

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770030

研究課題名（和文） 高等植物における GDP-グルコース合成経路とその生理的役割の解明

研究課題名（英文） A metabolic pathway for generation of GDP-glucose in higher plants

研究代表者

小竹 敬久 (KOTAKE TOSHIHISA)

埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：20334146

研究成果の概要（和文）：機能不明の糖ヌクレオチド合成酵素、KONJAC（KJC）1、2のGDP-糖合成における役割を解析した。シロイヌナズナの *kjc1* 変異体では、細胞壁グルコマンナン量が野生型植物の50%に減少した。大腸菌で作成した組換え KJC タンパク質は、それ自体は活性を持たなかったが、VTC1の活性を顕著に増加させた。これらのことから、KJC タンパク質にはVTC1によるGDP-マンノースやGDP-グルコースの合成を高める働きがあると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The *konjac(kjc)1* mutation appeared to affect glucomannan content. Recombinant KJC1 and KJC2 expressed in *E. coli* did not have any enzymatic activity, but they stimulated GDP-mannose/GDP-glucose synthase activity of VTC1. The results suggest that KJC1 and 2 are involved in glucomannan synthesis through the regulation of the synthesis of GDP-mannose and GDP-glucose catalyzed by VTC1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：植物の糖鎖生物学

科研費の分科・細目：生物科学、植物分子生物・生理学

キーワード：細胞壁、糖ヌクレオチド、グルコマンナン、GDP-マンノース、GDP-グルコース

### 1. 研究開始当初の背景

グルコマンナンは、グルコースとマンノースが $\beta$ -1,4-結合した直鎖状の多糖類であり、多くの植物で細胞壁にみられる。グルコマンナンは、糖転移酵素 Cellulose Synthase-like A の働きで、糖ヌクレオチドである GDP-マンノース（GDP-Man）や GDP-グルコース（GDP-Glc）から合成されるが、GDP-Glc がどのように合成されるかは全くわかってい

なかった。また、GDP-Man は、GDP-Man ピロホスホリラーゼ、VTC1 により合成されるが、VTC1 の活性がどのように調節されるかはわかっていなかった。

### 2. 研究の目的

機能未知糖ヌクレオチド合成酵素様タンパク質である、KONJAC(KJC)1 および KJC2 の GDP-Glc と GDP-Man 合成におけ

る役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

T-DNA の挿入により遺伝子が破壊されたシロイヌナズナの *kjc1* 変異体、*kjc2* 変異体、*kjc1kjc2* 二重変異体について (各変異体における T-DNA の挿入位置を図 1 に示す)、GDP-Glc 合成活性や GDP-Man 合成活性 (図 2)、細胞壁のグルコマンナン量、N-結合糖鎖の構造を調べた。また、大腸菌を利用して、組換え KJC1 および組換え KJC2 を作製し、これらの酵素活性や VTC1 の活性に与える影響を調べた。

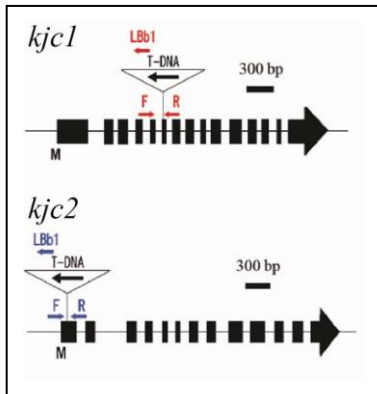


図 1. *kjc* 変異体の T-DNA 挿入部位

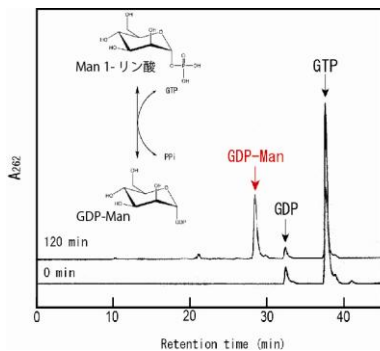


図 2. GDP-Man 合成活性の測定。マンノース 1-リン酸と GTP から、GDP-Man を合成する活性を測定した。GDP-Man は、UV 検出器を装備した HPLC により検出した。

### 4. 研究成果

#### (1) *kjc1kjc2* 二重変異体のわい性形質

*kjc1* 変異体や *kjc2* 変異体の成長や形態は野生型植物と変わらないが、*kjc1kjc2* 二重変異体は著しいわい性形質を示す (図 3)。そこで、*kjc1kjc2* 二重変異体の生育を野生型植物と詳細に比較した。二重変異体は、2 枚目の本葉が展開するまでは野生型植物と同様の生育を示したが、その後はどの本葉も野生型植物と比べて小さかった。根も同じ時期から伸長成長が抑えられていた。また、二重変異

体は、寒天培地で育成を続けると多数の葉を出したが、花茎を形成しなかった (図 4)。これらの結果から、KJC タンパク質は、シロイヌナズナの正常な成長・発達に重要な働きをもつことが示唆された。

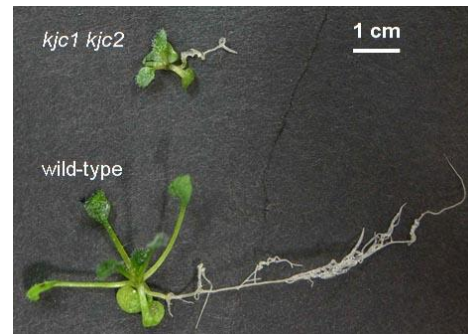


図 3. 寒天培地で 2 週間育成した *kjc1kjc2* 二重変異体

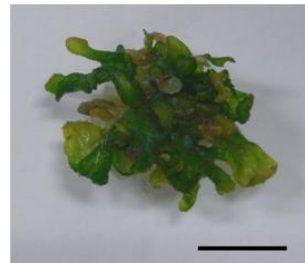


図 4. 寒天培地で 30 日間育成した *kjc1kjc2* 二重変異体

#### (2) *kjc* 変異体の GDP-糖合成活性

*kjc1* 変異体では、GDP-Man 合成活性が、野生型植物の 5% に低下していた (図 5)。*kjc1* 変異体では、主要な GDP-Man ピロホスホリラーゼである VTC1 が存在するが、KJC1 が働かないことで VTC1 が正常に機能していないことが示唆された。*kjc2* 変異体では、わずかに GDP-Man 合成活性が低下していた。また、*kjc1kjc2* 二重変異体では、GDP-Man 合成活性が、野生型植物の 3% に低下していた。これらの変異体の GDP-Glc 合成活性についても調べたが、活性が極めて弱く比較ができなかった。

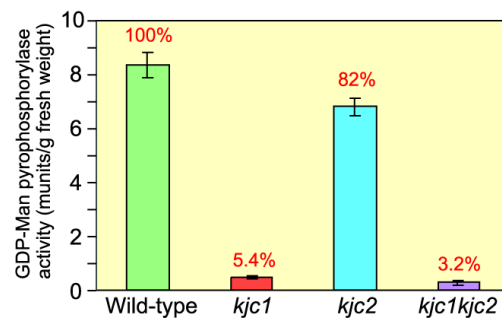


図 5. *kjc* 変異体の GDP-Man 合成活性

### (3) *kjc* 変異体の細胞壁グルコマンナン

細胞壁の構成単糖を調べたところ、*kjc1* 変異体と *kjc1kjc2* 二重変異体では、グルコマンナンやマンナンを構成するマンノースが半減していた (図 6)。さらに、細胞壁多糖類の量や構造を解析できる PACE システム (図 7) を利用して各変異体の細胞壁グルコマンナンを調べたところ、*kjc1* 変異体では、グルコマンナンが半減していることが確かめられた。

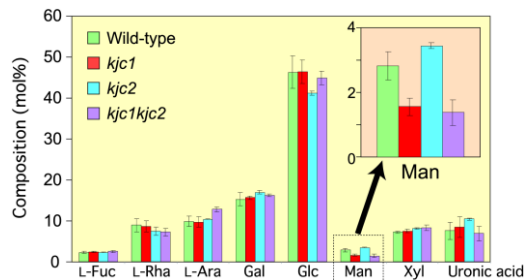


図 6. *kjc* 変異体の細胞壁単糖組成

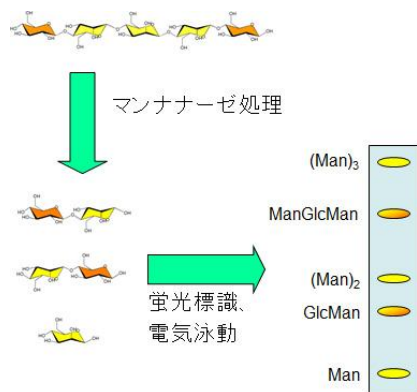


図 7. PACE 法の原理。細胞壁に含まれるグルコマンナンから特異的な酵素分解により生じる遊離したオリゴ糖を蛍光標識して電気泳動し、蛍光シグナルを検出した。

### (4) N-結合糖鎖の合成への影響

GDP-Man は、グルコマンナンの他に、糖タンパク質の N-結合糖鎖のマンノース残基の合成にも使われる。そこで、各変異体で N-結合糖鎖の構造を糖残基に特異的な抗体を用いて簡便に調べた。いずれの変異体でも、N-結合糖鎖の構造に顕著な変化は見られなかった。

### (5) 組換え KJC1 と組換え KJC2 の性状

当初 KJC タンパク質は、GDP-Glc や GDP-Man を合成する糖スクレオチドピロホスホラーゼと予測していたが、大腸菌で作製した組換え KJC1 と組換え KJC2 は、全く酵素活性を示さなかった。しかしながら、こ

れらのタンパク質は、VTC1 と混合するとその活性を顕著に高めた。VTC1 には弱い GDP-Glc 合成活性がみられ、組換え KJC1 や組換え KJC2 は、GDP-Glc 活性も高めた。

これらの結果から、KJC タンパク質は、VTC1 やそのホモログの GDP-糖合成活性を高めることが示唆された。

### 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 3 件) すべて査読有

① Kitazawa K., Tryfona T., Yoshimi Y., Hayashi Y., Kawachi S., Antonov L., Tanaka H., Takahashi T., Kaneko S., Dupree P., Tsumuraya Y. and Kotake T. (2013)  $\beta$ -Galactosyl Yariv reagent binds to the  $\beta$ -1,3-galactan of arabinogalactan-proteins. *Plant Physiol.* 161: 1117-1126, doi: 10.1104/pp.112.211722.

② Tryfona T., Liang H.-C., Kotake T., Tsumuraya Y., Stephens E. and Dupree P. (2012) Structural characterisation of Arabidopsis leaf arabinogalactan polysaccharides. *Plant Physiol.* 160: 653-666, doi: 10.1104/pp.112.202309.

③ Kotake T., Hirosawa C., Ando Y. and Tsumuraya Y. (2010) Generation of nucleotide sugars for biomass formation in plants. *Plant Biotechnol.* 27: 231-236.

[学会発表] (計 3 件)

① Toshihisa Kotake, Noriaki Tajima, Jenny Mortimer, Shota Sawake, Xiaolan Yu, Paul Dupree, and Yoichi Tsumuraya, *KONJAC1* and 2 Are Genes Involved in Glucomannan and L-Ascorbate Synthesis in Arabidopsis, International Conference for Arabidopsis Research, 2012 年 7 月 3 日、オーストリア・ウィーン

② 小竹敬久, Jenny Mortimer, 田島範明、宮崎祐一、Xiaolan Yu, Paul Dupree, 円谷陽一、細胞壁グルコマンナン合成における *KONJAC1, 2* の役割、日本植物生理学会、2012 年 3 月 17 日、京都府京都市・京都産業大学

③ Toshihisa Kotake, Noriaki Tajima, Yuichi Miyazaki, Jenny Mortimer, Xiaolan Yu, Paul Dupree, Yoichi Tsumuraya, *KONJAC1* and 2 are genes involved in glucomannan and vitamin C synthesis in Arabidopsis. The 4<sup>th</sup>

Conference on Biosynthesis of Plant Cell  
Wall, 2011年10月6日、兵庫県淡路市・  
淡路夢舞台

[図書] (計1件)

- ① 小竹敬久 (部分執筆)、講談社、植物細胞  
壁 (西谷和彦・梅澤俊明編) 2013、全349  
ページ、14-18、62-65、101-102、314-317

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小竹 敬久 (KOTAKE TOSHIHISA)  
埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授  
研究者番号：20334146

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：