

プロジェクト名：枯草菌を用いた異種細菌由来新規セルロソーム関連遺伝子の解析

代表者：氏名 松岡 聡（理工学研究科・助教）

嫌気性細菌 *Clostridium cellulovorans* はセルロース・ヘミセルロースなどの植物バイオマスを効率的に分解可能なセルラーゼ・ヘミセルラーゼ複合体“セルロソーム”を生産する。セルロソームは酵素活性を持たない骨格タンパク質とセルラーゼ・ヘミセルラーゼ群から成り、両サブユニットはコヘンドックリンドメイン間の特異的な相互作用によって複合体を形成する。現在までに、セルロソームを構成する遺伝子群は 14 種類が同定・クローニングされているが、その全体像は不明のままであった。2010 年田丸らにより *C. cellulovorans* の全ゲノム配列が解読された。解読されたゲノムから新たに 45 種類のセルロソーム関連遺伝子がアノテーションされた。そこで本研究では、枯草菌タンパク質分泌系を用いてこれら新規セルロソーム関連遺伝子の解析を行った。

### 1. *C. cellulovorans* ゲノムから見出された新規セルロソーム関連遺伝子のクローニング

*C. cellulovorans* は絶対嫌気性であり、また遺伝子組み換え技術も確立されておらず、そのままでは解析が難しいため、枯草菌異種遺伝子発現系を用いて解析を行った。今回 glycoside hydrolases Family (GH) 5 に属する clocel\_2600 遺伝子と既存の遺伝子との相同性が見られない cellulosome enzyme (CE) 遺伝子のクローニングを行った。クローニングベクターには pWB1000 を用いた。pWB1000 は大腸菌-枯草菌シャトルプラスミドであり、MCS 上流には枯草菌の SacB シグナル配列を有し、クローニングした遺伝子産物を菌体外へ分泌可能である。*C. cellulovorans* 染色体 DNA を鋳型として、両遺伝子に特異的なプライマーセットを用いて高校正機能付き DNA ポリメラーゼによる遺伝子増幅を行った。プライマーにはクローニングに必要な制限酵素認識配列と遺伝子の C 末端に His タグ配列が付加するように設計した。制限酵素処理をしたプラスミドと遺伝子断片をライゲーションし、大腸菌に導入することでクローニングした。クローニングの可否は PCR と DNA シークエンシングによって確認した。

### 2. 枯草菌への遺伝子導入と発現

標的遺伝子がクローニングされたプラスミドを枯草菌 WB801 株に導入し、遺伝子発現を行った。枯草菌 WB801 は菌体外プロテアーゼを全て欠損しているため、タンパク質の分泌発現に適した宿主である。対数増殖期後期まで培養した菌液を培養上清と菌体に分け、SDS-PAGE でタンパク質を分離後、抗 His タグ抗体を用いて目的タンパク質の発現を解析した。図 1 に示すように、clocel\_2600 は発現が全く見られなかつた。

*C. cellulovorans* ゲノムは GC 含量が枯草菌と比べてかなり低く、コドン使用頻度が異なるためうまく発現しなかったと考えられる。一方、CE は菌体では十分発現していたが（図 1 矢印）、菌体外には分泌されなかった。今回使用した SacB シグナル配列が適していなかったと考えられる。今後はコドンの最適化・適切なシグナル配列について検討したい。

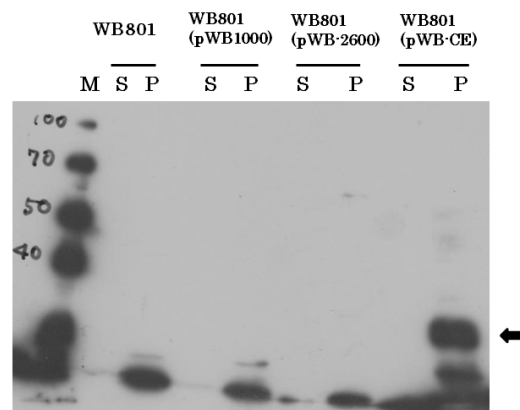


図1 対数増殖期後期まで培養した菌体を培養上清(S)とペレット(P)に分け、SDS-PAGEでタンパク質を分離後、Western blotting法によって目的タンパク質を解析した。M: 分子量マーカー(KDa)