

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23688021

研究課題名(和文)セルロース合成酵素複合体の構造解析基盤の構築

研究課題名(英文)Start-up study of the structural biology of 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) 18,100,000円、(間接経費) 5,430,000円

研究成果の概要(和文)：セルロース合成酵素複合体の三次元構造解析を、電子顕微鏡画像のランダムコニカルティルトおよび単粒子解析により進めた。得られた三次元構造は、2013年に別グループから報告された、セルロース合成酵素複合体のX線結晶構造にフィットすることが判明した。以上から、本系を用いて構造解析を進めることが可能だと結論でき、構造解析基盤構築の目的を達成した。

また、構造解析データの詳しい解釈のために、機能解析研究を行った。粗酵素の速度論的解析と、組換え体による、セルロース合成酵素の大腸菌内機能再構成を行った。後者の機能再構成系をCESECと名付け、変異体酵素の活性評価など、機能解析実験を開始した。

研究成果の概要(英文)：Electron microscopy was used for the three-dimensional structural determination of cellulose synthase complex. Preliminary analysis showed a three-dimensional model with some features. Our model is too primitive to be analyzed in detail, but it was shown as a result that the first X-ray crystallographic structure of cellulose synthase, which was reported in 2013 by another group, fits well to our structural model. We thus believe that our strategy is available for the structural biology of cellulose synthase, which will be used for future studies.

We also conducted, for discussing the structural data, some functional analyses of cellulose synthase: kinetics of crude enzyme and functional reconstitution of recombinant cellulose synthase in *E. coli*. Especially the latter result allows the functional analysis to be done with recombinant protein. We designated this system as CESEC (CEllulose Synthesis in *E. Coli*), which will be a promising tool for studying cellulose synthase.

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 セルロース合成酵素 電子顕微鏡 単粒子解析 構造生物学 機能再構成 c-di-GMP

## 1. 研究開始当初の背景

(1) セルロースは植物細胞壁の主成分であり、植物科学・木材科学・高分子科学の分野で研究が進められてきた。その合成の研究は、セルロース生産性細菌である酢酸菌を使い、1980年代に大きく進展し、1990年に、セルロース合成酵素遺伝子が初めて同定された。そのホモログを探索する形で、1996年に、植物のセルロース合成酵素遺伝子が、綿で初めて同定された。それ以降、植物科学が得意とする遺伝学的手法を用いて、分子細胞生物学研究が盛んに進められ、セルロース合成の分子細胞生物学的理解は大きく進んだ。

一方で、セルロース合成酵素自身の反応機構に関する研究例はほとんど存在していなかった。セルロース合成酵素遺伝子は既知であり、組換え体タンパク質の使用は原理上可能だったにもかかわらず、組換え体タンパク質を使った生化学的研究は数例しかなく、膜タンパク質かつヘテロ複合体であるという難易度の高さから、構造生物学研究例も存在しない状況であった。したがって、「酵素」の研究にもかかわらず、セルロース合成酵素を酵素として理解するための根拠は非常に乏しい状況であった。

(2) タンパク質の動作機構を理解する上で、構造生物学研究は大変重要である。タンパク質の構造解析を行うにあたり、もっともメジャーな方法はX線結晶構造解析である。しかし、本研究で対象とするセルロース合成酵素は、膜タンパク質かつヘテロ複合体であり、タンパク質精製および結晶化に大変な労力と時間がかかる。一方で、電子顕微鏡を使った構造生物学研究は、X線結晶構造解析ほどメジャーではないが、方法論が確立しつつある。また、試料が微量でも可能、結晶を作る必要がない、大きなタンパク質の方が適当である等、X線結晶構造解析にはない特徴がある。以上から、セルロース合成酵素の構造解析手法として、電子顕微鏡による構造解析は妥当であると考えられた。

## 2. 研究の目的

セルロース合成酵素タンパク質が、セルロースをマイクロフィブリルとして合成する仕組みを理解することを目的として、セルロース合成酵素の三次元構造解析を行い、世界に先駆けて構造モデルを提案する。

セルロース合成酵素として、その活性に必要な最小限なサブユニットが知られている、酢酸菌のCesA・CesB複合体を試料として選択する。その組換え体タンパク質を発現・精製し、電子顕微鏡観察を行い、得られたタンパク質粒子画像の単粒子解析計算により、セルロース合成酵素の三次元構造を構築する。

## 3. 研究の方法

(1) セルロース合成酵素の三次元構造解析  
大腸菌発現系を使い、酢酸菌のセルロース合成酵素の最小必要構成であるCesA・CesB複合体を発現し、Niアフィニティカラムとゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。得られたタンパク質を負染色法により電子顕微鏡で観察し、傾斜・非傾斜の粒子画像ペアを576組撮影した。マルチプルレファランスアライメント(MRA)を取り入れた後に、ランダムコニカルティルト法(RCT)により、三次元再構成を行った。この結果得られた構造データを初期構造として、単粒子解析により三次元構造を得た。

(2) セルロース合成酵素の機能解析研究  
構造解析データを解釈するためには、その機能についても知見があると、より深い洞察が可能となる。しかし、セルロース合成酵素の機能解析研究例は、数例しかない。そこで、構造解析と密接にリンクさせる目的で、以下の二つの機能解析研究を行った。

### 粗酵素を使った速度論的解析

酵素反応機構を解明するための基礎的な知見として、速度論的解析から得られる情報は大変重要である。しかし、セルロース合成酵素の研究において、そのような基礎的な知見でさえ整備されているとは言い難い。

そこで、酢酸菌の細胞膜からセルロース合成活性を含む粗酵素画分の抽出方法を確立し、その粗酵素の速度論的解析を行った。<sup>14</sup>CラベルしたUDP-グルコースを基質として使い、合成されたセルロース中に含まれる<sup>14</sup>Cを液体シンチレーションカウンティングで定量し、反応速度データを得た。その結果から、 $[S]$ - $V$ 曲線(基質濃度-反応速度のプロット)を描き、ヒル式にフィッティングさせることで、各速度論因子( $V_{max}$ (最大速度)、 $K_m$ (ミカエリス定数)、 $n$ (ヒル係数))を求めた。

### 組換え体セルロース合成酵素の機能再構成

(1) で使う大腸菌発現系を使えば、その組換え体セルロース合成酵素の酵素活性を見ることも、原理的には可能である。そこで、組換え体タンパク質を使った、セルロース合成酵素活性の評価系構築を目的に、大腸菌に発現させた組換え体セルロース合成酵素に、セルロースを合成させる系を構築した。酢酸菌のセルロース合成酵素は、c-di-GMPというセカンドメッセンジャーにより活性化される。そこで、c-di-GMP合成酵素を、セルロース合成酵素と同時に発現できる大腸菌形質転換体を作成した。

得られた大腸菌形質転換体のセルロース合成活性を定量的に評価するとともに、合成されたセルロースの構造評価を行った。また、部位特異的変異導入により、CesAの点変異

体タンパク質を作り、その合成活性を定量評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) CesB の三次元構造解析

大腸菌発現系を使って、CesA と CesB を、細胞膜に発現できることを確認した。遠心分画で得た細胞膜画分から、界面活性剤を使い可溶化したのちに、CesB タンパク質のC末につけた His タグを使って精製し、さらにゲル濾過クロマトグラフィー (SEC) により高度精製を行った。SEC 上で分子量約 1,000kDa の画分に、CesB のみが見られた (図 1)。CesA は精製の過程で脱離していったと考えられる。

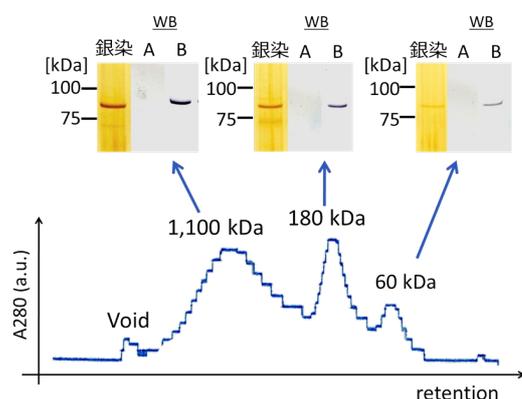


図 1 精製 CesAB タンパク質のゲル濾過クロマトグラムと、各画分の電気泳動 (銀染色および免疫プロット)

この精製した CesB タンパク質を、負染色法により電子顕微鏡観察した (図 2A)。傾斜・非傾斜の粒子画像ペアから、RCT (ランダムコニカルティルト法) で、三次元構造を再構成した。MRA (マルチレファランスアライメント) で設定した 30 のクラスに応じて、30 通りの三次元構造を再構成した (図 2B)。次に、これらを初期構造として、再度、元データの粒子画像全てについて投影角度の精密化を行った。つまり、同じデータセットを使い、初期構造を変えて 30 通りの単粒子解析計算を行った。その結果、多くの初期構造 (クラス) に共通して、図 2C のような、巾着のような特徴を持つ三次元構造を得るに至った。

