

博士論文

遊離 *N*-グリカンの生理機能解析を目的とした
エンド- β -*N*-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

2024 年 3 月

岡本 尚子

岡山大学大学院
環境生命科学研究科

目次

略号.....	3
第一章 序論.....	5
第二章 CRISPR-Cas9 によるゲノム編集を用いたエンド- β - <i>N</i> -アセチルグルコサミニダーゼ活性を抑制したトマト植物の構築.....	13
第一節 緒言.....	13
第二節 材料・試薬.....	14
第三節 実験方法.....	15
第一項 トマトの種子滅菌と生育条件.....	15
第二項 トマトへの変異導入.....	16
第三項 トマトの葉および果実からの粗抽出物の調製.....	18
第四項 エンド- β - <i>N</i> -アセチルグルコサミニダーゼ活性測定.....	18
第五項 トマトの葉と果実からのオリゴ糖抽出.....	19
第六項 遊離 <i>N</i> -グリカンの構造解析.....	19
第一節 実験結果.....	21
第一項 トマト ENGase 遺伝子に変異を導入した ENGase 編集トマトの作製.....	21
第二項 ハイマンノース型遊離 <i>N</i> -グリカンの構造解析.....	28
第五節 考察.....	40
第三章 イネ由来エンド- β - <i>N</i> -アセチルグルコサミニダーゼの糖転移活性の解析.....	42
第一節 緒言.....	42
第二節 材料・試薬.....	43
第三節 実験方法.....	44
第一項 糖転移反応の糖鎖供与基質となる糖ペプチドの調製.....	44
第二項 組換え Endo-Os (rEndo-Os) の発現と精製.....	48

第三項	rEndo-Os の糖転移活性の解析	49
第四項	rEndo-Os の部位特異的変異導入による加水分解活性および基質認識に関わる アミノ酸残基の特定	52
第五項	T259W 変異型 rEndo-Os の糖転移活性の解析	59
第四節	実験結果	60
第一項	雑豆（大納言）由来 HMT 糖ペプチドの調製と糖鎖構造の確認	60
第二項	rEndo-Os の大腸菌での発現と精製	62
第三項	糖転移活性の確認	66
第四項	変異型 rEndo-Os の加水分解活性の解析	74
第五項	T259W 変異型 rEndo-Os の糖転移活性の解析	80
第五節	考察	81
第四章	総括	84
	参考文献	87
	参考論文	98
	謝辞	99

略号

Con A	: Concanavalin A
DTT	: Dithiothreitol
ENGase	: Endo- β - <i>N</i> -acetylglucosaminidase
Endo-A	: <i>Arthrobacter protophormiae</i> ENGase
Endo-AT	: <i>Arabidopsis thaliana</i> ENGase
Endo-D	: <i>Streptococcus pneumoniae</i> ENGase
Endo-H	: <i>Streptomyces plicatus</i> ENGase
Endo-LE	: <i>Lycopersicum esculentum</i> ENGase
Endo-M	: <i>Mucor hiemalis</i> ENGase
Endo-Os	: <i>Oryza sativa</i> ENGase
ESI	: Electron spray ionization
FNG	: Free <i>N</i> -glycan
Fuc	: L-Fucose
Gal	: D-Galactose
Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2 (Gal2GN2M3)	: Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6(Gal β 1-4GlcNAc β 1- 2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc
GlcNAc	: <i>N</i> -Acetyl-D-Glucosamine
Glu	: D-Glucose
Hex	: Hexose
HexNAc	: <i>N</i> -Acetylhexosamine
HPLC	: High-performance liquid chromatography
Man	: D-Mannose

Man3Xyl1Fuc1GlcNAc2 (M3FX)	: Man α 1-6(Man α 1-3)(Xyl β 1-2)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc
Man6GlcNAc2 (M6B)	: Man α 1-6(Man α 1-3)Man α 1-6(Man α 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc
MeCN	: Acetonitrile
MES	: 2-(<i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
PA	: 2-aminopyridine
PCR	: Polymerase chain reaction
QTOF	: Quadrupole time of flight
RP-HPLC	: Reverse-phase HPLC
SDS-PAGE	: Sodium dodesyl sulphate -polyacrylamide gel electrophoresis
SF-HPLC	: Size-fractionation HPLC
TBS	: Tris buffer salined
TFA	: Trifluoroacetic acid
Tris	: Tris (hydroxymethyl) aminomethane
Xyl	: D-Xylose

第一章 序論

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、中でも分泌型タンパク質や膜タンパク質に限定してみるとそのほとんどは糖タンパク質である。特に、Asn-X-Ser/Thr (X≠Pro) 配列中のアスパラギン残基に結合した糖鎖 (N-グリカン) は、小胞体中でのタンパク質品質管理系で重要な役割を担っており、新生糖タンパク質のフォールディングに関与していること、分泌型タンパク質の *in vivo* 機能に重要な寄与をなしていることはよく知られている^{1,2)}。多細胞生物には、それぞれを特徴づける N-グリカン構造が存在しており、これらの糖鎖構造の違いは、ゴルジ装置内での N-グリカンのプロセッシング機構に関与する糖鎖代謝酵素 (糖転移酵素と加水分解酵素) やその基質特異性の違いを反映しているが、基本的な糖鎖合成やプロセッシング機構には真核生物に共通する流れがあることが明らかになっている³⁻⁷⁾。

Fig. 1-1 は、動植物の代表的な N-グリカンを示している^{8,9)}。ハイマンノース型 (high mannose type, HMT) 構造は動植物 N-グリカンに共通して見られ、共通のトリマンノシルコア構造 ($\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$) を有している。動物複合型 (animal complex type, ACT) N-グリカンの化学構造は、細胞の分化状態や組織特異性が反映されて極めて多様性に富んでいるが、基本的には (1) 非還元末端にシアル酸 (NeuNAc) 残基が存在することが多く、(2) 還元末端 GlcNAc 残基へのフコース (Fuc) 残基の結合が $\alpha 1,6$ 結合であり、(3) 2 本鎖構造以外に 3 ~ 5 本鎖構造が存在する等が構造的な特徴となる。一方で、植物複合型 (plant complex type, PCT) N-グリカンの特徴は、トリマンノシルコア構造中の (1) 還元末端 GlcNAc 残基への $\alpha 1,3\text{Fuc}$ 残基の結合、(2) $\beta 1,4\text{Man}$ 残基への $\beta 1,2\text{Xyl}$ 残基の結合、そして (3) 非還元末端側のルイス a (Lewis a, Le^a) 抗原 ($\text{Gal}\beta 1,3(\text{Fuc}\alpha 1,4)\text{GlcNAc}$) の形成である。PCT N-グリカンでは ACT N-グリカンと異なり 3~5 本鎖構造やシ

アル酸を有する構造は見いだされていない¹⁻⁹⁾。

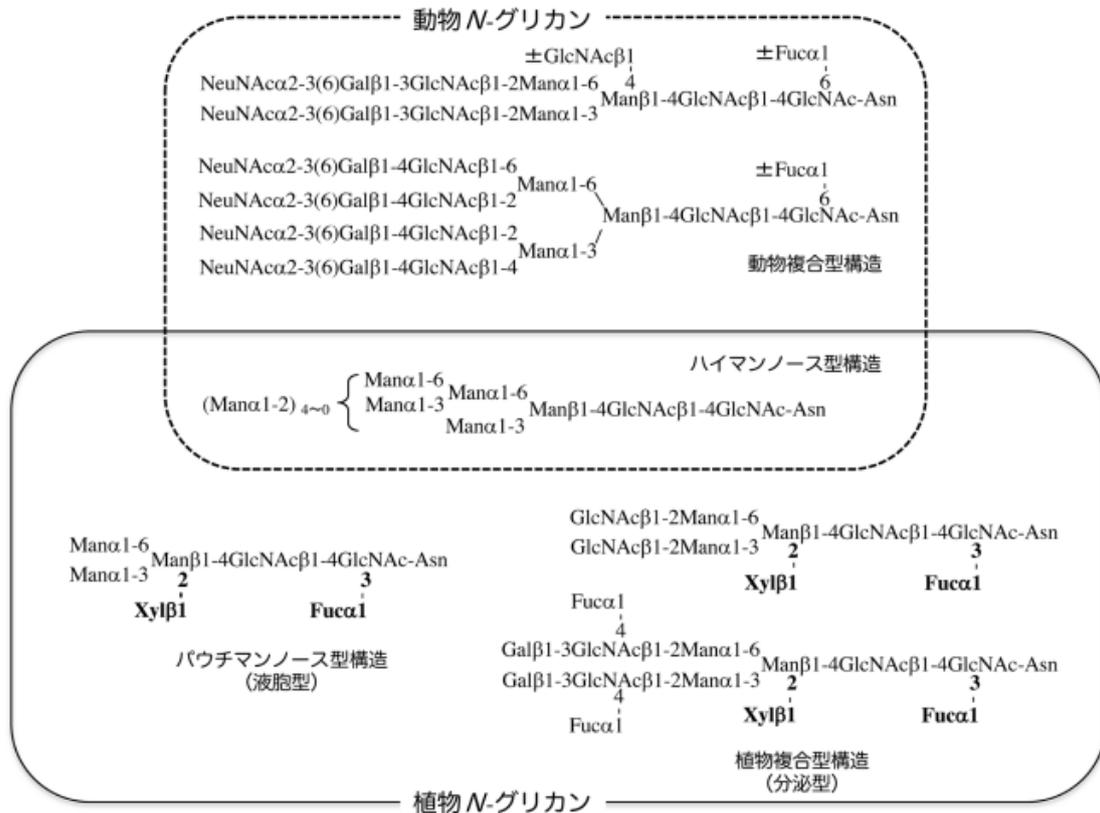


Fig.1-1 動物 N-グリカンと植物 N-グリカンの構造例

木村 吉伸, 化学と生物 Vol. 61, No. 2, 2023

Fig.1-2 は、植物 N-グリカンの生合成とプロセッシング経路を示している。植物の新生ポリペプチド鎖は、小胞体内腔で、オリゴ糖転移酵素 (OST) によりハイマンノース型糖鎖の 14 糖 ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, G3M9) のブロックがグリコシル化コンセンサス配列の Asn 残基へ転移される。その後、新生糖タンパク質の糖鎖 (G3M9) は、グルコシダーゼ I とグルコシダーゼ II によるトリミングを受け、これを認識するシャペロン分子 (カルネキシン, カルレティキュリン) を介した新生糖タンパク質のフォールディングが小胞体内腔で進行する。新生糖タンパク質のフォールディ

ングが完了すると、糖タンパク質の糖鎖 (G1M9) はグルコシダーゼ II とクラス I α 1,2 マンノシダーゼによるトリミングを受け Man α 1-3Man α 1-6Man β 1 アームの露出した M8 構造となり、ゴルジ装置へと小胞輸送される。糖タンパク質の糖鎖は、ゴルジ装置 (シス部位) で α 1,2Man 残基のトリミング、M5 構造への β 1,2GlcNAc 残基の付加を経て、GlcNAc2Man3GlcNAc2 構造が形成される。この一連の流れは、関与する酵素群 (α -Man'ase, GlcNAc 転移酵素) の特性を含めて、動植物ともにほぼ同様である。その後の、ゴルジ装置のメディアル部位及びトランス部位で起こる様々な糖転移酵素による糖残基の転移によって動植物それぞれを特徴づける N-グリカン構造ができあがる。この工程で、植物においては α 1,3Fuc 残基及び β 1,2Xyl 残基の結合、そして Le^a 抗原の組み立てが行われる。

細胞膜や細胞外 (細胞壁, アポプラスト領域) に輸送される糖タンパク質は、ゴルジ装置で形成された複合型糖鎖の形を保ったまま、輸送先でタンパク質機能を発揮する。一方で、Fig. 1-1 に示すように、液胞あるいはプロテインボディーに蓄積される糖タンパク質の N-グリカンは、パウチマンノース型構造が見られることから、ゴルジ装置内でいったん形成された糖鎖構造がゴルジ装置内や液胞中に存在する α -フコシダーゼ (α -Fuc'ase), β -ガラクトシダーゼ (β -Gal'ase), β -N-アセチルグルグルコサミニダーゼ (β -GlcNAc'ase) によりトリミングを受けていると考えられている。実際、種子貯蔵糖タンパク質は、パウチマンノース型の N-グリカンを有する割合が圧倒的に多いことがわかっている¹⁰⁻¹⁶⁾。植物糖タンパク質に特徴的な糖鎖の生理機能については未だ不明な点が多いが、その糖鎖構造からそれらの糖タンパク質が細胞膜や細胞外 (細胞壁, アポプラスト領域) で機能するタンパク質なのか、液胞あるいはプロテインボディーで機能するタンパク質であるかの判別が可能である。

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 *N*-グリカンが、遊離 *N*-グリカン (FNGs) として分化成長中の実生胚軸や果実、あるいは細胞培養液中に存在することが報告されている¹⁷⁻²⁰⁾。FNGs は、動物細胞から 1980 年代から見出されており、植物に特異的な現象ではないが、これらの FNGs のうち、還元末端側にキトビオースを有する FNGs (GN2-FNGs) が、ペプチド:*N*-グリカナーゼ (PNGase) の作用により生成し、還元末端側に GlcNAc1 残基を有する FNGs (GN1-FNGs) が、エンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) の作用により生成することが知られている²⁰⁻²¹⁾。これらの中性領域で作用する PNGase と ENGase により生成する HMT-FNGs は、細胞質においてミスフォールドした新生糖タンパク質が小胞体関連分解 (ER-associated degradation, ERAD) をうける際に生じることが明らかになっている²⁰⁻²²⁾。

小胞体内腔でフォールディングに成功した糖タンパク質は、ゴルジ装置へ配送され、*N*-グリカン部分は植物特徴的な複合型構造へと修飾反応を受けていく。一方、糖鎖認識シャペロン分子やジスルフィド結合形成酵素 (PDI) のアシストにも関わらず、適切な立体構造構築に失敗したミスフォールド糖タンパク質は、その分子表面に露出する疎水性領域の会合により凝集体を形成し、細胞毒性をもつようになるため、ERAD を受ける。すなわち、ミスフォールド糖タンパク質は、小胞体から細胞質へ逆輸送され、ユビキチン化された後にプロテアソームにより分解される。プロテアソームへミスフォールド糖タンパク質を搬入する際には、糖タンパク質の HMT 糖鎖が立体障害となるため、先に糖鎖の除去が行われると考えられている。まず細胞質 PNGase (cytosolic PNGase, cPNGase) 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 HMT-FNGs (GN2-HMT-FNGs) が切り出される。ポリペプチド鎖部分はユビキチン化を受けた後、プロテアソームで分解される。一方で、切り出された GN2-HMT-FNGs は 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) が細胞質で生

成する。cPNGase と ENGase (GH85) の協奏作用で生成した GN1-HMT-FNGs の分解に関しては、動物細胞の場合では細胞質に局在する α -Man'ase (細胞質 α -Man'ase) が、分解を司ることが明らかにされており、この細胞質 α -Man'ase は GN2-HMT-FNGs に比べ GN1-HMT-FNGs に対して速やかに作用することが証明されている²⁴⁻²⁵⁾。そのため、動物細胞においては、GN1-HMT-FNGs は、細胞質 α -Man'ase により Man3GlcNAc1 にトリミングされた後、リソソームへ取り込まれて単糖にまで分解されると理解されている。ところが、植物ではそれに対応する細胞質 α -Man'ase は見いだされておらず、オーソログ遺伝子も見つかっていない。また、植物細胞では液胞などの酸性領域で機能する PNGase(aPNGase)が存在している。このことから、植物の細胞質で生成した GN1-HMT-FNGs の分解機構は、動物細胞のそれとは異なる可能性がある。

FNGs 生成に関わる cPNGase や ENGase の欠損により引き起こされる表現型変化 (疾患等) については、ヒト cPNGase 遺伝子欠損により、発育不全、四肢の筋力低下、不随意運動などの重篤な症状が引き起こされることが明らかにされ、遺伝性稀少疾患「*NGLY1* 欠損症」として知られている。さらに、マウスにおいては、*Ngly1* 遺伝子を欠損したマウス (*Ngly1*-KO マウス) は生存するマウスが全く観察されず、胚性致死 (発生時期に分化の異常が生じ生まれてこない) であることが報告されており、さらに *Ngly1*-KO マウスの胚性致死は、その致死回避率は非常に低いながらも、*Engase* 遺伝子の欠損によって、一部致死性を回避して生存するマウスが生まれることが分かっている²⁶⁻²⁷⁾。一方、植物細胞内では、分化成長中の植物細胞においてマイクロモル濃度の GN1-HMT-FNGs が存在しており、存在する FNGs のそのほとんどが GN1 型構造をとっていることがわかっている¹⁸⁻²⁰⁾。また、トマトでは果実の成熟に伴い遊離糖鎖の量が増加し、Man8GlcNAc1 や Man9GlcNAc1 などの GN1-HMT-FNGs が蓄積していることがわかっている²⁸⁻²⁹⁾。このことから、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³⁰⁾。そこでGN1-HMT-FNGsの生成に参与するENGaseに注目してみると、シロイヌナズナにおけるENGase欠損株ではGN1-HMT-FNGsの消失とGN2-HMT-FNGsの蓄積が確認されたが、通常条件下では野生株と比べて表現型に違いは見られていない³¹⁾。しかしながら、果実の成熟過程におけるGN1-HMT-FNGsの影響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、トマトENGase欠損株を構築し、トマト果実におけるENGase活性測定およびHMT-FNGsの構造解析を行い、GN1-HMT-FNGsのトマト果実の成熟に与える影響について調べた。

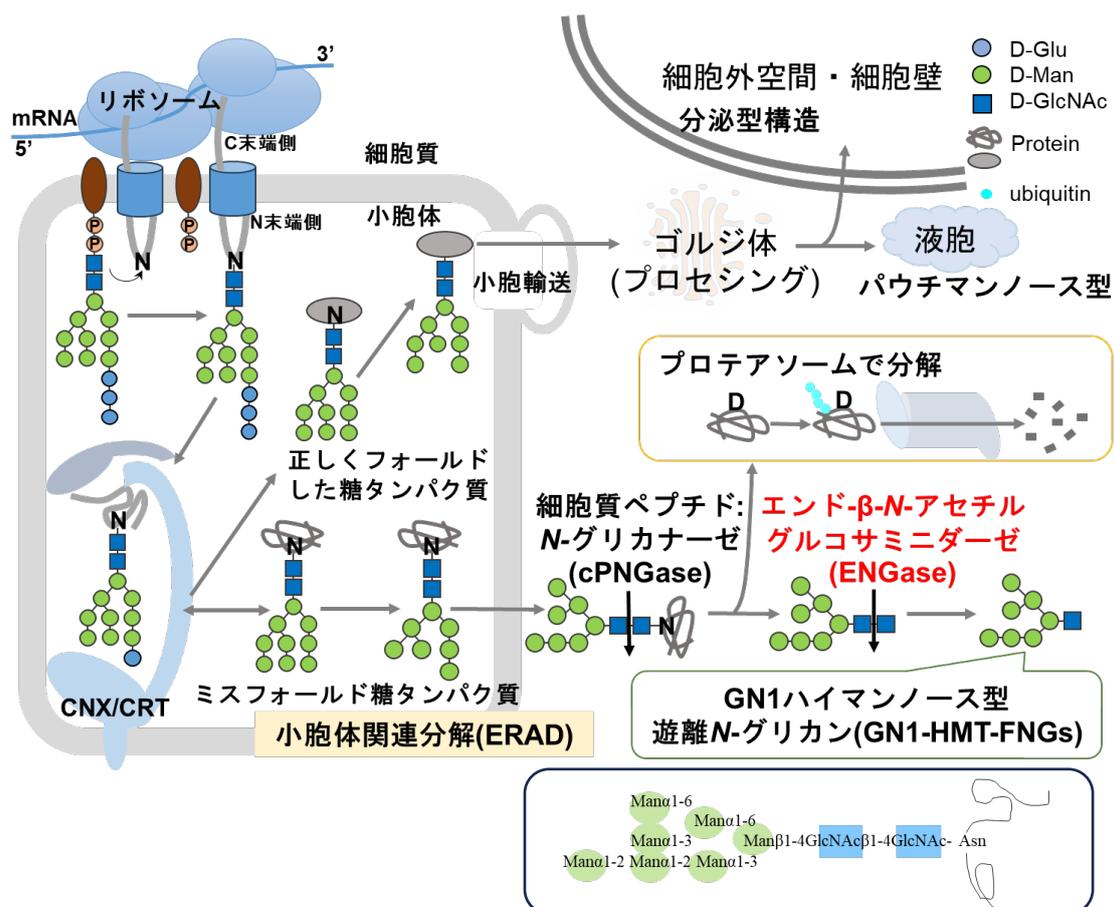


Fig.1-2 植物 N-グリカンの生合成とプロセッシング経路

ENGase の酵素学的な諸性質に注目すると、ENGase は HMT *N*-グリカンの還元末端側のキトビオースを加水分解するが、生物種の由来によって非還元末端側の糖鎖構造に対する基質特異性が異なる。前田らは、植物で初めて精製したイネ由来 ENGase (以下、Endo-Os) の遺伝子を同定し、大腸菌での組換え Endo-Os (rEndo-Os) 発現系を確立し、詳細な基質特異性解析を行ってきた。Endo-Os は、詳細な基質特異性解析により、Man α 1-2Man α 1-3Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc 構造ユニットを有する HMT *N*-グリカンに加水分解活性を示すものの、トリマンノシルコア構造に α 1,3 結合フコースおよび β 1,2 結合キシロース (α 1,3Fuc/ β 1,2Xyl 残基) を有する典型的な PCT *N*-グリカンに活性を全く示さない事が明らかにされている³⁴⁾。また、 α 1,3Fuc 残基を有さず β 1,2Xyl 残基を有する PCT *N*-グリカン (GlcNAc₂Man₃Xyl₁GlcNAc₂ 等) にも作用しないことが知られている^{29,35-38)}。以上の結果から、 α 1,3Fuc/ β 1,2Xyl 残基の存在が ENGase の加水分解活性を阻害しているものと考えられている。

さらに、ENGase は CAZy (Carbohydrate-Active enzymes) データベースにおいて、糖加水分解酵素 (Glycoside hydrolase: GH) Family 18 または Family 85 に分類される。ENGase は様々な生物種から見出されているが、Fig. 1-3 に示すように植物の ENGase はクレードを形成しており、GH Family85 に属していることがわかっている³⁴⁾。特に GH Family 85 に分類される微生物 ENGase には、加水分解活性だけでなく、糖転移活性を持つものがあることが知られており、その活性に重要なアミノ酸残基が明らかにされている³⁹⁻⁴⁴⁾。これら GH Family 85 に属す ENGase の糖転移反応は糖鎖をブロックで転移することができることから、糸状菌由来の微生物 Endo-M などは人工的な糖鎖デザインをおこなう有力なツールとして活用されている。しかしながら、植物 ENGase については、糖転移活性に注目した研究はなされていない。そこで本博士論文の第三章では大腸菌での発現系が確立している rEndo-

Os を用いて、まだ詳細な研究が行われていない糖転移活性の解析及び部位特異的変異の導入により加水分解活性と糖転移活性に関わるアミノ酸残基の特定を行った。

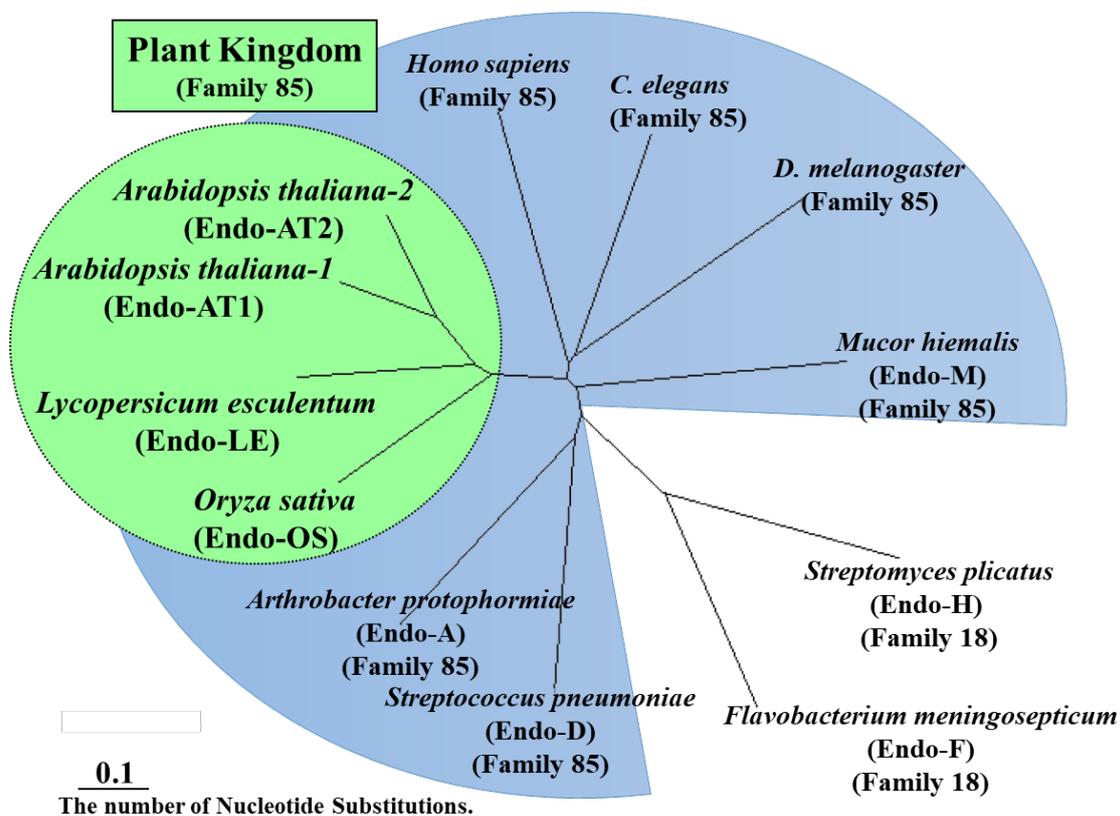


Fig.1-3 ENGase のアミノ酸配列を基に作製した隣接結合系統樹

Maeda, M., Okamoto, N., Araki, N., Kimura, Y., *Front. Plant Sci.*, **12**,647684 (2021) 掲載の図を一部加工

