

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23656527

研究課題名(和文) 寄生植物の細胞壁分解酵素を導入した微生物による木質バイオマスの直接イソプレン変換

研究課題名(英文) Direct conversion of plant biomass to isoprene by microorganisms expressing cell-wall degrading enzymes from parasitic plants

研究代表者

岡澤 敦司 (OKAZAWA, Atsushi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号：10294042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：植物バイオマスの効率的変換に有用な細胞壁分解酵素の遺伝子資源を、宿主の細胞壁を分解し、自身の器官を侵入させることの出来る寄生植物に求めた。ヤセウツボの RNAseq 解析により得られた配列情報をもとに、細胞壁多糖の分解に関わると想定される  $\beta$ -グルコシダーゼ様の酵素遺伝子の情報を取得し、このクローニングを行った。大腸菌で発現させた酵素はヤセウツボの種子の細胞壁多糖を基質とし、反応産物としてマンノースが得られたことから、細胞壁多糖を分解するエキソ型の  $\beta$ -マンノシダーゼであることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Enzymes which can degrade cell-wall polysaccharides of plants are useful for effective conversion of plant biomass. In this project, we focused on a parasitic plant, *Orobanche minor*, which can degrade the cell-wall of roots of their host plants. From RNAseq data, a beta-glucosidase homologous gene was obtained. The enzyme expressed in *E. coli* showed beta-mannosidase activity when cell-wall polysaccharides from *O. minor* seeds were used as a substrate. This is the first report that indicates beta-mannosidase from plants showed activity toward plant cell-wall components.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能、バイオプロセス

キーワード：寄生植物 糖質加水分解酵素 マンノシダーゼ バイオマス変換 細胞壁多糖

### 1. 研究開始当初の背景

植物バイオマスの効率的な変換には、難分解性の細胞壁を微生物に利用されやすい形に変換する必要がある。これまで、細胞壁を効率的に分解可能な酵素の遺伝子資源として主に白色腐朽菌が注目されてきた。本研究課題では、植物の細胞壁分解酵素の新たな遺伝子資源として寄生植物に着目した。寄生植物は、宿主植物の細胞壁を分解し、吸器と呼ばれる特殊な器官を宿主に侵入させることによって自身の維管束を宿主のものに接続する能力を有することから、効率のよい細胞壁分解系を有すると考えられた。

### 2. 研究の目的

寄生植物の細胞壁に関わる遺伝子群の取得、ならびに、これらの遺伝子がコードする酵素の機能解析を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

国内で入手および栽培が可能な帰化植物であるヤセウツボ (*Orobanche minor*) を実験材料として用いた。各生育段階まで育成したヤセウツボより全 RNA を抽出し、次世代シーケンサーによりトランスクリプトーム解析を行った。発芽～寄生過程で発現量の多い糖質加水分解酵素について常法によってクローニングを行った。取得した酵素について、細胞内局在ならびに基質特異性の解析を行った。

### 4. 研究成果

RNAseq の結果、発芽時に高発現している  $\alpha$ -グルコシダーゼ様酵素遺伝子の存在が明らかとなった。この遺伝子の全長 ORF 配列を取得し、*in silico* 解析を行ったところ、この酵素は細胞壁に輸送される  $\alpha$ -マンノシダーゼである可能性が示唆された。そこで、蛍光タンパク質との融合タンパク質としてタバコ BY-2 細胞やタマネギ表皮細胞で一過性に発現させたところ、この酵素が N 末端側のシグナルによって細胞壁に輸送されることが明らかとなった (図 1)。この遺伝子

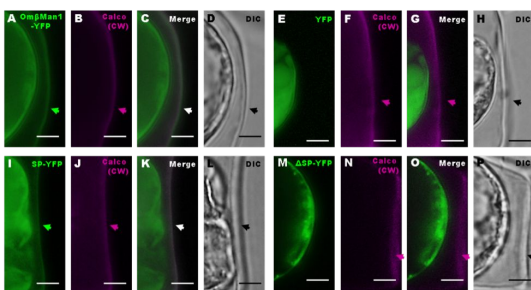


図 1.  $\alpha$ -マンノシダーゼ (OmBMAN) のタバコ BY-2 細胞での細胞壁への局在。

を大腸菌にて異種発現させたところ、至適 pH は 5 であることがわかり、この酵素が細胞壁で機能することの整合性が確認出来た。各種モデル配糖体を用いた基質特異性の解析によって、この酵素が  $\alpha$ -マンノシド結合の加水分解を特異的に触媒することが示された (図 2)。さらに、植物内での基質を特

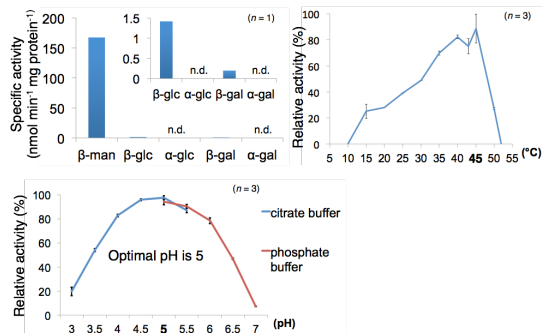


図 2.  $\alpha$ -マンノシダーゼの基質特異性、至適温度ならびに至適 pH の解析結果。

定するためにヤセウツボおよび宿主のムラサキツメクサの根より細胞壁多糖を調製し、これを基質として用いたところ、ヤセウツボの種子由来の細胞壁多糖を基質とした場合に、生成物としてマンノースが検出されたことから、この酵素が種子の細胞壁多糖のエキソ型  $\alpha$ -マンノシダーゼであることが示唆された (図 3)。これは植物由来の  $\alpha$ -マンノシダーゼが細胞壁を分解することを直接的に示した最初の報告例である。

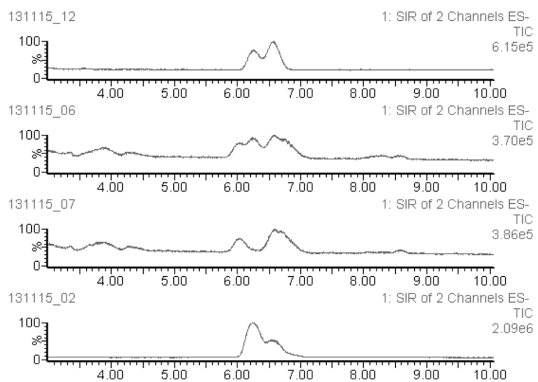


図 3.  $\alpha$ -マンノシダーゼによるヤセウツボの発芽種子より調製した細胞壁多糖の生成物 (2 段階目)。6.3 分に現れるピークがマンノースを示す。1 段階目はマンノースおよびグルコース (6.5 分付近のピーク) の標準物質、3 段階目は熱失活させた  $\alpha$ -マンノシダーゼを用いたネガティブコントロール。4 段階目は細胞壁多糖を塩酸で完全加水分解させた反応物。

さらに、この酵素のオルソログが植物の発芽に与える影響についても解析を行った。シロイヌナズナの相同遺伝子である  $\beta$ -グルコシダーゼ 44 (図 4. BGLU44) の欠損変異体株について、発芽の時間経過および発芽率を調べたところ、発芽時間の遅延、ならびに、発芽率の低下が確認された(図 5)。以上の結果から、この  $\beta$ -マンノシダーゼは植物の発芽になんらかの重要な役割を果たしていることも示唆された。

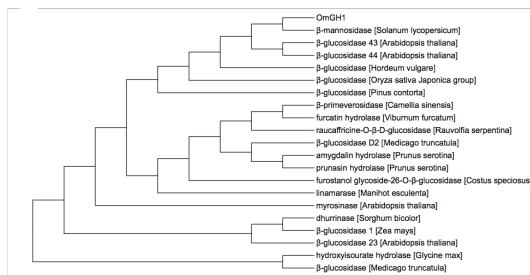


図 4. 植物の  $\beta$ -マンノシダーゼの分子系統樹。取得した配列はシロイヌナズナの  $\beta$ -グルコシダーゼ 43, 44 と高い配列同一性を持つ。

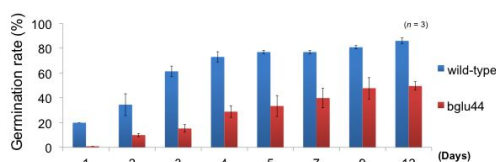


図 5. シロイヌナズナの  $\beta$ -グルコシダーゼ 44 欠損変異体株 (赤) は野生型株 (青) に比べ、発芽の遅延ならびに発芽率が低下する。

以上の結果より、ヤセウツボを遺伝子資源として細胞壁の分解に関わる新規酵素の取得に成功し、さらに、この酵素が植物の発芽に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

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 4 件)

- 東久保諒, ギリモグレゴリー, 若林孝俊, 水谷正治, 杉本幸裕, 關光, 村中俊哉, 岡澤敦司, ヤセウツボ発芽種子で高発現する糖加水分解酵素の機能解析, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2104.3.27-30, 東京

- 東久保諒, ギリモグレゴリー, 若林孝俊, 水谷正治, 杉本幸裕, 關光, 村中俊哉, 岡澤敦司, ヤセウツボ発芽種子で高発現する糖加水分解酵素の機能解析, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2104.3.27-30, 東京

- Guirimand, G., Higashikubo, R., Wakabayashi, T., Yasumoto, S., Mizutani, M., Sugimoto, Y., Seki, H., Muranaka, T., Okazawa, A., Functional characterization of  $\beta$ -mannosidase involved in the early germination process of *Orobancha minor*, 12<sup>th</sup> World Congress on Parasitic Plants, 2013.7.15-20, Sheffield, UK

- Guirimand, G., Higashikubo, R., Wakabayashi, T., Yasumoto, S., Mizutani, M., Sugimoto, Y., Seki, H., Muranaka, T., Okazawa, A., Functional characterization of  $\beta$ -mannosidase involved in the early germination process of the root-parasitic weed *Orobancha minor*, 第 54 回日本植物生理学会年会, 2013.3.21-23, 岡山

[図書](計 0 件)

[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

岡澤 敦司 (OKAZAWA, Atsushi)  
大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：10294042

(2)研究分担者

大槻 隆司 (OHTSUKI, Takashi )  
山梨大学・医学工学総合研究部・准教授  
研究者番号：70313781

(3)連携研究者

( )

研究者番号：