図 1 のゲル濾過で見積もられた分子量から、我々が精製した CesB タンパク質は、オリゴマーで存在していると考えられる。そこで、2 回対称軸を仮定して三次元再構成を行った (図 2C)。なお、この図では、ゲル濾過で見積もられた分子量で閾値を設定して表示している。得られた三次元再構成データに、特徴的な突起が見られることから、精製および構造解析計算に、明らかな間違いはないと考えられる。

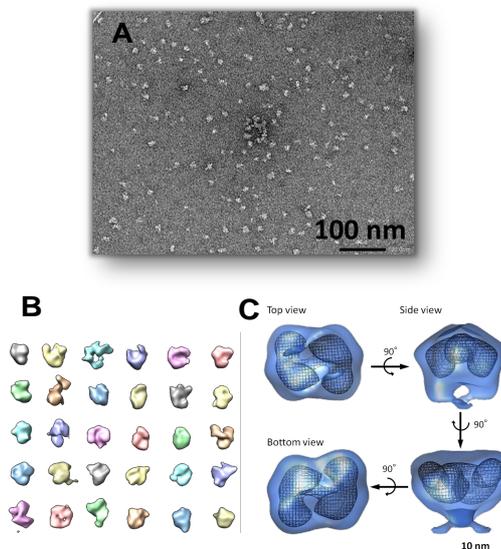


図 2 精製した CesB タンパク質の電子顕微鏡画像 (A) と、それよりランダムコニカルティルト法で三次元再構成したポリボリュームデータ (B) と、投影角度精密化により得られた三次元再構成データ (C)

この三次元再構成データと、本課題遂行中の 2013 年に報告された、X 線結晶構造解析による CesAB タンパク質の構造モデル (PDB ID: 4HG6) を重ね合わせると、およそ 4 量体として存在することが示唆された (未発表データ)。したがって、我々の電子顕微鏡のデータは、X 線結晶構造解析のデータと矛盾しないと考えられる。

分解能の点では明らかに劣る我々のデータであるが、上述の X 線結晶構造解析モデルでは、CesAB 複合体は単量体として結晶内に充填されている。このことは、セルロース合成酵素は、多量体で機能しているという通説と矛盾している。一方で、我々の電子顕微鏡データは、CesB のみのデータであるが、セルロース合成酵素の会合状態を反映していると考えられ、この点で、先述の X 線結晶構造よりも、生理学的な条件に近い構造であると推測される。今後、計算に使った粒子画像数を増やして、信頼性のあるデータを得る必要がある。

##### (2) セルロース合成酵素の機能解析研究:

###### 粗酵素を使った速度論的解析

まず、アルキルマルトシドにより、酢酸菌細胞膜から合成活性を可溶化する方法を確立した (論文発表済み)。基質である UDP-グルコースについて、 $[S]$ - $V$  曲線 (基質濃度 - 反応速度のプロット) の分析を行った。界面活性剤で可溶化する前には、 $[S]$ - $V$  曲線はおよそ双曲線型で説明できるものであり、ミカエリス・メンテン式で説明できるシンプルな反応機構であることが分かった。ところが、

界面活性剤で可溶化した粗酵素では、 $[S]/V$  曲線が双曲線型からシグモイド型に変化したように見られた。一方で  $K_m$  値は可溶化前後とも 1 mM 程度であり、UDP-グルコースの親和性に、可溶化の前後で大きな変化はないと考えられる。一般に、シグモイド型の  $[S]/V$  曲線は、酵素と基質の相互作用が 1:1 ではなく、1 以上の基質分子が同時に酵素と相互作用することで反応が進むことを示している（正の協同性）。

一方で、c-di-GMP について速度論的解析を行うと、可溶化前後ともに、強い正の協同性を認めることができた。c-di-GMP はアロステリックエフェクターであり、それを支持するデータである。また、c-di-GMP と酵素の相互作用に関しては、UDP-グルコースの場合と異なり、可溶化により協同性が大きく変化する様子は認められなかった。

以上から、可溶化によって、UDP-グルコースと酵素の相互作用に根本的な変調が生じたことが示された。脂質膜環境が、膜タンパク質の構造や機能に影響を及ぼす例が複数報告されていることを考えると、セルロース合成酵素が、可溶化により異なる挙動を示すという上述のデータは、セルロース合成酵素の動作機構を解明する上で、重要なヒントとなると考えられる（投稿準備中）。

組換え体セルロース合成酵素の機能再構成（投稿準備中）

本課題で使用しているセルロース合成酵素の大腸菌発現系は、IPTG で発現制御できる。そこで、c-di-GMP 合成酵素の発現系を、アラビノース誘導性として構築し、これら 2 つの発現系を、別々に制御できる大腸菌形質転換体を作成した。これを使い、IPTG でセルロース合成酵素のみを発現させた場合、アラビノースを加えて c-di-GMP 合成酵素のみを発現させた場合、両者を発現させた場合で、セルロース合成活性を評価した。さらに、セルロース合成酵素として、CesA のみを発現させた場合と、CesA と CesB 両者を発現させた場合を検証した。

その結果、CesA・CesB と c-di-GMP 合成酵素の両方を発現させた場合でのみ、セルロース合成を確認できた。以上から、(i)本系で観察されたセルロース合成は、確かに組換え体セルロース合成酵素に起因すること、(ii)構築したセルロース合成酵素の大腸菌発現系により、セルロース合成酵素を正しく発現できること、(iii)既報の通り、セルロース合成活性の必要最小構成は CesA/CesB であり、また c-di-GMP も事実上必須であることが判明した。

以上から、組換え体セルロース合成酵素を大腸菌に発現させ、大腸菌にセルロース合成活性を再構成させることに成功した。しかし、本系で合成されたセルロースを単離して構造解析すると、非天然型の結晶構造であるセルロース II であることが示された。したが

って、大腸菌に再構成した合成活性は、天然活性ではなく、部分的に変性してしまったと推測される。何らかの不足因子の存在が示唆される。

本実験系は、天然活性再構成の達成には至っていないが、組換え体を使ってセルロース合成酵素の機能解析を簡便に実行できるという長所を持っている。このような実験系は、世界的に見てもまだ例のないものだと思う。そこで、CESEC(Cellulose Synthesis in *E. Coli*)と命名した本実験系を使い、点変異体の酵素活性を定量的に評価した。配列比較や、X 線結晶構造解析の三次元構造から、重要と思われるアミノ酸残基に不活化変異を導入した場合、セルロース合成活性が消失することを確認した。以上から、CESEC を使うことで、変異体タンパク質の酵素活性を簡便に評価できることが示された。

以上をまとめると、本課題の成果として、次の 3 点が挙げられる。

1. 解析計算の信頼性を高める、精製条件を見直して CesAB 複合体の精製条件を確立する等、いくつか課題は残ったが、電子顕微鏡による三次元構造解析研究の道筋をつけることに成功した。
2. 粗酵素の速度論的解析を行い、セルロース合成酵素の反応機構に、興味深い性質を発見した。
3. 組換え体タンパク質を使った、セルロース合成酵素の機能解析研究の基盤を構築した。

本課題で構築した研究資源は、今後のセルロース合成酵素の構造解析と機能解析研究を進める上で、重要な基盤となる。我々は、これらを使用して、セルロース合成酵素の構造解析および機能解析研究を進めている。今後、セルロース生合成機構の理解が、生化学的・高分子科学の観点を取り入れた上で進み、既報の分子細胞生物学的知見と照らし合わせることで、総合的に大きく進展することが期待される。

## 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)

Hashimoto, A., Shimono, K., Horikawa, Y., Ichikawa, T., Wada, M., Imai, T., Sugiyama, J. "Extraction of cellulose-synthesizing activity of *Gluconacetobacter xylinus* by alkylmaltoside", *Carbohydrate Research*, **346** (17), 2760-2768, 2011.

DOI: 10.1016/j.carres.2011.09.031

査読あり

今井友也, "セルロース生合成研究におけるバクテリアモデルの可能性", *Cellulose*

Communications, 18, 156-162, 2011.  
査読なし

〔学会発表〕(計 16 件)

(2014.3.13-15) Shijing Sun, Yoshiki Horikawa, Junji Sugiyama and Tomoya Imai: "Function Analysis of Cys308 in Cellulose Synthase A gene from Gluconacetobacter xylinus" 第 64 回日本木材学会大会, @松山

(2013.11.15-17) Shijing Sun, Yoshiki Horikawa, Junji Sugiyama and Tomoya Imai: "Functional Analysis of Cellulose Synthase by Site directed Mutagenesis" 第 7 回細胞壁ネットワーク研究会, @つくば  
(2013/10/21-24) Imai, T., Sun, S., Horikawa, Y., Wada, M., Sugiyama, J.: "Functional reconstitution of cellulose synthase in Escherichia coli" EPNOE2013, @Nice

(2013/9/11-13) 今井友也、孫世静、堀川祥生、杉山淳司: "部位特異的変異導入によるセルロース合成酵素の機能解析" 第 86 回日本生化学会大会, @横浜

(2013/7/18-19) 孫世静、堀川祥生、杉山淳司、今井友也: "Site-directed Mutagenesis on Cellulose Synthase from Gluconacetobacter xylinum and Its Characterization" 第 20 回日本セルロース学会年次大会, @京都

(2013.3.27-29) 今井友也、堀川祥生、杉山淳司: "CESEC システム: 組換え体セルロース合成酵素によるセルロース合成" 第 63 回日本木材学会大会, @盛岡

(2012/10/10-12) Tomoya Imai, Akira Hashimoto, Kenji Shimono, Yoshiki Horikawa, Masahisa Wada, Junji Sugiyama: "Reinvestigation of cellulose-synthesizing activity of Gluconacetobacter xylinus" The 3rd International Cellulose Conference, @札幌市

(2012.10.1) 下農健治、堀川祥生、杉山淳司、今井友也: "セルロース合成活性の速度論的解析 -酢酸菌を用いて-" 第 5 回植物細胞壁ネットワーク定例研究会, @淡路島

(2012.9.22) 下農健治、杉山淳司、今井友也: "酢酸菌の膜内在性セルロース合成活性の再評価" 第 84 回日本生化学会大会, @京都

(2012.7.12-13) 下農健治、杉山淳司、今井友也: "セルロース合成活性の速度論的解析" 第 19 回日本セルロース学会, @名古屋市

(2012.5.19) 下農健治、杉山淳司、今井友也: ""界面活性剤による可溶化が膜タンパク質酵素の活性に及ぼす影響 -セルロース合成活性を例に-" 第 59 回日本生化学会近畿支部例会, @宇治市

(2012.3.15-17) 下農健治、堀川祥生、杉山淳司、今井友也: "セルロース合成活性の速度論的解析 -可溶化が合成活性に及ぼ

す影響 -" 第 62 回日本木材学会大会, @北海道

(2012.3.15-17) 今井友也、菅野亜美、杉山淳司、岩崎憲治: "セルロース合成酵素の単粒子構造解析 (I) -制御サブユニット GxCesB タンパク質の構造解析-" 第 62 回日本木材学会大会, @北海道

(2011.7.14-15) 菅野亜美、杉山淳司、今井友也、岩崎憲治: "GxCesB (酢酸菌セルロース合成酵素制御サブユニット) の電子顕微鏡構造解析" 第 18 回日本セルロース学会年次大会, @長野市

(2011.7.14-15) 下農健治、堀川祥生、今井友也、杉山淳司: "脂質再構成法によるセルロースの in vitro 合成" 第 18 回日本セルロース学会年次大会, @長野市

(2011.5.16-18) 今井友也、菅野亜美、杉山淳司、岩崎憲治: "セルロース合成酵素複合体における制御サブユニット GxCesB の単粒子構造解析" 日本顕微鏡学会第 67 回学術講演会, @福岡市

〔図書〕(計 1 件)

今井友也: 「005 セルロースはどこにあるの?」「006 セルロース生合成のメカニズム」セルロースのおもしろ科学とびっくり活用(セルロース学会編); 18-21, 2012

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: セルロース製造用発現ベクター形質転換体およびセルロースの製造方法  
発明者: 今井友也、杉山淳司  
権利者: 京都大学  
種類: 特許  
番号: 特許願 2012-288335  
出願年月日: 平成 24 年 12 月 28 日  
国内外の別: 国内

名称: セルロース製造用発現ベクター形質転換体およびセルロースの製造方法  
発明者: 今井友也、杉山淳司  
権利者: 京都大学  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2013/085138  
出願年月日: 平成 25 年 12 月 27 日  
国内外の別: 外国

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

論文投稿が完了次第、ホームページを立ち上げて、成果を紹介する予定。

#### 6. 研究組織

##### (1) 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

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし