

海藻細胞壁多糖を標的としたセルロソームの構築とその応用

田丸 浩

(三重大大学生物資源学部 水圏生物利用学教育研究分野)

【研究目的】

海洋バイオマスは、構造成分や貯蔵成分といった多種多様な多糖から成っている。この海洋バイオマスの生物学的分解は微生物から真核生物の広範囲の生物によって生産される多糖分解酵素を通して行なわれる。このように、生物による分解は環境中にある成分の自然な、あるいは、工業的な循環にとって重要である。さらには、生物学的分解は二酸化炭素の循環においても主要な役割を果たす。陸上植物の細胞壁構成成分は、セルロース、ヘミセルロースおよびリグニンから構成されているが、一方、海藻、特に紅藻における細胞壁の構成成分は -1,4-マンナン、 -1,3-キシランおよび寒天のような全くユニークな糖の重合体から成っている。特に、ポルフィラ属は日本において食用として親しまれておる重要な紅藻である。

一般に、植物バイオマスにおける多糖成分を循環させる主要な役割を演じる糖質分解酵素は、いくつかの酵素が相乗的に働く方法か、セルロソームと呼ばれる酵素複合体を形成する方法かのいずれかである。本研究では、海藻、特に紅藻ポルフィラ属の細胞壁を標的としたセルロソームの構築を試みた。

【方法】

紅藻細胞壁を分解するためのセルロソームを構築するために、嫌気性細菌 *Clostridium cellulovorans* 株由来の *mini-cbpA* 遺伝子および *engE* 遺伝子、*Vibrio* sp. PO-303 株由来のアガラーゼ (*AgaB* 遺伝子)、*Vibrio* sp. MA-138 株由来のマンナーゼ (*ManA* 遺伝子) および *Alcaligenes* sp. XY-234 株由来のキシラーゼ (*TxyA* 遺伝子) を使用した。Mini-CbpA に本来あるセルロース結合ドメイン (CBD) の代わりに、*Alcaligenes* sp. XY-234 株由来のキシラーゼが保有する糖質結合ドメイン (CBM) に換えた。*C. cellulovorans* 株由来の *EngE* のドックリンドメインを PCR 増幅して、pET-AgaB、pET-ManA、および pET-TxyA のそれぞれのタンパク質発現プラスミドを構築した (Fig. 1)。それぞれの遺伝子とドックリンドメインを含む増幅断片は pET22b ベクターの制限酵素 *NcoI* と *XhoI* サイトに挿入した。4 種類の組換えタンパク質は発現ベクターを保有する大腸菌 BL21 株から精製した。3 種類の海洋細菌由来の酵素がプロトプラスト形成能を有するかを判定するために、紅藻 *Porphyra yezoensis* を使用した。

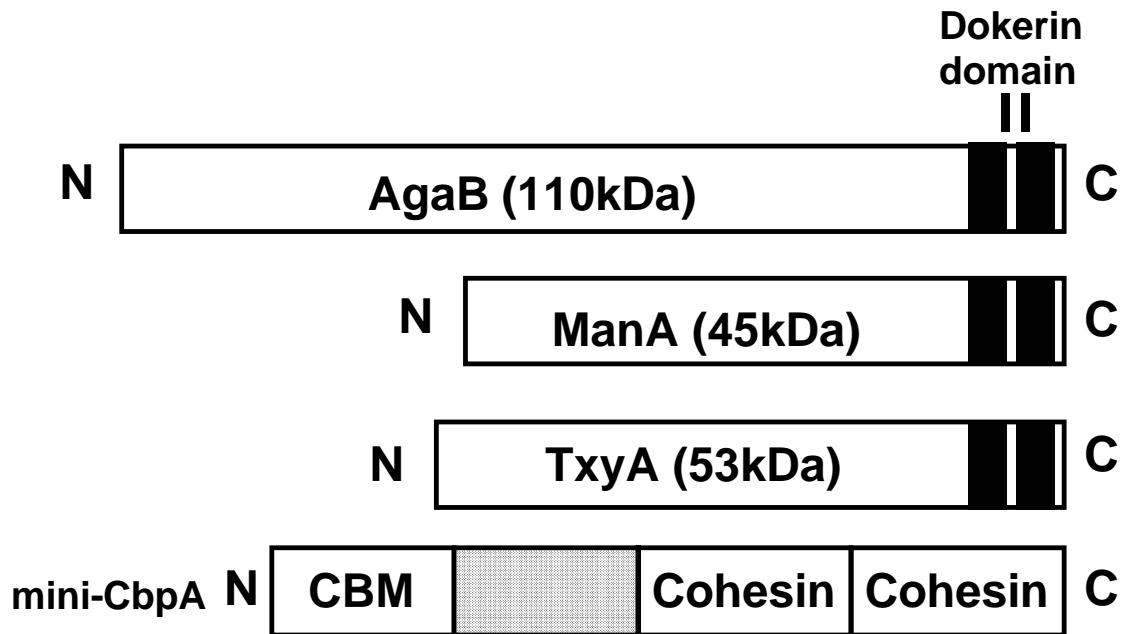


Fig. 1. Construction of expression plasmids for cellulosome.

【結果】

pET 発現プラスミドを保有する大腸菌 BL21 株を 300ml の LB 培地に 37 °C で吸光度 600 nm において濁度が 0.9 になるまで培養した。その後、終濃度 1 mM になるように IPTG を加え、さらに 30 °C で 3 時間培養した。遠心分離して菌体を回収後、ペリプラスム画分タンパク質を浸透圧ショック法により、50 ml 緩衝液 (20 mM Tris-HCl [pH8.0], 10 mM EDTA) で溶出させた。50 ml の上清をニッケル - アガロースカラムに添加した。それぞれのタンパク質を 200 mM イミダゾールを含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 7.0) で溶出させ、それぞれのタンパク質画分を得た。精製後、SDS-PAGE で確認したところ、最終調製画分は単一バンドを示した。これらの精製酵素を使って、mini-CbpA と 3 種類の酵素との相互作用を試験した。その結果、native PAGE において相互作用するバンドが検出されなかった。本結果から、酵素に付加したドックリンドメインが大腸菌内のプロテアーゼによって欠失したかもしれないと考えられた。次に、3 種類の組換え酵素が *Porphyra yezoensis* からのプロトプラスト作出に有効であることを確認するために、プロトプラスト作製試験を行なった。その結果、3 種類の酵素 1 ユニットと 0.5 M マンニトールを含む 20 mM MES 緩衝液 (pH 7.5) 、22 °C 、60 分間穏やかに振とうしたとき、およそ 4.0×10^4 個のプロトプラストが作出された。

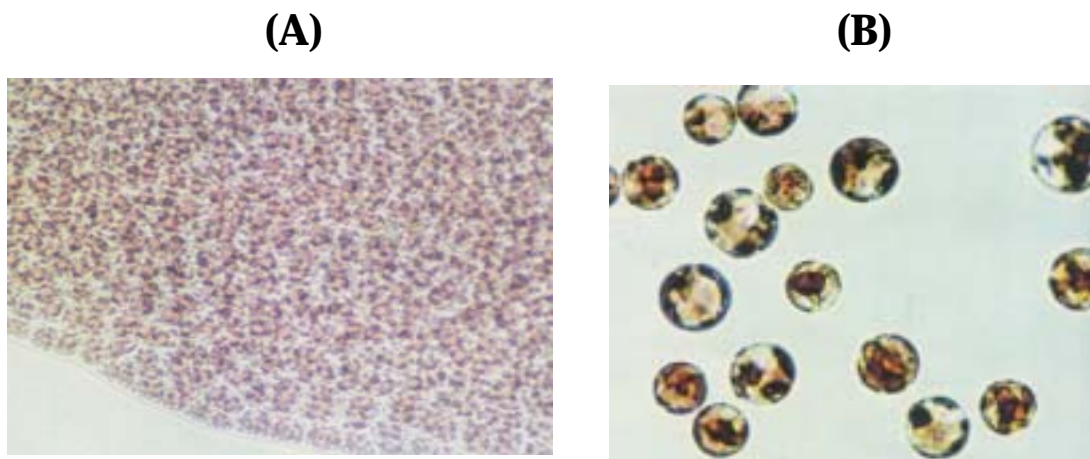


Fig. 2. Protoplast formation from *Porphyra yezoensis* using the recombinant enzymes from marine bacteria.

【結論】

海洋細菌由来の3種類の酵素を用いて、*Porphyra yezoensis* からのプロトプラストの作出に成功した。しかしながら、mini-CbpA および3種類の酵素との間のセルロソームにおける複合体は形成されなかった。この問題は恐らく大腸菌によるプロテオリシスが原因であるので、それ故、プロテアーゼを欠損した宿主株として選択する必要があると思われる。

Reference

- 1) Kosugi, A., Murashima, K., Tamaru, Y., and Doi, R. H. (2002) Cell-surface-anchoring role of N-terminal surface layer homology domains of *Clostridium cellulovorans* EngE. J. Bacteriol., **184**: 884-888