

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	好アルカリ性放線菌Nocardiosis sp. F96株が生産する β -1,3-グルカナーゼの研究
Title(English)	
著者(和文)	増田澄子
Author(English)	sumiko masuda
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第6473号, 授与年月日:2006年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:中村聡
Citation(English)	Degree:Doctor of Engineering, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第6473号, Conferred date:2006/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

G2005
M

好アルカリ性放線菌 *Nocardiopsis* sp. F96 株が生産する

β -1,3-グルカナーゼの研究

生物プロセス専攻

増田 澄子

目次

第1章 序論.....	1
1-1 β -1,3-グルカンおよび関連多糖.....	2
1-2 β -1,3-グルカナーゼおよび関連酵素.....	6
1-3 多糖分解酵素ファミリー 16 に属する β -1,3-グルカナーゼおよび関連酵素.....	8
1-4 好アルカリ性 <i>Nocardiopsis</i> sp. F96 株.....	12
1-5 本研究の目的と意義.....	16
1-6 引用文献.....	18
第2章 F96 株が生産する β -1,3-グルカナーゼの精製と性質検討.....	22
2-1 緒言.....	23
2-2 実験材料と方法.....	24
2-2-1 菌株、培地および培養条件.....	24
2-2-2 パキマンの調製.....	24
2-2-3 電気泳動および活性染色.....	25
2-2-4 精製方法.....	26
2-2-5 β -1,3-グルカナーゼの活性測定.....	28
2-2-6 タンパク質定量.....	29
2-2-7 反応 pH 依存性の測定.....	29
2-2-8 反応温度依存性の測定.....	29
2-2-9 基質特異性の評価.....	29
2-2-10 N 末端アミノ酸配列の解析.....	30
2-3 結果および考察.....	31
2-3-1 β -1,3-グルカナーゼ活性の検出.....	31
2-3-2 β -1,3-グルカナーゼ生産のための培養条件検討.....	31
2-3-3 天然型 β -1,3-グルカナーゼの精製.....	31
2-3-4 天然型 β -1,3-グルカナーゼの性質検討.....	32
2-3-5 天然型 β -1,3-グルカナーゼの N 末端アミノ酸配列解析.....	37
2-4 結論.....	43
2-5 引用文献.....	44
第3章 β -1,3-グルカナーゼ遺伝子のクローニングと解析.....	46

3-1 緒言.....	47
3-2 実験材料と方法.....	48
3-2-1 菌株、プラスミドおよび培地.....	48
3-2-2 クローニング技術.....	48
3-2-3 染色体 DNA の調製.....	49
3-2-4 PCR.....	50
3-2-5 プローブ DNA の調製.....	51
3-2-6 ハイブリダイゼーション解析.....	51
3-2-7 塩基配列の決定.....	52
3-2-8 遺伝情報解析.....	52
3-2-9 大腸菌菌体内画分の調製.....	52
3-2-10 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動と活性染色.....	53
3-3 結果および考察.....	54
3-3-1 <i>bglF</i> 遺伝子部分配列の PCR 増幅.....	54
3-3-2 <i>bglF</i> 遺伝子の染色体からのクローニング.....	54
3-3-3 <i>bglF</i> 遺伝子の解析.....	56
3-3-4 F96 株 β -1,3-グルカナーゼ遺伝子の大腸菌における発現と解析.....	64
3-4 結論.....	66
3-5 引用文献.....	67

第4章 β -1,3-グルカナーゼ遺伝子の大腸菌における高発現および組換え型酵素の 性質検討.....	70
4-1 緒言.....	71
4-2 実験材料と方法.....	72
4-2-1 菌株、プラスミドおよび培地.....	72
4-2-2 クローニング技術.....	72
4-2-3 PCR.....	72
4-2-4 塩基配列の決定.....	73
4-2-5 遺伝情報解析.....	73
4-2-6 大腸菌菌体内画分の調製.....	74
4-2-7 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動と活性染色.....	74
4-2-8 組換え型 BglF の精製.....	74
4-2-9 β -1,3-グルカナーゼの活性測定.....	75

4-2-10	タンパク質定量.....	75
4-2-11	反応 pH 依存性の測定.....	75
4-2-12	反応温度依存性の測定.....	75
4-2-13	温度安定性の評価.....	75
4-2-14	基質特異性の評価.....	75
4-2-15	薄層クロマトグラフィーによる加水分解産物の解析.....	76
4-2-16	不溶性多糖への結合能の評価.....	76
4-3	結果および考察.....	77
4-3-1	<i>bglF</i> 遺伝子高発現型プラスミドの構築.....	77
4-3-2	組換え型 BglF の精製.....	79
4-3-3	組換え型 BglF の性質検討.....	79
4-4	結論.....	90
4-5	引用文献.....	91
第5章	β -1,3-グルカナーゼのタンパク質工学検討.....	94
5-1	緒言.....	95
5-2	実験材料と方法.....	97
5-2-1	菌株、プラスミドおよび培地.....	97
5-2-2	クローニング技術.....	97
5-2-3	PCR.....	97
5-2-4	部位特異的変異導入法.....	98
5-2-5	塩基配列の決定.....	99
5-2-6	遺伝情報解析および分子モデリング.....	99
5-2-7	大腸菌菌体内画分の調製.....	100
5-2-8	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動と活性染色.....	100
5-2-9	β -1,3-グルカナーゼの活性測定.....	100
5-2-10	反応 pH 依存性の測定.....	100
5-2-11	反応温度依存性の測定.....	100
5-2-12	温度安定性の評価.....	100
5-2-13	薄層クロマトグラフィーによる加水分解産物の解析.....	101
5-2-14	不溶性多糖への結合能の評価.....	101
5-3	結果および考察.....	102
5-3-1	部位特異的変異導入による触媒残基の同定.....	102

5-3-1-1	部位特異的変位導入による基質結合に関与するアミノ酸残基の同定	102
5-3-1-2	変異型酵素 E123Q、E128Q および D125N の性質検討	102
5-3-2	部位特異的変位導入による基質結合に関与するアミノ酸残基の同定	105
5-3-2-1	変異型酵素 W118A および W220A の調製	105
5-3-2-2	変異型酵素 W118A および W220A の性質検討	107
5-3-3	ドメインシャフリングによる BglF キメラ酵素の調製と性質検討	110
5-3-3-1	各種キメラ酵素の調製	110
5-3-3-2	各種キメラ酵素の性質検討	114
5-4	結論	123
5-5	引用文献	124
第6章	総括	126
6-1	要約	127
6-2	今後の展望	129

謝辞

第 1 章

序論

1-1 β -1,3-グルカンおよび関連多糖

β -1,3-グルカンは D-グルコース残基が β -1,3 結合で直鎖状に連なった多糖である (Fig. 1-1)。自然界では種々の生物に存在し、様々な生理的役割を担う。褐藻類 *Laminaria* には、液胞中に貯蔵多糖としてラミナリンが存在する^{1,2)}。担子菌 *Poria cocos* 由来のパキマンは子実体に、高等植物由来のカロースは葉から根まで様々な部分に見られる。また、この他にも β -1,3-グルカンは酵母や糸状菌の細胞壁、そして大麦や烏麦などイネ科植物の種子の細胞壁に存在し、骨格構造物として機能している。 β -1,3-グルカンの例を Table 1-1 に示した。

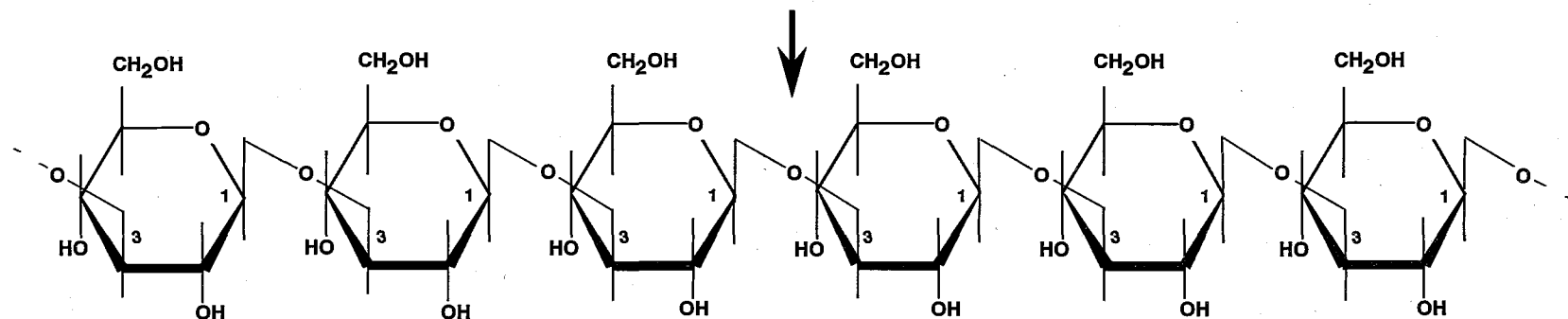
β -1,3-グルカンの中には他の結合様式による分岐をもつものもあり、水溶性などの物性の多様性を生み出している。たとえばラミナリンにも可溶性のもの (*Laminaria digitata* 由来) と不溶性 (*Laminaria cloustoni* 由来) のものがある³⁾。ラミナリンには β -1,3-グルカン主鎖に β -1,6 結合を介した側鎖 (β -1,3-グルカン) の分岐が含まれ、側鎖が少ないほど水に溶けにくい性質を示す。一方、パキマンやカードランは β -1,3 結合のみからなる β -1,3-グルカンであり、水に不溶性である。

β -1,3 結合を多く含むグルカンに β -1,3-1,4-グルカンがある。 β -1,3-1,4-グルカンは、2~4 個の β -1,4 結合で連なった D-グルコース残基が β -1,3 結合で連結した直鎖状の構造をとる (Fig. 1-1 参照)^{1,4)}。由来によって多少異なるが、 β -1,4 結合と β -1,3 結合の割合は 2~4:1 といわれている。 β -1,3-1,4-グルカンとしては、地衣類の葉状体に含まれるリケナン、大麦の細胞壁に含まれる大麦 β -グルカンなどが知られており、たとえば大麦の細胞壁に含まれる β -1,3-1,4-グルカンの含有は 7 割にも及ぶ (Table 1-1 参照)。ビール大麦の細胞壁にも β -1,3-1,4-グルカンが含まれ、細胞壁の約 7 割を占める⁵⁾。

このように、 β -1,3-グルカンおよび β -1,3-1,4-グルカンは自然界に豊富に存在しているが、その多くは未利用である。近年、海洋に豊富に存在する藻類 β -1,3-

(a) β -1,3-Glucan

β -1,3-Glucanase



(b) β -1,3-1,4-Glucan

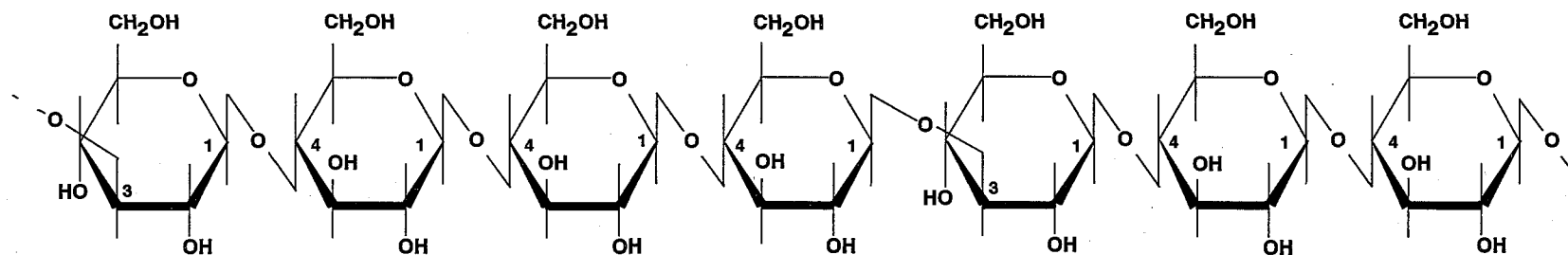


Fig. 1-1

典型的な β -1,3-グルカン (a) および β -1,3-1,4-グルカン (b) の構造
 β -1,3-グルカンにおいて β -1,3-グルカナーゼが切断する箇所を矢印で示した。

Table 1-1 β -1,3-グルカンおよび β -1,3-1,4-グルカン

	Linkage	Rate of β -1,3-linkage (%)	Source
β-1,3-Glucan			
Laminarin	β -1,3; β -1,6	90-95	Algae
Pachyman	β -1,3	100	Filamentous fungi
Callose	β -1,3	98*-100	Higher plants
Curdian	β -1,3	100	Soil bacteria
β-1,3-1,4-Glucan			
Lichenan	β -1,3; β -1,4	27-42	Lichens
Barley β -glucan	β -1,3; β -1,4	ca. 50	Higher plants (Barley)

*contains uronic acid (2%)

グルカンの家畜の餌として用いる試みがなされている^{6,7)}。なかでも、褐藻類由来のラミナリンは比較的消化がよいため、家畜の餌として適していることが報告されている。資源を浪費してきた現在、新たな資源の探索がますます重要になってきている。また、ハナビラダケなどの担子菌に含まれる β -1,3-グルカンのうち、6 位に分岐を有するものにマウスに対する免疫賦活化作用が報告され、注目を集めている⁸⁾。

1-2 β -1,3-グルカナーゼおよび関連酵素

β -1,3-グルカナーゼは β -1,3-グルカンなどに含まれる連続的な β -1,3 結合を加水分解する (Fig. 1-1 参照)。孤立して存在する β -1,3 結合は加水分解できないといわれている。また、加水分解の様式により、エキソ型 (EC. 3.2.1.58) とエンド型 (EC. 3.2.1.6 および EC. 3.2.1.39) に分類される。前者は還元末端から 1~2 残基単位で切断するのに対し、後者は基質の内部から切断する。エンド型 β -1,3-グルカナーゼの中で、EC. 3.2.1.39 に属するものは β -1,3-1,4-グルカンを加水分解できない。しかし、EC. 3.2.1.6 に属する β -1,3-グルカナーゼの中には β -1,3-1,4-グルカンの β -1,3 結合ないし β -1,4 結合を加水分解する酵素も知られている。一方、 β -1,3-1,4-グルカンを加水分解する β -1,3-1,4-グルカナーゼ (EC. 3.2.1.73) は、 β -1,3-1,4-グルカンに含まれる β -1,3 結合および β -1,4 結合のうち β -1,4 結合のみを分解する^{4,9,10)}。

β -1,3-グルカナーゼは古くからラミナリナーゼ (ラミナリン分解酵素) として研究がなされてきた。その由来は菌類をはじめ藻類、高等植物、原生動物、環形動物、節足動物、軟体動物など多様である¹⁾。 β -1,3-グルカナーゼの自然界で果たす役割は多岐にわたり、菌類や藻類の細胞内貯蔵多糖 (β -1,3-グルカン) の運搬や細胞分裂、高等植物における種子の発芽、小動物における消化、微生物による植物の生分解への関与などが知られている^{2,11)}。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞壁は他の微生物が生産する β -1,3-グルカナーゼによって分解を受けるが、自らも β -1,3-グルカナーゼを生産し細胞分裂を行う。

このように自然界において多くの役割を果たす β -1,3-グルカナーゼは工学応用面でも大きな期待がかけられており、いくつかの利用例が報告されている。藻類を家畜の餌として用いる際 (1-1 項参照)、 β -1,3-グルカナーゼをごく微量添加することにより家畜の成育がめざましく改善されたという報告がある¹²⁾。また、糸状菌の細胞壁に β -1,3-グルカンが存在するため β -1,3-グルカナーゼの抗菌剤とし

ての利用が考えられる¹³⁾。さらに、酵母を宿主として外来タンパク質生産を行った際、外来タンパク質の効率的な抽出にも応用できる。醸造業界における β -1,3-グルカナーゼの利用価値は高い。ビール製造過程での β -1,3-グルカナーゼの添加により、麦芽の発芽が促進され、醸造の効率が向上する。将来的に避けられない食料不足の時代へ向け、人類の新たなエネルギー源として β -1,3-グルカンを用物質へ変換することへの可能性も期待されている。

1-3 多糖分解酵素ファミリー 16 に属する β -1,3-グルカナーゼおよび関連酵素

多糖分解酵素は疎水性クラスター解析により 100 を越える多糖分解酵素 (GH) ファミリーに分類されている¹⁴⁻¹⁷⁾。 β -1,3-グルカナーゼが属する GH ファミリー (以後、単にファミリーと略す) は 16、17、55、64 および 81 と多岐にわたる。微生物由来の β -1,3-グルカナーゼは主にファミリー 16 に、そして植物由来のものはファミリー 17 に属する。

ファミリー 16 多糖分解酵素としては、 β -1,3-グルカナーゼの他に β -1,3-1,4-グルカナーゼも含まれる。ファミリー 16 に属する β -1,3-1,4-グルカナーゼのうち、*Bacillus licheniformis* 由来 Bgl¹⁸⁾ (PDB コード: 1GBG)、*Fibrobacter succinogenes* 由来リケナーゼ¹⁹⁾ (1MVE および 1ZM1) および *Paenibacillus macerans* 由来 Bgi^{20,21)} (1AJK、1AXK、1AJO、1BYH、1CPM、1CPN、1MAC、1GLH および 2AYH) は、X 線結晶構造解析が報告され、触媒部位近傍の詳細な解析が行われている。一方、ファミリー 16 β -1,3-グルカナーゼに関しては、つい最近になって *Pyrococcus furiosus* DSM 3638 株由来 LamA²²⁾ の解析が予備的に行われているだけで、詳細な 3 次元構造情報は現時点では公開されていない。そのため、 β -1,3-グルカナーゼの触媒部位近傍の解析に際しては、タンパク質レベルにおいて相同性が高い⁹⁾ β -1,3-1,4-グルカナーゼの 3 次元構造を参考に研究を進めざるを得ないのが現状である。

一般に多糖分解酵素においては、リテイニング機構 (Fig. 1-2) およびインバーティング機構と呼ばれる 2 つの反応機構が提唱されている^{23,24)}。前者の反応機構では加水分解反応前後において糖末端のアノマー炭素の立体配置が保持されるのに対し、後者の機構では立体配置が変化するという違いがある。また、両反応機構とも触媒残基として 2 つの酸性アミノ酸が関与する点は共通しているが、反応クレフト内部で互いに向かい合って存在する 2 つの酸性アミノ酸間の距離は異なる (リテイニング機構の方が、2 つの触媒残基間の距離が短い)。ファミリー 16 に

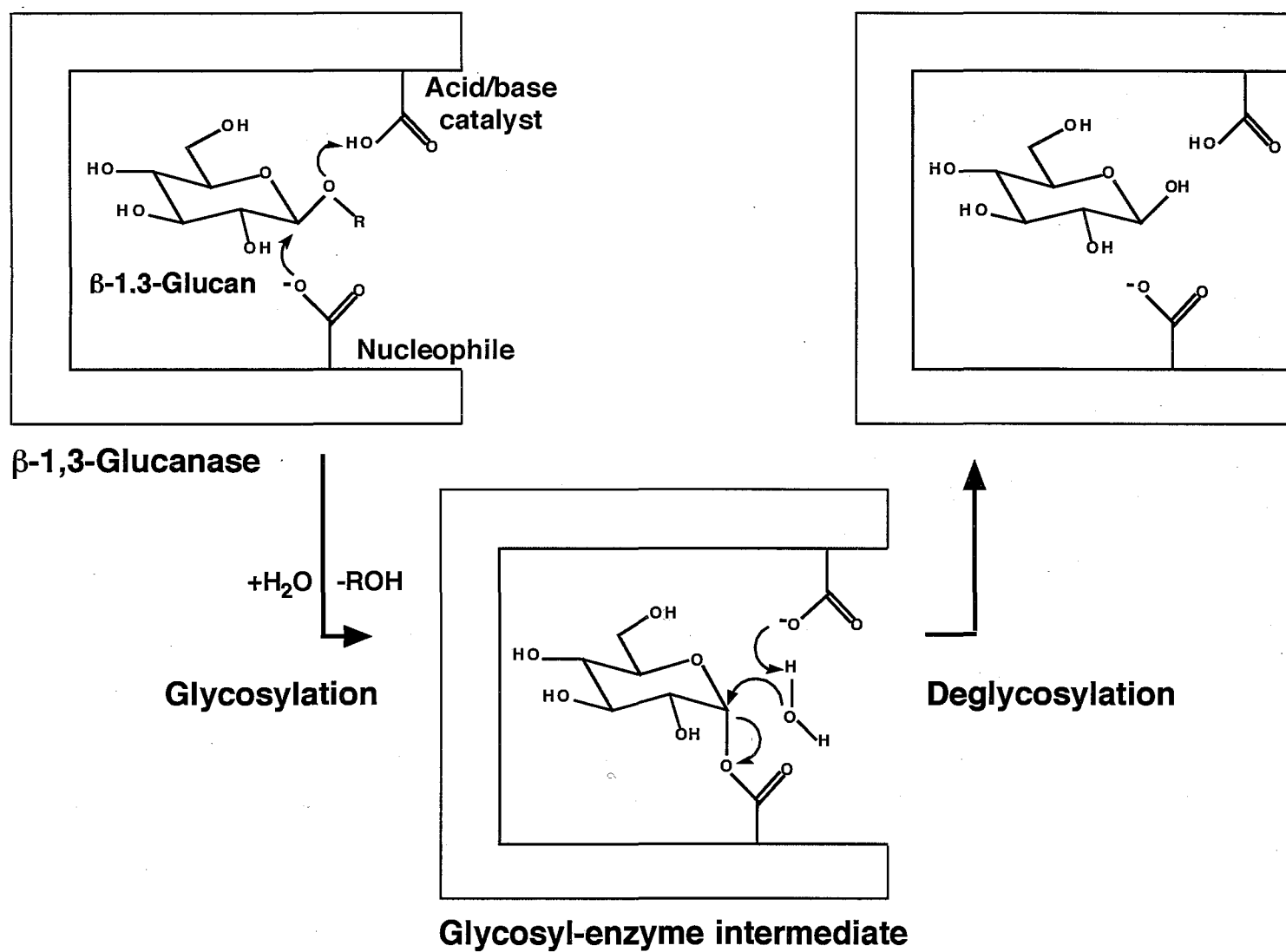


Fig.1-2 ファミリー 16 β-1,3-グルカナーゼの反応機構 (リテイニング機構)

属する多糖分解酵素はすべてリテイニング機構をとることが明らかにされている¹⁷⁾。

上述の触媒残基の周辺には、基質である多糖との相互作用に関与するアミノ酸が存在する。これらの残基が基質と結合し、基質を触媒残基間の適切な位置に固定することで、加水分解が効率的に進行する。セルラーゼおよびキシラナーゼといった多糖分解酵素においては、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニンなどの芳香族側鎖をもつアミノ酸が基質結合に関与することが明らかにされている^{25,26)}。これらのアミノ酸と基質との結合の原動力となっているのは、芳香環同士のスタッキング相互作用や水素結合といわれている。

多糖分解酵素においては、加水分解反応に主な役割を果たす触媒ドメイン以外に、付加ドメインをもつマルチドメイン酵素の存在が知られている。ファミリー 16 に属する β -1,3-グルカナーゼにおいても、*Bacillus circulans* IAM1165 株由来 BglH²⁷⁾ および BglM²⁸⁾、*B. circulans* WL-12 株由来 GlcA²⁹⁾、*Clostridium thermocellum* 由来 LicA³⁰⁾ などはマルチドメイン酵素として知られている。付加ドメインの中には機能が不明なものも多いが、基質との結合に関与する基質結合ドメインの存在が知られている。例えば、*B. circulans* IAM1165 株が生産する 3 つの β -1,3-グルカナーゼアイソザイム (BglH、BglM および BglL) のうち、BglH の *N* 末端および *C* 末端に存在する付加ドメインや、BglM の *C* 末端側にある付加ドメインは不溶性多糖および真菌の細胞壁への結合に関与することが報じられている³¹⁾ (Fig. 1-3)。なお、3 つのうち最も分子量が小さな BglL は BglM の付加ドメインがプロテオリシスにより欠失して生じた酵素であり、可溶性 β -1,3-グルカンに対する分解活性を保持している²⁸⁾。

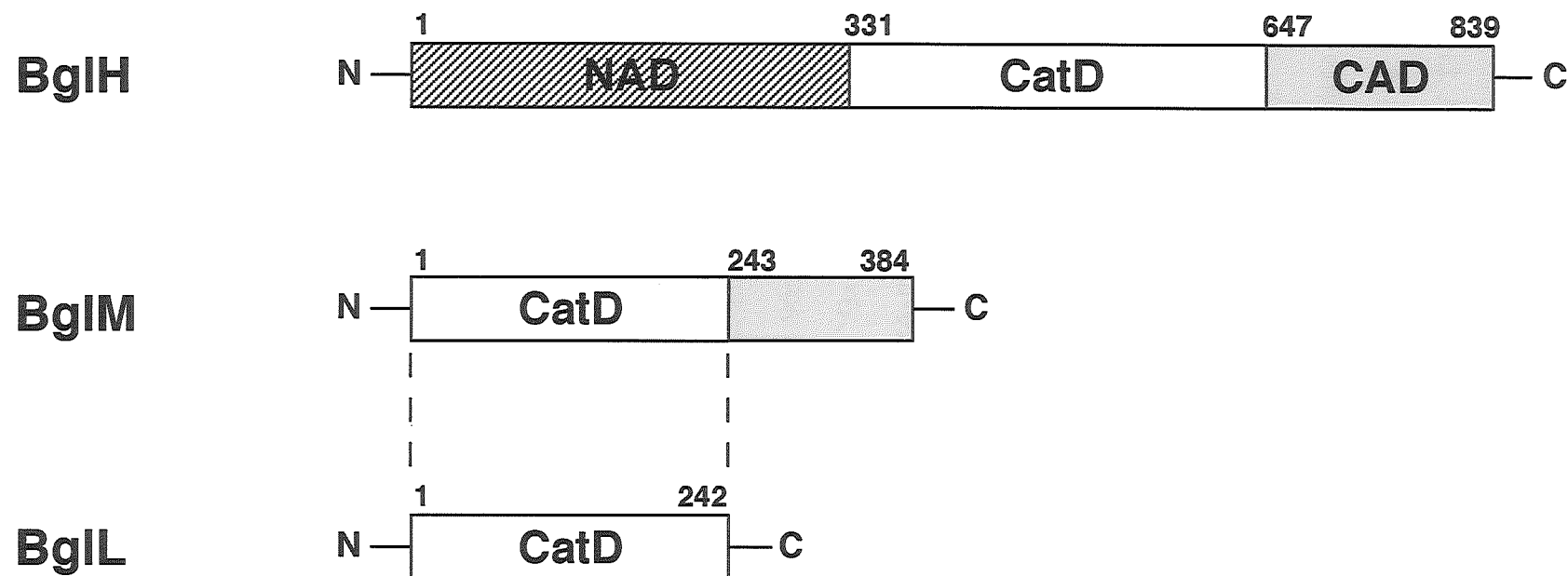


Fig. 1-3 *B. circulans* IAM1165 株由来 β -1,3-グルカナーゼ BglH、BglM および BglL の構造模式図
 本研究では各酵素の触媒ドメインを CatD (Catalytic Domain)、BglH の *N* 末端側および *C* 末端側の付加ドメインをそれぞれ NAD (N-Terminal Additional Domain) および CAD (C-Terminal Additional Domain) と呼ぶ (後述第 5 章 5-1-1 項参照)。

1-4 好アルカリ性 *Nocardiopsis* sp. F96 株

キチンは *N*-アセチル-D-グルコサミンが、そしてキトサンは D-グルコサミンがそれぞれ β -1,4 結合で直鎖状に連なった多糖である。キチンやキトサンはエビやカニなどの甲殻類や糸状菌の細胞壁などに多く含まれる。両者は自然界において混在していることから、キチン質と総称される。F96 株は、当研究室においてキチン質分解酵素を生産する好アルカリ性微生物として静岡県富士市の土壌より分離された³²⁾。走査型電子顕微鏡などを用いた形態観察によると、本菌は気菌糸を形成し直線状で単純分岐する (Fig. 1-4)。また、分節胞子を形成しており、胞子表面は平滑であることが観察された。さらに、化学分類学的特徴として、細胞壁はメソ型ジアミノピメリン酸を含む IIIC 型、リン脂質型はホスファチジルコリンを含む PIII 型であることが明らかとなった (Table 1-2)。このような形態学的ならびに化学分類学的特徴から、本菌は *Nocardiopsis* 属の放線菌と同定され、好アルカリ性 *Nocardiopsis* sp. F96 株と命名された。本菌は放線菌としては珍しく、中性よりもアルカリ性で、そして 30°C よりも 37°C においてより良好な生育を示した。

F96 株は培養上清中に少なくとも分子量の異なる 2 種類のキチン質分解酵素を分泌する³²⁾。そのうち 1 つはファミリー 18 に属するキチナーゼであり、遺伝子クローニングと大腸菌における発現³³⁾ならびに X 線結晶構造解析による 3 次元構造の解明³⁴⁾といった研究が既に行われている。

キシランは D-キシロースが β -1,4 結合を介して連なった多糖である。F96 株はキチナーゼだけでなく、キシラナーゼをも生産することが明らかにされた³⁵⁾。F96 株のキシラナーゼに関しては、精製と性質検討が行われた。そして、*N* 末端アミノ酸解析の結果より、本酵素は新規なキシラナーゼであることが明らかにされている。

このように、好アルカリ性 *Nocardiopsis* sp. F96 株は様々な多糖分解酵素を生産

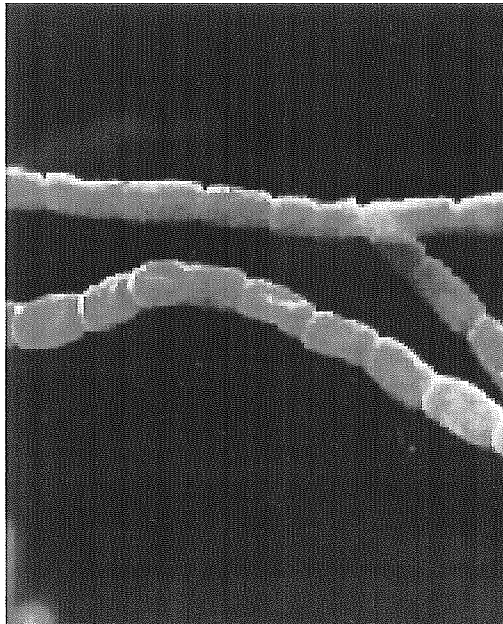
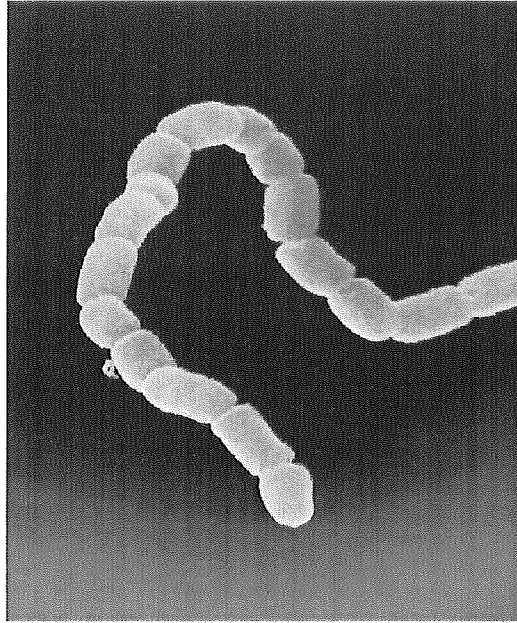


Fig. 1-4 F96 株の走査型電子顕微鏡写真

Table 1-2 F96 株の分類学的性質

(a) 形態学的特徴

-
- ・ 気菌糸を形成し、直線状で単純分岐する。
分節胞子を形成し、表面は平滑である。
 - ・ 茶色系の基生菌糸を豊富に形成する。
分断やジグザグ伸長はしない。
 - ・ 可溶性色素なし。
 - ・ メラニン様色素なし。
 - ・ グルコースとスクロースを資化する。
-

(b) 化学分類学的特徴

細胞壁型	III (<i>meso</i> - ジアミノピメリン酸)
全菌体糖型	C (特徴なし); キシロース
アシル基型	アセチル
主要メナキノン	MK-10 (H4)
ミコール酸	なし
リン脂質型	P III (ホスファチジルコリン)
GC 含量	69.0%

することから、その他にも種々の有用な多糖分解酵素を生産している可能性が高いことが期待される。

1-5 本研究の目的と意義

F96 株は放線菌としては珍しく好アルカリ性という性質を示す。このように新規な微生物は新規な酵素を生産している可能性があり、有用酵素分離源として格好のものと考えられる。本研究では、F96 株が β -1,3-グルカンのラミナリンを加水分解する β -1,3-グルカナーゼを生産することを見いだすことに成功した。F96 株が生産する β -1,3-グルカナーゼの精製と性質検討を行った結果、本酵素はアルカリ性条件下で高活性を示し、不溶性基質を効率的に加水分解することが明らかとなった。そこで、本酵素が示す特徴的な性質の発現機構を分子論的に探求することを目的とした。すなわち、本酵素をコードする遺伝子のクローニングと大腸菌における高発現を行い、組換え型酵素の性質を詳細に調べた。さらに、本酵素のタンパク質工学検討を行い、触媒残基等の特定と機能のさらなる向上を試みた。本研究により、工学応用可能な有用酵素の人工構築が可能になるものと期待される。

これまでににおいても、放線菌は抗生物質生産菌として工学応用されてきた経緯がある。また、 β -1,3-グルカナーゼの応用に 1 つに抗菌剤としての利用が考えられる。糸状菌の細胞壁は β -1,3-グルカンとキチンから構成される。従って、 β -1,3-グルカナーゼ単独、あるいはキチナーゼと組み合わせることで、強力な抗真菌剤の開発が可能になることが期待される。本研究の F96 株はキチナーゼと β -1,3-グルカナーゼの両方の酵素を生産することが明らかとなった。本研究により好アルカリ性放線菌の工業用酵素生産菌としての応用の可能性をも示せたことは意義深い。

本論文の構成は、以下の通りである。

第 2 章では、F96 株が生産する β -1,3-グルカナーゼの精製と性質検討について述べる。

第 3 章では、 β -1,3-グルカナーゼ遺伝子のクローニングと解析について述べる。

第 4 章では、 β -1,3-グルカナーゼ遺伝子の大腸菌における高発現および組換え

型酵素の性質検討について述べる。

第 5 章では、 β -1,3-グルカナーゼのタンパク質工学検討について述べる。

第 6 章では、本研究を総括し、今後の展望について述べる。

1-6 引用文献

- 1) A. E. Clarke and B. A. Stone. Chemistry and biochemistry of β -1,3-glucans. *Rev. Pure Appl. Chem.*, **13**, 134-156 (1963).
- 2) A. Bull and C. G. C. Chesters. The biochemistry of laminarin and the nature of laminarinase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **28**, 325-364 (1966).
- 3) W. L. Cuningham and D. J. Manners. Enzymic degradation of lichenin. *Biochem. J.*, **80**, 42-43 (1961).
- 4) F. A. Parrish, A. S. Perlin and E. T. Reese. Selective enzymolysis of poly- β -D-glucans, and the structure of the polymers. *Can. J. Chem.*, **38**, 2094-2104 (1960).
- 5) A. W. MacGregor and G. B. Fincher. Carbohydrates of the barley grains. in "Barley: Chemistry and Technology (eds. A. W. MacGregor and R. S. Bhatti)", Am. Soc. Brew. Chem., Minnesota, 1993, pp 73-130.
- 6) A. W. A. Burt, S. Bartlett and S. J. Rowland. The use of seaweed meals in concentrate mixtures for dairy cows. *J. Dairy Res.*, **21**, 299-304 (1954).
- 7) W. A. P. Black. Seaweed as a stockfood. *Agriculture (London)*, **60**, 126-130 (1953).
- 8) T. Harada, N. Miura, Y. Adachi, M. Nakajima, T. Yadomae and N. Ohn. Effect of SCG, 1,3-beta-D-glucan from *Sparaxis crispa* on hematopoietic response in cyclophosphamide induced leukopenic mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 931-939 (2002).
- 9) M. A. Anderson and B. A. Stone. A new substrate for investigating the specificity of β -glucan hydrolases. *FEBS Lett.*, **52**, 202-207 (1975).
- 10) L. Chen, G. B. Fincher and P. B. Høj. Evolution of polysaccharide hydrolase substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, **268**, 13318-13326 (1993).

