

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570048

研究課題名(和文) 高等植物細胞壁のアラビノガラクトタン-プロテインの糖鎖構造と機能

研究課題名(英文) Structure and function of arabinogalactan-proteins in cell walls of higher plants

研究代表者

円谷 陽一 (TSUMURAYA, Yoichi)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：10142233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：植物の細胞壁は主にセルロースと各種の多糖(ペクチン、ヘミセルロース)ならびにアラビノガラクトタン-プロテイン(AGP)と呼ばれる糖タンパク質で構成される。本研究ではAGPの糖鎖に着目し、糖鎖を特異的に分解する酵素の探索、酵素遺伝子のクローニング、酵素によるAGP糖鎖の断片化と構造解析、得られたオリゴ糖の生理機能解析を目指した。エノキタケ培養液から新規な酵素、エンド-β-1,3-ガラクタナーゼ、を精製してその性質を明らかにした。各種AGP分解酵素を用いてアラビドプシス葉のAGP糖鎖を断片化して構造を調べAGP糖鎖の構造モデルを構築した。同様にして、ダイコン成根AGPの糖鎖構造を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Plant cell walls consist mainly of cellulose and other polysaccharides, such as pectins and hemicelluloses as well as arabinogalactan-proteins (AGPs), a family of proteoglycans/glycoproteins. In this study, our laboratory has focused to explore a new galactanase hydrolyzing the carbohydrate moieties of AGPs in various microbial sources. We found an endo-beta-1,3-galactanase from winter mushroom and demonstrated that the enzyme is highly useful to elucidate the structure of AGPs. A model structure of the carbohydrate moieties of Arabidopsis leaf AGP has been proposed by application of several different kinds of AGP-degrading enzymes. Similar approach allowed to determine the structure of radish root AGP. We also appeared that the enzymatically degraded AGP fragments possess physiological function (elicitor activity) producing antimicrobial substances when administered to soybean cotyledons.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：植物細胞壁 細胞壁多糖 アラビノガラクトタン-プロテイン ガラクタナーゼ エノキタケ ダイコン

1. 研究開始当初の背景

植物の細胞壁は細胞の形状を規定し、ひいては植物細胞の生長・分化を支配している。生長の盛んな組織の細胞壁はセルロースと各種の多糖(ペクチン、ヘミセルロース)ならびに糖タンパク質で構成される。主要な糖タンパク質はアラビノガラクトサン-プロテイン(AGP)である。AGPは高等植物の細胞膜、細胞壁(一次細胞壁)と細胞間の中層(細胞間マトリックス)に普遍的に存在する糖タンパク質で、一般的には分子量約10万、約90%の糖鎖部分と約10%のタンパク質部分から成る。

AGPの糖鎖は主にガラクトース(Gal)とL-アラビノース(L-Ara)から成り、植物組織によってはグルクロン酸(または4-メチル-グルクロン酸)、L-フコース、などを含む。その構造は複雑でGal鎖が分岐した構造を有している。AGPの糖鎖は器官特異的であり、植物の生育に伴って変化するのが特徴であり、他の細胞壁多糖と異なり、AGPが組織分化と密接に関連していることを示している。実際、シロイヌナズナの器官の分化(van Hengel and Roberts, *Plant J.*, 2002)やヒヤクニチソウ培養細胞の木部分化(Motose et al., *Nature*, 2004)は特異的なAGP糖鎖によって引き起こされることが知られている。

しかしながら、これらの研究ではAGPのどのような構造が分化と関わっているかは不明なままで、組織分化を担う糖鎖構造(糖鎖の部分構造)と分化の分子機構の解明が課題となっている。

2. 研究の目的

アラビノガラクトサン-プロテイン(AGP)の糖鎖に着目し、糖鎖を特異的に分解する酵素の探索、酵素遺伝子のクローニング、酵素によるAGP糖鎖の断片化と構造解析、得られたオリゴ糖の生理機能解析を目指す。

3. 研究の方法

AGP糖鎖の新規な糖鎖分解酵素の探索と精製を行う。すでに、キノコの一種の培養でエンド- β -1,3-ガラクタナーゼが見出されており、その精製と遺伝子クローニングを行う。さらに、エキソ- β -1,6-ガラクタナーゼの検索を進める。次にこれらの酵素を用いたAGPの糖鎖の断片化と得られたオリ

ゴ糖の構造解析を進める。得られたオリゴ糖の生理機能解析を試みる。生理機能としてはペクチン由来のオリゴ糖で実証されている生体防御誘発(エリシター)活性に着目する。ケンブリッジ大学のDupree教授の協力を得てシロイヌナズナのAGPの糖鎖構造・機能相関の網羅的解析を行う。

4. 研究成果

AGP糖鎖に作用するエンド- β -1,3-ガラクタナーゼの探索を行い、エノキタケ培養液から各種クロマトグラフィーで酵素を精製した。精製酵素のN末アミノ酸配列を調べ、その配列をもとにcDNAを単離した。酵素の基質特異性などの性質を調べたところ、本酵素は β -1,3-ガラクトンのみに作用し、最終産物としてガラクトース(Gal)と β -1,3-ガラクトビオース(β -1,3-Gal₂)を生じた。本酵素は新規な糖鎖分解酵素であり、酵素番号(EC番号)3.2.1.181が付与された。研究成果を以下のように発表した: Kotake et al., *Journal of Biological Chemistry*, 286巻, 2011年。

ケンブリッジ大学のDupree教授と共同で、今までに見出した各種AGP分解酵素を用いてアラビドプシス葉のAGPの断片化とその構造解析を行った。得られたオリゴ糖の構造を調べAGP糖鎖の構造モデルを構築した: Tryfona et al., *Plant Physiology*, 160巻, 2012年。

ダイコン成根AGPをエキソ- β -1,3-ガラクタナーゼ、エンド- β -1,6-ガラクタナーゼ、 β -L-アラビノフラノシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、等を用いて断片化した。得られたオリゴ糖の構造を調べた。AGP糖鎖の側鎖である β -1,6-ガラクトン鎖には β -L-Araが単独で、または β -L-Ara-(1 \rightarrow 5)- β -L-Araの2糖単位で結合しており、その結合の数は β -1,6-ガラクトン鎖毎に異なることを明らかにした。L-Araが多様な結合でAGP糖鎖を構築していることを明らかにした: Shimoda et al., *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, in press。

AGP糖鎖由来のオリゴ糖を用いてその生体防御誘発(エリシター)活性を測定した。

ダイズ子葉片を用いたペクチン由来のオリゴ糖で実証されている抗菌性物質、グリセオリン、の誘導を調べた。AGP 由来のオリゴ糖でグリセオリンの誘導が確認できた。その再現性、誘導を引き起こすオリゴ糖の糖鎖構造、等の実験を進めている。

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8件)

1. R. Shimoda, K. Okabe, T. Kotake, K. Matsuoka, T. Koyama, T. Tryfona, H.-C. Liang, P. Dupree, Y. Tsumuraya, “Enzymatic fragmentation of carbohydrate moieties of radish arabinogalactan-protein and elucidation of the structures”. *Biosci. Biotech. Biochem.*, (2014) in press.
2. Knoch, A. Dilokpimol, T. Tryfona, C.P. Poulsen, G. Xiong, J. Harholt, B.L. Petersen¹, P. Ulvskov¹, M.Z. Hadi, T. Kotake, Y. Tsumuraya, M. Pauly, P. Dupree, N. Geshi, “A α -glucuronosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* involved in biosynthesis of type II arabinogalactan has a role in cell elongation during seedling growth”. *Plant J.*, 76, 1016-1029 (2013).
3. M. Endo, T. Kotake, Y. Watanabe, K. Kimura, and Y. Tsumuraya, “Biosynthesis of the carbohydrate moieties of arabinogalactan proteins by membrane-bound α -glucuronosyltransferases from radish primary roots”. *Planta*, 238, 1157-1169 (2013).
4. K. Kitazawa, T. Tryfona, Y. Yoshimi, Y. Hayashi, S. Kawauchi, L. Antonov, H. Tanaka, T. Takahashi, S. Kaneko, P. Dupree, Y. Tsumuraya, and T. Kotake, “ α -Galactosyl Yariv reagent binds to the α -1,3-galactan of arabinogalactan proteins”. *Plant Physiol.*, 161, 1117-1126 (2013).
5. T. Tryfona, H.-C. Liang, T. Kotake, Y. Tsumuraya, E. Stephens, and P. Dupree, “Structural characterisation of *Arabidopsis* leaf arabinogalactan polysaccharides”. *Plant Physiol.*, 160, 653-666 (2012).
6. T. Kotake, N. Hirata, Y. Degi, M. Ishiguro, K. Kitazawa, R. Takata, H. Ichinose, S. Kaneko, K. Igarashi, M. Samejima, and Y. Tsumuraya,

“Endo- α -1,3-galactanase from winter mushroom *Flammulina velutipes*”, *J. Biol. Chem.*, 286, 27848-27854 (2011).

[学会発表](計10件)

1. 佐藤一樹、北澤仁成、吉見圭永、小竹敬久、円谷陽一、「カラマツアラビノガラクトタンにおける α -ヤリブ試薬の特異的相互作用部位」、日本植物生理学会 2014年3月18日~20日 富山
2. 吉見圭永、菅原優美、金子哲、五十嵐圭日子、小竹敬久、円谷陽一、「エノキタケ由来のコアタンパク質分解酵素の精製」、日本植物生理学会 2014年3月18日~20日、富山
3. T. Kotake, K. Kitazawa, T. Tryfona, Y. Yoshimi, S. Kaneko, P. Dupree, and Y. Tsumuraya, “Specific interaction of α -galactosyl Yariv reagent with α -1,3-galactan”, The XI Cell Wall Meeting, 7-12 July, 2013, Nantes, France
4. 吉見圭永、小竹敬久、北澤仁成、T. Tryfona、金子 哲、P. Dupree、円谷陽一、「 α -ヤリブ試薬と AGP の α -1,3-ガラクトタンの特異的相互作用」、日本植物生理学会 2013年3月21日~23日、岡山
5. 小竹敬久、J. Mortimer、田島憲明、宮崎祐一、P. 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16日~18日、京都
6. R. Shimoda, K. Okabe, T. Kotake, K. Matsuoka, T. Koyama, H.-C. Liang, P. Dupree, Y. Tsumuraya, “Structure of the sugar chains in radish arabinogalactan-protein”, The 4th Conference on Biosynthesis of Plant Cell Wall, 2-6 October, 2011, Awaji, JAPAN
7. T. Kotake, N. Hirata, Y. Degi, M. Ishiguro, K. Kitazawa, R. Takata, H. Ichinose, S. Kaneko, K. Igarashi, M. Samejima, and Y. Tsumuraya, “Endo- α -1,3-galactanase from winter mushroom *Flammulina velutipes* and its action on arabinogalactan-protein”, The 4th Conference on Biosynthesis of Plant Cell Wall, 2-6 October, 2011, Awaji, JAPAN
8. 平田尚弘、出木雄太、北澤仁成、高田遼

平、小竹敬久、一ノ瀬仁美、金子 哲、
石黒真希、五十嵐今日子、鮫島正弘、円谷陽一、「アラビノガラクトサン-プロテイン糖鎖を分解するエンド-ガラクタナーゼ」、日本糖質学会、2011年7月11日～13日、長岡

〔図書〕(計1件)

1. 円谷陽一，植物細胞壁多糖、西谷和彦、梅澤俊明 編集、総ページ 349(5章分担執筆) 講談社、2013年

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

生体物質研究室

http://www.molbiol.saitama-u.ac.jp/bussitsu/index_j.html

埼玉大学 理学部 分子生物学科

<http://www.molbiol.saitama-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

円谷陽一 (TSUMURAYA, Yoichi)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：10142233

(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：