

アラビノキシラン資化能を有するコリネ型細菌の創出

久下 貴之

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 ストレス微生物科学講座

(高木 博史 教授)

平成 29 年 2 月 9 日提出

目次

諸言	4
第一章 キシラン利用能を有するコリネ型細菌の創製	7
1-1. 序論	7
1-2. 材料と方法	12
1-2-1. 使用培地	12
1-2-2. 抗生物質	13
1-2-3. DNA の基本操作	13
1-2-4. <i>C. glutamicum</i> を用いた実験	19
1-2-5. <i>C. alkanolyticum</i> の培養及びゲノム抽出	20
1-2-6. 基質	20
1-2-7. 縮重 PCR 及び染色体歩行（アダプターライゲーション法）	20
1-2-8. リコンビナントタンパク質発現用プラスミドの構築	23
1-2-9. <i>C. glutamicum</i> への遺伝子導入用プラスミドの構築	23
1-2-10. <i>C. glutamicum</i> ゲノムへの遺伝子導入	25
1-2-11. <i>xyII</i> 発現用プラスミドの構築	25
1-2-12. リコンビナントタンパク質の発現及び精製	26
1-2-13. アラビノフラノシダーゼ活性測定法	26
1-2-14. キシラナーゼ活性測定法（還元糖定量法）	27
1-2-15. HPLC によるオリゴ糖分析	28
1-2-16. LC-ESI-MS によるオリゴ糖分析	28
1-3. 結果	32
1-3-1. <i>C. alkanolyticum</i> の推定キシラナーゼ遺伝子の機能解析	32
1-3-2. <i>C. alkanolyticum</i> 細胞抽出液のアラビノフラノシダーゼ活性	35
1-3-3. <i>C. alkanolyticum</i> のアラビノフラノシダーゼ遺伝子の探索 ..	36
1-3-4. Abf51A 及び Abf51B の解析	39
1-3-5. <i>abf51B</i> 導入 <i>C. glutamicum</i> における AXOS 利用能の解析	42
1-3-6. <i>xyII</i> 遺伝子導入 <i>C. glutamicum</i> におけるキシラン利用能の評価	46
1-4. 考察	46

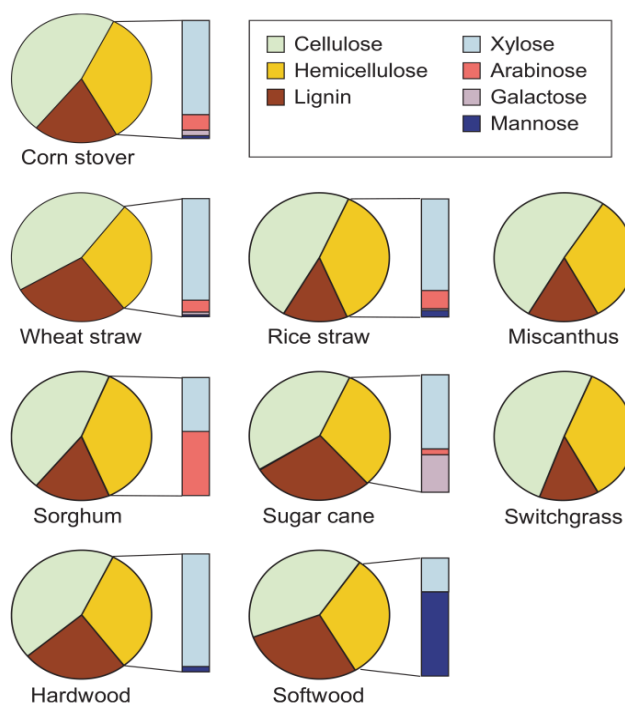
第二章 コリネ型細菌におけるアラビノース代謝関連遺伝子の発現制御機構の解明	53
2-1. 序論	53
2-2. 材料と方法	59
2-2-1. アラビノース代謝関連遺伝子破壊株の構築	59
2-2-2. AraR 結合サイト破壊株の構築	60
2-2-3. <i>PgalM-lacZ</i> 及び <i>ParaR-lacZ</i> 融合遺伝子導入株の構築	61
2-2-4. LacZ レポーターアッセイ	63
2-2-5. 定量 RT-PCR 法による遺伝子発現解析	63
2-2-6. AraR タンパク質発現系の構築及び精製	65
2-2-7. ゲルシフトアッセイ	66
2-2-8. DNaseI フットプリント法	68
2-3. 結果	75
2-3-1. <i>C. glutamicum</i> ATCC 31831 株のアラビノース代謝関連遺伝子クラスター	75
2-3-2. LacI ファミリーの転写因子 AraR の機能解析 (<i>in vitro</i>) ...	80
2-3-3. アラビノース代謝関連遺伝子のアラビノース誘導機構の解明 (<i>in vivo</i>)	93
2-4. 考察	102
総括	108
謝辞	109
参考文献	110

諸言

Corynebacterium glutamicum は放線菌門の *Corynebacterium* 属に属し、コリネ型細菌の名で知られる高 GC 含有のグラム陽性細菌である。本菌は近縁の *Mycobacterium* 属及び *Rhodococcus* 属と共にペプチドグリカン・アラビノガラクトタン層の外殻にミコール酸からなる脂肪酸の層を持つ事の特徴とする。本菌はグルタミン酸の高生産菌として 1950 年代に単離されて以降、リジン・バリン・イソロイシン等と、種々のアミノ酸の高生産菌としてその用途を広げ、現在でもアミノ酸生産において欠かす事の出来ない有用工業微生物である。90 年代初頭より *C. glutamicum* においても遺伝子操作技術が波及し、2000 年代初頭にタイプストレインである ATCC13032 のゲノム情報も明らかになったことで、現在では大腸菌・枯草菌等と同様に遺伝子工学的手法による各種化学品高生産株の育種が可能となっている。近年、生来の高い物質生産能力をアミノ酸生産だけでなく、様々な化学品及び燃料物質の生産へ適用することが可能になってきており、バイオベースの物質生産における宿主としての更なる活躍が期待されている。

バイオエタノールに代表される微生物を利用した物質生産は、従来サトウキビやトウモロコシ等の可食性バイオマスを原料にして行われてきた。しかし、食糧との競合問題、供給量不足とそれに伴う農地拡大及び森林伐採等の社会・環境への悪影響が問題視されている。そこで近年、食糧と競合せず、持続性と経済性が優れた物質生産技術の開発が急がれている。草本、木質廃棄物、農業残渣等のリグノセルロース系バイオマスは豊富に存在し、食糧需給に影響を与えない再生可能資源として注目されている。リグノセルロース系バイオマスにはセルロースやヘミセルロース等の糖質が豊富に含まれており、加水分解を経てグルコース・マンノース・キシロース・アラビノース等の単糖を生ずる（図 1-1）。微生物はこのような単糖を利用して生育出来るため、理論上、微生物を利用した物質生産はリグノセルロース系バイオマスを原料として行える。近年、このコンセプトの早期商業化を目指して世界中で研究が進められている。

A



B

Comparison of biomass feedstocks

Feedstock	Cellulose	Hemicellulose	Lignin	Reference
Corn stover	39.4	33.1	14.9	(9)
Wheat straw	34.9	22.5	21.3	(1)
Rice straw	41.6	31.5	12.5	(5)
Miscanthus	41.9	26.6	13.3	(3)
Sorghum	15	12.3	5.8	(6)
Switchgrass	46.1	32.2	12.3	(1)
Sugar cane	48.6	31.1	19.1	(4)
Hardwood (Birch)	40.7	22.4	19.1	(2)
Softwood (Pine)	42.4	18.4	24.7	(2)

**図 1-1. セルロース系バイオマス中の
セルロース、ヘミセルロース、リグニンの存在比**

A : 各バイオマス種におけるセルロース、ヘミセルロース、リグニンの構成比（円グラフ）、及びヘミセルロース構成単糖の比。

B : A の実際値（%、乾燥重量）。

引用文献を参考に一部改編した(7)。

バイオマスを原料とした高効率な物質生産プロセスを構築する為には、宿主がバイオマスに含まれる糖をもれなく利用出来ることが経済性の観点から重要である。しかし、*C. glutamicum* はセルロース及びキシラン等のリグノセルロース系バイオマスを構成する主要多糖を分解する能力はおろか、生成されるペントース（キシロース・アラビノース）の利用能さえも持たない。そこで近年、遺伝子工学的手法により大腸菌由来のキシロース資化遺伝子（*xylAB*）及びアラビノース資化遺伝子（*araBAD*）を導入することでキシロース及びアラビノースを単一炭素源として利用できる組換え株の開発が報告されている。これと同様に糖質加水分解酵素遺伝子を導入することでリグノセルロース系バイオマス由来のセルロース・キシラン等の多糖の利用能も付与した組換え株の開発も報告されている。このように *C. glutamicum* は、高い持続性を有するリグノセルロース系バイオマスからの物質生産を可能とする次代の工業微生物として大きな可能性を秘めている。

当研究室ではリグノセルロース系バイオマスを原料とした高効率な微生物バイオプロセスを構築する為に、*C. glutamicum* の糖代謝関連遺伝子の発現制御機構の解析及び外来遺伝子の導入による様々な糖の代謝能の付与などを行ってきた。本論文では、*C. glutamicum* へのペントース利用能の付与及び強化に有用な基盤を得るために行った 2 つの研究をまとめた。第一章ではリグノセルロース系バイオマスの主要構成成分であるキシランの分解酵素遺伝子の機能解析を行い、最終的に稲わら等において豊富なアラビノース側鎖の多いキシランの新しい利用経路を開発し、これを *C. glutamicum* に付与することに成功した。第二章では一般的にアラビノースを資化出来ないとされている *C. glutamicum* の中で、例外的にアラビノース資化能を有する *C. glutamicum* ATCC 31831 株のアラビノース資化性に着目し、そのユニークなアラビノース代謝制御機構を明らかにした。

第一章 キシラン利用能を有するコリネ型細菌の創製

1-1. 序論

農業残渣、林地残材等のリグノセルロース系バイオマスは安価で豊富に確保できる再生可能資源であり、これを原料としてバイオ燃料及び有用化学品を製造する技術は持続型社会の構築に有用と考えられている。リグノセルロース系バイオマスの主要構成多糖はセルロースとキシランである。セルロースは地球上で最も豊富に存在する炭水化物であり、D-グルコースが β -1,4 グリコシド結合で直鎖状に重合して合成される(20)。セルロースは植物細胞壁において、分子内水素結合によってパラレル方向に規則的に配列した結晶性のミクロフィブリルとして存在している(21)。キシランはヘミセルロースの主成分であり、 β -1,4 グリコシド結合で直鎖状に重合したキシロピラノース（5つの炭素と1つの酸素で六員環を形成したD-キシロース）を主鎖とし、L-アラビノース、D-グルクロン酸、4-O-メチル-D-グルクロン酸、酢酸、フェルラ酸、クマル酸等を側鎖に持つヘテロ多糖である（図 2-1）(22)。この側鎖のパターンは、植物の種類・部位によって大きく異なることが報告されている。植物細胞壁においてキシランはセルロースと水素結合するだけでなく、芳香族ポリマーであるリグニンと共有結合している。つまり、植物細胞壁の主要構成繊維を架橋することでその構造形成において非常に重要な役割を担っている(23, 24)。植物細胞壁は頑健な性質を有しているため、リグノセルロース系バイオマスから微生物が利用可能な単糖（グルコース・キシロース・アラビノース等）を生成することは容易なことではない(25, 26)。

非常に頑健なリグノセルロース系バイオマスから微生物が発酵可能な糖を生成するためには、熱・希硫酸・アルカリ等による前処理をまず行い、後続の糖化酵素を用いた糖化プロセスにおける酵素の基質への接触を可能にする結晶構造の緩和を施すことが必要である(27)。キシランは易分解性多糖であり従来のシビアな前処理条件においてほぼ分解されるが、過分解によって糖化酵素の活性阻害や発酵阻害を示すフラン類（フルフラール等）及び脂肪族カルボン酸（ギ酸・レブリン酸等）を生成する(27, 28)。近年では、これらの有害な二次生成物の生成を抑える、穏やかな前処理技術が最良と考えられている(29)。しかし、穏やかな前処理を経た後の溶液中には、キシランは単糖ではなくオリゴ糖あるいは多糖の状態でも多く存在しているため、酵素を用いて分解する必要がある。上述したように、キシランでは様々なグリコシド結合が存在するため、キシランの完全分解には基質特異性の異なる多様な酵素が必要となる

(30)。エンド- β -1,4-キシラナーゼ(EC 3.2.1.8)はキシランの分解酵素として最も重要であり、キシラン主鎖の β -1,4 キシロシド結合をランダムに切断して種々の大きさのオリゴ糖を生成する活性を持つ(図 2-1③)。精製されたオリゴ糖の非還元末端からキシロースを遊離する酵素が β -キシロシダーゼ(EC 3.2.1.37)である(図 2-1⑦)。また、側鎖のアラビノース、(4-O-メチル-) グルクロン酸、酢酸の切断酵素はそれぞれ、 α -アラビノフラノシダーゼ(EC 3.2.1.55)(図 2-1①)、 α -グルクロニダーゼ(EC 3.2.1.139)(図 2-1②)、アセチルキシランエステラーゼ(EC 3.1.1.72)(図 2-1④)である。糖質の分解に関わる酵素(グリコシドヒドロラーゼ、以下 GH)はそのアミノ酸配列に基づいて 100 以上のファミリーに分類されており(31)、この分類により構造的特徴、進化的関係、触媒機構が推定できる。しかし、この分類から基質特異性を推定することはしばしば難しい。例えば、ほとんどのキシラナーゼは GH10、GH11 に属し(32, 33)、近年ではこれらに GH5 及び GH8 を加えてキシラナーゼファミリーとされているが(34)、GH7、GH16、GH43 等に属する酵素がバイファンクショナルにキシラナーゼ活性を示すことがある(35-37)。また、たとえ GH10 に属する酵素であっても、キシラナーゼではなくエンド- β -1,4-グルカナーゼとして機能するものもある(38)。ほとんどがアラビノフラノシダーゼである GH51 であっても、アラビノフラノシド結合の α -1,2、 α -1,3、 α -1,5 の内のどの結合に対して高い分解活性を示すか、また、基質がオリゴ糖あるいは多糖であるか等、個々の酵素の細かな特徴は精製して機能を解析しなければ決められない(16, 39, 40)。従って、基質特異性に関してこのクラス分けは GH10、GH11 であればキシラナーゼである可能性が高く、GH3、GH43、GH51、GH54、GH62 であればアラビノフラノシダーゼの可能性があると推測出来る程度の確度しか持たないが、本研究で行ったような目的の活性を持つ酵素を取得したり、酵素のキャラクタライズを進める時の手がかりとなる。

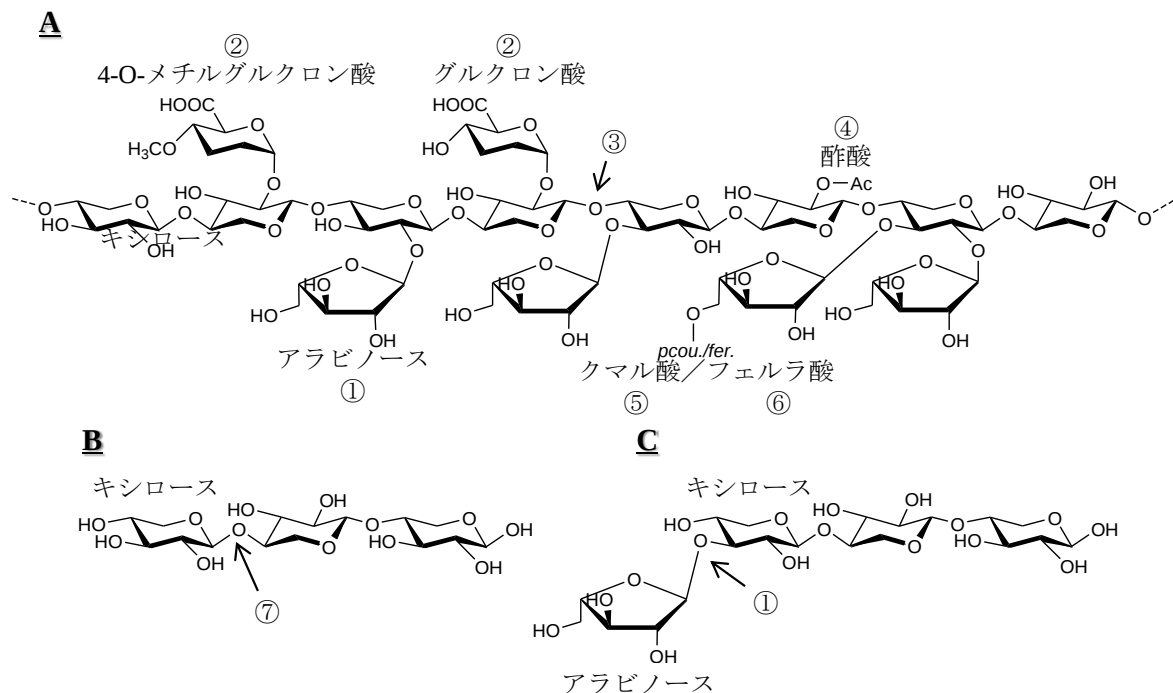


図 2-1. キシラン及びキシラン由来オリゴ糖の構造

A：キシランの構造。主鎖は β -1,4 グリコシドで結合したキシロピラノース。側鎖には、(4-O-メチル) グルクロン酸、アラビノース、酢酸、クマル酸、フェルラ酸等が存在する。側鎖パターンは植物種・部位によって大きく異なる。

B：キシロオリゴ糖の一つでキシロトリオース。側鎖のないキシラン主鎖部分。

C：アラビノキシロオリゴ糖の一つでアラビノキシロトリオース。キシラン主鎖に由来するキシロトリオースにアラビノフラノシド側鎖が結合している。

図中の①－⑦はその切断酵素。① α -アラビノフラノシダーゼ（キシランを基質とする場合にアラビノキシランアラビノフラノシダーゼと呼ばれることがある）、② α -グルクロニダーゼ、③エンド- β -1,4-キシランナーゼ（⑦と同じ結合を切るが、基質がキシラン）、④アセチルキシランエステラーゼ、⑤

-クマル酸エステラーゼ、⑥フェルラ酸エステラーゼ、⑦ β -キシロシダーゼ（③と同じ結合を切るが、基質がオリゴ糖であり、非還元末端から単糖を遊離する）

大腸菌ではキシランの直接利用による物質生産を可能にするため、キシラナーゼとアセチルキシランエステラーゼ遺伝子を導入した第一の株と、オリゴ糖取り込み体とオリゴ糖分解酵素遺伝子を導入した第二の株を共培養する方法が報告されている(41)。この報告では、第一の株がキシラナーゼとアセチルキシランエステラーゼを細胞外に分泌し、第二の株が生成されたオリゴ糖を取り込み、細胞内でオリゴ糖を分解して利用する。枯草菌は GH11 と GH30 に属する 2 つのキシラナーゼ遺伝子を有しており、キシランを生来的に利用出来る(42)。最近、枯草菌においてキシランに直接作用するアラビノフラノシダーゼ遺伝子を異種発現させることにより、アラビノース側鎖の多いキシラン（アラビノキシラン）を利用することが可能になった(43)。*Corynebacterium glutamicum* では、ビーチウッドキシラン（ほぼ側鎖のないキシラン）の直接利用がキシラン分解酵素遺伝子、キシロースの取り込み遺伝子、キシロース資化遺伝子（図 2-2 中 XylAB）を導入することにより可能となることが報告されている(44)。

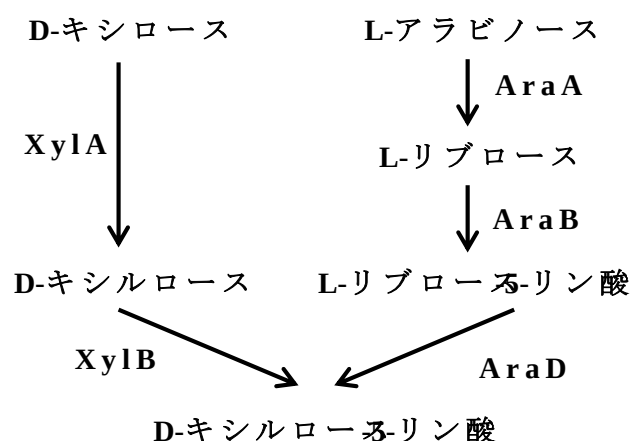


図 2-2. キシロース及びアラビノースの資化経路

XylA：キシロースイソメラーゼ、XylB：キシルロキナーゼ、AraA：アラビノースイソメラーゼ、AraB：リブロキナーゼ、AraD：リブロース-5-リン酸 4-エピメラーゼ。多くの細菌において、これらの酵素をコードする遺伝子はそれぞれ、*xylA*、*xylB*、*araA*、*araB*、*araD* と命名されている。D-キシルロース-5-リン酸はペントースリン酸経路の中間物質である。

C. glutamicum は古くからグルタミン酸、リジン等のアミノ酸の工業生産に利用されてきた高 GC 含量のグラム陽性細菌である(45)。本菌は非増殖時においても解糖経路等の主要な代謝活性を高く維持することが明ら

かになっている。当研究室はこの性質を利用して培養後の本菌を反応槽に充填し、あたかも化学触媒として微生物を利用して短時間で大量の化学物質を生産するシステム(RITE バイオプロセス)を開発した(8)。また、RITE バイオプロセス条件下において、*C. glutamicum* はフェノール・フラン類等のバイオマスに由来する発酵阻害物質に対して高い耐性能を有することがわかっている(46, 47)。従来、*C. glutamicum* はキシロース・アラビノース等のペントースの利用能を持たない細菌とされてきたが、大腸菌に由来するキシロース・アラビノース資化遺伝子(図 2-2)の導入により、カタボライト抑制なしにグルコース・キシロース・アラビノースの同時利用を可能にしている(13)。当研究室の先行研究において、*C. glutamicum* の近縁の細菌である *Corynebacterium alkanolyticum* のゲノムにおいて、キシラン由来のキシロオリゴ糖(XOS、図 2-1B)及びアラビノキシロオリゴ糖(AXOS、図 2-1C)の取り込み体をコードする *xylEFG*、及びその下流で β -キシロシダーゼをコードする *xylD* が同定されている(18)。また、*xylEFGD* 及び大腸菌由来のキシロース資化遺伝子 *xylAB* を導入した *C. glutamicum* 遺伝子組換え株が XOS の利用能を獲得することを明らかにしている。しかし、この株において、AXOS は細胞内に取込まれた後、利用されることなく蓄積していた。これを利用するためには、アラビノース側鎖を分解するアラビノフラノシダーゼ遺伝子の導入が必要と考えられた。このオリゴ糖取り込み経路を利用してキシランそのものを利用出来る *C. glutamicum* を構築できれば、バイオマス糖化液を原料とした高効率なバイオプロセスの構築に大きく貢献できると考えられる。そこで本章では、上記 XOS 利用株を基にしてキシランの直接利用能を *C. glutamicum* に獲得させることを目指して 2 つの糖質加水分解酵素を研究した。1 つ目がキシラン主鎖分解酵素のキシラナーゼ。2 つ目が AXOS 側鎖の分解酵素アラビノフラノシダーゼである。最終的に、これらの酵素遺伝子を XOS 利用株に導入することにより、世界で初めてアラビノキシランの直接利用能をコリネ型細菌に付与することに成功した。

1-2. 材料と方法

全ての実験で使用した蒸留水は DDW (Double Distilled Water) と標記され、MiliQ 水 (Milli-Q PLUS (MILLIPORE)) である。

1-2-1. 使用培地

下記の培地成分を混合した後、オートクレーブ 120℃、20 分で滅菌した。

固形培地作製時には 1.5% (w/v) で Agar (和光 特級) を加えた。また、以降 LB 培地から作製した固形培地を LB プレート、A 培地から作製した固形培地を A プレートと標記する。

・ LB 培地 (大腸菌用培地)

1% (w/v)	Bacto Trypton (DIFCO)
0.5% (w/v)	Yeast Extract (Becton, Dickinson company)
0.5% (w/v)	NaCl (ナカライ)

・ BTM 培地 (*C. glutamicum* 用最小培地)

Urea (ナカライ)	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (ナカライ)	7 g
K ₂ HPO ₄ (和光 特級)	0.5 g
KH ₂ PO ₄ (和光 特級)	0.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O (和光 特級)	0.5 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O (和光 特級)	6 mg
MnSO ₄ · 7H ₂ O (和光 特級)	6 mg
Biotin (和光 特級)	200 µg
Thiamine-HCl (和光 特級)	200 µg
CaCl ₂ · 2H ₂ O (和光 特級)	10 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O (和光 特級)	1 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O (和光 特級)	0.2 mg
NiCl ₂ · 6H ₂ O (和光 特級)	0.02 mg
DDW up to	1000 ml

培養開始時に適宜炭素源を加えた。

・ A 培地 (*C. glutamicum* 用栄養培地)

Urea (ナカライ)	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (ナカライ)	7 g
K ₂ HPO ₄ (和光 特級)	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	6 mg
MnSO ₄ · 7H ₂ O	6 mg
Biotin	200 µg
Thiamine-HCl	200 µg
Yeast extract (DIFCO)	1 g
Casamino acids (DIFCO)	1 g
DDW up to	1000 ml

培養開始時に適宜炭素源を加えた。

1-2-2. 抗生物質

大腸菌では Ampicillin (和光) 5 mg/l、Chloramphenicol (和光) 5 mg/l、Kanamycin (和光) 5 mg/l の濃度で使用した。

C. glutamicum では Chloramphenicol 0.5 mg/l、Kanamycin 5 mg/ml の濃度で使用した。

1-2-3. DNA の基本操作

1)DNA の精製

精製は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を使って行った。プロトコールはマニュアルを参照した。DNA の精製は PCR 後、制限酵素処理後、脱リン酸化後に行われた。

2)制限酵素による配列特異的切断

・ 反応液組成

DNA	10 µg
10×Buffer (TAKARA)	15 µl

制限酵素 (TAKARA) 100 U

DDW up to 150 μ l

ただし、DNA 溶液の濃度により適宜反応液の体積を調整した。37℃で 3 時間反応させた後、1)DNA の精製に記述されるように精製し、電気泳動で確認した。

3)電気泳動

サンプル DNA に 10×Loading Buffer (TAKARA) を加えてアガロースゲルにアプライし、100V で電気泳動した。30 分後にゲルを取り出し、エチジウムブロマイドで 30 分間染色した。最後に UV 照射により DNA を発色させてバンドを確認した。電気泳動時及びゲル作成には 1×TAE Buffer (下記のとおり) を使用した。

・ 50×TAE Buffer

Tris (和光) 240 g

EDTA・2Na 37 g

Acetic acid (和光) 57 ml

DDW up to 1000 ml

4)アガロースゲルからの DNA の抽出

QIAGEN Gel Extraction kit を使用した。プロトコールはマニュアルを参照した。

5)Alkaline Phosphatase による DNA 末端脱リン酸化

サンプル DNA 5 μ l に 10×Dephosphorylation Buffer (Roche) 5 μ l、Alkaline Phosphatase (Pharmacia Biotech) 2 μ l を加え、最後に DDW で 50 μ l にしたサンプルを 37℃で 30 分間静置した。

6)ライゲーション反応

ベクターDNA に対してインサート DNA がモル比で 1: 2~5 になるように混合した後、反応系の 10 分の 1 量の 10×Buffer 及び T4 DNA Ligase (TAKARA)を加えて 16℃で 1 時間静置した。反応終了後のサンプルは全量形質転換に使用された。

7)PCR 産物の直接的ベクター導入

PCR 産物は Mighty Cloning Reagent Set (TAKARA) のマニュアルに従って、直接 pUC118 *Hinc*II / BAP (TAKARA) に挿入された。

8) 大腸菌のコンピテントセルの作製 (CaCl₂ 法)

シングルコロニーを LB 培地 100 ml に植菌して 18℃で一晩培養した。濁度が OD600 値 0.3~0.8 になるまで培養した後、遠心管に移し、氷上で 10 分間静置した。その後、遠心 (3000 g、4℃、10 分) して菌体を沈殿させ、TB (下記のとおり) を 80 ml 加えて穏やかに懸濁した後、再び溶液を遠心 (3000 g、4℃、10 分) した。得られた沈殿を TB 20 ml で懸濁して DMSO 1.5 ml を加えた後に 100 µl ずつ懸濁して -80℃で保存した。

・ TB (pH 6.7)

PIPES solution	20 ml
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2.2 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	10.88 g
KCl	18.6 g
DDW	800 ml

9N KOH で pH6.7 に調整後、DDW で 1000ml に調整した。22 µm のフィルターを通して濾過滅菌し、50 ml のコーニングチューブに分注して 4℃で保存した。

9) 大腸菌の形質転換 (CaCl₂ 法)

氷上でコンピテンとセルを溶解させ、プラスミド DNA を 1 µg 加えてから 42℃で 45 秒熱処理を行った後、LB 培地 900 µl を加え、37℃で 1 時間静置した。その後、培養液を適当な抗生物質を加えた LB プレートに塗布し、37℃で一晩培養した。

10) 大腸菌からのプラスミド DNA の抽出

サンプル数に応じて 2 通りの方法で回収した。サンプル数が少ない場合は、mini-prep spin column kit (QIAGEN) をマニュアル通りに使用した。スクリーニング等の大量の大腸菌からプラスミドを抽出する際は、プラスミド自動分離装置 PI-200 (クラボウ) を使用した。マニュアルに従って操作した。

11) コロニー PCR

コロニー PCR では KAPATaq Extra (日本ジェネティクス) を使用した。

・ 反応液組成

Forward Primer	0.5 μ M
Reverse Primer	0.5 μ M
5 $\times$ Buffer	1.5 μ l
10 mM dNTPs	2.5 μ l
25 mM MgCl ₂	3.5 μ l
Polymerase	0.25 μ l
DDW up to	50 μ l

98°C 1 分

↓

96°C 20 秒→53°C 30 秒→72°C 1 分（増幅長 1 kb につき 1 分） $\times$ 35
サイクル

↓

72°C 5 分

↓

4°C

12) 遺伝子クローニング時の PCR

C. glutamicum から遺伝子をクローニングする時は、KOD-Plus-Ver. 2 (TOYOBO) を使用した。また、*C. alkanolyticum* は GC 含量が高い為、*C. alkanolyticum* から遺伝子をクローニングする時は、Tks Gflex™ DNA Polymerase (TAKARA) を使って PCR を行った。

・ 反応液組成 (KOD-Plus-Ver. 2)

Forward Primer	0.5 μ M
Reverse Primer	0.5 μ M
10 $\times$ Buffer	5 μ l
2 mM dNTPs	5 μ l
25 mM MgSO ₄	3 μ l
Polymerase	1 μ l
Template	100 ng
DDW up to	50 μ l

96°C 1 分
 ↓
 98°C 10 秒→55°C 30 秒→68°C 1 分（増幅長 1 kb につき 1 分）×35
 サイクル
 ↓
 68°C 5 分
 ↓
 4°C

・ 反応液組成（Tks Gflex™ DNA Polymerase）

Forward Primer	0.2 μM
Reverse Primer	0.2 μM
2×Buffer	25 μl
Polymerase	1 μl
DDW up to	50 μl

98°C 1 分
 ↓
 98°C 10 秒→60°C 15 秒→68°C 1 分（増幅長 1 kb につき 1 分）×35
 サイクル
 ↓
 4°C

13) オーバーラップエクステンション PCR

特定の塩基配列を指定の塩基種に置換する際にオーバーラップエクステンション PCR を行った(48)。1 段階目の PCR では、末端に重なる領域を持つ 2 つの DNA 断片を合成する。それぞれの PCR で得られた DNA を精製後、KOD-Plus-Ver. 2 の酵素類を使用して以下の反応系を組む。

・ オーバーラップエクステンション反応組成

PCR 産物①	100 ng
PCR 産物②	100 ng
10×Buffer	5 μl
2 mM dNTPs	5 μl
25 mM MgSO ₂	3 μl

Polymerase	1 μ l
DDW up to	48 μ l

96°C 1分→50°C 1分→68°C 2分でエクステンション反応を行う。その後、両端のプライマーをそれぞれ 1 μ l 加えて終濃度 0.5 μ M にする。その後、

96°C 1分

↓

98°C 10秒→55°C 30秒→68°C 1分（増幅長 1 kb につき 1分）×35 サイクル

↓

68°C 5分

↓

4°C

の条件で PCR 反応を行う。

14)DNA シークエンス

シーケンスは Dideoxynucleotide termination 法により、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を使用して行った。

・シーケンス用 PCR 反応液組成

Plasmid DNA	300 ng
Primer	1.6 pmol
BigDye Terminator V3.1 (Applied Biosystems)	1 μ l
5×Sequence Buffer	2 μ l
DDW up to	10 μ l

96°C 1分

↓

96°C 10秒→60°C 4分×35 サイクル

↓

4°C

PCR 後の精製は BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems) を用いてマニュアル通りに行った。配列の比較には Genetyx (Genetyx)、アラインメントには ATGC (Genetyx)を使用した。

1-2-4. *C. glutamicum* を用いた実験

15) *C. glutamicum* のコンピテントセルの作製

1%の D-グルコースを加えた A 培地 10 ml に *C. glutamicum* を植菌し、33℃で一晩培養した前培養液 100 μ l を 1%の D-グルコースを加えた A 培地 10 ml に植え継ぎした。本培養液を 33℃で 3 時間程度培養して濁度が OD₆₁₀=0.5 付近になった事を確認した後、遠心管に移し、氷上で 15 分間静置した。その後、遠心（6,000 g、4℃、10 分）して沈殿に 15%グリセロール 25 ml を加えて穏やかに懸濁した。この操作を二回繰り返して菌体を洗浄した。最後に遠心（6,000 g、4℃、10 分）して沈殿に 15%グリセロール 1ml を加え、穏やかに懸濁した後、100 μ l ずつ分注して-80℃で保存した。

16) *C. glutamicum* の形質転換

氷上で溶解させたコンピテントセルにプラスミド DNA を混合して氷上で 10 分間静置した。プラスミド DNA はメチル化酵素欠損株の SCS110 から抽出したものをを用いた。*C. glutamicum* はメチル化されたプラスミド DNA による形質転換効率が著しく減少する特性を有する。混合液を氷冷した 0.1 cm Gene Pulser® Cuvette へ移し、パルスをかけた（1.95 kV 20 μ F 200 Ω ）。A 培地 1 ml を速やかに加えて 33℃で 1 時間静置した。最後に適当な抗生物質を加えた A プレートに塗布し 33℃で一晩培養した。

17) *C. glutamicum* のゲノム DNA 抽出

1%の D-グルコースを加えた A 培地 10 ml に *C. glutamicum* を植菌し、33℃で一晩培養した。培養液を遠心(8,000g、室温、2 分)して沈殿にした後、10 mg/ml リゾチーム溶液 100 μ l で懸濁する。37℃で 2 時間静置して溶菌させた後は Genomic Prep Cell and Tissue Isolation Kit (Biotech) を使用してマニュアル通りにゲノム DNA を回収した。

以上の実験を本研究の第二章においても実施したが、第二章の材料と方法では省略する。

1-2-5. *C. alkanolyticum* の培養及びゲノム抽出

1%の D-グルコースを加えた A 培地 10 ml に *C. alkanolyticum* を植菌し、33℃で一晩培養した。培養液を遠心(8,000g、室温、2 分)して菌体を回収し、10 mg/ml リゾチーム溶液 100 μ l で懸濁する。37℃で 2 時間静置して溶菌させた後は Genomic Prep Cell and Tissue Isolation Kit (Biotech) を使用してマニュアル通りにゲノム DNA を回収した。

1-2-6. 基質

4-Nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside (pNP-AraF), 1,4- β -D-xylotriose, 1,4- β -D-xylotetraose, 1,4- β -D-xylopentaose, Arabinoxylan (AX; Wheat Flour; Low Viscosity ~ 10 cSt) は Megazyme から購入した。P-Nitrophenyl- β -D-xylopyranoside はナカライテスクから購入した。Birch wood xylan (BWV), Oat-spelt xylan (OSX) はフルカから購入した。xylobiose、Xylooligosaccharides (キシロオリゴ糖及びアラビノキシロオリゴ糖の混合試薬、アラビノキシラン由来オリゴ糖) は和光から購入した。

1-2-7. 縮重 PCR 及び染色体歩行 (アダプターライゲーション法)

縮重プライマー (DPAF、DPAR) の設計に関しては「1-3-3. *C. alkanolyticum* のアラビノフラノシダーゼ遺伝子の探索」において記述する。また、*C. alkanolyticum* は GC 含量が高い為、Tks Gflex™ DNA Polymerase (TAKARA) を使って PCR (下記のとおり) を行った。

・ PCR 反応液組成

DPPF	0.25 mM
DPPR	0.25 mM
2×Buffer	25 μ l
<i>C. alkanolyticum</i> genome	150 ng
Polymerase	1 μ l

DDW up to

50 µl

98°C 1分

↓

98°C 10秒→60°C 15秒→68°C 3分×35サイクル

↓

4°C

アダプターライゲーション法で用いるアダプター (*Bam*HI の場合) を図示する (図 2-3)。アダプターの合成法を以下に示す。

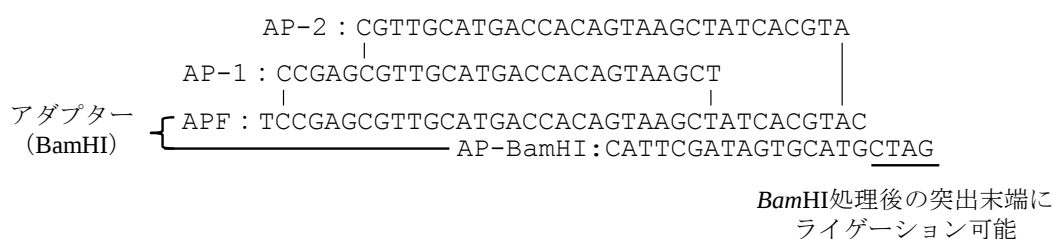


図 2-3. アダプターライゲーション法

ゲノムを *Bam*HI で制限酵素処理した溶液に、アダプターを加えてライゲーション反応を行う。アダプター由来の配列を持つ AP-1 プライマー及び AP-2 プライマーと、縮重 PCR によって得られた部分断片内の配列から合成した 2 種のプライマーを用いてネステッド PCR を行う。

・ アダプター合成反応組成 (*Bam*HI の場合)

APF 50 pmol

AP-BamHI 50 pmol

DDW up to 10 µl

96°C で 1 分、65°C で 1 分、62°C で 1 分、59°C で 1 分、56°C で 1 分、53°C で 1 分、50°C で 1 分と順に温度を下げていき APF 及び AP-BamHI を鋳型形成させる。

APF + AP-BamHI の組み合わせ以外に、APF + AP-MluI、APF + AP-NotI の組み合わせでもアダプターを合成した。また、*C. alkanolyticum* ゲノムを *Bam*HI 以外に、*Bgl*II、*Mlu*I、*Not*I でも完全に消化した。

・ ライゲーシオン反応組成

断片化したゲノム	10 µg
アダプター	2 µl
10×Buffer	10 µl
T4 DNA ligase	3 µl
DDW up to	100 µl

16℃で 24 時間反応させることにより、後のネステッド PCR における鋳型（ゲノムライブラリー）を得た。

また、断片化したゲノムとアダプターは、突出末端同士が対合を形成できるように組み合わせられた。

ゲノムライブラリーを鋳型にネステッド PCR を行った。

・ PCR 反応組成（1 回目）

AP1	0.2 µM
Gene specific primer 1	0.2 µM
2×Buffer	10µl
Gflex DNA Polymerase	0.25 µl
ゲノムライブラリー	1 µl
DDW up to	20 µl

98℃ 1 分

↓

98℃ 10 秒→60℃ 15 秒→68℃ 4 分×35 サイクル

↓

4℃

1 回目の PCR 反応後液は続く 2 回目の PCR における鋳型として使用された。

・ PCR 反応組成（2 回目）

AP2	0.2 µM
Gene specific primer 2	0.2 µM
2×Buffer	25 µl

Gflex DNA Polymerase	1 μ l
1 回目の PCR 反応後液	1 μ l
DDW up to	50 μ l

98°C 1 分

↓

98°C 10 秒→60°C 15 秒→68°C 4 分×35 サイクル

↓

4°C

Gene specific primer 1 及び 2 は縮重 PCR で得られた DNA 断片内部の配列に由来して設計したものであり、以下の表にまとめる。

伸長方向	3'方向		5'方向	
ネステッド PCR	1 回目	2 回目	1 回目	2 回目
<i>abf51A</i>	GWA-F1	GWA-F2	GWA-R1	GWA-R2
<i>abf51B</i>	GWB-F1	GWB-F2	GWB-R1	GWB-R2

ネステッド PCR で得られた DNA 断片は、Mighty Cloning Reagent Set (TAKARA)によって pUC118 Hinc II / BAP に挿入され、M13-M4、M13-RV プライマーを用いシーケンス解析を行うことにより、配列解読された。

1-2-8. リコンビナントタンパク質発現用プラスミドの構築

Abf51A、Abf51B、XylI の His6 タグ融合タンパク質を大腸菌で発現させる 為 に 、 *C. alkanolyticum* の ゲノム を 鋳 型 に し て Abf51A-NdeI-F/Abf51A-NdeI-R 、 Abf51B-NdeI-F/Abf51B-NdeI-R 、 XylI-SPcut-NdeI-F/XylI-NdeI-R で PCR を 行 い *abf51A*、*abf51B*、Signal sequence の ない *xylI* の DNA を 増 幅 し た。得られた DNA 断片は pColdI (TAKARA) の NdeI サイトにライゲーションされた。これにより、pCRF524 (Abf51A 発現用)、pCRF525 (Abf51B 発現用)、pCRF526 (XylI 発現用) を構築した。

1-2-9. *C. glutamicum* への遺伝子導入用プラスミドの構築

本研究では、*C. glutamicum* の R 株に特異的なゲノム領域（SSI: Strain Specific Island (49)）に糖質代謝関連の遺伝子を複数挿入した。本研究では *abf51B*、*xylI* をゲノムに挿入する為のプラスミド（それぞれ pCRF522、pCRF523）を構築したので、以下に構築方法を記述する。

pCRF522 を構築するためにまず、*C. alkanolyticum* ゲノムを鋳型にして Abf51B-NdeI-F/Abf51B-NdeI-R をプライマーに PCR を行った。得られた DNA 断片を *NdeI* で制限酵素処理した後、pCRB52T ベクター(18)の *tac* プロモーター下流にある *NdeI* サイトに挿入した。このプラスミドを鋳型として、Ptac-BglII-F/Ter-BglII-R をプライマーに PCR を行った（この PCR 産物を①とする）。次に、*C. glutamicum* R 株の SSI8 領域を増幅する為に、*C. glutamicum* R 株ゲノムを鋳型に、SSI8-F/SSI8-R をプライマーとして PCR を行った。増幅された SSI8 領域の DNA 断片の両端には、*SalI* 認識配列が付与されている。この PCR 産物を pCRA725 (8)の *SalI* サイトに挿入した。完成したプラスミドを鋳型にして BglIIinsert-SSI8-F/BglIIinsert-SSI8-R をプライマーに PCR を行った。この PCR 産物と①を *BglII* で制限酵素処理後にライゲーションして pCRF522 を構築した。

pCRF523 を構築するためにまず、*C. glutamicum* ゲノムを鋳型にして PgapA-*SalI*-BglII-F/PgapA-*SalI*-NdeI-F をプライマーに PCR を行い、*gapA* 遺伝子のプロモーター領域（PgapA）の DNA 断片を増幅した。得られた DNA 断片を *SalI* で制限酵素処理した後に pCRB22(15)の *SalI* サイトに挿入した。次に、転写終結因子の *rrnB* (50)を得る為に、pKK223-3 (Pharmacia) を鋳型にして、*rrnB*-NdeI-F/ *rrnB*-PshBI-BglII-R をプライマーにして PCR を行った。増幅された DNA 断片を *NdeI* と *PshBI* で制限酵素処理した後、上記 PgapA を含む pCRB22 の *NdeI* サイトに挿入した（完成したプラスミドを pCRB209 とする）。*xylI* 遺伝子の全長配列を得る為に、*C. alkanolyticum* ゲノムを鋳型にして、XylI-NdeI-F/XylI-NdeI-R をプライマーにして PCR を行った。その PCR 産物を *NdeI* で消化した後、pCRB209 の *NdeI* サイトに挿入した。完成したプラスミドを *BglII* で制限酵素処理することにより、PgapA-*xylI*-*rrnB* の DNA を得た。次に、*C. glutamicum* R 株の SSI3 領域を増幅する為に、*C. glutamicum* R 株ゲノムを鋳型に、SSI3-F/SSI3-R をプライマーとして PCR を行った。この PCR 産物を pCRA725 の *SalI* サイトに挿入した。完成したプラスミドを鋳型にして BglIIinsert-SSI3-F/BglIIinsert-SSI3-R をプライマーに PCR を行った。この

PCR 産物と PgapA-*xylI*-rrnB を *Bgl*II 消化後の対合末端でライゲーションし、pCRF523 を構築した。

1-2-10. *C. glutamicum* ゲノムへの遺伝子導入

本研究で構築した菌株は、先行研究で構築された *Ptrc*-*xylAB* を SSI3 に挿入した *C. glutamicum* R 株遺伝子組換え株（以下 X (13)）をベースに遺伝子導入を繰り返して構築された。SSI6 に *araBAD* を導入する為に、まず、*E. coli* SCS110 株から回収した pCRD109(13)を「16)*C. glutamicum* の形質転換」で説明した方法で X 株にエレクトロポレーションした。pCRD109 中には、*C. glutamicum* において複製起点として機能する配列がないため、形質転換後に選択培地で得られるコロニーは、プラスミド中の SSI6 配列と宿主ゲノム中の SSI6 配列の間で起こる相同組換えにより、プラスミド全体がゲノムに挿入された株と考えられる。これを終濃度 1% でグルコースを含む A 培地、33℃で一晩振盪培養した後、培養液 10 µl を 2% スクロースを含む A プレートに塗布し、*sacB* 遺伝子を用いたネガティブスクリーニングを行った。これにより、宿主ゲノムに由来する SSI6 配列と、プラスミド由来の SSI6 領域とそれに挟まれた *araBAD* が、相同組換えにより入れ替わった菌体を選択されることが期待できる。最後に *araBAD* 遺伝子がゲノムに挿入されたかを PCR で確認した（プライマーは省略する）。

上記 *araBAD* 導入と同様の方法で、pCRD522 及び pCRD523 を使用することで、*abf51B* 及び *xylI* 遺伝子の導入を行った。

xylEFGD を *C. glutamicum* で発現させる際は、ゲノムに挿入するのではなくプラスミドとして保持させた。使用したプラスミドは pCRF101 であり、本研究で構築していない(18)。

1-2-11. *xylI* 発現用プラスミドの構築

xylI 遺伝子全長配列を得るために、*C. alkanolyticum* ゲノムを鋳型にして、*XylI*-*KpnI*-F/*XylI*-*KpnI*-R をプライマーとして PCR を行った。得られた DNA 断片を *KpnI* で制限酵素処理して、PCRB12(12)の *KpnI* サイトに挿入した。完成したプラスミドを pCRF521 とした。

1-2-12. リコンビナントタンパク質の発現及び精製

本研究では、His タグ融合 Abf51A、Abf51B、XylII の 3 つのタンパク質を大腸菌で発現させ、精製した。全てのタンパク質は同じ方法で行われたので、Abf51A のみを以下に記述する。

pCRF524 を導入した BL21 (DE3) を LB 培地に懸濁し、37℃において OD₆₀₀ = 0.6 になるまで培養した。培養液を氷上で急冷した後、15℃で 30 分間振盪培養した。次に、終濃度が 1 mM になるように IPTG を加えて 15℃で 24 時間培養した。培養液を 6,000g、4℃、5 分の遠心分離にかけて、菌体を回収した。回収された菌体から Ni-NTA Fast Start kit (QIAGEN) を使用して、His タグ融合 Abf51A タンパク質を回収した。実験は付属のマニュアルに従って行われた。精製した Abf51A タンパク質溶液を PD-10 カラムにアプライし、20 mM citrate-phosphate buffer (pH 7.0), 10 mM NaCl で溶出した (バッファー交換処理)。次に精製度を上げるために、タンパク質溶液を AKTA fast-protein liquid chromatography (FPLC) system (GE Healthcare) にセットして、HiTrap Q HP カラム (陰イオン交換カラム、GE Healthcare) により精製した。溶出は 0-1.0 M NaCl のリニアグラジエントで行った。精製されたタンパク質の精製度を SDS-PAGE で確認した。タンパク質の定量には、Bio-Rad Protein Assay を使用した。

1-2-13. アラビノフラノシダーゼ活性測定法

アラビノフラノシド側鎖を切断する活性をアラビノフラノシダーゼという。本活性の測定は、 α -L-アラビノフラノースが *p*-nitrophenol とグリコシド結合した合成基質 *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside (*p*NP-AraF)を用いて行なった。すなわち、分解されて生じる *p*-nitrophenol が中性及びアルカリ性条件下で呈色することを利用した。至適 pH 検討実験、至適温度検討実験、生成物阻害効果検討実験、キシロースによる阻害効果検討実験において基本となる反応系及び実験操作を以下に示す。

・アラビノフラノシダーゼ活性測定時の反応系基本組成

Citrate-phosphate buffer	50 mM
<i>p</i> NP-AraF	1 mM
精製 Abf51A or Abf51B	0.0002 mg/500 μ l
DDW up to	500 μ l

上記の反応系で 4 分間所定の温度で反応させた後、500 mM Na₂CO₃ を 500 μ l 加えて反応を停止させた。その後、Beckman DU 800 Spectrophotometer (Beckman Coulter) を用いて 400 nm の吸光値を調べた。アラビノフラノシダーゼ活性測定における 1 ユニット (U) は、Abf51A あるいは Abf51B を 1 分間反応させた時に、1 μ mol の *p*-nitrophenol を生成するのに必要なタンパク質量と定義した。至適 pH 検討時には、Abf51A は 40℃、Abf51B は 50℃で反応させ、pH5-8 の範囲の Citrate-phosphate buffer を用いた。至適温度検討時には、両酵素共に pH7.0 の条件で、30 – 70℃の範囲で反応させた。生成物及びキシロースによる阻害効果検討時には、両酵素共に pH7.0、40℃で、DDW の代わりに所定の濃度の糖溶液を加えた。

反応速度論的パラメーターは、反応温度 Abf51A=40℃及び Abf51B=50℃、pH7.0 の条件で調べられた。0.05-3 mM の範囲で基質濃度を 6 点用意し、得られた値を Hanes-Woolf のプロットに当てはめ、 K_m 、 V_{max} 、 k_{cat} を計算した。

1-2-14. キシラナーゼ活性測定法（還元糖定量法）

キシラナーゼ活性はキシラン主鎖を分解し、キシランから還元末端を生成する活性である。3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS)は、アルカリ性煮沸条件下で、糖類の還元基と反応して発色する。DNS の還元は存在する遊離還元基数と比例性を示す為、キシロースを用いて検量線を作製することにより、キシラナーゼ活性を比色定量できる。本法を DNS 法という(51)。実験で使用する Dinitrosalicylic Acid Reagent (DAR) の作製法を示す。

・ Dinitrosalicylic Acid Reagent (DAR)

Dinitrosalicylic Acid	5g
Phenol	1g
Sodium sulfite	0.25g
Rochelle salts	100g

これらを 250 ml の 2% (w/v) NaOH 水溶液に溶かした後、500 ml にメスアップした。

至適 pH 条件検討実験、至適温度条件検討実験等の活性測定は、以下の反応系を基本条件とした。

キシラナーゼ反応系

1 % Xylan (substrate)	250 μ l
1 M Buffer	25 or 100 μ l
XylII (0.05 mg/ml)	50 μ l
Xylose (0.1 % w/v)	10 μ l
DDW up to	500 μ l

Buffer の分量は Citrate-phosphate buffer 及び Glycine-NaOH buffer の場合は 25 μ l、Borate-NaOH buffer の場合は 100 μ l 加えた。また、吸光測定時の Blank (Reagent Blank) は、反応系中の XylII が水に替わったものとした。また、検量線を作製する際は、反応系中の XylII が 0.01, 0.005, 0.0033, 0.002 M のキシロース水溶液に替わる。これらの反応系を調整後、5 分間所定の温度で反応させた後、900 μ l の DAR を加え、100℃で 15 分間ボイルした。煮沸した溶液を水冷した後、540 nm の吸光を調べた。キシラナーゼ活性測定における 1 ユニット (U) は、XylII を 1 分間反応させた時に、1 μ mol の還元糖 (キシロース換算) を生成するのに必要なタンパク質量と定義した。至適 pH 検討時には、65℃の温度で、pH3-8 の範囲は Citrate-phosphate buffer、pH8-10 の範囲は Borate-NaOH buffer、pH10-12 の範囲は Glycine-NaOH buffer を用いた。至適温度検討時には、両酵素共に pH6.5 で、20 – 100℃の範囲で活性を測定した。

1-2-15. HPLC によるオリゴ糖分析

HPLC (島津) を用いてオリゴ糖を分析した。カラムは HPX-87P (300 × 7.8 mm) (BIO-RAD)、オーブン温度は 85℃、流速は 0.6 ml/min、検出器は RI で行われた。

1-2-16. LC-ESI-MS によるオリゴ糖分析

培養液中及び細胞抽出液中のオリゴ糖を LC-ESI-MS により分析した。培養液を調べる場合は、まず回収した培養液を遠心分離 (10,000 g、4℃、10 分) した。次に上清を 10 倍希釈し、1.5 倍量のアセトニトリルを加えて混合する。再度同じ条件で遠心分離を行い、上清を分析に供した。細胞抽出液を調べる場合は、まず回収した培養液を遠心分離 (10,000 g、4℃、10 分) した。次に上清を捨てペレットを水で懸濁し、再度同じ条件で遠心分離を行った。この洗いを更にもう 1 回繰り返した後、OD₆₁₀ が 5 になるように水で再懸濁した。その内 1 ml を別のチューブに移し、遠心分離

(10,000 g、4℃、10 分) した。上清を捨て、150 μ l のアセトニトリルと 37.5 μ l の水を加えて懸濁した。その後 30 分間氷上で静置した。静置後のサンプルに 62.5 μ l の水を加えて遠心分離 (10,000 g、4℃、10 分) を行い、上清を分析に供した。LCMS は QTRAP5500 システム (SCIEX) と HPLC (島津) を用いて行った。HPLC は TSKgel Amide-80 カラム (250 $\times$ 4.6 mm) (東ソー) を用いて、オーブン温度 60℃、流速 0.2 ml/min で、溶離液 A : 10mM 酢酸アンモニウム水溶液、溶離液 B : アセトニトリルのリニアグラジエント (B75% $\rightarrow$ 35%) で溶出した。MS の検出は酢酸イオンが付加したネガティブチャージイオンを検出した。

使用した菌株及びプラスミドを表 2-1 に、使用したプライマーを表 2-2 にまとめる。

表2-1. 使用した菌株及びプラスミド

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<u>Strains</u>		
<u>E. coli</u>		
HST02	F ⁻ [traD36, proA ⁺ B ⁺ , lacI ^q , lacZΔM15]/Δ(lac-proAB), recA, endA, gyrA96, thi, e14 ⁻ (mcrA ⁻), supE44, relA, ΔdeoR, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)	TaKaRa
SCS110	rpsL (Str ^r) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44D (lac-proAB) [F ⁺ traD36 proAB lacI ^q ZΔM15]	TaKaRa
BL-21 (DE3)		
<u>C. alkanolyticum</u>	ATCC 21511	
<u>C. glutamicum</u>		
R	JCM18229	(10)
X	Markerless <i>P_{trc}-xylAB</i> recombinant genes integrated into R strain	(11)
XA	Markerless <i>P_{gapA}-araBAD</i> recombinant genes integrated into X	This study
XA-Af	Markerless <i>P_{tac}-abf51B</i> recombinant gene integrated into XA strain	This study
XA-Xyn	Markerless <i>P_{gapA}-xylI</i> recombinant gene integrated into XA strain	This study
XA-Af-Xyn	Markerless <i>P_{gapA}-xylI</i> recombinant gene integrated into XA-Af strain	This study
XA(EFGD)	Km ^r ; <i>C. glutamicum</i> XA bearing pCRF101	This study
XA-Af(EFGD)	Km ^r ; <i>C. glutamicum</i> XA-Af bearing pCRF101	This study
XA-Xyn(EFGD)	Km ^r ; <i>C. glutamicum</i> XA-Xyn bearing pCRF101	This study
XA-Af-Xyn(EFGD)	Km ^r ; <i>C. glutamicum</i> XA-Af-Xyn bearing pCRF101	This study
R(Xyn)	Km ^r ; <i>C. glutamicum</i> R bearing pCRF521	This study
<u>Plasmids</u>		
pColdI	Amp ^r ; IPTG-inducible expression vector	Merck
pCRF101	Km ^r ; <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> shuttle vector containing 5.6-kb NdeI-KpnI PCR fragment of the <i>xylEFGD</i> gene cluster	(18)
pCRB12	Km ^r ; <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> shuttle vector based on pCG1; 4,569 bp	(12)
pCRB22	Km ^r ; <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> shuttle vector derived from pHSG298 and pCASE1	(15)
pCRB209	Km ^r ; expression vector under the control of <i>gapA</i> promoter.	This study
pCRF521	Km ^r ; pCRB12 with a 2.9-kb KpnI-KpnI PCR fragment of <i>xylI</i> gene	(12)
pCRA725	Km ^r ; pHSG298 with <i>P_{tac}-sacR-sacB</i> gene	(8)
pCRD109	Km ^r ; pCRA725 with <i>araBAD</i> under the control <i>P_{gapA}</i> to integrate into SS16 region	(13)
pCRF522	Km ^r ; pCRA725 with <i>abf51B</i> under the control <i>P_{tac}</i> to integrate into SS18 region	This study
pCRF523	Km ^r ; pCRA725 with <i>xylI</i> under the control <i>P_{gapA}</i> to integrate into SS13 region	This study
pCRF524	Amp ^r ; pColdI with <i>abf51A</i> gene	This study
pCRF525	Amp ^r ; pColdI with <i>abf51B</i> gene	This study
pCRF526	Amp ^r ; pColdI with <i>xylI</i> gene	This study

表2-2. 使用したプライマー

Primer	Sequence (5'-3')	Restriction enzyme ^a
For degenerate Primer		
DPAF	CGSTAYCCSGGYGGSAACTTCGTSTCSGGM	
DPAR	CCGTCCATYTCGTTVCCSAGGCACCA	
For flanking sequence analysis		
APF	TCCGAGCGTTGCATGACCACAGTAAGCTATCACGTAC	
AP-NotIR	GGCCGTACGTGATAGCTTAC	
AP-BamHIR	GATCGTACGTGATAGCTTAC	
AP-MluIR	CGCGGTACGTGATAGCTTAC	
AP1	CCGAGCGTTGCATGACCACAGTAAGCT	
AP2	CGTTGCATGACCACAGTAAGCTATCACGTA	
GWA-F1	ACGAACTCGTGCAGGCCGAA	
GWA-F2	TTGGTCTCGATCGTGTGCCAT	
GWA-R1	CTCGTCGAGTACGCGAACCA	
GWA-R2	AACGGCGCGGCCGACCCGTT	
GWB-F1	AGCATGAGCTCGCTGCCGAT	
GWB-F2	TTCAGGCCGATCTGGTTCGT	
GWB-R1	GACCTGCTCGAATACGCCAA	
GWB-R2	CGTGGGACATCCGGATGTGGTGCT	
GWR2-R1	CGATTGAAACACGGCCGTGCCGACC	
GWR2-R2	GCGAAGACGAGAATGTCATCGCTCAC	
GWR3-R1	CGCTCGCAGTCAGCTGCCACAC	
GWR3-R2	GGCACGCACCTCGACCGTCTCAC	
GWR4-R1	AGAGGTACTCGGCGACCGCGAAG	
GWR4-R2	GCCTGATCGGCTTCCGAGTTCGTG	
For construction of plasmids		
Abf51A-NdeI-F	ATCATATGACCCGCGCCCGCATCACCATCGAC	NdeI
Afb51A-NdeI-R	ATCATATGTCAGGCCGTGCGGGCGTCGAGGACGATG	NdeI
Abf51B-NdeI-F	ATCATATGTCACCGCGAGCATTTCGCATCGA	NdeI
Abf51B-NdeI-R	ATCATATGTCAGCGCAGCGATGGCCGACCACGACAC	NdeI
XylI-SPcut-NdeI-F	ATCATATGGAGGAGGCGCCCGCGATCGCGACCGACT	NdeI
XylI-NdeI-R	ATCATATGTCAGCGACTCAGCTTCACCCGCGTCT	NdeI
Ptac-BglII-F	GAGATCTGGCTGTGCAGGTCGTAATCAC	BglII
Ter-BglII-R	GGAAGATCTAAGAGTTTGTAGAAACGC	BglII
SSI8-F	CTCTGTCGACTTTAGCGCATCCGTATTTCGC	SalI
SSI8-R	CTCTGTCGACTGTTTCAGCTACAGTTTGCGG	SalI
BglIIinsert-SSI8-F	CTCTAGATCTCACTATGAGTAAGGCTCCC	BglII
BglIIinsert-SSI8-R	CTCTAGATCTGGCTTTATTCCGTCACTGTG	BglII
SSI3-F	CTCTGTCGACGAGATCGTACTTCGTAGGC	SalI
SSI3-R	CTCTGTCGACAGCTCGAAATCGAAGACCG	SalI
BglIIinsert-SSI3-F	CTCTAGATCTACCAACTCCCAGAGCC	BglII
BglIIinsert-SSI3-R	CTCTAGATCTTTGGCCAGGTCGAACAG	BglII
XylI-NdeI-F	GGAATTCCATATGATGCCCTCACCCCTTCGCAGA	NdeI
XylI-KpnI-F	GTGGTACCATGATGCCCTCACCCCTTCGCAGAC	KpnI
XylI-KpnI-R	ATGGTACCTCAGCGACTCAGCTTCACCCGCGTC	KpnI
PgapA-SalI-BglII-F	CTCTGTCGACATCCAGATCTCCGAAGATCTGAAGATTCCCTG	SalI BglII
PgapA-SalI-NdeI-F	CTCTGTCGACGGATCCCATATGTGTCTCCTCTAAAGATTGTAGG	SalI NdeI
rmB-NdeI-F	CTCTGCATGCCATATGCTGTTTGGCGGATGAGAGA	NdeI
rmB-PshBI-BglII-R	CTCTGCATGCATTAATATCCAGATCTAAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGG	PshBI BglII

^a Restriction sites are indicated by underlining.

1-3. 結果

先行研究によって、*C. glutamicum* の近縁の細菌である *C. alkanolyticum* ゲノムからキシロオリゴ糖 (XOS)・アラビノキシロオリゴ糖 (AXOS) の取り込み体 *xylEFG* 及び、 β -キシロシダーゼ遺伝子 (*xylD*) が同定されている。この *xylEFGD* 遺伝子及び大腸菌由来のキシロース資化遺伝子 *xylAB* を導入した *C. glutamicum* 遺伝子組換え株はキシロオリゴ糖の資化能を獲得することが知られている。しかし、この株において取り込まれた AXOS は資化されることなく細胞内に蓄積しており、これを資化するにはアラビノフラノシダーゼ遺伝子の導入が必要と考えられた。本章では、このキシロオリゴ糖利用株を基にして、キシランそのものの利用能を *C. glutamicum* に獲得させることを目指して 2 種類の酵素を研究した。1 つ目がキシラン主鎖分解酵素のキシラナーゼ。2 つ目が AXOS の側鎖の分解酵素のアラビノフラノシダーゼである。また、これらの酵素をコードする遺伝子をキシロオリゴ糖利用株に導入することにより、アラビノース側鎖の多いキシラン (アラビノキシラン) の直接利用が可能となった。

1-3-1. *C. alkanolyticum* の推定キシラナーゼ遺伝子の機能解析

先行研究により、*C. alkanolyticum* ゲノムの *xylE* 遺伝子上流に *xylI* が見つかっている (GenBank accession number KY239027) (図 2-4A)。*xylI* は 2880 塩基からなる ORF で、959 アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、その推定分子量は 106×10^3 である。*XylI* の Ala34 と Ala35 の間にシグナルペプチド切断部位が存在することが SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) により予測されたため、本遺伝子産物は細胞外に局在すると推測される。シグナルペプチド切断後の成熟 *XylI* の推定分子量は 97×10^3 である。*XylI* には Pfam データベース (<http://pfam.xfam.org/>) に登録されている 3 つのドメインが含まれている (図 2-4B)。中心に GH10 catalytic module (GH10 触媒ドメイン、アミノ酸配列 201-533 の領域) があり、その C 末端側には基質との結合に関与すると予想される Carbohydrate Binding Module family 9_1 (CBM9_1、アミノ酸配列 692-869 の領域) が位置し、N 末端側には CBM4_9 (アミノ酸領域 40-178 の領域) がある。GH10 触媒ドメインはキシラナーゼの報告が最も多い GH10 に属する酵素で保存されているドメインであり、このことから *XylI* はキシラナーゼとして働く可能性が強く示唆された。

CBM9_1 は細菌のキシラナーゼの C 末端によく認められるドメインであり、可溶／不溶及び多糖／オリゴ糖を問わずに幅広い糖質に対して結合能を有するドメインと考えられている。CBM4_9 は上述の CBM9 に近い構造及び性質を有するドメインと考えられている。CBM に関する研究は現時点で少なく、今後の進展が待たれる。

Protein BLAST によると XylII のアミノ酸配列は放線菌の機能未同定の推定キシラナーゼ遺伝子と相同性が高かった。特に、*Leifsonia* sp. Leaf325 の hypothetical protein (GenBank accession number WP_056168464) とは 63% (527/838) 配列が一致していた。さらに、*Microbacterium* sp. TS-1 と *Cellulomonas flavigena* DSM 2010 の推定キシラナーゼ遺伝子 (GenBank accession number WP_023952752、ADG73550) とそれぞれ 49% (452/930)、57% (481/848) 配列が一致していた。上記 3 つの遺伝子及び XylII において、GH10 に属する酵素において高度に保存されている 2 つの反応基 (XylII の場合 Glu341 : acid/base、Glu459 : nucleophile) 及びその周辺のアミノ酸は保存されていた (データは省略する)。

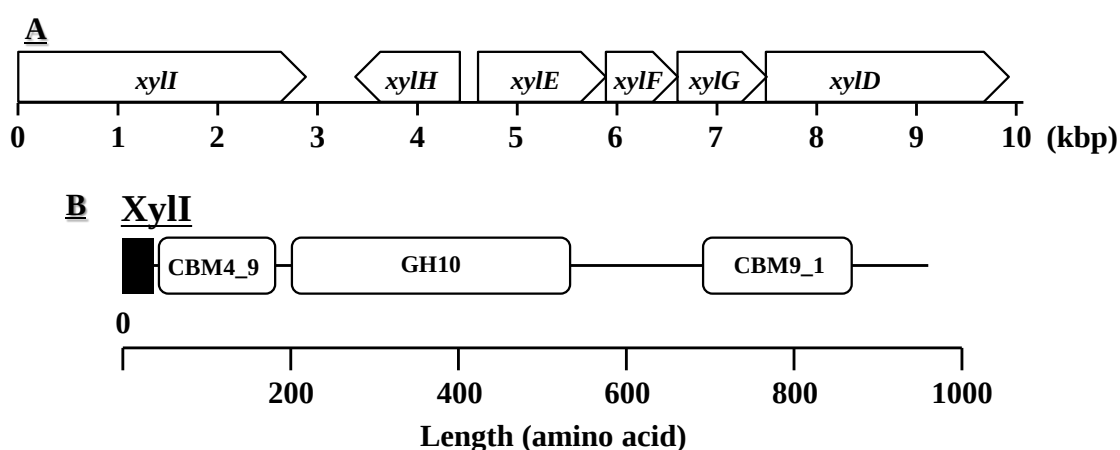


図 2-4. *C. alkanolyticum* のキシラン利用遺伝子クラスター及び XylII のドメイン構造

A : *C. alkanolyticum* ゲノム上のキシラン利用遺伝子クラスター。XylEFG : XOS 及び AXOS の取り込み体 (ABC トランスポーター)、XylD : β -キシロシダーゼ (GH3)、XylH : LacI ファミリーの転写因子、XylI : キシラナーゼ。

B : XylII のドメイン構造。CBM : Carbohydrate Binding Module、GH : Glycoside Hydrolase。

xylI 遺伝子の機能を調べる為に、XylII の Ala35 から終止コドンまでを pColdI に挿入したプラスミド (pCRF526) を構築し、BL21 (DE3) で発

現させ、Ni-NTA agarose と Hitrap Q HP カラムで His-tag 融合タンパク質を精製した。精製した XylII の比活性をカバノキ（ハードウッド）由来の Birch wood xylan (BWX)、オート麦由来の Oat spelt xylan (OSX)、麦の胚乳に由来する Arabinoxylan (AX) で測定した（図 2-5A）。現在、BWX 及び OSX の成分情報を購入元が開示していないため、正確な成分を知ることが出来ない。しかし、関連の研究から推察するに、BWX は側鎖にグルクロン酸及び酢酸が低頻度で結合しており、OSX はアラビノース側鎖が多いと思われる(52)。また、AX はアラビノースとキシロースが 0.61 (A/X) の割合で存在するキシランである (Megazyme)。XylII の比活性は BWX、OSX、AX のそれぞれで 29.7、38.5、38.3 U/mg であり、アラビノフラノシド側鎖が多い OSX、AX を基質とした時に、特に高い活性が認められた。XylII は pH 6.5 の条件下で最も高い活性を示し、pH 5.5 – 8 の範囲で至適 pH 条件時の約 80%以上の活性を有する（図 2-5B）。また、至適温度は 65℃であり、55 – 70℃の範囲で 80%以上の活性が認められた（図 2-5C）。

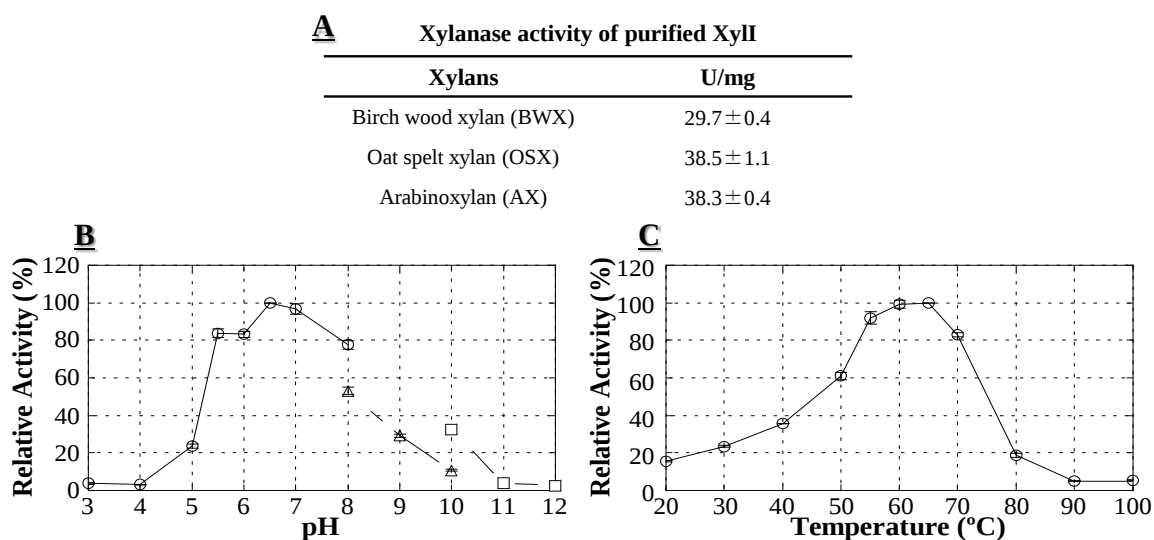


図 2-5. XylII リコンビナントタンパク質のキシラナーゼ活性

A：異なるキシラン基質に対する XylII のキシラナーゼ比活性。Birch wood xylan：カバノキ（ハードウッド）由来のキシラン、Oat spelt xylan：オート麦由来のキシラン、Arabinoxylan：麦の胚乳由来のキシラン。1 分間に XylII タンパク質が 1μmol の（キシロースベースの）糖還元末端を生じる活性を 1U とする。また、以下の B、C の検討実験には BWX を使用した。

B：至適 pH 検討実験、pH6.5 の時の比活性を 100%とする。pH3-8：

Citrate-phosphate buffer (○)、pH8-10：Borate-NaOH buffer (△)、pH10-12：Glycine-NaOH buffer (□)。

C：至適温度検討実験、65℃の時の比活性を 100%とする。

1-3-2. *C. alkanolyticum* 細胞抽出液のアラビノフラノシダーゼ活性

C. alkanolyticum にアラビノフラノシダーゼ遺伝子が存在するかどうかを調べた。*C. alkanolyticum* をグルコース、XOS と AXOS を含有する購入試薬（以下アラビノキシラン由来オリゴ糖）、OSX をそれぞれ 1% で含む培地で 24 時間培養し、回収した細胞から粗抽出液を調整した。アラビノフラノシダーゼ活性を、*p*-ニトロフェニル- α -L-アラビノフラノシド（以下 *p*NP-Araf）を用いて測定したところ、アラビノキシラン由来オリゴ糖で培養した細胞の抽出液から、約 1 U/mg の最も高いアラビノフラノシダーゼ活性が認められた（図 2-6）。OSX で培養した細胞の抽出液からも約 0.5 U/mg のアラビノフラノシダーゼ活性が認められたが、グルコースで培養した細胞中にアラビノフラノシダーゼ活性はほとんど検出されなかった。これらの結果から、*C. alkanolyticum* が細胞質に局在する誘導型のアラビノフラノシダーゼ遺伝子を持つ可能性が示唆された。

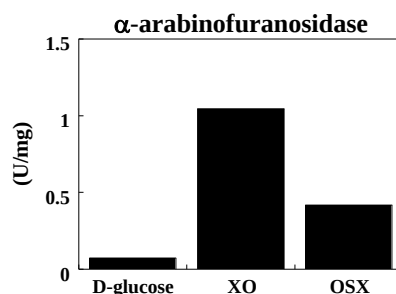


図 2-6. *C. alkanolyticum* 細胞抽出液中のアラビノフラノシダーゼ活性

グルコース（図中 D-glucose）、アラビノキシラン由来オリゴ糖（図中 XO）、Oat spelt xylan（図中 OSX）をそれぞれ 1%（w/v）で含む培養液において *C. alkanolyticum* を 24 時間培養し、回収した細胞の抽出液中におけるアラビノフラノシダーゼ活性を調べた。

1-3-3. *C. alkanolyticum* のアラビノフラノシダーゼ遺伝子の探索

C. alkanolyticum にアラビノフラノシダーゼ遺伝子の存在が示唆されたが、*C. alkanolyticum* はゲノム配列が不明であるため、アラビノフラノシダーゼの候補遺伝子をゲノム情報から予測することが出来ない。そこで、ゲノム情報が明らかな *C. alkanolyticum* の近縁種においてアラビノフラノシダーゼとして機能することが予想される遺伝子を抽出し、それらの配列を基に縮重プライマーを設計して、アラビノフラノシダーゼ遺伝子を *C. alkanolyticum* から得ることにした。

まず、*C. alkanolyticum* の 16S rRNA 配列について BLAST 解析した結果、最も配列の一致度が高かったものは *Microbacterium* 属の 16S rRNA 配列であった。この他に、*Clavibacter* 属、*Arthrobacter* 属、*Jonesia* 属等の 16S rRNA 配列とも相同性が高かった。従って、*C. alkanolyticum* は放線菌の中でも特に *Micrococcales* 目に属する細菌と近縁関係にあると思われる。上記の近縁種のゲノム情報から、推定アラビノフラノシダーゼ遺伝子は GH3、GH43、GH51 に属すると推測された。この内 GH3 や GH43 には、アラビノフラノシダーゼ以外の酵素も多く属しているため、これらに属する酵素は実際にはアラビノフラノシダーゼではない可能性もある。一方、GH51 に属する酵素の大部分はアラビノフラノシダーゼである。そこで本研究ではアラビノフラノシダーゼ遺伝子を取得する為に、近縁種の GH51 に属する遺伝子の保存領域で縮重プライマー（DPAF、DPAR）を設計した（図 2-7）。縮重 PCR を行った結果、329 塩基対の DNA 断片が 2 種類得られた。その後、得られた DNA 断片の上流及び下流の配列をアダプターライゲーション法により解読し、アラビノフラノシダーゼをコードすると推定される 2 つの遺伝子（*abf51A*、*abf51B*）の全長配列を決定した（GenBank accession number KY239025、KY239026）。

アミノ酸配列

Arthrobacter	-----MSRARITLDRDFTIGEVPRLFGSFVEHMGRCVYTGIIYEPGHPEADQN
Jonesia	-----MSTARLHLDPAFTVGPVRRRTFGAFVEHLGRCVYEGIIYEPHPSADAD
Microbacterium	-----MTTARLTLDTRFPIGAVRRRLFGGFVEHLGRHVYDGIYEPGHPEADDQ
Clavibacter	MTDAPSTTDAFPSADARIAIDRTAVVAPVNRRTFGSFVEHLGRCVYDGIYEPGHPTANAD

DPAF

Arthrobacter	GFRQDVLKLVKELGATVIRYPGGNFVSGYNWEDGIGPRENRPRRLDGAWHTVETNAFGLH
Jonesia	GFRTDVLELTKELGVS SVRYPGGNFVSGYRWEDGIGPREERPVRRLDLAWHSSDPNHVGV
Microbacterium	GFRRDVLELVRELGVSTIRYPGGNFVSGFRWEDSVGPREQRPRLDLAWHSTETNEIGLH
Clavibacter	GFRLDVVDLVKELGSSTIRYPGGNFVSGYRWEDGVGPRAERPRLDLAWHSLTNEVGLD

Arthrobacter	EFVDWSKQAGTEIMEAINLGRGVDAAREIVEYANHPGGTYWSDLRAKNGHKDPFNKLW
Jonesia	EYMAWCEKAGVEPMMAVNLGRGVQEAALDLEVCNVPGGTYWSDLRRKNGREEPYRITMW
Microbacterium	EFSDWLDKAGSDLMLAVNLGRGVLEALDLEYSNVPGGTTLSQQRIDNGRAEFPFGVRVW
Clavibacter	EFARWCELTGSELMMAVNLGRGVLEALDILEYSNHPGGTALSQRIANGSPFPHNVKMW

DPAR

Arthrobacter	CLGNEMDGPWQIGHKTADEYGRLEAQAAMRFVDPSELVACGSSNSGMPTFGAWEQTV (228)
Jonesia	CLGNEMDGPWQIGHKTAEEYARLATETARAMRMIDPTIELIVCGSSASDMETFGAWEATV (228)
Microbacterium	CLGNEMDGPWQLGHRSAADYGKIASQTAKGMRQLDPSIELVCGSSGASMPFTGEWERVV (228)
Clavibacter	CLGNEMDGPWQVGHMTADDYGKLANRTAGAMKMDPTLELVACGSSSGSMPTFGEWERTV (240)

DNA配列

DPAF領域(RYPGGNFVSG)

ArgTyrProGlyGlyAsnPheValSerGly

Arthrobacter	CGGTACCCCGGCGGCAACTTCGTCTCGGGC
Jonesia	CGGTATCCCGTGGGAACCTTCGTCTCCGGA
Microbacterium	CGCTACCCCGGCGGCAACTTCGTCTCGGGC
Clavibacter	CGCTACCCCGGCGGCAACTTCGTCTCCGGC

DPAR領域(WCLGNEMDG)

TrpCysLeuGlyAsnGluMetAspGly

TGGTGCCTGGGCAACGAGATGGACGGC
TGGTGCCTGGGTAACGAAATGGACGGC
TGGTGCCTCGGCAACGAGATGGACGGC
TGGTGCCTCGGCAACGAGATGGACGGC

アラインメント中略記 - 生物種 (ローカスタグ) a.a. (アミノ酸配列長)

Arthrobacter - *Arthrobacter aurescens* TC1 (AAur_0688) a.a. (513)

Jonesia - *Jonesia denitrificans* DSM 20603 (Jden0515) a.a. (508)

Microbacterium - *Microbacterium testaceum* StLB037 (MTES_1958) a.a. (505)

Clavibacter - *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB 382 (CMM_0310) a.a. (514)

図 2-7. GH51 遺伝子のアラインメント及び縮重プライマー設計

abf51A は 1536 塩基の ORF で 511 アミノ酸からなるタンパク質（分子量 56.5×10^3 ）をコードしていた。*abf51B* は 1494 塩基の ORF で 497 アミノ酸からなるタンパク質（分子量 55.1×10^3 ）をコードしていた。SignalP で両遺伝子のシグナルペプチドの有無を調べたところ、共にシグナルペプチドは認められなかった。これにより、両遺伝子産物は細胞内に局在することが予測された。*Abf51A* と *Abf51B* の一次配列を比較したところ、アミノ酸レベルで 56% の一致度、83% の類似性が認められた。同様に、両一次配列を既知の放線菌のアラビノフラノシダーゼと比較した結果を表にまとめた（表 2-3）。その結果、*Abf51A* と *Abf51B* は既知のアラビノフラノシダーゼとアミノ酸レベルで 50% 以上、配列が一致することがわかった。

表2-3. *Abf51A*及び*Abf51B*のアミノ酸配列比較

Protein (amino acid length)	Species	Query Cover (%)	Identity (%)	Accession No.	Reference
<u>Abf51A</u>					
<i>Abf51B</i> (497)	<i>Corynebacterium alkanolyticum</i>	99	56	KY239026	
<i>AbfCelf</i> (506)	<i>Cellulomonas fimi</i> ATCC484	98	54	AEE47435.1	(16)
<i>Abf51S9</i> (501)	<i>Streptomyces</i> sp. S9	98	58	ACY69989.1	(17)
<i>AbfB</i> (566)	<i>Bfidobacterium longum</i> B667	97	50	AAO84266.1	(14)
<u>Abf51B</u>					
<i>Abf51A</i> (511)	<i>Corynebacterium alkanolyticum</i>	99	56	KY239025	
<i>AbfCelf</i> (506)	<i>Cellulomonas fimi</i> ATCC484	87	58	AEE47435.1	(16)
<i>Abf51S9</i> (501)	<i>Streptomyces</i> sp. S9	99	55	ACY69989.1	(17)
<i>AbfB</i> (566)	<i>Bfidobacterium longum</i> B667	99	51	AAO84266.1	(14)

1-3-4. Abf51A 及び Abf51B の解析

E. coli BL21 (DE3) において His6-Abf51A、His6-Abf51B を発現させて精製し、*p*NP-Araf を用いて精製タンパク質のアラビノフラノシダーゼ活性を測定した (図 2-8)。両タンパク質は pH が 6 付近の時に最も高い活性を示した (図 2-8A)。また、pH5.5 – 7.0 の範囲で最大の活性の 80%以上の活性を示した。至適温度は Abf51A が 40℃、Abf51B が 50℃であった (図 2-8B)。共に 40 – 60℃の範囲で至適条件の 60 %以上の比活性を示した。Abf51A と Abf51B の生成物阻害効果を調べるために、0、10、20、50、100 mM の L-アラビノースを加えた時の活性を調べた (図 2-8C)。その結果、アラビノースが 100 mM 共存する場合に、Abf51A の活性は共存しない時に比べて 27%減少していた。しかし、Abf51B の活性は 100 mM のアラビノースが共存しても 8%しか減少しなかった。また、同様の実験をアラビノースと類似の化合物であるキシロースで行った (図 2-8D)。その結果、Abf51A はアラビノース程ではないが、キシロースの共存によっても活性が低下したが (17%減少)、Abf51B は 95%の活性を保持し、ほとんど影響をうけなかった。

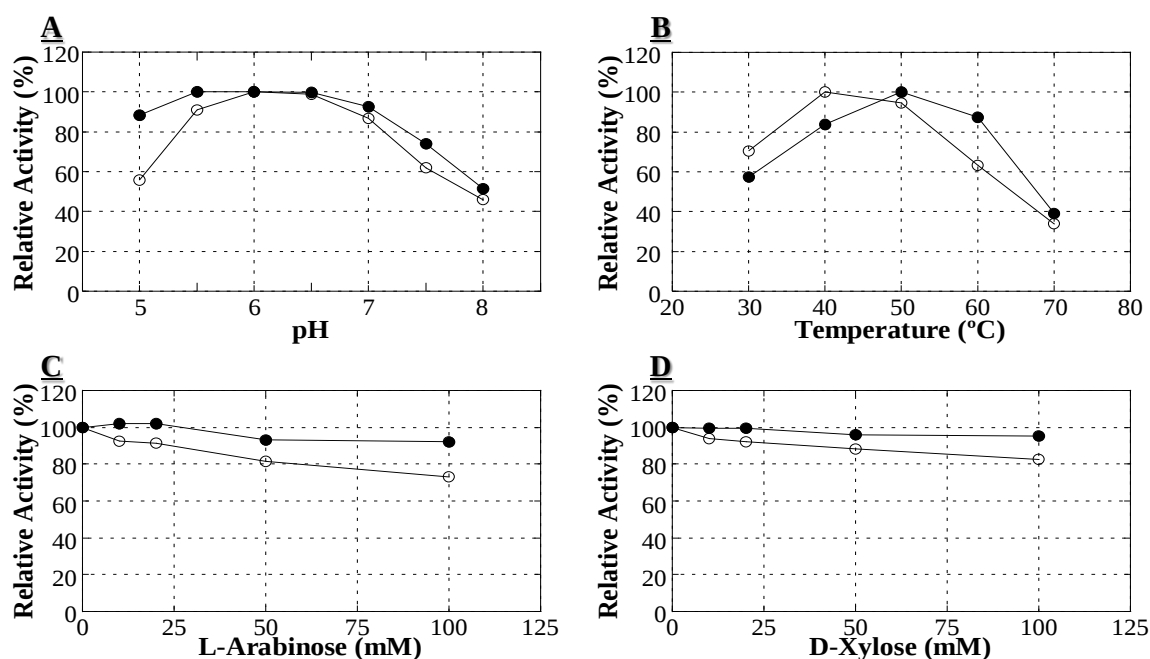


図 2-8. Abf51A 及び Abf51B の相対活性

○ : Abf51A、● : Abf51B

- A : 至適 pH 検討実験、Abf51A 及び Abf51B 共に pH6 の時の値を 100%とする。
B : 至適温度検討実験、Abf51A は 40℃、Abf51B は 50℃ の時を 100%とする。
C : アラビノースによる活性阻害効果の検討実験、0 mM 添加時を 100%とする。
D : キシロースによる活性阻害効果の検討実験、0 mM 添加時を 100%とする。

反応速度論的パラメーターを Hanes–Woolf のプロットを用いて求めた (表 2-4)。Abf51A の pNP-Araf に対する K_m (mM)、 V_{max} (U/mg)、 k_{cat} (sec^{-1}) は 0.7、153.1、149.8 であった。Abf51B の pNP-Araf に対する K_m (mM)、 V_{max} (U/mg)、 k_{cat} (sec^{-1}) は 0.1、64.3、62.9 であった。放線菌に属する他の細菌から報告された GH51 のアラビノフラノシダーゼとこれらの値を比較したところ、Abf51A はそれらと近いパラメーターを示したが、Abf51B の K_m 及び k_{cat} は比較的低かった。

表2-4. Abf51A、Abf51B、関連酵素の反応速度論的パラメーター

Enzyme	Species	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	k_{cat} (sec^{-1})	Reference
Abf51A*	<i>Corynebacterium alkanolyticum</i>	0.7 ± 0.0	153.1 ± 1.1	149.8 ± 1.1	
Abf51B*	<i>Corynebacterium alkanolyticum</i>	0.1 ± 0.0	64.3 ± 1.7	62.9 ± 1.7	
AbfCelf	<i>Cellulomonas fimi</i> ATCC484	1.5	112.4	123.6	(16)
Abf51S9	<i>Streptomyces</i> sp. S9	1.45	221	204	(17)
AbfB	<i>Bifidobacterium longum</i> B667	0.295	417	Not Written	(14)

*Values are means $\pm$ SD (n=3)

購入試薬であるアラビノキシラン由来オリゴ糖にはアラビノキシランの加水分解産物であるキシロビオース (X2)、キシロトリオース (X3)、キシロテトラオース (X4) の XOS のみならず、アラビノキシロビオース (AX2)、アラビノキシロトリオース (AX3)、アラビノキシロテトラオース (AX4) 等の AXOS が含まれている。そこで、Abf51A 及び Abf51B の AXOS からのアラビノースの生成を調べるために、pH 7、40℃の条件で 1 %のアラビノキシラン由来オリゴ糖を含む溶液に、終濃度 0.002 mg/ml になるように各精製酵素を加えて 1 時間反応させた後、アラビノース生成量を HPLC で調べた (図 2-9)。その結果、Abf51A を加えて 1 時間反応させた溶液中にアラビノースは生成されていなかったが、

Abf51B を加えた溶液ではアラビノースが生成されていた。以上の結果から、AXOS からアラビノースを生成する活性は Abf51B の方が Abf51A に比べて高く、*C. glutamicum* R 株が AXOS 利用能を獲得するために好適な遺伝子と考えられた。

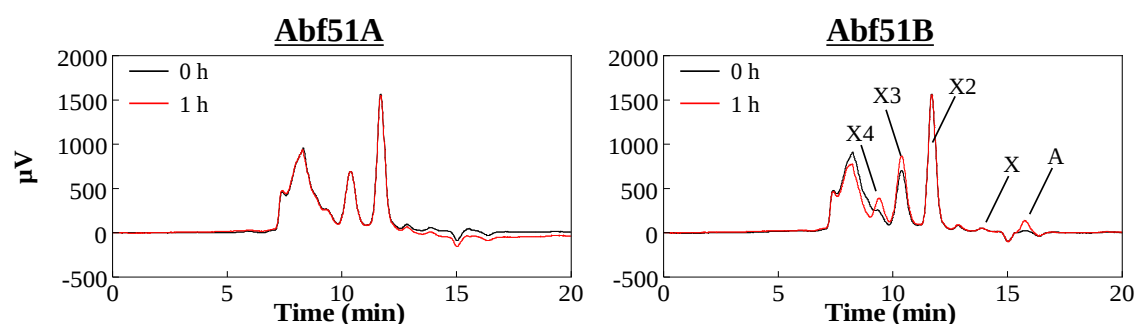


図 2-9. Abf51A 及び Abf51B の AXOS 分解活性

アラビノキシラン由来の XOS (X2: キシロビオース、X3: キシロトリオース、X4: キシロテトラオース)、AXOS (AX2: アラビノキシロビオース、AX3: アラビノキシロトリオース、AX4: アラビノキシロテトラオース) の混合試薬であるアラビノキシラン由来オリゴ糖を 1% (w/v) で含む溶液に、終濃度 0.002 mg/ml になるように精製酵素 (左: Abf51A、右: Abf51B) を加え、pH 7、40℃で 1 時間反応させた (反応開始時 0h: 黒、反応後 1h: 赤)。反応前後のそれぞれの溶液中の糖を HPLC によって調べた。保持時間はアラビノース (A) が 15.7 分、キシロース (X) が 13.9 分、X2 が 11.7 分、X3 が 10.4 分、X4 が 9.4 分である。

1-3-5. *abf51B* 導入 *C. glutamicum* における AXOS 利用能の解析

大腸菌由来のキシロース資化遺伝子 *xylAB* 及びアラビノース資化遺伝子 *araBAD* を導入した *C. glutamicum* 組換え株 (XA) は、キシロース及びアラビノースの利用能を有する (図 2-2)。XA 株に *abf51B* を導入した株を XA-Af 株とした。XA 株及び XA-Af 株に XOS 及び AXOS の取り込み体遺伝子 *xylEFG* と β -キシロシダーゼ遺伝子 *xylD* のオペロン (*xylEFGD*) を含むプラスミド pCRF101 を形質転換し、得られた株を XA(EFGD) 及び XA-Af(EFGD) 株とした。この 2 株をグルコースで培養したところ、増殖レベルに差はなく、また、細胞抽出液中の β -キシロシダーゼ活性はどちらも約 0.06 U/mg であった。

XA(EFGD) 及び XA-Af(EFGD) 株を購入試薬であるアラビノキシラン由来オリゴ糖を 0.25% で含む A 培地で 24 時間培養し、培養開始時、24 時間後の培養液及び 24 時間後の細胞抽出液に含まれる糖を LC-MS で解析した (図 2-10)。培養開始時に培地中に含まれている糖質を図 2-10A で示す。XA(EFGD) 株を 24 時間培養した培地から AX2 が検出されたが (図 2-10B)、XA-Af(EFGD) 株を 24 時間培養した培地からはオリゴ糖は何も検出されなかった (図 2-10C)。また、培養開始時の培養液にはペントース (P1) は存在しなかったが、24 時間後の両株の培養液から P1 が検出された (データは省略する)。24 時間培養した XA(EFGD) 株の細胞抽出液から AX2、AX3、AX4 が検出された (図 2-10D)。しかし、XA-Af(EFGD) 株の細胞内からはいかなるオリゴ糖も検出されなかった (図 2-10E)。以上の結果から、*Abf51B* は *C. glutamicum* において異種発現が可能であり、*abf51B* を導入した *C. glutamicum* 遺伝子組換え株は AXOSs の利用能を獲得することがわかった。

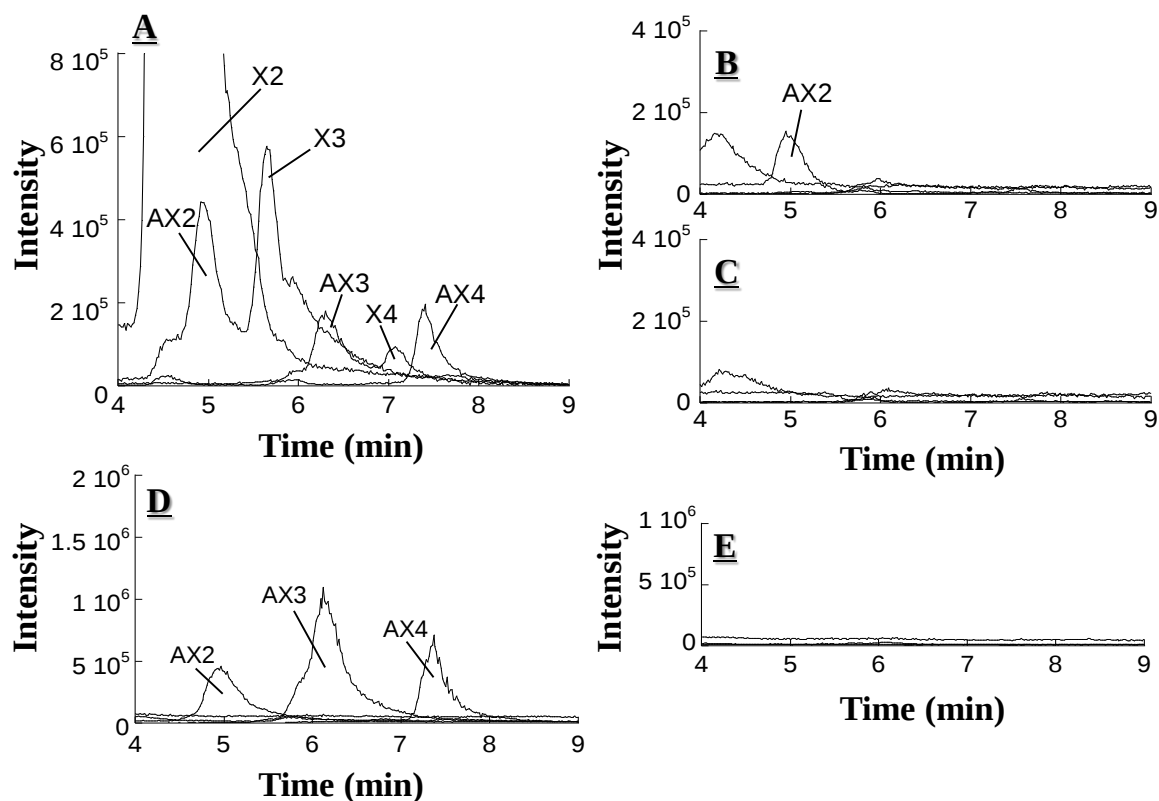


図 2-10. XA(EFGD)及び XA-Af(EFGD)株培養時の細胞内外のオリゴ糖

XA(EFGD)及び XA-Af(EFGD)株をアラビノキシラン由来オリゴ糖を 0.25%で含む培地で 24 時間培養し、培養開始時及び培養 24 時間後の培養液中に含まれる糖、24 時間後の菌体内に存在する糖を LC-MS で調べた。X2：キシロビオース（保持時間 4.7 分）、X3：キシロトリオース（保持時間 5.8 分）、X4：キシロテトラオース（保持時間 7.1 分）、AX2：アラビノキシロビオース（保持時間 5.1 分）、AX3：アラビノキシロトリオース（保持時間 6.3 分）、AX4：アラビノキシロテトラオース（保持時間 7.4 分）。

A：培養開始時に培地中に存在する糖。

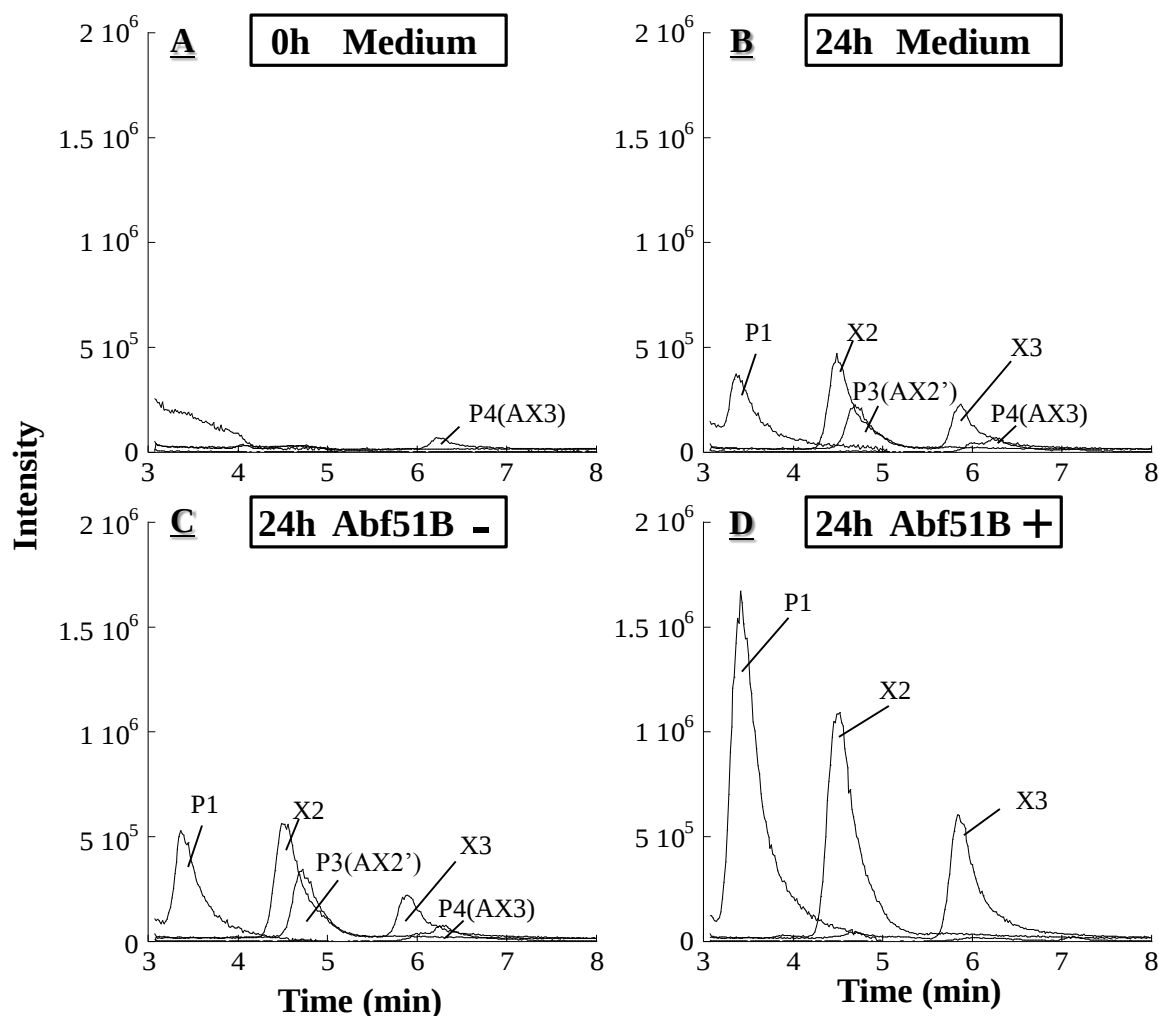
B：XA(EFGD)株を 24 時間培養した時の培養液中の糖。

C：XA-Af(EFGD)株を 24 時間培養した時の培養液中の糖。

D：XA(EFGD)株を 24 時間培養した時の細胞内の糖。

E：XA-Af(EFGD)株を 24 時間培養した時の細胞内の糖。

XylII が *C. glutamicum* において発現するかどうか、XylII によってアラビノキシラン (AX) から生成されたオリゴ糖のアラビノフラノシド側鎖を Abf51B が分解できるかどうかを調べた。まず、*xylII* 発現株として、*xylII* 遺伝子を有するプラスミド pCRF521 を野生型の *C. glutamicum* に形質転換し、R(Xyn)を構築した。R(Xyn)を 1%のグルコース及び 0.5%の AX を加えた A 培地で 24 時間培養し、培養開始時と 24 時間後の培養液中の糖を LC-MS で解析した。培養開始時にペントース 4 分子に相当するサイズの物質 (P4 とする、後に AX3 と判明する) が含まれていたが、それ以外のオリゴ糖は認められなかった (図 2-11A)。また、24 時間後の培地には P1、X2、ペントース 3 分子に相当するサイズの物質 (P3 とする、後に AX2' と判明する)、X3 が生成していた (図 2-11B)。この結果より、XylII は *C. glutamicum* において発現が可能であることがわかった。次に、同実験における 24 時間の培養後の上清を回収し、精製した Abf51B を終濃度 0.1 mg/ml になるように加え、24 時間、40℃で反応させた。コントロールとして Abf51B を加えずに 24 時間反応させた (図 2-11C)。Abf51B を加えて 24 時間反応させることにより、P1、X2、X3 のピークが増大し、P3 及び P4 のピークが消失した (図 2-10D)。この結果から、P3 がアラビノキシロビオース (AX2')、P4 がアラビノキシロトリオース (AX3) であることがわかった。念のため、図 2-11 の AX2' は図 2-10 の AX2 とは保持時間が異なる別の物質であることを述べておく。



**図 2-11. *xyII* を導入した *C. glutamicum* による
アラビノキシランからのオリゴ糖生成能**

xyII を導入した R(Xyn) を 1% グルコース及び 0.5% アラビノキシラン (AX) を含む A 培地で 24 時間培養し、培養開始時 (A) と 24 時間後の培養液 (B) 中の糖を LC-MS で分析した。24 時間培養後の培養液に精製した Abf51B を加えて (終濃度 0.1 mg/ml)、24 時間 40℃ で反応させ、LC-MS で溶液中の糖を分析した (C、D)。

A : 培養開始時に培地中に存在する糖。

B : 24 時間培養した時の培養液中の糖。

C : 24 時間培養後の培養液に Abf51B を加えずに 24 時間反応させた後の溶液中の糖。

D : 24 時間培養後の培養液に Abf51B を加えて 24 時間反応させた後の溶液中の糖。

1-3-6. *xylI* 遺伝子導入 *C. glutamicum* におけるキシラン利用能の評価

xylI の導入によって *C. glutamicum* がキシラン利用能を獲得するかどうかを調べる為に、XA-Af(EFGD)及び XA(EFGD)株に *xylI* を導入して XA-Af-Xyn(EFGD)及び XA-Xyn(EFGD)株を構築した。XA-Af(EFGD)株（図中○），XA-Xyn(EFGD)株（図中□），XA-Af-Xyn(EFGD)株（図中◇）をキシラン存在下で培養し、増殖レベル及び糖消費量を調べた（図 2-12）。具体的には、1% グルコースを含む A 培地で一晩前培養したそれぞれの細胞を、0.5%のアラビノキシラン（AX）を含む A 培地に初期 OD₆₁₀=0.5 になるように播種し、その後 48 時間に亘って培養液の OD₆₁₀ と含まれる全糖量を定量した。その結果、XA-Af(EFGD)株は 12 時間後に OD₆₁₀=3 付近まで増殖し、XA-Xyn(EFGD)株は OD₆₁₀=3.7 付近まで増殖した（図 2-12A）。*abf51B* と *xylI* を両方有する XA-Af-Xyn(EFGD)株は OD₆₁₀=5.2 まで増殖し、3 株の中で最も到達 OD が高かった（図 2-12A）。培地中の糖を定量したところ、XA-Af(EFGD)株は 48 時間でもほとんどアラビノキシランを消費していなかった。XA-Xyn(EFGD)株は 12 時間後までに約 7.3% を消費していたが、それ以降は消費していなかった（図 2-12B）。最も到達 OD が高かった XA-Af-Xyn(EFGD)株では約 19%が消費されていた（図 2-12B）。同様の実験を別のキシランである Oat spelt xylan（OSX）で行ったところ、XA-Xyn(EFGD)及び XA-Af-Xyn(EFGD)株の到達 OD は共に 7.5 であり、XA-Af(EFGD)株の 3.5 に比べてよく生育した（図 2-12C）。培地中の残存糖を培養 36 時間後の時点で調べてみたところ、XA-Xyn(EFGD)株が約 46%消費していたのに対して、XA-AF-Xyn(EFGD)株は 59%消費していた（図 2-12D）。また、AX を炭素源とした培養実験について、48 時間後に培地中に存在する糖を LC-MS によって解析した（図 2-13）。XA-Xyn(EFGD)株の培養上清から P1、X2、AX2'、AX3 が検出された（図 2-12B）。しかし、XA-Af-Xyn(EFGD)株の培養上清からは P1 以外に何も検出されなかった（図 2-12C）。以上のことから、*xylI* 遺伝子を AXOS 利用能を持つ *C. glutamicum* に導入することにより、*C. glutamicum* はキシランを直接的に利用出来ることがわかった。

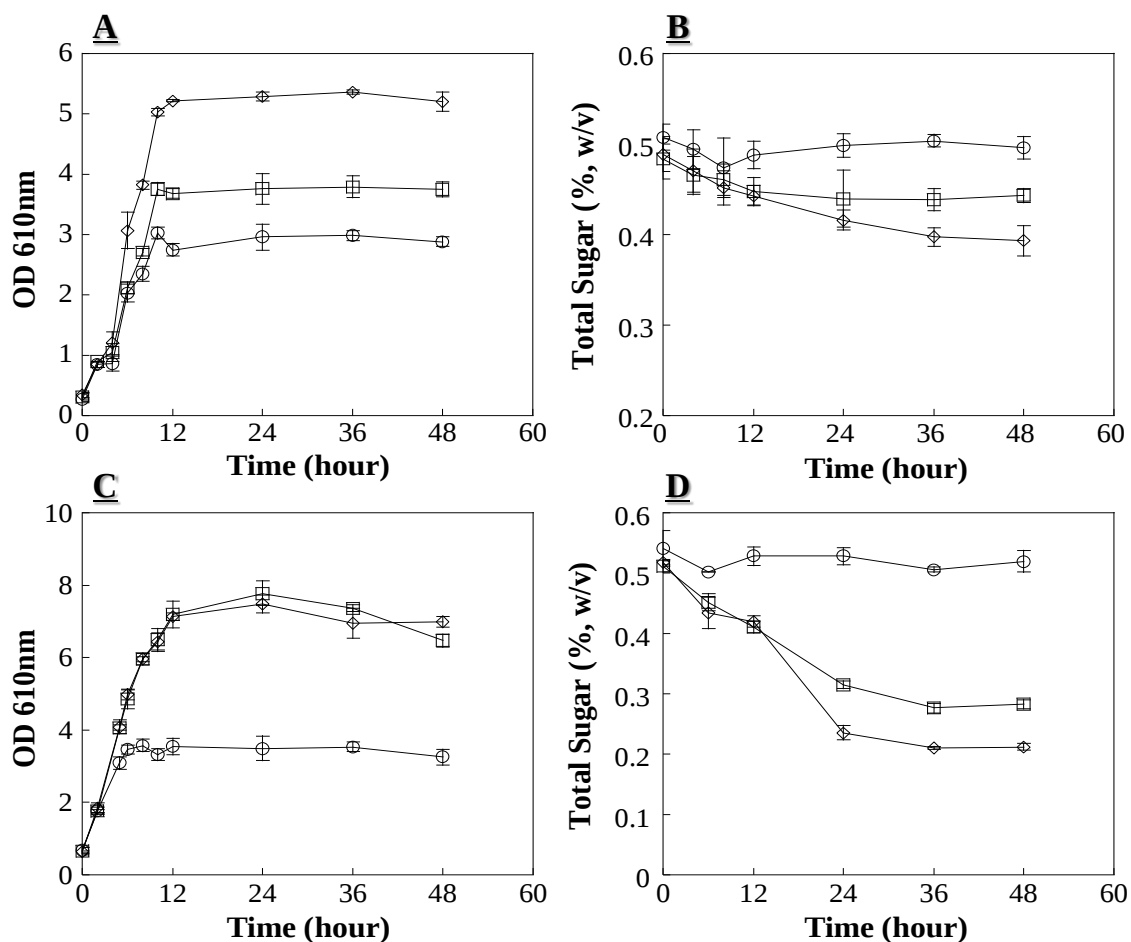


図 2-12. キシラン代謝関連遺伝子導入株のキシラン利用能の検討

○ : XA-Af(EFGD)株 - *C. glutamicum* に *xylAB*、*araBAD*、*abf51B*、*xylEFGD* を導入。
 □ : XA-Xyn(EFGD)株 - *C. glutamicum* に *xylAB*、*araBAD*、*xylI*、*xylEFGD* を導入。
 ◇ : XA-Af-Xyn(EFGD)株 - *C. glutamicum* に *xylAB*、*araBAD*、*abf51B*、*xylI*、*xylEFGD* を導入。

上記 3 株をアラビノキシラン (AX) 存在下あるいは、Oat spelt xylan (OSX) 存在下で培養した時の生育レベル、糖消費量を調べた。

A : AX 存在下で培養した時の生育レベル。

B : AX 存在下で培養した時の糖消費量。

C : OSX 存在下で培養した時の生育レベル。

D : OSX 存在下で培養した時の糖消費量。

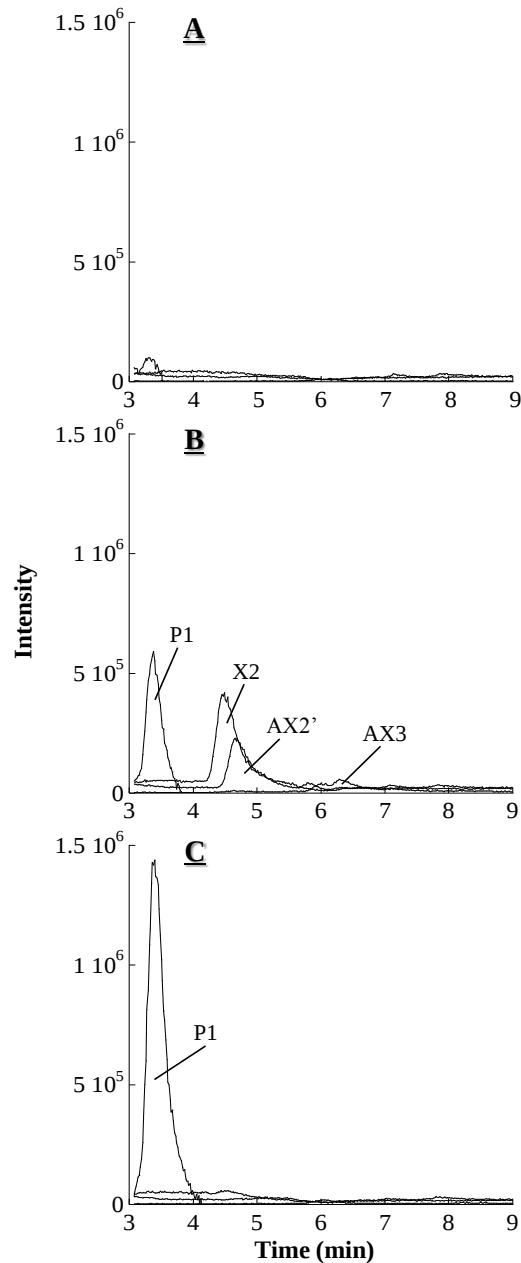


図 2-13. アラビノキシラン存在下で培養した時の培地中の糖分析

キシラン代謝関連遺伝子の導入株をアラビノキシランを含む培地で 24 時間培養した培地中に含まれる糖質を LC-MS で調べた。P1：キシロース及びアラビノース（保持時間 3.5 分）X2：キシロビオース（保持時間 4.7 分）、AX2'：アラビノキシロビオース（保持時間 4.8 分）、AX3：アラビノキシロトリオース（保持時間 6.3 分）。

A：XA-Af(EFGD)株－*C. glutamicum* に *xylAB*、*araBAD*、*abf51B*、*xylEFGD* を導入。
 B：XA-Xyn(EFGD)株－*C. glutamicum* に *xylAB*、*araBAD*、*xylI*、*xylEFGD* を導入。
 C：XA-Af-Xyn(EFGD)株－*C. glutamicum* に *xylAB*、*araBAD*、*abf51B*、*xylI*、*xylEFGD* を導入。

1-4. 考察

アラビノキシランは農業残渣等のリグノセルロース系バイオマスにおける主要多糖の 1 つとして、乾燥重量の約 3 割を占める(53)。従って、これを資化出来る微生物を用いて物質を生産することは、原料有効利用の観点から非常に重要である。アラビノキシランでは主鎖を構成する β -1,4 キシロピラノースの O-2、O-3 のどちらか、あるいは両方に α -アラビノフラノース（4 つの炭素原子と 1 つの酸素原子により 5 員環を形成したアラビノース）が結合している。キシラナーゼとアラビノフラノシダーゼはアラビノキシランの中核的な分解酵素である。キシラナーゼは、主鎖をランダムに切断してアラビノキシランからキシロオリゴ糖（XOS）及びアラビノキシロオリゴ糖（AXOS）を生成する。アラビノフラノシダーゼはアラビノキシランから直接、あるいは AXOS からアラビノースを遊離する。*C. alkanolyticum* の Abf51B は細胞質に局在するアラビノフラノシダーゼであった。このことから、Abf51B の本来の基質は細胞内に輸送可能な大きさの AXOS であると考えられる。実際に、精製した Abf51B は本研究で使用した 3 種類のキシランからは直接アラビノースを生成することはできなかった（データは省略する）。Abf51B と細胞外で働くキシラナーゼの XylII は、生来の宿主である *C. alkanolyticum* のアラビノキシラン利用能に関与すると考えられる。一方で、本研究で同定したもう一つのアラビノフラノシダーゼ Abf51A の AXOS 分解活性は非常に低かった（図 2-9）。もしかすると、Abf51A は O-2、O-3 の両方にアラビノフラノシド側鎖が置換した AXOS、あるいは他のアラビノオリゴ糖を基質とするアラビノフラノシダーゼなのかもしれない。例えば、*Bifidobacterium longum* B667 由来の AbfB は、アラビノキシラン及びアラビナン等の多糖だけでなく、アラビノビオース等のオリゴ糖を基質としてアラビノースを生成することが知られている(14)。この他に、*Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 の AXH-d3 は、アラビノキシラン中の O-2、O-3 の両方にアラビノフラノシド側鎖を有するキシロースから、O-3 の結合のみを切断することが報告されている(40, 54)。以上の事から、*abf51A* は本研究では導入しなかったが、今後アラビノキシラン及び他のアラビノースを含む糖質の利用能の強化・付与を目指す研究では有用となる可能性がある。

abf51B 及び *xylII* を導入した XA-Af-Xyn(EFGD)株は、麦の胚乳に由来するアラビノキシラン（AX）を投下量の 19%（図 2-12B）、Oat spelt xylan（OSX）を投下量の 59%を消費した（図 2-12D）。本研究で使用した AX

のアラビノース／キシロースの比率は 0.61 (A/X)であり、OSX より高いと予想される(52)。また、キシラナーゼは側鎖が置換したキシロースのグリコシド結合を切断することが出来ない(34)。これらのことから、AXの利用能が低いのは、XylII による切断点が少ないために取り込み体で取り込めるサイズまで分解されにくいためではないかと考えられる。アラビノフラノシダーゼを細胞外に分泌させてアラビノキシランの側鎖を除去することにより、キシラナーゼ活性が向上することが *B. subtilis* で報告されている(43)。このような側鎖を除去する酵素の導入によってキシラナーゼの攻撃箇所を増やすことが、側鎖の豊富なキシランの利用においては重要と考えられる。

xylII を導入した株をアラビノキシランで培養すると、培養開始時に存在しなかった P1 (キシロース、アラビノース) が培養上清に現れる (図 2-13BC)。培養上清からキシロシダーゼ及びアラビノフラノシダーゼ活性が検出されなかったため、細胞内で生成した単糖が細胞外に漏出していると思われる。このような利用可能な糖の排出機構は、菌体が資化出来る速度以上の速度で細胞内に糖が取り込まれた時に生じる浸透圧ストレス等の悪影響を回避するために備わっていると考えられている(55, 56)。例えば、大腸菌においてアラビノースの排出担体が複数同定されている(57, 58)。本研究で使用した全ての株では *xylAB* 遺伝子が染色体上に 1 コピー挿入されているが、先行研究により、このコピー数を増やすことによってキシロース資化速度を向上できることが分かっている(11)。単糖の資化速度を強化して排出に至る過剰な蓄積から回避することが出来れば、宿主のキシラン資化能を強化出来るかもしれない。また、当研究室は以前に *C. glutamicum* ATCC31831 株ゲノム上のアラビノース代謝関連遺伝子クラスター内に位置する *araE* が、アラビノースだけでなく、キシロースの取り込み体としても機能することを明らかにしている(13)。この *araE* を追加導入して一度排出された単糖の再取り込みを促進することにより、培養液中の未利用の単糖も資化出来ると考えられる。また、アラビノキシラン存在下で培養した XA-Xyn(EFGD) 株では、XA-Af-Xyn(EFGD)株と同レベルのキシロシダーゼ活性を有するにも関わらず、X2 を完全に消費出来なかった(図 2-13B)。このとき XA-Xyn(EFGD)株の細胞内には XA(EFGD)株を試薬のキシロオリゴ糖を含む培地で培養した時と同様の AXOS の蓄積 (図 2-10D) がみられた (データは省略する)。 *C. glutamicum* において AXOS は排出できないと考えられ、AXOS 存在下で細胞は浸透圧ストレスを受ける可能性がある。このようなスト

レスが原因で、XA-Xyn(EFGD)株では代謝活性自体が阻害されてしまった可能性がある。

近年、リグノセルロース系バイオマスを原料とした高効率なバイオベースの物質生産プロセスを構築するための有力なアプローチとして、**consolidated bioprocessing (CBP)** が提唱されている。CBP は宿主による糖化酵素の生産、酵素による多糖の加水分解、宿主の発酵による物質生産の工程を 1 つの反応槽で同時に行う概念である(59)。従って CBP は高価な酵素の添加、複雑な多段階工程、高コストな設備を全て必要としない点で経済性及び簡便性において優れている。効率的な CBP を実現するために宿主には、1) 糖質加水分解酵素の高い生産能、2) 生成した様々な単糖の同時利用能、3) 発酵阻害物質に対する高い耐性能、4) 高い物質生産能が求められる(60, 61)。本研究で構築したオリゴ糖取り込み体を介してキシランを利用する *C. glutamicum* は、高効率な CBP を実現するための基盤技術として活用できると思われる。序論で紹介した他研究グループのキシラン利用能を持つ *C. glutamicum* は、キシラナーゼ及びキシロシダーゼを細胞外に分泌させて細胞外でキシロースを生成した後、単糖を取り込んで利用する。この利用経路に対して、オリゴ糖取り込み体を利用した多糖利用経路はバイオマス糖化液を原料としたプロセスにおいて以下の 2 つの利点を有する。1) オリゴ糖分解酵素を分泌しないため、バイオマス前処理に由来する糖化酵素の活性阻害物質による影響を軽減できる、2) 酵素を分泌するという宿主にとっての大きな負担を軽減できる。実際のところ、オリゴ糖取り込み体を介したキシラン利用経路は、自然界のキシラン利用細菌において珍しくない。例えば、*Paenibacillus* sp. strain JDR-2 はオリゴ糖取り込み体 LplA を介して、アラビノキシランを利用する(62)。また、植物病原菌の *Xantomonas campestris* pv *campestris* において、XOS がキシラン利用遺伝子のインデューサーとして働くことが明らかにされており、インナーメンブレンに局在する XypB が XOS 取り込み体として機能する(63)。しかし、生来的に利用能を持たない従来 of 工業微生物に対してキシラン利用能を獲得させる目的でオリゴ糖取り込み体が導入されたのは、これまでに我々と大腸菌の例以外にない(41)。加えて、大腸菌の論文内で利用されていた *Klebsiella* 属に由来するシンポーター型の XOS 取り込み体 XynT は、AXOS 取り込み能を持たないと考えられている。しかし、我々が利用した XylEFG は XOS 及び AXOS の取り込みが可能であることが明らかにされている(18)。従って、草本及び農業残渣等のアラビノフラノシド側鎖の多いアラビノキ

シランも直接利用可能なオリゴ糖取り込み経路を実現したのは本研究が初めてである。

本研究においては XylII を分泌後に培地中に遊離させているが、近年、細胞外壁上に糖質加水分解酵素を結合させる技術がバイオプロセス効率化の基盤技術として注目されている。この技術は微生物による発酵生産プロセスにおいて、後述する 2 つの大きな利点を持つ(64-66)。1 つ目は、糖化酵素を細胞周辺に配し糖質の分解を細胞の近傍で行うため、分解後の利用しやすい糖質が培養液中に拡散しにくい。これにより、コンタミネーションのリスクを減らすことが出来る。2 つ目は、遊離の酵素と異なり菌体に付着しているため、菌体を回収・再使用した多段階の発酵プロセスにおいて、酵素を培地と共に廃棄することを防げる。このような有用な技術と、本研究で明らかにしたオリゴ糖取り込み体を利用した効率的な多糖利用技術等をうまく組み合わせることにより、リグノセルロース系バイオマスを原料とした経済的で高効率な物質生産プロセスの構築が可能になると思われる。

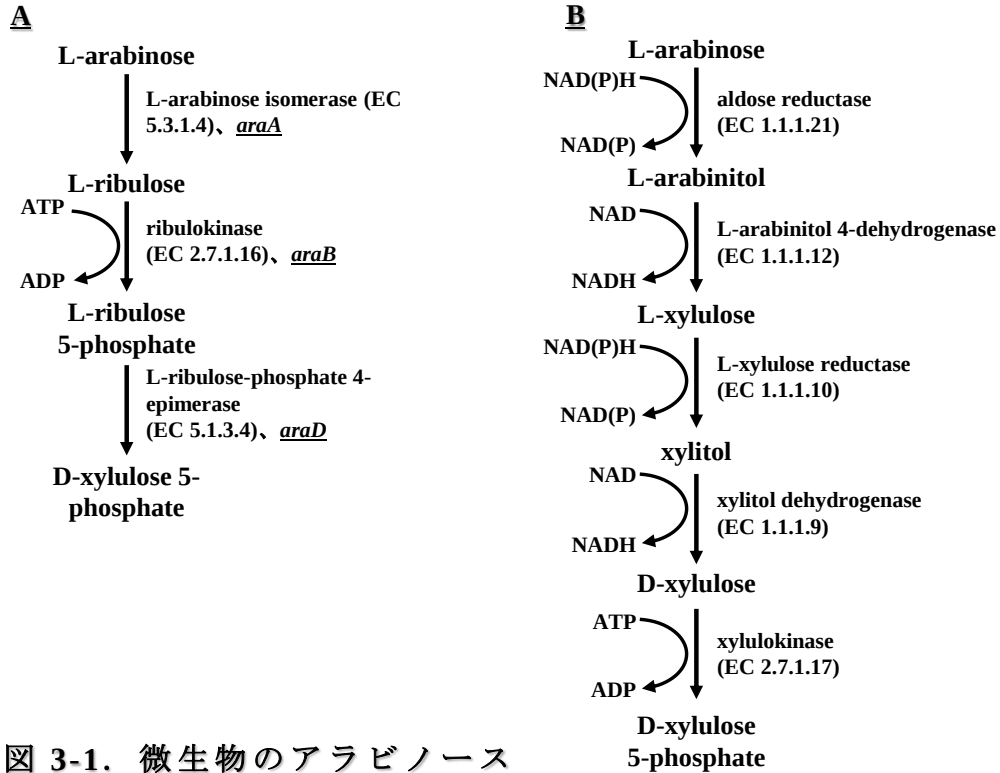
第二章 コリネ型細菌におけるアラビノース代謝関連遺伝子の 発現制御機構の解明

2-1. 序論

リグノセルロース系バイオマスは多くの微生物にとって利用しやすい D-グルコース以外にも、D-キシロース、L-アラビノース等のペントースを豊富に含んでいる。原料有効利用の観点から、微生物を用いた物質生産においては含まれる全ての糖を同時に資化出来る宿主が望まれているが、大腸菌・枯草菌等の従来の工業微生物はグルコースの優先代謝機構を持つため、バイオマスに由来する多様な糖の共存条件下においてペントースの利用能が乏しい。有用工業微生物である *C. glutamicum* は一般的にペントースの資化経路を持たず、*C. glutamicum* におけるペントース利用に関する研究報告は少ない。そのような中で、当研究室は以前に *C. glutamicum* ATCC 31831 株が例外的にアラビノース資化能を有することを見出し、本菌ゲノムからアラビノース代謝関連遺伝子クラスターを同定した(67)。そこで本研究では、有用工業微生物の *C. glutamicum* のペントース利用能強化に有用な基盤を得るため、*C. glutamicum* ATCC 31831 株のアラビノース代謝関連遺伝子の発現制御機構の解明を試みた。関連の研究背景として、まずは微生物のアラビノース代謝経路から概説する。

細菌のアラビノース代謝経路は *Escherichia coli* でよく研究されている(図 3-1A)。この経路においてアラビノースは AraA (アラビノースイソメラーゼ)、AraB (リブロキナーゼ)、AraD (リブロース 5 リン酸 4-エピメラーゼ) の 3 種の資化酵素によって、ペントースリン酸経路中の D-キシロース 5 リン酸に変換される。また、植物の根圏に生息する一部のプロテオバクテリア (*Azospirillum brasilense*、*Sinorhizobium meliloti*、*Pelomonas saccharophila* 等) は、*E. coli* のものとは異なるアラビノース資化経路を有する(図 3-1C) (68, 69)。この経路ではアラビノースデヒドロゲナーゼ、アラビノノラクトナーゼ、アラボン酸デヒドラターゼの 3 種の酵素により、アラビノースは 2-ケト-3-デオキシアラボン酸 (L-KDA) に変換される。L-KDA は L-KDA デヒドラターゼ、 α -ケトグルタレートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼにより、クエン酸回路中の α -ケトグルタル酸に変換される。また、L-KDA からピルビン酸とグリコールアルデヒドを生成する経路が *Bradyrhizobium japonicum* で明らかにされている(70)。一方で *Tricoderma reesei* 等から、4 種の酸化還元酵素が関与する真菌特有のアラビノース資化経路が見つかっている(図 3-1B) (71)。この経路ではアラビノースは L-アラビトール、L-キシロース、D-キシリト

ール、D-キシルロース、D-キシルロース 5 リン酸と順に変換される。この変換反応はアルドースレダクターゼ、L-アラビトール 4-デヒドロゲナーゼ、L-キシルロースレダクターゼ、キシリトールデヒドロゲナーゼ、キシルロキナーゼによって触媒される。初めに紹介した *E. coli* のアラビノース資化経路が、アラビノース資化性の細菌において広く保存されているが、関連遺伝子の発現制御に関しては *E. coli* と *Bacillus subtilis* から、異なるアラビノース応答性制御機構が報告されている。

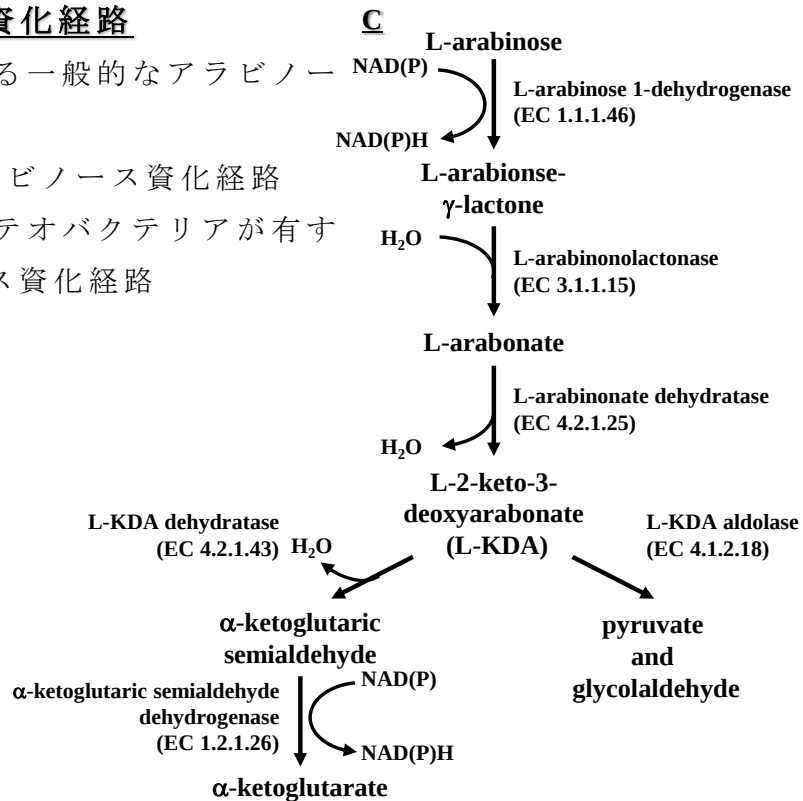


**図 3-1. 微生物のアラビノース
資化経路**

A: 細菌における一般的なアラビノース資化経路

B: 真菌のアラビノース資化経路

C: 一部のプロテオバクテリアが有するアラビノース資化経路



E. coli においては AraC ファミリーに属する AraC がアラビノース応答性転写因子として、アラビノース代謝関連遺伝子の発現促進・抑制に関与する(72)。AraC は 292 アミノ酸からなるタンパク質であり、AraC-like ligand binding domain (PfamID: PF02311、アミノ酸配列 21-156 の領域) と、2 つの HTH_18 : Helix-turn-helix domain (PfamID: PF00165、アミノ酸配列 186-227 及び 241-277 の領域) を有し、初めのドメインがアラビノースとの結合及びダイマー形成、残り 2 つのドメインが DNA との結合を担う。AraC は水溶液中においてダイマーを形成しており、それぞれの DNA 結合ドメインが独立して標的のダイレクトリピートモチーフに結合する (図 3-2)。アラビノース非存在下において AraC は *araB* プロモーター内の I1 とそこから約 210 塩基上流にある O2 に結合して、*araB* 遺伝子上流にループ構造を形成する(73-75)。これにより、アラビノース資化遺伝子オペロン (*araBAD*) の発現を強力に抑制する。また、この構造により上流逆向きに位置する *araC* の発現も同時に抑制される(図 3-2)(76)。アラビノース存在下において、AraC は I1 及び O2 ではなく、I1 及び I2 に結合するためループ構造は解消され、このタンデムな結合により *araB* プロモーターは活性化される (図 3-2) (77, 78)。この転写促進機構がアラビノース取り込み体をコードする *araFGH* 及び *araE* プロモーターにおいても存在すると考えられている(76)。*araC* の発現はループ構造の解消に伴い、一時的に脱抑制されるが、後に AraC が O1 に結合することにより自己抑制される。

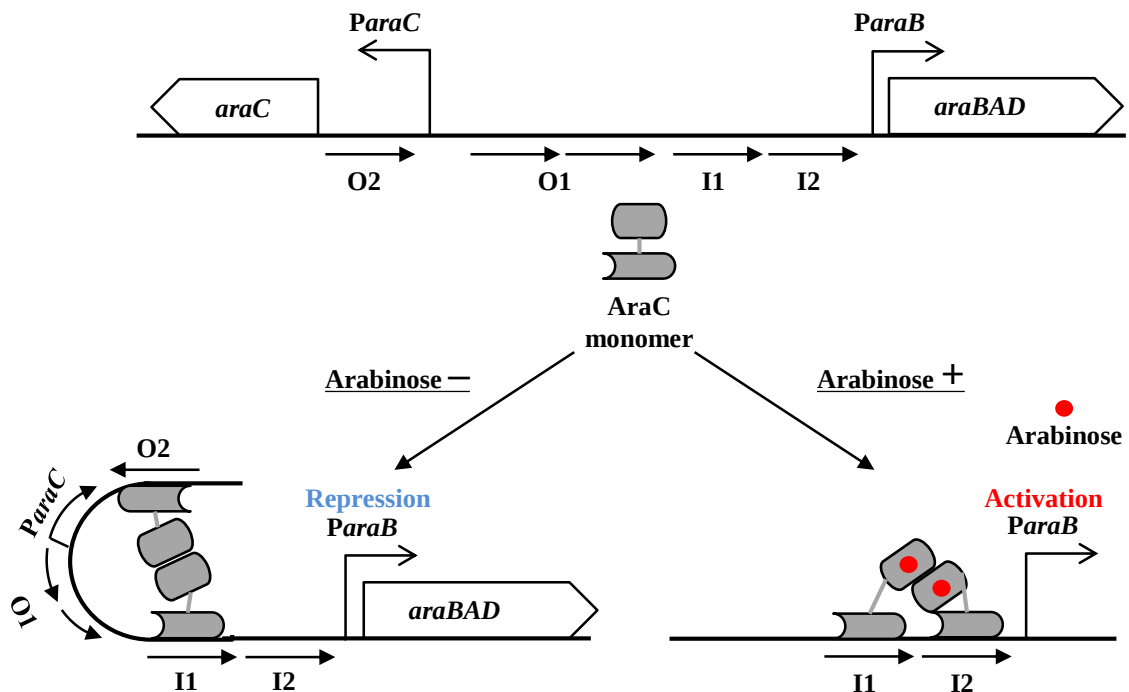


図 3-2. AraC による遺伝子発現制御機構

アラビノース非存在下において、AraC ダイマーは I1 及び O2 に結合し、*araB* プロモーター（*ParaB*）上流にループ構造を形成する。このループ構造により、*araBAD* オペロンの発現と、上流逆向きに位置する *araC* 遺伝子の発現発現を抑制する。アラビノース存在下においては、アラビノースが結合することにより AraC タンパク質の構造が変化し、O2 に結合していた AraC が I2 に結合する。これによりループ構造は解消される。また、I1-I2 に結合した AraC は、*ParaB* における RNA ポリメラーゼの集合及びその転写開始を促進するアクチベーターとして働く。

B. subtilis においては GntR ファミリーに特徴的な DNA 結合ドメインを N 末端領域（アミノ酸配列 25-90 の領域）に有する AraR による発現抑制機構が知られている。AraR の C 末端領域（アミノ酸配列 103-378 の領域）にある基質結合ドメインは、LacI ファミリーの転写因子に相同性を示すため、AraR はキメラ型タンパク質であるが、GntR ファミリーの一員として考えられている(79)。AraR は *E. coli* の AraC レギュロンのカウンターパートに加えて、アラビノースを含むオリゴ糖及び多糖の分解酵素をコードする遺伝子の発現も制御する(80-82)。アラビノース非存在下において AraR は、アラビノース資化遺伝子オペロン (*araABDLMNPQ-abfA*)、*araE*、*abnA* (アラビナナーゼ)、*xsa*、*araR* の 5 つのプロモーター領域に結合する。この中で、アラビノース資化遺伝子オペロン及び *araE* のプロモーターにおいてのみ、AraR によるループ構造の形成が認められており、他よりも強く発現を抑制すると考えられている(83)。このように、AraR はレギュロンの遺伝子間で制御様式を使い分けることで遺伝子毎のアラビノース応答を高度に調整していると考えられている。

E. coli では cAMP-CRP、*B. subtilis* では CcpA によって、グルコース共存時にアラビノース代謝関連遺伝子は転写レベルで発現が抑制されることが明らかにされている(84, 85)。従って、これらの細菌におけるアラビノース資化能はグルコースが共存する場合に乏しい。

先行研究によって、*C. glutamicum* ATCC 31831 株のゲノム上にアラビノース代謝関連遺伝子クラスターが同定されている（図 3-5）(67)。同研究において、クラスター内の LacI ファミリーの転写因子をコードする遺伝子 *araR* の破壊により、アラビノース非存在下におけるクラスター上の遺伝子の発現が上昇することが分かっている。このことから、*C. glutamicum* におけるアラビノース代謝関連遺伝子の発現制御に AraR が関与することが示唆されるが、よく研究が進んでいる *E. coli* 及び *B. subtilis* のアラビノース応答性転写因子と *C. glutamicum* の AraR は異なる転写因子ファミリーに属しており、制御機構は明らかではなかった。また、本菌はグルコースとアラビノースを同時に利用することが明らかにされており、制御系が異質のものである可能性が強く示唆された。そこで本研究では、*C. glutamicum* を宿主としたリグノセルロース系バイオマスからの効率的な物質生産に必須のペントース資化能の基盤を得るため、*C. glutamicum* ATCC 31831 株のアラビノース代謝関連遺伝子の発現制御機構を解明した。

2-2. 材料と方法

2-2-1. アラビノース代謝関連遺伝子破壊株の構築

本研究においてアラビノース資化遺伝子の *araA* 及びアラビノースプロトンシンポーターをコードする *araE* のマーカーレス遺伝子破壊株を構築した。以下に *araA* 遺伝子破壊株($\Delta araA$)、*araE* 遺伝子破壊株($\Delta araE$)の構築方法を示す。これに関連して、アラビノース資化株の *C. glutamicum* ATCC 31831 株は第一章で使用した *C. glutamicum* R 株に比べて形質転換効率が悪く遺伝子操作が難しい。そこで、当研究室が保有する温度感受性プラスミド(pCRD206)を使用した(19)。pCRD206 の *repA* 遺伝子は2カ所に変異を有しており (G109D、E180K)、これにより、pCRD206 を保有する菌体は選択培地において 25℃であればプラスミドを増幅し生育が可能であるが、37℃においてはプラスミドを保持出来ず生育出来なくなることが報告されている。従って、37℃の培養によって、プラスミドがゲノムに挿入された株を選抜出来る。

1) $\Delta araA$ 構築

araA 遺伝子上流の配列をクローニングするために、*araA*-ML-U-F/*araA*-ML-U-R をプライマーにして、*C. glutamicum* ATCC 31831 株のゲノムを鋳型として PCR を行った。また、*araA* 遺伝子下流の配列をクローニングするために、*araA*-ML-D-F/*araA*-ML-D-R をプライマーに *C. glutamicum* ATCC 31831 株のゲノムを鋳型として PCR を行った。それぞれの PCR で得られた DNA 断片を *Xba*I 及び *Spe*I で消化して、pCRD206 の *Xba*I サイトに挿入し、pCRF500 を構築した。

pCRD206 を使用した相同組換えは参考文献に詳しく述べられている。pCRF500 を *C. glutamicum* ATCC 31831 のコンピテトセルにエレクトロポレーション法により導入し、カナマイシンを含む A プレートに塗布して一晩 25℃で培養した。翌日に得られたコロニーは pCRF500 をプラスミドとして保持している。得られたコロニーを 10 ml の A 培地に終濃度 1% グルコースを加えてカナマイシン存在下において 25℃で一晩振盪培養した。培養液 10 μ l をカナマイシンを含む A プレートに塗布し、37℃で一晩培養した。ここで得られたコロニーはプラスミドがゲノムに挿入されている。得られたコロニーを 10 ml の A 培地に終濃度 1%のグルコースを加えて、カナマイシンを加えずに 33℃で一晩振盪培養した。培養液 10 μ l を

2% スクロースを含む A プレートに塗布し、33℃で一晩培養した。*araA* 遺伝子の破壊を PCR で確認した。

2) $\Delta araE$ 構築

araE 遺伝子上流の配列をクローニングするために、*araE*-ML-U-F/*araE*-ML-U-R をプライマーに *C. glutamicum* ATCC 31831 株のゲノムを鋳型として PCR を行った。また、*araE* 遺伝子下流の配列をクローニングするために、*araE*-ML-D-F/*araE*-ML-D-R をプライマーに *C. glutamicum* ATCC 31831 株のゲノムを鋳型として PCR を行った。それぞれの PCR で得られた DNA 断片を *Xba*I 及び *Bam*HI で消化して、pCRD206 の *Xba*I サイトに挿入し、pCRF501 を構築した。pCRF501 を「1) $\Delta araA$ 構築」における pCRF500 と同様に使用して、 $\Delta araE$ を構築した。

2-2-2. AraR 結合サイト破壊株の構築

詳細は結果の部分で記述するが、AraR 結合サイトは *araB-galM* 遺伝子間に 1 カ所 (BSB)、*araE* プロモーター内に 2 カ所 (BSE1、BSE2) 存在する。また、結合サイトに対する AraR の DNA 結合活性は、結合モチーフ中心の CG を AT に置換すると著しく低下することが *in vitro* で確認された。この知見を元に、*C. glutamicum* ATCC 31831 株ゲノム上の AraR 結合サイトの破壊株を構築した。まずは変異を加えた BSB を末端として、両側に伸びる 2 つの DNA 断片を得るために、*C. glutamicum* ATCC 31831 株ゲノムを鋳型として、プライマーセット BSB-integ-FW/BSB-mut-RV 及び BSB-integ-RV/BSB-mut-FW を用いて 2 組の PCR を行った。得られた 2 断片は変異を含む BSB の領域を共通して末端に有する。得られた 2 断片間の重なる領域を利用してオーバーラップエクステンション PCR を行い、2 断片を融合した。その後 *Eco*RV、*Xba*I により制限酵素処理し、同一の酵素で消化した pCRD206 とライゲーションした。完成したプラスミドを pCRF503 とした。BSE1 破壊株構築用プラスミド (pCRF504) を構築する時には、BSE-integ-FW/BSE1-mut-RV 及び BSE-integ-RV/BSE1-mut-FW の 2 組のプライマーセットを使用して、上記と同じ実験を行った。BSE2 破壊株構築用プラスミド (pCRF505) を構築する時には、BSE-integ-FW/BSE2-mut-RV 及び BSE-integ-RV/BSE2-mut-FW の 2 組プライマーセットを使用して、上記と同じ実験を行った。BSE1 及び BSE2 破

壊株構築用プラスミド (pCRF506) を構築する時には、pCRF504 を PCR の 鋳 型 と し て BSE-integ-FW/BSE2-mut-RV 及 び BSE-integ-RV/BSE2-mut-FW の 2 組のプライマーセットを使用して、上記と同じ実験を行った。pCRF503、pCRF504、pCRF505、pCRF506 を使用して AraR 結合サイトを破壊する方法は、上記「アラビノース代謝関連遺伝子破壊株の構築、1)ΔaraA 構築」と同様である。

2-2-3. PgalM-lacZ 及び ParaR-lacZ 融合遺伝子導入株の構築

C. glutamicum ATCC 31831 株ゲノム上に *lacZ* 融合遺伝子を挿入する位置を図 3-3 で示す。まず、相同組換え領域として使用する 2 つの配列を増幅する為に、integ-top-FW/integ-top-DW (図 中 A) 、integ-bottom-FW/integ-bottom-DW (図 中 B) のプライマーセットを用いて、*C. glutamicum* ATCC 31831 株ゲノムを鋳型として 2 組の PCR を行った。増幅された 2 断片を *Bam*HI/*Sca*I、*Xba*I/*Sca*I でそれぞれ消化して、*Bam*HI/*Xba*I で消化した pCRD206 とライゲーションした。完成したプラスミドを pCRF507 とした。次に、*E. coli* 由来の *lacZ* 遺伝子を得るために、*lacZ* 挿入プラスミドの pCRA741(86)を鋳型として *lacZ*-FW/*lacZ*-DW のプライマーセットを使用して PCR を行った。PCR 産物と pCRF507 を *Sca*I で消化してライゲーションし、pCRF508 (図 3-3) を構築した。*galM* プロモーターの配列を得るために、*C. glutamicum* ATCC 31831 株ゲノムを鋳型として、PgalM-*lacZ*-FW/PgalM-*lacZ*-RV のプライマーセットで PCR を行った。PCR 産物と pCRF508 を *Spe*I で消化し、ライゲーションした。*galM* プロモーターの挿入方向をシーケンス解析によって確認し、正しい向きで挿入されたプラスミドを pCRF511 とした。次に、*araR* プロモーターの配列を得るために、*C. glutamicum* ATCC 31831 株ゲノムを鋳型として、ParaR-*lacZ*-FW/ParaR-*lacZ*-RV のプライマーセットで PCR を行った。この PCR 産物と pCRF508 を *Spe*I で消化し、ライゲーションした。*araR* プロモーターの挿入方向をシーケンス解析によって確認し、正しい向きで挿入されたものを pCRF509、逆向きに挿入されたものを pCRF510 とした。pCRF509、pCRF510、pCRF511 を用いて、プロモーター-*lacZ* 融合遺伝子の導入株を構築した。ゲノムへの導入方法は「アラビノース代謝関連遺伝子破壊株の構築の、1)ΔaraA 構築」と同様である。pCRF509 を用いて構築された株を ParaR-F、pCRF510 を用いて構築された株を ParaR-R、pCRF511 を用いて構築された株を PgalM-F とした。

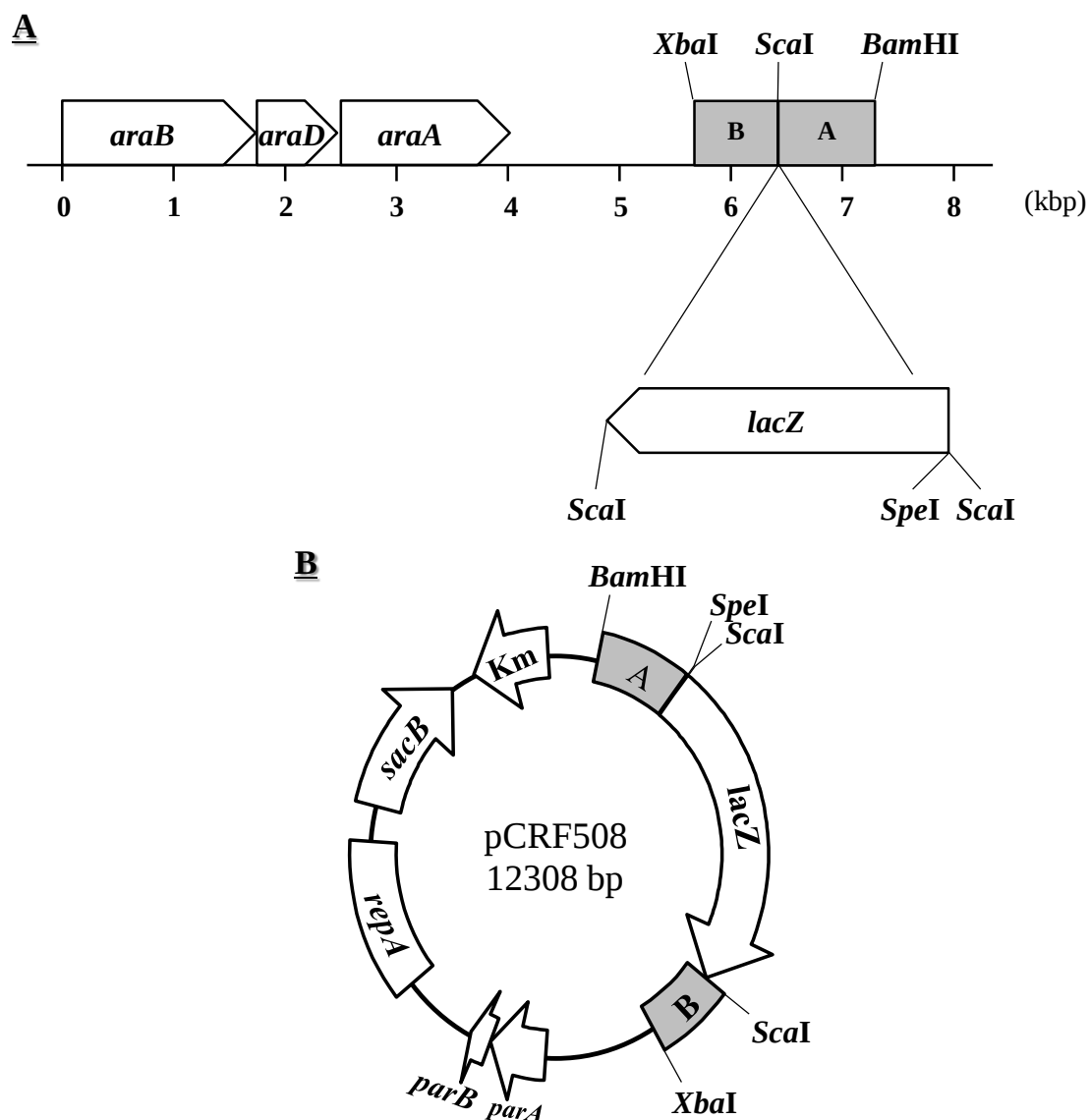


図 3-3. *lacZ* 遺伝子ゲノム導入株

A : *C. glutamicum* ATCC 31831 株のアラビノース資化遺伝子 *araBDA* 下流の領域。A 及び B の領域を所定の制限酵素認識配列を持つプライマーを用いて増幅し、相同組換え領域として使用した。

B : 2 つの相同組換え領域 (A 及び B) 及び大腸菌由来の *lacZ* 遺伝子を挿入した pCRD206。pCRF508 の *SpeI* 認識部位に対してプロモーター配列を挿入することにより、プロモーター-*lacZ* 融合遺伝子を合成した。

2-2-4. LacZ レポーターアッセイ

10 ml A 培地に終濃度 1% (w/v) のグルコースを加え、*ParaR-F*、*ParaR-R* を一晩前培養する。培養液を 10 ml A 培地に終濃度 2% (w/v) の D-グルコースあるいは L-アラビノースを加えた液体培地に、 $OD_{610}=0.2$ になるように植え継ぎ 4 時間培養する。菌体を回収した後、Z-buffer (組成は下記のとおり) で 1 回洗った後に同バッファーで再懸濁し、トルエンにより細胞抽出液を得た。 β -ガラクトシダーゼ活性を *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside を基質として使用して測定した(87)。

・ Z-buffer 組成

Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	16.1 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5.5 g
KCl	0.75 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25 g
DDW up to	1 l

2-2-5. 定量 RT-PCR 法による遺伝子発現解析

1) 培養及び菌体回収

10 ml A 培地に糖を加えずに、*C. glutamicum* ATCC 31831 株を一晩前培養した。その培養液を 100 ml の新しい A 培地に $OD_{610}=0.2$ になるように希釈した。4 時間後に 50% D-グルコースあるいは、50% L-アラビノースを 4 ml 加えて終濃度 2% (w/v) にする。加える直前を 0 分として実験用途に合わせて糖添加数分後の菌体を回収した。RNA を安定に回収するために、2 ml チューブに予め RNeasy Protect Cell Reagent (QIAGEN) を 1 ml 加えておき、等量の培養液を加えて懸濁した。10 分間室温で静置した後、遠心分離(8,000g、4℃、5 分)を行い、ペレットを -80℃ で保存した。

2) RNA 抽出

C. glutamicum ATCC 31831 株からのトータル RNA 抽出は RNeasy minikit (QIAGEN) を使って行った。マニュアルに従って実験を行った。

3) cDNA 合成

トータル RNA からの cDNA 合成は PrimeScript Reverse Transcriptase (TAKARA) と Random Primer (hexadeoxyribonucleotide mixture; pd (N)6) (TAKARA)を使用して行った。

・ プライマーのアニーリング反応

Total RNA	0.2 µg
Random Primer (50 µM)	1 µl
DDW up to	11.5 µl

65℃で 5 分反応させた後、氷上で 1 分間静置する。アニーリングサンプルに下記の逆転写反応溶液を 8.5 µl 添加した。

・ 逆転写反応溶液

5 × PrimeScript Buffer	4 µl
dNTP	1 µl
Ribonuclease Inhibitor (TAKARA)	0.5 µl
PrimeScript Reverse Transcriptase	0.5 µl
DDW up to	8.5 µl

穏やかに攪拌した後、30℃で 10 分間の前保温、42℃で 60 分間の逆転写反応、95℃で 5 分間の酵素の不活化を順に行った。反応後のサンプルを氷上で 1 分間静置した後、180 µl の DDW を加えた。得られた溶液を下記の定量 RT-PCR における cDNA sample として使用した。

3)定量 RT-PCR

定量 RT-PCR は、Applied Biosystems 7500 Fast real-time PCR system を使用した。実験時の反応系は下記のとおり。

・ 定量 RT-PCR 反応系

FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Diagnostics)	10 µl
Primer 1	0.3 µM
Primer 2	0.3 µM
cDNA sample	0.4 µl
DDW up to	20 µl

16S rRNA の発現レベルを内在性コントロールとした。PCR 条件は下記のとおり。

95°C 10 分
↓
95°C 15 秒 → 60°C 40 秒 × 40 サイクル
↓
95°C 15 秒
↓
60°C 1 分
↓
95°C 15 秒
↓
60°C 15 秒

5'-RACE

転写開始点を決定する為に、5'-Full RACE Core Set (TAKARA) を使用した。マニュアルに従って実験を行った。

2-2-6. AraR タンパク質発現系の構築及び精製

ゲルシフトアッセイ及び DNaseI フットプリント法において使用する為の AraR タンパク質を *E. coli* BL21(DE3)において発現させ精製した。

1) *araR* 発現用プラスミドの構築

araR 発現系を構築する為に、*C. glutamicum* ATCC 31831 株のゲノムを鋳型にして、AraR-Ex-F/AraR-Ex-R をプライマーとして用いて PCR を行い *araR* の全長配列を増幅した。この断片と pET-28a ベクター (Merck KGaA) を *NdeI/EcoRI* で消化後にライゲーションして、*araR* 発現用プラスミドの pCRF502 を構築した。

2) AraR タンパク質の精製

pCRF502 を導入した BL21 (DE3) を 100 ml の LB 培地で 37°C において OD₆₀₀ = 0.6 になるまで培養した。その後、終濃度が 1 mM になるように isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を加え、1 時間の培養後に、

6,000g、4℃、5 分の遠心分離によって菌体を回収した。回収された菌体から Ni-NTA Fast Start kit (QIAGEN) を使用して、His タグ融合 AraR タンパク質を回収した。実験は付属のマニュアルに沿って行われた。精製した AraR タンパク質溶液を PD-10 カラム (GE Healthcare) にアプライし、20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (DTT) からなるバッファーで溶出した。タンパク質の定量は、Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) を使用して行った。

2-2-7. ゲルシフトアッセイ

1)ゲル作製

非変性電気泳動用ゲルの組成は下記のとおり。

・ ゲル一枚分の組成

30% Acrylamide/Bis Solution (Bio-Rad)	2 ml
5×TBE (下記)	1 ml
50 % (v/v) Glycerol	1 ml
10 % (w/v) 過硫酸アンモニウム溶液	60 µl
TEMED (和光)	50 µl
DDW	6 ml

・ 5×TBE

Tris	53.9 g
ホウ酸	27.5 g
EDTA・2Na	3.7 g
DDW up to	1 l

上記の様に試薬を混合し、AE-6500 ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 (ATTO) で使用できるサイズのゲルを作製した。

2)DNA プローブの作製

C. glutamicum ATCC 31831 株のゲノムを鋳型として、PA-F/PA-R (*araB* 上流領域)、PB-F/PB-R (*galM* 上流領域)、PC-F/PC-R (*araE* 上流領域)、PD-F/PD-R (*araR* 上流領域) のプライマーセットを使用した 4 組の PCR を行い、*araB*、*galM*、*araE*、*araR* 遺伝子の翻訳開始点上流約 400 塩基対

の DNA 断片を得た。得られた 4 種の DNA 断片を Mighty Cloning Reagent Set を使って pUC118 に挿入した。得られた 4 つのプラスミド DNA を鋳型として、そのマルチクローニングサイトを挟む pUC-IR-Fw 及び pUC-IR-Rv プライマーを用いて PCR を行い、この PCR 産物をゲルシフトアッセイにおける DNA プローブとして使用した。*galM* 上流領域の数種の長さの異なる DNA プローブは、上記の PB-F/PB-R をプライマーとして増幅された DNA 断片を有するプラスミドを鋳型として、P2-F/PB-R (P2 作製時)、P3-F/PB-R (P3 作製時)、P4-F/PB-R (P4 作製時)、P5-F/PB-R (P5 作製時)、PB-F/P6-R (P6 作製時)、PB-F/P7-R (P7 作製時)、PB-F/P8-R (P8 作製時)、PB-F/P9-R (P9 作製時)、のプライマーセットを使用して PCR を行い作製した。BSB の特定の 3 塩基対を置換したプローブの作製は、*C. glutamicum* ATCC 31831 株ゲノムを鋳型としたオーバーラップエクステンション PCR によって行われた。6 種類のプローブ作製における P1、P4 は、PA-F、PB-R であり、それぞれの配列置換プローブの合成に使用した P2 及び P3 は図 3-4 の表にまとめた。オーバーラップエクステンション PCR による融合後の DNA 断片を Mighty Cloning Reagent Set を使って pUC118 に挿入した。構築されたプラスミドを鋳型として PA-F/PA-R のプライマーセットで PCR を行い、ゲルシフトアッセイで使用する配列置換を含む DNA プローブを合成した。

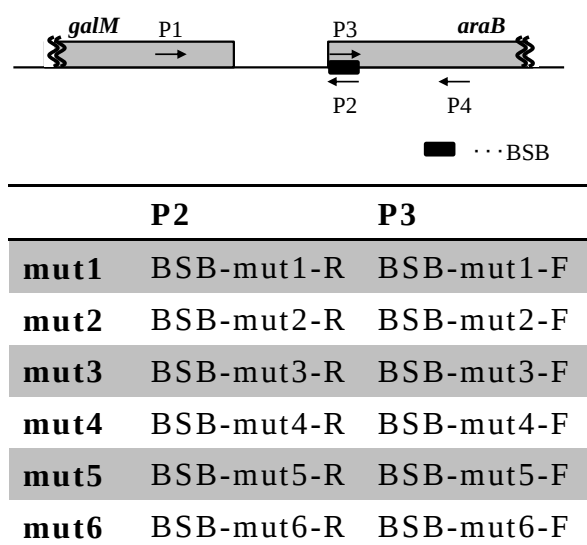


図 3-4. BSB に配列置換を含む DNA プローブの作製方法

P1/P2 及び P3/P4 の組み合わせの 2 組の PCR を行った後、得られた 2 断片をオーバーラップエクステンション PCR により融合した。それぞれの配列置換プローブ合成時に使用した P2 及び P3 プライマーを表にまとめた。

3)DNA-AraR タンパク質結合反応系及び電気泳動条件

所定の濃度の AraR タンパク質と DNA プローブを以下の溶液中で混合した。

・ タンパク質-DNA 結合反応溶液（ゲルシフトアッセイ）

20 mM	Tris-HCl (pH 7.5)
50 mM	NaCl
2.5 mM	MgCl ₂
0.45 mM	EDTA
0.5 mM	DTT
0.05 % (v/v)	Nonidet P-40
10 % (v/v)	Glycerol
DDW up to	20 µl

混合した後、25℃で 25 分間静置し、10×BPB（組成は下記のとおり）を 2 µl 加えて混合した後、全量をゲルの上段にアプライして、150V で 50 分間電気泳動した。ランニングバッファーには 0.5×TBE buffer を使用した。

・ 10×BPB

Bromophenol blue	1 mg
50 % (v/v) Glycerol	0.2 ml
DDW up to	1 ml

泳動後のゲルを SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (10,000X Concentrate in DMSO) (ThermoFisher) を使用して染色し、ルミノ・イメージアナライザー LAS-3000 (FUJIFILM) を使って撮影した。

2-2-8. DNaseI フットプリント法

1)IRD700 ラベル DNA プローブの作製

C. glutamicum ATCC 31831 株のゲノムを鋳型に、P5-F/P6-R をプライマーにして PCR を行い、*araB* の転写開始点より 90 塩基下流から 49 塩基上流までを増幅した。この DNA 断片を Mighty Cloning Reagent Set によって pUC118 に挿入した。このプラスミドを鋳型にして、pUC-IR-Fw と

IRD700 によって末端がラベルされた pUC-IR-Rv-IRD プライマーを使って PCR を行い、末端が IRD700 によってラベルされた DNA プローブを得た。また、*araE* 転写開始点より 85 塩基下流から 104 塩基上流までを *araE*-footprint-F/*araE*-footprint-R をプライマーとした PCR によって増幅し、*araB* の時と同様にプラスミドの作製、ラベル DNA プローブを合成した。

2)ダイプライマーシーケンシング

ダイプライマーシーケンシングは Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare) をマニュアル通りに使用して行った。1) で作製した 2 つのプラスミドを鋳型とし、IRD700 ラベルされた pUC-IR-Rv-IRD プライマーを用いた。

3)DNaseI フットプリント法

1)で作製したラベル DNA プローブと AraR タンパク質を以下の溶液中で所定の濃度で混合した。

・ タンパク質-DNA 結合反応溶液 (DNaseI フットプリント法)

20 mM	Tris-HCl (pH 7.5)
50 mM	NaCl
2.5 mM	MgCl ₂
0.45 mM	EDTA
0.5 mM	DTT
0.05 % (v/v)	Nonidet P-40
10 % (v/v)	Glycerol
DDW up to	20 µl

混合した後、25℃で 25 分間静置した後に下記の DNaseI 反応液（下記のとおり）を 4 µl 加え、DNaseI によりランダムに DNA 断片を分解した。

・ DNaseI 反応液

1 mU/µl	DNaseI (TAKARA)
5 mM	MgCl ₂
10 mM	CaCl ₂

室温で 1 分間反応させた後、2 μ l の 325 mM EDTA を加えて DNaseI による DNA の消化を停止した。その後、完全に DNaseI を失活させるために、速やかに 80°C で 10 分間加熱した。氷上で冷却後のサンプルの内、8 μ l を新しいチューブに移し、4 μ l の IR2 stop solution (Li-Cor) と混合してから 95°C で 3 分間加熱した。加熱後は氷上で取扱い、出来るだけ早く KB Plus gel matrix (LI-COR) で作製したゲルにアプライする。タンパク質-DNA 結合サンプルと同時に、2)で合成したシーケンスラダーを泳動する事により、得られた電気泳動像中のフットプリント領域の位置を特定した。電気泳動装置は 4300 DNA Analyzer (LI-COR) である。

使用した菌株及びプラスミドを表 3-1 に、使用したプライマーを表 3-2 にまとめる。

表3-1. 使用した菌株及びプラスミド

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<u>Strains</u>		
<u>E. coli</u>		
HST02	F ⁻ [<i>traD36</i> , <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>]/Δ(<i>lac-proAB</i>), <i>recA</i> , <i>endA</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>e14</i> ⁻ (<i>mcrA</i> ⁻), <i>supE44</i> , <i>relA</i> , Δ <i>deoR</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)	TaKaRa
SCS110	<i>rpsL</i> (Str ^r) <i>thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44D</i> (<i>lac-proAB</i>) [F ⁺ <i>traD36 proAB lacI</i> ^q <i>Z</i> Δ <i>M15</i>]	TaKaRa
<u>C. glutamicum</u>		
ATCC 31831	Wild-type strain	ATCC
Δ <i>araA</i>	ATCC 31831 with deletion of <i>araA</i>	This study
Δ <i>araE</i>	ATCC 31831 with deletion of <i>araE</i>	This study
B-m	ATCC 31831 with mutations in BS _B on the chromosome	This study
E1-m	ATCC 31831 with mutations in BS _{E1} on the chromosome	This study
E2-m	ATCC 31831 with mutations in BS _{E2} on the chromosome	This study
E1/2-m	ATCC 31831 with mutations in BS _{E1} and BS _{E2} on the chromosome	This study
Δ <i>araA</i> /B-m	Δ <i>araA</i> with mutations in BS _B on the chromosome	This study
ParaR-F	ATCC 31831 with the canonical <i>araR</i> promoter- <i>lacZ</i> fusion	This study
PgalM-F	ATCC 31831 with the canonical <i>galM</i> promoter- <i>lacZ</i> fusion	This study
ParaR-R	ATCC 31831 with the reverse <i>araR</i> promoter- <i>lacZ</i> fusion	This study
<u>Plasmids</u>		
pET-28a	Km ^r ; IPTG-inducible expression vector	Merck
pCRD206	Km ^r ; pCRB62 ^{DK} containing the <i>B. subtilis</i> <i>sacB</i> gene	(19)
pCRF500	Km ^r ; pCRD206 with a 1.42-kb DNA fragment flanking of the <i>araA</i> gene	This study
pCRF501	Km ^r ; pCRD206 with a 1.74-kb DNA fragment flanking of the <i>araE</i> gene	This study
pCRF502	Km ^r ; pET-28a with a 1047-bp fragment containing the <i>araR</i> gene	This study
pCRF503	Km ^r ; pCRD206 with a 2.12-kb DNA fragment containing the <i>araB</i> promoter with mutations in BS _B	This study
pCRF504	Km ^r ; pCRD206 with a 1.98-kb DNA fragment containing the <i>araE</i> promoter with mutations in BS _{E1}	This study
pCRF505	Km ^r ; pCRD206 with a 1.98-kb DNA fragment containing the <i>araE</i> promoter with mutations in BS _{E2}	This study
pCRF506	Km ^r ; pCRD206 with a 1.98-kb DNA fragment containing the <i>araE</i> promoter with mutations in BS _{E1} and BS _{E2}	This study
pCRF507	Km ^r ; pCRD206 with a 1.61-kb DNA fragment downstream of <i>araA</i>	This study
pCRF508	Km ^r ; pCRD206 with a 1.61-kb DNA fragment downstream of <i>araA</i> and the <i>E. coli</i> <i>lacZ</i> gene	This study
pCRF509	Km ^r ; a 397-bp <i>araR</i> promoter fragment inserted into the pCRF507 SpeI site in the forward direction	This study
pCRF510	Km ^r ; a 397-bp <i>araR</i> promoter fragment inserted into the pCRF507 SpeI site in the reverse direction	This study
pCRF511	Km ^r ; a 398-bp <i>galM</i> promoter fragment inserted into the pCRF507 SpeI site in the forward direction	This study
pCRF507	Km ^r ; pCRD206 with a 1.61-kb DNA fragment downstream of <i>araA</i>	This study

表3-2. 使用したプライマー（１）

Primer	Sequence (5'-3')	Restriction enzyme ^a
Plasmid construction for gene deletion		
araA-ML-U-F	GCTCTAGAGTGCTGACGATGATGGCGGA	<i>XbaI</i>
araA-ML-U-R	CTCTACTAGTTCATGTCGATCGAAGACCA	<i>SpeI</i>
araA-ML-D-F	GCTCTAGAAGTGCTATGGCAGTGCAACT	<i>XbaI</i>
araA-ML-D-R	CTCTACTAGTACTCACTGCGAACAAGGTCA	<i>SpeI</i>
araE-ML-U-F	GCTCTAGATCGCTCGGACACCGTCACAT	<i>XbaI</i>
araE-ML-U-R	GCGGATCCACCGAAGAAGTAGATGTACG	<i>BamHI</i>
araE-ML-D-F	CGGGATCCATCCCGCTCATCGTCGAGAA	<i>BamHI</i>
araE-ML-D-R	GCGATATCTGAGAGATGCCGTTGGTGCT	<i>EcoRV</i>
Plasmids construction for gene expression		
AraR-Ex-F	GGAATTCATATGAGCTCCACCCAG	<i>NdeI</i>
AraR-Ex-R	GGAATTCCTCAGAGCTGTGTGAAATC	<i>EcoRI</i>
For qRT-PCR analysis		
16s-F	CAGGTCTCTGGGCAGTAACTGA	
16s-R	CGTTTACGGCATGGACTACCA	
araA-F	GCGCCAATGACAACGTCAT	
araA-R	TCATTAGCCTGGGTGTGAAGGT	
araB-F	GGATCGAGCTCTTCAGTGAGGTT	
araB-R	CACCGGAGACGAAGTTGTAGGT	
araD-F	GCGATGGTGGTGTGCAACA	
araD-R	GGTCGAATGAGTGTGCACGAT	
araE-F	CATGTGGCCGATCATCCA	
araE-R	CGGCGATGACCATGAACA	
araR-F	GCACGCTGTCAAGCATTGA	
araR-R	GGTCTCTTCGGCATTTTTCATC	
galM-F	GGTCTTCGCCACCTTCTCTCT	
galM-R	GTGGTGTGCCCGACATTGT	
For 5'-RACE		
araB-RA-RT ^b	TGAGAACTAGGTCG	
araB-RA-F1	ACGGAGTTGAAAGTATGGAG	
araB-RA-R1	GTTCGGTTCCTTGATGAC	
araB-RA-F2	AATTCGGATCGACCCGCATT	
araB-RA-R2	TTTGAGAGCGGAGCTTCGTA	
araE-RA-RT ^b	GATCATCGTCTGGT	
araE-RA-F1	CGACCGTACATCTACTTCTT	
araE-RA-R1	GTTGAACAGTCTCTGTCATC	
araE-RA-F2	TCCTCTTCTCTGCGCTGGTA	
araE-RA-R2	GCTGTCTGAGCGGATGATGT	
galM-RA-RT	TGCCATCGGTGTAGA	
galM-RA-F1	TCCACGGTGGTGTCTCGTT	
galM-RA-R1	TTGATCGTGACCTGTTTCC	
galM-RA-F2	CCGACGGCATCTACACCGAT	
galM-RA-R2	CTTCTGGGGCGATGTGTCAT	

続く

表3-2. 使用したプライマー (2)

Primer	Sequence (5'-3')	Restriction enzyme ^a
For electrophoretic mobilityshift assay		
PA-F	TGGTGCTGCCATCGGTGTAG	
PA-R	AGCTTCGTATTGGTGTTATCGCT	
PB-F	CCTCGAGTGAGTAGCTCCAG	
PB-R	CTTCTGGGGCGATGTGTCAT	
PC-F	TCTGGGTTCCTCGGGTGATAA	
PC-R	GCTGTCTGAGCGGATGATGT	
PD-F	ACCGTCTCCTCCCGATCAGA	
PD-R	TGGGTGGAGCTCATGGTGAT	
P2-F	TGCGATCCGGTCACT	
P3-F	AATGCGGGTCGATCCGAA	
P4-F	ACGGTCCACGACACT	
P5-F	GTTTCGGTTCCTTGATGAC	
P6-R	GTGTGATGCTTGCTTGAC	
P7-R	GATGGCCGTTAAGAAC	
P8-R	CTCAAATGTGATCCGAAGC	
P9-R	ACGGAGTTGAAAGTATGGAG	
Dnase I footprinting analysis		
pUC-IR-Fw	TTGTAAAACGACGGCCAGTG	
pUC-IR-Rv	GGAAACAGCTATGACCATGA	
pUC-IR-Rv-IRD ^b	GGAAACAGCTATGACCATGA	
araB-DF-F	CTTCTGGGGCGATGTGTCAT	
araB-DF-R	AGCTTCGTATTGGTGTTATCGCT	
araE-DF-F	CGAGCGACAAACACGACA	
araE-DF-R	TTGTCCTGGTTCTTCGAC	
Mutated prove		
BSB-mut1-F	ATGGCCGTTAAGACACATGTTAGCGATA	
BSB-mut1-R	TTATCGCTAACATGTGTCTTAACGGCCA	
BSB-mut2-F	GCCGTTAAGAACACGTTTAGCGATAACA	
BSB-mut2-R	GTGTTATCGCTAAACGTGTTCTTAACGG	
BSB-mut3-F	GTTAAGAACAATGGGCGCGATAACACCA	
BSB-mut3-R	TTGGTGTATCGCGCCCATTTGTTCTTAA	
BSB-mut4-F	AGAACAATGTTAGATCTAACACCAATAC	
BSB-mut4-R	CGTATTGGTGTTAGATCTAACATTGTTT	
BSB-mut5-F	ACAATGTTAGCGAGCCCACCAATACGAA	
BSB-mut5-R	CTTCGTATTGGTGGGCTCGCTAACATTG	
BSB-mut6-F	ATGTTAGCGATAAACACAATACGAAGCT	
BSB-mut6-R	AGCTTCGTATTGTGTTTATCGCTAACAT	

続く

表3-2. 使用したプライマー (3)

Primer	Sequence (5'-3')	Restriction enzyme ^a
Plasmid construction for a genetically modified strain		
BSB-integ-FW	<u>TAGATAT</u> CGTGAATGCATGGTCCATGCG	
BSB-integ-RV	ACT <u>CTAGAG</u> TGTTGCAGTGCACCATC	
BSB-mut-RV	CGTATGGTGTAGATCTAACATGTTC	
BSB-mut-FW	AGAACAATGTTAGATCTAACACCAATAC	
BSE-integ-FW	<u>ACGATATCT</u> CACGGCTAATCGGCGTCAT	
BSE-integ-RV	ACT <u>CTAGAC</u> GATGAGCGGGATGTAGTAG	
BSE1-mut-RV	AAGGGCTAGTTTAGATCTCACATTTTCAT	
BSE1-mut-FW	ATGAAATGTGAGATCTAACTAGCCCT	
BSE2-mut-RV	TCCTAATGTCAAATCTAACATTTGAT	
BSE2-mut-FW	ATCAAATGTTAGATTTGACATTAGGA	
For RT-PCR analysis		
1-F	GGATCGAGCTCTTCAGTGAGGTT	
1-R	GGTCGAATGAGTGTGCACGAT	
2-F	GCGATGGTGGTGTGCAACA	
2-R	TCATTAGCCTGGGTGTGAAGGT	
3-F	ATCTACACCGATGGCAGCAC	
3-R	GTGAATGCATGGTCCATGCG	
4-F	GCACGCTGTCAAGCATTGA	
4-R	CAATCTCCCTCGAAGACGTC	
5-F	ACCGTCTCCTCCCGATCAGA	
5-R	GATTACCCTGGACACTGTCT	
6-F	TTGATCGTGACCTGTTTTC	
6-R	CCTCGAGTGAGTAGCTCCAG	
For construction of promoter-<i>lacZ</i> fusion		
Integ-top-FW	<u>ATGGATCC</u> ACTTACTTGCTGAACCTCGAA	<i>Bam</i> HI
Integ-top-DW	AAA <u>AGTACTACTAGT</u> CGATTGGTTCACCGGTTGCAA	<i>Sca</i> I <i>Spe</i> I
Integ-bottom-FW	ATG <u>AGTACT</u> ACGGTTCCCGTGTCTATTACA	<i>Sca</i> I
Integ-bottom-DW	TAAGGTCGTCGATGTTT <u>TCTAGAG</u> GGTT	<i>Xba</i> I
lacZ-FW	GAC <u>AGTACT</u> CCCCTGCCCGGTTATTATTAT	<i>Sca</i> I
lacZ-DW	TAC <u>AGTACT</u> ATGGATCCCGTCGTTTACAA	<i>Sca</i> I
ParaR-lacZ-FW	ATACTAGTACCGTCTCCTCCCGATCAGA	<i>Spe</i> I
ParaR-lacZ-RV	ATACTAGTGGTGGAGCTCATGGTGATCG	<i>Spe</i> I
PgalM-lacZ-FW	ATACTAGTCCTCGAGTGAGTAGCTCCAGTG	<i>Spe</i> I
PgalM-lacZ-RV	ATACTAGTTCTGGGGCGATGTGTCATATCT	<i>Spe</i> I

^a Restriction sites are indicated by underlining.

^b 5'IRD700-labeled primer.

2-3. 結果

2-3-1. *C. glutamicum* ATCC 31831 株のアラビノース代謝関連遺伝子クラスター

C. glutamicum ATCC 31831 株のゲノムにおいてアラビノースイソメラーゼ (AraA)、リブロキナーゼ (AraB)、リブロース-5-リン酸 4-エピメラーゼ (AraD)、アラビノースプロトンシンポーター (AraE)、LacI ファミリーの転写因子 (AraR)、推定アルドース 1-エピメラーゼ (GalM) をコードする 6 つのアラビノース代謝関連遺伝子からなる遺伝子クラスターが同定されている (図 3-5)。AraA、AraB、AraD はアラビノースからペントースリン酸経路中物質の D-キシルロース-5-リン酸への 3 段階の反応をそれぞれ触媒する。このアラビノース資化遺伝子はゲノム上において、*araB-araD-araA* の順に並んでおり、それぞれの遺伝子間領域は *araB-araD* で 13 塩基対、*araD-araA* で 35 塩基対である。*araB* 翻訳開始点より、76 塩基上流から逆向きに *galM-araR* が座しており、この *galM-araR* の遺伝子間領域は 26 塩基対である。*araR* の 234 塩基下流には *araE* が存在しており、先行研究により、本遺伝子産物がアラビノースの取り込みに関与することが明らかにされている。全長 7809 塩基対に及ぶ *araE* から *araA* までの本クラスターの GC 含量は 63.2% であり、*C. glutamicum* ゲノム全体の平均 GC 含量 (約 53.5%) に比べて高い。

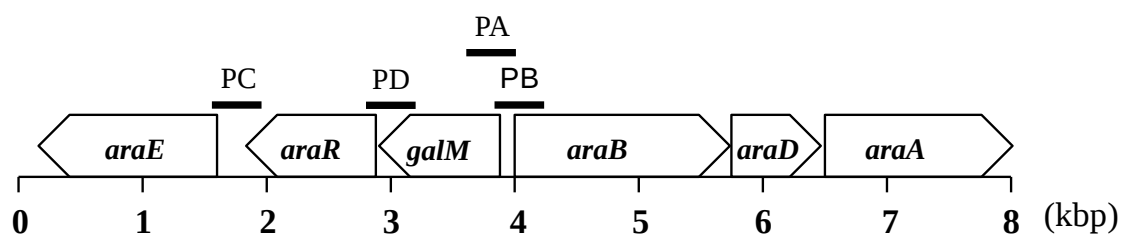


図 3-5. *C. glutamicum* ATCC 31831 株のアラビノース代謝関連遺伝子クラスター

C. glutamicum ATCC 31831 株ゲノム上のアラビノース代謝関連遺伝子クラスター。AraA : アラビノースイソメラーゼ、AraB : リブロキナーゼ、AraD : リブロース-5-リン酸 4-エピメラーゼ、AraE : アラビノースプロトンシンポーター、AraR : LacI ファミリーの転写因子、GalM : ガラクトースムタロターゼ。PA、PB、PC、PD は図 3-9 のゲルシフトアッセイで使用した DNA プローブに相当するゲノム領域。

先行研究によって、*araBDA* 及び *araE* はアラビノース存在下で高発現することが分かっている。本研究ではアラビノース代謝関連遺伝子の発現制御機構の全容解明を目指して、まず、アラビノースによる初期誘導を調べた。野生型の *C. glutamicum* ATCC 31831 株 (WT) を A 培地で 4 時間培養した後、終濃度が 2% (w/v) になるように D-グルコースあるいは L-アラビノースを加えた。添加前後の菌体からトータル RNA を回収し、定量 RT-PCR によってアラビノース代謝関連遺伝子の発現レベルを調べた。その結果、アラビノースの添加前に比べて *araB*、*araD*、*araA* 遺伝子は、アラビノース添加 5 分後に 20 倍以上発現が上昇していた (図 3-6)。この結果から、*araBDA* はポリシストロニック mRNA として転写されている可能性が示唆される。しかし、15 分後にはアラビノース添加前の 10 倍程度まで発現レベルが低下していた。*araE* は *araBDA* と同様の誘導パターンを示したが、*galM* 及び *araR* 遺伝子は 5 分後にせいぜい 4 倍程度であり、15 分後には減少して添加前の 2 倍程度の誘導レベルであった (図 3-6)。まとめると、クラスター上の 6 つの遺伝子はアラビノースによって発現が誘導されるが、*galM* 及び *araR* はそれ以外の *araBDA*、*araE* に比べて誘導レベルが小さいことがわかった。また、*galM* 及び *araR* と *araE* は異なるプロモーターによって制御される可能性が強く示唆される。

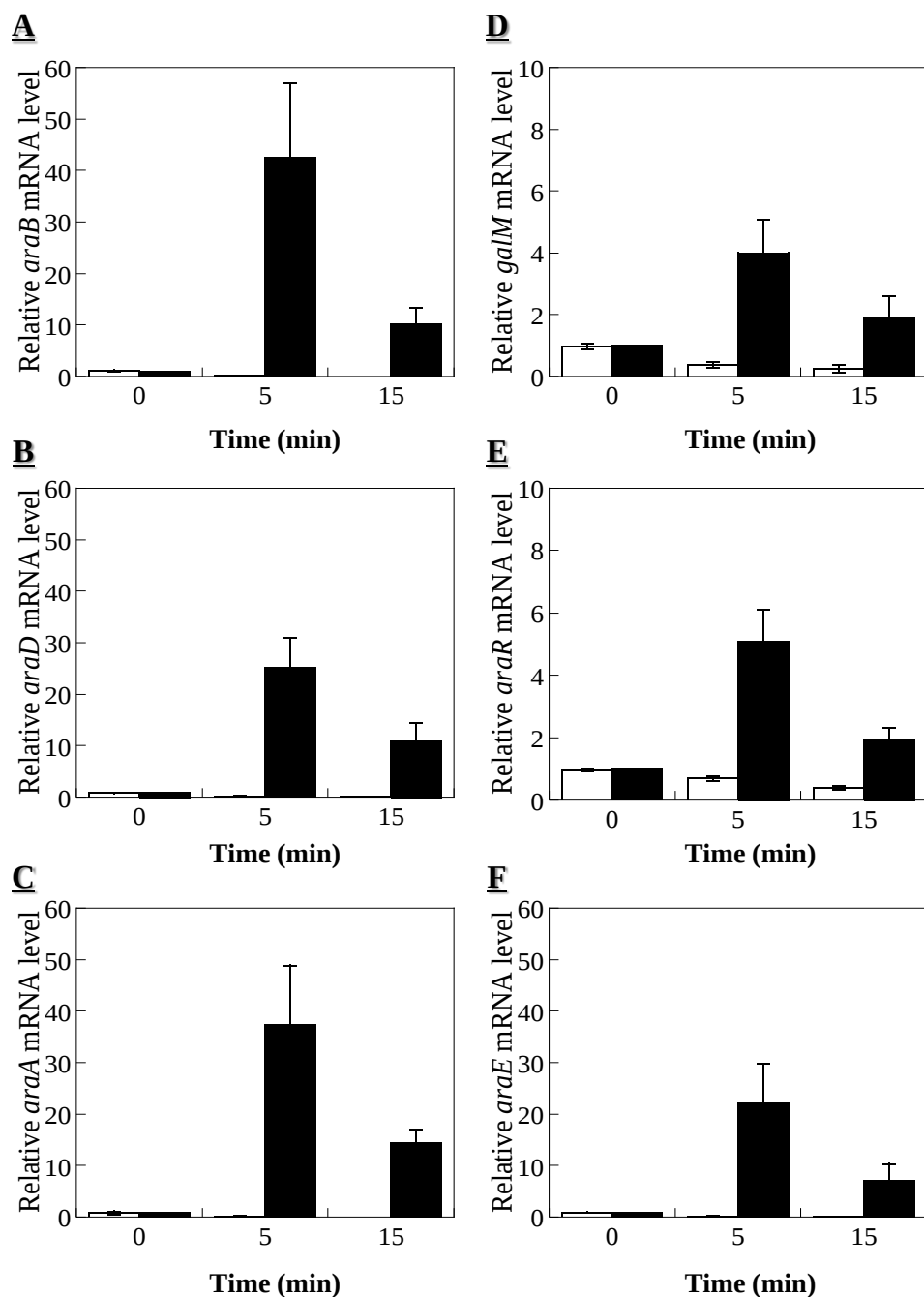


図 3-6. アラビノース代謝関連遺伝子の初期誘導

野生型の *C. glutamicum* ATCC 31831 株を糖を含まない A 培地で 4 時間培養した後、グルコース（白）あるいはアラビノース（黒）を終濃度 2% になるように添加した。添加直前（0 分）、添加 5 分及び 15 分後の菌体を回収して下記の遺伝子の発現レベルを定量 RT-PCR によって調べた。A: *araB*、B: *araD*、C: *araA*、D: *galM*、E: *araR*、F: *araE*。アラビノース添加直前の発現レベルを 1 としてその相対値を計算しグラフを作製した。標準偏差を独立した 3 回の繰り返し実験により求めた。

先行研究によって、本菌はグルコース及びアラビノースを同時に利用する事が明らかにされている。アラビノース代謝関連遺伝子のアラビノース誘導がグルコースの共存によって影響を受けるかどうかを調べる為に、糖を加えずに 4 時間培養した後、グルコース及びアラビノースを終濃度 2% ずつになるように同時に加えた。グルコースとの同時添加により、*araA* のアラビノースに対する速やかな応答が消失した(図 3-7)。しかし、添加 60 分後にはアラビノースのみを加えた場合と同等のレベルまで発現が上昇していた。*araE* 遺伝子の発現も *araA* と同様のパターンを示した。また、グルコースのみを加えたところ、添加 30 分後に *araA* 及び *araE* の発現は添加前と比べて減少するが、60 分後に添加前のレベルにまで戻る事がわかった。これらの実験により、アラビノース代謝関連遺伝子の速やかなアラビノース応答がグルコースの共存によって消失し、グルコースによる負の制御の存在が示唆された。

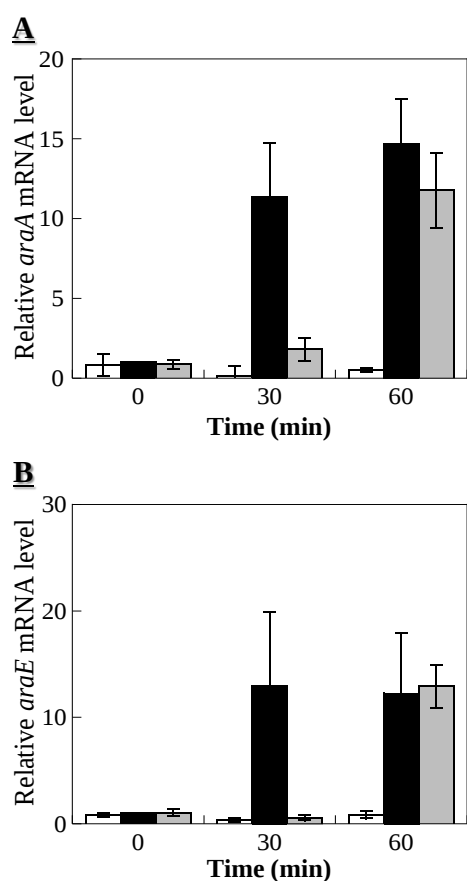


図 3-7. アラビノース及びグルコースに対するアラビノース代謝関連遺伝子の応答

野生型の *C. glutamicum* ATCC 31831 株を糖を含まない A 培地で 4 時間培養した後、グルコース（白）、アラビノース（黒）、グルコース及びアラビノース（灰）を終濃度 2% になるように添加した。添加直前（0 分）、添加 30 分及び 60 分後の菌体を回収して *araA* (A) 及び *araE* (B) 発現レベルを調べた。アラビノース添加直前の発現レベルを 1 としてその相対値を計算しグラフを作製した。標準偏差を独立した 3 回の繰り返し実験により求めた。

先行研究で *araR* の破壊により、*araBDA* 及び *araE* の発現がアラビノース非存在下においても高発現する事が明らかにされている。上述のアラビノース初期応答における AraR の役割を明らかにするために、*araB*、*araE*、*galM* の発現を WT と *araR* 遺伝子破壊株 ($\Delta araR$) において調べた。その結果、 $\Delta araR$ において *araB* の発現はアラビノース添加前に高発現していたが、L-アラビノースの添加 5 分後に強く抑制される事がわかった (図 3-8)。*araB* と同様に、*galM* 及び *araE* 遺伝子の両方がアラビノースの添加により抑制された。以上のことから、アラビノース代謝関連遺伝子はアラビノース非存在下で AraR によって負に制御されるだけでなく、AraR 非依存的な制御も受ける可能性が示唆される。

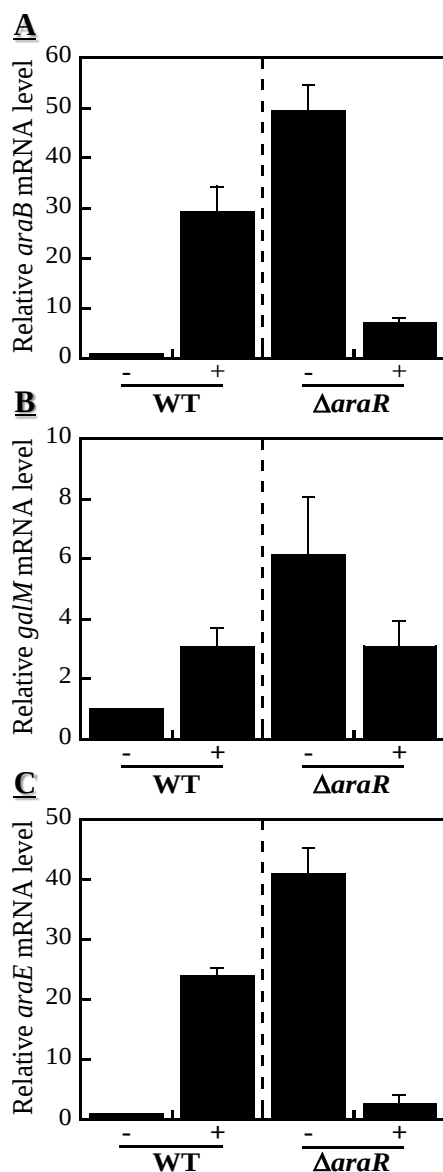


図 3-8. *araR* 破壊株におけるアラビノース初期応答

野生型及び *araR* を破壊した *C. glutamicum* ATCC 31831 株 (WT、 $\Delta araR$) を糖を含まない A 培地で 4 時間培養した後、アラビノースを終濃度 2% になるように添加した。添加直前及び添加 5 分後における *araB* (A)、*galM* (B)、*araE* (C) 発現レベルを調べた。添加直前を-、添加 5 分後を+で示す。アラビノース添加前の野生株の発現レベルを 1 としてその相対値を示す。標準偏差を独立した 3 回の繰り返し実験により求めた。

2-3-2. LacI ファミリーの転写因子 AraR の機能解析 (in vitro)

アラビノース誘導性遺伝子上流領域に対する AraR の結合

アラビノース代謝関連遺伝子のアラビノース応答制御に AraR が関与する可能性が示唆された。この関与が直接的であるかどうかを調べるために、アラビノース応答性遺伝子上流領域に AraR が結合するか調べた。AraR タンパク質は大腸菌で発現させて精製した His-tag 融合 AraR タンパク質を用いた。4 組の PCR により *araB* の翻訳開始点より 353 塩基上流から 28 塩基下流の *araB* 上流配列 (PA プローブ、図 3-9A)、*galM* の翻訳開始点より 380 塩基上流から 20 塩基下流の *galM* 上流配列 (PB プローブ、図 3-9B)、*araE* の翻訳開始点より 364 塩基上流から 30 塩基下流の *araE* 上流配列 (PC プローブ、図 3-9C)、*araR* の翻訳開始点より 388 塩基上流から 11 塩基下流の *araR* 上流配列 (PD プローブ、図 3-9D)、の DNA を増幅し、これらに対する AraR の結合の有無をゲルシフトアッセイにより調べた。電気泳動の結果、PA-AraR 複合体の形成を示す DNA バンドが添加した AraR の濃度に依存的に出現することがわかった。また同様の DNA-AraR 複合体形成が PB 及び PC プローブを用いた時にも確認されたが、PD プローブを使用した時には認められなかった。以上のことから、AraR は *araB*、*galM*、*araE* 遺伝子上流領域の配列に特異的に結合する事がわかった。また、PC プローブを用いた時のシフトパターンは、PA 及び PB の時とは異なり、AraR 添加濃度の上昇に伴い 2 段階のシフトパターンが認められた。

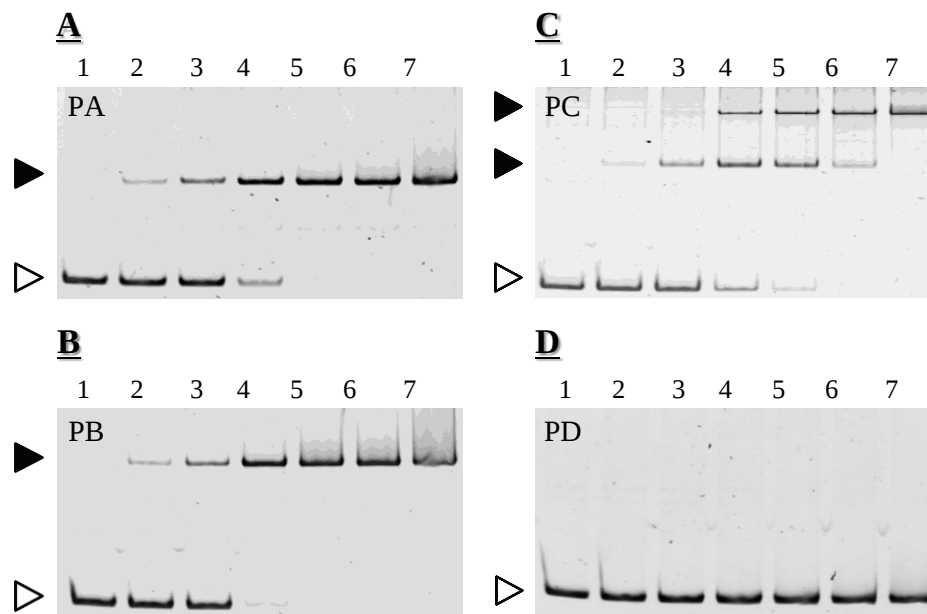


図 3-9. AraR ゲルシフトアッセイ

大腸菌で発現させ精製した AraR タンパク質を用いてゲルシフトアッセイを行った。A: *araB* 翻訳開始点の上流の DNA (PA プローブ) を用いた時の AraR ゲルシフトアッセイ。B: *galM* 翻訳開始点の上流の DNA (PB プローブ) を用いた時の AraR ゲルシフトアッセイ。C: *araE* 翻訳開始点の上流の DNA (PC プローブ) を用いた時の AraR ゲルシフトアッセイ。D: *araR* 翻訳開始点の上流の DNA (PD プローブ) を用いた時の AraR ゲルシフトアッセイ。それぞれの DNA プローブのゲノム上位置は図 3-4 に示される。20 μ l の反応系において DNA プローブは 1 nM の濃度、AraR が 1 で 0 nM、2 で 10 nM、3 で 25 nM、4 で 50 nM、5 で 75 nM、6 で 100 nM、7 で 125 nM の濃度で混合された。▷はフリーの DNA プローブを示し、◀は DNA-AraR 複合体を示す。

galM 上流領域 (PB プローブ) 内の AraR 結合サイトを絞り込むために、プローブを両端から約 50 塩基対ずつ短くしたプローブを用いてゲルシフトアッセイを行った (図 3-10)。使用したプローブ (P1-P9) の位置情報と、AraR との結合の有無 (+/-) を示す。*galM* 上流領域のプローブを 5' 側から 220 塩基対まで削ったプローブ (P2-P5) でも結合したが、3' 側から削った場合に P6 及び P7 で確認されたバンドシフトは P8 及び P9 で消失した。以上のことから、*galM* 上流領域の AraR 結合サイトは -59 から -109 塩基対の間に存在すると考えられる。また、この領域は *araB* 上流領域として使用したプローブ (PA) にも含まれており、両プローブにおける AraR 結合サイトは同一のものである可能性が示唆される。

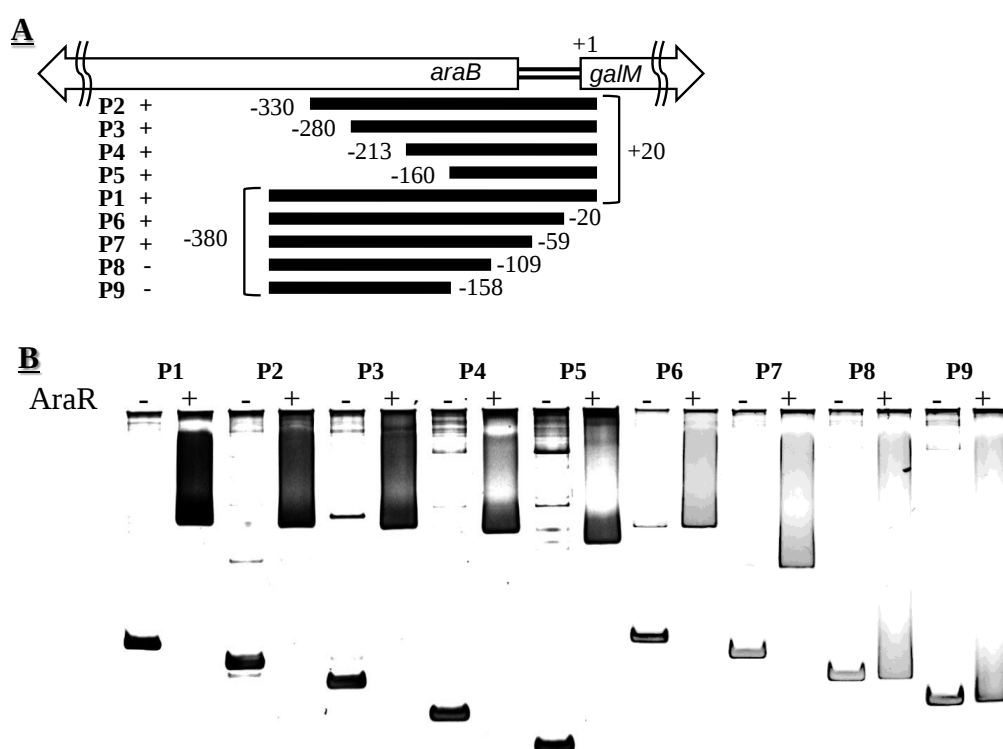


図 3-10. PB 内 AraR 結合サイトの絞り込み

図 3-9 で使用した *galM* 上流領域の DNA 断片 (PB プローブ) の両端から約 50 塩基対ずつ段階的に短くした種々の DNA プローブを合成し、ゲルシフトアッセイを行った。A では使用した各プローブの位置情報及び、結果として結合が認められたプローブを+、結合が認められなかったプローブを-で示す。B における-は反応系中に AraR を含まず、+は 100 nM の AraR タンパク質を反応系中に含む。

AraR 結合活性へのアラビノースの影響

AraR の DNA 結合活性がアラビノースによって影響を受けるかどうかを調べる為に、ゲルシフトアッセイの反応系にアラビノースを加えてゲルシフトアッセイを行った。AraR によって *araB* 上流領域の DNA (PA プローブ) が完全にシフトする 100 nM の AraR タンパク質を含む条件において、反応系に終濃度 5 mM になるようにアラビノースを加えたところ、AraR が結合していないフリーの PA が増加した (図 3-11)。また、フリーの PA は 15 mM のアラビノースを加える事により更に増加した。しかし、同じペントースのキシロースを 15 mM 加えた時には糖を加えない時と同様のバンドシフトが観察された (図 3-11)。このことより、アラビノースは AraR の DNA 結合活性を低下させるネガティブエフェクターとして働くことがわかった。

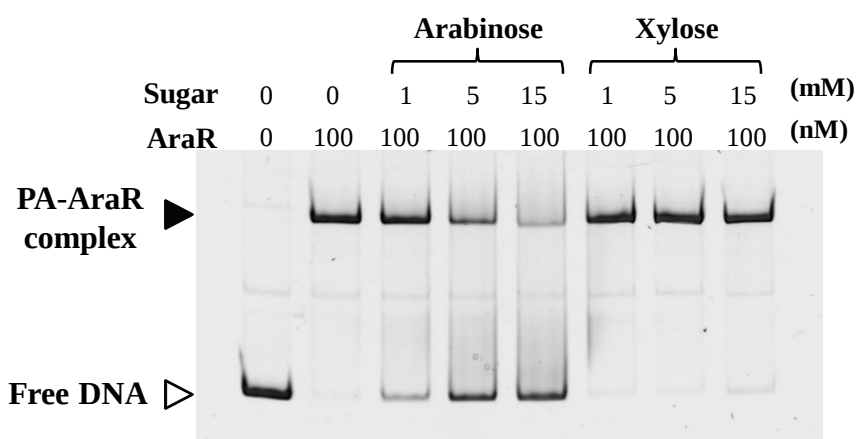


図 3-11. アラビノース及びキシロース存在下における AraR の DNA 結合活性

図 3-9 で使用した *araB* 上流領域の DNA (PA プローブ) に対する AraR の DNA 結合活性をアラビノースあるいはキシロース存在下で調べた。反応系中に泳動写真上部で示される濃度の AraR 及びアラビノースあるいはキシロースを加えた。

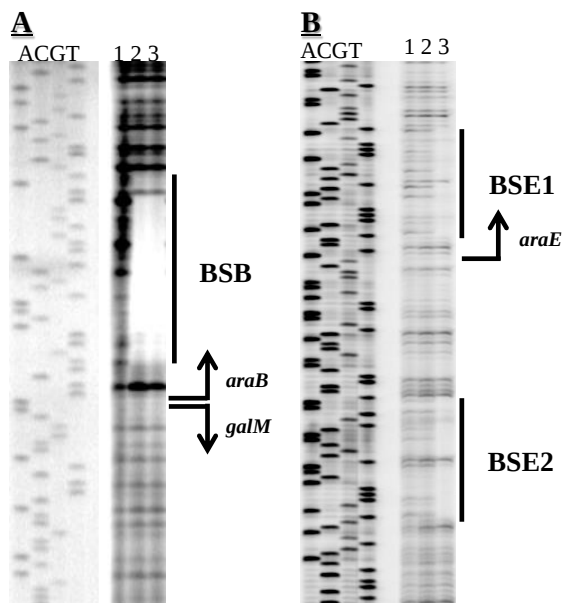
araB、*araE*、*galM* 遺伝子の転写開始点

araB、*araE*、*galM* の転写開始点を 5'-RACE 法により調べた。野生株におけるこれらの遺伝子の発現が最も高いのはアラビノース添加 5 分後であるので、この時のトータル RNA を 5'-RACE 法に供した。その結果、*araB*、*araE*、*galM* の転写開始点はそれぞれの翻訳開始点より、7、104、69 塩基上流にあることがわかった (図 3-12)。全ての転写開始点の上流に *C. glutamicum* のプリブノーボックス (-10 領域) を見出したが、-35 領域は *galM* では確認できなかった(88)。

AraR 結合領域の特定

araB、*galM*、*araE* 上流に存在する AraR の結合サイトを特定する為に、*araB-galM* 遺伝子間領域と *araE* 上流領域の DNA プローブを用いて DNaseI フットプリント法を行った (図 3-12A、B)。

その結果、*araB* の転写開始点より 4 塩基下流から 28 塩基下流の領域が DNaseI による DNA 消化から保護されていた。この領域は *araB* の上流で逆向きに転写される *galM* の転写開始点から見ると、5 塩基上流から 29 塩基上流の領域に相当していた。この AraR 結合サイトを BSB とした (図 3-12C)。また、DNaseI フットプリント法により、*araE* 転写開始点より 5 塩基下流から 28 塩基下流及び 28 塩基上流から 46 塩基上流の 2 カ所に AraR 結合サイトが存在することが分かり、前者を BSE1、後者を BSE2 とした (図 3-12D)。ゲルシフトアッセイを行った際に 2 段階のバンドシフトが確認されたのは、上流領域に BSE1、BSE2 の 2 つの結合サイトが存在していたためと考えられる。以上、AraR が *araB* 転写開始点より下流で翻訳開始点と重なる領域かつ、*galM* の -10 領域と重なる領域、*araE* 転写開始点より下流の非翻訳領域、*araE* の -35 領域と重なる領域に結合することを示した。



C

catatccttacaaggggtgaaacgtgtgatgcttgcttgacaaaggggctgt
 *****⁻³⁵
gtatagaatgtttccccactttgcacactacgaacgaactgtttcccccgaca

araB

BSB

ggcgggtgaaagatggccgttaagaACAATGTTAGCGATAACACCAATAcgaagc
 *****⁻¹⁰
 ccgccacttctaccggcaattctTGTTACAATCGCTATTGTGGTTATgcttcg
 *****⁻¹⁰

galM

D

BSE2

ATCAAATGTTAGCGTTGACATTtaggaagttcggtgacttaatcttcgctagg
 *****⁻³⁵
 TAGTTTACAATCGCAACTGTAAtccttcaagccactgaattagaaggcgatcc

BSE1

ATGAAATGTGAGCGCTAAACTAGCccttcgacttctgtgaaacaacacacaac
 TACTTTACACTCGCGATTTGATCGggaagctgaagacactttgttggtgtgttg

aggagccttcgtcgaagaaccaggacaacaccggccacgtccacgcaatg
 tcctcggaagcagcttcttgggtcctgttggtggccggtgcaggtgcggttac

図 3-12. DNaseI フットプリント法による AraR 結合サイトの同定

DNaseI フットプリント法により *araB-galM* 遺伝子間領域 (A) 及び *araE* 上流領域 (B) の AraR 結合サイトを調べた。A においては DNA プローブを 80 ng/レーン、AraR タンパク質を 1 で 0 nM、2 で 500 nM、3 で 1000 nM の濃度で加えた。B においては DNA プローブを 120 ng/レーン、AraR タンパク質を 1 で 0 nM、2 で 600 nM、3 で 1300 nM の濃度で加えた。C では *araB-galM* 遺伝子間領域、D では *araE* 上流領域の配列を示す。C 及び D 中の灰色の領域は AraR が結合することにより DNaseI による消化から保護された領域である。遺伝子の開始コドンに四角で囲み、プロモーターに特徴的な配列に星を付す。また、5'-RACE により決定した転写開始点を折れ線で示

AraR 結合サイトのアラインメントと認識配列の決定

3 カ所の AraR 結合サイト (BSB、BSE1、BSE2) の比較によりコンセンサス配列が見出された (5'-aTGTtAgCGnTaAcat-3'、3 サイトで一致する:大文字、2 サイトで一致:小文字、不一致:n) (図 3-13A)。このことより、AraR は CG を中心としたパリンδροームを認識すると推測される。AraR の認識配列を明らかにする為に、BSB 中の特定の 3 塩基対を置換した様々な DNA プローブ (mut1-mut6) を作製した (図 3-13B)。これらの DNA プローブを用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、mut1 と mut6 を用いた時には図 3-9A で示した野生型の BSB を含む DNA (PA プローブ) と同等のバンドシフトを示したが、mut2、mut3、mut4、mut5 に対する AraR の DNA 結合活性は低下していた。中でも、mut4 を用いた時には全く結合しなかった (図 3-13F)。これらの結果から、パリンδροーム中心の CG は AraR が結合するのに必須であること、また、中心に近い塩基対は標的認識に関わる重要な塩基対であり、特に保存度が高い 5'側でその傾向が強まることが示唆された。

BSE1、BSE2 における AraR の認識配列の決定

BSB の時と同様に BSE1 及び BSE2 においても中心の CG 塩基が、AraR が結合するのに必須であることを調べるために、BSE1、BSE2 の CG を置換したプローブを作製した。ゲルシフトアッセイを行った結果、野生型の *araE* 上流領域を用いた時に確認されていた 2 段階のバンドシフトは、BSE1 に置換を施した E1-mut 及び BSE2 に置換を施した E2-mut において 1 段階になり、両方が置換された E1/2-mut においてバンドシフトは観察されなかった (図 3-14)。これにより、AraR が BSE1 及び BSE2 を認識するには、BSB の時と同様に中心の CG が必要であることが示された。

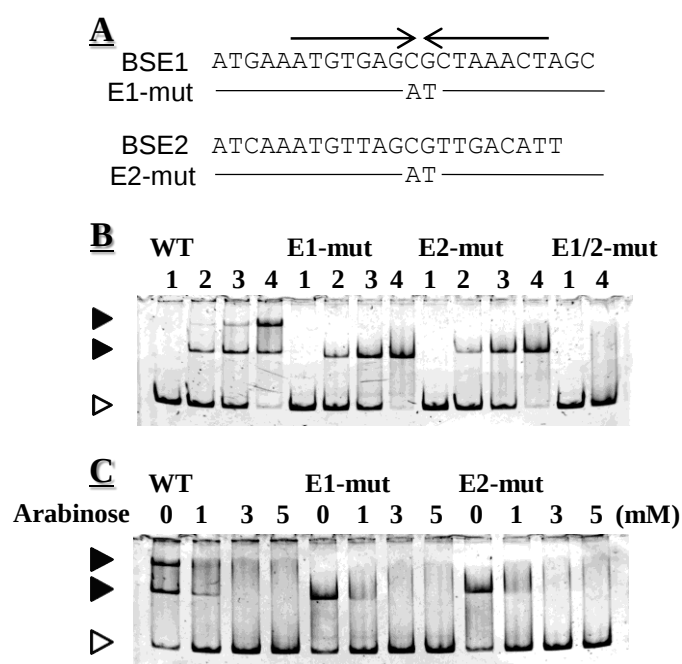


図 3-14. BSE1 及び BSE2 における AraR 認識配列の決定

A において BSE1 及び BSE2 の配列を示し、作製した配列置換を含む DNA プローブ (E1-mut 及び E2-mut) の置換パターンを示す。また、両方の置換パターンを持つ DNA プローブを E1/2-mut とした。置換を含まない野生型のプローブ (WT)、E1-mut、E2-mut、E1/2-mut を用いてゲルシフトアッセイを行った (B 及び C)。B においてレーン上部の番号は反応系中の AraR 濃度を示し、1 で 0 nM、2 で 4 nM、3 で 8 nM、4 で 16 nM であった。C においてはレーン上部で示す濃度でアラビノースを反応系に加え、AraR は全て 16 nM になるように加えた。各 DNA プローブを反応系中において 1 nM の濃度で加えた。▷ はフリーの DNA プローブを示し、▶ は DNA-AraR 複合体を示す。

アラビノース存在下における AraR の結合

AraR の DNA 結合活性へのアラビノースの影響を BSE1 及び BSE2 のそれぞれで調べたところ、アラビノースが 1 mM 存在する条件において顕著に結合が阻害されることが分かった (図 3-14C)。これらに BSB を加えた 3 つの結合サイト間のアラビノースによるエフェクター効果を調べるために、アラビノース非存在下あるいは 1 mM で存在する条件下で、AraR の濃度を変化させた時の結合がどうなるかを調べた (図 3-15)。その結果、BSB に対する AraR の DNA 結合活性は、1 mM のアラビノース添加による影響をほとんど受けないが、BSE1 及び BSE2 に対する AraR の DNA 結合活性は、1 mM のアラビノース添加により著しく低下することがわかった (図 3-15)。しかしながら、アラビノース非存在下における BSB、BSE1、BSE2 への AraR の DNA 結合活性に大きな違いは認められなかった (図 3-15)。3 カ所の AraR 結合サイトにおける AraR の解離定数 (K_d) を調べたところ、BSB、BSE1、BSE2 のそれぞれの K_d 値は $6.6 \pm 0.3 \times 10^{-8}$ M、 $10.9 \pm 0.9 \times 10^{-8}$ M、 $9.2 \pm 1.3 \times 10^{-8}$ M であり、ほとんど差がなかった (図 3-16)。しかし、BSB に対して AraR は 10 mM のアラビノース存在下でも複合体を形成できるが (図 3-16D)、BSE1 及び BSE2 に対しては、2 mM 以上のアラビノース存在下で全く複合体を形成できなかった (図 3-16E、F)。このことから、BSB、BSE1、BSE2 の間で認められる DNA 配列の差異が、アラビノース代謝関連遺伝子のアラビノース応答性に差異を生む可能性が示唆された。

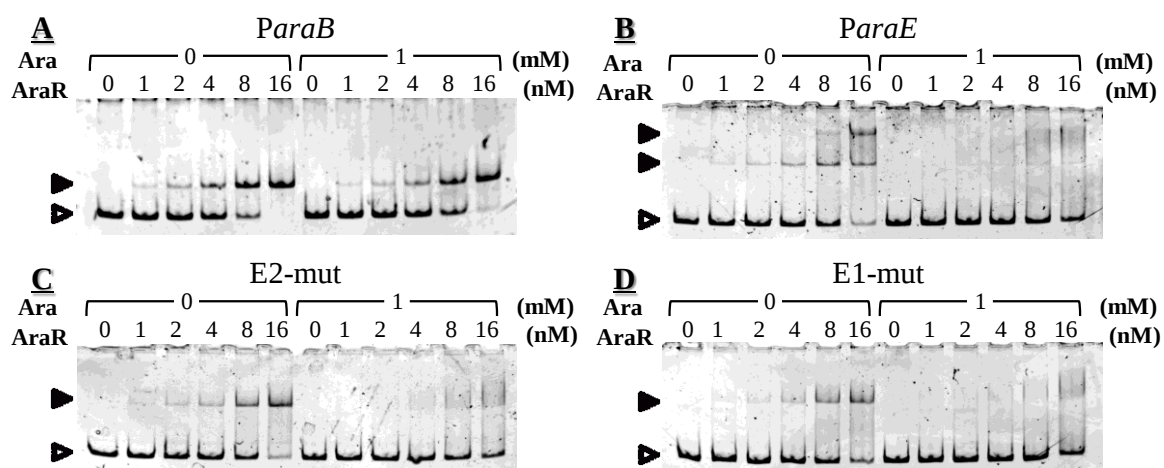


図 3-15. アラビノース存在下における AraR の DNA 結合活性

各 AraR 結合サイトに対する AraR の DNA 結合活性を 1 mM のアラビノース存在下で調べた。A 及び B は配列置換を含まない野生型の *araB* 上流配列 (ParaB) 及び *araE* 上流配列 (ParaE) である。C 及び D は ParaE 中の BSE2 に配列置換を含むプローブ (E2-mut) 及び BSE1 に配列置換を含むプローブ (E1-mut) であり、それぞれが野生型の BSE1 あるいは BSE2 をコードする。泳動写真上部の Ara で示す濃度のアラビノース及び AraR で示す濃度の AraR を反応系に加えた。▷ はフリーの DNA プローブを示し、▶ は DNA-AraR 複合体を示す。

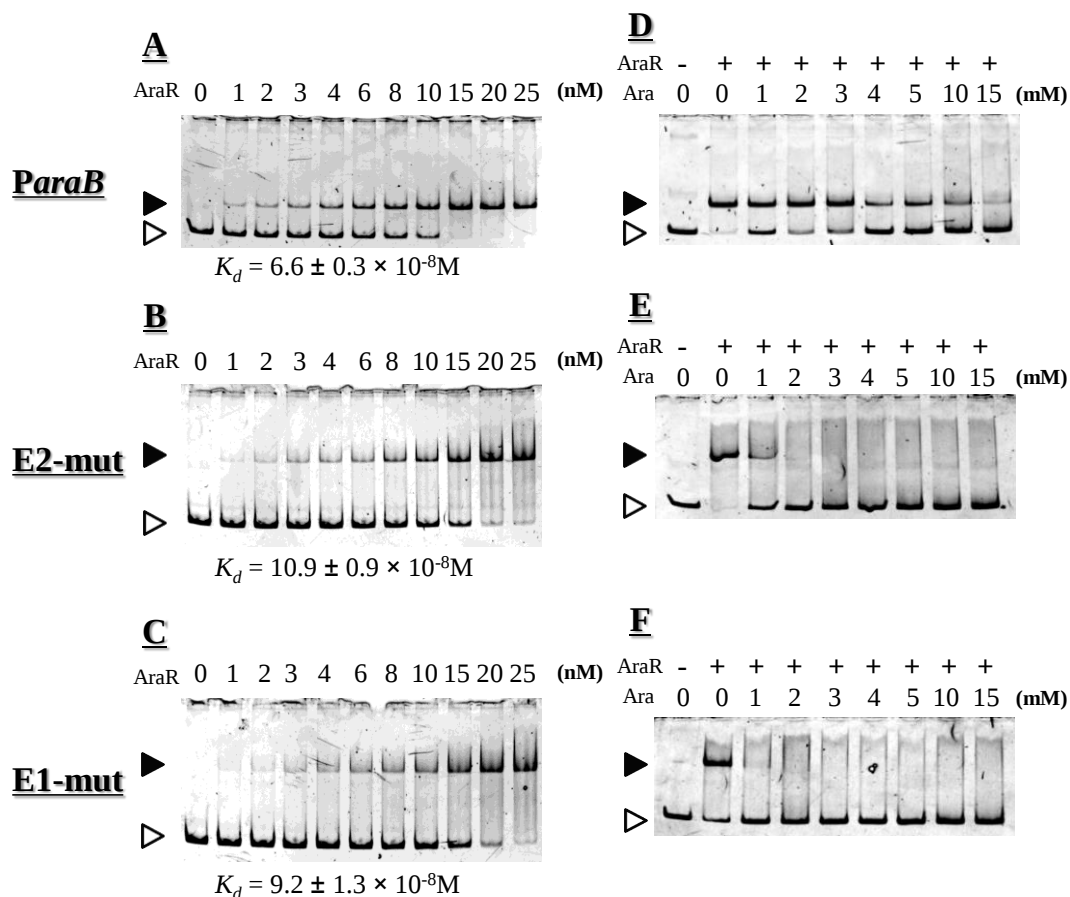


図 3-16. 各 AraR 結合サイトに対する AraR 平衡解離定数及びアラビノース有効濃度の検討

A では *ParaB* プローブ、B では *E2-mut* プローブ、C では *E1-mut* プローブを使用し、それぞれ BSB、BSE1、BSE2 における AraR の平衡解離定数を調べた。A-C における泳動写真上部の数字は反応系中の AraR タンパク質濃度を示し、各泳動写真下部に解離定数値 (K_d 値) を示す ($n=3$)。D-F では *ParaB* (D)、*E2-mut* (E)、*E1-mut* (F) への AraR の DNA 結合活性を、異なる濃度のアラビノース存在下で調べた。AraR は-のレーンで 0 nM、+のレーンで 10 nM の濃度になるように反応系に加えた。反応系中のアラビノース濃度を各レーン上部において示す。▷はフリーの DNA プローブを示し、▶は DNA-AraR 複合体を示す。

2-3-3. アラビノース代謝関連遺伝子のアラビノース誘導機構の解明 (*in vivo*)

アラビノース代謝関連遺伝子のアラビノース誘導におけるアラビノース代謝の関与

精製 AraR タンパク質を用いた実験により、アラビノースをエフェクター分子とする AraR によるアラビノース応答制御機構の存在が示唆された。そこで、アラビノース代謝関連遺伝子の発現制御におけるアラビノース代謝の関与を調べた。細胞内に取り込まれたアラビノースはアラビノースイソメラーゼ (AraA)、リブロキナーゼ (AraB)、リブロース 5 リン酸 4-エピメラーゼ (AraD)、計 3 つの資化酵素によって、ペントースリン酸経路中の D-キシルロース 5 リン酸に変換される。つまり、これらの遺伝子の破壊により資化経路を異なる段階で遮断できると考えられ、下流の中間代謝物の制御への関与を個別に調べる事が可能になる。先行研究において、これらの遺伝子破壊株はアラビノースを単一炭素源として増殖出来なくなることが確認されている。WT、*araA* 破壊株 ($\Delta araA$)、*araB* 破壊株 ($\Delta araB$)、*araD* 破壊株 ($\Delta araD$) を A 培地で 4 時間培養した後、終濃度 2 %になるようにアラビノースを加える直前 (0 分)、添加 5 分後 (5 分)、添加 15 分後 (15 分) の時点で菌体を回収し、トータル RNA を得た。まず、WT、 $\Delta araA$ 、 $\Delta araD$ における *araB* 遺伝子の発現を調べた (図 3-17A)。その結果、0 分及び 5 分における $\Delta araA$ 、 $\Delta araD$ の *araB* の発現レベルは、WT のそれと同等のレベルを示した。しかし、WT ではアラビノース添加 5 分後から 15 分後にかけて顕著に発現レベルが低下したが、 $\Delta araA$ 、 $\Delta araD$ ではほとんど変化しなかった。同様の結果が、WT、 $\Delta araB$ における *araA* の発現パターンで確認された (図 3-17A)。また、3 つの遺伝子破壊株は *araE*、*araR* の発現レベルにおいても、0 分、5 分で WT と同様のパターンを示したが、アラビノース添加 5 分後から 15 分後にかけて WT で生じる顕著な発現レベルの低下は認められなかった (図 3-17B、C)。まとめると、アラビノースの代謝はアラビノース代謝関連遺伝子のアラビノース応答に何ら影響を与えないが、アラビノース添加 5 分後から 15 分後にかけて生じる発現抑制に関与する可能性が考えられる。

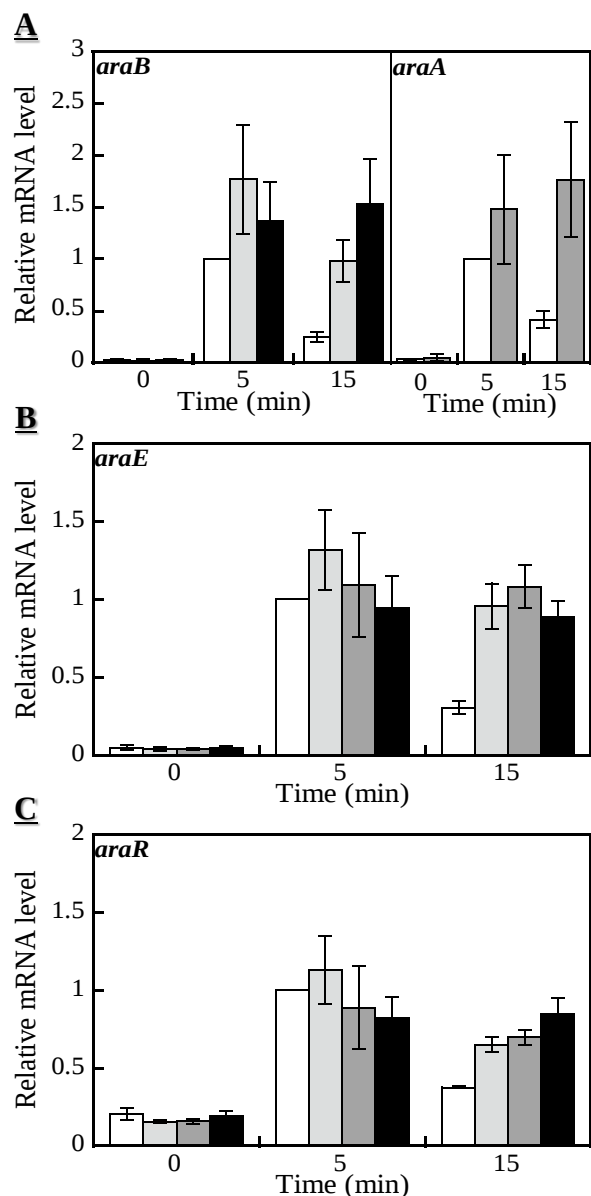


図 3-17. アラビノース代謝欠損株におけるアラビノース応答

野生型、*araA*、*araB* あるいは *araD* 遺伝子を破壊した *C. glutamicum* ATCC 31831 株を糖を含まない A 培地で 4 時間培養した後、アラビノースを終濃度 2% になるように添加した。添加直前 (0 分)、添加 5 分及び 15 分後の菌体を回収して *araB*、*araA*、*araE*、*araR* 遺伝子の発現レベルを調べた。野生株を白、*araA* 破壊株を明灰、*araB* 破壊株を暗灰、*araD* 破壊株を黒で示す。アラビノース添加 5 分後の野生株の値を 1 としてその相対値を示す。標準偏差を独立した 3 回の繰り返し実験により求めた。

アラビノース代謝関連遺伝子のアラビノース誘導におけるアラビノース取り込みの関与

アラビノース代謝関連遺伝子のアラビノース誘導におけるアラビノース取り込みの関与を明らかにするために、アラビノースプロトンシンポーターをコードする *araE* の破壊株 ($\Delta araE$) を構築した。WT と $\Delta araE$ を A 培地で 4 時間培養した後、様々な濃度のアラビノースを加え (終濃度 0.5、5、50、200 mM)、添加直前 (0 分)、添加 5 分後 (5 分) の時点の菌体からトータル RNA を回収し、定量 RT-PCR により発現レベルを調べた。その結果、0 分における *araB*、*araE*、*araR* の発現レベルは WT と

$\Delta araE$ で差がなかった (図 3-18)。 *araE* の発現レベルを *araE* 遺伝子の削除領域外で設計したプライマーを用いて調べた。 WT における *araB* 及び *araE* は、添加したアラビノースが低濃度である方が強く誘導されていた (図 3-18A、B)。 $\Delta araE$ における *araB* 及び *araE* は、アラビノースが 5、50、200 mM の範囲で添加された場合に WT と同様に強く誘導されたが、0.5 mM の濃度で添加したところ誘導レベルが著しく小さかった。 *araB* 及び *araE* と同様の傾向が *araR* 遺伝子でも確認された (図 3-18C)。低濃度のアラビノース存在下におけるアラビノース応答が、アラビノース取り込み体の欠損により著しく損なわれることから、アラビノース誘導は細胞内のアラビノースによって引き起こされることが明らかになった。

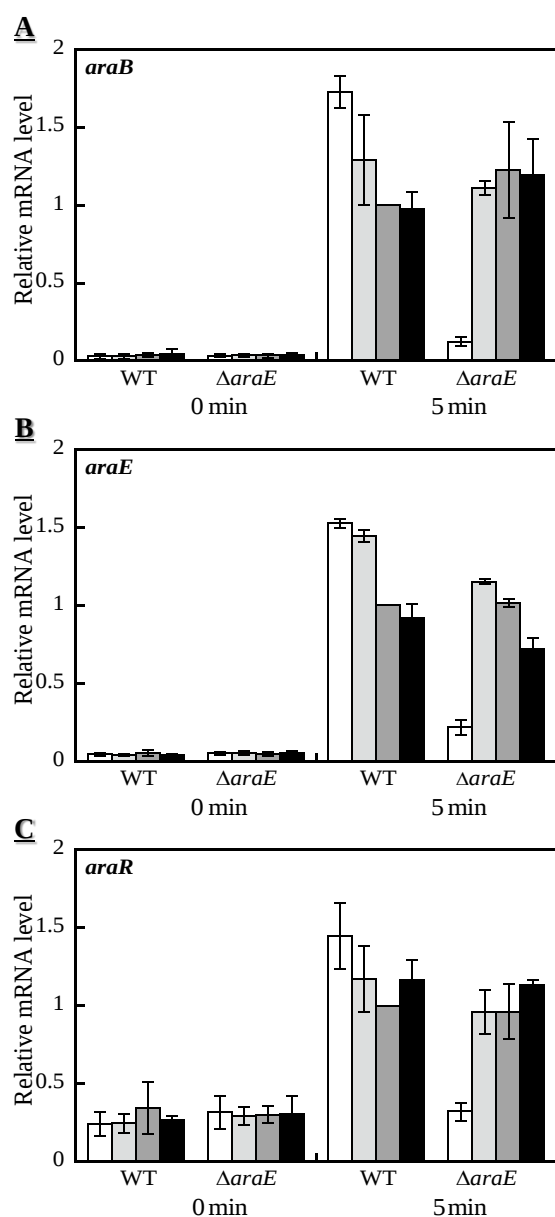


図 3-18. *araE* 破壊株におけるアラビノース応答

野生型、*araE* 遺伝子を破壊した *C. glutamicum* ATCC 31831 株 (WT、 $\Delta araE$) を糖を含まない A 培地で 4 時間培養した後、アラビノースを終濃度が 0.5 mM (白)、5 mM (明灰)、50 mM (暗灰)、200 mM (黒) になるように添加した。添加直前 (0 分) 及び添加 5 分後の菌体を回収して *araB*、*araE*、*araR* 遺伝子の発現レベルを調べた。終濃度が 50 mM になるようにアラビノースを添加した時の 5 分後の発現レベルを 1 としてその相対値を示す。標準偏差を独立した 3 回の繰り返し実験により求めた。

アラビノース代謝関連遺伝子の転写単位の決定

これまでの *araB*、*araD*、*araA* の発現パターン及びゲノム上の位置情報から、*araBDA* はオペロンを形成する可能性が強く示唆される。これと同様に、*galM* 及び *araR* もアラビノース誘導において同様の挙動を示すことから、オペロンを形成していると推測される。そこで、*araBDA* 及び *galM-araR* がオペロンを形成しているのかどうかを RT-PCR によって調べた。cDNA サンプルは WT をアラビノース存在下で 4 時間培養した菌体のトータル RNA から調製した。PCR 反応のポジティブコントロールとして *C. glutamicum* ATCC 31831 株ゲノムを、cDNA サンプル合成元のトータル RNA へのゲノム混入の可能性を排するために、同一のトータル RNA からの cDNA 合成反応時に逆転写酵素の代わりに水を加えたサンプル（-RT とする）を cDNA サンプル（+RT とする）と同様に鋳型として使用して PCR を行った。PCR で増幅した領域を図 3-19A で示す。実験の結果、*araB-araD* 及び *araD-araA* の遺伝子間領域を示すバンドがゲノム及び +RT を鋳型とした時に合成されたが、-RT を鋳型とした場合にバンドは認められなかった。このことから、*araB-araD-araA* はオペロンを形成することが明らかになった。同様の実験によって、*galM* 及び *araR* がオペロンを形成することが明らかになった。

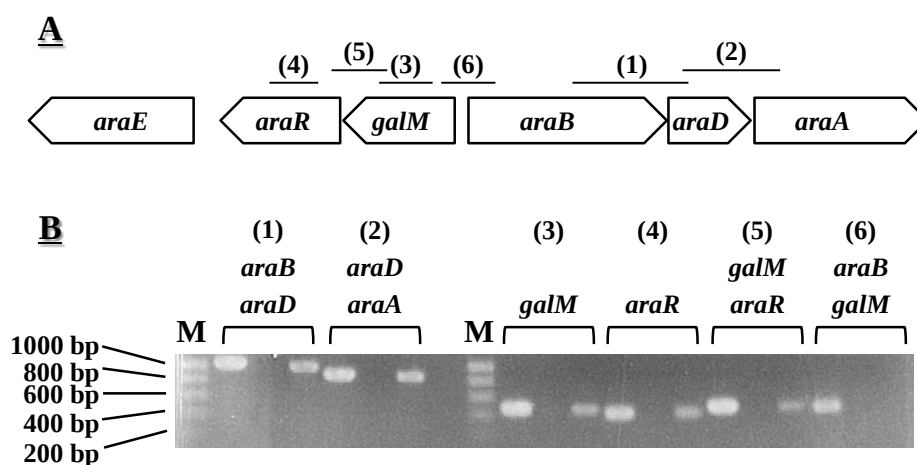


図 3-19. RT-PCR

araBDA 及び *galM-araR* の共転写産物が存在するかどうかを RT-PCR により調べた。A のクラスター上部において示される番号及び領域は、B における番号と PCR の増幅領域に相当する。B における増幅領域毎の 3 つのレーンは、左からゲノム、-RT（トータル RNA を用いた逆転写反応を行う際に、逆転写酵素を加えなかったもの）、+RT を鋳型として PCR 反応を行ったものをロードした。

***araR* の転写単位の解明**

上記研究結果に反して当研究室の先行研究では、*galM* 及び *araR* の転写が独立していることを示す結果が得られている。従って、*araR* は *galM* プロモーター以外のプロモーターによっても転写される可能性が示唆された。そこで、*araR* 上流配列（400 塩基対）を *lacZ* 遺伝子の上流に融合した *ParaR-lacZ* 遺伝子を *C. glutamicum* ATCC 31831 株ゲノムに挿入した株（*ParaR-F* 株）を構築して、*LacZ* レポーターアッセイを行った。実験のネガティブコントロールとして、*araR* 上流配列を逆向きに *lacZ* 遺伝子に融合した遺伝子を導入した *ParaR-R* 株を使用した。*ParaR-F* 株及び *ParaR-R* 株を 1% のグルコースあるいはアラビノースを含む A 培地で培養し対数増殖期における *LacZ* 活性を調べたところ、*ParaR-F* 株においてのみ活性が検出され、*ParaR-R* 株では活性はなかった（図 3-20A）。また、*ParaR-F* 株の *LacZ* 活性はグルコースで培養した時と、アラビノースで培養した時の菌体で差がなかった。

次に、*araR* のアラビノースによる発現誘導が *galM* プロモーターに依存するかどうかを調べるために、*galM* 上流領域（400 塩基対）を *lacZ* 遺伝子に融合した *PgalM-lacZ* 遺伝子を導入した *PgalM-F* を構築した。*PgalM-F* と *ParaR-F* を A 培地で 4 時間培養した後、終濃度が 2 % になるようにアラビノースを加え、直前、添加 5 分後、添加 15 分後における *lacZ* 発現レベルを定量 RT-PCR によって調べた。その結果、*PgalM-F* における *lacZ* 発現レベルは *galM* 遺伝子と同程度に、アラビノースの添加 5 分後に誘導された（図 3-20B）。しかし、*ParaR-F* における *lacZ* 発現レベルはアラビノースの添加前後で変化しなかった（図 3-20B）。これらの実験により、*araR* はアラビノース誘導性の *PgalM* だけでなく、アラビノース非誘導性の *ParaR* によっても転写されることが明らかになった。

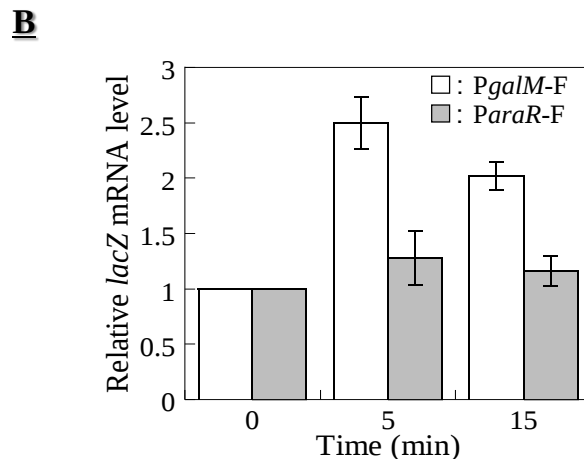
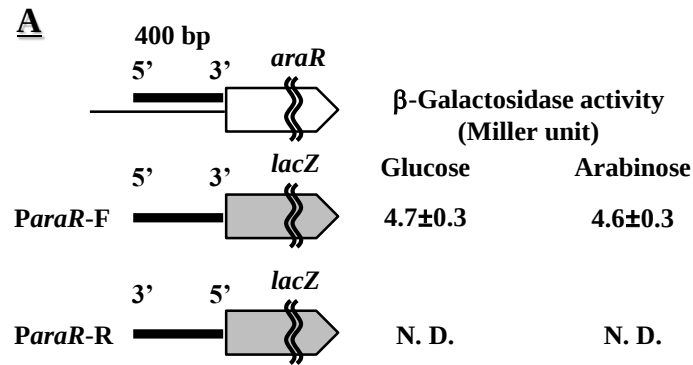


図 3-20. *araR* の転写単位

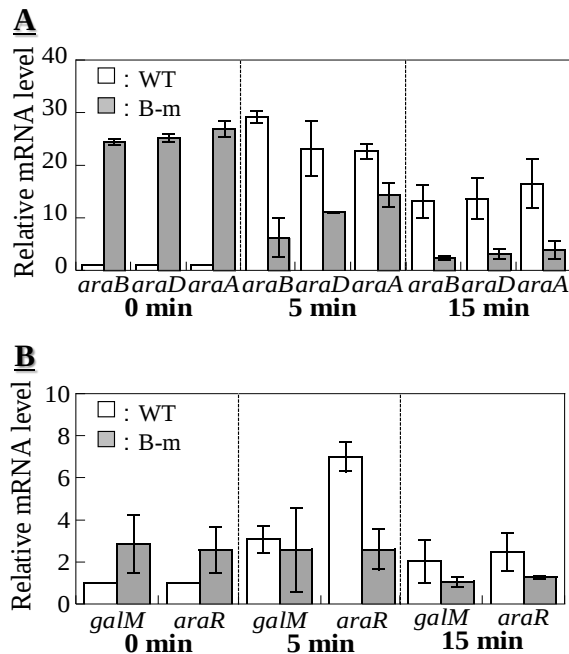
A : *araR* 遺伝子上流配列 (ParaR) を大腸菌由来の *lacZ* 遺伝子の先頭に接続した融合遺伝子を導入した *C. glutamicum* ATCC 31831 株を用いて *araR* のプロモーター活性を測定した。ParaR を順方向で接続した遺伝子を持つ ParaR-F 及び、逆向きに接続した ParaR-R をグルコースあるいはアラビノースを 2% で含む A 培地で 4 時間培養した。その後、菌体を回収して粗抽出液中の β-ガラクトシダーゼ活性を測定した。3 回の独立した繰り返し実験により、平均値及び標準偏差を求めた。N.D. は活性が検出されなかったことを示す。

B : ParaR-F 及び *galM* 遺伝子上流領域を *lacZ* 遺伝子に接続した融合遺伝子を有する PgalM-F を糖を含まない A 培地で 4 時間培養した。その後、アラビノースを終濃度 2% になるように添加した。添加直前 (0 分)、添加 5 分及び 15 分後の菌体を回収して *lacZ* 遺伝子の発現レベルを定量 RT-PCR によって調べた。PgalM-F を白、ParaR-F を灰で示す。アラビノース添加直前の値を 1 として相対値を示す。標準偏差を独立した 3 回の繰り返し実験により求めた。

BSB の機能解析

araB 及び *galM* の遺伝子間領域にある AraR 結合サイト (BSB) の遺伝子発現制御における役割を直接調べるために、ゲノム上の BSB (ATGTTAGCGATAACAC) の中心の CGA を ATC に置換した BSB 変異株 (B-m) を構築した。この配列置換によって、AraR の DNA 結合活性が著しく損なわれることをゲルシフトアッセイにおいて確認している (図 3-13F)。WT 及び B-m を A 培地で 4 時間培養した後、終濃度が 2 % になるように L-アラビノースを加え、直前、添加 5 分後、添加 15 分後における、*araBDA* の発現レベルを定量 RT-PCR によって調べた。同様の実験で既に述べたように、WT における *araBDA* の発現レベルはアラビノース添加 5 分後に 20 倍以上に誘導され、その後の 10 分間で低下する現象を認めた (図 3-21A)。B-m において *araBDA* 発現レベルはアラビノースの添加前において高発現していた (図 3-21A)。従って、*araBDA* の発現制御において、BSB は必須のシスエレメントとして働くことが明らかになった。また、B-m における *araBDA* の発現は、 Δ *araR* におけるのと同様に、アラビノース添加後に急激に抑制されたことから、AraR 以外の制御因子の関与が示唆された。BSB は *araB* の上流で逆向きに転写される *galM* の -10 領域に重なっているため、*galM* の発現制御にも関与する可能性が示唆された。そこで、B-m における *galM-araR* の発現レベルを調べてみたところ、アラビノース添加前に *galM-araR* 発現レベルが WT に比べて高いことが明らかになった (図 3-21B)。以上の実験により、*araB-galM* 遺伝子間領域に存在する BSB は、その周辺から転写される 2 つのオペロン (*araBDA* 及び *galM-araR*) のアラビノース誘導制御に関与する唯一のシスエレメントであることが明らかになった。また、BSB は *araB* 転写開始点に対して下流に位置するが、*galM* 転写開始点からは -10 領域付近に位置しており、抑制機構が *araB* 及び *galM* プロモーター間で異なることが示唆された。

**図 3-21. BSB 変異株におけるアラ
ビノース応答**



野生型及びゲノム上の BSB の中心配列を置換した *C. glutamicum* ATCC 31831 株 (WT、B-m) を糖を含まない A 培地で 4 時間培養した後、アラビノースを終濃度 2% になるように添加した。添加直前 (0 分) 及び添加 5 分、15 分後における *araB-araD-araA* (A)、*galM-araR* (B) 発現レベルを調べた。野生株を白、B-m を灰で示す。アラビノース添加前の野生株の発現レベルを 1 としてその相対値を示す。標準偏差を独立した 3 回の繰り返し実験により求めた。

BSE の機能解析

ゲノム上の BSE1 及び BSE2 の中心の CG を AT に置換することにより、AraR 結合サイト変異株 (E1-m、E2-m、E1/2-m) を構築した。E1-m は BSE1 が置換されており、BSE2 は無置換である。E2-m は E1-m とは逆に BSE2 が置換されている。また、E1/2-m は両方の結合サイトが置換された株である。WT、E1-m、E2-m、E1/2-m を A 培地で培養し、4 時間後の培養液にアラビノースを終濃度が 2 % になるように加え、添加直前 (0 分)、添加 5 分後、添加 15 分後における *araE* 発現レベルを定量 RT-PCR によって調べた。その結果、アラビノース添加前の発現レベルは、E2-m と WT と同じであったが、E1-m では 5 倍程度高かった (図 3-22)。また、E1/2-m の *araE* 発現レベルは WT の約 30 倍に上昇していた (図 3-22)。以上の結果から、BSE1 及び BSE2 は独立して機能するシスエレメントであり、それぞれが *araE* 発現抑制に関与するが、BSE1 の方がより効果的に抑制することが明らかになった。また、アラビノース添加 5 分後と比べて 15 分後の WT、E1-m、E2-m では *araE* 発現レベルが低下しているが、E1/2-m はアラビノース添加 15 分後に減少していなかった。これにより、アラビノース初期誘導後に AraR 依存的な抑制が存在する可能性が示唆された。*araE* 以外の他のアラビノース代謝関連遺伝子の発現は、WT と全ての BSE1、BSE2 変異株において差はなかった (データは省略する)。

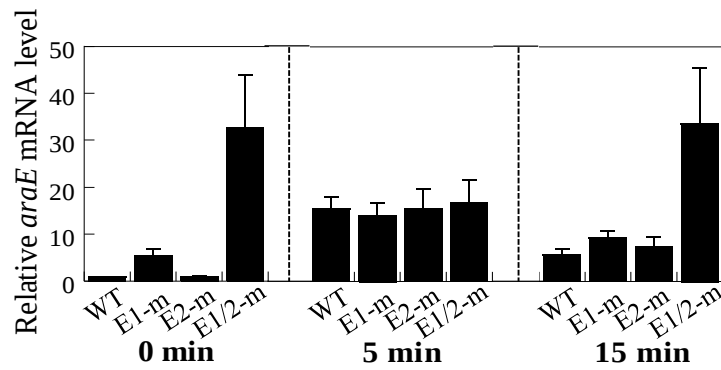


図 3-22. BSE 変異株におけるアラビノース応答

まず、ゲノム上の BSE1 の中心配列が置換された *C. glutamicum* ATCC 31831 株 (E1-m 株)、BSE2 の中心配列が置換された *C. glutamicum* ATCC 31831 株 (E2-m 株)、両方の BSE が置換された *C. glutamicum* ATCC 31831 株 (E1/2-m) を構築した。野生型 *C. glutamicum* ATCC 31831 株 (WT) 及び E1-m、E2-m、E1/2-m を糖を含まない A 培地で 4 時間培養した後、アラビノースを終濃度 2% になるように添加した。添加直前 (0 分) 及び添加 5 分、15 分後における *araE* 発現レベルを調べた。アラビノース添加前の WT の発現レベルを 1 としてその相対値を示す。標準偏差を独立した 3 回の繰り返し実験により求めた。

AraR 非依存的な発現抑制におけるアラビノース代謝の影響

AraR 非依存的なアラビノース代謝関連遺伝子の発現抑制にアラビノース代謝が関与するかどうかを調べるために、 $\Delta araA$ の BSB を置換した $\Delta araA/B$ -m を構築した。B-m 及び $\Delta araA/B$ -m を A 培地で 4 時間培養した後、L-アラビノースを終濃度 2 % になるように加え、添加直前、添加 15 分後で菌体を回収し、定量 RT-PCR によってアラビノース代謝関連遺伝子の発現レベルを調べた。その結果、アラビノース添加直前における *araB* 発現レベルは両株で差がなかったが、アラビノース添加 15 分後における B-m の *araB* 発現レベルは低下するのに対して、 $\Delta araA/B$ -m ではほとんど変化しなかった (図 3-23)。以上のことから、AraR 非依存的なアラビノース代謝関連遺伝子の発現抑制は、アラビノース代謝に依存的に起こることが明らかになった。変化量は *araB* に比べて小さいが、同様の傾向が *galM* でも確認された (図 3-23)。また、B-m において *araE* のアラビノース誘導が消失した (図 3-23)。これは、BSB の破壊によって恒常的にアラビノース資化経路が活性化されていることにより、細胞内にアラビノ

ースが蓄積しないためと考えられる。実際に、 $\Delta araA/B$ -m では誘導が確認された。

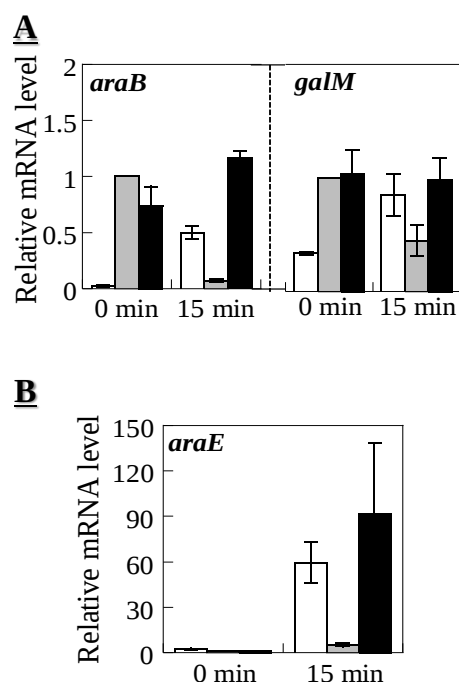


図 3-23. アラビノース代謝欠損株におけるアラビノース添加後の発現変化

araA 遺伝子破壊株のゲノム上の BSB に配列の置換を加えた $\Delta araA/B$ -m を構築した。野生株 (WT)、B-m、 $\Delta araA/B$ -m を糖を含まない A 培地で 4 時間培養した後、アラビノースを終濃度 2% になるように添加した。添加直前 (0 分) 及び添加 15 分後における *araB*、*galM*、*araE* 発現レベルを調べた。野生株を白、B-m を灰、 $\Delta araA/B$ -m を黒で示す。アラビノース添加前の B-m の発現レベルを 1 としてその相対値を示す。標準偏差を独立した 3 回の繰り返し実験により求めた。

2-4. 考察

本研究によって、*C. glutamicum* ATCC 31831 株のアラビノース代謝関連遺伝子クラスター内の LacI ファミリーの転写因子をコードする *araR* の遺伝子産物が、近傍のアラビノース資化遺伝子オペロン (*araBDA*) 及びアラビノース取り込み遺伝子 (*araE*) の上流領域に結合することを明らかにし (図 3-9)、AraR の DNA 結合活性がアラビノースにより低下することを *in vitro* で確認した (図 3-11)。また、アラビノース資化遺伝子欠損株においてもアラビノース代謝関連遺伝子の発現誘導が WT と同様に認められ (図 3-17)、アラビノース取り込み体をコードする *araE* の破壊により、アラビノース低濃度存在下におけるアラビノース誘導が大きく損なわれたことから (図 3-18)、細胞内に取り込まれたアラビノースをインデューサーとして、アラビノース代謝関連遺伝子は誘導されることが明らかになった。以上のことから、AraR がアラビノース応答性転写因子として *C. glutamicum* ATCC 31831 株のアラビノース代謝関連遺伝子のアラビノース誘導を直接的に制御することが明らかになった。