- 11) C. G. C. Chesters and A. T. Bull. The enzymic degradation of laminarin. 1. The distribution of laminarinase among micro-organism. *Biochem. J.*, **86**, 28-31 (1963).
- 12) E. L. Rickes, E. A. Ham, E. A. Moscatelli and W. H. Ott. The isolation and biological properties of a beta-glucanase from *B. subtilis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **96**, 371-375 (1962).
- 13) B. A. Andrews and J. A. Asenjo. Enzymatic lysis and disruption of microbial cells. *Trends Biol.*, **5**, 273-277 (1987).
- 14) B. Henrissat. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, **280**, 309-316 (1991).
- 15) B. Henrissat and A. Bairoch. New families in the classification of glycosylhydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.*, **293**, 781-788 (1993).
- 16) B. Henrissat and A. Bairoch. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, **316**, 695-696 (1996).
- 17) <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/acc.html>
- 18) M. Hahn, J. Pons, A. Planas, E. Querol and U. Heinemann. Crystal structure of *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolase at 1.8-A resolution. *FEBS Lett.*, **374**, 221-224 (1995).
- 19) R. M. Teather and J. D. Erfle. DNA sequence of a *Fibrobacter succinogenes* mixed-linkage beta-glucanase (1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolase) gene. *J. Bacteriol.*, **172**, 3837-3841 (1990).
- 20) T. Keitel, O. Simon, R. Borriss and U. Heinemann. Molecular and active-site structure of a *Bacillus* 1,3-1,4-beta-glucanase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 5287-5291 (1993).

- 21) M. Hahn, T. Keitel and U. Heinemann. Crystal and molecular structure at 0.16-nm resolution of the hybrid *Bacillus* endo-1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolase H(A16-M). *Eur. J. Biochem.*, **232**, 849-858 (1995).
- 22) A. Ilari, S. Angelaccio, A. Fiorillo, R. Florio, V. Consalvi and R. Chiaraluce. Crystalization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the laminarinase endo-beta-1,3-glucanase from *Pyrococcus furiosus*. *Acta Cryst.*, **D60**, 2394-2395 (2004).
- 23) M. L. Sinnott. Catalytic mechanisms of enzymic glycoside transfer. *Chem. Rev.*, **90**, 1170-1202 (1991).
- 24) J. D. McCarter and S. G. Withers. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Op. Struct. Biol.*, **4**, 885-892 (1994).
- 25) N. Din, I. J. Forsythe, L. D. Burtnick, N. R. Gilkes, R. C. Miller Jr, R. A. J. Warren and D. G. Kilburn. The cellulose-binding domain of endo-glucanase A (CenA) from *Cellulomonas fimi*: evidence for the involvement of tryptophan residues in binding. *Mol. Microbiol.*, **11**, 747-755 (1994).
- 26) S. Nakamura. Structure and function of a multidomain alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. *Catal. Surveys Asia*, **7**, 157-164 (2003).
- 27) 山本まみ. *Bacillus circulans* IAM1165 株の生産する β -1,3-グルカナーゼに関する研究. 博士論文, 東京工業大学 (2001).
- 28) 浅野健. *Bacillus circulans* IAM1165 株の β -1,3-グルカナーゼ M の精製と解析. 修士論文, 東京工業大学 (1995).
- 29) T. Watanabe, N. Kasahara, K. Aida and H. Tanaka. Three N-terminal domains of β -1,3-glucanase A1 are involved in binding to insoluble β -1,3-glucan. *J. Bacteriol.*,

- 174, 189-190 (1992).
- 30) K. P. Fuchs, V. V. Zverlov, G. A. Velikodvorskaya, F. Lottspeich and W. H. Schwarz. Lic16A of *Clostridium thermocellum*, a non-cellulosomal, highly complex endo- β -1,3-glucanase bound to the outer cell surface. *Microbiology*, **149**, 1021-1031 (2003).
 - 31) T. Asano, J. Taki, M. Yamamoto and R. Aono. Cloning and structural analysis of *bglM* gene coding for the fungal cell wall-lytic β -1,3-glucan-hydrolase BglM of *Bacillus circulans* IAM1165. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1246-1255 (2002).
 - 32) K. Endo, T. Fukazawa, R. Yatsunami and S. Nakamura. Molecular cloning of a family 18 chitinase gene from alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. strain F96. *Chitin Chitosan Res.*, **9**, 150-151 (2003).
 - 33) 遠藤きみ子. 好アルカリ性放線菌 F96 株が生産する多糖分解酵素の研究. 博士論文, 東京工業大学 (2004).
 - 34) T. Matsui, T. Kumasaka, K. Endo, T. Sato, S. Nakamura and N. Tanaka. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of chitinase F1 (ChiF1) from the alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. strain F96. *Acta Cryst.*, **D60**, 2016-2018 (2004).
 - 35) 早見徳介. 好アルカリ性 *Nocardiopsis* sp. F96 株が生産するキシラナーゼの精製. 学士論文, 東京工業大学 (2000).

第 2 章

F96 株が生産する β -1,3-グルカナーゼの精製と性質検討

2-1 緒言

本研究室では既に、キチン質分解酵素生産菌 *Nocardiopsis* sp. F96 株を土壌より分離している^{1,2)} (本論文第 1 章 1-3 節参照)。F96 株は放線菌としては珍しく好アルカリ性の性質を示し、新規アルカリ酵素生産菌としてのポテンシャルに期待が寄せられる。これまでに、本菌が生産するキチナーゼの遺伝子クローニング、大腸菌における発現、組換え型酵素の性質検討などが報告されている^{1,2)}。一方、本菌はキシラナーゼも生産することから³⁾、他にも種々の多糖分解酵素を生産している可能性が示唆された。

本研究では、F96 株が β -1,3-グルカナーゼを生産していることを見だし、その精製と性質検討を行った。

2-2 実験材料と方法

2-2-1 菌株、培地および培養条件

キチン質分解酵素生産菌である好アルカリ性 *Nocardiopsis* sp. F96 株を用いた。

1% ポリペプトン（日本製薬）、0.5% イーストエキス（Difco）、0.1% K_2HPO_4 、0.02% $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ を含む基本培地を中性培地とした。アルカリ性培地は、中性培地に終濃度 1% になるように Na_2CO_3 を添加して用いた。また、必要に応じ主要炭素源として、ラミナリン (*Laminaria digitata*、ナカライ)、パキマン（後述本章 2-2-2 項参照）、マンノースないしグルコースを終濃度 0.25% になるように加えた。固形平板培地は 1.5% の寒天を添加した。各成分は純水に溶解し、オートクレーブ滅菌は 121°C で 15 分間行った。

上述の液体培地を 18 mmφ 試験管に 7 ml ずつ作製し、37°C、170 rpm で振とう培養した（Water Bath Shaker Personal-11、タイテック）。400 ml スケールの培養には 2 L ひだ付き三角フラスコを使用し、37°C、170 rpm で振とう培養した（Bio-Shaker BR-300LF、タイテック）。

2-2-2 パキマンの調製

担子菌 *Poria cocos* の子実体の乾燥粉末 [ブクリョウ（鈴粉末薬品）] を以下の方法で脱脂し、パキマンを調製した⁴⁾。

- (1) ブクリョウ粉末約 200 g を 2 L ひだ付き三角フラスコに取り、クロロホルム-メタノール混合液 (1:1) 1 L を加えて、60°C、170 rpm で 6 時間振とうした。その後、40°C になるまで振とうしながら除冷し、さらに一晩放置した。
- (2) 吸引濾過を行い、固形物をクロロホルム-メタノール混合液約 100 ml で洗

浄し、(1) の操作をもう一度繰り返した。

- (3) クロロホルム-メタノール混合液での洗浄の後、ジエチルエーテル 500 ml を加え、一晚放置した。
- (4) 吸引濾過を行い、固形物をバット上に広げて 2 日間放置して乾燥させた。
- (5) 得られた乾燥粉末をパキマンとして以後の実験に使用した。使用の度に必要量を乳鉢で摩砕し、微細粉末にして用いた。

2-2-3 電気泳動および活性染色

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は SDS-12.5% ポリアクリルアミドゲルを用い、Laemmli の方法⁹⁾に従って行った。電気泳動用試料、SDS-PAGE 試料処理液 [4% (w/v) SDS、40% (v/v) 2-メルカプトエタノール、20% (v/v) グリセロール、125 mM Tris-HCl (pH 6.8)] および 0.5% (w/v) ブロモフェノールブルー (BPB) 水溶液を 5:2:1 で混合し、これを 100°C、3 分間加熱処理したものを用いた。泳動後のタンパク質はクーマシーブリリアントブルー R-250 (CBB、ナカライ) 染色および活性染色を施した。

SDS-PAGE 後の活性染色は以下の方法で行った。0.01% ラミナリンを含む SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した後、100 mM NaH_2PO_4 -NaOH 緩衝液 (pH 6.0) を用いてゲル内部を緩衝液で置換し (30 分間×4 回)、ゲル内の pH を調整した。ただし、始めの 2 回の置換操作においては、2-プロパノールを 25% (v/v) になるように加えた緩衝液を用い、SDS の除去を行った。ゲル内部を所定の pH に調整した後、37°C で 10 分間静置し、ゲル内でラミナリンの加水分解反応を行った。未分解のラミナリンを 0.1% コンゴーレッド (和光純薬) で染色した後、脱色を行うことで活性バンドをハローとして検出した。

なお、分子量マーカーは SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range (Bio-Rad) を使用した。組成は以下の通りであり、() 内の数字は分子量を示す。

Rabbit muscle phosphorylase b	(97,400)
Bovine serum albumin	(66,200)
Hen egg white ovalbumin	(45,000)
Bovine carbonic anhydrase	(31,000)
Soybean trypsin inhibitor	(21,500)
Hen egg white lysozyme	(14,400)

等電点電気泳動

等電点電気泳動 (IEF) は Immobiline Dry Strip pH 3.0-10.0, NL (Amersham Biosciences) を用いて行った。泳動後のタンパク質は CBB G-250 染色を施した。

なお、IEF 用マーカーは pI Markers Broad pI Kit pH 3.5-9.3 (Amersham Biosciences) を使用した。組成は以下の通りであり、() 内の数字は等電点 (pI) を表す。

Lentil lectin, basic	(8.65)
Lentil lectin, acidic	(8.15)
Myoglobin, basic band	(7.35)
Myoglobin, acidic band	(6.85)
Carbonic anhydrase B (human)	(6.55)
Carbonic anhydrase B (bovine)	(5.85)
β -Lactoglobulin A	(5.20)
Trypsin inhibitor	(4.55)
Amylglucosidase	(3.50)

2-2-4 精製方法

培養上清の限外濾過濃縮

主要炭素源としてパキマンを加えた中性培地を用い、2 L ひだ付き三角フラス

コにて 4 日間培養を行った。培養液の遠心 ($10,000 \times g$, 30 分間, 4°C) により得られた培養上清を限外濾過濃縮 (VIVA FLOW 50, 10,000 MWCO PES, Sartorius) した。培養上清濃縮物は 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に対して透析した。

DEAE-Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィー

カラムクロマトグラフィーには FPLC Standard System (Amersham Biosciences) を使用した。10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) を用いて平衡化した DEAE-Toyopearl 650M カラム ($2.6 \text{ cm}\phi \times 13 \text{ cm}$, 東ソー) に、上述の透析後の試料溶液をアプライした。カラムを同緩衝液で洗浄した後、0~1 M の NaCl 濃度勾配を直線的にかけ、吸着タンパク質を溶出した。流速は 1.5 ml/min とした。カラムからの溶出液はフラクションコレクターを用いて 7.5 ml ずつ分取し、波長 280 nm における吸光度測定によりタンパク質量をモニターした。タンパク質溶出ピークに相当するフラクションに対して SDS-PAGE を行った後、活性染色を施した。 β -1,3-グルカナーゼを含むフラクションを回収し、20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に対して透析を行った。

BioAssist Q カラムクロマトグラフィー

カラムクロマトグラフィーには ÄKTA FPLC System (Amersham Biosciences) を使用した。20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を用いて平衡化した BioAssist Q カラム ($0.46 \text{ cm}\phi \times 5 \text{ cm}$, 東ソー) に β -1,3-グルカナーゼを含む試料をアプライした。カラムを同緩衝液で洗浄した後、0~1 M の NaCl 濃度勾配を直線的にかけ、吸着タンパク質を溶出した。流速は 1.0 ml/min とした。カラムからの溶出液はフラクションコレクターを用いて 1 ml ずつ分取し、波長 280 nm における吸光度測定によりタンパク質量をモニターした。タンパク質溶出ピークに相当するフラクションに対して SDS-PAGE を行った後、CBB 染色および活性染色を施した。単一バンドの β -1,3-グルカナーゼを含むフラクションを回収し、これを精製標品とした。

2-2-5 β -1,3-グルカナーゼの活性測定

DNS 試薬の調製

糖の還元末端定量に用いる 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) 試薬⁶⁾の調製法を以下に示した。

- (1) 4.5% NaOH 水溶液 300 ml に、DNS の 1% 水溶液 880 ml およびロッセル塩 255 g を加えた。
- (2) (1) とは別に、10% NaOH 水溶液 22 ml にフェノール 10 g を加え、脱イオン水を追加して溶解し、100 ml とした。
- (3) 69 ml の (2) に NaHCO_3 を 6.9 g 加えて溶解した。
- (4) (1) に (3) を加え、ロッセル塩が十分に溶解するまで攪拌した。
- (5) 2 日間放置後、着色瓶中に保存した。

基質溶液の調製

ラミナリンを所定の緩衝液に懸濁し、超音波破碎により粒子の均一化をはかった。このラミナリン溶液を活性測定の基質溶液として用いた。

酵素活性測定 (DNS 法)

5% 基質溶液 160 μl に酵素標品を 40 μl 加え、37°C で 30 分間反応させた。反応は 100 mM NaH_2PO_4 -NaOH 緩衝液 (pH 6.0) または Britton-Robinson の緩衝液⁷⁾中で行った。反応液に 400 μl の DNS 試薬を加えて酵素反応を停止し、100°C で 10 分間煮沸した。氷冷した後、常温に戻した。波長 545 nm における吸光度を測定し (UV-1200、島津)、ラミナリンの加水分解により生じた還元末端量を算出した。対照にはグルコースを用いた。上述の条件において、1 分間にグルコース 1 μmol 相当の還元末端を遊離させるのに必要な酵素量を 1 ユニット (U) と定義した。

2-2-6 タンパク質定量

タンパク質濃度は DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) を用いて定量した。ここでは Bovine serum albumin (Sigma) を標準タンパク質として使用した。

2-2-7 反応 pH 依存性の測定

β -1,3-グルカナーゼ精製標品を用いて、37°C、各 pH 下で 30 分間反応を行った。基質にはラミナリンを用いた。反応により生じた還元末端を DNS 法にて定量し、酵素活性を算出した。反応液の pH 調整には Britton-Robinson の緩衝液系を用いた。

2-2-8 反応温度依存性の測定

β -1,3-グルカナーゼ精製標品を用いて、pH 6.0 の条件下、各温度で 30 分間反応を行った。基質にはラミナリンを用いた。反応により生じた還元末端を DNS 法にて定量し、酵素活性を算出した。反応液の pH 調整には 100 mM NaH_2PO_4 -NaOH 緩衝液 (pH 6.0) を用いた。

2-2-9 基質特異性の評価

β -1,3-グルカナーゼ精製標品を用いて、pH 6.0 の条件下、37°C で 30 分間反応を行った。基質にはラミナリン、パキマン、カードラン (和光純薬)、リケナン (Sigma)、アビセル (Merck)、CM-セルロース (和光純薬)、キシラン (Sigma)、デキストラン (ナカライ) およびパスツラン (Calbiochem) を用いた。反応により生じた還元末端を DNS 法にて定量し、酵素活性を算出した。反応液の pH 調整には 100 mM NaH_2PO_4 -NaOH 緩衝液 (pH 6.0) を用いた。

2-2-10 *N* 末端アミノ酸配列の解析

β -1,3-グルカナーゼの精製標品ないし部分精製標品を常法に従い PVDF 膜にブロットニングした後、プロテインシークエンサー (PPSQ-10、島津) にかけることにより、*N* 末端アミノ酸配列を決定した。また、アミノ酸配列の相同性検索にはホモロジー検索プログラム FASTA[®]を利用した。

2-3 結果および考察

2-3-1 β -1,3-グルカナーゼ活性の検出

F96 株を β -1,3-グルカンのラミナリンを含むアルカリ性固形平板培地上で生育させた場合、コロニー周囲にハローの形成が認められた（データ示さず）。これより、F96 株はキチナーゼやキシラナーゼのみならず、 β -1,3-グルカナーゼを生産していることが明らかとなった。

2-3-2 β -1,3-グルカナーゼ生産のための培養条件検討

F96 株の培養条件検討には以下の培地を用いた。すなわち中性培地ないしアルカリ性培地を基本とし、それらに対して主要炭素源として β -1,3-グルカンのラミナリン、パキマンあるいは単糖のマンノース、グルコースをそれぞれ添加したものを調製した。これらの 8 種類の培地に F96 株を植菌し、37°C で約 96 時間、試験管を用いて振とう培養した。得られた培養上清を限外濾過濃縮し、DNS 法にて活性測定を行った。その結果、ラミナリン含有中性培地、パキマン含有中性培地およびグルコース含有中性培地にて培養したものが、他に比べて若干高い活性を示した（データ示さず）。ラミナリンは高価であるため、 β -1,3-グルカナーゼ生産をめざした以後の実験では、同じく β -1,3-グルカンであるパキマンを添加した中性培地を用いることにした。

2-3-3 天然型 β -1,3-グルカナーゼの精製

パキマンを含む中性培地を用いて得られた F96 株培養上清について、ラミナリン含有ゲルを用いた SDS-PAGE を実施した。活性染色を行った結果、3 つの活

性バンドが検出された (Fig. 2-1)。分子量マーカーとの比較の結果、これらの活性バンドは、それぞれ分子量 34,100、32,400 および 30,700 であることがわかった。そこで、これらの酵素を分子量の大きい順に、それぞれ BglF1、BglF2 および BglF3 と命名した。F96 株培養上清を限外濾過し、透析・脱塩した後、DEAE-Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィーにかけた。SDS-PAGE 後の活性染色における分子量 31,000 付近の活性バンドを指標とした場合、3 つの β -1,3-グルカナーゼアイソザイムはいずれも NaCl 濃度 370 mM 付近で溶出するフラクションに含まれることがわかった。活性フラクションを回収し、透析・脱塩した後、BioAssist Q カラムクロマトグラフィーにかけた。NaCl 濃度 440 mM 付近で溶出したフラクションを SDS-PAGE に供し、活性染色を施した。その結果、3 つの β -1,3-グルカナーゼアイソザイムは、分子量の最も小さい BglF3 から順に、NaCl 濃度 440 mM 付近のフラクションに相次いで溶出することがわかった (Fig. 2-2)。最も分子量の大きい BglF1 については、CBB 染色および活性染色においてはほぼ単一バンドを示す標品を取得することができた。一方、BglF2 および BglF3 については完全精製には至らなかった。

BglF1 の各精製段階におけるタンパク質量および β -1,3-グルカナーゼ活性を測定し、それらに基づいて算出された比活性等の値をまとめて Table 2-1 に示した。680 ml の培養上清から、3.3 U/mg の比活性を有する精製標品 0.19 mg が得られ、その収率は 4.6% であった。

2-3-4 天然型 β -1,3-グルカナーゼの性質検討

物理化学的性質

SDS-PAGE により、BglF1 の分子量は 34,100 と決定された (Fig. 2-2 参照)。また、IEF により、本酵素の等電点は約 4.3 と見積もられた (Fig. 2-3)。

酵素学的性質

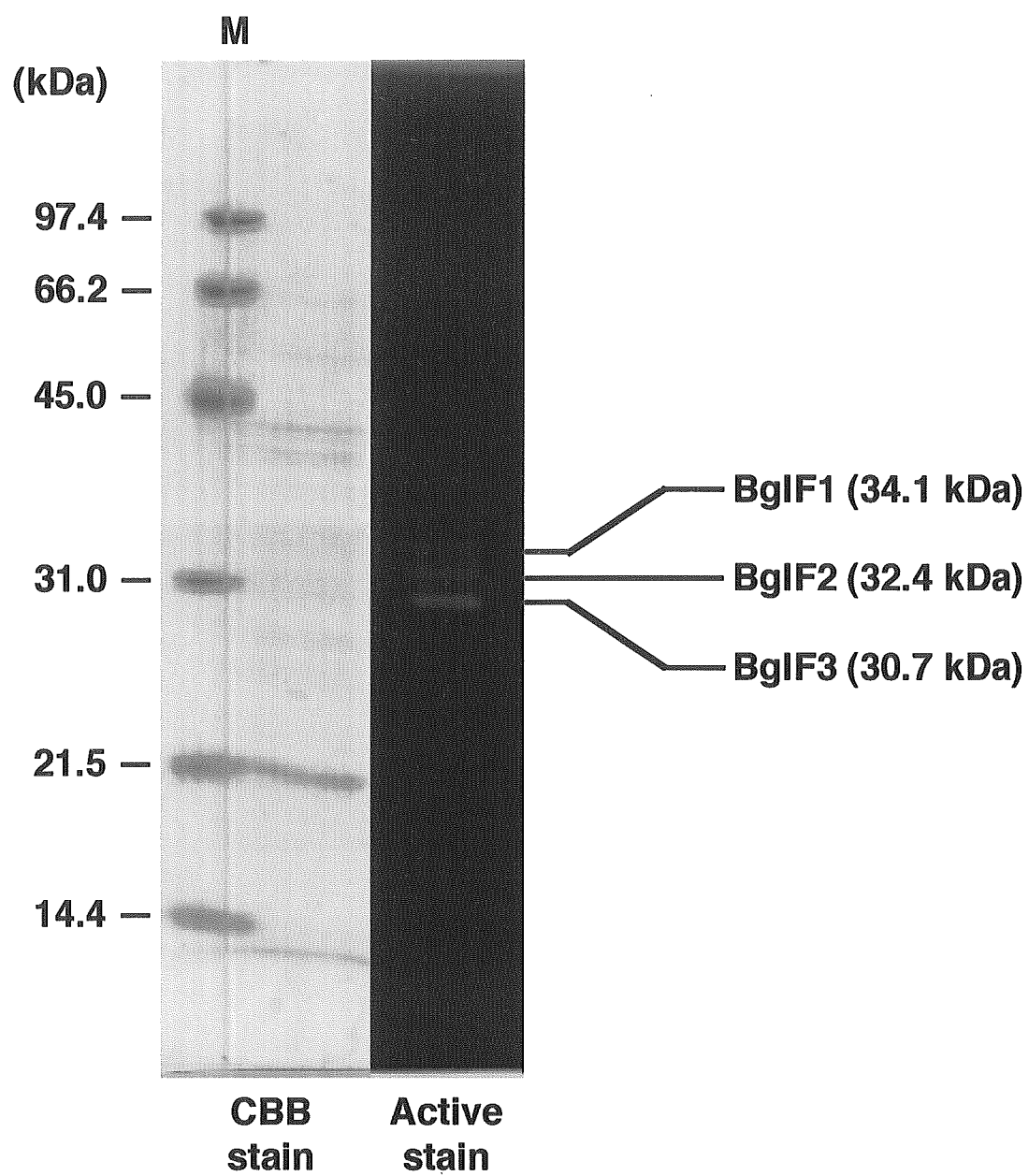


Fig. 2-1 F96 株培養上清の SDS-PAGE
CBB 染色および活性染色を施した。M は分子量マーカを表す。

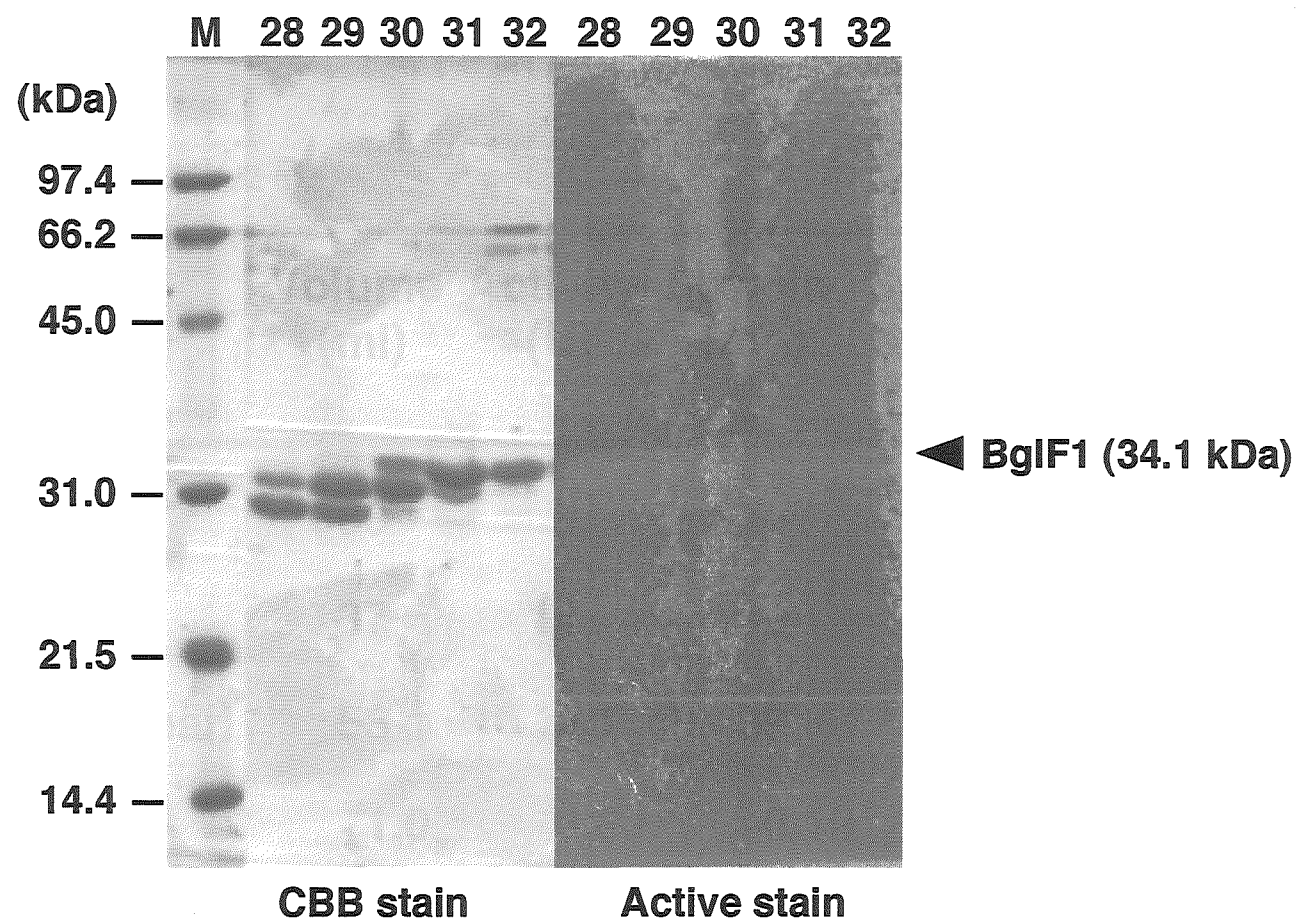


Fig. 2-2 BioAssist Q カラム溶出フラクションの SDS-PAGE
CBB 染色および活性染色を施した。M は分子量マーカー、数字は BioAssist Q
カラムからの溶出フラクション番号を表す。

Table 2-1 BglF1 の精製結果

	Volume (ml)	Activity (U)	Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
Culture sup.	680	—	—	—	—	—
Ultrafiltration	87	14	130	0.11	1.0	100
DEAE-Toyopearl	53	4.1	39	0.11	1.0	30
BioAssist Q	1.0	0.63	0.19	3.3	30	4.6

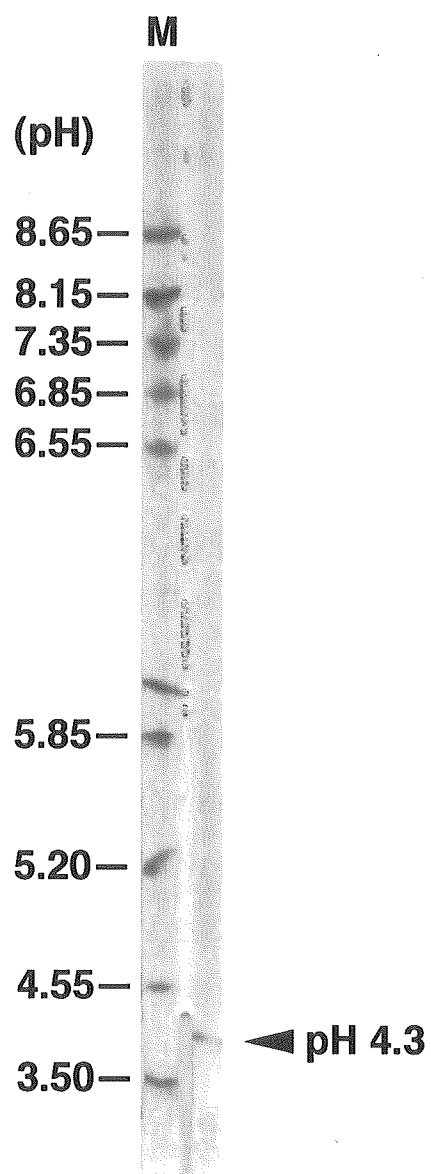


Fig. 2-3 BglF1 精製標品の等電点電気泳動
CBB 染色を施した。M は pI マー カーを表す。

37°C における反応 pH 依存性を調べた。その結果、本酵素の反応至適 pH は pH 8~9 であることが明らかとなった (Fig. 2-4)。β-1,3-グルカナーゼにおいて、pH 8~9 というアルカリ性に反応の至適をもつものはほとんど報告例がない。

pH 6.0 における反応温度依存性を調べた。その結果、BglF1 の反応至適温度は 70°C であり、本酵素は中温菌由来の酵素としては高い至適温度を有していることがわかった (Fig. 2-5)。

各種多糖を基質とした加水分解活性を測定し、ラミナリンを基質とした際の活性を 100% とした相対活性を Table 2-2 に示した。BglF1 はラミナリン、パキマン、カードランといった β-1,3-グルカンを加水分解し、なかでもパキマンに対して高い活性を示した。ラミナリンは可溶性、そしてパキマンは不溶性の β-1,3-グルカンであり、本酵素が不溶性基質も良好に加水分解することは興味深い。また、本酵素は β-1,3-1,4-グルカンであるリケナンに対し、ラミナリン分解活性の 8.9 倍の活性を示した。これまでに、β-1,3-1,4-グルカン分解活性をもつ β-1,3-グルカナーゼとして *Bacillus circulans* IAM1165 株由来 BglM および BglL^{9,10)}、*Clostridium thermocellum* F7 株由来 LicA¹¹⁾、*Phaffia rhodozyma* CBS6938 株由来 Bgl¹²⁾ などが報告されている。例えば、*B. circulans* IAM1165 株由来 BglM および BglL のリケナン分解活性は、ラミナリン分解活性のそれぞれ 1.2 倍および 1.5 倍の値を示す^{9,10)}。BglM や BglL もラミナリン分解活性よりもむしろ高いリケナン分解活性を示すが、その程度は BglF1 の方がはるかに高い。一方、BglF1 においては β-1,4-グルカンおよび β-1,6-グルカン分解活性は認められなかった。

