

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 11 年度博士課程 入学

氏名 賀 麗 瑛

指導教官名 大久保 明

### 論文題目

キャピラリー電気泳動法による糖分離機構および蕨類膜外 Mn-SOD の糖鎖の解析

### 第一部 キャピラリー電気泳動法による誘導体化糖の分離分析とその分離機構

糖タンパク質やグリコサミノグリカンなどの複合糖質から得られる微量のオリゴ糖および単糖を分析する場合、感度が高く、かつ優れた特異性を有する検出法と高い分離能を兼ね備えた分析法が必要である。キャピラリー電気泳動法(CE)は短時間で分析が完了し、分離能が高く、必要な試料が微量であり、環境負荷が少ない分析法として近年注目を集めている。糖を高感度で検出するためには、UV などの吸収を持つ化合物の誘導体に標識する必要がある。本研究では、還元末端を 2-アミノ安息香酸(2-AA)で標識し、その標識された糖誘導体が、キャピラリーゾーン電気泳動(CZE)で良好に分離分析できることを示し、その分離機構が糖誘導体の溶液内立体構造と電荷によることを NMR と分子モデリング計算法により証明した。

#### 1. 糖誘導体のキャピラリー電気泳動法による分離分析とその分離についての考察

2-AAを用いて糖の標識化反応を行い、CEによる分離を行った。まずこの標識反応の最適条件や標識率を調べ、CEによる検量線を検討した。その結果、溶媒には水を用い、65°C、2時間、pH

5.7、2-AA の濃度を 0.2 M、糖と 2-AA の濃度比を 1 対 2 としたとき、60% 以上の標識率が得られた。検量線は 10  $\mu$ M から 600  $\mu$ M の範囲で直線性を示し、検量限界は 100 fmol であった。

リン酸泳動液を用い、泳動液の pH を 5.5 から 7.0 まで変化させ、糖誘導体を CE による分離を行ったところ、pH 5.5 で最適な分離が得られ、セロビオースとマルトース(Mal)の二糖、六炭糖のマンノース(Man)とグルコース(Glc)、五炭糖のリボース(Rib)とキシロース(Xyl)、四炭糖のトレオースとエリトロース、三炭糖のグリセルアルデヒドの各誘導体が分子量の大きい順で良好に分離された。特に注目する点は、Man と Glc 誘導体、また Rib と Xyl 誘導体が、分子量が同じであるにもかかわらず、明瞭に分離していた点である。pH が 6.0、7.0 と上昇すると、電気浸透流が大きくなるため溶出が早くなり分離能が低下した。CZE では、試料の泳動速度は、試料の電気泳動速度と電気浸透流速度の和で決まる。試料の電気泳動速度は、試料の電荷量と溶媒の粘度およびストークス半径によって規定される。今回の分析条件では、糖誘導体の負電荷は同一であるので、分離の要因はストークス半径の大小に基づくものと思われる。つまり分子全体は負に帯電していることから、ストークス半径が大きいものが早く、小さいものほど遅く検出されることになる。Man と Glc 誘導体、また Rib と Xyl 誘導体が顕著に分離したことは、分子量が同じでも、水酸基の立体異性に基づくストークス半径のわずかな違いが分離の要因であると考察した。

糖の CE 分離にはホウ酸の添加が有効であり、実用的な分析がなされている。ホウ酸はシスジオール基をもつ化合物と安定なエステルを形成することが知られている。そのため CE 分析では単に誘導体自身のストークス半径だけではなく、ホウ酸との結合が分離に効果的に働くと考えられる。泳動液に 150 mM のホウ酸を添加した場合、主な単糖の誘導体が短時間でよく分離できた。特に六炭糖である Man、Gal、Glc、また五炭糖である Rib と Xyl の各誘導体が明確に分離した。この時は、ホウ酸を添加しない時とは異なり、Rib 誘導体は六炭糖より先に検出された。これらの結果から、ホウ酸を泳動溶液に添加することにより、糖のエステル化が起こり、pH が中性領域でも高い分離能が得られることが示された。

## 2. 糖誘導体の構造および電気泳動挙動についての解析

糖誘導体の構造および電気泳動の挙動について NMR を用いて検証を行った。各種の糖誘導体について、単離精製を行い、NMR 測定のサンプルとした。まず六炭糖及び五炭糖誘導体の立体構造を NMR で調べた。六炭糖を例とすると、グルコースの誘導体、2-AA-Glc とマンノースの誘導体、2-AA-Man の構造の違いは C-2 の不斉だけであるが、C-2 の水酸基の立体配置とベンゼン環のカルボキシル基との相互配置により、化学シフトは 2-AA-Glc と 2-AA-Man で大きく異なる。NMR により、両者のカップリング定数が得られ、このカップリング定数の中で最も異なるのは H-2 と H-3 の間の  $J_{23}$  であり、C-2 の不斉に基づく主鎖の C-2/C-3 の二面角の違いが分子構造に最も大きく影響していることが考えられる。さらに、Karplus の式によりカップリング定数から求めた二面角に基づいて、分子構造計算ソフト(PC Spartan Pro)を用いて、各糖誘導体の安定配座を求めた。計算した安定配座の構造モデルより、2-AA-Glc では C-3、C-4、C-5 位で折れ曲がり、一方、2-AA-Man では伸びた構造であることが示唆された。すなわち、2-AA-Glc は糖炭素鎖が

2-AA-Man よりも立体的にやや小さくなり、ストークス半径が2-AA-Manより小さいためにCEで遅く溶出すると考えられ、このことはCEの結果と一致する。五炭糖の2-AA-Ribと2-AA-Xylも同じ結果で、2-AA-Xylはストークス半径が2-AA-Rib より小さくなり、遅く溶出すると考えられ、CEの結果と一致する。

次に、ホウ酸による電気泳動の挙動に対する影響を考察するため、精製した糖誘導体をホウ酸と反応させ、得られたエステルの  $^{13}\text{C}$ ,  $^{11}\text{B}$ ,  $^1\text{H}$  の NMR 測定を行った。NMR の結果から、2-AA-Glc はホウ酸と主にジエステルを形成し、一方、2-AA-Rib, 2-AA-Mal などはモノエステルのみを形成した。2-AA のカルボン酸が電荷を与えるので、ホウ酸モノエステルの電荷は  $-2$ 、ジエステルの電荷は  $-3$  となる。従って、リン酸泳動液の場合と異なり、2-AA-Rib の電荷が  $-2$ 、2-AA-Glc の電荷が  $-3$  となり、電荷が主な分離の要因で、2-AA-Rib が 2-AA-Glc より先に検出されたと考えられ、これは CE の結果と一致する。

このように、泳動液にホウ酸を加えた分離では糖誘導体とホウ酸エステルを形成するため、ホウ酸との結合数や結合のしやすさが分離に影響を及ぼすことが確認された。

## 第二部 蘚類ネジグチコケ (*Barbula Unguiculata*) 膜外 Mn-SOD の糖鎖の解析

コケ植物は最初の陸上植物であると考えられ、生物が酸性毒性にどのように適応していたかを考察する上で重要な位置にあると考えられる。1999年、蘚類ネジグチコケの細胞の膜外に局在するタンパク質として、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)活性を持った膜外 Mn-SODが発見され、コムギの発芽時に特異的に発現するジャーミンと呼ばれるタンパク質と高い相同性が示された。そのため、このタンパク質はジャーミン様タンパク質と定義され、新規糖タンパク質と推定される。近年、このようなジャーミン様タンパク質はすべて糖タンパク質で、植物に普遍的に存在することが分かりつつあり、その性質についての研究、考察が盛んに行われているが、生理学的役割は未だに不明で、特に糖鎖構造についての報告はほとんどなされていない。

本研究では、ネジグチコケの膜外 Mn-SOD の生理的な意義を解明するため、まずこのタンパク質に関する生化学的知見とその糖鎖構造の解析を行った。

### 3. 蘚類ネジグチコケ (*B. Unguiculata*) の細胞培養および膜外 Mn-SOD の抽出精製

グルコースを炭素源、硝酸カリウムを窒素源とする培地を臍つきフラスコに入れ、好気明条件、 $25^{\circ}\text{C}$ で大量培養を行った。遠心により培養細胞を集め、膜外 Mn-SOD を  $1\text{ M NaCl}$  で抽出し、90%飽和硫酸アンモニウムで塩析し、沈殿画分を回収した。次に  $\text{Tris-HCl}$  に再溶解した後、透析し、透析内液について熱処理による部分精製を行った。Superdex ゲル濾過クロマトグラフィーにより活性画分を回収し、更に逆相クロマトグラフィーにより精製分取した。この精製したものを本タンパク質の生化学的性質および糖鎖の解析に供した。

#### 4. ネジグチコケ膜外 Mn-SOD の生化学的性質および糖鎖構造の解析

本タンパク質はゲル濾過クロマトグラフィーより、分子質量が 137 kDa と推定された。一方、強酸性条件や 70°C以上の熱処理を行うことでサブユニット単位に分離することが判り、そのサブユニットの分子質量は非還元 SDS-PAGE で 28 kDa であり、MALDI-TOF-MS では約 22 kDa であった。このことから、本タンパク質は六量体を形成することが示唆された。また、本タンパク質は耐熱性を示し、70°C以下で、多量体のままであり、SOD 活性を維持した。一方、サブユニットに分離すると同時に SOD 活性も確認されなくなった。

本タンパク質は金属酵素であるため、ゼーマン原子吸光分析法で金属含量を求めた。その結果、サブユニット当たり約 1 原子の Mn を含むことが判明した。

糖鎖構造の解析については特異的な糖鎖を認識して結合するレクチンを利用し、レクチンプロットによる糖鎖構造の絞りこみを試みた。膜外 Mn-SOD を PVDF 膜に転写し、八種類のビオチン標識レクチンを用い、感度が高いアビジン-ビオチン化酵素複合体で検出する方法(ABC法)によって膜外 Mn-SOD の糖鎖構造の推定を行った。その結果、膜外 Mn-SOD の糖鎖はアスパラギン型糖鎖であり、またアスパラギンに最も近い GlcNAc 残基に L-Fuc が  $\alpha$  1-6 結合した構造であることが強く示唆された。精製した膜外 Mn-SOD をアスパラギン型糖鎖切断酵素であるグリコペプチダーゼ F (GPF) で消化し、消化しないものとの比較を行ったところ、SDS-PAGE では明らかなバンドの変化が認められた。さらに、糖鎖の分子量と結合部位を MALDI-TOF-MS で求めることを試みた。その結果、サブユニットの全アミノ酸配列から想定される分子量も考慮し、糖鎖の分子量が 1300-1400 の範囲であることが判明した。また、アスパラギン型糖鎖はタンパク質に NX(T/S)の構造が必要であり、本タンパク質のアミノ配列にはこの配列は 55-57 残基一箇所しかない。それゆえ、55 番目のアスパラギンが糖鎖の付加部と考えられた。

また SDS-PAGE 後の膜外 Mn-SOD のバンドを切り取ってゲル内トリプシン消化を行い、その断片をセミマイクロ HPLC により分取した。それらの一部を GPF で消化し、MALDI-TOF-MS で分子量の変化する断片を探索し、糖残基結合ペプチド断片の特定も試みた。さらに糖鎖構造を決定するため、膜外 Mn-SOD の糖鎖をヒドラジン分解後、ピリジルアミノ化し、高速液体クロマトグラフィーによる二次元糖鎖マップ法によって、糖鎖構造の推定を試みた。以上のいくつかの方法よりこのタンパク質は (GlcNAc)<sub>3</sub>: Man<sub>3</sub>: Xyl: Fuc という構造をもつと推定した。今後は続けて確認を行う予定である。

#### 5. まとめ

本研究第一部では、NMR により糖誘導体の立体構造を示し、CE による誘導体化糖の分離機構を解明した。NMR のデータより CE の分離理論を裏付けたのは本研究が初めてと考えられる。この基礎研究の結果を生かし、他の手段とともに糖の高感度分析の多くの分野での実用が期待される。第二部では、蘚類ネジグチコケの膜外 Mn-SOD について生化学的性質や糖鎖構造の解析を行った。得られた知見はこの糖タンパク質をはじめジャーミン様タンパク質の生理的役割の解明への応用が期待される。