

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440139

研究課題名(和文)植物におけるUDP-N-アセチルグルコサミン生合成の生理的意義

研究課題名(英文)Physiological significance of UDP-N-acetylglucosamine biosynthesis in plants

研究代表者

佐藤 康(Sato, Yasushi)

愛媛大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：80274306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：UDP-N-アセチルグルコサミン(UDP-GlcNAc)は真核生物がタンパク質の糖鎖修飾を行う際の必須物質である。本研究ではUDP-GlcNAc新生が阻害されるシロイヌナズナ突然変異体lig等を用い、植物におけるUDP-GlcNAc生成の生理的意義・再生経路・欠乏の影響の解明を進めた。その結果、糖鎖分解等で生じるGlcNAcからのUDP-GlcNAc再生に必須なGlcNAcキナーゼ(GNK)を植物で初めて発見した。また、UDP-GlcNAc欠乏から根の成長停止及びリグニン異常蓄積に至る過程での、細胞壁ダメージ・小胞体ストレス・小胞体ストレス応答(UPR)の相互関係に関する新たな知見を得た。

研究成果の概要(英文)：UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) is essential for N-glycosylation of proteins in eukaryotes. In this study, we progressed the investigation of significance of synthesis, salvage pathway and effects of deficiency of UDP-GlcNAc in plants. For the purpose, we used various Arabidopsis mutants and transformants such as lig, in which de novo synthesis of UDP-GlcNAc was inhibited. As a result, we novelly revealed a GlcNAc kinase in plants, which is essential for salvage synthesis of UDP-GlcNAc from GlcNAc derived from degradation of glycoproteins. Furthermore, we obtained a new knowledge about relationship between cell-wall damage, endoplasmic reticulum (ER) stress and unfolded protein response (UPR) during the process from UDP-GlcNAc deficiency to growth suppression and ectopic lignification in roots.

研究分野：植物生理学

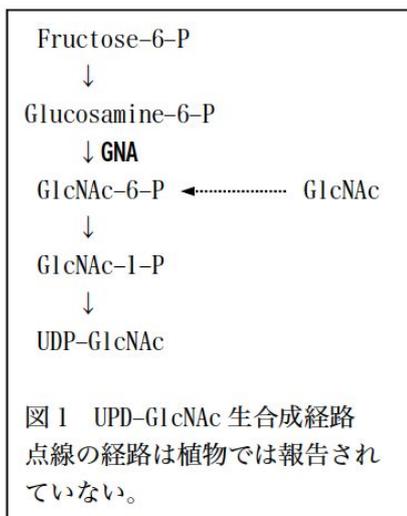
 キーワード：シロイヌナズナ lig変異体 UDP-N-アセチルグルコサミン 小胞体ストレス応答(UPR) リグニン化 G
 lcNAcキナーゼ タンパク質糖鎖修飾 温度感受性変異体

1. 研究開始当初の背景

真核生物において UDP-*N*-アセチルグルコサミン(UDP-GlcNAc)は、タンパク質の *N*-結合型糖鎖修飾等に必須の糖共与体だが、植物の発生、成長、環境応答における UDP-GlcNAc 生合成の生理的意義は十分に解明されていない。

私達は 28 の制限温度下で成長阻害とリグニンの異常蓄積を起こす *lignescens* (*lig*) 変異体を単離した。*lig* 変異体では、UDP-GlcNAc の生合成(図 1)に関わるグルコサミン-6-リン酸 *N* アセチルトランスフェラーゼ遺伝子(*GNA1*)への点突然変異により、制限温度下で UDP-GlcNAc が欠乏し、それによりタンパク質の *N*-結合型糖鎖修飾阻害及び小胞体ストレスが起こることが示され、それらが成長阻害及びリグニン異常蓄積を引き起こすと考えられた (Nozaki et al. 2012. *The Plant Cell* 24: 3366-3379)。

本研究では、*lig* 変異体及び種々の遺伝子組換え体を用い、植物における UDP-GlcNAc 生合成の生理的意義、及び UDP-GlcNAc 欠乏が引き起こす、成長阻害を伴うリグニン異常蓄積の仕組みを明らかにすることを目的とする。



2. 研究の目的

(1) *lig* 変異体における UDP-GlcNAc 欠乏が根の構造・機能に与える影響の解明

lig 変異体では UDP-GlcNAc 欠乏により、根の伸長抑制を起こすが、その際の根端分裂組織への影響、根における小胞体ストレス応答(UPR)の誘導等を解析する。

(2) *lig* 変異体における UDP-GlcNAc 欠乏がリグニン異常蓄積を引き起こす機構の解明

lig 変異体での UDP-GlcNAc 欠乏は、タンパク質の *N*-結合型糖鎖修飾阻害や小胞体ストレス応答(UPR)を引き起こす。これらの事象がリグニン異常蓄積にどのように関わるのかを、各種変異体を用い明らかにする。

(3) 植物における GlcNAc から UDP-GlcNAc を合成する経路の解明

lig 変異体に GlcNAc を与えると、28 でも正常に生育し、UDP-GlcNAc 含量の増加が確認された。この結果は、植物が GlcNAc からの UDP-GlcNAc 再生経路を持つことを意味している。本研究では、再生経路に主要な役割を果たす遺伝子・タンパク質を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *lig* 変異体における UDP-GlcNAc 欠乏が根の構造・機能に与える影響の解明

UDP-GlcNAc 欠乏は根の伸長阻害を引き起こす。その際の根の構造・機能への影響を詳細に解析する。具体的には、*CYCB1* や *BiP3* を発現マーカーとして、根端分裂組織に与える影響の解明や、UPR 誘導部位の解明を行う。

(2) *lig* 変異体における UDP-GlcNAc 欠乏がリグニン異常蓄積を引き起こす機構の解明

UDP-GlcNAc 欠乏は *N*-結合型糖鎖修飾阻害及び UPR を引き起こすことが示されており、それらがリグニン異常蓄積にどのように関わるかを明らかにする。具体的には、UPR 抑制変異体 *ire1a1 ire1b* や、*BiP3* プロモーター(*p*)::*GUS* 導入 *lig* 系統、*CCR2p*::*GUS* 導入 *lig* 系統、細胞壁ダメージセンサー遺伝子破壊 *lig* 系統等を用い、リグニン異常蓄積への影響を解析する。

(3) 植物における GlcNAc から UDP-GlcNAc を合成する経路の解明

GlcNAc から UDP-GlcNAc への再生経路は植物で報告されていない。菌類やほ乳類の GlcNAc キナーゼ遺伝子のシロイヌナズナ推定ホモログについて、融合タンパク質を作成し、GlcNAc キナーゼ活性を解析し、GlcNAc キナーゼを同定する。

4. 研究成果

(1) 小胞体ストレスとリグニン異常蓄積の関係の解明

UDP-GlcNAc 欠乏が小胞体ストレス応答(UPR)及び根の成長阻害とリグニン異常蓄積を引き起こすことが、*lig* 変異体を用いた研究で示されている。また、病傷害ストレスが UPR 誘導やリグニン生成を誘導するとの報告がある。UPR とリグニン異常蓄積の関係を明らかにするため、UPR 関連遺伝子 *BiP3p*::*GUS* 導入植物体の芽生えを用い、UPR 誘導試薬ツニカマイシン(TM)、キトサン及び病原体関連分子パターン flg22 により誘導されるリグニン異常蓄積と UPR 誘導部位の関係を解析した。その結果、TM は根及び子葉において、キトサ

ンは主に根において、flg22 は主に子葉において、UPR 及びリグニン異常蓄積を引き起こすことが示された。この結果は、UPR とリグニン異常蓄積の相互関係を明らかにする上で非常に重要である（学会発表）。

(2) *lig* 変異体における UDP-GlcNAc 欠乏と、UPR、成長阻害、リグニン異常蓄積の関係の解明

lig 変異体における UPR 誘導部位、リグニン異常蓄積部位、細胞分裂頻度の関係を解析するため、UPR 関連遺伝子 *BiP3p::GUS* 導入 *lig* 系統、リグニン生成関連遺伝子 *CCR2p::GUS* 導入 *lig* 系統、細胞周期マーカー遺伝子 *CYCB1p-DB::GUS* 導入 *lig* 系統を作成し、制限温度の 28℃ 処理後の GUS 発現を追跡した。その結果、*BiP3p::GUS* 発現は、根の基部付近で起こり始め根端方向に拡大していくことが示された。*CCR2p::GUS* 発現は、根の伸長領域で 28℃ 処理 24 時間後から確認された。この結果は、根の伸長領域では UPR が起こりにくい一方、リグニン異常蓄積が起こることを示しており、UPR は、小胞体ストレスにより誘導されるリグニン異常蓄積に抑制的に働くことを示唆している。*CYCB1-DB::GUS* の根端での発現は、28℃ 処理後著しく低下し、細胞分裂が抑制されていることが示された。さらに、細胞壁合成センサー遺伝子破壊 *lig* 系統を作成し、解析を行った結果、28℃ 処理による根の成長停止及びリグニン異常蓄積が緩和されることが示された。これらの結果は、*lig* 変異体における UDP-GlcNAc 欠乏が、根の成長阻害、リグニン異常蓄積をもたらす機構を明らかにする上で非常に重要である（学会発表）。

(3) *lig* 変異抑制変異体の単離と解析

lig 変異体をエチルメタンサルホン酸 (EMS) 処理し得られた *lig-M2* 系統を用い、制限温度下での *lig* の成長抑制が緩和される *lig* 変異抑制変異体の選抜を行い、3 系統を得た。これらの系統の解析を進めることで、UDP-GlcNAc 欠乏から根の成長阻害及びリグニン異常蓄積につながる機構に関与する遺伝子・タンパク質を明らかにできる可能性がある。

(4) 植物における GlcNAc から UDP-GlcNAc を合成する経路の解明

ほ乳類の GlcNAc キナーゼ遺伝子のシロイヌナズナ推定ホモログについて、融合タンパク質を作成し、GlcNAc キナーゼ活性を解析した結果、植物の GlcNAc キナーゼを同定することに成功した。シロイヌナズナ GlcNAc キナーゼ (*AtGNK*) は、ヒト GlcNAc キナーゼ (*HsGNK*) と比較し、GlcNAc のみならず *N*-アセチルガラクトサミン (*GalNAc*) に対してもある程度の触媒能力を持つことが示された。また、*AtGNK* ノックアウト (*gnk*) 系統では、GlcNAc を与えても、内生 UDP-GlcNAc 量上昇

が全く起こらず、GNK が GlcNAc 再生の主要経路として働くことが明らかとなった（図 2、雑誌論文、学会発表、）この結果は、植物における GlcNAc 再利用経路を明らかにした初めての報告であり、その意義は大きい。

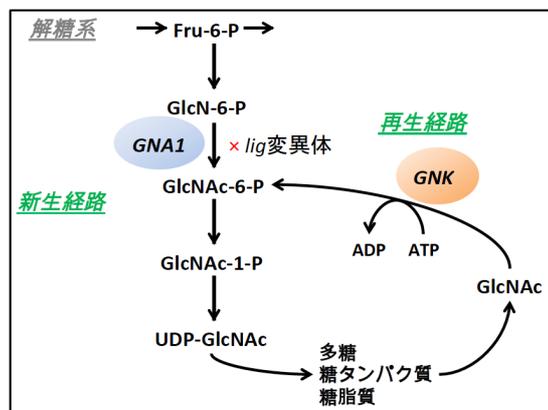


図 2 UDP-GlcNAc 新生経路及び再生経路

(5) *lig-gnk* 二重変異体の解析

lig-gnk 二重変異体を 28℃ 処理することで、UDP-GlcNAc 生成を完全に抑制することができ、UDP-GlcNAc 生成の生理的意義をより明確に示すことができると考えられる。交雑法により *lig-gnk* 二重変異体を作成したところ、*lig-gnk* ホモ二重変異体は、*lig* の許容温度である 18℃ でも、著しい成長抑制が起こることが示され、このことから、UDP-GlcNAc 新生経路と UDP-GlcNAc 再生経路は相互に関連しあいながら、生存に必須の役割を果たすことが示された（学会発表）。

(6) GlcNAc や GalNAc の再生に関わる *lig-M2* 変異体の単離と解析

lig 変異体を EMS 処理し得られた *lig-M2* 系統を用い、GlcNAc や GalNAc を与えても、28℃ での成長が回復しない系統を 6 系統以上得ることができた。これらの系統を解析することで、GlcNAc や GalNAc からの UDP-GlcNAc 再生機構をより詳細に解明することができる（学会発表、）。

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 1 件)

Keisuke Furo, Mamoru Nozaki, Hiroshi Murashige, Yasushi Sato. Identification of an N-acetylglucosamine kinase essential for UDP-N-acetylglucosamine salvage synthesis in *Arabidopsis*. FEBS Letters, 査読有, Vol. 589, No. 21, 2015, 3258-3262. DOI:10.1016/j.febslet.2015.09.011

〔学会発表〕(計 7 件)

小松淳平、佐藤 康、GlcNAc 及び GalNAc の再利用経路に関わるシロイヌナズナ突然変

異体の単離と解析、日本植物学会第 79 回大会、2015 年 9 月 8 日、朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター（新潟県・新潟市）

田中昌樹、村重紘志、佐藤 康、UDP-GlcNAc の再生経路に関わるシロイヌナズナ *N*-アセチルグルコサミンキナーゼの機能解析、日本植物学会第 79 回大会、2015 年 9 月 8 日、朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター（新潟県・新潟市）

中妻直登、佐藤 康、*lig* 変異体における UDP-GlcNAc 欠乏により誘導される根の成長阻害及びリグニン異常蓄積機構の解析、日本植物学会第 79 回大会、2015 年 9 月 7 日、朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター（新潟県・新潟市）

小松淳平、佐藤 康、GlcNAc 及び GalNAc の再利用経路に関わるシロイヌナズナ突然変異体の単離、中国四国植物学会 第 72 回大会、2015 年 5 月 17 日、愛媛大学（愛媛県・松山市）

村重紘志、風呂圭祐、野崎 守、佐藤 康、UDP-GlcNAc 再生に関わるシロイヌナズナ *N*-アセチルグルコサミンキナーゼの特性および機能解析、日本植物学会第 78 回大会、2014 年 9 月 13 日、明治大学（神奈川県・川崎市）

中妻直登、野崎 守、佐藤 康、シロイヌナズナにおけるストレス応答リグニン蓄積と小胞体ストレスとの関係の解析、第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 18 日、富山大学（富山県・富山市）

風呂圭祐、野崎 守、佐藤 康、植物における *N*-アセチルグルコサミンの再利用に関わる *N*-アセチルグルコサミンキナーゼの同定と解析、日本植物学会第 77 回大会、2013 年 9 月 13 日、北海道大学（北海道・札幌市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://bio.sci.ehime-u.ac.jp/morphol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 康 (SATO, Yasushi)
愛媛大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号：80274306

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

杉山宗隆 (SUGIYAMA, Munetaka)
東京大学・大学院理学(系)研究科・准教授
研究者番号：50202130

(4) 研究協力者

野崎 守 (NOZAKI, Mamoru)
風呂圭祐 (FURO, Keisuke)
中妻直登 (NAKATSUMA, Naoto)
村重紘志 (MURASHIGE, Hiroshi)
小松淳平 (KOMATSU, Junpei)
田中昌樹 (TANAKA, Masaki)