2-3-5 天然型 β-1,3-グルカナーゼの N 末端アミノ酸配列解析

BglF1 精製標品ならびに BglF2 および BglF3 の部分精製標品 (BioAssist Q カラムからの溶出フラクション) を用いて、各 β-1,3-グルカナーゼアイソザイムの N 末端アミノ酸配列解析を行った。Fig. 2-6 に示したように、3 つの配列は互いにオーバーラップしていることが明らかとなった。このことから、これら 3 つのア

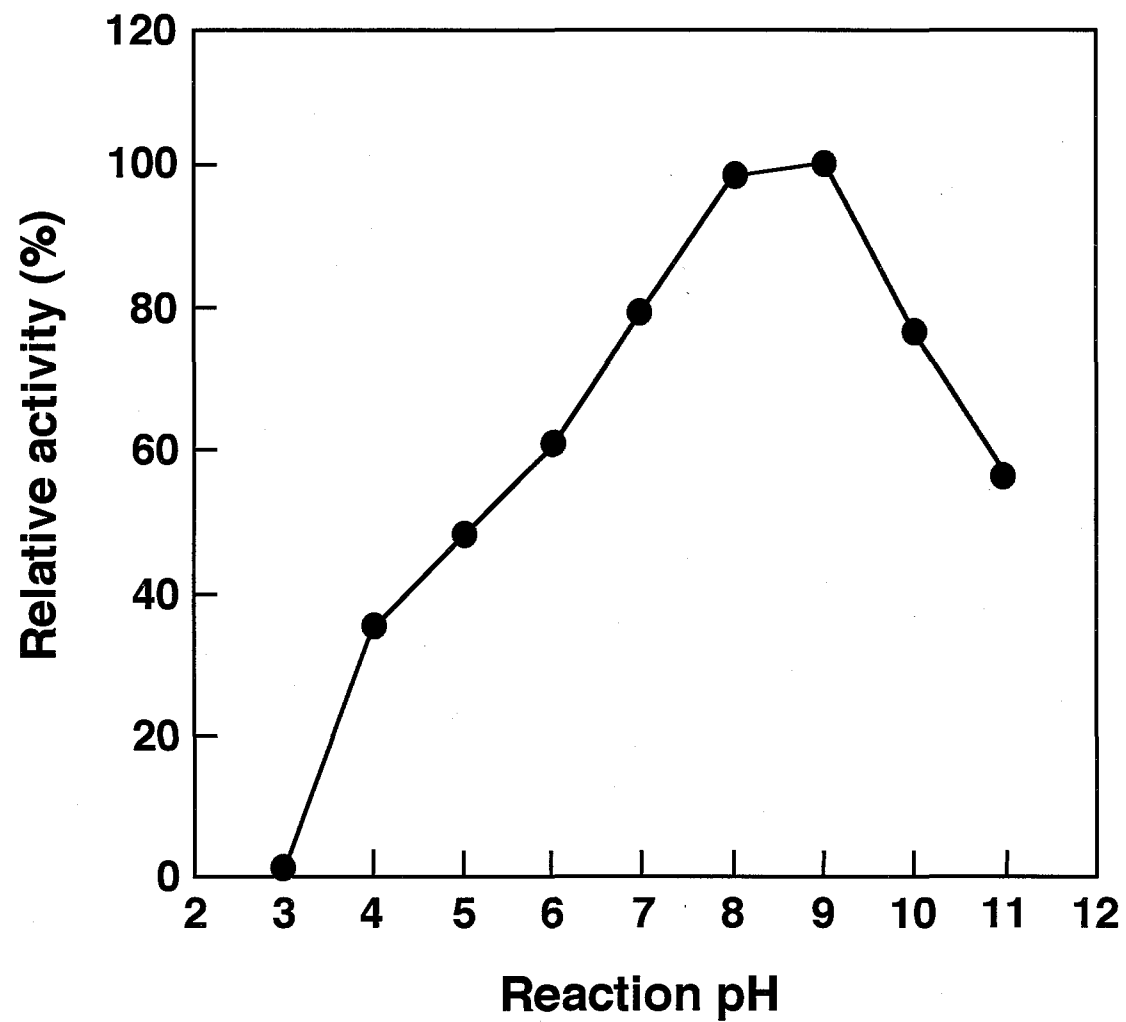


Fig. 2-4 BglF1 精製標品の反応 pH 依存性
反応は 37°C で 30 分間行い、pH の調整には Britton-Robinson の緩衝系を用いた。

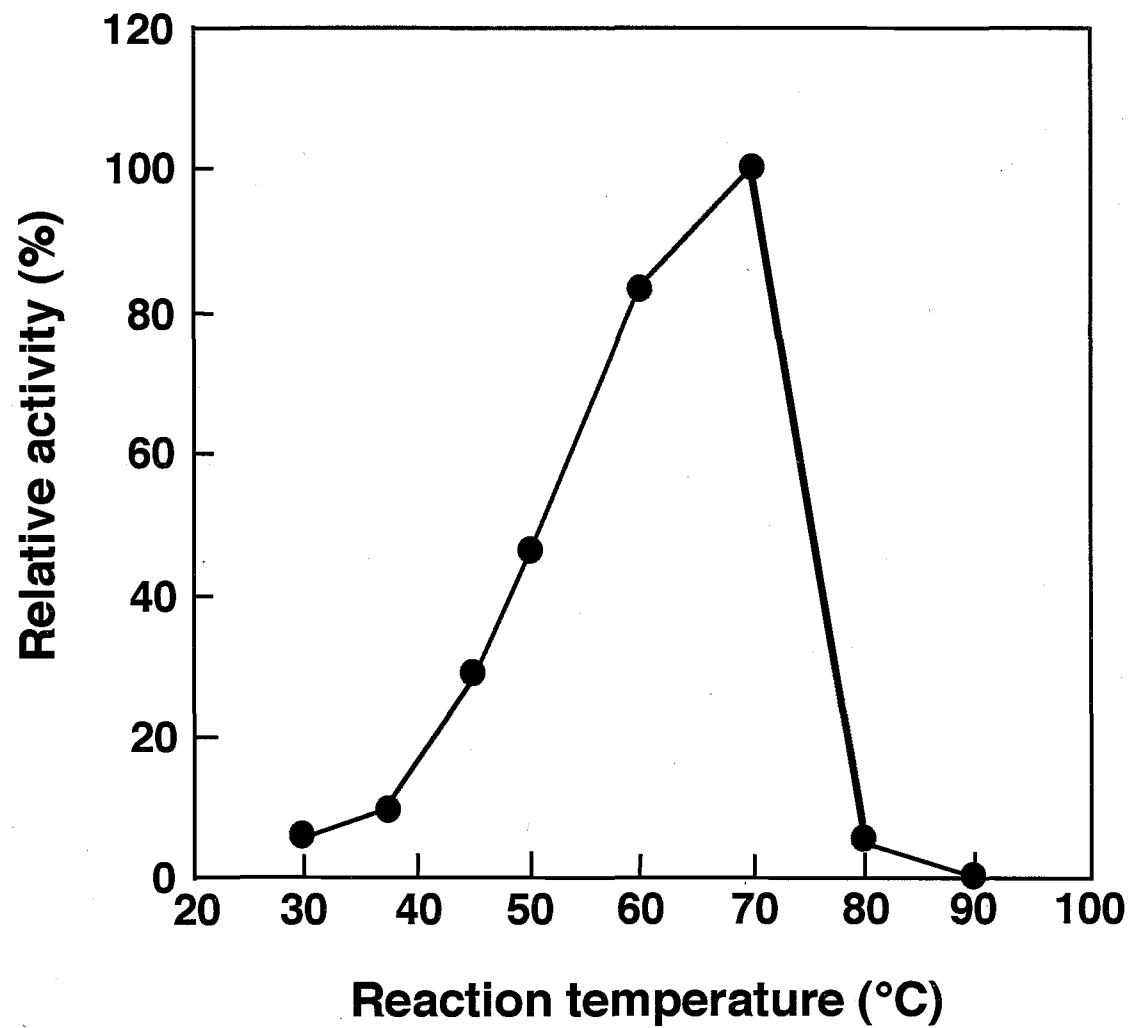


Fig. 2-5

BglF1 の反応温度依存性

反応は pH 6.0 で 30 分間行い、pH の調整には 100 mM NaH_2PO_4 -NaOH 緩衝液 (pH 6.0) を用いた。

Table 2-2 BglF1 の基質特異性

Polysaccharide	Linkage	Relative activity (%)
Laminarin	β -1,3; β -1,6	100
Pachyman	β -1,3	200
Curdlan	β -1,3	110
Lichenan	β -1,3; β -1,4	890
Avicel	β -1,4	41
CM-cellulose	β -1,4	N.D.*
Xylan	β -1,4	N.D.
Dextran	β -1,6	N.D.
Pustulan	β -1,6	N.D.

*N.D.: Not detected.

BglF1 **N-TESDMRATLV**
BglF2 **N-LVWSDEFDGPAG**
BglF3 **N-RATLVWSDEFDGPAG**

Fig. 2-6 BglF1、BglF2 および BglF3 の *N* 末端アミノ酸配列
オーバーラップしている領域はピンク色の網かけで示した。

イソザイムは同一遺伝子の産物であり、*N* 末端および *C* 末端のプロセシングの違いにより分子量の違いが生じていることが示唆された。

2-4 結論

好アルカリ性 *Nocardiopsis* sp. F96 株が分子量の異なる 3 つの β -1,3-グルカナーゼアイソザイム (BglF1、BglF2 および BglF3) を生産していることを見だし、その精製と性質検討を行った。最も分子量の大きな酵素 BglF1 が精製され、その分子量は 34,100、等電点は約 4.3、反応至適 pH は pH 8~9、反応至適温度は 70°C であることを明らかにした。BglF1 は可溶性 β -1,3-グルカンのみならず、不溶性 β -1,3-グルカンも良好に加水分解した。また、本酵素は β -1,3-グルカン分解活性よりもむしろ β -1,3-1,4-グルカンに対して高い活性を示すことがわかった。*N* 末端アミノ酸配列解析により、3 つのアイソザイムは同一遺伝子産物であることが示唆された。

2-5 引用文献

- 1) K. Endo, T. Fukazawa, R. Yatsunami and S. Nakamura. Molecular cloning of a family 18 chitinase gene from alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. strain F96. *Chitin Chitosan Res.*, **9**, 150-151 (2003).
- 2) 遠藤きみ子. 好アルカリ性放線菌 F96 株が生産する多糖分解酵素の研究. 博士論文, 東京工業大学 (2004).
- 3) 早見徳介. 好アルカリ性 *Nocardiopsis* sp. F96 株が生産するキシラナーゼの精製. 学士論文, 東京工業大学 (2000).
- 4) 山本まみ. *Bacillus circulans* IAM1165 株の生産する β -1,3-グルカナーゼに関する研究. 博士論文, 東京工業大学 (2001).
- 5) U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 6) J. B. Sumner. A more specific reagent for the determination of sugar in urine. *J. Biol. Chem.*, **47**, 393-395 (1925).
- 7) H. T. S. Britton and R. A. Robinson. Universal buffer solution and the dissociation constant of veronal. *J. Chem. Soc.*, **1931**, 1456-1462 (1931).
- 8) <http://fasta.bioch.Virginia.edu>
- 9) R. Aono, M. Hammura, M. Yamamoto and T. Asano. Isolation of extracellular 28- and 42-kilodalton β -1,3-glucanases and comparison of three β -1,3-glucanases produced by *Bacillus circulans* IAM1165. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 122-129 (1998).

- 10) T. Asano, J. Taki, M. Yamamoto and R. Aono. Cloning and structural analysis of *bglM* gene coding for the fungal cell wall-lytic β -1,3-glucan-hydrolase BglM of *Bacillus circulans* IAM1165. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1246-1255 (2002).
- 11) K. P. Fuchs, V. V. Zverlov, G. A. Velikodvorskaya, F. Lottspeich and W. H. Schwarz. Lic16A of *Clostridium thermocellum*, a non-cellulosomal, highly complex endo- β -1,3-glucanase bound to the outer cell surface. *Microbiology*, **149**, 1021-1031 (2003).
- 12) M. L. Bang, I. Villadsen, and T. Sandal. Cloning and characterization of an endo- β -1,3(4)glucanase and an aspartic protease from *Phaffia rhodozyma* CBS 6938. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 215-222 (1999).

第 3 章

β -1,3-グルカナーゼ遺伝子のクローニングと解析

3-1 緒言

好アルカリ性 *Nocardiopsis* sp. F96 株は、3 つの β -1,3-グルカナーゼアイソザイム BglF1、BglF2 および BglF3 を生産する（本論文第 2 章参照）。それらのうち、最も分子量の大きい BglF1 については精製が行われ、種々の性質が明らかにされた。さらに、*N* 末端アミノ酸配列解析により、3 つのアイソザイムは同一遺伝子産物であることが推察された。

本研究では、F96 株染色体 DNA からの β -1,3-グルカナーゼ遺伝子 (*bglF*) のクローニングを行った。また、*bglF* 遺伝子の大腸菌における発現を試みた。

3-2 実験材料と方法

3-2-1 菌株、プラスミドおよび培地

DNA 供与体として好アルカリ性 *Nocardiopsis* sp. F96 株を用いた^{1,2)}。宿主には大腸菌 (*Escherichia coli*) JM109 株を使用した。遺伝子型は以下の通りである。

(株)	(遺伝子型)
JM109	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>)/F' [<i>traD36</i> , <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacZ</i> Δ M15]

PCR 産物（後述本章 3-3-1 項参照）のクローニングには pGEM-T Easy Vector System (Promega) を用いた。ベクタープラスミド pUC119 は宝酒造より購入した。

F96 株の培養にはアルカリ性培地 (pH 10.5) を使用した（本論文第 2 章 2-2-1 項参照）。

大腸菌の培養には、LB 培地 (1% ポリペプトン、0.5% イーストエキス、1% NaCl、pH 7.2) の液体培地および固形平板培地を使用した。固形平板培地には 1.5% の寒天を添加した。必要に応じ、オートクレーブ滅菌後の培地に終濃度 50 μ g/ml のアンピシリン (Sigma) を添加して使用した。

3-2-2 クローニング技術

制限酵素および修飾酵素は東洋紡および宝酒造より購入し、説明書に従って使用した。

大腸菌の形質転換はエレクトロポレーション法で行った。エレクトロポレーシ

ョンには、MicroPulser (Bio-Rad) を使用した。コンピテントセルの作製は同社の説明書の指示に従った。

形質転換体からのプラスミドの回収はアルカリ-SDS 法³⁾で行った。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) は TBE 緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 0.3% ホウ酸, 1 mM EDTA·3Na, pH 8.2) を用いて行った。アガロースゲル電気泳動 (AGE) は TAE 緩衝液 [40 mM Tris-HCl, 2.8% (v/v) 酢酸, 2 mM EDTA·3Na, pH 7.8] を用いて行った。PAGE には 5% のポリアクリルアミドゲル、AGE には 0.7% のアガロースゲルを用いた。泳動後のゲルはエチジウムブロミド染色を行い、DNA を検出した。DNA 分子量マーカー (λ /Hind III digest- ϕ X174/Hae III digest) は東洋紡より購入した。

アガロースゲルからの DNA の回収は、以下のように行った。必要な DNA バンドを含むゲル断片をプラスチックチューブに取り、TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA·3Na, pH 8.0) で飽和したフェノールと共に凍結させた。37°C で再び溶解させ、遠心 (マイクロ遠心機を使用) した後、DNA を含む水層を回収した。ポリアクリルアミドゲルからの DNA の回収は、常法³⁾に従って行った。すなわち、必要な DNA バンドを含むゲル断片をプラスチックチューブ内で破碎し、溶出緩衝液 (50 mM 酢酸アンモニウム, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.2% SDS) を加えて、37°C で一晩インキュベートした。遠心等によりゲル破碎物を除去した後、エタノール沈殿して DNA を回収した。

3-2-3 染色体 DNA の調製

F96 株の染色体 DNA の調製は、Hopwood らの方法⁴⁾に準じて行った。F96 株を 800 ml のアルカリ性液体培地を用い、37°C、170 rpm で 4 日間振とう培養 (Bio-Shaker BR-300LF、タイテック) した。遠心 (15,000×g, 30 分間, 4°C) により集菌した後、菌体を 10% グリセロール溶液で 2 回洗浄し、25% スクロースを含む 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 14 ml に懸濁した。終濃度 0.8 mg/ml と

なるようにリゾチーム (Sigma) を加え、37°C で 90 分間インキュベートした。この間、15 分ごとに攪拌した。その後、終濃度 70 mM の EDTA と終濃度 0.8 mg/ml の プロナーゼ (Calbiochem-Novabiochem) を加え、37°C で 5 分間加温した後、終濃度 1% となるように SDS を混合・添加し、さらに 37°C で 90 分間インキュベートして溶菌させた。TE 緩衝液で飽和しフェノール溶液を 1/2 倍容加えて 20 分間攪拌し、さらにクロロホルムをフェノールと等量混合して 5 分間氷冷した。遠心分離 (3,000×g、15 分間、4°C) した後、上層の水層を回収した。このフェノール/クロロホルム抽出による除タンパク質操作を再度繰り返した後、水層に対して等量のクロロホルムを加え、充分混合した。遠心分離 (3,000×g、15 分間、4°C) し、下層のクロロホルムを取り除いた後、上層 (水層) に 2 倍容の冷エタノールをゆっくり重層した。ガラス棒で溶液をかき混ぜながら、染色体 DNA を絡め取った。ガラス棒に付着した DNA を 10 ml の TE 緩衝液に溶解した後、0.05 mg/ml のリボヌクレアーゼ A (Sigma) を加え、37°C で一晩反応させ、染色体 DNA 溶液とした。

3-2-4 PCR

オリゴヌクレオチドはベックスから購入し、滅菌水に溶解したものをそのまま PCR 用プライマーとして用いた。耐熱性 DNA ポリメラーゼは KOD Dash (東洋紡) を用いた。サーマルサイクラーは GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer) および iCycler (Bio-Rad) を使用した。

反応液 25 µl 中には 1 µg の鋳型染色体 DNA、各 20 pmol のプライマー、終濃度 0.2 mM の dNTP、10% (v/v) の 10×PCR Buffer、1.25 U の KOD Dash および 10% (v/v) のジメチルスルホキシド (GC 含量の高い鋳型 DNA の増幅に有効) が含まれる。

以下に PCR 条件を示す。

プレヒート

94°C 5 分

サイクル (25 回)	ステップ 1	94°C	30 秒
	ステップ 2	58°C	2 秒
	ステップ 3	74°C	30 秒
ポストヒート		74°C	4 分

3-2-5 プローブ DNA の調製

AGE 後のアガロースゲルより回収した DNA 断片約 1 μ g を、ジゴキシゲニン dUTP を用いたランダムプライム法 (DIG DNA Labeling and Detection Kit, Roche) により標識し、プローブとして用いた。

3-2-6 ハイブリダイゼーション解析

サザンハイブリダイゼーション

F96 株染色体 DNA を所定の制限酵素で完全分解した後、AGE を行った。電気泳動後のアガロースゲルをエチジウムブロミド染色して泳動パターンを確認した後、0.5 M NaOH-1.5 M NaCl に浸して DNA をアルカリ変性させた。アルカリ変性した DNA をキャピラリー法³⁾によりナイロン膜 (Hybond-N+, Amersham) にサザンブロッティングした。ブロッティング後のナイロン膜はサザンハイブリダイゼーション溶液 [5×SSC 溶液 (0.75 M NaCl, 0.075 M クエン酸三ナトリウム, pH 7.0)、0.5% ブロッキング試薬 (Roche)、0.1% *N*-ラウロイルサルコシナトリウム、0.02% SDS] を用いてプレハイブリダイゼーション (68°C、2 時間) した後、上述のプローブ DNA を加えてハイブリダイゼーション (68°C、16 時間) を行った。その後、アルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体 (DIG DNA Labeling and Detection Kit, Roche) を用いて陽性バンドを検出した。

コロニーハイブリダイゼーション

ニトロセルロース膜 (Membrane Filter、アドバンテック) 上の大腸菌の溶菌は、常法³⁾に準じて行った。ニトロセルロース膜上の DNA を 80°C で 2 時間ベーキングし、膜に固定した。2×SSC 溶液 (0.3 M NaCl、0.03 M クエン酸三ナトリウム、pH 7.0) で 5 分間洗浄した後、プレウォッシング溶液 (5×SSC、0.5% SDS、1 mM EDTA) を用い、50°C で 30 分間プレウォッシングを行った。その後、上述のサザンハイブリダイゼーションと同様の方法で陽性クローンの検出を行った。

3-2-7 塩基配列の決定

塩基配列の決定はジデオキシ法⁵⁾に基づいて行った。ThermoSequenase Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences) を用いて調製した試料の解析には、自動蛍光式 DNA シークエンサー DSQ-2000L (島津) を使用した。また、ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystems) を用いた場合は、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて解析した。

3-2-8 遺伝情報解析

DNA 塩基配列およびアミノ酸配列の解析には遺伝子情報処理ソフトウェア GENETYX-MAC Ver.11.1 (ゼネティックス) を使用した。相同性検索にはホモロジー検索プログラム FASTA⁶⁾を利用した。アミノ酸配列のモチーフ検索には PROSITE⁷⁾データベースを用いた。

3-2-9 大腸菌菌体内画分の調製

bglF 遺伝子を含む組換えプラスミド pBglF (後述本章 3-3-2 項参照) を有する大腸菌形質転換体の培養には、5 ml の LB 培地を用いた。遠心 (7,000×g、10 分間、4°C) により回収した菌体を 250 µl のペリプラスム画分調製用高張液 (25% シ

ヨ糖、10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 7.3) に懸濁した。この菌体懸濁液に終濃度 200 $\mu\text{g/ml}$ のリゾチーム (Sigma) を添加し、37°C で 2 時間反応させた。その後、遠心 (7,000 $\times g$ 、10 分間、4°C) を行い、上清をペリプラズム画分とした。

3-2-10 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動と活性染色

本論文第 2 章 2-2-3 項に準じて行った。

3-3 結果および考察

3-3-1 *bglF* 遺伝子部分配列の PCR 増幅

F96 株染色体 DNA からの *bglF* 遺伝子部分配列の PCR 増幅を目的として、 β -1,3-グルカナーゼ (BglF) アイソザイムの *N* 末端アミノ酸配列からセンスプライマー SG1-S を設計した (Fig. 3-1)。一方、各 BglF アイソザイムの *N* 末端アミノ酸配列は、*Cellulosimicrobium cellulans* LLG109 株および *Bacillus circulans* WL-12 株が生産する β -1,3-グルカナーゼ (それぞれ BglII⁸⁻¹⁰ および GlcA¹¹) と高い相同性を示した (Fig. 3-1 参照)。そこで、*C. cellulans* LLG109 株 BglII および *B. circulans* WL-12 株 GlcA 間に見られる保存配列よりアンチセンスプライマー SG5-A を設計した (Fig. 3-1 参照)。これらのプライマー SG1-S および SG5-A を用い、F96 株染色体 DNA を鋳型とする PCR を行った。その結果、約 700 bp の DNA 断片が増幅された。この DNA 断片をベクタープラスミド pGEM-T Easy Vector に連結し、組換えプラスミド pGEM-BglF を構築した。pGEM-BglF の挿入断片の塩基配列決定の結果、既知の β -1,3-グルカナーゼのホモログがコードされていることが明らかとなり (データ示さず)、F96 株 *bglF* 遺伝子の一部が PCR 増幅されたものと考えられた。そこで、先のプライマーを用い pGEM-BglF を鋳型とする PCR を行い、得られた PCR 産物 (*bglF* 遺伝子の一部に相当) を完全長の *bglF* 遺伝子クローニングのためのプローブとして用いることにした。

3-3-2 *bglF* 遺伝子の染色体からのクローニング

F96 株染色体 DNA を制限酵素 *Bam*HI、*Eco*R I、*Hind* III、*Kpn* I、*Pst* I、*Sac* I、*Sal* I、*Sma* I、*Sph* I および *Xba* I で切断した後、AGE を行った。アガロースゲル中の DNA をナイロン膜へサザンブロッティングした後、前述のプローブを用い

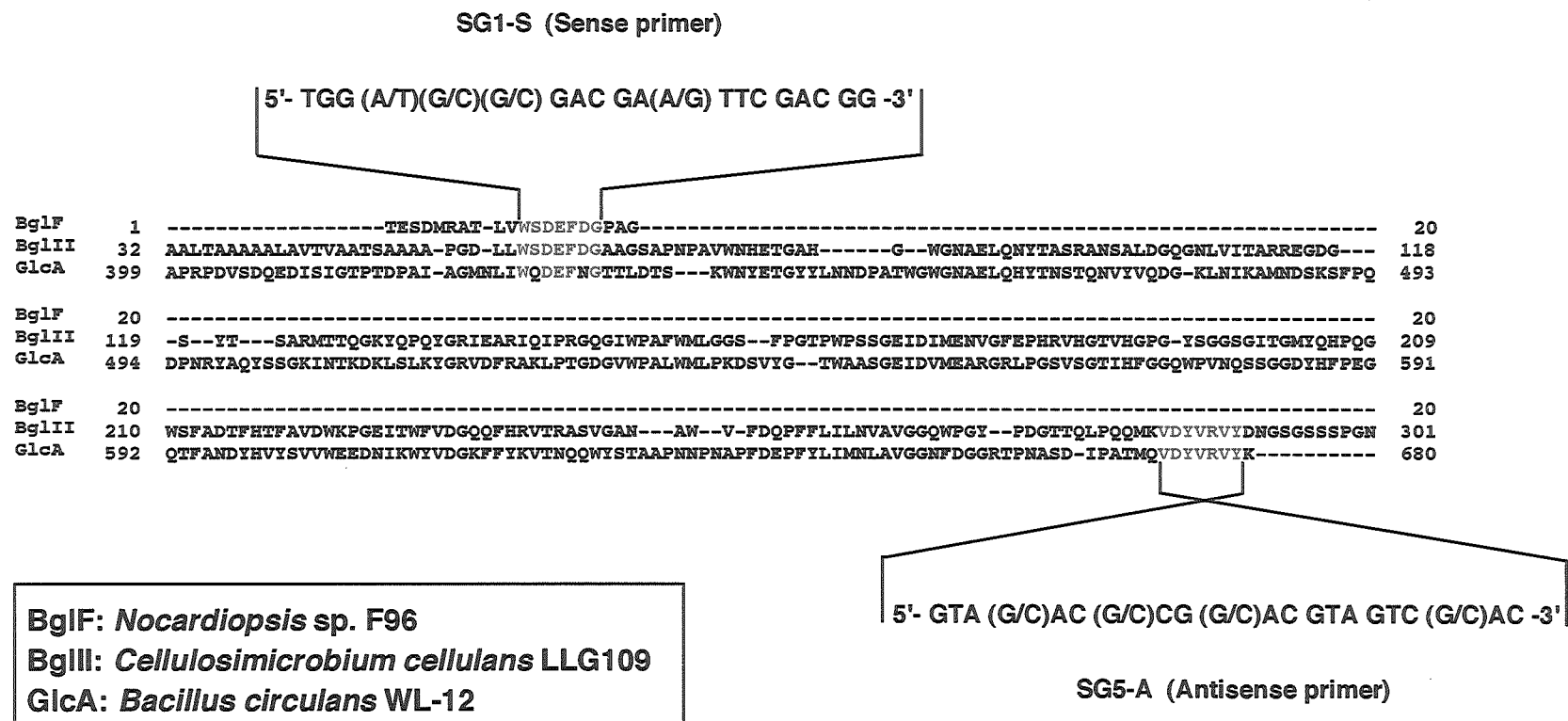


Fig. 3-1 *bglF* 遺伝子 PCR 増幅用プライマーの塩基配列

F96 株 β -1,3-グルカナーゼアイソザイムの *N* 末端アミノ酸配列、*C. cellulans* LLG109 株 BglIII および *B. circulans* WL-12 株 GlcA のアミノ酸配列間のアライメントを併せて示した。

(/) はコドンのゆらぎを表す。

てハイブリダイゼーションを行った。その結果、*Bam*HI 分解した染色体 DNA から約 4.4 kb の位置に単一の陽性バンドが検出された (Fig. 3-2)。各 BglF アイソザイムの分子量が約 34,000 であったことから (本論文第 2 章 2-3 節参照)、この 4.4 kb の *Bam*HI 断片は *bglF* 遺伝子全領域を包括しうるものと考えられた。そこで *Bam*HI 分解した染色体 DNA を AGE につけ 4.4 kb 付近の DNA 断片を分取した。得られた DNA 断片をベクタープラスミド pUC119 の *Bam*HI サイトに連結した後、大腸菌 JM109 株に導入し、部分染色体ライブラリーを作製した。前述のプロブを用いたコロニーハイブリダイゼーションにより、陽性クローンの選抜を行った。その結果、*Bam*HI ライブラリーを構成する 1,300 株の中から 9 株の陽性クローンが得られた (Fig. 3-3)。

これらクローンに含まれるプラスミドを抽出し再度サザン解析を行ったところ、9 株のうち 1 株が目的の *bglF* 遺伝子を含む約 4.4 kb の DNA 断片を保有していることがわかった。このプラスミドを pBglF と命名し、今後の解析に用いることにした。

3-3-3 *bglF* 遺伝子の解析

bglF 遺伝子の塩基配列決定に先立ち、約 4.4 kb の *Bam*HI 断片を含む組換えプラスミド pBglF の制限酵素地図を作製した (Fig. 3-4)。そして、この制限酵素地図をもとに *bglF* 遺伝子の塩基配列決定を行った。塩基配列の決定手順は Fig. 3-4 に示した。その結果、810 塩基からなる 270 アミノ酸をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) が見いだされた (Fig. 3-5)。N 末端側 26 番目から 45 残基目までのアミノ酸配列は先に決定した各 BglF アイソザイムの N 末端アミノ酸配列と一致しており、F96 株 *bglF* 遺伝子がクローニングされたものと結論した。BglF は F96 株の培養上清中に分泌されることから、成熟型酵素の上流に存在する 25 アミノ酸は分泌に関与するシグナルペプチドであると考えられた。

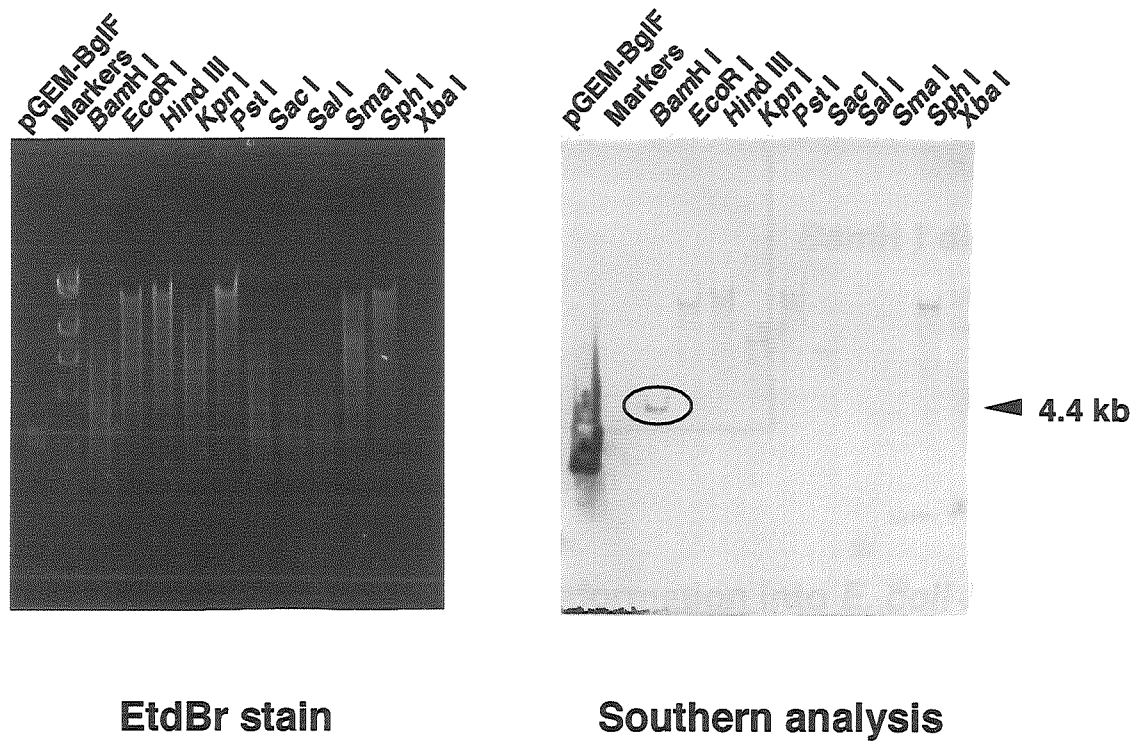


Fig. 3-2 F96 株染色体 DNA のサザンハイブリダイゼーション解析
PCR により得られた *bglF* 遺伝子部分配列をプローブとして
用いた。

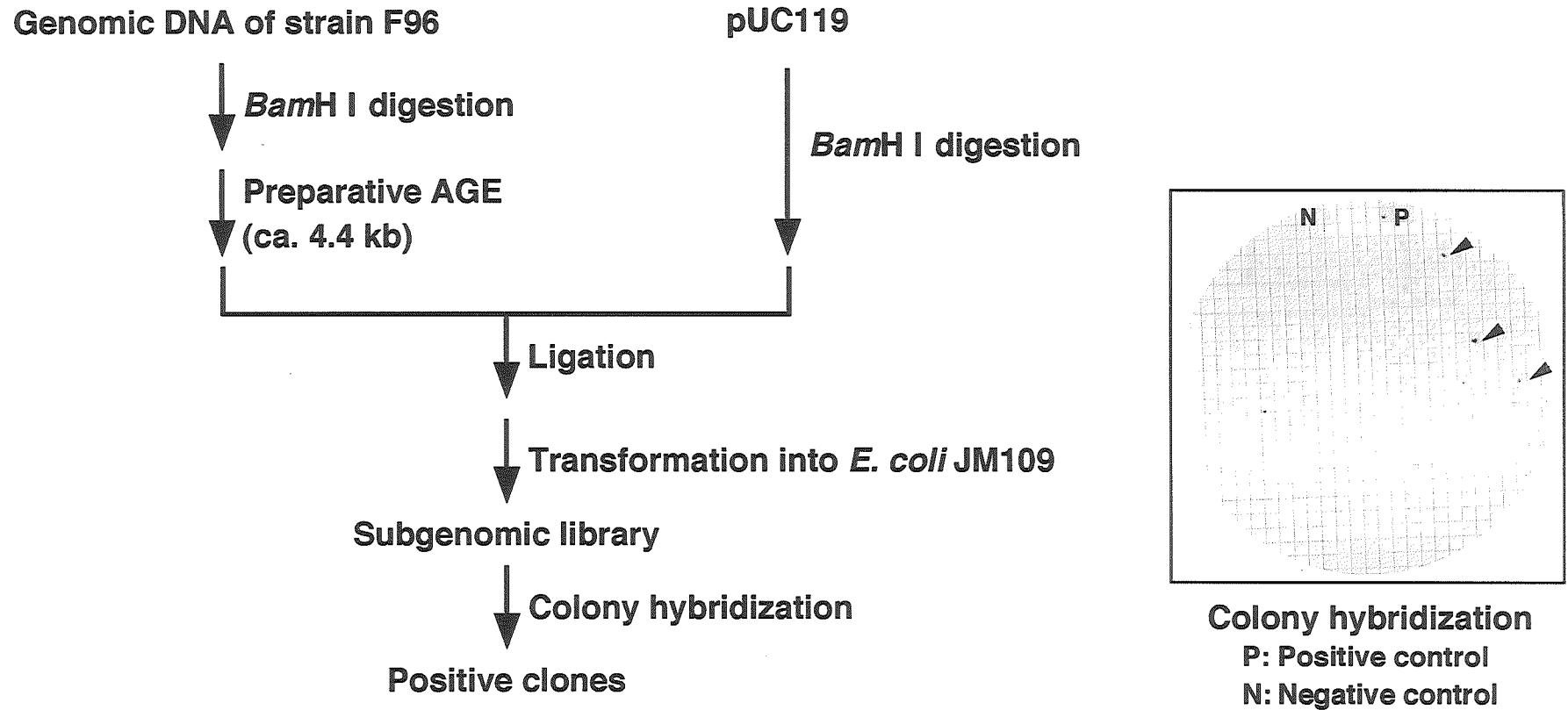


Fig. 3-3 F96 株染色体 DNA からの *bglF* 遺伝子のクローニング
 PCR により得られた *bglF* 遺伝子部分配列をプローブとするコロニーハイブリダイゼーションを行った結果が右の図である。ポジティブコントロールには pGEM-BglF を保有する大腸菌を、ネガティブコントロールには pUC119 を保有する大腸菌を使用した。アローヘッドは陽性クローンを示す。

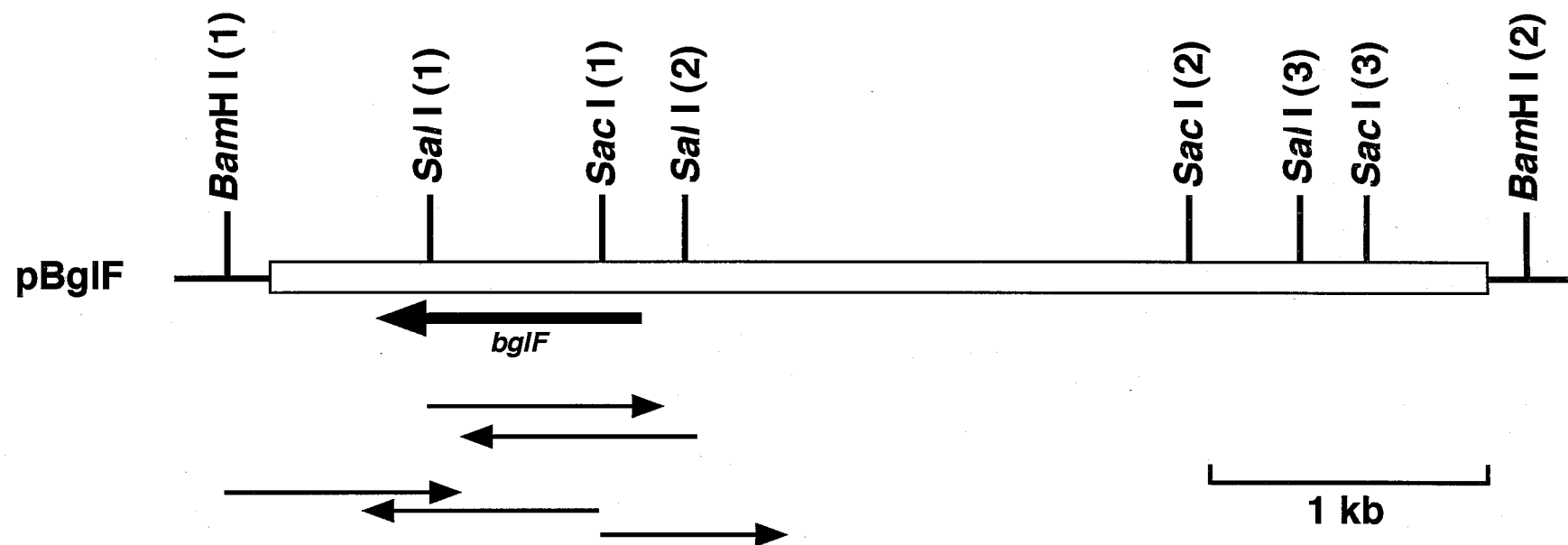


Fig. 3-4 組換えプラスミド pBgIF 挿入断片の制限酵素地図および *bglF* 遺伝子の塩基配列決定手順
太い矢印は *bglF* 遺伝子を表す。細い矢印の方向に塩基配列決定を行った。

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GTCGACCGGCGCCGACAGGAGAGCTGTTACCCCTCTAACCGTCCGCGTCATGACGGATGAGCGTAGAACCCCTTGTCTAGAGCGGGCGGACTTTTCGGAAAA

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
CTTCCACGAAAACCCCGCTTGTGCTATTCGAGAAGCCGAACGTAAGTGACGCCCTAAGTACTAATGGTCACAGGGTGACCACCCCGGGTGCACCCCTGTGGC
-35      -10

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GCTTCCCCCGGAGTAGCCATGCACCGCGCCCTGTTTCATGGCGGTGTCGTCACCGCGCGCGCCCTCATCTCCCCCACCACCGCCTCAGCATCCACCACGGAG
SD      M H R A L F M A V V T A A A L I S P T T A S A S T T E

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
TCCGACATGCGAGCCACCCCTCGTGTGGTCCGACGAGTTCGACGGCCCCGCCGGGAGCGCTCCCGACCCCGCCAACTGGAACCCACGAGACCGGTGATCAG
S D M R A T L V W S D E F D G P A G S A P D P A N W N H E T G D H G

410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
GCTGGGGCAACAACGAGCTTCAGAACTACACCGACAGCCGGGCCAACTCGGCCCTGGACGGCAACCGCAACCTCCTCATCACGGCCCGCAGGAGGGCGGA
W G N N E L Q N Y T D S R A N S A L D G N G N L V I T A R Q E A D

510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
CGGTGGCTACACCTCGGCCAGGCTGACCCCAAGAGGTGACGCCCGAGTACGGCGGAGTAGAGGCGAGTATCCAGATCCACGCGCCAGGGCATC
G G Y T S A R L T T Q N K V Q P Q Y G R V E A S I Q I P R G Q G I

610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
TGGCCCGCCTTCTGGATGCTGGGCGCGGACTTCCGAACACGCGTGGCGGGACTCGGGCGAGATCGACATCATGGAGAACATCGGCCGCGAGCCCCACC
W P A F W M L G A D F P N T P W P D S G E I D I M E N I G R E P H L

710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
TGGTGACGGTAGCCTCCACGGCCCGGGCTACTTCGGCGGCGAGCCGCTCACCGGTTCTTACATGCACCGCAGGGCTGGTCTTCGCCGACACCTTCCA
V H G S L H G P G Y F G G E P L T G S Y M H P Q G W S F A D T F H

810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
CACGTTCCGCGTGGACTGGAGGCCCGGTTCCGATCACCTGGTTCGCTCGACGGCGTCGCCCTATCAGACCTACACCTCGGCCGATACCCGAGGGAACCCGTGG
T F A V D W R P G S I T W S V D G V A Y Q T Y T S A D T R G N P W

910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
GTGTTGACGACCGCTTCTTCATGATCCTCAACGTGGCCGCTGGGCGGGCGACTGGCCCGGCTACCCCGACGGCAGTACGCAGTTCCCCCAGGAGATGCGCG
V F D Q P F F M I L N V A V G G D W P G Y P D G S T Q F P Q E M R V

1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100
TGGACTACGTGCGGGTCTACGAACCTGGGCTAGACCCCGGAACACCCCTGATCCGGGAGAGATCGAGGTGGGGCCCCGTCTCGGAAGCCGGGGCCCCACGT
D Y V R V Y E L G *

1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
CCATCCGAGTTTCGATCAACCGGACCCGTTTCGACGTACGGTGTCTGTCATGACCGTCTCTGATCATCGGTGGCAGTGGGTTTCTCGGCGGCGAAGTGA

1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300
CCCGACAGGCCATCGCCCGAGGACACACCGTTCAGGGCGACCTTCGGCACCCGCGCAGGAGCCCTCCCCGCGCGCAATGGCGGCTCGATCTCCGACATCC

1310    1320    1330    1340    1350    1360    1370    1380    1390    1400
CGAGGCGATCACCTCTCTGAGGAAAGTGGCAGCGACCGTCTGATCAACACGGCCCTATCGGAGGTCCGACTGGGCGACGACGGCGGACGGCGCCATC

1410    1420    1430    1440    1450    1460    1470    1480    1490    1500
AGGGTCGCGATGGCGCGGTTCGGCCAGGGCGCGCTCTGGTCCAGGTGTCCAGCGACACGGTCTTCTCCGGCGACCGGGTCCACTACGACGAGGACTCCC

