

精密分子設計に基づく蛍光基質の開発とそれを用いた新規 糖質加水分解酵素の探索と同定

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	三浦,一輝 袴田,航 西尾,俊幸
発行元	日本応用糖質科学会
巻/号	9巻3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 189-194
発行年月	2019年8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





Development of Fluorogenic Substrates Based on Elaborate Molecular Design, and Screening of Novel Glycosidases Using Its Substrates*

精密分子設計に基づく蛍光基質の開発とそれを用いた新規糖質加水分解酵素の探索と同定*

三浦一輝^{1,2,*}, 袴田 航², 西尾俊幸²

(みうら かずき, はかまた わたる, にしお としゆき)

Kazuki Miura,^{1,2,*} Wataru Hakamata,² and Toshiyuki Nishio²

¹ 慶應義塾大学理工学部応用化学科

² 日本大学生物資源科学部生命化学科

¹ Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Keio University

² Department of Chemistry and Life Science, College of Bioresource Sciences, Nihon University

要旨: 自然界には多種多様な構造を有する糖質が数多く存在し、生物はこれら多様な糖質を機能性分子など様々な用途として利用している。ヒトでは機能性分子としての糖質の代表的なものとして、タンパク質の翻訳後修飾の一つである糖鎖付加があり、本修飾はタンパク質の品質管理をはじめとした多くの生命現象に重要な役割を果たしている。本稿ではヒト細胞における *N*-結合型糖鎖プロセシング酵素のセルベース蛍光イメージング戦略、ならびに本戦略を用いた新規 *N*-結合型糖鎖プロセシング酵素活性の探索について紹介する。具体的には、以下二つの内容である。1) 既知 *N*-結合型糖鎖プロセシング酵素の活性部位構造について *in silico* 解析を行い、これら酵素の特徴的な活性部位構造を明らかにした。2) *in silico* 解析結果に基づいて新規 *N*-結合型糖鎖プロセシング酵素のための蛍光基質を開発し、これら蛍光基質を用いて新規ゴルジ体 β -アロシダーゼ活性、ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を発見した。また、開発した蛍光基質を用いることでリソソーム β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性、 α -L-フコシダーゼ活性を生細胞内で高感度に蛍光イメージングすることが可能となった。

キーワード: *N*-結合型糖鎖, 糖質加水分解酵素, 蛍光基質, 蛍光イメージング***

1. はじめに

自然界には結合様式や構成糖の種類が異なる様々な糖質が数多く存在し、生物はこれら多様な糖質をエネルギー源や機能性分子など様々な用途として利用している。我々は、機能性分子としての糖質に注目し研究を進めている。機能性分子としての糖質の代表的なものとして、タンパク質の糖鎖付加が存在する。タンパク質の糖鎖付加は真核生物において普遍的かつ高頻度に起こる翻訳後修飾の一つであり、本修飾はタンパク質の品質管理や細胞間情報伝達などタンパク質の多様な機能発現および多くの生命現象に重要な役割を果たしている¹⁻⁴⁾。糖鎖付加は主に *N*-結合型、*O*-結合型、*C*-結合型、GPI アンカー型の4種類の修飾に分類されるが、その中でも *N*-結合型糖鎖修飾は生物間で利用されている糖や糖鎖構造が若干違うものの、糖鎖の付加・トリミング・再付加と生物間共通の過程で行われ、

様々な糖質加水分解酵素および糖転移酵素が修飾に関与している³⁻⁷⁾。

筆者らは、ヒト細胞における *N*-結合型糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素 (以下、*N*-結合型糖鎖プロセシング酵素) の蛍光イメージングとこれら酵素に対する阻害剤の探索にこれまで取り組んできた。本稿ではヒト細胞における *N*-結合型糖鎖プロセシング酵素のセルベース蛍光イメージング戦略、ならびに本戦略を用いた新規 *N*-結合型糖鎖プロセシング酵素活性の探索について述べる。

2. *N*-結合型糖鎖プロセシング酵素のための蛍光基質の開発

2.1 *In silico* による *N*-結合型糖鎖プロセシング酵素の活性部位構造解析

ヒト細胞における *N*-結合型糖鎖修飾では、まず小胞体

* 本原稿は、日本応用糖質科学会東日本支部シンポジウム平成30年度東日本支部若手奨励賞受賞講演で一部発表された。

** 連絡先 (Tel. 045-566-1764, E-mail: k.miura@applc.keio.ac.jp)

*** Key words: *N*-glycan, glycosidase, fluorogenic substrate, fluorescence imaging
略記: DIC, differential interference contrast; Glc, glucose; Man, mannose.

で14糖からなる糖鎖がタンパク質に付加後、タンパク質のフォールディング状況に基づいて α -グルコシダーゼ I/II および小胞体 α -マンノシダーゼによる糖鎖のトリミングが行われる²⁻⁴⁾。その後、正常に糖鎖がトリミングされたタンパク質はゴルジ体へと輸送され、ゴルジ体 α -マンノシダーゼ I/II により更なる糖鎖のトリミング、各種糖転移酵素による糖鎖の再付加を受けたのちタンパク質は機能発現の場合へと輸送される³⁻⁴⁾。そこで、筆者らはこれらN-結合型糖鎖プロセッシング酵素の中でも、タンパク質の立体構造が解明されている α -グルコシダーゼ II (PDB ID: 5IEE)⁹⁾ および小胞体 α -マンノシダーゼ (PDB ID: 1X9D)⁹⁾ のタンパク質立体構造を用いて、これら酵素とそれぞれの天然基質とのタンパク質-リガンドドッキングシミュレーションを行い、活性部位構造の解析を行った。その結果、 α -グルコシダーゼ II の活性部位は触媒残基と推定される Asp 564, Asp 640⁸⁾ を中心として両側に一つずつの基質結合ポケット (基質の非還元認識側を Subsite -1, 還元認識側を Subsite +1) を持つ *exo* 型の糖質加水分解酵素であることが示された (図1 (A))。また、小胞体 α -マンノシダーゼでも、触媒残基と推定される Glu330, Glu599⁹⁾ を中心として両側に一つずつの基質結合ポケット (Subsite -1 および Subsite +1) を持つ *exo* 型の糖質加水分解酵素であることが示された (図1 (A))。これらの結果より、N-結合型糖鎖プロセッシング酵素は Subsite -1 および Subsite +1 を持つ *exo* 型の糖質加水分解酵素であることが示唆された¹⁰⁾。

2.2 酵素の立体構造を考慮した蛍光基質の分子設計

In silico 解析より得られた構造解析結果をもとに、N-結合型糖鎖プロセッシング酵素に適した蛍光基質の分子設計を行った。一般的に市販されている糖質加水分解酵素のための蛍光基質は糖残基に直接蛍光色素を結合させたものである。しかしながら、これら基質は蛍光色素の分子サイズが極めて大きく Subsite +1 に適さないと予想されるため、N-結合型糖鎖プロセッシング酵素の基質にはなりにくいと考えられる (図2 (A))。そこで、筆者らは糖残基とはほぼ同じ分子サイズであるフェニル基をリンカーとして用いることで Subsite +1 に許容される分子サイズとなり、これら設計した分子はN-結合型糖鎖プロセッシング酵素の基質となるのではないかと考えた (図2 (B))¹⁰⁻¹²⁾。なお、設計したこれら蛍光基質は1,6-脱離反応であるキノンメチド開裂反応を利用している。仕組みとしては、蛍光基質が酵素による加水分解を受けることで自発的な電子の移動が生じ、最終的に開裂反応が引き起こされることで4-ヒドロキシベンジルアルコールと蛍光色素を生じる (図3)。

次に我々の分子設計が適切であるか確認するため、N-結合型糖鎖プロセッシング酵素の活性部位構造解析で用いた小胞体 α -マンノシダーゼを例として、精密分子設計に基づく蛍光基質と小胞体 α -マンノシダーゼを *in silico* でドッキングさせた。その結果、一般的な基質では予想通り蛍光色素の分子サイズが大きく活性部位に適応できていないのに対して、上記分子設計に基づく蛍光基質は、天然オリゴ糖基質と同様に糖残基が Subsite -1, リンカーとして導入

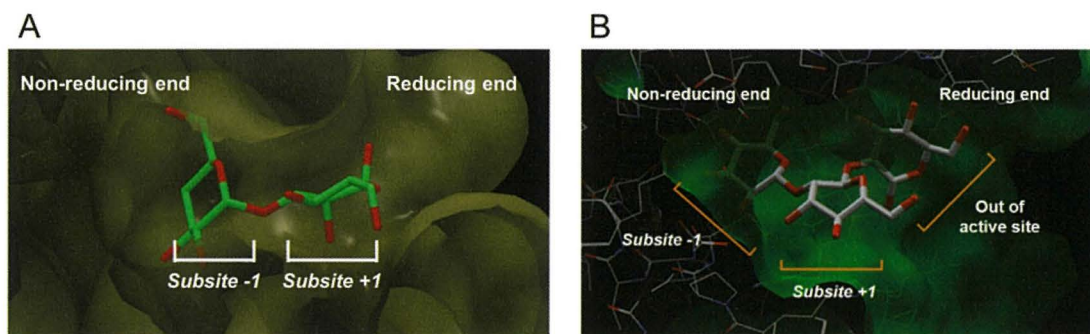


図1. N-結合型糖鎖プロセッシング酵素の *in silico* 解析

これまでに立体構造が報告されているN-結合型糖鎖プロセッシング酵素とそれぞれの天然基質について、Molegro Virtual Docker Ver. 6.0 および CLC Drug Discovery Workbench ver. 3.0.2 を用いてタンパク質-リガンドドッキングシミュレーションを行った。(A) α -グルコシダーゼ II (PDB ID: 5IEE) vs. 天然基質 (Glc- α 1,3-Man). (B) 小胞体 α -マンノシダーゼ (PDB ID: 1X9D) vs. 天然オリゴ糖基質 (Man- α 1,2-Man- α 1,2-Man).

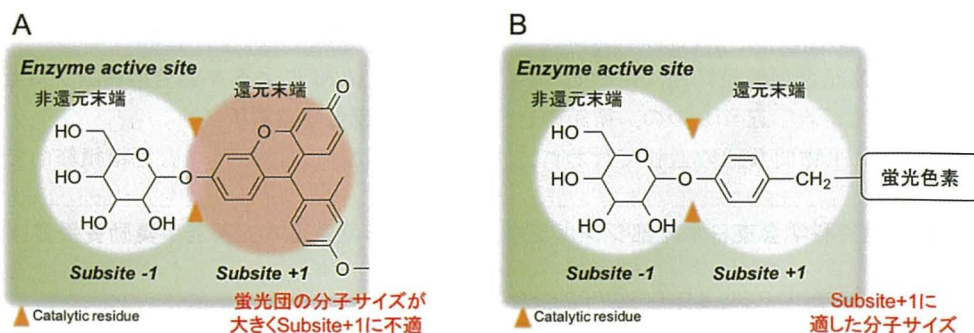


図2. 酵素の立体構造に基づいた蛍光基質の分子設計

したフェニル基が Subsite +1 に配置され、蛍光色素が活性部位の外側に位置していた (図 4)¹⁰⁾。このことから、我々の分子設計は *exo* 型の糖質加水分解酵素である *N*-結合型糖鎖プロセシング酵素の基質として適切であることが示唆された。また、筆者らはこれまでにキノンメチド開裂反応を利用した蛍光基質は細胞内で実際にキノンメチド開裂反応を伴い蛍光基質として機能すること、および本反応は蛍光色素の種類に依存しないことを報告しており¹²⁻¹⁵⁾、上記分子設計に基づく蛍光基質は細胞内で問題なく機能すると考えられる。

2.3 新規 *N*-結合型糖鎖プロセシング酵素の仮定

新規 *N*-結合型糖鎖プロセシング酵素を探索するにあたり、筆者らは標的酵素活性として以下の 4 種類の糖質加水分解酵素活性を設定した。一つ目は、 β -アロピラノシドのグリコシド結合を加水分解する酵素活性 (以下、 β -アロシダーゼ活性) である。アロースはがん細胞増殖抑制作用¹⁶⁾、細胞内活性酸素の抑制作用¹⁷⁾など様々な生物活性を有する希少糖である。加えて、これらアロースを構成糖とする配糖体にも抗酸化作用¹⁸⁾、がん細胞増殖抑制作用¹⁹⁾が知られており、アロースの代謝に関連する酵素活性はこれまでにヒト細胞内での報告はないものの、ヒト細胞において何か

しらのアロース関連酵素活性が存在する可能性が考えられる。二つ目は、 β -ガラクトシダーゼ活性、三つ目は β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性、四つ目は α -L-フコシダーゼ活性である。*N*-結合型糖鎖プロセシング酵素としてのこれら酵素活性の報告はないものの、ヒト細胞では β -ガラクトース、 β -*N*-アセチルグルコサミン、 α -L-フコースは *N*-結合型糖鎖の構成糖であり³⁻⁴⁾、*N*-結合型糖鎖修飾に関連するこれら酵素活性が存在する可能性が考えられる。そこで、新規 *N*-結合型糖鎖プロセシング酵素としての上記 4 種類の糖質加水分解酵素活性を探索するため、*N*-結合型糖鎖プロセシング酵素の特徴を考慮した蛍光基質をそれぞれ設計し、有機化学的手法を用いて合成した (図 5)。また、合成した蛍光基質については¹H-NMR、¹³C-NMR、質量分析によって目的の構造であることを確認した。

3. 精密分子設計蛍光基質を用いた新規 *N*-結合型糖鎖プロセシング酵素の探索

3.1 ヒト細胞内における β -アロシダーゼ活性

これまでの研究から、 β -アロシダーゼ活性はヒト細胞内での報告はない。そこで、 β -アロシダーゼのための蛍光基質 1-4 を 3 種類のヒト培養細胞にそれぞれ投与し、染色部

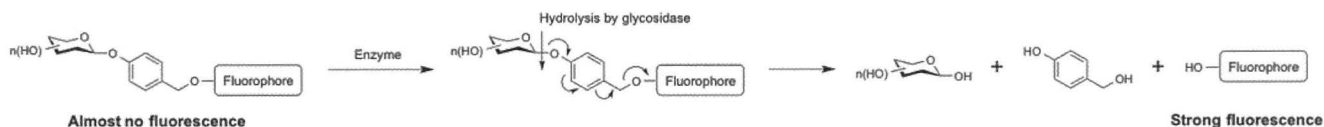
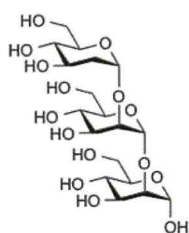


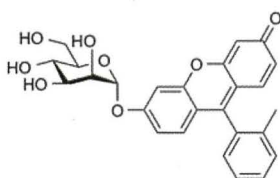
図 3. キノンメチド開裂を利用した蛍光基質の概要

設計した蛍光基質はグリコシド結合が加水分解されると分子内で電子の移動が生じ、最終的には単糖、4-ヒドロキシベンジルアルコール、および蛍光色素が生成される。

天然オリゴ糖基質



市販蛍光基質



設計した蛍光基質

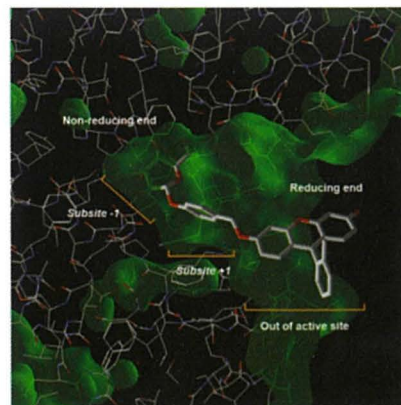
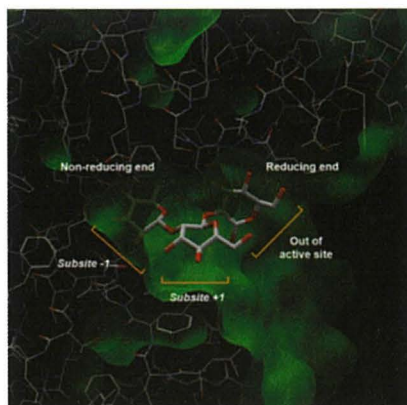
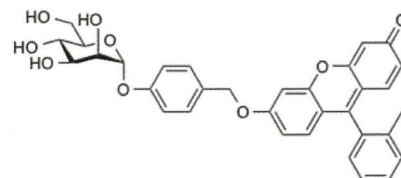


図 4. 各種基質と α -マンノシダーゼとのドッキングモデル

天然オリゴ糖基質 (Man- α 1,2-Man- α 1,2-Man)、市販蛍光基質、および設計した蛍光基質について、Molegro Virtual Docker Ver. 6.0 を用いて小胞体 α -マンノシダーゼ (PDB ID: 1X9D) とのドッキングモデルをそれぞれ構築した。

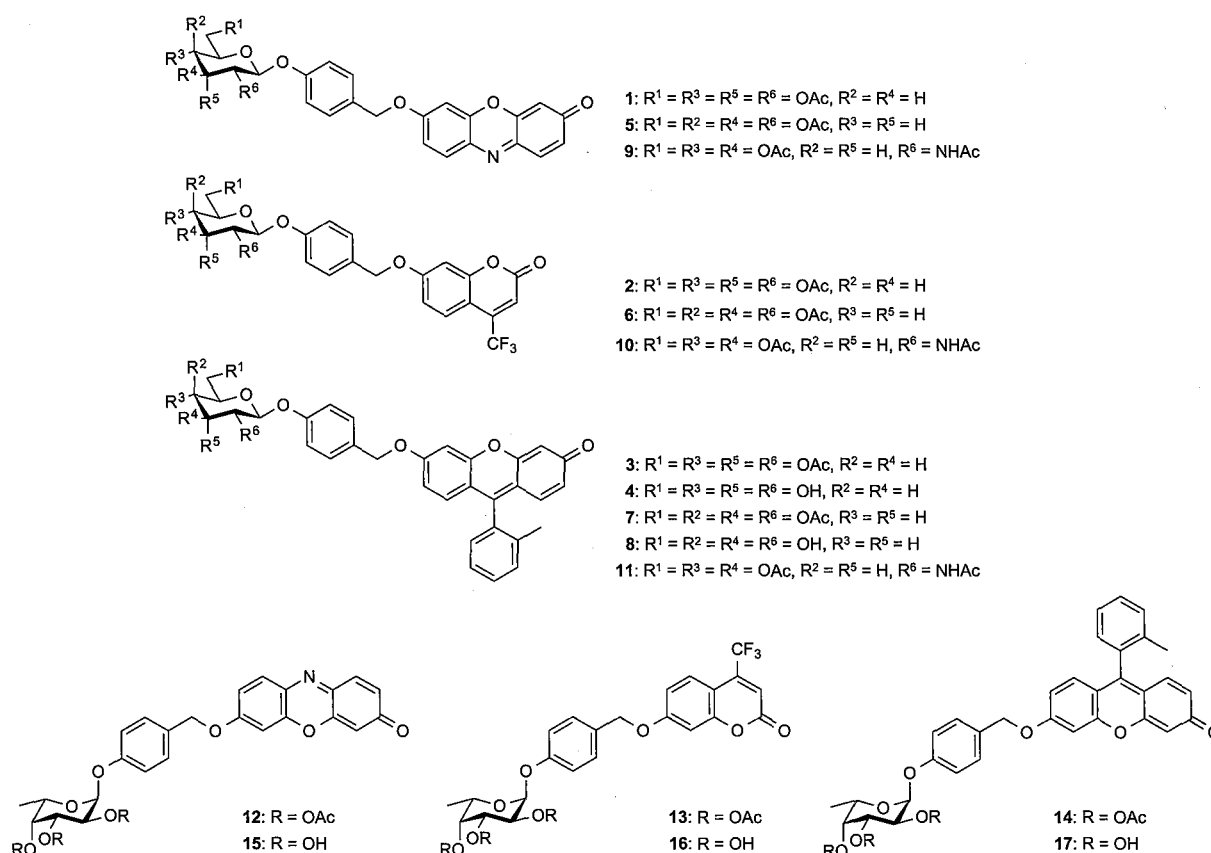


図5. 新規 *N*-結合型糖鎖プロセシング酵素探索のための蛍光基質の設計および合成

新規 *N*-結合型糖鎖プロセシング酵素として仮定した4種類の糖質加水分解酵素活性を探索するための蛍光基質を設計し、有機化学的手法により設計した蛍光基質を合成した。蛍光基質1-4はβ-アロシダーゼのための蛍光基質、蛍光基質5-8はβ-ガラクトシダーゼのための蛍光基質、蛍光基質9-11はβ-*N*-アセチルグルコサミニダーゼのための蛍光基質、蛍光基質12-17はα-*L*-フコシダーゼのための蛍光基質を示している。また、蛍光基質1, 5, 9, 12, 15は赤色蛍光色素である Resorufin, 蛍光基質2, 6, 10, 13, 16は青色蛍光色素である 4-(Trifluoromethyl) umbelliferone, 蛍光基質3, 4, 7, 8, 11, 14, 17は緑色蛍光色素である 2-Methyl-TokyoGreen を含む蛍光基質であり、それぞれの蛍光基質について、細胞膜透過性の向上を目指して水酸基をアセチル化した蛍光基質も設計・合成した。

位の同定を行った。その結果、すべての細胞種においてゴルジ体が染色されていた(図6(A, B))。また、ゴルジ体が染色されているか、ゴルジ体分散作用を持つ Brefeldin A²⁰⁾を用いた生化学的手法によっても確認した結果、染色部位が分散されたことから染色部位がゴルジ体であることを確認した(図6(C))。以上の結果から、開発したβ-アロシダーゼのための蛍光基質によりこれまでに報告のない新規ゴルジ体β-アロシダーゼ活性を発見した¹⁰⁾。

3.2 ヒト細胞内におけるβ-ガラクトシダーゼ活性

これまでの研究から、β-ガラクトシダーゼは細胞内においてリソソームに局在し、糖鎖の分解を担っていることが報告されている²¹⁾。そこで、β-ガラクトシダーゼのための蛍光基質5-8をヒト培養細胞に投与し、染色部位の同定を行った結果、ゴルジ体が染色されていた(図6(D, E))。また、β-アロシダーゼ活性と同様にゴルジ体が染色されているか、Brefeldin Aを用いても確認した。その結果、染色部位が分散されたことから染色部位がゴルジ体であることを確認した(図6(F))。以上の結果から、開発したβ-ガラクトシダーゼのための蛍光基質によりこれまでに報告のない新規ゴルジ体β-ガラクトシダーゼ活性を発見した²²⁾。

3.3 ヒト細胞内におけるβ-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性

これまでの研究から、β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼはサイトゾルおよびリソソームに局在し、いずれも糖鎖の分解を担っていることが報告されている²³⁻²⁴⁾。そこで、β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼのための蛍光基質9-11をヒト培養細胞に投与し、染色部位の同定を行った。その結果、リソソームが染色されており、開発した蛍光基質により新規 *N*-結合型糖鎖プロセシング酵素としてのβ-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性は見出せなかったものの、開発した蛍光基質はリソソームβ-*N*-アセチルグルコサミニダーゼの基質となることが明らかとなった。

3.4 ヒト細胞内におけるα-*L*-フコシダーゼ活性

これまでの研究から、α-*L*-フコシダーゼはリソソームに局在し、β-ガラクトシダーゼおよびβ-*N*-アセチルグルコサミニダーゼと同様に糖鎖の分解を担っていることが報告されている²⁵⁾。そこで、これまでと同様にα-*L*-フコシダーゼのための蛍光基質12-17をヒト培養細胞に投与し、染色部位の同定を行った。その結果、リソソームが染色されており、β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼと同様に *N*-結合型

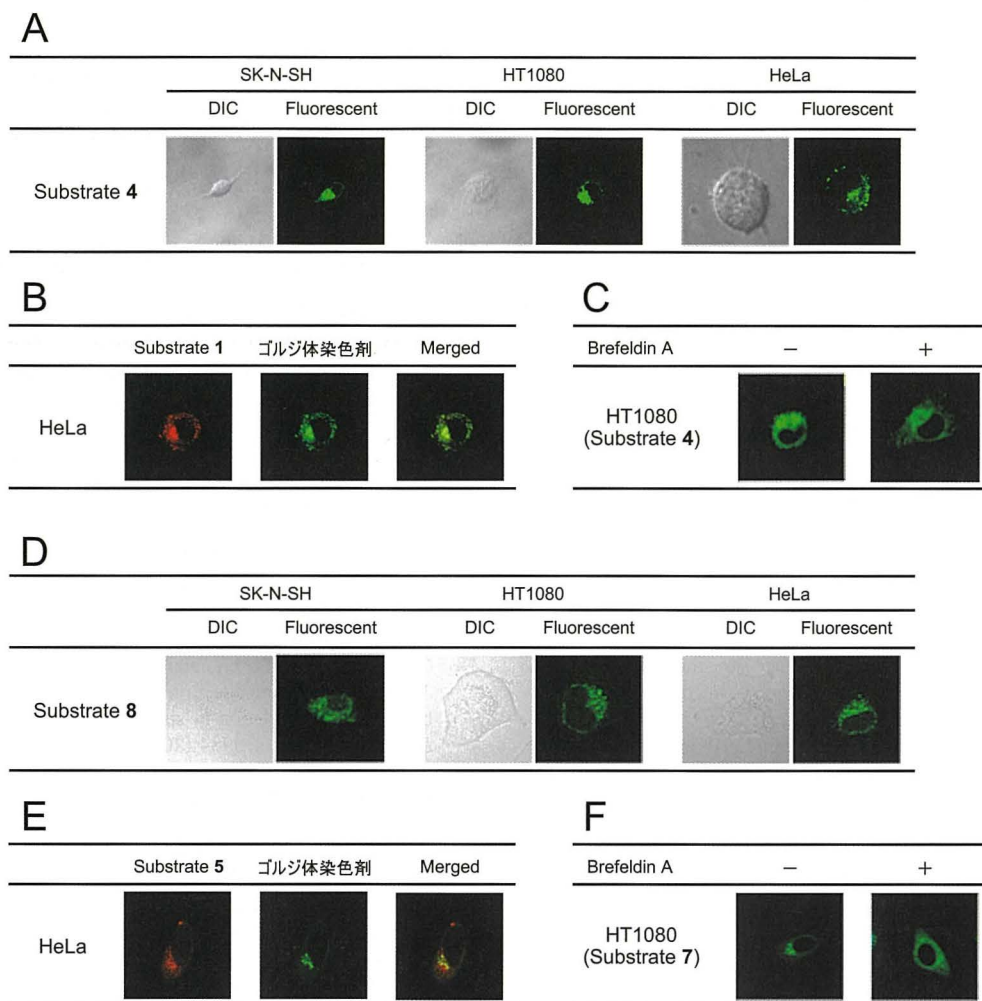


図 6. 開発した蛍光基質を用いた蛍光イメージング

合成した蛍光基質について SK-N-SH (ヒト神経芽細胞腫), HT1080 (ヒト線維肉腫), HeLa (ヒト子宮頸がん細胞) にそれぞれ投与し, 染色部位の観察を行った. なお, 本稿では一部の結果のみを示す. (A) 3 種のヒト細胞における β -アロシダーゼ活性. (B) ゴルジ体特異的染色剤による β -アロシダーゼ活性染色部位の同定. (C) Brefeldin A を用いた β -アロシダーゼ活性染色部位の同定. (D) 3 種のヒト細胞における β -ガラクトシダーゼ活性. (E) ゴルジ体特異的染色剤による β -ガラクトシダーゼ活性染色部位の同定. (F) Brefeldin A を用いた β -ガラクトシダーゼ活性染色部位の同定.

糖鎖プロセッシング酵素としての α -L-フコシダーゼ活性は見出せなかったものの, 開発した蛍光基質は α -L-フコシダーゼ活性を細胞内で蛍光イメージング可能な蛍光基質であることが明らかとなった.

4. 新規酵素活性を有する酵素の同定

本研究で見出したゴルジ体 β -アロシダーゼ活性, ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性はこれまでにヒト細胞で報告のない新規酵素活性である. そこで, これら酵素活性を有する酵素の同定を試みた. 一般的にヒト細胞由来 N -結合型糖鎖プロセッシング酵素は細胞外において不安定であり, 活性を保持したまま単離することは困難である. そこで, 様々なタンパク質が存在する細胞内でも標的タンパク質を標識化することが可能な光親和性標識法により, これら活性を有する酵素を細胞内で標識化し, 標識に基づいて単離・精製後, タンパク質アミノ酸配列解析を行うことで酵素の同定を試みた. その結果, いくつかの糖質関連酵素

を同定したが, ゴルジ体 β -アロシダーゼ活性, ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を有する酵素を決定するにはいたらなかった.

5. おわりに

本研究では, ヒト細胞における N -結合型糖鎖プロセッシング酵素の活性部位構造解析およびその活性部位構造に基づいた精密な蛍光基質の開発, 開発した蛍光基質を用いた新規 N -結合型糖鎖プロセッシング酵素活性の探索を行った. その結果, N -結合型糖鎖プロセッシング酵素の特徴的な活性部位構造を明らかとし, これら活性部位構造を考慮した蛍光基質を用いることで, これまでに報告のないゴルジ体 β -アロシダーゼ活性, ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を発見することに成功した. また, β - N -アセチルグルコサミニダーゼ活性, α -L-フコシダーゼ活性については新規酵素活性を見出せなかったものの, 開発した蛍光基質を用いることでリソソーム β - N -アセチルグルコサミニダーゼ活性,

および α -L-フコシダーゼ活性を生細胞内で高感度に蛍光イメージングすることが可能となった。しかしながら、酵素の同定では一部課題も残っており、今後はこれら新規酵素活性を有する酵素を明らかにしていきたい。また、併せて本研究で蛍光イメージングすることができた酵素に対する特異的阻害剤を探索し、見出した阻害剤を用いてN-結合型糖鎖修飾が担う生命現象の解明を行っていきたい。

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの先生方に多大なご協力・ご指導をいただきました。この場を借りて深く御礼申し上げます。また本研究は、笹川科学研究助成 (No. 27-304) およびホクト生物科学振興財団助成金の支援を受け行われました。

文献

- 1) V. Zoldoš, S. Grgurević, and G. Lauc: Epigenetic regulation of protein glycosylation. *Biomolecular Concepts*, **1**, 253-261 (2010).
- 2) C. Xu and D.T. Ng: Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **16**, 742-752 (2015).
- 3) H.H. Freeze: Genetic defects in the human glycome. *Nature Reviews Genetics*, **7**, 537-551 (2006).
- 4) K.W. Moremen, M. Tiemeyer, and A.V. Nairn: Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **13**, 448-462 (2012).
- 5) Y. Nagashima, A. von Schaewen, and H. Koiwa: Function of N-glycosylation in plants. *Plant Science*, **274**, 70-79 (2018).
- 6) Y. Chiba and H. Akeboshi: Glycan engineering and production of 'humanized' glycoprotein in yeast cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **32**, 786-795 (2009).
- 7) T. Walski, K. De Schutter, E.J.M. Van Damme, and G. Smagghe: Diversity and functions of protein glycosylation in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **83**, 21-34 (2017).
- 8) A.T. Caputo, D.S. Alonzi, L. Marti, I.B. Reca, J.L. Kiappes, W.B. Struwe, A. Cross, S. Basu, E.D. Lowe, B. Darlot, A. Santino, P. Roversi, and N. Zitzmann: Structures of mammalian ER α -glucosidase II capture the binding modes of broad-spectrum iminosugar antivirals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**, E4630-E4638 (2016).
- 9) K. Karaveg, A. Siriwardena, W. Tempel, Z.J. Liu, J. Glushka, B.C. Wang, and K.W. Moremen: Mechanism of class I (glycosylhydrolase family 47) α -mannosidases involved in N-glycan processing and endoplasmic reticulum quality control. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 16197-16207 (2005).
- 10) W. Hakamata, K. Miura, T. Hirano, and T. Nishio: Identification of a novel glycan processing enzyme with *exo*-acting β -allosidase activity in the Golgi apparatus using a new platform for the synthesis of fluorescent substrates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **23**, 73-79 (2015).
- 11) 袴田 航: グリコシダーゼの基質特性解析と阻害剤開発に関する研究. 応用糖質科学, **1**, 51-57 (2011).
- 12) 袴田 航: ヒト細胞における糖鎖プロセッシング酵素活性の可視化にむけて. 応用糖質科学, **3**, 195-196 (2013).
- 13) W. Hakamata, A. Machida, T. Oku, and T. Nishio: Design and synthesis of an ER-specific fluorescent probe based on carboxylesterase activity with quinone methide cleavage process. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **21**, 3206-3209 (2011).
- 14) W. Hakamata, S. Tamura, T. Hirano, and T. Nishio: Multicolor imaging of endoplasmic reticulum-located esterase as a prodrug activation enzyme. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **5**, 321-325 (2014).
- 15) M. Onda and W. Hakamata: Antiviral activity and mechanism of action of endoplasmic reticulum glucosidase inhibitors: a mini review. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **30**, E139-E145 (2018).
- 16) L. Sui, Y. Dong, Y. Watanabe, F. Yamaguchi, N. Hatano, K. Izumori, and M. Tokuda: Growth inhibitory effect of D-allose on human ovarian carcinoma cells *in vitro*. *Anticancer Research*, **25**, 2639-2644 (2005).
- 17) A. Murata, K. Sekiya, Y. Watanabe, F. Yamaguchi, N. Hatano, K. Izumori, and M. Tokuda: A novel inhibitory effect of D-allose on production of reactive oxygen species from neutrophils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **96**, 89-91 (2003).
- 18) C.H. Lin, J.B. Wu, J.Y. Jian, and C.C. Shih: (-)-Epicatechin-3-O- β -D-allopyranoside from *Davallia formosana* prevents diabetes and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *PLoS One*, **12**, e0173984 (2017).
- 19) P.C. Hsiao, C.C. Liaw, S.Y. Hwang, H.L. Cheng, L.J. Zhang, C.C. Shen, F.L. Hsu, and Y.H. Kuo: Antiproliferative and hypoglycemic cucurbitane-type glycosides from the fruits of *mormordica charantia*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**, 2979-2986 (2013).
- 20) T. Fujiwara, K. Oda, S. Yokota, A. Takatsuki, and Y. Ikehara: Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, **263**, 18545-18552 (1988).
- 21) U. Ohto, K. Usui, T. Ochi, K. Yuki, Y. Satow, and T. Shimizu: Crystal structure of human β -galactosidase structural basis of GM₁ gangliosidosis and morquio B diseases. *The Journal of Biological Chemistry*, **287**, 1801-1812 (2012).
- 22) K. Miura, W. Hakamata, A. Tanaka, T. Hirano and T. Nishio: Discovery of human Golgi β -galactosidase with no identified glycosidase using a QMC substrate design platform for *exo*-glycosidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **24**, 1369-1375 (2016).
- 23) 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 9691-9696 (2002).
- 24) M.J. Lemieux, B.L. Mark, M.M. Cherney, S.G. Withers, D.J. Mahuran, and M.N. James: Crystallographic structure of human β -hexosaminidase A: Interpretation of tay-sachs mutations and loss of GM₂ ganglioside hydrolysis. *Journal of Molecular Biology*, **359**, 913-929 (2006).
- 25) G. Dawson and G. Tsay: Substrate specificity of human α -L-fucosidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **184**, 12-23 (1977).