

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：13102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850113

研究課題名(和文) イネいもち病菌由来多糖分解酵素が誘導する植物細胞壁の力学的強度変化

研究課題名(英文) Fungal hemicellulose degrading enzymes cause physical property changes concomitant with solubilization of cell wall

研究代表者

高橋 真智子 (Takahashi, Machiko)

長岡技術科学大学・工学部・研究員

研究者番号：30633333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物細胞壁は骨格となるセルロースマイクロフィブリルにヘミセルロース鎖が架橋を形成する β -グルカンの複合体である。ヘミセルロース鎖の分解はセルロースマイクロフィブリル間にゆるみ(強度低下)を誘導する。単子葉植物細胞壁のヘミセルロース鎖を構成する、キシラン、1,3-1,4- β -グルカン及びキシログルカンそれぞれの分解が誘導する植物細胞壁の変化を詳細に解析するために、糸状菌類の有する基質特異的なヘミセルロース鎖分解酵素を用いて、ヘミセルロース鎖の分解による植物細胞壁のゆるみ誘導機構について力学的解析手法を用いて詳細を解析した。

研究成果の概要(英文)：Changes in the physical properties of plant cell walls, a viscoelastic structure, are thought to be one of the growth-limiting factors for plants and one of the infection-affecting factors for fungi. To study the significance of hemicellulose that form cross-bridges between cellulose microfibrils in controlling cell wall strength in monocot plants, the effects of hemicellulose degradation by each hemicellulases on the physical properties and polysaccharide solubilization were investigated using wheat coleoptiles. Treatments with xylanase or 1,3-1,4- β -glucanase significantly decreased the viscosity and elasticity of wheat coleoptile segments. In addition, xyloglucanase treatment slightly decreased the viscoelasticity. Degradation of these bridges causes decreases in the physical properties, resulting in increased extensibility of the cell walls. These findings provide hemicellulose-degrading enzymes play a significant role in loosening the walls during fungal infection.

研究分野：応用微生物

キーワード：Xylanase 1,3-1,4- β -glucanase Viscoelastic properties Hemicellulosic tethers

1. 研究開始当初の背景

植物細胞壁は骨格となるセルロースミクロフィブリルにヘミセルロース鎖が架橋を形成するβ-グルカンの複合体である。ヘミセルロース鎖の分解(架橋の切断)はセルロースミクロフィブリル間にゆるみ(強度低下)を誘導し、植物は成長の際に自身のヘミセルロース分解酵素を用い、植物細胞壁を分解することで細胞の伸長成長をコントロールし、成長を達成する。

一方、イネいもち病菌はイネに感染する病原菌である。イネいもち病菌は感染の際に菌糸の先端より細胞壁分解酵素分泌し、イネ細胞壁を分解することで菌糸を伸展させ栄養の獲得に役立っている。これまで、イネいもち病菌のヘミセルロース分解酵素を抑制した結果、感染率が抑制されたことが報告されている。このように、病原菌類の感染にはヘミセルロース分解酵素が重要であり、宿主細胞壁内にゆるみを誘導し、菌糸の侵入を助長していると推察される。本研究では糸状菌類の持つヘミセルロース分解酵素の機能に着目し、分解メカニズム及び植物細胞壁の分解による物理的強度解析を試みた。

2. 研究の目的

糸状菌類が生産するヘミセルロース分解酵素であるキシラナーゼ、1,3-1,4-β-グルカナーゼ、キシログルカナーゼを用いて、個々の酵素が与える植物細胞壁の分解に伴う物理的強度変化を解析し、さらに、ヘミセルロース鎖間の構造機作を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 異種発現及び酵素の調製

単子葉植物細胞壁のヘミセルロース鎖を構成する、キシラン、1,3-1,4-β-グルカン及びキシログルカンそれぞれの分解が誘導する植物細胞壁の変化を詳細に解析するために、イネいもち病菌由来のキシラナーゼ及び1,3-1,4-β-グルカナーゼを麹菌において、また、*Aspergillus aculeatus* 由来のキシログルカナーゼを *Brevibacillus choshinensis* を用いてそれぞれのタンパク質の異種発現を行った。調製したタンパク質は His 結合カラムにより精製し実験に用いた。 *Neocallimastix patriciarum* のキシラナーゼは SIGMA 製の標品を用いた。

(2) コムギ子葉鞘細胞壁の力学的強度解析

ヘミセルロース鎖の分解及び分解による植物細胞壁のゆるみ誘導機構について、力学的解析手法により詳細を解析した。精製した各酵素を用いて単子葉植物であるコムギ子葉鞘の酵素分解を行い、酵素処理した子葉鞘をそれぞれ、細胞壁強度測定装置を用いて植物組織の経時的ひずみを測定し、植物組織の弾性率及び粘性率を算出した。これにより特定のヘミセルロース鎖分解が及ぼす細胞壁

全体の物理的強度変化を明らかにし、基質特異性の異なるそれぞれの酵素化学的性質と植物細胞壁の強度変化誘導の関連性を詳細に解析した。

(3) ヘミセルロース分解酵素によるコムギ子葉鞘細胞壁分解産物の解析

コムギ子葉鞘を各ヘミセルロース分解酵素を用いて酵素処理を行い、分解産物の解析を行った。

(4) 酵素処理後のコムギヘミセルロースの蛍光顕微鏡による観察

コムギ子葉鞘を 200 μm の厚さにスライスした切片を用いて、各ヘミセルロースによる酵素処理後、キシラン、1,3-1,4-b グルカン、キシログルカンに特異的な抗体を用いて切片を観察し、それぞれの酵素処理後の各ヘミセルロースの局在を観察した。

4. 研究成果

(1) 基質特異的な酵素を用いたコムギ子葉鞘細胞壁分解による力学的強度解析

コムギヘミセルロース分解の解析に用いたそれぞれのヘミセルロース分解酵素(キシラナーゼ、1,3-1,4-b-グルカナーゼ、キシログルカナーゼ)は基質特異的であり、他のヘミセルロースを分解する活性を示さなかった(表1)それぞれのヘミセルロース分解酵素処理をしたコムギ子葉鞘の物理的強度解析を行った結果、イネいもち病菌のキシラナーゼ処理によるコムギ細胞壁のひずみ(strain)は大きく誘導された(図1)。1,3-1,4-β-グルカナーゼもまたコントロール(BSA 処理)と比較して大きくひずみが誘導され、キシログルカナーゼ処理においてはわずかであるが分解によるひずみの誘導が確認された。

表1. 各ヘミセルロース分解酵素の基質特異性

Substrates	Enzyme activities (U/mg)		
	Xylanase	1,3-1,4-β-Glucanase	Xyloglucanase
Xylan	7.29 ± 1.17	N.D.	N.D.
1,3-1,4-β-glucan	N.D.	20.4 ± 1.94	N.D.
Xyloglucan	N.D.	N.D.	14.1 ± 0.20

N.D.; Not detected due to low activity.

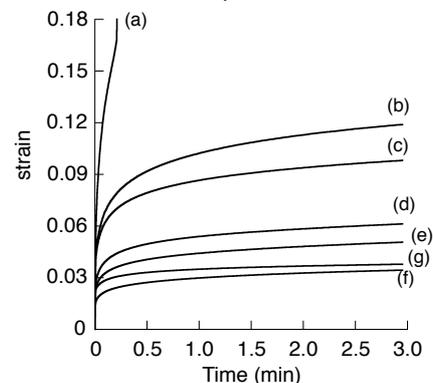


図1. 各酵素処理によるコムギのひずみ
a; キシラナーゼ (0.7U), b; キシラナーゼ (0.14U)
c; 1,3-1,4-β-グルカナーゼ (0.7U), d; 1,3-1,4-β-グルカナーゼ (0.14U), e; キシログルカナーゼ (0.7U), f; *N.patriciarum* キシラナーゼ (1U), g; コントロール