1510    1520    1530    1540    1550    1560
TCCCGGACCCGGTACCCCTACGGCGCGCGAAGGCCGCGAGCCGAAACCGGATCCGGTTGCTG

```

Fig. 3-5

bglF 遺伝子の塩基配列と類推されるアミノ酸配列

黒い下線部は各 *BglF* 精製酵素の *N* 末端アミノ酸配列である。推測される開始コドンおよび終止コドンは黒枠で囲んだ。また、プロモーター配列および SD 様配列は緑色の下線で示した。ファミリー 16β-1,3-グルカナーゼに存在する保存配列は赤色で示し、触媒残基と考えられるグルタミン酸残基は青枠で囲んだ。

bglF 構造遺伝子開始コドンの 6 塩基上流にはほとんどの細菌の 16S rRNA の 3' 末端に存在する配列と相補的な Shine-Dalgarno (SD) 様配列 5'-CGGAGT-3' があり、リボソーム結合サイトとして機能しているものと考えられた。さらに上流には、プロモーター配列である 5'-TTGTGC-3' (-35 領域) および 5'-TAAAGT-3' (-10 領域) が存在していた。

遺伝子配列から推測される BglF の全アミノ酸配列について、データベースを用いた相同性検索を行った。その結果、*C. cellulans* LLG109 株 BglIII、*C. cellulans* LLG109 株 BglIII¹²⁾、*B. circulans* IAM1165 株 BglM¹³⁾、*Rhodothermus marinus* ITI-278 株 LamR¹⁴⁾、*B. circulans* IAM1165 株 BglH¹⁵⁾、*B. circulans* WL-12 株 GlcA¹¹⁾ といったファミリー 16 に属する β -1,3-グルカナーゼと、それぞれ 74.7%、72.0%、48.5%、44.7%、38.9% および 37.8% の相同性を有していることがわかった。これより、本酵素もファミリー 16 に属するものと考えられた。BglF を含むこれらの β -1,3-グルカナーゼのアミノ酸配列のアラインメント結果を Fig. 3-6 に示す。データベース ProDom¹⁶⁾ 検索により、BglF はファミリー 16 触媒ドメインのみからなるシングルドメイン酵素であることがわかった。

ファミリー 16 多糖分解酵素においては E-[L/I/V]-D-[L/I/V/F]-x(0,1)-E-x(2)-[G/Q]-[K/R/N/F]-x-[P/S/T/A] という保存配列が知られている^{12,17)}。ここで、アミノ酸は 1 文字表記とし [] はアミノ酸のゆらぎ、x は任意のアミノ酸、そして () 内の数字はアミノ酸の数を表している。BglF を含む 6 つの β -1,3-グルカナーゼにおいて、この保存配列の存在が確認された (Fig. 3-7)。さらに、 β -1,3-1,4-グルカナーゼである *Clostridium thermocellum* F7 株 LicB、*Fibrobacter succinogenes* リケナーゼおよび *R. marinus* ITI-378 由来 BglA にも、本保存配列があることが知られている。この配列に含まれる 2 つのグルタミン酸は触媒残基と考えられている¹⁸⁾。BglF においても、成熟酵素の 123 番目と 128 番目の 2 つのグルタミン酸が触媒残基として機能することが予想された。この保存配列以外にも、ファミリー 16 β -1,3-グルカナーゼ間においてはトリプトファン、チロシン、フェニルアラニンなど芳香環をもつアミノ酸が高く保存されていることが知られている¹²⁾。BglF

			* * * *	*	**** * * *	* * * *	* * *	*
F96	BglF	1	TESDMRATLVWSDEFDGPAGSAPDPANWNHE	-----	TGDEHGWGNNELQNYTDSRANSALDGNGNLVITARQE	-----	ADGGYTSARLITTONKVQPOYGRVE	91
C.cel.	BglIII	49	-----SAAAAPGDLNWSDEFDGAAGSAPNPVWNHE	-----	TGAHGWGNNAELQNYTASRANSALDGQGNLVITARRE	-----	GDGSYTSARMTTQGGKYQPOYGRIE	139
C.cel.	BglIIa	60	-----PTAVTPESLANWSDEFDGAAGSAPNPVWNHE	-----	TGAGGWGNNAELQNYTTSRVNSALDGQGNLVITALQE	-----	SDGSYTSARLITTONGVQPOFGRIE	150
B.cir.	BglM	1	APNWNLVWSDEFNG	-----	TSLNLRANWTPEIG	-----	TGSGGWGNNELQYYTDRAQNQVVTG	88
R.mar.	LamR	5	-----PIRLPHWELVWSDEFD	-----	YNGLPDPKWDYD	-----	VGEGHGWGNQELQYYTRARIENARVGGGVLIIEARRES	95
B.cir.	BglH	382	-----DSAIEGMNLINQDEFN	-----	GTALDQSKWNYETGYLLNDPNTWGWGNSELQHYTDRAQNQVVD	-----	GKLNKALNEPKSFPQDPNRYAQYSSGKINTKDHFSKYGRVD	485
B.cir.	GlcA	379	-----DPAIAGMNLINQDEFN	-----	GTTLDTSKWNQYETGYLLNDPATWGWGNNAELQHYTNSTQNQVVD	-----	GKLNKAMNDSKSFQDPNRYAQYSSGKINTKDKLSKYGRVD	482
			* * * * *	*	**** *	*	* * * *	
F96	BglF	92	ASIQIPRGQGIWPAFWML	---	GADFPNTFPWDSGEIDIMENIGREPHLVHGSLSHGPGYFG	---	GEPLTGSYMEHPQGWSFADTFETFAVDWRPGSITWSVDGVAYQTYTSA	195
C.cel.	BglIII	140	ARIQIPRGQGIWPAFWML	---	CGSFPPTFPWPSSGEIDIMENVGFEPHVGTVHGGPGYSG	---	GGGITGMYPQHPQGWSFADTFETFAVDWKPGEITWVDGQGFHRVTRA	243
C.cel.	BglIIa	151	ARIQIPRGQGIWPAFWML	---	CANLPDTPWPTSGEIDIMENVGNAPHEVHGTVHGGPGYSG	---	DNGIMGTQHPQGWSFADTFETFGIDWTPGEITWVDGQGEYHRVITA	254
B.cir.	BglM	89	ARIKLPSGQGLWPAFWML	---	GSNISSVGWPKSGEIDIMENVNNNPY	---	VNGTVHWA	186
R.mar.	LamR	96	IRARLPSSGRGTWPAFWML	---	PDRQTYGSAYWPDNGEIDIMENVGFNPVHGTVHTKAYNELLGTQGGGIRVPTAR	---	TDPEVYAIETWTPPEIRWVDDSLYYRFPNERLT	203
B.cir.	BglH	486	FRAKLPTGNGIWPALWML	---	PQDNVYGTWASSGEIDVMEAKGRLLPGSTSGAVHFGGQWP	---	TNRYLSGEYHFFPEGQTFANDYHVYSVVWEEDNIKWYVDGKFFFKVTRDQWY	593
B.cir.	GlcA	483	FRAKLPTGDGVWPALWML	---	PKDSVYGTWASSGEIDVMEARGRLPGSVSGTIHFGGQWP	---	VNQSSEGGDYHFFPEGQTFANDYHVYSVVWEEDNIKWYVDGKFFFKVTNQOWY	590
			* * *	* * * *	*	*****		
F96	BglF	196	DTRG-N	---	PWVFDQPPFMIILNVAVGGDWPGYPD	---	GSTQFPQEMRVDYVRVYELG	245
C.cel.	BglIII	244	SVGA-N	---	AWVFDQPPFLILNVAVGQWPGYPD	---	GTTQLPQOMKVDYVRVYDNG	293
C.cel.	BglIIa	255	DVGA-N	---	QWVFDQPPFLILNVAIGGQWPGNPD	---	ATTFFPQOMKVDYVRVYDNA	304
B.cir.	BglM	187	NGTG-N	---	TEEFQRPFFILLNLAVGGNWPSPN	---	NSTPFPQMLVDYVRVYQDT	236
R.mar.	LamR	204	NPEA	---	DWRHWPFDQPFHLIMNIAVGGTNGGQGVDP	---	EAFPAQLVVDYVRVYRWV	256
B.cir.	BglH	594	SAAAPNNPNAPFDQPFYLIMNLAIGGTFDGGRTDPDSDIPATMQVDYVRVYKEG	---				647
B.cir.	GlcA	591	STAAPNNPNAPFDEFFYLIMNLAVGGNFDDGGRTPNASDIPATMQVDYVRVYKEQ	---				644

Fig. 3-6

BglF および各種ファミリー 16 β -1,3-グルカナーゼのアミノ酸配列比較

アスタリスクはすべての酵素において保存されているアミノ酸残基を表す。ファミリー 16 多糖分解酵素に共通して存在する保存配列 E-[LIV]-D-[LIVF]-x(0,1)-E-x(2)-[GQ]-[KRNF]-x-[PSTA] (□ 内はアミノ酸のゆらぎを、x は任意のアミノ酸を、そして () 内はアミノ酸の数を表す。) は赤色で示した。そのうち、触媒残基と考えられるグルタミン酸残基は青枠で囲んだ。また、すべての酵素において保存されている芳香族アミノ酸残基 (基質結合に関与する可能性が高い) は緑色で示した。

F96 BglF: *Nocardioopsis* sp. F96 株 BglF

C. cel. BglII: *Cellulosimicrobium cellulans* LLG109 株 BglII

C. cel. BglIIa: *Cellulosimicrobium cellulans* LLG109 株 BglIIa

B. cir. BglM: *Bacillus circulans* IAM1165 株 BglM

R. mar. LamR: *Rhodothermus marinus* ITI-278 株 LamR

B. cir. BglH: *Bacillus circulans* IAM1165 株 BglH

B. cir. GlcA: *Bacillus circulans* WL-12 株 GlcA

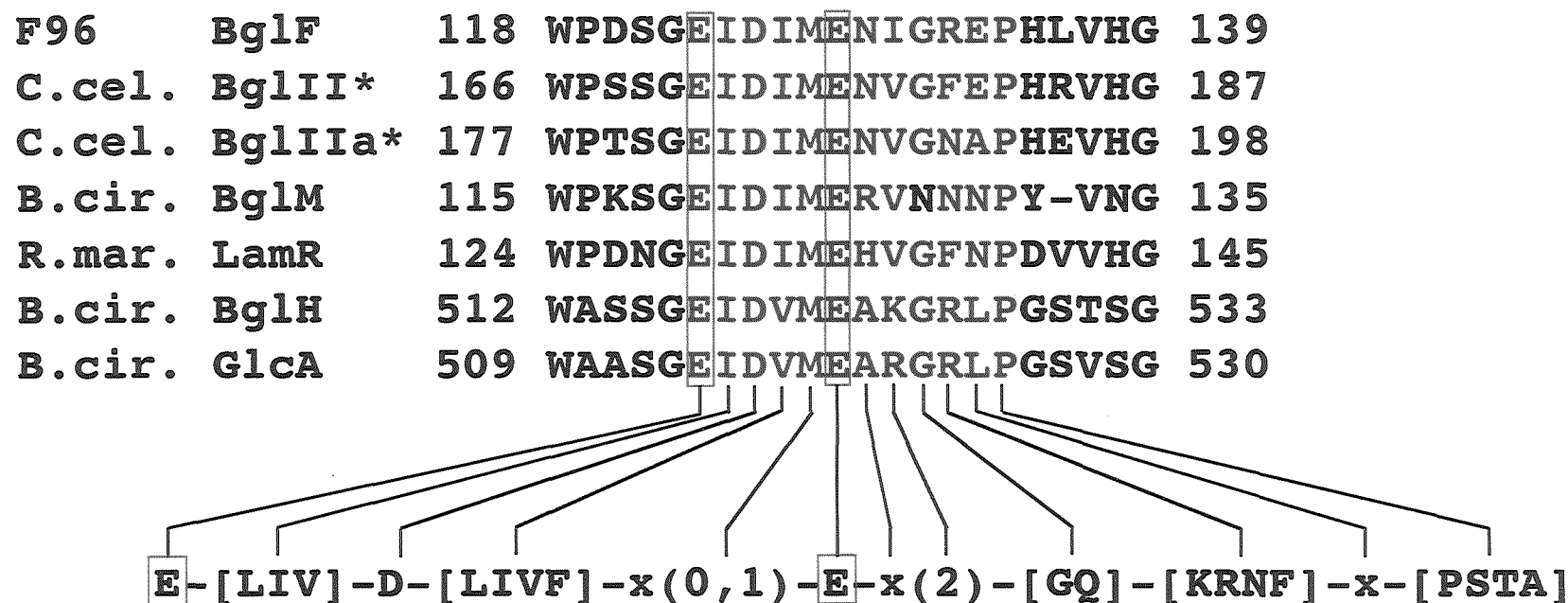


Fig. 3-7 BglF および各種ファミリー 16 β -1,3-グルカナーゼの部分アミノ酸配列比較
 ファミリー 16 多糖分解酵素に共通して存在する保存配列 E-[LIV]-D-[LIVF]-x(0,1)-E-x(2)-[GQ]-[KRNF]-x-[PSTA] (□ 内はアミノ酸のゆらぎを、x は任意のアミノ酸を、そして () 内はアミノ酸の数を表す。) は赤色で示した。そのうち、触媒残基と考えられるグルタミン酸残基は青枠で囲んだ。アスタリスクを付した酵素の残基番号は前駆体のものを表す。

F96 BglF: <i>Nocardiopsis</i> sp. F96 株 BglF	R. mar. LamR: <i>Rhodothermus marinus</i> ITI-278 株 LamR
C. cel. BglII: <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> LLG109 株 BglII	B. cir. BglH: <i>Bacillus circulans</i> IAM1165 株 BglH
C. cel. BglIIa: <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> LLG109 株 BglIIa	B. cir. GlcA: <i>Bacillus circulans</i> WL-12 株 GlcA
B. cir. BglM: <i>Bacillus circulans</i> IAM1165 株 BglM	

を含む 7 つの酵素においても数多くの芳香族アミノ酸が高く保存されていた (Fig. 3-6 参照)。これらの芳香族アミノ酸の役割は明らかにされていないが、セルラーゼやキシラナーゼといった多糖分解酵素においては基質結合への関与が示唆されている^{19,20)}。本酵素においても、これらの芳香族が基質結合に関与しているものと推察された。

3-3-4 F96 株 β -1,3-グルカナーゼ遺伝子の大腸菌における発現と解析

pBglF を含む大腸菌のペリプラズム画分を SDS-PAGE にかけた後、活性染色を行った。その結果、微弱ながらも β -1,3-グルカナーゼの活性バンドが認められ、*bglF* 遺伝子が大腸菌において発現していることが明らかとなった (Fig. 3-8)。組換え型酵素の分子量は約 34,000 であり、F96 株が生産する 3 つの β -1,3-グルカナーゼアイソザイムのうち、分子量の最も大きな BglF1 とほぼ同じであることがわかった。

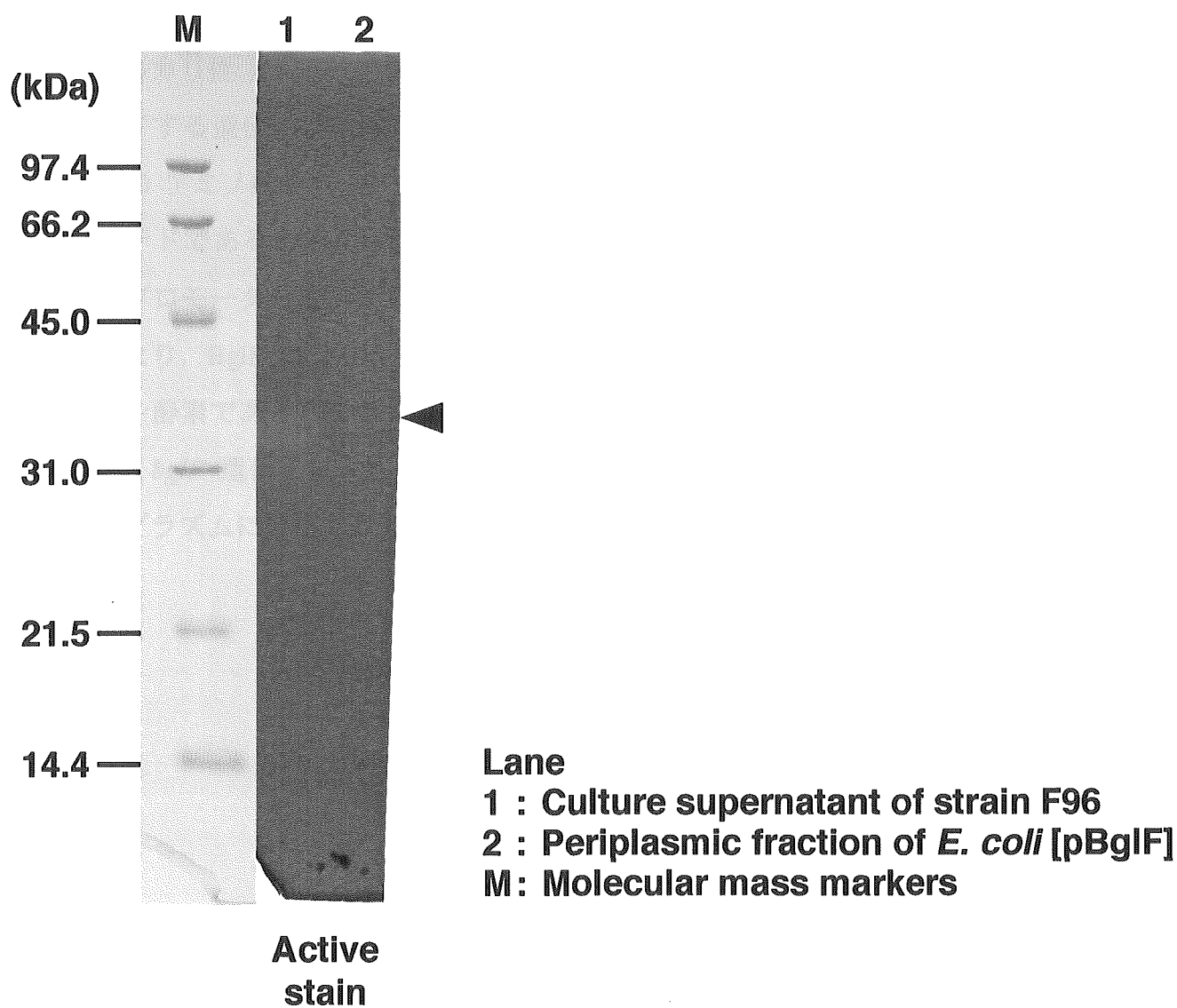


Fig. 3-8 pBglF を含む大腸菌ペリプラズム画分の SDS-PAGE 活性染色を施した。

3-4 結論

好アルカリ性 *Nocardiopsis* sp. F96 株染色体より、 β -1,3-グルカナーゼ (BglF) をコードする遺伝子 (*bglF*) をクローニングした。*bglF* 遺伝子は 810 塩基からなる 270 アミノ酸をコードする ORF からなり、N 末端の 25 アミノ酸はシグナルペプチドであると考えられた。*bglF* 構造遺伝子上流には、典型的な SD 様配列やプロモーター配列が見いだされた。成熟タンパク質のアミノ酸配列の相同性比較より、BglF はファミリー 16 に属する触媒ドメインのみからなるシングルドメイン酵素であり、ファミリー 16 多糖分解酵素に特徴的な保存配列が存在していた。*bglF* 遺伝子は *大腸菌* において発現し、分子量約 34,000 の組換え型酵素がペリプラズムに分泌されることがわかった。

3-5 引用文献

- 1) K. Endo, T. Fukazawa, R. Yatsunami and S. Nakamura. Molecular cloning of a family 18 chitinase gene from alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. strain F96. *Chitin Chitosan Res.*, **9**, 150-151 (2003).
- 2) 遠藤きみ子. 好アルカリ性放線菌 F96 株が生産する多糖分解酵素の研究. 博士論文, 東京工業大学 (2004).
- 3) J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989).
- 4) D. A. Hopwood, M. J. Bibb, K. F. Chater, T. Kieser, C. J. Bruton, H. M. Kieser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, J. M. Ward and H. Schrempf. "Genetic Manipulation of *Streptomyces* a Laboratory manual." The John Innes Foundation, Norwich (1985).
- 5) F. Sanger and A. R. Coulson. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467 (1977).
- 6) <http://fasta.bioch.Virginia.edu>
- 7) <http://www.expasy.ch/prosite/>
- 8) A. M. Ventom and J. A. Asenjo. Characterization of yeast lytic enzymes from *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 71-75 (1991).
- 9) P. Ferrer, L. Hedegaard, T. Halkier, I. Diers, D. Savva and J. A. Asenjo. Molecular cloning of a lytic beta-1,3-glucanase gene from *Oerskovia xanthineolytica* LLG109. A beta-1,3-glucanase able to selectively permeabilize the yeast cell wall. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **782**, 555-565 (1996).

- 10) J. Parrado, P. R. Escuredo, F. Conejero-Lara, M. Kotik, C. P. Ponting, J. A. Asenjo and C. M. Dobson. Molecular characterization of a thermoactive beta-1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1296**, 145-151 (1996).
- 11) N. Yahata, T. Watanabe, Y. Nakamura, Y. Yamamoto, S. Kamimiya and H. Tanaka. Structure of the gene encoding beta-1,3-glucanase A1 of *Bacillus circulans* WL-12. *Gene*, **86**, 113-117 (1990).
- 12) P. Ferrer, T. Halkier, L. Hedegaard, D. Savva, I. Diers and J. A. Asenjo. Nucleotide sequence of a β -1,3-glucanase isozyme II_A gene of *Oerskovia xanthineolytica* LL G109 (*Cellulomonas cellulans*) and Initial characterization of the recombinant enzyme expressed in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **178**, 4751-4757 (1996).
- 13) T. Asano, J. Taki, M. Yamamoto and R. Aono. Cloning and structural analysis of *bglM* gene coding for the fungal cell wall-lytic β -1,3-glucan-hydrolase BglM of *Bacillus circulans* IAM1165. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1246-1255 (2002).
- 14) M. Krah, R. Misselwitz, O. Politz, K. K. Thomsen, H. Welfle and R. Borris. The laminarinase from thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*. Conformation, stability, and identification of active site carboxylic residues by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.*, **257**, 101-111 (1998).
- 15) M. Yamamoto, R. Aono and K. Horikoshi. Structure of the 87-kDa beta-1,3-glucanase gene of *Bacillus circulans* IAM1165 and properties of the enzyme accumulated in the periplasm of *Escherichia coli* carrying the gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 1518-1525 (1993).
- 16) <http://prodes.toulouse.inra.fr/prodom.html>
- 17) B. Henrissat. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence

- similarities. *Biochem. J.*, **280**, 309-316 (1991).
- 18) M. Juncosa, J. Pons, T. Dot, E. Querol and Planas. Identification of active site carboxylic residues in *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4- β -D-glucan 4-glucanohydrolase by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14530-14535 (1994).
- 19) D. N. I. J. Forsythe, L. D. Burtnick, N. R. Gilkes, R. C. Miller Jr., R. A. J. Warren and D. G. Kilburn. The cellulose-binding domain of endo-glucanase A (CenA) from *Cellulomonas fimi*: evidence for the involvement of tryptophan residues in binding. *Mol. Microbiol.*, **11**, 747-755 (1994).
- 20) 中村 聡. 好アルカリ性細菌が生産する新規キシラナーゼの分子解剖. 応用糖質科学, **45**, 147-154 (1998).

第 4 章

β -1,3-グルカナーゼ遺伝子の大腸菌における高発現
および組換え型酵素の性質検討

4-1 緒言

好アルカリ性 *Nocardiopsis* sp. F96 株 β -1,3-グルカナーゼ (BglF) は、生産量が非常に少なく、*N* 末端および *C* 末端でのプロセシング部位が異なる 3 つのアイソザイム (BglF1、BglF2 および BglF3) の形で生産されていた (本論文第 2 章参照)。そのため、全アイソザイムの精製や詳細な性質検討には至っていない。一方、BglF をコードする遺伝子 (*bglF* 遺伝子) はクローニングされた^{1,2)} (本論文第 3 章参照)。また、*bglF* 遺伝子を導入した大腸菌においては *Nocardiopsis* 由来のプロモーターを利用した発現が認められたが、その生産量は少なく、組換え型 BglF の性質検討に足る量の確保は困難であった。

本研究では、*bglF* 遺伝子の大腸菌における高発現系の構築を試みた。さらに、組換え型 BglF の精製を行い、詳細な性質検討を実施した。

4-2 実験材料と方法

4-2-1 菌株、プラスミドおよび培地

遺伝子組換えの宿主としては大腸菌 (*Escherichia coli*) JM109 株 (本論文第 3 章 3-2-1 項参照) を、そして *bglF* 遺伝子発現用宿主としては大腸菌 BL21(DE3) 株を使用した。BL21(DE3) 株の遺伝子型は以下の通りである。

(株)	(遺伝子型)
BL21(DE3)	F, <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3)

pBglF は好アルカリ性 *Nocardiopsis* sp. F96 株 *bglF* 遺伝子を含む組換えプラスミドである^{1,2)} (本論文第 3 章参照)。PCR 産物 (後述本章 4-3-1 項参照) のクローニングには pUC119 (宝酒造) を、そして *bglF* 遺伝子の発現には高発現ベクター pET-21b(+) (Novagen) を使用した。

大腸菌の培養には、LB 培地の液体培地および固形平板培地を使用した (本論文第 3 章 3-2-1 項参照)。必要に応じアンピシリン (Sigma) を添加した。

4-2-2 クローニング技術

本論文第 3 章 3-2-2 項に準じて行った。

4-2-3 PCR

オリゴヌクレオチドはベックスおよびオペロンから購入し、TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶解した。以下のようにリン酸化を施した後、

PCR 用プライマーとして用いた。すなわち、反応溶液 200 μ l には各 40 pmol のプライマー、20 μ l の Protruding End Kinase Buffer (東洋紡)、終濃度 1 mM の ATP、および 40 U の T4 Polynucleotide Kinase (東洋紡) が含まれる。この反応溶液を 37°C で 30 分間、続いて 95°C で 3 分間インキュベートし、リン酸化を行った。

耐熱性 DNA ポリメラーゼは KOD -Plus- (東洋紡) を用いた。サーマルサイクラーは iCycler (Bio-Rad) を使用した。

反応液 50 μ l 中には 40 ng の鋳型 DNA、各 20 pmol のリン酸化プライマー、終濃度 0.2 mM の dNTP、1 mM の $MgSO_4$ 、10% (v/v) の 10 $\times$ PCR Buffer for KOD -Plus-、および 1 U の KOD -Plus- が含まれる。

以下に PCR 条件を示す。

プレヒート		94°C	1 分
サイクル (35 回)	ステップ 1	94°C	15 秒
	ステップ 2	68°C	50 秒
ポストヒート		68°C	4 分

4-2-4 塩基配列の決定

本論文第 3 章 3-2-7 項に準じて行った。ただし、ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystems) を用い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて解析した。

4-2-5 遺伝情報解析

DNA 塩基配列およびアミノ酸配列の解析には遺伝子情報処理ソフトウェア GENETYX-MAC Ver.12.2.4 (ゼネティックス) を使用した。相同性検索にはホモロジー検索プログラム FASTA³⁾ を利用した。

4-2-6 大腸菌菌体内画分の調製

高発現型プラスミド pET-BglF（後述本章 4-3-1 項参照）を含む大腸菌をアンピシリンを含む 5 ml の LB 培地を用い、37°C で一晩前培養した後、本培養用の新たな LB 培地に 1% 接種した。培養液の波長 660 nm における濁度 (OD_{660}) が 0.6 程度になるまで 37°C で培養した後、イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG、ナカライ) を終濃度 0.5 mM になるように加え、さらに 37°C で培養することにより T7 プロモーター制御下におかれた *bglF* 遺伝子の発現誘導を行った。遠心 ($7,000\times g$, 10 分間, 4°C) により集菌した後、プロテアーゼ阻害剤として 0.1 mM ふっ化フェニルメチルスルホニル (PMSF、ナカライ) を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に懸濁し、超音波破碎機 (Ultrasonic Disruptor UD-201、トミー精工) で菌体を破碎した。遠心 ($20,400\times g$, 10 分間, 4°C) により得られた上清を菌体内画分とした。

4-2-7 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動と活性染色

本論文第 2 章 2-2-3 項に準じて行った。

4-2-8 組換え型 BglF の精製

組換え型 BglF を含む大腸菌の菌体内画分（本章 4-2-6 項参照）を 0.1 mM PMSF を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に対して透析し、DEAE-Toyopearl 650M（東ソー）および BioAssist Q（東ソー）を担体としたカラムクロマトグラフィーに供した。カラムクロマトグラフィーは本論文第 2 章 2-2-4 項に準じて行った。タンパク質溶出ピークに相当するフラクションの SDS-PAGE を行い、CBB 染色および活性染色を施した。単一バンドの β -1,3-グルカナーゼを含むフラクションを回収し、これを精製標品とした。

4-2-9 β -1,3-グルカナーゼの活性測定

本論文第 2 章 2-2-5 項に準じて行った。

4-2-10 タンパク質定量

本論文第 2 章 2-2-6 項に準じて行った。

4-2-11 反応 pH 依存性の測定

本論文第 2 章 2-2-7 項に準じて行った。

4-2-12 反応温度依存性の測定

本論文第 2 章 2-2-8 項に準じて行った。

4-2-13 温度安定性の評価

組換え型 BglF の精製標品を所定の温度で 30 分間熱処理を行い、その残存活性を測定した。pH の調整には、100 mM NaH_2PO_4 -NaOH 緩衝液 (pH 6.0) を用いた。温度安定性に対する Ca^{2+} イオンの影響を調べる際には、終濃度 10 mM の CaCl_2 または EDTA を添加して熱処理を行った。

4-2-14 基質特異性の評価

本論文第 2 章 2-2-9 項に準じて行った。

4-2-15 薄層クロマトグラフィーによる加水分解産物の解析

2 mg/ml の各種基質（ラミナリン、パキマンおよびリケナン）溶液に組換え型 BglF 精製標品を加え、50 μ l の水溶液中で加水分解した。反応は pH 6.0、37°C で行った。反応 pH の調整には 100 mM NaH_2PO_4 -NaOH 緩衝液（pH 6.0）を用いた。反応終了後の試料を採取し、0.5 μ l を薄層クロマトグラフィー（TLC）プレート（TLC Plate Silica Gel 60 F254, Merck）上にスポットした。TLC プレートは 0.1 M NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 緩衝液（pH 7.4）に浸潤した後、68°C で一晩乾燥したものを使用した。展開は室温で行い、酢酸エチル-酢酸-水系（2:2:1, v/v/v）⁴⁾の展開溶媒を用いた。展開後の TLC プレートは風乾し、発色液に浸潤させた後、加熱して発色させた。発色液には 6.5 mM *N*-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸、0.3% 硫酸を含むメタノール溶液を使用した。標準物質としては 2 mg/ml グルコース（ナカライ）および 2 mg/ml ラミナリオリゴ糖混合物（生化学工業）を用いた。

4-2-16 不溶性多糖への結合能の評価

1.5 ml マイクロチューブを用い、20 μ g の組換え型 BglF 精製標品、10 mg の Bovine serum albumin、2 mg の不溶性多糖を 300 μ l の 100 mM NaH_2PO_4 -NaOH 緩衝液（pH 6.0）に溶解し、4°C で 1 時間緩やかに振とうした。不溶性多糖はパキマン、カードラン、リケナンおよびキチンを用いた。Bovine serum albumin は酵素の安定化のために添加した。また、対照として不溶性多糖を含まないものも同時に振とうした。試料液を遠心（5,000 $\times$ g、5 分間、4°C）し、不溶性多糖を沈殿・除去した後、上清の β -1,3-グルカナーゼ活性を測定した。対照試料中の酵素活性から不溶性多糖に未結合の酵素活性を差し引くことで、組換え型 BglF の不溶性多糖への結合率を算出した⁴⁾。

4-3 結果および考察

4-3-1 *bglF* 遺伝子高発現型プラスミドの構築

F96 株 *bglF* 遺伝子成熟タンパク質領域の PCR 増幅を目的として、プライマー PETF-S2 および PETF-A3 を設計・調製した (Fig. 4-1)。これらのプライマーはそれぞれ、*BglF* 成熟タンパク質領域の上流と下流に対応している。また、PCR 産物の上流および下流に制限酵素 *Nde* I および *Bam* H I 認識配列がそれぞれ導入されるよう設計してある。

リン酸化を施した各プライマーを用い、*bglF* 遺伝子を含む組換えプラスミド pBglF を鋳型とする PCR を行った。PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた結果、*bglF* 遺伝子成熟タンパク質領域に対応すると思われる約 780 bp の DNA 断片の増幅が確認された。目的物以外の DNA バンドも観察されたため、目的物の大きさに対応する DNA 断片のみをゲルより回収した。得られた DNA 断片を *Hinc* II 処理したベクター pUC119 に挿入した後、大腸菌 JM109 株に形質転換し、目的の DNA 断片を含む組換えプラスミド pUC-BglF を取得した。pUC-BglF を *Bam* H I および *Nde* I で切断した後、調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、*bglF* 遺伝子成熟タンパク質領域をコードする DNA 断片 (約 780 bp) を回収した。得られた DNA 断片を *Bam* H I および *Nde* I 処理した高発現ベクター pET-21b(+) に挿入し、高発現型プラスミド pET-BglF を構築した。pET-BglF 挿入断片について塩基配列決定を行った結果、*bglF* 遺伝子成熟タンパク質領域を含むことが確認された。また、この高発現型プラスミドはシグナル領域を含まないため、生産される組換え型 *BglF* は宿主大腸菌の菌体内に蓄積されるものと期待される。

pET-BglF ないし pET-21b(+) を含む大腸菌 BL21(DE3) 株の培養を行い、IPTG 添加による発現誘導を施した。なお、同時に IPTG 誘導を行わない培養も試みた。

PETF-S2

➤ **Mature BglIF**

PETF-A3

BamH I

bglF 遺伝子成熟タンパク質領域の PCR 増幅用プライマーの塩基配列

センスプライマー PETF-S2 (a) およびアンチセンスプライマー PETF-A3 (b) の塩基配列を鋳型 DNA の配列と共に示した。鋳型 DNA 配列中の数字は本論文第 3 章 Fig. 3-5 の塩基番号に対応する。プライマーに含まれる *Nde* I および *Bam*HI 認識配列を太線で、そして変異導入部分は小文字で示した。開始コドンおよび終止コドンは黒枠で囲んだ。

菌体内画分を調製した後、SDS-PAGE にかけ、ついで CBB 染色および活性染色を行った。その結果、IPTG 誘導を行った pET-BglF を含む大腸菌菌体内画分において、分子量 34,000 付近に濃いタンパク質バンドが認められ、当該バンドが活性を有していることがわかった (Fig. 4-2)。このことから、組換え型 BglF は大腸菌菌体内において可溶性タンパク質として活性を保持した形で多量に生産されることが明らかとなった。しかしながら、菌体内画分中の組換え型 BglF には若干のデグラデーションが認められ、この要因として大腸菌由来のプロテアーゼによるプロテオリシスが考えられた。そこで、以後の菌体内画分の調製および組換え型 BglF の精製 (後述本章 4-3-2 項参照) に用いる緩衝液には、プロテアーゼ阻害剤として広く利用されている PMSF を終濃度 0.1 mM になるように加えることとした。

4-3-2 組換え型 BglF の精製

IPTG 誘導を行った pET-BglF を含む大腸菌の菌体内画分を 0.1 mM PMSF を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に対して透析し、DEAE-Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィーに供した。SDS-PAGE 後の活性染色における分子量 34,000 付近の活性バンドを指標とすることにより、NaCl 濃度 440 mM 付近で溶出するフラクションに組換え型 BglF が含まれることがわかった。活性フラクションを回収し、透析・脱塩した後、BioAssist Q カラムクロマトグラフィーにかけた。その結果、500 mM 付近で溶出するフラクションに SDS-PAGE 後の CBB 染色および活性染色において、ほぼ単一バンドを示す標品を取得することができた (Fig. 4-3)。800 ml 培養分の大腸菌菌体から、3.78 U/mg の比活性を有する組換え型 BglF 精製標品が 20.3 mg が得られた。

4-3-3 組換え型 BglF の性質検討

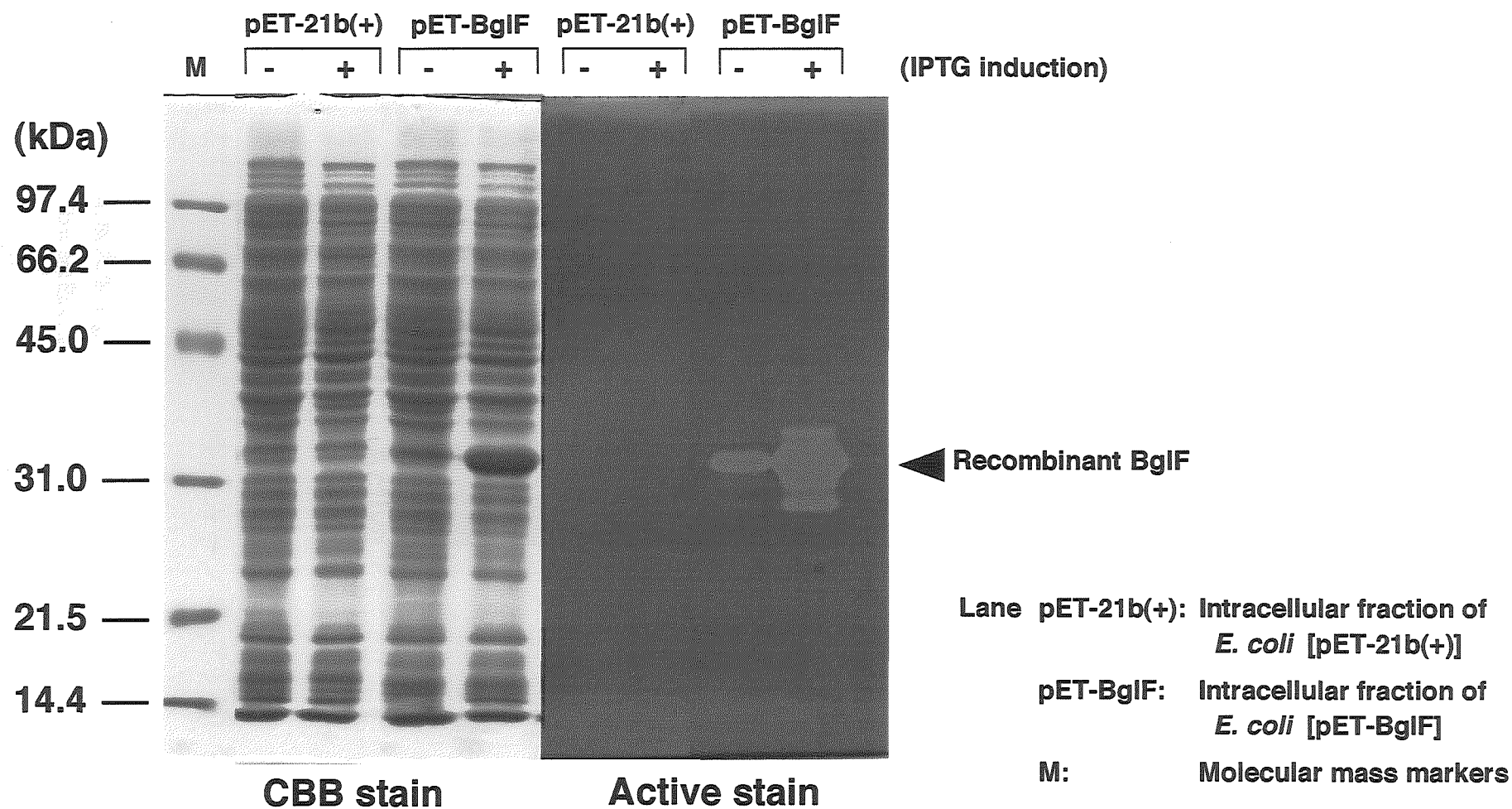


Fig. 4-2 pET-BglF ないし pET-21b(+) を含む大腸菌 BL21(DE3) 株菌体内画分の SDS-PAGE CBB 染色および活性染色を施した。+ および - は IPTG 誘導の有無を示す。

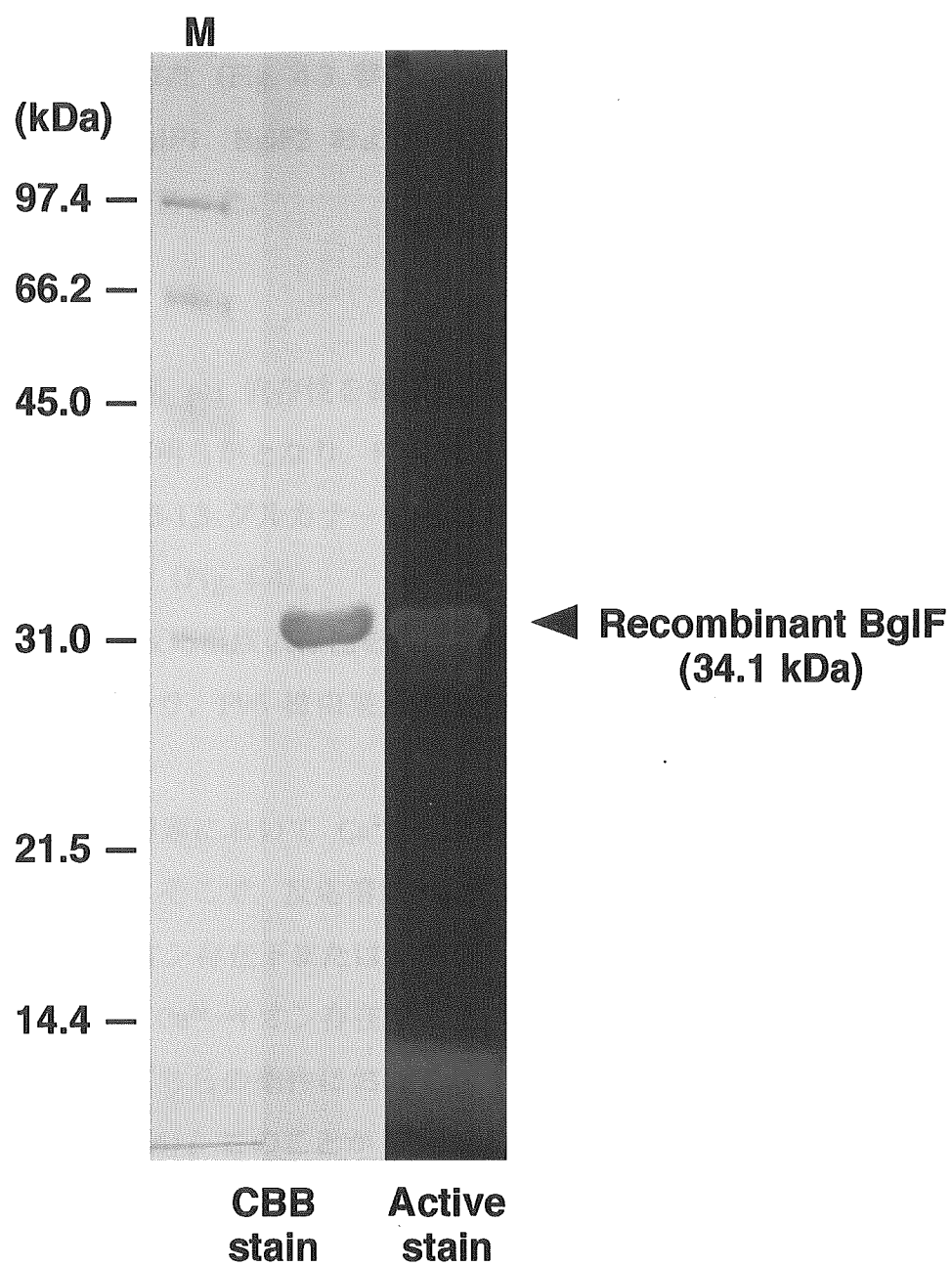


Fig. 4-3 組換え型 BglF 精製標品の SDS-PAGE
CBB 染色および活性染色を施した。M は分子量マーカを表す。

物理化学的性質

SDS-PAGE (CBB 染色および活性染色) により、組換え型 BglF の分子量は約 34,000 と見積もられた (Fig. 4-3 参照)。この値は F96 株由来 β -1,3-グルカナーゼアイソザイム (BglF1、BglF2 および BglF3) のうち、もっとも分子量の大きい BglF1 とほぼ同様であった。

酵素学的性質

37°C における反応 pH 依存性を調べた。組換え型 BglF は pH 7~9 に反応の至適を有することが明らかとなり、F96 株由来天然型 BglF1 と同様 (本論文第 2 章 2-3-4 項参照)、 β -1,3-グルカナーゼとしては珍しく好アルカリ性という性質を示すことがわかった (Fig. 4-4)。

pH 6.0 における反応温度依存性を調べた。その結果、組換え型 BglF の反応至適温度は 70°C であり、F96 株由来天然型 BglF1 と同様な性質を示した (Fig. 4-5)。

多くの多糖分解酵素において Ca^{2+} イオン存在下における温度安定性の向上が報告されている⁵⁶⁾。そこで、反応溶液中に終濃度 10 mM の CaCl_2 または EDTA を添加し、 Ca^{2+} イオン存在下または非存在下における温度安定性を比較することとした。その結果、 Ca^{2+} イオン存在下において 50°C での残存活性の向上が見受けられたものの、どちらの条件においても 70°C においてはほぼ失活することが観察された (Fig. 4-6)。このことから、BglF においては Ca^{2+} イオン存在下における温度安定性の向上はほとんど無いものと考えられた。組換え型 BglF の反応至適温度 (70°C) と温度安定性 (60°C 程度まで安定) との間に逆転が起こっているが、これは、基質存在下において本酵素が安定化されるためと解釈されよう。同様な傾向は、BglF と比較的高い相同性をもつファミリー 16 に属する β -1,3-グルカナーゼ、*Bacillus circulans* IAM1165 株 BglH (本論文第 3 章 3-3-3 項参照) においても観察されている⁶⁾。

反応至適温度や温度安定性を高温域にもつ β -1,3-グルカナーゼが数例知られて

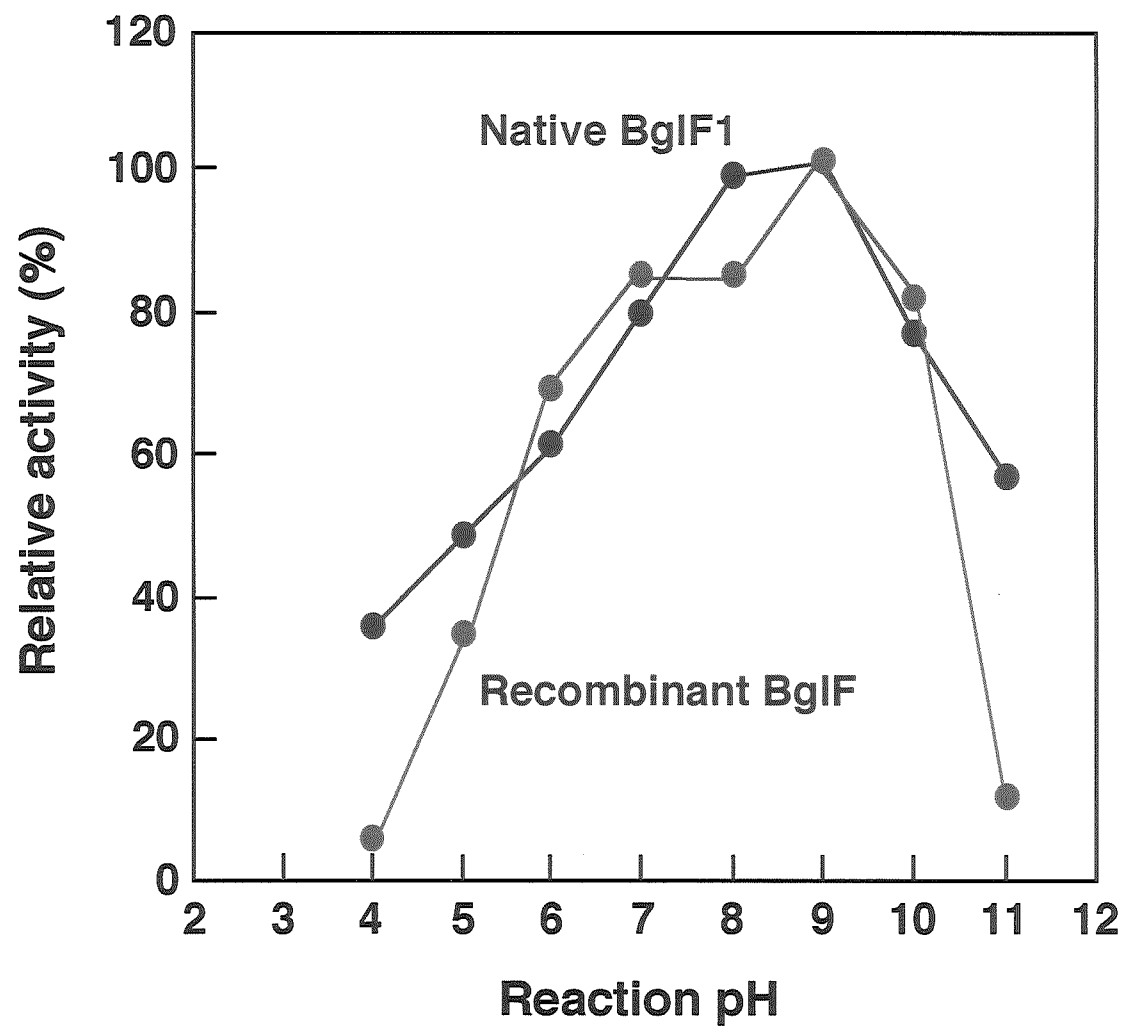


Fig. 4-4

組換え型 BglF および天然型 BglF1 の反応 pH 依存性
反応は 37°C で 15 分間（組換え型 BglF）ないし 30 分間（天然型 BglF1）行った。
pH の調整には Britton-Robinson の緩衝液系を用いた。

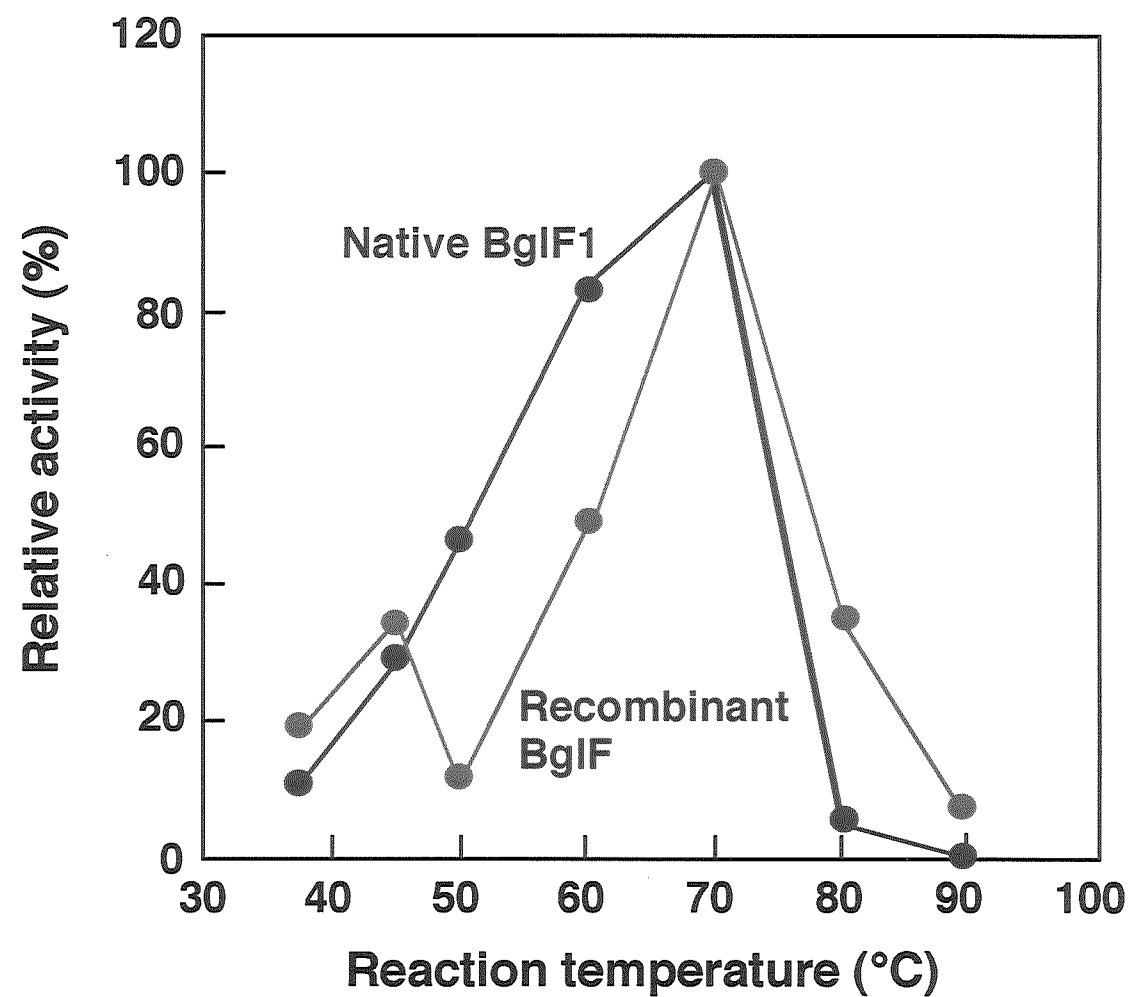


Fig. 4-5 組換え型 BglF および天然型 BglF1 の反応温度依存性
反応は 100 mM NaH_2PO_4 -NaOH 緩衝液 (pH 6.0) 中で、15 分間
(組換え型 BglF) ないし 30 分間 (天然型 BglF1) 行った。

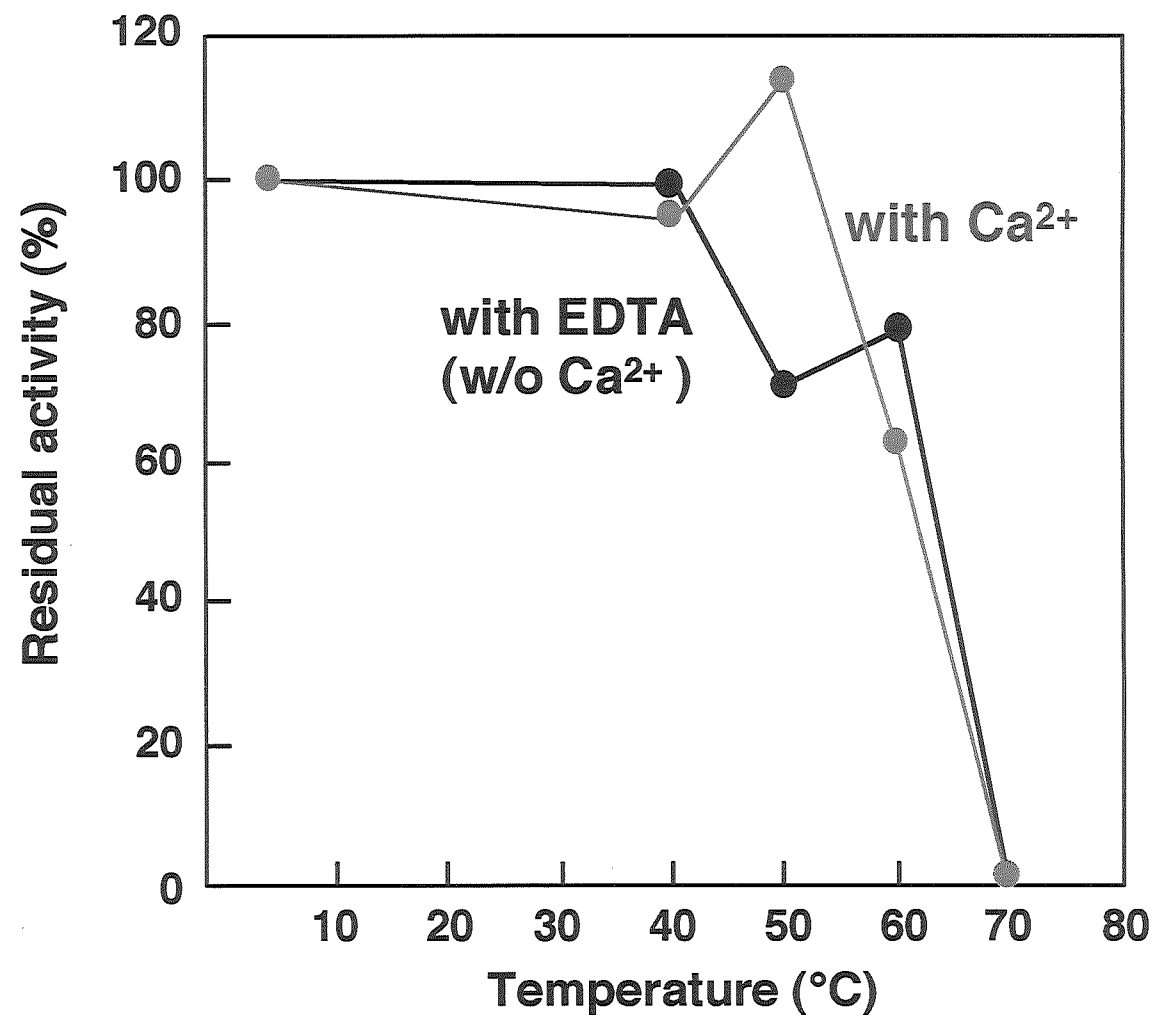


Fig. 4-6 組換え型 BglF の温度安定性に及ぼす Ca^{2+} イオンの影響
 Ca^{2+} イオンは EDTA の添加により除去した。pH の調整には 100 mM NaH_2PO_4 -NaOH 緩衝液 (pH 6.0) を用いた。所定の温度で 10 分間熱処理した後、反応は 37°C、pH 6.0 で 15 分間行った。

いる。*Pyrococcus furiosus* DSM 3638 株 LamA⁷⁾、*Thermotoga neapolitana* LamA^{8,9)}、*Rhodothermus marinus* ITI-378 株 LamR¹⁰⁾ および *Clostridium thermocellum* F7 株 LicA^{11,12)} の反応の至適温度はそれぞれ、100°C~105°C (pH 6.5、対ラミナリン)、95°C (pH 6.2、対大麦 β -グルカン)、80°C (pH 6.5、対ラミナリン) および 60°C (pH 6.5、対大麦 β -グルカン) である。また、これらの酵素は温度安定性も比較的高い。*P. furiosus* LamA は 80°C で 85 時間の熱処理にも耐える。*C. thermocellum* LicA は 65°C で 2 時間の熱処理後も活性を保持している。これらの酵素はすべて好熱菌や超好熱菌由来であり、生育環境に適合した酵素を分泌することは合理的であると考えられる。F96 株は本論文第 1 章に示したように中温菌であり、37°C に生育の至適をもつ。それにもかかわらず、生産する酵素の至適温度は 70°C と高く、このことの生理的意味は現時点では不明である。

ラミナリンは β -1,3 結合のほかに β -1,6 結合による分岐を含むヘテロな β -1,3-グルカンであるのに対し、パキマンは β -1,3 結合のみからなるホモな β -1,3-グルカンである。一方、リケナンは 2~4 個の β -1,4 結合で連なったグルコース残基同志が β -1,3 結合で連結した直鎖状の構造であることが知られており¹³⁻¹⁶⁾、 β -1,4 結合と β -1,3 結合の割合は 2~4:1 といわれている。これらの多糖に対する加水分解活性を測定し、ラミナリンを基質とした際の活性を 100% とする相対活性を Table 4-1 に示した。組換え型 BglF は F96 株由来天然型 BglF1 と同様、可溶性の β -1,3-グルカンのラミナリンおよび不溶性 β -1,3-グルカンのパキマンやカードランに対して高い活性を有していた。また、 β -1,3-1,4-グルカンであるリケナンの分解活性も有しており、当該活性は β -1,3-グルカン分解活性の 8 倍にも及んだ。その一方で、 β -1,4-グルカン分解活性は検出できなかった。一方、BglF と相同性の高い *Cellulosimicrobium cellulans* LLG109 株 BglII および BglIIa (本論文第 3 章 3-3-3 項参照) は、 β -1,3-グルカンであるラミナリン、パキマン、カードランに最も高い分解活性を示すが、 β -1,3-1,4-グルカン分解活性の有無は報じられていない¹⁷⁻²⁰⁾。また、BglF と比較的高い相同性をもつ *B. circulans* IAM1165 株 BglM (本論文第 3 章 3-3-3 項参照) は、 β -1,3-グルカン分解活性よりも β -1,3-1,4-グ

Table 4-1 天然型および組換え型 BglF ならびに各種 β -1,3-グルカナーゼの基質特異性

Glucan (Linkage)	Relative activity (%)			
	Recombinant BglF	Native BglF1	BglM*	LicA**
Laminarin (β -1,3; β -1,6)	100	100	100	100
Pachyman (β -1,3)	69.3	200	14.0	0.154
Curdan (β -1,3)	159	110	79.0	8.46
Lichenan (β -1,3; β -1,4)	851	890	123	692
Avicel (β -1,4)	N.D.***	41	-	-
CM-Cellulose (β -1,4)	N.D.	N.D.	< 5	24.6
Dextran (β -1,6)	N.D.	N.D.	-	-

* 文献¹⁷⁾** 文献¹¹⁾

*** N.D.: Not detected

ルカン分解活性が高いという BglF と類似した基質特異性をもつが、*B. circulans* BglM のラミナリン分解活性に対するリケナン分解活性比は約 1.5 倍であり、BglF の 8 倍には遠く及ばない²¹⁾。さらに、*C. thermocellum* LicA についてもラミナリン分解活性に対するリケナン分解活性の比は約 7 倍と高いが、不溶性 β -1,3-グルカンであるパキマンやカードランに対する分解活性は著しく低い¹²⁾。

ラミナリン、パキマンおよびリケナンを基質とした加水分解反応を行った後、TLC による反応産物の比較・解析を行った。ラミナリンの分解産物としては、1 時間の反応では主に 3 糖が生じ (Fig. 4-7)、さらに一晩の反応を行った場合、2 糖も生じたが、単糖はほとんど観察されなかった。比較的長い反応時間においても、単糖が産生されない現象は、*C. thermocellum* LicA においても見受けられる¹²⁾。一方、不溶性のパキマンを基質とした場合、1 時間の反応で 2 糖や単糖が生じていた。また、リケナンを基質とした場合、1 時間の反応では 3 糖がもっとも多いが、すでに単糖にまで分解していることが観察された。これより、BglF は β -1,3 結合のみならず、リケナンの β -1,4 結合をも切断することが示唆された。

組換え型 BglF を用い、パキマン、カードラン、リケナン、キチンといった不溶性多糖への結合能の評価を行った。その結果、BglF はいずれの不溶性多糖へも結合しなかった (データ示さず)。*B. circulans* BglH はパキマンに結合する性質をもち、基質結合に関与する付加ドメインの存在が知られている⁴⁾ (本論文第 1 章 1-3 節参照)。

BglF が各種不溶性多糖への結合能を示さなかったことは、本酵素が触媒ドメインのみからなるシングルドメイン酵素であるとする結論と矛盾しない (本論文第 3 章 3-3-3 項参照)。

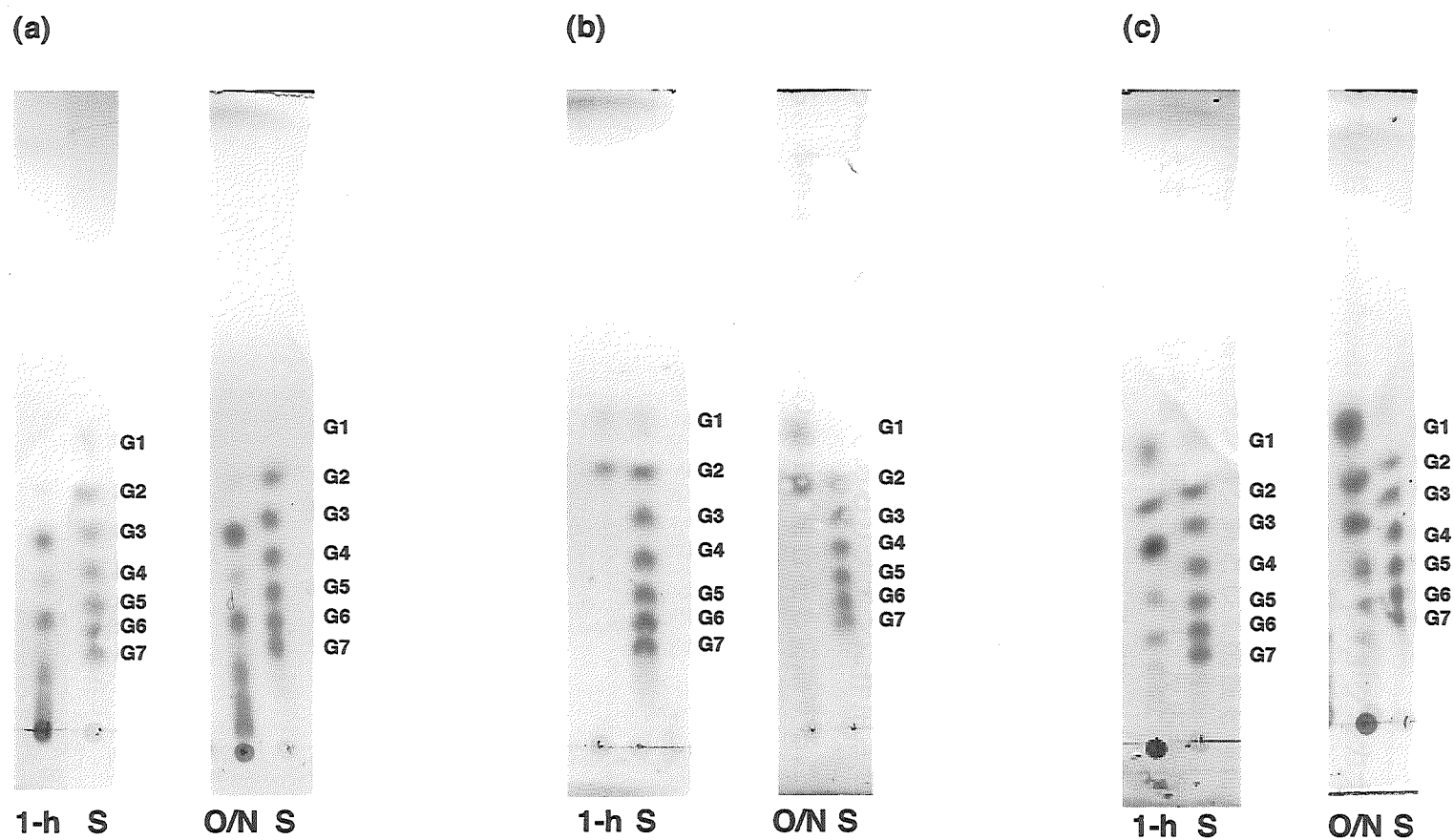


Fig. 4-7

組換え型 BglF による多糖加水分解産物の解析

ラミナリン (a)、パキマン (b) およびリケナン (c) を基質として用い、37°C、pH 6.0 において 1 時間 (1-h) または一晚 (O/N) 加水分解反応を行った。

S: ラミナリオリゴ糖混合物

4-4 結論

好アルカリ性 *Nocardiopsis* sp. F96 株由来 β -1,3-グルカナーゼ (BglF) をコードする *bglF* 遺伝子の成熟タンパク質領域の高発現系を構築した。組換え型 BglF は大腸菌菌体内において可溶性タンパク質として活性を保持した形で多量に生産された。組換え型 BglF の分子量、反応至適 pH、反応至適温度ならびに基質特異性は、F96 株が生産する天然型 BglF1 とほぼ同様であった。また、本酵素は 60°C 程度まで安定であった。組換え型 BglF は可溶性 β -1,3-グルカンのラミナリンよりも不溶性のパキマンを効率的に加水分解した。また、本酵素はラミナリンおよびパキマンの β -1,3 結合を加水分解し、2 糖および 3 糖を生じることがわかった。さらに、 β -1,3-1,4-グルカンであるリケナンに作用させた場合、単糖も生じたことから、本酵素はリケナンの β -1,4 結合をも切断することが示唆された。

4-5 引用文献

- 1) S. Masuda, K. Endo, T. Hayami, T. Fukazawa, R. Yatsunami and S. Nakamura. Cloning and expression of *bglF* gene from alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. strain F96. *Nucleic Acids Res. Suppl.*, **3**, 317-318 (2003).
- 2) S. Masuda, K. Endo, T. Hayami, T. Fukazawa, R. Yatsunami and S. Nakamura. Characterization of β -1,3-glucanases from alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. strain F96. In “*Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation*” (eds. K. Ohmiya, K. Sakka, S. Karita, T. Kimura, M. Sakka and Y. Onishi), Uni Publishers, Tokyo, 2004, pp. 495-500.
- 3) <http://fasta.bioch.virginia.edu/>
- 4) M. Yamamoto, T. Ezure, T. Watanabe, H. Tanaka and R. Aono. C-Terminal domain of β -1,3-glucanase H in *Bacillus circulans* IAM1165 has a role in binding to insoluble β -1,3-glucan. *FEBS Lett.*, **433**, 41-43 (1998).
- 5) T. Keitel, M. Meldgaard and U. Heinemann. Cation binding to a *Bacillus* (1,3-1,4)- β -glucanase. *FEBS Lett.*, **222**, 203-214 (1994).
