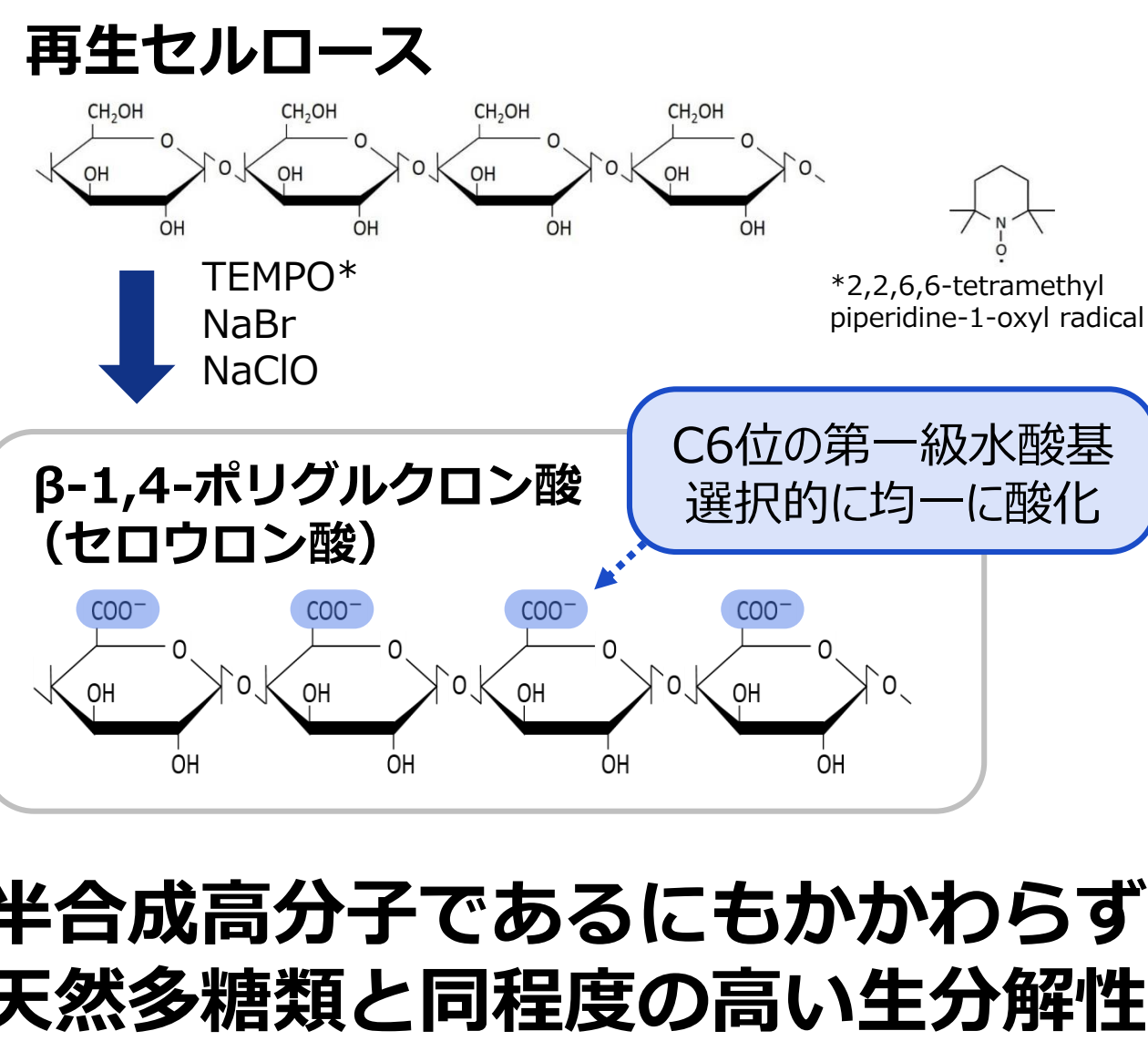


# Brevundimonas sp. SH203株由来 セロウロン酸分解酵素の遺伝子クローニング

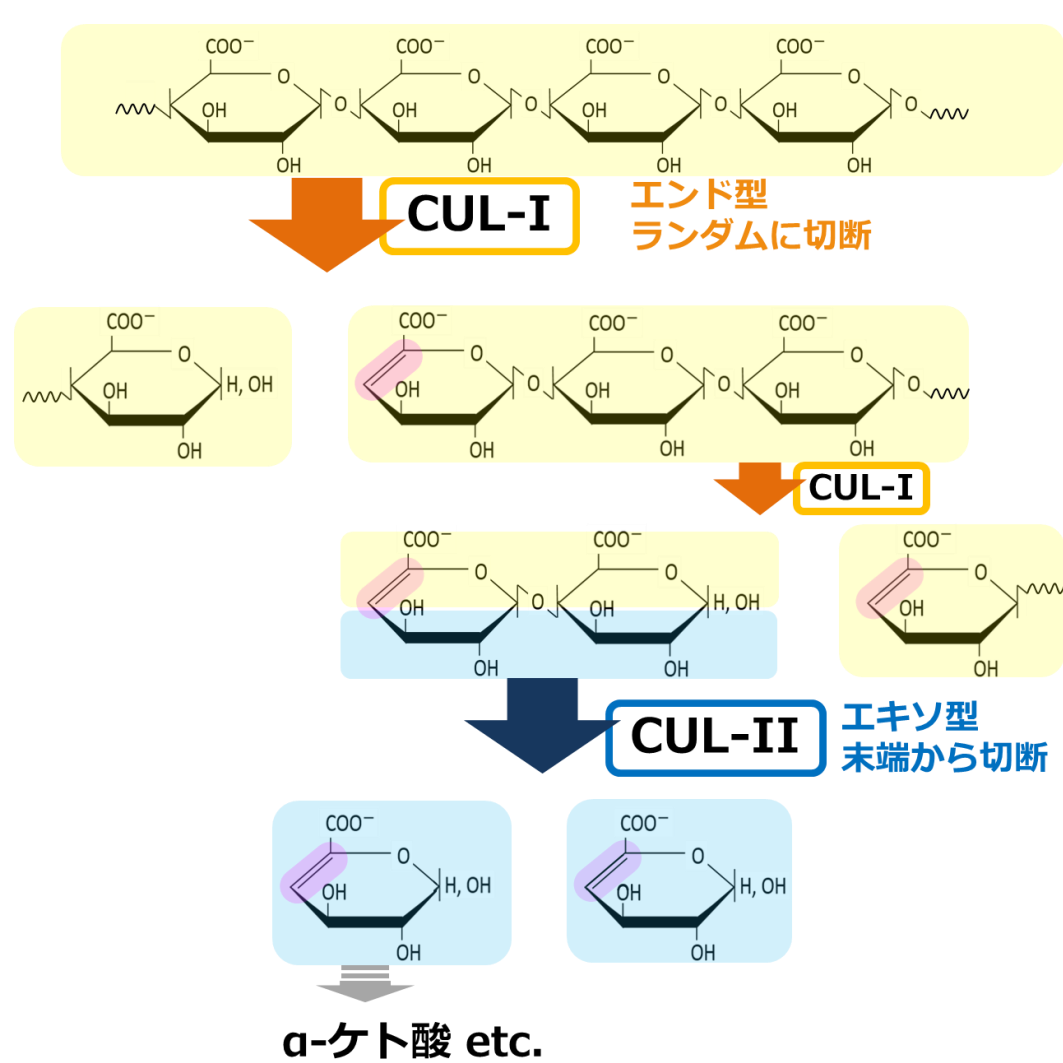
(宇大農) ○菊池雅子, 金野尚武, 羽生直人, (宇大バイオ) 藤井雄太, 児玉豊, 鈴木智大

## セロウロン酸



## セロウロン酸分解菌

### Brevundimonas sp. SH203株



- 土壌から単離・同定
  - グラム陰性, 好気性細菌
  - 分解モードの異なる2つのセロウロン酸リアーゼ (CUL)
  - β脱離反応によりグリコシド結合を切断
- CUL-IとCUL-IIを産生して 協調的に分解する

CUL-I

CUL-II

- 生化学的特性の解析
- 分解様式

Konno, N. et al., Carbohydr. Polym. 64 : 589-596, 2006, Konno, N. et al., Cellulose 15 : 453-463, 2008

- 遺伝子はクローニングされていない
- 構造情報に関して不明
- 天然におけるCULの産生理由や機能も不明

SH203株のゲノム解析  
分子生物学的アプローチ

目的

セロウロン酸分解酵素遺伝子のクローニング

## SH203株 ゲノム解析

DNA抽出

301×2 bpのペアエンドシーケンス (次世代シーケンサー (Miseq))

取得したリードのフィルタリング (Quality score < 15)

de novo アセンブル (SPAdes)

遺伝子抽出・アノテーション (Prokka)

### Assemble summary

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| Number of sequences     | 16        |
| Total bases             | 3,145,540 |
| Min sequence length     | 244       |
| Max sequence length     | 782,080   |
| Average sequence length | 196,596   |
| N50 length              | 497,772   |
| (A + T)s                | 32.42 %   |
| (G + C)s                | 67.58 %   |

