



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。



氏名・(本籍)	馬場知哉	(香川県)
博士の専攻分野の名称	博士(学術)	
学位記番号	博い第225号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成6年3月31日	
学位論文題目	<u>Bacillus stearothermophilus</u> 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	
審査委員	主査 教授 新家 龍	
	教授 団野源一	教授 辻 荘一
	教授 磯野克己	

論文内容の要旨

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起きていることを明らかにせんとしたものである。

第1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。12F株と13E株はキシラナーゼと β -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DNA断片13E(4.2 kb)はDNA断片2F(10.6 kb)の一部であることが示唆され、DNA断片17B(4.0 kb)はDNA断片2Fとは異なることが示唆された。

第2章の『Maxi-cell法を用いたクローン遺伝子産物の同定』では、サブクローニングによって得られた13E-PP(3.4 kb)および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見させ、その発現遺伝子産物の同定を二次元電気泳動と活性接触法により行った。その結果、同一の遺伝子産物であることが判明した。また、それらはBacillus stearothermophilus No.21が分泌するキシラナーゼおよび β -キシロシダーゼと電気泳動的に一致することも判明した。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。また、2Fおよび13Eにおける種々のサブクローニング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ものと推論した。

第3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、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 β -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)が存在して成り立っていることが明らかに

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。また、この塩基配列の解析と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た。また、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 β -キシロシダーゼの構造遺伝子中に存在することも示唆された。さらに、これら酵素のアミノ酸配列の検索から、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)の保存領域が存在した。一方、 β -キシロシダーゼはこれまでに報告されているどの酵素とも類似性がなく、新規なタイプの酵素であることが明らかになった。

第4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、17BからのサブクローンDNA断片17B-PE (2.0 kb) の全塩基配列を決定した。その結果、キシラナーゼアイソザイム遺伝子 (1,863塩基、620アミノ酸、70.5 kDa) の構造は β -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、 β -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)に対応させた場合には、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')として表すことができた。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、その相同性は44%であった。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と推論した。そして、Bacillus stearothermophilus No.21のキシラン分解酵素遺伝子群の生成は、遺伝子の水平伝達をとまなうA~Dの5つの遺伝子単位の混成によるものと推論した。

第5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。その結果、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。また、基質特異性の実験結果から、 β -キシロシダーゼはアラビノフラノシダーゼ活性および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、遺伝子単位の混成によって、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。

以上より、本論文では、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それぞれ異なる気質特異性を示すことを明らかにした。このことは、細菌の糖質分解酵素の分子進化の機構における新しい知見であり、また、細菌の環境適応への分子進化戦略の一つであることを示した。

論文審査の結果の要旨

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起きていることを明らかにせんとしたものである。

第1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。12F株と13E株はキシラナーゼと β -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DA断片13E（4.2 kb）はDNA断片2F（10.6 kb）の一部であることが示唆され、DNA断片17B（4.0 kb）はDNA断片2Fとは異なることが示唆された。

第2章の『Maxi-cell法を用いたクローン遺伝子産物の同定』では、サブクローニングによって得られた13E-PP（3.4 kb）および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見させ、その発現遺伝子産物の同定を二次元電気泳動と活性接触法により行った。その結果、同一の遺伝子産物であることが判明した、また、それらはBacillus stearothermophilus No.21が分泌するキシラナーゼおよび β -キシロシダーゼと電気泳動的に一致することも判明した。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。また、2Fおよび13Eにおける種々のサブクローニング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ものと推論した。

第3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、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 β -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）が存在して成り立ってい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。また、この塩基配列の解析と13Eのデリベ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た。また、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 β -キシロシダーゼの構造遺伝子中に存在することも示唆された。さらに、これら酵素のアミノ酸配列の検索から、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）の保存領域が存在した。一方、 β -キシロシダーゼはこれまでに報告されているどの酵素とも類似性がなく、新規なタイプの酵素であることが明らかになった。

第4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、17BからのサブクローンDNA断片17B-PE（2.0 kb）の全塩基配列を決定した。その結果、キシラナーゼアイソザイム遺伝子（1,863塩基、620アミノ酸、70.5 kDa）の構造は β -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、 β -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）に対応させた場合には、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'）として表すことができた。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、その相同性は44%であった。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と推論した。そして、Bacillus stearothermophilus No.21のキシラン分解酵素遺伝子群の生成は、遺伝子の水平伝達をとまうA～Dの5つの遺伝子単位の混成によるものと推論した。

第5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。その結果、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。また、基質特異性の実験結果から、 β -キシロシダーゼはアラビノフラノシダーゼ活性および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、遺伝子単位の混成によって、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。

以上より、本研究では、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それぞれ異なる気質特異性を示すことが明らかにされている。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つであることを示している。また、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もあり、分子進化の原因を明らかにするための研究材料として、遺伝子の構造とその発現、環境適応という3者を連結するための研究に大いに資するものと思われる。

以上のように、本論文は遺伝生化学ならびに発酵資源利用学分野に貢献する重要な知見を得たものであり、価値ある集積であると認める。よって、学位申請者馬場知哉は博士（学術）の学位を得る資格があると認める。