- 6) 山本 まみ. *Bacillus circulans* IAM1165 株の生産する β -1,3-グルカナーゼに関する研究. 博士論文, 東京工業大学 (2001).
- 7) Y. Gueguen, W. G. Voorhorst, J. van der Oost and W. M. de Vos. Molecular and biochemical characterization of an endo- β -1,3-glucanase of the hyperthermophilic

- Aecheon *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 31258-31264 (1997).
- 8) O. N. Dakhova, N. E. Kurepina, V. V. Zverlov, V. A. Svetlichnyi and G. A. Velikodvorskaya. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Thermotoga neapolitana* genes coding for enzymes of carbohydrate substrate degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**, 1359-1364 (1993).
 - 9) V. V. Zverlov, I. Y. Volkov, T. V. Velikodvorskaya and W. H. Schwarz. Highly thermostable endo-1,3- β -glucanase (laminarinase) LamA from *Thermotoga neapolitana*: nucleotide sequence of the gene and characterization of the recombinant gene product. *Microbiology*, **143**, 1701-1708 (1997).
 - 10) M. Krah, R. Misselwitz, O. Politz, K. K. Thomsen, H. Welfle and R. Borris. The laminarinase from thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*. Conformation, stability, and identification of active site carboxylic residues by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.*, **257**, 101-111 (1998).
 - 11) W. H. Schwarz, S. Schimming and W. L. Staudenbauer. Isolation of a *Clostridium thermocellum* gene encoding a thermostable β -1,3-glucanase (laminarinase). *Biotechnol. Lett.*, **10**, 225-230 (1988).
 - 12) K. P. Fuchs, V.V. Zverlov, G.A. Velikodvorskaya, F Lottspeich, and W. H. Schwarz. Lic16A of *Clostridium thermocellum*, a non-cellulosomal, highly complex endo- β -1,3-glucanase bound to ther outer cell surface. *Microbiology*, **149**, 1021-1031 (2003).
 - 13) A. E. Clarke and B. A. Stone. Chemistry and biochemistry of β -1,3-glucans. *Rev. Pure Appl. Chem.*, **13**, 134-156 (1963).
 - 14) A. Bull and C. G. C. Chesters. The biochemistry of laminarin and the nature of

- laminarinase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **28**, 325-364 (1966).
- 15) W. L. Cuningham and D. J. Manners. Enzymic degradation of lichenin. *Biochem. J.*, **80**, 42-43 (1961).
 - 16) F. A. Parrish, A. S. Perlin and E. T. Reese. Selective enzymolysis of poly- β -D-glucans, and the structure of the polymers. *Can. J. Chem.*, **38**, 2094-2104 (1960).
 - 17) A. M. Ventom and J. A. Asenjo. Characterization of yeast lytic enzymes from *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 71-75 (1991).
 - 18) P. Ferrer, L. Hedegaard, T. Halkier, I. Diers, D. Savva and J. A. Asenjo. Molecular cloning of a lytic beta-1,3-glucanase gene from *Oerskovia xanthineolytica* LLG109. A beta-1,3-glucanase able to selectively permeabilize the yeast cell wall. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **782**, 555-565 (1996).
 - 19) J. Parrado, P. R. Escuredo, F. Conejero-Lara, M. Kotik, C. P. Ponting, J. A. Asenjo and C. M. Dobson. Molecular characterization of a thermoactive beta-1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1296**, 145-151 (1996).
 - 20) P. Ferrer, T. Halkier, L. Hedegaard, D. Savva, I. Diers and J. A. Assenjo., Nucleotide sequence of a β -1,3-glucanase isozyme II_A gene of *Oerskovia xanthineolytica* LL G109 (*Cellulomonas cellulans*) and Initial characterization of the recombinant enzyme expressed in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **178**, 4751-4757 (1996).
 - 21) R. Aono, M. Hammura, M. Yamamoto and T. Asano. Isolation of extracellular 28- and 42-kilodalton β -1,3-glucanases and comparison of three β -1,3-glucanases produced by *Bacillus circulans* IAM1165. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 122-129 (1995).

第 5 章

β -1,3-グルカナーゼのタンパク質工学検討

5-1 緒言

ファミリー 16 に属する多糖分解酵素においては、2 つの酸性アミノ酸残基が関与する触媒機構（リテイニング機構）が提唱されている（本論文第 1 章 1-3 節参照）^{1,2)}。好アルカリ性放線菌 *Nocardiopsis* sp. F96 株 BglF においてもファミリー 16 β -1,3-グルカナーゼの保存配列が認められ、Glu123 および Glu128 が触媒残基である可能性が示唆された（Fig. 3-6 および本論文第 3 章 3-3-3 項参照）。また、*Rhodothermus marinus* 由来ファミリー 16 β -1,3-グルカナーゼである LamR においては、これら 2 つのグルタミン酸の間に位置するアスパラギン酸（BglF の Asp 125 に相当）は触媒残基の働きを補助することが知られている³⁾。セルラーゼ⁴⁾やキシラナーゼ⁵⁾においてはトリプトファンなどの芳香族アミノ酸は基質との相互作用に関与すると考えられている。BglF を含むファミリー 16 β -1,3-グルカナーゼにおいても高く保存されているトリプトファンが数多く見いだされており、これらの基質結合への関与が示唆された（Fig. 3-6 および本論文第 3 章 3-3-3 項参照）。

データベース ProDom⁶⁾検索により、BglF は触媒ドメイン（CatD）のみからなるシングルドメイン酵素であることが示唆された（本論文第 3 章 3-3-3 項参照）。一方、ファミリー 16 に属する β -1,3-グルカナーゼの中には、触媒ドメイン以外の付加ドメインをもつ、マルチドメイン酵素の存在が知られている（本論文第 1 章 1-3 節参照）。例えば、*Bacillus circulans* IAM1165 株が生産する β -1,3-グルカナーゼの BglH は、ファミリー 16 に属する触媒ドメイン以外に、N 末端側および C 末端側に付加ドメイン [それぞれ、NAD (N-Terminal Additional Domain) および CAD (C-Terminal Additional Domain)] を含む⁷⁾（Fig. 5-1）。

本研究では、部位特異的変異導入による触媒残基ならびに基質結合に関与するアミノ酸の特定を試みた。また、*B. circulans* IAM1165 株 BglH の付加ドメインを BglF へ付加したキメラ酵素を調製し、その性質検討を行った。

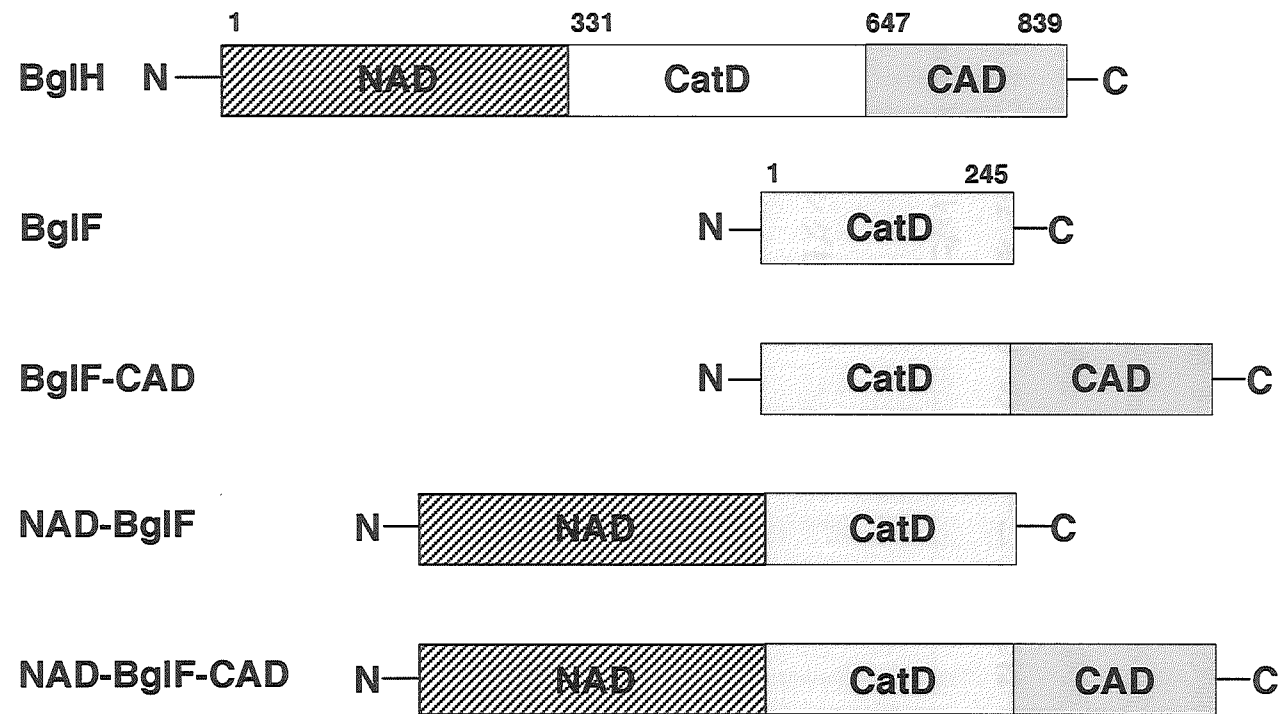


Fig. 5-1 *B. circulans* IAM1165 株 BglH、F96 株 BglF および各種キメラ酵素の構造模式図
 CatD: Catalytic Domain
 NAD: N-Terminal Additional Domain
 CAD: C-Terminal Additional Domain

5-2 実験材料と方法

5-2-1 菌株、プラスミドおよび培地

菌株および培地は本論文第 3 章 3-2-1 項および第 4 章 4-2-1 項に準じた。

pET-BglF は好アルカリ性 *Nocardiopsis* sp. F96 株 *bglF* 遺伝子成熟タンパク質領域高発現型プラスミドである（本論文第 4 章参照）。PCR 産物（後述本章 5-3-1 項および 5-3-2 項参照）のクローニングには pGEM-T Easy Vector System (Promega) を用いた。

5-2-2 クローニング技術

本論文第 3 章 3-2-2 項に準じて行った。

5-2-3 PCR

オリゴヌクレオチドはオペロンから購入し、TE 緩衝液（10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0）に溶解したものを PCR 用プライマーとして用いた。

耐熱性 DNA ポリメラーゼは KOD Dash（東洋紡）を用いた。サーマルサイクラーは iCycler（Bio-Rad）を使用した。

反応液 50 μ l 中には 45 ng の鋳型 DNA、各 10 pmol のプライマー、終濃度 0.2 mM の dNTP、10% (v/v) の 10 $\times$ PCR buffer、1.25 U の KOD Dash が含まれる。

以下に PCR 条件を示す。

プレヒート		94°C	5 分
サイクル (25 回)	ステップ 1	94°C	30 秒
	ステップ 2	61°C	2 秒

	ステップ 3	74°C	30 秒
ポストヒート		74°C	4 分

5-2-4 部位特異的変異導入法

部位特異的変異導入には QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) または、ExSite PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) に準じた方法を用いた。

QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit を用いた方法

オリゴヌクレオチドはオペロンより購入し、TE 緩衝液に溶解したものを変異導入用プライマーとして用いた。反応液 50 μ l 中には約 25 ng の鋳型 DNA、各 125 ng の変異導入用プライマー、終濃度 0.2 mM の dNTP、2.5 U の *PfuTurbo* DNA Polymerase が含まれる。サーマルサイクラーは iCycler (Bio-Rad) を使用した。

以下に PCR 条件を示す。

プレヒート		95°C	30 秒
サイクル (25 回)	ステップ 1	95°C	30 秒
	ステップ 2	55°C	1 分
	ステップ 3	68°C	6 分 11 秒

得られた反応産物に対して制限酵素 *Dpn*I 処理を行い、メチル化を含む鋳型 DNA を消化・除去した後、大腸菌 JM109 株へ導入することで、変異遺伝子を含む形質転換体を得た。目的とする変異が正しく導入されたか否かは塩基配列決定により確認した。

ExSite PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit に準じた方法

オリゴヌクレオチドはオペロンより購入し、TE 緩衝液に溶解した。本論文第 4 章 4-2-3 項に準じてリン酸化を施した後、変異導入プライマーとして用いた。反応液 50 μ l 中には約 40 ng の鋳型 DNA、各 10 pmol の変異導入用プライマー、終濃度 0.2 mM の dNTP、2.5 U の *PfuTurbo* DNA Polymerase が含まれる。サーマルサイクラーは iCycler (Bio-Rad) を使用した。

以下に PCR 条件を示す。

プレヒート		95°C	30 秒
サイクル (16 回)	ステップ 1	95°C	30 秒
	ステップ 2	55°C	1 分
	ステップ 3	68°C	6 分 50 秒

得られた反応産物に対して制限酵素 *Dpn*I 処理を行い、メチル化を含む鋳型 DNA を消化した後、調製用アガロースゲル電気泳動を行い（本論文第 3 章 3-2-2 項参照）、目的の大きさの DNA を回収した。Ligation High Kit（東洋紡）を用いてセルフライゲーションした後、大腸菌 JM109 株へ導入することで、変異遺伝子を含む形質転換体を得た。目的とする変異が正しく導入されたか否かは塩基配列決定により確認した。

5-2-5 塩基配列の決定

本論文第 3 章 3-2-7 項に準じて行った。ただし、ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystems) を用い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) または ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて解析した。

5-2-6 遺伝情報解析および分子モデリング

遺伝子情報解析は本論文第 4 章 4-2-5 項に準じて行った。

分子モデリングには GeneMine/Look Ver. 3.0 プログラム (Molecular Application Group) を使用した。構築した立体構造モデルは RasMol Ver. 2.7.1⁸⁾を用いて表示した。

5-2-7 大腸菌菌体内画分の調製

本論文第 4 章 4-2-6 項に準じて行った。

5-2-8 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動と活性染色

本論文第 2 章 2-2-3 項に準じて行った。

5-2-9 β -1,3-グルカナーゼの活性測定

本論文第 2 章 2-2-5 項に準じて行った。

5-2-10 反応 pH 依存性の測定

本論文第 2 章 2-2-7 項に準じて行った。

5-2-11 反応温度依存性の測定

本論文第 2 章 2-2-8 項に準じて行った。

5-2-12 温度安定性の評価

本論文第 4 章 4-2-13 項に準じて行った。なお、100°C における温度安定性の経時変化を調べる際は、100mM NaH_2PO_4 -NaOH 緩衝液 (pH 6.0) を用い、所定の時間での残存活性を測定した。

5-2-13 薄層クロマトグラフィーによる加水分解産物の解析

本論文第 4 章 4-2-15 項に準じて行った。

5-2-14 不溶性多糖への結合能の評価

本論文第 4 章 4-2-16 項に準じて行った。ただし、不溶性多糖としてはパキマン、カードラン、リケナン、キチン以外に、アビセルおよび CM-セルロースも用いた。

5-3 結果および考察

5-3-1 部位特異的変異導入による触媒残基の同定

5-3-1-1 変異型酵素 E123Q、E128Q および D125N の調製

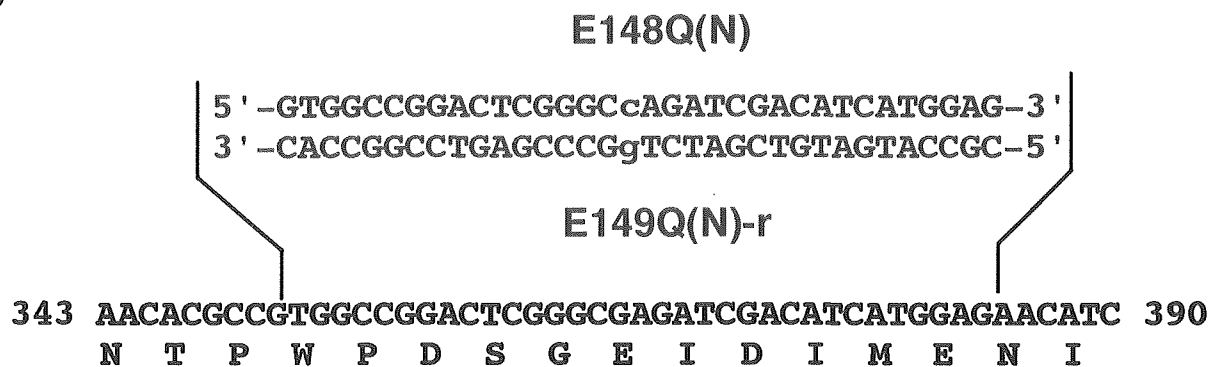
BglF の触媒残基である可能性が示唆された Glu123 および Glu128 をグルタミンに、そして触媒残基の働きを補助すると考えられた Asp125 をアスパラギンに置換した変異型酵素（それぞれ E123Q、E128Q および D125N）を調製し、その性質を調べることにした。

野生型 BglF 成熟タンパク質をコードする高発現型プラスミド pET-BglF を基盤として、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit を用いることで変異導入を行った。Fig. 5-2 に示した 3 組の変異導入プライマーセット E148Q(N)/E148Q-r、E153Q/E153Q-r および D125N/D125N-r を用い、それぞれ発現プラスミド pET-BglF/E123Q（変異型酵素 E123Q をコード）、pET-BglF/E128Q（変異型酵素 E128Q をコード）および pET-BglF/D125N（変異型酵素 D125N をコード）を構築した。各発現型プラスミドを導入した大腸菌 BL21(DE3) 株の培養を行い、イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) による発現誘導を施した。変異型酵素の性質検討には大腸菌菌体内画分をそのまま用いることとした。

5-3-1-2 変異型酵素 E123Q、E128Q および D125N の性質検討

変異型酵素 E123Q および E128Q を含む大腸菌菌体内画分について SDS-PAGE を行った。CBB 染色の結果、野生型 BglF と同様、分子量 34,000 付近に変異型酵素と思われるタンパク質バンドが観察された (Fig. 5-3)。E123Q および E128Q が可溶性タンパク質として生産されていることから、変異導入による構造

(a)



(b)



(c)

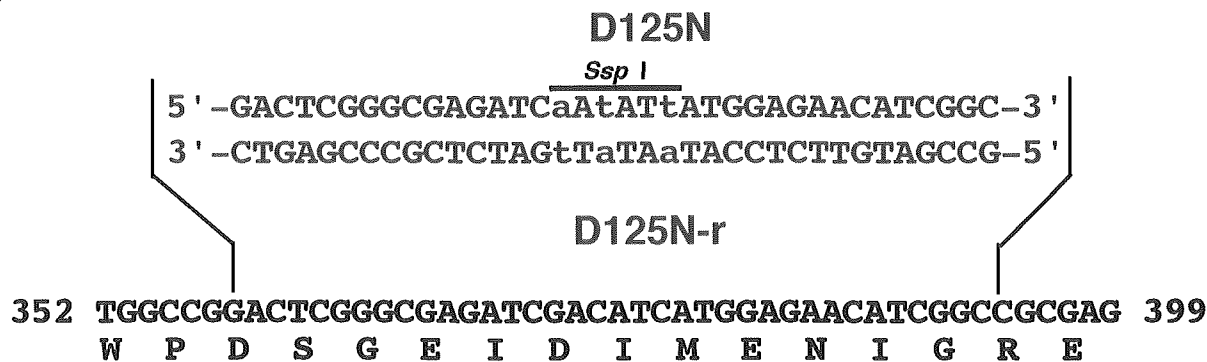


Fig. 5-2 触媒残基に関与する残基の特定に用いたプライマーセットの塩基配列
 (a) E123Q 構築用プライマーセット E148Q(N)/E148Q(N)-r
 (b) E128Q 構築用プライマーセット E153Q/E153Q-r
 (c) D125N 構築用プライマーセット D125N/D125N-r
 変異導入箇所は小文字で示した。D125N /D125N-r には制限酵素 *Ssp I* 認識配列が含まれている。

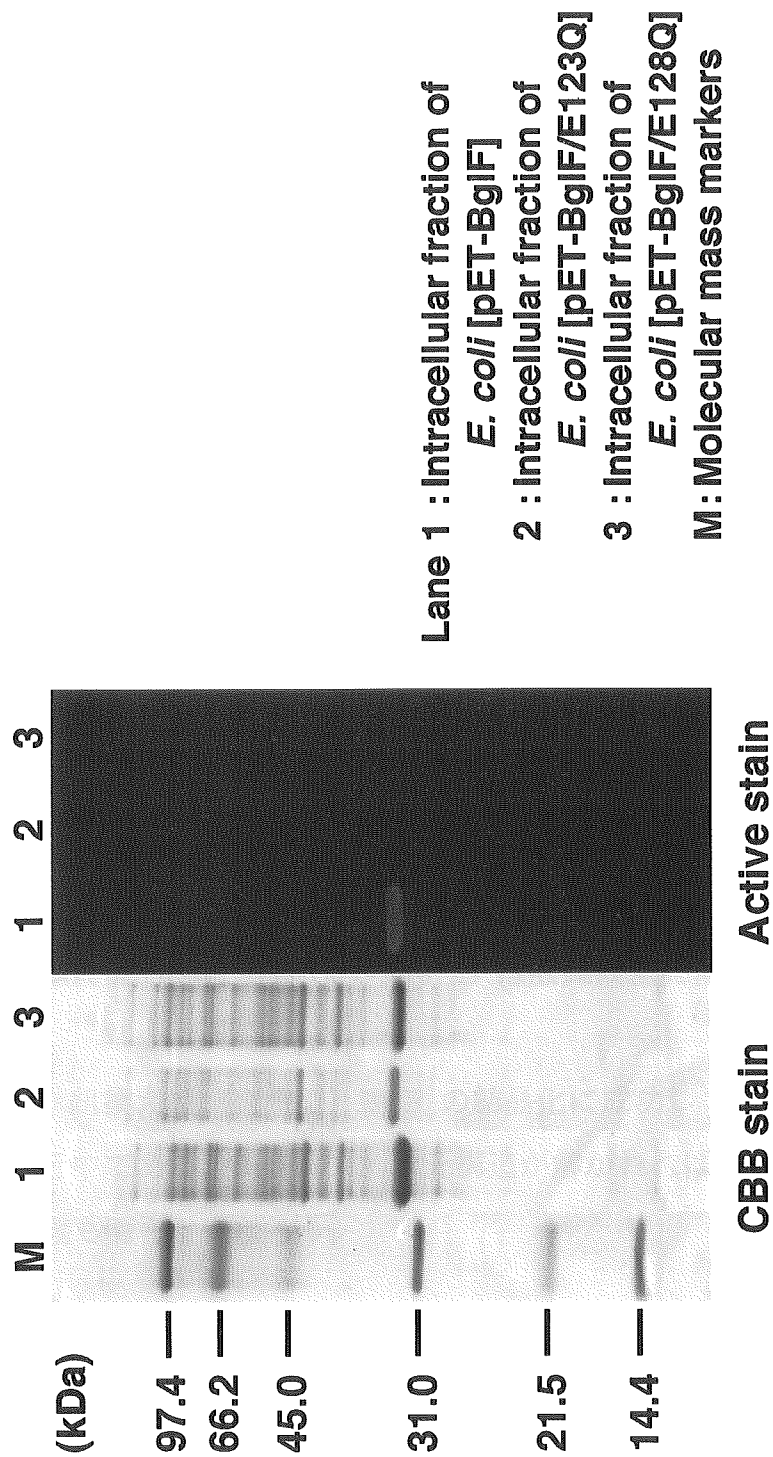


Fig. 5-3 変異型酵素 E123Q および E128Q を含む大腸菌菌体内画分の SDS-PAGE CBB 染色および活性染色を施した。

の大きな変化は無いと考えられた。また、E123Q および E128Q についてラミナリン含有ゲルを用いた SDS-PAGE を行ったが、活性染色において陽性バンドは検出されなかった (Fig. 5-3 参照)。また、ラミナリンを基質としたジニトロサリチル酸 (DNS) 法による活性測定においても、E123Q および E128Q の β -1,3-グルカナーゼ活性は検出されなかった (データ示さず)。Glu123 および Glu128 のグルタミンへの置換により著しく活性が損なわれたことから、これら 2 つのグルタミン酸は BglF の触媒残基であることが強く示唆された。Fig. 5-4 に、*Paenibacillus macerans* 由来 ファミリー 16 β -1,3-1,4-グルカナーゼ Bgi の立体構造 (PDB コード: 1BYH)^{9,10}を示す。ファミリー 16 β -1,3-グルカナーゼでは 3 次元構造が決定された例はないため、ここでは BglF と比較的相同性の高い (29.4 %) Bgi の構造を参照することとした。本モデルにおいて、Glu123 および Glu128 はクレフト内部に互いに向かい合って存在しており、これらの 2 つの酸性アミノ酸は触媒残基として機能しうる位置に存在している。D125N についても DNS 法による活性測定において β -1,3-グルカナーゼ活性は検出されなかった (データ示さず)。

BglF の分子モデルにおいて Asp125 は 2 つの触媒残基の極近傍に位置しており (Fig. 5-4 参照)、BglF においても Asp125 は触媒残基を補助している可能性が考えられた。

最近になって、組換え型 (野生型) BglF の結晶化に成功し¹¹⁾、現在は X 線結晶構造解析が進行中である。BglF の 3 次元構造が解かれれば、BglF の反応機構や Asp125 の意義も明らかとなろう。

5-3-2 部位特異的変位導入による基質結合に関与するアミノ酸残基の同定

5-3-2-1 変異型酵素 W118A および W220A の調製

BglF を含む種々のファミリー 16 β -1,3-グルカナーゼに高く保存されている

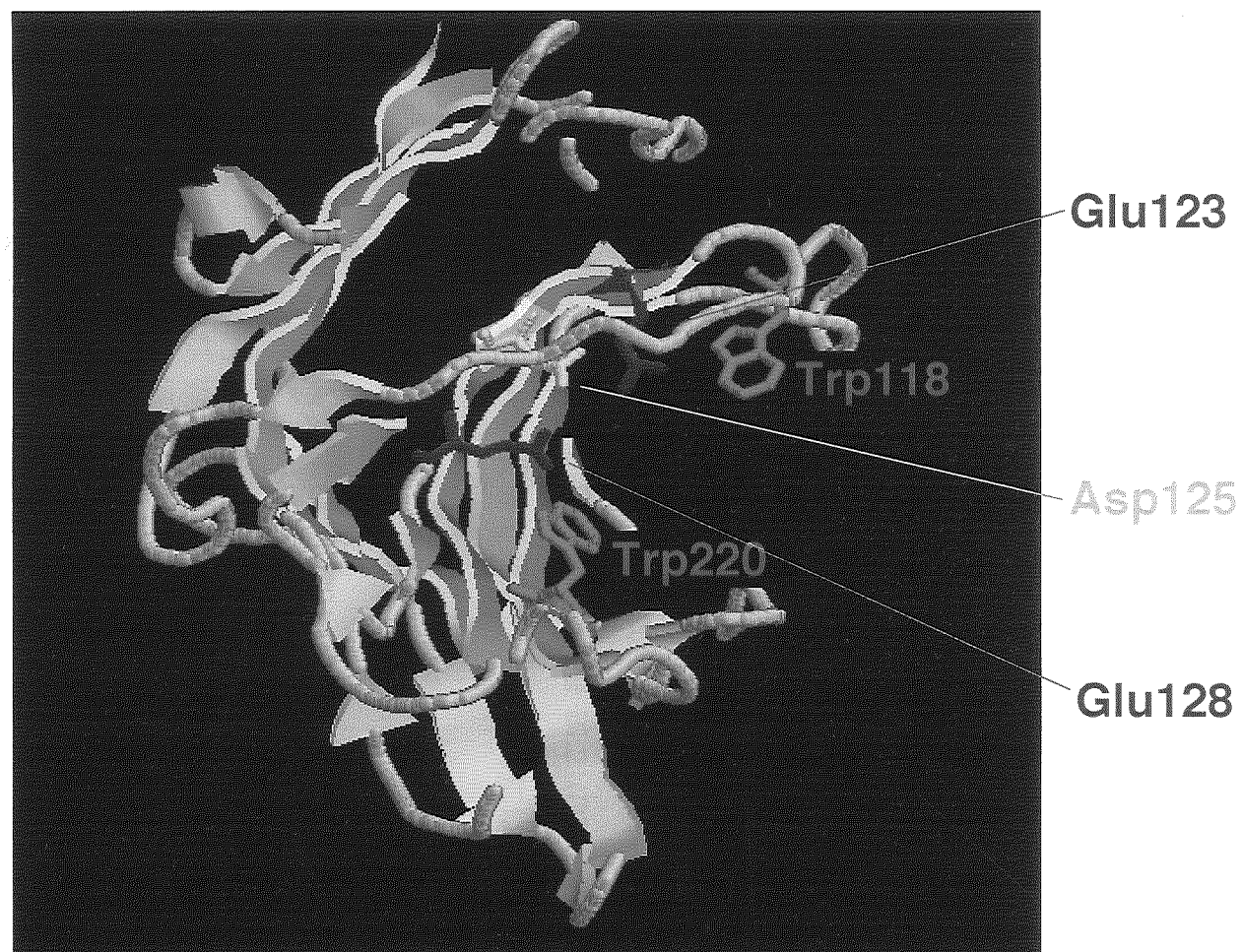


Fig. 5-4

組換え型 BglF の立体構造モデル

P. macerance 由来ファミリー 16 β -1,3-1,4-グルカナーゼ Bgi の立体構造 (PDB コード: 1BYH) を参考にして GeneMine/Look Ver. 3.0 プログラムを用いて構築した。構築した立体構造モデルは RasMol Ver. 2.7.1 を用いて表示した。

芳香族アミノ酸のうち基質結合に関与すると思われるトリプトファンにアミノ酸置換を導入することとした。しかしながら、1 次構造上の比較だけでは基質と結合に関与しうるトリプトファンの推定には至らないため、BglF の分子モデル上での位置を参照した。ファミリー 16 β -1,3-グルカナーゼにおいて高く保存されているトリプトファンのうち、Trp118 および Trp220 は、クレフト内部、2 つの触媒残基の近傍に位置しており、基質結合への関与が示唆された。そこで、これらのトリプトファンをアラニンに置換した変異体（それぞれ、W118A、W220A）を調製し、その性質を調べることにした。

野生型 BglF 成熟タンパク質をコードする高発現型プラスミド pET-BglF を基盤として、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit を用いることで変異導入を行った。Fig. 5-5 に示した 2 組の変異導入プライマーセット W118A/W118A-r および W220A/W220A-r を用い、それぞれ発現プラスミド pET-BglF/W118A（変異型酵素 W118A をコード）および pET-BglF/W220A（変異型酵素 W220A をコード）を構築した。各発現型プラスミドを導入した大腸菌 BL21(DE3) 株の培養を行い、IPTG による発現誘導を施した。変異型酵素の性質検討には大腸菌菌体内画分をそのまま用いることにした。

5-3-2-2 変異型酵素 W118A および W220A の性質検討

変異型酵素 W118Q および W220Q を含む大腸菌菌体内画分について SDS-PAGE を行った。CBB 染色の結果、野生型 BglF と同様、分子量 34,000 付近に変異型酵素と思われるタンパク質バンドが観察された (Fig. 5-6)。W118A および W220A が可溶性タンパク質として生産されていることから、変異導入による構造の大きな変化は無いと考えられた。ラミナリン含有ゲルを用いた SDS-PAGE を行った後、活性染色を施したところ、W118A では野生型 BglF に比してラミナリン分解活性が低下していることがわかった。(Fig. 5-6 参照)。次に、ラミナリン、パキマンおよびリケナンを基質とした加水分解を薄層クロマトグラフィー (TLC) に

