

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月29日現在

機関番号： 14301

研究種目： 挑戦的萌芽研究

研究期間： 2010～2011

課題番号： 22658053

研究課題名（和文） セルロース合成酵素の機能解析基盤の構築

研究課題名（英文） Start-up study of functional analysis of cellulose synthase

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）：セルロース合成酵素がセルロースを合成する仕組みは、実はあまり解明されていない。そこでセルロース合成酵素・合成活性を直接解析するために必要な下記3点の実験基盤を構築した：①セルロース合成酵素複合体の大腸菌発現系の構築、②試験管内および大腸菌内 c-di-GMP 合成系の構築、③試験管内セルロース合成活性の速度論的解析。いずれの実験材料・実験系もセルロース合成酵素そのものの解析を進める上で大変重要なものである（特に①は今まで報告のない貴重な研究資源である）。以上から、今後のセルロース生合成研究を飛躍的に進展させるための研究基盤を整備した。

研究成果の概要（英文）： The mechanism how cellulose synthase produces cellulose is not understood well, because this enzyme is very difficult to investigate and the enzymatic activity has been rarely analyzed in direct. In order to conduct direct analysis of cellulose synthase, three materials are prepared in this project: (i) recombinant proteins of cellulose synthase complex by *E. coli* expression system, (ii) c-di-GMP synthesis *in vitro* and in *E. coli* to fully activate the enzyme and (iii) enzymatic kinetics of cellulose-synthesizing activity *in vitro*. All of these are very important for direct analysis of cellulose synthase; especially (i) is the first example in the world and an outstanding research resource. Thus this study has set up important tools for studying cellulose biosynthesis deeply.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,800,000	270,000	3,070,000

研究分野：生物学

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、CesA、酵素反応速度論、c-di-GMP、酢酸菌

1. 研究開始当初の背景

セルロース生合成研究は、合成酵素遺伝子 *cesA* が発見されて以降は、遺伝情報のデータベースがよく整備されている植物を中心に進められた。ところが、その多くは分子細胞生物学研究であり、セルロース合成反応を直接の解析対象とした研究は少ない。セルロース合成酵素が複合体かつ膜タンパク質であ

り、研究対象として決して易しくないことが理由として挙げられる。このような状況のため、UDP-グルコースからセルロース高分子鎖の末端への糖転移反応の詳細や、そもそもセルロース分子末端へ直接転移されるのか、何らかの中間体を経由するのかについてさえ明確な答えは出ていない。つまり、酵素的・生化学的な知見がセルロース合成酵素に

関しては全く不足の状況である。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえると、セルロース合成酵素を直接取り扱うことができる実験系を構築し、合成活性そのものを直接観察する研究がやはり必要となってくる。特に組換え体を使った実験が可能となれば、合成酵素の作用機構の詳細がアミノ酸配列レベルで理解することが可能となる。そこで、セルロース合成酵素複合体の発現系を構築し、これを使ったセルロース合成の大腸菌内・試験管内再構成を目指した。

3. 研究の方法

上述のような困難な研究であることから、可能な限り単純なモデル生物の使用が重要となると考えられるため、バクテリアである酢酸菌をモデル生物として利用した。

(1) セルロース合成酵素複合体の大腸菌発現系の構築

酢酸菌では、そのゲノム構成から複合体を構成するタンパク質が推測できる。その4タンパク質 (GxCesA, GxCesB, GxCesC, GxCesD) の共発現系の構築を目指した。バクテリアを材料に用いることから、異種発現系として大腸菌を使用し、すでに構築済みであった *GxCesAB* (4,700bp) の共発現系に、*C* (4,000bp) と *D* (500bp) 遺伝子をリガーゼ反応でつなぐことでフル複合体発現系の構築を行った。各タンパク質の発現を、SDS-PAGE・免疫ブロット法で確認した。

(2) c-di-GMP 合成系の確立

酢酸菌をモデルとして研究を行うためには、c-di-GMP という低分子量核酸が合成活性発現のために必要となる。そこで、c-di-GMP 合成酵素 (DGC: diguanyl cyclase) の発現系の構築を行った。より高い DGC 酵素活性を持つ DGC 遺伝子として、既報の好熱性細菌 *Thermotoga maritima* 由来の遺伝子を選択し、その大腸菌発現系を構築した。本発現系による c-di-GMP の合成を、試験管内および大腸菌内のそれぞれで調査した。合成産物は、精製あるいは粗抽出物のまま、MALDI-TOF-MS や LC/MS を使って分析し、c-di-GMP の生成を確認した。

