

1pD15-5 Paecilomyces の生産する新規 beta-1,3- マンナーゼ大量発現系の構築○中嶋 弘康¹, 和田千代子², 杉野 浩幸², 藤井 隆夫²
(¹ 崇城大・工・応微工, ² 崇城大・応生命)

<目的> 赤色酵母の *Rhodotorula* 菌は特殊な細胞壁構造を持ち、市販の溶菌酵素では溶菌できないことがわかっている。このため、*Rhodotorula* 菌の遺伝学解析等が遅れている。しかし、村尾らによって、カビの一種である *Paecilomyces lilacinus* が、この細胞壁の β -1,3- マンノシド結合を切断する新規の β -1,3- マンナーゼ (MAN5C) を産生することが報告されている。我々は、この酵素をコードする mRNA から調製した cDNA (MAN5C) をすでにクローニングし、報告した。本研究では、本 cDNA を大腸菌で発現させ、MAN5C の大量調製法を確立することを目的とした。

<方法と結果> MAN5C 大量発現系は宿主大腸菌、BL21 と発現プラスミド、pET28a を用いて構築した。この系において発現タンパク質は不溶性の封入体となり酵素活性を持たなかった。そこで、塩酸グアニジンで可溶化後、人工シャペロン (β -シクロデキストリン) を用いてタンパク質の立体構造を正常に巻き戻すリフォールディングを試みた。再構成における最適条件を検討したところ、150ml の培養スケールで 10mg の活性型の MAN5C を得ることに成功した。現在、さらにスケールアップを行うと同時に、各種酵素学的性質についても調べている。

High level expression of a novel beta-1,3-mannanase from *Paecilomyces lilacinus* in *Escherichia coli*○Hiroyasu NAKAJIMA¹, Chiyoko WADA², Hiroyuki SUGINO², Takao FUJII²
(¹Dept. Appl. Microb. Technol., Fac. Eng., Sojo Univ., ²Fac. Appl. Life Sci., Sojo Univ.)**Key words** beta-1,3-mannanase, *Paecilomyces lilacinus*, High level expression, Refolding**1pD16-2 *Alteromonas (Cellvibrio) sp. E-1* 由来の成熟型 β -アガラーゼをコードする遺伝子 (*aga1-m*) の大腸菌における発現**○高橋 啓, 石井 義孝, 木野 邦器, 桐村光太郎
(早大・理工・応化)

【目的】 演者らは、*Alteromonas (Cellvibrio) sp. E-1* に新規な菌体内 β -アガラーゼ (AgaI) を見出し、アガロースから選択的にネオアガロビオースを生産可能なことを確認した¹⁾。既に当該酵素をコードする遺伝子 (*aga1*) の全長を大腸菌内で発現させることに成功しているが²⁾、本研究では成熟型の β -アガラーゼをコードしている領域 (*aga1-m*) を大腸菌内で高発現させ、組換え酵素の機能について検討した。

【方法および結果】 遺伝子 *aga1* より推定されるアミノ酸配列は、*Alteromonas sp. E-1* から精製した AgaI より N 末端側が 30 アミノ酸残基分長いものであった。そこで、成熟型酵素としての AgaI に相当する遺伝子 *aga1-m* を PCR を利用してクローニングし、高発現ベクター pET21-a(+) に挿入したプラスミド pEAGAI-M を作成した。pEAGAI-M を保持する *Escherichia coli* BL21 (DE3) の無細胞抽出液のネオアガロビオース生産活性は 25.1 U/mg であり、*aga1* を pET21-a(+) に挿入したプラスミド pEAGAI を保持した大腸菌の 22.4 倍、原株 E-1 の 395 倍に達した。また、組換え AgaI-M によるアガロースからのネオアガロビオース生産を確認した。

1) K. Kirimura et al., J. Biosci. Bioeng., 87, 436-441(1999).
2) 高橋ら、日本生物工学会 2003 年度大会講演要旨集、p.56.**Expression of the *aga1-m* gene encoding a mature beta-agarase of *Alteromonas (Cellvibrio) sp. E-1***○Kei TAKAHASHI, Yoshitaka ISHII, Kuniki KINO, Kohtaro KIRIMURA
(Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Eng., Waseda Univ.)**Key words** agar, beta-agarase, *Alteromonas*, neoagarbiose**1pD16-1 *Penicillium chrysogenum* の生産するエキソアラビナーゼによるアラビノビオース転移活性**○阪本 龍司¹, 居原 秀², 藤田 智之¹, 川崎 東彦¹
(¹ 阪府大院・農生命・応生化, ² 阪府大・総科)

