

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24114008

研究課題名(和文)植物細胞壁合成酵素および分解酵素を用いた細胞外情報処理空間の動的可視化

研究課題名(英文)Dynamic visualization of extracellular information processing space using synthetic and degrading enzymes of plant cell wall components

研究代表者

五十嵐 圭日子(IGARASHI, Kiyohiko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：80345181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 45,500,000円

研究成果の概要(和文)：植物の細胞壁は多様な高分子物質が互いに作用しあつた複雑な構造を有しており、詳細は明らかになっていない。細胞壁を構成するそれぞれの成分は細胞の酵素によって合成された後、自己組織化によって複合化することで細胞外に複雑な細胞壁構造を構築する。一方、細胞壁を栄養源として生育するきのこの等生物は自身が生産する分解酵素により細胞壁の複雑な構造を分解することで、栄養を獲得している。そこで本研究ではこれらの生物が有する酵素と細胞壁を構成する成分の組織化との関係性を顕微鏡技術や生化学技術によって明らかにし、複雑な植物細胞壁の理解、利用に向けた知見を得た。

研究成果の概要(英文)：The plant cell wall has a complicated structure in which various polymeric materials interact with each other, and the details are not clarified. Each component constituting the cell wall is synthesized by the enzyme of the cell and then complexed by self-assembly to construct a complicated cell wall structure outside the cell. On the other hand, organisms such as mushrooms that grow with the cell wall as a nutrient source acquire nutrition by decomposing the complicated structure of the cell wall by the degrading enzyme. Therefore, in this study, the relationship between the enzymes of these organisms and the organization of components constituting the cell wall was clarified by microscope technology and biochemical technology, and knowledge was obtained for understanding and utilizing complex plant cell wall.

研究分野：バイオマス生物学

キーワード：植物細胞壁 バイオマス セルロース

1. 研究開始当初の背景

植物細胞壁は、セルロース、ヘミセルロース、ペクチン、リグニンといったポリマーが複合化した難分解性のマトリックスであるが、生合成酵素自体はモノマーの重合という化学反応を触媒しているに過ぎず、むしろ生産された高分子化合物が自己組織化によって複合化することで細胞外に高度なマトリックスを構築していることが大きな特徴であると言える。

一方で自然界にはこのような植物細胞壁構成成分を資化して生きる微生物が数多く存在する。その生分解プロセスは、一般的に微生物の細胞外に分泌された消化酵素が、植物細胞壁中のポリマーをオリゴマーまたはモノマーにまで分解し、可溶化する反応によって構成されている。これら消化酵素の中で芳香族ポリマーであるリグニンを分解する酵素は、活性酸素種によってランダムに分解するという反応を利用しているのに対して、多糖を分解する酵素の場合は基質の多様性に合わせてタンパク質を進化させることで、グルコースの単純なポリマーであるセルロースだけでなく、ヘミセルロースやペクチンといった様々な修飾を受けたヘテロ多糖の構造を認識できるように適応してきた。

このような細胞外における細胞壁構成成分同士または細胞壁と分解酵素の分子間インタラクションに関する情報は、細胞外情報処理空間としての植物細胞壁に対する理解を深める上で非常に重要となる。

2. 研究の目的

本研究では、植物細胞壁構成成分の合成酵素および分解酵素の挙動を定性的および定量的に解析することで(1)植物細胞壁成分の自己組織化および(2)植物細胞壁分解酵素の基質認識を利用した細胞壁の動的可視化を試みるとともに、得られる情報を統合することで「細胞外情報処理空間」に関する知識の蓄積に貢献することを目指す。

研究代表者はこれまで、植物細胞壁の分解に関わる酵素の研究を主に遂行してきたことから、酵素の生化学および構造生物学に関する経験を豊富に持ち合わせており、主な研究手法としてタンパク質の異宿主大量発現や変異酵素の作成、反応速度論的解析、X線結晶構造解析などに精通している。さらに最近、これらの植物細胞壁分解酵素の解析に生物物理学的手法を取り入れることで、分解酵素の動的挙動観察に成功し、それらの反応機構に関する新しい知見を公表している。一方、これまでの植物細胞壁研究において、酵素そのものの研究は微生物の場合と比較して格段に少ないことが指摘されている。細胞外情報処理空間の機能発現にはこのようなタンパク質の性質が大きく貢献していることが推測されることから、本申請において申請者が本領域の研究者と有機的に結合することにより、細胞外情報処理空間としての植

物細胞壁の動的挙動解析が可能となるだけでなく、分解酵素にとっての基質である植物細胞壁をより深く理解することで細胞壁分解に関する知識の構築できる。また、本研究で開発した一分子解析技術やその成果は総括班に蓄積し、班員間で共有すると同時に、イメージング解析支援室を通して、細胞壁の動態を解析する班との間で共同研究を進め、研究プロジェクトを加速度的に推進する。

3. 研究の方法

本研究では植物細胞壁由来の生合成・生分解酵素を酵母などの組換え発現系により大量生産し、得られた組換え酵素を利用した生化学的な解析と高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)、全反射照明蛍光顕微鏡(TIRFM)などの観察技術を組み合わせる事により、細胞壁由来成分や酵素のインタラクションの動的変化を可視化する手法を確立した。

4. 研究成果

(1) 植物細胞壁成分の自己組織化

① セルロース合成プロセスの動的可視化

植物におけるセルロース合成過程は複数の合成酵素がセルロース合成プロセスに関連する複雑な系であり、その詳細は未だ明らかになっていない。そこで本研究では古くからセルロース合成のモデル生物として研究が行われており、より単純なセルロース合成系を有する酢酸菌 *Gluconacetobacter xylinus* 由来のセルロース合成酵素(*GxCeSAB*)を対象として組換え酵素発現系の構築し、セルロース合成の可視化を行った。

遺伝子配列解析の結果、*gxc*esAB 遺伝子のコドン使用頻度はメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* におけるコドン使用頻度と大きく異なることが判った。そこでまず *gxc*esAB についてコドンの最適化を実施した。その結果、遺伝子配列から発現量を推定する指標の1つである Codon Adaptation Index (CAI) が 0.00 から 0.92 に向上した最適化遺伝子 *gxc*esAB_{opt} を取得し、これを *P. pastoris* のゲノム内に組み込むことで発現系の構築を行ったところ、作製した酵母株中のタンパク質を Western Blotting により解析した結果、*GxCeSAB* タンパク質の発現を確認した。次に発現した組換え *GxCeSAB* の活性を測定する為、細胞破碎液を用いた *in vitro* セルロース合成試験を実施した。

GxCeSAB による *in vitro* セルロース合成反応の結果、白色の水不溶性物質の生成が確認された。合成試験により得られた産物を、セルロース特異的に結合する事が知られている蛍光標識セルロース結合タンパク質 (RFP-CBM1) によって染色した結果、生成物が CBM1 と融合している RFP により特異的に染色される現象を確認した。また生成物を電子顕微鏡により観察した結果、生成物は幅約 40-50 nm のセルロースに非常に類似した繊維状の形態を有していることが確認さ

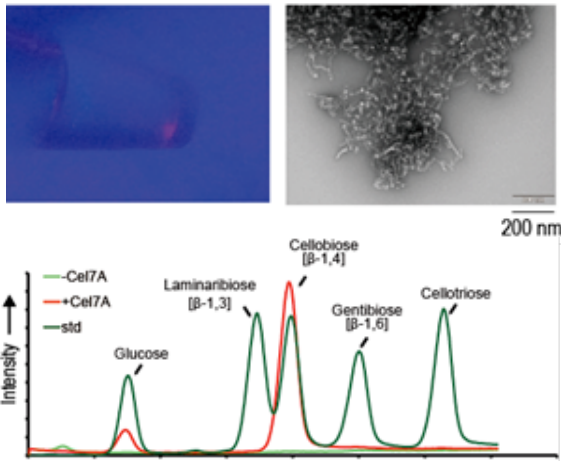


図1 組換え GxCeSAB による合成産物の RFP-CBM1 による染色 (上図左)、TEM 像 (上図右) およびセルラーゼによる分解生成物の解析 (下図)

れた。さらに、生成物を *Trichoderma reesei* 由来のセルラーゼ (*Tr*-Cel7A) によって分解した結果、白色の水不溶性物質は完全に無くなり、分解物としてグルコースとセロビオースが生じることを確認した(図 1)。

以上の結果から、粗酵素液を用いたセルロース合成反応条件下でも、セルロース結合タンパク質を用いた染色、およびセルラーゼによる基質分解を通じた物質同定手法により合成されるセルロースの同定が可能となる事が確認された。

② キシログルカンおよびキシログルカン結合性タンパク質の動的可視化

ヘミセルロースの代表的な成分の 1 つであるキシログルカンは主に一次細胞壁においてセルロースと直接的に相互作用し、細胞壁全体におけるつなぎの役割を果たしていると推定されている。しかし、これまでに溶液中におけるキシログルカンの動態やキシログルカン-セルロース間の相互作用の様子を直接観察した例はない。

そこで本研究ではキシログルカンを HS-AFM により観察する事で、溶液中でのキシログルカンの動態およびキシログルカンと関連タンパク質間の相互作用を明らかにすることを目的とした。

観察ではキシログルカンとしてタマリンドガム由来キシログルカン市販品を 0.5%エタノール沈殿により精製したキシログルカンポリマーを用いた。またキシログルカンに相互作用すると推定されるタンパク質として *Arabidopsis thaliana* 由来 エクспанシンタンパク質 *AtEXPA17* を使用した。*AtEXPA17* 大量発現系はプレバチルス発現システムを用いて構築し、得られた組換え *AtEXPA17* はニッケルアフィニティカラムによる簡易精製を行った後実験に使用した。

キシログルカン水溶液をグラファイト基盤へ滴下し HS-AFM による観察を実施したところ、グラファイト基板上に白色の凝集した物質が堆積している様子が観察された (図 B2)。さらに堆積したキシログルカンに対し *AtEXPA17* を添加したところ、凝集状態のキ

シログルカンの上に白色、塊状の *AtEXPA17* が結合する様子が観察された (図 2 C)。一方、基板上に堆積したセルロースに対し *AtEXPA17* を加えた場合には変化は見られなかった。

以上の結果から本研究ではキシログルカンを HS-AFM で観察する手法の確立を行い、細胞壁タンパク質エクспанシンとキシログルカンが相互作用する様子を可視化する事に成功した。

(2) 植物細胞壁分解酵素の基質認識を利用した細胞壁の動的可視化

① セロビオヒドロラーゼによる結晶性セル

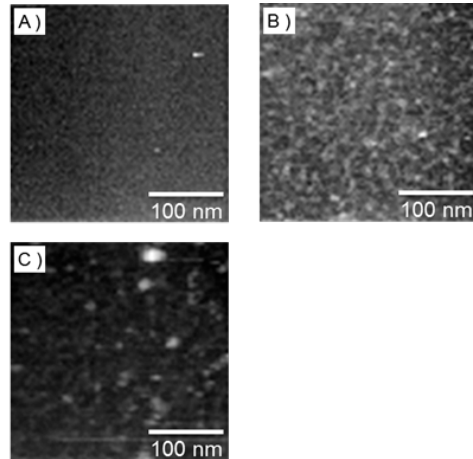


図2 HS-AFM によるキシログルカンの観察 A) グラファイト基板のみ、B) キシログルカン添加、C) キシログルカン+エクспанシン(*AtEXPA17*) 添加

ロース分解過程の動的可視化

セルロース分解酵素を HS-AFM および TIRFM で可視化するためには、二つの技術がお互いに相補できることが重要である。我々は HS-AFM と TIRFM を同時観察できる装置の開発を世界ではじめて行い、それを用いて結晶性多糖分解酵素の観察を行った。本結果は科学機器総説に公表された (発表論文④)。

セルロース分解性糸状菌として研究が盛んな *Trichoderma reesei* 由来のセロビオヒドロラーゼ (*Tr*-Cel7A) の活性ドメインを蛍光色素でラベルし、緑藻類の一種であるシオグサ由来の結晶性セルロース表面における *Tr*-Cel7A の挙動を調べた。はじめに結晶性セルロース表面に吸着した酵素の滞在時間を測定し、その頻度分布のヒストグラムを解析したところ、二重指数関数で近似されることが明らかとなり、そこから短時間 (非生産的) および長時間 (生産的) の吸着それぞれの解離定数 (k_{off}^{NP} 、 k_{off}^P) を求めることに成功した。セルロース Ia を用いた場合、 k_{off}^P は毎秒 0.12 回、 k_{off}^{NP} が毎秒 0.86 回であった。

また、連続的 (プロセス) な加水分解速度が異なると考えられる 3 つのセロビオヒドロラーゼ (*Tr*-Cel7A、*Pc*-Cel7C、*Pc*-Cel7D) の加水分解速度と解離定数の関係を明らかにするために、高速原子間力顕微鏡によって三つの酵素の挙動を明らかにした (図 3)。そ

の結果加水分解速度と表面からの解離にはトレードオフの関係が成り立つことが分かった。本結果は米国化学会誌に受理された(発表論文③)。

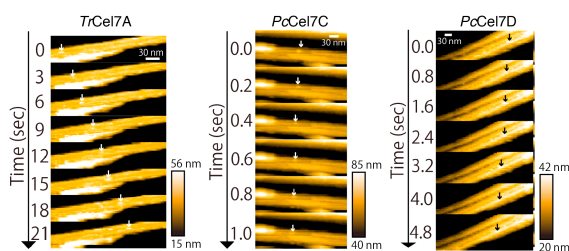


図 3 高速原子間力顕微鏡によるセロビオヒドロラーゼの観察

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 24 件)

① [著者] Shinohara, N., Sunagawa, N., Tamura, S., Yokoyama, R., Ueda, M., Igarashi, K., and Nishitani, K., [標題] The plant enzyme AtXTH3 catalyses covalent crosslinking between cellulose and cellooligosaccharide, [雑誌名] Scientific Reports, [査読] 有, [巻号] 7, 46099 (2017), [DOI] 10.1038/srep46099

② [著者] Nakamura, A., Ishida, T., (他 12 名), [標題] “Newton’s cradle” proton relay with amide-imidic acid tautomerization in inverting cellulase visualized by neutron crystallography, [雑誌名] Science Advances, [査読] 有, [巻号] 1, e1500263 (2015), [DOI] 10.1126/sciadv.1500263

③ [著者] Nakamura, A., Watanabe, H., (他 6 名), [標題] Trade-off between processivity and hydrolytic velocity of cellobiohydrolases at the surface of crystalline cellulose, [雑誌名] J. Amer. Chem. Soc., [査読] 有, [巻号] 136, 4584-4592 (2014), [DOI] 10.1021/ja4119994

④ [著者] Fukuda, S., Uchihashi, T., Iino, R., Okazaki, Y., Yoshida, M., Igarashi, K., and Ando, T., [標題] High-speed atomic force microscope combined with single-molecule fluorescence microscope, [雑誌名] Rev. Sci. Instr., [査読] 有, [巻号] 84, 073706 (2013) [DOI] 10.1063/1.4813280

⑤ [著者] Sugimoto, N., Igarashi, K., Wada, M., and Samejima, M., [標題] Adsorption characteristics of fungal family 1 cellulose-binding domain from *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I on crystalline cellulose: Negative cooperative adsorption via a steric exclusion effect, [雑誌名] Langmuir, [査読] 有, [巻号] 28, 14323-14329 (2012) [DOI] 10.1021/la302352k

〔学会発表〕(計 23 件)

① [発表者] Kiyohiko Igarashi, [標題] Biochemical and biophysical analysis of the synergy between cellobiohydrolase and lytic polysaccharide monoxygenase from *Phanerochaete chrysosporium*, [学会名] Symposium on the Chemistry, Biology and Application of Lytic Polysaccharide Monoxygenases, [発表日] 2016 年 11 月 15-17 日, [発表場所] コペンハーゲン (デンマーク)

② [発表者] Naoki Sunagawa, [標題] Functional expression of cellulose synthase in *Pichia pastoris*, [学会名] OIST Mini Symposium "Unraveling the mysteries of cellulose: From biosynthesis & biological diversity to biomaterials", [発表日] 2015 年 4 月 21-22 日, [発表場所] Okinawa Institute of Science and Technology (沖縄県・恩納村)

③ [発表者] 五十嵐 圭日子, [標題] セルラーゼとキチナーゼの反応解析：一分子観察と中性子構造解析, [学会名] 日本化学会第 95 春季年会アドバンスドテクノロジープログラム(ATP), [発表日] 2015 年 3 月 26-29 日, [発表場所] 日本大学 理工学部船橋キャンパス (千葉・船橋)

④ [発表者] Kiyohiko Igarashi, [標題] Single molecular observations of cellulases for cellulose biorefinery, [学会名] Danish-Japanese Workshop on Bioenergy, [発表日] 2014 年 9 月 11 日, [発表場所] オーゼンセ (デンマーク)

⑤ [発表者] Kiyohiko Igarashi, [標題] Single molecular observations of processive cellulases and chitinases for effective degradation of crystalline structural polysaccharides, [学会名] Frontiers in Protein Science 8th Workshop in Protein, [発表日] 2012 年 11 月 1 日, [発表場所] コンゲンス・リユンビュー (デンマーク)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐圭日子 (IGARASHI, Kiyohiko)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：80345181

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

内橋貴之 (UCHIHASHI, Takayuki)
金沢大学・理工研究域・教授
研究者番号：30326300

(4) 研究協力者

なし