

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	好熱好アルカリ性Bacillus sp. TAR-1株由来の好熱性アルカリキシラナーゼに関する研究
Title(English)	
著者(和文)	高橋秀典
Author(English)	
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5408号, 授与年月日:2003年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第5408号, Conferred date:2003/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

好熱好アルカリ性 *Bacillus* sp. TAR-1 株由来の
好熱性アルカリキシラナーゼに関する研究

生物プロセス専攻

高橋 秀典

目次

第 1 章 序論	1
1-1. キシラナーゼについて	2
1-1-1. キシランとキシラナーゼ	2
1-1-2. キシラナーゼの触媒機構	2
1-1-3. キシラナーゼの産業応用	6
1-1-4. 好熱好アルカリ性 <i>Bacillus</i> sp. TAR-1 株の生産するキシラナーゼ	7
1-2. 進化分子工学について	11
1-2-1. タンパク質工学と進化分子工学	11
1-2-2. 進化分子工学に用いられる手法	11
1-2-3. タンパク質工学と進化分子工学の融合	14
1-3. 本研究の目的と意義	16
引用文献	19
第 2 章 TAR-1 株に由来する塩基性キシラナーゼの生産と精製	21
2-1. 緒言	22
2-2. 実験材料と方法	23
2-2-1. 菌株、培地および培養条件	23
2-2-2. 電気泳動および活性染色	23
2-2-3. 試料の限外濾過濃縮	25
2-2-4. 精製	25
2-2-5. キシラナーゼ活性の測定	26
2-2-6. タンパク質の定量	27
2-3. TAR-1 株による塩基性キシラナーゼの生産	28
2-3-1. TAR-1 株培養上清の等電点電気泳動	28
2-3-2. キシラナーゼ T の生産条件の検討	28
2-4. キシラナーゼ T の精製	33
2-5. 結論	37
引用文献	38

第 3 章	TAR-1 株に由来する塩基性キシラナーゼの諸性質	39
3-1.	緒言	40
3-2.	実験材料と方法	41
3-2-1.	キシラナーゼ T 精製標品	41
3-2-2.	キシラナーゼ活性の測定	41
3-2-3.	反応 pH 依存性の測定	41
3-2-4.	pH 安定性の評価	41
3-2-5.	反応温度依存性の測定	42
3-2-6.	温度安定性の評価	42
3-2-7.	加水分解産物の分析	42
3-3.	キシラナーゼ T の酵素学的性質	43
3-3-1.	反応 pH 依存性	43
3-3-2.	pH 安定性	43
3-3-3.	反応温度依存性	43
3-3-4.	温度安定性	43
3-4.	キシラナーゼ T によるキシランの加水分解産物の分析	49
3-5.	結論	51
	引用文献	53
第 4 章	TAR-1 株に由来する 2 つのキシラナーゼ遺伝子のクローニング と解析	54
4-1.	緒言	55
4-2.	実験材料と方法	56
4-2-1.	菌株および培地	56
4-2-2.	クローニング技術	56
4-2-3.	N 末端アミノ酸配列の分析	57
4-2-4.	染色体 DNA の調製	57
4-2-5.	PCR	58
4-2-6.	PCR 産物の大腸菌用ベクターへの組み込み	59
4-2-7.	塩基配列の決定	59
4-2-8.	遺伝情報解析	59
4-2-9.	サザンハイブリダイゼーション解析	60

4-3. キシラナーゼT 遺伝子の一部をコードする DNA 断片の PCR 増幅	61
4-3-1. キシラナーゼT の N 末端アミノ酸配列	61
4-3-2. PCR によるキシラナーゼT 遺伝子の部分的増幅	61
4-3-3. PCR 産物のクローニングと塩基配列決定	63
4-4. キシラナーゼT 遺伝子全領域の PCR 増幅と塩基配列解析	66
4-4-1. キシラナーゼT 遺伝子全領域の PCR 増幅と塩基配列決定	66
4-4-2. キシラナーゼT 遺伝子の解析	70
4-5. キシラナーゼR 遺伝子の一部をコードする DNA 断片の PCR 増幅	74
4-5-1. PCR によるキシラナーゼR 遺伝子の増幅	74
4-5-2. PCR 産物のクローニングと塩基配列決定	74
4-6. キシラナーゼR 遺伝子全領域の PCR 増幅と塩基配列解析	77
4-6-1. キシラナーゼR 遺伝子全領域の PCR 増幅と塩基配列決定	77
4-6-2. キシラナーゼR 遺伝子の解析	77
4-7. トランスポザラーゼ遺伝子を指標とした <i>B. halodurans</i> C-125 株との進化的関係の解析	81
4-7-1. キシラナーゼT 遺伝子上流域の解析	81
4-7-2. サザンハイブリダイゼーション解析	81
4-8. 結論	85
引用文献	86

第 5 章 部位特異的変異を導入した酵素の性質検討	88
5-1. 緒言	89
5-2. 実験材料と方法	90
5-2-1. 分子モデリング	90
5-2-2. 菌株、プラスミドおよび培地	90
5-2-3. クローニング技術	90
5-2-4. PCR	90
5-2-5. 部位特異的変異導入法	91
5-2-6. 塩基配列の決定	94
5-2-7. 大腸菌無細胞抽出液の調製	94
5-2-8. キシラナーゼ活性の測定	95
5-2-9. 反応温度依存性の測定	95

5-2-10. PNP- β -D-glucopyranoside 分解活性および PNP- β -D-cellobioside 分解活性の測定	95
5-3. キラナーゼ T および R の立体構造モデリング	96
5-3-1. キシラナーゼ T の立体構造モデリング	96
5-3-2. キシラナーゼ R の立体構造モデリング	100
5-4. キシラナーゼ T 遺伝子の大腸菌における発現	103
5-5. キシラナーゼ T のループ欠失変異体の性質	105
5-6. Pro114 に saturation 変異を導入したキシラナーゼ T 変異体の性質	106
5-7. 結論	111
引用文献	112
第 6 章 複数箇所への saturation 変異同時導入法の確立	113
6-1. 緒言	114
6-2. 実験材料と方法	115
6-2-1. 菌株、プラスミドおよび培地	115
6-2-2. クローニング技術	115
6-2-3. PCR	115
6-2-4. キシラナーゼ T 遺伝子の複数箇所への saturation 変異導入	115
6-2-5. 塩基配列の決定	116
6-3. 複数箇所への saturation 変異同時導入法の概要	117
6-4. キシラナーゼ T のクレフト内に複数の saturation 変異を同時導入したライブラリーの作製と評価	119
6-5. 結論	125
引用文献	126
第 7 章 複数箇所への saturation 変異同時導入法を用いた変異型キシラナーゼ T の作製と評価	127
7-1. 緒言	128
7-2. 実験材料と方法	129
7-2-1. 菌株および培地	129
7-2-2. プラスミド	129
7-2-3. クローニング技術	129
7-2-4. 複数箇所への saturation 変異の同時導入	129
7-2-5. 大腸菌無細胞抽出液の調製	130

7-2-6.	キシラナーゼ活性の測定	130
7-2-7.	反応 pH 依存性の測定	130
7-2-8.	加水分解産物の分析	130
7-2-9.	塩基配列の決定	131
7-3.	キシラナーゼ T の反応 pH 依存性の改変	132
7-3-1.	saturation 変異導入の標的とするアミノ酸残基の決定	132
7-3-2.	変異型遺伝子ライブラリーの構築と反応 pH 依存性が 変化した変異型酵素のスクリーニング	135
7-3-3.	pH 依存性が変化した変異型酵素の性質検討	138
7-4.	キシラナーゼ T のキシラン切断様式の改変	144
7-4-1.	saturation 変異導入の標的とするアミノ酸残基の決定	144
7-4-2.	変異型遺伝子ライブラリーの構築とキシランの切断様式が 変化した変異型酵素のスクリーニング	144
7-4-3.	キシランの切断様式が変化した変異型酵素のアミノ酸配列	148
7-5.	結論	155
	引用文献	156
第 8 章	総括	157
8-1.	要旨	158
8-2.	今後の展望	161
謝辞		163

第 1 章

序論

1-1. キシラナーゼについて

1-1-1. キシランとキシラナーゼ

陸上植物の細胞壁は、セルロース、ヘミセルロース、ペクチン等の多糖類およびリグニンから構成されている。ヘミセルロースは植物からアルカリ性水溶液で抽出される多糖類混合物の総称であり、セルロースやペクチン以外の細胞壁構成多糖を含む。

β -1,4-キシラン (キシラン) は、陸上植物のヘミセルロースの主要な構成成分であり、D-キシロースが β -1,4 結合した主構造を有する高分子多糖である (Fig. 1-1)。その重合度は由来植物によりかなり異なっている。天然に存在するキシランは一般にヘテロ多糖であり、主鎖の一部はアラビノース、グルクロン酸、アセチル基等により修飾を受けている。また、その修飾の程度も由来植物により異なっている¹⁾。

キシランを加水分解する酵素には、キシラナーゼ (1,4- β -D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) および β -キシロシダーゼ (1,4- β -D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.37) がある。キシラナーゼはキシランの β -1,4 結合を加水分解して、キシロースおよび種々のキシロオリゴ糖を生成する。一方、 β -キシロシダーゼはキシランおよびキシロオリゴ糖を非還元末端側から加水分解して、キシロースを生成する。キシラナーゼはそのアミノ酸配列に基づいて 2 つのグループ (ファミリー 10 と 11) に分類されている²⁾(Table 1-1)。ファミリー 10 に属するキシラナーゼは平均して分子量が 37,000 程度で、等電点を酸性側に有することが多い。ファミリー 11 に分類されるキシラナーゼの平均分子量は 21,000 程度であり、さらに等電点を酸性側に持つグループ (サブファミリー i) と塩基性側に持つグループ (サブファミリー ii) とに分けられる。

1-1-2. キシラナーゼの触媒機構

キシラナーゼの一次構造においては、いくつかの酸性アミノ酸残基が高度に保存されており、2 つの酸性アミノ酸残基が関与する触媒機構が提唱されている³⁾ (Fig. 1-2)。すなわち、片方の未解離のカルボキシル基が酸触媒として機能し、解離型で存在するもう一方が求核剤となりアノマー炭素を攻撃する。アノマー炭素の攻撃を受けたキシロース残基はオキソカルベニウムイオン様の遷移状態を経て、酵素と共有結合した中間体を形成する。この中間体は水分子による求核攻撃を受けて再びオキソカルベニウムイオン様の遷移状態を経て酵素から解離する。この際、先に酸触媒として機能したカルボキシル基が塩基触媒として水分子に作用する。触媒残基による攻撃を受けるキ

Xylanase

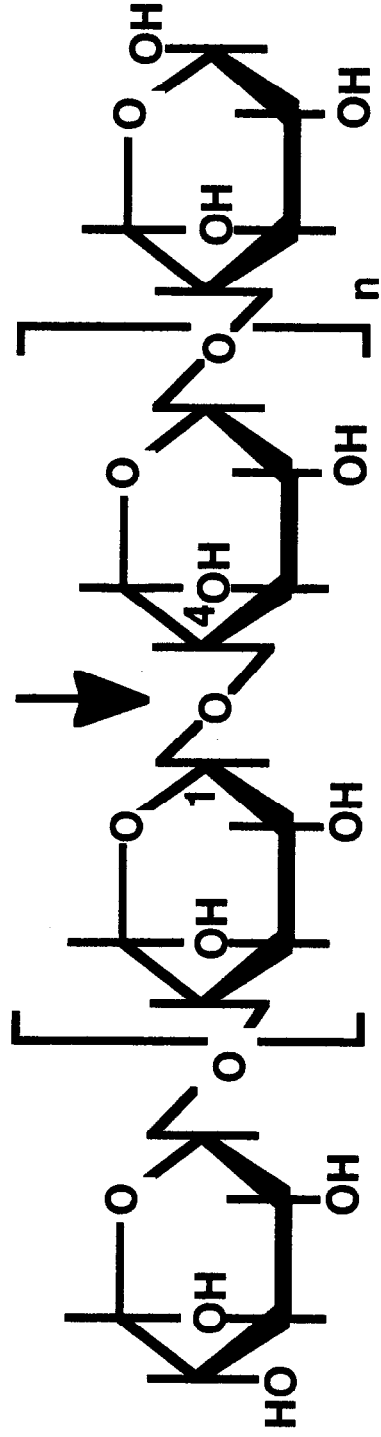


Fig. 1-1 β -1,4-キシランの構造.

Table 1-1 ファミリー 10 および 11 キシラナーゼの触媒ドメインの性質

Family	Subfamily	Average molecular mass	Average pI
10		37 kDa (21 kDa to 40 kDa)	5.7 (4.7 to 6.8)
11	i	21 kDa (17 kDa to 24 kDa)	5.0 (3.8 to 6.0)
	ii	21 kDa (20 kDa to 24 kDa)	9.5 (8.8 to 10)

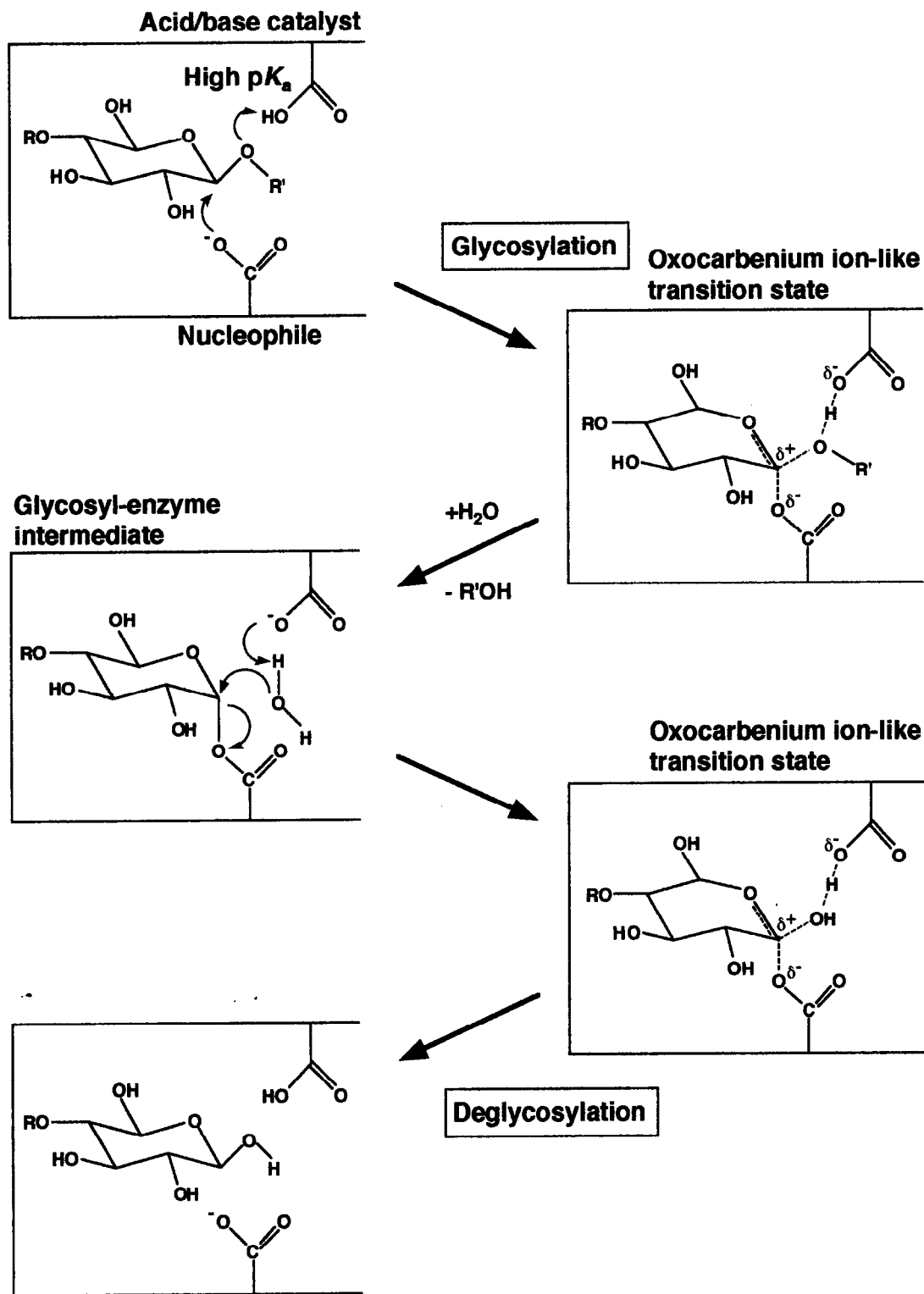


Fig. 1-2 キシラーゼの反応機構 (retaining 機構)

シロース残基は反応の前後でアノマー炭素の立体配置が維持されることから、この反応機構は retaining 機構と呼ばれている。

キシラナーゼの活性発現において、もう一つ重要な要素に基質認識が挙げられる。加水分解を行うにあたり、活性部位にキシランのみを選択的に導き、触媒残基に対して正しい位置に基質を配置する必要がある。キシランを構成するキシロース残基を基準とする、サブサイトの概念が提唱されている⁴⁾。すなわち、キシラナーゼによるキシランの切断部位を中心に非還元末端側のキシロース残基に対し、触媒残基に近い方から -1、-2、-3、また還元末端側のキシロース残基にも触媒残基に近い方から +1、+2、+3 と番号を付ける。キシラナーゼの基質認識部位で、対応する各々のキシロース環を認識するアミノ酸側鎖群をサブサイト -1、-2、+1、+2、などと呼ぶ。*Bacillus circulans*⁵⁾ や *Trichoderma reesei*⁶⁾ が生産するファミリー 11 キシラナーゼ *Cellulomonas fimi*⁷⁾ のファミリー 10 キシラナーゼなどにおいては、酵素-基質アナログ複合体の X 線結晶構造解析がなされ、サブサイトの同定がなされるに至っている。サブサイトを構成するアミノ酸側鎖のうち、特に芳香環によるキシロース環とのスタッキング相互作用が重要な役割を担っていると考えられているが⁸⁾、サブサイトにおいてキシロース環は多数のアミノ酸残基と水素結合などを形成しており、基質認識機構の詳細については明らかになっていない。サブサイトにおける基質認識の違いは、キシラナーゼによるキシランの最終分解生成物にも影響すると予測される。

1-1-3. キシラナーゼの産業応用

キシラナーゼの産業応用が注目されている⁹⁾。キシランにキシラナーゼを作用させることにより、整腸作用や保湿作用を有するキシロオリゴ糖が製造される。また、家畜の飼料となる穀物をキシラナーゼで処理することにより、その栄養価および体内での分解性を高めることができる。このような植物由来のバイオマスの有効利用は、今後ますます重要になると考えられる。最近では、製紙工程におけるパルプの漂白にもキシラナーゼが利用されている。従来の塩素漂白に代わりキシラナーゼを用いることで、ダイオキシン等の有害な芳香族塩素化合物の発生を避けることが可能となる¹⁰⁾。それ以外にも、医薬から工業の分野まで、幅広くキシラナーゼは使われている。

一般にキシランは高温・アルカリ性で水溶性が増すため、産業応用を考えた場合、そのような条件下で作用するキシラナーゼが望ましいことはいうまでもない。高温条件下で酵素反応を行うことにより、反応速度を上げることができ、また高温ないしアルカリ性の条件下での反応により反応器の生物学的汚染リスクを減らすことも可能となる¹¹⁾。

従って、酵素の温度安定性や pH 安定性が高いことも、実用化に向けて重要である。このような要求に応えるキシラナーゼを手に入れるために、その分離源を極限環境微生物に求めることが理にかなっており、有力な方法といえる。近年、進化分子工学 (後述、1-1-2 項参照) が注目されており、キシラナーゼについても既存の酵素の機能を向上させることで産業応用上での要求に応える試みも行われようとしている。

1-1-4. 好熱好アルカリ性 *Bacillus* sp. TAR-1 株の生産するキシラナーゼ

キシラナーゼは多くの糸状菌や細菌などによって生産されることが知られており^{12,13)}、好アルカリ性微生物^{14~18)} や好熱性微生物^{19~22)} の産生するキシラナーゼも報告されている (Table 1-2)。好アルカリ性微生物由来のキシラナーゼの中には、アルカリ性領域でも活性を持つものがある。また、好熱性微生物由来のキシラナーゼ^{23~25)} は、65~80°C に反応の至適温度を持つものが多い。しかしながら、キシラナーゼを生産する好熱好アルカリ性微生物はほとんど報告されていない。好熱好アルカリ性 *Bacillus thermoalkalophilus* T-6 株²³⁾ や *Bacillus* sp. NCIM 59 株²⁴⁾ の生産するキシラナーゼは反応の至適を比較的高温域に有するものの、反応至適 pH は中性域にある。

本研究室では高温・アルカリ性領域で高活性を示すキシラナーゼ生産菌の検索を行い、TAR-1 株を分離した²⁶⁾ (Table 1-3)。本菌は pH 10.5、50°C で至適な生育を示し、分類学的検討の結果、好熱好アルカリ性 *Bacillus* sp. TAR-1 株と命名された。さらに、TAR-1 株の生産する好熱性アルカリキシラナーゼ (キシラナーゼ R) が精製され、その諸性質も明らかにされている²⁷⁾ (Table 1-4)。本酵素は、アルカリ性条件 (pH 9.0) において最も高い反応至適温度 (70°C) を有する新規な酵素であった。

Table 1-2 極限環境微生物の生産するキシラナーゼ

Source	Name	Optimum pH	Optimum temp. (°C)	Reference
Alkaliphilic bacteria				
<i>Bacillus</i> sp. 41M-1	J	9.0	50	14
C59-2	-	5.5-9.0	60	15
YC-335	-	6.0	55	16
<i>Bacillus halodurans</i> C-125	A	6.0-10.0	70	17
<i>Aeromonas</i> sp. 212	N	6.0-7.0	70	17
	S	5.0-7.0	60	18
	M	6.0-8.0	50	18
	L	7.0-8.0	50	18
Thermophilic bacteria				
<i>Bacillus licheniformis</i> A 99	-	7.0	50	19
<i>Clostridium stercorarium</i> F-9	A	6.5	75	20
<i>Thermotoga</i> sp.	A	6.2	92	21
<i>Thermomonospora fusca</i> BD21	-	6.0-8.0	65	22
Thermoalkaliphilic bacteria				
<i>Bacillus thermoalkalophilus</i> T-6	-	6.0-7.0	60, 70	23
<i>Bacillus</i> sp. NCIM 59	-	6.0	50-60	24
W1	I	6.0	65	25
	II	7.0-9.0	70	25

Table 1-3 好熱好アルカリ性 *Bacillus* sp. TAR-1 株の
性質

Form	Rods
Size	0.8 μm x 3-4 μm
Motility	Motile
Gram stain	Variable
Spore	Oval

Table 1-4 TAR-1 株の生産するキシラナーゼR の性質

Molecular mass	40 kDa
pI	pH 4.1
Optimum pH	pH 5-10 (50°C)
Optimum temperature	70°C (pH 9.0), 75°C (pH 7.0)
Thermostability	≤55°C
Enzyme type	Endo-type

1-2. 進化分子工学について

1-2-1. タンパク質工学と進化分子工学

今日、微生物をはじめとする多様な生物から様々な酵素が見いだされ、種々の産業分野で利用されている。微生物のスクリーニングは有用酵素を得るための常道であるが、タンパク質工学の発展とともに自然界から得られた酵素にさらに改良を加えることも行われるようになってきた。

タンパク質工学は、データベース解析や立体構造予測に基づき標的アミノ酸を決定し、遺伝子への部位特異的変異導入や遺伝子の組換えを施し、たとえば機能の向上した変異型タンパク質を構築する技術である。ジスルフィド結合の導入によるリゾチームの熱安定化など成功例は多いが、タンパク質の構造と機能の相関関係については未知の部分も多く、目的に応じた変異型タンパク質設計の基盤は確立されていない。既知の理論に基づいた分子設計を行っても期待通りの結果になるとは限らず、得られた変異体が構造的に不安定で活性を失うこともある。

そこで、タンパク質工学に代わるタンパク質機能向上の手段として、進化分子工学が脚光をあびるようになった²⁸⁾。進化分子工学とは自然界におけるタンパク質の「進化」の過程を、実験室内でその速度を増して模倣するものである。進化の過程は次の3ステップからなる。

- ① 対象となるタンパク質をコードする遺伝子に対するランダム変異導入
- ② 変異遺伝子の発現と変異タンパク質の生産
- ③ 機能が改良されたタンパク質のスクリーニング

この①～③のステップを繰り返すことにより、段階的にタンパク質を目的にあった性質に改良していくことができるといわれている。

進化分子工学のタンパク質工学との大きな違いは、対象となるタンパク質の構造や機能に関する情報が全くない場合にも、その改良が可能である点にある。カナマイシン耐性酵素（カナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ）の耐熱化²⁹⁾や、ズブチリシンの有機溶媒耐性の向上³⁰⁾、フコシダーゼの基質特異性の改変など、進化分子工学の成功例は多数報告されるに至っている。

1-2-2. 進化分子工学に用いられる手法

進化分子工学においては、目的とするタンパク質を簡便に、効率よく進化させるこ

とが望まれる。そのため、変異の導入方法やその組み合わせ方などについて様々な手法が試みられてきた。以下によく用いられる手法を示す。

error-prone PCR

error-prone PCR は、変異導入の対象となる遺伝子領域を PCR で増幅する際に、エラーが起こりやすい条件にして変異導入する手法である。一般に error-prone PCR を行うときには、校正能を欠いているためにエラーを起こしやすい *Thermus aquaticus* 由来の Taq DNA ポリメラーゼが用いられる。エラーが起こる頻度は、基質となる dNTP の濃度を不均衡にしたり、反応溶液に $MnCl_2$ を加えることによって調節できる³¹⁾。

DNA シャフリング

DNA シャフリングは遺伝子間の組換えを試験管内で引き起こし、キメラ遺伝子を形成させる方法として考案された³²⁾。DNA シャフリングは中立あるいは有害な変異を除き、独立に得られた有用な変異を 1 つのクローンに集積するための優れた方法である。通常、error-prone PCR など構築したランダムな点突然変異体の中から、最初のスクリーニングでタンパク質機能が向上した複数の変異体を選抜する。得られた変異体に対し、再び最初に用いた手法で変異を導入する代わりに DNA シャフリングを行う。具体的な手順を Fig. 1-3 示した。まず、機能が向上したタンパク質をコードする複数の変異型遺伝子を混合し、デオキシリボヌクレアーゼ I (DNase I) を用いてランダムに切断する。ここで生じた DNA 断片の混合物に特定のプライマーを加えずに PCR 反応を行うと (アセンブリー反応)、遺伝子断片の再構成が行われる。この際、反応条件を選ぶことによって新たな変異を導入することも可能である。最後に遺伝子の 5' および 3' 末端領域にアニールするプライマーを用いた PCR により、変異型遺伝子全域を増幅することで複数の変異を併せもつ遺伝子ライブラリーが構築される。タンパク質機能の向上を指標としたスクリーニングを実施することで、有用な変異のみが集積されたクローンを取得することができるわけである。

saturation 変異

saturation 変異は、特定の残基を 20 種類のアミノ酸で置換する際に用いられる³³⁾。上述の error-prone PCR では限られたアミノ酸置換しか導入できない。例えばフェニルアラニンのコドン (TTT、TTC) からグリシンのコドン (GGT、GGC、GGA、GGG) への置換が生じるためには、3 塩基からなるコドンのうち少なくとも 2 塩基が変化する必要があるが、通常の error-prone PCR の変異導入率を考慮すると、1 つのコドンの中

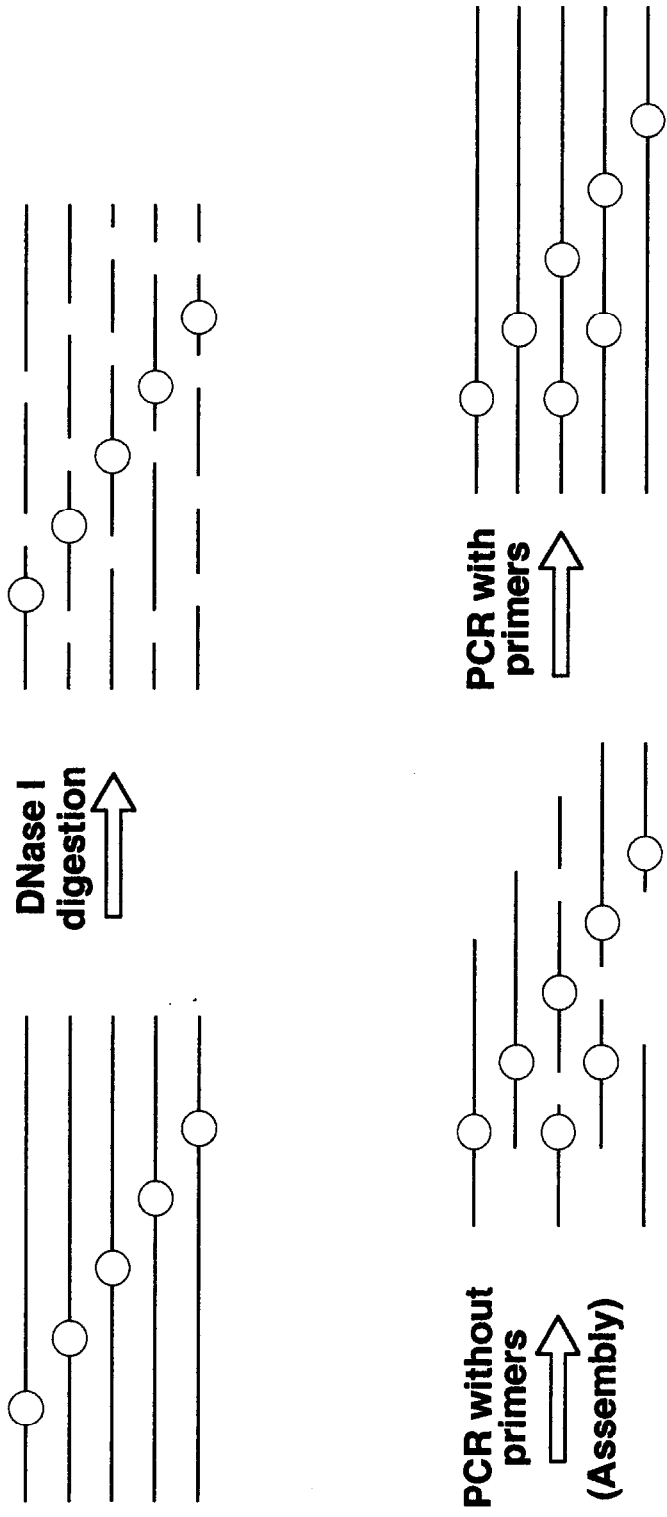


Fig. 1-3 DNA シャフリングの原理

図の丸印は塩基置換を表す。

に 2 つの変異が導入される確率は極めて低い。従って 1 種類のアミノ酸は、平均すると 5.7 種類の他のアミノ酸にしか置換できないことになる。saturation 変異では、ある特定の部位のアミノ酸のコドンに NNN (N は 4 塩基の混合) に置き換えたプライマーを作製し、従来の部位特異的変異導入法を利用して変異を導入することになるが、20 種類のアミノ酸全てへの置換が可能となる。

ここで示した以外にも、StEP 法³⁴⁾ (staggered extension process)、RPR 法³⁵⁾ (random-priming *in vitro* recombination) など様々な手法が確立され、進化分子工学の可能性を広げるのに大きく寄与している。

1-2-3. タンパク質工学と進化分子工学の融合

進化分子工学をキシラーゼなどの酵素に適用する第一歩は、酵素をコードする遺伝子へのランダム変異導入である。対象となる遺伝子にどれくらいの割合で変異を導入するかが、目的酵素の取得の成否に大きく影響する。1 つの酵素に多数のアミノ酸置換を導入すると、機能が明確に向上した変異型酵素がライブラリー中に出現する確率は高くなる。しかし、様々な組み合わせの置換が導入されるため、ライブラリーを構成する母集団は莫大な数となる。従って、ライブラリー全体に占める目的の酵素の割合は指数関数的に小さくなり、スクリーニングの労力は非常に大きくなる。しかも、複数の変異が一度に導入された場合、酵素の立体構造の維持が困難となり、運良く機能を高める変異が導入されたとしても、その効果が打ち消されてしまう可能性も高い³⁶⁾。以上の理由により、通常は対象とする酵素に対して 1~2 アミノ酸置換が導入される程度に変異導入率が設定される³⁶⁾。しかし、通常たった 1 つのアミノ酸置換で酵素の機能が大幅に向上することは希であり、仮に向上したとしてもその度合いは少ない。簡便で高感度なスクリーニング系が確立されている場合にはよいが、そうでない多くの場合、野生型酵素に比べて極わずかに機能が向上したものを選び出すために、多数のクローンについて厳密な評価を行う必要が生じる。さらに、1 アミノ酸置換変異体で構成されるライブラリーの中には、目的とする変異型酵素は存在しない可能性も考えられる。

このような問題を解決する一つの方法として、タンパク質工学と進化分子工学を融合させたアプローチが試みられている。すなわち、既に明らかとなっている機能部位を標的として saturation 変異を導入するというものである。従来のタンパク質工学で行われてきた特定のアミノ酸から特定のアミノ酸への置換ではなく、特定のアミノ酸か

ら 20 種類のアミノ酸への置換を導入したライブラリーを構築することで、理論的な予測の限界を補うことが可能となった。機能部位のアミノ酸が一次構造上で集中している場合、複数のアミノ酸残基を対象として同時に saturation 変異を導入できるため、そのようなライブラリーから目的の変異型酵素を取得するのは効率的と考えられる。実際、*Bacillus megaterium* 由来のシトクロム P450 においては、この手法により野生型酵素では水酸化できない炭素数 8 の脂肪酸を水酸化できる変異型酵素が取得されている³⁷⁾。

上述のように、立体構造に基づいた機能部位への saturation 変異導入は酵素の機能向上の有力な手段である。その一方で、機能部位を構成するアミノ酸は立体構造上は寄り集まっても、一次構造における位置は分散しているという現実がある。従って、機能部位を構成するアミノ酸残基の一部のみに saturation 変異を導入したライブラリーしか構築できないのが現状である。機能部位全体を対象とした saturation 変異を実現するため、一次構造上で分散して存在する標的アミノ酸に対して同時に saturation 変異を導入する手法の開発が望まれる。

1-3. 本研究の目的と意義

キシラナーゼを生産する微生物の中には、2種類以上のキシラナーゼを生産するものが多く報告されている^{17,18,25,28} (Table 1-5)。例えば、好アルカリ性 *Bacillus halodurans* C125 株からは、2種類のキシラナーゼ、キシラナーゼA および N の生産が確認されている¹⁵。キシラナーゼA はキシラナーゼN に比べ分子量が大きく、反応の至適 pH もそれぞれ pH 6~10 および 6~7 と異なる⁹。同様に、好アルカリ性 *Bacillus* sp. W1 株の生産する 2種類のキシラナーゼも互いに大きく性質が異なる¹⁹。

先に述べたように、本研究室で分離した TAR-1 株は優れた性質を有する好熱性アルカリキシラナーゼ、キシラナーゼR を生産していた²¹。本菌もキシラナーゼR 以外に、他のキシラナーゼを生産していることが期待される。TAR-1 株が生産する新たなキシラナーゼを見出し、その性質検討を行うことで、キシラナーゼR と同様に優れた酵素を取得できる可能性がある。さらに、広く微生物が複数のキシラナーゼを生産することの生理的な意義を解明する手掛かりも得られることが期待される。一方、極限環境微生物の生産する酵素は、その特異的な性質ゆえに進化分子工学の対象として興味深い。TAR-1 株の生産するキシラナーゼを進化分子工学の対象とすることは、構造-活性相関に関する学術的な知見を蓄え、将来的には産業応用に適したキシラナーゼの創製につながると期待される。

以下に本論文の構成を述べる。

第2章では、TAR-1 株の培養上清中に塩基性キシラナーゼ (キシラナーゼT) を見出し、培養時間や培地中の主要炭素源がその生産に及ぼす影響を明らかにした。さらに、その酵素の精製を行い、物理化学的性質について述べた。

第3章では、TAR-1 株が生産するキシラナーゼT の酵素学的性質を検討し、その結果について述べた。

第4章では、TAR-1 株染色体より塩基性キシラナーゼT および R をコードする遺伝子をクローニングし、その塩基配列を明らかにすると共に、類推されるアミノ酸配列について考察した。

第5章では、TAR-1 株に由来するキシラナーゼT および R の立体構造モデルを構築した。さらに、立体構造モデルを基に、基質認識に関与していると考えられたアミノ酸を置換した各種変異型酵素を作製し、解析した。

第6章では、TAR-1 株キシラナーゼT をモデルとして複数のアミノ酸残基に saturation 変異を同時に導入する手法を確立した。

第7章では、第6章で確立した手法を用いて TAR-1 株キシラナーゼT の機能改

Table 1-5 複数のキシラナーゼを生産する微生物

Source	Name	Molecular mass (kDa)	pI	Optimum pH	Optimum temp. (°C)	Family	Reference
<i>Bacillus halodurans</i> C-125	A	43.0	-	6.0-10.0	70	10	17
	N	16.0	-	6.0-7.0	70	-	17
<i>Bacillus</i> sp. W1	I	21.5	8.5	6.0	65	-	25
	II	49.5	3.6	7.0-9.0	70	-	25
<i>Aeromonas</i> sp. 212	S	23.0	-	5.0-7.0	60	-	18
	M	37.0	-	6.0-8.0	50	-	18
	L	145	-	7.0-8.0	50	-	18
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	I	54.0	4.2	7.0	70	10	38
	II	35.2	8.0	7.0	60	11	38
<i>Magnaporthe grisea</i>	33	33.0	10	-	-	10	39
	22	22.0	9.7	-	-	11	39

変を行い、得られた変異型酵素を解析した。

第 8 章では、本研究を総括した。

引用文献

- 1) Biely, P. 1985. Trends Biotechnol., 3: 286-290.
- 2) Henrissat, B. 1991. Biochem. J., 280: 309-316.
- 3) Gilkes, N. R., Henrissat, B., Kilburn, D. G., Miller, Jr., R. C. and Warren, R. A. J. 1991. Microbiol. Rev., 55: 303-315.
- 4) Bray, M. R. and Clarke, A. J. 1992. Eur. J. Biochem., 204: 191-196.
- 5) Campbell, R., Rose, D., Wakarchuk, W. W., To, R., Sung, W. and Yaguchi, M. 1993. In Proc. of the Second TRICEL Symposium on *Trichoderma reesei* Cellulases and Other Hydrolases (Suominen, P., and Reinikaninen, T., Eds.), Helsinki, pp. 63-77.
- 6) Törrönen, A. and Rouvinen, J. 1995. Biochemistry, 34: 847-856.
- 7) White, A., Withers, S. G., Gilkes, N. R. and Rose, D. R. 1994. Biochemistry, 33: 12546-12552.
- 8) Wakarchuk, W. W., Campbell, R. L., Sung, W. L., Davoodi, J. and Yaguchi, M. 1994. Prot. Sci., 3: 467-475.
- 9) Coughlan, M. P. and Hazlewood, G. P. 1993. Biotechnol. Appl. Biochem., 17: 259-289.
- 10) Viikari, L., Panua, M., Kantelinen, A., Sundquist, J. and Linko, M. 1986. In Proc. of the Third International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Stockholm, pp. 67-69.
- 11) Kulkarni, N., Shedye, A. and Rao, M. 1999. FEMS Microbiol. Rev., 23: 411-456.
- 12) Wong, K. K. Y., Tan, L.U.L. and Sadler, J. N. 1988. Microbiol. Rev., 52 : 305-317.
- 13) Bastawde, K. B. 1992. World J. Microbiol. Biotechnol., 8: 353-368.
- 14) Nakamura, S., Wakabayashi, K., Nakai, R., Aono, R. and Horikoshi, K. 1993. Appl. Environ. Microbiol., 59: 2311-2316.
- 15) Honda, H., Kudo, T., Ikura, Y. and Horikoshi, K. 1985. Can. J. Microbiol., 31: 538-542.
- 16) Horikoshi, K. and Atsukawa, Y. 1973. Agric. Biol. Chem., 37: 2097-2103.
- 17) Park, Y. S., Yum, D. Y., Bai, D. H. and Yu, J. H. 1992. Biosci. Biotechnol. Biochem., 56: 1355-1356.
- 18) Ohkoshi, A., Kudo, T., Mase, T. and Horikoshi, K. 1985. Agric. Biol. Chem., 49: 3037-3038.
- 19) Archana, A. and Satyanarayana, T. 1997. Enzyme Microbiol. Technol., 21: 12-17.
- 20) Berenger, J., Frixon, C., Creuzet, N. and Bigliardi, J. 1985. Can. J. Microbiol., 31: 635-643.
- 21) Simpson, H. D., Haufler, U. R. and Daniel, R. M. 1991. Biochem. J., 277: 413-417.
- 22) Bachmann, S. L. and McCarthy, A. J. 1991. Appl. Environ. Microbiol., 57: 2121-2130.
- 23) Rajaram, S. and Varma, A. 1990. Appl. Microbiol. Biotechnol., 34: 141-144.

- 24) Dey, D., Hinge, J., Shendye, A. and Rao, M. 1992. *Can. J. Microbiol.*, 38: 436-442.
- 25) Okazaki, W., Akiba, T., Horikoshi, K. and Akahoshi, R. 1984. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19: 335-340.
- 26) Nakamura, S., Nakai, R., Wakabayashi, K., Ishiguro, Y., Aono, R. and Horikoshi, K. 1994. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 18: 78-81.
- 27) Nakamura, S., Ishiguro, Y., Nakai, R., Wakabayashi, K., Aono, R. and Horikoshi, K. 1995. *J. Mol. Catal. B Enzymatic*, 1: 7-15.
- 28) Arnold, F. H. and Volkov, A. A. 1999. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3: 54-59.
- 29) 永井和夫, 中森 茂, 虎谷哲夫, 掘越弘毅, 微生物工学. 1996. 講談社. pp.178-179.
- 30) Strausberg, S. L., Alexander, D. T., Gallagher, G. L., Gilliland, Barnett, B. L. and Bryan, P. N. 1995. *Bio/Technology*, 13: 668-673.
- 31) Leung, D. W., Chen, E. and Goeddel, D. V. 1989. *Technique*, 1: 11-15.
- 32) Stemmer, W. P. C. 1994. *Nature (London)*, 370: 389-391.
- 33) Reidhaar-Olson, J. F. and Sauer, R. T. 1998. *Science*, 241: 53-57.
- 34) Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J. A. and Arnold, F. H. 1999. *Nature (London)*, 399: 670-673.
- 35) Shao, Z., Zhao, H., Giver, L. and Arnold, H. 1998. *Nucleic Acids Res.*, 26: 681-683.
- 36) 辻 融, 土居信英, 柳川弘志. 2001. 酵素工学ニュース, 第 46 号. 酵素工学研究会. pp. 7-21.
- 37) Li, Q., Schwaneberg, U., Fischer, M., Schmitt, J., Pleiss, J., Lutz-Wahl, S., Schmid, R. D. 2001. *Biochim. Biophys. Acta*, 1545: 114-121.
- 38) Minami, K., Sakamoto, T., Hasegawa, T. and Inamori, Y. 1992. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 371-375.
- 39) Wu, S. C., Kauffmann, S., Darvill, A. G. and Albersheim, P. 1995. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 8: 506-514.

