植物繊維分解ルーメン細菌における遺伝子工学

大宮邦雄・荻田修一*

三重大学生物資源学部, 津市 514

* 三重大学遺伝子実験施設, 津市 514

Genetic Engineering of the Plant Fiber-degrading Rumen Bacteria

Kunio OHMIYA and Shuichi KARITA*

Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu-shi 514

* Center for Molecular Biology and Genetics, Mie
University, Tsu-shi 514

Key words : genetic engineering, plant fiber degradation, rumen bacteria, cellulase,
cloning

牛や羊のような反すう家畜は、人類に乳肉や毛皮を供給し、労役を提供する重要な経済動物である。そのうえ人や豚や鶏が利用し難い牧草等のリグノセルロース性物質を主たる飼料としているので、人類と食糧を争奪する関係にない点でも極めて有用な家畜である。この反すう家畜の生産性を高めるために近年わが国の畜産業は濃厚飼料にかなり依存してきた。しかし生産コストの低減化をせまられ地球規模での食料不足が予測される昨今においては、粗飼料の高度利用がみなおされ始めている。家畜が摂取した粗飼料は、ルーメン内の嫌気性微生物群（細菌、糸状菌、原生動物）の相乗作用により可溶化されるので、これら微生物のリグノセルロース分解能を改良することに大きな関心が向けられている。なかでもセルロース分解嫌気性細菌の果たす役割は特に重要であろう。

一方大腸菌で始まった遺伝子組換えは、この10年間で簡便普遍化した技術として確立され、単に原核細胞のDNA組換えにとどまらず植物や動物といった真核細胞も広く利用されるようになり、いわゆる生物の研究には

不可欠な手段となっている。その結果、分子育種という新たな学問領域をつくるに至った。このおかげでわれわれが希望する機能の高い形質を導入した新奇な生物を育種することが可能となってきた。

こういった状況のなかで、セルロース分解能を高めたルーメン細菌の育種を考える時、セルラーゼに関連する酵素群の遺伝子組換えに関心がもたれるのは当然の成りゆきであろう。それではルーメン菌の遺伝子組換えによりどのようなことが期待できるであろうか。

1. 植物繊維分解効率の向上。（ルーメン菌のセルロース性物質の分解能力を付与改善する。例えばセルロースあるいはヘミセルロース分解酵素遺伝子を新たに導入したり、在来遺伝子の発現量を多くする。また生成物阻害を受けにくい酵素の遺伝子を導入する。）

2. 窒素の利用率の向上。（プロテアーゼ生産菌やウレアーゼ生産菌の生産能を下げたり、あるいは必須アミノ酸の合成系を強化する。）

3. 抗生物質生産能の付与。（病原微生物の生育を抑える。例えば真核生物に対する抗菌物質をルーメン細菌

に生産させることにより、抗生物質の経口投与量を減らす。またセルロース分解菌に抗生物質耐性を付与し主要菌叢とする、生育の早い乳酸生産菌を抑制する。)などが考えられている^{10,19,27,73,85)}。

ルーメン細菌の遺伝子組換えに関する研究はまだ緒に上ったばかりである。それでも遺伝子組換え技術の活用により、ルーメン細菌の植物繊維分解機能の改良に関する新たな知見がいくつか得られている。例えば *Ruminococcus albus* や *Fibrobacter succinogenes* では、数種のエンドグルカナーゼの存在が明らかになり、従来の生化学的精製法だけでは検出されていなかった酵素が、クローニングにより大腸菌で発現増幅され、あるいは抗体によるイムノプロットにより、新たなセルラーゼの存在が確認されている。このように発現量が少なく見のがされてきた酵素がクローニングにより新たに発見されたり、それらの酵素の存在場所や発現時期なども明らかになりつつあり、これらのルーメン細菌内での発現を爆発的に高めうる可能性もでてきた。

この総説では、これらルーメン細菌の植物繊維分解に関わる酵素の遺伝子組換えについて紹介するとともに、ルーメン細菌のセルロース分解機能を改良するために新たな宿主ベクター系の開発についてもふれる。

植物繊維分解酵素遺伝子のクローニング

植物繊維分解に関わるルーメン微生物の酵素系は一般に複数の酵素群で構成されており、段階的および相乗的作用を発揮している。現在までに表1に示す酵素が単離されている。大きくセルラーゼ系とヘミセルラーゼ系に分けられる。セルラーゼ系の場合、エキソグルカナーゼ、エンドグルカナーゼ、 β -グルコシダーゼの3つのタイプがある。エキソグルカナーゼはセルロースを非還元末端よりセロビオース単位で分解する。エンドグルカナーゼはセルロースの非結晶部をランダムに切り、エキソグルカナーゼの基質となるような多くの非還元末端を生じる。 β -グルコシダーゼはこれらの酵素より生じたセロビオースやセロデキストリンをグルコースに分解する。ここに至ってはじめてグルコースの代謝系が働くことになる。キシラナーゼに代表されるヘミセルラーゼ系についても同様の酵素系が知られている。このような酵素系をさらに調べてみると同じエンドグルカナーゼの中にも複数の酵素が存在していることが最近あきらかになってきた。このような例は *Clostridium thermocellum*^{3,74)} などでも報告されている。このことは、多様な成分よりなり分解に時間のかかる植物繊維を多種の酵素の相乗的作用により効率的に分解可溶化するために必要

Table 1. Rumen bacterial enzymes participating in polysaccharide digestion

Enzyme	References
Endoglucanase	13, 51, 65, 92.
Exoglucanase	21, 35, 63
β -Glucosidase	64
Cellodextrinase	33, 34
Xylanase	28
Xylosidase	99
Acetyl xylan esterase	29, 50
Acetyl esterase	29, 50
α -L-Arabinofuranosidase	89
Amylase	11
Arabinase	99
Laminarinase	16
Lichenase	15
Pectinase	99
α -Glucuronidase	80

なのであらうと考えている⁸⁷⁾。

現在までに多くの植物繊維分解に関わる酵素の遺伝子がルーメン細菌より単離され、これにコードされる酵素が大腸菌で人為的に増やされている、すなわちクローニングされている。クローンとは、あるひとつの細胞や分子を先祖とし、それと完全に同じ細胞や分子の一群と定義される⁴²⁾。従って DNA の断片をクローニングすると、元の分子がただ1個であってもこの分子から同一の分子を無限に増やすことができる。一度クローニングされた DNA 断片は増やされ解析することが可能になる。例えば塩基配列を決定することでその DNA がどのようなアミノ酸配列の蛋白質(酵素)をコードしているかを、全アミノ酸のシーケンスを決定することなく容易に推定することができる。クローニング技術は、まず目的の DNA 断片をクローニングベクターと呼ばれるプラスミドあるいはファージにつなぎ、新しい DNA を創る。これを組換え DNA と呼び、宿主菌に導入して形質転換を行なう。この一連の技術を遺伝子工学と呼んでいることは周知のとおりである。ルーメン細菌遺伝子のクローニングはほとんど大腸菌のプラスミドベクターあるいはファージベクターを使用して行なわれており、大腸菌を宿主として組換え DNA を増殖させ、解析に使用している。その酵素遺伝子の多くは、ルーメン細菌自身のプロモーターが、大腸菌の RNA ポリメラーゼにより認識されて転写され、大腸菌リボソームで翻訳されている。しかし通性嫌気性菌である大腸菌を絶対嫌気

条件下のルーメンに定着させ繊維質分解に寄与させ得ることへの危惧があるので、ルーメン菌のホストベクター系を新たに開発する必要もある。

次にセルロースやヘミセルロースの分解酵素遺伝子がクローニングされているルーメン菌の例をいくつか紹介する。

1. *Ruminococcus albus*

ルーメン内での植物繊維分解に寄与する主要菌株の一つであり、われわれを含めいくつかのチームで研究が進められている。われわれは *R. albus* F-40 から3つの異なるエンドグルカナーゼ⁹²⁾、エキソグルカナーゼ⁶³⁾、 β -グルコシダーゼ⁶⁴⁾について精製し、その特性を明らかにしている。

R. albus F-40 のエンドグルカナーゼのひとつ EGI* の遺伝子がクローニングされ⁶⁶⁾塩基配列が決定されている⁶⁷⁾。EGI をコードする遺伝子は、1,218塩基対(bp)からなっており、これより406のアミノ酸配列が推定されている。翻訳開始コドンの前には-35配列と-10配列と思われるTATACAとAATAATを含むプロモーター領域が存在し、リボソーム結合部位のコンセンサス配列と予想されるAAGGAGGA配列が存在する。さらに終止コドンの下流域にパリンドローム(回文)構造がありmRNAポリメラーゼのターミネーターとして働くと予想される。*R. albus* F-40 から精製された酵素のひとつはN末端アミノ酸配列として、Ala-Ala-Asp-Glu-Ser-Glu-Thr-Glu-Asn-Val-Pro-Val-Ser-Gln-Thrを保有する。この配列は44番目のアミノ酸から始まっている。従って上記配列より前に存在する43個のアミノ酸は成熟蛋白質になる段階でシグナルペプチドとして取り除かれると考えられる。このEGIは *C. thermocellum* のエンドグルカナーゼ E²⁵⁾ と高い相同性がある。しかし、*C. thermocellum* では、この領域は活性発現領域とは考えられていないので、わずかなアミノ酸配列の相違が、活性発現を左右していることがうかがえる。さらにEGIをコードする遺伝子 *egl* の一部を5'側で切り取って短縮した。これを大腸菌で発現させた結果、推定されるシグナルペプチド切断部位よりもさらに15個のアミノ酸を取り除いて短くした酵素 Egl-I (pURA1-1) は、もとの EglI* よりも大腸菌で高い生産性を示し、EGI に比べ至適 pH は酸性側にシフトし、熱安定性が若干劣っている。このことは、

*: *R. albus* F-40 の遺伝子 *egl* により *R. albus* で発現している酵素。

** : *R. albus* F-40 の遺伝子 *egl* を大腸菌で発現させて精製した酵素。

このN末端側が酵素の熱安定性に寄与していることを示唆している⁷⁰⁾。(図1, 2)

R. albus F-40 の β -グルコシダーゼ遺伝子についても塩基配列が決定されている⁶⁸⁾。この遺伝子は、2,841bp からなっており推定されるアミノ酸配列は947個である。大腸菌で発現した酵素のN末端のアミノ酸配列は、Met-Ile-Lys-Asp-Trp-Asn-Glu-Tyr-Leu-Glu-Lys-Ala-Ala-Glu-Val-Asn-Ala-Glu-Gly で *R. albus* F-40 から精製した酵素のN末端と全く同じであった。このことから本酵素はシグナル配列をもたず、従って *R. albus* の菌体外には分泌されないことが予想された⁸²⁾。事実、本酵素は *R. albus* F-40 の菌体画分から精製されている⁶⁴⁾。

R. albus SY3 のエンドグルカナーゼ遺伝子 *celA* と *celB* についても塩基配列が決定されている⁷¹⁾。それぞれ1,095bp, 1,227bp からなり、推定される酵素 EGA と EGB はそれぞれ分子量41,200, 45,500と推定されている。*celB* はアミノ酸配列の相同性が *R. albus* F-40 の EglI と81% もありほぼ同じものであらうと思われる。

R. albus 8 染色体の λ フェージを使ったライブラリーからセルラーゼ活性を示す10種類の異なる制限酵素地図をもつクローンがえられている³¹⁾。このうちの3つはエンドグルカナーゼ、3つはエキソタイプのグルカナーゼ、残りの4つはエンドグルカナーゼとエキソグルカナーゼに加え β -グルコシダーゼ活性をも示す複合型のクローンであることが判明している。 λ フェージを使ったクローニングは一般に大きいサイズのDNA(10kbp以上)を挿入できる。複合型のクローンには複数の酵素遺伝子がのっている可能性があり、これら遺伝子がクラスターを形成していることを示唆していて興味深い。また *R. albus* AR67 からはエンドグルカナーゼ活性をもつ3つの異なるクローンがえられており、AR68 からは1つのクローンがえられている。しかしこれらの遺伝子間には相同性が低いことが明らかになっている⁹¹⁾。

2. *Fibrobactor (Bacteroides) succinogenes*

本菌もルーメンでの植物繊維分解に関与する主要菌のひとつであり、よく研究されている。この菌は最近になり *Fibrobactor* と再分類された⁵⁶⁾。本菌の繊維分解での役割、分類、生理については文献を参照されたい⁸¹⁾。

従来の生化学的精製法によって2つのエンドグルカナーゼ⁵¹⁾、セロデキストリナーゼ^{33,34)}、セロビオシダーゼ³⁵⁾などが単離され、その特性が報告されている。一方遺伝子のクローニングでは、6種の β -1,4-グルカナーゼ活性をもつクローンが得られ¹²⁾、その多様性が明ら

AAGCTTCTGCCAAAGTGGGTGGACGGTGTGAGGTATACAACAGCGGGAACGGAAGGAAGTATACAACGAGCGT	75
GCTGAGTGGTATGCAAAAGCAGTACGGTTTTCGTATGACGGCGAGAAGGACAATCACATCTTGATAAGCCAAAGTGAA	150
AGACTTGGCCGGCATTATCACTGAGGTGAGGTTTGAATGTGCTGAGGATTATGCGGGTGCATTTTTTTCAGGCGAGG	225
GTAATACCGCTGTATCCGAAGGAACGGCTTTGATATACA <u>AAATGTTT</u> TACCTGGAACATTTTGGGGTATATACATT	300
↓	
TTAAAAAGTAAGCGCGGGA <u>AAATA</u> TGCTTACCGGAATATATACATGAGATGCATATATCCCGTAAGCAAAGA <u>A</u>	375
<u>AGGAGGAT</u> GTTTTATGAACAGCAAAAAAATAGGTGCTATGATAGCAGCAGCTGTGCTGAGTTTAATTGTTATGAC	450
SD MetAsnSerLysLysIleGlyAlaMetIleAlaAlaAlaValLeuSerLeuIleValMetThr	
-43	
ACCTGCGGCAACAAAGGAAGATAGTTCAAAGGCAGACAAGAAATCTTCGACAGCAGTTGAGAACAGTGCTGCTGA	525
ProAlaAlaThrArgLysIleValGlnArgGlnThrArgAsnSerSerThrAlaValGluAsnSer <u>AlaAlaAsp</u>	
↑	
TGAGAGCGGACAGAGAATGTACCTGTTTCTCAGACACATACAAACGATACCATGACAGTGACTTCGGCAAGGA	600
<u>GluSerGluThrGluAsnValProValSerGlnThrHisThrAsnAspThrMetThrValThrSerAlaLysAsp</u>	
CCTGCTAGCAACATGACCAACCGATGCAATCTCGGAAATACTATGGATGCTACAGCTCAGCGTCTCGGATCGGA	675
LeuValAlaLysMetThrAsnGlyTrpAsnLeuGlyAsnThrMetAspAlaThrAlaGlnGlyLeuGluSerGlu	
GGTTAGCTGGCTTCTTTAAAGCTTACCACAACAAGTACATGATAGATATGCTGCCCGAAGCAGGATTCAATGT	750
ValSerTrpLeuProLeuLysValThrThrAsnLysTyrMetIleAspMetLeuProGluAlaGlyPheAsnVal	
GCTTCGTATCCCGCTAAGCTGGGGCAACCATATTATCGACGATAAGTACACCAAGTATCCTGCGTGGATGGACAG	825
LeuArgIleProValSerTrpGlyAsnHisIleIleAspAspLysTyrThrSerAspProAlaTrpMetAspArg	
AGTTCAGGAGATAGTAAACTACGGCATAGATAATGGACTTTATGTTATACTGAACACACATACCGAGGAATGGTA	900
ValGlnGluIleValAsnTyrGlyIleAspAsnGlyLeuTyrValIleLeuAsnThrHisHisGluGluTrpTyr	
TATGCCCAAGCCAGCGAGAAGGACGGCGATATTGAGGAGATCAAAGCTGTATGGGCACAGATAGCCGACCGTTT	975
MetProLysProSerGluLysAspGlyAspIleGluGluIleLysAlaValTrpAlaGlnIleAlaAspArgPhe	
CAAGGGGTATGACGAGCATCTGATATTTGAAGGACTCAACGAACCCAGACTTCGGCGGAGAGGGCGGTGAATGGAC	1050
LysGlyTyrAspGluHisLeuIlePheGluGlyLeuAsnGluProArgLeuArgGlyGluGlyAlaGluTrpThr	
AGGTACATCCGAAGCGAGAGAGATAATAAAGGACTACGAAAAAGCATTGCTTGAACAGTAAGAGCATCCGGCGG	1125
GlyThrSerGluAlaArgGluIleIleAsnGluTyrGluLysAlaPheValGluThrValArgAlaSerGlyGly	
AAACAATGGTGACAGATGCCTGATGATAACAGGCTATGCTGCATCGAGCGCATACAACAATCTTCTGCTATTGA	1200
AsnAsnGlyAspArgLysLeuMetIleThrGlyTyrAlaAlaSerSerAlaTyrAsnAsnLeuSerAlaIleGlu	
ACTTCCCGAGGACAGTGACAAGCTGATAATCTCGGTACACGCATACCTGCCTTACTCATTTCGACTGGATACAAA	1275
LeuProGluAspSerAspLysLeuIleIleSerValHisAlaTyrLeuProTyrSerPheAlaLeuAspThrLys	
GGGTACGGATAAGTATGACCGCTGAGGATACAGCTATACCTGAGCTGTTTGAGCATCTCAACGAGCTTTTCATAAG	1350
GlyThrAspLysTyrAspProGluAspThrAlaIleProGluLeuPheGluHisLeuAsnGluLeuPheIleSer	
CAAGGGCATACCTGTTATAGTAGCGGAATTCGGTACGATGAACAAGGAAAAACCGAGGACAGAGTAAATGTCT	1425
LysGlyIleProValIleValGlyGluPheGlyThrMetAsnLysGluAsnThrGluAspArgValLysCysLeu	
GGAGGATTACCTTGCAGCTCGGGCAAGTACGATATACCTGTGTATGGTGGGATAACTATGCACCGCATCGGTAA	1500
GluAspTyrLeuAlaAlaAlaAlaLysTyrAspIleProCysValTrpTrpAspAsnTyrAlaArgIleGlyAsn	
CGGACAGAAATTCGGTCTGATGAACCGTCTGATCTGGAATGGTATTCCCTGATCTGATAGAGACTTTCAAGAC	1575
GlyGluAsnPheGlyLeuMetAsnArgAlaAspLeuGluTrpTyrPheProAspLeuIleGluThrPheLysThr	
TTATGCCGAGAAGGATCCGGCATCGGCTGAATGATACACTTAAGGATATAATTATTTAAGATACCGAGCGGTGAA	1650
TyrAlaGluLysAspProAlaSerAla <u>Gly***</u>	
383	
AAAAATGTCAACAGCATTACAGAGGGCGGATATTCTTCTGCCAAAGGATACGGATATGAAAAATGGGCTGTAGTT	1725
GCCTGGCAGCAGTACACTTCTGAACCGGAATACTGGGACAGAGTTGAAAAGTACGTAGGGGATGCTAAAAGCGCC	1800
TATCATCTTATCCTGCCCGAGGTATACCTGGAACAGCGCGGACTAGATTACCGCATAGACAAGATACCGGCACA	1875
ATGAATCAATATATTGAAAAAGGCTATTGGAAGAATACAAGGATGCTATGATATATCCAGAGACTGCCAGTCC	1950
GACGGCAGACTGACAGCAGGTCTTATCGGCGGGATACCTGGAGCAGTACGAATACTACAAAGGCTCCGAATCT	2025
CAGGTAAAGGCTACGAGGCTACTGTTATCGAACGTTATACCGCCCGTATAAAGATACGCAAGGGCGCCACTGTG	2100
GACTGCCGCATATAATGATACTCATAGATGATGTGAAGAAACGCATCATTGAACCGCTGGCTGATAAGAAAGACG	2175
AATTC	2180

Fig. 1. Nucleotide and amino acid sequence of the *R. ablus* endo-1, 4- β -glucanase gene. The underlined sequences marked -35 and -10 refer to RNA polymerase recognition and binding sites, respectively. SD indicates a possible ribosome binding site. The initiation site for the transcription is indicated by a vertical arrow. The cleavage site of the signal sequence is shown by an arrowhead. Palindromic sequences in the 5' and 3' flanking regions are denoted by horizontal arrows. The stop codon is indicated by three asterisks.

Fig. 2. Restriction map showing the construction of the *R. albus* CMC-degrading enzyme gene starting with progressive N-terminal deletions and then the C-terminal deletions. Abbreviations: Plac (arrowhead), promoter of lactase in pUC vector; -35, -35 region; -10, -10 region; SD, a possible ribosome binding site; SS, signal sequence.

かにされている。この他にキシラナーゼ^{32,79)}、セロデキストリナーゼ²³⁾などの遺伝子がクローニングされている。いずれの遺伝子も *F. succinogenes* のプロモーターにより発現し SD 配列なども大腸菌において正常に機能している。

F. succinogenes S85 の *cel-3* 遺伝子はエンドグルカナーゼ活性とセロビオシダーゼ活性の両方を有している酵素蛋白質 EG 3 をコードしている⁵³⁾。この遺伝子は 1,974 bp の読枠をもちアミノ酸配列から推定した分子量は 73,400 であるが、大腸菌からのそれは 43,000⁸³⁾ とかなり小さいことから、大腸菌内で翻訳後プロテアーゼによって分解されたことがうかがえる。この大腸菌で発現した蛋白質 EG 3 を抗原とし抗体を作成してウェスタンブロット法で確認すると、*F. succinogenes* が産生する粗酵素試料中では 118,000 の分子量を持つ蛋白質として存在していることが判明した。したがって遺伝子から推定した分子量 73,400 との差は、糖が付加されているか、あるいは膜成分と会合していることなどに起因すると考えられている。この *cel-3* は *C. thermocellum* の *celC*⁷⁵⁾ と高い相同性がある。*F. succinogenes* S85 のエンドグルカナーゼ EG 1 と EG 2 はカラムクロ

マトグラフィーにより精製されており⁵¹⁾、それぞれの抗体を使った試験では、結晶性セルロースを炭素源としたときに EG 1 は早い培養時期から培地中に遊離されることが判明している。EG 2 は細胞に結合しており、EG 3 は培地と細胞結合の両面分に見いだされている⁵⁴⁾。また EG 2 はトリプシン消化により分子量 43,000 と 51,000 のペプチドに分かれ、43,000 のペプチドは結晶性セルロースに結合する。一方 51,000 のペプチドは元の EG 2 と同様な CMC に対する活性を有しているものの、結晶性セルロースに対してはその活性が半分に減ってしまう。このことからそれぞれのペプチドは基質結合ドメインと酵素触媒ドメインを形成しているものと考えられている⁵²⁾。EG 3 はまた CMC に対する活性のみならず *p*-ニトロフェニル-β-D-セロビオシドや *p*-ニトロフェニル-β-D-ラクトシドにも活性を示す⁵³⁾。この 3 つのエンドグルカナーゼ EG 1, EG 2, EG 3 の主要な基質分解物はそれぞれセロビオース、セロテトラオース、セロトリオースであり、セルロースあるいはグルコースを炭素源とした培養では 3 つの酵素はいずれも生合成されるが、セロビオースの場合には EG 1 の生成のみが抑制されることが明らかになっている⁵⁴⁾。

F. succinogenes S 85 のセロデキストリナーゼ遺伝子もクローニングされている²³⁾。このセロデキストリナーゼはセロオリゴ糖に対して活性を有しているが CMC は分解しない。大腸菌で発現した酵素と、元菌の菌体外培養濾液より精製したセロデキストリナーゼとでは同じものが得られている。この遺伝子は大腸菌内でグルコースによるカタボライト抑制を受け、セロビオースにより誘導されない。

キシラナーゼ遺伝子もクローニングされ、*F. succinogenes* S 85 の培養濾液より精製されたキシラナーゼと同じ Km 値をもつ酵素が大腸菌で発現し、その 46 % がペリプラズムに存在している⁷⁹⁾。この遺伝子は大腸菌内でカタボライト抑制を受けずキシランやキシロースにより誘導されない。*F. succinogenes* 135 からもキシラナーゼ遺伝子がクローニングされている³²⁾。この遺伝子は S 85 のものとは相同性がなく、大腸菌で発現した酵素は、元菌の菌体培養液から精製したキシラナーゼとは異なっており、むしろ高い活性を示している。

ミックスドリンケージ β -グルカナーゼ (1, 3-1, 4- β -D-Glucan 4-Glucanohydrolase) は、リケナン (β -1, 3-1, 4-グルカン) を分解するが CMC に対しては活性を示さない酵素で、これもクローニングされている⁸⁶⁾。これまでに知られている多くのグルカナーゼがリケナンをよく分解するためにリケナンだけを分解する本酵素は検出されていなかったが、クローニングによりその存在がはじめて明らかになった。本酵素遺伝子の塩基配列では⁸⁶⁾、前述の *celC* や他のグルカナーゼとの相同性は低い、*Bacillus subtilis* のリケナーゼ⁶⁰⁾ と高い相同性を示している。また特徴あるアミノ酸配列も見つかっている。これは C 末端側に存在するセリンの多い領域で、Pro-Xxx-Ser-Ser-Ser-Ser-(Ala or Val) という配列が 5 回も繰り返して連なっている構造である。この配列はコンピュータによる予想ではターン・アルファヘリックス・ターン構造をもっており、おおまかにいって基質の繰り返し構造と大きさがあうので、酵素と基質との相互作用に何らかの働きをもつであろう。しかしこの部分を削った酵素でも活性は極端に落ちないことからこの配列が全体のコンフォメーションや活性中心に対する貢献は少なく、むしろ酵素-基質複合体の安定化に働く領域と著者らは考えている⁸⁶⁾。同じルーメン細菌である *Butyrivibrio fibrisolvens* H 17 c のエンドグルカナーゼにおいても Pro-Asp-Pro-Thr-Pro-Val-Asp といった繰り返しが報告されている⁴⁾。しかし、このような繰り返し配列は他の微生物のグルカナーゼ²⁰⁾ においても一般に見られるもので、最近ではこういったプロ

リンを含む繰り返し配列はリンカー配列と呼ばれ、酵素の触媒部位とセルロースへの結合部位をつなぐヒンジの部分に共通な配列として認められるようになってきている²²⁾。(図 3)

F. succinogenes AR 1 のエンドグルカナーゼ遺伝子 *endA_{FS}* は、ユニークな塩基配列を有している^{7,8)}。この遺伝子は開始コドンから 379 bp、アミノ酸にして 127 番目にストップコドンが出てしまう。しかし一塩基だけ 5' 側にずらして重複して読み続けると分子量および途中のアミノ酸配列も実際に精製されている酵素のそれらと一致する。すなわちコードされている 2 つの読み枠 (ORF 1 と 2) が 1 塩基重複して読まれることで長い読み枠となり、一つのエンドグルカナーゼを産生していることになる。このようなフレームシフトの原因のひとつとしては、ORF 1 の終止コドンの前にある Arg と 4 つの Thr に使用頻度の少ないコドン AGG と ACA がそれぞれ使用されているためと考えられている。使用頻度の少ないコドンのアミノ酸を転移できる tRNA はその含量も少ないため、連続使用によって tRNA の枯渇が生じる。これを補うためには、使用頻度の高いコドンを使用することになり、従ってフレームシフトを起こすほうが都合がよい⁹³⁾。一方、16 S rRNA と結合する AGCGGG のような SD 配列でフレームシフトが起きることも報告されている⁹⁴⁾。*endA_{FS}* の ORF 1 の終止コドンの前には AAGGAAG という SD 配列と推定できるものも存在しているので、このこともフレームシフトの一因になっているであろう。(図 4)

3. *Ruminococcus flavefaciens*

ルーメンでの植物繊維分解に関与する主要菌種のひとつであるが、上記の *R. albus* や *F. succinogenes* に比べ報告はすくない。

R. flavefaciens FD-1 のクローニングされたエンドグルカナーゼは、大腸菌ではグルコースによるカタボライト抑制を受ないため大量に発現生産され、その大部分は大腸菌のペリプラズムに蓄積されている²⁾。また同じ株のセロデキストリナーゼ遺伝子の塩基配列が決定されている⁹⁰⁾。この遺伝子 (*celA*) は 1,056 bp で、アミノ酸 352 個からなっている。酵素は大腸菌のペリプラズムに蓄積するが、アミノ酸配列上にシグナルに相当する部分が無いので、異なる機構により分泌されると推定されている。

R. flavefaciens 17 の λ EMBL 3 のライブラリーからは 4 つの異なるキシラナーゼがクローニングされている¹⁸⁾。そのうちのひとつのクローンはキシラナーゼ活性の他にキシロシダーゼ活性と β (1, 3-1, 4) グルカナ

800 320 840 880
C GAA CCT GCT CGG CAA TCT TCT AGC AGC GCT CGG GCA TCT TCT AGC AGT GTT CCG GCA AGC TCC TCT AGC GTC CCT GCC TCC TCG AGC AGC
Glu Pro Ala Pro Gln Ser Ser Ser Ser Ala Pro Ala Ser Ser Ser Ser Val Pro Ala Ser Ser Ser Ser Val Pro Ala Ser Ser Ser Ser
270 280 290
900 920
GCA TTT GTT CCG CCG AGC TCC TCG AGC GCC ACA AAC GCA ATC
Ala Phe Val Pro Pro Ser Ser Ser Ser Ala Thr Asn Ala Ile
300 310

Mixed-linkage β -glucanase gene of F. succinogenes S85

1220 TC CCT TCA ACT GAG CAG CCA GAT CCT ACA CCG GTA GAT CCA GAT CCA ACA CCG GTA GAT CCG GAC CCA ACA CCG GTA GAC
 Pro Ser Thr Gln Gln Pro Asp Pro Thr Pro Val Asp Pro Asp Pro Thr Pro Val Asp Pro Asp Pro Thr Pro Val Asp
 410 420 430

1300 CCA GAT CCT ACA CCT GTA GAC CCG GAT CCA CAG CCT GTA GAT CCT ACT CCT GTA TCC GGC
 Pro Asp Pro Thr Pro Val Asp Pro Asp Pro Gln Pro Val Asp Pro Thr Pro Val Ser Gly
 440 450

Endoglucanase gene of *B.fibrisolvens* H17c

Fig. 3. Partial nucleotide sequences of the direct repeats from *Fibrobacter succinogenes*⁽⁸⁶⁾ and *Butyrivibrio fibrisolvens*.⁽⁴⁾ Repeat sequences are underlined.

700 720 740 760
ORF-1 Ser Thr Thr Phe Ile Leu Val Thr Thr Pro Thr Thr Arg Lys Pro Thr Thr Thr Pro STOP
T TCT AGC ACC TTT ATA CTG GTG ACT ACA CCG ACT ACA AGG AAG CCA ACA ACT ACA CCA TGA AG AGC GGT AAG CCC AAC AAG CTG CGT
ORF-2 Met Lys Ser Glu Lys Pro Asn Lys Val Arg

Fig. 4. Nucleotide sequence of a putative frame-shift region of endoglucanase gene of *F. succinogenes* AR 1.⁸⁾ A proline and threonine-rich region of ORF-1 is underlined. Potential Shine-Dalgarno sequence for ORF-2 is double underlined.

—ゼ活性をも発現している.

4. その他

(1) *Prevotella* (*Bacteroides*) *ruminicola*

この菌種も再分類が行なわれ *Prevotella* 属が提案されている⁷⁶⁾。*Bacteroides ruminicola* はセロビオースをはじめ低分子のセルロース分解物(セロデキストリン)を利用できるものの、ボールミルセルロースなどの高分子セルロースを炭素源としては生育できない菌種である。

B. ruminicola AR 20 からエンドグルカナーゼ遺伝子がクローニングされている¹⁰⁾。この遺伝子により大腸菌でつくられたエンドグルカナーゼはキシランにも活性を示しており、デレーションによる変異では、この2つの活性が同一遺伝子上にあることが示されている。

B. ruminicola B₁4 のエンドグルカナーゼもクロニングされ⁴⁸⁾、塩基配列が決定されている⁴⁹⁾。この菌の遺伝子の場合にも上述のように、はじめの ORF は比較的短く、すぐにストップコドンがあらわれる。しかし大腸菌で生産されるエンドグルカナーゼは分子量 40,500 である。その上この蛋白質の抗体で *B. ruminicola* B₁4 の培養上清を調べるとさらに大きな 88,000 と 82,000 の蛋白質が存在し、これら二つの蛋白質の N 末端のアミノ酸配列はそれぞれ初めの ORF と二番目の ORF に存在していた。これら分子量の異なる 3 つの酵素が同一の遺伝子にコードされており、CMC やキシランに対しても同程度の活性を示すこと、さらに 40,500 の蛋白質に対する抗体が 88,000 と 82,000 の蛋白質と強く反応することから、これら 3 つの蛋白質の C 末端側は同一

であろうと推定されている⁴⁹⁾。

B. ruminicola 23 のキシラナーゼ遺伝子もクローニングされている⁹⁵⁾。このキシラナーゼ遺伝子は、*Bacteroides* のシャトルベクターを用いて、ルーメン細菌ではない *Bacteriodes fragilis*⁹⁶⁾, *B. uniformis*⁹⁶⁾, *B. thetaiotaomicron*⁹⁷⁾ で発現している。 *B. thetaiotaomicron* では、この遺伝子がさらに染色体上に移され、安定なキシラナーゼ活性を発現している⁹⁷⁾。一方 *B. ruminicola* D 31 d のキシラナーゼ遺伝子もクローニングされている⁹⁸⁾。しかしこの遺伝子はサザンハイブリダイゼーション法での比較では *B. ruminicola* 23 のキシラナーゼ遺伝子とは全く異なる塩基配列を有していることが明らかとなっている。

(2) *Butyrivibrio fibrisolvens*

ルーメン中でキシランの分解に関与している *B. fibrisolvens* GS 113 のキシロシダーゼ遺伝子はクローニングされ⁷⁷⁾、塩基配列を決定され⁸⁹⁾、1,551 bp、アミノ酸 517 個より構成されていることが明らかとなっている。大腸菌で生産された本遺伝子の酵素は、 β -D-キシロシダーゼ活性と α -L-アラビノフラノシダーゼ活性の二つの機能をもっている。またこの遺伝子には自身のプロモーターが含まれていないために pUC 18 の *lac* プロモーターの下流に組み込んだ時のみ活性を示すことと、ターミネーターが無く、すぐ下流に SD 配列と次の ORF が存在する事実から、この遺伝子はある種のオペロンの一部分だと予想されているが⁸⁹⁾、その全体の特性はまだ不明である。

B. fibrisolvens 49 の産生する二つのキシラナーゼの

うちのひとつがクローニングされ、塩基配列が決められており、推定されるアミノ酸 411 個で構成されている⁴⁵⁾。この酵素はセルラーゼ、アラビノシダーゼ、およびキシロシダーゼ活性を示さないエンド型キシラナーゼであることが明らかにされている。

B. fibrisolvens H 17 c のセロデキストリナーゼ遺伝子がクローニングされ塩基配列が決定されている⁵⁾。本遺伝子 (*ced 1*) は、1,641 bp、アミノ酸 547 個からなっており、*C. thermocellum* のエンドグルカナーゼ D³⁷⁾ と相同性があることが明らかになっている。この株のエンドグルカナーゼについてもクローニングされ塩基配列が決定されている⁴⁾。エンドグルカナーゼ *end 1* 遺伝子は 1,641 bp、アミノ酸 547 個より構成されており、大腸菌で生産された本遺伝子の酵素は、CMC のみならずキシランに対しても活性を有している。種類の酵素蛋白質が 2 つの活性を発現できるためには、活性部位がどのような構造になっており、どのような作用機作で発現するかといった点は興味ある問題として残されている。

また *B. fibrisolvens* A 46 のエンドグルカナーゼ遺伝子 (*celA*) は、1,296 bp でアミノ酸 432 個からなっている²⁶⁾。大腸菌で生産された本遺伝子の酵素は、H 17 c のエンドグルカナーゼと同様な基質特異性を示したにもかかわらず構造的には相同性を持たないことが明らかにされている。

以上のようにルーメン菌が産生する植物繊維分解系の多くの酵素がクローニングされており、それらのうち塩基配列の決定されているものについては表 2 にまとめた。

Table 2. The sequenced genes encoding β -glycan-degrading enzymes from rumen bacteria

Bacterium	Gene(bp)	Enzyme	References
<i>Ruminococcus albus</i> F-40	<i>egl</i> (1,218)	Endoglucanase	67
<i>R. albus</i> F-40	<i>bg11</i> (2,841)	β -Glucosidase	82
<i>R. albus</i> SY3	<i>celA</i> (1,095)	Endoglucanase	71
<i>R. albus</i> SY3	<i>celB</i> (1,227)	Endoglucanase	71
<i>R. flavefaciens</i> FD-1	<i>celA</i> (1,056)	Cellodextrinase	90
<i>Fibrobacter succinogenes</i> S85	<i>cel3</i> (1,974)	Endoglucanase	53
<i>F. succinogenes</i> S85	(1,047)	Lichenase	86
<i>F. succinogenes</i> AR-1	<i>endA</i> _{FS}	Endoglucanase	8
<i>Bacteroides ruminicola</i> B14		Endoglucanase	49
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> 49	<i>xynA</i> (1,233)	Xylanase	45
<i>B. fibrisolvens</i> GS113	<i>xy1B</i> (1,551)	Xylosidase	89
<i>B. fibrisolvens</i> H17c	<i>end1</i> (1,641)	Endoglucanase	4
<i>B. fibrisolvens</i> H17c	<i>ced1</i> (1,641)	Cellodextrinase	5
<i>B. fibrisolvens</i> A46	<i>celA</i> (1,296)	Endoglucanase	26

各種の遺伝子が大腸菌で発現されているが、クローニング手法の特性から、大腸菌で発現しやすいが実際には元菌で発現していない酵素遺伝子のみを採っている可能性もあることを忘れてはならない。事実われわれが使用している *R. albus* の場合でも、その培養上清に遊離されてくるメジャーな酵素をコードしている遺伝子は、大腸菌を用いるクローニング法では未だに単離できていない。クローニングされてくるのは元菌での発現量の少ないいわゆる代替用の半休眠遺伝子かもしれない。いいかえれば大腸菌内で働きうるプロモーターの下流にある構造遺伝子のみが発現している可能性がある。すなわち *R. albus* で常時発現している遺伝子はむしろ大腸菌という異種菌体では発現しにくいような何らかの機構をもっているであろう。したがって大腸菌以外の宿主を用いれば、別の遺伝子をクローニングできる可能性もある。例えば *R. albus* はグラム陽性菌であるので、グラム陰性の大腸菌よりも枯草菌や *Streptococcus* といったグラム陽性菌を宿主としてクローニングを試みることも必要と思われる。

実際に遺伝子が元菌で発現しているか否かは、大腸菌で産生した酵素に対して作成した抗体を用いた免疫反応で容易に識別できる。この試験によれば元菌で発現している酵素の分子量に比べ大腸菌で産生した酵素のそれは小さい場合が多い。これは大腸菌内で生成された異種遺伝子産物が異種蛋白質として認識された結果、大腸菌プロテアーゼにより蛋白質分解を受けたと予想される。この他の理由としては元菌で産生された酵素蛋白質がグリコシテーションなどの修飾をうけているのに大腸菌では全くないためである。こういった遺伝子レベルの知識を増やすことが、ルーメン細菌の改良に重要であると考えている。さらにクローニングされた遺伝子は *in vitro* での変異遺伝子の作成が可能であるため、より活性の強い酵素をコードする遺伝子の構築をすることもできる。そうすれば次のステップとしては、この構築遺伝子を元の親株にもどし安定に発現させる方法が必要になる。

ルーメン細菌への遺伝子の導入

ルーメン細菌のセルロース分解機能の改良にかかわる遺伝子の導入は、現在のところ大腸菌や枯草菌を用いる基本的手法で試みられている。その概略を以下に述べる。

1. プラスミドを利用する方法

プラスミドを遺伝子の運び屋（ベクター）として利用する方法は大腸菌で最も進んでおり、利用し易い特徴を持った種々のプラスミドが構築されて市販されている。プラスミドはそれ自身に複製領域を持っているので、ホス

トへ安定に導入さえできればプラスミドに組み込まれた遺伝子は発現し形質転換しやすい。しかしプラスミドの複製機構の違いから大腸菌のプラスミドをそのままルーメン細菌の形質転換には利用できない。したがって、ルーメン細菌の形質転換にはルーメン細菌のプラスミドをベクターとして使用することが望ましく、このためルーメン細菌の保有するプラスミドの検索が行なわれている。すでにルーメン細菌からいくつかの小型プラスミドが発見され単離されているが、いずれも形質が不明ないいわゆる「クリプティック」プラスミドである。*R. albus* の6株および *R. flavefaciens* の2株より各1種類のプラスミドが分離されている¹⁾。そのいずれれもがクリプティックである。このうちの *R. flavefaciens* から得られた pRfl 186 は 5.2 kbp の大きさでベクターとして利用できる可能性を持っている。また *R. albus* F-40 は 15.3 と 7 kbp の大きさの2種類のプラスミドをもっている⁶⁹⁾。7 kbp の pRAB は *Bam*HI, *Pst*I により1カ所のみの切断サイトを保持しているのでベクターとして利用できる可能性をもっている。*Selenomonas ruminantium* HD-4 からは 4.8 kbp のプラスミドが⁴⁷⁾、また *S. ruminantium* の分離菌株からは6種類のプラスミドが単離されている⁶¹⁾。*Butyrivibrio fibrisolvens* からは非常に大きなプラスミド⁸⁴⁾と 2.7 kbp の pOM1⁴⁴⁾ が分離されている。pOM1 からは種々の大腸菌レプリコンとの組合せによりマーカーとして抗生物質耐性をもったベクターが構築されているが、親株の形質転換は難しいようである。こういったプラスミドの複製領域のみを取り出し大腸菌で利用できるプラスミドにつなぐことによる、シャトルベクターの開発が現在進められている基本的な戦略であろうが、まだ具体的な進展はみられていない。最近になり *in vitro* で作成したプラスミドを宿主菌に導入するための手段として、電気穿孔法（エレクトロポレーション）の研究が進められている^{14,43)}。ルーメン細菌には抗生物質耐性を有するものが見つかっており、これらの遺伝子をマーカーとして利用できる可能性がある^{9,17)}。

2. ファージを利用する方法

ルーメン細菌に感染するファージの存在については報告があるものの^{38,39,62)}、ルーメン細菌の遺伝子組換えに有用なファージは、現在まだ発見されていない。

3. 接合伝達を利用する方法

プラスミドの接合伝達はその分子サイズが比較的大きな場合に起きる現象で、そのプラスミド保有株を、もっていない株と接合させることによりプラスミドを伝達させる方法である。

Bacteroides rumenicola 233/M 2/7 は多数のプラスミドをもつテトラサイクリン耐性株である。この株のテトラサイクリン耐性遺伝子をもつ 19.5 kbp のプラスミド pRRI 4 を接合伝達¹⁷⁾ およびエレクトロポレーション⁸⁸⁾ の両方法により *B. rumenicola* を形質転換しテトラサイクリン耐性を付与することに成功している。このプラスミドをベクターとして利用できる可能性がでてきている。しかし大腸菌で複製しないことと若干分子量が大きい点でベクターとしては難点がある。

腸内細菌 *Bacteroides uniformis* のプラスミド pRDB 5 はルーメン細菌 *Prevotella rumenicola* B₁ 4 に接合伝達されている⁷⁸⁾。このプラスミドは大腸菌のベクター pBR 328 の一部、腸内細菌 *Bacteroides* 属のクリプティックプラスミド pB 8-51 とテトラサイクリン耐性遺伝子より構築されており、大腸菌においても複製できる。しかしなぜか pBDB 5 はエレクトロポレーションでは形質転換できないが、大腸菌からプラスミド R 751 による可動化により *B. uniformis* へ移すことに成功している。*B. uniformis* から *P. rumenicola* へは、染色体上の可動要素により可動する。従って大腸菌からルーメン細菌へ遺伝子を直接移動させることはできないが、腸内細菌 *B. uniformis* を経由して大腸菌よりルーメン細菌へ遺伝子を移動できる。

Butyrivibrio fibrisolvens に *Enterococcus faecalis* から接合伝達により pAM β 1 とトランスポゾン Tn 916 が移されている³⁰⁾。

Bacteroides rumenicola のキシラナーゼ遺伝子が腸内細菌 *B. thetaiotaomicron* の染色体上に移され発現に成功している⁹⁷⁾。大腸菌で組換えた遺伝子を R 751 を使用して *B. thetaiotaomicron* に導入したプラスミド pBTX 1 (大腸菌発現ベクター pUC 18 にキシラナーゼ遺伝子を組み込んだもので *Bacteroides* 内で複製できるレプリコンを持っていない) が、菌体内で相同組換えにより染色体に組み込まれたものである。また同様に導入された複製領域をもつ pVAL-RX のキシラナーゼ活性は、約 60 世代後ではプラスミドをほとんど落とし失活してしまったが、染色体に取り込んだほうは、安定に保持されることが示されている。

ルーメン細菌の植物繊維への吸着と分解

ルーメンに取り込まれた植物繊維が分解可溶化される過程においては、まずルーメン細菌が繊維に吸着する必要があることはこれまでの電子顕微鏡観察⁶²⁾でも明示されている。したがって植物繊維の分解効率の向上を考える時、これまで述べてきたルーメン細菌のセルロース

分解酵素の生産能力を増幅することの他にルーメン細菌の繊維への吸着能力を高めるための研究をも進める必要がある。すなわち基質である植物繊維へのルーメン細菌の吸着能力を支配する因子を明確にし、特性を明らかにする必要がある。これまでの研究で吸着現象については電子顕微鏡による観察結果に加え、最近いくつかの生化学的情報が得られている。しかし吸着に関する因子の遺伝子のクローニングなど遺伝子レベルでの研究は今のところ全くないので、今後こういった方面での研究に資するために、これまでに報告されているルーメン菌の繊維への吸着特性に関するデータを以下に紹介する。

エンドグルカナーゼを生産しているにもかかわらずセルロース資化能が低い *R. albus* の菌株は、セルロースへの吸着能が少ないことが示されていることから、吸着とセルロース分解能とは密接に関連していることは容易に理解できる⁵⁷⁾。*R. albus* をセルロースを主炭素源とする培地で連続培養するときに、3-フェニルプロパン酸の添加によって *R. albus* のセルロース分解が明らかに促進されることが示されている⁵⁹⁾。このとき *R. albus* 菌体のセルロース繊維への吸着が顕著に増加していることが観察されている。具体的には *R. albus* のセルロースへの吸着能は pH 5.5 から 8 まであまり変化はないが、5 以下で著しく低下する一方、メチルセルロースや CMC などの基質類似体やある種の高分子リグニン化合物によって強く阻害されることも報告されている⁵⁸⁾。ちなみにクマリン酸などリグニン由来のフェノール系化合物は *B. rumenicola* の生育を阻害し、*B. succinogenes* の β -グルコシダーゼを強く阻害する⁴⁶⁾。

メチルセルロースは菌体のセルロースへの吸着を阻害し⁵⁵⁾、一度吸着した菌体を遊離させる作用を有している。これを利用して一度菌体をセルロースへ吸着させた後、遊離させたあとを電子顕微鏡で観察すると *F. succinogenes* では規則的な筋状の溝がセルロース繊維上に残存しているが、*R. flavefaciens* ではそのような溝は検出されていない。このことは菌種によって吸着の状態や酵素分解の様式に違いがあることを示唆している⁴⁰⁾。(図 5) 大麦わらへの吸着の程度も調べられている。*F. succinogenes* と *R. flavefaciens* それぞれの最大吸着菌体量を求め、次いで両者の混合菌液に大麦わらをひたし充分吸着させたところ、両菌株とも単独の場合で得られた菌体量とほぼ同じ吸着量が得られていることから、これら 2 種のルーメン菌のわらへの吸着には、それぞれの菌株の異なる吸着領域が働いているものと考えられる⁶⁾。

R. flavefaciens FD 1 のセルロースへの付着はホル

Fig. 5. SEM of Whatman no. 1 filter paper incubated with cellulolytic bacteria.⁴⁰⁾ Adherence (A) and detachment (B) of *Bacteroides succinogenes*. Adherence (C) and detachment (D) of *Ruminococcus flavefaciens*. Control (E).

ムアルデヒド、メチルセルロース、CMC により阻害される⁷²⁾。また *F. succinogenes* S 85 の結晶性セルロースへの付着は、熱処理、グルタルアルデヒド、トリプシン、プロナーゼにより阻害される²⁴⁾。また結晶性セルロースへの付着能を失った3つのグループの変異株が得られている。これらの変異株はエンドグルカナーゼやセロビオシダーゼなどの酵素活性に変化はないが、クラス1変異株はグルコース、セロビオース、アモルファスセルロース及び結晶性セルロースで生育できるのに対し、一方クラス2ではセロビオースと結晶性セルロースで生育できず、クラス3ではグルコースとセロビオースでしか生育できないなどの差異が生じている。このことは結晶性セルロースへの吸着にある種の特異的な蛋白質が関与

していることを示している²⁴⁾。

C. thermocellum で知られているセルロース複合体「セルロソーム」と同様な突起がルーメン細菌の細胞表面に見つかっており⁴¹⁾、これら突起物に含まれるある種の蛋白質がセルロースへの菌体の吸着を司っていると考えられている。この考えにもとづいて、パスツール研究所の Beguin 一派は、これらの吸着に關与する蛋白質遺伝子の *C. thermocellum* からのクローニングに成功し、塩基配列の決定を急いでいるとの私信を得ている。今後この種の研究が進むに従って、ルーメン菌の繊維質への吸着のメカニズムが解明されれば、難分解性の植物繊維の可溶化を遺伝子操作技術でさらに促進することになるであろう。

おわりに

はじめにもふれたように、ルーメン細菌の遺伝子レベルでの研究は始まったところであるが、その進展にはめざましいものがある。この種の研究で得られる成果は、ルーメンでの植物繊維の分解効率を上げるにとどまらず、その応用範囲は広くルーメン内での様々な現象の解明に利用できると思われる。ルーメン細菌のセルラーゼやキシラナーゼ関連の諸酵素遺伝子、あるいは植物繊維への吸着に関わっている蛋白質の遺伝子を導入し、植物繊維分解能を著しく高めたルーメン細菌を遺伝子工学の技術で新たに育種することがわれわれに課された当面の大きな問題である。目的にかなったルーメン細菌を育種することに成功したあかつきにはこれら組換え菌が「微生物のつば」とも言えるルーメンの中で、先住の原生動物を始めとするばう大な種類の微生物群と共存し主要な菌叢となりうるか否かが、次に解決しなければならない問題である。ついで組換え菌が反すう動物の生育にいかなる影響をもたらすかも問題となろう。このような各種の難関を克服することにより、太陽エネルギーを豊富に蓄積している植物繊維の利用効率を高め、高級な食料の増産が可能になるであろう。このためには畜産学の幅広い分野の研究者との共同研究を必要とする。

ルーメン細菌の遺伝子の組換えに関する研究は、アメリカ、カナダ、イギリス、南アフリカ、オーストラリア、ニュージーランドなどの畜産先進国で活発に行なわれていることは、ここで紹介したとおりである。わが国においてもこの種の研究に関心を持たれる研究者が益々増えることを期待してやまない。

最後に本総説を書く機会を与えていただいた三重大学生物資源学部星野貞夫教授並びに東北大学農学部佐々木康之教授に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) ASMUNDSON, R.V. and W.J. KELLY, Isolation and characterization of plasmid DNA from *Ruminococcus*. *Curr. Microbiol.*, **16**: 97-100. 1987.
- 2) BARROS, M.E.C. and J.A. THOMSON, Cloning and expression in *Escherichia coli* of a cellulase gene from *Ruminococcus flavefaciens*. *J. Bacteriol.*, **169**: 1760-1762. 1987.
- 3) BEGUIN, P., J. MILLET, O. GREPINET, A. NAVARRO, M. JUY, A. AMIT, R. POLJAK and J.P. AUBERT, The *cel* (cellulose degradation) genes of *Clostridium thermocellum*. *Biochemistry and genetics of*

cellulose degradation. (J.P. AUBERT, P. BEGUIN and J. MILLET eds.) 267-282. Academic Press Inc. San Diego. 1988.

- 4) BERGER, E., W.A. JONES, D.T. JONES and D.R. WOODS, Cloning and sequencing of an endoglucanase (*end1*) gene from *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c. *Mol. Gen. Genet.*, **219**: 193-198. 1989.
- 5) BERGER, E., W.A. JONES, D.T. JONES and D.R. WOODS, Sequencing and expression of a cellodextrinase (*ced1*) gene from *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c cloned in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **223**: 310-318. 1990.
- 6) BHAT, S., R.J. WALLACE and E.R. ØRSKOV, Adhesion of cellulolytic ruminal bacteria to barley straw. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 2698-2703. 1990.
- 7) CAVICCHIOLI, R. and K. WATSON, Molecular cloning, expression, and characterization of endoglucanase genes from *Fibrobacter succinogenes* AR1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 359-365. 1991.
- 8) CAVICCHIOLI, R., P.D. EAST and K. WATSON, *endA_{FS}*, a novel family E endoglucanase gene from *Fibrobacter succinogenes* AR1. *J. Bacteriol.*, **173**: 3265-3268. 1991.
- 9) CHAMPION, K.M., C.T. HELASZEK and B.A. WHITE, Analysis of antibiotic susceptibility and extrachromosomal DNA content of *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *Can. J. Microbiol.*, **34**: 1109-1115. 1988.
- 10) CHENG, K.J., C.W. FORSBERG, H. MINATO and J.W. COSTERTON, Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen: Proceedings of the seventh international symposium on ruminant physiology. (T. TSUDA, Y. SASAKI and R. KAWASAKI eds) 595-624. Academic Press, Inc. San Diego and the Government of Canada. 1991.
- 11) COTTA, M.A., Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**: 772-776. 1988.
- 12) CROSBY, B., B. COLLIER, D.Y. THOMAS, R.M. TEATHER and J.D. ERFLE, Cloning and expression in *Escherichia coli* of cellulase genes from *Bacteroides succinogenes*: Fifth Canadian Bioenergy R & D Seminar. (S. HASNAIN eds) 573-576. Elsevier Applied Science Publications, Amsterdam, Netherlands. 1984.

- 13) DEGUCHI, H., Y. WATANABE, T. SASAKI, T. MATSUDA, S. SHIMIZU and K. OHMIYA, Purification and properties of the endo-1, 4- β -glucanase from *Ruminococcus albus* and its gene products in *Escherichia coli*. J. Ferment. Bioeng., **71**: 221-225. 1991.
- 14) DOWER, W.J., J.F. MILLER and C.W. RAGSDALE, High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res., **16**: 6127-6145. 1988.
- 15) ERFLE, J.D., R.M. TEATHER, P.J. WOOD and J.E. IRVIN, Purification and properties of a 1, 3-1, 4- β -D-glucanase (lichenase, 1, 3-1, 4- β -D-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.73) from *Bacteroides succinogenes* cloned in *Escherichia coli*. Biochem. J., **255**: 833-841. 1988.
- 16) ERFLE, J.D. and R.M. TEATHER, Isolation and properties of a (1, 3)- β -D-glucanase from *Ruminococcus flavefaciens*. Appl. Environ. Microbiol., **57**: 122-129. 1991.
- 17) FLINT, H.J., A.M. THOMSON and J. BISSET, Plasmid-associated transfer of tetracycline resistance in *Bacteroides rumenicola*. Appl. Environ. Microbiol., **54**: 855-860. 1988.
- 18) FLINT, H.J., C.A. MCPHERSON and J. BISSET, Molecular cloning of genes from *Ruminococcus flavefaciens* encoding xylanase and β (1-3, 1-4) glucanase activities. Appl. Environ. Microbiol., **55**: 1230-1233. 1989.
- 19) FORSBERG, C.W., B. CROSBY and D.Y. THOMAS, Potential for manipulation of the rumen fermentation through the use of recombinant DNA techniques. J. Anim. Sci., **63**: 310-325. 1986.
- 20) FUKUMORI, F., N. SASHIHARA, T. KUDO and K. HORIKOSHI, Nucleotide sequences of two cellulase genes from alkalophilic *Bacillus* sp. strain N-4 and their strong homology. J. Bacteriol., **168**: 479-485. 1986.
- 21) GARDNER, R.M., K.C. DOERNER and B.A. WHITE, Purification and characterization of an exo- β -1, 4-glucanase from *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. J. Bacteriol., **169**: 4581-4588. 1987.
- 22) GILKES, N.R., B. HENRISSAT, D.G. KILBURN, R.C. MILLER, Jr. and R.A.J. WARREN, Domains in microbial β -1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. Microbiol. Rev., **55**: 303-315. 1991.
- 23) GONG, J., R.Y.C. LO and C.W. FORSBERG, Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a cellodextrinase gene from *Bacteroides succinogenes* S85. Appl. Environ. Microbiol., **55**: 132-136. 1989.
- 24) GONG, J. and C.W. FORSBERG, Factors affecting adhesion of *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85 and adherence-defective mutants to cellulose. Appl. Environ. Microbiol., **55**: 3039-3044. 1989.
- 25) HALL, J., G.P. HAZLEWOOD, P.J. BARKER and H.J. GILBERT, Conserved reiterated domains in *Clostridium thermocellum* endoglucanases are not essential for catalytic activity. Gene, **69**: 29-38. 1988.
- 26) HAZLEWOOD, G.P., K. DAVIDSON, J.I. LAURIE, M.P.M. ROMANIEC and H.J. GILBERT, Cloning and sequencing of the *celA* gene encoding endoglucanase A of *Butyrivibrio fibrisolvens* strain A 46. J. Gen. Microbiol., **136**: 2089-2097. 1990.
- 27) HESPELL, R.B., Biotechnology and modifications of the rumen microbial ecosystem. Proc. Nutr. Soc., **46**: 407-413. 1987.
- 28) HESPELL, R.B., R. WOLF and R.J. BOTHAST, Fermentation of xylans by *Butyrivibrio fibrisolvens* and other ruminal bacteria. Appl. Environ. Microbiol., **53**: 2849-2853. 1987.
- 29) HESPELL, R.B. and P.J. O'BRYAN-SHAH, Esterase activities in *Butyrivibrio fibrisolvens* strains. Appl. Environ. Microbiol., **54**: 1917-1922. 1988.
- 30) HESPELL, R.B. and T.R. WHITEHEAD, Conjugal transfer of Tn 916, Tn 916 Δ E, and pAM β 1 from *Enterococcus faecalis* to *Butyrivibrio fibrisolvens* strains. Appl. Environ. Microbiol., **57**: 2703-2709. 1991.
- 31) HOWARD, G.T. and B.A. WHITE, Molecular cloning and expression of cellulase genes from *Ruminococcus albus* 8 in *Escherichia coli* bacteriophage λ . Appl. Environ. Microbiol., **54**: 1752-1755. 1988.
- 32) HU, Y.J., D.C. SMITH, K.J. CHENG and C.W. FORSBERG, Cloning of a xylanase gene from *Fibrobacter succinogenes* 135 and its expression in *Escherichia coli*. Can. J. Microbiol., **37**: 554-561. 1991.
- 33) HUANG, L. and C.W. FORSBERG, Isolation of a cellodextrinase from *Bacteroides succinogenes*. Appl. Environ. Microbiol., **53**: 1034-1041. 1987.
- 34) HUANG, L. and C.W. FORSBERG, Purifica-

- tion and comparison of the periplasmic and extracellular forms of the cello-dextrinase from *Bacteroides succinogenes*. Appl. Environ. Microbiol., **54**:1488-1493. 1988.
- 35) HUANG, L., C.W. FORSBERG and D.Y. THOMAS, Purification and characterization of a chloride-stimulated cellobiosidase from *Bacteroides succinogenes* S85. J. Bacteriol., **170**: 2923-2932. 1988.
- 36) IRVIN, J.E. and R.M. TEATHER, Cloning and expression of a *Bacteroides succinogenes* mixed-linkage β -glucanase (1, 3-1, 4- β -D-glucane 4-glucanohydrolase) gene in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., **54**: 2672-2676. 1988.
- 37) JOLIFF, G.J., P. BEGUIN and J.P. AUBERT, Nucleotide sequence of the cellulase gene *celD* encoding endoglucanase D of *Clostridium thermocellum*. Nucleic Acids Res., **14**: 8605-8613. 1986.
- 38) KLIEVE, A.V., J.F. HUDMAN and T. BAUCHOP, Inducible bacteriophages from ruminal bacteria. Appl. Environ. Microbiol., **55**: 1630-1634. 1989.
- 39) KLIEVE, A.V., K. GREGG and T. BAUCHOP, Isolation and characterization of lytic phages from *Bacteroides ruminicola* ss *brevis*. Curr. Microbiol., **23**: 183-187. 1991.
- 40) KUDO, H., K.J. CHENG and J.W. COSTERTON, Electron microscopic study of the methylcellulose-mediated detachment of cellulolytic rumen bacteria from cellulose fibers. Can J. Microbiol., **33**: 267-272. 1987.
- 41) LAMED, R., J. NAIMARK, E. MORGENSTERN and E.A. BAYER, Specialized cell surface structures in cellulolytic bacteria. J. Bacteriol., **169**: 3792-3800. 1987.
- 42) LEWIN, B., Genes IV. 451-462. Oxford Univ. Press, New York and Cell Press, Cambridge. 1990.
- 43) LUCHANSKY, J.B., P.M. MURIANA and T.R. KLAENHAMMER, Application of electroporation for transfer of plasmid DNA to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Propionibacterium*. Mol. Microbiol., **2**: 637-646. 1988.
- 44) MANN, S.P., G.P. HAZLEWOOD and C.G. ORPIN, Characterization of a cryptic plasmid (pOM1) in *Butyrivibrio fibrisolvens* by restriction endonuclease analysis and its cloning in *Escherichia coli*. Curr. Microbiol., **13**: 17-22. 1986.
- 45) MANNARELLI, B.M., S. EVANS and D. LEE, Cloning, sequencing, and expression of a xylanase gene from the anaerobic ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*. J. Bacteriol., **172**: 4247-4254. 1990.
- 46) MARTIN, S.A. and D.E. AKIN, Effect of phenolic monomers on the growth and β -glucosidase activity of *Bacteroides ruminicola* and on the carboxymethylcellulase, β -glucosidase, and xylanase activities of *Bacteroides succinogenes*. Appl. Environ. Microbiol., **54**: 3019-3022. 1988.
- 47) MARTIN, S.A. and R.G. DEAN, Characterization of a plasmid from the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. Appl. Environ. Microbiol., **55**: 3035-3038. 1989.
- 48) MATSUSHITA, O., J.B. RUSSELL and D.B. WILSON, Cloning and sequencing of a *Bacteroides ruminicola* B₁₄ endoglucanase gene. J. Bacteriol., **172**: 3620-3630. 1990.
- 49) MATSUSHITA, O., J.B. RUSSELL and D.B. WILSON, A *Bacteroides ruminicola* 1, 4- β -D-endoglucanase is encoded in two reading frames. J. Bacteriol., **173**: 6919-6926. 1991.
- 50) McDERMID, K.P., C.R. MACKENZIE and C. W. FORSBERG, Esterase activities of *Fibrobacter succinogenes* S85. Appl. Environ. Microbiol., **56**: 127-132. 1990.
- 51) McGAVIN, M. and C.W. FORSBERG, Isolation and characterization of endoglucanases 1 and 2 from *Bacteroides succinogenes* S85. J. Bacteriol., **170**: 2914-2922. 1988.
- 52) McGAVIN, M. and C.W. FORSBERG, Catalytic and substrate-binding domains of endoglucanase 2 from *Bacteroides succinogenes*. J. Bacteriol., **171**: 3310-3315. 1989.
- 53) McGAVIN, M.J., C.W. FORSBERG, B. CROSBY, A.W. BELL, D.DIGNARD and D.Y. THOMAS, Structure of the *cel-3* gene from *Fibrobacter succinogenes* S85 and characteristics of the encoded gene product, endoglucanase 3. J. Bacteriol., **171**: 5587-5595. 1989.
- 54) McGAVIN, M., J. LAM and C.W. FORSBERG, Regulation and distribution of *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85 endoglucanases. Appl. Environ. Microbiol., **56**:

- 1235-1244. 1990.
- 55) MINATO, H. and T. SUTO, Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystem. II. Attachment of bacteria isolated from bovine rumen to cellulose powder *in vitro* and elution of bacteria attached therefrom. J. Gen. Appl. Microbiol., **24**: 1-16. 1978.
 - 56) MONTGOMERY, L., B.A. FLESHER and D.A. STAHL, Transfer of *Bacteroides succinogenes* (Hungate) to *Fibrobacter* gen. nov. as *Fibrobacter succinogenes* comb. nov. and description of *Fibrobacter intestinalis* sp. nov. Int. J. Sys. Bacteriol., **38**: 430-435. 1988.
 - 57) MORRIS, E.J. and O.J. COLE, Relationship between cellulolytic activity and adhesion to cellulose in *Ruminococcus albus*. J. Gen. Microbiol., **133**: 1023-1032. 1987.
 - 58) MORRIS, E.J., Characteristics of the adhesion of *Ruminococcus albus* to cellulose. FEMS Microbiol. Lett., **51**: 113-118. 1988.
 - 59) MORRISON, M., R.I. MACKIE and A. KISTNER, 3-Phenylpropanoic acid improves the affinity of *Ruminococcus albus* for cellulose in continuous culture. Appl. Environ. Microbiol., **56**: 3220-3222. 1990.
 - 60) MURPHY, N., D.J. MCCONNELL and B.A. CANTWELL, The DNA sequence of the gene and genetic control sites for the excreted *B. subtilis* enzyme β -glucanase. Nucleic Acids Res., **12**: 5355-5367. 1984.
 - 61) NING, Z., G.T. ATTWOOD, R.A. LOCKINGTON and J.D. BROOKER, Genetic diversity in ruminal isolates of *Selenomonas ruminantium*. Curr. Microbiol., **22**: 279-284. 1991.
 - 62) OGIMOTO, K. and S. IMAI, Atlas of rumen microbiology. 71-125. Japan Scientific Societies Press, Tokyo. 1981.
 - 63) OHMIYA, K., M. SHIMIZU, M. TAYA and S. SHIMIZU, Purification and properties of cellobiosidase from *Ruminococcus albus*. J. Bacteriol., **150**: 407-409. 1982.
 - 64) OHMIYA, K., M. SHIRAI, M. KURACHI and S. SHIMIZU, Isolation and properties of β -glucosidase from *Ruminococcus albus*. J. Bacteriol., **161**: 432-434. 1985.
 - 65) OHMIYA, K., K. MAEDA and S. SHIMIZU, Purification and properties of endo-(1, 4)- β -glucanase from *Ruminococcus albus*. Carbohydr. Res., **166**: 145-155. 1987.
 - 66) OHMIYA, K., K. NAGASHIMA, T. KAJINO, E. GOTO, A. TSUKADA and S. SHIMIZU, Cloning of the cellulase gene from *Ruminococcus albus* and its expression in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., **54**: 1511-1515. 1988.
 - 67) OHMIYA, K., T. KAJINO, A. KATO and S. SHIMIZU, Structure of a *Ruminococcus albus* endo-1, 4- β -glucanase gene. J. Bacteriol., **171**: 6771-6775. 1989.
 - 68) OHMIYA, K., T. TAKANO and S. SHIMIZU, DNA sequence of a β -glucosidase from *Ruminococcus albus*. Nucleic Acids Res., **18**: 671. 1990.
 - 69) OHMIYA, K., C. HOSHINO and S. SHIMIZU, Novel plasmids responsible for the cellulose utilizing ability of *Ruminococcus albus*. Jpn. J. Zotech. Sci., **61**: 557-561. 1990.
 - 70) OHMIYA, K., H. DEGUCHI and S. SHIMIZU, Modification of the properties of a *Ruminococcus albus* endo-1, 4- β -glucanase by gene truncation. J. Bacteriol., **173**: 636-641. 1991.
 - 71) POOLE, D.M., G.P. HAZLEWOOD, J.I. LAURIE, P.J. BARKER and H.J. GILBERT, Nucleotide sequence of the *Ruminococcus albus* SY 3 endoglucanase genes *celA* and *celB*. Mol. Gen. Genet., **223**: 217-223. 1990.
 - 72) RASMUSSEN, M.A., B.A. WHITE and R.B. HESPELL, Improved assay for quantitating adherence of ruminal bacteria to cellulose. Appl. Environ. Microbiol., **55**: 2089-2091. 1989.
 - 73) RUSSELL, J.B. and D.B. WILSON, Potential opportunities and problems for genetically altered rumen microorganisms. J. Nutr., **118**: 271-279. 1988.
 - 74) SAKKA, K., S. FURUSE and K. SHIMADA, Cloning and expression in *Escherichia coli* of the thermophilic *Clostridium* sp. F1 genes related to cellulose hydrolysis. Agric. Biol. Chem., **53**: 905-910. 1989.
 - 75) SCHWARZ, W.H., S. SCHIMMING, K.P. RUCKNAGEL, S. BURGSCWAIER, G. KREIL and W.L. STAUDENBAUER, Nucleotide sequence of the *celC* gene encoding endoglucanase C of *Clostridium thermocellum*. Gene, **63**: 23-30. 1988.
 - 76) SHAH, H.N. and M.D. COLLINS, *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melanogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. Int. J. Syst. Bacteriol., **40**: 205-208. 1990.

- 77) SEWELL, G.W., E.A. UTT, R.B. HESPELL, K.F. MACKENZIE and L.O. INGRAM, Identification of the *Butyrivibrio fibrisolvens* xylosidase gene (*xylB*) coding region and its expression in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., **55**: 306-311. 1989.
- 78) SHOEMAKER, N.B., K.L. ANDERSON, S.L. SMITHSON, G.R. WANG and A.A. SALYERS, Conjugal transfer of a shuttle vector from the human colonic anaerobe *Bacteroides uniformis* to the ruminal anaerobe *Prevotella (Bacteroides) ruminicola* B₁₄. Appl. Environ. Microbiol., **57**: 2114-2120. 1991.
- 79) SIPAT, A., K.A. TAYLOR, R.Y.C. LO, C.W. FORSBERG and P.J. KRELL, Molecular cloning of a xylanase gene from *Bacteroides succinogenes* and its expression in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., **53**: 477-481. 1987.
- 80) SMITH, D.C. and C.W. FORSBERG, α -Glucuronidase and other hemicellulase activities of *Fibrobacter succinogenes* S85 grown on crystalline cellulose or ball-milled barley straw. Appl. Environ. Microbiol., **57**: 3552-3557. 1991.
- 81) STEWART, C.S. and H.J. FLINT, *Bacteroides (Fibrobacter) succinogenes*, a cellulolytic anaerobic bacterium from the gastrointestinal tract. Appl. Microbiol. Biotechnol., **30**: 433-439. 1989.
- 82) TAKANO, M., R. MORIYAMA and K. OHMIYA, Structure of a β -glucosidase gene from *Ruminococcus albus* and properties of the translated product. J. Ferment. Bioeng., **73**: 79-88. 1992.
- 83) TAYLOR, K.A., B. CROSBY, M. MCGAVIN, C.W. FORSBERG and D.Y. THOMAS, Characteristics of the endoglucanase encoded by a *cel* gene from *Bacteroides succinogenes* expressed in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., **53**: 41-46. 1987.
- 84) TEATHER, R.M., Isolation of plasmid DNA from *Butyrivibrio fibrisolvens*. Appl. Environ. Microbiol., **43**: 298-302. 1982.
- 85) TEATHER, R.M., Application of gene manipulation to rumen microflora. Can. J. Anim. Sci., **65**: 563-574. 1985.
- 86) TEATHER, R.M. and J.D. ERFLE, DNA sequence of a *Fibrobacter succinogenes* mixed-linkage β -glucanase (1, 3-1, 4- β -D-glucan 4-glucanohydrolase) gene. J. Bacteriol., **172**: 3837-3841. 1990.
- 87) TEATHER, R.M. and K. OHMIYA, Molecular genetics of rumen cellulase system. Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants: Proceedings of the seventh international symposium on ruminant physiology. (T. TSUDA, Y. SASAKI and R. KAWASAKI eds) 701-718. Academic Press, Inc. San Diego and the Government of Canada. 1991.
- 88) THOMSON, A.M. and H.J. FLINT, Electroporation induced transformation of *Bacteroides ruminicola* and *Bacteroides uniformis* by plasmid DNA. FEMS Microbiol. Lett., **61**: 101-104. 1989.
- 89) UTT, E.A., C.K. EDDY, K.F. KESHAV and L.O. INGRAM, Sequencing and expression of the *Butyrivibrio fibrisolvens xylB* gene encoding a novel bifunctional protein with β -D-xylosidase and α -L-arabinofuranosidase activities. Appl. Environ. Microbiol., **57**: 1227-1234. 1991.
- 90) WANG, W. and J.A. THOMSON, Nucleotide sequence of the *celA* gene encoding a cellobextrinase of *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. Mol. Gen. Genet., **222**: 265-269. 1990.
- 91) WARE, C.E., T. BAUCHOP and K. GREGG, The isolation and comparison of cellulase genes from two strains of *Ruminococcus albus*. J. Gen. Microbiol., **135**: 921-930. 1989.
- 92) WATANABE, Y., R. MORIYAMA, T. MATSUDA, S. SHIMIZU and K. OHMIYA, Purification and properties of the endo-1, 4- β -glucanase III from *Ruminococcus albus*. J. Ferment. Bioeng., **73**: 54-57. 1992.
- 93) WEISS, R.B. and J.A. GALLANT, Frameshift suppression in aminoacyl-tRNA limited cells. Genetics, **112**: 727-739. 1986.
- 94) WEISS, R.B., D.M. DUNN, A.E. DAHLBERG, J.F. ATKINS and R.F. GESTELAND, Reading frame switch caused by base-pair formation between the 3' end of 16S rRNA and the mRNA during elongation of protein synthesis in *Escherichia coli*. EMBO J., **7**: 1503-1507. 1988.
- 95) WHITEHEAD, T.R. and R.B. HESPELL, Cloning and expression in *Escherichia coli* of a xylanase gene from *Bacteroides ruminicola* 23. Appl. Environ. Microbiol., **55**: 893-896. 1989.
- 96) WHITEHEAD, T.R. and R.B. HESPELL, Heterologous expression of the *Bacteroides*

- ruminicola* xylanase gene in *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides uniformis*. FEMS Microbiol. Lett., **66**: 61-66. 1990.
- 97) WHITEHEAD, T.R., M.A. COTTA and R.B. HESPELL, Introduction of the *Bacteroides ruminicola* xylanase gene into the *Bacteroides thetaiotaomicron* chromosome for production of xylanase activity. Appl. Environ. Microbiol., **57**: 277-282. 1991.
- 98) WHITEHEAD, T.R. and D.A. LEE, Cloning and comparison of xylanase genes from ruminal and colonic *Bacteroides* species. Curr. Microbiol., **23**: 15-19. 1991.
- 99) WILLIAMS, A.G. and S.E. WITHERS, The production of plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes by hemi-cellulolytic rumen bacterial isolates grown on a range of carbohydrate substances. J. Appl. Bacteriol., **52**: 377-387. 1982.
- 100) WOODS, J.R., J.F. HUDMAN and K. GREGG, Isolation of an endoglucanase gene from *Bacteroides ruminicola* subsp. *brevis*. J. Gen. Microbiol., **135**: 2543-2549. 1989.