

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580241

研究課題名(和文) 微生物ナノファイバー紡糸装置における繊維排出機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism on the extrusion of nanofiber from protein complex on cell membrane of acetic acid bacterium.

研究代表者

天野 良彦 (AMANO, Yoshihiko)

信州大学・学術研究院工学系・教授

研究者番号：80273069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：Asaia bogorensisが生産するセルロース合成タンパク質複合体中の1成分であるCesD (AbCesD)について、異種発現生産した精製タンパク質をX線結晶構造解析し、最終的に中央に孔を形成する8量体構造であることを突き止めた。中央部の孔の構造がG. xylinusのCesDと異なり、これがセルロースナノファイバーの構造に影響していることが構造モデルから推測された。また、AbCesDの局在について、抗体を用いた免疫電顕観察から膜近傍に存在していることが明らかとなった。また、このタンパク質の発現時期を調べたところ、細胞周期に関係なく常時発現していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：One of cellulose synthesizing protein complex, CesD from Asaia bogorensis was expressed in E.coli and purified. Then the structure of CesD has been determined by X-ray diffraction after crystallization. It is suggested CesD is composed of octamer and forms a specific pore which related to the extrusion of cellulose fibers. The pore size seems to be different from that from Gluconacetobacter xylinus, so that may be a one of the reason for less mass production of cellulose. The localization of CesD was analyzed using antibody under microscope and is suggested to exist near outer cell membrane. In addition, CesD was expressed constantly regardless of cellular growth stage.

研究分野：生物工学

キーワード：セルロース合成酵素 Asaia bogorensis タンパク質複合体 繊維排出機構 CesDタンパク質 立体構造

1. 研究開始当初の背景

酢酸菌はエタノールを好気的条件下で酸化し、酢酸を生産するグラム陰性のバクテリアであるが、一部にセルロースを生産するものが知られている。中でも *Gluconacetobacter xylinus* は、セルロース高生産菌として知られており、微生物によるセルロース生産が Hestrin らによって 1947 年に初めて確認されてから約 50 年以上もの間、それらの研究が主に *G. xylinus* において進められてきた。一方、近年のゲノム解析手法の進歩により、数多くの微生物において、セルロース生合成に関係する遺伝子の存在が明らかになってきている。その結果、セルロース生合成に関与するタンパク質の遺伝子群が、必ずしも *G. xylinus* と同じオペロンを形成しているわけではなく、*G. xylinus* とは同性的の低い蛋白質の存在も明らかになっている。こうした相違は、*G. xylinus* の研究から提唱されている生合成モデルだけでは説明のつかない事象も多い。現在、*G. xylinus* 以外で実際のセルロース生産が確認されている微生物は、*Entelobacter* 属など極少数であり、更に、それらのセルロース生産性は著しく低く、セルロースを単離することも非常に難しいのが現状である。これまでに、我々は *G. xylinus* 以外の微生物におけるセルロース合成菌のスクリーニングを行い、酢酸菌の一種である *A. bogorensis* がセルロース合成を行うことを明らかにした。本菌のセルロース生産量は、*G. xylinus* よりも低いですが、生産するセルロース繊維は、繊維幅が 2-10 nm であり、*G. xylinus* のもの (20-100 nm) よりも更に微細であるという特徴を有している。こうした特徴を生み出している原因の一つとして、菌体表面における TC の配置や、TC の中でも特にセルロース鎖の凝集に関与するとされる CesD の構造に起因していることが示唆された。

2. 研究の目的

本課題では、セルロースマイクロフィブリルの凝集に最も直接的な役割を果たすと考えられる CesD に着目し、*A. bogorensis* の CesD (AbCesD) の機能について明らかにすることを目的とした。具体的には、X 線結晶構造解析による AbCesD の立体構造を決定することで、既に立体構造が明らかとなっているセルロース高生産菌 *G. xylinus* の CesD (GcCesD) との構造比較が可能となり、セルロース鎖を通過させるための“孔”についての詳細な機構を明らかにすることが可能になると考えられる。また、AbCesD の菌体における局在を同定することで、*A. bogorensis* における TC の配列形状や、それに伴うセルロース繊維の形状への影響を明らかにすることが可能になると考えられる。

3. 研究の方法

(1) AbCesD の発現系の構築及び精製

AbCesD は非酵素タンパク質であるため、C 末端に His タグを付加した組換え体として発現を行った。*A. bogorensis* JCM10569 AJ 株のゲノムを鋳型として PCR を行い、pET21a ベクターに組込むことで、発現用プラスミド pET-AbCesD を構築した。このプラスミドを用い *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS を形質転換した。形質転換体を LB 培地で培養し、終濃度 1 mM IPTG にて発現誘導を行った。培養終了後、集菌した菌体を超音波破碎した後、Ni キレートカラムを用いて、SDS-PAGE にて単一のバンドになるまで精製を行った。

