

## セルロソーム生産菌 *Clostridium cellulovorans* 743B の全ゲノム解析

三宅 英雄<sup>1, 2, 3</sup>・田丸 浩<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup> 三重大学大学院生物資源学研究科,

<sup>2</sup> 三重大学生命科学研究支援センター・バイオインフォマティクス部門,

<sup>3</sup> 三重大学ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー バイオテクノロジー応用研究室

### Genome sequence of the cellulosome-producing organism *Clostridium cellulovorans* 743B

Hideo MIYAKE<sup>1, 2, 3</sup> and Yutaka TAMARU<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup> Department of Life Science, Graduate School of Bioresources,

<sup>2</sup> Department of Bioinformatics, Life Science Research Center,

<sup>3</sup> Laboratory of Applied Biotechnology, Venture Business Laboratory,  
Mie University 1577 Kurimamachiya, Tsu, Mie 514-8507, Japan

#### Abstract

Among Clostridia, an extracellular enzyme complex called the cellulosomes produced by *Clostridium* species are particularly designed for efficient degradation of plant cell wall polysaccharides. *Clostridium cellulovorans* 743B, an anaerobic and mesophilic bacterium, produces the cellulosomes on the cell surface and free extracellular enzymes called noncellulosomes. Recently, we have reported the whole genome sequence of *C. cellulovorans* comprising 4,220 predicted genes in 5.10 Mbp. As a result, the genome size of *C. cellulovorans* was about 1 Mbp larger than that of other cellulosome-producing clostridia, mesophilic *C. cellulolyticum* and thermophilic *C. thermocellum*. A total of 57 cellulosomal genes were found in the *C. cellulovorans* genome, in addition to two novel genes encoding scaffolding proteins CbpB and CbpC. *C. cellulovorans* genome included not only cellulosomal genes but also a large number of genes encoding noncellulosomal enzymes, the genome expansion of *C. cellulovorans* included genes more related to degradation of polysaccharides, such as hemicelluloses and pectins, than to cellulose.

**Key Words:** *Clostridium cellulovorans*, cellulosome, comparative genome

#### 1. はじめに

化石燃料依存の石油化学産業は微生物などの生体触媒を用いた産業（ホワイトバイオテクノロジー産業）への技術革新が必要になっている。ガソリンに代わる燃料としてアメリカやブラジルを中心に“バイオエタノール”が急速に普及し始めているが、使用するバイオマスがデンプン質や糖質などの食料であるため食料問題と競合している。そのため、農作物の残渣や廃材などを利用したセル

ロース質からのバイオ燃料の生産など“バイオリファイナリー”への基盤形成が急務となっている。

農林水産省と経済産業省のバイオ燃料技術革新協議会によると、草本系、木質系のリグノセルロースを出発原料とし、リグノセルロースに含まれるセルロース、ヘミセルロース、リグニンから中間体であるシュガープラットフォームとフェノールプラットフォームの構築が重要である<sup>1)</sup>。シュガープラットフォームであるグルコース、ガラクトース、キシロースなどの単糖から発酵微生物を使っ

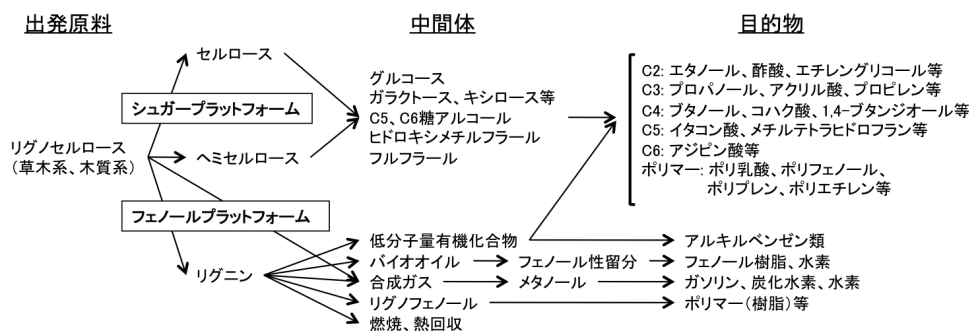


図1 セルロース系バイオマスからのバイオリファイナリー<sup>1)</sup>  
(参考: バイオ燃料技術革新協議会資料)

てエタノール、プロパノール、ブタノールなどのアルコールや酢酸、乳酸、コハク酸などの有機酸への変換と、フェノールプラットフォームである低分子量有機化合物、バイオオイル、リグノフェノールからアルキルベンゼン類、フェノール樹脂、水素、ポリマー（樹脂）への変換を行うことで、セルロース系バイオマスからのバイオリファイナリーを目指す（図1）。特にセルロース、ヘミセルロースは難分解性の高分子多糖で、堅固な結晶構造を取っているため、前処理として酸・アルカリを使った化学的処理、爆砕、亜臨界状態における物理化学的処理などが必要である。しかしながら、これらの手法は環境負荷がかかるため高エネルギーが必要で、微生物前処理糖化法の開発が必要とされている。一方、ある種の嫌気性微生物には、これらの分子多糖を非常に効率よく分解できる酵素複合体“セルロソーム”を分泌・生産することが近年の研究で明らかとなった<sup>2)</sup>。分子生物学、生化学等の技術を駆使した解析により、セルロソームは骨格タンパク質をベースに多数の高分子多糖分解酵素が結合した構造を取り、これらの複数の酵素が共役してセルロースに作用することで、非常に高い多糖の分解活性を示すことが明らかになっている<sup>2)</sup>。

そこで本稿では著者らが全ゲノム解析をしたセルロソーム生産性中温菌 *Clostridium cellulovorans* が生産するセルロソームについて紹介するとともに、ゲノム情報を活用した研究戦略について紹介する。

## 2. 植物細胞壁の構成成分

植物細胞壁は、主にセルロース、ヘミセルロース、リグニンの3つの成分から構成されており、それぞれ約40%、30%、20%の割合で含まれ、植物の種類や季節によってその割合は変動する<sup>3)</sup>。細胞壁の基本骨格を構成しているセルロースはグルコースが $\beta$ -1,4結合で重合したポリマーであり、分子間で多数の水素結合を形成することで強い結晶性の繊維構造を示す。さらに、セルロースには双子葉植物由来のタイプIおよび単子葉植物由来のタイプIIがあり、セルロース繊維に絡まるヘミセルロースが異なる。

ヘミセルロースは、セルロース以外の糖であり、構成する糖が多種多様であり結合様式も複雑である。ヘミセルロースは、セルロースと水素結合やリグニンと共有結合などを形成することで細胞壁を補強する役割を担っており、骨格となる主鎖の糖に側鎖の糖などが結合した構造を形成しているため、それらを分解するヘミセルラーゼは、非常に種類が多い。特にヘミセルロースの分解には主鎖を分解する酵素だけではうまくいかず、側鎖を分解する酵素が加わって初めて効果的に分解が進む。

リグニンは、芳香族化合物であり、複雑な構造を形成する。そのため、微生物による分解を受けにくい。リグニンは、細胞壁と細胞壁の間に存在し、それらを接着する役割をしている。リグニンを分解できるのは、おもに白色腐朽菌というキノコ類であり、リグニンを酸化することで分解する。

表1 セルロソーム生産性 *Clostridium* 属のゲノムの比較<sup>9)</sup>

Organism	GenBank accession No.	Genome size (Mb)	No. genes	No. cellulosomal genes	% GC
<i>C. cellulovorans</i> 743B	DF 093537- DF 093556	5.10	4220	57	31.1
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	AE 001437	3.94	3672	12	30.9
<i>C. cellulolyticum</i> H10	CP 001348	4.07	3390	65	37.4
<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405	CP 000568	3.84	3191	84	39.0

### 3. セルラーゼとセルロソーム

細菌から糸状菌にわたる多くの微生物でセルロース分解酵素を生産することが報告されており、それらは土壌や草食動物の消化管などに生息し、植物細胞壁などのセルロースを分解している。セルラーゼは、糖のO-グリコシド結合を加水分解する酵素であり、セルラーゼ (EC 3.2.1.4),  $\beta$ -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.21), グルカン 1,4- $\beta$ -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.74), セルロース 1,4- $\beta$ -セロビオシダーゼ (EC 3.2.1.91) の4種類が確認されている。セルロース分解性微生物は菌体外に作用機構の異なる多種多様なセルロース分解酵素を生産し、それらの協同作用や相乗効果によってセルロースを分解する。しかしながら、セルロース繊維は強固な結晶構造をとる領域が多く、これらの酵素を使って効率よくグルコースまで糖化する技術は未だ確立されていない。

セルロソームに関する研究は、1981年に嫌気性菌 *Clostridium thermocellum* 由来のエンドグルカナーゼが精製され<sup>4)</sup>、1983年に Lamed らによって初めてセルロースに結合する高分子複合体“セルロソーム”について報告された<sup>2)</sup>。1980年代後半になって、カリフォルニア大学デイビス校の Doi らによって世界で初めて *C. cellulovorans* 由来のセルロソームの骨格タンパク質 (Cellulose-binding protein A: CbpA) 遺伝子がクローニングされた<sup>5)</sup>。セルロソームは骨格タンパク質をベースに多数の高分子多糖分解酵素が結合した構造を取り、これらの複数の酵素が共役してセルロースに作用することで、高分子多糖に対して非常に高い分解活性を示すことが明らかにされた。その後、マサチューセッツ工科大学の Demain らによって

*C. thermocellum* 由来の *cipA*<sup>6)</sup>、フランス・マルセイユ CNSR の Belaich らによって *C. cellulolyticum* 由来の *cipC*<sup>7)</sup>、三重大大学の宮・栗冠らによって *C. josui* 由来の *cipA*<sup>8)</sup> から同様のセルロソーム骨格タンパク質遺伝子がクローニングされ、各種の *Clostridium* 属におけるセルロソームの存在が証明された。

### 4. *C. cellulovorans* のゲノム解析

上述のように *Clostridium cellulovorans* は嫌気性中温菌であり、カリフォルニア大学の Doi らによってセルロソームや分泌型の酵素であるノンセルロソームに関する研究がこれまで行われてきた。

筆者らは、嫌気条件下で *C. cellulovorans* を培養し、ゲノム DNA を抽出した。さらに、Roche Genome Sequencer FLX 454 および Illumina Genome Analyzer II を用いて、全ゲノムシーケンスを行った。最終的に、601 コンティグを含む30個のスキュフォールドにアッセンブリングでき、全ゲノム長は5.1 Mbp であることが明らかになった<sup>9)</sup>。さらに、CRITICA および Glimmer 2 による遺伝子予測を行ったところ、全遺伝子数は4220 遺伝子あるいは4297 遺伝子とそれぞれ推定された。興味深いことに、*C. cellulovorans* セルロソームに関する遺伝子の総数は、*C. cellulolyticum* および *C. thermocellum* のゲノムと比べて最も少ないことが判明した (表1)。

### 5. バイオマス利用に関連した *Clostridium* 属のゲノム解析

上述のように、セルロソーム生産性 *Clostridium*

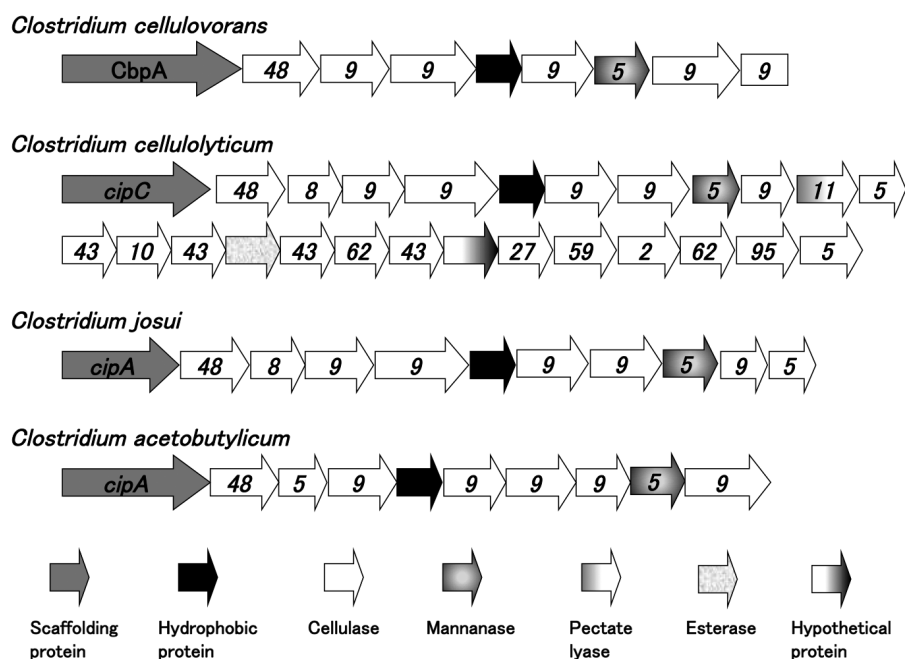


図2 バイオマス利用に関連する中温性 *Clostridium* 属のセルロソーム遺伝子クラスター<sup>14)</sup>  
矢印内の番号は、CAZy のファミリーナンバーを示す。

属は注目されているが、アセトン・ブタノール・エタノール (ABE) 発酵における *Clostridium* 属の歴史はさらに長い<sup>10)</sup>。*C. acetobutylicum* を使った ABE 発酵は、酵母を使ったエタノール発酵に続いて実用化された発酵技術であり、第二次世界大戦まで日本でも行われていた。一方、ゲノム解析については、2001 年にマサチューセッツにある Genome Therapeutics 社によってゲノム解読が完了されている<sup>11)</sup>。さらに、米国エネルギー省の Joint Genome Institute (JGI) では、2002 年からゲノムの相互作用からエコシステムの変化まで、あらゆるレベルの知識の統合体を構築するという微生物を利用した国内のエネルギー需要に画期的な解決法の開発を目指す GTL (Genomes to Life) プログラムに取り組んでいる<sup>12)</sup>。またイリノイ大学の Blaschek らは、高ブタノール生産菌である *C. beijerinckii* のゲノム解読を JGI の支援によって完了している。さらに、マサチューセッツ大学の Leschine らは、糖化-エタノール発酵が可能な *C. phytofermentans* に注目し<sup>13)</sup>、同じく JGI の支援によって本菌のゲノム解読を完了している。

セルロソーム生産性 *Clostridium* 属のゲノム解析では、中温菌である *C. cellulovorans* に 22 kb 以上にもおよぶセルロソームな (セルロソームを

構成することのできる) 遺伝子クラスターが発見された<sup>5)</sup>。さらに、上述で示したように筆者らの研究グループは、2009 年に本菌のゲノム解読を完了した<sup>9)</sup>。*C. cellulovorans* と同じ中温菌である *C. cellulolyticum* のゲノム情報も JGI によってゲノム情報が解読され、*cipC* を含むセルロソームな遺伝子クラスターが見つかり<sup>7)</sup>、中温菌である *C. josui* にもセルロソームな遺伝子クラスター<sup>8)</sup>が見つかりしている。さらに興味深いことに、上述の中温菌である *C. acetobutylicum* は、セルロソーム生産菌ではないが、偽遺伝子として *cipA* が存在している<sup>11)</sup>。これらはいずれもセルロソーム生産性 *Clostridium* 属に共通して保存された中温菌由来の遺伝子クラスターであり (図2)<sup>14)</sup>、セルロソームな酵素の組み合わせを探ることで効率的なバイオマス分解の戦略を導き出せそうである。また一方、セルロソーム生産性高温菌である *C. thermocellum* ATCC 27405 は、JGI によってゲノム情報が完全解読されたが、中温菌の *Clostridium* 属に見られるセルロソームな遺伝子クラスターはゲノム中に存在しなかった<sup>15)</sup>。

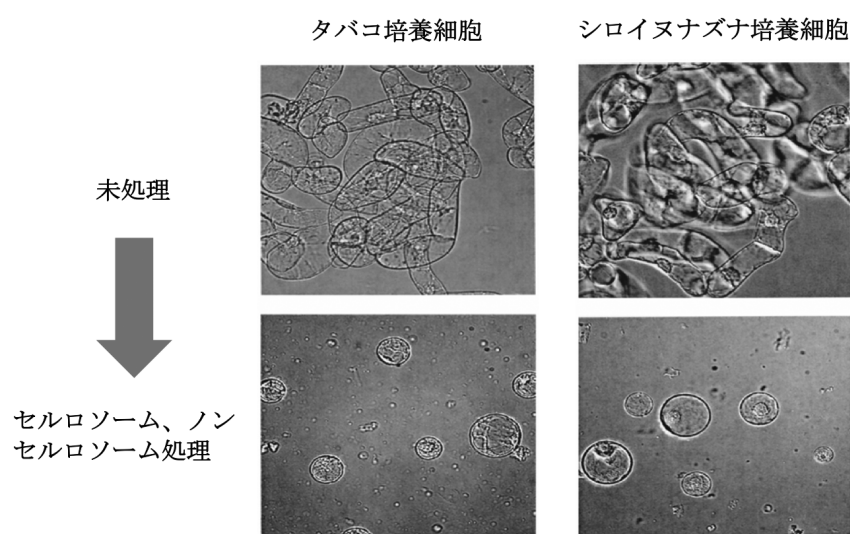


表2 セルロソーム, ノンセルロソームの相乗効果<sup>18)</sup>

Enzyme fraction	Amount of released sugar (mg/ml)
No enzyme	0.0
Cellulosome fraction (CS)	506.9 ± 16.6
Non-cellulosomal fraction (nCS)	209.5 ± 17.7
CS and nCS	1555.3 ± 15.9
CS and rBglA	695.4 ± 22.5
nCS and rBglA	238.5 ± 10.8
rBglA	24.1 ± 5.9

BglA:  $\beta$ -glucan glucohydrolase

Incubation for 16 h at 50°C.

図3 *C. cellulovorans* のセルロソーム, ノンセルロソームを用いた植物培養細胞からのプロトプラストの作出<sup>19)</sup>

## 6. セルロソームおよびノンセルロソームの相乗効果

一般的にソフトバイオマスはハードバイオマスよりもリグニンの含有量が少ないため酵素による反応が促進されやすい。ヘミセルロースはセルロースに比べ様々な種類があるため、ヘミセルロースを糖化するには多種多様なヘミセルラーゼが必要である。ソフトバイオマスを完全分解し、発酵微生物を使ってアルコールや酸などに変換する“バイオリファイナリー”を効率よく行うためには、C6糖からなるセルロース、C5、C6糖からなるヘミセルロースをグルコース、ガラクトース、キシロースなどの単糖にまで分解する必要がある。

セルロソーム生産性 *Clostridium* 属は、セルロソームのみならず、分泌型の酵素“ノンセルロソーム”も生産する<sup>16)</sup>。また、バイオマスに応じてセ

ルロソームな酵素の組み合わせやノンセルロソームな酵素の分泌が異なる<sup>17)</sup>。*C. cellulovorans* のセルロソーム, ノンセルロソームおよびノンセルロソームなリコンビナント  $\beta$ -グルカングルコヒドラーゼを調製し、不溶性のセルロースに対して単独あるいはそれらを組み合わせたときの酵素活性を調べたところ、セルロソームとノンセルロソームを組み合わせたときに最も高い酵素活性を示した(表2)<sup>18)</sup>。その活性は、セルロソームあるいはノンセルロソームを単独で作用させたときの合計よりも2.2倍もの相乗効果が見られ、セルロソームとリコンビナント  $\beta$ -グルカングルコヒドラーゼを組み合わせたときよりも1.3倍の相乗効果が見られた。また、ノンセルロソームな酵素同士だと相乗効果は見られないことから、セルロソームとノンセルロソームを組み合わせることでセルロースを効率よく分解することが証明さ

表3 セルロソーム生産性 *Clostridium* 属が生産する糖質関連酵素数の比較<sup>21)</sup>

Organism	Cellulosomal GHs + PLs	Non-cellulosomal GHs + PLs	Cellulosomal GHs + PLs/ Non-cellulosomal GHs + PLs
<i>C. cellulovorans</i> 743B	29	63	0.46
<i>C. cellulolyticum</i> H10	47	42	1.1
<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405	53	14	3.8

