

氏名(本籍地)	堀内里紗(栃木県)		
学位の種類	博士(生命科学)		
報告・学位記番号	甲第438号(甲(生)第38号)		
学位記授与の日付	平成30年3月25日		
学位記授与の要件	本学学位規程第3条第1項該当		
学位論文題目	イネの初期生長におけるグライコム解析		
論文審査委員	主査 教授	博士(水産学)	宮西伸光
	副査 教授	博士(農学)	柏田祥策
	副査 准教授	博士(農学)	廣津直樹
	副査	国立研究開発法人産業技術総合研究所首席研究員 理学博士	平林淳

【論文審査】

本論文は、生物の構成分子の一つである「糖鎖」に着目し、これらの糖鎖がイネの初期生長においてどのように変遷を遂げているかを初めて解析した論文である。「糖鎖」はマンノースやガラクトースなどの単糖が数十種類で構成されており、糖タンパク質や糖脂質、あるいは細胞間質のグライコキャリックスとして存在しており、生体内において様々な機能に参与している。タンパク質の翻訳後修飾の結果生じる糖タンパク質は、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。糖タンパク質糖鎖のうち、タンパク質のアスパラギン残基の窒素原子を介して結合した糖鎖は特にN-グリカンと呼ばれており、トリマンノシルコア構造と呼ばれる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共通したコア構造を持つのが特徴である。N-グリカンは生合成経路や最終構造などが、発現する細胞や生物種間で異なる場合があり、特に植物におけるN-グリカン構造は、コア構造に付加する糖やその結合様式に基づき、ハイマンノース型、コンプレックス型、パウチマンノース型の3タイプに分類される。植物型N-グリカンの最も特徴的な点は、トリマンノシルコア構造の β マンノースへの β 1,2-ザイロースの付加や、還元末端側のGlcNAcへの β 1,3-フコースの付加、さらに非還元末端側へのルイスa構造[Gal β 1,3(Fuc β 1,4)GlcNAc β 1]が挙げられる。

植物に存在するN-グリカン構造の生理機能や生物学的意義については、これまでに様々なN-グリカンプロセシング酵素の欠損体を用いた研究や植物糖タンパク質N-グリカン

の構造解析、部位特異的な N-グリカン発現や分布などに関する研究が行われてきた。しかしながら、植物 N-グリカンの生理機能やその生物学的意義に関しては確証ある知見が殆どない。本論文では、*Oryza. sativa* の初期生長と N-グリカンの挙動に着目し、生長段階や生育環境の異なる *O. sativa* の N-グリカンの糖鎖基盤情報について解析しており、以下の4章で構成されている。一連の糖鎖構造解析については、長谷らが世界で初めて報告したピリジルアミノ化蛍光標識法を用いており、分析感度や分析精度が高度に標準化された手法を採用している。また、植物糖鎖の構造解析2D マップについては既存のマップが無いことから、本論文では全て新規に構築している。

【第1章 発芽前 *O. sativa* 胚部におけるグライコム解析】

第1章では、発芽前 *O. sativa* 胚部に存在する 6 種類の主要 N-グリカン構造を明らかにしている。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%) であり、次いで M3FX (16.7%)、M4X (14.3%)、M5A (9.3%)、M6B (6.7%) の順であり、最も少なかった N-グリカン構造は植物コンプレックス型糖鎖の GN2M3FX (7.2%) であった。また、これらの N-グリカンを構造のカテゴリー別に分類した結果では、パウチマンノース型が76.7%、ハイマンノース型が17.0%、コンプレックス型が7.2%であった。植物特異的な糖付加という視点からの解析では、トリマンノシルコア構造に β 1,2- ザイロースのみが付加した構造が全体の60.0%、 β 1,2- ザイロースおよび β 1,3- フコースが付加した構造が全体の23.9%であった。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おり、本論文ではこれらの構造が「非生物学的ストレス（乾燥など）や生物学的ストレス（外敵からの攻撃など）に対し抵抗機構を備えるための構造である」ことを新しい考え方として言及している。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-グリカンの割合が多く、本章はこれらの既報を踏まえた考察において、N-グリカンが組み合わさることによる糖タンパク質の耐乾燥性制御のメカニズムの存在を示唆している。発芽前 *O. sativa* 胚部における GN2M3FX の存在は、コンプレックス型 N-グリカンの生合成および種子形成において重要な GlcNAc 転移酵素 I (GnT-I) が種子形成時に機能していたことを示している。本章の結果では、種子形成時に生合成されたコンプレックス型 N-グリカンが種子形成期の収束とともに *O. sativa* 胚部への蓄積は殆ど行われなかったことを明らかにしており、これらの結果から、N-グリカンの構造多様性に大きく貢献するコンプレックス型 N-グリカンは、保存を目的とする「種子」には適さないことを考察している。すなわち、種子内部の細胞内分化多様性を減らしながら、長期保存を可能にした植物の生存戦略において、糖鎖多様性についても最小限に留めておく戦略を取った事を示す重要な結果が本章において示されている。以上の結果から、N-グリカン構造は

発芽前 *O. sativa* 胚部において、種子の長期保存や発芽に必要な最低限の N-グリカン構造で構成されていることが明らかとなった。

【第2章 発芽48時間後 *O. sativa* 胚部におけるグライコム解析】

第2章では、発芽48時間後 *O. sativa* 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ている。発芽48時間後の *O. sativa* 胚部において10%以上の割合存在していた N-グリカンは、M3X (17.9%)、M3FX (15.3%)、GN2M3FX (14.8%) であり、5%以上の割合で存在している N-グリカンは、Gal2F2GN2M3FX (9.6%)、Gal2F1GN2M3FX (6.3%)、M8A (5.8%)、M4X (5.5%)、M5A (5.2%)、Gal1F1GN2M3X (5.2%) である事を初めて明らかにした。また、これらの N-グリカンの構造カテゴリー別の分類では、パウチマンノース型38.7%、コンプレックス型44.1%、ハイマンノース型17.3%で構成されている事を明らかにしている。さらに、コンプレックス型 N-グリカンのうち、ルイス a 構造を持つ N-グリカンはコンプレックス型 N-グリカンの半数であった。これらのコンプレックス型 N-グリカンは主に分泌型糖タンパク質糖鎖として存在し、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た。また、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植物病原菌などの侵入を防ぐための防御機構の1つに関与している事を明らかにしている。発芽後 *O. sativa* 胚部において、トリマンノシルコア構造に β 1,2- ザイロースおよび β 1,3- フコースが付加した N-グリカン構造は50.0%を占め、発芽前の23.9%から大幅に増加した事を初めて明らかにしている。以上の事から β 1,2- ザイロースや β 1,3- フコースが付加されたコンプレックス型 N-グリカンは *O. sativa* の発芽初期段階における発芽誘導および *O. sativa* 胚部の生長初期に関与する糖鎖であることを明らかにした。本研究結果および木村らによる銀杏種子の経時変化に伴う N-グリカンの挙動解析から、植物の生長・分化における N-グリカン構造の変動は種子形成時にはコンプレックス型からパウチマンノース型へ移行し、種子保存時には比較的シンプルなパウチマンノース型 N-グリカンを主体とする少数の N-グリカンへ集約されることが明らかとなった。また、発芽時の種子の N-グリカン構造が、結合するタンパク質群の発現に伴い「糖鎖多様性も増加」することを明らかにした。以上の結果から、第2章では、分化誘導初期の *O. sativa* 胚部において、高度に修飾を受け、かつ多様性に富んだ N-グリカンが重要であり、発芽前後の *O. sativa* 胚部における N-グリカンの構造多様性の増加が、生長部位における急激な細胞環境の変化に柔軟に対応している事を明らかにした。

【第3章 発芽120時間後 *O. sativa* 生長部位におけるグライコム解析】

第3章では、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。また、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 は根部において劇的に減少している事を明らかにした。また、他の植物種の既報において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事を総括して考察し、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-グリカンである事を見出した。本章の大きな発見の一つとしては、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ている点がある。比較構造解析の結果、M3X、M3FX、GNM3FX、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を証明し、さらに、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が確認されなかった事を明らかにしており、初期生長時の芽部における N-グリカンが光に対する応答と別のシステムで制御されていることを世界で初めて明らかにした。一連の植物と N-グリカンの高等進化に関する既報を踏まえ、本章の研究結果から「*O. sativa* の特定部位の生長や分化における N-グリカンの挙動が、植物の高等進化と深く関わっていることを示す」という興味深い考察をしている。

【第4章 銀ナノコロイド曝露を受けた *O. sativa* 生長部位のグライコーム解析】

第4章では、過度な環境変化に伴う N-グリカンの挙動を解析するために、Silver Nano Colloid (SNC) 曝露を受けた *O. sativa* 生長部の N-グリカン構造解析を展開している。表現型解析の結果、SNC 曝露を受けた *O. sativa* 芽部は、いずれの 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った。これらの観察結果から、*O. sativa* 根部は高濃度の SNC 曝露により重篤な影響を受けることが明らかとなった。SNC 曝露を受けた植物に関する既報では、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起こる事が考えられたことから、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。SNC 曝露を受けた *O. sativa* 芽部の N-グリカン解析の結果、糖鎖発現量や構造多様性に顕著な差異は確認されなかったことから、*O. sativa* 芽部は糖鎖構造の視点からも SNC 曝露の影響を殆ど受けていないことが明らかとなった。続いて、SNC 曝露の影響が表現型に顕著に現れた *O. sativa* 根部の糖鎖構造解析では、4種類の糖タンパク質結合型 N-グリカンおよび4種類の遊離型 N-グリカ

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コンプレックス型 N-グリカンであったことから、SNC 曝露を受けた *O. sativa* 根部において、これらのコンプレックス型 N-グリカンの結合する糖タンパク質が積極的に生合成されていることが考えられた。特筆すべき重要な研究結果として、遊離型のコンプレックス型 N-グリカンの著しい増加が、SNC 曝露を受けた *O. sativa* 根部において、初めて確認された点である。遊離型コンプレックス型 N-グリカンは *O. sativa* 根部において少なくとも非生物ストレスに対する耐性機構に関与し、*O. sativa* 芽部に対する SNC 曝露の影響に対応している事を示した意義のある結果である。本章の研究の結果、過度な環境変化下における遊離型のコンプレックス型 N-グリカンの増加が明らかとなった。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過度な環境変化下における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。

【審査結果】

本論文では、*O. sativa* 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* 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ている。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にし、また初期生長時の芽部における N-グリカンが光に対する応答と別のシステムで制御されていることを世界で初めて明らかにした。さらに、SNC 曝露を受けた根部では遊離型コンプレックス型 N-グリカンの劇的な増加を世界で初めて捉えている。本論文の研究結果から、糖鎖は、*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制御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り、本論文の各章の研究結果における個々の新規性も極めて高い。*O. sativa* は陸上植物において最も高等進化を遂げた被子植物の1つであり、次世代の基となる胚部には生長に必要な情報が集約・蓄積されている。本論文のような初期生長における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は、*O. sativa* のみならず多くの植物の生長とそれに伴う N-グリカン構造の関連性について新たな領域を開拓する重要な研究であり、さらに、植物進化とともに常に新たな環境適応を繰り返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多くの新知見を得るための礎となる非常に意味のある研究結果である。本論文は、生命科学研究科（生命科学専攻）の博士学位審査基準と照合し、妥当な研究内容であると認められる。従って、所定の試験結果と論文評価に基づき、本審査委員会は全員一致をもって堀内里紗氏の博士学位請求論文は、本学博士学位を授与するに相応しいものと判断する。