表2. 各酵素処理によるコムギ細胞壁の粘弾性パラメーター

	ϵ_1 , MPa	ϵ_2 , MPa	ϵ_3 , MPa	η_{12} , MPa.s	η_{21} , MPa.s	η_{31} , MPa.s	η_{01} , MPa.s
Control	9.86 ± 0.56	46.2 ± 3.10	41.1 ± 1.50	4.05 ± 0.20	339.0 ± 26.0	1648.7 ± 89.0	12013.4 ± 594.4
Xylanase (0.14 U)	6.11 ± 0.42	12.8 ± 1.48	8.28 ± 0.78	3.04 ± 0.20	78.0 ± 10.5	303.6 ± 24.0	2939.3 ± 268.7
1,3-1,4-β-glucanase (0.14 U)	7.55 ± 0.29	25.5 ± 3.13	16.5 ± 1.59	3.42 ± 0.09	160.0 ± 15.2	620.8 ± 67.6	4832.8 ± 380.7
1,3-1,4-β-glucanase (0.7 U)	4.48 ± 0.29	12.3 ± 0.80	10.5 ± 0.70	2.25 ± 0.12	82.4 ± 6.3	408.5 ± 27.7	3210.3 ± 141.5
Xyloglucanase (0.7 U)	8.68 ± 0.65	29.0 ± 3.40	21.9 ± 2.40	3.81 ± 0.25	196.0 ± 28.0	886.0 ± 122.6	5790.5 ± 526.4

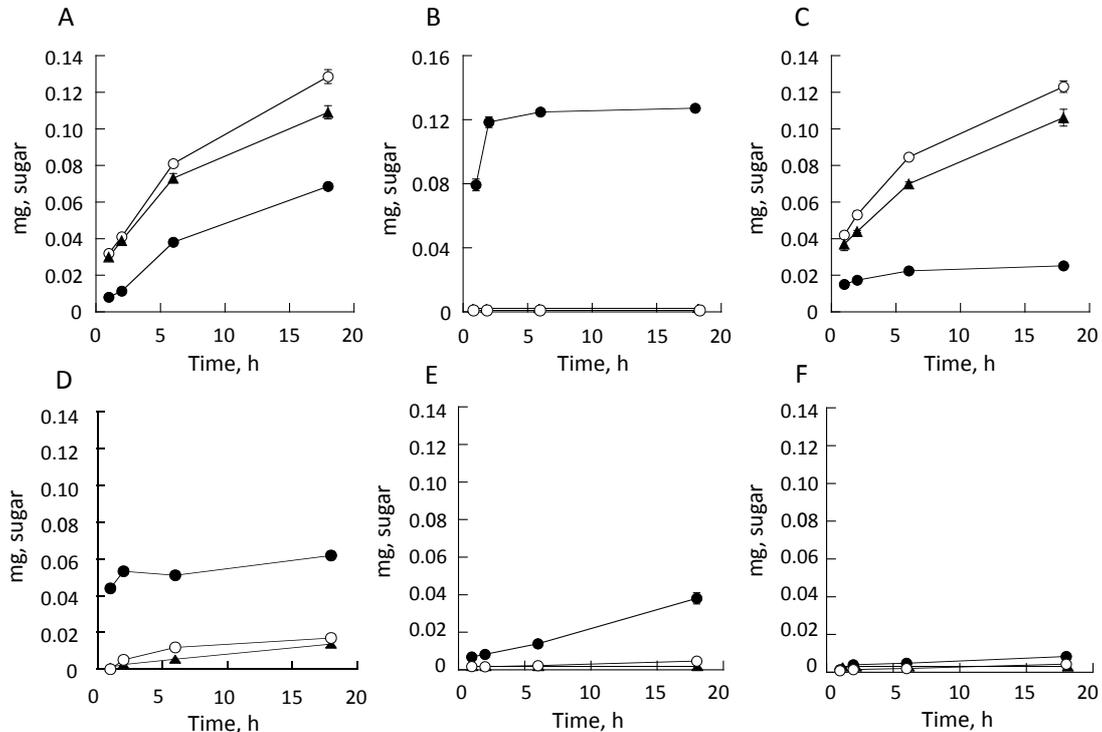


図2. 各酵素処理によるコムギ子葉鞘分解産物の構成糖解析 ●Glucose ○Xylose ▲Arabinose

一方、*N. patriciarum* 由来のキシラナーゼを用いた解析ではコントロールと変わらない挙動を示し、コムギ子葉鞘のひずみを誘導しないことが明らかとなった。これらの結果から、実際の植物を用いた場合の酵素の作用は、植物細胞壁の構造に依存することが示唆された。

また、これらのデータを Keivin-Voigt モデルを用いてコムギ子葉鞘分解による粘性率及び弾性率を計算した結果、キシラナーゼ (0.14U) 処理により弾性率(ϵ_{1-3})がコントロールと比較し 18-62%、粘性率(η_{1-3})が 18-75% 顕著に低下したことが明らかとなった(表 2)。また、1,3-1,4-β-グルカナーゼ (0.14U) 処理においては ϵ_{1-3} は 40-77%、 η_{1-3} は 38-84% 低下した。これら酵素の処理によりコムギ細胞壁全体の強度が低下したことが示唆された。これらの結果から、ヘミセルロース分解によりコムギ細胞壁の伸展性が増加し、さらにヘミセルロース架橋の分解により細胞壁構造の緩みを誘導したことが示唆された。

(2)ヘミセルロース分解酵素によるコムギ子葉鞘分解産物の構成糖解析

メタノール処理及びアミラーゼ処理を行ったコムギ子葉鞘を用いて各ヘミセルラーゼによる酵素処理を行い、可溶性画分を TFA 処理し、HPLC により分解産物の構成糖解析を行った(図 2)。その結果、キシラナーゼ処理によりキシランの主な構成糖であるキシロース及びアラビノースが認められた他、グルコースの遊離が認められた(図 2A)。1,3-1,4-β-グルカナーゼ処理においては 1,3-1,4-β-グルカンの構成糖であるグルコースのみが検出された(図 1B)。さらに、1,3-1,4-β-グルカナーゼ処理後、キシラナーゼ処理を行った場合はキシロース及びアラビノースはキシラナーゼ処理の場合と同等量見られたが、グルコースの量が低下していた(図 2C)。キシラナーゼ処理後、1,3-1,4-β-グルカナーゼ処理を行った場合はグルコースと少量のキシロース及びアラビノースが検出された(図 2D)。一方、キシログルカナーゼのみの処理ではグルコースのみが確認された(図 2E)、1,3-1,4-β-グルカナーゼ処理後

のキシログルカナーゼ処理ではほとどの糖も検出されなかった(図 2F)。

(3)キシラナーゼ及びキシログルカナーゼ処理による可溶性画分の解析

コムギ子葉鞘を用いて、キシラナーゼ及びキシログルカナーゼ処理を行い、分解後の可溶性画分を用いて 1,3-1,4-β-グルカン定量キットを用い測定した(図 3)。その結果、キシラナーゼ処理及びキシログルカナーゼ処理により処理時間と共に 1,3-1,4-β-グルカンの増加が認められた。

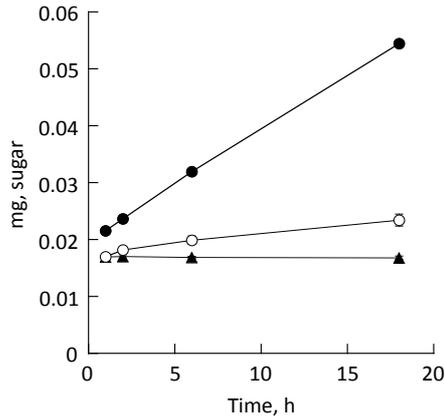


図3.キシラナーゼ処理(●)及びキシログルカナーゼ処理(○)、水処理(▲)による1,3-1,4-β-グルカンの遊離

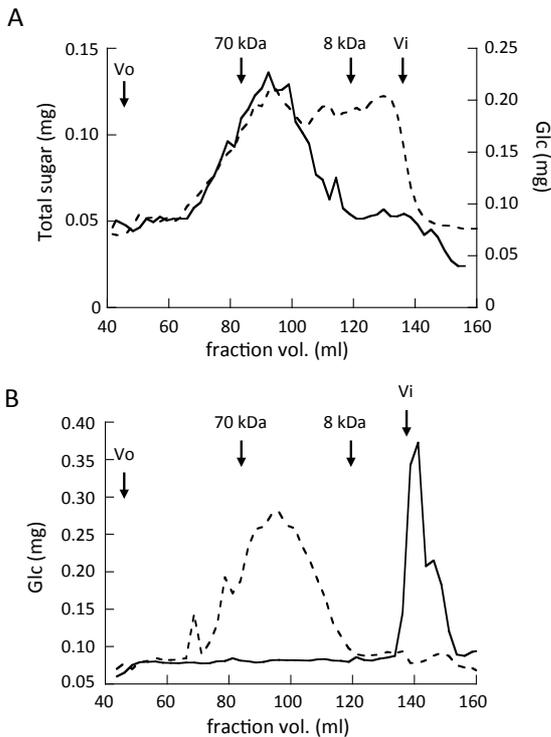


図4.キシラナーゼ処理後の可溶性画分のGPC
グルコース量(実線)、全糖量(点線)

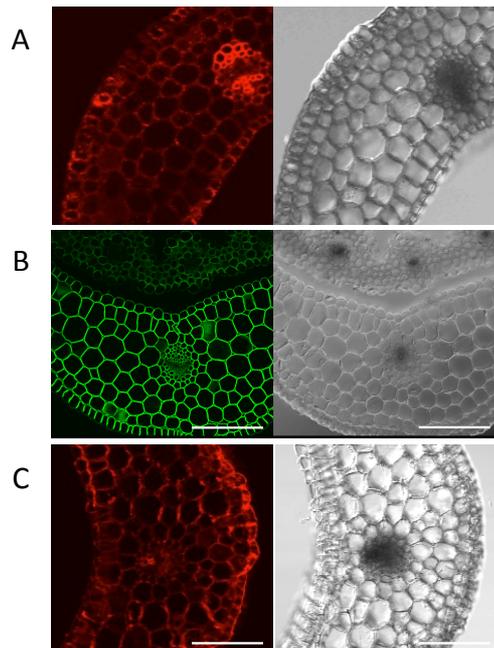
また、キシラナーゼ処理後の可溶性画分を GPC を用いて分画し、各フラクションを TFA 処理後、全糖量及びグルコース量を測定した(図 4A)。さらに、キシラナーゼ処理を行った後(図 4A)の Fraction No.70-110 を回収

し、キシラナーゼ処理または 1,3-1,4-β-グルカナーゼ処理をそれぞれ行い、再度各酵素処理産物を GPC に供し、TFA 処理後フラクションの全糖量及びグルコース量を測定した(図 4B)。その結果、キシラナーゼ処理後のグルコースはフラクション No.66-120、また、1,3-1,4-β-グルカナーゼ処理後のグルコースはフラクション No.134-152 に検出された。

これら(2)及び(3)の結果より、コムギ子葉鞘のキシラナーゼ及びキシログルカナーゼ処理により、キシラン及びキシログルカン分解と共に 1,3-1,4-β-グルカンが遊離していることが示唆された。

(4)ヘミセルロース分解酵素処理による各ヘミセルロースの局在観察

コムギ子葉鞘の切片を蛍光顕微鏡により観察した結果、キシラン、キシログルカン及び 1,3-1,4-β-グルカンを示す蛍光が観察された(図 5A-C)。また、切片をキシラナーゼ、1,3-1,4-β-グルカナーゼ及びキシログルカナーゼ処理したそれぞれの切片の蛍光はすべての処理において蛍光の減衰が見られたことにより各酵素処理により各ヘミセルロースの分解が確認された(図 5D-F)。さらに、キシラナーゼ処理により 1,3-1,4-β-グルカンの蛍光の減衰が認められた(図 5G)。この結果から、(2),(3)の結果のように、キシラナーゼ処理による 1,3-1,4-β-グルカンの遊離が顕微鏡による局在観察においても示唆された。一方、キシログルカナーゼ処理による 1,3-1,4-β-グルカンの蛍光はほとんど変化が見られなかった(図 5H)。このことは、(2),(3)の結果のように、遊離する 1,3-1,4-β-グルカンの遊離量が少ないことが原因と考えられる。



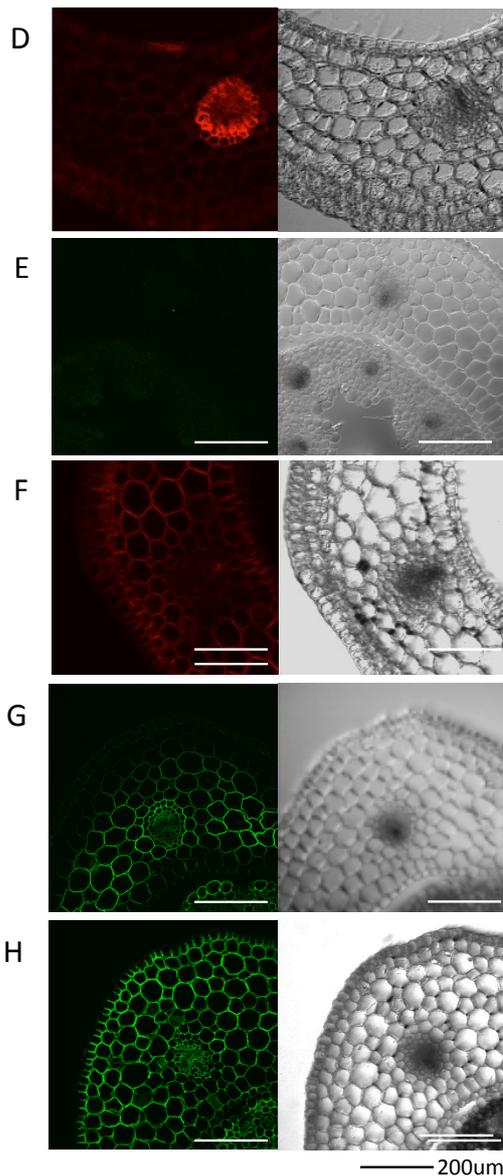


図5 ヘミセルロース分解処理後の各抗体によるコムギ子葉鞘切片の観察
 A; キシラン抗体, B; 1,3-1,4-β-グルカン抗体, C; キシログルカン抗体, D; キシラナーゼ処理後キシラン抗体, E; キシログルカナーゼ処理後、1,3-1,4-β-グルカン抗体, F; キシログルカナーゼ処理後キシログルカン抗体, G; キシラナーゼ処理後1,3-1,4-β-グルカン抗体, H; キシログルカナーゼ処理後1,3-1,4-β-グルカン抗体

本研究の結果より、コムギ子葉鞘細胞壁構造のヘミセルロースの架橋は、(1)セルロースマイクロフィブリル間をキシランまたはキシログルカンなどと共に 1,3-1,4-β-グルカンのマトリクスが架橋する構造(図 6 A)や、(2)キシランやキシログルカン鎖を 1,3-1,4-β-グルカンのマトリクスがセルロースマイクロフィブリルに繋ぎとめる構造(図 6B)を成すと説明でき、キシラナーゼの分解により 1,3-1,4-β-グルカンが遊離したと示唆された。また、図 6C のように、1,3-1,4-β-グルカンが分解することでコムギ子葉鞘細胞壁の緩みを誘導し、一方で図 6D のように分解によりヘミセルロース類は遊離するが、細胞壁の緩みには関与しない構造が存在することが明らかとなった。

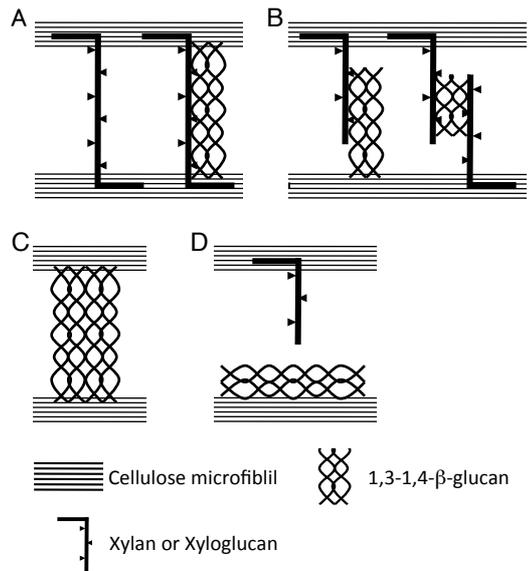


図6. コムギ子葉鞘の細胞壁におけるセルロースマイクロフィブリル間のヘミセルロース架橋構造モデル

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 1 件)

Machiko Takahashi, Ryoichi Yamamoto, Naoki Sakurai, Yuki Nakano, Takumi Takeda, Fungal hemicellulose-degrading enzymes cause physical property changes concomitant with solubilization of cell wall, *Planta* (2015) 241:359-370

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] (計 0 件)

[その他] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋真智子 (Machiko Takahashi)
 長岡技術科学大学・工学部
 産学官連携研究員
 研究者番号：30633333

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし