

氏 名	とよ だ あつし 豊 田 淳
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2498 号
学位授与の日付	平 成 15 年 11 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Studies on the Adhesion of the Major Rumen Cellulolytic Bacterium, <i>Eubacterium cellulosolvens</i> 5, to Cellulose (ルーメン内主要セルロース分解菌, <i>Eubacterium cellulosolvens</i> 5, のセルロースへの付着に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 矢 野 秀 雄 教 授 今 井 裕 教 授 廣 岡 博 之

論 文 内 容 の 要 旨

ルーメン内セルロース分解菌がセルロースを消化するためには、セルロースへの付着が必須であることが知られている。しかし、ルーメン内主要セルロース分解菌 *Eubacterium cellulosolvens* の付着機構についてはほとんど研究されていない。そこで本論文は、*E. cellulosolvens* 5のセルロースへの付着機構を分子生物学的に解析した成績をまとめたものである。本論文は9章により構成されている。

第1章では、本研究の背景と目的を述べている。

第2章では、本研究に関連する従来の研究を概説している。

第3章では、*E. cellulosolvens* 5のセルロース付着機構を解明するために、本菌が発現し、セルロースに付着能を有するタンパク質を探索した。その結果、本菌の培養上清および菌体より、多数のセルロース結合性タンパク質 (CBPs) を見出している。CBPsはセルロースから5%SDSで溶出されたが、セロビオースやカルボキシメチルセルロース (CMC) などの溶出液では溶出されないことを示すとともに、CBPsの主要構成分子である160kDaセルロース結合性タンパク質 (CBPA) が、カルボキシメチルセルラーゼ活性を有していることを明らかにしている。

第4章では、*E. cellulosolvens* 5からCBPAの精製および抗CBPA抗体の作製を行っている。抗CBPA抗体はウエスタンブロット法により、*E. cellulosolvens* 5由来の複数のCBPsを認識することを示している。また、代表的な17菌種のルーメン細菌が抗CBPA抗体に認識されるタンパク質を発現しているか調べ、*E. cellulosolvens* 5以外にこれに該当するルーメン細菌は存在しないことを明らかにしている。

第5章では、*E. cellulosolvens* 5培養液の上清および菌体画分におけるCBPAの分布を調べている。セロビオースを炭素源として培養すると、培養初期には発現したCBPAは主に菌体に分布することを示している。一方、培養後期においてはCBPAが主に培養上清に分布することを見出している。CMCを炭素源として培養すると、CBPAは培養時間に関係なく菌体および培養上清の両方に分布していることを示している。これらの結果から、炭素源を変化させるとCBPAの分布が変化することを明らかにしている。

第6章では、*E. cellulosolvens* 5のCBPAをエンコードしている遺伝子のクローニング、シーケンシングおよび大腸菌での発現を行っている。セルロースに結合するタンパク質を発現するクローンの取得に成功し、クローンのインサート部分の全塩基配列を明らかにしている。このクローンはCBPA遺伝子の上流が欠損していることを見出し、標的遺伝子歩行 (targeted gene walking) PCRによって上流部をクローニングし、その塩基配列を決定している。その結果、N末端側にファミリー9のグリコシルヒドロラーゼ (GHF9) と相同性のあるドメインが存在したが、他のドメインは既知のタンパク質と有意な相同性が無いことを明らかにしている。大腸菌で発現させた組換えCBPAは、セルロースへ結合することを確認し、抗CBPA抗体でも認識されることを明らかにした。

第7章では、*E. cellulosolvens* 5のCBPAのドメイン構造解析を行っている。CBPA分子をエンコードする遺伝子を用

いて各種ドメインを欠失しているクローンを作成し、大腸菌で発現させている。アミノ酸配列から推定されるようにCBPAのN末端側にセルラーゼ触媒ドメインが存在することを明らかにしている。また、セルラーゼ触媒ドメインのC末端側に未知ドメインがつながっているが、これはセルロース結合ドメインであることを証明している。さらに、セルロース結合性ドメインのC末端側にも未知ドメインを持つが、このドメインは本菌の細胞壁に結合することから菌体細胞壁結合ドメインであることを明らかにしている。

第8章では、*E. cellulosolvens* 5のセルロースへの付着におけるCBPAの役割を検討している。対数増殖期の菌体は、CBPAを保有しており、セルロースに付着することを示している。一方、培養後期以降の菌体はCBPAを培養上清に放出し、ほとんど保有していないことを明らかにし、この菌体はセルロースに付着しないことも見出している。これらの結果から、菌体でのCBPAの存在がセルロース付着能を決定していることを示唆している。セルロース付着能を失った培養後期の菌体懸濁液に組換えCBPAを添加したところ、付着能を取り戻すこと、ならびに付着能を持つ対数増殖期の菌体を抗CBPA抗体で処理することによりセルロース付着能を失うことも明らかにしている。

第9章では、本研究によって得られた成果を要約している。

論文審査の結果の要旨

反芻家畜は、ルーメン内でセルロースを分解し、エネルギー源とすることができる。セルロース分解には菌体がセルロースに付着することが必須であり、その機構解明の研究は重要である。本論文は、ルーメン内セルロース分解菌 *Eubacterium cellulosolvens* 5のセルロース付着機構について検討したものであり、評価される点は以下のとおりである。

1. 結晶性セルロースへの親和性を利用した精製法を用いて、*E. cellulosolvens* 5のセルロース結合性タンパク質を見出している。また同時にSDS-PAGEのゲル内で直接セルラーゼ活性を検出し、着目すべきタンパク質を効率的に選択している。

2. カルボキシメチルセルラーゼ活性を有するセルロース結合性タンパク質（CBPA）をSDS-PAGEゲルから直接単離し、簡便な方法で精製CBPAを得ている。また抗CBPA抗体を用いたウエスタンブロット法により、CBPAが*E. cellulosolvens* 5に特異的なタンパク質であり、他の主要なルーメン細菌に存在していないことを見出している。

3. CBPA遺伝子については、抗CBPA抗体を用いてクローニングに成功している。また標的遺伝子歩行（targeted gene walking）PCRによってCBPA遺伝子の全塩基配列を明らかにしている。その結果、CBPAはファミリー9グリコシルヒドロラーゼに属し、未知のドメインを持つ新規タンパク質であることを証明している。

4. CBPAのドメイン構造の解析において、2つの新規なドメインを見出している。1つはセルロース結合ドメインであり、CBPA分子がセルロースに結合するために必須のドメインである。もう1つは菌体細胞壁結合ドメインであり、CBPAが本菌の細胞壁に局在するのに必須のドメインである。

5. CBPAが*E. cellulosolvens* 5のセルロース付着因子であることを細胞レベルで証明し、セルロースへの付着と分解を同時に担うタンパク質であることを明らかにしている。

以上のように、本論文は反芻家畜のルーメン内セルロース分解菌のセルロース付着機構をCBPAタンパク質の解析を通して明らかにしたものである。セルロース分解菌の付着促進を通して、ルーメン内繊維消化率の向上の可能性を示したもので、動物栄養学、飼料学ならびに畜産業に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値のあるものと認める。

なお、平成15年9月18日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。