C. glutamicum ATCC 31831 株の LacI ファミリーの転写因子 AraR は、既知の同ファミリーの転写因子と同様に 16 塩基対のパリンドローム様

配列を標的とすることが明らかになった (図 3-13A) (89)。これまでに、様々な細菌から LacI ファミリーの転写因子が糖質代謝関連遺伝子の制御因子として働くことが報告されている (90)。関連研究及び本研究の成果から、*C. glutamicum* の AraR は C 末端のアラビノース結合ドメインにアラビノースが結合することにより、N 末端の DNA 結合ドメインの構造が変化し、DNA 結合活性が低下するのだと思われる。LacI ファミリーの転写因子において、アラビノースをエフェクターとして DNA 結合活性が変化するのを認めたのは本研究が初めてである。大腸菌及び枯草菌においてアラビノース応答性転写因子が同定されているが、これらは LacI ファミリー以外に属する。大腸菌の AraC は AraC/XylS ファミリーに属し、アラビノース非存在下においてリプレッサーとして、また、アラビノース存在下においてアクチベーターとして働く (91)。AraC によるアラビノース応答制御モデルは、大腸菌と近縁の *Enterobacter* 属、*Klebsiella* 属等の腸内細菌科に属する細菌においてよく保存されている (92)。枯草菌の AraR は GntR ファミリーに属するタンパク質と相同な DNA 結合ドメインを有し、アラビノース代謝関連遺伝子をアラビノース非存在下で抑制する (82)。GntR ファミリーの AraR 相同タンパク質による制御が、枯草菌と同じフィルミクテス門に属する *Clostridium acetobutylicum* においても見つかっており、同論文において *Bacillus* 属、*Clostridium* 属、*Lactobacillus* 属における AraR 相同タンパク質のレギュロンの比較が行われている (93)。今日までに、ATCC 31831 株以外のアラビノース資化性 *C. glutamicum* は見つかっていない。しかし、*C. glutamicum* と同じ放線菌門に属する *Mycobacterium smegmatis* 及び *Streptomyces venezuelae* は、*C. glutamicum* ATCC 31831 株と同様にアラビノース資化遺伝子及び LacI ファミリーの AraR 相同タンパク質をコードする遺伝子からなるクラスターを有し、それぞれの AraR 相同タンパク質のアミノ酸配列が *C. glutamicum* の AraR と 44%、41%一致する。*M. smegmatis* のアラビノース資化遺伝子がアラビノースにより誘導されることが知られているが、AraR 相同タンパク質の制御への関与は明らかにされていない (94, 95)。これまでにアラビノース代謝遺伝子の制御系が放線菌門に属する細菌で解析された例はほとんどないが、アラビノース資化性の放線菌においては本研究で明らかにされた LacI ファミリーの AraR による制御が保存されているかもしれない。

DNaseI フットプリンティングにおいて、DNaseI の消化から保護された 3 つの領域から、16 塩基対の特徴的な保存配列を見出した (ATGTtAGCGnTaAcat) (図 3-13A)。このモチーフは、*araB* 転写開始点

より 8 塩基下流から 23 塩基下流 (BSB)、*araE* 転写開始点より 10 塩基下流から 25 塩基下流 (BSE1) 及び 29 塩基上流から 44 塩基上流 (BSE2) に存在する (図 3-12)。先行研究により、LacI ファミリーの転写因子はパリンδροーム様配列を標的とすることが分かっており、特に中心は LacI ファミリーのほとんどの転写因子において CG で共通である。しかし、ファミリー内でパリンδροームの外縁部分にバリエーションが認められ、その違いにより特異的なターゲットに結合出来ると考えられている(89, 90)。これらの成果から推察されるように、本研究においても標的モチーフの中心配列の置換により、AraR の DNA 結合活性は著しく低下した (図 3-13F、3-14)。また、大腸菌の LacI 及び GalR 等の LacI ファミリーに属する一部の転写因子は、プロモーター内及びその近傍の複数の結合サイトに協調的に結合し、ループ構造を形成して相乗的に強く発現を抑制することが知られている(96, 97)。*araE* プロモーターにおける 2 つの AraR 標的モチーフの中心間距離は 53 塩基対であり、DNA 二重らせん構造に基づいてちょうど 5 ヘリックスの距離において標的モチーフは同一平面上に存在する (1 ヘリックスは約 10.5 塩基対(98-100))。このようなことから、AraR は *araE* プロモーターにおいて協調的に 2 カ所の結合サイトを占有する可能性が考えられた。この仮説を検証するために、ゲノム上の各 AraR 結合サイトを破壊した株における *araE* 発現パターンを調べたが、*araE* の発現を制御するのに AraR は必ずしも両方に結合する必要はなく、BSE1 に結合するだけで野生株と同等に発現を抑制出来ることが明らかになった (図 3-22)。また、BSE2 も BSE1 に比べて抑制レベルは弱い、AraR シスエレメントとして *araE* の発現抑制に関与することが明らかになった (図 3-22)。精製 AraR タンパク質を用いたゲルシフトアッセイにおいて、BSE1 及び BSE2 に対する AraR の DNA 結合活性にほとんど差がなかったため(図 3-16B、C)、*araE* 抑制レベルの差異が AraR の DNA 結合活性に起因しないと思われる。*araE* プロモーターにおいて、BSE1 は転写開始点下流に位置するが BSE2 は -35 領域周辺に位置しており、転写開始点に対する位置関係が異なる (図 3-12D)。転写抑制因子は転写開始点下流に結合するケースが多く、転写の開始と伸長の両方を阻害することが知られている(101)。もしかすると、BSE1 及び BSE2 を介した AraR による抑制レベルに差があるのは、結合位置が異なるために抑制機序が異なるからなのかもしれない。まとめると、*araE* プロモーターにおいては、弱い抑制をもたらす結合サイト (BSE2) と強い抑制をもたらす結合サイト (BSE1) を介した AraR による 2 パターンの制御が並存してい

る。この生理学的意義として、アラビノース取り込み遺伝子 *araE* の発現レベルにゆらぎを持たせることが出来るかもしれない。この他にも関連研究から、複数の結合サイトを配することによって AraR の局所的濃度を高く保ち、結合サイトの占有率を上げる等のことも考えられる(102, 103)。これに関して、他のアラビノース応答性転写因子である大腸菌の AraC 及び枯草菌の AraR の結合サイトがプロモーター内に 2カ所存在する場合は、転写因子タンパク質が両結合サイトに協調的に結合して形成されるループ構造が発現制御の要であることが分かっており(72, 82, 83)、*C. glutamicum* ATCC 31831 株の AraR とは複数の結合サイトが存在する場合の制御機構が異なる。

アラビノース代謝関連遺伝子クラスター内の *araB* 及びその上流から逆向きに転写される *galM* の間に位置する AraR 結合サイト (BSB) の変異により、両遺伝子を先頭とする 2 つのオペロンがアラビノース非存在下で高発現していた (図 3-21)。また、BSB の周辺に BSB 以外の AraR 結合サイトは見つからなかった。BSE1 及び BSE2 は両オペロンの転写開始点付近から 2 kbp 以上離れており制御への関与は考えにくく、実際に、BSE1 及び BSE2 の変異株における *araBDA* 及び *galM-araR* の発現パターンは野生株と同様の傾向を示した (データは省略する)。これらの結果から、BSB は周辺から転写される *araBDA* 及び *galM-araR* オペロンのアラビノース応答性を制御する唯一のシスエレメントとして働くことが明らかになった。また、BSB 変異による発現への影響は *araBDA* の方が *galM-araR* に比べて大きく、BSB を介した AraR による抑制レベルにオペロン間で差がある可能性が示唆された (図 3-21)。BSB は *araB* 転写開始点より 8 塩基下流から 23 塩基下流に位置し、*araE* プロモーターにおいて強い抑制をもたらす BSE1 と位置関係が似ている。しかし、BSB は *galM* 転写開始点より 9 塩基上流から 24 塩基上流に位置している。AraR による *araBDA* と *galM-araR* の発現制御においても、各オペロンの転写開始点に対する BSB の位置が抑制レベルを決定する要因となる可能性がある。

araB 及び *araE* プロモーターから見出された 3 つの AraR 結合サイトに対する、AraR の DNA 結合活性はアラビノース非存在下においてほとんど同じであった (図 3-16)。しかし、アラビノース存在下における AraR の DNA 結合活性は BSE1 及び BSE2 と比べて BSB で顕著に高いことが示された (図 3-15、図 3-16)。このことから、*araBDA* の脱抑制に必要な細胞内のアラビノース濃度が、*araE* の脱抑制に必要な濃度に比べて高いことが示唆される。このような結合サイト毎に異なるアラビノース応答性

や *araE* 上流で見られる補助的な AraR 結合サイトにより、アラビノースの取り込みと資化がうまく共役しているのかもしれない。

BSB 変異株を用いた解析及び RT-PCR 解析の結果から、AraR は上流のアラビノース応答性の *galM* プロモーター依存的に自身の発現を抑制することが明らかになった (図 3-19、3-21)。このような転写因子の自己抑制制御は、インデューサーの非存在下において自身の発現を保持することと、脱抑制によって増加した転写因子タンパク質によって外界環境の変化に対する迅速な適応を可能にすると考えられる。また、*araR* はアラビノースによって誘導されないプロモーターによっても転写されることが明らかになった (図 3-20)。アラビノースに対して非誘導性であるのは、*araR* 遺伝子上流に AraR 結合サイトが見つからなかったことと一致している (図 3-9D)。*galM* プロモーターと *araB* プロモーターの制御は BSB を介して同時に行われるため、*galM* プロモーター依存的に *araR* が転写される状況では *araBDA* の発現を十分に抑制出来ない可能性がある。この *araR* 上流の非誘導性プロモーターは、*araBDA* の発現を抑制したまま *araR* を発現するために存在するのかもしれない。先行研究により、AraR と同じ自己抑制型及び恒常的な 2 つのプロモーターによって転写される LacI ファミリーの転写因子遺伝子が *Streptomyces griseus* において見つっている (104)。

アラビノース代謝関連遺伝子は *araR* 破壊株においてアラビノース添加後に抑制されたことから、AraR 依存的な制御に加えて、AraR 非依存的な制御も受けることが強く示唆される。これと同様に、BSB 変異株における *araBDA* もアラビノース添加後に抑制されたが、*araA* 遺伝子破壊株をベースに BSB を変異させた株では、*araBDA* の発現がアラビノース添加後も保持された。このことから、アラビノース依存的かつ AraR 非依存的な抑制はアラビノースの代謝を必要とすることが示唆される。また、AraR による制御の可能性もあるが、野生株におけるアラビノース添加 5 分後をピークとして 15 分後に発現が低下する現象も、AraR 非依存的な制御によるのかもしれない。アラビノースの資化によってアラビノース代謝関連遺伝子の発現が抑制される現象は大腸菌においても認められており、この発現抑制は誘導によって過剰量の代謝酵素を合成してしまわないように備わっていると考えられている (105)。しかし大腸菌の場合は、この抑制を完全に解除するためにアラビノース資化経路を遮断するだけでなく、cAMP を培地中に添加する必要がある点で *C. glutamicum* ATCC 31831 株と異なっている (76)。大腸菌における cAMP-CRP はグルコース

共存時におけるアラビノース代謝抑制にも関与しており、大腸菌はグルコースとアラビノースを同時に利用出来ない。しかし、*C. glutamicum* においては、大腸菌における cAMP-CRP の様なカタボライトリプレッション因子が見つかっておらず、事実、*C. glutamicum* によるグルコース及びアラビノース等の異なる炭素源の同時利用が報告されている(106-109)。しかし本研究によって、グルコース及びアラビノースの同時添加により、アラビノース添加 5 分以内に生じる速やかな発現誘導が消失することを認め、短時間ではあるが異種糖質の共存条件において、未知の発現制御機構が存在する可能性が示唆された(図 3-7)。*C. glutamicum* の糖質応答性については更なる研究が必要である。本研究で明らかにした AraR 依存的な発現制御機構に加えて、AraR 非依存的な制御機構を解明出来れば、有用工業微生物である *C. glutamicum* の糖質代謝能の全容解明に貢献出来るだけでなく、アラビノースの効率的な資化能を有する遺伝子組換え株の育種に有用な基盤を得ることが可能になると思われる。

総括

食料資源と競合せずに豊富に確保できる稲わら等のリグノセルロース系バイオマスを原料として、バイオ燃料及び化成品を生産することにより循環型社会の構築に大きく近づく。本研究では、アミノ酸生産菌として古くから利用されてきた *C. glutamicum* を宿主としたリグノセルロース系バイオマスからの物質生産において、その効率化に重要なペントース利用について研究した。

第一章では、先行研究で構築されたキシロオリゴ糖利用能を有する *C. glutamicum* を基に、近縁の細菌から同定したキシラナーゼ及びアラビノフラノシダーゼ遺伝子を導入することにより、アラビノキシランの直接利用能を獲得させた。

第二章では、一般的にペントースの資化能を持たないとされてきた *C. glutamicum* において、例外的にアラビノース資化能を有する *C. glutamicum* ATCC 31831 株のアラビノース資化性に着目し、新規のアラビノース誘導制御機構を解明した。

微生物の発酵能力を最大限に活用するためには、培養経過中における微生物細胞内の代謝反応の変化を十分に把握・解析した上で、プロセス全体の最適化や制御を実現することが肝要である。近年ではゲノム科学や代謝工学の進展に伴い、遺伝子発現、タンパク質、代謝物に関するオミクスデータが得られるようになってきている。このような生体内分子ネットワークの網羅的解析結果に基づいて的確な代謝改変戦略を導出することにより、標的物質の収率・生産性の向上が可能になる。本研究では新規の多糖分解酵素遺伝子の単離とその機能の理解に基づいて、本菌で初めてアラビノキシランの直接利用を可能にただけでなく、アラビノキシラン関連糖質であるアラビノースの代謝関連遺伝子を制御する新規の転写因子を解明した。本研究で得られた知見は、高機能な発酵生産菌を育種する上での基盤情報として産業上重要であるだけでなく、細菌の糖質代謝能の基本的理解に大きく貢献すると信じている。今後、基礎・応用の境界なく、本研究で達成したことが活用されることを願う。

謝辞

本研究を行うに当たり、数々の御指導ならびに、数々の御助言を賜りました公益財団法人地球環境産業技術研究機構バイオ研究グループ乾将行グループリーダーに深く御礼申し上げます。

本論文の執筆にあたり格別の御配慮を頂きました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科ストレス微生物科学研究室高木博史教授、システム微生物学研究室森浩禎教授に深く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、直接的な御指導、御助言を賜りました公益財団法人地球環境産業技術研究機構バイオ研究グループ寺本陽彦研究員、渡邊彰研究員に深く御礼申し上げます。

最後に公私共々、色々とお気づかい下さいました、バイオ研究グループの皆様にも深く御礼申し上げます。

参考文献

1. **Lynd LR, Wyman CE, Gerngross TU.** 1999. Biocommodity Engineering. *Biotechnology Progress* **15**:777-793.
2. **Taherzadeh MJ, Eklund R, Gustafsson L, Niklasson C, Lidén G.** 1997. Characterization and Fermentation of Dilute-Acid Hydrolyzates from Wood. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **36**:4659-4665.
3. **Magid J, Luxhøi J, Lyshede OB.** 2004. Decomposition of plant residues at low temperatures separates turnover of nitrogen and energy rich tissue components in time. *Plant and Soil* **258**:351-365.
4. **Sanjuán R, Anzaldo J, Vargas J, Turrado J, Patt R.** 2001. Morphological and Chemical Composition of Pith and Fibers from Mexican Sugarcane Bagasse. *Holz als Roh- und Werkstoff* **59**:447-450.
5. **Jin S, Chen H.** 2007. Near-infrared analysis of the chemical composition of rice straw. *Industrial Crops and Products* **26**:207-211.
6. **Billa E, Koullas DP, Monties B, Koukios EG.** 1997. Structure and composition of sweet sorghum stalk components. *Industrial Crops and Products* **6**:297-302.
7. **Pauly M, Keegstra K.** 2008. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *The Plant Journal* **54**:559-568.
8. **Inui M, Kawaguchi H, Murakami S, Vertès AA, Yukawa H.** 2004. Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for Fuel Ethanol Production under Oxygen-Deprivation Conditions. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **8**:243-254.
9. **Chundawat SPS, Venkatesh B, Dale BE.** 2007. Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility. *Biotechnology and Bioengineering* **96**:219-231.
10. **Yukawa H, Inui M, Vertès AA.** 2007. Genomes and genome-level engineering of amino acid-producing bacteria, p 349-401. *In* Wendisch VF (ed.), *Amino Acid Biosynthesis ~ Pathways, Regulation and Metabolic Engineering*, vol. 5. Springer, Berlin Heidelberg.
11. **Sasaki M, Jojima T, Inui M, Yukawa H.** 2008. Simultaneous utilization of D-cellobiose, D-glucose, and D-xylose by recombinant *Corynebacterium glutamicum* under oxygen-deprived conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **81**:691-699.

12. **Okibe N, Suzuki N, Inui M, Yukawa H.** 2010. Antisense-RNA-mediated plasmid copy number control in pCG1-family plasmids, pCGR2 and pCG1, in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **156**:3609-3623.
13. **Sasaki M, Jojima T, Kawaguchi H, Inui M, Yukawa H.** 2009. Engineering of pentose transport in *Corynebacterium glutamicum* to improve simultaneous utilization of mixed sugars. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**:105-115.
14. **Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG.** 2003. Purification and Functional Characterization of a Novel α -l-Arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum* B667. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:5096-5103.
15. **Hasegawa S, Uematsu K, Natsuma Y, Suda M, Hiraga K, Jojima T, Inui M, Yukawa H.** 2012. Improvement of the Redox Balance Increases l-Valine Production by *Corynebacterium glutamicum* under Oxygen Deprivation Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **78**:865-875.
16. **Yang Y, Zhang L, Guo M, Sun J, Matsukawa S, Xie J, Wei D.** 2015. Novel α -l-Arabinofuranosidase from *Cellulomonas fimi* ATCC 484 and Its Substrate-Specificity Analysis with the Aid of Computer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**:3725-3733.
17. **Shi P, Li N, Yang P, Wang Y, Luo H, Bai Y, Yao B.** 2010. Gene Cloning, Expression, and Characterization of a Family 51 α -l-Arabinofuranosidase from *Streptomyces* sp. S9. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **162**:707-718.
18. **Watanabe A, Hiraga K, Suda M, Yukawa H, Inui M.** 2015. Functional Characterization of *Corynebacterium alkanolyticum* β -Xylosidase and Xyloside ABC Transporter in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **81**:4173-4183.
19. **Okibe N, Suzuki N, Inui M, Yukawa H.** 2010. Efficient markerless gene replacement in *Corynebacterium glutamicum* using a new temperature-sensitive plasmid. *Journal of Microbiological Methods* **85**:155-163.
20. **Chris S.** 2006. Cellulose Synthesis in Higher Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **22**:53-78.

21. **Herzog RO.** 1925. The Nature of the Structure of Cellulose and its Significance in Chemical Transformations. *The Journal of Physical Chemistry* **30**:457.
22. **Ebringerová A, Hromádková Z, Heinze T.** 2005. Hemicellulose, p 1-67. *In* Heinze T (ed.), *Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
23. **Köhnke T, Östlund Å, Brelid H.** 2011. Adsorption of Arabinoxylan on Cellulosic Surfaces: Influence of Degree of Substitution and Substitution Pattern on Adsorption Characteristics. *Biomacromolecules* **12**:2633-2641.
24. **Li L, Pérré P, Frank X, Mazeau K.** 2015. A coarse-grain force-field for xylan and its interaction with cellulose. *Carbohydrate Polymers* **127**:438-450.
25. **Grabber JH, Mertens DR, Kim H, Funk C, Lu F, Ralph J.** 2009. Cell wall fermentation kinetics are impacted more by lignin content and ferulate cross-linking than by lignin composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **89**:122-129.
26. **Laureano-Perez L, Teymouri F, Alizadeh H, Dale BE.** 2005. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: characterization of pretreated corn stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **121-124**:1081-99.
27. **Hendriks ATWM, Zeeman G.** 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* **100**:10-18.
28. **Ge X, Xu F, Li Y.** 2016. Solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Recent progress and perspectives. *Bioresource Technology* **205**:239-249.
29. **Zeng Y, Zhao S, Yang S, Ding S-Y.** 2014. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. *Current Opinion in Biotechnology* **27**:38-45.
30. **Van Dyk JS, Pletschke BI.** 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances* **30**:1458-1480.

31. **Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B.** 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research* **42**:D490-D495.
32. **Paës G, Berrin J-G, Beaugrand J.** 2012. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnology Advances* **30**:564-592.
33. **Gilbert HJ.** 2010. The Biochemistry and Structural Biology of Plant Cell Wall Deconstruction. *Plant Physiology* **153**:444-455.
34. **Pollet A, Delcour JA, Courtin CM.** 2010. Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Critical Reviews in Biotechnology* **30**:176-191.
35. **Furniss CSM, Williamson G, Kroon PA.** 2005. The substrate specificity and susceptibility to wheat inhibitor proteins of *Penicillium funiculosum* xylanases from a commercial enzyme preparation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**:574-582.
36. **Flint HJ, Martin J, McPherson CA, Daniel AS, Zhang JX.** 1993. A bifunctional enzyme, with separate xylanase and beta(1,3-1,4)-glucanase domains, encoded by the *xynD* gene of *Ruminococcus flavefaciens*. *Journal of Bacteriology* **175**:2943-2951.
37. **Sae-Lee R, Boonmee A.** 2014. Newly derived GH43 gene from compost metagenome showing dual xylanase and cellulase activities. *Folia Microbiologica* **59**:409-417.
38. **Saul DJ, Williams LC, Grayling RA, Chamley LW, Love DR, Bergquist PL.** 1990. *celB*, a gene coding for a bifunctional cellulase from the extreme thermophile "*Caldocellum saccharolyticum*". *Applied and Environmental Microbiology* **56**:3117-3124.
39. **Inácio JM, Correia IL, Sá-Nogueira Id.** 2008. Two distinct arabinofuranosidases contribute to arabino-oligosaccharide degradation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **154**:2719-2729.
40. **Van Laere KM, Beldman G, Voragen AG.** 1997. A new arabinofuranohydrolase from *Bifidobacterium adolescentis* able to remove arabinosyl residues from double-substituted xylose units in arabinoxylan. *Applied Microbiology and Biotechnology* **47**:231-235.

41. **Shin H-D, McClendon S, Vo T, Chen RR.** 2010. *Escherichia coli* Binary Culture Engineered for Direct Fermentation of Hemicellulose to a Biofuel. *Applied and Environmental Microbiology* **76**:8150-8159.
42. **Rhee MS, Wei L, Sawhney N, Rice JD, St. John FJ, Hurlbert JC, Preston JF.** 2014. Engineering the Xylan Utilization System in *Bacillus subtilis* for Production of Acidic Xylooligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology* **80**:917-927.
43. **Rhee MS, Wei L, Sawhney N, Kim YS, Rice JD, Preston JF.** 2016. Metabolic potential of *Bacillus subtilis* 168 for the direct conversion of xylans to fermentation products. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**:1501-1510.
44. **Yim SS, Choi JW, Lee SH, Jeong KJ.** 2016. Modular Optimization of a Hemicellulose-Utilizing Pathway in *Corynebacterium glutamicum* for Consolidated Bioprocessing of Hemicellulosic Biomass. *ACS Synthetic Biology* **5**:334-343.
45. **Yukawa H, Omumasaba CA, Nonaka H, Kós P, Okai N, Suzuki N, Suda M, Tsuge Y, Watanabe J, Ikeda Y, Vertès AA, Inui M.** 2007. Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. *Microbiology* **153**:1042-1058.
46. **Tsuge Y, Hori Y, Kudou M, Ishii J, Hasunuma T, Kondo A.** 2014. Detoxification of furfural in *Corynebacterium glutamicum* under aerobic and anaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**:8675-8683.
47. **Sakai S, Tsuchida Y, Okino S, Ichihashi O, Kawaguchi H, Watanabe T, Inui M, Yukawa H.** 2007. Effect of Lignocellulose-Derived Inhibitors on Growth of and Ethanol Production by Growth-Arrested *Corynebacterium glutamicum* R. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:2349-2353.
48. **Higuchi R, Krummel B, Saiki RK.** 1988. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Research* **16**:7351-7367.
49. **Suzuki N, Okayama S, Nonaka H, Tsuge Y, Inui M, Yukawa H.** 2005. Large-Scale Engineering of the *Corynebacterium glutamicum* Genome. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:3369-3372.

50. **Lesnik EA, Sampath R, Levene HB, Henderson TJ, McNeil JA, Ecker DJ.** 2001. Prediction of rho-independent transcriptional terminators in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* **29**:3583-3594.
51. **Bailey MJ, Biely P, Poutanen K.** 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology* **23**:257-270.
52. **Liab K, Azadi P, Collins R, Tolan J, Kim JS, Eriksson K-EL.** 2000. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme and Microbial Technology* **27**:89-94.
53. **Beg Q, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal G.** 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**:326-338.
54. **Van Laere JKM, Voragen LCH, Kroef T, Van den Broek MLA, Beldman G, Voragen JAG.** 1999. Purification and mode of action of two different arabinoxylan arabinofuranohydrolases from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**:606-613.
55. **Danchin A.** 2009. Cells need safety valves. *BioEssays* **31**:769-773.
56. **Jack DL, Yang NM, H. Saier M.** 2001. The drug/metabolite transporter superfamily. *European Journal of Biochemistry* **268**:3620.
57. **Koita K, Rao CV.** 2012. Identification and Analysis of the Putative Pentose Sugar Efflux Transporters in *Escherichia coli*. *PLoS One* **7**:e43700.
58. **Fritz G, Megerle JA, Westermayer SA, Brick D, Heermann R, Jung K, Rädler JO, Gerland U.** 2014. Single cell kinetics of phenotypic switching in the arabinose utilization system of *E. coli*. *PLoS One* **9**:e89532.
59. **Yamada R, Hasunuma T, Kondo A.** 2013. Endowing non-cellulolytic microorganisms with cellulolytic activity aiming for consolidated bioprocessing. *Biotechnology Advances* **31**:754-763.
60. **den Haan R, van Rensburg E, Rose SH, Görgens JF, van Zyl WH.** 2015. Progress and challenges in the engineering of non-cellulolytic microorganisms for consolidated bioprocessing. *Current Opinion in Biotechnology* **33**:32-38.

61. **Elkins JG, Raman B, Keller M.** 2010. Engineered microbial systems for enhanced conversion of lignocellulosic biomass. *Current Opinion in Biotechnology* **21**:657-662.
62. **Sawhney N, Preston JF.** 2014. GH51 Arabinofuranosidase and Its Role in the Methylglucuronoarabinoxylan Utilization System in *Paenibacillus* sp. Strain JDR-2. *Applied and Environmental Microbiology* **80**:6114-6125.
63. **Déjean G, Blanvillain-Baufumé S, Boulanger A, Darrasse A, de Bernonville TD, Girard A-L, Carrère S, Jamet S, Zischek C, Lautier M, Solé M, Büttner D, Jacques M-A, Lauber E, Arlat M.** 2013. The xylan utilization system of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv *campestris* controls epiphytic life and reveals common features with oligotrophic bacteria and animal gut symbionts. *New Phytologist* **198**:899-915.
64. **Liu Z, Inokuma K, Ho S-H, Haan Rd, Hasunuma T, van Zyl WH, Kondo A.** 2015. Combined cell-surface display- and secretion-based strategies for production of cellulosic ethanol with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels* **8**:1-12.
65. **Kondo A, Shigechi H, Abe M, Uyama K, Matsumoto T, Takahashi S, Ueda M, Tanaka A, Kishimoto M, Fukuda H.** 2002. High-level ethanol production from starch by a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying cell-surface glucoamylase. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**:291-296.
66. **Sanda T, Hasunuma T, Matsuda F, Kondo A.** 2011. Repeated-batch fermentation of lignocellulosic hydrolysate to ethanol using a hybrid *Saccharomyces cerevisiae* strain metabolically engineered for tolerance to acetic and formic acids. *Bioresource Technology* **102**:7917.
67. **Kawaguchi H, Sasaki M, Vertès AA, Inui M, Yukawa H.** 2009. Identification and functional analysis of the gene cluster for L-arabinose utilization in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**:3419-3429.
68. **Watanabe S, Kodaki T, Makino K.** 2005. L-Arabinose 1-dehydrogenase: A novel enzyme involving in bacterial L-arabinose metabolism. *Nucleic Acids Symposium Series* **49**:309-310.

69. **Watanabe S, Kodak T, Makino K.** 2006. Cloning, Expression, and Characterization of Bacterial L-Arabinose 1-Dehydrogenase Involved in an Alternative Pathway of L-Arabinose Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **281**:2612-2623.
70. **Koch M, Delmotte N, Ahrens CH, Omasits U, Schneider K, Danza F, Padhi B, Murset V, Braissant O, Vorholt JA, Hennecke H, Pessi G.** 2014. A Link between Arabinose Utilization and Oxalotrophy in *Bradyrhizobium japonicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **80**:2094-2101.
71. **Akel E, Metz B, Seiboth B, Kubicek CP.** 2009. Molecular Regulation of Arabinan and L-Arabinose Metabolism in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Eukaryotic Cell* **8**:1837-1844.
72. **Schleif R.** 2010. AraC protein, regulation of the L-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action. *FEMS Microbiology Reviews* **34**:779-796.
73. **Lee NL, Gielow WO, Wallace RG.** 1981. Mechanism of *araC* autoregulation and the domains of two overlapping promoters, P_C and P_{BAD}, in the L-arabinose regulatory region of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**:752-756.
74. **Hahn S, Schleif R.** 1983. *In vivo* regulation of the *Escherichia coli* *araC* promoter. *Journal of Bacteriology* **155**:593-600.
75. **Seedorff J, Schleif R.** 2011. Active Role of the Interdomain Linker of AraC. *Journal of Bacteriology* **193**:5737-5746.
76. **Johnson CM, Schleif RF.** 1995. *In vivo* induction kinetics of the arabinose promoters in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **177**:3438-3442.
77. **Lutz R, Lozinski T, Ellinger T, Bujard H.** 2001. Dissecting the functional program of *Escherichia coli* promoters: the combined mode of action of Lac repressor and AraC activator. *Nucleic Acids Research* **29**:3873-3881.
78. **Zhang X, Reeder T, Schleif R.** 1996. Transcription Activation Parameters at *ara pBAD*. *Journal of Molecular Biology* **258**:14-24.
79. **bastien S, Derouaux A, Giannotta F, Dusart J.** 2002. Subdivision of the Helix-Turn-Helix GntR Family of Bacterial Regulators in the FadR,

- HutC, MocR, and YtrA Subfamilies. *Journal of Biological Chemistry* **277**:12507-12515.
80. **Inácio JM, Sá-Nogueira Id.** 2008. Characterization of *abn2* (*yxiA*), encoding a *Bacillus subtilis* GH43 arabinanase, Abn2, and its role in arabino-polysaccharide degradation. *Journal of Bacteriology* **190**:4272-4280.
 81. **Raposo MP, Inácio JM, Mota LJ, Sá-Nogueira Id.** 2004. Transcriptional regulation of genes encoding arabinan-degrading enzymes in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **186**:1287-1296.
 82. **Mota LJ, Tavares P, Sá-Nogueira I.** 1999. Mode of action of AraR, the key regulator of L-arabinose metabolism in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **33**:476-489.
 83. **Mota LJ, Sarmento LM, Sá-Nogueira Id.** 2001. Control of the arabinose regulon in *Bacillus subtilis* by AraR *in vivo*: crucial roles of operators, cooperativity, and DNA looping. *Journal of Bacteriology* **183**:4190-4201.
 84. **Hahn S, Dunn T, Schleif R.** 1984. Upstream repression and CRP stimulation of the *Escherichia coli* L-arabinose operon. *Journal of Molecular Biology* **180**:61-72.
 85. **Inácio JM, Costa C, Sá-Nogueira Id.** 2003. Distinct molecular mechanisms involved in carbon catabolite repression of the arabinose regulon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **149**:2345-2355.
 86. **Inui M, Suda M, Okino S, Nonaka H, Puskas LG, Vertes AA, Yukawa H.** 2007. Transcriptional profiling of *Corynebacterium glutamicum* metabolism during organic acid production under oxygen deprivation conditions. *Microbiology* **153**:2491-504.
 87. **Miller JH.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory.
 88. **Pátec M, Nešvera J.** 2011. Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology* **154**:101-113.
 89. **Camas FM, Alm EJ, Poyatos JF.** 2010. Local gene regulation details a recognition code within the LacI transcriptional factor family. *Computational Biology Public Library of Science Computational Biology* **6**:e1000989.

90. **Weickert MJ, Adhya S.** 1992. A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *Journal of Biological Chemistry* **267**:15869-15874.
91. **Schleif R.** 2003. AraC protein: A love-hate relationship. *BioEssays* **25**:274-282.
92. **Stringer AM, Currenti S, Bonocora RP, Baranowski C, Petrone BL, Palumbo MJ, Reilly AA, Zhang Z, Erill I, Wade JT.** 2013. Genome-Scale Analyses of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* AraC Reveal Noncanonical Targets and an Expanded Core Regulon. *Journal of Bacteriology* **196**:660-671.
93. **Zhang L, Leyn SA, Gu Y, Jiang W, Rodionov DA, Yang C.** 2012. Ribulokinase and transcriptional regulation of arabinose metabolism in *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology* **194**:1055-1064.
94. **Takata G, Poonperm W, Rao D, Souda A, Nishizaki T, Morimoto K, Izumori K.** 2007. Cloning, expression, and transcription analysis of L-arabinose isomerase gene from *Mycobacterium smegmatis* SMDU. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **71**:2876-2885.
95. **Izumori K, Elbein KYAD.** 1976. Pentose metabolism in *Mycobacterium smegmatis*: specificity of induction of pentose isomerases. *Journal of Bacteriology* **128**:587-591.
96. **Oehler S, Eismann ER, Krämer H, Müller-Hill B.** 1990. The three operators of the *lac* operon cooperate in repression. *EMBO Journal* **9**:973-979.
97. **Semsey S, Geanacopoulos M, Lewis DEA, Adhya S.** 2002. Operator-bound GalR dimers close DNA loops by direct interaction: tetramerization and inducer binding. *EMBO Journal* **21**:4349-4356.
98. **Lee DH, Schleif RF.** 1989. *In vivo* DNA loops in *araCBAD*: Size limits and helical repeat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**:476-80.
99. **Rhodes D, Klug A.** 1980. Helical periodicity of DNA determined by enzyme digestion. *Nature* **286**:573.
100. **Tullius TD, Dombroski BA.** 1985. Iron(II) EDTA used to measure the helical twist along any DNA molecule. *Science* **230**:679-681.

101. **Collado-Vides J, Magasanik B, Gralla JD.** 1991. Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. Microbiological Reviews **55**:371-394.
102. **Oehler S, Müller-Hill B.** 2010. High Local Concentration: A Fundamental Strategy of Life. Journal of Molecular Biology **395**:242-253.
103. **Cournac A, Plumbridge J.** 2013. DNA Looping in Prokaryotes: Experimental and Theoretical Approaches. Journal of Bacteriology **195**:1109-1119.
104. **Marushima K, Ohnishi Y, Horinouchi S.** 2009. CebR as a master regulator for cellulose/celooligosaccharide catabolism affects morphological development in *Streptomyces griseus*. Journal of Bacteriology **191**:5930-40.
105. **Katz L, Englesberg E.** 1971. Hyperinducibility as a result of mutation in structural genes and self-catabolite repression in the *ara* operon. Journal of Bacteriology **107**:34-52.
106. **Dominguez H, Coccagn-Bonsquet M, Lindley ND.** 1997. Simultaneous consumption of glucose and fructose from sugar mixtures during batch growth of *Corynebacterium glutamicum*. Applied Microbiology and Biotechnology **47**:600-603.
107. **Stansen C, Uy D, Delaunay S, Eggeling L, Goergen J-L, Wendisch VF.** 2005. Characterization of a *Corynebacterium glutamicum* Lactate Utilization Operon Induced during Temperature-Triggered Glutamate Production. Applied and Environmental Microbiology **71**:5920-5928.
108. **Teramoto H, Inui M, Yukawa H.** 2009. Regulation of Expression of Genes Involved in Quinate and Shikimate Utilization in *Corynebacterium glutamicum*. Applied and Environmental Microbiology **75**:3461-3468.
109. **Wendisch VF, Graaf AAd, Sahm H, Eikmanns BJ.** 2000. Quantitative determination of metabolic fluxes during cointilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. Journal of Bacteriology **182**:3088-3096.