

# 加リン酸分解酵素の組み合わせによるセルロース合成

(東大院農) ○久我友大、砂川直輝、石田卓也、五十嵐圭日子、鮫島正浩

## 1. 諸言

セロデキストリン加リン酸分解酵素 (CDP) は、右の図の反応式(1)であらわされる反応を可逆的に行う酵素であり、これによりII型のセルロースが合成される<sup>1)</sup>。この合成反応は、グリコシターゼによるセルロース *in vitro* 合成で基質として用いられるフツ化糖を必要としないことが長所である。一方で、セルロース鎖が伸長されるとともに無機リン酸イオン (Pi) が蓄積するため平衡が加リン酸分解側に傾き、合成反応が阻害される可能性が示唆されていた。

そこで本研究では、CDPの反応系に新たに反応式(2)で表されるスクロース加リン酸分解酵素 (SP) を導入することによってPiの蓄積を解消し、さらに基質としてG1Pを用いずにスクロースを用いるセルロースの *in vitro* 合成系を検討した。

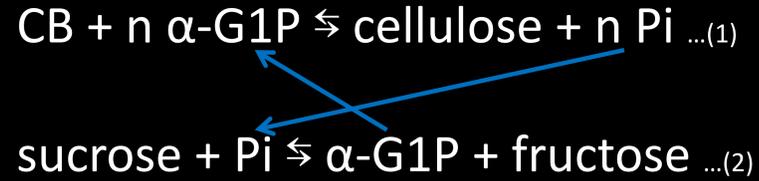


Fig. 1. Reaction scheme of CDP and SP.

上段: CDPが触媒する反応、下段: SPが触媒する反応。  
反応中に起こるPiとα-G1Pの授受をそれぞれ矢印で示した。

## 2. セルロースの合成

Table 1. Reaction mixture.

x = 4, 20, 40 or 100 mM.

CDPのみを用いた反応の組成		CDPとSPを用いた反応の組成	
CDP	...	CDP	...
		SP	...
CB	...	CB	...
G1P	...	sucrose	...
HEPES pH 7.5	...	HEPES pH 7.5	...
		Na-phos pH 7.5	...

Reaction  
... °C, ... h



Fig. 2. Enzymatic synthesis of insoluble cellulose.

## 3. 反応時リン酸濃度変化の定量

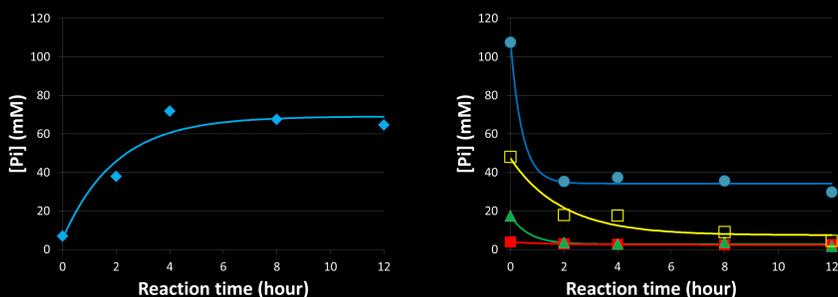


Fig. 3. The accumulation of Pi.

Left: Reaction with CDP (◆), Right: Reaction with CDP and SP. Initial [Pi] was 4 mM (■), 20 mM (▲), 40 mM (□), 100 mM (●).

- CDPのみで反応を行ったとき最終的に[Pi]は約70 mMで平衡に達した。
- SPをCDPの反応系に加えた反応では、CDPのみを用いた反応と比較して最終的な[Pi]を抑えることができた。[Pi]<sub>0</sub> = 4, 20, 40 mMの時は最終的に10 mM未満に収束し、[Pi]<sub>0</sub> = 100 mMの時は最終的に約35 mMに収束した。

## 5. TEMによる観察

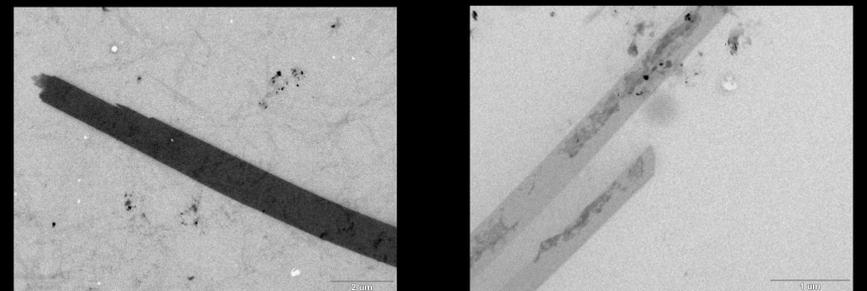


Fig. 5. The products observed by transmission electron microscopy.

- 放射状生成物は確認されず、板状生成物のみが観察された。

## 4. 蛍光顕微鏡による観察

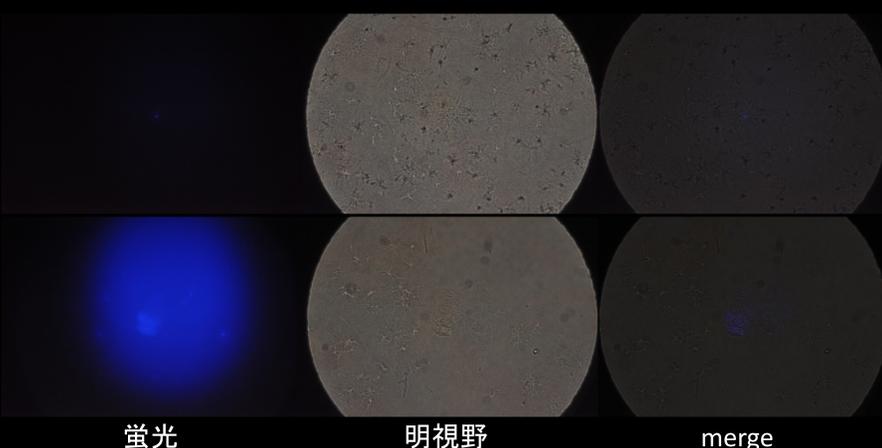


Fig. 4. The products observed by fluorescence microscopy.

The aggregation containing CDP and SP was observed after Calcofluor treatment. Magnification: 1000 x. Initial [Pi] was 4 mM.

- 放射状と板状の2種類の生成物が確認された。
- Calcofluorは放射状生成物の中央部分に吸着し、板状生成物には全体に弱く吸着することが観察された。

## 6. X線回折実験

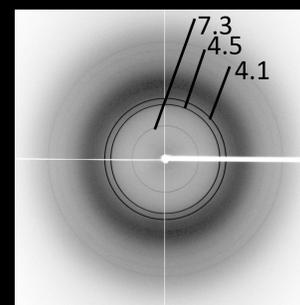


Fig. 6. X-ray diffraction of the products.

The purified CDP (0.25 U/ml) and SP (1.5 U/ml) were incubated for 24 h at 60 °C in 50 mM HEPES buffer, pH 7.5, and 20 mM Na-phos buffer pH 7.5, containing 10 mM CB and 50 mM sucrose.

- X線回折実験で得られた面間隔パターンがII型のセルロースと一致  
⇒SPをCDPの反応系に加えてもII型のセルロースが合成される

セルロース結晶の面間隔  
(セルロースの材料科学、磯貝 より)

	110	1-10	200
セルロース I	5.99	5.28	3.93
セルロース II	7.31	4.48	4.04
セルロース III	7.55	4.29	4.29
セルロース III'	7.31	4.31	4.31
セルロース IV	5.67	5.67	3.95

## 7. まとめ

CDPの反応系にSPを加え反応を行ったところ、CDPのみを用いた反応と比べて最終的なPiの蓄積を抑制することができた。この反応における生成物にCalcofluorを吸着させると生成物が集中している部分に着色が見られ、これがセルロースであることが示唆された。TEMによる観察では板状の生成物のみが観察され、X線回折実験により生成物の回折パターンがII型のセルロースの回折パターンと一致したため、CDPとSPを用いてスクロースからII型のセルロースが合成されることが明らかになった。

謝辞

SPの提供をしていただいた農研機構食品研究部門 北岡本光博士、TEM観察の指導をして頂きました東京大学大学院 竹内美由紀博士に感謝いたします。

参考文献 1) Hiraiishi, M. et al., *Carbohydrate Research*, **344** (2009)