

サブテーマ名：3 環境浄化能等のある微生物・植物の分子育種

小テーマ名：3-2-b 土壌細菌の遺伝子発現解析と有用土壌細菌のデザイン

フェーズ I のみ

[概要]

枯草菌グルコマンナン分解利用オペロンの解析が完了し、分泌性マンナーゼ酵素の有効利用に目処がついた。

(1) 環境に放出される生物由来の有機物はタンパク質、多糖、脂質、核酸などを含んでいる。従って環境浄化にはこれらの分解が重要であり、分泌性分解酵素の遺伝子の発現が高まることが重要である。枯草菌はゲノム解析が進んでいて分泌酵素の研究も進んでいる。これらのうちでタンパク質、多糖、脂質、核酸を分解する分泌性分解酵素遺伝子の転写誘導物質の探索を、食品食材と2成分制御シグナル伝達系を用いて検索した。タンパク質分解酵素遺伝子を含む8オペロン、多糖分解酵素遺伝子を含む18オペロン、脂質分解酵素遺伝子を含む3オペロン、核酸分解酵素遺伝子を含む9オペロンのプロモーターをプラスミド pMUTIN ヘクローニングし、lacZ 遺伝子に転写融合する。さらにこの組換えプラスミドを枯草菌染色体へ挿入した株を作成する。

これらの枯草菌株は分泌性タンパク質遺伝子が外来の食材（生ゴミ基質）によって転写発現が誘導される場合、X-gal 寒天平板培地上で青色を呈する。あらゆる種類の食材（野菜、果物、肉、魚、飲料、香辛料など）400種を用意する。X-gal を含む栄養寒天培地に指示菌を塗布し、食材サンプルを置き一晚培養する。誘導物質がある場合はサンプルの周辺が青く染まる。

バクテリア遺伝子の発現は時として外部からのシグナルを伝達して（2成分制御系によるリン酸リレー）亢進する。ゲノム解析で判明した枯草菌の36の2成分制御系のうちの28の制御因子を多コピープラスミド pDG148 にクローン化したものを用意した。分泌性分解酵素遺伝子でシグナル伝達を受けるものを検索した。

(2) 殊にグルコマンナン分解利用オペロンの解析を並列して進めた。このオペロンは日欧共同研究のゲノム解析中に定家研究室で発見したものである。ORF から推定したアミノ酸配列比較によって、コンニャクの主成分であるグルコマンナン分解分泌性マンナーゼのオペロンと推定されていた。

[フェーズ I の研究成果]

(1) 枯草菌の35種（多糖分解 *amyE*, *ydhM*, *pel*, *bglC*, *xynD*, *pelB*, *xynA*, *csn*, *sacC*, *abnA*, *amyX*, *amyDC*, *yvfO*, *sacB*, *yveB*, *yvpBA*, *licT*, *yxIA*、タンパク質分解 *mpr*, *aprE*, *wprA*, *nprB*, *nprE*, *bpr*, *vpr*, *epr*、脂質分解 *glpT*, *lipA*, *lipB*、核酸分解 *yqhZ*, *yokFE*, *yncB*, *yisB*, *nucA*, *yvaL*, *yurF*, *nucB*, *yq1B*）の分泌性分解酵素遺伝子の転写誘導測定株を構築した。この株を用いてパプリカ、チーズ、ミカンの白皮、卵白、シイタケ、など400種の食材で分泌性分解酵素遺伝子の転写誘導をテストした。殊にチーズ、ミルク、ヨーグルト、ごま油などによる脂質分解酵素遺伝子 (*lipA*)、スキムミルク、チーズによるタンパク分解酵素遺伝子 (*wprA*)、ミルク、サラダ油、ごま油、卵白によるキトサン分解酵素遺伝子 (*csn*)、スキムミルク、チーズ、卵白による RNA 分解酵素遺伝子 (*rnr*) などの誘導が顕著であった。

更に2成分制御系の28のレギュレーター (*DegS-DegU*, *PhoR-PhoP*, *ComP-ComACitS-CitR*, *DesK-DesR*, *LytS-LytT*, *YbdK-YbdJ*, *YcbA-YcbB*, *YcbM-YcbL*, *YccG-YccH*, *Yc1K-Yc1J*, *YdbF*, *YdbG*, *YdtH-YdtI*, *YesM-YesN*, *YfiJ-YfiK*, *YhcY-YhcZ*, *YkoH-YkoG*, *YrkO*, *YrkP*, *YtsB-YtsA*, *YufL-YufM*, *YvcO-YvcP*, *Yvft-YvfU*, *YvqB-YvqA*, *YvqE-YvqC*, *YvrG-YvrH*, *YxdK-YxdJ*, *YxjM-YxjL*) を多コピープラスミドにクローン化したものを大腸菌経由で全て精製し、分泌タンパク質オペロンのプロモーター *LacZ* 融合株に導入し、効果を調べた。*YvrH* が *wprA*, *yokFE*, *lipB* の、*yhcZ* が *yxjP*

の、 *yvqC* が *yxiP* の転写を誘導することを見いだしたが、他の組み合わせでは顕著に効果のあったものはなかった。

(2) 実験系としてグルコマンナンオペロンの転写はコンニャク粉中のグルコマンナンによって誘導されるのみならず、柑橘類の白皮、穀物、小麦粉、パプリカ、メイプルシロップなどにも強い誘導性があり、これらの食材中にグルコマンナンないしこのオペロンの誘導物質の存在が示唆された。ことに、パプリカにはグルコマンナンが分解されて出来た強烈な誘導物質セロビオースの存在が示唆されるとともに、メイプルシロップには逆に高分子のグルコマンナンの存在が示唆された。

このオペロンについては、先頭の3つのORFがオリゴ糖のトランスポーターを形成し、5番目のORFがリプレッサータンパク質の遺伝子で、最後の遺伝子が分泌性のマンナーゼ遺伝子であり、他の3個の遺伝子は取り込まれたオリゴ糖を解糖系へ持ち込む代謝系遺伝子群であることが分かった。この遺伝子群はコンニャクグルコマンナンやセロビオース、マンノビオースで誘導されるオペロンであることが分かった。さらに、ブドウ糖を添加すると誘導抑制がかかり *CcpA* 変異で誘導抑制解除がおこるので、典型的なカタボライト感受性オペロンであることが分かった。転写開始点を決定し、典型的なシグマA依存のオペロンであることが判明した^[海外論文55]。

[今後の展開] :

グルコマンナンオペロンはあらゆる生物で初めて解析されたものである。グルコマンナンはコンニャクの主成分であるが、いろいろな植物由来の生物材料にも含まれている。枯草菌はこのグルコマンナンでコンニャクを分解する。近縁菌である納豆菌もコンニャクを分解する。弱いながらCMセルロースの分解活性があり、高速分子進化技術によるターゲット分子としても価値がある。高価なオリゴ糖の精製・販売や、コンニャク産業への支援（グルコマンナンの付加価値、コンニャクイモ残さ処理）が期待される。バイオエタノール工業への応用も考えられる。