

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月15日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07016

研究課題名(和文)植物細胞壁ペクチンの分子ネットワーク形成に関与するアピオース転移酵素の同定

研究課題名(英文) Identification of apiosyltransferase involved in biosynthesis of pectin in plant cell wall

研究代表者

石水 毅 (Takeshi, Ishimizu)

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号：30314355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：UDP-アピオースは不安定(pH8.0、25℃で半減期32秒)で、これまでに単離例はなかった。本研究では、UDP-アピオースにN,N-ジメチルシクロヘキシルアミンやトリエチルアミンを配向させた時、UDP-アピオースの半減期が39時間(pH6.0、25℃)になることを見出した。この条件でUDP-アピオースをmg単位で調製することに成功した。またバイオインフォマティクスにより、ペクチンラムノガラクトuronan II:アピオース転移酵素の候補遺伝子を選抜した。そのリコンビナントタンパク質にアピオース転移酵素活性を見出し、当該遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：UDP-apiose, a donor substrate of apiosyltransferases, is known to be labile due to the intramolecular self-cyclization, resulting in the formation of a-D-apio-D-furanosyl 1:2-cyclic phosphate. Its half-life is 32 seconds at pH 8.0 and 25°C. We found that bulky cations, especially tertiary amines, effectively suppressed the degradation of UDP-apiose. Consequently, a half-life of UDP-apiose was prolonged to 38.5 hours at pH 6.0 and 25°C using triethylamine as a counter ion. Using this isolated UDP-apiose, we identified a gene encoding pectin rhamnogalacturonan II: apiosyltransferase.

研究分野：生化学

キーワード：植物 細胞壁 多糖 ペクチン 糖転移酵素 糖ヌクレオチド アピオース

### 1. 研究開始当初の背景

ペクチンは、植物の成長時に合成される細胞壁多糖であり、ペクチン生合成と植物成長は直接的な関係がある。しかし、ペクチンの構造が複雑なため、ペクチン生合成に関わる多くの糖転移酵素が同定されておらず、植物成長に伴うペクチン生合成の分子的理解がされていない。

ペクチンは、いくつかの構造ドメインに分類される。そのうち、ラムノガラクトナン II (RG-II) は、12 種類の単糖成分から構成され、糖結合様式を 22 種類含む最も複雑な構造をしている。この構造中のアピオースは、その水酸基と植物の必須元素であるホウ素がホウ酸ジエステル架橋を形成し、細胞壁の分子ネットワーク構築に関与している。ホウ素が欠乏すると、細胞壁が形成されず、重篤な表現型を示すことが知られている。ペクチン分子中のアピオース残基がホウ素とのジエステル結合を介して架橋形成に関わり、ペクチンは細胞壁の空間的構築に重要な役割を果たしている。ペクチン分子にアピオースが組み込まれることも同様に細胞壁構築ひいては植物成長に重要であると思われるが、アピオース転移酵素が同定されておらず、その理解が進んでいない。

アピオース転移酵素の同定には、アピオース前駆体の UDP-アピオースが必要であるが、この化合物が非常に不安定で単離できず、利用できない。UDP-アピオースは UDP-グルクロン酸を基質として、UDP-アピオース/UDP-キシロース合成酵素から生合成される。しかし、UDP-アピオースは溶液中で速やかにアピオース-1,2-環状リン酸に分解されてしまう(半減期 32 秒 [pH 8.0, 25 °C])。この分解反応は、UDP-アピオース/UDP-キシロース合成酵素の至適 pH があるアルカリ性で特に起こりやすい。また、pH 3 以下の比較的強い酸性条件下でも、UDP とアピオースに分解される反応が起こる。これまでに、UDP-アピオースを安定に単離できる条件は見いだされていない。UDP-アピオースを利用できれば、この化合物を基質とするアピオース転移酵素の解析ができるようになり、ペクチン生合成機構やペクチン架橋構造形成の生理機能の解明に貢献できる。

### 2. 研究の目的

UDP-アピオースを安定に単離すること、ペクチン生合成に関わるアピオース転移酵素を同定することを目的とする。この研究は、ペクチン生合成分子機構の全貌を解明する一歩となる。

### 3. 研究の方法

UDP-アピオースを酵素合成させた。溶液中での UDP-アピオース分解反応が起こらないように、酵素合成で生成させた直後の

UDP-アピオースに嵩高いカウンターイオンを配置させた。この UDP-アピオースの安定性を調べた。

バイオフィオマトリックス的手法によりアピオース転移酵素の候補遺伝子を選抜した。候補遺伝子がコードするタンパク質をタバコ培養細胞 BY-2 株で発現させた。この発現タンパク質を UDP-アピオースに作用させ、ペクチン RG-II アピオース転移酵素の活性測定を行った。

### 4. 研究成果

UDP-アピオースは不安定で、これまでに単離例はなかった。UDP-アピオースに適切な嵩高いカウンター陽イオンを配向させることで安定化させることを試みた。また UDP-アピオースの安定な pH も探索した。UDP-アピオースは UDP-アピオース/UDP-キシロース合成酵素により生成させた。この酵素の至適 pH8.0 ではなく、pH6.0 で UDP-アピオースが比較的安定であった。UDP-アピオースに *N,N*-ジメチルシクロヘキシルアミンやトリエチルアミンを配向させた時、pH6.0 で半減期が 39 時間になることを見出した。この条件で UDP-アピオースを mg 単位で調製することに成功した (投稿論文作成中)。

ガラクトナン酸から構成される多糖にアピオースが結合したアピオガラクトナンというペクチン成分が多いウキクサで発現量が高い糖転移酵素様遺伝子に注目し、このシロイヌナズナ相同遺伝子を実験アピオース転移酵素の候補遺伝子とした。タバコ培養細胞 BY-2 株でリコンビナントタンパク質を発現させ、UDP-アピオースを基質として用いて、このタンパク質にペクチン RG-II アピオース転移酵素活性を初めて見出した。現在、この酵素の生化学的解析を進めている。

このように、本科研費助成で、当初の目的を大まかに達成することができた。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Rahman, M.Z., Maeda, M., Tsujimori, Y., Hossain, M.A., Ishimizu, T., Kimura, Y. Molecular characterization of second tomato  $\alpha$ 1,3/4-fucosidase ( $\alpha$ -Fuc'ase Sl-2), a member of glycosyl hydrolase family 29 active toward the core  $\alpha$ 1,3-fucosyl residue in plant N-glycans. **J. Biochem.** (2018)

doi: 10.1093/jb/mvy029、査読有

Kato, S., Hayashi, M., Kitagawa, M., Kajiura, H., Maeda, M., Kimura, Y., Igarashi, K., Kasahara, M. and Ishimizu, T. Degradation pathway of plant complex-type N-glycans: Identification and

characterization of a key  $\alpha$ 1,3-fucosidase from glycoside hydrolase family 29. **Biochem. J.** 475: 305-317. (2018)  
doi: 10.1042/BCJ20170106、査読有  
Ohashi, T., Jinno, J., Inoue, Y., Ito, S., Fujiyama, K., Ishimizu, T. A polygalacturonase localized in the Golgi apparatus in *Pisum sativum*. **J. Biochem.** 162: 193-201 (2017)  
doi: 10.1093/jb/mvx014、査読有  
Rahman, M.Z., Maeda, M., Itano, S., Hossain, M.A., Ishimizu, T., Kimura, Y. Molecular characterization of tomato  $\alpha$ 1,3/4-fucosidase, a member of glycosyl hydrolase family 29, involved in degradation of plant complex type N-glycans. **J. Biochem.** 161: 421-432 (2017)  
doi: 10.1093/jb/mvw089、査読有  
Uehara, Y., Tamura, S., Maki, Y., Yagy, K., Mizoguchi, T., Tamiaki, H., Imai, T., Ishii, T., Ohashi, T., Fujiyama, K., Ishimizu, T. Biochemical characterization of rhamnosyltransferase involved in biosynthesis of pectic rhamnogalacturonan I in plant cell wall. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 486: 130-136 (2017)  
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.012、査読有

[学会発表](計34件)

東篤志、坂直樹、鈴木史朗、山村正臣、石水毅、三上文三、梅澤俊明 *cis*-ヒノキレジノール合成酵素による酵素反応の分子機構解明に向けた $\beta$ サブユニットのX線結晶構造解析 第68回日本木材学会大会 2018年  
今井友也、中島啓介、石水毅 脂質変換大腸菌による細胞壁生合成関連酵素の発現 第68回日本木材学会大会 2018年  
今井友也、中島啓介、石水毅 脂質変換大腸菌による真核生物由来膜タンパク質の大腸菌発現 第90回日本生化学会大会(2017年度生命科学系合同年次大会) 2017年  
藤森多恵、松田諒子、鈴木真未、武田陽一、石水毅 植物細胞壁ペクチン成分ラムノガラクトンIIの生合成に必要なUDP-アピオースの単離法の開発 第90回日本生化学会大会(2017年度生命科学系合同年次大会) 2017年  
Yagy, K., Uehara, Y., Tamura, S., Matsumoto, N., Morii, Y., Ishimizu, T. Assays for glycosyltransferases involved in biosynthesis of pectic rhamnogalacturonan I in plant cell wall. Taiwan-Japan Plant Biology 2017 2017年  
Fujimori, T., Matsuda, R., Suzuki, M., Takenaka, Y., Kajiura, H., Takeda, Y.,

Ishimizu, T. Preparation of UDP-apiose, a donor substrate of a glycosyltransferase involved in pectin biosynthesis. Taiwan-Japan Plant Biology 2017 2017年  
Takenaka, Y., Kato, K., Ogawa-Ohnishi, M., Tsuruhama, K., Kajiura, H., Yagy, K., Takeda, A., Kunieda, T., Hara-Nishimura, I., Kuroha, T., Nishitani, K., Matsubayashi, Y., Ishimizu, T. Discovery and biochemical characterization of rhamnosyltransferase involved in pectin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Taiwan-Japan Plant Biology 2017 2017年  
石水毅 植物細胞壁のペクチンの生合成 日本応用糖質科学会 第43回近畿支部会 2017年 招待講演  
東篤志、坂直樹、鈴木史朗、山村正臣、石水毅、三上文三、梅澤俊明 (Z)-ヒノキレジノール合成酵素 $\beta$ サブユニットのX線結晶構造解析 第62回リグニン討論会 2017年  
Ishimizu, T. Pectin biosynthetic rhamnogalacturonan I rhamnosyltransferase. Workshop on Plant Glycobiology 2017年 招待講演  
加藤耕平、竹中悠人、鶴浜和奈、柳生健太、竹田篤史、國枝正、西村いくこ、小川(大西)真理、松林嘉克、石水毅 植物細胞壁ペクチン成分ラムノガラクトンIの生合成に關与するラムノース転移酵素遺伝子の同定 第36回日本糖質学会年会 2017年  
Maeda, M., Takata, S., Ishimizu, T., Van Damme, E.J.M., Kimura, Y. Accumulation of GN1-type plant complex type free N-glycans in  $\alpha$ 1,3/4-fucosidase knockout mutant of *A. thaliana*. 12th Carbohydrate Bioengineering Meeting 2017年  
加藤耕平、竹中悠人、鶴浜和奈、柳生健太、竹田篤史、國枝正、西村いくこ、小川(大西)真理、松林嘉克、石水毅 植物細胞壁ペクチン成分ラムノガラクトンIの生合成に關与するラムノース転移酵素の同定 日本農芸化学会大会 2017年度大会 2017年  
竹中悠人、加藤耕平、柳生健太、石水毅 植物細胞壁ペクチン成分ラムノガラクトンIの生合成分子機構 第1回生物資源・次世代農業セミナー「循環型炭素資源—植物細胞壁の研究動向」 2017年 招待講演  
松廣拓真、上野皓輝、石水毅 キシログルカンに作用する植物 $\alpha$ 1,2-フコシダーゼに含まれる新規糖質結合モジュールの同定 第35回日本糖質学会年会 2016年  
高田和拓、加藤大詞、平岡誉登、石水毅 植物ゴルジ体膜局在ペクチン生合

- 成関連酵素複合体の解析 第35回日本糖質学会年会 2016年  
平岡誉登、加藤大詞、高田和拓、大谷美沙都、米田新、出村拓、石水毅 植物ゴルジ体局在キシラン：キシロース転移酵素複合体の解析 第35回日本糖質学会年会 2016年  
加藤俊、林めぐみ、北川真衣、前田恵、木村吉伸、五十嵐圭日子、笠原賢洋、石水毅 植物コンプレックス型糖鎖の分解経路 $\alpha$ 1,3-フコシダーゼの同定と解析 第35回日本糖質学会年会 2016年  
松廣拓真、上野皓輝、石水毅  $\alpha$ 1,2-フコシダーゼに含まれる新規糖質結合モジュールの同定 第89回日本生化学会大会 2016年  
Kato, S., Hayashi, M., Kitagawa, M., Maeda, M., Kimura, Y., Igarashi, K., Kasahara, M. Ishimizu, T. Degradation pathway of plant complex-type N-glycans: Identification and characterization of  $\alpha$ 1,3-fucosidase. 28th International Carbohydrate Symposium 2016年
- 21 川原悠太郎、石水毅 植物N型糖鎖分解に關与するシロイヌナズナ液胞 $\alpha$ -マンノシダーゼの同定 日本農芸化学会2016年度大会 2016年
- 22 松本直樹、上原洋平、田村峻佑、高田和拓、柳生健太、石水毅 植物細胞壁ペクチンの生合成に關与するガラクトース転移酵素の生化学的解析と超活性化 日本農芸化学会2016年度大会 2016年
- 23 高田和拓、加藤大詞、平岡誉登、石水毅 植物ゴルジ体膜局在ペクチン合成酵素複合体の解析 日本農芸化学会2016年度大会 2016年
- 24 松田諒子、鈴木真未、石水毅 植物細胞壁ペクチンの生合成に必要なUDP-アピオースの単離法の開発 日本農芸化学会2016年度大会 2016年
- 25 前田恵、高田駿、石水毅、木村吉伸  $\alpha$ 1,3/4-フコシダーゼ欠損 *Arabidopsis thaliana* に存在する遊離糖鎖の構造解析 日本農芸化学会中四国第44回講演会 2016年
- 26 田村峻佑、上原洋平、松本直樹、牧祐介、溝口忠、民秋均、石水毅 植物細胞壁ペクチン由来ラムノガラクトンIの生合成酵素の活性測定法構築 第88回日本生化学会大会 2015年
- 27 松本直樹、上原洋平、田村峻佑、石水毅 植物細胞壁ペクチンの生合成に關与するガラクトース転移酵素の基質特異性解析 第88回日本生化学会大会 2015年
- 28 松本直樹、上原洋平、田村峻佑、石水毅 植物細胞壁多糖ラムノガラクトンI生合成に關与するガラクトース転移酵素の活性測定法構築と生化学的解析 第34回日本糖質学会年会 2015年
- 29 田村峻佑、上原洋平、松本直樹、牧祐介、溝口正、民秋均、石水毅 植物細胞壁多糖ラムノガラクトンI由来のオリゴ糖調製とラムノガラクトンI生合成酵素活性測定法構築 第34回日本糖質学会年会 2015年
- 30 井上嘉之、神野淳、大橋貴生、藤山和仁、石水毅 植物細胞にゴルジ体局在膜結合型ポリガラクトンIが存在する 第34回日本糖質学会年会 2015年
- 31 Takada, K., Kato, H. Ishimizu, T. Analysis of protein complexes containing glycosyltransferases in plant cell. 第11回化学的にプログラムされた合成色素類の超分子ナノ科学 2015年
- 32 田村峻佑、上原洋平、松本直樹、溝口正、民秋均、石水毅 植物細胞壁ペクチン由来ラムノガラクトンI (RG-I) オリゴ糖の調製とRG-I生合成酵素の活性測定法の構築 第62回日本生化学会近畿支部例会 2015年
- 33 松本直樹、上原洋平、田村峻佑、石水毅 植物細胞壁ペクチンの生合成に關与するガラクトース転移酵素の生化学的解析 第62回日本生化学会近畿支部例会 2015年
- 34 松田諒子、鈴木真未、石水毅 植物細胞壁生合成に必要なUDP-アピオースの調製法の開発 第62回日本生化学会近畿支部例会 2015年

〔図書〕(計 1件)

石井忠、石水毅、梅沢俊明、加藤陽治、岸本崇生、小西照子、松永俊朗 植物細胞壁実験法 弘前大学出版会 (2016) 404 (総ページ数)

〔その他〕

ホームページ

立命館大学生命科学部石水研ホームページ  
<http://www.ismz.sk.ritsume.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石水毅 (ISHIMIZU, TAKESHI)  
立命館大学・生命科学部・准教授  
研究者番号：30314355