

氏名	WOO KWAN KIT
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2934号
学位授与の日付	平成17年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生命分子科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Studies on the purification and characterization of $\alpha$ -mannosidase and $\beta$ -xylosidase from <i>Ginkgo biloba</i> seeds: Application to Glycobiology (銀杏種子由来の $\alpha$ -マンノシダーゼと $\beta$ -キシロシダーゼの精製と酵素学的諸性質に関する研究:糖鎖生物学への応用利用)
論文審査委員	教授 木村 吉伸 教授 高畑 京也 教授 馬場 直道

#### 学位論文内容の要旨

In this thesis, plant  $\alpha$ -mannosidase and  $\beta$ -xylosidase were purified and characterized from developing *Ginkgo biloba* seeds to elucidate physiological function of free *N*-glycan occurring in developing or growing plant cells. Molecular weight of the  $\alpha$ -mannosidase was estimated as 120 kDa by SDS-PAGE in the presence of 2-mercaptoethanol, and 340 kDa by gel filtration, indicating that the enzyme may function in oligomeric structures in the plant cell. The *N*-terminal amino acid sequence was Ala-Phe-Met-Lys-Tyr-X-Thr-Thr-Gly-Gly-Pro-Val-Ala-Gly-Lys-Ile-Asn-Val-His-Leu-.  $\alpha$ -mannosidase activity for Man6GlcNAc1 was enhanced by the addition of  $\text{Co}^{2+}$ , but no significant effect from  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , or EDTA. In the presence of  $\text{Co}^{2+}$ , hydrolysis rate for pyridylaminated Man6GlcNAc1 was significantly faster than pyridylaminated Man6GlcNAc2, suggesting the enzyme is involved in the degradation of free *N*-glycans occurring in developing plant cells. To our knowledge, this is the first report of plant cells  $\alpha$ -mannosidase activated by  $\text{Co}^{2+}$  and prefers the oligomannose type free *N*-glycans bearing one GlcNAc residue. When the enzyme was incubated with pyridylamino derivative of Man9GlcNAc2 (M9A) without cobalt ion, Man5GlcNAc2-PA (M5A) having no  $\alpha$ 1-2 mannosyl residue was obtained as a main product. However, with  $\text{Co}^{2+}$  (1 mM), Man3-1GlcNAc2-PA were obtained as major products releasing  $\alpha$ 1-3/6 mannosyl residues in addition to  $\alpha$ 1-2 mannosyl residues. The results show that  $\text{Co}^{2+}$  did not affect the trimming pathway from M9A to M5A but the hydrolytic activity towards  $\alpha$ 1-3/6 mannosyl linkages was stimulated by it. Structural analysis of the products clearly showed that the  $\alpha$ -mannosidase could produce truncated high-mannose type *N*-glycans found in developing or growing plant cells, suggesting the enzyme might be involved in the degradation of high-mannose type free *N*-glycans.

The molecular weight of *Ginkgo* $\beta$ -xylosidase was estimated as 16 kDa by SDS-PAGE in the presence of 2-mercaptoethanol, and 35 kDa by gel filtration, indicating that the enzyme may function in oligomeric structures in the plant cell. The optimum pH and temperature of  $\beta$ -xylosidase with *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside was around pH 3.5 and 55°C, respectively. The enzyme was able to release  $\beta$ 1-2xylose residue from Man1Xyl1GlcNAc2-PA (MX) or Man1Xyl1Fuc1GlcNAc2-PA (MFX). On the contrary, no  $\beta$ 1-2xylose residue was released from Man3Xyl1Fuc1GlcNAc2-PA (M3FX) or GlcNAc2Man3Xyl1Fuc1GlcNAc2-PA (GN2M3FX), indicating that the action of  $\beta$ -xylosidase might inhibit by the outer mannose residues or *N*-acetylglucosamine residues. However, the ability of the purified  $\beta$ -xylosidase to release  $\beta$ 1-2xylose residue might serve as a useful tool for structural analysis of  $\beta$ 1-2xylose containing glycoprotein.

## 論文審査結果の要旨

本学位論文は、分化成長中の植物細胞に存在する遊離 N-グリカンの機能解明研究の一環として、遊離 N-グリカンの分解に関与すると考えられる $\alpha$ -マンノシダーゼ及び $\beta$ -キシロシダーゼをイチョウ種子から精製後、詳細な基質特異性を始めとする酵素学的諸性質を明らかにし、更に、これら2種の植物グリコシダーゼが、糖鎖構造・機能解析、糖鎖リモデリング研究において重要なツールとなること証明している。本論文は緒論を含めて4章から構成されている。

第2章では、イチョウ種子から $\alpha$ -マンノシダーゼを各種クロマトグラフィーを組み合わせることにより単一精製することに成功し、本酵素が(1)分子量120kDaを有するサブユニットが3分子会合した多量体構造を形成していること、(2)植物複合型糖鎖が結合する糖タンパク質であること、(3)至適 pH を 5.0 付近に有すること、(4)還元末端に GlcNAc 残基を1分子有するハイマンノース型糖鎖に対して強い活性を示すことなどを明らかにした。更に、本酵素がコバルトイオンにより活性制御を受けるといった非常にユニークな特性を有することを発見している。第3章では、第2章で得られた $\alpha$ -マンノシダーゼの詳細な基質特性を蛍光標識 N-グリカンを用いて解析した結果が論述されている。ハイマンノース型糖鎖 (Man9GlcNAc2) を本酵素で処理した後、得られた生成糖鎖の化学構造を分析することにより、本酵素によるマンノーストリミング経路を明らかにした。その結果、本酵素はコバルトイオン非存在下では $\alpha$ 1-2 マンノシダーゼ活性を示し Man5GlcNAc2 構造を誘導する一方、コバルトイオン存在下では $\alpha$ 1-2,  $\alpha$ 1-3,  $\alpha$ 1-6 結合マンノース残基を全て遊離させ Man1GlcNAc2 構造を誘導することを明らかにし、糖鎖構造・機能解析にとって極めて有用な酵素であることを証明した。第4章では、イチョウ種子から $\beta$ -キシロシダーゼを精製し、蛍光標識 N-グリカンを用いて詳細な基質特異性を明らかにした内容が論実されている。その結果、本酵素は $\beta$ -キシロース残基を有する植物抗原性糖鎖から、 $\beta$ 1-2 キシロース残基を遊離させることを証明し、抗原性糖鎖の構造・機能解析にとって非常に有用な酵素となることを示した。

以上の内容を持つ本論文は、博士論文として相応しい学問的意義および価値を有するものと判定した。