

【緒言】キシランを分解して得られるキシロオリゴ糖に様々な生理活性が報告されている。また、キシランの構成単糖であるキシロースはキシリトールの原料として用いられており、キシランの分解に関わる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が、*Cellvibrio* 属細菌のキシラン分解酵素に関する論文はほとんど報告されていない。一方、本研究室で単離した *Cellvibrio* sp. 0A-2007 の全ゲノムを解析した結果、ゲノム中に幾つかのキシラン分解酵素遺伝子を見出し、これまでに本菌株のキシラナーゼ遺伝子のクローニングに成功している。そこで本研究では、キシランの完全資源化を目的に、*Cellvibrio* sp. 0A-2007 のキシラン分解酵素遺伝子の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。

【実験方法】他の *Cellvibrio* 属細菌のキシラナーゼ遺伝子と相同性を示す配列を *Cellvibrio* sp. 0A-2007 のゲノム中より遺伝子解析ツールを使用し探索した。また、本研究室ではこれまで *Cellvibrio* sp. 0A-2007 の生産する β -キシロシダーゼの部分精製に成功しており、報告されている他の *Cellvibrio* 属細菌のキシロシダーゼの中で推定分子量の近い β -キシロシダーゼ遺伝子と *Cellvibrio* sp. 0A-2007 のゲノム中の塩基配列との比較を、遺伝子解析ツールを用い行った。その結果、*Cellvibrio* sp. 0A-2007 のゲノム上にキシロシダーゼ遺伝子と思われる幾つかの候補を見出した。相同性を持つキシラン分解酵素遺伝子をプラスミドベクター pUC19 に連結後、大腸菌に導入した。組み換え菌を培養・超音波破壊処理し、粗酵素を回収した。

組み換えキシラナーゼ及びキシロシダーゼのキシラン及びキシロオリゴ糖の分解機構及び動力学的パラメーターを調べる為、回収した粗酵素と市販のキシラン(東京化成工業株式会社)・キシロオリゴ糖{キシロビオース(東京化成工業株式会社)、1,4- β -D-キシロトリオース(Megazyme)キシロテトラオース(Megazyme)}を所定の濃度で混合、所定の温度・時間で分解した。反応停止後、分解産物を HPLC・TLC により分析した。

【結果】*Cellvibrio japonicus* と高い相同性を示した *Cellvibrio* sp. 0A-2007 のキシラナーゼ遺伝子をクローニングした大腸菌の粗酵素液は、キシランを分解しキシロオリゴ糖を生産したことからクローニングされた遺伝子がキシラナーゼ遺伝子であることが分かった。

また、*Cellvibrio japonicus* の β -キシロシダーゼ遺伝子と高い相同性を示す *Cellvibrio* sp. 0A-2007 の推定分子量 40920 の β -キシロシダーゼ遺伝子をクローニングした大腸菌の粗酵素液は、キシロオリゴ糖を分解しキシロースを生産した。 β -1,4 結合を切断されると黄色に発色する人工基質 pNPX(4-ニトロフェニル β -D-キシロピラノシド)が分解され、発色したことから、キシロシダーゼ遺伝子のクローニングにも成功した。組み換え β -キシロシダーゼのキシロビオースに対する K_m 値は 26.2mM であり、キシロトリオースに対する K_m 値は 2.1mM であった。キシロシダーゼの各キシロオリゴ糖に関する反応速度を比較したところ、キシロオリゴ糖が長鎖になるほど β -キシロシダーゼの活性が高くなった。