

N型糖鎖に作用する植物マンノシダーゼ

誌名	応用糖質科学
ISSN	21856427
著者名	石水,毅
発行元	日本応用糖質科学会
巻/号	3巻1号
掲載ページ	p. 93-98
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

N 型糖鎖に作用する植物マンノシダーゼ



石水 毅 (いしみず たけし)
立命館大学生命科学部 准教授

は、各論的に植物マンノシダーゼの知見をまとめる。

1. はじめに

植物マンノシダーゼは、1895年にエミル・フィッシャーによってアーモンドから見出された¹⁾。フィッシャーはマンノシダーゼ以外にもいくつかの糖質加水分解酵素の活性を検出し、酵素の基質特異性の概念や鍵と鍵穴モデルを提唱した。1960年代になって、タチナタマメ由来のマンノシダーゼの生化学的解析が行われ²⁾、これは現代まで続く糖質関連酵素研究の基礎となっている。このマンノシダーゼは比較的容易に調製でき、1970年代中頃から市販されている。研究ツールとして長年用いられ、糖鎖構造解析に役割を果たした。このように植物マンノシダーゼは生命科学の一端でその発展に寄与してきた。しかし、植物マンノシダーゼ自体の研究は、いくつかのマンノシダーゼの生化学的解析が行われてきたのみで、遺伝子や生理機能との関連は解析されてこなかった。最近になって、哺乳動物や酵母を対象とした糖質科学の進展と、植物ゲノム科学の進展が相まって、植物マンノシダーゼの遺伝子解析、機能解析の研究が本格的に始まった。本稿では、ここ10年ほどで明らかになってきた植物マンノシダーゼの生化学的および生理学的知見を概説する。

植物でマンノースが含まれる化合物は、細胞壁多糖のグルコマンナンや糖タンパク質糖鎖のN型糖鎖が主である。細胞壁多糖にはManβ1-4Man結合などが存在する。N型糖鎖にはManα1-2Man, Manα1-3Man, Manα1-6Man, Manβ1-4GlcNAc結合が存在する。それぞれのマンノシド結合を加水分解するマンノシダーゼ活性が植物から検出されており、それぞれの酵素遺伝子が同定されつつある。

本稿では、紙面の都合もあり、N型糖鎖に作用する植物マンノシダーゼのみを扱う。N型糖鎖はプロセッシングや分解の段階で、マンノシダーゼをはじめとする各酵素の作用を受け、さまざまな構造に変遷する。各段階で作用する特異性の高い植物マンノシダーゼの活性が検出されてきており、最近ではモデル植物のシロイヌナズナ由来の酵素について、その遺伝子同定や機能解析が進んでいる。酵素遺伝子変異体の解析により、特定の糖鎖の機能を探ることも可能になってきた。表1には、シロイヌナズナゲノム上にある遺伝子で、N型糖鎖に作用するマンノシダーゼとして帰属されているものを挙げた。一見すると、マンノシダーゼの遺伝子は全て同定されているようにみえるが、植物以外の生物種で同定されているマンノシダーゼのオーソログとして帰属されているだけで、遺伝子産物の酵素の基質特異性や生理機能との関連が不明なものもある。次章で

2. N 型糖鎖に作用するマンノシダーゼ

2.1 小胞体 α-マンノシダーゼ

小胞体 α-マンノシダーゼは、N型糖鎖のプロセッシングやN型糖鎖依存的なタンパク質品質管理に関わる。Man₅GlcNAc₂を基質とし、特定のManα1-2Man結合を加水分解し、Man₅GlcNAc₂を生成する(図1)。哺乳動物や酵母で遺伝子が先に同定されており、植物では相同遺伝子の解析から、2009年にGH47に属するシロイヌナズナ遺伝子(At1g30000)が同定された³⁾。この遺伝子産物は想定された基質特異性を持つが、シスゴルジか小胞体-ゴルジ体の中間の区画に局在すると判断され^{3,4)}、哺乳動物酵素と局在場所がやや異なる。この遺伝子が発現しない変異体では、加水分解されるべきManα1-2Man結合を残しながらコンプレックス型糖鎖へプロセッシングがある程度進み、植物体の表現型には大きな影響は及ぼさない³⁾。

