

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650033

研究課題名(和文) 光散乱および分光法によるセルロース合成酵素活性の新規定量法の開発

研究課題名(英文) Exploitation of protocols for assaying cellulose synthase activity by using light-scattering and spectroscopy

研究代表者

今井 友也 (Imai, Tomoya)

京都大学・生存圏研究所・准教授

研究者番号：90509142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：放射性同位元素を使わない、セルロース合成酵素の酵素活性測定系の開発を行った。天然由来の粗酵素による試験管内合成系と、組換え体タンパク質の大腸菌再構成系の2つの酵素活性測定系について研究を行った。前者では、合成されたセルロースの不溶化による光散乱を、通常の吸光光度計で濁度として求め、酵素反応速度論的解析を行うことに成功した。後者では、従前法を改良したプロトコルを確立し、大腸菌系におけるセルロース合成を定量的に示すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Some methods to estimate the enzymatic activity of cellulose synthase, without using radioisotopes, were tested with (i) in vitro system using crude native enzyme and (ii) recombinant cellulose synthase reconstituted in *E. coli*. For the system (i), the turbidity, which is due to light-scattering by aggregation of cellulose product, was used for seeing the progress of reaction and a kinetic analysis was successfully made. For the system (ii), a classical protocol of anthrone-sulfuric acid method was improved for the adequate quantification of cellulose, which quantitatively demonstrated the production of cellulose by recombinant cellulose synthase in the reconstitution system with *E. coli*.

研究分野：膜タンパク質

キーワード：酵素反応速度論 非放射性同位元素 セルロース合成酵素 光散乱 濁度測定 セルロース大腸菌合成系 アンスロン硫酸法 Direct Red-23

1. 研究開始当初の背景

セルロースは、植物細胞壁の主要成分であり、バイオエタノールおよびバイオリファイナリーの材料として、その応用研究が盛んに進められている。しかし、その生成に関する研究は比較的遅れている。その原因として、セルロース合成酵素が膜タンパク質かつ複合体であり、酵素タンパク質研究の対象として、難しい試料であることが挙げられる。さらに、セルロースは水に不溶の高分子であり、その合成活性の測定が難しいことも一因である。その活性測定は、放射性同位元素 (RI) ラベルした基質を使い、反応産物中への放射活性の取込量を測定する方法が一般的だが、RI を扱う必要があり、手間と時間と経費の面で高コストであった。

2. 研究の目的

酵素反応の活性測定は、酵素反応機構解明のための必須の分析である。そこで、非 RI によるセルロース合成酵素の活性測定方法の構築を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 濁度変化による定量 (試験管内合成系)

我々が報告した方法 (*Carbohydr. Res.* **346**, 2760 - 2769 (2011)) で、酢酸菌の細胞膜画分より粗酵素画分を界面活性剤で抽出した。この粗酵素による試験管内でセルロース合成反応を実験系として利用した。

本系は、反応の進行とともに、合成されたセルロースが不溶化し、光散乱により反応液が白濁するという特徴を持つ。この濁度変化を、通常の吸光度計およびプレートリーダーを用いて測定した。セルロース合成活性に影響するリガンド 3 種 UDP-Glucose (基質)、c-di-GMP (活性化因子)、セロピオース (機能不明) について濁度変化速度の濃度依存性を調べ、酵素反応速度論解析を行った。

(2) 大腸菌合成系によるセルロース合成活性の定量

我々は、最近、セルロース合成酵素の大腸菌機能再構成系の開発に成功した (*CESEC; Biomacromolecules* **15** 4206 (2014))。本系は、組換え体セルロース合成酵素のセルロース合成活性を測定できるという重要な特徴を持つ。しかし、本課題開始時点では、その活性測定を行う適当な方法が存在しない状況であったため、本実験系に適用可能な測定系の構築を行った。

具体的には、次の 3 つの手法を試みた。

古典的な化学的手法であるアンスロン硫酸法を使う方法

洗浄した試料から ATR-FTIR 法 (全反射吸収赤外分光法) で得た赤外スペクトルの指紋領域 (1064 cm^{-1}) の吸収を使う方法
セルロースに特異的に結合すると報告された蛍光色素 Scarlet 4-B (DirectRed-23) (*Plant Physiol.* **152**,

787 (2010)) を反応液に加えて、蛍光光度計による蛍光光度測定を行った。

4. 研究成果

(1) 試験管内合成反応の濁度による合成活性測定と酵素反応速度論的解析

まず、酢酸菌より抽出した粗酵素によるセルロースの試験管内合成反応液の可視光スペクトルを測定し、特徴的な吸収のない領域を選択した。そのデータを図 1 に示す。

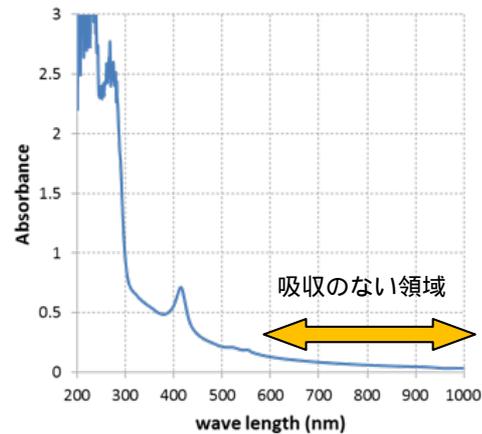


図 1 試験管内反応の可視光スペクトル

その結果、600 nm から 1000 nm までを使用できると考えた。そこで、プレートリーダーを使って、二つの波長 (620 nm と 830 nm) で、96 穴プレート中の 200 μL 反応液の濁度の時間変化を、吸光度測定で測定した。その測定例を図 2 に示す。

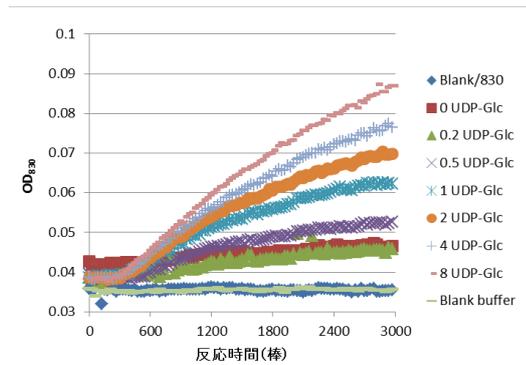


図 2 試験管内反応の濁度変化
830 nm の波長で各 UDP-Glc 濃度における濁度変化を時間軸 (秒) でプロット

最初の 5 分程度は変化が見られないが、その後、濁度が上昇していく様子が観察された。その上昇速度には濃度依存性が見られた。そこで反応時間 8 分から 15 分の間で直線近似を行い、濁度上昇速度を算出した。リガンド濃度に対してこの速度をプロットした図を図 3 に示す。これを Hill 式にフィット (Origin Pro 8.1 を使用) させたところ、表 1 のような酵素パラメーターを得た。

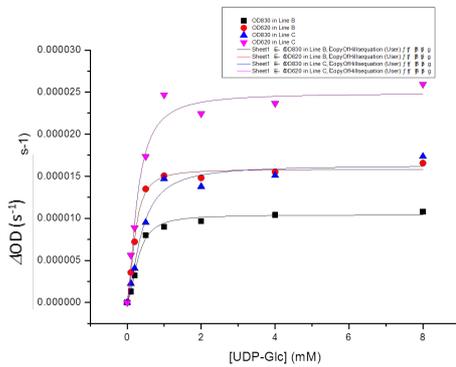


図3 試験管内反応の濁度上昇速度によるUDP-GlcのS-V曲線(0 mM UDP-Glcにおける濁度上昇速度を0として、二波長それぞれで2セット測定した結果をプロット)

表1

UDP-Glc	OD830	OD620
K_m (mM)	0.29	0.21
V_{max}	1.04E-05	1.58E-05
n	1.8	1.8

同じ手法で調製した粗酵素を使って、RI基質による活性測定から得られた値($K_m=1$ mM, $n=1.5$)と比較すると、 K_m は同等あるいは若干低い値となった。またヒル係数は同等の値となった。

同様の手順で、c-di-GMPで速度論的解析を行った結果を表2に示す。

表2

c-di-GMP	OD830	OD620
K_m (μ M)	2.1	1.5
V_{max}	2.3E-05	3.5E-05
n	1.07	0.99
base	3.8.E-06	9.0.E-06

同じ手法で調製した粗酵素を使って、RI基質による活性測定から得られた値($K_m=3$ μ M, $n=2.6$)と比較すると、 K_m は同様の値となったが、ヒル係数はほぼ1となり、ミカエリス-メンテン型で説明できることが示された点で、RI実験による結果と大きく異なった。

最後にセロピオースについては、明瞭な濃度依存性を見ることができなかつた。RI基質を使った測定の分析では、ミカエリス-メンテン型の反応機構でセロピオースの効果を説明することができた。この点で、結果のミスマッチが見られた。

以上の結果から、濁度変化の追跡により、RIを使わずにセルロース合成酵素の酵素反応速度論的解析が可能であることが示唆された。一方で、c-di-GMP濃度依存性やセロピオース濃度依存性で見られたように、RIラベル基質を使った場合と異なる結果が濁度変化測定から得られうることも明らかとなった。現時点では、濁度変化による定量では、RIラベル基質の不溶性画分への取込量と異なるものが観察されると結論できる。今後、濁度変化速度の物理的意味付けやポリスチレンビーズなどの標準試料での測定結果を検討し、上述の結果の不一致について考察を進める予定である。

また、もう一つの問題点として、基質なしの濁度上昇(タンパク質の凝集)が小さい場合と大きい場合で、解析値が変動するようが見えた。後者では、タンパク質凝集の情報がセルロース合成の情報と重なっていると考えられ、慎重な解釈が必要であろう。今後、より信頼性の高いデータを得るために、測定条件の最適化(酵素濃度の適正化やタンパク質安定化剤の添加など)など、測定データの安定性について検討が必要であると考えられる。

(2) 大腸菌合成系によるセルロース合成活性の定量

アンスロン硫酸反応

まず、セルロース標準試料を使って、プロトコルの最適化を行った。試料として、市販の微結晶性セルロース(アビセル)と、アビセルから調製したリン酸膨潤セルロース(PASC)を用いて、既報に従い発色反応を行った。その結果、同量にも関わらず、625 nmの吸光度の読み値に両者で違いが見られた。図4にその可視光スペクトルを示す。

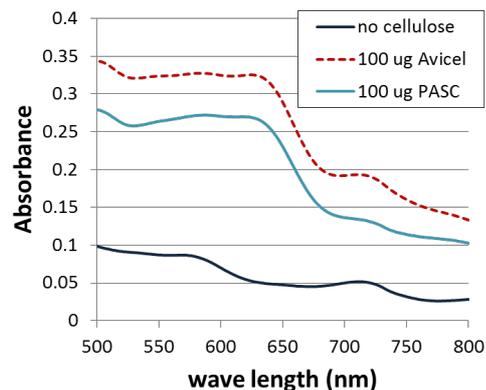


図4 アンスロン硫酸発色反応のスペクトル

スペクトルを見ると、700 nm付近から吸収が立ち上がっていた。そこで、625 nmの吸収を、700 nmの吸収を差し引いて読み取り分析したところ、実験によるばらつきを抑えることができることを確認した(図5)。以上に基づき、下記のようにプロトコルを確定させた。

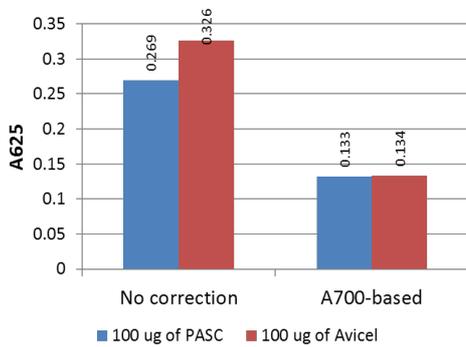


図5 アンスロン硫酸発色反応の625 nmの吸収の読み値
左は直接625 nmの吸光度を読んだ場合で、
右は700 nmの吸光度で0を取った場合

試薬

- AN液：酢酸8vと硝酸1vの混液
- アンスロン液：0.1 gのアンスロンを50 mLの濃硫酸に溶かす（すぐに溶ける）、調製後6h以上4に置いてから使う。
- 66% (v/v) 硫酸

試料

- 容量は0.05-0.2 mLとする。
- 標準試料としてPASCを使い、25-500 ug程度で検量線を作る（線形性が保たれている範囲）

手順

0.05-0.2 mLの試料に、1 mLのAN液を加え、ガラス試験管で105・30分処理
ガラス試験管のまま遠心水洗し、上清を除く
水を10 mL入れ、遠心し、可能な限り上清を除く
1 mLの67%(v/v)硫酸を入れ、よく混ぜてから室温で1-2 h静置
0.05-0.1 mLを別チューブに取り出して、水を加えて総量0.5 mLとする
氷上で1 mLの冷アンスロン液を加え、よく混ぜてから105で15分処理
氷上で2-3分冷やした後に、RTで15分放置
吸光度計で625 nmと700 nmの吸収を測定する
A625からA700を引いた値を得て、ゼロ試料の吸光度を0として検量線を作り、定量する

このプロトコルを使用して、セルロース合成酵素の大腸菌内機能再構成系に適用した。その定量結果を図6に示す。

以上から、セルロース合成活性にはCesAとCesB両方の発現が必要であること、c-di-GMPが必要であること、観察されたセルロース合成は、大腸菌内在性のセルロース合成活性によるものではなく、異種発現させた

組換え体セルロース合成酵素（CesAB）によるものであることを、定量的に示すことができた（*Biomacromolecules* 15, 4206 - 4213 (2014)）。本法は、現在、点変異体セルロース合成酵素の酵素活性定量や、試験管内セルロース合成実験での重合度測定に使用している（一部成果を学会で発表済み）。

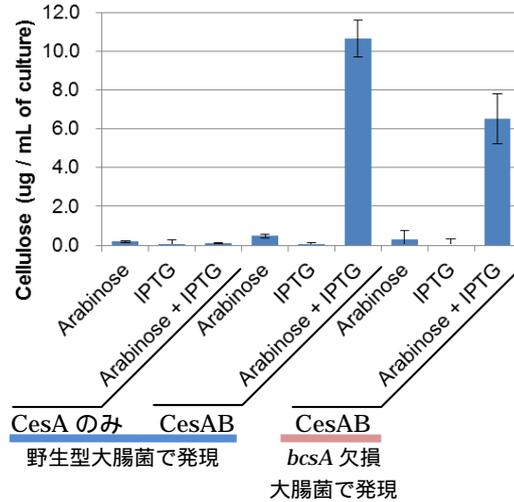


図6 大腸菌合成セルロースの定量
Arabinose: c-di-GMP合成酵素を発現させる
IPTG: セルロース合成酵素を発現させる
Arabinose+IPTG: 両者を発現させる

ATR-FTIR法による定量

モデル試料としてPASCを使い、ATR-FTIRにより異なる濃度での赤外スペクトルを得た(図7)。その指紋領域の最大ピーク1064 cm^{-1} の高さ強度を求めて濃度との相関を見た(図8)。

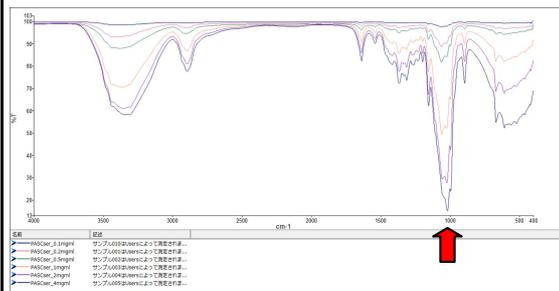


図7 異なる濃度のPASCから取得したATR-FTIRスペクトル
(0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/mL)
矢印は1064 cm^{-1} の吸収

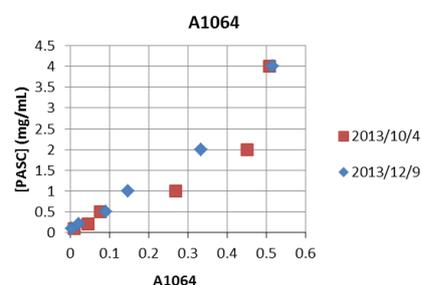


図8 ATR-FTIRスペクトル1064 cm^{-1} 高さ強度とセルロース濃度の相関

4 mg/mL の PASC 試料では、明らかにスペクトルが飽和してしまっており、0.1~2 mg/mL 程度の範囲で定量が可能であることが判明した。しかし、ATR プローブ上での試料乾燥の仕方により吸収の変動が相当あることも分かった。また、先述のアンスロン硫酸反応の手順の後に、遠心水洗を行うことで、大腸菌の菌体を取り除き、大腸菌合成セルロースの精製品を得て、その ATR-FTIR スペクトルから PASC による標準曲線に基づき定量したところ、得られた値はアンスロン硫酸反応で算出されたものより低い傾向があることが判明した。

以上から、ATR-FTIR による定量は可能ではあるが、前述のアンスロン硫酸反応の方が優れていると考えられる。

蛍光染料による方法

モデル試料として PASC を使って蛍光スペクトル測定を行った。0.01%の DirectRed-23 水溶液と、PBS 中に懸濁した PASC 溶液を 1 : 9 で混合し、1 時間インキュベート後に遠心して上清を除き、1 mL の PBS 中にセルロース試料を懸濁させ、励起蛍光二次元測定を行った(図 9)。

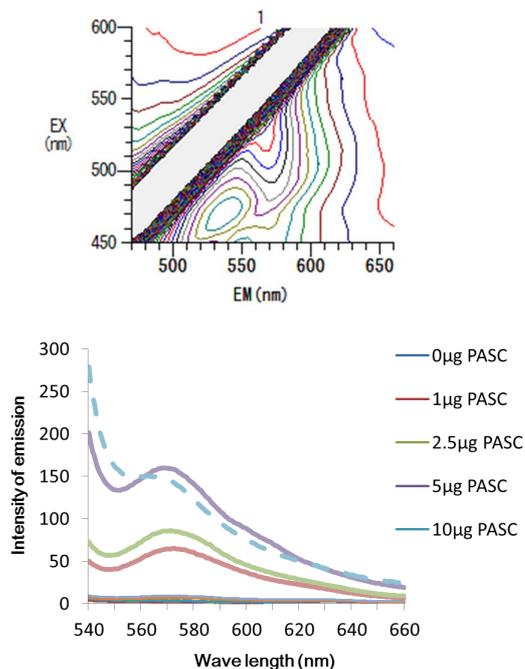


図 9 PASC/DirectRed-23 の励起蛍光スペクトル (上) 励起蛍光の二次元測定結果; (下) 異なる PASC 濃度での蛍光スペクトル (励起 520 nm)

上記測定の結果と、セルロース大腸菌合成系を試料に行った予備実験の結果から、励起光 520 nm/蛍光 570 nm で定量をまず試みた。PASC 濃度と蛍光強度の相関を図 10 に示す。その結果、蛍光と PASC 濃度には正の相関があることは分かったが、線形性はよくなかった。多項式で検量線を作製し、大腸菌合成セルロースの定量を行ったところ、アンスロン硫酸反応で得られる値と同等か、若干高い値が得られた。

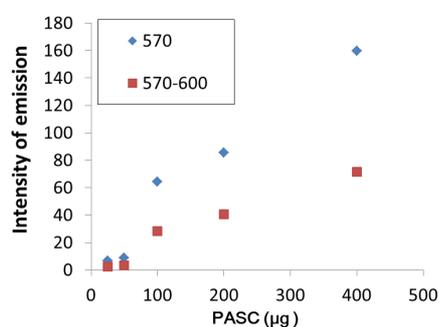


図 10 励起 520nm/蛍光 570nm の強度値と PASC 量との相関; 570-600 は、Em@600 nm の値を差し引いた Em@570 nm 値

本法は簡便にセルロースを定量できる方法として有望であり、今後、引き続いて条件最適化を行う予定である。

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 1 件)

1. *Biomacromolecules* **15**, 4206 - 4213 (2014) "Functional reconstitution of cellulose synthase in *Escherichia coli*" Tomoya Imai, Shi-jing Sun, Yoshiki Horikawa, Masahisa Wada, Junji Sugiyama

[学会発表](計 6 件)

1. Paavo A. Penttilä, Junji Sugiyama, Tomoya Imai "In vitro synthesis of cellulose under various conditions" 249th American Chemical Society National Meeting & Exposition (2015.3.22-26)
2. Shi-jing Sun, Yoshiki Horikawa, Junji Sugiyama, Tomoya Imai "Function analysis of cellulose synthase by site-directed mutagenesis" International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (2015.3.15-17)
3. Paavo A. Penttilä, Junji Sugiyama, Tomoya Imai "Effects of reaction conditions on cellulose structures synthesized in vitro" International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (2015.3.15-17)
4. 孫世静、今井友也、杉山淳司「部位特異的変異導入によるセルロース合成酵素の機能解析 (II)」第 87 回日本生化学会大会 (2014/10/15-18)
5. 今井友也、孫世静、堀川祥生、和田昌久、杉山淳司「セルロース合成酵素の大腸菌内機能再構成」セルロース学会第 21 回年次大会 (2014/7/17-18)

6. 孫世静、堀川祥生、杉山淳司、今井友也
「Quantification of the cellulose
produced by recombinant cellulose
synthase in E.coli」セルロース学会第
21 回年次大会 (2014/7/17-18)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

アンスロン硫酸法のプロトコルについては
WEB 等で公開予定

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 友也 (Tomoya Imai)
京都大学・生存圏研究所・准教授
研究者番号：90509142

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし