



北海道大学
大学院工学研究科
生物機能高分子専攻
准教授
博士（工学）
田島健次
棟方正信
姚 関（北大院先端生命）

1991 年北海道大学工学部卒業
1993 年同大学大学院工学研究科修士課程修了
1993 年日本学術振興会特別研究員 DC1
1995 年北海道大学工学部助手
2002 年同大学大学院工学研究科助教授
2007 年同大学大学院工学研究科准教授
現在に至る

セルロース合成酵素複合体の立体構造および機能の解析

はじめに

セルロースは自然界に最も豊富に存在する高分子で、地球上での年間生産量は 1,000 億トンと言われており、その量は穀物年間生産量の 50 倍におよぶ。セルロースは、大気中の二酸化炭素を原料として、植物の光合成により生産されるグルコースが β 1,4 結合した直鎖状の高分子（多糖）であり、非常に丈夫な材料である。セルロースそのものは紙や衣類として、またその誘導体は、増粘剤、フィルター、液晶パネルなど様々なところで利用されている。また、最近では非食用のバイオマス資源として、バイオエタノールの原料として注目されている。セルロースのほとんどは植物によって合成されるが、バクテリア、藻類、カビ、動物（ホヤ）によっても合成されることが知られている。この内、バクテリアによって合成されるセルロースは、バクテリアセルロース（BC）と呼ばれ、植物由来のセルロースとは異なるユニークな構造と性質を有しており、それらを利用した様々な材料への応用が検討・あるいは実用化されている。また、植物を含めてセルロースの合成機構には不明な点が多く存在し、セルロース合成機構解明のためのモデルとしても利用されている。

これまでに様々なバクテリアにセルロース合成関連遺伝子が存在していることが報告されているが、最も古くから研究されているのが酢酸菌である。酢酸菌は、絶対好気性・グラム陰性の桿菌で、天然においては果物の表面などに存在している。酢酸菌のセルロース合成酵素遺伝子は、1990 年に Wong らによって初めてクローニングされ、4 つの ORF (*axcesA-D*) を含むオペロンとして存在していた。その後 1994 年にエンドグルカナーゼ (CMCax) 遺伝子、1997 年に β -グルコシダーゼ遺伝子がそれぞれクローニングされ、これらは何れもセルロース合成酵素遺伝子オペロンとクラスターを形成していることがわかった。これまでに数株の酢酸菌においてセルロース合成関連遺伝子群がクローニングされているが、我々は *Acetobacter xylinum* (*A. xylinum*) ATCC23769 におけるセルロース合成関

連遺伝子群のクローニングを行なった。まずセルロース合成酵素遺伝子の下流に位置する β -グルコシダーゼ (BglxA) 遺伝子を取得クローニングした。 *A. xylinum* ATCC23769 株についてはこれまでにセルロース合成酵素遺伝子オペロンの上流に位置する CMCax 遺伝子、CcpAx (ORF2) 遺伝子の塩基配列が報告されており、Long-PCR によって図1のようなセルロース合成関連遺伝子クラスターを取得した。この遺伝子群に含まれる6つのORFについて、blastp プログラムを用いてアミノ酸レベルにおける相同性の比較を行なったところ、いずれのORFもこれまで報告されているセルロース合成関連酵素と高い相同性を有しており、特に *A. xylinum* ATCC53582 とはほぼ同一であることがわかった。

