

機関番号：88001

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780166

研究課題名（和文） ホヤのセルロース合成タンパク複合体の構成分子の網羅的同定

研究課題名（英文） A proteomic approach to cellulose-synthesizing membrane protein complexes in the ascidian *Ciona intestinalis*

研究代表者

中島 啓介（NAKASHIMA KEISUKE）

独立行政法人沖縄科学技術研究基盤整備機構・マリンゲノミクスユニット・研究員

研究者番号：10422924

研究成果の概要（和文）：カタユウレイボヤのセルロース合成酵素に対する抗体を作成し、アフィニティ精製と吸収処理を行うことにより、ウエスタンブロットティングにおける非特異的なバンドを減ずることに成功した。その結果、フレンチプレスを用いて破碎した胚から超遠心分離により調製した膜画分に、セルロース合成酵素分子が局在することが明らかとなった。今後、セルロース合成タンパク複合体を単離・精製する上で不可欠な技術を確立した。

研究成果の概要（英文）：We report a western blotting system to assess cellulose-synthesizing membrane protein complexes in the ascidian *Ciona intestinalis*. Rabbit polyclonal antibodies were raised against several synthetic peptides corresponding to the parts of Ci-CesA, which is the cellulose synthase of *C. intestinalis*. After purifications with affinity columns using the peptides and an adsorption with *Ciona* acetone powder, either non-specific reactivity or cross-reactivity was reduced so that the single band was obtained with the estimated molecular mass of Ci-CesA, only in microsome preparations. For sample preparations, French-press worked fine for *Ciona* embryos.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：セルロース

1. 研究開始当初の背景

セルロースは地球上に最も豊富に存在する生物資源であり、その有効利用は社会的に重要な課題である。例えば、社会の持続的な発

展を目指して、米国エネルギー省が取り組むバイオ燃料計画において、セルロースは化石資源に代わる最有力候補と位置づけられている。同計画における長期的な狙いのひとつ

に「遺伝子操作によるセルロース資源の設計と利用」が挙げられる。従来、天然セルロースを如何に効率よく利用するかを追求する立場から、効率よく利用するためのセルロース資源をあらかじめ設計して生産する立場への転換を図ろうとするものである。しかし、現状は生合成に関わる分子の同定もままならず、生合成経路は不明である。このようにセルロース生合成研究は、社会に貢献する可能性を秘めつつも、その進展にブレークスルーを必要としており、中心的課題は生合成に関わる分子を同定することであった。

従来、電子顕微鏡を用いた観察によって、細胞膜上の膜タンパク複合体（ターミナル・コンプレックス〔以下、TC〕）がセルロース合成の場であることは、共通の見解として受け入れられている。しかしながら、TC がいかなる分子によって構成され、それらの分子のどのような働きによってセルロースが合成されているかは不明な点が多い。唯一、植物モデルにおける変異体の解析を通じて発見され、セルロース合成酵素（CesA）と名づけられた、糖転移酵素ファミリー2に属する分子がTCに局在することが免疫電顕法により示されていた。

CesA分子は植物・細菌・粘菌などセルロースを合成する生物において共通して保存されていることから、セルロース合成に不可欠な分子であると考えられていた。しかし、CesAの立体構造やTCにおける役割、共同する分子の有無など、セルロース合成における具体的な作用機構は推測の域を出ない。申請者はセルロースを合成する唯一の動物グループである被囊（ひのう）動物の一員であるカタユウレイボヤの実験動物としての優位性に着目し、カタユウレイボヤ CesA 遺伝子の単離、生体内における同遺伝子の働きを評価する系の構築に取り組み、セルロース合成に中心的な役割を果たしていることを明らかにしていた。しかし、他の生物同様に、カタユウレイボヤ CesA のセルロース生合成における具体的な作用機構は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、カタユウレイボヤのTCを単離・精製して、TCを構成するタンパク分子を同定することである。TCの分子的实际体を明らかにし、それぞれの分子について推定される役割を総合することによって、生合成分子機構を理解する糸口をつかむことを狙いとした。

3. 研究の方法

従来、主に植物細胞を対象として、試験管内におけるセルロース生合成活性を指標にTCを精製する試みがなされてきたが、 β 1,3グルカンやヘミセルロースなどの多糖が主たる産物として得られることや、精製に伴って生合成活性が低下することから、TCの単離・精製は困難であった。そこで、本研究では、ヘミセルロースを合成しないホヤを研究対象とすることにより、生合成活性測定時にセルロース以外の産物の生成を避けることを試みた。次いで、TCに局在することが判明している唯一の分子であるCesAに着目し、抗CesA抗体を用いてTCの局在を評価することにより、生合成活性を指標としないTCの精製を試みた。

4. 研究成果

研究対象には胚の準備が比較的容易で、扱いに習熟しているカタユウレイボヤを用いた。解剖して集めた卵を媒精し、発生中の胚を集め、フレンチプレス法あるいは超音波法により破碎し、超遠心分離により、細胞膜が含まれる画分を調製した。植物および酢酸菌におけるプロトコルを参考にして試験管内生合成実験を行った。多量の沈殿物が得られたが、アルカリを用いた精製ののち、透過型電子顕微鏡により観察を行ったところ、セルロースに特徴的な直鎖状構造は主生成物ではなかった。直鎖状の構造については、構造解析を行うに十分なほどに収量をあげることができなかった。カタユウレイボヤについては、植物や酢酸菌と比較して、生試料から得られる膜画分の収率が低い傾向が認められ、それが本課題の遂行を困難なものにした。加えて、カタユウレイボヤ胚の発生に季節性が存在することから、発生のよい時期に試料を大量に調製して冷凍保存する工夫が必要であると考えている。以上のことから、試験管内における生合成活性を指標にしてTCを単離・精製するのは、少なくとも現時点においては不利な点が多いと判断し、抗CesA抗体を用いてTCの局在を評価する試みを推し進めた。

抗CesA抗体は都合8つのペプチドをウサギに免疫して、それぞれのペプチドに対するポリクローナル抗体を作成したが、すべての場合において非特異的なバンドが複数検出され、実験結果の解釈が困難であった。そこで、免疫に用いたペプチドを用いてアフィニティカラム精製を行い、加えて、ホヤ胚から作成したアセトンパウダーによる吸収処理を行うことで、2つの抗体において、モノマーの予想分子量に単一のシグナルを得ることに成功した。この際、二次抗体の製品間差が大きく、また化学発光基質の違いから生じるシグナルノイズ比の差も大きいと、20以

上の組み合わせを試し、最も安定してシグナルが得られる条件を設定した。

CesA の局在を評価する系が定まったので、次いで、試料の調製法の検討を行った。様々な発生ステージにおいて、フレンチプレスあるいは超音波破碎の諸条件を検討した。その結果、尾芽胚期においてフレンチプレス法を用いることが最も効率がよいことが明らかとなった。先に、試料の冷凍保存に必要性について触れたが、超遠心分離してペレット化した膜画分を液体窒素で瞬間凍結し、 -80°C 保存した場合、少なくとも3ヶ月は上述のウエスタンブロットティング系にて評価することが可能であった。

上述の方法で調製した膜画分から、各種界面活性剤を用いて、TC 可溶化作業に取り組んだが、現在のところ可溶化画分に生合成活性および CesA 局在シグナルは得られていない。そこで、少なくとも植物において TC の局在が示され、かつ TC のセルロース生合成活性が維持されるために重要な単位であることが示されつつある微小膜環境である“脂質ラフト” (Bessueille *et al.*, 2009. *Biochem J* 420: 93-103.) に着目し、ホヤの脂質ラフトを調製し、脂質ラフトごと TC を単離・精製する試みを進めているところである。

本研究課題を遂行するにあたり、最も時間と労力を費やした過程は、抗 CesA 抗体を用いて CesA の局在を評価するウエスタンブロット系を確立したことであり、同評価系は今後ホヤのセルロース合成複合体の構成分子の同定に向けた TC 精製作業を推進する上で、TC の可溶化あるいは脂質ラフトの単離の何れのアプローチにおいても基盤となる技術であると考えている。

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2件)

- ① Keisuke Nakashima, Atsuo Nishino, Yoshiki Horikawa, Euichi Hirose, Junji Sugiyama, and Nori Satoh. The crystalline phase of cellulose changes under developmental control in a marine chordate, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 査読有, Vol. 68(9), 2011, pp. 1623-1631. <http://www.springerlink.com/content/mgt2v3640830xj32/>

- ② Keisuke Nakashima, Atsuo Nishino, and Euichi Hirose. Forming a tough shell via an intracellular matrix and cellular junctions in the tail epidermis of *Oikopleura dioica* (Chordata: Tunicata: Appendicularia), *Naturwissenschaften*, 査読有, in press. DOI: 10.1007/s00114-011-0815-y. <http://www.springerlink.com/content/g453445h7h3321r2/>

[学会発表] (計2件)

- ① Keisuke Nakashima, Cellulosic structures of Oikopleurid appendicularians, 口頭発表, The 5th International Tunicate Meeting, 23 June 2009, 那覇.
- ② 中島 啓介, 動物がつくるセルロース、口頭発表、OIST シンポジウム「動物の不思議な能力～ゲノムからの挑戦」、2011年1月29日、沖縄産業支援センター (那覇市).

[その他]

所属部局サイト：
独立行政法人沖縄科学技術研究基盤整備機構マリンゲノミクスユニット
<http://www.irp.oist.jp/satoh/>

雑誌論文①に関するプレスリリースのサイト：
英語版
<http://www.oist.jp/en/press-room/press-releases/40-2010/696-dr-keisuke-nakashima-and-dr-satoh-elucidates-mechanism-of-cellulose-synthesis-in-appendicularian.html>

日本語版
<http://www.oist.jp/ja/press-room/press-releases/40-2010/696-dr-keisuke-nakashima-and-dr-satoh-elucidates-mechanism-of-cellulose-synthesis-in-appendicularian.html>

学会発表①に関するサイト：
The 5th International Tunicate Meeting
<http://www.irp.oist.jp/tunicatemeeting/dp.php>

学会発表②に関するサイト：

<http://www.oist.jp/ja/events/event-reports/745-oist-symposium-on-extraordinary-abilities-of-animals.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 啓介 (NAKASHIMA, Keisuke)

独立行政法人沖縄科学技術研究基盤整備
機構・マリンゲノミクスユニット・研究
員

研究者番号：10422924

(2) 研究分担者

なし