

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 賀 麗 蘋

糖鎖は、生体内でタンパク質や脂質と結合し、重要な機能的役割を担っていることが知られている。糖タンパク質における糖鎖は、細胞の発生、分化、細胞間接着さらには免疫やがんの転移などの生命現象に深く関わっている。また糖鎖の機能として、タンパク質の溶解性やその代謝に関与しており、その構造に関して多くの知見を得ることは機能発現機序を解明する上で大変重要である。本研究では、キャピラリー電気泳動法を用いた糖鎖の分析手法の開発ならびに未知糖鎖の構造を解析することを目指した。本研究は二部構成よりなる。

第一部では、分析法としてキャピラリー電気泳動法の有用性を示し、その分離機構について NMR を用いて解析した。

第 1 章では第一部の序論として本研究の第一部の背景と目的を述べている。

第 2 章では糖誘導体のキャピラリー電気泳動法 (CE) による分離分析とその分離について述べている。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るなどの利点を有する、優れた分析方法である。糖の還元末端を 2-アミノ安息香酸 (2-AA) で標識し、CE で分離分析を行った。種々の条件検討の結果、誘導体化糖は迅速かつ高感度に定量分析することが可能であり、単糖組成分析に有効であることを示した。

第 3 章では、糖誘導体の構造およびキャピラリー電気泳動法の分離挙動に関する NMR を用いた解析について述べている。糖誘導体のリン酸泳動液中の分離を行った場合、分子量、電荷が同一の五炭糖である Rib と Xyl、ならびに六炭糖である Man と Glc が明瞭に分離していることを確認し、このことは、これら誘導体のストークス半径の差に起因すると考え、NMR ならびに分子モデリング手法による 3 次元構造の解析を行い、両誘導体間でストークス半径に差のあることを示し、CE の泳動挙動を論理的に説明した。泳動液にホウ酸を加えた分離挙動について、 $^{13}\text{C}$ -NMR、 $^{11}\text{B}$ -NMR を用いて調べた。糖誘導体とホウ酸エステルを形成するため、ホウ酸との結合形態、その結果生じるホウ酸エステルの電荷とストークス半径などの因子が分離に影響を及ぼすことが確認された。NMR の結果から CE の分離理論を裏付けたのは本研究が初めてであり、この研究成果を活かし、他の分析手段と共に糖の高感度分析の多くの場面で実用化が期待される。

第二部では、実際の糖タンパク質として蘚類ネジクチゴケ (*B. Unguiculata*) の膜外 Mn-SOD を対象とし、いくつかの手法を用いて糖鎖の構造解析を行っ

た。

第 4 章では第二部の序論として、本研究の第二部の背景を述べ、この分野での位置づけを明確にしている。

第 5 章では蘚類ネジクチゴケの細胞培養および膜外 Mn-SOD の抽出精製について述べている。熱処理による部分精製、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。

第 6 章ではネジクチゴケ膜外 Mn-SOD の生化学的性質について述べている。本タンパク質は分子質量が 123 kDa と推定され、そのサブユニットの分子質量は MALDI-TOF-MS では約 22 kDa であったため、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、ゼーマン原子吸光分析法で金属含量を求めた結果、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。

第 7 章では糖鎖構造の解析について述べている。糖鎖構造の解析についてはまず 8 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 結合した構造が強く示唆された。また 55 番目のアスパラギンが糖鎖の付加部と推定した。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、糖鎖構造の推定をした。以上のいくつかの方法によりこのタンパク質は  $(\text{GlcNAc})_3 : \text{Man}_3 : \text{Xyl} : \text{Fuc}$  という構造をもつと推定した。

以上本論文は、生命活動に深く関っている糖鎖について、NMR ならびに分子モデリング手法によりキャピラリー電気泳動法での糖誘導体の分離機構を解明し、あわせて蘚類ネジクチゴケの膜外 Mn-SOD について生化学的性質や糖鎖構造の解析を行ったもので、学術上応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。