



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Aeromonas caviae ME-1の高分子型キシラナーゼ
(XynE) に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 柳, 陳堅 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2672

氏名(本国籍)	柳 陳 堅 (中華人民共和国)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第331号
学位授与年月日	平成16年3月15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 の高分子型キシラナーゼ (XynE) に関する研究
審査委員会	主査 岐阜大学 教授 河合 啓 一 副査 岐阜大学 助教授 鈴木 徹 副査 静岡大学 教授 田原 康 孝 副査 信州大学 助教授 橋本 博 之

論 文 の 内 容 の 要 旨

キシラナーゼ高生産菌 *A. caviae* ME-1 が生産する多様なキシラナーゼをコードしている遺伝子を解析するために、*A. caviae* ME-1 の λ ファージゲノムライブラリーが構築され、エクスペリメンタルスクリーニング法によりキシラナーゼ陽性ファージが得られ、発現したキシラナーゼの分子種及びそれらの分子量から5つにグルーピングされた。

本論文は、これらのファージグループのうち、110kDa、84kDa、72kDa、及び66kDaの4種のキシラナーゼを発現した組換えファージグループEに着目し、110kDaの高分子型キシラナーゼの遺伝子解析を行うとともに、72kDa及び66kDaのキシラナーゼの生成プロセスと菌体外への分泌機構について検討を加えたものである。

ファージグループEに挿入されている約12kbのDNA断片の *EcoRI* 消化物を pUC18 に組み込み *Escherichia coli* MC4100 に導入し、キシラナーゼ陽性形質転換体を得た。この形質転換体が約6.3kbのDNA断片が組み込まれたプラスミド (pXEE65 と命名) を保有していること並びにこのDNA断片に2,823 bp からなるオープンリーディングフレーム (ORF) が存在していることを認めた。そして、このORFが941アミノ酸からなる分子量104,153の蛋白質をコードしていることを推定、この分子量が λ ファージグループEが発現したキシラナーゼのうち分子量の最も大きい110kDaのキシラナーゼとほぼ一致していることを指摘した。またサザンハイブリダイゼーションにより、pXEE65の挿入DNA断片が *A. caviae* ME-1由来であることを確認している。さらに、この形質転換体 *E. coli* 4100/pXEE65の無細胞抽出液には110kDa、84kDa、72kDa及び66kDaの4種のキシラナーゼが、培養上清中には72kDa及び66kDaの2種のキシラナーゼが存在していることを明らかにした。次に、pXEE65をサブクローニング

した結果、このORFを含む約3.0kbのDNA断片を挿入したプラスミド (pXED30) を保有している *E. coli* 形質転換体が無細胞抽出液に110kDa、84kDa、72kDa及び66kDaの4種のキシラナーゼを、培養上清に72kDa及び66kDaの2種のキシラナーゼを生産していることを認め、本ORFが110kDaのキシラナーゼをコードしていること並びに84kDa、72kDa及び66kDaの3種のキシラナーゼが110kDaキシラナーゼからのプロセシング産物である可能性を示した。この110kDaキシラナーゼ遺伝子を *xynE* 及びその産物を XynE とそれぞれ命名した。ホモロジー検索及び構造的特徴から、このXynEはファミリー10キシラナーゼに属することを示した。また、*A. caviae* ME-1の培養上清中にも72kDa及び66kDaのキシラナーゼが生産されていることが認められていることから、同様のプロセシングが作動している可能性が高いことを指摘した。

次に、培養上清中の66kDaキシラナーゼの構造と分泌生成機構について検討した。66kDaキシラナーゼを電気泳動的に単一にまで精製し、その精密分子量をMALDI-TOF MSで求めたところ、60,154.50Daと算出されたことからこの66kDaキシラナーゼをXynE₆₀と命名した。XynE₆₀のN-末端アミノ酸配列及び精密分子量から、XynE₆₀はXynEのN-末端のシグナルペプチドがシグナルペプチダーゼIによりコア切断サイトであるGly₂₆-Gly₂₇で切断されたN-末端を有していること及びC-末端のアミノ酸がThr₅₆₅であることを推定した。これらの結果から、XynE₆₀は細胞内で生成したXynEのN-末端シグナルペプチドが細胞内膜を透過する際にシグナルペプチダーゼIにより切断され、次いで細胞外膜透過時にC-末端領域がプロセシングを受け培養液中に分泌されているものと推定した。また、精製XynE₆₀の諸性質を検討し、典型的なエンド型のβ-1,4-キシラナーゼであることを明らかにした。次に、培養上清中の72kDaキシラナーゼの構造と分泌生成機構について検討した。SDS-PAGE後のゲルから72kDaキシラナーゼを切り出す操作を繰り返すことにより72kDaキシラナーゼの単一標品を調製し、N-末端アミノ酸配列を決定した。その結果、XynE₆₀のN-末端アミノ酸配列とまったく同様の配列であることを明らかにし、72kDaキシラナーゼもXynEのN-末端領域のGly₂₆-Gly₂₇サイトで切断されたN-末端アミノ酸配列を有していることを明らかにした。一方、C-末端については精密分子量の測定が不能であったため、そのアミノ酸残基を推定することはできなかった。OmpT欠損株では72kDaキシラナーゼは培養上清中に分泌されなかったことから、72kDaキシラナーゼは細胞外膜にあるOmpT的作用によりC-末端側が切断を受けることにより培養液中に分泌されるものと推定した。一方、XynE₆₀はOmpT欠損株においても培養液中に分泌されていることから、XynE₆₀はOmpT非依存性の膜透過機構により分泌されているものと推定した。

審 査 結 果 の 要 旨

平成16年1月23日14時35分より、審査委員全員の出席のもとに公開論文発表会が開催され約30分間の発表と約30分間の質疑応答が行われた。審査委員等からの質問に対する応答に一部理解不足のところが見受けられたものの、概ね適切に答えた。

本論文は、キシラナーゼ高生産菌 *Aeromonas caviae* ME-1のλファージゲノムライブラリーのうち、λ-ファージグループEが発現した高分子型の110kDaのキシラナーゼ (XynE) に着

目し、その遺伝子解析を行うとともに、72kDa及び66kDaの2種のキシラナーゼの生成プロセスと菌体外への分泌機構について検討し、以下に示す研究成果を得ている。

(1)110kDaキシラナーゼ遺伝子のクローニングと遺伝子解析：ファージグループEに挿入されたDNA断片(約12kbp)をEcoRI処理しpUC18に組み込み、*E. coli* MC4100に導入、キシラナーゼ陽性形質転換株を得た。この陽性株が約6.3kbpのDNA断が組み込まれたプラスミド(pXEE65)を保有していること及びこの断片に2,823bpからなるオープンリーディング(ORF)を認め、941アミノ酸からなる分子量104,153の蛋白質をコードしていることを推定し、この分子量がXynE(110kDa)とほぼ一致していることを指摘した。サザンハイブリダイゼーションにより挿入断片が*A. caviae* ME-1由来であることを確認した。次に、このORFを含む約3kb断片をpUC18に組み込んだプラスミド(pXED30)を保有している*E. coli* MC4100/pXED30が無細胞抽出液中に4種のキシラナーゼを、培養上清に2種のキシラナーゼを生産していることを認め、このORFが110kDaキシラナーゼ(XynE)をコードしていること並びに84kDa、74kDa及び66kDaの3種のキシラナーゼがXynEからのプロセシング産物であることを指摘した。ホモロジー検索及び構造的特徴からXynEがファミリー10に属することを明らかにした。なお、*A. caviae* ME-1も培養上清に72kDa及び66kDaのキシラナーゼを生産していることから、本菌も同様のプロセシングが起こっているものと推定した。

(2)66kDaキシラナーゼの構造及び分泌：*E. coli* MC4100/pXED30の培養上清より高度に精製した66kDaキシラナーゼの精密分子量をMALDI-TOF MSにて求めたところ、60,154.50と算出されたので、本キシラナーゼをXynE₆₀と命名した。XynEの全アミノ酸配列、XynE₆₀のN-末端アミノ酸配列及び精密分子量より、XynE₆₀はXynEのGly₂₆-Gly₂₇サイトで切断されたN-末端を有していること、またC-末端アミノ酸をThr₅₆₅と推定した。以上の結果から、XynE₆₀は細胞内で発現したXynEのN-末端領域のシグナルペプチドが細胞内膜通過時にシグナルペプチダーゼIにより切断され、次いで細胞外膜通過時にC-末端領域が切断され培養液中に分泌されているものと推定した。XynE₆₀が典型的なエンド型β-1,4-キシラナーゼであることを示した。

(3)72kDaキシラナーゼの構造と分泌：72kDaキシラナーゼを単一にまで精製し、N-末端アミノ酸配列を決定した。その結果、XynE₆₀とまったく同じ配列であることを認め、同様の機構で切断されていることを明らかにした。一方、精密分子量の測定が不能であったため、C-末端のアミノ酸を推定するには至っていない。OmpT欠損*E. coli*変異株を用いた実験結果から、72kDaキシラナーゼは外膜中のOmpTにより、分泌されることを明らかにした。一方、XynE₆₀はOmpT非依存性の膜透過機構により分泌されているものと推定した。

以上、本論文は、*A. caviae* ME-1の高分子型として発現した110kDaキシラナーゼ(XynE)が細胞膜透過時にプロセシングを受けて66kDa及び77kDaのキシラナーゼを分泌生産することを実証したもので、*A. caviae* ME-1が生産するキシラナーゼの多様性の一端を明らかにしたものとして、その研究内容は学術的価値は高く、また未利用バイオマス資源としてのキシランの有効利用に対する技術開発にも貴重な情報を提供したのものとして高く評価された。

審査委員会において、本論文の構成や内容について慎重に審議した結果、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値のあるものと判定した。

[基礎となる学術論文]

1. C. Liu, T. Suzuki, S. Hirata, and K. Kawai: The processing of high-molecular-weight xylanase (XynE, 110 kDa) from *Aeromonas caviae* ME-1 to 60-kDa xylanase (XynE₆₀) in *Escherichia coli* and purification and characterization of XynE₆₀.
J. Biosci. Bioeng., Vol. 95, No. 1, pp. 95-101 (2003).
2. C. Liu, T. Suzuki, S. Hirata, and K. Kawai: Processing of XynE (110-kDa) of *Aeromonas caviae* ME-1 to 72-kDa xylanase in *Escherichia coli* transformant.
J. Biosci. Bioeng., Vol. 96, No. 4, pp. 406-408 (2003).