

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32670

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15763

研究課題名（和文）数十個のセルロース合成酵素複合体から1本のセルロース繊維が形成される仕組み

研究課題名（英文）A mechanism by which acetic acid bacteria form a single cellulose fiber with multiple cellulose synthase complexes on the cell membrane.

研究代表者

吉田 徹（YOSHIDA, Toru）

日本女子大学・理学部・助教

研究者番号：30724546

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：酢酸菌が産生するセルロースは、膜上に配置された複数のタンパク質複合体によって産生・分泌され、最終的に1本の繊維となる。本研究では、この複合体の構造および膜状の配置・配向を、クライオ電子顕微鏡を用いたトモグラフィー法により解明することを目的とした。トモグラフィー観察を可能にするために、人工的に小さくした細胞であるミニセルの作製に成功した。また、ミニセルがセルロース合成能を持つことを確認した。今後、トモグラフィーでの観察を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バクテリアセルロースを合成・分泌するタンパク質複合体は、膜状に複数配置されている。各複合体から分泌されたセルロースは最終的に1本の繊維となるため、各複合体の膜状の配置・配向は繊維形成に重要な働きを担うと考えられる。本研究は、膜上に配置された複数の複合体をまるごと観察することで、各複合体の構造だけでなく、それらの配置や配向も解明することを目的とする。そのため本研究は、まだ理解が不十分な、分子レベルの構造と細胞レベルの構造をつなぐ研究である。

研究成果の概要（英文）：The cellulose produced by acetic acid bacteria is synthesized and secreted by multiple protein complexes located on the membrane, ultimately forming a single fiber. The aim of this study is to elucidate the structure of these complexes, as well as their distribution and orientation on the cell membrane, with cryo-electron tomography. To enable tomographic observations, we successfully created minicells, which are artificially reduced in size. Furthermore, we confirmed that these minicells retain cellulose synthesis ability. Tomographic observations will be performed.

研究分野：生物物理学、構造生物学

キーワード：バクテリアセルロース トモグラフィー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酢酸菌 (*Komagataeibacter xylinus*) が分泌するセルロースはバクテリアセルロースと呼ばれ、数百本のセルロース鎖 (グルコースが重合した1本の鎖のこと) が束になった繊維である。バクテリアセルロースの合成と分泌は、ターミナルコンプレックス (TC) と呼ばれる、内膜上の合成酵素 (BcsAB)・外膜上の分泌酵素 (BcsC) を含むタンパク質複合体によって行われる。内膜上の合成酵素によって合成された1本のセルロース鎖は、ある程度の束になった状態 (この束はサブエレメンタリーフィブリルと呼ばれる) で TC から分泌され、細胞外で最終的に1本の繊維を形成する (図1)。

酢酸菌によるバクテリアセルロース合成機構の最大の謎は、セルロース鎖が「どこで」「どのように」束になるのか、ということである。まず、1本のセルロース鎖は、TC から分泌された時点でサブエレメンタリーフィブリルを形成している。これは、TC 自身がセルロース鎖を束ねる仕組みを持つことを示唆している。しかし、TC を構成する各タンパク質のストイキオメトリーおよび TC の全体構造が分かっていないため、その仕組みは不明である。次に、各 TC から分泌されたサブエレメンタリーフィブリルは最終的に1本の繊維となる。これは、細胞膜上に配置された TC の数・配置・配向が、1本の繊維形成に影響を及ぼしている可能性を示唆している。現在、酢酸菌には数十個の TC が存在し、それらが菌の長軸方向に沿って一列に並んでいることは分かっている。しかし、TC の細胞に対する配向、TC から分泌されるサブエレメンタリーフィブリルの細胞に対する配向、TC 同士の間隔、などは全く分かっていない。

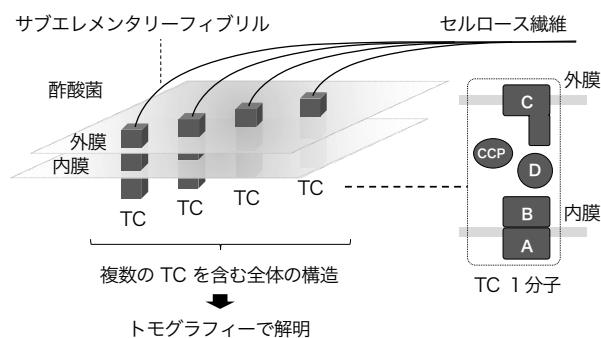


図1 本研究の概要 (BcsA を A と表示している)

2. 研究の目的

本研究では、クライオ電子顕微鏡トモグラフィーにより、酢酸菌上に配置された TC の構造・配置・配向を解明することを目的とする。理想的には、サブエレメンタリーフィブリルが分泌されている状態の TC の構造を捉えたい。また、サブトモグラムアベレーシングによる TC 全体構造の解明および、TC を構成する各タンパク質のストイキオメトリーの解明も目指す。

3. 研究の方法

酢酸菌の大きさは数マイクロメートルであるため、トモグラフィー観察には少し大きい。そこでまず、酢酸菌のミニセルを作製する。作製したミニセルがセルロース生産能を有していることを確認し、クライオ電子顕微鏡による観察に進む。

4. 研究成果

酢酸菌のミニセル作製の報告はないため、一般的なミニセル調製方法の1つである *Min* 遺伝子の破壊を試みた (図2a)。*Min* 遺伝子破壊株はコロニーの形状が明らかに野生型と異なっていた。また、グラム染色した上で光学顕微鏡によって観察したところ、野生型より明らかに小さな細胞が観察された。ミニセルは、遠心分離によってそれ以外の細胞と分離することが可能であった (図2b)。さらに、固定化・脱水・乾燥した上で SEM によって観察したところ、やはり野生型より明らかに小さな球状の細胞が観察された (図2c)。そのため、*Min* 遺伝子を破壊することによるミニセルの調製に成功したと考えられる。ただ、固定化・脱水・乾燥の工程でほとんど全てのミニセルは壊れてしまったため、ミニセルと考えられる細胞は2個しか観察されなかった。観察できたミニセルの大きさは0.5 μmと1 μmだったが、全てのミニセルが同様の大きさなのかは分かっていない。次に、ミニセルが TC を持つかどうかを確認するために、ミニセルのセルロース生産能を確認した。精製したミニセルおよび、精製後3日間培養したミニセルを共焦点顕微鏡で観察したところ、培養後は明らかにセルロースの量が増加していた。そのため、調製したミニセルが TC を有し、さらにセルロース生産能を有している可能性は高い。

以上の実験により、セルロース生産能を有する酢酸菌のミニセルの調製に成功したと判断し、ミニセルをクライオ電子顕微鏡により観察した。しかし、ミニセルと思われる細胞を観察することは出来なかった。これは、調製したミニセルの濃度不足、また、グリッド作製の際にミニセルが全てろ紙に吸着してしまったためである可能性が高い。今後は、より濃度の高いミニセルを調製し、グリッド作製条件の検討を行う。

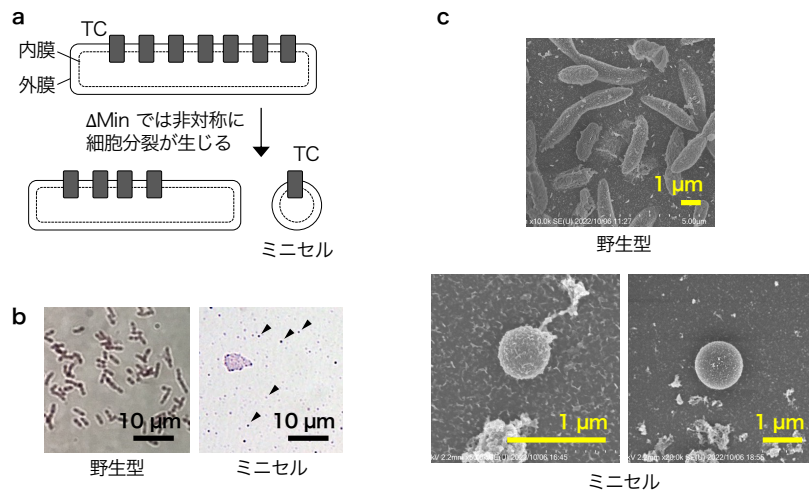


図2 (a) ミニセルの作製方法
 (b) 精製した酢酸菌ミニセルの光学顕微鏡画像 (グラム染色)
 (c) 精製した酢酸菌ミニセルのSEM画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawamoto Akihiro, Yamada Tomohito, Yoshida Toru, Sato Yusui, Kato Takayuki, Tsuge Hideaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Cryo-EM structures of the translocational binary toxin complex CDTa-bound CDTb-pore from <i>Clostridioides difficile</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-33888-4	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 Yoshida Toru, Sugano Yasushi	4. 巻 33
2. 論文標題 Unexpected diversity of dye-decolorizing peroxidases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101401 ~ 101401
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2022.101401	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 -

〔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 吉田徹、内田悠斗、山田等仁、津下英明
2. 発表標題 <i>Clostridium perfringens</i> 由来二成分毒素CP1Ebの膜貫通孔は、セリンで形成された最狭窄部位を持つ
3. 学会等名 第68回トキシシンポジウム
4. 発表年 2022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
---------	---------