

氏名	中村 浩介
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3914号
学位授与の日付	平成21年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Studies on the physiological roles of free <i>N</i> -glycans on tomato fruit maturation —Identification and expression analysis of endo- $\beta$ - <i>N</i> -acetylglucosaminidase gene— (トマト果実成熟における遊離 <i>N</i> -グリカンの生理機能に関する研究 —エンドグリコシダーゼ遺伝子の同定と発現解析—)
論文審査委員	教授 木村 吉伸 教授 久保 康隆 教授 村田 芳行

### 学位論文内容の要旨

We reported that the amount of high-mannose type free *N*-glycans increased significantly in accordance with the fruit ripening, while total endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase (ENGase) activities in tomato fruits did not significantly vary with ripening process. Furthermore, the structural analysis of high-mannose type *N*-glycans linked to matured glycoproteins revealed that the amount and structural features of high-mannose type *N*-glycans linked to glycoproteins could not account for those of free *N*-glycans occurring immature red tomato fruits, suggesting that endogenous substrate for tomato ENGase may be misfolded glycoprotein accumulated in the cytosol. On the other hand, during structural analysis of high-mannose type *N*-glycans linked to glycoproteins, we also analyzed plant complex type *N*-glycans to see the occurrence ratio of high-mannose type to plant complex type in red mature tomato fruits. Predominant occurrence of complex type *N*-glycans in tomato glycoproteins was observed. The occurrence of these plant complex type *N*-glycans as a major component, suggest clearly that majority of *N*-glycans linked tomato glycoproteins may be exposed on the surface of protein molecules and fully processed by the processing  $\alpha$ -mannosidases and glycosyltransferases.

A database research (NCBI nucleotide BLAST) based on the rice ENGase (endo-OS) gene resulted in the identification of a putative ENGase gene (BT013932) in the tomato genome. Construction of expression plasmid in *E. coli* was prepared, then recombinant proteins were extracted and enzyme activity was measured. Significant enzymatic activity was found in supernatant of the lysate, indicating that BT013932 gene encodes a tomato ENGase (Endo-LE). While molecular weight of recombinant protein was not agreed with putative size, recombinant proteins showed same characteristics as native ENGase. To reveal changes in expression of Endo-LE gene during fruit maturation, we analyzed the amount of mRNA for Endo-LE in tomato fruits maturing. The expression of mRNA for Endo-LE in the tomato fruits did not vary significantly with the ripening process, indicating that biosynthesis rate of Endo-LE is basically maintained at a certain level through tomato fruit ripening. Therefore, the significant increase of high-mannose type free *N*-glycans at the late stage of fruit ripening must be due to increase of endogenous substrates or to a reduction in the degradation rate of free *N*-glycans by the cytosolic  $\alpha$ -mannosidase.

We also tried to generate transgenic tomato plants with sense (over-expression) or antisense (knock-down) Endo-LE genes for the purpose of directly elucidating physiological roles of free *N*-glycans accumulation and metabolism. Frequency of explants forming calli with ENGase-S (over-expression) was almost same as described previous paper. However, independent rooted plants were not obtained enough. A lot of elongated shoots aged early and died before rooting when shoots were transferred to root induction medium. This observation suggests that the timing of transferring to root induction medium was late because of unskilled technique or over-expression of ENGase promotes aging. For generating knock-down transgenic plants, explants did not generate enough calli, only one quarter of explants generated calli, and then no rooted plant was obtained. This fact supports our hypothesis which suppression of ENGase activities by antisense expression brings somewhat aberrant morphology to regenerate.

## 論文審査結果の要旨

本学位論文では、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行われた（1）トマト果実の熟成過程における遊離N-グリカンの変動解析（2）果実中のタンパク質結合N-グリカンの構造解析（3）遊離N-グリカン生成を司る *endo-β-N-acetylglucosaminidase* (ENGase) 遺伝子の同定（4）果実成熟過程におけるEndo-LEの発現量および活性変動解析（5）ENGase 遺伝子の過剰発現及びノックダウン植物体の作製についての研究成果が記載されている。論文は緒論(第1章)と結論(第6章)を含めて6章構成となっている。第2章ではトマト果実熟成にしたがって、ENGaseにより生成した遊離型糖鎖量が顕著に増加することを明らかにするとともに、糖鎖構造にも差異が生じていることを見出している。この結果は、糖タンパク質糖鎖代謝が果実熟成過程で重要な意味を持つことを示唆するものである。第3章では、ENGaseの内在基質を明らかにする目的で、果実中に発現されている全糖タンパク質の糖鎖構造解析を行っている。その結果、糖タンパク質に結合する糖鎖は77%程度が複合型構造であり、ENGase基質となりうるハイマンノース型構造の糖鎖存在量が少ないことから、ENGase内在性基質は成熟型糖タンパク質ではなく、タンパク質生合成時に生じるミスフォールド糖タンパク質糖鎖である可能性を示唆した。第4章では、遊離糖鎖生成に関与するENGase遺伝子の同定を行っている。イネENGase遺伝子配列を基にトマトゲノム情報から候補遺伝子を絞り込み、その遺伝子を大腸菌で発現させた。得られた組換えタンパク質からENGase活性を検出し、候補遺伝子がトマトENGaseであることを証明している。次いで、果実熟成に伴うENGase遺伝子の発現変動をReal-time PCR法で解析し、ENGase遺伝子が常に一定レベルで発現していることを明らかにした。第6章ではENGase遺伝子の過剰発現植物とノックアウト植物の作製についての結果が論述されており、ENGase遺伝子の発現制御が植物の分化過程に大きく影響を及ぼす可能性を示唆している。

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及び価値を有するとともに、糖鎖機能を利用した植物バイオテクノロジー開発に向けての実用的価値を有するものと判定した。