

## 2Da14 アルギン酸リアーゼ vAL-1(S) は反応 pH により異なる作用様式 (エンド / エキソ型) を示す

○小倉 康平<sup>1</sup>, 山崎 正幸<sup>2</sup>, 橋爪 貴也<sup>3</sup>, 山田 隆<sup>3</sup>, 三上 文三<sup>2</sup>, 橋本 渉<sup>1</sup>, 村田 幸作<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>京大院・農・食品生物, <sup>2</sup>京大院・農・応用生命, <sup>3</sup>広島大院・先端・生命機能)

【背景と目的】クロレウイルス由来vAL-1はクロレ細胞壁構成糖中のグルクロン酸を認識し、β-脱離反応によりグリコシド結合を切断する。vAL-1は、N末端側11kDaの細胞壁吸着ドメインとC末端側26kDaの触媒ドメインから成る。C末端触媒ドメイン(vAL-1(S))は、細胞壁分解活性を失うが、アルギン酸リアーゼ活性を示す。本研究は、アルギン酸リアーゼvAL-1(S)の構造・機能相関を解析した。【方法と結果】pH 7においてvAL-1(S)は、反応開始直後に種々の鎖長のアルギン酸不飽和オリゴ糖を産生した。一方、pH 10では反応時間に拘わらずアルギン酸から不飽和糖のみを遊離した。従って、本酵素は反応 pH により異なる作用様式 (pH 7, エンド型; pH 10, エキソ型) を示すことが明らかになった。この特異な作用様式に関わる構造要因を解析するため、pH 7におけるvAL-1(S)とグルクロン酸との複合体の立体構造を決定した。βサンドイッチ構造を基本骨格とするvAL-1(S)は、活性部位における分子表面には塩基性残基を配置し、酸性多糖との結合を容易にすることが考えられた。シミュレーションにより示されたpH 7とpH 10における活性部位の荷電変化が、作用様式の決定に関与することが示唆された。尚、本研究は生研センタープロジェクトの一環として行われた。

## Alginate lyase vAL-1(S) shows different modes of action (endo/exo-type) in neutral and alkaline pH.

○Kohei OGURA<sup>1</sup>, Masayuki YAMASAKI<sup>2</sup>, Takaya HASHIDUME<sup>3</sup>, Takashi YAMADA<sup>3</sup>, Bunzo MIKAMI<sup>2</sup>, Wataru HASHIMOTO<sup>1</sup>, Kousaku MURATA<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Div. Food Sci. Biotech., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., <sup>2</sup>Div. Appl. Lif. Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., <sup>3</sup>Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

**Key words** alginate lyase, endo/exo, X-ray crystallography

## 2Dp01 無細胞蛋白質合成系を用いたセルラーゼの進化分子工学

○菅原 知宏, 松田 英樹, 児島 孝明, 中野 秀雄  
(名大院・生命農・生命技術)

【目的】セルロース系バイオマス資源は、その存在量が極めて多く、持続的で再生可能な資源である。木質バイオマス中のセルロースは結晶領域と非結晶領域から構成されており、特に結晶領域では、複数のセルロース鎖が水素結合によって強固に束ねられている。このようなセルロースの複雑な構造は、セルラーゼによる酵素糖化にとって大きな障害となっている。既存のセルラーゼが有するセルロース分解活性では、産業的な利用に十分であるとは言えないため、セルロースをより効率良く糖化するセルラーゼが必要とされている。そこで本研究では、無細胞蛋白質合成系を用いたハイブリッドなセルラーゼ変異体の合成及び酵素活性の評価を行った。【実験方法及び結果】糸状菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来のセロビオドロラーゼ (CBH) のホモロジーモデルから、セルロース鎖と相互作用すると予測されるアミノ酸24残基に対して、オーバーラップPCRにより部位特異的変異を導入した。これを鋳型DNAとして、無細胞蛋白質合成系を用いてセルラーゼ変異体を発現し、酵素活性を測定した。アラニンスキャンニング及び飽和変異導入により得られた各種クローンの解析の結果、野生型CBHに対して最大で酵素活性が約3倍向上したセルラーゼ変異体を獲得することに成功した。

## Directed evolution of cellulase with cell-free protein synthesis

○Tomohiro SUGAHARA, Hideki MATSUDA, Takaaki KOJIMA, Hideo NAKANO  
(Dept. Bioeng., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

**Key words** cellulase, cell-free protein synthesis, in vitro alanine scanning, in vitro saturation mutagenesis

## 2Da15 真菌 *Aureobasidium pullulans* が産生する β-キシロシダーゼをコードする遺伝子のクローニング

○藤本 仁寿, 藤井 信哉, 脇山 元氣, 太田 一良  
(宮崎大・農・応生科)

【目的】β-キシロシダーゼ (EC 3.2.37) は、キシラナーゼと共に未利用バイオマス資源としてのキシランへの応用が期待されている。既に真菌 *A. pullulans* ATCC20524 株から2種のキシラナーゼ遺伝子をクローニングした。本報では同菌株のキシラン分解酵素系について考察するため、β-キシロシダーゼを精製し、コードする遺伝子を明らかにした。【方法および結果】カラス麦製キシランを炭素源とした *A. pullulans* の菌体から細胞破砕液を調製し、各種クロマトグラフィーを用いて分子量88.5 kDaのβ-キシロシダーゼを電気泳動的に単一に精製した。精製酵素のN末端、およびV8プロテアーゼ処理により得られたペプチド断片について決定したアミノ酸配列とGH family 3に属するβ-キシロシダーゼの保存領域を基に縮重プライマーを作製し、染色体DNAを鋳型としてPCRを行った。DIG標識した700 bpの増幅断片をプローブとして、サザン・ハイブリダイゼーションを行った結果、β-キシロシダーゼ遺伝子 *xyII* は同菌株の染色体上に1コピー存在する事が示唆された。クローニングした5.5 kbpの *EcoRI-XbaI* 断片を用いて、*xyII* の完全長ORFと周辺の塩基配列を決定した。20アミノ酸残基の分泌シグナルと785アミノ酸残基の成熟酵素 (推定分子量 84993 Da) の *XylII* には16箇所のN型糖鎖付加のためのコンセンサス配列が認められた。*xyII* のORFは2415 bpから成り、2箇所でイントロンを含むことを特徴とした。なお、本研究は文部科学省特別教育研究経費研究推進事業の一環として行われたものである。

## Purification and characterization of β-xylosidase from *Aureobasidium pullulans* ATCC20524 and molecular cloning of the encoding gene

○Hirohisa Fujimoto, Shinya Fujii, Motoki Wakiyama, Kazuyoshi Ohta  
(Dept. Biochem. Appl. Biosci., Miyazaki Univ.)

**Key words** beta-xylosidase, *Aureobasidium pullulans*

## 2Dp02 *Bacillus licheniformis* SVD1 株のキシラナーゼ / セルラーゼ酵素複合体の特性

○立野 諭<sup>1</sup>, 栗冠 真紀子<sup>1</sup>, 木村 哲哉<sup>1</sup>, 栗冠 和郎<sup>1</sup>, バンディック スーザン<sup>2</sup>, プレストチェック プレット<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>三重大院・生資,<sup>2</sup>ローズ大)

【目的】植物の細胞壁の主要構成成分であるセルロースやヘミセルロースを分解する酵素を含むセルロゾームの研究は嫌気性菌である *Clostridium* 属細菌でよく行われている。好気性菌である *Bacillus licheniformis* において多くのセルラーゼやヘミセルラーゼが今までに見つかっている。しかし、*Bacillus* 属がセルロゾームのような酵素複合体を作っているという報告は少ない。本研究では、南アフリカで分離された *B. licheniformis* SVD1 株を様々な基質で培養したときに見られるセルロース分解系酵素について報告する。

【方法と結果】*B. licheniformis* SVD1 株をアビセル、セロビオース、パーチウッドキシラン、バガスおよびイナゴ豆ガムを基質としてそれぞれ培養し、培養上清をSephacrose 4Bカラムで分画した。約2,000kDaの画分を用いて、パーチウッドキシランおよびカルボキシメチルセルロース (CMC) に対する活性をザイモグラムにより分析し、粗酵素液と比較した。その結果、約2,000kDaの溶出画分には、複数のタンパク質が含まれておりこれらが酵素複合体を構成している可能性が示された。酵素複合体では21および45kDaのタンパク質がキシラナーゼ活性を示し、また、25および30kDaのタンパク質がセルラーゼ活性を示した。このことから、酵素複合体には少なくとも2種のキシラナーゼと2種のセルラーゼが含まれると推定された。

## Analysis of Xylanolytic and Cellulolytic Multienzyme Complex of *Bacillus licheniformis* SVD1

○Satoshi Tachino<sup>1</sup>, Makiko Sakka<sup>1</sup>, Tetsuya Kimura<sup>1</sup>, Kazuo Sakka<sup>1</sup>, J Susan van Dyk<sup>2</sup>, Brett I Pletschke<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Bioresources, Mie Univ., <sup>2</sup>Rhodes Univ)

**Key words** *Bacillus licheniformis*, xylanase, cellulase, multienzyme complex