

植物 *N*-結合型糖鎖の分解機構

石 水 毅

植物糖鎖加水分解酵素の研究の歴史は長く、エミール・フィッシャーから始まる。1970年頃には、さまざまな植物酵素活性の検出が行われ、いくつかの酵素は糖質研究のツールとして使われてきた。しかし、それらの細胞内での糖鎖分解における役割分担や生理的意義については不明なままであった。2004年にエンド- β -マンノシダーゼという植物特異的酵素の基質特異性解析、遺伝子クローニングが行われて以降、植物 *N*-結合型糖鎖の分解経路やその生理的意義を調べる研究が進展している。本稿では、植物の *N*-結合型糖鎖分解の研究の歴史を踏まえて、明らかにされつつある植物特有の *N*-結合型糖鎖の分解経路を概説し、糖鎖分解の生理機能や未解明課題について議論したい。

1. はじめに

N-結合型糖鎖の小胞体で行われる生合成過程は、真核生物でほぼ保存されている¹⁾。しかし、その後のゴルジ体で行われるプロセッシング過程は、大まかには生物界ごとに異なり、糖鎖構造の違いを生み出している^{2,3)}。では *N*-結合型糖鎖の分解過程はどうか。糖鎖構造が異なっていることに加え、細胞構造が生物界ごとに大きく異なり、ゲノムにコードされている糖鎖加水分解酵素の種類と数も異なる。そのため分解機構もそれぞれで異なると思われるが、*N*-結合型糖鎖の分解は、これまで哺乳動物における過程しか理解されていなかった。哺乳動物細胞では、リソソームで働く一群の糖鎖分解酵素の遺伝子は既に同定され⁴⁾、分解経路もほぼ明らかにされている。これらの酵素の遺伝子欠損により、糖鎖分解が滞り、それらの基質オリゴ糖が蓄積することで、細胞障害を引き起こす（リソソーム病⁴⁾）。これは *N*-結合型糖鎖の分解が、哺乳動物では正常な細胞機能に必須な過程であることを示している。

植物細胞では *N*-結合型糖鎖の最終的な分解は液胞で行われる。液胞は、リソソームとは異なり、貯蔵組織としての働きもある。細胞の発達段階では、分解型液胞と貯蔵型液胞に分かれているが、融合型もあり、成長した細胞では融合型が多くを占める。大きく成長した細胞では液胞が細胞体積の大半を占める。

植物の *N*-結合型糖鎖の構造には、よく研究されている哺乳動物のものとは異なるところがある。植物 *N*-結合型糖鎖の代表的な構造を挙げた（図1）。多くの植物で最も含有量の高い糖鎖は、M5A 構造や M3FX 構造である。特徴的なのは M3FX のような植物コンプレックス型糖鎖で、キシロース、フコース残基を含む。植物の複合糖質にシアル酸が存在するとの報告はあるが⁵⁾、シアル酸を持つ *N*-結合型糖鎖は見いだされていない。そして、ルイス a 糖鎖を非還元末端にもつ植物コンプレックス型糖鎖（Le(a) 2M3FX, 図1）が知られている⁶⁾。このように、植物では細胞の構造も *N*-結合型糖鎖の構造も哺乳動物のそれらとは異なっている。

さらに、植物 *N*-結合型糖鎖の分解に関わる加水分解酵素には、哺乳動物のものとは異なるものがある（図2）。糖質科学の黎明期（1970年頃）に、いくつかの植物由来の糖鎖分解酵素の活性が検出された。これには日本人研究者の功績が非常に大きい⁷⁾。植物由来酵素は、現在も糖鎖構造解析によく使用されている。しかし、それらの構造解析、遺伝子クローニング、基質特異性解析、生体内での機能解析は、長年行われてこなかった。

大阪大学大学院理学研究科化学専攻（〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町1-1）

Degradation mechanism of plant *N*-glycans
Takeshi Ishimizu (Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, 1-1 Machikaneyamacho, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan)

本総説は2010年度奨励賞を受賞した。



図1 植物 N-結合型糖鎖の代表的な構造
 構造と略号を示した。このうち、M5A と M3FX は植物細胞に最も多く存在する糖鎖である。

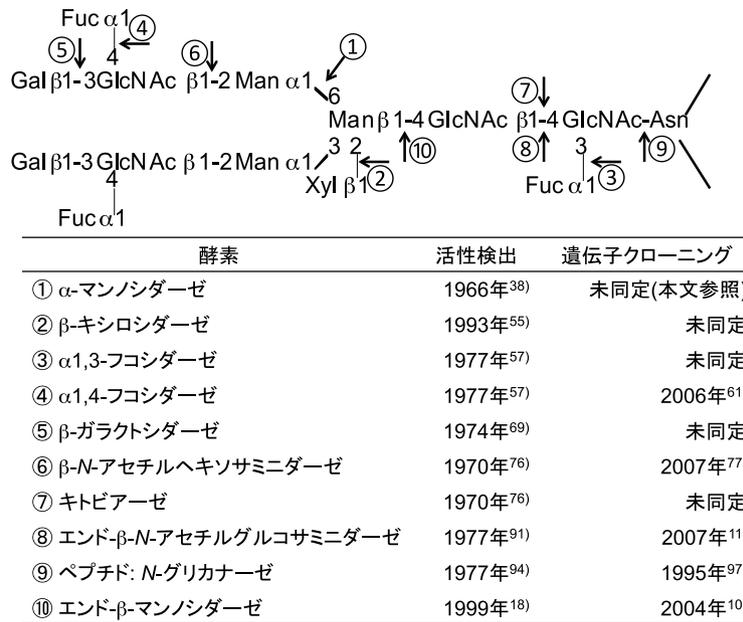


図2 植物 N-結合型糖鎖の分解に関与する酵素
 植物コンプレックス型糖鎖の分解を例に、各酵素が作用する結合と番号で示した。

我々は1990年代後半に、ある植物糖タンパク質に N-, N'-ジアセチルキトビオース (GlcNAcβ1-4GlcNAc) を N-結合型糖鎖として発見した^{8,9)}(図1)。その糖鎖の生成機構の考察から、植物に特異的に発現する N-結合型糖鎖加水分解酵素であるエンド-β-マンノシダーゼを2004年に見いだした¹⁰⁾(図2)。その生化学的解析は植物 N-結合型糖鎖の

分解経路の解明の端緒となった。そして、その基質特異性に他の糖鎖加水分解酵素のものと厳密な相補性があることを見だし、植物 N-結合型糖鎖の分解が、最終分解物に至るまで、複数の酵素により厳密に分担されていることを示した。このエンド-β-マンノシダーゼの解析を皮切りに、2000年代中盤以降、いくつかの糖鎖加水分解酵素の

基質特異性解析と遺伝子同定が行われている。現在は、植物における *N*-結合型糖鎖の分解経路の全貌が見えつつあるところである。しかし、*N*-結合型糖鎖分解の機能が総じて論じられることはまだない。

本稿では、植物の *N*-結合型糖鎖の分解の知見をまとめる。糖鎖分解は、細胞質遊離糖鎖や小胞体関連分解との関連で論じられることが多いが¹¹⁻¹³、本稿では、液胞を中心に行われる *N*-結合型糖鎖の最終的な分解を扱う。まず、エンド- β -マンノシダーゼの発見の経緯、その基質特異性、この酵素が関与する植物特有の *N*-結合型糖鎖分解経路を概説する^{14,15}。次いで、植物 *N*-結合型糖鎖の分解に関わる他の酵素について各論的に整理し、遺伝子同定、基質特異性解析の現状を紹介する。そして、植物糖鎖分解の生理機能や未解明の課題について議論したい。

2. エンド- β -マンノシダーゼ

2.1. *N*-結合型糖鎖としての *N*-,*N*'-ジアセチルキトビオースの発見

植物の自家不和合性に関わる S-RNase は、自己と他己の花粉を識別する糖タンパク質である。その構造機能相関研究のため、S-RNase の糖鎖構造を含めた構造解析を行った^{8,9}。ニホンナシ由来 S₃-RNase は糖鎖結合可能部位 Asn18 と Asn116 を持つ。そのプロテアーゼ消化物を LC/MS で解析すると、Asn18 を含むペプチドについて、計算値より 406 大きい分子量を観察した。406 は *N*-,*N*'-ジアセチルキトビオース (GlcNAc β 1-4GlcNAc) に相当する。Asn116 を含むペプチドには、M3X [Man α 1-6(Man α 1-3)(Xyl β 1-2)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc] の付加が見られる分子量を主に観察した。次いで、ヒドラジン分解により糖鎖を S-RNase から遊離させ、蛍光標識して HPLC にて分析した。GlcNAc β 1-4GlcNAc が主たる構造として観察され、M3X や M3FX、トリマンノシルコア構造 [Man α 1-6(Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc] が検出された。このようにして、GlcNAc β 1-4GlcNAc を *N*-結合型糖鎖として初めて見いだした⁹。トリマンノシルコア構造が *N*-結合型糖鎖の共通最小構造とされていたので、意外な発見であった。ニホンナシ S₃-RNase の X 線結晶構造解析¹⁶では、*N*-結合型糖鎖由来の電子密度も観察され、Asn18 に GlcNAc β 1-4GlcNAc が、Asn116 に Man α 1-6(Xyl β 1-2)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc の構造が見える (図3)。これら両糖鎖は活性部位クレフトの反対側に位置している。よく見ると、Asn18 の糖鎖は糖鎖加水分解酵素の作用を受けやすい位置にあるが、Asn116 の糖鎖はペプチド部分と相互作用して酵素の作用を受けにくい位置にある。なお、ニホンナシ由来のどの S-RNase にも、主たる *N*-結合型糖鎖として GlcNAc β 1-4GlcNAc が観察された⁹。そして、S-RNase 間の糖鎖構造には顕著な違いは見られず、糖鎖は

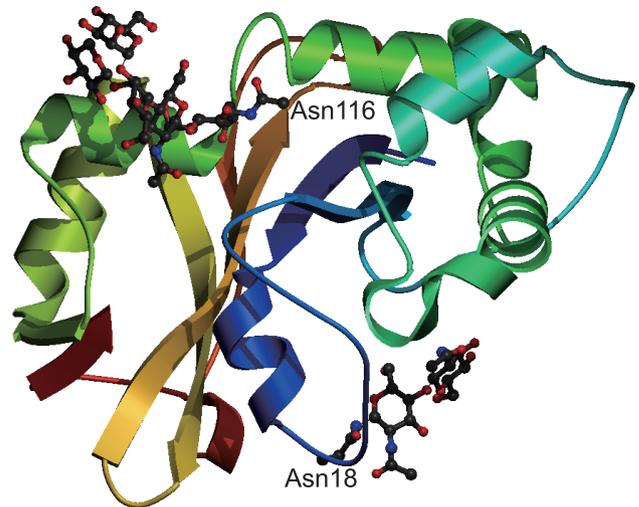


図3 ニホンナシ S₃-RNase の立体構造 (1IQQ) 活性部位クレフトの裏側から見ている。Asn18 に GlcNAc β 1-4GlcNAc、Asn116 に Man α 1-6(Xyl β 1-2)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc が見える。(松浦孝範博士提供)

自他識別には関与しないと結論づけた⁹。実際、糖鎖欠損 S-RNase も自家不和合性反応を起こす¹⁷。

2.2. *N*-,*N*'-ジアセチルキトビオースを生成する酵素、エンド- β -マンノシダーゼの発見

S-RNase の *N*-結合型糖鎖に GlcNAc β 1-4GlcNAc が主として存在するため、この糖鎖を積極的に生成させる機構があると考えた。糖鎖の生合成、プロセッシング機構から、ハイマンノース型糖鎖や植物コンプレックス型糖鎖が分解を受けて生成したと考えられた。S-RNase の糖鎖構造で、GlcNAc β 1-4GlcNAc に次ぐ小さい糖鎖がトリマンノシルコア構造であった⁹。GlcNAc β 1-4GlcNAc が生成する際にトリマンノシルコア構造が逐次分解されて現れる中間体の糖鎖は S-RNase に見られない。そのため、トリマンノシルコア構造の Man β 1-4GlcNAc 結合にエンド型酵素 (エンド- β -マンノシダーゼ) が作用して、GlcNAc β 1-4GlcNAc を直接生成すると考えた。このような特異性を持つ酵素はまったく知られていなかった。

トリマンノシルコア構造 Man α 1-6(Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA (-PA, ピリジルアミノ化) を基質に、植物抽出液を作用させると GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA が生成したが、比較的生成速度が遅く、また二相的に生成した (図4(A))。これは少なくとも二つの酵素の作用によって生成物が生じたことを示している。Man α 1-6Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA を基質にしたときは、GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA が時間を追って直線的に生成した (図4(B))。同時に Man α 1-6Man も定量的に生成し (図4(C))、エンド型で作用する β -マンノシダーゼ活性を観察した。Man α 1-3Man α 1-6Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA や Man α 1-6

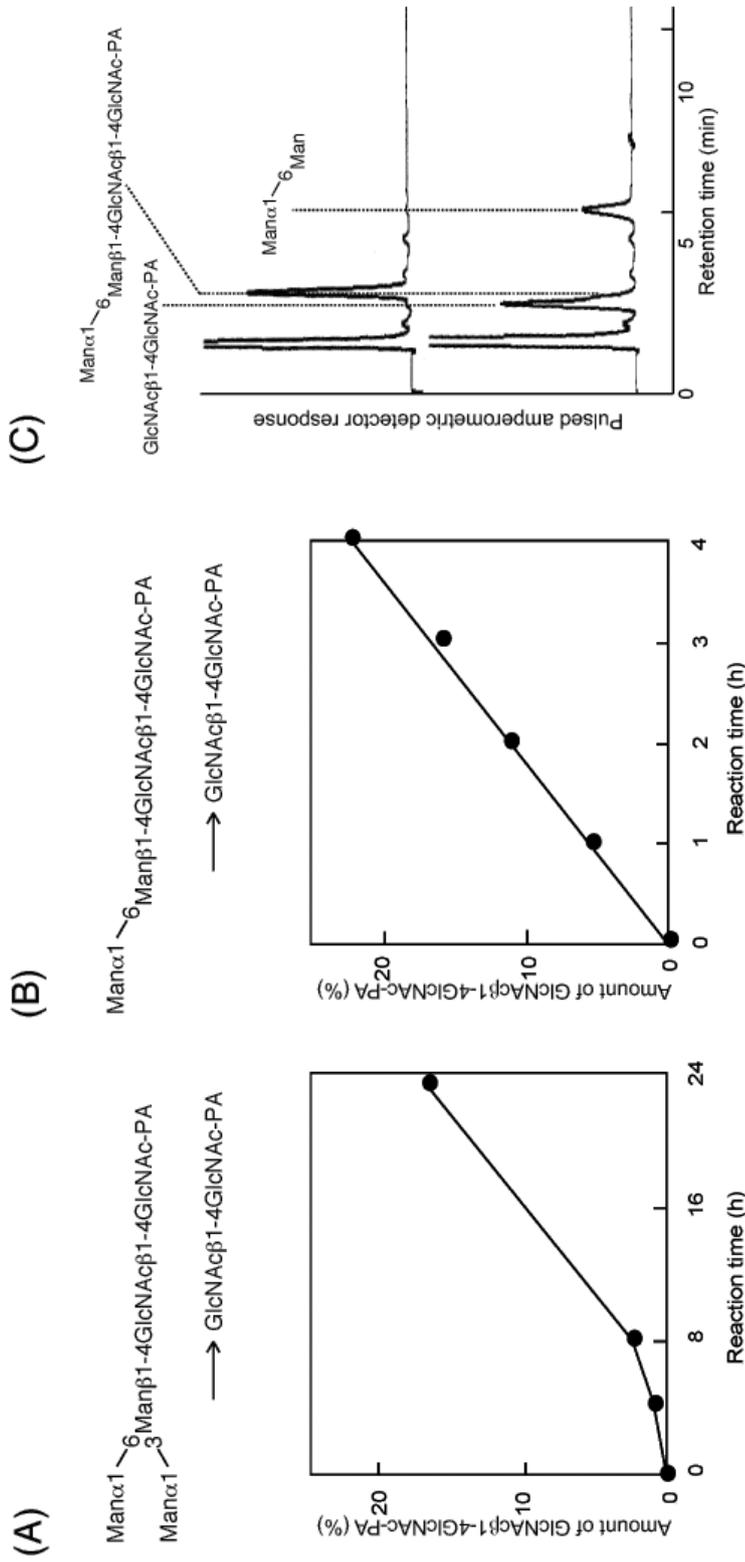


図4 エンドβ-マンノシダーゼの発見
 Manα1-6(Manα1-3)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-PA (A) および Manα1-6Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-PA (B) にテッポウユリ抽出物を用させたときの
 GlcNAcβ1-4GlcNAc-PA の生成における時間依存性. (C) Manα1-6Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-PA に精製エンドβ-マンノシダーゼを用させた加水分解
 物の解析. 上: 反応時間 0 分, 下: 反応時間 30 分.

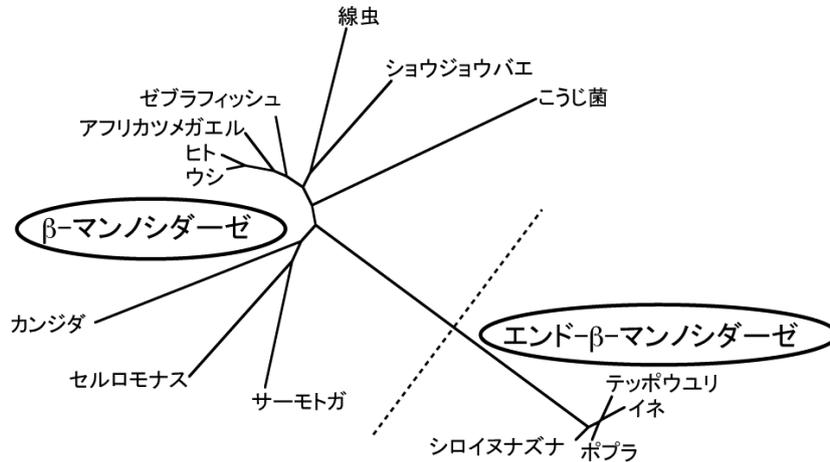


図5 エンド-β-マンノシダーゼと関連遺伝子の系統樹

(Man α 1-3)Man α 1-6Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA にも同様にエンド型で作用して、GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA を生成した。このようにして、植物にエンド-β-マンノシダーゼが存在することを示した¹⁸⁾。新たに見いだされた特異性を持つため、酵素番号 EC 3.2.1.152 が与えられた。マンナン (マンノースが β 1,4 結合した多糖) や *p*-ニトロフェニル-β-マンノシドには作用しなかったため、エンド-β-マンノシダーゼは、マンナーゼや β-マンノシダーゼと異なり、*N*-結合型糖鎖に特異的に作用する。

この反応を取り入れた活性測定法を利用して、テッポウユリ、キャベツの抽出液を酵素源とし、エンド-β-マンノシダーゼを精製した^{10,19)}。本酵素は4本のポリペプチド鎖から構成されていた。これらは一つの遺伝子にコードされ、翻訳後に分解を受けている^{10,19,20)}。この遺伝子は約950アミノ酸をコードし、CAZY データベース²¹⁾のGH2に分類される。シロイヌナズナの相同遺伝子 (Atlg09010) の大腸菌での発現産物には、エンド-β-マンノシダーゼ活性があった¹⁰⁾。相同性検索を行うと、植物由来の遺伝子とのみ高い相同性を示し、系統樹上で植物由来遺伝子が一つのクレードを形成した (図5)。動物、カビ、細菌由来の β-マンノシダーゼは異なるクレードにある。動物、カビ、細菌には本酵素活性が検出されなかった。これらのことは、エンド-β-マンノシダーゼが植物特異的酵素であることを示している。なお、最近ゲノム解析されたコケ植物²²⁾やシダ植物²³⁾にも植物由来遺伝子のクレード近くに位置する配列が認められ、これらの植物にも本酵素が存在すると思われる。

2.3. エンド-β-マンノシダーゼの基質特異性と *N*-結合型糖鎖分解における役割

各種 *N*-結合型糖鎖を用いたエンド-β-マンノシダーゼの基質特異性解析は、植物 *N*-結合型糖鎖の分解経路を解く突破口になった^{10,19,20)}。テッポウユリ、キャベツおよびシ

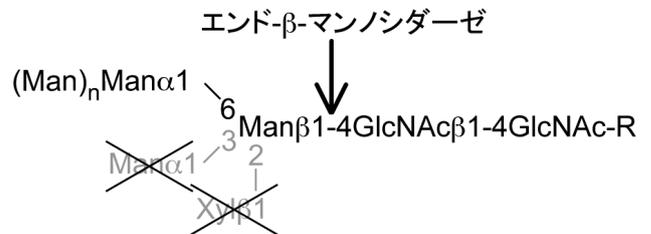


図6 エンド-β-マンノシダーゼの基質特異性

Man β 1-4GlcNAc 結合をエンド型で加水分解する。Man α 1-3Man β 結合および Xyl β 1-2Man β 結合を有する糖鎖には作用しない。還元末端は遊離でもペプチドが付加してもピリジルアミノ化体でも作用する。

ロイヌナズナ由来の酵素の基質特異性 (図6) はほぼ同一であった。これまでに調べたオリゴ糖基質のうち、最もよい基質は Man α 1-6Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc である。この非還元末端の Man α 1-6Man β にいくつかのマンノース残基が結合しても基質になる (図6)。速度は遅いが Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc にも作用する。Man α 1-3Man β 結合や Xyl β 1-2Man β 結合を有する糖鎖には作用しない。還元末端は蛍光標識されていても、遊離糖鎖でも、ペプチドがついていても作用する。まとめると、エンド-β-マンノシダーゼは、Man $_n$ Man α 1-6Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-R ($n = 0 \sim 2$, R = -H, -PA, -ペプチド) の Man β 1-4GlcNAc 結合をエンド型で加水分解する (図6)。本酵素は少なくとも Man α 1-6Man β 1-4GlcNAc 部分からアグリコンのペプチド部分を認識していると考えられる。

この特徴的な基質特異性が、他の糖鎖加水分解酵素の特異性と関連している^{14,24)}。エンド-β-マンノシダーゼが作用する一連の糖鎖基質は、植物に最も多く存在する *N*-結合型糖鎖の一つである M5A 構造 (図1) にタチナタマメ α -マンノシダーゼが作用して生じる糖鎖²⁵⁾に等しい。つまり、両酵素の基質特異性が相補的になっている²⁴⁾ (図7)。この α -マンノシダーゼは活性の至適 pH が酸性であることから、液胞 α -マンノシダーゼに相当すると思われる。

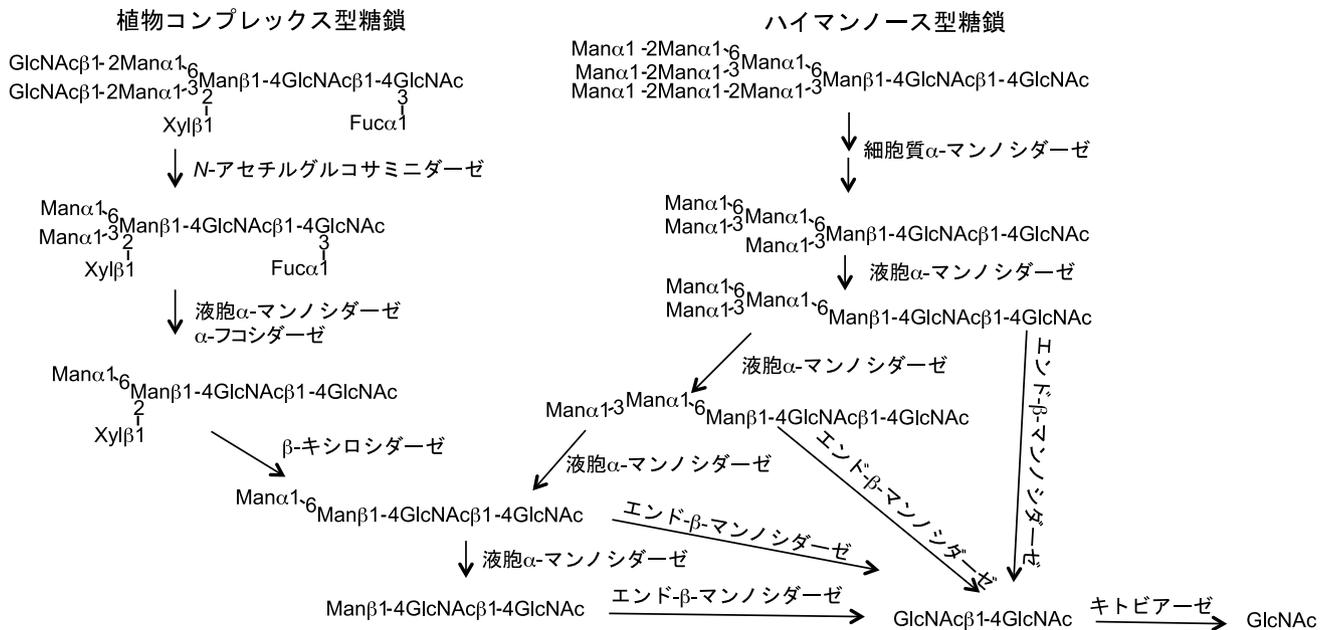


図7 植物 *N*-結合型糖鎖の推定分解経路

る。

トリマンノシルコア構造に植物抽出液を作用させたとき、 $\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ が時間を追って二相的に生成するのは(図4(A))、この基質糖鎖にまず液胞 α -マンノシダーゼが作用して $\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ が生成し、次いでエンド- β -マンノシダーゼが作用した結果と解釈できる。トリマンノシルコア構造の分解経路は、哺乳細胞のものとは異なる^{4,26)}。哺乳動物のリソソームでは、 $\text{Man}\alpha 1-3\text{Man}\beta$ を優先的に加水分解する α -マンノシダーゼ、 $\alpha 1,6$ -マンノシダーゼ²⁵⁾、 β -マンノシダーゼの3種類の酵素が、幾分複雑な経路で分解する²⁶⁾。

エンド- β -マンノシダーゼの特異な基質特異性に関連して、本酵素にトランスグリコシレーション活性があり、 $\text{Man}\beta$ 結合の形成に利用できることにも触れておく²⁷⁾。 $\text{Man}\beta$ 結合は1,2-シスの相対立体配置で、1,2-トランス立体配置の $\text{Man}\alpha$ 結合より不安定である(立体化学的および立体電子的な要因による)。そのため、 Man 結合の合成に際しては $\text{Man}\alpha$ 結合の形成が優先され、 $\text{Man}\beta$ 結合を含む糖鎖の化学合成は難しい²⁸⁾。エンド- β -マンノシダーゼのトランスグリコシレーション活性により、 $\text{Man}\beta$ 結合を含む糖鎖の合成が達成された²⁷⁾。この酵素の特異な基質特異性のため、マンノース単糖だけでなく、オリゴマンノースを転移して $\text{Man}\beta$ 結合を形成できる。アクセプター基質特異性は比較的あいまいで、 GlcNAc のみでなく、 Man や Glc など C4 位の水酸基が環から横向き(エクソトリアル位)にある糖がアクセプター基質として働く²⁷⁾。このように、本酵素は様々な $\text{Man}\beta$ 結合を含む糖鎖の合成に利用できる。

2.4. エンド- β -マンノシダーゼの局在場所, 存在様式

エンド- β -マンノシダーゼはテッポウユリの調べた器官(花, 葉, 茎, 根, 球根)すべてに発現している²⁰⁾。シロイヌナズナ遺伝子の発現解析でも調べた器官すべてに発現している²⁹⁾。以上は、この酵素が器官特異的な働きに関わるのではなく、植物細胞の維持に根幹的な機能を持っていることを示唆した。細胞内局在についての情報もある。シロイヌナズナの液胞プロテオーム解析によると³⁰⁾、エンド- β -マンノシダーゼは液胞に発現している。液胞は酸性オルガネラで、エンド- β -マンノシダーゼの至適 pH が 4.5 付近であること^{10,19,20)}と合致する。エンド- β -マンノシダーゼは、液胞糖鎖加水分解酵素の一つであると言える。液胞に加えて、細胞壁も酸性環境下にあり、エンド- β -マンノシダーゼが細胞壁に発現している可能性は今のところ排除できない。

S-RNase の *N*-結合型糖鎖として $\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ があることは、これで説明できるだろうか。S-RNase は小胞を介して細胞外に分泌されるタンパク質である³¹⁾。エンド- β -マンノシダーゼが発現する液胞は、植物内膜系の一つで分泌経路にも関わる³²⁾。S-RNase が運ばれる小胞と液胞の関係は明らかでないが、S-RNase と液胞糖鎖加水分解酵素が共局在する時空間がどこかにあるのだろう。エンド- β -マンノシダーゼが細胞壁にも発現していて、S-RNase が何らかの方法で細胞壁を経由して分泌されているのかもしれない。基質特異性の観点からは、S-RNase に検出されているトリマンノシルコア構造に液胞 α -マンノシダーゼとエンド- β -マンノシダーゼが作用して $\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ を生成したと説明できる。

テッポウユリからエンド- β -マンノシダーゼをゲルろ過を用いて精製した際、精製した活性ピーク（分子量約10万）とは別にマイナーな活性ピーク（分子量約20万）を観察していた¹⁰。このマイナーピークを精製し、構造解析すると、エンド- β -マンノシダーゼとその会合タンパク質の複合体であることがわかった³³。会合タンパク質のアミノ酸配列は、ビフィズス菌 α 1,2-フコシダーゼ³⁴の活性ドメインと相同性があった。実際にこの会合タンパク質は α 1,2-フコシダーゼ活性があり、 α 1,2-フコシド結合をもつ植物細胞壁糖鎖キシログルカンに作用した³³。植物 *N*-結合型糖鎖に α 1,2 結合したフコースは見いだされていないため、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何であろうか。哺乳動物細胞にはカテプシン 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存在する³⁵。これらの酵素は同じ基質に対して働かないにも関わらず、複合体を形成しているが、その理由はリソソーム内に多く発現するプロテアーゼの攻撃からお互いを守るためだと考えられている³⁵。植物液胞で複合体を形成しているエンド- β -マンノシダーゼと α 1,2-フコシダーゼも、お互いを液胞プロテアーゼの攻撃から守るために複合体を形成しているのではないかと推測される。

3. エンド- β -マンノシダーゼ以外の *N*-結合型糖鎖分解に関わる植物酵素

2.3 節で述べたように、エンド- β -マンノシダーゼは植物 *N*-結合型糖鎖の分解において、中核的な役割がある。植物 *N*-結合型糖鎖の分解経路の全体像を掴むために、分解に関わる酵素を図2に、それらによる推定分解経路を図7に示している。図7はエンド- β -マンノシダーゼなど明らかにされている酵素の基質特異性と、これまでに活性が検出されている酵素の推定基質特異性、植物で見いだされている *N*-結合型糖鎖の構造を元にして描いた。ここではエンド- β -マンノシダーゼ以外の酵素の各論を述べる。

3.1. 液胞 α -マンノシダーゼ

植物 α -マンノシダーゼ研究の歴史は古く、1895年にエミール・フィッシャーがアーモンドから α -マンノシダーゼの活性を見つけたところから始まる³⁶（彼は、アーモンドや酵母から複数の糖鎖加水分解酵素の活性を検出し、酵素の基質特異性の概念、酵素の鍵と鍵穴モデルを提出した）。現在では、植物には数種類の α -マンノシダーゼが発現していることがわかっているが、至適 pH が酸性の α -マンノシダーゼは、1934年にアーモンド、アルファルファから見いだされた³⁷。酸性 α -マンノシダーゼが *N*-結合型糖鎖に作用することは、タチナタマメ由来酵素で1966年

に見いだされている^{38,39}。このとき、糖タンパク質糖鎖に $\text{Man}\alpha$ 結合があることが証明された³⁸。1970年代後半には、酸性 α -マンノシダーゼが液胞⁴⁰⁻⁴²あるいは細胞壁⁴³に発現することが示された。タチナタマメ酵素は $\text{Man}\alpha$ 1-2 Man 、 $\text{Man}\alpha$ 1-3 Man 、 $\text{Man}\alpha$ 1-6 Man のいずれの結合も加水分解するが、 $\text{Man}\alpha$ 1-3 $\text{Man}\beta$ 結合を優先的に加水分解する^{44,45}。植物の *N*-結合型糖鎖で多く存在する構造の一つが M5A 構造である（図1）^{46,47}。M5A にこの α -マンノシダーゼを作用させると²⁵、図7にある経路で加水分解され、一連の生成物を与える。それらの生成物がエンド- β -マンノシダーゼの基質になる。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^{48,49}、GH38の酵素の配列に相同性があるが、一次構造の全貌は未だに明らかになっていない。2010年になって、GH38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⁵⁰⁻⁵²。これらは細胞壁に発現し、果実の成熟に関わる遊離糖鎖⁵³の生成に関与するとされる^{51,52}。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が明確には示されていないものの、これらは、酸性 α -マンノシダーゼで遺伝子が同定された初めての例である。シロイヌナズナには、これらのアミノ酸配列に相同性があり、GH38に属する遺伝子（At3g26720, At5g13980, At5g66150）が見いだされている⁵⁴。いずれの候補遺伝子産物が液胞に局在し、液胞 α -マンノシダーゼに期待される基質特異性を持つのか、生化学的解析が待たれる。

3.2. β 1,2-キシロシダーゼ

植物 *N*-結合型糖鎖の $\text{Xyl}\beta$ 1-2 Man 結合を加水分解する β 1,2-キシロシダーゼ遺伝子はまだ同定されていない。1993年にシカモアカエデの培養細胞から植物コンプレックス型糖鎖の $\text{Xyl}\beta$ 1-2 $\text{Man}\beta$ 結合を分解する酵素活性が検出され、部分精製された⁵⁵。至適 pH は4.0で、液胞で働くことを示唆している。この酵素は、 $\text{Man}\alpha$ 1-6($\text{Xyl}\beta$ 1-2) $\text{Man}\beta$ 1-4 $\text{GlcNAc}\beta$ 1-4 GlcNAc を基質とし、 $\text{Man}\alpha$ 1-3 $\text{Man}\beta$ 結合を有する M3FX は基質としない。これらのことから、M3FX の分解は液胞において、まず液胞 α -マンノシダーゼにより $\text{Man}\alpha$ 1-3 $\text{Man}\beta$ が加水分解され、次いで β -キシロシダーゼにより $\text{Xyl}\beta$ 1-2 $\text{Man}\beta$ が加水分解され、その後、エンド- β -マンノシダーゼが作用することがわかる（図7）。これら三つの酵素の基質特異性がぴったりと相補的になっている。

同様の酵素がジャガイモ塊茎から精製された⁵⁶。その *N*末端アミノ酸配列は、塊茎の貯蔵タンパク質であるパタチンの内部配列に相同性がある。パタチンのアミノ酸配列と相同性があるジャガイモ塊茎の加水分解酵素がいくつか知られており、発芽や病原体防御との関連が指摘されている。このアミノ酸配列に相同性のある遺伝子がシロイヌナ

ズナ (At2g26560, At4g37050, At4g37070) に存在するが、それらは典型的な糖質加水分解酵素とは相同性がない。構造的に新規なファミリーに分類される糖質加水分解酵素であるかもしれない。これらの機能同定には、リコンビナント酵素の生化学的解析が必要である。

3.3. α 1,3-フコシダーゼ, α 1,4-フコシダーゼ

植物コンプレックス型糖鎖の還元末端近傍の Fuc α 1-3GlcNAc 結合を分解する α 1,3-フコシダーゼの遺伝子同定は混乱が続いており、まだ明確になっていない。植物 α -フコシダーゼの最初の記述は 1977 年で、アーモンドより α 1,3/4-フコシダーゼと α 1,2-フコシダーゼが見いだされた⁵⁷⁾。 α 1,3/4-フコシダーゼは、複数のグループにより精製が進められたが⁵⁸⁻⁶⁰⁾、構造解析には至らなかった。2006 年に改めて精製されたアーモンド酵素の部分アミノ酸配列に相同性があるシロイヌナズナ遺伝子 (At2g28100, GH29) が同定され、そのリコンビナントタンパク質に α -フコシダーゼ活性があった⁶¹⁾。 Le(a)2M3FX (図 1) の Fuc α 1-4GlcNAc 結合に作用したため、 α 1,4-フコシダーゼと考えられた。本酵素は、植物コンプレックス型の *N*-結合型糖鎖 Man α 1-6 (Man α 1-3) Man β 1-4GlcNAc β 1-4 (Fuc α 1-3) GlcNAc (M3F) の Fuc α 1-3GlcNAc 結合には作用しなかった。しかし、この酵素が植物糖鎖に作用する α 1,3-フコシダーゼでないとはまだ言い切れず、M3F より小さい糖鎖 (GlcNAc β 1-4 (Fuc α 1-3) GlcNAc など) を基質にした活性を検証する必要がある。

この遺伝子 At2g28100 は、過去に α 1,2-フコシダーゼとして報告されており⁶²⁾、混乱があった。他にも α 1,2-フコシダーゼとして報告された二つの遺伝子があったが⁶²⁻⁶⁴⁾、ともに後になって否定される混乱もあった^{65,66)}。 α 1,2-フコシダーゼ遺伝子 (GH95) は 2007 年になって同定に至った³³⁾。 2.4 節で前述したように、エンド- β -マンノシダーゼと相互作用する酵素として見いだされ、キシログルカン側鎖の Fuc α 1-2Gal 結合を加水分解する³³⁾。 シロイヌナズナ由来の酵素遺伝子 (At4g34260) も α 1,2-フコシダーゼとして同定された⁶⁷⁾。

植物 α -フコシダーゼ遺伝子の同定における混乱の原因は酵素活性測定法にある。これら α 1,3/4-フコシダーゼも α 1,2-フコシダーゼも *p*-ニトロフェニル- α -フコシドには作用しないため、簡便な活性測定法が利用できない。このフコシダーゼの同定には、放射ラベルした糖鎖を用いて遊離する放射能をカウントしたり、酵素反応の後に上昇すべき糖鎖の還元性を測定する方法が用いられてきた。これらの方法は、酵素活性の生成物を直接的に観察する方法でないため、結果の誤解釈が起こった。蛍光標識した糖鎖基質と生成物を HPLC で分離・定量する方法が確実である^{24,68)}。この方法は基質調製に長い期間を要し、実際の活性測定に

も時間がかかるため、敬遠されがちである。未だに続いている植物フコシダーゼ遺伝子の同定に関する混乱を解決するためには、今のところ、この面倒な方法を用いる他に手段がない。

3.4. β 1,3-ガラクトシダーゼ

ルイス a 糖鎖をもつ植物コンプレックス型糖鎖の非還元末端の Gal β 1-3GlcNAc 結合を加水分解する酵素の遺伝子も明確になっていない。1974 年にタチナタマメとアーモンドの抽出物に Gal β 1-3GlcNAc 結合を加水分解する活性が見られているが⁶⁹⁾、その後の β 1,3-ガラクトシダーゼの精製例はない。シロイヌナズナには 17 の β -ガラクトシダーゼ様遺伝子 (GH35) があり⁷⁰⁾、そのうちガラクトオリゴ糖の Gal β 1-3Gal 結合を加水分解する酵素遺伝子は同定されているものの^{70,71)}、Gal β 1-3GlcNAc 結合を加水分解する酵素遺伝子の同定はまだ行われていない。

3.5. β 1,2-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ

植物の *N*-結合型糖鎖で多く存在する構造の一つは M3FX 構造である^{46,47)}。この糖鎖のキシロース、フコース残基は、それぞれ β 1,2-キシロース転移酵素⁷²⁾、 α 1,3-フコース転移酵素⁷³⁾により転移される。これらの転移には GlcNAc β 1-2Man α 1-3 構造が必要である。すなわち、まず GlcNAc β 1-2Man α 1-3 が付加した M3FX (GnM3FX) が生成し、この糖鎖に β 1,2-*N*-アセチルグルコサミニダーゼが作用して M3FX が生成する。M5FX (M5A にキシロース、フコース残基が付加した糖鎖) の存在も知られており⁷⁴⁾、M5FX に GlcNAc β 1-2Man α 1-3 が付加した糖鎖にもこの酵素は作用すると思われる。

この酵素活性が初めて見いだされたのは、GnM3FX の構造を決定する際にタチナタマメ由来の酵素が用いられたときである⁷⁵⁾。元々この酵素は β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼとして見いだされていた⁷⁶⁾。2007 年になって、シロイヌナズナの酵素遺伝子が同定された⁷⁷⁾。GH20 に分類される *HEXO1* (At3g55260), *HEXO2* (At1g05590), *HEXO3* (At1g65590) の発現産物に GnM3FX の GlcNAc β 1-2Man α 1,3-結合を加水分解する活性が見いだされた。いずれも pH5 付近で最大活性を示す。このうち *HEXO1* は活性が非常に強い。タバコ培養細胞を用いて調べると、*HEXO1* は液胞に局在し、*HEXO2*, *HEXO3* は形質膜 (筆者の解釈では細胞壁) に局在する⁷⁸⁾。シロイヌナズナではこのうち *HEXO1*, *HEXO3* が機能的に発現している。液胞タンパク質に見られる M3FX の生成には *HEXO1* が、分泌タンパク質に見られる M3FX の生成には *HEXO3* が関わる分担があるのだろう。なお、これらの遺伝子のノックアウトシロイヌナズナは、GnM3FX から M3FX への変換が見られなくなるが、表現型に変化はなかった⁷⁸⁾。最近になり、トマト、唐

辛子の細胞壁に局在する本酵素遺伝子も同定されている^{51,52}。

3.6. 細胞質 α -マンノシダーゼ

植物の細胞質 α -マンノシダーゼはまだ明確には見いだされていないが、その存在が示唆されている。M9 構造 (図1) は小胞体・ゴルジ体で M5A 構造 (図1) までプロセシングされ^{2,3}、コンプレックス型糖鎖を形成する。M5A の形成に関わる二つのゴルジ α -マンノシダーゼ I を欠損させてもある程度の M5A が糖タンパク質に見られる⁴⁷。これは、ゴルジ体でのプロセシング経路以外に、M5A を生成させる経路があることを示している。また植物の *N*-結合型糖鎖で多く存在する構造の一つが M5A 構造である (図1)^{46,47}。さらに、植物細胞質遊離糖鎖で最も多い構造が M5A の還元末端の GlcNAc が 1 残基ない構造である^{11,79}。このことは、M5A 構造を生成させる α -マンノシダーゼが細胞質に存在することを示唆している。

このような α -マンノシダーゼの候補がイチヨウ種子に見いだされている⁸⁰。この酵素は M9 を M5A にまで加水分解する基質特異性を有していた。しかし、この酵素の局在場所ははまだ示されていない。至適 pH は 5 付近で^{80,81}、細胞質 α -マンノシダーゼに期待される至適 pH (中性) とは異なる。また、部分アミノ酸配列から見いだされた相同性遺伝子は GH38 の液胞 α -マンノシダーゼ候補遺伝子であった。このイチヨウ種子 α -マンノシダーゼの細胞内局在の解析と構造解析が待たれる。

哺乳動物の細胞質 α -マンノシダーゼ遺伝子 (GH38) が同定されているが^{82,83}、この遺伝子のオルソログは植物には見いだされない。哺乳動物と植物の細胞質遊離糖鎖の構造が違うことと関係しているのだろう。シロイヌナズナゲノムにはいくつかの α -マンノシダーゼ様遺伝子があるが、まだ機能同定されていないものとして、M5A を生成させるゴルジ α -マンノシダーゼと同じ GH47 に分類される At1g27520 と At5g43710 がある。これらが細胞質 α -マンノシダーゼに相当するのかもしれない。

3.7. β 1,4-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (キトビアーゼ)

エンド- β -マンノシダーゼの作用により、ある種のハイマンノース型糖鎖がオリゴマンノースと GlcNAc β 1-4GlcNAc に分解される過程がある (図7)。オリゴマンノースは液胞 α -マンノシダーゼにより、GlcNAc β 1-4GlcNAc は β 1,4-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (キトビアーゼ) により単糖にまで分解されると考えられる。このキトビアーゼ遺伝子は明確になっていない。

先に述べた液胞に局在する HEXO1 (At3g55260, GH20) は候補の一つで、GlcNAc β 1-4GlcNAc を加水分解できる⁷⁷。

また、タチナタマメ⁷⁶、コロハ芽生え⁸⁴、トウモロコシ芽生え⁸⁵などから、酸性領域に至適 pH を持つキトビアーゼが見いだされている。コロハ、トウモロコシ由来酵素の一番良い基質が GlcNAc β 1-4GlcNAc である。これらの酵素の遺伝子同定が待たれる。他に、エンド型キチナーゼのうち、GH18 のいくつかは、至適 pH が酸性で、キトビアーゼ活性を持つ⁸⁶⁻⁸⁸。なお、哺乳動物のリソソームに局在するキトビアーゼも GH18 に属する^{89,90}。当該遺伝子のノックアウト植物体で GlcNAc β 1-4GlcNAc が蓄積することを示すのが本酵素遺伝子の一つの同定方法である。

3.8. エンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ

N-結合型糖鎖が分解される際、糖タンパク質上の糖鎖が分解される経路と、糖鎖が遊離されてから分解される経路がある。後者の場合に必要酵素がエンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (本節) とペプチド:*N*-グリカナーゼ (次節) である。

エンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼは、*N*-結合型糖鎖の還元末端近傍の GlcNAc β 1-4GlcNAc 結合をエンド型で加水分解し、還元末端に GlcNAc 残基が一つある遊離糖鎖を生成する。真核生物に広く存在する。植物酵素の活性が初めて検出されたのは 1977 年で⁹¹、いくつかの植物から酵素が精製されている⁹²。中性付近に至適 pH があり、細胞質に存在すると考えられている。植物酵素はハイマンノース型糖鎖によく作用し、キシロースが結合した糖鎖にも作用するが、フコースが結合した糖鎖には作用しない。植物由来の酵素ではイネ由来の酵素遺伝子 (GH85) が 2007 年に同定された¹¹。シロイヌナズナにはこの酵素の遺伝子が二つ (At3g11040, At5g05460) ある⁹³。野生型植物の遊離糖鎖のほとんどが、還元末端 GlcNAc が 1 残基の糖鎖であったのに対し、その二重ノックアウト変異体の遊離糖鎖では、ほとんどが還元末端 GlcNAc が 2 残基の糖鎖で占められていた⁹³。このことは、この酵素が還元末端 GlcNAc が 1 残基の遊離糖鎖の生成に関わることを、ペプチド:*N*-グリカナーゼも遊離糖鎖の生成に関わることを示している。なお、この二重変異体の表現型は野生型と変わらなかった。

3.9. ペプチド:*N*-グリカナーゼ

ペプチド:*N*-グリカナーゼ (PNGase) は、糖ペプチドのアスパラギン残基と *N*-結合型糖鎖の間のグリコシルアミンの部分加水分解するアミダーゼで、1977 年にアーモンドから活性が検出された⁹⁴後、真核生物に広く存在することがわかった。PNGase はその後、いくつかの植物から精製されている^{95,96}。アーモンド酵素 PNGase A は微生物酵素とは異なり、アスパラギン残基に結合している GlcNAc 残基に α 1,3-フコースをもつ糖鎖にも作用する。

また糖タンパク質にはほとんど作用せず、糖ペプチドに作用する。アーモンド由来 (PNGase A)⁹⁷とトマト由来⁹⁸の酵素遺伝子が同定されている。これらの植物酵素の至適 pH はいずれも酸性領域にあり、シロイヌナズナの対応タンパク質 (At3g14920, At5g05480) が液胞プロテオーム解析で頻度高く現れていることと合わせて³⁰、この PNGase は液胞に局在していると考えてよい。このペプチド: *N*-グリカナゼ遺伝子の発現を制御した植物体の機能解析はまだ行われていない。糖タンパク質の液胞での分解は、プロテアーゼにより短い糖ペプチドに分解された後に、PNGase が作用して糖鎖を遊離し、各糖鎖分解酵素が作用して、糖鎖が完全分解される、というのが一つの分解ルートであろう。しかし、エンド- β -マンノシダーゼ¹⁹や液胞 α -マンノシダーゼ³⁸は、糖鎖そのものだけでなく、タンパク質 (ペプチド) に結合した状態の *N*-結合型糖鎖にも作用する。そのため、液胞内での糖タンパク質の分解は、ペプチドからも糖鎖からも起こりうる。

一方、PNGase には中性 pH 領域に至適活性をもち、細胞質に発現するタイプのものがある。シロイヌナズナの対応遺伝子 (At5g49570) のノックアウト変異体は明らかな表現型を示さなかったが、小胞体関連分解に関わると想定されている⁹⁹。

4. 植物 *N*-結合型糖鎖分解の経路と生理機能

これまで述べてきたように、現在、植物 *N*-結合型糖鎖の分解経路 (図7) の全貌が見えつつある。そして近年は同定された分解酵素の遺伝子を用いた糖鎖分解の機能解析が行われ始めている。

β 1,2-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (3.5 節) やエンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (3.7 節) のノックアウトシロイヌナズナでは、糖鎖構造の変化は観察されるが、変異体には何の表現型も表れない^{78,93}。細胞壁に発現する酸性 α -マンノシダーゼおよび β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼの発現を抑制すると果実の成熟が遅くなり、過剰発現すると果実の成熟が促進されることが最近示された^{51,52}。これらの酵素は果実の成熟を促す遊離糖鎖⁵³の生成に関与していると考えられる。

しかし、液胞で発現する α -マンノシダーゼやエンド- β -マンノシダーゼなどの糖鎖加水分解酵素を発現制御した植物体の機能解析はまだ行われておらず、液胞における糖鎖分解が及ぼす生理的意義はまだ明確でない。哺乳動物のリソソーム病のような重篤な表現型が現れるのか、液胞の形態や役割が異なる植物の成長段階ごとに表現型が現れるのか、興味を持たれる。

5. 植物 *N*-結合型糖鎖分解研究のこれからの課題

エンド- β -マンノシダーゼの際立つ特徴はその基質特異

性で、複数の構造の糖鎖に作用し、GlcNAc β 1-4GlcNAc を生成する。まだ遺伝子は同定されていないが、細胞質 α -マンノシダーゼも複数の基質に作用し、M5A を生成する。糖鎖関連酵素の作用は一般的に糖鎖の構造多様性を生むが、これらの酵素はそうではなく、糖鎖の構造多様性に対応して、複数の糖鎖を基質にして一つの生成物を与える²⁴。これらのユニークな基質特異性は、分子レベルで未だ説明できていない。これらの酵素の構造生物学的研究は、酵素の基質認識機構の観点から価値がある。また、3.2 節で見たように、植物コンプレックス型糖鎖の分解における α -マンノシダーゼと β -キシロシダーゼとエンド- β -マンノシダーゼの連携 (基質特異性の相補性) は見事で、それぞれの酵素の基質認識機構は興味ある課題である。これらは同じ時空間で働くはず (液胞で常時発現している) で、これらの遺伝子の発現機構も今後の一つの課題である。エンド- β -マンノシダーゼと α 1,2-フコシダーゼの複合体形成の生理的意義も興味ある課題である。複合体の安定性の解析や立体構造解析がそれを解く鍵となるであろう。

植物 *N*-結合型糖鎖の分解に関わる各酵素 (図2) の基質特異性解析と遺伝子同定が現在進められており、図7の経路は明らかにされつつある。しかし、この図は概略しか示していない。例えば、分解の各段階がどのオルガネラで行われるか明示されていない。一部の酵素については、局在場所がわかってきており、その情報からハイマンノース型糖鎖の分解は M9 から M5A までが細胞質、M5A から単糖に至るまでが液胞で行われていると考えられる。では、この場合、M5A がどのように液胞に取り込まれるのだろうか。オートファジーで取り込まれる糖タンパク質の主要な糖鎖が M5A である、ということだけであろうか。最近、液胞膜上に発現する単糖あるいは二糖のトランスポーターが複数同定されている^{100,101}。シロイヌナズナには、機能未同定のものも含めて 50 以上の単糖トランスポーター様遺伝子がコードされている⁹⁵。では、オリゴ糖を認識するトランスポーターが液胞膜上にあるのだろうか。この観点から、哺乳動物細胞の小胞体膜上の遊離オリゴ糖を輸送するトランスポーターの存在が示されていることは興味深い¹⁰²。

図7の一連の糖鎖の還元末端部分は遊離糖鎖のものになっているが、実際は糖タンパク質上の糖鎖に働きうる酵素もあり、各分解の段階において、一概に還元末端近傍の構造は確定できない。糖タンパク質糖鎖の分解におけるエンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼとペプチド: *N*-グリカナゼの寄与がどれほどかという問題でもある。

図7の *N*-結合型糖鎖の分解経路は植物特有のものであるが、2.3 節で述べたように哺乳動物の経路とは異なる。他の生物種における *N*-結合型糖鎖の分解経路はどうだろうか。これまでに生物種特有の糖鎖構造が見いだされてい

ること¹⁰³⁾を考えると、各生物種特有の糖鎖分解経路があることは十分にありうる。比較生物学的な観点で糖鎖分解を捉える研究は、糖鎖分解の意義に迫る一つの方法であろう。

液胞で単糖にまで分解された糖鎖がリサイクルされる過程では、どのようなタイミングでトランスポーターを介して液胞から細胞質に単糖が運ばれていくのだろうか。液胞は哺乳動物細胞のリソソームとは異なり、貯蔵装置としての機能もある。リサイクルされずに液胞に貯め込まれる糖鎖、単糖の割合はどれくらいであろうか。植物の各成長段階で異なるのかもしれない。

このような「糖鎖分解」から「糖鎖代謝」¹⁰⁴⁾につながる研究によって、植物における糖鎖分解の生理的意義が明らかになるだろう。糖鎖の分解研究は、これまで生化学的な酵素研究が中心であったが、現在では生理機能との関連の解明を目指した研究へとシフトしてきている。これらの研究成果が、糖鎖代謝のみならず、糖鎖生合成、糖鎖が作用する分子の研究成果と合わさって、細胞内外での糖鎖の一生を表す「糖鎖サイクル」¹⁰⁵⁾の理解の一翼となっていくはずである。

謝辞

本研究は、筆者が学生時代に在籍した大阪大学蛋白質研究所化学構造部門、助手として在籍した大阪大学大学院理学研究科化学専攻有機生物化学研究室で行われたものです。学生時代から一貫してご指導賜りました長谷純宏先生に深甚の謝意を表します。タンパク質化学の初歩から丹念に指導してくださいました崎山文夫先生、網澤進先生、乗岡茂巳先生に深く感謝申し上げます。研究を共に進め、苦楽を共にした大学院生のみなさまに感謝いたします。そして、いくつかの共同研究により、研究が進展しました。ご指導いただきました研究者のみなさまに厚く御礼申し上げます。

文 献

- Gomord, V., Fitchette, A.-C., Menu-Bouaouiche, L., Saint-Jore-Dupas, C., Plasson, C., Michaud, D., & Faye, L. (2010) *Plant Biotechnol. J.*, **8**, 564–587.
- Lerouge, P., Bardor, M., Pagny, S., Gomord, V., & Faye, L. (2000) *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **1**, 347–354.
- Strasser, R. (2009) *Plant Biosyst.*, **143**, 636–642.
- Winchester, B. (2005) *Glycobiology*, **15**, 1R–15R.
- Shah, M.M., Fujiyama, K., Flynn, C.R., & Joshi, L. (2003) *Nat. Biotechnol.*, **21**, 1470–1471.
- Fitchette-Lainé, A.C., Gomord, V., Cabanes, M., Michalski, J. C., Saint Macary, M., Foucher, B., Cavelier, B., Hawes, C., Lerouge, P., & Faye, L. (1997) *Plant J.*, **12**, 1411–1417.
- Kobata, A. (2001) *Glycobiology*, **11**, 99R–105R.
- Ishimizu, T., Norioka, S., Kanai, M., Clarke, A.E., & Sakiyama, F. (1996) *Eur. J. Biochem.*, **242**, 627–635.
- Ishimizu, T., Mitsukami, Y., Shinkawa, S., Natsuka, S., Hase, S., Miyagi, M., Sakiyama, F., & Norioka, S. (1999) *Eur. J. Biochem.*, **263**, 624–634.
- Ishimizu, T., Sasaki, A., Okutani, S., Maeda, M., Yamagishi, M., & Hase, S. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 38555–38562.
- Kimura, Y. (2007) in *Comprehensive Glycoscience* (Kamerling, J. P., Boons, G.-J., Lee, Y.C., Suzuki, A., Taniguchi, N., & Voragen, A.G.J. eds.), Vol. 3, pp. 61–78, Elsevier, Oxford.
- Chantret, I. & Moore, S.E. (2008) *Glycobiology*, **18**, 210–224.
- Funakoshi, Y. & Suzuki, T. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, **1790**, 81–94.
- Ishimizu, T. & Hase, S. (2006) *Trends Glycosci. Glycotech.*, **18**, 65–73.
- Ishimizu, T. & Hase, S. (2006) in *Endoglycosidases* (Endo, M., Hase, S., Yamamoto, K., & Takagaki, K. eds.), pp. 74–83, Kodansha/Springer, Tokyo.
- Matsuura, T., Sakai, H., Unno, M., Ida, K., Sato, M., Sakiyama, F., & Norioka, S. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 45261–45269.
- Karunanandaa, B., Huang, S., & Kao, T.-h. (1994) *Plant Cell*, **6**, 1933–1940.
- Sasaki, A., Yamagishi, M., Mega, T., Norioka, S., Natsuka, S., & Hase, S. (1999) *J. Biochem.*, **125**, 363–367.
- Ishimizu, T., Hashimoto, C., Kajihara, R., & Hase, S. (2006) *J. Biochem.*, **139**, 1035–1043.
- Sasaki, A., Ishimizu, T., & Hase, S. (2005) *J. Biochem.*, **137**, 87–93.
- Henrissat, B. & Davies, G.J. (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 637–644.
- Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A.D., Terry, A., Salamov, A., et al. (2008) *Science*, **319**, 64–69.
- Banks, J.A., Nishiyama, T., Hasebe, M., Bowman, J.L., Grib-skov, M., et al. (2011) *Science*, **332**, 960–963.
- Ishimizu, T. & Hase, S. (2005) *Trends Glycosci. Glycotech.*, **17**, 215–227.
- Oku, H., Hase, S., & Ikenaka, T. (1990) *Anal. Biochem.*, **185**, 331–334.
- Oark, C., Meng, L., Stanton, L.H., Collins, R.E., Mast, S.W., Yi, X., Strachan, H., & Moreman, K.W. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 37204–37216.
- Sasaki, A., Ishimizu, T., Geyer, R., & Hase, S. (2005) *FEBS J.*, **272**, 1660–1668.
- Ito, Y. & Ohnishi, Y. (2001) in *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology*. (Fraser-Reid, B.O., Tatsuta, K., and Thiem, J. eds.), pp. 1589–1619, Springer-Verlag, Berlin.
- Obayashi, T., Okegawa, T., Sasaki-Sekimoto, Y., Shimada, H., Masuda, T., Asamizu, E., Nakamura, Y., Shibara, D., Tabata, S., Takamiya, K., & Ohta, H. (2004) *DNA Res.*, **11**, 11–25.
- Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E.L., Girke, T., & Raikhel, N.V. (2004) *Plant Cell*, **16**, 3285–3303.
- Cornish, E.C., Pettitt, J.M., Bonig, I., & Clarke, A.E. (1987) *Nature*, **326**, 99–102.
- Surpin, M. & Raikhel, N. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 100–109.
- Ishimizu, T., Hashimoto, C., Takeda, R., Fujii, K., & Hase, S. (2007) *J. Biochem.*, **142**, 721–729.
- Katayama, T., Sakuma, A., Kimura, T., Makimura, Y., Hiratake, J., Sakata, K., Yamanoi, T., Kumagai, H., & Yamamoto, K. (2004) *J. Bacteriol.*, **186**, 4885–4893.
- Pshezhetsky, A.V. & Ashmarina, M. (2001) *Prog. Nucleic*

