

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580495

研究課題名(和文)細胞質に存在する遊離型糖鎖の植物成長制御機能の証明と植物育種への応用

研究課題名(英文)Functional analysis of cytosolic free N-glycans involved in regulation of plant growth and application of the biofunction of free N-glycans

研究代表者

木村 吉伸 (Yoshinobu, Kimura)

岡山大学・その他の研究科・教授

研究者番号：70195387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本申請では、糖鎖代謝に関する酵素の遺伝子発現制御を通して、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、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ている。植物特異的な糖鎖遊離酵素(酸性PNGase(aPNGase))については、トマトをモデル植物として過剰発現株の構築に成功した。過剰発現トマトにおいては果実強度等に変化が確認され、aPNGaseの植物分化への関与が確認された。一方、アラビドプシスについては2種類aPNGase遺伝子のダブルノックアウト株を構築し、組換え植物が環境ストレスに対して感受性が高まることを見出した。

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.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：植物糖タンパク質 植物糖鎖 遊離 N-グリカン PNGase ENGase トランスジェニック植物

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

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、分化成長中の植物組織中には、N-グリカンが遊離型 N-グリカン(FNGs)としてマイクロモル濃度存在している。近年、これら FNGs が植物の分化・成長に関わるシグナル分子として機能を有する可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

植物の成長組織中には、遊離型のアスパラギン結合糖鎖（N-グリカン）が μM 濃度で存在する。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。本申請では、糖鎖代謝に関与する酵素の遺伝子発現制御を通して、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、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ている。

3. 研究の方法

糖鎖遊離酵素（ENGase / PNGase）遺伝子を発現制御した植物の作出：糖タンパク質あるいは糖ペプチドからの糖鎖遊離を司る 3 種酵素（ENGase, cytosolic PNGase, acidic PNGase）遺伝子の発現を抑制あるいは昂進させた植物体の構築を行うことで、FNGs の植物生長および果実熟成速度に関わる生理機能を実証する。

植物特異的な遊離糖鎖の代謝分解に関わるグリコシダーゼ(β -Galactosidase (β -Gal'ase), α -Fucosidase(α -Fuc'ase))遺伝子の同定と発現解析：植物特徴的なFNGsの分解に関わるグリコシダーゼ (β -Gal'ase, α -Fuc'ase) の精製、基質特異性解析、遺伝子同定、発現解析を行う。

4. 研究成果

糖鎖遊離酵素（ENGase / PNGase）遺伝子を発現制御した植物の作出：

- (1) 酸性 PNGase (aPNGase)過剰発現トマトの果実形態変化と果実強度変化についての再現性確認を行い、aPNGase 遺伝子発現が果実熟成に関わることを明らかにした。
- (2) 過剰発現させた aPNGase 遺伝子について、GFP 標識法により細胞内局在を解析し、本酵素が液胞内に局在することを明らかにした。
- (3) トマト aPNGase 遺伝子は 6 種類が存在し、その内の 3 種類の遺伝子は果実、茎、葉等で定常的に発現される一方、他の 3 種類は果実には発現されておらず、茎特異的に発現されていることが明らかになった。この結果から、それぞれの aPNGase 遺伝子は組織、時間特異的に発現が制御されていることが示唆された。
- (4) *Arabidopsis thaliana* には aPNGase 候補遺伝子が 2 種類しか存在しないため、aPNGase 遺伝子のダブルノックアウト株の構築を試みた。その結果、ダブルノックアウト株の作成に成功し、aPNGase 遺伝子の完全消失を確認した。野生株と変異株間では、表現系には顕著な違いは認められなかったが、環境変動に対する応答に顕著な差がみられた。以上の結果から、aPNGase 活性および生成物である遊離 N-グリカンが細胞壁代謝で重要な機能を担っていることが示唆された。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。

植物特異的な遊離糖鎖の代謝分解に関わるグリコシダーゼ (β -Galactosidase (β -Gal'ase), α -Fucosidase(α -Fuc'ase))遺伝子の同定と発現解析：

- (1) -キシロシダーゼ(-Xyl'ase)をトマト果実と銀杏種子から単一精製後、酵素学的諸性質を明らかにするとともに、詳細な基質特異性を明らかにし、

本酵素が 1-3Man 残基が除去された後に, 1-2Xyl 残基に作用することを明らかにした。

- (2) β -ガラクトシダーゼ (β -Gal'ase)を銀杏種子から単一精製後, 酵素学的諸性質を明らかにするとともに, N-末端配列を同定した。本酵素はルイス a 抗原含有 N-グリカンに対して活性を示したことから, 複合型糖鎖の代謝に関与することが示唆された。本酵素は, これまでに同定されている植物 β -Gal'ase の中で最小分子量を有しており, 最小の糖鎖結合部位と触媒ドメインから成るユニークな酵素であることが明らかになった。
- (3) α -Fuc'ase を銀杏種子から単一精製後, 詳細な基質特異性解析を行い, 本酵素が α 1-3/4 Fuc 結合に対して強い活性を示すことを明らかにした。一方, トマト α -Fuc'ase 遺伝子の同定と異種発現系構築に成功し, 組換え酵素が N-グリカン中の α 1-3/4 Fuc 結合に対して活性を示すことを明らかにするとともに, 分子モデリング法による立体構造解析を行った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

- (1) β -Galactosidase from *Ginkgo biloba* seeds active against β -galactose-containing N-glycans: Purification and characterization. Rahman, Md, Z., Maeda, M., and **Kimura, Y.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**, in press (2015) **査読有**
DOI:10.1080/09168451.2015.1034653
- (2) Changes in biochemical characteristics and activities of ripening associated enzymes in mango fruit during the storage at different temperatures. Hossain, M.A., Rana, M.M., **Kimura, Y.**, and Roslan, H.A. *Biomed Res Int.*, **2014**, 1-11 (2014) **査読有**
- (3) Structural features of free N-glycans occurring in plants and functional features of de-N-glycosylation enzymes, ENGase and PNGase. Maeda, M., and **Kimura, Y.** *Frontier in Plant Science*, **5**, 1-9 (2014) **査読有**

- (4) Purification and molecular characterization of *Ginkgo biloba* β -xylosidase active for plant complex type N-glycans. Maeda, M., Akiyama, T., Yokouchi, D., Woo, K. K., and **Kimura, Y.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1973-1976 (2013). **査読有**
- (5) Large-scale preparation of Asn-glycopeptide carrying structurally homologous antigenic N-glycan. Maeda, M., Takeda, N., Mano, A., Yamanishi, M., Kimura, M., and **Kimura, Y.**, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1269-1274 (2013) **査読有**
- (6) Structural and Functional Features of Plant Glycoprotein Glycans Maeda, M., and **Kimura, Y.** In "Chemistry, Molecular Sciences and Engineering" (Reedijk, J., ed) pp 2-15, Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.01500-6. **査読有**
- (7) Purification and characterization of β -xylosidase that is active for plant complex type N-glycans from tomato (*Solanum lycopersicum*): removal of core α 1-3 mannosyl residue is prerequisite for hydrolysis of β 1-2 xylosyl residue. Yokouchi, D., Ono, N., Nakamura, K., Maeda, M., and **Kimura, Y.** *Glycoconj. J.*, **30**, 463-472 (2013). **査読有**
- (8) 植物糖タンパク質の代謝に関わる糖鎖関連酵素の機能特性と遊離型糖鎖の存在意義-植物 endo- β -N-acetylglucosaminidase (ENGase)と peptide:N-glycanase (PNGase)-前田恵, **木村吉伸** 応用糖質科学, **3**, 77-86 (2013) **査読有**

[学会発表](計32件)

- (1) 兵庫彬斗, 前田恵, **木村吉伸**, 「植物糖タンパク質フォールディング機構に関与する β -Glucosidase の機能解析と遺伝子発現系の構築」, 岡山バイオアクティブ研究会, シンポジウム岡山県立大学2012
- (2) Murata, S., Kyotani, Y., Maeda, M., **Kimura, Y.**, 「Purification and Characterization of α -Glucosidase II from cultured rice cells involved in the Glycoprotein Folding quality control」 XXVI International Carbohydrate Symposium (ICS 2012), Madrid, Spain 2012年07月22日~2012年07月27日
- (3) Hyogo, A., Kyotani, Y., Maeda, M.,

- Kimura, Y**, 「Purification and construction of gene expression system of rice α -1,2-Glucosidase I involved in protein folding in Endoplasmic Reticulum」, XXVI International Carbohydrate Symposium (ICS 2012), Madrid, Spain 2012年07月22日~2012年07月27日
- (4) Shouhei Murata, Megumi Maeda, **Yoshinobu Kimura**, 「Purification and characterization of α -glucosidase II from cultured rice cell involved in the glycoprotein folding quality control」 Bioactive Okayama2012(BAO2012) 岡山大学 2012年09月13日~2012年09月14日
- (5) Akito Hyougo, Megumi Maeda, **Yoshinobu Kimura**, 「Characterization and construction of expression system of α -1,2-Glucosidase□ involved in folding system of plant glycoproteins」 Bioactive Okayama2012(BAO2012) 岡山大学 2012年09月13日~2012年09月14日
- (6) 藤重 誠, 前田恵, **木村吉伸**, 「植物複合型 N-グリカンの代謝に係わるイネ α -L-fucosidase の精製」, 第31回日本糖質学会年会 鹿児島 2012年09月17日~2012年09月20日
- (7) 千葉 燃, 岡本尚子, 前田 恵, **木村吉伸**, 「植物エンドグリコシダーゼの部位特異的変異導入による触媒部位の同定と基質特性の改変」, 第85回日本生化学会大会 2012年12月14日~2012年12月16日
- (8) 藤重 誠, 前田 恵, **木村吉伸**, 「植物複合型 N-グリカンの代謝に関わるイネ α -L-Fucosidase の精製, 基質特異性解析及び遺伝子同定」, 日本農芸化学会中四国支部 35回講演会 高知大学 2013年01月26日
- (9) 横内大輔, 中村浩介, 前田 恵, **木村吉伸**, 「Endo- β -N-acetylglucosaminidase (ENGase) ノックダウン植物の構築と ENGase 発現抑制が及ぼす影響」, 日本農芸化学会中四国支部 35回講演会 高知大学 2013年01月26日
- (10) 前田 恵, 竹田直人, **木村吉伸**, 「植物抗原性 N-グリカン含有糖ペプチドの多量調製法の確立とネオグリコペプチドの合成」, 日本農芸化学会中四国支部 35回講演会 高知大学 2013年01月26日
- (11) 前田 恵, 秋山剛, Ziaur Rahman, **木村吉伸**, 「植物 N - グリカン代謝に関与する β - キシロシダーゼの精製と性質検討」, 日本農芸化学会中四国支部 35回講演会 高知大学 2013年01月26日
- (12) Tsuyoshi Akiyama, Megumi Maeda, and **Yoshinobu Kimura**, 「Purification and characterization of Ginkgo biloba β -xylosidase that is active for plant complex type N-glycans」, 第三回 比較発生糖鎖生物学とその医工学の応用に関する日本・オーストリア二国間セミナー 理化学研究所 (和光市) 2013年07月01日~2013年07月03日
- (13) **Yoshinobu Kimura**, 「Free N-glycans in plants: structural features and putative function」, 第三回 比較発生糖鎖生物学とその医工学の応用に関する日本・オーストリア二国間セミナー 理化学研究所 (和光市) 2013年07月01日~2013年07月03日
- (14) 村田翔平, 前田恵, 中村浩介, 中野龍平, **木村吉伸**, 「酸 Peptide:N-glycanase (PNGase) 過剰発現トマトの構築」, 第37回講演会 (日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部合同大会) 広島 2013年09月5日~2013年09月6日
- (15) Ziaur Rahman, 秋山剛, 前田恵, **木村吉伸**, 「植物複合型糖鎖の代謝に関与する β -ガラクトシダーゼ (β -Gal'ase) の精製と酵素学的性質」, 第37回講演会 (日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部合同大会) 広島 2013年09月5日~2013年09月6日
- (16) 兵庫 彬斗, 江原 愛美, 前田 恵, **木村吉伸**, 「イネ EDEM 様タンパク質の昆虫細胞を用いた発現系の構築」, 第86回 日本生化学会大会 横浜市 2013年09月11日~2013年09月13日
- (17) 村田翔平, 前田恵, 中村浩介, 中野龍平, **木村吉伸**, 「酸性 Peptide: N-glycanase 植物遺伝子の過剰発現及び発現抑制を通じた糖タンパク質糖鎖の生理機能解析」, おかやまバイオアクティブ研究会 第44回シンポジウム 岡山市 2013年10月11日
- (18) Tsuyoshi Akiyama, Megumi Maeda, Kazuhito Fujiyama and **Yoshinobu Kimura**, 「Suppression of Cytosolic and Acidic Peptide:N-Glycanase (PNGase) in Arabidopsis thaliana」, Annual Meeting of the Society for Glyco biology 2013 Petersburg, Florida, USA 2013年11月17日~2013年11月20日 (30) 兵庫 彬斗, 前田恵, **木村吉伸**, 「植物細胞の小胞体品質管理機構に関わる糖鎖関連タンパク質の機能解析」, 日本農芸化学会大会中四国支部例会, 高松 2014年01月25日
- (19) 村田翔平, 前田恵, **木村吉伸**, 「酸性 Peptide:N-glycanase (PNGase) 過剰発現トマトの構築と遊離糖鎖構造解析」 日本農芸化学会大会中四国支部例会 高松 2014年01月25日
- (20) 前田恵, 松丸千紘, **木村吉伸**, 「トマト実生中における ENGase と PNGase の発現解析及び遊離糖鎖の分布解析」, 平成 26 年度日本農芸化学会大 東京

- 2014年03月27日～2014年03月30日
- (21) 前田恵, 谷 美里, **木村吉伸**, 「淡水性藻類に発現される N-グリカンの構造解析: ルイス a エピトープ含有糖鎖のスクリーニング」, 平成 26 年度日本農芸化学会大会 東京 2014 年 03 月 27 日～2014 年 03 月 30 日
- (22) Md. Ziaur Rahman, Megumi Maeda, and **Yoshinobu Kimura**, 「Purification and characterization of plant β -galactosidase that hydrolyzes β 1-3 Gal residue in complex type N-glycans」, 平成 26 年度日本農芸化学会大会 東京 2014 年 03 月 27 日～2014 年 03 月 30 日
- (23) Misato Tani, Megumi Maeda and **Yoshinobu Kimura**, 「Plant antigenic N-glycans carrying Lewis a epitope(s) are predominantly expressed in submerged plants」, 25th Joint Glycobiology Meeting (Ghent, Belgium) September 14-16 2014
- (24) Kazuko Seo, Megumi Maeda, **Yoshinobu Kimura** 「The transglycosylation Activity of Endo- β -N-Acetylglucosaminidase from *Oriza sativa* L」, 25th Joint Glycobiology Meeting (Ghent, Belgium) September 14-16 2014
- (25) Chihiro Matsumaru, Megumi Maeda and **Yoshinobu Kimura**, 「New method to detect acidic PNGase activity in crude plant extract」, 25th Joint Glycobiology Meeting (Ghent, Belgium) September 14-16 2014
- (26) 前田 恵 板野紗月 **木村吉伸** 「ルイス a 抗原に作用する植物 α -フコシダーゼの精製と諸性質」, 学会創立 90 周年記念 日本農芸化学会 2014 年度中四国支部大会 (第 40 回講演会) (徳島大学常三島キャンパス) 2014 年 9 月 26 日～27 日
- (27) Tsuyoshi Akiyama, Megumi Maeda, Chihiro Matsumaru, Kazuhito Fujiyama, **Yoshinobu Kimura**, 「酸性 PNGase 欠損 *A. thaliana* 植物体が産生する遊離 N-グリカン構造と PNGase 活性」, 第 87 回日本生化学会大会 (国立京都国際会館) 2014 年 10 月 15 日～18 日
- (28) 前田 恵, 藤川 真奈, **木村吉伸**, 「酸性ペプチド N-グリカナーゼのトマト果実における遺伝子発現解析」, 日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山大津島キャンパス) 2015 年 3 月 26 日～29 日
- (29) 秋山 剛, 前田 恵, 藤山 和仁, **木村吉伸**, 「酸性 PNGase ダブルノックアウト *A. thaliana* 植物体の構築」, 日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山大津島キャンパス) 2015 年 3 月 26 日～29 日
- (30) Md. Ziaur RAHMAN, Megumi MAEDA, **Yoshinobu KIMURA**, 「Molecular cloning and gene expression of α 1,3/4-Fucosidase from *Solanum lycopersicum*」, 日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山大津島キャンパス)

2015 年 3 月 26 日～29 日

- (31) 前田 恵, 板野 紗月, **木村吉伸**, 「植物 α 1,3/4-フコシダーゼの精製と基質特異性の解析」, 日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山大津島キャンパス) 2015 年 3 月 26 日～29 日
- (32) 前田 恵, **木村吉伸**, 「遊離 N-グリカンの生理機能解析: ENGase と PNGase の発現を制御した植物体の構築」, 日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山大津島キャンパス) 2015 年 3 月 26 日～29 日

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