

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06570

研究課題名(和文) バクテリアセルロース合成酵素構成因子相互作用関係の解明

研究課題名(英文) Interaction analysis between subunits of bacterial cellulose synthase

研究代表者

于 健 (Yu, Jian)

大阪大学・蛋白質研究所・特任准教授(常勤)

研究者番号：20587860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：バクテリアが合成するバクテリアセルロース(BC)は複雑で密な網目構造を形成しており、高い純度、高い強度、高い保水性を持つという特徴があるため、新規材料として期待されている。一方、BC合成機構が未解明のため、大量生産も困難である。本研究では、BC生産菌由来の合成複合体TCの構成因子間の相互作用解析により、BcsA-BcsBによって合成されたBCを介してBcsA-BcsBとBcsDの複合体形成することを明らかにした。また、BC排出因子BcsCの膜貫通ドメインの大量調製ができ、分子量の解析によって、BcsCの多量体形成が分かり、生産菌EnterobacterにおけるBCの合成・排出機構を提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

構造生命科学の大きな研究ターゲットの一つは、膜結合型の生体高分子合成装置の構造機能解明である。本研究の対象であるBC合成装置TCが内膜外膜に貫通する膜蛋白質複合体は、そのような研究対象の一つである。本研究では、TC構成因子間の相互作用関係の解明により、各因子が協調的に機能するというBC合成メカニズムを明らかにし、BCの生産性向上のための分子基盤情報を提供することができた。そして、バイオ素材としてのBC活用が推進されるのであろう。この成果は、ライフ・イノベーションの推進に寄与するばかりでなく、持続的循環型の社会を形成する上において、環境問題の解決に対して、大いに波及効果を及ぼすものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Bacterial cellulose (BC), which is synthesized by bacteria, forms a complex and dense network structure, and is expected to be a new material because of its high purity, high strength, and high-water retention properties. On the other hand, mass production of BC is still difficult because the BC synthesis mechanism has not been elucidated. In this study, we analyzed the interactions among the subunits of the BC synthesis complex TC derived from BC-producing bacteria, and found that the complex of BcsA-BcsB and BcsD is formed through BC synthesized by BcsA-BcsB. In addition, we were able to express a large amount of the transmembrane domain of the BC export factor BcsC. The analysis of the molecular weight revealed the multimeric formation of BcsC, and we proposed a mechanism for BC synthesis and export in the BC-producing bacteria Enterobacter.

研究分野：生物物理学関連

キーワード：バクテリアセルロース TC構成因子 膜タンパク質 構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

地球上で最も多く存在する多糖であるセルロースは、植物や藻類、一部の動物やバクテリアなどの様々な生物によって合成されている。セルロースは自然界に最も豊富に存在する高分子であり、主に植物、そして藻類や一部の微生物、さらにはホヤなどの動物によっても合成される (図 1)。そのうち、バクテリアが合成する

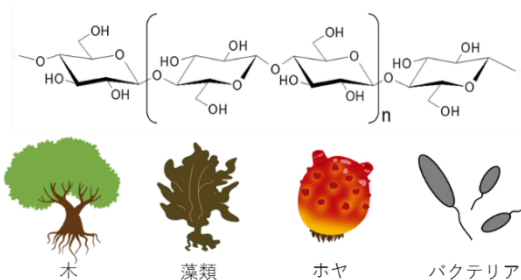


図 1 セルロースの分子構造と由来生物種

バクテリアセルロース (BC) は一般的にゲル状膜となる、複雑で密な網目構造を形成しており、他の生物種が合成するセルロースよりも非常に高い純度、高い強度、高い保水性を持つという特徴がある。そのため、医療や工業用の新規材料として注目され、ナタデココのような食品や、音響機器の振

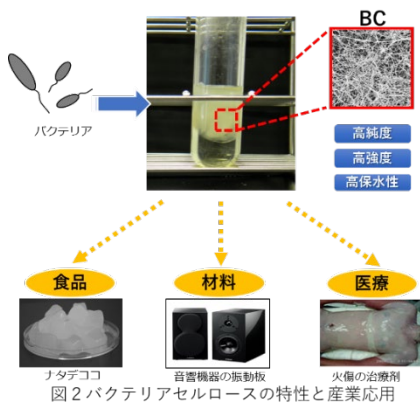


図 2 バクテリアセルロースの特性と産業応用

動板、医療の分野では人工血管や火傷の治療の材料に用いられる (図 2) など、幅広い分野で新規材料として期待されている。さらに、最近、薬剤の送達体 (デリバリー体) としての利用可能性も見出した。優れた性質を持つ BC が新規材料として期待されている一方、BC 合成が発見された 70 年代から 40 年間の研究を経ても、その合成機構の不明点が多く残っている。BC 合成機構の未解明のため、大量生産も困難であり、BC の利用がまだ研究段階

に止まっている。

BC 生産菌の合成酵素はターミナルコンプレックス (Terminal Complex: TC, 分子量 270 万ダルトン) と呼ばれ、グラム陰性菌の内膜と外膜を貫通する巨大なタンパク質複合体である。バクテリアセルロース生産菌である酢酸菌の TC は、BcsA, BcsB, BcsC, BcsD サブユニット<sup>[1-4]</sup> からなる複合体の多量体である (図 3)。

そのうち、内膜にある BcsAB は細胞基質内に存在する活性化グルコースからセルロース鎖を合成している。BcsC は細胞内膜で合成された BC の会合と輸送を担っていると考えられ、そのアミノ酸配列から、外膜を貫通する  $\beta$ -バレルからなるドメイン (BcsC-C) と複数のテトラトリコペプチドリピート (TPR) ドメイン (BcsC-TPR) から構成されることが予測されている。ペリプラズム中に存在する BcsD を経由して菌体外に排出されることがわかっている。これまで、

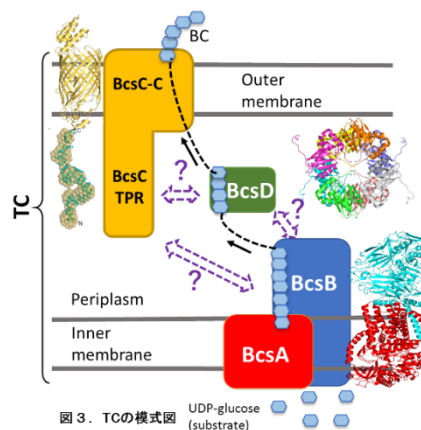


図 3. TC の模式図

酢酸菌由来の BcsAB 複合体と BcsD の X 線結晶構造及び BcsC-TPR の X 線小角散乱構造は解明されたが、TC 構成因子の間でどのような相互作用により、BC を形成と排出するという本研究の核心をなす学術的「問い」はまだ不明である。したがって、TC の構成因子相互作用関係を解明すれば、BC 合成のメカニズムを明らかにでき、酢酸菌を効率的に利用して BC の大量生産を期待できる。

## 2. 研究の目的

セントラルドグマの構成要素である DNA, RNA, 蛋白質を合成する基幹装置の立体構造が全て解明された現在, 構造生命科学の次の大きな研究ターゲットの一つは, 膜結合型の生体高分子合成装置の構造機能解明である. 本研究の対象であるセルロース合成装置 TC の構成因子は, そのような研究対象の一つである. TC 複合体は分子量 270 万ダルトンを超え, グルカン鎖の重合からセルロースリボンの排出までを行う超分子複合体である. 膜結合型の生体高分子合成装置の構造機能解明は, 学術的に非常に興味深い反面, 難易度の極めて高い挑戦的な課題である.

本研究の目的は, TC 構成因子相互作用関係を解明し, そして, *in vivo* での酢酸菌活性測定による機能解明により BC の合成メカニズムを明らかにし, BC の生産性向上や機能性 BC 創製のための分子基盤情報を提供することを目的としている. それに基づいて, BC 生産量の拡大や新規機能性セルロースの開発が可能となれば, 今後は, さまざまな分野において, バイオ素材としてのバクテリアセルロースの活用が進むであろう. すなわち本研究の成果は, ライフ・イノベーションの推進に寄与するばかりでなく, 持続的循環型の社会を形成する上において, 環境問題の解決に対して, 大いに波及効果を及ぼすものと期待される.

## 3. 研究の方法

バクテリアセルロース生産菌である酢酸菌の TC は, BcsA, BcsB, BcsC, BcsD サブユニットからなる複合体の多量体である. BC 合成メカニズムを明らかにするために, TC 構成因子間の相互作用関係の解明が必要である.

本研究では, まず, 自動誘導法という培養方法を新たに導入し, 大腸菌発現系で BcsD に His タグ付きの TC 構成因子 BcsA, BcsB, BcsD の三者複合体の大量調製を行った. さらに, 界面活性剤のスクリーニングなどの最適化によって, 各サンプルの可溶性の改善を行った. 大量調製した三者複合体 BcsA-BcsB-BcsD について, ネガティブ染色の電顕で観察した. また, 3種類のセルラーゼを用いて, ニッケルアフィニティー精製による BcsA-BcsB と BcsD の複合体形成のメカニズムを検討した.

次, 情報が少ない膜タンパク質 BcsC-C の構造解析について, 大腸菌を用いた発現量向上のため, BcsA-BcsB-BcsD の大量調製と同様に, 自動誘導法という培養方法を新たに導入した. さらに, BcsC-C の精製条件 (界面活性剤の濃度, TEV の濃度, 精製カラム) の改善をいろいろ検討し, 結晶化へ進めた. また, マスフォトメトリー法を用いた分子量測定によって, BcsC-C の多量体形成を解析した.

## 4. 研究成果

### 研究対象のサンプルの調製について

本研究の目的を達成するためには, サンプルの *in vitro* での大量調製が必須である. 研究では, まず大腸菌発現系で BC 生産菌由来の TC 構成因子 BcsA-BcsB-BcsD という膜複合体の培養・精製などの条件を最適化し, 特に, BcsB の分解を抑えることができ, 次の実験に適用できる大量なサンプル調製に成功した (図 4).

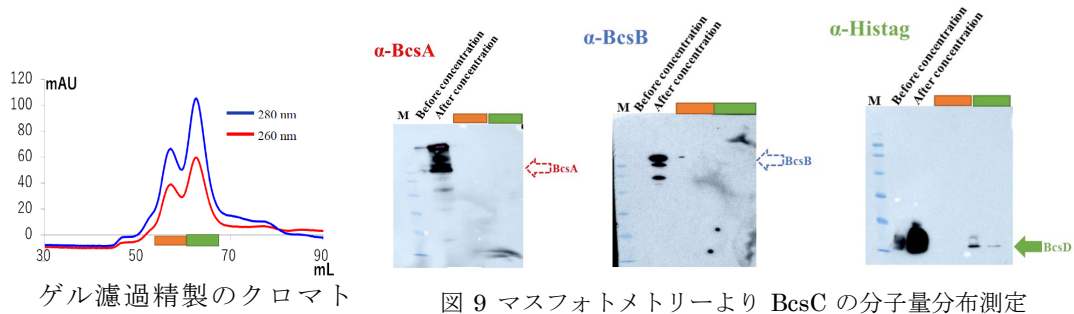


図 4. BcsA-BcsB-BcsD の精製（濃縮後にサンプルのバンドがはっきり見える）

### 各因子間の相互作用について

BcsA-BcsB と BcsD の相互作用解析について、ニッケルアフィニティー精製後の BcsA-BcsB-BcsD に市販のセルラーゼ混交体 Onozuka RS を加えた解析には、様々な条件を検討した。その結果、BC によって BcsA-BcsB と BcsD の相互作用が示されていたが、BcsA と BcsB の分解を完全抑えられないため、純度の高い市販の ThCellulase を試みた。しかし、

ThCellulase の活性の最適な温度が 60°C であるため、証明が不十分である。そして、Bacillus subtilis 由来のセルラーゼ Bscel5A の使用を試みた。まず、共同研究先が提供された Bscel5A

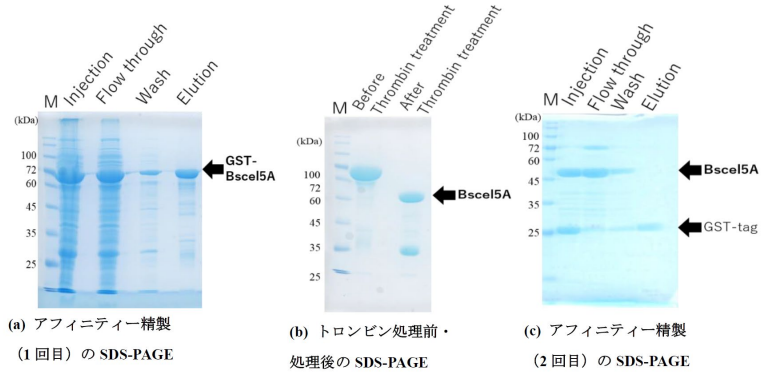


図 5 Bscel5A の精製

の発現ベクターを用いて、Bscel5A の大量調製に成功した (図 5)。

次に、酢酸菌を培養し、生産された BC を用いて Bscel5A の BC 分解活性を測定した。その結果、Bscel5A は BC を分解する機能を持つことが確認できた。次に、ニッケルアフィニティー (NiAC) 精製後の BcsA-BcsB-BcsD に調製した Bscel5A で処理した後に、もう一度 NiAC 精製によって解析を行った。様々な反応条件を検討した結果、

図 6 に示しているように、Bscel5A 処理前後のバンドを比べてみると、BcsA と BcsB の溶出量がはっきりと減少した。すなわち、セルラーゼ処理により BcsABD 間のセルラーゼが分解され、BcsD から BcsA-BcsB 複合体が解離したことが示された。よって、BcsA-BcsB と BcsD の相互作用は BcsA-BcsB によって生産された BC を介していることが明らかになった。

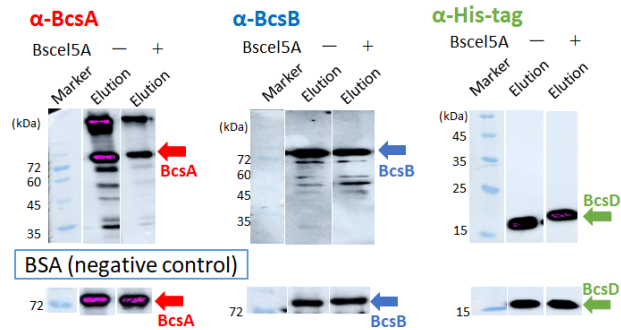


図 6 Bscel5A 処理前後の BcsA, BcsB, BcsD のウエスタンブロッティング

## 複合体の構造解析について

大量調製した BcsA-BcsB-BcsD を用いてネガティブ染色の電顕で観察を試みた。ニッケルアフィニティー精製後のサンプルは、ゲル濾過精製後サンプルより、BcsA-BcsB-BcsD 複合体のような粒子が多く見られていた (図 7)。恐らく、BC を介していた BcsA-BcsB と BcsD の相互作用が弱いことを示唆している。また、全体的にタンパク質の凝集も多いため、今後、界面活性剤の濃度含む測定条件の検討が必要である。また、図 4 に示しているように、BcsA-BcsB-BcsD の大量調製ができたが、SEC-SAXS 測定用の量に辿り着けていないため、SEC-SAXS による溶液中の構造解析を断念した。

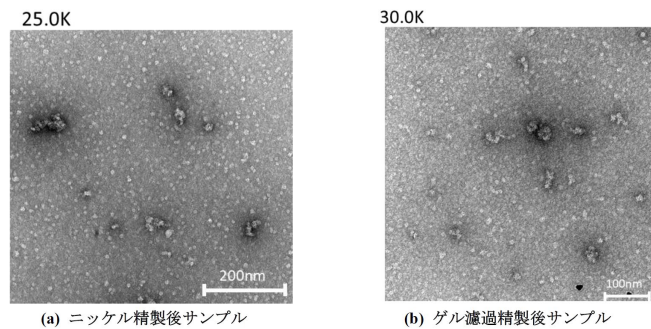


図 7 BcsA-B-D 複合体ネガティブ染色

## BcsC-C について

自動誘導法という培養方法を新たに導入したことで、菌体の培養量が 10mg/L に増加しました。次に、BcsC の膜貫通ドメイン BcsC-C の精製条件について、界面活性剤の濃度の調整、His タグ切断用の酵素

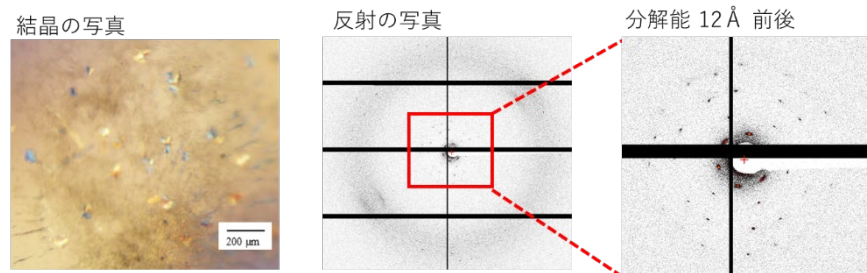


図8 シットティングドロップ蒸気拡散法による結晶の回折データ

TEV の濃度の調整、精製カラムなどの改善をいろいろ検討した結果、BcsC-C の精製収量が 0.4mg/1L までになり、結晶化へ進めた。また、当研究室で開発していた蛋白質結晶核形成促進剤を用いて、BcsC-C 初期結晶を得た (図 8)。

BcsC-C の SEC 精製結果は、BcsC-C が多量体形成を示しているが、はっきり断言できない状態である。調製したサンプル濃度により界面活性剤の影響によるものもあると考え、マスフォトメトリー法というレーザの反射光と散乱光の干渉解析方法によって溶液中の分子量を測定した結果、①は 2 量体付近、②は 4 量体付近で多く分子がカウントされた (図 9)。これらの結果から、セルロース排出の提案として、合成されたセルロース鎖 4 本は、4 量体の BcsC によって排出され、その後会合しバクテリアセルロースが作られることが示唆し、新しい知見が得られた。

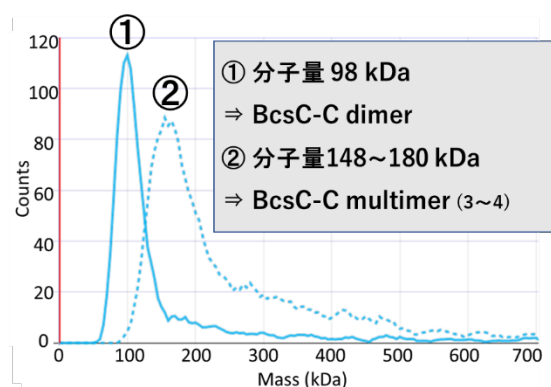


図9 マスフォトメトリーよりBcsCの分子量分布測定

## 参考文献

- [1] Hu SQ, et al, *Proc Natl Acad Sci USA*. 107 (2010). [2] Morgan JL, et al., *Nature*. 493(2013)
- [3] Shingo N, et al, *Scientific reports*.7(2017). [4]J.F.Acheson, et al, *structure*. 27 (2019)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Horikoshi Shu, Saburi Wataru, Yu Jian, Matsuura Hideyuki, Cairns James R Ketudat, Yao Min, Mori Haruhide	4. 巻 86
2. 論文標題 Substrate specificity of glycoside hydrolase family 1 -glucosidase AtBGLu42 from Arabidopsis thaliana and its molecular mechanism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 231 ~ 245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab200	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 Kondo Tatsuya, Nakamura Yui, Nojima Shingo, Yao Min, Imai Tomoya	4. 巻 596
2. 論文標題 The BcsD subunit of type I bacterial cellulose synthase interacts dynamically with the BcsAB catalytic core complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3069 ~ 3086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14495	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Thayyil Sampreeth, Nishigami Yukinori, Islam Md. Jahirul, Hashim P. K., Furuta Ken'ya, Oiwa Kazuhiro, Yu Jian, Yao Min, Nakagaki Toshiyuki, Tamaoki Nobuyuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Dynamic Control of Microbial Movement by Photoswitchable ATP Antagonists	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemistry A European Journal	6. 最初と最後の頁 e202200807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202200807	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 于健
2. 発表標題 About phasing with native SAD
3. 学会等名 PF-UAのタンパク質結晶構造解析ユーザーグループ (PX-UG) 第6回タンパク質結晶構造解析中級者向け講習会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 于健
2. 発表標題 Prediction of ligand-protein binding site
3. 学会等名 022年PF-UA第7回タンパク質結晶構造解析中級者向け講習会。(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 于健
2. 発表標題 OneDep: Unified System for Deposition, Biocuration, and Validation of Macromolecular Structures
3. 学会等名 The 17th Conference of the Asian Crystallographic Association (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村結衣, 田島健次, 今井友也, 近藤辰哉, 姚閔
2. 発表標題 バクテリアセルロース合成酵素複合体のサブユニット間の相互作用関係の解明
3. 学会等名 第6回北大・部局横断シンポジウム
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------