

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840034

研究課題名(和文)新規ゴルジ体局在型ポリガラクトナーゼが関与するペクチン生合成機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of pectin biosynthesis mechanism involving novel Golgi-localized polygalacturonase

研究代表者

大橋 貴生(OHASHI, TAKAO)

大阪大学・生物工学国際交流センター・助教

研究者番号：10597876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ポリガラクトナーゼはペクチンを加水分解する酵素である。植物において、従来、ポリガラクトナーゼは細胞壁に分泌・局在し、一度細胞壁で組み立てられたペクチンを分解していると考えられていた。特に、果実の成熟、落葉・落果、花粉の成熟等の細胞壁強度を変化させる必要がある生命現象に関わるポリガラクトナーゼについて、広く研究がなされてきた。本研究では、従来型とは異なり、細胞内膜系であるゴルジ体に局在する新規ポリガラクトナーゼを見出し、その酵素学的性質を明らかにした。また、シロイヌナズナゴルジ体局在型変異体の解析を行い、生体内における役割について追った。

研究成果の概要(英文)：Polygalacturonase is pectin-hydrolyzing enzyme. It was thought that the polygalacturonase was secreted and localized at cell wall, and degrade the assembled pectic polysaccharides. Especially the cell wall-type polygalacturonases involved in the fruit maturation, leave and fruit abscissions and pollen maturation were well studied. In this study, I found the novel Golgi-localized polygalacturonase and enzymatically characterized. In addition, I attempted to elucidate the physiological functions of the Golgi-localized polygalacturonase using Arabidopsis T-DNA mutants.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：ペクチン 植物細胞壁 ポリガラクトナーゼ 分裂酵母 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

ペクチンは植物細胞壁多糖の三大構成成分(セルロース、ヘミセルロース、ペクチン)の一つであり、ガラクトuron酸を多量に含有した酸性複合多糖である。ペクチンはその物性(酸性基を有するため水素結合を形成しやすい)やその局在性(マトリックス多糖としてセルロース微小繊維間を埋めている)のため、その都度微細構造を変換することにより、植物の生長・分化、細胞間接着、細胞壁多孔性の調節、細胞伸長等、多様な機能を有することが知られている。この微細構造の変換にはペクチナーゼと呼ばれる一群の分解酵素群が関与している。

ペクチンの主骨格はガラクトuron酸が直鎖状に  $\alpha$ 1,4 結合で重合したポリガラクトuron酸であり、加水分解する酵素としてペクチナーゼの一種であるポリガラクトuronナーゼ(PG)が知られている。PGは植物から微生物まで広く存在しており、巨大なタンパク質ファミリーを形成している。PGはその系統樹解析により、クレードAからFまで6つのクレードに分類されることが報告されており(Torki et al., 2000、図1) 例え、モデル植物である Arabidopsis のゲノム配列上からは69種類のPGの存在が予測されている。果実の成熟に関与しているPGはクレードAに、花や葉の器官脱離、および葯の裂開による花粉の飛散に関与するPGはクレードBおよびCに属していることが報告されている。ことが一部明らかにされている。しかし、他のクレード(クレードD、EおよびF)に属するPGに関しては、部分的にRT-PCR等を用いた転写発現解析がなされたのみで、各遺伝子の機能は不明で、ポリガラクトuronナーゼ活性を有しているのかも明らかではない。

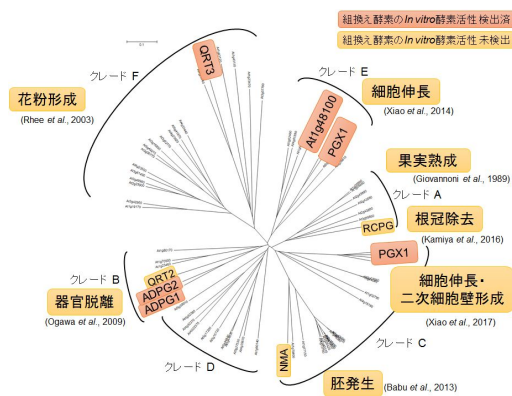


図1 Arabidopsis PG 系統樹

一方、申請者らのグループにおけるポリガラクトuron酸の伸長に関与するガラクトuron酸転移酵素における研究過程で、偶然にもガラクトuron酸転移活性と同時にマイクロソーム画分に膜結合型のPG活性を見出した(Akita et al., 2002)。この結果はPGが膜結合

型としてゴルジ体などの内膜系に存在していることを示唆していた。従来、PGは可溶性分泌タンパク質として細胞壁に分泌・局在していると考えられ、細胞内局在について詳細に調べられたことはほとんど無かった。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロソームに検出された膜結合型PGはゴルジ局在型PGであると仮定し、このゴルジ局在型PGの生理機能を明らかにすることを最終目標とした。現在までに同定・解析されているPGは全て可溶性タンパク質であり膜結合型PGは知られていないが、ペクチン生成の場であるゴルジ体に局在し、ペクチン生成に関与する新規のPGが存在すれば、非常に興味深い。

3. 研究の方法

(1) スクロース密度勾配遠心

エンドウ豆を暗闇、室温で発芽、生育させモヤシを調製した。エンドウ豆モヤシからオルガネラ混合溶液を抽出し、20-50%スクロース密度勾配の上に重層し、130,000gで3時間遠心した。遠心後20本のフラクションに分画し、各オルガネラマーカ酵素およびPGの酵素活性を測定した。

(2) タバコ BY-2 細胞を用いた細胞内局在解析

PG遺伝子について、EGFP遺伝子をインフレームで3'末端に連結後、植物発現用ベクターpBI121に組み込み、アグロバクテリウムに導入し、形質転換体を得た。アグロバクテリウム形質転換体をタバコBY-2細胞に感染させ、PG-EGFP遺伝子を導入した。EGFPの蛍光シグナルを共焦点顕微鏡を用いて観察した。

(3) 分裂酵母を用いた組換えPGの生産と酵素活性測定

PG遺伝子について、分裂酵母発現ベクターpREP1に組み込み、分裂酵母で発現させた。発現ベクターを導入した酵母株を生育させ、粗タンパク質を抽出後、ポリガラクトuron酸および蛍光標識化オリゴガラクトuron酸(DP=3-20)を基質として、PG酵素反応を行った。

4. 研究成果

(1) 膜結合型PG活性はゴルジ体に局在する

マイクロソーム画分に検出されたPG活性のより詳細な細胞内局在を調べるため、エンドウ豆モヤシを酵素源に使い、ショ糖密度勾配遠心法によるオルガネラ分画を行った(図2)。その結果、PG活性がゴルジ体マーカー酵素と共沈降しており、ゴルジ体に局在していることを初めて明らかにした。さらに、ショ糖密度勾配で分画したインтактなゴルジ体を含む画分を用いて、プロテアーゼ感受性試験を行い、ゴルジ体局在型PGの触媒部位はゴルジ体内腔に存在することを示した。

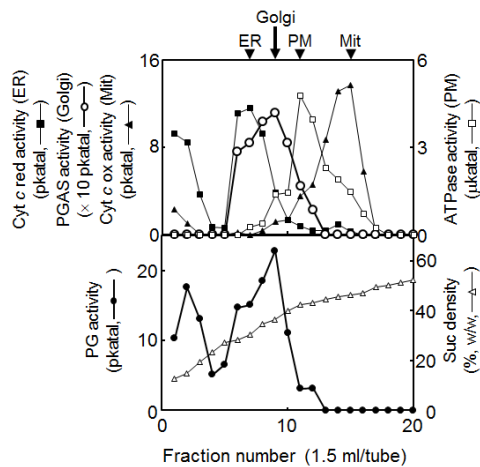


図2 エンドウ豆モヤシ由来粗酵素のスクロース密度勾配遠心

## (2) 膜結合型 PG をコードする Arabidopsis 由来 PG 遺伝子の探索

Arabidopsis ゲノム配列上に予測されている 69 種類の全ての PG タンパク質について、膜貫通ドメイン予測ツール (SOSUI および TMHMM) を用いて配列解析を行った。その結果、43 個の PG 配列中に推定膜貫通ドメインが予測された。これらの推定膜貫通 PG の中でも、特に分子同定および機能解析がとられているクレード D、E および F に属する PG を解析対象とすることにした。これらの推定膜結合型 PG の C 末端に EGFP を付加した融合タンパク質 PG-EGFP として、タバコ BY-2 細胞で発現させ、細胞内局在解析を行った。共焦点顕微鏡観察の結果、クレード E および F に属する複数の PG-EGFP において、ゴルジマーカータンパク質と共局在する PG を見出すことに成功した。また、クレード E に属する PG (PGE) において、培養日数に依存して、ER、ゴルジ体、次いで液泡と局在を変化させているものも観察された。また、クレード D に属する PG (PGD) については、典型的な GPI アンカー型タンパク質様のドメイン構造を有するものが有り、この PGD の局在を観察したところ、他の GPI アンカー型タンパク質と同様、細胞膜への局在が見られた。この PGD タンパク質は当初狙っていたゴルジ局在型 PG では無かったが、膜結合型 PG の一つとして見なすことができ、従来型の細胞壁局在型とは異なり、新規な PG であり、従来に無い新規な機能を有している可能性が考えられ、新たな研究対象として非常に興味深い。

## (3) ゴルジ局在型 PG の酵素学的特性解析

ゴルジ局在であることが確認された PGE および PGF について、分裂酵母を用いて組換え酵素を生産させ、酵素活性測定を行った。組換え PG タンパク質は *c-myc* タグとの融合

タンパク質として発現させ、ウエスタンブロット解析により、分裂酵母での生産を確認した。次に、酵母菌体よりタンパク質を抽出し、ポリガラクトuron酸多糖および蛍光標識化オリゴガラクトuron酸を基質として酵素反応を行った。酵素反応産物をポリガラクトuron酸多糖に関しては、Somogyi-Nelson 法により還元糖の定量を、蛍光標識化オリゴガラクトuron酸に関しては、HPLC 法を用いて酵素生成物の定量を行い酵素反応を評価した。その結果、組換え PGE タンパク質では、ポリガラクトuron酸多糖に対してのみ、PG 活性を示し、蛍光標識化オリゴガラクトuron酸を基質としなかった。一方、組換え PGF タンパク質では、PGE とは反対に、蛍光標識化オリゴガラクトuron酸に対してのみ、PG 活性を示した。これらの結果は、ゴルジ体局在型 PG の中で、ポリガラクトuron酸分解に対する役割分担が存在することを示唆している。また、組換え PGF タンパク質は 7 糖から 16 糖ぐらいの鎖長のオリゴ糖に優先的に作用しており、他にもその他の鎖長のオリゴ糖を分解する酵素が存在しているかもしれない。

## (4) Arabidopsis 膜結合型 PG 遺伝子変異体の解析

PGD、PGE および PGF 遺伝子座に T-DNA が挿入された Arabidopsis T-DNA 変異体を ABRC から取り寄せ、PCR 法を用いた Genotyping によりホモ株を選抜した後、これら変異体の生育速度を観察した。ほとんどの単独 PGE および PGF 遺伝子変異株において、全ての生育段階において野生株との優位な変化は観察されなかった。一方で、GPI アンカー型 PG をコードしている PGD 遺伝子の変異株では芽生えの根の伸長が促進していた。さらにマンニトール添加による浸透圧ストレスを与えると、この芽生えの根の伸長速度の野生株との差が拡大していた。一方で、塩化ナトリウム添加による塩ストレスを与えたときには、ストレスフリーの条件下で見られていた芽生えの根の伸長速度の差が抑圧されていた。つまり、細胞膜に局在する GPI アンカー型 PG である PGD は芽生えの根における、特に浸透圧ストレスおよび塩ストレス応答に関与しているかもしれない。

## 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2件)

- (1) Ohashi T, Jinno J, Inoue Y, Ito S, Fujiyama K, Ishimizu T. A polygalacturonase localized in the Golgi apparatus in *Pisum sativum*. J Biochem. (2017) 査読有 doi:10.1093/jb/mvx014
- (2) 大橋豊生: 植物細胞壁研究のフロンティア、バイオメディア、生物工学会誌、93(1):37. (2015) 査読無

〔学会発表〕(計4件)

- (1) Takao Ohashi, Mami Suzuki, Nabilah Sari, Ryo Misaki, Kazuhito Fujiyama. Novel membrane-bound type plant pectin-degrading enzyme. JSPS Japanese-German Graduate Externship International Symposium “Biological and Chemical Methods for Selective Catalysis”, RWTH Aachen University (Aachen), 2016.9.6-7.
- (2) 大橋貴生、鈴木真未、三崎亮、藤山和仁：高等植物由来推定 GPI アンカー型ポリガラクトナーゼの細胞内局在解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、札幌コンベンションセンター（札幌）、2016.3.27-30.
- (3) Takao Ohashi, Mami Suzuki, Nabilah Sari, Muneyoshi Matsushita, Ryo Misaki, Kazuhito Fujiyama. Functional characterization of membrane-bound polygalacturonase from Arabidopsis thaliana. Biotechnology and Chemistry for Green Growth, Osaka University, 2016.3.9-10.
- (4) 大橋貴生、ムスタファ ナビラー サリ、松下宗義、三崎亮、藤山和仁：高等植物における膜結合型ポリガラクトナーゼの酵素学的特性解析、日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山大学（岡山）、2015.3.26-29.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 貴生 (OHASHI, Takao)

大阪大学・生物工学国際交流センター・助教

研究者番号：10597876