

# Kochi University of Technology Academic Resource Repository

---

Title	キシラン完全資源化を目指したキシラン分解酵素遺伝子のクローニング
Author(s)	坂口, 直人
Citation	
Date of issue	2018-03
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10173/1881">http://hdl.handle.net/10173/1881</a>
Rights	
Text version	author



Kochi, JAPAN

<http://kutarr.lib.kochi-tech.ac.jp/dspace/>

2017 年度

修士論文

キシラン完全資源化を目指した  
キシラン分解酵素遺伝子のクローニング  
Cloning of xylan-decomposing enzyme genes  
for complete utilization of xylan

高知工科大学大学院 工学研究科 基盤工学専攻  
物質生命システム工学コース 1205011 坂口直人

主査 指導教員 有賀修 准教授

副査 蒲池 雄介 教授, 田中 誠司 教授

2018 年 3 月 12 日

## 目次

緒言	1
第 1 章 <i>Cellvibrio</i> sp.OA-2007 全ゲノム配列からのキシラナーゼ遺伝子の探索	3
1-1 実験方法	3
1-2 結果と考察	3
第 2 章 キシラナーゼ遺伝子のクローニング及びキシラン・キシロオリゴ糖分解	5
2-1 実験方法	5
2-1-1 プライマー設計	5
2-1-2 PCR	5
2-1-3 制限酵素を用いた消化反応	5
2-1-4 PCR 産物消化物と pUC19 消化物のライゲーション	5
2-1-5 形質転換	6
2-1-6 キシラナーゼ粗酵素の回収	6
2-1-7 キシランの分解	6
2-1-8 キシロオリゴ糖 (2S,3S,4S) の分解	6
2-1-9 TLC	7
2-2 結果と考察	7
第 3 章 <i>Cellvibrio</i> sp.OA-2007 全ゲノム配列からのキシロシダーゼ遺伝子の探索	12
3-1 実験方法	12
3-2 結果と考察	12
第 4 章 キシロシダーゼ遺伝子のクローニング及びキシロオリゴ糖分解	16
4-1 実験方法	16
4-1-1 プライマー設計	16
4-1-2 PCR	16
4-1-3 制限酵素を用いた消化反応	16
4-1-4 PCR 産物消化物と pUC19 消化物のライゲーション	16
4-1-5 形質転換	16
4-1-6 キシロシダーゼ粗酵素の回収	16
4-1-7 キシロオリゴ糖混合物の分解	16
4-1-8 2S の分解	17
4-1-9 3S の分解	17

4-1-10 4S の分解 . . . . .	18
4-2 結果と考察 . . . . .	18
結言 . . . . .	25
謝辞 . . . . .	26
参考文献 . . . . .	27

## 緒言

近年、地球温暖化の進行が問題となり、低炭素社会の実現に向けた再生可能エネルギーの研究が世界的に行われている。主要な再生可能エネルギーの一つとしてバイオマスがある。1年間にバイオマスとして生産される炭素量は約 60Gt だ。一方、地球温暖化の原因となる化石燃料由来の炭素放出量は年間約 6.4Gt である。つまり、もし、年間のバイオマス生産量の 1 割でも有効利用できるると低炭素社会の実現は可能だ。しかし、現実には採算性等の課題があり、60Gt のうち人類が利用できているのは約 1.4Gt に過ぎない。こういった課題を解決する為には、バイオマスリファイナリーが必須であり、バイオマスのより良い利活用の為、バイオマスの主成分であるセルロースやヘミセルロースに関する基礎研究が求められている。

ヘミセルロースの主成分である多糖キシランは、構成単糖である D-キシロースが  $\beta$  1-4 結合を介して連なった主構造をとる。(Fig.1)この結合を糖加水分解酵素であるキシラナーゼでランダムに加水分解することにより、D-キシロースが 2-数个連なった構造を取るキシロオリゴ糖が得られ、更に生産されたキシロオリゴ糖の結合を  $\beta$ -キシロシダーゼで更に加水分解することで D-キシロースが得られる。今日、キシラン分解産物及び分解酵素は、ビフィズス菌の選択増殖活性による整腸作用(キシロオリゴ糖)、低カロリーの甘味料(キシロオリゴ糖)、生分解性プラスチックの原料として用いられる L-乳酸の原料(キシロース)、木材パルプの無塩素漂白に使用(キシラナーゼ)といった様々な有用性が報告されており、未利用のバイオマスのより有効な活用の為にも、新たなキシラン分解酵素の発見とその諸特性の解明が望まれている。

一方、本研究室で扱っている寒天分解菌 *Cellvibrio* sp. OA-2007 の全ゲノムを解析したところ、ゲノム中にいくつかのキシラン分解酵素を見出した。新たなキシラン分解酵素の発見とその諸特性の解明が望まれている現在、論文の報告の少ない *Cellvibrio* 属細菌のキシラン分解酵素に関する研究は有意義である。

そこで本研究では、キシランの完全資源化を目的に、*Cellvibrio* sp. OA-2007 のキシラン分解酵素遺伝子の大腸菌を用いたクローニングを試みるとともに、得られたキシラン分解酵素の特性の解明を目指した。

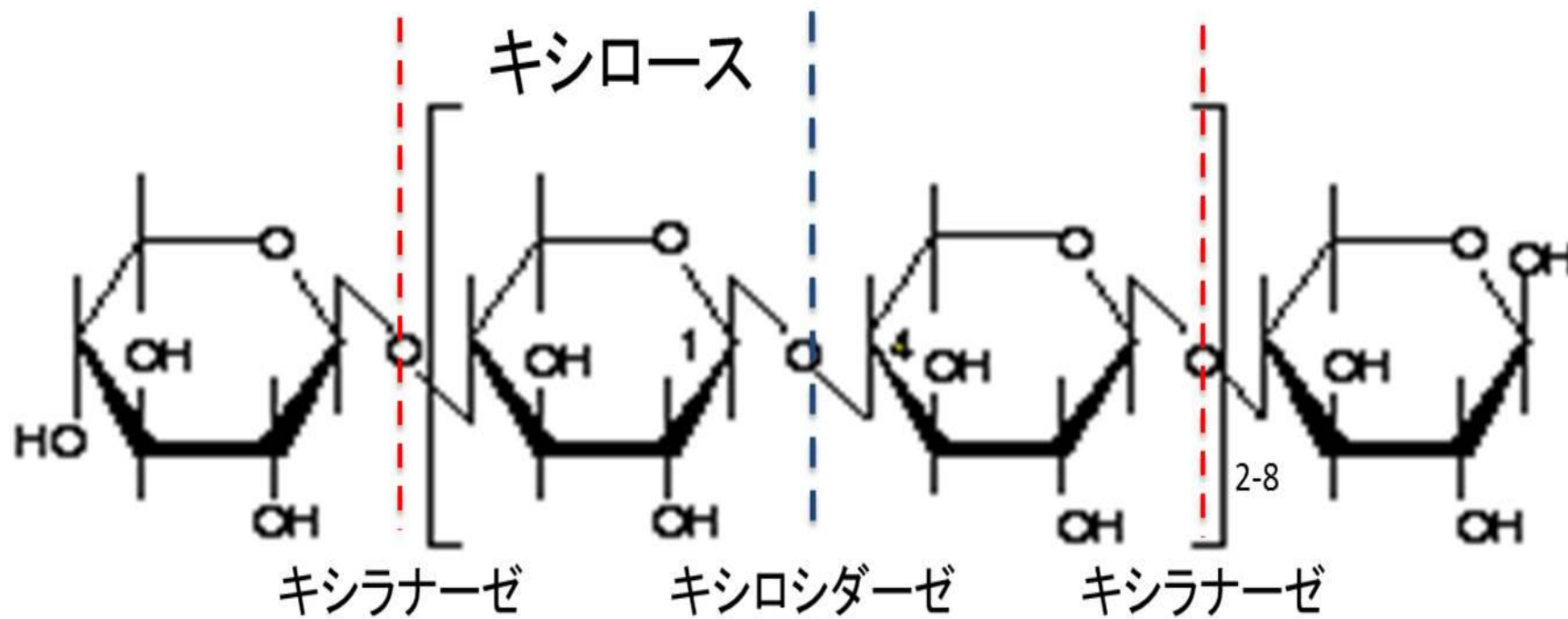


Fig.1 キシランの分子構造

## 第 1 章 *Cellvibrio* sp.OA-2007 全ゲノム配列からの キシラナーゼ遺伝子の探索

### 1-1 実験方法

遺伝子解析ツール Unipro UGENE を用い、NCBI に報告されている他の *Cellvibrio* 属細菌のキシラナーゼと予測されるアミノ酸配列と *Cellvibrio* sp.OA-2007 の全ゲノム配列の相同性検索を行った。

### 1-2 結果と考察

*Cellvibrio* sp.OA-2007 のコンティグ 603 番上の 1 つの ORF (Fig.2) が、複数の他の *Cellvibrio* 属細菌のキシラナーゼと予測されるアミノ酸配列と高い相同性を示した。また、NCBI の BLAST を利用し、相同性を示した *Cellvibrio* sp.OA-2007 の ORF の塩基配列と他の菌株の塩基配列の相同性検索を行ったところ、様々な菌株のキシラナーゼ遺伝子と予測される遺伝子と高い相同性を示した。このことから本 ORF はキシラナーゼ遺伝子である可能性が高いと考え、大腸菌を用いたクローニングを目指した。

