

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570163

研究課題名(和文)植物N-結合型糖鎖分解の経路解明とその経路破綻植物体の機能解析

研究課題名(英文)The degradation pathway of plant N-glycans and functional analysis of the N-glycan degradation-deficient mutant

研究代表者

石水 毅 (Ishimizu, Takeshi)

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号：30314355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：植物糖タンパク質のN型糖鎖の分解について、これまでにハイマンノース型糖鎖の分解経路を明らかにしていた。本研究では、1,3-フコシダーゼの遺伝子を同定し、この基質特異性から植物コンプレックス型糖鎖の分解経路を初めて解明した。また当遺伝子のノックアウト植物は、糖鎖構造に大きな変化をもたらし、一つの酵素の欠損がN型糖鎖の分解に大きな影響を及ぼすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The degradation pathway of high-mannose type N-glycans in plant cells has been clarified. In this study, we identified a gene encoding (alpha)1,3-fucosidase acting on Fuc(alpha)1-3GlcNAc linkage in plant complex type N-glycans. Its substrate specificity analysis revealed the degradation pathway of plant complex type N-glycans. The (alpha)1,3-fucosidase-deficient mutant changed the composition of N-glycans in plant cells, showing that (alpha)1,3-fucosidase is an essential glycosidase in plant N-glycan degradation.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：糖タンパク質 N型糖鎖 糖質関連酵素 フコシダーゼ フコース 植物

1. 研究開始当初の背景

糖タンパク質糖鎖の N 型糖鎖は、タンパク質の物性だけでなく、機能にも影響を及ぼしている。例えば、N 型糖鎖にはタンパク質の品質管理に役割を果たしているものがある。しかし、N 型糖鎖の機能の全貌は依然として見えていない。この解析のためには N 型糖鎖の生合成・分解の経路解明と、それに関わる遺伝子群の変異体解析が有効である。

N 型糖鎖の生合成経路は、ほぼ解明されている。一方、N 型糖鎖の分解経路は、動物で解明されたが、植物においては一部が解明されているのみである。N 型糖鎖の分解は、植物細胞では最終的に液胞で行われる。植物の N 型糖鎖分解には、7 種類の酵素の関与が想定されているが、このうち遺伝子が同定され、基質特異性が解析されているのは、報告者が同定したエンド-β-マンノシダーゼのみである (Ishimizu et al. 2004)。

植物 N 型糖鎖は、ハイマンノース型糖鎖と植物コンプレックス型糖鎖に大別される (図 1)。エンド-β-マンノシダーゼを同定・解析したことにより、植物特有のハイマンノース型糖鎖の分解経路を明らかにしていた

(Ishimizu and Hase, 2006)。しかし、植物コンプレックス型糖鎖の分解経路は、明らかになっていなかった。特に、α1,3-フコシダーゼについて、遺伝子が未同定であり、基質特異性が未解明であった。

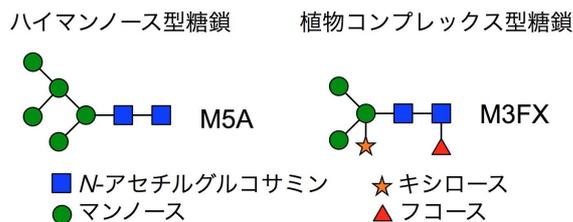


図1. 植物N型糖鎖の構造

植物 N 型糖鎖の分解酵素の遺伝子が同定されると、それぞれの酵素遺伝子がノックアウトされた糖鎖分解が破綻した植物体を解析することが可能になり、N 型糖鎖あるいはその分解の生理的役割を解明できる。

2. 研究の目的

植物 N 型糖鎖の分解経路の全貌を明らかにし、その分解経路破綻植物体の解析を行い、植物 N 型糖鎖およびその分解の生理的意義を探ることを目的とする。

具体的には、まだ未解明の植物コンプレックス型糖鎖の分解経路に焦点を当てる。植物コンプレックス型糖鎖の分解に関与する α1,3-フコシダーゼの遺伝子を同定し、その基質特異性解析を行う。植物コンプレックス型糖鎖の分解に関わる他の酵素であるエンド

