

令和元年6月10日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07391

研究課題名(和文)L-アラビノース合成系の起源と生理的意義の解明

研究課題名(英文)Metabolism and physiological importance of L-arabinose in plants

研究代表者

小竹 敬久 (Kotake, Toshihisa)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：20334146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：L-アラビノースは動物には見られない植物特有の糖である。植物生体内でL-アラビノースは、糖ヌクレオチドであるUDP-L-アラビノースの形で作られる。UDP-L-アラビノースを新生経路で合成する反応は、UDP-キシロースのC-4エピマー化だけであり、この反応は細胞質基質ではUDP-グルコース4-エピメラーゼの一種であるUGE1により触媒される。この活性を持たないUGE2との間でアミノ酸残基を交換した変異タンパク質を作成したところ、3つのアミノ酸残基がこの活性に重要であることがわかった。UGEがこれらの残基を持つことで、陸上植物は細胞質基質でのUDP-L-アラビノース合成能を獲得したと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

L-アラビノースは動物にはない植物特有の糖であるが、植物がこの糖の合成系をどのように獲得したかはよくわかっていない。L-アラビノースの合成系は2経路あり、一つは細胞質基質に、もう一つはゴルジ体にある。このうち、前者の経路でL-アラビノース合成反応を行っている酵素について調べたところ、元々は別の働きを持っていた酵素が変異して、L-アラビノース合成も行うようになったことが示唆された。植物は2つのL-アラビノース合成系を獲得したことで、L-アラビノースの利用を加速させた可能性がある。

研究成果の概要(英文)：L-Arabinose (L-Ara) is a plant-specific sugar that is not found in animals. L-Ara is synthesized as a form of UDP-L-Ara from UDP-xylose (UDP-Xyl), which is catalyzed by UDP-glucose 4-epimerase (UGE) 1 in the cytosol. Although UGE1 shares high similarity of amino acid sequence with UGE2, only UGE1 has UDP-Xyl 4-epimerase (UDP-L-Ara synthase) activity. To identify the amino acid residues important for UDP-L-Ara synthase activity, recombinant UGE1 proteins with a point mutation to replace a residue with that of UGE2 were prepared in *E. coli*. Three amino acid residues were found to affect UDP-L-Ara synthase activity of UGE1. To the contrary, mutated UGE2 with a residue corresponding to UGE1 showed weak UDP-L-Ara synthase activity. These results suggest that these residues have changed substrate specificity of UGE1, which enabled plants to synthesize UDP-L-Ara in the cytosol.

研究分野：植物生化学

キーワード：L-アラビノース キシロース 糖ヌクレオチド シロイヌナズナ 陸上植物 UDP-グルコース4-エピメラーゼ UDP-キシロース4-エピメラーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

L-アラビノースは、植物特有の5炭糖(ペントース)の一種であり、かつ植物の主要な糖である。細胞壁では、ペクチンのアラビナン側鎖やアラビノガラクトタン-プロテインやエクステンシンの糖鎖を構成する。イネ科植物をはじめとする多くの植物では、キシランのL-アラビノース側鎖としても存在する。さらに、CLEペプチドの糖鎖も構成している(Kotake et al., 2016, J. Plant Res.)。L-アラビノースは糖ヌクレオチドの一種であるUDP-L-アラビノースとして、UDP-キシロースから合成される。このUDP-L-アラビノース合成反応(UDP-キシロースのC-4エピマー化)は、植物でL-アラビノースを合成する唯一の反応である。少なくともシロイヌナズナでは、UDP-L-アラビノース合成経路はゴルジ体と細胞質基質に存在し(図1)、それぞれ異なる酵素により触媒されることがわかっているが、それぞれの経路の起源や生理的重要性はわかっていない。

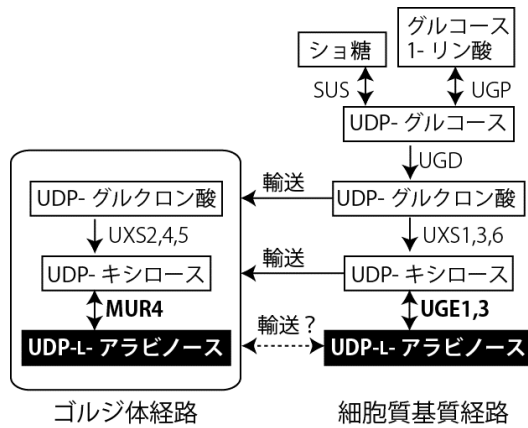


図1. 2つのL-アラビノース合成系

糖ヌクレオチドのエピマー化反応は、原核生物でも真核生物でも、糖を別の糖に変換する主要な反応である。UDP-グルコース 4-エピメラーゼ(UGE)は、UDP-グルコース(UDP-Glc)とUDP-ガラクトース(UDP-Gal)の相互変換を触媒し、バクテリアから哺乳類まで高度に保存されている。興味深いことに、UGEには、基質認識部位の構造が変化して他のUDP-糖にも作用できる分子種が存在する。哺乳類では、UGE活性に加えてUDP-N-アセチルグルコサミン(UDP-GlcNAc)とUDP-N-アセチルガラクトサミン(UDP-GalNAc)の相互変換活性も持つ酵素が有名である(Thoden et al., 2001, J. Biol. Chem.)。シロイヌナズナには、5つのUGEが存在するが、このうち2つ(UGE1とUGE3)は、UDP-グルコース 4-エピメラーゼに加えてUDP-キシロース 4-エピメラーゼ活性をもつ。このことから、UGE1とUGE3は細胞質基質でUDP-L-アラビノース合成酵素として機能することが、過去の研究で提案されている(Kotake et al., 2009, Biochem. J.)。

2. 研究の目的

種子植物のUGEは、シロイヌナズナのUGE1やUGE3と配列相同性が高いUGE Iファミリーと、UGE2やUGE4、UGE5と配列相同性が高いUGE IIファミリーに分類でき、前者はUDP-キシロース 4-エピメラーゼ活性をもち、後者はもっていないと予想される(図2)。そこで、モデリングを利用して、シロイヌナズナのUGE1とUGE2の間で立体構造を比較するとともに、両者の間でアミノ酸残基を交換した変異タンパク質を作成することで、UDP-キシロース 4-エピメラーゼ活性に重要なアミノ酸残基の特定を目指した。また、UDP-L-アラビノース合成経路については、MUR4と呼ばれる膜結合酵素に触媒されるゴルジ体経路が2003年に見つかっている(Burget et al., 2003, Plant Cell)。mur4変異体の性状から、ゴルジ体経路が主要経路、細胞質基質経路がマイナー経路だと考えられている。そこで、シロイヌナズナのuge1 uge3二重変異体、mur4変異体、mur4 uge1 uge3三重変異体を準備し、表現形質とL-アラビノースから、細胞質基質経路の生理的重要性を明らかにすることを目的とした。

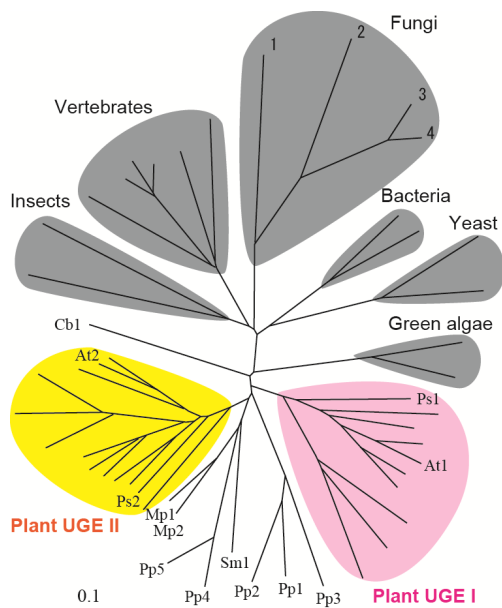


図2 . 植物の UGE I ファミリーと UGE II ファミリー

3 . 研究の方法

まず、既知の UGE の立体構造を利用して、シロイヌナズナの UGE1 と UGE2 の立体構造を予測し、基質ポケットやその他の部位の構造を比較した。平行して、UGE I ファミリーと UGE II ファミリーそれぞれについて、多数の配列からなるアラインメントを作成して比較し、両者で異なるアミノ酸残基が保存されている部位をリストアップした。

大腸菌で組換え AUGE1 と組換え AtUGE2 を作成し、これらの UDP-グルコース 4-エピメラーゼ活性と UDP-キシロース 4-エピメラーゼを調べた。続いて、立体構造予測とアラインメントの結果に基づいて、AUGE1 と AtUGE2 の間でアミノ酸残基を交換した変異タンパク質を作成し、これらの UDP-グルコース 4-エピメラーゼ活性と UDP-キシロース 4-エピメラーゼを調べた。シロイヌナズナの *uge1 uge3* 二重変異体 (オーストリア・ザルツブルグ大学・Seifert 博士から分譲いただいた、Rösti et al., 2007, Plant Cell) と *mur4* 変異体入手し、掛け合わせにより、*mur4 uge1 uge3* 三重変異体を作成した。これらの変異体を野生型シロイヌナズナとともに 5 週間育成し、部位別に細胞壁の可溶性画分とアルカリ画分を調製し、加水分解して HPLAEC-PAD にかけることで L-アラビノース含量を調べた。

4 . 研究成果

UGE1 と UGE2 は高い配列相同性を示すが、立体構造予測でも極めて酷似した構造が予測された。また興味深いことに、基質である UDP-糖が入る基質ポケットの内部を構成するアミノ酸残基には両者の間で違いがなく、他の構造が基質特異性に影響していることが示唆された(図3)。アラインメントの比較からは、UGE I ファミリーと UGE II ファミリーの間で異なるアミノ酸残基が保存されている部位が見つかり、このうち、ファミリー内での保存性が高く、かつ基質ポケット入り口または触媒部位全体の構造に影響しうる 7 組のアミノ酸残基を重要残基と判断した。



図3 . UGE1 (赤) と UGE2 (青) の立体構造の比較

野生型の UGE1 と UGE2 の組換えタンパク質を大腸菌で作成し、UDP-糖に対する基質特異性を調べたところ、UGE1 は高い UDP-キシロース 4 エピメラーゼをもち、UGE2 はほとんどこの活性をもたないことが確認された。続いて、UGE1 と UGE2 の間でアミノ酸残基を交換する変

異タンパク質を大腸菌で作成し、UDP-キシロース 4 エピメラーゼを調べたところ、7組のうち3組は、UGE1 の UDP-キシロース 4 エピメラーゼ活性を低下させ、UGE2 に UDP-キシロース 4 エピメラーゼ活性を付与させることが分かった。しかしながら、変異 UGE2 タンパク質で見られた UDP-キシロース 4 エピメラーゼ活性は、野生型の UGE1 の UDP-キシロース 4 エピメラーゼ活性 (UDP-グルコース 4 エピメラーゼ活性の 40%程度) と比べると微弱であった。これらの結果から、今回調べた3つの残基はいずれも UGE の UDP-キシロース 4 エピメラーゼ活性に重要であり、少なくともこれら3つの残基を持つことが、細胞質基質の UDP-L-アラビノース合成活性の獲得に必要であったことが示唆された。

uge1 uge3 二重変異体、*mur4* 変異体、*mur4 uge1 uge3* 三重変異体をそれぞれ5週齢まで育成したが、いずれも背丈や形態は野生型植物と同様であり、顕著な外見的な形質は見られなかった。ただし、三重変異体では、収穫される種子が少ない傾向が見られた。

葉、花茎、鞘に分け、それぞれの可溶性画分 (AGP などが多く含まれる) とアルカリ画分 (ペクチンやヘミセルロースが多く含まれる) の構成糖を調べたところ、大半の部位では *mur4* 変異による L-アラビノース含量の低下のみが見られ、*uge1 uge3* 二重変異の影響は見られなかった。一方で、鞘のアルカリ画分では、*mur4 uge1 uge3* 三重変異体で、他の3つの植物と比べて顕著な L-アラビノース含量の低下が見られた。

これらの結果から、シロイヌナズナの多くの部位・組織では、主に MUR4 が触媒するゴルジ体経路で UDP-L-アラビノースが合成されているが、鞘 (未熟種子を含む) などの限られた部位・組織では、UDP-L-アラビノース合成に細胞質基質型酵素の UGE1 や UGE3 が貢献していると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

Sato K, Hara K, Yoshimi K, Kitazawa K, Ito H, Tsumuraya Y, Kotake T. Yariv reactivity of type II arabinogalactan from larch wood. *Carbohydrate Research*, 査読有, Vol. 467, p8-p13 (2018).

Yoshimi Y, Yaguchi K, Kaneko S, Tsumuraya Y, Kotake T. Properties of fungal endo- β -1,3-galactanases and their synergistic action on arabinogalactan-proteins with an exo- β -1,3-galactanase. *Carbohydrate Research*, 査読有, Vol. 453-454, p26-p35 (2017).

小竹敬久, 植物のプロテオグリカン、*生物工学会誌「バイオメディア」*, 査読有, Vol. 96, p4 (2017).

Imaizumi C, Tomatsu H, Kitazawa K, Yoshimi Y, Shibano S, Kikuchi K, Yamaguchi M, Kaneko S, Tsumuraya Y, Kotake T. Heterologous expression and characterization of an Arabidopsis β -L-arabinopyranosidase and α -D-galactosidases acting on β -L-arabinopyranosyl residues. *Journal of Experimental Botany*, 査読有, Vol. 68, p4651-p4661 (2017).

円谷陽一, 小竹敬久, 植物のプロテオグリカン、アラビノガラクトタン-プロテインの構造と機能、*日本生化学会「生化学」*, 査読有, Vol. 89, p1-p10 (2017).

Yoshimi Y, Sugawara Y, Hori C, Igarashi K, Kaneko S, Tsumuraya Y, Kotake T. A protease/peptidase from culture medium of *Flammulina velutipes* that acts on arabinogalactan-protein. *Bioscience, Biotechnology, & Biochemistry*, 査読有, Vol. 81, p475-p481 (2017).

Kotake T, Yamanashi Y, Imaizumi C, Tsumuraya Y. Metabolism of L-arabinose in plants. *Journal of Plant Research*, 査読有, Vol. 129, p781-p792 (2016).

[学会発表] (計12件)

菊池馨、澤進一郎、円谷陽一、小竹敬久、AGP による細胞成長制御に関する未知因子の探索、日本植物学会第82回大会、2018年9月14日~16日、広島国際会議場 (広島県・広島市)

原克弥、澤田鉄兵、吉見圭永、円谷陽一、小竹敬久、シロイヌナズナ AGP4 単一分子種の糖鎖構造、日本植物学会第82回大会、2018年9月14日~16日、広島国際会議場 (広島県・広島市)

小竹敬久、原克弥、佐藤一樹、吉見圭永、北澤仁成、円谷陽一、カラマツのアラビノガラクトタンのヤリブ試薬反応性、日本植物学会第82回大会、2018年9月14日~16日、広島国際会議場 (広島県・広島市)

Toshihisa Kotake, Disorganization of tissues caused by type II AG degradation, 7th Cell Wall Conference, 2018年6月18日~22日、Asilomar Conference Grounds, (米国・カリフォルニア州アシロマ)

芝野誠二、八鍬頼誠、吉見圭永、出崎能丈、賀来華江、澁谷直人、中神弘史、円谷陽一、小竹敬久、植物プロテオグリカン AGP の病害応答反応における役割、日本植物学会第81回大会、2017年9月8日~10日、東京理科大学野田キャンパス (千葉県・野田市)

原克弥、中村俊輝、犬飼達也、浅野功平、円谷陽一、小竹敬久、シロイヌナズナの AGP1 と AGP4 の遺伝子発現と糖鎖構造の解析、日本植物学会第81回大会、2017年9月8

日～10日、東京理科大学野田キャンパス（千葉県・野田市）
吉見圭永、吉村真美、八鍬頼誠、芝野誠二、円谷陽一、小竹敬久、真菌由来エキソ-β-1,3-ガラクトナーゼの発現による植物のII型アラビノガラクトサンの分解、日本植物学会第81回大会、2017年9月8日～10日、東京理科大学野田キャンパス（千葉県・野田市）

Seiji Shibano, Raijo Yakuwa, Yoshihisa Yoshimi, Yoshitake Desaki, Hanae Kaku, Naoto Shibuya, Horofumi Nakagami, Yoichi Tsumuraya, Toshihisa Kotake, Role of arabinogalactan-protein in plant disease response, 6th International Conference on Plant Cell Wall Biology, 2017年7月16-20日、大連国際会議場（中国・遼寧省大連市）

Yoshihisa Yoshimi, Mami Yoshimuraa, Raijo Yakuwa, Seiji Shibano, Yoichi Tsumuraya, Toshihisa Kotake, In vivo degradation of type-II arabinogalactan by expression of fungal exo-beta-1,3-galactanase 6th International Conference on Plant Cell Wall Biology, 2017年7月16-20日、大連国際会議場（中国・遼寧省大連市）

山梨優貴子、佐分将太、田島範明、吉見圭永、Mortimer C. Jenny、Yu Xiaolan、Dupree Paul、小竹敬久、円谷陽一、KONJAC タンパク質による GDP-マンノース合成の活性化、日本植物学会第80回大会、2016年9月16日～19日、沖縄コンベンションセンター（沖縄県・宜野湾市）

小竹敬久、今泉知枝美、戸松遥美、北澤仁成、吉見圭永、芝野誠二、金子哲、Dupree Paul、円谷陽一 AGP 糖鎖に作用する GH27 ファミリーの β-L-アラビノピラノシダーゼ、日本植物学会第80回大会、2016年9月16日～19日、沖縄コンベンションセンター（沖縄県・宜野湾市）

Toshihisa Kotake, Shota Sawake, Noriaki Tajima, Jenny Mortimer, Lao Jeemeng, Toshiki Ishikawa, Xiaolan Yu, Yukiko Yamanashi, Yoshihisa Yoshimi, Maki Kawai-Yamada, Paul Dupree, Yoichi Tsumuraya, KONJAC proteins affect glucomannan accumulation through the stimulation of GDP-mannose synthesis, Cell Wall Meeting, 2016年7月12-17日、Minoa Palace（ギリシャ・クレタ島ハニア市）

〔図書〕（計0件）

なし

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

なし

取得状況（計0件）

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.saitama-u.ac.jp/~seitaibusshitsu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。