AAGCCTGTTTGGTACTCGATTACACCTGCTTGCAA TAGGCAGG  
ATCAACCTTCGACAGTCCCTCCACTTCTATAGGCGGTATTGGTT  
GAGAGGCTATTTAAGAGAGTCTAATAATGAAATTTTCTGGCAA  
AAAATCCTGAGCACGCTTATCGGGCGCTGCAGCTTTGTGTGTAA  
CAGCGGTCAACGCACAAACCCTAAGCTCCAATCAACCGGTAC  
CAATAACGGTTTTTACTACACCTTCTGGAAAGATTCGGGCAGC  
GCCTCTATGACCTTACAGTCGGGGCGGTTCGCTATACCTCGCAAT  
GGACAAGTAATACTAATAACTGGGTGGGCGGTAAAGGCTGGAA  
TCCGGGTACCAGTTCACGTGTGGTTAGTTATTCAGGTA ACTAC  
GGCGCGTCCAATTCACAAA ACTCCTACCTGGCATT TTTATGGCT  
GGACCAGAAATCCGTTGATTGAGTATTACATCATCGAAAGTTAT  
GGTTCATACAACCAGCCTCTTGTTCGGGCGGCACCGACTACG  
GCAGTTTCACCAGCGATGGTGC GACTTATAACGTGCGTCGCTG  
CCTGCGCACTCAACAACCATCGATTGATGGCACCCAAACCTTC  
TATCAATACTTCAGCGTGC GCAATCCGAAGAAAGGTTTTGGTA  
ACATTTCTGGCACCATCACCTTTGCCAATCACGCCAACTTTTGG  
GCGAGCAAGGGCTTGAATCTGGGCACCCATGATTATCAAGTTC  
TGGCGACCGAAGGCTATCAAAGCACTGGCAGTTCGGATATCAC  
CGTAAGCGCGGGCACCTCAGGCGGGCGGCAGCTCAAGCTCGGC  
GCCATCAGGCGGTAGCAAAA CTATCGTTGTGCGCGCCAGAGGC  
GTTGCCGGTGGTGAGAGCATTACCCTGAAAGTGAATAACACGA  
CAGTGCAA ACTTGGACTCTTTCCACCACTATGACCAACTACAC  
CGCAACGACTTCTTTGTCTGGCGGCAGCCTGGTGGAAATACACC  
AACGATTCTGGCAACCGCGACGTACAAATCGATTACATCAGTG  
TGAACGGCAGCGTTCGTCAATCGGAAGCGCAAAGCTACAACAC  
CGGTGTGTATCAAAACGGTGCCTGTGGCGGGCGGCAATGGTATG  
AGCGAGTGGCTGCACTGTAACGGGCGCGATTGGTTACGGTAATT  
TA TAAGCCTTAGTCCTAGCTGATTAAGTAGGAATCGGTAAACAAA  
AAAAGGGGCGATTAATTTGCCCCTTTTTTATCACTCTAAAAATA  
ATAAAAGTAACTATAACGAGAGATAAACATGGCCAAC

Fig. 2 *Cellvibrio* sp. OA-2007 キシラナーゼ ORF 周辺の塩基配列  
(緑色 : キシラナーゼ ORF, 水色 : FW・RV プライマー, 黄色 :  
プロモーター)



## 第 2 章 キシラナーゼ遺伝子のクローニング及び キシラン・キシロオリゴ糖分解

### 2-1 実験方法

#### 2-1-1 プライマー設計

1 章で探索したキシラナーゼ ORF を PCR によって増幅させる為、ORF の前後で、プロモーターを含むよう Forward primer, Reverse primer を以下のように設計した。

Forward primer 5'-ACCAAGCTTAAGCCTGTTTGGTACTCG-3'

Reverse primer 5'-CCATCTAGAGTTGGCCATGTTTATCTCTC-3'

Forward primer の下線部は *Hind* III の制限酵素サイト、Reverse primer の下線部は *Xba* I の制限酵素サイト、二重下線部は *Cellvibrio* sp.OA-2007 の染色体 DNA と相補的な配列を示す。

#### 2-1-2 PCR

*Cellvibrio* sp.OA-2007 の染色体 DNA を鋳型とし PCR を行った。PCR 溶液の組成は以下の通りである。

dNTP Mixture (タカラバイオ) 4  $\mu$  l, 10 $\times$  *Ex Taq* Buffer (タカラバイオ) 5  $\mu$  l, Forward primer 1.5  $\mu$  l, Reverse primer 1.5  $\mu$  l, *Ex Taq* (タカラバイオ) 1  $\mu$  l, 染色体 DNA 1  $\mu$  l, 滅菌水で全量が 50  $\mu$  l になるよう調製。

PCR 条件は変性反応 (94 $^{\circ}$ C, 20 秒)、アニーリング (53 $^{\circ}$ C, 30 秒)、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C, 1 分 20 秒)、サイクル数を 30 回とした。その後、PCR 産物を NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up (タカラバイオ) を用い精製した。

#### 2-1-3 制限酵素を用いた消化反応

プラスミドベクターとして pUC19 DNA (タカラバイオ) を使用した。消化反応に使用した反応液は以下のように調製した。PCR 産物反応液は Universal Buffer 10 $\times$ M buffer (タカラバイオ) 5  $\mu$  l, PCR 産物 2  $\mu$  l, *Xba* I (タカラバイオ) 1  $\mu$  l, *Hind* III (タカラバイオ) 1  $\mu$  l, 滅菌水で全量 50  $\mu$  l に調製、pUC19 反応液は Universal Buffer 10 $\times$ M buffer 5  $\mu$  l, pUC19 DNA 4  $\mu$  l, *Xba* I 1  $\mu$  l, *Hind* III 1  $\mu$  l, 滅菌水で全量 50  $\mu$  l に調製した。それぞれの反応液を 37 $^{\circ}$ C に 1 時間加温し、消化反応を進めた。その後、70 $^{\circ}$ C で 15 分加温することで反応を停止させた。PCR 産物消化物と pUC19 消化物を NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up を用い精製した。

#### 2-1-4 PCR 産物消化物と pUC19 消化物のライゲーション

PCR 産物消化物 3  $\mu$  l, pUC19 消化物 7  $\mu$  l そして DNA Ligation Kit < Mighty Mix > Ligation Mixture (タカラバイオ) 10  $\mu$  l

を混合し、その後、16℃で1時間30分のライゲーション反応を行った。

#### 2-1-5 形質転換

宿主として *E. coli* DH5 $\alpha$  を選択した。*E. coli* DH5 $\alpha$  Competent Cells (タカラバイオ) 100 $\mu$ l をライゲーション産物 10 $\mu$ l に加え、42℃で45秒加温することで、組み換えプラスミドを *E. coli* DH5 $\alpha$  に導入し形質転換を行った。2分間水中で冷却後、付属の900 $\mu$ lのSOC培地を加え、37℃で1時間振とうした。振とう後、アンピシリン(100 $\mu$ g/ml), Agar 1%を含むLB寒天培地プレート(Tryptone 1w/v%, Yeast Extract 0.5w/v%, NaCl 1w/v%, pH7.0)にX-Gal 30 $\mu$ l, 形質転換された *E. coli* DH5 $\alpha$  20 $\mu$ l を塗布し、25℃で3日間培養後、白いコロニーを組み換えが成功している菌とみなし、青白選抜を行った。

#### 2-1-6 キシラナーゼ粗酵素の回収

白いコロニーをランダムに選択し、アンピシリン(100 $\mu$ g/ml)を含むLB培地5mlに植菌、37℃で一昼夜振とうし、前培養した。前培養液200 $\mu$ lをアンピシリン(100 $\mu$ g/ml)を含むLB培地200mlに加え、25℃で2日間振とう培養した。菌体を遠心分離(8000rpm, 4℃, 10分)により集菌、上清液を取り除いた。菌体を20mMリン酸バッファー(pH6.8)で懸濁し遠心分離(8000rpm, 4℃, 10分)により集菌、上清液を取り除いた。この作業を2度繰り返し、菌体を洗浄した。その後、再び菌体を20mMリン酸バッファー35mlで懸濁、氷冷しながら菌体を超音波壊砕(出力60%, 15分間, 1秒間隔でON/OFF, 最大9℃)した。遠心分離(8000rpm, 4℃, 10分)により菌体残渣を取り除き、上清液を粗酵素液として回収した。

#### 2-1-7 キシランの分解

20mMリン酸バッファー1mlにキシラン(和光純薬)を20mg加え20g/lキシラン溶液を調製した。20g/lキシラン溶液900 $\mu$ lと回収した粗酵素100 $\mu$ lを混合し、25℃で一昼夜振とう、分解反応を行った。反応液を100℃で5分間加熱し、反応を停止させた。その後、遠心分離(8000rpm, 5分間)で蛋白の沈殿を取り除き、上清液をフィルターろ過、HPLC, TLCによって分析した。

#### 2-1-8 キシロオリゴ糖(2S, 3S, 4S)の分解

20mMリン酸バッファー1.2mlにキシロビオース(東京化成工業)、キシロトリオース(Megazyme)、キシロテトラオース(Megazyme)をそれぞれ1.2mg加え、1g/lのキシロビオース溶液、キシロトリオース溶液、キシロテトラオース溶液を調製した。それぞれの調製した溶液1.2mlと回収した粗酵素1.2mlを

混合し、37℃で振とう、分解反応を行った。反応物の経時的な変化を確認する為、1時間、2時間、4時間、6時間経過時点で、反応液を600μlずつ回収、100℃で5分間加熱し、反応を停止させた。遠心分離(8000rpm, 5分間)で蛋白の沈殿を取り除き、上清液をフィルターろ過、HPLC,TLCによって分析した。

#### 2-1-9 TLC

2-1-7,2-1-8 で用いた展開溶媒の組成は n-ブタノール : ピリジン : 水 = 6 : 4 : 3 である。(4章でも同じものを使用) 3回展開を行った後、発色試薬を噴霧、100℃のホットプレートで加熱した。また、発色試薬はナフトレゾシノール 0.2g とジフェニルアミン 0.4g を 95%エタノール 100ml に溶かし、98%の硫酸 4ml を氷冷しながらゆっくりと加え調製した。(4章でも同じものを使用)

#### 2-2 結果と考察

組み換え菌から回収した粗酵素はキシランを 2S、3S、4S、5S に分解した。(Fig.3,4) このことからキシラナーゼ遺伝子のクローニングに成功したと考えられる。

本キシラナーゼ粗酵素は 2S 及び 3S を分解することはできなかった。(Fig.5)

本キシラナーゼ粗酵素は 4S を分解した。ほとんどの場合、2S に分解したが、いくらかを 3S、単糖に分解した。(Fig.6)

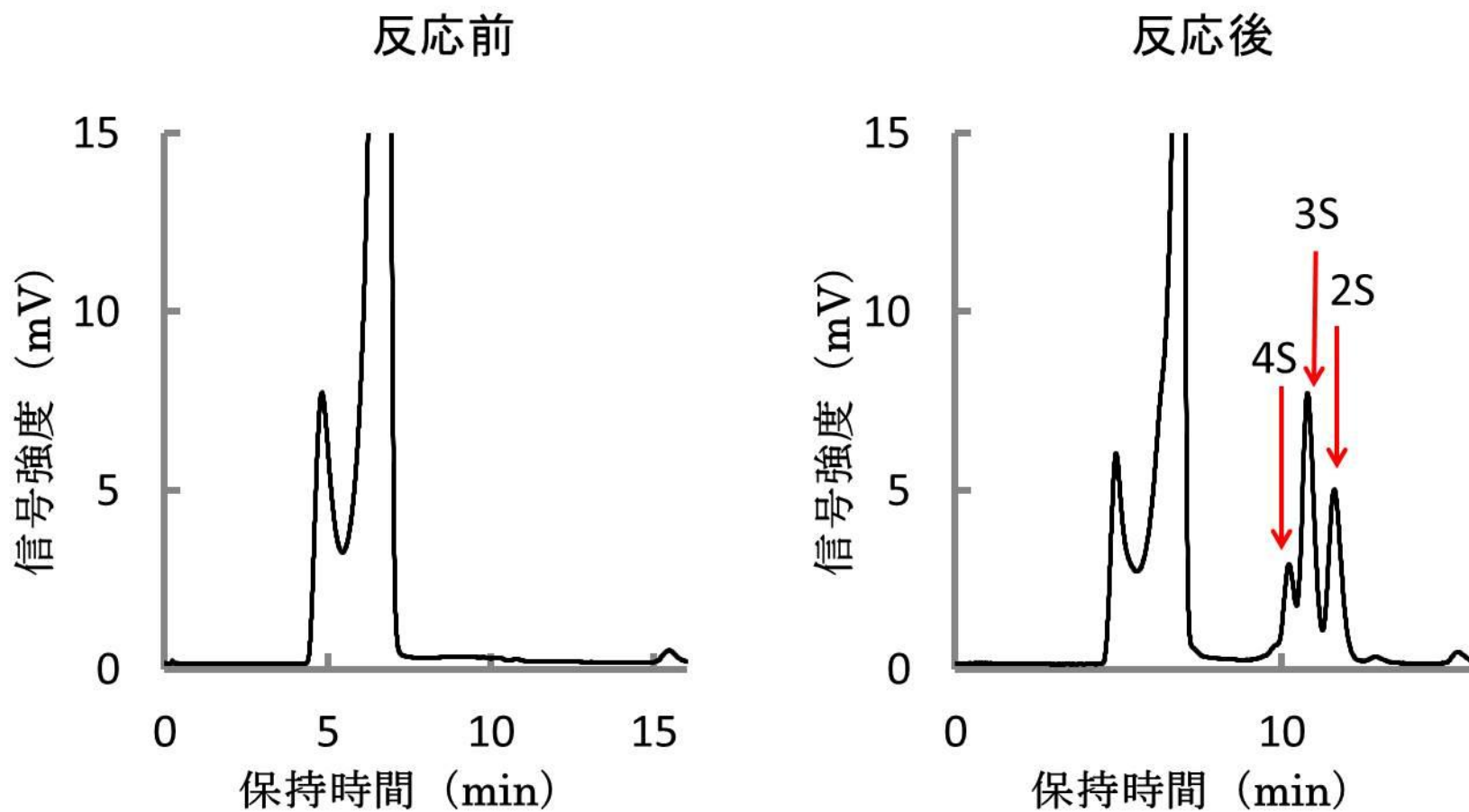


Fig.3 本キシラナーゼ粗酵素によるキシランの分解(HPLC分析結果)

# キシラン分解産物TLC

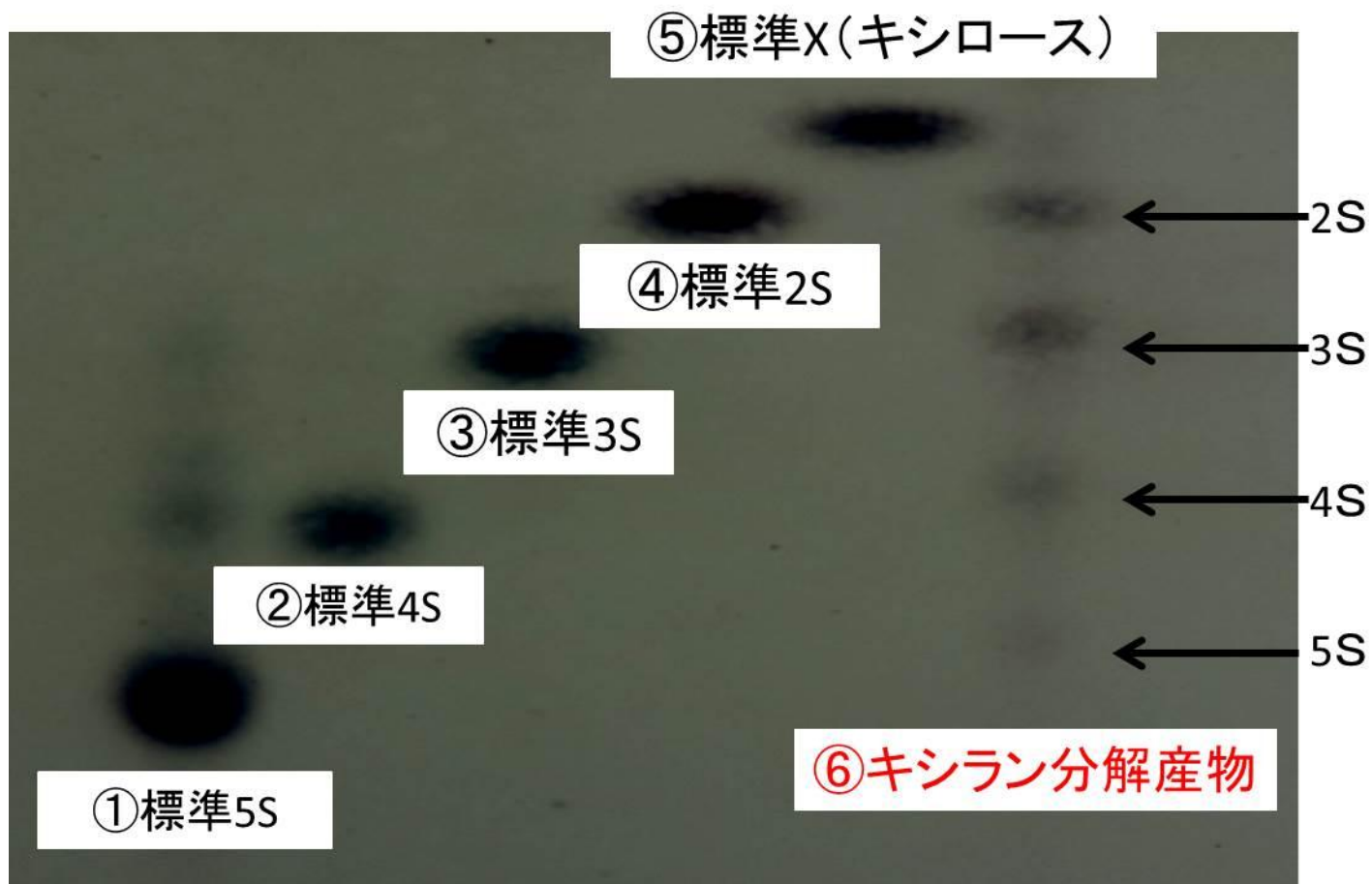
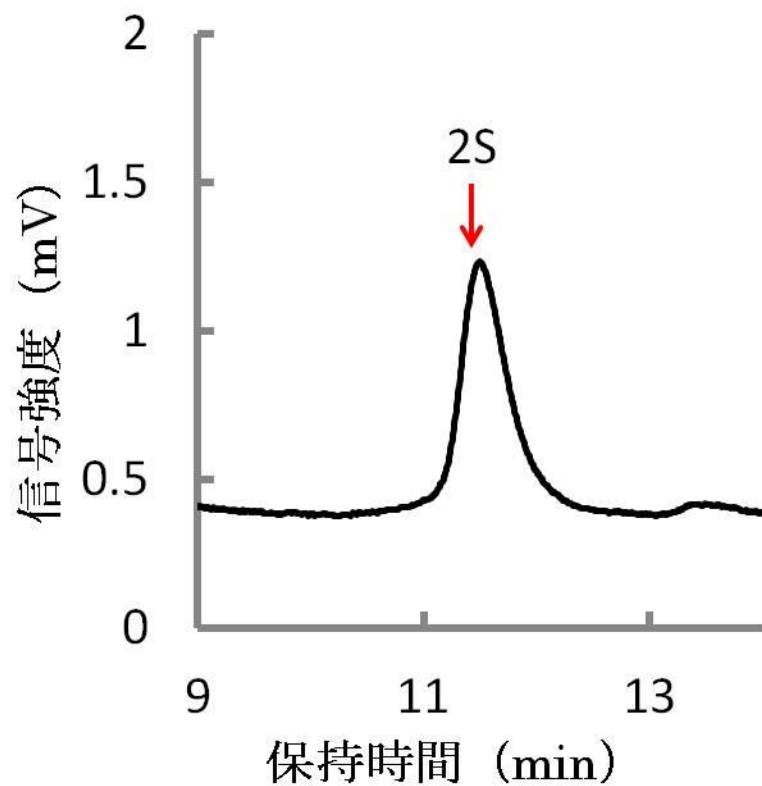


Fig.4 本キシランナーゼ粗酵素によるキシラン分解産物の TLC 分析

## 2S分解6h



## 3S分解6h

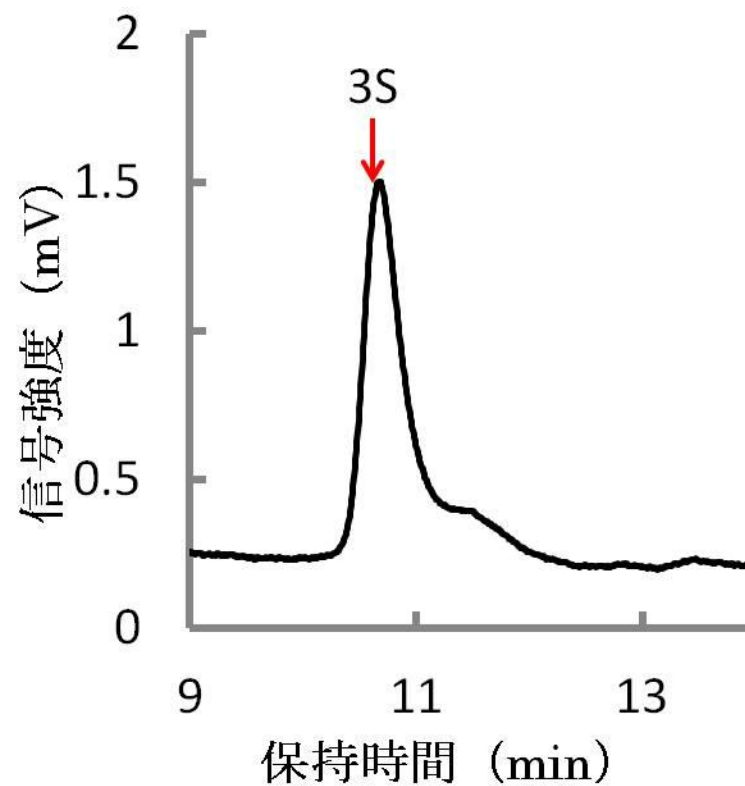


Fig.5 本キシラナーゼ粗酵素による 2S,3S の分解 (HPLC 分析結果)

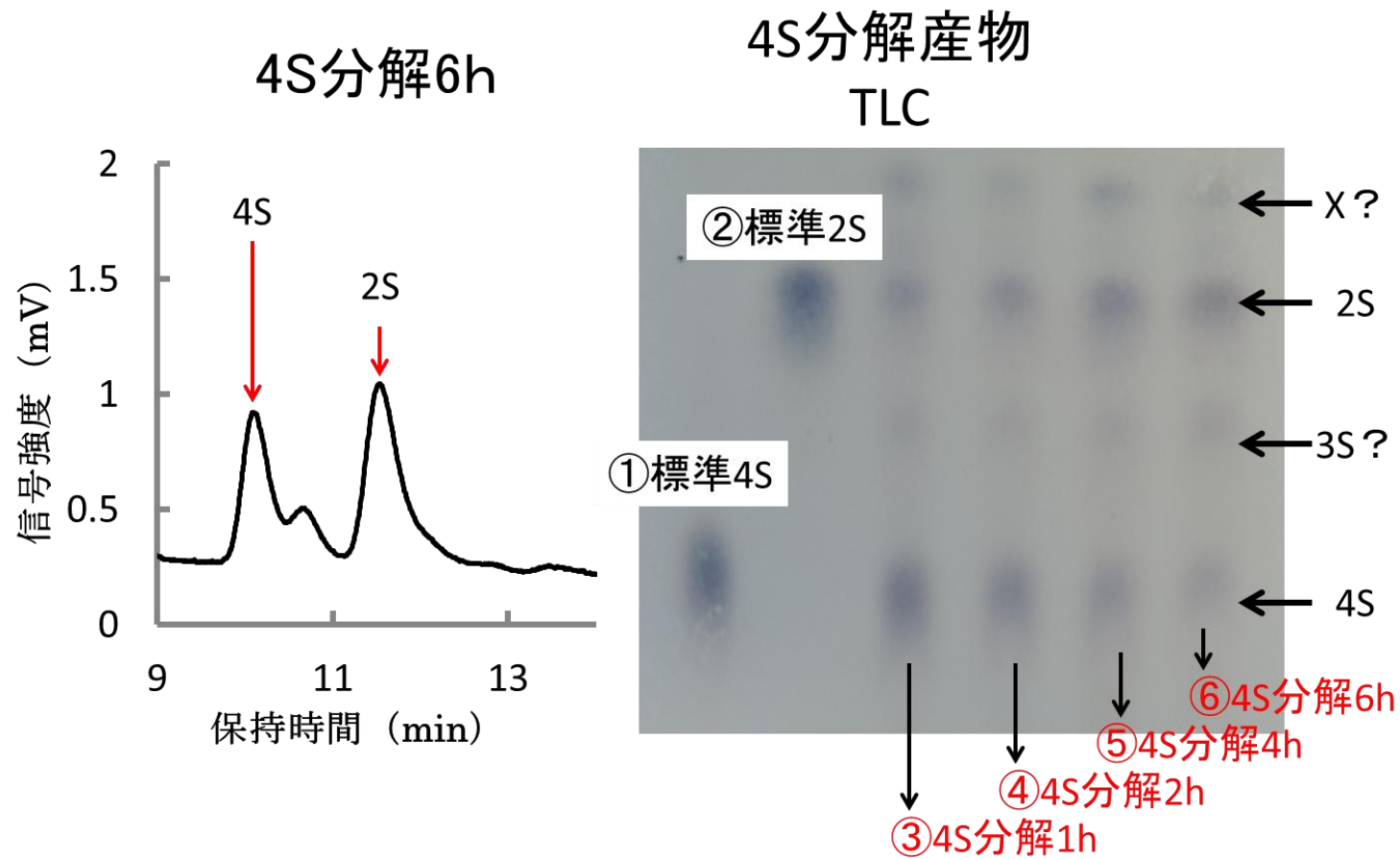


Fig.6 本キシラーナーゼ粗酵素による4S分解物のHPLC(左)TLC(右)分析

## 第 3 章 *Cellvibrio* sp.OA-2007 全ゲノム配列からの キシロシダーゼ遺伝子の探索

### 3.1 実験方法

本研究室では過去に安居が *Cellvibrio* sp.OA-2007 のキシロシダーゼの部分精製に成功しており、推定分子量は 44000Da であった。そこで、NCBI に報告されている他の *Cellvibrio* 属細菌のキシロシダーゼと予測されるアミノ酸配列の中から、推定分子量の近いタンパク質を生産すると考えられるものを探した。結果、次の 4 つの候補が見つかった。(Fig.7)

遺伝子解析ツール Unipro UGENE を用い見つかった候補のアミノ酸配列と *Cellvibrio* sp.OA-2007 の全ゲノム配列の同一性検索を行った。

### 3.2 結果と考察

*Cellvibrio* sp.OA-2007 のコンティグ 585 番上の 1 つの ORF (Fig.8) が見つかった 4 つの候補の内 3 つと高い同一性を示した。また、NCBI の BLAST を利用し同一性を示した *Cellvibrio* sp.OA-2007 の ORF の塩基配列と他の菌株の塩基配列の同一性検索を行ったところ、様々な菌株のキシロシダーゼ遺伝子と予測される遺伝子と高い同一性を示した。(Fig.9) このことから、本 ORF はキシロシダーゼ遺伝子である可能性が高いと考え、大腸菌を用いたクローニングを目指した。



## 推定分子量約40000のタンパク質を生産する*Cellvibrio*属のキシロシダーゼ遺伝子

Description	MW
beta-xylosidase/alpha-L-arabinofuranosidase, putative, gly43N [ <i>Cellvibrio</i> sp. BR]	33486
glycoside hydrolase family 43 domain protein [ <i>Cellvibrio</i> sp. BR]	38081
alpha-N-arabinofuranosidase [ <i>Cellvibrio japonicus</i> ]	38091
secretion protein [ <i>Cellvibrio</i> sp. BR]	37908

