様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　５ 年　　５ 月 １７ 日現在

機関番号：３８００５
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2022
課題番号：１８Ｋ０６１４２

研究課題名（和文）セルロースのオンデマンド人工合成に向けた結晶化過程の解明

研究課題名（英文）Cell-free approach to design cellulose nanofibers

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・スタッフサイエンティスト

研究者番号：１０４２２９２４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、望みの形状のセルロース結晶繊維をつくること（オンデマンド人工合成）を目指した。まず、昆虫細胞抽出液を用いて、分子量200kDa超のホヤセルロース合成酵素を合成する無細胞反応系を樹立した。膜タンパク質である合成酵素は、適当な疎水性環境が近傍になければ合成直後に凝集して失活する。そこで、種々の人工的疎水環境を反応系に組み込み、無細胞合成産物の８割がリン脂質環境に取り込まれる条件を見出した。放射性同位元素を用いて基質の取込み活性を高感度・迅速・定量的に評価する系を立ち上げ、合成至適条件を検討した。その反応産物を電子顕微鏡・赤外分光・電子線回折等で分析し、セルロース結晶繊維の合成を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
従来、植物由来のセルロースが木材・パルプ繊維として利用されることが主であったが、近年はそれを結晶繊維のレベルで新たな機能を発現させた高付加価値の新資源として利用する試みがなされている。天然物であるセルロースの結晶繊維は、物性を左右する諸性質（太さ・長さ・単位胞組成など）が不均一であり、それが生合成の過程でどのように制御されているかは不明である。そのしくみを解明し、活用することで、新たなセルロース利用が可能になる。本研究は、自然界で唯一単位胞レベルで均質な結晶繊維をつくる生物であるホヤのセルロース合成酵素に着目し、望みの性状の結晶繊維を創ること（セルロースのオンデマンド人工合成）を目指した。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to produce cellulose crystal fibers with desired properties (on-demand artificial synthesis). First, a cell-free reaction system was established to synthesize ascidian cellulose synthase with a molecular weight of over 200 kDa using insect cell extracts. The synthesized enzyme, which is a membrane protein, aggregates and becomes inactive upon synthesis if there is no suitable hydrophobic environment in the vicinity. Therefore, we incorporated various artificial hydrophobic domains into the reaction system and found conditions under which 80% of the cell-free synthesis products are incorporated into the phospholipid environment. We set up a system for sensitive, rapid, and quantitative evaluation of substrate uptake activity using radioisotopes, and investigated optimal conditions for synthesis. The reaction products were analyzed by electron microscopy, infrared spectroscopy, and electron diffraction, and the synthesis of cellulose crystal fibers was confirmed.

研究分野：生化学

キーワード：無細胞タンパク質合成系　膜タンパク質　セルロース合成酵素

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景
セルロースは単糖グルコースが直鎖状に連なった化学構造をした天然多糖である。自然界では主に植物細胞壁の主成分として、また地球上最大のバイオマス資源として存在する。人類による利用の歴史は長く、古くから材や燃料として利用されてきた。その後、化学処理された再生セルロースとして盛んに工業利用された。近年になり、セルロースをナノサイズの結晶繊維（ナノファイバー）として調製することが可能となり、結晶繊維レベルで新規の機能を備えた新素材としての利用が期待されている。例えば、日本再興戦略（改定 2016）では、「セルロースナノファイバー（鋼鉄と同等の強さを持つ一方で、重量は 5 分の１という特徴をもつ超微細植物結晶繊維）の国際標準化・製品化に向けた研究開発を進める」ことを目指している。また、再生産可能でカーボンニュートラルな材料であることから、地球温暖化対策への貢献も期待されている。

このようにセルロース結晶繊維の利用促進が図られている一方で、セルロースの生合成のしくみは長い間不明であった。しかし、2013 年に細菌細胞膜上の膜タンパク質複合体の構成要素であるセルロース合成酵素の立体構造が解明されたことを皮切りとして、セルロース合成酵素がグルカン鎖を伸長し、細胞外に排出するしくみの理解が進んだ。一方で、この伸長過程に続いて起こる結晶化の過程、つまり「数百本超と予想される大量のグルカン鎖がどのように空間配置されて結晶繊維を形成するのか」の理解は進んでいない。

２．研究の目的
本研究は、上述の背景で述べた、結晶化のしくみを明らかにして、その活用により、望みの形状の結晶繊維を人工合成すること（オンデマンド人工合成）を目的とした。

３．研究の方法
結晶化のしくみを理解するためには、対象とする系の選択が重要であると考えた。天然セルロースは２つの結晶系（三斜晶系と単斜晶系）からなる複合結晶であり、その混合比率は生物種に特異的である。例えば、木材セルロースの場合、三斜晶系と単斜晶系が３：７程度の比率で認められることが多い。本研究では、自然界で唯一、単位胞（結晶構造の基本単位）レベルで均一なセルロース結晶繊維を合成する（ほぼ純粋な三斜晶系のみ、あるいは単斜晶系のみで構成される結晶繊維を合成できる）生き物であるホヤの仲間のセルロース合成酵素を用いることにした。

