

機関番号：18001

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20780129

研究課題名 (和文) 植物細胞壁糖鎖生合成メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Analysis of plant cell wall biosynthesis

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

研究成果の概要 (和文) : 植物細胞壁糖鎖は紙やパルプの原料として利用され、また食物繊維源として我々の健康維持に貢献するなど、人類の生活に欠かせないものである。近年では、バイオエタノールの原料としても注目されている。しかし、植物がどのように細胞壁多糖を合成しているのか、その仕組みについては未だ不明な点が多い。そこで、本課題では植物の細胞壁糖鎖の生合成メカニズムを明らかにするため、細胞壁糖鎖合成に関連する酵素、UDP-アラビノピラノースムターゼの特性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 which is the enzyme involved in the cell wall biosynthesis in order to clear the mechanism of plant cell wall biosynthesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：セルロース、細胞壁糖鎖、生合成、糖鎖、酵素、植物

## 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化に伴い、大気中の二酸化炭素を

減少させることが地球規模の課題となっている。その中で大気中の二酸化炭素を効率よ

く循環させる策が有効であるとされ、植物から作られるエネルギーの開発研究が盛んに行われている。植物由来のバイオエタノールにはサトウキビに代表されるように砂糖を原料とするエタノール、大豆やとうもろこしなどの種子に含まれるでんぷんを原料とするエタノール、そしてセルロースなど細胞壁糖鎖から造られるセルロース系エタノールがある。現在バイオエタノールの原料としては、大量に調製できること、食糧と競合しないこと、そして廃棄されている資源を利用するということから、トウモロコシの茎や葉（コーンストバー）、サトウキビの搾りかす（バガス）や稲わらが注目されている。これらはセルロースなど細胞壁糖鎖に富んでおり、セルロース系エタノールの原料として非常に有用である。植物細胞壁糖鎖はセルロース、ヘミセルロース及びペクチンから成り、一般的には細胞壁糖鎖の～40%をセルロース、～30%をヘミセルロースが占める。バイオエタノールはこれら糖鎖の糖化、発酵等の過程を経て製造されることから、バイオエタノール生産効率は、細胞壁中のセルロースやヘミセルロースの構造、蓄積量により左右されると言える。それゆえ植物細胞壁糖鎖の構造や組成を改変し、より糖化し易いものへと改変することは、植物の燃料エネルギーへの変換効率を増加させることにつながるものと期待できる。そのためには、植物内で細胞壁糖鎖がどのように合成されるのか、そのメカニズムを知る必要がある。

## 2. 研究の目的

植物の細胞壁糖鎖はヌクレオチド糖を基質とし、糖転移酵素の触媒により合成される。しかしながら、その生合成メカニズムについては、最近になっていくつかの糖転移酵素が

同定されたものの、未だ不明な点が多い。近年、我々は糖鎖合成に関わる酵素、UDP-アラビノピラノースムターゼ（UDP-arabinopyranose mutase; 以下 UAM と略す UAM）の存在を植物で初めて明らかにした(Konishi et al., Glycobiology 2007)。UAM は UDP-アラビノースのフラノース型（5員環）とピラノース型（6員環）の変換を行う異性化酵素である（図1）。

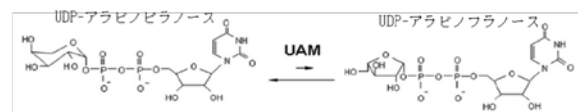


図1. UAMによるUDP-アラビノピラノースとUDP-アラビノフラノースの相互変換

植物細胞壁中にアラビノース残基を含む糖鎖にはアラビナンなどがあり、UAM は植物内で UDP-アラビノピラノースから UDP-アラビノフラノースへの変換を行った後、アラビノース転移酵素にこの糖を直接供給していると推察される。また、UAM は UDP-アラビノース以外にも UDP-グルコース、UDP-ガラクトース、そして UDP-キシロースにも結合するが、これらに対して異性化酵素活性は見られない。これらのヌクレオチド糖に対しては異性化反応することなしで、これらを基質として合成されるグルカン、ガラクトタン、キシランなどの糖鎖合成酵素に基質を直接供給している可能性がある。それゆえ、この UAM の細胞壁糖鎖生合成への作用を解明することは、細胞壁糖鎖全体の生合成機構を解明することにつながり、その結果、植物の細胞壁糖鎖生合成の制御が可能になると考えられる。そこで、本研究では植物細胞壁の生合成機構を解明することを目的として、UAM の植物細胞壁合成に果たす役割について検討する。

### 3. 研究の方法

UAM はイネには3つ、アラビドプシスには5つ、そしてクラミドモナスには1つのホモログが存在し、高等植物から微細藻類まで広く植物間に分布している酵素である。

UAM は単体では~40 KDa の酵素であるが、植物内では18量体を形成するなど、アイズタイム同士で非常に大きな複合体を形成している。本課題では、ホモログが1つ存在するクラミドモナスのUAMについて検討することとした。ホモログが1つのみということは、複合体を形成してもホモ複合体であり、UAMの酵素化学的解析を行うのにあたり有利であると考えたからである。

#### ①クラミドモナス UAM の精製

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

(HPAEC)で検出し、行った。1ユニットは1分間に1 μmolのUDP-アラビノースを生成する酵素量と定義した。

#### ②UAM の酵素諸科学的性質の検討

精製したUAMの最適温度、最適pH、カイネティクスなど、酵素の諸科学的性質を求めた。分子量測定はゲルろ過クロマトグラフィーを用い求めた。

### 4. 研究成果

#### ①クラミドモナス UAM の精製

クラミドモナスのUAMを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することにより、クラミドモナスUAMを最終的に92.3倍にまで精製することに成功した(表1、図2)。精製画分をSDS-PAGEに供し、UAMが単一に精製出来ていることを確認した(図3、レーン4)。

表1. クラミドモナス UAM 精製表

	総タンパク質量 (mg)	活性 (nmol/25 μl)	総活性 (μmol)	比活性 (μmol/mg/min)	精製倍率	収率 (%)
細胞質画分	169.3 (5.84 mg/mL)	2.51	72.8	0.09	1.00	100
硫酸アンモニウム画分	42.9 (2.41 mg/mL)	3.13	55.7	0.26	2.89	76.5
疎水クロマトグラフィー	0.313 (1.56 mg/mL)	0.49	1.57	1.00	11.1	2.16
ゲルろ過クロマトグラフィー	0.013 (0.018 mg/mL)	0.74	0.54	8.31	92.3	0.74

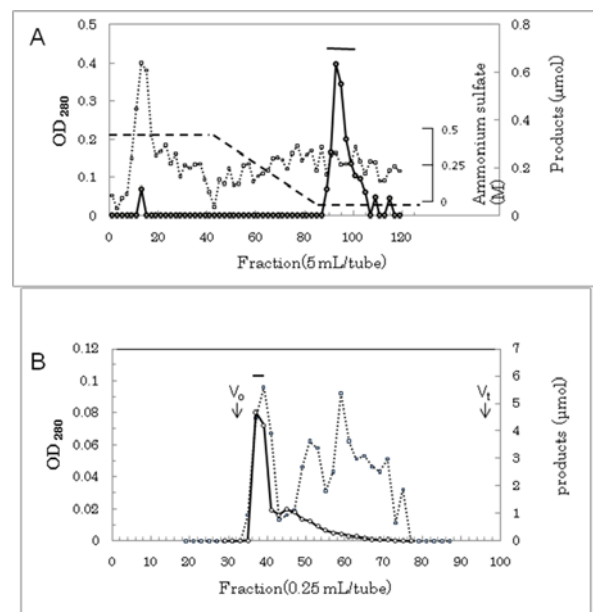


図2. UAM 精製クロマトグラム (A) 疎水クロマトグラム (B) ゲルろ過クロマトグラム

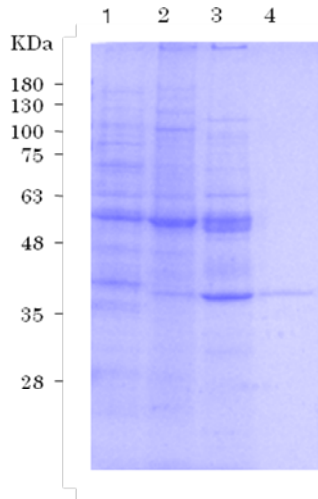


図3. 各画分の SDS-PAGE  
 レーン1；細胞質画分、レーン2；硫酸沈殿画分、レーン3；疎水クロマトグラフィー活性画分、レーン4；ゲルろ過クロマトグラフィー画分

精製 UAM の科学的性質について検討した結果、至適温度、至適 pH は、それぞれ 60°C、pH 6.0 であった。これは先に報告されたイネ UAM と同様であることがわかった。さらに、酵素反応が UDP-アラビノピラノース生成に傾いていることや、酵素カインेटィクスにおいてもクラミドモナス UAM はイネ UAM と同様の性質をもつことが明らかとなった。また、分子量測定の結果、8量体の複合体を形成していることが明らかとなった。クラミドモナスは UAM のアイソザイムが1つしか存在しないことから、この複合体はホモで6量体を形成していることが推察される。このことより、イネ UAM は18量体の複合体を形成しており、イネには3つの UAM が存在することから、1つの UAM が6量体を形成し、それが3つ合わさった複合体であることが予想された。クラミドモナス UAM がホモ複合体でも活性を示したことより、UAM はホモの複合体でも活性を示すが、イネの場合、なぜ3つの UAM によるヘテロ複合体を形成するのかは不明であり、興味を持たれるところである。

本研究の成果は細胞壁生成における初めての知見となる。今回は UAM の性質が微細藻類でも陸上の植物でも同様の性質を持つことがわかった。今後、細胞壁生成のメカニズム解明のため、UAM 遺伝子の過剰発現体の解析など、UAM の植物における機能についてさらなる知見を深める予定である。

## 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)

[学会発表] (計4件)

①辻真喜 (琉球大)、石井忠 (森林総研)、田幸正邦 (琉球大)、小西照子 (琉球大) : UDP-アラビノピラノースムターゼのリン酸化、日本植物生理学会大会、東北大学、2011年3月21日

② Yasushi Azama (University of the Ryukyus), Tadashi Ishii (FFPRI), Masakuni Tako (University of the Ryukyus), and Teruko Konishi (University of the Ryukyus) : Characterization of Chlamydomonas UDP-arabinopyranose mutase, 12<sup>th</sup> Cell Wall Meeting, Porto (Portugal) July 2010. 25-30

③ 安座間康 (琉球大)、石井忠 (森林総研)、田幸正邦 (琉球大)、小西照子 (琉球大) : UDP-アラビノピラノースムターゼの機能解析、日本植物生理学会大会、熊本大学、2010年3月20日

④ 安座間康 (琉球大)、田幸正邦 (琉球大)、小西照子 (琉球大) : 月桃 (*Alpinia serumbet*) 果実細胞壁多糖の構造解析、日本応用糖質科学会平成20年度大会、琉球大学、2008年9月18日

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