

氏名	Surina
授与学位	博士(工学)
学位記番号	博乙第27号
学位授与年月日	平成25年9月6日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項
学位論文題目	Study on DNA polymorphism and biological polysaccharides in plant resources (植物資源中のDNA多様性と生理活性糖鎖に関する研究)
論文審査委員	主査 教授 吉田 孝 教授 青山 政和 教授 星 雅之 准教授 服部 和幸 教授 阿部 良夫

## 学位論文内容の要旨

本論文は天然植物由来のDNAや糖鎖の構造、生理活性など研究についてまとめたものである。

漆はアジア原産の植物で数千年の昔から塗料や接着剤として使われている天然高分子であり、ラッカーゼ酵素によって重合する唯一の天然物である。漆のDNA遺伝子に関する研究は少なく、これまでにウルシ属植物葉緑体DNA中の*TmL-F*領域やPS-ID領域について塩基配列の解析が行われているが、核DNA中のITSやETS領域、葉緑体遺伝子*rbcL*や5S領域などについての研究はない。本研究では漆の系統解析、漆樹液の性質、地域差、資源保護などを目的に主に網走産漆(北海道)と会津若松産漆(福島県)のDNAのITSなど5つ領域の塩基配列を解析して、漆DNAの多様性を初めて見出した。日本の漆生産地である浄法寺町の漆(岩手県)のDNA塩基配列と比較し系統樹を作製した。またウルシの塩基配列変化と寒冷な生育環境の関係についても検討した。

実験は漆の新鮮な葉を用いて、初めにDNeasy Plant Mini Kitを用いDNA抽出しPCRによる各領域の増幅を行った。さらに電気泳動でPCR増幅結果を確認した。PCR産物を精製後、シーケンス反応を行いABI Prism 3130 Genetic AnalyzerでBigDye Terminator cycle sequencingとPrimerを用い配列決定した。

また、北海道網走市のウルシ植栽試験A、B、C地区漆樹について代表的なDNA領域を選びDNA塩基配列変化を移植元の漆と比較検討した。各配列長は、網走A、B地区に移植した漆では変化がないものの、網走C地区の漆ではITS領域で移植元の漆の配列長に比べ変化していた。また塩基配列も異なる割合が高かった。遺伝子領域については変化が少ないものの、スペーサー領域で変化が大きいことが分かった。塩基配列の変化は多様性によると推定され系統樹の結果とも一致した。

漆樹液中に含まれるラッカーゼ酵素は銅を含む糖タンパク質であり、タンパク質の構造、酵素としての性質やCu金属の役割などについての報告は多いが、糖鎖構造についての研究例はない。そこで種々の酵素を用いてN型糖鎖を分離精製しLC/MS装置により糖鎖

構造の解析を初めて行い、いくつかの糖鎖構造を同定することに成功した。さらに資源量も多いコンニャクグルコマンナンの有効活用を目指した生理活性化および生理活性作用メカニズムの解析についても予備的に研究を行った。その結果、高い抗ウイルス作用、抗凝血性を持つことが分かり、SPRによる作用メカニズムの解析からウイルスタンパク質中の塩基性アミノ酸部分との相互作用により生理活性が発現していることが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

漆は環境に優しい次世代の天然塗料として注目されているが資源量も少なく環境変化にも敏感なため資源保護が求められている。申請者は、漆の資源保護を大きな目的に遺伝子およびラッカーゼ酵素、天然糖鎖の相互作用などの観点から研究を進めた。漆の遺伝子研究例は少なく、漆栽培品種の DNA 塩基配列について、系統解析、漆樹液の性質、地域差、資源保護などの解明を目的に研究を行った。網走（北海道）、浄法寺町（岩手県）、会津若松（福島県）、那覇（沖縄県）の漆試料を採取し、種々の PCR 法を組み合わせ ITS など 5 領域の DNA 塩基配列を解析から栽培品種の多様性を見出した。この結果は栽培品種内の多様性を DNA 塩基配列から解析できる手段になると考えられる。漆ラッカーゼ酵素が持つ糖鎖の解析を種々の酵素分解および高分解能液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC/MS/MS)、MALDI TOF MS などの大型質量分析装置などを用いて解析し、漆ラッカーゼ酵素中には 15 ヶ所のアスパラギン結合糖鎖部位があることを見出し、そのうち 12 か所で糖鎖が結合し、それらの糖鎖構造の解析にも成功した。さらに資源量も多いグルコマンナンの有効活用を目指した生理活性化および生理活性作用メカニズムの解析についても研究を行った。その結果、高い抗ウイルス作用、抗凝血性を持つことが分かり、SPR による作用メカニズムの解析からウイルスタンパク質中の塩基性アミノ酸部分との相互作用により生理活性が発現していることが示唆された。

これらの成果は、国際専門学術誌に総合論文として掲載決定され、かつ国際会議、高分子学会等でも発表されている。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、かつ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。