

氏名	Md. Ziaur Rahman
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学術
学位授与番号	博甲第5235号
学位授与の日付	平成27年 9月30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5条第1項該当)
学位論文の題目	Molecular identification and characterization of plant β -D-galactosidase and α -L-fucosidase: two glycoenzymes involved in <i>N</i> -glycoprotein degradation during plant cell development (植物 β -D-ガラクトシダーゼと α -L-フコシダーゼの分子同定と酵素学的諸性質: 植物生長時に N 型糖タンパク質分解に関わる二つの糖鎖関連酵素)
論文審査委員	教授 木村 吉伸 教授 村田 芳行 教授 田村 隆

学位論文内容の要旨

As part of a study to elucidate the physiological role of free *N*-glycan and de-*N*-glycosylation mechanism working in plants, I targeted two glycoenzymes, α -fucosidase and β -galactosidase, that are involved in turn over of *N*-glycoproteins. It has been reported that free *N*-glycan acts as signaling molecule for fruit ripening process but their physiological role in plant remains unknown. Therefore, the main aim of this research is the molecular characterization of α -fucosidase and β -galactosidase to prepare transgenic plants, in which expressions of the glycoenzymes are regulated.

I purified and biochemically characterized an acidic β -galactosidase from *Ginkgo biloba* (β -Gal'ase Gb-1), one of the important glycoenzymes involved in the turnover of bioactive plant glycoproteins, that showed substantial activity for β 1-4 galactosyl residue and modest activity for β 1-3 galactosyl residue with an optimum pH near 5.0, which may involve in the degradation of plant complex type *N*-glycans. In addition to plant β -Gal'ase,

I also focused on characterization and molecular identification of a plant α -fucosidase (α -Fuc'ase) that is active against *N*-glycans bearing α -3/4 fucosyl residues, since it has been believed that α -3/4 Fuc'ase has a critical role in degradation of plant complex type *N*-glycans. For this purpose, rice α -fucosidase (α -Fuc'ase Os, 58 kDa) was purified from cultured cell (K-1 line) and found active against α 1-4 fucosyl residue in Lewis a unit on plant *N*-glycans, but not for α 1-3 fucosyl residue in the pyridylaminated Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc, core structure of plant specific *N*-glycans. The identified N-terminal sequence (AAPTTPPL) of α -Fuc'ase Os was found in the amino acid sequence of a putative rice α -fucosidase (Os04g0560400), which belongs to GH 29 family. This sequence information I further used for searching the putative α -fucosidases in tomato (*Solanum lycopersicum*) following cloning, expression, and localization of the respective genes (LOC101254568). The tomato α -fucosidase 1 (namely rFuc'ase SI-1, 55kDa) expressed in insect cells (Sf9) was collected from extracellular culture medium and infected cell extracts, which can substantially hydrolyzed non-reducing terminal α 1,3-fucose residues on animal complex type *N*-glycan and α 1,4-fucose residues from Le^a determinants on plant complex type *N*-glycans. This rFuc'ase SI-1 hydrolyzed neither α 1,2-linked fucose nor fucose in α 1,3-linkage to the innermost GlcNAc residue on the core structure of plant complex *N*-glycan (Man₃Xyl₁Fuc₁GlcNAc₂). But, when the mannose and xylose residues are trimmed from Man₃Xyl₁Fuc₁GlcNAc₂, the rFuc'ase SI-1 can act on α 1,3-linkage to the innermost GlcNAc residue of GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc. For better understanding the protein structure-function relationship, a molecular 3-D modeling of rFuc'ase SI-1 was done that conferred Asp¹⁹³ and Glu²³⁷ are the important substrate-binding residues, which is remarkably conformed between tomato rFuc'ase SI-1 and X-ray solved crystal structure of *Biofidobacterium longum* subsp. *infantis* α -L-fucosidase.

論文審査結果の要旨

本学位論文は、植物糖タンパク質糖鎖 (*N*-グリカン)の代謝分解経路と植物の分化生長に関わる糖鎖機能を明らかにする研究の一端として、 β -ガラクトシダーゼ (β -Gal'ase)と α -フコシダーゼ(α -Fuc'ase) に焦点を当て、酵素精製、基質特異性解析、遺伝子同定と発現系構築、細胞内分布解析、分子モデリングに基づく立体構造解析を行った結果を論述している。研究成果の概略を以下に記す。

第二章では、貯蔵糖タンパク質の殆どが植物複合型糖鎖構造を有する銀杏種子に注目し、 β -ガラクトシダーゼを単一精製後、基質特異性解析を行い、本酵素が植物*N*-グリカンから β 1-3 Gal 残基を遊離させることを明らかにしている。また、本酵素は既知植物 β -Gal'ase のうち最小の分子構造 (16 kDa) を有していることから、触媒ドメインのみから構成される極めてユニークな分子種であることを明らかにしている。

第三章では、Lewis a エピトープ含有糖タンパク質を多く発現するイネ培養細胞に注目し、 α 1-4 結合フコースに作用する α -Fuc'aseを単一精製後、酵素学的所性質を明らかにするとともに、*N*-末端アミノ酸配列情報を基に候補遺伝子を同定し植物 α -Fuc'aseの分子進化についての知見を与えている。

第四章では、第三章で同定したイネ α -Fuc'ase の遺伝子情報を基に、二種のトマト α -Fuc'ase候補遺伝子に焦点を当て、遺伝子クローニングと昆虫細胞を用いた遺伝子発現系を構築している。得られた組換えトマト α -Fuc'ase (rFuc'ase S1)は Lewis a エピトープ中の α 1-4Fuc残基及びラクト-*N*-フコペタオース III 中の α 1-3Fuc 残基に作用することから、本酵素が α 1-3/4Fuc 特異的な GH29-Bファミリーに属する分子種であることを明らかにしている。次いで、rFuc'ase S1 がGlcNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAcに作用する一方、Fuc α 1-3GlcNAcには作用しないことから、非還元末端に存在するGlcNAc残基の基質結合部位への結合が加水分解反応に必須であることを証明している。また、分子モデリングによる立体構造解析から、基質結合に関与するアミノ酸残基と触媒アミノ酸残基 (Glu, Asp)を同定している。更に、GFPとの融合タンパク質をタバコ細胞で発現させることで、本酵素が細胞壁あるいはアポプラストで発現していることを示した。

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。