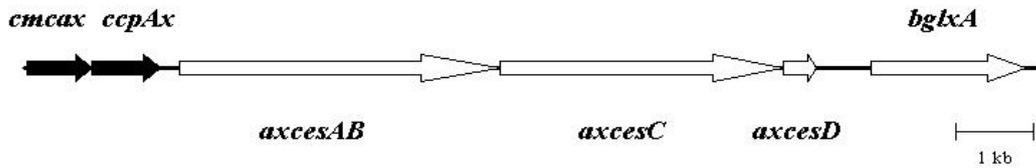


図1 酢酸菌におけるセルロース合成関連遺伝子クラスター

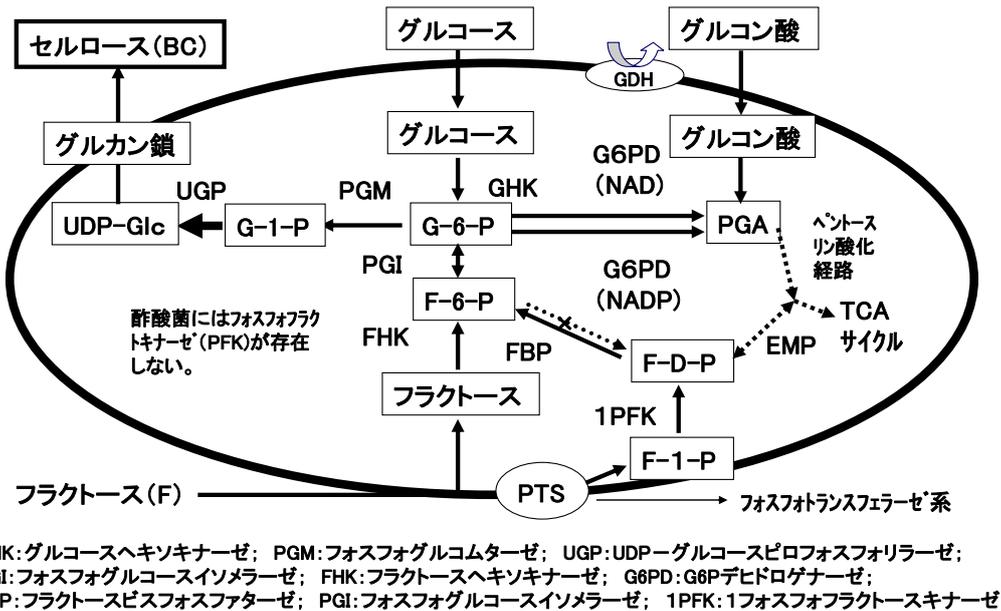


図2 酢酸菌におけるセルロース合成経路

酢酸菌においてセルロースは、細胞の膜に存在する合成装置 (セルロース合成酵素複合体 (TC)) によって合成され、数百本の分子鎖からなる1本の繊維として、菌体外に排出されている (図3-BDE)。数十個~百個程度 TC が菌体の長軸に沿って直線的に配置して

おり (図 3-D)、TC においてセルロース分子鎖が複数本合成され、セルロースサブエレメンタリーフィブリル (SEF) として菌対外に排出される。SEF は菌体外で自己集合してミクロフィブリルを形成し、さらにそれらが集まってリボンを形成する (図 3-D)。1 本のセルロースリボンの太さは 50~100 nm であり、木材由来のパルプ繊維の 1000 分の 1 程度の太さである。セルロース合成装置の全体構造は今のところ明らかにされていないが、数種類のタンパク質 (AxCeSA、B、C、D) が複数集まっていると予想されている (図 3-E)。セルロース合成における AxCeSA、B、C、D の機能はそれぞれ、AxCeSA : 触媒作用、AxCeSB : アクチベーター (c-di-GMP) の結合による活性の制御、AxCeSC : セルロース合成のための孔の形成、AxCeSD : サブエレメンタリーフィブリルの排出・結晶過程に関与、と推定されており、AxCeSA-C については遺伝子欠損によってセルロース合成能の欠失、AxCeSD についてはかなりの減少が見られる。

