

平成21年 5月31日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18688015

研究課題名（和文） ルーメン内セルロース結合性タンパク質の網羅的解析

研究課題名（英文） Identification of the cellulose-binding proteins from rumen contents

研究代表者

豊田 淳 (TOYODA ATSUSHI)

茨城大学・農学部・講師

研究者番号：00292483

研究成果の概要：ルーメン内セルロース分解を効率化するためには、その分子メカニズムについて詳細に理解する必要がある。本研究ではルーメン内でセルロース分解に関与するタンパク質(CBP)を網羅的に同定することを目的とした。ルーメン内 CBPs として *Fibrobacter succinogenes* の Endoglucanase F、TPR domain protein、OmpA family protein、Fibro-slim domain protein、*Piromyces equi* の Cel6A が同定された。ルーメン内セルロース付着菌のメタゲノム解析を行った。ルーメンからセルロースに付着する菌を採取し、ゲノムDNAを抽出後、次世代シーケンサーによる解析を行った。*F. succinogenes* などの繊維分解菌由来の DNA と相同性の高い DNA が多数検出された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2007年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
総計	22,800,000	6,840,000	29,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産学・草地学

キーワード：ルーメン、セルロース、セルラーゼ、セルロース結合性タンパク質、プロテーム、モノクロナール抗体、メタゲノム

1. 研究開始当初の背景

世界的な人口増加や気候変動で、食糧不足が深刻化している。実際にアフリカなどでは飢餓状態に陥っている地域も存在する。そこで食糧資源の有効利用が必須の課題となっている。セルロースは地球最大のバイオマスであり、貴重なエネルギー源としてその有効利用が重要視されている。ヒトはセルロースを消化出来ず、エネルギー源にはできないが、反芻家畜は反芻胃（ルーメン）内微生物の作用でセルロースを分解し、エネルギー源に出

来る。故に、セルロースはヒトの食糧と競合しない貴重な多糖類である。本研究では反芻家畜のセルロース消化能力を増強させ、粗飼料給与による家畜生産性を向上させることを最終目標としている。そのためにはルーメン内セルロース分解の分子機構の詳細を解明することが重要である。

2. 研究の目的

私共はルーメン内セルロース分解の分子機構の詳細を解明することを目的とした。そ

ここで、その最初のステップとして、ルーメン内セルロース分解に関わるタンパク質の網羅的取得を目指した。具体的には、ルーメン内で実際に機能しているセルロース分解酵素を網羅的に分離して、同定することが目的である。セルロース分解酵素はセルロースへの結合能を有する場合が多いことから、まずセルロース結合性タンパク質(CBP)をルーメン内容物から分離する。下記の項目を実施した。

(1) ヒツジのルーメン内CBPsの網羅的分離および電気泳動による可視化

(2) 質量分析計を用いたCBPsの同定

(3) CBPsのモノクローナル抗体の作成

さらに下記の通り、CBPs遺伝子の塩基配列情報を取得、解析するために、最近低価格で利用が可能となった次世代シーケンサーで、ルーメン内セルロース付着菌のメタゲノム解析を行った。

(4) CBPs 遺伝子の取得と解析

3. 研究の方法

(1) ヒツジのルーメン内CBPsの網羅的分離および電気泳動による可視化

ヒツジ(セントクロイ種、メス、体重50kg、ルーメンフィステル付き)から、朝の給餌前(8:00AM)にルーメン内容物をサンプリングした。サンプリングしたルーメン内容物は、滅菌済み容器に密閉後、38°Cに保温した状態で実験室に運搬し、CBPsの分離を試みた。ルーメン内容物をワーリングブレンダーで物理的破碎し、界面活性剤(Triton X-100)を最終濃度2%で加え、タンパク質を可溶化させた。10万×g、1時間の遠心処理により植物繊維、プロトゾア、細菌などの固形成分を沈殿させ、上清(可溶性タンパク質画分)を回収した。この画分を結晶性セルロース(アビセルセルロース、旭化成)と混合し、セルロースに吸着性のあるタンパク質を分離、回収した。このタンパク質の吸着したアビセルセルロースは緩衝液で非特異結合タンパク質を除去後に、得られたセルロース吸着性タンパク質をセルロース結合性タンパク質(CBP)とした。

(2) 質量分析計を用いたCBPsの同定

CBPsをアビセルセルロースから尿素を含む緩衝液で溶出し、SDS-PAGEに供した。泳動後のゲルからタンパク質バンドを検出した。このゲルを30分割して、それぞれのゲルピースに含まれるタンパク質を、液体クロマトグラフィータンデムマス質量分析計(LC-MS/MS)にかけて、タンパク質同定を試みた。

(3) CBPsのモノクローナル抗体の作成

CBPsをBalb/cマウス(オス)の背部皮下に数回免疫し、抗体価上昇を確認後、脾臓を取り出した。脾臓細胞をマイエローマと融合し、

ハイブリドーマを作成し、このハイブリドーマを96穴培養ディッシュで培養した。CBPsに対する抗体を培養上清に産生しているハイブリドーマクローンをELISAにより選択し、各種CBPsに対するモノクローナル抗体のライブラリーを作成した。

(4) CBPs遺伝子の取得と解析

CBPs 遺伝子の取得をするため、ルーメン内でアビセルセルロースに付着する菌の分離を試みた。ヒツジのルーメンにアビセルセルロースを24時間留置し、回収した。アビセルセルロースを緩衝液で洗浄し、非特異的な付着菌を除去した。得られたアビセルセルロース付着菌からゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAを物理的に破碎して断片化し、300~800bpの断片を得た。磁気ビーズを利用した一本鎖DNA回収法でsstDNAを回収した。sstDNAにCapture beadをアニールさせ、エマルジョンPCRを行った。Genome Sequence FLX(ロッシュ・ダイアグノスティクス社)でシーケンスを行った。得られたシーケンスをBLASTnのNCBIIntによって相同検索し、相同性の高いDNA断片をリストアップした。

4. 研究成果

(1) ヒツジのルーメン内CBPsの網羅的分離および電気泳動による可視化

ルーメンから分離されたCBPsをSDS-PAGEした結果、CBPsは様々な分子量の多数のタンパク質で構成されることが明らかとなった(Fig.1)。CMCを基質に用いたZymogram法によってCBPsにはエンドグルカナーゼ活性を持つものが存在することも明らかになった。このエンドグルカナーゼ活性は、95°Cで失活した。以上により、このCBPsにはルーメン由来のセルラーゼが濃縮されていることが予想された。そこでルーメンからCBPsを大量に分離し、質量分析による同定を試みた。

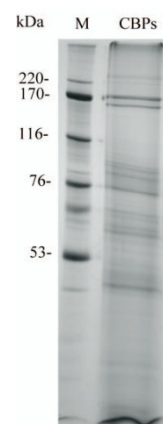


Fig.1. CBPs の SDS-PAGE

(2) 質量分析計を用いたCBPsの同定

CBPs を分離した SDS-PAGE ゲルを分子量によって 30 分割して、酵素処理後、得られたペプチドを LC-ESI-MS/MS によって質量分析した。その結果、5 種のタンパク質が同定された (Fig.2)。すなわち、*Fibrobacter succinogenes* の Endoglucanase F、TPR domain protein、OmpA family protein、Fibro-slime domain protein、*Piromyces equi* の Cel6A である。EGF はセルロース結合能、セルラーゼ活性を持つタンパク質であり、Glycosyl Hydrolase Family51 に属する。また CBM30 と CBM11 の 2 つのセルロース結合ドメインも存在する。抗 EGF 抗体を用いてウエスタンブロットしたところ、ルーメン内 CBPs 中に EGF が存在することを確認した。免疫組織化学的手法では EGF はルーメン内の飼料片に付着する細菌に発現していることが明らかとなった。*Piromyces equi* の Cel6A は CBM10 を持つセルラーゼである。他のタンパク質についてはセルロースに結合することは知られているが、機能がよく分かっていない。

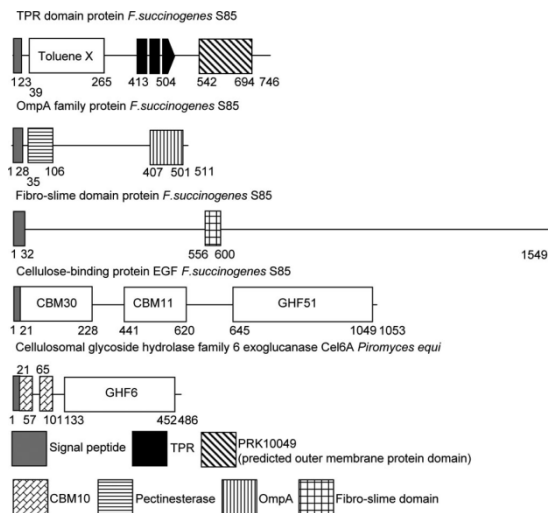


Fig.2.同定された CBPs のドメイン構造

(3) CBPsのモノクローナル抗体の作成

抗CBPs抗体を産生する110種類のハイブリドーマを得た。ルーメン内容物を用いた免疫組織化学的手法で評価した。その結果、44株の抗体が免疫組織化学的手法で使用でき、これらのモノクローナル抗体のなかには、ルーメン内飼料片付着菌を認識するものが多数含まれていた (Fig.3)。

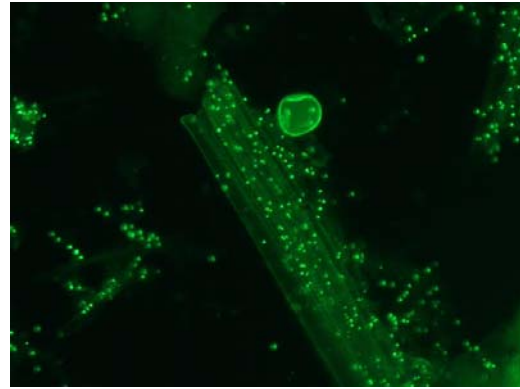


Fig.3.免疫組織化学的スクリーニングによるモノクローナル抗体の選択

このモノクローナル抗体を用いて、免疫沈降法によりルーメン液からカルボキシメチルセルラーゼの分離を試みたが、活性のある免疫沈降物は得られなかった。

(4) CBPs遺伝子の取得と解析

CBPs 遺伝子の取得と解析をするために、ルーメン内でアビセルセルロースに付着する菌を分離した。この微生物群から直接ゲノム DNA を抽出し、ロッジの次世代シーケンサー FLX454 により塩基配列の解析を行った。解析総リード数は 28,729、解析総塩基数は 10,894,412bp であった。GC 含量は 45.83% だった。得られた塩基配列を BLAST した結果、140,406 個の配列と相同性があった。

代表的ルーメン内セルロース分解菌である *Fibrobacter succinogenes* の配列が 190 件ヒットし、以下、*Ruminococcus albus* は 8 件、*Ruminococcus flavefaciens* 11 件、*Butyrivibrio fibrisolvens* 2 件ヒットした。なお、*Eubacterium cellulosolvens* の DNA はヒットしなかった。さらに、ルーメン内細菌および古細菌の DNA にヒットした件数は、*Enterococcus faecium* 25 件、*Streptococcus bovis* 1 件、*Bacillus licheniformis* 126 件、*Bifidobacterium adolescentis* 89 件、*Bifidobacterium boum* 1 件、*Bifidobacterium longum* 210 件、*Bifidobacterium merycicum* 1 件、*Bifidobacterium pseudolongum* 1 件、*Bifidobacterium thermophilum* 1 件、*Megasphaera elsdenii* 2 件、*Veillonella parvula* 6 件、*Prevotella bryantii* 10 件、*Prevotella ruminicola* 40 件、*Ruminobacter amylophilus* 2 件、*Selenomonas ruminantium* 14 件、*Wolinella succinogenes* 31 件、*Methanobacterium formicicum* 1 件、*Methanosarcina barkeri* 20 件であった。

真菌では、*Neocallimastix* 属は 2 件、*Piromyces* 9 件、*Orpinomyces* 13 件、*Caecomyces* および *Anaeromyces* では 0 件だった。またプロトゾアでは、*Eudiplodinium maggii*、*Polyplastron multivesiculatum*、*Diplodinium dentatum*、*Epidinium caudatum*、*Ophryoscolex*

purkynjei, *Isotricha intestinalis* はそれぞれ 0 件、*Dasytricha ruminantium* 8 件ヒットした。さらに、ルーメン細菌以外の代表的セルロース分解菌である *Clostridium thermocellum* の配列には 132 件、*Clostridium cellulolyticum* には 130 件ヒットした。

以上により、アビセルセルロースに付着する菌の DNA は繊維分解菌由来のものが多くと考えられた。そこで糖質分解酵素関連遺伝子と相同性のあった配列を検索すると、Cellulase が 72 件、Xylanase が 54 件、Amylase が 23 件それぞれヒットした。*Fibrobacter succinogenes* について、本菌由来のセルラーゼおよび CBPs に関連する遺伝子として検出されたのは、CelD、CelE、CelF、CelG、CelJ、Cel15K、Cel19D、FSU0809 glycoside hydrolase family 9 gene、FSU2914 cellulase、FSU2303 glycoside hydrolase family 8 gene、FSU2361 endoglucanase 1、Endoglucanase 3、XynC、XynD、Xyn10L、Acetyl xylanesterase (Axe6A)、Cellodextrinase (CedA)、FSU0257 chloride-stimulated cellobiosidase、FSU0794 cellulose-binding protein、FSU1231 cellulose-binding protein、FSU2007 cellulose-binding protein、FSU2078 OmpA family protein、FSU2397 TPR domain protein、FSU2398 TPR domain protein、FSU2502 fibro-slime domain protein であった。また *Ruminococcus albus* の CbpC であった。

以上の研究により、プロテームおよびゲノム解析を駆使して、ルーメンで直接セルロース分解に関係しているタンパク質、遺伝子の情報を獲得することができた。今後は未同定のタンパク質および遺伝子の機能を解明して、発現する微生物を同定することが必須である。そのためには、本研究で得た、CBPs 由来ペプチドの網羅的な質量情報、抗 CBPs モノクロナール抗体ライブラリー、メタゲノムのシーケンス情報が強力なリサーチツールになるであろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① K. Fujiwara, M. Yamazaki, H. Abe, K. Nakashima, Y. Yakabe, M. Otsuka, Y. Ohbayashi, Y. Kato, K. Namai, A. Toyoda, Y. Miyaguchi, Y. Nakamura “Effect of *Bacillus subtilis* var. *natto* fermented soybean on growth performance, microbial activity in the caeca and cytokine gene expression of domestic

meat type chickens” The Journal of Poultry Science, 46(2), 116-122, 2009、査読有

- ② A. Toyoda, W. Iio, M. Mitsumori, H. Minato “Isolation and identification of cellulose-binding proteins from sheep rumen contents” Appl. Environ. Microbiol. 75(6), 1667-73. 2009、査読有
- ③ K. Fujiwara, Y. Miyaguchi, X. H. Feng, A. Toyoda, Y. Nakamura, M. Yamazaki, K. Nakashima, H. Abe “Effect of fermented soybean, “Natto” on the production and qualities of chicken meat” Asia-Aust. J. Anim. Sci. 21(12), 1766-1772, 2008、査読有
- ④ K. Fujiwara, Y. Miyaguchi, A. Toyoda, Y. Nakamura, M. Yamazaki, K. Nakashima, and H. Abe “Effect of fermented soybean “Natto” supplement on egg production and qualities” Asia-Aust. J. Anim. Sci. 21(11), 1610-1615, 2008、査読有
- ⑤ M. Yoshimatsu, A. Toyoda, N. Onizawa, Y. Nakamura, and H. Minato “Biochemical characterization of cellulose-binding proteins (CBPA and CBPB) from the rumen cellulolytic bacterium *Eubacterium cellulosolvens* 5.” Biosci. Biotechnol. Biochem., 71(10), 2577-2580, 2007、査読有
- ⑥ J. Ogura, A. Toyoda, T. Kurosawa, A. L. Chong, S. Chohnan, and T. Masaki “Purification, characterization, and Gene analysis of cellulase (Cel8A) from *Lysobacter* sp. IB-9374” Biosci. Biotechnol. Biochem., 70(10), 2420-2428, 2006、査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 豊田淳、飯尾恒、湊 一 「反芻動物のルーメン内容物に含まれるセルロース結合タンパク質に対する抗体ライブラリーの作製」(日本畜産学会、第 110 回大会、藤沢、2009)
- ② 豊田淳、飯尾恒、湊 一 「反芻動物のルーメン内容物に含まれるセルロース結合タンパク質に対する抗体ライブラリーの作製」(第 81 回日本生化学会、第 31 回日本分子生物学会合同大会、神戸、2008)
- ③ 豊田淳、飯尾恒、湊 一 「反芻動物のルーメン内容物に含まれるセルロース結合タンパク質の分離と同定」(日本畜産学会、第 109 回大会、茨城、2008)
- ④ 豊田淳、飯尾恒、湊 一 「反芻動物のルーメン内容物に含まれるセルロース結合性タンパク質の分離と同定」(第 30 回

- 日本分子生物学会、第 80 回日本生化学会大会、横浜、2007 年 12 月)
- ⑤ 矢野由梨、吉松美帆、豊田淳「ルーメン内セルロース分解菌 *Eubacterium cellulosolvans* 5 のセルラーゼ Cel9D の遺伝子解析」(日本畜産学会、第 108 回大会、岡山、2007)
 - ⑥ Miho Yoshimatsu, Atsushi Toyoda, Yutaka Nakamura, Hajime Minato “Biochemical characterization of cellulose-binding proteins (CBPA and CBPB) from the rumen cellulolytic bacterium *Eubacterium cellulosolvans* 5.” (The 6th Joint Symposium of Japan-Korea-China on Rumen Metabolism and Physiology - Improvement of rumen function for efficient animal production, Sekkoh, China, 2007)
 - ⑦ 吉松美帆、鬼澤直樹、豊田淳「ルーメン内繊維分解細菌 *Eubacterium cellulosolvans* 5 のセルロース結合性タンパク質 CBPA および CBPB の性状比較」(日本畜産学会第 107 回大会、神奈川、2007 年)
 - ⑧ Atsushi Toyoda and Hajime Minato “The cellulose-binding proteins in rumen cellulolytic bacterium *Eubacterium cellulosolvans* 5” (XIIth AAAP Animal Science Congress 2006 Busan, Korea, 2006)
 - ⑨ 吉松美帆、鬼澤直樹、豊田淳「ルーメン内繊維分解細菌 *Eubacterium cellulosolvans* 5 セルロース結合性タンパク質 CBPB の性状解析」(日本畜産学会第 106 回大会、福岡、2006 年)
 - ⑩ 鬼澤直樹、吉松美帆、豊田淳「*Eubacterium cellulosolvans* 5 のセルロース結合性タンパク質 A のモジュール構造が酵素活性に及ぼす影響」(日本畜産学会第 106 回大会、福岡、2006 年)
 - ⑪ 小倉治朗、鐘 愛玲、豊田 淳、長南 茂、正木武治「*Lysobacter* sp. IB-9374 由来 endoglucanase (Cel18A) 遺伝子のクローニング」(2006 年度日本農芸化学会、京都、2006 年)

[その他]

ホームページ等

<http://doubutu.agr.ibaraki.ac.jp/siryou/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 淳 (TOYODA ATSUSHI)

茨城大学・農学部・講師

研究者番号：00292483

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし