

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H03997

研究課題名(和文)細胞間情報を担う糖鎖AMORの発見に基づく植物糖鎖シグナリングの解明

研究課題名(英文)Plant Glycosignaling Based on the Discovery of AMOR, a Bioactive Sugar Chain for Intercellular Signaling

研究代表者

東山 哲也(Higashiyama, Tetsuya)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授

研究者番号：00313205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らが同定に成功した生理活性をもつ糖鎖AMORを突破口に、情報分子としての糖鎖が、植物細胞間コミュニケーションでどのような重要性をもち、いかにして情報伝達を担うのかを明らかにすることを旨とした。AMORの新たな機能の探索や、AMORの受容メカニズムの解析を進めるために、有機化学合成によりAMORを改変することに成功した。これをもとに、AMOR構造(メチルグルクロノシルガラクトース)を特異的に認識するモノクローナル抗体を樹立した。また、多量体AMORを作製し、1分子あたりの高い活性を確認できた。AMOR合成系や受容体候補の遺伝子について解析を進めるためにウリクサの有用性が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AMORは特定の生理活性を有する植物糖鎖構造として初めて同定された。有機化学合成により植物糖鎖の研究を進めている研究グループは国内外に無く、本研究は目的においてもアプローチにおいても、極めて先導的な取り組みとなった。AMOR構造であるメチルグルクロノシルガラクトースを特異的に認識するモノクローナル抗体や、多量体AMORの作製にも初めて成功した。トレンニアで見いだされたトレンニアのAMOR生合成系や受容体等の候補遺伝子群について、トレンニア属ウリクサにおける進展も期待される。植物生殖の研究においても、植物糖鎖シグナリングの研究においても、新たな研究の潮流を生み出す研究として大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the importance of AMOR as a signaling molecule in plant cell-to-cell communication and how it is used for signal transduction, using the biologically active sugar chain AMOR. In order to explore the new functions of AMOR and to analyze the mechanism of AMOR reception, we succeeded in modifying AMOR by organic chemical synthesis. Based on this, we established monoclonal antibodies that specifically recognize the AMOR structure (methylglucuronosylgalactose). In addition, multimeric AMOR molecules were produced and high activity per molecule was confirmed; it is expected that *Torenia crustacea* will be useful for further analysis of the AMOR synthesis system and candidate receptor genes in combination of developed molecular tools.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：糖鎖 植物 細胞間シグナリング 受容体 有機化学合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究の発端は、我々が植物の生殖において、動物の受精能獲得に似た現象が存在することを発見したことにさかのぼる。動物の精子がメスの生殖器官内を移動するあいだに受精能を獲得するように、花粉管が雌しべの中を伸長するあいだに、卵組織からの誘引シグナルに応答できるようになることが明らかとなった。そして、卵組織を包む「胚珠(はいしゅ)」という受精前の種子組織の培養液に、花粉管を活性化する因子が含まれることを見出した。我々はこの因子を Activation Molecule for Response-capability から、AMOR (ギリシャ語でキューピッドの意味) と命名し、13 年間に渡ってその分子実体の同定を目指してきた。その結果、AMOR は胚珠やその近傍の組織に多く存在するアラビノガラクトタン (AG) 糖鎖であることを発見した。

AG 糖鎖は、アラビノガラクトタンタンパク質 (Arabinogalactan proteins; AGPs) と呼ばれる糖含量 90% 以上のペプチドグリカンの糖鎖として産生される。ガラクトースを主鎖・側鎖の主成分とする糖鎖である。AG 糖鎖は、全身の細胞壁に存在するものの、その組成や末端修飾は組織や細胞によって大きく異なることが、主にモノクローナル抗体を用いて示されてきた。AGPs が細胞間シグナリングに関わることはいくつかの AGPs で示されてきたが、「AG 糖鎖の機能」は長らく明らかではなかった。AG 糖鎖の生合成系の解明は進展しているが、特定の生理活性を有する植物糖鎖およびその構造の同定に成功した研究グループや、合成糖を用いて植物糖鎖の研究を進めている研究グループも国内外に他になかった。

2. 研究の目的

植物という多細胞体の維持において、糖鎖は情報分子としてどのような役割を果たすのか。本研究の目的は、申請者が初めて同定に成功した生理活性をもつ糖鎖 AMOR を突破口に、情報分子としての糖鎖が、植物細胞間コミュニケーションでどのような重要性をもち、いかにして情報伝達を担うのかを明らかにすることである。AMOR は植物の受精過程で、雌しべから花粉管に作用し、花粉管に生殖能を与えるという興味深い分子である。驚いたことに、複雑な糖鎖である AMOR の活性には、末端のメチルグルクロン酸 + ガラクトースという、たった 2 糖の構造が必要かつ十分であった。化学合成した 2 糖 (メチルグルクロノシルガラクトース) が、合成 AMOR として活性を示した。そこで AMOR の構造活性相関をもとに、化学合成により AMOR の分子構造を改変する。これにより、これまで世界的に得られたことのない AMOR2 糖構造を認識するモノクローナル抗体の作製、AMOR のパートナー分子同定や可視化を目指す。また、AMOR 生合成系の変異体や合成糖を用いて、AMOR の新しい機能を探査する。これらにより植物糖鎖シグナリングを解明する。

3. 研究の方法

AMOR 活性を担う 2 糖構造は、トレニアの雌しべに限らず、広く様々な植物、そして様々な器官の AG 糖鎖に見られる末端構造である。しかし、雌しべの中でもその分布は一様ではないことが示唆されているように、特定の発生ステージや、植物体の特定の位置で、様々な細胞間コミュニケーションを担っている可能性がある。糖鎖構造の分布は、糖鎖の生合成系の酵素の組織特異的な発現が担っていると考えられる。そこで本研究では、以下の 2 つのアプローチから、植物糖鎖シグナリングの解明を目指す。

(1) AMOR の新たな機能の探索

AMOR 生合成系について、シロイヌナズナおよびトレニアで、遺伝子候補をリスト化し、ゲノム編集技術も用いてグルクロン酸転移酵素およびメチル基転移酵素の変異体を確立する。一方で有機化学合成により AMOR の構造を改変し、モノクローナル抗体作製のための抗原を準備する。AMOR 活性は末端のメチル基の有無により 1000 倍程度変化するため、このメチル基の有無を判別できるモノクローナル抗体の作製を目指す。作製したモノクローナル抗体を用いた免疫染色の条件を確立し、植物体の組織中での AMOR 構造の分布を明らかにするとともに、上記変異体での変化を明らかにすることを目指す。変異体において栄養成長期や生殖成長期においてどのような表現型が見られるか、またそれらが化学合成した AMOR を与えた時に 2 糖構造特異的に回復するかどうか、明らかにすることを目指す。

(2) AMOR の受容メカニズムの解析

AMOR が発見されたトレニアの AMOR アッセイ系を用いて、花粉管における AMOR の受容メカニズムを探る。トレニア近縁種においても AMOR が生理活性を持つか調べる。有機化学合成により AMOR を改変し、高活性な AMOR 分子の設計、可視化や相互作用分子の探索を進めることで、AMOR の受容メカニズムを明らかにすることを目指す。受容体候補と考えられる遺伝子をゲノム解析およびトランスクリプトーム解析からリスト化し、ゲノム編集によりノックアウトラインを得て、その表現型解析を進める。

4. 研究成果

(1) AMOR の生合成系の解析

シロイヌナズナのグルクロン酸転移酵素の変異体の解析を進めたところ、用いた変異体では表現型が安定せず明確ではなかった。トレニアの受精過程における解析の重要性及び AMOR の糖鎖末端構造の分布や量を簡便に調べるためのモノクローナル抗体の重要性があらためて示唆された (Su and Higashiyama, 2018)。トレニアのゲノム解析から、シロイヌナズナのグルクロン酸転移酵素のホモログとして 5 遺伝子を見出した。またシロイヌナズナのメチル基転移酵素のホモログとして 3 遺伝子を見出した。トレニアでのゲノム編集による遺伝子破壊を進めた。

(2) AMOR 受容体候補の探索

トレニアのゲノムデータおよび花粉管トランスクリプトームデータをもとに、一回膜貫通型の受容体キナーゼをリスト化し、このうちレクチンドメインを持ち花粉管特異的発現を示すものなど、ゲノム編集による遺伝子破壊を進めた。

(3) AMOR の有機化学合成による改変

AMOR の構造活性相関をもとに、研究協力者である理化学研究所の萩原伸也博士及び草野修平博士の協力のもと、閉環構造を保ったままの AMOR2 糖のガラクトースに、リンカーとしてポリエチレングリコールを付加した。モノクローナル抗体作製のためには、キャリアタンパク質 (KLH, BSA) 1 分子に対してクリック反応により AMOR を 10 分子程度付加した。また、リンカー同士を結合することで多量体 (2 量体、3 量体、4 量体) の AMOR も作製した。

(4) モノクローナル抗体の作製

上記 2 種の抗原に対し、モノクローナル抗体の作製を進めた。AMOR 活性を大きく向上させる末端のメチル基の有無を認識する抗体を産生するハイブリドーマを選抜するために、メチル基を持たない分子についても抗原同様に作製した。その結果、AMOR2 糖 (メチル基あり) を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ 6 株を樹立することに成功した。これまでの海外での大規模な取組みでもメチル基の有無を認識する抗体は存在しなかったことから、メチル基の有無を作り分けながら抗原を調製した有機化学合成の技術や、国内の GANP マウスの技術により達成できたと考えられる。6 種類のハイブリドーマから得られた抗体の力価はそれぞれ異なる。ハイブリドーマは全て IBBP で保管している。また、免疫染色の条件を検討し、トレニア胚珠でシグナルが得られることを確認した。シロイヌナズナのグルクロン酸転移酵素及びメチル基転移酵素の変異体や、それらのトレニアでのホモログの変異体でシグナルがどのように変化するか、さらに解析を進めている。

(5) 多量体 AMOR を用いた解析

天然の AMOR は 2 糖の AMOR よりも活性が高いことが示唆されている。その理由の一つに考えられるのが、アラビノガラクトタン糖鎖は一般に枝分かれするため、一つの分子に多数のメチルグルクロノシルガラクトース末端が存在する可能性が考えられる。多量体 AMOR はこれを模倣した構造と期待されるため、活性を調べた。その結果、多量体 AMOR は溶液中の AMOR の分子数に応じた活性を示したが、1 分子あたりでの活性は高まり、4 量体 AMOR では 3.4 nM で十分な活性が得られることが明らかとなった。花粉管誘引を定量的に調べるマイクロ流体デバイスも複数開発できたことで、花粉管の LURE 応答能獲得に関する研究の発展が期待される (Yanagisawa et al., 2021)。

(6) 遺伝学への利用が期待されるトレニア属ウリクサのモデル化

トレニアにおける AMOR 合成系や受容体候補の解析においては、他殖性であるトレニアの自家受粉による弱勢や、遺伝子導入の際の培養変異が見られ、解析が容易ではなかった。ゲノム編集により得た変異体については、現在野生型に戻し交雑し、培養変異などを除いている。そこで最近トレニア属に編入されたウリクサに注目した。ウリクサは自殖性であり、小型で、花期は長く世代は短いといった特徴がある。ウリクサでも合成 2 糖の AMOR により花粉管が受精能を得ることを確認した。さまざまな整備を進めており、今後分子遺伝学も駆使した AMOR の解析に貢献することが期待される。

< 引用文献 >

Su S. and Higshiyama T. (2018) Arabinogalactan proteins and their sugar chains: functions in plant reproduction, research methods, and biosynthesis. *Plant Reproduction* 31, 67-75.

Yanagisawa N., Kozgunova E. and Higashiyama T. (2021) Pulsatile reverse flow actuated microfluidic injector: toward the application for single-molecule chemotropism assay. *RCS Advances* 11, 27011-27018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Su Shihao, Nagae Takuya T., Higashiyama Tetsuya	4. 巻 13
2. 論文標題 GPI-Anchored Proteins Cooperate in the Long Journey of the Pollen Tube	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Plant	6. 最初と最後の頁 8~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molp.2019.12.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yanagisawa Naoki, Higashiyama Tetsuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Quantitative assessment of chemotropism in pollen tubes using microslit channel filters	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomicrofluidics	6. 最初と最後の頁 024113~024113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5023718	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 東山 哲也	4. 巻 53
2. 論文標題 花粉管が誘引物質LUREを受容し伸長方向を調節するしくみ	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 植物の生長調節	6. 最初と最後の頁 131~138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18978/jscrp.53.2_131	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Xiao Wei, Su Shihao, Higashiyama Tetsuya, Luo Da	4. 巻 146
2. 論文標題 A homolog of the ALOG family controls corolla tube differentiation in <i>Torenia fournieri</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev177410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.177410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Su Shihao, Higashiyama Tetsuya	4. 巻 31
2. 論文標題 Arabinogalactan proteins and their sugar chains: functions in plant reproduction, research methods, and biosynthesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Reproduction	6. 最初と最後の頁 67 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00497-018-0329-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurihara Daisuke, Mizuta Yoko, Nagahara Shiori, Higashiyama Tetsuya	4. 巻 62
2. 論文標題 ClearSeeAlpha: Advanced Optical Clearing for Whole-Plant Imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1302 ~ 1310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcab033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yanagisawa Naoki, Kozgunova Elena, Grossmann Guido, Geitmann Anja, Higashiyama Tetsuya	4. 巻 62
2. 論文標題 Microfluidics-Based Bioassays and Imaging of Plant Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1239 ~ 1250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcab067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yanagisawa Naoki, Kozgunova Elena, Higashiyama Tetsuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Pulsatile reverse flow actuated microfluidic injector: toward the application for single-molecule chemotropism assay	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 27011 ~ 27018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1RA04505A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kumarswamyreddy Nandarapu, Reddy Damodara N., Robkis D. Miklos, Kamiya Nao, Tsukamoto Ryoko, Kanaoka Masahiro M., Higashiyama Tetsuya, Oishi Shunsuke, Bode Jeffrey W.	4. 巻 -
2. 論文標題 Chemical synthesis of <i>Torenia</i> plant pollen tube attractant proteins by KAHA ligation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2CB00039C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 東山哲也	4. 巻 62
2. 論文標題 花の中での知られざる情報処理	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 情報処理	6. 最初と最後の頁 e4-e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20729/00213733	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 東山哲也	4. 巻 54
2. 論文標題 植物のしなやかな受精：哺乳類との比較	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 13-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 16件 / うち国際学会 12件)

1. 発表者名 Higashiyama T.
2. 発表標題 Biodiversity for Exciting Discoveries
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Symposium "Biodiversity for Exciting Discoveries" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Higashiyama T.
2. 発表標題 Whither molecules for overcoming genome barriers?
3. 学会等名 ISTbM (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東山哲也
2. 発表標題 ワクワクする異分野融合
3. 学会等名 超分野植物科学研究会 第1回研究会「分野を超えて植物科学の未来を創る」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東山哲也
2. 発表標題 イメージングから解き明かす植物という多細胞体の生存戦略
3. 学会等名 理研BRC設立20周年記念シンポジウム「バイオリソースが駆動する生命科学とイノベーション」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東山哲也
2. 発表標題 顕微鏡下で自由自在に操る生命科学ツールを駆使した植物の受精研究
3. 学会等名 一般社団法人レーザー学会学術講演会第42回年次大会「生体光計測」セッション(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東山哲也
2. 発表標題 花の中で流れている時間：雄と雌のカウントダウン
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会学術大会シンポジウム「植物の生殖と時間生物学」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東山哲也
2. 発表標題 生命科学とその技術を根底から変えるゲノム編集
3. 学会等名 ノーベル賞特別講演会「ブラックホールとゲノム編集」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水上茜、蘇詩豪、草野修平、萩原伸也、東山哲也
2. 発表標題 花粉管の誘引物質LUREsへの応答能を付与する糖鎖因子AMORの作用機序の解明にむけて
3. 学会等名 日本植物学会第84回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水上茜、蘇詩豪、草野修平、萩原伸也、東山哲也
2. 発表標題 花粉管に誘引物質への応答能を付与する糖鎖AMORの発見と作用機序の解明にむけて —糖鎖が描く植物の受精—
3. 学会等名 日本分子生物学会第43回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Higashiyama Tetsuya
2. 発表標題 Live-Cell Analysis of Multi-Step Signaling in Pollen Tube Guidance
3. 学会等名 The 11th Tri-National Arabidopsis Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Higashiyama Tetsuya
2. 発表標題 Key molecules of sexual reproduction identified by live-cell and synthetic-chemistry approaches
3. 学会等名 22nd Plant Biology Symposium: Plant Cell Dynamics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Higashiyama Tetsuya
2. 発表標題 Evolution of Sexual Plant Reproduction and Its Key Molecules
3. 学会等名 5th International Volvox Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Higashiyama Tetsuya
2. 発表標題 Key signalling molecules in plant reproduction: Re-discovery of a reproductive hormone
3. 学会等名 Woolhouse Lecture of John Innes Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Higashiyama Tetsuya
2. 発表標題 Key signalling molecules in pollen tube guidance
3. 学会等名 Symposium Down Under: Mechanisms controlling plant reproduction (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Higashiyama T.
2. 発表標題 Live-Cell Analysis of Molecules Involved in Pollen Tube Guidance
3. 学会等名 The 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Higashiyama T.
2. 発表標題 Cruising inside flowers: from cellular dynamics to key signaling molecules
3. 学会等名 International Conference on Arabidopsis Research ICAR2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Higashiyama T.
2. 発表標題 Visualization and manipulation of genomes in sexual reproduction
3. 学会等名 Plant Genomes in a Changing Environment (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Higashiyama T.
2. 発表標題 HBMC (Horticulture Biology and Metabolomics Center) Symposium in Fujian Agriculture and Forestry University
3. 学会等名 Dynamics and key signaling molecules of pollen tube guidance (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Higashiyama T.
2. 発表標題 Live-Cell Analysis of Signaling and Key Molecules in Plant Reproduction
3. 学会等名 Invited seminar in Institute of Plant and Microbial Biology, Academia Sinica (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 北島 健、佐藤 ちひろ、門松 健治、加藤 晃一	4. 発行年 2020年
2. 出版社 名古屋大学出版会	5. 総ページ数 306
3. 書名 糖鎖生物学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	水上 茜 (Mizukami Akane)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	萩原 伸也 (Hagihara Shinya)		
研究協力者	草野 修平 (Kusano Shuhei)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関