(2) AbCesD の結晶化及び構造決定

精製 AbCesD は 2.5 mg/mL まで濃縮した後、ハンギングドロップ蒸気拡散法により 20°C で結晶化を行った。タンパク質量測定は、Bradford 法により牛血清アルブミンを標準物質として行った。得られた結晶の X 線回折強度測定は、高エネルギー加速器研究機構の放射光施設 (PF-AR NW12A) にて行った。位相決定には *Gluconacetobacter xylinus* 由来の CesD (GxCesD) を鋳型とした分子置換法により行った。

(3) AbCesD の多量体形成の確認

水溶液中における AbCesD の多量体形成の確認は、Blue Native-PAGE 及び TSKgel SuperSW3000k ラムを用いた HPLC 分析により行った。

(4) AbCesD のポリクローナル抗体の作製

E. coli による組換え AbCesD 及び、免疫動物にウサギを使用して、抗 AbCesD ポリクローナル抗体を作製した。

(5) AbCesD の局在決定

A. bogorensis を HS 培地にて培養後、集菌した後、凍結処理を行い超薄切片を作製した。その後、AbCesD 抗体を金ナノ粒子でラベル化したものを作用させ、透過型電子顕微鏡にて観察を行った。

(6) 変異型 AbCesD の調製

野生型の AbCesD 遺伝子が挿入されたベクターを鋳型として、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara) を用いて、*A. bogorensis* の N 末端配列を、*G. xylinus* のアミノ酸配列になるように置換した変異体を作製した。

(7) AbCesD 遺伝子破壊株の作製

A. bogorensis の CesD 遺伝子中に、選択マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子を相同組換えにて挿入し、遺伝子の破壊を行った。*A. bogorensis* 内への相同組換え用のプラスミドの導入は電気穿孔法にて行った。

4. 研究成果

(1) AbCesD の異種発現

AbCesD は C 末端に 6 × His タグが融合した 148 アミノ酸残基からなるタンパク質として発現され、Ni キレートカラム精製により、一次構造から推定される分子量 16,000 付近に電気泳動的に単一なバンドが得られた (図 1)。

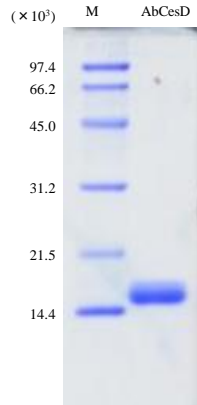


図 1. 精製後の SDS-PAGE

(2) AbCesD の結晶化

市販のスクリーニングキットを用いて初期条件の検討を行った結果、沈殿剤にポリエチレングリコール (PEG) 及び 2-メチル-2,4-ペンタンジオール (MPD) を組合せ条件で微結晶が得られた。最終的に終濃度が 1.25 mg/mL AbCesD 及び、50 mM マロン酸ナトリウム (pH 6.2), 2% PEG3400, 8% MPD の条件において、0.04 × 0.04 × 0.2 mm の六角柱状の単結晶が得られた (図 2)。

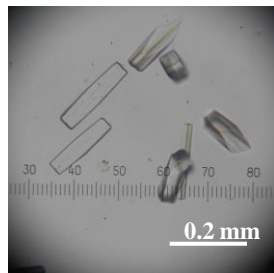


図 2. AbCesD の結晶

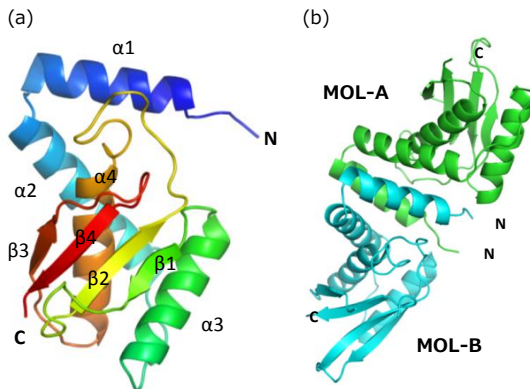


図 3. AbCesD の立体構造
(a) 1 分子, (b) 2 分子

(3) AbCesD の X 線結晶構造

X 線回折強度測定の結果より、AbCesD 結晶の空間群は $I222$ であり、格子定数は $a = 99.2 \text{ \AA}$, $b = 57.8 \text{ \AA}$, $c = 112.5 \text{ \AA}$ であった。位相決定は、分解能 31.7-1.95 \AA のデータを用いて、既に立体構造が 3.0 \AA 分解能で決定されている GxCesD (PDB: 3A8E) を鋳型とした分子置換法によって行い、最終的に R-factor は 22.7%, R_{free} は 27.8% となった。結晶学的な非

対称単位中に、独立した 2 分子の AbCesD と 200 個の水分子を決定した。

1 分子の AbCesD は、4 本の α -ヘリックスと β -ストランドから構成されており、1 番目及び 2 番目の α -ヘリックスを介してもう一分子と相互作用をし、2 量体を形成していた (図 3)。

また結晶中では、この 2 量体が対称性により 4 つ会合し、8 量体を形成していた。その結果、8 量体の全体構造としては円柱状となり、その中央に十字状の孔を有していた。この孔は最も広い部分で約 30 \AA 、狭い部分で約 14 \AA であった (図 4)。

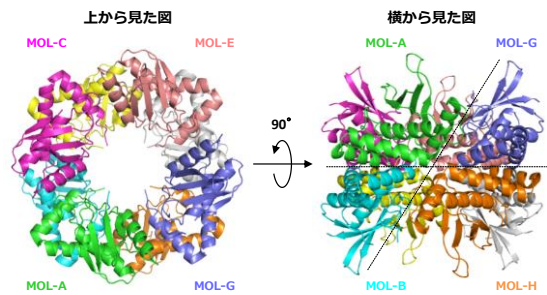


図 4. AbCesD の 8 量体構造

(4) 多量体形成の確認

X 線結晶構造解析から、AbCesD は結晶中で 8 量体を形成していることが明らかとなったが、この多量体が溶液中でも形成しているのかを調べるために、電気泳動法及びゲル濾過カラムによる HPLC にて検証を行った。Blue-Native PAGE (図 5) 及び、HPLC (図 6) の結果はともに分子量は、約 144,000 であった。1 分子当りの推定分子量は約 16,000 であるので、9 分子に相当する。しかし、AbCesD と GxCesD の 8 量体構造を重ね合わせると、主鎖の位置はほぼ一致する。両タンパク質の違いは、8 量体の内部の孔を形成する N 末端領域の長さであり、多量体形成時のタンパク質の形状には影響を及ぼさないと考えられる。その結果、Blue-Native PAGE 及び HPLC では、見かけ上大きな分子量として現れたものと考えられる。

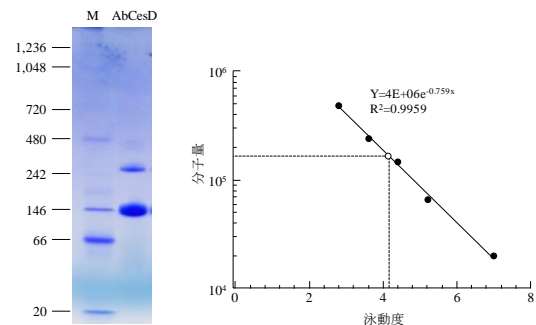


図 5. Blue-Native PAGE による多量体形成の確認

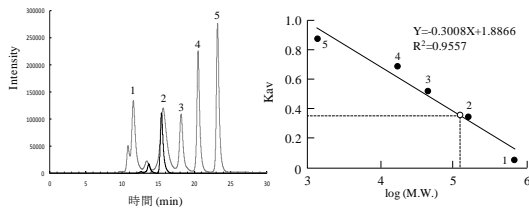


図 6. ゲル濾過カラムによる多量体形成の確認

(5) 電子顕微鏡による AbCesD の局在

AbCesD のアミノ酸配列には、シグナル配列と推定される領域は存在していないが、セルロース合成オペロンを形成するタンパク質の 1 サブユニットとして TA を形成していると考えられる。これまでに、セルロース合成酵素 CesA 及びサブユニット CesB の複合体構造が解明され、膜に位置していることが明らかになっている。

そこで AbCesD の局在を調べるために、AbCesD に対する抗体を作製した。菌体を固定化後に超薄切片を作成し、これを 2 重免疫染色法により染色したところ、金粒子は菌体表層の膜付近に集中して見られた。以上のことから、CesD タンパク質は、従来 *G. xylinus* で言われているように、セルロース合成タンパク質複合体 (TC:ターミナルコンプレックス) のメンバーとして、膜に固定化された複合体の外膜近傍に局在していることが予想された (図 7 参照)。ただし、今回の画像では、1ヶ所のみ集中して見られることから、*G. xylinus* のように細胞膜上で一列に配列してはいないことが予想された。今後、さらに詳細に CesD タンパク質の局在について観察する必要がある。

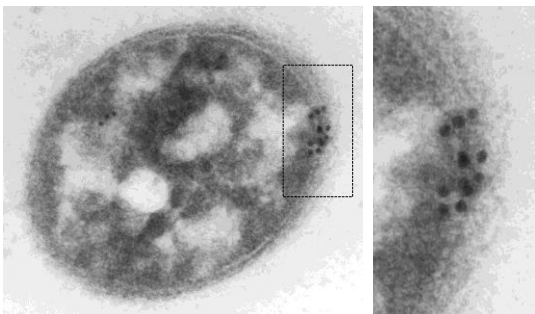


図 7. AbCesD 抗体を用いた菌体における AbCesD の局在

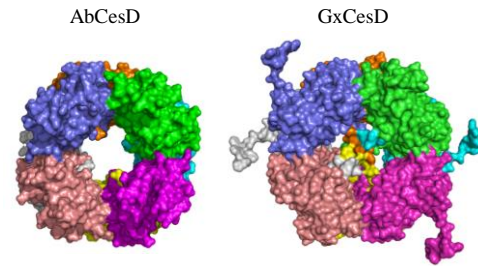


図 8. AbCesD と GxCesD の 8 量体構造の比較

(6) AbCesD の機能解明

AbcesD の機能を解明するため、セルロース生産性の高い *G. xylinus* の同タンパク質と構造の比較を行なった (図 8)。8 量体の構造から予測される中心部の孔については、AbCesD のほうが大きく、全体がひとつの孔として存在していた。これらの孔はセルロースの排出の際の菌体外への出口と考えられる。CesD と他のセルロース合成に関わるタンパク質の複合体の構造についてはいまだ明らかになっていないが、おそらく 4 本のセルロース鎖が排出されてくるものと考えたとき、GxCesD では中心部の細かく仕切られた孔からそれぞれの鎖が合成されて出てきた後に、束ねられているであろう。しかるに、AbCesD では、合成された後のセルロースを束ねるガイドの部分の欠如しているものと考えられる。各々の CesA が完全に同調されていれば、均一な束としてきれいなサブフィブリルが形成されるであろうが、そうでない場合には、これらを束ねて欠陥を少なくする機構が必要であろう。さもなくば、セルロース鎖が無秩序に会合して、孔をふさいでしまうかもしれない。今回、両菌の CesD の構造が明らかとなり、この孔の形成の状態がセルロース合成に影響を与えていることが改めて明らかになった。田島らにより GxCesD の N 末端から 5 つのアミノ酸を削除するとセルロースの生産性が減少するとの報告とよく一致する結果となった。現在、AbCesD の N 末端側にアミノ酸を付加した変異型のタンパク質を発現して、その表現系の変化を観察しているところである。

(7) 総括

今回の研究により、セルロース合成酵素複合体のメンバーである CesD をより高感度で X 線構造解析することが可能になり、水分子の位置まで特定することが可能となった。また、多量体構造が、セルロースのサブフィブリルの菌体外への排出のガイド的な役割を果たしていることを考察した。セルロース鎖との複合体の共結晶などの観察により詳細な排出の機構が明らかになることが望まれる。また、これまでモデルとして提唱されているのみであった CesD が外膜付近に局在していることを二重免疫電顕観察で初めて観察した。

今後は、細胞表層での TC の数やその配列について、明らかにすることにより、セルロース生産性に与える因子の解明につながると考えている。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 小竹一樹、水野正浩、野崎功一、伏信進矢、天野良彦、Asaia bogorensis におけるセルロース合成における CesD タンパク質の機能解析、日本農芸化学会中部支部創立 60 周年記念第 171 回例会、要旨集 p6、2014 年 10 月 11 日
- ② 水野正浩、小竹好、野崎功一、荒川孝俊、伏信進矢、天野良彦、Asaia bogorensis におけるセルロース合成関連タンパク質 AbCesD の X 線結晶構造解析、日本応用糖質科学会平成 26 年度大会、p53、2014 年 9 月 24 日
- ③ 水野正浩、酢酸菌 Asaia bogorensis における微細セルロースの生合成、セルロース学会東日本支部ミニシンポジウム、招待講演、講演要旨集 p1-4、2014 年 9 月 19 日
- ④ Masahiro Mizuno, Akio Kumagai, Kouichi Nozaki, Kazuo Okuda, Inder M. Saxena, Yoshihiko Amano ; Comparriosn of the assembly of cellulose microfibrils in Gluconacetobacter xylinus and Asaia bogorensis. 3rd International Cellulose Conference, p75, Sapporo, Japan, October 10-12, (2012)

[図書] (計 1 件)

- ① 天野良彦、セルロースの面白科学とびっくり活用、セルロース学会編、講談社、p22-23,130-131 (2012)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天野 良彦 (AMANO, Yoshihiko)
信州大学・学術研究院工学系・教授
研究者番号：80273069

(2) 研究分担者

水野 正浩 (MIZUNO, Masahiro)
信州大学・学術研究院工学系・助教
研究者番号：60432168

奥田 一雄 (OKUDA, Kazuo)
高知大学・教育研究部・教授
研究者番号：40152417