



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

AEROMONAS CAVIAE ME-1 XYLANASES :
Biochemical Studies, Biotechnological Utilization
and Analysis of Xylanase(s) Gene

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Kubata Bruno Kilunga メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2357

氏 名 (国籍)	Kubata Bruno Kilunga (ザイール共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第16号
学 位 授 与 年 月 日	平成6年3月14日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	<i>AEROMONAS CAVIAE</i> ME-1 XYLANASES: Biochemical Studies, Biotechnological Utilization and Analysis of Xylanase(s) Gene.
審 査 委 員	主査 岐阜大学 教授 堀 津 浩 章 副査 岐阜大学 教授 河 合 啓 一 副査 信州大学 教授 寄 藤 高 光 副査 岐阜大学 教授 中 村 征 夫 副査 静岡大学 教授 山 田 雄 三

論 文 の 内 容 の 要 旨

- 1)野蚕の一種であるレピドプテラン科の幼虫(*Samia cynthia pryeri*)の腸管内容物からキシランを加水分解する通性嫌気性グラム陰性桿菌を分離、*Aeromonas caviae* と同定、ME-1株と命名した。本菌のキシラナーゼは β -1,4-キシランにより誘導され、グルコースやキシロースでは抑制された。N源としてはポリペプトンが有効であり、本酵素生産の最適pHは9.0であった。本菌のキシラナーゼはカラス麦精製キシランを加水分解し、D-キシロースとキシロオリゴ糖を生成した。
- 2)本菌のキシラナーゼの利用方法として各種キシランを対象に検討したところ、ピーナッツ殻キシランが有効であった。即ち、ピーナッツ殻からアルカリ処理とエタノール沈澱によって得られたキシランを本菌の粗製キシラナーゼにより消化させると、21.7%の収率で主にキシロオリゴ糖が得られた。得られたキシロオリゴ糖は10%硫酸(100°C, 2hr)の加水分解でD-キシロースのみが生成された。
- 3)本菌は複数のキシラナーゼを生産する。そのうちキシラナーゼ I, IV, Vを単離精製した。I(エンド型キシラナーゼ)が11倍、9.3%の収率で精製された。PAGE, SDS-PAGEおよびIEF上で単一となり、質量分析の結果20,186 $\pm$ 56の分子量を有し、Km値は9.4mg/ml、見かけのVmax値は4330 μ mol D-Xylose equivalent min⁻¹·mg protein⁻¹であった。最適温度、pHはそれぞれ50°C、7.0であり、pH6.5から8.0の範囲で60%以上の

活性が保持され、pI値は7.1であった。本酵素はキシランからキシロトリオース、キシロテトラオース、キシロペンタオースと、より高分子量のオリゴ糖を生産した。キシロビオース、キシロテトラオース、澱粉、セルロース、CM-セルロース、ラミナリン、 β -1,3-キシラン等を加水分解せず、またトランスフェラーゼ活性も示さなかった。

4) カラス麦キシランからキシロテトラオースのみを生産する新規キシラナーゼIVを本菌の培養液より単離した。IVは硫酸沈殿、ゲルろ過クロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーで収率1.9%、25倍に精製された。SDS-PAGEによる分子量は約41,000であり、カラス麦キシランに作用しキシロテトラオースのみを生成した。分解生成物の酸加水分解でD-キシロースが得られた。本酵素はp-ニトロフェニール- β -D-キシロシドやキシロビオース、キシロテトラオース、澱粉、セルロース、CM-セルロース、ラミナリン、 β -1,3-キシラン等を加水分解せず、トランスキシロシダーゼ活性も全くなかった。

5) カラス麦キシランと樺キシランからキシロビオースのみを生産するキシラナーゼVを本菌の培養液から単離した。Vは硫酸沈殿、疎水性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーで精製され、SDS-PAGEとアガロースゲル電気泳動で単一であった。Vの分子量は46KDa、pI値は5.4、pH6.8、30-37°Cで最大活性を示した。pH5.0-8.6、25-37°Cで安定であり、樺キシランを基質とした際のKm値は2mg/ml、見かけのVmax値は182 μ mol D-Xylose equivalent min⁻¹·mg protein⁻¹であった。Vは、 β -キシロシターゼ、 α -L-アラビノフラノシターゼ、セルラーゼ、 β -1,3-キシラナーゼ活性を有せず、最小基質はキシロトリオースであった。このことよりVはエキソ型キシラナーゼであることが示唆された。

6) ショットガンクローニング法により得られたキシラナーゼ生成*E.coli* JM109形質転換株は、*A. caviae*のゲノムDNAの4.0kb断片をpB322に挿入したプラスミド(pPOCH1)を保有していた。本挿入断片はIのN末端アミノ酸配列のオリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズしたので、この断片にキシラナーゼI遺伝子がコードされていることがわかった。*E.coli* (pPOCH1)はキシラナーゼを細胞内外に構成的に生成した。LB培地及びキシラン培地から得られたキシラナーゼ活性は各々0.808U/mg cell protein, 0.941U/mg cell proteinであった。

以上の実験結果から申請者は、大学院連合農学研究科博士課程修了者としての学力並びに識見を有するものと認め、博士（農学）の学位を与えるに十分な資格を持つものと判定した。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、現在又は将来全世界で共通する大きな問題である農産廃棄物の有効利用を目的とした研究である。即ち、未だ世界的に解決されておらず、しかも膨大な量に及ぶ農産廃棄物の一つであるヘミセルロースの有効利用に着目し、特に微生物酵素を利用した処理法を研究したもの

である。ヘミセルロースの主成分であるキシランについて微生物分解を行った。キシランの分解効率が高く、しかも付加価値の高い生産物生産を目的とし、キシラン分解菌のスクリーニングからスタートした。特に採取対象として、自然界でヘミセルロースを栄養として生育している昆虫の腸管微生物を対象を絞り、スクリーニングした結果、野蚕の一種であるレピドプテラン科の幼虫(*Samia cynthia pryeri*)の腸管内容物からキシランを加水分解する微生物を分離、同定し、*Aeromonas caviae* ME-1株と命名した。引き続きキシランを基質として本細菌を大量培養し、菌体外酵素であるキシラナーゼについて分離、精製したところ本細菌には少なくとも5種のキシラナーゼが存在することが確認された。そこでまずそのうちで生産量が最も多く、精製されやすいキシラナーゼVについて分離、精製、単一蛋白とした。ついでその酵素化学的諸性質を明らかにした。その結果、キシラナーゼIはキシランを基質とした際にキシロトリオース、キシロテトラオース、キシロペンタオースといったキシロオリゴ糖のみを生産するエンド型であることを明らかにした。現在まで特にオリゴ糖のみを生産するキシラナーゼについては報告がなく、大変ユニークなキシラナーゼであることが明らかにされた。

次にキシラナーゼI以外のキシラナーゼについても検討した結果、特にキシロテトラオースのみを生産する新規エキソ型キシラナーゼIVを分離精製することに成功した。本酵素は特にカラス麦キシランを基質とした場合に簡単にキシロテトラオースのみを生産する。この発見は世界で初めてでその利用性はすこぶる高い。さらに他のキシラナーゼについても検討した結果、前2者と全く異なったカラス麦キシランからキシロビオースのみを生産するエキソ型キシラナーゼVを分離精製することにも成功した。このようなエキソ型キシラナーゼについても未だ報告をみていない。

以上、本論文のキシラナーゼI、IV及びVはいずれをとってみてもキシランの利用について大きな貢献をすると共にこれらの酵素は学問的にもキシランの構造解析に有効な試薬として利用できる道を開いたものである。

他方またキシラナーゼIについてはその遺伝子を*E. coli*にクローニングする遺伝子工学的な研究についても成功、今後キシラナーゼIの大量生産基礎技術の開発の道を開いたことも高く評価できる。

以上の結果を総合的に考察して、審査委員全員は博士論文としてその内容は十分なものと判定した。