

学位論文題名

バクテリアにおけるセルロース合成関連タンパク質の機能解析

学位論文内容の要旨

近年、化石資源に依存せず、生分解性を有し、生体適合性に優れている天然高分子が注目されている。この内、セルロースは地球上で最も豊富に存在する天然高分子材料である。セルロースのほとんどは植物によって合成されるが、ある種のバクテリアもセルロース合成を行うことが知られており、合成されたセルロースはバクテリアセルロース(BC)と呼ばれている。BCは植物由来のセルロースにはない優れた特性を有していることから、新規の機能性材料として期待されている。しかしながら、BCの生産性は低く、産業的に利用するためには、合成機構解明に基づく生産性の向上や機能化が必要である。

本論文では、BCの生産性向上や機能化に向けた基礎的知見を得ることを目的として、代表的なBC合成菌である *Acetobacter xylinum* (*A. xylinum*) ATCC23769 におけるセルロース合成関連タンパク質の機能解析を行った。また、近年新たに発見され、BC生産菌としての利用が期待されている *Enterobacter* sp. CJF-002 のセルロース合成関連遺伝子の取得・解析を行い、*A. xylinum* のセルロース合成関連遺伝子との比較を行った。

第1章は序論であり、研究の背景および本研究の目的を明らかにした。

第2章では、*A. xylinum* のセルロース合成関連タンパク質の1つである AxCeSD の機能解析を行った。酢酸菌におけるセルロース合成は、細胞膜の1カ所に菌体に沿って直線状に配列したセルロース合成酵素複合体(ターミナルコンプレックス(TC))によって行われており、AxCeSDは、TCの構成タンパク質の1つであると考えられている。AxCeSDは八量体環状構造を有し、環内側にはN末端によって形成される4つのトンネルが存在している。また、セロオリゴ糖との共結晶の解析結果から、合成されたグルカン鎖1本が各トンネルを通過して菌体外に排出されている可能性が示唆されているが、その機能については明らかにされていない。そこで、2-2節では、AxCeSDの特徴的な構造であるN末端領域に His-tag を融合したタンパク質(His-AxCeSD)を *axcesD* 遺伝子欠損株において発現させ、セルロース合成に与える影響を解析した。実験の結果、His-AxCeSDを発現した株では、野生株と比較してセルロースの合成量が約60%に低下した。これはN末端に導入した His-tag がグルカン鎖の排出に影響を与えている可能性を示唆する結果であり、菌体内部で合成されたグルカン鎖が AxCeSD 八量体の環内部を通過して排出されているというモデルを支持するものと考えた。2-3節では、N末端の機能をさらに明確にするため、N末端領域が欠損した AxCeSD を *axcesD* 遺伝子欠損株において発現させ、セルロース合成に与える影響を解析した。実験の結果、N末端が6アミノ酸残基以上欠損した AxCeSD を発現する株ではセルロース合成量が野生株の約30%まで低下した。またモデリングの結果から、AxCeSDのN末端が6アミノ酸残基欠損した場合には、環内側のトンネル構造が完全に消失することが分かった。これらの結果から、菌体内部で合成されたグルカン

鎖は AxCeSD の N 末端によって形成されるトンネルを通して菌体外に排出されている可能性が高く、N 末端により形成されるトンネル構造が *A. xylinum* の効率的なセルロース合成において非常に重要であることが明らかとなった。

第 3 章では、*A. xylinum* のセルロース合成関連遺伝子クラスター内にその遺伝子が存在し、セルロース合成に必須である CcpAx の機能解析を行った。3-2 節では蛍光タンパク質 (EGFP) によって標識した CcpAx (CcpAx-EGFP 融合タンパク質) を *ccpax* 遺伝子欠損株において発現させ、菌体における CcpAx の局在性を蛍光顕微鏡によって観察した。観察の結果は、CcpAx が細胞膜の 1 カ所に菌体に沿って直線状に局在していることを示しており、この局在性は、TC と同様なものであった。CcpAx は *A. xylinum* のセルロース合成に必須のタンパク質であり、この結果から CcpAx が TC のメンバーである可能性が示唆された。次にこの仮説を立証するため、TC の構成タンパク質の 1 つであると考えられている AxCeSD と CcpAx の相互作用の有無を解析することにした。3-3 節では相互作用解析に先立ち、AxCeSD の局在性を CcpAx の時と同様の方法によって確認した。蛍光顕微鏡観察の結果から AxCeSD は TC、CcpAx と同様の局在性を有していることが確認された。3-4 節ではプルダウンアッセイ法、および等温滴定カロリーメトリー法によって CcpAx と AxCeSD の相互作用を解析した。解析結果から、CcpAx と AxCeSD との間には直接的な相互作用があることが確認された。また 3-5 節では CcpAx が AxCeSD の局在性に与える影響を調べるために、*ccpax*・*axcesD* 遺伝子二重欠損株で AxCeSD-EGFP 融合タンパク質を発現させ、蛍光顕微鏡観察を行った。細胞膜の 1 カ所で菌体に沿った直線状の蛍光像の代わりに、粒子状の蛍光の塊が細胞全体に観察され、CcpAx が AxCeSD の局在性に影響を与えることが分かった。以上の結果より、CcpAx は TC の構成タンパク質として、セルロース合成において機能していることが明らかとなった。

第 4 章では、近年新たに単離され、セルロース合成速度が早いといった *A. xylinum* と異なるセルロース合成挙動を示す *Enterobacter* sp. CJF-002 について解析を行った。4-2 節では様々な炭素源を培地中に添加した際のセルロース合成量の比較を行った。比較の結果、CJF-002 は *A. xylinum* ATCC23769 と比較してセルロース合成速度や炭素源の資化性に違いがあることが確認された。次に、ATCC23769 とのセルロース合成機構の比較を行うため、4-3 節では CJF-002 のセルロース合成関連遺伝子クラスターの取得と解析を行った。解析の結果、CJF-002 のセルロース合成関連遺伝子クラスター内の遺伝子、およびその順序は酢酸菌と異なっており、*Escherichia coli* や *Salmonella* のものと類似していることが分かった。4-4 節ではセルロース合成酵素遺伝子オペロン内に存在する遺伝子の内、*bcsC* 遺伝子と *bcsZ* 遺伝子に着目し、解析を行った。*bcsC* 遺伝子に関しては欠損株と相補株を作製し、この遺伝子が CJF-002 のセルロース合成に必須であることを確認した。4-5 節ではエンドグルカナーゼと推定された BcsZ のモデリングを行い、酢酸菌由来のエンドグルカナーゼである CMCax との比較を行った。その結果、BcsZ は CMCax との相同性が低いにもかかわらず、その立体構造は非常に類似していることが確認された。また組換え BcsZ を用いた基質特異性の解析結果から、CMCax と同様な基質特異性を有していることが確認された。これらの結果から CJF-002 は、ATCC23769 と同様の分子機構によってセルロースを合成している可能性が示唆された。

第 5 章は総括であり、本論文の成果および今後の展望をまとめた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	田口	精一
副査	教授	高木	陸
副査	教授	及川	英秋
副査	教授	大利	徹
副査	准教授	田島	健次

学位論文題名

バクテリアにおけるセルロース合成関連タンパク質の機能解析

近年、化石資源に依存せず、生分解性を有し、生体適合性に優れている天然高分子が注目されている。この内、セルロースは地球上で最も豊富に存在する天然高分子材料である。セルロースのほとんどは植物によって合成されるが、ある種のバクテリアもセルロース合成を行うことが知られており、合成されたセルロースはバクテリアセルロース (BC) と呼ばれている。BC は植物由来のセルロースにはない優れた特性を有していることから、新規の機能性材料として期待されている。しかしながら、BC の生産性は低く、産業的に利用するためには、合成機構解明に基づく生産性の向上や機能化が必要である。

以上のような状況を踏まえて、本研究では、BC の生産性向上や機能化に向けた基礎的知見を得ることを目的として、代表的な BC 合成菌である *Acetobacter xylinum* (*A. xylinum*) ATCC23769 におけるセルロース合成関連タンパク質の機能解析を行っている。また、近年新たに発見され、BC 生産菌としての利用が期待されている *Enterobacter* sp. CJF-002 のセルロース合成関連遺伝子の取得・解析を行い、*A. xylinum* のセルロース合成関連遺伝子との比較を行っている。

第 1 章は序論であり、研究の背景および本研究の目的を記述している。

第 2 章では、*A. xylinum* のセルロース合成関連タンパク質の 1 つである AxCeSD の機能解析を行った。酢酸菌におけるセルロース合成は、細胞膜の 1 カ所に菌体に沿って直線状に配列したセルロース合成酵素複合体 (ターミナルコンプレックス (TC)) によって行われており、AxCeSD は、TC の構成タンパク質の一つであると考えられている。AxCeSD は八量体環状構造を有し、環内側には N 末端によって形成される 4 つのトンネルが存在している。また、セロオリゴ糖との共結晶の解析結果から、合成されたグルカン鎖 1 本が各トンネルを通過して菌体外に排出されている可能性が示唆されているが、その機能については明らかにされていない。そこで、2-2 節では、AxCeSD の特徴的な構造である N 末端領域に His-tag を融合したタンパク質 (His-AxCeSD) を *axcesD* 遺伝子欠損株において発現させ、セルロース合成に与える影響を解析した。実験の結果、His-AxCeSD を発現した株では、野生株と比較してセルロースの合成量が約 60 % に低下した。これは N 末端に導入した His-tag がグルカン鎖の排出に影響を与えている可能性を示唆する結果であり、菌体内部で合成されたグルカン鎖が AxCeSD 八量体の環内部を通過して排出されているというモデルを支持するものであると考えた。2-3 節では、N 末端の機能をさらに明確にするため、N 末端領域が欠損した AxCeSD を *axcesD* 遺伝子欠損株において発現させ、セルロース合成に与える影響を解析した。実験の結果、N 末端が 6 アミノ酸残基以上欠損した AxCeSD を発現する株ではセルロース合成量が野生株の約 30 % まで低下し

た。またモデリングの結果から、AxCeSDのN末端が6アミノ酸残基欠損した場合には、環内側のトンネル構造が完全に消失することが分かった。これらの結果から、菌体内部で合成されたグルカン鎖はAxCeSDのN末端によって形成されるトンネルを通して菌体外に排出されている可能性が高く、N末端により形成されるトンネル構造が*A. xylinum*の効率的なセルロース合成において非常に重要であることを明らかにした。

第3章では、*A. xylinum*のセルロース合成関連遺伝子クラスター内にその遺伝子が存在し、セルロース合成に必須であるCcpAxの機能解析を行った。3-2節では蛍光タンパク質(EGFP)によって標識したCcpAx(CcpAx-EGFP融合タンパク質)を*ccpAx*遺伝子欠損株において発現させ、菌体におけるCcpAxの局在性を蛍光顕微鏡によって観察した。観察の結果は、CcpAxが細胞膜の1カ所に菌体に沿って直線状に局在していることを示しており、この局在性は、TCと同様なものであった。CcpAxは*A. xylinum*のセルロース合成に必須のタンパク質であり、この結果からCcpAxがTCのメンバーである可能性が示唆された。次に、この仮説を立証するため、TCの構成タンパク質の1つであると考えられているAxCeSDとCcpAxの相互作用の有無を解析した。3-3節では相互作用解析に先立ち、AxCeSDの局在性をCcpAxの時と同様の方法によって確認した。蛍光顕微鏡観察の結果からAxCeSDはTC、CcpAxと同様の局在性を有していることが確認された。3-4節ではプルダウンアッセイ法、および等温滴定カロリーメトリー法によってCcpAxとAxCeSDの相互作用を解析した。解析結果から、CcpAxとAxCeSDとの間には直接的な相互作用があることが確認された。また3-5節ではCcpAxがAxCeSDの局在性に与える影響を調べるために、*ccpAx*・*axcesD*遺伝子二重欠損株でAxCeSD-EGFP融合タンパク質を発現させ、蛍光顕微鏡観察を行った。細胞膜の1カ所で菌体に沿った直線状の蛍光像の代わりに、粒子状の蛍光の塊が細胞全体に観察され、CcpAxがAxCeSDの局在性に影響を与えることが分かった。以上の結果より、CcpAxはTCの構成タンパク質として、セルロース合成において機能していることを明らかにした。

第4章では、近年新たに単離され、セルロース合成速度が早いといった*A. xylinum*と異なるセルロース合成挙動を示す*Enterobacter* sp. CJF-002について解析を行った。4-2節では様々な炭素源を培地中に添加した際のセルロース合成量の比較を行った。比較の結果、CJF-002は*A. xylinum* ATCC23769と比較してセルロース合成速度や炭素源の資化性に違いがあることが確認された。次に、ATCC23769とのセルロース合成機構の比較を行うため、4-3節ではCJF-002のセルロース合成関連遺伝子クラスターの取得と解析を行った。解析の結果、CJF-002のセルロース合成関連遺伝子クラスター内の遺伝子、およびその順序は酢酸菌と異なっており、*Escherichia coli*や*Salmonella*のものと同様であることが分かった。4-4節ではセルロース合成酵素遺伝子オペロン内に存在する遺伝子の内、*bcsC*遺伝子と*bcsZ*遺伝子に着目し、解析を行った。*bcsC*遺伝子に関しては欠損株と相補株を作製し、この遺伝子がCJF-002のセルロース合成に必須であることを確認した。4-5節ではエンドグルカナーゼと推定されたBcsZのモデリングを行い、酢酸菌由来のエンドグルカナーゼであるCMCaxとの比較を行った。その結果、BcsZはCMCaxとの相同性が低いにもかかわらず、その立体構造は非常に類似していることが確認された。また組換えBcsZを用いた基質特異性の解析結果から、CMCaxと同様な基質特異性を有していることを確認した。これらの結果からCJF-002は、ATCC23769と同様の分子機構によってセルロースを合成している可能性が示唆された。

第5章は総括であり、本論文の成果および今後の展望をまとめている。

これを要するに、著者は、バクテリアにおけるセルロース合成関連タンパク質の機能を明らかにしており、生物工学に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士(工学)の学位を授与される資格あるものと認める。