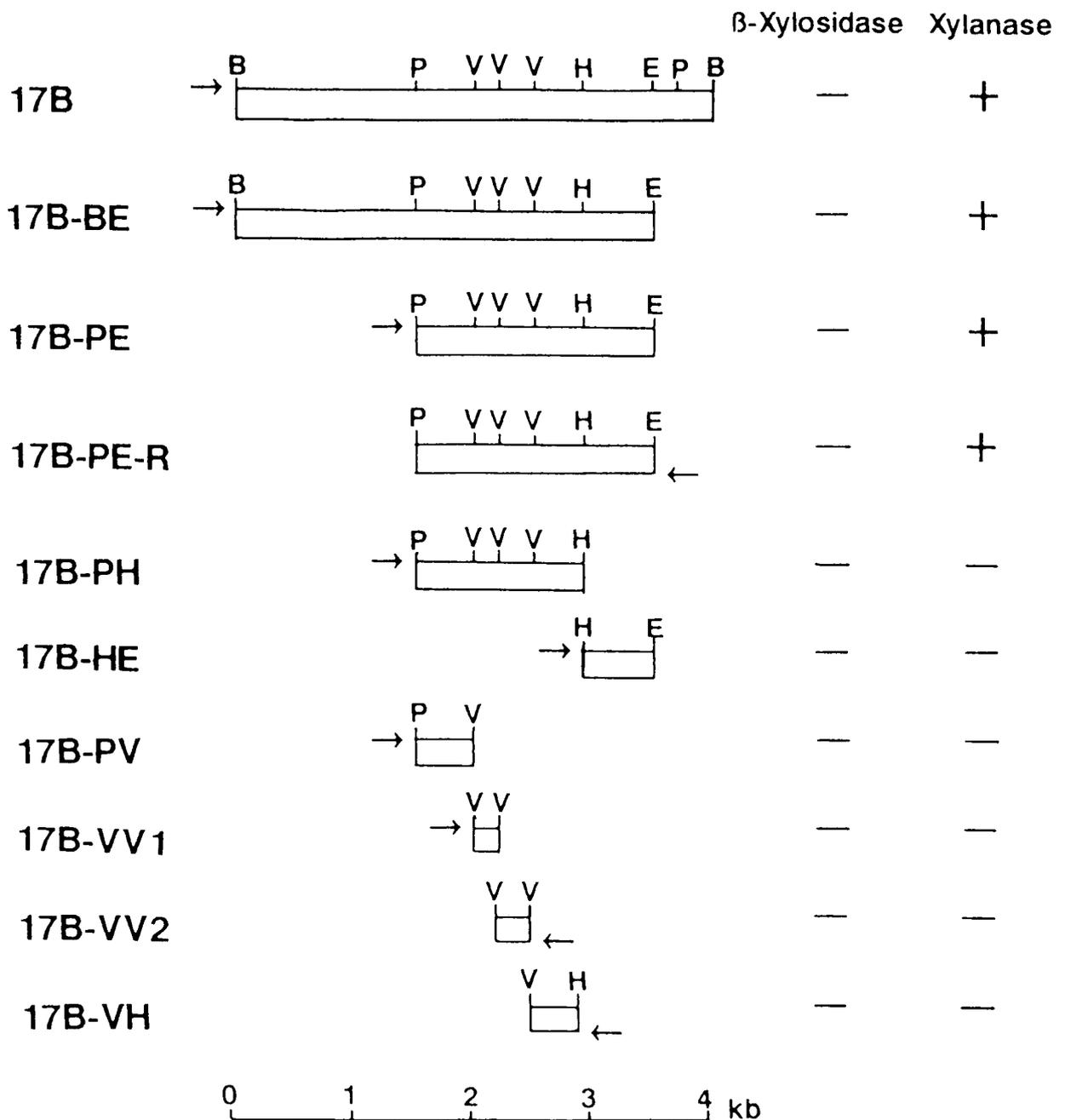


Fig.1-6. Production of  $\beta$ -xylosidase and xylanase in *E. coli* JM109 clones and restriction maps of inserted fragments on their plasmids. The plasmids of original clone (17B) and subclones were transformed into *E. coli* JM109 strain.

→ ; Direction of *lacZ* promoter, B; BamHI, P; PstI, E; EcoRI, V; PvuII, H;HindIII.

## 第II章 Maxi-cell法を用いたクローン遺伝子産物の同定

### 第1節 序

南森らが報告している Bacillus stearothermophilus No.21のキシラナーゼとβ-キシロシダーゼの分子量は、それぞれ39.5kDaと150kDaであり、β-キシロシダーゼは75kDaのサブユニットからなる二量体である<sup>23)</sup>。1アミノ酸の平均分子量を110Daとして、それぞれの酵素の分子量から推定されるアミノ酸残基数は約680アミノ酸と360アミノ酸であり、そのDNAの大きさは約2.0kbと1.1kbである。これらの酵素がコードされているクローン遺伝子断片の特定を、Maxi-cell法を用いたクローン遺伝子の産物同定により行った。

Maxi-cell法はSancarらにより考案された、プラスミド上にコードされたDNAのみを効率的に発現させるシステムであり、宿主大腸菌に Escherichia coli CSR603 (recA1, uvrA6, phr1) を用いる<sup>29)</sup>。この大腸菌株は紫外線(UV)によるゲノムDNA傷害の修復機能を欠損しており、形質転換株を対数増殖期の初期にUVを短時間照射するとゲノムDNAに損傷を受け細胞の増殖能は失われるが、細胞内の転写・翻訳系の機能は保持される。このため、プラスミドDNAのDNA産物が蓄積されることになる。

### 第2節 Maxi-cell法によるクローン遺伝子の発現

#### A. 実験方法

##### (1) キシラナーゼ活性測定法

###### ① 3,5-DNS試薬の調製法

5gのジニトロサリチル酸を200mlの2N NaOHに50~60℃で溶解し、300gのロッシェル塩を加え溶解して脱塩水で1000mlに定容した。

###### ② 2%キシラン基質溶液の調製法

2gのオート麦キシラン(ナカライテスク)を0.1M 酢酸バッファー(pH 6.0)に懸濁し、4℃で12時間攪拌した。遠心分離(10,000×g, 4℃, 10分)により不溶性のキシランを集め、100mlに同バッファーで懸濁し、キシラナーゼ活性測定用の基質溶液とした。

###### ③ キシラナーゼ活性測定法

1.5ml容のチューブに、0.5mlの2%キシラン基質溶液と0.5mlの酵素液を加え、攪拌しながら55℃で30分間反応させた。遠心分離(12,000×g, 4℃, 5分)後、上

清0.5mlに1mlの3,5-DNS試薬を加え混和し、沸騰水浴中で5分間加熱し発色させた。流水で急冷した後、535nmにおける吸光度を測定し、キシラナーゼの反応により生成した遊離還元糖量をキシロース量に換算した。2%キシラン基質溶液と酵素液の混合液を、55℃でのインキュベーション操作を行わずに発色させ、これをコントロールの値とした。キシラナーゼ活性1 unitは、1分間にキシロースを1  $\mu$ mole生成する酵素量とした。

## (2) $\beta$ -キシロシダーゼ活性測定法

### ① 0.02M フェニル- $\beta$ -D-キシロシド溶液の調製法

フェニル- $\beta$ -D-キシロシド溶液（ナカライテスク）を終濃度0.02Mになるように0.1M 酢酸バッファー（pH 6.0）に溶解し、 $\beta$ -キシロシダーゼ活性測定用の基質溶液とした。

### ② 1N フェノール試薬の調製法

2N フェノール試薬（和光純薬）を脱塩水で希釈し1Nとした。

### ③ $\beta$ -キシロシダーゼ活性測定法

0.1mlの0.02M フェニル- $\beta$ -D-キシロシド溶液に0.1mlの酵素溶液を加え、攪拌しながら55℃で30分間反応させた後、1mlの0.55M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ を加え、0.1mlの1N フェノール試薬を加え混和した。30分間室温で放置し、酵素反応により生成した遊離フェノールを発色させ、660nmの吸光度を測定した。フェニル- $\beta$ -D-キシロシド溶液と酵素溶液の混合液を、55℃でのインキュベーション操作を行わずに発色させ、これをコントロールの値とした。 $\beta$ -キシロシダーゼ活性1 unitは、1分間に1  $\mu$ moleのフェノールを生成する酵素量とした。

## (3) タンパク質の定量法

タンパク質の定量はLowryらの方法<sup>30)</sup>に従った。

## (4) 宿主大腸菌 (*Escherichia coli* CSR603) コンピテントセルの調製とプラスミドの形質転換法

第1章、第2節(4)(5)で述べた方法に従った。

## (5) Maxi-cell法によるクローン遺伝子の発現法

*Escherichia coli* CSR603の形質転換株について、50  $\mu$ g/ml ampicillinを含む1mlのK培地（1% casamino acid, 0.2% glucose, 1.51%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0.3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05%  $\text{NaCl}$ , 0.1%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.025%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.015%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1  $\mu$ g/l vitamineB<sub>1</sub>）に単一コロニーより接種し、37℃で12時間振とう培養した

ものを前培養とした。48ng/ml IPTG、50 $\mu$ g/ml ampicillinを含むK培地10mlを25ml容三角フラスコに作成し、前培養液を0.1ml植菌し37 $^{\circ}$ Cで200rpmの条件で650nmでの培養液濁度が0.3になるまで振とう培養した。培養液を滅菌済みのペトリ皿に移し、15Wの紫外線滅菌ランプを用いて85cmの高さから30秒間の紫外線照射をした後、滅菌済みの25ml三角フラスコに移し37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。D-cycloserineを終濃度100 $\mu$ g/mlになるように加え、37 $^{\circ}$ Cで12時間インキュベートした。その後、遠心分離（12,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 5分）により菌体と培養上清に分け、菌体を100 $\mu$ lの0.1M 酢酸バッファー（pH 6.0）に懸濁させ、60 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートし溶菌させ、遠心分離（12,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 5分）により上清を得た。得られた上清と培養上清について、キシラナーゼ活性、 $\beta$ -キシロシダーゼ活性、タンパク質量を測定した。

#### （6）Escherichia coli JM109とEscherichia coli CSR603でのクローン遺伝子の発現の比較検討法

Escherichia coli JM109の形質転換株について、50 $\mu$ g/ml ampicillinを含む1mlのLB培地に単一コロニーより接種し、37 $^{\circ}$ Cで12時間振とう培養したものを前培養とした。48ng/ml IPTG、50 $\mu$ g/ml ampicillinを含むLB培地10mlを25ml容三角フラスコに作成し、前培養液を0.1ml植菌し37 $^{\circ}$ Cで200rpmの条件で15時間振とう培養した。その後、遠心分離（12,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 5分）により菌体と培養上清に分け、菌体を1mlの0.1M 酢酸バッファー（pH 6.0）に懸濁させ、60 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートし溶菌させ、遠心分離（12,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 5分）により上清を得た。得られた上清と培養上清について、キシラナーゼ活性、 $\beta$ -キシロシダーゼ活性、タンパク質量を測定した。また、Escherichia coli CSR603の形質転換株についても同様の操作を行い、各値を測定した。

#### B. 実験結果

13Eと2Fについて、そのサブクローンとともにEscherichia coli CSR603にそれぞれ形質転換し、Maxi-cell法によりクローン遺伝子の発現能を調べた。クローン遺伝子の発現量を、菌体量あたり（650nmでの培養液濁度）のキシラン分解酵素量で比較し、Fig. 2-1に示した。13Eに比べ13E-PP・13E-PEにおいてクローン遺伝子の高発現が認められた。また、2F・2F-BB-Rに比べて2F-BB・2F-PB・2F-PH・2F-PEE・2F-PEにおいてクローン遺伝子の高発現が認められた。

キシラナーゼおよびβ-キシロシダーゼの高発現能を示した13E-PPについて、Escherichia coli JM109とEscherichia coli CSR603での発現効率について、菌体内から抽出された酵素液のキシラン分解酵素量をタンパク質量あたりの比活性で表しTable2-1に示した。クローン遺伝子をLB培地で発現させると、Escherichia coli JM109に比べEscherichia coli CSR603の発現効率は44.4%であった。クローン遺伝子をEscherichia coli CSR603においてMaxi-cell法で発現させると、発現効率はEscherichia coli JM109に比べ15.7倍高い値を示した。(Table 2-1)。

### 第3節 電気泳動によるクローン遺伝子産物の同定

#### A. 実験方法

##### (1) 等電点電気泳動法

第2節(5)で得られた上清について、等電点電気泳動を行った。LKB 2117 Multiphor II 電気泳動システム(Pharmacia-LKB)により、等電点4.0-6.5アンホラインゲルPAGプレート(Pharmacia-LKB)を用いて行った。1500V、20mA、20W、10℃の条件で2時間泳動した。

##### (2) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)法

SDS-PAGEは、LKB 2117 Multiphor II 電気泳動システム(Pharmacia-LKB)により、ポリアクリルアミドグラジエント(8~18%)Excel-Gel™(Pharmacia-LKB)を用いて行った。600V、50mA、30W、15℃の条件で75分間泳動した。SDS-PAGEは、等電点電気泳動の後の2次元電気泳動的にも行った。

##### (3) タンパク質染色法

電気泳動後のタンパク質の染色は、Coomassie brilliant blue R 250(Sigma社製)を用いた(C. B. B. 法)。

##### (4) 活性染色法

等電点電気泳動後の、キシラナーゼとβ-キシロシダーゼの活性染色を以下の方法で行った。等電点電気泳動に用いたゲルと同じサイズの、2% agarプレート[0.1M 酢酸バッファー(pH 6.0)に3mg/ml RBB-xylan、60ng/ml 4MU-β-xylosideを含む]を作成し、これを電気泳動後のゲルに重ねて、60℃でインキュベートした。10分間のインキュベート後、365nmの紫外線を照射し、4MU-β-xylosideによるβ-キシロシダーゼの活性バンドを検出した。さらに、6時間のイ

ンキュベート後、RBB-xylanによるキシラナーゼの活性バンドを検出した。

## B. 実験結果

13E-PPと2F-BBについて、Maxi-cell法で発現させたクローン遺伝子の産物同定を等電点電気泳動とSDS電気泳動で行った。等電点電気泳動後、C. B. B. 法でタンパク染色した結果をFig. 2-2に示す。どちらのサンプルにも4本のバンドが検出されそれぞれの等電点は、5.1、4.8、4.5、4.3であった。キシラナーゼと $\beta$ -キシロシダーゼの活性染色を行い、等電点5.1と4.8のバンドの位置にキシラナーゼ活性、等電点4.5と4.3のバンドの位置に $\beta$ -キシロシダーゼ活性がそれぞれ検出された。コントロールとして、pUC19のみをMaxi-cell法で発現させたサンプルを同様に泳動し、タンパク染色および活性染色を行ったが、活性のあるバンドは検出されなかった。等電点電気泳動を1次元として、SDS-PAGEでの2次元電気泳動を行い、1次元上の各バンド（等電点5.1、4.8、4.5、4.3）の分子量を調べた（Fig. 2-3）。13E-PPと2F-BBのどちらのサンプルについても同じ分子量のスポットが得られ、キシラナーゼ活性を示す等電点5.1と4.8については分子量40kDaの位置に、 $\beta$ -キシロシダーゼ活性を示す等電点4.5と4.3については分子量75kDaの位置にそれぞれのスポットが検出された。なお、1次元のSDS-PAGEを行い、pUC19のコントロールとの比較を行った結果もFig. 2-3に示す。13E-PPと2F-BBのどちらのサンプルについても分子量75kDaと40kDaのバンドが検出された。

## 第4節 クローン遺伝子産物のN末端アミノ酸配列の決定

### A. 実験方法

#### (1) SDS-PAGE法

第3節(2)のSDS-PAGEの方法に従った。

#### (2) エレクトロブロットティング法

SDS-PAGE後、分離したタンパク質をゲルからImmobilon transfer membrane (PVDF) (Millipore社製) にエレクトロブロットティングした。エレクトロブロットティングには、Sartoblot II-S (Sartorius社製) を用いた。PVDFはメタノールに20秒間浸漬後、電解液(10mM 3-cyclohexylamino-1-propanesulfonic acid (CAPS) buffer (pH 11.0), 10% メタノール) に15分間振とうしながら浸漬した後

に使用した。SDS-PAGEゲルを電解液中で5分間洗浄した後PVDFを重ね、それを電解液に浸漬したWhatman 3MM濾紙の間に挟み、Sartoblot II-Sの炭素電極の間にPVDFが陽極側になるようにセットした。120mAの定電流で1時間通電した。通電後、PVDFを超純水で数回洗浄し、0.1%濃度のPonceau S (Sigma社製) を含む1%酢酸溶液で染色した。目的のタンパク質のバンドを切り出し、そのPVDFを1%酢酸溶液で数回洗浄した後、超純水で数回洗浄した。

