

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05774

研究課題名(和文) 希少糖を用いた糖代謝とレドックス制御に関する解析の新たなアプローチ

研究課題名(英文) Novel approaches to the analysis of sugar metabolism and redox regulation by using rare sugars

研究代表者

望月 進 (Mochizuki, Susumu)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：40567020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、植物に対する希少糖D-アロースとD-アルロース(D-ブシコース)の作用メカニズム解析を通じて、糖代謝と希少糖による植物への耐病性付与やレドックス状態制御の関連性の解明を目指した。これらの希少糖の作用にはD-アロース6リン酸(A6P)の生成が必須だが、D-アルロース処理時のD-アルロース6リン酸-A6P間の変換がホスホグルコースイソメラーゼ(イネOsPGI1/2)によることを組換え酵素や形質転換植物を用いた実験から明らかにし、また、D-アロース処理イネでの活性酸素種増加に繋がるG6PDH活性の維持が、A6Pを含むリン酸糖によるOsG6PDH1特異的安定化によって起こる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、希少糖による植物の耐病性誘導や一過的生長抑制のメカニズムを明らかにしたものであるが、糖代謝が耐病性誘導に繋がる植物細胞の酸化還元状態に直接的に関与することを示すだけでなく、他のストレス(塩ストレスなど)でも示唆されているG6PDHによる制御が、イネのOsG6PDH1などの細胞質型キナーゼのリン酸糖による安定化によることを示唆するなど、学術的にも重要な知見に繋がるものである。また、希少糖は天然物であり、特にD-アルロース(D-ブシコース)やD-アロースは安全性も担保されており、本研究を含めた作用メカニズム研究の成果は、安全な農業資材の確保という社会的意義を持つ重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the relationship between sugar metabolism and rare sugar-induced disease resistance and redox state regulation in plants through the analysis of the mechanism of effects of the rare sugars, D-allose and D-allulose (D-psicose), on plants. The formation of D-allose 6-phosphate (A6P) is essential for the mode of action of these rare sugars, and experiments using recombinant enzymes and transgenic plants have revealed that the phosphoglucose isomerase (rice OsPGI1/2) catalyze the conversion from the D-allulose 6-phosphate (caused by the D-allulose-treatment) to the A6P, and that the maintenance of G6PDH activity, which leads to an increase in ROS species in D-allose-treated rice plants, might be mediated by the specific stabilization of OsG6PDH1 by the sugar phosphates including the A6P.

研究分野：植物生理学

キーワード：希少糖 糖代謝 レドックス状態 活性酸素種 リン酸糖 イネ G6PDH ホスホグルコースイソメラーゼ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物は外的環境の変化に伴って細胞内のレドックス状態を変化させることが知られている。我々の研究グループでは、希少糖 D-ブシコースや D-アロースが植物内での天然型単糖の代謝に対して似て非なるものとして作用し、生長抑制や活性酸素種の発生を介した耐病性付与といった効果をもたらすことを明らかにしていた。その中で、イネにおける D-ブシコースや D-アロースの作用は、ヘキソキナーゼなどの糖リン酸化酵素によるリン酸化などを経て生成する D-アロース 6 リン酸 (A6P) に起因しており、そのターゲット酵素がグルコース 6 リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) であること、NADPH オキシダーゼである RbohC による活性酸素種の生成が関与していることが明らかになっていった。しかしながら、D-ブシコースリン酸化物である D-ブシコース 6 リン酸 (P6P) から A6P の変換酵素は不明なままであり、また、A6P の G6PDH への作用メカニズムも明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

上記の研究背景の下、「希少糖 D-ブシコースや D-アロースが植物細胞へのレドックス状態にどのように作用するのか」「植物の糖代謝と細胞のレドックス制御はどのように関連しているか」について、モデル植物のイネやシロイヌナズナを用いて解明することを目的とした。具体的には、希少糖 D-ブシコースや D-アロースを処理した植物における A6P 生成に関与する「P6P-A6P 変換酵素」を単離し、その特性を解析するとともに、A6P による細胞の酸化/抗酸化に関与すると考えられる「G6PDH」の特性を知る酵素学的な解析を行うことで、糖代謝酵素による植物細胞内でのストレス応答によるレドックス制御の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

「P6P-A6P 変換酵素」の解析では、A6P と P6P の構造異性体であり、糖代謝の中心的なリン酸糖である D-グルコース 6 リン酸 (G6P) と D-フルクトース 6 リン酸 (F6P) 間を変換するホスホグルコースイソメラーゼ (PGI) に着目し、A6P 生成が起こる細胞質で作用するイネ細胞質型 PGI である OsPGI1, OsPGI2 の大腸菌組換え酵素とその変異型酵素を用いた酵素学的解析を行った。また、これらの酵素を過剰発現するイネを作出し、D-アロースや D-ブシコース処理の影響を調べることによって、植物内での OsPGI1/2 が P6P-A6P 変換酵素として機能しうるかの検証を行った。「糖代謝酵素 G6PDH」の解析では、イネの持つ 5 つの G6PDH (細胞質型 OsG6PDH1/2 と葉緑体型 OsG6PDH3/4/5) の大腸菌組換え酵素を用い、A6P が活性や阻害に作用するかの検証を行うとともに、G6PDH の酵素活性や安定性に作用する因子の探索を行った。

### 4. 研究成果

#### 「リン酸糖異性化酵素」の解析

イネ OsPGI1 および OsPGI2 を単離し、大腸菌組換え酵素を取得した。得られた組換え酵素と A6P を反応させた結果、P6P の生成が確認でき、また、D-ブシコースと酵母ヘキソキナーゼの反応産物にこれらの PGI 組換え酵素の反応産物から A6P が確認された。また、OsPGI1/OsPGI2 過剰発現イネの D-ブシコース感受性が高まることを明らかにし、OsPGI1/OsPGI2 が P6P から A6P への変換酵素であることが確認できた。さらにこれらの各種点変異酵素を作製し、本来基質である G6P、F6P と D-マンノース 6 リン酸 (M6P) との反応を確認することで基質結合に関与する残基の特定を行い、T217A 置換により M6P を基質とできなくなることを明らかにした。

#### 「糖代謝酵素 G6PDH」の解析

イネの 5 つの G6PDH 酵素 OsG6PDH1/2 (細胞質型) および OsG6PDH3/4/5 (プラスチド型) の大腸菌組換え酵素を取得し、OsG6PDH1-3 が活性型であること、いずれも A6P を基質にすることができないことを確認した。これらの G6PDH 酵素は熱処理によって活性が低下するが、A6P を含めたリン酸糖と共存した状態では、OsG6PDH1 特異的に熱処理による活性低下が軽減されることが明らかになった。この安定化機構を明らかにするために、基質結合部位近傍の N130~R142 近くに位置し、OsG6PDH1 特異的な N 末端のグリシン残基とセリン残基に富む領域の欠失変異型酵素を作出し、活性試験を行ったところ、欠失の領域に応じた活性の低下が確認されたが、A6P による安定化とは関係しないことがわかった。引き続き A6P の作用メカニズムの解析を進めている。さらに、シロイヌナズナの細胞質型 G6PDH である AtG6PD5/6 をリン酸化する ASK と同じグリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 ファミリーの酵素 OsSK11, 12, 13, 41

(OsGSK5)を単離し、OsG6PDH1-5 や OsRbohC との相互作用検定を行ったところ、OsG6PDH1 を介した活性酸素種生成に關与する OsRbohC が OsSK41/OsGSK5 と相互作用することを見出した。

#### 本研究成果のまとめ

希少糖 D-アロースや D-ブシコースは、糖代謝のキー化合物である天然型単糖 D-グルコースと D-フルクトースのエピマーであり、似て非なるものである。これまでの先行研究から、希少糖の作用機構は、天然型単糖の代謝経路を阻害しつつ、模倣するように自身も代謝されることであることが明らかになってきた。そこで本研究では D-アロースと D-ブシコースの作用メカニズムを解析することで植物のストレス応答における糖代謝を介したレドックス制御の解明を目指した。その結果、希少糖 D-ブシコースや D-アロースの作用は、P6P-A6P 変換酵素である OsPGI の作用によって A6P によるシグナル反応に合流し、また、蓄積した A6P は G6PDH1 の活性を維持することによって活性酸素種の産生を維持することが明らかになった。この結果は、D-アロースと D-ブシコースをそれぞれ処理したイネにおける発現変動の共通性とも一致するものであった。近年、G6PDH は植物における塩ストレスなどの様々なストレス応答下で植物細胞のレドックス状態に影響を及ぼすことが報告されてきており、今回明らかになった D-アロース処理時の諸反応が塩ストレスなどの様々なストレス応答下における反応と同じ作用メカニズムであることが予想される。さらに、OsSK41/OsGSK5 が OsRbohC と直接的に相互作用することが見出されたことは、OsG6PDH1-OsSK41/OsGSK5-OsG6PDH1 が複合体を形成してレドックス状態のスイッチングを担っている可能性を示唆するものである。今後、イネにおける OsSK11, 12, 13, 41 と OsG6PDH1 や OsRbohC の作用機序が明らかになれば、本複合体を介した糖代謝酵素によるストレス応答機構の解明に繋がるものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mochizuki Susumu, Izumori Ken, Akimitsu Kazuya	4. 巻 47
2. 論文標題 Potential of rare sugars, D-allose and D-allulose, as novel agrochemical	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Pesticide Science	6. 最初と最後の頁 60 ~ 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1584/jpestics.W22-26	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 Mochizuki Susumu, Fukumoto Takeshi, Ohara Toshiaki, Ohtani Kouhei, Yoshihara Akihideo, Shigematsu Yoshio, Tanaka Keiji, Ebihara Koichi, Tajima Shigeyuki, Gomi Kenji, Ichimura Kazuya, Izumori Ken, Akimitsu Kazuya	4. 巻 3
2. 論文標題 The rare sugar d-tagatose protects plants from downy mildews and is a safe fungicidal agrochemical	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01133-7	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 望月進・何森健・秋光和也
2. 発表標題 農業資材としての希少糖D-ブシコース (D-アルロース) とD-アロースの可能性
3. 学会等名 日本農薬学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 江島早紀, 加野彰人, 福元健志, 何森健, 小原敏明, 石田豊, 望月進, 市村和也, 五味剣二, 秋光和也
2. 発表標題 希少糖の植物への作用 (55) : P6P/A6P間の触媒反応を担うイネphosphoglucose isomeraseの機能解析
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島村祐成, 松平一志, 江島早紀, 森口晃希, 加野彰人, 佐藤正資, 何森健, 望月進, 吉原明秀, 市村和也, 五味剣二, 秋光和也
2. 発表標題 希少糖の植物への作用(56): 固定化酵素を用いたA6Pの生産法について
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋原奏, 大谷夏生, 安喜絢花, 松平一志, 加野彰人, 福元健志, 大谷耕平, 吉田裕美, 神鳥成弘, 加藤志郎, 五味剣二, 市村和也, 吉原明秀, 何森健, 秋光和也, 望月進
2. 発表標題 D-allose作用機構におけるイネG6PDHの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第58回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yusei Shimamura, Yuna Matsuoka, Kazushi Matsudaira, Saki Ejima, Akihito Kano, Masashi Sato, Ken Izumori, Susumu Mochizuki, Akihide Yoshihara, Kazuya Ichimura, Kenji Gomi, and Kazuya Akimitsu
2. 発表標題 Examination of efficient conditions for production of rare phosphate sugars using sugar-metabolizing enzymes of Escherichia coli
3. 学会等名 Rare Sugar Congress 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Towa Inoue, Susumu Mochizuki, Koki Yoshioka, Kouhei Ohtani, Akihide Yoshihara, Kazuya Ichimura, Ken Izumori, and Kazuya Akimitsu
2. 発表標題 Characteristic analysis of Itea virginica transketolase 1 (IvTK1)
3. 学会等名 Rare Sugar Congress 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Maho Takezaki, Saki Ejima, Susumu Mochizuki, Akihito Kano, Takeshi Fukumoto, Kazuya Ichimura, Kenji Gomi, Ken Izumori, and Kazuya Akimitsu
2. 発表標題 Functional analysis of rice phosphoglucose isomerase
3. 学会等名 Rare Sugar Congress 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹崎真帆, 江島早紀, 望月進, 加野彰人, 福元健志, 小原敏明, 市村和也, 五味剣二, 何森健, 秋光和也
2. 発表標題 希少糖の植物への作用 (60) : 点変異導入によるイネ phosphoglucose isomeraseの機能解析
3. 学会等名 令和 4 年度日本植物病理学会関西西部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島村祐成, 松平一志, 江島早紀, 森口晃希, 加野彰人, 佐藤正資, 何森健, 望月進, 吉原明秀, 市村和也, 五味剣二, 秋光和也
2. 発表標題 希少糖の植物への作用 (61) : 各種希少リン酸糖の生産に向けた希少糖代謝関連酵素の酵素学的諸性質及び反応条件の検討
3. 学会等名 令和 4 年度日本植物病理学会関西西部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shimamura, Y., Matsudaira, K., Ejima, S., Moriguchi, K., Kano, A., Sato, M., Izumori, K., Mochizuki, S., Yoshihara, A., Ichimura, K., Gomi, K., Akimitsu, K
2. 発表標題 Examination of enzymatic properties and reaction conditions of enzymes related to rare sugar metabolism for the production of various rare phosphate sugars
3. 学会等名 Environmental and Resource Genomics and Life Sciences
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takezaki, M., Ejima, S., Mochizuki, S., Kano, A., Fukumoto, T., Ichimura, K., Gomi, K., Izumori, K., Akimitsu, K
2. 発表標題 Functional analysis of rice phosphoglucose isomerase by a point mutagenesis
3. 学会等名 Environmental and Resource Genomics and Life Sciences
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Inoue T., Mochizuki S., Yoshioka K., Ohtani K., Yoshihara A., Ichimura K., Izumori K., Akimitsu K.
2. 発表標題 Characteristic analysis of the transketolase in <i>Itea virginica</i>
3. 学会等名 Environmental and Resource Genomics and Life Sciences
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ura, S., Hagihara, K., Ohtani, N., Aki, A., Kano, A., Fukumoto, T., Ohtani, K., Ichimura, K., Yoshihara, A., Izumori, K., Akimitsu, K. and Mochizuki, S.
2. 発表標題 Functional analysis of the N-terminal region of rice G6PDH1
3. 学会等名 Environmental and Resource Genomics and Life Sciences
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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	秋光 和也  (Akimitsu Kazuya)	香川大学・農学部・教授  (16201)	

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	吉原 明秀  (Yoshihara Akihide)	香川大学・国際希少糖研究教育機構・准教授  (16201)	

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