

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580380

研究課題名（和文） β -グルカンをバイオマス資源として有効利用するための基盤研究研究課題名（英文） Study of barley P23k to utilize β -glucan as a biomass resource

研究代表者

木藤 新一郎 (KIDOU SHINICHIRO)

名古屋市立大学・大学院システム自然科学研究科・教授

研究者番号：60271847

研究成果の概要（和文）：

本研究では、オオムギ P23k タンパク質が β -グルカン合成に関わることを証明するため、イネに P23k 遺伝子を導入して β -グルカン合成に及ぼす影響を調べると共に、P23k 相互作用因子の単離同定を試みた。その結果、P23k の発現に伴って僅かではあるがイネの種子で β -グルカン含量が上昇することを確認すると共に、P23k 相互作用因子の候補として糖代謝に関わる β -アミラーゼを単離同定するに至った。

研究成果の概要（英文）：

P23k is a barley protein that is highly expressed in β -glucan-rich tissues. To elucidate the relationship between P23k and β -glucan synthesis, a gain of function analysis of P23k were performed. The β -glucan content in P23k-expressing transgenic rice was increased slightly. In addition, β -amylase was isolated as a candidate of P23k interacting protein by GST pull-down assay. These results suggest that P23k is involved in the synthesis of β -glucan in barley.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：バイオマス

1. 研究開始当初の背景

(1) β -グルカン [正式名称：(1,3;1,4)- β -D-グルカン] は、植物の細胞壁を構成するヘミセルロースの一種で、イネ科作物に特異的に存在する。特にオオムギの種子に大量に含まれ、穀粒の硬軟質性を左右する主要成分として知られている。この β -グルカンは、

セルロースやデンプンと同様にグルコースの重合体であり、且つ、セルロースよりも溶解性に優れているという特徴を有している。従って、同じヘミセルロースでもイネで主成分となっているアラビノキシランと比べてバイオマス資源としての利用価値が非常に高い。今後は、 β -グルカン含量の高いイネ

科作物の開発が育種の重要課題に上ると予想される。稲わらをはじめとする穀物収穫後の茎葉をバイオマス資源として活用できれば、農業の活性化にも繋がると期待できる。 β -グルカンバイオマス資源として有効利用するためにはオオムギにおける効率的な β -グルカン合成機構を理解する必要があるが、それには、本応募研究課題で取り組むオオムギ β -グルカン合成制御遺伝子の単離同定が必要不可欠である。

(2) 申請者は、オオムギから新規タンパク質 P23k を単離し解析を続けてきた。そして、P23k が β -グルカン合成に関与する事を示唆する以下の結果を得ている。①P23k をコードする遺伝子は、 β -グルカン合成能力のあるイネ科作物特異的である。②イネ科作物では、P23k の発現量と β -グルカン含有量が正比例の関係にある。③P23k の発現は、 β -グルカン合成の材料となるグルコースやスクロースに依存する。④P23k は、 β -グルカン合成の場である小胞体とゴルジ体に局在し、複数のタンパク質と複合体を形成している。⑤P23k は、細胞壁多糖類の合成に関わっているJIP-23 と高い相同性を示す。⑥P23k 遺伝子の発現抑制は、細胞壁の構造異常を誘発する。以上のことから、申請者は P23k がオオムギの高 β -グルカン含有形質に関わっていると考えている。

2. 研究の目的

オオムギは、他のイネ科作物に比べてヘミセルロースに占める β -グルカンの割合が高い。その理由は不明であるが、 β -グルカン合成酵素 (Cs1F) がイネ科作物に共通に存在し且つ発現していることから推測すると、オオムギには Cs1F の活性を高める独自の機構が備わっていると推測できる。申請者は、この機構にイネ科作物特異的で且つオオムギで高発現しているタンパク質 P23k が関わっていると考えている。本研究では、第一に、この仮説を実証する。また、 β -グルカンはセルロース合成酵素と類似の構造を有するCs1F を核とした複合体で合成されると推測されるが、Cs1F 以外の複合体構成因子は未同定のままである。よって、第二に、Cs1F や P23k と複合体形成能力のあるタンパク質の遺伝子を網羅的にスクリーニングする。以上の研究を通じて、 β -グルカン合成における P23k の役割を明らかとし、 β -グルカン含量の高いイネ科作物を開発するための礎を築く。

3. 研究の方法

(1) P23k が β -グルカン合成に関わることを証明するため、オオムギの P23k 遺伝子を導入して過剰発現させた形質転換イネを作製した。具体的には、オオムギ P23k 遺伝子

の ORF を 35S プロモーターの下流に連結し、アグロバクテリウム法でイネのカルスに導入した。そして、得られた形質転換カルスを細分化させ、オオムギ P23k を発現する形質転換イネを作製した。

(2) P23k 発現形質転換イネと野生型イネの β -グルカン含量を測定・比較し、 β -グルカン合成過程における P23k の効果について検証した。 β -グルカン含量の測定には、Megazyme 社の Mixed-linkage beta-glucan assay kit を使用した。なお、解析には植物体の種子と葉を利用した。

(3) 酵母ツーハイブリッド法を利用して、 β -グルカン合成酵素 Cs1F ならびに P23k の相互作用因子をスクリーニングした。使用した cDNA ライブラリーは、 β -グルカン合成の盛んな発芽種子由来の mRNA をもとに作成した。ベイトには、オオムギ Cs1F6 の可溶性領域 553 アミノ酸 (159 Pro~712 Pro) とオオムギ P23k の全体を使用した。

(4) 免疫沈降法を利用して、P23k 相互作用因子の単離同定を試みた。実験に使用した P23k の抗体は、P23k のアミノ酸配列をもとに作製した 3 種類のペプチドを抗原に用いて作製した。

(5) GST プルダウン法を利用して、P23k 相互作用因子の単離同定を試みた。実験に使用した GST-P23k 融合タンパク質は、pGEX-6P1 の下流に P23k の ORF を連結することで作製した。

4. 研究成果

(1) 形質転換イネにおけるオオムギ P23k タンパク質の発現をウエスタンブロット法で確認し、発現量の高い 3 系統を選抜した。そして、それら 3 系統を栽培して生育速度や形態を観察した。P23k は細胞壁多糖類である β -グルカンの合成に関与する可能性が高いことから、P23k の発現に伴って葉の形態異常や生育遅延が起きると予想していたが、P23k 発

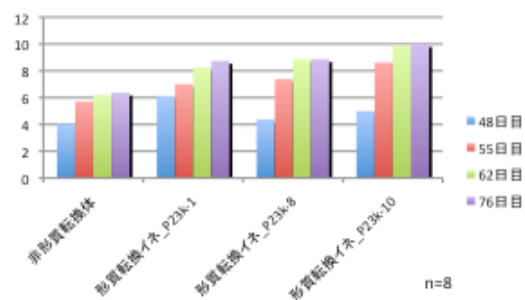


図1. P23k発現イネ系統の形質評価(分けつ数)

現イネの形態に異常は無く、また、生育速度もコントロールのイネと比べて有意な差はなかった。ただし、分けつ数がコントロールと比べて増加する傾向にあることがわかった(図1)。

(2) まず、種子の β -グルカン含量を測定した結果、P23kの発現に伴って種子の β -グルカン含量が僅かであるが有意に上昇することが明らかとなった。この結果により、P23kがオオムギの β -グルカン合成に関わる因子であることをイネに於いても十分に機能しうることが明らかとした。ただし、P23k単独の発現誘導では劇的な β -グルカン含量の増加は確認できず、種子における β -グルカン含量の増加には β -グルカン合成酵素であるCs1Fや未だ未同定のP23k相互作用因子の共発現が必要であることを裏付ける結果となった。次に葉の β -グルカン含量を測定した結果、P23kの発現の有無にかかわらず β -グルカン含量が有意に変化することはなかった(図2)。その理由として、**①**イネの葉では種子と異なり一定レベルの β -グルカンが合成されているためP23kの発現に伴う効果が現れなかった可能性が高い。**②**P23kと共同で β -グルカンの合成に働く因子が葉では発現しておらず、P23k単独の発現誘導では効果が確認できない。等が考えられるが、本研究ではその検証には至らなかった。

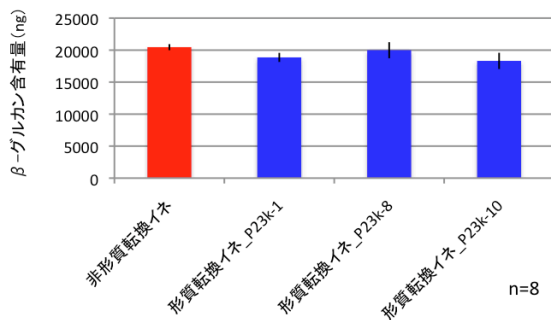


図2. P23k発現イネ系統の葉における β グルカン含量

(3) 酵母ツーハイブリッド法によるオオムギCs1F6ならびにP23kに対する相互作用因子のスクリーニングでは、作製したオオムギcDNAライブラリーに含まれる全クローン数を数倍カバーする量の形質転換を行った。しかし、残念ながら候補因子を得るに至らなかった。P23kは複数のタンパク質と複合体を形成することが確認できていることから、上記の結果は、P23kに融合させたタンパク質(BD)がP23kと真の相互作用因子との結合を阻害したか、P23kの相互作用因子が膜タンパク質であり、使用したGAL4システムでは単離・同定できなかったと判断した。また、Cs1Fに関して推測した可溶性領域のみをベイトに用いたため、相互作用因子の同定に至らな

ったと考える。

(4) 免疫沈降法によるスクリーニングでは、P23kのN末端側のアミノ酸配列をもとに作製したペプチド抗体でP23kと相互作用する可能性のある2種類の候補因子を単離することに成功した(図3)。しかし、解析を進めた結果、それら候補因子はすべて擬陽性であり、残念ながら真のP23k相互作用因子でないことが明らかとなった。その後も条件を変えて免疫沈降実験を繰り返したが、新たな因子の単離同定には至っていない。ただ、同時に進めたBlue Native-PAGE法を用いたP23kの複合体解析では、P23kが細胞内で複数のタンパク質と4種類の複合体を形成していることや、その大きさが各々約1050kDa、680kDa、350kDa、160kDaであることが明らかとなった(図4)。P23kとCs1Fの推定分子量を足すと120kDa程度であることから、複合体には推測していたよりも多くのタンパク質が含まれていることが明らかとなった。

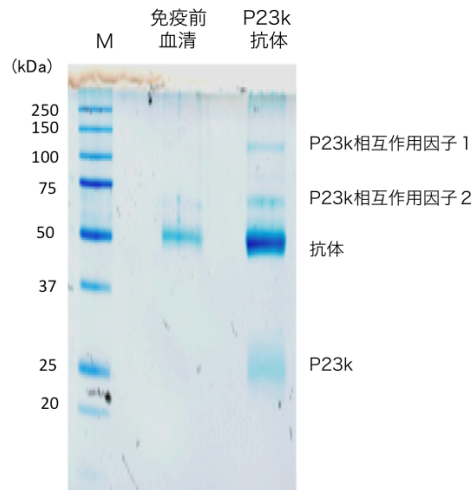


図3. 免疫沈降法によるP23k相互作用因子の同定

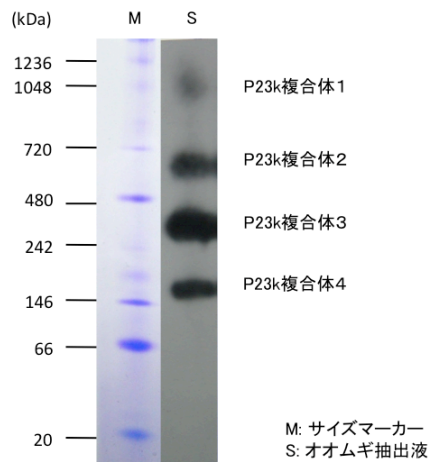


図4. Blue Native PAGE法によるP23k複合体の解析

(5) GST-プルダウン法で P23k 相互作用因子のスクリーニングを行った結果、GST のみを用いたプルダウンでは検出できない複数のバンドを得ることができた (図 5)。これらバンドの解析を進めた結果、P23k 相互作用因子の候補として β -アミラーゼを同定することができた。 β -アミラーゼは発芽種子のデンプン分解に関わる重要な酵素であり、間接的ではあるが β -グルカンの基質である UDP グルコースの供給にも関わっている。よって、 β -アミラーゼは β -グルカンの合成を円滑に進めるためには必要不可欠なタンパク質でもあり、P23k 相互作用因子の候補として同定できたことは大変興味深い。P23k も β -アミラーゼと同様に発芽種子で過剰発現していることがわかっており、P23k が β -グルカンの基質である UDP-グルコースの供給に関わっている可能性が出てきた。今後は、酵母ツーハイブリッド法などを利用して 2 つの因子の結合を詳細に調べ、 β -アミラーゼが真の P23k 相互作用因子であることを検証する計画である。

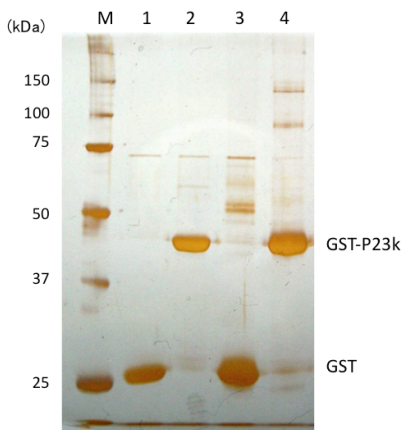


図5. GST プルダウン法によるP23k相互作用因子の同定

M. サイズマーカー、1. GST、2. GST-P23k、
3. GSTによるプルダウン産物、4. GST-P23kによるプルダウン産物

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

① Kidou, S. A putative physiological function of a grass-unique 23kDa protein, P23k, in barley. International Symposium on Biodiversity Sciences "Genome, Evolution and Environment" (2010. 08. 03, Nagoya)

[図書] (計 1 件)

(1) Hayashi, T., Kaida, R., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., Nishikubo, N., Kidou, S. and Yoshida, K. (2010). Enhancing primary raw materials for biofuels. Biomass to Biofuels: strategies for global industries, Wiley UK p459-490.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木藤 新一郎 (KIDOU SHINICHIRO)
名古屋市立大学・大学院システム自然科学
研究科・教授
研究者番号：60271847

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：