微生物ナノセルロース合成装置の機能解明

信州大学学術研究院（工学系）　水野正浩

１．はじめに

微生物が生産するセルロースは、バクテリアセルロース (BC) と呼ばれており、酢酸菌が生産する BC はナタデココとしても知られている。酢酸菌によるセルロースの生合成および菌体外への排出は、細胞膜に存在するターミナルコンプレックス (TC) と呼ばれる蛋白質複合体によって行われており、各々の TC 構成蛋白質機能や蛋白質間の相互作用の解明が、BC 生合成機構解明には必要となる。これまで、BC 生合成に関する研究では、*Gluconacetobacter xylinus* (= *Komagataeibacter xylinus*) がモデル微生物として扱われてきたが、我々は *G. xylinus* が生産するセルロース繊維 (40-100 nm) よりも更に微細なセルロース繊維 (5-20 nm) を生産する菌として高糖濃度酢酸菌 *Asaia bogorensis* を見出した [1]。本菌のセルロース生産量は、*G. xylinus* の約 1/10 と低いが、セルロースを実際に回収し分析することが可能であり、セルロースの形状とセルロース生合成に関する遺伝子との関係を結びつけながら考察がすることが可能である。本研究では、TC 構成蛋白質の内、セルロース鎖の会合および排出に関与していると考えられる CeSD 蛋白質に着目し、更なる機能解明を目指した。

２．実験結果

A. bogorensis の CeSD 蛋白質 (*Ab*CeSD) は、既に大腸菌を宿主とした異種発現により得られており、X 線結晶構造解析により立体構造を決定している (**図 1**)。*Ab*CesD は非対称単位中に 2 分子が存在し、更に結晶学的な対称性により、最終的に 8 量体を形成していた。また、この *Ab*CeSD の 8 量体の中央には十字状の孔が形成されている。一方、*G. xylinus* の CeSD 蛋白質 (*Gx*CeSD) も同様に環状の 8 量体構造を形成しているが、*Ab*CeSD に見られる十字状の孔は仕切られ、小さな 4 つのトンネルが形成されている [2]。菌体内部で合成されたセルロース鎖は、このトンネルを通り抜け、菌体外に排出されると考えられている。

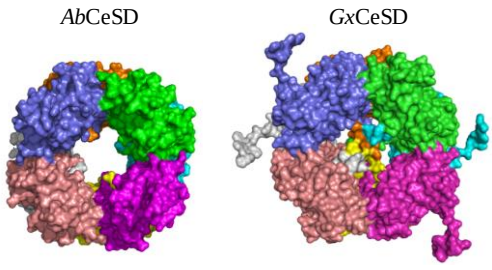

図 1　CeSD の 8 量体立体構造

そこで、先ず *Ab*CeSD 遺伝子破壊株を作製し、*A. bogorensis* における CeSD 蛋白質のセルロース生合成への影響を調査した。*A. bogorensis* はカナマイシンに対する感受性が高いため、ゲノム中の *Ab*CeSD 遺伝子内部にカナマイシン耐性遺伝子を相同組換えで導入することにより、*Ab*CeSD 遺伝子の破壊と破壊株の選択を

行った。遺伝子破壊が確認された株について、セルロース合成酵素などの他のセルロース生合成関連遺伝子の転写量を RT-PCR にて確認した結果、野生株と比較して大きな変化は認められなかった。次に、SH 培地にて静置培養を行った結果、破壊株と野生株のいずれにおいても気液界面に薄いペリクル形成が認められた (**図 2**)。しかし、試験管を緩やかに振とうさせると、野生株ではペリクルが崩れることなく沈降するに対して、破壊株ではペリクルが容易に崩壊し沈降した。得られた沈査に対して蛍光蛋白質を融合させたセルロース結合蛋白質 (CBM1-GFP) を作用させると蛍光が観察されたことから、破壊株においても僅かながらセルロースが生産されていることが示唆された。以上の結果より、CeSD 遺伝子はセルロース生合成に必須ではないが、効率的な菌体外への排出に影響を与えると考えられる。