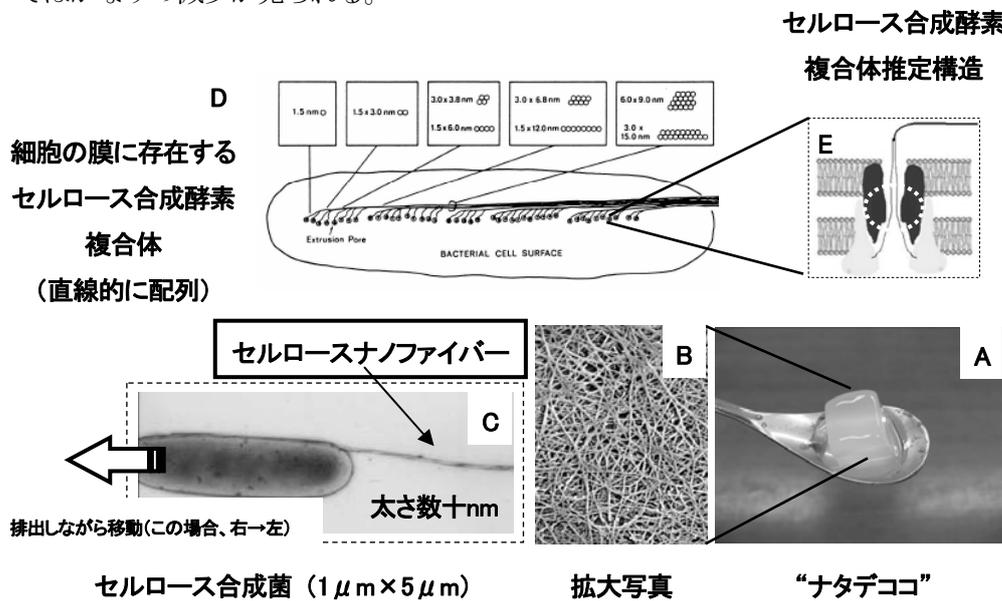


図 3 酢酸菌におけるセルロース合成

セルロース合成における AxCeSC の機能

AxCeSC は酢酸菌のセルロース合成酵素複体のサブユニットの一つであり、孔の形成に関与していることが推定されている。しかし、AxCeSC のセルロース合成における機能は明らかとなっていない。そこで、AxCeSC 欠損株 (Δ CD)、および相補株を調製し、セルロース合成への影響について調べることにした。遺伝子欠損用のプラスミドを作製し、エレクトロポレーションによって酢酸菌(野生株)に導入した。抗生物質耐性を指標として、候補株を選択した。候補株における遺伝子の欠損に関して、PCR、および Western blotting (抗 AxCeSD 抗体を使用) によって確認した。

野生株、AxCeSCD 欠損株 (ΔCD)、相補株における菌体量、セルロース合成量の比較を行った。全ての株において菌体量には大きな差がみられなかった。このことから、遺伝子の欠損、および相補が菌体増殖に影響を与えないことを確認した。セルロース合成に関して、欠損株 (ΔCD (pTI99)) ではセルロースが全く合成されなかった (図 4)。また、相補株 (ΔCD (pTCD)) ではセルロース合成が一部回復、AxCeSD のみを相補した株 (ΔCD (pTDK)) ではセルロース合成が全く回復しなかった。これらの結果から、AxcesC は酢酸菌のセルロース合成において必須であることが確認された。

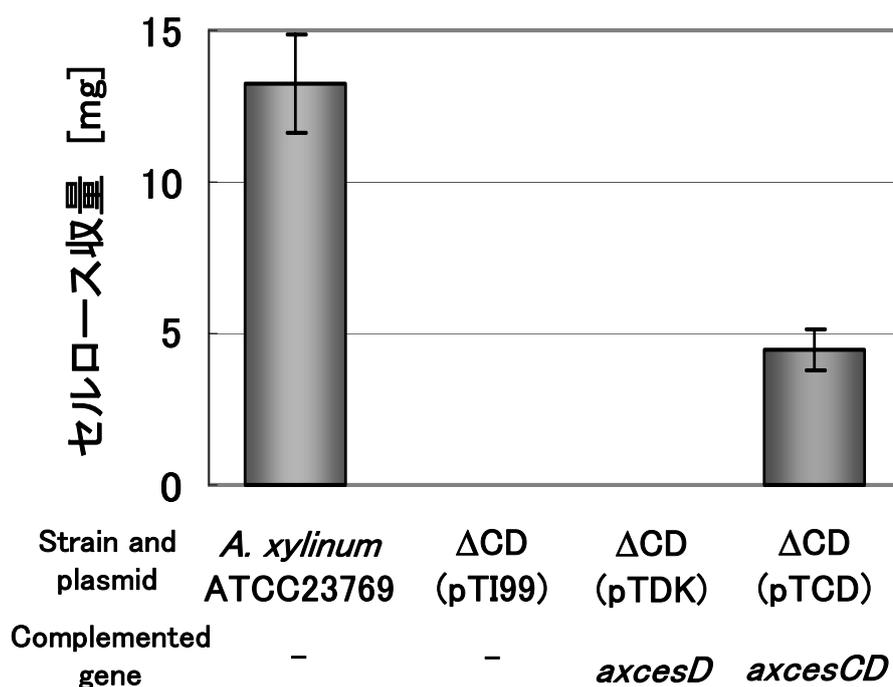


図 4 野生株、欠損株、相補株におけるセルロース合成量の比較

これまでの研究で、酢酸菌のセルロース合成酵素複合体は菌体の長軸に沿って直線的に配列していることが報告されている。また、我々の研究室でも AxCeSD を蛍光標識することによって、菌体の長軸に沿って直線的に配列していることを確認している。上述のように、AxCeSC は酢酸菌のセルロース合成酵素複合体のサブユニットの一つであり、AxCeSD と同様に菌体の長軸に沿って直線的に配列していることが推定されている。そこで、AxCeSC を Lumio-tag (赤色蛍光) で、AxCeSD を EGFP (緑色蛍光) で標識し、蛍光顕微鏡観察することによってその局在性を確認した。

AxCeSCD 欠損株 (ΔCD) に *axcesC::lumio* および *axcesD::egfp* を含むプラスミドを導入し、菌体量、セルロース合成量について相補株 (ΔCD (pTCD)) との比較を行った。その結果、菌体量、セルロース合成量ともにほぼ同じであることが確認された。次にこの株を

用いて、蛍光顕微鏡観察を行った。以前調製した AxCeSD 欠損株に *axcesD::egfp* を導入した株では局在性が観察されたのに対し (図 5 左)、今回調製した株については赤色蛍光観察、緑色蛍光観察ともに明確な局在性を確認することが出来なかった (図 5 中、右)。これについては、相補株におけるセルロース合成能の回復が野生株の 3 分の 1 程度であること、また AxCeSA-D がオペロンとして発現していることから、セルロース合成酵素複合体の形成が完全に行われていないためであると考えられる。

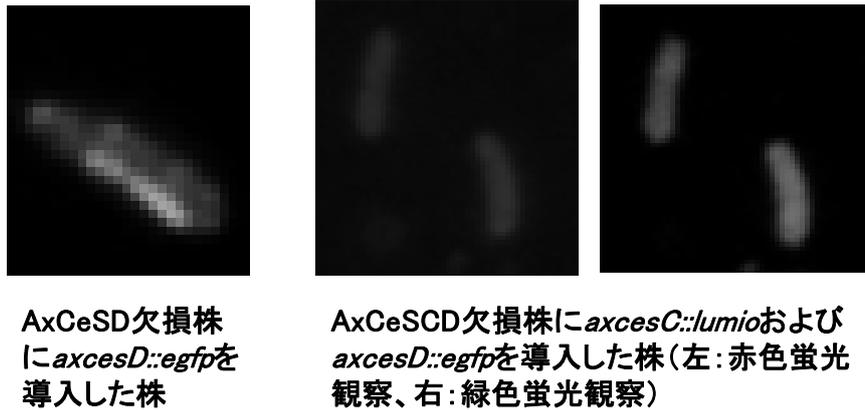


図 5 蛍光顕微鏡観察による AxCeSC、AxCeSD の局在性の推定

セルロース合成における AxCeSD の機能

AxCeSD は酢酸菌のセルロース合成酵素複合体のサブユニットの一つであり、サブエレメンタリーフィブリルの排出・結晶化に関与していると推定されている。我々は最近、AxCeSD の立体構造解析に成功した。AxCeSD は図 6 に示すような八量体環状構造で、環内側にさらに 4 つの穴が存在し、その穴をセルロース鎖が通っていることが示唆された。

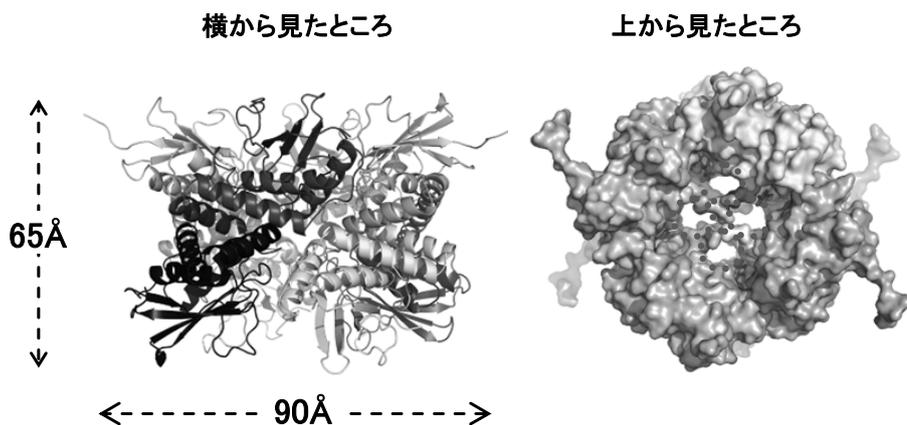


図 6 AxCeSD の全体構造

AxCeSD の構造的特徴として、全てのサブユニットの N 末端が、八量体環状構造の内側を向いており、環内側に 4 つの穴(トンネル)が形成されているということが挙げられる。そこで、この特徴的な構造を形成している N 末端に着目し、それらがセルロース合成においてどのような機能を果たしているかを様々な検討を行うことによって、推定することにした。検討項目は以下の通りである。AxCeSD-セロペンタオース複合体の立体構造解析、AxCeSD 欠損株 (DBC 株) における N 末端欠損 AxCeSD 発現、およびそれらの株における菌体量・セルロース合成量・セルロース繊維幅の比較

セルロース分子のモデルとしてセロペンタオースを使用し、AxCeSD との共結晶を作製した。得られた共結晶に関して構造解析を行った (図 7)。セロペンタオースは、AxCeSD の N 末端によって形成される 4 つの穴 (トンネル) に存在し、4 本のセルロース分子鎖が AxCeSD の内側を通過して菌体外に排出されていることが示唆された。

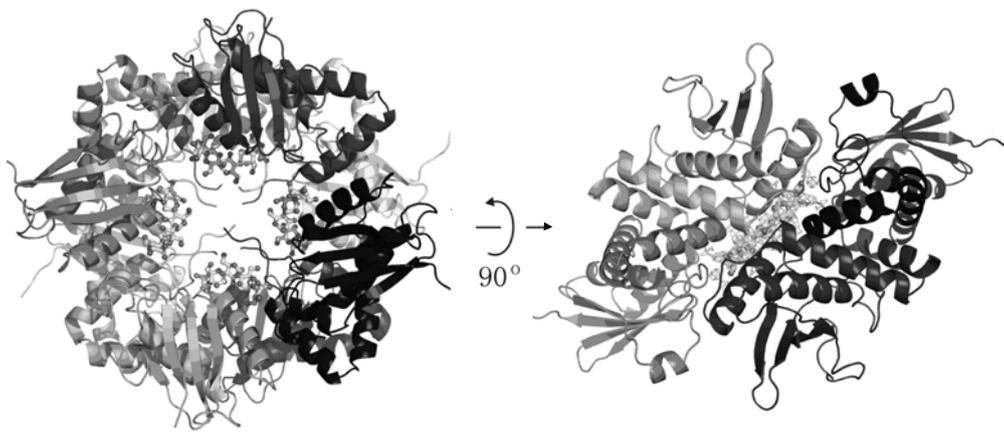


図 7 AxCeSD-セロペンタオース複合体の構造

次に、セルロース合成における N 末端の機能を解析するために AxCeSD 欠損株 (DBC 株) に様々な長さで (D Δ 2-4、D Δ 2-5、D Δ 2-6) N 末端を欠損した AxCeSD を発現するプラスミドを導入した。野生株、欠損株、相補株 (D、D Δ 2-4、D Δ 2-5、D Δ 2-6) について菌体量・セルロース合成量・セルロース繊維幅の比較をおこなった。

