



Title	Unravelling the N-linked Glycan Structures of Selected Ustilaginomycete Yeasts and Prospects of Glycan Information on Diversity, Biology and Biotechnology
Author(s)	Flores, Jose Danila Ronilo
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/82201
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (FLORES RONILO JOSE DANILA)

Title

Unravelling the N-linked Glycan Structures of Selected Ustilaginomycete Yeasts and Prospects of Glycan Information on Diversity, Biology and Biotechnology (選択した Ustilaginomycete 酵母の N 結合型糖鎖構造の解明と、多様性・生物学・バイオテクノロジーに関する糖鎖情報の展望)

Abstract of Thesis

Chapter 1 General Introduction

Glycosylation is one of the most dominant post translational modifications known. In fact, majority of the proteins in eukaryotic organisms are glycosylated (Agard and Bertozzi, 2009; Grobe et al., 2002). In the fungal kingdom, ascomycetous yeasts, e.g. *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* to name a few, are known to produce larger hypermannosylated glycans. On the other hand, Ustilaginomycotina is a subphylum under the basidiomycetous yeasts phylum. Some of its members are considered to be important in biotechnology and medicine. *Sympodiomyopsis paphiopedili*, *Pseudozyma antarctica* and *Malassezia furfur* are examples of ustilaginomycetous yeasts belonging to three different classes and whose N-linked glycans have never been intensively studied. With the void in knowledge on the glycosylation of these yeasts vis-à-vis their biotechnological and medical importance, it is warranted and at the same time interesting to elucidate the N-linked glycan structures of these yeasts. This dissertation comprises the first reports on the N-linked glycans of these ustilaginomycetous yeasts.

Chapter 2 The Neutral N-linked Glycans of the Ustilaginomycete Yeast *Sympodiomyopsis paphiopedili*

The glycoprotein from *S. paphiopedili* was prepared firstly by extraction using citrate buffer followed by release using hydrazine and then 2-aminopyridine (PA) tagging. The prepared PA-glycans were analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS). Glycan linkages were verified using glycosidase digestion analyses. Neutral N-linked glycans ranging from $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ to $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ in length were detected using HPLC and MS analyses. The most abundant neutral N-linked glycan structure in this species was found to be the $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}6(\text{Man}\alpha 1\text{-}3)\text{Man}\alpha 1\text{-}6(\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}3)\text{Man}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}$ (M8A). Furthermore,

$\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}6(\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}3)\text{Man}\alpha 1\text{-}6(\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}3)\text{Man}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}$ (M9A) and the $\text{Man}\alpha 1\text{-}6(\text{Man}\alpha 1\text{-}3)\text{Man}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}$ (M3B) were the second and third most abundant neutral N-linked glycans, respectively. On the other hand, the effect of the combination of glycoprotein extraction methods and the subsequent glycan release methods on the detection of N-linked glycan peaks was also examined to avoid underrepresentation of N-linked glycan structures. It was also determined that the citrate buffer extraction-hydrazinolysis method gave the highest peak yields as compared with the other methods. Here we report the first account of the structural analysis of the neutral N-linked glycan of *S. paphiopedili* and the comparison of the effect of combinations of glycoprotein extraction methods and glycan release methods in glycan analysis.

Chapter 3 The Neutral N-linked Glycans of the Ustilaginomycete Yeasts *Pseudozyma antarctica* and *Malassezia furfur*

N-linked glycans of *P. antarctica* and *M. furfur* were prepared, digested with glycosidase, and structurally analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS) as in chapter 2.

Analyses revealed the presence of neutral *N*-linked glycans ranging in length from Man₃GlcNAc₂-PA to Man₉GlcNAc₂-PA. The two species shared the M8A structure as the most abundant neutral *N*-linked glycan. The second and third most abundant neutral *N*-linked glycans for *P. antarctica* were M9A and M5A, respectively. In the case of *M. furfur*, Man α 1–2Man 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 (M7A) was the second most abundant, while both M8A and M9A were tied for the third most abundant. The presence of putative galactose (Gal) residues in the hypermannosylated neutral *N*-linked glycans.

Chapter 4 Prospects

The elucidation of the structures of predominant neutral *N*-linked glycans opened up an avenue for the appreciation of the vastness of this major post-translational modification. *N*-linked glycan information of the representative Ustilaginomycetous yeasts opens up a range of potential use and interest in the biological roles of these glycans. The detected high mannose glycans ranging from Man_{3,9}GlcNAc₂-PA is very interesting in light of diversity since other yeasts such as the Ascomycetous yeasts are known to produce larger glycans. This also opens up an opportunity to further investigate the roles of these smaller-sized *N*-linked glycans in the biology of the Ustilaginomycete yeasts studied. The discovery of novel *N*-linked glycan structures raises the possibility that there are enzymes that can be discovered which may be used for biotechnological and industrial purposes. The detection of galactose residues in the *N*-linked glycans of *M. furfur* is a breakthrough and may be a target of future work on their role in pathogenicity and as therapeutic targets.

Chapter 5 Conclusion

The *N*-linked glycans of *S. paphiopedili*, *P. antarctica* and *M. furfur* are of the high mannose type ranging from Man₃GlcNAc₂-PA to Man₉GlcNAc₂-PA in size and comprises the first ever glycan structural elucidation in the three yeasts with the M8A as the common most dominant structure. Various novel structures were also discovered in the three yeasts. The combination of citrate buffer extraction and hydrazine release was proven to not cause underrepresentation but also yields the highest as compared to other methods. Gal was also detected as part of the *N*-linked glycan of *M. furfur*. Lastly, the structural elucidation of *N*-glycans can serve as a jumping off point for future studies in biotechnology, biology and classification.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (FLORES RONILO JOSE DANILA)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	藤山和仁
	副 査	教授	大政健史
	副 査	教授	本田孝祐
論文審査の結果の要旨			
第一章 概略紹介			
<p>糖鎖修飾は、既知の最も優先的な翻訳後修飾の 1 つである。事実、多くの真核生物のタンパク質は糖鎖修飾されている (Agard and Bertozzi, 2009; Grobe et al, 2002)。真菌界において、子嚢菌酵母、例えば <i>Saccharomyces cerevisiae</i> と <i>Candida albicans</i> をその例として挙げると、より大きなハイパーマンノシル化糖鎖を生成することが知られている。一方で、Ustilaginomycotina (クロボキン亜門) は担子菌酵母門の下の亜門である。そのメンバーのいくつかは、バイオテクノロジーと医学において重要であると考えられている。<i>Symposiomycopsis paphiopedili</i>、<i>Pseudozyma antarctica</i> および <i>Malassezia furfur</i> は代表的なクロボキン亜門酵母で、3 つの異なる網に属しているが、これらの N 結合型糖鎖は全く研究されていない。これらの酵母はバイオテクノロジーおよび医学的見地において重要であるが、これら糖鎖修飾に関する知識が欠けているため、これらの酵母の N-結合型糖鎖構造は解明されるべきであると同時に興味深い。本論文は、これらのクロボキン亜門酵母の N 結合型糖鎖に関する最初の報告である。</p>			
第二章 クロボキン亜門酵母 <i>Symposiomycopsis paphiopedili</i> の中性 N 結合型糖鎖			
<p>まず、<i>S. paphiopedili</i> からクエン酸緩衝液を用いて糖たんぱく質を抽出した。抽出した糖たんぱく質からヒドラジン分解により糖鎖を遊離した後および 2-アミノピリジン (PA) を用いた蛍光標識を行い、PA 化糖鎖を調製した。調製した PA 化糖鎖を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と質量分析 (MS) を用いて分析した。糖鎖の結合様式は、グリコシダーゼ消化分析により確認した。HPLC および MS 分析の結果、Man₃-9GlcNAc₂-PA の構造を持つ中性 N 結合型糖鎖が検出された。含有量は多いものから Manα1-2Manα1-6 (Manα1-3)Manα1-6 (Manα1-2Manα1-2Manα1-3)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc (M8A)、Manα1-2Manα1-6 (Manα1-2Manα1-3)Manα1-6 (Manα1-2Manα1-2Manα1-3)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc (M9A)、Manα1-6 (Manα1-3)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc (M3B) の順であった。一方、糖タンパク質の抽出法と、糖鎖遊離法の組合せの N 結合型糖鎖の収率に及ぼす効果を調査した。その結果、クエン酸緩衝液抽出-ヒドラジン分解法の組合せが、他の方法と比較して最も高い収率を与えることを示した。本章の結果は、<i>S. paphiopedili</i> の中性 N 結合型糖鎖構造解析の最初の報告であり、糖鎖解析における糖タンパク質抽出法と糖鎖遊離法組合せの効果に関して報告している。</p>			
第三章 クロボキン亜門酵母 <i>Pseudozyma antarctica</i> と <i>Malassezia furfur</i> の中性 N 結合型糖鎖			
<p><i>P. antarctica</i> および <i>M. furfur</i> の N 結合型糖鎖を調製し、グリコシダーゼで消化し、第二章と同様に HPLC と MS 分析法を使用して糖鎖構造を解析した。Man₃-9GlcNAc₂-PA の中性 N 結合糖鎖が存在することを示した。両方の酵母において、M8A 構造が最も豊富な中性 N 結合糖鎖であった。<i>P. antarctica</i> の場合は、M8A について M9A と M5A の含有量が多かった。<i>M. furfur</i> の場合は M8A の次に、Manα1-2Manα1-6 (Manα1-3)Manα1-6 (Manα1-2Manα1-3)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc (M7A) の含有量が多く、M9A と M5A がほぼ同等の含有量を示し、3 番目に多い糖鎖構造であった。さらに、<i>M. furfur</i> においてハイパーマンノシル化された中性 N 結合糖鎖にガラクトース (Gal) 残基が存在することが推定された。</p>			

第四章 展望

一般的に、主要な中性N結合型糖鎖の構造を解明することは、翻訳後修飾の生理機能の理解を広げることになる。本論文では、代表的なクロボキン亜門酵母の新規なN結合型糖鎖情報を得ることができ、これらの糖鎖の産業応用の可能性と生物学的役割の解明の基盤情報となった。子囊菌酵母などの他の酵母はより大きな糖鎖を生産することが知られているので、本研究で検出されたMan3-9GlcNAc2-PAの構造を持つ、比較的小さなサイズの高マンノース糖鎖は、多様性の観点から非常に興味深く、クロボキン亜門酵母において、特異的な生物学的役割が期待され、非常に興味深い。本研究で発見された新規N結合型糖鎖構造は、糖鎖工学上、非常に有用な酵素の存在を示唆している。*M. furfur*において、N結合型糖鎖上に付加したガラクトース残基を検出できたことは画期的なものであり、病原性への関与の解明およびその知見を土台とした治療薬開発としての将来的な研究のターゲットとなりうる。

第五章 結論

本研究において *S. paphiopedili*、*P. antarctica* および *M. furfur* のN結合型糖鎖が初めて解析され、Man3-9GlcNAc2-PAの構造を持つ高マンノース型からなり、最も含有量の多い構造としてM8Aを共通して持つことが明らかとなった。これらの酵母において、その他にも新規な糖鎖構造が見出された。クエン酸緩衝液とヒドラジン分解の組合せが、他の方法と比べてN結合型糖鎖の調製法として、最も高い収率を与えることが明らかとなった。Gal残基が *M. furfur* のN結合型糖鎖の一部として検出された。最後に、N結合型糖鎖の構造解析は、バイオテクノロジー、生物学、そして分類における今後の研究のための、非常に有用なツールであると言える。

以上のように、本論文は、これまで研究が進んでいなかった担子菌酵母のバイオテクノロジーおよび医学的見地において重要であるN結合型糖鎖について解析した。子囊菌酵母とは異なり、Man3-9GlcNAc2-PAの中性N結合糖鎖が存在し、主たる構造がMan8GlcNAc2-PA(M8A)であり、Gal残基が *Malassezia furfur* のN結合型糖鎖の一部として存在することを示し、担子菌酵母の糖鎖修飾に関する新規知見を確立している。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。