### Prokkaによる抽出情報

|                      |       |
|----------------------|-------|
| タンパク質をコードする遺伝子 (CDS) | 2,961 |
| tRNA                 | 52    |

COGおよびPfamのドメイン情報に基づく  
アノテーションを行い, DDBJデータベースへ登録

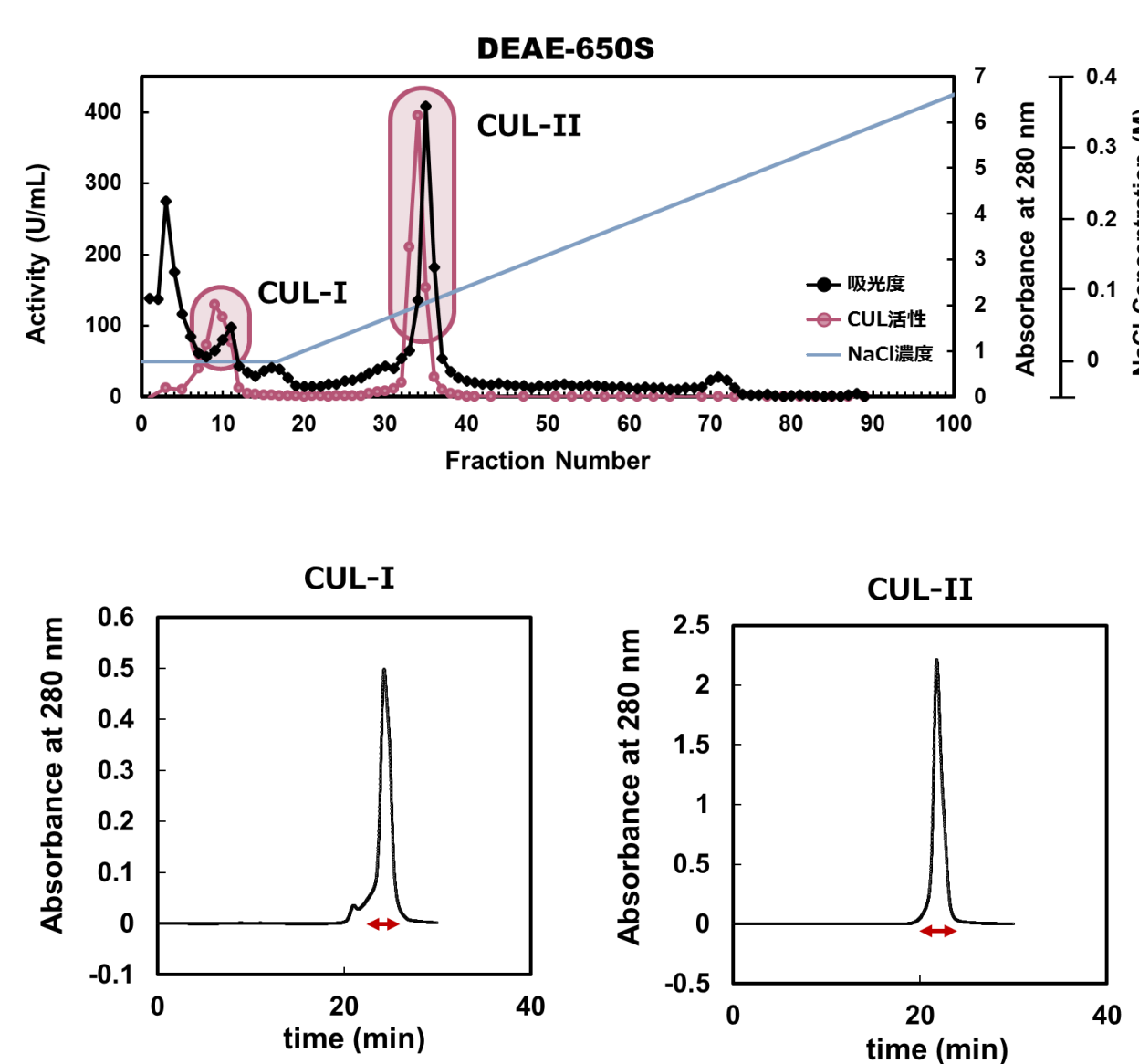
## CUL-I, CUL-IIの精製

### 培養

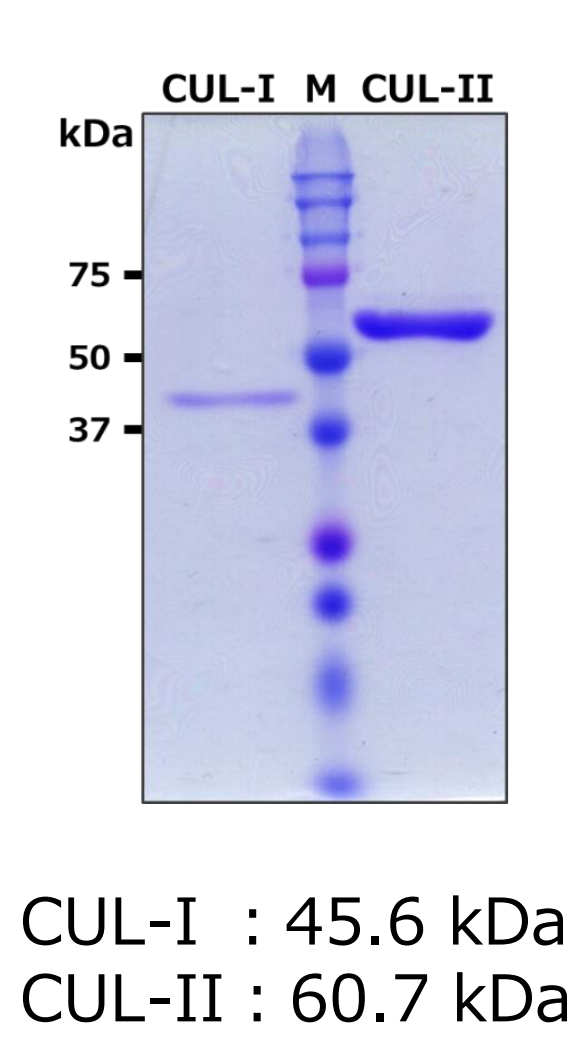
0.5% (w/v) セロウロン酸培地  
旋回培養 (30℃, 120 rpm, 4 days)

陰イオン交換クロマトグラフィー  
疎水クロマトグラフィー  
陰イオン交換クロマトグラフィー  
サイズ排除クロマトグラフィー

SuperQ-650M  
Phenyl-650M  
DEAE-650S  
TSKgel G3000SWXL



### SDS-PAGE結果



CUL-I : 45.6 kDa  
CUL-II : 60.7 kDa

## CUL-I アミノ酸配列

>hypothetical protein [Brevundimonas sp. SH203]

MKRLIPSLTALVAACAQAQAAQSAVVESSNAAPVCDGSAGYSAVFEGRRITFLWRPDWLSTIKVRLSADASLQPAWTLKDRADAALSRAPYTVVDKTMTPASGDKHDYMSMGPIYWPDRSKRDGLPYVRRDGGFNPERNTDAFDVVRLSAMSQDVQALALTG YFTGDPRIYAVKAGDMIRAWFLTPATRMNPNFNHGGQVPGRVSGRAEGVLDHRLMRVVEAAGLLSPTGALTSDENQALQDWFGDLVQWMAISPLGRQERAAENVHGLYYDILITHFALFAGMDDVAAVAERAKTRRLAAQIEPDGSLPKELTRTRSLHYTTWTLTAAFDLADAEARCVGVDLWNYRSDDGRLRGATDFVAAYAGRETEIRWPELNKAETEGIEYVLQRAAWSDPSYADKAALYAERNAGLSLNLRTPPYTR

下線: ペプチドMSフィンガープリンティングで同定されたアミノ酸配列  
斜体: アルギン酸リアーゼドメイン (E値: 2.6×10<sup>-80</sup>)

| アミノ酸残基数 | 推定分子量    | Coverage | シグナルペプチド (SignalP) |
|---------|----------|----------|--------------------|
| 426 aa  | 47080.83 | 81.0%    | 有 (21 aa)          |

