

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04530

研究課題名(和文)セルロース合成酵素複合体の会合構造決定

研究課題名(英文)Structural determination of oligomeric cellulose synthase complex

研究代表者

今井 友也 (Imai, Tomoya)

京都大学・生存圏研究所・准教授

研究者番号：90509142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：セルロースは木材等植物細胞壁の半分を占める成分であり、複数本の高分子鎖が伸びきり鎖状態で充填された結晶性繊維「マイクロフィブリル」として存在する。本研究は細菌モデルを使い、セルロース合成酵素タンパク質がマイクロフィブリル構造を作るメカニズムの構造的解明を目指した。その結果、セルロース合成酵素触媒サブユニットが規則正しく細胞内で並んでいることを示した。さらに高分解能の構造解析を目指して、セルロース合成酵素タンパク質の精製方法の最適化を進め方法確立に目途をつけた。また凝集が作られる試験管内セルロース合成反応において酵素により合成されるセルロース分子を観察し、その凝集過程が二段階であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セルロース合成酵素がマイクロフィブリル構造を作る機能は、高分子を常温常圧水系溶媒下で制御して、特定の構造を合成する機能である。これは高分子科学的に大変高度な機構であり、本研究はその解明を進めた。得られた成果はまだ解明の糸口を見つけ出したに過ぎないが、セルロース生合成の本質が常温常圧水系溶媒下で高分子を自在に制御するタンパク質機能であることを示したことが本研究の学術的意義である。また再生可能資源としてますます注目を浴びるセルロースへの感心は今後ますます高くなると思われるが、その生合成が非常に高度な生物機構であることを広く国民に説明する知見を与えることが本課題の一番の社会的意義である。

研究成果の概要(英文)：Cellulose is a major part of plant cell wall including wood, and exists as “microfibril” in which many polymer chains are packed in extended conformation. This study, on the bacterial model, aims for clarifying the mechanism of cellulose synthase protein to produce this microfibril structure.

First of all, we showed that the catalytic subunit of cellulose synthase is regularly arranged in living bacterial cell. Protein purification of cellulose synthase complex has been optimized for further higher resolution structural analysis. Observation of cellulose molecules synthesized by cellulose synthase protein was also made, and showed that cellulose molecules are aggregated through two-step process, not a single-step process.

研究分野：木質科学、タンパク質科学

キーワード：セルロース合成酵素 セルロース セルロースマイクロフィブリル 固体構造 膜タンパク質 高分子集合 合成

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

セルロースは天然に最も豊富に存在する高分子の一つであり、天然状態の構造はマイクロフィブリルと呼ばれる複数本の分子鎖が伸びきり鎖状態で束ねられた高分子集合体である。このようなセルロースの高次構造は、セルロース合成酵素が会合体(多量体)を形成することで作られると考えられていた。しかし2013年に報告された、X線結晶構造解析によるセルロース合成酵素の初めての立体構造モデル(バクテリアのセルロース合成酵素の最小機能単位であるCesA/CesB複合体)は、その仮説に反してCesA/CesB複合体は結晶中で会合体を形成していない(図1)。一方で結晶化サブユニットであるCesDタンパク質の結晶構造解析からは、CesDは2-mer of 4-merの8量体を形成し、この8量体構造が4本のセルロース分子鎖を抱えていることが示されていた(図2)。我々も独自の構造解析を進めており、CesBタンパク質単体の構造解析から、CesBが4量体を形成することを支持する結果を得ていた(図3)。これらの知見を総合したところ、セルロース合成酵素のもつ高分子集積機構の解明にはタンパク質の立体構造を含めまだ多くの知見が不足していると考えに至った。

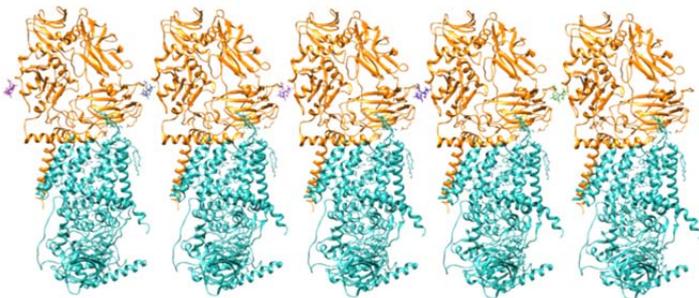


図1 CesAB複合体のX線結晶構造解析により得られたモデル (PDB ID: 4P00)

