

氏名	TUMURBAATAR OYUNJARGAL		
授与学位	博士(工学)		
学位記番号	博甲第146号		
学位授与年月日	平成27年9月4日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項		
学位論文題目	Enzymatic Digestion and Mass Spectroscopies of <i>N</i> -Linked Glycans in Lacquer Stellacyanin and Laccase from <i>Rhus vernicifera</i> (酵素処理と質量分析による漆ステラシアニンとラッカーゼ中のN-型糖鎖の解析)		
論文審査委員	主査	教授	吉田 孝
		准教授	菅野 亨
		准教授	服部 和幸
		准教授	佐藤 利次
		教授	阿部 良夫

## 学位論文内容の要旨

天然塗料として使われている漆樹液は強い接着力と艶やかな光沢を持つフェノール系の天然樹脂である。漆樹液にはウルシオール、多糖、糖タンパク質及びラッカーゼ酵素、ステラシアニンやペルオキシダーゼなどの酵素が含まれている。ラッカーゼ酵素及びステラシアニンは銅含有糖タンパク質あり、アミノ酸配列については解明されているが、タンパク質に付加する糖鎖に関する研究はないため全体構造が不明である。そこで、漆樹液に含まれ電子移動反応に関与する漆ステラシアニンおよび酸化還元酵素ラッカーゼ中のN-型結合糖鎖の構造解析を酵素処理や質量分析装置を用いて行った。糖タンパク質中の糖鎖は植物の小胞体内で起こる翻訳後修飾でタンパク質の折り畳み、相互作用、安定性、機能性などの重要な役割を果たしている。

アミノ酸配列から漆ステラシアニンにはN-型結合糖鎖の結合可能なモチーフが3ヶ所(Asn28, 60, 102)、ラッカーゼでは15ヶ所存在する。アセトンパウダーから分離精製したステラシアニンをトリプシン及びキモトリプシンで消化後、PNGase AやFでN-型糖鎖を切断し、ラベル化を行った。ラベル化N-型糖鎖のMALDI-TOF MS結果から漆ステラシアニンに分子量や構造の異なる複合型のN-型糖鎖( $\text{GlcNAc}_4\text{Man}_3\text{Gal}_2\text{Fuc}_3\text{Xyl}_1$ )が存在することが分かった。さらにトリプシン及びキモトリプシンで消化液をそれぞれLC/MS/MSに用いN-型糖鎖の結合位置について解析を行った。LC/MS/MSではTotal Ion Chromatography (TIC)から $m/z$  204 ( $\text{HexNAc}^+$ )のフラグメントイオンを指標して糖ペプチドのスペクトル(XIC)を検出しMS/MSを解析した。その結果、漆ステラシアニンでのN-型糖鎖結合可能な3か所すべてにMALDI-TOF/MS解析と同様な複合型のフコースやキシロース含有二分歧糖鎖が結合していることが分かった。複合型のN-型結合糖鎖、特にキシロース修飾は植物由来糖タンパク質の特異的な構造である。

漆ラッカーゼでも同様に解析を行った。SDS-PAGEでは100kDa付近にバンドが現れ、タンパク質のアミノ酸配列から結合する糖鎖の割合は1/3以上と予想された。トリプシン及びキモトリプシンで消化後、PNGase AやFでN-型糖鎖を切断しラベル化を行った。ラベル化N-型糖鎖のMALDI-TOF MS結果から漆ステラシアニンに分子量や構造の異なる複合型のN-型糖鎖( $\text{GlcNAc}_4\text{Man}_3\text{Gal}_2\text{Fuc}_3\text{Xyl}_1$ )、漆ラッカーゼには複合型に加えハイブリッド型N-型糖鎖( $\text{GlcNAc}_{2-3}\text{Man}_{4-5}\text{Fuc}_1\text{Xyl}_1$ )が存在することが分かった。トリプシン及びキモトリプシン消化物(ペプチドと糖ペプチドの混合物)をそれぞれLC/MS/MS装置を用いて糖ペプチドの解析を行った。Total Ion Chromatography (TIC)から $m/z$  204 (N-アセチルヘキソサミン,  $\text{HexNAc}^+$ )のフラグメントイオンを指標にしてすべての糖ペプチドのスペクトル(Extracted Ion Chromatography)を抽出した。糖ペプチドのMS/MSによる解析

ではペプチドのアミノ酸配列や N-結合糖鎖結合可能な部位を推定することで漆ラッカーゼでの N-型糖鎖の結合可能な 15 か所の中 13 か所に糖鎖が結合していることが分かった。漆ラッカーゼの N-型糖鎖は主に複合型のフコース含有二分岐糖鎖であり、Asn5, 233, 381 にはハイブリッド型糖鎖が結合していることが分かった。漆糖タンパク質の糖ペプチドの MS/MS では  $m/z$ 204 の他に 366 [GalGlcNAc<sup>+</sup>] 及び 512 [Gal(Fuc)GlcNAc<sup>+</sup>] のピークが多く検出され、 $m/z$ 512 は植物由来糖タンパク質の複合型 N-結合糖鎖の Lewis エプトープ診断イオンのピークと考えられる。

## 論文審査結果の要旨

天然塗料として使われる漆樹液は強い接着力と艶やかな光沢を持つフェノール系の天然樹脂で、樹液中にはウルシオール、多糖、糖タンパク質及びラッカーゼ酵素、ステラシアニンやペルオキシダーゼなどの酵素が含まれている。漆ラッカーゼ酵素及びステラシアニンは銅含有糖タンパク質あり、1次構造は解明されているが、タンパク質に付加する糖鎖に関する研究はない。申請者は漆樹液に含まれ電子移動反応に関与する漆ステラシアニンおよび酸化還元酵素ラッカーゼ中の N-型結合糖鎖の構造解析を酵素処理を行った後に質量分析装置を用いて解析を行い、複合型およびハイマンノース型糖鎖であることを初めて明らかにした。

漆ステラシアニンおよびラッカーゼの1次構造、すなわちアミノ酸配列から N-型結合糖鎖結合可能部位は3ヶ所および15ヶ所存在する。トリプシン及びキモトリプシンで消化後、PNGase AやF酵素で N-型糖鎖を切断、ラベル化を行い、N-型糖鎖を分離した。MALDI-TOF MS、LC/MS/MS等で解析した。その結果、漆ステラシアニンでは3か所すべてに複合型のフコースやキシロース含有二分岐糖鎖が結合し、ラッカーゼ酵素の13ヶ所では複合型に加えハイブリッド型 N-型糖鎖も結合していることが分かった。これらの糖鎖はタンパク質の折り畳み、相互作用、安定性、機能性などに重要な役割を果たしていると考えた。

これらの成果は国際専門学術誌に総合論文として掲載され、かつ学会での発表も行っている。本研究の成果は博士論文として必要な事項をすべて満たし研究の発展性も期待できる。よって申請者は北見工業大学博士(工学)の学位を授与される資格があると審査委員会は認めた。