

平成22年5月31日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19208017

研究課題名（和文） 細胞壁多糖のインビトロ合成とそのキャラクタリゼーション

研究課題名（英文） *In vitro* synthesis of cell wall polysaccharides and their characterization

研究代表者

杉山 淳司（SUGIYAMA JUNJI）

京都大学・生存圏研究所・教授

研究者番号： 40183842

研究成果の概要（和文）：

数種のセルロース生産性生物を使ってセルロースの試験管内合成を行わせた。植物培養細胞からは既報の通り、 β 1→3-グルカンが合成された。緑藻チリモを用いた場合も植物と同様に β 1→3-グルカンが主に合成されることが本研究で初めて明らかとなった。酢酸菌では既報の通りセルロースがII型結晶として合成されることを電子回折、X線回折、FTIRにより再確認した。またこの試験管内合成されたセルロースは、人工合成セルロースの多くで見られるようなオリゴマーではなく、おそらくポリマーであることが初めてMALDI-ToF MSにより示され、界面活性剤による可溶化は合成酵素活性に深刻な機能不全をもたらしていないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

In vitro synthesis of cellulose was conducted with several cellulose-producing organisms. When green algae *Micrasterias crux-melientes* used, β 1→3-D-glucan was the major product as well as plant cultured cells used. We reconfirmed by electron diffraction, X-ray diffraction and FTIR that cellulose II was synthesized *in vitro* when *Gluconacetobacter xylinus* (vinegar-producing bacterium) used, as shown previously. Noticeably, it was shown by MALDI-ToF MS for the first time that this cellulose was not oligomer like many of artificially synthesized cellulose, but probably polymer. It is thus concluded that solubilization by detergent does not damage seriously the cellulose synthesizing activity of *G. xylinus*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,600,000	3,180,000	13,780,000
2008年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2009年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
総計	28,200,000	8,460,000	36,660,000

研究分野： 農学

科研費の分科・細目： 林学・林産化学、木質工学

キーワード： セルロース、バイオマス、セルロース合成酵素、膜タンパク質、BY-2、酢酸菌、緑藻

1. 研究開始当初の背景

セルロース生合成に関しては近年分子生物学的な研究が著しく進歩しているものの、

セルロース合成をタンパク質レベルで研究する例はなく、膜タンパク質の活性を保持しつつ取り出す実験系が確立されてないこと

が大きな障害となっていた。また過去の文献には、合成産物の解釈に疑問があり、セルロースを合成したとする実験結果自体が危うい例も見受けられた。そこでセルロースと膜タンパク質の専門家が連携し、確実にセルロースを試験管内で合成できる条件を見いだすことが、この分野のブレークスルーとなると考えた。

2. 研究の目的

原形質膜に局在するセルロース合成酵素複合体（ターミナルコンプレックス）によって天然セルロースは合成される。しかし、膜結合性の特殊なタンパク質であるために、その構造ならびに機能については多くのことがまだ明らかになっていない。

本研究は、セルロースの合成酵素の構造と機能を調べるために、①ステーブルな細胞培養とセルロース合成活性酵素抽出法を確立し、②インビトロセルロース合成の「その場」観察により合成機構を調べ、さらに③インビトロセルロースの構造解析によるセルロースの形態形成に及ぼす外的環境の影響等を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

実験材料として、セルロース生産性の生物を利用しなければならないが、以下の4つを選択した。①植物（タバコ BY-2 培養細胞）、②ホヤ（カタユウレイボヤ）、③緑藻（接合藻類チリモ）、④酢酸菌、⑤組換え体合成酵素。

上記の生物を培養あるいは採取し、遠心分画法により膜画分を単離した。これに界面活性剤を加えて、膜タンパク質であるセルロース合成酵素を可溶化した。これにセルロース生合成の基質である UDP-グルコースを加えて、セルロースの試験管内合成を行わせた。合成された産物を各種分析（RI ラベル取り込み量測定、電子顕微鏡観察、電子回折、X線回折、赤外スペクトル、酵素分解性など）により評価した。なお合成条件に関しては、用いた材料に関わらず同一の条件とした（酢酸菌のみ c-diGMP；環状二グアニルリン酸という合成活性化因子を追加した）。

4. 研究成果

① 植物（タバコ BY-2 培養細胞）

ジギトニンによる膜可溶化画分に UDP-グルコースを加えたところ、 β 1 \rightarrow 3-グルカンらしき構造体が見られた。FTIR や X線回折データを標品のカードランと比較したところきわめてよい一致をみた。

② ホヤ

植物が障害を受けた際に発現する β 1 \rightarrow 3-グルカンが植物に得意的な現象であ

ることを考え、動物でありながら、唯一セルロースを合成するホヤに着目して同様の実験を行った。細胞膜を可溶化すると活性が見られなかったが、可溶化前の細胞膜にはグルカン合成活性が見られた。合成産物の量が僅少であったため、その構造の分析はできなかった。

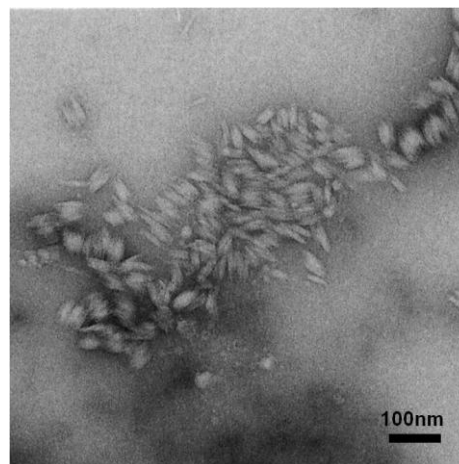


Figure 1 タバコ由来の合成産物の電子顕微鏡観察（負染色像）の典型例

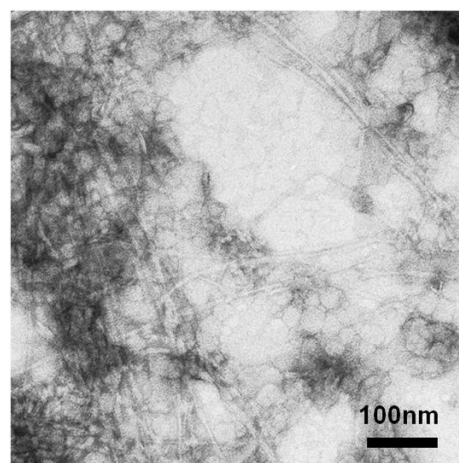


Figure 2 ホヤ由来の合成産物の電子顕微鏡観察（負染色像）の典型例

③ 緑藻

植物を用いた場合の、セルロース *in vitro* 合成系の抱える最大の問題点は、主要な合成産物が β 1 \rightarrow 3-グルカンとなり、セルロース合成活性があったとしても非常に弱く検出できないことである。そこで、細胞壁に β 1 \rightarrow 3-グルカンの存在が報告されていない緑藻を用いることにした。

膜可溶化のための界面活性剤をいくつかスクリーニングにかけ、ジギトニンを用いた場合、 β 1 \rightarrow 3-グルカンらしき短繊維構造が電子顕微鏡下で主に観察された。

さらにマイノリティであるが長繊維構造もしばしば見られた。これをさらに顕微IRで分析したところ、 β 1 \rightarrow 3-グルカンとセルロースの混合物であることが示唆された。また β 1 \rightarrow 3-グルカンナーゼ処理で合成産物がほぼ消失したことから、主要な合成産物は β 1 \rightarrow 3-グルカンであることが示唆された。

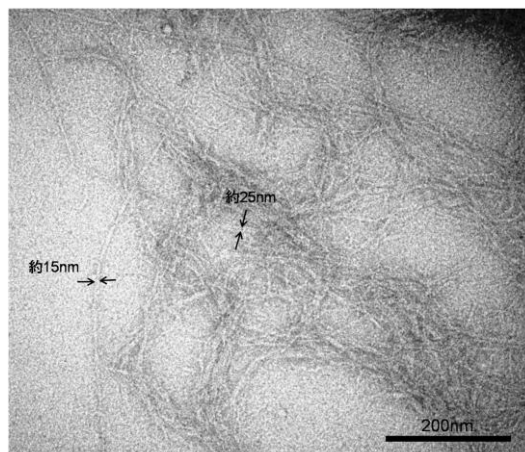


Figure 3 合成産物の電子顕微鏡観察（負染色像）の典型例

幅 15nm の長繊維と幅 25nm の複数本のバンドルからなる短繊維構造が見られた。

④・酢酸菌

酢酸菌はすでに試験管内セルロース合成の構築に成功している生物であり、セルロース生合成研究のマイル・ストーン的な実験系である。ところが本系で合成されるセルロースはセルロース II 結晶であることが報告されている。天然のセルロースはセルロース I 結晶であることから、本合成系は生物の持つセルロース合成を再現できていない。そこで今一度本合成系について調査した。

まず使用されたことのない界面活性剤を試し、DM 及び DDM で合成活性を可溶化することに成功した。しかしこれらの界面活性剤を用いてもセルロース II が合成されることが確認された。また MALDI-ToF MS の結果から、合成されたセルロースはオリゴマーではなくポリマーであることが示唆された。すなわちセルロース II が合成されたのは合成活性が著しく損なわれた訳ではないことが示唆された。

界面活性剤により可溶化された合成酵素では、合成されたセルロースも溶液中を無秩序に吐き出した結果、セルロース II が合成されたと仮説を立て、一度膜よ

り可溶化した膜タンパク質画分を脂質二重膜へ再構成して合成を行わせることを試みた。その結果、繊維状構造物が観察された。現在、この繊維状構造物の同定を進めている。

またこの試験管内合成系の確立の過程で、酢酸菌におけるセルロース合成の活性化因子である c-diGMP の酵素合成系を確立した。

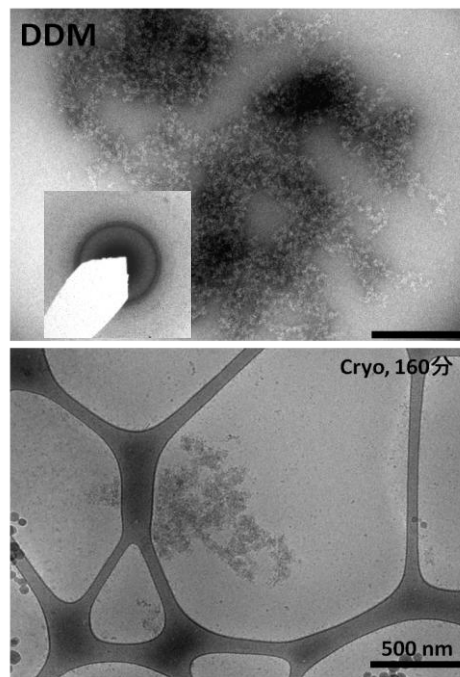


Figure 4 合成産物の電子顕微鏡観察（上段：負染色像、下段：氷包埋試料のクライオ観察）の典型例 [DDMを使用]

天然で見られるような繊維ではなく、凝集体として観察される。また電子回折像（上段挿入図）からはセルロース II であることが示唆された。

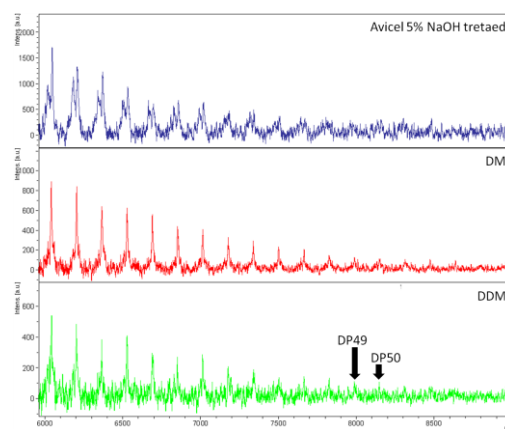


Figure 5 MALDI-ToF MS

DP50 相当以上の m/z までシグナルが見られ、ポリマーだと推測される。

⑤ 組換え体合成酵素

より詳細にセルロース合成酵素の機能解析を行うためには組換え体の利用が望まれる。そこで分担者(今井)がすでに構築した酢酸菌の合成酵素遺伝子群の大腸菌発現系を用いて合成活性を復元することを試みた。そのための組換え体タンパク質の精製条件の検討を行った。合成活性の必要条件である CesA と CesB の共精製が可能であることを見出した。今後はこの組換え体 CesAB による試験管内セルロース合成を試すとともに、c-diGMP 合成酵素とセルロース合成酵素遺伝子群の共発現系による大腸菌セルロース合成系の確立を行う計画である。

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)

① [雑誌論文] (計 3 件)

1. Nakashima K, Sugiyama J and Sato N
A spectroscopic assessment of cellulose and the molecular mechanisms of cellulose biosynthesis in the ascidian *Ciona intensitinalis*
Marine genobics(査読あり), vol.1, pp9-14,2008
2. Horikawa Y, Sugiyama J
Accessibility and size of Valonia cellulose microfibril studied by combined deuteration/rehydrogenation and FTIR technique
Cellulose(査読あり), vol15, pp419-424, 2008
3. 杉山淳司、堀川祥生
セルロースマイクロフィブリルと結晶多形
木材学会誌(査読なし), vol54, pp49-57, 2008

② [学会発表] (計 23 件)

1. 橋本章、堀川祥生、今井友也、杉山淳司
細胞膜に内在するセルロース合成活性の in vitro 再構築(Ⅱ)～酢酸菌を用いて～
第 60 回日本木材学会大会, 2010 年 3 月 18 日, 宮崎観光ホテル (宮崎県)
2. 菅野亜美、杉山淳司、岩崎憲治、今井友也
酢酸菌セルロース合成酵素複合体の精製とその構造決定に向けて
第 60 回日本木材学会大会, 2010 年 3 月 18 日, 宮崎観光ホテル (宮崎県)
3. 市川典、杉山淳司、今井友也
セルロース大腸菌合成系構築に向けた c-di-GMP の in vivo 合成
第 60 回日本木材学会大会, 2010 年 3 月 17 日,

宮崎市民プラザ (宮崎県)

4. 橋本章、堀川祥生、今井友也、杉山淳司
細胞膜に内在するセルロース合成活性の in vitro 再構築(Ⅰ)～緑藻を用いて～
第 60 回日本木材学会大会, 2010 年 3 月 17 日
宮崎市民プラザ (宮崎県)
5. 菅野亜美、杉山淳司、今井友也
酢酸菌のセルロース合成酵素複合体における GxCesA と GxCesB との直接相互作用
第 47 回日本生物物理学会年会, 2009 年 10 月 31 日, アスティとくしま (徳島県)
6. 橋本章、堀川祥生、今井友也、杉山淳司
淡水藻類ミクラステリアスを用いたセルロースの in vitro 合成の試み
セルロース学会第 16 回年次大会, 2009 年 7 月 3 日, 北海道大学 (札幌市)
7. 市川典、杉山淳司、今井友也
組換え体 BcsAB によるセルロースの試験管内合成に向けて
セルロース学会第 16 回年次大会, 2009 年 7 月 3 日, 北海道大学 (札幌市)
8. Yoshiki Horikawa, Chiori Ito, Tomoya Imai, Vincent Bulone and Junji Sugiyama
In vitro β -glucan synthesis of plant cells
237th ACS National Meeting & Exposition, 2009/3/22, Salt Lake City, UT
9. 市川典、堀川祥生、杉山淳司、今井友也
セルロース合成活性化因子 c-di-GMP の酵素合成
第 59 回木材学会, 2009/3/15, 長野県松本市
10. 橋本章、堀川祥生、今井友也、杉山淳司
淡水藻類 *Micrasterias* を用いた多糖繊維の in vitro 合成
第 59 回木材学会, 2009/3/15, 長野県松本市
11. 今井友也、堀川祥生、木村聡、杉山淳司
酢酸菌 BcsB タンパク質の生化学的解析
第 59 回木材学会, 2009/3/15, 長野県松本市
12. 堀川祥生、杉山淳司
海藻由来のマイクロフィブリル内における $I\alpha I\beta$ の局在
セルロース学会第 15 回年次大会, 2008/7/11, 京都府京都市
13. 中村伊都子、大前仁、木村俊作、杉山淳司
変異エンドグルカナーゼ金基板への異なる配向固定化と酵素活性への影響
セルロース学会第 15 回年次大会, 2008/7/11, 京都府京都市
14. Junji Sugiyama and Yoshiki Horikawa
Localization of crystalline allomorphs in algal cellulose microfibril
235th ACS National Meeting &

- Exposition, 2008/4/6, New Orleans, LA, USA
15. Yoshiki Horikawa and Junji Sugiyama
Structural features of cellulose microfibrils observed by FTIR technique combined with deuteration/rehydrogenation at elevated temperature
235th ACS National Meeting & Exposition, 2008/4/6, New Orleans, LA, USA
 16. 伊藤千織, 杉山淳司, Vincent Bulone
BY2 培養細胞を用いた多糖繊維のin vitro 合成-digtonin 抽出画分による合成産物の構造II-
第58回日本木材学会大会、2008/3/17-19, 茨城県つくば市
 17. 堀川祥生, 杉山淳司
マイクロフィブリル内における $I\alpha \cdot I\beta$ 結晶の局在
第58回日本木材学会大会、2008/3/17, 茨城県つくば市
 18. Yoshiki Horikawa and Junji Sugiyama
Various difference of cellulose microfibrils dimension observed by infrared spectroscopy
2nd International Cellulose Conference (ICC2007)、2007/10/21, 東京都江戸川区
 19. Ciori Itoh, Vincent Bulone and Junji Sugiyama
In vitro synthesis of cellulose and callose by plant cell-free extracts and product characterization
2nd International Cellulose Conference (ICC2007)、2007/10/21, 東京都江戸川区
 20. 伊藤千織, 杉山淳司, Vincent Bulone
BY2 培養細胞を用いた多糖繊維の in vitro 合成 - digtonin 抽出画分による合成産物の構造 -
第 57 回日本木材学会大会、2007/8/8, 広島県広島市
 21. 堀川祥生, 杉山淳司、加藤千秋 (JAMSTEC)、山中茂(信州大繊維)
深海動物オオグチボヤ(Megalodicopia hians)のセルロース
第 57 回日本木材学会大会、2007/8/8, 広島県広島市
 22. 伊藤千織、今井友也、杉山淳司
bcsA タンパク質の大腸菌発現系に関する研究
セルロース学会第14回年次大会、2007/7/19, 静岡県静岡市
 23. 堀川祥生, 杉山淳司
結晶内重水素化を用いたマイクロフィブリルのアクセシビリティとサイズの検討
セルロース学会第14回年次大会、2007/7/19, 静岡県静岡市

③ [図書] (計1件)

杉山淳司、セルロースの結晶・微細構造、木質の化学 (木材学会編)、文永堂出版、p. 63-75, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 淳司 (SUGIYAMA JUNJI)
京都大学・生存圏研究所・教授
研究者番号：40183842

(2) 研究分担者

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

馬場 啓一 (BABA KEIICHI)
京都大学・生存圏研究所・助教
研究者番号：20238223

(3) 連携研究者

和田 昌久 (WADA MASAHISA)
東京大学大学院・農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：40270892