

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20653

研究課題名（和文）糖転移酵素変異株を用いた植物におけるアラビノガラクトタンプロテインの新規機能探索

研究課題名（英文）Exploring New Functions of Arabinogalactan Protein in Plants Through Glycosyltransferase Mutant Analysis.

研究代表者

大西 真理 (Ohnishi, Mari)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：50377793

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：植物特有のプロテオグリカンファミリーであるアラビノガラクトタンプロテイン（AGP）は植物の生育・生殖プロセスに重要であるが、分子数が多く重複性が高いため機能解析が困難である。また、構造が複雑で非常に大きな糖鎖が付加しており、この糖鎖がAGPの生理活性に重要である。本研究では、AGP糖鎖修飾の第一段階を担う糖転移酵素HPGTの三重変異株hpgt1,2,3の表現型探索により、AGPの新規機能解明を目指した。その結果、気孔のパターン形成や原形質連絡の生合成、細胞壁の定常性をAGPが担っていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、植物にとって重要な機能を持つと考えられているにも関わらず、重複性の高さからこれまで顕在化してこなかったAGPの新規機能探索を、糖鎖修飾酵素HPGTの欠損によりAGP全体の機能を抑制させるという全く新しいアプローチにより行ったものである。その結果、これまでに報告がなかった気孔や原形質連絡の形成に重要な働きをしていることを明らかにすることができた。この新規のアプローチにより、今まで解析が困難であったAGPの更なる解明が進むことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Arabinogalactan proteins (AGPs), plant-specific proteoglycan families, play crucial roles in the growth and reproductive processes of plants. However, their functional analysis is difficult due to their high molecular number and redundancy. Moreover, their complex structure with extensive glycosylation is essential for their biological functions. In this study, we aimed to elucidate novel functions of AGPs through the phenotypic exploration of triple mutants (hpgt1,2,3) deficient in the first step of AGP glycan modification, mediated by the glycosyltransferase HPGT. As a result, we revealed that AGPs are involved in stomatal patterning, plasmodesmata biogenesis, and cell wall integrity maintenance.

研究分野：植物生理学

キーワード：アラビノガラクトタンプロテイン 原形質連絡 細胞壁 糖転移酵素 糖鎖 気孔 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

アラビノガラクトタンプロテイン (Arabinogalactan protein: AGP) は植物の細胞壁に多く存在する植物特有のプロテオグリカンファミリーである。AGP の機能については長い間研究されており、AGP 欠損株の解析や、AGP 糖鎖に結合して沈殿を形成するヤリブ試薬投与による機能阻害実験等から、AGP が細胞の伸長や分裂・分化・花粉管伸長など植物の発達、成長の重要なプロセスに関与していると考えられている。また、ヒヤクニチソウ培養細胞の道管分化を誘導する Xylogen や花粉管誘引に対する応答能を与えるトレニアの AMOR など限られた植物種ではあるが、情報伝達物質として機能すると考えられる AGP の報告もあり非常に興味深い分子である。しかし、AGP はシロイヌナズナに 150 種類以上存在するなど分子種が非常に多く、重複性が高いため、個々の AGP 欠損株で表現型が見えてくるのはごく一部であること、ヤリブ試薬は植物体内部までは浸透しないため、見られる影響が限定的であることからこれらの解析で得られる情報は十分とは言えなかった。また、情報伝達物質として機能する AGP に関するシロイヌナズナでの報告例はまだなく、AGP の情報伝達としての機能が一般的なものであるかは不明である。更に、AGP はその重量の 90% が複雑な構造を持つアラビノガラクトタン糖鎖で占められており、この糖鎖による高い多様性・不均一性が AGP 解析を一層困難にしている。近年申請者は AGP 糖鎖付加の第一段階を担う糖転移酵素群 Hydroxyproline O-galactosyltransferases (HPGT1, HPGT2, HPGT3) を同定し、その *hpgt1,2,3* 三重変異株で AGP 欠損株と類似した表現型が見られることから AGP 糖鎖が活性に必須であることを直接的に示した (Ogawa-Ohnishi et al., 2015)。この *hpgt1,2,3* 三重変異株は AGP の機能抑制株として AGP 研究に用いることが可能である。

2. 研究の目的

本研究は、従来の解析では顕在化してこなかった AGP の新規機能を明らかにすることで、AGP という植物固有なプロテオグリカンファミリーが植物の一生にどのように関与するのかを解明することを目的としている。AGP はその重量の 90% が複雑な構造を持つ糖鎖であり、この糖鎖が分子機能に重要である。AGP の糖鎖修飾はガラクトシル化酵素である 3 つの Hydroxyproline O-galactosyltransferases (HPGT1, HPGT2, HPGT3) によって、最初のガラクトースがコアペプチドのヒドロキシプロリンへ付加されることから開始されるため、このガラクトシル化酵素が存在しなければ AGP の糖鎖修飾自体が起こらない。AGP は糖鎖が活性に重要であるが、実際この *hpgt1,2,3* 三重変異株ではライフサイクルは維持しつつ、矮化や根毛の伸長、花粉生成の異常、NaCl 添加時における根の膨張など AGP の変異株で報告のあるいくつかの表現型が確認されており、植物内の全ての AGP の機能

が著しく抑制された状態を網羅的に示していると考えられる。本研究ではこの *hpgt1,2,3* 三重変異株を「AGP 機能抑制株」として用い、詳細な表現型解析および情報伝達系の探索を行う。それにより今まで顕在化してこなかった AGP の新規機能が見いだせると考えられる (図 1)。

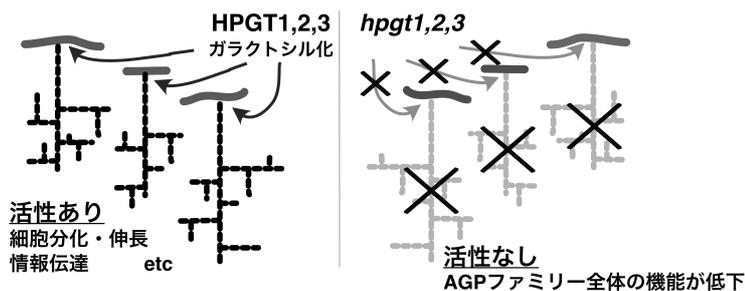


図1.本研究のコンセプト
AGPの糖鎖抑制株を用いて、AGPの新規機能を顕在化させる

表現型の顕在化

3. 研究の方法

hpgt1,2,3 三重変異株では AGP の糖鎖修飾が野生型の 10 分の 1 にまで減少し、AGP 欠損株と類似した表現型のいくつかを示すことから、AGP の機能が著しく抑制されていると考えられる。そのため、この *hpgt1,2,3* 三重変異株では AGP が重要な機能を持つ部位でなんらかの表現型を示すと推測される。本研究では、*hpgt1,2,3* 三重変異株を用いてこれまで報告がなかった部位や組織での詳細な表現型探索を網羅的に行うと共に、得られた表現型の原因解析を進める。また、タンパク質の可逆的リン酸化は、細胞内のシグナル伝達機構として広く用いられている反応であり、ある刺激条件に対し、リン酸化状態が変化したタンパク質群を調べることにより、その刺激がどのような情報を伝えているのかを知ることができる。そのため、*hpgt1,2,3* 三重変異株にシロイヌナズナから抽出した AGP を添加し、添加の有無によりリン酸化が変化したタンパク質をリン酸化プロテオミクスにより探索し、AGP を基軸とした情報伝達系を探る。

4. 研究成果

hpgt1,2,3 三重変異株の表現型探索を行った結果、通常隣り合わないよう形成される気孔が、複数個でクラスターを形成する割合が増加していることが観察された (図 2)。また、蛍光タンパク質をパーティクルボンバードメント法により葉の表皮細胞に一過性発現させたところ、*hpgt1,2,3* 三重変異株では野生株と比較して蛍光タンパク質が発現させた細胞から周辺の細胞に、より広範囲に広がる様子が見られ、シンプラスト輸送が増加していることが明らかとなった (図 3)。

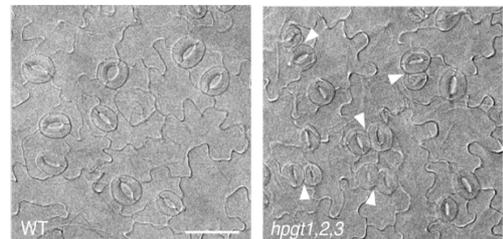


図 2. *hpgt1,2,3* 三重変異株における気孔のクラスター化

植物におけるシンプラスト輸送は細胞間をトンネルのように繋ぐ原形質連絡を通じて行われるため、電子顕微鏡を用いて原形質連絡の詳細な観察を行った結果、変異株において枝分かれの多い複雑な構造の原形質連絡の割合が増加しており、特に枝分かれの中央部分に非常に大きい空間が存在するような構造の原形質連絡も多く見られた (図 4)。このことから、原形質連絡の正常な形成には AGP の機能が重要であることが明らかとなった。気孔のクラスター化の原因は様々だが、*hpgt1,2,3* 三重変異株においては原形質連絡の構造の複雑化によりシンプラスト輸送が増加し、適時適所で機能するべき気孔の形成制御因子の制御が不完全になってしまった可能性が考えられる。また、*hpgt1,2,3* 三重変異株の細胞壁ではセルロース割合が減少している一方、細胞壁の可塑性を制御するペクチンの割合が増加しており、AGP 糖鎖がこの細胞壁特性の定常性を担っていることが示唆された (図 5)。また、AGP の情報伝達

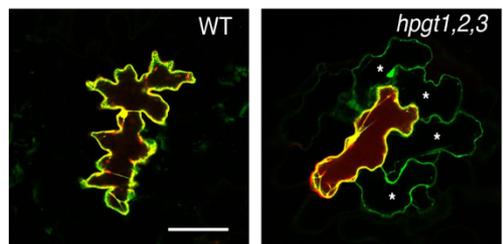


図 3. GFP 蛍光タンパク質の拡散の違い

植物におけるシンプラスト輸送は細胞間をトンネルのように繋ぐ原形質連絡を通じて行われるため、電子顕微鏡を用いて原形質連絡の詳細な観察を行った結果、変異株において枝分かれの多い複雑な構造の原形質連絡の割合が増加しており、特に枝分かれの中央部分に非常に大きい空間が存在するような構造の原形質連絡も多く見られた (図 4)。このことから、原形質連絡の正常な形成には AGP の機能が重要であることが明らかとなった。気孔のクラスター化の原因は様々だが、*hpgt1,2,3* 三重変異株においては原形質連絡の構造の複雑化によりシンプラスト輸送が増加し、適時適所で機能するべき気孔の形成制御因子の制御が不完全になってしまった可能性が考えられる。また、*hpgt1,2,3* 三重変異株の細胞壁ではセルロース割合が減少している一方、細胞壁の可塑性を制御するペクチンの割合が増加しており、AGP 糖鎖がこの細胞壁特性の定常性を担っていることが示唆された (図 5)。また、AGP の情報伝達

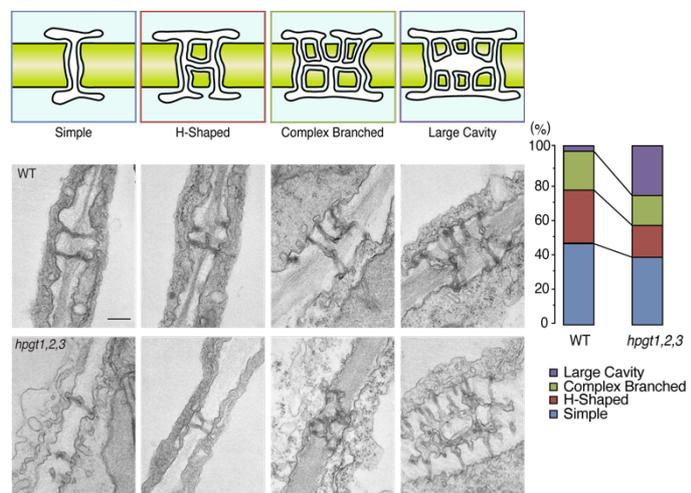


図 4. 原形質連絡の形による分類と割合

因子としての分子機能の解明のため、*hpgt1,2,3* 三重変異株に対して AGP の投与を行い、リン酸化プロテオミクスを用いて AGP 投与の有無によりリン酸化状態が変化するタンパク質の探索を試みた。まだ特定の候補は得られておらず、今後、生育条件や投与条件を検討していく必要があると考えている。

本研究は、植物にとって重要な機能を持つと考えられているにも関わらず、重複性の高さからこれまで顕在化してこなかった AGP の新規機能探索を、糖鎖修飾酵素 HPGT の欠損により AGP 全体の機能を抑制させるという全く新しいアプローチにより行ったものである。その結果、これまでに報告がなかった気孔や原形質連絡の形成に重要な働きをしていることを明らかにすることができた。この新規のアプローチにより、今後も AGP の更なる解明が進むと考えられる。

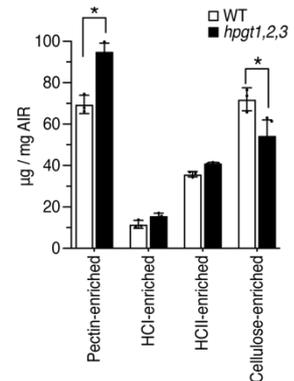


図 5. 細胞壁の分画による構成多糖比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryoya Okawa, Yoko Hayashi, Yasuko Yamashita, Yoshikatsu Matsubayashi and Mari Ogawa-Ohnishi	4. 巻 113
2. 論文標題 Arabinogalactan protein polysaccharide chains are required for normal biogenesis of plasmodesmata	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 493-503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.16061	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 -
1. 著者名 Mari Ogawa-Ohnishi, Tomohide Yamashita, Mitsuru Kakita, Takuya Nakayama, Yuri Ohkubo, Yoko Hayashi, Yasuko Yamashita, Taizo Nomura, Saki Noda, Hidefumi Shinohara, Yoshikatsu Matsubayashi	4. 巻 378
2. 論文標題 Peptide ligand-mediated trade-off between plant growth and stress response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 175-180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.abq5735	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 -
1. 著者名 Ito Momoyo, Tajima Yuri, Ogawa-Ohnishi Mari, Nishida Hanna, Nosaki Shohei, Noda Momona, Sotta Naoyuki, Kawade Kensuke, Kamiya Takehiro, Fujiwara Toru, Matsubayashi Yoshikatsu, Suzaki Takuya	4. 巻 15
2. 論文標題 IMA peptides regulate root nodulation and nitrogen homeostasis by providing iron according to internal nitrogen status	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 733-745
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-024-44865-4	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 大西（小川）真理、松林嘉克	4. 巻 81
2. 論文標題 ペプチドホルモンとその受容体を介した植物の成長とストレス応答のトレードオフ制御	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 232-233
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mari Ogawa-Ohnishi
2. 発表標題 AGP polysaccharide chains are required for normal biogenesis of plasmodesmata
3. 学会等名 The 33rd International Conference on Arabidopsis Research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mari Ogawa-Ohnishi Tomohide Yamashita, Mitsuru Kakita, Takuya Nakayama Yuri Okubo, Yoko Hayashi, Yasuko Yamashita Taizo Nomura, Saki Noda, Hidefumi Shinohara Yoshikatsu Matsubayashi
2. 発表標題 Peptide ligand-mediated trade-off between plant growth and stress response
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Ogawa-Ohnishi, M., Matsubayashi, Y	4. 発行年 2024年
2. 出版社 Humana New York	5. 総ページ数 314
3. 書名 Extraction of Apoplastic Peptides for the Structural Elucidation of Mature Peptide Hormones in Arabidopsis /Plant Peptide Hormones and Growth Factors/Methods in Molecular Biology	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 改変植物体	発明者 松林嘉克 大西真理	権利者 国立大学法人東海国立大学機構
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-164023	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------