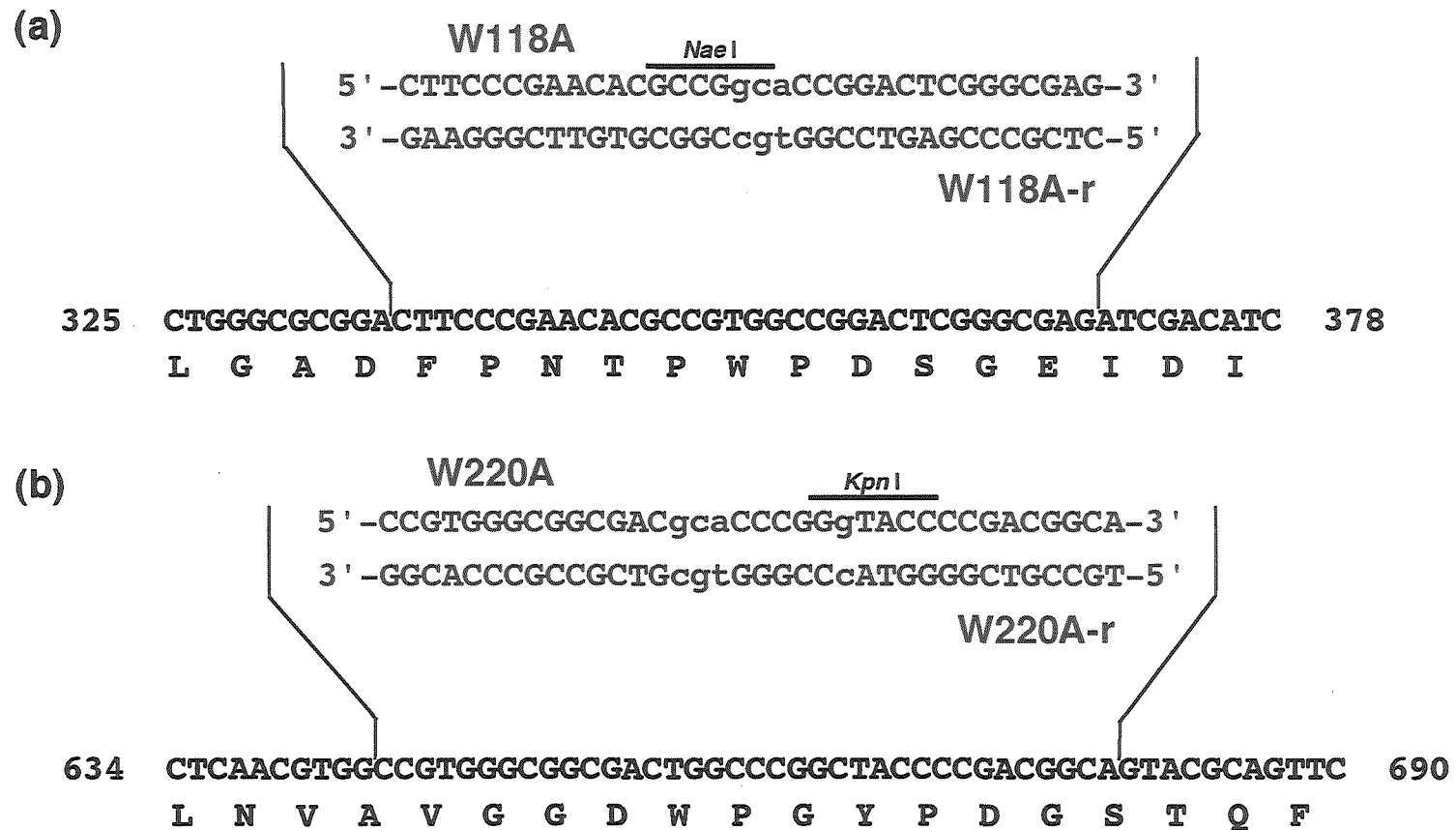


Fig. 5-5 基質結合に関与するアミノ酸残基の特定に用いたプライマーセットの塩基配列

(a) W118A 構築用プライマーセット W118A/W118A-r

(b) W220A 構築用プライマーセット W220A/W220A-r

変異導入箇所は小文字で示した。W118A/W118A-r には制限酵素 *Nae I* 認識配列が、W220A/W220A-r には制限酵素 *Kpn I* 認識配列が含まれている。

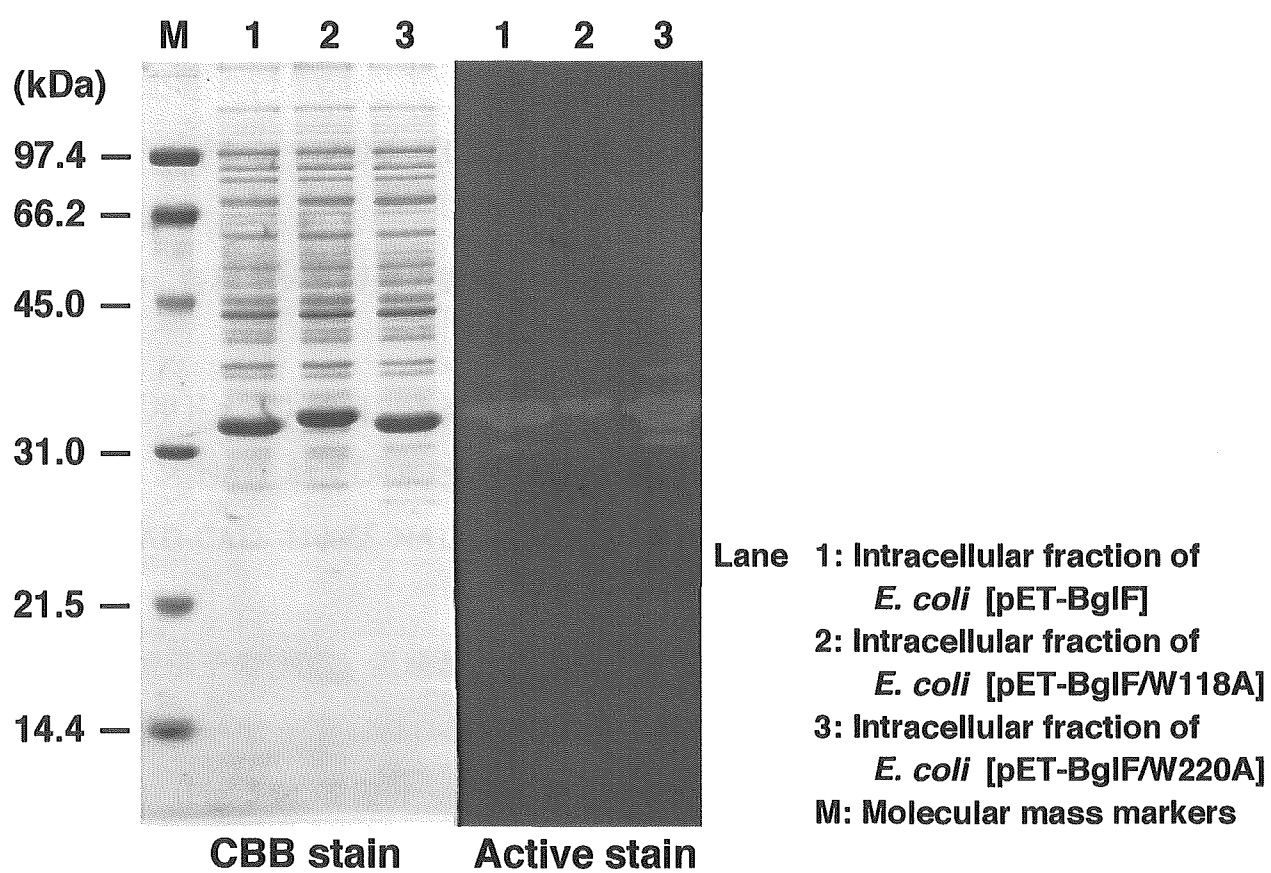


Fig. 5-6 変異型酵素 W118A および W220A を含む大腸菌菌体内画分の SDS-PAGE CBB 染色および活性染色を施した。

よる解析を行った。その結果、W118A を用いた場合には、加水分解産物の検出には至らなかった (Fig. 5-7)。一方、W220A の場合、ラミナリンやパキマンに対する加水分解産物は野生型 BglF と変わりなかったが、リケナンに対する分解活性がやや劣ることが明らかとなった。

以上より、ファミリー 16 β -1,3-グルカナーゼにおいて高く保存されている芳香族アミノ酸のうち、BglF の Trp118 および Trp220 はなんらかの形で基質結合に関与していることが示唆された。BglF において基質結合に関与するアミノ酸残基は Trp118 および Trp220 以外にも多数存在すると考えられ、BglF の 3 次元構造の解明が待たれる。

5-3-3 ドメインシャフリングによる BglF キメラ酵素の調製と性質検討

5-3-3-1 各種キメラ酵素の調製

シングルドメイン酵素である BglF に *B. circulans* IAM1165 株 BglH 由来の付加ドメイン NAD および/または CAD を融合したキメラ酵素（それぞれ、NAD-BglF、NAD-CAD および NAD-BglF-CAD）を調製し、その性質を調べることにした。

bglH 遺伝子の NAD 領域および CAD 領域の PCR 増幅を目的として、2 組のプライマーセット NAD-S-32/NAD-A-1 (Fig. 5-8) および H-S-bam-1/H-A-bamstop-1 (Fig. 5-9) を設計・調製した。pBG200 を鋳型する PCR を行うことで、*bglH* 遺伝子 NAD 領域および CAD 領域は、それぞれ両端に *Nde* I 認識配列 (NAD 領域) および *Bam*HI 認識配列 (CAD 領域) が付与される。PCR 産物を調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた結果、NAD 領域 (約 1000 bp) および CAD 領域 (約 580 bp) に対応すると思われる DNA 断片の増幅が確認された。目的物以外の DNA バンドも観察されたため、それぞれ目的物の大きさに対応する DNA 断片のみをゲルより回収した。

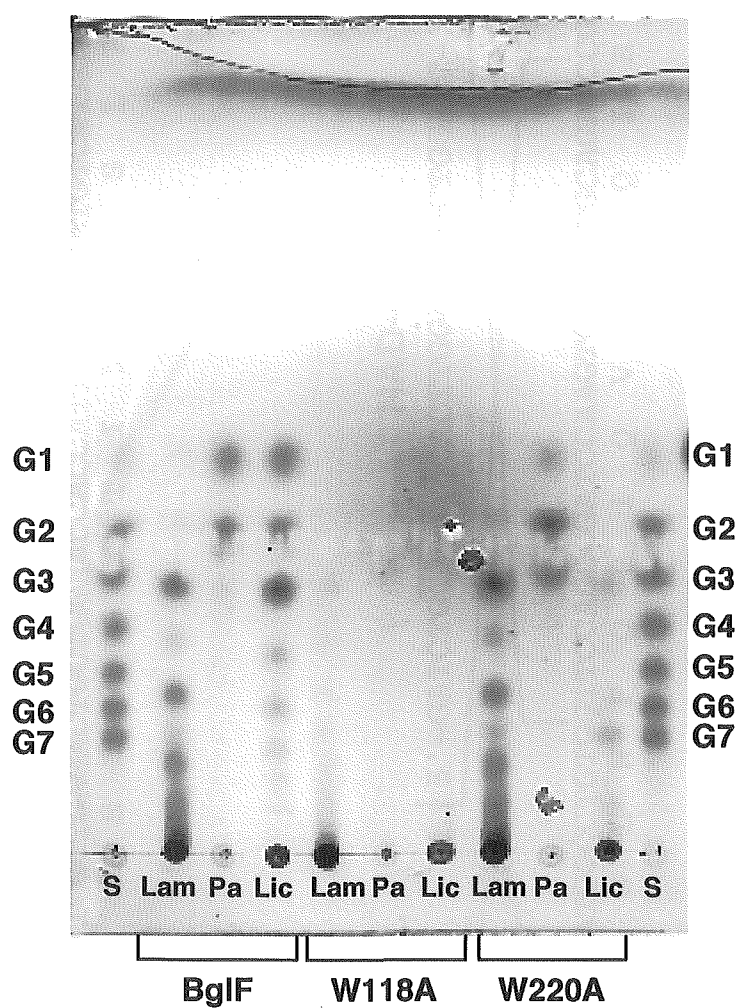
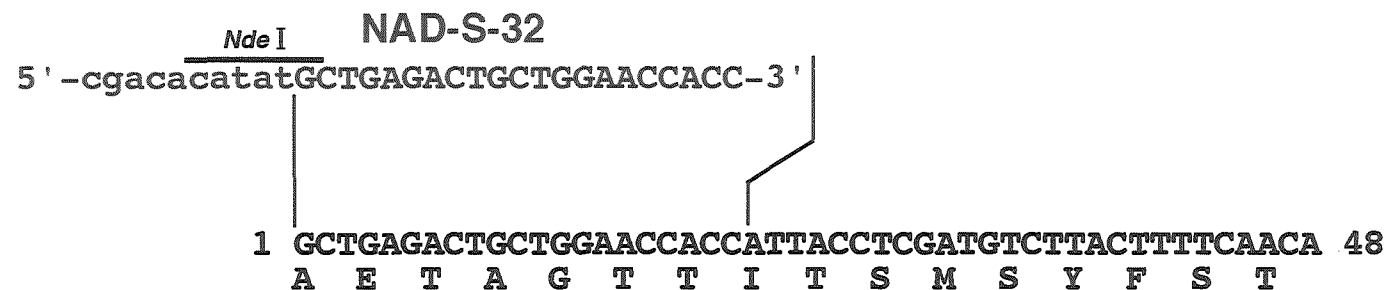


Fig. 5-7 変異型酵素 W118A および W220A による多糖加水分解産物の解析
 ラミナリン (Lam)、パキマン (Pa) およびリケナン (Lic) を
 基質として用い、37°C、pH 6.0 において 30 分間反応を行った。
 S: ラミナリオリゴ糖混合物

(a)



(b)

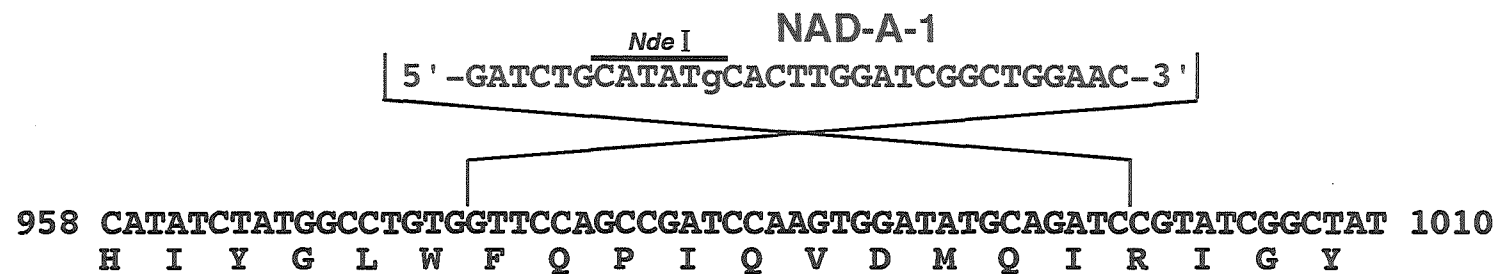


Fig. 5-8

B. circulans IAM1165 株 *bglH* 遺伝子 NAD 領域 PCR 用プライマーの塩基配列

センスプライマー NAD-S-32 (a) およびアンチセンスプライマー NAD-A-1 (b) の塩基配列を示した。

鋳型 DNA 配列中の数字は *bglH* 遺伝子成熟タンパク質領域の塩基番号に対応する。Nde I 認識配列を太線で、そして変異導入部分は小文字で示した。

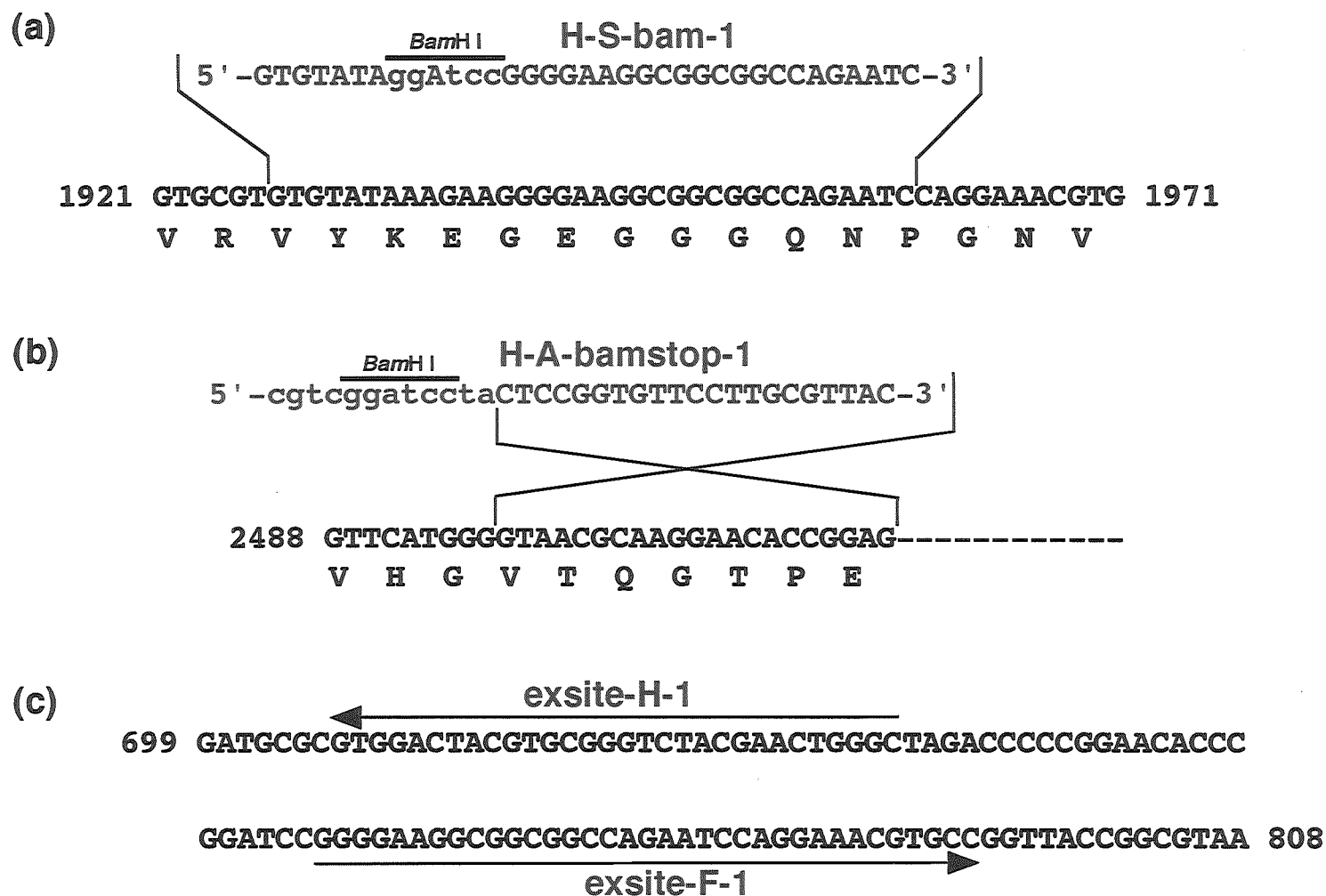


Fig. 5-9 *B. circulans* IAM1165 株 *bglH* 遺伝子 CAD 領域 PCR 増幅用プライマーの塩基配列
 センスプライマー H-S-bam-1 (a)、アンチセンスプライマー H-A-bamstop-1 (b)、
 ならびにセンスプライマー exsite-H-1 およびアンチセンスプライマー exsite-F-1 の
 アニールング位置 (c) を示した。BamHI 認識配列を太線で示した。

NAD 領域の DNA 断片をベクタープラスミド pGEM-T Easy Vector に挿入した後、大腸菌 JM109 株に形質転換し、目的の NAD 領域を含む組換えプラスミド pGEM-NAD を取得した。pGEM-NAD を *Nde* I で切断した後、調製用アガロースゲル電気泳動を行い、NAD 領域をコードする DNA 断片を回収した。得られた DNA 断片を *Nde* I 処理した pET-BglF の *bglF* 遺伝子上流に挿入し、発現型プラスミド pET-NAD-BglF を構築した。

一方、CAD 領域の DNA 断片は *Bam*H I 処理を行った後、調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて CAD 領域をコードする DNA 断片を回収し、*Bam*H I 処理した pET-BglF の *bglF* 遺伝子下流に挿入することで、pET-BglF-stop-CAD を構築した。pET-BglF-stop-CAD においては、*bglF* 遺伝子と CAD 領域との間に終止コドンが存在するため、このままの遺伝子産物は野生型 BglF となってしまう。そこで、ExSite PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit の方法に準じ、プライマー exsite-H-1 および exsite-F-1 (Fig. 5-9 参照) を用いた PCR により終止コドンを欠失させることで、発現型プラスミド pET-BglF-CAD を得た。

さらに、pET-NAD-BglF-CAD の構築を試みた。すなわち、pGEM-NAD を *Nde* I 処理して得た NAD 領域を、同制限酵素処理を施された pET-BglF-CAD の *bglF-cad* 遺伝子領域上流に挿入し、NAD-BglF-CAD をコードする発現型プラスミド pET-NAD-BglF-CAD を得た。

各発現型プラスミドを導入した大腸菌 BL21(DE3) 株の培養を行い、IPTG による発現誘導を施した。変異型酵素の性質検討には大腸菌菌体内画分をそのまま用いることとした。

5-3-3-2 各種キメラ酵素の性質検討

各発現型プラスミドを含む菌体内画分を SDS-PAGE にかけた後、CBB 染色を行った。その結果、pET-BglF-CAD を含む大腸菌菌体内画分にのみ、BglF-CAD と思われるタンパク質バンドが検出された (Fig. 5-10)。分子量マーカーとの比較が

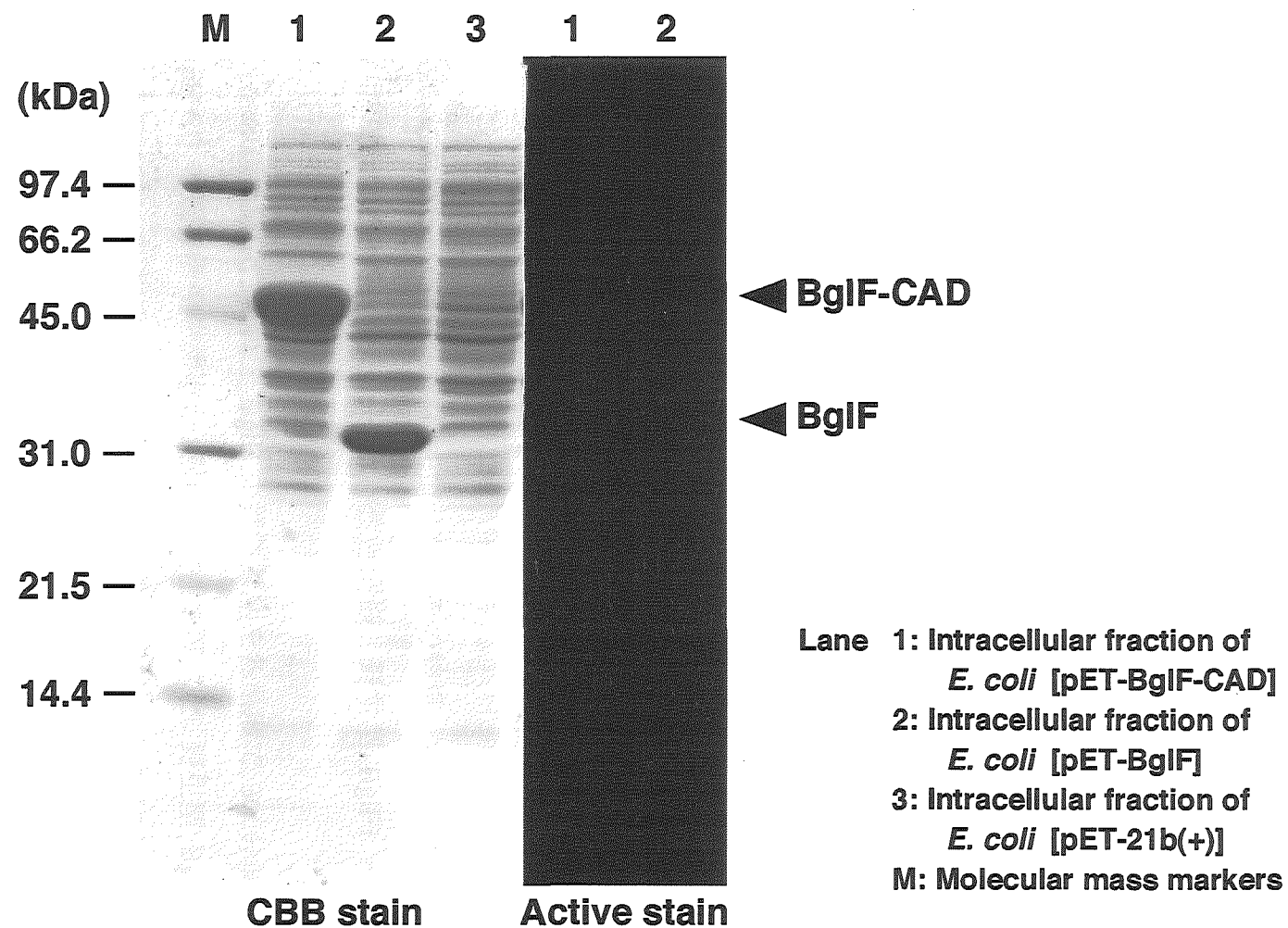


Fig. 5-10 キメラ酵素 BglF-CAD を含む大腸菌菌体内画分の SDS-PAGE
CBB 染色および活性染色を施した。

ら、BglF-CAD の分子量は約 52,700 と決定され、アミノ酸配列から類推される分子量 (49,818) とほぼ一致した。一方、pET-NAD-BglF および pET-NAD-BglF-CAD を含む大腸菌に関しては、可溶性の菌体内画分だけでなく、不溶性画分においても目的のタンパク質バンドが検出されず (データ示さず)、これらのキメラ酵素は大腸菌において発現しなかったことがわかった*。

pET-BglF-CAD を含む大腸菌菌体内画分をラミナリン含有ゲルを用いた SDS-PAGE にかけた後、活性染色を行った結果、分子量約 52,700 から 34,000 にかけてスメアーな陽性バンドが検出された (Fig. 5-10 参照)。このことから、BglF-CAD においては、C 末端に付加した CAD 領域が、部分的にプロテオリシスを受けている可能性が示唆された。

BglF-CAD の酵素学的性質

BglF-CAD を含む大腸菌可溶性菌体内画分を用いて性質検討を行った。

37°C における反応 pH 依存性を調べたところ、BglF-CAD は pH 7~9 に反応の至適を有することが明らかとなり、野生型 BglF とほぼ同様な性質を示すことがわかった (Fig. 5-11)。

pH 6.0 における反応温度依存性を調べた。その結果、本組換え型酵素の反応至適温度は 70°C であり、反応 pH 依存性と同様、野生型 BglF1 と同様な性質を示した (Fig. 5-12)。

pH 6.0 の緩衝液中において BglF 未精製標品を各温度で 30 分間熱処理した後、37°C、pH 6.0 で残存活性を測定し、温度安定性を調べた。野生型 BglF は 50°C までの熱処理に対してはほぼ 100% の活性を保持したが、70°C においては残存活性は 10% 以下にまで低下した (Fig. 5-13)。これに対し、BglF-CAD は 60°C での熱処理に対してはほぼ 100% の活性を保持し、70°C および 80°C における熱処理においても約 40~50% の残存活性を示した。次に、100°C での熱処理に対する残存活性の経時変化を調べることにした。その結果、5 分間の熱処理で野生型 BglF の活性は 10% にまで低下するのに対し、BglF-CAD は 70% の残存活性を

* 後の検討により、宿主保存菌株に問題があることが判明した。宿主を替えることにより、目的のキメラ酵素 (NAD-BglF および NAD-BglF-CAD) の発現が認められた。

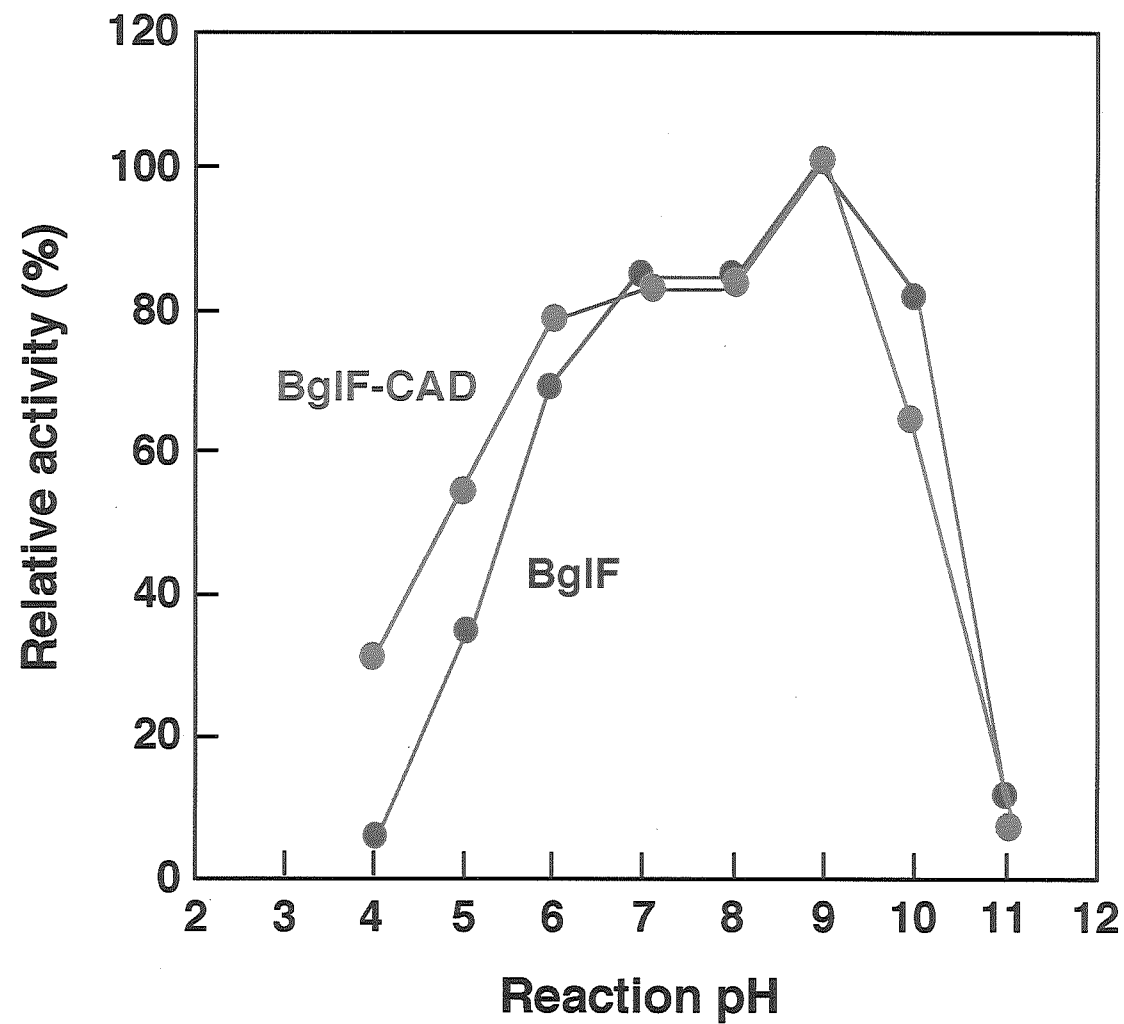


Fig. 5-11

キメラタンパク質 BglF-CAD および野生型 BglF の反応 pH 依存性

反応は 37°C で 15 分間行い、pH の調整には Britton-Robinson の緩衝液系を用いた。

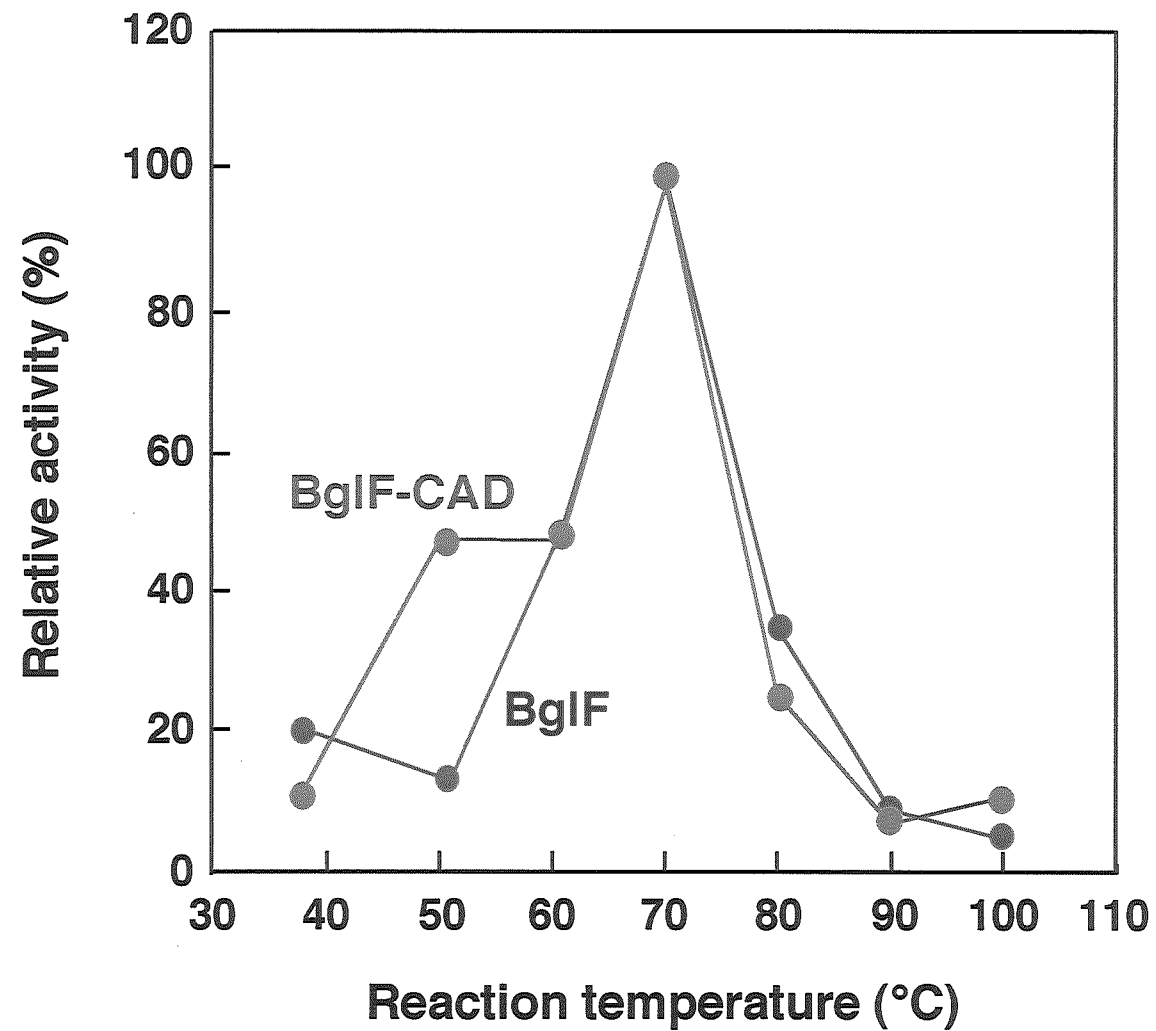


Fig. 5-12

キメラタンパク質 BglF-CAD の反応温度依存性

反応は 37°C で 15 分間行い、pH の調整には 100 mM NaH_2PO_4 -NaOH 緩衝液 (pH 6.0) を用いた。

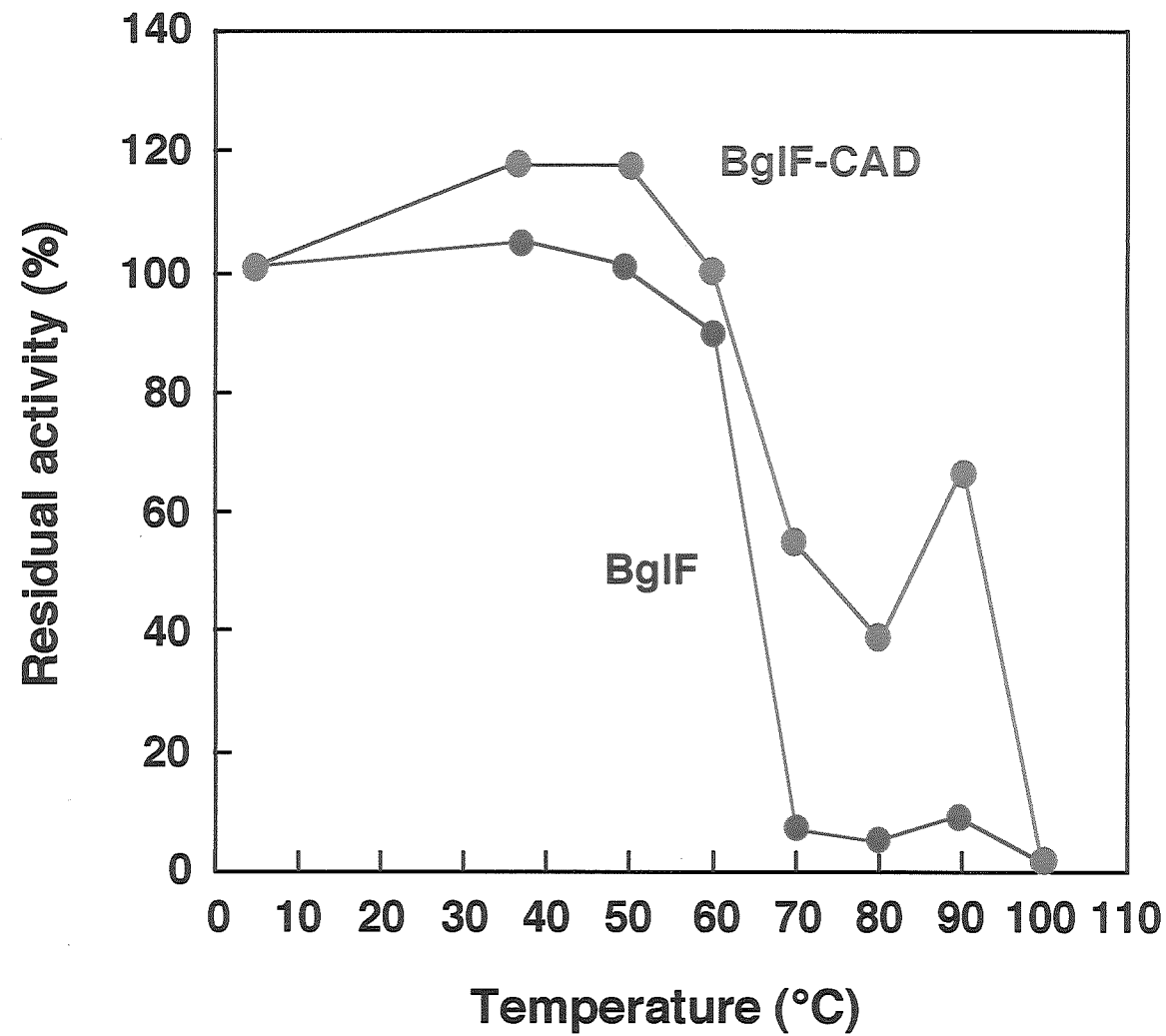


Fig. 5-13 キメラタンパク質 BglF-CAD および野生型 BglF の温度安定性
pH の調整には 100 mM NaH_2PO_4 -NaOH 緩衝液 (pH 6.0) を用いた。所定の温度で 30 分間熱処理した後、反応は 37°C、pH 6.0 で 15 分間行った。

示した (Fig. 5-14)。これらのことから、CAD 領域の付加により、BglF の温度安定性が向上したことが明らかとなり、CAD は熱安定化に関与することが示唆された。一方、もともと CAD 領域を含む *B. circulans* 由来 BglH は、CAD 領域を欠失しても温度安定性はほとんど変化しない⁷⁾。CAD 領域の付加により、なぜ BglF の温度安定性が向上したかについては今後詳細に解析する必要がある。

BglF-CAD の不溶性多糖への結合能の評価を行った。その結果、BglF-CAD はパキマン、カードラン、リケナン、アビセルおよびキチンに対しそれぞれ 68%、37%、26%、36% および 26% 結合能を示した (Table. 5-1)。野生型 BglF においては、これらの不溶性多糖への結合能は認められておらず (本論文第 4 章 4-3-3 項参照)、CAD 領域は BglF に不溶性多糖への結合能を付与したことが明らかとなった。そこで、BglF-CAD の各種多糖に対する加水分解活性を調べることにした。

ラミナリン、パキマン、アビセルおよび CM-セルロースを基質とした加水分解反応の後、TLC による分解産物の解析を行った。その結果、BglF-CAD は野生型 BglF と同様、アビセルおよび CM-セルロースに対する分解活性を示さなかった (データ示さず)。また、可溶性多糖のラミナリンやパキマンの分解産物に関しても両酵素間での違いは認められなかった。

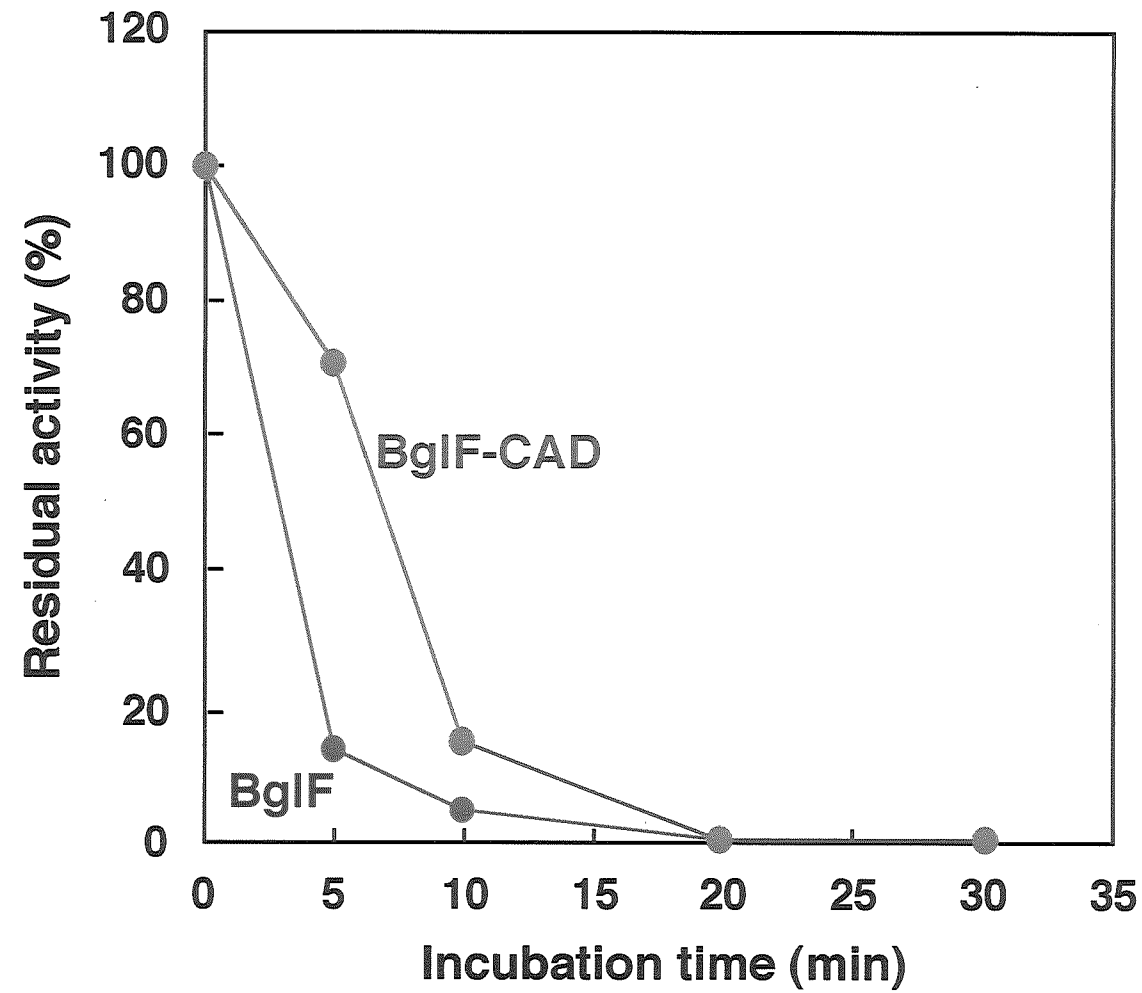


Fig. 5-14 BglF-CAD の 100°C での熱処理に対する残存活性の経時変化
pH の調整には 100 mM NaH_2PO_4 -NaOH 緩衝液 (pH 6.0) を用いた。
100°C で熱処理した後、37°C、pH 6.0 で 15 分間反応を行った。

Table 5-1 キメラ酵素 BglF-CAD の不溶性多糖への結合能

Glucan (Linkage)	Binding rate (%)	
	BglF-CAD	BglF
Pachyman (β-1,3)	68	N.D.
Curdlan (β-1,3)	37	N.D.
Lichenan (β-1,3; β-1,4)	26	N.D.
Avicel (β-1,4)	36	N.D.
Chitin* (β-1,4)	26	N.D.

* β -1,4-Poly-*N*-acetyl-D-glucosamine

5-4 結論

部位特異的変異導入により変異型酵素を調製し、野生型酵素との性質比較を行った。その結果、BglF の触媒残基は Glu123 および Glu128 であり、Asp125 は触媒残基を補助する役割を担うことが考えられた。また、Trp118 および Trp220 は基質結合になんらかの形で関与していることが示唆された。

B. circulans IAM1165 株由来 BglH の C 末端に存在する付加ドメイン (CAD) を BglF に付加したキメラ酵素 BglF-CAD を調製した。大腸菌が生産した BglF-CAD の反応至適 pH および反応至適温度は野生型 BglF とほぼ同様であったが、BglF-CAD は野生型 BglF に比して高い温度安定性を示した。また、BglF-CAD においては不溶性多糖への結合能が向上していた。

5-5 引用文献

- 1) M. L. Sinnott. Catalytic mechanisms of enzymic glycoside transfer. *Chem. Rev.*, **90**, 1170-1202 (1991).
- 2) J. D. McCarter and S. G. Withers. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Op. Struct. Biol.*, **4**, 885-892 (1994).
- 3) M. Krah, R. Misselwitz, O. Politz, K. K. Thomsen, H. Welfle and R. Borris. The laminarinase from thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*. Conformation, stability, and identification of active site carboxylic residues by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.*, **257**, 101-111 (1998).
- 4) D. N. I. J. Forsythe, L. D. Burtnick, N. R. Gilkes, R. C. Miller Jr., R. A. J. Warren and D. G. Kilburn. The cellulose-binding domain of endo-glucanase A (CenA) from *Cellulomonas fimi*: evidence for the involvement of tryptophan residues in binding. *Mol. Microbiol.*, **11**, 747-755 (1994).
- 5) 中村 聡. 好アルカリ性細菌が生産する新規キシラナーゼの分子解剖. 応用糖質科学, **45**, 147-154 (1998).
- 6) <http://prodes.toulouse.inra.fr/prodom.html>
- 7) 山本まみ. *Bacillus circulans* IAM1165 株の生産する β -1,3-グルカナーゼに関する研究. 博士論文, 東京工業大学 (2001).
- 8) <http://www.umass.edumicrobiorasmol>

- 9) T. Keitel, O. Simon, R. Borriess and U. Heinemann. Molecular and active-site structure of a *Bacillus* 1,3-1,4-beta-glucanase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 5287-5291 (1993).
- 10) M. Hahn, T. Keitel and U. Heinemann. Crystal and molecular structure at 0.16-nm resolution of the hybrid *Bacillus* endo-1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolase H(A16-M). *Eur. J. Biochem.*, **232**, 849-858 (1995).
- 11) G. Fibriansah, S. Masuda, S. Nakamura, R. Hirose, K. Hamada, N. Tanaka, T. Kumasaka. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of endo-1,3- β -glucanase from alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. strain F96. *Acta Cryst.*, **F62**, 20-22 (2006).

第 6 章

総括

6-1 要約

Nocardiopsis sp. F96 株はキチン質分解酵素を生産する好アルカリ性微生物として静岡県富士市の土壌より分離された。本研究では F96 株が β -1,3-グルカナーゼを生産することを見だし、その精製と性質検討を行った。また、 β -1,3-グルカナーゼをコードする遺伝子のクローニングと解析、そして大腸菌における高発現と組換え型酵素の性質検討を実施した。さらに、本酵素の活性発現機構の解明とさらなる機能向上を目的としてタンパク質工学検討を行った。以下に、本論文を要約する。

第 2 章では、F96 株が分子量の異なる 3 つの β -1,3-グルカナーゼアイソザイム (Bg1F1、Bg1F2 および Bg1F3) を生産していることを見だし、その精製と性質検討を行った。最も分子量の大きな酵素 Bg1F1 が精製され、その分子量は 34,100、等電点は約 4.3、反応至適 pH は pH 8~9、反応至適温度は 70°C であることを明らかにした。Bg1F1 は可溶性 β -1,3-グルカンのみならず、不溶性 β -1,3-グルカンも良好に加水分解した。また、本酵素は β -1,3-グルカン分解活性よりもむしろ β -1,3-1,4-グルカンに対して高い活性を示すことがわかった。*N* 末端アミノ酸配列解析により、3 つのアイソザイムは同一遺伝子産物であることが示唆された。

第 3 章では、F96 株染色体より β -1,3-グルカナーゼ (Bg1F) をコードする遺伝子 (*bglF*) をクローニングした。*bglF* 遺伝子は 810 塩基からなる 270 アミノ酸をコードするオープンリーディングフレームからなり、*N* 末端の 25 アミノ酸はシグナルペプチドであると考えられた。*bglF* 構造遺伝子上流には典型的な SD 様配列やプロモーター配列が見いだされた。成熟タンパク質のアミノ酸配列の相同性比較より、Bg1F はファミリー 16 に属する触媒ドメインのみからなるシングルドメイン酵素であり、ファミリー 16 多糖分解酵素に特徴的な保存配列が存在していた。*bglF* 遺伝子は大腸菌において発現し、分子量約

34,000 の組換え型酵素がペリプラズムに分泌されることがわかった。

第 4 章では、F96 株 BglF をコードする *bglF* 遺伝子の成熟タンパク質領域の高発現系を構築した。組換え型 BglF は大腸菌菌体内において可溶性タンパク質として活性を保持した形で多量に生産された。組換え型 BglF の分子量、反応至適 pH、反応至適温度ならびに基質特異性は、F96 株が生産する天然型 BglF1 とほぼ同様であった。また、本酵素は 60°C 程度まで安定であった。組換え型 BglF は可溶性 β -1,3-グルカンのラミナリンよりも不溶性のパキマンを効率的に加水分解した。また、本酵素はラミナリンおよびパキマンの β -1,3-結合を加水分解し、2 糖および 3 糖を生じることがわかった。さらに、 β -1,3-1,4-グルカンであるリケナンに作用させた場合、単糖も生じたことから、本酵素はリケナンの β -1,4 結合をも切断することが示唆された。

第 5 章では、部位特異的変異導入により変異型酵素を調製し、野生型酵素との性質比較を行った。その結果、BglF の触媒残基は Glu123 および Glu128 であり、Asp125 は触媒残基を補助する役割を担うことが考えられた。また、Trp118 および Trp220 は基質結合になんらかの形で関与していることが示唆された。

B. circulans IAM1165 株由来 BglH の C 末端に存在する付加ドメイン (CAD) を BglF に付加したキメラ酵素 BglF-CAD を調製した。大腸菌が生産した BglF-CAD の反応至適 pH および反応至適温度は野生型 BglF とほぼ同様であったが、BglF-CAD は野生型 BglF に比して高い温度安定性を示した。また、BglF-CAD においては不溶性多糖への結合能が向上していた。

6-2 今後の展望

F96 株 BglF のタンパク質工学研究により、本酵素の触媒残基および基質との相互作用に参与するアミノ残基の推定に成功した。しかしながら、BglF の触媒機構や基質認識機構については不明な点が多く残されている。BglF については、現在 X 線結晶構造解析が進行中である。本酵素の 3 次元構造が解かれれば、その触媒機構や基質認識機構の解明も可能となろう。

BglF と *B. circulans* IAM1165 株 BglH の CAD 領域とのキメラ酵素 BglF-CAD においては、野生型 BglF に比して温度安定性の向上が認められた。BglF-CAD の 3 次元構造を明らかにすることで、熱安定化機構に関する知見が得られるものと期待される。また、BglF-CAD においては、不溶性基質に対する結合能の向上が認められた。その一方で、CAD の付加による不溶性基質加水分解能向上への寄与は認められなかった。今後は、他の β -1,3-グルカナーゼに含まれる多糖結合ドメインとのキメラ酵素を構築し、不溶性基質加水分解能の向上を目指したい。

一方、BglH の NAD 領域とのキメラ酵素 NAD-BglF および NAD-BglF-CAD については大腸菌での生産が認められず、機能評価には至らなかった。この理由の 1 つとして、キメラ酵素の構造が不安定であったことが考えられる。多糖分解酵素のドメイン間の領域には、リンカーと呼ばれる数アミノ酸の連結部分が存在するものも多い。BglF とのキメラ酵素においても、適当なリンカー配列を挿入することで生産が可能になるかもしれない。

β -1,3-グルカナーゼの応用に 1 つに抗菌剤としての利用が考えられる。糸状菌の細胞壁は β -1,3-グルカンとキチンから構成される。従って、 β -1,3-グルカナーゼ単独、あるいはキチナーゼと組み合わせることで、強力な抗真菌剤の開発が可能になることが期待される。興味深いことに、本研究の F96 株はキチナーゼと β -1,3-グルカナーゼの両方の酵素を生産する。現在、F96 株由来キチナー

ゼおよび β -1,3-グルカナーゼの麹カビ *Aspergillus oryzae* への抗菌活性を調べている。近い将来、放線菌が抗生物質生産以外の用途にも用いられるようになることを確信している。

謝辞

本研究を行うにあたり、また、私の 9 年間にもわたる大学生活全般において大変お世話になりました東京工業大学教授 中村聡先生に心からお礼申し上げます。

いつもやさしく、公私にわたりいつも見守ってくださった東京工業大学助手 八波利恵先生に深く感謝します。

研究を進めるにあたり、数々の示唆に富んだご助言をいただきました元東京工業大学助手 遠藤きみ子先生に心より感謝致します。

N 末端配列分析をお引き受けくださり、また、数多くのご助言をいただきました、三共ライフテック株式会社 深沢徹也氏に深くお礼申し上げます。

研究を進めるにあたり、数々のご助言をいただきました、元東京工業大学助教授 山本まみ先生、早見徳介先輩に深く感謝致します。

いつもニコニコ、中村先生のもと、終始楽しい雰囲気の中、6 年におよぶ研究室生活を送るなか、同期の方々をはじめ、たくさんのすばらしい先輩、後輩との出会いがあったことに心より感謝致します。こんな私ですがこれからもどうぞよろしくお願い致します。

最後に、いつも支えてくださいました両親をはじめ、私を支えてくれた全ての方々、愛犬タロー、ごんに深く感謝しつつ、本論文を捧げます。