(目的) *P. chrysogenum* 31B 株の生産するエキソアラビナーゼ (Abnx) は α -1,5-L- アラビナンを非還元末端よりビオース単位で切断する酵素である¹⁾。本酵素遺伝子の解析結果より、Abnx は既報のアラビナン分解酵素とは構造的に全く類似性がないことを明らかにしている²⁾。本研究では Abnx の詳細な酵素学的性質を検討した。

(方法と結果) 本研究では大腸菌で発現させた組換え型 Abnx を用い、また反応生成物の定量は高性能陰イオン交換クロマトグラフィーにより行った。重合度 (DP) 3-7 のアラビノオリゴ糖に対する特異性を調べた結果、本酵素は DP6 に最大活性を示し、DP3 に対しては微弱であった。DP7 を基質として、酵素反応産物の経時変化を分析することにより、本酵素が "multi-chain attack mode" で基質に作用することを明らかにした。種々のアルコール、糖の存在下で直鎖型アラビナンに Abnx を作用させると、本酵素はアクセプター特異性はあるものの殆どの化合物に対してアラビノビオース転移能を有した。グリセリンに対して最大の転移活性を示したことから、その主要転移産物を単離し、その構造を NMR により O- α -L-arabinosyl-(1->5)-O- α -L-arabinosyl-(1->1)-glycerol と決定した³⁾。

1) Sakamoto, Thibault (2001) Appl Environ Microbiol 67:3319. 2) Sakamoto et al. (2004) FEBS Lett 560:199. 3) Sakamoto et al. BBA-Gen Sub/ in press.

Transglycosylation catalyzed by a *Penicillium chrysogenum* exo-arabinanase○Tatsuji SAKAMOTO¹, Hideshi IHARA², Tomoyuki FUJITA¹, Haruhiko KAWASAKI¹
(¹Dept. Appl. Biol. Chem., Osaka Pref. Univ., ²Dept. Earth Life Sci., Osaka Pref. Univ.)**Key words** *Penicillium chrysogenum*, exo-arabinanase, arabinobiose, transglycosylation**1pD16-3 *Paenibacillus fukuinensis* IK-5 キトサナーゼ遺伝子に見出されたキトサン結合ドメイン**金井 元¹, 木元 久², 草桶 秀夫¹
(¹ 福井工大・工・環境生命, ² 福井大学・医・生化学 I)

【目的】 我々は土壌細菌から分離した *Paenibacillus fukuinensis* 由来のキトサナーゼ遺伝子の構造と機能との関係を明らかにしてきた。その結果、キトサナーゼ遺伝子は、797 個のアミノ酸残基からなる推定分子量 85610 をコードする 2391bp のオープンリーディングフレームで構成されていた。また、キトサナーゼ遺伝子は、N 末端領域にはファミリー 8 糖質分解酵素ドメインおよび C 末端領域にはディスコイジンドメインをもつファミリー 8 グルカナーゼであった。本研究では、キトサナーゼ遺伝子中のディスコイジンドメインのキトサンに対する結合能について検討した。

【方法と結果】 390bp と 393bp の 2 つのディスコイジンドメインは GST(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ) 融合タンパク質をコードするプラスミド pGEX4T-1 に連結し、*E. coli* BL-21 によって形質転換した。次に BL-21 によって産生されたディスコイジンタンパク質をアフィニティーカラムにより精製した。その結果、キトサンは N 末端側の 390bp からなるディスコイジンドメインから得られる 40kDa の融合タンパク質に 80% 以上吸着した。このことは、ディスコイジンドメインがキトサンとの結合に関与していることが示唆された。

Chitosan binding domain found in a chitosanase gene from *Paenibacillus fukuinensis* IK-5Hajime KANAI¹, Hisashi KIMOTO², ○Hideo KUSAOKE²
(¹Dept. Appl. Phys. Chem, Fukui Inst. Technol., ²Dept. Biochem. I Fukui Univ.)**Key words** chitosanase, chitosan binding domain, discoidin domain, chitosanase gene