—受賞論文—

The Study of the Biosynthesis and the Structure of Plant Cell Wall Polysaccharides*

植物細胞壁多糖の生合成ならびに構造解析に関する研究*

小西照子 (こにし てるこ)^{1,*}Teruko Konishi^{1,*}

¹ 琉球大学農学部亜熱帯生物資源科学科
903-0213 沖縄県西原町千原 1 番地

¹ Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus
1 Senbaru, Nishihara, Okinawa 903-0213, Japan

要旨：植物の細胞壁多糖構造を解明するには、細胞壁を構成する多糖を緻密に分離し、それぞれの多糖について解析を行う必要がある。しかし、キシログルカンのような数種の糖から構成されるヘテロ多糖の構造は極めて複雑であり、構造解析には多くの時間とサンプル量を要する。そこで、キシログルカン特異的な酵素であるキシログルカナーゼおよびイソプリメバロース生成酵素を用いた新たな構造解析方法を開発し、迅速かつ微量サンプルでのキシログルカン構造解析を可能とした。一方、細胞壁多糖の生合成メカニズムの解明は、細胞壁構造を理解するうえで重要なアプローチであるが、その生合成メカニズムは未だ不明な点が多い。細胞壁多糖の多くはピラノース型の糖から構成されているのに対し、フラノース型の糖のみで構成されているアラビナンの生合成メカニズムは、植物細胞壁多糖の中でも最も興味深いものである。筆者は *in vitro* におけるアラビナンの生合成に世界で初めて成功した。ついで、アラビナンの生合成基質となる UDP-アラビノフラノースを生成する酵素 (UDP-アラビノピラノースムターゼ) の精製・単離に成功し、本酵素が植物に存在することを証明した。

キーワード：植物細胞壁多糖、キシログルカン、アラビナン、UDP-アラビノフラノース、UDP-アラビノピラノースムターゼ***

1. はじめに

植物の細胞をとり囲む細胞壁は多糖類を主成分とし、植物の伸長成長、細胞の形態形成、外的環境ストレスや病原菌からの防御機構に関与するなど、植物の生命維持に重要な働きを担っている。また、植物の細胞壁多糖は地球上で最も豊富な有機物資源であり、食物繊維源や化学製品の原料として利用されるほか、近年では、バイオ燃料の原料として注目されるなど、我々の生活に欠かせない物質である。このような背景から、例えばバイオ燃料に適した細胞壁をもつ植物など、細胞壁多糖の組成や構造を改変し、利用しやすい細胞壁を有する植物を人為的に作出する研究が活発化している。こうした技術開発の基盤となるのは、植物細胞壁多糖の構造の詳細な理解と、生合成のメカニズムの解明である。細胞壁多糖の生合成に関しては、生化学的手法に加え、順遺伝学や逆遺伝学的手法により、ここ数年で多くの合成関連酵素の遺伝子が明らかにされているが、

生合成機構の完全解明には至っていない。

筆者らは、植物の伸長成長と密接な関係が示唆されるキシログルカンの構造解析や、フラノース型の糖で構成されることでその生合成メカニズムが注目されるアラビナンの生合成について、先駆的な成果を上げることになった。本論では、これらの研究成果と将来展望についてレビューする。

2. キシログルカンの構造解析¹⁾

キシログルカンは、双子葉植物において最も主要なヘミセルロースであり、セルロースと水素結合することによりセルロース繊維を架橋している²⁾。キシログルカンとセルロースのネットワークは、植物の伸長成長と密接な関係があることが示されている。キシログルカンはセルロース様 β -1,4-グルカンを主鎖とし、側鎖にキシロース、ガラクトース、フコースが付加された非常に複雑な構造を有する

* 本原稿は、日本応用糖質科学会平成 26 年度大会の奨励賞受賞講演で一部発表された。

** 連絡先 (Tel. 098-895-8733, Fax. 098-895-8734, E-mail: konishi@agr.u-ryukyu.ac.jp)

*** Key words: plant cell wall polysaccharides, xyloglucan, arabinan, UDP-arabinofuranose, UDP-arabinopyranose mutase

多糖である^{2,3)}。当時、キシログルカンの構造を解析するためには、植物から4 M KOHでヘミセルロースを抽出した後、ヘミセルロース画分からさらにキシログルカンを精製しなければならず、多くの時間とサンプル量が必要であった。そこで、我々は新たなキシログルカンの構造解析の方法を検討した。キシログルカンは4つのグルコース主鎖にキシロース側鎖が結合した7糖のオリゴ糖を基本ユニットとし、オリゴ糖ユニットの繰り返し構造から構成される(図1, 2)。キシログルカンに特異的な微生物由来キシログ

ルカーゼ (XGase) で処理すると、数種のオリゴ糖ユニットが得られ、さらにXGase分解物をイソプリメベロース生成酵素 (IPase) で処理すると、さらに数種のオリゴ糖が得られる(図1, 2)^{4,5)}。これらの酵素生成物をパルスドアンペロメトリー検出器を装備した高速液体クロマトグラフィーに供し、キシログルカンを構成しているオリゴ糖を同定した(図3)⁶⁾。この方法により、キシログルカンを精製する必要がなく、高感度で検出できるため微量サンプルでの構造解析を可能にし、迅速かつ簡便にキシログルカンの詳細な構造解析を行えるようになった。この方法を用いて、葉菜類5種および根菜類5種のキシログルカン構造を比較した結果(表1)、キシログルカンの構成オリゴ糖ユニットに品種間の差はみられず、10品種すべてのキシログルカンは、6種のオリゴ糖ユニットで構成されており、中でもXXXXG, XXFG, XLFG(図2を参照)のオリゴ糖ユニットの比率が高いことが明らかとなった⁶⁾。さらに、この方法をもとに、リングの軟化時におけるキシログルカンの構造が解析され、果実の成熟に伴って生じるキシログルカンの構造変化に関する知見が得られている⁷⁾。

図1. キシログルカンの酵素処理

キシログルカンをキシログルカーゼおよびイソプリメベロース生成酵素で処理するとオリゴ糖ユニットが得られる。ハサミは酵素切断箇所を示す。

3. アラビナンの生合成

アラビナンはアラビノフラノースが α -1,5-結合した多糖

図2. キシログルカーゼおよびイソプリメベロース生成酵素処理で得られるキシログルカンオリゴ糖ユニット

図1のように、キシログルカンをキシログルカーゼおよびイソプリメベロース生成酵素で処理するとオリゴ糖ユニットが得られる。それぞれのオリゴ糖は末端残基の糖をもとにした一文字表記により表わされる。G, グルコース; X, キシロース; L, ガラクトース; F, フコース。

図3. キシログルカンの酵素処理のクロマトグラム

(A) キシログルカンの全オリゴ糖ユニット, (B) キシログルカンをキシログルカナーゼ処理した反応生成物, (C) キシログルカナーゼ処理後の反応生成物をさらにイソプリメバロース生成酵素で処理した反応生成物のクロマトグラム。

表1. 葉菜類および根菜類由来キシログルカンオリゴ糖ユニットの構造

	オリゴ糖ユニット (モル%)					
	XXXG	XXLG	XLXG	XXFG	XLLG	XLFG
葉菜類						
キャベツ	35	6	5	22	3	29
ハクサイ	35	9	5	24	2	25
ホウレンソウ	38	6	5	22	5	24
チンゲンサイ	35	14	6	19	4	22
レタス	33	7	4	31	3	22
根菜類						
カブ	35	3	8	17	4	33
ダイコン	34	2	10	13	3	38
ゴボウ	34	3	4	27	4	28
ニンジン	33	7	4	29	1	26
レンコン	41	2	5	37	2	13

であり、ラムノガラクトツロナン I の側鎖として存在する。多糖中の多くの糖残基がピラノース型 (6 員環) で存在する中、アラビナンは熱力学的に不安定なフラノース型 (5 員環) の糖のみで構成されている。細胞壁中のアラビナン

図4. 多糖合成メカニズム

多糖の生合成は、糖転移酵素が基質である糖ヌクレオチド (NDP-糖) の糖部分をオリゴ糖アクセプターの非還元末端に転移することで行われる。

が欠損した植物では種子形成において異常をきたすことが報告⁹⁾されるなど、植物の生命維持や生殖には必須の多糖である。一般的に、植物の細胞壁多糖は、糖ヌクレオチドを基質とし、糖転移酵素が糖ヌクレオチドの糖部分をアクセプターの非還元末端に付加することにより合成されるが (図4)^{2,9,10)}、アラビナンの生合成については、他の細胞壁多糖に比べてまったく理解が進んでいなかった。

図5. アラビナン合成

酵素はマングマメ由来膜画分、アクセプターにアラビノオリゴ糖、基質にUDP-アラビノピラノースまたはUDP-アラビノフラノースを用いた。(左) UDP-アラビノピラノースまたは(右) UDP-アラビノフラノースを基質に用いた場合は、アラビノピラノースまたはアラビノフラノースが、アクセプターの非還元末端にそれぞれ1つずつ転移される。

図6. マングマメ由来ミクロゾーム画分を用いたアラビナン生合成

基質にUDP-アラビノフラノース、アクセプターにアラビノオリゴ糖7糖、酵素にマングマメ由来膜画分を用いて *in vitro* におけるアラビナン生合成を行うと、酵素反応1時間後にアラビノオリゴ糖8糖および9糖が新しく検出され、4時間後には8糖、9糖に加えて10糖が検出される。

3.1 *in vitro* におけるアラビナン生合成¹¹⁾

アラビナンの構成糖はアラビノフラノースであるため、基質としてはUDP-アラビノフラノースが考えられるが、当時、植物からUDP-アラビノフラノースは検出されておらず、アラビノフラノース残基の前駆体はUDP-アラビノピラノースであると推察されていた。そこで、基質としてUDP-アラビノピラノース、アクセプターにはアラビノオリゴ糖、酵素にはマングマメ由来膜画分を用いて *in vitro* におけるアラビナンの生合成反応を行った。その結果、アクセプターの非還元末端にはアラビノピラノースが β -1,3で転移されることがわかった(図5)¹²⁾。しかし、これはアラビナンの構造と異なり、アラビナンの合成基質はUDP-アラビノピラノースではないことが明らかとなった。そこで次に、UDP-アラビノフラノースを合成し、それを基質として使い、UDP-アラビノピラノースのときと同様にアラビナン生合成反応を行ったところ、1時間後にはアクセ

図7. イネ由来細胞質画分を用いたUDP-アラビノピラノースムターゼ活性

基質にUDP-アラビノフラノース (UDP-Araf) (左) またはUDP-アラビノピラノース (UDP-Arap) (右) を用いて反応させると、5分後にはUDP-Arap またはUDP-Araf がそれぞれ検出される。

プターに1残基または2残基の糖が付加されたオリゴ糖が検出された。これを質量分析器で解析した結果、反応生成物はアクセプターの非還元末端にアラビノフラノースが α -1,5で転移されたアラビノオリゴ糖であることがわかった(図6)¹¹⁾。この結果より、アラビナンの合成基質はUDP-アラビノフラノースであることが明らかとなった(図5)。この成果をもとに、アラビナン合成に関与する転移酵素がゴルジ膜画分に局在すること、また、アクセプターとして4糖のアラビノオリゴ糖を用いたときにアラビナン生合成が最も効率良く行われることなどが明らかとなった¹¹⁾。

3.2 UDP-アラビノピラノースムターゼ¹³⁾

マイコバクテリアなどの微生物では、UDP-ガラクトピラノースとUDP-ガラクトフラノースの相互変換を行う酵素のUDP-ガラクトピラノースムターゼの存在が既に報告されていた^{14,15)}。このことより、植物では、アラビナンの合成基質であるUDP-アラビノフラノースはUDP-アラビ

図 8. 植物における UDP-グルコースから UDP-アラビノフラノースまでの糖ヌクレオチド *de novo* 合成経路

UDP-アラビノピラノースムターゼの発見により、糖ヌクレオチドの *de novo* 合成経路において UDP-アラビノフラノース生成の経路が新たに加えられた。矢印の右側は経路の反応を触媒する酵素を示す。

ノピラノースムターゼ (UAM) により合成されると推察した我々は、UDP-アラビノフラノースと UDP-アラビノピラノースを相互変換する酵素の活性方法確立した (図 7)¹³⁾。そしてイネの細胞質画分より UAM の単離・精製に成功し、UAM には新しく EC 番号 (EC. 5.4.99.30) が付与された。これにより、植物細胞内では UDP-キシロースから UDP-アラビノピラノースが生成され、次いで UDP-アラビノフラノースが生成されるという糖ヌクレオチドの *de novo* 合成における新しい経路を見出すことができた (図 8)。また、興味深いことに、UAM のアミノ酸配列は、Dhugga らによって既に報告されていた Reversibly glycosylated polypeptide (RGP)^{16,17)} とよばれる酵素と完全に一致した。RGP は UDP-グルコースの糖部分を自身のタンパク質に転移する糖転移活性を有することから、多糖合成のイニシエーターと考えられている酵素である。しかしながら、UAM のムターゼ活性と RGP の糖転移の関係については未だ解明されていない。

イネ由来 UAM の平衡反応は UDP-アラビノピラノース生成に大きく傾いており、UDP-アラビノフラノースに対する基質親和性は UDP-アラビノピラノースに対する基質親和性に比べて高い。UDP-アラビノフラノースが非常に不安定で壊れやすい点、そして UAM の反応特性や酵素特性から考えると、植物細胞内における UDP-アラビノフラノース生成は、他の糖ヌクレオチドと違って緻密に制御されており、UAM により合成された UDP-アラビノフラノースは直ちにアラビナンなどの多糖合成に利用されることが考えられ、非常に代謝回転の速い物質であることが推察された。また、UAM はイネには 3 種、アラビドプシスには 5 種のホモログが存在するなど、UAM は植物内で遺伝子ファミリーを形成し、活性を保持するクラス 1 と活性を保持しないクラス 2 とに分類されている¹⁸⁾。そして、イネ由来 UAM では UAM 1, 2 および 3 が複合体を形成しており、ヘテロ複合体として存在することが明らかとなっている¹³⁾。さらに、UAM は膜貫通部位を保持しないにも関

わらず、ゴルジ膜に局在する UAM も検出されている。細胞壁多糖の合成に関与する糖転移酵素の多くはゴルジ膜に局在することから、細胞質に局在する UAM よりもゴルジ膜に局在する UAM が細胞壁合成に深く関わっているものと考えられるが、現在、これらの解明に向けて取組んでいるところである。

4. おわりに

筆者は植物細胞壁多糖であるキシログルカンの分子構造の規則性の美しさに魅せられ、この研究の世界に入った。現在では、多糖の構造解析に加えて、植物細胞壁多糖の生合成メカニズムの解明へと新たな研究の方向を展開している。細胞壁多糖の生合成に関しては、多糖の種類それぞれで基質やアクセプター、合成酵素 (糖転移酵素) が異なるため、1 つの多糖合成の条件を確立するまでにかなりの時間を要する。また、多糖の合成酵素の多くが膜タンパク質であるため酵素が不安定で酵素精製が困難であることに加えて、基質が高額であることなどの理由から、研究が困難な分野であり、植物細胞壁多糖を扱う研究者でもその生合成を対象とする研究者は少ない。しかし、昨今のバイオ燃料の開発研究が活発化するのに伴い、国内外において植物細胞壁多糖に関する研究の重要性が見直されてきたことで、様々な研究分野の研究者が細胞壁多糖の研究に携わるようになった。ここ数年で、糖転移酵素など細胞壁多糖合成に関連する酵素遺伝子が次々と明らかになっているが^{19,20)}、これは様々な研究分野の研究者の知恵が集結し、新たな視点や斬新な実験手法が取り入れられたことが突破口となり、研究の躍進につながったと考えている。

著者が発見した UAM については、例えば、膜貫通部位をもたない UAM がどのようにゴルジ膜に局在しているのか、また細胞質型 UAM と膜局在型 UAM の特性の違い等々、まだまだ明らかにすべきことが山積みである。これまでに指導を受けた先生方から「研究に終わりはない。」という言葉が聞かされた。現実には、新しい発見をすればするほど次々と新たな疑問が湧き、本当に研究に終わりが無いと痛感する毎日である。今回の受賞を契機に、今後とも筆者のライフワークとして、多糖の構造解析や UAM など多糖の生合成に関与する酵素の特性解明など、植物細胞壁多糖に関する研究に一層精進、尽力する所存である。

謝辞

このたび平成 26 年度日本応用糖質学会奨励賞を受賞するにあたり、日本応用糖質学会会長の春見隆文先生をはじめとする選考委員会の諸先生方、ご推薦を賜りました日本応用糖質学会九州支部支部長の鯨島吉廣先生をはじめ、同会九州支部の関係者の皆様に深く感謝いたします。また、植物細胞壁多糖の研究を始めるきっかけを与えていただきました加藤陽治先生 (弘前大学教育学部名誉教授)、林隆久先生 (現 東京農業大学教授)、Kenneth Keegstra 先

生 (ミシガン州立大学教授), 石井忠先生 (森林総合研究所) には終始ご指導を賜りましたことを厚く御礼申し上げます。さらに, これらの研究成果は多くの共同研究者の方々のご指導やご協力, 有益な議論によって得られたものです。これまでに筆者との共同研究に鋭意ご尽力いただきましたすべての皆様と, 研究を支えて下さったすべての方々に心より感謝申し上げます。

文献

- 1) T. Konishi, Y. Mitsuishi and Y. Kato: Analysis of the oligosaccharide units of xyloglucans by digestion with isopremeberose-producing oligoxyloglucan hydrolase followed by anion-exchange chromatography. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 2421–2424 (1998).
- 2) N. Carpita and M. McAnn: The cell wall. in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, B.B. Buchanan, W. Gruissem and R.L. Jones, eds., the American Society of Plant Biologists, Rockville, pp. 52–108 (2000).
- 3) T. Hayashi: Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, **40**, 139–168 (1989).
- 4) Y. Kato and K. Matsuda: Examination of the fine structures of xyloglucans using endo-(1,4)- β -D-glucanases. *Methods Carbohydr. Chem.*, **5**, 207–216 (1994).
- 5) Y. Kato, J. Matsushita, T. Kubodera and K. Matsuda: A novel enzyme producing isopremeberose from oligoxyloglucans of *Aspergillus oryzae*. *J. Biochem.*, **97**, 801–810 (1985).
- 6) T. Konishi, Y. Mitsuishi and Y. Kato: Compositional analysis of the oligosaccharide units of xyloglucans isolated from the cell walls of leaf and root vegetables. *J. Appl. Glycosci.*, **45**, 401–405 (1998).
- 7) S. Ito, Y. Mitsuishi, T. Okuno and Y. Kato: Changes in the structure of xyloglucan of apple fruit during development. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, **73**, 51–56 (2004).
- 8) G. Drakakaki, O. Zabolina, I. Delgado, S. Robert, K. Keegstra and N. Raikhel: Arabidopsis reversibly glycosylated polypeptides 1 and 2 are essential for pollen development. *Plant Physiol.*, **142**, 1480–1492 (2006).
- 9) W.D. Reiter: Biochemical genetics of nucleotide sugar interconversion reactions. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **11**, 236–243 (2008).
- 10) M. Bar-Peled and M.A. O'Neill: Plant nucleotide sugar formation, interconversion, and salvage by sugar recycling. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **62**, 127–155 (2011).
- 11) T. Konishi, H. Ono, M. Ohnishi-Kameyama, S. Kaneko and T. Ishii: Identification of a mung bean arabinofuranosyltransferase that transfers arabinofuranosyl residues onto (1,5)-linked α -L-arabino-oligosaccharides. *Plant Physiol.*, **141**, 1098–1105 (2006).
- 12) T. Ishii, T. Konishi, Y. Itoh, H. Ono and M. Kameyama: A β -(1 $\rightarrow$ 3)-arabinopyranosyltransferase that transfers a single arabinopyranose onto arabino-oligosaccharides in mung bean (*Vigna radiate*) hypocotyls. *Phytochemistry*, **66**, 2418–2425 (2005).
- 13) T. Konishi, T. Takeda, Y. Miyazaki, T. Hayashi and T. Ishii: A plant mutase that interconverts UDP-arabinofuranose and UDP-arabinopyranose. *Glycobiology*, **17**, 345–354 (2007).
- 14) P.M. Nassau, S.L. Martin, R.E. Brown, A. Weston, D. Monsey, M.R. McNeil and K. Duncan: Galactofuranose biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: identification and cloning of UDP-galactopyranose mutase. *J. Bacteriol.*, **178**, 1047–1052 (1996).
- 15) S.M. Berverley, K.L. Owens, M. Showalter, C.L. Griffith, D.L. Doering, V.C. Jones and M.R. McNeil: Eukaryotic UDP-galactopyranose mutase (*GLF* gene) in microbial and metazoal pathogens. *Eukaryot. Cell*, **4**, 1147–1154 (2005).
- 16) K.S. Dhugga, P. Ulvskov, S.R. Gallagher and P.M. Ray: Plant polypeptides reversibly glycosylated by UDP-glucose-possible components of Golgi β -glucan synthase in pea cells. *J. Biol. Chem.*, **266**, 21977–21984 (1991).
- 17) K.S. Dhugga, S.C. Tiwari and P.M. Ray: A reversibly glycosylated polypeptide (RGP 1) possibly involved in plant cell wall synthesis: purification, gene cloning, and trans-Golgi localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7679–7684 (1997).
- 18) C. Rautengarten, B. Ebert, T. Herter, C.J. Petzold, T. Ishii, A. Mukhopadhyay, B. Usadel and H.V. Scheller: The interconversion of UDP-arabinopyranose and UDP-arabinofuranose is indispensable for plant development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **23**, 1373–1390 (2011).
- 19) N. Anders, M.D. Wilkinson, A. Lovegrove, J. Freeman, T. Tryfona, T.K. Pellny, T. Weimar, J.C. Mortimer, K. Stott, J.M. Baker, M. Defoin-Platel, P.R. Shewry, P. Dupree and R.A. Mitchell: Glycosyl transferases in family 61 mediate arabinofuranosyl transfer onto xylan in grasses. *Proc. Natl. Sci. USA*, **109**, 989–993 (2012).
- 20) C. Rautengarten, B. Ebert, I. Moreno, H. Temple, T. Herter, B. Link, D. Donas-Cofre, A. Moreno, S. Saez-Aguayo, F. Blanco, J.C. Mortimer, A. Schultink, W.D. Reiter, P. Dupree, M. Pauly, J.L. Heazlewood, H.V. Scheller and A. Orellana: The Golgi localized bifunctional UDP-rhamnose/UDP-galactose transporter family of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Sci. USA*, **111**, 11563–11568 (2014).