

プロジェクト名：枯草菌タンパク質分泌経路の解明と改変によるセルラーゼの高分泌生産

プロジェクト代表者：氏 名 松岡 聡（理工学研究科・助教）

嫌気性細菌 *Clostridium cellulovorans* ゲノムからクローニングしたセルラーゼ複合体”セルロソーム”遺伝子群を枯草菌に導入することにより、枯草菌での（ミニ）セルロソーム再構成に成功した。次のステップとして、タンパク質（セルラーゼ）の生産・分泌効率を向上させることがバイオマスエネルギーとしてセルロースを利用する上でも非常に重要である。特に枯草菌におけるタンパク質分泌機構は完全に解明されておらず、この機構を解明することで、セルラーゼ生産・分泌をより向上させ、バイオマス利用実用化につながると期待される。また、タンパク質分泌経路・分泌シグナル配列を改変しタンパク質分泌能力を向上させた枯草菌を宿主として利用することでメタゲノムなど環境から見出された新規有用遺伝子の効率的な生産に利用できると期待される。そこで以下の研究を行った。

1. 枯草菌タンパク質分泌経路のひとつである Tat 経路依存の分泌シグナル配列の解析

大腸菌では TatABC がタンパク質分泌に関わっている。分泌シグナルペプチドは twin-arginine モチーフを持ち、分泌タンパク質はフォールディングされたまま分泌される。枯草菌では 2 コピーの Tat 分泌経路遺伝子（TatAdCd と TatAyCy）が存在し、大腸菌由来の Tat シグナル配列が枯草菌で機能することが分かっている。枯草菌においては Tat 経路で分泌されるタンパク質の報告はあるものの全容は解明されていない。そこで枯草菌ゲノムから Tat 経路依存の分泌タンパク質の候補の探索を行った。枯草菌のゲノムは既に解読され全遺伝子のアミノ酸配列を DDBJ から入手した。枯草菌ゲノム配列情報を分泌シグナル配列予想プログラムである SignalP3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) を用いて解析したところ、約 300 の遺伝子が分泌シグナル配列を持つと予想された。さらに分泌シグナル配列部分に注目し、Tat 経路依存分泌シグナル配列に特徴的な twin-arginine モチーフの有無を精査し、54 の遺伝子が候補に挙がった。候補遺伝子のシグナル配列と *C. cellulovorans* 由来のエキシソグルカナーゼ遺伝子を融合し枯草菌に導入したところ、分泌量の増加が確認された。

2. 分泌経路および分泌シグナル配列の改変によるタンパク質の高生産

本プロジェクト代表者はミニセルロソームの分泌に成功した。しかしながら、実際には生産された全タンパク質が分泌されていないことがわかり、タンパク質分泌経路がボトルネックであることが示唆された。そこで、タンパク質分泌経路に関わる因子の増強を試みた。まず、細菌の主要な分泌経路である Sec 経路のコンポーネントのひとつでタンパク質分泌を駆動する SecA をコードする *secA* 遺伝子を枯草菌に追加導入してタンパク質分泌能を解析した。レポーターとして、*C. cellulovorans* 由来のエンドグルカナーゼを利用した。驚いたことに SecA を 2 コピー持つ枯草菌では野生株と比べてタンパク質分泌量が低下していた。分泌量増加のためには他のコンポーネントをコードする遺伝子も必要だと示唆された。本プロジェクト等での成果を下記の著書にまとめた。

Matsuoka, S., and Doi, RH. 2012. Chapter 10-2; *Clostridium cellulovorans* cellulosome and analysis by *Bacillus subtilis* heterologous host system. *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*; the frontiers of molecular microbiology revisited. Research Signpost, India. In printing.