-β-マンノシダーゼ、β1,2-キシロシダーゼ (遺伝子未同定)、液胞 α-マンノシダーゼ (遺伝子未同定) は既に基質特異性が明らかにされているため、α1,3-フコシダーゼが同定・解析されると、植物コンプレックス型糖鎖の分解経路の全貌を解明できる。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナ At2g28100 遺伝子産物の基質特異性解析

これまでに、シロイヌナズナ At2g28100 遺伝子が α1,3/4-フコシダーゼとして同定されていた (Zeleny et al. 2006)。この酵素は植物コンプレックス型糖鎖 M3FX (図 1) に含まれる Fucα1-3GlcNAc 結合には作用しなかった。しかし、報告者はこの遺伝子産物が植物コンプレックス型糖鎖に作用する α1,3-フコシダーゼであると考えた。At2g28100 遺伝子を pPICZα ベクターに組み込み、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* にて発現させた。この酵素が作用する糖鎖を探索するため、大きさの異なる 6 種類の植物コンプレックス型糖鎖 (いずれも Fucα1-3GlcNAc 結合を含む) も調製した。植物 (エンドウ芽生え) から抽出した糖タンパク質をヒドラジン分解して、N 型糖鎖を調製した。糖鎖の還元末端を 2-アミノピリジンにより蛍光標識し、M3FX をサイズ分画 HPLC および逆相 HPLC にて分離・精製した。α-マンノシダーゼや β-キシロシダーゼなどを処理し、Fucα1-3GlcNAc を含む 6 種類の糖鎖を調製した。これらの糖鎖に At2g28100 遺伝子産物を作用させた。

(2) α1,3-フコシダーゼノックアウト植物体 (N 型糖鎖分解破綻植物体) の解析

At2g28100 遺伝子のノックアウト植物体 (T-DNA 挿入変異体) を米国ソーク研究所より入手した。この植物体を育成し、表現形観察と N 型糖鎖構造解析を行った。N 型糖鎖構造解析は、植物抽出物からヒドラジン分解により調製した糖鎖を蛍光標識し、サイズ分画 HPLC および逆相 HPLC にて、分離・定量することで行った。

4. 研究成果

At2g28100 遺伝子産物を *P. pastoris* で発現させた。糖鎖修飾されたタンパク質として発現した。エンド H という酵素により糖鎖を取り除き、目的産物の分子量と一致したタンパク質が発現したことを確認した。このタンパク質を Fucα1-3GlcNAc 結合を含む 6 種類の植物コンプレックス型糖鎖の分解産物に作用させると、GlcNAcβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc のみ α1,3-フコシダーゼ活性による分解を受けた。このことから、At2g28100 が植物コンプレックス型糖鎖に作用する α1,3-フコシダーゼ遺伝子であることが判明した。また M3FX のよ

うな典型的な植物コンプレックス型糖鎖に直接作用せず、液胞 α -マンノシダーゼ、 β 1,2-キシロシダーゼ、エンド- β -マンノシダーゼによって逐次分解された短くなった糖鎖に作用する、特有の基質特異性があることが明らかになった。これらの酵素の基質特異性から、初めて植物コンプレックス型糖鎖の分解経路を提出することができた。これにより、ハイマンノース型糖鎖の分解を含めた植物N型糖鎖の分解経路の全貌を明らかにすることができた(図2)。

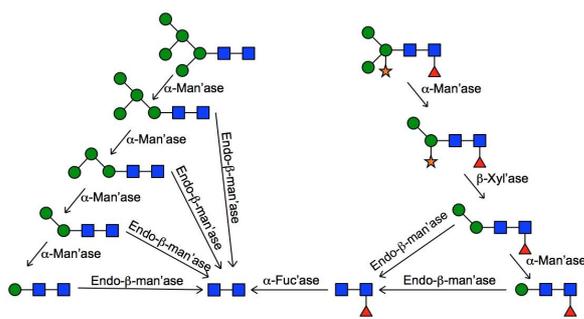


図2. 本研究で全貌が明らかにされた植物N型糖鎖の分解経路

さらに、この酵素が関与する植物コンプレックス型糖鎖の分解経路を明確にするために、 α 1,3-フコシダーゼ遺伝子ノックアウト植物(T-DNA挿入変異体)の解析を行った。変異体は α 1,3-フコシダーゼ活性が検出されず、この遺伝子が α 1,3-フコシダーゼをコードすることを裏付けた。変異体では、はっきりとした表現型の変化は観察されず、 α 1,3-フコシダーゼによるN型糖鎖分解は、通常条件下では生育に関与しないことが明らかになった。変異体のN型糖鎖は、 α 1,3-フコシダーゼが基質とするGlcNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAcが分解されずに残っていた。これは、 α 1,3-フコシダーゼがGlcNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAcを基質とするという生化学的解析の結果と一致し、植物コンプレックス型糖鎖の分解経路を明確にできた。また、変異体では、分解されずに残っている糖鎖が他にもあり、 α 1,3-フコシダーゼのノックアウトにより糖タンパク質糖鎖の分解全体が滞っていることを示した。これは、糖タンパク質糖鎖の分解には複数の酵素が連携していることを示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

- (1) 石水 毅 植物N型糖鎖の分解とその生理機能 *バイオサイエンスとインダストリー* **71**, 220-223 (2013) 査読有
http://www.jba.or.jp/pc/archive/bi_archive/
- (2) 石水 毅 N型糖鎖に作用する植物マンノシダーゼ *応用糖質科学* **3**, 93-98 (2013)

査読有

- (3) Ishimizu, T. The N-glycan degradation pathway in plants. *Glycoscience 2008-2012* **1**, 68-69 (2012) 査読無
- (4) Kimura, M., Izumi, M., Okamoto, R., Ishimizu, T., and Kajihara, Y. New strategy for the synthesis of glycoprotein: A single expression method of two peptide segments encoded as a tandem sequence in plasmid and its conversion to peptide-athioester. *Peptide Science* **2012** **48**, 15-16 (2012) 査読有
- (5) 石水 毅 八方美人なアルギニン--アルギニンがタンパク質凝集抑制に効くワケ *化学* **66**, 60-61 (2011) 査読無
- (6) 石水 毅 植物N-結合型糖鎖の分解機構 *生化学* **83**, 1087-1099 (2011) 査読有
<http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2013/05/83-12-03.pdf>
- (7) Arakawa, J., Uegaki, M., and Ishimizu, T. Effects of L-arginine on solubilization and purification of plant membrane proteins. *Protein Expr. Purif.* **80**, 91-96 (2011) 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2011.05.014>

[学会発表](計 3 2件)

- (1) 上原洋平、田村峻佑、加藤大詞、牧 祐介、湯浅大史、石水 毅 植物細胞壁多糖ラムノガラクトツロナンIの主鎖の生合成に関与するラムノース転移酵素の生化学的解析 日本農芸化学会 2014年度大会 明治大学(神奈川) 2014年3月29日
- (2) 石水 毅 植物N型糖鎖の分解経路 立命館大学糖鎖工学研究センター10周年記念シンポジウム 立命館大学(滋賀) 2014年3月14日(招待講演)
- (3) 石水 毅、上原洋平、田村峻佑、鶴浜和奈、牧 祐介、今井友也 植物細胞壁成分ペクチンの生合成酵素の解析 第238回京都大学生存圏研究所シンポジウム 京都大学生存圏研究所(京都) 2013年11月18日(招待講演)
- (4) 鈴木真未、石水 毅 RG-IIに含まれるアピオースの前駆体であるUDP-アピオースの単離法 第7回植物細胞壁ネットワーク研究会 つくばグランドホテル(茨城) 2013年11月13日
- (5) 鶴浜和奈、石水 毅 ラムノガラクトツロナンIの生合成に関与するラムノース転移酵素の同定 第7回植物細胞壁ネットワーク研究会 つくばグランドホテル(茨城) 2013年11月13日
- (6) 石水 毅 植物N型糖鎖に作用する糖質分解酵素の解析 第86回日本生化学会大会 横浜パシフィコ(神奈川) 2013年9月12日(招待講演)
- (7) 石水 毅 立命館大学生命科学部バイオエネルギー研 研究室紹介 滋賀経済同友会「新・ものづくり」研究会 ホテルニューオウミ(滋賀) 2013年9月6日
- (8) 牧 祐介、上原洋平、田村峻佑、石井 忠、

- 石水 毅 植物細胞壁多糖ラムノガラクトツロナンI ラムノース転移酵素の活性測定法の構築 第32回日本糖質学会年会 大阪国際交流センター(大阪) 2013年8月7日
- (9) 北川真衣、加藤俊、林めぐみ、石水 毅 植物コンプレックス型糖鎖に作用する α 1,3-フコシダーゼの同定 第32回日本糖質学会年会 大阪国際交流センター(大阪) 2013年8月7日
- (10) 石水 毅 膜タンパク質の効率的可溶化法・精製法の開発 サントリー生有研シンポジウム「生体膜における生命現象解明の新展開」 サントリー生物有機科学研究所(大阪府) 2013年7月17日(招待講演)
- (11) Mustafa, N.S., Ohashi, T., Ishimizu, T., Fujiyama, K. Cloning, expression and characterization of polygalacturonase from *Arabidopsis thaliana*. 日本農芸化学会 2013年度大会 東北大学(宮城) 2013年3月25日
- (12) 牧 祐介、俣木彩恵子、石井 忠、今井友也、長谷川友香、大橋貴生、藤山和仁、石水 毅 ペクチンラムノガラクトツロナンの合成に關与するラムノース転移酵素の活性測定法 日本農芸化学会2013年度大会 東北大学(宮城) 2013年3月25日
- (13) 牧 祐介、俣木彩恵子、石井 忠、長谷川友香、大橋貴生、藤山和仁、石水 毅 植物細胞壁多糖ラムノガラクトツロナンの合成に關わるラムノース転移酵素の活性測定法の構築 第85回日本生化学会大会 福岡国際会議場(福岡) 2012年12月16日
- (14) 北川真衣、村田 岳、五十嵐圭日子、鮫島正浩、石水 毅 植物コンプレックス型糖鎖に作用する α 1,3-フコシダーゼの同定 第85回日本生化学会大会 福岡国際会議場(福岡) 2012年12月16日
- (15) 牧 祐介、俣木彩恵子、石井 忠、長谷川友香、大橋貴生、藤山和仁、石水 毅 植物細胞壁多糖ラムノガラクトツロナン合成酵素の活性測定法 第6回植物細胞壁ネットワーク研究会 ユニチホテル南城(沖縄) 2012年12月1日
- (16) 石水 毅 食タンパク質技術の紹介 アグリビジネス創出フェア 東京ビッグサイト(東京) 2012年11月14~16日
- (17) 石水 毅 微量膜タンパク質解析法 産学官連携推進会議第11回イノベーションジャパン2012 東京国際フォーラム(東京) 2012年9月27日
- (18) 岡村彩葉、李 リ怡、石水 毅、安田(高崎)剛志 ニホンナシ花柱組織の發育に伴うS-RNaseの蓄積 園芸学会平成24年度秋季大会 福井県立大学(福井) 2012年9月23日
- (19) 鹿内俊秀、梶 裕之、鈴木芳典、藤田典昭、前田真砂子、文 紅玲、石崎 円、澤木弘道、奥田修二郎、鴨さおり、中尾広美、石水 毅、川寄伸子、川寄敏祐、山田一作、本庄秀之、森 昌子、弘瀬友理子、水野真盛、加藤雅樹、菅 秋次、山口芳樹、木下聖子、河野 信、成松 久 JCGGDBの活動報告 第31回日本糖質学会年会 鹿児島市民文化ホール(鹿児島) 2012年9月18日
- (20) 石水 毅 植物糖鎖の生合成・分解の分子機構 鳥取県西部農業改良普及所セミナー 鳥取県西部農業改良普及所大山普及所(鳥取) 2012年8月27日(招待講演)
- (21) Nakano, Y., Fukamizu, Y., Ito, Y., Goue, N., Igarashi, H., Yamaguchi, M., Ishimizu, T., Demura, T. Tobacco BY-2 cell-based induction system for xylem vessel element differentiation; useful tool to study molecular mechanisms for secondary cell wall biogenesis. 第53回日本植物生理学会年会 京都産業大学(京都) 2012年3月18日
- (22) 深水祐一郎、中野仁美、山口雅利、石水 毅、出村 拓 VND7による道管要素分化誘導系を用いたキシランキシロシルトランスフェラーゼの生化学的解析 第53回日本植物生理学会年会 京都産業大学(京都) 2012年3月18日
- (23) Nakano, Y., Fukamizu, Y., Ito, Y., Goue, N., Igarashi, H., Yamaguchi, M., Ishimizu, T., Demura, T. Tobacco BY-2 Cell-Based Induction System for Xylem Vessel Element Differentiation; Useful Tool to Study Molecular Mechanisms for Secondary Cell Wall Biogenesis. The 4th Conference on Biosynthesis of Plant Cell Wall 淡路島夢舞台(兵庫) 2011年10月5日
- (24) Arakawa, J., Uegaki, K., Ishimizu, T. Effects of L-arginine on solubilization and purification of polygalacturonic acid synthase. The 4th Conference on Biosynthesis of Plant Cell Wall 淡路島夢舞台(兵庫) 2011年10月5日
- (25) Ishimizu, T., Yasui, K., Uegaki, K., Arakawa, J. Efficient solubilization and purification methods for polygalacturonic acid synthase. The 4th Conference on Biosynthesis of Plant Cell Wall 淡路島夢舞台(兵庫) 2011年10月4日
- (26) 石水 毅、安井一敏、上垣眞理、荒川隼至 植物細胞壁生合成酵素の同定に向けた膜タンパク質の効率的調製法の開発 第84回日本生化学会大会 京都国際会館(京都) 2011年9月24日(招待講演)
- (27) 荒川隼至、上垣眞理、石水 毅 ペクチン生合成酵素の精製における塩基性アミノ酸の利用 第84回日本生化学会大会 京都国際会館(京都) 2011年9月24日
- (28) 前田紗希、石水 毅 植物液胞 α -マンノシダーゼ候補タンパク質の発現系構築 第84回日本生化学会大会 京都国際会館(京都) 2011年9月23日
- (29) 荒川隼至、上垣眞理、石水 毅 ペクチン生合成酵素の精製における塩基性アミノ酸の利用 第30回日本糖質学会年会 長岡リリックホール(新潟) 2011年7月13日

- (30) 石水 毅 植物糖鎖関連酵素の解析と植物糖鎖分解システム 食品安全工学科セミナー 近畿大学生物理工学部(和歌山) 2011年7月6日(招待講演)
- (31) 荒川隼至、石水 毅 膜タンパク質精製における塩基性アミノ酸の利用 第11回日本蛋白質科学会年会 ホテル阪急エキスポパーク(大阪) 2011年6月8日
- (32) 石水 毅 植物糖タンパク質糖鎖の分解機構 第12回関西グライコサイエンスフォーラム 大阪大学(大阪) 2011年5月14日(招待講演)

〔図書〕(計 3件)

- (1) 長谷川慎、前田衣織、有馬一成、石水 毅 生体高分子の基礎 実教出版 総ページ数188 2014年刊行予定
- (2) Ishimizu, T. Plant N-glycans and their degrading enzymes. In *Glycoscience: Biology and Medicine* (Eds, Taniguchi, N., Endo, T., Hart, G., Seeberger P., Wong, C.H.) Springer-Verlag 2014年刊行予定
- (3) 石水 毅 「蛍光標識糖鎖の分離定量」「N型糖鎖の構造解析」「酵素分解による構造解析」植物細胞壁(西谷和彦、梅澤俊明編) pp. 304, 307-309 講談社 2013年

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

- (1) ホームページ
立命館大学生命科学部石水研ホームページ
<http://www.ismz.sk.ritsumeai.ac.jp/>
- (2) アウトリーチ活動
酵素を見てみよう 立命館宇治中学校
2013年6月7日
- (3) アウトリーチ活動
立命館大学生命科学部入学のススメ 滋賀県立石山高等学校 2013年9月20日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石水 毅 (ISHIMIZU TAKESHI)
立命館大学・生命科学部・准教授
研究者番号: 30314355