- Acid Res. Mol. Biol.*, 69, 81–114.
- 36) Fischer, E. (1895) *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 28, 1429–1438.
 - 37) Hill, K. (1934) *Ber. Verhandl. sächs. Akad. Wiss. Leipzig, Math.-phys. Klasse*, 86, 115–128.
 - 38) Li, Y.-T. (1966) *J. Biol. Chem.*, 241, 1010–1012.
 - 39) Li, Y.-T. (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 5474–5480.
 - 40) Harris, N. & Chrispeels, M.J. (1975) *Plant Physiol.*, 56, 292–299.
 - 41) Boller, T. & Kende, H. (1979) *Plant Physiol.*, 63, 1123–1132.
 - 42) van der Wilden, W., Gilkes, N.R., & Chrispeels, M.J. (1980) *Plant Physiol.*, 66, 390–394.
 - 43) van der Wilden, W. & Chrispeels, M.J. (1983) *Plant Physiol.*, 71, 82–87.
 - 44) Maley, F. & Trimble, R.B. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 1088–1090.
 - 45) Berman, E. & Allerhand, A. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 6657–6662.
 - 46) Rendic, D., Wilson, I.B.H., Lubec, G., Gutternigg, M., Altmann, F., & Léonard, R. (2007) *Electrophoresis*, 28, 4484–4492.
 - 47) Kajiuira, H., Koiwa, H., Nakazawa, Y., Okazawa, A., Kobayashi, A., Seki, T., & Fujiyama, K. (2010) *Glycobiology*, 20, 235–247.
 - 48) Howard, S., He, S., & Withers, S.G. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 2067–2072.
 - 49) Kimura, Y., Hess, D., & Strum, A. (1999) *Eur. J. Biochem.*, 264, 168–175.
 - 50) Hossain, M.A., Nakano, R., Nakamura, K., Hossain, M.T., & Kimura, Y. (2010) *J. Biochem.*, 148, 603–616.
 - 51) Meli, V.S., Ghosh, S., Prabha, T.N., Chakraborty, N., & Datta, A. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 2413–2418.
 - 52) Ghosh, S., Meli, V.S., Kumar, A., Thakur, A., Chakraborty, N., Chakraborty, S., & Datta, A. (2011) *J. Exp. Bot.*, 62, 571–582.
 - 53) Priem, B. & Gross, K. (1992) *Plant Physiol.*, 98, 399–401.
 - 54) Fujiyama, K., Kira, Y., Iizuka, M., Kimura, Y., & Seki, T. (2001) *J. Biosci. Bioeng.*, 92, 401–404.
 - 55) Tezuka, K., Hayashi, M., Ishihara, H., Nishimura, M., Onozaki, K., & Takahashi, N. (1993) *Anal. Biochem.*, 211, 205–209.
 - 56) Peyer, C., Bonay, P., & Staudacher, E. (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, 1672, 27–35.
 - 57) Ogata-Arakawa, M., Muramatsu, T., & Kobata, A. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.*, 181, 353–358.
 - 58) Yoshima, H., Takasaki, S., Ito-Mega, S., & Kobata, A. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.*, 194, 394–398.
 - 59) Imber, M.J., Glasgow, L.R., & Pizzo, S.V. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 8205–8210.
 - 60) Scudder, P., Neville, D.C., Butters, T.D., Fleet, G.W., Dwek, R.A., Rademacher, T.W., & Jacob, G.S. (1990) *J. Biol. Chem.*, 265, 16472–16477.
 - 61) Zeleny, R., Leonard, R., Dorfner, G., Dalik, T., Kolarich, D., & Altmann, F. (2006) *Phytochemistry*, 67, 641–648.
 - 62) de la Torre, F., Sampedro, J., Zarra, I., & Revilla, G. (2002) *Plant Physiol.*, 128, 247–255.
 - 63) Augur, C., Benhamou, N., Darvill, A., & Albersheim, P. (1993) *Plant J.*, 3, 415–426.
 - 64) Augur, C., Stiefel, V., Darvill, A., Albersheim, P., & Puigdomenech, P. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 24839–24843.
 - 65) Akoh, C.C., Lee, G.-C., Liaw, Y.-C., Huang, T.-H., & Shaw, J.-F. (2004) *Prog. Lipid Res.*, 43, 534–552.
 - 66) Tarragó, T., Martínez, I., Torrent, M., Codina, A., Giralt, E., Puigdomènech, P., & Ludevid, D. (2003) *Plant Mol. Biol.*, 51, 877–884.
 - 67) Léonard, R., Pabst, M., Bonddili, J.S., Chambat, G., Veit, C., Strasser, R., & Altmann, F. (2008) *Phytochemistry*, 69, 1983–1988.
 - 68) 石水 毅 (2009) ピリジルアミノ化による糖鎖解析 (長谷純宏編), pp. 86–90, 大阪大学出版会, 大阪.
 - 69) Arakawa, A., Ogata, S., Muramatsu, T., & Kobata, A. (1974) *J. Biochem.*, 75, 707–714.
 - 70) Ahn, Y.O., Zheng, M., Bevan, D.R., Esen, A., Shiu, S.H., Benson, J., Peng, H.P., Miller, J.T., Cheng, C.L., Poulton, J. E., & Shih, M.C. (2007) *Phytochemistry*, 68, 1510–1520.
 - 71) Kotake, T., Dina, S., Konishi, T., Kaneko, S., Igarashi, K., Samejima, M., Watanabe, Y., Kimura, K., & Tsumuraya, Y. (2005) *Plant Physiol.*, 138, 1563–1576.
 - 72) Bencúr, P., Steinkellner, H., Svoboda, B., Mucha, J., Strasser, R., Kolarich, D., Hann, S., Kölensperger, G., Glössl, J., Altmann, F., & Mach, L. (2005) *Biochem. J.*, 388, 515–525.
 - 73) Leiter, H., Mucha, J., Staudacher, E., Grimm, R., Glössl, J., & Altmann, F. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 21830–21839.
 - 74) Shimazaki, A., Makino, Y., Omichi, K., & Hase, S. (1999) *J. Biochem.*, 125, 560–565.
 - 75) Takahashi, N., Hotta, T., Ishihara, H., Mori, M., Tejima, S., Bligny, R., Akazawa, T., Endo, S., & Arata, Y. (1986) *Biochemistry*, 25, 388–395.
 - 76) Li, S.-C. & Li, Y.-T. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 5153–5160.
 - 77) Strasser, R., Bondili, J.S., Schoberer, J., Svoboda, B., Liebminger, E., Glossl, J., Altmann, F., Steinkellner, H., & Mach, L. (2007) *Plant Physiol.*, 145, 5–16.
 - 78) Liebminger, E., Veit, C., Pabst, M., Batoux, M., Zipfel, C., Altmann, F., Mach, L., & Strasser, R. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 10793–10802.
 - 79) Priem, B., Solokwan, J., Wieruszkeskp, J.-M., Strecker, G., Nazih, H., & Morvan, H. (1990) *Glycoconj. J.*, 7, 121–132.
 - 80) Woo, K.K., Miyazaki, M., Hara, S., Kimura, M., & Kimura, Y. (2004) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 2547–2556.
 - 81) Woo, K.K. & Kimura, Y. (2005) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 1111–1119.
 - 82) Suzuki, T., Hara, I., Nakano, M., Shigeta, M., Nakagawa, T., Kondo, A., Funakoshi, Y., & Taniguchi, N. (2006) *Biochem. J.*, 400, 33–41.
 - 83) Costanzi, E., Balducci, C., Cacan, R., Duvet, S., Orlacchio, A., & Beccari, T. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, 1760, 1580–1586.
 - 84) Bouquetlet, S. & Spik, G. (1978) *Eur. J. Biochem.*, 84, 551–559.
 - 85) Oikawa, A., Itoh, E., Ishihara, A., & Iwamura, H. (2003) *J. Plant Physiol.*, 160, 991–999.
 - 86) Kragh, K.M., Jacobsen, S., Mikkelsen, J.D., & Nielsen, K.A. (1993) *Physiol. Plant.*, 89, 490–498.
 - 87) Nielsen, K.K., Mikkelsen, J.D., Kragh, K.M., & Bojsen, K. (1993) *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 6, 495–506.
 - 88) Brummer, F., Stintzi, A., Fritig, B., & Legrand, M. (1998) *Plant J.*, 14, 225–234.
 - 89) Fisher, K.J. & Aronson, N.N., Jr. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 19607–19616.
 - 90) Liu, B., Ahmad, W., & Aronson, N.N., Jr. (1999) *Glycobiology*, 9, 589–593.
 - 91) Ogata-Arakawa, M., Muramatsu, T., & Kobata, A. (1977) *J. Biochem.*, 82, 611–614.

- 92) Berger, S., Menudier, A., Julien, R., & Karamanos, Y. (1995) *Biochimie*, **77**, 751–760.
- 93) Kimura, Y., Takeoka, Y., Inoue, M., Maeda, M., & Fujiyama, K. (2011) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1019–1021.
- 94) Takahashi, N. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 1194–1201.
- 95) Taga, E.M., Waheed, A., & van Etten, R.L. (1984) *Biochemistry*, **23**, 815–822.
- 96) Yet, M.G. & Wold, F. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 118–122.
- 97) 伊豆博幸, 三田正範, 加藤郁之進 (1995) 特開平07-274969.
- 98) Hossain, M.A., Nakano, R., Nakamura, K., & Kimura, Y. (2010) *J. Biochem.*, **147**, 157–165.
- 99) Diepold, A., Li, G., Lennarz, W.J., Nurnberger, T., & Brunner, F. (2007) *Plant J.*, **52**, 94–104.
- 100) Neuhaus, H.E. (2007) *FEBS Lett.*, **581**, 2223–2226.
- 101) Büttner, M. (2007) *FEBS Lett.*, **581**, 2318–2324.
- 102) Haga, Y., Totani, K., Ito, Y., & Suzuki, T. (2009) *Glycobiology*, **19**, 987–994.
- 103) Natsuka, S. (2005) *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **17**, 229–236.
- 104) Suzuki, T. (2009) *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **21**, 219–227.
- 105) Taniguchi, N. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 34469–34478.
-