

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月12日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580414

研究課題名（和文） 遊離アスパラギン結合型糖鎖の植物分化制御機能の解明と応用

研究課題名（英文） Functional analysis of free N-glycans involved in regulation of plant differentiation.

研究代表者

木村 吉伸 (KIMURA YOSHINOBU)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：70195387

研究成果の概要（和文）：分化成長中の植物組織には、糖タンパク質から酵素的に遊離した糖鎖（N-グリカン）がマイクロ濃度存在する。その遊離糖鎖の機能を明らかにする研究の一端として、糖タンパク質から糖鎖を切り出す2種類の酵素（ENGase, PNGase）遺伝子について、それぞれの発現を抑制したトランスジェニック植物を作出した。酵素活性の消失に伴い遊離型糖鎖の構造特性に顕著な違いが観察され、変異導入植物は発芽後の成長には生育障害は見られなかったものの、ある環境条件下においては、果実熟成過程に特徴的な差異が見られた。

研究成果の概要（英文）：

In developing plant tissues, free N-glycan that are enzymatically liberated from glycoproteins occur ubiquitously at micromolar level. As a part of study to elucidate the physiological function(s) of these free N-glycans involved in plant development, we constructed knock-out or knock-down plants, in which the expressions of ENGase or PNGase genes were suppressed. The structural features of free N-glycans expressed in those transgenic plants were clearly distinguishable from those expressed in wild type plants. Although significant difference in phenotype between the transgenic plants and wild type was not observed, a specific difference in the fruit-ripening process was observed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：

科研費の分科・細目：基盤研究（C）・応用分子細胞生物学

キーワード：(1) 植物タンパク質 (2) 遊離 N-グリカン (3) ENGase (endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase)(4) PNGase (Peptide:N-glycanase) (5) 遺伝子発現抑制 (6) トランスジェニック植物 (7) 糖鎖機能

1. 研究開始当初の背景

N-グリカンは、機能性タンパク質に共有結

合することで、それら糖タンパク質のフォールディング機構や *in vivo* 生理機能の発現に重要な寄与をなしている。一方、申請者らは、分化成長中の植物組織中に、これらの *N*-グリカンが遊離型糖鎖としてマイクロモル濃度存在することを見出し、それら遊離型糖鎖の構造特性と分布解析、そして糖鎖代謝酵素の遺伝子同定と発現系構築を行って来た。しかしながら、これら遊離型糖鎖の生理機能に注目した研究は少ない状況であった。

## 2. 研究の目的

本申請では、糖鎖代謝に関与する酵素の遺伝子発現制御（トランスジェニック植物の構築）を通して、① 遊離*N*-グリカンの植物成長あるいは果実熟成の制御機構に関わる生理機能を実証するとともに、② その生理機能を植物成長制御技術の開発へ応用することを目的とした。

## 3. 研究の方法

① 分化成長中の植物組織中に遍在する遊離 *N*-グリカンの生産に関わる酵素（細胞質 ENGase, 細胞質 PNGase, 酸性 PNGase）について、精製酵素のアミノ酸配列データ及びゲノム情報を基にトマト果実中で発現される ENGase 及び PNGase の遺伝子同定と酵母による発現系の構築を試みた。

② 次に、遊離糖鎖の分解を司る  $\alpha$ -Man'ase についても、トマト果実から精製した酵素のアミノ酸配列を基にして、遺伝子同定と酵母による発現系構築を試みた。

③ 同定した酵素遺伝子配列も基に、アラビドプシスをを用いて、ENGase / PNGase 遺伝子のダブルノックアウト変異株の作出を試みた。また、トマトについては、RNAi 法を用いて、ENGase, 酸性 PNGase についてのシングルノックダウン植物の構築を試み

た。変異株構築の確認については、植物体に発現されている遊離型糖鎖を蛍光標識後、糖鎖マッピング法、酵素消化法、ESI-MS 分析等により解析した。酵素活性については、蛍光標識糖鎖を基質として用い、生成物を HPLC により分析することにより測定した。

## 4. 研究成果

① 果実熟成に関わる ENGase 機能を明らかにする目的で、トマト果実熟成に伴う ENGase 遺伝子の発現変動を解析した。その結果、遊離糖鎖は果実成熟に伴い顕著な量的・質的変動を示すものの、mRNA 合成及び ENGase 活性ともに顕著な上昇は認められなかった。このことは、トマト果実熟成の後期において ENGase 基質量が上昇することで、遊離糖鎖の生成量が増加することを示すものであり、遊離糖鎖が果実熟成に関与する生物機能を有することを想定させた。

② アラビドプシスとトマトについては、ENGase と 中性 PNGase 遺伝子発現をそれぞれ抑制したトランスジェニック植物を作出した。この内、ENGase 遺伝子発現を完全抑制した植物体の作出は世界に先駆ける成果となった。また、ENGase 遺伝子発現を RNAi 法でノックダウンすることで、遊離糖鎖生成量を抑制した果実（トマト）の作出も世界に先駆けた成果である。ENGase 活性の消失に伴い遊離型糖鎖の構造特性に顕著な違いが観察された。一方、変異導入植物の発芽後の成長には生育遅延や成熟異常等は見られなかったものの、ある環境条件下においては、果実熟成過程に特徴的な差異が観察された。この事実は、果実熟成をはじめとする植物分化機構において、遊離 *N*-グリカンがシグナル分子としての機能を有する可能性示唆するものである。

③ 一方、ENGase については、その糖転移性を糖鎖工学に応用する視点からも、分子モ

デリング法による立体構造解析を行った。そのデータを基に、部位特異的変異導入法による触媒残基(Glu, Asn)と基質結合残基(Trp)の同定に成功した。更に、2倍の加水分解活性を有する変異体、複合型糖鎖に作用する基質特異性変異体の作出にも成功した。

④ 植物細胞質中の遊離糖鎖の分解に関わる $\alpha$ -Man'aseについても、トマト果実から酵素精製を行った後、そのアミノ酸配列情報を基に遺伝子同定に成功し、酵母を用いた遺伝子発現系の構築に成功した。植物酸性 $\alpha$ -Man'aseとして遺伝子が同定された最初の報告となった。

以上の成果を踏まえ、今後の展望としては、ENGase / PNGase /  $\alpha$ -Man'ase 遺伝子のトリプルノックアウトあるいはノックダウン変異体の作成を進め、遊離糖鎖生成を完全に抑制することで、遊離糖鎖のシグナル分子あるいはタンパク質フォールディングに関わる機能を実証するとともに、糖鎖機能の植物育種への応用を目指す。また、遊離糖鎖がシグナル分子として機能するならば、レセプタータンパク質の存在が考えられるため、そのレセプタータンパク質の探索を今後の課題とする。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

- (1) Double Knockout of Putative Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase (ENGase) genes in *Arabidopsis thaliana*: Loss of ENGase activity induced accumulation of high-mannose type free N-glycans bearing N,N'-acetylchitobiosyl unit. \***Kimura, Y.**, Takeoka, Y., **Maeda, M.**, Fujiyama, K., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1019-1021 (2011)
- (2) Purification and characterization of plant  $\beta$ -xylosidase involved in turnover of plant

- complex-type N-glycans. Yokouchi, D., Ono, N., Nakamura, K., and \***Kimura, Y.** *Glycoconjugate, J.*, **28** 316 (2011)
- (3) Changes of substrate specificity of plant ENGase (Endo-Os) by site-directed mutagenesis. Okamoto, N., Maeda, M., Kimura, M., and \***Kimura, Y.** *Glycoconjugate, J.*, **28** 317 (2011)
- (4) Molecular characterization and expression analysis of  $\alpha$ -fucosidase from tomato fruits. Fujishige, M., Ono, N., Nakamura, K., and \***Kimura, Y.** *Glycoconjugate, J.*, **28** 317 (2011)
- (5) A New Lectin from the Tuberous Rhizome of *Kaempferia rotunda*: Isolation, Characterization, Antibacterial and Antiproliferative Activities. Kabir S. R., Hossen, M. A., Zubair, M. A., Alom, M.J., Islam, M. F., Hossain, M.A., **Kimura, Y.** *Protein Pept Lett.* **18**, 1140-1149 (2011)
- (6) Purification and Characterization of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent novel lectin from *nymphaea nouchali* tuber with antiproliferative activities. Kabir SR, Zubair MA, Nurujjaman M, Haque MA, Hasan I, Islam MF, Hossain MT, Hossain MA, Rakib MA, Alam MT, Shaha RK, Hossain MT, **Kimura Y**, Absar N., *Biosci Rep.* **31**, 465-475. (2011)
- (7) N-Glycans linked to glycoproteins in edible beans (*Zatsu-mame*): Natural resources for bioactive oligosaccharides. Kimura, M., Hara, T., and \***Kimura, Y.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 155-158 (2011)
- (8) Intracellular and extracellular free N-glycans produced by plant cells: Occurrence of unusual plant complex-type free N-glycans in extracellular spaces. Maeda, M, Mariko, K., and \***Kimura, Y.**, *J. Biochem.* **148**, 681-692 (2010).
- (9) Molecular identification and characterization of an acidic peptide:N-glycanase (PNGase) from tomato fruits. Hossain, M. A., Nakano, R., Nakamura, K., and \***Kimura, Y.** *J. Biochem.*, **147**, 157-165 (2010).
- (10) Molecular characterization of plant acidic

- $\alpha$ -mannosidase, a member of glycosylhydrolase family 38, involved in the turnover of *N*-glycans during tomato fruit ripening. Hossain, M. A., Nakano, R., Nakamura, K., Hossain, M. T., and \*Kimura, Y., *J. Biochem.* **148**, 603-616. (2010).
- (11) Identification of a royal jelly glycoprotein that carries unique complex-type *N*-glycans harboring the T-antigen (Gal $\beta$ 1-3GalNAc) unit. \*Kimura, Y., Nagai, H., Miyamoto, M., Kimura, M., and Yonekura, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2148-2150 (2010).
- (12) Molecular cloning and gene expression analysis of tomato endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase, an endoglycosidase involved in the production of high-mannose type free *N*-glycans during tomato fruit ripening. Nakamura, K., Inoue, M., Nakano, R., Hosoi, K., and \*Kimura, Y. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73** 461-464 (2009).
- (13)  $\alpha$ -Mannosidase involved in turnover of plant complex type *N*-glycans in tomato fruits. Hossain, Md, A., Nakamura, K., and \*Kimura, Y. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73** 140-146 (2009).
- (14) Predominant occurrence of truncated complex type *N*-glycans among glycoproteins in mature-red tomato. Nakamura, K., Inoue, M., and \*Kimura, Y. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73** 221-223 (2009).

[学会発表] (計 17 件)

- (1) Megumi Ehara (Yoshinobu KIMURA), Correlation analysis between tomato-ripening mutants and *N*-glycan metabolism in ERAD., 15th European Carbohydrate Symposium. 2009.7.23. Vienna (Austria).
- (2) Naoko Okamoto (Yoshinobu KIMURA), The Transglycosylation Activity of Endo- $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase from *Oriza sativa* L. 15th European Carbohydrate Symposium. 2009.7.23. Vienna (Austria).
- (3) Yuki Takeoka (Yoshinobu KIMURA), Suppression of Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase and

- Peptide:N-glycanase Activity in *Arabidopsis thaliana*. 15th European Carbohydrate Symposium. 2009.7.23. Vienna (Austria).
- (4) 京谷 優, 木村 吉伸. 新生タンパク質の品質管理系に関与する植物 $\alpha$ -グルコシダーゼの精製と性質 日本農芸化学学会 中四国支部講演会 2010. 1. 23 松山
- (5) 山西 真緒美, 木村吉伸 機能性糖鎖を多価有する人工糖鎖ポリマーの作成 日本農芸化学学会 中四国支部講演会 2010. 1. 23 松山
- (6) 三輪 昇 (木村吉伸) 肝がん患者由来の血清糖タンパク質糖鎖及び遊離型糖鎖の構造特性 日本農芸化学学会 中四国支部講演会 2010. 1. 23 愛媛大学
- (7) Md.Anowar Hossain (Yoshinobu Kimura) Molecular characterization of acidic  $\alpha$ -mannosidase involved in turnover of glycoproteins in tomato (*Lycopersicon esculentum*) 25<sup>th</sup> International Carbohydrate Symposium 2010.8.5 Tokyo
- (8) 岡本尚子 (木村吉伸) イネ エンド- $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼの糖転移酵素活性と変異体作成 第 5 1 回 日本生化学会 中四国支部例会 2010. 5. 15 山口大学
- (9) Md.Anowar Hossain (木村吉伸) Molecular characterization and molecular modeling of plant  $\alpha$ -mannosidase. 日本農芸化学学会 平成 22 年度中四国支部大会 2010. 9. 25. 香川大学
- (10) 江原愛美 (木村吉伸) 植物 ERAD で機能する糖鎖遺伝子の機能解析 日本農芸化学学会 中四国支部第 2 9 回講演会 2011. 1. 22. 徳島大学
- (11) 藤重誠 (木村吉伸) トマト複合型 N-グリカンの代謝に関わる  $\alpha$ -Fucosidase の遺伝子同定と発現系構築 日本農芸化学学会 中四国支部第 2 9 回講演会 2011. 1. 22. 徳島大学
- (12) 岡本尚子 (木村吉伸) 植物エンドグリコシダーゼの糖転移活性と部位特異的変異導入による活性残基同定 日本農芸化学学会 中四国支部第 2 9 回講演会 2011. 1. 22. 徳島大学
- (13) 横内大輔 (木村吉伸) 植物複合型 N-グリカンの代謝に関わる  $\beta$ -Xylosidase の精製と発現系構築 日本農芸化学学会 中四国支部第 2 9 回講演会 2011. 1. 22. 徳島大学
- (14) Naoko Okamoto, (Yoshinobu KIMURA) Changes of substrate specificity of plant ENGase (Endo-Os) by site-directed mutagenesis. International Symposium on Glycoconjugate XXI 2011.8.25 Vienna (Austria)

- (15) Daisuke Yokouchi (Yoshinobu Kimura)  
Purification and characterization of plant  $\beta$ -xylosidase involved in turnover of plant complex-type N-glycans. International Symposium on Glycoconjugate XXI  
2011.8.25 Vienna (Austria)
- (16) Makoto Fujishige (Yoshinobu Kimura)  
Molecular characterization and expression analysis of  $\alpha$ -fucosidase from tomato fruits. International Symposium on Glycoconjugate XXI  
2011.8.25 Vienna (Austria)
- (17) Takeo Yoshiie (Yoshinobu Kimura)  
Structural features and immunological activity of N-glycans of sea weed glycoproteins. International Symposium on Glycoconjugate XXI  
2011.8.25 Vienna (Austria)

〔図書〕 (計 1 件)

木村 吉伸 化学同人 はじめて学ぶ生命科学の基礎：3章生体分子 II-糖質, 脂質- (2011年) 28  
( pp 39-66)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村吉伸 (Yoshinobu Kimura)

岡山大学大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：70195387