

平成 30 年 7 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2015～2017

課題番号：15KK0282

研究課題名（和文）抗花粉症薬剤の開発を目指した機能性糖鎖ポリマーの作製と細胞性免疫活性解析（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Preparation of functional glyco-polymers and analysis of their cellular immune activities to develop anti-pollinosis drugs(Fostering Joint International Research)

研究代表者

前田 恵 (MAEDA, Megumi)

岡山大学・環境生命科学研究所・准教授

研究者番号：20434988

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円

渡航期間： 7ヶ月

研究成果の概要（和文）：植物細胞に遍在する遊離N-グリカン（FNGs）は、糖タンパク質や糖ペプチドからペプチド：N-グリカナーゼ（PNGase）やエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ（ENGase）により生成され植物の分化・生長や果実熟成を促進するホルモン様活性を有すると推定されている。また近年、植物細胞には様々な機能未知のレクチンが発現しており、それらのいくつかは環境ストレス（塩、乾燥、気温、微生物感染など）により発現誘導することが報告されている。そこで本研究では、（1）糖鎖遊離酵素欠損*A. thaliana*のストレス（塩や病原体）感受性の解析と（2）糖鎖ポリマーによるレクチンのスクリーニングを試みた。

研究成果の概要（英文）：Naturally occurring free N-glycans (FNGs) derived from glycoproteins/glycopeptides by the action of peptide: N-glycanase (PNGase) and endo-β-N-acetylglucosaminidase (ENGase) have been postulated to act as signaling molecules stimulating plant growth or fruit ripening. To elucidate the physiological role of FNGs in plants, we have analyzed the sensitivity of the *A. thaliana* mutants, ENGase-DKO and acidic PNGase-DKO, to abiotic (NaCl treatment) and biotic (*P. syringae* infection) stresses. Since it is believed that nucleocytoplasmic lectins function in the plant stress response, synthesized glycopolymers were used to study the interaction between FNGs and lectins in plant cells.

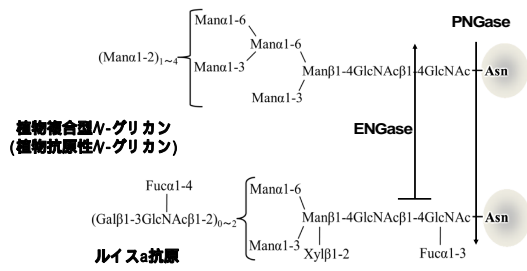
研究分野：糖鎖生物学，生化学，免疫学

キーワード：遊離N-グリカン 糖鎖結合タンパク質 レクチン 糖鎖ポリマー PNGase ENGase 小胞体品質管理
ルイスa抗原

1. 研究開始当初の背景

植物細胞に遍在する遊離 N-グリカン (FNGs) は、糖タンパク質からペプチド:N-グリカナーゼ (PNGase) やエンド-β-N-アセチルグルコサミナーゼ (ENGase) により生成され植物の分化・生長や果実熟成を促進するホルモン様活性を有すると推定されている (図 1, 参考論文)。また近年、植物細胞には様々な機能未知の糖鎖結合タンパク質 (レクチン) が発現しており、それらのいくつかは環境ストレス (塩, 乾燥, 気温, 微生物感染など) により発現誘導することが報告されている (図 2, 参考論文)。そこで本研究では、「機能未知レクチンが遊離 N-グリカンと相互作用し植物の分化・生長を制御する糖鎖シグナルとなる」と予想した。

ハイマンノース型N-グリカン



エンド-β-N-アセチルグルコサミナーゼ (ENGase)
ペプチド:N-グリカナーゼ (PNGase)

図 1. 植物細胞におけるアスパラギン結合型糖鎖 (N-グリカン) の構造と脱グリコシル化酵素 (ENGase, PNGase)

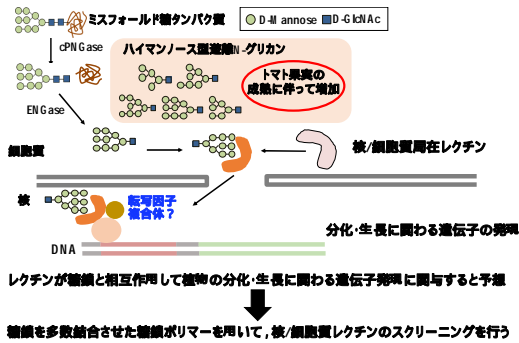


図 2. 核/細胞質レクチンを介した糖鎖シグナルの解明

2. 研究の目的

(1) 糖鎖遊離酵素欠損 *A. thaliana* のストレス応答解析
植物遊離 N-グリカンが核/細胞質レクチンと相互作用し、植物生理に関わるシグナル経路を介してストレス抵抗性に関与すると予想し、*A. thaliana* の N-グリカン遊離酵素である酸性 PNGase (aPNGase) 欠損体および ENGase 欠損体を用いて、非生物ストレス (NaCl 処理) と生物ストレス (*Pseudomonas syringae* 感染) による感受性の解析を試みた。

(2) ダイズ実生胚軸に発現する核/細胞質レクチンのスクリーニング
核/細胞質レクチンが遊離 N-グリカンと相互作用して植物の分化生長に関与する遺伝子の発現を制御していると作業仮説を立て、その立証研究の一端として、糖鎖ポリマーを合成し核/細胞質レクチンのスクリーニングへの応用を試みた。

3. 研究の方法

(1) 糖鎖遊離酵素欠損 *A. thaliana* のストレス応答解析

NaCl 存在・非存在下 (0, 50, 100 mM) 1/2 MS 寒天培地に野生株 aPNGase 欠損体 ENGase 欠損体を 50 粒ずつ播種した (n=3)。播種後 2 日目の発芽率を測定した。

播種後 28 日の野生株, aPNGase 欠損体, ENGase 欠損体に予め培養しておいた *Pseudomonas syringae* の希釈液をスプレーした (0 dpi)。その翌日 (1 dpi) から、葉のサンプリングを 5 dpi まで毎日行った。一部の葉は、スキャナーにより画像取り込みを行い、葉の感染領域を APS Assess 2.0 により解析した (n=3)。更に、一部の葉はゲノム DNA の抽出を行い、*Pseudomonas* のゲノム DNA に存在する *Oprf* region を増幅させる定量 PCR を行い、葉に感染した *Pseudomonas* の存在量を解析した。

(2) ダイズ実生胚軸に発現する核/細胞質レクチンのスクリーニング

マンノース結合タンパク質の同定
Asn-糖鎖 (Man5~9GlcNAc2-Asn) はローヤルゼリー糖タンパク質 (参考論文) からペプシン消化, アクチナーゼ消化, ゲルろ過, 逆相クロマト, 親水性クロマトを組み合わせたことにより調製・精製し、その構造はアミノ酸組成分析と糖鎖構造解析 (RP-, SF-HPLC, MS 分析) により確認した。糖鎖ポリマーは Asn-糖鎖のアミノ基をポリ-L-グルタミン酸 (-PGA) のカルボキシル基に結合させ合成した。発表論文 参照

ガラクトース結合タンパク質の同定
卵黄の糖ペプチドから、アクチナーゼ消化, ゲルろ過, 逆相及び親水性クロマトにより Asn-糖鎖 (Gal12GN2Man3GN2-Asn) を調製した。糖鎖ポリマーの合成はと同様に行った。

4. 研究成果

(1) 糖鎖遊離酵素欠損 *A. thaliana* のストレス応答解析

塩ストレス感受性
aPNGase 欠損体および ENGase 欠損体のいずれについても、野生株と同様に、100 mM の NaCl 処理により発芽率が低下し、塩ストレス感受性に差は認められなかった。

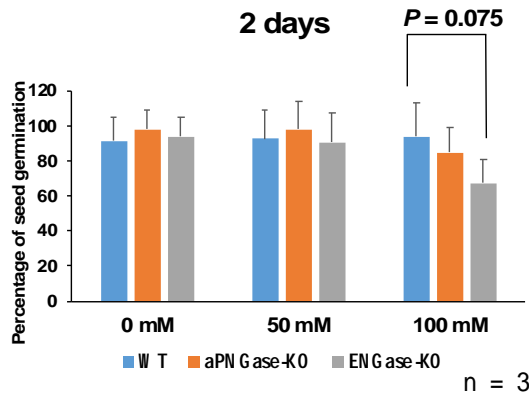


図 3. 塩ストレスの発芽率への影響

Pseudomonas syringae による病原体感染への影響

Pseudomonas syringae による感染への影響を感染領域 (%) と *Pseudomonas syringae* のゲノム量から解析したが、aPNGase 欠損体および ENGase 欠損体のいずれについても、野生株との間に大きな違いは認められなかった。

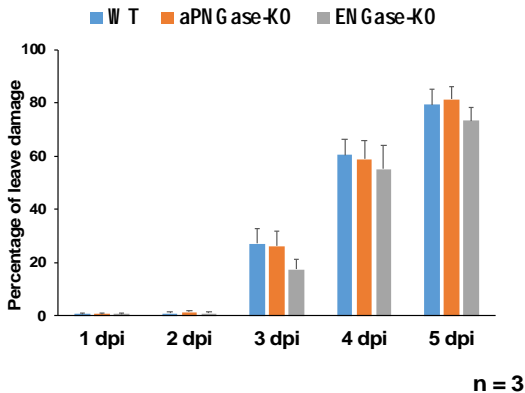


図 4. *Pseudomonas syringae* 感染による病変解析

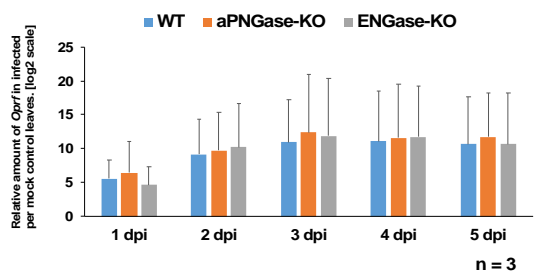


図 5. *Pseudomonas syringae* 感染量の解析

の実験に用いた糖鎖遊離酵素欠損 *A. thaliana* は完全に遊離糖鎖を欠損していないことが遊離糖鎖の構造解析により明らかになった。遊離糖鎖を完全に消失した植物体を構築し、追試験を行う必要性が考えられた。

(2) ダイズ実生胚軸に発現する核/細胞質レクチンのスクリーニング

マンノース結合タンパク質の同定

ハイマンノース型糖鎖を多価に結合させた糖鎖ポリマーは、マンノース特異的レクチン Morniga M (参考論文) と結合することをゲルろ過により確認した。次いで、ダイズ胚軸由来可溶性タンパク質と複合体を形成させ、SDS-PAGE 分析から、複数のマンノース結合タンパク質の存在が確認された。これらのタンパク質は伸長中のダイズ胚軸において、ハイマンノース型糖鎖と相互作用し、分化・生長に参与している可能性が示唆された。N 末端アミノ酸配列解析やペプチドマッピングによる同定が必要と考えられた。

ガラクトース結合タンパク質の同定

非還元末端にガラクトース残基を有する複合型糖鎖を多価に結合させた糖鎖ポリマーは、ガラクトース特異的レクチン Morniga G (参考論文) と結合することをゲルろ過により確認した。しかしながら、ダイズ実生胚軸由来可溶性タンパク質とほとんど複合体を形成しなかった。この結果から、ダイズ実生胚軸由来可溶性タンパク質には、ガラクトース結合タンパク質はほとんど発現していないと考えられた。

ハイマンノース型糖鎖ポリマー	複合型糖鎖ポリマー
MornigaMと複合体を形成	MornigaGと複合体を形成
糖鎖ポリマーを利用したα-マンノシド結合レクチン検出法を確立	糖鎖ポリマーを利用したβ-ガラクトシド結合レクチン検出法を確立
ダイズ胚軸から数種類のα-マンノシド結合型レクチン様タンパク質を検出した	ダイズ胚軸からはβ1,4-ガラクトシド結合型レクチン様タンパク質は検出されなかった

図 6. まとめ

(3) その他

銀杏種子から植物抗原性糖鎖の抗原性低下に關与する 1,3/4 フコシダーゼの精製を行った。銀杏種子由来 1,3/4 フコシダーゼは分子量約 120 kDa, 至適 pH5.5 であることから、既報のイネ -L- フコシダーゼ (分子量 58 kDa, 至適 pH6.0) とは異なる新しい分子種であると考えられた。発表論文

トマト 1,3/4 フコシダーゼの 2 種遺伝子 (*Solyc03g006980*, *Solyc11g006910*) を同定し、昆虫細胞 Sf9 で組換えタンパク質を発現させた。いずれの遺伝子産物についても、ルイス a 抗原中の 1-4Fuc 残基, LNFP-III 中の 1-3Fuc 残基には活性を示したが、Man₁Xyl₁Fuc₁GlcNAc₂ (MFX), Fuc₁GlcNAc₂ (GNF) の Fuc 残基には活性を示さなかった。その一方で、Fuc₁GlcNAc₂ (GN2F) 中の Fuc 残基には活性を示す事が明らかになった。細胞内局在解析については、液胞と細胞外空間への局在を予想し、タバコ BY2 細胞と *N. benthamiana*

用いた実験を行ったが、本研究期間中に明らかにすることは出来なかった。発表論文

1,3/4 フコシダーゼ欠損 *A. thaliana* (発表論文), 酸性 PNGase 欠損 *A. thaliana* における遊離 N-グリカンの構造解析を行った。

新生糖タンパク質の小胞体品質管理系に關与する遺伝子を欠損した *A. thaliana* の遊離 N-グリカンの構造解析をウィーン大学の Richard Strasser 教授との共同研究として行った。

【参考論文】

Maeda, M. and Kimura, Y.: Structural features of free N-glycans occurring in plants and functional features of de-N-glycosylation enzymes, ENGase, and PNGase: the presence of unusual plant complex type N-glycans. *Front. Plant. Sci.*, 5, 1-9 (2014)

N. Lannoo, E.J.M. Van Damme, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 2010, 1800, 190-201

Y. Kimura, C. Miyagi, *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2000, 63, 2109-2120

E.J.M. Van Damme, B. Hause, *et al.*, *Plant Physiol.*, 2002, 130, 757-769

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

前田恵, 木村万里子, 木村吉伸 スギ・ヒノキ花粉アレルゲンに結合した N-グリカンの構造特性と免疫活性解析に向けた新技術アレルギーの臨床, 38, 55-59(2018)査読有

Uemura R, Ogura M, Matsumaru C, Akiyama T, Maeda M, Kimura Y. Novel assay system for acidic Peptide:N-glycanase (aPNGase) activity in crude plant extract. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 印刷中(2018)査読有

Rahman Z, Tsujimori Y, Maeda M, Hossain A, Ishimizu T, Kimura Y. Molecular characterization of second tomato 1,3/4-fucosidase (-Fuc'ase SI-2), a member of glycosyl hydrolase family 29 active toward the core 1,3-fucosyl residue in plant N-glycans. *J Biochem.*, 印刷中(2018)査読有

Kato S, Hayashi M, Kitagawa M, Kajiura H, Maeda M, Kimura Y, Igarashi K, Kasahara M, Ishimizu T. Degradation pathway of plant complex-type N-glycans: identification and characterization of a key 1,3-fucosidase from glycoside hydrolase family 29. *Biochem J.*, 475,305-317(2018)査読有

Maeda M, Ebara N, Tani M, Vavricka CJ, Kimura Y. Occurrence of complex type free N-glycans with a single GlcNAc residue at the reducing termini in the fresh-water plant, *Egeria densa*. *Glycoconj J.*, 34,

229-240(2017)査読有

Itano S., Maeda M., Rahman M.Z., and Kimura Y. Ginkgo biloba -fucosidase with activity towards plant complex type N-glycans containing the Lewis a epitope: Purification and characterization. *Scientific Reports of the Faculty of Agriculture, Okayama University*,106, 5-12(2017)査読有

Rahman ZM., Maeda M., Itano S., Hossain A., Ishimizu T., Kimura Y. Molecular characterization of tomato 1,3/4-fucosidase, a member of glycosyl hydrolase family 29 involved in the degradation of plant complex type N-glycans. *J Biochem.*, mvw089, 1-12(2016) 査読有

Maeda M., Tani M., Yoshiie T., Vavricka CJ., Kimura Y. Structural features of N-glycans linked to glycoproteins expressed in three kinds of water plants: Predominant occurrence of the plant complex type N-glycans bearing Lewis a epitope. *Carbohydr Res.*, 435,50-57(2016) 査読有

〔学会発表〕(計 23 件)

小椋美夏子, 酸性 PNGase 過剰発現トマト (T4 世代)の PNGase 活性と遊離糖鎖構造解析, 日本農芸化学会中四国支部第 50 回記念講演会(例会), 2018 年 1 月 27 日, 広島大学東広島キャンパス

高瀬美穂, 新規人工糖鎖ポリマーを利用したダイズ核/細胞質レクチンの同定, 日本農芸化学会中四国支部第 50 回記念講演会(例会), 2018 年 1 月 27 日, 広島大学東広島キャンパス

古田佳織, 小胞体関連分解に関わる糖鎖認識タンパク質を欠損した *A. thaliana* が産生する遊離 N-グリカン (FNGs) の構造解析, 日本農芸化学会中四国支部第 50 回記念講演会(例会), 2018 年 1 月 27 日, 広島大学東広島キャンパス

上村 亮太, 脱グリコシル化酵素を欠損した *A. thaliana* の構築と遊離 N-グリカン構造解析, 日本農芸化学会中四国支部第 50 回記念講演会(例会), 2018 年 1 月 27 日, 広島大学東広島キャンパス

辻森祐太, トマト導管液中に存在する Lea 抗原含有 N-グリカン代謝関連酵素の活性と遊離 N-グリカン構造解析, 日本農芸化学会中四国支部第 50 回記念講演会(例会), 2018 年 1 月 27 日, 広島大学東広島キャンパス

上村 亮太, 酸性 PNGase 活性を欠損させた *A. thaliana* の表現型と内在する遊離 N-グリカンの構造特性, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017) 2017 年 12 月 7 日, 神戸ポートアイランド

Megumi Maeda, Plant free N-glycans as signaling molecules: Putative functions

and Receptor proteins. 「国際シンポジウム - Biomolecules controlling cellular function and environmental adaptation in plants - 」2017年11月22日(岡山大学創立五十周年記念館 2F 大会議室) 依頼講演

Megumi Maeda, Application of Glycopolymers Bearing Multivalent N-Glycans for Detection of Lectins. 28th Joint Glycobiology Meeting, 2017年9月18日, RWTH, Aachen, Germany

Yuta Tsujimori, MOLECULAR CHARACTERIZATION SOLANUM LYCOPERSICUM 1,3/4-FUCOSIDASE II (-FUC ' ASE SL-II) INVOLVED IN DEGRADATION OF PLANT COMPLEX TYPE N-GLYCAN. 19th European Carbohydrate Symposium (EUROCARB), 2017年7月6日, Barcelona CCIB, Spain

Ryota Uemura, ENZYME ASSAY AND FREE N-GLYCANS STRUCTURAL ANALYSIS OF ACIDIC PEPTIDE: N-GLYCANASE (APNGASE) KNOCKOUT PLANT. 19th European Carbohydrate Symposium (EUROCARB), 2017年7月3日, Barcelona CCIB, Spain

M. Maeda, Accumulation of GN1-type plant complex type free N-glycans in 1,3/4-fucosidase knockout mutant of *A. thaliana*. 12th Carbohydrate Bioengineering Meeting (The CBM12), 2017年4月25日, Audi Max, Vienna/Austria

K. Furuta, Significant decrease in the amount of GN1-type free N-glycans in ER- α -mannosidase knocked-out *A. thaliana*. 12th Carbohydrate Bioengineering Meeting (The CBM12), 2017年4月25日, Audi Max, Vienna/Austria

上村亮太, 酸性 PNGase 遺伝子を完全にノックアウトした *A.thaliana* 中の PNGase 活性と遊離 N-グリカンの構造特性, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017年3月18日, 京都女子大学

藤川真奈, 酸性 PNGase 過剰発現トマトの果実成熟に関わる遺伝子の発現解析, 支部創立 15 周年記念 日本農芸化学会中四国第 47 回講演会(支部例会), 2017年1月28日, 島根大学 松江キャンパス

上村亮太, 酸性ペプチド: N-グリカナーゼ遺伝子ノックアウト植物に存在する遊離 N-グリカン構造解析, 支部創立 15 周年記念 日本農芸化学会中四国第 47 回講演会(支部例会), 2017年1月28日, 島根大学 松江キャンパス

辻森祐太, 昆虫細胞を用いたトマト 1,3/4-フコシダーゼ II (Fuc'ase SI2) の発現系構築, 支部創立 15 周年記念 日本農芸化学会中四国第 47 回講演会(支部例会), 2017年1月28日, 島根大学 松江キャンパス

古田佳織, 小胞体品質管理に関わる α -マンノシダーゼ二重欠損体の遊離糖鎖構造解析, 支部創立 15 周年記念 日本農芸化学会中四国第 47 回講演会(支部例会), 2017年1月28

日, 島根大学 松江キャンパス

藤川真奈, トマト酸性 Peptide: N-glycanase 過剰発現体の遺伝子発現解析」(Gene expression analysis of tomato plant overexpressing acidic peptide: N-glycanase, 第 89 回日本生化学会大会, 2016年9月26日, 仙台国際センター

上村亮太, 酸性ペプチド: N-グリカナーゼ (aPNGase) 候補遺伝子ノックアウト植物体の aPNGase 活性, 遊離糖鎖構造解析及びストレス感受性解析, 日本農芸化学会 2016 年度中四国支部大会(第 46 回講演会) 2016年9月16日, 高知県立県民文化ホール グリーンホール, 高知大学 朝倉キャンパス

Md. Ziaur Rahman, Molecular characterization of second tomato 1, 3/4-fucosidase (-Fuc ' ase S1-2) involved in degradation of plant complex type N-glycans. 日本農芸化学会 2016 年度中四国支部大会(第 46 回講演会), 2016年9月16日, 高知県立県民文化ホール グリーンホール, 高知大学 朝倉キャンパス

① Megumi Maeda, Effect of *Pseudomonas syringae* Infection on ENGase or Acidic PNGase Knockout *Arabidopsis thaliana* Plants. 10th Tri-National Arabidopsis Meeting, 2016年9月14-16日, Vienna, Austria

②木村吉伸, 酸性ペプチド: N-グリカナーゼ (aPNGase) 過剰発現トマトの構築と表現型解析, 第 35 回日本糖質学会年会, 2016年9月3日, 高知市文化プラザ かるぽーと
〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
糖鎖機能化学研究室
http://www.okayama-u.ac.jp/user/agr/profile/nougaku01_3.html
岡山大学 研究者総覧
<http://soran.cc.okayama-u.ac.jp/view?l=ja&u=ec49c68c89dc75d674506e4da22f6611>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 恵 (MAEDA, Megumi)
岡山大学・大学院環境生命科学研究所・准教授
研究者番号: 20434988

(2) 研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕
Prof. Els J.M. VAN DAMME
Faculty of Bioscience Engineering,
Ghent University, Department of
Molecular Biotechnology

〔その他の研究協力者〕

Ziaur Rahman, Ph.D.

Institute of Food and Radiation Biology,
Atomic Energy Research Establishment,
Bangladesh Atomic Energy Commission