

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780339

研究課題名(和文)植物における細胞壁糖鎖生合成メカニズムの解明

研究課題名(英文)Biosynthesis mechanisms of the the plant cell wall polysaccharides

研究代表者

小西 照子(KONISHI, TERUKO)

琉球大学・農学部・准教授

研究者番号：30433098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：植物細胞壁は地球上で最も豊富なバイオマス資源である。昨今、細胞壁の構造を改変した有用なバイオマス資源の開発が求められているが、細胞壁が合成されるしくみについては未だ明らかでないため、細胞壁の合成を制御することは難しい。日本近海海藻種は1,500種にもものぼり、日本は海洋バイオマス資源を豊富に持つ国である。特に、藻類は陸上植物に比べて10倍以上もの炭素固定能を有し、次世代のバイオ燃料の原料として注目されている。それゆえ、本研究では、植物でも藻類に着目し、藻類の細胞壁糖鎖合成に関与する酵素の機能を明らかにすることを目的とし、クラミドモナス由来の細胞壁生合成関連酵素について研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Plant cell wall polysaccharides are useful in our daily life as a source of pulp and dietary fiber. The plant cell wall polysaccharides are also considered as important source of biofuel such as bioethanol. However, the mechanism of plant cell wall biosynthesis has been unknown. In this project, we studied UDP-arabinopyranose mutase (UAM) and UDP-galactopyranose mutase (UGM) that are the enzymes involved in the cell wall biosynthesis in order to clear the mechanism of plant cell wall biosynthesis. Japan has a lot of species of algae which possess an ability of CO<sub>2</sub> fixation higher than land plants do and become a source of bioenergy. Thus, we focused on algae cell wall, and used *Chlamydomonas reinhardtii* as a simple in this project. In order to clarify the function of these enzymes in the *Chlamydomonas* cell, we analyzed the characterization of *Chlamydomonas* UAM and detected *Chlamydomonas* UGM activity. We also analyzed the UAM and UGM gene expression on cell cycle.

研究分野：6702

科研費の分科・細目：6702

キーワード：植物 細胞壁 糖鎖 生合成 クラミドモナス

## 1. 研究当初の背景

植物の細胞壁はセルロースなど複数の糖鎖から主に構成されている。植物は大気中の二酸化炭素を光合成によって吸収し、最終的には細胞壁糖鎖へと変換する（炭素固定）能力を有する。それゆえ、地球温暖化の解決策として大気中の二酸化炭素量を減少させるために、植物の細胞壁糖鎖を原料とした燃料（バイオ燃料）の開発や、植物の光合成能力を活性化させるための研究が盛んに行われている。その中で、バイオ燃料に適した細胞壁構造を持つバイオマスを創ることや、光合成を活性化させるためには、最終産物である細胞壁糖鎖の生合成を活性化させることがポイントと考えられる。しかし、植物の細胞壁を構成する糖鎖の構造は複雑であり、さらにその生合成メカニズムについては解明されていないため、植物細胞壁糖鎖の合成を制御することが難しく、これらの研究の壁となっている。そこで、本研究では、植物における細胞壁の生合成メカニズムを解明することを目的とし、細胞壁糖鎖の生合成に関わる酵素の機能を明らかにする。

陸上植物の細胞壁糖鎖は品種間、生長過程、部位によって大差がなく保存性が高い。一方、海洋植物、即ち海藻の糖鎖は品種により異なり、また、同品種でも生育場所、時期によりその種類や構造が大きく異なる。そのため、藻類における細胞壁糖鎖の研究はあまり進んでおらず、糖鎖構造の知見はあるものの、その生合成メカニズムについては未だ明らかに

されていない。日本は排他的経済水域世界第6位を誇り、日本近海の高藻種は1,500種にもものぼり、海洋バイオマス資源を豊富に持つ。特に、藻類は陸上植物に比べて10倍以上もの炭素固定能を有し、次世代のバイオ燃料生産原料として注目されている。それゆえ、本研究課題では、植物でも藻類に着目し、藻類の細胞壁糖鎖合成に関与する酵素の機能を明らかにする。

## 2. 研究目的

植物の細胞壁多糖はヌクレオチド糖を基質とし、糖転移酵素の作用により合成される。UDP-アラビノースムターゼ（以下UAMと略す）はアラビナンの合成基質であるUDP-アラビノースを合成する酵素であり、UDP-アラビノースのピラノース型（6員環）とフラノース型（5員環）の相互変換を触媒する酵素である。最近の研究により、UAMは高等植物においてアラビナンをはじめとするアラビノフラノース残基を含む細胞壁糖鎖の合成酵素（糖転移酵素）に基質を供給する働きの他に、生殖の段階でも重要な役割を持つことが分かってきた。植物にとっては生命維持に必須の酵素であるUAMだが、微生物や動物には存在しない。一方、結核菌であるマイコバクテリアの細胞壁糖鎖にはガラクトフラノース（ガラクトース5員環）残基が含まれ、マイコバクテリアはUAMと同様の酵素、UDP-ガラクトースムターゼ（UGM）を持っている。このUGMはUDP-アラビノースも認識し、UAM活性を持つこと

も明らかとなっているが、UAM と UGM の反応機構は全く異なる。UGM を阻害する物質が結核菌治療薬として利用されており、UGM はマイコバクテリアにとって必須の酵素であることが分かっている。この UGM は植物には存在しておらず、ガラクトフラノース残基は微生物特異的である。近年のゲノム解読により、微細藻類のクラミドモナス（和名：コナミドリムシ）は、高等植物に必須な UAM と微生物に必須な UGM の両方の酵素遺伝子を有していることが明らかになった。実際、クラミドモナス細胞壁糖鎖にはアラビノ-フラノース残基とガラクトフラノース残基が存在し、クラミドモナスは糖鎖合成において植物と微生物の両方の特徴を持ち合わせたユニークな生物であることも分かってきた。また、UAM はイネで3つ、シロイヌナズナで5つと高等植物では多くの相同遺伝子が存在する点、酵素がヘテロの複合体を形成している点などから、高等植物を用いた UAM 研究は非常に難しい。しかし、クラミドモナスには UAM の相同遺伝子が存在せず、酵素の解析をするには高等植物に比べて容易であると考えられる。そこで、本研究ではクラミドモナスを用い、細胞壁糖鎖合成における UAM の機能を解明するとともに、成長過程における UAM と UGM の機能について、分子生物学的手法や生化学的手法を用いて明らかにした。

### 3. 研究の方法

#### (1) クラミドモナス UAM 酵素科学的性質

微細藻類のクラミドモナスを 25 で 6 日間培

養し、藻体を超音波で破碎後、超遠心(100,000 x g、15 分間)の上清を回収し細胞質画分とした。細胞質画分に硫酸アンモニウムを加えタンパク質を沈殿させた後、疎水クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーに順次供し、UAM の精製を行った。UAM の酵素活性測定は、酵素タンパク質、バッファー、塩化マンガン、さらに基質として UDP-アラビノピラノースまたは UDP-アラビノフラノースを含む反応溶液を 25 で 5 分間反応させ、酵素を失活させた後、反応生成物を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で検出し、行った。1 ユニットは 1 分間に 1  $\mu\text{mol}$  の UDP-アラビノースを生成する酵素量と定義した。精製 UAM を用いて、酵素科学的性質を検討した。

(2) クラミドモナス UGM 酵素活性の同定  
クラミドモナスのゲノム情報により UGM 遺伝子が存在するものの、酵素活性については測定されていないことから、クラミドモナス由来 UGM 活性の測定方法を確立することとした。クラミドモナスを 25 で 6 日間培養し、藻体を超音波で破碎後、超遠心(100,000 x g、90 分間)の上清を回収し細胞質画分とした。細胞質画分に含まれる UGM の活性を測定した。UGM の酵素活性測定は、酵素タンパク質、バッファー、塩化ナトリウム、さらに基質として UDP-ガラクトピラノースを含む反応溶液を 37 で 10 分間反応させ、酵素を失活させた後、反応生成物を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で検出した。

(3) クラミドモナスの細胞分裂時における UAM および UGM の遺伝子発現解析

クラミドモナスは光条件をコントロールすることで容易に同調培養を行えることから、ク

ラミドモナスを同調化させ、2 時間毎にサンプルを回収し、細胞分裂ステージの異なる細胞を得た。得られた各ステージの細胞から mRNA を抽出し、cDNA を合成し、それを鋳型に Real-time PCR を行い、遺伝子の発現解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) クラミドモナス UAM 酵素科学的性質

精製したクラミドモナス UAM の酵素科学的性質について調べ、イネ由来の UAM と比較した。その結果を表 1 に示す。至適温度や至適 pH、 $K_m$  値においてクラミドモナス由来 UAM とイネ由来 UAM で大差は見られなかった。このことより、クラミドモナス UAM の働きは陸上植物の UAM と大きな違いはないと考えられる。しかしクラミドモナス UAM のネイティブ酵素と組換え酵素を比較すると、組換え UAM の UDP-アラビノフラノース生成において非常に高い  $K_m$  値を示した(表 2)。しかし、UDP-アラビノピラノース生成における  $K_m$  値には大差が見られなかった。これは組換え酵素がネイティブ酵素と比べて、基質となる UDP-アラビノピラノースに対して非常に反応性が低いことを示している。この結果より、ネイティブ酵素は UDP-アラビノフラノース生成を触媒しやすいように、生体内で制御されている可能性が示唆された。

表 1. クラミドモナス UAM とイネ UAM の酵素科学的性質  
UDP-Arap; UDP-アラビノピラノース, UDP-Araf; UDP-アラビノフラノース

	クラミドモナス UAM		イネ UAM	
	UDP-Arap 生成	UDP-Araf 生成	UDP-Arap 生成	UDP-Araf 生成
至適温度 (°C)	60	60	55	55
至適 pH	5.0-5.5	5.5-6.0	5.5-6.0	7.0-7.5
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$152 \pm 27.1$	$371 \pm 23.5$	55	531
$k_{cat}/K_m$ ( $\times 10^4$ ) $\text{S}^{-1}/\text{M}^{-1}$	3.94	0.19	—	—
分子量 (kDa)	> 669		> 460	

表 2. クラミドモナス UAM のネイティブ酵素と組換え酵素の酵素科学的性質

UDP-Arap; UDP-アラビノピラノース, UDP-Araf; UDP-アラビノフラノース

	ネイティブ UAM		組換え UAM	
	UDP-Arap 生成	UDP-Araf 生成	UDP-Arap 生成	UDP-Araf 生成
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	152	371	148	10300
$k_{cat}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1}\text{S}^{-1}$ )	39.3	0.70	9.73	0.09
$k_{cat}$ ( $\text{S}^{-1}$ )	5.98	0.26	1.44	0.93

(2) クラミドモナス UGM 酵素活性の同定  
クラミドモナスの細胞質画分を用いて UGM 活性を行ったところ、新たなピークを検出した(図 1)。酵素反応後に検出されたピークを LC-MS で解析し、UDP-ガラクトフラノースであると同定した。

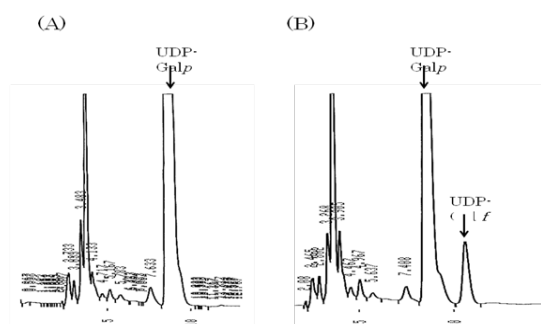


図 1. UGM 活性反応生成物のクロマトグラム  
(A)酵素反応 0 分、(B)酵素反応 10 分 UDP-Galp; UDP-ガラクトピラノース, UDP-Galf; UDP-ガラクトフラノース

UGM の至適 pH (図 2)、至適温度 (図 3) について検討した。酵素タンパク質が 100 ng で反応を行った時、反応時間 10 分以降において反応生成物は増加しない結果となった。また、クラミドモナス細胞質画分に存在する UGM の至適 pH は pH 7.5、至適温度は 40 であった。

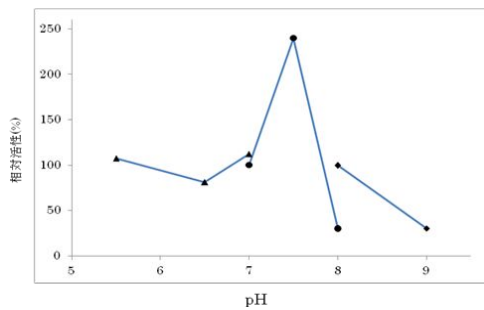


図 2. UGM 活性の至適 pH  
pH 7.0 の活性を 100% とし、相対活性で示した。

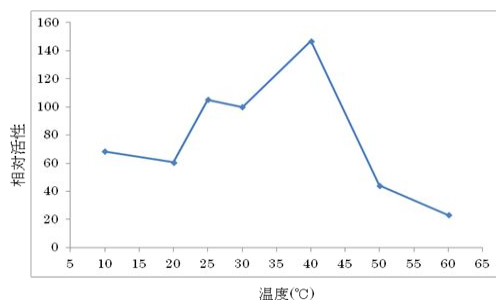


図 3. UGM 活性の至適温度  
30 の活性を 100% とし、相対活性で示した。

(3) クラミドモナスの細胞分裂時における UGM および UAM の遺伝子発現解析  
 クラミドモナスを同調化後、2 時間毎に細胞を回収し、G1 期～M 期までの細胞周期の異なる細胞を得た(図 4)。それぞれの細胞から調製した cDNA を鋳型に、UGM および UAM の遺伝子発現解析を行った結果、UGM1 と UAM の遺伝子発現量および発現パターンは同様であり 16～18 時間目でピークを示した。一方、UGM2 の遺伝子発現パターンは他 2 つの遺伝子とは異なり、6～18 時間目で一定の発現を示した。これらの結果より、UGM 遺伝子および UAM 遺伝子は細胞分裂が活発な時期に強く発現することが明らかとなった。さらに、UAM や UAM1 と異なり、UGM2 遺伝子は M 期以外にも S 期および G2 期でも発現しており、細胞の肥大時に

も必要であることが示唆された。

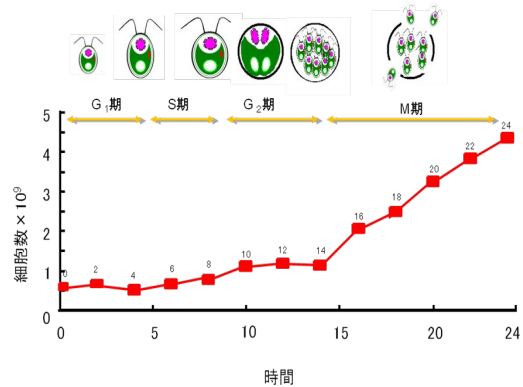


図 4. クラミドモナスの同調培養  
G1 期～M 期にかけて細胞周期の異なる細胞を得た。

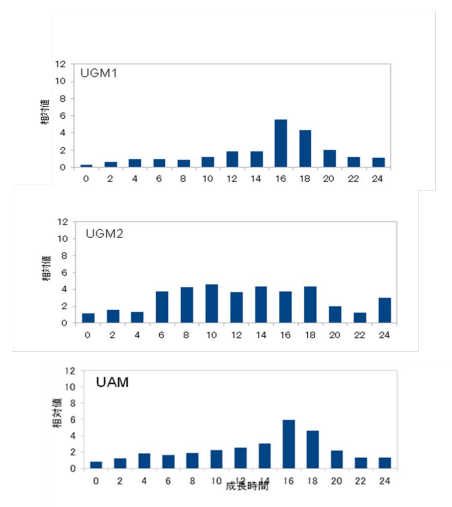


図 5. クラミドモナス UGM および UAM の遺伝子発現解析  
L27a リボソームタンパク質の遺伝子発現に対する相対発現量で示した。

本研究の成果は水中で生育する植物の細胞壁合成における初めての知見となる。今回は UAM が微細藻類由来でも陸上の植物由来でも同様の酵素特性を示すことが明らかとなった。また、UAM と同様の酵素反応を触媒する酵素 UGM の活性も同定できたことから、今後、酵素を精製し、酵素特性を明らかにする予定

である。遺伝子発現においても UGM および UAM の遺伝子発現に大差はなく、細胞分裂が活発な M 期に強く発現することが明らかとなった。このことより、両者の酵素は独立して細胞内で働いていることが示唆された。今後、より詳細な細胞壁生合成のメカニズム解明のため、UAM や UGM 遺伝子の発現抑制体の解析など、細胞壁合成における両者酵素の働きを解明するとともに、他の細胞壁合成関連酵素についても、細胞分裂時における遺伝子発現解析を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ayana Kotani, Maki Tsuji, Yasushi Azama, Tadashi Ishii, Takumi Takeda, Tetsuro Yamashita, Mie Shimojima, and Teruko Konishi: Purification and characterization of UDP-arabinopyranose mutase from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2013) 77; (9) Oct 1874-1878. (査読有り)

Teruko Konishi and Tadashi Ishii: The Origin and functions of arabinofuranosyl residues in plant cell walls, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, (2012) 24; 13-23. (査読有り)

〔学会発表〕(計 3 件)

前田美奈子(琉球大)、小西照子(琉球大): クラミドモナス細胞周期における糖ヌクレオチド合成酵素遺伝子群の解析、第 55 回日本植物生理学会大会、富山、2014 年 3 月

小谷彩奈(琉球大)、安座間康(琉球大)、石井忠(森林総研)、小西照子(琉球大): クラミドモナスにおける糖ヌクレオチド合成酵素の特性について、2011 クラミドモナスワークショップ、岡崎(愛知)、2011 年 3 月

Ayana Kotani (University of the Ryukyus), Tadashi Ishii (FFPRI), Masakuni Tako (University of the Ryukyus), and Teruko Konishi (University of the Ryukyus): Purification of *Chlamydomonas* UDP-arabinopyranose mutase, 4th Cell Wall Biosynthesis Meeting, Awaji October 2011

〔図書〕(計 1 件)

小西照子, 竹田匠: 植物由来の細胞壁分解酵素, バイオマステクノロジーシリーズ「バイオマス分解酵素の研究の最前線」シーエムシー出版 監修: 近藤昭彦, 天野良彦, 田丸浩 (2012)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西 照子 (KONISHI TERUKO)

琉球大学・農学部・准教授

研究者番号: 30433098