

(論文内容の要旨)

糖質は生物科学的にも産業的にも重要な物質群であり、簡便かつ高感度な分析法の開発が求められている。代表的な糖質分析手段として高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が用いられているが、多くの糖質に発色団や発蛍光団が無い場合、示差屈折計による検出が一般的である。しかしその検出感度は低いため、微量糖質の検出には、高感度分光分析が可能になるように分析カラムの前あるいは後で糖質を誘導体化する必要がある。本研究は、広範な糖質および糖質関連物質に適用できる有効な分析法の確立を目的としており、ポストカラムラベル化剤ベンズアミジン (BA) による還元糖の蛍光誘導化反応を導入したHPLCを用いる糖質の微量分析法の開発およびその応用について検討したものである。その主な内容は以下のとおりである。

1. 発蛍光試薬の還元糖微量分析への適用 (糖組成分析) : 還元糖をホウ酸錯体として陰イオン交換 HPLC で分離する糖組成分析において、BA のポストカラム蛍光誘導化試薬としての可能性を検討した。反応試薬溶液へのアセトニトリル添加により、最適反応温度の低下とシグナル・ノイズ (S/N) 比の上昇を見出し、既知の蛍光誘導化剤アルギニン (最適反応温度 150℃) や 2-シアノアセタミド (同 100℃) で得られるのと同等の検出限界値 [D-グルコース、20.3 pmol/10 μ L (S/N = 3)] を低い反応温度 (95℃) で達成した (以下、検出限界値は試料溶液 10 μ L あたり、S/N = 3 における試料量を pmol で表示)。本分析法は木材廃液や配糖体の構成糖分析に応用でき、BA が HPLC による糖分析のポストカラム蛍光誘導化剤として有用であることが示された。

2. 還元糖微量分析HPLCによる中性単糖とオリゴ糖の同時分析 : BAを用いた還元糖のポストカラム蛍光誘導化反応を順相分配HPLC (カラム: TSKgel Amide-80) へ導入することにより濃度勾配溶離が可能になり、その結果単糖とオリゴ糖の迅速な同時微量定量法が確立できた [検出限界値 : D-グルコース、1.8 ; マルトヘキサオース、2.6]。単糖間の分離を保ったまま、45分以内に七糖までの分析が可能になり、オリゴ糖シロップおよびオリゴ糖混合物中の単糖とオリゴ糖の微量分析が達成できた。本分析法は高感度かつ迅速であり、広濃度域における検量線の直線性と高い再現性の利点を有しており、単糖とオリゴ糖の自動同時微量分析法として有用であることが示された。

3. 還元糖微量分析法のウロン酸微量分析への応用： BAを用いた還元糖のポストカラム蛍光誘導化反応を導入した順相分配HPLCによりウロン酸の微量分析を検討した。移動相への塩の添加によりウロン酸モノマー [D-グルクロン酸 (GlcA)、D-ガラクトン酸 (GalA)、D-マンヌロン酸 (ManA)] のカラムへの保持を改善でき、各種ウロン酸の最適分離条件を確立し、検出限界値はGlcA、7.2 ; GalA、23.9 ; ManA、7.1と求められた。飲料中の微量ウロン酸を中性糖とともに分析でき、本分析法はウロン酸微量分析法として有用であることが示された。

4. 紅藻類大型海藻ツルシラモ由来D-フルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼ (FBPA) の精製と性質： 紅藻類オゴノリ属大型海藻 *Gracilaria chorda* (ツルシラモ) 500 g (乾燥重量) の硫酸画分からイオン交換HPLC、疎水性相互作用HPLCによりFBPA 42 µgを精製した。ツルシラモには45 kDaと39 kDaの2種類のClass II FBPAが存在すること、ともに0.5 mM EDTAで失活すること、この失活はZn²⁺添加により回復することを明らかにした。一次構造の比較から、39 kDaの酵素は *Haemophilus influenzae* Class II FBPAと相同性が50%であり、本酵素が微生物由来のFBPAと近縁であることが示唆された。

5. ポストカラム蛍光誘導化反応を導入した還元糖微量分析法の海藻由来糖質関連物質研究への応用： BAを用いた還元糖のポストカラム蛍光誘導化反応を導入した順相分配HPLCと濃度勾配溶離法を組み合わせ、ウロン酸オリゴマーなど海藻由来糖質関連物質の微量分析を検討したところ、アルギン酸加水分解物に含まれるウロン酸モノマー [グルロン酸 (GulA) とManA] およびウロン酸オリゴマーの分離が可能であった。本分析法は海藻由来糖質関連物質の分析と分離に対し有効に利用できることが示された。

(論文審査の結果の要旨)

糖質は生物科学的にも産業的にも重要な物質群であり、簡便かつ高感度な分析法の開発が望まれている。本研究は、広範な糖質および糖質関連物質に適用できる有効な分析法の確立を目的として、ポストカラムラベル化剤ベンズアミジン (BA) による還元糖の蛍光誘導化反応を導入した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた糖質微量分析法の開発およびその応用について検討したものである。成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. 還元糖をホウ酸錯体として陰イオン交換HPLCで分離する糖組成分析において、BAによる還元糖の蛍光誘導化反応の条件を検討し、反応試薬溶液へのアセトニトリルの添加が最適反応温度の低下と検出感度の向上をもたらすことを見出した。既知の蛍光誘導化剤で得られるのと同等の検出限界値が低い反応温度で得られることを明らかにした。本分析法が木材廃液や配糖体の構成糖分析に応用できることを示し、糖のHPLCにおけるポストカラム蛍光誘導化剤としてBAの有用性を実証した。

2. BAを用いた還元糖のポストカラム蛍光誘導化反応を順相分配HPLCへ導入することにより、濃度勾配溶離を可能にし、単糖とオリゴ糖の迅速な同時微量定量を達成した。単糖間の分離を保ったまま、七糖までを45分以内に分析できた。本分析法を用いてオリゴ糖シロップおよびオリゴ糖混合物中の単糖とオリゴ糖の微量分析を行い、本分析法が単糖とオリゴ糖の自動同時微量分析法として有用であることを示した。

3. BAを用いた還元糖のポストカラム蛍光誘導化反応を導入した順相分配HPLCによりウロン酸の微量分析において、移動相への塩の添加によりウロン酸モノマーのカラムへの保持が改善されることを明らかにした。誘導化反応条件の最適化を行い、ウロン酸の微量分析法を確立し、飲料中の微量ウロン酸と中性糖の同時分析を達成した。本分析法がウロン酸微量分析に応用可能なことを示した。

4. 紅藻類オゴノリ属大型海藻ツルシラモから、45 kDaと39 kDaの2種類のClass II

D-フルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼ (FBPA) の存在を解明し、均一にまで精製した。一次構造の比較から、39 kDaの酵素は微生物由来FBPAと近縁であることが示された。本研究の成果は紅藻類大型海藻類由来のFBPAに関する最初の報告である。

5. BAを用いた還元糖のポストカラム蛍光誘導化反応を導入した順相分配HPLCと濃度勾配溶離法を組み合わせ、ウロン酸オリゴマーなどの海藻由来糖質関連物質の微量分析を検討し、各種ウロン酸モノマーおよびウロン酸オリゴマーの分離が可能であることを明らかにした。本分析法が海藻由来糖質関連物質の分離・分析に有効に利用できることを示した。

以上のように本論文は、ベンズアミジンによるポストカラム蛍光誘導化反応を導入した高速液体クロマトグラフィーによる還元糖微量分析法を確立することを目的に、誘導化反応条件および分析条件を最適化し、各種糖質を数 pmol の検出感度で微量分析可能な条件を確立したことに加え、本分析法が食品や産業廃棄物に含まれる糖質の分析や糖質関連酵素の食品生物科学的研究に有効に利用できることを実証したものであり、酵素化学、食品分析化学、食品工学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 21 年 1 月 23 日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。