

セルロースの生合成 -その紡糸機構に関する考察*

今井 友也**

1. はじめに

大地に根を張って生きる植物は、自身を形作る細胞の外側に、強固な細胞壁を作り上げる。移動できない植物は、この強固な構造体で自身の体を支えて、その生まれた地で寿命を全うする。ではなぜ植物細胞壁は植物体を支えるほど丈夫なのか？ 時として樹高 100 メートルをも超える樹木は、その実質である細胞壁なくしては自身の体を支えきれないであろう。植物細胞壁の材料性能の高さは尋常ではない。その理由として、「それは植物細胞壁が鉄筋コンクリートのような複合構造だからである」という説明が分かり易い。植物細胞壁はセルロース、ヘミセルロース、リグニンの 3 つを主成分として構成され、セルロースは繊維の形態を取り、ヘミセルロースやリグニンはそれらの間隙を充填するように存在する (図 1)。すなわち鉄筋はセルロース、コンクリートはリグニン、鉄筋をまとめあげ、鉄筋とコンクリートの間を取り持つ役割をヘミセルロースは負っている。ではなぜセルロースは鉄筋と例えられるのか？

それは、上述の植物細胞壁主要三成分 (セルロース、ヘミセルロース、リグニン) の内、セルロースのみが繊維という明瞭な形態を取るからであろう。セルロース合成酵素遺伝子の機能欠損変異体植物では、セルロース含量が低いものや、セルロースが明瞭な繊維状形態を取らないものが得られる。そしてその多くが矮性である (通常より背丈が低い) こと^{1,2)}からも、セルロースを鉄筋に例えることは的外れなものではなからう。一方で、古来より人間はセルロースを日々の生活において様々な用途で使用してきた。綿布や紙がその代表的な例であろう。そのどちらにおいても、セルロースの高強度性が活用されており、やはりセルロースは鉄筋に例えられるだけの性質を持っている。しかし、どうしてセルロースのみが繊維となるのだろうか？

一つは分子そのものの性質、もう一つはその生合成機構にあるものと考えられる。この総説では、特に後者に焦点を当ててみたい。

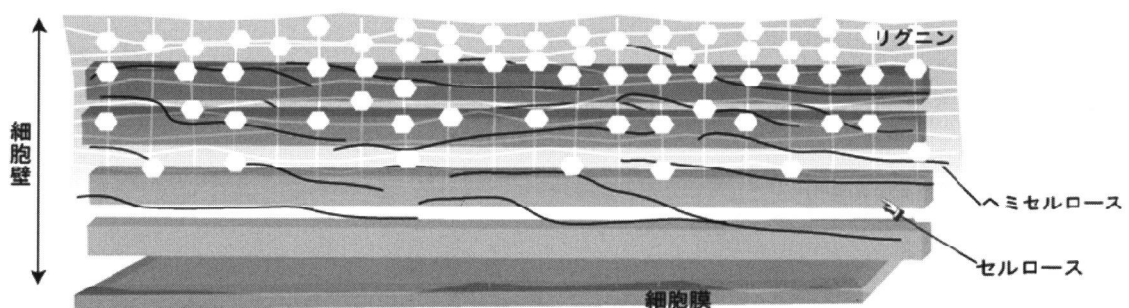


図 1 植物細胞壁のモデル

セルロースは繊維として存在する。一方、ヘミセルロースはセルロースのように集合せず、リグニンは不規則な化学結合で三次元の網目状ネットワークを形成し、この両者は明らかな形態を取らない。

* 2009年6月24日作成 本稿は、第5回生存圏研究所公開講演会 (2008年10月18日における講演要旨に、加筆・変更を行ったものである)

** 〒611-0011 宇治市五ヶ庄 京都大学生存圏研究所 バイオマス形態情報分野.
E-mail: timai@rish.kyoto-u.ac.jp

2. 生合成の仕組み

2.1 セルロースとは

セルロースの繊維とは具体的にはどのようなものなのか？ セルロースマイクロフィブリルと呼ばれるこの微小繊維は、複数の分子が集合したものである。一本のセルロース分子は、グルコピラノースが、その対角線上に位置する1位と4位の水酸基間で β グルコシド結合したものである。この分子構造により、セルロースには一直線に伸びきったコンフォメーションが与えられる。さらに各グルコピラノース環は、引張り荷重下でも安定にイス型配座を取り続けることができるため、剛直な性質を持つことになる³⁾。セルロースマイクロフィブリルは、このような剛直な分子鎖が、水素結合により規則正しく束ねられることで作り上げられた⁴⁾、高強度な微小繊維（ナノファイバー）である。

しかしここで、「セルロース生合成において、どのようにマイクロフィブリルは形成されるのか？」、より具体的には「どうやって40本弱、多いものでは2000本もの分子鎖を、同じ向きに並べて繊維として紡糸できるのか？」という問いが現れる。これを説明するモデルとして、「重合同時結晶化」あるいは「ターミナルコンプレックス」仮説が現在受け入れられている。

2.2 合成酵素は膜タンパク質

ターミナルコンプレックスとは、「凍結切断レプリカ法」という電子顕微鏡法で観察される、セルロース生産性生物の細胞膜上の特徴的な顆粒構造である（図2）。この顆粒構造は、合成中と思われるセルロース繊維の末端に観察されることから、「ターミナル」コンプレックスと命名され、細胞膜からセルロースが伸びているところだと考えられている⁵⁾。藻類で発見されたのを皮切りに、セルロース生産性生物のほぼ全てで発見されたことから、これがセルロース合成酵素の実体であると考えられた。しばしば議論の的となっていたこの仮説は、近年ようやく免疫ラベル化法により確かめられた^{6,7)}。また蛍光タンパク質融合体のセルロース合成酵素の観察から、セルロース合成酵素が細胞膜上を移動する様子が示唆されている⁸⁾。このように、細胞膜上に酵素を配置することで、酵素重合が終了するや否や、分子を束ねる（すなわち結晶化の）過程に入ることができることを可能にしていると考えられている。この仮説を重合同時結晶化と呼んでいる。

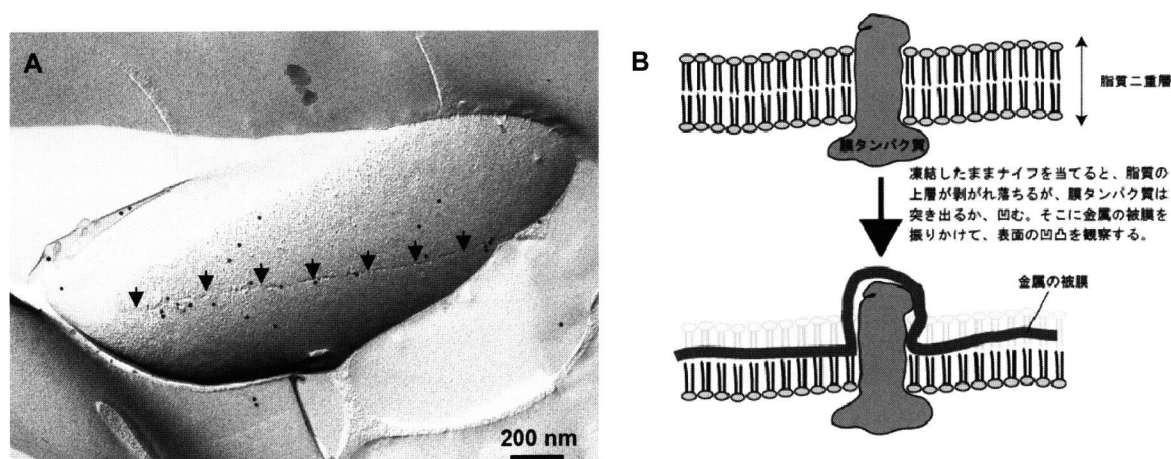


図2 セルロース合成酵素複合体・ターミナルコンプレックス

- A: 酢酸菌の凍結切断レプリカ法による観察像。矢印で標したのが一列に並んだ酢酸菌におけるターミナルコンプレックス。BcsB（セルロース合成酵素の補助サブユニットの一つ）の抗体による金コロイドラベルを施した。
- B: 凍結切断レプリカ法の原理。膜タンパク質の観察に適した方法である。

ターミナルコンプレックスが細胞膜上に見られることから、セルロース合成酵素は細胞膜に存在することが想像される。実際、セルロース生産性生物のセルロース合成活性は細胞膜画分に見られるし⁹⁻¹²⁾、多くの生物種で同定されたセルロース合成酵素遺伝子は、膜貫通ドメインを複数持つタンパク質をコードすることから、明らかな膜貫通タンパク質であると予測されている¹³⁾。そこで、セルロース合成酵素が機能する場である細胞膜について考察する。

2.3 細胞膜とは？

樹木も含めて生物は全て細胞から成り立っている。細胞膜とは、細胞という「生物」を「非生物」である外界から分けている境界である。細胞膜でもって外なる世界から切り離された細胞の中では、生命維持のための反応がいくつも回っている。細胞膜は疎水性（水になじみにくい）なので、細胞はいわばビニール袋の中に反応の役者たちのカクテルを入れて口を閉じたものに似ている。このように書くと、細胞一つ一つは外のことなど全く目もくれずに内部で黙々と反応を回しているように聞こえるかもしれない。しかし生命活動を営んでいるということは、細胞内は細胞外と異なる環境であることを意味する。細胞内外の間には物質やイオンの偏りが存在するので等価ではなく、ポテンシャル差が生じる。より正確には、細胞は積極的にこのポテンシャル差を作り出している。これを上手に使用して、細胞は化学的エネルギーの合成反応を回したり、そのために必要な代謝基質（いわゆる栄養）を取り込んだりしている（図3）。さらに動物の神経細胞に見られるような数十メートル毎秒の高速信号伝達も、このポテンシャル差を利用している。

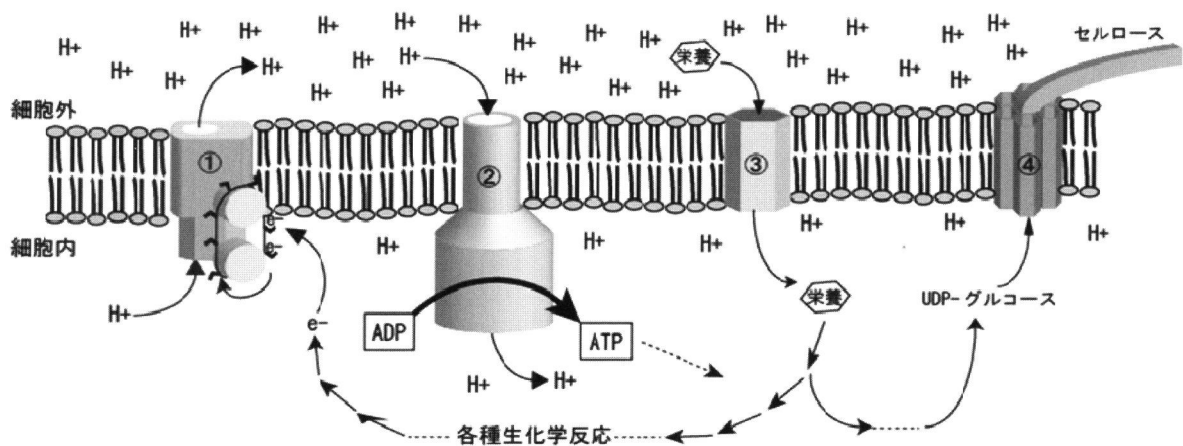


図3 細胞膜を舞台とする重要なイベント例（細菌、あるいはミトコンドリア内膜をモデルとしているので、この場合のポテンシャル差は主にプロトン（ H^+ ）の電気化学ポテンシャル差（プロトン駆動力と呼ばれる）となる）。

- ① 電子伝達系：栄養を分解して得た高エネルギー電子（ e^- ）を使って、 H^+ の汲みだしを行う。実際には複数のタンパク質の複合体である。
- ② ATP合成酵素：プロトン駆動力を利用してATP（細胞内で広く使われる共通エネルギー）の合成を行う。実際には複数のタンパク質の複合体である。
- ③ トランスポーター：各種ポテンシャル差やATPの加水分解エネルギーを利用して、各種分子を細胞内に取り込んだり、細胞外へ排出したりする。単独で機能できる分子である。
- ④ セルロース合成酵素：細胞内でUDP-グルコースからセルロースへの末端へのグルコース転移反応を行う。複合体と推測されている。

細胞内外にポテンシャル差を作り出し、それを利用してエネルギー合成反応や物質交換を行うこれらの機能の分子実体が、その境界である細胞膜に存在する膜タンパク質でなければならないのは自明である。それでは、セルロース合成酵素が膜タンパク質であるが故に果たしている機能とは、一体何なのだろうか？

3. 膜タンパク質酵素 — 二次元工場

3.1 酵素による人工合成

その考察のための戦略一つは、膜タンパク質以外でセルロースを合成させて、どのようなものができるか見るということである。幸運なことに、可溶性タンパク質である分解酵素や糖リン酸化酵素を使って、セルロースなどの多糖・オリゴ糖を合成する試みが、以前から報告されている^{14,15)}。すなわち、反応条件の改変や、糖供与体に工夫を加える（例えば、糖フッ化物やグルコースーリン酸などの活性化糖を利用する）ことで反応の向きを引っくり返し、分解酵素に糖転移反応を行わせるものである。このようなシステムを使って行われる重合反応は、セルロース合成酵素が行うものと反応機能的には全く同じタイプの反応である（糖転移反応）。そして、使用された分解酵素は可溶性の酵素であることから、膜タンパク質により行われるセルロース生合成の対照実験となる。

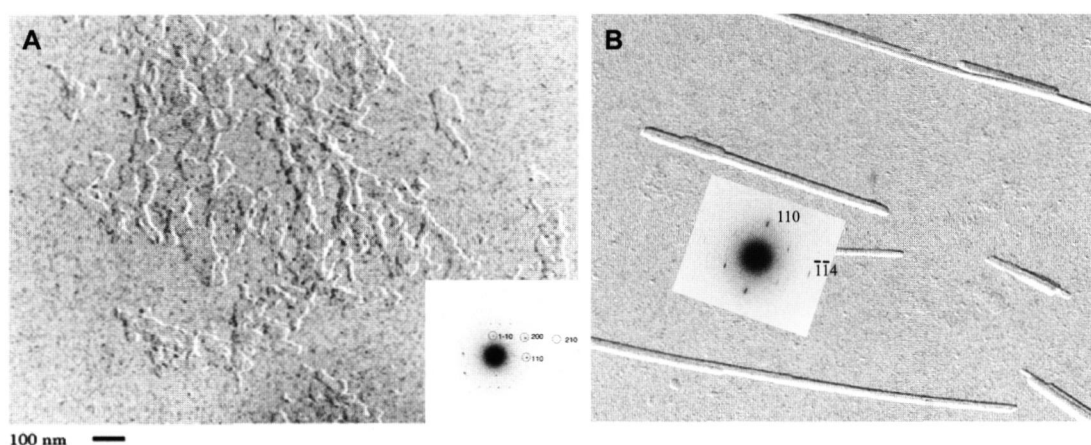


図4 人工・天然セルロースの電子顕微鏡像

- A: 分解酵素の逆反応により合成したセルロース。反応産物を水洗後にシャドーイング法で観察。微小領域からの電子回折像（右下）から、平板に対して分子鎖軸が立った状態のセルロース II 結晶であることが分かる（文献 16 より引用・改変）。
- B: 天然セルロースの繊維（海藻の一種、バロニアの細胞壁由来）。希酸による加水分解で解繊したものをシャドーイング法で観察（倍率はAと同じ）。微小部電子回折（挿入図）から、繊維軸に沿って分子鎖が充填された、セルロース I 結晶であることが分かる。

その結果は図 4 A で示すようなものとなった^{16,17)}。驚くべきことに、セルロースは非常に薄い平板状となってしまい、天然で見られるような繊維状の結晶（図 4 B）とは全く違う構造体が出現した。セルロースは、グルコースというエネルギー源を原料にして合成される。そしてそれを外へ堆積させるのだから、相当な出費を払ってセルロースが合成される訳である。そのセルロースが薄い板状では、わずかな曲げの力が加わるだけで簡単に割れてしまい、生物にとっては全く利益なしである。冒頭で鉄筋に例えたように、セルロースは繊維状の形態でなければ、本来の機能を果たせないのである。

実は、キチンや β 1 \rightarrow 3-グルカンについても、全く同様の実験結果が得られている^{18,19)}。これらの多糖は、セルロースと同様、いずれも微小な繊維として細胞壁など細胞外に堆積し、生体の力学的支持を担う多糖類（構造多糖）であり、その生合成は細胞膜上の膜タンパク質で行われる。そして上述と

同様の分解酵素の逆反応で合成させると、平板状の結晶が合成される。 β 1 \rightarrow 3-グルカンの場合には特に美しく、見事な六角形の結晶性の平板が出来上がる (図5 A)。これは、 β 1 \rightarrow 3-グルカンが六回対称性という高い対称性を持つ故に^{20, 21)}、その「癖」が目に見える形で表れたものである(「晶癖」と呼ばれる)。通常、このような美しい六角形の β 1 \rightarrow 3-グルカン結晶を作るには、熱と圧力をかけて分子を再配列させなければならない²²⁾。しかし、酵素人工合成系は常温常圧で同じことを成し遂げる。これは、合成直後の β 1 \rightarrow 3-グルカンの分子鎖が非常に柔軟なものであることを明示している。「鉄は熱いうちに打て」と同様、「多糖(高分子)は熱いうちに打て」ということであろう。

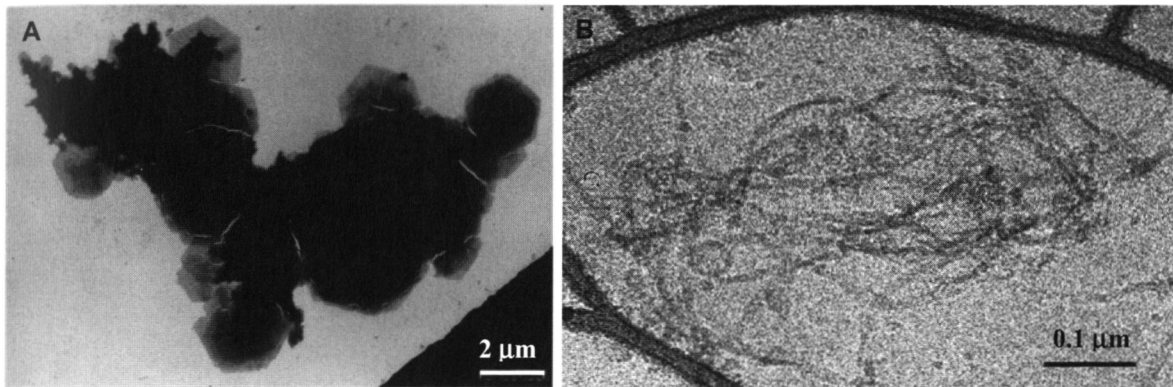


図5 酵素合成された β 1 \rightarrow 3-グルカンの電子顕微鏡像 (AとBで倍率が異なることに注意)
 A: 人工合成された β 1 \rightarrow 3-グルカン(通常観察)。六角形のシートが何層も積み重なっている。
 B: 植物(ブラックベリー)より単離した合成活性で作られた β 1 \rightarrow 3-グルカン(氷包埋法)

一方で、生物から酵素活性を抽出し、 β 1 \rightarrow 3-グルカンを合成させると、きれいな繊維が合成される(図5 B)。すなわち、「熱い」うちに繊維へと成型する機構が、生物の β 1 \rightarrow 3-グルカン合成酵素に存在することは確実である。これは、他の多糖の場合でも全く同様であろう。

3.2 膜タンパク質複合体

先述の通り、分解酵素と合成酵素による多糖合成反応は、反応機構的には全く同一のタイプである。よって、セルロースをはじめ、多糖の合成酵素が膜タンパク質であるのは、繊維を形成するためではなかろうかと考えられる。すなわち、可溶性の酵素は溶液中を三次元に自由に動き回り、自身の回転も許されるなど、運動の自由度が高い(図6 A)。しかも溶液中では、溶媒の分子が激しくランダムに運動しており(ブラウン運動)、それらが衝突することで、激しく酵素タンパク質は揺さぶられていると考えられる。そういう分子機械に高分子を作らせても、合成されたばかりの分子鎖を秩序正しく並べることは不可能と言っても過言ではなかろう。ところが、細胞膜に合成酵素を埋め込んでしまえば、面内での並進・回転の可能性は残るが動きは二次元に抑えられる(図6 B)。さらに、細胞骨格と呼ばれるタンパク質で、細胞膜の直下から合成酵素を裏打ちするなどして、触媒部位を互いに近接させて複数個集合させれば、面内の運動も原理的には抑えられる。事実、細胞骨格の一つである微小管が、セルロース合成へ関与することは、直接か間接かは議論の余地があるところだが、確かであろう^{23, 24)}。こうして、繊維紡糸可能なシステムが組み上げられることが予想される。

様々な知見を考慮に入れると、他の補助タンパク質の必要性が強く示唆されるため、生物がセルロースを紡糸する機構の全体像はまだ見えてはいない。しかし、セルロース(おそらくキチンや β 1 \rightarrow 3-グルカンも)を繊維として合成するためには、以上のような大掛かりな設えが必要であることは、疑いのないことだと思われる。セルロース合成酵素が、複数種のタンパク質の集積した膜タンパク質複合体であることは、以下のような形で示唆されている。

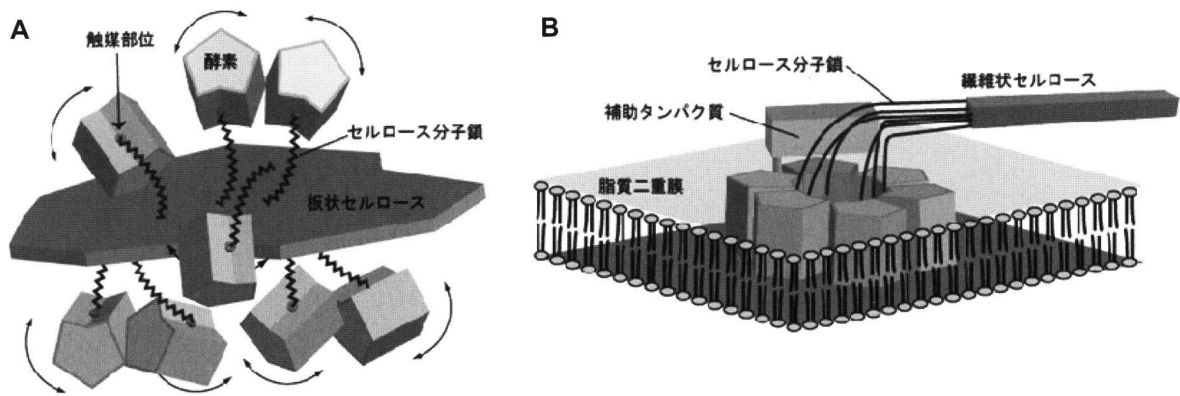


図6 膜タンパク質による多糖合成

A: 可溶性タンパク質単独によるセルロースの重合。酵素がお互いに独立して運動するため、合成された分子鎖はバラバラに溶液中に吐き出されていく。さらに、水分子のブラウン運動による衝突を受け、激しく揺動している。その結果、近傍の分子鎖と無秩序に会合するため、繊維にならない。

B: 膜タンパク質複合体によるセルロースの重合。細胞膜という二次元場に収まっているため、膜面内での並進・回転以外の自由度は存在しない。Aで見られるような酵素の高運動性は見られない。しかも規則正しく会合し、補助タンパク質とともに複合体を形成することで、かなり高度に制御された繊維形成が可能であろう。

- ① 凍結切断レプリカ法で粒子構造が観察されるということは、その膜タンパク質は巨大な構造体である可能性が高く、複合体が推測される^{5, 25, 26)} (図6 B)。
- ② バクテリアのセルロース合成酵素遺伝子は、複数のオープンリーディングフレームがクラスターを形成しており、セルロース合成酵素は、これら複数のタンパク質の複合体として働くことが示唆されている²⁷⁻²⁹⁾。
- ③ 植物の場合、様々な膜結合性のタンパク質の関与が変異体解析や生化学的解析から示唆されている³⁰⁾。中でもセルロース分解酵素がセルロース合成に関与しているというデータは特に興味深い³¹⁻³³⁾。セルロース合成能を持つ動物・ホヤでは、セルロース合成酵素遺伝子の一部に、セルラーゼと相同性の高い配列がコードされている³⁴⁻³⁶⁾。またバクテリアでも、セルラーゼ遺伝子や β -D-グルコシダーゼがその近傍に存在したり^{37, 38)}、セルラーゼ遺伝子が *cesA* とともにクラスターを形成したり²⁹⁾、また実際に合成に関与していることも示されている³⁹⁾。従って、セルロース分解酵素がセルロース合成に関わるのは普遍的なシステムである可能性が高い。先述のように、分解酵素が反応を逆に回して合成反応を触媒することは可能であるため、セルラーゼがセルロース生合成に直接に関わる仮説も提案されている^{13, 32, 40, 41)}。

セルロース合成酵素はただのグルコース連結機ではなく、膜という二次元にアンカーされた上で、いくつもの装置を備えた巨大分子複合体として存在し、これにより「重合同時結晶化」を可能にしている「二次元素子」と考えられる。しかしこの複合体の実体や、その詳細な分子機構については、断片的にしか分かっていない。

4. まとめ

セルロース生合成の場が細胞膜であるという説は、これらが細胞外に堆積するという事実からすでに推測されていたことであり、いくつもの実験的証明も存在する。しかし、可溶性である分解酵素を使って合成したセルロース結晶の構造は、生体で合成されるものとはかけ離れたものとなり、生体にとって全く役に立たないものになった。このことは、細胞膜という二次元場で合成することが、セルロースを繊維として形成するために必要であることを改めて実証したものである。そして、このシステムは生物の進化の過程で利点として働いたために、多くの植物がセルロースを合成する事態が実現されたのだと推測される。他の構造多糖（キチンや $(\beta 1 \rightarrow 3)$ -グルカン）についても、全く同じことが言えると推測される。

合成酵素が細胞膜という二次元場で働くことで、セルロースが繊維として紡糸されるという状況は、実は高分子における溶融・溶液紡糸技術と本質的には同じものであろう。すなわち、ポリエチレンやPETなど多くの汎用高分子で、融解状態、あるいは溶液状態の高分子を、紡糸ノズルという小さな穴から押し出して繊維に成型する技術が広く使用されている。セルロース合成酵素は重合反応を粛々と繰り返してセルロース分子を合成するのみならず、細胞膜にノズルを装備してセルロース繊維を紡糸しているのではなかろうか。ノズルの形状を変えて高分子繊維の断面形態を変えることで、同じ高分子でも全く異なる性質が現れることはよく知られており、メーカーが新たな製品開発の手段とするのもしばしばである。これに倣って、セルロース合成酵素の分子機構、特に紡糸機構にヒントを得て新たな紡糸技術を開発し、セルロースという古典的な材料に、これまでにない新しい物性を付与できれば、低環境負荷の新規材料開発につながるものと期待される。

5. 謝辞

本総説で紹介したデータの一部は、京都大学生存圏研究所の杉山淳司教授、スウェーデン王立科学研究所 (KTH) の Vincent Bulone 教授と、両博士それぞれの共同研究の中で行った結果に基づいています。ここに、深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Arioli, T., Peng, L., Betzner, A.S., Burn, J., Wittke, W., Herth, W., Camilleri, C., Hofte, H., Plazinski, J., Birch, R., Cork, A., Glover, J., Redmond, J., Williamson, R.E. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*, *Science* **279**, 717-720, 1998.
- 2) Desprez, T., Juraniec, M., Crowell, E.F., Jouy, H., Pochylova, Z., Parcy, F., Höfte, H., Gonneau, M., Vernhettes, S. Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **104**, 15572-15577, 2007.
- 3) Marszalek, P.E., Pang, Y.-., Li, H., El Yazal, J., Oberhauser, A.F., Fernandez, J.M. Atomic levers control pyranose ring conformations, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**, 7894-7898, 1999.
- 4) Nishiyama, Y., Langan, P., Chanzy, H. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I β from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction, *J.Am.Chem.Soc.* **124**, 9074-9082, 2002.

- 5) Brown Jr., R.M., Montezinos, D. Cellulose microfibrils: Visualization of biosynthetic and orienting complexes in association with the plasma membrane, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **73**, 143-147, 1976.
- 6) Kimura, S., Laosinchai, W., Itoh, T., Cui, X., Linder, C.R., Malcolm Brown Jr., R. Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*, *Plant Cell* **11**, 2075-2085, 1999.
- 7) Kimura, S., Chen, H.P., Saxena, I.M., Brown R.M., J., Itoh, T. Localization of c-di-GMP-binding protein with the linear terminal complexes of *Acetobacter xylinum*, *J.Bacteriol.* **183**, 5668-5674, 2001.
- 8) Paredez, A.R., Somerville, C.R., Ehrhardt, D.W. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules, *Science* **312**, 1491-1495, 2006.
- 9) Aloni, Y., Delmer, D.P., Benziman, M. Achievement of high rates of in vitro synthesis of 1,4- β -D-glucan: Activation by cooperative interaction of the *Acetobacter xylinum* enzyme system with GTP, polyethylene glycol, and a protein factor, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **79**, 6448-6452, 1982.
- 10) Kudlicka, K., Malcolm Brown Jr., R. Cellulose and callose biosynthesis in higher plants: I. Solubilization and separation of (1 \rightarrow 3)- and (1 \rightarrow 4)- β -glucan synthase activities from mung bean, *Plant Physiol.* **115**, 643-656, 1997.
- 11) Glaser, L. The enzymic synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*, *BBA - Biochimica et Biophysica Acta* **25**, 436, 1957.
- 12) Lai-Kee-Him, J., Chanzy, H., Müller, M., Putaux, J.-, Imai, T., Bulone, V. In vitro versus in vivo cellulose microfibrils from plant primary wall synthases: Structural differences, *J.Biol.Chem.* **277**, 36931-36939, 2002.
- 13) Delmer, D.P. Cellulose biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study, *Annual Review of Plant Biology* **50**, 245-276, 1999.
- 14) Kobayashi, S., Kashiwa, K., Kawasaki, T., Shoda, S.-. Novel method for polysaccharide synthesis using an enzyme: The first in vitro synthesis of cellulose via a nonbiosynthetic path utilizing cellulase as catalyst, *J.Am.Chem.Soc.* **113**, 3079-3084, 1991.
- 15) Mackenzie, L.F., Wang, Q., Warren, R.A.J., Withers, S.G. Glycosynthases: Mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis, *J.Am.Chem.Soc.* **120**, 5583-5584, 1998.
- 16) Kobayashi, S., Hobson, L.J., Sakamoto, J., Kimura, S., Sugiyama, J., Imai, T., Itoh, T. Formation and structure of artificial cellulose spherulites via enzymatic polymerization, *Biomacromolecules* **1**, 168-173, 2000.
- 17) Fort, S., Boyer, V., Greffe, L., Davies, G.J., Moroz, O., Christiansen, L., Schuñlein, M., Cottaz, S., Driguez, H. Highly efficient synthesis of β (1 \rightarrow 4)-oligo- and -polysaccharides using a mutant cellulase, *J.Am.Chem.Soc.* **122**, 5429-5437, 2000.
- 18) Sakamoto, J., Sugiyama, J., Kimura, S., Imai, T., Itoh, T., Watanabe, T., Kobayashi, S. Artificial chitin spherulites composed of single crystalline ribbons of α -chitin via enzymatic polymerization, *Macromolecules* **33**, 4155-4160, 2000.

- 19) Hrmova, M., Imai, T., Rutten, S.J., Fairweather, J.K., Pelosi, L., Bulone, V., Driguez, H., Fincher, G.B. Mutated barley (1,3)-beta-D-glucan endohydrolases synthesize crystalline (1,3)-beta-D-glucans. *J.Biol.Chem.* **277**, 30102-30111, 2002.
- 20) Deslandes, Y., Marchessault, R.H., Sarko, A. Triple-helical structure of (1-3)-beta-D-glucan, *Macromolecules* **13**, 1466-1471, 1980.
- 21) Chuah, C.T., Sarko, A., Deslandes, Y., Marchessault, R.H. Triple-helical crystalline structure of curdlan and paramylon hydrates, *Macromolecules* **16**, 1375-1382, 1983.
- 22) Harada, T., Koreeda, A., Sato, S., Kasai, N. Electron microscopic study on the ultrastructure of curdlan gel: Assembly and dissociation of fibrils by heating, *J.Electron Microsc.* **28**, 147-153, 1979.
- 23) DeBolt, S., Gutierrez, R., Ehrhardt, D.W., Melo, C.V., Ross, L., Cutler, S.R., Somerville, C., Bonetta, D. Morlin, an inhibitor of cortical microtubule dynamics and cellulose synthase movement, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **104**, 5854-5859, 2007.
- 24) Paredez, A.R., Somerville, C.R., Ehrhardt, D.W. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules, *Science* **312**, 1491-1495, 2006.
- 25) Zaar, K. Visualization of pores (export sites) correlated with cellulose production in the envelope of the gram-negative bacterium *Acetobacter xylinum*, *J.Cell Biol.* **80**, 773-777, 1979.
- 26) Giddings Jr., T.H., Brower, D.L., Staehelin, L.A. Visualization of particle complexes in the plasma membrane of *Micrasterias denticulata* associated with the formation of cellulose fibrils in primary and secondary cell walls, *J.Cell Biol.* **84**, 327-339, 1980.
- 27) Saxena, I.M., Kudlicka, K., Okuda, K., Brown Jr., R.M. Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (acs operon) of *Acetobacter xylinum*: Implications for cellulose crystallization, *J.Bacteriol.* **176**, 5735-5752, 1994.
- 28) Wong, H.C., Fear, A.L., Calhoun, R.D., Eichinger, G.H., Mayer, R., Amikam, D., Benziman, M., Gelfand, D.H., Meade, J.H., Emerick, A.W., Bruner, R., Ben-Bassat, A., Tal, R. Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **87**, 8130-8134, 1990.
- 29) Matthyse, A.G., White, S., Lightfoot, R. Genes required for cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*, *J.Bacteriol.* **177**, 1069-1075, 1995.
- 30) Schindelman, G., Morikami, A., Jung, J., Baskin, T.I., Carpita, N.C., Derbyshire, P., McCann, M.C., Benfey, P.N. COBRA encodes a putative GPI-anchored protein, which is polarly localized and necessary for oriented cell expansion in *arabidopsis*, *Genes and Development* **15**, 1115-1127, 2001.
- 31) Lane, D.R., Wiedemeier, A., Peng, L., Hofte, H., Vernhettes, S., Desprez, T., Hocart, C.H., Birch, R.J., Baskin, T.I., Burn, J.E., Arioli, T., Betzner, A.S., Williamson, R.E. Temperature-sensitive alleles of *rsw2* link the KORRIGAN endo-1,4- β -glucanase to cellulose synthesis and cytokinesis in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* **126**, 278-288, 2001.

- 32) Sato, S., Kato, T., Kakegawa, K., Ishii, T., Liu, Y.-., Awano, T., Takabe, K., Nishiyama, Y., Kuga, S., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Shibata, D. Role of the putative membrane-bound endo-1,4- β -glucanase KORRIGAN in cell elongation and cellulose synthesis in *Arabidopsis thaliana*, *Plant and Cell Physiology* **42**, 251-263, 2001.
- 33) Nicol, F., His, I., Jauneau, A., Vernhettes, S., Canut, H., Hofte, H. A plasma membrane-bound putative endo-1,4- β -D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in *Arabidopsis*, *EMBO J.* **17**, 5563-5576, 1998.
- 34) Matthyse, A.G., Deschet, K., Williams, M., Marry, M., White, A.R., Smith, W.C. A functional cellulose synthase from ascidian epidermis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **101**, 986-991, 2004.
- 35) Nakashima, K., Yamada, L., Satou, Y., Azuma, J.-., Satoh, N. The evolutionary origin of animal cellulose synthase, *Dev.Genes Evol.* **214**, 81-88, 2004.
- 36) Sasakura, Y., Nakashima, K., Awazu, S., Matsuoka, T., Nakayama, A., Azuma, J.-., Satoh, N. Transposon-mediated insertional mutagenesis revealed the functions of animal cellulose synthase in the ascidian *Ciona intestinalis*, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **102**, 15134-15139, 2005.
- 37) Standal, R., Iversen, T.-., Coucheron, D.H., Fjaervik, E., Blatny, J.M., Valla, S. A new gene required for cellulose production and a gene encoding cellulolytic activity in *Acetobacter xylinum* are colocalized with the bcs operon, *J.Bacteriol.* **176**, 665-672, 1994.
- 38) Tonouchi, N., Tahara, N., Kojima, Y., Nakai, T., Sakai, F., Hayashi, T., Tsuchida, T., Yoshinaga, F. A Beta-Glucosidase Gene Downstream of the Cellulose Synthase Operon in Cellulose-producing *Acetobacter*, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **61**, 1789-1790, 1997.
- 39) Kawano, S., Tajima, K., Kono, H., Erata, T., Munekata, M., Takai, M. Effects of endogenous endo- β -1,4-glucanase on cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum* ATCC23769, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **94**, 275-281, 2002.
- 40) Peng, L., Kawagoe, Y., Hogan, P., Delmer, D. Sitosterol- β -glucoside as primer for cellulose synthesis in plants, *Science* **295**, 147-150, 2002.
- 41) Mølhøj, M., Ulvskov, P., Dal Degan, F. Characterization of a functional soluble form of a *Brassica napus* membrane-anchored endo-1,4- β -glucanase heterologously expressed in *Pichia pastoris*, *Plant Physiol.* **127**, 674-684, 2001.