(3) セルロース合成活性の速度論的解析

(2) の DGC 合成系を使って大量に得られるようになった c-di-GMP を活用し、試験管内セルロース合成活性の速度論的解析を行った。合成活性の評価は、基質として UDP-[U-¹⁴C]-glucose を使い、合成されたセルロース中の ¹⁴C ラベルを液体シンチレーションカウントで測定することにより定量した。得られた濃度依存性データは Hill 式 (下式)

にフィットさせて酵素反応速度論パラメーターを得た。

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]^n}{K_m^n + [S]^n}$$

V_{\max} : 最大速度、 K_m : ミカエリス定数、 n : ヒル係数

4. 研究成果

(1) セルロース合成酵素複合体の大腸菌発現系の構築

図1に、構築した大腸菌発現系における4タンパク質の発現を確認した免疫ブロットの結果を示す。

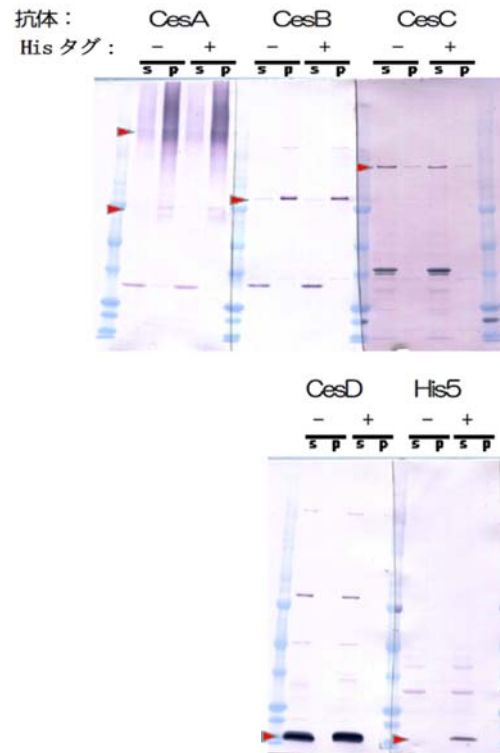


図1 構築した大腸菌発現系の発現確認。IPTG で発現誘導し、得られた大腸菌の菌体を、アルカリ可溶画分(s)と不溶画分(p)に分画し、SDS-PAGE後に免疫ブロットで確認した。pには膜タンパク質、sにはそれ以外のタンパク質が分画される。目的のタンパク質のバンドを矢頭で示した

アルカリ分画を使って、各タンパク質の発現局在を細胞膜とそれ以外という形で評価したところ、AとBは膜タンパク質として発現していることが確認され、これら2つのタンパク質は封入体ではなく正しくフォールドされて発現したと推測される。CesCについては局在に関する実験的証拠に乏しく、結果を慎重に検討する必要があるが、CesDについて

では、可溶性タンパク質として発現することが示唆される報告があるため、アルカリ分画において膜に見られなかったことと矛盾しない。

以上から、セルロース合成酵素「複合体」の組換え体を得られるようになった。本系は今まで報告のないものであり、今後のセルロース合成研究を加速的に進行させる基盤となることが期待される。また CesD に His6 タグを融合したコンストラクトの構築も成功し、試験管内における活性再構成など、研究の大きな展開が今後期待できる。

(2) c-di-GMP 合成系の確立

Thermotoga maritime 由来の DGC タンパク質 (tDGC) を使うことで、試験管内での c-di-GMP 合成反応が、従来使用していた DGC より数十倍効率が上がることが判明した。

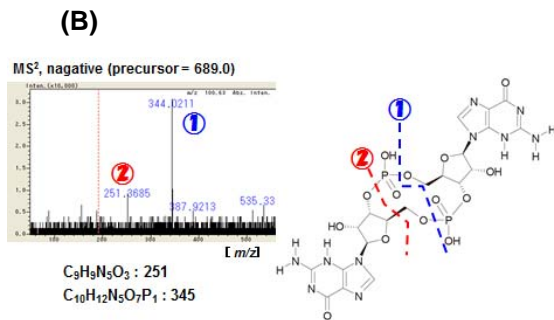
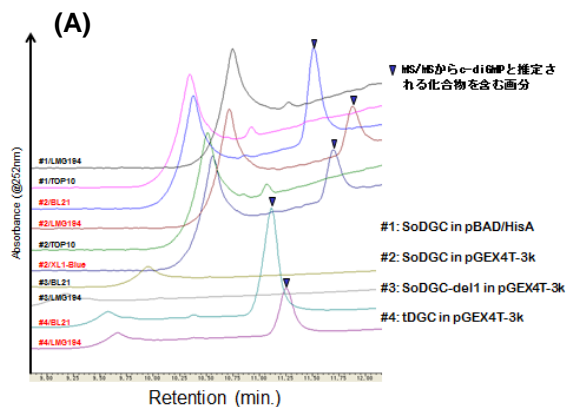


図2 (A) DGC 発現大腸菌の菌体抽出物の液体クロマトグラフ。4 種類のコンストラクトと 4 種類の大腸菌株の組み合わせをいくつか試行した例。矢頭で示したピークが、ESI-TOF-MS で c-di-GMP を含むことが確認されたピーク。(B) 菌体内抽出物の LC/MS で得られる c-di-GMP の質量スペクトルの一例。m/z=689 の負イオンの MS/MS スペクトルと、そこから予想される開裂パターン

また、この tDGC を発現している大腸菌から抽出した細胞内容物を LC/MS 分析したところ、

c-di-GMP の存在を確認した (図 2)。発現誘導前には c-di-GMP に相当するシグナルは得られないことから、tDGC を発現させることで c-di-GMP の細胞内レベルが上昇することを確認できた。

(3) セルロース合成活性の速度論的解析

基質である UDP-グルコース、活性化因子である c-di-GMP と、その試験管内反応における役割が明確でないセロビオースについて、合成活性の濃度依存性を調査した。その結果、UDP-グルコースと c-di-GMP についてはその濃度に依存して合成活性が変化した。セロビオース濃度も同様にセルロース合成活性に影響を及ぼすことが示され、その影響が Michaelis-Menten 式で説明できることが分かった (図 3)。今後、慎重に検討を進める必要があるが、セルロース合成酵素の機能を解明する上で、酵素反応速度論的解析はまさに基盤となるデータであり、継続して分析を進めていく計画である。

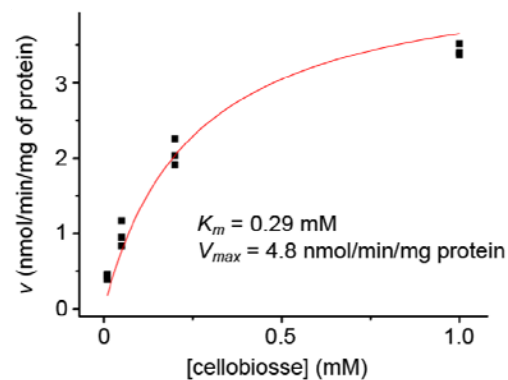


図3 酢酸菌の試験管内セルロース合成活性の、セロビオースに関する基質飽和曲線。赤線は Michaelis-Menten 式にフィットさせた曲線であり、そこから得られた速度論的パラメーターを示す。

まとめると、

- ① セルロース合成酵素複合体の大腸菌発現系構築に成功した。
- ② c-di-GMP 酵素合成系の改良と、これを利用した大腸菌内の c-di-GMP レベルの亢進に成功した。
- ③ 試験管内でのセルロース合成活性の速度論的解析を行い、酵素反応に関する基礎的なデータを得た。

①②により、組換え体タンパク質を使った、

セルロース合成活性の再構成を目指すことが可能となった。特に大腸菌内で c-di-GMP レベルを高めることができることが判明したことから、より簡便な、大腸菌での合成活性再構成が期待できる。また③により、酵素反応機構を解明するために不可欠な酵素反応速度論解析が可能となり、実際にデータの分析を現在行っている。これから、合成活性の実態について描像を得ることが可能になると考えられる。

以上から、セルロース合成酵素・合成活性を直接解析するための基盤構築を達成できたと考えている。今後、本課題で構築した基盤（組換え体タンパク質と酵素反応速度論的解析の実験系）を使い、研究を加速させていきたい。

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 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
- ② 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.

[学会発表] (計10件)

- ① 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、2012年5月19日、京都府宇治市
- ② 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、2012年3月15-17日、北海道札幌市
- ③ 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、2011年10月1日、京都府京都市

④ 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、2011年9月22日、京都府京都市

⑤ 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、2011年7月14-15日、長野県長野市

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

- 学会等主催のシンポジウムでの依頼公演にて結果の一部を紹介
- ホームページを準備中

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