第二章 CRISPR-Cas9 によるゲノム編集を用いたエンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性を抑制したトマト植物の構築

第一節 緒言

植物細胞では、遊離 *N*-グリカン (FNGs) がマイクロモル濃度で存在しており、植物の分化と成長を促進するホルモン様活性を有すると推測されている。植物細胞には 2 種類の脱グリコシル化酵素が存在し、1 つはペプチド：*N*-グリカナーゼ (PNGase) である。この酵素は、還元末端側に *N,N'*-ジアセチルキトビオースを持つ GN2-FNGs を生成する。もう一つは、エンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) である。この酵素は、還元末端側に 1 つの GlcNAc 残基を持つ GN1-FNGs を生成する²⁰⁻²²)。植物細胞において、ハイマンノース型の GN1-FNGs (GN1-HMT-FNGs) は、細胞質に局在する PNGase と ENGase の連続した作用により、ミスフォールドした糖タンパク質から生成されると考えられているが、植物における GN1-HMT-FNGs の生理学的機能は明らかになっていない⁴⁵⁻⁴⁶)。

ENGase はさまざまな植物から精製され、その酵素学的な特性が明らかにされており^{35-37,47-49})、植物由来の ENGase は $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-3\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ ユニットを有する HMT *N*-グリカンには作用するが、トリマンノシルコア構造内の $\beta 1,2$ -キシロース残基と $\alpha 1,3$ -フコース残基を有する植物複合型 *N*-グリカンには作用しないことが木村らの研究により明らかにされている^{35,36,49})。

精製と遺伝子の同定に成功したイネの ENGase (Endo-Os) 遺伝子配列 (*Os05g0346500*) を用いて^{34,50})、トマトの ENGase 遺伝子 (*Solyc06g050930*) を同定し、その酵素活性を検出した²⁹)。さらに、イネとトマトの ENGase のアミノ酸配列を用いた相同性検索により、シロイヌナズナには ENGase をコードする 2 つの遺

伝子 (*At5g05460* と *At3g11040*) が存在することが明らかになり、植物細胞における GN1-HMT-FNGs の生理学的機能を解明するため、木村らはシロイヌナズナの ENGase 欠損変異株を構築したところ、通常の生育条件下では特徴的な表現型は観察されなかった^{31,51)}。シロイヌナズナの ENGase 欠損変異株における FNGs の構造解析を行ったところ、GN2-HMT-FNGs の存在は確認されたが、GN1-HMT-FNGs は確認できなかった³¹⁾。この結果から、ENGase は、小胞体関連分解 (ERAD) を受けたミスフォールド糖タンパク質から細胞質 PNGase (cPNGase) によって生成される GN2-HMT-FNGs を基質として GN1-HMT-FNGs を生成していることが示唆された。興味深いことに、トマト果実の成熟中に ENGase 活性とそれに対応する GN1-HMT-FNGs 量の増加が確認された²⁸⁾。しかし、トマト果実の熟成における GN1-HMT-FNGs の役割はまだ解明されていない。最近、新しい育種技術であるゲノム編集により、 γ -アミノ酪酸含有量が高いトマトが生み出されたが⁵²⁾、本博士論文では、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術とアグロバクテリウムによる形質転換を組み合わせ、ENGase 活性が抑制された ENGase 変異トマト (Δeng 変異株) を構築し、得られた Δeng 変異株について ENGase 活性の測定と HMT-FNGs の構造解析を行った。

第二節 材料・試薬

トマト (*Solanum lycopersicum*) 種子は、矮性品種の Micro-Tom を用いた。エタノールと次亜塩素酸ナトリウムは富士フィルム和光純薬社製のものを用いた。Tween 20 は Sigma-Aldrich 社製のものを用いた。制限酵素 BbsI はニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン社製のものを用いた。ベクターは pDeCas9_Kan, pMR218 及び pMR217 を用いた。MultiSite Gateway LR 反応は Thermo Fisher Scientific 社のものを用いた。ハイポネックス培地 (0.15% Hyponex plant food 6.5-6-19, 0.5% スクロ

ース, 0.8% agar for plant culture medium, pH 5.8) は富士フィルム和光純薬社製のものを
を用いた。ムラシゲ・スクーグ培地は日本製薬社製のものをを用いた。Gamborg's B5
ビタミンは Duchefa Biochemie B. V.社製のものをを用いた。ゼアチンは富士フィルム
和光純薬社製のものをを用いた。インドール-3-酢酸はナカライテスク社製のものを
を用いた。抗生物質のうちカナマイシンは富士フィルム和光純薬社製のものを、メロ
ペネムは住友ファーマ社製のものをを用いた。Tks Gflex DNA Polymerase はタカラバ
イオ社製のものをを用いた。サイクルシークエンスには Thermo Fisher Scientific 社製
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit をを用いた。スワインソニン及びデオキシ
マンノジリマイシンは Sigma-Aldrich 社製のものをを用いた。無水ヒドラジン
はナカライテス社製のものをを用いた。2-アミノピリジンは富士フィルム和光純薬社製の
ものを n-ヘキサン中で再結晶させた後、使用した。Dowex 50WX2 及び Dowex 1WX2
は富士フィルム和光純薬社製のものをを使用した。Sephadex G-25 superfine は GE
ヘルスケアバイオサイエンス社製のものをを用いた。Shodex Asahipak NH2P-50 column
(φ0.46×25 cm) は昭和電工社製のものをを用いた。Con A-Sepharose はタチナタメより
Con A を精製後、Sepharose 4B 樹脂に化学カップリングさせて調製した。α-1,2-マン
ノシダーゼ (*Aspergillus saitoi*) は Agilent 社製ものを、α-マンノシダーゼ (jack bean)
は Sigma-Aldrich 社製のものをを用いた。

第三節 実験方法

第一項 トマトの種子滅菌と生育条件

トマト種子は、75% (v/v) エタノールで 5 秒間処理し、0.1% Tween 20 を含む 10%
(v/v) 次亜塩素酸ナトリウム溶液で 15 分間浸漬し表面滅菌後、滅菌水で 5 回洗浄し
た。滅菌種子は、人工気象器内で、温度 25 °C、相対湿度 50% 明暗周期は明期 16h/
暗期 8h で発芽および生育させた。

第二項 トマトへの変異導入

2-1 ゲノム編集用発現ベクターの構築

CRISPR/Cas9 システムのベクターは、pDeCas9_Kan ベクターを Holger Puchta 教授 (Botanical Institute II, Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Germany) から、multi-gRNA 用ベクターを Anne Britt 教授と Mily Ron 博士 (Department of Plant Biology and Genome Center, University of California, Davis, USA) から譲渡されたものを使用した^{53,54)}。

ゲノム DNA 上のプロトスペーサー隣接モチーフ配列 (5-NGG-3) を含む 2 つの標的部位 (ENGase-t1, ENGase-t2) は、CCTop-CRISPR/Cas9 ターゲットオンライン予測ツール (<https://cctop.cos.uni-heidelberg.de:8043/>) を用い、トマト ENGase 遺伝子 (*Solyc06g050930*) 上の配列から CRISPRater スコアに基づいて選択した^{55,56)}。ENGase-t1 および ENGase-t2 の二本鎖 DNA 断片は、Table 2-1 に示す一本鎖 DNA オリゴヌクレオチド [ENGase-t1-F (5-ATTGGGTTCTGATGGATCAAACGG-3) と ENGase-t1-R (5-AAACCCGTTTGATCCATCAGAACC-3) , ENGase-t2-F (5-ATTGGTGTTAATCCAACAAGGAGG-3) と ENGase-t2-R (5-AAACCCTCCTTGTTGGATTAACAC-3)] をアニーリングすることで調製し、その後、それぞれ BbsI 消化したシングルガイド RNA (sgRNA) 発現ベクター MR218 および pMR217 にライゲーションした⁵⁴⁾。MultiSite Gateway LR 反応を使用して、AtU6 プロモーター、トマト ENGase 標的配列 (ENGase-t1 または ENGase-t2), および gRNA scaffold 配列を含む 2 つの sgRNA モジュールは、線形化した pDeCas9_Kan にクローン化され目的プラスミドが得られた。構築したプラスミドは、トマト植物の形質転換に使用するため *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 に導入した^{57,58)}。

2-2 アグロバクテリウムを介したトマトの形質転換

トマトの形質転換は標準的な手順に従って行った⁵⁹⁾。滅菌種子は、滅菌ハイポネックス培地（0.15%Hyponex plant food 6.5-6-19, 0.5%スクロース, および 0.8%植物組織培養用寒天, pH 5.8）40 mL を入れた培養容器中で発芽させた。発芽後 7 日から 10 日目の子葉から切片を切り出し, Gamborg's B5 ビタミン, 3%スクロース, および 0.7%寒天を含む Murashige and Skoog (MS) 培地 (pH5.8) のプレートで 24 時間前培養した⁶⁰⁾。続いて, 前培養した子葉切片は, アグロバクテリウムの懸濁液に 5 分間浸漬し, 濾紙でアグロバクテリウムの懸濁液を吸い取り, 前培養に使用したプレートに戻して, 暗所条件下で 3 日間培養した。カルスの形成と組織切片の選別は, 同じ培地に 1 mg/L ゼアチン, 0.1 mg/L 3-インドール酢酸, 50 mg/L カナマイシン, および 12.5 mg/L メロペネムを加えて行った。シュートへの再分化は, 同じ培地に 1 mg/L ゼアチン, 50 mg/L カナマイシン, および 12.5 mg/L メロペネムを加えて行った。再分化したシュートは, Gamborg's B5 ビタミン, 1%スクロース, 0.7%寒天, 50 mg/L カナマイシン, および 12.5 mg/L メロペネムを含む MS 培地 (pH 5.8) で発根させ, 培養土に移した。

形質転換された植物は, ゲノム DNA を鋳型とし PCR によって同定した。葉(約 5 mm 角)を 0.1 M NaCl, 5 mM EDTA, および 0.1% SDS を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 100 μ L 中で穏やかに破碎し, 20,600 g で 10 分間, 4 $^{\circ}$ C で遠心分離し, ゲノム DNA を含む上清を粗抽出物として使用した。PCR 反応は, 25 μ L の 1X Gflex PCR Buffer (Mg^{2+} , dNTP plus), 2.5 μ L の粗抽出液, 0.4 μ M の各プライマー (ENGase-t1/t2_F, および ENGase-t1/t2_R2), および 1.25 ユニットの Tks Gflex DNA ポリメラーゼを混合した。PCR 条件は TaKaRa PCR サーマルサイクラー Dice Touch TP350 (Takara-Bio) で, 94 $^{\circ}$ C で 1 分間を 1 サイクル, 98 $^{\circ}$ C で 10 秒間, 60 $^{\circ}$ C で 15 秒間, 68 $^{\circ}$ C で 2 分間を 35 サイクル, 68 $^{\circ}$ C で 7 分間を 1 サイクルで行っ

た。PCR 産物は電気泳動で分子サイズを確認し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いて Applied Biosystems 3130-Avant Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific)により配列を決定した。使用したオリゴヌクレオチドプライマーは Table 2-1 に示す。

第三項 トマトの葉および果実からの粗抽出物の調製

トマトの葉と果実は、野生株と Δeng 変異株（葉 T1 世代，果実 T2 世代）から採取し，液体窒素中で乳鉢と乳棒を使って粉碎した。得られた粉末 0.25 g は，0.1 M NaCl を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液（pH7.8）1 mL に再懸濁し，粗酵素液を抽出した。5 分間遠心分離（20,600 g, 4°C）した後，得られた上清は ENGase 活性測定に使用した。

第四項 エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性測定

ENGase 活性は，基質として M6B [Man α 1-6(Man α 1-3)Man α 1-6(Man α 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA]，内部標準として M3FX [Man α 1-6(Man α 1-3)(Xyl β 1-2)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc-PA] を使用して測定した³¹⁾。トマトの葉および果実の粗抽出物（38 μ L）は，4 mM EDTA，0.1 mM スワインソニン，および 0.1 mM デオキシマンノジリマイシンを含む 40 mM MES 緩衝液（pH6.0）50 μ L 中で M6B（20 pmol）および M3FX（14 pmol）と混合し，37 °C で 60 min（葉）および 24 時間（果実）反応させた後，100 °C，5 分間湯浴中で加熱して反応を停止させた。5 分間遠心分離（20,600 g, 4°C）した後，得られた上清（50 μ L）は，Shodex Asahipak NH2P-50 カラム（ ϕ 0.46 \times 25 cm）を用いたサイズ分画高速液体クロマトグラフィー（SF-HPLC）で分析した^{28,29)}。

第五項 トマトの葉と果実からのオリゴ糖抽出

トマトの葉は、野生株（新鮮重量 4.70 g）および Δeng 変異株の T1 世代（新鮮重量 4.27 g）を回収した。トマトの果実は、野生株（新鮮重量 8.91 g）と Δeng 変異株の T2 世代（新鮮重量 9.90 g）を回収した。これらの試料は、液体窒素中で乳鉢と乳棒を使って粉碎後、得られた粉末は、0.2 M NH_4OH (15 mL) を用いてオリゴ糖を抽出した。得られた抽出物は、脱イオン水（1 L）に対して 2 回透析し、透析外液を減圧濃縮した。得られた溶液は、Dowex 50WX2 および Dowex 1WX2 樹脂に連続的に供することで脱塩し、ペクチンおよびペプチドの除去を行った。その非吸着画分は濃縮し、0.1 M NH_4OH で平衡化した Sephadex G-25 superfine ゲルろ過カラム ($\phi 2.6 \times 38$ cm) に供して他の小分子の除去を行った。オリゴ糖の還元末端は強アルカリ性条件で著しくエピマー化を引き起こすが、ここで検出されたエピマー化オリゴ糖は極僅かであった。オリゴ糖はフェノール硫酸法⁶¹⁾ を使用して検出し、オリゴ糖を含む画分は回収後、直ちに減圧濃縮させた。得られた残渣は、脱イオン水に溶解し、凍結乾燥後、蛍光標識した。

第六項 遊離 N-グリカンの構造解析

6-1 遊離 N-グリカンのピリジルアミノ化

FNGs のピリジルアミノ化は、長束ら⁶²⁾の方法により行った。過剰の 2-アミノピリジンは、0.1 M NH_4OH で平衡化した Sephadex G-25 superfine カラム ($\phi 2.6 \times 38$ cm) を用いたゲル濾過により除去された。ピリジルアミノ化糖鎖 (PA-糖鎖) は、蛍光分光光度計 (励起波長 310 nm, 蛍光波長 380 nm, 日本分光株式会社製 FP-8200) を使用して蛍光強度を測定した。PA-糖鎖を含む画分はロータリーエバポレーターで濃縮乾固させた。

6-2 Con A-セファロースカラムクロマトグラフィー

PA-糖鎖を含む残渣は、0.1 M NaCl, 5 mM CaCl₂ を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.8) 4 mL に溶解させ、同じバッファーで平衡化した Con A-Sepharose CL-4B カラム (φ1.2 × 15 cm) に供した。非吸着画分は、同じ緩衝液 120 mL による洗浄で回収し、ハイマンノース型 *N*-グリカンを含む吸着画分は、0.3 M メチル- α -D-マンノピラノシドを含む同じ緩衝液で溶出した。PA-糖鎖は、蛍光分光光度計 (励起波長 310 nm, 蛍光波長 380 nm, 日本分光株式会社製 FP-8200) により検出した。各吸着画分は減圧濃縮し、0.1 M NH₄OH で平衡化した Sephadex G-25 superfine カラム (φ2.8 × 38 cm) によるゲル濾過により脱塩した。PA-糖鎖を含む画分は濃縮乾固し、脱イオン水 (0.5 mL) に溶解させ、Cosmosil 5C18-AR-II カラム (φ1.0 × 25 cm) を付設した HPLC 装置 (JASCO PU-2080 Plus インテリジェント HPLC ポンプ, JASCO FP-920 インテリジェント蛍光検出器: 励起波長 310 nm, 蛍光波長 380 nm) を用いた、逆相 HPLC (RP-HPLC) により分離した。PA 糖鎖は、0.02% トリフルオロ酢酸中のアセトニトリル濃度を 0% から 7% まで 1.5 mL/min の流速で 60 分間かけて直線的に徐々に増加させることによって溶出した⁶³⁾。GN1-HMT-FNGs および GN2-HMT-FNGs を含む各画分は回収後、濃縮乾固させた。部分精製した PA-糖鎖は、Shodex Asahipak NH2P-50 カラム (φ0.46 × 25 cm) を用いた SF-HPLC によって更に分離した。PA-糖鎖は前項と同じ条件で溶出させた。

6-3 エキソグリコシダーゼ消化

PA 糖鎖 (~200 pmol) は、*Aspergillus saitoi* 由来の α -1,2-マンノシダーゼ (EC 3.2.1.24) および jack bean 由来の α -マンノシダーゼ (EC 3.2.1.24) で連続的に消化された⁶⁴⁾。反応は、混合物を 3 分間湯浴で煮沸することにより停止させ、各消化物の一部を、Shodex Asahipak NH2P-50 カラム (φ0.46 × 25 cm) を用いた SF-HPLC を使

用して分析した。

6-4 質量分析

PA-糖鎖のエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC/MS) およびタンデム質量分析 (MS/MS) による解析は、前田ら⁶⁵⁾の方法に従って実施した。マイクロウェルプレートオートサンプラー (10.0 °C)、キャピラリーサンプルローディングポンプ、ナノポンプ、HPLC-チップインターフェイス、および Agilent 6520 Q-TOF LC/MS システムを備えた Agilent 6500 series HPLC-Chip/QTOF-MS system で分析した。

第一節 実験結果

第一項 トマト ENGase 遺伝子に変異を導入した ENGase 編集トマトの作製

CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を使用して、トマト ENGase 遺伝子 (*Solyc06g050930*) を標的とすることにより、ENGase 活性が強く抑制されたトマト変異株を構築した。Fig. 2-1 に示すように、トマト ENGase 遺伝子に対して2つの標的部位 (ENGase-t1 および ENGase-t2) を選択し、それら2つのガイド RNA と Cas9ヌクレアーゼを共発現する CRISPR/Cas9 ベクターを構築し、*A. tumefaciens* EHA105 を介して Micro-Tom へ形質転換した。得られたトランスジェニック株 (T0 世代) は、カナマイシン耐性に基づく選抜を行いながら生育させた。更に、その T1 世代の3株 ($\Delta eng1-2$, -22, および -26) は、CRISPR/Cas9 をヌル欠損しており、同じ変異についてホモ接合体であった。プライマー (ENGase-t1/t2_F および ENGase-t1/t2_R) を用いて得られた2つの標的配列を含む PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動を行い、T1 世代の PCR 産物のサイズは 514 bp であるのに対し、野生株の PCR 産物のサイズは 598 bp であった (Fig. 2-2 (1))。更に、DNA 配列分析により、

T1 株では 2 つの標的部位 (ENGase-t1 および ENGase-t2) の近くに 3 つの変異 (ENGase-t1 近傍の 56 塩基欠失, ENGase-t2 近傍の 28 塩基欠失および 1 塩基置換) があることが明らかになった (Fig. 2-2 (2))。Δeng 変異株で翻訳される可能性のある変異型 ENGase の部分アミノ酸配列は, 野生型 ENGase のアミノ酸配列上にハイライトで示した (Fig. 2-3)。ENGase 遺伝子の 5' 領域には複数の終止コドンが挿入されているため, Δeng 変異株の N 末端領域は翻訳されないと考えられた。しかし, 変異した DNA 配列の下流に開始コドンが存在しており, 活性部位を含む部分的な ENGase 配列が翻訳される可能性が示唆された。それでも, 葉および果実の粗抽出物を使用した ENGase 活性測定では, 野生株では ENGase 活性が検出され, Δeng 変異株では検出されなかつた (Fig. 2-4)。しかしながら, Δeng 変異株の T2 世代の果実の成熟は, 野生株と比較して有意な差は見られなかつた。

Table. 2-1 List of primer.

Primer Name	Sequence (5' to 3')
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC
NosP-R	TCCTTCAACGTTGCGGTTC
ENGase-t1/t2_F	TCAAACCCTAGCTTCCCTCA
ENGase-t1/t2_R2	TCTTGTTTCAAAGAAGTTAACCAA
NosP_F1	GGATGATCTGGACGAAGAGC
Nos_ter_R	CTCATAAATAACGTCATGCATTACA
TiBo-F1	CGTTGTGGCCTTACTGGGTG
TiBo-R1	ATCGTCGCGCTCTTAACTGAG

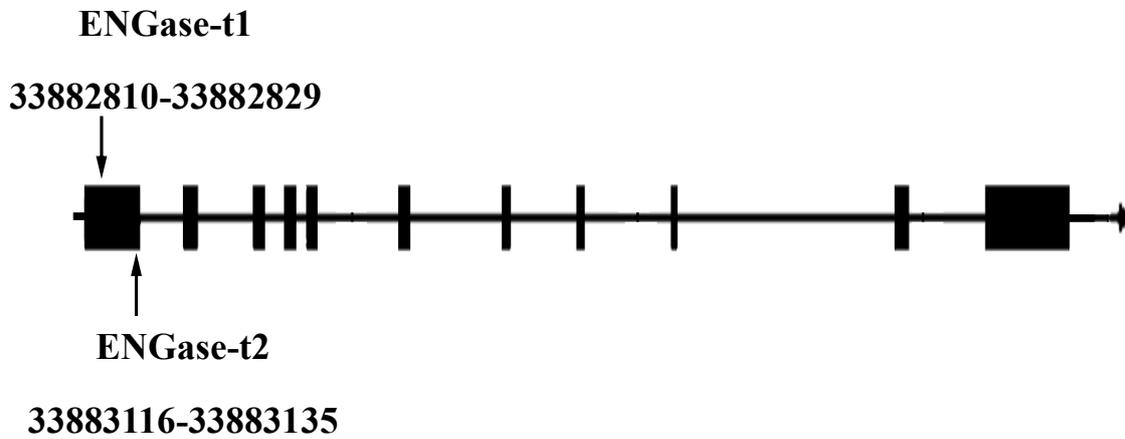


Fig. 2-1 Schematic representation of the target sites for the tomato ENGase gene, Solyc06g050930.

Two target sites, ENGase-t1 and ENGase-t2, are located in exon 1 of the tomato ENGase gene sequence. Black boxes represent exons and lines represent introns and 5' and 3' untranslated regions.

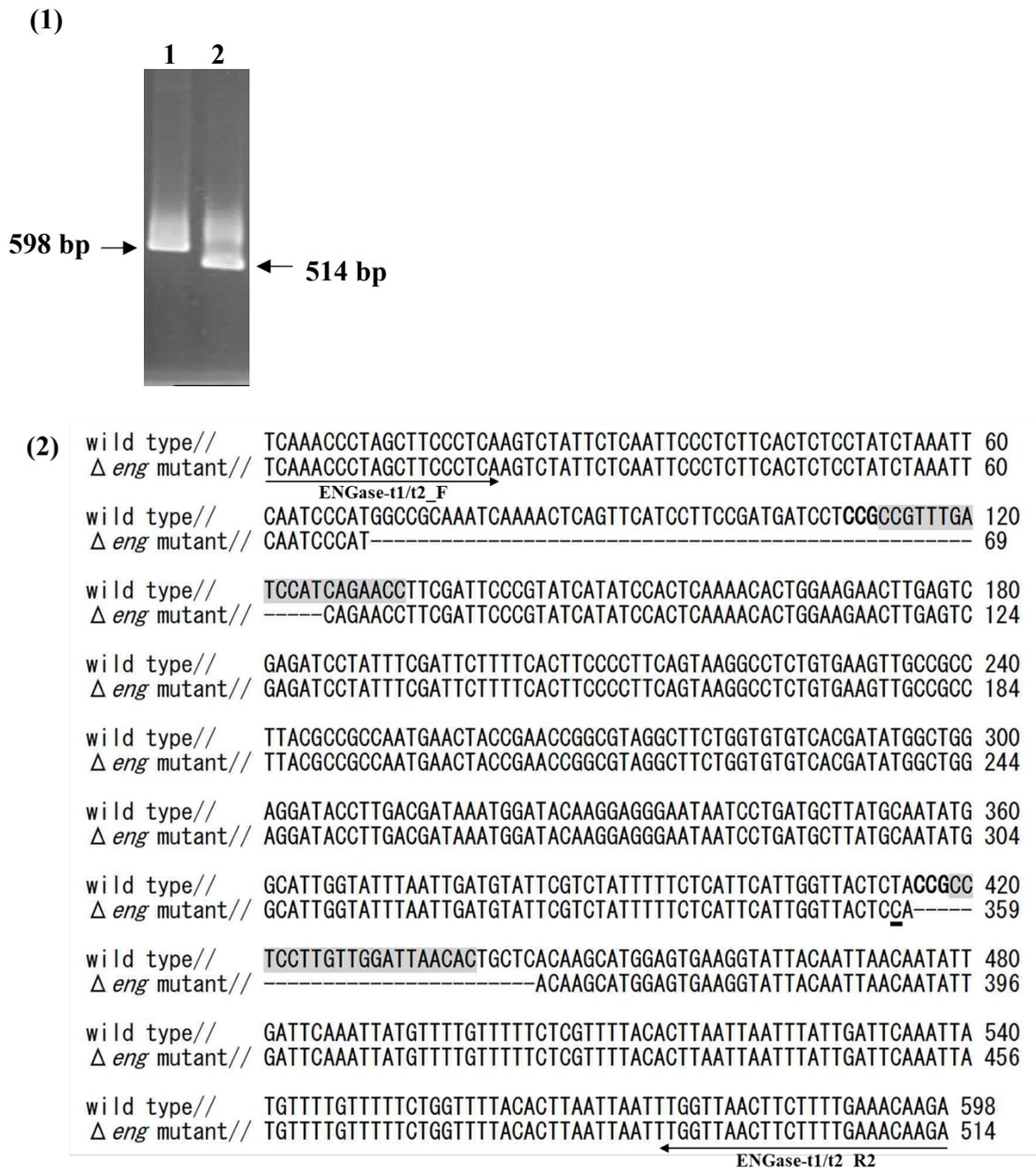


Fig. 2-2 Analysis of partial DNA sequence containing two target sites of the tomato ENGase gene.

(1) The size of DNA fragments amplified by PCR. 1, wild type; 2, Δeng mutant. (2) Comparison of partial DNA sequences of the tomato ENGase gene in wild type and Δeng mutant. Target sites are highlighted in grey, PAM sequences are shown in bold, thick line represents substitution of T to C, and primer sequences are indicated by arrows.

MTFNFRSYFKSHHPQTLASLKSILNSLFTLLSKFNPMAANQNSVHPSDDPPPFDPSEPSI 60
 PVSYPKLTLEELESRSYFDSFHFPPFSKASVKLPPYAANELPNRRRLVCHDMAGGYLDDK 120
 WIQGGNPDAYAIWHWYLIDVFVYFSSHSLVTLPPPCWINTAHKHGVKVLGTFILEWDEGK 180
 HIANKLLSSKNSAQMYAERLSELAALGF DGWLVN**ME**VSLDVGQIPNLKEFVSHLTQSMH 240
SLVPGSLVIWYDSVTIDGKLSWQDQLNEKNKPPFDISDGIFVNYTWRENYPKLSAEVAVD 300
RKFDVYMGIDVFGRNTYGGGQWTTNLALDVIKRDNVSAAIFAPGWVYETKQLPDFQTAQN 360
RWWALVEKSWDISQNYPQILPFYSNFDQGHGYQFTVDGKQMSQTPWNNISSQSFQFLRF 420
SGESTGGNLKVAVDIKEPSYNGGGNLTFNGLTEGDFQFSARLFEGKLLADSPVHFTYSV 480
KSNGLSLLGLSLEFTSAATEQKSVLLASSGDSLLTMSRFVRFHFDNVIMPHRVTKLESESS 540
WVIQESSISMEGYTLTKIHAVCYKLRPEVHKSESQKTMALSPSEYHAVLGHGLAINSLTL 600
NSGFPPSTSWLVEGNFTKLSSSNSNGSRKLNKLDWKLKGGKTHFPKYNIYVKKQPNLL 660
IAESNGSLQLVHEYLGVTVLEAYVSDLVVPSGTSSVTFIIQVCSMDGSLQKLEESPSLD 720
LDVQGS 726

Fig. 2-3 Predicted amino acid sequence of tomato ENGase expressed in wild type and Δ eng mutants.

The partial ENGase sequence predicted to be expressed in the Δ eng mutants is underlined in the wild type ENGase sequence. E217—an important amino acid for ENGase hydrolytic activity is shown in bold.

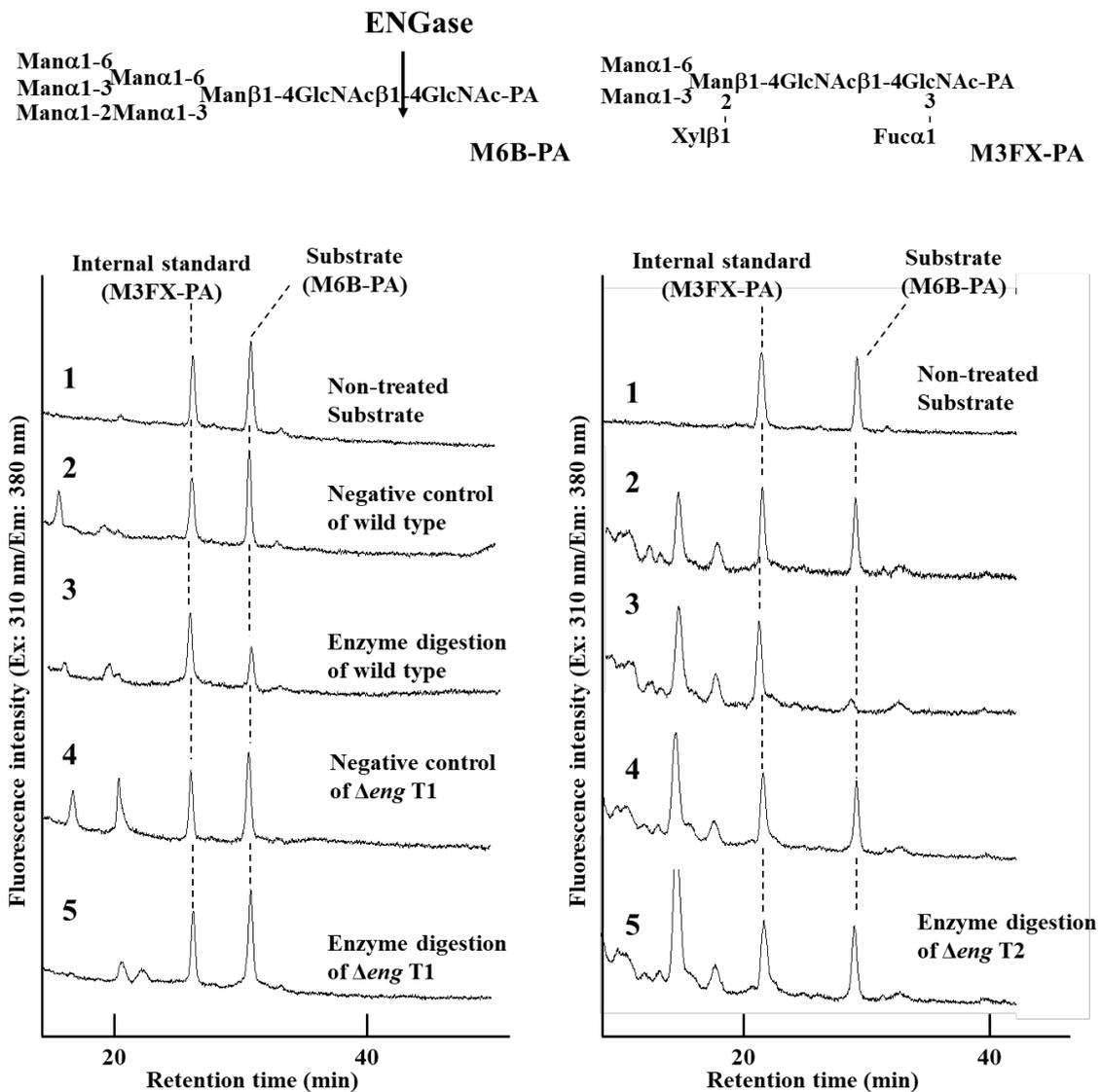


Fig. 2-4 ENGase activity assay of tomato leaves and fruits on SF-HPLC.

Enzymatic activity of leaves (left panel) and fruits (right panel) was determined using $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA}$ (M6B) as the substrate and $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)(\text{Xyl}\beta 1-2)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc-PA}$ (M3FX) as the internal standard. 1, nontreated substrate; 2, negative control with heat treated wild type ENGase; 3, enzyme activity of the wild type ENGase; 4, negative control with heat treated enzyme of Δeng mutant; 5, enzyme activity of the Δeng mutant ENGase.

第二項 ハイマンノース型遊離 N-グリカンの構造解析

Fig. 2-4 に示したように、 Δeng 変異株では ENGase 活性は検出されなかった。そこで、 Δeng 変異株の ENGase によって生成されるハイマンノース型遊離 N-グリカンの構造解析を行った。遊離 N-グリカンは、野生株および Δeng 変異株の葉から調製後、PA 標識し、Con A アフィニティークロマトグラフィーに供してハイマンノース型 N-グリカンを精製した。ハイマンノース型遊離 N-グリカンを含む Con A 吸着画分は、RP-HPLC に供し、GN1-HMT-FNGs (F1 画分) と GN2-HMT-FNGs (F2 画分) に分画した (Fig. 2-5)。主要なピークが野生株では F1 画分、 Δeng 変異株では F2 画分で検出されたことから、野生株には GN1-HMT-FNGs、 Δeng 変異株には GN2-HMT-FNGs が主に存在していると考えられた。そこで、野生株および Δeng 変異株から調製した、それぞれの画分の HMT-FNGs の構造的特徴は、SF-HPLC により更に分析を行った。

野生株由来の GN1-HMT-FNGs および Δeng 変異株由来の GN2-HMT-FNGs の溶出位置は、それぞれ標準 PA 糖鎖 $\text{Man}_{9.5}\text{GlcNAc}_1\text{-PA}$ および $\text{Man}_{9.5}\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ と一致した (Fig. 2-6)。SF-HPLC では、特に $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_1\text{-PA}$ でダブルレットのピークが観察されたが、これらのピークは、以下に説明するように、 α -1,2-マンノシダーゼ消化および ESI-MS に基づいて異性体構造であることを確認した。Fig. 2-6 に示したように、SF-HPLC の溶出パターンでは、F1 画分の GN1-HMT-FNGs として 5 つのピーク (ピーク a, b, c, d, e) が主に野生株で検出されており、 Δeng 変異株で検出されたすべてのピークの強度は非常に低かった。これらの PA-糖鎖の構造は、 α -マンノシダーゼ消化と ESI-MS によって更に分析した。野生株および Δeng 変異株の F1 画分のすべての PA-糖鎖は、*Aspergillus* α -1,2-マンノシダーゼ消化により $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1\text{-PA}$ に変換され、その生成物は更に jack bean α -マンノシダーゼにより $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_1\text{-PA}$ に変換された。この結果は、野生株および Δeng 変異株に存在す

る GN1-HMT-FNGs が共通のコア構造である $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ を含んでいることを示していた (Fig. 2-7(1))。SF-HPLC における溶出位置および α -マンノシダーゼ消化の結果から、ピーク a の PA-糖鎖は $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1\text{-PA}$ 、ピーク b の PA-糖鎖は $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_1\text{-PA}$ 、ピーク c の PA-糖鎖は $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_1\text{-PA}$ 、ピーク d の PA-糖鎖は $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_1\text{-PA}$ 、ピーク e の PA-糖鎖は $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_1\text{-PA}$ であると推定された。Tabel. 2-2 に示したように、ESI-MS により、ピーク a からは、 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1\text{-PA}$ の理論値である m/z 1110.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ のイオンが観察された。同様に、ピーク b からは、 $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_1\text{-PA}$ の理論値である m/z 1272.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ のイオンが観察された。ピーク c からは、 $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_1\text{-PA}$ の理論値である m/z 1434.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ のイオンが観察された。ピーク d からは、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_1\text{-PA}$ の理論値である m/z 1596.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ のイオンが観察された。ピーク e からは、 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_1\text{-PA}$ の理論値である m/z 879.8 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ のイオンが観察された。ピーク a の $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1\text{-PA}$ の ESI-MS スペクトルを Fig. 2-8(1) に示した。

対照的に、F2 画分中の GN2-HMT-FNGs は、SF-HPLC の溶出パターンでは、野生株と Δeng 変異株のいずれについても 5 つのピーク (ピーク f, g, h, i, j) が検出されていたが、そのピークの強度は野生株で非常に低かった (Fig. 2-6(2))。これらの PA-糖鎖の構造は、 α -マンノシダーゼ消化と ESI-MS により更に分析された。野生株および Δeng 変異株の F2 画分のすべての PA-糖鎖は、*Aspergillus* α -1,2-マンノシダーゼ消化により $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ に変換され、その生成物は更に jack bean α -マンノシダーゼにより $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ に変換された。この結果は、野生株および Δeng 変異株に存在する GN2-HMT-FNGs が共通のコア構造である $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ を含んでいることを示していた (Fig. 2-7(2))。SF-HPLC における溶出位置および α -マンノシダーゼ消化の結果から、ピーク f の PA-糖鎖は $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、ピーク g の PA-糖鎖は $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、

ピーク h の PA-糖鎖は $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、ピーク i の PA-糖鎖は $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、ピーク j の PA-糖鎖は $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ であると推定された。Table 2-2 に示したように、ESI-MS により、ピーク f からは、 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ の理論値である m/z 1313.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ のイオンが観察された。同様に、ピーク g からは、 $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ の理論値である m/z 1475.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ のイオンが観察された。ピーク h からは、 $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ の理論値である m/z 1637.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ のイオンが観察された。ピーク i からは、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ の理論値である m/z 900.2 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ のイオンが観察された。ピーク j からは、 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ の理論値である m/z 981.2 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ のイオンが観察された。ピーク f の $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ の ESI-MS スペクトルを Fig. 2-8(2) に示した。

Δeng 変異株では、T2 世代の果実においても ENGase 活性が検出されず、また GN1-HMT-FNGs の代わりに GN2-HMT-FNGs が生成されていたことから、同じ変異が安定して T2 世代に引き継がれていると考えられた (Fig. 2-9)。野生株および Δeng 変異株の葉に含まれている HMT-FNGs の定量結果を Table 2-3 にまとめた。野生株および Δeng 変異株における GN1-HMT-FNGs 量は、それぞれ 7.10 nmol/g および 0.40 nmol/g であった。対照的に、野生株および Δeng 変異株における GN2-HMT-FNGs 量は、それぞれ 0.59 nmol/g および 10.53 nmol/g であった。続いて、野生株および Δeng 変異株の果実に含まれている HMT-FNGs の定量結果を Table 2-4 にまとめた。野生株における GN1-HMT-FNGs 量は 8.64 nmol/g であったが、 Δeng 変異株では検出されなかった。対照的に、野生株および Δeng 変異株における GN2-HMT-FNGs 量は、それぞれ 0.73 nmol/g および 7.52 nmol/g であった。これらの結果は、典型的な GN1-HMT-FNGs が野生株には遍在しているが、ENGase 活性を抑制した Δeng 変異株ではほとんど検出されず、トマトについても ENGase が GN1-HMT-FNGs の生成に関与していることが確認された。また、GN1-HMT-FNGs の代わりに GN2-HMT-FNGs が Δeng 変異株に蓄積していたという結果から、野生株では

GN2-HMT-FNGs が ENGase の基質として作用すると考えられた。

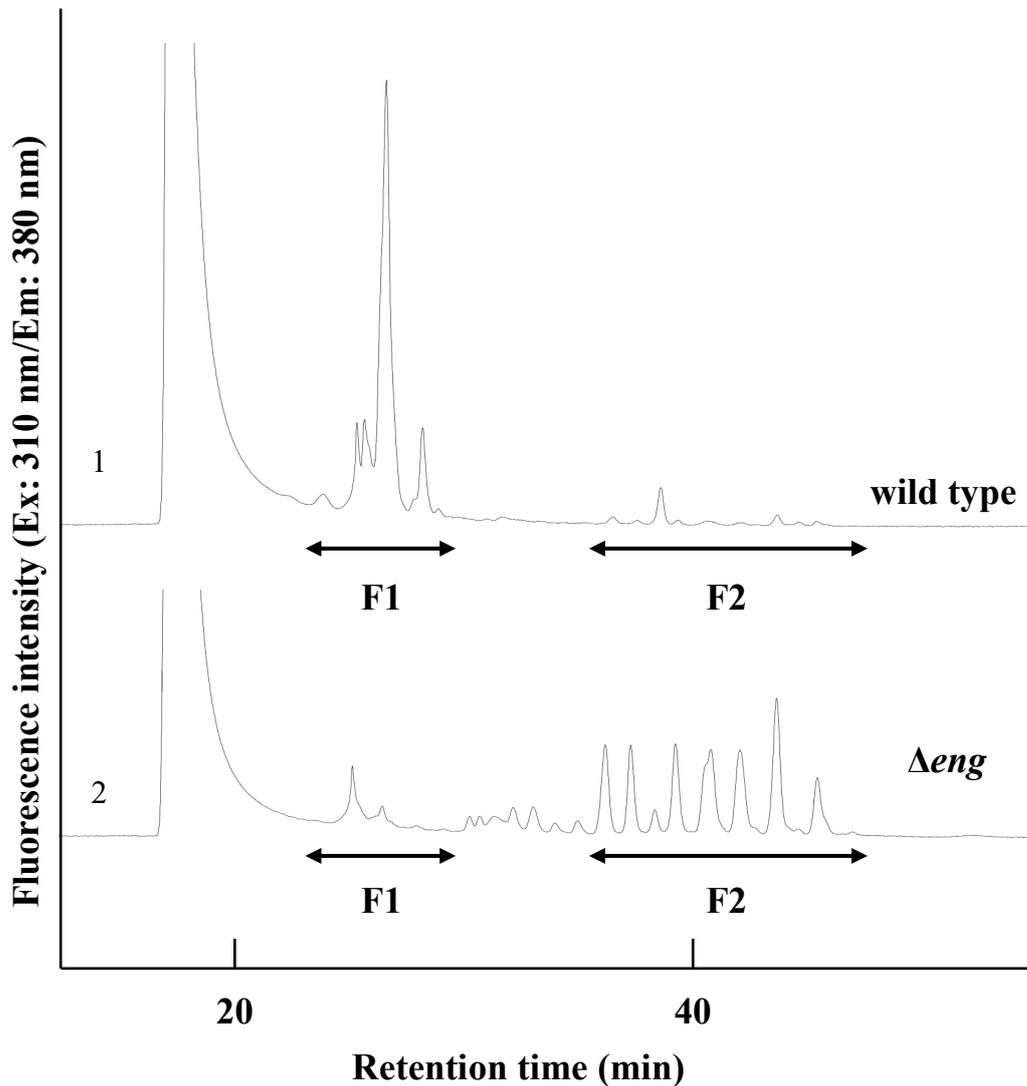


Fig. 2-5 RP-HPLC of PA-sugar chains in Con A adsorbed fractions prepared from tomato leaves. RP-HPLC profiles using a Cosmosil 5C18-AR-II column.

1, wild type; 2, Δeng mutant. F1 represents the GN1-HMT-FNGs fraction and F2 represents the GN2-HMTFNGs fraction. Each fraction was collected for SF-HPLC analysis.

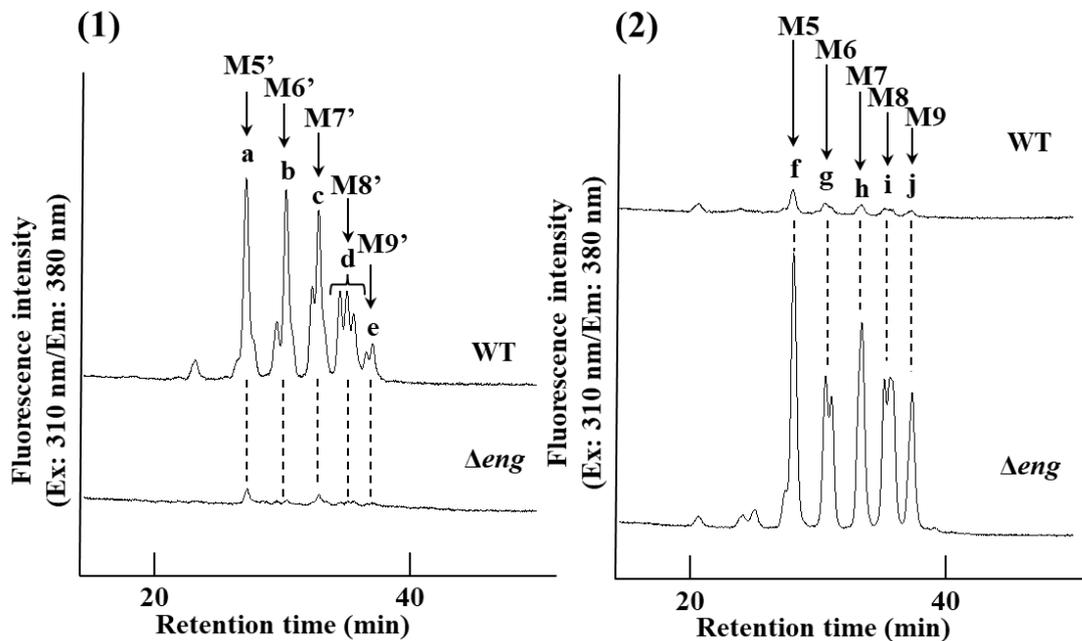
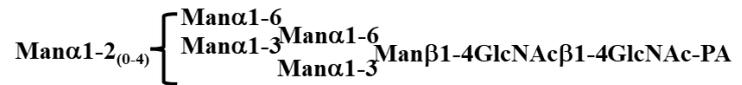
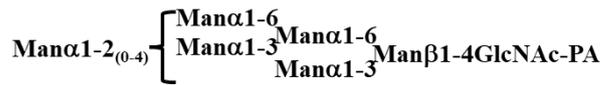


Fig. 2-6 SF-HPLC of PA-sugar chains in Con A adsorbed fractions prepared from tomato leaves.

(1) SF-HPLC profiles of PA-sugar chains in F1 fraction obtained by RP-HPLC using a Shodex Asahipak NH2P-50 column. Arrows (M5', M6', M7', M8', and M9') indicate the elution positions of authentic PA-sugar chains: Man5GlcNAc1-PA, Man6GlcNAc1-PA, Man7GlcNAc1-PA, Man8GlcNAc1-PA, and Man9GlcNAc1-PA. (2) SF-HPLC profiles of PA-sugar chains in F2 fraction obtained by RP-HPLC using a Shodex Asahipak NH2P-50 column. Arrows (M5, M6, M7, M8, and M9) indicate the elution positions of authentic PA-sugar chains: Man5GlcNAc2-PA, Man6GlcNAc2-PA, Man7GlcNAc2-PA, Man8GlcNAc2-PA, and Man9GlcNAc2-PA. 1, Wild type; 2, Δeng mutants. Each peak was collected for ESI-MS analyses.

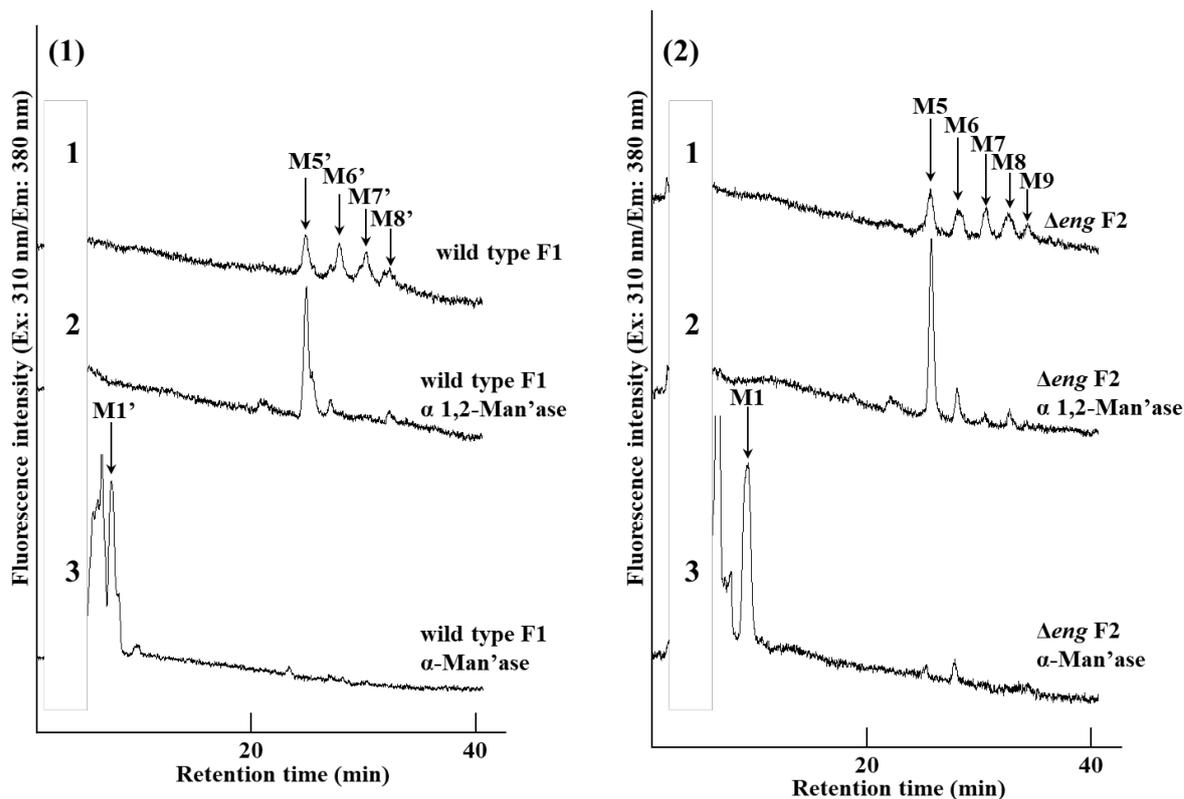


Fig. 2-7 SF-HPLC of α -mannosidase digested PA-sugar chains prepared from tomato leaves.

(1) SF-HPLC profiles of exoglycosidase digests of PA-sugar chains in F1 fraction obtained by RP-HPLC of wild type sample. (2) SF-HPLC profiles of exoglycosidase digests of PA-sugar chains in F2 fraction obtained by RP-HPLC of the Δ eng mutant samples. 1, PA-sugar chains obtained by RP-HPLC; 2, *Aspergillus* α -1,2-mannosidase digest of 1; 3, jack bean α -mannosidase digest of 2. Arrows (M1' and M1) indicate the elution positions of authentic PA-sugar chains: Man1GlcNAc1-PA and Man1GlcNAc2-PA. Other arrows indicate the elution positions of authentic PA-sugar chains, as described in Fig. 6.

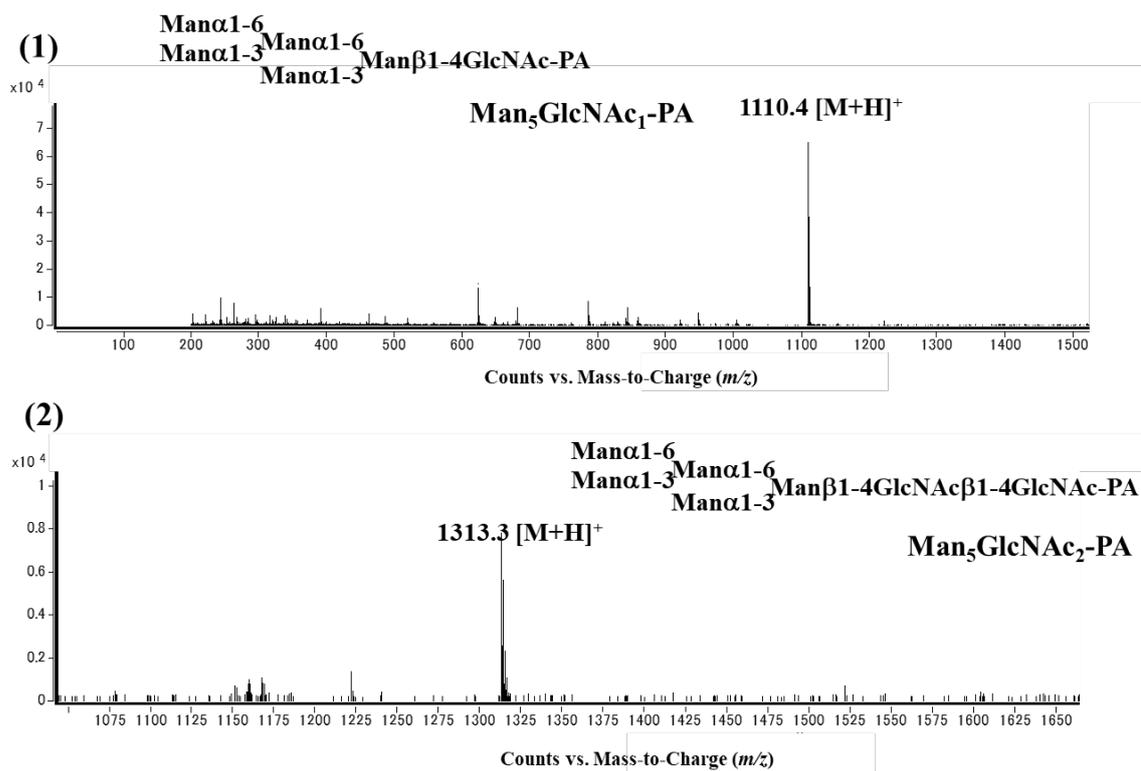


Fig. 2-8 ESI-MS Spectra of peaks a and f in Fig. 2-6.

(1) ESI-MS of peak a. (2) ESI-MS of peak f. Each structure is shown in the spectra.

Table 2-2 MS list of PA-sugar chains.

Peak name	Structure	<i>m/z</i>	
Peak a	Hex5HexNAc1-PA	1110.4	[M+H] ⁺
Peak b	Hex6HexNAc1-PA	1272.3	[M+H] ⁺
Peak c	Hex7HexNAc1-PA	1434.5	[M+H] ⁺
Peak d	Hex8HexNAc1-PA	1596.5	[M+H] ⁺
Peak e	Hex9HexNAc1-PA	879.8	[M+2H] ²⁺
Peak f	Hex5HexNAc2-PA	1313.3	[M+H] ⁺
Peak g	Hex6HexNAc2-PA	1475.5	[M+H] ⁺
Peak h	Hex7HexNAc2-PA	1637.4	[M+H] ⁺
Peak i	Hex8HexNAc2-PA	900.2	[M+2H] ²⁺
Peak j	Hex9HexNAc2-PA	981.2	[M+2H] ²⁺

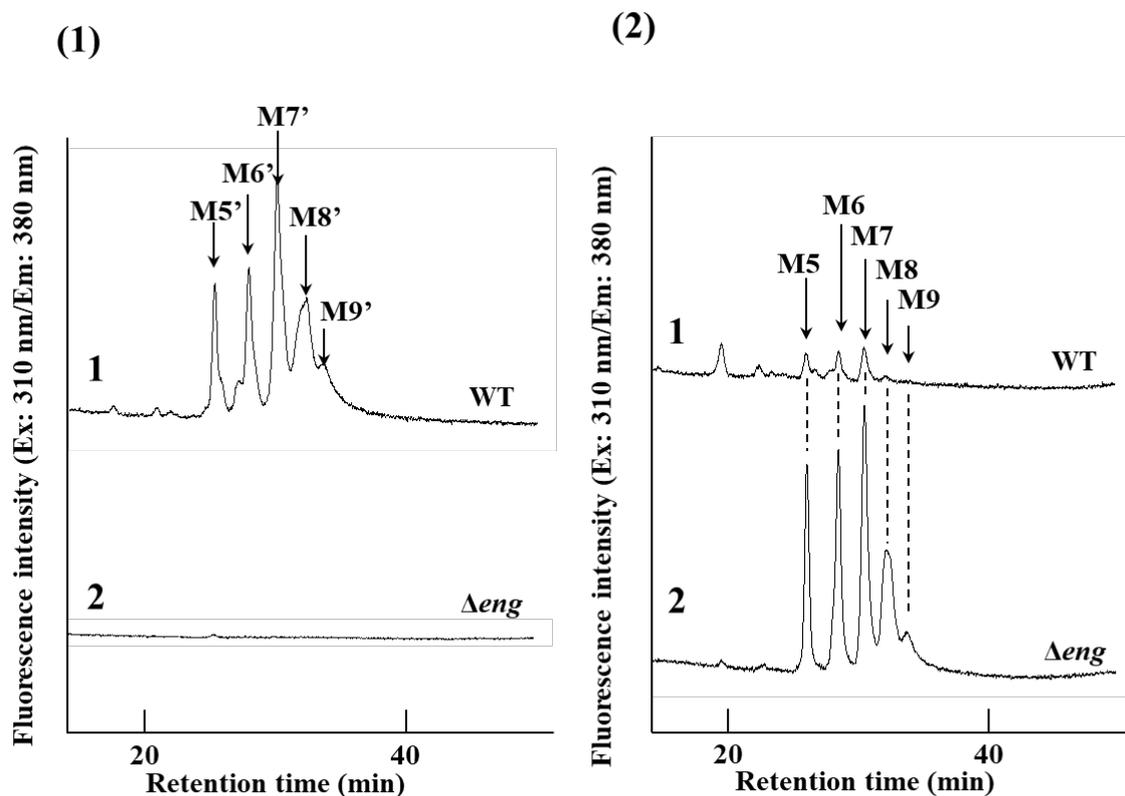


Fig. 2-9 SF-HPLC of PA-sugar chains in Con A adsorbed fractions prepared from tomato fruits.

(1) SF-HPLC profiles of PA-sugar chains in nonadsorbed fraction obtained by RP-HPLC using a Shodex Asahipak NH2P-50 column. Arrows (M5', M6', M7', M8', and M9') indicate the elution positions of authentic PA-sugar chains: Man5GlcNAc1-PA, Man6GlcNAc1-PA, Man7GlcNAc1-PA, Man8GlcNAc1-PA, and Man9GlcNAc1-PA.

(2) SF-HPLC profiles of PA-sugar chains in adsorbed fraction obtained by RPHPLC using a Shodex Asahipak NH2P-50 column. Arrows (M5, M6, M7, M8, and M9) indicate the elution positions of authentic PA-sugar chains: Man5GlcNAc2-PA, Man6GlcNAc2-PA, Man7GlcNAc2-PA, Man8GlcNAc2-PA, and Man9GlcNAc2-PA. 1, Wild type; 2, Δ eng mutants. Each peak was collected for ESI-MS analyses.

Table 2-3 Summary of HMT-FNGs produced in tomato leaves (T1).

Peak name	Structure		wild type		Δeng mutants	
			(nmol/g)	(%)	(nmol/g)	(%)
Peak a	Man5GlcNAc1-PA	(M5')	1.77	23.0	0.12	1.1
Peak b	Man6GlcNAc1-PA	(M6')	1.87	24.3	0.04	0.4
Peak c	Man7GlcNAc1-PA	(M7')	1.82	23.7	0.12	1.1
Peak d	Man8GlcNAc1-PA	(M8')	1.36	17.7	0.08	0.7
Peak e	Man9GlcNAc1-PA	(M9')	0.28	3.6	0.04	0.4
	High mannose type (GN1-type)		7.10	92.3	0.40	3.7
Peak f	Man5GlcNAc2-PA	(M5)	0.21	2.7	2.41	22.0
Peak g	Man6GlcNAc2-PA	(M6)	0.13	1.7	2.05	18.8
Peak h	Man7GlcNAc2-PA	(M7)	0.10	1.3	2.13	19.5
Peak i	Man8GlcNAc2-PA	(M8)	0.10	1.3	2.65	24.2
Peak j	Man9GlcNAc2-PA	(M9)	0.05	0.7	1.29	11.8
	High mannose type (GN2-type)		0.59	7.7	10.53	96.3

Table 2-4 Summary of HMT-FNGs produced in red mature tomato fruits (T2).

Structure		wild type		<i>Δeng</i> mutants	
		(nmol/g)	(%)	(nmol/g)	(%)
Man5GlcNAc1-PA	(M5')	1.07	11.1	ND	-
Man6GlcNAc1-PA	(M6')	1.72	17.9	ND	-
Man7GlcNAc1-PA	(M7')	2.69	28.0	ND	-
Man8GlcNAc1-PA	(M8')	2.24	23.3	ND	-
Man9GlcNAc1-PA	(M9')	0.92	9.5	ND	-
High mannose type (GN1-type)		8.64	89.8	ND	-
Man5GlcNAc2-PA	(M5)	0.27	2.8	1.22	16.2
Man6GlcNAc2-PA	(M6)	0.18	1.9	1.70	22.5
Man7GlcNAc2-PA	(M7)	0.23	2.4	2.17	28.9
Man8GlcNAc2-PA	(M8)	0.26	2.7	1.81	24.1
Man9GlcNAc2-PA	(M9)	0.03	0.4	0.62	8.3
High mannose type (GN2-type)		0.98	10.2	7.52	100

第五節 考察

CRISPR/Cas9 システムを用いて ENGase 活性を抑制した Δeng 変異株の構築に成功した⁶⁵⁾。まず、T1 変異世代の葉における HMT-FNGs の構造的特徴の解析と定量を行った。 Δeng 変異株では、GN1-HMT-FNGs はほとんど検出されず、野生株に存在する GN1-HMT-FNGs とほぼ同じ量の GN2-HMT-FNGs が検出された⁶⁵⁾。

ENGase の活性中心は高度に保存されており、トマト ENGase の E217 は加水分解活性にとって重要なアミノ酸残基である³⁴⁾。今回の研究では、トマト ENGase 遺伝子のエクソン 1 の中に 2 つの標的領域を選択し (Fig. 2-1)、得られた変異株では、エクソン 1 またはその近傍に合計 84 塩基の欠失と 1 塩基の置換が確認された (Fig. 2-2(2))。この変異により、ENGase 遺伝子の 5' 領域に終止コドンが導入されたため、活性部位を含む ENGase の部分配列が翻訳されると予想した (Fig. 2-3)。しかし、 Δeng 変異株では ENGase 活性が低く、ENGase の N 末端領域は、完全な ENGase 活性に重要であることが示唆された (Fig. 2-4)。ENGase 活性における N 末端領域の重要性は、トマト ENGase の部分配列を大腸菌で発現させ、組換え ENGase の活性を測定することによって確認できると考えられた。

また、 Δeng 変異株の T2 世代を生育させ、その成熟したトマト果実における ENGase 活性と HMT-FNGs の構造的特徴を解析した (Fig. 2-4, Fig. 2-9, および Table 2-4)。 Δeng 変異株の T2 世代の果実では、ENGase 活性が検出されず、GN1-HMT-FNGs の代わりに GN2-HMT-FNGs が生成されていた⁶⁵⁾。これは、同じ変異が安定して T2 世代に引き継がれたことを示していた。しかしながら、 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 *A. thaliana* 変異株で観察された結果と一致していた³¹⁾。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⁶⁵⁾。

今後、GN1-HMT-FNGs の果実成熟における生理学的機能を解明するには、ENGase を過剰発現した遺伝子組換えトマトの構築も必要であると考えられた。また、これまでに植物に発現している糖鎖遊離酵素として知られている細胞質 PNGase (cPNGase), ENGase, 酸性 PNGase (aPNGase) を全て欠損した植物は構築されておらず、CRISPR/Cas9 を使用して、本章で構築されたトマト Δeng 変異株から cPNGase/aPNGase を欠失させた三重変異株を作製し、それらの表現型を調べる必要があると考えられた。

第三章 イネ由来エンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼの糖転移活性の解析

第一節 緒言

成熟過程のトマト果実には、ENGaseにより生成したGN1-HMT-FNGs量の増加が確認されたことから、HMT-GN1-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があるのではないかと推測し、トマト果実の成熟過程におけるGN1-HMT-FNGsの役割を解明するため、第二章ではENGase活性が抑制されたENGase変異体トマト (Δeng 変異株) を構築し、ENGase活性の測定とHMT-FNGsの構造解析を行ったところ、ENGaseは、GN2-HMT-FNGsを基質としてGN1-HMT-FNGsを生成していることが更に裏付けられたが、ENGase活性を抑制しても、通常生育条件下でトマトの表現型に変化は見られなかった。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出来なかった⁶⁵⁾。

ここで、植物ENGaseの酵素学的な緒性質に注目すると、植物で初めて精製されたイネ由来ENGase (Endo-Os) は、 $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-3\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 構造ユニットを有するHMT *N*-グリカンに加水分解活性を示すものの、トリマンノシルコア構造に $\alpha 1,3$ 結合フコースおよび $\beta 1,2$ 結合キシロースを有する典型的な植物複合型 *N*-グリカンに活性を全く示さない。また植物ENGaseはGH Family85に分類されている³⁴⁾。GHファミリー85に属する微生物のENGaseには加水分解活性に加えて糖転移活性があるものが報告されている³⁹⁻⁴⁴⁾。加水分解反応では、基質から遊離した糖鎖が水に転移されるが、糖転移反応では、基質から遊離した糖鎖が水酸基を有する化合物へ転移される。微生物ENGaseの糖転移活性については、詳細な解析がなされているが³⁹⁻⁴⁴⁾、植物ENGaseの糖転移活性については、未だ報告がない。そこで本章では、これまでに大腸菌での発現系を確立している組換えイネ由来

ENGase (rEndo-Os)³⁴⁾を用いて、糖転移活性の解析及び部位特異的変異導入により加水分解活性および糖転移活性に関わるアミノ酸残基の特定を行った。

まず、rEndo-Os (細胞質酵素) と糸状菌由来の微生物 Endo-M (分泌型酵素) の HMT 糖鎖に対する糖転移活性を調べるため、供与基質として雑豆 (大納言) から調製した HMT 糖ペプチドを、受容基質として 20 mM *p*NP-GlcNAc および 0.5 M GlcNAc を用いて糖転移反応を行い、糖転移産物を解析した。

続いて、13 種類の変異型 rEndo-Os を部位特異的変異導入により作製した。ここでは、基質認識において重要であると考えられているアミノ酸残基のうち、植物 ENGase で高度に保存されているスレオニン残基を微生物 ENGase の Endo-M で保存されているトリプトファン残基に変異させた T259W 変異型 rEndo-Os に注目し、HMT 糖鎖と ACT 糖鎖に対する加水分解活性への影響を解析した。

更に、T259W 変異型 rEndo-Os の糖転移活性については、野生型 rEndo-Os と比較解析した。

第二節 材料・試薬

雑豆 (大納言) 粉末は北海道産のものを用いた。ペプシンは、富士フィルム和光純薬社製のものを使用した。無水ヒドラジンはナカライテスク社製のものを用いた。2-アミノピリジンは富士フィルム和光純薬社製のことを *n*-ヘキサン中で再結晶させた後、使用した。Dowex 50WX2 はムロマチテクノス社製のものを使用した。Sephadex G-25 superfine は GE ヘルスケアバイオサイエンス社製のものを用いた。Wakogel 100C18 は和光純薬工業製のものを用いた。SF-HPLC 用カラム Shodex Asahipak NH2P-50 column (4.6 × 250 mm 及び 10 × 250 mm) は昭和電工社製のものを用いた。RP-HPLC 用カラム Cosmosil 5C18-AR-II Packed Column (4.6 × 250 mm 及び 10 × 250 mm) はナカライテスク社製のものを用いた。陰イオン交換カラム TSKgel

DEAE-5PW column (7.5 × 750 mm) は東ソー社製のものを用いた。プラスミドは Novagen 社製 pET41(b)+を用いた。制限酵素 XhoIはタカラバイオ社製を, DnpIは東洋紡社製を用いた。プラスミドの増幅には東洋紡社製の *E. coli* JM109 を用い, 目的タンパク質の発現はタカラバイオ社製の *E. coli* BL21 (DE3) を用いた。大腸菌培養に使用した Luria-Bertani 培地には, Bacto Tryptone 及び Bacto Yeast Extract はベクトン・ディッキンソン社製のものを, 寒天培地を作製する際にはナカライテスク社製のものを用いた。カナマイシンとアンピシリンはナカライテスク社製のものを用いた。コロニーPCR にはプロメガ社の GoTaq® Green Master Mix を用いた。プラスミド抽出には GE Healthcare 社製の illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit を用いた。大腸菌で発現させた目的タンパク質精製には Novagen 社製の Ni-NTA His・Bind Resin および GST・Bind Resin を用いた。PCR 酵素はタカラバイオ社製の PrimeSTAR HS DNA Polymerase を用いた。DNA シークエンスには Thermo Fisher Scientific 社製の BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いた。Endo-H はニュー・イングランド・バイオラボ社のものを用いた。Gal2GN2M3 [Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6(Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-PA]は卵黄糖ペプチドから調製した糖鎖をシアリダーゼ処理したものを用いた⁶⁸⁾。

第三節 実験方法

第一項 糖転移反応の糖鎖供与基質となる糖ペプチドの調製

1-1 雑豆（大納言）由来ハイマンノース型糖鎖含有糖ペプチドの調製^{66,67)}

雑豆（大納言）乾燥粉末（300 g）は, 4 L の 0.1 M NaCl を含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.5) に懸濁し, 4 °C で 2 時間, マグネチックスターラーを用いて攪拌し, タンパク質を抽出した。タンパク質抽出液は遠心分離 (10,160 g, 20 分間) 後, 得られた上清に 100%飽和になるまで硫酸アンモニウムを加え, 塩析を行った。塩析

物を遠心分離（12,000 g, 4°C, 20 min）後、得られたタンパク質の沈殿物は少量の脱塩水で懸濁し、10 L の脱塩水に対して透析した（4°C, 24 時間）。得られた透析内液のタンパク質溶液は、5%（v/v）となるようにギ酸を添加し、37°Cで6日間、ペプシン（300 mg）消化を行った。高分子量のタンパク質や多糖等を除去するため、60%（v/v）になるようにエタノールを添加し、エタノール分画を行った。ペプシン消化物は遠心分離（10,160 g, 20 分間）後、上清を回収し、エバポレーターで減圧濃縮した。濃縮液は Dowex 50WX2 に供し、非吸着画分を 5%ギ酸で洗浄し、吸着画分は 0.1 M NH₄OH により溶出させ、0.1 M NH₄OH で平衡化した Sephadex G-25 superfine ゲルろ過カラム（4.0 × 85 cm）に供し、その他の低分子の除去を行った。糖ペプチドは 230 nm の吸光度とフェノール硫酸法⁶¹⁾により ERMA 社製比色計（AF-11M）で検出した。糖ペプチドを含む画分（247.5 mL）は、回収後、エバポレーターで減圧濃縮させ、wakogel 100C18（3.5 × 20 cm）に供した。非吸着画分は脱イオン水で洗浄し、糖ペプチドは、脱イオン水に含まれるアセトニトリル濃度を 0% から 25%まで直線的に上昇させることにより溶出させた。糖ペプチドは 230 nm の吸光度とフェノール硫酸法⁶¹⁾により ERMA 社製比色計（AF-11M）で検出した。糖ペプチドを含む画分（494 mL）は、回収後、エバポレーターで減圧濃縮させ、凍結乾燥し、ハイマンノース型糖鎖含有糖ペプチド（HMT 糖ペプチド）とした（凍結乾燥重量約 100 mg）。

1-2 糖ペプチドからの N-グリカンの遊離

得られた雑豆（大納言）由来 HMT 糖ペプチドの凍結乾燥試料を入れたネジ蓋付き試験管に、無水ヒドラジン（約 1 mL）を加え、100 °C, 10 時間反応を行い、糖ペプチドから N-グリカンを遊離させた。冷却後、遊離したオリゴ糖鎖を含む反応液は冷却したアセトン（25 mL）で沈殿させた後、遠心分離（10,160 g, 15 分間）を

行い、オリゴ糖鎖を回収し減圧下で乾燥させた。乾燥した遊離オリゴ糖鎖に飽和重炭酸ナトリウム 3 mL, 無水酢酸 300 μ L を加え, 室温で *N*-アセチル化を行った。反応液に Dowex 50WX2 樹脂 (約 10 mL) を加え pH を 3 に調製し反応を止めた後, 小カラムに移して, 約 5 倍量の脱塩水で樹脂を洗浄した。洗液を濃縮後, ゲルろ過 (Sephadex G-25 superfine (4.4 \times 35 cm)) に供し, 脱塩と不純物の除去を行った。中性糖の検出については, フェノール硫酸法⁶¹⁾により ERMA 社製比色計 (AF-11M) で検出した。糖陽性画分をロータリーエバポレーターで濃縮した後, 凍結乾燥を行った。

1-3 糖鎖の蛍光標識 (ピリジルアミノ化)⁶²⁾

凍結乾燥した *N*-グリカンに 2-アミノピリジン溶液 (2-アミノピリジン 1.00g : HCl 0.65 mL) を試験管一本につき 100 μ l ずつ加え封管し, 90 $^{\circ}$ C で 30 min 反応させた。さらに, 試験管一本につき 10 μ l の還元試薬 (NaBH₃CN 20 mg : H₂O 12 μ l の比で混合) を加え, 再び封管し, 90 $^{\circ}$ C で 1 h 還元反応を行った。反応終了後, 酢酸を試験管一本につき 1 μ l 加え, Sephadex G-25 (4.0 \times 35 cm) カラムに供し, 0.1 N アンモニア水溶液で展開し, 過剰の 2-アミノピリジンを除去した。糖鎖画分はフェノール硫酸法⁶¹⁾ および, 蛍光分光光度計 (励起波長 310 nm, 蛍光波長 380 nm, Jasco FP-8200ST) を用いて蛍光強度を測定することにより検出した。得られたピリジルアミノ化糖鎖 (PA-糖鎖) 画分をロータリーエバポレーターで濃縮し, HPLC の試料とした。

1-4 RP-HPLC による PA-糖鎖の部分精製

前項で得られた PA-糖鎖を RP-HPLC により分離した。Cosmosil 5C18-AR-II カラム (10 \times 250 mm) を付設した HPLC システム (Jasco HPLC システム) に供し, 含ま

れる PA 糖鎖を部分精製した (Fig. 3-3)。PA 糖鎖の検出には、蛍光分光光度計 (励起波長 310 nm, 蛍光波長 380 nm, Jasco 920-FP) を用いた。PA-糖鎖の溶出は、流速 1.5 mL/min の条件で、0.02% TFA 溶液中のアセトニトリル濃度を 60 分間で 0% から 7% に直線的に変化させた。

1-5 SF-HPLC による PA-糖鎖の構造確認

HMT 糖ペプチドから得られた PA-糖鎖画分を濃縮, 50 %アセトニトリルとなるよう調製し SF-HPLC のサンプルとした。Shodex Asahipak NH₂P-50 4E カラム (4.6 × 250 mm) を付設した HPLC システムに供し, 流速 0.7 mL/min の条件で, アセトニトリル濃度を 40 分間で 74% から 50% に直線的に変化させた。PA 糖鎖の検出には, 蛍光分光光度計 (励起波長 310 nm, 蛍光波長 380 nm, Jasco 920-FP) を用いた。それぞれの PA-糖鎖の溶出時間を標準糖鎖の溶出位置と比較し, 糖鎖構造の確認を行った。PA 糖鎖の検出には, 蛍光分光光度計 (励起波長 310 nm, 蛍光波長 380 nm, Jasco 920-FP) を用いた。

1-6 質量分析

PA-糖鎖のエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC/MS) およびタンデム質量分析 (MS/MS) による解析は, 第 2 章の第 3 節の実験方法 6-4 に従って実施した。マイクロウェルプレートオートサンプラー (10.0 °C), キャピラリーサンプルローディングポンプ, ナノポンプ, HPLC-チップインターフェイス, および Agilent 6520 Q-TOF LC/MS システムを備えた Agilent 6500 series HPLC-Chip/QTOF-MS system で分析した。

第二項 組換え Endo-Os (rEndo-Os) の発現と精製

2-1 rEndo-Os の大腸菌による発現

イネ由来 ENGase (Endo-Os) の発現用プラスミド (pET41-b/AK112067) は当研究室で構築されたものを使用した³⁴⁾。このプラスミドは, *E. coli* BL21 (DE3) に形質転換し, カナマイシン (50 µg/mL) 添加 LB プレートで 37°C, 16 時間培養した。コロニーを選抜後, カナマイシン (50 µg/mL) 添加 LB 培地 2 mL で 37°C, 16 時間培養した。培養液 100 µL をカナマイシン (50 µg/mL) 含有 LB 培地 50 mL に植菌し, 20°C, 約 24 時間振とう培養した。培養液は遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) し, 12 mL の 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.9) で洗浄した。得られた菌体は, 酵素の精製まで -80°C で保存した。

2-2 rEndo-Os の精製

回収した菌体に約 5~9 倍量の 20 mM Tris-HCl / 0.5 M NaCl buffer (pH 8.0) を加え, 超音波 (Sonics & Materials 社製超音波破碎機 VCX600, 破碎条件: 出力 50%, 破碎 5.0 秒-on ice 9.9 秒を 20 分間) により菌体の破碎を行った。遠心分離 (10,000 rpm, 60 分間) 後, 得られた上清はザルトリウス社製 VIVASPIN 50,000 MW のフィルターで遠心濃縮し, 5 mM Imidazole と 0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液で平衡化した Ni-NTA His・Bind column (1.5 × 3.0 cm) に供した。非吸着画分は 5 mM Imidazole と 0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液 50 mL および 20 mM Imidazole と 0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液 50 mL で洗浄後, 吸着画分は 200 mM Imidazole と 0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液で溶出した (Fig. 3-4)。Ni-NTA His・Bind column により部分精製した画分はザルトリウス社製 VIVASPIN 50,000 MW フィルターで遠心濃縮した後, 1 mM DTT, 5 mM EDTA と 0.1 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液で平衡

化した GST・Bind™ column (1.5 × 1.2 cm) に供した。非吸着画分は、1 mM DTT, 5 mM EDTA と 0.1 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液 20 mL で洗浄し、組換え ENGase を含む吸着画分は、10 mM グルタチオン (還元型), 1 mM DTT, 5 mM EDTA と 0.1 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液で溶出した (Fig.3-5)。組換え ENGase を含む溶出画分は 50,000 MW フィルターで遠心濃縮し、緩衝液を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) / 0.1 M NaCl あるいは 50 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH6.5) に置換した。

2-3 SDS-PAGE³⁴⁾

タンパク質試料は等量のサンプル用緩衝液 (2% SDS, 10% 2-メルカプトエタノール, 10 mM Tris-HCl (pH6.8), 40% グリセリン) を混合し、5% 2-メルカプトエタノールを加え、50°C で 2 時間反応させ還元および SDS 化を行った。SDS-PAGE は 7.5% ポリアクリルアミドゲル、泳動用緩衝液 (0.025 M Tris, 0.192 M グリシン, 0.1% SDS) を用いて 1 枚のゲルにつき 10 mA の定電流で行った。標準タンパク質は 10 種類の異なる分子量の組換えタンパク質 (10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 kDa) を含む Precision Plus™ Standards Dual color (BIORAD) を使用した。

第三項 rEndo-Os の糖転移活性の解析

3-1 rEndo-Os の (*p*NP-GlcNAc) を受容基質とした糖転移反応の測定⁶⁹⁻⁷¹⁾

rEndo-Os の糖転移活性測定は、GST・Bind™ column 吸着画分を酵素液とし、供与基質として第一項で調製した雑豆 (大納言) 由来 HMT 糖ペプチドを、受容基質として *p*NP-GlcNAc を用いた。酵素反応液 50 μL は、HMT 糖ペプチド, 20 mM *p*NP-GlcNAc, rEndo-Os (4 μg または 40 μg), 50 mM MES 緩衝液 (pH6.5) となるように調製し、37°C, 15 分間または 1 時間反応させた。コントロールは失活させた

rEndo-Os を用いた。Endo-M の糖転移活性測定は、酵素反応液 50 μ L は、HMT 糖ペプチド(1.5 mg), 20 mM *p*NP-GlcNAc, Endo-M (1 μ g), 50 mM MES 緩衝液 (pH6.5) となるように調製し、30°C, 15 分間反応させた⁶⁹⁻⁷¹⁾。酵素反応は、100°C, 3 分間湯浴中で停止させた。反応液は、5 分間遠心分離 (20,600 g, 4°C) した後、得られた上清 (50 μ L) は、Cosmosil 5C18-AR-II カラム (10 \times 250 mm) を付設した HPLC システムに供した。*p*NP-糖鎖は、吸光度 (280 nm) の測定により検出した。*p*NP-糖鎖の溶出は、流速 1.5 mL/min の条件で、Fig. 3-6 に示す溶媒系とプログラムを用い、0.1%TFA 溶液中のアセトニトリル濃度を 60 分間で 0%から 28 %に直線的に変化させた。

反応産物について、還元末端側にキトビオースを持つ糖転移産物 (GN2 型糖鎖) であることを確認するために一部を Endo-H で消化した。まず、糖転移反応液 5 μ L, Endo-H 2 μ L および 10X Glycoprotein Denaturing Buffer 6 μ L を混合し、脱イオン水を 17 μ L 加え、37 °Cで 16 時間反応させた後、100 °C, 10 分間湯浴中で加熱して反応を停止させた。5 分間遠心分離 (20,600 g, 4°C) した後、得られた上清は、Fig. 3-6 に示した条件を用いて RP-HPLC で分析した。

3-2 rEndo-Os の *N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) を受容基質とした糖転移反応の測定^{39, 80)}

rEndo-Os の糖転移活性測定は、供与基質として第一項で調製した雑豆 (大納言) 由来ハイマンノース型 (HMT) 糖ペプチドを、受容基質として GlcNAc を用いた。酵素反応液 50 μ L は、HMT 糖ペプチド (1.5 mg), 0.5 M GlcNAc, rEndo-Os (4 μ g), 50 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH6.5) となるように調製し、37°C, 15 分間反応させた。GlcNAc を添加せずに反応させたものをコントロールとした。Endo-M の糖転移活性測定は、酵素反応液 50 μ L は、HMT 糖ペプチド (1.5 mg), 0.5 M GlcNAc,

Endo-M (1 µg), 50 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH6.5) となるように調製し, 30°C, 15 分間反応させた³⁹⁾。酵素反応は, 100°C, 3 分間湯浴中で停止させた。反応液は, 凍結乾燥し, 2-アミノピリジンにより蛍光標識した。ピリジルアミノ化は, Natsuka and Hase (1998) らの方法により行った⁶²⁾。過剰の 2-アミノピリジンは, 0.1 M NH₄OH で平衡化した Sephadex G-25 superfine カラム (φ2.6 × 38 cm) を用いたゲル濾過により除去した。PA-糖鎖は, 蛍光分光光度計 (励起波長 310 nm, 蛍光波長 380 nm, 日本分光株式会社製 FP-8200) とフェノール硫酸法⁶¹⁾ により ERMA 社製比色計 (AF-11M) で検出した。PA-糖鎖を含む画分はロータリーエバポレーターで濃縮し, 以下に示す方法で SF-HPLC により分取した。Shodex Asahipak NH2P-50 4E カラム (4.6 × 250 mm) を付設した HPLC システムに供した。PA-糖鎖の検出には, 蛍光分光光度計 (励起波長 310 nm, 蛍光波長 380 nm, Jasco 920-FP) を用いた。PA-糖鎖の溶出には, 流速 0.7 mL/min の条件で, Fig. 3-8 に示す溶媒系とプログラムを用い, 超純水中のアセトニトリル濃度を 40 分間で 74% から 50% に直線的に変化させた。PA-糖鎖画分を回収後, ロータリーエバポレーターで濃縮し, 以下に示す方法で RP-HPLC により分取した。Cosmosil 5C18-AR-II カラム (6 × 250 mm) を付設した HPLC システム (Jasco HPLC システム) に供し, 糖転移反応によって得られる還元末端側にキトビオースを有する GN2 型 PA-糖鎖は吸着画分から回収し, 非吸着画分の加水分解反応によって生成する還元末端側に GlcNAc 1 残基を有する GN1 型 PA-糖鎖と分離した (Fig.3-7)。PA 糖鎖の検出には, 蛍光分光光度計 (励起波長 310 nm, 蛍光波長 380 nm, Jasco 920-FP) を用いた。PA-糖鎖の溶出は, 流速 1.2 mL/min の条件で, Fig. 3-7 に示す溶媒系とプログラムを用い, 0.02% TFA 溶液中のアセトニトリル濃度を 40 分間で 0% から 7% に直線的に変化させた。得られた GN2 型 PA-糖鎖画分は, SF-HPLC により分析した (Fig. 3-8)。SF-HPLC の溶出条件は, 上で述べた条件と同様に行った。

第四項 rEndo-Os の部位特異的変異導入による加水分解活性および基質認識に関わるアミノ酸残基の特定

4-1 プラスミドの調製

Endo-Os への部位特異的変異の導入は、微生物 ENGase のケカビ (*Mucor hiemalis*) 由来 ENGase (Endo-M), 肺炎レンサ球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 由来 ENGase (Endo-D), 真正細菌 (*Arthrobacter protophormiae*) 由来 ENGase (Endo-A), と植物 ENGase の Endo-Os, シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来 ENGase (Endo-AT1, Endo-AT2), トマト (*Solanum lycopersicum*) 由来 ENGase (Endo-LE) のそれぞれのアミノ酸配列情報 (UniProt, <https://www.uniprot.org/>) を相同性比較し (Clustal Omega, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), 既知の微生物 ENGase の加水分解活性, 糖転移活性に重要とされているアミノ酸残基^{41-44,72-74}) と植物 ENGase 間で高度に保存されているアミノ酸残基に注目し, 変異導入するアミノ酸残基を決定し, プライマーを設計した。Primer の設計には Fast PCR を用いた (Fig. 3-1, Table 3-1)。

PCR 反応の鋳型には, イネ由来 ENGase 発現用プラスミド (pET41-b/AK112067)³⁴), N189K 変異型 rEndo-Os 発現用プラスミド (N189Q 変異型 rEndo-Os 作成用), E242G 変異型 rEndo-Os 発現用プラスミド (E242W 変異型 rEndo-Os 作成用), T259S 変異型 rEndo-Os 発現用プラスミド (T259C 変異型 rEndo-Os 作成用), T259C 変異型 rEndo-Os 発現用プラスミド (T259W 変異型 rEndo-Os 作成用) を用いた。

PCR 反応は, 16 μ L 滅菌水, 5 μ L の 5x PrimeSTAR Buffer (Mg^{2+}), 2 μ L の 2.5 mM dNTP Mixture, 0.5 μ L のプラスミド, 0.24 μ M の各プライマー (Table 3-1 各変異型 F, および R), および 0.625 ユニットの PrimeSTAR HS DNA Polymerase を混合した。PCR 条件は TaKaRa PCR サーマルサイクラー Dice Touch TP350 (Takara-Bio) で, 98°C で 30 秒間を 1 サイクル, 98°C で 10 秒間, 各プライマーのアニーリング温

度に合わせ 50~65 °Cで 5 秒間, 68°Cで 9 分間を 15 サイクルで行った。

PCR 産物は, 鋳型プラスミドを分解するために, DpnI 消化 (37 °C, 60 分間) 後, *E.coli* JM109 に形質転換した。カナマイシン (50 µg/mL) 含有 LB 寒天培地で 37°C, 16 時間培養した。コロニーを選抜し, カナマイシン (50 µg/mL) 含有 LB 培地 (2 mL) で 37 °C, 16 時間培養した。培養液は遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) し, 得られた菌体は, 0.5 mL の 20 mM Tris-HCl buffer (pH8.0) で洗浄し, プラスミド溶液の調製に使用した。プラスミドの精製には, FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN) を用い, プラスミド抽出溶液 (50 µL) を調製した。得られたプラスミド溶液の一部は Xho I で処理し, アガロース電気泳動で発現用プラスミドに組み込んだ rEndo-Os 遺伝子のサイズを確認した。

4-2 部位特異的変異の確認

目的の rEndo-Os 遺伝子の導入が確認できたプラスミド溶液の一部を BigDye® Terminator v3.1 LycleCycleSequencing kit (Applied Biosystems) を用いて Applied Biosystems 3130-Avant Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific)により配列を確認した。使用したプライマーは Table 3-1B に示す。

4-3 変異型 rEndo-Os の大腸菌による発現

作製した変異型 Endo-Os 発現用プラスミドを用い, それぞれを *E. coli* BL21 (DE3) に形質転換し, カナマイシン (50 µg/mL) 添加 LB プレートで 37°C, 16 時間培養した。コロニーPCR によってプラスミドの導入を確認した。コロニーPCR にはプロメガ社の GoTaq® Green Master MixTaq を使用した。PCR 反応は, 16 µL 滅菌水, 5 µL の 5X PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺), 2 µL の 2.5 mM dNTP Mixture, 0.5 µL のプラスミド, 0.24 µM の各プライマー (各変異型 F, および R), および

0.625 ユニットの PrimeSTAR HS DNA Polymerase を混合した。

PCR 条件は TaKaRa PCR サーマルサイクラー-Dice Touch TP350(Takara-Bio) で、PCR 条件は、95°Cで2分間を1サイクル、95°Cで30秒間、60°Cで30秒間、72°Cで1分間を35サイクル、72°Cで5分間を1サイクルで行った。PCR産物は電気泳動で分子サイズを確認した。コロニーを選抜後、カナマイシン (50 µg/mL) 添加 LB 培地 2 mL で 37°C, 16 時間培養した。培養液 100 µL をカナマイシン (50 µg /mL) 含有 LB 培地 50 mL に植菌し、20°C, 約 24 時間振とう培養した。培養液は遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) し、12 mL の 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.9) で洗浄した。得られた菌体は、酵素の精製まで-80°Cで保存した。

4-4 変異型 rEndo-Os の精製

第二項 2-2 で述べた rEndo-Os の精製方法に従って行った。第二項 2-3 で述べた方法に従って、精製した変異型 rEndo-Os は SDS-PAGE に供し、単一であることを確認した。

4-5 変異型 rEndo-Os の PA-糖鎖に対する加水分解活性の測定³⁴⁾

変異型 rEndo-Os の加水分解活性は、GST・Bind™ column 吸着画分を酵素液とし、基質として M6B [Man α 1-6(Man α 1-3)Man α 1-6(Man α 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA] , Gal2GN2M3 [Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA], 内部標準として M3FX [Man α 1-6(Man α 1-3)(Xyl β 1-2)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc-PA] を使用して測定した (Table 3-2)。

50 mM MES 緩衝液 (pH6.0) 60 µL 中で各基質と 37°C, 15 分間, 1 時間, または 16 時間反応させた後, 100 °C, 3 分間湯浴中で加熱して反応を停止させた。反応液

を5分間遠心分離 (20,600 g, 4°C) し, 得られた上清 (60 µL) は, サイズ分画高速液体クロマトグラフィー (SF-HPLC) で分析した。Shodex Asahipak NH₂P-50 4E カラム (4.6 × 25 cm) を付設した HPLC システムに供し, PA 糖鎖の検出には, 蛍光分光光度計 (励起波長 310 nm, 蛍光波長 380 nm, Jasco 920-FP) を用いた。PA-糖鎖の溶出には, Fig. 3-10 に示す溶媒系とプログラムを用い, 0.7 mL/min の流速で行った。

Table 3-1 作製した変異型 rEndo-Os と部位特異的変異の導入プライマー

A	変異型	部位特異的変異導入用プライマー
N189	N189K	F: ggctggctgatcaagattgaggtaaactcgac R: gtcgagtttaacctcaatcttgatcagccagcc
	N189Q	F: ggctggctgatccagattgaggtaaactcgac R: gtcgagtttaacctcaatctggatcagccagcc
E191	E191D	F: ctggctgatcaatattgacgttaaactcgacatac R: gtatgtcgagtttaacgtcaatattgatcagccag
	E191A	F: ctggctgatcaatattgccgttaaactcgacatac R: gtatgtcgagtttaacggcaatattgatcagccag
W224	W224L	F: ggatcattagtcattgtatgatgca R: tgcatacaaatatgactaatgatccagg
Y225	Y225F	F: tcattagtcattatggttgatgcaatt R: aattgcatcaaaccatattgactaatga
W236	W236L	F: gcccttgacttgagaataagcttaacgag R: ctcgtaagcttattctgcaagtcaagggc
	W236L	F: gcccttgacttgagaataagcttaacgag R: ctcgtaagcttattctgcaagtcaagggc
E242	E242G	F: cagaataagcttaacgggtataacaagccat R: atggcttggtataaccgtaagcttattctg
	E242W	F: taagcttaactgtataacaagccattctt R: agaatggcttggtataaccagttaagct
T259	T259S	F: gtttagcaattattcttggaggcaaaatatcc R: ggatattttgcctccaagaataattgctaaac
	T259W	F: ctgtagcaattattggtggaggcaaaatatcc R: ggatattttgcctccaccaataattgctaaacag
W296	W296L	F: ttcggtggtggtcagttgaataccaatgtgcc R: gggcaacattggtattcaactgaccaccaccgaa

B Cycle-sequence用プライマー

F1 : 355 gactggcacctcatcgacgt 375
 F2 : 515 gctacggaggcttctgccaa 535
 R1 : 1789 cacccatgatcttgctggagg 1769

C コロニーPCR用プライマー

F3 : 830 gaatcagctgtagttgctggt 850
 R1 : 1789 cacccatgatcttgctggagg 1769

Table 3-2 野生型および変異型 rEndo-Os の加水分解活性測定に用いた

PA-糖鎖構造

High-mannose type <i>N</i> -glycans	
$\begin{array}{l} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{Man}\alpha 1-3 \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Man}\alpha 1-2 \text{ Man}\alpha 1-3 \end{array}$
(M6B)	
Plant complex type <i>N</i> -glycans	
$\begin{array}{l} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{Man}\alpha 1-3 \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA} \\ \text{Xyl}\beta 1 \quad \quad \quad \text{Fuc}\alpha 1 \end{array}$
(M3FX)	
Animal complex type <i>N</i> -glycans	
$\begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-3 \end{array}$	$\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA}$
(Gal2GN2M3)	

第五項 T259W 変異型 rEndo-Os の糖転移活性の解析

5-1 rEndo-Os の (pNP-GlcNAc) を受容基質とした糖転移反応の測定⁶⁹⁻⁷¹⁾

基質認識において重要であると考えられているアミノ酸残基のうち、植物 ENGase で高度に保存されているスレオニン残基を微生物 ENGase の Endo-M で保存されているトリプトファン残基に変異させた T259W 変異型 rEndo-Os 注目し、糖転移活性の解析を行った。糖転移活性測定は、第三項の 3-1 で述べた方法と同様に行った。

5-2 rEndo-Os の N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) を受容基質とした糖転移反応の測定^{39, 70)}

T259W 変異型 rEndo-Os の糖転移活性測定は、第三項の 3-2 で述べた方法と同様に行った。

第四節 実験結果

第一項 雑豆（大納言）由来 HMT 糖ペプチドの調製と糖鎖構造の確認

調製した大納言由来の糖ペプチドに結合している糖鎖構造を確認するため、ヒドラジン分解により糖鎖を遊離させ、*N*-アセチル化後、PA 化し、RP-HPLC により PA-糖鎖を部分精製した。得られた PA-糖鎖は、50%MeCN/水に溶解し、SF-HPLC に供与することで糖鎖構造解析を行った。SF-HPLC のクロマトグラムを Fig.3-2 に示した。

SF-HPLC では主要ピークが5つ（ピーク 3-a, -b, -c, -d, -e）検出され、標準糖鎖の溶出位置からピーク 3-a は $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、ピーク 3-b は $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、ピーク 3-c は $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、ピーク 3-d は $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、ピーク 3-e は $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ であった。ESI-MS により、ピーク 3-a からは、 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ の理論値である m/z 1313.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ のイオンが観察された。同様に、ピーク 3-b からは、 $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ の理論値である m/z 1475.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ のイオンが観察された。ピーク 3-c からは、 $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ の理論値である m/z 819.3 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ のイオンが観察された。ピーク 3-d からは、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ の理論値である m/z 900.3 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ のイオンが観察された。ピーク 3-e からは、 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ の理論値である m/z 981.3 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ のイオンが観察された。以上の結果から、大納言から調製した糖ペプチドには、 $\text{Man}_{5\sim 9}\text{GlcNAc}_2$ の HMT 糖鎖が結合していることが確認できた。

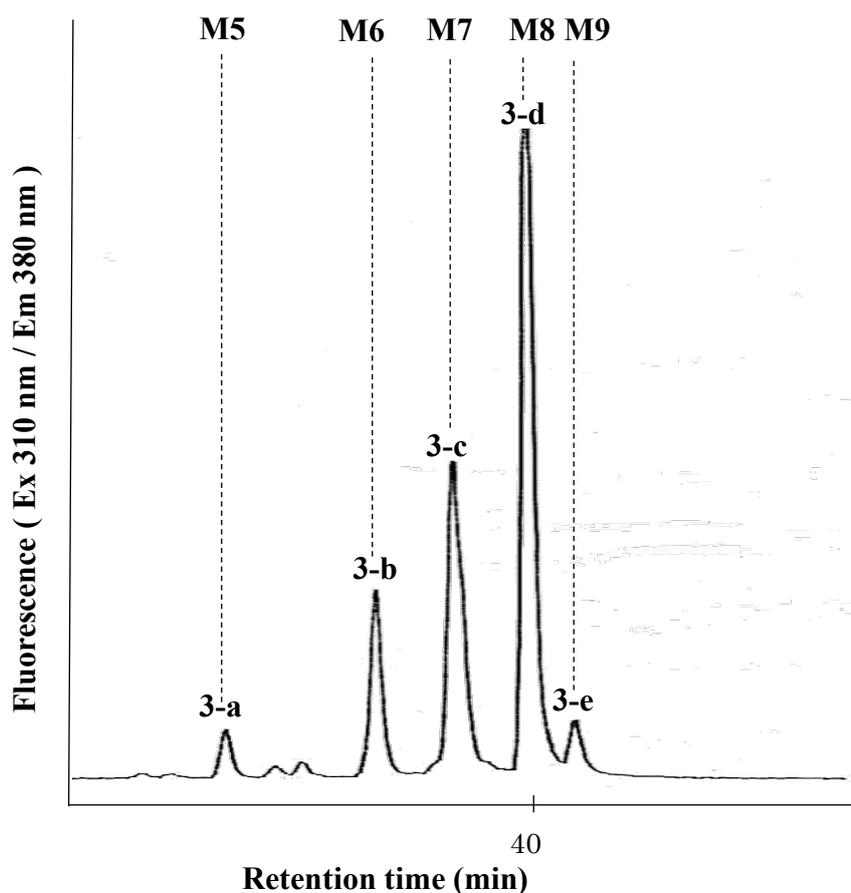


Fig. 3-2 雑豆（大納言）由来糖ペプチドから調製した PA-糖鎖の SF-HPLC プロファイル

M5, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$; M6, $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$; M7, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 2 ; M8, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$; M9, $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$

Column : Shodex Asahipak $\text{NH}_2\text{P-50 4E}$ (4.6 × 25 cm)

Solvent A : 80% MeCN

Solvent B : 20% MeCN

Flow rate : 0.7 mL / min

Time (min)	0	5	45	46
Solvent A (%)	90	90	50	90
Solvent B (%)	10	10	50	10

第二項 rEndo-Os の大腸菌での発現と精製

大腸菌で発現させた rEndo-Os は、N 末端側に His tag および GST tag を融合した組換え酵素であるため、酵素の精製は、Novagen 社製の Ni-NTA His・Bind Resin および GST・Bind Resin を用いて行った (Fig. 3-3, 3-4)。精製した rEndo-Os は、SDS-PAGE により 114 kDa の分子量であることを確認した (Fig. 3-5)。

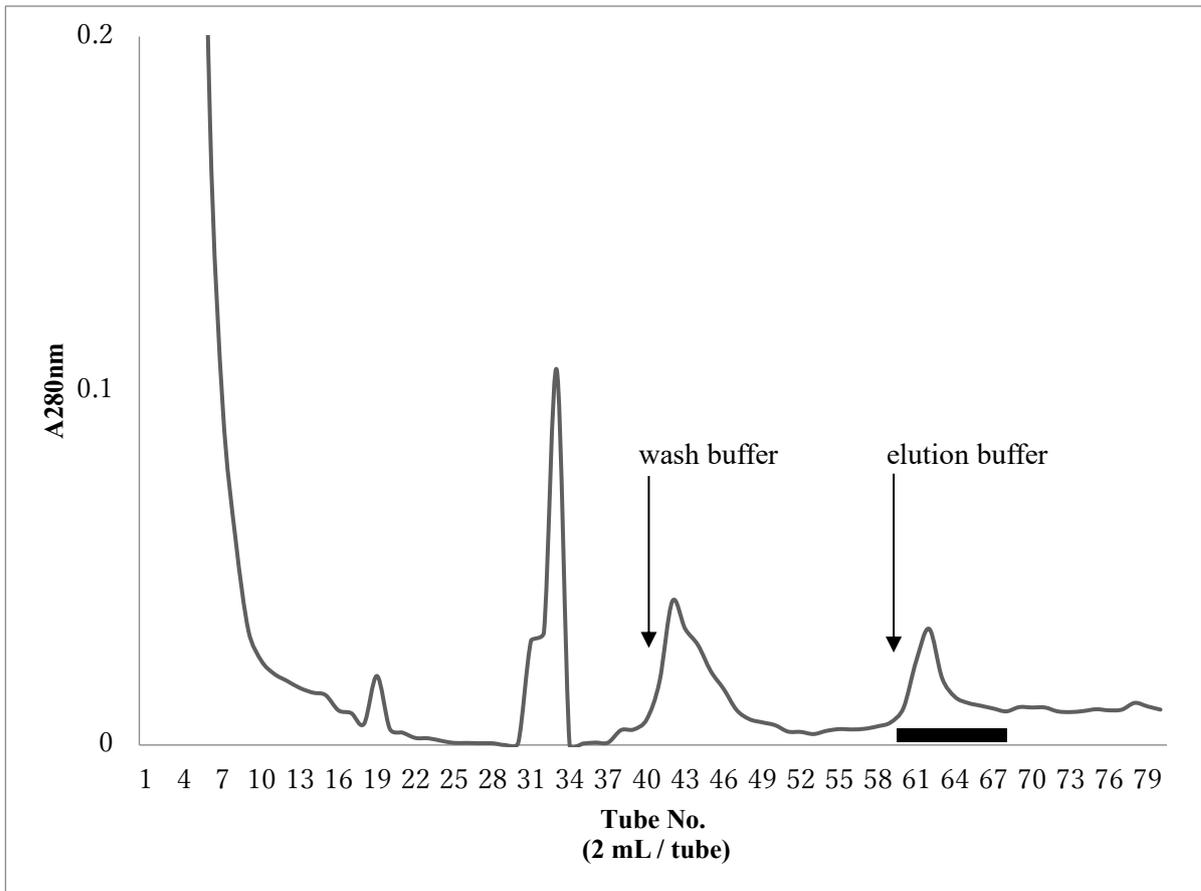


Fig. 3-3 Ni Column による rEndo-Os の精製

rEndo-Os を発現させた大腸菌を超音波で破碎した後、遠心した上清を Ni-NTA His・Bind column (1.5 x 3 cm) に供した。非吸着画分は 5 mM Imidazole と 0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液および 20 mM Imidazole と 0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液で洗浄した後、吸着画分は 200 mM Imidazole と 0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液で溶出し、黒線で示す画分を回収した。

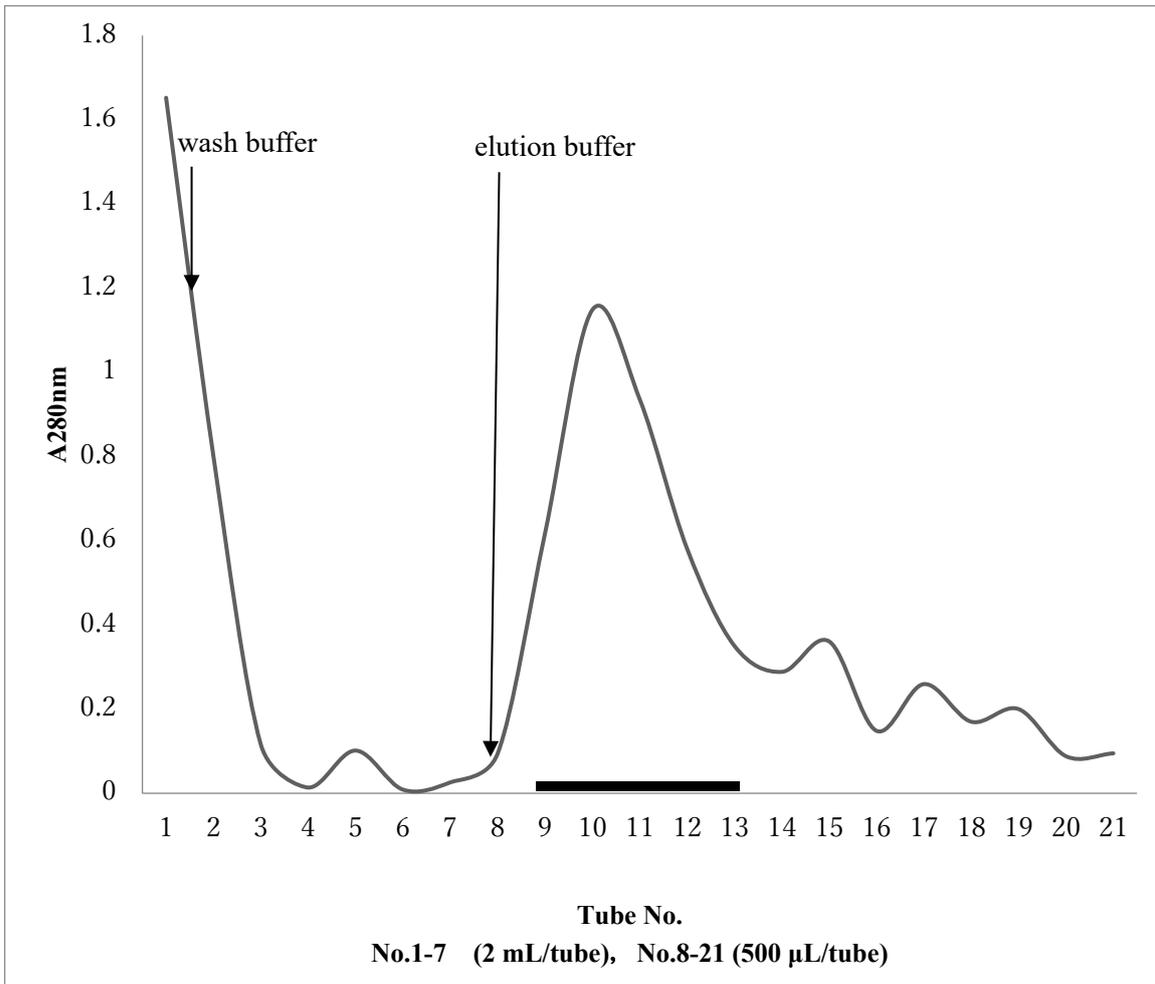


Fig. 3-4 GST Column による rEndo-Os の精製

rEndo-Os を含む Fig.3-4 で回収した画分を濃縮し、GST・Bind column (1.5x1.2 cm) に供した。非吸着画分は、1 mM DTT, 5 mM EDTA, 0.1 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液で洗浄し、吸着画分は、10 mM グルタチオン (還元型), 1 mM DTT, 5 mM EDTA, 0.1 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH8.0) 緩衝液で溶出し、黒線で示す部分を回収した。

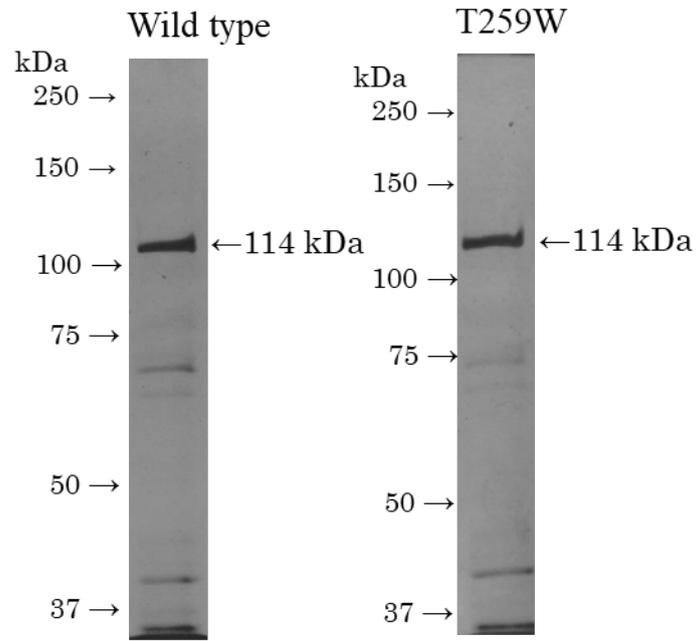


Fig. 3-5 精製した野生型および変異型 rEndo-Os の SDS-PAGE

野生型および変異型 rEndo-Os は、5%の 2-メルカプトエタノールによる還元条件下、7.5%のポリアクリルアミドゲルで分離した。ゲル上のタンパク質は銀染色により検出した。Wild type, 野生型 rEndo-Os; T259W, T259W 変異型 rEndo-Os

第三項 糖転移活性の確認

3-1 *p*NP-GlcNAc への HMT *N*-グリカンの転移反応の解析

rEndo-Os の糖転移活性測定は、供与基質として第一項で調製した雑豆（大納言）由来 HMT 糖ペプチドを、受容基質として *p*NP-GlcNAc を用いて行った。反応液は、RP-HPLC に供し、糖転移産物を分析した (Fig. 3-6)。この実験により生じる糖転移産物は、HMT 糖ペプチド（供与基質）から rEndo-Os の加水分解活性により遊離した GN1 型 HMT 糖鎖が、rEndo-Os の糖転移活性により *p*NP-GlcNAc（受容基質）に転移され、還元末端側にキトビオースを有する GN2 型 HMT の *p*NP-糖鎖の構造をとると考えられた。糖転移活性を有することが知られている糸状菌由来の微生物 Endo-M（分泌型酵素）による糖転移産物は、グレーのハイライトで示した溶出位置に検出され (Fig. 3-6 G)、Endo-H 消化によるピークの消失から (Fig. 3-6 H)、GN2 型 HMT の *p*NP-糖鎖の生成を確認することが出来た。rEndo-Os（細胞質酵素）の糖転移反応産物からも同じ溶出位置にピークがごく僅かに検出され (Fig. 3-6 C)、Endo-H 消化によるピークの消失も確認されたが (Fig. 3-6 D)、糖転移産物の生成量は非常に少なく、Endo-M の GN2 型 HMT の *p*NP-糖鎖を生成する酵素量（比活性）を 100% とすると、rEndo-Os の相対活性は 1% 未満と極めて低かった (Table 3-3)。

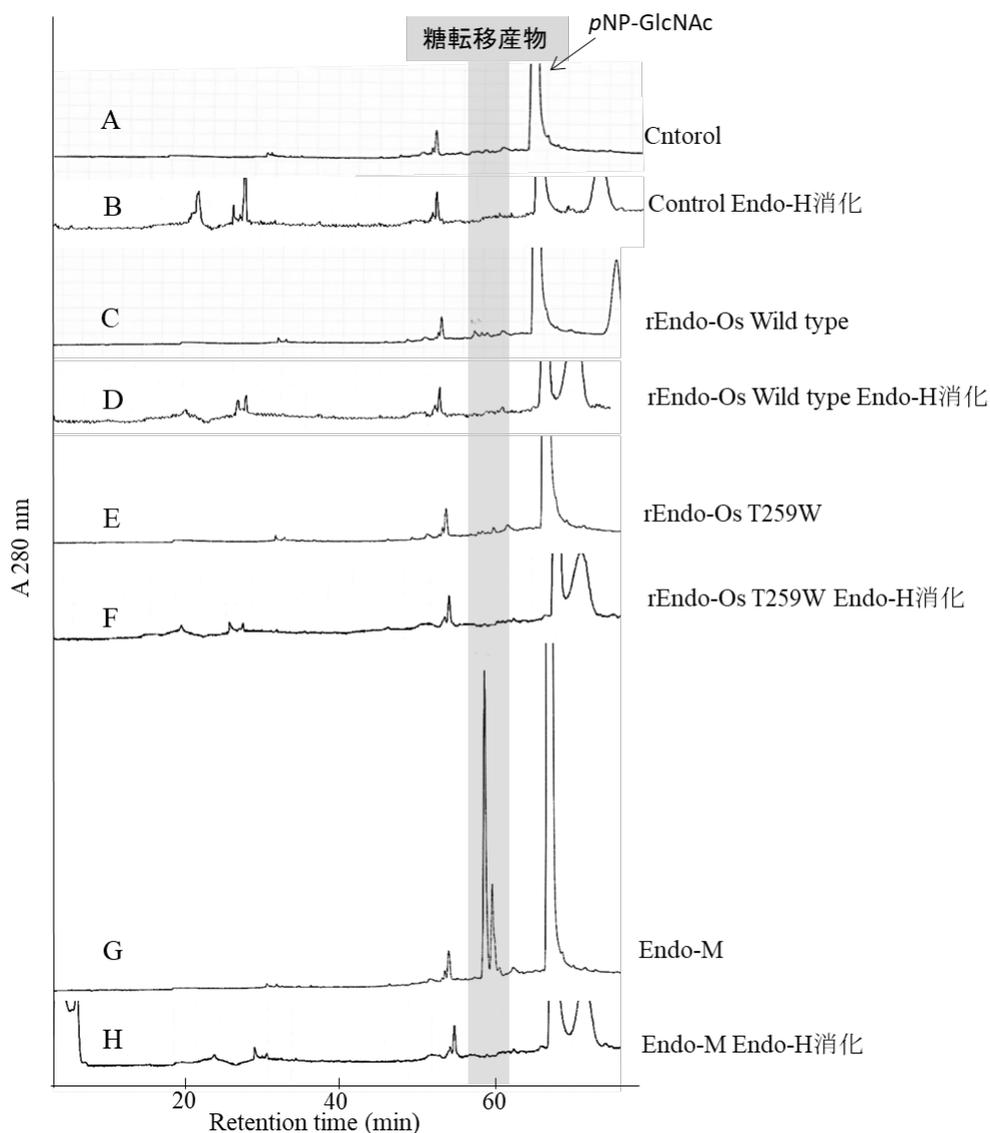


Fig. 3-6 *pNP-GlcNAc* を受容基質とした野生型および変異型 *rEndo-Os* によるハイマンノース型糖鎖の RP-HPLC による転移反応解析

雑豆 (大納言) 由来 HMT 糖ペプチド (150 μg), 20 mM *pNP-GlcNAc*, 50 mM MES Buffer (pH6.5) を野生型, 変異型 *rEndo-Os* および Endo-M で 37°C, 15 分間反応させた。グレーハイライトは糖転移産物の溶出位置。それぞれの糖転移産物は Endo-H 消化した。

Column: COSMOSIL 5C18-AR- II
 (10 \times 250 mm)
 Solvent A : 0.1% TFA
 Solvent B : 0.1%TFA / 80% MeCN
 Flow rate : 1.5 mL / min

Time (min)	0	10	70	71
Solvent A (%)	100	100	65	100
Solvent B (%)	0	0	35	0

Table 3-3 *p*NP-GlcNAc を受容基質とした rEndo-Os の糖転移活性

	比活性 (nmol/min/mg)	相対活性 (%) ^c
野生型 rEndo-Os ^a	2.2	0.5
T259W 変異型 rEndo-Os ^a	1.1	0.3
Endo-M ^b	421.1	100

a: 野生型あるいは T259W 変異型 rEndo-Os (4 μg), HMT 糖ペプチド (1.5 mg), 20 mM *p*NP-GlcNAc, 37°C, 15 分間, 0.5 M MES buffer (pH 6.5) の条件で反応させた; b: Endo-M (1 μg), HMT 糖ペプチド (1.5 mg), 20 mM *p*NP-GlcNAc, 30°C, 15 分間, 0.5 M MES buffer (pH 6.5) の条件で反応させた; c: Endo-M の比活性 (nmol/min/mg) を 100 としたときの相対活性

3-2 GlcNAc への HMT *N*-グリカンの転移反応の解析

第三項の 3-1 で、rEndo-Os の糖転移活性はほとんど検出されなかった。この結果には、rEndo-Os の加水分解活性により糖転移産物が消化され、糖転移産物の収量低下が影響している可能性が考えられた。そこで、rEndo-Os の加水分解活性を阻害し、糖転移産物の分解を抑制するために、受容基質として 20 mM *p*NP-GlcNAc の代わりに 0.5 M GlcNAc を用いて糖転移反応を行った^{39,70)}。ここでは糖転移産物を検出するため反応液から PA-糖鎖を調製した。この PA-糖鎖には、糖転移産物 (GN2 型 PA-糖鎖) と加水分解産物 (GN1 型 PA-糖鎖) が含まれているため、PA-糖鎖は SF-HPLC で分取後に、RP-HPLC に供し、吸着画分から糖転移産物 (GN2 型 PA-糖鎖) を回収した (Fig. 3-7)。得られた PA-糖鎖は、SF-HPLC に供し、糖転移産物 (GN2 型 PA-糖鎖) の溶出パターンは Fig. 3-8 に示した。

rEndo-Os の糖転移産物である GN2 型 PA-糖鎖の SF-HPLC では、主要ピークが 3 つ検出され、それぞれ標準糖鎖の Man₆GlcNAc₂-PA, Man₇GlcNAc₂-PA, Man₈GlcNAc₂-PA の溶出位置と一致していた (Fig. 3-8 AI)。また、これらの糖鎖は Endo-H 消化によりピークが消失したため、GN2 型 PA-糖鎖であると考えられた (Fig. 3-8 AII)。しかしながら、検出された rEndo-Os の糖転移産物のごく僅かであり、rEndo-Os の GN2 型 HMT の PA-糖鎖を生成する酵素量 (比活性) は、64.0 nmol/min/mg であった (Table 3-4)。

また、糸状菌由来の微生物 Endo-M (分泌型酵素) については、糖転移産物である GN2 型 PA-糖鎖の SF-HPLC では、主要ピークが 3 つ検出され、それぞれ標準糖鎖の Man₆GlcNAc₂-PA, Man₇GlcNAc₂-PA, Man₈GlcNAc₂-PA の溶出位置と一致した (Fig. 3-8 BI)。また、これらの糖鎖は Endo-H 消化によりピークが消失したため、GN2 型 PA-糖鎖であると考えられた (Fig. 3-8 BII)。Endo-M の GN2 型 HMT の PA-糖鎖を生成する酵素量 (比活性) は、6004.7 nmol/min/mg であった (Table 3-4)。

以上の結果から、本実験条件においても rEndo-Os（細胞質酵素）の糖転移産物はほとんど検出されず、Endo-M（分泌型酵素）の糖転移産物を生成する酵素量（比活性）を 100%とすると、rEndo-Os の相対活性は、約 1%と極めて低いことが明らかになった（Table 3-4）。

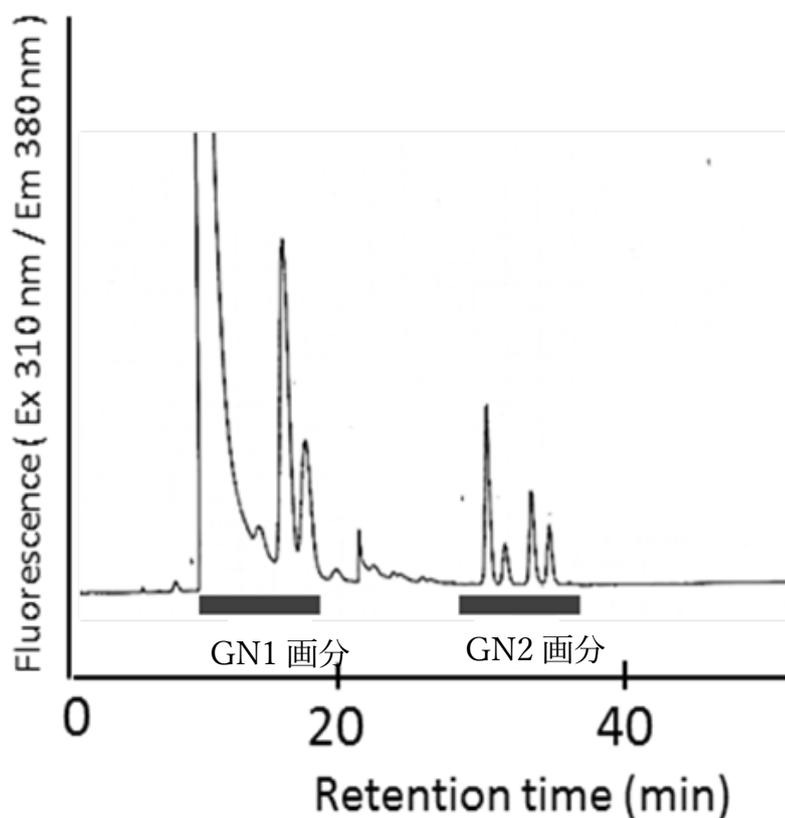


Fig. 3-7 糖転移反応溶液から調製した PA-糖鎖の SF-HPLC 分取画分の RP-HPLC による分取

Fig.3-13 で分取した PA-糖鎖を COSMOSIL 5C18-AR-II (10×250 mm) に供し，以下に示す 2 つの画分をそれぞれ回収した。GN1 画分，還元末端側に GlcNAc 1 残基を有する PA-糖鎖（加水分解産物）；GN2 画分，還元末端側にキトビオースを有する PA-糖鎖（糖転移産物）

Column: COSMOSIL 5C18-AR- II
 (6 × 250 mm)
 Solvent A: 0.02% TFA
 Solvent B: 0.02%TFA / 20% MeCN
 Flow rate: 1.2 mL / min

Time (min)	0	5	45	46
Solvent A (%)	100	100	65	100
Solvent B (%)	0	0	35	0

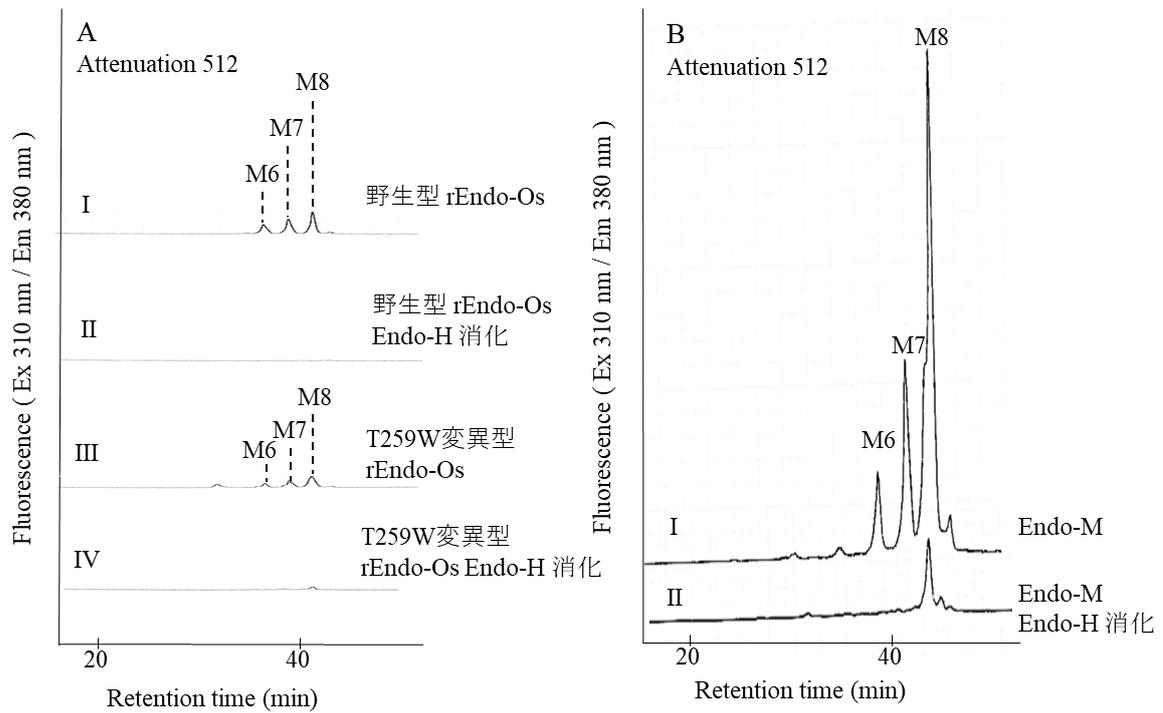


Fig. 3-8 糖転移産物 GN2-HMT-FNGs の SF-HPLC によるプロファイル

Fig.3-7 で得られた GN2 画分を Shodex Asahipak NH₂P-50 4E (4.6 × 250 mm) で分析した。それぞれの GN2 画分の GN2-HMT-FNGs は Endo-H 消化により構造を確認した。A, 野生型および T259W 変異型 rEndo-Os の糖転移反応産物; B, Endo-M の糖転移反応産物

Column : Shodex Asahipak NH₂P-50 4E (4.6 × 250 mm)
 Solvent A : 80% MeCN
 Solvent B : 20% MeCN
 Flow rate : 0.7 mL / min

Time (min)	0	5	45	46
Solvent A (%)	90	90	50	90
Solvent B (%)	10	10	50	10

Table 3-4 GlcNAc を受容基質とした rEndo-Os の糖転移活性

	比活性 (nmol/min/mg)	相対活性 (%) ^c
野生型 rEndo-Os ^a	64.0	1.1
T259W 変異型 rEndo-Os ^a	3.8	0.1
Endo-M ^b	6004.7	100

a: 野生型あるいは T259W 変異型 rEndo-Os (4 μg), HMT 糖ペプチド (1.5 mg), 0.5 M GlcNAc, 37°C, 15 分間, 0.5 M MES buffer (pH 6.5) の条件で反応させた; b: Endo-M (1 μg), HMT 糖ペプチド (1.5 mg), 0.5 M GlcNAc, 30°C, 15 分間, 0.5 M MES buffer (pH 6.5) の条件で反応させた; c: Endo-M の比活性 (nmol/min/mg) を 100 としたときの相対活性

第四項 変異型 rEndo-Os の加水分解活性の解析

4-1 野生型および変異型 rEndo-Os のハイマンノース型 PA-糖鎖 (M6B) に対する加水分解活性の比較

Endo-Os は、 $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-3\text{Man}\beta 1$ unit をもつハイマンノース型 (HMT) 糖鎖に強い活性を示すため、野生型および変異型 rEndo-Os (Table 3-1) の加水分解活性の測定には、M6B を基質として用いた (Table 3-2)。既知の微生物 ENGase の配列から加水分解活性に重要なアミノ酸残基と推測した N189, E191 の変異型 (N189K, N189Q, E191D, E191A) rEndo-Os では M6B の消化がほとんどみられず、加水分解活性が著しく低下していた (Fig. 3-9)。植物間で高度に保存され、基質認識に重要なアミノ酸残基と推測した W224, W236, E242, T259 の変異型 rEndo-Os では、37°C で 1 時間反応させたときの野生型 rEndo-Os の M6B に対する比活性を 100% とすると、W224L 変異型 rEndo-Os では約 38%、W236L 変異型 rEndo-Os では約 4%、E242G 変異型 rEndo-Os では約 3%、E242W 変異型 rEndo-Os では約 56%、T259W 変異型 rEndo-Os では約 45% の相対活性であり、加水分解活性が低下していた。一方で、W225F, T259S, T259C, W296L 変異型 rEndo-Os の相対活性に大きな変化はみられなかった (Fig. 3-9)。そこで本研究では、基質認識において重要であると考えられているアミノ酸残基のうち、植物 ENGase で高度に保存されているスレオニン残基を微生物 ENGase の Endo-M で保存されているトリプトファン残基に変異させた T259W 変異型 rEndo-Os に注目した^{34,73,75})。野生型と T259W 変異型 rEndo-Os について、M6B を基質として 37°C で 15 分間反応させた場合、野生型 rEndo-Os の M6B 消化量を 100% とすると、T259W 変異型 rEndo-Os の相対活性は、53% であり加水分解活性の低下を確認できた (Fig. 3-10, Table 3-5)。

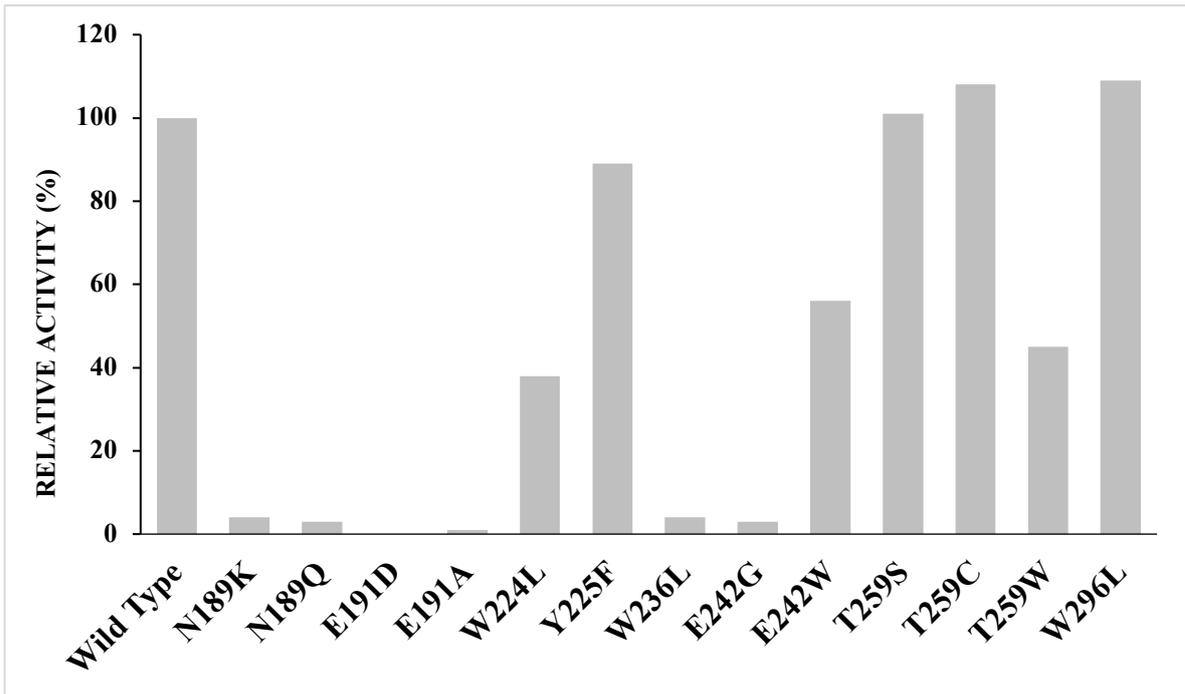


Fig. 3-9 rEndo-Os の各変異型の加水分解活性の比較

加水分解活性は、rEndo-Os (4 μ g), M6B (40 pmol), 37°C, 60 分間, 0.5 M MES buffer (pH 6.5) の条件で反応させた。野生型 rEndo-OS の比活性 (nmol/min/mg) を 100 としたときの相対活性。

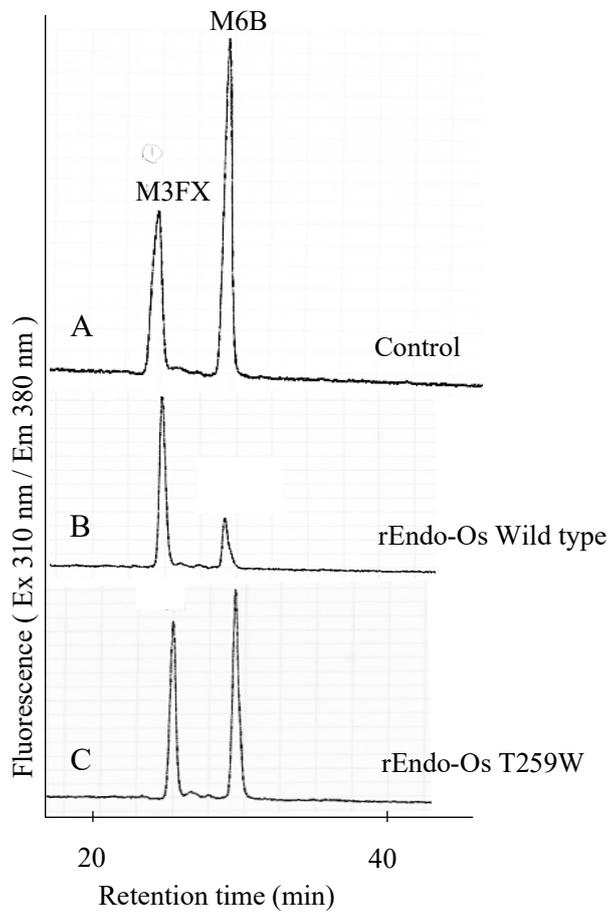


Fig. 3-10 野生型および変異型 rEndo-Os のハイマンノース型糖鎖 (M6B) に対する加水分解活性の解析

rEndo-Os (4 μ g) と PA-糖鎖の基質 M6B (126 pmol) と内部標準 M3FX (67 pmol) を、50 mM MES buffer (pH 6.5) の条件下で 37°C で 15 分間反応させ、反応産物を Shodex Asahipak NH₂P-50 4E (4.6×250 mm) で分析した。A, 煮沸した rEndo-Os の反応産物；B, 野生型 rEndo-Os の反応産物；C, T259W 変異型 rEndo-Os の反応産物

Column : Shodex Asahipak NH₂P-50
4E (Φ4.6×250 mm)
Solvent A : 80% MeCN
Solvent B : 20% MeCN
Flow rate : 0.7 mL / min

Time (min)	0	5	45	46
Solvent A (%)	90	90	50	90
Solvent B (%)	10	10	50	10

Table. 3-5 野生型およびT259W変異型rEndo-Osの加水分解活性の比較

基質 (PA-糖鎖)	加水分解量 (pmol) 相対活性 (%)	
	野生型	T259W変異型
High-mannose type (M6B)		
Man α 1-6 Man α 1-3 Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA Man α 1-2 Man α 1-3	107.8 (100) ^a	56.7 (53) ^a
Animal complex type (Gal2GN2M3)		
Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6 Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3 Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA	11.7 (100) ^b	22.6 (193) ^b

a: 野生型 rEndo-Os (4 μ g), M6B (126 pmol), 37°C, 15 分間, 0.5 M MES buffer (pH 6.5) の条件で反応させたときの加水分解量 (pmol) を 100 としたときの相対活性 (%)

b: 野生型 rEndo-Os (4 μ g), Gal2GN2M3 (39 pmol), 37°C, 16 時間, 0.5 M MES buffer (pH 6.5) の条件で反応させたときの加水分解量 (pmol) を 100 としたときの相対活性 (%)

4-2 野生型および T259W 変異型 rEndo-Os の動物複合型 (ACT) PA-糖鎖に対する加水分解活性の測定

微生物 ENGase の中でも Endo-M は、HMT 糖鎖にもバイアンテナ型 ACT 糖鎖にも加水分解活性を示す⁷⁶⁾。一方で、Endo-A は HMT 糖鎖には作用するが、バイアンテナ型 ACT 糖鎖には作用しない⁴³⁾。そこで、野生型および T259W 変異型 rEndo-Os のバイアンテナ型 ACT 糖鎖 (Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂-PA, Gal2GN2M3) に対する加水分解活性を測定した。37°C で 15 分間反応させたところ、Gal2GN2M3 の消化がわずかに確認されたが、野生型と T259W 変異型 rEndo-Os の消化量に大きな違いはみられなかった (Fig. 3-11 A)。そこで、37°C で 16 時間反応させたところ、野生型 rEndo-Os の Gal2GN2M3 消化量を 100% とすると、T259W 変異型 rEndo-Os の相対活性は、約 193% であり加水分解活性の上昇を確認できた (Fig. 3-11 B, Table 3-5)。以上の結果から、T259W 変異型 rEndo-Os の W259 は、バイアンテナ型 ACT 糖鎖との相互作用に寄与する可能性が考えられた。

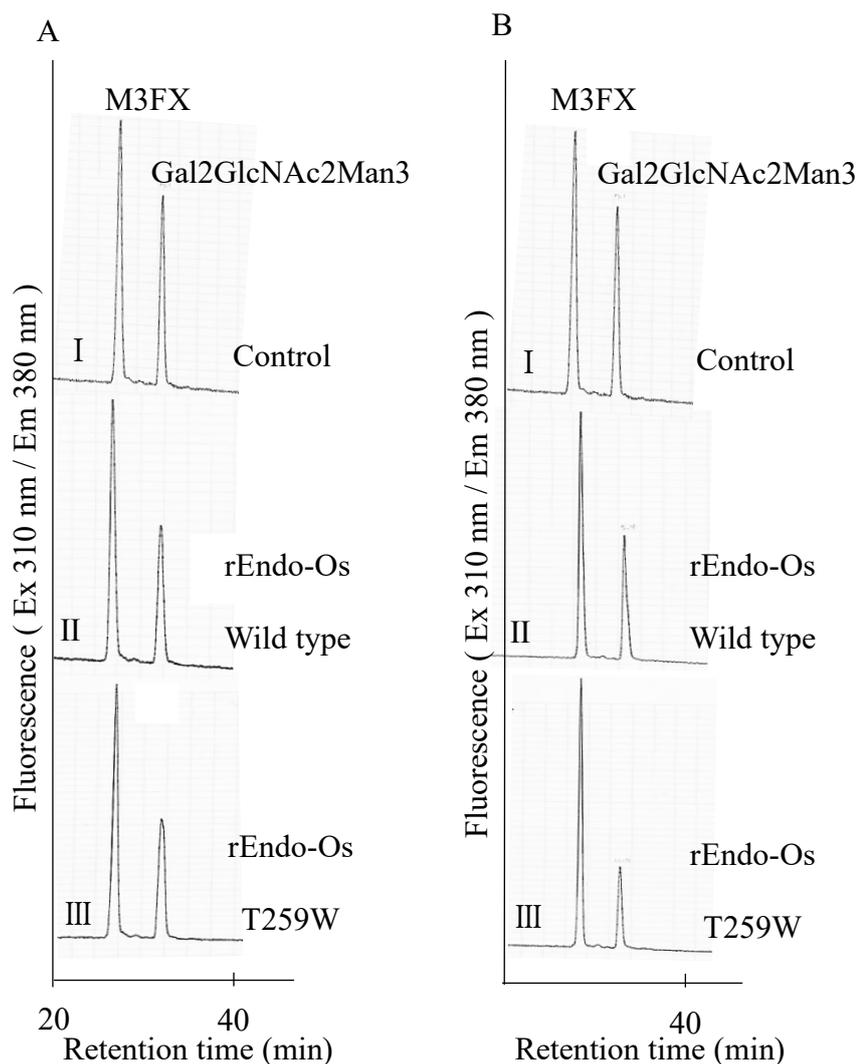


Fig. 3-11 野生型および変異型 rEndo-Os の動物複合型糖鎖

(Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2) に対する加水分解活性の解析

rEndo-OS (4 μ g) と PA-糖鎖の基質 Gal2GlcNAc2Man (39 pmol) と内部標準 M3FX (53 pmol) を、50 mM MES buffer (pH 6.5) の条件下 37°C で 15 分間 (A) または 16 時間 (B) 反応させ、反応産物を Shodex Asahipak NH₂P-50 4E (4.6 \times 250 mm) で分析した。PA 糖鎖の検出は、流速 1.5 mL/min の条件で、Fig. 3-9 に示す溶媒系とプログラムを用いた。I, 煮沸した rEndo-Os の反応産物; II, 野生型 rEndo-Os の反応産物; III, T259W 変異型 rEndo-Os の反応産物。

第五項 T259W 変異型 rEndo-Os の糖転移活性の解析

5-1 *p*NP-GlcNAc への HMT *N*-グリカンの転移反応の解析

T259W 変異型 rEndo-Os の糖転移活性測定は、供与基質として第一項で調製した雑豆（大納言）由来 HMT 糖ペプチドを、受容基質として *p*NP-GlcNAc を用いて行った。得られた反応液は、RP-HPLC に供し、糖転移産物を分析した (Fig. 3-6)。その結果、野生型 rEndo-Os の結果と同様に、T259W 変異型 rEndo-Os の糖転移産物の生成量は非常に少なく (Fig. 3-6 E)、その比活性は 1.1 nmol/min/mg であり野生型 rEndo-Os の 1/2 程度であった (Table 3-3)。

5-2 GlcNAc への HMT *N*-グリカンの転移反応の解析

第三項 3-2 と同様に、T259W 変異型 rEndo-Os の加水分解活性を阻害し、糖転移産物の分解を抑制するために、受容基質として 20 mM *p*NP-GlcNAc の代わりに 0.5 M GlcNAc を用いて糖転移反応を行った^{39,70}。反応液から PA-糖鎖を調製し、SF/RP-HPLC に供し、糖転移産物である GN2 型 PA-糖鎖を回収した。これを SF-HPLC に供し、糖転移産物である GN2 型 PA-糖鎖を分析した (Fig. 3-8)。T259W 変異型 rEndo-Os の糖転移産物は、僅かに Man₆GlcNAc₂-PA, Man₇GlcNAc₂-PA, Man₈GlcNAc₂-PA の溶出位置にピークが検出され (Fig. 3-8 AIII)、Endo-H 消化によりピークの消失が確認されたため (Fig. 3-8 AIV)、GN2 型 PA-糖鎖であると考えられた。しかしながら、T259W 変異型 rEndo-Os の糖転移産物の生成量は非常に少なく、その比活性は 3.8 nmol/min/mg であり野生型 rEndo-Os の 1/16 程度であった (Table 3-4)。

第五節 考察

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) を用いた。rEndo-Os (細胞質酵素) と糸状菌由来の微生物 Endo-M (分泌型酵素) の HMT 糖鎖に対する糖転移活性を調べるため、供与基質として雑豆 (大納言) から調製した HMT 糖ペプチドを、受容基質として 20 mM *p*NP-GlcNAc および 0.5 M GlcNAc を用いて糖転移反応を行い、糖転移産物を RP/SF-HPLC で分析した。その結果、rEndo-Os (細胞質酵素) の糖転移産物が僅かに検出されたが、Endo-M (分泌型酵素) の糖転移産物を生成する酵素量 (比活性) を 100% とすると、rEndo-Os の相対活性は、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。

続いて、13 種類の変異型 rEndo-Os を部位特異的変異導入により作製した。加水分解活性に重要なアミノ酸残基と推測した N189 及び E191 の変異型 rEndo-Os では加水分解活性が著しく低下した。UniProt (<https://www.uniprot.org/>) の AlphaFold や SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)⁷⁷⁻⁸¹⁾ で予測された Endo-Os の三次構造をみると、Endo-A, Endo-D と同様に $(\beta/\alpha)_8$ バレル構造を持ち、 β サンドイッチ構造からなる 2 つのドメインが確認できた (Fig. 3-12)。PyMOL (<https://pymol.org/>) でアミノ酸残基の位置を確認すると、Endo-Os の N189, E191 と Endo-M, Endo-A, Endo-D の加水分解活性中心とされる N と E の位置と一致しており^{42,44,72,74)}(Fig. 3-1), このことは、Endo-Os は Endo-M などすでに報告のある GH ファミリー 85 に属す ENGase と同じ反応機構を持っており、E191 は酸/塩基触媒として作用し、N189 は基質の *N*-アセチル基と水素結合を介して基質の位置を固定し、E191 による触媒作用を補助していると考えられた。基質認識に重要なアミノ酸残基と推測した W224 及び W236 の変異型 rEndo-Os では、加水分解活性の低下が見られた⁴⁴⁾。こ

これらのトリプトファン残基は基質結合サイトに存在し、基質の結合を補助していることが推測された。

ここでは、基質認識において重要であると考えられているアミノ酸残基のうち、植物 ENGase で高度に保存されているスレオニン残基を微生物 ENGase の Endo-M で保存されているトリプトファン残基に変異させた T259W 変異型 rEndo-Os に注目した。野生型と T259W 変異型 rEndo-Os について、HMT 糖鎖 (M6B) を基質として 37°C で 15 分間反応させた場合、野生型 rEndo-Os の M6B 消化量を 100% とすると、T259W 変異型 rEndo-Os の相対活性は、53% であり加水分解活性の低下を確認できた。また、バイアンテナ型動物複合型糖鎖 (Gal2GN2M3) を基質として 37°C で 16 時間反応させた場合、野生型 rEndo-Os の Gal2GN2M3 消化量を 100% とすると、T259W 変異型 rEndo-Os の相対活性は、約 193% であり加水分解活性の上昇を確認できた。以上の結果から、T259W 変異型 rEndo-Os の W259 は、バイアンテナ型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。

更に、T259W 変異型 rEndo-Os の HMT 糖鎖に対する糖転移活性については、野生型 rEndo-Os よりも低く、ほとんど検出されなかった。今後は、T259W 変異型 rEndo-Os のバイアンテナ型動物複合型糖鎖に対する糖転移活性を解析する必要があると考えられた。

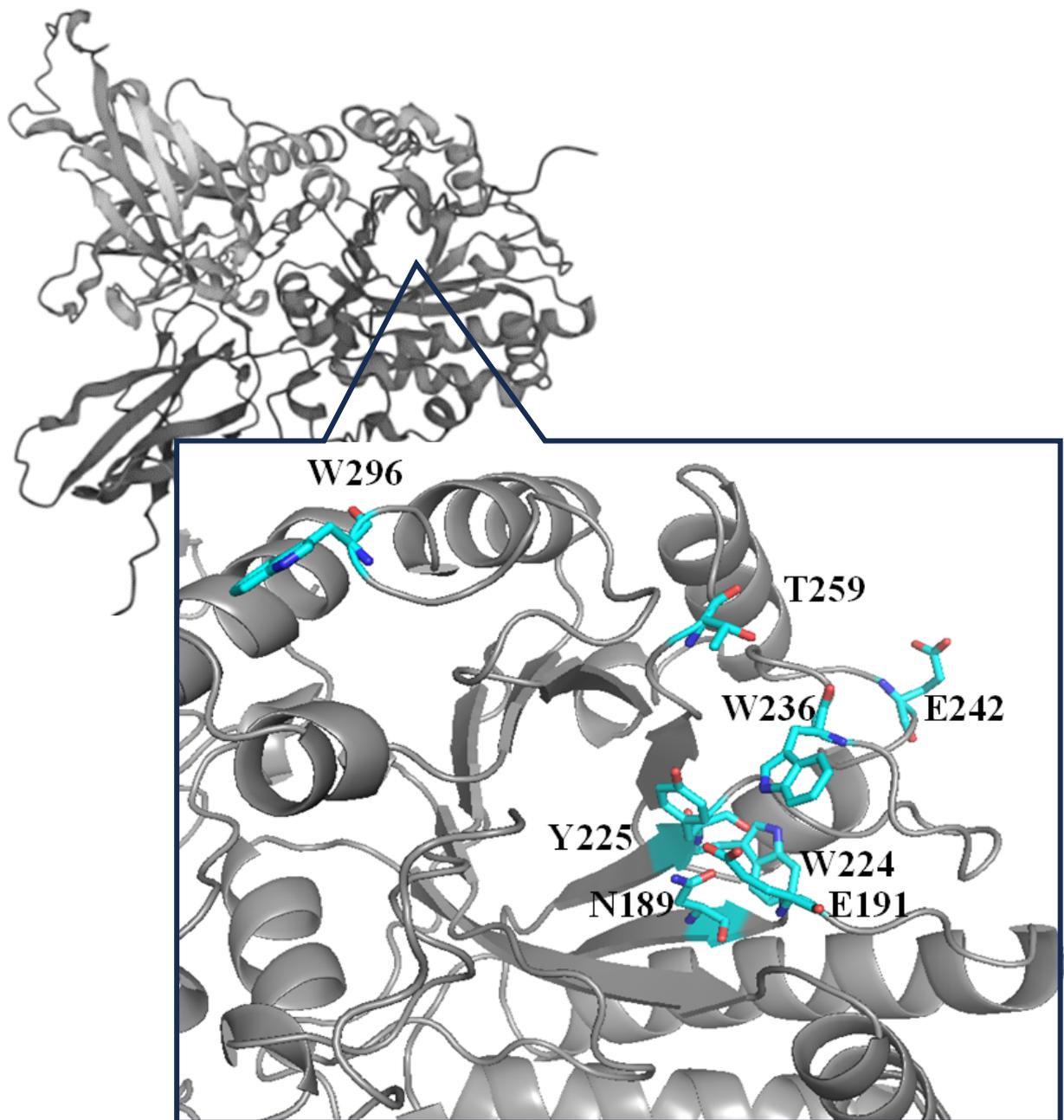


Fig. 3-12 SwissModel による Endo-Os の 3 次構造予測と変異を導入したアミノ酸の配置 ⁷⁷⁻⁸¹⁾

SwissModel で予測した Endo-Os の 3 次構造。変異を導入したアミノ酸残基を stick で示す。

第四章 総括

分化成長中の実生胚軸や成熟過程の果実中には μM で還元末端側に GlcNAc1 残基を有する 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³⁰⁾。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²⁸⁾。そこで本博士論文の第二章では, トマト ENGase 欠損株を構築し, トマト果実における ENGase 活性測定および HMT-FNGs の構造解析を行い, GN1-HMT-FNGs のトマト果実の成熟に与える影響について調べることを目的とした。

更に, 植物 ENGase の酵素学的な緒性質に注目すると, 植物で初めて精製されたイネ由来 ENGase (Endo-Os) は, $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-3\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 構造ユニットを有する HMT *N*-グリカンに加水分解活性を示すものの, トリマンノシルコア構造に $\alpha 1,3$ 結合フコースおよび $\beta 1,2$ 結合キシロースを有する典型的な植物複合型 *N*-グリカンに活性を全く示さない³⁴⁾。また植物 ENGase は GH Family85 に分類されており, 加水分解活性だけでなく, 糖転移活性を持つ可能性が考えられている。しかしながら, 植物 ENGase については, 糖転移活性に注目した研究はなされていない。そこで本博士論文の第三章では大腸菌での発現系が確立している rEndo-Os を用いて, まだ詳細な研究が行われていない糖転移活性の解析及び部位特異的変異の導入により加水分解活性と糖転移活性において重要なアミノ酸残基の特定を行った。

第二章では, トマトの ENGase 欠損株 (Δeng 変異株) を構築し, ENGase 活性測定および FNGs 構造解析を行った⁶⁵⁾。CRISPR/Cas9 システムを用いて ENGase 活性を抑制した Δeng 変異株の構築し, Δeng 変異株の T1 世代の葉における HMT-FNGs

の構造的特徴の解析と定量を行った。その結果、 Δeng 変異株の T1 世代では、GN1-HMT-FNGs はほとんど検出されず、野生株に存在する GN1-HMT-FNGs とほぼ同じ量の GN2-HMT-FNGs が検出された⁶⁵⁾。また、 Δeng 変異株の T2 世代を生育させ、その成熟したトマト果実における ENGase 活性と HMT-FNGs の構造的特徴を解析した。その結果、 Δeng 変異株の T2 世代の果実では、ENGase 活性が検出されず、GN1-HMT-FNGs の代わりに GN2-HMT-FNGs が生成されていた。これは、同じ変異が安定して T2 世代に引き継がれたことを示していた。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 *A. thaliana* ENGase 欠損株で観察された結果と一致していた³¹⁾。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、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) を用いた³⁴⁾。rEndo-Os (細胞質酵素) と糸状菌由来の微生物 Endo-M (分泌型酵素) の HMT 糖鎖に対する糖転移活性を調べるため、供与基質として雑豆 (大納言) から調製した HMT 糖ペプチドを、受容基質として 20 mM *p*NP-GlcNAc および 0.5 M GlcNAc を用いて糖転移反応を行い^{39,70)}、糖転移産物を RP/SF-HPLC で分析した。その結果、rEndo-Os (細胞質酵素) の糖転移産物が僅かに検出されたが、Endo-M (分泌型酵素) の糖転移産物を生成する酵素量 (比活性) を 100% とすると、rEndo-Os の相対活性は、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。

続いて、13 種類の変異型 rEndo-Os を部位特異的変異導入により作製した。加水分解活性に重要なアミノ酸残基と推測した N189 及び E191 の変異型 rEndo-Os では

加水分解活性が著しく低下した。この結果から、Endo-Os は既報の GH ファミリー 85 に属す ENGase と同様に、E191 は酸/塩基触媒として作用し、N189 は基質の *N*-アセチル基と水素結合を介して基質の位置を固定し、E191 による触媒作用を補助していると考えられた。

ここでは、基質認識において重要であると考えられているアミノ酸残基のうち、植物 ENGase で高度に保存されているスレオニン残基を微生物 ENGase の Endo-M で保存されているトリプトファン残基に変異させた T259W 変異型 rEndo-Os に注目した。野生型と T259W 変異型 rEndo-Os について、HMT 糖鎖 (M6B) を基質として 37°C で 15 分間反応させた場合、野生型 rEndo-Os の M6B 消化量を 100% とすると、T259W 変異型 rEndo-Os の相対活性は、53% であり加水分解活性の低下を確認できた。また、バイアンテナ型動物複合型糖鎖 (Gal2GN2M3) を基質として 37°C で 16 時間反応させた場合、野生型 rEndo-Os の Gal2GN2M3 消化量を 100% とすると、T259W 変異型 rEndo-Os の相対活性は、約 193% であり加水分解活性の上昇を確認できた。以上の結果から、T259W 変異型 rEndo-Os の W259 は、バイアンテナ型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。

更に、T259W 変異型 rEndo-Os の HMT 糖鎖に対する糖転移活性については、野生型 rEndo-Os よりも低くほとんど検出されなかった。今後は、T259W 変異型 rEndo-Os のバイアンテナ型動物複合型糖鎖に対する糖転移活性を解析する必要があると考えられた。

参照文献

- 1) Ajit, V. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, **3**, 97-130.
- 2) Ari, H. and Markus, A. (2001) Intracellular Functions of *N*-Linked Glycans. *Science*, **291**, 2364-2369.
- 3) Helenius, A. and Abei, M. (2004) Roles of *N*-Linked Glycans in the Endoplasmic Reticulum. *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 1019
- 4) Kobata, A. (1992) Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur. J. Biochem.* **209**, 483-501.
- 5) Kobata, A., Kamerling, J.P., Boons, G.-J., Lee, Y.C., Suzuki, A., Taniguchi, N. and Voragen, A.G.J. eds. (2007) Glycoprotein Glycan Structures. in *Comprehensive Glycoscience, Elsevier*, **1**, 61-78.
- 6) Strasser, R. (2016) Plant protein glycosylation. *Glycobiology*, **26**, 926-939
- 7) Nagashima, Y., Schaewen, A. von, and Koiwa, H. (2018) Function of *N*-glycosylation in plants. *Plant Sci.*, **274**, 70-79.
- 8) 木村吉伸 (2023) Free *N*-glycans Induce Protein Folding and Suppress Amyloid Aggregation: Biofunctions of Free *N*-glycans Emerging from Plant Glycobiology Research. *化学と生物*, **61**, 64-77.
- 9) 前田 恵と木村 吉伸 (2013) 植物糖タンパク質の代謝に関わる糖鎖関連酵素の機能特性と遊離型糖鎖の存在意義. *日本応用糖質科学会誌*, **3**, 77-86.
- 10) Kimura, Y. and Matsuo, S. (2000) Changes in *N*-Linked Oligosaccharides during Seed Development of *Ginkgo biloba*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 562-568.
- 11) Horiuchi, R., Hirotsu, N. and Miyanishi, N. (2015) Comparative analysis of *N*-glycans in the ungerminated and germinated stages of *Oryza sativa*. *Carbohydr. Res.*, **418**, 1-8.

- 12) Hase, S., Koyama, S., Daiyasu, H., Takemoto, H., Hara, S., Kobayashi, Y., Kyogoku, Y. and Ikenaka, T. (1986) Structure of a sugar chain of a protease inhibitor isolated from barbados pride (*Caesalpinia pulcherrima* Sw.) seeds. *J. Biochem.*, **100**, 1-10
- 13) Kimura, Y., Hase, S., Kobayashi, Y., Kyogoku, Y., Ikenaka, T. and Funatsu, G. (1988) Structures of sugar chains of ricin D. *J. Biochem.*, **103**, 944-949.
- 14) Kimura, Y., Hase, S., Kobayashi, Y., Kyogoku, Y., Ikenaka, T. and Funatsu, G. (1988) Structures of sugar chains of *Ricinus communis* agglutinin. *Biochim. Biophys. Acta*, **966**, 248-256.
- 15) Kimura, Y., Minami, Y., Tokuda, T., Nakajima, S., Takagi, S. and Funatsu, G. (1991) Primary structures of *N*-linked oligosaccharides of momordin-a, a ribosome-inactivating protein from *Momordica charantia* seeds. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2031-2036.
- 16) Yamaguchi, O., Kimura, M., Araki, M., Yamasaki, N., Kimura, Y., Nakajima, S. and Takagi, S. (1993) Chemical structures of two subunits, A-subunit and B-subunit, of galactose-specific isolectins from *Erythrina variegata* seeds. *J. Biochem.*, **114**, 560-566.
- 17) Kimura, Y. and Matsuo, S. (2000) Free *N*-Glycans Already Occur at an Early Stage of Seed Development. *J. Biochem.*, **127**, 1013-1019.
- 18) Priem, B., Gitti, R., Bush, C. A. and Gross, K. C. (1993) Structure of ten free *N*-glycans in ripening tomato fruit. Arabinose is a constituent of a plant *N*-glycan. *Plant Physiol.*, **102**, 445-458.
- 19) Kimura Y., Takagi S. and Shiraishi T. (1997) Occurrence of free *N*-glycans in pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 924-926.
- 20) Maeda, M. and Kimura, Y. (2014) Structural features of free *N*-glycans occurring in plants and functional features of de-*N*-glycosylation enzymes, ENGase, and PNGase:

- the presence of unusual plant complex type *N*-glycans. *Front. Plant Sci.*, **5**, 429.
- 21) Cacan, R. and Verbert, A. (1997) Free oligomannosides produced during the *N*-glycosylation process: origin, intracellular trafficking and putative roles. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **9**, 365-377.
 - 22) Suzuki, T. and Funakoshi, Y. (2006) Free *N*-linked oligosaccharide chains: formation and degradation. *Glycoconj. J.*, **23**, 291-302.
 - 23) Hüttner, S. and R. Strasser, R. (2012) Endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins in plants. *Front. Plant Sci.*, **3**, 67.
 - 24) Oku, H., Hase, S. and Ikenaka, T. (1991) Purification and characterization of neutral alpha-mannosidase that is activated by Co²⁺ from Japanese quail oviduct. *J. Biochem.*, **110**, 29-34.
 - 25) Oku, H. and Hase, S. (1991) Studies on the substrate specificity of neutral alpha-mannosidase purified from Japanese quail oviduct by using sugar chains from glycoproteins. *J. Biochem.*, **110**, 982-989.
 - 26) Suzuki, T. (2015) The cytoplasmic peptide:*N*-glycanase (*Ngly1*)—basic science encounters a human genetic disorder. *J. Biochem.*, **157**, 23-34.
 - 27) Fujihira, H., Masahara-Negishi, Y., Tamura, M., Huang, C., Harada, Y., Wakana, S., Takakura, D., Kawasaki, N., Taniguchi, N., Kondoh, G., Yamashita, T., Funakoshi, Y. and Suzuki, T. (2017) Lethality of mice bearing a knockout of the *Ngly1*-gene is partially rescued by the additional deletion of the *Engase* gene. *PLoS Genet.*, **13**, 1006696.
 - 28) Nakamura, K., Inoue, M., Yoshiie, T., Hosoi, K. and Kimura, Y. (2008) Changes in structural features of free *N*-glycan and endoglycosidase activity during tomato fruit ripening. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 2936-2945.
 - 29) Nakamura, K., Inoue, M., Maeda, M., Nakano, R., Hosoi, K., Fujiyama, K. and Kimura,

- Y., (2009) Molecular cloning and gene expression analysis of tomato endo- β -*N*-acetylglucosaminidase, an endoglycosidase involved in the production of high mannose type free *N*-glycans during tomato fruit ripening. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 461-464.
- 30) Priem, B., and Gross, K. C. (1992). Mannosyl- and xylosyl-containing glycans promote tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit ripening. *Plant Physiol.*, **98**, 399-401.
- 31) Kimura, Y., Takeoka, Y., Inoue, M., Maeda, M., and Fujiyama, K. (2011) Double-knockout of putative endo- β -*N*-acetylglucosaminidase (ENGase) genes in *Arabidopsis thaliana*: loss of ENGase activity induced accumulation of high-mannose type free *N*-glycans bearing *N,N'*-acetylchitobiosyl unit. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **75**, 1019-1021.
- 32) Kang, J.S., Fraank, J., Kang, C.H., Kajiura, H., Vikram, M., Ueda, A., Kim, S., Bahk, J.D., Triplett, B., Fujiyama, K., Lee, S.Y., von Schaewen, A., and Koiwa, H. (2008) Salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* requires maturation of *N*-glycosylated proteins in the Golgi apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **105**, 5933-5938.
- 33) Takano, S., Matsuda, S., Funabiki, A., Furukawa, J., Yamauchi, T., Tokuji, Y., Nakazono, M., Shinohara, Y., Takamure, I. and Kato, K. (2015) The rice *RCNII* gene encodes β 1,2-xylosyltransferase and is required for plant responses to abiotic stresses and phytohormones. *Plant Sci.*, **236**, 75-88.
- 34) Maeda, M., Okamoto, N., Araki, N. and Kimura, Y. (2021) Purification, characterization, and gene expression of rice endo- β -*N*-Acetylglucosaminidase, endo-Os. *Front. Plant Sci.*, **12**, 647684. doi: 10.3389/fpls.2021.647684
- 35) Kimura, Y., Matsuo, S. and Takagi, S. (1998) Enzymatic properties of a Ginkgo biloba endo β -*N*-acetylglucosaminidase and *N*-glycan structures of storage glycoproteins in the seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 253-261.

- 36) Kimura, Y., Tokuda, T., Ohno, A., Tanaka, H. and Ishiguro, Y. (1998) Enzymatic properties of endo- β -*N*-acetylglucosaminidases from developing tomato fruits and soybean seed: substrate specificity of plant origin endoglycosidase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1381**, 27-36.
- 37) Nishiyama, A., Nishimoto, T. and Yamaguchi, H. (1991) A Novel endo- β -*N*-acetylglucosaminidase from shoots of *Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens*. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1155-1158.
- 38) Maeda, M., Ebara, N., Tani, M., Vavricka, C. J. and Kimura, Y. (2017) Occurrence of complex type free *N*-glycans with a single GlcNAc residue at the reducing termini in the fresh-water plant, *Egeria densa*. *Glycoconj. J.*, **34**, 229-240.
- 39) Yamamoto, K., Kadowaki, S., Watanabe, J. and Kumagai, H. (1994) Transglycosylation Activity of *Mucor Hiemalis* Endo- β -*N*-Acetylglucosaminidase Which Transfers Complex Oligosaccharides to the *N*-Acetylglucosamine Moieties of Peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **203**, 244-252
- 40) Yamamoto, K. and Takegawa, K. (1997) Transglycosylation Activity of Endoglycosidases and Its Application. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **9**, 339-354.
- 41) Umekawa, M., Huang, W., Li, B., Fujita, K., Ashida, H., Wang, L.-X. and Yamamoto, K. (2008) Mutants of *Mucor hiemalis* Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase Show Enhanced Transglycosylation and Glycosynthase-like Activities. *J. Biol. Chem.*, **283**, 4469-4479.
- 42) Umekawa, M., Li, C., Higashiyama, T., Huang, W., Ashida, H., Yamamoto, K. and Wang, L.-X. (2010) Efficient glycosynthase mutant derived from *Mucor hiemalis* endo-beta-*N*-acetylglucosaminidase capable of transferring oligosaccharide from both sugar oxazoline and natural *N*-glycan. *J. Biol. Chem.*, **285**, 511-521.
- 43) Takegawa, K., Yamaguchi, S., Kondo, A., Iwamoto, H., Nakoshi, M., Kato, I. and

- Iwahara, S. (1991) Transglycosylation activity of endo-beta-*N*-acetylglucosaminidase from *Arthrobacter protophormiae*. *Biochem. Int.*, **24**, 849-855.
- 44) Yin, j., Li, L., Shaw, N., Li, Y., Song, J.K., Zhang, W., Xia, C., Zhang, R., Joachimiak, A., Zhang, H.-C., Wang, L.-X., Liu, Z.-J. and Wang, P. (2009) Structural basis and catalytic mechanism for the dual functional endo-beta-*N*-acetylglucosaminidase A. *PLoS One*, **4**, e4658. doi: 10.1371/journal.pone.0004658.
- 45) Diepold, A., Li, G., Lennarz, W.J., Nürnberger, T. and Brunner, F. (2007) The Arabidopsis AtPNG1 gene encodes a peptide: *N*-glycanase. *Plant J.* **52**, 94-104.
- 46) Masahara-Negishi, Y., Hosomi, A., Della Mea, M., Serafini-Fracassini, D. and Suzuki, T. (2012) A plant peptide: *N*-glycanase orthologue facilitates glycoprotein ER-associated degradation in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, 1457-1462.
- 47) Berger, S., Menudier, A., Julien, R. and Karamanos, Y. (1995) Endo-*N*-acetyl- β -D glucosaminidase and peptide-*N*4-(*N*-acetylglucosaminyl) asparagine amidase activities during germination of *Raphanus sativus*. *Phytochemistry*, **39**, 481-487.
- 48) Yet, M.G. and Wold, F. (1988) Purification and characterization of two glycopeptide hydrolases from jack beans. *J. Biol. Chem.*, **263**, 118-122.
- 49) Kimura, Y., Matsuo, S., Tsurusaki, S., Kimura, M., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M. (2002) Subcellular localization of endo- β -*N*-acetylglucosaminidase and high-mannose type free *N*-glycans in plant cell. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1570**, 38-46.
- 50) Kimura, Y. (2007) Structural and functional features of plant glycoprotein glycans. In: Kamerling, H. (Ed.), *Comprehensive Glycoscience—From Chemistry to Systems Biology*, **3**, Elsevier, Oxford, pp.61-77.
- 51) Fischl, R.M., Stadlmann, J., Grass, J., Altmann, F. and L'eonard, R. (2011) The two endo-beta *N*-acetylglucosaminidase genes from *Arabidopsis thaliana* encode

- cytoplasmic enzymes controlling free *N*-glycan levels. *Plant Mol. Biol.*, **77**, 275-284.
- 52) Nonaka, S., Arai, C., Takayama, M., Matsukura, C. and Ezura, H. (2017) Efficient increase of γ -aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis. *Sci. Rep.*, **7**, 7057.
- 53) Fauser, F., Schiml, S. and Puchta, H. (2014) Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **79**, 348-359.
- 54) Ritter, A., Inigo, S., Fern'andez-Calvo, P., Heyndrickx, K.S., Dhondt, S., Shi, H., De Milde, L., Vanden Bossche, R., De Clercq, R., Eeckhout, D., Ron, M., Somers, D.E., Inz'e, D., Gevaert, K., De Jaeger, G., Vandepoele, K., Pauwels, L., Goossens, A. (2017) The transcriptional repressor complex FRS7-FRS12 regulates flowering time and growth in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.*, **8**, 15235.
- 55) Labuhn, M., Adams, F.F., Ng, M., Knoess, S., Schambach, A., Charpentier, E.M., Schwarzer, A., Mateo, J.L., Klusmann, J.H. and Heckl, D. (2018) Refined sgRNA efficacy prediction improves large- and small-scale CRISPR-Cas9 applications. *Nucleic Acids Res.*, **46**, 1375-1385.
- 56) Stemmer, M., Thumberger, T., Del Sol Keyer, M., Wittbrodt, J. and Mateo, J.L. (2015) CCTop: an intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool. *PLoS One*, **10**, e0124633.
- 57) Hood, E.E., Gelvin, S.B.G., Melchers, L.S. and Hoekema, A. (1993) New agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic. Res.*, **2**, 208-218.
- 58) Sun, H.J., Uchii, S., Watanabe, S. and Ezura, H. (2006) A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell Physiol.*, **47**, 426-431.

- 59) Bird, C.R., Smith, C.J., Ray, J.A., Moureau, P., Bevan, M.W., Bird, A.S., Hughes, S., Morris, P.C., Grierson, D. and Schuch, W. (1988) The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.*, **11**, 651-662.
- 60) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- 61) DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.
- 62) Natsuka, S. and Hase, S. (1998) Analysis of *N*- and *O*-glycans by pyridylamination. *Methods Mol. Biol.*, **76**, 101-113.
- 63) Maeda, M., Tani, M., Yoshiie, T., Vavricka, C.J. and Kimura, Y. (2016) Structural features of *N*-glycans linked to glycoproteins expressed in three kinds of water plants: predominant occurrence of the plant complex type *N*-glycans bearing Lewis a epitope. *Carbohydr. Res.*, **435**, 50-57.
- 64) Maeda, M., Kimura, M. and Kimura, Y. (2010) Intracellular and extracellular free *N*-glycans produced by plant cells: occurrence of unusual plant complex-type free *N*-glycans in extracellular spaces. *J. Biochem.*, **148**, 681-692.
- 65) Okamoto, N., Maeda, M., Yamamoto, C., Kodama, R., Sugimoto, K., Shinozaki, Y., Ezura, H. and Kimura, Y. (2022) Construction of tomato plants with suppressed endo- β -*N*-acetylglucosaminidase activity using CRISPR-Cas9 mediated genome editing. *Plant physiol. Biochem.*, **190**, 203-211
- 66) Kimura, M., Hara, T. and Kimura, Y. (2011) *N*-glycans linked to glycoproteins in edible beans (zatsu-mame): natural resources for bioactive oligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 155-158
- 67) Maeda, M., Takeda, N., Mano, A., Yamanishi, M., Kimura, M. and Kimura, Y. (2013)

- Large-scale preparation of Asn-glycopeptide carrying structurally homologous antigenic *N*-glycan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1269-1274.
- 68) Akira, S., Mamoru, K., Masakazu N., Yuko E., Hisham, RI., Lekh, R. J., Mujo K. and Takehiko Y. (1997) Occurrence of a sialylglycopeptide and free sialylglycans in hen's egg yolk. *Biochim. Biophys. Acta*, **1335**, 23-32.
- 69) Takegawa, K., Fujita, K., Fan, J. Q., Tabuchi, M., Tanaka, N., Kondo, A., Iwamoto, H., Kato, I., Lee, Y. C., and Iwahara, S. (1998) Enzymatic synthesis of a neoglycoconjugate by transglycosylation with *Arthrobacter* endo-beta-*N*-acetylglucosaminidase: a substrate for colorimetric detection of endo-beta-*N*-acetylglucosaminidase activity. *Anal. Biochem.*, **257**, 218-23.
- 70) Fan, J. Q., Takegawa, K., Iwahara, S., Kondo, A., Kato, I., Abeygunawardana, C. and Lee, Y.C.(1995) Enhanced transglycosylation activity of *Arthrobacter protophormiae* endo-beta-*N*-acetylglucosaminidase in media containing organic solvents. *J. Biol. Chem.*, **270**, 17723-17729.
- 71) Akaike, E. and Yamanoi, T., (2006) The Transglycosylation Activity of the Recombinant Endo- β -*N*-Acetylglucosaminidase from *Mucor hiemalis* in Media Containing Organic Solvents. *Trends Glycosci. and Glycotechnol.*, **18**, 63-71.
- 72) Abbott, D.W., Macauley, M.S., Vocadlo, D.J. and Boraston, AB. (2009) *Streptococcus pneumoniae* endohexosaminidase D, structural and mechanistic insight into substrate-assisted catalysis in family 85 glycoside hydrolases. *J. Biol. Chem.*, **284**, 11676-11689.
- 73) Fujita, K. and Takegawa, K. (2001) Tryptophan-216 is essential for the transglycosylation activity of endo-beta-*N*-acetylglucosaminidase A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**, 680-686.
- 74) Ling, Z., Suits, M. D.L., Bingham, R. J., Bruce, N. C., Davies, G. J., Fairbanks, A. J.,

- Moir, J.W.B. and Taylor, E. J. (2009) The X-ray Crystal Structure of an *Arthrobacter protophormiae* Endo- β -*N*-Acetylglucosaminidase Reveals a (β/α)₈ Catalytic Domain, Two Ancillary Domains and Active Site Residues Key for Transglycosylation Activity. *J. Mol. Biol.*, **389**, 1-9.
- 75) Katoh, T., Katayama, T., Tomabechi, Y., Nishikawa, Y., Kumada, J., Matsuzaki, Y. and Yamamoto, K. (2016) Generation of a Mutant *Mucor hiemalis* Endoglycosidase That Acts on Core-fucosylated *N*-Glycans. *J. Biol. Chem.*, **291**, 23305-23317
- 76) Yamamoto, K., Kadowaki, S., Fujisaki, M., Kumagai, H., and Tochikura, T. (1994). Novel specificities of *Mucor hiemalis* endo- β -*N*-acetylglucosaminidase acting complex asparagines-linked oligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 72-77.
- 77) Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R. and Schwede, T. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.*, **46**, W296-W303.
- 78) Bienert, S., Waterhouse, A., de Beer, T.A.P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L. and Schwede, T. (2017) The SWISS-MODEL Repository - new features and functionality. *Nucleic. Acids. Res.*, **45**, D313-D319.
- 79) Guex, N., Peitsch, M.C. and Schwede, T. (2009) Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis.*, **30**, S162-S173.
- 80) Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A.M., Gumienny, G., Haas, J. and Schwede, T. (2020) QMEANDisCo - distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics.*, **36**, 1765-1771.
- 81) Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L. and Schwede, T. (2017) Modeling protein

quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific Reports* 7.

参考論文

Okamoto, N., Maeda, M., Yamamoto, C., Kodama, R., Sugimoto, K., Shinozaki, Y., Ezura, H. and Kimura, Y. (2022) Construction of tomato plants with suppressed endo- β -N-acetylglucosaminidase activity using CRISPR-Cas9 mediated genome editing. *Plant physiol. Biochem.*, **190**, 203-211.

謝辞

本研究を遂行し、本論文をまとめるにあたり、全構成にわたり御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました岡山大学大学院 環境生命科学研究科 前田 恵 准教授に深甚なる謝意を表します。

本研究を遂行し、本論文をまとめるにあたり、終始有益なる御指導、御激励を頂きました岡山大学大学院 環境生命科学研究科 木村 吉伸 名誉教授に深い感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、有益な御指導を賜りました副指導教員である岡山大学大学院 環境生命科学研究科 守屋 央朗 教授に深い感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、有益な御指導を賜りました副指導教員である岡山大学大学院 環境生命科学研究科 田村 隆 教授に深い感謝の意を表します。

本研究のトマトのゲノム編集体の作製にあたり、有益な御指導を賜りました筑波大学 つくば機能植物イノベーション研究センター 江面 浩 教授、杉本 貢一 助教、東京農工大学 グローバルイノベーション研究院 篠崎 良仁 特任助教に深い感謝の意を表します。

本研究のトマトのゲノム編集体の作製にあたり、CRISPR/Cas9 のベクター構築について有益な御指導を賜りました国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 (NARO) 遠藤 真咲 博士に深く感謝致します。

本研究のトマトのゲノム編集体の作製にあたり、pDeCas9_Kan プラスミドを提供して下さったドイツカールスルーエ工科大学 Botanical Institute II Friedrich Fauser 博士、Simon Schiml 博士、Puchta Holger 教授および multi-gRNA 用ベクターを提供して下さったカリフォルニア大学 Department of Plant Biology and Genome Center Anne Britt 教授と Mily Ron 博士に深く感謝致します。

本研究のトマトのゲノム編集体の作製にあたり、アグロバクテリウムを介したトマトの形質転換について、有益な御指導を賜りました京都大学大学院 農学研究科 附属農場 中野 龍平 准教授に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、Endo-M を譲渡して下さった京都大学 大学院生命科学 研究科 加藤紀彦 准教授に深く感謝致します。

本研究を遂行し、本論文をまとめるにあたり、多大なる御協力頂きました岡山大学 農学部 糖鎖機能化学研究室 瀬尾 和子 さん、白井 佐保子 さん、山本 千晴 さん、児玉 怜央 さんに厚く御礼申し上げます。