2.2 ゴルジ α-マンノシダーゼ

ゴルジ α-マンノシダーゼIは、N型糖鎖のプロセッシングの際、Man₅GlcNAc₂をMan₃GlcNAc₂に加水分解する(図1)。ハイブリッド型およびコンプレックス型糖鎖への変換に欠かせない。植物では最近になって2種類のシロイヌナズナ遺伝子(At1g51590, At3g21160)が同定された^{3,5)}。哺乳動物、酵母で先に同定されていた遺伝子と相同性のあるGH47に属する遺伝子である。シロイヌナズナ遺伝子のそれぞれの発現タンパク質には、想定された特異性があった^{3,5)}。また最適活性にCa²⁺イオンが必要である⁵⁾。当該遺伝子の二重変異体植物では、Man₅GlcNAc₂などのより小さなハイマンノース型糖鎖がいくぶん生じるものの、Man₅GlcNAc₂が蓄積し、コンプレックス型糖鎖が生成されない^{3,5)}。この変異体の表現型(通常生育条件)は、野生型のもものと変わらなかった^{3,5)}。

シロイヌナズナの1つの小胞体 α-マンノシダーゼと2つのゴルジ α-マンノシダーゼIの三重変異体では、Man₅GlcNAc₂が蓄積し、コンプレックス型糖鎖やより小さなハイマンノース型糖鎖が生成されない。根の伸長が悪くなり、花の開花がやや遅れる³⁾。細胞壁のペクチン含量も若干減少するなど、細胞壁多糖の合成にも影響が及ぶ。すなわち、シロイヌナズナではこれら3つの α-マンノシダーゼが糖鎖プロセッシングに役割を果たし、糖鎖プロセッシングは植物の正常な生育に必要である³⁾。

表1. N型糖鎖に作用する植物マンノシダーゼ

マンノシダーゼ	加水分解される結合	GH ファミリー	帰属されているシロイヌナズナ遺伝子	シロイヌナズナ酵素の生化学的同一性 (文献)
小胞体 α -マンノシダーゼ	Man α 1-2Man	GH 47	At1g30000	3)
ゴルジ α -マンノシダーゼ I	Man α 1-2Man	GH 47	At1g51590 At3g21160	3,5)
ゴルジ α -マンノシダーゼ II	Man α 1-6Man, Man α 1-3Man	GH 38	At5g14950	6)
EDEM タンパク質		GH 47	At1g27520 (?) At5g43710 (?)	
細胞質 α -マンノシダーゼ	Man α 1-2Man	GH 38	(?)	
液胞あるいは細胞壁 α -マンノシダーゼ	Man α 1-6Man, Man α 1-3Man	GH 38	At3g26720 (?) At5g13980 (?) At5g66150 (?)	
エンド- β -マンノシダーゼ	Man β 1-4GlcNAc	GH 2	At1g09010	27)

(?) は、哺乳動物の対応遺伝子のオーソログとして帰属されているのみで、その遺伝子産物の生化学的同一性が行われていない遺伝子を表す。

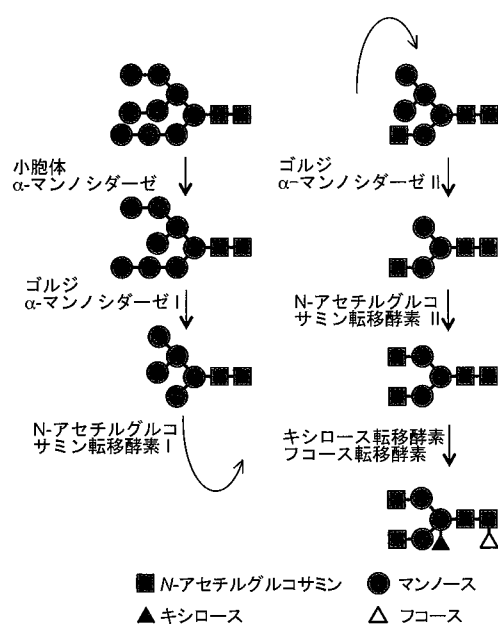


図1. 植物 N 型糖鎖のプロセッシング経路

ゴルジ α -マンノシダーゼ II は GlcNAcMan₅GlcNAc₂ の Man α 1-6Man 結合と Man α 1-3Man 結合を加水分解し、GlcNAcMan₃GlcNAc₂ にする (図1)。哺乳動物で既に同定されていた遺伝子に相同性のあるシロイヌナズナ遺伝子 (At5g14950) がクローニングされ、発現したタンパク質には想定された基質特異性があった⁹。この酵素は GH 38 に属する。この遺伝子をノックアウトした植物は、正常に生育するが、通常の植物には存在しない Man₅XylFucGlcNAc₂ という植物コンプレックス型糖鎖が主に生合成される⁹。植物によっては、パパイヤのように Man₅XylFucGlcNAc₂ 糖鎖がタンパク質に結合している場合がある⁷。パパイヤでは、ゴルジ α -マンノシダーゼ II の発現が減少しているか、この遺伝子が欠損していると思われる。これらのことは、ゴルジ α -マンノシダーゼ II は植物コンプレックス型糖鎖の生合成に役割を果たしているが、通常条件下では生育に必要な酵素ではないことを示している。

2.3 EDEM タンパク質

GH 47 に分類されるシロイヌナズナの α -マンノシダーゼは、他に At1g27520, At5g43710 の 2 種類がある。これらはヒト EDEM タンパク質 (ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein)⁹⁾ に相同性が高く、EDEM タンパク質と帰属されている (表1)。ヒト EDEM と同様に、 α -マンノシダーゼ活性に必要な S-S 結合を形成するシステイン残基が欠損している。このタンパク質の α -マンノシダーゼ活性や小胞体関連分解との関わりはまだ研究されていない。

2.4 細胞質 α -マンノシダーゼ

上述のように、小胞体 α -マンノシダーゼ、ゴルジ α -マンノシダーゼ I の欠損植物でもある程度の量の Man₅GlcNAc₂ が生成する。これらのことは、Man₅GlcNAc₂ を生成する α -マンノシダーゼが他に存在することを示唆している。実際にそのような基質特異性を持ち、小胞体 α -マンノシダーゼ、ゴルジ α -マンノシダーゼ I とは異なる α -マンノシダーゼがイチヨウ種子より精製されている^{9,10)}。またこの酵素は Co²⁺ イオンによって基質特異性が制御される¹⁰⁾。哺乳動物由来の細胞質 α -マンノシダーゼ遺伝子 (GH 38) が見出されているが^{11,12)}、植物にはこのオーソログ遺伝子が存在せず、植物酵素の遺伝子が明確になっていない。イチヨウ種子 α -マンノシダーゼの部分アミノ酸配列から、この酵素は GH 38 に属することがわかっている⁹⁾。哺乳動物のものとは異なるサブファミリーに属するのかもしれない。ただこの酵素の至適 pH は 5 付近であり、 α -マンノシダーゼに期待される至適 pH (中性) とは異なるため、この酵素の局在場所や一次構造の解析等、さらなる研究が待たれる。

この細胞質 α -マンノシダーゼは、細胞質に存在する N 型糖鎖由来の遊離糖鎖の生成に関わっていると考えられている¹³⁾。還元末端の GlcNAc が 1 残基の Man₃GlcNAc~Man₅GlcNAc が遊離糖鎖として主に存在している。

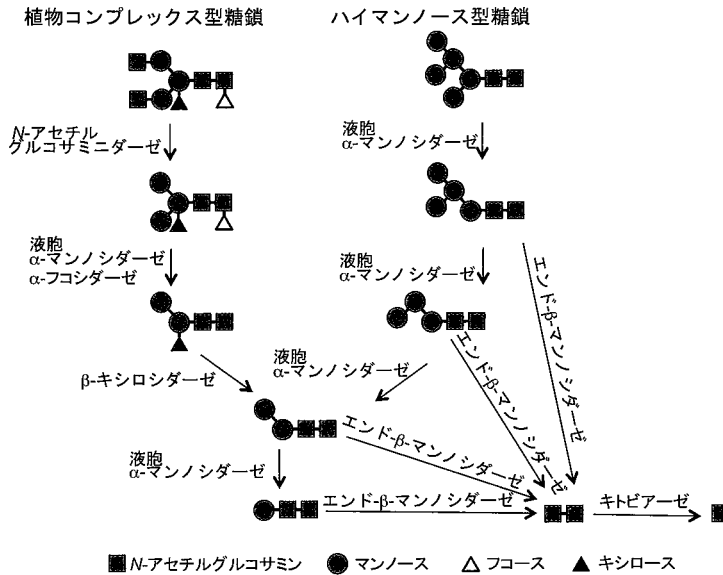


図2. 植物 N 型糖鎖の推定分解経路

この経路は、 β -キシロシダーゼや α -フコシダーゼの基質特異性が明確でないため、推定の経路である。

2.5 液胞 α -マンノシダーゼ，細胞壁 α -マンノシダーゼ

糖タンパク質は最終的に液胞で分解されると考えられている。植物糖タンパク質で多く存在する N 型糖鎖の $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ や $\text{Man}_3\text{XylFucGlcNAc}_2$ ^{5,14)}，あるいはその部分分解物を基質として α -マンノシド結合を分解する液胞 α -マンノシダーゼが存在すると想定されている。実際にそのような基質特異性を持つ植物 α -マンノシダーゼは，以前から知られている。タチナタマメ α -マンノシダーゼはそのような特異性を持ち¹⁵⁾，至適 pH は液胞酵素に期待される酸性領域にある。酸性 α -マンノシダーゼが液胞あるいは細胞壁に局在することは生化学的に示されてきた¹⁶⁻¹⁹⁾。液胞 α -マンノシダーゼ遺伝子は，哺乳動物のリソソーム α -マンノシダーゼ遺伝子 (GH 38) のオースログとして帰属されている (表 1)。しかし，これらの遺伝子産物が実際に液胞に局在し，液胞 α -マンノシダーゼに期待される基質特異性を持つかは未だ明確になっていない。

タチナタマメ α -マンノシダーゼの基質特異性の詳細を述べる。 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ を基質としたとき， $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}$ ， $\text{Man}\alpha 1-3\text{Man}$ ， $\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}$ のいずれの結合も加水分解する。 $\text{Man}\alpha 1-3\text{Man}\beta$ 結合に優先的に作用し，図 2 にある経路で分解が進行する¹⁵⁾。そのため，この α -マンノシダーゼは，液胞 α -マンノシダーゼであると考えられている。しかし，その細胞内の局在場所は調べられていない。タチナタマメ α -マンノシダーゼは，アミノ酸配列が一部解析されていて^{20,21)}，GH 38 に属するが，一次構造の全貌は明らかになっていない。

2010 年に，GH 38 に属する酸性 α -マンノシダーゼの遺伝子がトマトと唐辛子より同定された²²⁻²⁴⁾。これらは細胞壁に発現し，果実の成熟に関わる遊離糖鎖²⁵⁾の生成に関与するとされる^{23,24)}。タチナタマメ α -マンノシダーゼと同じ基質特異性を持つか明確には示されていないが，これらは酸性 α -マンノシダーゼとして遺伝子が同定された初めて

の例である。シロイヌナズナでは，GH 38 に属する 3 つの遺伝子が ($\text{At}3\text{g}26720$ ， $\text{At}5\text{g}13980$ ， $\text{At}5\text{g}66150$) が液胞あるいは細胞壁 α -マンノシダーゼと想定されている (表 1)。このうち， $\text{At}3\text{g}26720$ の発現産物には α -マンノシダーゼ活性があることが確認されている²⁶⁾。いずれの遺伝子産物が液胞あるいは細胞壁に局在するのか，液胞 α -マンノシダーゼに期待される基質特異性を持つのか，さらに N 型糖鎖の分解が滞ることによる生理学的表現型はどのようなものか等，まだ解析が行われていない。

2.6 エンド- β -マンノシダーゼ

植物糖タンパク質糖鎖で多く存在する $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ が液胞 α -マンノシダーゼで消化されると特定の構造の $\text{Man}_n\text{GlcNAc}_2 \sim \text{Man}_1\text{GlcNAc}_2$ を生成する (図 2)。これら一連の糖鎖のみを基質とし， $\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ をエンド型で加水分解するエンド- β -マンノシダーゼが GlcNAc_2 にまで分解する²⁷⁻²⁹⁾ (図 2)。液胞 α -マンノシダーゼとエンド- β -マンノシダーゼが協同してハイマンノース型糖鎖を分解している。両酵素の基質特異性を眺めると，両者はその特異性が相補的になっており³⁰⁾，合目的に共進化してきたことがうかがえる。これらの酵素の基質特異性は植物由来酵素のみにみられるものであり，図 2 の N 型糖鎖分解経路は植物に特有の経路である。特に，エンド- β -マンノシダーゼは植物に特有の酵素で，このような活性を持つ酵素は植物以外には見出されていない³¹⁾。

植物特有の N 型糖鎖分解機構を特徴付けるエンド- β -マンノシダーゼの発見は，セレンディピティ的なものであった。N 型糖鎖の構造解析から派生した発見である。筆者は，顕花植物の自家不和合性 (近親交配を避けるため，自家の花粉では受精できず，他家の花粉で受精できる性質) の分子機構の解明を目標に，その性質に関与する糖タンパク質 S-RNase の糖鎖構造解析を行った^{32,33)}。S-RNase は，植物

にみられる典型的な糖鎖 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ や $\text{XylFucMan}_3\text{GlcNAc}_2$ に加え、 GlcNAc_2 のみから構成される短い糖鎖を持っていた。このような短い糖鎖が N 型糖鎖として見出された初めての例である。 N 型糖鎖の最小構造は $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ とされていたので、意外な発見であった。 $S\text{-RNase}$ の糖鎖では GlcNAc_2 が最も多く存在したため、この糖鎖を積極的に生成させる機構があると考えた。 $S\text{-RNase}$ では GlcNAc_2 に次いで大きい糖鎖が $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ であり、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ が逐次分解して現れる中間体の構造はみられない。そのため、ハイマンノース型糖鎖の $\text{Man}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ 結合をエンド型で加水分解するエンド- β -マンノシダーゼが存在し、 GlcNAc_2 が生成すると考えた。この考えに基づき、植物抽出物からエンド- β -マンノシダーゼを探索し、酵素活性を見出した。この酵素はマンナンや p -ニトロフェニル- β -マンノシドには作用せず、これまでに見出されていた β -マンノシダーゼとは異なる基質特異性を持っていた³⁴⁾。

植物抽出物よりエンド- β -マンノシダーゼを精製し、その構造解析から遺伝子をクローニングした^{27,34,35)}。シロイヌナズナでは At1g09010 がコードしており (表 1)、約 950 アミノ酸コードする GH 2 ファミリーに属する。アミノ酸配列解析から、植物由来のエンド- β -マンノシダーゼは、GH 2 に分類されるマンノシダーゼの系統樹上で 1 つのクラスターを形成し、この酵素が植物に特有の酵素であることを支持した²⁷⁾。最近ゲノム解析されたコケ植物³⁶⁾やシダ植物³⁷⁾にもエンド- β -マンノシダーゼに相同性のある配列が認められ、本酵素や本酵素が関わる N 型糖鎖の分解機構は植物進化の早い段階で獲得されたものと考えられた。

3. マンノシダーゼが関わる N 型糖鎖の分解機構

植物 N 型糖鎖のプロセッシング過程 (図 1) については、関わる酵素の同定が進み、その分子機構が明らかになってきた。分解過程 (図 2) については、未だに遺伝子同定されていない酵素が多く、未知な部分が多い。この章では、前章の各論的な知見を受けて、全体像がはっきりしていない N 型糖鎖の分解機構について述べる。

エンド- β -マンノシダーゼは $\text{Man}\alpha 1\text{-6Man}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ に最もよく作用し、 $\text{Man}_n\text{Man}\alpha 1\text{-6Man}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ ($n = 0\sim 2$) を基質とする。この特徴的な基質特異性が、他の酵素の特異性と関連している³⁰⁾。エンド- β -マンノシダーゼが作用する糖鎖は、植物が持つ N 型糖鎖で最も存在量が多い糖鎖の 1 つ $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ に液胞 α -マンノシダーゼが作用して生じる一連の糖鎖である。液胞 α -マンノシダーゼが優先的に作用する $\text{Man}\alpha 1\text{-3Man}\beta$ 結合や β -キシロシダーゼ³⁸⁾が作用する $\text{Xyl}\beta 1\text{-2Man}\beta$ 結合を有する糖鎖には作用しない。これら 3 つの酵素 (エンド- β -マンノシダーゼ、液胞 α -マンノシダーゼ、 β -キシロシダーゼ) の至適 pH はいずれも酸性で、これらの酵素が酸性オルガネラである液胞で作用し、ハイ

マンノース型糖鎖やキシロース残基を含む植物コンプレックス型糖鎖を協調的に分解していると思われる (図 2)。実際にエンド- β -マンノシダーゼは液胞に発現していることが確認されている³⁹⁾。

これらの酵素が協調的に働くためにどのような機構があるのだろうか。同じ液胞に発現すべきことから、各酵素の遺伝子の転写・翻訳が同じように制御されていると思われる。しかし、液胞 α -マンノシダーゼ、 β -キシロシダーゼの遺伝子が明確に同定されておらず、発現制御は今後の研究課題である。なお、植物コンプレックス型糖鎖に含まれる $\alpha 1,3$ -フコシド結合を分解するフコシダーゼ遺伝子も未同定で、他の酵素の基質特異性との関連に興味もたれる (図 2)。

エンド- β -マンノシダーゼに関しては、タンパク質レベルでの存在様式の情報が得られている。テッポウユリのエンド- β -マンノシダーゼは、キシログルカン側鎖に作用する $\alpha 1,2$ -フコシダーゼと複合体を形成している⁴⁰⁾。植物 N 型糖鎖に $\alpha 1,2$ 結合したフコースは見出されていないため、この複合体の両酵素は、基質を異にする。これらの酵素が複合体を形成している理由は、タンパク質分解酵素が多く発現している液胞で互いに安定性を増すため、と考えられる。このような例が哺乳動物で、カテプシン A、 β -ガラクトシダーゼ、シアリダーゼ、 N -アセチルガラクトサミン-6-硫酸スルファターゼから構成されるリソソーム酵素複合体が報告されている⁴¹⁾。これらの酵素の基質は互いに異なる。

また、図 2 の N 型糖鎖の分解経路は植物特有のもので、哺乳動物のものとは異なる^{28,42)}。エンド- β -マンノシダーゼが存在しない哺乳動物では、エンド- β -マンノシダーゼの代替として、リソソーム $\alpha 1,6$ -マンノシダーゼ⁴³⁾と β -マンノシダーゼ⁴⁴⁾がその役割を担う。哺乳動物リソソームでは、 α -マンノシダーゼ、 $\alpha 1,6$ -マンノシダーゼ、 β -マンノシダーゼの 3 種類の酵素が、ハイマンノース型糖鎖を幾分複雑な経路で分解する⁴²⁾。

4. おわりに

これらの知見を統合すると、植物の N 型糖鎖のプロセッシングについては、その経路とそれに関わる酵素遺伝子が明らかにされてきた段階である。プロセッシング酵素の基質特異性は厳密で、小胞体 α -マンノシダーゼ、ゴルジ α -マンノシダーゼ I で、基質特異性が相補的になっていることは興味深い³⁰⁾。現在、 N 型糖鎖のプロセッシングの生理的役割について知見が集められ始めている。これらの各 α -マンノシダーゼがそれぞれ欠損しても、プロセッシングは不完全ではあるが幾分進み、植物の生育に大きな影響はきたさない。小胞体 α -マンノシダーゼ、ゴルジ α -マンノシダーゼ I の両酵素が発現しない変異体では、プロセッシングが進まなくなり、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ が蓄積し、より小さな糖鎖が生成されない。上述のように、この変異体では、いくつかの

表現型変化が観察されるが、糖鎖構造の変化がどのようにして表現型の変化に結びつくのかについての分子機構はまだ不明である。

N型糖鎖の分解については、エンド-β-マンノシダーゼの発見を契機にその分解機構が明らかになりつつある。しかし、未だ分解に関わる酵素群(α-マンノシダーゼを含む)の遺伝子同定や基質特異性解析が進んでいない。これは、酵素同定に必要な各種糖鎖基質を調製するのに多大な労力を要するためである。地道な生化学研究が必要である。ゲノム解析の進展により、各酵素の候補遺伝子は既に挙げられており、近々、各酵素遺伝子と酵素の基質特異性が明らかにされ、図2のN型糖鎖の分解機構が明確になってくる。同時にN型糖鎖の分解と生理機能の関連も明らかになってくるはずである。

文献

- 1) E. Fischer: Über den Einfluss der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme III. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **28**, 1429-1438 (1895).
- 2) Y.-T. Li: Presence of α-D-mannosidic linkage in glycoproteins. Liberation of D-mannose from various glycoproteins by α-mannosidase isolated from jack bean meal. *J. Biol. Chem.*, **241**, 1010-1012 (1966).
- 3) E. Liebminger, S. Hüttner, U. Vavra, R. Fischl, J. Schoberer, J. Grass, C. Blaukopf, G.J. Seifert, F. Altmann, L. Mach and R. Strasser: Class I α-mannosidases are required for N-glycan processing and root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **21**, 3850-3867 (2009).
- 4) T.P. Dunkley, S. Hester, I.P. Shadforth, J. Runions, T. Weimar, S.L. Hanton, J.L. Griffin, C. Bessant, F. Brandizzi, C. Hawes, R.B. Watson, P. Dupree and K.S. Lilley: Mapping the *Arabidopsis* organelle proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **103**, 6518-6523 (2006).
- 5) H. Kajiuura, H. Koiwa, Y. Nakazawa, A. Okazawa, A. Kobayashi, T. Seki and K. Fujiyama: Two *Arabidopsis thaliana* Golgi α-mannosidase I enzymes are responsible for plant N-glycan maturation. *Glycobiology*, **20**, 235-247 (2010).
- 6) R. Strasser, J. Schoberer, C. Jin, J. Glössl, L. Mach and H. Steinkeller: Molecular cloning and characterization of *Arabidopsis thaliana* Golgi α-mannosidase II, a key enzyme in the formation for complex N-glycans in plants. *Plant J.*, **45**, 789-803 (2006).
- 7) Y. Makino, A. Shimazaki, K. Omichi, S. Odani and S. Hase: Processing pathway deduced from the structures of N-glycans in *Carica papaya*. *J. Biochem.*, **127**, 1121-1126 (2000).
- 8) Y. Oda, N. Hosokawa, I. Wada and K. Nagata: EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released by calnexin. *Science*, **299**, 1394-1397 (2003).
- 9) K.K. Woo, M. Miyazaki, S. Hara, M. Kimura and Y. Kimura: Purification and characterization of a Co(II)-sensitive α-mannosidase from *Ginkgo biloba* seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 2547-2556 (2004).
- 10) K.K. Woo and Y. Kimura: Regulation of substrate specificity of plant α-mannosidase by cobalt ion: *in vitro* hydrolysis of high-mannose type N-glycans by Co²⁺-activated *Ginkgo* α-mannosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1111-1119 (2005).
- 11) T. Suzuki, I. Hara, M. Nakano, M. Shigeta, T. Nakagawa, A. Kondo, Y. Funakoshi and N. Taniguchi: Man2C1, an α-mannosidase, is involved in the trimming of free oligosaccharides in the cytosol. *Biochem. J.*, **400**, 33-41 (2006).
- 12) E. Costanzi, C. Balducci, R. Cacan, S. Duvet, A. Orlacchio and T. Beccari: Cloning and expression of mouse cytosolic α-mannosidase (MAN2C1). *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**, 1580-1586 (2006).
- 13) 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, Oxford, pp. 61-78 (2007).
- 14) D. Rendic, I.B.H. Wilson, G. Lubec, M. Gutternigg, F. Altmann and R. Leonard: Adaptation of the "in-gel release method" to N-glycome analysis of low-milligram amounts of material. *Electrophoresis*, **28**, 4484-4492 (2007).
- 15) H. Oku, S. Hase and T. Ikenaka: Separation of oligomannose-type sugar chains having one to five mannose residues by highperformance liquid chromatography as their pyridylamino derivatives. *Anal. Biochem.*, **185**, 331-334 (1990).
- 16) N. Harris and M.J. Chrispeels: Histochemical and biochemical observations on storage protein metabolism and protein body autolysis in cotyledons of germinating mung beans. *Plant Physiol.*, **56**, 292-299 (1975).
- 17) T. Boller and H. Kende: Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. *Plant Physiol.*, **63**, 1123-1132 (1979).
- 18) W. van der Wilden, N.R. Gilkes and M.J. Chrispeels: The endoplasmic reticulum of mung bean cotyledons: role in the accumulation of hydrolases in protein bodies during seedling growth. *Plant Physiol.*, **66**, 390-394 (1980).
- 19) W. van der Wilden and M.J. Chrispeels: Characterization of the isozymes of α-mannosidase located in the cell wall, protein bodies, and endoplasmic reticulum of *Phaseolus vulgaris* cotyledons. *Plant Physiol.*, **71**, 82-87 (1983).
- 20) S. Howard, S. He and S.G. Withers: Identification of the active site nucleophile in jack bean α-mannosidase using 5-fluoro-β-L-guloxyl fluoride. *J. Biol. Chem.*, **273**, 2067-2072 (1998).
- 21) 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).
- 22) M.A. Hossain, R. Nakano, K. Nakamura, M.T. Hossain and Y. Kimura: Molecular characterization of plant acidic α-mannosidase, a member of glycosylhydrolase family 38, involved in the turnover of N-glycans during tomato fruit ripening. *J. Biochem.*, **148**, 603-616 (2010).
- 23) V.S. Meli, S. Ghosh, T.N. Prabha, N. Chakraborty and A. Datta: Enhancement of fruit shelf life by suppressing N-glycan processing enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**, 2413-2418 (2010).
- 24) S. Ghosh, V.S. Meli, A. Kumar, A. Thakur, N. Chakraborty, S. Chakraborty and A. Datta: The N-glycan processing enzymes α-mannosidase and β-D-N-acetylhexosaminidase are involved in ripening-associated softening in the non-climacteric fruits of capsicum. *J. Exp. Bot.*, **62**, 571-582 (2011).
- 25) B. Priem and K. Gross: Mannosyl- and xylosyl-containing glycans promote tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit ripening. *Plant Physiol.*, **98**, 399-401 (1992).
- 26) K. Fujiyama, Y. Kira, M. Iizuka, Y. Kimura and T. Seki: Identification of putative gene encoded on ORF 16 of the 81 kb contig of *Arabidopsis thaliana* chromosome III as α-mannosidase. *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 401-404 (2001).
- 27) T. Ishimizu, A. Sasaki, S. Okutani, M. Maeda, M. Yamagishi and S. Hase: Endo-β-mannosidase, a plant enzyme acting on N-glycan: purification, molecular cloning, and characterization. *J. Biol. Chem.*, **279**, 38555-38562 (2004).
- 28) T. Ishimizu and S. Hase: Endo-β-mannosidase, a plant enzyme acting on N-glycans. *Trends Glycosci. Glycotech.*, **18**, 39-47 (2006).
- 29) 石水 毅: 植物 N-結合型糖鎖の分解機構. *生化学*, **83**, 1087-1099 (2011).
- 30) T. Ishimizu and S. Hase: Substrate recognition by sugar chain-related enzymes: Recognition of a large area of substrates and its strictness and tolerance. *Trends Glycosci. Glycotech.*, **17**, 215-227 (2005).
- 31) A. Sasaki, M. Yamagishi, T. Mega, S. Norioka, S. Natsuka and S. Hase: Partial purification and characterization of a novel endo-β-mannosidase acting on N-linked sugar chains from *Lilium longiflorum* Thunb. *J. Biochem.*, **125**, 363-367 (1999).
- 32) T. Ishimizu, S. Norioka, M. Kanai, A.E. Clarke and F. Sakiyama: Location of cysteine and cystine residues in tobacco S₆-RNase and Japanese pear S₁-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *Eur. J. Biochem.*, **242**, 627-635 (1996).

- 33) T. Ishimizu, Y. Mitsukami, S. Shinkawa, S. Natsuka, S. Hase, M. Miyagi, F. Sakiyama and S. Norioka: Presence of asparagines-linked *N*-acetylglucosamine and chitobiose in *Pyrus pyrifolia* S-RNases associated with gametophytic self-incompatibility. *Eur. J. Biochem.*, **263**, 624–634 (1999).
- 34) A. Sasaki, T. Ishimizu and S. Hase: Substrate specificity and molecular cloning of lily endo- β -mannosidase acting on *N*-glycans. *J. Biochem.*, **137**, 87–93 (2005).
- 35) T. Ishimizu, C. Hashimoto, R. Kajihara and S. Hase: A retaining endo- β -mannosidase from a dicot plant, cabbage. *J. Biochem.*, **139**, 1035–1043 (2006).
- 36) S.A. Rensing, D. Lang, A.D. Zimmer, A. Terry, A. Salamov, *et al.*: The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science*, **319**, 64–69 (2008).
- 37) J.A. Banks, T. Nishiyama, M. Hasebe, J.L. Bowman, M. Gribskov, *et al.*: The compact Selaginella genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science*, **332**, 960–963 (2011).
- 38) K. Tezuka, M. Hayashi, H. Ishihara, M. Nishimura, K. Onozaki and N. Takahashi: Purification and substrate specificity of β -xylosidase from sycamore cell (*Acer pseudoplatanus* L.): application for structural analysis of xylose-containing *N*-linked oligosaccharides. *Anal. Biochem.*, **211**, 205–209 (1993).
- 39) C. Carter, S. Pan, J. Zouhar, E.L. Avila, T. Girke and N.V. Raikhel: The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell*, **16**, 3285–3303 (2004).
- 40) T. Ishimizu, C. Hashimoto, R. Takeda, K. Fujii and S. Hase: A novel α 1,2-L-fucosidase acting on xyloglucan oligosaccharides is associated with endo- β -mannosidase. *J. Biochem.*, **142**, 721–729 (2007).
- 41) H. Ostrowska, K. Krukowska, J. Kalinowska, M. Orłowska and I. Lengiewicz: Lysosomal high molecular weight multienzyme complex. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **8**, 19–24 (2003).
- 42) C. Oark, L. Meng, L.H. Stanton, R.E. Collins, S.W. Mast, X. Yi, H. Strachan and K.W. Moreman: Characterization of a human core-specific lysosomal α 1,6-mannosidase involved in *N*-glycan catabolism. *J. Biol. Chem.*, **280**, 37204–37216 (2005).
- 43) R. De Gasperi, P.F. Daniel and C.D. Warren: A human lysosomal α -mannosidase specific for the core of complex glycans. *J. Biol. Chem.*, **267**, 9706–9712 (1992).
- 44) H. Chen, J.R. Leipprandt, C.E. Traviss, B.L. Sopher, M.Z. Jones, K.T. Cavanagh and K.H. Friderici: Molecular cloning and characterization of bovine β -mannosidase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 3841–3848 (1995).