

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 5月31日現在

機関番号：17701
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23780042
 研究課題名(和文) 植物細胞壁糖タンパク質の糖鎖分解に関わるキサントモナス属菌由来新規酵素群の解析
 研究課題名(英文) Functional analysis of novel enzymes related to degradation of sugar chains present on plant cell wall glycoproteins in *Xanthomonas* sp.
 研究代表者
 中村 正幸 (NAKAMURA MASAYUKI)
 鹿児島大学・農学部・准教授
 研究者番号：90404475

研究成果の概要(和文)：アブラナ科植物黒腐病細菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC33913)に認められる新規酵素群の遺伝子クローニングとタンパク質機能解析を行った結果、xcc2399およびxcc2394は、植物細胞壁に存在する糖タンパク質であるエクステンシン上のβ-アラビノオリゴ糖鎖を基質とする酵素群であることが明らかとなった。これら酵素群は、病原性には関与しておらず、植物体上での炭素源利用に関わっていることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：We cloned and analyzed novel enzyme genes from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC33913. As a result, it was revealed that xcc2399 and xcc2394 have activities to degrade β-L-arabinofuranosides present on extensin in plant cell walls. These enzymes are not involved in pathogenicity but thought to be related to arabinose uptake for carbon source metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：植物細胞壁 糖タンパク質 糖鎖分解酵素 エクステンシン *Xanthomonas*

1. 研究開始当初の背景

近年、ビフィズス菌より新規の酵素群が発見され、そのオルソログが植物病原細菌である *Xanthomonas* 属細菌にも存在することが明らかとなった。また、新規酵素群の基質は、植物細胞壁に存在する糖タンパク質であるエクステンシン上の糖鎖(β-アラビノオリゴ糖

鎖)であることから、*Xanthomonas* 属細菌のゲノム上に認められるオルソログが、ビフィズス菌と同じようにエクステンシン上のβ-アラビノオリゴ糖鎖を分解できるなら、病原性に関わっている可能性が考えられた。そこで、本研究では、*Xanthomonas* 属細菌由来新規酵素

群のクローニングと機能解析を行い、病原性との関わりについて調査した。

2. 研究の目的

Xanthomonas 属細菌由来新規酵素群の機能解析を行い、これら酵素群が病原性に関わっているのかどうかを明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

フルーシークエンス済みであるアブラナ科植物黒腐病細菌 *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 株を用い、新規酵素群のクローニングと大腸菌を用いた組み換えタンパク質発現を行い、機能を特定した。遺伝子発現解析については、定量PCRを用いた。また、各酵素遺伝子の破壊株を作出し、病原性に関わっているかどうかを調査した。

4. 研究成果

(1) *xcc2399* 遺伝子の組み換えタンパク質発現に成功した(図 1)。本酵素は、エクステン上に存在する Ara3-Hyp(β 結合したアラビノース 3 つがヒドロキシプロリンに結合)より β -Ara2(アラビノースが 2 糖 β 結合)を特異的に遊離する働きを持っていることが明らかとなった(図 2)。

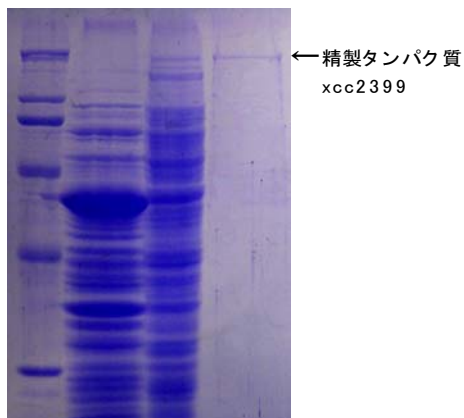


図 1. *xcc2399* の組み換えタンパク質発現
発現ベクターには、pCold TF を使用した。

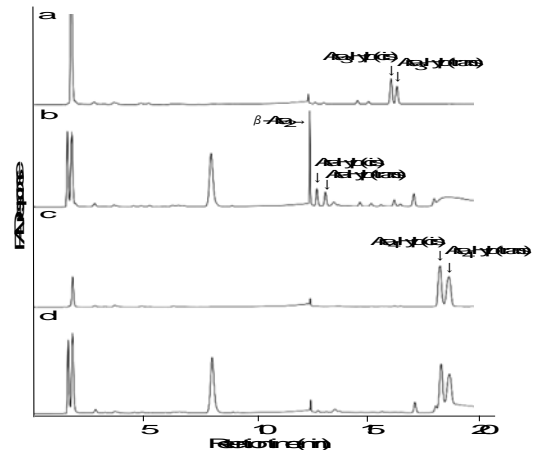


図 2. *xcc2399* が遊離する糖の検出
(HPAEC-PAD)

(2) *xcc2394* 遺伝子の組み換えタンパク質発現にも成功した(図 3)。本酵素は、 β -Ara2 を基質に、単糖のアラビノースを遊離する働きがあることが明らかとなった(図 4)。

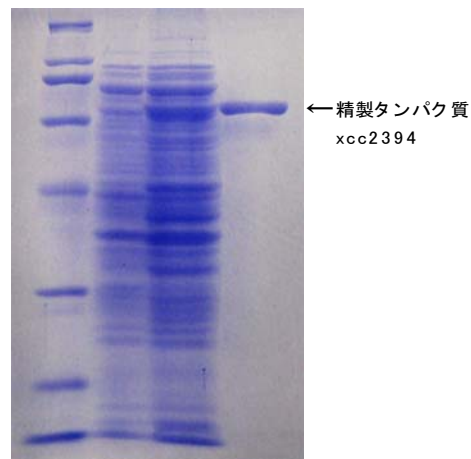


図 3. *xcc2394* の組み換えタンパク質発現
発現ベクターには、pET-23b を使用した。

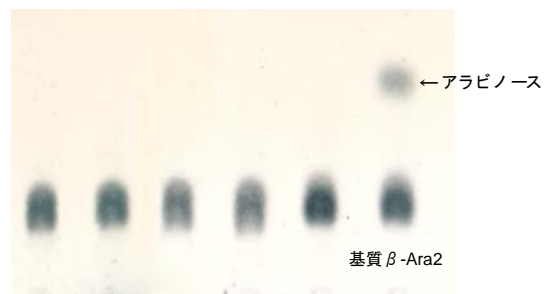


図 4. *xcc2394* が遊離する糖の検出(TLC)
(3) *xcc2399* のプロモーター領域に *hrpX* の結

合する PIP box 様配列(TTCG-N₁₆-TTCG)が認められた。そこで、*xcc2399*が *hrpX*により制御されているのかどうかを明らかにするため、完全培地および *hrp*-inducing medium (XVM2)を用い、*xcc2399*の発現解析を行った(図5)。その結果、*hrpX*の発現が増加しても、*xcc2399*の発現は、増加せず、*hrpX*による *xcc2399*の制御は無いと考えられた。

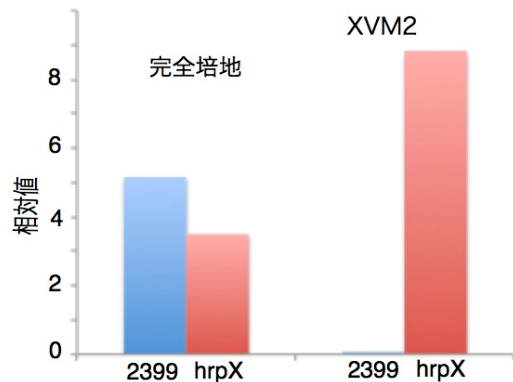


図5. *xcc2399* 遺伝子の発現解析

(4) *xcc2399* および *xcc2394* 遺伝子の破壊株を作出し、シロイヌナズナに接種したところ、野生株と同等の病徴を示し(図6)、これらの酵素が病原性に関与していないことが分かった。

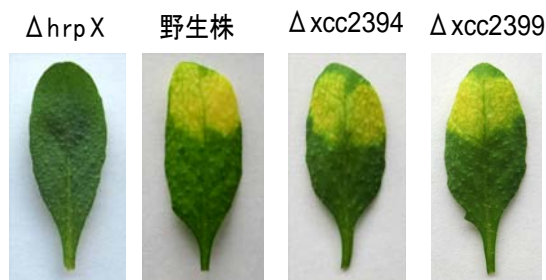


図6. シロイヌナズナを用いた遺伝子破壊株の接種

(5) 以上の結果をまとめると、まず *xcc2399*により、エクステンシン上のβ-アラビノオリゴ糖鎖 Ara₃-Hyp からβ-Ara₂が遊離され、その後、遊離されたβ-Ara₂は、*xcc2394*に

より、単糖のアラビノースに分解される一連の流れがあることが推測された(図7)。遺伝子破壊株による実験では、これらの酵素遺伝子が病原性に関与していないことが明らかとなったが、基質が自然界では、植物細胞壁内のみに存在することを考えると、これら酵素群は、植物体上でアラビノースを炭素源として利用する代謝に関与している可能性が考えられた。

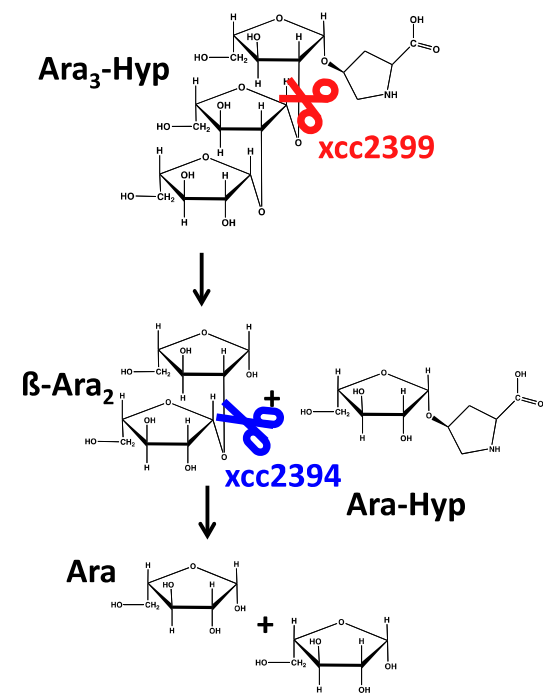


図7. *xcc2399* および *xcc2394* によるβ-アラビノオリゴ糖鎖分解の流れ

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. 安川結野・中村正幸・藤田清貴・岩井 久
Xanthomonas campestris pv. *campestris* ATCC33913 株由来 β-L-アラビノビオシダーゼのクローニングと機能解析(2012年11月14~15日) 日本植物病理学会九州部会 福岡県農村整備センター

2. 安川結野・中村正幸・藤田清貴・岩井 久
Xanthomonas campestris pv. *campestris*
ATCC33913 株由来 β -L-アラビノフラノシ
ダーゼのクローニングと機能解析(2011 年
11月9日) 日本植物病理学会九州部会 大
分 大分県労働福祉会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 正幸 (NAKAMURA MASAYUKI)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：90404475

(2) 連携研究者

藤田 清貴 (FUJITA KIYOTAKA)

鹿児島大学・農学部・助教

研究者番号：20381189