GHs: Glycoside hydrolases

PLs: Polysaccharide Lyases

れた。

植物の培養細胞に含まれる細胞壁多糖は、天然のソフトバイオマスと同様に、主にセルロース、ヘミセルロースで構成されており、通常、これらの培養細胞から植物細胞壁のないプロトプラストを調製するには、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、ペクチナーゼなどの複数の酵素製剤を用いる必要がある。驚くべきことに、タバコやシロイヌナズナの培養細胞に *C. cellulovorans* のセルロソームとノンセルロソームで処理するとプロトプラストを調製することができる (図3)<sup>19)</sup>。さらに、炭素源にグルコース、セロビオース、キシラン、ローカストビーンガムで *C. cellulovorans* を培養し、生産されたセルロソーム、ノンセルロソームを調べたところ、どの炭素源においてもカルボキシメチルセルロース分解酵素 (CMCase)、キシラナーゼ、マンナナーゼ、ペクチンリアーゼなどの酵素活性が見られたが、ローカストビーンガムで培養したものにはセルロソームの発現が確認されなかった。さらに、各炭素源におけるセルロソーム、ノンセルロソームを用いて植物培養細胞からのプロトプラスト形成能の有無を確認したところ、ローカストビーンガムで培養したものだけがプロトプラストを形成することができなかったことから、植物細胞壁の分解にはセルロソームが必須であることがわかった。実バイオマスに関しては、稲わらなどのソフトバイオマスを炭素源として培養すると菌体量が増大し、直接分解される<sup>20)</sup>。これらの結果から、*C. cellulovorans* のセルロソーム、ノンセルロソームを詳細に調べることで、ソフトバイオマスを完全糖化するヒントを見つけることができるだろう。

## 7. *C. cellulovorans* のソフトバイオマス分解の戦略

植物細胞壁を効率よく分解するにはセルロソーム、ノンセルロソームの両方の酵素成分が必要である。上述のゲノム解析が完了している *C. cellulovorans*, *C. cellulolyticum*, *C. thermocellum* のKEGG パスウェイ解析を行い、代謝に関連する酵素を全て導き、それ以外にゲノム中に含まれるセルロース系バイオマスを分解するのに必要な糖質加水分解酵素と多糖リアーゼの総数を調べた。その結果、*C. cellulovorans* は、セルロソームな糖質加水分解酵素と多糖リアーゼの合計は29個と一番少なかったが、ノンセルロソームな糖質加水分解酵素と多糖リアーゼの合計は63個と最も多く、*C. thermocellum* の約4倍近くあった。そして、それらの多くがヘミセルラーゼであった (表3)<sup>21)</sup>。ゲノム情報から推測できることは、*C. cellulovorans* は多種多様な分泌型のノンセルロソームを使ってバイオマスに含まれるヘミセルロースを分解し、内部に埋もれているセルロースを露出させて効率的に分解しているようである。さらに、セルロソーム関連遺伝子については、CbpAのようなセルロソームな酵素が9つ結合可能な骨格タンパク質以外にも、セルロソームな酵素を1つ結合できる HbpA、さらに新規な遺伝子であり、HbpA と同じくセルロソームな酵素が1つ結合可能な CbpB, CbpC の合計4種類が明らかになった (図4)。なお、CbpA に関しては、バイオマスに応じて他の *Clostridium* 属よりも少ない組み合わせからなるセルロソームな酵素群を構築し、これら大小異なるセルロソームを使って露出したセルロースを効率よく分解すると推測できる。

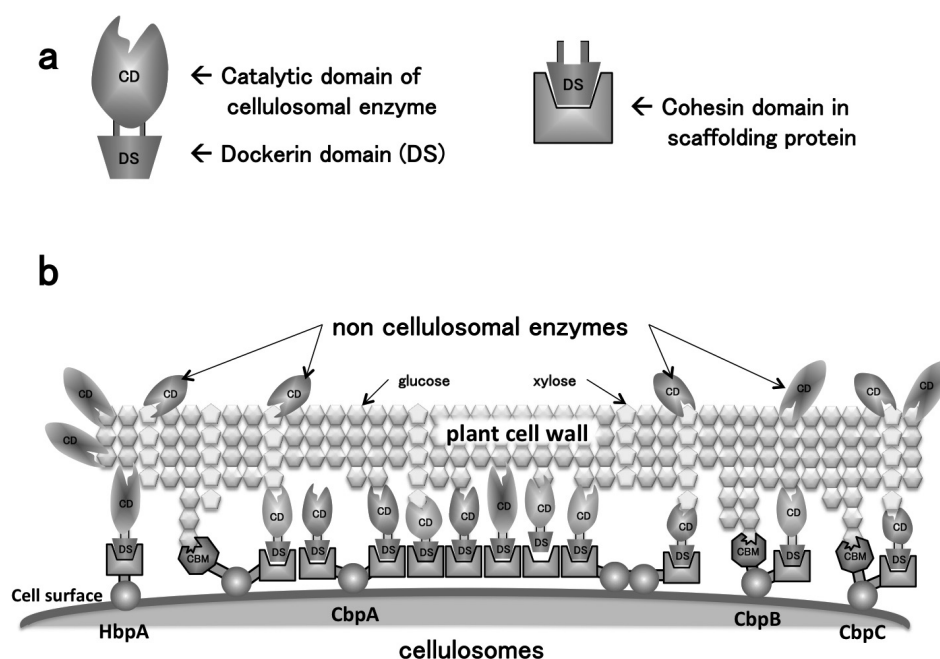


図4 *C. cellulovorans* のソフトバイオマス分解の戦略

a: バイオマスに応じて、触媒ドメインを持つセルロソームな酵素を発現する。

b: 細胞表層に大小異なる4種類のセルロソーム(HbpA, CbpA, CbpB, CbpC)を発現させ、バイオマスに応じてセルロソーム、ノンセルロソームな酵素を組み合わせることによって糖化の効率を上げると予想される。

## 8. ゲノム情報を活用した研究戦略

セルロース系バイオマスの組成は植物の種類やその部位ごとに千差万別であるが、*C. cellulovorans* は、その組成を察知して様々な組み合わせからセルロソームを構築しノンセルロソームを分泌している。そのため、各種バイオマスに対して分泌されるセルロソームやノンセルロソームの構成成分の解析が重要であり、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析によりどのようなセルロソーム、ノンセルロソームが発現しているかを定量的に解析する必要がある。これらはすべてゲノム情報、すなわち細胞の設計図に直ちに立ち戻ることができるため、各種バイオマスに対して実際にどのようなセルロソームやノンセルロソームの構成成分が必要であるかを *C. cellulovorans* から学ぶことができる。さらに、バイオマス由来の植物細胞壁多糖の分解にセルロソームが必須であることから、発現量の多い酵母を用いた細胞表層工学や嫌気性菌発現系を活用した組換え微生物などを使ってバイオマスに適したセルロソームが必要になる

と考えられる。各種バイオマスに適した“デザインナブルセルロソーム”を構築することで、最終的にはバイオマス前処理・糖化に微生物そのものを活用する“微生物前処理糖化法”への応用が期待される。

## 謝 辞

本稿で紹介した研究の一部は、住友商事株式会社と京都大学大学院農学研究科の植田充美先生との共同研究により行われた。

## 和文要約

*Clostridia* の中にはセルロソームと呼ばれる細胞外に酵素複合体を形成する *Clostridium* 属が存在し、それらは植物細胞壁を効率よく分解する。*Clostridium cellulovorans* 743B は、嫌気性中温菌であり、細胞表層にセルロソームと細胞外にフリーな酵素であるノンセルロソームを生産する。近年、我々は、*C. cellulovorans* の全ゲノム配列を決定し、

予想される遺伝子は4,220あり、そのゲノムサイズは5.1 Mbpであった。中温菌である *C. cellulolyticum* や高温菌である *C. thermocellum* と比較すると *C. cellulovorans* は約1 Mbp ゲノムサイズが大きいことが分かった。*C. cellulovorans* のゲノム中にセルロソーマルな遺伝子は合計57個あり、新たに2つの骨格タンパク質をコードする遺伝子である CbpB と CbpC が見つかった。*C. cellulovorans* のゲノムは、セルロソーマルな遺伝子だけでなく、多数のノンセルロソーマルな酵素をコードする遺伝子が含まれており、セルロースを分解する酵素よりもヘミセルロースやペクチンを分解する酵素の方が多く含まれていた。

## 文 献

- 植田充美, 黒田浩一, 三宅英雄, 田丸浩. (2010) ソフトバイオマス完全糖化の新バイオ技術, 「配管技術」(日本工業出版), 52: 1-6.
- LAMED, R., SETTER, E. and BAYER, E. A. (1983) Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* **156**: 828-836
- STÖCKER, M. (2008) Biofuels and biomass-to-liquid fuels in the biorefinery: catalytic conversion of lignocellulosic biomass using porous materials. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **47**: 9200-9211.
- PETRE, J., LONGIN, R. and MILLET, J. (1981) Purification and properties of an endo-beta-1,4-glucanase from *Clostridium thermocellum*. *Biochimie.* **63**: 629-639
- SHOSEYOV, O., TAKAGI, M., GOLDSTEIN, M. A. and DOI, R. H. (1992) Primary sequence analysis of *Clostridium cellulovorans* cellulose binding protein A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 3483-3487
- GERNGROSS, U. T., ROMANIEC, M. P., KOBAYASHI, T., HUSKISSON, N. S. and DEMAINE, A. L. (1993) Sequencing of a *Clostridium thermocellum* gene (cipA) encoding the cellulosomal SL-protein reveals an unusual degree of internal homology. *Mol. Microbiol.* **8**: 325-344
- PAGÉS, S., BELAICH, A., TARDIF, C., REVERBEL-LEROY, C., GAUDIN, C. and BELAICH, J. P. (1996) Interaction between the endoglucanase CelA and the scaffolding protein CipC of the *Clostridium cellulolyticum* cellulosome. *J. Bacteriol.* **178**: 2279 (1996)
- KAKIUCHI, M., ISUI, A., SUZUKI, K., FUJINO, T., FUJINO, E., KIMURA, T., KARITA, S., SAKKA, K. and OHMIYA, K. (1998) Cloning and DNA sequencing of the genes encoding *Clostridium josui* scaffolding protein CipA and cellulase CelD and identification of their gene products as major components of the cellulosome. *J. Bacteriol.* **180**: 4303-4308
- TAMARU, Y., MIYAKE, H., KURODA, K., NAKANISHI, A., KAWADE, Y., YAMAMOTO, K., UEMURA, M., FUJITA, Y., DOI, R. H. and UEDA, M. (2010) Genome sequence of the cellulosome-producing mesophilic organism *Clostridium cellulovorans* 743B. *J. Bacteriol.* **192**: 901-902
- 三宅英雄, 田丸浩 (2008) アセトン・ブタノール・エタノール発酵における研究開発の動向, 「微生物によるものづくり」(シーエムシー出版), p.295-301
- NÖLLING, J., BRETON, G., OMELCHENKO, M. V., MAKAROVA, K. S., ZENG, Q., GIBSON, R., LEE, H. M., DUBOIS, J., QIU, D., HITTI, J., WOLF, Y. I., TATUSOV, R. L., SABATHE, F., DOUCETTE-STAMM, L., SOUCAILLE, P., DALY, M. J., BENNETT, G. N., KOONIN, E. V. and SMITH, D. R. (2001) Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **183**: 4823-4838
- <http://www.jgi.doe.gov/>
- WARNICK, T. A., METHÉ, B. A. and LESCHINE, S. B. (2002) *Clostridium phytofermentans* sp. nov., a cellulolytic mesophile from forest soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 1155-1160
- 三宅英雄, 田丸浩 (2010) ソフトバイオマス完全糖化を目指したデザインナブルセルロソームの構築. 生物工学会誌 **88**: 336-339
- BAYER, E. A., LAMED, R., WHITE, B. A. and FLINT, H. J. (2008) From cellulosomes to cellulosomics. *Chem. Rec.* **8**: 364-377
- DOI, R. H. and TAMARU, Y. (2008) The *Clostridium cellulovorans* cellulosome: an enzyme complex with plant cell wall degrading activity. *Chem. Rec.* **1**: 24-32
- HAN, S. O., YUKAWA, H., INUI, M. and DOI, R. H. (2005) Effect of carbon source on the cellulosomal subpopulations of *Clostridium cellulovorans*. *Microbiology*, **151**: 1491-1497
- KOSUGI, A., ARAI, T. and DOI, R. H. (2006) Degradation of cellulosome-produced cello-oligosaccharides by an extracellular non-cellulosomal beta-glucan glucohydrolase, BglA, from *Clostridium cellulovorans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **349**: 20-23



- 
- 19 TAMARU, Y., UI, S., MURASHIMA, K., KOSUGI, A., CHAN, H., DOI, R. H. and LIU, B. (2002) Formation of protoplasts from cultured tobacco cells and *Arabidopsis thaliana* by the action of cellulosomes and pectate lyase from *Clostridium cellulovorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2614-2618
- 20 日経ものづくり 2010年2月号：バイオエタノールの低コスト化に新手法、京大と三重大がヘミセルロースも糖化（日経BP），p.26
- 21 TAMARU, Y., MIYAKE, H., KURODA, K., NAKANISHI, A., MATSUSHIMA, C., DOI, R. H. and UEDA, M. (2010) Comparison of the mesophilic cellulosome-producing *Clostridium cellulovorans* genome with other cellulosome-related clostridial genomes. *Microbial. Biotech.* in press.