

平成21年5月14日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580235

研究課題名（和文）蛍光CBMを用いた紅藻アマノリ細胞壁の構造解析

研究課題名（英文）Structural analysis of the cell wall of a red alga, *Bangia atropurpurea* by using a fluorescent CBM

研究代表者 荒木 利芳 (Araki Toshiyoshi)

三重大学・大学院生物資源学研究科・教授

研究者番号：40091368

## 研究成果の概要：

海洋細菌 *Vibrio* sp. MA-138 のゲノム DNA 由来の組換え  $\beta$ -1,4-マンナン結合タンパク質 (CBM) を蛍光標識し、これをプローブとして、アマノリと同じ科に属するウシケノリから単離したプロトプラストを用いて、細胞壁が形成される様子を観察した。その結果、蛍光 CBM は 12 時間培養後のプロトプラストで結合が観察され始め、60 時間培養でプロトプラスト全体が  $\beta$ -1,4-マンナンで覆われることが判明した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：ウシケノリ、プロトプラスト、 $\beta$ -1,4-マンナーゼ、CBM、細胞壁、GFP、 $\beta$ -1,3-キシラーゼ、アガラーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

紅藻アマノリの細胞壁は3種類のユニークな多糖 ( $\beta$ -1,4-マンナン、 $\beta$ -1,3-キシラン、ポルフィラン) で構成されている。筆者らは海域から分離した、これら多糖分解酵素産生細菌の産生する酵素の酵素学的研究ならびに分子生物学的研究を行っている。これまで3種類の細菌のゲノム DNA から上記酵素遺伝子をクローニングし、塩基配列を解析するとともに、大腸菌で発現させ各組換え酵素を得た。データベースに基づくホモロジー検索を行ったところいずれの酵素も触媒モジュー

ールに加えて、多糖に結合する糖質結合モジュール (CBM) の存在が示唆された。

よって、各 CBM を大腸菌で発現させ、得られた組換え CBM の多糖に対する結合試験を行ったところ、*Alcaligenes* sp. XY-234 由来の  $\beta$ -1,3-キシラーゼ-A (TxyA) に存在する CBM は不溶性の  $\beta$ -1,3-キシランに特異的に結合した。*Vibrio* sp. MA-138 由来の  $\beta$ -1,4-マンナーゼ-C (ManC) に存在する CBM とアガラーゼ-D に存在する CBM はそれぞれ可溶性  $\beta$ -1,4-マンナンとアガロースに結合した。また、著者らはこれまで単離菌から調製した3種類の酵素

を用いて、スサビノリやウシケノリからプロトプラストを大量に単離する方法を確立するとともに、これらプロトプラストがもとの葉体に再生することを確認した。

このような背景のもとに著者らはこれら CBM に GFP 蛍光タンパク質を融合させた蛍光 GFP-CBM を用いることにより、ウシケノリプロトプラストの細胞壁形成の様子を観察することができるのではないかと考え、本実験を行った。

## 2. 研究の目的

我が国で広く養殖されている重要な産業用海藻であるアマノリの細胞壁は  $\beta$ -1,4-マンナン、 $\beta$ -1,3-キシラン、ポルフィランというユニークな多糖で構成されている。しかしながら、本海藻細胞壁の構造に関する知見は乏しいのが現状である。筆者はこれら3種類の多糖分解酵素の遺伝子をクローニングし、それらの塩基配列を解析した結果、いずれの酵素も多糖結合能を有する領域 (CBM) を含んでいた。よって、本研究では蛍光標識したこれら CBM をプローブとして、アマノリと同じ科に属するウシケノリから単離したプロトプラストを用いて、細胞壁が構築される様子を観察し、細胞壁の構造に関する知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞壁多糖分解酵素の調製 {担当: 代表者・研究協力者 (大学院生 2 名)}

マンナーゼ産生細菌 *Vibrio* sp. MA-138、キシランナーゼ産生細菌 *Alcaligenes* sp. XY-234 またはアガラーゼ産生細菌 *Vibrio* sp. PO-303 を、0.5 % コンニャク粉末または 0.3 % キシラン、0.3 % 寒天を含むペプトン培地で振とう培養し、遠心分離で得られた培養上澄液を硫酸塩析して各酵素液を調製する。

(2) ウシケノリ葉体からのプロトプラストの単離と培養 {担当: 代表者、研究協力者 (大学院生 1 名)}

ウシケノリ葉体をパパイニン処理後、細胞壁分解酵素液 ( $\beta$ -1,4-マンナーゼ、 $\beta$ -1,3-キシランナーゼ、アガラーゼの各 5.0 unit) を作用させ、プロトプラストを調製する。生じたプロトプラストは 17 °C、照度 1000 lux の蛍光灯下で、明期 9 時間/暗期 15 時間の光周期で静置培養し、数日後、仮根を生じ始めたとき、照明を 4000 lux にして、振とう培養する。

(3) 3 種類の蛍光 CBM の構築 {担当: 代表者・分担者・研究協力者 (大学院生 1 名)}

$\beta$ -1,4-マンナーゼ-C (ManC) ならびにア

ガラーゼ-D (AgaD) に存在する CBM をコードする遺伝子を蛍光色素 GFP 発現ベクター pRSET/GFP の、また  $\beta$ -1,3-キシランナーゼ CBM (TxyCBM) 遺伝子を pRSET/BFP の制限酵素サイトに組み込み、宿主大腸菌 BL21 (DE3) pLysS を形質転換して、各蛍光 CBM タンパク質 (ManCBM/GFP、AgaCBM/GFP、TxyCBM/BFP) を発現させる。発現した各 CBM は Ni-アガロースレジンで精製し、蛍光 CBM を構築する。

(4) 蛍光 CBM の基質結合試験 {担当: 分担者}

ManCBM/GFP、AgaCBM/GFP、TxyCBM/BFP をそれぞれ、 $\beta$ -1,4-マンナン、アガロース、 $\beta$ -1,3-キシランに作用させ、各 CBM の基質に対する結合状態を蛍光顕微鏡で観察する。

(5) 蛍光 CBM のウシケノリ細胞壁結合試験 {担当: 代表者、研究協力者 (大学院生 1 名)}

ウシケノリプロトプラストを培養し、経時的に ManCBM/GFP を作用させて、細胞壁に結合する時期を観察し、細胞壁の形成過程を解明する。

## 4. 研究成果

ウシケノリプロトプラストの細胞壁再生を観察するために、2 種類の蛍光 CBM を構築した (Fig. 1)。 $\beta$ -1,4-マンナーゼ-C (ManC) に存在する CBM をコードする遺伝子を蛍光色素 GFP 発現ベクター pRSET/GFP の、また  $\beta$ -1,3-キシランナーゼ CBM (TxyCBM) 遺伝子を pRSET/BFP の制限酵素サイトに組み込み、宿主大腸菌 BL21 (DE3) pLysS を形質転換して、各蛍光 CBM タンパク質 (ManCBM/GFP、TxyCBM/BFP) を発現させ、得られた各蛍光 CBM を Ni-アガロースレジンで精製した。構築された 2 種類の蛍光 CBM は SDS-PAGE で均一に精製されていることが確認された。

これら蛍光 CBM の基質結合試験を行った。ManCBM/GFP と TxyCBM/BFP をそれぞれグリコール  $\beta$ -1,4-マンナンと  $\beta$ -1,3-キシランに作用させ、蛍光顕微鏡で観察した結果、両蛍光 CBM もそれぞれの基質に結合することが確認された (Fig. 3)。また、24 時間培養したウシケノリプロトプラストと結合実験を行ったところ、TxyCBM/BFP の結合は観察されなかったが、ManCBM/GFP はプロトプラストの外周に結合することが確認された。

しかしながら、AgaDCBM の GFP 融合体はアガロースに対する結合力が非常に弱かった。また、TxyA 蛍光 CBM はウシケノリ細胞壁に対する結合力が非常に弱かった。よって、本実験では ManC 由来蛍光 CBM (GFP-CBM27) を用いて、ウシケノリプロトプラスト表面における  $\beta$ -1,4-マンナン形成を蛍光顕微鏡で観察した。まず、ウシケノ

リ葉体をパパイニンで前処理後、3種類のアマノリ細胞壁多糖分解酵素 ( $\beta$ -1,4-マンナーゼ、 $\beta$ -1,3-キシラーゼ、アガラーゼ) で処理し、プロトプラストを単離した (Fig. 2)。これらプロトプラストは60時間までは試験管で培養したものを、それ以後はガラスカバーに付着したものを用了。その結果、GFP-CBM27は12時間培養後のプロトプラストで結合が観察され始めた。60時間培養でプロトプラスト全体が $\beta$ -1,4-マンナンで覆われることが判明した (Fig. 4)。また、12, 24, 36, 48 および60時間ではそれぞれ3, 12, 17, 29, 25% のプロトプラストの細胞表面にGFP-CBMの結合が観察された (Fig. 5)。以上の結果から、ウシケノリプロトプラストは12時間後から $\beta$ -1,4-マンナンを中心とした細胞壁を形成し始めることが明らかになった。

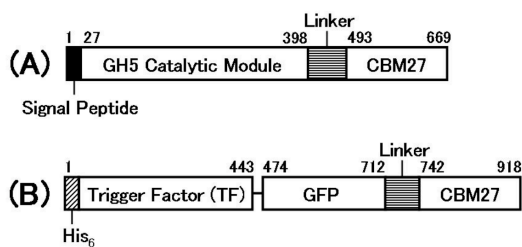


Fig.1. ManCの触媒モジュールとCBM及びGFP-CBM融合タンパク質

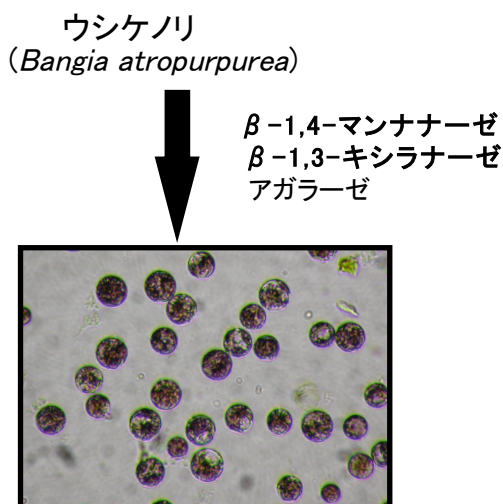


Fig.2. ウシケノリ葉体からのプロトプラストの単離

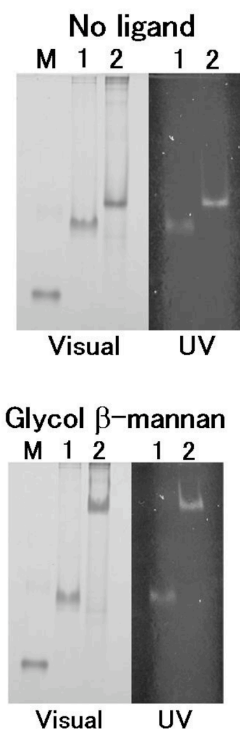


Fig.3. GFP-CBMのnative PAGE  
M: bovine serum albumin, 1: GFP, 2: GFP-CBM.

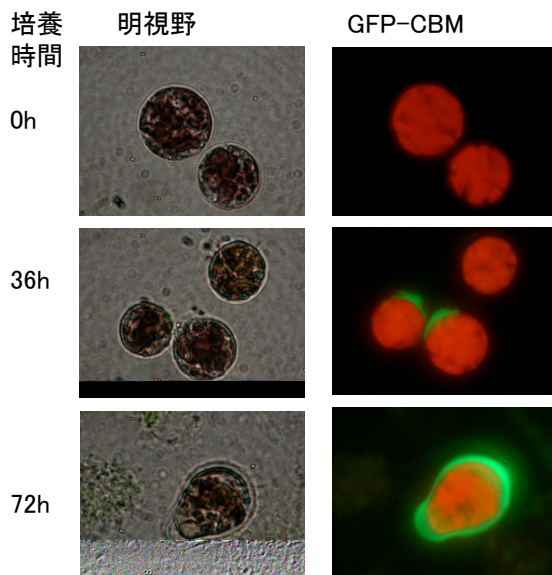


Fig.4. GFP-CBMを用いたウシケノリ細胞壁再生の観察

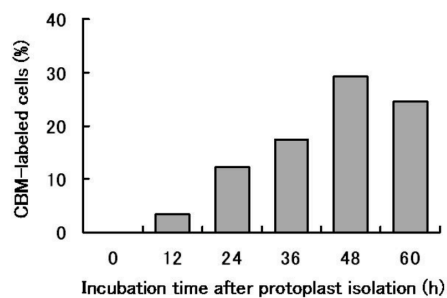


Fig.5. GFP-CBM 結合プロトプラストの割合の経時変化

#### 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 3 件)

- 1) Teruwo Morita, Akira Kurashima, Miyuki, Maegawa, and Toshiyoshi Araki (2009) Artificial sporeling and mesocosm tank culture of *Bangia atropurpurea* (RHODOPHYTA) for elucidate the desiccation and UV tolerance, *Aquaculture Sci.*, 57, 1-8.
- 2) Megumi TANAKA, Yoshiaki UMEMOTO, Hidenori OKAMURA, Daiichirou NAKANO, Yutaka TAMARU, and Toshiyoshi ARAKI (2009) Cloning and Characterization of a  $\beta$ -1,4-Mannanase 5C Possessing a Family 27 Carbohydrate-Binding Module from a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. Strain MA-138, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 109-116.

- 3) Yoshiaki Umemoto · Toshiyoshi Araki (2009) Cell Wall Regeneration in *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta) Protoplasts Observed Using a Mannan-Specific Carbohydrate-Binding Module. *Marine Biotechnology*. (in Press)

[学会発表] (計 2 件)

- 1) 梅本善明、荒木利芳、海洋細菌 *Vibrio* sp. XY-214 株由来キシロースイソメラーゼ遺伝子の解析 (2009. 3. 28) 平成21年度日本水産学会春季大会、東京海洋大学、日本水産学会
  - 2) Yoshiaki Umemoto and Toshiyoshi Araki Observation of the Cell Wall Regeneration in *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta) Protoplasts Using Mannan-Specific Carbohydrate-Binding Module (2008.10.22) 5<sup>th</sup> World Fisheries Congress, Pacifico Yokohama、日本水産学会
- #### 6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
荒木 利芳 (Araki Toshiyoshi)  
三重大学・大学院生物資源学研究科・教授  
研究者番号：40091368
  - (2) 研究分担者  
荻田 修一 (Karita Shuichi)  
三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授  
研究者番号：90233999
  - (3) 連携研究者