第2章

TAR-1 株に由来する塩基性キシラナーゼの生産と精製

2-1. 緒言

キシランは高温・アルカリ性で水に溶解易くなることが知られているため、そのような条件下でキシラナーゼを作用させることで、効率的な加水分解が可能になると考えられる。一般に、好熱性細菌は熱に安定な酵素を生産し、好アルカリ性細菌の生産する酵素はアルカリ性条件下で安定で、高活性を示す。高温かつアルカリ性環境下でキシランに作用するキシラナーゼは、好熱好アルカリ性細菌から取得が可能であることが期待される。

本研究室ではすでに、好熱性アルカリキシラナーゼ生産菌である好熱好アルカリ性 *Bacillus* sp. TAR-1 株を土壌より分離している¹⁾。本菌は高温・アルカリ性条件下でキシランを良好に分解する好熱性アルカリキシラナーゼ、キシラナーゼ R を菌体外に分泌することがわかっている²⁾。キシラナーゼを生産する微生物には、2 種類以上のキシラナーゼを分泌するものが報告されている (文献^{3~7)} および本論文第 1 章参照)。TAR-1 株もキシラナーゼ R の他に有用なキシラナーゼを生産している可能性が考えられる。

本研究では、TAR-1 株がキシラナーゼ R とは別の塩基性キシラナーゼを生産していることを見出し、培養時間や培地中の主要炭素源がその生産に及ぼす影響を明らかにした。さらに、その酵素の精製を行い、物理化学的性質検討を行った。

2-2. 実験材料と方法

2-2-1. 菌株、培地および培養条件

土壌より分離した好熱性アルカリキシラナーゼ生産菌、好熱好アルカリ性 *Bacillus* sp. TAR-1 株¹⁾ を用いた。

培養には 0.5% ポリペプトン (日本製薬)、0.5% イーストエキス (Difco)、0.1% K₂HPO₄、0.02% MgSO₄·7H₂O の共通成分に炭素源を添加し、終濃度 1% の Na₂CO₃ (別滅菌) を加え、pH 10.5 に調整した液体培地を用いた。主要炭素源としては、上記の組成の液体培地にキシラン(oat spelts、Sigma)、キシロースまたはグルコースをそれぞれ加えた。各成分は純水に溶解し、121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌したものを用いた。

上記の組成の液体培地を 18 mmφ 試験管に 5 ml、あるいは 2 l ひだ付き三角フラスコに 400 ml ずつ分注し、50°C、170 rpm で振盪培養した (Bio-Shaker BR-15 または Bio-Shaker BR-300LF、タイテック)。培養液を遠心分離 (10,000 x g、10 分間、4°C) することにより培養上清を得た。

2-2-2. 電気泳動および活性染色

等電点電気泳動

等電点電気泳動 (IEF) は Ampholine PAGplate pH 3.5-9.5 (Amersham Pharmacia Biotech AB) を用いて行い、2D-SILVER STAIN・II “DAIICHI” (第一化学薬品) による銀染色および活性染色を行った。

IEF 後のキシラナーゼの活性染色は次のようにして行った。泳動後のゲルを、0.05% のキシラン (oat spelts) を含む 1.2% アガロースゲル [1 mm 厚、100 mM クエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8)] 上に密着し、50°C で 30 分間反応させた。反応終了後のアガロースゲルは、0.1% コンゴレッド水溶液を用いて染色した。1 M NaCl 水溶液を用いてゲルの脱色を行い、キシランに吸着していないコンゴレッドを除去した。最後に 0.5% 酢酸を加えることにより、コンゴレッドを赤色から青色に変色させ、活性に基づくハロー (活性バンド) を明瞭化した。

なお、IEF 用マーカーは IEF calibration kit pH 3-10 (Amersham Pharmacia Biotech AB) を使用し、組成は以下の通りである。() 内の数字は 等電点 (pI) を表す。

trypsinogen	(9.30)
lentil lectin-basic band	(8.65)
lentil lectin-middle band	(8.45)
lentil lectin-acidic band	(8.15)
myoglobin-basic band	(7.35)
myoglobin-acidic band	(6.85)
human carbonic anhydrase B	(6.55)
bovine carbonic anhydrase B	(5.85)
β -lactoglobulin A	(5.20)
soybean trypsin inhibitor	(4.55)
amyloglucosidase	(3.50)

ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) は、7.5% native-ポリアクリルアミドゲル (1 mm 厚) を用い、Reisfeld らの方法⁸⁾ に従って行った。30% アクリルアミド溶液 3.5 ml (37: 1) に緩衝液 3.75 ml (0.06 M KOH、0.376 M 酢酸、pH 4.3)、純水 7.75 ml および 20% 過硫酸アンモニウム 150 μ l を加え脱気した後、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミンを 55 μ l を添加して固化したゲルを使用した。試料、PAGE 試料用緩衝液 (0.06 M KOH、0.0628 M 酢酸、pH 6.8) および 80% (v/v) グリセロールを 5: 1: 2 (容積比) で混合したものを電気泳動用試料として用いた。電極液には 0.350 M β -アラニンと 0.14 M 酢酸を含む溶液 (pH 4.5) を用い、上部電極を陽極、下部電極を陰極として通電した。通常の Davis の PAGE⁹⁾ とは異なり、この方法では酸性タンパク質は泳動されず、塩基性の pI をもつタンパク質のみが泳動されることになる。

泳動後のキシラナーゼの活性染色は、pH 5.8、50°C、3 時間の反応条件で、IEF 後の活性染色と同じ手順で行った。

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 12.5% ポリアクリルアミドゲルを用い、Laemmli の方法¹⁰⁾ に従って行った。電気泳動用試料は、SDS-PAGE 試料用緩衝液 [終濃度 2.0% SDS、5% 2-メルカプトエタノール、13% (v/v) グリセロール、15 mM Tris/HCl (pH 6.8)] に溶解させ、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 Sil-Best Stain, for Protein/PAGE (ナカライテスク) による銀染色および活性染色を施した。

SDS-PAGE 後のキシラナーゼの活性染色は、Morag らの方法¹¹⁾ に準じて行った。0.05% キシラン (oat spelts) を含む SDS-ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド濃度 12.5%) を用いて電気泳動した後、100 mM クエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) を用いて、ゲル内部を緩衝液で置換し (30 分間 x 4 回)、ゲル内の pH を調整した。ただし、はじめの 2 回の置換操作においては、イソプロパノールを 25% (v/v) になるように加えた緩衝液を用いて SDS を除去した。ゲル内部を所定の pH に調整した後、50°C に加温した同一 pH の緩衝液にゲルを浸し、30 分間ゲル内でキシランの加水分解反応を行った。その後、コンゴレッド水溶液で染色し、NaCl 水溶液を用いた脱色操作の後、酢酸を加えることにより活性バンドを明瞭化した。

なお、分子量マーカーは Silver stain SDS-PAGE molecular weight standards, low range (Bio-Rad Labs.) を使用し、組成は以下の通りである。() 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 ovalbmin	(45,000)
bovine carbonic anhydrase	(31,000)
soybean trypsin inhibitor	(21,500)
hen egg white lysozyme	(14,400)

2-2-3. 試料の限外濾過濃縮

試料の限外濾過濃縮には、ULTRA FILTER UNIT USY-1 (アドバンテック) または CENTRICON 10 (Amicon) を用い、説明書に従って使用した。

2-2-4. 精製

培養

キシロースを主要炭素源として加えた液体培地を 2 l ひだ付き三角フラスコに 400 ml ずつ分注し、2-2-1 項に準じて培養を行った。培養液を遠心分離 (10,000 x g、10 分間、4°C) することにより、培養上清 (930 ml) を得た。

硫酸アンモニウム分画

培養上清に細かく砕いた硫酸アンモニウム (硫安) の 50% 飽和量を加え、4°C で 1

晩放置した。沈澱画分を遠心分離 (15,800 x g、30 分間、4°C) により除去した後、上清に 80% 飽和量となるまでさらに硫酸を加え、4°C で 1 晩放置した。沈澱画分を遠心分離 (15,800 x g、30 分間、4°C) により回収し、10 mM クエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) に再溶解し、同緩衝液に対する透析操作を行った (試料の最終液量 62.2 ml)。

陽イオン交換カラムクロマトグラフィー

10 mM クエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) を用いて平衡化した CM-Toyopearl 650 M カラム (1.6 cmφ x 20 cm、東ソー) に、上記の透析後の溶液をアプライした。

カラムを同緩衝液で洗浄した後、0~300 mM 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。溶出は流速 2 ml/min で行った。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 3 ml ずつ分取し、タンパク質量は波長 280 nm における吸光度測定によりモニターした。溶出ピークに相当するフラクションに対して、PAGE を行った後、活性染色を施した (2-2-5 項参照)。

2-2-5. キシラナーゼ活性の測定

3,5-dinitrosalicylic acid 試薬の調製法

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 試薬は以下の手順で調製した。

- 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、純水を追加して溶解し 100 ml にした。
- ③ 69 ml の②に NaHCO₃ 6.9 g を加えて溶解した。
- ④ ③に①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、着色瓶に保存した。

活性の測定法

1.5% キシラン (birchwood、Sigma) 溶液 160 μl および酵素液 40 μl を 15 mmφ 試験管に入れ、50°C で 10 分間反応させた。反応は 80 mM クエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) 中で行った。キシランの加水分解に伴って生じた還元末端を DNS 法¹²⁾ よって定量することにより、キシラナーゼ活性を算出した。上述の反応条件にお

いて、キシロース 1 μmol に相当する還元末端量を 1 分間に遊離する酵素量を 1 ユニット (U) と定義した。

2-2-6. タンパク質の定量

タンパク質濃度は、DC protein assay kit (Bio-Rad Labs.) により定量した。ただし、ここでは bovine serum albumin を標準タンパク質として用いた。

2-3. TAR-1 株による塩基性キシラナーゼの生産

2-3-1. TAR-1 株培養上清の等電点電気泳動

pH 10.5 の液体培地 (2-2-1 項参照) に、キシロースを終濃度 0.1% になるように加えたものを用い、50 時間培養した後、遠心により上清を取得した。上清を限外濾過 (ULTRA FILTER UNIT USY-1) により 5 倍に濃縮した後、IEF に供した。銀染色および活性染色を施したところ、本研究室で以前見出されたキシラナーゼ R²⁾ (pI 4.1) 以外に複数の活性バンドが見られた。特に、pI 9.3 に相当する活性バンドは、キシラナーゼ R に次いで明瞭なハローを形成した (Fig. 2-1)。

この塩基性キシラナーゼを、以後キシラナーゼ T と呼ぶことにする。

2-3-2. キシラナーゼ T の生産条件の検討

pH 10.5 の液体培地 (2-2-1 項参照) に、キシラン、キシロース、またはグルコースを終濃度 0.1% になるように加えたものと、炭素源を加えないものを用い、18 mmφ 試験管で 50 時間培養し、培養上清を取得した。本菌の培養上清中にはキシラナーゼ T 以外にキシラナーゼ R も存在しているため、DNS 法による活性測定によってキシラナーゼ T の生産量を見積もることはできない。そこで、活性染色により、キシラナーゼ T のみを特異的に検出することにした。Fig. 2-2 に培養上清を PAGE にかけた結果を示す。炭素源を加えなかった場合との比較において、キシランあるいはキシロースの添加はキシラナーゼ T の生産量に顕著な影響を与えないことがわかった。一方、グルコースを主要炭素源として添加すると、活性バンドが薄く、生産量が低下したと考えられる結果となった。

同じく TAR-1 株の生産するキシラナーゼ R についても、グルコースを主要炭素源として加えた場合、キシロースを加えたときと比して生産量の低下が見られた。本研究室で以前取得された好アルカリ性 *Bacillus* sp. 41M-1 株の生産する好アルカリ性のキシラナーゼ J では、培地中のキシロースおよびグルコースがその生産を抑制することがわかっている^{13,14)}。

グルコースによるカタボライト抑制はキシラナーゼの生合成において一般的な現象である¹⁵⁾ が、TAR-1 株についてもグルコースがキシラナーゼ T および R の生産を抑制している可能性が示唆された。

培養時間によるキシラナーゼ T 生産量変化を見積もるため、経時的に (培養開始

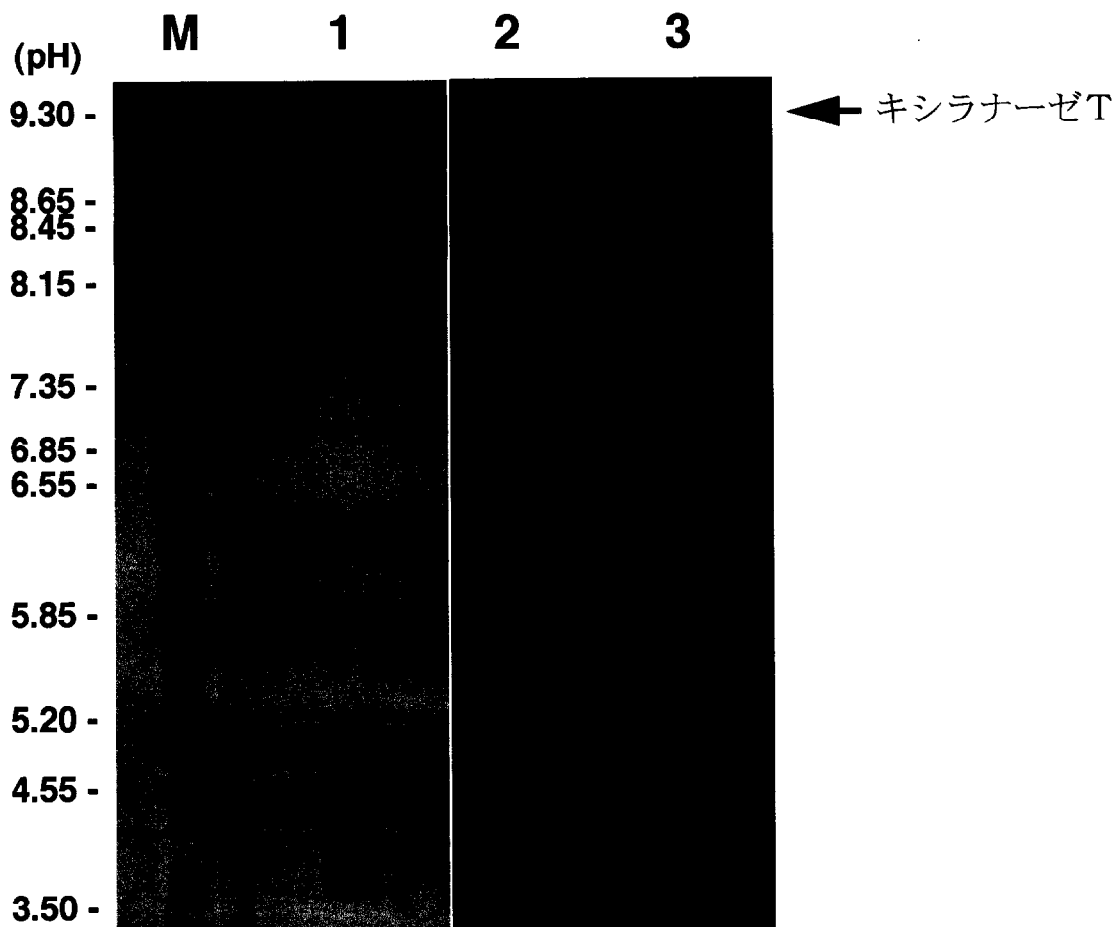


Fig. 2-1 TAR-1 株培養上清の等電点電気泳動

培養上清を限外濾過 (ULTRA FILTER UNIT USY-1) で 5 倍に濃縮し、電気泳動した後、銀染色 (レーン 1) および活性染色 (レーン 2) を行った。同時にキシラナーゼR の精製標品も泳動した (レーン 3)。活性染色は 2-2-2 項の方法にて実施した。M は等電点マーカ-を表す。

- レーン 1 : 培養上清 100 μ l 相当
- 2 : 培養上清 50 μ l 相当
- 3 : キシラナーゼR の精製標品

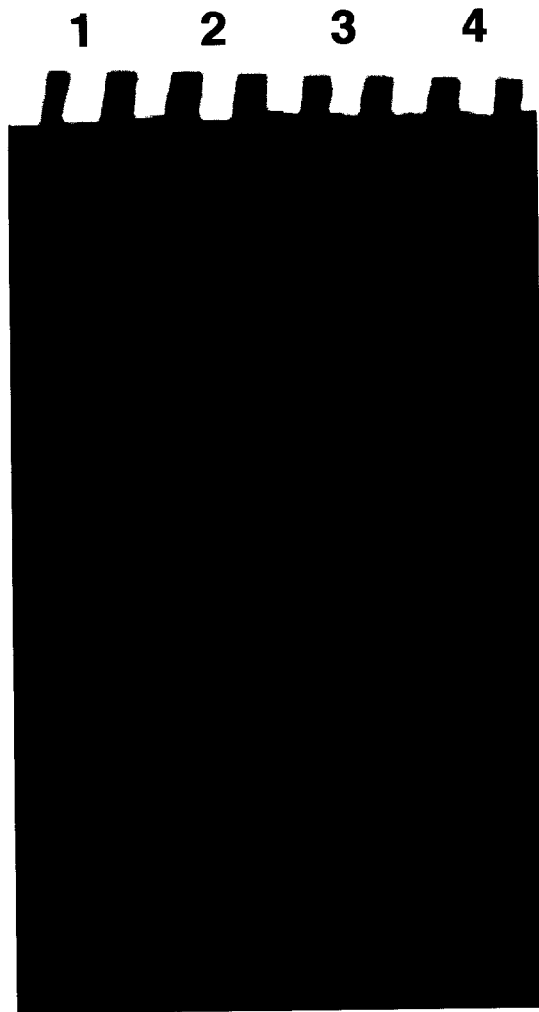


Fig. 2-2 各種炭素源を用いて培養した TAR-1 株培養上清の PAGE

主要炭素源を替えて TAR-1 株を振とう培養し、50 時間後の培養上清 10 μ l を PAGE にかけた。泳動後、2-2-2 項に記載した方法で活性染色を行った。

- レーン 1 : 0.1% キシロースを加えて培養した上清
- 2 : 0.1% キシランを加えて培養した上清
- 3 : 特に炭素源を添加せずに培養した上清
- 4 : 0.1% グルコースを加えて培養した上清

後 2、3、4 日) 培養液を採取して上清を取得した。培養上清の PAGE の結果より、培養開始 2 日後および 3 日後では差が見られなかったが、4 日後ではわずかに活性バンドが薄く、キシラナーゼ T の量が減少したと考えられた (Fig. 2-3)。しかし、活性染色ではキシラナーゼ T の定量が困難で、どの時点で最大の生産量が得られるかを正確に決定するには至らない。キシラナーゼ T の精製には、主要炭素源としてキシロースを添加した培地で 50 時間培養した上清を用いることにした。



Fig. 2-3 TAR-1 株培養上清の PAGE

TAR-1 株培養液を経時的に採取し、培養上清 10 μ l 相当を PAGE に供した。泳動後、2-2-2 項に記載した方法で活性染色を行った。

- レーン 1 : 培養開始 2 日後の培養上清
- 2 : 培養開始 3 日後の培養上清
- 3 : 培養開始 4 日後の培養上清

2-4. キシラナーゼ T の精製

TAR-1 株の培養上清に対して硫酸分画を行い、活性画分を回収した。50~80% 飽和濃度の画分を CM-カラムクロマトグラフィーにかけた結果、キシラナーゼ活性を有するタンパク質は、NaCl 濃度が約 150 mM 付近で溶出した。

CM-カラムクロマトグラフィー後の標品を SDS-PAGE および IEF に供し、銀染色を施したところ、いずれにおいても単一バンドが得られた (Fig. 2-4 および 2-5)。また、同時に行った活性染色においても単一バンドを与え、活性バンドとタンパク質バンドが一致していることが示された。SDS-PAGE より、この精製標品の分子量は 23,000 と決定された。また、IEF より pI はおよそ 9.3 以上と見積もられたが、ここで用いた両性担体の pH インターバル (pH 3~10) を考えると、あまり正確な値ではない。

各精製段階におけるタンパク質量およびキシラナーゼ活性を測定し、それらに基づいて算出された値をまとめて Table 2-1 に示した。930 ml の培養上清から、最終的に 270 U/mg の比活性を有する標品 0.23 mg が得られ、その収率は 10% であった。

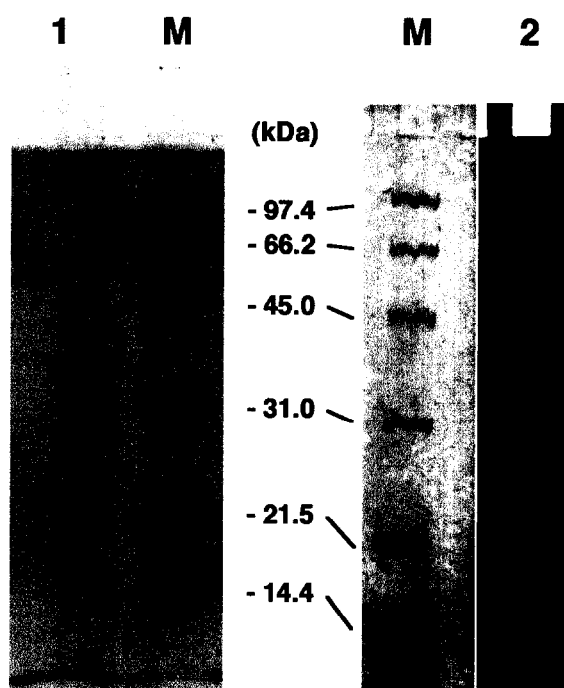


Fig. 2-4 キシラナーゼT 精製標品の SDS-PAGE

CM-Toyopearl 650M カラムにより分画したキシラナーゼT 精製標品を限外濾過 (CENTRICON 10) で濃縮した後に、SDS-PAGE を行い、銀染色 (レーン 1) と活性染色 (レーン 2) を行った。活性染色の方法は 2-2-3 項に従った。泳動に用いた試料の量を以下に示した。

レーン 1 : 0.76 μg

レーン 2 : 0.19 μg

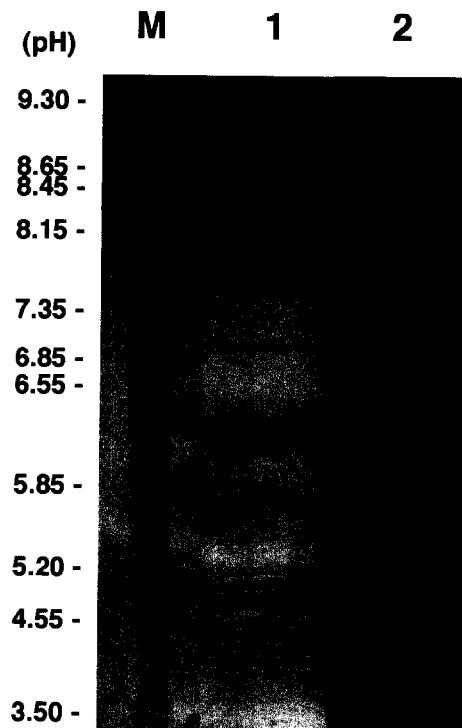


Fig. 2-5 キシラナーゼT 精製標品の IEF

CM-Toyopearl 650M カラムにより分画したキシラナーゼT 精製標品を限外濾過 (CENTRICON 10) で濃縮した後に、IEF を行い、銀染色 (レーン 1) と活性染色 (レーン 2) を行った。活性染色の方法は 2-2-3 項に従った。泳動に用いた試料の量を以下に示した。

レーン 1 : 0.38 μg

レーン 2 : 0.19 μg

Table 2-1 キシラナーゼTの精製

Purification step	Volume (ml)	Activity ^a (U)	Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
Culture supernatant	930	600	2700	0.22	100
Ammonium sulfate fractionation	62.2	200	8.8	22	32
CM-chromatography	12.0	62	0.23	270	10

^a Xylanase activity was measured at 50°C for 10 min. Reaction pH was adjusted with 80 mM citrate buffer (pH 5.8).

2-5. 結論

好熱好アルカリ性 *Bacillus* sp. TAR-1 株の培養上清中に、pI を 9.3 以上に有する新規な塩基性キシラナーゼ (キシラナーゼT) を見出した。本酵素の生産は、グルコースにより抑制された。

キシラナーゼT の精製を行い、SDS-PAGE および IEF で単一バンドを示す精製標品を得た。本キシラナーゼの精製標品の分子量は 23,000 であり、最終的な比活性は 270 U/mg と算出された。

引用文献

- 1) Nakamura, S., Nakai, R., Wakabayashi, K., Ishiguro, R., Aono, R. and Horikoshi, K. 1994. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58 : 78-81.
- 2) Nakamura, S., Ishiguro, Y., Nakai, R., Wakabayashi, K., Aono, R. and Horikoshi, K. 1995. *J. Mol. Catal. B Enzymatic*, 1: 7-15.
- 3) Honda, H., Kudo, T., Ikura, Y. and Horikoshi, K. 1985. *Can. J. Microbiol.*, 31: 538-542.
- 4) Ohkoshi, A., Kudo, T., Mase, T. and Horikoshi, K. 1985. *Can. J. Microbiol.* 49: 3037-3038.
- 5) Atkins, E. D. T. 1992. In "Xylan and xylanases", eds. Visser, J., Beldman, G., Somern M. A. K. and Voragen, A. G. J., Elsevier, Amsterdam, pp. 21-39.
- 6) Wu, S. C., Kauffmann, S., Darvill, A. G. and Albersheim, P. 1995. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 8: 506-514.
- 7) Minami, K., Sakamoto, T., Hasegawa, T. and Inamori, Y. 1992. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 371-375.
- 8) Reisfeld, R. A., Lewis, U. J. and Williams, D. E. 1962. *Nature (London)*, 195: 281-283.
- 9) 堀尾武一編, 蛋白質・酵素の基礎実験法. 1994. 南江堂.
- 10) Laemmli, U. K. 1970. *Nature (London)*, 227 : 680-685.
- 11) Morag, E., Bayer, E. A., and Lamed, R. 1990. *J. Bacteriol.*, 172 : 6098-6105.
- 12) Sumner, J.B. 1925. *J. Biol. Chem.*, 47 : 393-395.
- 13) Nakamura, S., Wakabayashi, K., Nakai, R., Aono, R. and Horikoshi, K. 1993. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 9: 221-224.
- 14) Nakamura, S., Wakabayashi, K., Nakai, R., Aono, R. and Horikoshi, K. 1992. In "Xylan and xylanases", eds. Visser, J., Beldman, G., Somern M. A. K. and Voragen, A. G. J., Elsevier, Amsterdam, pp. 443-446.
- 15) Kulkarni, N., Shedye, A. and Rao, M. 1999. *FEMS Microbiol. Rev.*, 23: 411-456.

第3章

TAR-1 株に由来する塩基性キシラナーゼの諸性質

3-1. 緒言

好熱好アルカリ性 *Bacillus* sp. TAR-1 株は、好熱性アルカリキシラナーゼ (キシラナーゼ R) 生産菌として分離された^{1,2)}。本菌はキシラナーゼ R とは別に、塩基性キシラナーゼ (キシラナーゼ T) を菌体外に分泌する。このキシラナーゼ T の分子量は 23,000 であり、本菌が菌体外に分泌するキシラナーゼ群の中で最も高い等電点を有するものであった。すでに、キシラナーゼ T の TAR-1 株培養上清からの精製も行われている (本論文第 2 章参照)。

TAR-1 株が生産するキシラナーゼ R は、pH 7.0 における反応至適温度を 75°C、そして 50°C における反応至適 pH を pH 5~10 に有する優れた酵素であった^{2,3)}。キシラナーゼ T も、キシラナーゼ R と同様、高温・アルカリ性条件下で高い活性を有することが期待される。

本研究では、キシラナーゼ T 精製標品を用い、その酵素学的性質を明らかにすることを目的とした。

3-2. 実験材料と方法

3-2-1. キシラナーゼ T 精製標品

キシラナーゼ T 精製標品は、本論文 2-2-5 項の方法に従って調製した。
mM クエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液)、50°C における比活性が 270 U/mg、
述、3-2-2 項参照) のものを用いた。

3-2-2. キシラナーゼ活性の測定

1.5% キシラン (birchwood、Sigma) 溶液 160 μ l および酵素溶液 40 μ l を 15 mm ϕ 試験管に入れ、50°C で 10 分間反応させた。キシランの加水分解に伴って生じた還元末端を DNS法⁴⁾ によって定量することにより、キシラナーゼ活性を算出した。以上の反応条件において、キシロース 1 μ mol に相当する還元末端量を 1 分間に遊離する酵素量を 1 ユニット (U) と定義した (本論文 2-2-5 項参照)。

3-2-3. 反応 pH 依存性の測定

キシラナーゼ T 精製標品を用いて、50°C、各 pH 下で 10 分間反応を行った。反応により生じた還元末端量を DNS 法で定量することにより、酵素活性を算出した。pH の調整には下記の緩衝液を用いた。各 pH は 50°C で測定した。

80 mM クエン酸/クエン酸ナトリウム	(pH 3.2~5.8)
80 mM KH ₂ PO ₄ /NaOH	(pH 5.8~8.2)
80 mM BICINE/NaOH	(pH 7.8~9.0)
80 mM Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃	(pH 9.6~10.5)

3-2-4. pH 安定性の評価

キシラナーゼ T 精製標品 0.042 U (pH 5.8、50°C で測定) を用いて、各 pH の緩衝液中、50°C で 3 時間インキュベートした後、残存活性を測定した。活性測定は pH 5.8 で行い、インキュベート前の酵素標品の活性を 100% とする相対活性で示した。pH の調整には以下の緩衝液を用いた。各 pH は 50°C で測定した。

50 mM KH ₂ PO ₄ /NaOH	(pH 5.8~7.1)
50 mM BICINE/NaOH	(pH 7.8~9.0)
50 mM Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃	(pH 9.6~10.5)

3-2-5. 反応温度依存性の測定

キシラナーゼT 精製標品を用いて、pH 5.8、各温度で 10 分間反応を行った。反応により生じた還元末端量を DNS 法で定量することにより、酵素活性を算出した。反応液の pH 調整には、80 mM クエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) を用いた。

3-2-6. 温度安定性の評価

キシラナーゼT 精製標品 0.042 U (pH 5.8、50°C で測定) を pH 5.5 の緩衝液 (10 mM クエン酸/クエン酸ナトリウム) 中、各温度において 30 分間インキュベートした後、残存活性を pH 5.8、50°C で測定した。反応により生じた還元末端量を DNS 法で定量することにより、酵素活性を算出した。4°C においてインキュベートした場合の残存活性を 100% とする相対活性で示した。80 mM クエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) を用いて反応液の pH を調整した。

3-2-7. 加水分解産物の分析

0.32 mg のキシラン (birchwood および oat spelts, Sigma) に、キシラナーゼT 精製標品 0.1 U (pH 5.8、50°C で測定) を加え、200 μ l の水溶液中で加水分解した。反応は、pH 5.8、50°C で行い、pH の調整には 80 mM KH₂PO₄/NaOH 緩衝液 (pH 5.8) を用いた。反応液を経時的に採取し、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。展開は室温で行い、アセトニトリル-水 (3:1, v/v) の展開溶媒を使用した。展開後の TLC プレートは風乾し、1% オルシノール-50% 硫酸水溶液を噴霧した後、ドライヤーで加熱して発色させた⁵⁾。

標準物質としてキシロース (X₁)、キシロビオース (X₂)、キシロトリオース (X₃)、キシロテトラオース (X₄)、キシロペンタオース (X₅) を用いた。X₂~X₅ のキシロオリゴ糖は、元筑波大学教授の安井恒男先生に御供与頂いた。

3-3. キシラナーゼ T の酵素学的性質

3-3-1. 反応 pH 依存性

キシラナーゼ T 精製標品を用いて、キシラナーゼ活性の 50°C における反応 pH 依存性を調べた結果を Fig. 3-1 に示した。本酵素は pH 5~8 の pH 域で高活性を維持していることが明らかとなった。同じく TAR-1 株の生産するキシラナーゼ R の至適 pH (pH 5~10)^{2,3)} に比べると、作用 pH 域は若干狭いことがわかった。

3-3-2. pH 安定性

キシラナーゼ T 精製標品を用いて、キシラナーゼ活性のアルカリ性域における pH 安定性を調べた結果を Fig. 3-2 に示した。キシラナーゼ T は、50°C の条件下、少なくとも pH 10.5 まで安定であり、活性の低下は見られなかった。従って、本酵素の活性が pH 9 以上で低下している (Fig. 3-1) のは、少なくともタンパク質の不安定性に起因する現象ではないことがわかる。

本酵素をアルカリ性 pH でインキュベートした場合、中性 pH でインキュベートしたときより活性が向上する傾向が見られた。原因の詳細は不明であるが、アルカリ性条件下で本酵素が活性化される可能性が考えられた。

3-3-3. 反応温度依存性

キシラナーゼ T 精製標品を用いて、キシラナーゼ活性の pH 5.8 における反応温度依存性を調べた結果を Fig. 3-3 に示した。本酵素の反応至適温度は 70°C であった。塩基性 pI を有するキシラナーゼで 70°C という高温に反応の至適を持つ酵素は、現在のところ報告されていない。TAR-1 株は酸性 pI を有するキシラナーゼ R (反応至適温度 75°C) も生産するが^{2,3)}、キシラナーゼ T はこの酵素とほぼ同等の温度で最も有効に作用することが明らかとなった。

3-3-4. 温度安定性

キシラナーゼ T 精製標品を各温度条件下で 30 分間インキュベートした後の残存活性を調べた。その結果を Fig. 3-4 に示す。本酵素は 55°C まで安定であることがわ

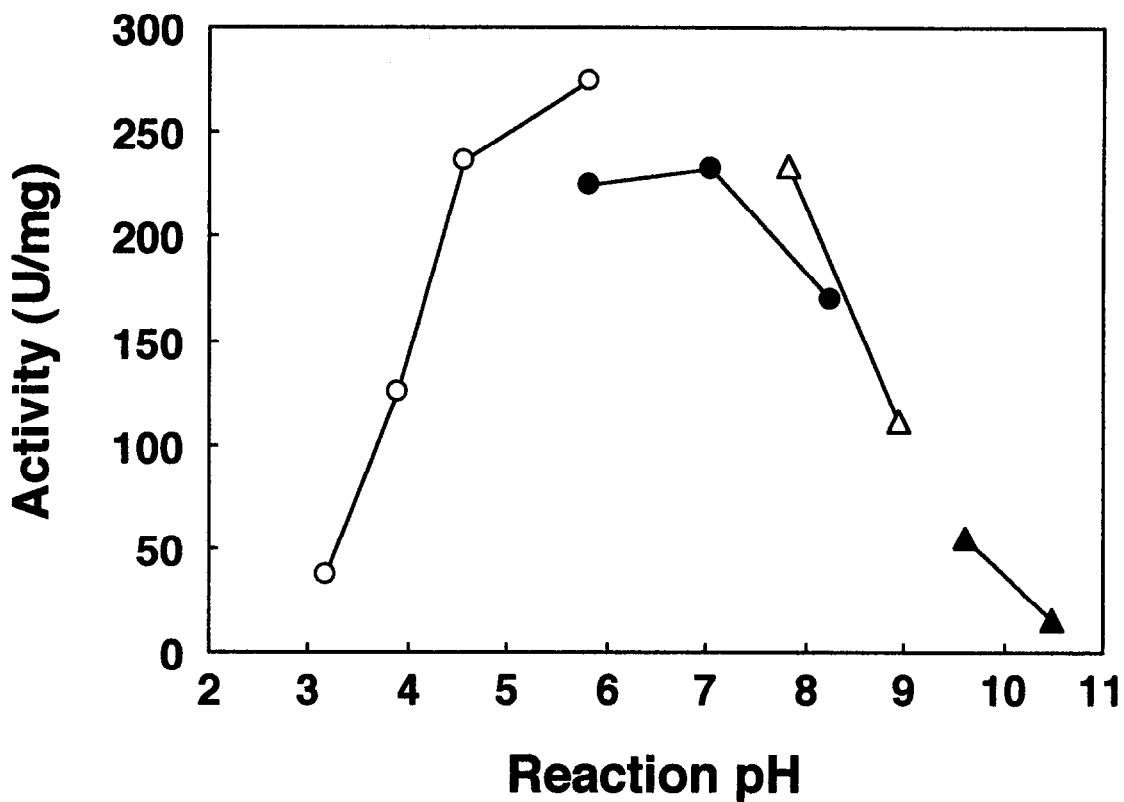


Fig. 3-1 キシラナーゼ T の反応 pH 依存性

各 pH の条件下、50°C で 10 分間反応を行った。pH の調整には以下の緩衝液を用いた。

- : 80 mM クエン酸/クエン酸ナトリウム (pH 3.2~5.8)
- : 80 mM KH₂PO₄/NaOH (pH 5.8~8.2)
- △ : 80 mM BICINE/NaOH (pH 7.8~9.0)
- ▲ : 80 mM Na₂CO₃/NaHCO₃ (pH 9.6~10.5)

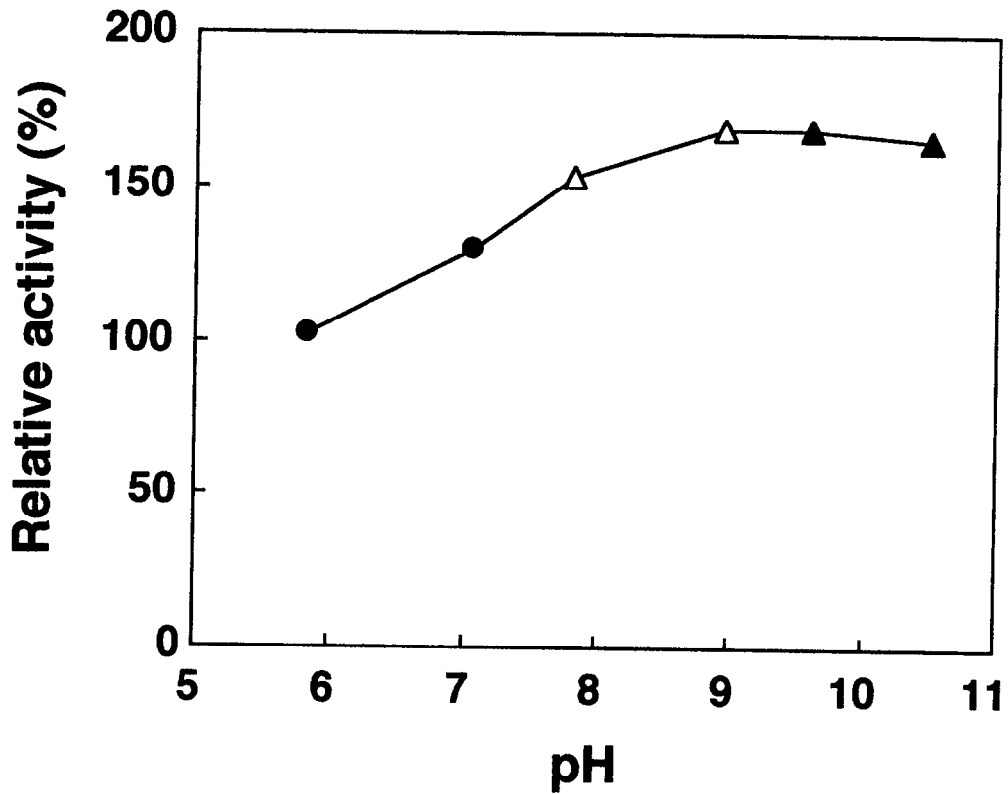


Fig. 3-2 キシラナーゼT の pH 安定性

各 pH の緩衝液中、50°C で 3 時間インキュベートした後の残存活性を pH 5.8、50°C で測定した。インキュベート前の酵素標品の活性を 100% とした。pH の調整には以下の緩衝液を用いた。

- : 80 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ (pH 5.8 ~ 8.2)
- △ : 80 mM BICINE/ NaOH (pH 7.8 ~ 9.0)
- ▲ : 80 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (pH 9.6 ~ 10.5)

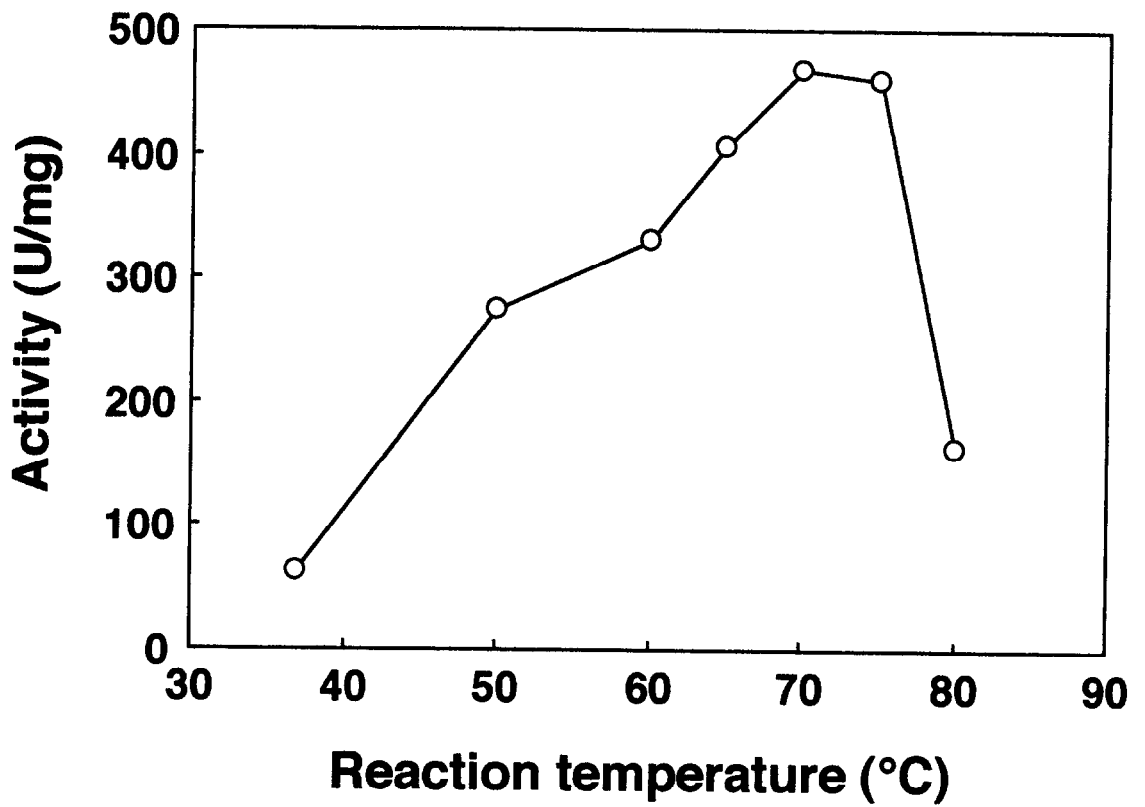


Fig. 3-3 キシラナーゼT の反応温度依存性

80 mM クエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) を用いて、各温度で 10 分間反応を行った。

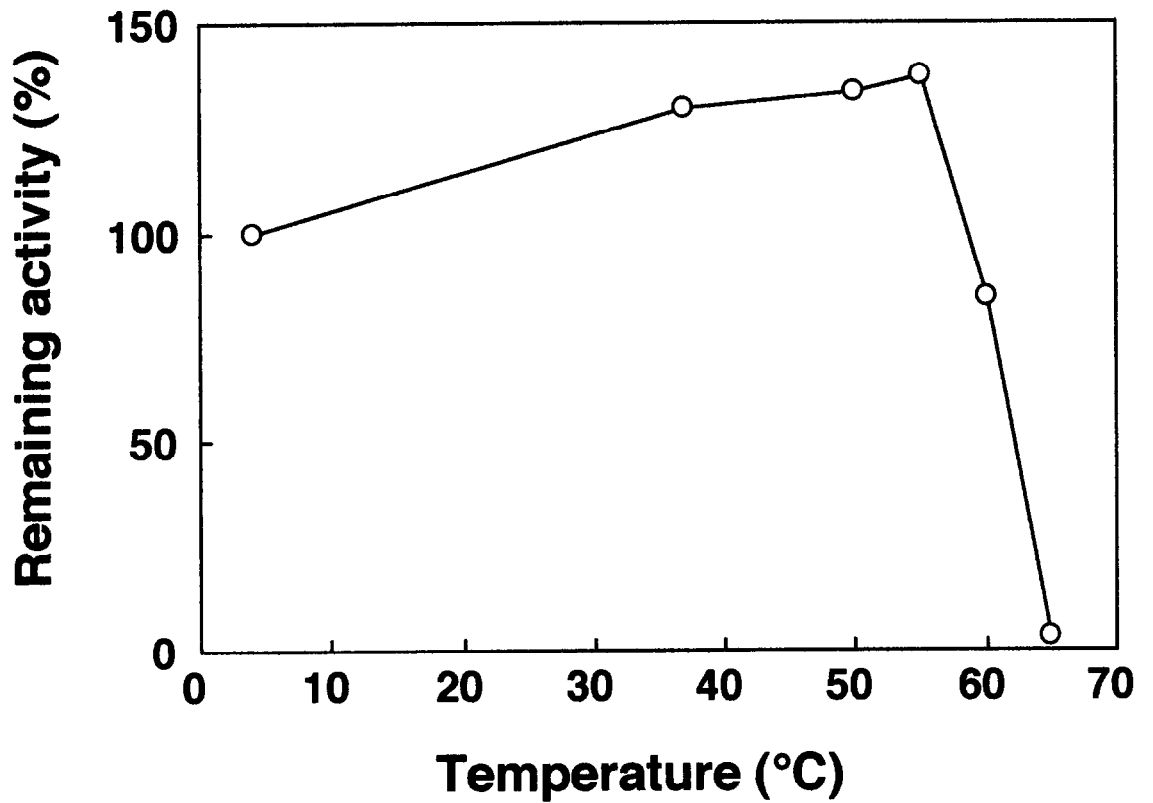


Fig. 3-4 キシラナーゼT の温度安定性

各温度において30分間インキュベートした後、pH 5.8、50°Cで10分間反応を行い、残存活性を測定した。4°Cにおいてインキュベートした場合の残存活性を100%とした。pH調整には80 mM クエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) を用いた。

かった。キシラナーゼT は、同じく TAR-1 株の生産するキシラナーゼR^{2,3)} と同等の温度安定性を示した。

本酵素の活性は 55°C を超える温度での熱処理により速やかに減少するが、反応の至適温度は 70°C であり、75°C においても高活性を保っている (Fig. 3-3、3-4 参照)。これは、酵素が基質キシランと共存することで安定化するためと考えられる。キシラナーゼR についても、基質共存下での温度安定性の向上が報告されている³⁾。

3-4. キシラナーゼ T によるキシラン加水分解産物の分析

キシラナーゼ T 精製標品によるキシランの加水分解産物を TLC により分析した。birchwood 由来のキシランを用いた際の結果を Fig. 3-5 に示す。キシランの分解産物として、X₂、X₃をはじめとする各種キシロオリゴ糖が確認された。反応時間の短い場合には比較的高分子のキシロオリゴ糖が多いが、反応時間が長くなるにつれ、次第に 2 糖以上のオリゴ糖に低分子化されていくことがわかった。birchwood 由来のキシランは比較的水溶性が高いが、水溶性のより低い oat spelts 由来のキシランを使用した場合にもほぼ同様な結果が得られた (データ示さず)。

以上より、本酵素は高分子キシランをランダムに加水分解するエンド型キシラナーゼであると考えられた。ちなみに、同じく TAR-1 株が生産するキシラナーゼ R もエンド型酵素である^{2,3)}。

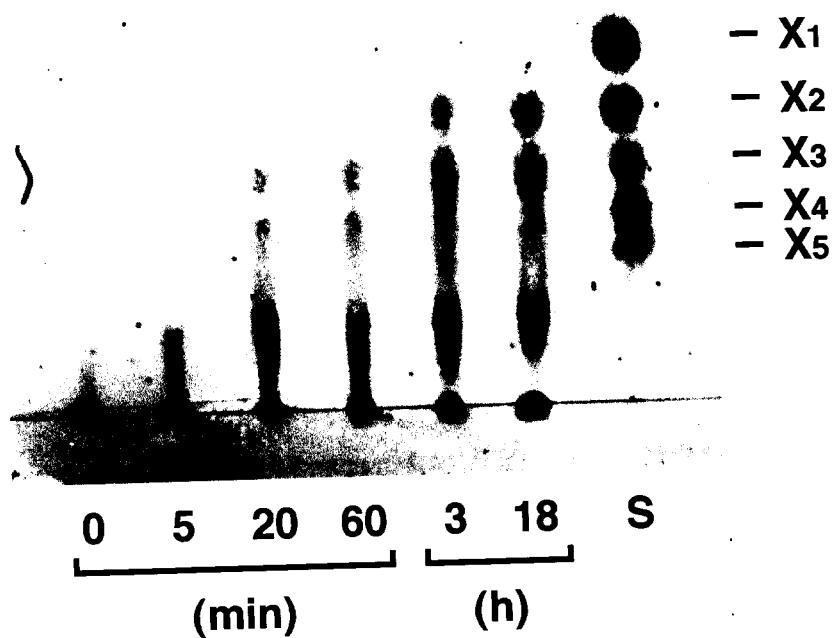


Fig. 3-5 キシラナーゼT によるキシラン分解産物の TLC

キシラナーゼT 精製標品を用いて、pH 5.8、50°C でキシラン (birchwood) の加水分解を行い、反応液を経時的 (反応開始後 0分、5分、20分、60分、3時間、18時間後) に採取した。分解産物はシリカゲル薄層プレートを用いた TLC により調べた。反応 pH の調整には、80 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ (pH 5.8) を用いた。S はキシロースおよびキシロオリゴ糖の標準物質を示す。

3-5. 結論

好熱好アルカリ性 *Bacillus* sp. TAR-1 株の培養上清より精製したキシラナーゼT を用いて、その酵素学的性質を検討した。本酵素は、pH 5.8 における反応至適温度を 70°Cという高温域に有する、新規な好熱性の塩基性キシラナーゼであることが明らかとなった。

キシラナーゼT の主な性質⁶⁾を、同じく TAR-1 株の生産するキシラナーゼR の性質^{2,3)}と共に、Table 3-1 にまとめて示した。本酵素は高温条件でも高活性を示すことから、工業的にも有用な酵素であると考えられた。

Table 3-1 キシラナーゼT とキシラナーゼR の性質比較

	Xylanase T	Xylanase R
Molecular weight	23,000	40,000
pI	≥ pH 9.3	pH 4.1
Optimum pH	pH 5-8 (at 50°C)	pH 5-10 (at 50°C)
Optimum temperature	70°C (pH 5.8)	75°C (at pH 7.0)
pH stability	≤ pH 10.5 ^a	N. D. ^b
Thermostability	≤ 55°C (at pH 5.5)	≤ 55°C (at pH 9.0)
Enzyme type	Endo-type	Endo-type

^a Effect of pH on stability was not measured at over pH 10.

^b N. D. : Not determined

引用文献

- 1) Nakamura, S., Nakai, R., Wakabayashi, K., Ishiguro, R., Aono, R. and Horikoshi, K. 1994. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58: 78-81.
- 2) Nakamura, S., Nakai, R., Ishiguro, Y., Wakabayashi, K., Aono, R. and Horikoshi, K. 1993. In "Genetics biochemistry and Ecology of Lignocellulose Degradation", eds, Shimada, K., Hoshino, S., Ohmiya, K., Sakka, K., Kobayashi, Y. and Shimada, K., Uni Publishers, Tokyo, pp. 334-342.
- 3) Nakamura, S., Ishiguro, Y., Nakai, R., Wakabayashi, K., Aono, R. and Horikoshi, K. 1995. *J. Mol. Catal. B Biocatal.*, 1: 7-15.
- 4) Sumner, J. B. 1925. *J. Biol. Chem.*, 47: 393-395.
- 5) Bruckner, H. 1995. *Biochem. J.*, 60: 200-205.
- 6) Takahashi, H., Nakai, R. and Nakamura, S. 2000. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64: 887-890

第 4 章

TAR-1 株に由来する 2 つのキシラナーゼ遺伝子の クローニングと解析

4-1. 緒言

本研究室で分離された好熱好アルカリ性 *Bacillus* sp. TAR-1 株は、好熱性アルカリキシラナーゼであるキシラナーゼR を分泌生産する¹⁾。キシラナーゼ生産菌の中には、複数の酵素を生産するものが多く知られている。(本論文第 1 章 1-1 節参照)。本菌の培養上清中からも、キシラナーゼR 以外に、塩基性キシラナーゼであるキシラナーゼT が見出され、精製が行われた(文献²⁾ および本論文第 2 章参照)。さらに、本酵素の諸性質も明らかにされている(本論文第 3 章参照)。キシラナーゼT は、pH 5.8 における反応至適温度を 70°C という高温に有し、高い温度安定性と pH 安定性を示した。一方、キシラナーゼR は、分子量も等電点も全く異なるが、pH 9.0 においてキシラナーゼT と同等の反応至適温度と温度安定性を有していた。これらの特徴は、タンパク質の一次構造に起因していると考えられる。

本研究では、キシラナーゼT およびキシラナーゼR タンパク質の一次構造を明らかにする目的で、両酵素をコードする遺伝子のクローニングを行った。

4-2. 実験材料と方法

4-2-1. 菌株および培地

塩基性キシラナーゼ生産菌である好熱好アルカリ性 *Bacillus* sp. TAR-1 株¹⁾ および大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 株 [*supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*] を使用した。

TAR-1 株の培養には、0.5% 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% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.2% キシロースの組成に、終濃度 1% の Na_2CO_3 (別滅菌) を加え、pH 10.5 に調整した液体培地を用いた。各成分は純水に溶解し、121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌したものを用いた (本論文第 2 章 2-2-1 項参照)。

Bacillus halodurans C-125 株は理化学研究所微生物系統保存施設より購入し (JCM no. 9153)、TAR-1 株と同じ培地を用いて 37°C で培養した。

大腸菌の培養には、L-broth [1% トリプトン (Difco)、0.5% イーストエキス、0.5% 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。各成分は純水に溶解し、121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌したものを用いた。滅菌後の培地には、終濃度 50 μ g/ml のアンピシリン (Sigma) を添加して使用した。

4-2-2. クローニング技術

制限酵素およびポリヌクレオチドキナーゼは東洋紡より、またリガーゼは宝酒造より購入し、それぞれ説明書の指示に従って使用した。

大腸菌の形質転換はエレクトロポレーションで行った。エレクトロポレーションには Cell-Porator Electroporation System および Voltage Booster (GIBCO BRL) 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 \cdot 3Na、pH 8.2) を用いて行なった。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 \cdot 3Na、pH 7.8] を用いて行なった。特に記述のない限り、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 Hin dIII 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。必要なバンドを含むゲル断片をマイクロチューブにとり、TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、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。

4-2-3. N 末端アミノ酸配列の分析

TAR-1 株の培養上清から、硫酸アンモニウム分画、CM-カラムクロマトグラフィーの操作を経て、電気泳動的に単一なキシラナーゼ T 精製標品を取得した (文献²⁾ および本論文第 2 章参照)。精製標品約 30 pmol を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、キシラナーゼ T の N 末端のアミノ酸配列を決定した。

4-2-4. 染色体 DNA の調製

TAR-1 株の染色体の調製は、既法⁴⁾に準じて行った。TAR-1 株を 100 ml の液体培地 (400 ml 容ヒダ付きフラスコを使用) を用い、50°C、170 rpm で 28 時間振とう培養 (Bio-Shaker BR-15、タイテック) した。遠心 (8,000 x g、10 分間、4°C) により集菌した後、菌体を 25% スクロースを含む 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で洗浄した後、同緩衝液 9 ml に懸濁させた。1.8 ml 0.5 M EDTA と 0.9 ml リゾチーム (10 mg/ml、Sigma) を加え、37°C で 1 時間加温し、その後 5.4 ml SDS (3.3%) を添加し、さらに 37°C で 1 時間インキュベートして溶菌させた。5 ml 4M NaCl を加えた後、TE 緩衝液で飽和させたフェノール溶液 9 ml を加えて 20 分間攪拌し、さらにクロロホルム 9 ml を混ぜて 5 分間氷冷した。遠心 (8,000 x g、10 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を再度繰り返した後、水層に対して等量のジエチルエーテルを加え、充分混合した。遠心 (1,500 x g、10 分間、4°C) し、上層のエーテルを取り除いた後、下層 (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 を絡めとった。ガラス棒に付着させた DNA を 4 ml の TE 緩衝液に溶解した後、500 μ l リボヌクレアーゼ A (1 mg/ml、Sigma) を加え、37°C で一晩反応させ、染色体 DNA 溶液とした。

B. halodurans の染色体は、TAR-1 株の染色体の調製方法に準じた。但し、培養は 37°C で行った。

4-2-5. 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。反応装置は GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer) を使用した。

キシラナーゼ遺伝子の部分的増幅

N 末端アミノ酸配列などに基づくミックスプライマーを用いて 2 つのキシラナーゼ遺伝子を部分的に増幅する目的には、2 種類の耐熱性 DNA ポリメラーゼを使用した。

キシラナーゼ T 遺伝子の増幅には TaKaRa Taq (宝酒造)を用いた。反応液 50 μ l 中には 400 ng の鑄型染色体 DNA、各 50 pmol のプライマー、2.5 mM の dNTP、2.5 U のポリメラーゼが含まれる。94°C、5 分間のプレヒート後、

94°C x 1 分 → 45°C x 1 秒 → 72°C x 2.5 分

のサイクルを 25 回繰り返す、最後に 72°C 1 分間のポストヒートを行った。

キシラナーゼ R 遺伝子の増幅には KOD dash DNA ポリメラーゼ (東洋紡) を用いた。反応液 50 μ l 中には 400 ng の鑄型染色体 DNA、各 50 pmol のプライマー、2.0 mM の dNTP、2.5 U のポリメラーゼが含まれる。94°C、5 分間のプレヒート後、

94°C x 1 分 → 40°C x 2 秒 → 74°C x 30 秒

のサイクルを 30 回繰り返す、最後に 74°C 1 分間のポストヒートを行った。

cassette-ligation mediated PCR

cassette-ligation mediated PCR は既法⁵⁾に準じて、LA PCR *in vitro* Cloning Kit を用いて行った。各種 DNA カセット、耐熱性ポリメラーゼ、およびカセットプライマー C1、C2 はキットに含まれるものを説明書の指示に従って使用した。

KOD DNA ポリメラーゼを使用した高精度 PCR

ポリメラーゼの複製エラーを低減する目的には、正確性の高い KOD DNA ポリメラーゼ (東洋紡) を用いた。反応液 50 μ l 中には 100 ng の鋳型染色体 DNA、各 30 pmol のプライマー、2.0 mM の dNTP、2.5 U のポリメラーゼが含まれる。98°C、2 分間のプレヒート後、

98°C x 15 秒 \rightarrow (プライマーの T_m に応じた温度) x 2 秒 \rightarrow 74°C x 30 秒のサイクルを 25 回繰り返す、最後に 74°C 1 分間のポストヒートを行った。

4-2-6. PCR 産物の大腸菌用ベクターへの組み込み

PCR 産物のクローニングには、pGEM-T Easy Vector System (Promega) を用いた。プロトコールの指示に従い、PCR 産物を pGEM-T Easy ベクターに連結した後、大腸菌 DH5 α 株に形質転換した。ただし、KOD DNA ポリメラーゼを使用して増幅した PCR 産物はリン酸化した後、*Hin* cII 処理した pUC119 に連結して大腸菌 DH5 α 株に形質転換した。

4-2-7. 塩基配列の決定

塩基配列の決定はジデオキシ法⁶⁾にて行い、2 種類の DNA シークエンサーを用いた。すなわちダイプライマー法に基づく ThermoSequenase サイクルシークエンシングキット (Amersham Pharmacia Biotech AB) 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、ダイターミネーター法に基づく BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE バイオシステムズ) を用いて調製した試料は、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE バイオシステムズ) を用いて解析した。

4-2-8. 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.10.1 (SDC ソフトウェア開発) を使用した。

4-2-9. サザンハイブリダイゼーション解析

プローブの調製

PCR 産物を AGE にかけた後、目的 DNA バンドを回収した。DNA 断片の約 1 μg をジゴキシゲニン dUTP を用いたランダムプライム法 (ノンラジオシステム DNA 標識および検出キットを使用、Boehringer Mannheim) により標識したものを、プローブとして用いた。

サザンブロッキングおよびハイブリダイゼーション

約 10 μg の TAR-1 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、脱塩のため純水中で 30 分間の振とう操作を 2 回、20 倍に希釈した TAE 緩衝溶液中で 30 分間の振とう操作を 1 回行った。ゲル中の DNA 断片は、高速転写装置 (NB-1513C 型、日本エイドー) を用いてナイロン膜 (Hybond-N、Amersham Pharmacia Biotech AB) に転写した。転写後のナイロン膜はハイブリダイゼーション溶液 [5 \times SSC (750 mM NaCl、75 mM クエン酸三ナトリウム、pH 7.0)、0.5% ブロッキング試薬 (Boehringer Mannheim)、0.1% N-ラウロイルサルコシンナトリウム、0.02% SDS] を用いてプレハイブリダイゼーション (68 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間) した後、上述のプローブを加えてハイブリダイゼーション (68 $^{\circ}\text{C}$ 、16 時間) を行った。その後、アルカリフォスファターゼ標識-抗ジゴキシゲニン抗体 (ノンラジオシステム DNA 標識および検出キット、Boehringer Mannheim) を使用して陽性バンドを検出した。

4-3. キシラナーゼT 遺伝子の一部をコードする DNA 断片の PCR 増幅

4-3-1. キシラナーゼT の N 末端アミノ酸配列

キシラナーゼT 精製標品の N 末端アミノ酸配列分析の結果 (Table 4-1)、N 末端 18 アミノ酸の配列は、



と決定された。

キシラナーゼは、アミノ酸配列によりファミリー 10 とファミリー 11 に分類される⁷⁾。キシラナーゼT の N 末端アミノ酸配列は、ファミリー 11 に属するキシラナーゼのものと同様性が高く (データ示さず、Fig. 4-5 参照)、さらに等電点 (pI) を塩基性側 (pH 9.3 以上) に有していることから、本酵素はファミリー 11 のサブファミリー ii (本論文第 1 章 1-1-1 項参照) に属すると考えられた。TAR-1 株の生産するもう一つのキシラナーゼ、キシラナーゼR はその N 末端アミノ酸配列より、ファミリー 10 に分類されている⁸⁾。ちなみに、キシラナーゼR の pI は pH 4.1 である。

糸状菌 *Trichoderma reesei* RUT C-30 株も、pI を酸性側および塩基性側に有する 2 種のキシラナーゼ (キシラナーゼ I およびキシラナーゼ II) を生産しており、分子量も 9,000 および 20,000 と異なる⁹⁾。これら 2 つの酵素は、基質であるキシランの構造によって加水分解能に違いが見られた。すなわち、キシラナーゼ II はキシラナーゼ I に比して、修飾の少ないキシランに対し有効に作用することが示された。TAR-1 株の生産する 2 つのキシラナーゼも、分子量や pI、そして属するファミリーが異なっており、基質の種類によって加水分解能に差がある可能性がある。自然界に存在するキシランは、その由来する植物の種類によって様々な修飾を受けている (本論文第 1 章 1-1-1 項参照)。微生物は性質の異なるキシラナーゼを複数生産することで、様々な植物由来のキシランを効率よく加水分解し、炭素源として利用していると思われる。

4-3-2. PCR によるキシラナーゼT 遺伝子の部分的増幅

N 末端アミノ酸配列分析で得られたキシラナーゼT の部分アミノ酸配列と、ファミリー 11 に属するキシラナーゼに保存されている C 末端付近の配列より、PCR のためのオリゴヌクレオチドプライマーの設計を行った。一般に、1 種類のアミノ酸に対応するコドンは複数個存在する。そこで、特異性の高いプライマーを得ることを目的として、コドンのゆらぎのなるべく小さい領域をプライマー領域として選定した。ま

Table 4-1 N末端アミノ酸配列の解析結果

サイクル	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Asp	3.5	1.6	1.9	1.4	1.7	1.7	1.5	1.6	12.4	5.1
Glu	23.1	22.4	21.8	21.2	23.2	21.3	21	21.2	21.1	20.3
Asn	32	4.7	3	3.3	3.2	3.7	4.2	4.6	4.9	4.8
Gln	3.6	9.1	4.4	7.2	25.3	12.2	10.4	6.1	6	5.4
Ser	4	-	3.3	-	-	-	-	4	4.1	4.3
Thr	2	13.1	2.2	1.2	1.5	1.5	2.5	7.5	4.5	3.1
His	2.4	1.5	-	-	-	-	1.2	1.1	1.2	1
Gly	3.9	2.2	2.4	2.9	2.7	2.7	3.1	3.5	3.5	9.5
Ala	5.7	3.1	2.1	-	-	-	-	1.3	1.3	1.6
Tyr	1.8	3.1	27	4.6	2.7	19.7	6.8	4.6	3.5	3.4
Arg	1.6	1.2	1.4	1.3	1.9	1.5	1.4	1.5	1.5	1.4
Met	1.1	3.1	1.7	1.7	1.8	1.4	2	3.6	3.5	1.6
Val	1.7	3.5	2.9	3.1	3.5	3.3	3.9	4.5	4.5	4.5
Pro	-	2.5	2.3	2	1.9	2	2.1	2.4	2.5	1.4
Trp	-	-	-	5.9	-	-	3.1	-	-	-
Phe	2.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ile	4.4	3.7	3.2	4.5	1.5	3.4	1.3	1.4	1.3	-
Leu	-	1.9	-	-	-	-	-	-	-	-
Cys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

サイクル	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Asp	2.8	2	1.8	1.8	1.7	1.7	2	1.6	1.8	1.7
Glu	20.8	20.5	20.7	20.9	20.4	20.7	24.3	22.5	23.6	22.9
Asn	4.9	4.9	5	4.9	8.9	7.2	6.8	8.4	7.2	5.8
Gln	5.8	5.4	5.4	5.5	5.4	5.6	11.6	9.8	10.1	9.8
Ser	4.1	4.5	4.5	4.4	4.2	4.6	-	-	-	-
Thr	2.6	2.4	4.7	3.7	2.7	2.6	4.1	3.1	2.6	2.4
His	1.1	1.2	1.2	1.2	1.1	1.1	1.3	1.3	1.2	1.2
Gly	11.2	11.1	6.9	5.3	4.8	4.3	4.3	4.1	5.3	5
Ala	1.5	1.7	1.6	1.6	1.6	5.4	3.5	2.3	2	1.5
Tyr	3.4	3.3	3.4	3.5	3.2	3.2	3.3	2.9	3.2	2.9
Arg	1.6	1.7	1.6	1.7	1.4	1.8	1.8	1.7	1.8	1.6
Met	3.1	2.2	3.1	-	-	3.2	2.5	2.4	3.1	1.6
Val	4.8	5.3	5	11.4	8.8	6.2	3.5	5.1	4.5	4.2
Pro	2	2	1.9	1.6	1.6	1.9	-	2.7	2.1	3.8
Trp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ile	1.7	1.8	1.9	2.2	2.4	3	2.2	3.1	2.2	-
Leu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

数値は、pmol 単位で表した各アミノ酸量表す。

た、コドンのゆらぎがある部分は、可能性のある全ての塩基を含むミックス配列とした。キシラナーゼ T の N 末端領域に対応するセンスプライマー (TS-1: N 末端の 1 番目のアスパラギンから 8 番目のトレオニンに対応)、およびファミリー 11 キシラナーゼの保存領域に対応するアンチセンスプライマー¹⁰⁾ (GR) を、それぞれ設計し化学合成した。合成したオリゴヌクレオチドの塩基配列を Fig. 4-1 に示した。

上述の合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR を行うことにより、TAR-1 株染色体 DNA から約 520 bp の DNA 断片が増幅された (データ示さず)。増幅された DNA 断片の大きさは、N 末端アミノ酸配列の相同性が高い他のキシラナーゼの遺伝子から推測される大きさにほぼ一致していた。得られた約 520 bp の PCR 産物について詳細に解析することとした。

4-3-3. PCR 産物のクローニングと塩基配列決定

4-3-2 項で得られた PCR 産物のクローニングを試みた。PCR 後の DNA 断片を AGE (ゲル濃度 2.0%) にかき、目的の約 520 bp の DNA 断片のみを精製した。この DNA 断片を pGEM-T Easy ベクターと連結した後、大腸菌 DH5 α 株に導入し、組換えプラスミド pTSGR1 を取得した。

pTSGR1 の挿入断片について塩基配列決定を行った結果を、Fig. 4-2 に示した。対応する 3 つの読み取りフレームのアミノ酸配列のうち、1 番目のフレームのものは、挿入断片全領域 (524 bp) に渡るオープンリーディングフレーム (ORF) が見出された。この ORF にコードされるアミノ酸配列のうち、袋文字で示した Asn から Asn までの配列は、先に示した TAR-1 株の N 末端アミノ酸配列と完全に一致した。従ってセンスプライマー TS-1 とアンチセンスプライマー GR を用いて得られた PCR 産物は、TAR-1 株のキシラナーゼ T をコードする遺伝子の一部であると考えられた。

Sense primer TS-1

5'- AA(T/C) AC(T/C/G/A) TA(T/C) TGG CA(G/A) TA(T/C) TGG AC -3'
Asn Thr Tyr Trp Gln Tyr Trp Thr

Antisense primer GR

5'- CC GCT (T/C/G/A)CT TTG GTA (T/C/G/A)CC TTC -3'
Gly Ser Arg or Ser Gln Tyr Gly Glu

Fig. 4-1 キシラナーゼT 遺伝子の一部を増幅するためのPCR用プライマーの塩基配列
塩基配列の下には対応するアミノ酸を記した。

TS-1
 1 AACACGTAATGGCAATACTGGACCGATGGTGGTGGaAcAGTAAATGCTACAATGGACCTGGTGGAAATTACAGTGTGACATGGAGAGATACAGGGAAC T 100
 NTY W Q Y W T D G G T V N A T M G P G G N Y S V T W R D T G N F
 H V L A I L D R W W W N S K C Y K W T W K L Q C D M E R Y R E L

101 TTGTTGCGGTAAGGTTGGAAATCGGTTCCAAATCGAACGATCCATTACAATGCTGGTGGTGGAACTCTGGAATCGGAAATGGATATTTGACTCTTA 200
 V V G K G W E I G S P N R T I H Y N A G V W E P S G N G Y L T L Y
 L L S V K V G K S V H Q I E R S I T M L V F G N R L E M D I * L S M
 C C R * R L G N R F T K S N D P L Q C W C L G T V W K W I F D S L

201 TGGGTGGACAAGGAATCAGCTCATGAAATATTATGCTGTTGATTAATTTGGGAACTTACAGACCTACTGGAACCCATCGAGGCCCGTTGTCAGTGATGGA 300
 G W T R N Q L I E Y Y V D N W G T Y R P T G T H R G T V V S D G
 G G Q G I S S * N I M S L I I G E L T D L L E P I E A P L S V M E
 W V D K E S A H R I L C R * * L G N L Q T Y W N P S R R H R C Q * W R

301 GGAACATATGACATCTATACGACTATGCCATACAATGCACCTTCCATTTGATGGCCACACAACAGTTCCACAGTTCTGGAGTGTGAGGCAATCGAAGAGAC 400
 G T Y D I Y T M R Y N A P S I D G T Q F W S V R Q S K R P
 E H M T S I R L C D T M H L P L M A H K R S N S S G V * G N R R D
 N I * H L Y D Y A I Q C T F H * W H T N V P T V L E C E A I E E T

401 CGACTGGAATAACGTTAGCATTTAGCAATTCAGTGGTGGAAATCGGTAATGCGTGGAGAAATGCAGGAATGAATCTGGGAAAGTAGTTGTTACCAGGTATTAGC 500
 T G N N V S I T F S N H V N A W R N A G M N L G S S W S Y Q V L A
 R L E I T L A L R L A T T * M R G E M Q E * I W E V V G L T R Y * Q
 D W K * R * H Y V * Q P R E C V E K C R N E S G K * L V L P G I S

GR
 501 AACAGAAGGTTACCAAGAAGCGG
 T E G Y Q R S
 Q K V T K E A
 N R R L P K K R

TS-5
TS-6
TA-3
TA-4

Fig. 4-2 キシラナーゼT 遺伝子の一部に対応する PCR 産物の塩基配列

塩基配列上の矢印は PCR プライマーに対応する。塩基配列の下には、対応する3つの読みとりフレームのアミノ酸配列を示した。「*」は終止コドンを意味する。1 番目のフレームには全領域に渡る ORF が見いだされた。袋文字の配列は、キシラナーゼT の N 末端アミノ酸配列決定により得られた配列と完全に一致した。

4-4. キシラナーゼ T 遺伝子全領域の PCR 増幅と塩基配列解析

4-4-1. キシラナーゼ T 遺伝子全領域の PCR 増幅と塩基配列決定

キシラナーゼ T 遺伝子の全領域を PCR 増幅するために、部分的に明らかとなった塩基配列を利用して *cassette-ligation mediated PCR* を行った (Fig. 4-3)。すなわち、染色体 DNA を各種制限酵素で切断した後、カセット DNA を連結し、カセットライブラリーを構築した。ライゲーション産物を鋳型とし、キシラナーゼ T 遺伝子の配列の明らかになった領域から設計した 2 つの既知領域プライマーと、カセット DNA に対応するカセットプライマー C1 および C2 を用い、*nested PCR* を行った (Fig. 4-4)。

キシラナーゼ T 遺伝子上流域については、既知領域プライマー TA-3 と TA-4 を使用して、*Eco RI* カセットライブラリーを鋳型とする *nested PCR* により、約 1 kb の DNA 断片が良好に増幅されたことが確認された。一方、キシラナーゼ T 遺伝子下流域については、既知領域プライマー TS-5 および TS-6 (Fig. 4-2) を用いて *Bgl II* カセットライブラリーを鋳型とした PCR を行い、約 500 bp の DNA 断片の良好な増幅を確認した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により見積もられたキシラナーゼ T の分子量は 23,000 であり (文献²⁾ および本論文第 2 章 2-5 節参照)、成熟タンパク質をコードする DNA 領域は約 700 bp と考えられる。従って、上述の 2 つの PCR 産物はキシラナーゼ遺伝子全域を包括していると考えられた。

これらの PCR 産物を pGEM-T Easy ベクターにクローニングし、塩基配列決定に供した。ここで構築されたキシラナーゼ遺伝子上流側を含むプラスミドを pTXT1、下流側を含むプラスミドを pTXT2 と名付けた。キシラナーゼ遺伝子を含む領域の塩基配列を Fig. 4-5 に示した。なお PCR における鋳型の複製エラーの可能性を低減し確実に期すため、キシラナーゼ T 遺伝子を含む領域について、正確性の高い耐熱性ポリメラーゼ KOD を用いた染色体 DNA を鋳型とする PCR を別途行い (高精度 PCR、本論文第 4 章 4-2-5 項参照)、PCR 産物のクローニングおよび塩基配列決定を行った。この際、プライマーとしてキシラナーゼ T 遺伝子上流域の取得には TS-10 と TA-4 を、下流域の取得には TS-4 と TA-7 をそれぞれ使用した。TS-10 と TA-7 に相当する位置を Fig. 4-5 に示した。

TS-10 と TA-4 をプライマーとする PCR を行い、キシラナーゼ遺伝子全領域を含む DNA 断片のクローニングも試みたが、形質転換体を得ることはできなかった。部分染色体ライブラリーからのコロニーハイブリダイゼーションを利用したキシラナーゼ遺伝子の取得もできなかったことから (データ示さず)、キシラナーゼ T 遺伝子な

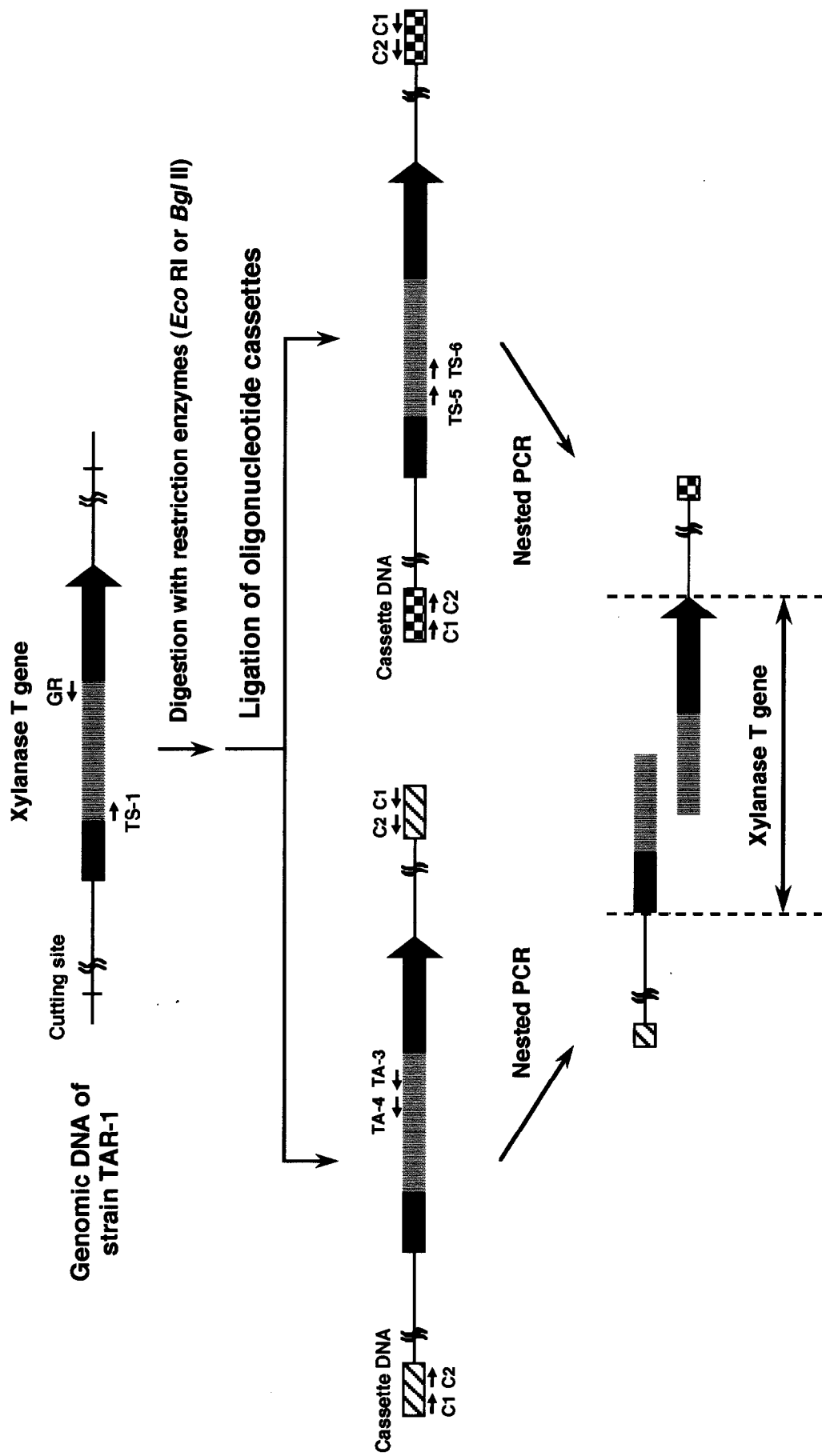


Fig. 4-3 cassette-ligation mediated PCRによるキシラナーゼT遺伝子のクローニングの概要

キシラナーゼT遺伝子の網かけの部分は既に塩基配列が明らかにされている部位を示す。

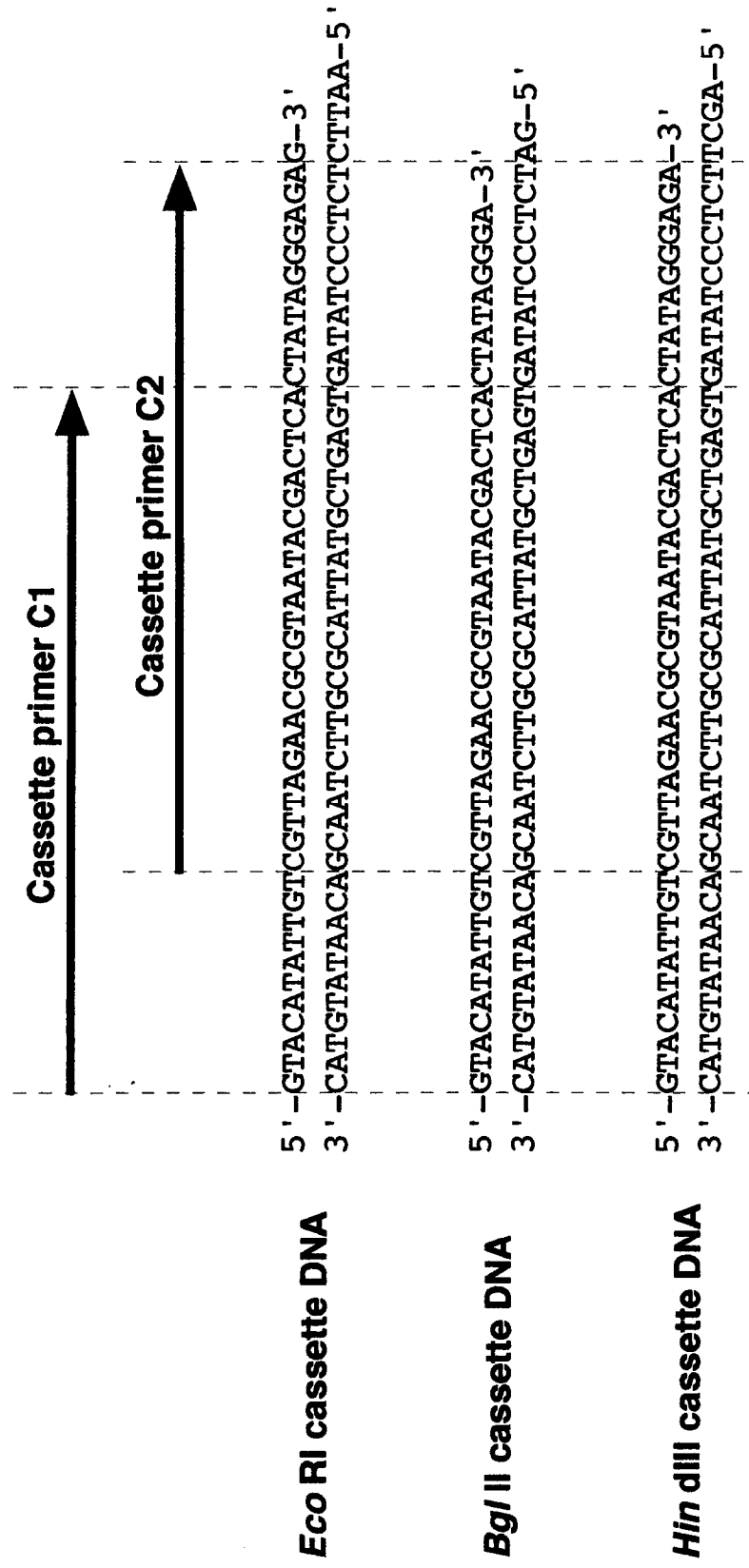


Fig. 4-4 カセット DNA とカセットプライマーの塩基配列

cassette-ligation mediated PCR に用いたカセット DNA の塩基配列を示した。図の上部の矢印はカセットプライマーに対応する。

Eco RI
1 GAATTCCTTCGACAAGACGGATCAATATAGAAATAACCATCGCTGGATAAATCAATGCTTCTGGTCCCAAGGTGAGATTTTTTTCGTACCTCGTGGACAATGGAAACAGATCAATAG 120

121 CGGAAAAAATCGCGTCATAACGGTTGGGTCCATCAATCAATCTTTCGATGCTAAATAAATACTCAATTTGTCGATATAAAGGTCATAGGAAGTACTCCTCCAGTCTTTTTTGGGATGTT 240

141 TTCGCGACTACCAATTAATGACTGGATTTGGGAGGTACTTCCTTTTTTGTGCCTAGGAACCCCTTGAACAAAAGGCTCGAGATTTATGAAATTTACTCATATAAATAAATAAACAATAATC 360

161 AAAATGTTGTAATAATCTTAATATTTATAAAAATCTGCAATGTTGGCGCTTTTCATACATAATCTCCAAATGAAGGAGGTGATGATGAAGTTCCCAATAATGTGATAAAAGCCAAATCGT 480

181 GGACTGAATCAAGAAAATCGACAACAACCGTGTAAATAAGTAGTACGATAAAAATTTGAGGAGGACCTATATGTTTAAAGTTTCGTTACGAAAGTTTTCGACGGTAGTAATTCGACGCTACAA 600

201 TTAGTTTTGTTGAGTGCAGTACCGCAAGTGCCTAATACCTATTTGGCAATTTGGACCGATGGTGTGGAACAAGTAAATGCTACAATAAGCCTGGTGGAAATTTACAGTGTGACATGGA 720

221 S F C L S A V P A S A N T Y W Q Y W T D G G G T V N A T N G P G G N Y S V T W R
G A G A T A C A G G A A C T T T G T T G C G G T A A A G G T T G G A A A T C C G T T C A C C A A A T C C A A A T C C A A T G C T G T T G G A A C C G T C T G G A A T G G A T A T T T G A C T C T C T A T G G G T 840

241 D T G N F V V G K G W E I G S P N R T I H Y N A G V W E P S G N G Y L T L Y G W
G G A C A A G G A A T C A G T C A T A G A A T A T T A T G C G T T G A T A T T G G G A A C C C A T C G A T T A C A A T G C T G T T G G A A C C G T C T G G A A T G G A T A T T T G A C T C T C T A T G G G T 840

261 T R N Q L I E Y Y V V D N W G T Y R P T G T H R G T V V S D G G T Y D I Y T T M
G G A C A A G G A A T C A G C T C A T A G A A T A T T A T G C G T T G A T A T T G G G A A C C T A C A C C T A C T G G A C C G T T G C A T G A T G G A G G A C A C A T A T G A C A T C T A N A C G A C T A 960

281 T G C G A T A C A A T G C A C C T T C C A T T G A T G G C A C A C A A A C G T T C C A A C A G T T C T G A G T G A G G C C A T C G A A A T A A C G T T A G C A T A C G T T A G C A C C A C C G T G A T G 1080

301 R Y N A P S I D G T Q T F Q Q F W S V R Q S K R R P T G N N V S I T F S N H V N A
C G T G G A A A A T C A G G A A T G A A T C T G G G A A T A G C A C A G A A G G T A T C A A A G T A G C G G G A G A T C G A A T G T A A C G T T G C T A G A A C G A A A A G A T G A A A 1200

321 W R N A G M N L G S S W S Y Q V L A T E G Y Q S S G R S N V T V W *
T T A C T T T C T G A A T A T T T A A A A C A A A T C T A T T G T T G T G A C G A A C T T A A G A T T A C T C A T T A A G A A G A A T G A A C G G G A C C G T C A G G G G C T C A G A G C A A C C T T T T A T C C G A A A A 1320

341 T G C T A T C G T C C T A T T G G A C A A G C C C A T G G C C G C A C C T T T T T A T T A C C G A G G C C C A A C A T A A G C G A T G A T A G G C G T T G G C A T C A T C A T C C T A T T C G T C T A A A G G A G 1440

Bgl II
1441 ATCT 1444

Fig. 4-5 キシラナーゼT 遺伝子の塩基配列と類推されるアミノ酸配列

塩基配列上の四角は開始コドンと終止コドンを示す。開始コドンの上流にはSD配列と-10領域と推測される配列を、それぞれ実線と破線で示した。また、ターミネーターと考えられる逆向き反復配列を塩基配列の上に矢印で表した。塩基配列の両端には、カセットDNAにより連結された制限酵素サイトを示した。アローヘッドはシグナルペプチダーゼによる切断部位を意味する。KOD DNAポリメラーゼを使用してPCR増幅する際に使用したプライマーを塩基配列の上に緑色の矢印で示した。プライマーTS-10およびTA-7で挟まれた部分が、高精度PCRで増幅された領域に相当する。

いは、その近傍に存在する遺伝子が大腸菌において発現し、生育を阻害する可能性が考えられた。

4-4-2. キシラナーゼ T 遺伝子の解析

cassette-ligation mediated PCR を利用してクローニングしたキシラナーゼ T 遺伝子断片の塩基配列決定より、TAR-1 株のキシラナーゼ T 遺伝子は 630 塩基のオープンリーディングフレーム (ORF) よりなり、210 アミノ酸をコードしていることがわかった (Fig. 4-5)。開始コドンの 8 塩基上流には SD 配列と考えられる配列が、また、終止コドンの約 200 塩基下流にはターミネーターとして機能していると考えられる逆向き反復配列が見出された。SD 配列のさらに 117 塩基上流には、*Bacillus subtilis* において σ^{43} 因子が関与するプロモーターの -10 領域の保存配列 (TATAAT)¹¹⁾ が見られた。しかしその近傍に σ^{43} 因子が認識する -35 領域の保存配列 (GGATCA)¹¹⁾ は存在しなかった。TAR-1 株培養上清中に大量に分泌されるキシラナーゼ R の遺伝子上流域には両方の保存配列が見いだされたことから (後述、本論文第 4 章 4-6-2 項参照)、プロモーター配列の違いがキシラナーゼ T と R の生産量の違いの一因であることが推察された。

N 末端から数えて 29 番目のアスパラギンから 46 番目のアスパラギンまでの 18 アミノ酸の配列は、精製標品の解析により明らかになったキシラナーゼ T の N 末端アミノ酸配列と完全に一致した。従って、開始コドンのメチオニンから 28 番目のアラニンまでの領域はシグナルペプチドとして機能すると考えられた。

この ORF にコードされるアミノ酸配列を他の微生物が生産するファミリー 11 キシラナーゼのものと比較した結果、*Bacillus stearothermophilus* (最近になり *Geobacillus stearothermophilus* と改名された¹²⁾ が、本論文では旧称を用いた。) 236 株¹³⁾ のものと 88%、*Aeromonas caviae* ME-1 株¹⁴⁾ のものと 82% の相同性が認められた (Fig. 4-6; シグナル領域も含めた比較)。他にも、*Bacillus* sp. YA 株¹⁵⁾、*Bacillus circulans*¹⁶⁾ の生産するキシラナーゼともアミノ酸配列が類似していることが明らかとなった。好アルカリ性 *Bacillus halodurans* C-125 株は最近ゲノム解析が完了し、その染色体上にキシラナーゼをコードしていると考えられる ORF がいくつか見出されている¹⁷⁾。そのうちの 1 つ、BH0899 は現時点で酵素としての実体は明らかとなっていないが、本研究で明らかとなった TAR-1 株の生産するキシラナーゼ T とアミノ酸配列が完全に一致していた (Fig. 4-6)。

A. caviae ME-1 株は分子量約 20,000 のキシラナーゼ (キシラナーゼ I) を生産

```

Bacillus sp. TAR-1
B. halodurans C-125
B. stearothermophilus 236
A. caviae ME-1
30 MFKFFVTKVLTVVIAAATISFCLS-AVPASAT-YWQYWTDDGGTVAATNGPGGNYSVTWRD
58 MFKFFVTKVLTVVIAAATISFCLS-AVPASANT-YWQYWTDDGGTVAATNGPGGNYSVTWRD
31 M-KLKKKMLTLLLTASMSFGLFGATS-SATDYWQYWTDDGGMVNAVNGPGGNYSVTWQN
31 MFKFFGKKLMTVVLAASMSFVFAATS-SATDYWQNWTDGGTVAVNGSGGNYSVSWQN
* * * * *
31 TCNFFVVGKWEIGSPNRTIHYNAGVWEPGNGYLTLYGWTRNQLLEIYYVVDNWGTYRPTG 90
59 TCNFFVVGKWEIGSPNRTIHYNAGVWEPGNGYLTLYGWTRNQLLEIYYVVDNWGTYRPTG 118
32 TCNFFVVGKWTGSPNRVINYNAGIWEPSGNGYLTLYGWTRNALLLEIYYVVDNWGTYRPTG 91
32 TCNFFVVGKWTYGTTPNRVNVYNAGVFAVPSGNGYLTFYGWTRNALLLEIYYVVDNWGTYRPTG 91
***** * * * *
91 THRGTVVSDGGTYDIYTTMRYNAPSIDGTQTFQFWSVRQSKRPTGNVSIFFSNHVNAW 150
119 THRGTVVSDGGTYDIYTTMRYNAPSIDGTQTFQFWSVRQSKRPTGNVSIFFSNHVNAW 178
92 NYKGTVNSDGGTYDIYTTMRYNAPSIDGTQTFQFWSVRQSKRPTGNSVSIFFSNHVNAW 151
92 TYKGTVNSDGGTYDIYTTMRYNAPSIDGTQTFQFWSVRQSKRPTGNSVSIFFSNHVNAW 151
***** * * * *
151 RNAGMNLGSSWSYQVLALEGYQSSGRSNVTVW 182
179 RNAGMNLGSSWSYQVLALEGYQSSGRSNVTVW 202 100%
152 RSKGMNLGSSWAYQVLALEGYQSSGRSNVTVW 183 82%
152 PSKGMYLGNWSYQVMATEGYQSSGNANVTVW 183 78%
** ** * * * * *
<Identity>

```

Fig. 4-6 塩基配列より類推されるキシラナーゼTのアミノ酸配列と他のキシラナーゼとのアミノ酸配列比較

TAR-1 株の生産するキシラナーゼTと *B. halodurans* C-125 株、*B. stearothermophilus* 236 株および *A. caviae* ME-1 株のキシラナーゼのアミノ酸配列を一字表記で示した。ただし、*B. halodurans* C-125 株のキシラナーゼは染色体上に ORF (BH0899) の存在が確認されたのみであり、酵素としての実体は明らかではない。各残基番号は、*B. halodurans* C-125 株を除き、すべて成熟型酵素のものであり、N 末端のアミノ酸を赤で示した。「-」はギャップを示し、「*」は4つのキシラナーゼ全てに保存されているアミノ酸残基である。触媒残基と考えられる2つのグルタミン酸は四角で囲った。

し、30°C、pH 9.0 で生育する好アルカリ性細菌である。キシラナーゼ I の性質¹⁸⁾ は比較的よく調べられており、Table 4-2 にキシラナーゼ T の性質と共に示した。キシラナーゼ I の反応の至適は pH 7.0 および 50°C であり、温度安定性や pH 安定性もキシラナーゼ T に比べ低い。アミノ酸配列のわずかな違いが、これら二つの酵素の性質を大きく分けていることがわかった。

ファミリー 11 キシラナーゼにおいては、2 つのグルタミン酸残基が関与する retaining 機構が提唱されている (文献¹⁹⁾ および本論文第 1 章 1-1-2 項参照)。たとえば、*Bacillus pumilus* IPO 株²⁰⁾、*Bacillus circulans*²¹⁾、好アルカリ性 *Bacillus* sp. 41M-1 株²²⁾ などのファミリー 11 キシラナーゼにおいては、タンパク質工学的手法により触媒残基のグルタミン酸が特定されるに至っている。この 2 つのグルタミン酸は、既報の全てのファミリー 11 キシラナーゼに保存されている。キシラナーゼ T においては、他のファミリー 11 キシラナーゼとの比較により、成熟タンパク質の N 末端から 76 番目および 169 番目の 2 つのグルタミン酸が触媒残基として機能していると推測された (Fig. 4-6)。

Table 4-2 TAR-1 株キシラナーゼT と A. caviae ME-1 株キシラナーゼ I の性質比較

	Xylanase T	Xylanase I
Molecular mass	23 kDa	20 kDa
pI	≥ pH 9.3	pH 7.1
Optimum pH	pH 5.0-8.0	pH 7.0
Optimum temperature	70°C	50°C
pH stability	≤ pH 10 ^a	6.5-8.0
Thermostability	≤ 55°C ^b	30-40°C ^c
Enzyme type	Endo-type	Endo-type

^a Effect of pH on stability was not measured at over pH 10.

^b Residual activity was measured after incubation of 30 min.

^c Residual activity was measured after incubation of 10 min.

4-5. キシラナーゼR 遺伝子の一部をコードする DNA 断片の PCR 増幅

4-5-1. PCR によるキシラナーゼR 遺伝子の増幅

キシラナーゼR 精製標品の N 末端アミノ酸配列は

H₂N- AsnAspGlnProPheAlaTrpGlnValAlaSerLeuSerGluArgTyrGlnGluGlnPheAsp
IleGlyAlaAlaValGluProTyrGlnLeuGluGlyArgGlnAlaGlnIleLeuLysHisHisTyr
AsnGluLeuGluAlaAsp

であることが既に明らかとなっている。キシラナーゼR の部分アミノ酸配列より、PCR のためのオリゴヌクレオチドプライマーの設計を行った。コドンのゆらぎのなるべく小さい領域をプライマー領域として選定し、可能性のある全ての塩基を含むミックス配列としたセンスプライマー (RS-1)、およびアンチセンスプライマー (RA-1) を、それぞれ設計し化学合成した。合成したオリゴヌクレオチドの塩基配列を Fig. 4-7 に示した。

N 末端アミノ酸配列から、上述のプライマーを用いて TAR-1 株染色体 DNA を鋳型とするPCR を行うと、134 bp の DNA 断片が増幅される計算になり、実際、期待される大きさの DNA 断片の増幅が確認された (データ示さず)。以後、134 bp の PCR 産物について詳細に解析することとした。

4-5-2. PCR 産物のクローニングと塩基配列決定

4-5-1 項で得られた PCR 産物のクローニングを試みた。PCR 後のDNA 断片を PAGE にかけて、目的の 134 bp の DNA 断片のみを精製した。この DNA 断片を pGEM-T Easy ベクターとライゲーションした後、大腸菌 DH5 α 株に導入し、組換えプラスミド pRNP1 を取得した。

pRNP1 の挿入断片について塩基配列決定を行った結果を、Fig. 4-8 に示した。対応する 3 つの読み取りフレームのアミノ酸配列のうち、1 番目のフレームのものは、挿入断片全領域 (524 bp) に渡る ORF が見出された。この ORF にコードされるアミノ酸配列は、先に示したキシラナーゼR の N 末端アミノ酸配列と完全に一致した。従ってセンスプライマー RS-1 とアンチセンスプライマー RA-1 を用いて得られた PCR 産物は、TAR-1 株のキシラナーゼR の N 末端アミノ酸配列 をコードする遺伝子の一部であると考えられた。

Sense primer RS-1

5'- AA(T/C) GA(T/C) CA(G/A) CC(T/C/G/A) TT(T/C) GC(T/C/G/A) TGG C -3'
Asn Asp Gln Pro Phe Ala Trp Gln

Antisense primer RA-1

5'- TC (G/A) TT (G/A) TA (G/A) TG (G/A) IG (T/C) TT -3'
Glu Asn Tyr His His Lys

Fig. 4-7 キシラナーゼR 遺伝子の一部を増幅するための PCR 用プライマーの塩基配列
塩基配列の下には対応するアミノ酸を記した。

4-6. キシラナーゼ R 遺伝子全領域の PCR 増幅と塩基配列解析

4-6-1. キシラナーゼ R 遺伝子全領域の PCR 増幅と塩基配列決定

キシラナーゼ R 遺伝子の全領域の PCR 増幅を試みた。4-4-1 項でキシラナーゼ T 遺伝子の全領域を PCR 増幅するために行った、cassette-ligation mediated PCR の手法を用いた。カセットプライマー C1; C2 と既知領域プライマーを用いて *Hin* dIII カセットライブラリーを鋳型とする nested PCR を行った。キシラナーゼ R 遺伝子上流域の増幅には RA-4 と RA-5 を、下流域の増幅には RS-3 と RS-4 を既知領域プライマーとして用いた。その結果、上流域と下流域について約 2.1 kb、2.0 kb の DNA 断片の良好な増幅が確認された。SDS-PAGE により見積もられたキシラナーゼ R の分子量は 40,000 であり (文献²⁾ および本論文第 2 章参照)、成熟タンパクに対応する DNA は約 1,200 bp と考えられる。従って、これらの PCR 産物はキシラナーゼ遺伝子の範囲を包括していると考えられた。これらの PCR 産物を pGEM-T Easy ベクターにクローニングし、予備的に塩基配列を決定した。

キシラナーゼ R 遺伝子の全領域を含む DNA 断片をクローニングするため、明らかとなった塩基配列を基にキシラナーゼ R 遺伝子上流域と下流域にそれぞれセンスプライマー RS-6 およびアンチセンスプライマー RA-6 を設計した。正確性の高い KOD DNA ポリメラーゼを用いて染色体 DNA を鋳型とする PCR を行い、得られた DNA 断片の pUC119 ベクターへのクローニングを試みた。得られたキシラナーゼ R 遺伝子の全領域を含むプラスミドを pXR34 と名付けた。pXR34 を含む形質転換体を 37°C で培養したところ生育が悪く、30°C での培養により若干の改善が見られた。pXR34 の挿入断片について塩基配列決定を行った結果を Fig. 4-9 に示した。

4-6-2. キシラナーゼ R 遺伝子の解析

cassette-ligation mediated PCR 等を利用してクローニングしたキシラナーゼ R 遺伝子の塩基配列決定より、TAR-1 株のキシラナーゼ R 遺伝子は 1,191 塩基の ORF よりなり、396 アミノ酸をコードしていると考えられた (Fig. 4-9)。開始コドンの 102 塩基上流には、同一の読みとりフレームでさらにメチオニンのコドン ATG が存在し、キシラナーゼ R 遺伝子が 1,293 塩基の ORF で構成される可能性も示唆された。しかし、このメチオニンの上流近傍には SD 配列と考えられる配列が見当たらないこと、およびシグナル配列としての長さ、および他の微生物由来のキシラナーゼとの相同性

1 CGACGGTGAAGTCCATCTTGGTGGTAAATAAATAAGCTTCTCAATTTGGTGGCAAGAAAGCCATAAAGCCATGATCTTAGGCTAAAGCACTTTTAAAGCACTAAAGTGGGCTGATAA 120
RB-6
121 CAGTTTTTAATTAATTAACATTCGGATTAATTTTGAATAAATAGTTAGTTTGGTTCGGTGGATCACTAAAGTTTATCTTCTGCTATAATGGATATAAGTACCACAGTAAAGATTTAAT 240
SD
241 TTTTTCACAACTTTAUGAAAGCCCTTCCTTTATCGACAGCGCCACITTTATGAAAGAGCTTTAGTAAAGCCCTATTTTTCGCAATTTTACTTTGGCTACGAAAGGAGAAATTTGCTGATCA 360
M I
361 TTACACTTTTTTAAAGCCCTTTTGGTGGCTAGCGATCTCTTTAATAGTTGGAGGGGGATCGGCAATGCTGCTCAAGGAGGACCACCAAAAATCCGGAGTCTTTTCGAGAA 480
T L F K K P F V A G L A I S L L V G G I G N V A A A Q G G P P K S G V F G E N
481 ATGAAAAGAAATGATCAGCCCTTTGGATGGCAAGTTGCTTCTTCTGAGCGGATATCAAGAGCAGTTTTCATATGAGCAGCGGCTGAGCCCTATCAATTAGAAGGGAGACAAAGCCC 600
E K R N D Q P F A W Q V A S L S E R Y Q E Q F D I G A A V E P Y Q L E G R Q A Q
601 AAATTTAAGCATCATTAACAGCCCTTTGGCGGAAAATGCAATGAAGCCTGAATCACTCCAGCCAAAGAGAGCTGAGTGGAAAGCGCTGACAAAATTTGGAGTTTGGCC 720
I L K H Y N S L V A E N A M K P E S L Q P R E G E W N W E G A D K I V E F A R
721 GCAACAATAACATGGAGCTTCACACCGCTTGGCAGCGCAATGACAGAGTGGTTCATCGAAGAGCGCAATCGGATGGATGGAGTGGATGAAACAGACCCAGATAAACGTTG 840
K H N M E L R F H T L V W H S Q V P E W F F I D E D G N R M V D E T D P D K R E
841 AAGCGAATAACAGCTGTTATAGCGCATGGAACCAATATAAACCGTTTGAACCTTATAAAGATGATGACTTCAATGAGACGCTTCAATGAGTGGTCAATGAAGTTATTGACGATGCGGGG 960
A N K Q L L L E R M E N H I K T V V E R Y K D D V T S W D V V N E V I D D G G G
961 GCCTGCCTGAATCAGAAATGATCAAAATAACAGCGCACTGACTACATTAAGTAGCTTTTGAACCGCAAGAAATAATGGTGGTGAAGAGGCAAAATGTFACATTAATGATTCACACCG 1080
L R E S E W Y Q I T G T D Y I K V A F E T A R K Y G G E E A K L Y I N D Y N T E
1081 AAGTTCTTCAAAAAGAGATGACCTTTACACCTGGTGAAGACTTATTAGACCAAGGATGCTCCATGAGGAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG 1200
V P S K R D D L Y N L V K D L L E Q G V P I D G V G H Q S H I Q I G W P S I E D
1201 ATACAAGAGCTTCTTTTGAAGCTTACGAGTGTAGGATAGACAACTGACTGACATGACATGACATGACATGACATGACATGACATGACATGACATGACATGACATGACATGACATGACATGAC 1320
T R A S F E K F T S L G L D N Q V T E L D M S L Y G W P P T G A Y T S Y D D I P
1321 CAGCAGAACTCCTCAAGCCAGGACGCTTACGATCAGCTTTTCAGTATACGAAGAATAGCTGCTGATATAGCAGTGAACCTTTCGAGGAAATTCCTGATTAACCATACATGCGC 1440
A E L L Q A Q A D R Y D Q L F E L Y E E L A A D I S S V T F W G I A D N H T W L
1441 TTGATGGCCGGCTAGAGTACAATAATGGAGTAGGGATCGACCAATTTGTTTGTATCACTATCGAGTGAACCTTCTTACTGGAGAAATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG 1560
D G R A R E Y N N G V G I D A P F V F D H N Y R V K P A Y W R I I D *
1561 AATTAATAGTCTAGCAACGAACAGCTCTGCTTTGGCAGCTGTTTATTTGGAACCAAAAGCCCTATTTTGGTAAATAATCAATATTAATCAAGTTTCTGAAAGGAAACAAACATTT 1680
1681 CGACGGTTGCAACTTAATAACAATCCAGGTAATGGTAAAGGTTTTCACCTATGATAGGAAAGTGAAGAAATAATGATCAACAGTATGACAGGAGG 1786
RA-6

Fig. 4-9 キシラナーゼR 遺伝子の塩基配列と類推されるアミノ酸配列

塩基配列上の四角は開始コドンと終止コドンを示す。開始コドンの上流にはSD配列と-10、-35領域と推測される配列を、それぞれ実線と破線で示した。また、ターミネーターと考えられる逆向き反復配列を矢印で示した。KOD DNA ポリメラーゼを使用しPCR増幅する際に使用したプライマーRS-6とRA-6を塩基配列の下に矢印で示した。

から、キシラナーゼR 遺伝子は 1,191 塩基の ORF よりなると結論した。開始コドンの 9 塩基上流には SD 配列と考えられる配列が、また、終止コドンの 33 塩基下流にはターミネーターとして機能していると考えられる逆向き反復配列が見出された。SD 配列の 136 塩基上流には *B. subtilis* の σ^{43} 因子が関与するプロモーターの -10 領域の保存配列¹¹⁾ が、さらに 17 塩基を挟んだ上流には -35 領域の保存配列¹¹⁾ が見出された。

N 末端のメチオニンから数えて 46 番目のアスパラギンから 44 アミノ酸配列は、精製標品の解析により明らかになったキシラナーゼR の N 末端アミノ酸配列と完全に一致した。従って、開始コドンのメチオニンからの 45 番目アラニンまでの領域はシグナルペプチドとして機能すると考えられた。塩基配列より推測されるキシラナーゼR の N 末端アミノ酸配列は精製標品の N 末端アミノ酸配列分析で明らかとなっている 49 アミノ酸の配列と C 末端側が若干異なったが、これは分析の精度の限界によると思われる。

この ORF にコードされるアミノ酸配列を他の微生物が生産するファミリー 10 キシラナーゼのものと比較した結果、好アルカリ性細菌 *B. halodurans* C-125 株のキシラナーゼA²³⁾ や、同じく好アルカリ性細菌の *Bacillus* sp. NG-27 株²⁴⁾ のキシラナーゼと高い相同性を有していた。(Fig. 4-10)。特に、*B. halodurans* C-125 株キシラナーゼA とはシグナルペプチドの配列中に 1 アミノ酸の違いがある以外は、すべてが一致していた。しかし、*B. halodurans* C-125 株キシラナーゼA について報告されている成熟タンパク質の N 末端アミノ酸²⁵⁾ は、TAR-1 株が分泌したキシラナーゼR の N 末端アミノ酸と異なり、TAR-1 株のキシラナーゼR の方が 16 アミノ酸短い。TAR-1 株においては一旦キシラナーゼA と同じ位置でシグナルペプチドが切断された後、別のプロテアーゼによるプロセッシングを受けた可能性も考えられる。

ファミリー 10 キシラナーゼは、ファミリー 11 キシラナーゼと同様に、2 つのグルタミン酸残基が関与するリテイニング機構¹⁸⁾ が提唱されている。いくつかのファミリー 10 キシラナーゼに関してタンパク質工学的手法で 2 つの触媒残基が同定され、既報の全てのファミリー 10 キシラナーゼに保存されていることが明らかとなっている。キシラナーゼR においては、他のファミリー 10 キシラナーゼとの比較により、成熟タンパク質の N 末端から 150 番目および 256 番目の 2 つのグルタミン酸が触媒残基として機能していると推測された (Fig. 4-10)。

4-7. トランスポザーゼ遺伝子を指標とした *B. halodurans* C-125 株との進化的関係の解析

4-7-1. キシラナーゼ T 遺伝子上流域の解析

pTXT1 に含まれるキシラナーゼ T 遺伝子上流域にはキシラナーゼ T 遺伝子の転写方向と反対の向きに、挿入断片の末端に至る 208 塩基の ORF が存在していた。この ORF は *B. halodurans* C-125 株の染色体上に見出された 4 つの ORF、BH0275、BH0981、BH2696、BH3635 と、開始コドンの上流 131 bp を含めて、塩基配列が完全に一致した²³⁾。*B. halodurans* C-125 株のこれらの ORF はそれぞれ、挿入配列 IS656-01、IS656-02、IS656-03、IS656-04 のトランスポザーゼであると考えられている。挿入配列は転移性遺伝要素の一つで、一般にトランスポザーゼ遺伝子を含む。その両端には、転移時にトランスポザーゼによる認識と切断の対象となる逆向き反復配列が存在する。挿入配列はトランスポザーゼのアミノ酸配列に基づいて、大まかに 17 のファミリーに分類されている²⁶⁾。*B. halodurans* C-125 株染色体上において挿入配列と推測された 112 の領域についても分類が試みられたが、4 つの IS656 については既知のトランスポザーゼと相同性が低く、新規なファミリーとして分類することが提唱されていた²⁷⁾。キシラナーゼ T 遺伝子の塩基配列が *B. halodurans* C-125 株染色体上の ORF、BH0899 と高い相同性を有していることは既に記したが、BH0899 の上流で最も近い位置に存在する IS656 ですら 600 kb 以上離れている。

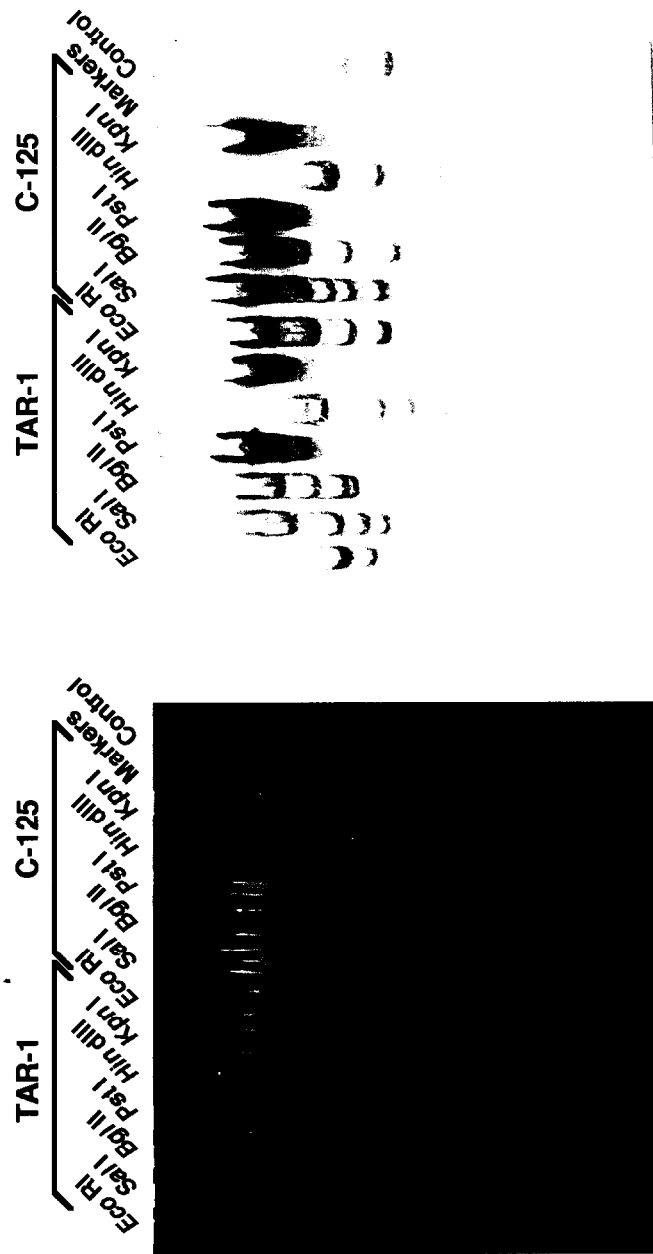
4-7-2. サザンハイブリダイゼーション解析

TAR-1 株および *B. halodurans* C-125 株は、いずれも特徴的な挿入配列 IS656 を共有しているながら、それらの染色体上での位置関係が全く異なることが示唆された。そこで菌株の進化的関係に関する詳しい知見を得ることを目的として、トランスポザーゼ遺伝子を指標としたサザンハイブリダイゼーション解析を行った。

トランスポザーゼ ORF の一部を増幅するための PCR 用プライマー TPS-1 および TPR-1 を設計、合成した (Fig. 4-11)。これらのプライマーを用い、キシラナーゼ T の上流域が挿入されているプラスミド pTXT1 を鋳型とする PCR を行った。得られた 202 bp の DNA 断片にジゴキシゲニン標識を施し、ハイブリダイゼーションのプロブとして用いることにした。

TAR-1 株および *B. halodurans* C-125 株の染色体 DNA を制限酵素 *Eco* RI、*Hin* dIII、

Pst I、*Sal* I あるいは *Xho* I で切断し、AGE を行った。アガロースゲル中の DNA をナイロンメンブレンへサザンブロッティングした後、上記のプロープを用いてハイブリダイゼーションを行った。その結果、TAR-1 株染色体においては *B. halodurans* C-125 株の染色体と同様、*Kpn* I で切断したレーンを除き、複数の陽性バンドが見られ、TAR-1 株においても IS656 と相同性の高い挿入配列が複数存在していることが示唆された (Fig. 4-12)。また、同一の制限酵素で切断した場合に両菌株間で同じ位置に陽性バンド検出されたレーンもあることから、一部のトランスポザーゼの近傍領域は高度に類似している可能性が考えられた。TAR-1 株のトランスポザーゼ ORF が *B. halodurans* C-125 株にしか見出されていない IS656 と一致したことと併せ、両菌株が進化の上で比較的近縁であることが推察された。中温好アルカリ性細菌である *B. halodurans* C-125 株が進化の過程で好熱性を獲得して TAR-1 株のような好熱好アルカリ性細菌が生じたのか、あるいはその逆であるのかなど、興味はつきない。



EtdBr staining

Southern analysis

Fig. 4-12 TAR-1 株と *B. halodurans* C-125 株染色体 DNA のサザン
ハイブリダイゼーション解析

アガロースゲル用いて電気泳動を行った。プローブにはキシラナーゼT 遺伝子上流域に見出されたトランスポザーゼ遺伝子断片を用いた。ポジティブコントロールには pTXT1 を使用した。

4-8. 結論

キシラナーゼT の N 末端アミノ酸配列を決定し、本酵素がファミリー 11 のサブファミリー ii に属することを明らかにした。

また、キシラナーゼT および R をコードする DNA 領域を PCR 増幅し、その塩基配列を決定した。塩基配列より推測されるキシラナーゼT のアミノ酸配列は、*B. stearothermophilus* 236 株や *A. caviae* ME-1 株の生産するキシラナーゼと高い相同性を有していた。また、*B. halodurans* C-125 株染色体上の、キシラナーゼをコードしていると推測されている ORF とアミノ酸配列が完全に一致した。

キシラナーゼR のアミノ酸配列は、*B. halodurans* C-125 株や *Bacillus* sp. NG-27 株の生産するキシラナーゼと類似していた。特に *B. halodurans* C-125 株のキシラナーゼ A とは極めて相同性が高かったが、キシラナーゼT の N 末端の方が 17 アミノ酸短いことが明らかとなった。

キシラナーゼT の上流域に存在する挿入配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析により、TAR-1 株が *B. halodurans* C-125 株と近縁であることが示唆された。

引用文献

- 1) Nakamura, S., Nakai, R., Wakabayashi, K., Ishiguro, Y., Aono, R. and Horikoshi, K. 1994. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58: 78-81.
- 2) Takahashi, H., Nakai, R. and Nakamura, S. 2000. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64: 887-890
- 3) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. In "Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd Ed.", Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 4) Saito, H. and Miura, K. 1963. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 619-629.
- 5) Isegawa, Y., Sheng, J., Sokawa, Y., Yamanishi, K., Nakagomi, O. and Ueda, S. 1992. *Mol. Cel. Pro.*, 6: 467-475.
- 6) Sanger, F. and Coulson, A. R. 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467.
- 7) Henrissat, B. 1991. *Biochem. J.*, 280: 309-316.
- 8) Nakamura, S., Ishiguro, Y., Nakai, R., Wakabayashi, K., Aono, R. and Horikoshi, K. 1995. *J. Mol. Catal. B Biocatal.*, 1: 7-15.
- 9) Viikari, L., Kantelinen, A., Buchert, J. and Puls, J. 1994. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41: 124-129.
- 10) Morris, D. D., Gibbs, M. D. and Bergquist, P. L. 1996. In "Enzymes for pulp and paper processing", eds. Jeffries, T. W. and Viikari, L., American Chemical Society, Washington DC, pp. 101-115.
- 11) Johnson, W. C., Moran, C. P. Jr. and Losick, R. 1983. *Nature (London)*, 302: 800.
- 12) Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarans, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., Lysenko, A. M., Pertrunyak, V. V., Osipov, G. A., Belyaev, S. S. and Ivanov, M. V. 2001. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51(Pt. 2): 433-446.
- 13) Cho, S. and Cho, Y. 1995. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 5: 117-124.
- 14) Suzuki, T., Itoh, Y., Naitoh, H., Kubata, K. B., Horitsu, H., Takamizawa, K. and Kawai, K. 1994. (unpublished)
- 15) Yu, J. H., Park, Y. S., Yum, D. Y., Kim, J. M., Kong, I. S. and Bai, D. H. 1993. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 3: 139-145.
- 16) Yang, R. C., MacKenzie, C. R. and Narang, S. A. 1988. *Nucleic Acids Res.*, 16: 7187.
- 17) Takami, H., Nakasone, K., Takaki, Y., Maeno, G., Sasaki, R., Masui, N., Fuji, F., Hiram, C., Nakamura, Y., Ogasawara, N., Kuhara, S. and Horikoshi, K. 2000. *Nucleic Acids Res.*, 28: 4317-4331.
- 18) Kubata, K. B., Horitsu, H., Kawai, K., Takamizawa, K. and Suzuki, T. 1992. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56: 1463-1464.

- 19) Gilkes, N. R., Henrissat, B., Kilburn, D. G., Miller, Jr., R. C. and Warren, R. A. J. 1991. *Micrbiol. Rev.*, 55: 303-315.
- 20) Ko, P. E., Akatsuka, H., Moriyama, H., Shinmyo, A., Hata, Y., Katsube, Y., Urabe, I. and Okuda, H. 1992. *Biochem. J.*, 288: 117-121.
- 21) Wakarchuk, W. W., Campbell, R. L., Sung, W. L., Davoodi, J. and Yaguchi, M. 1994. *Protein Sci.*, 3: 467-475.
- 22) Nakamura, S., Nakai, R., Namba, K., Kubo, T., Wakabayashi, K., Aono, R. and Horikoshi, K. 1995. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 34: 99-100.
- 23) Hamamoto, T., Honda, H., Kudo, T. and Horikoshi K. 1987. *Agric. Biol. Chem.* 51: 953-955.
- 24) Gupta, N., Vanga, S. R., Sankar, M. and Giiisii, A. 2000. *Appl. Environ. Microbiol.*, June: 2631-2635.
- 25) Honda, H., Kudo, T., Ikura, Y. and Horikoshi, K. 1985. *Can. J. Microbiol.*, 31: 538-542.
- 26) Mnhillon, J. and Chandler, M. 1998. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, Sept: 725-774.
- 27) Takami, H., Han, C., Takaki, Y. and Ohtsubo, E. 2001. *J. Bacteriol.*, July: 4345-4356.

第5章

部位特異的変異を導入したキシラーナーゼT の性質検討

5-1. 緒言

本研究室で分離された好熱好アルカリ性 *Bacillus* sp. TAR-1 株は、好熱性キシラナーゼであるキシラナーゼT および R を分泌生産する (文献^{1,2)} および本論文第 2 章参照)。本菌の培養上清から両酵素が精製され、その性質が明らかにされた (文献¹⁾ および本論文第 3 章参照)。さらに、両酵素をコードする遺伝子がクローニングされ、塩基配列とそれに基づくアミノ酸配列が決定された (本論文第 4 章参照)。

本研究では、キシラナーゼT および R タンパク質の立体構造モデリングを行った。また、キシラナーゼT の大腸菌での発現系を構築し、キシラナーゼT の立体構造モデルに基づいて、基質認識に関与していると考えられる特徴的なループ構造に部位特異的変異を導入し、得られた変異型酵素の性質を検討した。

5-2. 実験材料と方法

5-2-1. 分子モデリング

キシラナーゼ立体構造の分子モデリングには、GeneMine プログラム (Molecular Applications Group) を用いた。

5-2-2. 菌株、プラスミドおよび培地

発現型プラスミドの構築のための宿主には、大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 株 [*supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*] を使用した。大腸菌における外来遺伝子発現のための宿主には、大腸菌 BLR(DE3) 株 [*ompT*, *gal*, *dcm*, *hsdS Δ B*, Δ (*srl-recA*)306::*Tn10*(Tc^R)(DE3)] を使用した。

大腸菌用プラスミドベクター pUC119 は宝酒造より購入した。大腸菌用発現ベクターには pET-21b(+)(Novagen) を用いた。

大腸菌の培地には LB 培地 (本論文第 4 章 4-2-1 項参照) を使用した。

5-2-3. クローニング技術

本論文第 4 章 4-2-2 項に準じた。ただし、エレクトロポレーションには MicroPulser (Bio-Rad Labs.) を使用した。

5-2-4. 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。反応装置は GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer) を使用した。

染色体 DNA を鋳型とする PCR の耐熱性 DNA ポリメラーゼには KOD DNA ポリメラーゼ (東洋紡) を用いた。反応液 50 μ l 中には染色体 DNA 100 ng、各 30 pmol のプライマー、2.0 mM の dNTP、2.5 U のポリメラーゼが含まれる。98°C、2 分間のプレヒート後、

98°C x 15 秒 \rightarrow 54°C x 2 秒 \rightarrow 74°C x 30 秒

のサイクルを 25 回繰り返す、最後に 74°C で 1 分間のポストヒートを行った。

プラスミドを鋳型とする PCR の耐熱性 DNA ポリメラーゼには KOD dash DNA ポリメラーゼ (東洋紡) を用いた。反応液 50 μ l 中には鋳型 DNA 1 ng、各 30 pmol のプライマー、2.0 mM の dNTP、2.5 U のポリメラーゼが含まれる。94°C、5 分間のプレヒート後、

94°C x 1 分 \rightarrow 55°C x 2 秒 \rightarrow 74°C x 30 秒

のサイクルを 25 回繰り返す、最後に 74°C で 1 分間のポストヒートを行った。

アセンブリー反応後の PCR は、プラスミドを鋳型とする PCR に準じて行った。ただし、アニーリングは 60°C x 2 秒とした。

5-2-5. 部位特異的変異導入法

ループ欠失変異体の作製

キシラナーゼ T のループ欠失は、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用い、non-PCR temperature cycling 法³⁾にて行った。伸長反応には GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer) を用いた。

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。正しく変異が導入された発現型プラスミドは大腸菌 BLR(DE3) 株に形質転換し、キシラナーゼ T ループ欠失変異体の調製に供した。

ループ欠失変異体の構築に用いた変異導入用プライマーの配列を以下に示す。

DL1F: 5'-CTATACGACTATGCGATAACAATACGTTCCAACAGTTCTGAGATG
TGAGGC-3'

DL1R: 5'-GCCTCACACTCCAGAAGCTGTTGGAACGTATTGTATCGCATAGTC
GTATAG-3'

Pro 114 変異体の作製

成熟キシラナーゼ T の N 末端から 114 番目のプロリン (Pro114; 以下同様) への saturation 変異導入は、以下のように行った。

Pro114 に相当する位置にアニールする変異導入用プライマーセット MP114XF および MP114XR を合成した (Fig. 5-1)。

Pro114 変異体作製の方法を Fig. 5-2 に示した。これらの変異導入用プライマーと pET-21b(+) のクローニングサイト近傍にアニールするセンスプライマー MF-0 (5'-

105	Ile Tyr Thr Thr Met Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Asp Gly Thr Gln Thr Phe Gln Phe	114	125
	5'-ATC TAT ACG ACT ATG ATG CGA TAC AAT GCA CCT TCC ATT GAT GGC ACA CAA ACG TTC CAA CAG TTC-3'		
		<i>Ban III</i>	
MP114XF	5'-CG ACT ATG CGA TAC AAT GCA DNB TCC	ATC GAT	GGC ACA CAA ACG-3'
MP114XR	3'-GC TGA TAC GCT ATG TTA CGT HNV AGG	TAG CTA	CCG TGT GTT TGC-5'
MP114QF	5'-CG ACT ATG CGA TAC AAT GCA CAA TCC	ATC GAT	GGC ACA CAA ACG-3'
MP114QR	3'-GC TGA TAC GCT ATG TTA CGT GTT AGG	TAG CTA	CCG TGT GTT TGC-5'
MP114HF	5'-CG ACT ATG CGA TAC AAT GCA CAT TCC	ATC GAT	GGC ACA CAA ACG-3'
MP114HR	3'-GC TGA TAC GCT ATG TTA CGT GTA AGG	TAG CTA	CCG TGT GTT TGC-5'
MP114GF	5'-CG ACT ATG CGA TAC AAT GCA GGT TCC	ATC GAT	GGC ACA CAA ACG-3'
MP114GR	3'-GC TGA TAC GCT ATG TTA CGT CCA AGG	TAG CTA	CCG TGT GTT TGC-5'

Fig. 5-1 Pro114 変異体の作製に用いた変異導入用プライマー

最上段にはキシラナーゼT の Ile105 から Phe125 までのアミノ酸配列とそのコドンを示した。置換した Pro114 のコドンを赤字で表記した。D は C 以外の 3 種類の塩基、B は A 以外の 3 種類の塩基、V は T 以外の 3 種類の塩基、H は G 以外の 3 種類の塩基を表す。青い囲いは変異導入の可否を判別する目的で導入した *Ban III* サイトを示す。

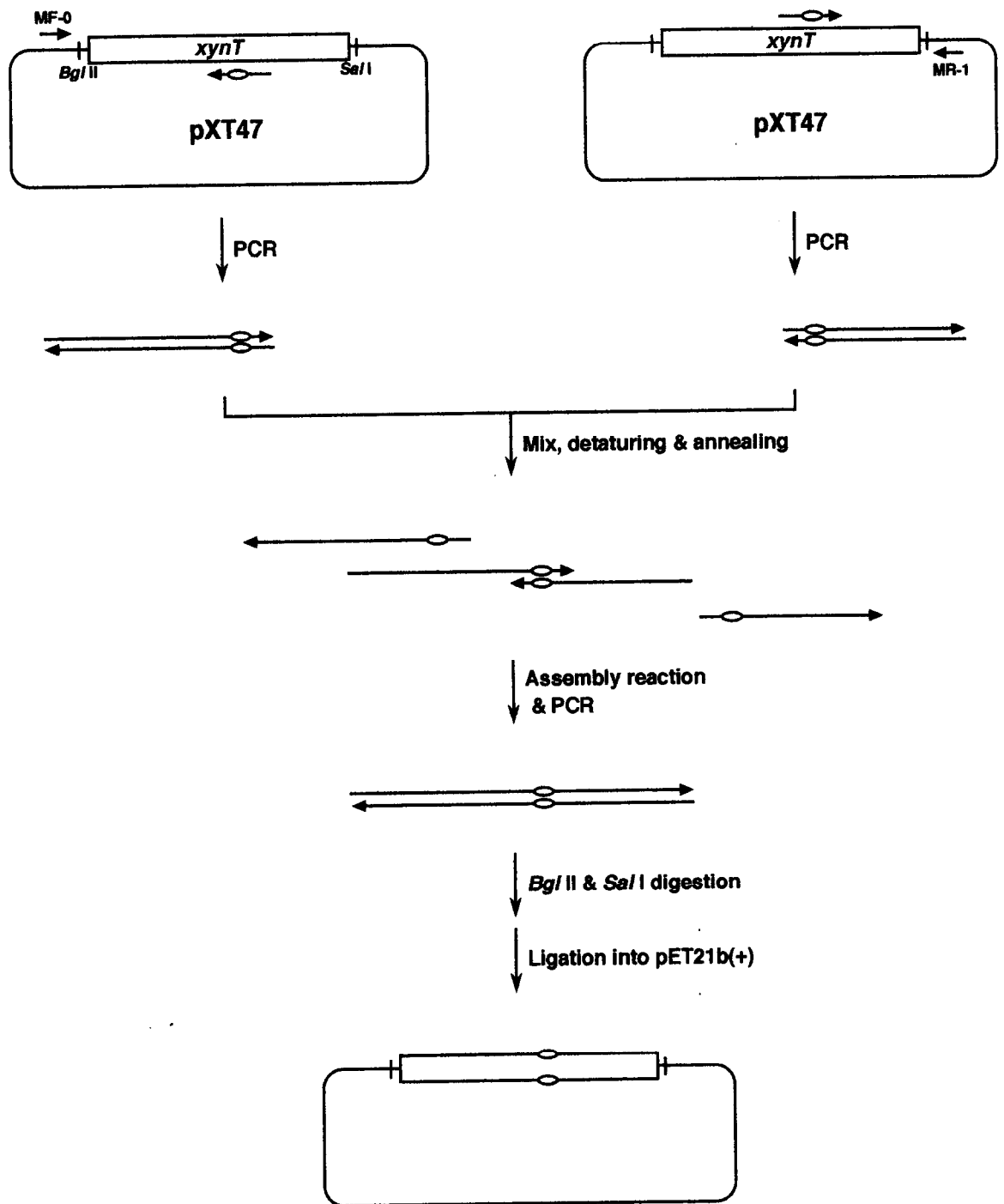


Fig. 5-2 Pro114 変異体の作製手順

xynT はキシラナーゼT 遺伝子を示す。オープンサークルは変異導入箇所を表す。

GTGATGTCGGCGATATAGGCG-3')あるいはアンチセンスプライマー MR-1 (5'-GCCGGATCTCAGTGGTGGTG-3')を組み合わせ、キシラナーゼ T 遺伝子を保持する発現型プラスミド pXT47 (後述、5-4 節参照)を鋳型 DNA とした PCR を行うことにより、キシラナーゼ T 遺伝子上流側と下流側を別個に増幅した。PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) にかけて、目的の 556 bp と 329 bp の DNA 断片を回収し、プライマーを加えないで PCR の反応液を調製した。9 サイクルの熱サイクルをかけた後 (アセンブリー反応; 5-2-4 項参照)、反応生成物を鋳型 DNA としてプライマー MF-0 および MR-1 を用いた PCR を行うことにより、キシラナーゼ T 遺伝子を含む全長の DNA 断片を取得した。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動 (AGE) にかけて、目的の DNA を回収した後、*Bgl* II と *Sal* I で処理し、同じく *Bgl* II と *Sal* I で処理した pET-21b (+) に連結して変異型酵素遺伝子発現型プラスミドを構築した。

変異型酵素 P114Q (Pro114 をグルタミンに置換した変異型酵素; 以下同様)、P114H、P114G をコードする変異型酵素遺伝子発現型プラスミドの構築は、個々に設計したプライマーを用い、上に示した方法に準じて行った。P114Q 用にはプライマーセット MP114HQ と MP114HQ を、P114H 用にはプライマーセット MP114HF と MP114HR を、P114G 用にはプライマーセット MP114GF と MP114GR を、それぞれ設計、合成して用いた (Fig. 5-1)。

すべての変異導入用プライマーには、変異導入の可否を判別する目的で *Ban* III サイトを付加した。

5-2-6. 塩基配列の決定

塩基配列の決定はジデオキシ法⁵⁾にて行い、ダイターミネーター法に基づく BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE バイオシステムズ) を用いて調製した試料を、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE バイオシステムズ) を用いて解析した。

5-2-7. 大腸菌無細胞抽出液の調製

各種発現型プラスミドを有する大腸菌 BLR(DE3) 株を LB 培地で一晩前培養し、培養液を本培養用の新たな LB 培地に 1% 接種した。OD₆₆₀ が 0.6 前後となるまで培養した後、isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 0.4 mM となるように加え、さらに 1 時間培養することにより、遺伝子の発現誘導をかけた。培養液の遠心

(7,000 x g、10 分間、4°C) により集菌した後、得られた菌体を 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液に懸濁した。ソニケーター (トミー、UD-201) を用いて菌体の超音波破碎を行った (氷冷下、30 秒間、5 回)。超音波処理後、遠心 (17,000 x g、10 分間、4°C) により未破碎菌体を除き、上清を無細胞抽出液とした。

5-2-8. キシラナーゼ活性の測定

本論文第 2 章 2-2-5 項に準じ、3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 法にて行った。

5-2-9. 反応温度依存性の測定

本論文第 3 章 3-2-5 項に準じた。

5-2-10. PNP- β -D-glucopyranoside 分解活性および PNP- β -D-cellobioside 分解活性の測定

1.25 mM PNP β -D-glucopyranoside (Sigma) または PNP- β -D-cellobioside (Sigma) を含む 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液 800 μ l に酵素試料 200 μ l を加え、37°C で 30 分間反応させた後、さらに 50°C で 30 分間反応させた。加水分解に伴う PNP の遊離を 405 nm における吸収を測定することで、活性を見積もった。

5-3. キシラナーゼ T および R の立体構造モデリング

5-3-1. キシラナーゼ T の立体構造モデリング

キシラナーゼ T は、アミノ酸配列相同性よりファミリー 11 に位置づけられている。既に X 線結晶構造解析がなされているファミリー 11 キシラナーゼのうち、*Bacillus circulans* のキシラナーゼ A の立体構造⁴⁾をもとに、キシラナーゼ T の分子モデリングを試みた。キシラナーゼ T と *B. circulans* キシラナーゼ A とのアミノ酸配列比較を Fig. 5-3 に示す。成熟タンパク質で比較した場合、キシラナーゼ T は *B. circulans* キシラナーゼ A と 80% のアミノ酸配列相同性を有する。GeneMine プログラムを用いた分子モデリングを行い、キシラナーゼ T の立体構造モデルを構築した (Fig. 5-4)。

キシラナーゼ T は、ファミリー 11 キシラナーゼにおいて共通して見られる β -jelly roll 構造をとると考えられた。2 つの β -プリーツ構造に挟まれた、基質と相互作用すると考えられる深いクレフトの存在が確認された。ファミリー 11 キシラナーゼにおいては、2 つの酸性アミノ酸残基が関与する retaining 機構が提唱されている⁵⁾。この触媒機構においては、2 つの酸性アミノ酸の側鎖カルボキシル基が互いに向かい合って存在し、片方の未解離のカルボキシル基が酸/塩基触媒として機能し、もう一方の解離型のカルボキシル基が求核剤ならびに反応中間体の安定化に働く (本論文第 1 章 1-1-2 項参照)。 *B. circulans* キシラナーゼ A においては、Glu172 が酸/塩基触媒残基、そして Glu78 が求核剤残基として同定されている⁶⁾。 *B. circulans* キシラナーゼ A とのアミノ酸配列相同性より、キシラナーゼ T においては Glu169 が酸/塩基触媒残基、そして Glu76 が求核剤残基に対応する (Fig. 5-3)。本研究で構築したキシラナーゼ T の立体構造モデルにおいては、Glu76 および Glu169 は互いに向かい合って存在している (Fig. 5-4)。この Glu76 および Glu169 の配置は、キシラナーゼ T が retaining 機構をとるとする仮説と矛盾せず、本立体構造モデルの妥当性が示された。

B. circulans キシラナーゼ A においては、基質アナログ (2',4'-dinitrophenyl 2-deoxy-2-fluoro- β -xylobioside) との複合体の X 線結晶構造解析がなされ、サブサイト -1 と -2 の同定がされるに至っている⁷⁾。この複合体の立体構造を基に、基質と複合体を形成した状態のキシラナーゼ T の分子モデリングを行った結果を Fig. 5-5 に示した。基質と結合した場合でも、キシラナーゼ T の立体構造に大きな変化は見られなかった。クレフトを塞ぐように伸びていたループは、サブサイト -1 と -2 に結合したキシロース残基の近傍に位置し、それらのキシロース残基と相互作用をしていると考えられた。

<i>Bacillus</i> sp. TAR-1	1	--NT-YWQYWTDDGGITVNAINGPGGNYSVTWRDTGNFVVGKGWEIGSPNRT	48
<i>B. circulans</i>	1	ASTDYQNWTDDGGIIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFRT	50
		* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
<i>Bacillus</i> sp. TAR-1	49	IHYNAGVWEPGNGYLTLYGWTRNQLIEYYVVDNMGTYRPTGTHRGTVVS	98
<i>B. circulans</i>	51	INYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLEIYYVVDNMGTYRPTGTYKGTVKS	100
		* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
<i>Bacillus</i> sp. TAR-1	99	DGGTYDIYTTMRYNAPSIDGTQT-FQQFWSVRQSKRPTGNNSITFSNHV	147
<i>B. circulans</i>	101	DGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRITFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFTNHV	150
		***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
<i>Bacillus</i> sp. TAR-1	148	NAWRNAGMNLGSSWSYQVLATEGYQSSGSRNVTW	182
<i>B. circulans</i>	151	NANKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSRNVTW	185
		*** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	

Fig. 5-3 キシラナーゼT と *B. circulans* キシラナーゼA のアミノ酸配列比較

TAR-1 株キシラナーゼT成熟タンパク質と *B. circulans* キシラナーゼA 成熟タンパク質のアミノ酸配列を一文字表記で示した。「-」はギャップを示し、「*」は2つのキシラナーゼに共通しているアミノ酸残基である。



Fig. 5-4 キシラナーゼT の立体構造モデル

左図はクレフトを横から、右図は正面から見たモデルである。黄色は β -シート構造、紫色は α -ヘリックス構造を示す。クレフトを塞ぐように伸びている Ala113 から Gln120 までのループ構造を緑色で表した。触媒残基と考えられる Glu76 と Glu169 を赤色で示した。

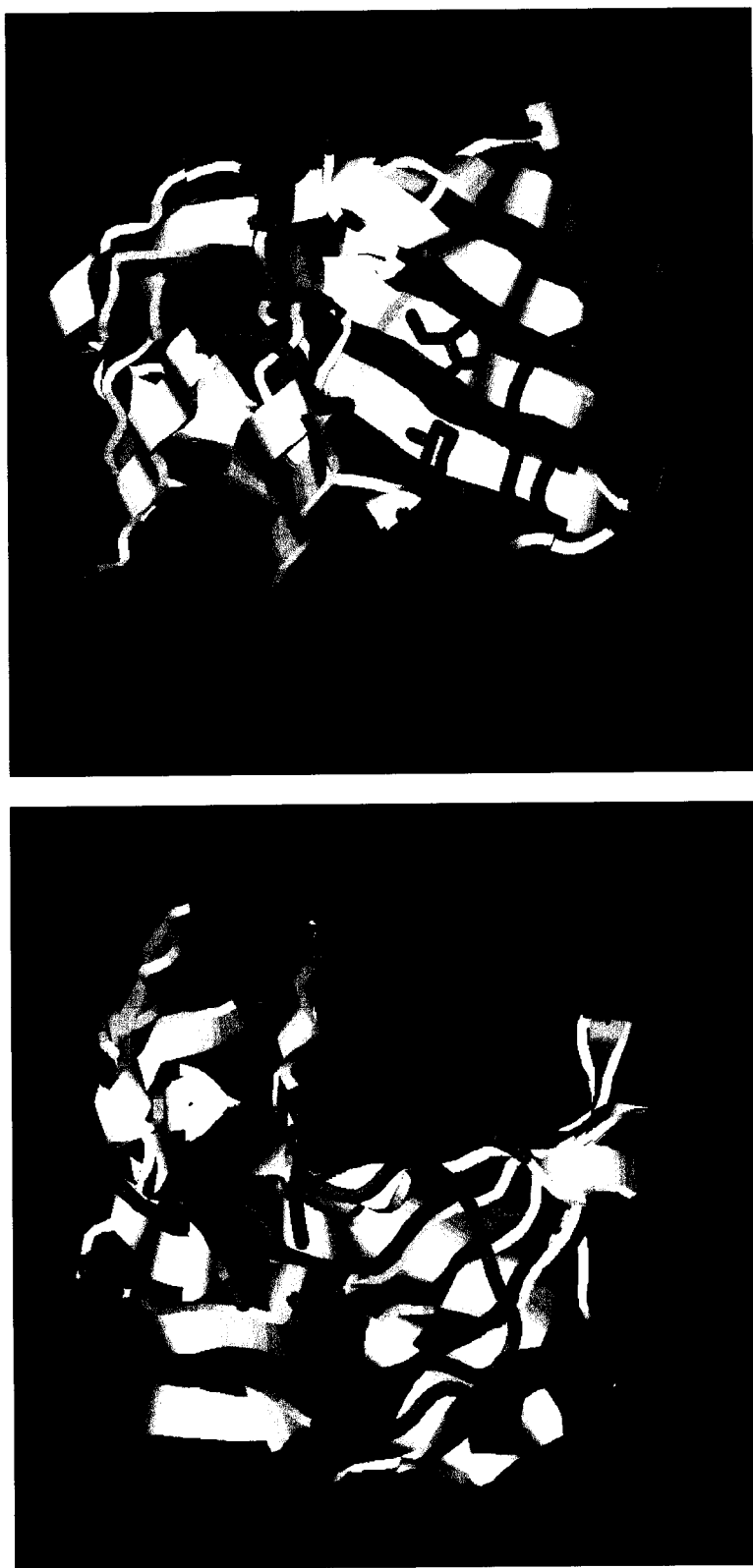


Fig. 5-5 キシラナーゼT-基質複合体の立体構造モデル

左図はクレフトを横から、右図は正面から見たモデルである。

5-3-2. キシラナーゼ R の立体構造モデリング

キシラナーゼ R は、アミノ酸配列相同性よりファミリー 10 に位置づけられている (本論文第 4 章参照)。既に X 線結晶構造解析がなされているファミリー 10 キシラナーゼのうち、*Bacillus stearothermophilus* (最近になり *Geobacillus stearothermophilus*⁸⁾ と改名されたが、本論文では旧称を用いた。) T-6 株のキシラナーゼの立体構造を基に、キシラナーゼ R の分子モデリングを試みた。キシラナーゼ R と *B. stearothermophilus* キシラナーゼ⁹⁾ とのアミノ酸配列比較を Fig. 5-6 に示した。成熟タンパク質で比較すると、キシラナーゼ R は *B. stearothermophilus* のキシラナーゼと 64% のアミノ酸配列相同性を有する。GeneMine プログラムを用いた分子モデリングを行い、キシラナーゼ R の立体構造モデルを構築した (Fig. 5-7)。

キシラナーゼ R は α/β barrel 構造をとり、キシラナーゼ T に比べて浅いクレフトを形成していることが予想された。ファミリー 10 キシラナーゼは、ファミリー 11 と全く異なる骨格構造をとるにもかかわらず、同様の触媒機構 (retaining 機構) によってキシランの加水分解を行うことが知られている。*Cellulomonas fimi* の生産するファミリー 10 キシラナーゼ/グルカナーゼ Cex などにおいては、基質アナログと結合させた酵素の分析や X 線結晶解析などにより求核残基と酸/塩基触媒として機能する 2 つのグルタミン酸残基の同定がなされている^{10,11)}。*C. fimi* キシラナーゼ/グルカナーゼ Cex の 2 つの触媒残基はすべてのファミリー 10 キシラナーゼにおいて保存されており、キシラナーゼ R においては Glu150 が酸/塩基触媒残基、そして Glu256 が求核剤残基に対応する。2 つの触媒残基のグルタミン酸のカルボキシル基間の距離は、*C. fimi* キシラナーゼ/グルカナーゼ Cex では 5.5 Å と報告された¹²⁾。一方、ファミリー 11 キシラナーゼである *B. circulans* キシラナーゼ A においても、2 つのグルタミン酸側鎖の距離は 5.4 Å と見積もられている⁴⁾。また、キシラナーゼと同じく retaining 機構で反応が進行すると言われている卵白リゾチームにおいては、触媒残基であるアスパラギン酸とグルタミン酸の距離は 5.5 Å であることが、X 線結晶構造解析により明らかにされている¹³⁾。キシラナーゼ R の立体構造モデルにおいて、2 つの触媒残基 Glu150 と Glu256 の間の距離もこれらとほぼ一致しており、これらの糖質加水分解酵素が類似の触媒機構を有するという仮説と矛盾しない。

```

Bacillus sp. TAR-1      1  -----NDQPF--AWQVASLSERYEQFDIGAAVEPYQLEGRQA-QILKHHYNSLVAENAMKPELQPREGEWNWEGAD  70
B. stearothermophilus  1  KNADSYAK-KPHISALNAPQLDQRYKNEFTIGAAVEPYQLQNEKDVQMLKRHFNSIVAENVMKPI SIOPEEGKFNFEQAD  79
      * * * * * ***** * * * * * ***** * * * * * ***** * * * * * *****
Bacillus sp. TAR-1      71  KIVEFARKHNMEIRFHFTLVVHSQVPEWFFIDEDGNRMVDETPDKREANKQILLEREMENHIKTVVERYKDDVTSWDVVNE  150
B. stearothermophilus  80  RIVKFAKANGMDIRFHFTLVVHSQVPOWFFLDKEGKPMVNETDPVKREONKQLLKRLETHIKTIVERYKDDIKYWDVVNE  159
      ** ** * ***** * * * * * ***** * * * * * ***** * * * * * *****
Bacillus sp. TAR-1      151  VIDDDGGLRESEWYQITGTDYIKVAFETARKYGGEEAKLYINDYNTVEVPSKRDDLNLVLDLLEQGVPIDGVGHQSHIQI  230
B. stearothermophilus  160  VVGDDGKLRNSPWYQIAGIDYIKVAFQAARKYGGDNIKLYMNDYNTVEVPEKRTALYNLVKQKKEGVPI DGGHGHQSHIQI  239
      * * * * * ***** * * * * * ***** * * * * * ***** * * * * * *****
Bacillus sp. TAR-1      231  GWPSIEDTRASFEKFTSLGLDNQVTELDMSLYGWPPTGAYTSYDDIPAEL-LOAQADRYDQLFELYEELAADISSVTFWG  309
B. stearothermophilus  240  GWPSEAEIEKTINMFAALGLDNQITELDVSMYGWPPRA-YPTYDAIPKQKFLD-QAARYDRFLKLYEKLSDKISNVTFWG  317
      ***** * * * * * ***** * * * * * ***** * * * * * ***** * * * * * *****
Bacillus sp. TAR-1      310  IADNHTWLDGRAREYNGVGI-----DAPFVFDHNYRVKPAYWRIID--  351
B. stearothermophilus  318  IADNHTWLDSDRADVYYDANGNVVDDPNAPYAKVEKGGKDPFVFGPDYKVKPAYWAIIDHK  379
      ***** ** * * * * * ***** * * * * * *****

```

Fig. 5-6 キシラナーゼR と *B. stearothermophilus* T-6 株キシラナーゼのアミノ酸配列比較

TAR-1 株キシラナーゼR 成熟タンパク質と *B. stearothermophilus* T-6 株キシラナーゼ成熟タンパク質のアミノ酸配列を一文
字表記で示した。「-」はギャップを示し、「*」は2つのキシラナーゼに共通しているアミノ酸残基である。

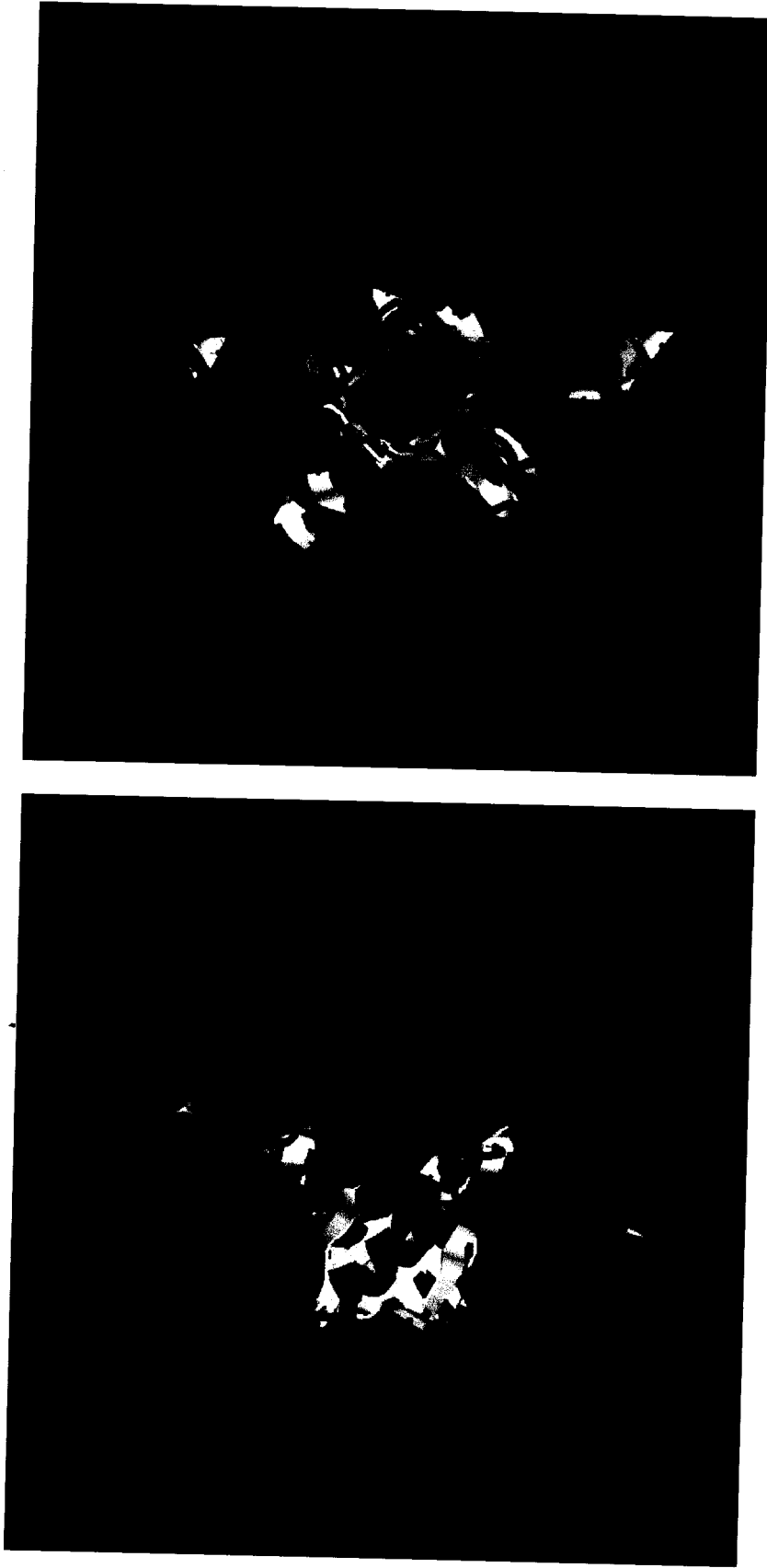


Fig. 5-7 キシラナーゼRの立体構造モデル

左図はクレフトを横から、右図は正面から見たモデルである。黄色は β -シート構造、紫色は α -ヘリックス構造を示す。触媒残基と考えられる Glu150 と Glu256 を赤色で示した。

5-4. キシラナーゼ T 遺伝子の大腸菌における発現

大腸菌発現用ベクター pET-21b(+) は強力な T7 プロモーターを有しており、培地に IPTG を添加することにより外来遺伝子の発現が誘導される。pET-21b(+) の SD 配列の下流には外来遺伝子を挿入するための *Nde* I サイトが存在している。さらに下流には *Eco* RI サイトが存在する。キシラナーゼ T 遺伝子の pET-21b(+) への連結を目的として、成熟キシラナーゼ T の N 末端に相当する位置に開始コドン ATG および *Nde* I サイトを導入するための変異導入用プライマー TS-9N を設計、合成した (Fig. 5-8)。変異導入用センスプライマー TS-9N とキシラナーゼ T の C 末端位置に相当する位置にアニールするアンチセンスプライマー TA-9 を用いて TAR-1 株染色体 DNA を鋳型とする PCR を行った。その結果、目的とする約 550 bp の DNA 断片が増幅された。PCR 産物の 5'-末端をリン酸化した後、*Hin* cII 切断したベクタープラスミド pUC119 に連結し、大腸菌 DH5 α に形質転換することにより組換えプラスミド pTN64 を取得した。pTN64 を *Nde* I および *Eco* RI で切断し、キシラナーゼ T 遺伝子断片を含む *Nde* I 断片および *Nde* I-*Eco* RI 断片を分取した後、同じく *Nde* I と *Eco* RI で処理した pET-21b(+) と連結することで、キシラナーゼ T 遺伝子発現型プラスミド pXT47 を構築した (Fig. 5-8)。

構築した発現型プラスミド pXT47 を大腸菌 BLR(DE3) 株に形質転換した。得られた形質転換体の培養を行い、IPTG 誘導をかけて得られた菌体から無細胞抽出液を調製し、DNS 法によりキシラナーゼ活性を測定した。その結果、培養液 1 ml 当たり 4.3 U のキシラナーゼ活性を有しており、野生型組換えキシラナーゼ T が大腸菌菌体内で高効率に、活性を保持する形で生産されていることが明らかとなった。

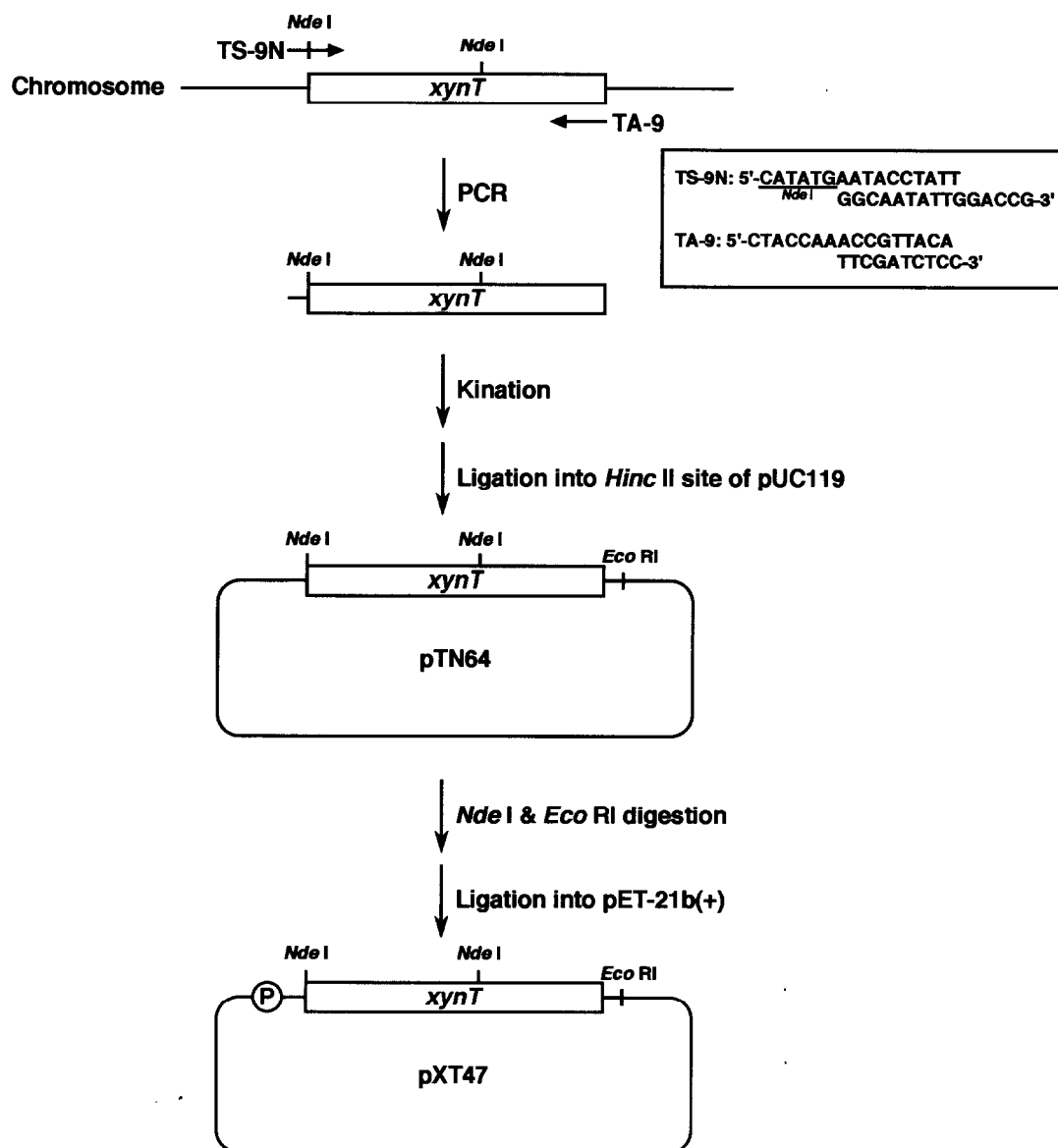


Fig. 5-8 キシラナーゼT 遺伝子発現型プラスミド pXT47 の構築

赤色 は染色体、青色は pUC119、緑色は pET-21b(+) 由来の 領域に対応する。P は T7 ファージプロモーターを表す。囲いにはプライマー TS-9N と TA-9 の配列を示した。

5-5. キシラナーゼT のループ欠失変異体の性質

キシラナーゼT と基質との複合体の立体構造モデルにおいては、クレフトを塞ぎ、かつ基質と相互作用する特徴的なループ構造が見られた (5-3-1 項参照; Fig. 5-5)。 *B. circulans* キシラナーゼA¹⁴⁾ や *Trichoderma reesei* キシラナーゼI および II¹⁵⁾ にも存在するこのループは、X線構造解析の結果に基づき基質認識に関与している可能性が示されていたが、実験的に確かめられた例はない。このループ領域が本酵素の加水分解活性に果たす役割についての知見を得るため、キシラナーゼT のループ領域 (Ala113 から Gln120) を欠失させた変異型キシラナーゼT の調製を行った。

野生型キシラナーゼT 遺伝子を含む発現型プラスミド pXT47 を鋳型 DNA とし、変異導入用プライマーセット、DL1F および DL1R (5-2-5 項参照) を用いて欠失変異導入を行い、ループ欠失型キシラナーゼT 遺伝子発現型プラスミド pTDL12 を構築した。得られたプラスミドを大腸菌 BLR (DE3) 株に形質転換し、無細胞抽出液を調製した後、キシラナーゼ活性を測定した。その結果、無細胞抽出液中にキシラナーゼ活性は検出されず、ループ欠失型キシラナーゼT はキシラナーゼ活性を完全に失っていると考えられた。これより、キシラナーゼT のループ領域はキシラナーゼ活性の発現に必須であることが示唆された。

5-6. Pro114 に saturation 変異を導入したキシラナーゼ T 変異体の性質

キシラン加水分解に必須であると考えられたキシラナーゼ T のループ領域は AlaProSerIleAspGlyThrGln のアミノ酸配列からなる。このうち、Pro114 は基質と複合体を形成したキシラナーゼ T の立体構造モデルから、その側鎖がサブサイト -2 に結合するキシロース環の 5 位に近接していると予想された (Fig. 5-9)。キシロースとグルコースは構造が類似しているが、キシロースでは 5 位の炭素に水酸基が結合しているのに対し、グルコースでは CH₂OH 基が結合しているという点で異なる。従って、キシラナーゼ T のサブサイト -2 とグルコース環との相互作用を想定した場合、この CH₂OH 基と Pro114 のピロリジン環との間に立体障害を生じることが推測された。実際、キシラナーゼ T はセルラーゼ (グルコースが β -1,4 結合したポリマーであるセルロースの加水分解酵素) の基質であるカルボキシメチルセルロースや PNP- β -D-cellobioside に対して活性を示さない。そこでキシラナーゼ T のループ領域についてさらなる知見を得るため、Pro114 を様々なアミノ酸に置換した変異体を構築し、その性質を検討することにした。

Pro114 に相当する位置にアニールする、saturation 変異導入用プライマーセット MP114XF および MP114XR を合成した (Fig. 5-1)。これらのプライマーにおいては、Pro114 のコドン CCT を DNB に変えてある。ここで、D は C 以外の 3 種類の塩基を、B は A 以外の 3 種類の塩基を表す。このコドンの変換により、Pro114 の種々のアミノ酸への置換が可能となる。またその際、野生型であるプロリンのコドンと、3 種類のストップコドン (TAA、TAG、TGA) のうち 2 種類 (TAA、TGA) の導入を防ぐことができる。グルタミンとヒスチジンについてはこのコドンに対応しておらず、変異型酵素 P114Q と P114H を作製するため、部位特異的変異導入用プライマーセット MP114QF および MP114QR (P114Q 用)、ならびに MP114HF および MP114HR (P114H 用) を設計、合成し用いた。

Pro114 コドンに saturation 変異を導入した変異型プラスミドを大腸菌 BLR (DE3) 株に形質転換し、無作為に選んだクローンからプラスミドを回収した。塩基配列決定を行ったところ、8 株の異なるアミノ酸置換の導入された変異型キシラナーゼ T が得られたことが明らかとなった (Table 5-1)。これとは別に調製した変異型酵素 P114Q および P114H と合わせ、計 10 種類の変異型キシラナーゼ T を構築したことになった。20 種類のアミノ酸のうち、側鎖が最も小さいグリシンへの置換が生じた変異体は得られなかった。Pro114 に対して側鎖が小さいグリシンへの置換を導入することで、サブサイト -2 での糖環との接近が解消され、たとえばグルコース残基との相互作用も

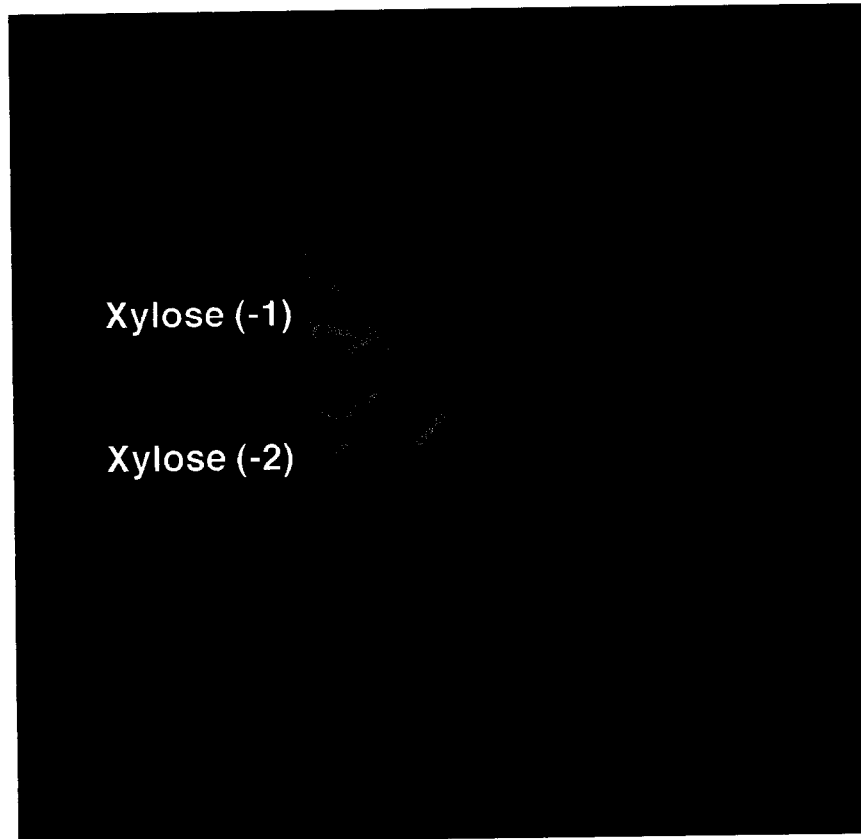


Fig. 5-9 キシラナーゼTのPro114近傍の立体構造モデル
ループ領域を緑色で示した。Pro114の側鎖は空間充填モデルで表した。

Table 5-1 saturation 変異導入によって
得られた Pro114 のコドン置換

Amino acid	Codon
Pro (Wild type)	CCT
Lys	AAG
Ser	AGT
Asn	AAC
Asp	GAC
Phe	TTT
Met	ATG
Glu	GAG
Val	GTC

可能になると考えられる。そこで、新たに変異導入用プライマーセット MP114GF および MP114GR を合成し、変異型酵素 P114G をコードするプラスミドを取得した。

計 11 種類の変異型酵素発現型プラスミドを導入した大腸菌 BLR (DE3) 株の培養を行い、IPTG 誘導をかけて得られた菌体から無細胞抽出物を調製した。DNS 法によりキシラナーゼ活性を測定した結果を Fig. 5-10 に示した。培養液 1 ml 当たりの活性で比較した場合、P114D と P114E は大腸菌が生産した野生型キシラナーゼ T と同様の活性を示したが、ほとんどの変異型酵素では大幅に活性が低下していることが明らかとなった。*B. circulans* キシラナーゼ A においては、キシラナーゼ T の Pro114 に相当するプロリン残基の主鎖カルボニルが、サブサイト -1 に結合するキシロース残基の 3 位の O 原子と水素結合を形成することが報告されており、当該プロリン残基の基質認識への関与が示唆されていた¹⁵⁾。キシラナーゼ T の Pro114 にアミノ酸置換を導入した変異型酵素の多くに活性の低下が認められたことから、Pro114 は主鎖カルボニルのみでなくその側鎖も基質認識などに関与していると考えられた。キシラナーゼ活性を保持していた P114D と P114E では、Pro114 のピロリジン環が担っていた役割を、アスパラギン酸およびグルタミン酸に共通するカルボキシル基が補った可能性もある。アミノ酸置換がキシラナーゼ活性の温度依存性に及ぼす影響について調べるため、P114D と P114E の反応温度依存性を測定した結果、いずれの変異型酵素も大腸菌が生産した野生型キシラナーゼ T と顕著な違いは認められなかった (データ示さず)。また、各種変異型酵素の PNP-β-D-glucopyranoside 分解活性と PNP-β-D-cellobioside 分解活性を測定したが、いずれの基質に対しても分解能を示さなかった。P114G を含む変異型酵素のいくつかは、サブサイト -2 にグルコース残基が入り込んだ際に生じるグルコース残基の CH₂OH 基と Pro114 の側鎖との立体障害が解消されると考えられるが、PNP-β-D-glucopyranoside や PNP-β-D-cellobioside に対する分解活性を獲得するには至らなかった。サブサイト -1 のキシロース残基に対する認識が厳しく、サブサイト -2 にグルコース残基が入り込めてもサブサイト -1 にまでは入り込めない可能性や、サブサイト -2 に入り込むグルコース残基に対する親和性の獲得が不十分であった可能性などが考えられた。

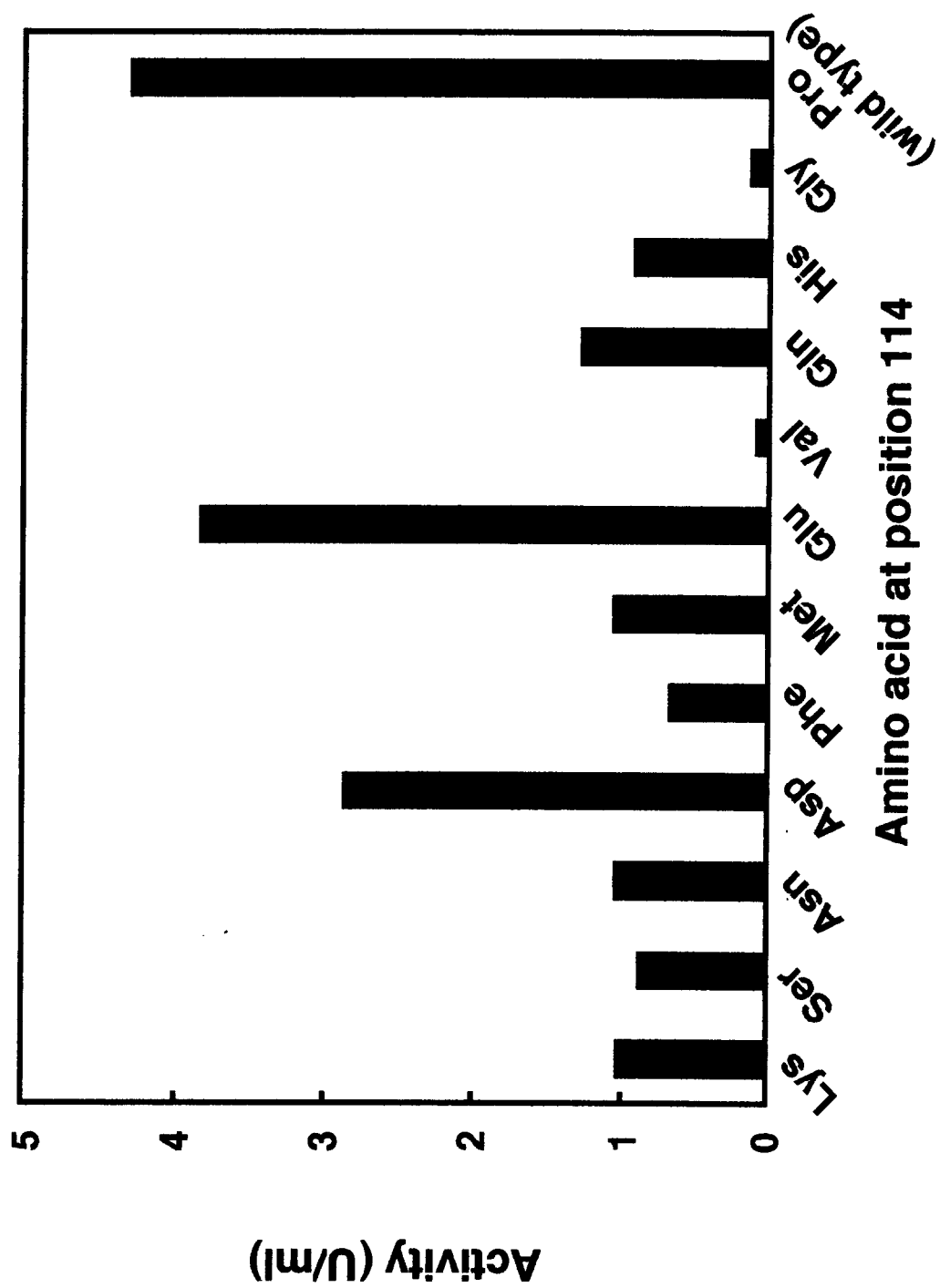


Fig. 5-10 各種 Pro114 変異型酵素を含む大腸菌無細胞抽出液のキシラナーゼ活性
キシラナーゼ活性は、培養液 1 ml 当たりの活性で示した。

5-7. 結論

キシラナーゼ T および R の立体構造モデルを構築した。両酵素はそれぞれファミリー 11 および 10 に典型的な構造モチーフを有することが予測された。キシラナーゼ T と基質アナログが結合した状態の立体構造モデルから、ループ領域が基質と相互作用していると考えられた。キシラナーゼ T 遺伝子の*E. coli*における発現系を構築し、ループ領域に種々の変異を導入した変異型酵素を調製した。ループを欠失させた変異型酵素ではキシラナーゼ活性が完全に失われた。また、ループ領域中の Pro114 にアミノ酸置換を導入した変異型酵素では、グルタミン酸やアスパラギン酸に置換されたものでは活性が維持されたが、ほとんどのものは活性の大幅な低下が観察された。

引用文献

- 1) Takahashi, H., Nakai, R. and Nakamura, S. 2000. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64: 887-890.
- 2) Nakamura, S., Nakai, R., Wakabayashi, K., Ishiguro, Y., Aono, R. and Horikoshi, K. 1994. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58: 8-81.
- 3) Nelson, M. and McClelland, M. 1992. *Methods. Enzymol.*, 216: 279-303.
- 4) Campbell, R., Rose, D., Wakarchuk, W. W., To, R., Sung, W. and Yaguchi, M. 1993. in *Proceedings of the second TRICEL Symposium on Trichoderma reesei Cellulases and other Hydrolases* (Suominen, P., and Reinikaninen, T., Eds.) pp. 63-77, Foundation for Biotechnological and Industrial Fermentation Research, Helsinki.
- 5) Gilkes, N. R., Henrissat, B., Kilburn, D. G., Miller, Jr. R. C. and Warren, R. A. J. 1991. *Microbiol. Rev.*, 55: 303-315.
- 6) Wakarchuk, W. W., Campbell, R. L., Sung, W. L., Davoodi, J. and Yaguchi, M. 1994. *Protein Sci.*, 3: 467-475.
- 7) Sidhu, G., Withers, S. G., Nguyen, N. T., McIntosh, L. P., Ziser, L. and Brayer, G. D. 1999. *Biochemistry*, 38: 5346-5354.
- 8) Teplitsky, A., Shulami, S., Moryles, S., Shoham, Y. and Shoham, G. 2000. *Acta Cryst. D56*: 181-184.
- 9) Gat, O., Lapidot, A., Alchanati, I., Regueros, C. and Shoham, Y. 1994. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1889-1896.
- 10) Tull D., Withers S. G., Gilkes N. R., Kilburn D. G., Warren R. A. J. and Aebersold R. 1991. *J. Biol. Chem.*, 266: 15621-15625.
- 11) MacLeod A. M., Lindhorst T., Withers S. G. and Warren R. A. J. 1994. *Biochemistry*, 33: 6371-6376.
- 12) White, A., Withers, S. G., Gilkes, N. R. and Rose, D. R. 1994. *Biochemistry*, 33: 12546-12552.
- 13) Imoto, T., Johnson, L. N., North, A. C. T., Phillips, D. C. and Rupley, J. A. 1972. in *The Enzymes* (Boyer, P. D., Ed.) pp 666-668, Academic Press, New York.
- 14) Wakarchuk, W. W., Campbell, R. L., Sung, W. L., Davoodi, J. and Yaguchi, M. 1994. *Protein Sci.*, 3: 467-475.
- 15) Törrönen, A. and Rouvinen, J. 1995. *Biochemistry*, 34: 847-856.

第6章

複数箇所への saturation 変異同時導入法の確立

6-1. 緒言

本研究室で分離された好熱好アルカリ性 *Bacillus* sp. TAR-1 株は、好熱性アルカリキシラナーゼであるキシラナーゼ T および R を分泌生産する (文献^{1,2}) および本論文第 2 章参照)。好熱性細菌や好アルカリ性細菌などが生産する酵素はそのポリペプチド骨格が頑丈であり、アミノ酸置換による全体構造への負荷に起因する失活に対して耐性が高いことが期待され、進化分子工学的検討の対象として好ましいと考えられる。本研究では、キシラナーゼ T の進化分子工学による機能改変の第一歩として、特定かつ多数のアミノ酸残基に対し、一括して saturation 変異を導入する新規な変異導入法の確立を行った。

6-2. 実験材料と方法

6-2-1. 菌株、プラスミドおよび培地

ライブラリー構築用の宿主には大腸菌 BLR(DE3) 株を用いた。キシラナーゼ T 遺伝子発現型プラスミド pXT47 は、本論文第 5 章 5-4 項で構築したものを使用した。大腸菌用発現ベクターには pET-21b(+)(Novagen) を用いた。

大腸菌の培地には LB 培地 (本論文第 4 章 4-2-1 項参照) を使用した。

6-2-2. クローニング技術

本論文第 5 章 5-2-2 項に準じた。

6-2-3. 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 ポリメラーゼには KOD dash DNA ポリメラーゼ (東洋紡) を用いた。反応装置は GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer) を使用した。反応液 50 μ l 中には鋳型 DNA、プライマー、2.0 mM の dNTP、2.5 U のポリメラーゼが含まれる。94°C、5 分間のプレヒート後、

94°C x 30 秒 → 60°C x 2 秒 → 74°C x 30 秒

のサイクルを 25 回繰り返す、最後に 74°C で 1 分間のポストヒートを行った。

6-2-4. キシラナーゼ T 遺伝子の複数箇所への saturation 変異導入

変異導入用 PCR

1 ng の pXT47 を鋳型とし、各 15 pmol の所定の変異導入用プライマー (後述、Fig. 6-3 参照)、ならびに pET-21b(+) のクローニングサイト近傍にアニールするプライマーセット MF-0 および MR-1 (本論文第 5 章 5-2-3 項参照) を用いてキシラナーゼ T 遺伝子断片を増幅した。PCR 産物を一つにまとめ、調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) により所定の大きさの DNA 断片を精製した。得られた DNA 断片を 20 μ l の滅菌水に溶解した。

アセンブリー反応

上で調製したサンプルの内、10 μ l に 5 μ l の 10 \times PCR 用緩衝液、終濃度 0.2 mM の dNTP および 2.5 U の KOD dash DNA ポリメラーゼを加え、滅菌水を加えて最終的に 50 μ l とした。サーマルサイクラーを用いて、94 $^{\circ}$ C、5 分間のプレヒート後、

94 $^{\circ}$ C x 30 秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C x 2 秒 \rightarrow 74 $^{\circ}$ C x 30 秒

のサイクルを 9 回繰り返す、最後に 74 $^{\circ}$ C で 1 分間のポストヒートを行った。

2nd PCR

アセンブリー反応後の産物 1 μ l を鋳型として、MF-0 および MR-1 各 30 pmol をプライマーとして用いた PCR を行った。PCR 産物を調製用アガロースゲル電気泳動 (AGE) にかけて、目的の約 840 bp の DNA 断片を精製、回収した。

大腸菌での変異ライブラリーの作製

2nd PCR によって得られた DNA 断片は、本論文第 5 章 5-2-5 項に準じて pET-21b(+) ヘクローニングし、大腸菌 BLR(DE3) 株に形質転換し、大腸菌ライブラリーを作製した。

6-2-5. 塩基配列の決定

本論文第 5 章 5-2-4 項に準じた。

6-3. 複数箇所への saturation 変異同時導入法の概要

部位特異的 saturation 変異導入法³⁾ と DNA シャフリングの手法⁴⁾ を融合させることにより、一次構造上で複数箇所にわかれて存在する標的アミノ酸に対し、同時に saturation 変異を導入する手法を開発した。その概要を Fig. 6-1 に示した。

一次構造上で比較的近い位置に存在する標的アミノ酸を含む領域に対応するセンスおよびアンチセンスの両方のオリゴヌクレオチドを合成し、変異導入用プライマーとした。この際、標的アミノ酸に対応するコドンは、NNN として合成した。これにより、20 種類すべてのアミノ酸への置換が可能になる。

まず、互いに隣り合う領域のセンスプライマーとアンチセンスプライマーを組み合わせさせて用い、標的遺伝子を鋳型とする PCR を行う。ここで得られる PCR 産物の標的アミノ酸のコドンには saturation 変異が導入されている。また、隣り合った領域間の PCR 産物同士は、プライマーに対応する領域が、標的アミノ酸のコドンを除いて重複している。従って、各種 PCR 産物を混合し、耐熱性ポリメラーゼを加えた系で熱サイクルをかけることで (アセンブリー反応)、解離した PCR 産物の一本鎖 DNA がそれぞれプライマーとして機能し、隣の領域まで DNA 伸長を繰り返す。すなわち、DNA シャフリングと同様の原理により、標的遺伝子の全長が回復する。最後に、この反応産物を鋳型として両末端に対応するプライマーを用いて PCR を行うことにより、目的の位置に saturation 変異が導入され標的遺伝子全長を回復した DNA 断片のみを回収する。得られた DNA 断片をベクターに組み込み大腸菌に形質転換することで、複数箇所に同時に saturation 変異が導入されたライブラリーが構築される。

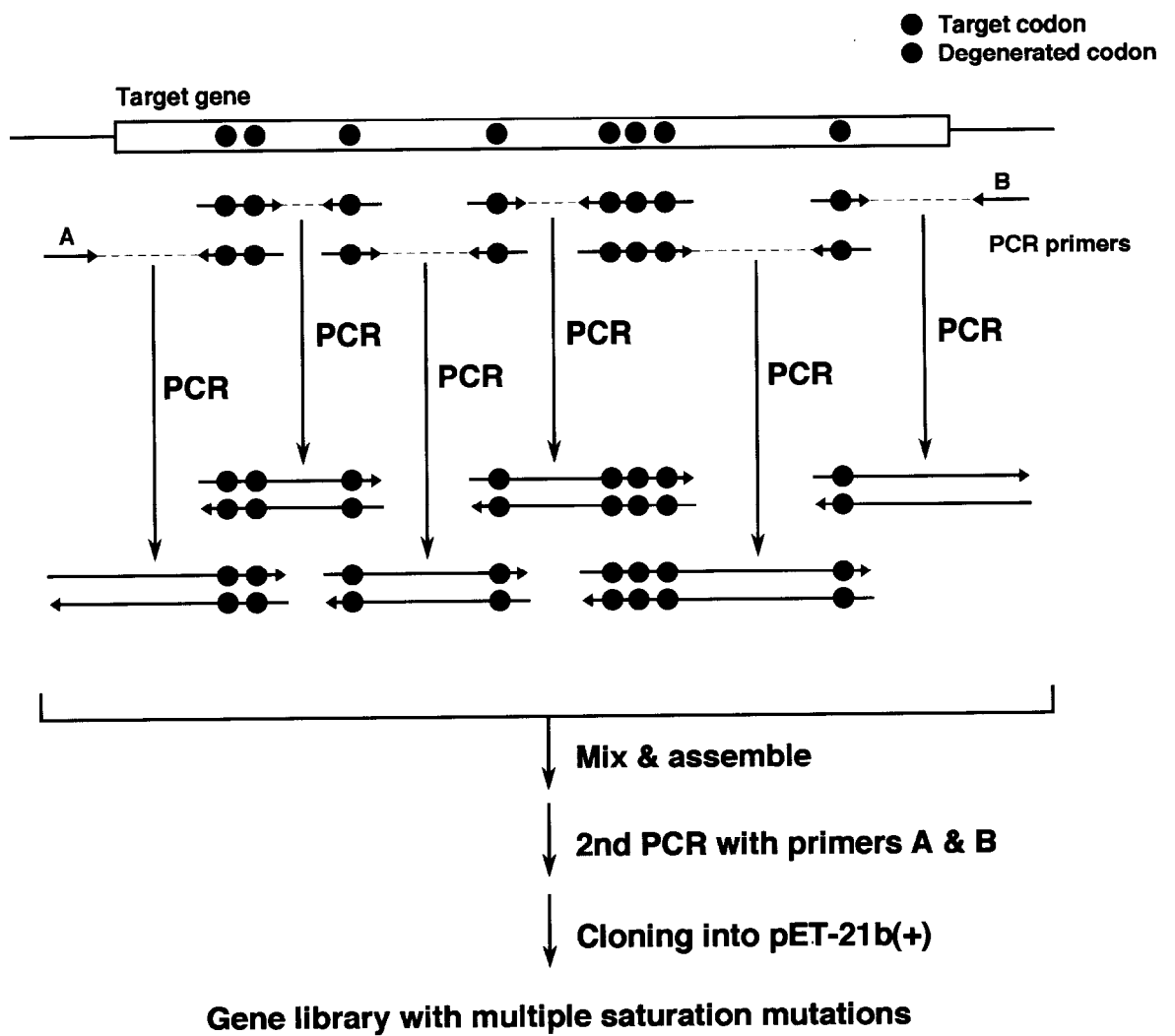


Fig. 6-1 複数箇所への saturation 変異同時導入法

6-4. キシラナーゼT のクレフト内に複数の saturation 変異を同時導入したライブラリーの作製と評価

好熱好アルカリ性 *Bacillus* sp. TAR-1 株キシラナーゼT をモデルとして、複数箇所への saturation 変異の同時導入を試みた。キシラナーゼT の立体構造モデルに基づき、側鎖がクレフトの内側に位置していると予想される 24 個のアミノ酸残基の位置を Fig. 6-2 に示した。これらのアミノ酸残基は基質と直接的に相互作用しうることから、キシランの加水分解活性に重要な役割を果たしていることが推測される。キシラナーゼT の一次構造上で、これらのアミノ酸残基は分散して存在している (Fig. 6-3)。これらのアミノ酸残基に対応するコドンに同時に saturation 変異を導入したライブラリーの構築を試みた。

変異導入の標的となる 8 箇所の領域について計 16 本の変異導入用プライマーを設計、合成した (Fig. 6-3)。次に、互いに隣り合う領域のセンスプライマーとアンチセンスプライマーを組み合わせて用い、キシラナーゼT 遺伝子発現型プラスミド pXT47 を鋳型とする PCR を行った。得られた PCR 産物を調製用 PAGE にかけて、ゲルから回収することで鋳型 DNA を除去した。PCR 産物に対し、dNTP、DNA ポリメラーゼおよび緩衝液を加え、熱サイクルをかけた (アセンブリー反応)。アセンブリー反応後の反応生成物を鋳型とし、MF-0 および MR-1 をプライマーとして用いた 2nd PCR を行った。得られた PCR 産物を調製用 AGE にかけて、キシラナーゼT 遺伝子全長に相当する DNA 断片を回収した後、*Bgl* II および *Sal* I で制限酵素処理し、同じく制限酵素処理した pET-21b(+) と連結した。大腸菌 BLR(DE3) 株に形質転換し、変異型遺伝子ライブラリーを構築した。

・ 得られたライブラリーより無作為に 16 クローンを選び、プラスミドを回収した。AGE での解析により、11 クローンで目的の大きさのプラスミドが確認され、このうち 5 クローンについて塩基配列を決定した (Fig. 6-4)。その結果、側鎖がクレフトの内側を向いている 24 カ所のすべてのアミノ酸残基に対応するコドンに変異が導入されていることが確認された。標的部位以外にも、ポリメラーゼの複製エラーに起因すると思われる塩基置換が 4 クローンに計 6 カ所見られた。塩基配列より類推される変異型キシラナーゼT のアミノ酸配列を Fig. 6-5 に示した。置換されたアミノ酸の種類に特に偏りは見られず、コドンの置換が塩基レベルでランダムになされたことが示された。

解析したすべてのクローンにおいて、終止コドンが導入されていることが明らかになった。コドンは全部で 64 通り存在するが、そのうち 3 つが終止コドン (TAA、

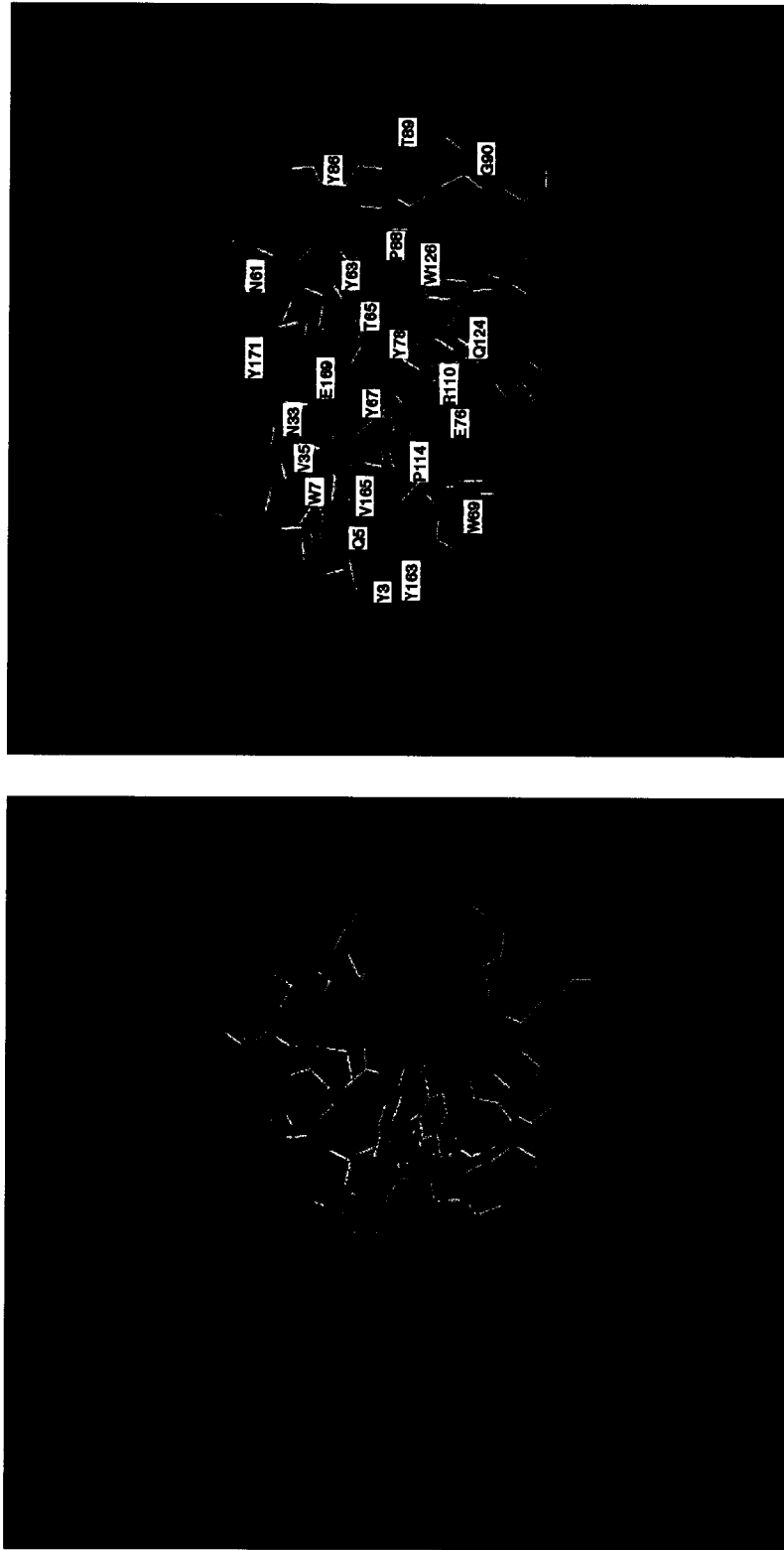


Fig. 6-2 側鎖がクレフトの内側に位置しているアミノ酸残基

キシラナーゼTの立体構造モデルにおいて、側鎖がクレフトの内側に位置しているアミノ酸残基をスティックモデルで示した。左図はクレフトを横から、右図は正面から、それぞれ見えた図に対応する。触媒残基の2つのグルタミン酸は赤色で示した。スティックモデルで示したすべてのアミノ酸残基を saturation 変異の標的とした。

1 GTGATGTCGGGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGGGGGTATGCGCGCCAGCATGCGCCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGGAAATTAATACGACTACTATAG 120
 MF-0 5'-GTGATGTCGGGATATAGGCG-3
 121 GGGAATGTGAGCGGATTAACAATTCCTCCTAGAAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAATACCTTATGGCAATATGGACCAGATGGTGGACACAGTAATGC 240
 MNTY W Q Y W T D G G T V N A
 M1F 5'-GGAGATATACATATGAATACACCCNNNTGNNNTATNNNACCGAATGGTGG-3'
 M1R 3'-CCTCTATATGATATACTATGNNNACCNNNATANNNTGGCTACCACCACC-5'
 241 TACAAATGGACCTGGTGAATTTACAGTGTGACATGAGAGATACAGGAACTTTGTTGCGGTAAAGGTTGGAAATCGGTTACCCAAATCGAACGATCCATTACAAATCTGGTGTG 360
 T N G P G G N Y S V T W R D T G N F V V G K G W E I G S P N R T I H Y N A G V W
 M2F 5'-GGAGATACAGGGNNNTTNNNGTCGGTAAAAGTTGG-3'
 M2R 3'-CCTCTATGTCCTCCNNNAANNACGCCATTTCCCAACC-5'
 M3F 5'-G
 M3R 3'-C
 361 GGAACTGTTGGAATGATTTGACTCTCTATGCGGTGACAAAGGATCAGCTCATAGAAATATATGTTGTTGATAAATGGGAACCTTACAGACCTACTGGAAACCCATCGAGGCACCGT 480
 E P S G N G Y L T L Y G W T R N Q L I E Y V V D N W G T Y R P T G T H R G T V
 M4F 5'-CAAGGAATCAGCTCATANNNTATNNNGTCTGATAATGG-3'
 M4R 3'-GTTCTTAGTGGAGTATNNNATANNNACGAACTATTAACC-5'
 M5F 5'-GATAAATGGGGAACCTNNNAGANNNNNNNACCCATCGAGGCACC-3'
 M5R 3'-CTATTAACCCCTTGANNTCTNNNNNNNNNTGGTAGCTCCGTTGG-5'
 M6F 5'-CTATACGACTATGNNNTACATGCAANNNTCAITGATGG-3'
 M6R 3'-GATATGCTGATACNNNATGTTACGTTNNNAGGTAACACTACC-5'
 481 TGTCAGTGTAGGAGACATATACACTATACGACTATCGATATGCAATGCACTTCCAACTGATGGCACAAACGTTCCAAACAGTTCTGGAGTGTGAGCAATCGAAAGAGACCGACTGG 600
 V S D G G T Y D I Y T T M R Y N A P S I D G T Q T F Q Q F W S V R Q S K R P T G
 M7F 5'-CAGAAAAGTTCCAANNNTTCNNNAGTGTGAGCAATCG-3'
 M7R 3'-GTGTTTGCAGGTTNNNAAAGNNNTCACCTCCGTTAGC-5'
 M8F 5'-GGAAAGTATGTTGTTCTNNNAGNNNTTAGCAACANNNGCCNNNCAAAAGTAGCGGG-3'
 M8R 3'-CCCTTCATCAACACAGANNNGTCNNNAATCGTTGTNNNCCGNNNGTTTCATCGCCC-5'
 601 AAATPACGTTAGCATTAGCAACCCAGTGAATGCGTGGAGAAATGCAAGGATGAATCTTACCAAGTATAGCAACAGAGGCTATCAAAGTAGCGGGAG 720
 N N V S I T F S N H V N A W R N A G M N L G S S W S Y Q V L A T E G Y Q S S G R
 M9F 5'-GGAAAGTATGTTGTTCTNNNAGNNNTTAGCAACANNNGCCNNNCAAAAGTAGCGGG-3'
 M9R 3'-CCCTTCATCAACACAGANNNGTCNNNAATCGTTGTNNNCCGNNNGTTTCATCGCCC-5'
 721 ATCGAATGTACCGGTTTGTGAGGACTCTGAGGATCCCGGGTACCGAGCTGGATTCGACTCCGTGCAAGGTTGCGGCCACTCGAGCACCACCACCACTGAGATCCGG 840
 S N V T V W *
 MR-1 3'-GTGGTGTGACTTAGGCC
 841 C 841
 G--5'

Fig. 6-3 saturation 変異の標的部位および変異導入用プライマーの塩基配列

変異導入の標的としたアミノ酸残基とコドンを赤色で示した。キシラナーゼT 遺伝子由来の配列を紫色の下線で、ベクター由来の配列を緑色の下線で表した。

Wild type	1	ATGAATACC	TGG	TAT	ACC	GATGGTGGTGGAA	CAGTAAATGCTACAAATGGACCTGGTGGAAAT	TACAGTGT	80	
Mutant 1	1	ATGAATACC	TGG	TAT	ACC	GATGGTGGTGGAA	CAGTAAATGCTACAAATGGACCTGGTGGAAAT	TACAGTGT	80	
Mutant 2	1	ATGAATACC	TGG	TAT	ACC	GATGGTGGTGGAA	CAGTAAATGCTACAAATGGACCTGGTGGAAAT	TACAGTGT	80	
Mutant 3	1	ATGAATACC	TGG	TAT	ACC	GATGGTGGTGGAA	CAGTAAATGCTACAAATGGACCTGGTGGAAAT	TACAGTGT	80	
Mutant 4	1	ATGAATACC	TGG	TAT	ACC	GATGGTGGTGGAA	CAGTAAATGCTACAAATGGACCTGGTGGAAAT	TACAGTGT	80	
Mutant 5	1	ATGAATACC	TGG	TAT	ACC	GATGGTGGTGGAA	CAGTAAATGCTACAAATGGACCTGGTGGAAAT	TACAGTGT	80	
Wild type	81	GACATGGAGAGATACAGGG	TTT	GTC	GGTAAAGGTTGGGAAATCGGTT	CACCAAAATCGAACGATCCATTACAATG	160			
Mutant 1	81	GACATGGAGAGATACAGGG	TTT	GTC	GGTAAAGGTTGGGAAATCGGTT	CACCAAAATCGAACGATCCATTACAATG	160			
Mutant 2	81	GACATGGAGAGATACAGGG	TTT	GTC	GGTAAAGGTTGGGAAATCGGTT	CACCAAAATCGAACGATCCATTACAATG	160			
Mutant 3	81	GACATGGAGAGATACAGGG	TTT	GTC	GGTAAAGGTTGGGAAATCGGTT	CACCAAAATCGAACGATCCATTACAATG	160			
Mutant 4	81	GACATGGAGAGATACAGGG	TTT	GTC	GGTAAAGGTTGGGAAATCGGTT	CACCAAAATCGAACGATCCATTACAATG	160			
Mutant 5	81	GACATGGAGAGATACAGGG	TTT	GTC	GGTAAAGGTTGGGAAATCGGTT	CACCAAAATCGAACGATCCATTACAATG	160			
Wild type	161	CTGGTGTGGGAAACCGTCTGGA	GGA	TTG	CTC	GGG	ACAAGGAATCAGCTCATA	TAT	GTC	240
Mutant 1	161	CTGGTGTGGGAAACCGTCTGGA	GGA	TTG	CTC	GGG	ACAAGGAATCAGCTCATA	TAT	GTC	240
Mutant 2	161	CTGGTGTGGGAAACCGTCTGGA	GGA	TTG	CTA	GGG	ACAAGGAATCAGCTCATA	TAT	GTC	240
Mutant 3	161	CTGGTGTGGGAAACCGTCTGGA	GGA	TTG	CTC	GGG	ACAAGGAATCAGCTCATA	TAT	GTC	240
Mutant 4	161	CTGGTGTGGGAAACCGTCTGGA	GGA	TTG	CTC	GGG	ACAAGGAATCAGCTCATA	TAT	GTC	240
Mutant 5	161	CTGGTGTGGGAAACCGTCTGGA	GGA	TTG	CTC	GGG	ACAAGGAATCAGCTCATA	TAT	GTC	240
Wild type	241	GTTGATAATTGGGGAAC	TAGA	ACCCATCGAGGCACCGTTGTCAGT	GTATGGAGGAACATATGACATCTA	320				
Mutant 1	241	GTTGATAATTGGGGAAC	TAGA	ACCCATCGAGGCACCGTTGTCAGT	GTATGGAGGAACATATGACATCTA	320				
Mutant 2	241	GTTGATAATTGGGGAAC	TAGA	ACCCATCGAGGCACCGTTGTCAGT	GTATGGAGGAACATATGACATCTA	320				
Mutant 3	241	GTTGATAATTGGGGAAC	TAGA	ACCCATCGAGGCACCGTTGTCAGT	GTATGGAGGAACATATGACATCTA	320				
Mutant 4	241	GTTGATAATTGGGGAAC	TAGA	ACCCATCGAGGCACCGTTGTCAGT	GTATGGAGGAACATATGACATCTA	320				
Mutant 5	241	GTTGATAATTGGGGAAC	TAGA	ACCCATCGAGGCACCGTTGTCAGT	GTATGGAGGAACATATGACATCTA	320				
Wild type	321	TACGACTATG	TACAATGCA	TCCATTGATGGCACACAAACGTTCCAA	TTCT	AGTGTGAGGCCAATCGAAGA	400			
Mutant 1	321	TACGACTATG	TACAATGCA	TCCATTGATGGCACACAAACGTTCCAA	TTCT	AGTGTGAGGCCAATCGAAGA	400			
Mutant 2	321	TACGACTATG	TACAATGCA	TCCATTGATGGTTCCACAAACGTTCCAA	TTCT	AGTGTGAGGCCAATCGAAGA	400			
Mutant 3	321	TACGACTATG	TACAATGCA	TCCATTGATGGCACACAAACGTTCCAA	TTCT	AGTGTGAGGCCAATCGAAGA	400			
Mutant 4	321	TACGACTATG	TACAATGCA	TCCATTGATGGCACACAAACGTTCCAA	TTCT	AGTGTGAGGCCAATCGAAGA	400			
Mutant 5	321	TACGACTATG	TACAATGCA	TCCATTGATGGTTCCACAAACGTTCCAA	TTCT	AGTGTGAGGCCAATCGAAGA	400			
Wild type	401	GACCGACTGGAAATAACGTTAGCATTACGTTT	TAGCAACCACGTTGAATGCGTGGAGAAATGCAGGAATGAATCTGGGAAGT	480						
Mutant 1	401	GACCGACTGGAAATAACGTTAGCATTACGTTT	TAGCAACCACGTTGAATGCGTGGAGAAATGCAGGAATGAATCTGGGAAGT	480						
Mutant 2	401	GACCGACTGGAAATAACGTTAGCATTACGTTT	TAGCAACCACGTTGAATGCGTGGAGAAATGCAGGAATGAATCTGGGAAGT	480						
Mutant 3	401	GACCGACTGGAAATAACGTTAGCATTACGTTT	TAGCAACCACGTTGAATGCGTGGAGAAATGCAGGAATGAATCTGGGAAGT	480						
Mutant 4	401	GACCGACTGGAAATAACGTTAGCATTACGTTT	TAGCAACCACGTTGAATGCGTGGAGAAATGCAGGAATGAATCTGGGAAGT	480						
Mutant 5	401	GACCGACTGGAAATAACGTTAGCATTACGTTT	TAGCAACCACGTTGAATGCGTGGAGAAATGCAGGAATGAATCTGGGAAGT	480						
Wild type	481	AGTTGGTCT	CAG	TTAGCAACA	GGC	CAAAGTAGCGGGAGATCGAATGTAACGGTTTGGTAG	552			
Mutant 1	481	AGTTGGTCT	CAG	TTAGCAACA	GGC	CAAAGTAGCGGGAGATCGAATGTAACGGTTTGGTAG	552			
Mutant 2	481	AGTTGGTCT	CAG	TTAGCAACA	GGC	CAAAGTAGCGGGAGATCGAATGTAACGGTTTGGTAG	552			
Mutant 3	481	AGTTGGTCT	CAG	TTAGCAACA	GGC	CAAAGTAGCGGGAGATCGAATGTAACGGTTTGGTAG	552			
Mutant 4	481	AGTTGGTCT	CAG	TTAGCAACA	GGC	CAAAGTAGCGGGAGATCGAATGTAACGGTTTGGTAG	552			
Mutant 5	481	AGTTGGTCT	CAG	TTAGCAACA	GGC	CAAAGTAGCGGGAGATCGAATGTAACGGTTTGGTAG	552			

Fig. 6-4 変異型キシラナーゼT 遺伝子の塩基配列

変異導入の標的としたコドンを示した。標的部位以外で置換が生じた塩基を黄色で示した。

TAG、TGA) である。従って NNN の配列でランダムに塩基置換を導入した場合、特定の 1 つのコドンに終止コドンが現れる確率は $3/64$ である。ここでは 24 カ所のアミノ酸についてコドンを変換したので、少なくとも 1 カ所以上に終止コドンが導入される確率は $1-(61/64)^{24}$ 即ち 68% と高い。NNN の配列の代わりに NNB (B は A 以外の 3 つの塩基) を用いた場合、導入される終止コドンは TAG のみとなるので、この確率を 40% に低下させることが可能である。終止コドン TAG は、アンバー変異 *supE* を有する大腸菌 JM109 株 [*e14-*、*supE44*、 Δ (*lac-proAB*)、*hsdR17*、*recA1*、*endA1*、*gyrA96*、*thi-1*、*relA1*、[F'、*traD36 proAB*、*lacI^q* Z Δ M15]] や DH5 α 株 [*supE44*、 Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15)、*hsdR17*、*recA1*、*endA1*、*gyrA96*、*thi-1*、*relA1*] においては、一部が Gln のコドンとして認識される。従って標的アミノ酸に対応するコドンを NNB としたライブラリーを構築する際、これら的大腸菌を宿主としてとして使用することで、完全長の変異型酵素からなるライブラリーを構築することができる。

本研究で確立した手法を基盤として用いることにより、標的タンパク質の立体構造に基づいて様々なライブラリーを戦略的に構築することが可能となる。タンパク質の機能部位に対し、集中してランダムな変異を同時に導入することで、ライブラリーの母集団の大きさを抑えながら、なおかつ標的部位に関しては網羅的にアミノ酸置換を導入することが可能となり、タンパク質の機能改変を容易に行えるものと期待される。理論的なアプローチによる部位特異的変異導入と、従来の遺伝子全体へのランダム変異の双方の利点を活かすことが可能となったといえよう。

6-5. 結論

部位特異的 saturation 変異導入法と DNA シャフリングの手法を融合させることにより、複数の標的アミノ酸に対する saturation 変異の同時導入を試みた。本手法を用い、キシラナーゼT のクレフト内の 24 アミノ酸をランダム変異の標的とした変異型遺伝子ライブラリーを構築した。ライブラリーを構成する一部のクローンについて塩基配列を決定した結果、標的アミノ酸にランダムに変異導入されていることが明らかとなった。

引用文献

- 1) Takahashi, H., Nakai, R. and Nakamura, S. 2000. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64: 887-890.
- 2) Nakamura, S., Nakai, R., Wakabayashi, K., Ishiguro, Y., Aono, R. and Horikoshi, K. 1994. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58: 78-81.
- 3) Reidhaar-Olson, J.F. and Sauer, R.T. 1988. *Science*, 241: 53.
- 4) Stemmer, W. P. C. 1994. *Nature (London)*, 370: 389-391.

第7章

複数箇所への saturation 変異同時導入法を用いた
変異型キシラーゼTの作製と性質検討

7-1. 緒言

本研究室で分離された好熱好アルカリ性 *Bacillus* sp. TAR-1 株は、好熱性アルカリキシラナーゼであるキシラナーゼT および R を分泌生産する¹⁾。キシラナーゼT は反応の至適を pH 5~8 に有するファミリー 11 の好熱性のキシラナーゼで、エンド型の切断様式を持つ (本論文第 3、4 章参照)。遺伝子クローニングにより明らかとなった一次構造を基に立体構造モデルが構築され、キシラナーゼT は基質と相互作用する深いクレフトを有していることが予測されている (本論文第 5 章参照)。また、キシラナーゼT をモデルとし、側鎖がクレフトの内側を向いている複数のアミノ酸残基に同時に saturation 変異を導入するための新手法の確立に成功している (本論文第 6 章参照)。

本研究では第 6 章で確立した新手法を用い、クレフト内部の複数のアミノ酸残基を標的として saturation 変異を導入した変異型キシラナーゼT 遺伝子ライブラリーを構築し、反応 pH 依存性ないしキシランの切断様式が変化した変異体の取得を試みた。

7-2. 実験材料と方法

7-2-1. 菌株および培地

組換えプラスミド構築用の宿主には、大腸菌 DH5 α 株 [*deoR*、*supE44*、 Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15)、*hsdR17*、*recA1*、*endA1*、*gyrA96*、*thi-1*、*relA1*] を用いた。

変異型遺伝子ライブラリー構築用の宿主には、大腸菌 JM109(DE3) Δ F' 株 [*e14*、*supE44*、 Δ (*lac-proAB*)、*hsdR17*、*recA1*、*endA1*、*gyrA96*、*thi-1*、*relA1* (DE3)] を用いた。本菌株は、 λ DE3 Lysogenization Kit (Novagen) を使用して大腸菌 JM109 株にバクテリオファージ DE3 を溶原化させた後、抗生物質を含まない LB 培地で培養し、F' 因子を脱落させて作製したものである。

大腸菌の培用には LB 培地 (本論文第 4 章 4-2-1 項) を使用し、必要に応じて終濃度 50 μ g/ml のアンピシリン (Sigma) あるいは終濃度 20 μ g/ml のカナマイシン (ナカライテスク) を添加して用いた。

ハローの観察の際には、LB 培地に超音波破碎により粒子を均一化したキシラン (Oat spelts、Sigma) を 0.2% 加えた。

7-2-2. プラスミド

pXT47 は本論文第 5 章 5-4 節で構築したキシラナーゼ T 遺伝子発現型プラスミドであり、アンピシリン耐性遺伝子を保有する。pXT47 を制限酵素 *Bgl* II および *Sal* I で切断した後、キシラナーゼ T 遺伝子を含む DNA 断片を同じく *Bgl* II と *Sal* I で切断した発現ベクター pET-24b(+) (Novagen) に連結することにより、カナマイシン耐性をもつキシラナーゼ T 遺伝子発現型プラスミド pXT47K を構築した。

7-2-3. クローニング技術

本論文第 5 章 5-2-2 項に準じた。

7-2-4. 複数箇所への saturation 変異の同時導入

キシラナーゼ T 遺伝子の複数箇所への saturation 変異同時導入は本論文第 6 章 6-2-2 項に準じた。ただし、アセンブリー反応後の反応液を *Dpn* I 処理することで鋳型

プラスミドを完全に分解した後、2nd PCR に供した。また、2nd PCR 産物のクローニングには pET-24b(+) を使用した。

7-2-5. 大腸菌無細胞抽出液の調製

1.5 ml マイクロチューブに 500 μ l の培地を入れ、各種発現型プラスミドを有する大腸菌 JM109(DE3) Δ F' 株を一晩培養した。その後、isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 1.0 mM となるように加え、さらに 3 時間培養することにより、遺伝子の発現誘導をかけた。遠心分離 (7,000 x g、10 分間、4 $^{\circ}$ C) により集菌した後、菌体を 200 μ l の 25% ショ糖、1 mM EDTA、10 mM Tris-HCl (pH 7.3) もしくは 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に懸濁し、ソニケーター (Bioruptor UCD-200TM、コスモバイオ) を用いて超音波破碎を行った (氷冷下、15 秒間、60 回)。超音波処理後、遠心分離 (7,000 x g、10 分間、4 $^{\circ}$ C) により未破碎菌体を除き、上清を無細胞抽出液とした。

7-2-6. キシラナーゼ活性の測定

本論文第 3 章 3-2-2 項に準じ、3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 法にて行った。

7-2-7. 反応 pH 依存性の測定

大腸菌無細胞抽出液を用いて、50 $^{\circ}$ C、各 pH 下で 10 分間反応を行った。反応により生じた還元末端量を DNS 法で定量することにより、酵素活性を算出した。pH の調整には下記の緩衝液を用いた。各 pH は 50 $^{\circ}$ C で測定した。

80 mM クエン酸/クエン酸ナトリウム	(pH 3.2 および 5.8)
80 mM BICINE/NaOH	(pH 7.8)

7-2-8. 加水分解産物の分析

0.4 mg のキシラン (birchwood, Sigma) に 5~35 mU (pH 5.8、50 $^{\circ}$ C で測定) 分の無細胞抽出液を加え、25 μ l の水溶液中で加水分解した。反応は pH 5.8、50 $^{\circ}$ C で行い、pH の調整には 80 mM KH₂PO₄/NaOH 緩衝液 (pH 5.8) を用いた。12 時間反応させた後、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。展開、発色および用いた標準物質は本論文第 3 章 3-2-7 項に準じた。

7-2-9. 塩基配列の決定

本論文第 5 章 5-2-4 項に準じた。

7-3. キシラナーゼ T の反応 pH 依存性の改変

7-3-1. saturation 変異導入の標的とするアミノ酸残基の決定

キシラナーゼ T の立体構造モデルから、触媒残基であるグルタミン酸の近傍に位置するアミノ酸残基を同定できる。これらの触媒残基近傍に存在するアミノ酸の多くは、ファミリー 11 キシラナーゼにおいて高度に保存されている。特にキシラナーゼ T 成熟タンパク質の N 末端から 67 番目のチロシン (Tyr67; 以下同様)、Trp69、Tyr78、Arg110、Pro114 および Gln124 に相当するアミノ酸残基は、ほぼ全てのファミリー 11 キシラナーゼに共通している (Fig. 7-1)。これらのアミノ酸残基は触媒残基やサブサイト -1 に存在する基質のキシロース残基と直接的な相互作用が可能な位置にあり、キシラナーゼ活性の発現に重要な役割を担っていると考えられる (Fig. 7-2)。サブサイト -1 は、キシロース環と結合し、キシランを活性部位に導くのと同時に、反応中間体であるオキソカルベニウム様イオンを安定化させることにより活性化エネルギーを低下させ、効率よく加水分解を進行させる機能を担っているとされている²⁾。成熟キシラナーゼ T と 80% の相同性を有する *Bacillus circulans* キシラナーゼ A において、Tyr67、Tyr78、Arg110、Gln124 に相当する位置にアミノ酸置換を導入した変異型酵素の解析が行われ、作製された変異型酵素の活性が大幅に低下したことが報告されている³⁾。また、キシラナーゼ T の Pro114 に種々のアミノ酸置換を導入した変異型酵素の解析により、Pro114 が活性に大きな影響を及ぼすことが明らかになっている (本論文第 5 章参照)。これらのアミノ酸残基はキシラナーゼ活性の発現に際して、既に最適化された状態であると考えられる。

・触媒残基である 2 つのグルタミン酸は異なる pKa を持つことにより、一方が酸/塩基触媒、もう片方が求核残基として機能すると考えられている (本論文第 1 章 1-1-1 項参照)。同じグルタミン酸であるにもかかわらず異なる pKa を持つ理由として、これらの触媒残基と、その極近傍に存在するアミノ酸側鎖との相互作用の違いが挙げられている。キシラナーゼの反応至適 pH は、これら 2 つの触媒残基の pKa によって規定される。従って、pH 依存性が変化したキシラナーゼを取得するためには、タンパク質工学的手法により触媒残基極近傍にアミノ酸置換を導入し、触媒残基の pKa を変化させればよいことになる。実際、好アルカリ性細菌 *Bacillus* sp. 41M-1 株の生産するキシラナーゼ J について、触媒残基極近傍のアスパラギンをアスパラギン酸に置換することにより、反応の至適が pH 9 から pH 6 に変化することが報告された⁴⁾。しかし、先に述べた *B. circulans* キシラナーゼ A の例のように、触媒残基極近傍へのアミノ酸

Bacillus sp. TAR-1
 B. stearothermophilus
 A. caviae
 B. circulans
 T. reesei II
 T. reesei I
 S. lividans B
 S. lividans C
 A. tubigenesis
 B. pumilus
 C. acetobutylicum
 R. flavefaciens

```

1  -----NTWYQVWTDGGTAVNAGPFGGNTSVTWK---DTGNFVVKQWMEIGSPNRT-----IHYNAGVWEPGSGNYLIT 94
1  -----ATDYMQWTDGGGTAVNAGPFGGNTSVTWK---NTGNFVVKQWMTVGGSPNRY-----INYNAGIWEPSGNGYLT 95
1  -----ASTDYMQWTDGGGTAVNAGPFGGNTSVTWK---NTGNFVVKQWMTVGGSPNRY-----INYNAGIWEPSGNGYLT 96
1  -----ASTDYMQWTDGGGTAVNAGPFGGNTSVTWK---NTGNFVVKQWMTVGGSPNRY-----INYNAGIWEPSGNGYLT 97
1  -----ASINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 93
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 94
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 95
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 96
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 97
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 98
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 99
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 100
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 101
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 102
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 103
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 104
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 105
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 106
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 107
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 108
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 109
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 110
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 111
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 112
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 113
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 114
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 115
1  -----AGINVDQNTQCG--QVSYIS--FSNTGFSVNWK---TQDDFVVGQWTTGSSBAP-----INFGGSFVNSGTGLLSV 116
  
```

Tyr67 Tyr78
 Trrp69

Arg110 Pro114 Gln124

```

95  TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 182
96  TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 183
97  TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 184
98  TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 185
99  TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 190
100 TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 191
101 TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 192
102 TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 193
103 TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 194
104 TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 195
105 TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 196
106 TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 197
107 TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 198
108 TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 199
109 TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 200
110 TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 201
111 TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 202
112 TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 203
113 TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 204
114 TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 205
115 TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 206
116 TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 207
117 TWVSDGGTDYIYTKVYNA SIDG--TQITQ  FWSVQSKRPTGNN-----VSITFSNVNVAWNAAGMLGSSWSQVLATEGYQSGRSNV--TVW 211
  
```

Fig. 7-1 キシラナーゼTおよびその他のファアミリー 11 キシラナーゼのアミノ酸配列
 成熟タンパク質のアミノ酸配列を示した。キシラナーゼTにおけるの触媒残基近傍に位置するアミノ酸と、
 他のキシラナーゼでその位置に相当するアミノ酸を赤色の四角で示した。略号は以下の通り。
 B. stearothermophilus: *Bacillus stearothermophilus* 236, A. caviae: *Aeromonas caviae* ME-1; B. circulans: *Bacillus circulans*, T. reesei II: *Trichoderma reesei* Xyn II, T. reesei I: *T. reesei* Xyn I, S. lividans B: *Streptomyces lividans* Xyn B, S. lividans C: *S. lividans* Xyn C, A. tubigenesis: *Aspergillus tubigenesis*, B. pumilus: *Bacillus pumilus*, C. acetobutylicum: *Clostridium acetobutylicum*, R. flavefaciens: *Ruminococcus flavefaciens*



Fig. 7-2 ファミリー 11 キシラーゼの触媒残基近傍で高度に保存されているアミノ酸残基

キシラーゼTの立体構造モデルにおいて、側鎖がクレフトの内側に位置しているアミノ酸残基を青色で示した。このうち、触媒残基近傍に位置し、ファミリー 11 キシラーゼに保存されているアミノ酸残基を黄色で示した。触媒残基の2つのグルタミン酸は赤色で表した。

置換は、活性の大幅な低下をもたらすことが多い。これは、触媒残基極近傍のアミノ酸が触媒残基の pKa を制御するのみならず、基質との相互作用などにも複雑に関与するためと考えられている。従って、理論に基づいた分子設計 (アミノ酸置換) により、活性を維持したままキシラナーゼの反応 pH 依存性を変化させるのは必ずしも容易ではない。そこで、キシラナーゼ活性の発現に必須な、アミノ酸置換の余地が少ないと考えられる触媒残基極近傍のアミノ酸は変えず、触媒残基からある程度離れ、しかも間接的には触媒残基の pKa に影響を与えると推測されるクレフト最深部のアミノ酸残基を標的とし、複数の saturation 変異を同時導入した変異型遺伝子ライブラリーを構築することとした。

キシラナーゼ T の立体構造において、Thr65 と Val165 はクレフトの最深部に位置し、触媒残基や基質と直接の相互作用は無いと考えられる (Fig. 7-3)。しかし、これらのアミノ酸残基はイオン結合ネットワークや局所的な立体構造の変化を介して活性部位に影響を与えることが十分に可能な位置に存在している。Thr65 および Val165 の 2 つのアミノ酸残基を標的として同時に saturation 変異を導入し、反応 pH 依存性が変化した変異型酵素の取得を試みた。

7-3-2. 変異型遺伝子ライブラリーの構築と反応 pH 依存性が変化した変異型酵素のスクリーニング

キシラナーゼ T 遺伝子発現型プラスミド pXT47K を鋳型として、本論文第 6 章で確立した手法を用いて、Thr65 と Val165 のコドン を NNB に変えた変異型遺伝子ライブラリーを構築した。使用したプライマーの配列を Fig. 7-4 に示した。宿主に用いた大腸菌 JM109(DE3)ΔF' 株は、β-ガラクトシダーゼ活性を指標としたスクリーニング (本論文では述べない) に供するために作製された β-ガラクトシダーゼ欠損株である。

遺伝子ライブラリーを構成する大腸菌形質転換体 500 株について、キシラン含有プレート上に植菌し、37°C で一晚生育させた後に 33 mM IPTG を噴霧し、さらに 4 時間インキュベートして発現を誘導した。その後、50°C で 4 時間インキュベートし、キシラナーゼ活性に起因するハローの有無を観察した。その結果、29 株についてコロニーの周囲にハローの形成が認められた。すなわち、ほとんどの変異型酵素については活性が失われたと考えられ、Thr65 と Val165 が触媒残基や基質と直接的な相互作用が無いにも拘わらず、活性発現に強く関与していることが示唆された。ハローを形成した形質転換体について無細胞抽出液を調製し、pH 5.8 と pH 7.8 でのキシラナーゼ活性を予備的に測定した。野生型キシラナーゼ T の場合、pH 5.8 での活性に対する、

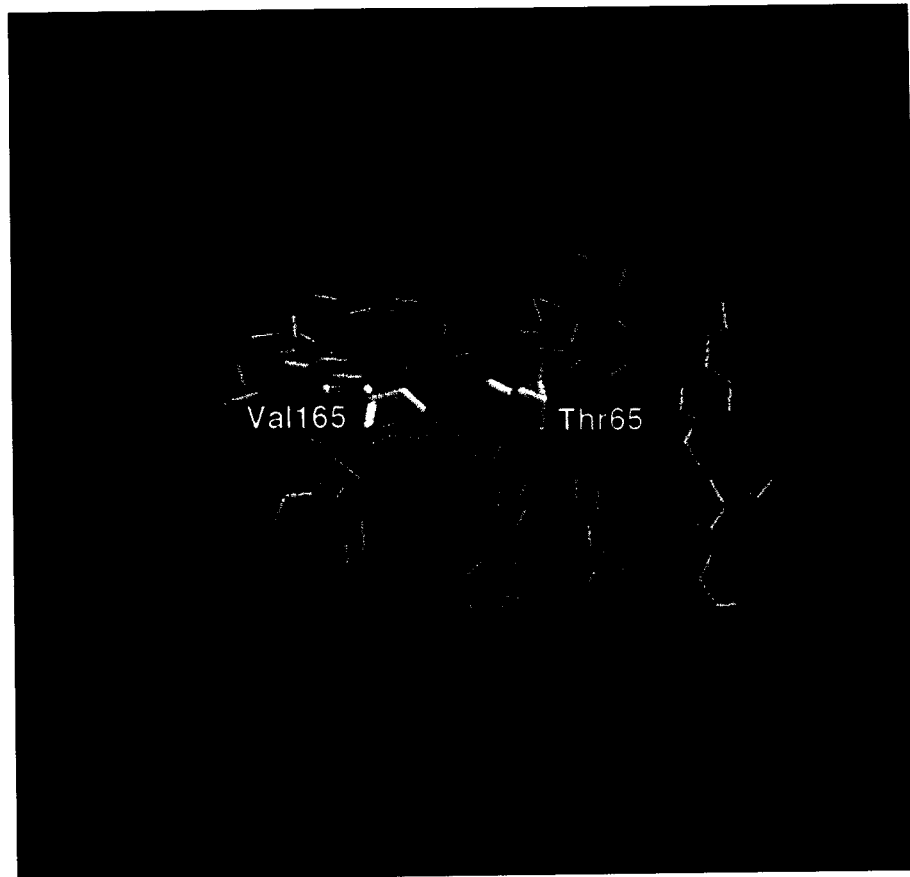


Fig. 7-3 Thr65 と Val165 のキシラナーゼ T 立体構造モデル上での位置

キシラナーゼ T 立体構造モデルにおいて、側鎖がクレフトの内側を向いているアミノ酸残基を青色で示した。そのうち、saturation 変異の標的とした Thr65 と Val165 は黄色で、触媒残基の 2 つのグルタミン酸は赤色で表した。

pH 7.8 での相対活性は 80 % 程度であった。それに対し、変異型酵素 C13、C91、C165、C231 および C255 では、pH 7.8 での活性が顕著に低下していた。

7-3-3. pH 依存性が変化した変異型酵素の性質検討

7-3-2 項で取得した 5 つの変異型キシラナーゼ T の性質検討を行った。変異型キシラナーゼ T 遺伝子を含む大腸菌の菌体内画分について、pH 3.2、pH 5.8、pH 7.8 での活性を調べた (Fig. 7-5)。pH 5.8 での活性を 100% とした場合、野生型キシラナーゼ T の pH 7.8 での相対活性は 84% であった (Fig. 7-6)。取得した 5 つの変異体のうち C165 を除く 4 つでは、pH 7.8 における相対活性が 26~36% と大幅に低下していた。C165 の pH 7.8 における相対活性は 66% であり、他の変異型酵素に比べると低下の度合いは少なかった。同じく pH 5.8 での活性を 100% とした場合、野生型キシラナーゼ T の pH 3.2 での相対活性は 10% 程度であった。C91 を除く 4 つの変異型酵素では、pH 3.2 における相対活性が野生型酵素より 1.2~3.4 倍向上していることが明らかとなった。C91 の pH 3.2 における相対活性は野生型の半分程度に低下していた。

得られた 5 つの変異型酵素をコードする遺伝子の塩基配列を決定した結果、標的である Thr65 と Val165 に対応するコドンに変異が導入されていることが確認された (Fig. 7-7)。また、C91、C231 および C255 では、ORF 中の標的の位置以外にポリメラーゼの複製エラーに起因すると思われる塩基置換が導入されていた。C91 では開始コドンの約 100 塩基上流にも 1 塩基置換が生じていた。

塩基配列に基づく各変異型酵素のアミノ酸配列を Fig. 7-8 に示した。5 つの変異型酵素のうち、Thr65 は 4 つが Ser に、そして Val165 は 4 つが Leu に置換されていた。変異を導入した 2 カ所のアミノ酸に注目すると、C91、C231、C255 では同じアミノ酸置換を有していた。しかしながら、同一アミノ酸であっても、ほとんどが異なるコドンを採用していた。このことから、本研究の手法により偏りのないランダムな変異型遺伝子ライブラリーが構築され、その中から選択圧によってこれらのアミノ酸置換に収束したと考えられた。

ファミリー 11 キシラナーゼにおいて、キシラナーゼ T の Thr65 に相当するアミノ酸残基は多様である (本論文 Fig. 4-1 参照)。ファミリー 11 に属する *Trichoderma reesei* のキシラナーゼ I と II は互いに約 50% の相同性を有しており、キシラナーゼ I は pH 3~6 で、そしてキシラナーゼ II は pH 4~8 で活性を示す⁵⁾。キシラナーゼ T の Thr65 に相当するアミノ酸はキシラナーゼ I では Ser であり、キシラナーゼ II では Thr である。キシラナーゼ T の Thr65 に相当する位置のアミノ酸残

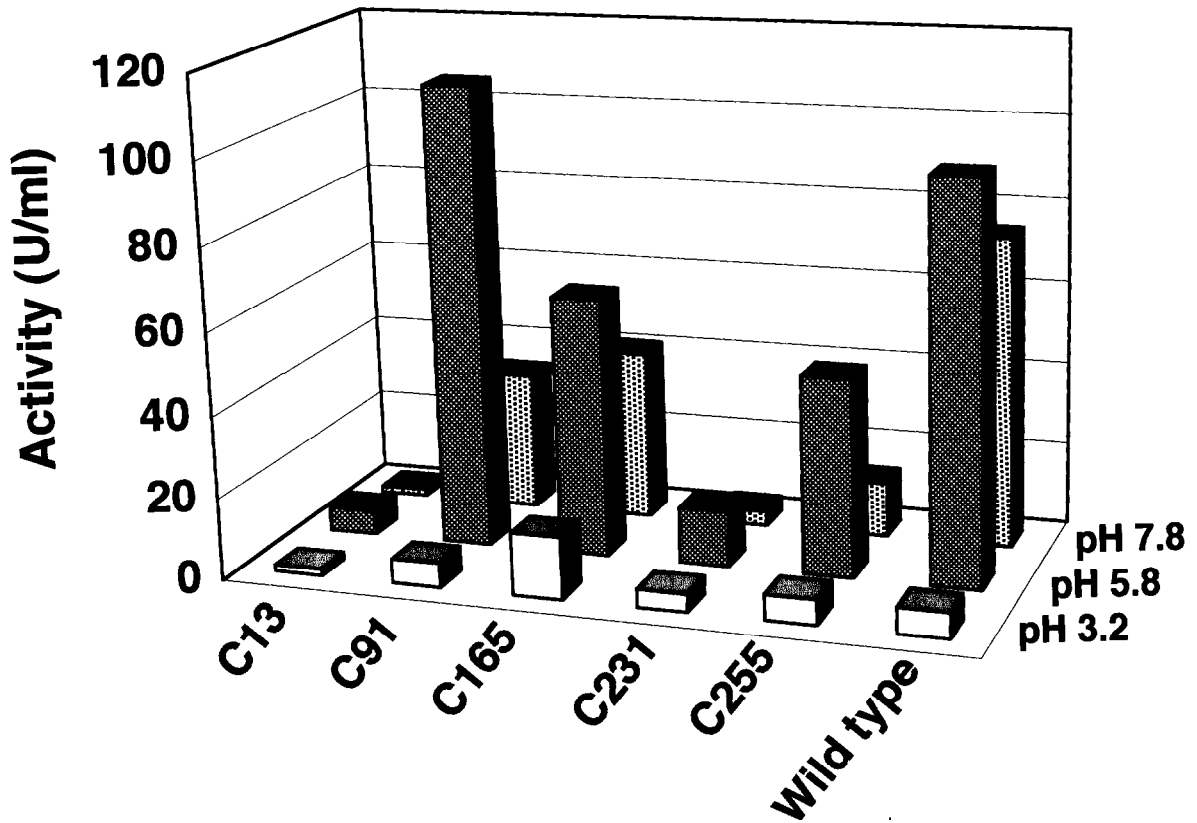


Fig. 7-5 各変異型酵素の反応 pH 依存性

変異型酵素を含む大腸菌無細胞抽出液を用いて、50°C で10 分間反応を行った。活性は培養液 1 ml 当たりの活性に換算して示した。Wild type は pXT47K を用いて発現させた野生型キシラナーゼである。pH の調整には 80 mM クエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.2 および 5.8) と 80 mM BICINE/NaOH 緩衝液 (pH7.8) を用いた。

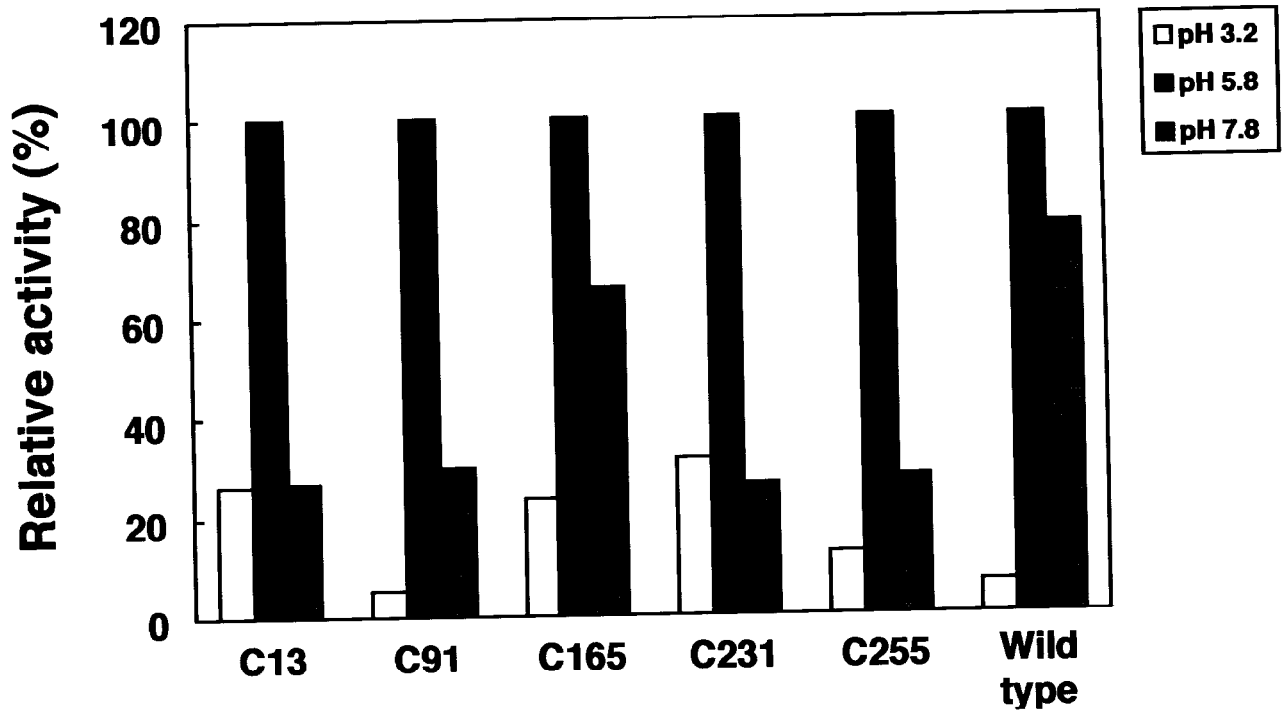


Fig. 7-6 各種変異型酵素の反応 pH 依存性 (規格化後)

各種変異型キシラナーゼT を含む試料の pH 3.2、5.8、および 7.8 における活性を測定し、それぞれ pH 5.8 での活性を 100% とした相対活性を示した。Wild type は pXT47K を用いて発現させた野生型キシラナーゼである。

Wild type	1	ATGAATACCTATTGGCAATATTGGACCGATGGTGGTGGAAACAGTAAATGCTACAAATGGACCTGGTGGAAATTACAGTGT	80
C13	1	ATGAATACCTATTGGCAATATTGGACCGATGGTGGTGGAAACAGTAAATGCTACAAATGGACCTGGTGGAAATTACAGTGT	80
C91	1	ATGAATACCTATTGGCAACATTGGACCGATGGTGGTGGAAACAGTAAATGCTACAAATGGACCTGGTGGAAATTACAGTGT	80
C165	1	ATGAATACCTATTGGCAATATTGGACCGATGGTGGTGGAAACAGTAAATGCTACAAATGGACCTGGTGGAAATTACAGTGT	80
C231	1	ATGAATACCTATTGGCAATATTGGACCGATGGTGGTGGAAACAGTAAATGCTACAAATGGACCTGGTGGAAATTACAGTGT	80
C255	1	ATGAATACCTATTGGCAATATTGGACCGATGGTGGTGGAAACAGTAAATGCTACAAATGGACCTGGTGGAAATTACAGTGT	80
Wild type	81	GACATGGAGAGATACAGGGAACCTTTGTTGTCGGTAAAGGTTGGGAAATCGGTTCCACAAATCGAACGATCCATTACAATG	160
C13	81	GACATGGAGAGATACAGGGAACCTTTGTTGTCGGTAAAGGTTGGGAAATCGGTTCCACAAATCGAACGATCCATTACAATG	160
C91	81	GACATGGAGAGATACAGGGAACCTTTGTTGTCGGTAAAGGTTGGGAAATCGGTTCCACAAATCGAACGATCCATTACAATG	160
C165	81	GACATGGAGAGATACAGGGAACCTTTGTTGTCGGTAAAGGTTGGGAAATCGGTTCCACAAATCGAACGATCCATTACAATG	160
C231	81	GACATGGAGAGATACAGGGAACCTTTGTTGTCGGTAAAGGTTGGGAAATCGGTTCCACAAATCGAACGATCCATTACAATG	160
C255	81	GACATGGAGAGATACAGGGAACCTTTGTTGTCGGTAAAGGTTGGGAAATCGGTTCCACAAATCGAACGATCCATTACAATG	160
Wild type	161	CTGGTGTGGGAAACCGTCTGGAAATGGATATTGCTCTATGGGTGGACAAGGAATCAGCTCATAGAATATTATGTC	240
C13	161	CTGGTGTGGGAAACCGTCTGGAAATGGATATTGCTCTATGGGTGGACAAGGAATCAGCTCATAGAATATTATGTC	240
C91	161	CTGGTGTGGGAAACCGTCTGGAAATGGATATTGCTCTATGGGTGGACAAGGAATCAGCTCATAGAATATTATGTC	240
C165	161	CTGGTGTGGGAAACCGTCTGGAAATGGATATTGCTCTATGGGTGGACAAGGAATCAGCTCATAGAATATTATGTC	240
C231	161	CTGGTGTGGGAAACCGTCTGGAAATGGATATTGCTCTATGGGTGGACAAGGAATCAGCTCATAGAATATTATGTC	240
C255	161	CTGGTGTGGGAAACCGTCTGGAAATGGATATTGCTCTATGGGTGGACAAGGAATCAGCTCATAGAATATTATGTC	240
Wild type	241	GTTGATAATTGGGGAACCTTACAGACCTACTGGAACCCATCGAGGCACCGTTGTCAGTGTGGAGGAACATATGACATCTA	320
C13	241	GTTGATAATTGGGGAACCTTACAGACCTACTGGAACCCATCGAGGCACCGTTGTCAGTGTGGAGGAACATATGACATCTA	320
C91	241	GTTGATAATTGGGGAACCTTACAGACCTACTGGAACCCATCGAGGCACCGTTGTCAGTGTGGAGGAACATATGACATCTA	320
C165	241	GTTGATAATTGGGGAACCTTACAGACCTACTGGAACCCATCGAGGCACCGTTGTCAGTGTGGAGGAACATATGACATCTA	320
C231	241	GTTGATAATTGGGGAACCTTACAGACCTACTGGAACCCATCGAGGCACCGTTGTCAGTGTGGAGGAACATATGACATCTA	320
C255	241	GTTGATAATTGGGGAACCTTACAGACCTACTGGAACCCATCGAGGCACCGTTGTCAGTGTGGAGGAACATATGACATCTA	320
Wild type	321	TACGACTATGCGATACAATGCACCTTCCATTGATGGCACACAAACGTTCCAACAGTTCGGAGTGTGAGGCAATCGAAGA	400
C13	321	TACGACTATGCGATACAATGCACCTTCCATTGATGGCACACAAACGTTCCAACAGTTCGGAGTGTGAGGCAATCGAAGA	400
C91	321	TACGACTATGCGATACAATGCACCTTCCATTGATGGCACACAAACGTTCCAACAGTTCGGAGTGTGAGGCAATCGAAGA	400
C165	321	TACGACTATGCGATACAATGCACCTTCCATTGATGGCACACAAACGTTCCAACAGTTCGGAGTGTGAGGCAATCGAAGA	400
C231	321	TACGACTATGCGATACAATGCACCTTCCATTGATGGCACACAAACGTTCCAACAGTTCGGAGTGTGAGGCAATCGAAGA	400
C255	321	TACGACTATGCGATACAATGCACCTTCCATTGATGGCACACAAACGTTCCAACAGTTCGGAGTGTGAGGCAATCGAAGA	400
Wild type	401	GACCGACTGGAAATAACGTTAGCATTACGTTTAGCAACCACGTTGAATGCGTGGAGAAATGCAGGAATGAATCTGGGAAGT	480
C13	401	GACCGACTGGAAATAACGTTAGCATTACGTTTAGCAACCACGTTGAATGCGTGGAGAAATGCAGGAATGAATCTGGGAAGT	480
C91	401	GACCGACTGGAAATAACGTTAGCATTACGTTTAGCAACCACGTTGAATGCGTGGAGAAATGCAGGAATGAATCTGGGAAGT	480
C165	401	GACCGACTGGAAATAACGTTAGCATTACGTTTAGCAACCACGTTGAATGCGTGGAGAAATGCAGGAATGAATCTGGGAAGT	480
C231	401	GACCGACTGGAAATAACGTTAGCATTACGTTTAGCAACCACGTTGAATGCGTGGAGAAATGCAGGAATGAATCTGGGAAGT	480
C255	401	GACCGACTGGAAATAACGTTAGCATTACGTTTAGCAACCACGTTGAATGCGTGGAGAAATGCAGGAATGAATCTGGGAAGT	480
Wild type	481	AGTTGGTCTTACCAGTTTAGCAACAGAAGGCTATCAAAGTAGCGGGAGATCGAATGTAACGGTTTGGTAG	552
C13	481	AGTTGGTCTTACCAGTTTAGCAACAGAAGGCTATCAAAGTAGCGGGAGATCGAATGTAACGGTTTGGTAG	552
C91	481	AGTTGGTCTTACCAGTTTAGCAACAGAAGGCTATCAAAGTAGCGGGAGATCGAATGTAACGGTTTGGTAG	552
C165	481	AGTTGGTCTTACCAGTTTAGCAACAGAAGGCTATCAAAGTAGCGGGAGATCGAATGTAACGGTTTGGTAG	552
C231	481	AGTTGGTCTTACCAGTTTAGCAACAGAAGGCTATCAAAGTAGCGGGAGATCGAATGTAACGGTTTGGTAG	552
C255	481	AGTTGGTCTTACCAGTTTAGCAACAGAAGGCTATCAAAGTAGCGGGAGATCGAATGTAACGGTTTGGTAG	552

Fig. 7-7 反応 pH 依存性が変化した変異型キシラナーゼ T 遺伝子の塩基配列

変異導入の標的とした Thr65 と Val165 のコドンを実色で示した。標的部位以外で置換が生じた塩基を黄色で示した。ただし、青色で示した塩基置換は、変異導入の可否を確認する目的で導入した制限酵素 (*Eco* RV) サイトに基づく変異である。

1

Wild type	MNTYWOYWTDDGGGTVNAATNGPGGNYSVTWRTDGNFVVGKWEIGSPNRTIHYNAGVWEPSCNGYL	LYGWTRNQLIEYYVVDNMGTYRPTGTHRGIVVSD	99
C13	MNTYWOYWTDDGGGTVNAATNGPGGNYSVTWRTDGNFVVGKWEIGSPNRTIHYNAGVWEPSCNGYL	LYGWTRNQLIEYYVVDNMGTYRPTGTHRGIVVSD	99
C91	MNTYWOHWTDDGGGTVNAATNGPGGNYSVTWRTDGNFVVGKWEIGSPNRTIHYNAGVWEPSCNGYL	LYGWTRNQLIEYYVVDNMGTYRPTGTHRGIVVSD	99
C165	MNTYWOYWTDDGGGTVNAATNGPGGNYSVTWRTDGNFVVGKWEIGSPNRTIHYNAGVWEPSCNGYL	LYGWTRNQLIEYYVVDNMGTYRPTGTHRGIVVSD	99
C231	MNTYWOYWTDDGGGTVNAATNGPGGNYSVTWRTDGNFVVGKWEIGSPNRTIHYNAGVWEPSCNGYL	LYGWTRNQLIEYYVVDNMGTYRPTGTHRGIVVSD	99
C255	MNTYWOYWTDDGGGTVNAATNGPGGNYSVTWRTDGNFVVGKWEIGSPNRTIHYNAGVWEPSCNGYL	LYGWTRNQLIEYYVVDNMGTYRPTGTHRGIVVSD	99

Wild type	100	GGTYDIYTTMRYNAPSIDGTQTFQFWSVRSQKRPTGNNVSIITFSNHVNAWRNAGMNLGSSWSYQ	LATEGYQSSGRSNVTWV	182
C13	100	GGTYDIYTTMRYNAPSIDGTQTFQFWSVRSQKRPTGNNVSIITFSNHVNAWRNAGMNLGSSWSYQ	LATEGYQSSGRSNVTWV	182
C91	100	GGTYDIYTTMRYNAPSIDGTQTFQFWSVRSQKRPTGNNVSIITFSNHVNAWRNAGMNLGSSWSYQ	LATEGYQSSGRSNVTWV	182
C165	100	GGTYDIYTTMRYNAPSIDGTQTFQFWSVRSQKRPTGNNVSIITFSNHVNAWRNAGMNLGSSWSYQ	LATEGYQSSGRSNVTWV	182
C231	100	GETYDIYTTMRYNAPSIDGTQTFQFWSVRSQKRPTGNNVSIITFSNHVNAWRNAGMNLGSSWSYQ	LATEGYQSSGRSNVTWV	182
C255	100	EGTYDIYTTMRYNAPSIDGTQTFQFWSVRSQKRPTGNNVSIITFSNHVNAWRNAGMNLGSSWSYQ	LATEGYQSSGRSNVTWV	182

Fig. 7-8 反応 pH 依存性が変化した変異型キシラナーゼT のアミノ酸配列

変異導入の標的とした Thr65 と Val165 を赤色で示した。標的部位以外で置換が生じたアミノ酸を黄色で示した。

基は、キシラナーゼTに限らず、一般的に加水分解反応の pH 依存性に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

キシラナーゼTの Val165 に相当するアミノ酸も、Thr65 と同様、ファミリー 11 キシラナーゼで保存されているわけではない (本論文 Fig. 4-1 参照)。キシラナーゼTの Val165 の位置に、変異型酵素に多く見られた Leu を持つような既報のキシラナーゼは見当たらない。また、反応 pH 依存性の変化を指標としたスクリーニングでは、Val165 が保存された変異型酵素は得られなかった。このことから、キシラナーゼTにおいては Val165 が保存された場合、pH 依存性が変化しないか、もしくは Thr65 単独の変異では活性が維持できないと考えられる。活性を保持したまま反応 pH 依存性を変化させるために、Thr65 と Val165 の位置に新たに出現したアミノ酸残基が協調的に働いた可能性もある。また、得られた変異体のほとんどが目的のアミノ酸残基以外にも変異導入されており、それらのアミノ酸置換も反応 pH 依存性に影響を及ぼしうる。反応 pH 依存性が変化したより多くの変異型酵素を取得し、それらを解析することでさらなる知見が得られると考えられる。

7-4. キシラナーゼT のキシラン切断様式の改変

7-4-1. saturation 変異導入の標的とするアミノ酸残基の決定

キシラナーゼT はエンド型切断様式を有する加水分解酵素であり、キシランの加水分解により、2 糖 (キシロビオース) 以上の加水分解産物を生成する (本論文第 2 章 2-4 節参照)。即ち、基質の加水分解に際しては、サブサイトの - 側と + 側が少なくとも 2 つずつ基質のキシロース残基で埋められた状態を好み、その状態での反応が優先的に進行すると考えられる (Fig. 7-9)。この切断様式を改変し、キシランを単糖のキシロースにまで分解できるようにするためには、サブサイトにおける基質との相互作用を変化させる必要がある。一方、サブサイト -1 と +1 を構成するアミノ酸残基は基質認識に加え、触媒残基との相互作用や、オキソカルベニウムイオン中間体の安定化による活性化エネルギーの低減などに関与しており、アミノ酸置換により活性自体を失うことが危惧される。そこで、キシラナーゼT の立体構造に基づいて、サブサイト -1 と +1 以外の部位で基質認識に関与していると考えられる複数のアミノ酸残基を標的と定め、saturation 変異を同時導入した変異型遺伝子ライブラリーを構築することとした。

Tyr63、Tyr86、Tyr171 はいずれもサブサイトの + 側に位置するアミノ酸残基で、その側鎖はクレフトの内側を向いており、基質と直接的な相互作用が可能な位置に存在している (Fig. 7-10 参照)。そして、これらのアミノ酸はファミリー 11 キシラナーゼにおいて高度に保存されている (Fig. 7-1 参照)。キシラナーゼT の Tyr63、Tyr86 および Tyr171 に saturation 変異を同時に導入することで、サブサイト + 側における基質との相互作用を変化させ、切断様式の変化した変異型酵素の取得を試みた。

7-4-2. 変異型遺伝子ライブラリーの構築とキシランの切断様式が変化した変異型酵素のスクリーニング

キシラナーゼT 遺伝子発現型プラスミド pXT47K を鋳型として、本論文第 6 章で確立した手法を用いて、Tyr63、Tyr86 および Tyr17 のコドン を NNB に変えた変異型遺伝子ライブラリーを構築した。使用したプライマーの配列を Fig. 7-11 に示した。

遺伝子ライブラリーを構成する大腸菌 JM109(DE3)ΔF' 株形質転換体 3,000 株について、キシラン含有プレート上に植菌し、37°C で一晩生育させた後に 33 mM IPTG を噴霧し、さらに 4 時間インキュベートして発現を誘導した。その後、50°C で 4 時間

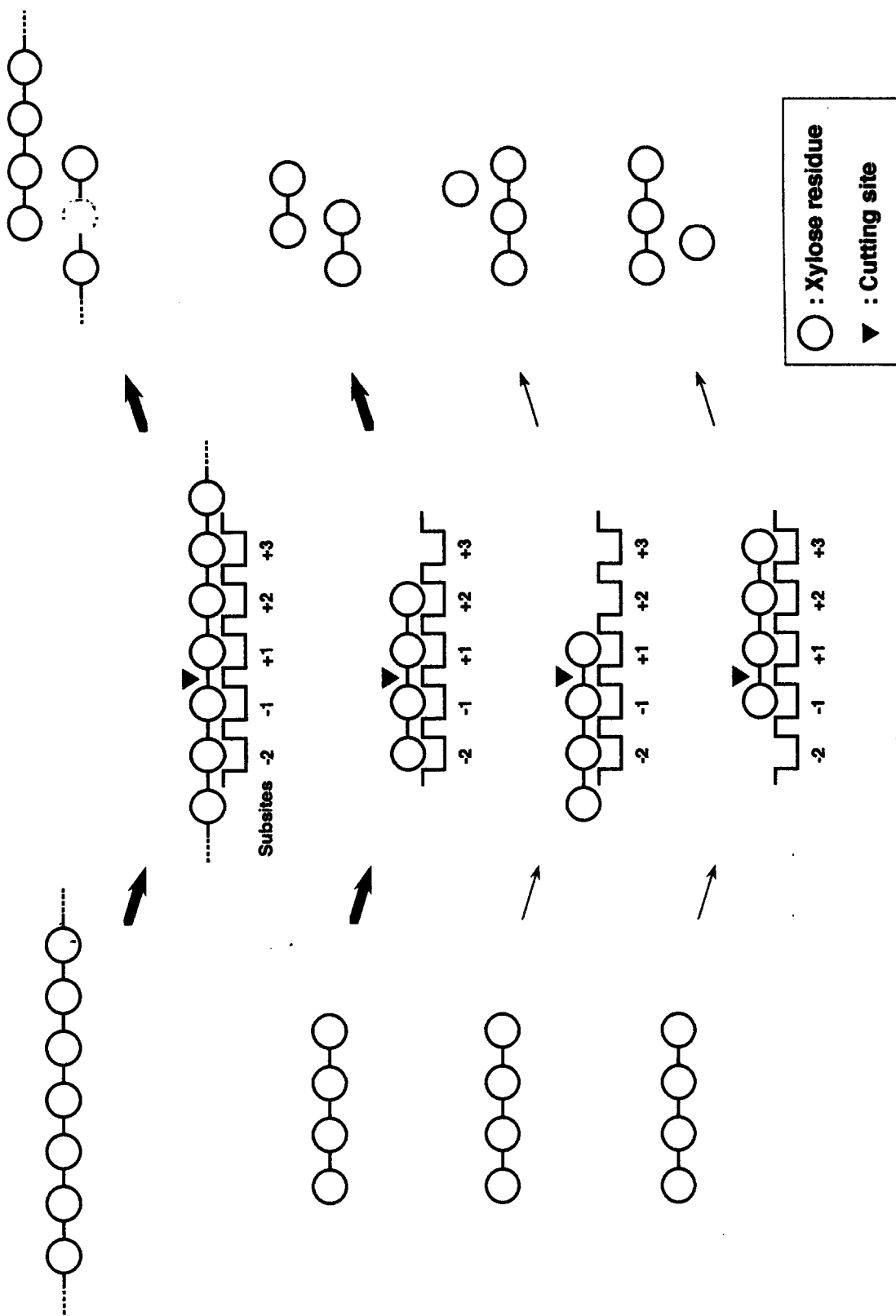


Fig. 7-9 キシラナーゼTによる基質切断の模式図

T. reesei キシラナーゼ II にならない、キシラナーゼTも5つのサブサイト(-2, -1, +1, +2, +3)から構成されると仮定した。例として、長鎖キシランとキシロテトラオースの切断の様子を模式的に示した。矢印の太さに応じて加水分解反応が進行する。



Fig. 7-10 Tyr63、Tyr86 および Tyr171 のキシラナーゼT 立体構造モデル上での位置

キシラナーゼT 立体構造モデルにおいて、側鎖がクレフトの内側を向いているアミノ酸残基を青色で示した。そのうち、saturation 変異の標的とした Tyr63、Tyr86 および Tyr171 は黄色で、触媒残基の2つのグルタミン酸は赤色で表した。

1 GTGATGTGGCGATATAGCCGCCAGCAACCCGACCTGTGGCCCGCGTGTATCCCGCCAGCATGCCGTCCGCGGTAGAGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAMTAAATPAGGACTCACTATAG 120
 MF-0 5'-GTGATGTGGCGATATAGCCG-3
 121 GGGAATTTGTAGCGGATAACAATTCGCCCTCTAGAAATATTTTGTAACTTTAAGAGAGGATATACATATGAACTACTATGGCAATATTTGGACCATGTTGGTGGAAACAGTAAATTCG 240
 M N T Y W Q Y W T D G G G T V N A
 241 TACAAATGGACCTGGTGGAAATPACAGTGTGACATGGAGATACAGGAACTTTTGTTCGGTAAAGTTGGAAATCGGFTCCACCAATTCGAAAGCATCCATPACAAATGCTGGTGGTGTG 360
 T N G P G G N Y S V T W R D T G N F V V G K G W E I G S P N R T I H Y N A G V W
 361 GGAAACCTCTGGAAATGGATATTTGACTCTCTATGGTGGACAAGGATCAGCTATAGAAATATTTATGTTGATATTTGGGAACCTTACAGACCTACTGGAAACCCATFCGAGGACCGGT 480
 E P S G N G Y L T L Y G W T R N Q L I E Y Y V V D N W G T Y R P T G T H R R G T V
 MR3F 5'-CGTCTGGAAATGGANNBTGGACTCTCTATGGG-3'
 MR3R 3'-GCAGACCTTTACCTNNVAACNNNGAGATACCC-5'
 KpnI
 481 TGTCAGTGTGGAGGAACATATGACATCTATACGACTATCGGATACCAATGCACCTTCCATFTGAGTGGCACACAACGFTCCACAGTTCGGAGTGTGGCAATTCGAAGACCGACTGG 600
 V S D G G T Y D I Y T T M R Y N A P S I D G T Q T F Q Q F W S V R Q S K R P T G
 601 AAATAAGGTTAGCAATAGCTTTAGCAACCCAGTGTGATGCGTGGAGAAATCGAGAAATGATCTGGGAATGATTTACCAGGTATTAGCAAGAGAGGCTATCAAGTACCGGGAG 720
 N N V S I T F S N H V N A W R N A G M N L G S S W S Y Q V L A T E G Y Q S S G R
 MR8F 5'-GGTATTAGCAACAGAGAGGNNBCAAAGTAGCCGGAG
 MR8R 3'-CCATATGCTGTCTCCGNNNGTTTCATCCGCCCTC
 721 ATCGAATGTAAGGTTGGTAGGACTTAGAGGATCCCGGGTACCAGCTCGGATTCGAGTCCGTCGAGACGTTGGCGCCGACCTCGGAGCACACACCGACCTGAGATCCGG 840
 S N V T V W *
 ATCG-3'
 TAGC-5'
 841 C 841
 G-5'
 MR-1 3'-GTGGTGGTACTCTAGGCC

Fig. 7-11 Tyr63, Tyr86 および Tyr171 の saturation 変異導入に用いた変異導入用プライマーの配列

変異導入の標的としたアミノ酸残基とコドンを赤色で示した。キシラナーゼT 遺伝子由来の配列を紫色の下線で、ベクター由来の配列を緑色の下線で表した。MR5F と MR5R には変異導入の可否を判別するために、青色で示した Kpn I サイトを導入した。

インキュベートし、キシラナーゼ活性に起因するハローの有無を観察した。ハローの形成が認められたのは 25 株のみであり、5-3-2 項で構築した Thr65 と Val165 に変異を導入したライブラリーと同様、ほとんどの変異型酵素で活性が失われたことがわかった。ハローを形成した形質転換体について無細胞抽出液を調製し、pH 5.8 でのキシラナーゼ活性を測定した。培養液あたりの活性で比較すると、ほとんどの変異型酵素では活性が大幅に低下していた (Fig. 7-12)。試料溶液のキシラナーゼ活性が大まかに揃うように調製した後、pH 5.8、50°C の条件下で 12 時間キシランの加水分解反応を行った。加水分解産物を TLC で解析した結果を Fig. 7-13 に示した。変異型酵素 RX5、RX7、RX12、RX13、RX15 および RX16 による加水分解産物中には、野生型酵素ではほとんど見られないキシロースが含まれていることが明らかとなった。また、すべての変異型酵素において、2 糖以上のキシロオリゴ糖の生成も認められた。

7-4-3. キシランの切断様式が変化した変異型酵素のアミノ酸配列

キシランの加水分解産物としてキシロースを生成するようになった、変異型酵素 RX5、RX7、RX12、RX13、RX15 および RX16 をコードする遺伝子の塩基配列を決定した。標的である Tyr63、Tyr86、および Tyr171 に対応するコドンに変異が導入されていることが確認された (Fig. 7-14)。また、RX5 を除く全ての変異体では、ORF 中の標的の位置以外に塩基置換が導入されていたが、RX7 以外の塩基置換はサイレント変異であった。

塩基配列に基づいた各変異型酵素のアミノ酸配列を Fig. 7-15 に示した。変異導入によって新たに出現したアミノ酸残基の種類に関しては、顕著な傾向は認められなかった。RX7 と RX16 では Tyr63 が、また RX15 では Tyr171 が、それぞれ置換されずに保持されていた。しかし、3 カ所の標的のうち 2 カ所以上が置換されずに保持された変異型酵素は無かった。

ファミリー 11 に属する *T. reesei* キシラナーゼ II は TAR-1 株のキシラナーゼ T と 56% の相同性を有しており、X線結晶構造解析により立体構造が明らかにされている⁵⁾。*T. reesei* キシラナーゼ II では、クレフトにキシロオリゴ糖をフィットさせた構造モデルも構築され、5 つのサブサイト (-2、-1、+1、+2、+3) の存在が提唱されている⁵⁾。そして、キシラナーゼ T の Tyr86 に相当する Tyr96 はサブサイト +3 でキシロース残基と、また、キシラナーゼ T の Tyr171 に相当する Tyr179 はサブサイト +2 でキシロース残基と、それぞれスタッキング相互作用すると考えられている。ちなみに、キシラナーゼ T の Tyr63 はこれら 2 つのチロシン残基の中間に位置する (Fig. 7-

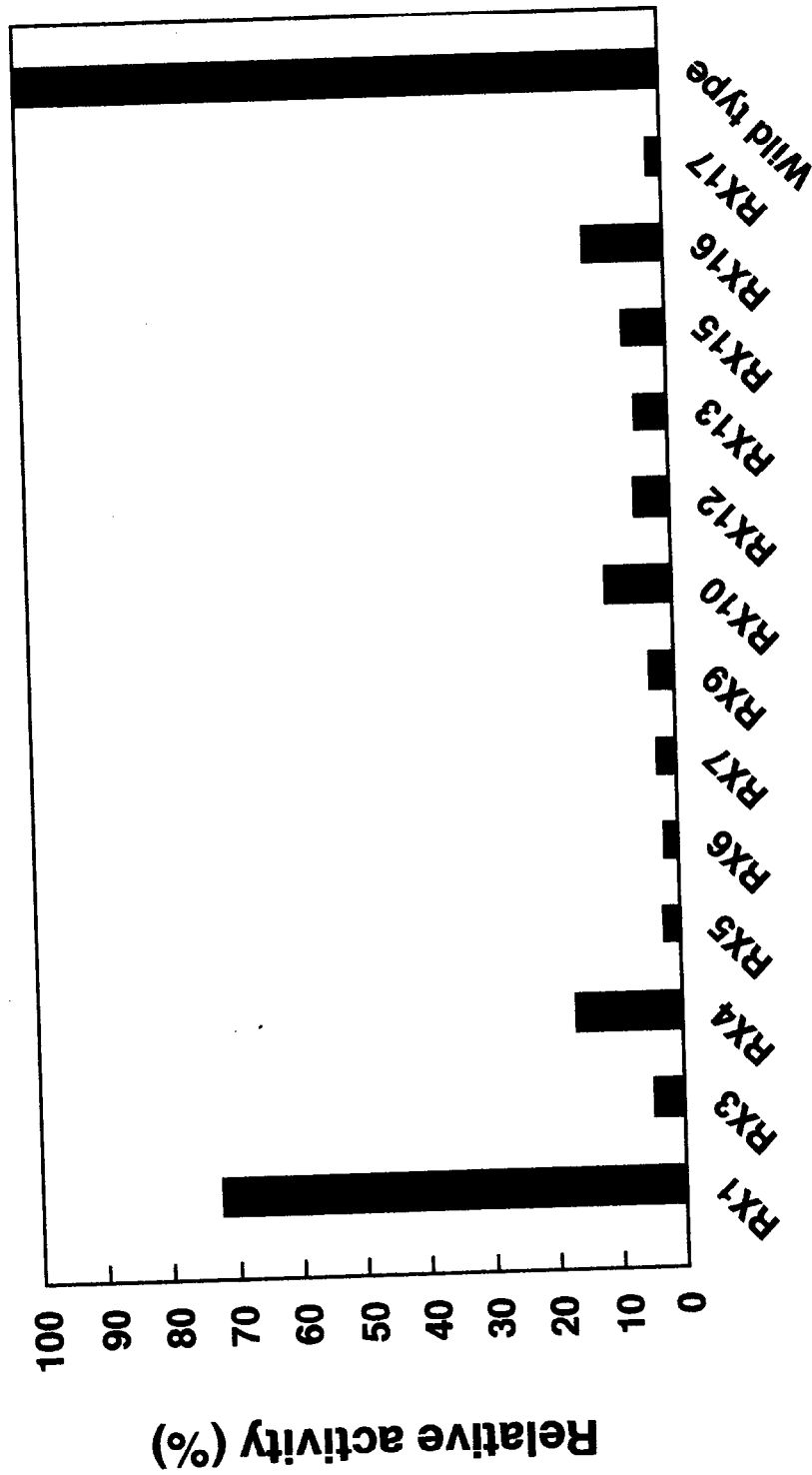


Fig. 7-12 各種変異型キシラナーゼTの活性

変異型酵素を含む大腸菌無細胞抽出液を用いて、pH 5.8、50°Cで10分間反応を行った。Wild typeはpXT47Kを含む大腸菌が生産した野生型キシラナーゼである。活性は培養液1 ml当たりの活性に換算し、野生型酵素の活性を100%とする相対活性で示した。pHの調整には80 mM クエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液を用いた。

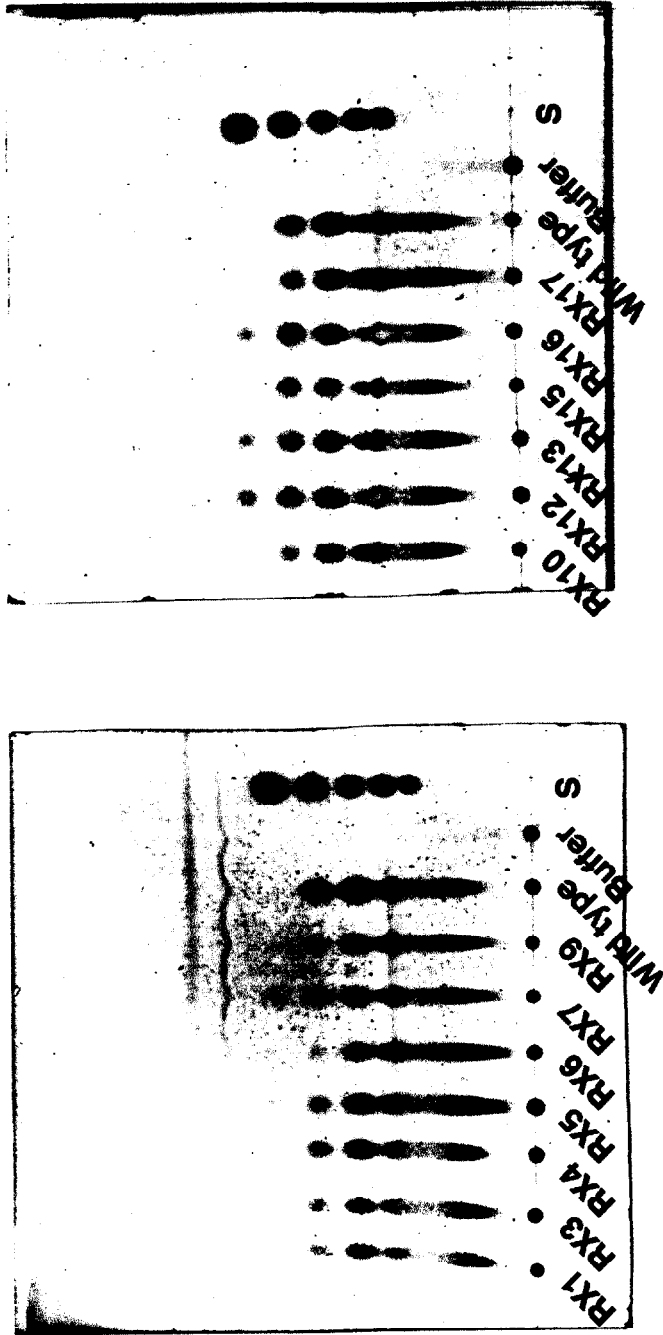


Fig. 7-13 変異型キシラナーゼT によるキシラン分解産物の TLC

変異型酵素を含む大腸菌無細胞抽出液を用いて、キシラン (birchwood) の加水分解を pH 5.8、50°C で 12 時間行った。分解産物はシリカゲル薄層プレートを用いた TLC により調べた。反応 pH の調整には、80 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ (pH 5.8) を用いた。Wild type は pXT47K を含む大腸菌が生産した野生型キシラナーゼである。S はキシロースおよびキシロオリゴ糖の標準物質を示す。Buffer は酵素試料を加えず、緩衝液のみを用いた反応産物である。

Wild type	1	ATGAATACCTATTGGCAATATTGGACCGATGGTGGTGGAAACAGTAAATGCTACAAATGGACCTGGTGGAAATTACAGTGT	80
RX5	1	ATGAATACCTATTGGCAATATTGGACCGATGGTGGTGGAAACAGTAAATGCTACAAATGGACCTGGTGGAAATTACAGTGT	80
RX7	1	ATGAATACCTATTGGCAATATTGGACCGATGGTGGTGGAAACAGTAAATGCTACAAATGGACCTGGTGGAAATTACAGTGT	80
RX12	1	ATGAATACCTATTGGCAATATTGGACCGATGGTGGTGGAAACAGTAAATGCTACAAATGGACCTGGTGGAAATTACAGTGT	80
RX13	1	ATGAATACCTATTGGCAATATTGGACCGATGGGGTGGAAACAGTAAATGCTACAAATGGACCTGGTGGAAATTACAGTGT	80
RX15	1	ATGAATACCTATTGGCAATATTGGACCGATGGTGGTGGAAACAGTAAATGCTACAAATGGACCTGGTGGAAATTACAGTGT	80
RX16	1	ATGAATACCTATTGGCAATATTGGACCGATGGTGGTGGAAACAGTAAATGCTACAAATGGACCTGGTGGAAATTACAGTGT	80
Wild type	81	GACATGGAGAGATACAGGAACTTTGTTGTCGGTAAAGGTTGGGAAATCGGTTTCACCAAAATCGAACGATCCATTACAATG	160
RX5	81	GACATGGAGAGATACAGGAACTTTGTTGTCGGTAAAGGTTGGGAAATCGGTTTCACCAAAATCGAACGATCCATTACAATG	160
RX7	81	GACATGGAGAGATACAGGAACTTTGTTGTCGGTAAAGGTTGGGAAATCGGTTTCACCAAAATCGAACGATCCATTACAATG	160
RX12	81	GACATGGAGAGATACAGGAACTTTGTTGTCGGTAAAGGTTGGGAAATCGGTTTCACCAAAATCGAACGATCCATTACAATG	160
RX13	81	GACATGGAGAGATACAGGAACTTTGTTGTCGGTAAAGGTTGGGAAATCGGTTTCACCAAAATCGAACGATCCATTACAATG	160
RX15	81	GACATGGAGAGATACAGGAACTTTGTTGTCGGTAAAGGTTGGGAAATCGGTTTCACCAAAATCGAACGATCCATTACAATG	160
RX16	81	GACATGGAGAGATACAGGAACTTTGTTGTCGGTAAAGGTTGGGAAATCGGTTTCACCAAAATCGAACGATCCATTACAATG	160
Wild type	161	CTGGTGTTTGGGAACCGTCTGGAATGGAATTGACTCTCTATGGGTGGACAAGGAATCAGCTCATAGAATATTATGTC	240
RX5	161	CTGGTGTTTGGGAACCGTCTGGAATGGAATTGACTCTCTATGGGTGGACAAGGAATCAGCTCATAGAATATTATGTC	240
RX7	161	CTGGTGTTTGGGAACCGTCTGGAATGGAATTGACTCTCTATGGGTGGACAAGGAATCAGCTCATAGAATATTATGTC	240
RX12	161	CTGGTGTTTGGGAACCGTCTGGAATGGAATTGACTCTCTATGGGTGGACAAGGAATCAGCTCATAGAATATTATGTC	240
RX13	161	CTGGTGTTTGGGAACCGTCTGGAATGGAATTGACTCTCTATGGGTGGACAAGGAATCAGCTCATAGAATATTATGTC	240
RX15	161	CTGGTGTTTGGGAACCGTCTGGAATGGAATTGACTCTCTATGGGTGGACAAGGAATCAGCTCATAGAATATTATGTC	240
RX16	161	CTGGTGTTTGGGAACCGTCTGGAATGGAATTGACTCTCTATGGGTGGACAAGGAATCAGCTCATAGAATATTATGTC	240
Wild type	241	GTTGATAATTGGGGAACTTACAGACCTACTGGAACCCATCGAGGCACCGTTGTCAGTGTGAGGAAACATATGACATCTA	320
RX5	241	GTTGATAATTGGGGAACTTACAGACCTACTGGAACCCATCGAGGCACCGTTGTCAGTGTGAGGAAACATATGACATCTA	320
RX7	241	GTTGATAATTGGGGAACTTACAGACCTACTGGAACCCATCGAGGCACCGTTGTCAGTGTGAGGAAACATATGACATCTA	320
RX12	241	GTTGATAATTGGGGAACTTACAGACCTACTGGAACCCATCGAGGCACCGTTGTCAGTGTGAGGAAACATATGACATCTA	320
RX13	241	GTTGATAATTGGGGAACTTACAGACCTACTGGAACCCATCGAGGCACCGTTGTCAGTGTGAGGAAACATATGACATCTA	320
RX15	241	GTTGATAATTGGGGAACTTACAGACCTACTGGAACCCATCGAGGCACCGTTGTCAGTGTGAGGAAACATATGACATCTA	320
RX16	241	GTTGATAATTGGGGAACTTACAGACCTACTGGAACCCATCGAGGCACCGTTGTCAGTGTGAGGAAACATATGACATCTA	320
Wild type	321	TACGACTATGCGATACAATGCACCTTCCATTGATGGCACACAAACGTTCCAAACAGTTCTGGAGTGTGAGGCAATCGAAGA	400
RX5	321	TACGACTATGCGATACAATGCACCTTCCATTGATGGCACACAAACGTTCCAAACAGTTCTGGAGTGTGAGGCAATCGAAGA	400
RX7	321	TACGACTATGCGATACAATGCACCTTCCATTGATGGCACACAAACGTTCCAAACAGTTCTGGAGTGTGAGGCAATCGAAGA	400
RX12	321	TACGACTATGCGATACAATGCACCTTCCATTGATGGCACACAAACGTTCCAAACAGTTCTGGAGTGTGAGGCAATCGAAGA	400
RX13	321	TACGACTATGCGATACAATGCACCTTCCATTGATGGCACACAAACGTTCCAAACAGTTCTGGAGTGTGAGGCAATCGAAGA	400
RX15	321	TACGACTATGCGATACAATGCACCTTCCATTGATGGCACACAAACGTTCCAAACAGTTCTGGAGTGTGAGGCAATCGAAGA	400
RX16	321	TACGACTATGCGATACAATGCACCTTCCATTGATGGCACACAAACGTTCCAAACAGTTCTGGAGTGTGAGGCAATCGAAGA	400
Wild type	401	GACCGACTGGAAATAACGTTAGCATTACGTTTACCAACCACGTTGAATGCGTGGAGAAATGCAGGAATGAATCTGGGAAGT	480
RX5	401	GACCGACTGGAAATAACGTTAGCATTACGTTTACCAACCACGTTGAATGCGTGGAGAAATGCAGGAATGAATCTGGGAAGT	480
RX7	401	GACCGACTGGAAATAACGTTAGCATTACGTTTACCAACCACGTTGAATGCGTGGAGAAATGCAGGAATGAATCTGGGAAGT	480
RX12	401	GACCGACTGGAAATAACGTTAGCATTACGTTTACCAACCACGTTGAATGCGTGGAGAAATGCAGGAATGAATCTGGGAAGT	480
RX13	401	GACCGACTGGAAATAACGTTAGCATTACGTTTACCAACCACGTTGAATGCGTGGAGAAATGCAGGAATGAATCTGGGAAGT	480
RX15	401	GACCGACTGGAAATAACGTTAGCATTACGTTTACCAACCACGTTGAATGCGTGGAGAAATGCAGGAATGAATCTGGGAAGT	480
RX16	401	GACCGACTGGAAATAACGTTAGCATTACGTTTACCAACCACGTTGAATGCGTGGAGAAATGCAGGAATGAATCTGGGAAGT	480
Wild type	481	AGTTGGTCTTACCAGCTTATTAGCAACAGAAGGCCTCAAAGTAGCGGGAGATCGAATGTAACGGTTTGGTAG	552
RX5	481	AGTTGGTCTTACCAGCTTATTAGCAACAGAAGGCCTCAAAGTAGCGGGAGATCGAATGTAACGGTTTGGTAG	552
RX7	481	AGTTGGTCTTACCAGCTTATTAGCAACAGAAGGCCTCAAAGTAGCGGGAGATCGAATGTAACGGTTTGGTAG	552
RX12	481	AGTTGGTCTTACCAGCTTATTAGCAACAGAAGGCCTCAAAGTAGCGGGAGATCGAATGTAACGGTTTGGTAG	552
RX13	481	AGTTGGTCTTACCAGCTTATTAGCAACAGAAGGCCTCAAAGTAGCGGGAGATCGAATGTAACGGTTTGGTAG	552
RX15	481	AGTTGGTCTTACCAGCTTATTAGCAACAGAAGGCCTCAAAGTAGCGGGAGATCGAATGTAACGGTTTGGTAG	552
RX16	481	AGTTGGTCTTACCAGCTTATTAGCAACAGAAGGCCTCAAAGTAGCGGGAGATCGAATGTAACGGTTTGGTAG	552

Fig. 7-14 キシランの切断様式が変化した変異型キシラナーゼT 遺伝子の塩基配列

変異導入の標的としたコドンを示した。標的部位以外で置換が生じた塩基を黄色で示した。ただし、青色で示した塩基置換は、変異導入の可否を確認する目的で導入した制限酵素 (*Kpn* I) サイトに基づく変異である。

Wild type	1	MNTYWQYWTIDGGGTVNAATNGP	GGNYSVTW	RDTCGNFV	VKGWEI	IGSPNRTI	IHNAGVWEP	SGNG	LTLYGWTR	NQLLEYVV	DNWGT	RPTGTHR	GTIVSD	99
RX5		MNTYWQYWTIDGGGTVNAATNGP	GGNYSVTW	RDTCGNFV	VKGWEI	IGSPNRTI	IHNAGVWEP	SGNG	LTLYGWTR	NQLLEYVV	DNWGT	RPTGTHR	GTIVSD	99
RX7		MNTYWQYWTIDGGGTVNAATNGP	GGNYSVTW	RDTCGNFV	VKGWEI	IGSPNRTI	IHNAGVWEP	SGNG	LTLYGWTR	NQLLEYVV	DNWGT	RPTGTHR	GTIVSD	99
RX12		MNTYWQYWTIDGGGTVNAATNGP	GGNYSVTW	RDTCGNFV	VKGWEI	IGSPNRTI	IHNAGVWEP	SGNG	LTLYGWTR	NQLLEYVV	DNWGT	RPTGTHR	GTIVSD	99
RX13		MNTYWQYWTIDGGGTVNAATNGP	GGNYSVTW	RDTCGNFV	VKGWEI	IGSPNRTI	IHNAGVWEP	SGNG	LTLYGWTR	NQLLEYVV	DNWGT	RPTGTHR	GTIVSD	99
RX15		MNTYWQYWTIDGGGTVNAATNGP	GGNYSVTW	RDTCGNFV	VKGWEI	IGSPNRTI	IHNAGVWEP	SGNG	LTLYGWTR	NQLLEYVV	DNWGT	RPTGTHR	GTIVSD	99
RX16		MNTYWQYWTIDGGGTVNAATNGP	GGNYSVTW	RDTCGNFV	VKGWEI	IGSPNRTI	IHNAGVWEP	SGNG	LTLYGWTR	NQLLEYVV	DNWGT	RPTGTHR	GTIVSD	99

Wild type	100	GGTYDIYTTMRYNAPS	IDGTQTF	QOFWSV	RQSKRPT	GNVSI	ITFSNHVNAWR	NAGMNL	GSSWSY	QVLATEG	QSSGR	SNVTW	182
RX 5	100	GGTYDIYTTMRYNAPS	IDGTQTF	QOFWSV	RQSKRPT	GNVSI	ITFSNHVNAWR	NAGMNL	GSSWSY	QVLATEG	QSSGR	SNVTW	182
RX 7	100	GGTYDIYTTMRYNAPS	IDGTQTF	QOFWSV	RQSKRPT	GNVSI	ITFSNHVNAWR	NAGMNL	GSSWSY	QVLATEG	QSSGR	SEVTW	182
RX 12	100	GGTYDIYTTMRYNAPS	IDGTQTF	QOFWSV	RQSKRPT	GNVSI	ITFSNHVNAWR	NAGMNL	GSSWSY	QVLATEG	QSSGR	SNVTW	182
RX 13	100	GGTYDIYTTMRYNAPS	IDGTQTF	QOFWSV	RQSKRPT	GNVSI	ITFSNHVNAWR	NAGMNL	GSSWSY	QVLATEG	QSSGR	SNVTW	182
RX 15	100	GGTYDIYTTMRYNAPS	IDGTQTF	QOFWSV	RQSKRPT	GNVSI	ITFSNHVNAWR	NAGMNL	GSSWSY	QVLATEG	QSSGR	SNVTW	182
RX 16	100	GGTYDIYTTMRYNAPS	IDGTQTF	QOFWSV	RQSKRPT	GNVSI	ITFSNHVNAWR	NAGMNL	GSSWSY	QVLATEG	QSSGR	SNVTW	182

Fig. 7-15 キシランの切断様式が変化した変異型キシラーゼT のアミノ酸配列

変異導入の標的とした Tyr63、Tyr86、および Tyr171 を赤色で示した。標的部以外で置換が生じたアミノ酸を黄色で示した。

10 参照)。立体構造上でのこれらのアミノ酸残基の位置、さらには変異型酵素がキシロースのみを特異的に生成するわけではなく、長鎖キシランをも加水分解すること、そしてその活性が野生型に比べて大幅に低下したことから、切断様式が変化したことは以下のように説明できる。

すなわち、標的とした 3 つのチロシン残基にアミノ酸置換が導入されたことで、サブサイト +2 あるいは +3 におけるキシロース環との親和力が低下した。基質に対する親和力の低下により加水分解活性は低下するものの、長鎖キシランのオリゴ糖にまで分解される。野生型酵素においては 4 糖以上の基質に対して少なくとも 4 つのサブサイト (-2、-1、+1、+2) が埋まった状態で結合する (Fig. 7-9 参照)。変異型酵素では +2 や +3 の親和力が低下しているため、4 つすべてが埋まった状態と -2、-1、+1 の 3 つのサブサイトが埋まった状態とのエネルギー的な差が小さくなる。従って、反応溶液中には両方の状態が混在することになり、キシロースを遊離する比率が高くなると考えられる (Fig. 7-16)。この仮説を実証するために、キシロオリゴ糖に対する切断様式を詳細に調べ、加水分解反応を動力学的に解析する必要がある。

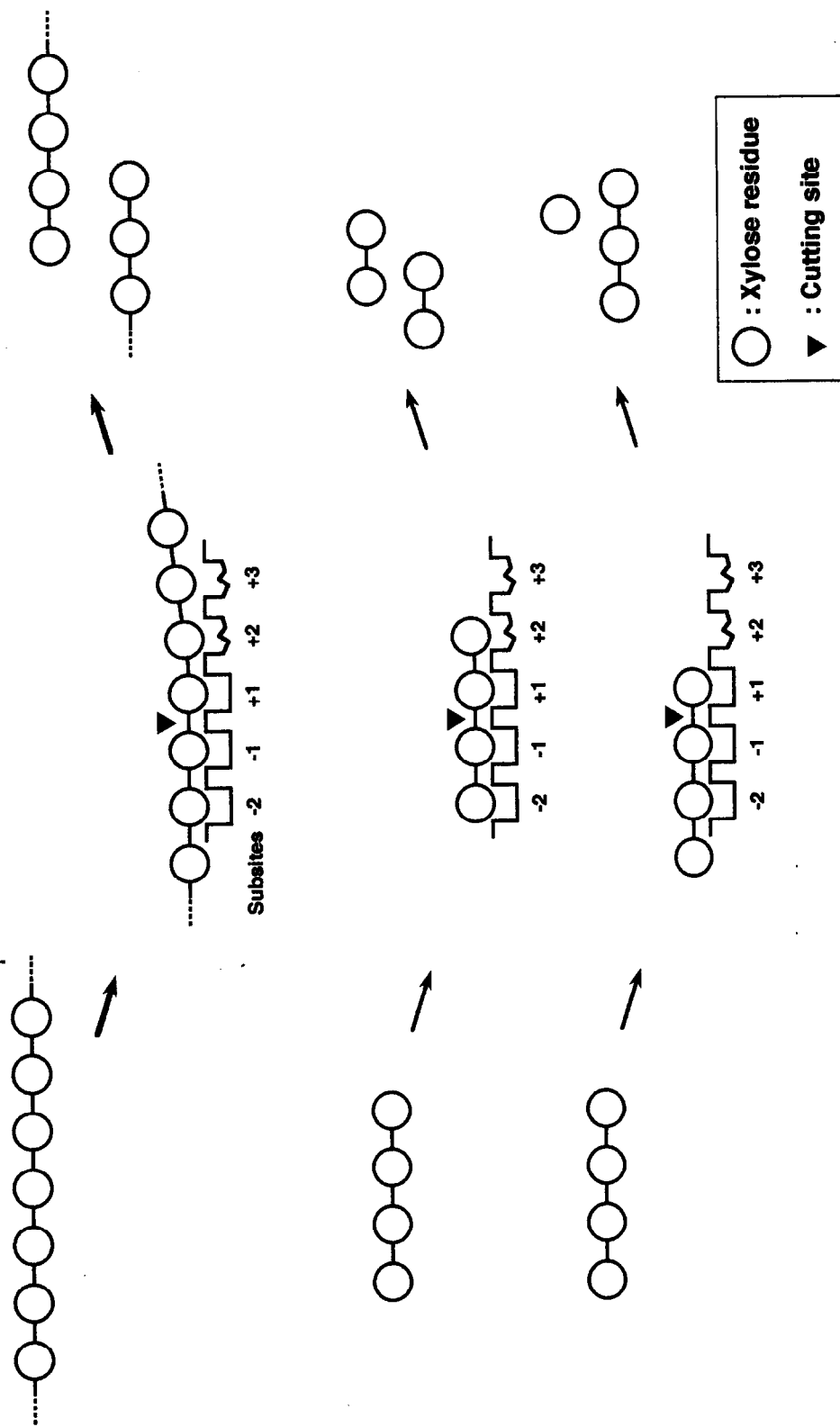


Fig. 7-16 変異型キシラーナーゼTによる基質切断の模式図

例として、長鎖キシランとキシロテトラオースの切断の様子を模式的に示した。変異型酵素においては、長鎖キシランに対する加水分解活性が低下している。サブサイト+2と+3のキシロース残基に対する親和力が低下したと仮定した。矢印の太さに応じて加水分解反応が進行する。

7-5. 結論

キシラナーゼT の立体構造モデルに基づき、クレフト内部の複数のアミノ酸残基に saturation 変異を同時導入した変異型キシラナーゼT 遺伝子ライブラリーを構築した。キシラナーゼT のクレフト最深部に位置する Thr65 と Val165 に変異を導入したライブラリーから、反応 pH 依存性が変化した変異型酵素が得られた。塩基配列の解析により、変異型酵素の多くは Thr65 が Ser に、Val165 が Leu に置換されていることがわかった。また、サブサイトの + 側に位置する Tyr63、Tyr86 および Tyr171 に変異を導入したライブラリーから、キシランの切断様式が変化した変異型酵素を取得することができた。キシラナーゼT を用いてキシランを加水分解した場合、主として 2 糖以上のキシロオリゴ糖が生成するのに対し、得られた変異型酵素を用いた場合にはキシロースの生成が観察され、置換した 3 つのチロシン残基が基質特異性に大きな影響を与えていることが明らかになった。

引用文献

- 1) Nakamura, S., Nakai, R., Wakabayashi, K., Ishiguro, Y., Aono, R. and Horikoshi, K. 1994. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58: 78-81.
- 2) Sidhu, G., Withers, S. G., Nham, T. N., McIntosh, L. P., Ziser, L. and Brayer, G. D. 1999. *Biochemistry*, 38: 5346-5354.
- 3) Wakarchuk, W. W., Campbell, R. L., Sung, W. L., Davoodi, J. and Yaguchi, M. 1994. *Protein Sci.*, 3: 467-475.
- 4) 井手麻衣子. 修士論文. 2000. 東京工業大学.
- 5) Törrönen, A. and Rouvinen, J. 1995. *Biochemistry*, 34: 847-856.

第 8 章

総括

8-1. 要旨

Bacillus sp. TAR-1 株は、pH 10.5、50°C の条件下で生育する好熱好アルカリ性細菌であり、多糖キシランの加水分解酵素キシラナーゼの生産菌として土壌より分離された。本菌の培養上清からキシラナーゼRが精製され、その諸性質も明らかにされていた。キシラナーゼRは優れた性質を有する好熱性アルカリキシラナーゼであり、産業応用に適していると考えられた。キシラナーゼを生産する微生物の中には2種類以上のキシラナーゼを生産するものが多く報告されていることから、TAR-1株においてもキシラナーゼR以外の優れたキシラナーゼを生産している可能性が考えられた。そこで本研究では、TAR-1株培養上清中より新規なキシラナーゼを見だし、精製することでその性質を検討した。また、キシラナーゼR遺伝子と共に遺伝子クローニングを行った。一次構造に基づいて構築した立体構造モデルを基にタンパク質工学的手法や進化分子工学的手法を用いて、機能部位を調べた。

以下に本研究で得られた成果を各章ごとに要約する。

第2章では、好熱好アルカリ性 *Bacillus* sp. TAR-1 株の培養上清中に、pI を 9.3 以上に有する新規な塩基性キシラナーゼ (キシラナーゼT) を見出した。本酵素の生産は、培地へのグルコースの添加により抑制された。キシラナーゼTの精製を行い、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動および等電点電気泳動で単一バンドを示す精製標品を得た。本キシラナーゼの精製標品の分子量は約 23,000 であり、最終的な比活性は 270 U/mg と算出された。

第3章では、TAR-1株の培養上清より精製したキシラナーゼTを用いて、その酵素学的性質を検討した。本酵素は、pH 5.8における反応至適温度を 70°C という高温域に有する、新規な好熱性の塩基性キシラナーゼであることが明らかとなった。本酵素は高温条件でも高活性を示すことから、工業的にも有用な酵素であると考えられた。

第4章では、キシラナーゼTのN末端アミノ酸配列を決定し、本酵素がファミリー 11 のサブファミリー ii に属することを明らかにした。

また、キシラナーゼTおよびキシラナーゼRをコードするDNA領域をPCR増幅し、その塩基配列を決定した。塩基配列より推測されるキシラナーゼTのアミノ酸配列は、*B. stearothermophilus* 236株や *A. caviae* ME-1株の生産するキシラナーゼと高い相同性を有していた。また、*B. halodurans* C-125株染色体上の、キシラナーゼをコー

ドしていると推測されている ORF とアミノ酸配列が完全に一致した。

キシラナーゼ R のアミノ酸配列は、*B. halodurans* C-125 株や *Bacillus* sp. NG-27 株の生産するキシラナーゼと類似していた。特に *B. halodurans* C-125 株のキシラナーゼ A とは極めて相同性が高かったが、キシラナーゼ T の N 末端の方が 17 アミノ酸短いことが明らかとなった。

キシラナーゼ T の上流域に存在する挿入配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析により TAR-1 株が *B. halodurans* C-125 株と近縁であることが示唆された。

第 5 章では、キシラナーゼ T および R の立体構造モデルを構築した。両酵素はそれぞれファミリー 11 および 10 に典型的な構造モチーフを有することが予測された。キシラナーゼ T と基質アナログが結合した状態の立体構造モデルから、ループ領域が基質と相互作用していると考えられた。キシラナーゼ T 遺伝子の大腸菌における発現系を構築し、ループ領域に種々の変異を導入した変異型酵素を調製した。ループを欠失させた変異型酵素ではキシラナーゼ活性が完全に失われた。また、ループ領域中の Pro114 にアミノ酸置換を導入した変異型酵素では、グルタミン酸やアスパラギン酸に置換されたものでは活性が維持されたが、ほとんどのものは活性の大幅な低下が観察された。

第 6 章では、部位特異的 saturation 変異導入法と DNA シャプリングの手法を融合させることにより、複数の標的アミノ酸に対する saturation 変異の同時導入を試みた。本手法を用い、キシラナーゼ T のクレフト内の 24 アミノ酸をランダム変異の標的とした変異型遺伝子ライブラリーを構築した。ライブラリーを構成する一部のクローンについて塩基配列を決定した結果、標的アミノ酸にランダムに変異導入されていることが明らかとなった。

第 7 章では、キシラナーゼ T の立体構造モデルに基づき、クレフト内部の複数のアミノ酸残基に saturation 変異を同時導入した変異型キシラナーゼ T 遺伝子ライブラリーを構築した。キシラナーゼ T のクレフト最深部に位置する Thr65 と Val165 に変異を導入したライブラリーから、反応 pH 依存性が変化した変異型酵素が得られた。塩基配列の解析により、変異型酵素の多くは Thr65 が Ser に、Val165 が Leu に置換されていることがわかった。また、サブサイトの + 側に位置する Tyr63、Tyr86 および Tyr171 に変異を導入したライブラリーから、キシランの切断様式が変化した変異型

酵素を取得することができた。キシラナーゼT を用いてキシランを加水分解した場合、主として二糖以上のキシロオリゴ糖が生成するのに対し、得られた変異型酵素を用いた場合にはキシロースの生成が観察され、置換した 3 つのチロシン残基が基質特異性に大きな影響を与えていることが明らかになった。

8-2. 今後の展望

本研究では、好熱好アルカリ性 *Bacillus* sp. TAR-1 株の培養上清から新規な塩基性キシラナーゼ、キシラナーゼ T を見出し、精製と性質検討を行った。キシラナーゼ T は優れた耐熱性や耐アルカリ性を有し、既に本菌培養上清から得られていたキシラナーゼ R と同様、工業的にも有用な酵素であることが明らかとなった。キシラナーゼ R とキシラナーゼ T が異なるファミリーに属しながら、共に優れた性質を有していたことは、両酵素が同じ好熱好アルカリ性細菌に由来することに起因するものであろう。このことは、産業応用上優れた酵素を得る手段として、極限環境微生物を利用することの有用性と、既に分離されている極限環境微生物から新たな酵素を見出すことが効率的であることを示している。本研究により、新規な極限環境微生物のスクリーニングのみならず、既知極限環境微生物からの合目的酵素のスクリーニングが促進されることになるであろう。

TAR-1 株の生産するキシラナーゼ T および R の一次構造を明らかにする目的で、両酵素をコードする遺伝子のクローニングを行った。既報のキシラナーゼの中には性質は異なりながらも両酵素と一次構造の相同性が高いものもあり、わずかな一次構造の違いがキシラナーゼの性質を規定している可能性が考えられる。それらのアミノ酸残基を特定することで、キシラナーゼ T および R の耐熱性機構や耐アルカリ性機構の本質にせまることができるかもしれない。

キシラナーゼ T 遺伝子の⁺大腸菌での発現系を構築し、特徴的なループ構造に様々な変異を導入した変異型酵素を構築した。変異型酵素の性質を検討した結果、ループ構造はキシラナーゼ活性に大きく影響を及ぼすことが明らかとなった。ループ構造はファミリー 11 キシラナーゼにおいて保存されており、また本酵素の一次構造に基づいて構築した立体構造モデルから基質と相互作用していることが予測され、キシラナーゼの基質特異性にも深く関係していることが想像される。ループ構造についてさらに解析を行うことで、キシランの分子認識機構の解明につながると思われる。

部位特異的 saturation 変異導入法と DNA シャプリングの手法を融合させて、複数の標的アミノ酸に対する saturation 変異を同時に導入する手法を開発した。この新規に確立した手法により、従来は不可能であった機能部位を構成する複数のアミノ酸に saturation 変異を導入することが可能となった。立体構造モデルに立脚して標的アミノ酸残基を選ぶことによって構築した変異型キシラナーゼ T 遺伝子ライブラリーから、反応 pH 依存性やキシランの切断様式が変化した変異型酵素が複数取得された。このことは、従来の進化分子工学の手法に比べ、本法が遙かに効率よく酵素の機能改変を

達成できることを示す。キシラナーゼのみならず、様々な酵素をこの手法を利用して機能改変できることは想像に難くない。酵素のポリペプチド骨格のみを残し、基質と相互作用し得る全てのアミノ酸に同時に saturation 変異を導入することも可能であり、このようなライブラリーから酵素が本来持つ活性とは全く違う活性でスクリーニングを行うことで、天然に存在しない酵素を創製することも考えられる。例えば、キシラナーゼを人工ポリマー分解酵素に「進化」させることも夢ではなくなるであろう。

謝辞

本研究を行うにあたり、6年の長きに渡り終始懇切な御指導を賜りました、東京工業大学教授 中村 聡先生に心から御礼申し上げます。また、多大な助言を頂きました同助手、八波利恵先生に深謝いたします。

キシロオリゴ糖を御供与頂きました元筑波大学教授 安井恒男先生に深く感謝いたします。

N 末端配列分析をお引き受けくださった、現在三共株式会社にて活躍されている本研究室卒業生の若林謙爾氏に深く御礼申し上げます。

本研究室多糖加水分解酵素チーム (PHET) として共に研究し、多大なる協力、提言をしてくださったメンバーの皆様、数々の支援を賜りました全ての中村研究室の皆様
に深謝いたします。

最後にこれまで経済的、精神的援助をしていただいた家族に感謝いたします。