

氏名	岡本 尚子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第 7070 号
学位授与の日付	2024年 3月 25日
学位授与の要件	環境生命科学研究科 農生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	遊離 <i>N</i> -グリカンの生理機能解析を目的としたエンド- β - <i>N</i> -アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) 欠損トマトの構築と植物 ENGase の糖転移活性に関する研究
論文審査委員	教授 清田洋正 教授 田村 隆 教授 守屋央朗 准教授 前田 恵
学位論文内容の要旨	
<p>真核生物が産生するタンパク質の 60%程度は糖鎖修飾を受けており、アスパラギン結合糖鎖 (<i>N</i>-グリカン) は、小胞体内腔でのタンパク質品質管理系で重要な役割を担っている。一方で、本来なら、タンパク質に結合することでタンパク質機能に重要な役割を果たすべき <i>N</i>-グリカンが、遊離 <i>N</i>-グリカン (FNGs) として存在しており、フォールディングに失敗した新生糖タンパク質が小胞体関連分解をうける際に生じることが明らかになっている。細胞質の FNGs は、細胞質 PNGase によりミスフォールド糖タンパク質から還元末端側にキトビオースを有するハイマンノース型 FNGs (GN2-HMT-FNGs) として生成し、続いて ENGase による加水分解を受け、還元末端側に GlcNAc1 残基を有する HMT-FNGs (GN1-HMT-FNGs) が生成する。分化成長中の実生胚軸や成熟過程の果実中には μM で GN1-HMT-FNGs が存在しており、GN1-HMT-FNGs が植物の分化生長や果実の成熟に関わるホルモン様の作用を有するのではないかと推測されている。一方、トマト果実については、成熟に伴い GN1-HMT-FNGs が蓄積することがわかっているが、果実の成熟過程における GN1-HMT-FNGs の生理機能については未だ明らかにされていない。そこで、本博士論文の第二章では、CRISPR/Cas9 システムを用いてトマトの ENGase 欠損株を構築し、ENGase 活性測定および FNGs 構造解析を行った。その結果、ENGase 活性を抑制した Δeng 変異株の構築に成功した。Δeng 変異株の T2 世代の成熟トマト果実について、ENGase 活性と HMT-FNGs の構造的特徴を解析したところ、ENGase 活性が検出されず、GN1-HMT-FNGs の代わりに GN2-HMT-FNGs が生成されていた。しかしながら、野生株と比べて Δeng 変異株の T2 世代の表現型には明らかな変化は観察されておらず、この結果は <i>A. thaliana</i> ENGase 欠損株で観察された結果と一致していた。以上の結果から、GN1-HMT-FNGs は、トマト果実成熟促進には関与していないと考えられたが、GN2-HMT-FNGs が存在するため、HMT-FNGs の生理機能を否定することはできなかった。第三章では、植物 ENGase の酵素学的な性質に注目し、GH Family 85 に分類される植物 ENGase の糖転移活性を解析するために、大腸菌での発現系が確立しているイネ組換え ENGase (rEndo-Os) を用いて、供与基質に HMT 糖鎖を有する糖ペプチドを、受容基質に <i>p</i>NP-GlcNAc および GlcNAc を用いて糖転移反応を行った。その結果、rEndo-Os (細胞質酵素) による糖転移産物が僅かに検出されたが、微生物 Endo-M (分泌型酵素) の約 1%と極めて低いことが明らかになった。以上の結果は、細胞質内での rEndo-Os の糖転移活性が抑制されていることを示唆すると考えられた。また、部位特異的変異の導入により加水分解活性と基質認識に関わるアミノ酸残基の特定を試みた結果、T259W 変異型 rEndo-Os の W259 は、動物複合型糖鎖との相互作用に寄与する可能性があると考えられた。</p>	

論文審査結果の要旨

植物の細胞質の遊離*N*-グリカン (FNGs) は、細胞質PNGaseによりミスフォールド糖タンパク質から還元末端側にキトビオースを有するハイマンノース型FNGs (GN2-HMT-FNGs) が生成され、続いてENGaseにより、還元末端側にGlcNAc1残基を有するGN1-HMT-FNGsが生成される。分化成長中の実生胚軸や成熟過程の果実中には μM でGN1-HMT-FNGsが存在しており、植物の分化生長や果実の成熟に関わるホルモン様の作用を有するのではないかと推測されている。一方、トマト果実については、成熟に伴いGN1-HMT-FNGsが蓄積するが、果実の成熟過程におけるGN1-HMT-FNGsの生理機能については未解明である。そこで、本学位論文の第二章では、CRISPR/Cas9システムを用いてトマトのENGase欠損株を構築し、ENGase活性測定およびFNGs構造解析を行った結果を論述している。その結果、 Δeng 変異株の成熟トマト果実では、ENGase活性が検出されず、GN1-HMT-FNGsの代わりにGN2-HMT-FNGsが生成されることを見出している。しかしながら、野生株と比べて Δeng 変異株の表現型には明らかな変化は観察されておらず、GN1-HMT-FNGsは、トマト果実成熟促進には関与していないと考えている。第三章では、植物ENGaseの糖転移活性を解析するため、イネ組換えENGase (rEndo-Os) を用いて、HMT糖鎖に対する糖転移反応を行った結果を論述している。その結果、rEndo-Os (細胞質酵素) による糖転移産物が僅かに検出され、微生物Endo-M (分泌型酵素) の約1%と極めて低いことが明らかにされている。以上の結果は、細胞質内でのrEndo-Osの糖転移活性が抑制されていることを示唆すると考えている。

以上、遊離 *N*-グリカンの生理機能解析を目的として、ENGase 欠損トマトを構築し、GN1-HMT-FNGs はトマト果実成熟促進には関与しないこと見出し、また植物 ENGase の糖転移活性は低く抑制されているという新しい知見を示した本論文は、博士論文として相応しい学問的意義及び価値を有するものと判定した。