



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | バチルス・プミルスのキシラン分解酵素遺伝子のクローニング                                                                                                                    |
| Author(s)    | Watanalai, Panbangred                                                                                                                           |
| Citation     | 大阪大学, 1984, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/33895">https://hdl.handle.net/11094/33895</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|         |                                                                |
|---------|----------------------------------------------------------------|
| 氏名・（本籍） | ワタナライ パンバングレツト<br>Watanalai Panbangred                         |
| 学位の種類   | 工 学 博 士                                                        |
| 学位記番号   | 第 6 4 4 4 号                                                    |
| 学位授与の日付 | 昭 和 59 年 3 月 24 日                                              |
| 学位授与の要件 | 工学研究科 醗酵工学専攻<br>学位規則第 5 条第 1 項該当                               |
| 学位論文題目  | バチルス・プミルスのキシラン分解酵素遺伝子のクローニング                                   |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教 授 岡田 弘輔<br>教 授 芝崎 勲 教 授 合葉 修一 教 授 大嶋 泰治<br>教 授 田口 久治 |

### 論 文 内 容 の 要 旨

キシランは稲わら、バガス、木材など自然界に多量に存在する多糖であり、微生物分解により有用な醗酵原料であるキシロースへの転換が期待されている。本論文ではキシラン分解能の高い細菌をタイ国の土壌より分離し、キシラン分解に関与する酵素系を明らかにすると同時に分解能を更に高めるために、分解系遺伝子をクローン化し研究したものである。

第 1 章では、Bacillus pumilus と同定した分離菌の培養液からキシラナーゼ (EC 3.2.1.8 Endo - 1,4- $\beta$ -D-xylan xylanohydrolase) を精製し、その性質を明らかにしている。キシラナーゼは分子量 21,000 の単純たんぱく質で、キシランをキシロオリゴ糖に分解し、カラマツキシランに対する分解限度は 25% である。本酵素はキシロオリゴ糖に対して糖転移の反応をも行うことをキシロトリオーズ、キシロテトラオーズを用いて証明している。

第 2 章においては上記キシラナーゼおよび  $\beta$ -キシロシダーゼ (EC 3.2.1.37 Exo - 1,4- $\beta$ -D - xylosidase) 遺伝子を大腸菌にクローン化している。すなわち B. pumilus IPO の染色体 DNA の 7.7 Mdal Pst I 断片をベクタープラスミド pBR 322 の Pst I 部位に連結したハイブリッドプラスミド pOXN 29 で形質転換した大腸菌はキシラナーゼと  $\beta$ -キシロシダーゼを生産する。pOXN 29 から誘導したプラスミドの解析結果から両酵素の遺伝子座を決定している。クローン化された大腸菌の生産するキシラナーゼ、 $\beta$ -キシロシダーゼはともに免疫的に B. pumilus IPO の生産するそれぞれの酵素と同一であることを証明している。また pOXN 29 の染色体由来の DNA の挿入方向を逆にすると、 $\beta$ -キシロシダーゼ生産が 50 倍、キシラナーゼ生産は 5 倍に増加し、 $\beta$ -キシロシダーゼは DNA 供与株の 6 ~ 7 倍になっている。

第3章ではpOXN 29とは独立に得た *B. pumilus* の染色体DNA の2.6 Mdal の Bgl II断片をpBR 322の Bam HI部位に継ぎ込んだ合成プラスミド、pOXD 28上にも $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子が存在することを明らかにしている。pOXN 29上の $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子(xynB)とpOXD 28上のもの(xynC)とは遺伝子構造でも酵素的性質においても全く異なることを明らかにしxynCはキシラン代謝には関係しないと結論している。

以上の結果をもとに、キシラン分解酵素遺伝子の増巾、およびそれによる酵素生産の増加の可能性を指摘している。

## 論文の審査結果の要旨

本論文は農産廃資源の有効利用に必要なキシラン分解酵素の生産に対し、遺伝子工学の技術を駆使して育種の可能性を追求したものである。

第1章においてはクローン化の目的としたキシラナーゼを *B. pumilus* IPO から精製しその酵素蛋白質の性質を明らかにしたものである。本酵素はキシランからキシロオリゴ糖を生産するのみでなく、キシロオリゴ糖の糖転移反応をも触媒することを明らかにしているが、後者の活性は細菌キシラナーゼにおいては初めて証明されたものである。

第2章においてはキシラナーゼ、 $\beta$ -キシロシダーゼの *E. coli* へのクローン化を行っているが、キシラン分解酵素での最初の成功例である。*B. pumilus* IPO の染色体DNA の7.7 Mdal の断片をpBR 322に継ぎ込んだpOXN 29は *E. coli* 中でキシラナーゼ、 $\beta$ -キシロシダーゼをともに生産すること、生産された両酵素はDNA 供与菌 *B. pumilus* の生産する両酵素と免疫的に差のないこと、pOXN 29の異種DNA 部分が *B. pumilus* の染色体DNA とSouthern hybridization テストにより同一塩基配列を有することを証明し、*B. pumilus* 由来の遺伝子が *E. coli* 中で発現したものと結論している。またpOXN 29を改変することにより *E. coli* 中で *B. pumilus* IPO の6～7倍の $\beta$ -キシロシダーゼを生産させることに成功し、この方法が酵素生産性菌の育種に充分使用できることを示している。

第3章では *B. pumilus* の生産する2種の $\beta$ -キシロシダーゼ遺伝子を別々にクローン化し、DNA および酵素レベルで比較し両者が全く異なることを証明している。

以上の成果は、微生物による酵素生産の技術向上に貢献するのみでなく、微生物の分子遺伝学ならびに遺伝子工学の発展に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。