

# 植物の糖ヌクレオチド合成機構に関する研究

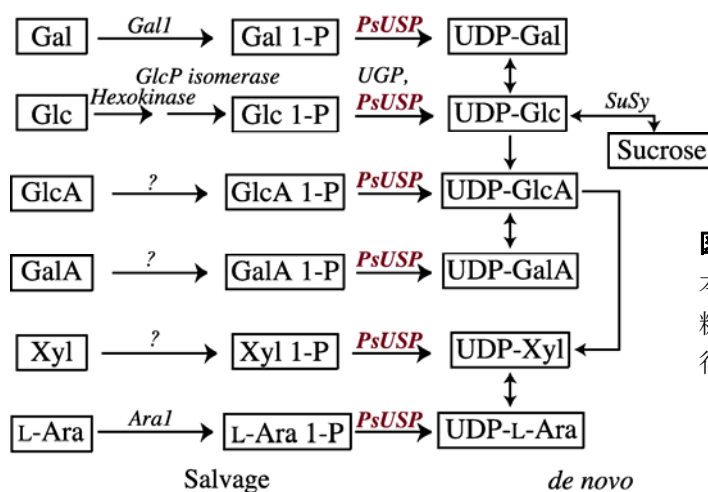
## Biosynthesis of nucleotide sugars in higher plants

プロジェクト代表者名: 小竹 敬久 (理学部・助手)

Toshihisa Kotake (faculty of science, research associate)

### 1 研究背景と目的

植物の多糖類、糖脂質、配糖体のほとんどは糖ヌクレオチドを基質として、糖転移酵素の働きにより合成される。グルコース(Glc)、キシロース(Xyl)、アラビノース(Ara)などの単糖がヌクレオチドと結合した糖ヌクレオチドは、*de novo*、*salvage* の2つの経路から供給される。*de novo* 経路では、UDP-グルコース(UDP-Glc)を初発基質とした変換反応により様々な UDP-糖が合成されるのに対して、*salvage* 経路では多糖類の分解などで生じた単糖から単糖1-リン酸を経て各種 UDP-糖が合成される(図1参照)。しかしながら、*salvage* 経路において UDP-糖の合成に関わる酵素はその一部しか同定されていない。本研究では、*salvage* 経路で各種糖1-リン酸を UDP-糖に変換する新規の UDP-糖ピロフォスホリラーゼの単離と性状解析を目的とした。



**図1 植物の糖ヌクレオチド合成経路**  
本研究では各種糖 1-リン酸から UDP-糖を合成する PsUSP の単離・解析を行った。

### 2 新規の糖ヌクレオチド合成酵素、PsUSP の単離と同定

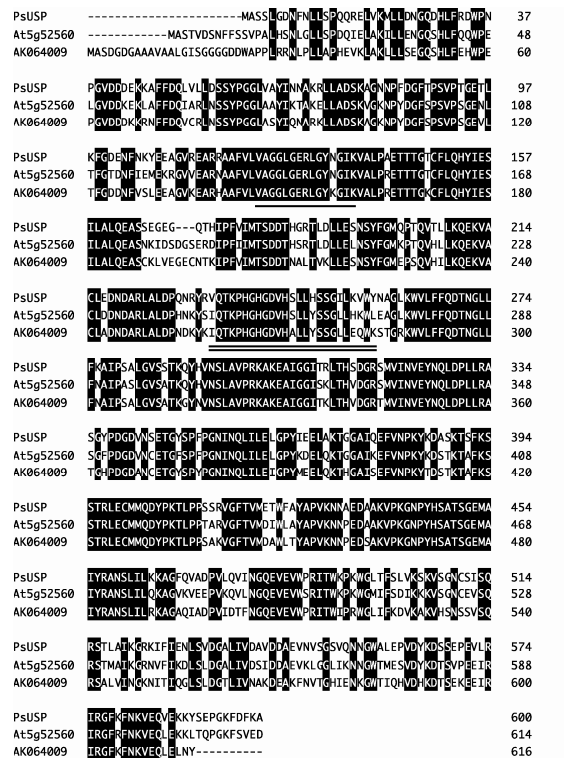
予備的な実験から、市販のトウモロコシ (*Pisum sativum*、エンドウ豆の芽生え) に、アラビノース 1-リン酸 (Ara 1-P) 及び UTP の存在下で、UDP-アラビノース (UDP-Ara) を合成する強い活性が含まれることが明らかとなった。そこで、トウモロコシ約 1 kg から UDP-Ara 合成酵素を精製した。一晩馴化したトウモロコシをジューサーミキサーで破碎し、硫酸塩析により粗酵素画分を調製した。粗酵素画分を透析後、DEAE-Sepharose FF カラムにかけ、0 - 0.3 M NaCl で溶出したところ、0.1 M NaCl 溶出画分で強い UDP-Ara 合成活性が検出された。この画分をさらに、Butyl-Toyopearl、Sephacryl S-200、DEAE-Sepharose FF カラムを用いて約 1200 倍に精製し

た。精製したタンパク質は SDS-PAGE 上で相対分子量 67 kDa の単一のバンドとして検出され、ほぼ純品に精製されていることが確認された。精製酵素は PsUSP (*Pisum sativum* UDP-sugar pyrophosphorylase) と命名した。

精製した PsUSP を用いて酵素の特性解析を行った。PsUSP の反応の至適温度は 45°C で、至適 pH は 7.0 であり、反応には Mg<sup>2+</sup> イオンが不可欠であった。糖ヌクレオチドのピロフォスフォリラーゼは通常、ヌクレオチド供与体基質 (ATP, UTP など) と糖供与体基質 (糖 1-リン酸) の存在下で、糖ヌクレオチドとピロリン酸を生成する。そこで、PsUSP のヌクレオチドや糖 1-リン酸に対する基質特異性を調べた。PsUSP は UTP 以外のヌクレオチド、ATP, CTP, GTP, ITP は基質とせず、UTP に高い特異性を示した。しかし一方で、糖 1-リン酸には幅広い特異性を示し、各種糖 1-リン酸から UDP-Glc、UDP-ガラクトース、UDP-キシロース、UDP-Ara、UDP-グルクロン酸を合成した。現在までに動物等も含めて真核生物にこのような幅広い基質特性を示す酵素は知られていないため、PsUSP が植物特有の新規の酵素であることが示唆された。

### 3 PsUSP 遺伝子の単離と大腸菌による組み換え酵素の作成

精製した PsUSP をプロテアーゼで限定加水分解し、内部のアミノ酸配列を決定した。決定した配列、YNQLDPLXRASGYPD (X は未同定) はシロイヌナズナやイネの機能不明遺伝子と高い相同性があった。そこで、これらの遺伝子間で保存された領域にデジェネレートプライマーを設計し、RT-PCR によりウミヨウから PsUSP の cDNA を増幅した。得られた cDNA 断片は決定したアミノ酸配列と一致する領域を含んでいた。増幅した塩基配列情報をもとに 3' 及び 5' RACE を行い、全長の PsUSP cDNA を単離した。PsUSP 遺伝子は 600 アミノ酸をコードしており、シロイヌナズナの機能不明遺伝子 At5g52560 と 77%、イネの cDNA クローン AK064009 と 72% の相同性を示した (図 2 参照)。また、弱い相同性 (20-30%) を示した UDP-Glc ピロフォスフォリラーゼや UDP-グルコサミンピロフォスフォリラーゼ以外に、動物、酵母、細菌等に相同な遺伝子は見つからなかった。

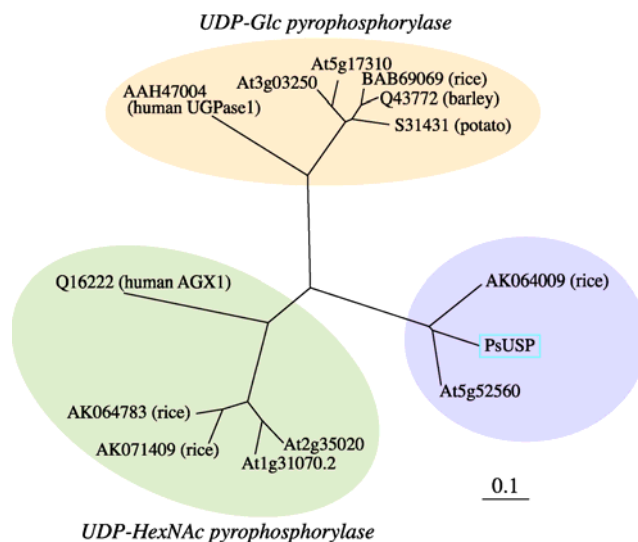


—, pyrophosphorylase consensus motif  
 ==, uridine-binding motif

図 2 PsUSP のアミノ酸配列

アミノ酸配列をもとに配列系統樹を作成したところ、PsUSP、At5g52560、AK064009 は UDP-Glc ピロフォスホリラーゼや UDP-グルコサミンピロフォスホリラーゼとは異なる集団を形成していることが明らかになった(図3参照)。このことから、PsUSP とそのホモログは糖ヌクレオチドの salvage 経路で UDP-糖の合成に関わる植物特有の酵素であることが示唆された(図1参照)。

*PsUSP* cDNA を市販のタンパク質発現用ベクター、pET32a に連結し、大腸菌で組み換え酵素を作成した。組み換え PsUSP (rPsUSP) はチオレドキシン、6 x His タグとの融合タンパク質として発現させた。10°C、6 日間の培養後、1.0 mM の IPTG により組み換えタンパク質を誘導し、大腸菌破砕物をニッケルキレートカラムにかけて組み換え酵素を精製した。得られた組み換え酵素はトロンビン消化により融合タンパク質(チオレドキシン、6 x His タグ)を除去し、SDS-PAGE により純度を確認した。rPsUSP は糖 1-リン酸に幅広い特異性を示し、トウモロコシから精製したネイティブな PsUSP と同じ性質を有することが示された。



**図3 PsUSP と他の酵素の関係**  
配列系統樹は Clustal W で作成した。

#### 4 組み換え酵素を用いた UDP-Ara の大量調製

先にも述べたとおり、UDP-糖は生体内では多糖類合成の基質として利用される分子であり、糖質研究には欠かせない物質の1つである。しかしながら、UDP-糖は全般に高価であり、化学合成の難しさから入手が困難な物質も多い。そこで、現在、米国で化学合成製品が販売されている UDP-Ara の酵素的な大量調製を試みた。

rPsUSP を 100 mg の Ara 1-P、100 mg の UTP に作用させた。この際、副産物として生じるピロリン酸を市販の酵母由来のピロフォスファターゼにより除去することで、ピロリン酸による逆反応の進行を抑制した。24 時間の酵素反応でほぼ全ての基質(90%以上)が反応し、活性炭カラム、ペーパークロマトグラフィーにより、純度の高い UDP-Ara(40 mg)が得られた。合成し

た UDP-Ara は  $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、 $^{31}\text{P-NMR}$  による構造解析から、UDP- $\beta$ -L-アラビノピラノシド(6員環体)であることが示された。これは、植物体内に存在する UDP-Ara と同一の構造で、組み換え酵素を用いた *in vitro* の酵素反応系により、天然に存在する UDP-Ara を合成出来ることが証明された。既に単糖を単糖 1-リン酸に変換する単糖キナーゼは同定されているため、原理的には、*in vitro* で単糖と ATP(単糖キナーゼの基質)、UTP から UDP-糖を多量に合成することが可能となった。

## 5 今後の展望

本研究では植物の糖ヌクレオチド salvage 経路で UDP-糖の生産に関わる新規の UDP-糖ピロフォスホリラーゼを単離した。シロイヌナズナやイネのゲノムには、他にも機能不明な糖ヌクレオチドピロフォスホリラーゼ様遺伝子が多数見られることから、植物には新規な糖ヌクレオチド代謝酵素が多く含まれている可能性が高い。現在、これらの遺伝子を単離して組み換え酵素の性状解析を行うとともに、シロイヌナズナのノックアウトラインを利用した遺伝子機能の解析を進めている。既に、PsUSP のシロイヌナズナにおけるホモログ、At5g52560 は PsUSP と同様の酵素活性があり、少なくとも生殖に不可欠な役割を果たすことなどを明らかにしている。今後、植物特有の糖ヌクレオチド代謝酵素を網羅的に解析するとともに、これらの生理的な意義についても明らかにしたい。

## 6 参考文献

Kotake T., Yamaguchi D., Ohzono H., Hojo S., Kaneko S., Ishida H. and Tsumuraya Y. UDP-sugar pyrophosphorylase with broad substrate specificity towards various monosaccharide 1-phosphates from pea sprouts. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 45728-45736 (2004).