実験で用いるホヤのセルロース合成酵素は、当初はホヤから単離精製して調製していたが、調製過程に時間と予算を要するのに対して、収量が高くなかったため、組換えタンパク質として調製することにした。組換えタンパク質の調製は、はじめは大腸菌、次いでピキア酵母を宿主として試みた。前者においては、ホヤのセルロース合成酵素の分子量の大きさ（200kDa 超）がネックとなり収量をあげることが困難であった。後者においては、細胞壁に存在するβ1-3 グルカンとその合成酵素の存在が分析上の問題を引き起こした。これらの宿主由来の影響を小さくすることを意図して、無細胞タンパク質合成系によるセルロース合成酵素の調製を試みた。

無細胞タンパク質合成系の選択においては、主成分となる細胞抽出液の由来に留意して、比較検討を行った。その結果、昆虫細胞由来の反応系が最も精製がよく、これを採用した。

セルロース合成酵素は膜タンパク質あるため、近傍に適した疎水性環境がなければ、凝集して活性を失う。そこで、無細胞合成反応液に人工の疎水性環境を導入し、比較検討を行った。予想に反して、標準脂質で作成したサイズの異なるリポソーム群はおしなべて合成反応全体を阻害する傾向が認められた。標準脂質と界面活性剤で作成した混合ミセルも同様に合成反応を阻害した。一方で、細胞から抽出した天然脂質混合物で作成したリポソームの場合、条件によっては、良好な合成結果が得られた。さらに検討を重ね、最終的に無細胞合成産物の８割がリポソームに組み込まれる条件を得た。

無細胞合成反応の鋳型となる mRNA について、ホヤ幼生の RNA-seq 解析を行い、新たに主たる転写産物配列を同定した。

無細胞合成反応産物の評価には、当初、ショ糖密度勾配による分画を行ったが、手間と時間の節約のため、他の密度勾配用媒体を試し、Iodixanol が良好な成績を示すことをわかった。分画後の評価には、ホヤセルロース合成酵素に導入したタグ配列に対する抗体を用いたウェスタン・ブ

ロッティング法を用いた。

活性の評価は、放射性同位元素（RI）で標識した UDP-グルコースの取り込みを液体シンチレーションカウンタで評価することで行った。RI の導入により、感度が高く、迅速で、定量的な評価を行うことが可能となり、カチオン濃度・pH・バッファなどの項目に対して網羅的な条件検討を行い、至適条件を得た。

非 RI の無細胞合成反応を至適条件で大容量で行い、得られた反応産物を精製・洗浄したのち、電子顕微鏡観察・フーリエ変換赤外分光・電子線回折で評価を行い、狙い通りセルロース結晶繊維が合成されたことを確認した。

４．研究成果
事前に認識していた課題である、無細胞合成された膜タンパク質の凝集に対し、天然脂質リポソームを反応液中に組み込むことで回避し、無細胞合成と同時に脂質膜中に埋め込む系の確立に成功した。界面活性剤を用いた可溶化・精製・脂質環境への再構成という困難で時間を要する過程を回避して膜タンパク質を調製できる優れた系と評価している。

狙い通り、無細胞合成反応で調製したホヤセルロース合成酵素を用いて、セルロースの結晶繊維を合成することに成功した。

合成された結晶繊維は、天然セルロースに特徴的な平行鎖セルロース（セルロース I）ではなく、逆平行鎖セルロース（セルロース II）であった。生体中で前者を合成するタンパク質が、インビトロ合成では後者を合成する、そのしくみを明らかにすべく、本研究を基課題とした国際共同研究が、科研費・国際共同研究加速基金(国際共同研究強化(A))）の支援を受けて、進行中である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計4件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　2件／うちオープンアクセス　3件）

１．著者名 Kun-Lung Li, Keisuke Nakashima, Jun Inoue, and Noriyuki Satoh	４．巻 11
２．論文標題 Phylogenetic Analyses of Glycosyl Hydrolase Family 6 Genes in Tunicates: Possible Horizontal Transfer	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Genes	６．最初と最後の頁 937
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes11080937	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Jun Inoue, Keisuke Nakashima, and Noriyuki Satoh	４．巻 10
２．論文標題 ORTHOSCOPE Analysis Reveals the Presence of the Cellulose Synthase Gene in All Tunicate Genomes but Not in Other Animal Genomes	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Genes	６．最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes10040294	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

１．著者名 Keisuke Nakashima	４．巻 5
２．論文標題 A comparative approach to decipher intestinal animal-microbe associations	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Microbial Cell	６．最初と最後の頁 522-524
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15698/mic2018.11.658	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

１．著者名 中島啓介、菊池さくら	４．巻 37
２．論文標題 腸内細菌による粘液層への定着は動物進化上の新しい特徴である	５．発行年 2019年
３．雑誌名 実験医学	６．最初と最後の頁 69-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 中島啓介、菊池さくら、佐藤矩行、小川悠、游智凱、相馬智史、渡邊壮一、金子豊二、木村聡
２．発表標題 脊椎動物の消化管におけるキチン製バリア免疫機構の発見とその喪失が哺乳類の腸内細菌に及ぼした影響
３．学会等名 セルロース学会
４．発表年 2018年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	今井　友也 (Imai Tomoya) (90509142)	京都大学・生存圏研究所・教授 (14301)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of Virginia			