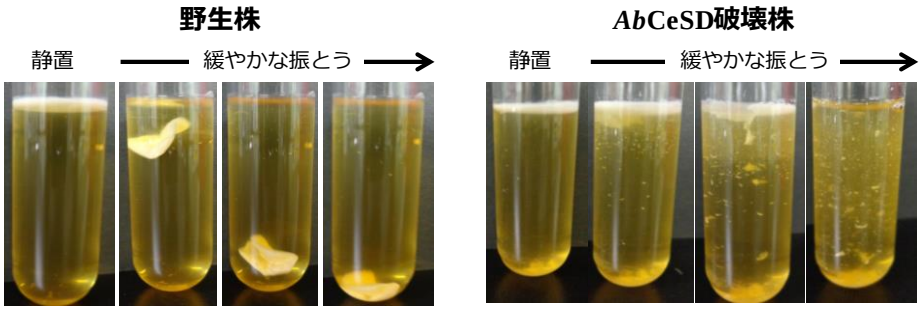

図 2　野生株および *Ab*CeSD 破壊株におけるペリクル形成の様子

次に、*Ab*CeSD 遺伝子欠損株に対する *Ab*CeSD 遺伝子の相補を試みた。また、この際に *Gx*CeSD の 8 量体構造においてセルロース鎖を通す小さいトンネル形成に重要な役割を持つとされる N 末端配列を元に、*Gx*CeSD 型に変異させた 4 種類の変異型 *Ab*CeSD (ΔN3K、ΔN3KK、ΔN3EKK、ΔN3FEKK) を作製し、破壊株への相補を試みた (**図 3**)。相補用のベクターには、グラム陰性細菌用の広宿主プラスミド pBBR122 (MoBiTec) を用い、クロラムフェニコール耐性遺伝子部位に目的遺伝子を導入した。得られたベクターを用いて *Ab*CeSD 遺伝子欠損株の形質転換を行った。ΔN3EKK 以外の得られた形質転換体を、SH 培地にて静置培養を行った結果、各菌株においてばらつきはあるものの、いずれの菌株についても薄いペリクルの形成が確認された。また、試験管を緩やかに振とうさせた場合、ΔN3K 及び ΔN3KK では *Ab*CeSD 破壊株と同様にペリクルが容易に崩壊するのに対して、ΔN3FEKK では野生型と同様にペリクルが崩壊することなく沈降した。破壊株の試験と同様に、他のセルロース生合成関連遺伝子の発現量に変化はなく、また、CBM1-GFP によるセルロースの確認においてもセルロースの生産が確認された。今回の試験において、*Ab*CeSD 蛋白質の N 末端領域を

*Ab*CesD	MISPDFSLFIHSLATE…
⊿N3K	MKPDFSLFIHSLATE…
⊿N3KK	MKKPDFSLFIHSLATE…
⊿N3EKK	MEKKPDFSLFIHSLATE…
⊿N3FEKK	MFEKKPDFSLFIHSLATE…
*Gx*CesD	MTIFEKKPDFTLFLQTLSWE…

図 3　*Ab*CeSD と *Gx*CesD の N 末端配列の比較

*Gx*CeSD と同じになるように伸長させた ΔN3FEKK を相補させた場合、野生株と同様にペリクルが形成されたことから、CeSD の 8 量体中央に形成される孔の形状がセルロース生産に重要な役割を担っていることが示唆された。なお、今回作製した各変異体 *Ab*CeSD については、大腸菌による異種発現及び精製後に、ゲル濾過クロマトグラフィーによって水溶液中で野生型と同様に 8 量体を形成することを確認している。実際のトンネル形成については、各変異体の結晶構造を解析し、その形状を確認する必要がある。また、セルロースの生産量測定については、アルカリ処理後に得られる乾燥重量が非常に少ないため、培養条件の検討を行う必要がある。

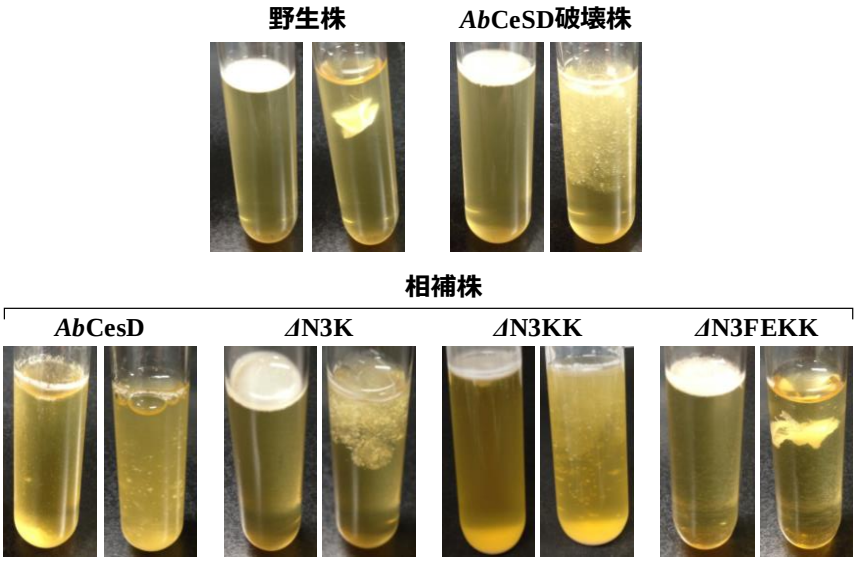

図 4　*Ab*CeSD 破壊株に対する野生型及び変異型 *Ab*CeSD 相補試験

謝辞

本研究の遂行にあたりご支援を頂きました一般財団法人杉山産業化学研究所および関係者の皆様に深く御礼申し上げます。

参考文献

1. A. Kumagai, M. Mizuno, K. Kato, K. Nozaki, E. Togawa, S. Yamanaka, K. Okuda, I. M. Saxena, Y. Amano: Ultrafine cellulose fibers produced by *Asaia bogorensis*, an acetic acid bacterium. *Biomaclomolecules*, **12**, 2815-2821 (2011).
2. S. -Q. Hu, Y. -G. Gao, K. Tajima, N. Sunagawa, Y. Zhou, S. Kawano, T. Fujiwara, T. Yoda, D. Shimura, Y. Satoh, M. Munekata, I. Tanaka, M. Yao: Structure of bacterial cellulose synthase subunit D octamer with four inner passageways. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**, 17957-17961 (2010).