CesAB複合体の単量体が直線に並んでおり、会合体を形成している様子はない

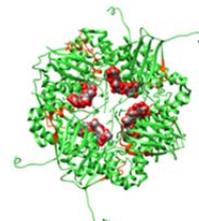


図2 CesDのX線結晶構造解析により得られたモデル

(PDB ID: 3A8E)

8量体内に4本のセルロース分子鎖(充填ボールモデル)が見える

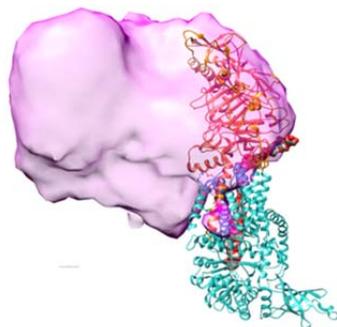


図3 CesBタンパク質の単粒子解析で得た立体構造モデル(未発表)

CesBの4量体が示唆される。リボン図はCesABタンパク質(PDB ID: 4HG6)をフィッティング

### 2. 研究の目的

セルロース合成酵素に備わる機能として、グルコースを $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4結合で連結する「重合」機能については、2013年のX線結晶構造解析による立体構造モデルの提案によりメカニズムの理解は進んだ。一方で、重合により合成されたセルロース高分子鎖を集積して結晶性マイクロフィブリルを合成する「結晶化」機能のメカニズム解明は未だ進んでいない。その一つの象徴が、上述のセルロース合成酵素の立体構造モデルでは会合体形成が見られない点にある。そこで本研究では、セルロース合成酵素複合体の構造を会合体形成の観点から再度精査しなおすとともに、セルロース合成酵素のもつ結晶化機能の解明を目指し研究を行った。

### 3. 研究の方法

実験モデルとしてセルロース生産性細菌である酢酸菌(ナタデココを作る細菌)を採用した。本研究は、(1)分析に利用するための酵素タンパク質の準備、(2)酵素タンパク質の細胞内観察、(3)酵素がセルロースを合成する様子の直接観察の3つ方法で行った。

#### (1)セルロース合成酵素複合体の精製

セルロース合成酵素の研究のためにはその酵素タンパク質の準備する必要がある。本研究では二つのアプローチでセルロース合成酵素の精製を試みた。

##### ①ネイティブソース(酢酸菌)からの精製

酢酸菌 *Komagataeibacter xylinus* を培養し、定法により細胞膜画分を得た。非イオン性の界面活性剤ドデシルマルトシド(dodecyl- $\beta$ -D-maltoside, DDM)を使い、細胞膜から可溶化したセルロース合成酵素の粗酵素をイオン交換クロマトグラフィーで分画し、セルロース合成酵素の濃縮・部分的精製を試みた。

## ②組換え体タンパク質を使った精製

酢酸菌 *K. sucrofermentans* の *cesAB* 遺伝子オペロンをクローニングし (GenBank: LC428282. 1)、大腸菌発現用のプラスミド DNA を使って上記遺伝子を導入した大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を使い、*CesA/CesB* タンパク質の大量発現とそれに引き続いての精製実験を行った。細胞破砕物の遠心分画により細胞膜を単離し、界面活性剤でセルロース合成酵素を可溶化するステップまでは (1) ① と同じだが、標的タンパク質の遺伝子に融合させたタグ (ポリヒシチジンタグなど) を使ってアフィニティ精製を行い、*CesAB* 複合体のみを精製した。タンパク質発現条件や精製に使う界面活性剤などの精製条件のスクリーニングを行い、*CesA/CesB* タンパク質複合体を解離させずに精製できる条件探索を行った。

### (2) セルロース合成酵素複合体の超分子構造解析

酢酸菌のセルロース合成酵素複合体は、細胞長軸上に直線状に並んでいると考えられている。この直線状に配置されたセルロース合成酵素の超分子複合体はターミナルコンプレックス (TC) と呼ばれており、セルロースをマイクロフィブリルとして形成するために重要であると考えられている。TC には、*CesA*, *CesB*, *CesC*, *CesD*, GH-8 (CMCax), *ccp2* の 6 サブユニットが少なくとも含まれると考えられているが、実験的証拠が存在するのは、*CesB*, *CesD*, *ccp2* タンパク質の 3 つのみであり、最も重要な触媒サブユニットである *CesA* タンパク質について TC 局在の実験的証拠は存在していなかった。

そこで各タンパク質の抗体を使って免疫標識を行い、顕微鏡観察により各サブユニットタンパク質の細胞内局在の解析を行った。培養した酢酸菌細胞に対して抗体蛍光標識を施して観察する免疫蛍光顕微鏡法と、電子顕微鏡観察用の凍結切断レプリカに対して免疫標識を行う SDS-FRL (Sodium Dodecyl Sulfate-Freeze Replica Labelling) 法を適用し、TC とそこへの各タンパク質の局在観察を行った。

### (3) 試験管内セルロース合成酵素反応におけるセルロース分子鎖のその場観察

セルロース合成酵素には、合成した高分子鎖を制御してマイクロフィブリル構造を形成する機能が備わるのは先述の通りである。ところが酢酸菌の細胞膜から抽出したセルロース合成活性により試験管内合成されるセルロースは、天然型のセルロース I 型結晶のマイクロフィブリルではなく、塊状凝集で II 型結晶となることが先行研究から分かっていた。この部分的変性の原因究明から結晶化機構の解明につながる情報を得ることを目的に、小角 X 線散乱 (SAXS) によるその場観察を試験管内セルロース合成反応に対して行った。

酢酸菌の細胞膜からセルロース合成酵素の粗酵素を抽出し、試験管内合成反応に供した。光路長 3 mm の液体セル中で試験管内セルロース合成反応を 28°C の温度制御下で行わせ、反応開始直後から 5 分毎に 2 分間露光で SAXS 測定を行った。SAXS 測定は SPring-8 の BL40B2 で行い、波長 0.1 nm、カメラ長 4 m、ハイブリッド型光子検出器で散乱パターンの撮影を行った。得られた散乱パターンは吸収率補正後に円環積分により一次元化してデータ解析に供した。

## 4. 研究成果

### (1) セルロース合成酵素複合体の精製

#### ①ネイティブソース (酢酸菌) からの精製

単離した酢酸菌細胞の細胞膜を DDM で可溶化して得た粗酵素画分を、DEAE カラムを使って分画を試みた。試行した限りではセルロース合成酵素の比活性はカラム精製前の粗酵素の値と変わらず、活性濃縮には至らなかった (図 4)。また他にも強アニオン交換樹脂やカチオン交換樹脂でも試行したが、いずれでも活性の濃縮には至らず、ネイティブソースからのイオン交換精製には条件改善が必要であることが示唆された。今後さらなる検討が必要である。

一方で有益な情報として、イオン交換クロマトグラフィーを使うことで粗酵素の界面活性剤濃度を可溶化時の濃度から低減可能なことが判明した (DDM の場合は 1% から 0.1% に低減可能)。条件検討を今後進めることで、有用なプロトコルになる可能性は十分にあると考えられる。

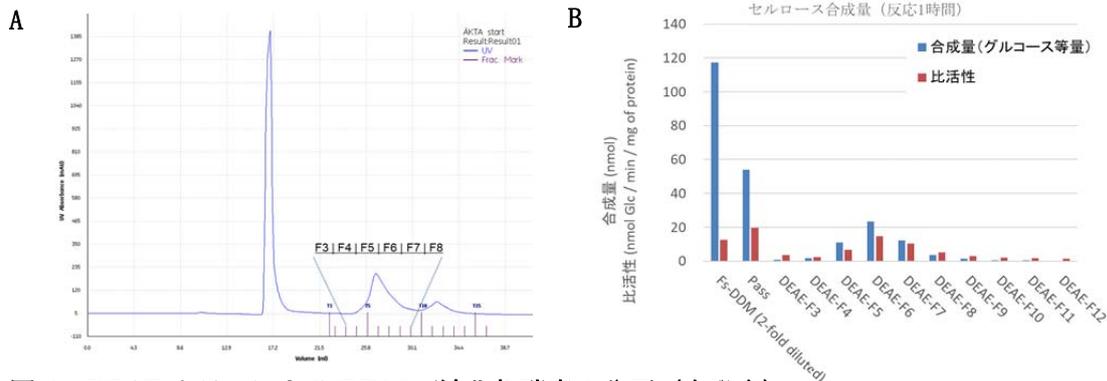


図 4 DEAE カラムによる DDM 可溶化粗酵素の分画 (未発表)

A: クロマトグラム ( $\lambda=280$  nm の吸光度) B: 各画分の酵素活性 (総活性と比活性)

## ②組換え体タンパク質を使った精製

通常の IPTG 誘導で CesAB タンパク質の大腸菌発現を行わせ、そこから可溶化と精製を行った場合は、CesA タンパク質と CesB タンパク質が解離し、CesAB 複合体の精製には至らなかった。そこで自動誘導を使うなど、発現条件を改善することにより、CesA と CesB タンパク質二つの解離を抑えて精製することが可能となった。詳細は現在も検討中であるが、CesAB 複合体精製条件の道筋をつけることができた。

また先行研究で作出したセルロース合成能を持たせた大腸菌形質転換体を使って、発現コンストラクトの最適化を行った。本系を使うことで様々な変異導入セルロース合成酵素複合体の活性を調べることが可能となる。その一例として、CesA タンパク質の触媒ドメイン付近にある FFCGS ドメインのシステインの機能について網羅的変異体導入解析から調査を行い、発表論文 (1) として公表した (図 5)。またタンパク質精製条件の最適化の一環として、各種変異体やタグの種類、位置を様々に変えた CesAB タンパク質発現系のスクリーニングも行った (未発表データ)。これらのデータは継続研究に重要な情報として生かされている。

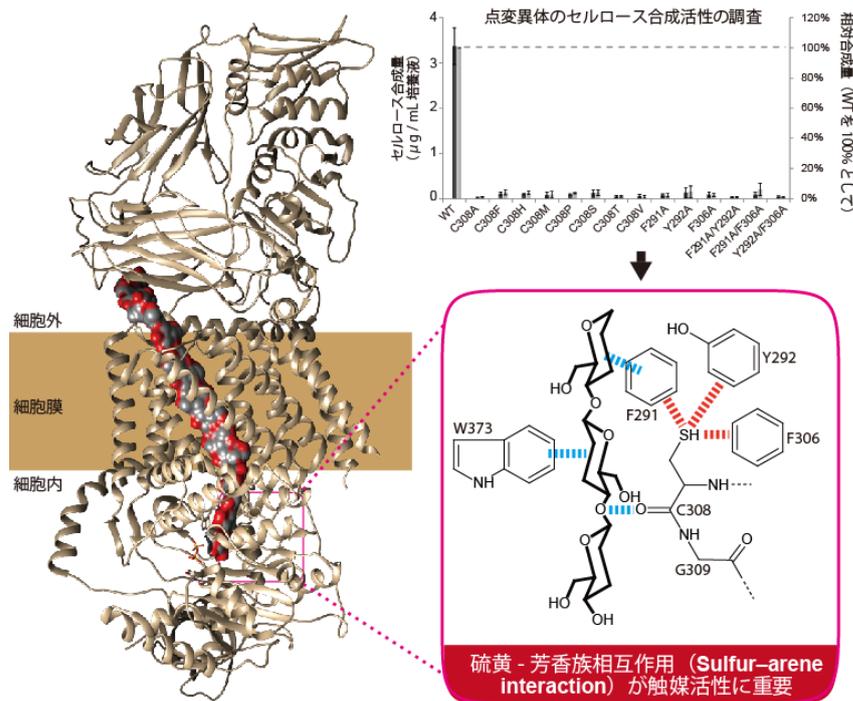


図 5 大腸菌合成系で部位特異的変異導入を使ったセルロース合成酵素タンパク質の機能解析例 (発表論文 1)

主鎖カルボニルがセルロースと相互作用することが示された FFCGS モチーフ中のシステイン残基側鎖は、周囲の芳香族アミノ酸と相互作用をもつことが機能に重要であることを示した

