

## 別紙 4

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目 植物特異的な Hyp O-グリコシル化修飾に関わる糖転移酵素群の同定  
氏 名 小川 (大西) 真理

## 論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質の糖鎖修飾は、酵母、動物、植物を含め全ての真核生物に存在する翻訳後修飾であり、タンパク質の生理的機能に必要な立体構造の保持やプロテアーゼ抵抗性、また、糖鎖自体が細胞間情報伝達に関わるなど、種々の重要な役割を担うことが明らかとなってきた。タンパク質の糖鎖修飾は N-結合型と O-結合型に分類されるが、動植物間で類似した構造をもつ N-結合型糖鎖修飾に対し、O-結合型糖鎖修飾は動植物間で大きく異なる。すなわち動物ではセリン残基あるいはスレオニン残基に N-アセチルガラクトサミンが付加する一方、植物ではヒドロキシプロリン (Hyp) 残基にアラビノースあるいはガラクトース、セリン残基にガラクトースが付加する。Hyp 残基は動物でもコラーゲンなど細胞外タンパク質で多く見られる翻訳後修飾アミノ酸残基であるが、この Hyp 残基に糖が付加するのは植物に特異的な修飾である。

Hyp O-アラビノシル化は、1967 年にトマト培養細胞の細胞壁中に発見された糖鎖修飾であり、主に細胞外構造タンパク質であるエクステンシンや細胞間情報伝達を行う短鎖ペプチドホルモンなどに存在する。一方、Hyp O-ガラクトシル化は 1974 年に小麦胚乳より発見され、植物特異的なプロテオグリカンであるアラビノガラクトンプロテイン (AGP) などに見出される糖鎖修飾である。これらの Hyp O-グリコシル化は、まず初めに Hyp の水酸基にそれぞれアラビノースまたはガラクトースが付加され、その後さらに別の酵素によって糖鎖が伸長する。これらの糖鎖修飾の第一段階を行う Hyp O-グリコシル化酵素群の活性は、小胞体やゴルジ装置に見出されることが報告されていたが、その実体は 40 年以上も明らかとなっていなかった。

本研究では、まず初めに Hyp O-アラビノシル化酵素 (HPAT) の同定を目的としてアラビノシル化活性測定法を確立し、アラビノース付加効率が高い基質ペプチドを探索した。この基質ペプチドを固定化したカラムを用いて、シロイヌナズナ培養細胞由来のミクロソーム膜画分から HPAT のアフィニティー精製を行った。高い Hyp O-アラビノシル化活性を持つ溶出画分を SDS-PAGE で分離し、nano LC-MS/MS で解析したところ、At5g25265 と At2g25260 由来のペプチド断片が検出され、これらはホモログである At5g13500 を含めて 3 種類のタンパク質からなる新規ファミリーを形成していた。3 つのタンパク質を酵母で発現させたところ、リコンビナントタンパク質に明確な Hyp O-アラビノシル化活性が検出されたことから、これらがシロイヌナズナの HPAT であると結論づけた。HPAT はシスゴルジに局在する分子量約 42 kD の N 末端

に膜貫通領域を持つ II 型膜タンパク質である。これらのタンパク質の 1 次配列は既知のどの糖転移酵素とも類似性を示さなかったが、藻類から高等植物まで広く保存されており、Hyp O-アラビノシル化修飾の植物における普遍的な重要性が示唆された。HPAT の植物体における機能を明らかにするため、T-DNA 挿入変異株の解析を行ったところ、細胞壁の薄化による胚軸の徒長、花芽形成の早期化、葉の老化の促進 (early senescence) や花粉管の伸長異常など様々な表現型が見られたことから、Hyp O-アラビノシル化修飾が植物の栄養成長・生殖成長どちらにも重要であることが明らかとなった。また本成果によって、変異株が根粒過剰着生を示すエンドウの NOD3 やタルウマゴヤシの RDN1、茎頂メリステムが肥大するトマトの FIN など、明確な表現型にも関わらずこれまで機能が分かっていなかった分子群が、HPAT のオルソログであったことが判明した。マメ科植物やトマトにおいて、根粒数や茎頂メリステムサイズをアラビノシル化ペプチドが制御していることが知られているが、HPAT の欠損によるこれらのペプチドの糖鎖欠損が顕著な表現型の原因であると考えられる (第 1 章)。

次に、Hyp O-グリコシル化を行うもう一つの酵素である、Hyp O-ガラクトシル化酵素 (HPGT) の同定を行った。第 1 章の HPAT の同定研究を参考にし、高いガラクトース受容活性をもつペプチドを固定化したカラムを用いたアフィニティー精製を行ったところ、溶出画分から At5g53340 と At4g32120 タンパク質が検出された。これらは At2g25300 を含めた 3 つのタンパク質でサブファミリーを形成しており、CAZy GT-31 に属する糖転移酵素候補群であった。酵母で発現させたリコンビナントタンパク質には意外にも活性が見出されなかったが、タバコ BY-2 細胞で発現させたタンパク質は高い Hyp O-ガラクトシル化活性を示したことから、これらのタンパク質が HPGT であると結論づけた。HPGT はシスゴルジに局在する 38~39 kD の II 型膜タンパク質であり、藻類から高等植物まで植物界全体に広く保存されていた。T-DNA 挿入変異株を用いて植物体内での機能を解析したところ、3 重変異株において AGP の糖鎖修飾が著しく減少し、側根の伸長、根毛の伸長と密度増加、根端皮層細胞の肥大、植物体の矮化、稔性の低下など様々な表現型が観察された。これらの表現型は今までに報告されている AGP 変異株の表現型と類似していることから、HPGT が AGP の Hyp O-ガラクトシル化に主に働く糖転移酵素であると考えられる。また、AGP の糖鎖部分こそが植物の成長や分化・生殖において重要な働きをしていることが直接的に示された (第 2 章)。

以上のように、本研究では半世紀近くの間実体が明らかとなっていなかった 2 つの Hyp O-グリコシル化酵素群を、アフィニティー精製という生化学的手法を用いて同定することに成功した。Hyp O-グリコシル化修飾を受けているエクステンシンや短鎖ペプチドホルモン、AGP はどれも非常に大きなファミリーを形成しており、機能的重複の高さゆえに個々の分子の機能解析が遅れている。本研究で同定した HPAT、HPGT の変異株で観察される表現型は、それぞれの糖鎖修飾が非常に低下した状態を表しており、この表現型を手がかりにすることで、これまで高い遺伝子重複のために隠されていた Hyp O-グリコシル化タンパク質・ペプチドについて新しい知見を得られることが期待される。