

## 研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		超耐熱性キシラナーゼに対する耐アルカリ性の付与			
研究テーマ (欧文) AZ		Improvement of alkali-tolerancy of a hyper-thermostable xylanase			
研究氏 代表名 者	カタカナ CC	姓) ナカムラ	名) サトシ	研究期間 B	2009 ~ 2011 年
	漢字 CB	中村	聡	報告年度 YR	2012 年
	ローマ字 CZ	Nakamura	Satoshi	研究機関名	東京工業大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		東京工業大学大学院生命理工学研究科・教授			
概要 EA (600 字~800 字程度にまとめてください。)					
<p>多糖キシランは D-キシロースが <math>\beta</math>-1,4 結合で連なった主構造を有する。キシランの <math>\beta</math>-1,4 結合を加水分解する酵素がキシラナーゼである。一般にキシランは高温・アルカリ性条件下で水溶性が増すため、工業的には高温・アルカリ性で高活性を示すキシラナーゼが望まれる。高度好熱性細菌 <i>Dictyoglomus thermophilum</i> が生産する GH ファミリー 11 キシラナーゼ B は高い耐熱性を有するが、アルカリ性では活性を示さない。本研究では、キシラナーゼ B への耐アルカリ性の付与を試みた。キシラナーゼ B の立体構造モデルを構築し、好アルカリ性細菌 <i>Bacillus</i> sp. 41M-1 株が生産するアルカリキシラナーゼ (キシラナーゼ J) の立体構造との比較の結果、キシラナーゼ B においてはキシラナーゼ J のアルカリ性適応に関与する塩橋の一部しか形成されていないことがわかった。そこで、キシラナーゼ B のクレフト内部へのキシラナーゼ J 特徴的塩橋の導入を試みた。塩橋を強化したすべての変異型酵素の反応至適 pH は野生型酵素と同じ pH 6.0 であり、野生型酵素に比して比活性と反応至適温度の低下が認められた。次に、キシラナーゼ B の Ser/Thr 表面に新たに 4 つの Arg を導入した変異型酵素を調製した。分子表面に Arg を導入した変異型酵素では、反応至適 pH が野生型酵素の pH 6.0 から pH 7.0 へとアルカリシフトすることが明らかとなった。また、分子表面に Arg を導入した変異型酵素の反応至適温度は 90° C であり、100° C においても高い活性を維持することがわかった。一方で、その比活性は野生型酵素に比べて大きく低下していた。</p>					
キーワード FA	キシラナーゼ	超好熱性細菌	好アルカリ性細菌	タンパク質工学	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	

欧文概要 EZ

Xylan has a backbone of  $\beta$ -1,4-linked xylose units. Xylanase catalyzes the hydrolysis of  $\beta$ -1,4 bonds of xylan. Since the solubility of xylan in aqueous solutions increases at alkaline pH, xylanases active under high temperature and alkaline conditions are required for industrial applications. Alkaliphilic *Bacillus* sp. 41M-1 produces an alkaliphilic glycoside hydrolase (GH) family 11 xylanase (xylanase J). Xylanase J has characteristic salt bridges in the catalytic cleft, and the salt bridges are shown to contribute to the alkali-tolerancy of xylanase J. Extremely thermophilic bacterium *Dictyoglomus thermophilum* produces a hyper-thermostable GH family 11 xylanase (xylanase B). The structure model of xylanase B from *D. thermophilum* was constructed. Structural comparison of xylanase B with xylanase J revealed that xylanase B lacked some of the characteristic salt bridges found in xylanase J. Some artificial salt bridges were introduced into the catalytic cleft of xylanase B according to the structure model. The optimum pH of the mutants was almost the same as that of wild-type xylanase B. Next, excess Arg residues were introduced at the Ser/Thr surface of xylanase B. Wild-type xylanase B was most active at pH 6.0, and the optimum pH of the Arg-introduced mutants was shifted to pH 7.0.