



# セルロース試験管内合成における セルロース分子鎖集合過程の直接観察

今井友也<sup>1</sup>, 湯口宜明<sup>2</sup>

<sup>1</sup>京大大学生存圏研究所, <sup>2</sup>大阪電気通信大学

キーワード：セルロース合成酵素、分子集合過程、時分割 SAXS、その場測定

## 1. 背景と研究目的

セルロースは天然にもっとも豊富に存在する高分子の一つであり、近年その利用開発研究が大変活発に進められている。セルロースの生合成は細胞膜に存在するセルロース合成酵素により行われるが、この酵素はグルコースを連続付加することで高分子量の直鎖高分子を合成する機能だけではなく、この合成した高分子鎖を複数本束ねてマイクロフィブリルと呼ばれる結晶性の繊維状分子集合構造を合成する機能も持つ点で、大変特徴的な酵素である。後者の酵素過程を直接観察する手法として、小角 X 線散乱 (SAXS) は興味深く、本課題では合成されるセルロース分子鎖の集合過程の観察が SAXS で可能かを検証することを目的として実験を行った。

## 2. 実験内容

既報<sup>1)</sup>に従い、セルロース生産細菌である酢酸菌の細胞膜から、セルロース合成活性を界面活性剤 (ドデシル-β-D-マルトシド・DDM) により可溶化し、セルロースの試験管内合成に用いた。水晶薄板の窓を持つ液体試料セル中で試験管内合成反応を行わせ、温度制御装置つき試料ステージに試料セルをセットして、合成反応の SAXS その場測定を 5 分ごとに行った (カメラ長 4 m、波長 0.92 Å、検出器は Pilatus 100K、露光時間 4 分)。得られた散乱パターンの円周方向積分を行い、一次元の SAXS プロファイルを得た。これを吸収率補正のうえ分析に供した。なお本系で合成されるセルロースはマイクロフィブリルではなく塊状凝集であり、本測定の直接の目的は、この部分的変性の原因調査を行うことである。

## 3. 結果および考察

得られた SAXS データの Kratky プロット ( $q \cdot q^2 I$  プロット) を Fig.1 に示す (溶媒減算済)。対照実験として、細菌由来セルロース合成酵素の活性化因子である c-di-GMP なしで行った合成反応について同様の時分割 SAXS 測定を行った。まず、散乱上昇は c-di-GMP ありの反応 (Fig. 1A) でのみ観察されたことから、セルロース合成酵素の試験管内反応において、合成されたセルロース分子鎖の観察に成功したと考えられる。

しかし、放射光という強い X 線を用いたことによる試料の放射線損傷が、このような散乱上昇をもたらした可能性も考えられる。そこで、その場 SAXS 測定に用いた反応液の一部を別に取り分け、その場測定と平行して別個に反応を進め (オフライン反応)、時分割 SAXS 測定終了後直ちに SAXS 測定を行った。放射線損傷が反応進行に特異的な散乱の上昇の原因である場合、一連の時分割 SAXS の最後のデータは、オフライン反応 (Fig. 1、ひし形マークによるプロット) よりも高い散乱を示すことが予測される。しかし実際にはそのような様子は観察されず、逆にオフライン反応の方がより高い散乱を示していた。このことから、その場 SAXS 測定において、観察された散乱上昇は放射線損傷によるタンパク質など生体分子の凝集によるものではないことが確認された。おそらく、反応進行とともに水に不溶の高分子である合成されたセルロースが沈降したことにより、オフライン反応よりも散乱が見た目に弱くなったことによると考えられる。

今後は、SPring-8 の BL40B2 でも同様に放射線損傷のないデータを撮影できるかについて確認を行うとともに、得られた時分割 SAXS データの解釈から、本反応系において合成されたセルロース分子鎖が集合する様子について何らかの描像を与える予定である。

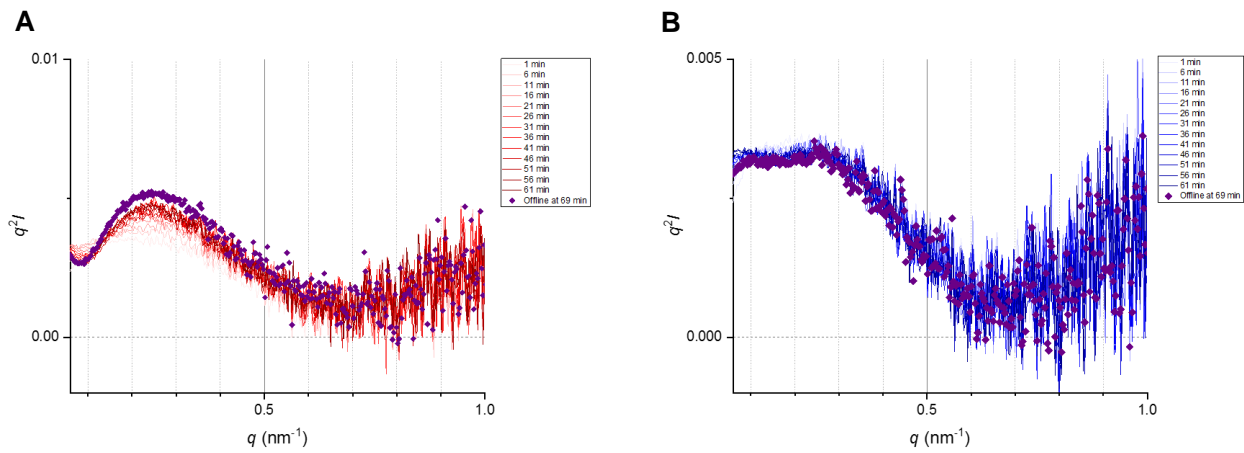


Fig. 1 セルロース合成反応の時分割測定（折れ線）およびオフライン反応（プロット散布図）の SAXS プロファイル。Kratky プロットで示した。

(A) 10  $\mu\text{M}$  c-di-GMP での合成反応 (B) c-di-GMP 非存在下での合成反応

#### 4. 参考文献

1. *Carbohydrate Research* **346**, 2760-2768 (2011).