Fig.7 推定分子量約 40000 のキシロシダーゼを生産すると予測される  
*Cellvibrio* 属細菌のアミノ酸配列及び菌種

ACAGCGCACAGATGGATGAGGTA TTCCCTCACGCCTATCAATTTGAGC  
 GCGGCTTTTTTACCCAGGCGAAGCGCCGGGGCACGGTGTGGACATAG  
 ATGAAACGCTCGCCGCCAAATATCCCTACAAGCGCGCCTGCCTACCTG  
 TGAATCGG TTGGAA GACGGAACGCTCTGGCATTGG TAAGAT TGTGCTG  
 GCAAACAGCAAAACACAATCCACAACGAGACAATAATT ATGACAACAC  
 AACAAATCCTGATGTCTAGCCTCATCGCTGGCAGCTTGCTCATCAGCG  
 GCTGCCAAGATAAAACCGCACCTGAGACTAGCACTGCAGCTGCTTCAT  
 CCGTTGCTGCTGTAGCGCCCGCACCAACACCAGCAGATCCAGCGCAAT  
 TTATCGGTCAACCACTCATCAGCGAGATTTACACCGCCGATCCATCTGC  
 CCATGTGTTTAAACGGCAAAATTTATATTTATCCCTCACACGACATAGAT  
 ACAGGCACCACCTCTGAAGGAGATGGCGATAAATTCGATATGAATGAT  
 TATCGCGTGCTCTCTATGGATAGCGCCGATGGCACCGCGACCCTGCAC  
 GATGTAGCACTGAAACTGGAAGATGTACCCTGGGCCAGCCGTCAACTT  
 TGGGCGCCTGACGCGGCGGAAAAAGACGGCAAGTACTATTTATTTTTC  
 CCTGCTAAAAACAAAGAGCAGATTTTCCAGATCGGCGTCGCCACCAGC  
 GACTCGCCTACCGGCCCATTCAAAGCCGAACCCGAGCCAATCAAAGGC  
 AGCTTCAGCATCGACCCAGCCGTATTTAAAGACGATGACGGAGCCTAC  
 TACATGTACTTCGGCGGCATCTGGGGCGGCCAATTACAGCGCTGGGCC  
 AGCGGCAGCTATGTTGAAGAAGATAAATATCCAGCAAGTAATGAACCC  
 GCCTACAGCCCGAAAATCGCCCGTATGAGCGACGACTTGCTGCAATTT  
 GCCGAAACGCCAAAAGATGTGCAAATCATCGACGGCGGCGGTGTTCCG  
 CTGCTGGGCACAGATAACCAATCGCCGCTTTTTTTGAAGCAGCTTGGGTA  
 CATAAATTTAACGGGAAATATTATTTATCCTACTCCACCGGCGACACCC  
 ACTTTATCGCCTACGCGATTGGCGACACCCCTACGGCCCCTTCACTTA  
 CAAAGGCATGGTGTTAGCACCAAGTTTTAGGCTGGACCAACCATCACTC  
 AATCGTGAAGCACAAACGACAAATGGTATTTGTTCTACCACGATTCACAA  
 CTGTCCGGCGGCCAAACCCACCTGCGCAATGTGAAAGTGAAGTACTGAGCTA  
 GTTCACAATGACGATGGCACCATTAACACCATTGATGCCTATCTCGACT  
 AGCGTCTACTGCACTGATGCAACAACCCGGAACCCCGCCCGATTAAT  
 CCGGCGGGGTTTTTATTATTTGAAAGTCAAAACACAAAAATTGACTTTT  
 GTCATACTAGGTGAATATTATTTGAAACGCCAGCAAATGTCTTATCAATG  
 GCAAATAGCCCTAATAATAATTACTCACACGAGACTAATTCATGCGCA  
 ATCTTCTCATCAAACCTGCTAAAAACATTACCCTCAGTTGC CCTTGTTTG  
 CTCCTATCGCCACTC

Fig.8 *Cellvibrio* sp.OA-2007 キシロシダーゼ ORF 周辺の塩基配列  
 ( 緑色 : キシロシダーゼ ORF, 水色 : FW・RV プライマー, 黄色 :  
 プロモーター )

## BLASTによる推定キシロシダーゼ遺伝子の相同性検索

Description	Ident
Xylosidase/arabinoxidase [ <i>Flavobacteriaceae bacterium</i> FS1-H7996/R]	66%
Xylosidase/arabinoxidase [ <i>Luteitalea pratensis</i> ]	65%
Xylosidase/arabinoxidase [ <i>Cystobacter fuscus</i> ]	64%

Fig.9 *Cellvibrio* sp.OA-2007 キシロシダーゼ ORF と相同性を示す  
他の菌種のキシロシダーゼ遺伝子とその相同率

## 第 4 章 キシロシダーゼ遺伝子のクローニング及び キシロオリゴ糖分解

### 4-1 実験方法

#### 4-1-1 プライマー設計

3 章で探索したキシロシダーゼを生産すると考えられる ORF を PCR によって増幅させる為、ORF の前後で、プロモーターを含むよう Forward primer ,Reverse primer を以下のように設計した。

Forward primer

5'- ACCAAGCTTACAGCGCACAGATGGATGAGGTA-3'

Reverse primer

5'- CCATCTAGAGAGTGGCGATAGGAAGCAAACAAGG-3'

Forward primer の下線部は *Hind*Ⅲ の制限酵素サイト、Reverse primer の下線部は *Xba*I の制限酵素サイト、二重下線部は *Cellvibrio* sp.OA-2007 の染色体 DNA と相補的な配列を示す。

#### 4-1-2 PCR

*Cellvibrio* sp.OA-2007 の染色体 DNA を鋳型とし PCR を行った。PCR 溶液の組成は以下の通りである。

dNTP Mixture (タカラバイオ) 4  $\mu$  l, 10 $\times$  *Ex Taq* Buffer (タカラバイオ) 5  $\mu$  l, Forward primer 1.5  $\mu$  l, Reverse primer 1.5  $\mu$  l, *Ex Taq* (タカラバイオ) 1  $\mu$  l, 染色体 DNA 1  $\mu$  l, 滅菌水で全量が 50  $\mu$  l になるよう調製。

PCR 条件は変性反応 (94 $^{\circ}$ C, 20 秒)、アニーリング (66 $^{\circ}$ C, 30 秒)、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C, 1 分 35 秒)、サイクル数を 30 回とした。その後、PCR 産物を NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up (タカラバイオ) を用い精製した。

#### 4-1-3 制限酵素を用いた消化反応

2-1-3 と同様の方法で消化反応を行った。

#### 4-1-4 PCR 産物消化物と pUC19 消化物のライゲーション

2-1-4 と同様の方法でライゲーション反応を行った。

#### 4-1-5 形質転換

2-1-5 と同様の方法で形質転換を行った。

#### 4-1-6 キシロシダーゼ粗酵素の回収

2-1-6 と同様の方法でキシロシダーゼ粗酵素の回収を行った。

#### 4-1-7 キシロオリゴ糖混合物の分解

基質をキシラン(東京化成工業)に変更し、2-1-7 の手順でキシロオリゴ糖混合溶液を調整した。調整したキシロオリゴ糖混合

溶液 900  $\mu$ l と回収した粗酵素 100  $\mu$ l を混合し、37℃で 30 分振とう、分解反応を行った。10 分間 100℃で加熱し、分画分子量 10000 の Vivaspin(GE ヘルスケア・ジャパン)を用い粗酵素を取り除くことで反応を停止させた。その後、反応物を HPLC により分析した。

#### 4-1-8 2S の分解

20mM リン酸バッファー 900  $\mu$ l にキシロビオース(東京化成工業)を 0.99mg 加えキシロビオース溶液を調整した。終濃度が 1g/l になるようキシロビオース溶液 810  $\mu$ l と回収した粗酵素(3 倍希釈)90  $\mu$ l を混合し、37℃で振とう、分解反応を行った。反応物の経時的な変化を確認するため、30 分、1 時間、1 時間 30 分経過時点で 300  $\mu$ l ずつ回収し、10 分間 100℃で加熱、分画分子量 10000 の Vivaspin を用い、粗酵素を取り除くことで反応を停止させた。その後、反応物を HPLC, TLC により分析した。

また、本キシロシダーゼ粗酵素のキシロビオースに対する  $K_m$  値を調べる為、20mM リン酸バッファーにキシロビオースを終濃度が 0.5g/l, 1g/l, 2g/l, 4g/l になるように加え、キシロビオース溶液を調整した。それぞれの調整した溶液 270  $\mu$ l と回収した粗酵素 30  $\mu$ l を混合し、37℃で 10 分振とう、分解反応を行った。10 分間 100℃で加熱、分画分子量 10000 の Vivaspin を用い粗酵素を取り除くことで、反応を停止させた。その後、反応物を HPLC により分析した。

#### 4-1-9 3S の分解

20mM リン酸バッファー 1.2ml にキシロトリオース(Megazyme)、を 1.32mg 加えキシロトリオース溶液を調整した。終濃度が 1g/l になるようキシロトリオース溶液 1.08ml と回収した粗酵素(30 倍希釈)120  $\mu$ l を混合し、37℃で振とう、分解反応を行った。反応物の経時的な変化を確認するため、30 分、1 時間、1 時間 30 分、2 時間経過時点で 300  $\mu$ l ずつ回収し、10 分間 100℃で加熱、分画分子量 10000 の Vivaspin を用い粗酵素を取り除くことで反応を停止させた。その後、反応物を HPLC, TLC により分析した。

また、本キシロシダーゼ粗酵素のキシロトリオースに対する  $K_m$  値を調べる為、20mM リン酸バッファーにキシロトリオースを終濃度が 0.5g/l, 1g/l, 2g/l になるように加え、キシロビオース溶液を調整した。それぞれの調整した溶液 270  $\mu$ l と粗酵素(30 倍希釈)30  $\mu$ l を混合し 37℃で 30 分振とう、分解反応を行った。10 分間 100℃で加熱、分画分子量 10000 の Vivaspin を用い粗

酵素を取り除くことで反応を停止させた。その後、反応物を HPLC により分析した。

#### 4-1-10 4S の分解

20mM リン酸バッファー 900  $\mu$ l にキシロテトラオース (Megazyme) を 0.99mg 加え、キシロテトラオース溶液を調整した。終濃度が 1g/l になるようキシロテトラオース溶液 810  $\mu$ l と回収した粗酵素(50倍希釈)90  $\mu$ l を混合し、37°C で振とう、分解反応を行った。反応物の経時的な変化を確認するため、30分、1時間、1時間30分経過時点で 300  $\mu$ l ずつ回収し、10分間 100°C で加熱、分画分子量 10000 の Vivaspın を用い粗酵素を取り除くことで反応を停止させた。その後、反応物を HPLC, TLC により分析した。

#### 4-2 結果と考察

本粗酵素はキシロオリゴ糖混合物及びキシロオリゴ糖 (2S, 3S, 4S) を分解した。(Fig.10.11.12.13) このことからキシロシダーゼのクローニングに成功したと考えられる。

本キシロシダーゼ粗酵素は 2S を単糖に分解した。(Fig.11) 3S を分解すると、3S の減少量とほぼ同程度の量の 2S と単糖が生産された。(Fig.12) この結果から、本キシロシダーゼ粗酵素は 3S を単糖に分解するのではなく、2S と単糖に分解すると考えられる。また、4S を分解すると分解 1 時間までは 4S の減少量分とほぼ同程度の量の 3S と単糖が生産されたが、1 時間 30 分経過時には 4S の量が減少しているにも関わらず、3S の量がほとんど増加しておらず 2S の量が増加していた。(Fig.13) この結果から本キシロシダーゼ粗酵素は、まず、4S を 3S と単糖に分解し、生産された 3S を更に 2S と単糖に分解すると考えられる。

2S, 3S, 4S を本キシロシダーゼ粗酵素で分解した際に生産される単糖量で相対活性を求めた結果、2S に対する活性を 1 とした場合、3S, 4S に対する活性はそれぞれ 4.45, 6.85 だった。(Fig.14) このことから、本キシロシダーゼ粗酵素は分解するキシロオリゴ糖の基質鎖長が長くなるほど強く作用すると考えられる。

ラインウィーバー・バークプロット (Fig.15) から Km 値を求めたところ、本キシロシダーゼ粗酵素の 2S、3S に対する Km 値はそれぞれ 26.8mM, 5.2mM だった。この結果から、3S は 2S と比べて本キシロシダーゼ粗酵素との親和性が高いと考えられる。

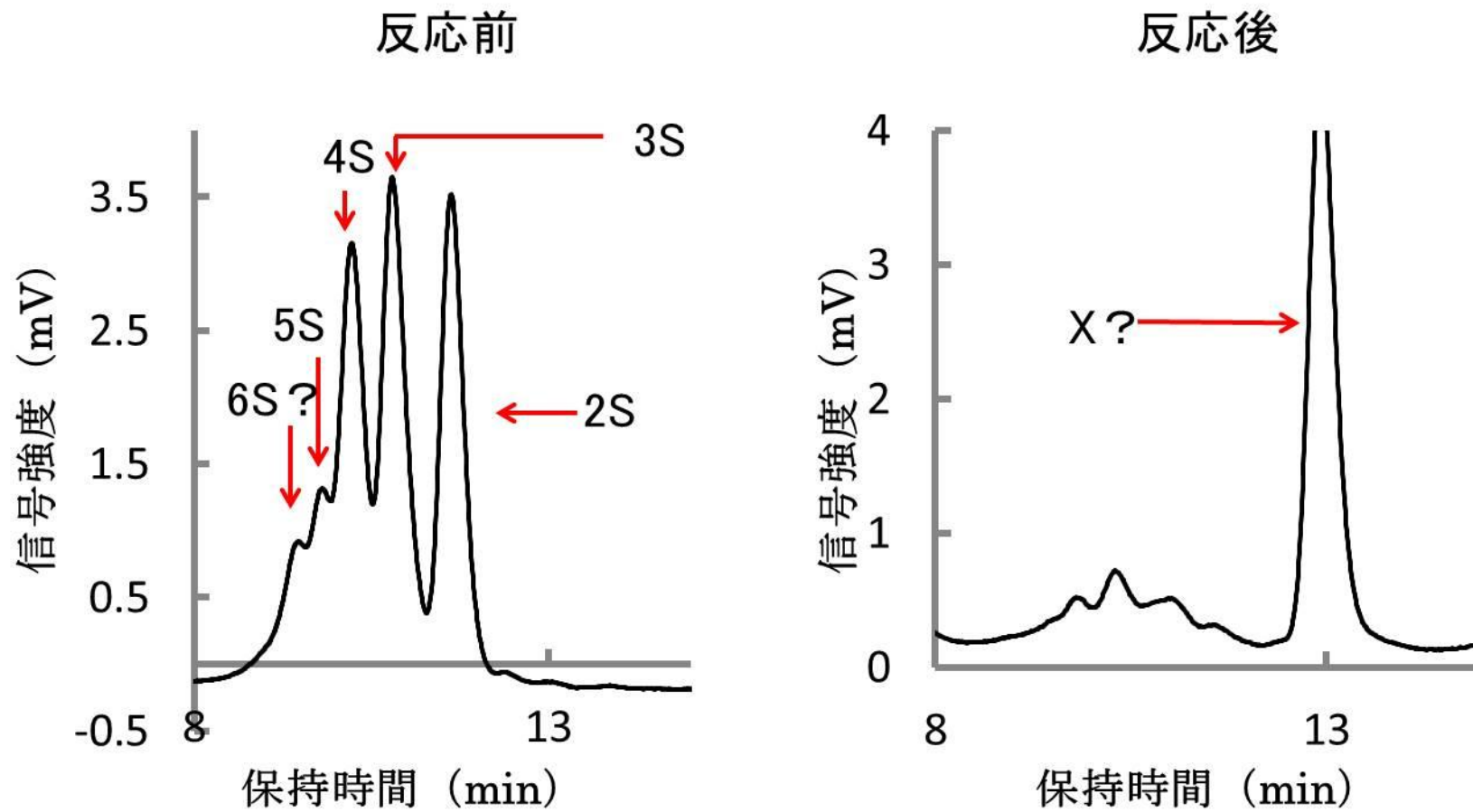


Fig.10 本キシロシダーゼ粗酵素によるキシロオリゴ糖混合物の分解  
(HPLC 分析結果)

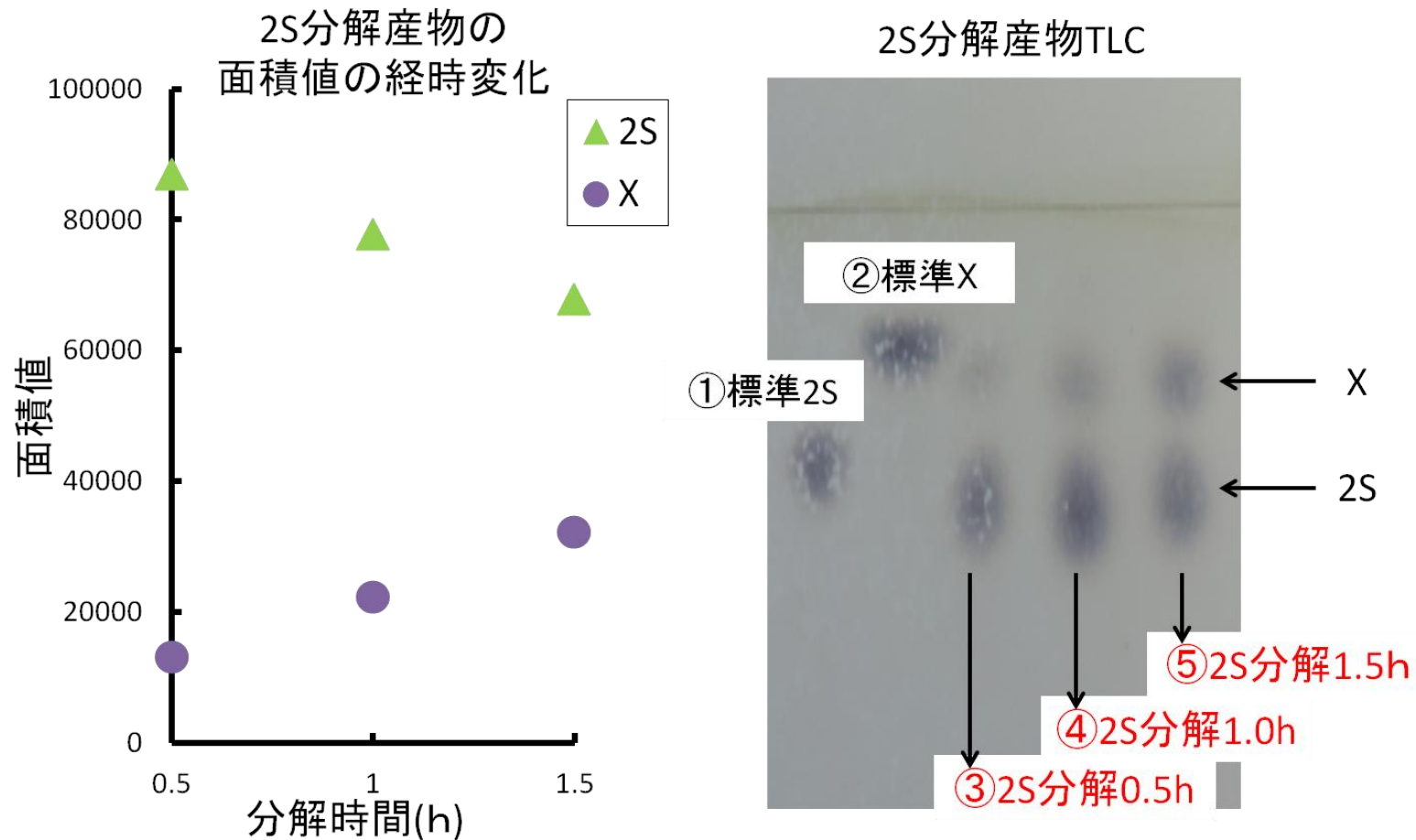


Fig.11 本キシロシダーゼ粗酵素による 2S 分解物の HPLC(左)TLC(右)分析



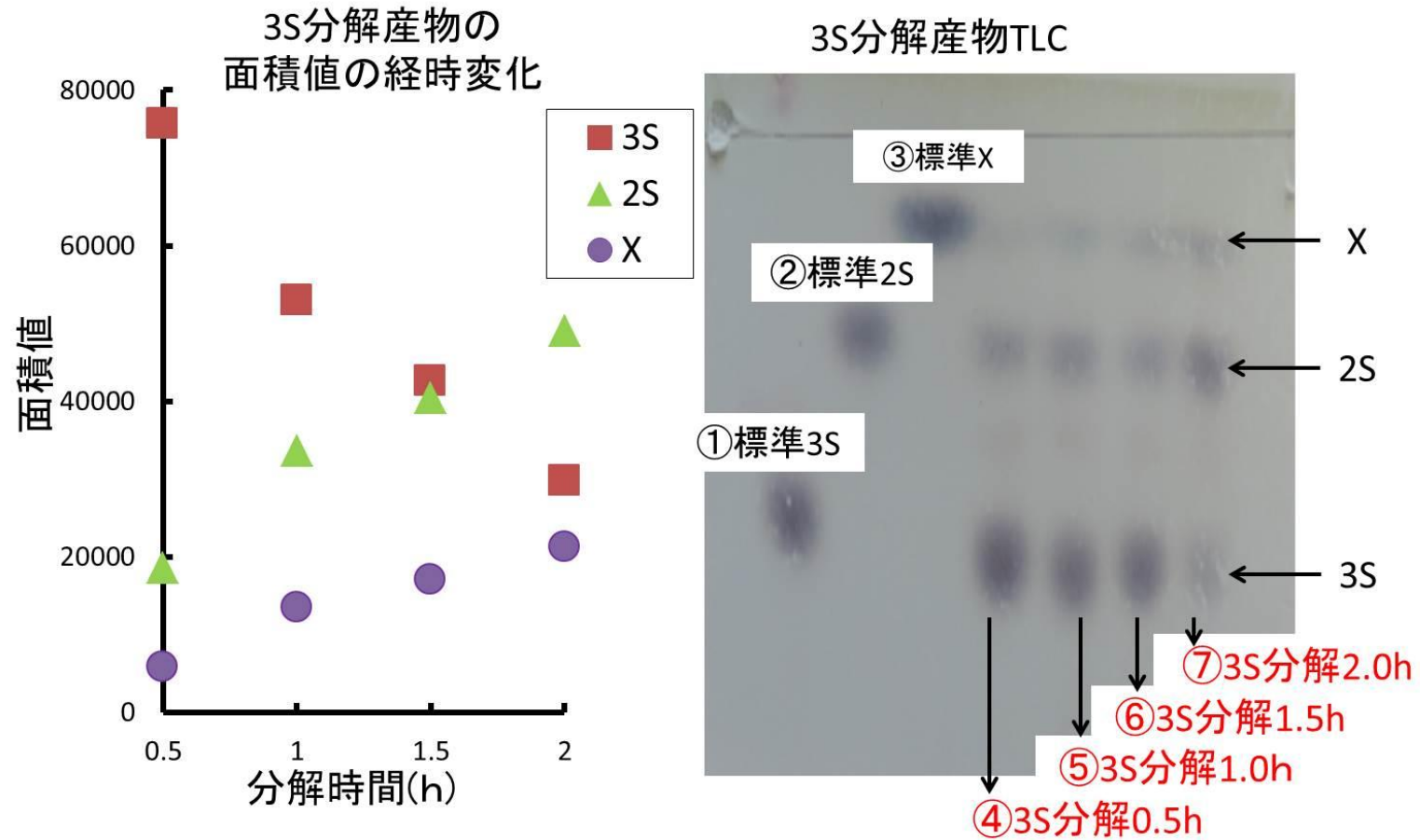


Fig.12 本キシロシダーゼ粗酵素による 3S 分解物の HPLC(左)TLC(右)分析

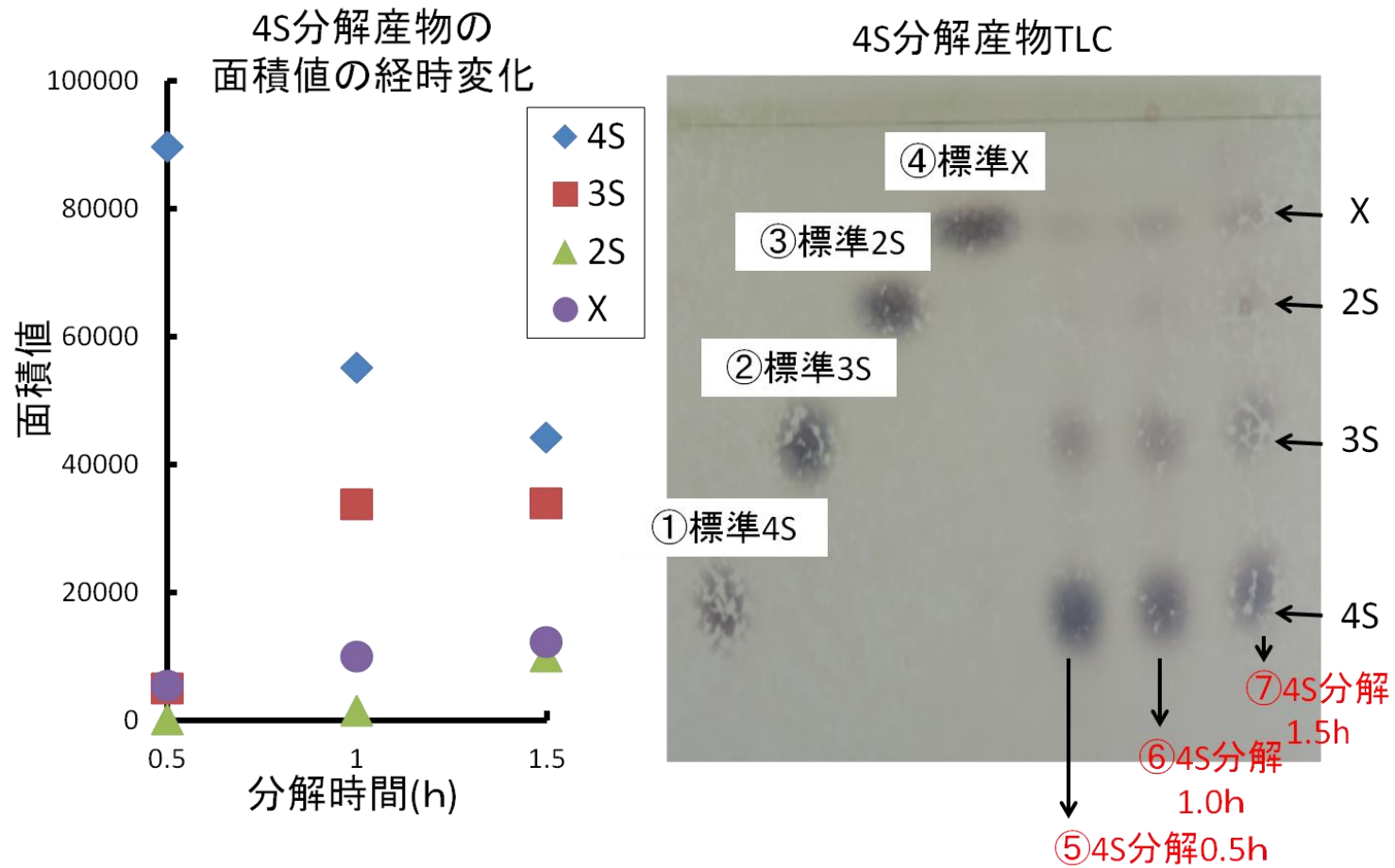
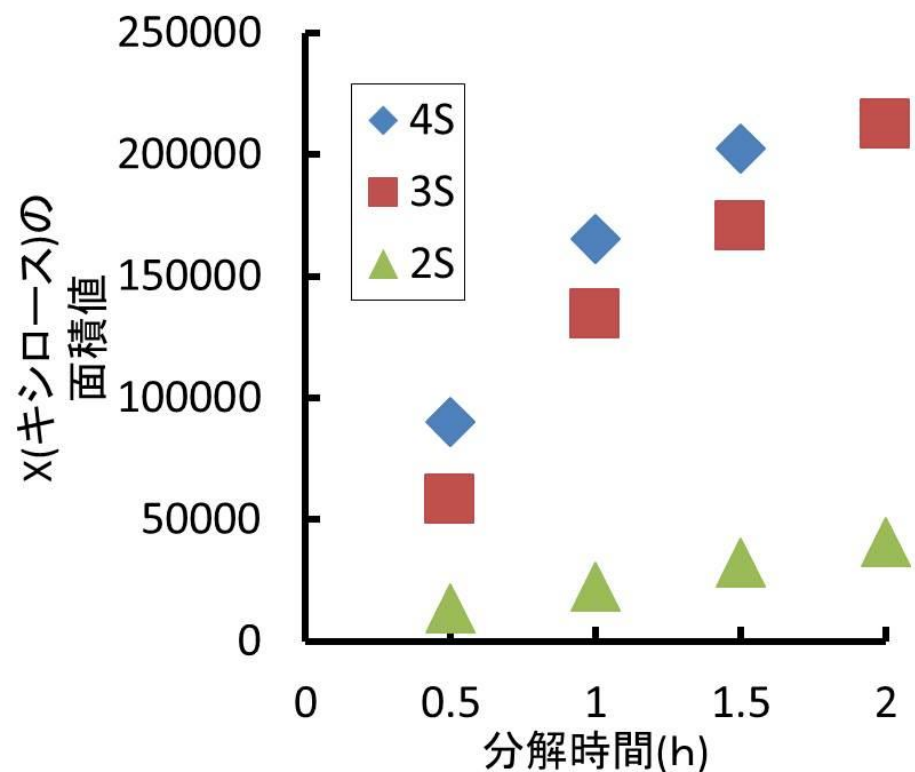


Fig.13 本キシロシダーゼ粗酵素による 4S 分解物の HPLC(左)TLC(右)分析

2S,3S,4S分解産物の  
X(キシロース)の面積値の経時変化



相対活性	
2s	1
3s	4.45
4s	6.85

Fig.14 本キシロシダーゼ粗酵素により 2S,3S,4S を分解した際の単糖生産量 (HPLC 分析結果)

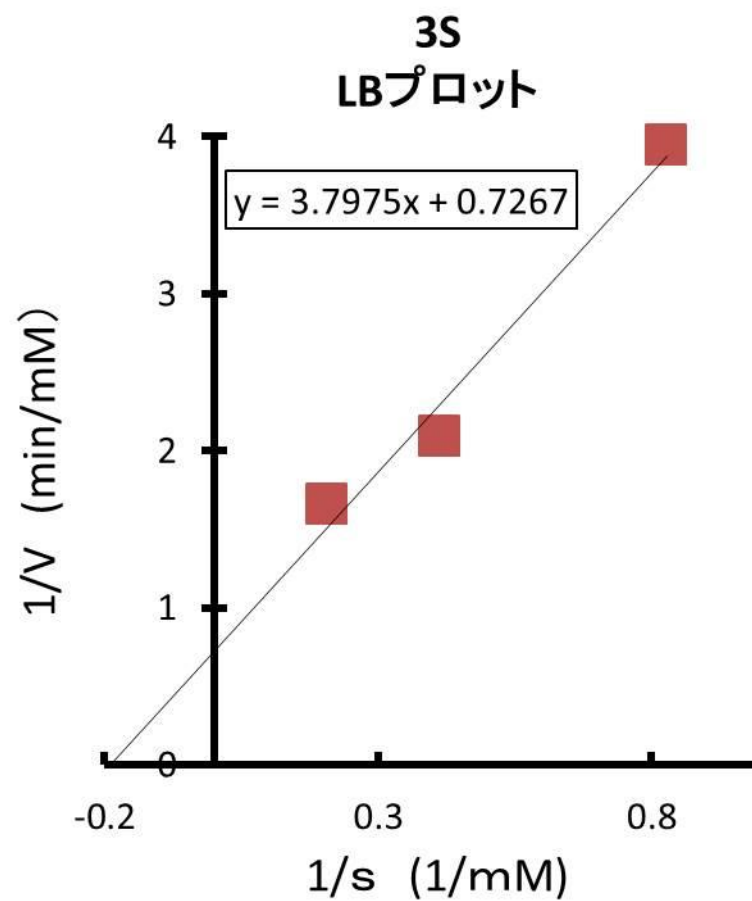
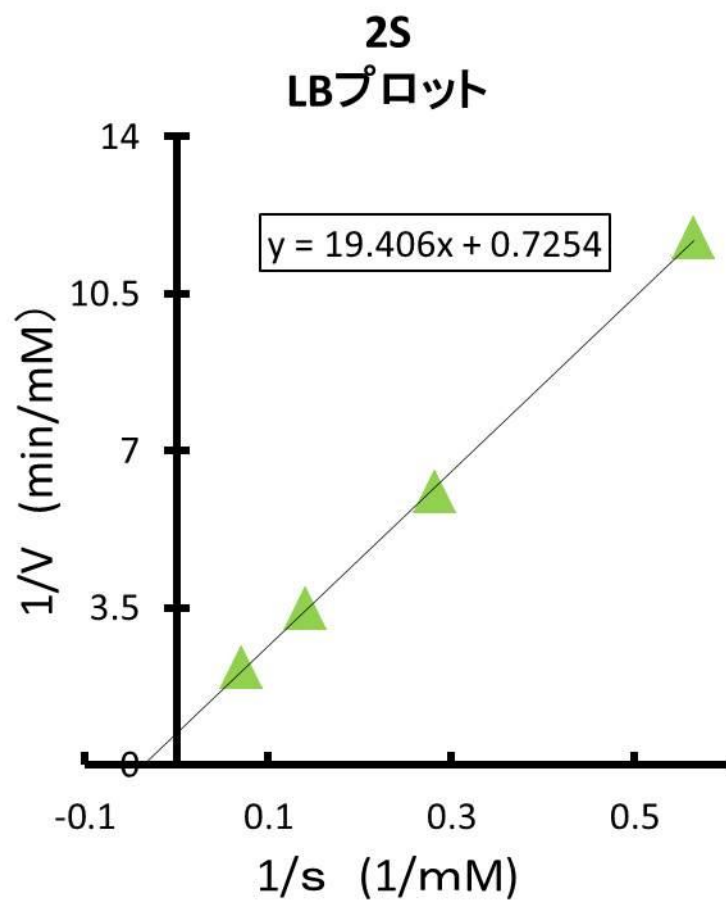


Fig.15 本キシロシダーゼ粗酵素による 2S,3S 分解産物の LB プロット

## 結言

BLAST を用いた相同性検索結果を基に *Cellvibrio* sp. OA-2007 の染色体 DNA からキシラン分解酵素遺伝子の大腸菌を用いたクローニングに成功した。また、得られたキシラン分解酵素の一部の鎖長のキシロオリゴ糖の分解機構の確認に成功した。

## 謝 辞

本研究に際して、様々なご指導を頂きました高知工科大学大学院 工学研究科 基盤工学専攻 物質生命システム工学コース 有賀修 准教授に深謝いたします。また、6年間の間、ご教授頂いた全ての教授の方々に心から感謝申し上げます。最後に日頃から御協力いただいた有賀研究室の先輩方、後輩方に心から感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Fuji Uchino & Toshihiko Nakane (1981) A Thermostable Xylanase from a Thermophilic Acidophilic *Bacillus* sp., Agricultural and Biological Chemistry, Vol45, No5 pp1121~1127
2. Aditya Bhalla, Kenneth M Bischoff and Rajesh K Sanil, (2014) Highly thermostable GH39  $\beta$ -xylosidase from a *Geobacillus* sp. strain WSUCF1, BMC Biotechnology, DOI 10.1186/s12896-014-0106-8
3. Thitiporn Teeravivattanakit, Sirilak Baramee, Paripok Phitsuwan, Rattiya Waeonukul, Patthra Pason, Chakrit Tachaapaikoon, Kazuo Sakka, Khanok Ratanakhanokchaia (2016) Novel Trifunctional Xylanolytic Enzyme Axy43A from *Paenibacillus curdlanolyticus* Strain B-6 Exhibiting Endo-Xylanase,  $\beta$ -D-Xylosidase, and Arabinoxylan Arabinofuranohydrolase Activities, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 82, No. 23, pp 6942~6951
4. C. M. G. A. Fontes, H. J. Gilbert, G. P. Hazlewood, J. H. Clarke, J. A. M. Prates, V. A. McKie, T. Nagy, T. H. Fernandes, L. M. A. Ferreira (2000) A novel *Cellvibrio mixtus* family 10 xylanase that is both intracellular and expressed under non-inducing conditions, Microbiology, Vol.146, pp 1959-1967
5. 安居菜摘, (2015) *Cellvibrio* sp. OA-2007 の  $\beta$ -1,4 キシロシダーゼの精製, 修士論文 (未公刊)