

氏名	吉家 猛雄		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	農 学		
学位授与番号	博甲第5052号		
学位授与の日付	平成26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	未利用海藻に発現される糖タンパク質糖鎖の構造特性解析及び海藻由来レクチンの精製と糖鎖結合特異性解析		
論文審査委員	教授 木村 吉伸	教授 稲垣 賢二	教授 田村 隆

学位論文内容の要旨

本研究では、瀬戸内海に生育する海藻（海草）を未利用植物バイオマスとして捉え、機能性糖鎖の有効な供給源としての可能性を探索するために、それらが産生する糖タンパク質糖鎖、特にN-グリカンについて網羅的な構造解析を行うとともに（第2章）、医療への応用が期待されるレクチンの精製と糖鎖結合特異性解析（第3章）を行っている。

褐藻類7種、紅藻類5種、緑藻類2種及び海草1種の合計15種の海藻および海草から、ペプシン消化、イオン交換、ゲルろ過および親水性クロマトを組み合わせることで糖ペプチドを部分精製した後、ヒドラジン分解、N-アセチル化、ピリジルアミノ化により蛍光標識糖鎖を調製した。蛍光標識糖鎖を逆相及び順相HPLCで精製した後、ESI-MS及び酵素消化法により構造解析を行った。その結果、海藻（海草）糖タンパク質には複合型糖鎖は見られず、ハイマンノース型糖鎖のみが結合することを明らかにしている。特に、ホンダワラ、アマモでは、Man9GlcNAc2構造が主要構造として存在することが明らかとなり、抗HIV抗体作成への応用が期待される。一方、淡水圏で生育する沈水性植物（オオカナダモ、コカナダモ、マツモ）が産生する糖タンパク質糖鎖は、植物複合型（抗原性）糖鎖がほとんどを占めており、ルイスaエピトープを持つ糖鎖も比較的多量に存在することを明らかにした。この結果は、これらの沈水性植物が有用な免疫活性を持つ機能性糖鎖の重要な供給源になることを示すものであった。

第3章では、緑藻類であるミル (*Codium fragile*) に着目して、レクチンの精製と糖鎖結合特異性解析を行った。ミルからタンパク質を抽出した後、疎水クロマトとゲルろ過により2種のレクチン(CFL-I, CFL-II)を精製した。CFL-IはヒトA型、AB型赤血球とニワトリ赤血球を特異的に凝集させたが、B型およびO型赤血球に対しては凝集活性を示さなかった。それに対して、CFL-IIはヒトA型、B型、AB型、O型全てのタイプの赤血球を凝集させたが、ニワトリ赤血球に対しては凝集活性を示さなかった。これらのことから、CFL-IとCFL-IIの糖鎖結合特異性は異なることが推察された。CFL-IとCFL-IIの分子量は、還元条件下のSDS-PAGEで、それぞれ40kDaおよび12kDaであった。また、CFL-IのN末端配列がA-P-T-K-L-P-L(X)-(X)-Y-であるのに対して、CFL-IIのそれはF-Q-T-G-I-V-Q-E-S-G-であり、ゲルろ過とSDS-PAGEとの結果から、CFL-I、CFL-IIは異なるタンパク質であることが明らかとなった。CFL-IとCFL-IIが赤血球凝集活性に違いを示したことから、糖鎖アレイ分析により詳細な糖鎖結合特異性を解析した。その結果、CFL-I、CFL-IIともにA型抗原糖鎖のみに結合活性を示し、糖鎖結合特異性は同一であることが明らかになった。従って、ヒト赤血球に対するCFL-IIのレクチン活性は、血液型抗原糖鎖のみでなく、ヒト赤血球表面に遍在し、かつニワトリ赤血球表面には存在しないヒト特異的な赤血球表層糖鎖に結合することが推察された。

論文審査結果の要旨

本学位論文は、瀬戸内海に生育する海藻を未利用植物バイオマスとして捉え、機能性糖鎖の有効な供給源としての可能性を探索するために、それらが産生する糖タンパク質糖鎖、特にN-グリカンについて網羅的な構造解析を行うとともに、海藻から医療への応用が期待されるレクチンの精製と糖鎖結合特異性解析を行っている。

褐藻類 7 種、紅藻類 5 種、緑藻類 2 種及び海草 1 種の合計 15 種の海藻及び海草から、糖ペプチドを部分精製した後、蛍光標識糖鎖を調製し、ESI-MS 及び酵素消化法により糖鎖構造を解析した。その結果、海藻糖タンパク質には複合型糖鎖は見られず、ハイマンノース型糖鎖のみが結合することを明らかにしている。特に、ホンダワラ、アマモでは、Man9GlcNAc2 構造が主要構造として存在することが明らかとなり、抗 HIV 抗体作成への応用・利用が期待される。海水圏沈水性植物の糖鎖構造特性の知見をもとに、淡水圏沈水性植物が産生する糖タンパク質糖鎖について、比較生化学的観点から糖タンパク質糖鎖の構造特性解析を行った。その結果、淡水圏沈水性植物では、植物抗原性糖鎖が主要構造を占めることが明らかとなり、免疫活性を持つ機能性糖鎖の重要な供給源になることを示した。

次いで、緑藻ミル (*Codium fragile*) に着目して、レクチンの精製と糖鎖結合特異性解析を行った。まず、ミルから 2 種のレクチン(CFL-I, CFL-II) を精製した。CFL-I (40 kDa) はヒトA型、AB型赤血球とニワトリ赤血球を特異的に凝集させたが、B型およびO型赤血球に対しては凝集活性を示さなかった。それに対して、CFL-II (12kDa) はヒトA型、B型、AB型、O型全てのタイプの赤血球を凝集させたが、ニワトリ赤血球に対しては凝集活性を示さなかったことから、CFL-IとCFL-IIの糖鎖結合特異性は異なることが推察された。そこで、糖鎖アレイ分析により詳細な糖鎖結合特異性を解析したところ、CFL-I, CFL-IIともに A型抗原糖鎖 (非還元末端 α -GalNAc残基) にのみに結合活性を示し、糖鎖結合特異性は同一であることが明らかになった。この結果から、ヒト赤血球に対するCFL-II のレクチン活性は、血液型抗原糖鎖のみでなく、ヒト赤血球表面に遍在し、かつニワトリ赤血球表面には存在しないヒト特異的な赤血球表層糖鎖に結合することが推察され、Forssman 抗原のような腫瘍抗原糖鎖に特異的に結合する可能性を推定している。

以上の内容を持つ本論文は学問的意義及び価値を有するとともに、糖鎖薬剤開発や腫瘍細胞検出試薬開発に向けた海藻および淡水圏沈水性植物の有用性を示すものであり、博士論文として意義あるものと判定した。