

氏名	吉見 圭永
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 1083 号
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 23 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	植物の細胞外プロテオグリカンの機能に関する研究
論文審査委員	委員長 教授 小竹 敬久 委員 連携教授 鈴木 匡 委員 准教授 山口 雅利 委員 教授 高橋 康弘

## 論文の内容の要旨

植物は成長に伴って細胞の形態を制御し、様々な器官や組織を発達させる。植物細胞は細胞壁に囲まれており、細胞が肥大や伸長、形態変化するとき細胞壁が大きく変化する。植物細胞壁は様々な成分の複合体であり、セルロース、ペクチン、ヘミセルロース、プロテオグリカンなどで構成されている。これらの細胞壁成分の中で、プロテオグリカンに分類されるアラビノガラクトン-プロテイン (AGP) は、細胞伸長や細胞形態に関わることが予想されている。本論文は、AGP のアラビノガラクトン (AG) 糖鎖に着目し、AG 糖鎖に特異的な分解酵素の探索と分解酵素を利用した AG 糖鎖の機能解析について記述した。

第一章では、これまで明らかになっている AGP の基本構造や合成・分解に関わる酵素、生理機能に関してまとめている。AGP は、植物界に広く存在する分子であり、大きく複雑な AG 糖鎖と重量の 10% 以下のコアタンパク質から構成されている。多くの研究で AGP の機能には AG 糖鎖が重要であることが示されている。AGP の AG 糖鎖の基本骨格は、 $\beta$ -1,3-ガラクトン主鎖に  $\beta$ -1,6-ガラクトン側鎖が分岐結合した  $\beta$ -1,3-1,6-ガラクトンで構成されている。側鎖の末端には様々な単糖が結合し、生物種や植物の組織に多様性が見られる。しかしながら、その詳細な分子機能についてはほとんど未解明のままである。AGP の分子機能解析が進まない原因として、AGP の複雑な糖鎖構造を考慮した実験系が確立されていないことが挙げられる。これまで、AG 糖鎖に特異的で強力な真菌由来の分解酵素がいくつか単離されており、AG 糖鎖の構造解析に利用されてきた。これらの分解酵素は AG 糖鎖の機能解析に有効であると考えられるが、その利用例はない。そこで本研究では、AGP の分子機能の解明を目指し、糖鎖の機能解析に有効である特異的分解酵素の探索や性状解析、また、特異的分解酵素を用いた新規な実験系の構築を行った。

第二章では、利用可能な AG 糖鎖特異的分解酵素の探索のため、エンド- $\beta$ -1,3-ガラクタナーゼの探索と性状解析を行った。これまでエンド- $\beta$ -1,3-ガラクタナーゼはエノキタケ由来の FvEn3GAL しか報告されておらず、この酵素の性状が広く保存されているかどうか不明であった。また、機能解析のツールとしてより有効な酵素が見つかる可能性がある。まず、FvEn3GAL の系統解析により、真菌やバクテリアなど多くの微生物種において FvEn3GAL と相同なタンパク質が存在することを確認した。そこで、*Aspergillus flavus* と *Neurospora crassa* からオルソログ遺伝子をクローニングし、それぞれ Af3G と NcEn3GAL とした。ピキア酵母を用いてこれらの組換え酵素（それぞれ rAf3G、rNcEn3GAL）を作成したところ、FvEn3GAL と似

た特徴を示し、AG糖鎖主鎖の $\beta$ -1,3-ガラクトンに特異的なガラクターナーゼであることが分かった。また、rAf3G、rNcEn3GAL、rFvEn3GALをAGPに作用させたところ、分解率はそれぞれ2%、5%、3%であった。続いて、ウスバタケ由来のエキソ- $\beta$ -1,3-ガラクターナーゼ (II3GAL) との協調作用について検討した。II3GAL単独ではAGPの分解率は10%であり、AGPの糖鎖主鎖に換算すると約40%が分解されていた。一方、rAf3GやrNcEn3GAL、rFvEn3GALとII3GALの同時処理では、AGPの分解率は14%、19%、15%に上昇し、これはAGPの糖鎖主鎖の56%、76%、60%が分解されたことを示している。これらの結果は、エンド- $\beta$ -1,3-ガラクターナーゼは、II3GAL単独で分解されずに残った糖鎖構造を分解し、新たなII3GALの作用部位を生み出すことで、AG糖鎖の分解を促進していることを示唆している。

第三章では、AG糖鎖を劇的に分解する真菌由来のエキソ- $\beta$ -1,3-ガラクターナーゼ (II3GAL) をシロイヌナズナに導入し、植物生体内でAG糖鎖の分解する実験系の構築を行った。この実験系では、II3GAL遺伝子をデキサメタゾン (DEX) 誘導発現プロモーターに連結した人工遺伝子を構築した。この遺伝子をシロイヌナズナに導入した *DEX::II3GAL* 植物では、DEX処理時にのみII3GALの遺伝子発現が誘導されてII3GALタンパク質が蓄積し、植物生体内のAGP量が45%減少することが分かった。また、植物抽出液をHPLCで分析したところ、*DEX::II3GAL* 植物をDEX処理した場合にのみAG糖鎖由来のオリゴ糖が多く検出され、この植物ではDEX処理により、AGPのAG糖鎖の分解を起こすことが確認できた。これらのことは、本研究で作出した植物は、AG糖鎖の機能を人為的に阻害可能であることを示している。*DEX::II3GAL* 植物の表現型を観察したところ、処理するDEX濃度に依存して胚軸や子葉の形態異常が起きることが分かった。走査型電子顕微鏡による観察では *DEX::II3GAL* 植物の胚軸の表皮細胞が丸く肥大していることが、また、胚軸の横断切片の観察では、細胞肥大は内部の組織でも起きていることが分かった。植物細胞の形態は細胞壁のセルロースの配向により決定され、セルロースの配向制御には表層微小管が重要な役割を担っている。そこで、まず細胞壁の各成分を定量したところ、DEX処理した *DEX::II3GAL* 植物ではセルロース量が顕著に減少していることが分かった。このときセルロース合成酵素 *CesA* の発現量は変化していなかったため、AG糖鎖の分解はセルロース合成酵素の輸送、活性、またはセルロース微繊維の沈着に影響を与えたと予想された。続いて、表層微小管結合因子MAP65-1にGFPを融合したMAP65-1-GFPを用いて表層微小管を可視化し、経時的に表層微小管の変化を観察した。表層微小管の画像解析の結果、*DEX::II3GAL* 植物の表皮細胞ではDEX処理後48-60時間にはMAP-65-1-GFPの蛍光輝度や表層微小管の密度、平均角度が変化していた。従って、細胞肥大に伴って表層微小管の配向が変化していることが示唆された。これらの結果より、AG糖鎖はセルロース合成酵素の活性制御または表層微小管の配向制御を介して、細胞形態の制御に関与することが示された。

第四章では、AGPの機能解析の今後の展望について述べた。本研究では、特異的分解酵素に着目してAGPの機能研究における新規なアプローチを確立した。*DEX::II3GAL* 植物のセルロース合成活性や表層微小管の変化をより詳細に調べることで、AG糖鎖の作用メカニズムを明らかにできると考えられる。また、別の分解酵素や複数の酵素を組み合わせることで、AG糖鎖の機能に重要な糖鎖構造を同定できる可能性がある。

## 論文の審査結果の要旨

本論文は、植物の細胞外プロテオグリカンであるアラビノガラクトサン-プロテイン (AGP) のアラビノガラクトサン (AG) 糖鎖に作用する特異的分解酵素の探索・同定と、分解酵素遺伝子を利用した AG 糖鎖分解植物の作出、これを用いた AGP の機能解析についてまとめられたものである。

第一章では、AGP の糖鎖構造や合成・分解酵素、生理機能の研究の歴史についてまとめられている。AGP は糖鎖が重量の 90% 以上を占めるプロテオグリカンと呼ばれる分子であり、緑藻から被子植物に普遍的に存在する。AGP の AG 糖鎖は、末端の修飾や側鎖の長さなどに多様性がみられるが、共通して  $\beta$ -1,3-ガラクトサン主鎖と  $\beta$ -1,6-ガラクトサン側鎖を基本骨格としている。これまでに、 $\beta$ -1,3-ガラクトサン主鎖に特異的に結合する Yariv 試薬を用いた実験で、AGP が細胞成長や分化、生殖、ストレス耐性などに関与することが示されているが、AG 糖鎖の分子機能はいまだに解明されていない。また、AGP にはコアプロテインが異なる分子種が多数存在するため、ノックアウト株を利用した機能解析が困難である。真菌や微生物の酵素には、AG 糖鎖の  $\beta$ -1,3-ガラクトサンや  $\beta$ -1,6-ガラクトサンに特異的に作用するものがあり、AG 糖鎖の構造解析に使われてきたが、これらを AGP の機能解析に利用した例はない。

第二章では、特異的な AG 糖鎖分解酵素の一つであるエンド- $\beta$ -1,3-ガラクタナーゼの探索と同定について述べられている。AG 糖鎖の  $\beta$ -1,3:1,6-ガラクトサン骨格に特異的に作用する酵素としては、エキソ- $\beta$ -1,3-ガラクタナーゼやエンド- $\beta$ -1,6-ガラクタナーゼが単離されていた。これに加えて、最近、エノキタケから、新種の酵素であるエンド- $\beta$ -1,3-ガラクタナーゼ、FvEn3GAL が発見されている。FvEn3GAL のアミノ酸配列を用いた解析から、真菌やバクテリアに FvEn3GAL のホモログ遺伝子が存在することが分かった。そこで、これらのうち、*Aspergillus flavus* と *Neurospora crassa* の遺伝子をそれぞれ Af3G と NcEn3GAL と命名し、RT-PCR でクローニングし、ピキア酵母を用いて組換え酵素、rAf3G と rNcEn3GAL を作成した。rAf3G と rNcEn3GAL の性状解析から、両者は FvEn3GAL と同様に特異性の高いエンド- $\beta$ -1,3-ガラクタナーゼであることがわかった。また、*Irpex lacteus* 由来エキソ- $\beta$ -1,3-ガラクタナーゼ (I3GAL) とこれらのエンド- $\beta$ -1,3-ガラクタナーゼによる協調的な AG 糖鎖分解について調べたところ、rAf3G と rNcEn3GAL は単独では AG 糖鎖にほとんど作用しないが、I3GAL による分解を著しく高めることがわかった。これらの結果から、Af3G と NcEn3GAL は、エンド型酵素として AG 糖鎖主鎖の内部に作用してエキソ型酵素の作用部位を生み、AG 糖鎖の分解を促進することが示唆された。また、3つのエンド- $\beta$ -1,3-ガラクタナーゼのうちでは NcEn3GAL が最もよく AG 糖鎖を分解し、有力なツールとなりうることがわかった。

第三章では、AG 糖鎖の劇的な分解を引き起こす植物の作出とこれを用いた AG 糖鎖の機能解析について述べられている。AG 糖鎖の  $\beta$ -1,3:1,6-ガラクトサン骨格に特異的に作用する酵素のうちで、単独の作用で最も劇的な分解を引き起こすエキソ  $\beta$ -1,3-ガラクタナーゼの遺伝子、I3GAL をデキサメタゾン (DEX) 誘導プロモーターに連結してシロイヌナズナに導入し、DEX::I3GAL 植物を作出した。

DEX::I3GAL 導入植物では、DEX 処理時にのみ I3GAL の遺伝子発現が誘導されてガラクタナーゼ活性が上昇し、AGP 量が著しく減少することが確かめられた。また、植物抽出液の HPLC 分析では、AG 糖鎖の分解で生じた AG オリゴ糖が蓄積していることが示された。I3GAL タンパク質自体が二次的な影響を与えていないことを確かめるために、点突然変異により活性を失った I3GAL-PM を導入した DEX::I3GAL-PM 植物も同時に作出した。DEX::I3GAL-PM 植物を DEX 処理した場合には、ガラクタナーゼ活性の上昇と AGP 量の減少、AG オリゴ糖の蓄積のいずれも起こらなかった。これらの結果から、DEX 処理により AG 糖鎖の分解を人為的に引き起こす新しい AGP の機能解析系を構築できたことが確認された。DEX::I3GAL 植物で

は、処理する DEX 濃度に依存して細胞肥大が起き、胚軸や子葉の著しい形態異常が起きることがわかった。走査型電子顕微鏡を用いた観察では、一部の表皮細胞が風船のように肥大していることが観察された。また、横断切片の観察では、表皮だけではなく、皮層などの内部組織も組織構成が大きく乱れていることがわかった。このときの細胞壁の各成分を定量したところ、DEX 処理した *DEX::H3GAL* 植物でセルロース量が顕著に減少していた。セルロース合成酵素 *CesA* の発現量は変化していなかったため、AG 糖鎖の分解はセルロース合成酵素遺伝子の発現ではなく、輸送や活性、セルロース微繊維の沈着に影響を与えたことが示唆された。さらに、セルロースの配向制御に重要な表層微小管を可視化して DEX 処理後の経時的な観察を行ったところ、細胞肥大に伴って表層微小管の配向が変化していることが示唆された。本研究により、AGP の AG 糖鎖は、表層微小管の配向変化またはセルロース合成酵素の活性制御を介して、細胞形態の制御に関わることが初めて提案された。

第四章では、総合考察として、今後の研究の進め方や AGP 研究の展望について述べられている。*DEX::H3GAL* 植物で、セルロース合成活性や細胞骨格の変化をより詳細に解析することで、AG 糖鎖のより具体的な分子機能が解明されると期待される。さらに別の AG 糖鎖構造を標的とした分解酵素導入植物を作出することで、AGP の機能に重要な AG 糖鎖構造やそれを認識するタンパク質を同定できる可能性がある。

本論文の第二章では、新規のエンド- $\beta$ -1,3-ガラクタナーゼを同定するとともに、効率的な AG 糖鎖の分解を明らかにしている。第二章の研究内容はすでに英文の専門雑誌で論文発表されている。また、第三章では、二次的影響が懸念される Yariv 試薬とは独立した AGP の機能解析系として *DEX::H3GAL* 植物を作出し、AG 糖鎖の分解で植物細胞の形態異常が引き起こされることを初めて明らかにしており、大変高く評価できる。以上より、本論文は博士（理学）の学位論文に値すると判断し、学位論文審査委員会は「合格」と判定した。