



Title	エンドーβ-マンノシダーゼに関する研究
Author(s)	佐々木, 明子
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45126
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	佐々木 明子
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 18385 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科化学専攻
学 位 論 文 名	エンド- β -マンノシダーゼに関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 長谷 純宏 (副査) 教 授 相本 三郎 教 授 関口 清俊

論 文 内 容 の 要 旨

以前当研究室において自家不和合性に関与すると推定されるニホンナシ (*Pyrus pyrifolia*) の花柱に存在する S-RNase の糖鎖構造解析が行われた。ここで検出された糖鎖構造より *N*結合型糖鎖の Man β 1-4GlcNAc 結合をエンド型で加水分解する酵素の存在が示唆された。これはエンド- β -*N*アセチルグルコサミニダーゼのさらにもう 1 糖非還元末端側をエンド型で切り出す酵素であり、これまでに全く報告のされていない酵素である。このような基質特異性をもった新規酵素が存在するかどうかを正確に調べるために活性の検出を試みた。活性測定のためにこれに適した基質を選び、検出の系を決めた。また酵素の部分精製を行い、この酵素が実際に Man β 1-4GlcNAc 結合をエンド型で加水分解する酵素であることを明らかにした。

エンド- β -マンノシダーゼは新しいカテゴリーに属する酵素であり、その性質や構造についてはこれまでに全く知られていない。そこでエンド- β -マンノシダーゼのさらに詳細な性質や一次構造解析を行うことを目的として、本酵素の精製を行った。テッポウユリの花より各種クロマトグラフィーを用いて精製し、SDS-PAGE、Native-PAGE で単一のタンパク質を得た。本酵素について至適 pH 等の一般的な性質や植物中での存在部位を調べた。同時に、当研究室において精製酵素の部分アミノ酸配列から遺伝子の相同性の解析が行われ、シロイヌナズナのエンド- β -マンノシダーゼ遺伝子 (*AtEBM*) がクローニングされた (Ishimizu *et al.*)。この *AtEBM* の大腸菌発現酵素 (*AtEBM*) が得られたことから、*AtEBM* の性質についても解析を行った結果、ほぼ同一であることが明らかとなった。遺伝子相同性の解析から、エンド- β -マンノシダーゼは β -マンノシダーゼ、 β -マンナナーゼと相同性の低い新規酵素であることが示された。

エンド- β -マンノシダーゼの基質特異性を精製酵素を用いて明らかにした。天然に存在する基質に近い形である糖ペプチドへの基質特異性についても調べ、本酵素の *in vivo* での基質について考察した。また *AtEBM* の基質特異性についても調べた結果、テッポウユリ由来の精製酵素とほぼ同一であることが明らかとなった。

加水分解酵素の性質の一つとして糖転移反応や縮合反応が知られているため、本酵素の糖転移活性についても調べた。エンド- β -マンノシダーゼは化学合成が困難とされる Man β -結合を加水分解する酵素であることから、逆反応が進行するならば合成が可能となり、糖鎖工学の面での利用が期待される。調べた結果、転移活性を有していることが明らかとなった。そこで種々のドナー基質やアクセプター基質を用いて糖転移反応を行った。得られた転移生成物の立体選択性と結合位置特異性について調べるため、エキソグリコシダーゼ消化による生成物の解析、スミス分解、メ

チル化分析 (R. Geyer *et al.*) 等より調べた結果、主に $\beta 1-4$ 結合を合成することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

佐々木明子君提出の論文は、エンド- β -マンノシダーゼ活性の発見と酵素の精製、諸性質の解明を行ったものである。本研究では、エンド- β -マンノシダーゼをテッポウユリより各種クロマトグラフィーを行い精製した。精製酵素は Native-PAGE で単一のタンパク質として検出され、同じ位置に活性が検出された。また 3 本のペプチドからなる酵素であることも明らかとなった。本酵素の至適 pH は 5 で、酸性側では安定な酵素であり、金属イオンは要求しなかった。Man $\alpha 1-3$ Man $\alpha 1-6$ Man $\beta 1-4$ GlcNAc $\beta 1-4$ GlcNAc-PA を基質として用いたときには Man $\alpha 1-3$ Man $\alpha 1-6$ Man と GlcNAc $\beta 1-4$ GlcNAc-PA のみが検出され、非還元末端側のマンノース残基数の異なる糖鎖、還元末端が異なる糖ペプチドや遊離の糖鎖でも Man $\beta 1-4$ GlcNAc 結合が水解された。これらの事より、本酵素は Man $\beta 1-4$ GlcNAc をエンド型で加水分解する酵素であることが明らかとなった。本酵素の糖転移活性を調べたところ、GlcNAc $\beta 1-4$ GlcNAc-PA や pNP β -GlcNAc にマンノースやマンノオリゴ糖が転移し、エンド- β -マンノシダーゼを用いた Man $\beta 1-4$ 結合の合成が可能であることが明らかとなった。シロイヌナズナのエンド- β -マンノシダーゼ遺伝子のリコンビナント酵素は、テッポウユリの酵素とほぼ同一の性質を持っていた。遺伝子相同性の解析から、エンド- β -マンノシダーゼは、他の β -マンノース水解酵素と活性の面でも、また遺伝子の面からも異なる新しいカテゴリーの酵素であることが示された。これは糖鎖水解酵素の生化学における重要な成果であり、糖鎖の役割の解析に大きく寄与するものである。よって、佐々木君提出の論文は博士（理学）の学位論文として十分価値有るものと認める。