### (3) N末端アミノ酸配列の決定法

第4節(2)で得た目的のタンパク質のバンドを吸着したPVDFを、気相プロテインシーケンサーApplied Biosystem 477Aにセットし、N末端アミノ酸配列を決定した。

## B. 実験結果

13E-PPに関して、クローン遺伝子産物をMaxi-cell法で発現させ、SDS電気泳動で分離された75kDaと40kDaのタンパク質バンドをPVDFにエレクトロブロットイングし、気相プロテインシーケンサーによりN末端アミノ酸配列を決定した。 $\beta$ -キシロシダーゼ活性を示した75kDaのバンドからはPTNLFF (Pro-Thr-Asn-Leu-Phe-Phe-) のN末端アミノ酸配列が得られ、キシラナーゼ活性を示した40kDaのバンドからはSSIPS (Ser-Ser-Ile-Pro-Ser-) のN末端アミノ酸配列が得られた。

### 第5節 考察

Maxi-cell法は宿主の対数増殖期の初期に増殖を止めてプラスミドDNAの発現を行うために、クローン遺伝子の発現が宿主菌体の増殖による制約(プラスミドDNAの欠損、挿入DNAの欠失など)を受けることなく定量的に比較し得る。Fig. 2-1より、13E、2F、2F-BB-Rではキシラナーゼ遺伝子と $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子はlacZプロモーターとは逆の向きにコードされているため、自己のプロモーターで発現していると考えられる。その他のクローンでは、lacZプロモーターと同じ向きに両酵素遺伝子がコードされるため、lacZプロモーターによりその発現量が増加していると考えられる。13E-PEと2F-PEにおいて $\beta$ -キシロシダーゼの発現量が同程度であり、キシラナーゼの発現が認められないことから両DNAが同じものであることが考えられる。しかし、自己のプロモ

ーターで発現していると考えられる13Eと2F-BB-Rにおいて、13Eに比べ2F-BB-Rにおける両酵素の発現量が、 $\beta$ -キシロシダーゼで1.3倍、キシラナーゼで5.7倍もあることから、これらの酵素の発現に関与する制御遺伝子の存在が示唆される。このことは、2F-BB、2F-PB、2F-PH、2F-PEE、2F-PEでの $\text{lacZ}$ プロモーターを利用して発現させた場合にも両酵素の発現に変化が認められ、 $\text{BamHI}$ から $\text{Pst I}$ の領域、あるいは $\text{EcoRI}$ から $\text{HindIII}$ 近辺の領域に発現を制御する遺伝子の存在の可能性が示唆される。

Escherichia coli CSR603は、Escherichia coli JM109に比べ、LB培地でクローン遺伝子を発現させるとその発現効率は低いが、Maxi-cell法で用いると飛躍的に発現効率が高くなる (Table 2-1)。通常、Maxi-cell法は Escherichia coli JM109などでは発現しにくいDNAの発現や、非常に不安定なDNA産物の同定に使われ、産物の同定は $^{35}\text{S}$ メチオニンでラベルしオートラジオグラフィによる間接同定で行われる。本研究においては、pUC19の $\text{lacZ}$ プロモーターを利用してMaxi-cell法によりクローン遺伝子を高効率で発現させ、その産物同定をラジオアイソトープを用いない同定に成功した (Fig. 2-2、Fig. 2-3)。

南森らが報告しているBacillus stearothermophilus No. 21のキシラナーゼと $\beta$ -キシロシダーゼの等電点は、それぞれ5.1と4.2であり、分子量は、それぞれ39.5kDaと150kDaで、 $\beta$ -キシロシダーゼは75kDaのサブユニットからなる二量体である<sup>23)</sup>。Fig. 2-2とFig. 2-3より、13E-PPと2F-BBは同じDNA産物であり、それぞれのキシラナーゼと $\beta$ -キシロシダーゼは南森らの報告にある、Bacillus stearothermophilus No. 21のそれらと一致した。等電点電気泳動においてキシラナーゼ活性と $\beta$ -キシロシダーゼ活性を示すバンドが複数検出されたが、二次元電気泳動において分子量の差がみられないことから、末端のアミノ酸の欠落あるいは、宿主大腸菌内での部分的な修飾などが考えられる。

Bacillus stearothermophilus No. 21の $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子 (2.1kb) とキシラナーゼ遺伝子 (1.0kb) は13E-PPの3.4kbのDNA上に存在することが確認されたが、これらの遺伝子は隣接あるいは重複して存在しているものと考えられる。複数遺伝子のこのような存在形態 (ジーンクラスター構造) は、キシラン分解酵素においてはWhiteheadらによってBacteroides ovatusでそれを示唆する報告<sup>27)</sup>があるが、本研究におけるようなDNA産物の同定はなされておらず、またDNAシーケンスからの証明もなされてはいない。

	Activity ( units / A <sub>650</sub> )	
	$\beta$ -Xylosidase	Xylanase
13E	0.092	0.013
13E-PP	1.762	0.530
13E-PE	1.579	0.000
2F	0.014	0.019
2F-BB	1.946	0.499
2F-BB-R	0.122	0.075
2F-PB	1.403	0.491
2F-PH	0.805	0.338
2F-PEE	0.606	0.221
2F-PE	1.547	0.000

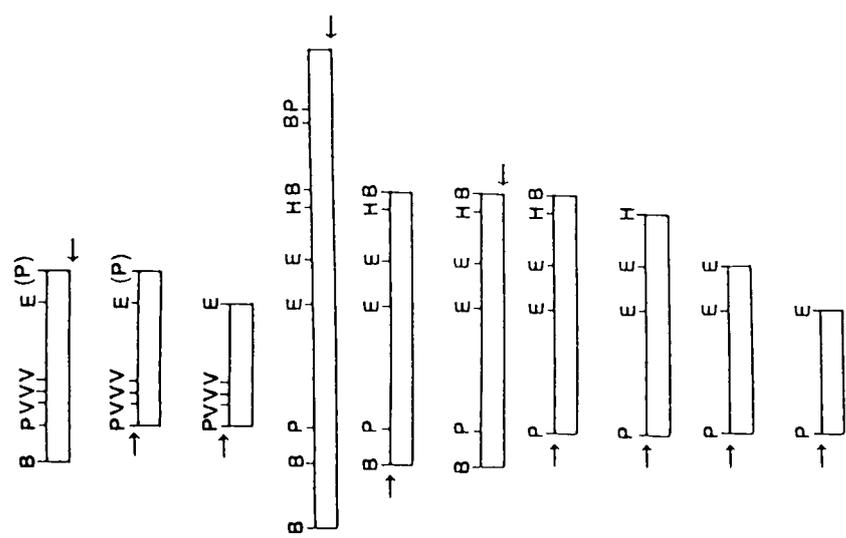


Fig.2-1. Production of  $\beta$ -xylosidase and xylanase by the Maxi-cell method.

The plasmids of original clones (13E and 2F) and their subclones were transformed into *E. coli* CSR603 strain. Xylan-degrading enzymes were assayed. The restriction maps are described in the figure.

→ ; Direction of lacZ promoter, B; BamHI, P; PstI, E; EcoRI, V; PvuII, H; HindIII, ( ) ; pUC multi-cloning site.

Table 2-1. Remarkable increase of specific activity of each xylan-digesting enzyme produced in UV-irradiated E. coli CSR603 strain.

Strain	UV-irradiation	Specific activity ( units / mg )	
		$\beta$ -xylosidase	xylanase
<u>E. coli</u> JM109	-	0.412	0.081
<u>E. coli</u> CSR603	-	0.183	0.055
<u>E. coli</u> CSR603	+	6.475	1.962

Protein contents were measured by the method of Lowry <sup>30</sup>).

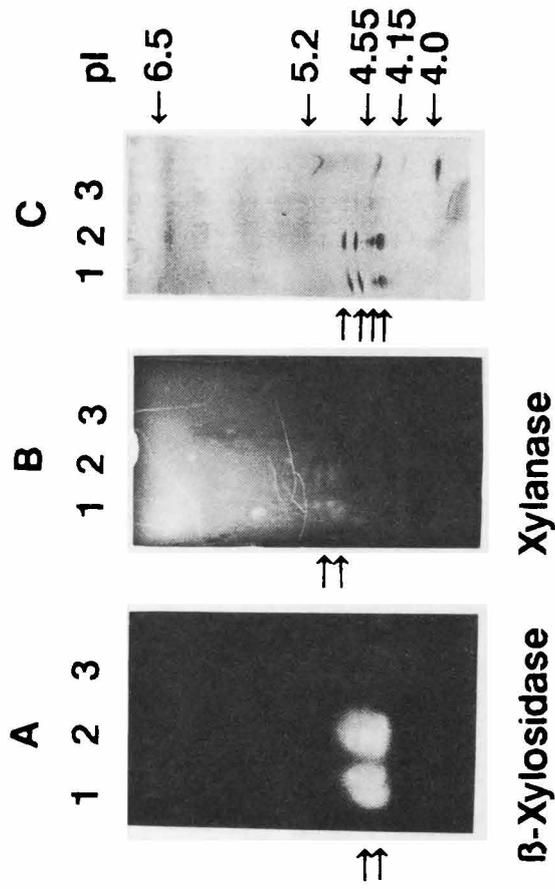


Fig.2-2. Identification of *E. coli* CSR603 products in the Maxi-cell method by isoelectrofocusing (pH range 4.0-6.5).  $\beta$ -Xylosidase (A) and xylanase (B) were detected by active staining. Proteins were visualized by coomassie brilliant blue R staining (C).  
 lane 1; products of 13E-PP clone, lane 2; products of 2F-BB clone,  
 lane 3; products of control plasmid (pUC19) clone.

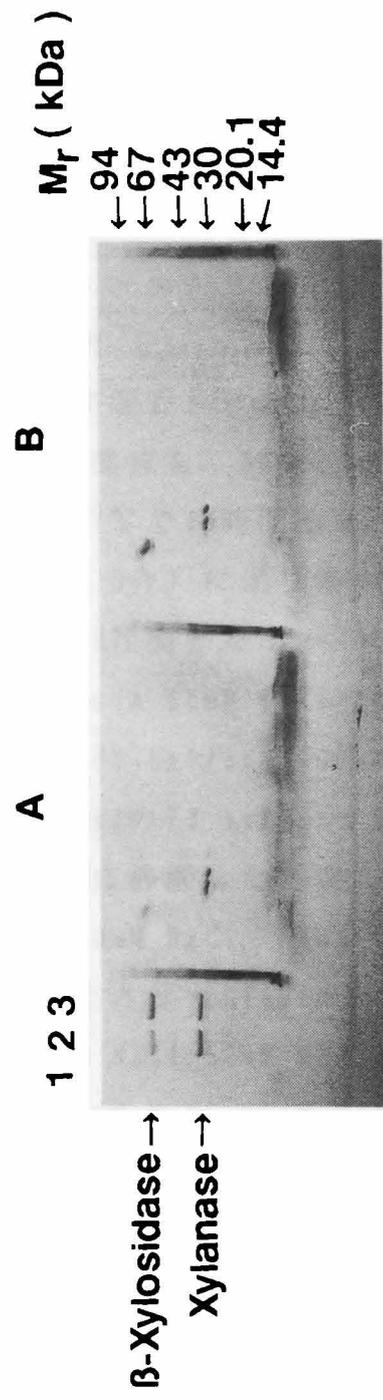


Fig.2-3. Identification of  $\beta$ -xylosidase and xylanase by two-dimensional electrophoresis. Products of 13E-PP clone (A) and 2F-BB clone (B) were separated by a first dimensional gel electrophoresis (Isoelectrofocusing, pH range 4.0-6.5) followed by second dimensional gel electrophoresis (SDS-gel electrophoresis). The gels were visualized by coomassie brilliant blue R staining. The first dimensional SDS-gel electrophoresis: lane 1; products of control plasmid (pUC19), lane 2; products of 13E-PP clone, lane 3; products of 2F-BB clone.

### 第Ⅲ章 Bacillus stearothermophilus No. 21のクラスター構造を形成するキシラン分解酵素遺伝子群の構造解析

#### 第1節 序

Bacillus stearothermophilus No. 21のキシラナーゼ遺伝子と $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子は13E-PPの3.4kbのDNA上に隣接あるいは重複して存在しクラスター構造を形成していると考えられる。本章では、DNAシーケンスにより、Bacillus stearothermophilus No. 21のクラスター構造を形成するキシラン分解酵素遺伝子群の構造解析を試みた。

#### 第2節 クラスター構造遺伝子の全塩基配列の決定

##### A. 実験方法

##### (1) 鋳型DNAの調製法

DNAシーケンスの鋳型DNAとなるプラスミドを有する大腸菌 Escherichia coli JM109の形質転換株を、50 $\mu$ g/ml ampicillinを含む5mlのLB培地に単一コロニーより接種し、37 $^{\circ}$ Cで12時間振とう培養した後、菌体を培養液3mlから遠心分離(10,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 5分)により集めた。菌体からのプラスミドの抽出はPlasmid Mini Kit(QIAGEN社製)を用い、以下の方法で行った。0.3mlのP1 buffer [100 $\mu$ g/ml RNase A, 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA (pH 8.0)]に菌体を懸濁させ、0.3mlのP2 buffer (200mM NaOH, 1% SDS)を加え混和し、5分間室温に静置した後、0.3mlのP3 buffer [3.0M potassium acetate buffer (pH 5.5)]を加え10分間氷中に静置した。遠心分離(13,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 10分)後、上清を1mlのQBT buffer [750mM NaCl, 50mM MOPS (pH 7.0), 15% ethanol, 0.15% Triton X-100]で平衡化させたQIAGEN-tip 20カラムにアプライした。カラムを4mlのQC buffer [1.0M NaCl, 50mM MOPS (pH 7.0), 15% ethanol]で洗浄後、0.8mlのQF buffer [1.25M NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 8.5), 15% ethanol]で溶出を行った。0.7倍量のイソプロパノールを加え遠心分離(13,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 10分)し、得られたDNAの沈澱を70%エタノールで洗浄後、遠心分離(13,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 5分)しデシケーター内で減圧乾燥させ、50 $\mu$ lのTEバッファーに溶解した。DNAの濃度と純度を測定した。2 $\mu$ gのDNAに2 $\mu$ lの2N NaOHと2 $\mu$ lの2mM EDTA (pH 8.0)を加え滅菌蒸留水で20 $\mu$ lに定容し、37 $^{\circ}$ Cで5分間静置した後8 $\mu$ lの5M酢酸アンモニウム (pH 4.5)と100 $\mu$ lのエタノールを加え-80 $^{\circ}$ Cで5分間静置

後、遠心分離により回収した沈澱を70%エタノールで洗浄しデシケーター内で減圧乾燥後10 $\mu$ lの滅菌蒸留水に溶解し、これを鋳型DNA溶液とした。

#### (2) DNAシーケンスゲルの作成法

DNAシーケンスゲルはLong Ranger (AT Biochem社製) を用いて以下の方法で作成した。21gのUreaを6mlの10 $\times$ TBE buffer [900mM Tris-borate (pH 8.0), 20mM EDTA (pH 8.0)] と5mlの50% Long Rangerを含む蒸留水に溶解し、50mlに定容した。フィルターろ過後、25 $\mu$ lのN,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)と0.25mlのammonium persulfate (APS)を加え、DNAシーケンス用のガラス板(480mm $\times$ 200mm $\times$ 0.35mm) (アトー社製) に流し込みゲルを作成した。

#### (3) DNAシーケンス法

第2節(1)で調製した鋳型DNA溶液のDNAシーケンスのポリメラーゼ反応は、BcaBEST™ Dideoxy Sequencing Kit (宝酒造) を用いて行い、放射性同位元素には [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] dCTP (37TBq/mmol) (Amersham社製) を用いた。シーケンスゲルのオートラジオグラフィーにはX線フィルム (フジフィルム) を用い、-80 $^{\circ}$ Cで4日間行い、フィルムの現像には、現像液レンドール (フジフィルム) と定着液レンフィックス (フジフィルム) を用いて行った。

#### (4) DNAシーケンスの解析法

第2節(3)で得られたX線フィルムのDNAシーケンスラダーの読み取り入力と解析は、DNAシーケンス入力解析システムDNASIS™ (V.7.00) (日立ソフトウェアエンジニアリング) を用いて行った。

### B. 実験結果

13Eについての全塩基配列を決定し、そのDNAシーケンスのストラテジーをFig. 3-1に示した。また、決定されたDNAシーケンス(4,200塩基)をFig. 3-2に示す。2つのオープンリーディングフレーム(ORF)の存在が確認された。ORF1は、全長2,118塩基705アミノ酸(理論分子量79.8kDa)で構成され、開始Met(ATG)コドンが835番目から始まり、終止コドン(TAA)が2,952番目で終結していた。ORF2は、全長993塩基330アミノ酸(理論分子量38.5kDa)で構成され、開始Met(ATG)コドンが2,955番目から始まり、終止コドン(TAA)が3,947番目で終結していた。2つのORFの間は、2塩基の隔たりが存在した。ORF1上にPve IIサイトが3カ所確認され、ORF2上にはEcoRIサイトが1カ所確認された。

DNASIS™ (V. 7. 00) を用いた DNA シークエンスの検索の結果、ORF1 と ORF2 について、それぞれ SD 配列 (Shine-Dalgarno 配列) とプロモーター配列 (-35 領域および -10 領域) の存在が示唆された (Fig. 3-2)。第 2 章で決定された  $\beta$ -キシロシダーゼとキシラナーゼの N 末端アミノ酸配列は、それぞれ ORF1 と ORF2 の N 末端領域のアミノ酸配列と一致した (Fig. 3-2)。また、DNA 配列中における逆方向反復配列 (Inverted-repeat sequences) を矢印で示した (Fig. 3-2)。

Bacillus stearothermophilus No. 21 のキシラナーゼ (XynA) のアミノ酸配列について DNASIS™ (V. 7. 00) を用いたプロテインシークエンス・データベースからのホモロジー検索を行い、類似性がみられたタンパクとの保存領域を Fig. 3-5 に示す。すべてキシラナーゼあるいはセルラーゼであり、6 つの領域 (I ~ VI) で高い保存性が認められた。これらの 6 つの領域を含む範囲 (Bacillus stearothermophilus XynA において 42 番目から 243 番目までの 202 アミノ酸) でのホモロジーを計算した。好熱性細菌 Caldocellum saccharolyticum のキシラナーゼ (XynA)<sup>31)</sup> およびセロビオヒドロラーゼ (CelB)<sup>32, 33)</sup> と 50% のホモロジーを示した。他のキシラナーゼでは、好熱性細菌 (Clostridium thermocellum<sup>34)</sup>, Thermoascus aurantiacus<sup>45, 46)</sup>)、好アルカリ性細菌 (Bacillus sp. C-125)<sup>35)</sup>、糸状菌 (Aspergillus kawachii)<sup>38)</sup>、ルーメン細菌 (Ruminococcus flavefaciens)<sup>40)</sup>、酵母 (Cryptococcus albidus)<sup>44)</sup> など真核生物・原核生物の両方にわたり、常温型キシラナーゼの他に耐熱性キシラナーゼ・耐アルカリ性キシラナーゼとのホモロジーが認められた。また、Cellulomonas fimi のセロビオヒドロラーゼ<sup>39)</sup> ともホモロジーが認められた。

$\beta$ -キシロシダーゼは、これまでに 5 例しかアミノ酸配列の決定がなされていない<sup>31, 47-50)</sup>。Bacillus stearothermophilus XylA は  $\beta$ -キシロシダーゼとしては 6 例目になるが、アミノ酸配列のホモロジー検索の結果、どの  $\beta$ -キシロシダーゼとも類似性が認められなかった。

### 第 3 節 Maxi-cell 法を用いたプロモーター領域の推定

#### A. 実験方法

第 I 章、第 4 節 (4) で得られた 13E のデリーションクローン 13E-1 ~ 13E-7 について、DNA シークエンスを第 2 節の方法により行い、各デリーションクローンの挿入 DNA の末端部位を決定した。次に、第 II 章、第 2 節の方法に従っ

て、各デリーションクローンをMaxi-cell法により発現させ、キシラナーゼ活性と $\beta$ -キシロシダーゼ活性を測定した。

## B. 実験結果

Fig. 3-3に、各デリーションクローンにおける挿入DNAの末端部を、13EのDNAシーケンスに対して示すとともに、Fig. 3-2においても示した。また、Maxi-cell法での発現量を、650nmの培養液濁度での菌体量あたりの酵素量で算出しFig. 3-3に示した。

DNASIS™ (V. 7. 00)を用いたDNAシーケンスの検索より、 $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子中にプロモーター配列が2カ所とSD配列の存在が示唆された。13Eおよびそのデリーションクローンの13E-1~13E-7でpUC19のlacZプロモーターはキシラン分解酵素遺伝子に対しては逆向きに存在する。従って各酵素遺伝子の発現には自己のプロモーターおよびSD配列の存在が不可欠である。Fig. 3-3において、自己のプロモーターの位置を矢印で示した。13E-5および13E-6では、キシラナーゼの構造遺伝子は存在するがプロモーター領域が存在しないためにキシラナーゼ遺伝子の発現は行われなかった。13E-4では1カ所のプロモーターが存在するためキシラナーゼ遺伝子は発現し、13E-2と13E-3では2カ所のプロモーターが存在するため13E-4に比べ2倍のキシラナーゼ遺伝子の発現量となった。さらに13E-1と13Eでは3カ所のプロモーターが存在するためにキシラナーゼ遺伝子の発現量は増加し、 $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子の発現も行われた。

## 第4節 考察

第I章および第II章の結果をふまえ、本章における13EのDNAシーケンスの結果から判断すると、ORF1(2,118塩基)とORF2(993塩基)は、アミノ酸に翻訳した場合の理論分子量と制限酵素の切断サイトの位置、そしてN末端アミノ酸配列の情報から、それぞれ南森らの報告にある Bacillus stearoothermophilus No. 21の $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子(XylA)とキシラナーゼ遺伝子(XynA)であると考えられる。すなわち、Bacillus stearoothermophilus No. 21においては、 $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子(2.1kb)を上流に2塩基を隔てた後キシラナーゼ遺伝子(1.0kb)が存在し、両遺伝子は3.1kbの中にジーンクラスター構造を形成するというものである。Bacillus stearoothermophilus No. 21のキシラ

ン分解酵素遺伝子のジーンクラスター構造を、これまでに報告されている他のキシラン分解酵素遺伝子の位置関係と対比してFig. 3-4に示す。好熱菌 Caldocellum saccharolyticumにおいては、キシラナーゼ遺伝子が上流にありβ-キシロシダーゼ遺伝子との間は2.2kbの距離があり、そこには2つのORFが存在する<sup>31)</sup>。また、Bacillus pumilusにおいては約4kbの距離が存在する<sup>47)</sup>。Bacillus stearothermophilus No. 21のキシラン分解酵素遺伝子のジーンクラスター構造は、キシラン分解酵素遺伝子に限らず糖質分解酵素遺伝子においてこれまでに報告がない。

キシラナーゼ遺伝子の発現量の増加は、プロモーター数によるmRNA量の増加であると考えられる。従って、3カ所のプロモーター配列とSD配列は、それぞれが酵素遺伝子の発現に関与し得ると考えられる。細菌のmRNAにおいて、複数のタンパクをコードしているmRNA（ポリシストロニックmRNA）は多くみられる現象であるが、一般的に下流にコードされているタンパクは上流にコードされているタンパクよりも翻訳されにくい傾向がある（極性効果）<sup>52)</sup>。これら3カ所のプロモーター配列とSD配列は、この極性効果に対する対応の1つである可能性が考えられる。β-キシロシダーゼ遺伝子中にあるプロモーター配列とキシラナーゼ遺伝子の間には、約750塩基の距離があり、通常のプロモーターと構造遺伝子の距離よりもかなり長い。この約750塩基の領域には、2,794番目から2,828番目までのDNAの位置に逆方向反復配列があり、mRNAにおいてステム・ループ構造を形成した場合の自由エネルギーの変化は-10.9kcal/molと推定され、転写あるいは翻訳において何らかの制御領域になっている可能性がある<sup>52)</sup>。

また、Bacillus stearothermophilus No. 21のキシラン分解酵素遺伝子のジーンクラスター構造は、両酵素遺伝子間の距離が2塩基で短いことから1つのオペロンを形成し、両酵素遺伝子は同じmRNAに転写される可能性が考えられる。mRNAでの翻訳においては、リボソーム（特にリボソームの30Sサブユニット）がβ-キシロシダーゼの翻訳を終止した後、解離することなくキシラナーゼの翻訳を開始することが考えられ、このシステムは翻訳において本来行われるはずのリボソームのmRNAからの解離と再結合のステップを省略することになり、キシラナーゼとβ-キシロシダーゼのように協調的に作用する複数の酵素の発現には効率的であると考えられる<sup>52)</sup>。

キシラン分解酵素の遺伝子発現における制御機構に関しては未だ解明されて

いない分野であり、Bacillus stearothermophilus No. 21のキシラン分解酵素遺伝子についても、そのクラスター構造との関係や、第2章で示唆された周辺遺伝子領域との関係において発現制御機構の研究は今後の課題であると考えられる。

セルラーゼとキシラナーゼは、Henrissatらによって Hydrophobic cluster analysisによるファミリー分け<sup>18)</sup>が提唱されて以来、Beguin、Gilkesらにより現在A～Iの9つのファミリーに分類され、そのなかでキシラナーゼはファミリーFとファミリーGに分類されている<sup>19,20)</sup>。ファミリー間では1次構造上での類似性は認められず、 $\beta$ -1,4多糖分解酵素の起源の多様性が考えられる。Bacillus stearothermophilus XynAとホモロジーのあるキシラナーゼとセルラーゼ(セロビオヒドロラーゼ)はすべてファミリーFに分類されているものであり<sup>31-46)</sup>、従ってBacillus stearothermophilus XynAはファミリーFに属するキシラナーゼであると考えられる。キシラナーゼの両ファミリーのホモロジー領域をFig. 3-6に示す。ファミリーGにおいても、常温菌の他に好熱性細菌(Clostridium stercorarium)<sup>56)</sup>、糸状菌(Trichoderma reesei)<sup>57)</sup>、ルーメン細菌(Ruminococcus flavefaciens)<sup>40)</sup>などがあり、ファミリーFと同様に微生物種に広く分布している<sup>53-55)</sup>。ファミリーGにおいてはファミリーFと異なり、セルラーゼは存在せず、キシラナーゼのみで構成されている<sup>37,40,53-57)</sup>。Ruminococcus flavefaciensのキシラナーゼ(XynA)には、ファミリーFとファミリーGが両方ドメインとして含まれそれぞれのドメインにおいて酵素反応が行われ得るという報告がなされている<sup>40)</sup>。また、Streptomyces lividansでは、3つのキシラナーゼアイソザイム遺伝子(XlnA、XlnB、XlnC)が存在するが、XlnAはファミリーFに属し、XlnBとXlnCはファミリーGに属するキシラナーゼである<sup>37)</sup>。このように、キシラナーゼには2つの起源が存在し、それぞれの分子進化の過程において、ファミリーFの様に一部はセルラーゼに進化したグループと、ファミリーGの様にキシラナーゼとしてのみ進化したグループが形成されたと考えられる。

$\beta$ -キシロシダーゼに関してはキシラナーゼやセルラーゼのようなファミリーの分類はまだなされてはいない。そこで、 $\beta$ -キシロシダーゼについてホモロジー領域の検索よりグループ分けを試み、その結果をFig. 3-7に示した。Bacillus pumilus<sup>47)</sup>とButyrivibrio fibrisolvens<sup>48)</sup>の常温菌の $\beta$ -キシロシダーゼ

の間で34%、Caldocellum saccharolyticum<sup>31)</sup>とThermoanaerobacter sp.<sup>49)</sup>の好熱性細菌のβ-キシロシダーゼの間で38%、また好熱菌Clostridium sterco-  
rariumのβ-キシロシダーゼ<sup>50)</sup>と常温菌Bacillus polymyxaのどのファミリーにも属さないキシラナーゼ<sup>51)</sup>の間で22%のホモロジーが認められた。

それぞれのグループ間ではホモロジーが認められないことから、β-キシロシダーゼに関しては、Bacillus stearothermophilus XylAを含めて4つの起源が考えられ、キシラナーゼに比べて多様な分子進化の過程を経て現在に至っていると考えられる。

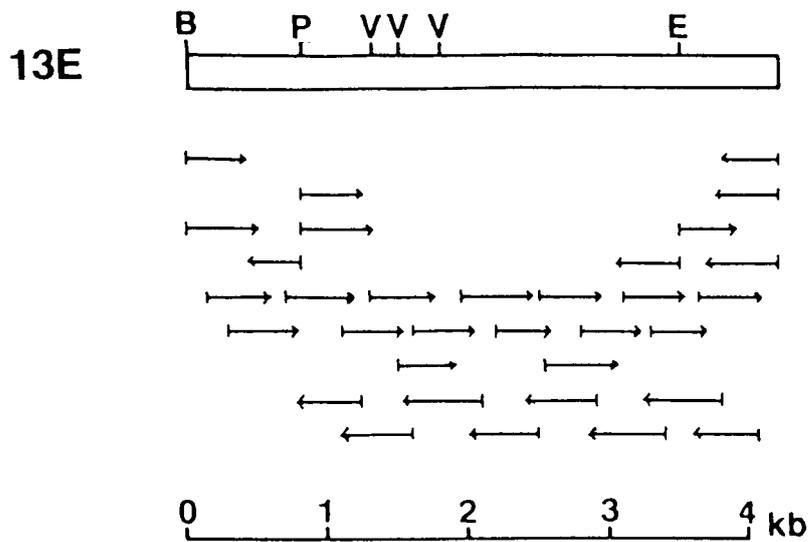


Fig.3-1. Restriction map of 13E plasmid and DNA sequence strategy.

Segments whose nucleotide sequence was determined are indicated by arrows below the restriction map, which indicate the extent and direction of each analysis.

B; BamHI, P; PstI, E; EcoRI, V; PvuII.

**BamHI**  
1 GGATCC TTTT TATGCAACTGATCGCCTTAGCTCTTTTCAAGTGTGCTCTTGTCT  
61 GGTGCTCTTTTCTCATGAAAATAACCAGGAAGTATTCAATACACCGTTGCTTTTCGC  
121 CTCCATCACCACCGCGGTGGAAAATTATGTAAAAGTTGGGTGGAAGGCAACATTGGGCA  
181 GTACTTTTCAACAGTGTCTGGATTACGACCGTCTCTGTCATTTGACTGTATTGCTTGC  
241 TAGTTTCGCGACCTTTGCCATTACACGCATGAATTGGAAGTGAAACATGTTGTGCTTGG  
301 ACTTTTATGGTTCGGTTAATGATTCCGATTCATTCGACGTTAATCCCATTGTTTCAGCTT  
361 TTTTATGAAAGTGAAGTCTCATCGATC A TCCGTTATCGATTGCTTAAACCAATATTGGATT  
421 TAACTTACCGATTACATCATGATCTTGCTCGGTTTTTACCAGTCGCTTCCGCGTGAGTTG  
481 GAAGAATCAGCGGTGATGGATGGGTGTTCCGTTTCATCGTATGTTTTTCCGGATCATTTTG  
541 CCGATGACGGCACCGGTGATCGTTACGACGACGATTATCAACATGATTTACAACCTGGAAC  
601 GAGTTCGTTTTTGTGAACACATTTATTAGCTCAGATGAGTTTAAAACGTTAACTGTCCGT  
661 ATTCAAACCTTTATCGGCCAGTATACGACCGATTGGGGAGCGATTGGTGCCACTTTAATG  
721 ATCAGCGTTCTGCCTATTTTGA TCGTCTTCTTCTTCTTAAGCGATAAAAATCATGGAAGGT  
781 ATTACTGCAGGAGCGATTAAAGGATAAATGTAGAAAAAGGGGAGAGAAGTAACCATGCCA  
841 ACCAATCTATTTTCAACGCCACCCTCACCAGTTGGAGCGTTTGGCAGCTTTACATTA  
T N L F F N A H H S P V G A F A S F T L  
901 GGATTTCCAGGAAAAAGCGGGGATTGGATCTTGAACCTCGCCCGTCCCCCGCGGCAAAAC  
G F P G K S G G L D L E L A R P P R Q N  
961 GTATTGATTGGTGTGGAATCGTTACATGAATCGGGCTTATATCATGTCCTTCCGTTTTG  
V L I G V E S L H E S G L Y H V L P F L  
1021 GAAACAGCCGAAGAAGATGAAAGCAAACGGTATGACATCGAAAATCCTGACCCGAATCCG  
E T A E E D E S K R Y D I E N P D P N P  
1081 CAAAAACCGAACATCTTAATCCCATTG CCAAAGAGGAGATTCAACGTGAATTTTCATGTG  
Q K P N I L I P F A K E E I Q R E F H V  
1141 GCCACAGATACGTGGAAGGCTGGAGATTTAACGTTTACGATTTATTCCTCTGTAAGCG  
A T D T W K A G D L T F T I Y S P V K A  
1201 GTGCCAAATCCGGAACCGCGGACGAGGAAGAACTCAAGCTGGCGTTGGTTCCAGCTGTC  
V P N P E T A D E E E L K L A L V P A V  
1261 ATCGTGGAGATGACGATTGATAATACAAATGGAACAAGGGCCCGGGCGGCTTTTTCGGG  
I V E M T I D N T N G T R A R R A F F G  
1321 TTCGAAGGCACCGATCCGTATACTTCAATGCGGCGGATCGATGACACATGCCCGCAACTG  
F E G T D P Y T S M R R I D D T C P Q L  
1381 CGCGGGGTCGGTCAAGGGCGGATTTTGGAGCATTGTATCCAAGGACGAGGGTGTTCGCTCA  
R G V G Q G R I L S I V S K D E G V R S  
1441 GCGCTGCATTTTAGCATGGAGGATATCTTAACGGCACAGCTGGAAGAAAACCTGGACGTTT  
A L H F S M E D I L T A Q L E E N W T F  
1501 GGGCTTGGCAAAGTGGGCGCCTTAATTGTCGATGTGCCGGCAGGCGAAAAGAAAACCTTAT  
G L G K V G A L I V D V P A G E K K T Y  
1561 CAATTTGCGGTTTGTTTTTACCGAGGCGGGTACGTGACGGCGGGGATGGATGCTTCCTAT  
Q F A V C F Y R G G Y V T A G M D A S Y

1621 TTTTATACCCGTTTC<sup>→1638</sup>CAAAAATATTGAGGAAGTCGGCCTTTATGCCCTGGAGCAGGCG  
 F Y T R F F Q N I E E V G L Y A L E Q A  
 1681 GAAGTATTGAAGGAGCAATCGTTCGGTTCCAATAAGCTGATTGAAAAAGAATGGCTGTCT  
 E V L K E Q S F R S N K L I E K E W L S  
 1741 GATGATCAAACATTTATGATGGCGCACGCCATTCGCAGCTACTACGGCAATACGCAGCTG<sup>Pvell</sup>  
 D D Q T F M M A H A I R S Y Y G N T Q L  
 1801 TTAGAGCACGAGGGGAAACCGATTGGGGTGGTCAACGAAGGCGAGTACCGGATGATGAAT  
 L E H E G K P I W V V N E G E Y R M M N  
 1861 ACGTTTGATTG<sup>-35</sup>ACCGTTGACCAACTCTTTTTTGA<sup>-10</sup>AACTGAACTGAATCCATGGACGGTC  
 T F D L T V D Q L F F E L K L N P W T V  
 1921 AAAAATGTTCTCGATTTGTACGTCGAGCGCTACAGTTACGAGGATCGCGTTTCGTTTTCCG  
 K N V L D L Y V E R Y S Y E D R V R F P  
 1981 GGAGAAGAGACAGAATATCCGAGCGGCATCAGTTTTACTCACGACATGGGAGTAGCCAAT  
 G E E T E Y P S G I S F T H D M G V A N  
 2041 ACGTTCTCGCGCCCGCACTACTCGTCATACGAGCTGTATGGCATTAG<sup>→2086</sup>CGGCTGCTTCTCG  
 T F S R P H Y S S Y E L Y G I S G C F S  
 2101 CACATGACGCACGAACAGCTTGTCAACTGGGTGCTTTGCGCGGCGGTGTACATGAAACAA  
 H M T H E Q L V N W V L C A A V Y I E Q  
 2161 ACGAAAGACTGGGCATGGCGCGACAAGCGGCTTGCTATTTTGGAGCAATGCCTAGAAAGC<sup>-35</sup>  
 T K D W A W R D K R L A I L E Q C L E S<sup>-10</sup> <sup>→2198</sup>  
 2221 ATGGTTCCGCGGATCATCCCGATCCGGAACAACGAAATGGCGTAATGGGACTCGACAGC  
 M V R R D H P D P E Q R N G V M G L D S  
 2281 ACCCGCACGATGGGCGGGGCGGAAATTACGACATATGACAGTTTGGACGTTTCCCTCGGC  
 T R T M G G A E I T T Y D S L D V S L G  
 2341 CAAGCCCGCAACAATTTATATTTAGCAGGTAAATGTTGGGCGGCCTATGTAGCGCTTGAA  
 Q A R N N L Y L A G K C W A A Y V A L E  
 2401 AAATTGTTCCGTGATGTCGGCAAGGAAGAATTGGCCGCGCTGGCGGGAGAGCAGGCGGAA  
 K L F R D V G K E E L A A L A G E Q A E  
 2461 AAATGCGCCGCGACGATCGTCAGCCATGTAACCGATGACGGGTATATTCCGGCGATCATG  
 K C A A T I V S H V T D D G Y I P A I M  
 2521 GGAGAAGGAAACGACTCAAAAATCATTCGGCTATTGAGGGGCTTGTGTTCCCTTATTTTC  
 G E G N D S K I I P A I E G L V F P Y F  
 2581 ACCAATTGCCATGAAGCGTTGGACGAAAACGGACGCTTTGGAGCATATATTC AAGCGTTG  
 T N C H E A L D E N G R F G A Y I Q A L  
 2641 CGCAACCATTTGCAATACGTGTTGCGGGAAGGAATTTGCCTGTTCCCGGATGGAGGCTGG  
 R N H L Q Y V L R E G I C L F P D G G W  
 2701 AAAATTTCCCTCAACGAGCAACAACACTCATGGCTAAGTAAAATTTACCTATGTCAGTTCATT  
 K I S S T S N N S W L S K I Y L C Q F I  
 2761 GCCCGTCATA<sup>→2771</sup>TTTAGGCTGGGAATGGGATGAACAAGGCAAACGGGCCGATGCCGCCAT  
 A R H I L G W E W D E Q G K R A D A A H  
 2821 GTCGCTTGGCTCACCCATCCGACATTATCCATTTGGAGCTGGAGTGATCAAATCATCGCG  
 V A W L T H P T L S I W S W S D Q I I A  
 2881 GGTGAAATTACCGGCAGCAAATATTACCCGCGCGGCGTGACAAGTATTTTGTGGCTTGAG<sup>~</sup>  
 G E I T G S K Y Y P R G V T S I L W L E  
 2941 <sup>SD</sup>GAGGGAGAATAACGATGTGCTCATCCATCCCGTCCCTTCGCGAAGTGTTTGCCAATGATT  
 E G E \* M C \_ S \_ S \_ I \_ P \_ \_ S \_ L R E V F A N D

3001 TTCGCATCGGGGAGCAGTCAATCCAGTGACGCTAGAAGCCCAACAATCGCTGTTGATCC  
 F R I G A A V N P V T L E A Q Q S L L I  
 3061 GCCATGTAAACAGCCTTACCGCCGAAAACCATATGAAGTTTGAACATCTTCAGCCAGAGG  
 R H V N S L T A E N H M K F E H L Q P E  
 3121 AGGGGCGGTTTACGTTTGACATCGCGATCAAATCATCGACTTCGCCGTTCTCATCACATG  
 E G R F T F D I A I K S S T S P F S S H  
 3181 GCGTTCGCGGACATACGCTCGTGTGGCATAACCAAACCCCGAGCTGGGTGTTTCAAGACA  
 G V R G H T L V W H N Q T P S W V F Q D  
 3241 GCCAAGGGCATTTCGTCCGGCAGAGATGTGTTGCTGGAACGGATGAAATCTCATATCTCCA  
 S Q G H F V G R D V L L E R M K S H I S  
 3301 CGGTTGTACAGCGATACAAAGGGAAAGTCTATTGTTGGGATGTCATCAACGAAGCGGTCG  
 T V V Q R Y K G K V Y C W D V I N E A V  
 3361 CCGATGAGGGGAGCGAATGGCTGCGCTCCTCAACGTGGCGACAAATCATCGGCGATGATT  
 A D E G S E W L R S S T W R Q I I G D D  
 3421 TTATTCAGCAGGCGTTTCTTTATGCCCATGAAGCGGACCCAGAGGCGTTGCTGTTTACA  
 F I Q Q A F L Y A H E A D P E A L L F Y  
 3481 ACGACTATAATGAATGTTTTCCGGAAAAACGCGAGAAAAATTTACACACTAGTAAAAATCTT  
 N D Y N E C F P E K R E K I Y T L V K S  
 3541 TGCGTGACAAAGGAATTCCCATTCACGGCATCGGCATGCAGGCGCACTGGAGCCTGAACC  
 L R D K G I P I H G I G M Q A H W S L N  
 3601 GCCCCAGCCTTGATGAAATTCGCGCGGCGATTGAGCGATATGCGTCTCTCGGAGTCATTC  
 R P T L D E I R A A I E R Y A S L G V I  
 3661 TCCATATTACCGAAC TTGATATATCGATGTTTGAATTTGACGATCATCGAAAGGACTTGG  
 L H I T E L D I S M F E F D D H R K D L  
 3721 CTGCTCCTACAAACGAAATGGTTCGAACGGCAGGACAGAGCGGTACGAACAAATTTTCTCTC  
 A A P T N E M V E R Q A E R Y E Q I F S  
 3781 TATTCAAGGAATATCGTGATGTCATTCAAAATGTCACGTTTGGGGGAATTGCCGATGACC  
 L F K E Y R D V I Q N V T F W G I A D D  
 3841 ACACGTGGCTTGACCACTTCCCTGTGCAAGGAAGAAAAAATTTGGCCCTTTTGTTCGATG  
 H T W L D H F P V Q G R K N W P L L F D  
 3901 AACAAACACAACCCCAACCGGCTTTTTGGCGGGTGGTGAATATCTAAATTTCTAGTTGCT  
 E Q H N P K P A F W R V V N I \*  
 3961 TTGAAATCATACTATATAGTGAAGAGGGGAAAAAATAGAGTTTAGTCTCCCTCTTCCA  
 4021 TAATAATAGAAAAC TTTCAGAAAAGTATTGAATATGGGGAGGTTTTTCGTTATAATAAAA  
 4081 ACAAAC TAGTATACTAGTGTACTAGTAATCAAGTATCGCGTAAGA TTGTACGTTTGCC  
 4141 TTTTGAAC TAGAAGATATPATTTTCAAAC TAGTATACTAGAATGTTAATTTGTGATCC

Fig.3-2. The nucleotide sequences (13E) and deduced amino acid sequences of the *B. stearothermophilus* No.21  $\beta$ -xylosidase (xylA) and xylanase (xynA) genes. The N-terminal amino acid sequence of each enzyme is denoted as dotted lines. Possible promoter regions and possible Shine-Dalgarno (SD) sequences of each gene have wavy lines. Inverted-repeat sequences are denoted as inverted arrows. The numbers refer to the position in the sequence of 13E at which the deletions commence.

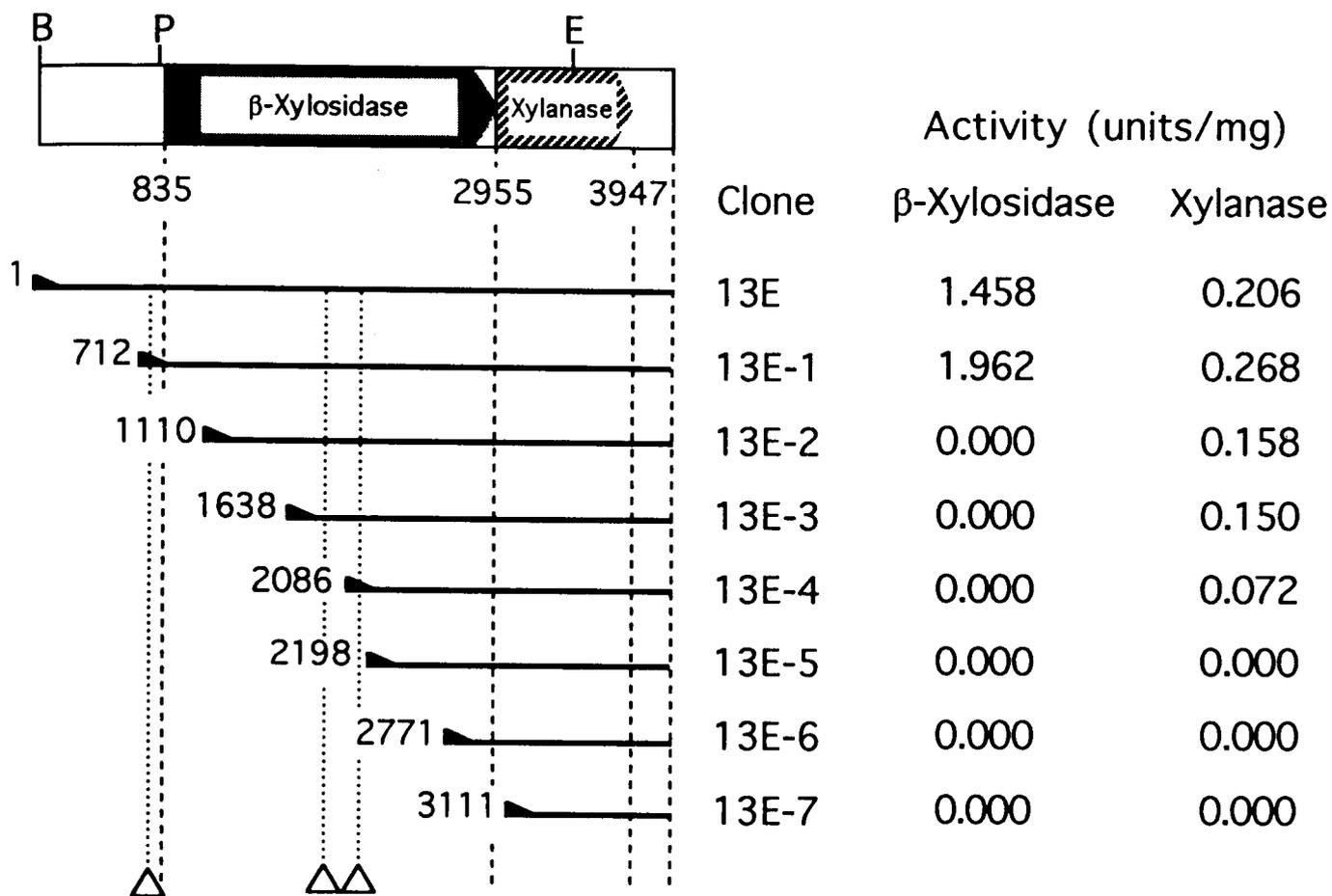


Fig.3-3. Diagrammatic representation of truncated plasmids in the clustered genes and their productivities of  $\beta$ -xylosidase and xylanase by the Maxi-cell method. The numbers refer to the position in the sequence of 13E at which the deletions commence.

$\triangle$  ; Position of possible promoter sequence, B; BamHI, P; PstI, E; EcoRI.

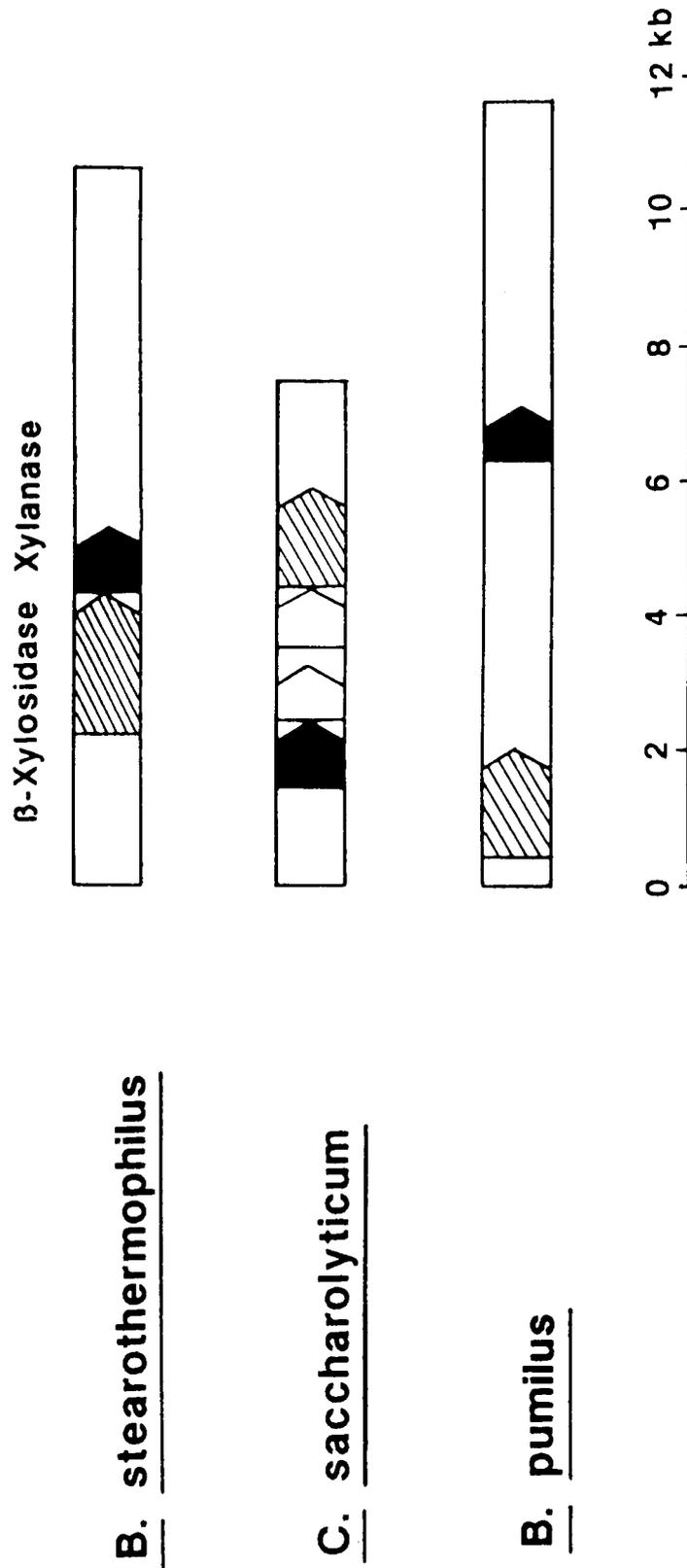


Fig.3-4. Comparison of the clustered gene structures of xylan-degrading enzymes.

Homology(%)

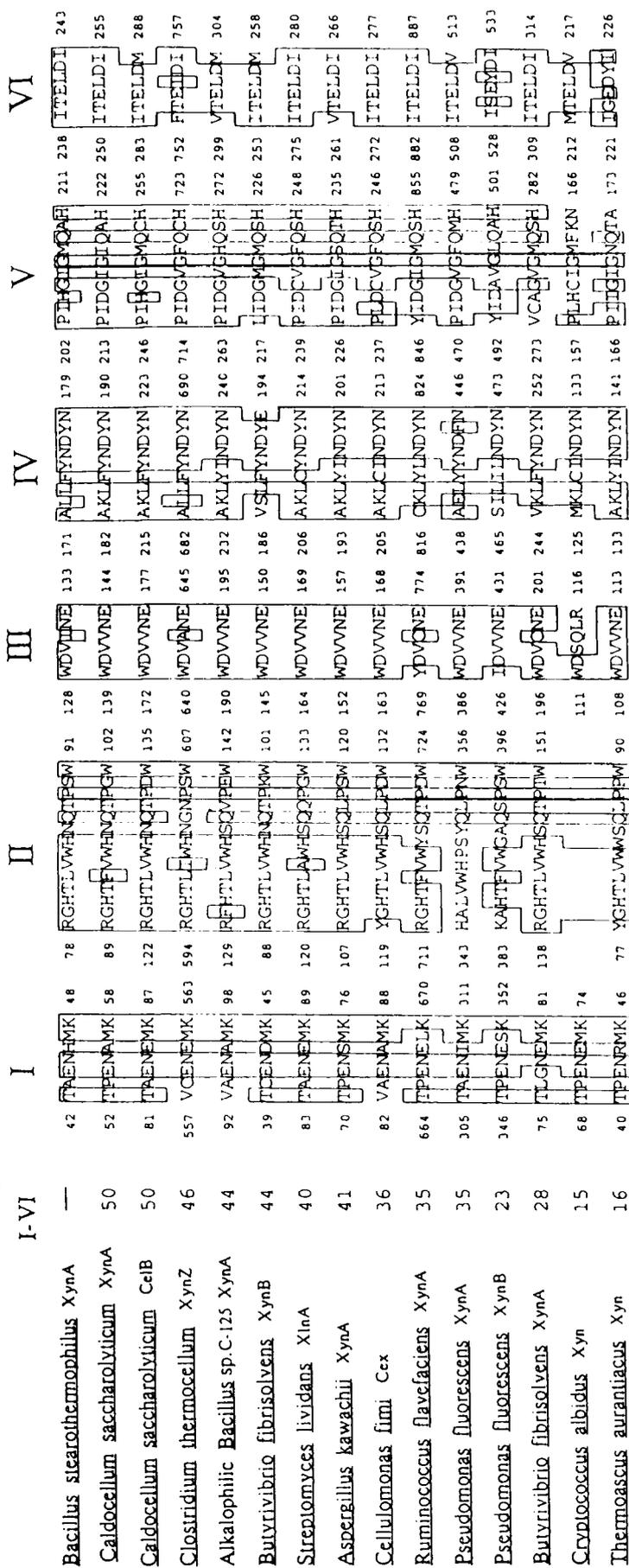


Fig. 3-5. Homologous regions in the amino acid sequences of family F xylanase and cellulases.

Bacillus stearothermophilus xynA (this study), Caldocellum saccharolyticum xynA<sup>31)</sup>,

Caldocellum saccharolyticum celB<sup>32,33)</sup>, Clostridium thermocellum xynZ<sup>34)</sup>,

Alkalophilic Bacillus sp. C-125 xynA<sup>35)</sup>, Butyrivibrio fibrisolvens xynB<sup>36)</sup>,

Sireplomyces lividans xlnA<sup>37)</sup>, Aspergillus kawachii xynA<sup>38)</sup>,

Cellulomonas fimi cex<sup>39)</sup>, Ruminococcus flavefaciens xynA<sup>40)</sup>,

Pseudomonas fluorescens xynA<sup>41)</sup>, Pseudomonas fluorescens xynB<sup>42)</sup>,

Butyrivibrio fibrisolvens xynA<sup>43)</sup>, Cryptococcus albidus xyn<sup>44)</sup>,

Thermoascus aurantiacus xyn<sup>45,46)</sup>.

Homology (%) among amino acid sequences in the region (From 42I to 243I, 202 amino acid residues) of B. stearothermophilus xylanase (xynA) containing these six sequences (I-VI) was calculated against those of other xylanases or cellulases belonging to family F.

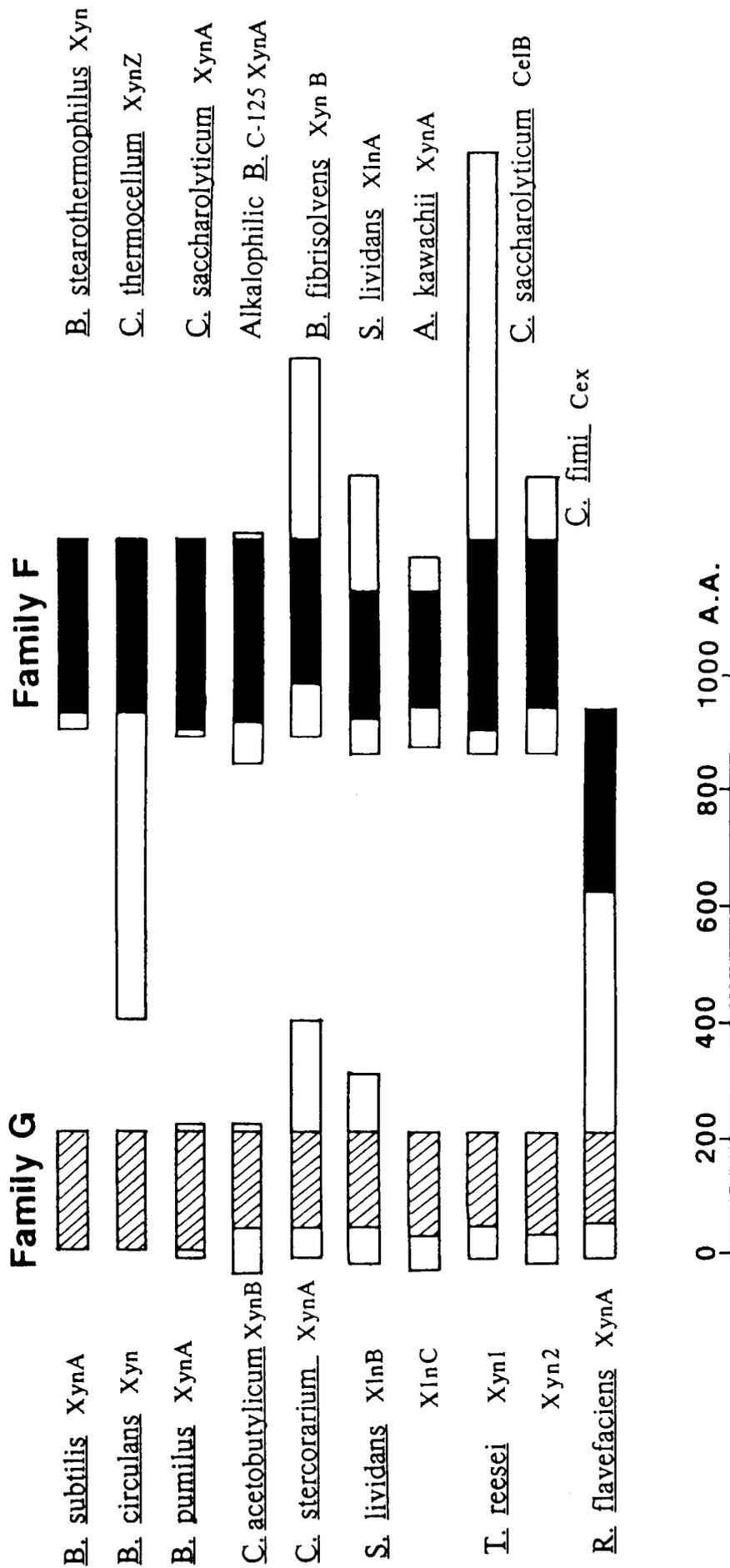


Fig.3-6. Schematic diagrams of xylanase and cellulase on family F and G.

Catalytic domains are defined as a homologous region on the amino acid sequences.



## 第IV章 Bacillus stearothermophilus No. 21のキシラナーゼアイソザイム 遺伝子の構造解析

### 第1節 序

第II章、第III章を通じて南森らの報告<sup>23)</sup>にある Bacillus stearothermophilus No. 21のキシラナーゼと $\beta$ -キシロシダーゼの遺伝子の解析を行ったが、第I章で得られたキシラナーゼのアイソザイム遺伝子と考えられる17Bのクローン遺伝子についてDNAシーケンスを行いその構造解析を試みた。

### 第2節 キシラナーゼアイソザイム遺伝子の全塩基配列の決定

#### A. 実験方法

DNAシーケンスおよびその解析については、第III章、第2節で用いた方法に従った。

#### B. 実験結果

17B-PEについての全塩基配列を決定し、そのDNAシーケンスのストラテジーをFig. 4-1に示した。また、決定されたDNAシーケンス(2,009塩基)をFig. 4-2に示す。1つのORF(ORF3)の存在が確認された。ORF3は、全長1,863塩基 620アミノ酸(理論分子量70.5kDa)で構成され、開始Met(ATG)コドンが51番目から始まり、終止コドン(TAG)が1,913番目で終結していた。DNASIS<sup>TM</sup>(V. 7. 00)を用いたDNAシーケンスの検索の結果、ORF3についてSD配列の存在が示唆された(Fig. 4-2)。DNAシーケンスで決定された17B-PEのPstIサイトから1,310塩基目までが、13EにおけるPstIサイトから1,310塩基目までと塩基レベルで完全に一致した。従って、ORF3は第III章のORF1( $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子)と開始Met(ATG)コドンから1,260塩基において完全に一致し、アミノ酸に翻訳した場合437アミノ酸が一致した。そしてORF3の後半部分(183アミノ酸)はORF2(キシラナーゼ遺伝子)の後半部分(160アミノ酸)と130アミノ酸において44%のホモロジーを示した。このホモロジー領域は、第III章のFig. 3-5で示されたファミリーFキシラナーゼの保存領域のうちIV~VIの領域に相当した。ORF3を Bacillus stearothermophilus No. 21のキシラナーゼ遺伝子(XynB)とあらし、Fig. 4-3に13Eと17B-PEの両クローン遺伝子上にコードされた $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子(XylA)とキシラナーゼ遺伝子(XynA)およびキシラナーゼ

アイソザイム遺伝子 (XynB) の構造上の特徴を図示した。β-キシロシダーゼの前半 437アミノ酸をAドメイン、後半268アミノ酸をBドメインとし、キシラナーゼ (XynA) の前半170アミノ酸をCドメイン、後半160アミノ酸をDドメインとした場合、キシラナーゼ (XynB) は前半437アミノ酸はβ-キシロシダーゼのAドメインに一致し、後半183アミノ酸はキシラナーゼ (XynA) のDドメインに類似したD'ドメインと表せる。Fig. 4-4にXynBを含めてXynAのIV～VIの領域におけるホモロジーを、XynAに対してとXynBに対して算出した。XynAとXynBのホモロジー44%に対して、好熱菌 *Caldocellum saccharolyticum* のキシラナーゼ<sup>31)</sup>とXynAは54%でXynBは44%であり、好アルカリ性細菌 *Bacillus* sp. C-125のキシラナーゼ<sup>35)</sup>とXynAは44%でXynBは67%のホモロジーであった。

### 第3節 考察

*Bacillus stearothermophilus* No. 21のXynBの構造は620アミノ酸のうちN末端側の70% (437アミノ酸、Aドメイン) がβ-キシロシダーゼの構造をしているにも関わらず、酵素の機能はβ-キシロシダーゼではなくキシラナーゼである。このことは、β-キシロシダーゼの活性部位がAドメインではなくBドメインにあることを示唆すると共に、キシラナーゼの活性部位がD'ドメインにあることを指示する。D'ドメインは、XynAのDドメインとFig. 4-4で示されるIV～VIの領域でアミノ酸配列の類似性がみられ、これらの領域は他のファミリーFのキシラナーゼにも保存されていることから、キシラナーゼの活性に重要な領域であると考えられる。Tullらはラジオアイソトープラベルした基質アナログを用いた酵素化学的な解析により、ファミリーFに属する *Cellulomonas fimi* のセルラーゼの活性部位がVIの領域のITELD (-Ile-Thr-Glu-Leu-Asp-) のアミノ酸配列にあり、特に活性中心がE (Glu) であることを報告<sup>58)</sup>していることから、XynA・XynBのD・D'ドメインにおいてもVIの領域が活性部位であると考えられる。

β-キシロシダーゼの活性部位がBドメインにあり、キシラナーゼの活性部位がD・D'ドメインにあるとすると、A・Cドメインの役割が問題となる。A・Cドメインの役割に関する知見は現在のところ何も得られてはいないが、Aドメインはβ-キシロシダーゼとXynBにおいて完全に保存され、また、CドメインもファミリーFのキシラナーゼにおいてI～IIIの領域が保存されていること

から、何らかの重要な機能を備えていると考えられる。

Fig. 4-4のIV～VIの領域でのホモロジー検索より、DドメインはD'ドメインより *Caldocellum saccharolyticum*の耐熱性キシラナーゼに類似し、D'ドメインはDドメインよりも *Bacillus* sp. C-125の耐アルカリ性キシラナーゼに類似していることからD・D'ドメインの起源は異なる細菌に由来すると考えられる。すなわち、*Bacillus stearothermophilus* No. 21においては、A・B・C・D・D'の各ドメインに対応する5つの遺伝子単位がそれぞれ混成することにより、遺伝子の水平伝達によるとも表現されるXynB遺伝子を含む各キシラン分解酵素遺伝子が生成されたと考えられる。

真核生物においては、酵素のユニットをコードする遺伝子単位としてのエキソンの混成による酵素の分子進化という概念（エキソン混成）<sup>59,60)</sup>が確立されつつあるが、イントロンを持たない原核生物においては、こうした酵素の分子進化の機構は未知の分野である。

南森らは、細菌の $\alpha$ -1,4多糖分解酵素における生澱粉分解能がC末端領域のドメイン構造に起因し、ドメインレベルでの遺伝子混成による分子進化を示唆する報告を行っている<sup>61,62,63)</sup>。

また、佐藤らは*Bacillus stearothermophilus*において、 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子が水平伝達によりもたらされたことを指示する報告を行っている<sup>64)</sup>。

本研究は、細菌の環境適応における分子進化戦略としての、遺伝子の水平伝達にともなう遺伝子単位混成の例を示していると考えられる。次に、このような遺伝子混成により生成した個々の酵素分子が機能面においてどのような影響を受けているのかを検討する必要がある。

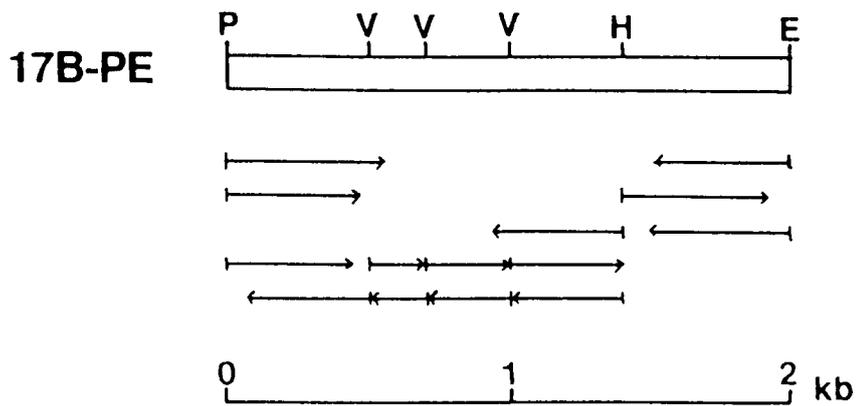


Fig.4-1. Restriction map of 17B-PE plasmid and DNA sequence strategy.

Segments whose nucleotide sequence was determined are indicated by arrows below the restriction map, which indicate the extent and direction of each analysis.

P; PstI, V; PveII, H; HindIII, E; EcoRI.

PstI  
 1 CTGCAGGAGCGATTAAAGGATAAATGTAGAAAAAGGGAGAGAAGTAACCATGCCAACC  
SD M P T  
 60 AATCTATTTTTCAACGCCCACTCACCAGGTTGGAGCGTTTGCAGCTTTACATTAGGA  
 N L F F N A H H S P V G A F A S F T L G  
 120 TTTCCAGGAAAAAGCGGGGATTGGATCTTGAACCTCGCCCGTCCCCGCGGCAAAACGTA  
 F P G K S G G L D L E L A R P P R Q N V  
 180 TTGATTGGTGTCTGAATCGTTACATGAATCGGGCTTATATCATGTCCTTCCGTTTTGGAA  
 L I G V E S L H E S G L Y H V L P F L E  
 240 ACAGCCGAAGAAGATGAAAGCAAACGGTATGACATCGAAAATCCTGACCCGAATCCGCAA  
 T A E E D E S K R Y D I E N P D P N P Q  
 300 AAACCGAACATCTTAATCCCATTTGCCAAAGAGGAGATTCAACGTGAATTTTCATGTGGCC  
 K P N I L I P F A K E E I Q R E F H V A  
 360 ACAGATACGTGGAAGGCTGGAGATTTAACGTTTACGATTTATTCTCCTGTAAAAGCGGTG  
 T D T W K A G D L T F T I Y S P V K A V  
 420 CCAAATCCGGAACCGCGGACGAGGAAGAACTCAAGCTGGCGTTGGTTCAGCTGTCATC  
Pvll  
 P N P E T A D E E E L K L A L V P A V I  
 480 GTGGAGATGACGATTGATAATACAAATGGAACAAGGGCCCGGCGGGCGTTTTTCGGGTTC  
 V E M T I D N T N G T R A R R A F F G F  
 540 GAAGGCACCGATCCGTATACTTCAATGCGGCGGATCGATGACACATGCCCGCAACTGCGC  
 E G T D P Y T S M R R I D D T C P Q L R  
 600 GGGGTCGGTCAAGGGCGGATTTTGAGCATTGTATCCAAGGACGAGGGTGTTCGCTCAGCG  
 G V G Q G R I L S I V S K D E G V R S A  
 660 CTGCATTTTAGCATGGAGGATATCTTAACGGCACAGCTGGAAGAAAACCTGGACGTTTGGG  
Pvll  
 L H F S M E D I L T A Q L E E N W T F G  
 720 CTTGGCAAAGTGGGCGCCTTAATTGTCGATGTGCCGGCAGGCGAAAAGAAAACCTTATCAA  
 L G K V G A L I V D V P A G E K K T Y Q  
 780 TTTGCGGTTTGTTTTTACCGAGGCGGGTACGTGACGGCGGGGATGGATGCTTCCTATTTT  
 F A V C F Y R G G Y V T A G M D A S Y F  
 840 TATACCCGTTTCTTTCAAATATTGAGGAAGTCGGCCTTTATGCCCTGGAGCAGGCGGAA  
 Y T R F F Q N I E E V G L Y A L E Q A E  
 900 GTATTGAAGGAGCAATCGTTCCGTTCCAATAAGCTGATTGAAAAGAATGGCTGTCTGAT  
 V L K E Q S F R S N K L I E K E W L S D

PvuII

960 GATCAAACATTTATGATGGCGCACGCCATTCGCAGCTACTACGGCAATACGCAGCTGTTA  
D Q T F M M A H A I R S Y Y G N T Q L L

1020 GAGCACGAGGGGAAACCGATTTGGGTGGTCAACGAAGGCGAGTACCGGATGATGAATACG  
E H E G K P I W V V N E G E Y R M M N T

1080 TTTGATTTGACCGTTGACCAACTCTTTTTTGAAGTGAAGTGAATCCATGGACGGTCAAA  
F D L T V D Q L F F E L K L N P W T V K

1140 AATGTTCTCGATTTGTACGTCGAGCGCTACAGTTACGAGGATCGCGTTCGTTTTCCGGGA  
N V L D L Y V E R Y S Y E D R V R F P G

1200 GAAGAGACAGAATATCCGAGCGGCATCAGTTTTACTCACCACATGGGAGTAGCCAATACG  
E E T E Y P S G I S F T H D M G V A N T

1260 TTCTCGCGCCCGCACTACTCGTCATACGAGCTGTATGGCATTAGCGGCTGCTTCTCGCAC  
F S R P H Y S S Y E L Y G I S G C F S H

HindIII

1320 ATGACGCACGAACAGCTTGTCAACTGGGTGCTTTGCGCGGCCGAAGCTTACATGAATGAT  
M T H E Q L V N W V L C A A E A Y M N D

1380 TACAATACAGAAGTCGAACCGAAGCGAACCGCTCTTTACAATTTAGTCAAACAACCTGAAA  
Y N T E V E P K R T A L Y N L V K Q L K

1440 GAAGAGGGTGTTCGGATCGACGGCATCGGCCATCAATCCACATCCAAATCGGCTGGCCT  
E E G V P I D G I G H Q S H I Q I G W P

1500 TCTGAAGCAGAAATCGAGAAAACGATTAACATGTTCCGCGCTCTCGGTTTAGACAACCAA  
S E A E I E K T I N M F A A L G L D N Q

1560 ATCACTGAGCTTGATGTGAGCATGTACGGTTGGCCGCCGCGCTTACCCGACGTATGAC  
I T E L D V S M Y G W P P R A Y P T Y D

1620 GCCATTCCAAAACAAAAGTTTTTGGATCAGGCAGCGCGCTATGATCGTTTGTCAAACCTG  
A I P K Q K F L D Q A A R Y D R L F K L

1680 TATGAAAAGTTGAGCGATAAAAATTAGCAACGTCACCTTCTGGGGCATCGCCGACAATCAT  
Y E K L S D K I S N V T F W G I A D N H

1740 ACGTGGCTCGACAGCCGTGCGGATGTGTACTATGACGCCAACGGGAATGTTGTGGTTGAC  
T W L D S R A D V Y Y D A N G N V V V D

1800 CCGAACGCTCCGTACGCAAAGTGGAAAAGGGAAAAGGAAAAGATGCGCCGTTTCGTTTTT  
P N A P Y A K V E K G K G K D A P F V F

1860 GGACCGGATTACAAAGTCAAACCCGCATATTGGGCTATTATCGACCACAAATAGACAGCC  
G P D Y K V K P A Y W A I I D H K \*

1920 AAAAGCACATAGGTGTCTCCAGCAAAGAAGAGGATGTCTCAACAACAACGAGCATCCTCT

1980 TTCTAATAATATGCCGTAATTGTCATGGCA

Fig.4-2. The nucleotide sequences (17B-PE) and deduced amino acid sequences of the B. stearothermophilus No.21 xylanase isozyme (xynB) gene.

Possible Shine-Dalgarno (SD) sequences have wavy lines.

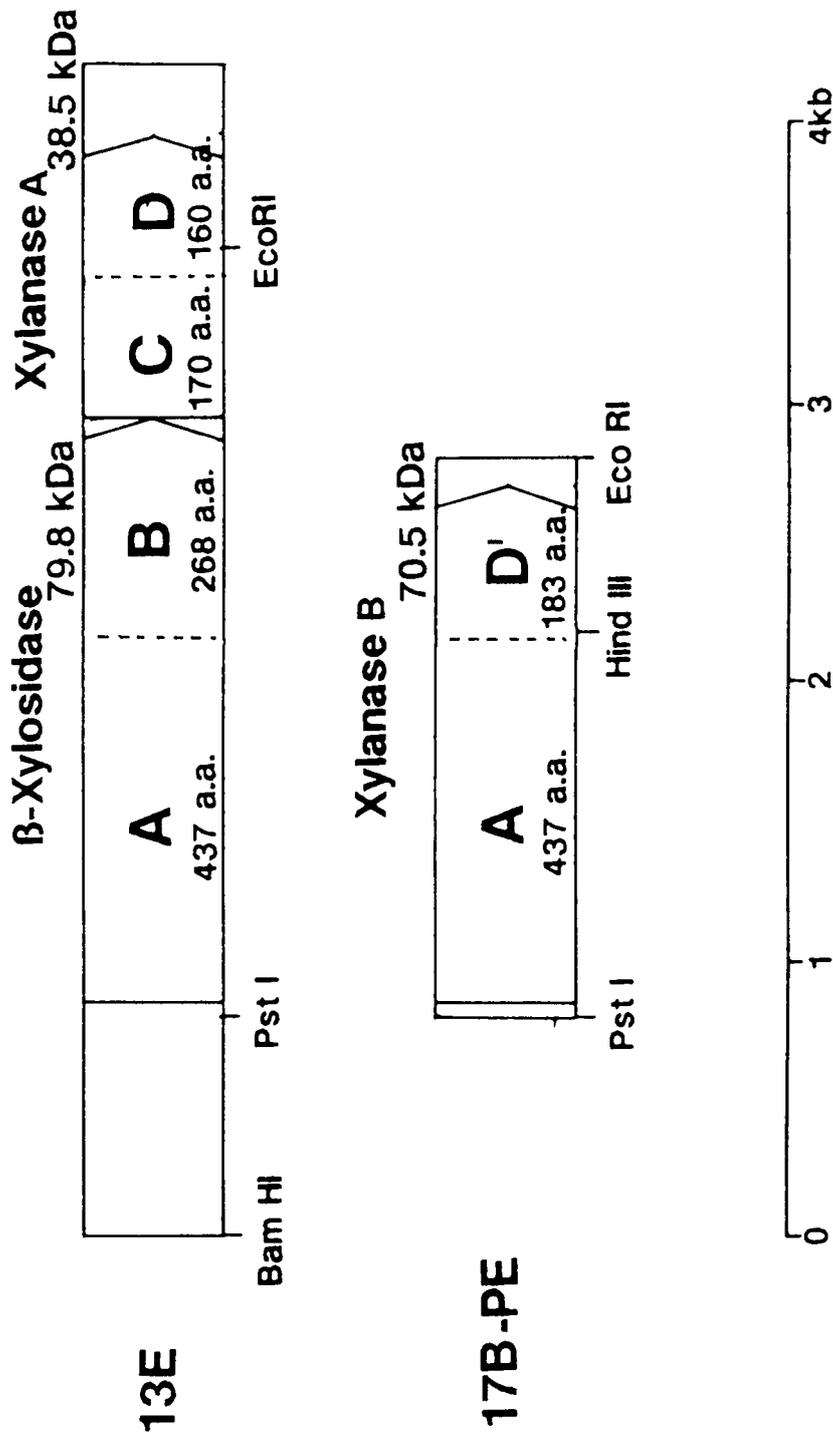


Fig.4-3. Gene unit structure of xylan-degrading enzymes in the clustered gene (13E) and the fusion gene (17B-PE).

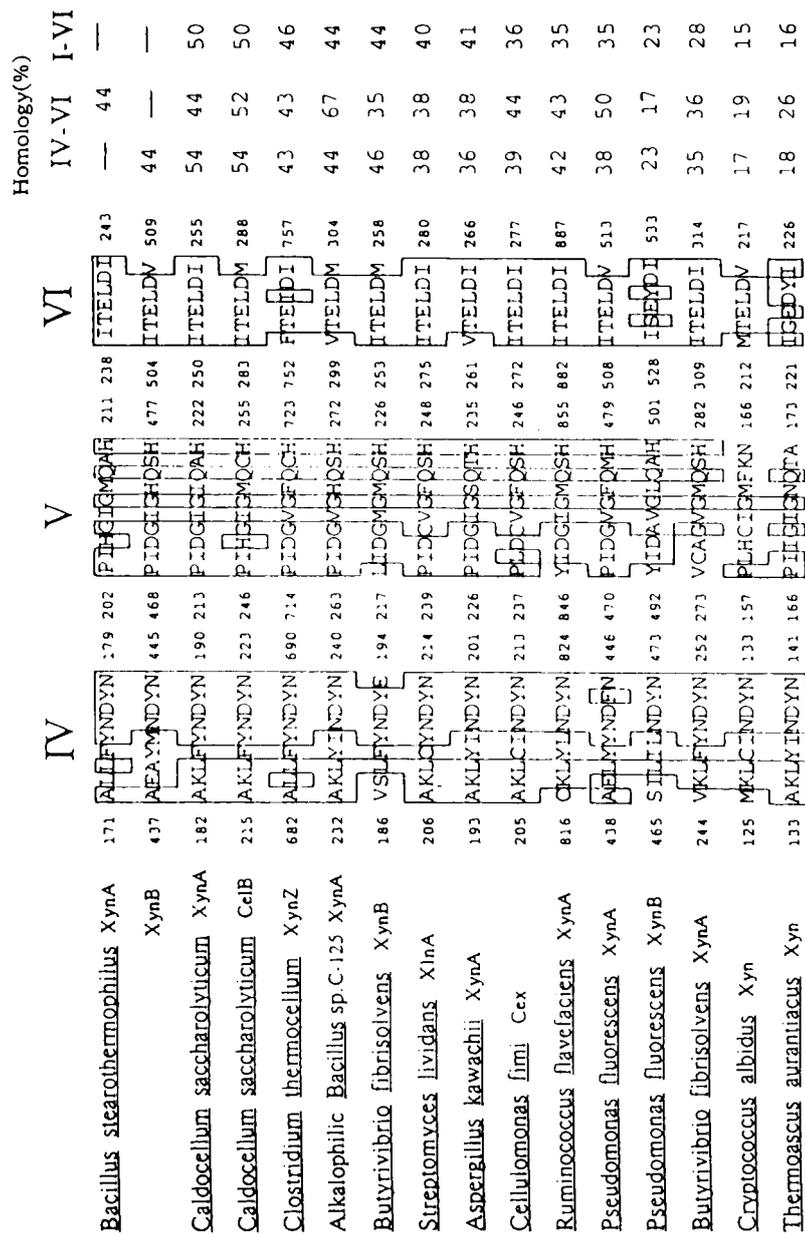


Fig. 4-4. Homologous regions in the amino acid sequences of family F xylanase and cellulases.

*Bacillus stearothermophilus* xynA (this study), xynB (this study),

*Caldocellum saccharolyticum* xynA<sup>31)</sup>, *Caldocellum saccharolyticum* celB<sup>32,33)</sup>,

*Clostridium thermocellum* xynZ<sup>34)</sup>, Alkalophilic *Bacillus* sp. C-125 xynA<sup>35)</sup>,

*Butyrivibrio fibrisolvens* xynB<sup>36)</sup>, *Streptomyces lividans* xlnA<sup>37)</sup>,

*Aspergillus kawachii* xynA<sup>38)</sup>, *Cellulomonas fimi* cex<sup>39)</sup>,

*Ruminococcus flavefaciens* xynA<sup>40)</sup>, *Pseudomonas fluorescens* xynA<sup>41)</sup>,

*Pseudomonas fluorescens* xynB<sup>42)</sup>, *Butyrivibrio fibrisolvens* xynA<sup>43)</sup>,

*Cryptococcus albidus* xyn<sup>44)</sup>, *Thermoascus aurantiacus* xyn<sup>45,46)</sup>.

Homology (%) among amino acid sequences in the region (From 171A to 243I, 73 amino acid residues) of *B. stearothermophilus* xylanase (xynA) containing these three sequences (IV-VI)

was calculated against those of other xylanases or cellulases belonging to family F.

## 第V章 Bacillus stearothermophilus No. 21のキシラン分解酵素群の遺伝子デザインと分子進化の特徴

### 第1節 序

Bacillus stearothermophilus No. 21におけるキシラン分解酵素遺伝子群の分子進化が遺伝子の単位混成に起因することを示唆したが、遺伝子単位の混成が個々のキシラン分解酵素の機能に及ぼす効果を検討する必要がある。本章においては、大腸菌クローンの遺伝子デザインによる効率的な各キシラン分解酵素遺伝子の単独あるいは複数同時の発現システム系を検討した後、その結果を利用して各キシラン分解酵素の基質特異性と作用機構の解析を行い、発現酵素の機能面からの分子進化について考察を試みた。

### 第2節 クローン遺伝子の大腸菌 (Escherichia coli JM109) における発現能

#### A. 実験方法

Escherichia coli JM109の形質転換株について、50  $\mu$ g/ml ampicillinを含む5mlのLB培地に単一コロニーより接種し、37°Cで12時間振とう培養したものを前培養とした。48ng/ml IPTG、50  $\mu$ g/ml ampicillinを含むLB培地50mlを300ml容三角フラスコに作成し、前培養液を0.5ml植菌し37°Cで200rpmの条件で15時間振とう培養した。その後、遠心分離(10,000 $\times$ g, 4°C, 10分)により菌体と培養上清に分け、菌体を1mlの0.1M 酢酸バッファー(pH 6.0)に懸濁させ、60°Cで1時間インキュベートし溶菌させ、遠心分離(12,000 $\times$ g, 4°C, 5分)により菌体内容物上清を得た。得られた菌体内容物上清と培養上清について、キシラナーゼ活性、 $\beta$ -キシロシダーゼ活性、タンパク質量を測定した。

また、Bacillus stearothermophilus No. 21の培養を第I章の第2節(1)で用いた培地に1% オート麦キシランを加えた培地(キシラン培地)で行った。キシラン培地5mlにBacillus stearothermophilus No. 21の菌体を接種後、55°Cで24時間振とう培養を行い前培養液とした。同じ組成の培地50mlを300ml容三角フラスコに作成し、前培養液を0.5ml植菌し55°Cで200rpmの条件で48時間振とう培養した。遠心分離(10,000 $\times$ g, 4°C, 10分)により得られた培養上清について、キシラナーゼ活性、 $\beta$ -キシロシダーゼ活性を測定した。

なお、キシラナーゼ活性、 $\beta$ -キシロシダーゼ活性、タンパク質量の測定は、

第Ⅱ章、第2節の方法に従った。

## B. 実験結果

Bacillus stearothermophilus No. 21の培養上清中の各酵素量と、Escherichia coli JM109の各形質転換株の菌体内と培養上清中の各酵素量を、培養液1 mlあたりで算出したものを、Table 5-1に示した。Bacillus stearothermophilus No. 21は培養上清中に $\beta$ -キシロシダーゼを0.114 units/mlとキシラナーゼを0.085 units/mlを生成した。Escherichia coli JM109の各形質転換株における $\beta$ -キシロシダーゼとキシラナーゼの菌体内と培養上清中の酵素量を合わせた生成量はBacillus stearothermophilus No. 21に比べ、13Eで1/14と1/85であったが、13E-PPでは3.3倍と6.4倍であった。また、13E-PEは $\beta$ -キシロシダーゼのみを4.2倍生成し、13E-VPはキシラナーゼのみを同程度生成した。17Bのキシラナーゼアイソザイムのキシラナーゼ生成量は13Eと同程度であり、17B-PEでは13E-VPの1/2であった。13Eと17Bにおいて、生成酵素は菌体内に蓄積されたが、13E-PPでは生成した $\beta$ -キシロシダーゼの52%とキシラナーゼの75%が菌体外の培養上清に分泌され、13E-PEの $\beta$ -キシロシダーゼは65%、13E-VPのキシラナーゼは30%、17B-PEのキシラナーゼは54%がそれぞれ分泌された。Escherichia coli JM109の各形質転換株のうち、13E-PP・13E-PE・13E-VP・17B-PEについて、各酵素の菌体内と培養上清における比活性をTable 5-2に示した。すべての株で生成酵素の比活性は菌体内において高い値を示した。

### 第3節 各キシラン分解酵素のキシラン分解特性

#### A. 実験方法

##### (1) 人工基質に対する分解特性

以下のそれぞれの人工基質を含むLB培地プレート（LB培地中に以下を含む、1.5% agar, 50  $\mu$ g/ml ampicillin, 48ng/ml IPTG）に、Escherichia coli JM109の形質転換株を接種し、37℃で12時間培養した後、60℃で4時間インキュベートし、宿主大腸菌の溶菌と酵素反応を行い、ハロー生成の有無により各酵素活性を調べた。

##### ① キシラナーゼ活性検出法

800ng/mlのRBB-xylanを含むLB培地プレートにより調べた。ハローの検出は第

I 章、第 3 節の方法に従った。

②  $\beta$ -キシロシダーゼ活性検出法

20ng/mlの4MU- $\beta$ -xylosideを含むLB培地プレートにより調べた。

③ アラビノフラノシダーゼ活性検出法

20ng/mlの4-methylumbelliferyl  $\alpha$ -L-arabinofuranoside (4MU- $\alpha$ -arabino-  
side) (Sigma社製) を含むLB培地プレートにより、アラビノフラノシダーゼ  
( $\alpha$ -L-arabinofuranosidase; EC 3.2.1.55) 活性を調べた。

④ セロビオヒドロラーゼ活性検出法

20ng/mlの4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-cellobiopyranoside (4MU- $\beta$ -cello-  
bioside) (Sigma社製) を含むLB培地プレートにより、セロビオヒドロラーゼ  
(exo-cellobiohydrolase; EC 3.2.1.91) 活性を調べた。

4-methylumbelliferyl誘導体は、各酵素により分解作用を受けると360nmの紫  
外線照射に対し蛍光を発する性質を利用した。なお、各酵素はそれぞれの人工  
基質に対し特異的に作用することが知られている<sup>43)</sup>。

(2) 天然基質に対する分解特性

オート麦キシラン、キシロピオース、キシロトリオース、カルボキシメチル  
セルロース (CMC)、セロピオースに対しての分解作用を、生成糖の薄層クロマ  
トグラフィー (TLC) により調べた。

① 基質溶液の調製法

オート麦キシランについては、第 2 章第 2 節のキシラナーゼ活性測定法での  
2%キシラン基質溶液を用いた。バッファーに0.1M酢酸バッファー (pH 6.0) を  
用い、以下の基質溶液を調製した。キシロピオース、キシロトリオースについ  
ては、これらの混合物であるキシロオリゴ糖 (和光純薬) の1%溶液を調製した。  
CMCについては、CMC (和光純薬) の0.1%溶液を調製した。セロピオースについ  
ては、セロピオース (和光純薬) の1%溶液を調製した。

② 酵素液の調製法

第 2 節で得られた菌体内上清をバッファーで希釈し、100 $\mu$ lあたりキシラナ  
ーゼの酵素量が0.010 unitsまたは $\beta$ -キシロシダーゼの酵素量が0.013 unitsと  
なるように調製したものを酵素液とした。

③ 酵素反応法

各基質溶液100 $\mu$ lに酵素液100 $\mu$ lを加え、60 $^{\circ}$ Cで4時間攪拌しながらインキュ

ベートし、遠心分離（12,000×g, 4℃, 5分）後その上清をTLCに供した。

#### ④ 薄層クロマトグラフィー（TLC）法

TLCは、シリカゲルプレート（Merck社製）を担体として、n-プロパノール：蒸留水 = 85:15 (V/V) の組成の展開溶媒を用い、展開後アニリンフタレート（水飽和n-ブタノール100ml中に、0.93gのアニリンと1.6gのフタル酸を溶解し調製）を発色液としてプレートに噴霧し、180℃の電気炉で加熱し発色させた。生成糖の同定には、マーカーとして、キシロース、キシロピオース、キシロトリオース、グルコース、セロピオース（以上、和光純薬）を用いた。

### B. 実験結果

オート麦キシランに対し、各形質転換株からの酵素液を作用させたときの生成糖のTLCの結果をTable 5-3に示した。13E-VP（キシラナーゼXynA）ではキシロースとキシロピオース、17B-PE（キシラナーゼアイソザイムXynB）ではキシロピオースとキシロトリオースが生成糖のスポットとして検出され、13E-PE（β-キシロシダーゼ）では生成糖のスポットが得られなかった。13E-PP（キシラナーゼXynA、β-キシロシダーゼ）ではキシロースのみが検出され、13E-PEと13E-VPあるいは17B-PEの組み合わせにおいてもキシロースのみが検出された。その他の各天然基質および各人工基質に対する分解能をTable 5-3に示した。13E-PE（β-キシロシダーゼ）はキシロピオース、キシロトリオース、4MU-β-xyloside、4MU-α-arabinoside、セロピオースに作用した。13E-VP（キシラナーゼXynA）はRBB-xylan、キシロトリオースに作用した。17B-PE（キシラナーゼアイソザイムXynB）はRBB-xylan、キシロピオース、4MU-β-cellobiosideに作用した。どの酵素もCMCの分解作用は示さなかった。

Bacillus stearothermophilus No. 21のβ-キシロシダーゼにおいてβ-キシロシダーゼ活性以外にアラビノフラノシダーゼ活性を示したが、Clostridium stercorarium<sup>50)</sup>とButyrivibrio fibrisolvens<sup>48)</sup>のβ-キシロシダーゼにおいてもβ-キシロシダーゼ活性とアラビノフラノシダーゼ活性を示すことが報告され、キシランのアラビノフラノース側鎖の分解に関与していると考えられる。また、Bacillus stearothermophilus No. 21のβ-キシロシダーゼはセロピアーゼ活性も示し、1,4-β-D-キシロシド結合のみならず1,4-β-D-グルコシド結合にも分解作用しβ-1,4結合をしたオリゴ糖に対する基質特異性の広がり示唆

しているものと考えられる。

キシラナーゼ (XynA) は、キシランとキシロトリオース以上のキシロオリゴ糖に作用し、そのためキシランに作用させた場合の生成糖はキシロピオースが主生成物となると考えられる。ファミリー F のキシラナーゼにおいては、これまでに Caldocellum saccharolyticum のキシラナーゼの CMC に対する分解作用が報告されているが<sup>65)</sup>、Bacillus stearothermophilus No. 21 のキシラナーゼ (XynA) は Caldocellum saccharolyticum のキシラナーゼ<sup>31)</sup> やセルラーゼ<sup>32, 33)</sup> と 50% のホモロジーが認められながらも CMC の分解作用を示さないことから、キシラナーゼ (XynA) の構造上には 1, 4- $\beta$ -D-キシロシド結合のみを認識する部位が存在すると考えられる。

キシラナーゼ (XynB) は、キシランとキシロピオースに作用しキシロトリオースには作用しない、そのためキシランに作用させた場合の生成糖はキシロトリオースが主生成物となると考えられる。また、4MU- $\beta$ -cellobioside に作用し、セロピオースに作用しないことから、セロピオヒドロラーゼ活性 (セルロースおよびセロオリゴ糖の 1, 4- $\beta$ -D-グルコシド結合の非還元末端部に作用しセロピオースを生成) が示唆された。これらの結果は、キシラナーゼ (XynB) の示す基質特異性がキシラナーゼ (XynA) とともに  $\beta$ -キシロシダーゼとも異なり、各酵素は遺伝子単位混成の結果それぞれ別の機能を示す酵素分子として生成されたことを指示している。

以上の実験結果を総括し、Fig. 5-1 に Bacillus stearothermophilus No. 21 のキシラン分解酵素における遺伝子単位混成 (A-B、C-D、A-D') のモデルとその生成酵素への機能的影響を示した。さらに、その存在の可能性が推論される遺伝子単位の組み合わせの 1 例 (C-B) を挙げる。

#### 第 4 節 考察

Bacillus stearothermophilus No. 21 がキシランを誘導物質に菌体外に分泌する  $\beta$ -キシロシダーゼとキシラナーゼ (XynA) の DNA は、ゲノム中の 3.4 kb (13E-PP) の領域にジーンクラスターを形成しているため、その DNA 断片 (13E-PP) の lacZ プロモーターを利用した大腸菌における効率的な同時発現システムの構築が初めて可能になったと考えられる。また、 $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子のみ (13E-PE) あるいはキシラナーゼ (XynA) 遺伝子のみ (13E-VP) の単

独発現の遺伝子デザインも可能であったが、13E-VPにおけるキシラナーゼ (XynA) 遺伝子の発現システムについては、これから改良の余地があると考えられる。これは、lacZプロモーターから構造遺伝子までの距離が1.0kbと長いためにその遺伝子発現が効率的に行われていない可能性が示唆される。また、Bacillus stearothermophilus No. 21のこれまでの報告にはないキシラナーゼアイソザイム (XynB) 遺伝子 (17B-PE) の大腸菌における発現システムの構築も可能であることが示唆された。

Table 5-1. Production of  $\beta$ -xylosidase and xylanase by B. stearothermophilus No.21 and E. coli JM109 clones.

Strain	Activity ( units / ml )					
	$\beta$ -xylosidase			xylanase		
	I	E	T	I	E	T
<u>B. stearothermophilus</u> No.21		0.114	0.114		0.085	0.085
<u>E. coli</u> JM109 13E	0.007	0.001	0.008	0.001	0.000	0.001
13E-PP	0.183	0.201	0.384	0.132	0.413	0.545
13E-PE	0.166	0.313	0.479	0.000	0.000	0.000
13E-VP	0.000	0.000	0.000	0.059	0.025	0.084
17B	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001
17B-PE	0.000	0.000	0.000	0.020	0.024	0.044

Activity (unit) for each extracellular fraction of 1 ml culture filtrate (E) or for intracellular fraction from 1 ml each culture (I) and total activity from 1ml culture (T) is described. Both enzymes produced by E. coli JM109 strains were assayed under each condition of presence of IPTG(50 $\mu$ g/ml).

Table 5-2. Specific activity of each xylan-digesting enzyme produced in E. coli JM109 strain.

Strain	Specific activity(units/mg)			
	$\beta$ -xylosidase		xylanase	
	I	E	I	E
<u>E. coli</u> JM109 13E-PP	4.154	0.093	5.735	0.045
13E-PE	4.486	0.071	0.000	0.000
13E-VP	0.000	0.000	3.216	0.005
17B-PE	0.000	0.000	0.690	0.004

Activity (unit) for each extracellular fraction of 1 ml culture filtrate (E) or for intracellular fraction from 1 ml each culture (I) is described. Both enzymes produced by E. coli JM109 strains were assayed under each condition of presence of IPTG(50 $\mu$ g/ml).Protein contents measured by the method of Lowry<sup>30</sup>).

Table 5-3. Substrate specificity of each xylan-degrading enzyme.

	Xylan	Xylobiose	Xylotriose	4MU-Xylo- pyranoside	4MU-Arabino- furanoside	4MU-Cellobio- pyranoside	CMC	Cellobiose
<b>β-Xylosidase</b>	A-B	-	+	+	+	-	-	+
<b>Xylanase A</b>	C-D	+	-	+	-	-	-	-
<b>Xylanase B</b>	A-D'	+	+	-	-	+	-	-

4MU;4-Methyl unbelliferyl

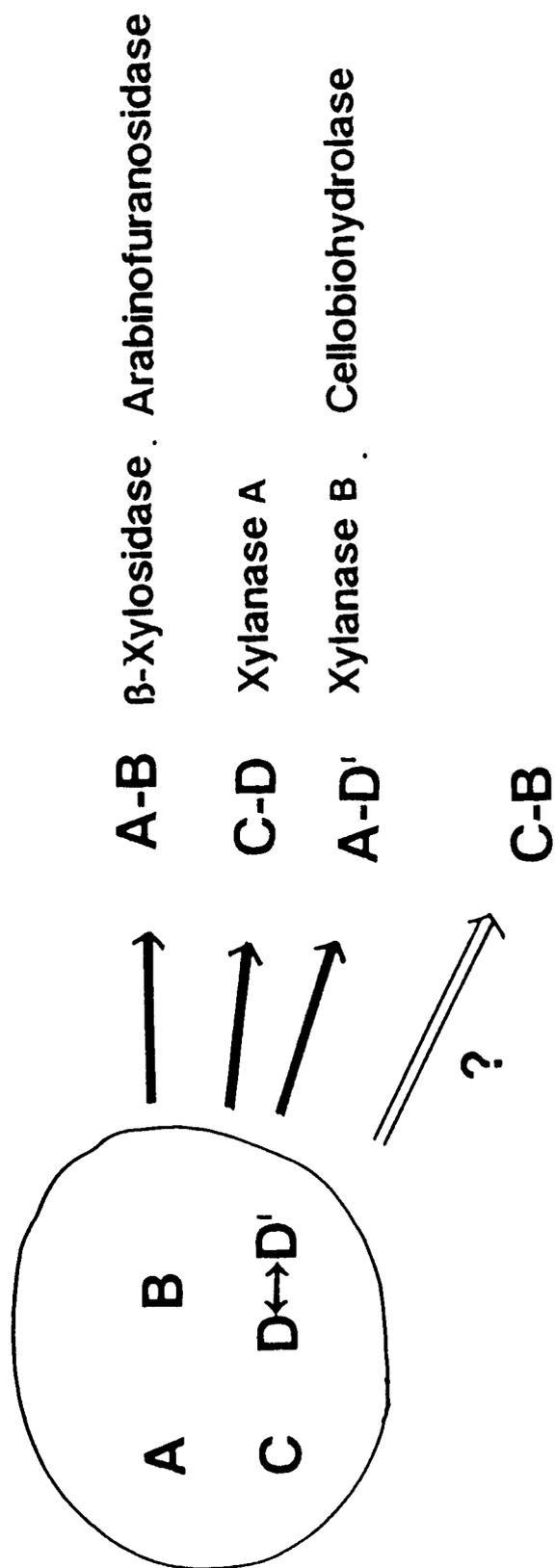


Fig.5-1. Gene shuffling hypothesis in each xylan-degrading enzyme of B. stearothermophilus.

## 要約

本研究は、細菌の環境適応への分子進化の1つの戦略として、遺伝子の水平伝達、あるいは遺伝子単位の混成による、酵素遺伝子構造の再編成、さらには基質特異性の改変が行われていることを明らかにせんとしたものである。

1) Bacillus stearothermophilus No. 21のゲノムDNAライブラリーを、プラスミドベクター (pUC19) と宿主として大腸菌 (Escherichia coli JM109) を用いて作成し、3株 (2F株、13E株、17B株) のキシラン分解酵素遺伝子クローンの形質転換株を得た。2F株と13E株はキシラナーゼと $\beta$ -キシロシダーゼの両酵素活性を示し、17B株はキシラナーゼ活性のみを示した。制限酵素地図から13E (4.2 kb) は2F (10.6 kb) の一部であることが示唆され、17B (4.0 kb) は2Fとは異なるDNA断片であることが示唆された。

2) サブクロニングによって得られた13E-PP (3.4 kb) と2F-BB (6.1 kb) のDNA断片について、Maxi-cell法を用いてそれぞれ発現させ、その発現DNA産物の同定を二次元電気泳動と活性染色法により行った結果、同一のDNA産物であることを明らかにした。また、それらは Bacillus stearothermophilus No. 21が分泌するキシラナーゼと $\beta$ -キシロシダーゼに電気泳動的に一致した。したがって、両酵素遺伝子は3.4 kbのゲノムDNA上にクラスターを形成することが明らかになった。

3) 2Fと13Eにおける種々のサブクロニングDNA断片のMaxi-cell法による発現実験から、両酵素遺伝子のクラスター周辺の遺伝子領域が両酵素遺伝子の発現に関与していることが示唆された。

4) 13Eの全塩基配列を決定した結果、両酵素遺伝子のクラスター構造は $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子 (2,118塩基、705アミノ酸、79.8 kDa) を上流に2塩基の距離をおいてキシラナーゼ遺伝子 (993塩基、330アミノ酸、38.5 kDa) の存在することによって成立することが明らかになった。糖質分解酵素において、このようなクラスター構造が解明されたのは本研究が初めてである。

5) DNAシーケンスの解析と13EのデリーションクローンのMaxi-cell法による発現実験から、3カ所の推定プロモーター部位と2カ所のSD配列の存在が示唆され、キシラナーゼの2カ所の推定プロモーター部位とSD配列は $\beta$ -キシロ

シダーゼの構造遺伝子中に存在することが示唆された。

6) アミノ酸シーケンスの検索から、キシラナーゼはファミリーFのキシラナーゼに分類され、6カ所(I~VI)の保存領域の存在が示唆されたが、 $\beta$ -キシロシダーゼはこれまでに報告されているどの $\beta$ -キシロシダーゼとも類似性が認められず、新規なタイプの $\beta$ -キシロシダーゼであることが示唆された。

7) 17Bからのサブクローン17B-PE (2.0kb) について全塩基配列を決定した結果、キシラナーゼアイソザイム遺伝子 (1,863塩基、620アミノ酸、70.5kDa) の構造は $\beta$ -キシロシダーゼのN末端側の一部分とキシラナーゼ遺伝子のC末端側に類似する部分から構成されることが明らかになった。すなわち、 $\beta$ -キシロシダーゼのN末端側437アミノ酸(A)とC末端側268アミノ酸(B)、キシラナーゼのN末端側170アミノ酸(C)とC末端側160アミノ酸(D)に対し、キシラナーゼアイソザイムはN末端側437アミノ酸(A)とC末端側183アミノ酸(D')として表された。そしてDとD'にはファミリーFキシラナーゼにおける3カ所(IV~VI)の保存領域が存在し、それらの間で44%のホモロジーを示した。また、Dは *Caldocellum saccharolyticum* の耐熱性キシラナーゼと54%のホモロジーを示し、D'は *Bacillus* sp. C-125の耐アルカリ性キシラナーゼと67%のホモロジーを示した。したがって、DとD'は異なる細菌由来のものであることが示唆された。しかも、*Bacillus stearothermophilus* No. 21のキシラン分解酵素遺伝子群の生成が遺伝子の水平伝達をともなうA~D'の5つの遺伝子単位の混成によることが示唆された。

8) *Bacillus stearothermophilus* No. 21のキシラン分解酵素遺伝子群の大腸菌クローン遺伝子を用いて、単一のクローンにおける各酵素遺伝子の単独あるいは複数同時発現システムのための遺伝子デザインを可能にした。これによって、個々の酵素の基質特異性に及ぼす分子進化の研究が可能になった。

9) 基質特異性の実験結果から、 $\beta$ -キシロシダーゼはアラビノフラノシダーゼ活性とセロビアーゼ活性を示し、キシラナーゼはキシロトリオースに作用するのに対し、キシラナーゼアイソザイムはキシロトリオースに作用せず、セロビオヒドロラーゼ活性を示し、それぞれの酵素分子はその機能が互いに異なることが明らかになった。以上のことから、*Bacillus stearothermophilus* No. 21のキシラン分解酵素遺伝子群の各酵素分子は、遺伝子単位の混成の結果それぞれ別の機能を有する酵素分子として成立したことを支持する結果を得た。

本研究において、Bacillus stearothermophilus No. 21のキシラン分解酵素遺伝子群が水平伝達あるいは遺伝子単位の混成により生成し、各遺伝子の発現酵素が機能面でそれぞれが異なる基質特異性を示すことを明らかにした。このことは、細菌における環境適応への分子進化戦略の1つであることを示唆している。これは細菌の糖質分解酵素の分子進化の機構に関する新しい知見であると共に、分子進化の原因を明らかにするための好研究材料になると思われる。さらに、遺伝子の構造とその発現、そして環境適応という3者を連結するためのさらなる研究に道を開くものと期待される。

## 参考文献

- 1) 阿武喜美子、瀬野信子、“糖化学の基礎”、講談社サイエンティフィック、p. 136 (1990).
- 2) 村尾沢夫、荒井基夫、阪本禮一郎、“セルラーゼ”、講談社サイエンティフィック、p. 108 (1989).
- 3) 岡崎昌子、藤川茂昭、松元信也：日本栄養・食料学会誌、**43**, 395 (1990).
- 4) S. S. Jorgensen, N. Munk and L. S. Pedersen, *Proceeding of 5th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, p. 93 (1992).
- 5) S. L. Bachmann and A. J. McCarthy, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2121 (1991).
- 6) R. Esteban, J. R. Villanueva and T. G. Villa, *Can. J. Microbiol.*, **28**, 733 (1982).
- 7) M. M. Frederick, J. R. Frederick, A. R. Fratzk and P. J. Reilly, *Carbohydr. Res.*, **97**, 87 (1981).
- 8) I. V. Gorbacheva and N. A. Rodionova, *Biochem. Biophys. Acta.*, **484**, 79 (1977).
- 9) A. Khasin, I. Alchanati and Y. Shoham, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1725 (1993).
- 10) V. Kitpreechavanich, M. Hayashi and S. Nagai, *J. Ferment. Technol.*, **62**, 415 (1984).
- 11) S. F. Lee, C. W. Forsberg and L. N. Gibbins, *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 1068 (1985).
- 12) S. F. Lee and C. W. Forsberg, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 651 (1987).
- 13) M. Matsuo, A. Fujie, M. Win and T. Yasui, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2367 (1987).
- 14) M. G. Paice, L. Jurasek, M. R. Carpenter and L. B. Smillie, *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 802 (1978).
- 15) W. Panbangred, O. Kawaguchi, T. Tomita, A. Shinmyo and H. Okada,

- Eur. J. Biochem., **138**, 267 (1984).
- 1 6 ) C. A. Robert, C. Yang, R. Mackenzie, D. Bilous, V. L. Seligy and S. A. Narang, Appl. Environ. Microbiol., **54**, 1023 (1988).
- 1 7 ) W. Shao and J. Wiegel, J. Bacteriol., **174**, 5848 (1992).
- 1 8 ) B. Henrissat, M. Claeysens, P. Tomme, L. Lemesle and J. -P. Mornon, Gene, **81**, 83 (1989).
- 1 9 ) P. Beguin, Annu. Rev. Microbiol., **44**, 219 (1990).
- 2 0 ) N. R. Gilkes, B. Henrissat, D. G. Kilburn, R. C. Miller, JR. and R. A. J. Warren, Microbiol. Rev., **55**, 303 (1991).
- 2 1 ) S. Mishra, P. Beguin and J. Aubert, J. Bacteriol., **173**, 80 (1991).
- 2 2 ) E. Fukusaki, W. Panbangred, A. Shinmyo and H. Okada, FEBS Lett., **171**, 197 (1984).
- 2 3 ) T. Nanmori, T. Watanabe, R. Shinke, A. Kohno and Y. Kawamura, J. Bacteriol., **172**, 6669 (1990).
- 2 4 ) F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl, "CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY", Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, p.2.4.1 (1987)
- 2 5 ) F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl, "CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY", Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, p.5.3.1 (1987)
- 2 6 ) P. Biely, O. Markovic and D. Mislovicova, Analytic. Biochem., **144**, 147 (1985).
- 2 7 ) T. R. Whitehead and R. B. Hespell, J. Bacteriol., **172**, 2408 (1990).
- 2 8 ) L. Clerke and J. Carbon, Cell, **9**, 91 (1976).
- 2 9 ) A. Sancar, A. M. Hack and W. D. Rupp, J. Bacteriol., **137**, 692 (1979).
- 3 0 ) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
- 3 1 ) E. Luthi, D. R. Love, J. Mcanulty, C. Wallace, P. A. Caughey, D. Saul and P. L. Bergquist, Appl. Environ. Microbiol., **56**, 1017

- (1990).
- 3 2 ) D. J. Saul, L. C. Williams, D. R. Love, L. W. Chamley and P. L. Bergquist, Nucleic Acids Res., **17**, 439 (1989).
- 3 3 ) D. J. Saul, L. C. Williams, R. A. Grayling, L. W. Chamley, D. R. Love and P. L. Bergquist, Appl. Environ. Microbiol., **56**, 3117 (1990).
- 3 4 ) O. Grepinet, M. -C. Chebrou and P. Beguin, J. Bacteriol., **170**, 4582 (1988).
- 3 5 ) T. Hamamoto, H. Honda, T. Kudo and K. Horikoshi, Agric. Biol. Chem., **51**, 953 (1987).
- 3 6 ) L. -L. Lin and J. A. Thomson, Mol. Gen. Genet., **228**, 55 (1991).
- 3 7 ) F. Shareck, C. Roy, M. Yaguchi, R. Morosoli and D. Kluepfel, Gene, **107**, 75 (1991).
- 3 8 ) K. Ito, T. Ikemasu and T. Ishikawa, Biosci. Biotech. Biochem., **56**, 906 (1992).
- 3 9 ) G. O'Neill, S. H. Goh, R. A. J. Warren, D. G. Kilburn and R. C. Miller Jr., Gene, **44**, 325 (1986).
- 4 0 ) J. -X. Zhang and H. J. Flint, Mol. Microbiol., **6**, 1013 (1992).
- 4 1 ) J. Hall, G. P. Hazlewood, N. S. Huskisson, A. J. Durrant and H. J. Gilbert, Mol. Microbiol., **3**, 1211 (1989).
- 4 2 ) L. E. Kellett, D. M. Poole, L. M. A. Ferreira, A. J. Durrant, G. P. Hazlewood and H. J. Gilbert, Biochem. J., **272**, 369 (1990).
- 4 3 ) B. M. Mannarelli, S. Evans and D. Lee, J. Bacteriol., **172**, 4247 (1990).
- 4 4 ) F. Boucher, R. Morosoli and S. Durand, Nucleic Acids Res., **16**, 9874 (1988).
- 4 5 ) B. R. Srinivasa, P. J. Vithayathil, R. P. Roy and K. R. Swaminathan, J. Protein Chem., **9**, 337 (1990).
- 4 6 ) B. R. Srinivasa, K. R. Swaminathan, C. Ganapathy, R. P. Roy, S. K. Murthy and P. J. Vithayathil, Protein Seq. Data Anal., **4**, 15 (1991).

- 47) W. -Z. Xu, Y. Shima, S. Negoro and I. Urabe, Eur. J. Biochem., **202**, 1197 (1991).
- 48) E. A. Utt, C. K. Eddy, K. F. Keshav and L. O. Ingram, Appl. Environ. Microbiol., **57**, 1227 (1991).
- 49) Y. -E. Lee and J. G. Zeikus, Unpublished data (1992).
- 50) K. Sakka, K. Yoshikawa, Y. Kojima, S. Karita, K. Ohmiya and K. Shimada, Biosci. Biotech. Biochem., **57**, 268 (1993).
- 51) M. J. Gosalbes, J. A. Perez-Gonzalez, R. Gonzalez and A. Navarro, J. Bacteriol., **173**, 7705 (1991).
- 52) B. Lewin, "GENES III", 東京化学同人, p.236 (1989).
- 53) M. G. Paice, R. Bourbonnais, M. Desrochers, L. Jurasek and M. Yaguchi, Arch. Microbiol., **144**, 201 (1986).
- 54) R. C. A. Yang, C. R. MacKenzie and A. Narang, Nucleic Acids Res., **16**, 7187 (1988).
- 55) H. Zappe, W. A. Jones and D. R. Woods, Nucleic Acids Res., **18**, 2179 (1990).
- 56) K. Sakka, Y. Kojima, T. Kondo, S. Karita, K. Ohmiya and K. Shimada, Biosci. Biotech. Biochem., **57**, 273 (1993).
- 57) A. Torronen, R. L. Mach, R. Messner, R. Gonzalez, N. Kalkkinen, A. Harkki and C. P. Kubicek, BIO/TECHNOLOGY, **10**, 1461 (1992).
- 58) D. Tull, S. G. Withers, N. R. Gilkes, D. G. Kilburn, R. A. J. Warren and R. Aebersold, J. Biol. Chem., **266**, 15621 (1991).
- 59) W. Gilbert, Nature, **271**, 501 (1978).
- 60) C. C. F. Blake, Nature, **273**, 267 (1978).
- 61) 南森隆司、三上文三：第16回 日本分子生物学会年会講演要旨集 (1992).
- 62) T. Nanmori, M. Nagai, Y. Shimizu, R. Shinke and B. Mikami, Appl. Environ. Microbiol., **59**, 623 (1993).
- 63) 南森隆司、"科学と生物", **31**, 482 (1993).
- 64) H. Satoh, H. Nishida and K. Isono, J. Bacteriol., **170**, 1034 (1988).
- 65) E. Luthi, N. B. Jasmat and P. L. Bergquist, Appl. Environ. Microbiol., **56**, 2677 (1990).

## 謝辞

本研究において、終始適切なる御指導をいただきました神戸大学農学部、南森隆司助教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行に際し、Maxi-cell法における大腸菌株の提供と御助言をいただきました神戸大学理学部、磯野克己教授、実験に際し激励をいただきました神戸大学農学部、王子善清教授、相園泰生教授、N末端アミノ酸配列の決定において御指導いただきました京都大学食糧科学研究所、三上文三助教授に深く感謝いたします。

本論文をまとめるにあたり、終始御高配、御鞭撻を賜りました本論文主査の神戸大学農学部、新家龍教授、ならびに本論文の副査をしていただきました神戸大学農学部、団野源一教授、辻莊一教授、神戸大学理学部、磯野克己教授に心より感謝の意を表します。

最後に、神戸大学大学院自然科学研究科資源生物科学専攻資源利用講座ならびに神戸大学農学部農芸化学科発酵生産学講座、生物機能利用学講座の皆様の御協力に対し深く感謝いたします。