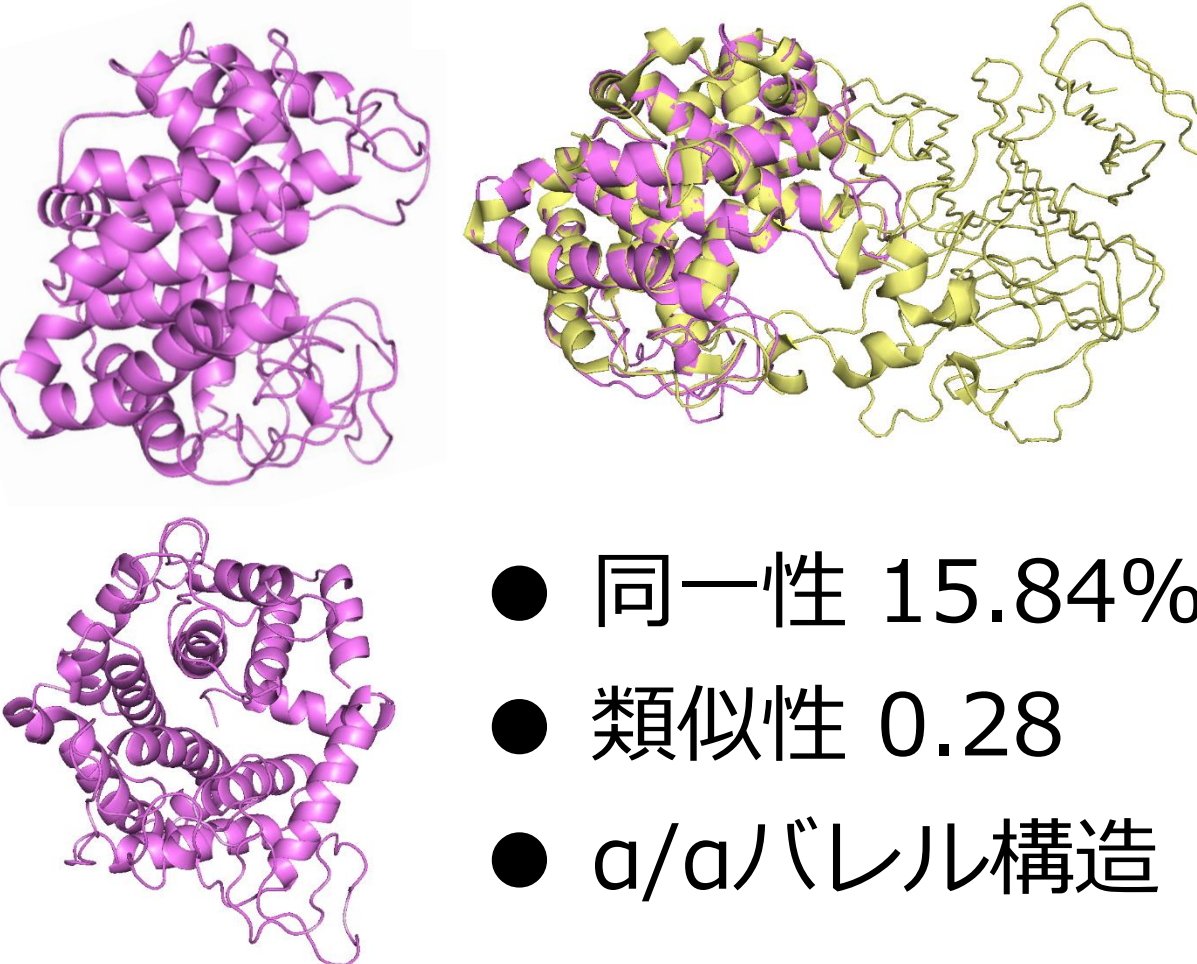
## 相同性検索 (Blastp,nrデータベース)

| タンパク質名         | 生物種                                   | E値                   |
|----------------|---------------------------------------|----------------------|
| alginate lyase | <i>Caulobacter henricii</i>           | 3×10 <sup>-139</sup> |
| alginate lyase | <i>Caulobacter</i> sp. UNC358MFTsu5.1 | 9×10 <sup>-138</sup> |
| alginate lyase | <i>Caulobacter</i> sp. OV484          | 3×10 <sup>-135</sup> |
| alginate lyase | <i>Caulobacter</i> sp. AP07           | 1×10 <sup>-134</sup> |
| alginate lyase | <i>Caulobacter</i> sp. Root1455       | 5×10 <sup>-134</sup> |
| alginate lyase | <i>Caulobacter</i> sp. Root487D2Y     | 1×10 <sup>-133</sup> |

生化学的には未解析のタンパク質  
CAZy (Carbohydrate Active enZymes) に未登録 ➡ 新規PLファミリー?

## 立体構造のホモロジーモデリング

(SWISS-MODEL使用)

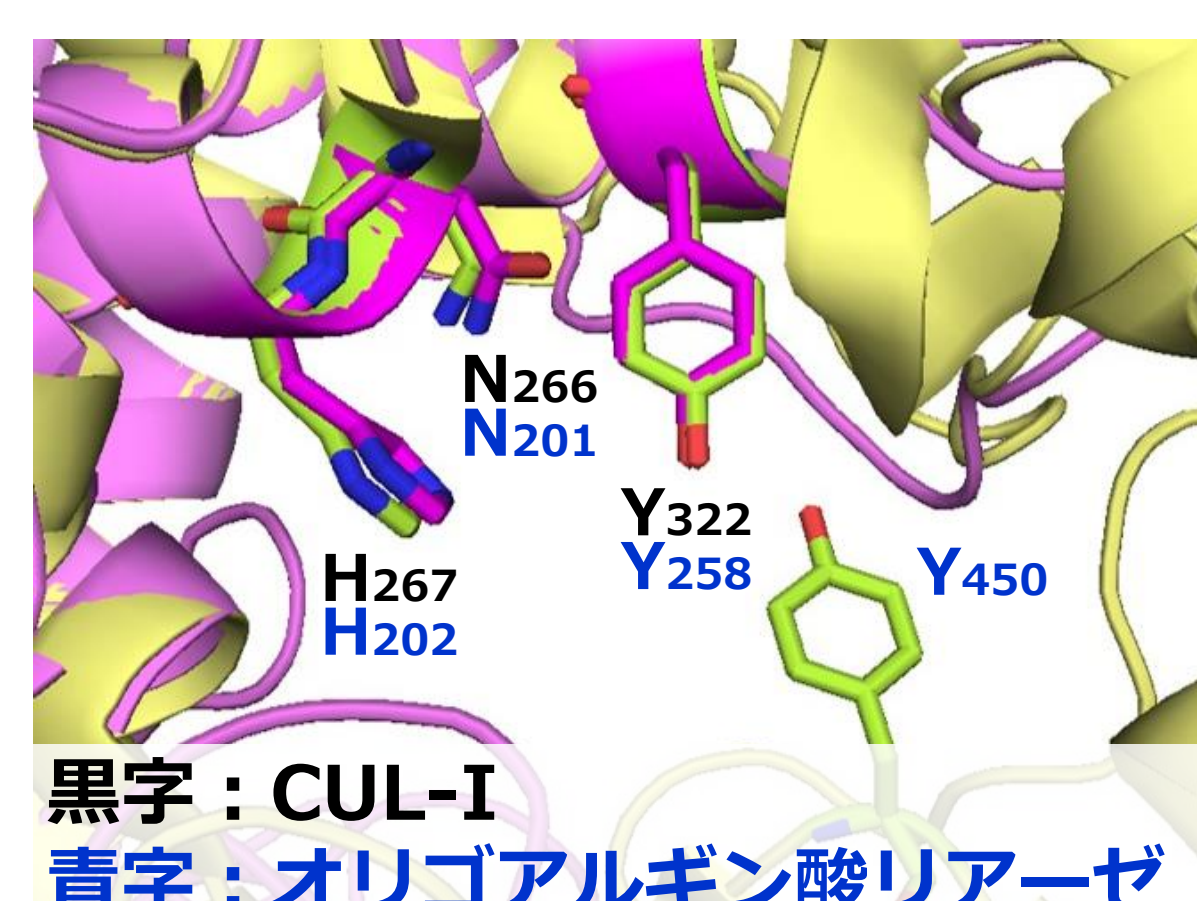


### CUL-I

### オリゴアルギン酸リアーゼ

- Saccharophagus degradans 2-40
- PL17
- 2ドメイン
- N末端側: 不完全なαバレル構造
- C末端側: 逆平行βシート構造

## 活性中心残基の予測

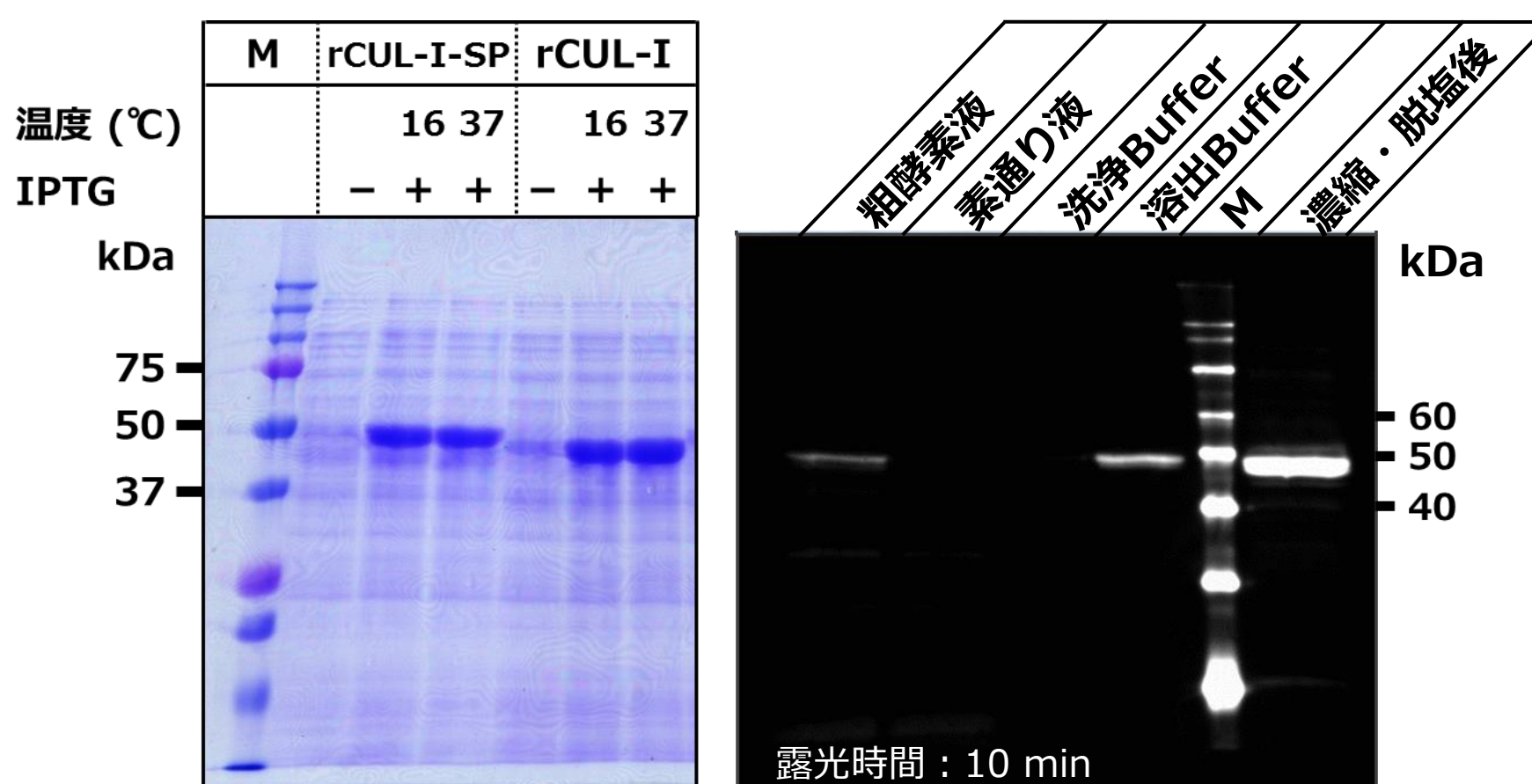


## 大腸菌を用いた異種発現

宿主 *E. coli* Rosetta2 (DE3) 株  
誘導物質 IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)

### IPTG添加前後

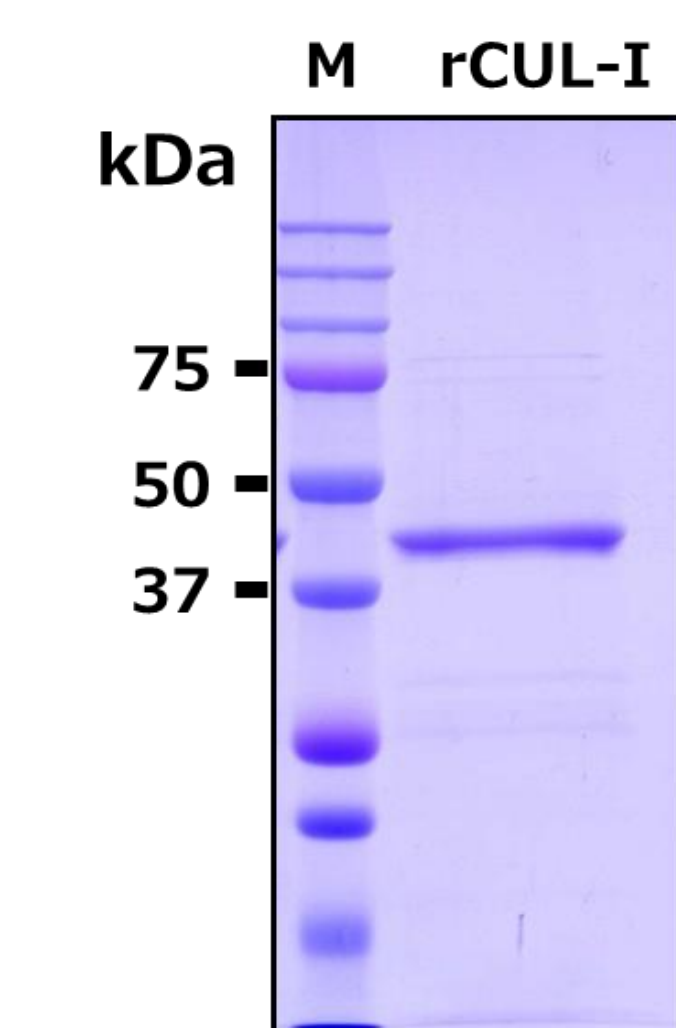
### ウェスタンブロット



Recombinant CUL-I (rCUL-I) の発現を確認した

## rCUL-Iの精製

アフィニティークロマトグラフィー  
サイズ排除クロマトグラフィー



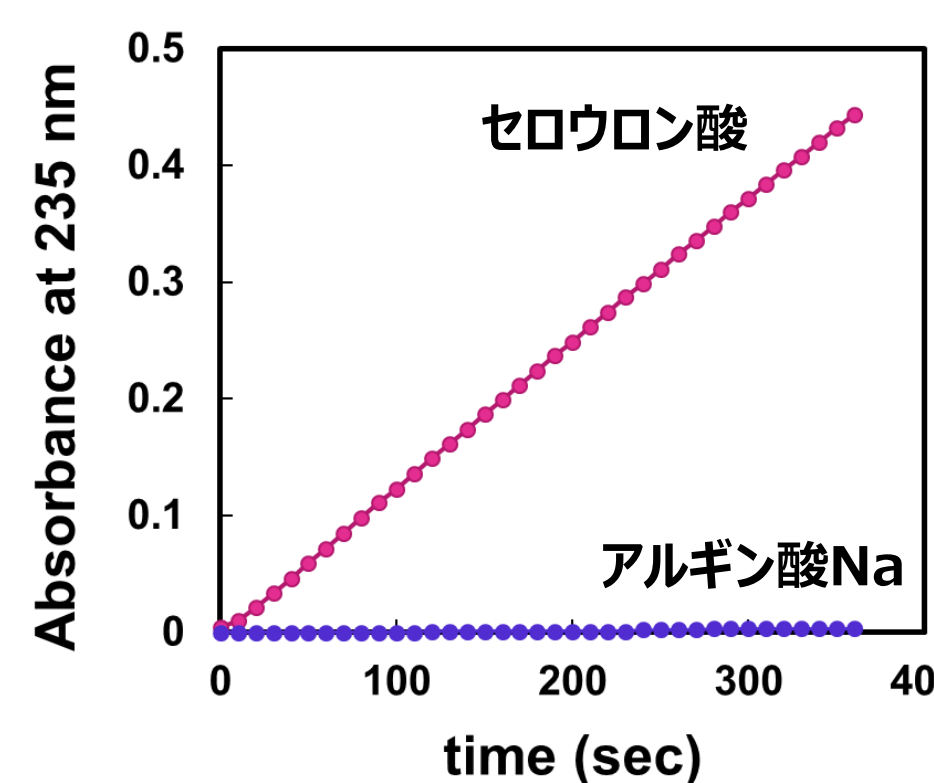
## rCUL-Iの活性測定

酵素液 + 基質溶液 (0.5% (w/v) C.U.)  
→ 235 nmの吸光度を経時的に測定

1Unit : 1分間あたりに吸光度が  
0.01増加する酵素活性

| 画分        | CUL活性 (U) |
|-----------|-----------|
| 超音波破碎 上清  | 9276      |
| 素通り液      | 4400      |
| イミダゾール溶出液 |           |
| 5 mM      | 792       |
| 85 mM     | 4500      |
| 200 mM    | N.D.      |

セロウロン酸およびアルギン酸Naの分解活性比較



基質濃度: 0.5% (w/v)  
基質溶媒: 50 mM リン酸Na緩衝液 (pH7.0)

➡ rCUL-Iのアルギン酸リアーゼ活性は  
確認されなかった

## 結論

- SH203株のドラフトゲノムを解読した. Suzuki et al., Genome Announcements, 5, e00262-17, 2017
- CUL-I遺伝子は, *Caulobacter*属や*Sphingomonas*属などのグラム陰性細菌にも保存されていた.
- 大腸菌を用いたrCUL-Iの異種発現および精製に成功した.
- 精製したrCUL-Iにアルギン酸リアーゼ活性は認められないことから, セロウロン酸に高い基質特異性を示す新規酵素であると考えられる.