

氏名	Md. Anowar Hossain
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学術
学位授与番号	博甲第4231号
学位授与の日付	平成22年 9月30日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Molecular identification and characterization of α -mannosidase and peptide:N-glycanase from tomato: two glycoenzymes involved in N-glycoprotein degradation during fruit ripening (トマト果実由来の α -マンノシダーゼ及びペプチド:N-グリカナーゼの分子生物学的解析: 果実熟成期におけるN型糖タンパク質分解に関与する2種の糖鎖関連酵素)
論文審査委員	教授 木村 吉伸 教授 村田 芳行 准教授 中野 龍平

学位論文内容の要旨

At first, I purified and characterized an α -mannosidase to homogeneity from mature red tomato fruits. The purified α -mannosidase (Man-Le) could hydrolyzed the α 1-2, 1-3, and 1-6-mannosidic linkages from both high-mannose type and plant complex type N-glycan, but preferred a truncated plant complex type structure to high-mannose type N-glycans bearing α 1-2 mannosyl residues. Then I cloned and expressed a cDNA from tomato fruits in *Pichia pastoris* and identified the α -mannosidase activity in Pichia cell lysate. The gene-encoded-protein is single polypeptide chain of 1028 amino acids containing glycosyl hydrolase super-family domain 38 with predicted molecular mass of 116 kDa. All the physico-chemical properties of recombinant α -mannosidase are same as that of native enzyme. I also developed a molecular 3-D model of Man-Le based on the crystal structure of bovine lysosomal α -mannosidase which showed that catalytically important residues of Man-Le are conserved and superimposed with C α atoms of animal lysosomal α -mannosidase, suggesting that plant acidic α -mannosidase possesses very similar active site conformation and catalytic mechanism as that of animal one. Lastly I did the cloning and expression of a cDNA from tomato fruits that encoded an acidic peptide:N-glycanase in the *Pichia* culture supernatant. The PNGase-gene-encoded protein is a single polypeptide chain of 588 amino acids with a predicted molecular mass of 65.8 kDa. I characterized the recombinant acidic peptide:N-glycanase and drawn a phylogenetic tree.

論文審査結果の要旨

本学位論文は、植物の分化成長に関わる糖タンパク質糖鎖の代謝機構解明と遊離糖鎖の機能利用を目的とした研究の一環として（１）トマト果実の熟成過程で発現される α -マンノシダーゼ (α -Man'ase) の精製とキャラクターゼーション（２）トマト α -Man'ase の遺伝子同定、発現系構築、組換え酵素の性質検討及び分子モデリングによる立体構造解析（３）トマト果実の熟成過程で発現され糖タンパク質から糖鎖の遊離を司るペプチド:*N*-グリカナーゼ (PNGase)の遺伝子同定、発現系構築及び組換え酵素の性質検討についての研究成果が記載されている。論文は緒論(第1章)と結論(第5章)を含めて5章構成となっている。第2章ではトマト果実からの酸性 α -Man'aseの精製とキャラクターゼーション結果が記載されている。精製 α -Man'aseは、これまでに報告されている植物 α -Man'aseとは性質を異にし、弱酸性領域に至適pHを有し、パウチマンノース型糖鎖の α 1-6 Man 残基に対して強い活性を示した。構成サブユニットのN-末端アミノ酸配列を明らかにしたが、N-末端領域で相同性の高い既知 α -Man'aseは検索されなかった。第3章では、2章で明らかにしたアミノ酸配列をもとにトマト α -Man'ase遺伝子クローニングを行っている。当時、トマトゲノム解析が終了していなかったため、断片的な配列情報を基にRace法を駆使してcDNA全長を明らかにした。次いで、酵母発現系を用いてフラッグタグ付加タンパク質として組換え酵素の発現と単一精製に成功している。精製組換え酵素について、詳細な基質特異性をはじめとする酵素化学的性質を明らかにし、本酵素が果実熟成期の糖タンパク質代謝に重要な役割を担うことを明らかにした。更に、全アミノ酸配列を用いた相同性検索により、トマト α -Man'aseがウシリソソーム α -Man'aseと高い相同性を有することを見だし、ウシ酵素の結晶構造をもとに分子モデリング法により立体構造予測を行った。その結果、トマト α -Man'aseの立体構造はウシ酵素のそれと高い相同性を有し、触媒ドメイン及び触媒アミノ酸残基の空間配置も完全に保存されていることを明らかにした。第4章では、タンパク質からの糖鎖遊離を司る酸性PNGase遺伝子の同定を行っている。アーモンドPNGase遺伝子配列を基にトマトゲノム情報から候補遺伝子を絞り込み、その遺伝子を大腸菌で発現させることで遺伝子同定に成功し、組換え酵素の基質特性をはじめとする酵素学的性質を明らかにした。以上の内容を持つ本論文は、博士論文として相応しい学問的意義及び価値を有するとともに、糖鎖機能を利用した植物バイオテクノロジー開発に向けての実用的価値を有するものと判定した。