

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580239

研究課題名(和文) ホヤ C e s A による試験管内セルロース生合成系の構築

研究課題名(英文) Start up study of in vitro cellulose biosynthesis system using ascidian Cesa

研究代表者

木村 聡 (KIMURA, SATOSHI)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：00420224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：セルロース合成酵素の研究は植物やバクテリアで発展した。これまでの知見として、複数の合成酵素や付随酵素の共存下ではじめてセルロース合成が起こるという極めて複雑な系であることがわかっている。そこで本研究では、新規かつシンプルなセルロース生合成研究のモデルとして有望である、ホヤのセルロース合成酵素に着目、酵母による組換え酵素の発現と精製に関する研究基盤を整備した。

研究成果の概要(英文)：Considerable progress has been made in the study of cellulose biosynthesis in plants and bacteria. However, it has been revealed that cellulose biosynthesis is extremely complicated system, e.g. necessity of multiple synthase and several associated proteins. In this project, we focused ascidian cellulose synthases (CiCesA) expected to a new model organism and simple system for cellulose biosynthesis study, and constructed recombinant CiCesA protein by Pichia expression system for in vitro experiment system of cellulose biosynthesis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：セルロース ホヤ セルロース合成酵素 Pichia

1. 研究開始当初の背景

セルロースは地球上で最多量に生産され、材料分野を中心に広く利用されている天然高分子である。セルロースのほとんどは植物により生産されるが、バクテリアや動物（ホヤ類）でも生産される。セルロース生産生物の間で、セルロースマイクロフィブリルの形状や結晶性は異なり、ホヤ類では高結晶性セルロースマイクロフィブリルを合成することが知られている。多様な形態のセルロースを生物が作り分ける仕組みを明らかにすることは、生物学興味のみならずセルロース利用の面から重要な課題である。セルロース合成酵素の研究はバクテリアでは酢酸菌を、植物ではワタとシロイヌナズナをモデルとして国内外で精力的な研究が進められてきた。これまでの知見として、酢酸菌のセルロース合成酵素の活性化に環状グアニル酸の存在が必須であること、機能は不明であるが、糖鎖加水分解酵素（CMCase、グルカナゼ）の共存下でセルロースの合成量が最大となること、植物細胞では、3種類の異なるセルロース合成酵素が複合体を形成し、酢酸菌と同様にセルラーゼ様タンパク質の共存下でセルロース合成が行われる等、セルロースはその単純な構造にも関わらず生合成の仕組みは極めて複雑である。

一方、動物でありながら高結晶性セルロースを合成することで知られるホヤ類は、発生学のモデル生物としてゲノム配列情報や数々の遺伝子操作技術が整備されており、カタコウレイボヤ (*Ciona Intestinalis*) の全ゲノム解読により、バクテリアや植物のセルロース合成酵素遺伝子の相同遺伝子 (*C. Intestinalis Cellulose Synthase A* (CiCesA)) が発見されている(1)。

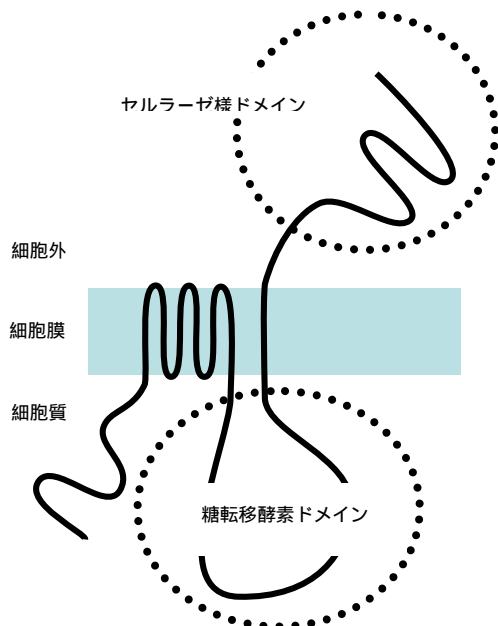


Figure 1. 塩基配列情報によるホヤのセルロース合成酵素の想像図

2. 研究の目的

本研究課題では、ホヤのセルロース合成酵素である CiCesA に着目した。CiCesA の特徴として、セルロース合成酵素をコードする遺伝子がゲノム上で一つしか見つからないこと、酢酸菌のセルロース合成に必須である環状グアニル酸結合タンパク質をコードする遺伝子が見つからないこと、さらに CiCesA 遺伝子上にはバクテリアと植物のセルロース合成において重要な役割が指摘されているセルラーゼ様タンパク質をコードする配列が組込まれていること等、セルロース生合成研究において興味深い知見が得られている (Fig. 1)。すなわち、ホヤは新規かつシンプルなセルロース生合成研究のモデル生物として有望であると考えられた。そこで、本研究では酵母発現系を利用してホヤのセルロース合成酵素を生産させる実験系を確立すること、組換え CiCesA タンパク質の精製や可溶性条件を検討し試験管内セルロース合成の実験基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

カタコウレイボのセルロース合成酵素遺伝子 (CiCesA) をクローニングし、発現ベクターへサブクローニングした。メタノール資化酵母 (*Pichia pastoris*) ヘプラスミドを導入して CiCesA の発現系を構築した。Pichia 細胞を効率よく破碎し、かつ CiCesA タンパク質を無傷で抽出する方法の検討を行った。そして各種界面活性剤による CiCesA タンパク質の可溶性条件の検討および CiCesA タンパク質による試験管内セルロース合成を試みた。

4. 研究成果

CiCesA のクローニング、メタノール資化酵母 (*Pichia pastoris*) への遺伝子組込み作業を行い、組換え CiCesA タンパク質を Pichia 細胞で発現させることに成功した。CiCesA タンパク質は、メタノール誘導開始に伴って細胞内に蓄積され、誘導後 3-4 日後に最大となることがわかった。CiCesA タンパク質の Pichia 細胞内における局在を明らかにするため、細胞破碎物の分画を行ったところ、CiCesA は細胞破碎物の水不溶性画分に、そしてそのほとんどが細胞膜画分と考えられる画分に局在することがわかった。しかし、硝子ビーズ法による細胞破碎では、CiCesA タンパク質は予想される分子量よりも低分子化される問題がしばしば起こり、細胞破碎液や破碎の条件を検討することにした。その結果、細胞破碎法としては、窒素ガス圧力式細胞破碎器を使用し、破碎の前処理としてゼイモリアーゼ処理により細胞壁の部分分解を行う処理とを組み合わせることが効果的であることがわかり、この方法では、タンパク質分解を受けずに予想

分子量（約150 kDa）のCiCesA組換えタンパク質を効率的に発現・抽出できることを明らかにした。CiCesAタンパク質をウエスタンブロットングにより検出する際に、当初、CiCesAにタグとして付加したポリヒスチジンに対する抗体を使用していたが、*Pichia*細胞には分子量約50 kDaの抗ヒスチジン抗体により認識されるタンパク質が存在し、CiCesAの分解産物との区別が困難であることが判明した（Fig. 2）。

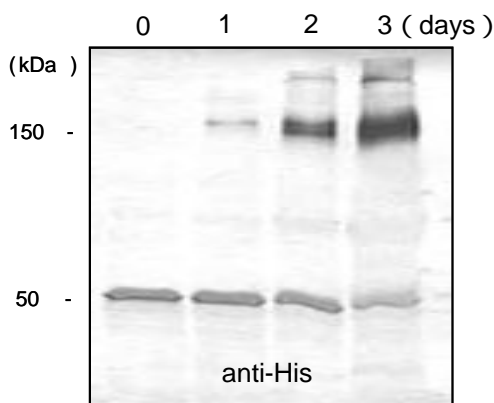


Figure 2.
*Pichia*細胞破砕物のウエスタンブロット像
抗His抗体を使用した場合、分子量150 kDa
付近のCiCesAの予想シグナルと50 kDa付近
に誘導とは無関係に現れるシグナルが認め
られる

そこでCiCesAのC末端に存在するセルラーゼドメイン（Cel6）に対する抗体を新たに使用した。抗Cel6抗体によるウエスタンブロットングの結果、内在性のポリヒスチジン含有タンパク質とCiCesAを区別可能であること、今回検討した細胞破砕条件ではCiCesAが分解されずに全長として発現および抽出できることがわかった（Fig.3）。

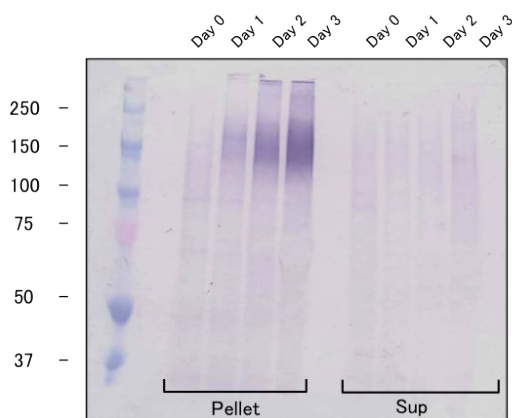


Figure 3
*Pichia*細胞破砕物のウエスタンブロット像
抗Cel6抗体を使用することで、CiCesAタン
パク質特異的なシグナルのみ検出が可能

CiCesAタンパク質を含む膜分画を各種の界面活性剤を使用して可溶化した。主に既報のセルロース合成実験において定評のある界面活性剤のシリーズ（CHAPS、n-Octyl-D-glucoside、n-Dodecyl-D-maltoside、ジギトニン、Brij58、タウロコール酸ナトリウム等）を臨界ミセル濃度の上下の種々の濃度で作用させ、処理物の遠心分離上清に含まれるCiCesAタンパク質に対して抗Cel6抗体を使用したウエスタンブロットング解析を行ったところ、CHAPS以外の界面活性剤においてCiCesAタンパク質の可溶化が確認された。そして特にジギトニンが効果的であることがわかった。そこで、界面活性剤処理後の遠心分離上清を用いてセルロースの試験管内合成を試みた。合成反応液の組成は、基質としてのUDPグルコース、2価カチオンとしてCaとMg、セロビオースを異なる濃度で添加したカクテルを調製し、30 °Cで一昼夜の反応を行った。その結果、ジギトニンやタウロコール酸ナトリウムで可溶化した試料の場合において、反応液が白濁し、微量であるが何らかの合成産物が生じることがわかった。この合成反応物を透過形電子顕微鏡で観察すると、不定形もしくは乱れた微細な繊維構造が観察された。しかしその多くは既報のグルカン類の顕微鏡像と類似していた。そこで合成産物を酢酸と硝酸の混合液で処理し、結晶性セルロースの精製を試みたところ、この処理により、ほとんどの合成産物が消失した。すなわち、ここで観察された合成産物は*Pichia*細胞の膜分画に混在する少量のグルカン合成活性によることが示された。内在性のグルカン合成活性とCiCesAタンパク質の分離を目的に、CiCesAを含む膜分画をジギトニンで処理して可溶化後、NiカラムによりCiCesAタンパク質の部分精製を試みた。ジギトニン濃度0.5-1.0%では、CiCesAタンパク質の部分精製が可能であることがわかり、この溶出液を使用してセルロース合成反応を試みた。合成反応液として、基質のUDPグルコース、2価カチオンとしてCaとMg、セロビオースを含み、それぞれの添加濃度を変化させた反応系を準備し、30 °Cで一昼夜の反応を行った。その結果、反応液が若干白濁する反応条件が見出されたので、沈殿物を回収しX線回折測定に供したが、セルロースを示す回折像は得られなかった。本研究では、ホヤのセルロース合成酵素であるCiCesAを*Pichia*細胞で発現させ、可溶化タンパク質を取得する方法を確立できたが、セルロース合成活性を確認するまでには至らなかった。界面活性剤の選択やセルロース合成のプライマーの問題等、今後これらの課題を解決する必要がある。一方、酵母は種々のグルカン合成活性を有し、

これらと同様にUDPグルコースを基質とするセルロース合成酵素もPichiaの細胞内において機能する可能性が高い。CiCesAの活性の詳細を明らかにするために、定常的にCiCesAを発現させる組換え酵母の作製とin vivoの実験系の確立を今後検討したい。

引用文献

Nakashima *et al.*, *Marine Genomics*, 1: 8, 2008.

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 聡 (KIMURA SATOSHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：00420224

(2)連携研究者

中島 啓介 (NAKASHIMA KEISUKE)

沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミクスユニット・研究員

研究者番号：10422924

和田 昌久 (WADA MASAHISA)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：40270897

五十嵐 圭日子 (IGARASHI KIYOHICO)

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