

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22658010

研究課題名（和文） ピタヤのアラビノガラクトタンはバイオエタノールの原料となり得るか

研究課題名（英文） Can we use the arabinogalactan in pitaya as a source of bioethanol?

研究代表者

野村 啓一 (NOMURA KEIICHI)

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：60252798

研究成果の概要（和文）：糖組成分析の結果、ピタヤの粘性多糖は、アラビノガラクトタンとキシログルカンを中心とすることが示唆された。種々の糖質分解酵素のクローニングを試みた結果、 β -galactosidase については全長 cDNA を取得することができた。一方、生育に関与している酵素群の中で、NADP-ME のクローニングが完了したが、翻訳に際して alternative splicing が起こっていることが示唆された。 β -galactosidase, NADP-ME ともに今後発現形の構築をはじめ、酵素の性質の解明が必要である。

研究成果の概要（英文）：Carbohydrate analysis suggests that the major oligosaccharides related to the viscosity are arabinogalactan and xyloglucan. Full length cDNA of β -galactosidase could be obtained among some carbohydrate hydrolytic enzymes. In addition, cDNA cloning of NADP-ME also has been completed, but it is still ambiguous where a real initiation codon in the cDNA is. It is necessary that construction of expression system and following enzymatic analysis of both enzymes, β -galactosidase and NADP-ME.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	0	2,200,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学、園芸学・造園学

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

今日、わが国では化石燃料や原子力に代わるエネルギーの確保が急務となっている。中でも CO₂ 排出削減などを視野に入れ、特にバイオエタノールが注目されている。この原料としては、経済問題を考慮して、「非食料」を原料とする試みがなされており、特に藁などの廃棄物に由来するセルロースの利用、さらには C₄ 植物の非可食部である葉に移動デ

ンを蓄積させる試みがなされている。

Crassulacean Acid Metabolism (CAM) 型光合成は、亜熱帯原産の耐乾性を有する多肉植物によく見られる。CAM 型光合成では、夜間に気孔を開いて CO₂ を取り込み、Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) の作用で Phosphoenol pyruvate (PEP) に固定する。生じたオキサロ酢酸 (OAA) は速やかに Malate dehydrogenase (MDH) によってリンゴ酸に変換され、液胞に蓄積する。日中には

気孔を閉じるとともに液胞から出たリンゴ酸から CO₂ を取り出し, Calvin-Benson 回路に取り入れて通常の C₃ 型光合成を行う。日中に気孔を閉じることから, 水利用効率が高く乾燥した不毛地でも生育できる植物が多い。また, CAM 植物の中で経済的に利用されているのは, パイナップル (*Ananas comosus*), アロエ (*Aloe vera*), ウチワサボテン (*Opuntia ficus-indica*), ピタヤ (*Hylocereus undatus*) およびアガベ (*Agave tequilana*) など数種に限られている。したがって, 経済栽培されていない CAM 植物を不毛地で栽培し, それをバイオエタノールの原料とする構想も立てられている。

2. 研究の目的

ピタヤなど果実を利用する CAM 植物を栽培し, その葉・茎を利用すれば, 作物としてもバイオエタノールの原料としても利用できる。特にウチワサボテンとピタヤは, 茎に保水機能を有する粘性多糖を多量に含んでいる。果実栽培の過程では, 茎をせん定するため多量の廃棄茎が生じるので, これを利用すれば全く無駄は生じないといえる。しかし, これら粘性多糖は単純なグルコースオリゴマーではなく, 様々な構成糖からなる多糖であるので, 醗酵原料として利用する際には, 種々の単糖に分解する必要がある。

多糖の分解・利用には微生物を利用するのが一般的であるが, これには多数の微生物のスクリーニングが必要となる。一方で, 植物体の方は必ず多糖を「代謝」しており, これはその分解酵素が存在することを意味している。したがって, 当該植物体の糖鎖組成の変動を明らかにするとともに, その代謝に関与する糖質加水分解酵素, あるいは糖質転移酵素を発現させ, 固定化酵素として用いることで, 多糖の分解が可能となる。

本研究では, CAM 型作物の中でピタヤに着目し, 果樹栽培時に生じる廃棄茎の有効利用を目指して, その粘性多糖の分解系の確立を目的として立案した。すなわち,

- (1) ピタヤにはどのような組成の粘性多糖が存在し,
- (2) それらの代謝のためどのような糖質分解酵素が発現しているか,
- (3) 旺盛な生育を示す管理法の確立に向け, CAM 型代謝機構を解明する, の 3 点を中心に研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 材料

神戸大学構内のガラス室 (無加温) にて育成している 6~7 年生のピタヤ (*Hylocereus undatus*) の茎を用いた。サンプリング後小

さく切り刻むと同時に液体窒素で凍結し, 凍結乾燥標品として -80°C で保存した。

(2) 方法

①粘性多糖の抽出

茎から 20 倍量の蒸留水で抽出して, 得られた上清を水抽出画分 (W 画分) とした。残渣に 10 倍量の 1N NaOH を加え, 得られた上清を NaOH 抽出画分 (N 画分) とした。両画分ともに蒸留水に対して透析し, 糖の分析に用いた。中性糖の定量はフェノール硫酸法で, ウロン酸の定量はカルバズール-硫酸法で行った。糖組成分析は, 加水分解後箱守法に準じて行った。

②糖質加水分解酵素の抽出と活性測定

ピタヤの茎 2g を液体窒素存在下で粉砕後, 20ml の抽出用緩衝液を加えて約 1 時間 4°C で攪拌し, 遠心分離 (10000rpm×20min, 4°C) した後, 上清をミラクロスでろ過してろ液を抽出液とした。粗抽出液 250 μl に, 0.1M 酢酸 buffer (pH5.0) に溶解した基質 750 μl を加え, 37°C で反応させた。基質の終濃度は 2mM とした。所定の反応時間経過後, 1ml の 0.5M Na₂CO₃ を加え, 反応を停止して 400nm の吸光度を測定した。活性は U (単位) で表し, 1U は 1 分間に 1 μmol の pNP を遊離する酵素量とした。基質としては, 種々の pNP 合成基質を用いた。

③RT-PCR

茎から抽出したトータル RNA 約 3 μg と Oligo (dT) NotI プライマーを用い, ReverTra Ace (TOYOBO) によって逆転写を行った。得られた一本鎖 cDNA を鋳型として, 種々の degenerate primer を用いて PCR を行った。対象とした酵素は, endo-β-1,4-glucanase (Glu500 及び Glu600), β-1,3-glucanase (13Glu), α-galactosidase (aGal), β-galactosidase (bGal), α-mannosidase (aMan), α-arabinofuranosidase (Ara), α-arabinofuranosidase/xylosidase (AF/XL) の 7 種である。いずれも他の植物由来の配列の相同性に基づきプライマーを設計した。PCR は, KOD-Plus-Neo (TOYOBO) を用い, プライマー濃度を 3・M, アニーリングを 50°C で 30 秒, 伸長を 68°C で 1.5 分とした。

④TA-クローニングおよび配列解析

該当する増幅断片が認められたものについて, TA-クローニングを行った。インサートのチェックを行った後, 該当するコロニーよりアルカリミニプレップ法によってプラスミドを単離した。塩基配列の決定は, BigDye terminator v1.1 (Applied Biosystems) を用い, 添付のマニュアルに準じて反応。精製を行い, ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied

Biosystems) によって解析した。

⑤ RACE 法

3' RACE は、上で得た配列に基づいてプライマーを設計し、Adapter プライマーとの組み合わせで PCR を行った後、TA-クローニング、配列解析を行うことで遂行した。5' RACE は Gene Racer (Life technologies) を用いて、添付のマニュアルに従って行った。

⑥ アミノ酸配列の解析

cDNA から推定したアミノ酸配列は、SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) でシグナルペプチドの有無を、また Compute pI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/) で等電点と分子量をそれぞれ予測した。

⑦ NADP-ME の精製

茎 400g を粉砕し、これに 15 倍量の抽出バッファーを加え、1 時間攪拌した後遠心分離 (10000rpm×20min, 4°C) にかけて。上清をミラクロスでろ過し、これを粗抽出液とした。この粗抽出液を、Q-Sepharose, Phenyl-Sepharose, Mono Q, Mono S, Blue-Sepharose の各カラムクロマトグラフィーに供して精製した。

⑧ NADP-ME の活性測定

活性は NADP の還元による 340nm の吸収の増加によって測定した。1 活性単位 (U) は、1 分間に 1 μmol の NADP を還元することができる酵素量とした。

⑨ SDS-PAGE および N-末端配列分析

SDS-PAGE は 10% の分離用ゲルを用いて行い、CBB R-250 で染色した。N-末端配列分析に際しては、PVDF メンブレンに転写し、ポンソー S で染色後、目的のバンドを切り出して ABI 494 Protein Sequencing System (Applied Biosystems) に供した。

⑩ 酵素学的特性の解析

リンゴ酸と NADP に対する K_m の pH 依存性を pH 6.0, 6.5, 7.0 および 7.5 で測定した。また各種代謝中間産物の活性に及ぼす効果を、NADP 濃度を 20 μM に固定し、リンゴ酸濃度は半飽和の状態 (pH 7.0 では 0.5 mM, pH 7.5 では 4 mM) で解析した。用いた緩衝液は pH 6.0: MES buffer, pH 6.5: MES buffer, pH 7.0: HEPES buffer, pH 7.5: HEPES buffer とし、いずれも 0.1M の濃度で調整した。

⑪ NADP-ME のクローニング

RNA の単離、RT-PCR、RACE 法などは全て糖質加水分解酵素の場合と同様に行った。

4. 研究成果

(1) W および N 画分の糖分析

W と N 画分について中性糖含量、ウロン酸含量および糖組成の解析を行った (表 1)。

表1. W, N 画分の糖含量と糖組成

Contents (mg/g, FW)	W-fraction	N-fraction
	Neutral sugar	2.84
Uronic acids	0.92	0.46
Composition ¹⁾		
Arabinose	1	1
Galactose	2.72	3.84
Rhamnose	0.88	0.59
Xylose	0.14	2.20
Mannose	tr	0.30
Glucose	tr	6.34

1): Sugar compositions are represented as ratio to arabinose.
tr: trace.

中性糖含量は両者で顕著な差はなかったが、ウロン酸含量は W 画分の方が N 画分の 2 倍の値を示した。糖組成では、W 画分は Gal が主となり、Ara, Rha がこれに次いでいた。N 画分は Glc, Gal が主となり Xyl がこれに次いでいたことから、W 画分はアラビノガラクトン (AG)、N 画分はキシログルカン (XG) を主要な構成多糖としていると推察できる。したがって、これらの粘性多糖の代謝には、bGal, Ara, 14Glu (13Glu) などが主として作用していると考えられる。これらの酵素はマルチジーンファミリーを形成し、基質特異性も幅広く、場合によっては bifunctional なものも存在する。そこで次に、種々の合成基質を用いてこれらの酵素の活性の有無を検索した。

(2) 各種合成基質に対する酵素活性

α-Gal, β-Gal, α-Ara に対してはいずれも有意の活性を認め、α-Man に対しては最も強い活性を認めた (表 2)。

表2. 各種合成基質に対する活性

Time (min)	Activity (mU/g, FW)							
	β-Xyl	α-Glc	β-Glc	α-Gal	β-Gal	α-Man	α-Ara	β-GU
30	3.39	6.78	2.80	24.0	10.3	81.9	21.4	1.40
60	2.27	5.75	2.39	25.2	11.7	77.2	15.8	2.10

β-Xyl, α-Glc, β-Glc, β-GU の中で、β-Xyl, β-GU については、反応時間に対する直線性が無く、実際に活性があるかは疑わしい。この結果から、ピタヤの茎では、aMan, aGal, bGal, Ara が発現していると考えられる。最も強い活性を示したのは aMan であるが、構成糖の分析で、Man 含量が低いこと、およびこの酵素の主要な機能が N-Glycan のプロセッシングに関与していると考えられることなどから、粘性多糖の代謝に関与している可能性は低いといえる。Ara については、β-Xyl に対する活性が検出されなかったことから、ピタヤでは bifunctional 酵素ではないと推察できる。一方、aGlu, bGlu についても、発現している可能性はあるが、量的には極めて少ないと考えられる。しかし糖質加水分解

酵素の中には、天然の高分子基質には作用するが、合成基質には作用しないか弱い活性しか示さない場合も考慮する必要がある。

(3) RT-PCR と PCR クローニング

RT-PCR の結果、Glu500, Glu600, bGal, aMan, Ara, AF/XL については、推定される位置にバンドを認めた。この6種についてTA-クローニングを行い、その配列を決定した。その結果、Glu500 と bGal についてのみデータベースの配列と相同性のある断片が得られた。bGal についてはプライマー部位を除いて721bp の配列を決定でき、それから推定したアミノ酸配列は、Glycoside Hydrolase family (GHF) 35 に属する bGal であることが明らかになった。得られた bGal の部分配列に基づいて、プライマーを設計し、3' RACE と 5' RACE を行い、全長 cDNA の取得を試みた。最終的に明らかになった cDNA (*HubGal1*) は、3042bp からなり、5' と 3' の非翻訳領域はそれぞれ 169bp, 368bp であった。ORF は 2505bp で、HubGal は 835 アミノ酸残基からなり、N-末端側は GH family 35 に属し、C-末端領域に Galactose-binding lectin domain を有していた(図 1)。SignalP による推定の結果、N-末端から 21 残基はシグナルペプチドであると考えられた。得られたアミノ酸配列は、ニホンナシやアボカドの酵素と 73% の同一性、84% の相同性を示した。

植物の bGal はマルチゼンファミリーを形成し、各 isozyme で生理的機能が異なると考えられている。既報の 28 の植物由来 bGal との関係を観るため系統樹を作成した(図 2)。その結果、HubGal はニホンナシの isozyme5, 8, STBG6, アボカドの isozyme4, *Arabidopsis* の isozyme3, 5 およびモモの酵素と一つのクラスターを形成した。このクラスターは、果実の成長期の細胞壁多糖の代謝に関与するものが多いといえるが、基質特異性についての報告はない。これまでの報告に基づく、ピタヤの属するクラスターも β -(1 \rightarrow 4) 結合に作用すると推察できる。AG には β -(1 \rightarrow 4) 結合を主とする typeI と β -(1 \rightarrow 3) 結合が主となる typeII が存在するが、ピタヤでは両 type が存在し、HubGal1 は typeI の代謝に関与していると考えられる。

Glu500 については、全長 cDNA の取得には至らなかったが、951bp の配列を決定でき、それから推定した 317 アミノ酸残基の配列は、GHF9 に属する endo- β -1,4- glucanase であることが明らかになった。この部分配列は、リュウガンやイチゴの酵素と 84% の同一性を示した。endo- β -1,4-glucanase についても、先の bGal 同様、isozyme 間での詳細な基質特異性については明らかになっておらず、今後の解析が待たれる。ピタヤにおいても、cDNA の全長の配列を明らかにするとともに、

発現系の構築と isozyme の確認を行う必要がある。

他の加水分解酵素については、RT-PCR において該当する断片が得られなかったことから、degenerate primer を作り直す必要があると考えられる。

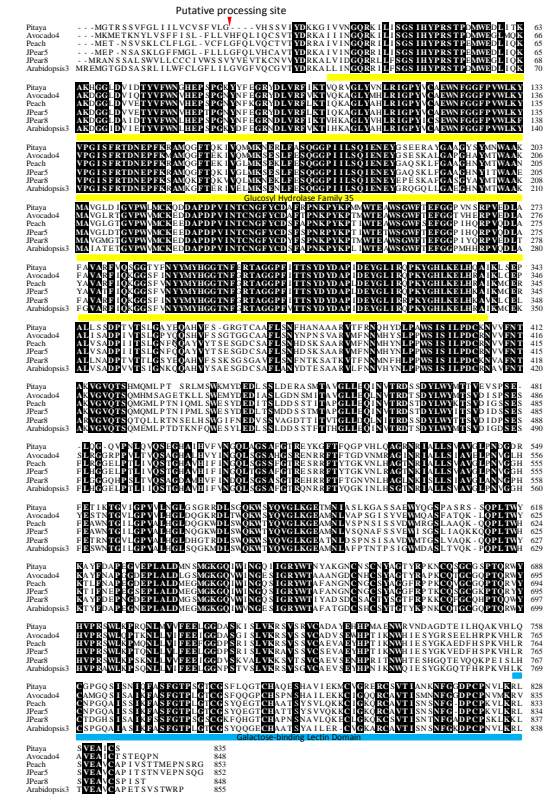


図1. HubGal1のアミノ酸配列。ClustalWによるpairwise法によって他植物由来のGHF35に属する β -galactosidaseとアラインメントを行った。最初のMet残基から番号をつけた。全てに同一のアミノ酸は白抜き文字で示した。赤い三角はSignalPによる推定プロセッシング部位、黄色と青の下線はそれぞれGHF35ドメインとガラクトース結合性レクチンドメインを示している。

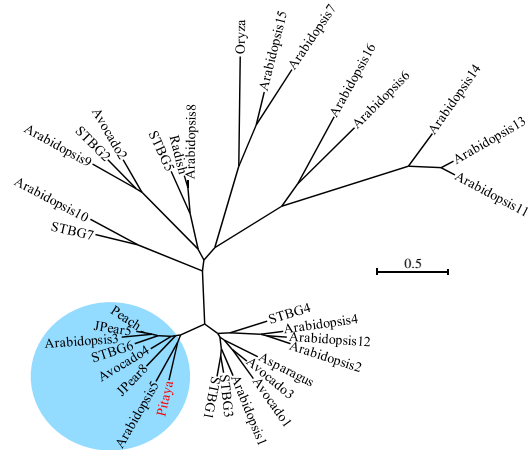


図2. HubGal1 と他植物のGHF35に属する β -galactosidase との系統樹をClustalWで作成した。それぞれの accession は以下の通りである Arabidopsis1, AEE175407; Arabidopsis2, AEE178999; Arabidopsis3, AEE86646; Arabidopsis4, AED96817; Arabidopsis5, AEE32082; Arabidopsis6, AED97799; Arabidopsis7, AED92880; Arabidopsis8, AEC08128; Arabidopsis9, AEC08745; Arabidopsis10, AED97800; Arabidopsis11, AEE86446; Arabidopsis12, AEE85163; Arabidopsis13, AEC06532; Arabidopsis14, AEE86951; Arabidopsis15, AEE31387; Arabidopsis16, AAO64909; STBG1, AAF21626; STBG2, AEE01408; STBG3, ADO34788; STBG4, ADO34789; STBG5, ADO34790; STBG6, ADO34791; STBG7, ADO34792; Avocado1, BAB83260; Avocado2, BAF1232; Avocado3, BAF1233; Avocado4, BAF1234; rice, BAF26280; JPear5, BAD91082; JPear8, BAD91085; Radish, BAD20774; Peach, AAW47739; Asparagus, CAA54525.

(4) NADP-ME の精製

精製における各ステップでの結果を表3にまとめた。最終的に精製倍率は6750倍、収率

表3. NADP-MEの精製のまとめ

	Total activity (U)	Yield (%)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification fold
Extract	23.0	100	1620	0.0141	1
Q-Sepharose	32.6	142	333	0.0978	10
Phenyl-Sepharose	19.2	83.7	19.5	0.982	98
Mono Q	9.19	40.0	11.1	0.828	83
Mono S	4.43	19.3	1.99	2.22	222
Blue-Sepharose	1.35	5.88	0.0151	67.5	6750

5.88%で、比活性 67.5 U/mg の標品を得ることができた。この精製標品を SDS-PAGE に供した結果、2本のバンドが検出でき推定分子量は、それぞれ71kDと67kDであった。非還元状態でも同様のパターンを示したことから、サブユニット間のS-S結合はないといえる。それぞれのバンドについて、N-末端配列分析を行ったが、N-末端はブロックされていた。両バンドの関係は、現時点では明らかではない。

(5) HuME の酵素学的特性の解析

HuME の至適 pH は低基質濃度 (0.2 mM) では 6.0, 高基質濃度 (10 mM) では 7.0 であった。また、pH 6.5~8.0, 30°C までは安定であった。リンゴ酸に対する K_m は、pH 6.0~7.0 では 0.65~0.82 mM であったが、pH 7.5 では 4.5 mM と約 5 倍大きくなった。NADP に対する K_m も pH 6.0~7.0 では 30~35 \cdot M であったが pH 7.5 では 49 \cdot M と上昇したが、その割合は 1.5 倍程度であった。種々の代謝中間産物の効果については図3に示した。

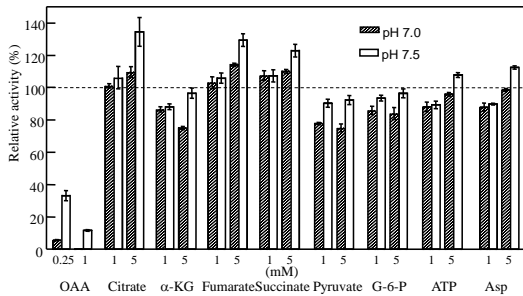


図3. 種々の代謝中間産物のHuME活性に及ぼす効果。結果はコントロールに対する相対活性で示した。リンゴ酸濃度は、pH 7.0と7.5でそれぞれ0.5 mMと4 mMとした。

全般に阻害は pH7.0 の方が強く、活性化は pH 7.5 の方が強かった。OAA が最も強い阻害を示し、pH 7.0 では 1 mM で完全に活性を抑えた。α-KG、ピルビン酸、G-6-P は、pH 7.0 において約 20%の阻害を示したが、pH 7.5 では 10%程度であった。一方、クエン酸、フマル酸、コハク酸は pH 7.5 において 5 mM で 20~30%の活性化を示したが、1 mM あるいは pH 7.0 では顕著な活性化は認められなかった。

HuME の cDNA のクローニング

RT-PCR, TA-クローニングの後の配列解析で、他植物由来の NADP-ME との相同性を認めた。得られた配列に基づいて、プライマーを設計し、3' RACE, 5' RACE によって最終的に 2494bp の cDNA を得た(図4, HuME)。

```

ctctttttcttccctgaagtttttgcagttgicctccgaagatctgtgagctggaaagaagaaggaga 70
aagagttggagaaatagaaaaaatcaacagctttcttctctctcactggcaaaagctagaagctcaacct 145
tttcaaggtgttaattcaacATGATCTCTTACACAGCCCACTTCTTGAACAACCCCCAGCATATCTGGG 220
M I S L H T A H F L N N T P S I S G
AGATCTTTCGGGTGCACCCATTTGCAGAGGCGGTGTCAGTGGGGTGTCTCGGGTCGCGGTGGCCCTCTCTC 295
R S F G S T H L Q R R C F Y G M V R V A Y G P S F
GGCCGATCAACGATGCGGTCTGACGGAGGAGGCAAGAAAGGATAGTTGGCTGTGTGACTTGGATGATAAA 370
G R S T D A V L T E E A R E G V V G A V D L D D K
TCGACGGTCACTGATGCTGGGTTGAAGATATGACGGTGGGATATCTGCCACCGGACCGCTGTCAACGCT 445
S T V T D A G V E D M Y G E D T A T E D Q L V T C
TGGTCTCTCTCTGCTAGTGGCTACTCATTTGTCGGGATCTCTACTCACTAATAAGGCTAGCTACAGAAA 520
W S L S V A S G Y S L R D P H Y N K G L A F T E
AGGGAGAGATGCACTACTTGTCTGCTTCTTCCCAACTGTTCACGCAAGACATTCAGCAAGAGAAA 595
R E R D A H Y L R G L L P P T V I S Q D I Q A K K
ATGATTCAATAATCCGCGATCAAGTACCTTACAGAAATCATGCAATGGATGCTCAGGAATAAACA 670
M I H N I R Q Y Q V P L P V G K L S L Y T A L L G
GAAAGCTTTTTCGCACTCTCTTCACTGCAATGCGAAGGTTGCTCCAGTGGCTACACCCCACTGTGGT 745
E K L F F Y R L L I D N V E L L F V V Y V T P T V G
GAGGCTCCAGAAATATGAGTATCTTCAAGGCTTCAAGGCTTCTTATCAAGTATGAGGAAAAGGAAAG 820
E A C Q K Y G S I F R R P Q G L F I S L K E K G K
GTTCTAGAGATATAAAGAACTGGCAGAGAGGACATCCAAGTATTGTTGTAAGTGGTGAACGGATTTG 895
V L E V L K N W P E R H I Q V I V V T D G E R I L
GGCTTGGAGATCTGGTGTGAGGAATGGAAATCCAGTCGGAAGCTTCTCTATACACTGCTCTGGTGGC 970
G L G L D L G C Q G M G I P V V G K L S L Y T A L L G
ATTCCGCTTCAAGCTGCTGCAATAACCTTGAACGTTGGGAAACAACAACGAGGACCTGTGATGATGAATT 1045
I R F S A C L P I T I D V Q G T A S V V L A G V L
TACATGGCTTCGCAAAAGAGGCACTGGGCGAGGATATGCTGATATGATGATGAAATCATGACGGCAGT 1120
Y I G L R Q R R A T G Q E A E L M H E F M L A K K
AAGCAGTTTATGGGAGAGGCTCTTATTCAGTTTGAAGATTTTGCACCAATGATGATGATGATGATGAT 1195
K Q F Y G E R V L I Q F E D F A N H N A F D L L A
AAGTATGGCAGTACCACTTGTATTCAGTATGATATACAGGGGACAGGCTGTGGTCTGTGGCTGCTCTC 1270
K Y G S T H L V F N D D I Q G T A S V V L A G V L
ACCGCAGAGAGTATGAGGCAAGACTTGGCTGATCAAACTTTCTGTTTGGGGCTGGGAGGCTGGTACT 1345
T A Q K L A G K T L A D Q T F L F L G A G E A G T
GGTATAGCTGAGCTCATAGCTCTGCAAAATTCAGGAGCAAAATATGCTCTTGGAGGAGCTGTAAGAAGAT 1420
G I A K E I A L E I S K Q T N M P L E E A R K K I
TGGCTTGTGGACTCGAAGGACTTATAGTCAAGAGCCGATGGAGTATTAAGACATTTAAGAAAGCGTGGCT 1495
W L V D S K G L I V K S R M E S L Q H F E K P W A
CAGCAATGAACTTAAAGGACTTCTAACTGATTAATCTTGAACCCAGCTGTGATGGTTCATCT 1570
H E H E P I K G L L N A I N S L K A P T V L I G S S
GGAGTTGGAAGCAATTAACAAGGAGGTTGTTGAGGCAATGGCCACTTACAAGTGGAGGAGCTGTCAATCT 1645
G V G R T F T K E V E A M A T Y S E R P V I L A
CTCTAATCAACCTCAACTCAGAGTGCACAGGAGGAGGCTTACTTGGAGTCAAGGTCGGGCAATTTT 1720
L S N P T S Q L E C T A E A T A T W S L Q H F E K P W A
GCGAGTGGAGCCATCTCTCTGTTGAGTTTGAAGGAAAGCTTTACTTGGACAGGCAAAATGATCA 1795
A S G S P F P P V E F E G K T F T P G Q A N N A Y
ATCTCTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCT 1870
F P F G F G L G L I M S G A I R V H D M L L A A
CTGAGCCCTGGCTTCCAGGTAACAGAGGAGACTTCCGCAAGGAGGCTTCTTACCTCGTTCAAGACATC 1945
S E A L A S Q V T E H F A K G L L Y P F K T I
AGAAAATCTCGGCACACTTGCAGCAATGCGGCAAGGAGGCTTAACTTGGACTTGGACTTGGCTTGGCT 2020
R K I S A H I A N Y A T K A Y E L G L A T R L P
CAACGAGCAATCTGGTAAAGTACGCGGAGAGCTGATGATGACAGCCCTGCTACCTTGGTACCGG;gaa 2095
Q P A N L V K Y A E S C M Y S P A Y R S Y R *
aaacttttggagatccaggacccttttggagacccttttttttttttttttttttttttttttttttttt 2170
atagctgagatgatttctatttttcatatggcaagcctagtgattgtattac11aaccttgcagcct 2245
ctaaagaaagagggggggctgtctacacccagtcagtaactaaatgaagcagggccttagtatttaggta 2320
gaagcagagattgcaagcagcagggcctaaatacagatagctcaagaaacaacttttcttcat1tagat 2395
cagtgaactttaaactgcaatgacttgggttaacgtttaaaccctt1gaaacttggaa1gggtt1cgt1ct 2470
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

図4. HuMEの塩基配列と推定アミノ酸配列。ORFとUTRはそれぞれ大文字と小文字で示した。左の数字は推定N-末端Metからのアミノ酸残基の番号、右側の数字はS-末端からの塩基の番号を示している。青の矢印はゲノムPCRによってイントロンの位置と長さを調べた時に用いたプライマーの位置を示している。赤の矢印はイントロンの位置を示し、3'UTRの青字は3'RACEにおいて、幾つかのプラスミドで欠損していた配列を示している。赤のアスタリクスはChloroP.1.1で推定したプロセッシング部位を示している。

HuMEは166bpの5' UTRと405bpの3' UTRを持ち、640残基のアミノ酸をコードする1920bpのORFを有していた。推定アミノ酸配列をCompute pI/Mwで解析した結果、pIは6.18、分子量は70,490 Daとなった。また、ChloroP.1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>)によってArg36までがtransit peptideに相当すると予測された(図4)。transit peptideが外れた場合の mature 酵素については、pI 5.73、分子量66,498 Daと推定できた。得られたアミノ酸配列を、他の植物由来のNADP-MEと比較したところ、トウモロコシおよびブドウ由来の酵素と82%の同一性を示した。種々の植物由来の酵素と系統樹を作成したところ、図5に示したような結果が得られた。

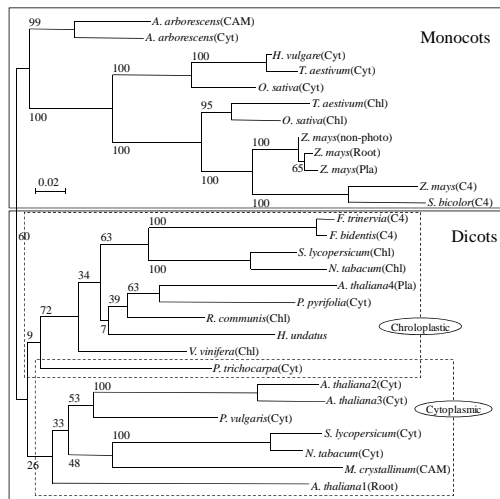


図5. NADP-ME isozymeの系統解析. 1,000回の繰り返しのブートストラップ値を示した. CAMはCAM型光合成関係, Cytは細胞質型, Chlは葉緑体型. Rootは根特異的, C4はC4光合成関係, Plaは色素体型, non-photoは非光合成型を示している. それぞれのaccession numberは以下の通りである. *F. triniervia*(C4), 1701292A; *F. bidentis*, AAW56450; *S. lycopersicum*(Cyt), AAB58728; *S. lycopersicum*(Chl), AAB58727; *A. thaliana*(Root), AEC06941; *A. thaliana*(Cyt), AED91708; *A. thaliana*(Cyt), AED93497; *A. thaliana*(Pla), AEE36294; *N. tabacum*(Cyt), AB198681; *N. tabacum*(Chl), AB198682; *R. communis*(Chl), AAF73006; *P. trichocarpus*(Cyt), CAA39690; *P. vulgaris*(Cyt), AAA19575; *V. vinifera*(Chl), AAB08874; *M. crystallinum*(CAM), CAA45772; *P. pyrifolia*(Cyt), ADU20198; *H. undatus*, AEK25136; *A. arborescens*(CAM), AB016804; *A. arborescens*(Cyt), AB005808; *O. sativa*(Chl), BAA03949; *O. sativa*(Cyt), AAQ99276; *H. vulgare*(Cyt), AC146151; *T. aestivum*(Cyt), ABY25986; *T. aestivum*(Pla), ABW77317; *Z. mays*(Chl), 001105383; *Z. mays*(C4), AAA33487; *Z. mays*(Pla), AAK91502; *Z. mays*(non-photo), AAQ88396; *Z. mays*(root), AAD10504; *S. bicolor*(C4), AAP32204.

植物起源のNADP-MEは、単子葉あるいは双子葉植物由来の酵素として大別でき、それぞれがさらに色素体存在型と細胞質存在型に分けられる。植物のNADP-MEはマルチジェンファミリーを形成し、オルガネラや器官で発現特異性が異なる。HuMEについて観ると、双子葉植物群になるのは当然であるが、色素体型に位置している。CAM型光合成の脱炭酸に関与する場合は、細胞質に存在せねばならず、上述したようなtransit peptideを有して色素体に組み込まれては本来の機能を果たせない。アミノ酸配列を再考すると、34番目にもMetが存在し、これを開始コドンとした場合には、transit peptideは存在せず、607残基からなるpI 5.81、分子量66,885 Daの酵素タンパク質が予測された。このことは、細胞内局在性の異なる酵素を、開始コドンを使い分けて発現させている可能性を示唆している。

(7) isozymeの存在の可能性

図10にゲノムをテンプレートとした時のPCRの結果を示した。いずれの場合も単一のバンドしか認められなかったことから、少なくともイントロン長の差に基づくisozymeは存在しないと考えられる。以上の結果から、ピタヤにおいては開始コドンの使い分け、すなわちalternative splicingによって局在性の異なるNADP-MEを使い分けている可能性が示唆された。この2つのmRNAの発現制御については、更なる検証が必要である。

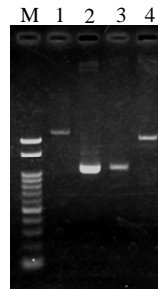


図6. ゲノムに対するPCRの結果. レーンMは100bpラダーマーカー, レーン1はMENtermとAMMDrv, レーン2はERERDfwとGIPVGrv, レーン3はGIPVGfwとLLTAQKfw, レーン4はLLTAQKfwとMECtermvの結果を示している.

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2件)

①和田萌花, 山中慎介, 緒方達志, 前田隆昭, 野村啓一 「ピタヤにおける粘性多糖加水分解酵素のクローニング -Galactosidase-」平成24年度園芸学会近畿支部大阪大会発表要(2012.3.28~29、大阪府立大学)

②和田萌花, 各務恵理菜, 山中慎介, 緒方達志, 前田隆昭, 野村啓一 「ピタヤにおけるNADP依存性Malic Enzymeの酵素学的性質とクローニング」園芸学会平成24年度春季大会研究発表要旨pp309(2012.3.28~29、大阪府立大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 啓一 (NOMURA KEIICHI)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 60252798

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし