

プロジェクト名：細菌細胞表層上でのセルラーゼ複合体の構築とその改変

プロジェクト代表者：松岡 聡 (理工学研究科・助教)

嫌気性セルロース分解性細菌 *Clostridium cellulovorans* の生産するセルロソームと呼ばれる酵素複合体は、セルロースやヘミセルロースを効率的に分解する。セルロソームは、酵素活性を示さない骨格タンパク質(CbpA)とセルロソーマル酵素群の2種類のコンポーネントからなる。CbpAは、セルロース結合ドメイン(CBD)、Cohesinドメイン、SLH(Surface Layer Homology)ドメインを持つ。セルロソーマル酵素はCbpAのCohesinドメインに結合するためのDockerinドメインを持ち、CbpAと酵素複合体を形成し、セルロースを効率的に分解できる。*C. cellulovorans* では、セルロソームのほかにセルラーゼや他のコンポーネントが協調的に働くことでセルロース分解における高い活性を示す。しかしながら、嫌気性菌である *C. cellulovorans* は培養が難しく、また遺伝子組み換え技術が確立されていないためセルロソームの研究・利用は容易ではない。そこで、大腸菌とともに遺伝子組み換え技術で実績のある枯草菌を用いて、セルロソームの解析・改変を行った。

1. 枯草菌細胞表層局在型骨格タンパク質の構築

CbpAは *C. cellulovorans* 細胞表層に特異的に結合するが、枯草菌の細胞表層には結合しない。CbpAを細胞表層結合型に改変することでセルラーゼの活性・安定性が向上すると考え、枯草菌細胞表層局在型CbpAの構築を試みた。枯草菌において、既に細胞表層に局在が確認されているタンパク質ピックアップし、その細胞表層局在ドメインとの融合CbpAタンパク質の構築を試みたが、細胞毒性を示すためかクローニングできなかった。そこで、NguyenとSchumannによって報告された *Listeria monocytognes* 由来タンパク質を用いた枯草菌細胞表層へのタンパク提示系を用いて細胞表層局在型cbpAを構築した。

2. セルロソーム遺伝子クラスター内に存在する新奇遺伝子の解析

C. cellulovorans のセルロソーム遺伝子クラスターには機能未知遺伝子 *hbpA* が存在する。*hbpA* は、1つのCohesinドメインと1つのSLHドメインから成り、*C. acetobutylicum* や *C. josui* など他のセルロソーム生産菌でも保存されているが機能解析は行われていなかった。HbpAはCbpAと同様に単独では酵素活性を持たないが、我々の研究からHbpAとセルラーゼが同時に存在することでセルラーゼ活性が亢進することが *in vitro* の実験で示されている (Matsuoka et. al., 2007)。本実験では、枯草菌に *hbpA* 遺伝子とエンドグルカナーゼ遺伝子(*engB*)を導入して培養上清に共発現させて、培地中のセルロース分解量をネオキュプロイン法によって定量した。右図に示すようにHbpAとセルラーゼを共発現させると、セルロース分解によって生じる還元糖量は培養開始から36時間後において、セルラーゼ単独と比べて1.4倍に上昇した。セルラーゼと共にHbpAを発現させることでより効率的なセルロース分解が期待される。また、どのような機構でセルラーゼ活性を亢進しているのか興味を持たれる。

