

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18780133  
 研究課題名 (和文) アプタマーを用いた網羅的組織化学法によるヘミセルロース形成機構の解明  
 研究課題名 (英文) Hemicellulose biosynthesis related enzyme localization by aptamer-histochemistry

研究代表者  
 粟野 達也 (AWANO TATSUYA)  
 京都大学・大学院農学研究科・助教  
 研究者番号：40324660

## 研究成果の概要：

ポプラ木部組織よりタンパク質を抽出し、ヘミセルロースまたはセルロースを不動化したカラムを用いたアフィニティー精製によりそれぞれの糖に結合するタンパク質を得た。これらを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、該当タンパク質に吸着する DNA アプタマーを SELEX 法により取得した。しかしながら、多くのタンパク質と交差反応するため、組織化学用プローブとして利用するには至らなかった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	300,000	3,800,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：林学・林産科学・木質工学

キーワード：アプタマー、ヘミセルロース、木質バイオマス、プロテオーム、細胞壁

## 1. 研究開始当初の背景

一次壁に分布するヘミセルロースのキシログルカンに関しては、その生合成、細胞壁への輸送、細胞壁中での修飾の過程についてこれまでに数多くの研究が報告されており、キシログルカンは細胞の伸長や細胞壁のゆるみを制御していると考えられている。

一方、主に二次壁に分布するヘミセルロースであるキシランに関しては、木材細胞壁の主要構成成分であるヘミセルロースの一つであり、セルロースに次ぐバイオマス資源として注目されるにもかかわらず、その生合成、

細胞壁への輸送、細胞壁中での修飾の過程、さらに機能についていまだ明らかではない。

近年、アラビドプシスやポプラなどのモデル植物において、ゲノム解析や EST 解析が進み、これらの植物においてキシランなどの二次壁ヘミセルロースに作用すると思われる酵素が多数存在することが明らかになった。それらには糖転移酵素 (グリコシルトランスフェラーゼ)、糖加水分解酵素 (グリコシルヒドロラーゼ)、エステル化酵素 (エステラーゼ) などが含まれる。これらのうち、糖加水分解酵素の多くは糖質結合モジュール

(Carbohydrate Binding Module: CBM) を含み、基質であるヘミセルロースに特異的に結合できると推定されている。また、ウメオ植物科学センター（スウェーデン）との共同研究により、ポプラ分化中木部においてキシラナーゼ遺伝子が発現していることを RT-PCR により確認した。これらのことから、キシラナーゼが細胞壁形成過程において何らかの役割を果たしていることが考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、キシラン、セルロースに作用する酵素のうち、これらに特異的に結合できるものをアフィニティークロマトグラフィーを用いて単離し、各酵素の発現を組織化学的手法を用いて明らかにすることを目的とする。従来、このような目的に抗体が用いられてきたが、抗体の作製には（1）抗体取得の可否は免疫動物に依存する、（2）特異性の明確なモノクローナル抗体の作製と維持には多額の費用と時間が必要である、などの問題があった。本研究では、抗体と同様に標的分子を特異的に認識できるアプタマー（aptamer）の利用を試みた。アプタマーとは、人工的に取得された親和性分子であり、抗体の代わりに種々の実験に用いることができる。これまでに、低分子化合物からタンパク質に至る様々な標的分子に対して、高い親和性・特異性で結合するアプタマーが取得されている。アプタマーという用語は、「適合」を意味するラテン語 *aptus* に接尾語 *-mer* をつけたものである。アプタマーの素材は DNA、RNA、ペプチドなどの生体高分子が用いられるが、本研究では PCR により簡便に増幅できることから、DNA アプタマーを用いた。

アプタマーを用いることにより、多種の酵素に対する分子プローブを迅速に作製する系を確立する。これらを利用したアプタマー組織化学（Aptamer histochemistry: AHC）により、キシランおよびセルロースに結合するタンパク質の分化中木部組織での局在を明らかにすることを目的とした。また、各酵素のアミノ酸配列から mRNA を特定し、*in situ hybridization* (ISH) 法により、転写レベルでの発現も明らかにする。

## 3. 研究の方法

ポプラ木部組織をホモジナイズし、バッファー A (25mM アスコルビン酸、2mM EDTA、1% PVPP、0.5mM PMSF、1mM DTT を含む 50mM 酢酸バッファー) で抽出し、可溶性タンパク質画分とした。残さをバッファー B (250mM 塩化ナトリウムを含むバッファー A) で抽出し、細胞壁イオン結合性タンパク質画分とした。あるいは、バッファー C (50mM アスコルビン酸、5mM EDTA、20mM DETC、10mM 四ホウ酸ナトリウム、

1mM DTT を含む 50mM 酢酸バッファー) で抽出し、可溶性タンパク質画分とした。残さをバッファー D (250mM 塩化ナトリウムを含むバッファー C) で抽出し、細胞壁イオン結合性タンパク質画分とした。

キシランまたはセルロースを固定化したカラムを調製し、これに上記抽出タンパク質を添加し、タンパク質を結合させた。カラムを十分に洗浄した後、糖に結合したタンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。分離後のゲルを PVDF 膜に転写（ブロッティング）した。

アプタマーを次に示す SELEX 法により調製した。（1）60 塩基のランダム配列を含むオリゴ DNA ライブラリ（初期オリゴ DNA ライブラリ）を調製し、上記 PVDF 膜にインキュベートした。（2）PVDF 膜を染色した後、標的とするタンパク質バンドを切り出した。（3）吸着したオリゴ DNA を含む PVDF 膜を鋳型とし、オリゴ DNA 特異的プライマーを用いて PCR 増幅した。この PCR 産物を用いて（1）～（3）を 4～10 回繰り返し、標的タンパク質に特異的に吸着すると思われるオリゴ DNA を取得した。

上記方法で得られたオリゴ DNA を FITC 標識オリゴ DNA 特異的プライマーを用いて非対称 PCR により増幅し、PCR 産物を FITC 標識オリゴ DNA プローブとした。

プローブの特異性を確認するため、アプタマー・ブロッティングを行った。これは通常抗体を用いて標的タンパク質を検出するウェスタン・ブロッティングに相当するものである。すなわち、標的タンパク質を含む PVDF 膜に FITC 標識オリゴ DNA プローブをインキュベートし、落射照明カメラをもちいて蛍光像を記録した。

また、FITC 標識オリゴ DNA プローブをポプラ分化中木部組織切片にインキュベートし、落射型蛍光顕微鏡で観察した。

## 4. 研究成果

ポプラ木部組織よりタンパク質を抽出する方法を検討した。キシラナーゼの抽出バッファーとして報告されている酢酸バッファーをベースに、細胞壁性タンパク質のプロテオミクス研究で用いられている調合を参考に抽出バッファー A～D を調製し、可溶性タンパク質および細胞壁イオン結合性タンパク質を抽出した。その結果、バッファー A および B を用いた場合よりもバッファー C および D を用いた場合の方がタンパク質の収率が高かった（図 1）。

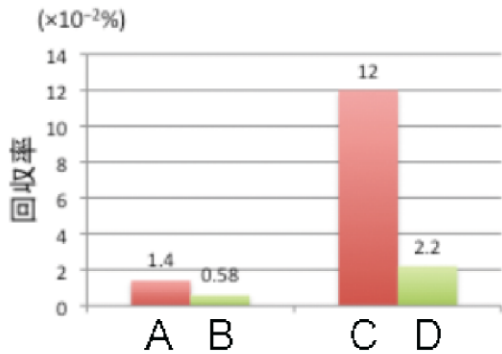


図1 ポプラ分化中木部からのタンパク質抽出

- A: バッファーA (可溶性画分)
- B: バッファーB (細胞壁イオン結合性画分)
- C: バッファーC (可溶性画分)
- D: バッファーD (細胞壁イオン結合性画分)

キシランまたはセルロースカラムを用いたアフィニティー精製によりそれぞれの糖に結合するタンパク質を得た。

得られたタンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離すると、複数のタンパク質が含まれることが明らかとなった (図1)。キシランに結合するタンパク質の量は極めて少なかった。

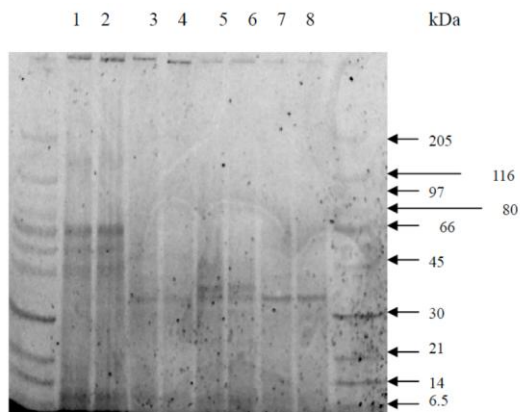


図2 SDS-PAGE による糖結合タンパク質の分離  
 レーン 1,2 : 細胞壁性タンパク質 (W)  
 レーン 3,4 : 可溶性タンパク質 (S)  
 レーン 5,6 : W 由来のセルロース結合タンパク質  
 レーン 7,8 : S 由来のセルロース結合タンパク質

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のタンパク質をエレクトロブロッティングにより PVDF 膜に転写した。PVDF 膜上のタンパク質バンドに初期オリゴ DNA ライブラリをインキュベートし、一本鎖 DNA を吸着させた。洗浄の後、CBB 染色または Sypro Orange 染色により該当タンパク質のバンドを可視化し、そのバンドを含む PVDF 膜を切り出した。PVDF 膜を PCR チューブに入れ、特異的プライマーを用いて PCR 増幅した後、非対称 PCR を行い、一本鎖 DNA を増幅した。

PVDF 膜への吸着、PCR 増幅を 4~10 回繰り返して、該当タンパク質に吸着するアプタマーを得た。FITC オリゴ DNA プローブを標的タンパク質を含む PVDF 膜に反応させたところ、多くの場合、複数のタンパク質と交差反応することが確認された (図2)。

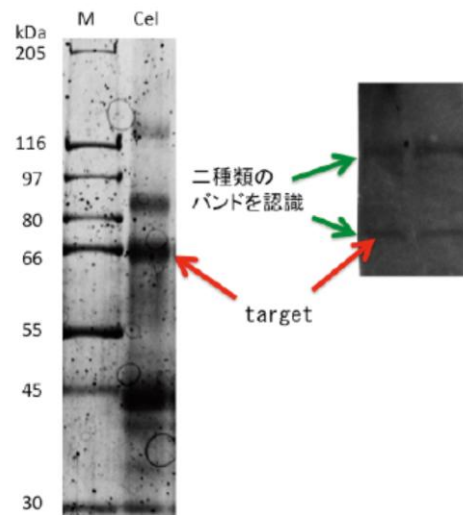


図3 ブロッティングによるアプタマーの特異性確認  
 左図: 赤矢印で示すバンドをターゲットとしてアプタマーを調製した。  
 右図: 得られたアプタマーをブロッティングしたところ、2種類のバンドを認識することが判明した。

上記のようにして調製した FITC 標識オリゴ DNA プローブをポプラ分化中木部組織切片に反応させたところ、標識はほとんど観察されなかった。

以上のことから、キシランおよびセルロース結合タンパク質について特異的に結合する DNA アプタマーを取得したが、その特異性には問題を残した。また、組織切片中のタンパク質には標識が認められなかったが、組織の固定条件や包埋樹脂が DNA アプタマーの反応に及ぼす影響など、更なる検討が必要である。

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)

該当なし

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
栗野 達也 (AWANO TATSUYA)  
京都大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：40324660  
(2)研究分担者  
該当なし  
(3)連携研究者  
該当なし