

2017 年度

東洋大学審査学位論文

イネの初期生長におけるグリコーム解析

生命科学研究科 生命科学専攻 博士後期課程

4910150002 堀内 里紗

目次

序論	1
本論で扱った試薬	8
本論	
第1章 発芽前 <i>O. sativa</i> 種子胚部におけるグライコーム解析	13
1.1 緒言	13
1.2 実験方法	14
1.2.1 実験材料	14
1.2.2 ピリジルアミノ化 <i>N</i> -グリカンの調製	14
1.2.3 サイズ分画 HPLC 分析	15
1.2.4 逆相 HPLC 分析	17
1.2.5 質量分析	19
1.2.6 酵素消化	19
1.3 結果および考察	20
1.3.1 サイズ分画 HPLC 分析	20
1.3.2 逆相 HPLC 分析	22
1.3.3 質量分析	24
1.3.4 フラクシオン a1 の構造解析	26
1.3.5 フラクシオン b1 の構造	28
1.3.6 フラクシオン b2 の構造解析	30
1.3.7 フラクシオン c1 および d1 の構造解析	32
1.3.8 フラクシオン e1 の構造解析	34
1.3.9 発芽前 <i>O. sativa</i> 種子胚部に存在する <i>N</i> -グリカンについて	37

第2章 発芽48時間後 <i>O. sativa</i> 種子胚部におけるグライコーム解析	42
2.1 緒言	42
2.2 実験方法	43
2.2.1 実験材料	
2.2.2 ピリジルアミノ化 <i>N</i> -グリカンの調製	
2.2.3 サイズ分画 HPLC 分析	
2.2.4 逆相 HPLC 分析	
2.2.5 質量分析	
2.2.6 酵素消化	
2.3 結果および考察	45
2.3.1 サイズ分画 HPLC 分析	45
2.3.2 逆相 HPLC 分析	47
2.3.3 質量分析	51
2.3.4 フラクシオン d1 の構造解析	53
2.3.5 フラクシオン d2 の構造解析	53
2.3.6 フラクシオン d3 の構造解析	56
2.3.7 フラクシオン d4 の構造解析	61
2.3.8 フラクシオン g1 および g2 の構造解析	63
2.3.9 フラクシオン f1 の構造解析	66
2.3.10 フラクシオン g3, g4 および h1 の構造解析	68
2.3.11 発芽48時間後 <i>O. sativa</i> 種子胚部に存在する <i>N</i> -グリカンについて	71
第3章 発芽120時間後の <i>O. sativa</i> 生長部位におけるグライコーム解析	78
3.1 緒言	78
3.2 実験方法	79

3.2.1 実験材料	
3.2.2 ピリジルアミノ化 <i>N</i> -グリカンの調製	
3.2.3 サイズ分画 HPLC 分析	
3.2.4 逆相 HPLC 分析	
3.2.5 質量分析	
3.2.6 酵素消化	
3.3 結果および考察	81
3.3.1 明所条件で生育した <i>O. sativa</i> 生長部の <i>N</i> -グリカン構造解析	81
3.3.1.1 サイズ分画 HPLC 分析	81
3.3.1.2 逆相 HPLC 分析	84
3.3.1.3 フラクシオン b3 の構造解析	88
3.3.1.4 フラクシオン e3 の構造解析	90
3.3.1.5 フラクシオン h1 および h2 の構造解析	93
3.3.1.6 フラクシオン b1 の構造解析	97
3.3.1.7 フラクシオン b2 の構造解析	102
3.3.1.8 フラクシオン d1 の構造解析	104
3.3.1.9 明所条件で生育した <i>O. sativa</i> 生長部に存在する <i>N</i> -グリカンについて	110
3.3.2 暗所条件で生育した <i>O. sativa</i> 生長部の <i>N</i> -グリカン構造解析	112
3.3.2.1 サイズ分画 HPLC 分析	112
3.3.2.2 逆相 HPLC 分析	115
3.3.3 光照射が <i>O. sativa</i> 生長部の <i>N</i> -グリカン生合成に及ぼす影響について	117
第 4 章 銀ナノコロイド曝露を受けた <i>O. sativa</i> 生長部位のグライコーム解析	123
4.1 緒言	123
4.2 実験方法	125

4.2.1 実験材料	
4.2.2 ピリジルアミノ化 <i>N</i> -グリカンの調製	
4.2.3 サイズ分画 HPLC 分析	
4.2.4 逆相 HPLC 分析	
4.2.5 質量分析	
4.2.6 酵素消化	
4.3 結果および考察	127
4.3.1 表現型観察	127
4.3.2 芽部の <i>N</i> -グリカン構造解析	130
4.3.2.1 サイズ分画 HPLC 分析	130
4.3.2.2 逆相 HPLC 分析	132
4.3.2.3 遊離型ハイマンノース型 <i>N</i> -グリカンの構造解析	136
4.3.2.4. 対照区と SNC 曝露区の <i>O. sativa</i> 芽部に存在する <i>N</i> -グリカンについて	139
4.3.3 根部の <i>N</i> -グリカン構造解析	141
4.3.3.1 サイズ分画 HPLC 分析	141
4.3.3.2 逆相 HPLC 分析	143
4.3.3.3 フラクション b1 の構造解析	145
4.3.3.4 遊離型ハイマンノース型 <i>N</i> -グリカンの構造解析	148
4.3.4 対照区と SNC 曝露区の <i>O. sativa</i> 根部に存在する <i>N</i> -グリカンについて	152
第 5 章 結章	154
参考文献	160
発表論文リスト	169
謝辞	170

序論

生体内において、糖質にはエネルギー源としての役割と生体構成分子としての役割をもつものが存在する。エネルギー源としての糖質には、グルコースやフルクトースなどの単糖類、マルトース（麦芽糖）やラクトース（乳糖）やスクロース（砂糖）などの二糖類、そして糖ポリマーとしてデンプンやセルロースなどの単純多糖や、ヘミセルロースやヒアルロン酸などの複合多糖がある。一方で、生体構成分子としての糖質は「糖鎖」と呼ばれ、マンノースやガラクトースなどの十数種類単糖がグリコシド結合して構成される糖の鎖であり、構成する糖の種類や結合様式により様々な構造形態を有する。糖鎖は生体内において脂質やタンパク質と結合したグライココンジュゲートとして存在し、細胞内外において様々な生命現象に関与していることが知られている。糖脂質は一般的に細胞表面に存在し、細胞膜を介したシグナル伝達に関与することが広く知られている。一方、タンパク質の翻訳後修飾の1つとして糖鎖が結合した糖タンパク質は細胞表面または細胞外へ分泌された形で存在し、コアとなるタンパク質の性質に応じて糖鎖の役割は様々である。タンパク質に結合した糖鎖の役割は、構造安定化や輸送などのタンパク質の機能性の修飾や、糖鎖の細胞間相互作用を利用した自己非自己の認識や免疫機能への関与など多岐にわたる。

糖タンパク質には、窒素原子を介してペプチドのアスパラギン残基に結合した *N*-グリカン、およびセリン/スレオニン残基に結合した *O*-グリカンが存在する。いずれも共通するコア構造を持つ様々な構造バリエーションが存在し、コア構造の側鎖に生物活性を有する糖鎖抗原が発現している。特に、*N*-グリカンはトリマンノシルコア構造 (Fig. introduction-1) と呼ばれる *N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) 2 残基とマンノース 3 残基から構成されるコア構造を持ち、このコア構造は全ての *N*-グリカン構造が共通して持つ点において非常に特徴的であるといえる。*N*-グリカンは殆ど全ての生物に存在しているが、*N*-グリカンの生合成経路や最終構造などは発現する細胞や生物種間で異なる場合がある。特に、植物型 *N*-グリカんに最も特徴的な点として、トリマンノシルコア構

造の β マンノースへの β 1,2キシロースや最も還元末端側に位置する GlcNAc への α 1,3 フコースの付加が挙げられる (Fig. introduction-1, 点線枠内)。植物型 *N*-グリカン構造は、*N*-グリカン構造の非還元末端側のグリコシル結合部やコア構造に付加する糖に基づき、ハイマンノース型、複合型、パウチマンノース型の 3 タイプに分類される (Fig. introduction-1)。ハイマンノース型 *N*-グリカンはトリマンノシルコア構造のマンノース 3 残基に加えて 1~6 残基の α -マンノースが付加した構造、複合型 *N*-グリカンはトリマンノシルコア構造の非還元末端に GlcNAc やガラクトース、フコースなどの糖残基が付加した構造、パウチマンノース型 *N*-グリカンは主にトリマンノシルコア構造に β 1,2キシロースおよび α 1,3 フコースが付加した構造である。

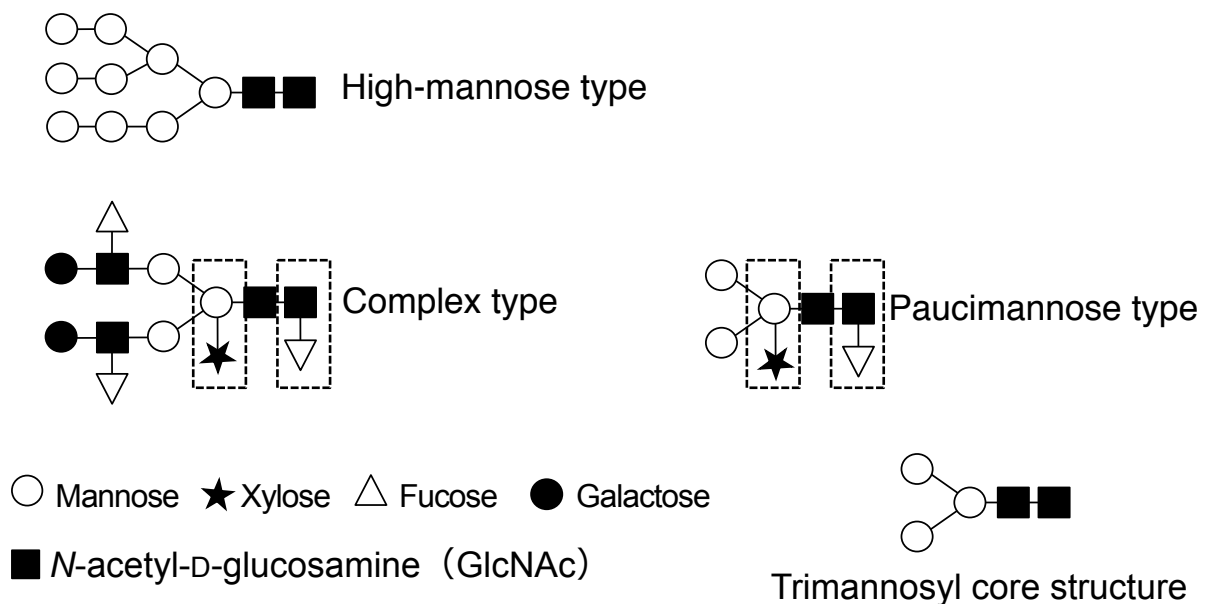


Fig. introduction-1 植物に多く検出される *N*-グリカン構造例

N-グリカン構造の生合成は小胞体 (Endoplasmic reticulum, ER) およびゴルジ器官で行われ、様々な糖転移酵素および糖加水分解酵素により厳密に制御されている (Fig. introduction-2)。まず、小胞体において PP ドリコールオリゴ糖がオリゴ糖転移酵素により新生ポリペプチド鎖の Asn-X-Ser/Thr 側鎖 (X はプロリンを除くアミノ酸) への転移

が行われる。このドリコールオリゴ糖の転移後、*N*-グリカン前駆体は ER グルコシダーゼにより 2 残基の GlcNAc と 9 残基のマンノースから構成されるハイマンノース型オリゴ糖 (M9 構造) に変換される。この ER グルコシダーゼによるトリミングの後、M9 は ER α -マンノシダーゼおよびゴルジ α -マンノシダーゼにより 2 残基の GlcNAc と 5 残基のマンノースから構成される M5 構造に変換される。この M5 構造に GlcNAc 転移酵素 I (GN transferase-I) が作用しトリマンノシルコア構造の Man α 1,3 アーム側に GlcNAc が付加され、複合型 *N*-グリカンの生合成が開始される。特に、植物型 *N*-グリカンに最も特徴的な点なトリマンノシルコア構造への β 1,2キシロースおよび α 1,3 フコースの付加や、複合型 *N*-グリカンの生合成のための *N*-グリカン構造の非還元末端側への GlcNAc やガラクトース、フコースの付加などは、メディアルゴルジからトランスゴルジにかけて行われることが予測されている (Fig. introduction-2)。しかしながら、トリマンノシルコア構造への β 1,2キシロース付加の過程についても複数の推定経路が示されているように (Bencúr *et al.*, 2005, Kajiura *et al.*, 2012)、メディアルゴルジからトランスゴルジにおける生合成経路については、各 *N*-グリカンプロセシング酵素の存在は明らかにされているものの、詳細な生合成経路についての情報は殆どないのが現状である。

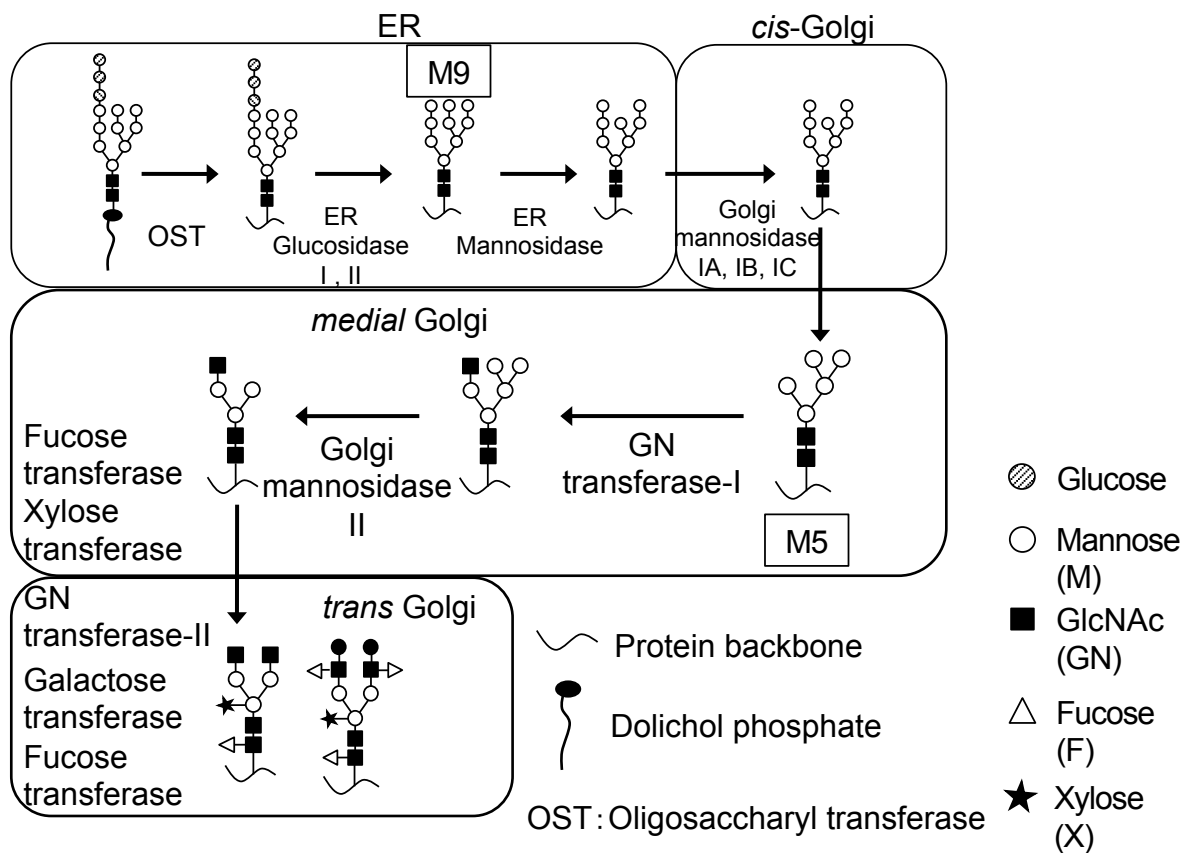


Fig. introduction-2. 植物特異的な *N*-グリカン生合成経路

植物における *N*-グリカン構造の生理機能や生物学的意義を調べるため、これまでに様々な *N*-グリカンプロセッシング酵素の欠損体を用いた研究が行われてきた。例えば、*N*-グリカン生合成上流部に存在する ER α -グルコシダーゼ I 欠損体は、形成された種子が発芽しないことから細胞分化や胚形成に影響が生じていることが報告されている (Boisson *et al.*, 2001)。他にも、ER α -マンノシダーゼおよびゴルジ α -マンノシダーゼの欠損体は、芽部および根部の伸長に負の影響を及ぼすことが報告されている (Liebminger *et al.*, 2009)。さらに、 α 1,3フコース転移酵素および β 1,2キシロース転移酵素の欠損体は塩ストレスに対して感受性が高くなることが報告されている (Kang *et al.*, 2008)。一方で、メディアルゴルジからトランスゴルジに局在する GlcNAc 転移酵素-II (Yoo *et al.*, 2015)、 α 1,3フコース転移酵素や β 1,2キシロース転移酵素 (Strasser *et al.*, 2004)、 β 1,3ガラクトー

ス転移酵素 (Strasser *et al.*, 2007) の欠損体では明確な表現型の差異が確認されていない。このように、*N*-グリカンプロセシング酵素欠損体を用いた植物型 *N*-グリカンの生理機能やその生物学的意義に関しては様々な報告があり、コアタンパク質の物性や機能調節因子としての *N*-グリカン修飾の可能性が考えているものの、確証が得られていないのが現状である。そこで、植物糖タンパク質 *N*-グリカンの構造解析や部位特異的な *N*-グリカン発現・分布などに関する研究から、植物 *N*-グリカンの生物学的意義の可能性について述べる。

まず、植物糖タンパク質 *N*-グリカンの網羅的な構造解析例として、Wilson らにより 26 種類の植物を用いた報告がある (Wilson *et al.*, 2001)。この報告において、植物はその種類とは関係なく、ハイマンノース型、パウチマンノース型および複合型などの幅広い *N*-グリカンの構造多様性をもっていることが示されている。続いて、豆類を中心とした種子植物の糖タンパク質 *N*-グリカンに焦点を当てた構造解析結果が報告されている (Kimura *et al.*, 1996、Kimura *et al.*, 1997、Makino *et al.*, 2000、Olczak and Watorek 2000、Kimura *et al.*, 2001、Léonard *et al.*, 2004)。この報告において、種子植物から検出された *N*-グリカンは、いずれもパウチマンノース型とハイマンノース型を中心とした *N*-グリカン構成であることが示されている。これらの *N*-グリカン構造解析から、高等植物の果実ないし種子の糖タンパク質における *N*-グリカンの構造依存的な分布の差は殆どなく、また、パウチマンノース型およびハイマンノース型 *N*-グリカンは種子の貯蔵に重要な役割を果たしていることが考えられている。さらに、経時変化した特定の部位における *N*-グリカン分布について、種子形成期において成熟度の異なるイチョウ種子を用いた報告がある (Kimura and Matsuo, 2000a)。この報告において、成熟初期のイチョウでは 2 種類のパウチマンノース型 *N*-グリカンと 2 種類の複合型 *N*-グリカンが主要 *N*-グリカンとして存在していたが、種子の成熟度が増加するにつれて複合型 *N*-グリカンの割合は減少し、成熟後期のイチョウにおいては全体の 9 割をパウチマンノース型が占めていたという結果が報告されている。以上の報告から、植物の果実ないし種子の糖タンパク質における *N*-

グリカン構造の分布が示され、また、少なくとも種子形成時における植物の生長サイクルと *N*-グリカン構造の挙動には関連性があることが示された。しかしながら、このような種子植物の生長サイクルと *N*-グリカン構造の挙動、特に種子の発芽誘導後の初期生長における全 *N*-グリカン構造とその挙動に関する情報は少なく、また、種子植物の中でも主要作物として栽培されているイネ (*Oryza sativa*) は、モデル植物として育種を通じた遺伝学的知見の蓄積が数多く行われてきたにもかかわらず、グライコム解析を通じた糖鎖生物学的観点から *O. sativa* 種子胚部の生長とグライコムの関連性について言及した報告はないのが現状である。

このような状況を鑑み、本研究では、*O. sativa* の特定の部位における *N*-グリカン構造に着目し、生長ステージや生育環境の異なる *O. sativa* の *N*-グリカン構造の挙動について解析することとした。このような植物の特定部位の経時変化や生育環境の変化に伴う *N*-グリカン構造とその挙動を解析することにより、*O. sativa* の生長とそれに伴う *N*-グリカン構造の関連性について明らかにすることができ、さらに、新たな環境に適応してきた植物において、*N*-グリカンの多様化が果たしてきた生物学的意義について知見が得られるものと考えられる。

本論文では、*O. sativa* の初期生長における *N*-グリカンについて、一連の研究で得られた実験結果および考察を以下 5 章に分けて記述する。

まず第 1 章では、未発芽状態の *O. sativa* 胚領域の糖鎖基盤情報を得るため、発芽前 *O. sativa* 種子胚部に存在する *N*-グリカンの構造解析を行い、これらの結果に基づいて発芽前 *O. sativa* 種子胚部と *N*-グリカン構造の関連性について述べる。

第 2 章では、48 時間の発芽誘導を行った *O. sativa* 種子胚部における *N*-グリカンの構造解析を行い、これらの結果に基づいて発芽に伴う *O. sativa* 種子胚部の経時変化と *N*-グリカン構造の挙動について述べる。

第 3 章では、芽部および根部へと分化した *O. sativa* 生長部に存在する *N*-グリカン、および明暗条件で生育した *O. sativa* 生長部に存在する *N*-グリカンの構造解析を行い、これ

らの結果に基づいて *O. sativa* の分化と *N*-グリカン構造の関連性や、光照射が *O. sativa* 生長部の *N*-グリカン生合成に及ぼす影響について述べる。

第 4 章では、極度な環境変化を想定した生育条件において生育した *O. sativa* 生長部における *N*-グリカンの構造解析を行い、これらの結果に基づいて環境変化に伴う *O. sativa* 生長部と *N*-グリカン構造の挙動について述べる。

第 5 章では、本論文のまとめを行う。

本論で扱った試薬

- 無水ヒドラジン (東京化成工業)
- トルエン (ナカライテスク)
- 炭酸水素ナトリウム (ナカライテスク)
- 無水酢酸 (ナカライテスク)
- Dowex 50W×2 (ムロマチケミカル)
- 2-アミノピリジン (ナカライテスク)
- 酢酸 (ナカライテスク)
- ボラン-ジメチルアミン (ナカライテスク)
- TOYOPEAL HW-40S (東ソー)
- Super-2,5-Dihydroxybenzoic acid (Sigma-Aldrich)
- 糖加水分解酵素

(1) α -マンノシダーゼ

【由来】 タチナタマメ

【ユニット数】 19 U/mg

【ユニット数の定義】 pH 4.5、25°C の条件下において、1 分間に 1.0 μmol の *p*-ニトロフェニル α -D-マンノシドを *p*-ニトロフェノールと D-マンノースに加水分解する酵素量

【会社】 Sigma-Aldrich

【基質特異性】 α -マンノシダーゼはグリコシド結合の非還元末端側に α 結合したマンノース残基を加水分解する基質特異性をもつ。 α -マンノシダーゼは、 α 1,2 結合、 α 1,3 結合、 α 1,6 結合の順に優先的に加水分解する。

【反応条件 1】 PA 糖鎖 1 μL (2 pmol) に α -マンノシダーゼ (19 U/mg) 1 μL 、10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH4.5) 10 μL を加え、37°Cで 1 時間酵素消化を行った。

(2) β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ

【由来】 タチナタマメ

【ユニット数】 50 mU/ μL

【ユニット数の定義】 pH 5.0、 37°Cの条件下において、1 μmol の *pNP N*-アセチル- β -D-グルコサミニドを 1 分間に生成する酵素活性

【会社】 ProZyme

【基質特異性】 β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼは、非還元末端側に存在する β -1, 2, 3, 4, 6 結合 β -*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)または β -*N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を加水分解することができるが、バイセクティング GlcNAc の遊離には高濃度の酵素量が必要とされる。各糖の遊離に最適な pH は、GlcNAc が 5.0~6.0、GalNAc が 3.5~4.0 とされている。

【反応条件 2】 PA 糖鎖 1 μL (2 pmol) に β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ (50 mU/ μL) 1 μL 、250 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 1 μL 、D. D. W (Distilled Deionized Water) 3 μL を加え、37°Cで 4 時間酵素消化を行った (基質 2 pmol 程度であれば、1 時間の酵素反応でも十分に加水分解が行われる)。

(3) β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ

【由来】 *Streptococcus pneumoniae*

【ユニット数】 400 mU/ μL

【ユニット数の定義】 10 μL の反応溶液で、37°C、1 時間の条件下において、GlcNAc β 1,4GlcNAc β 1,4GlcNAc-AMC から 1 nmol の非還元型 β -*N*-アセチルグルコサミン残基を生成する酵素活性

【会社】 New England BioLabs

【基質特異性】 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼは、非還元末端側に存在する β -*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc) β 1-2, 3, 4, 6 結合を加水分解することができる。

【反応条件 3】 PA 糖鎖 1 μL (2 pmol) に β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (40 mU/ μL , または 400 mU/ μL) 1 μL 、付属試薬の 10×GlycoBuffer (5 mM CaCl₂, 500 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH5.5) 1 μL 、D.D.W 8 μl を加え、37°C で 1 時間酵素消化を行った。

(4) α 1,3/4-*L*-フコシダーゼ

【由来】 *Streptomyces sp.* 142

【ユニット数】 1 mU/ μL

【ユニット数の定義】 pH6.0、37°Cの条件下において、PA-ラクト-*N*-フコペンタオース III (PA-Sugar Chain 045)から 1 分間に 1 μmol の PA-ラクト-*N*-ネオテトラオースを生成する酵素活性

【会社】 タカラバイオ

【基質特異性】 α 1,3/4-*L*-フコシダーゼは、GlcNAc 残基に α 1,3結合あるいは α 1,4結合したフコース残基を加水分解する基質特異性をもつ。ただし、還元末端側に 2-アミノピリジンが導入されている場合や非還元末端側に分子量の大きな分子が結合している場合、加水分解は殆ど行われぬ。

【反応条件 5】 PA 糖鎖 1 μL (2 pmol) に α 1,3/4-*L*-フコシダーゼ (1 mU/ μL) 1 μL 、

0.1 M リン酸クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 5 μ L を加え、37°C で 1 時間酵素消化を行った。

(5) α 1,3/4-フコシダーゼ

【由来】 *Prunus dulcis*

【ユニット数】 4 U/ μ L

【ユニット数の定義】 10 μ L の反応溶液で、37°C、1 時間の条件下において、Gal β 1,4GlcNAc β 1,3(Fuc α 1,3)Gal β 1,4Glc-7-アミノ-4-メチル-クマリンから 1 分間に 1 nmol の α -フコースを生成する酵素活性

【会社】 New England BioLabs

【基質特異性】 α 1,3/4-フコシダーゼは、オリゴ糖から α 1,3結合と α 1,4結合型フコース残基を加水分解する基質特異性をもつ。

【反応条件 6】 PA 糖鎖 1 μ L (2 pmol) に α 1,3/4-フコシダーゼ (4 U/ μ L) 1 μ L、D. D. W 1 μ L、付属試薬の 10 \times GlycoBuffer (5 mM CaCl₂, 500 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH5.5) 1 μ L と BSA (100 mg/mL) 1 μ L を加え、37°C で 1 時間酵素消化を行った。

(6) ラクト-N-ビオシダーゼ

【由来】 *Streptomyces sp.* 142

【ユニット数】 1 μ U/ μ L

【ユニット数の定義】 pH 5.5、37°C の条件下において、PA-ラクト-N-テトラオースから 1 分間に 1 μ mol の PA-ラクトースを生成する酵素活性

【会社】 タカラバイオ

【基質特異性】 ラクト-N-ビオシダーゼは、I 型糖鎖構造 (Gal β 1,3GlcNAc 結合, ラクト-N-ビオース) を加水分解し、II 型糖鎖構造 (Gal β 1,4GlcNAc 結合) には作用

しない。 α 1,3/4-L-フコシダーゼとの併用により、ルイス a 構造とルイス x 構造の識別が可能となる。

【反応条件 7】PA 糖鎖 1 μ L (2 pmol) にラクト-N-ビオシダーゼ (1 μ U/ μ L) 0.25 μ L、30 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH5.5) 5 μ L を加え、37°C で 1 時間酵素消化を行った。

(7) β 1,2 キシロシダーゼ

【由来】 *Xanthomonas sp.*

【ユニット数】 50 mU/ μ L

【ユニット数の定義】 pH 5.0、37°C の条件下において、4-メチルウンベリフェリル-7- β -D-ザイロシドから 1 分間に 1 nmol のメチルウンベリフェロンを生成する酵素活性

【会社】 Merck Millipore

【基質特異性】 β 1,2 キシロシダーゼは、N-グリカンのコアマンノシル構造に存在する β 1,2 キシロース結合を特異的に加水分解することができる。なお、加水分解を行うために、コアマンノシル構造の α 1,3 マンノースの除去と、反応溶液への 5 mM CaCl_2 の添加が必要である。

【反応条件 8】 PA 糖鎖 1 μ L (2 pmol) に β 1,2 キシロシダーゼ (50 mU/ μ L) 1 μ L、0.1 M リン酸クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH4.1) 5 μ L を加え、37°C で 1 時間酵素消化を行った。

第 1 章 発芽前 *O. sativa* 種子胚部におけるグライコーム解析

1.1 緒言

序論で述べたように、*N*-グリカンタンパク質の翻訳後修飾の 1 つとして、細胞間認識に基づいた生体内の自己非自己の認識や免疫機能において重要な役割を果たしていることが知られている。近年、植物体内における *N*-グリカンの生合成およびその生物学的意義への関心の高まりから、様々な植物糖タンパク質 *N*-グリカンの網羅的な構造解析が行われてきた。2001 年、Wilson らは、植物はその種類とは関係なく、ハイマンノース型やパウチマンノース型、複合型 *N*-グリカンなどの幅広い *N*-グリカン多様性をもつことを示した (Wilson *et al.*, 2001a)。また、裸子植物と被子植物の糖タンパク質 *N*-グリカンに着目した研究では、いずれの植物もパウチマンノース型と複合型を中心とした *N*-グリカン構成であることが報告されており (Leonard *et al.*, 2004)、これらの結果から、高等植物の果実や種子における *N*-グリカンの構造依存的な分布の差は殆どないことが考えられている。いずれの報告においても β 1,2 キシロースや α 1,3 フコースが結合した植物特異的な *N*-グリカン構造が検出されていることから、植物 *N*-グリカンは植物生体内において重要な役割を果たしていることが示唆されているものの、これらの植物 *N*-グリカンが植物においてどのような生物学的意義を有しているのかについては殆ど明らかにされていないのが現状である。そこで、植物 *N*-グリカンの生物学的意義を明らかにするための第 1 段階として、本研究では植物の特定の部位に発現する *N*-グリカン構造に着目し、植物の生長と *N*-グリカン構造の挙動との関連性について明らかにすることとした。特に、種子胚部の *N*-グリカン基本情報は、*O. sativa* 種子胚部の生長に伴う *N*-グリカン構造の挙動解析を行うにあたり極めて重要であることが考えられたため、本章では、未発芽状態の *O. sativa* 種子胚部の *N*-グリカン構造解析を行うこととした。

1.2 実験方法

1.2.1 実験材料

本研究には、茨城県つくば市産のコシヒカリ (2010 年産) を用いた。*O. sativa* は脱穀機と精米機に通して殻と胚乳部を除去した後、糠胚混合物から種子胚部のみを手作業で回収した。回収した *O. sativa* 種子胚部は全て乳棒と乳鉢で細かくすり潰した。その後、すり潰した種子胚部は凍結乾燥機にかけ完全な乾燥粉体とし、 -30°C にて保存した。

1.2.2 ピリジルアミノ化 *N*-グリカンの調製

N-グリカンの調製は、長束らの方法 (Natsuka *et al*, 2011) に従って行った。*N*-グリカンの遊離は、*O. sativa* 胚 10 mg (乾燥重量)に 1 mL の無水ヒドラジンを加え、 100°C で 10 時間反応させることにより行った。遊離した *N*-グリカンはトルエンで共沸し、減圧下で乾燥させた。乾燥させた *N*-グリカンには飽和炭酸水素ナトリウム 2.0 mL、無水酢酸 40 μL を加え、氷上で 5 分間反応させた。再び、飽和炭酸水素ナトリウム 1.0 mL、無水酢酸 40 μL を加え、氷上で 25 分間反応させ、*N*-アセチル化を行った。この反応液に Dowex 50W \times 2 樹脂を約 5 g 加え、pH 試験紙で pH 3 になったことを確認後、小カラム (1.0 \times 10 cm)に移し、約 5 倍量の D. D. W で樹脂を洗浄した。この洗液を全て回収し、遠心濃縮を行った後、小瓶に移し凍結乾燥機にて乾燥させた。凍結乾燥試料は、ピリジルアミノ化試薬 (2-アミノピリジン 552 mg を酢酸 200 μL に溶解したものを)を 100 μL 加えて封管し、 90°C で 60 分間反応させることにより、*N*-グリカンの還元末端に蛍光標識を導入した (ピリジルアミノ化, PA 化)。蛍光標識を導入した PA-*N*-グリカンは、350 μL の還元試薬 (ボラン-ジメチルアミン 250 mg を酢酸 100 μL と D. D. W 62.5 μL に溶解したものを)を加えて再び封管し、 80°C で 35 分間反応させることにより還元反応を行った。この PA グリカン調製方法は 1978 年に長谷らにより確立された 2-アミノピリジンによる糖鎖の蛍光標識法 (Hase *et al*, 1978)に準じた。反応後の PA-*N*-グリカンは、小カラム (TOYOPEAL HW-40S, 1.0 \times 10 cm)に供してゲルろ過により過剰の 2-アミノピリジンを除去した。さらに、夾雑

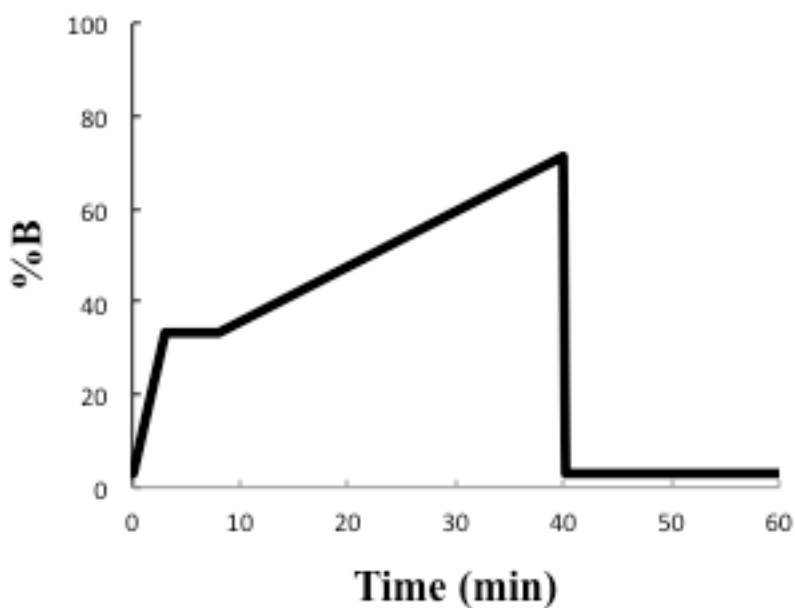
物を完全に除くため、PA-N-グリカンは GL-Pak Carbograph (ジーエルサイエンス株式会社)を用いた固相抽出を行い精製した。精製した PA-N-グリカンは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた構造解析用試料とした。

1.2.3 サイズ分画 HPLC 分析

HPLC 装置は高速液体クロマトグラフ Prominence (島津製作所) を使用した。1.2.2 で精製した PA-N-グリカンは 100 μ L の D.D.W で溶解させた後、Cosmosil 5NH₂-MS カラム (4.6 ID \times 150 mm, ナカライテスク)を用いたサイズ分画 HPLC により糖の重合度別に分離を行った。サイズ分画 HPLC では、構成糖の数が小さいものから順に溶出させる事が可能である。サイズ分画 HPLC の詳細な分析条件は Table 1-1 に示した。

Table 1-1. サイズ分画 HPLC の分析条件

- Column : 5NH₂-MS (4.6 ID × 150 mm)
- Flow rate : 0.8 ml/min
- Column temperature : 40°C
- Detection : Fluorescence (Excitation: 310 nm, Emission: 380 nm)
- Buffer A : acetonitrile (93%), acetic acid (0.3%) (v/v), adjusted by pH 7.0 using aqueous ammonia (28%)
- Buffer B : acetonitrile (20%), acetic acid (0.3%) (v/v), adjusted by pH 7.0 using aqueous ammonia (28%)
- Gradient :



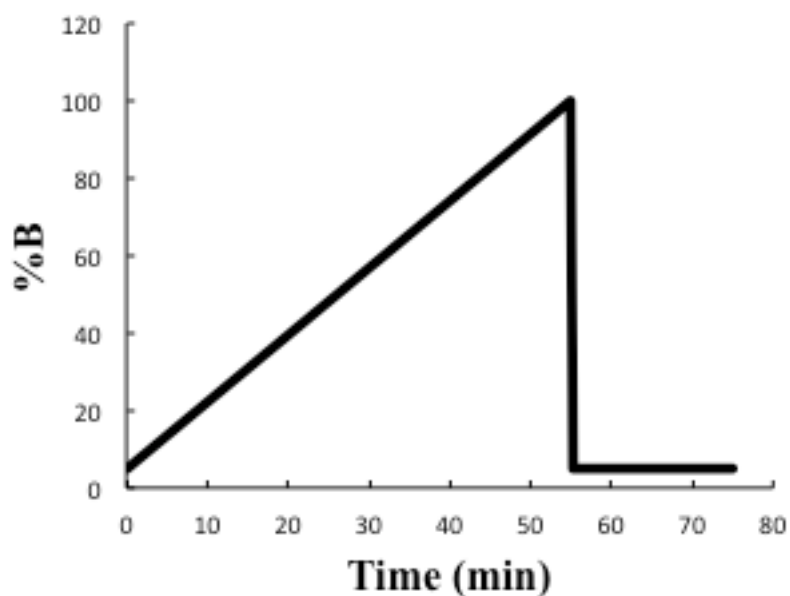
1.2.4 逆相 HPLC 分析

サイズ分画 HPLC にて分離した PA-*N*-グリカンは、Cosmosil 5C₁₈-P カラム(4.6 ID × 150 mm, ナカライテスク)を用いた逆相 HPLC により 構成糖および糖の結合位置の異なる構造ごとに分離した。この異性体の分離において、PA 化標識の適度な疎水性は逆相 HPLC の分離能を向上させることが知られている。従って、構成糖の組成が同一の糖鎖である場合においても、アノマー構造やグリコシド結合の位置の異なる化学構造を識別することが可能となる。逆相 HPLC の詳細な分析条件は table 1-2 に示した。

Table 1-2. 逆相 HPLC の分析条件

- Column : 5C₁₈-P (4.6 ID × 150 mm)
- Flow rate : 1.5 ml/min
- Column temperature : 40°C
- Detection : Fluorescence (Excitation: 315 nm, Emission: 400 nm)
- Buffer A : 10 mM ammonium acetate buffer, adjusted by pH 4.0 using aqueous ammonia (28%)
- Buffer B : 10 mM ammonium acetate buffer, adjusted by pH 4.0 using aqueous ammonia (28%) containing 1% 1-butanol

- Gradient :



1.2.5 質量分析

サイズ分画 HPLC および逆相 HPLC により分離・精製した PA-*N*-グリカンは、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF/MS)を用いて質量数の確認を行った。MALDI-TOF/MS 装置は AXIMA-CFR plus (島津製作所)を用いた。MALDI プレート上における PA-*N*-グリカンの調製方法を以下に示す。まず、Super-2,5-Dihydroxybenzoic acid 2.5 mg を 50%エタノール水 1.0 mL で溶解し、マトリックス溶液を調製した。まず、2 pmol/ μ L の試料溶液 1.0 μ L を MALDI プレートに滴下し、乾燥させた。続いてマトリックス溶液 0.5 μ L を MALDI プレートに滴下して混晶を作製し、乾固させた。乾固後、100%エタノール 0.2 μ L を MALDI プレートに滴下し、混晶の再結晶化を行った。測定はポジティブモード、リフレクトロンモード、Power: 80~110、5 Shots、1 Profile \times 100 の条件で行った。

1.2.6 酵素消化

N-グリカンの糖組成および糖結合様式は、基質特異性の高いグリコシダーゼを用いた酵素消化を行うことにより決定した。各グリコシダーゼの基質特異性、および反応条件は「本論で扱った試薬」に記載した。酵素反応の停止は、全て 98°C で 5 分間反応液を加熱処理することにより行った。

本章で用いた糖加水分解酵素は以下に示した。

- α -マンノシダーゼ (タチナタマメ由来, Sigma-Aldrich)
- β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ (タチナタマメ由来, ProZyme)
- β 1,2 キシロシダーゼ (*Xanthomonas sp.*由来, Merck Millopore)

1.3 結果および考察

1.3.1 サイズ分画 HPLC 分析

O. sativa 種子胚部の糖タンパク質由来 *N*-グリカンを得るため、*O. sativa* 種子胚部のヒドラジン分解を行い、遊離した *N*-グリカンの *N*-アセチル化および PA 化を行った。PA 化した *N*-グリカンはサイズ分画 HPLC にて糖重合度別に分離し、その結果を Fig. 1-1 に示した。マンノース 3 残基と GlcNAc 2 残基の 5 糖から構成されているトリマンノシルコア構造は *N*-グリカンの基本構造である事から、本節では糖重合度 5 糖以上の *N*-グリカン構造に着目した。その結果、*O. sativa* 種子胚部の主要フラクションは 5 本であり、糖重合度は 5~9 糖の範囲に存在していることが明らかとなった。これら 5 本のフラクションはそれぞれフラクション a~e と表記した。フラクション面積は、フラクション a が最も大きく、次いで b、c、d、e、の順に小さくなった。さらに、これらのフラクションの構造異性体を分離するため、それぞれのフラクションを分取し、逆相 HPLC 分析を行った。

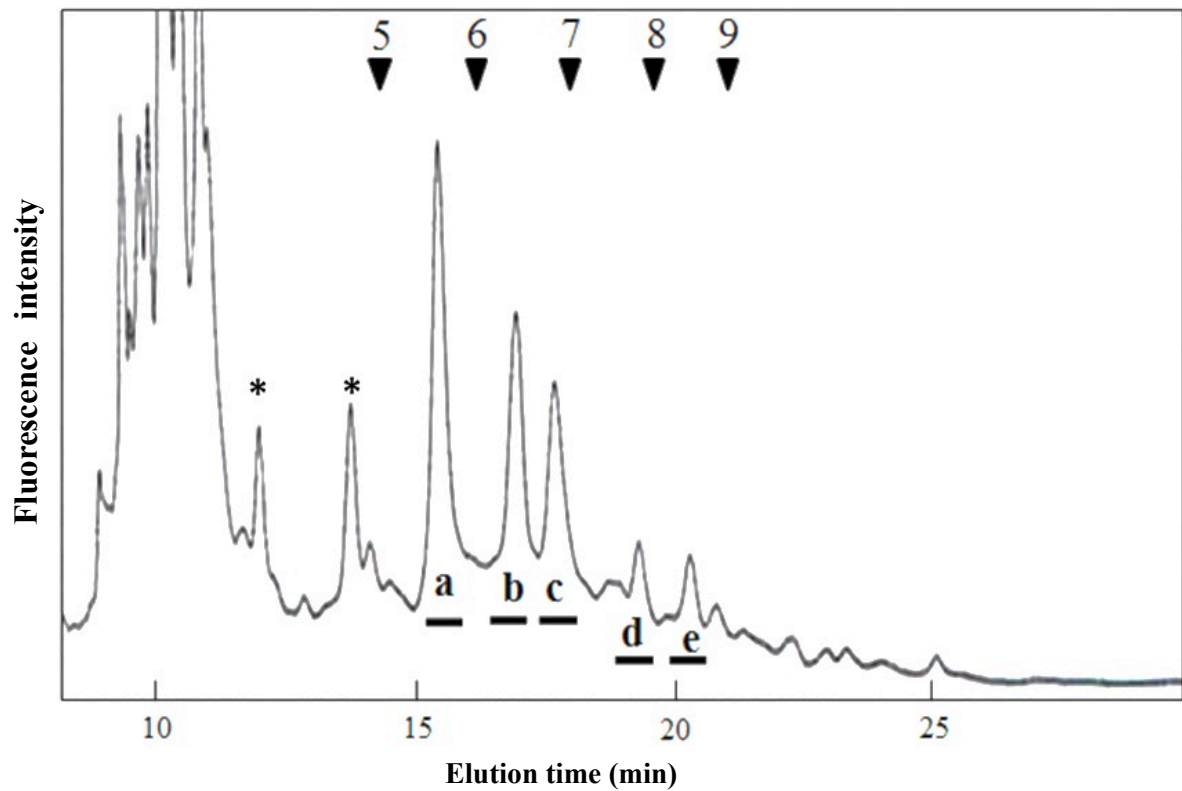


Fig. 1-1. サイズ分画 HPLC による発芽前 *O. sativa* 胚領域の重合度別 *N*-グリカンパターン

番号付き矢印 (▼); PA-イソマルトオリゴ糖の重合度に基づいた溶出位置

アスタリスク: 逆相 HPLC 分析においてトリマンノシルコア構造を有していない *N*-グリカンと判断したため、解析から除外した

1.3.2 逆相 HPLC 分析

逆相 HPLC 分析は、疎水性相互作用を利用した同様の糖重合度をもつ *N*-グリカンの構造異性体の分離に用いられる手法である。特に、PA を導入した *N*-グリカン構造異性体の分離に優れている。サイズ分画 HPLC にて分取した *O. sativa* 種子胚部由来の主要フラクション 5 本の逆相 HPLC 分析結果を Fig. 1-2 に示した。通常、トリマンノシルコア構造を持つ *N*-グリカンは、逆相 HPLC 分析において糖重合度 5 糖以降の位置に溶出することが知られている (Maeda and Kimura, 2006)。逆相 HPLC 分析において糖重合度 5 糖以降の位置に溶出したフラクションに着目すると、フラクション a、c、d および e は 1 種類、フラクション b には 2 種類の *N*-グリカンが存在していることが示された。これら 6 本のフラクションは溶出順にそれぞれ a1、b1、b2、c1、d1 および e1 と表記した。フラクション b1 および b2 はそれぞれ 55%、45%の割合でフラクション b に存在していることが明らかとなった。これら 6 本のフラクションの質量を確認し構成糖の推定を行うため、それぞれのフラクションを分取し、MALDI-TOF/MS を用いて質量分析を行った。

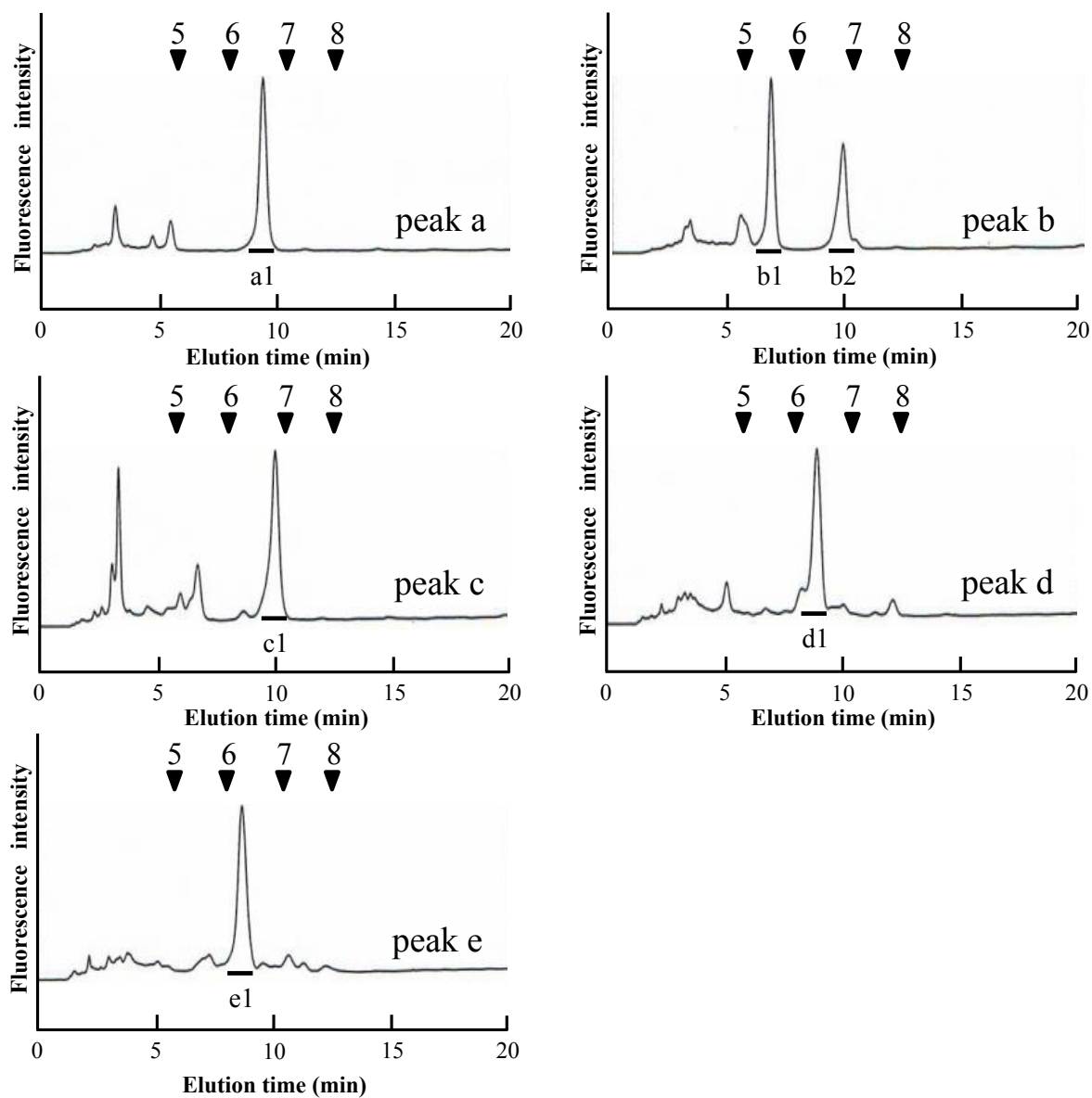


Fig. 1-2. 逆相 HPLC による発芽前 *O. sativa* 胚領域の構造特性格別 *N*-グリカンパターン
番号付き矢印 (▼): PA-イソマルトオリゴ糖の重合度に基づいた溶出位置

1.3.3 質量分析

MALDI-TOF/MS は、多量のマトリックスと共にサンプルをイオン化させる方法と質量電荷比 m/z の差をイオンの飛行時間の差に反映されることを利用した質量分析法を組み合わせた分析手法である。逆相 HPLC にて分取した 6 本のフラクションは m/z 値から *N*-グリカンの構造を推定した (Table 1-1)。質量分析の結果、フラクション a1 からは 1120.84 (H^+)、1142.85 (Na^+)、1158.82 (K^+) の m/z 値が得られた。この m/z 値はヘキソース 3 残基、ペントース 1 残基、*N*-アセチルヘキソサミン 2 残基から構成される M3X 構造 $[(Hex)_3(HexNAc)_2(Pent)_1-PA]$ の m/z 値に相当したため、フラクション a1 は M3X 構造と推定した。同様に、フラクション b1 はヘキソース 3 残基、ペントース 1 残基、デオキシヘキソース 1 残基、*N*-アセチルヘキソサミン 2 残基から構成される M3FX 構造 $[(Hex)_3(HexNAc)_2(Deoxyhexose)_1(Pent)_1-PA]$ 、フラクション b2 はヘキソース 4 残基、ペントース 1 残基、*N*-アセチルヘキソサミン 2 残基から構成される M4X 構造 $[(Hex)_4(HexNAc)_2(Pent)_1-PA]$ 、フラクション c1 はヘキソース 5 残基、*N*-アセチルヘキソサミン 2 残基から構成される M5 構造 $[(Hex)_5(HexNAc)_2-PA]$ 、フラクション d1 はヘキソース 6 残基、*N*-アセチルヘキソサミン 2 残基から構成される M6 構造 $[(Hex)_6(HexNAc)_2-PA]$ 、フラクション e1 はヘキソース 3 残基、ペントース 1 残基、デオキシヘキソース 1 残基、*N*-アセチルヘキソサミン 4 残基から構成される GN2M3FX 構造 $[(Hex)_3(HexNAc)_4(Deoxyhexose)_1(Pent)_1-PA]$ と推定された。

Table 1-1. 質量分析による検出値およびその推定構造

Fraction	Mass (observed)	Mass (expected)	Estimated Composition
a1	1120.84 (H⁺)	1122.03 (H⁺)	(Hex)₃(HexNAc)₂(Pent)₁-PA
	1142.85 (Na⁺)	1144.01 (Na⁺)	
	1158.82 (K⁺)	1160.12 (K⁺)	
b1	1288.81 (Na⁺)	1290.17 (Na⁺)	(Hex)₃(HexNAc)₂(Deoxyhexose)₁(Pent)₁-PA
	1304.76 (K⁺)	1306.28 (K⁺)	
b2	1304.24 (Na⁺)	1306.15 (Na⁺)	(Hex)₄(HexNAc)₂(Pent)₁-PA
c1	1334.79 (Na⁺)	1336.16 (Na⁺)	(Hex)₅(HexNAc)₂-PA
	1350.70 (K⁺)	1352.27 (K⁺)	
d1	1496.15 (Na⁺)	1498.30 (Na⁺)	(Hex)₆(HexNAc)₂-PA
e1	1695.06 (Na⁺)	1696.59 (Na⁺)	(Hex)₃(HexNAc)₄(Deoxyhexose)₁(Pent)₁-PA
	1711.06 (K⁺)	1712.70 (K⁺)	

1.3.4 フラクシオン a1 の構造解析

質量分析の結果から、フラクシオン a1 は(Hex)₃(HexNAc)₂(Pent)₁-PA の糖組成を有する M3X 構造であることが推測されたため、 α -マンノシダーゼ消化による構成糖および結合の種類を確認を行った。酵素消化により遊離した糖はグルコースユニット (Glucose Unit, 以下 G.U) の推移により判断した。グルコースユニットの換算は長束らの G.U 換算方法 (Natsuka and Hase, 1998)を用いた。その結果、G.U がフラクシオン a1 の 5.59 から 1.26 および 2.11 前にシフトしたフラクシオンが確認された事から (Fig. 1-3-II)、フラクシオン a1 は非還元末端側に α -マンノースが 2 残基結合した構造であることが明らかとなった。また、標準糖鎖の M3 の G.U は 5.18 である事から、植物型 N-グリカンに特徴的なコアマンノシルコア構造への β 1,2キシロースの結合による G.U のシフトは 0.4 であることが示された。

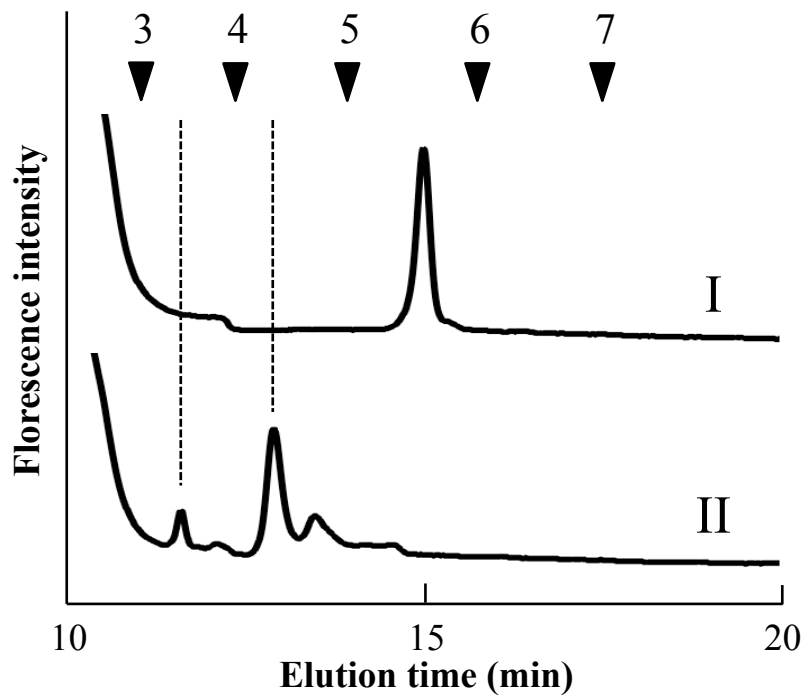


Fig. 1-3. フラクション a1 の α -マンノシダーゼ消化消化産物のサイズ分画 HPLC 結果
 I, 酵素消化前 a1、II, I の α -マンノシダーゼ消化後

1.3.5 フラクション b1 の構造解析

質量分析の結果から、フラクション b1 は(Hex)₃(HexNAc)₂(Deoxyhexose)₁(Pent)₁-PA の糖組成を有する M3FX 構造であることが推測されたため、 α -マンノシダーゼおよび β 1,2キシロシダーゼ消化による構成糖および結合の種類の確認を行った。 α -マンノシダーゼ消化の結果、G.U がフラクション b1 の 6.11 から 2.36 前にシフトしたフラクションが確認された事から (Fig. 1-4-II)、フラクション b1 は非還元末端側に α -マンノースが 2 残基結合した構造であることが示された。さらに、このフラクションに対して β 1,2キシロシダーゼ消化を行った結果、G.U が 0.71 前にシフトしたフラクションが確認された事から (Fig. 1-4-III)、フラクション b1 はコアマンノシルコア構造への β 1,2キシロースが 1 残基結合した構造であることが示された。また、本酵素消化条件では、M3X から M2X は 86.8%、MX は 13.2%生成されることが示された。 β 1,2キシロース 1 残基の G.U が 1.3.4 に記述した M3X と僅かに異なる点に関しては、M3FX 構造に存在するコア α 1,6 フコースの存在の有無により、その G.U が変動することが考えられた。

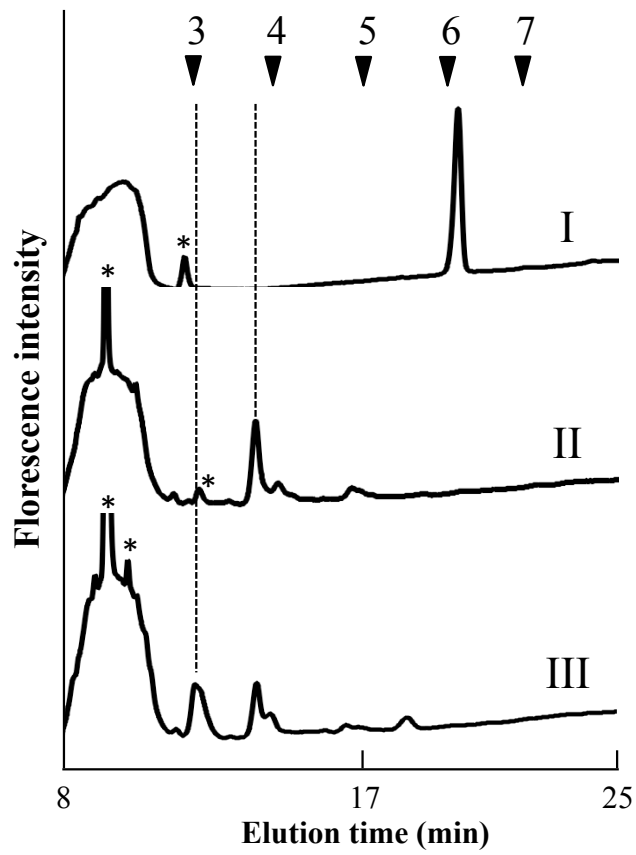


Fig. 1-4. フラクシオン b1 の α -マンノシダーゼおよび β 1,2キシロシダーゼ消化産物のサイズ分画 HPLC 結果

I, g3、II, I の α -マンノシダーゼ消化後、III, II の β 1,2 キシロシダーゼ消化後

1.3.6 フラクシオン b2 の構造解析

質量分析の結果から、フラクシオン b2 は(Hex)₄(HexNAc)₂(Pent)₁-PA の糖組成を有する M4X 構造であることが推測されたため、 α -マンノシダーゼ消化による構成糖および結合の種類を確認を行った。ポジティブコントロールとして糖鎖標準品の M4B [(Man α 1,6) (Man α 1,3) Man α 1,6 Man β 1,4GlcNAc β 1,4GlcNAc]を用いた。 α -マンノシダーゼ消化の結果、G.U が 0.72 前にシフトしたフラクシオンと 1.94 前にシフトしたフラクシオンが確認された (Fig. 1-5A-II)。各フラクシオンは M4B 構造から α -マンノースが 1 残基遊離した M3 構造および 2 残基遊離した M2 構造であることを示しており、各フラクシオンの存在比は M3 (G.U=5.18) が 72.5%、M2 (G.U=3.96) が 27.5%であった。ポジティブコントロールの結果を踏まえ、フラクシオン b3 の α -マンノシダーゼ消化を行った。その結果、G.U が 0.74 前にシフトしたフラクシオンと 2.00 前にシフトしたフラクシオンが確認された (Fig. 1-5B-II)。各フラクシオンは M4X 構造から α -マンノースが 1 残基遊離した M3X 構造および 2 残基遊離した M2X 構造であることを示しており、各フラクシオンの存在比は M3X (G.U=5.59) が 73.4%、M2X (G.U=4.33) が 26.6%であった。この酵素消化産物の存在比から、フラクシオン b2 は、M4B と同様のコアマンノシル構造の α 1,6 アーム側に α 1,3、 α 1,6 結合した 2 残基の α -マンノースが結合した結合様式であることが推測された。

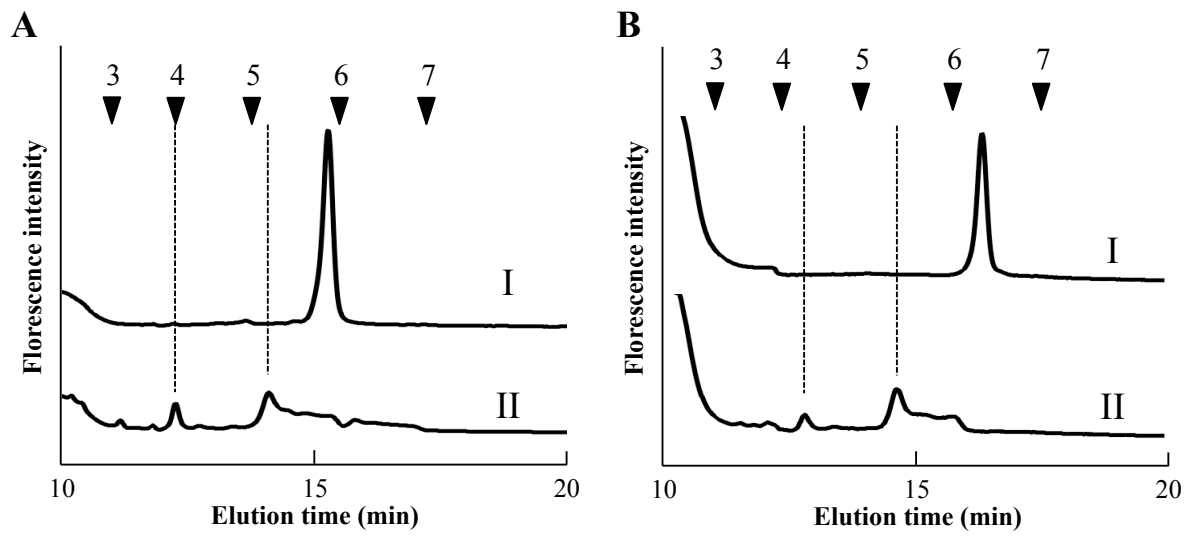


Fig. 1-5. フラクション b2 の α -マンノシダーゼ消化産物のサイズ分画 HPLC 結果

A-I, M4B、A-II, I の α -マンノシダーゼ消化後

B-I, b2、B-II, I の α -マンノシダーゼ消化後

1.3.7 フラクシオン c1 および d1 の構造解析

質量分析の結果から、フラクシオン c1 は $(\text{Hex})_5(\text{HexNAc})_2\text{-PA}$ 、フラクシオン d1 は $[(\text{Hex})_6(\text{HexNAc})_2\text{-PA}]$ のハイマンノース型 *N*-グリカンの糖組成であることが推測されたため、逆相 HPLC 分析を用いて糖鎖標準品と溶出位置の比較を行った。その結果、フラクシオン c1 は M5A、フラクシオン d1 は M6B と溶出位置が一致したため (Fig. 1-6)、フラクシオン c1 は M5A、フラクシオン d1 は M6B であることが示された。

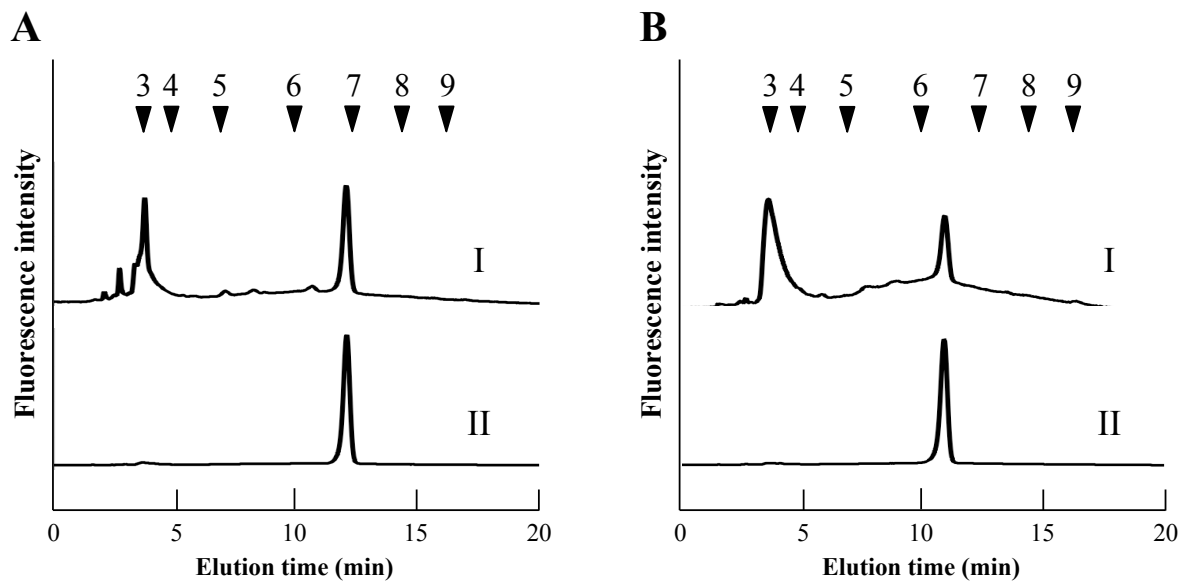


Fig. 1-6. 逆相 HPLC を用いた *O. sativa* 種子胚部由来ハイマンノース型 *N*-グリカン構造の溶出位置確認

A-I, c1, A-II, M5A

B-I, d1, B-II, M6B

1.3.8 フラクション e の構造解析

質量分析の結果から、フラクション e1 は(Hex)₃(HexNAc)₄(Deoxyhexose)₁(Pent)₁-PA の糖組成を有する GN2M3FX 構造であることが推測されたため、 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼおよび α -マンノシダーゼ消化による構成糖および結合の種類の確認を行った。 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ消化の結果、G.U が 1.76 前にシフトしたフラクションが確認された事から (Fig. 1-7-II)、フラクション e1 は非還元末端側に GlcNAc が 2 残基結合していることが示された。さらに α -マンノシダーゼ消化の結果、G.U が 1.25 前にシフトしたフラクションと 2.34 前にシフトしたフラクションが確認された事から、(Fig. 1-7-III)、非還元末端側に α -マンノースが 2 残基結合していることが示された。 α -マンノースに対する α -マンノシダーゼの特異性は α 1,2、 α 1,3、 α 1,6 の順に低くなる事から、 α -マンノシダーゼ消化後の主要な消化産物である G.U が 1.25 前にシフトしたフラクションはトリマンノシルコア構造の α 1,3 マンノースが遊離した M2 構造、一方で 2.34 前にシフトした微量な消化産物は M2 構造から α 1,6 マンノースが遊離した M1 構造と考えられる。M1 構造が微量な点については M2 構造からトリマンノシルコア構造の α 1,6 マンノースを遊離するための α -マンノシダーゼの酵素量が不足しているためと考えられる。また、 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ消化後のフラクション e1 の G.U は 6.26 となり、M3FX の G.U とほぼ同様であった事からも、フラクション e1 は M3FX に GlcNAc が 2 残基結合した GN2M3FX 構造であることが示された。

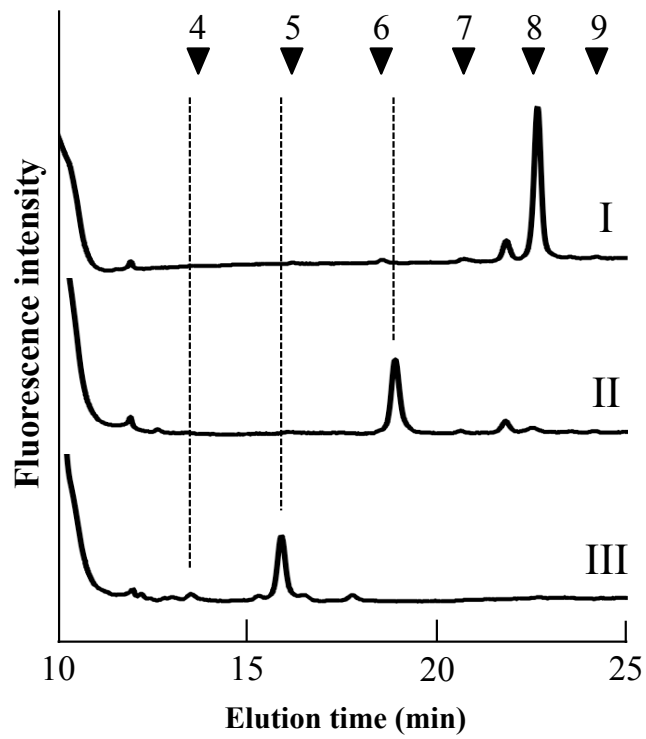


Fig. 1-7. フラクション e1 の β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼおよび α -マンノシダーゼ消化産物のサイズ分画 HPLC 結果

I, e1、II, I の β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ消化後、III, II の α -マンノシダーゼ消化後

Table 1-4. 発芽前 *O. sativa* 種子胚部の *N*-グリカン構造およびその存在比

Fraction	Structure	Abbreviation	Ratio (%)	Glucose Units	
				Size	ODS
a1	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \diagdown 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Xyl}\beta 1$	M3X	45.7	5.53	6.72
b1	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \diagdown 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Xyl}\beta 1 \qquad \qquad \text{Fuc}\alpha 1$	M3FX	16.8	6.31	5.33
b2	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \diagdown 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \diagup 3 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \diagdown 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Xyl}\beta 1$	M4X	14.3	6.36	6.95
c1	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \diagdown 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \diagup 3 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \diagdown 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA}$	M5A	9.3	6.77	6.76
d1	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \diagdown 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \diagup 3 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \diagdown 6 \\ \text{Man}\alpha 1-2 \text{Man}\alpha 1 \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA}$	M6B	6.7	7.70	6.21
e1	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta 1-2 \text{Man}\alpha 1 \diagdown 6 \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2 \text{Man}\alpha 1 \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Xyl}\beta 1 \qquad \qquad \text{Fuc}\alpha 1$	GN2M3FX	7.2	8.16	6.25

パーセンテージは、発芽前 *O. sativa* 種子胚部由来主要 *N*-グリカンの全量を 100%としたときの各 *N*-グリカンの相対比を示した。

1.3.9 発芽前 *O. sativa* 種子胚部に存在する *N*-グリカンについて

糖鎖構造解析の結果、発芽前 *O. sativa* 種子胚部の糖タンパク質由来主要 *N*-グリカンは 6 種類の *N*-グリカンから構成されており、その割合は M3X (45.7%)、M3FX (16.8%)、M4X (14.3%)、M5A (9.3%)、M6B (6.7%)、GN2M3FX (7.2%) であることが初めて明らかとなった。この結果から発芽前 *O. sativa* 種子胚部の *N*-グリカンは他の植物と比較して多様性が非常に少ないことが明らかとなった (Wilson *et al.*, 2001a, Bardor *et al.*, 2002)。発芽前 *O. sativa* 種子胚部全体の *N*-グリカンは、比較的短い鎖長のパウチマンノース型 76.8%、複合型 7.2%、ハイマンノース型 17.0%の割合で構成されており、パウチマンノース型が約 8 割を占めていた。また、トリマンノシルコア構造に付加した糖による分類では、 β 1,2キシロースのみが付加した *N*-グリカンが 84.0%と最も多く、 β 1,2キシロースおよび α 1,3フコースが付加した *N*-グリカンは 24.0%であった。発芽前 *O. sativa* 種子胚部の *N*-グリカンに最も多くみられた β 1,2キシロース付加は植物 *N*-グリカン最大の特徴であり、植物特有の糖鎖抗原性を示す構造である。 β 1,2キシロース付加の基質となるウリジン二リン酸 (UDP) -キシロースは UDP-グルコースを初発糖ヌクレオチドとした複数の代謝反応により生成される糖ヌクレオチドであり、細胞壁構成成分であるヘミセルロースの生合成にも関与していることから、生体内における UDP-キシロースの供給レベルは十分高いことが考えられる。*N*-グリカンへの β 1,2キシロース付加が行われない場合、*O. sativa* 種子では、アブシジン酸添加後も休眠状態が維持されないことから (Takano *et al.*, 2015)、 β 1,2キシロース付き *N*-グリカンは種子の保存や発芽における外的ストレスへの対応に重要な役割を果たしていることが示唆された。

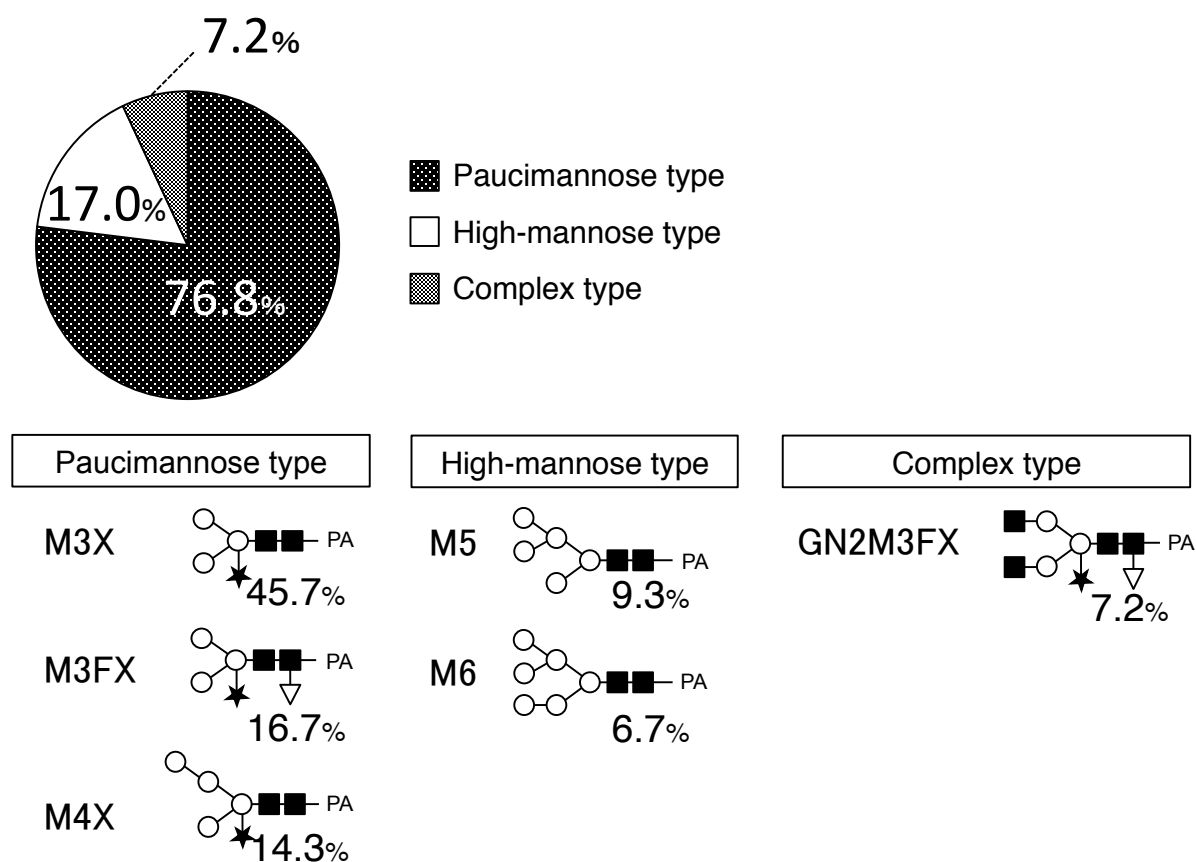


Fig. 1-8. 発芽前 *O. sativa* 種子胚部における *N*-グリカン構成比

他にも、*O. sativa* 種子全体や葉由来の *N*-グリカンは、M3X や M3FX などのパウチマンノース型を中心に構成されていることが報告されている (Léonard *et al.*, 2004, Matsuo *et al.*, 2011)。これらの結果に対し、*O. sativa* 培養細胞を用いた場合は複合型 *N*-グリカンの比率が細胞基質はで 79%、細胞壁面分では 87.3%と、全 *N*-グリカンの 8~9 割を占めており、さらに、*O. sativa* 培養細胞には非還元末端に糖鎖抗原となるルイス a 型構造 [Gal β 1,3(Fuca1,4)GlcNAc β 1]を持つ複合型 *N*-グリカンは約 20%存在していることが報告されている (Maeda and Kimura, 2006)。このような *O. sativa* の種子胚部と培養細胞における *N*-グリカン構成の差は、「休眠状態の細胞」と「脱分化し増殖能力に特化した細胞」という細胞そのもののライフサイクル期や細胞の機能分化の差を反映している事が考えられた事から、今後は *N*-グリカン構成に基づいた植物培養細胞の新たな品質管理や評価

方法に応用できる可能性が考えられた。例えば、パウチマンノース型が主体となった培養細胞は種子状態を示し、複合型の割合が増加し始めた培養細胞は休眠状態から脱した種子状態を示すなど、*N*-グリカン構造比較は新たな植物培養細胞の発達ステージの判断を可能にし、各発達ステージの培養細胞を用いた新たな植物生理機能の解明の一助となることが考えられた。

ハイマンノース型 *N*-グリカンやパウチマンノース型 *N*-グリカンは、主に液胞内の貯蔵タンパク質に結合していることが報告されている (Kimura *et al.*, 1996, Sturm *et al.*, 1987)。発芽前 *O. sativa* 種子胚部では、M3X や M3FX、M4X などパウチマンノース型 *N*-グリカンが存在比の上位を占めていたことから、これらのパウチマンノース型 *N*-グリカンは *O. sativa* 種子胚部の貯蔵糖タンパク質に結合して存在している可能性が高い。*O. sativa* 種子の胚乳組織にはプロラミンやグルテリンなどの種子貯蔵タンパク質が存在し、それぞれのタンパク質は小胞体内で合成され小胞体内腔へ運ばれたのち、異なる細胞内画分へ移動する (Choi *et al.*, 2000)。これら種子貯蔵タンパク質は糖タンパク質であり、プロラミンはムチン型 *O*-グリカンである Gal β -1,3GalNAc 構造 (Kilcoyne *et al.*, 2009)、グルテリンもムチン型 *O*-グリカンである Gal β -1,3GalNAc 構造 (Kishimoto *et al.*, 1999) および M5~M9 までのハイマンノース型 *N*-グリカンを有することが報告されている (Kishimoto *et al.*, 2001)。これらの先行研究結果から、*O. sativa* 種子の糖タンパク質由来 *N*-グリカンは、種子胚部と胚乳組織において最終構造、分布および発現量などが異なるものの、いずれも貯蔵糖タンパク質に結合する *N*-グリカンであることが示されている。

O. sativa 以外の植物種子糖タンパク質の *N*-グリカン解析において、豆の主要な貯蔵タンパク質であるファセオリンにはハイマンノース型 *N*-グリカンや M3X、GN2M3FX などの *N*-グリカンが多く検出されており (Sturm *et al.*, 1987, Marsh *et al.*, 2011)、ミヤコグサ (*Lotus japonicus*)の種子グロブリンには主に M3X や M3FX、GN2M3FX などの複合型 *N*-グリカンが多く含まれている (Dam *et al.*, 2013)。ムクナマメ (*Mucuna pruriens*)の糖タンパク質には M5 から M9 までのハイマンノース型 *N*-グリカンと M2FX、M3X、M4X、M3FX

などのパウチマンノース型 *N*-グリカンが検出されている (Patrizi *et al.*, 2006)。さらに、黄色ハウチワマメ (*Lupinus luteus*) の液胞タンパク質である酸性フォスファターゼには M3X や M3FX などのパウチマンノース型 *N*-グリカンが最も多く含まれることが報告されている (Olczak and Watorek, 2002)。これら種子由来糖タンパク質の *N*-グリカンに共通する点としてパウチマンノース型およびハイマンノース型 *N*-グリカンの種類や存在比の高さがある。このことから、発芽前 *O. sativa* 種子胚部に存在する *N*-グリカン構造は他の植物種においても同様に貯蔵型糖タンパク質における機能性に関与する事が考えられた。

続いて、発芽前 *O. sativa* 種子胚部において僅かな存在比を示した複合型 *N*-グリカンについて考察する。*N*-グリカン生合成経路において、複合型 *N*-グリカンの生合成はシスゴルジにおける M5 構造への GlcNAc 付加により開始され、この GlcNAc 付加に伴う複合型 *N*-グリカンの生合成は、植物ないし動物の発生や発達において非常に重要な過程である。例えば、GlcNAc 付加が行われないマウスは胎児が胎内で致死し (Ioffe and Stanley, 1994, Metzler *et al.*, 1994)、また、GlcNAc 付加が行われない *N*-グリカンを有する *O. sativa* では、生長遅延や早期致死により種子の形成が行われないことが報告されている (Fanata *et al.*, 2013)。本章の構造解析結果および先行研究結果から、発芽前 *O. sativa* 種子胚部における複合型 *N*-グリカンの存在は、*O. sativa* の種子形成までの過程が正常に行われたことを裏付ける結果であった。しかしながら、複合型 *N*-グリカンは発芽前 *O. sativa* 種子胚部における存在比が低かったことから、種子形成後の種子の保存への対応には複合型 *N*-グリカンの関与は低いことが示唆された。

さらに、得られた全 *N*-グリカンの量的観点から、種子形成期の *O. sativa* 種子胚部における *N*-グリカンの生合成経路について考察した。まず、植物 *N*-グリカンの生合成経路において (Fig. 1-9)、ハイマンノース型 *N*-グリカンは *N*-グリカン生合成経路の上流部である ER からシスゴルジで生合成されることから、多様な *N*-グリカン構造の生成に不可欠な存在といえるハイマンノース型 *N*-グリカンは優先的に種子胚部に蓄積されてい

ることが考えられた。また、パウチマンノース型はメディアルゴルジからトランスゴルジにおいてハイマンノース型から複合型に移行する過程で生合成されることから、パウチマンノース型 *N*-グリカン は発芽に伴う複合型 *N*-グリカンの生合成をより効率よく進めるために、種子形成期の *O. sativa* 種子胚部において優先的に蓄積されていることが考えられた。

以上の結果から、発芽前イネ種子胚部では糖鎖の存在が初めて明らかとなり、さらにその糖鎖構造の多様性は非常に少ないことが明らかとなった。そして、これらの糖鎖構造は、次世代の生長に重要な種子の保存期間や、種子の発芽・生長において重要な役割を果たしていることが示唆された。

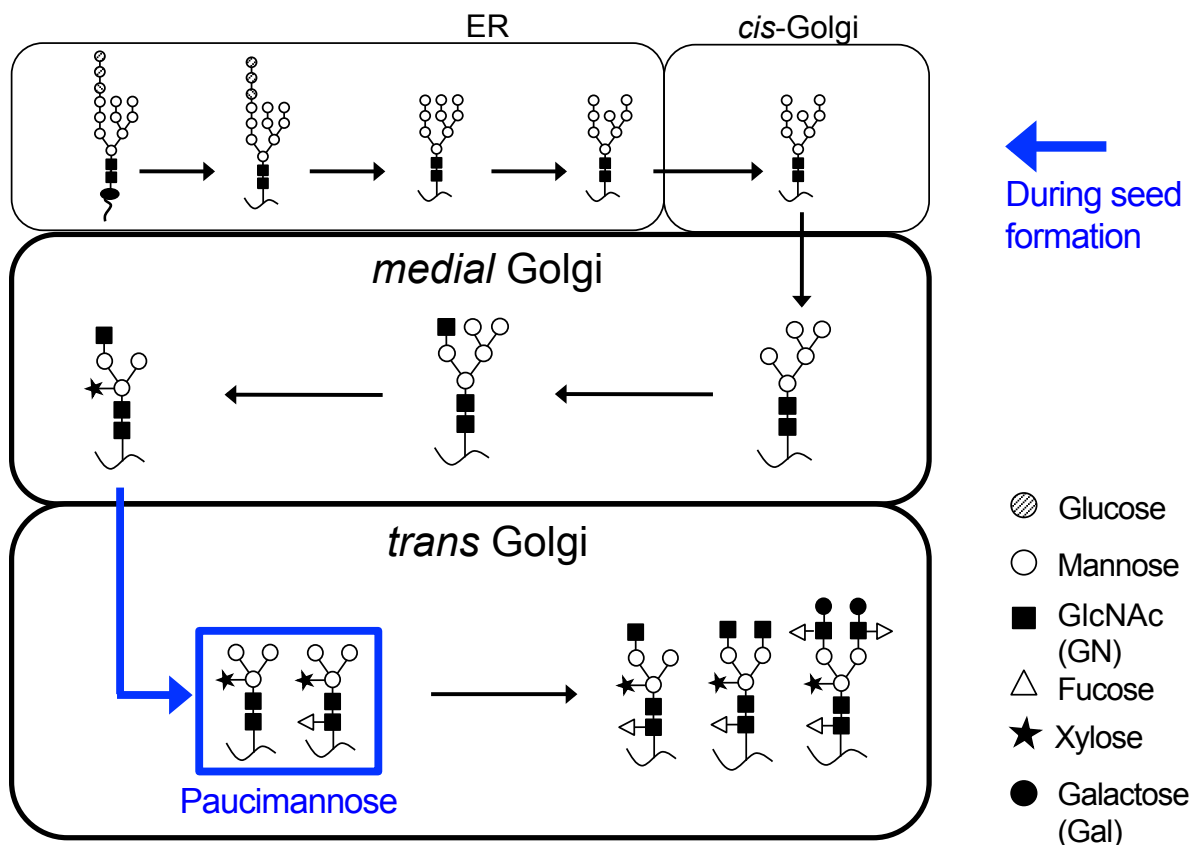


Fig. 1-9. 発芽前 *O. sativa* 種子胚部における *N*-グリカン生合成経路

第2章 発芽48時間後 *O. sativa* 種子胚部における グライコーム解析

2.1 緒言

第1章で行った研究により、発芽前 *O. sativa* 種子胚部における主要 N-グリカンパウチマンノース型であることが明らかとなった。この N-グリカンは *O. sativa* の種子形成段階において蓄積されていることから、次世代の生長に重要な *O. sativa* 種子の保存期間や、種子の発芽・生長において重要な役割を果たしていることが示唆された。続いて、生長度の異なる *O. sativa* 種子胚部における N-グリカンに着目し、*O. sativa* 種子胚部の生長と N-グリカンの関連性について調べることにした。これまでに植物の生長に伴う N-グリカン構成の変化について、イチョウ種子の成熟により糖タンパク質由来パウチマンノース型 N-グリカンの割合が増加した事が報告されていることから (Kimura and Matsuo, 2000a)、植物の生長とパウチマンノース型 N-グリカン構造の挙動には関連性があることが示唆された。しかしながら、特定の生長部位の経時変化に伴う N-グリカンの挙動に関する情報は少ないのが現状である。そこで、本章では特定部位の経時変化に伴う N-グリカン構造の挙動およびその生物学的意義を調べるため、発芽に伴う *O. sativa* 種子胚部の N-グリカン構造解析を行った。

。

2.2 実験方法

2.2.1 実験材料

本研究には、茨城県つくば市産のコシヒカリ (2010 年産) を用いた。*O. sativa* は脱穀機と精米機に通して殻と糠を除去した後、種子胚部のみを回収した。回収した *O. sativa* 種子胚部は全て乳棒と乳鉢で細かくすり潰した。その後、すり潰した種子胚部は凍結乾燥機にかけ完全な乾燥粉体とし、 -30°C にて保存した。

2.2.2 ピリジルアミノ化 *N*-グリカンの調製

N-グリカンの調製は、1.2.2 に示した通りに行った。

2.2.3 サイズ分画 HPLC 分析

サイズ分画 HPLC は、1.2.3 に示した通りに行った。

2.2.4 逆相 HPLC 分析

逆相 HPLC は、1.2.4 に示した通りに行った。

2.2.5 質量分析

試料の調製およびその質量分析は、1.2.5 に示した通りに行った。

2.2.6 酵素消化

各グリコシダーゼの基質特異性、および反応条件は「本論で扱った試薬」に記載した。

酵素反応の停止は、全て 98°C で 5 分間反応液を加熱処理することにより行った。

本章で用いた糖加水分解酵素は以下に示した。

- ・ α -マンノシダーゼ (タチナタマメ由来, Sigma-Aldrich)

- β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ (タチナタマメ由来, ProZyme)
- α 1,3/4-L-フコシダーゼ (*Streptomyces sp.* 142 由来, タカラバイオ)
- ラクト-*N*-ビオシダーゼ (*Streptomyces sp.* 142 由来, タカラバイオ)

2.3 結果および考察

2.3.1 サイズ分画 HPLC 分析

サイズ分画 HPLC 分析の結果、発芽 48 時間後 *O. sativa* 種子胚部では、糖重合度 5~13 の間にフラクション a から h の 8 本のフラクションが確認された (Fig. 2-1)。8 本のフラクションの中ではフラクション a に含まれる糖の量が最も多く、次いでフラクション e、フラクション b の順に多く検出された。しかしながら、発芽前 *O. sativa* 種子胚部の N-グリカンの溶出パターンと比較すると (Fig. 2-1、図内)、フラクション a は劇的に減少していることが示された。一方、G.U が 10~13 の間に溶出したフラクション f、フラクション g およびフラクション h は発芽後 *O. sativa* 種子胚部において初めて主要フラクションとして確認されたフラクションであった。このため、発芽後 *O. sativa* 種子胚部の N-グリカン構成は発芽前 *O. sativa* 種子胚部とはサイズの異なることが明らかとなった。

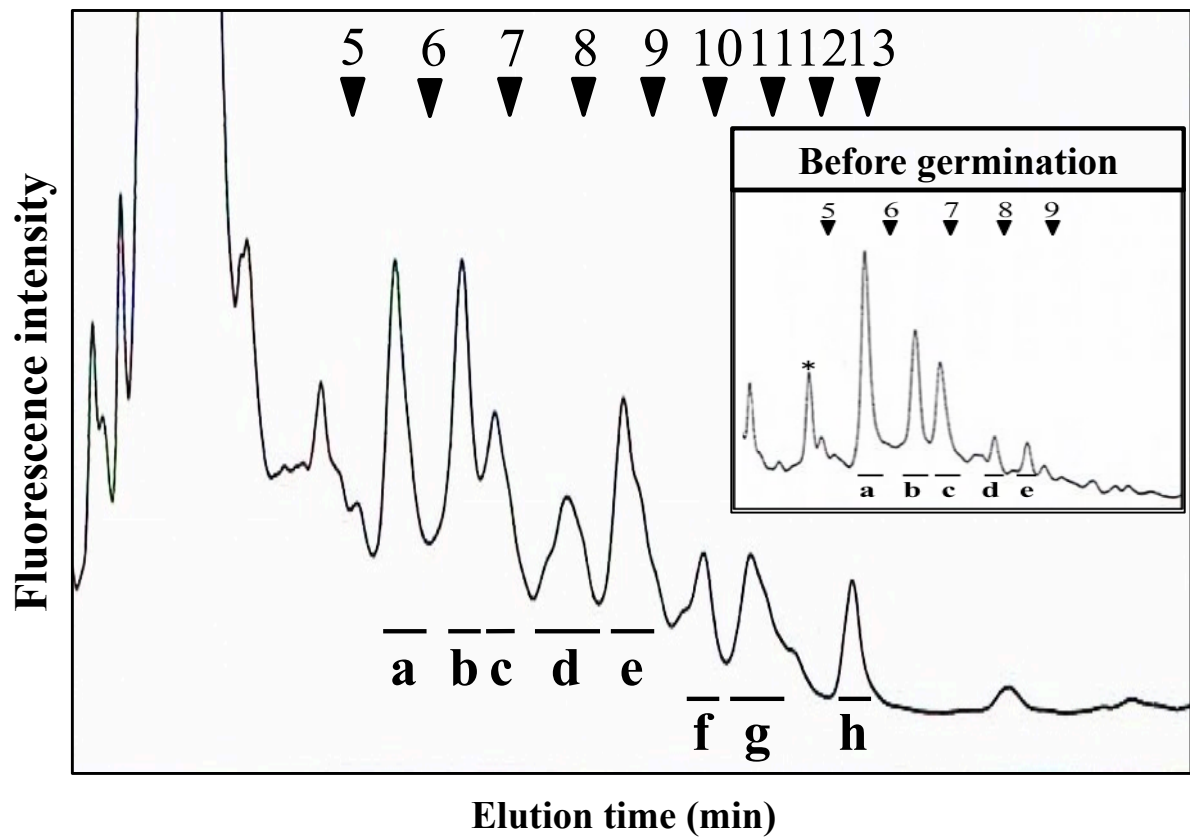


Fig. 2-1. サイズ分画 HPLC による発芽 48 時間後 *O. sativa* 種子胚部の重合度別 *N*-グリカンパターン

番号付き矢印 (▼); PA-イソマルトオリゴ糖の重合度に基づいた溶出位置

2.3.2 逆相 HPLC 分析

Fig. 2-1 から得られた各フラクションを逆相 HPLC に供し、得られた主要フラクションを下線部で示した。逆相 HPLC 分析の結果、フラクション a、e、f、h は 1 本、フラクション b、c、f、h は 2 本、フラクション d、g は 4 本の主要フラクションが検出された (Fig. 2-2-1, 2-2-2)。それぞれのフラクションは溶出順に番号を振分けた。発芽 48 時間後 *O. sativa* 種子胚部では、フラクション d の構造異性体の数が増加し、さらにフラクション f~h の 6 本が主要フラクションとして検出された。このことから、発芽前後の *O. sativa* 種子胚部において糖鎖パターンが劇的に変化したことが明らかとなった。続いて、発芽 48 時間後 *O. sativa* 種子胚部の N-グリカンの構造推定を行うため、長束らの G.U 換算法 (Natsuka and Hase, 1998) を用いてフラクション a1、b1、b2、c2、e1 の G.U を算出した。その結果、発芽 48 時間後 *O. sativa* 種子胚部のフラクション a1、b1、b2、c2、e1 の G.U はそれぞれ発芽前 *O. sativa* 種子胚部の M3X、M3FX、M4X、M5、GN2M3FX と一致した。なお、フラクション c1 については、フラクション b1 (M3FX) とサイズ分画および逆相 HPLC の溶出位置が一致したことから (Fig. 2-3)、フラクション c1 は Fig. 2-1 のサイズ分取時において隣接したフラクション b が混入した結果と判断した。

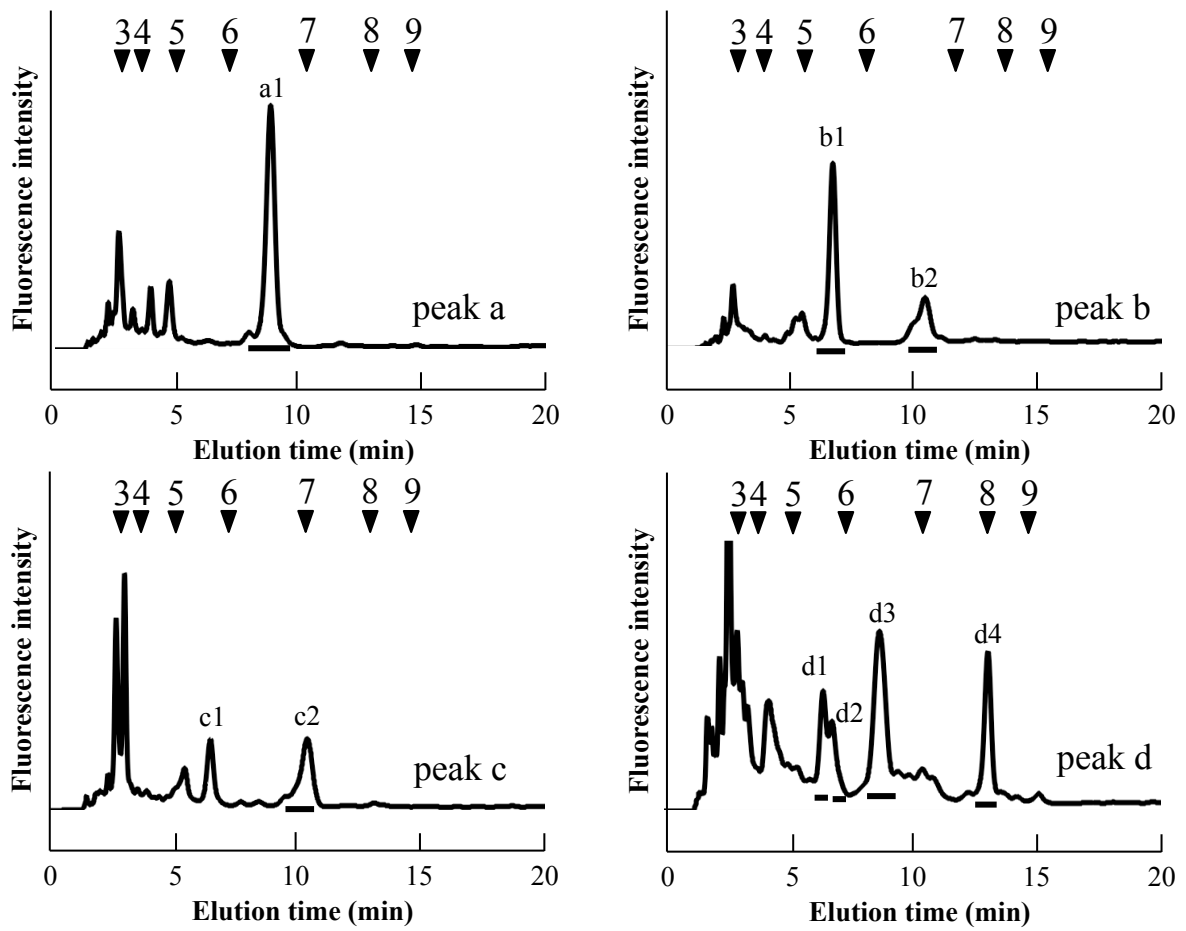


Fig. 2-2-1. 逆相 HPLC による発芽 48 時間後 *O. sativa* 種子胚部の構造特性格 N-グリカンパターン

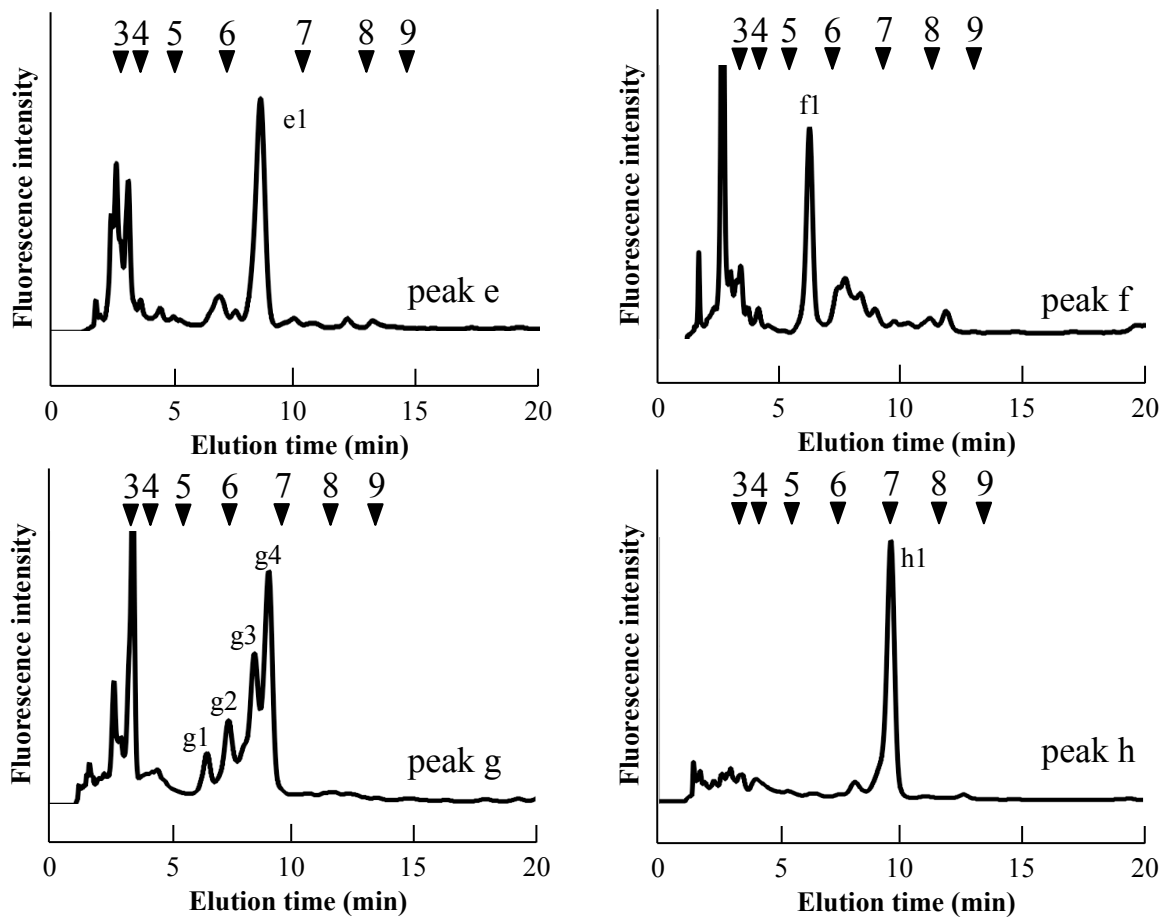


Fig. 2-2-2. 逆相 HPLC による発芽 48 時間後 *O. sativa* 種子胚部の構造特性格 N-グリカンパターン

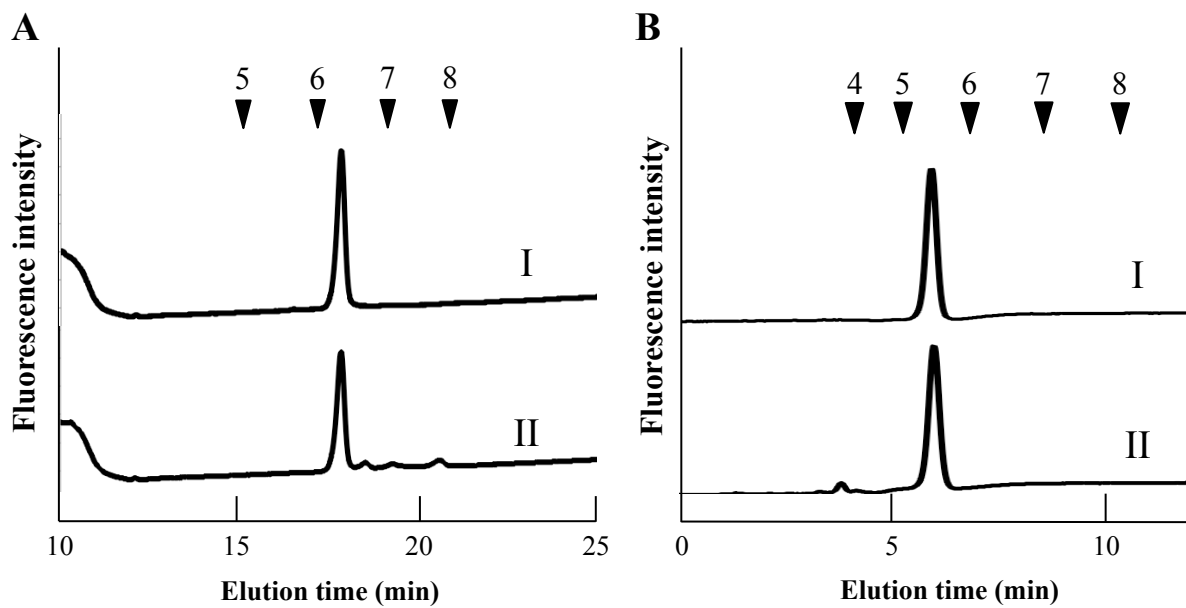


Fig. 2-3. サイズ分画および逆相 HPLC によるフラクション b1 および c1 の溶出位置の比較

A-I, フラクション b1 のサイズ分画 HPLC の結果、A-II, フラクション c1 のサイズ分画 HPLC の結果

B-I, フラクション b1 の逆相 HPLC の結果、B-II, フラクション c1 の逆相 HPLC の結果

2.3.3 質量分析

2.3.2 において発芽前 *O. sativa* 種子胚部由来 *N*-グリカンの G.U と一致しないフラクションが複数存在していたことから、MALDI-TOF/MS を用いた質量分析の結果から構造推定を行った。質量分析の結果を table 2-1 に示す。質量分析の結果、

フラクション d1 は[(Hex)₃(HexNAc)₂(Deoxyhexose)₁(Pent)₁-PA, 1290.17 (Na⁺),

フラクション d2 は[(Hex)₃(HexNAc)₃(Deoxyhexose)₁(Pent)₁-PA, 1493.38 (Na⁺),

フラクション d3 は[(Hex)₃(HexNAc)₃(Deoxyhexose)₁(Pent)₁-PA, 1493.38 (Na⁺), および [(Hex)₃(HexNAc)₂-PA, 1498.30 (Na⁺),

フラクション d4 は[(Hex)₃(HexNAc)₄(Pent)₁-PA, 1550.43 (Na⁺),

フラクション g3 は[(Hex)₄(HexNAc)₄(Deoxyhexose)₂(Pent)₁-PA], 2004.59 (Na⁺),

フラクション g4 は[(Hex)₅(HexNAc)₄(Deoxyhexose)₁(Pent)₁-PA], 2020.87 (Na⁺),

フラクション h1 は[(Hex)₅(HexNAc)₄(Deoxyhexose)₃(Pent)₁-PA], 2313.19 (Na⁺)

に相当する糖組成であることが予測された (Table 2-1)。

Table 2-1. 質量分析による検出値およびその推定構造

Fraction	Mass (observed)	Mass (expected)	Estimated Composition	
d1	1288.58 (Na ⁺)	1290.17 (Na ⁺)	(Hex) ₃ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ (Pent) ₁ -PA	
	1304.42 (K ⁺)	1306.28 (K ⁺)		
d2	1491.28 (Na ⁺)	1493.38 (Na ⁺)	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ (Pent) ₁ -PA	
	1507.31 (K ⁺)	1509.49 (K ⁺)		
d3	1469.18 (H ⁺)	1476.31 (H ⁺)	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (Deoxyhexose) ₁ (Pent) ₁ -PA	
	1491.19 (Na ⁺)	1493.38 (Na ⁺)		
	1474.17 (H ⁺)	1476.31 (H ⁺)		(Hex) ₆ (HexNAc) ₂ -PA
	1496.15 (Na ⁺)	1498.30 (Na ⁺)		
	1512.14 (K ⁺)	1514.41 (K ⁺)		
d4	1528.19 (H ⁺)	1528.44 (H ⁺)	(Hex) ₃ (HexNAc) ₄ (Pent) ₁ -PA	
	1548.14 (Na ⁺)	1550.43 (Na ⁺)		
	1564.03 (K ⁺)	1566.54 (K ⁺)		
g3	2004.47 (Na ⁺)	2004.89 (Na ⁺)	(Hex) ₄ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₂ (Pent) ₁ -PA	
	2019.39 (K ⁺)	2021.00 (K ⁺)		
g4	1998.47 (H ⁺)	1998.88 (H ⁺)	(Hex) ₅ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₁ (Pent) ₁ -PA	
	2019.63 (Na ⁺)	2020.87 (Na ⁺)		
h1	2312.68 (Na ⁺)	2313.19 (Na ⁺)	(Hex) ₅ (HexNAc) ₄ (Deoxyhexose) ₃ (Pent) ₁ -PA	
	2328.65 (K ⁺)	2329.30 (K ⁺)		

2.3.4 フラクシオン d1 の構造解析

質量分析の結果、フラクシオン d1 は 1290.17 (Na^+) の m/z 値が検出されたため、フラクシオン d1 は $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_2(\text{Deoxyhexose})_1(\text{Pent})_1\text{-PA}$ の糖組成を有する M3FX 構造であることが考えられた。従って、サイズ分画および逆相 HPLC 分析から、フラクシオン d1 の G.U の確認を行った。サイズ分画および逆相 HPLC 分析の結果、フラクシオン d1 はサイズ分画 HPLC における G.U が 6.31、逆相 HPLC における G.U が 5.83 であることが確認されたため、フラクシオン d1 は Fig. 2-1 のサイズ分取時においてフラクシオン b1 に由来する M3FX が混入した結果と判断した。

2.3.5 フラクシオン d2 の構造解析

フラクシオン d2 は 1493.38 (Na^+) に相当する m/z 値が検出されたため、フラクシオン d2 は $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_3(\text{Deoxyhexose})_1(\text{Pent})_1\text{-PA}$ の糖組成を有する GNM3FX 構造であることが考えられた。フラクシオン d2 は、非還元末端側に *N*-アセチルヘキソサミン残基が 1 残基と α -マンノースが 2 残基結合した糖鎖構造であることが推測されたので、 β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼおよび α -マンノシダーゼによる酵素消化を行った。ポジティブコントロールは、第 1 章で構造決定した GN2M3FX を用いた。GN2M3FX の β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ消化の結果、G.U が 1.92 前にシフトしたフラクシオンが得られた。用いた β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼは、バイセクティング GlcNAc を除く β GlcNAc 結合に特異性の高い糖加水分解酵素であるため、GN2M3FX の非還元末端側から GlcNAc が 2 残基遊離したことを確認した (Fig. 2-4A-II)。さらに α -マンノシダーゼ消化の結果、G.U が 2.34 前にシフトしたフラクシオンが得られ、 α -マンノースが 2 残基遊離したことを確認した (Fig. 2-4A-III)。これらの結果から β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼおよび α -マンノシダーゼの酵素活性には問題がないことを確認した。ポジティブコントロールの結果を踏まえ、フラクシオン d2 の酵素消化を行った。 β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ消化の結果、G.U が 1.01 前にシフトしたフラクシオンが得られたことから、

フラクション d2 の非還元末端側には GlcNAc が 1 残基結合していることを確認した (Fig. 2-4B-II)。さらに α -マンノシダーゼ消化の結果、G.U が 2.30 前にシフトしたフラクションが得られた事から、 α -マンノースが 2 残基結合していることを確認した (Fig. 2-4B-III)。

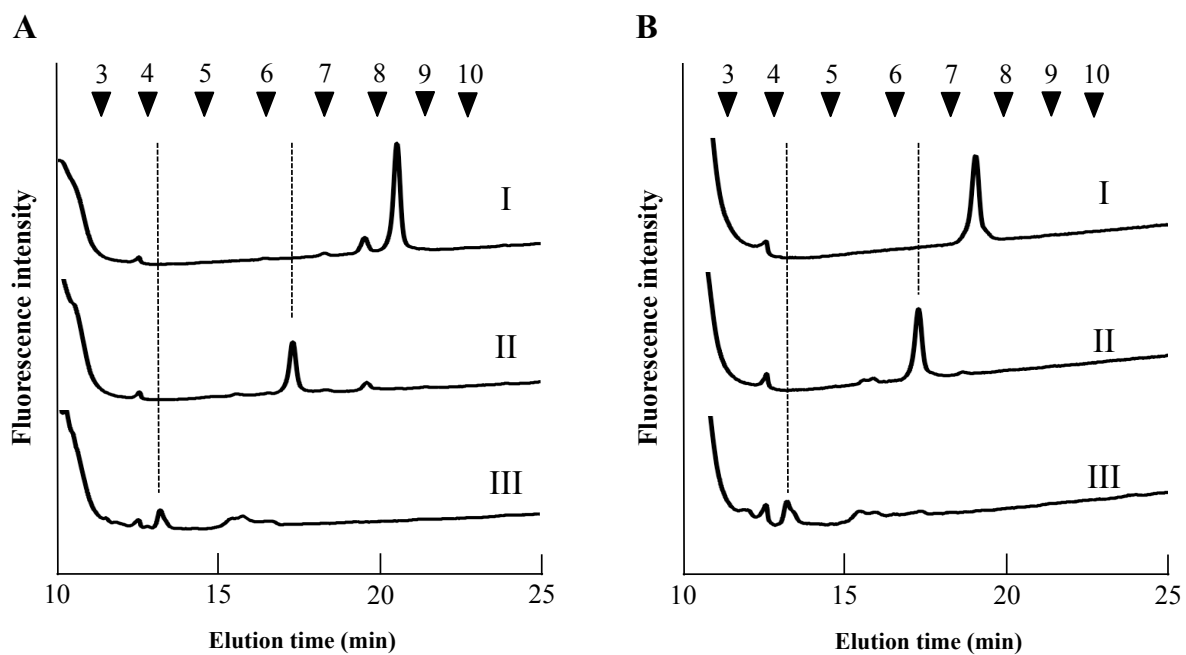


Fig. 2-4. d2 の β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼおよび α -マンノシダーゼ消化産物のサイズ分画 HPLC 結果

A-I, GN2M3FX、A-II, A-I の β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ消化後、A-III, A-II の α -マンノシダーゼ消化後

B-I, d2、B-II, A-I の β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ消化後、B-III, A-II の α -マンノシダーゼ消化後

2.3.6 フラクシオン d3 の構造解析

フラクシオン d3 は 1493.38 (Na⁺)、および 1498.30 (Na⁺)に相当する m/z 値が検出されたため、フラクシオン d3 は少なくとも 2 種類の成分が混合していることが示された (Table 2-1)。 m/z 値から、フラクシオン d3 は (Hex)₃(HexNAc)₃(Deoxyhexose)₁(Pent)₁-PA および (Hex)₃(HexNAc)₂-PA の糖組成を有する GNM3FX 構造および M6 構造であることが推測された。2 種類の m/z 値が検出されたフラクシオン d3 に関して溶出条件を変えて再度サイズ分画 HPLC 分析を行ったところ、2 つの成分を完全分離することができた (Fig. 2-5)。得られたフラクシオンは溶出順にフラクシオン d3-1、d3-2 とし、それぞれの存在比はフラクシオン d3-1 が 48.7%、フラクシオン d3-2 が 51.3%であった。フラクシオン d3-2 は、サイズ分画 HPLC 分析では 7.7、逆相 HPLC 分析では 6.2 の G.U を示し、第 1 章で得られた M6B の G.U と一致したため、フラクシオン d3-2 は、M6B であると判断した。

フラクシオン d3-1 は、 m/z 値から (Hex)₃(HexNAc)₃(Deoxyhexose)₁(Pent)₁-PA の糖組成を有する GNM3FX 構造であることが考えられた。フラクシオン d3-1 は、非還元末端側に *N*-アセチルヘキソサミン残基が 1 残基と α -マンノースが 2 残基結合した糖鎖構造であることが推測されたので、 β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼおよび α -マンノシダーゼによる酵素消化を行った。ポジティブコントロールは、第 1 章で構造決定した GN2M3FX を用いた。GN2M3FX の β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ消化の結果、G.U が 1.93 前にシフトしたフラクシオンが得られ、GN2M3FX の非還元末端側から GlcNAc が 2 残基遊離したことを確認した (Fig. 2-6A-II)。さらに α -マンノシダーゼ消化の結果、G.U が 1.25 および 2.30 前にシフトしたフラクシオンが得られ、 α -マンノースが最大で 2 残基遊離したことが確認された (Fig2-6A-III)。ポジティブコントロールの結果から β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼおよび α -マンノシダーゼの酵素活性には問題がないことを確認した。これらの結果を踏まえ、フラクシオン d3-1 の酵素消化を行った。 β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ消化の結果、G.U が 0.98 前にシフトしたフラクシオンが得られたことから、フラクシオン d3-1 の非還元末端側には GlcNAc が 1 残基結合していることを確認した (Fig.

2-6B-II)。さらに α -マンノシダーゼ消化の結果、G.U が 1.25 および 2.32 前にシフトしたフラクションが得られたことから、フラクション d3-1 には α -マンノースは最大 2 残基結合していることを確認した (Fig. 2-6B-III)。

逆相 HPLC 分析において、トリマンノシルコア構造の α 1,6 アームに GlcNAc が結合した $^{\text{GN}}\text{M3FX}$ 構造は、GN2M3FX 構造よりも溶出位置が早く、トリマンノシルコア構造の α 1,3 アームに GlcNAc が結合した $^{\text{GN}}\text{M3FX}$ 構造は GN2M3FX 構造よりも溶出位置が遅いことが高橋らにより示されている (Takahashi *et al.*, 1986)。この識別方法に基づき、逆相 HPLC の溶出位置の比較によるフラクション d2 および d3-1 の構造決定を行った。逆相 HPLC 分析の結果、それぞれの G.U は GN2M3FX は 6.26、フラクション d2 は 5.49、フラクション d3-1 は 6.34 を示した (Fig. 2-7)。この結果から、フラクション d2 はトリマンノシルコア構造の α 1,6 アームに GlcNAc が結合した $^{\text{GN}}\text{M3FX}$ 構造、フラクション d3-1 はトリマンノシルコア構造の α 1,3 アームに GlcNAc が結合した $^{\text{GN}}\text{M3FX}$ 構造であることが示された。

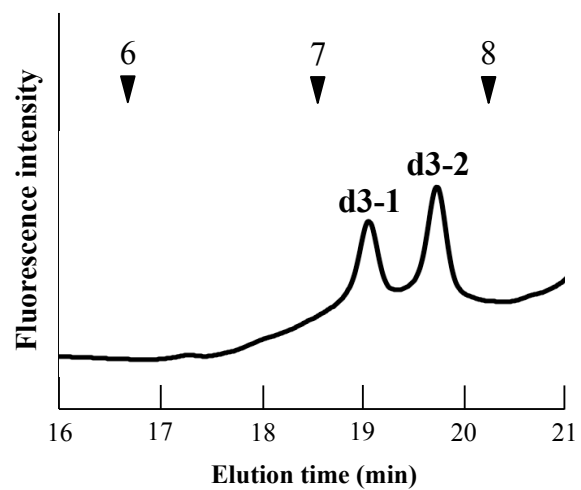


Fig. 2-5. 逆相分取後フラクション d3 の再サイズ分画 HPLC 結果

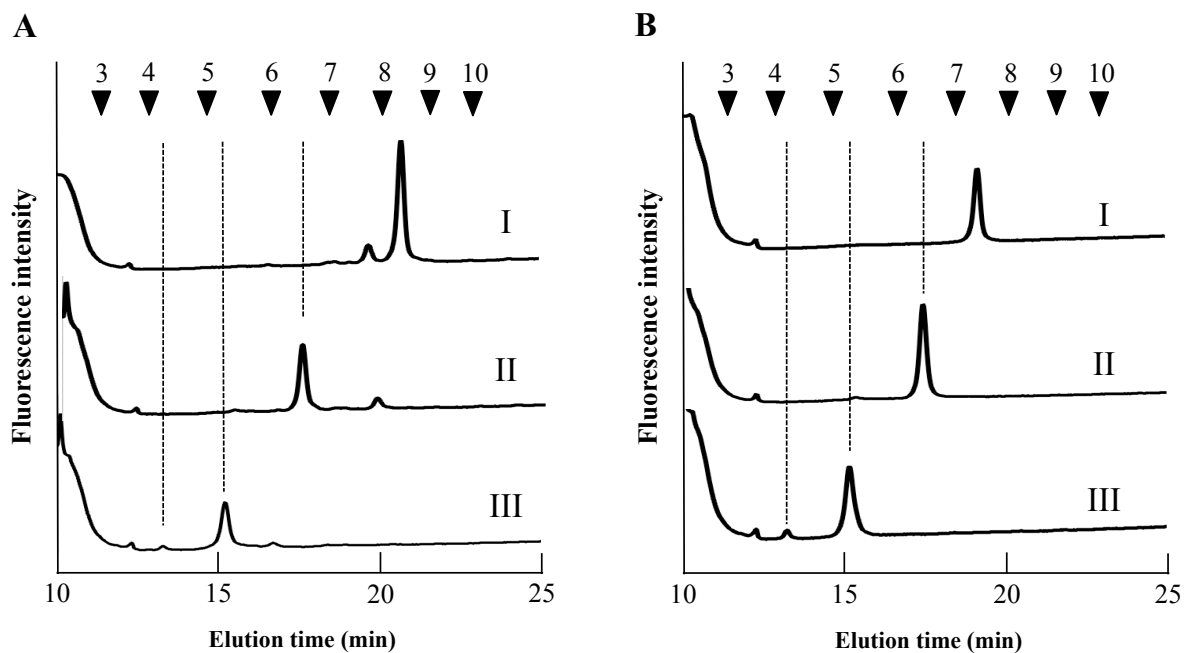


Fig. 2-6. d3-1 の β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼおよび α -マンノシダーゼ消化産物のサイズ分画 HPLC 結果

A-I, GN2M3FX、A-II, A-I の β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ消化後、A-III, A-II の α -マンノシダーゼ消化後

B-I, d3-1、B-II, A-I の β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ消化後、B-III, A-II の α -マンノシダーゼ消化後

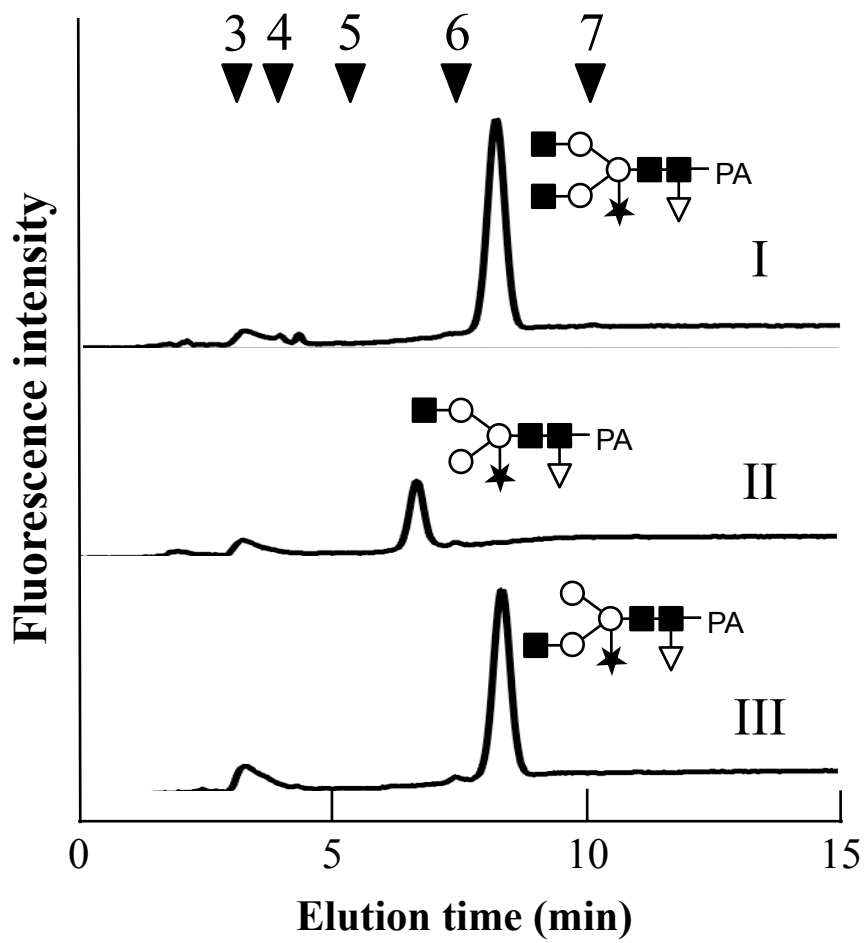


Fig.2-7. 逆相 HPLC による d2 および d3-1 の構造決定

I, GN2M3FX、II, d2、III, d3-1

2.3.7 フラクション d4 の構造解析

フラクション d4 は 1550.43 (Na^+) に相当する m/z 値が検出されたため、フラクション d4 は $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_4(\text{Pent})_1\text{-PA}$ の糖組成を有する GN2M3X 構造であることが考えられた。フラクション d4 は、非還元末端側に *N*-アセチルヘキソサミン残基が 2 残基結合した糖鎖構造であることが推測されたので、 β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼによる酵素消化を行った。ポジティブコントロールは、第 1 章で構造決定した GN2M3FX を用いた。GN2M3FX の β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ消化の結果、G.U が 1.81 前にシフトしたフラクションが得られた。GN2M3FX の非還元末端側から GlcNAc が 2 残基遊離したことを確認した (Fig. 2-8A-II)。これらの結果から β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼの酵素活性には問題がないことを確認した。この結果を踏まえ、フラクション d4 の酵素消化を行った。 β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ消化の結果、G.U が 1.76 前にシフトしたフラクションが得られたことから、フラクション d4 は非還元末端側に GlcNAc が 2 残基結合している構造であることを確認した (Fig. 2-8B-II)。また、 β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ消化後のフラクション d4 の G.U は 5.42 となり、M3X の G.U の 5.38 に近い値を示した (Fig. 2-8B-III)。質量分析および酵素消化の結果、フラクション d4 は M3X 骨格に GlcNAc 2 残基が結合した GN2M3X 構造であることが示された。

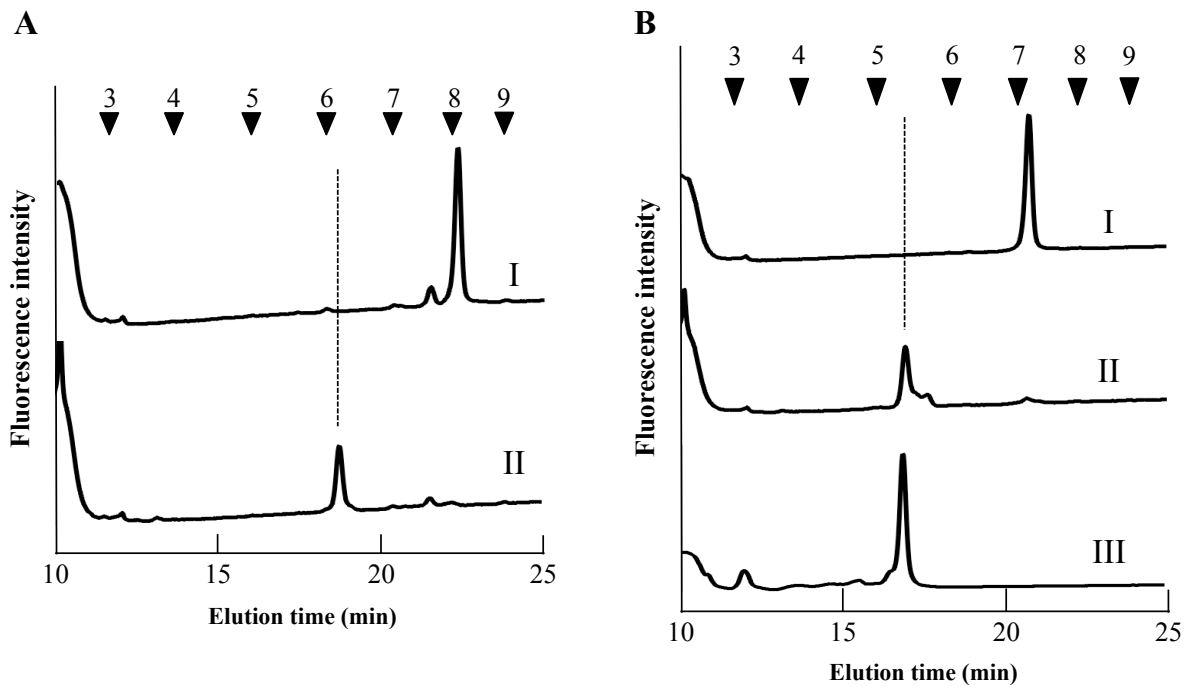


Fig. 2-8. d4 の β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ消化産物のサイズ分画 HPLC 結果

A-I, GN2M3FX、A-II, A-I の β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ消化後

B-I, d4、B-II, A-I の β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ消化後、B-III, M3X

2.3.8 フラクシオン g1 および g2 の構造解析

逆相 HPLC 分析において、フラクシオン g1 およびフラクシオン g2 はそれぞれ糖鎖標準品の M8A、M9A の溶出位置がと一致することを確認した (Fig. 2-9)。溶出位置の比較から、フラクシオン g1 および g2 はハイマンノース型 N-グリカンであることが推測されたため、 α -マンノシダーゼによる構成糖の確認を行った。ポジティブコントロールには糖鎖標準品の M8A を用い、 α -マンノシダーゼは通常 40 倍希釈の濃度を用いた。 α -マンノシダーゼ消化の結果、M8A から α -マンノースが 1~3 残基遊離した M7、M6、M5 のフラクシオンが得られ、それぞれの G.U は 8.70 (M7)、7.74 (M6)、6.81 (M5) であった。これらの存在比は 48% (M7)、17% (M6)、35% (M5) であった (Fig. 2-10A-II)。この結果を踏まえ、フラクシオン g1 の α -マンノシダーゼ消化を行った。その結果、ポジティブコントロールの結果と同様に α -マンノースが 1~3 残基遊離したフラクシオンが 3 本得られ、それぞれの G.U は溶出の遅い順に 8.60、7.65、6.75 を示し、それぞれの存在比は 44%、15%、41% であった。これらの結果はポジティブコントロールの結果と同様であったことから、フラクシオン g1 は M8A であることが示された (Fig. 2-10B-II)。さらに、フラクシオン g2 の α -マンノシダーゼ消化を行ったところ、 α -マンノースが 1~4 残基遊離したフラクシオンが 4 本得られ、それぞれの G.U は溶出の遅い順に 9.44、8.54、7.63、6.73 を示し、存在比はそれぞれ 46%、24%、24%、9% であった (Fig. 2-10C-II)。各フラクシオンの G.U は、 α -マンノシダーゼ消化を行ったフラクシオン g1 由来のものと同様であったため、フラクシオン g2 は M8A に α -マンノースが 1 残基結合した M9A 構造であることが示された。

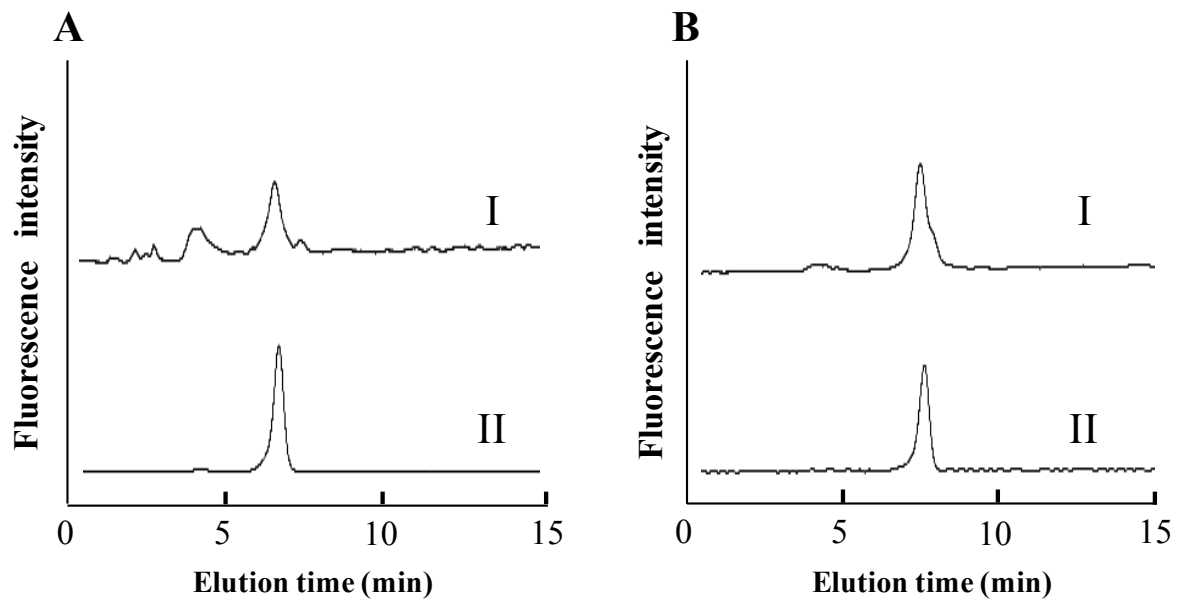


Fig. 2-9. 逆相 HPLC を用いたフラクション g1 およびフラクション g2 の溶出位置の確認

A-I, g1, A-II, M8A

B-I, g2, B-II, M9A

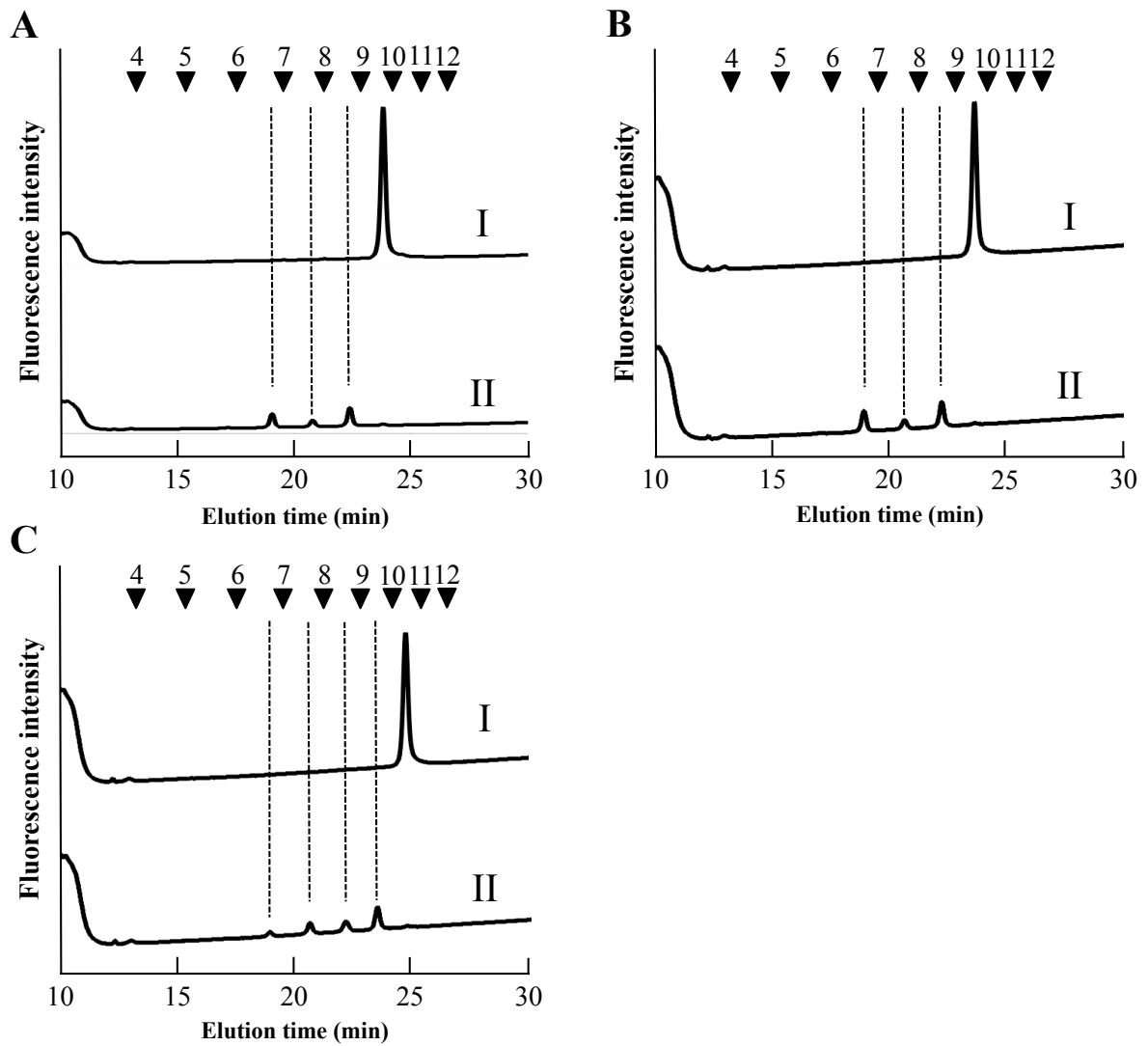


Fig. 2-10. g1 および g2 の α -マンノシダーゼ消化産物のサイズ分画 HPLC 結果

A-I, M8A、A-II, A-I の α -マンノシダーゼ消化後

B-I, g1、B-II, B-I の α -マンノシダーゼ消化後

C-I, g2、C-II, C-I の α -マンノシダーゼ消化後

2.3.9 フラクション f1 の構造解析

逆相 HPLC 分析において、フラクション f1 の G.U とフラクション g1 (M8A) の G.U が 5.68 と一致していたため (Fig. 2-2-2)、フラクション f1 の α -マンノシダーゼ消化を行い、その糖組成の確認を行った。 α -マンノシダーゼ消化の結果、フラクション f1 の G.U からそれぞれ 2.88、3.84 前にシフトしたフラクションが 2 本得られた (Fig. 2-11-II)。この G.U のシフトは、2.3.8 のフラクション g1 (M8A) の α -マンノシダーゼ消化の場合と同様であったため、Fig. 2-11-II で得られた 2 本のフラクションはフラクション f1 から α -マンノースが 3~4 残基遊離した M5 および M4 であることが示された。これら結果から、フラクション f1 はサイズ分画 HPLC 分取において隣接するフラクション g1 が混入した結果だと判断した。

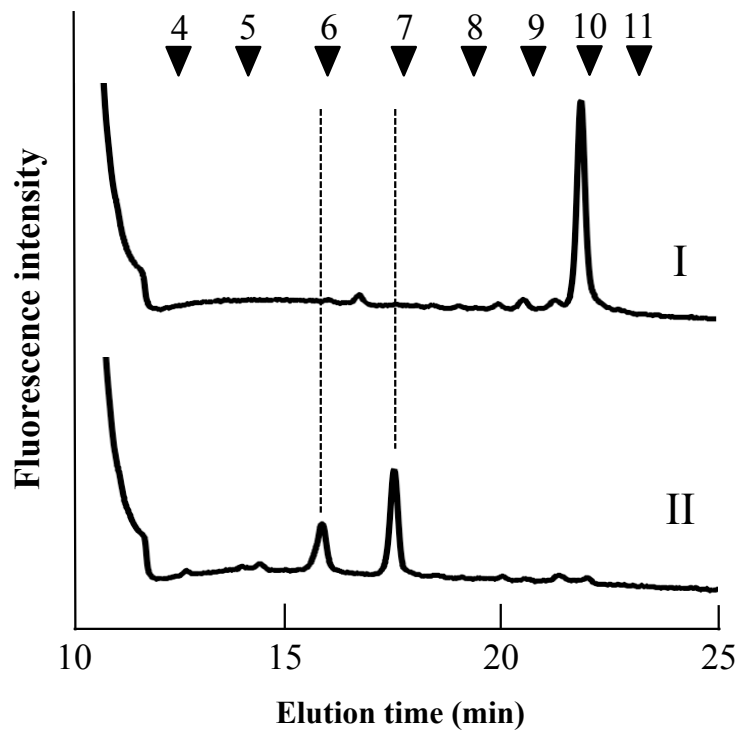


Fig. 2-11. f1 の α -マンノシダーゼ消化産物のサイズ分画 HPLC 結果

I, f1、II, I の α -マンノシダーゼ消化後

2.3.10 フラクシオン g3, g4 および h1 の構造解析

質量分析の結果、フラクシオン g3 は 2004.59 (Na⁺)、フラクシオン g4 は 2020.87 (Na⁺)、フラクシオン h1 は 2313.19 (Na⁺) に相当する *m/z* 値が検出された。これらの *m/z* 値から、フラクシオン g3 は (Hex)₄(HexNAc)₄(Deoxyhexose)₂(Pent)₁-PA、フラクシオン g4 は (Hex)₅(HexNAc)₄(Deoxyhexose)₁(Pent)₁-PA、フラクシオン h1 は (Hex)₅(HexNAc)₄(Deoxyhexose)₃(Pent)₁-PA の糖組成を有する構造であることが推測された (Table 2-1)。複数のデオキシヘキソース (フコース) を有する組成であることから、いずれのフラクシオンも非還元末端側にルイス a 構造を持つことが予想されたため、 α 1,3 フコースおよび α 1,4 フコースを加水分解する α 1,3/4-L-フコシダーゼおよび I 型糖鎖構造 (Gal β 1,3GlcNAc) を加水分解するラクト-N-ビオシダーゼを用いた 2 段階酵素消化による構造決定を行った。ポジティブコントロールはラクト-N-フコペンタオース II (Gal β 1,3 (Fuc α 1,4)GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc-PA, タカラ PA-Sugar Chain 044) を用いた。酵素消化の結果、 α 1,3/4-L-フコシダーゼ消化によりラクト-N-フコペンタオース II からフコース 1 残基 (G.U = 0.88) が遊離し (Fig. 2-12A-II)、さらにラクト-N-ビオシダーゼ消化により Gal β 1,3GlcNAc 2 残基 (G.U = 2.02) が遊離したことを確認した (Fig. 2-12A-III)。ポジティブコントロールの結果から α 1,3/4-L-フコシダーゼおよびラクト-N-ビオシダーゼの酵素活性には問題がないことを確認した。この結果を踏まえ、フラクシオン g3、フラクシオン g4、フラクシオン h1 の酵素消化を行った。

α 1,3/4-L-フコシダーゼ消化の結果、フラクシオン g3 は G.U が 0.90 前にフラクシオンがシフトしたことから (Fig. 2-12B-II)、フラクシオン g3 は非還元末端側にフコース 1 残基が結合していることを確認した。このとき α 1,3/4-L-フコシダーゼにより消化された構造は 34%であった。さらに、ラクト-N-ビオシダーゼ消化により、フラクシオン g3 は G.U が 1.73 前にフラクシオンがシフトしたことから (Fig. 2-12B-III)、非還元末端側に Gal β 1,3GlcNAc 2 残基が結合していることを確認した。このときラクト-N-ビオシダーゼ

により消化された構造は 13.3%であった。質量分析および酵素消化の結果を踏まえ、フラクション g3 は非還元末端側に $\text{Fuc}\alpha 1,4\text{Gal}\beta 1,3\text{GlcNAc}$ の 3 残基を有する Gal1F1GN2M3FX であることが明らかとなった。

続いて、フラクション g4 の $\alpha 1,3/4\text{-L-}$ フコシダーゼ消化の結果、フラクション g4 は G.U が 0.99 前にフラクションがシフトした事から (Fig. 2-12C-II)、フラクション g4 は非還元末端側にフコース 1 残基が結合していることを確認した。フコース消化を行ったフラクション g4 は、さらにラクト-N-ビオシダーゼ消化により、G.U が 1.71 前にシフトした (Fig. 2-12C-III)。またこのとき、フコース未消化のフラクション g4 (G.U = 9.53) よりも G.U が 1.84 前にシフトしたフラクションも 2.6%の存在比で確認された事から (Fig. 2-12C-III)、フラクション g4 は非還元末端側にフコースが結合した $\text{Gal}\beta 1,3\text{GlcNAc}$ およびフコースが結合していない $\text{Gal}\beta 1,3\text{GlcNAc}$ 残基を有することが示された。質量分析および酵素消化の結果を踏まえ、フラクション g4 は分岐鎖の非還元末端側に $\text{Gal}\beta 1,3(\text{Fuc}\alpha 1,4)\text{GlcNAc}$ および $\text{Gal}\beta 1,3\text{GlcNAc}$ を有する Gal2F1GN2M3X であることが明らかとなった。

続いて、フラクション h1 の $\alpha 1,3/4\text{-L-}$ フコシダーゼ消化の結果、フラクション g4 は G.U が 0.97 および 1.88 前にフラクションがシフトした事から (Fig. 2-12D-II)、フラクション h1 は非還元末端側にフコース 2 残基が結合していることを確認した。さらにラクト-N-ビオシダーゼ消化により、G.U が 8.47、7.67、5.96 の新たなフラクションが出現した。これらのフラクションはそれぞれフコース 1 残基付き h1 から $\text{Gal}\beta 1,3\text{GlcNAc}$ が遊離した N-グリカン、フコース未結合の h1 から $\text{Gal}\beta 1,3\text{GlcNAc}$ 1 ユニットが遊離した N-グリカン、フコース未結合の h1 から $\text{Gal}\beta 1,3\text{GlcNAc}$ が 2 ユニット遊離した N-グリカンであることが考えられた。本酵素条件では、フコース未結合の h1 から $\text{Gal}\beta 1,3\text{GlcNAc}$ 1 ユニットが遊離した N-グリカン構造が最も生成されやすいということが示された。これらの解析結果を踏まえ、フラクション h1 は分岐鎖の非還元末端側に $\text{Gal}\beta 1,3(\text{Fuc}\alpha 1,4)\text{GlcNAc}$ を 2 ユニット有する Gal2F2GN2M3FX であることが明らかとなった。

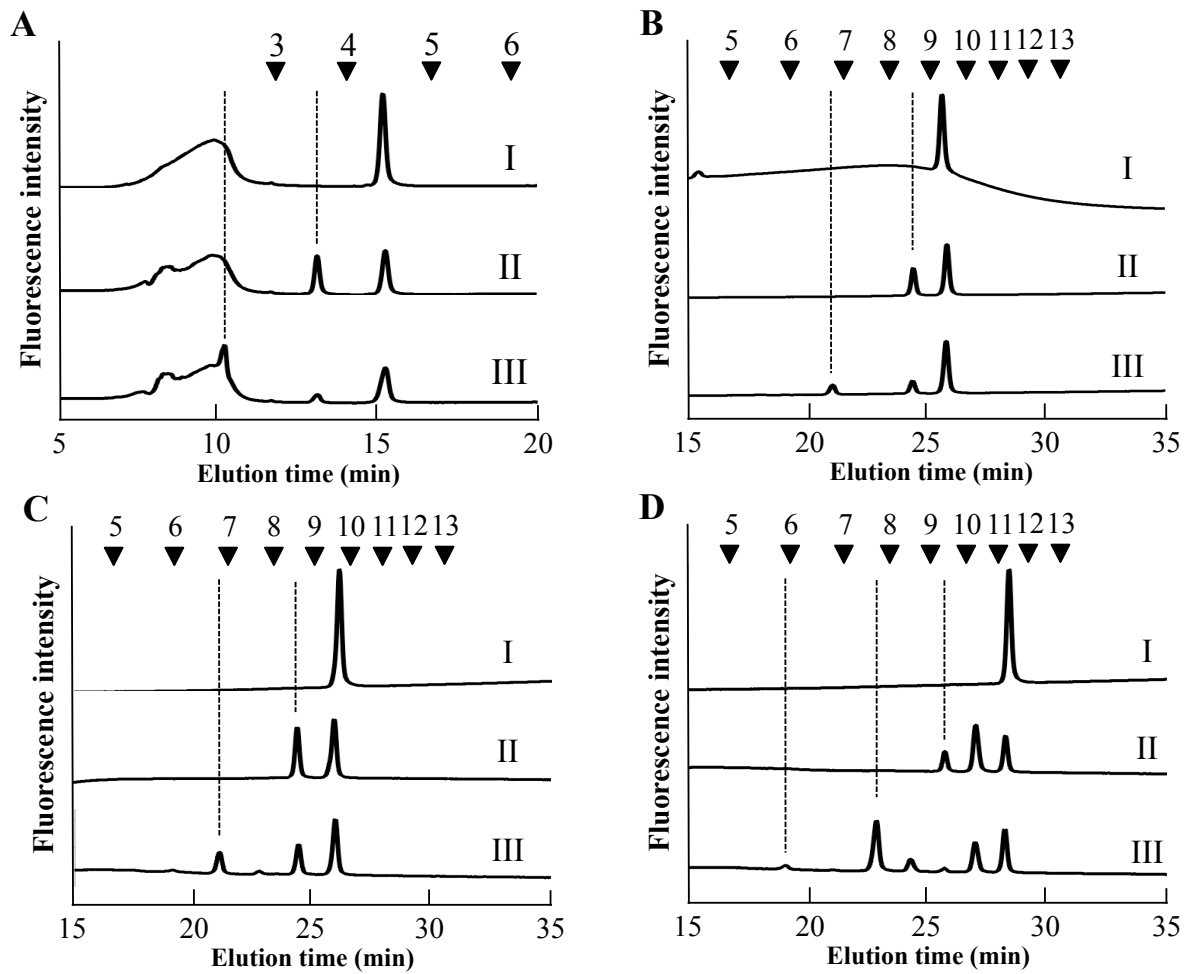


Fig. 2-12. g3, g4 および h1 の α 1,3/4-L-フコシダーゼおよびラクト-N-ビオシダーゼ消化産物のサイズ分画 HPLC 結果

A-I, ラクト-N-フコペンタオース II、A-II, A-I の α 1,3/4-L-フコシダーゼ消化後、A-III, A-II のラクト-N-ビオシダーゼ消化後

B-I, g3、B-II, B-I の α 1,3/4-L-フコシダーゼ消化後、B-III, B-II のラクト-N-ビオシダーゼ消化後

C-I, g4、C-II, C-I の α 1,3/4-L-フコシダーゼ消化後、C-III, C-II のラクト-N-ビオシダーゼ消化後

D-I, h1、D-II, D-I の α 1,3/4-L-フコシダーゼ消化後、D-III, D-II のラクト-N-ビオシダーゼ消化後

2.3.11 発芽 48 時間後 *O. sativa* 種子胚部に存在する *N*-グリカンについて

構造解析の結果、発芽 48 時間後 *O. sativa* 種子胚部から得られた *N*-グリカン構造、存在比(%）、2次元糖鎖マッピングにおける溶出位置のそれぞれを Table 2-2 に示した。これらの結果から、発芽 48 時間後の *O. sativa* 種子胚部には 14 種類の *N*-グリカンが含まれていることが初めて明らかとなった。発芽 48 時間後の *O. sativa* 種子胚部において全体の 10%以上の割合を示した *N*-グリカンは、M3X (17.9%)、M3FX (15.3%)、GN2M3FX (14.8%)であった。また、5%以上の割合を示した *N*-グリカンは、Gal2F2GN2M3FX (9.6%)、Gal2F1GN2M3FX (6.3%)、M8A (5.8%)、M4X (5.5%)、M5A (5.2%)、Gal1F1GN2M3X (5.2%)であった。上記の *N*-グリカンを構造特徴別に分類すると、発芽 48 時間後の *O. sativa* 種子胚部の *N*-グリカンは、パウチマンノース型 38.7%、複合型 44.0%、ハイマンノース型 17.3%で構成されていた。複合型 *N*-グリカン 44.0%のうち、ルイス a 構造を 1 つあるいは 2 つ持つ *N*-グリカンは 21.1%と複合型 *N*-グリカンの半数を占めていた。これまでにルイス a 構造を有する *N*-グリカン構造は基本的に分泌タンパク質に結合し、その *N*-グリカン構造は植物細胞表面に存在する事から、ルイス a 構造付き複合型 *N*-グリカンは細胞間相互作用に関与することが示唆されている (Fitchette-Laine *et al.*, 1997, Fitchette-Laine *et al.*, 1999)。この事から、発芽後 *O. sativa* 種子胚部の複合型 *N*-グリカンは分泌型タンパク質に結合した形で存在し、分化や生長などの劇的な細胞環境の変化に伴う細胞間あるいは関連する分子間相互作用に関与していることが考えられた。また、複合型 *N*-グリカンの半数が非還元末端側の GlcNAc にガラクトースやフコースの付加を受けていた事は、外的ストレスに対する防御機構の 1 つである事が考えられる。例えば、アブラナ科の黒腐病を引き起こす原因と考えられている植物病原菌 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* が GlcNAc を利用して植物に感染する事が報告されており、*X. campestris* pv. *campestris* はパウチマンノース型 *N*-グリカンの主な構成糖である α 1,3 フコースや β 1,2 キシロース、 α -マンノースや β -マンノースの加水分解酵素も保有する可能性が高い事が報告されている (Boulangier *et al.*, 2014, Dupoirion *et al.*, 2015)。しかしながら、

M1 構造にコア α 1,3 フコースが結合した *N*-グリカン構造に対する *X. campestris* pv. *campestris* 由来 α 1,3 フコシダーゼ活性は低い事が示されている (Dupouiron *et al.*, 2015)。この事から、非還元末端側 GlcNAc へのガラクトースキャッピングおよび還元末端側 GlcNAc への α 1,3 フコースキャッピングは、*N*-グリカン構成糖を資化する他の生物に対する防御機構の 1 つである事が考えられた。

また、還元末端側の GlcNAc への α 1,3 フコースとトリマンノシルコア構造への β 1,2 キシロース付加を有する *N*-グリカンは全体の 50%、トリマンノシルコア構造に β 1,2 キシロースのみが結合した *N*-グリカンは全体の 32.7%を占めていた (Fig. 2-13)。しかし、複合型 *N*-グリカンの中で還元末端側の GlcNAc に α 1,3 フコースのみが結合した構造は検出されなかった。発芽前後の *O. sativa* 種子胚部において複合型 *N*-グリカンの割合の 7.2% (発芽前) から 44.0% (発芽後) と *N*-グリカン構成がパウチマンノース型主体から複合型主体へと劇的に変化したことが明らかとなった。第 1 章でも述べたように複合型 *N*-グリカン生合成の初期段階に必要とされる GlcNAc 付加は植物の生長において重要な役割を果たしている事から、複合型 *N*-グリカンの存在は *O. sativa* の発芽初期段階における発芽誘導に重要なトリガーとしての役割を果たしている事が考えられた。

トリマンノシルコア構造に注目すると、 β 1,2 キシロースが付加した構造は発芽前と同様に全糖鎖の約 8 割を占めることが明らかとなった。このことから、発芽前後の *O. sativa* 種子胚部では、 β 1,2 キシロース付き糖鎖は周囲の環境変化に対応するタンパク質の機能の最適化などに関与することが示唆された。さらに、トリマンノシルコア構造に α 1,3 フコースが付加した構造は全 *N*-グリカンの 50%と、発芽前から大幅に増加したことが明らかとなり、このような種子胚部の発芽に伴う α 1,3 フコースが付加した糖鎖構造の増加は、植物において初めて見出された。フコース付加に関与するフコース転移酵素

(Fucosyltransferase, FUT) は、動植物で少なくとも 13 種類存在しており、このうち FUT11、FUT12、FUT13 は *A. thaliana* において発現が確認されている (Wilson *et al.*, 2001b, Strasser *et al.*, 2004)。動物細胞において、FUT は血液型抗原の合成や癌細胞の増殖への関与など

様々な発生過程において重要な役割を果たしていることが知られている (Kizuka and Taniguchi, 2016)。さらに、 α 1,3 フコース付加は動物や植物において外敵の侵入を防ぐ役割があると一般的に考えられていることから、発芽後イネ種子胚部における α 1,3 フコースの急激な増加も、極めて脆弱な発芽初期のイネにおいて、微生物やウイルスなどの攻撃による外的ストレスに対して対応した結果であることが考えられた。また、フコースの付加はグアノシン二リン酸 (GDP) -フコースを必要とし、その代謝経路は GDP-マンノースを初発糖ヌクレオチドとして生成される事から、 β 1,2 キシロース付加のための UDP-キシロースの代謝経路とは厳密に分けられている。このように植物 N-グリカン特徴的な構成糖が互いに独立した代謝経路から生成される事は、糖鎖抗原性の維持のためのリスク回避や糖ヌクレオチド供給源の確保ための植物の生存戦略の 1 つに関与していることが考えられた。

植物の生長における表現型の経時変化と N-グリカン構成の挙動の関連性については Kimura らによるイチョウ種子を用いた報告がある。この報告によると、種子成熟初期段階のイチョウではパウチマンノース型 N-グリカンが 6 割、複合型 N-グリカンが 4 割の割合で存在していたが、種子の成熟度が増すにつれて複合型糖鎖の割合が減少し、成熟後期においては全体の 9 割がパウチマンノース型であったことが示されている (Kimura and Matsuo, 2000a)。本章の N-グリカン構造解析結果と Kimura らの報告から、種子植物の N-グリカン構造の変動は種子形成時には複合型からパウチマンノース型へ移行し、種子保存時にはパウチマンノース型 N-グリカンを主体とする比較的シンプルな少数の主要 N-グリカンへ集約されることが考えられた。また発芽時の種子の N-グリカン構造は再び複雑な構造へと移行するとともに、結合するタンパク質群の発現に伴い多様性が増加することが考えられた。このような N-グリカン構造の多様性の差は関連する N-グリカンプロセシング酵素の発現条件により生じる事から (Yoo *et al.*, 2015)、発芽前後の *O. sativa* 種子胚部における N-グリカンの構造多様性の差もまた、発芽前後における N-グリカンプロセシング酵素の発現の差を反映している事が示された。

さらに、発芽前後の *O. sativa* 種子胚部の *N*-グリカン構造解析を行った結果、検出された構造の量的観点から、発芽前と発芽後の種子胚部における *N*-グリカン生合成経路の考察を行った (Fig. 2-14)。まず、第 1 章の *N*-グリカン構造解析から、発芽前 *O. sativa* 種子胚部では、パウチマンノース型 *N*-グリカンを主要 *N*-グリカンとする *N*-グリカン構成であったことから、種子形成期の *O. sativa* 種子胚部では α 1,3 フコースや β 1,2 キシロース付加が行われると予想されるメディアルゴルジからトランスゴルジにおける生合成経路が活性化していることが示された (Fig. 2-14、青枠)。次に、第 2 章の *N*-グリカン構造解析から発芽後の *O. sativa* 種子胚部では、複合型 *N*-グリカンを中心とした *N*-グリカン構成であったことから、発芽誘導初期の *O. sativa* 種子胚部では *N*-グリカンの非還元末端側に GlcNAc やガラクトース、フコースの付加が行われると予想されるトランスゴルジにおける生合成経路が活性化し、種子形成期に *O. sativa* 種子胚部に蓄積・保存されていた *N*-グリカンを利用して複合型 *N*-グリカンを合成していることが考えられた (Fig. 2-14、赤枠)。

以上の結果から、発芽前後の *O. sativa* 種子胚部において *N*-グリカン構成が劇的に変化していることが初めて明らかとなった。このことから、*O. sativa* 種子の発芽にともない、「種子の保存」のための糖鎖生合成機構から「生長や発達」のための糖鎖生合成機構へ移行したことが示唆された。

Table 2-2. 発芽 48 時間後 *O. sativa* 種子胚部の *N*-グリカン構造およびその存在比

Fraction	Structure	Abbreviation	Ratio (%)	Glucose Units	
				Size	ODS
a1	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Xyl}\beta 1 \end{array}$	M3X	17.9	5.33	6.72
b1	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Xyl}\beta 1 \quad \text{Fuca}1 \end{array}$	M3FX	15.3	6.31	5.33
b2	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Xyl}\beta 1 \end{array}$	M4X	5.5	6.16	6.95
c1	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \end{array}$	M5A	5.2	6.77	6.76
d2	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Xyl}\beta 1 \quad \text{Fuca}1 \end{array}$	^{GN}M3FX	2.0	7.30	5.54
d3-1	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Xyl}\beta 1 \quad \text{Fuca}1 \end{array}$	^{GN}M3FX	3.1	7.30	6.27
d3-2	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \end{array}$	M6B	3.3	7.70	6.21
d4	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Xyl}\beta 1 \end{array}$	GN2M3X	3.0	7.40	7.79
e1	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Xyl}\beta 1 \quad \text{Fuca}1 \end{array}$	GN2M3FX	14.8	8.16	6.25
f1 and g1	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \end{array}$	M8A	5.8	9.74	5.60
g2	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \end{array}$	M9A	3.0	10.47	5.98
g3	$\begin{array}{c} \text{Fuca}1-4 \left[\begin{array}{l} \text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Xyl}\beta 1 \quad \text{Fuca}1 \end{array} \right. \end{array}$	Gal1F1GN2M3FX	5.2	9.36	6.46
g4	$\begin{array}{c} \text{Fuca}1-4 \left[\begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Xyl}\beta 1 \end{array} \right. \end{array}$	Gal2F1GN2M3X	6.3	9.65	6.73
h1	$\begin{array}{c} \text{Fuca}1 \begin{array}{l} \diagup 4 \\ \diagdown 1 \end{array} \left[\begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \diagdown 3 \end{array} \text{Xyl}\beta 1 \quad \text{Fuca}1 \end{array} \right. \end{array}$	Gal2F2GN2M3FX	9.6	11.35	6.96

パーセンテージは、発芽 48 時間後 *O. sativa* 種子胚部由来主要 *N*-グリカンの全量を 100% としたときの各 *N*-グリカンの相対比を示した。

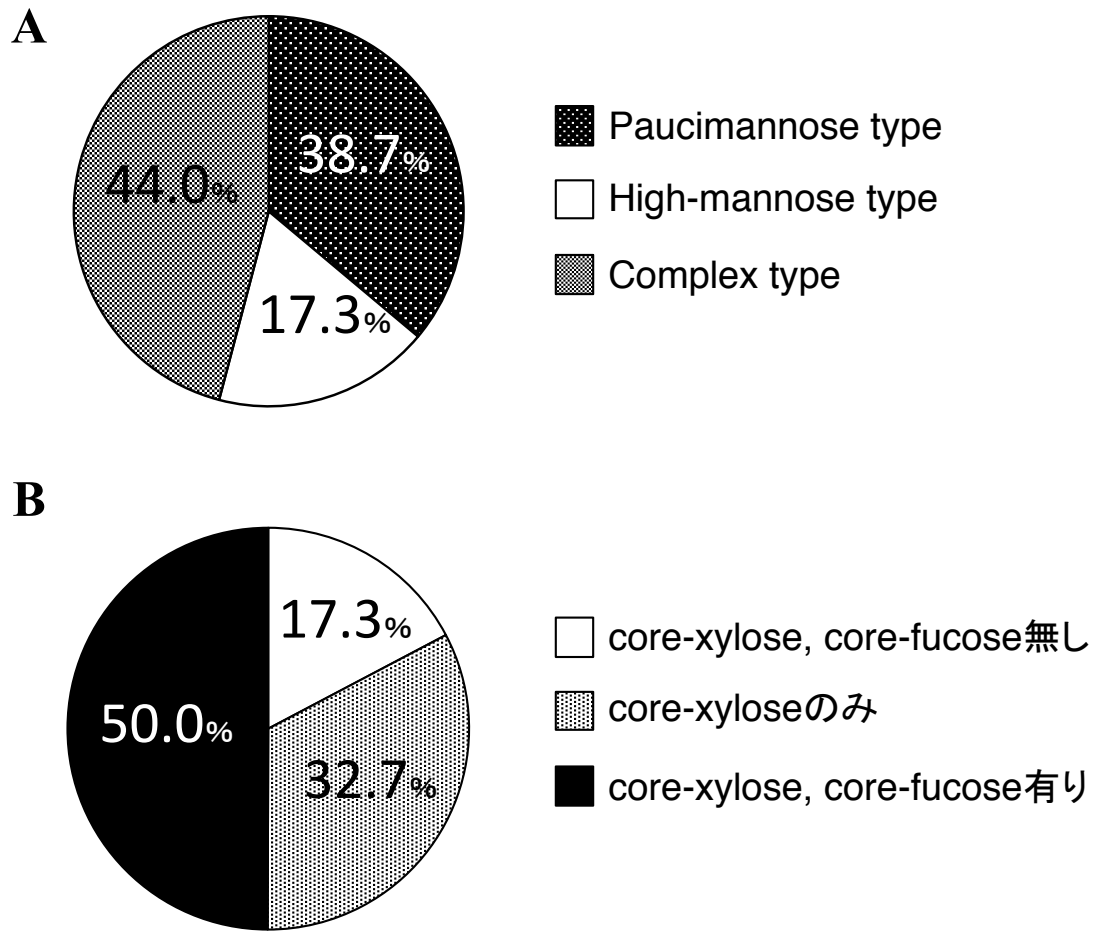


Fig. 2-13. 構造別 *N*-グリカン構成

A, 構造カテゴリー別

B, トリマンノシルコア構造への α 1,3 フコースおよび β 1,2 キシロース付加の有無別

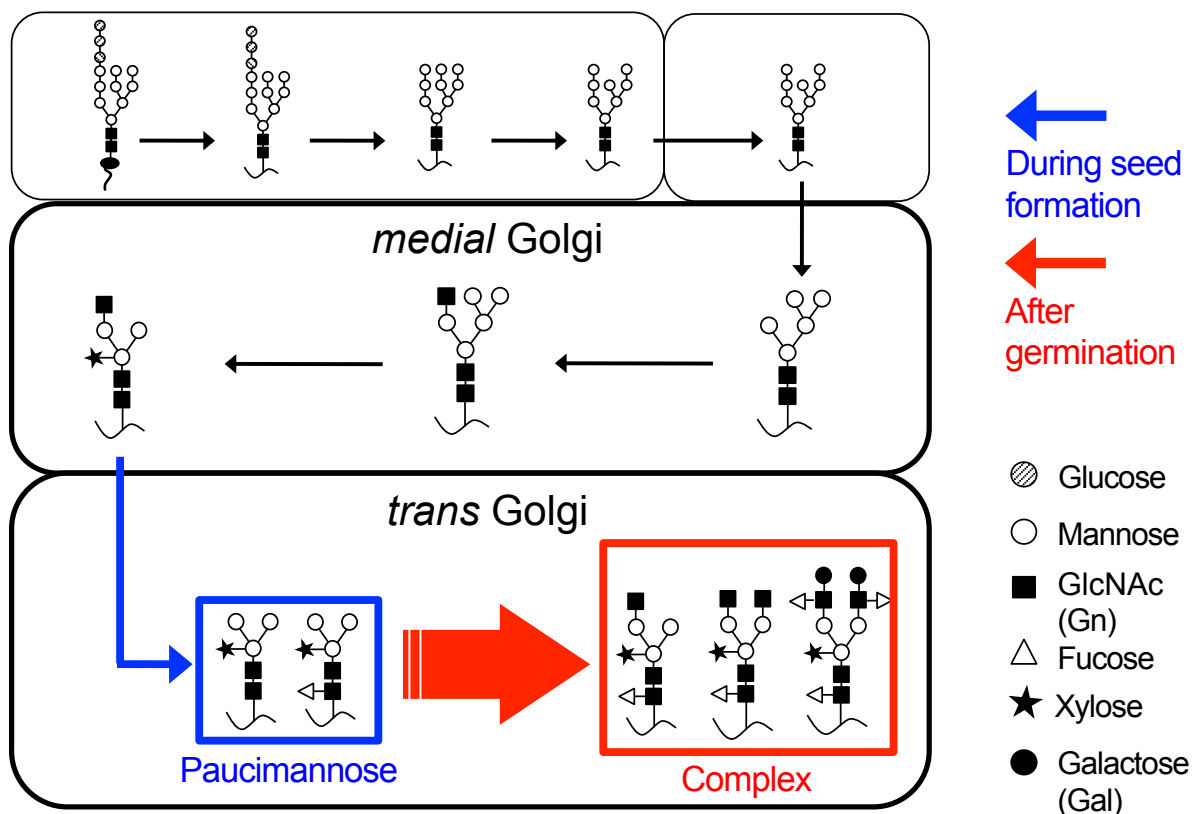


Fig. 2-14. 発芽前後の *O. sativa* 種子胚部における *N*-グリカン生合成経路

第3章 発芽120時間後の *O. sativa* 生長部位における グライコーム解析

3.1 緒言

第1章および第2章で行った研究において、発芽前後 *O. sativa* 種子胚部における主要な *N*-グリカン構成はパウチマンノース型から複合型へ推移したことから、発芽前後の *O. sativa* 種子胚部において *N*-グリカン構成が劇的に変化していることが明らかとなった。この結果から、パウチマンノース型 *N*-グリカンは種子形成とその後の種子保存の過程において、また複合型 *N*-グリカンは *O. sativa* の発芽誘導やその後の生長・発達において重要な役割を果たしていることが示唆された。先行研究において、*N*-グリカン関連糖転移酵素および糖加水分解酵素を欠損させた植物では芽や根の伸長阻害 (Liebminger *et al.*, 2009) や種子形成不全 (Fanata *et al.*, 2013) が引き起こされる事や、塩ストレス (Kang *et al.*, 2008) や温度ストレス (Takano *et al.*, 2015) に対する感受性が高くなるなど、正常な *N*-グリカン生合成が行われないことにより植物の生長や発達に大きな影響を及ぼしている可能性が高いことが示されている。しかしながら、*N*-グリカンの構造やその詳細な発現量の解析についての研究は少なく、*N*-グリカン構造やその構成比が様々なストレス条件下でどのように変動しているのか明らかにされていないのが現状である。そこで、本研究では分化誘導させた *O. sativa* の芽部および根部の *N*-グリカン構造解析を行い、芽部と根部の分化に伴う *N*-グリカンの挙動を調べるとともに、植物の生長に重要な要素の1つである明暗条件が *N*-グリカン生合成経路に与える影響を調べるため、日照条件の異なる *O. sativa* の芽部および根部の *N*-グリカン構造解析も行うこととした。

3.2 実験方法

3.2.1 実験材料

本研究には、茨城県つくば市産のコシヒカリ (2010 年産)を用いた。まずシャーレに水道水を張り (水深 7 mm)、*O. sativa* 種子を浸水させた。次に暗所(30°C)にて 48 時間のインキュベーションを行った後、明所 (30°C) にて 72 時間のインキュベーションを行い、芽部(第 2 葉展開初期)と根部へ発芽・成長させた。成長後の各部位は凍結乾燥させ、全て乳棒と乳鉢で細かくすり潰した。その後、再び凍結乾燥機にかけ、-30°Cにて密封保存した。

3.2.2 ピリジルアミノ化 *N*-グリカンの調製

N-グリカンの調製は、1.2.2 に示した通りに行った。

3.2.3 サイズ分画 HPLC 分析

サイズ分画 HPLC は、1.2.3 に示した通りに行った。

3.2.4 逆相 HPLC 分析

逆相 HPLC は、1.2.4 に示した通りに行った。

3.2.5 質量分析

試料の調製およびその質量分析は、1.2.5 に示した通りに行った。質量分析装置は AXIMA[®] Resonance を用いた。

3.2.6 酵素消化

各グリコシダーゼの基質特異性、および反応条件は「本論で扱った試薬」に記載した。酵素反応の停止は、全て 98°Cで 5 分間反応液を加熱処理することにより行った。

本章で用いた糖加水分解酵素は以下に示した。

- α -マンノシダーゼ (タチナタマメ由来, Sigma-Aldrich)
- β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ (タチナタマメ由来, ProZyme)
- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (*Streptococcus pneumoniae* 由来, New England BioLab)
- β 1,2 キシロシダーゼ (*Xanthomonas sp.*由来, Merck Millopore)
- α 1,3/4-L-フコシダーゼ (*Streptomyces sp.* 142 由来, タカラバイオ)
- ラクト-*N*-ビオシダーゼ (*Streptomyces sp.* 142 由来, タカラバイオ)

3.3 結果および考察

3.3.1 明所条件で生育した *O. sativa* 生長部の N-グリカン構造解析

3.3.1.1 サイズ分画 HPLC 分析

暗所にて発芽誘導後、72 時間の光照射を行った *O. sativa* の芽部は第 2 葉展開初期まで生長させた (Fig. 3-1)。生長させた芽部および根部は回収し、ヒドラジン分解、N-アセチル化、PA 化を行い、サイズ分画 HPLC 分析を行った。その結果を Fig. 3-2 に示した。サイズ分画 HPLC 分析の結果、発芽 120 時間後 *O. sativa* の芽部および根部において、糖重合度 5~12 の間に a から m の 13 本のフラクションが溶出したことを確認した (Fig. 3-2)。芽部ではフラクション g の蛍光強度が最も高く、次いでフラクション c、d、e の順に蛍光強度が低くなった (Fig. 3-2-I)。根部は芽部と同様にフラクション g の蛍光強度が最も高いことが示されたが、その他に芽部とは異なるフラクションの挙動が確認された。特に、フラクション c が根部において著しく減少していた一方で、フラクション b、フラクション d、フラクション k は根部において増加傾向を示していた。検出された各フラクションの構造解析を行うため、芽部および根部の各 13 本のフラクションは全て分取し、逆相 HPLC 分析を行った。



Fig. 3-1. 暗所条件で 48 時間生育後、明所条件で 72 時間生育させた *O. sativa* 生長部

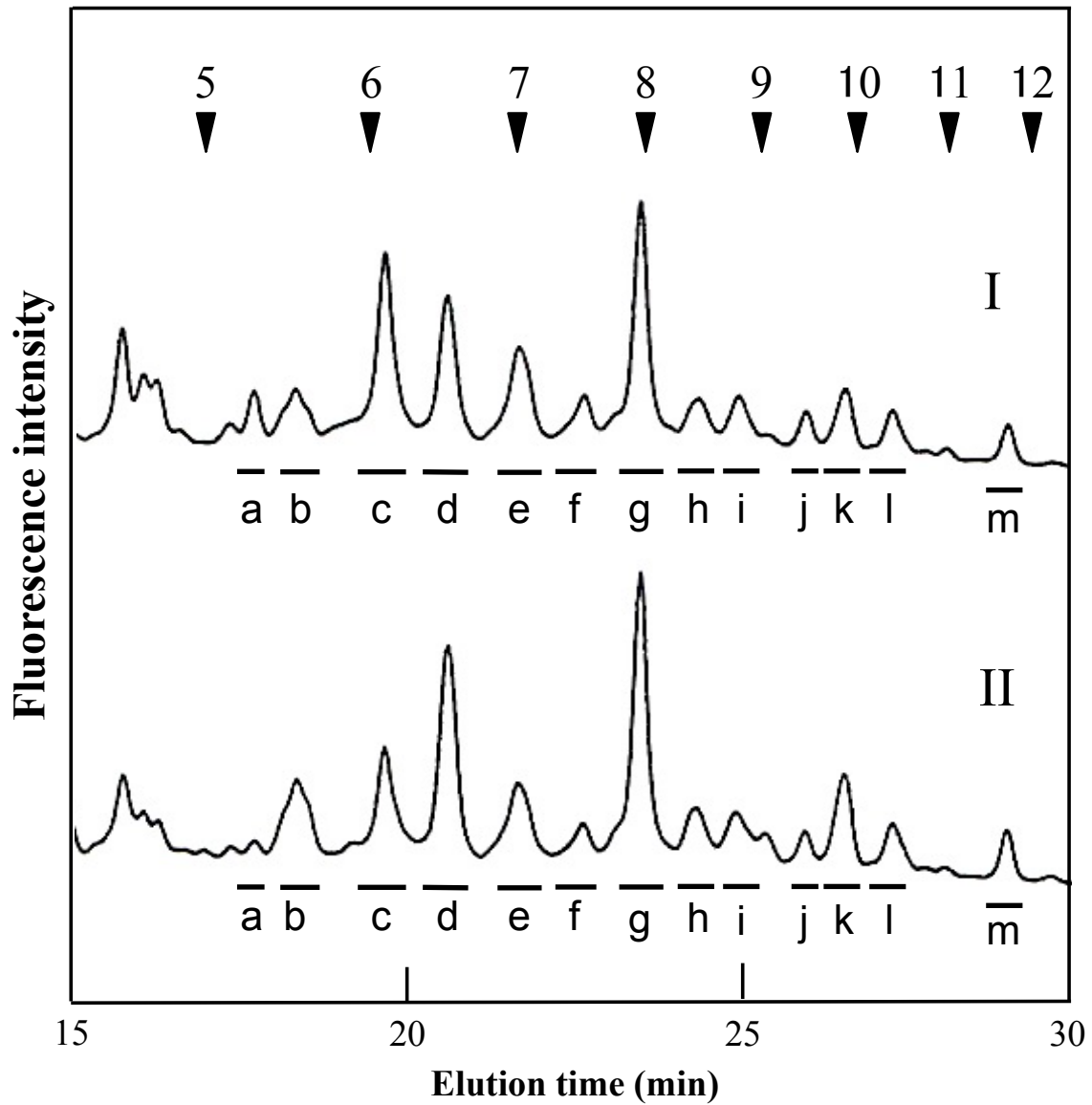


Fig. 3-2. サイズ分画 HPLC による発芽 120 時間後 *O. sativa* 芽根部の重合度別 *N*-グリカンパターン

I, 芽部、II, 根部

番号付き矢印 (▼); PA-イソマルトオリゴ糖の重合度に基づいた溶出位置

3.3.1.2 逆相 HPLC 分析

逆相 HPLC 分析の結果、芽部および根部由来の主要フラクションは同様の位置に溶出していることが示された (Fig. 3-3-1, 3-3-2, 3-3-3)。G.U が 5.0 以降に溶出した主要フラクションは 17 本、G.U が 3.0 付近にのみ主要フラクションが溶出したのはフラクション b1、b2 および d1 の 3 フラクションであった。第 2 章までに得られた *N*-グリカンの二次元マップ情報から、

フラクション a1 は M3X、

フラクション c1 は M3FX、

フラクション c2 は M4X、

フラクション e1 は ^{GN}M3FX、

フラクション e2 は _{GN}M3FX、

フラクション e4 は GN2M3X、

フラクション f1 は M6B、

フラクション g1 は GN2M3FX、

フラクション j1 は M8A、

フラクション k1 は Gal1F1GN2M3FX、

フラクション k2 は Gal21F1GN2M3X、

フラクション l1 は M9A、

フラクション m1 は Gal21F2GN2M3FX

であることが明らかとなっている。従って、本章では G.U が 5.0 以降に溶出したフラクション c3、e3、h1、h2 および G.U が 3.0 付近に溶出したフラクション b1、b2、d1 に着目して構造決定を行うこととした。

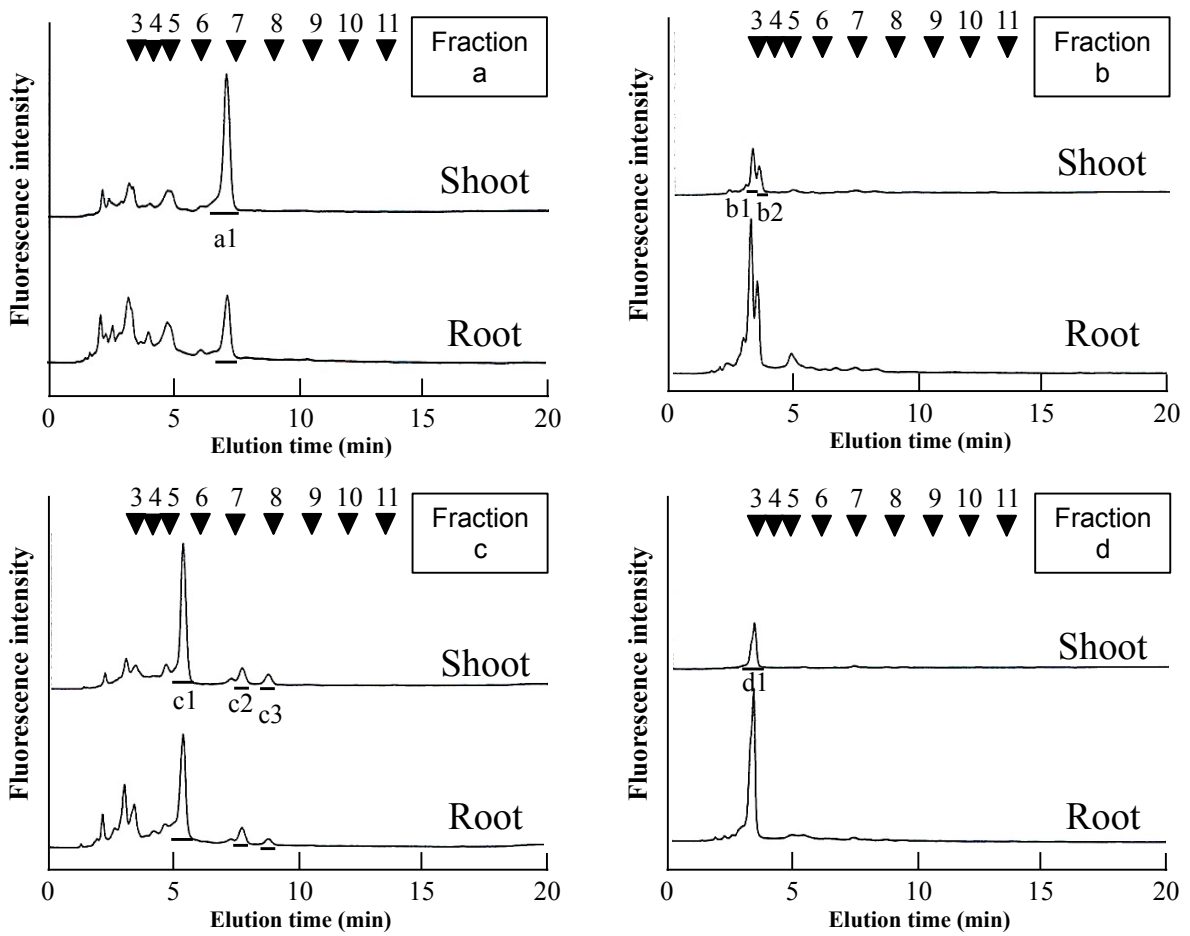


Fig. 3-3-1. 逆相 HPLC による発芽 120 時間後 *O. sativa* 芽根の構造特性別 N-グリカンパターン

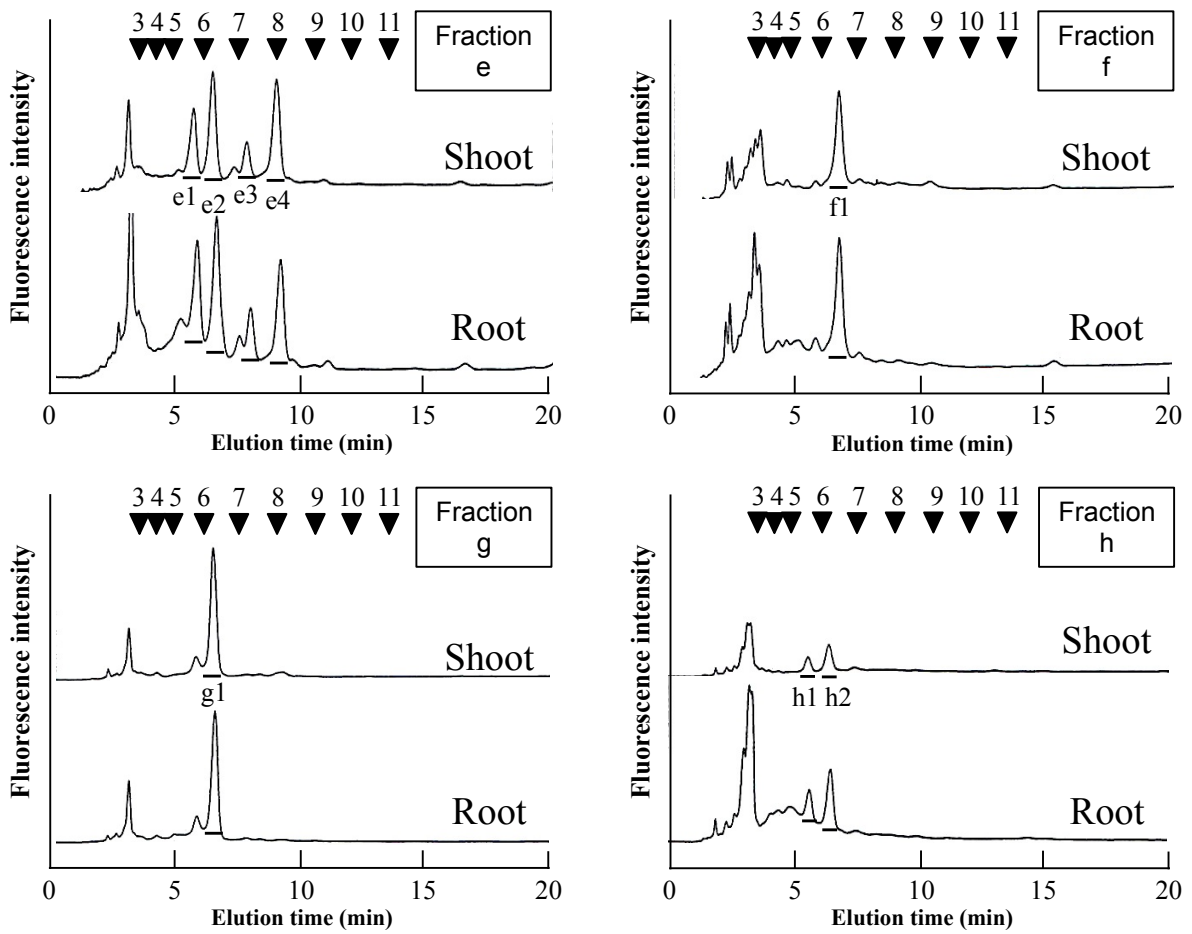


Fig. 3-3-2. 逆相 HPLC による発芽 120 時間後 *O. sativa* 芽根の構造特性別 *N*-グリカンパターン

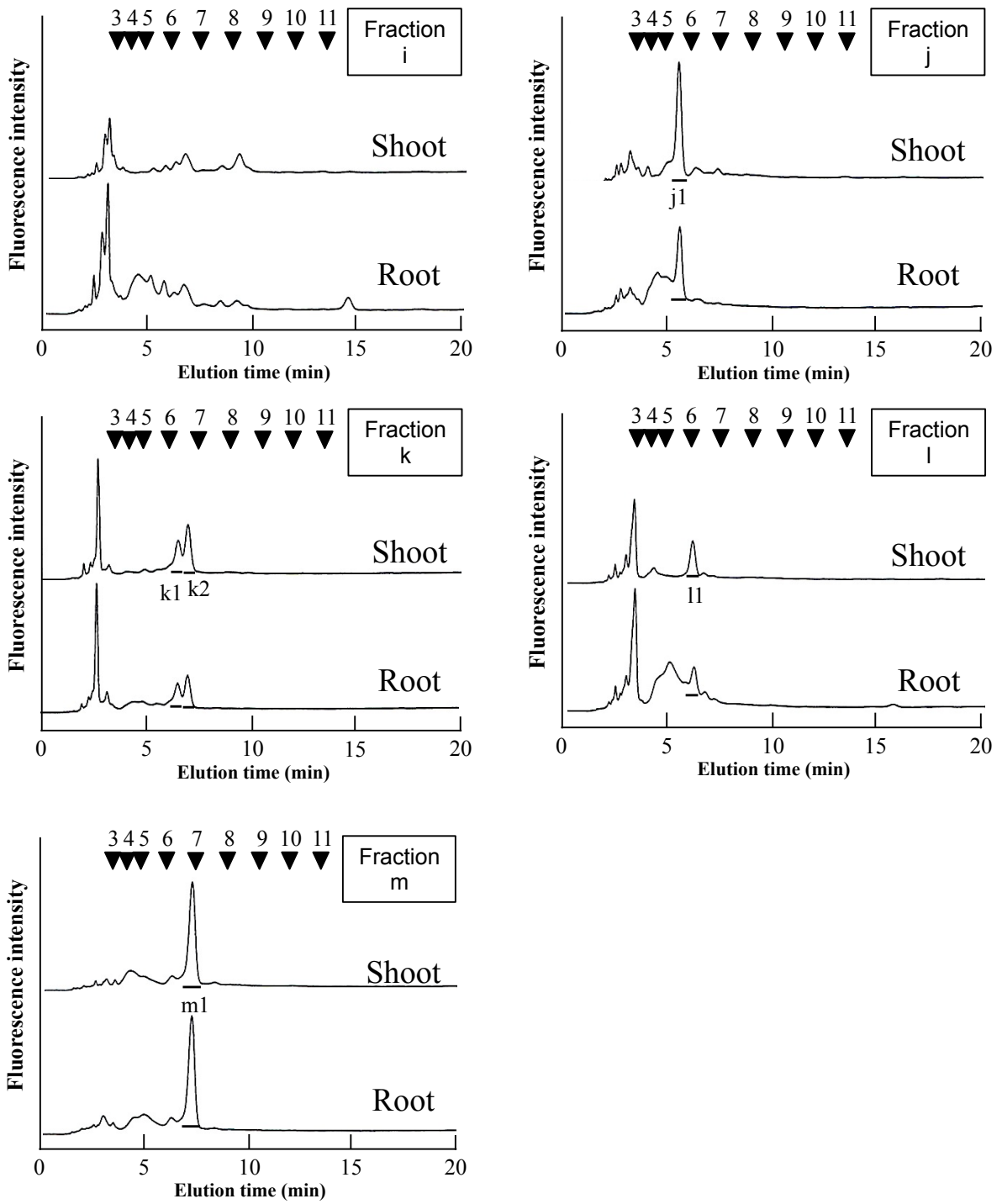


Fig. 3-3-3. 逆相 HPLC による発芽 120 時間後 *O. sativa* 芽根の構造特性別 *N*-グリカンパターン

3.3.1.3 フラクション c3 の構造解析

フラクション c3 は、 β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼおよび α -マンノシダーゼを用いた酵素消化による糖組成の確認を行った。 β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ消化の結果、フラクション c3 は G.U が 0.82 前にシフトした事から (Fig. 3-4-II)、フラクション c3 は非還元末端側に GlcNAc が 1 残基結合していることが示された。また、 β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ消化後のフラクション c3 の G.U は 5.52 となり、1.3.4 に示した M3X (G.U = 5.59) との差は 0.07 であった。さらに β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ消化産物に α -マンノシダーゼ処理を行ったところ、G.U が 1.32 および 2.42 前にシフトした事から (Fig. 3-4-III)、フラクション c3 は非還元末端側に α -マンノースが 2 残基結合していることが示された。2 段階酵素消化の結果、フラクション c3 は M3X 構造に GlcNAc が 1 残基結合した GNM3X 構造と推定した。

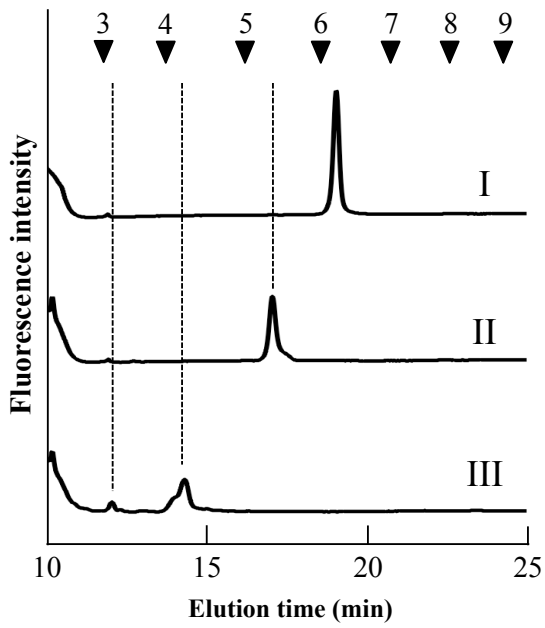


Fig. 3-4. c3 の β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼおよび α -マンノシダーゼ消化産物のサイズ分画 HPLC 結果

I, c3、II, I の β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ消化後、III, II の α -マンノシダーゼ消化後

3.3.1.4 フラクシオン e3 の構造解析

フラクシオン e3 は、サイズ分画 HPLC 分析において他の複合型 *N*-グリカンのフラクシオン e1 (^{GN}M3FX)、e2 (_{GN}M3FX)、e4 (GN2M3X) と同じフラクシオンであったことから、これら 3 つの複合型 *N*-グリカンと同様の糖組成であることが考えられた。また、高橋らの二次元糖鎖マップ情報から、フラクシオン e3 は M3FX 構造にガラクトース 1 残基と GlcNAc1 残基が結合した GalGNM3FX 構造と G.U の値が同様であることが示されたため、ラクト-*N*-ビオシダーゼを用いた酵素消化による構成糖の確認を行った。ポジティブコントロールはラクト-*N*-テトラオース[Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc-PA]を用いた。ラクト-*N*-ビオシダーゼ消化の結果、G.U が 1.42 前にシフトしたフラクシオンが検出されたため、ラクト-*N*-テトラオースの Galβ1,3GlcNAc 1 ユニットが遊離したことを確認した (Fig. 3-5A-II)。ポジティブコントロールの結果を踏まえ、フラクシオン e3 のラクト-*N*-ビオシダーゼ消化を行った。その結果、フラクシオン e3 は G.U が 1.55 前にシフトし (Fig. 3-5B-II)、M3X の G.U に近い値となった。このことから、フラクシオン e3 は M3X 構造の非還元末端側に Galβ1,3GlcNAc1 ユニットが結合していることが考えられた。さらに、フラクシオン e3 のα-マンノシダーゼ消化を行ったところ、消化産物はα-マンノースが 1 残基遊離したフラクシオンが 14%、未消化のフラクシオン e3 構造が 72%、フラクシオン e3 よりも G.U が 0.16 大きいフラクシオンが 14% の割合で検出された (Fig. 3-5C-II)。なお、α-マンノシダーゼ消化は M3 が基質の場合に消化産物の M1 が 36%、M2 が 64% の割合に消化される酵素消化条件で行ったことから、フラクシオン e3 に対するα-マンノシダーゼ活性の低さは別分岐鎖の非還元末端に存在する Galβ1,3GlcNAc との立体障害に起因するものと考えられる。また、フラクシオン e3 に対するラクト-*N*-ビオシダーゼ活性の低さについては、コアマンノシルコア構造に結合する他の糖による立体障害に起因するものであることが示唆された。上記のように、ラクト-*N*-ビオシダーゼ消化後のフラクシオン e3 の G.U は M3X のものと殆ど一致する事から、フラクシオン e3 のコア構造は M3X と仮定すると、フラクシオン e3 に対するラクト-*N*-ビオシダーゼ活性の低さは、

Gal β 1,3GlcNAc 残基がコアマンノシル構造の α 1,3 アームに結合していることによるコア β 1,2 キシロースとの立体障害のためだと考えられる。従って、フラクション e3 の推定構造は M3X 構造の α 1,3 アームに Gal β 1,3GlcNAc 1 ユニットが結合した GalGNM3X 構造であることが強く示唆された。

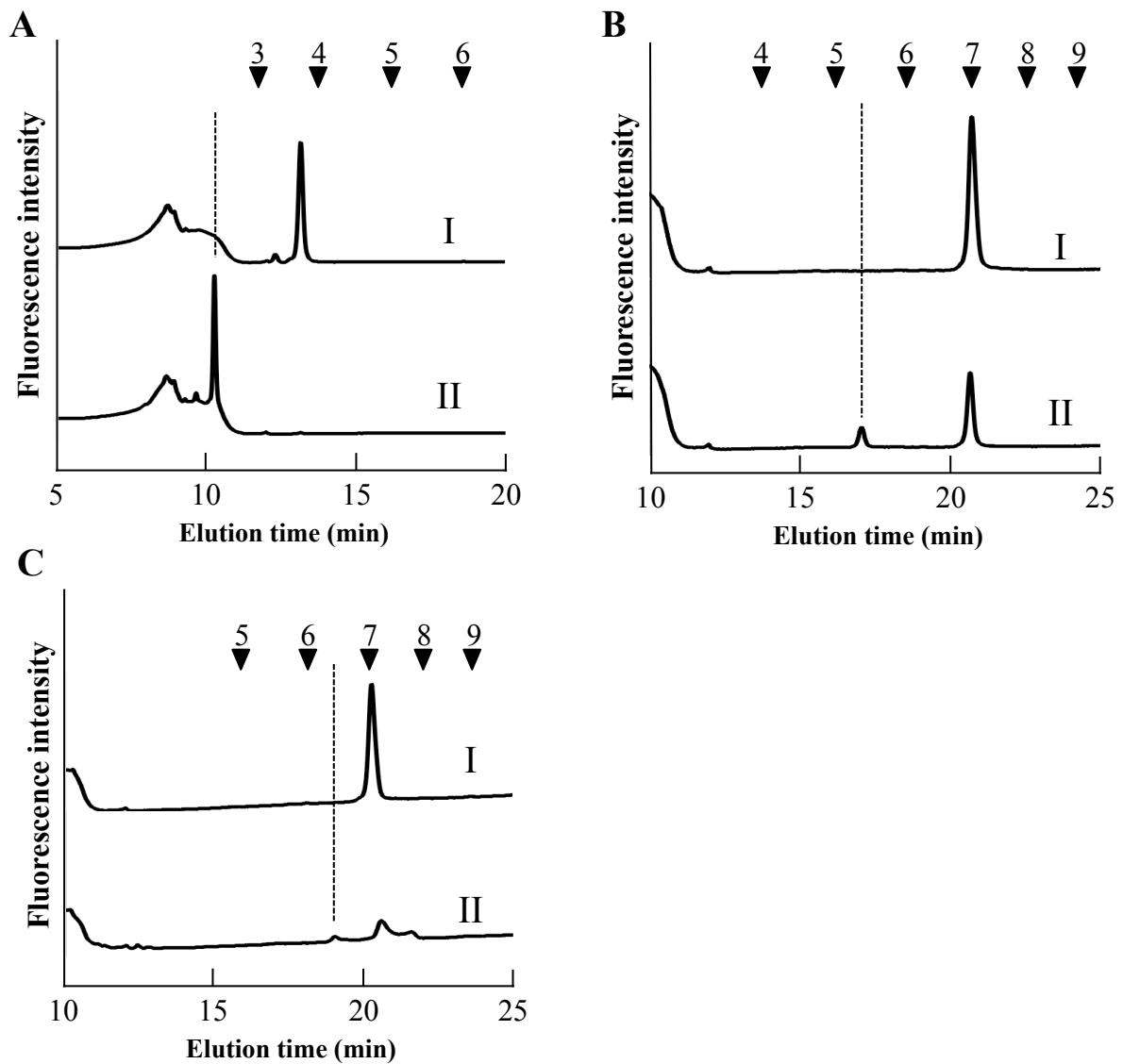


Fig. 3-5. e3 のラクト-N-ビオシダーゼおよび α -マンノシダーゼ消化産物のサイズ分画

HPLC 結果

A-I, ラクト-N-テトラオース、A-II, A-I のラクト-N-ビオシダーゼ消化後

B-I, e3、B-II, B-I のラクト-N-ビオシダーゼ消化後

C-I, e3、C-II, B-I の α -マンノシダーゼ消化後

3.3.1.5 フラクション h1 および h2 の構造解析

フラクション h1 および h2 は、サイズ分画 HPLC における G.U が 8.74 と糖重合度が高く、逆相 HPLC における G.U が 5.23 および 6.29 と溶出が早いことから、ハイマンノース型 N-グリカンであると予想した。そこで、逆相 HPLC 分析による糖鎖標準品との溶出位置の照合の結果、フラクション h1 は G.U が 5.21 の M7A と一致し (Fig. 3-6A-I, A-II)、フラクション h2 は G.U が 6.28 の M7B と一致した (Fig. 3-6B-I, B-II)。さらに α -マンノシダーゼ消化により、 α -マンノース数の確認を行った。まずポジティブコントロールとして糖鎖標準品の M8A を用いて α -マンノシダーゼ消化を行った。酵素消化の結果、M8A は α -マンノースが 1~3 残基遊離した M7、M6、M5 のフラクションを確認した (Fig. 3-7A-II)。各フラクションの存在比は 48% (M7)、17% (M6)、35% (M5)であり、M7 の存在比が最も高く、次いで M5、M6 の順に存在比は低くなった。この結果から、M8A から M7 への移行および M6 から M5 への移行は速やかに行われることが示された。ポジティブコントロールの結果を踏まえ、フラクション h1 およびフラクション h2 の α -マンノシダーゼ消化を行った。その結果、フラクション h1 およびフラクション h2 はいずれも α -マンノース 2 残基が遊離したことを確認した (Fig. 3-7B-II, 3-7C-II)。この際に、フラクション h1 の M7A は α -マンノース 2 残基が加水分解を受け M5 構造に移行した割合が 87%であったのに対し (Fig. 3-7B-II)、フラクション h2 の M7B は未消化産物が 46%であり、 α -マンノース 2 残基が加水分解を受け M5 構造に移行した割合は 38%であった (Fig. 3-7C-II)。このフラクション h2 の消化産物の割合はポジティブコントロールの M8A の消化産物の割合と近い値であったことから、この α -マンノース加水分解率の差は M7 構造バリエーションにおける α 1,2 マンノースの結合位置に起因していることが考えられる。 α -マンノシダーゼは、 α 1,2 結合、 α 1,3 結合、 α 1,6 結合の順に優先的に加水分解することが知られており、酵素消化の結果から、M7A 構造のコアマンノシルコア構造の α 1,6アームに結合する Man α 1,2Man α 1,6 残基の α 1,2 マンノースと α 1,3アームに結合する α 1,2 マンノースが優先的に加水分解されていることが示された。一方で、M7B はコアマンノシルコ

ア構造の α 1,3アームに結合する $\text{Man}\alpha$ 1,2 $\text{Man}\alpha$ 1,2 残基の非還元末端側の α 1,2 マンノースの遊離が遅く、M6 への移行が遅いことが示された。

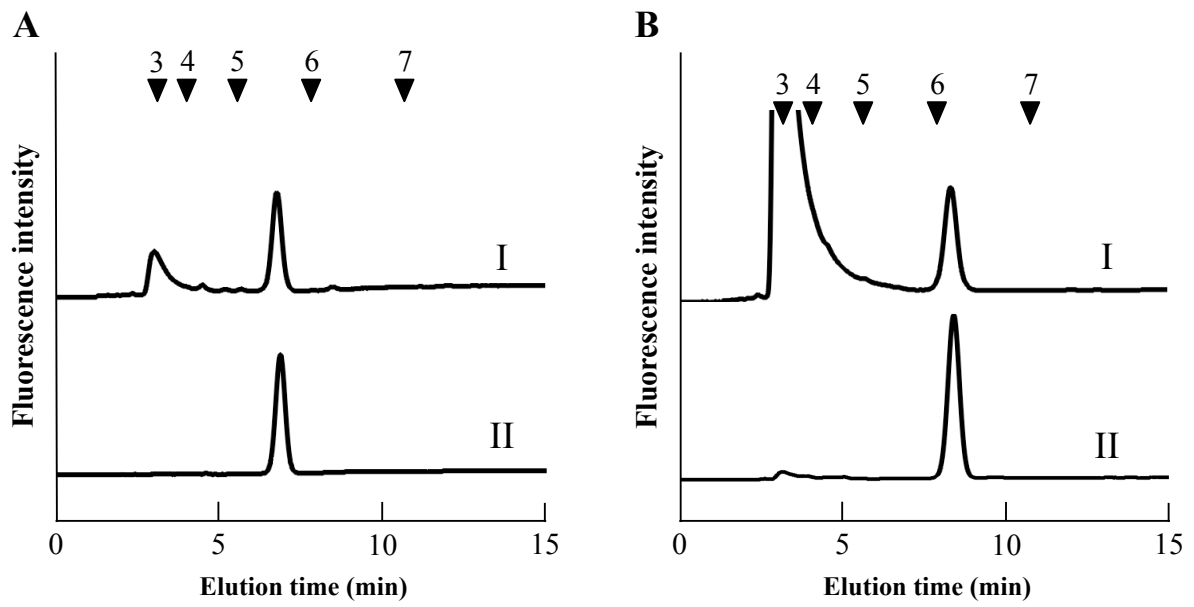


Fig. 3-6. h1 および h2 の逆相 HPLC による溶出位置の照合

A-I, h1、A-II, M7A

B-I, h2、B-II, M7B

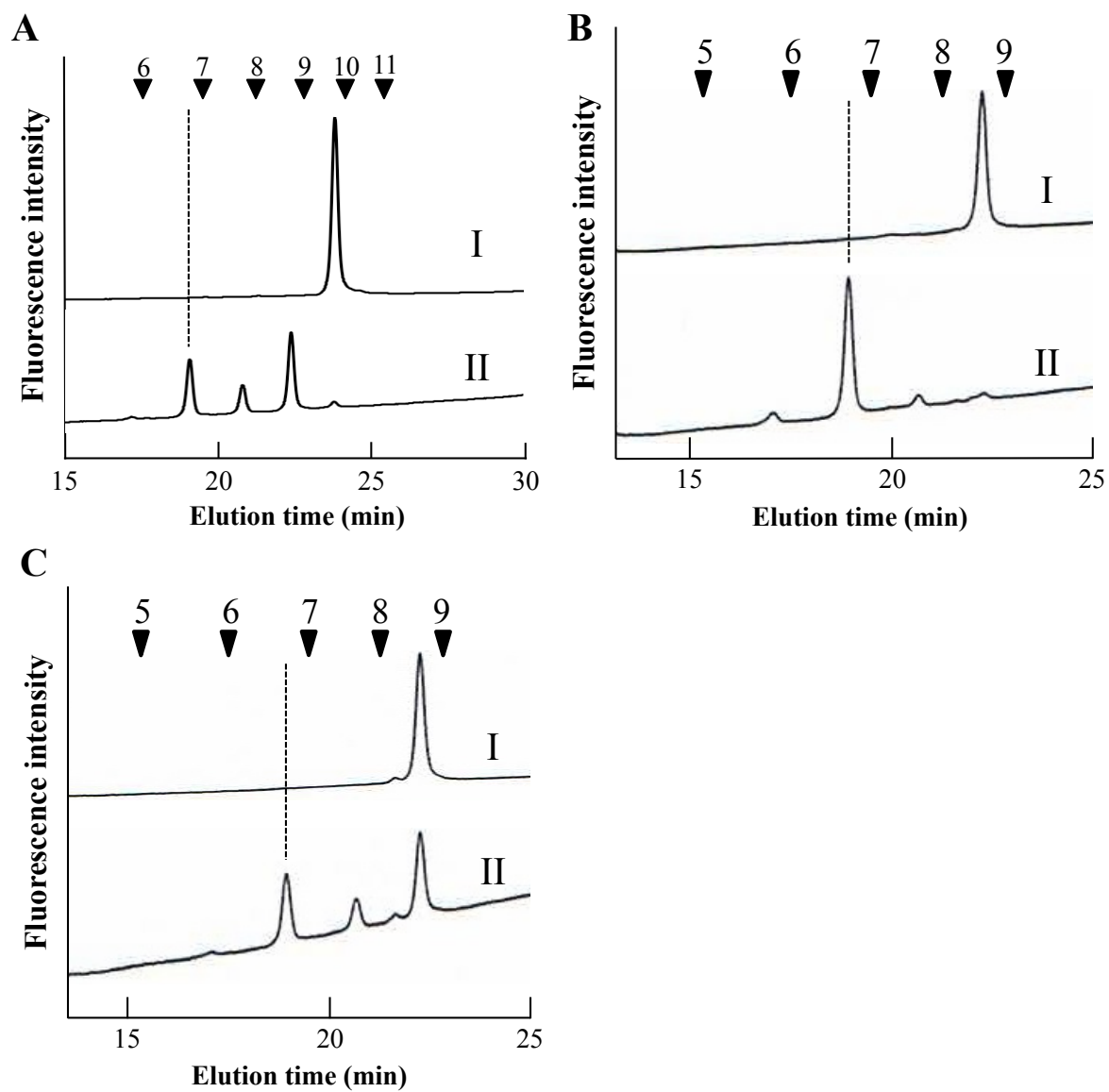


Fig. 3-7. h1 および h2 の α -マンノシダーゼ消化産物のサイズ分画 HPLC 結果

A-I, M8A、A-II, A-I の α -マンノシダーゼ消化後

B-I, h1、B-II, A-I の α -マンノシダーゼ消化後

C-I, h2、C-II, B-I の α -マンノシダーゼ消化後

3.3.1.6 フラクション b1 の構造解析

Fig. 3-3-1 の逆相 HPLC 分析において、フラクション b1 の G.U は 3.19 の値を示した。このフラクションは糖重合度毎に分取したフラクション b の主要な構成成分として検出されたため、質量分析および酵素消化法を用いて詳細な解析を行うこととした。質量分析の結果、1143.2705 (Na^+) の値が得られたことから (Table 3-1)、フラクション b1 は $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_2(\text{Pent})_1\text{-PA}$ の糖組成であることが予想された。この糖組成から推定される *N*-グリカン は M3X 構造であるが、逆相 HPLC 分析における溶出位置から (Fig. 3-3-1)、既知の M3X 構造ではないことが考えられた。そこで、特異性の高い糖加水分解酵素を用いてフラクション b1 の構造推定を行った。

まず始めに、非還元末端に 2 残基の GlcNAc が結合したアガラクトバイアンテナをポジティブコントロールとして、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ消化を行った (40 mU, 30 分間反応)。その結果、G.U が 2.09 前にシフトしたフラクションが得られたため、非還元末端に結合した GlcNAc 2 残基がアガラクトバイアンテナから遊離したことを確認した (Fig. 3-8A-II)。ポジティブコントロールの結果を踏まえ、同条件でフラクション b1 の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ消化を行った。その結果、G.U が 1.15 前にシフトしたフラクション GN1-b1 が得られたが、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ消化産物の割合は全体の 65%、未消化産物は 35%であった (Fig. 3-8B)。酵素消化は、10 pmol のアガラクトバイアンテナから 2 残基の β 1,2GlcNAc を加水分解するのに十分な条件で行っていることから、未消化フラクションの非還元末端の GlcNAc は β 1,2 結合以外の結合様式であることが示唆された。この未消化フラクションの末端 GlcNAc の遊離のため、Fig. 3-8B における酵素消化条件 (40 mU, 37°C, 30 分間の反応時間) よりも反応時間を 30 分間延長して酵素消化を行った。しかしながら、Fig. 3-8B の未消化フラクションは β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼによる加水分解を受けなかった (Fig. 3-8C)。そこで、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼの酵素量を 10 倍にし、1 時間酵素反応を行うこととした。その結果、G.U が 1.20 前にシフトしたフラクション GN2-b1 が得られた (Fig. 3-8D)。本

研究に用いた β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼは β 1,2,3,4,6結合のいずれの結合様式に対しても等しく加水分解を行う事から、フラクション GN1-b1 およびフラクション GN2-b1 は非還元末端 GlcNAc の結合様式は不明瞭だが、その結合様式は互いに異なることが明らかとなった。

続いて、 α -マンノース残基数を確認するため、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ消化を行ったフラクションの α -マンノシダーゼ消化を行った。このとき、酵素反応時間は24時間で行った。ポジティブコントロールとして1.3.5で構造決定を行ったM3FXを用いた。 α -マンノシダーゼ消化の結果、M3FXからG.Uが2.27前にシフトしたフラクションが確認された事から (Fig. 3-9A-II)、この酵素消化条件において α -マンノースが2残基遊離することが示された。ポジティブコントロールの結果を踏まえ、フラクション GN1-b1 およびフラクション GN2-b1 の α -マンノシダーゼ消化を行った。その結果、フラクション GN1-b1 はG.Uが1.94、フラクション GN2-b1 はG.Uが1.96前にシフトしたフラクションが確認された (Fig. 3-9B-II, 3-9C-II)。この結果から、フラクション GN1-b1 およびフラクション GN2-b1 の非還元末端に α -マンノースが2残基結合していることが示された。

Table. 3-1 フラクション b1、b2、d1 の質量分析結果

Fraction	Mass (observed)	Mass (expected)	Estimated Composition
b1	1143.2705 (Na⁺)	1143.9823 (Na⁺)	(Hex)₃(GlcNAc)₂(Pent)₁-PA
	1159.2505 (K⁺)	1160.0816 (K⁺)	
b2	1143.2329 (Na⁺)	1143.9823 (Na⁺)	(Hex)₃(GlcNAc)₂(Pent)₁-PA
	1159.2060 (K⁺)	1160.0816 (K⁺)	
d1	1346.1434(Na⁺)	1347.1773 (Na⁺)	(Hex)₃(GlcNAc)₃(Pent)₁-PA
	1362.1115 (K⁺)	1363.2766 (K⁺)	

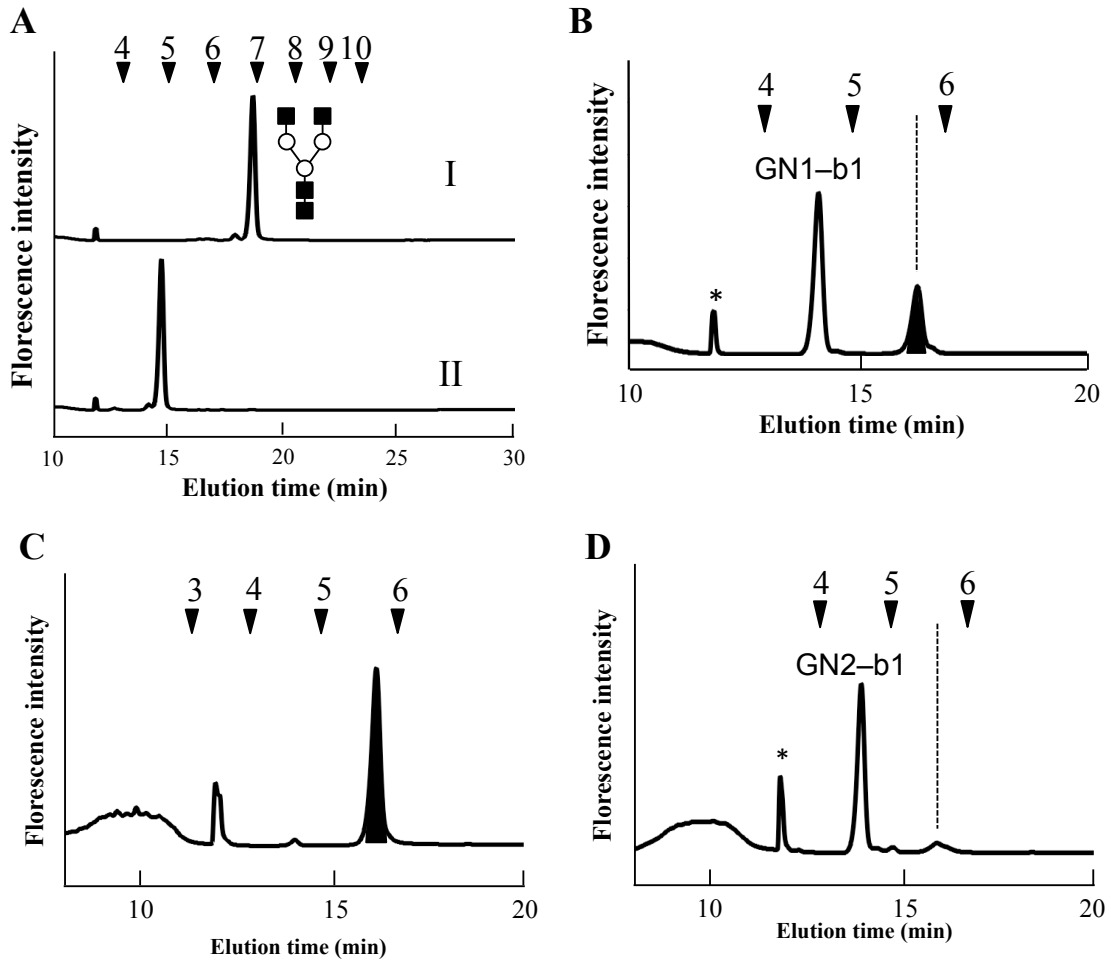


Fig. 3-8. b1 の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ消化産物のサイズ分画 HPLC 結果

A-I, アガラクトバイアンテナ, A-II, A-I の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ酵素消化後 (40 mU, 30 分間反応)

B, フラクシオン b1 の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ酵素消化後 (40 mU, 30 分間反応)

黒フラクシオン; 未消化物

C, Bの未消化フラクシオンの β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ酵素消化後 (40 mU, 1 時間反応)

黒フラクシオン; 未消化物

D, C の未消化フラクシオンの β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ酵素消化後 (400 mU, 1 時間反応)

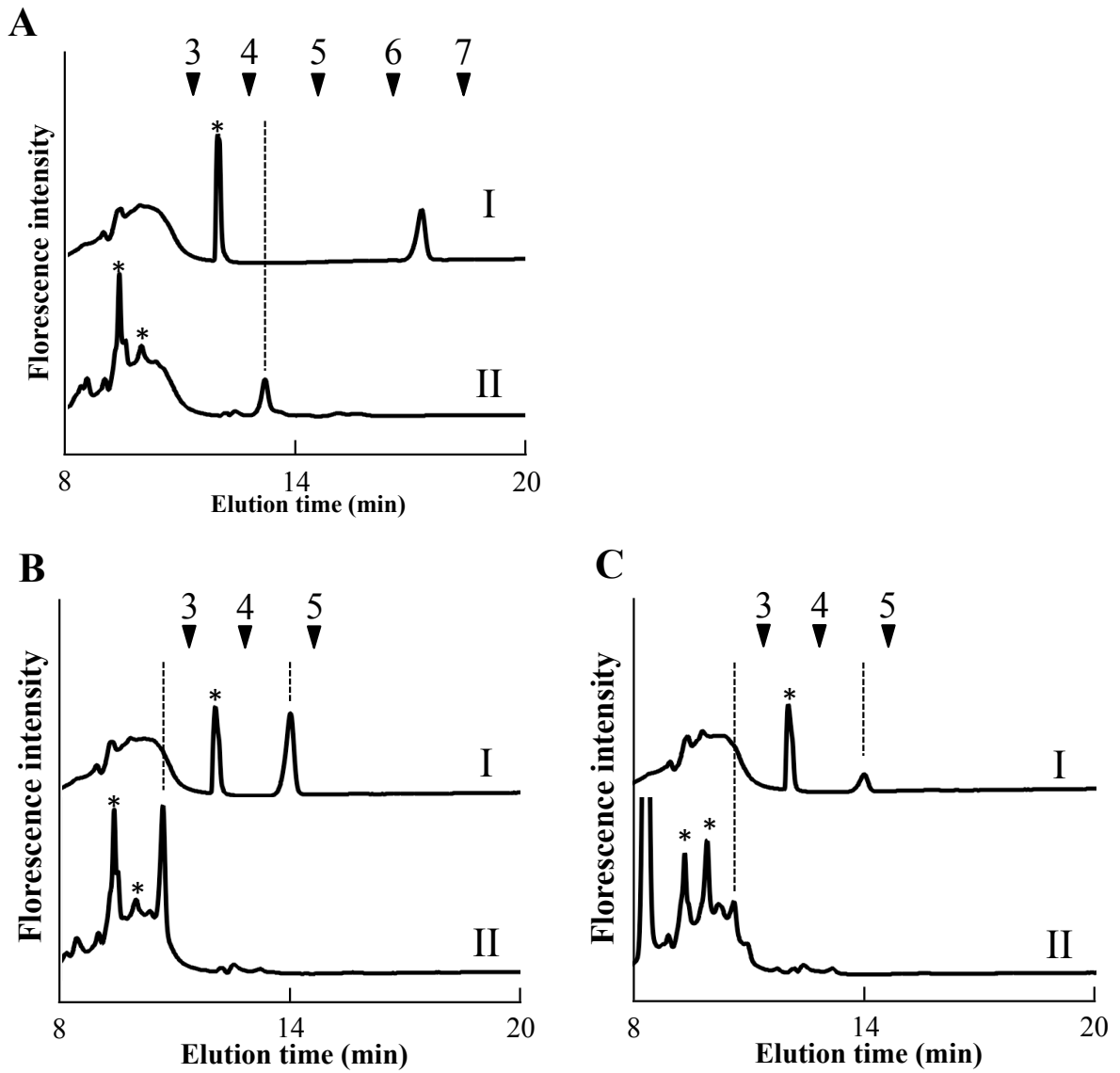


Fig. 3-9. β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ消化後 b1 の α -マンノシダーゼ消化産物のサイズ分画 HPLC 結果

A-I, M3FX、A-II, A-I の α -マンノシダーゼ消化後

B-I, GN1-b1、B-II, B-I の α -マンノシダーゼ消化後

C-I, GN2-b1、C-II, C-I の α -マンノシダーゼ消化後

3.3.1.7 フラクション b2 の構造解析

Fig. 3-3-1 の逆相 HPLC 分析において、フラクション b2 の G.U は 3.48 の値を示した。フラクション b2 はフラクション b1 と同様に、糖重合度毎に分取したフラクション b の主要な構成成分の 1 つとして検出されたため、質量分析および酵素消化法を用いて詳細な解析を行うこととした。質量分析の結果、1143.2329 (Na⁺) の値が得られた事から (Table 3-1)、フラクション b2 はフラクション b1 と同様に、(Hex)₃(HexNAc)₂(Pent)₁-PA の糖組成であることが予想された。この糖組成から推定される N-グリカン は M3X 構造であるが、逆相 HPLC 分析における溶出位置から (Fig. 3-3-1)、既知の M3X 構造ではないことが考えられた。そこで、特異性の高い糖加水分解酵素を用いてフラクション b2 の構造推定を行った。

まず、GlcNAc 残基数を確認するため、フラクション b2 のβ-N-アセチルグルコサミナーゼ消化を行った。その結果、G.U1.01 前にシフトしたフラクションを確認した (Fig. 3-10-II)。続いて、α-マンノース残基数を確認するため、Fig. 3-10-II に示したフラクションのα-マンノシダーゼ消化を行った。その結果、フラクション b2 は G.U が 1.88 前にシフトしたフラクションが確認され (Fig. 3-10-III)、フラクション b2 の非還元末端にはα-マンノースが 2 残基結合していることが示された。酵素消化の結果から、フラクション b2 はフラクション GN1-b1 およびフラクション GN2-b1 と同様に、還元末端側の GlcNAc が 1 残基である遊離型 N-グリカンであることが明らかとなった。しかしながら逆相分析において、フラクション b2 はフラクション b1 由来のフラクションとは異なる溶出位置に溶離された事から、フラクション b2 はフラクション b1 由来の遊離型 N-グリカンとは異なる構造であることが示唆された。

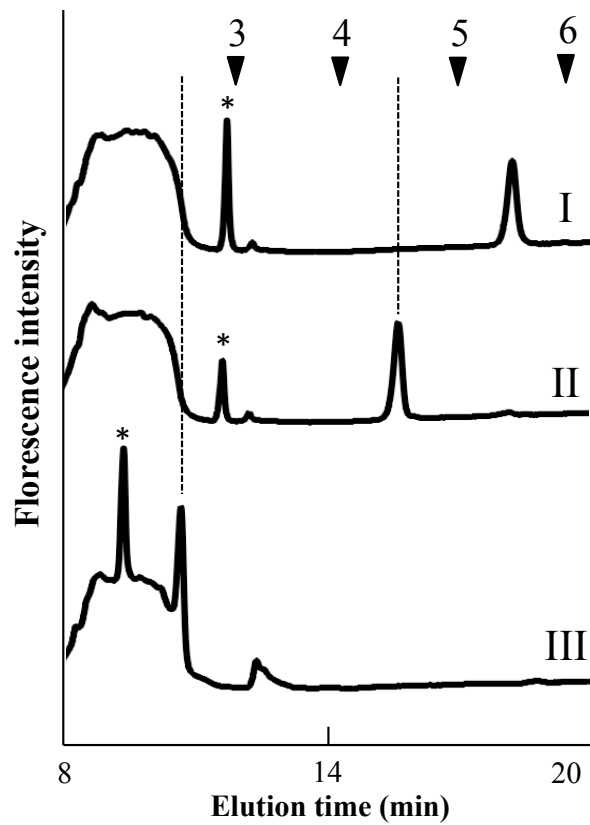


Fig. 3-10. b2 の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼおよび α -マンノシダーゼ消化産物のサイズ分画 HPLC 結果

I, b2、II, I の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ消化後、III、 II の α -マンノシダーゼ消化後

3.3.1.8 フラクション d1 の構造解析

Fig. 3-3-1 の逆相 HPLC 分析において、フラクション d1 の G.U は 3.32 の値を示した。フラクション d1 は糖重合度毎に分取したフラクション d の主要な構成成分のとして検出されたため、質量分析および酵素消化法を用いて詳細な解析を行うこととした。質量分析の結果、1346.1434 (Na^+) の値が得られた事から (Table 3-1)、フラクション d1 は $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_3(\text{Pent})_1\text{-PA}$ の糖組成であることが予想された。この糖組成から推定される *N*-グリカン は GNM3X 構造であるが、逆相 HPLC 分析における溶出位置から (Fig. 3-3-1)、既知の GNM3X 構造ではないことが考えられた。そこで、特異性の高い糖加水分解酵素を用いてフラクション d1 の構造推定を行った。

まず始めに、アガラクトバイアンテナをポジティブコントロールとして、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ消化を行った。その結果、G.U が 1.99 前にシフトしたフラクションが得られたため、非還元末端に結合した GlcNAc 2 残基がアガラクトバイアンテナから遊離したことを確認した (Fig. 3-11A-II)。ポジティブコントロールの結果を踏まえ、同条件でフラクション d1 の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ消化を行った。その結果、G.U が 2.10 と 1.93 前にシフトしたフラクション GN1-d1 および GN2-d1 が得られ、その消化産物の割合はフラクション GN1-d1 が 65%、フラクション GN2-d1 が 35%であった (Fig. 3-11B)。それぞれのフラクションの G.U は GN1-d1 が 4.60、フラクション GN2-d1 が 4.85 であり、両フラクションの G.U 間は 0.17 の差異が認められた。

続いて、 α -マンノース残基数を確認するため、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ消化を行ったフラクションの α -マンノシダーゼ消化を行った。このとき、酵素反応時間は 24 時間で行った。ポジティブコントロールとして 1.3.5 で構造決定を行った M3FX を用いた。 α -マンノシダーゼ消化の結果、M3FX から G.U が 2.27 前にシフトしたフラクションが確認された事から (Fig. 3-11A-II)、この酵素消化条件において α -マンノースが 2 残基遊離することが示された。ポジティブコントロールの結果を踏まえ、フラクション GN1-d1 およびフラクション GN2-d1 の α -マンノシダーゼ消化を行った。その結果、フラク

クション GN1-d1 は G.U が 1.93、フラクション GN2-d1 は G.U が 2.20 前にシフトしたフラクションが確認された (Fig. 3-11B-II, 3-11C-II)。この結果から、フラクション GN1-b1 およびフラクション GN2-b1 の非還元末端に α -マンノースが 2 残基結合していることが示された。

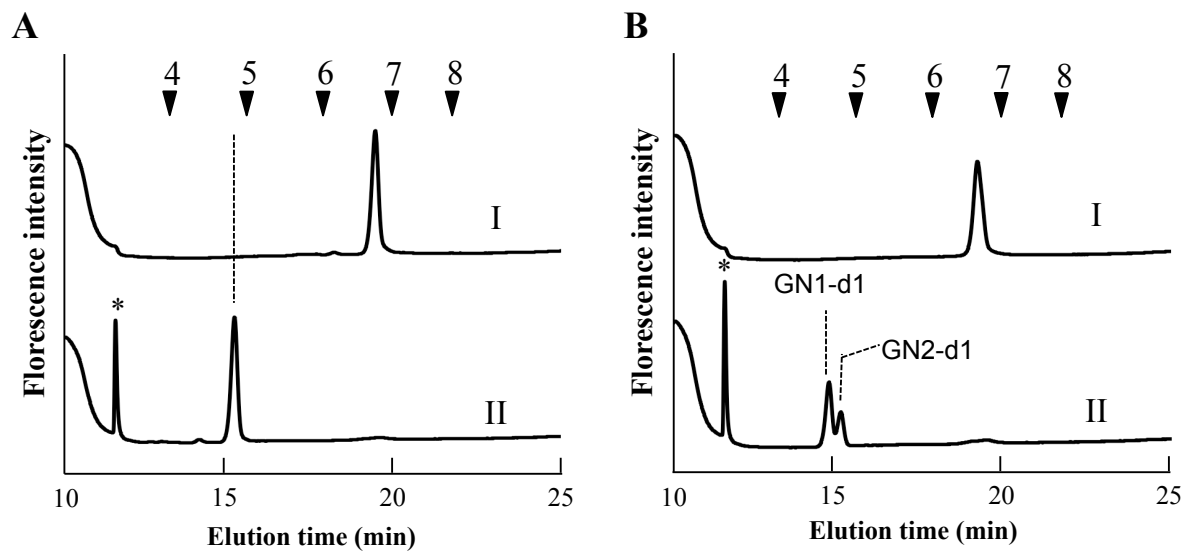


Fig. 3-11. d1 の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ消化産物のサイズ分画 HPLC 結果
 A-I, アガラクトバイアンテナ、A-II, A-I の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ消化後
 B-I, d1、B-II, B-I の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ消化後

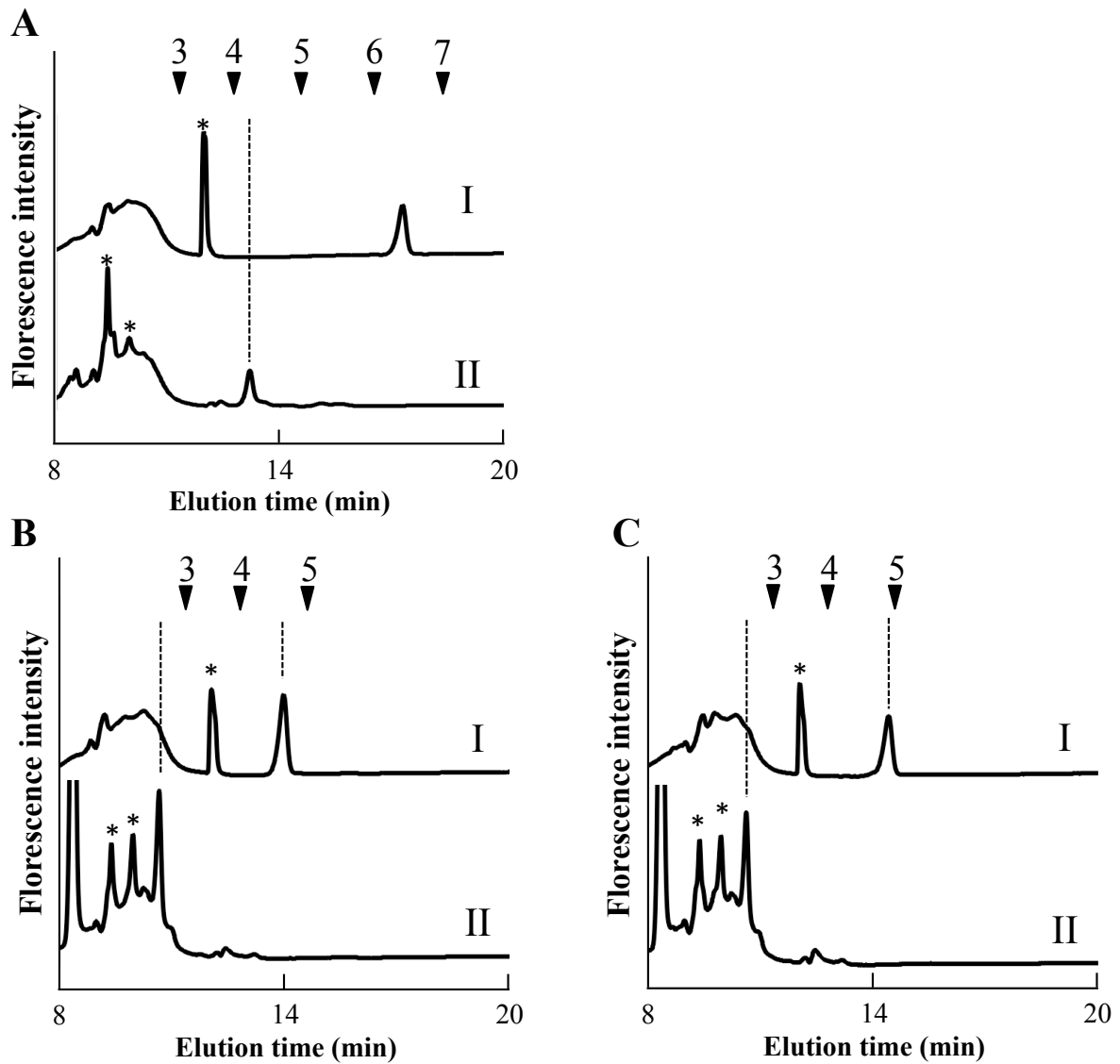


Fig. 3-12. β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ消化後 d1 の α -マンノシダーゼ消化産物のサイズ分画 HPLC 結果

A-I, M3FX、A-II, A-I の α -マンノシダーゼ消化後

B-I, GN1-d1、B-II, B-I の α -マンノシダーゼ消化後

C-I, GN2-d1、C-II, B-I の α -マンノシダーゼ消化後

Table. 3-2 明所芽根の推定構造

Fraction	Structure	Abbreviation	Yield (pmol/mg of dry weight)		Ratio	
			Shoot	Root	Shoot	Root
a1		M3X	23.5	4.0	27.5	4.6
c1		M3FX	65.6	29.2	76.9	33.7
c2		M4X	10.5	6.4	12.3	7.4
c3		GN M3X	6.6	2.2	7.8	2.6
e1		GN M3FX	12.5	9.6	14.6	11.2
e2		GN M3FX	19.7	15.2	23.1	17.6
e3		GalGN M3X	7.0	5.6	8.2	6.4
e4		GN2 M3X	22.6	13.5	26.5	15.6
f1		M6B	14.0	7.0	16.5	8.1
g1		GN2 M3FX	85.3	86.5	100.0	100.0
h1		M7A	3.9	3.0	4.5	3.5
h2		M7B	7.9	7.0	9.3	8.1
j1		M8A	13.8	7.0	16.2	8.0
k1		Gal1F1GN2M3FX	3.2	3.1	3.7	3.6
k2		Gal2F1GN2M3X	6.9	4.7	8.1	5.5
l1		M9A	8.7	2.7	10.2	3.2
m1		Gal2F2GN2M3FX	15.6	17.0	18.3	19.7

Table. 3-3 明所条件生育下の芽部および根部における遊離型 *N*-グリカンの推定構造

Fraction	Structure	Abbreviation	Yield (pmol/mg of dry sample)		Ratio	
			Shoot	Root	Shoot	Root
b1	$\text{GlcNAc}\beta 1 - \left[\begin{array}{l} \text{Man}\alpha 1 - 6 \\ \text{Man}\alpha 1 - 3 \end{array} \right] \text{Man}\beta 1 - 4 \text{GlcNAc-PA}$ $\text{Xyl}\beta 1$	Free-GNM3X (isomer 1)	10.8	14.8	12.6	17.1
		Free-GNM3X (isomer 2)	21.7	29.7	25.4	34.3
b2		Free-GNM3X (isomer 3)	24.8	31.6	29.0	37.0
d1	$\text{GlcNAc}\beta 1 - \text{Man}\alpha 1 - \text{Man}\beta 1 - 4 \text{GlcNAc-PA}$ $\text{GlcNAc}\beta 1 - \text{Man}\alpha 1 - \text{Xyl}\beta 1$	Free-GN2M3X (isomer 1)	31.9	47.8	37.4	55.3
		Free-GN2M3X (isomer 2)	63.7	95.5	74.7	110.4

Each *N*-glycan was expressed in terms of the percentage proportion relative to the GN2M3FX. Red bar indicates an unknown linkage types.

3.3.1.9 明所条件で生育した *O. sativa* 生長部に存在する *N*-グリカンについて

O. sativa 芽部および根部に存在する *N*-グリカンの構造、存在量および存在比は Table 3-2 に示した。*O. sativa* 芽部および根部において 17 種類の主要 *N*-グリカンが得られ、いずれの部位においても GN2M3FX 構造が最も多く存在していた。GN2M3FX 構造は芽部において 85.3 pmol/mg、根部において 86.5 pmol/mg とほぼ同等の存在量を示していた事から GN2M3FX の相対比は 100 とし、その他の構造の相対比を算出した。比較構造解析の結果、M3FX 構造は芽部および根部において GN2M3FX の次に多く存在しており、*N*-グリカンの総量に対する GN2M3FX および M3FX の割合は芽部では 46%、根部では 52% であった。しかしながら、GN2M3FX に対する M3FX 構造の相対比は芽部では 76.9%、根部では 33.7% であった事から、M3FX 構造は根部において劇的に減少した事が明らかとなった。カイワレダイコン (*Raphanus sativus*) の根のパウチマンノース型やハイマンノース型 *N*-グリカンの存在量が芽部よりも僅かに少ないことや (Mega, 2005)、芽部と根部の区別が曖昧な下等植物にはパウチマンノース型 *N*-グリカンが検出されなかった事から (Mega, 2007)、パウチマンノース型 *N*-グリカンは芽部と根部の分化に関わる基盤 *N*-グリカンである可能性が考えられた。

これまでに遊離型のハイマンノース型 *N*-グリカンはトマトやイチョウ、大豆など様々な植物から検出されており (Yunovitz *et al.*, 1996, Kimura and Matsuo, 2000b, Kimura and Kitahara, 2000)、植物の生長過程における遊離型のハイマンノース型 *N*-グリカンの存在量や濃度から遊離型のハイマンノース型 *N*-グリカンは植物の生長との関連性が高いことが示唆されてきた (Priem *et al.*, 1993, Nakamura *et al.*, 2008)。しかしながら、遊離型の複合型 *N*-グリカンの報告例は *O. sativa* 培養細胞 (Maeda and Kimura, 2010) と淡水植物の *Egeria densa* (Maeda *et al.*, 2017) のみであり、遊離型の複合型 *N*-グリカンやその存在量の増減がどのような生物学的意義を持つのかという点については明らかにされていないのが現状である。本研究の結果から、*O. sativa* 生長部には少なくとも 2 種類の遊離型複合型 *N*-グリカンの GNM3X および GN2M3X が存在し、いずれも非還元末端の β GlcNAc

または α -マンノースの結合様式が異なる構造異性体を持つ分子であることが明らかとなり、これらの遊離型複合型 *N*-グリカン¹は明所条件で生育された根部において増加傾向にあることが示された。いずれの遊離型複合型 *N*-グリカンも G.U が 5.73 (遊離 GNM3X) または 6.63 (遊離 GN2M3X) であり、芽部と根部において明確な差異が現れた M3FX 構造の G.U も 6.2 付近であった事から、*O. sativa* の生長部において糖重合度のやや低い、中間生成物としての *N*-グリカン構造は芽部と根部の分化や生長に関わる基盤 *N*-グリカンとなることが考えられた。またその他の可能性として、一般的に遊離型のハイマンノース型 *N*-グリカンは糖タンパク質の生合成経路におけるミスフォールド糖タンパク質や生長過程において変性した糖タンパク質のマーカーとして糖タンパク質の品質管理に関与する事から、遊離型の複合型 *N*-グリカンの挙動は地中で生育する根が通常とは異なる明所条件において生育されたことによるストレス応答の一種であることが考えられた。

3.3.2 暗所条件で生育した *O. sativa* 生長部の *N*-グリカン構造解析

光照射は植物の生長に重要な要素の1つである。植物は葉緑体において光合成を行い、生長に必要な分子を生成する。近年、葉緑体にはいくつかの葉緑体関連糖タンパク質があり、それらのタンパク質にはハイマンノース型 *N*-グリカンや複合型 *N*-グリカンが結合していることが報告されている (Buren *et al.*, 2011)。しかしながら、光照射に関連する *N*-グリカンの詳細な構造や挙動についての研究は行われていない。そこで、本節では暗所条件で生育した *O. sativa* 生長部の *N*-グリカン構造解析を行い明所条件のものと比較することにより、光条件が *N*-グリカン生合成に及ぼす影響について調べることを目的とした。

3.3.2.1 サイズ分画 HPLC 分析

暗所にて 120 時間の生育した *O. sativa* の芽部は鞘葉期 (コレオプチル) まで生長したことを確認した (Fig. 3-13)。生長した芽部および根部は回収し、ヒドラジン分解、*N*-アセチル化、PA 化を行い、サイズ分画 HPLC 分析を行った。その結果を Fig. 3-14 に示した。サイズ分画 HPLC 分析の結果、発芽 120 時間後 *O. sativa* の芽部および根部において、糖重合度 5~12 の間に a から l の 12 本のフラクションを確認した (Fig.3-14)。芽部ではフラクション f の蛍光強度が最も高く、次いでフラクション c、b、d の順に蛍光強度が低くなった。根部は芽部と同様にフラクション g の蛍光強度が最も高いことが示されたが、その他に芽部とは異なるフラクションの挙動が確認された。特に、明所条件で生育した場合と同様に、フラクション b が根部において著しく減少していた。検出された各フラクションの構造推定を行うため、芽部および根部の各 12 本のフラクションは全て分取し、逆相 HPLC 分析を行った。



Fig. 3-13. 暗所で 120 時間生育させた *O. sativa* 生長部

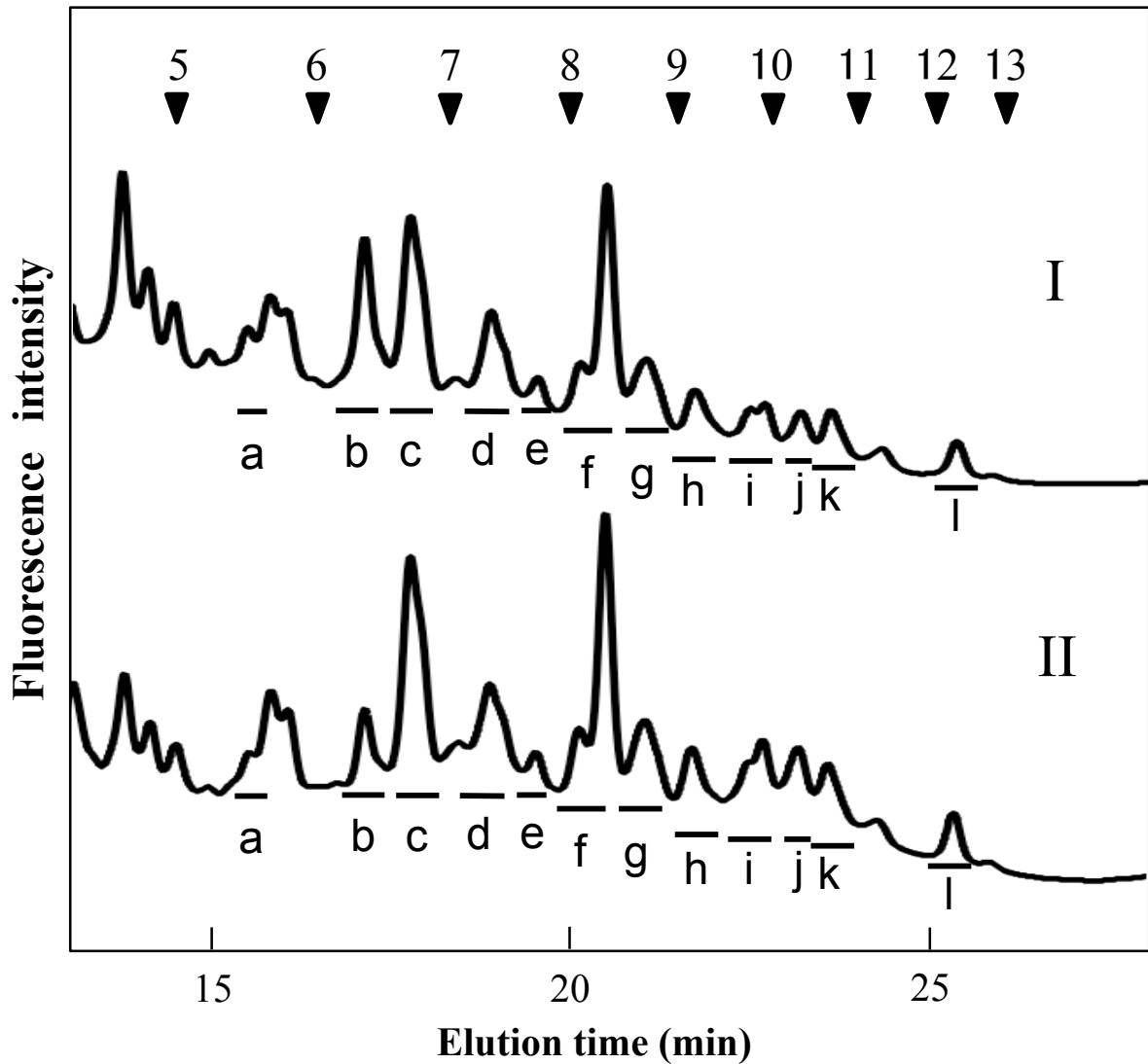


Fig. 3-14. サイズ分画 HPLC による暗所で 120 時間生育した *O. sativa* 芽根部の重合度別 *N*-グリカンパターン

I, 芽部、II, 根部

番号付き矢印 (▼); PA-イソマルトオリゴ糖の重合度に基づいた溶出位置

3.3.2.2 逆相 HPLC 分析

逆相 HPLC 分析の結果、芽部および根部由来の主要フラクションは同様の位置に溶出していることが示された (Fig. 3-3-1, 3-3-2, 3-3-3)。G.U が 5.0 以降に溶出した主要フラクションは 17 本であった。これまでに得られた *N*-グリカンの二次元マップ情報から、フラクション a1 は M3X、フラクション b1 は M3FX、フラクション b2 は M4X、フラクション b3 は GNM3X、フラクション d1 は ^{GN}M3FX、フラクション d2 は _{GN}M3FX、フラクション d3 は _{GalGN}M3X、フラクション d4 は GN2M3X、フラクション e1 は M6B、フラクション f1 は GN2M3FX、フラクション g1 は M7A、フラクション g2 は M7B、フラクション i1 は M8A、フラクション j1 は Gal1F1GN2M3FX、フラクション j2 は Gal21F1GN2M3X、フラクション k1 は M9A、フラクション l1 は Gal21F2GN2M3FX であることが明らかとなっている。

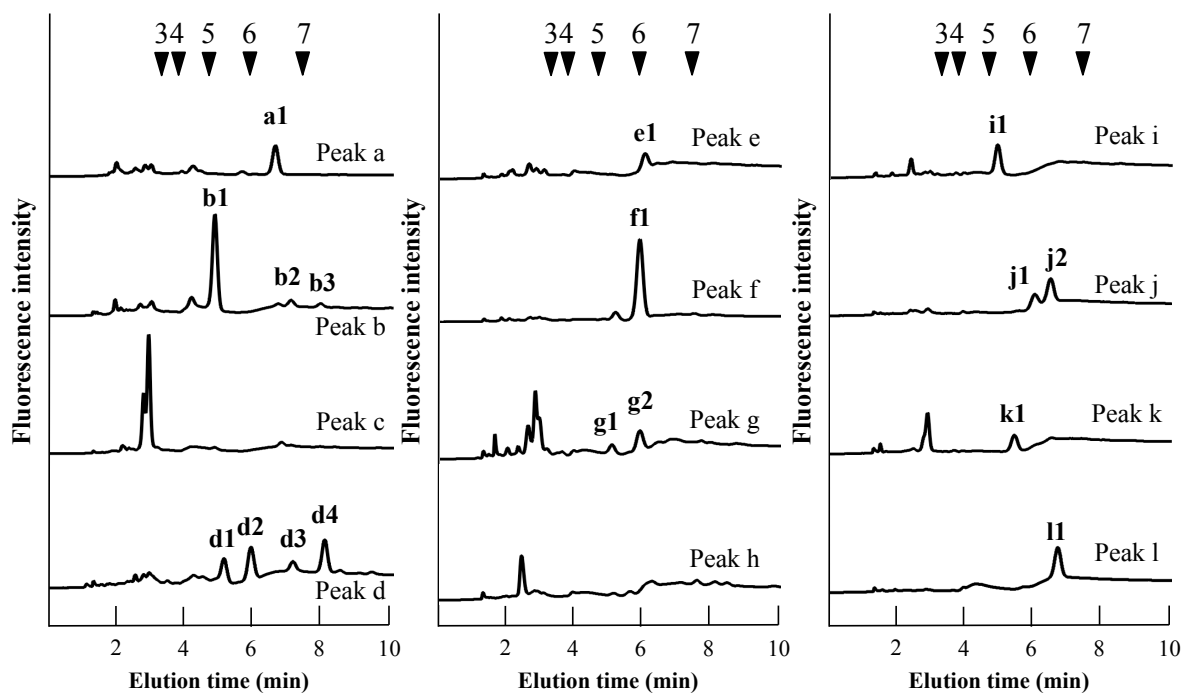


Fig. 3-15. 逆相 HPLC による発芽 120 時間後 *O. sativa* 芽部の構造特性格別 *N*-グリカンパターン

ーン

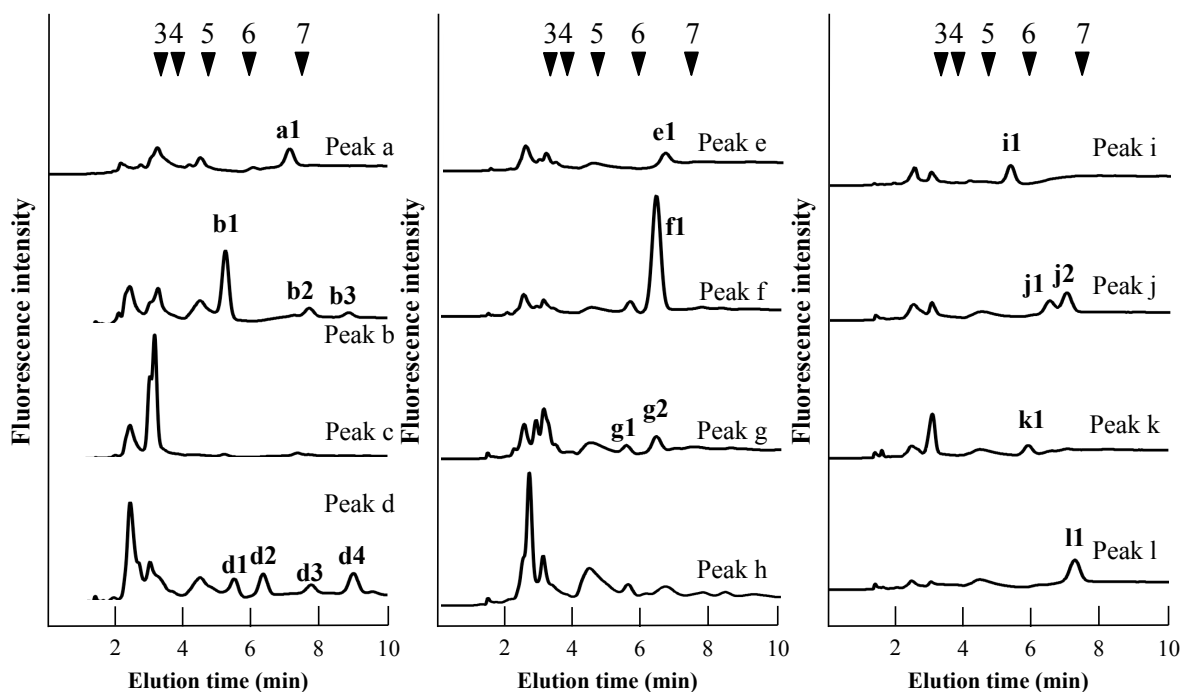


Fig. 3-16. 逆相 HPLC による発芽 120 時間後 *O. sativa* 根部の構造特性格別 *N*-グリカンパターン

ーン

3.3.3 光照射が *N*-グリカン生合成に及ぼす影響について

構造解析の結果、暗所条件下で生育した *O. sativa* 芽部および根部は同様の *N*-グリカン構造から構成されており、さらに、明所条件と同様に根部における M3FX 構造の相対比は芽部の約半分であることが明らかとなった (Table 3-3)。また M8A と M9A の相対比が根部において減少するなど、M3FX の他にも明所条件で生育した *O. sativa* 生長部 *N*-グリカンとの共通部分が確認された。

続いて、光照射が *N*-グリカン構造およびその生合成に及ぼす影響について、明所条件と暗所条件で生育した芽部を比較対象として考察した。比較構造解析の結果、M3X、M3FX、_{GN}M3FX、GN2M3X、Gal2F1GN2M3X および Gal2F2GN2M3FX の 6 種類は明所条件および暗所条件において相対比 5 以上 10 未満の僅かな差異が確認され、いずれも M3X または M3FX を基本骨格として持つ *N*-グリカンであることが示された (Fig. 3-16)。しかしながら、明所条件と暗所条件におけるこれらの *N*-グリカン構造の顕著な差異は確認されなかった事から、初期生長時の芽部における *N*-グリカンは光照射に対する感受性が低いことが示唆された。この結果は、根は地中に、芽は地上に存在する事から、光条件に対する根部の *N*-グリカンの感受性は低く、芽部の *N*-グリカンの光感受性は高いという予想とは異なっていた。加えて、 β 1,2 キシロース転移酵素ノックアウト *O. sativa* のクロロフィル量は野生型との差異が殆ど認められなかった事からも (Takano *et al.*, 2015)、*O. sativa* における光合成関連分子の挙動と *N*-グリカン生合成は互いに独立している事が示された。この事は植物の高等進化と *N*-グリカンの高等進化を考察する上で極めて興味深い結果であり、少なくとも *O. sativa* は光環境変化への適応には *N*-グリカンの変化を必要としないことが示唆された。

続いて、これまでに報告されている藻類およびコケ・シダ植物などの *N*-グリカン構造解析の結果から植物の高等進化と *N*-グリカンの高等進化の関連性について言及する。まず、光合成微生物と真核生物との共生により進化した単細胞緑藻類の 1 つである *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 *N*-グリカンは主にハイマンノース型およびコア β 1,2 キシ

ロース結合ハイマンノース型 *N*-グリカンで構成されている事が明らかにされている (Mathieu-Rivet *et al.*, 2013)。また、このような単細胞藻類が新たな真核生物に取り込まれた結果生じた二次植物の珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* は遺伝子解析上では GnT-I の存在が認められているにもかかわらず、主要 *N*-グリカンはハイマンノース型 *N*-グリカンである事が報告されている (Baïet *et al.*, 2011)。しかしながら、この *P. tricornutum* の GnT-I は GnT-I ノックアウト CHO 細胞において機能した事から、二次植物には植物の更なる高等進化の過程のために GnT-I の機能が既に保存されているものの、二次植物の状態では GnT-I の機能を発現することができない状態である事が示唆された。さらに、30 種類のコケ・シダ植物の *N*-グリカン構造解析から、パウチマンノース型 *N*-グリカンの出現はコケ植物の高等進化における主要な現象の 1 つであり、本研究結果と同様に芽部と根部の分化に対するパウチマンノース型 *N*-グリカンの関与が提唱されている (Mega, 2007)。この点については、*N*-グリカン生合成に関与する糖転移酵素の数が植物進化における環境適応のプロセスを反映することを示唆する報告がある事からも (Ulvskov *et al.*, 2013)、植物の高等進化の過程における *N*-グリカンプロセッシング酵素の多様化が *N*-グリカンの多様性を生み出し、植物の高等進化とともに *N*-グリカンの生合成経路も高等進化した事が考えられた。

これら一連の植物と *N*-グリカンの高等進化に関する研究報告を踏まえ、本研究結果から筆者は *N*-グリカンの高等進化が植物の高等進化と同時に進行してきたのではないかという仮説を提唱する (Fig. 3-17)。まず、*C. reinhardtii* や *P. tricornutum* では小胞体で生合成されるハイマンノース型糖鎖が主要糖鎖であった事から、これらの植物やその近縁に属する植物の糖鎖生合成においてゴルジ装置の機能の高度化がまだ行われていないことが考えられた。そして *P. tricornutum* などの二次植物において GnT-I は保存されているが GnT-I の機能は制限されている事から、少なくとも進化的に早期の植物の生長や生命維持に GnT-I の作用は必ずしも重要ではない事が考えられた。続いて、植物と *N*-グリカンの高等進化における重要な転換期として、コケ植物門の蘚苔類におけるパウチマンノ

ース型 *N*-グリカンの出現がある。この事は、保存されている *N*-グリカンプロセシング酵素を全て利用するか否かは別として、高等に進化した植物がハイマンノース型 *N*-グリカンをパウチマンノース型 *N*-グリカンに変換するために必要な糖転移酵素および糖加水分解酵素を獲得・保存し、進化段階に合わせて発達させてきた事を示している。このような植物特異的 *N*-グリカンの生合成経路において、ハイマンノース型 *N*-グリカンは初期段階で GnT-I により GNM5 構造に変換され、GNM5 構造は α -マンノシダーゼ II および β 1,2 キシロース転移酵素により GNM3X に変換される (Kajiura *et al.*, 2012)。この GNM3X 構造は *N*-グリカン生合成経路の分岐点となる構造であり、生合成経路の下流においてパウチマンノース型 *N*-グリカンや複合型 *N*-グリカンに変換される構造である。これら一連の生合成経路により生み出される *N*-グリカンの多様性の増加は植物進化の転換期において発生してきた事から、発芽前後の *O. sativa* 種子胚部における *N*-グリカン構成の差異や *O. sativa* の芽部と根部におけるパウチマンノース型 *N*-グリカンの差異もまた植物の環境適応における *N*-グリカン構造の変遷の 1 つと捉えることができ、これらの現象は植物の高等進化の過程を反映している事が示唆された。

Table 3-3 暗所芽根の推定構造

Fraction	Structure	Abbreviation	Ratio	
			shoot	root
a1	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \\ \text{Xyl}\beta 1 \end{array}$	M3X	20.5	15.8
b1	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \\ \text{Xyl}\beta 1 \qquad \qquad \qquad \text{Fuca}1 \end{array}$	M3FX	85.4	39.0
b2	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 2 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \\ \text{Xyl}\beta 1 \end{array}$	M4X	7.8	10.0
b3	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \\ \text{Xyl}\beta 1 \end{array}$	^{GN}M3X	3.4	4.0
d1	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \end{array}$	^{GN}M3FX	14.9	13.1
d2	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \\ \text{Xyl}\beta 1 \qquad \qquad \qquad \text{Fuca}1 \end{array}$	^{GN}M3FX	18.0	13.3
d3	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \\ \text{Xyl}\beta 1 \end{array}$	Gal1GNM3X	8.4	5.8
d4	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \\ \text{Xyl}\beta 1 \end{array}$	GN2M3X	15.1	14.2
e1	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \end{array}$	M6B	10.3	11.5
f1	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \\ \text{Xyl}\beta 1 \qquad \qquad \qquad \text{Fuca}1 \end{array}$	GN2M3FX	100.0	100.0
g1	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \end{array}$	M7A	5.6	5.2
g2	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \end{array}$	M7B	10.2	10.8
i1	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \end{array}$	M8A	18.1	13.2
j1	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1-3 \left[\begin{array}{l} \text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \\ \text{Xyl}\beta 1 \qquad \qquad \qquad \text{Fuca}1 \end{array} \right. \end{array}$	Gal1F1GN2M3FX	8.0	10.4
j2	$\begin{array}{c} \text{Fuca}1-4 \left[\begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \\ \text{Xyl}\beta 1 \end{array} \right. \end{array}$	Gal2F1GN2M3X	14.6	14.5
k1	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \\ \text{Fuca}1 \end{array}$	M9A	8.2	5.1
l1	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \\ \text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 3 \\ \diagup 2 \end{array} \\ \text{Fuca}1 \qquad \qquad \qquad \text{Xyl}\beta 1 \qquad \qquad \qquad \text{Fuca}1 \end{array}$	Gal2F2GN2M3FX	23.3	20.9

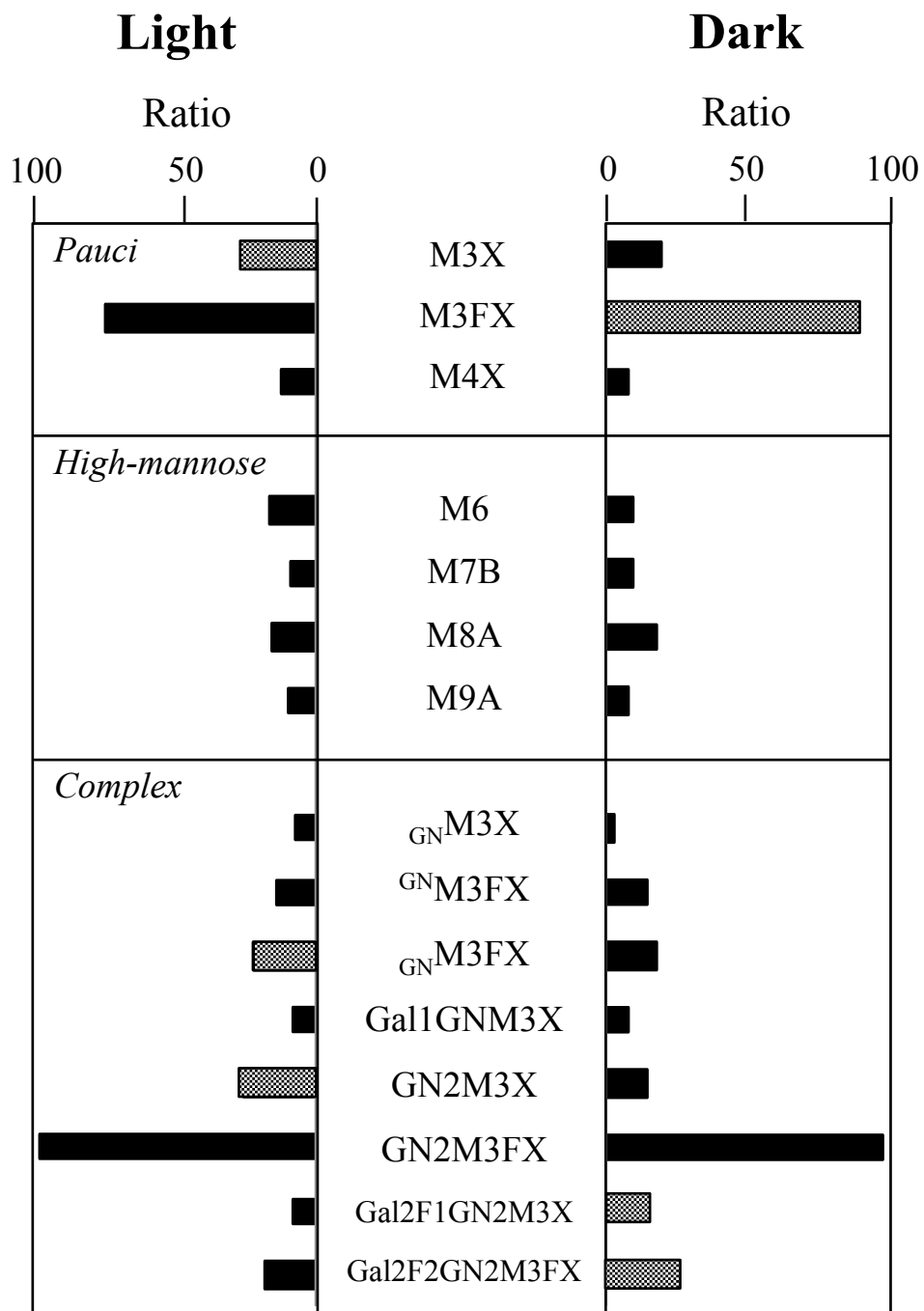


Fig. 3-16. 明暗条件におけるの根部に存在する *N*-グリカン相対比の比較

N-glycan and plant evolution

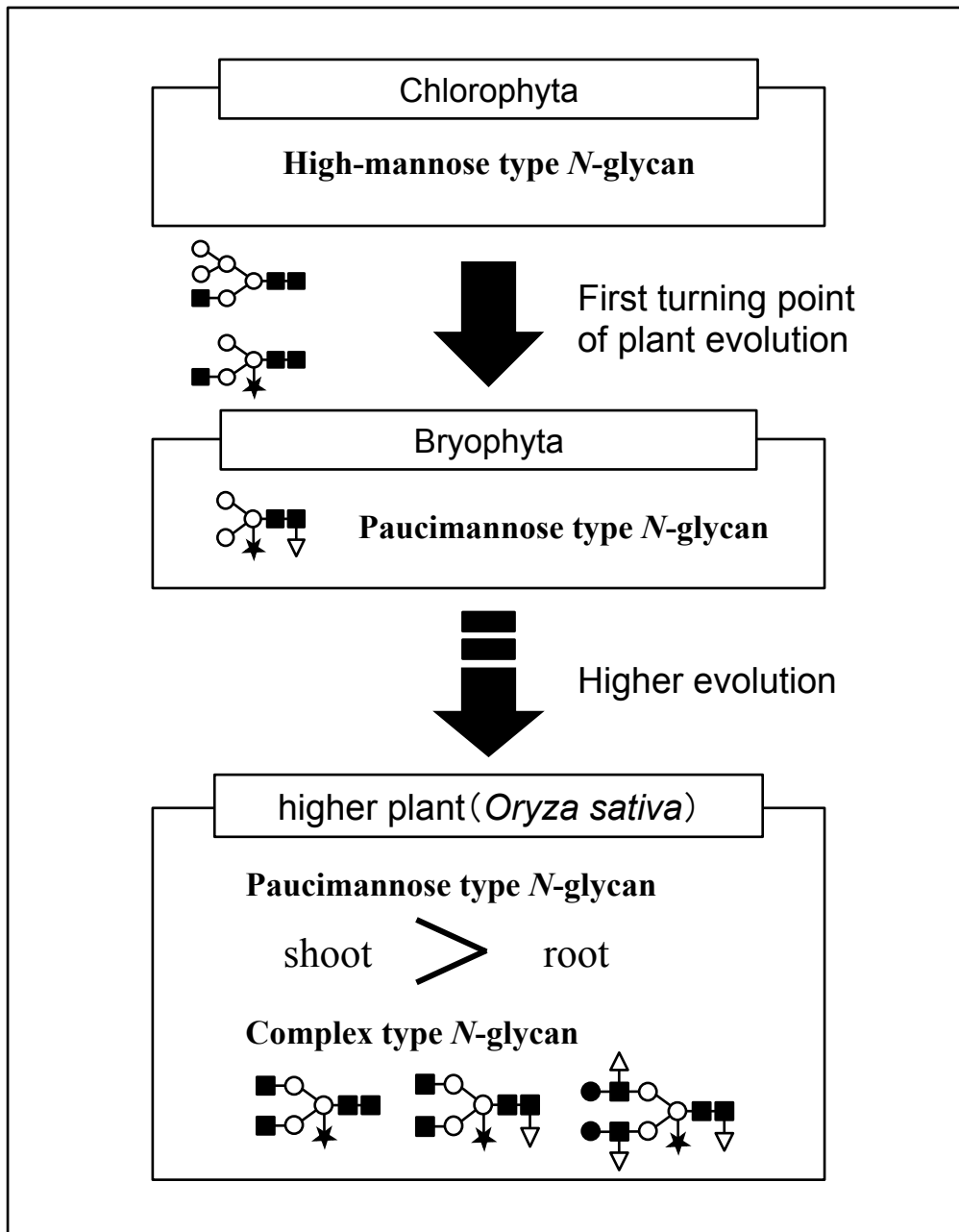


Fig. 3-17. 植物と *N*-グリカンの高等進化について

第4章 環境圧下における *O. sativa* 生長部位のグライコーム解析

4.1 緒言

第1章から第3章の研究において、*N*-グリカンタンパク質の翻訳後修飾の一つとして *O. sativa* の生長や発達に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。*N*-グリカン構造は細胞環境の他にも外環境の変化などの外的影響を敏感に反映する事から、外的影響を受けた植物の *N*-グリカン構造やその挙動を解析することは、新たな環境への適応を繰り返してきた植物の高等進化に付随した *N*-グリカンの高等進化の知見を得ることができる可能性が高いことが考えられた。しかしながら、第3章において異なる日照条件下で生育した *O. sativa* 生長部はその *N*-グリカン発現に殆ど差が確認されなかった事から、日常的な環境変化に伴う *N*-グリカン発現の変化は非常に少ないことが示唆された。そこで、過度な環境変化を想定した生育環境における植物の生長や発達に焦点を当てることとした。本章では過度な環境変化の例として、*O. sativa* を含む水生生物にとって最も懸念される、大量の化学物質が環境中に流出することによる環境汚染に着目した。研究対象とした銀ナノコロイド (Silver nanocolloids, SNCs) はその抗菌活性から多くの抗菌製品に使用され、大量に消費されている化学物質である。しかしながら、SNCs が環境中へ大量流出することによる潜在的危険性に関する情報は少なく、植物の発達やその生育環境へ与える影響に関する報告は殆どないのが現状である。生育環境は植物の生長や発達に関わる重要な外的要因である事から、高濃度の重金属汚染など大量の化学物質が生育環境中へ流出することによる影響は植物の生長や発達に及ぶ可能性が高く、それらの影響が *N*-グリカン生合成にも影響を及ぼすことが考えられる。そこで、本研究では重金属汚染を想定した過度な生育環境の変化を受けた植物の生長・発達や *N*-グリカン構造の挙動を観察することにより、植物の高等進化の過程で繰り返し受けてきた過度な環境ストレス下において *N*-グリカンがどのような挙動を示すのか調べることを目的とし、

SNCs 曝露を受けた *O. sativa* 生長部の *N*-グリカン構造解析を行った。

4.2 実験方法

4.2.1 実験材料

本研究には、茨城県つくば市産のコシヒカリ (2010 年産) を用いた。まずシャーレに水道水 (対照区) または各濃度の SNC 懸濁液 (0.5, 1.0, 1.5, 3.0, 5.0, 10.0, 25.0 mg/L) を張り、*O. sativa* 種子を浸水させた。次に暗所 (37°C) にて 96 時間のインキュベーションを行った。生育後の *O. sativa* 各部位は凍結乾燥させ、全て乳棒と乳鉢で細かくすり潰した。その後、再び凍結乾燥機にかけ、-30°C にて密封保存した。

4.2.2 ピリジルアミノ化 *N*-グリカンの調製

N-グリカンの調製は、1.2.2 に示した通りに行った。

4.2.3 サイズ分画 HPLC 分析

サイズ分画 HPLC は、1.2.3 に示した通りに行った。

4.2.4 逆相 HPLC 分析

逆相 HPLC は、1.2.4 に示した通りに行った。

4.2.5 質量分析

試料の調製およびその質量分析は、1.2.5 に示した通りに行った。質量分析装置は AXIMA[®] Resonance を用いた。

4.2.6 酵素消化

各グリコシダーゼの基質特異性、および反応条件は「本論で扱った試薬」に記載した。酵素反応の停止は、全て 98°C で 5 分間反応液を加熱処理することにより行った。本章で用いた糖加水分解酵素は以下に示した。

- α -マンノシダーゼ (タチナタマメ由来, Sigma-Aldrich)
- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (*Streptococcus pneumoniae* 由来, New England BioLab)

4.3 結果および考察

4.3.1. 表現型観察

はじめに、SNC 曝露が *O. sativa* 種子の生長にどのような影響を与えるのか観察するため、発芽誘導 48 時間後の発芽率の測定を行った。その結果、48 時間後の発芽率は 95% (対照区)、100% (SNCs 0.5 mg/L)、100% (SNCs 1.0 mg/L)、95% (SNCs 1.5 mg/L)、100% (SNCs 3.0 mg/L)、95% (SNCs 5.0 mg/L)、90% (SNCs 10.0 mg/L)、100% (SNCs 25.0 mg/L)であった。この結果から、どの SNC 濃度も *O. sativa* の発芽には影響を及ぼさないことを確認した。続いて 96 時間培養を行った対照区および SNC 曝露区の *O. sativa* 生長部の身長測定を行った。その結果、対照区の芽部および根部の長さは、芽部が 1.46 ± 0.08 cm、根部が 0.98 ± 0.08 cm であった (Fig. 4-1-A)。芽部については、どの SNC 濃度区においても伸長への影響は確認されなかった一方で、根部は、SNC 濃度が 0.5 mg/L から 10.0 mg/L の曝露区において対照区よりも根の伸長が増加していた。しかしながら、SNC 濃度 25.0 mg/L の曝露区において、根部の長さは対照区の半分以下であった。対照区および SNC 濃度 25.0 mg/L の曝露区における *O. sativa* 生長部を Fig. 4-1-B に示した。対照区の根部は色が白く、1 cm 程生長していたのに対し、SNC 25.0 mg/L 曝露区の根部は茶色に変色し、対照区よりも太く短くなっていた。これらの観察結果から、根部は SNC 曝露により重篤な影響を受けていることが考えられた。

水溶液中において、SNC は銀ナノ粒子と銀ナノ粒子から生成される遊離の銀イオンの形態で存在しており、一般的には、酸化力を有する遊離銀イオンのほうがナノ粒子よりも毒性が高いことが知られている。本研究に用いた SNC (粒子径 28.4 ± 8.5 nm) における銀ナノイオンの割合は 81.1% と全体の約 8 割を占めている (Kataoka *et al.*, 2016)。他の植物を用いた銀ナノ粒子曝露研究において、銀イオンはシロイヌナズナの根部に蓄積しやすい傾向があり (Wang *et al.*, 2013)、蓄積した銀イオンは細胞代謝に関与するタンパク質に影響をおよぼすことが報告されている (Hossain *et al.*, 2016)。また、SNCs あるいは銀ナノイオンは水草の *Eruca sativa* の小胞体や液胞に存在するタンパク質に影響を

及ぼすことや (Vannini *et al.*, 2013)、*O. sativa* 生長部の全糖量にも影響を及ぼすことも報告されている (Nair and Chung, 2014)。これらの報告から、SNC 曝露は植物の細胞代謝やそれに伴うタンパク質の翻訳後修飾へ影響を及ぼすことが示唆され、この影響はタンパク質の翻訳後修飾の 1 つとしての *N*-グリカン修飾に対して生じることが考えられた。従って、SNC 曝露が *O. sativa* 生長部に及ぼす影響について調べるため、植物の生長と *N*-グリカンの挙動に着目し、SNC 曝露を受けた *O. sativa* 生長部の *N*-グリカン構造解析を行った。

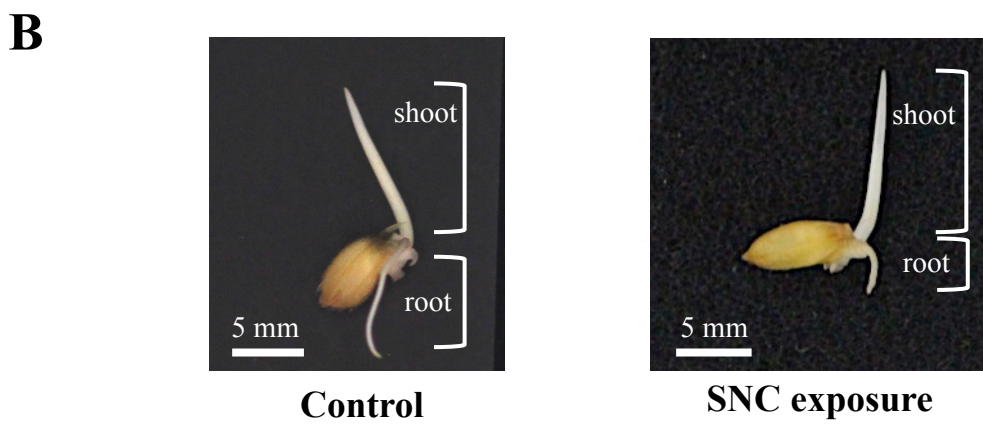
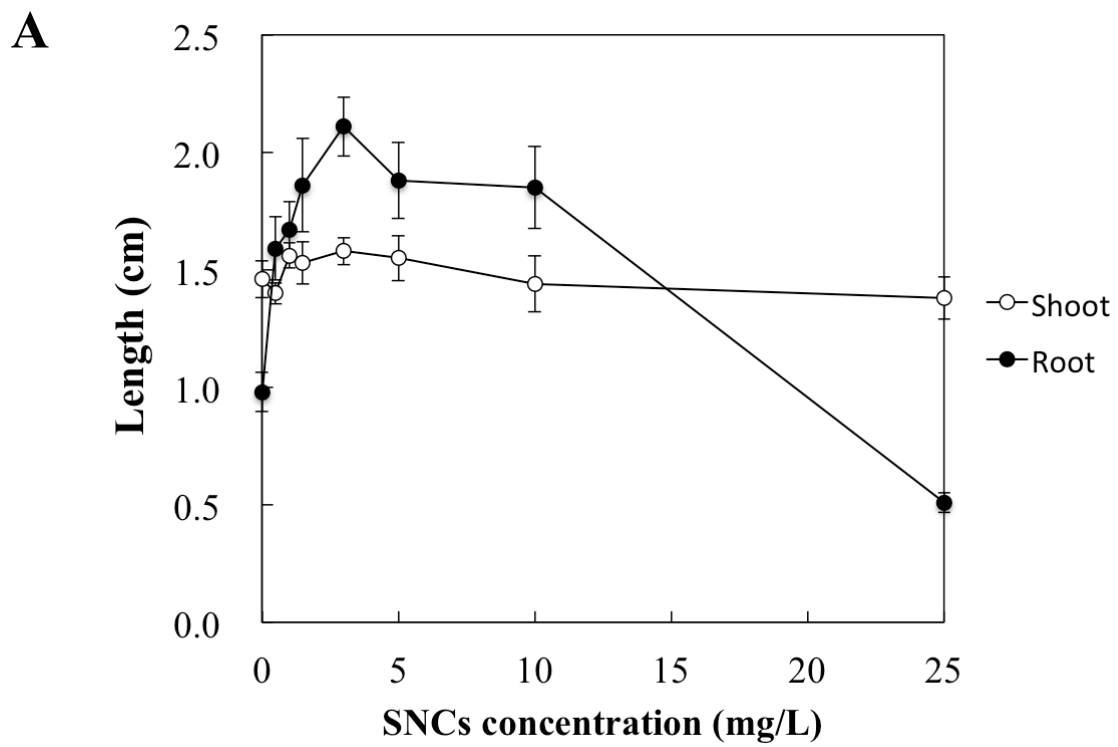


Fig. 4-1. SNC 曝露 *O. sativa* 生長部の観察結果

A, 芽部および根部の伸長測定結果、B, 対照区および 25.0 mg/L SNC 曝露区の *O. sativa* の写真

4.3.2 芽部の N-グリカン構造解析

4.3.2.1 サイズ分画 HPLC 分析

O. sativa 生長部における N-グリカン構造やその生合成経路に対する SNCs の影響を調べるため、対照区および最も高濃度の 25.0 mg/L SNCs 溶液で生育した *O. sativa* 生長部の糖鎖構造解析を行った。まず、対照区と SNC 曝露区において表現型に差異が殆ど認められなかった芽部のサイズ分画 HPLC 分析を行った。サイズ分画 HPLC 分析の結果、フラクション a から o の 15 本のフラクションが対照区と SNC 曝露区において検出され、フラクション数の増減は確認されなかった (Fig. 4-2)。フラクション g は対照区および SNC 曝露区において最も強い蛍光強度を示し、フラクション c、フラクション e がフラクション g に次いで強い蛍光強度を示した。フラクション l については、SNC 曝露区において相対的に減少傾向にあった。

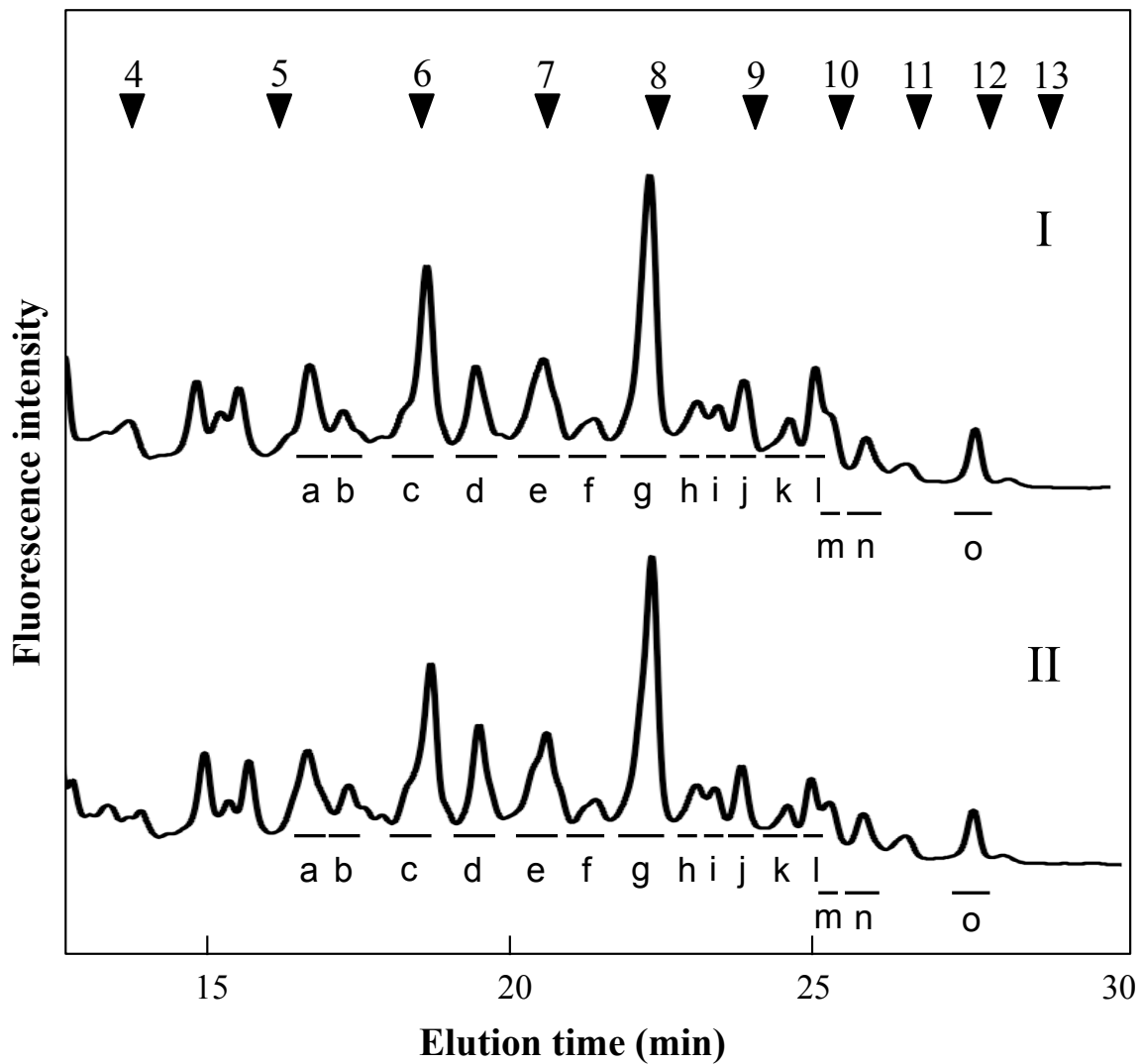


Fig. 4-2. サイズ分画 HPLC による芽部の重合度別 *N*-グリカンパターン

I, 対照区 *O. sativa* 芽部、II, SNC 曝露区 *O. sativa* 芽部

番号付き矢印 (▼); PA-イソマルトオリゴ糖の重合度に基づいた溶出位置

4.3.2.2 逆相 HPLC 分析

Fig. 4-2 で得られた 15 本のフラクションは全て分取し、逆相 HPLC 分析に供した。対照区および SNC 曝露区の逆相 HPLC 分析の結果、G.U が 5.0 以降のフラクションは 15 本であった (Fig. 4-3-1, 4-3-2)。これらのフラクションは、これまでに得られた *N*-グリ

カンの二次元マップ情報から、

フラクション a1, b1 は M3X、

フラクション c1 は M3FX、

フラクション e1 は ^{GN}M3FX、

フラクション e2 は _{GN}M3FX、

フラクション d4 は GN2M3X、

フラクション f1 は M6B、

フラクション g1 は GN2M3FX、

フラクション h1 は M7A、

フラクション h2 は M7B、

フラクション k1 は M8A、

フラクション m1 は Gal1F1GN2M3FX、

フラクション m2 は Gal21F1GN2M3X、

フラクション n1 は M9A、

フラクション o1 は Gal21F2GN2M3FX
であることが明らかとなっている。2 次元糖鎖マッピングにて構造決定したフラクションには簡略化した *N*-グリカン構造を記載した。

一方で、Fig. 4-2 のサイズ分画 HPLC 分析において対照区と SNC 曝露区間の溶出パターンに差異のあったフラクション 1 の逆相 HPLC 分析を行った結果、主要フラクションであるフラクション 1 は G.U が 3.0 よりも早く溶出することを確認した。第 3 章の *N*-グリカン構造解析の結果から、G.U が 3.0 よりも早く溶出したフラクション 1 は還元末端側

の GlcNAc を 1 残基のみ有する遊離型 *N*-グリカンである可能性が高いことが示された。

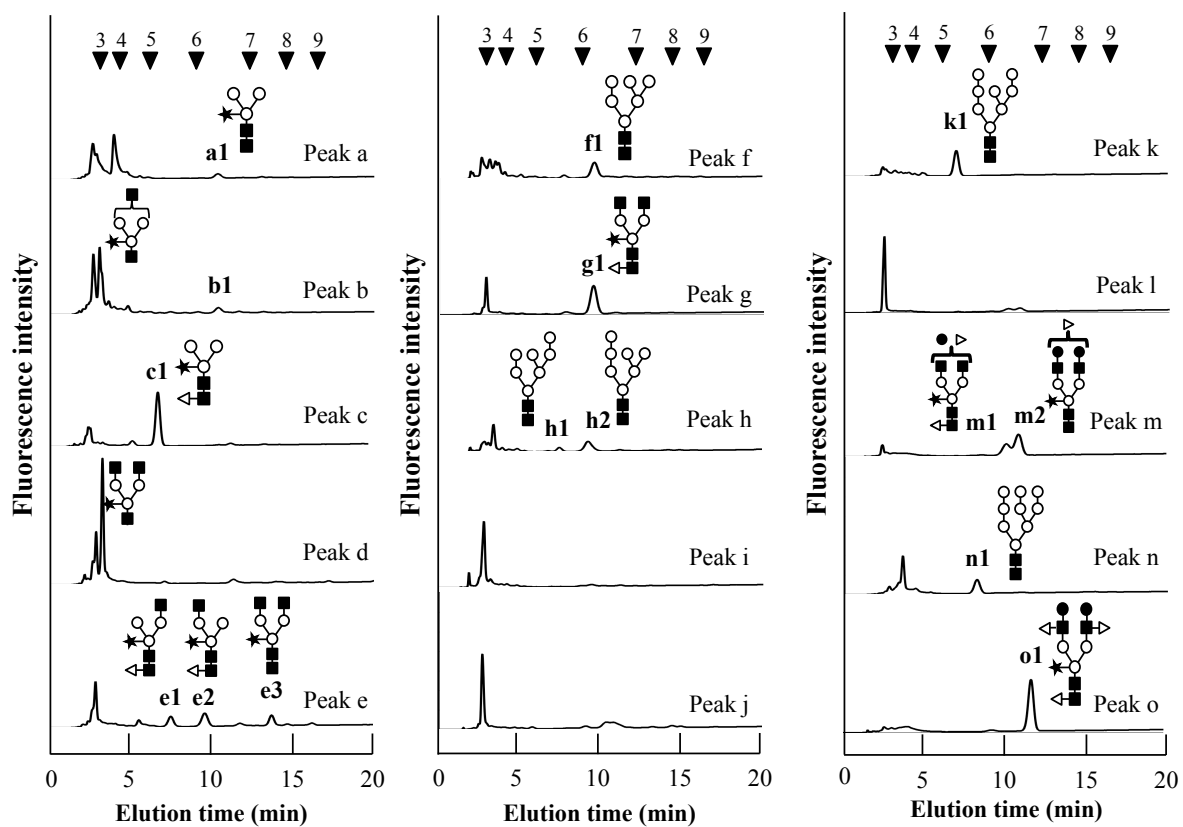


Fig. 4-3-1. 逆相 HPLC による対照区 *O. sativa* 芽部の構造特異的 *N*-グリカンパターン

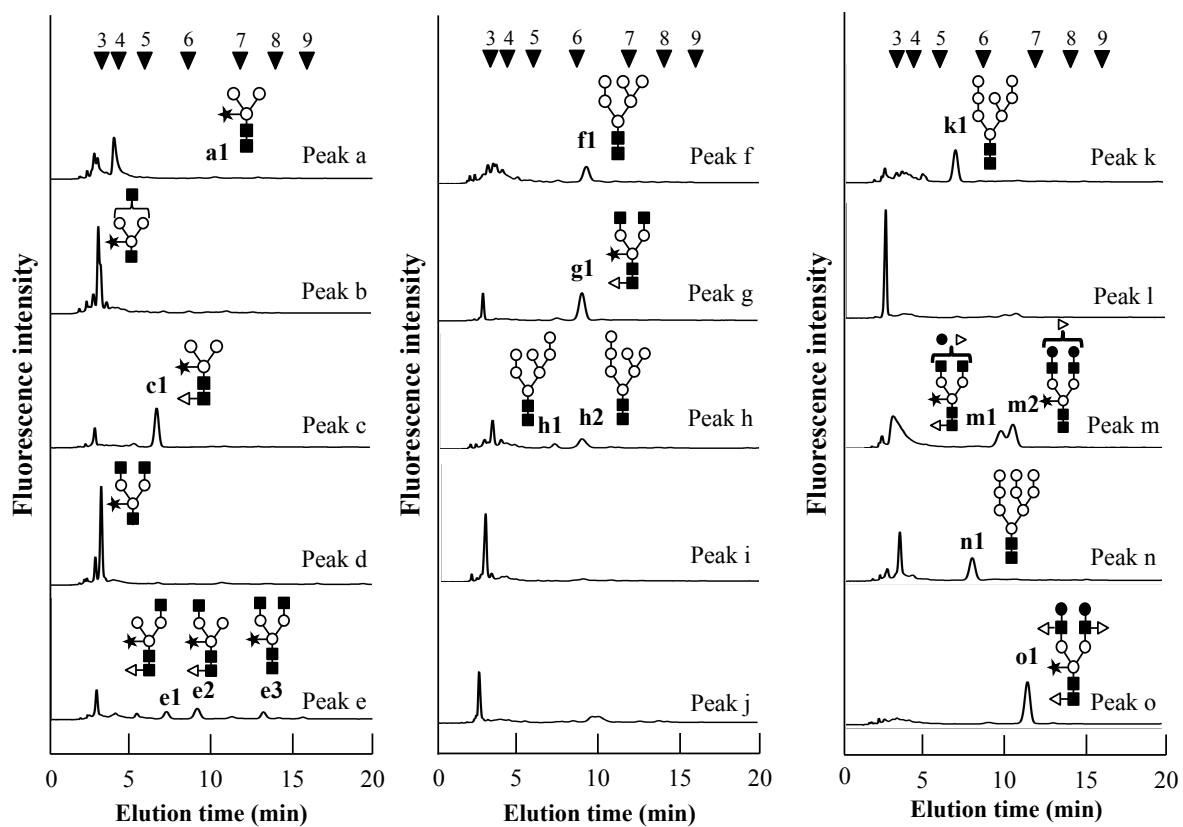


Fig. 4-3-2. 逆相 HPLC による SNC 曝露区 *O. sativa* 芽部の構造特性別 N-グリカンパターン

4.3.2.3 遊離型ハイマンノース型 *N*-グリカンの構造解析

質量分析の結果、フラクシオン1は 1780.3210 (Na^+)の m/z 値を示した。この m/z 値から、フラクシオン1は還元末端側の GlcNAc が 1 残基のみ結合した遊離型ハイマンノース型 *N*-グリカンの M9 構造であることが予想された。続いて、構成糖およびその結合様式を確認するため、フラクシオン1はの α -マンノシダーゼ消化を行った。ポジティブコントロールには糖鎖標準品の M8A (2 pmol/ μL) を用いた。 α -マンノシダーゼ消化の結果、M8A (G.U = 9.66) は G.U が 4.48、5.80 および 6.53 前にシフトしたフラクシオンが得られ、G.U からそれぞれのフラクシオンは M8A から α -マンノースが 5~7 残基遊離した M3、M2 および M1 構造であることが示された (Fig. 4-4A-II)。ポジティブコントロールの結果を踏まえ、フラクシオン1はの α -マンノシダーゼ消化を行った。なお、Fig. 4-3-1 の逆相 HPLC 分析においてフラクシオン1はほぼ単一フラクシオンであったため、 α -マンノシダーゼ消化はサイズ分画 HPLC にて分取後のフラクシオン1を用いた。 α -マンノシダーゼ消化の結果、1は (G.U = 9.96) は G.U が 6.67 および 7.45 前にシフトしたフラクシオンが得られ、G.U からそれぞれのフラクシオンは遊離型 M9 から α -マンノースが 7 残基および 8 残基遊離した M2 および M1 構造であることが示された (Fig. 4-4B-II)。 α -マンノシダーゼ消化後の G.U が 9~10 付近のフラクシオンについては、逆相 HPLC 分析にて1とは異なる G.U をもち、非還元末端に α -マンノース残基が結合していない別の糖分子である可能性が高い。酵素消化の結果から、フラクシオン11は遊離型ハイマンノース型 *N*-グリカンの M9 であることが示された。

さらに、逆相 HPLC 分析において遊離型ハイマンノース型 *N*-グリカンを含む可能性が高いフラクシオンについて質量分析を行った。フラクシオン g およびフラクシオン j の質量分析の結果、それぞれ 1456.6669 (Na^+)および 1619.2116 (Na^+)の m/z 値を示した。この m/z 値から、フラクシオン g およびフラクシオン j は還元末端側の GlcNAc が 1 残基のみ結合した遊離型ハイマンノース型 *N*-グリカンの M7 および M8 構造であることが予想された。従って、フラクシオン g およびフラクシオン j の構成糖およびその結合様式を

確認するため、フラクション g およびフラクション j の α -マンノシダーゼ消化を行った。フラクション g の α -マンノシダーゼ消化の結果、フラクション g (G.U = 8.36) は G.U が 5.07 および 5.85 前にシフトしたフラクションが得られ、G.U からそれぞれのフラクションは遊離型 M7 から α -マンノースが 5 残基および 6 残基遊離した M2 および M1 構造であることが示された (Fig. 4-4C-II)。また、フラクション j の α -マンノシダーゼ消化の結果では、フラクション j (G.U = 9.21) は G.U が 5.92 および 6.70 前にシフトしたフラクションが得られ、G.U からそれぞれのフラクションは遊離型 M8 から α -マンノースが 6 残基および 7 残基遊離した M2 および M1 構造であることが示された (Fig. 4-4D-II)。

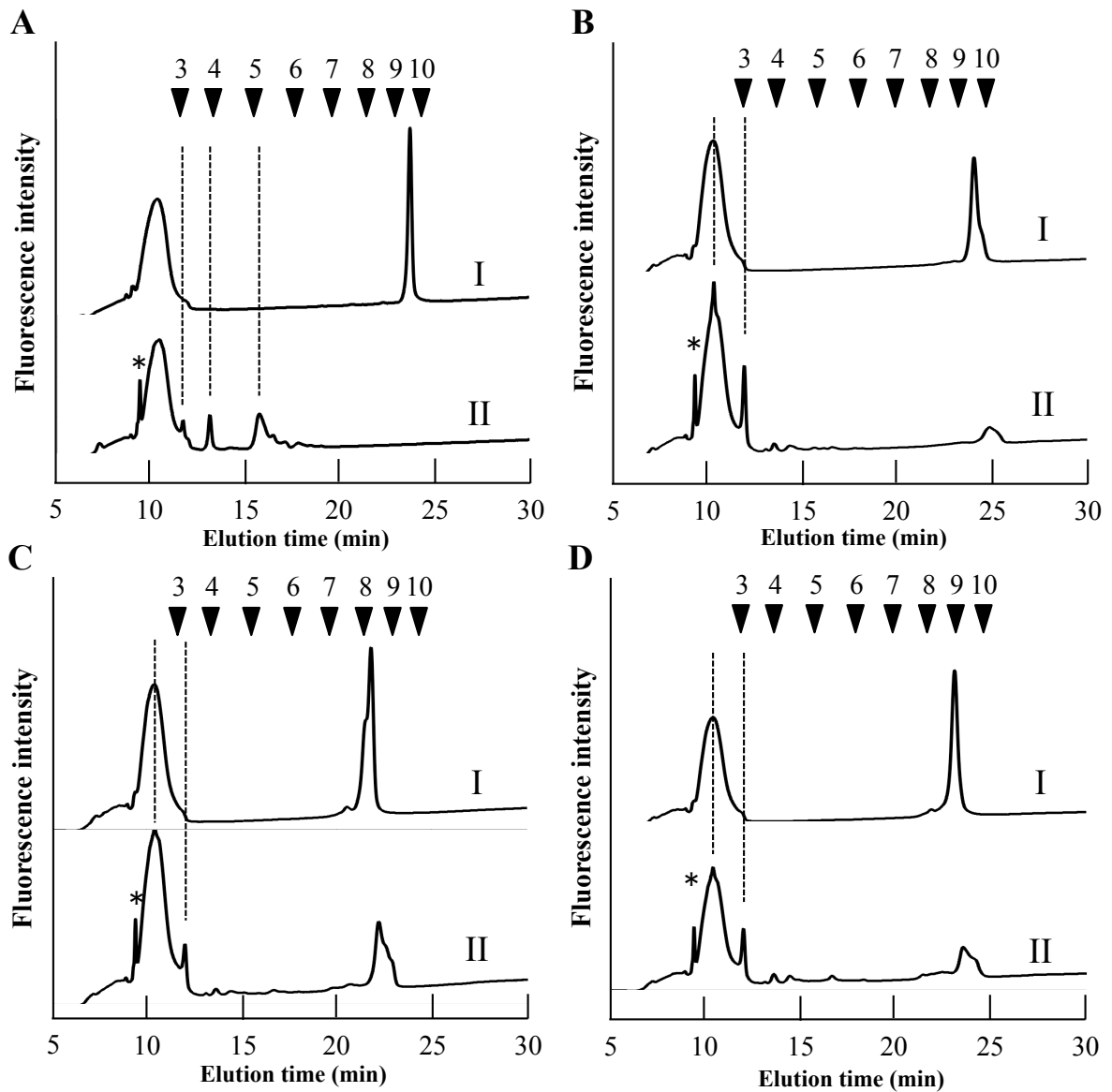


Fig. 4-4. フラクシオン I、フラクシオン g およびフラクシオン j の α -マンノシダーゼ消化産物のサイズ分画 HPLC 結果

A-I, M8A、A-II, A-I の α -マンノシダーゼ消化後、

B-I, フラクシオン I、B-II, B-I の α -マンノシダーゼ消化後

C-I, フラクシオン g、C-II, B-I の α -マンノシダーゼ消化後

D-I, フラクシオン j、D-II, B-I の α -マンノシダーゼ消化後

4.3.2.4. 対照区と SNC 曝露区の *O. sativa* 芽部に存在する *N*-グリカンについて

対照区と SNC 曝露区において得られた全ての *N*-グリカンの構造および存在比は Fig. 4-5 に示した。存在比は対照区および SNC 曝露区において最も多く存在していた GN2M3FX 構造を 100 として算出した。比較解析の結果、対照区と SNC 曝露区間において *N*-グリカン構造や相対比は全体として同様のパターンを示したが、パウチマンノース型 *N*-グリカンと一部の複合型 *N*-グリカンおよび遊離型 *N*-グリカンは SNC 曝露区において僅かに減少していた。M3X は 7 (対照区) から 2 (SNC 曝露区)、M3FX は 74 (対照区) から 60 (SNC 曝露区)、Gal2F1GN2M3X は 19 (対照区) から 10 (SNC 曝露区)、遊離型 M8 は 19 (対照区) から 13 (SNC 曝露区)、遊離型 M9 は 36 (対照区) から 23 (SNC 曝露区) であった。また、相対比較の結果、SNC 曝露区において増加した *N*-グリカンは検出されなかった。しかしながら、SNC 曝露 *O. sativa* 芽部は対照区との生長度の差が殆ど確認されなかったことから、本節における *N*-グリカンの減少量では、表現型の変化に大きな影響がないことが示唆された。

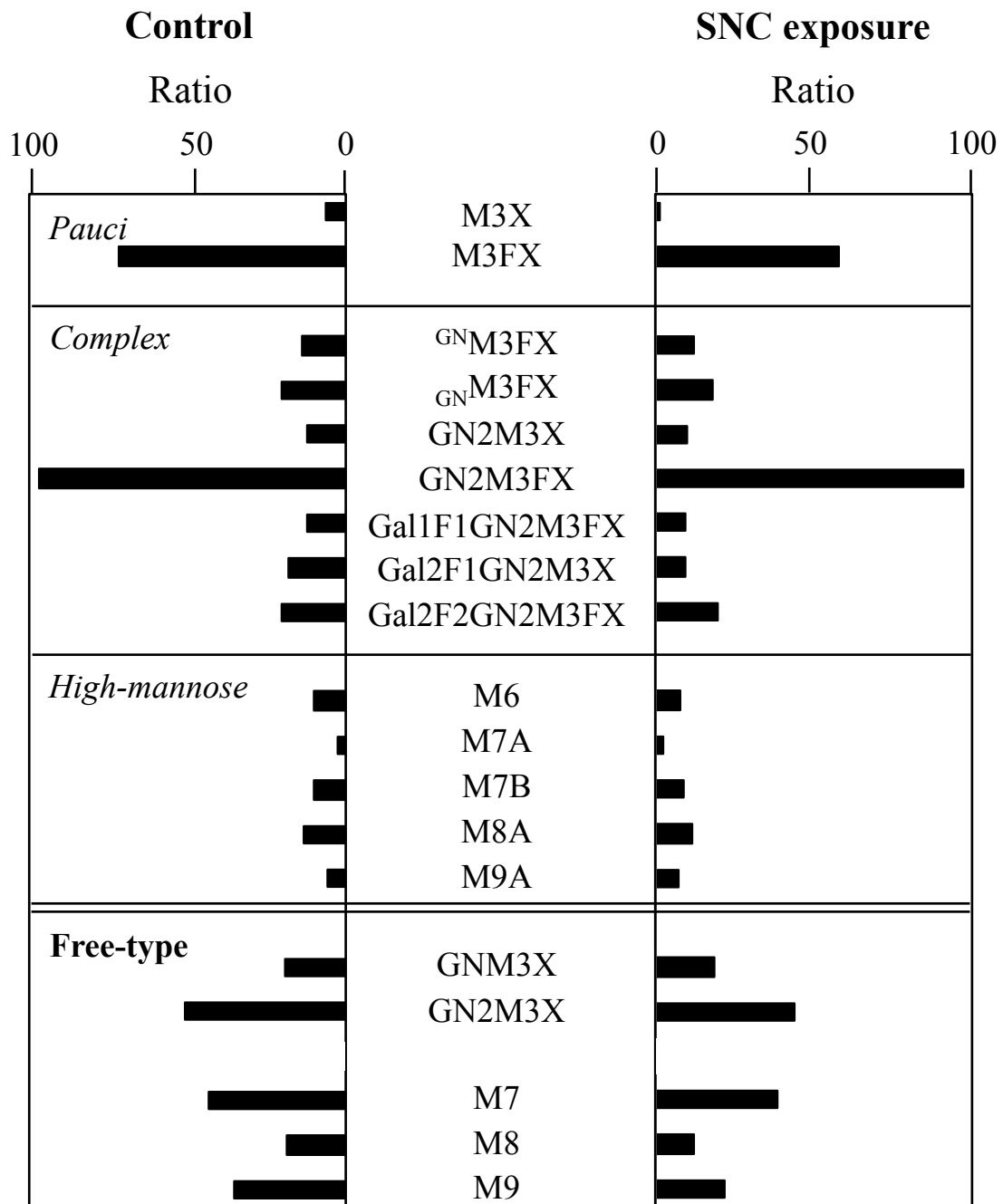


Fig. 4-5. 対照区および SNC 曝露区の芽部における N-グリカン相対比の比較

4.3.3 根部の *N*-グリカン構造解析

4.3.3.1 サイズ分画 HPLC 分析

続いて、表現型に顕著な差異が認められた根部のサイズ分画 HPLC 分析を行った。その結果、対照区および SNC 曝露区のいずれにおいてもフラクション a から m の 13 本のフラクションが確認された (Fig. 4-6)。対照区において、最も高い蛍光強度を示したのはフラクション g であり、次いでフラクション d、フラクション f の順であった。一方、SNC 曝露区において最も高い蛍光強度を示したのはフラクション g であったが、フラクション b が 2 番めに高い蛍光強度を示した点は対照区とは異なっていた。また、SNC 曝露区のフラクション a、フラクション b、フラクション e、フラクション m は対照区のものよりも相対的に高いことが示されたため、これら 4 フラクションの逆相 HPLC 分析を行った。

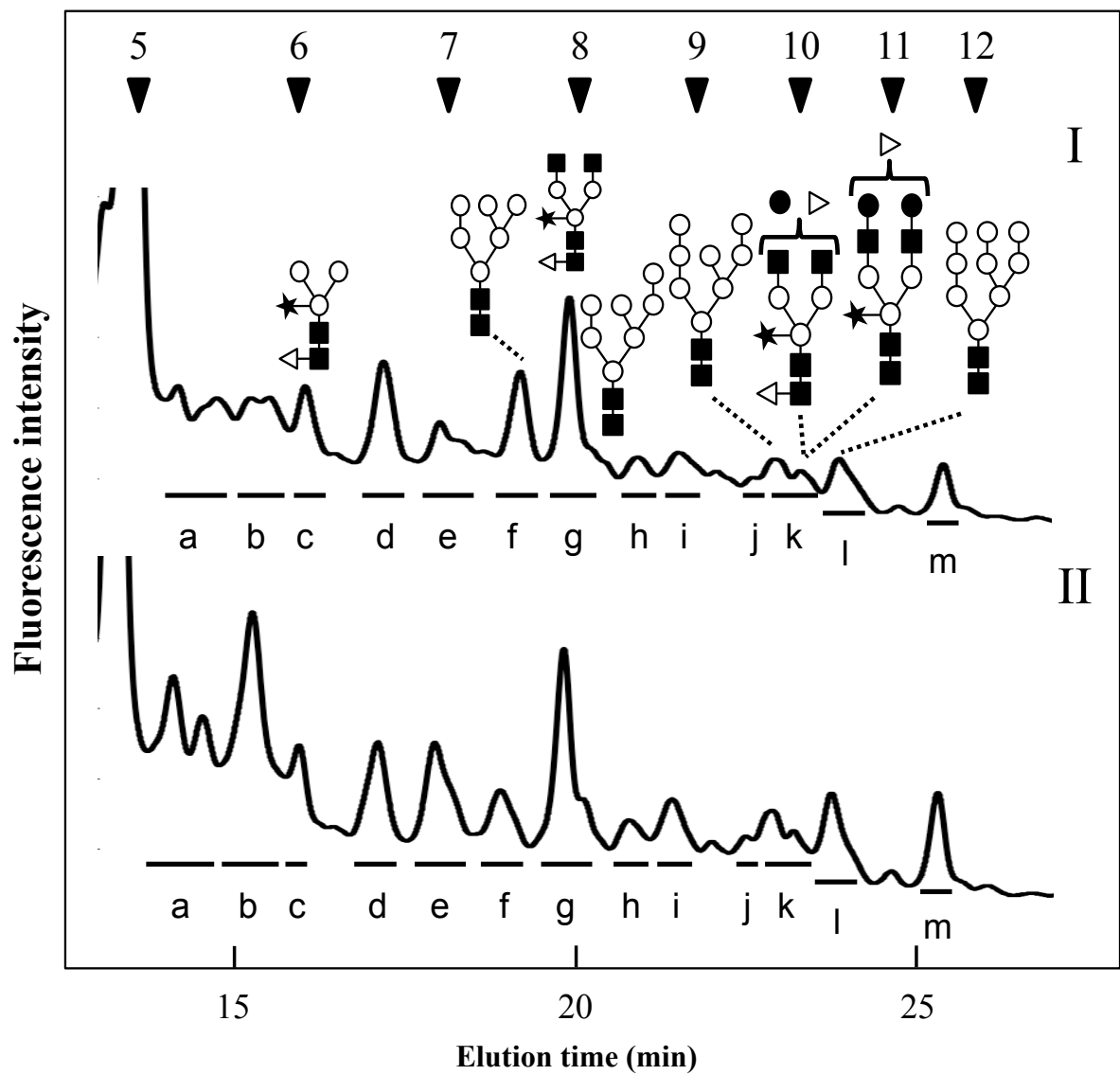


Fig. 4-6. サイズ分画 HPLC による根部の重合度別 *N*-グリカンパターン

I, 对照区、II, SNC 曝露区

番号付き矢印 (▼); PA-イソマルトオリゴ糖の重合度に基づいた溶出位置

4.3.3.2 逆相 HPLC 分析

フラクシオン a、フラクシオン b、フラクシオン e およびフラクシオン m は Fig. 4-6 のサイズ分画 HPLC 分析において SNC 曝露区での相対量の増加が確認されたため、逆相 HPLC に供し構造異性体の分離を行った。まず、フラクシオン e およびフラクシオン m の逆相 HPLC 分析の結果、フラクシオン e はフラクシオン e1、フラクシオン e2 およびフラクシオン e3 の 3 本 (Fig. 4-7A)、フラクシオン m はフラクシオン m1 の 1 本 (Fig. 4-7B) が G.U が 5.0 以降の主要フラクシオンとして検出された。これら 4 本のフラクシオンについてはこれまでに得られた N-グリカンの二次元マップ情報から、フラクシオン e1 は $^{\text{GN}}\text{M3FX}$ 、フラクシオン e2 は $^{\text{GN}}\text{M3FX}$ 、フラクシオン d4 は GN2M3X 、フラクシオン m1 は Gal21F2GN2M3FX であることが明らかとなった (Fig. 4-7、フラクシオン上部に構造を記載した)。

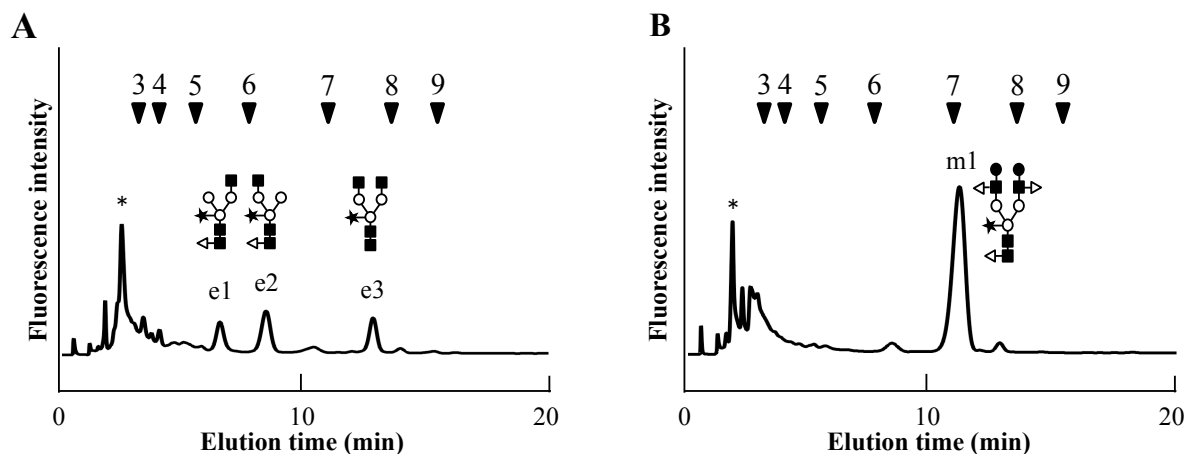


Fig. 4-7. 逆相 HPLC による SNC 曝露区のフラクシオン e およびフラクシオン m の構造特性別 N-グリカンパターン

A, フラクシオン e の逆相 HPLC 分析結果

B, フラクシオン m の逆相 HPLC 分析結果

続いて、フラクシオン a の逆相 HPLC 分析の結果、G.U が 5.0 以前のフラクシオンが 5 本、G.U が 5.0 以降のフラクシオンが 1 本検出された (Fig. 4-8A)。逆相 HPLC 分析における糖鎖標準品のラクト-*N*-ペンタオース (Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc-PA) の G.U は 4.34 (Fig. 4-7B) である事から、逆相 HPLC におけるフラクシオン a1~a5 の溶出位置はラクト-*N*-テトラオースのような *N*-グリカン以外の構成糖および結合様式を有した分子であることが考えられた。また、G.U は 5.20 を示したフラクシオン a6 は、M7A の G.U と一致したが、サイズ分画 HPLC 分析における G.U が M7A と一致しなかったため、フラクシオン a6 も *N*-グリカン以外の構成糖および結合様式を有した分子であることが考えられた。

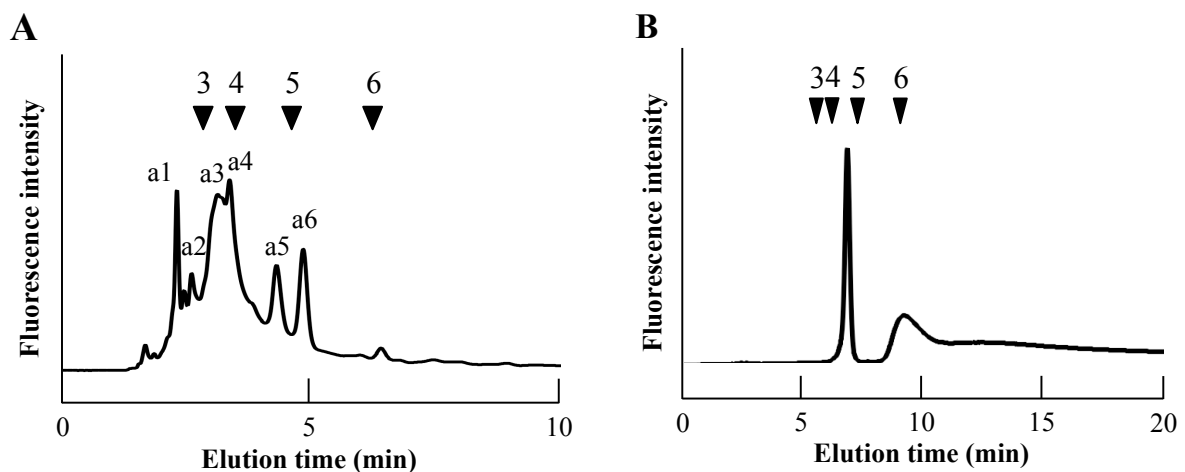


Fig. 4-8. 逆相 HPLC による SNC 曝露区のフラクシオン a の構造特性別 *N*-グリカンパターン

A, フラクシオン a の逆相 HPLC 分析結果

B, ラクト-*N*-テトラオース (Gal β -1,3GlcNAc β -1,3Gal β -1,4Glc-PA) の逆相 HPLC 分析結果

4.3.3.3 フラクション b1 の構造解析

フラクション b のサイズ分画 HPLC における G.U は遊離型 GNM3X のものと一致したが、フラクション b の逆相 HPLC 分析の結果、G.U3.0 付近にフラクション b1 およびフラクション b2 の 2 本が確認された (Fig. 4-9A)。フラクション b1 およびフラクション b2 が混在した状態では酵素消化に影響を及ぼすため、逆相 HPLC 分析において再分取を行った。再分取したフラクション b1 の逆相 HPLC 分析結果は Fig. 4-9B に示した。このフラクション b1 の構成糖を確認するため、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼおよび α -マンノシダーゼ消化を行った。ポジティブコントロールには糖鎖標準品のアガラクトバイアンテナを用いた。アガラクトバイアンテナの β -N-アセチルグルコサミニダーゼ消化の結果、G.U が 1.92 前にシフトしたフラクションが検出され、非還元末端側の GlcNAc が 2 残基遊離したことを確認した (Fig. 4-10A-II)。続いて α -マンノシダーゼ消化の結果、G.U が 1.04 および 1.72 前にシフトしたフラクションが検出され、非還元末端側の α -マンノースが 2 残基遊離したことを確認した (Fig. 4-10A-III)。ポジティブコントロールの結果を踏まえ、フラクション b1 の酵素消化を行った。まず β -N-アセチルグルコサミニダーゼ消化の結果、G.U が 1.06 前にシフトしたフラクションが検出され、非還元末端側の GlcNAc が 1 残基遊離したことを確認した (Fig. 4-10B-II)。続いて α -マンノシダーゼ消化の結果、G.U が 1.04 および 1.97 前にシフトしたフラクションが検出され、非還元末端側の α -マンノースが 2 残基遊離したことを確認した (Fig. 4-10B-III)。

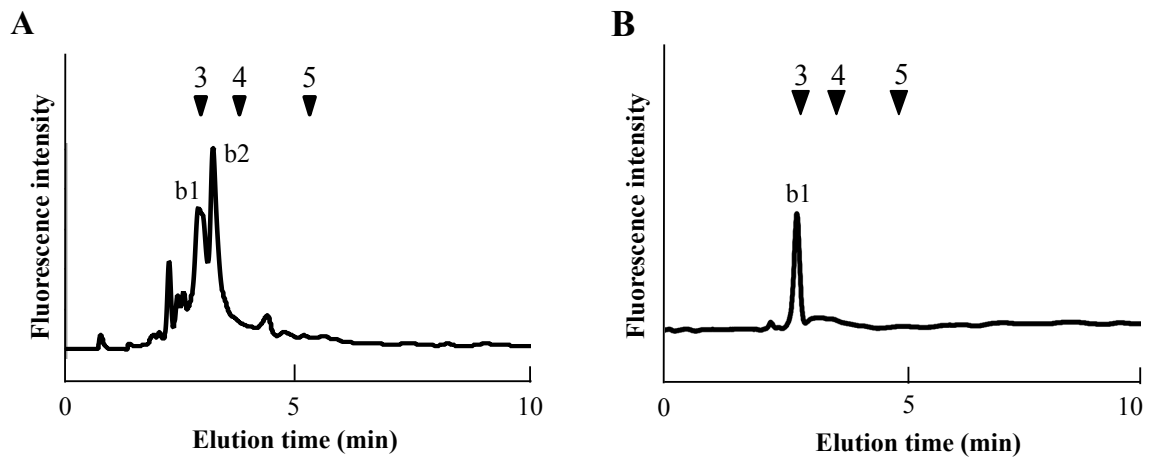


Fig. 4-9. 逆相 HPLC による SNC 曝露区フラクション b の構造特性格糖鎖パターン

A, フラクション b の逆相 HPLC 分析結果

B, フラクション b1 の再・逆相 HPLC 分析結果

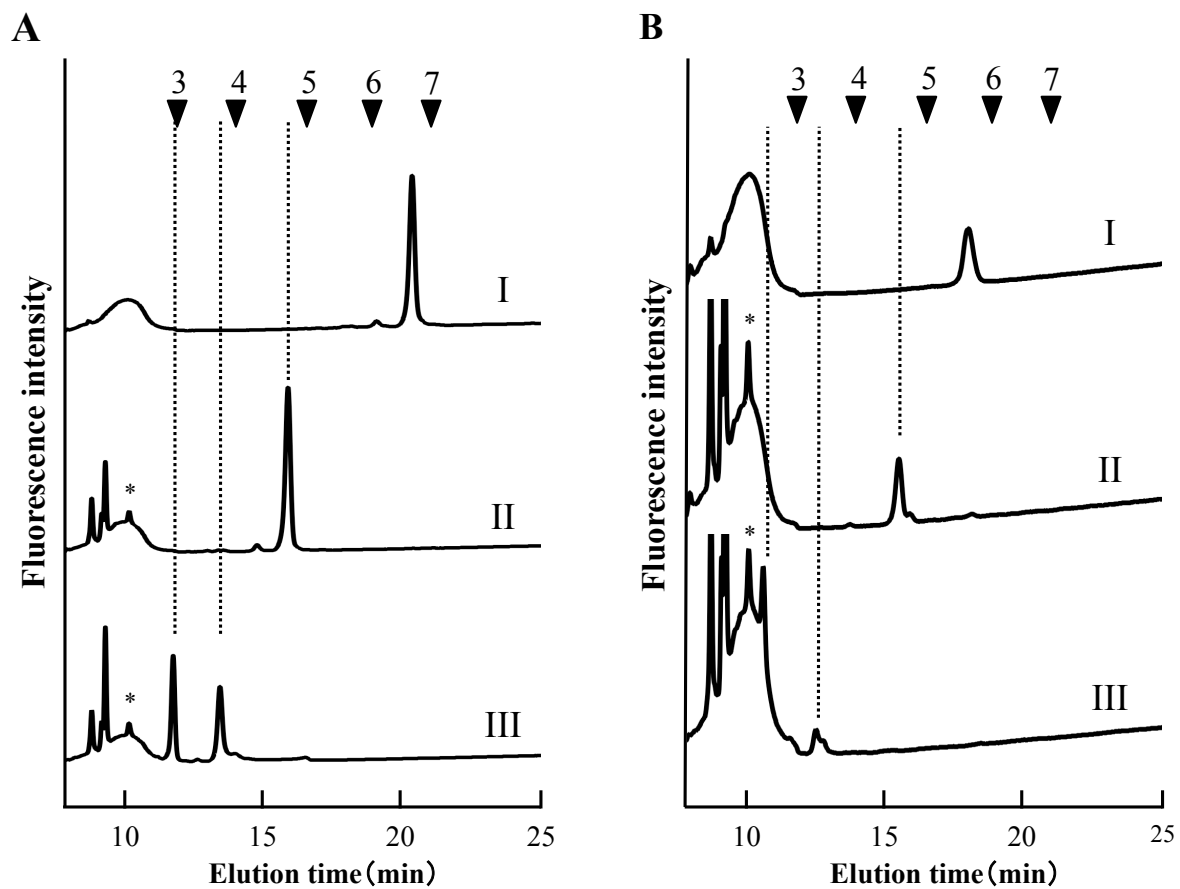


Fig. 4-10. フラクシオン b1 の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼおよび α -マンノシダーゼ消化産物のサイズ分画 HPLC 結果

A-I, アガラクトバイアンテナ、A-II, A-II の A-I の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ消化後、A-III, A-II の α -マンノシダーゼ消化後

B-I, b1、B-II, B-I の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ消化後、B-III, B-II の α -マンノシダーゼ消化後

4.3.3.4 遊離型ハイマンノース型 *N*-グリカンの構造解析

4.3.2.3 の芽部の *N*-グリカン構造解析において遊離型ハイマンノース型 *N*-グリカンの存在が明らかになったことから、根部にも同様の構造が存在することが考えられたため、遊離型ハイマンノース型 *N*-グリカンの G.U に相当するフラクション g、フラクション i、フラクション k の α -マンノシダーゼ消化を行い、構造の確認を行った。ポジティブコントロールには糖鎖標準品の M8A を用いた。 α -マンノシダーゼ消化の結果、M8A (G.U = 9.66) は G.U が 4.48、5.80 および 6.53 前にシフトしたフラクションが得られ、G.U からそれぞれのフラクションは M8A から α -マンノースが 5~7 残基遊離した M3、M2 および M1 構造であることが示された (Fig. 4-11A-II)。この結果を踏まえ、フラクションフラクション g、フラクション i、フラクション k の α -マンノシダーゼ消化を行った。なお、 α -マンノシダーゼ消化にはいずれもサイズ分画 HPLC にて分取後のフラクションを用いた。 α -マンノシダーゼ消化の結果、フラクション g (G.U = 8.33) は G.U が 5.04 および 5.82 前にシフトしたフラクションが得られ、G.U からそれぞれのフラクションは遊離型 M7 から α -マンノースが 5 残基および 6 残基遊離した M2 および M1 構造であることが示された (Fig. 4-11B-II)。また、フラクション i (G.U = 9.17) は G.U が 5.89 および 6.66 前にシフトしたフラクションが得られ、G.U からそれぞれのフラクションは遊離型 M8 から α -マンノースが 6 残基および 7 残基遊離した M2 および M1 構造であることが示された (Fig. 4-11C-II)。フラクション k (G.U = 9.91) は G.U が 6.62 および 7.04 前にシフトしたフラクションが得られ、G.U からそれぞれのフラクションは遊離型 M9 から α -マンノースが 7 残基および 8 残基遊離した M2 および M1 構造であることが示された (Fig. 4-11C-II)。なお α -マンノシダーゼ消化後の G.U が 9~10 付近のフラクションについては、逆相 HPLC 分析にて遊離型ハイマンノース型 *N*-グリカンとは異なる G.U をもち、非還元末端に α -マンノース残基が結合していない別の糖分子である可能性が示唆された (Fig. 4-12A, B, C)。酵素消化の結果から、フラクション g、フラクション i、フラクション k はそれぞれ遊離型ハイマンノース型 *N*-グリカンの M7、M8、M9 であることが示された。

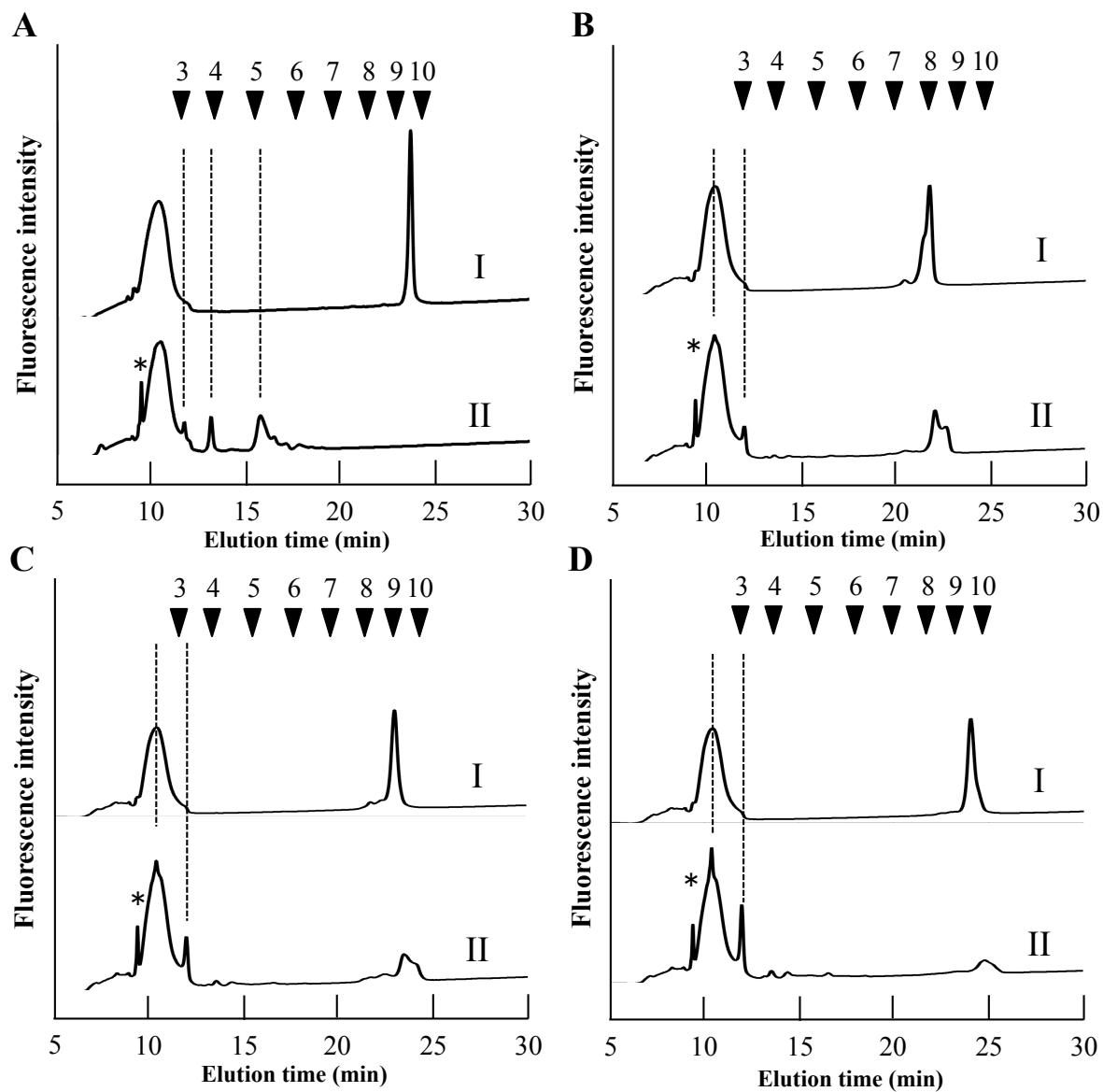


Fig. 4-11. フラクシオン g、フラクシオン i およびフラクシオン k の α -マンノシダーゼ消化産物のサイズ分画 HPLC 結果

A-I, M8A、A-II, A-I の α -マンノシダーゼ消化後

B-I, フラクシオン g、B-II, B-I の α -マンノシダーゼ消化後

C-I, フラクシオン i、C-II, B-I の α -マンノシダーゼ消化後

D-I, フラクシオン k、D-II, B-I の α -マンノシダーゼ消化後

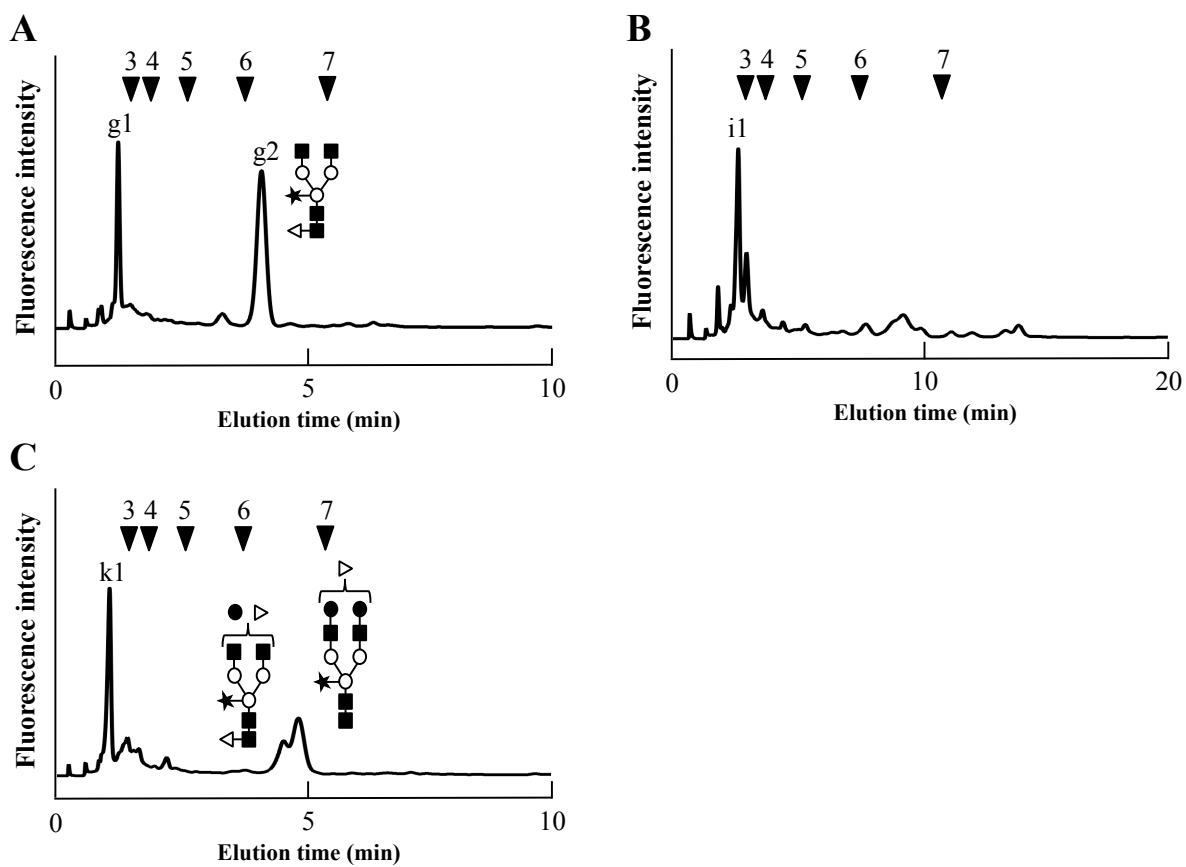


Fig. 4-12. フラクシオン g、フラクシオン i およびフラクシオン k の逆相 HPLC 結果

A, フラクシオン g

B, フラクシオン i

C, フラクシオン k

Table 4-1. フラクシオン e およびフラクシオン m の *N*-グリカン構造およびその相対比

Fraction	Structure	Abbreviation	Ratio	
			Control	SNCs exposure
e1		GN M3FX	3	15
e2		GN M3FX	5	24
e3		GN2M3X	3	18
m1		Gal2F2GN2M3FX	18	60

Each *N*-glycan was also expressed in terms of percentage proportion relative to the GN2M3FX structure.

Table 4-2. 遊離型 *N*-グリカン構造およびその相対比

Fraction	Structure	Abbreviation	Ratio	
			Control	SNCs exposure
b1		Free-GNM3X	9	58
g1		Free-M7	16	45
i1		Free-M8	8	22
k1		Free-M9	10	29

Each *N*-glycan was also expressed in terms of percentage proportion relative to the GN2M3FX structure.

4.3.4 対照区と SNC 曝露区の *O. sativa* 根部に存在する *N*-グリカンについて

まず、還元末端側の GlcNAc が 2 残基存在する *N*-グリカンの構造および相対比については Table 4-1 に示した。構造比較の結果、^{GN}M3FX の相対比は 3 (対照区) から 15 (SNC 曝露区)、_{GN}M3FX の相対比は 5 (対照区) から 24 (SNC 曝露区)、GN2M3X の相対比は 3 (対照区) から 18 (SNC 曝露区)、Gal2F2GN2M3FX の相対比は 18 (対照区) から 60 (SNC 曝露区) の値を示した。いずれの *N*-グリカン構造も SNC 曝露区においては対照区の 5~6 倍の値を示した。これら 4 種類の *N*-グリカンはいずれも複合型 *N*-グリカンであり、シスゴルジからメディアルゴルジにおいて高度な糖修飾を受けて生合成される分子である。従って、複合型 *N*-グリカンのような複雑な *N*-グリカン構造が SNC 曝露区において顕著な増加を示したことに関しては、これらの生合成を司るシスゴルジからメディアルゴルジに対して SNC 曝露の影響が生じていることが考えられた。タンパク質に結合した複合型 *N*-グリカンの適切な生合成は、結合するタンパク質の適切なターゲティングや機能性に関連することや (Rips *et al.*, 2014, von Schaewen *et al.*, 2015)、塩ストレスなどの外的ストレスへの抵抗に重要な役割を果たしていることが報告されている事から (Kang *et al.*, 2008, von Schaewen *et al.*, 2008)、ゴルジ局在型の *N*-グリカン生合成酵素は植物の生長や発達に密接に関連している事が示されている。SNC 曝露区ではより複雑な構造の Gal2F2GN2M3FX の相対比の増加の幅がやや小さく、^{GN}M3FX、_{GN}M3FX および GN2M3X の増加が顕著であった事から、SNC 曝露の影響は ^{GN}M3FX、_{GN}M3FX および GN2M3X の生合成を行う経路上流部に生じやすく、より複雑な *N*-グリカンの生合成を行う経路下流部への影響は比較的少ないことが示唆された。またこの結果から、*N*-グリカン生合成経路への影響はより複雑な *N*-グリカンを生合成するための中間生成物となる *N*-グリカンに顕著に現れ、中間生成物となる複合型 *N*-グリカンは過度なストレス条件において生体の状態変化に対して重要な役割を果たしていることが考えられた。

さらに SNC 曝露区において相対比の増加が確認された遊離型 *N*-グリカンの構造および相対比については Table 4-2 に示した。遊離型のハイマンノース型 *N*-グリカンである

M7、M8 および M9 は SNC 曝露区において対照区の約 3 倍の値を示した。一般的に、遊離型ハイマンノース型 N-グリカン糖タンパク質のリサイクリングシステムにおいて生成される分子であることから、SNC 曝露を受けた *O. sativa* 根部においてミスフォルド糖タンパク質や生長過程において変性した糖タンパク質が増加した結果、SNC 曝露区における遊離型ハイマンノース型 N-グリカンの相対比が増加したことが考えられた。

遊離型 GNM3X の相対比は 9 (対照区) から 58 (SNC 曝露区) と約 6 倍に増加した。遊離型 GNM3X は *O. sativa* 芽部においても確認されているが、芽部における挙動は確認されなかった。遊離型の複合型 N-グリカンは、一般的に検出される遊離型ハイマンノース型 N-グリカンとは異なり、ゴルジ器官における高度な糖修飾を受けているという特徴がある。しかしながら、遊離型の複合型 N-グリカンは植物から検出された例が少ないため、遊離型複合型 N-グリカンの生物学的意義についてはよく知られていないのが現状である。このような現状の中、本研究の SNC 曝露を受けた *O. sativa* 根部において遊離型複合型 N-グリカン相対比の著しい増加が確認されたことから、遊離型の複合型 N-グリカンは SNC 曝露により変性した糖タンパク質から遊離した N-グリカンであることが考えられた。また、本研究において環境変化を受けた *O. sativa* 根部における遊離型の複合型 N-グリカンの増加が明らかとなったことから、N-グリカンはタンパク質の翻訳後修飾の 1 つとしてタンパク質の性質や機能性に関わるだけでなく、N-グリカンそのものが劇的な環境変化を受けた植物の生長や発達にとって重要であることが示唆された。

第5章 結章

本研究では、*O. sativa* の初期生長における *N*-グリカン構造とその生物学的意義に関する知見を得ることを目的として、発芽前後の *O. sativa* 種子胚部、分化後の芽部および根部、光照射条件の異なる芽部および根部、そして極度な環境変化下にて生育された芽部および根部に存在する *N*-グリカンの構造解析を行った。本研究で得られた成果を以下に要約する。

第1章

「発芽前 *O. sativa* 種子胚部におけるグライコーム解析」では、発芽前 *O. sativa* 種子胚部に存在する6種類の主要 *N*-グリカン構造について明らかにした。これらの *N*-グリカンのうち最も多く存在していたのは M3X (45.7%)、次いで M3FX (16.8%)、M4X (14.3%)、M5A (9.3%)、M6B (6.7%) の順に多く、最も少なかった *N*-グリカン構造は GN2M3FX (7.2%) であった。これらの *N*-グリカンを構造のカテゴリー別に分けると、パウチマンノース型が 76.8%、ハイマンノース型が 17.0%、複合型が 7.2% であった。またトリマンノシルコア構造に着目すると、トリマンノシルコア構造に β 1,2 キシロースのみが付加した構造は全体の 84.0% と最も多く、 β 1,2 キシロースおよび α 1,3 フコースが付加した構造は全体の 23.9% であることが示された。このようなパウチマンノース型 *N*-グリカンやハイマンノース型 *N*-グリカンの存在は、他の種子由来糖タンパク質からも確認されている。種子は保存の観点において乾燥などの非生物学的ストレスや病害虫などの生物学的ストレスに対し抵抗機構を備える必要があり、その機構には糖鎖抗原となる β 1,2 キシロースが付加されたパウチマンノース型 *N*-グリカンが関与している事が考えられた。また、一般的に種子糖タンパク質にはパウチマンノース型 *N*-グリカンの他に親水性の高いハイマンノース型 *N*-グリカンの割合も多いことから、これらの *N*-グリカンを組み合わせることにより適当な保水力を示す耐乾燥糖タンパク質が生成されている可能性が考えられた。

発芽前 *O. sativa* 種子胚部における GN2M3FX は、複合型 *N*-グリカンの生合成および *O. sativa* の生長において重要な GlcNAc 付加が行われていたことを示す存在である。しかしながら、*N*-グリカンの構造多様性に大きく貢献する複合型 *N*-グリカンの存在は安定的な種子保存には適さないため、種子形成時に生合成された複合型 *N*-グリカンは種子形成期の収束とともに糖加水分解酵素による分解を受け、*O. sativa* 種子胚部への蓄積は殆ど行われなかったことが考えられた。

以上の結果から、発芽前イネ種子胚部では *N*-グリカンの存在が初めて明らかとなり、さらにその *N*-グリカン構造の多様性は非常に少ないことが明らかとなった。そして、これらの *N*-グリカン構造は、次世代の生長に重要な種子の保存期間や、種子の発芽・生長において重要な役割を果たしていることが示唆された。

第 2 章

「発芽 48 時間後 *O. sativa* 種子胚部におけるグリコーム解析」では、発芽 48 時間後 *O. sativa* 種子胚部に存在する 14 種類の主要 *N*-グリカン構造について明らかにした。発芽 48 時間後の *O. sativa* 種子胚部において 10%以上の割合を示した *N*-グリカンは、M3X (17.9%)、M3FX (15.3%)、GN2M3FX (14.8%)であった。また、5%以上の割合を示した *N*-グリカンは、Gal2F2GN2M3FX (9.6%)、Gal2F1GN2M3FX (6.3%)、M8A (5.8%)、M4X (5.5%)、M5A (5.2%)、Gal1F1GN2M3X (5.2%)であった。上記の *N*-グリカンを構造特徴別に分類すると、パウチマンノース型 38.7%、複合型 44.0%、ハイマンノース型 17.3%で構成されていた。複合型 *N*-グリカン 44.0%のうち、ルイス a 構造を 1 つあるいは 2 つ持つ *N*-グリカンは 21.1%と複合型 *N*-グリカンの半数を占めていた。これらの複合型 *N*-グリカンは主に分泌型糖タンパク質として存在し、細胞表面での分子間相互作用に深く関与していることが考えられている。しかしながら、このような細胞間認識分子は植物病原菌などの外来生物の感染時にターゲットとなる可能性が高く、実際に GlcNAc を資化してアブラナ科植物に感染する植物病原菌の存在が知られている。このことから、非還元末端側

GlcNAc へのガラクトースやフコースのキャッピングは *N*-グリカン構成糖を資化する他の生物に対する防御機構の 1 つに関与している事が考えられた。

また、発芽後 *O. sativa* 種子胚部において、トリマンノシルコア構造に α 1,3 フコースが付加した *N*-グリカン構造は全体の 50%を占め、発芽前の 23.9%から大幅に増加した。 α 1,3 フコース付加は動物や植物において外敵の侵入を防ぐ役割があると一般的に考えられていることから、発芽後イネ種子胚部における α 1,3 フコースの急激な増加も、極めて脆弱な発芽初期のイネにおいて、微生物やウイルスなどの攻撃による外的ストレスに対して対応した結果であることが考えられた。この事から、 α 1,3 フコースが付加された複合型 *N*-グリカンの存在も *O. sativa* の発芽初期段階における発芽誘導および *O. sativa* 種子胚部の生長にも深く関与している可能性が考えられた。

発芽前後の *O. sativa* 種子胚部から検出された構造の量的観点から、発芽前と発芽後の種子胚部における *N*-グリカン生合成経路の考察を行った。まず、発芽前 *O. sativa* 種子胚部では、パウチマンノース型 *N*-グリカンを主要 *N*-グリカンとする *N*-グリカン構成であったことから、種子形成期の *O. sativa* 種子胚部ではメディアルゴルジからトランスゴルジにおける生合成経路が活性化していることが示された。次に、発芽後の *O. sativa* 種子胚部では、複合型 *N*-グリカンを中心とした *N*-グリカン構成であったことから、発芽誘導初期の *O. sativa* 種子胚部ではトランスゴルジにおける生合成経路が活性化し、種子形成期に *O. sativa* 種子胚部に蓄積・保存されていた *N*-グリカンを利用して複合型 *N*-グリカンを合成していることが考えられた。

以上の結果から、発芽前後の *O. sativa* 種子胚部において *N*-グリカン構成が劇的に変化していることが初めて明らかとなった。このことから、*O. sativa* 種子の発芽にともない、「種子の保存」のための糖鎖生合成機構から「生長や発達」のための糖鎖生合成機構へ移行したことが示唆された。

第 3 章

「発芽 120 時間後のイネ生長部位におけるグライコーム解析」では、発芽 120 時間後 *O. sativa* 生長部に存在する 17 種類の主要 N-グリカン構造について明らかにした。比較構造解析の結果、M3FX は芽部および根部において GN2M3FX の次に多く存在し、N-グリカンの総量に対する GN2M3FX および M3FX の割合は芽部では 46%、根部では 52%であった。しかしながら、GN2M3FX に対する M3FX の相対比は芽部では 76.9%、根部では 33.7%であったことから、M3FX 構造は根部において劇的に減少している事が明らかとなった。また、カイワレダイコン (*Raphanus sativus*) の根のパウチマンノース型やハイマンノース型 N-グリカンの存在量が芽部よりも僅かに少ないことや、芽部と根部の区別が曖昧な下等植物にはパウチマンノース型 N-グリカンが検出されなかったことから、パウチマンノース型 N-グリカンは芽部と根部の分化に関わる基盤 N-グリカンである事が強く示唆された。

光照射が N-グリカン構造およびその生合成に及ぼす影響について、明所条件と暗所条件で生育した芽部を比較対象として考察した。比較構造解析の結果、M3X、M3FX、_{GN}M3FX、GN2M3X、Gal2F1GN2M3X および Gal2F2GN2M3FX の 6 種類は明所条件および暗所条件において相対比 5 以上 10 未満の僅かな差異が確認され、いずれも M3X または M3FX を基本骨格として持つ N-グリカンであることが示された。しかしながら、明所条件と暗所条件におけるこれらの N-グリカンの顕著な差異は確認されなかったことから、初期生長時の芽部における N-グリカンは光照射に対する感受性が低いことが示唆された。

一連の植物と N-グリカンの高等進化に関する研究報告を踏まえ、本研究結果から *O. sativa* の特定部位の生長や分化における N-グリカンの挙動は、植物の高等進化と深く関わっていることが示唆された。

第 4 章

「銀ナノコロイド曝露を受けたイネ生長部位のグライコーム解析」では、SNC 曝露を受けた *O. sativa* 生長部の *N*-グリカン構造解析を行い、過度な環境変化に伴う *N*-グリカンの挙動を明らかにした。表現型解析の結果、SNC 曝露を受けた *O. sativa* 芽部は、どの SNC 濃度区においても表現型への影響は確認されなかった。一方で、SNC 25 mg/L の曝露区における根部の長さは、対照区の半分であることが示された。これらの観察結果から、*O. sativa* 根部は SNC 曝露により重篤な影響を受けていることが考えられた。SNC 曝露を受けた植物に関する過去の報告から、SNC 曝露は植物の細胞代謝やそれに伴うタンパク質の翻訳後修飾へ影響を及ぼすことが明らかにされており、この影響は *N*-グリカン修飾に対しても同様に生じていることが明らかとなった。

O. sativa 芽部は、表現型観察や *N*-グリカン解析において SNC 曝露による顕著な差異が確認されなかったことから、*O. sativa* 芽部は SNC 曝露の影響を殆ど受けていないことが示された。続いて、SNC 曝露の影響が表現型に顕著に現れた *O. sativa* 根部では、4 種類の糖タンパク質結合型 *N*-グリカンおよび 1 種類の遊離型 *N*-グリカンの顕著な増加が確認された。4 種類の糖タンパク質結合型 *N*-グリカンはいずれもトリマンノシルコア構造に β 1,2 キシロースが付加され複合型 *N*-グリカンであったことから、SNC 曝露は β 1,2 ギャロース付加を行う *N*-グリカン生合成経路のメディアルゴルジからトランスゴルジに影響を及ぼすことが考えられた。また、SNC 曝露を受けた *O. sativa* 根部において遊離型の複合型 *N*-グリカン相対比の著しい増加が確認されたことから、SNC 曝露は遊離型の複合型 *N*-グリカン、あるいはこれらの *N*-グリカンが結合したタンパク質の生合成に影響を及ぼすことが示唆され、さらに、*N*-グリカンはタンパク質の翻訳後修飾の 1 つとしてタンパク質の性質や機能性に関わるだけでなく、*N*-グリカンそのものが劇的な環境変化を受けた植物の生長や発達にとって重要であることが示唆された。

総括

本研究では、*O. sativa* 種子胚部の経時変化に伴う *N*-グリカンの挙動解析を行い、発芽前後の *O. sativa* 種子胚部における構成 *N*-グリカンが劇的に変化することを明らかにした。発芽誘導 120 時間後の *O. sativa* 芽部および根部の *N*-グリカンの挙動解析から、根部におけるパウチマンノース型 *N*-グリカンが芽部の半分以下であることが明らかとなり、また芽部 *N*-グリカンは光照射に対して感受性が低いことが示された。さらに、SNC 曝露を受けた根部では遊離型複合型 *N*-グリカンの顕著な増加が確認された。

このような第 1 章から第 4 章にわたる一連の結果から、中間産物としての *N*-グリカンは、*O. sativa* における芽部と根部の分化や植物の高等進化における転換期、さらに過度な生育環境の変化を受けた場合など、細胞環境や外環境の急激な変化に対する植物体内において緩衝機能としての主要な役割を担っていることが明らかとなった。さらに、本研究は、グリコームを介した植物進化への新しい知見を提案するものであり、これまでに明らかにされていなかった植物糖鎖生物学を展開させるための有益な結果を得ることができた。

参考文献

Baïet B, Burel C, Saint-Jean B, Louvet R, Menu-Bouaouiche L, Kiefer-Meyer MC, Mathieu-Rivet E, Lefebvre T, Castel H, Carlier A, Cadoret JP, Lerouge P, Bardor M. N-glycans of *Phaeodactylum tricornutum* diatom and functional characterization of its N-acetylglucosaminyltransferase I enzyme. *J. Biol. Chem.* (2011) 286(8), 6152-6164.

Boisson M, Gomord V, Audran C, Berger N, Dubreucq B, Granier F, Lerouge P, Faye L, Caboche M, Lepiniec L. Arabidopsis glucosidase I mutants reveal a critical role of N-glycan trimming in seed development. *EMBO J.* (2001) 20(5), 1010-1019.

Boulanger A, Zischek C, Lautier M, Jamet S, Rival P, Carrère S, Arlat M, Lauber E. The plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* exploits N-acetylglucosamine during infection. *MBio.* 2014 5(5), e01527-14.

Choi SB, Wang C, Muench DG, Ozawa K, Franceschi VR, Wu Y, Okita TW. Messenger RNA targeting of rice seed storage proteins to specific ER subdomains. *Nature.* (2000) 407(6825), 765-767.

Dam S, Thaysen-Andersen M, Stenkjær E, Lorentzen A, Roepstorff P, Packer NH, Stougaard J. Combined N-glycome and N-glycoproteome analysis of the Lotus japonicus seed globulin fraction shows conservation of protein structure and glycosylation in legumes. *J. Proteome. Res.* (2013) 12(7), 3383-3392.

Dupoiron S, Zischek C, Ligat L, Carbonne J, Boulanger A, Dugé de Bernonville T, Lautier M,

Rival P, Arlat M, Jamet E, Lauber E, Albenne C. The *N*-Glycan cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: a toolbox for sequential plant *N*-glycan processing. *J. Biol. Chem.* (2015) 290(10), 6022-6036.

Fanata WI, Lee KH, Son BH, Yoo JY, Harmoko R, Ko KS, Ramasamy NK, Kim KH, Oh DB, Jung HS, Kim JY, Lee SY, Lee KO. *N*-glycan maturation is crucial for cytokinin-mediated development and cellulose synthesis in *Oryza sativa*. *Plant J.* (2013) 73(6), 966-979.

Fitchette-Lainé AC, Gomord V, Cabanes M, Michalski JC, Saint Macary M, Foucher B, Cavelier B, Hawes C, Lerouge P, Faye L. *N*-glycans harboring the Lewis a epitope are expressed at the surface of plant cells. *Plant J.* 1997 12(6), 1411-1417.

Fitchette AC, Cabanes-Macheteau M, Marvin L, Martin B, Satiat-Jeunemaitre B, Gomord V, Crooks K, Lerouge P, Faye L, Hawes C. Biosynthesis and immunolocalization of Lewis a-containing *N*-glycans in the plant cell. *Plant Physiol.* (1999) 121(2), 333-344.

Hase S, Ikenaka T, Matsushima Y, Structure analyses of oligosaccharides by tagging of the reducing end sugars with a fluorescent compound. *Biochem Biophys Res Commun.* (1987) 85(1), 257-263.

Hossain Z, Mustafa G, Sakata K, Komatsu S. Insights into the proteomic response of soybean towards Al₂O₃, ZnO, and Ag nanoparticles stress. *J. Hazard Mater.* (2016) 304 291-305.

Ioffe E, Stanley P. Mice lacking *N*-acetylglucosaminyltransferase I activity die at mid-gestation, revealing an essential role for complex or hybrid *N*-linked carbohydrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

U S A. (1994) 91(2), 728-732.

Kajiura H, Okamoto T, Misaki R, Matsuura Y, Fujiyama K. *Arabidopsis* β 1,2-xylosyltransferase: substrate specificity and participation in the plant-specific *N*-glycosylation pathway. *J. Biosci. Bioeng.* (2012), 113(1), 48-54.

Kang JS, Frank J, Kang CH, Kajiura H, Vikram M, Ueda A, Kim S, Bahk JD, Triplett B, Fujiyama K, Lee SY, von Schaewen A, Koiwa H. Salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* requires maturation of *N*-glycosylated proteins in the Golgi apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* (2008) 105(15), 5933-5938.

Kataoka C, Ariyoshi T, Kawaguchi H, Nagasaka S, Kashiwada S. Salinity increases the toxicity of silver nanocolloids to Japanese medaka embryos. *Environ. Sci.: Nano*, (2015) 2, 94-103.

Kilcoyne M, Shah M, Gerlach JQ, Bhavanandan V, Nagaraj V, Smith AD, Fujiyama K, Sommer U, Costello CE, Olszewski N, Joshi L. *O*-glycosylation of protein subpopulations in alcohol-extracted rice proteins. *J. Plant Physiol.* (2009) 166(3), 219-232.

Kimura Y, Ohno A, Takagi S. Structural elucidation of *N*-linked sugar chains of storage glycoproteins in mature pea (*Pisum sativum*) seeds by ion-spray tandem mass spectrometry (IS-MS/MS). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (1996) 60(11), 1841-1850.

Kimura Y, Ohno A, Takagi S. Structural analysis of *N*-glycans of storage glycoproteins in soybean (*Glycine max. L*) seed. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (1997) 61(11), 1866-1871.

Kimura Y and Kitahara E. Structural analysis of free *N*-glycans occurring in soybean seedlings and dry seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2000) 64(9), 1847-1855.

Kimura Y and Matsuo S. Changes in *N*-linked oligosaccharides during seed development of *Ginkgo biloba*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2000a) 64(3), 562-568.

Kimura Y and Matsuo S. Free *N*-glycans already occur at an early stage of seed development. *J. Biochem.* (2000b), 127(6), 1013-1019.

Kimura Y, Suzuki M, Kimura M. *N*-linked oligosaccharides of glycoproteins from *Ginkgo biloba* pollen, an allergenic pollen. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2001) 65(9), 2001-2006.

Kishimoto T Watanabe M, Mitsui T, Hori H. Glutelin basic subunits have a mammalian mucin-type *O*-linked disaccharide side chain. *Arch. Biochem. Biophys.* (1999) 370(2), 271-277.

Kishimoto T, Hori H, Takano D, Nakano Y, Watanabe M, Mitsui T. Rice alpha-mannosidase digesting the high mannose glycopeptide of glutelin. *Physiol. Plant.* (2001) 112(1), 15-24.

Kizuka Y and Taniguchi N.

Enzymes for *N*-Glycan Branching and Their Genetic and Nongenetic Regulation in Cancer. *Biomolecules.* (2016) 6(2). pii: E25. doi: 10.3390/biom6020025.

Léonard R, Kolarich D, Paschinger K, Altmann F, Wilson IB. A genetic and structural analysis of the *N*-glycosylation capabilities. *Plant Mol. Biol.* (2004) 55(5),631-644.

Liebminger E, Hüttner S, Vavra U, Fischl R, Schoberer J, Grass J, Blaukopf C, Seifert GJ, Altmann F, Mach L, Strasser R. Class I alpha-mannosidases are required for *N*-glycan processing and root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. (2009) 21(12), 3850-3867.

Maeda M and Kimura Y. Glycoform analysis of *N*-glycans linked to glycoproteins expressed in rice culture cells: predominant occurrence of complex type *N*-glycans. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2006) 70(6), 1356-1363.

Maeda M, Kimura Y. Glycoform analysis of *N*-glycans linked to glycoproteins expressed in rice culture cells: predominant occurrence of complex type *N*-glycans. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2006) 70(6), 1356-1363.

Maeda M, Kimura M, Kimura Y. Intracellular and extracellular free *N*-glycans produced by plant cells: occurrence of unusual plant complex-type free *N*-glycans in extracellular spaces. *J. Biochem.* (2010) 48(6), 681-692.

Maeda M, Ebara N, Tani M, Vavricka CJ, Kimura Y. Occurrence of complex type free *N*-glycans with a single GlcNAc residue at the reducing termini in the fresh-water plant, *Egeria densa*. *Glycoconj. J.* (2017) 34(2), 229-240.

Makino Y, Shimazaki A, Omichi K, Odani S, Hase S. Processing pathway deduced from the structures of *N*-glycans in *Carica papaya*. *J. Biochem.* (2000) 127(6), 1121-1126.

Marsh JT, Tryfona T, Powers SJ, Stephens E, Dupree P, Shewry PR, Lovegrove A. Determination of the *N*-glycosylation patterns of seed proteins: applications to determine the authenticity and substantial equivalence of genetically modified (GM) crops. *J. Agric. Food*

Chem. (2011) 59(16), 8779-8788.

Mathieu-Rivet E, Scholz M, Arias C, Dardelle F, Schulze S, Le Mauff F, Teo G, Hochmal AK, Blanco-Rivero A, Loutelier-Bourhis C, Kiefer-Meyer MC, Fufezan C, Burel C, Lerouge P, Martinez F, Bardor M, Hippler M. Exploring the *N*-glycosylation pathway in *Chlamydomonas reinhardtii* unravels novel complex structures. Mol. Cell Proteomics. (2013) 12(11), 3160-3183.

Mega T. Glucose trimming of *N*-glycan in endoplasmic reticulum is indispensable for the growth of *Raphanus sativus* seedling (kaiware radish). Biosci. Biotechnol. Biochem. (2005) 69(7), 1353-1364.

Mega T. Plant-type *N*-glycans containing fucose and xylose in Bryophyta (mosses) and Tracheophyta (ferns). Biosci. Biotechnol. Biochem. (2007) 71(12), 2893-2904.

Metzler M, Gertz A, Sarkar M, Schachter H, Schrader JW, Marth JD. Complex asparagine-linked oligosaccharides are required for morphogenic events during post-implantation development. EMBO J. (1994) 13(9), 2056-2065.

Nair PM and Chung IM. Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa L.*) seedlings. Chemosphere. (2014) 112, 105-113.

Nakamura K, Inoue M, Yoshiie T, Hosoi K, Kimura Y. Changes in structural features of free *N*-glycan and endoglycosidase activity during tomato fruit ripening. Biosci. Biotechnol. Biochem. (2008) 72(11), 2936-2945.

Natsuka S. and Hase S. Analysis of *N*- and *O*-glycans by pyridylation. Methods Mol. Biol.

(1998) 76, 101-113.

Natsuka S, Hirohata Y, Nakakita S, Sumiyoshi W, Hase S. Structural analysis of *N*-glycans of the planarian *Dugesia japonica*. FEBS J. 278 (2011) 452-460.

Olczak M and Watorek W. Processing of *N*-glycans of two yellow lupin phosphohydrolases during seed maturation and dormancy. Phytochemistry. (2002) 61(6), 645-655.

Rips S, Bentley N, Jeong IS, Welch JL, von Schaewen A, Koiwa H. Multiple *N*-glycans cooperate in the subcellular targeting and functioning of *Arabidopsis* KORRIGAN1. Plant Cell. (2014) 26(9) 3792-3808.

Patrizi LD, Rosati F, Guerranti R, Pagani R, Gerwig GJ, Kamerling JP. Structural characterization of the *N*-glycans of gpMuc from *Mucuna pruriens* seeds. Glycoconj. J. (2006) 23(7-8), 599-609.

Priem B, Gitti R, Bush CA, Gross KC. Structure of ten free *N*-glycans in ripening tomato fruit. Arabinose is a constituent of a plant *N*-glycan. Plant Physiol. (1993) 102(2), 445-458.

Strasser R, Altmann F, Mach L, Glössl J, Steinkellner H. Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex *N*-glycans lacking beta1,2-linked xylose and core alpha1,3-linked fucose. FEBS Lett. (2004) 561(1-3), 132-136.

Strasser R, Bondili JS, Vavra U, Schoberer J, Svoboda B, Glössl J, Léonard R, Stadlmann J, Altmann F, Steinkellner H, Mach L. A unique beta1,3-galactosyltransferase is indispensable for the biosynthesis of *N*-glycans containing Lewis a structures in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell.

(2007) 19(7), 2278-2292.

Sturm A, Van Kuik JA, Vliegthart JF, Chrispeels MJ. Structure, position, and biosynthesis of the high mannose and the complex oligosaccharide side chains of the bean storage protein phaseolin. *J. Biol. Chem.* (1987) 262(28), 13392-13403.

Takahashi N, Hotta T, Ishihara H, Mori M, Tejima S, Bligny R, Akazawa T, Endo S, Arata Y. Xylose-containing common structural unit in *N*-linked oligosaccharides of laccase from sycamore cells. *Biochemistry*, (1986) 25, 388-395.

Takano S, Matsuda S, Funabiki A, Furukawa J, Yamauchi T, Tokuji Y, Nakazono M, Shinohara Y, Takamura I, Kato K. The rice RCN11 gene encodes β 1,2-xylosyltransferase and is required for plant responses to abiotic stresses and phytohormones. *Plant Sci.* (2015) 236, 75-88.

Ulvskov P, Paiva DS, Domozych D, Harholt J. Classification, naming and evolutionary history of glycosyltransferases from sequenced green and red algal genomes. *PLoS One.* (2013) 8(10), e76511.

Vannini C, Domingo G, Onelli E, Prinsi B, Marsoni M, Espen L, Bracale M. Morphological and proteomic responses of *Eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate. *PLoS One.* (2013) 8(7), e68752.

von Schaewen A, Frank J, Koiwa H. Role of complex *N*-glycans in plant stress tolerance. *Plant Signal Behav.* (2008) 3(10), 871-873.

von Schaewen A, Rips S, Jeong IS, Koiwa H. *Arabidopsis thaliana* KORRIGAN1 protein: *N*-glycan modification, localization, and function in cellulose biosynthesis and osmotic stress responses. *Plant Signal Behav.* (2015) 10(5), e1024397.

Wang J, Koo Y, Alexander A, Yang Y, Westerhof S, Zhang Q, Schnoor JL, Colvin VL, Braam J, Alvarez PJ. Phytostimulation of *poplars* and *Arabidopsis* exposed to silver nanoparticles and Ag⁺ at sublethal concentrations. *Environ. Sci. Technol.* (2013) 47(10), 5442-5449.

Wilson IB, Zeleny R, Kolarich D, Staudacher E, Stroop CJ, Kamerling JP, Altmann F. Analysis of Asn-linked glycans from vegetable foodstuffs: widespread occurrence of Lewis a, core alpha1,3-linked fucose and xylose substitutions. *Glycobiology.* (2001a) 11(4), 261-274.

Wilson IB, Rendić D, Freilinger A, Dumić J, Altmann F, Mucha J, Müller S, Hauser MT. Cloning and expression of cDNAs encoding alpha1,3-fucosyltransferase homologues from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta.* (2001b) 1527(1-2), 88-96.

Yoo JY, Ko KS, Seo HK, Park S, Fanata WI, Harmoko R, Ramasamy NK, Thulasinathan T, Mengiste T, Lim JM, Lee SY, Lee KO. Limited Addition of the 6-Arm β 1,2-linked *N*-Acetylglucosamine (GlcNAc) Residue Facilitates the Formation of the Largest *N*-Glycan in Plants. *J. Biol. Chem.* (2015) 290(27), 16560-16572.

Yunovitz H, Livsey JN, Gross KC. Unconjugated Man5GlcNAc occurs in vegetative tissues of tomato. *Phytochemistry.* (1996) 42(3), 607-610.

発表論文リスト

1. Risa Horiuchi, Naoki Hirotsu, Nobumitsu Miyanishi.
Comparative analysis of *N*-glycans in the ungerminated and germinated stages of *Oryza sativa*
Carbohydrate Research, 418, 1-8 (2015).
2. Risa Horiuchi, Naoki Hirotsu, Nobumitsu Miyanishi.
N-glycan transition of the early developmental stage in *Oryza sativa*
Biochemical and Biophysical Research Communications, 477(3), 426-432 (2016).
3. Risa Horiuchi, Yukari Nakajima, Shosaku Kashiwada, Nobumitsu Miyanishi
Effects of silver nanocolloids on plant complex type *N*-glycans in *Oryza sativa* roots
Scientific Reports, 8, doi:10.1038/s41598-018-19474-z (2018).

謝辞

本研究の遂行、論文の執筆にあたり、終始ご激励、ご鞭撻を賜りました宮西伸光教授（東洋大学大学院 生命科学研究科）、本研究の遂行にあたり終始適切なお助言を賜りました廣津直樹准教授（東洋大学大学院 生命科学研究科）、SNC 曝露の実験を行うにあたり適切なお助言を賜りました柏田祥策教授（東洋大学大学院 生命科学研究科）、論文の執筆にあたり適切なお助言を賜りました平林淳先生（国立研究開発法人 産業総合技術研究所 生命工学領域 創薬基盤研究部門）に心より感謝申し上げます。

糖質生命機能科学研究室員の皆様に感謝いたします。特に SNC 曝露の影響を受けた *O. sativa* の N-グリカン構造解析を共に進めた中島由加里氏（東洋大学 生命科学部）に感謝いたします。

最後に、研究生活を支えてくれた家族に深く感謝いたします。