

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月20日現在

機関番号：38005

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780191

研究課題名（和文）被囊動物オタマボヤを用いたセルロース結晶多形が生じるしくみの解析

研究課題名（英文）Study on the formation of two polymorphs of cellulose I in *Oikopleura*

研究代表者

中島 啓介（NAKASHIMA KEISUKE）

沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミックスユニット・研究員

研究者番号：10422924

研究成果の概要（和文）：セルロース生合成における結晶形成過程を理解するべく、海洋性動物プランクトンであるワカレオタマボヤのセルロース合成酵素の解析を行った。ワカレオタマボヤは、結晶の単位胞が異なるセルロースを合成し、その際、別個のセルロース合成酵素を用いる。変異導入したメッセンジャーRNAを胚に注入して影響を評価する方法は効果的に機能しなかったため、異種発現系（大腸菌・ピキア酵母・昆虫細胞）を用いた天然型分子の調製に取り組んでいる。

研究成果の概要（英文）：To understand molecular mechanisms behind crystallization processes in cellulose biosynthesis, we analyzed the two cellulose synthases in the marine chordate *Oikopleura dioica*, those are proposed to be involved in the formation of two polymorphs of cellulose I. With negative results in assessing the embryos injected with mRNAs encoding mutated cellulose synthases, we challenged to express native forms using heterologous system with bacterial, yeast, and insect cell hosts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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

天然セルロースの単位胞（結晶構造の最小単位）には多形が存在する（三斜晶系と単斜晶系）が、その形成のしくみや生物学的な意味はほぼ不明である。

一般的に、生物のつくるセルロースは三斜晶系と単斜晶系が混在した状態にある。その混在比率は生物種に特有（つまり一定）であり、また、系統関係に沿うことが知られている（例えば、植物なら大体4：6、細菌なら大体7：3）。例外的に、セルロースをつくる唯一の動物群である被囊（ひのう）動物のセルロースは、ほぼ純粋な単斜晶系で構成さ

れることが報告されている。浮遊生活を送る被囊動物の仲間ワカレオタマボヤ（*Oikopleura dioica*）は、成体時には他の被囊動物同様にほぼ純粋な単斜晶系からなるセルロースをつくるが、幼生時には一転してほぼ純粋な三斜晶系からなるセルロースをつくる。このように同一種内において単位胞の組成が変化する事例は従来知られていなかった。更に、異なる単位胞を形成するにあたって、それぞれ別個のセルロース合成酵素遺伝子が働くことも明らかにされた（三斜晶系からなるセルロースをつくる際にはO<sub>d</sub>-CesA1分子が働き、単斜晶系からなるセル

ロースをつくる際には Od-CesA2 分子が働く)。つまり、ここに初めて、生物がセルロースの単位胞を制御し得ること、および、その制御過程においてセルロース合成酵素の使い分けが重要である可能性が指摘された。

## 2. 研究の目的

本研究は、天然セルロースの結晶形成過程の最初期に単位胞の多形が生じるしくみの解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

セルロース合成酵素は原形質膜上において膜タンパク複合体ターミナルコンプレックスを構成する一要素である。ターミナルコンプレックスの働きにより伸長した  $\beta$ -1,4 グルカン鎖は伸長度 7 程度で不溶化し、速やかにパッキングされ、結晶形成すると考えられている。このときパッキングの過程は 2 段階で進行する自己組織化過程であり、その最初期におけるグルカン鎖の空間配置が単位胞を決定づけるであろうこと、ならびにグルカン鎖の空間配置を規定するのはターミナルコンプレックスの立体構造であろうことが計算科学の手法から提案されている。ワカレオタマボヤにおける 2 種類のセルロース合成酵素を使い分けた異なる単位胞形成の例は、この仮説の内容によく一致しているように思えるため、ワカレオタマボヤを用いて結晶多形が生じるしくみの実験的な検証を行うことを着想した。

ワカレオタマボヤがほぼ純粋な三斜晶系ならびに単斜晶系からなる結晶を合成する際に機能するセルロース合成酵素 Od-CesA1 と Od-CesA2 は、それぞれ約 1,400 アミノ酸残基からなり、そのうち 400 アミノ酸残基の配列が異なる。タンパク立体構造はアミノ酸配列によって一意的に決定されるため、これらの 400 残基のアミノ酸配列の違いから、立体構造の違いが生じ、単位胞の違いが生じているはずである。よって、これらの違いを考慮した人為的な変異を導入した一連のセルロース合成酵素の働きを検証することを通じて、アウトプットとしての単位胞の変化を見いだすことができれば、単位胞の違いを生み出す領域をアミノ酸配列上に特定できるはずである。

実験系として、2 段階で進めることを想定している。まず、変異を導入した mRNA を顕微注入したオタマボヤ胚を準備し、発生後のセルロース構造について、顕微 FTIR や電子線回折による評価を行う系である。この系の利点は、セルロース合成酵素が実際に単位胞の違いを生み出している場合、直接その効果を評価できる点にある。一方、この系の難点として、オタマボヤの安定した飼育と胚発生を維持することが容易ではないこと、また、

顕微注入が胚に与える影響の評価がむずかしいことが挙げられる。よって、第一の方法に取り組んだ結果、これらの難点が現実的な問題となった場合に備えて、第二の方法を準備する。

第一の方法の難点は主にオタマボヤ生体に内在的な要因によるところが大きい。第二の実験系はオタマボヤ生体・胚を用いず、異種発現系によるセルロース合成酵素の組換え発現体の機能評価を行う。発現宿主には、既に機能的な発現系を構築済の大腸菌を用い、大腸菌系に問題が生じた場合、酵母や昆虫細胞といった真核細胞宿主を順次試す予定である。

組換えセルロース合成酵素の機能の評価は、2 段階で行う。まず、発現宿主から調製したタンパク試料を SDS-PAGE ゲル展開したのち、タンパク染色とタグ抗体を用いたウェスタンブロットイングにより、発現をチェックする。次いで、発現が認められた株を大量培養して、破碎と超遠心分画により調製したマイクロソーム画分を用いた試験管内セルロース合成による定量的な活性評価を行う予定である。これらの免疫染色ならびにラジオアイソトープを用いた試験管内合成活性評価系は立ち上げ済みである。

## 4. 研究成果

ワカレオタマボヤは、沖縄県国頭郡恩納村恩名沖合にて漁船からプランクトンネットを用いて採取していたが、恩納村前兼久の漁港岸壁においても採取できることが後ほど判明したため、主に後方で採取した。採取したオタマボヤは、研究室にて種分けしたのち、手製の攪拌器を用いて、天然海水あるいは人工海水条件にて、20-22°C で飼育した。基本的に、採取した個体が性成熟して有した卵・精子を用いることが多く、次世代個体が性成熟する程に飼育できることはほとんどなかった。当初、新たに屋外に設置したタンクに保持した天然海水を用いていたが、飼育・胚発生ともにすこぶる調子が悪く、用事海からくみ上げた海水あるいは人工海水を用いる方が順調に飼育できた。おそらく、タンクの配管に由来する何らかの要因（接着剤の成分？）が悪影響を及ぼしていたものを理解される。このように、飼育による試料の調製において、不具合が頻発した。

顕微注入する mRNA は、同一の制限酵素を用いて一カ所だけ切断した *Od-CesA1* と *Od-CesA2* をキメラ状に再構成したものを用いた（例えば、N 末端側 1,200 残基は *Od-CesA1* に、C 末端側 200 残基は *Od-CesA2* にそれぞれ由来するキメラ mRNA）。In vitro 転写により調製したキャップ構造不含 mRNA は、0.1 mg/ml 濃度に調整した（含 0.2 mg/ml FastGreen 試薬）。顕微注入は、ホールディ

ングピペットで胚を保持しながら、検鏡下行った。顕微注入した胚をシャーレで保持し、発生が進み、オタマジャクシ幼生の尾びれ部分が十分に伸長したのち、回収・ホルマリン固定した。

固定した個体は水洗後、フッ化バリウム製の専用ウインドウに移し、ドライヤー乾燥したのち、顕微 FTIR 測定に供した。計測に成功した場合、全てのコントロールにおいて三斜晶系のシグナルが得られたように、変異 mRNA 顕微注入した個体においても三斜晶系のシグナルが得られた。実際には、顕微注入した場合、尾びれ部分が十分に伸長するような正常発生をする個体は少なく、1割以下であった。残りの9割の個体においては尾部そのものの形態が伸長不十分であることが多く、幼生セルロース構造である larval envelope が体表に付着した状態であったため、試料の分厚さとセルロース含量の兼ね合いによる原理的な理由において、顕微 FTIR 系を用いた計測が不可能であった。

以上のように、一年目の研究に関しては、飼育の効率、顕微注入後の発生効率、発生後の評価効率がおしなべて芳しくない状態にあり、総合的に時間と労力に対するデータの効率が悪いと、二年目を迎えるにあたり対策が必要であると結論づけられた。

あらかじめ、このような事態を想定して、オタマボヤ生体の状態に依存せず、異種発現系を用いてセルロース合成酵素の機能評価を行う実験系を準備していたため、思い切って二年目は後者に切り替えた。

発現ホストには、大腸菌・ピキア酵母・昆虫細胞を想定していた。まず、大腸菌はコールドショック誘導プラスミドを基本とした系を用いて、分泌型のタンパク質を発現させることに成功していたため、これを用いて天然型 Od-CesA1 と Od-CesA2 (但し、いずれも C 末端側に His6 タグを付加してある) の発現を試みた。経験に基づいて、種々の条件において発現誘導を試みたが、結果的に可溶化画分・沈殿画分・封入体画分のいずれにおいても誘導発現を確認することは出来なかった。なお、確認作業は、界面活性剤を利用した市販の抽出試薬を用いて各画分を調製し、タンパク定量後、SDS-PAGE ゲル上にて展開した後、タンパク CBB 染色・銀染色・抗 His タグ抗体を用いたウエスタンブロッティングにより判定した。

次いで、ピキア酵母ならびに昆虫細胞 Sf9 を用いた発現に取り組んだ。大腸菌の時と同様に C 末端に His タグを付加した配列を、それぞれのホストのコドン使用頻度に沿った組成に変成し直し、合成遺伝子として準備した。ピキア酵母に関しては、発現していることを示すデータが得られているため、引き続き作業を進めて、組換えセルロース合成酵素

の解析を果たしたい。

## 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 3 件)

① Keisuke Nakashima, Atsuo Nishino, Yoshiki Horikawa, Euichi Hirose, Junji Sugiyama, and Nori Satoh. (2011) “The crystalline phase of cellulose changes under developmental control in a marine chordate” *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**: 1623-1631.

② Keisuke Nakashima, Atsuo Nishino, and Euichi Hirose. (2011) “Forming a tough shell via an intracellular matrix and cellular junctions in the tail epidermis of *Oikopleura dioica* (Chordata: Tunicata: Appendicularia)” *Naturwissenschaften* **98**: 661-669.

③ Euichi Hirose, Keisuke Nakashima, Atsuo Nishino. (2011) “Is there intracellular cellulose in the appendicularians tail epidermis? A tale of the adult tail of an invertebrate chordate” *Communicative & Integrative Biology* **4**: 768-771.

[学会発表] (計 2 件)

① 中島 啓介、「動物がつくるセルロースの特徴」、細胞壁研究者ネットワーク年会、2012 年 12 月 2 日、於那覇。

② Keisuke Nakashima, “The crystalline phase of cellulose changes under developmental control in a marine chordate”, The 3rd International Cellulose Conference, 2012 年 10 月 10 日、於札幌。

[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]

所属グループホームページ：  
<https://groups.oist.jp/mgu>

オタマボヤによるセルロース合成に関するプレスリリース：  
<http://www.oist.jp/pressrelease/dr-nakashima-and-dr-satoh-elucidate-mechanism->

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 啓介 (NAKASHIMA KEISUKE)  
沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミッ  
クスユニット・研究員  
研究者番号：10422924