菌体量については、すべての株についてほぼ同程度であった。これらの結果から、AxCeSD の欠損および相補は菌体増殖に影響しないことが確認された。また、それぞれの株におけるセルロース合成量の比較から、AxCeSD 遺伝子欠損株のセルロース合成量は野生株と比較して約 10 %に低下するが、AxCeSD 相補株では低下したセルロース合成量が野生株と比較して約 88 %程度まで回復することが確認された。また AxCeSD の N 末端が 6 アミノ酸残基以上欠損した変異株ではセルロース合成量が野生株と比較して約 30 %程度に低下することが明らかになった。一方、5 アミノ酸残基までの欠損では、セルロース合成量は野生株の約 80 %程度であり、環内側の構造の有無によって収量が大きく変化した (図 8)。さ

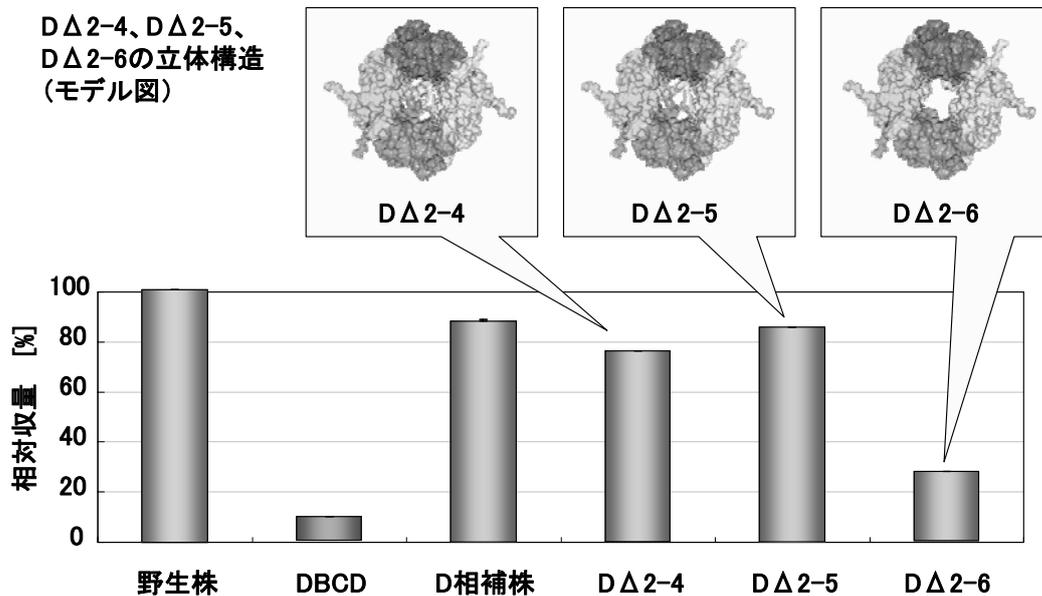


図8 AxCeSD-セロペンタオース複合体の構造

らに、それぞれの株において合成されたセルロースのSEM画像解析を行った結果、AxCeSD欠損株、AxCeSD相補株、AxCeSD変異株によって合成されるセルロースは野生株と同じ3次元の網目状構造を有しており、セルロース繊維幅にも変化が無いことが明らかになった。このことから、AxCeSD変異株やAxCeSD欠損株におけるセルロース合成量の低下は、菌体あたりに合成されるセルロース繊維の数や1本のセルロース繊維に存在するセルロース分子数が低下した為ではなく、排出速度が遅くなったことに起因していると考えられた。

これらの結果より、AxCeSDのN末端は菌体内で合成されるセルロースの効果的な排出を促す排出口の機能を有しており、その機能には環の内側に突出したN末端によって作られる構造が重要であることが明らかとなった。

おわりに

本研究において、酢酸菌におけるセルロース合成の一端が明らかとなった。しかし植物を含めて、セルロース生合成には未知の部分が多く残されており、セルロース生合成全体の仕組みが早急に解明されることが望まれる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご援助を頂きましたサッポロ生物科学振興財団、ならびにご協力を頂きました皆様方にお礼申し上げます。(敬称略、順不同) 砂川直輝、吉田誠、佐藤康治、田中勲、河野信