

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

植物endo- β -N-acetylglucosaminidase (ENGase) とpeptide: N-glycanase(PNGase)

誌名	応用糖質科学：日本応用糖質科学会誌 = Bulletin of applied glycoscience
ISSN	21856427
著者名	前田, 恵 木村, 吉伸
発行元	日本応用糖質科学会
巻/号	3巻1号
巻号補足	
掲載ページ	p. 77-86
発行年月	2013年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat





マンノシダーゼ
研究の最前線

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
—植物 *endo-β-N-acetylglucosaminidase*
(*ENGase*) と *peptide : N-glycanase*
(*PNGase*)—



1. はじめに

真核生物が産生する 60% 程度のタンパク質がグリコシル化を受けた糖タンパク質であることはすでに周知の事実である。しかしながら、分泌型タンパク質に限ってみるならば、それらのほとんどはこの糖タンパク質の範疇に入る。哺乳動物と高等植物では、それら糖タンパク質に結合するオリゴ糖鎖の構造特性にさまざまな違いがみられるが、それらの差異はゴルジ装置中で機能する糖鎖代謝酵素群 (糖転移酵素と加水分解酵素) の基質特異性の違い、あるいはゲノム中にコードされる糖鎖代謝酵素群の遺伝子そのものの違いが反映されたものである。糖タンパク質糖鎖のうちアスパラギン結合型糖鎖 (*N*-グリカン) に注目すると、それらの生合成およびプロセッシング機構には真核生物に共通するコンテキストが存在し、構造多様性の中にも共通のトリマンノシルコア構造 ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$, *Man*,

前田 恵 (まえだ めぐみ)¹
木村吉伸 (きむら よしのぶ)²
¹ 岡山大学大学院環境生命科学研究科 WTT 特任助教
² 岡山大学大学院環境生命科学研究科 教授

マンノース; *GlcNAc*, *N*-アセチルグルコサミン; *Asn*, アスパラギン) がみられるなど、高等植物と哺乳動物とで構造特性の比較が可能である。哺乳動物と高等植物が産生する *N*-グリカンの代表的な構造を図 1 に示している。哺乳動物の複合型構造には極めて高い多様性があるので¹⁾, わずかの例を挙げるにとどめるが、基本的には, (1) 非還元末端にシアル酸残基が存在する場合が多い, (2) ガラクトース (*Gal*) 残基は β 1-4 結合で *GlcNAc* 残基に結合する, (3) 還元末端 *GlcNAc* 残基へのフコース (*Fuc*) 残基の結合が α 1-6 結合である, (4) バイセクト *GlcNAc* 残基が β 1-4 *Man* 残基に結合する場合がある, (5) 2 本鎖構造以外に 3~5 本鎖構造が存在する等々が哺乳動物 *N*-グリカンの構造的特徴である²⁾。一方, 植物 *N*-グリカンには (1) コア構造中の β -*Man* 残基へキシロース (*Xyl*) 残基が β 1-2 結合し, 還元末端 *GlcNAc* 残基へ *Fuc* 残基が α 1-3 結合する, (2) 非還元末端側にルイス a (*Lewis a*, *Le^a*) 抗原 ($\text{Gal}\beta$ 1-3

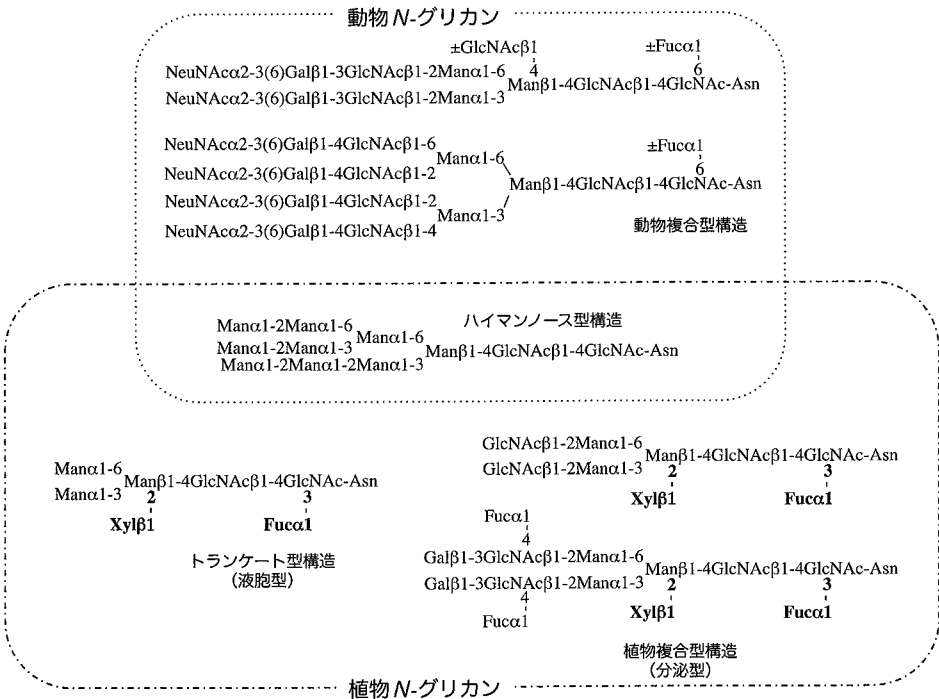


図 1. 動物 *N*-グリカンと植物 *N*-グリカンの構造例
ハイマンノース型構造は動植物で共通に存在する。NeuNAc, *N*-アセチルノイラミン酸 (シアル酸)。

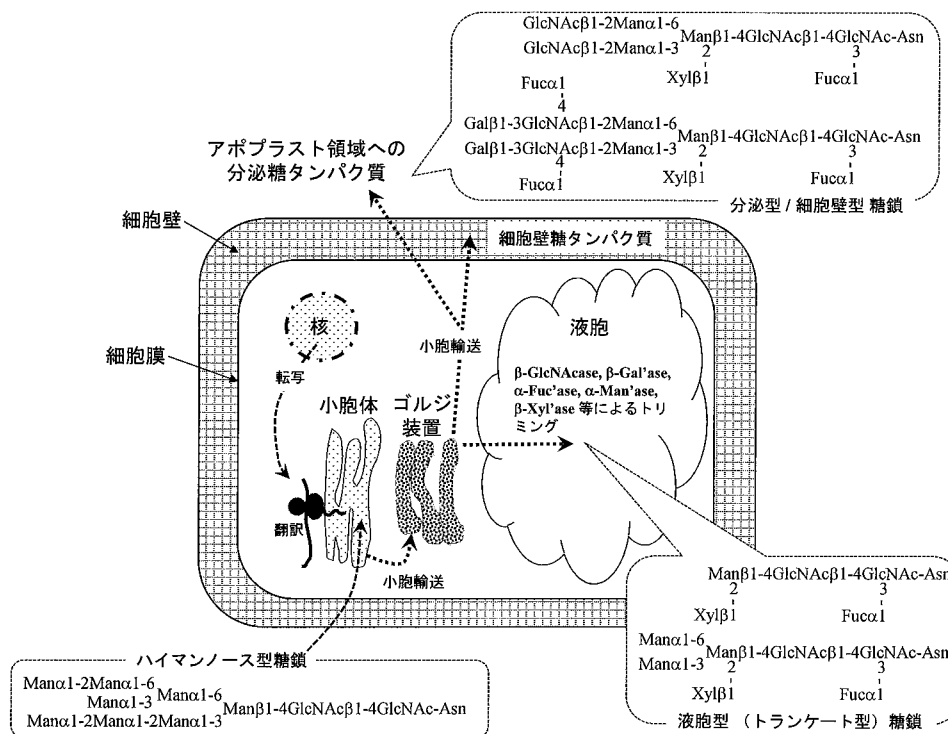


図2. 植物糖タンパク質のプロセッシングと分泌・輸送

植物糖タンパク質の糖鎖構造は、その糖タンパク質が分泌型タンパク質か液胞（プロテインボディー）に輸送された貯蔵タンパク質であることを示唆している。α-Man'ase, α-mannosidase; α-Fuc'ase, α-fucosidase; β-Gal'ase, β-galactosidase; β-GlcNAc'ase, β-N-acetylglucosaminidase; β-Xyl'ase, β-xylosidase.

(Fucα1-4)GlcNAc) が存在する場合があります、Gal 残基は β1-3 結合で GlcNAc 残基に結合する、(3) 3~5 本鎖構造やシアル酸を有する構造は見出されていない等の特徴がある²⁻⁷⁾。

哺乳動物と高等植物の *N*-グリカン構造に共通点と相違点が存在する事実は、当然のことながら、これら *N*-グリカンの代謝分解の過程に関与する加水分解酵素の機能特性と遺伝子構造にも共通点と相違点が生じていることを意味する⁸⁾。また、糖タンパク質から生成したと思われる遊離型糖鎖（遊離 *N*-グリカン）が、哺乳動物細胞と同じように植物細胞からも見出されている。特にこれら遊離型糖鎖の生理機能については、1990 年代前半に果実熟成や胚軸伸長を促進させるシグナル分子として機能する仮説が提唱され、植物生理に関わる糖鎖機能に興味を持たれた時期もあった^{9,10)}。しかしながら、この推定機能を検証する分子生物学的なアプローチはなされておらず、遊離型糖鎖の生理活性は依然として仮説のままとどまっている。その要因として、植物 *N*-グリカンの生合成や分解に関わる酵素の機能特性解析や遺伝子同定があまり進んでいなかったことが挙げられる。しかしながら、この 10 年の間に植物が産生する糖タンパク質糖鎖関連の酵素群についても遺伝子同定や遺伝子発現を制御した植物体の構築が進展しており、植物 *N*-グリカンの機能解析ツールも整ってきた。本総説では、植物糖タンパク質の品質管理系や代謝分解系で機能する糖鎖遊離酵素 (Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase (EN-Gase) と Peptide : *N*-glycanase (PNGase)) に主な焦点を当てて、植物酵素の機能特性や遺伝子構造、そして遊離型糖

鎖の代謝機構について概説する。哺乳動物における糖鎖代謝との比較により、植物に特徴的な糖鎖代謝のコンテキストを浮かび上がらせることで、植物の糖鎖代謝が持つ生理的意義や糖鎖機能について議論してみたい。

2. 植物 *N*-グリカンの生合成とプロセッシング機構

植物遊離型糖鎖の生成機構や構造特性を概説する前に、まず植物糖タンパク質糖鎖の生合成とプロセッシング機構を簡単に紹介させていただく。動物細胞と同様に、*N*-グリカンは小胞体中のドリコールリン酸サイクルでグルコース (Glc) 残基を 3 分子有するハイマンノース型糖鎖 (Glc₃Man₉GlcNAc₂) が組み立てられた後、伸長中のポリペプチド鎖に存在するグリコシル化コンセンサス配列 (-Asn-X-Ser/Thr/Cys-, Cys はまれ) に転移される。その後、*N*-グリカンの非還元末端に位置する α1-3 Glc 残基を認識するシャペロン分子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中で進行し、フォールディングの完了とともに Glc 残基と 1 分子の Man 残基の除去が行われる。ここまでの過程は動植物の間で共通すると考えられているが、正常にフォールディングした糖タンパク質がゴルジ装置へ配送された後の糖鎖修飾反応に違いが生じる。すなわち、高等植物ではゴルジ装置中で、β1-2 Xyl, α1-3 Fuc 残基の付加と Le^a 抗原の組み立てが行われ、植物特徴的な *N*-グリカン構造が構築されることになる^{6,7)}。

細胞膜あるいは細胞外（細胞壁、アポプラスト領域）へ

輸送される糖タンパク質は、ゴルジ装置中で形成された植物複合型糖鎖 (図2) を保ったまま、それぞれの場所でタンパク質機能を発揮する^{5,6)}。この Le^a 抗原は、動物細胞では細胞間認識などで重要なリガンドとして機能しており、事実、この糖鎖は血液型を決める抗原の1つである¹¹⁾。しかしながら、Le^a 抗原含有 *N*-グリカンの植物における生理的意義は全く不明であり、Le^a 抗原を有する *N*-グリカンが検出されない植物 (例えば、トマト) も存在する^{12,13)}。一方、液胞あるいはプロテインボディー中で機能する (あるいは貯蔵される) 糖タンパク質の *N*-グリカンは、奇妙なことに、いったん形成された複合型糖鎖が数種のグリコシダーゼによりトリミングを受け、パウチマンノース型あるいはトランケート型と呼ばれる比較的短い構造 (図2) へと収束する⁹⁾。実際、種子貯蔵糖タンパク質は、このトランケート型構造の *N*-グリカンを有する割合が圧倒的に高い^{3,4,14-16)}。この一見無駄にみえる糖鎖構造変化の生理的意義についても不明のままである。以上のように、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不明点が多いものの、その糖鎖構造からそれら糖タンパク質が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群であるか、あるいは細胞膜上、細胞壁、アポプラスト等の細胞外スペースで機能するタンパク質であるかの判別は可能である (図2)。

3. 植物細胞の小胞体関連分解 (ERAD) で生じる遊離 *N*-グリカンと糖鎖遊離酵素

本来なら、その名前が示すようにタンパク質に結合すべき *N*-グリカンが、遊離型糖鎖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は、1990年代から報告されてきている (図3)¹⁷⁻²³⁾。もっとも、これら遊離 *N*-グリカンは、1980年代に動物細胞からも見出されていたので、遊離型糖鎖の存在が植物に特異的な現象ではなかった²⁴⁻²⁷⁾。しかしながら、これらの遊離 *N*-グリカンのうち、還元末端に GlcNAc 1 残基を有する (GN1 型) ハイマンノース型構造の糖鎖が、小胞体中で機能するタンパク質の品質管理 (ERQC) 系において、ミスフォールドした新生糖タンパク質から生じたものであることが明らかになったのは、比較的最近のことである²⁸⁻³⁰⁾。この ERQC 機構において、新生糖タンパク質に結合する Glc 残基含有のハイマンノース型糖鎖とシャペロン分子 (カルネキシン、カルレティキュリン) との相互作用が糖タンパク質フォールディングの嚆矢となり、小胞体 α -グルコシダーゼ (α -Glc'ase), α -マンノシダーゼ (α -Man'ase), そして EDEM (ER-degradation enhancement mannosidase-like protein) 等が織りなす微妙な糖鎖構造の遷移が、ミスフォールド糖タンパク質とフォールド糖タンパク質の命運を左右することになる。動物小胞体中における糖タンパク質フォールディング機構の詳細については、すでに多くの優れた総説があるので、それらを参考にさせていただきたい³¹⁻³³⁾。

さて、植物の小胞体中でのフォールディングに成功した糖タンパク質は、前述のように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糖鎖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) 等の涙ぐましい努力にも関わらず、適切なコンフォメーションへのフォールディングに失敗した糖タンパク質は、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、毒性を持つようになる。そのため、これらミスフォールドタンパク質は小胞体中から排除されなければならない存在となるが、多くの場合、小胞体から細胞質への逆輸送に際しても *N*-グリカンが重要な機能を果たしている。動物細胞の場合、ミスフォールド糖タンパク質の見極めと細胞質への排出には、EDEM や OS9 (ハイマンノース型糖鎖認識タンパク質) が重要な役割を担っていることが明らかになりつつあるが、これらに対応する植物タンパク質の同定および機能解析についてはあまり進んでいない。最近、Hüttner ら³⁴⁾が OS9 (酵母では YOS9) のホモログ遺伝子 (MRH domain-containing protein) をアラビドプシスゲノム中に見出し、YOS9 欠損酵母中でその遺伝子を発現させることで、ERAD 機構が補完されることを見出している。彼らは、植物細胞でも動物や酵母と同様のコンテキストで分泌型タンパク質の品質管理機構が機能していると推測しているが、このアラビドプシス OS9 様タンパク質が、植物細胞中で実際にミスフォールド糖タンパク質の糖鎖を認識して ERAD 機構に関わっているか否かは明らかでない。いずれにせよ、植物小胞体中でミスフォールド糖タンパク質のマーキングと識別に関与するタンパク質分子群の機能特性は、植物細胞における糖タンパク質の品質管理機構を理解する上でも明確に把握しておく必要があり、生化学的、分子生物学的両面からの解析が待たれる。

細胞質へ搬送されたミスフォールド糖タンパク質に待ち受ける運命は、ユビキチン化修飾を受けた後のプロテアソームでの分解である。動物細胞では、ミスフォールド糖タンパク質の 26S プロテアソームへの搬入には結合するハイマンノース型糖鎖が障害となるため、先だって糖鎖除去が必要になる、というシナリオが受け入れられている。

ミスフォールド糖タンパク質は、まず細胞質 PNGase (cytosolic PNGase, cPNGase) による脱グリコシル化を受けハイマンノース型糖鎖が遊離する。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のに対して、遊離型糖鎖の方は、細胞質 endo- β -*N*-acetylglucosaminidase (ENGase) により遊離型糖鎖中のキトビオース (GlcNAc β 1-4GlcNAc) 間が加水分解される²⁸⁻³⁰⁾。ENGase は変性糖タンパク質や糖ペプチドからもハイマンノース型糖鎖を遊離させることができるが、現在のところ、ENGase は cPNGase により生成した GN2 型 (還元末端側に GlcNAc β 1-4GlcNAc を持つ構造) 遊離型糖鎖の還元末端のトリミングだけを司ると理解されている。動物細胞におけるハイマンノース型遊離糖鎖の分解機序において、

細胞質 α -Man'ase が, GN2 型糖鎖に比べ, ENGase の作用で生じる GN1 型糖鎖に対して速やかに作用することが証明されている^{35,36)}。そして, この事実が ENGase のいささか拍子抜けするような細胞内機能の根拠の1つとなっている。

一方, 植物においても, 検出されるほとんどのハイマンノース型構造の遊離型糖鎖は GN1 型構造を有しているので, 動物細胞と同じように ENGase が作用していることは明らかである。しかしながら, それらが動物細胞でのシナリオと同じように, cPNGase の後に続く ENGase の作用により生じたものであるか, あるいは変性糖タンパク質に ENGase が直接作用して生じたものであるかを証明する実験はなされていない。以下では, 植物から検出されている遊離型糖鎖の構造特性, 植物 PNGase および ENGase の機能特性等をそれぞれ検証していくことで, 植物における遊離 *N*-グリカンの生成機構と潜在的な生理機能について議論してみたい。

3.1 植物から見出される遊離 *N*-グリカンの構造特性

植物細胞で機能するミスフォールド糖タンパク質からの糖鎖遊離機構については不明な点が残されているが, その分子機構を理解する上でも, 植物体内で生成している遊離型糖鎖の構造を把握しておくことは重要である。これまで, 様々な植物組織 (果実, 実生胚軸, 登熟種子, 培養細胞等) から遊離 *N*-グリカンが見出されてきており, それらの構造解析に関する報告も多い^{17-23,37,38)}。図3に示すように, 植物からはハイマンノース型と植物複合型の2種類の遊離 *N*-グリカンが見出されている。ハイマンノース型糖鎖については, それらのほとんどが GN1 型構造, 植物複合型あるいはトランケート型糖鎖については GN2 型構造がほとんどである。この事実から, ハイマンノース型遊離糖鎖の生成には ENGase の関与が, そして植物複合型糖鎖の生成には PNGase のみが作用していることが明らかである。後述するように, 植物 ENGase は Man α 1-2Man α 1-3Man β 1-構造ユニットを有するハイマンノース型糖鎖に対して作用するが, 還元末端 GlcNAc 残基に Fuc 残基が α 1-3 結合する植物複合型糖鎖には作用しない。それゆえ, 複合型 (トランケート型) の遊離糖鎖が GN2 型構造を有することは合理的な説明がつく。ハイマンノース型遊離糖鎖のほとんどが Man α 1-2Man α 1-3Man β 1-ユニットを持つ GN1 型構造であることは動物細胞の遊離型糖鎖の構造特性と類似しており, 動物細胞における ERAD 機構のアナロジーからも, これらハイマンノース型遊離糖鎖がミスフォールド糖タンパク質から植物 ERAD 機構で生成したものと考えられる。後述するようにアラビドプシスの2つの ENGase 遺伝子をノックアウトすると, PNGase により生成する GN2 型構造の遊離型糖鎖のみが検出されるようになるので, 動物細胞と同様に GN1 型ハイマンノース型遊離糖鎖は, ミスフォールド糖タンパク質から cPNGase と ENGase の協奏により生成されたものと考えてよさそうである (図4)^{39,40)}。

ある (図4)^{39,40)}。遊離ハイマンノース型糖鎖からは Man9' 構造 (Man α 9GlcNAc β 1) も検出されるが, M5'~M7' 構造の存在量が多く, このことは小胞体中におけるミスフォールド糖タンパク質が ER Man'ase I や EDEM⁴¹⁾ によりマーキングを受けた結果を反映しているのかも知れない。ただし, 動物細胞で発見された EDEM 分子のオロソログは植物でも見出されているが, それらの発見タンパク質についての機能解析は行われておらず, α -Man'ase 活性の有無も未だ不明である。

一方, これまで報告されてきた植物複合型 (あるいはトランケート型) 構造の遊離 *N*-グリカンは GN2 型構造を有するものがほとんどである。植物 *N*-グリカンのプロセシング機構を考慮すると, これらの糖鎖を結合していたタンパク質は, 小胞体中でのタンパク質フォールディングとゴルジ装置での糖鎖プロセシングを完了して, それぞれの細胞部位で, それぞれのタンパク質機能を発揮していたはずである。したがって, 植物複合型遊離糖鎖は細胞壁や細胞外スペースで, トランケート型遊離糖鎖は液胞 (プロテインボディー) 中で, それぞれ PNGase の作用により, 老朽

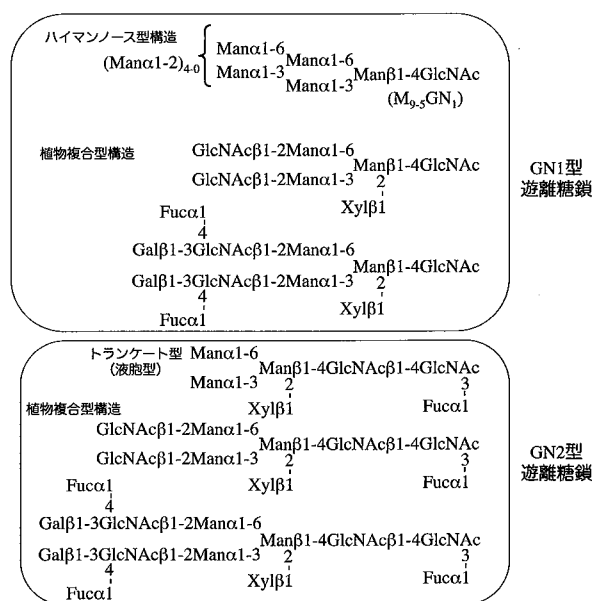


図3. 植物にみられる遊離 *N*-グリカン

GN1 型, 還元末端側に GlcNAc 残基が 1 残基; GN2 型, 還元末端側に *N*-アセチルキトビオース (GlcNAc β 1-4GlcNAc) が存在する

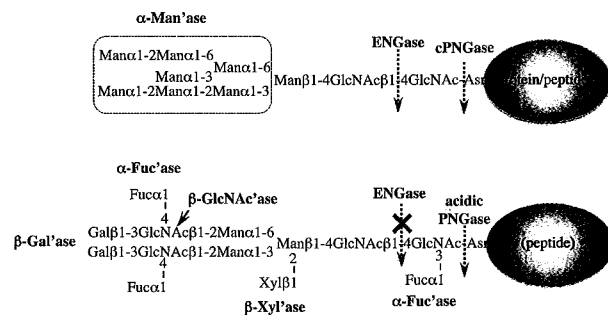


図4. 植物 *N*-グリカンの代謝に関わる酵素群とそれらの作用点

α -Man'ase, α -mannosidase; α -Fuc'ase, α -fucosidase; β -Gal'ase, β -galactosidase; β -GlcNAc'ase, β -*N*-acetylglucosaminidase; β -Xyl'ase, β -xylosidase; ENGase, endo- β -*N*-acetylglucosaminidase; cPNGase, cytosolic peptide: *N*-glycanase.

化(役目を終えた)糖タンパク質から生成したことが考えられる。後述するように、植物細胞には、cPNGaseとは異なり酸性領域で機能するPNGase (acidic PNGase, aPNGase)が存在しており、この植物特徴的なaPNGaseが複合型(トランケート型)遊離N-グリカンの生成に関与しているものと思われる。さらに、複合型構造とトランケート型構造の2種類の遊離型糖鎖が存在することは、aPNGaseにも細胞壁周辺と液胞(プロテインボディー)で機能する2種類の分子が存在することを示唆している。

以上のように、これまで植物から検出されてきた遊離N-グリカンの化学構造は、それぞれの由来や関与する酵素についての明確な(あるいは確からしい)情報を与えてくれる。ところが最近、これまで動植物で明らかにされてきた糖鎖代謝機構では合理的な説明がつかない複合型遊離N-グリカンがイネ培養細胞の培養液中から検出された(図3)⁴²⁾。これらの遊離型糖鎖は奇妙なことに還元末端側にGN1型構造を持ちながら、非還元末端側には植物複合型構造が存在する。すなわち、ENGaseの作用を受けていると同時にゴルジ装置を経て糖鎖プロセッシングが完了している構造である。上述のように、ENGaseは細胞質でのミスフォールド糖タンパク質からの糖鎖遊離機構に関与するので、GN1型構造であることは、これらの遊離型糖鎖が細胞質で生じたものであることを意味する。一方、非還元末端側に複合型構造を持つことは、ゴルジ装置中での糖鎖プロセッシングを受け細胞外へ配送・分泌されたことを意味している。したがって、還元末端側にGN1型構造を持ち、非還元末端側に複合型構造を持つこれらの遊離糖鎖は、既知の糖鎖代謝機構では説明できないパラドックスを抱えていることになる。先に述べたように、植物ENGaseは α 1-3結合Fuc残基を持つ植物複合型糖鎖には作用しないし、植物複合型糖鎖に作用するようなENGaseは、これまで動植物のみならず微生物からも見出されていない。もちろん、 α 1-3結合Fuc残基を持たない複合型糖鎖にのみENGaseが作用したとも考えられるが、 α 1-3結合Fuc残基を持たない複合型糖鎖はイネ培養細胞が産生する糖タンパク質にはほとんどみられない⁴³⁾。ただし、この奇妙な構造の遊離N-グリカンは、これまでイネ培養細胞の培養液から見出されているだけなので、人為的に脱分化させた植物組織でみられる特殊現象なのか、あるいは分化・成長している通常の植物組織でも生じている普遍現象なのかを把握する必要がある。最近、培養動物細胞系においてもGN1型の動物複合型遊離N-グリカンが見出されている⁴⁴⁾。したがって、GN1型の複合型遊離糖鎖の存在は、植物に特異的な現象ではない。しかしながら、動物糖タンパク質糖鎖では、還元末端GlcNAcに結合するFuc残基は α 1-6結合しており、この構造の複合型糖鎖に作用するENGaseは存在するので、動物の場合はENGaseの関与も否定できない。

筆者らが見出した新奇なGN1型構造を持つ植物複合型遊離糖鎖の生成機構とその意義については、植物の糖鎖遊

離酵素(PNGaseとENGase)の基質特性や遺伝子構造を紹介したあと、それら酵素の機能特性を踏まえつつ、再度議論してみたい。

3.2 植物由来のPNGaseとENGase

出芽酵母や哺乳動物の細胞質で機能するcPNGaseについては、機能特性、遺伝子構造等に関しての鈴木らによる一連の見事な研究があり、この酵素が細胞質中でミスフォールド糖タンパク質からハイマノース型糖鎖を遊離させていることは、広く受け入れられている²⁸⁻³⁰⁾。動物cPNGaseは至適pHを中性領域に有しており、ハイマノース型と動物複合型いずれの糖鎖構造を有する糖ペプチド/糖タンパク質からも糖鎖部分を遊離させ、アスパラギン残基はアスパラギン酸残基へと変換される。ミスフォールド糖タンパク質の脱グリコシル化に際しては、まず、ミスフォールド糖タンパク質がレクチン-ユビキチンリガーゼFbx2によりユビキチン化される。そして、HR23B(酵母ではRad23p)を介して26Sプロテアソームと結合するcPNGaseがユビキチン化された糖タンパク質基質を脱グリコシル化することで、プロテアソーム分解をスムーズに行きさせると考えられている³⁰⁾。

一方、植物のcPNGaseについては、動物cPNGaseの遺伝子情報をもとにアラビドプシスのゲノム情報からオロソログ遺伝子が同定され、その候補遺伝子をcPNGase欠損酵母中で発現させることで、植物細胞でもPNGaseがミスフォールド糖タンパク質の脱グリコシル化に関与することが示された^{45,46)}。しかしながら不思議なことに、植物cPNGaseは、動物cPNGaseや酵母cPNGaseが作用する糖ペプチド基質には作用せず、*in vitro*における酵素活性は未だ証明されていない。植物cPNGaseによる脱グリコシル化反応には、動物酵素ではみられないミスフォールド糖タンパク質のポリペプチド構造認識、あるいは補助的な機能を担う別のタンパク質が必要なのかもしれない。さらに、植物cPNGaseの脱グリコシル化機構とリンクする細胞質タンパク質群の実態も明らかにされるべき課題である。筆者らは、cPNGase遺伝子(Ar5g49570)をノックアウトしたアラビドプシス中で生成している遊離型糖鎖の構造解析を行ったところ、cPNGase発現を抑制してもENGaseの作用を受けたGN1型遊離糖鎖が生成していることを確認している(未発表データ)。この事実、ミスフォールド糖タンパク質からの脱グリコシル化はcPNGaseとENGaseが補完しあっている可能性を示唆しているとも考えられる。しかしながら、植物にはcPNGaseとは遺伝子を異にするaPNGaseが存在することから、このaPNGaseがミスフォールド糖タンパク質の脱グリコシル化に関与する可能性も完全には否定できないため、筆者らの観察についての正しい解釈は、二種PNGase遺伝子のダブルノックアウト植物体の構築を待たなければならない。

ところで、現在ではcPNGaseの持つ生理機能の重要性が強調されているが、酵素発見史の観点からすれば、

PNGaseは植物(アーモンド種子)から最初に精製され、詳細な基質特異性解析が行われた経緯がある^{47,48)}。筆者らも植物遊離型糖鎖の機能解析の一環として、大豆からPNGaseを精製し、その酵素学的性質を明らかにしている⁴⁹⁾。しかしながら、これら植物aPNGaseは動物のcPNGaseとは異なり、(1)酸性領域に至適pHを有し、(2)ハイマンノース型および植物特異的複合型構造の糖鎖を有する糖ペプチドに対して作用するが、(3)糖タンパク質基質にはほとんど作用しない。実際、植物PNGase(PNGase A)を利用して糖鎖遊離を行う場合も、最初にタンパク質をペプシン等のプロテアーゼでポリペプチドに分解する必要がある。したがって、この植物PNGaseは、細胞質(pHは中性領域)で起こるミスフォールド糖タンパク質からの糖鎖遊離ではなく、細胞壁領域や液胞などの酸性環境下において、老朽化(役目を終えた)タンパク質のプロテアーゼ分解により生じた糖ペプチド断片から糖鎖を遊離させる役割を担っていることが考えられる。最近、筆者らはトマトaPNGase遺伝子の同定と酵母を用いた組換えタンパク質発現系の構築に成功した⁵⁰⁾。aPNGase遺伝子は植物や糸状菌(キノコ類も含めて)で保存されているが、動物細胞からは対応するオロソログは見出されない⁵⁰⁾、動物では必要とされない植物独自の生理的意義を持つ糖鎖遊離酵素だと考えられる。aPNGaseの植物生理的意義を明らかにするためにも、ノックアウトあるいはノックダウン植物体の構築とそこで発現される遊離型糖鎖や糖ペプチドの化学構造解析が待たれる。さらに、植物特異的なaPNGaseは液胞および細胞壁領域で機能していることが推定されるが、局在場所を異にする数種の分子種が存在するならば、

その局在を制御している分子構造の違いにも興味を持たれる。

ミスフォールドタンパク質の ERAD に関わるもう 1 つの糖鎖代謝酵素として知られる *endo*- β -*N*-acetylglucosaminidase は、*N*-グリカン中のキトビオース間を加水分解するエンドグリコシダーゼ (ENGase) である。微生物由来の ENGase は糖鎖構造解析やタンパク質の *N*-グリコシル化状態を解析するツールとして汎用されてきており⁵¹⁾、最近では糸状菌 ENGase の糖転移活性を利用した糖タンパク質糖鎖のリモデリング技術への応用も進んでいる^{52,53)}。動植物細胞にも ENGase が存在していることは以前から報告されていたが、酵素の遺伝子解析が進んだのは今世紀になってからである。哺乳動物からの ENGase については、最初に加藤らがニワトリ輸卵管から単一精製に成功し⁵⁴⁾、次いで鈴木ら⁵⁵⁾によってヒト ENGase の遺伝子構造が明らかにされている。動物 ENGase は、糖転移活性を有する糸状菌 (*Mucor*) ENGase (*Endo-M*) と同じ Family 85 に属し、放線菌 ENGase (*Endo-H*) をはじめとする原核生物の Family 18 ENGase とはタンパク質構造や遺伝子構造を異にしている^{53,54)}。

一方、筆者らはイネ培養細胞から植物としては初めて ENGase の精製に成功し、その内部アミノ酸配列を基にして遺伝子を同定し、大腸菌による発現系を構築した。その後、トマト、アラビドプシスについてもそれぞれの ENGase 遺伝子を同定した結果、植物 ENGase 間では、N-末端側領域に高い相同性がみられる一方、C 末端側領域は相同性が低いことが明らかになった (図 5)^{39,56,57}。植物 (イネ) ENGase は分子量がおおよそ 70 kDa、pH 6.5 付近に至適

Endo-AT1	-----MSVAP-----PAPSPPPDPKTPSTPISFPIKTLQDLKRSYFDS-----FHYFPNRSSVPLR-RNIGALSDFRLLVCHDMKGGVY	76
Endo-AT2	-----MPKSNDDDVQSEAVPLDLVPSLPLSIFPIKALQDLKRSYFDS-----FHFFQFNRSVPFR-RNSCDLPNRRVLVCHDMKGGVY	81
Endo-LE	MTFNFRSYFKSHHPQTLASLKSILNSLFTLLSKFNPMANQNSVSPDDPDLKSEPSVYPLKTLLEELRSYFDS-----FHFFPSKASVKLPPYAANELPNRRLVCHDMKGGVY	117
Endo-OS	-----MLPSAAPAAAAAGEEEEGRBRWEPFPDASQAPPISYPIITLAAALASRAYLSEAGNFPFLPNRASSPR-----AAPLPNRRILACHDRGGRY	91

Endo-AT1	DDKWVQCGGNAGYAIWDWYLMDFVYFVSHSLVTLPPPCWNTAHRHGKVLGTFITIEWDEGKATCKELLATKESAOHYAERLAELAAALGFDGWLNIENVIDEVQPNLMVFVSHLTK	196
Endo-AT2	DDKWVQCGENEAGFAIWHWYLMDFVYFVSHSLVTIPPCWNTAHRHGKVLGTFITIEWDEGKATCKEMATKESAOHYAERLAELAAALGFDGWLNIENIDEVQPNMKFVSHLKK	201
Endo-LE	DDKWQCGGNNDGAYAIWHWYLDVYFVSHSLVTLPPPCWNTAHRHGKVLGTFITIEWDEGKHAINKLSPKNSAOHYAERLSLAAALGFDGWLNVMEVSLDVGGQPNLKEFVSHLTQ	237
Endo-OS	DDAAQCGGHPDAGAYAIWHWYLDVYFVSHSLVTLPPPCWNAALHGKVLGTFITIEWEGAIECEMLATEASAOHYAERLTLAAYLGFDGWLNIENVKDIFQIDNLKEFVSHLTK	211

Endo-AT1	VHMSVPGGLVIWYDSVTIVDGLHAWQDLTENNKFIDICDGFIMYTKENYKPKASAEATDRKRYDVMYMGIDVFRGTYGGGQWTANVALDLLKSSNVSAIIFAPGWYETEQQPDFYT	316
Endo-AT2	VLHLSTPGALVWYDSVTIVRGNLWQDLTLNKPFPDLCDGFIIMYTKESYPNLSAEVAGDRKFDVMYMGIDVFRGTYGGGQWTANVALDLLKRNINSAIIFAPGWYETQAPNPHF	321
Endo-LE	SMHSLVPGSLVWYDSVTIDGKLSWQDLNEKNKPFDDISDGFIMYTKENYKPKLSAEVADRKFDVMYMGIDVFRGTYGGGQWTNLDLIDKRNINSAIIFAPGWYETKQPLHFDQ	357
Endo-OS	TMHAAPVGLSVIWDYATTKGALDWQNLNENYKPFDDLCGLFSNYTKWAKYQDESVAVAGERKRYDVMYMGIDVYGRNTFGGGQWTNVALDLLKDDVSAIIFAPGWYETKQPNPRT	331

Endo-AT1	AQNKWWSLVEKSWGIVQTYQVLPFYSDFNQGLGSHSTLGGKRLSEAPWYNISQSLQPLFEFNEGRL-----	384
Endo-AT2	AQNKWWSLVEKSWGIVQTYQVLPFYSDFNQGGYHVSLEGRQLSDSPWYNISQSLQPLFEFNEGDKDITQVTVDQEGKWFVSEQLNNYYEYDSAREASFNGGGNIIVFRGLKGDA	441
Endo-LE	AQNRWWLVEKSWDSIQNYQPLPFYSDFDGGHYQFTVDGKQNTTPWNISQSPQFPLRFSESGTG-----GNLKVAVDJKEPSYNGGNIITFNGLTEGDF	456
Endo-OS	AQNRWWLQVESWGLQSYPKQLPFYSDFDGGHYQVYSIEGVKYAPWDNISQSPQFPMKYAGDRG-----LQTVINFEDEPYSGGNCVTVGSLQNGE	427

Endo-AT1	-----SETIQVSKDRKSELILLSHSSPSEQKSMLMPNSES-----INRFQDMFLPCLLTQSKQTTSG-WTVHETNLV-LDGHILTETISAFCS-----RPDDLTEET	474
Endo-AT2	YFTTRLKPHQLQSSPITITSYVSKDETSNLGILLSFSSPSEIKSLIVAPEDP-----IRRFDDMSLQCLITSVQTVSE-WTVHEASLV-MDGHILTETISAFY-----RPE-----NST	546
Endo-LE	QFSARLFEGKLLLAADSPVHFITYSVKNSGSLGLSLFETSAATEQRSVLLASGDSLTLTMSRFVRHFDWIMPHRVTKLESESS-WVIOQSSITS-MEGYTLTKIHAKYKLRPEWHKSES	574
Endo-OS	IFLSEQLFNGGLSMEGYSVYFVSKADERSLGLSLDLSGNNSESSILIADDTAFAFRKKQ-HRYKGSYVKADKAEPHTPVQHNWVYKATILPSAGFLTGINIVTCKMTTSGDTPET	546

Endo-AT1	-----LEYFALLGHSHIK-----SQQAKVYPLASWWEAAHHVKFVPGDS-GSKTLSCKLHWRLKHPEDESVPFKYNNYAENLSSESYRPRKVMEEPRSEKVFGLTAHVDAY	578
Endo-AT2	NT-----AEFVALLGHSHIKVQHNPELILPASWWEAAHHVKFVPGNS-SKSLRLVKLBWRQD-LEDSAFRYNNYAENKSLTLDRPKLEKPSCTLLGTAHVPAV	653
Endo-LE	QKGKTMALS-----PSEYHVLGHAIN-----SLTLNSGFPPSTSWLVEGNFTKLSSNSNSGSRKLNVLKDLKGLG-KGTHPFPKYNYIVK-KOPNLLTAESNGSLQVHVEYLGVTLVEAY	683
Endo-OS	DGDGSSFEAGANRSLHMHASLGHYSIR-----NTEETEFPAPRSWVEGDIYSNWSGSD-ESKLASLKISWELN-KQQAQPMKYNNYVEKILTADSN-----AKAPRIFLGVASVQVF	651

Endo-AT1	YVSEMVGSDVKGVRFVQQTGCGDGSWQELDASPNLVVEVERILQVYVYGPYLKDSKDD	639
Endo-AT2	YVAELVVESDVKAVRFMQACGDSALGKLEALNLVDLEG-----LSVNHD-----	701
Endo-LE	YVSDLVPSTGTSVYFIIQVCSMGDSLQKLEEPSLDDLVDQGS-----	726
Endo-OS	YVSDLVPSEVTLAKFFIQCGRDQSCQGLHECPKFLHVPVDSAM-----	696

Endo-AT, アラビドプシス ENGase; Endo-LE, トマトENGase; Endo-OS, イネENGase

図 5. 植物 ENGase のアミノ酸配列と相同性

pHを有しており、動物や糸状菌由来の ENGase と同じく Family 85 に属し、糖転移活性を有する⁵⁸⁾。

Man α 1-2Man α 1-3Man β 1-構造ユニットを有するハイマンノース型糖鎖に対して効率よく作用するが、ハイマンノース型構造の母核構造である Man₅GlcNAc₂ (Man α 1-2Man α 1-3Man ユニットを欠く) に対しては反応速度が著しく低下し、植物複合型 (トランケート型) 糖鎖には全く作用しない。このことから、植物 ENGase も細胞質で起こるミスフォールド糖タンパク質 (Man α 1-2Man α 1-3Man ユニット含有のハイマンノース型糖鎖を持つ) の分解系に関与していることがうかがえる。事実、蛍光抗体染色法や超遠心分離を用いた細胞小器官分画法により、植物 ENGase が細胞質に局在していることが示されている^{37,56)}。しかしながら、カボチャ実生胚軸を用いた細胞小器官分画法においては、小胞体画分にもわずかに ENGase 活性が検出される³⁷⁾ことから、植物 ENGase は小胞体中にもわずかに分布しているか、あるいは細胞質側で小胞体と緩やかな相互作用している可能性がある。もし、そうだとすると ENGase により生じた GN1 型糖鎖も小胞体近傍に存在することになる。上述したとおり、植物中からのハイマンノース型遊離糖鎖はそれらのほとんどが GN1 型構造であり、その存在量はマイクロモル濃度に達することからも、ENGase が極めて効率よくハイマンノース型遊離糖鎖の生成に関与しているかがわかる。植物細胞内で高濃度存在するこれらのハイマンノース型遊離糖鎖の機能を明らかにする研究の一環として、筆者らは、トマト果実をモデルとして果実熟成段階 (Mature Green (緑熟期), Breaker (催熟期), Pink (桃熟期), Red (完熟期)) における遊離型糖鎖生成量、ENGase 活性、および遺伝子発現等を比較解析した³⁸⁾。その結果、(1) 遊離型糖鎖は果実熟成に伴い上昇し (完熟期では緑熟期の5倍量)、特に成熟後期の遊離型糖鎖には Man₆GlcNAc₁ や Man₈GlcNAc₁ 構造の蓄積がみられること (図6)、(2) 酵素活性や遺伝子転写には大きな変動はみられない⁵⁷⁾ことがわかった。そして、この事実からは (1) ENGase は果実熟成期を通してコンスタントに発現されミスフォールドタンパク質の分解系に関わっていること、(2) 果実熟成にともなって基質糖タンパク質、つまりミスフォールド糖タンパク質量が増加しているか、あるいは遊離型糖鎖の分解に関与する α -Man'ase 活性 (あるいは発現) が低下していることが考えられる³⁸⁾。いずれにせよ、催熟期から桃熟期にかけてハイマンノース型遊離糖鎖が増加することが、この時

期の植物生理に遊離型糖鎖がなんらかの機能を担っているのではないかと考える根拠の1つとなっている。

前述のように、1990年代には、遊離 *N*-グリカンが果実熟成や胚軸伸長を促進させるシグナル分子として機能するとの仮説が提出されたが、依然として仮説のままで留まっている。そこで筆者らは、ENGase 遺伝子をノックアウトあるいはノックダウンさせた植物体を構築し、遊離型糖鎖の発現抑制を試みた。アラビドプシスには2つの ENGase 候補遺伝子が存在し、シングルノックアウト体からダブルノックアウト体を構築することではじめて ENGase 活性が完全消失したことから、両者ともに ENGase をコードしていることがわかった。ENGase ダブルノックアウト植物と野生株の間では、少なくとも人工気象器内での栽培条件において、形態的には顕著な差異がみられず、発芽率や生長速度についても顕著な違いはみられない^{39,40)}。一方、ダブルノックアウト体に発現されている遊離 *N*-グリカンの構造解析を行ったところ、野生株と同じようにハイマンノース型遊離糖鎖が生成されてはいたが、ENGase 活性の消失を反映してそれらは全て GN2 型構造を有していた。この結果は、植物も哺乳動物と同じように、ENGase の作用に先立って cPNGase が遊離型糖鎖を生成し、それらハイマンノース型遊離糖鎖が ENGase により GN1 型構造に変換されていることを示唆している³⁹⁾。また、ENGase 遺伝子をノックダウンしたトマトについても同様な結果を得ており、ENGase 活性の有無は結実や果実熟成には目立った影響を与えない (未発表データ)。このように、ENGase 活性が欠損しても PNGase 活性により遊離型糖鎖が生成されるため、植物の分化・成長における遊離型糖鎖の機能を把握するためには、ENGase、cPNGase、そして aPNGase 遺伝子をトリプルノックアウトした植物体を構築することが必要となる。筆者らも、現在、糖鎖遊離酵素遺伝子をトリプルノックアウト/ダウンした植物体の作成を急いでいるのだが、その一方で ENGase のレーゾンデートルは一体何であろうか、という疑問が生じる。ハイマンノース型遊離糖鎖の α -Man'ase による分解を促進させるために還元末端 GlcNAc 残基を除去するのが機能だとしても、その活性を欠損した植物も健全に生育するので、必要不可欠な機能のようにも思えない。

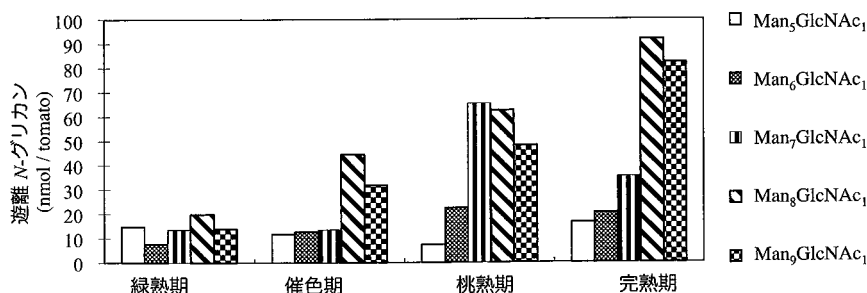


図6. トマト果実熟成に伴う遊離 *N*-グリカンの生成量変動と構造分布

4. 遊離 *N*-グリカンの小胞体/ゴルジ装置へ移行する可能性と生理機能

ここで、ENGase により生成した遊離型糖鎖の機能を考える足がかりとして、植物細胞外へ分泌された GN1 型構造の複合型遊離糖鎖について、その生成機構について考えてみたい。前述したように、筆者らは、植物細胞培養液中に、GN1 型構造の複合型遊離 *N*-グリカンを見出している。この構造は、GN2 型構造の植物複合型遊離 *N*-グリカンから、これまでに知られていない新規の ENGase の作用により生成したとも考えられるが、植物 (イネ) 培養細胞のホモジネートや培養液からは、そのような ENGase 活性は検出されない。とはいえ、この構造は生成過程のどこかで ENGase の作用を受けていることを示していると同時に、この糖鎖がゴルジ装置でのプロセッシングを受けた後、細胞外に分泌されたことを示している。これらの事実を踏まえると、GN1 型構造の複合型遊離 *N*-グリカンの生成機構に関して以下のユニークな仮説が浮かび上がる (図 7)。まず、(1) 細胞質でミスフォールド糖タンパク質から cPNGase により生成した糖鎖が、ENGase により GN1 型構造となる。次いで、(2) これらの遊離型糖鎖はトランスポーターを經由して再び小胞体に取り込まれ、フォールド糖タンパク質とともにゴルジ装置へ輸送される。そして、(3) ゴルジ装置中で糖タンパク質糖鎖と同じようにプロセッシングを受けたあと、分泌型糖タンパク質と一緒に細胞外へ分泌される⁴²⁾。それでは、小胞体に取り込まれる意義はなんだろうか? 筆者らは以前に、タチナタマメ α -Man'ase をモデル糖タンパク質として用い、結合するハイマンノース型糖鎖あるいは遊離型糖鎖が変性酵素の再フォール

ディングに際して重要な機能 (4 次構造構築促進) を有することを報告した^{59,60)}。また、山口らは Asn-糖鎖がシャペロン機能を有することを証明している⁶¹⁾。しかしながら、これら糖鎖がシャペロン様機能を持つとしても、タンパク質のフォールディング機構が作動している場所に遊離型糖鎖が存在しう機会がないと思われていたのも、*in vivo* 機能としての意義に疑問が残った。もし、筆者らが推定しているように ENGase により生じた GN1 型構造の遊離型糖鎖が小胞体へ再び輸送されるとすると、遊離型糖鎖はタンパク質フォールディングの場に存在することが可能になりそれらのシャペロン様機能が現実味を帯びてくる。一方、小胞体に取り込まれたハイマンノース型遊離糖鎖がフォールド糖タンパク質とともにゴルジ装置でプロセッシングを受けるとすると、フォールド糖タンパク質糖鎖のプロセッシングとの間で一見無意味な競合が起こるようになるが、見方を変えると、この競合ノイズにより *N*-グリカン構造にみられる不均一性 (多様性) の創出が可能になる。さらに、糖質やポリエンチレングリコールがタンパク質構造を安定化させることが知られているので、小胞体中に存在する遊離型糖鎖は、フォールディングが不完全なタンパク質群の凝集を抑制することも可能である。

以上述べた遊離型糖鎖の小胞体におけるシャペロン様機能は、あくまで、筆者らが見出した GN1 型構造の植物複合型糖鎖の構造を根拠にした仮説であり、細胞質で生じた遊離ハイマンノース型糖鎖が小胞体に再輸送されることが可能か否かについての実験的根拠はない。しかしながら、細胞免疫系においては、細胞質でプロテアソーム分解を受けたウイルスタンパク質由来のペプチドが ABC トランスポーター (TAP) により小胞体に取り込まれ、Class I 型

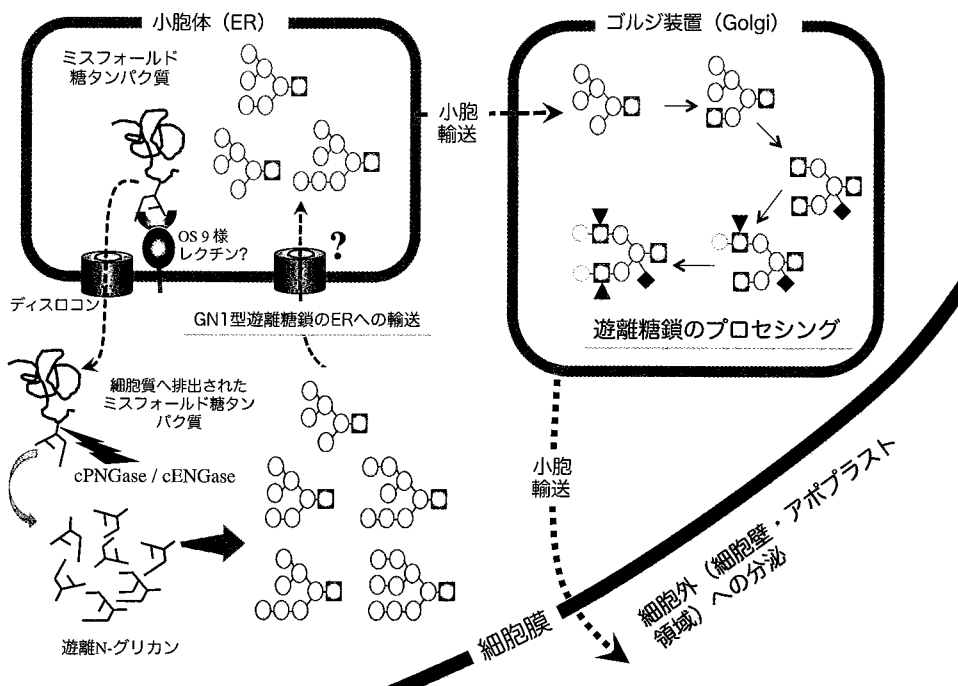


図 7. GN1 型の植物複合型遊離糖鎖の仮説生成機構

細胞質で生成した GN1 型遊離型糖鎖の小胞体への逆輸送に関わるトランスポーターについては、あくまで仮想的な存在である。

MHC と結合することが知られているので⁶²⁾、細胞質で生じたオリゴ糖鎖が小胞体へ逆輸送されることがあっても不思議なことではない。いずれにせよ、小胞体中でのタンパク質フォールディングに関わる遊離型糖鎖機能の大胆な仮説を立証するためには、(1) GN1 型の複合型遊離糖鎖の存在性を証明するとともに、(2) 遊離型糖鎖の小胞体への輸送に関与するトランスポーターの存在を証明しなければならない。さらに、(3) 遊離 *N*-グリカンの生成を完全に抑制した植物体あるいはトランスポーター遺伝子を破壊した植物体等の構築が必要となるであろう。

5. おわりに

本総説では、植物糖タンパク質糖鎖、特に *N*-グリカンに焦点を当てて、ミスフォールド糖タンパク質や老朽化糖タンパク質 (あるいはそこから派生する糖ペプチド) から糖鎖を遊離させる酵素 (PNGase, ENGase) の機能特性と生成する遊離型糖鎖の構造特性について概説した。植物糖タンパク質糖鎖の代謝に関わる酵素群の機能については、アラビドプシスやイネなどのゲノム構造が明らかになったことから、植物試料からのネイティブ酵素の精製や機能解析をスキップして、動物や微生物の遺伝子情報を基にした分子生物学的な手法で機能特性が解析されたものも多い。そして、ミスフォールド糖タンパク質からの脱グリコシル化機構やその意義についても、動物細胞で明らかになった (なりつつある) 事実に基づいて、そのアナロジーからの議論が多いようにも思える。しかしながら、植物糖タンパク質には植物特異的な構造の複合型 *N*-グリカンが存在し、それらの脱グリコシル化においては、動物にはみられないタイプの酸性 PNGase が働いている。さらには、還元末端が GN1 型構造の複合型遊離糖鎖が生成、分泌されており、植物には動物とは少し異なるコンテキストでの *N*-グリカン生合成や分解機構が備わっていることを示している。植物 *N*-グリカンの生合成と分解に関係する酵素群の遺伝子同定もほぼ完了しつつある現在、これらの糖鎖遺伝子の発現制御や過剰発現を施したトランスジェニック植物の構築と生化学的な解析が相まって、植物に特異的な糖鎖機能が明らかになることが期待される。

文献

- 1) A. Kobata: Glycoprotein Glycan Structures. in *Comprehensive Glycoscience*, Vol. 1, J.P. Kamerling, G.-J. Boons, Y.C. Lee, A. Suzuki, N. Taniguchi and A.G.J. Voragen, eds., Elsevier, Amsterdam, pp. 61-78 (2007).
- 2) H. Ishihara, N. Takahashi, S. Oguri and S. Tejima: Complete structure of the carbohydrate moiety of stem bromelain. An application of the almond glycopeptidase for structural studies of glycopeptides. *J. Biol. Chem.*, **254**, 10715-10719 (1979).
- 3) S. Hase, S. Koyama, H. Daiyasu, H. Takemoto, S. Hara, Y. Kobayashi, Y. Kyogoku and T. Ikenaka: Structure of a sugar chain of a protease inhibitor from barbados pride (*Caesalpinia pulcherrima* Sw.) seeds. *J. Biochem.*, **100**, 1-10 (1986).
- 4) Y. Kimura, S. Hase, Y. Kobayashi, Y. Kyogoku, T. Ikenaka and G. Funatsu: Structures of sugar chains of ricin D. *J. Biochem.*, **103**, 944-949 (1988).
- 5) A.-C. Fichette-Lainé, V. Gomord, M. Cabanes, J.-C. Michalski, M.S. Macary, B. Foucher, B. Cavellier, C. Hawes, P. Lerouge and L. Faye: *N*-Glycans harboring the Lewis a epitope are expressed at the surface of plant cells. *Plant J.*, **12**, 1411-1417 (1997).
- 6) P. Lerouge, M. Cabanes-Macheteau, C. Rayon, A.-C. Fichette-Lainé, V. Gomord and L. Faye: *N*-Glycoprotein biosynthesis in plants: Recent developments and future trends. *Plant Mol. Biol.*, **38**, 31-48 (1998).
- 7) V. Gomord, A.-C. Fichette, L. Menu-Bouaouiche, C. Saint-Jore-Dupas, C. Plasson, D. Michaud and L. Faye: Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnol. J.*, **8**, 564-587 (2010).
- 8) 石水 毅: 植物 *N*-型糖鎖の分解機構. 生化学, **83**, 1087-1099 (2011).
- 9) B. Priem and K.C. Gross: Mannosyl- and xylosyl-containing glycans promote tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit ripening. *Plant Physiol.*, **98**, 399-401 (1992).
- 10) H. Yunovitz and K.C. Gross: Delay of tomato fruit ripening by an oligosaccharide *N*-glycan. Interactions with IAA, galactose and lectins. *Physiol. Plant*, **90**, 152-156 (1994).
- 11) W.T.J. Morgan and W.M. Watkins: Unraveling the biochemical basis of blood group ABO and Lewis antigenic specificity. *Glycoconj. J.*, **17**, 501-530 (2000).
- 12) R. Zeleny, F. Altman and W. Praznik: Structural characterization of the *N*-linked oligosaccharides from tomato fruit. *Phytochemistry*, **51**, 199-210 (1999).
- 13) K. Nakamura, M. Inoue and Y. Kimura: Predominant occurrence of truncated complex type *N*-glycans among glycoproteins in mature-red tomato. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 221-223 (2009).
- 14) Y. Kimura, S. Hase, Y. Kobayashi, Y. Kyogoku, T. Ikenaka and G. Funatsu: Structures of sugar chains of *Ricinus communis* agglutinin. *Biochim. Biophys. Acta*, **966**, 248-256 (1988).
- 15) Y. Kimura, Y. Minami, T. Tokuda, S. Nakajima, S. Takagi and G. Funatsu: Primary structures of *N*-linked oligosaccharides of momordin-a, a ribosome-inactivating protein from *Momordica charantia* seeds. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2031-2036 (1991).
- 16) O. Yamaguchi, M. Kimura, M. Araki, N. Yamasaki, Y. Kimura, S. Nakajima and S. Takagi: Chemical structures of two subunits, A-subunit and B-subunit, of galactose-specific isolectin from *Erythrina variegata* seeds. *J. Biochem.*, **114**, 560-566 (1993).
- 17) B. Priem, J.S. Kwan, J.M. Wieruszkeski, G. Strecker, H. Nazih and H. Morvan: Isolation and characterization of free glycans of the oligomannoside type from the extracellular medium of a plant cell suspension. *Glycoconj. J.*, **7**, 121-132 (1990).
- 18) B. Priem, R. Gitti, C.A. Bush and K.C. Gross: Structure of ten free *N*-glycans in ripening tomato fruit. *Plant Physiol.*, **102**, 445-458 (1993).
- 19) C. Faugeron, S. Lhernould, E. Maes, P. Lerouge, G. Strecker and H. Morvan: Tomato plant leaves also contain unconjugated *N*-glycans. *Plant Physiol. Biochem.*, **35**, 73-79 (1997).
- 20) C. Faugeron, S. Lhernould, J. Lemoine, G. Costa and H. Morvan, H. Identification of unconjugated *N*-glycans in strawberry plants. *Plant Physiol. Biochem.*, **35**, 891-895 (1997).
- 21) Y. Kimura, S. Takagi and T. Shiraishi: Occurrence of free *N*-glycans in pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 924-926 (1997).
- 22) Y. Kimura and S. Matsuo: Free *N*-glycans already occur at an early stage of seed development. *J. Biochem.*, **127**, 1013-1019 (2000).
- 23) Y. Kimura and E. Kitahara: Structural analysis of free *N*-glycans occurring in soybean seedlings. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 2109-2120 (2000).
- 24) S.E.H. Moore and R.G. Spiro: Intracellular compartmentalization and degradation of free polymannose oligosaccharides released during glycoprotein biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **269**, 12715-12721 (1994).
- 25) D. Kmiecik, V. Herman, C.J.M. Stroop, J.C. Michalaki, A.M. Mir, O. Labiau, A. Verbert and R. Cacan: Catabolism of glycan moieties of lipid intermediates leads to a single Man,

- GlcNAc oligosaccharide isomer: a study with permeabilized CHO cells. *Glycobiology*, **5**, 483–494 (1995).
- 26) S. Ohashi, K. Iwai, T. Mega and S. Hase: Quantitation and isomeric structure analysis of free oligosaccharides present in the cytosol fraction of mouse liver: Detection of a free disialobiantennary oligosaccharide and glucosylated oligomannosides. *J Biochem.*, **126**, 852–858 (1999).
 - 27) R. Cacan and A. Verbert: Transport of free and *N*-linked oligosaccharide species across the rough endoplasmic reticulum membranes. *Glycobiology*, **10**, 645–648 (2000).
 - 28) R.G. Spiro: Role of *N*-linked polymannose oligosaccharides in targeting glycoproteins for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 1025–1041 (2004).
 - 29) T. Suzuki and Y. Funakoshi: Free *N*-linked oligosaccharide chains: Formation and degradation. *Glycoconj. J.*, **23**, 291–302 (2006).
 - 30) 鈴木 匡:細胞質ペプチド:*N*-グリカナーゼ (PNGase) と細胞質 *N* 型糖鎖の代謝. 生化学, **78**, 1123–1130 (2006).
 - 31) T. Suzuki, K. Tanabe and Y. Funakoshi: Folding and quality control of glycoproteins. in *Comprehensive Glycoscience*, Vol. 3, J.P. Kamerling, G.-J. Boons, Y.C. Lee, A. Suzuki, N. Taniguchi and A.G.J. Voragen, eds., Elsevier, Amsterdam, pp. 129–147 (2007).
 - 32) A. Helenius: How *N*-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell*, **5**, 253–265 (1994).
 - 33) A.J. Parodi: Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 69–93 (2000).
 - 34) S. Hüttner, C. Veit, J. Schoberer, J. Grass and R. Strasser: Unraveling the function of *Arabidopsis thaliana* OS9 in the endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins. *Plant Mol. Biol.*, **79**, 21–33 (2012).
 - 35) H. Oku, S. Hase and T. Ikenaka: Purification and characterization of neutral α -mannosidase that is activated by Co^{2+} from Japanese quail oviduct. *J. Biochem.*, **110**, 29–34 (1991).
 - 36) H. Oku and S. Hase: Studies on the substrate specificity of neutral α -mannosidase purified from Japanese quail oviduct by using sugar chains from glycoproteins. *J. Biochem.*, **110**, 982–989 (1991).
 - 37) Y. Kimura, S. Matsuo, S. Tsurusaki, M. Kimura, M. Nishimura and I. Nishimura-Hara: Subcellular localization of endo- β -*N*-acetylglucosaminidase and high-mannose type free *N*-glycans in plant cell. *Biochim. Biophys. Acta*, **1570**, 38–46 (2002).
 - 38) K. Nakamura, M. Inoue, T. Yoshiie, K. Hosoi and Y. Kimura: Changes in structural features of free *N*-glycan and endoglycosidase activity during tomato fruit ripening. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 2936–2945 (2008).
 - 39) Y. Kimura, Y. Takeoka, M. Inoue, M. Maeda and K. Fujiyama: 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. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1019–1021 (2011).
 - 40) R.M. Fischl, J. Stadlmann, J. Grass, F. Altman and R. Léonard: The two endo- β -*N*-acetylglucosaminidase genes from *Arabidopsis thaliana* encode cytoplasmic enzymes controlling free *N*-glycan levels. *Plant Mol. Biol.*, **77**, 275–284 (2011).
 - 41) N. Hosokawa, I. Wada, K. Hasegawa, T. Yorihozi, L.O. Tremblay, A. Herscovics and K. Nagata: A novel ER α -mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep.*, **2**, 415–422, (2001).
 - 42) M. Maeda, M. Kimura and Y. Kimura: 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 (2010).
 - 43) M. Maeda and Y. Kimura: Glycoform analysis of *N*-glycans linked to glycoproteins expressed in rice culture cells: Predominant occurrence of complex type *N*-glycans. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1356–1363 (2006).
 - 44) A. Ishizuka, Y. Hashimoto, R. Naka, M. Kinoshita, K. Kakehi, J. Seino, Y. Funakoshi, T. Suzuki, A. Kamayama and H. Nari-matsu: Accumulation of free complex-type *N*-glycans in MKN7 and MKN45 stomach cancer cells. *Biochem. J.*, **413**, 227–237 (2008).
 - 45) A. Diepold, G. Li, W.J. Lennarz, T. Nürnberger and F. Brunner: The *Arabidopsis* AtPNG1 gene encodes a peptide: *N*-glycanase. *Plant J.*, **52**, 94–104 (2007).
 - 46) Y. Masahara-Negishi, A. Hosomi, M.D. Mea, D. Serafini-Fracassini and T. Suzuki: A plant peptide: *N*-glycanase orthologue facilitates glycoprotein ER-associated degradation in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, 1457–1462 (2012).
 - 47) N. Takahashi: Demonstration of a new amidase acting on glycopeptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 1194–1201 (1977).
 - 48) N. Takahashi and H. Nishibe: Some characteristics of a new glycopeptidase acting on aspartylglycosylamine linkages. *J. Biochem.*, **84**, 1467–1473 (1978).
 - 49) Y. Kimura and A. Ohno: A new peptide-*N*⁴-(acetyl- β -glucosaminyl) asparagine amidase from soybean (*Glycine max*) seeds: Purification and substrate specificity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 412–418 (1998).
 - 50) M.A. Hossain, R. Nakano, K. Nakamura and Y. Kimura: Molecular identification and characterization of an acidic peptide: *N*-glycanase (PNGase) from tomato fruits. *J. Biochem.*, **147**, 157–165 (2010).
 - 51) T. Muramatsu: Demonstration of an endo-glycosidase acting on a glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **246**, 5535–5537 (1971).
 - 52) K. Yamamoto: Endoglycosidases that relate to *N*-glycans. in *Endoglycosidase*, M. Endo, S. Hase, K. Yamamoto and K. Takagaki, eds., Kodansha-Springer, Tokyo, pp. 55–74 (2006).
 - 53) K. Yamamoto: Biological analysis of the microbial metabolism of hetero-oligosaccharides in application to glycotechnology. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 1815–1827 (2012).
 - 54) T. Kato, K. Hatanaka, T. Mega and S. Hase: Purification and characterization of endo- β -*N*-acetylglucosaminidase from hen oviduct. *J. Biochem.*, **122**, 1167–1173 (1997).
 - 55) T. Suzuki, K. Yano, S. Sugimoto, K. Kitajima, W.J. Lennarz, S. Inoue, Y. Inoue and Y. Emori: Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase, an enzyme involved in processing of free oligosaccharides in the cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **15**, 9691–9696 (2003).
 - 56) Y. Kimura: Structural and functional features of plant glycoprotein glycans. in *Comprehensive Glycoscience*, Vol. 3, J.P. Kamerling, G.-J. Boons, Y.C. Lee, A. Suzuki, N. Taniguchi and A.G.J. Voragen, eds., Elsevier, Amsterdam, pp. 61–76 (2007).
 - 57) K. Nakamura, M. Inoue, R. Nakano, K. Hosoi and Y. Kimura: 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 (2009).
 - 58) N. Okamoto, M. Kanazawa, H. Nagai, M. Maeda and Y. Kimura: The transglycosylation activity of endo- β -*N*-acetylglucosaminidase from *Oryza sativa*. in *Abstract Book of 15th European Carbohydrate Symposium*, AP 496, Vienna, Austria (2009).
 - 59) Y. Kimura, D. Hess and A. Strum: The *N*-glycans of jack bean α -mannosidase; Structure, topology, and function. *Eur. J. Biochem.*, **264**, 168–175 (1999).
 - 60) Y. Kimura, H. Inoue, M. Kimura, M. Suzuki and A. Strum: Functional analysis of high-mannose type *N*-glycan of jack bean α -mannosidase. *Glycoconj. J.*, **18**, 48 (2001).
 - 61) H. Yamaguchi: Chaperone-like functions of *N*-glycans in the formation and stabilization of protein conformation. *Trends. Glycosci. Glycotechnol.*, **14**, 139–151 (2002).
 - 62) J. Loureiro and H.L. Ploegh: Antigen presentation and the ubiquitin proteasome system in host-pathogen interactions. *Adv. Immunol.*, **92**, 225–305 (2006).