Osaka University Knowledge Archive

Title	ｼﾛｲﾇﾅｽﾞﾅ N-結合型糖鎖修飾に関わる酵素遺伝子の同定と機能解析
Author(s)	梶浦, 裕之
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58405
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【10】

氏　　名	梶　浦　裕　之（かじ うら ひろ ゆき）
博士の専攻分野の名称	博　士（工　学）
学　位　記　番　号	第　２４１４５　号
学位授与年月日	平成22年8月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学　位　論　文　名	シロイヌナズナ *N*-結合型糖鎖修飾に関わる酵素遺伝子の同定と機能解析
論文審査委員	（主査） 教　授　藤山　和仁 （副査） 教　授　仁平　卓也　　教　授　福崎英一郎　　教　授　原島　　俊 教　授　大竹　久夫　　教　授　福井　希一　　教　授　紀ノ岡正博 教　授　渡邉　　肇　　教　授　野地　博行

論　文　内　容　の　要　旨

本論文は機能未同定のシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)由来の糖鎖修飾関連酵素のうち，ER膜及びゴルジ体で糖鎖のマンノース残基の修飾に関与するasparagine-linked glycosylation 3（ALG3），α1,2-mannosidase I（MANI）に注目し，その機能同定と植物細胞の生育に与える糖鎖修飾の必要性を見出すことを目的とし，研究を行った．

第1章では，現在までに報告されている生化学的，生理学的機能をもとに細胞内における糖鎖修飾の重要性を記載している．これまで得られている糖鎖修飾における知見の多くは動物細胞，あるいは酵母で得られた知見であり，植物細胞においてはその糖鎖合成に関与する遺伝子も未同定のものが多数存在し，それに伴い植物の生育と糖鎖修飾の関連性に関する知見が極めて乏しかった．こうした背景のもと，本研究では植物細胞内における糖鎖修飾の生物学的意義を見出すことにした経緯を述べ，本論文の目的を明確にしている．本章では、本研究でモデル植物，シロイヌナズナを用い，未同定の植物糖鎖修飾酵素の*ALG3*と*MANI*に着目した理由について触れ，さらに植物の変異体の根の伸長を指標にし，植物型糖鎖と植物の生長に関する知見を得ることを目的とし，研究を行った経緯を記載した．

第2章では、シロイヌナズナ由来ALG3(AtALG3)がER膜内腔での糖鎖合成初期に関与するおけるマンノース残基の転移に関与するα1,3-mannosyltransferseであることを記載している．AtALG3の生物学的活性を酵母*alg3*変異体の相補試験により確認し，またシロイヌナズナ*alg3*変異体を用いて植物内でのAtALG3の機能を同定し，AtALG3がα1,3-mannosyltransferseであると同定した．さらに，*alg3*変異体では、ER膜内腔において糖鎖合成不全を起こすが，植物型糖鎖を保持し，野生型では検出されていない構造を有していることを見出した．また，*alg3*変異体の根の生育に着目したところ，様々なストレス環境下で野生型と同様の表現型を示した．これよりAtALG3の欠損は、シロイヌナズナの生長と生存に致命的な影響を与えないことを明らかにした．

第3章では，シロイヌナズナには2種類のMAN I (AtMANI)が存在し，ゴルジ体における糖鎖合成初期に関与する酵素であることを明らかにしている．2種類のAtMANIについて大腸菌で組換え酵素を生産し、酵素学的特徴を解明した．また，AtMANIと蛍光タンパク質の融合タンパク質を植物細胞で発現させ，AtMANI がER膜に局在することを示した．さらにシロイヌナズナ*man I*変異体の糖鎖構造を解析し，シロイヌナズナにおける糖鎖修飾は2種類のAtMANIの酵素が関与することを示した．

第4章では，糖鎖上の特定の糖残基が，シロイヌナズナの根の伸長を阻害することを記載している．第3章で作製した2種の*manI*変異体では，根の伸長が阻害された．この結果をもとに，第2，3章で使用したシロイヌナズナ変異体を用い特定の糖残基を保持する変異体を作製し，その糖鎖構造解析を行い，植物糖鎖構造と根の生育の相関関係を求めた．本章で得られた結果は，新規の植物細胞内における糖鎖修飾の新たなる重要性を提唱したものである．

第5章では，各変異体の根の生育から，植物細胞内におけるER膜，ゴルジ体における各初期段階の糖鎖修飾が根の生育に与える影響をまとめ，本研究を総括している．本研究で得られた結果は，これまで動物細胞・酵母で先行していた糖鎖生物学に関する知見とは異なり，新しい糖鎖機能が植物において見いだされ，植物における糖鎖生物学の研究領域が新たな方向へと拡大することが期待される結果となっている．

論文審査の結果の要旨

本論文は機能未同定のシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)由来の糖鎖修飾関連酵素のうち，ER膜及びゴルジ体で糖鎖のマンノース残基の修飾に関与する asparagine-linked glycosylation 3 (ALG3)，α1,2-mannosidase I (MANI)に注目し，その機能同定と植物細胞の生育に与える糖鎖修飾の必要性を見出すことを目的として研究を行ったものである．

第 1 章では，現在までに報告されている生化学的，生理学的機能をもとに細胞内における糖鎖修飾の重要性を記載している．しかしながら，その多くは動物細胞，あるいは酵母で得られた知見であり，植物細胞においてはその糖鎖合成に関与する遺伝子も未同定のものが多数存在し，それに伴い植物の生育と糖鎖修飾の関連性に関する知見が極めて乏しい現状について述べている．こうした背景のもとで，本研究で植物細胞内における糖鎖修飾の生物学的意義を見出すことにした経緯を述べ，本論文の目的を明確にしている．本章では，本研究でモデル植物，シロイヌナズナを用い，未同定の植物糖鎖修飾酵素の *ALG3* と *MANI* に着目した理由について触れ，さらに植物の変異体の根の伸長を指標にして，植物型糖鎖と植物の生長に関する知見を得ることを目的とし，研究を行った経緯を記載している．

第 2 章では，シロイヌナズナ由来 ALG3(AtALG3)が ER 膜内腔での糖鎖合成初期に関与するおけるマンノース残基の転移に関与するα1,3-mannosyltransferase であることを記載している．AtALG3 の生物学的活性を酵母 *alg3* 変異体の相補試験により確認し，さらにシロイヌナズナ *alg3* 変異体を用いて植物内での AtALG3 の機能を同定し，AtALG3 がα1,3-mannosyltransferase であると同定している．さらに，シロイヌナズナ *alg3* 変異体では，ER 膜内腔において糖鎖合成不全を起こすが，植物型糖鎖を保持し，さらに野生型では検出されていない構造を有していることを見出している．また，*alg3* 変異体の根の生育に着目したところ，様々なストレス環境下で野生型と同様の表現型である．これより AtALG3 の欠損は，シロイヌナズナの生長と生存に致命的な影響を与えないことを明らかにしている．

第 3 章では，シロイヌナズナには 2 種類の MAN I (AtMANI)が存在し，ゴルジ体における糖鎖合成初期に関与する酵素であることを明らかにしている．2 種類の AtMANI について大腸菌で組換え酵素を生産し，酵素学的特徴を解明している．また，AtMANI と蛍光タンパク質の融合タンパク質を植物細胞で発現させ，AtMANI がゴルジ体に局在することを証明している．さらにシロイヌナズナ *manI* 変異体の糖鎖構造を解析し，シロイヌナズナにおける糖鎖修飾は 2 種類の AtMANI の酵素が関与することを示している．

第 4 章では，糖鎖上の特定の糖残基が，シロイヌナズナの根の伸長を阻害することを記載している．第 3 章で作製した 2 種の *manI* 変異体では，根の伸長が阻害された．この結果をもとに本章ではさらに，第 2，3 章で使用したシロイヌナズナ変異体を用い特定の糖残基を保持する変異体を作製し，その糖鎖構造解析を行い，植物糖鎖構造と根の生育の相関関係を確立している．本章で得られた結果は，新規の植物細胞内における糖鎖修飾の新たなる重要性を提唱したものである．

第 5 章では，各変異体の根の生育から，植物細胞内における ER 膜，ゴルジ体における各初期段階の糖鎖修飾が根の生育に与える影響をまとめ，本研究を総括している．本研究で得られた結果は，これまで動物細胞・酵母で先行していた糖鎖生物学に関する知見とは異なり，新しい糖鎖機能が植物において見いだされ，植物における糖鎖生物学の研究領域が新たな方向へと拡大することが期待される結果となっている．よって本論文は博士論文として価値のあるものと認める．