## (2) セルロース合成酵素複合体の超分子構造解析

酢酸菌細胞の蛍光抗体ラベルの結果を図 6 に示す。細菌のセルロース合成酵素複合体中で最も重要な触媒サブユニットである CesA タンパク質が細胞長軸に沿って直線的に配列している様子を観察することに成功し、CesA が TC 構成サブユニットであることの初の実験的証拠が得られた。セルロース合成活性を再構成した大腸菌には直線状配置は見られないことから、酵素タンパク質の配置制御がセルロースを繊維構造として合成するために重要であることが示唆された。

また細胞の前処理による抗体ラベル挙動の変化に基づき、セルロース合成酵素複合体におけるサブユニット配置のモデルを提案した (図 7)。

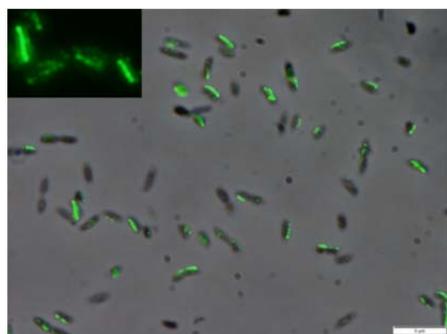


図 6 CesA タンパク質の蛍光抗体ラベルによる可視化 (発表論文 2)  
細胞の長軸に沿って CesA が直線に並んで言う様子が見られる

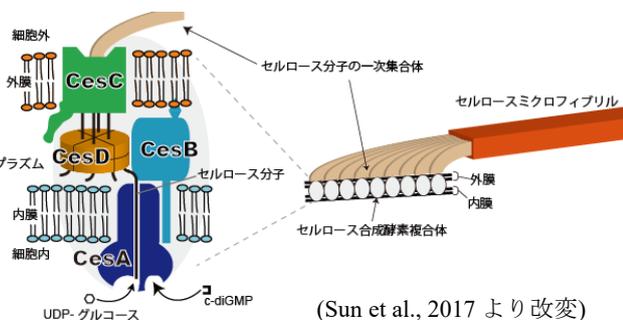


図 7 蛍光抗体ラベル化実験結果をもとにして提案したセルロース合成酵素複合体モデル (発表論文 2)

(3) 試験管内セルロース合成酵素反応におけるセルロース分子鎖のその場観察

セルロースの試験管内合成反応を5分ごとに SAXS 測定で追跡したデータを図8に示す。その結果、本試験管内反応で合成されるセルロース分子の凝集は二段階反応で形成されることが判明した。一段階目の素凝集は慣性半径 10 nm 弱であり、電子顕微鏡観察から円盤状構造だと推測される。おそらく酵素複合体が整列していない状態でセルロースを合成した結果、ランダムにセルロースの高分子鎖が凝集して形成されるのがこの慣性半径 10 nm 程度の構造であることが推測される。

今後、天然構造のセルロースを作る実験系において同様の測定を行うことで、セルロース合成酵素がセルロースの高分子鎖をどのように制御して繊維構造を作り上げるのか、直接観察からその機構解明を行う準備が整った。

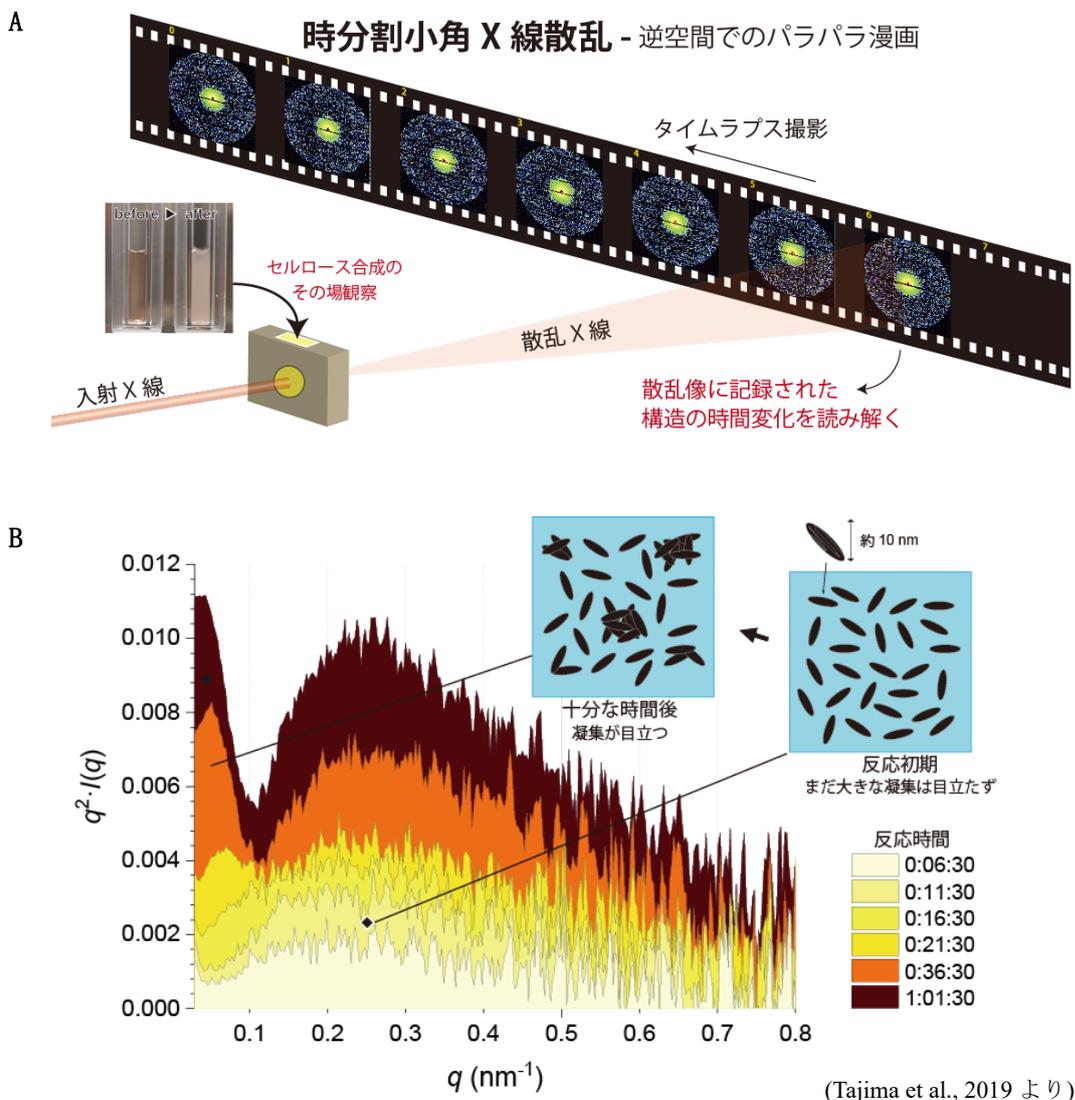


図8 試験管内合成反応のその場 SAXS 測定 (発表論文 3)

A: セルロース合成反応の時分割 SAXS 測定の概要

B: 得られた時分割 SAXS 測定データと、そこから導かれた本試験管内系で合成されたセルロース高分子鎖の挙動。初期には慣性半径 10 nm 程度の素構造のみが見られるが、濃度あるいはセルロースの分子量など何らかの臨界点を超えるとこれらが凝集してより大きな構造が形成されることが示唆される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sun Shi-jing, Imai Tomoya, Sugiyama Junji, Kimura Satoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 CesA protein is included in the terminal complex of Acetobacter	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cellulose	6. 最初と最後の頁 2017 ~ 2027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10570-017-1237-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sun Shi-jing, Horikawa Yoshiki, Wada Masahisa, Sugiyama Junji, Imai Tomoya	4. 巻 434
2. 論文標題 Site-directed mutagenesis of bacterial cellulose synthase highlights sulfur?arene interaction as key to catalysis	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Carbohydrate Research	6. 最初と最後の頁 99 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.08.009">https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.08.009</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tajima Hirotaka, Penttil? Paavo A., Imai Tomoya, Yamamoto Kyoko, Yuguchi Yoshiaki	4. 巻 130
2. 論文標題 Observation of in vitro cellulose synthesis by bacterial cellulose synthase with time-resolved small angle X-ray scattering	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 765 ~ 777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 9件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Tomoya Imai, Junji Sugiyama
2. 発表標題 Cellulose II formation by cellulose synthase: Negative data can make themselves positive
3. 学会等名 The 253rd ACS National Meeting Spring (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今井友也
2. 発表標題 セルロースの合成に学ぶ高分子構造の制御
3. 学会等名 第25回京都大学宇治キャンパス産学交流会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今井友也
2. 発表標題 セルロースをめぐる生物学
3. 学会等名 セルロース学会第22回ミクロシンポジウム「ナノファイバーを研究し始めた方を対象とするセルロースの基礎講座」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shi-jing Sun, Tomoya Imai, Junji Sugiyama, Satoshi Kimura
2. 発表標題 Molecular anatomy of cellulose synthase complex in Acetobacter
3. 学会等名 The 3rd International Symposium on Bacterial Nano Cellulose(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomoya Imai, Shi-jing Sun, Junji Sugiyama
2. 発表標題 CESEC: a platform to assay cellulose synthase activity
3. 学会等名 The 4th International Cellulose Conference 2017(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomoya Imai
2. 発表標題 Biosynthesis of cellulose: enzymatic synthesis of an assembly of molecules
3. 学会等名 Asia Research Node Symposium on Humanosphere Science (organized by Univeristy Sanis Malaysia and RISH, Kyoto University) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今井友也
2. 発表標題 セルロース合成酵素の研究からみえる細胞壁形成機構の解明の難しさ
3. 学会等名 日本木材学会 組織と材質研究会講演会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今井友也
2. 発表標題 分子集合体であるセルロースの生合成機構
3. 学会等名 第1回生物資源・次世代農業セミナー「循環型炭素資源—植物細胞壁の研究動向」 立命館大学R-GIRO「90億人時代に向けた気候変動対応型農業の基盤創生」拠点 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今井友也
2. 発表標題 セルロース合成酵素のミクロフィブリル構造形成機構の解明に向けて
3. 学会等名 第11回トランスポーター研究会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 今井友也、杉山淳司
2. 発表標題 セルロース合成酵素の大腸菌発現系最適化
3. 学会等名 第66回日本木材学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 今井 友也, ペンティラ パーヴォ, 田島 寛隆, 山本 郷湖, 湯口 宜明
2. 発表標題 セルロース合成酵素が作るセルロース分子の小角X線散乱によるその場観察
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井 友也, Paavo A. Penttila, 田島寛隆, 山本郷湖, 湯口宜明
2. 発表標題 試験管内系におけるセルロース合成酵素反応の時分割小角X線散乱測定
3. 学会等名 セルロース学会第26回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Paavo Penttila, Tomoya Imai, Ralf Schweins, Junji Sugiyama
2. 発表標題 Interplay of Cellulose and Other Biopolymers in Biological & Designed Materials Systems
3. 学会等名 The 257th ACS National Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井 友也, 田島 寛隆, PENTTILA Paavo, 山本 郷湖, 湯口 宜明
2. 発表標題 セルロース試験管内合成反応におけるセルロース分子鎖のタイムラプス観察
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田島寛隆, Penttila Paavo, 山本郷湖, 湯口宜明, 杉山淳司, 今井友也
2. 発表標題 時分割小角X線散乱による試験管内セルロース合成のその場観察
3. 学会等名 第68回日本木材学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirotaka Tajima, Paavo. A. Penttila, Kyoko Yamamoto, Yoshiaki Yuguchi, Junji Sugiyama, Tomoya Imai
2. 発表標題 In situ measurement of cellulose biosynthesis using small angle X-ray scattering
3. 学会等名 The 255th ACS National Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田島寛隆, Paavo Penttila, 今井友也, 杉山淳司, 湯口宜明
2. 発表標題 セルロース合成の時分割X線小角散乱による計測
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shi-jing Sun, Yoshiki Horikawa, Junji Sugiyama, Tomoya Imai
2. 発表標題 Cellulose synthase activity assayed in the living cell
3. 学会等名 ACS National Meeting 2016 Spring (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 矢野浩之、今井友也	4. 発行年 2017年
2. 出版社 日刊工業新聞社	5. 総ページ数 100
3. 書名 工業材料	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	岩崎 憲治  (Iwasaki Kenji)  (20342751)	筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・教授   (12102)	