

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21403

研究課題名（和文）植物細胞壁多糖合成におけるメタボロン形成の検証

研究課題名（英文）Identification of metabolon for plant cell wall polysaccharide synthesis

研究代表者

石水 毅（Ishimizu, Takeshi）

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：30314355

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：植物の糖質化合物は糖転移酵素が形成する複合体によって効率的に生合成されると考えられている。本研究では、この酵素複合体を検出することを目的とした。

ペクチンラムノガラクトツロナンI生合成ガラクトース転移酵素が高分子電解質により超活性化することを見出した。本酵素を核にタンパク質集合体を形成していることが示唆された。また、キシラン生合成糖転移酵素 IRX9, IRX10, IRX14-Lが含まれる分子量61万のタンパク質複合体を見出した。さらに、フラボノイド配糖体アピイン生合成酵素を含む分子量45万の複合体を見出した。いずれの複合体も検出量が非常に少なく、一時的に形成されていることも考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命科学における主流研究技術（次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析や各種オミクス解析、変異体の解析など）では、酵素複合体は解析できない。このような技術的な理由から、本研究が目指す糖転移酵素を含む複合体の検出・解析は遅れている。本研究では、植物糖質化合物の生合成に関する酵素複合体を複数見出した。いずれも量が少ないことも見出し、一過的に形成されることが多い相分離集合体である可能性もある。このように本研究成果は、未解明なことが多い細胞内でのタンパク質集合体の形成と機能について、一定の回答を示すものであり、学術的意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：It is thought that carbohydrate compounds in plants are efficiently biosynthesized by a protein complex including glycosyltransferases. In this study, we aimed to detect such an enzyme complex.

We found that pectin rhamnogalacturonan I biosynthetic galactosyltransferase is superactivated by polyelectrolytes, suggesting that a protein complex was formed with this enzyme at the core. We also found a protein complex with molecular mass of 610 kDa that contains xylan biosynthetic glycosyltransferases IRX9, IRX10, and IRX14-L. Furthermore, a complex with molecular mass of 450 kDa containing the flavonoid glycoside apiiin biosynthetic enzymes was found. These complexes were detected in very low amounts, suggesting that they were formed temporarily.

研究分野：植物生化学

キーワード：糖転移酵素 植物細胞壁 多糖 タンパク質複合体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物は他の生物に比べて多量で多様な糖質化合物を生産している。これを反映して、植物ゲノムには、哺乳動物ゲノムに比べて2~3倍の数(500~700)の糖転移酵素遺伝子をコードしている。しかし、糖転移酵素の機能が明確にされているものはまだ1/3くらいであり、各糖転移酵素の機能同定の研究が必要である。さらに、植物の糖質化合物は連続的に糖鎖が連なっている場合が多い。この場合、複数の糖転移酵素が一つの化合物の生合成に関わる。植物の糖質化合物の中には、構造が非常に複雑なものがあったり、大量に生合成されているものがあったりする。そのため、糖転移酵素が複合体を形成し、効率的に糖質化合物を生合成していると考えられている。これまでに、特定の組み合わせの糖転移酵素どうしが相互作用していることが酵母ツーハイブリッド法や二分子蛍光補完法(BiFC法)などを用いて示されてきているものの、糖転移酵素が含まれるタンパク質複合体そのものが同定されたことはほとんどない。このため、植物細胞内における糖質化合物の効率的な生合成の分子機構は不明なままである。

### 2. 研究の目的

植物の糖質化合物は糖転移酵素が形成する複合体によって効率的に生合成されと考えられている。本研究では、複雑な構造をした多糖(ペクチンラムノガラクトツロナンIとキシラン)と生合成量が多いフラボノイド配糖体アピインの生合成に焦点をあてた。これらの糖質化合物が生合成されるには、複数の糖転移酵素が複合体を形成して連続的に効率的に反応していると考えられている。これらの糖質化合物の生合成に関わる糖転移酵素を同定し、生化学的性質を明らかにすることを一つの目的とした。そして、これらの糖転移酵素を含む酵素複合体を検出することを目的とした。この酵素複合体の構造を明らかにすることは、糖質化合物の効率的な生合成の分子機構を解明することにつながる。

### 3. 研究の方法

ペクチンラムノガラクトツロナンIの生合成に関わるガラクトース転移酵素の解析には、ペクチン生合成が盛んなアズキ上胚軸のミクロソーム画分を用いた。この酵素の活性発現条件を解析した。

キシラン生合成に関わる糖転移酵素を含む複合体の同定には、キシランを含む二次細胞壁の合成が非常に盛んなVND7(転写因子)過剰発現タバコ培養細胞BY-2株を材料にした。この抽出物をスクロース密度勾配遠心法により、小胞体膜、ゴルジ体膜、原形質膜に分離し、それらをCN-PAGEにより各膜構造に局在するタンパク質複合体を分離した。ゲル上の分離したタンパク質複合体に、キシラン生合成糖転移酵素IRX9, IRX10, IRX14-Lの抗体と反応させ、これらの糖転移酵素が含まれるタンパク質複合体を検出した。

フラボノイド配糖体アピインはパセリで大量(湿重量1gあたり20mg)に生合成される。パセリでアピインが盛んに生合成される幼少期の本葉のRNA-Seq解析を行い、アピイン生合成に関わるアピオース転移酵素、グルコース転移酵素の遺伝子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調製し、酵素活性を検出することで、両糖転移酵素の遺伝子を同定した。アピイン生合成に関わる酵素は10種類程度存在する。パセリタンパク質抽出物をCN-PAGEにより分離し、どの分子量の複合体に酵素活性が含まれるか、調べた。

#### 4. 研究成果

ペクチンラムノガラクトツロナンI生合成ガラクトース転移酵素の活性をアズキ上胚軸ミクロソーム画分より検出した。この酵素活性が初めて検出されたためEC番号(EC 2.4.1.375)が発行された。この酵素はポリアクリルアミンなどの高分子電解質により40倍ほどに超活性化することを見出した。このようなタンパク質の特徴は、疎水性領域が表面に出ている、天然変性領域を持っていたりしていることが多い。シロイヌナズナゲノムを参照すると、天然変性領域を持つと予測される糖転移酵素が複数コードされていることを見出した。これらの遺伝子をガラクトース転移酵素の候補遺伝子とした。本酵素を核にタンパク質集合体を形成していることが示唆された。

キシラン生合成糖転移酵素IRX9, IRX10, IRX14-Lの抗体を作成した。キシランの生合成量が数十倍高くなる、VND7を過剰発現したタバコ培養細胞のミクロソーム画分を調製した。これをスクロース密度勾配遠心で分画し、それぞれの画分をCN-PAGEで各タンパク質複合体を分離した。このゲル転写物に対して3種類の抗体を用いてウェスタンブロッティングを行うと、いずれの抗体でも分子量61万のタンパク質複合体が染色された。すなわち、これら3つの糖転移酵素を含むタンパク質複合体を検出した。

フラボノイド配糖体アピインが多く生産されるパセリ幼少期の本葉を材料に、CN-PAGEで分離したタンパク質複合体を解析した。ゲル上のタンパク質に対していくつかの酵素活性を測定したところ、複数のアピイン生合成に関わる酵素を含む分子量45万の複合体を見出した。

このように、植物糖質化合物を生合成する糖転移酵素がタンパク質複合体を形成している例を複数のケースにおいて見出した。生命科学における主流研究技術(次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析や各種オミクス解析、変異体の解析など)では、見出すことができなかったものである。この知見は、糖質化合物が酵素複合体により効率的に生合成されていることを示している。いずれの複合体も検出量が非常に少なく、相分離集合体などの一過的に形成される複合体である可能性も考えられた。このように本研究成果は、未解明なことが多い細胞内でのタンパク質集合体の形成と機能について、一定の回答を示すものであり、学術的意義が大きい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsushima, R., Hisano, H., Galis, I., Miura, S., Crofts, N., Takenaka, Y., Oitome, N.F., Ishimizu, T., Fujita, N., Sato, K.	4. 巻 136
2. 論文標題 FLOURY ENDOSPERM 6 mutations enhance the sugary phenotype caused by the loss of ISOAMYLASE1 in barley.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Theor. Appl. Genet.	6. 最初と最後の頁 94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00122-023-04339-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takata, S., Hayashi, M., Maeda, M., Ishimizu, T., Kimura, Y.	4. 巻 86
2. 論文標題 Structural features of free N-glycans in 1,3/4-fucosidase-deficient Arabidopsis thaliana: deletion of 1,3/4-fucosidase activity induced accumulation of plant complex type GN1 free N- glycans.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 1413-1416
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Gundupalli, M.P., Kajiura, H., Ishimizu, T., Bhattacharyya, D.	4. 巻 12
2. 論文標題 Alkaline hydrolysis of coconut pith: process optimization, enzymatic saccharification, and nitrobenzene oxidation of Kraft lignin.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomass Conv. Bioref.	6. 最初と最後の頁 2349-2367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13399-020-00890-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Cao, Y.L., Li, Y.L., Fan, Y.F., Li, Z., Yoshida, K., Wang, J., Ma, X., Wang, N., Mitsuda, N., Kotake, T., Ishimizu, T., et al.	4. 巻 4
2. 論文標題 Wolfberry genomes and the evolution of Lycium.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun. Biol.	6. 最初と最後の頁 671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02152-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Wachananawat, B., Kuroha, T., Takenaka, Y., Kajiura, H., Naramoto, S., Yokoyama, R., Ishizaki, K., Nishitani, K., Ishimizu, T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Diversity of pectin rhamnogalacturonan I rhamnosyltransferases in glycosyltransferase family 106	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.00997	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 竹中悠人、石水毅	4. 巻 10
2. 論文標題 植物細胞壁ペクチン生合成機構解明への幕開け	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 応用糖質科学	6. 最初と最後の頁 96-102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5458/bag.10.2_96	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 石水毅、竹中悠人	4. 巻 10
2. 論文標題 植物細胞壁ペクチンの構造と機能	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 応用糖質科学	6. 最初と最後の頁 215-221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5458/bag.10.4_215	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件(うち招待講演 6件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 金井梨夏、濱出拓斗、石水毅
2. 発表標題 パセリ由来時空間特異的に発現するタンパク質複合体の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 瀧井治貴、高原遥、青田夏美、石水毅
2. 発表標題 植物細胞壁ペクチンRG-II: Kdo転移酵素のドナー基質CMP-Kdoの調製
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 聖治、木塚 康彦、石水 毅、鈴木 史朗
2. 発表標題 エノコログサ ( <i>Setaria viridis</i> ) のアラビノキシラン生合成に関わるアラビノフラノース転移酵素の組換えタンパク質発現
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石水毅
2. 発表標題 逆生化学的手法によるペクチンおよびフラボノイド配糖体生合成糖転移酵素の同定
3. 学会等名 第25回比較グライコム研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺本智世、上條岳己、上田晴子、石水毅、長田敏行、森田理日斗、南善子
2. 発表標題 ペクチナーゼのマセレーション活性を促進する <i>Aspergillus japonicus</i> 由来の未知因子の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeshi Ishimizu
2. 発表標題 Biochemistry of pectin RG-I biosynthesis
3. 学会等名 International Symposium on “Plant-Structure Optimization” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeshi Ishimizu
2. 発表標題 Biosynthesis of pectin and flavonoid glycosides
3. 学会等名 Pectin Research Beyond Borders (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林美稀, 石水毅, 大橋貴生
2. 発表標題 大腸菌におけるアピゲニン-7-O-グルコシド生産向上を目指したグルコース転移酵素発現条件の検討
3. 学会等名 第39回日本植物バイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木聖治, 木塚康彦, 石水毅, 石井忠, 鈴木史朗
2. 発表標題 エノコログサ ( <i>Setaria viridis</i> ) のアラビノキシラン生合成に関わるアラビノフラノース転移酵素の機能解析
3. 学会等名 第39回日本植物バイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Song An, Maho Yamashiata, Masaru Kobayashi, Takeshi Ishimizu
2. 発表標題 Identification and biochemical characterization of parsley apiosyltransferase involved in apiin biosynthesis
3. 学会等名 第71回日本応用糖質科学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本斗汰, 森岡佑香, 石水毅
2. 発表標題 セロリ由来アピイン生合成グルコース転移酵素遺伝子の同定
3. 学会等名 第71回日本応用糖質科学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 砂崎遥香, 竹中悠人, 石水毅
2. 発表標題 ペクチンRG-I:ガラクトツロン酸転移酵素遺伝子の同定
3. 学会等名 第71回日本応用糖質科学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Haruka Sunazaki, Yohei Uehara, Yuto Takenaka, Takeshi Ishimizu
2. 発表標題 Biochemical characterization of glycosyltransferases involved in pectin RG-I backbone biosynthesis
3. 学会等名 IX Cell Wall Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 小林美稀、柿木優佑、石水毅、大橋貴生
2. 発表標題 大腸菌を用いたアピゲニン-7-0-グルコシドの生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下真穂、藤森多恵、An Song、竹中悠人、小林優、石水毅
2. 発表標題 セロリ由来フラボノイド配糖体アピイン生合成アピオース転移酵素の同定と基質認識
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石水毅
2. 発表標題 植物フラボノイド配糖体アピインの生合成
3. 学会等名 第62回日本生化学会中国・四国支部例会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石水毅
2. 発表標題 逆生化学的手法による植物糖転移酵素の機能同定
3. 学会等名 第18回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Bussarin Wachananawat, Takeshi Kuroha, Yuto Takenaka, Kazuhiko Nishitani, Takeshi Ishimizu
2. 発表標題 Diversity of Pectin RG-I Rhamnosyltransferases in GT106
3. 学会等名 The 7th International Conference on Plant Cell Wall Biology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下真穂、藤森多恵、竹中悠人、梶浦裕之、小林優、小埜栄一郎、石水毅
2. 発表標題 セロリ由来フラボノイド配糖体アピニン生合成アピオース転移酵素の同定とその性質
3. 学会等名 第70回日本応用糖質科学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 九鬼寛明、曽我康一、西垣南歩、竹中悠人、山口雅利、石水毅、高橋大輔、小竹敬久
2. 発表標題 シロイヌナズナmur1-1胚軸をモデルとした細胞壁の化学/物理学的特性の解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石水毅、竹中悠人
2. 発表標題 植物糖鎖生合成に関わる新規糖転移酵素
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 白木賢太郎 編	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京科学同人	5. 総ページ数 416
3. 書名 相分離生物学の全貌	

〔産業財産権〕

〔その他〕

立命館大学生命科学部生物工学科石水研ホームページ <a href="http://www.ismz.sk.ritsume.ac.jp/">http://www.ismz.sk.ritsume.ac.jp/</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大橋 貴生  (Ohashi Takao)  (10597876)	摂南大学・理工学部・准教授    (34428)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------