

Title	Structural Analysis of Cytosolic Oligomannosides Using Improved Pyridylamination Method
Author(s)	柳田, 寛太
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41925
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	柳 田 寛 太 <small>やなぎ た かん た</small>
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 1 5 1 7 0 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科化学専攻
学位論文名	Structural Analysis of Cytosolic Oligomannosides Using Improved Pyridylamination Method (改良ピリジルアミノ化法を用いた細胞質オリゴマンノシドの構造解析)
論文審査委員	(主査) 教授 長谷 純宏 (副査) 教授 下西 康嗣 教授 関口 清俊

論 文 内 容 の 要 旨

細胞内において糖鎖は、糖脂質や糖蛋白質のような複合糖質や、動物細胞のサイトゾル中に存在する遊離オリゴマンノシドの形で存在し、様々な役割を担っている。しかし、このような糖鎖は存在量が少ないため、構造解析を行うのは困難であった。今回私は、サイトゾルに存在する遊離のオリゴマンノシドの生成経路を明らかにするため、微量の試料の構造解析を簡便に行うことができるピリジルアミノ化法 (PA 化法) の改良を行い、この改良法を用いてサイトゾルのオリゴマンノシドの構造解析を行った。

糖鎖の切り出しから蛍光標識まで1つのバイアルで行うため、アミノ酸の再 *N*-アセチル化を従来の飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と無水酢酸に代え、揮発性の試薬である0.1M 酢酸アンモニウム緩衝液中、無水酢酸とコリジンをを用いて行った。蛍光標識後、過剰の試薬を従来のクロロホルム抽出、およびゲルろ過に代え、フェノール-クロロホルム抽出と陽イオン交換樹脂を用いた。その結果、従来の方法に比べて、PA 化糖鎖の調製にかかる時間が約半分に短縮でき、また1 μ g の糖蛋白質からでもピリジルアミノ化糖鎖が簡便かつ高収率で得られた。

得られたピリジルアミノ化糖鎖を逆相 HPLC で高精度に分析するため、PA 化糖鎖の溶出時間の標準化を行った。PA 化糖鎖を構成する各糖残基は、逆相 HPLC の溶出位置に寄与する固有の値 (部分溶出時間) を持っており、各糖残基の部分溶出時間の和は、その PA 化糖鎖の溶出位置となる。今回、フコース残基の部分溶出時間を一定にする様に変換曲線を作成し、その変換曲線を用いて93種類の PA 化糖鎖の溶出位置の標準化を行った。この溶出位置から各糖残基の部分溶出時間を求めると、各糖残基の部分溶出時間のばらつきが減少し、各糖残基の部分溶出時間から求めた予想される溶出位置が、実際の測定値に近い値となった。

この開発された方法を用いてサイトゾル中に存在する微量のオリゴマンノシドの分析を行った。細胞質に存在する遊離オリゴマンノシドは、還元末端に *N*-アセチルグルコサミン1 残基を有する構造をしており、このような糖鎖は、従来の糖蛋白質糖鎖を分析する方法では構造解析することが困難であった。そこで、逆相およびサイズ分画 HPLC の溶出条件を改良し、細胞質オリゴマンノシドを分析する糖鎖二次元マップを作成した。この糖鎖二次元マップを用い、HepG 2 細胞の細胞質画分から得られた PA 化糖鎖の構造解析を行ったところ、12種類のオリゴマンノシドの構造が新しく見出された。また、グルコース残基を認識する蛋白質であるカルレティキュリンを固定化したカラムを用いて、グルコース残基を持つオリゴマンノシドを調製し、糖鎖二次元マップを用いて構造解析することにより9種類のオリゴマンノシドの構造を推定した。さらに、これらオリゴマンノシドの生合成経路を明らかにするため、細胞質

に存在する糖蛋白質糖鎖の構造解析および swainsonine による細胞質 α -マンノシダーゼの阻害実験を行った。その結果、これまでに報告されてきた小胞体から放出される経路以外に、細胞質や小胞体に存在する糖蛋白質からもオリゴマンノシドが生成することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

柳田君は、サイトゾルに存在する遊離オリゴマンノシドの構造を決定するためにピリジルアミノ化法を改良し、またピリジルアミノ化糖鎖の逆相HPLCの溶出時間を逆相スケール値という値に変換する事により正確に構造解析が行える様にした。これらの方法を用いて、サイトゾルの遊離オリゴマンノシドの構造解析を行った結果、29種類のオリゴマンノシドの構造が解明された。これらの生成経路を、細胞質糖蛋白質の糖鎖構造解析および細胞質 α -マンノシダーゼの阻害実験より推定し、従来の小胞体で生成する経路以外に、新たに糖蛋白質から生成する経路を発見した。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。