

機関番号：35304

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19500701

研究課題名（和文） 未利用海産藻類に含まれる抗原性糖鎖の細胞性免疫活性とその利用

研究課題名（英文） Cellular immunological activities of antigenic N-glycans from unused seaweed-glycoproteins and it's applications.

研究代表者 木村 万里子 (KIMURA MARIKO)

くらしき作陽大学・食文化学部・准教授

研究者番号：00351932

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、未利用海産藻類糖タンパク質に結合するアスパラギン結合型糖鎖の化学構造を明らかにするとともに、免疫活性等の生理活性についての解析を行った。まず、褐藻類、緑藻類および紅藻類をミキサーで破碎後、ペプシン消化を行い、その消化物からゲルろ過とイオン交換により糖ペプチドを調製した。糖鎖をヒドラジン分解によりペプチドから遊離させ、還元末端を蛍光標識した後に高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって各々の化学構造を決定した。その結果、未利用海藻からは動植物に普遍的に存在するハイマンノース型糖鎖が多量に見出されたものの、陸生植物に特徴的なキシロース・フコース含有の糖鎖の存在は認められなかった。その一方、動植物由来の糖タンパク質糖鎖に対して作用する糖質分解酵素群に抵抗性を示す糖鎖の存在が示唆された。更に、ホンダワラから調製した糖ペプチド画分がヒト単球を活性化することが認められた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the structures and cellular immunological activities of N-glycans linked to seaweed glycoproteins. First, glycopeptides were prepared from the pepsin-digests of seaweed homogenates (brown algae, red seaweeds, and green laver) by gelfiltration and HPLC. Glycan moieties were liberated by hydrazinolysis and then were fluorescence-labeled. The structural analysis using HPLC-mapping showed that major N-glycans of hydrophytes are typical high-mannose type structures, while the typical plant complex type N-glycans having  $\alpha$ 1-3Fuc and  $\beta$ 1-2 Xyl residues were not found. However, we found some unique glycans that were resistant to several glycosidases, indicating that some hydrophytes-specific glycans might occur on some seaweed glycoproteins. Furthermore, the immunological activity of the seaweed glycopeptides was assayed, and it was found that some glycopeptide-fraction could stimulate human monocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度	0	0	0
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：食品化学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：海藻、生理活性、抗原性、糖鎖、サイトカイン、未利用資源

### 1. 研究開始当初の背景

近年、食品に含まれる種々のアレルゲン性タンパク質の同定がなされてきているが、それらの多くが糖タンパク質である。そして、糖タンパク質性アレルゲンに $\alpha$ 1-3 結合フコースおよび $\beta$ 1-2 結合キシロース含有のアスパラギン結合型糖鎖(N-グリカン)が結合することも明らかになってきている。これらのN-グリカンが哺乳動物に対して強い抗原性を有することが示されるにつれ、抗原性糖鎖の摂取とアレルギー疾患発症との相関性に興味を持たれてきているものの、これら抗原性糖鎖とアレルギー疾患発症との相関についての生化学的・免疫化学的解析は十分に行われていない。

申請者らは、種々の植物糖タンパク質の糖鎖構造解析を行い、種子貯蔵糖タンパク質およびアレルゲン性花粉糖タンパク質に結合する抗原性糖鎖の構造特性を既に明らかにしているとともに、それら抗原性糖鎖のライブラリー化を行っている。特に、植物細胞は、ルイス a 抗原を非還元末端に有するN-グリカンを普遍的に産生することが知られており、申請者らもスギ花粉アレルゲンやイネ培養細胞糖タンパク質から、それら植物に特徴的な糖鎖を見出し、それらの化学構造を明らかにしてきた。更に、植物抗原性糖鎖がT細胞(Th2)によるインターロイキン4(IL4)の産生を抑制することを見出し、植物抗原性糖鎖が細胞性免疫調節活性を有することを始めて証明した。

以上の、研究背景ならびに研究データを基に、未利用海産藻類にも細胞免疫活性をコントロールしうる種々の抗原性糖タンパク質糖鎖が存在するのではないかとの実験仮説を立てた。未利用海産藻類に含まれるオリゴ糖鎖を機能性糖鎖食品あるいは医療素材へと変換することが可能となれば、海洋エコシステムで生成する膨大な量の未利用海産物を貴重な資源として利用する道が開かれることが期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、未利用海産藻類に含まれる糖タンパク質あるいは糖脂質に結合する糖鎖

の細胞免疫活性と抗アレルギー性について以下の点を明らかにすることを目的とする。(1)海産藻類に発現される糖タンパク質・糖脂質糖鎖の構造特性、(2)海藻オリゴ糖鎖が有する抗原性、(3)海藻糖タンパク質に結合する抗原性糖鎖のヒト細胞性免疫に及ぼす生理機能(T細胞の分化・生育、サイトカイン分泌促進)、(4)抗原性糖鎖の細胞性免疫調節活性(サイトカイン分泌促進・抑制活性)を利用したアレルギー疾患(花粉症)治療薬(糖鎖薬剤)開発の可能性。

以上の解析結果から、未利用海産藻類に含まれる糖タンパク質・糖脂質に結合するオリゴ糖鎖の機能性食品あるいは医療素材開発の基礎が確立されるものと思われる。

### 3. 研究の方法

#### (1)海藻からの糖ペプチドの調製

ホンダワラ、ヒジキ、フノリ、アナアオサ、フクロノリ、ヒトエグサ、トゲモク、ウミノトラノオ、イシゲ、アキヨレモク、テングサ(約100g)をハサミで裁断後、熱湯水処理(100℃、5分間)によりタンパク質を変成させた。次いで、最終濃度が5%になるようにギ酸を加えた後、ペプシン(Sigma社製 ブタ由来)200mgを加え、37℃で48時間インキュベートすることで、可溶性タンパク質および膜タンパク質からペプチドを遊離させた。その後、5lの脱塩水に対して4℃で2日間にわたり透析を行った。透析外液を約200mlに減圧濃縮後、Sephadex G-25カラム(5.0 x 90cm, 0.1Nアンモニア水)により脱塩操作を行った。フェノール硫酸発色による陽性画分を回収した後、減圧乾固した。残渣を5%ギ酸に溶解させ、Dowex 50 x 2(2.0 x 30cm)カラムに供与した。非吸着画分を溶出させ、ギ酸で樹脂を洗浄後、0.1Nアンモニア水で吸着したペプチドを溶出させた。次いで、ペプチド画分を凍結乾燥し、50%アセトニトリルに溶解させ、Shodex NH2-50カラム(10 x 250mm)に供与した。非糖鎖成分を含む非吸着画分を溶出させ、80%アセトニトリルでカラムを洗浄後、吸着した糖ペプチドを10%アセトニトリル溶液で溶出させた。得られた糖ペプチド画分を凍結乾燥後、以下の実験に供した。

#### (2)糖ペプチドからの蛍光標識糖鎖の調製

海藻由来の糖ペプチド凍結乾燥標品からヒドラジン分解(100℃、10時間)によりN-グリカンを遊離させた。遊離したオリゴ糖鎖

をアセトンで沈殿させた後、遠心分離 (8000 rpm、20 分間) し、得られた沈殿物を減圧下で乾燥させた。この乾燥したオリゴ糖鎖に飽和重炭酸ナトリウム 30 ml、無水酢酸 3 ml を加え、室温で *N*-アセチル化を行った。反応液に Dowex 50×2 (mesh 200~400) 樹脂を加えて pH を 2 にした後、小カラムに移し、約 5 倍量の脱塩水で樹脂を洗浄した。洗液を濃縮後、Sephadex G-25 カラムによるゲル濾過に供して脱塩を行った。溶出液を濃縮した後、凍結乾燥を行った。凍結乾燥試料に 2-アミノピリジン (2-アミノピリジン 1.00 g : 塩酸 0.65 ml) を試験管一本につき 400  $\mu$ l ずつ加えて封管し、90°C で 30 分間反応させた。冷却後開管し、試験管 1 本につき 40  $\mu$ l の還元試薬 (シアノ水素化ホウ素ナトリウム 20 mg : 蒸留水 : 12  $\square$  l) を加えて再び封管し、90°C で 1 時間還元反応を行った。反応終了後、蒸留水を試験管一本につき 400  $\mu$ l 加え、Sephadex G-25 カラムに供して過剰の 2-アミノピリジンを除去した。糖鎖は蛍光測定により検出した。得られたピリジルアミノ化 (PA-) 糖鎖画分を濃縮乾固させ高速液体クロマトグラフィーの試料とした。

### (3) 逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) による PA-糖鎖の部分精製

PA-糖鎖を少量の 0.05% トリフルオロ酢酸に溶解した後、Cosmosil 5C18 AR カラムを用いた RP-HPLC により部分精製を行った。

カラム : Cosmosil 5C 18AR (10 × 250 mm)

溶媒 A : 0.02% トリフルオロ酢酸

溶媒 B : 0.02% トリフルオロ酢酸/20% アセトニトリル

流速 : 1.2 ml/分

蛍光光度計 : 励起波長 310nm、蛍光波長 380nm

### (4) 順相高速液体クロマトグラフィー (SF-HPLC) による PA-糖鎖の部分精製

RP-HPLC にて部分精製した糖鎖画分を Shodex Asahipak NH2-P5 カラムを用いた SF-HPLC により構造解析を行った。

カラム : Shodex Asahipak NH2P- 50 (4.6 x 250 mm)

溶媒 A : 80% アセトニトリル

溶媒 B : 20% アセトニトリル

流速 : 0.7 ml/分

蛍光光度計 : 励起波長 310nm、蛍光波長 380nm

### (5) グリコシダーゼ消化による構造解析

海藻糖タンパク質から調製した PA-糖鎖の構造をグリコシダーゼ消化により解析した。

#### ① $\alpha$ 1,2-マンノシダーゼ消化

PA-糖鎖 5  $\mu$ l に  $\alpha$ 1,2-マンノシダーゼ

(*Aspergillus saitoi* 由来) (0.1 unit / 100  $\mu$ l) 10  $\mu$ l、0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 30  $\mu$ l、トルエン 1  $\mu$ l を加え 37°C にて 24 時間酵素消化を行った。酵素反応の停止は、100°C 5 分間反応液を煮沸することにより行った。この酵素反応溶液を 13,400rpm で 10 分間遠心分離し、上清 9  $\mu$ l を 70% アセトニトリル 91  $\mu$ l と混合後、SF-HPLC に供して酵素消化物の分析を行った。

#### ② $\alpha$ -マンノシダーゼ消化

$\alpha$ 1,2-マンノシダーゼ消化で得られた PA-糖鎖 (5  $\mu$ l) に  $\alpha$ -マンノシダーゼ (タチナタ豆) (19 units / mg) 10  $\mu$ l、0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 20  $\mu$ l、トルエン 1  $\mu$ l を加え、37°C で 48 時間酵素消化を行った。酵素反応の停止は、100°C 5 分間反応液を煮沸することにより行った。この酵素反応溶液を 13,400rpm で 10 分間遠心分離し、上清 7  $\mu$ l を 70% アセトニトリル 93  $\mu$ l と混合後、SF-HPLC に供して酵素消化物の分析を行った。

#### (6) ハイマンノース型糖鎖を多価有する糖鎖ポリマーの作成

#### ① $\gamma$ -ポリグルタミン酸と糖ペプチドのカップリング反応

BOP 試薬 (170 mg)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (18 mg) を含むジメチルスルホキシド (0.3 ml) を室温で 15 分間スターラーにより攪拌した。そこに、ヒジキおよびホンダワラ等の褐藻類から調製したハイマンノース型糖ペプチド (Man<sub>9-7</sub>GlcNAc<sub>2</sub> が主要構造のもの 3.5 mg) をジメチルスルホキシド (0.6 ml) に溶解したものを加え、数分攪拌した後、 $\gamma$ -ポリグルタミン酸 (7 mg) (分子量 200,000~500,000) を添加し、室温にて 16 時間スターラーで攪拌しながら反応させた。

#### ② 糖鎖ポリマーの精製

上記カップリング反応溶液をゲル濾過 (Sephadex G-25 superfine 2.0×87 cm) に供し、余剰カップリング試薬を除去した。次いで、ゲル濾過 (TSK-G3000 SW XL) により、未反応の糖ペプチドと糖鎖ポリマーを分離した。糖ペプチド画分およびポリグルタミン酸画分を濃縮し、フェノール硫酸法により糖の発色を確認した。

#### ③ 糖鎖ポリマーのアミノ酸分析

糖鎖ポリマー画分を 3 l の脱塩水に対して 2 回透析し、糖ペプチドと分離した。透析内液 120  $\mu$ l (全体の 1/100 量) を遠心濃縮し、定沸点塩酸 (0.1% の 2-メルカプトエタノールを含む) をサンプルに加え、100 °C で 24 時間加水分解した。特級エタノール : 超純水 : トリエチルアミン = 1 : 1 : 1 の試薬を 100  $\mu$

1 加えて中和し、遠心濃縮した。更に、特級エタノール：超純水：トリエチルアミン=7：1：1の試薬を100  $\mu$ l 加え、そこに3  $\mu$ l のフェニルイソチオシアネートを加えて16分間室温で放置し、蛍光標識した。アミノ酸分析を行い、構成アミノ酸を同定した。

(7)ホンダワラ由来の糖ペプチド画分の細胞性免疫活性

①ホンダワラからの糖ペプチドの調製

日本海（島根県 隠岐の島）にて採取したホンダワラ（約100g）をハサミで裁断後、熱湯水処理（100℃、5分間）によりタンパク質を変成させた。次いで、最終濃度が5%になるようにギ酸を加えた後、ペプシン（Sigma社製 プタ由来）200 mg を加え、37℃で48時間インキュベートすることで、可溶性タンパク質および膜タンパク質からペプチドを調製した。反応終了後、5l の脱塩水に対して4℃で2日間にわたり透析を行った。透析外液を約200 ml に減圧濃縮後、Sephadex G-25 カラム（5.0 X 90 cm、0.1N アンモニア水）により脱塩操作を行った。フェノール硫酸発色による陽性画分を回収後、減圧乾固した。残渣を5%ギ酸に溶解させた後、Dowex 50 x 2（2.0 X 30 cm）カラムに供与した。非吸着画分を溶出させ、ギ酸で樹脂を洗浄後、0.1N アンモニア水で吸着したペプチドを溶出させた。次いで、ペプチド画分を凍結乾燥した後、50% アセトニトリルに溶解させ Shodex NH2-50 カラム（10 x 250 mm）に供与した。非糖鎖成分を含む非吸着画分を溶出させ、80% アセトニトリルでカラムを洗浄後、吸着した糖ペプチドを10% アセトニトリル溶液で溶出させた。得られた糖ペプチド画分を凍結乾燥後、以下の実験に供した。

②海藻由来糖ペプチドの末梢血単核球に対する免疫活性測定

ホンダワラから調製した糖ペプチド（約100mg）をリン酸緩衝生理食塩水に溶解させた後、遠心分離（15,000 rpm、5分間）により不溶解物を除去し、上清をフィルター滅菌した後、免疫活性測定に供した。末梢血単核球細胞（PBMC）は、ヘパリン処理血液から比重分離法により調製した。24穴プレートにPBMCを $1 \times 10^6$ 個播種し、海藻由来糖ペプチド（1  $\mu$ g/1ml、10  $\mu$ g/1ml、100  $\mu$ g/1ml）を添加したRPMI1640培地1ml中で7日間培養した。培養後の細胞は、フローサイトメトリーによってCD3、CD4、CD8、NK細胞の%や、抗原提示細胞のマーカータンパク質HLA-DR、CD80、CD86の発現を解析し、培養上清はCBAアッセイによりサイトカイン（IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-17A、IL-10、TNF- $\alpha$ ）産生量を測定した。

4. 研究成果

(1)褐藻類（ヒジキ、ホンダワラ、ウミトランオ、イシゲ、マメタワラ）、緑藻類（アナアオサ、ヒトエグサ）、紅藻類（テングサ、フクロフノリ）に含まれる糖タンパク質に結合するN-グリカン構造

①褐藻類由来糖タンパク質に結合するN-グリカンの化学構造

ヒジキ、フノリ、ホンダワラ等の褐藻類には、糖タンパク質が豊富に含まれており（図1）、得られたN-グリカンの大部分は $\alpha$ 1,2-マンノシダーゼ消化によりN-アセチルグルコサミン2残基およびマンノース6残基からなるM5構造に収束し、更に、タチナタ豆 $\alpha$ -マンノシダーゼ消化によりN-アセチルグルコサミン2残基およびマンノース1残基からなるM1構造に収束した。従って、褐藻類の糖タンパク質では、典型的なハイマンノース型糖鎖が主要構造を占めていることが明らかとなった。しかしながら、陸上植物が生産する糖タンパク質において一般的に見出される植物複合型構造（ $\beta$ 1-2 キシロース残基と $\alpha$ 1-3 フコース残基をトリマンノシルコア構造に有する構造）は、緑藻類、褐藻類、紅藻類共に見出されなかった。この事実は、陸生植物に共通に存在している植物複合型糖鎖が、植物の陸上生活における特異的な生理機能に関与する可能性や、植物の陸生化に伴い植物複合型糖鎖の生合成機構を獲得した可能性も考えられ、植物の進化的側面からも興味深い。褐藻類から多量に得られるハイマンノース型糖鎖については、ヒト自然免疫系の活性化を有することや白血病ウイルス特異的な細胞障害性T-細胞を誘導することが報告されているため、ハイマンノース型糖鎖を多価有する糖鎖ポリマーの調製に利用できるものと思われる。

②緑藻・紅藻類由来糖タンパク質に結合するN-グリカンの化学構造

緑藻類（アナアオサ、ヒトエグサ）からは、RP-HPLCでハイマンノース型糖鎖や植物複合型糖鎖に比べて溶出時間がかなり遅い画分に複数の糖鎖シグナルが得られたが、これらの糖鎖画分は $\alpha$ -マンノシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -N-アセチルグルコサミンダーゼ、 $\alpha$ -フコシダーゼ等によっても消化を受けなかったことから、陸生植物中にはこれまで見出されていない糖鎖構造を有することが考えられた。しかし、緑藻類からは、糖組成分析を行うために必要な試料量が得られなかったことから、詳細な構造解析を行うことができなかった。テングサ（紅藻類）についても、緑藻類同様の結果が得られた。緑藻類および紅藻類には、もともとN-グリカ

ン存在量が少ないと考えられるが、今後は、糖鎖の多量調製法を確立し、今回分析できなかった微量糖鎖の化学構造を明らかにする必要がある。

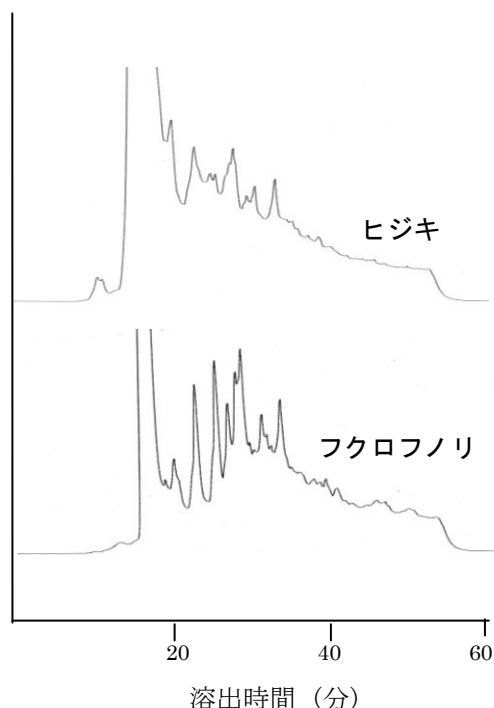


図1 ヒジキ及びフノリ由来のPA-糖鎖のRP-HPLC 溶出パターン

(2) 海藻由来のハイマンノース型糖鎖の応用を目指した人工糖鎖ポリマーの作成

ゲルろ過の高分子画分から、極めて多量の $\gamma$ -ポリグルタミン酸由来のグルタミン酸が検出されるとともに、糖鎖結合アスパラギンに由来するアスパラギン酸が確認されたことから、人工糖鎖ポリマーが合成されたことを確認した。

(3) ホンダワラ由来の糖ペプチド画分の細胞性免疫活性

①ホンダワラ由来の糖ペプチド画分の T 細胞増殖に及ぼす影響

海藻糖ペプチドは CD3 陽性 T 細胞増殖に影響を与えなかったが、CD4 陽性 T 細胞増殖をわずかに誘導した。この誘導活性は、低濃度 ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) でより顕著に観察された。一方、CD8 陽性 T 細胞の増殖をわずかに低下させた。以上の結果から、海藻糖ペプチドは CD4/CD8 の割合を CD4 優位に誘導することが考えられた。また、海藻糖ペプチドは濃度依存的に NK 細胞の増殖を誘導した。

②ホンダワラ糖ペプチド画分が HLA-DR、CD80、CD86 発現に及ぼす影響

ヒト主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス II (HLA-DR) は、B 細胞、単球、マクロ

ファージ、樹状細胞および活性化 T 細胞を含むヒト抗原提示細胞表面に発現している。HLA-DR は  $\alpha$  と  $\beta$  サブユニットからなるヘテロ二量体膜貫通型タンパクで、CD4 陽性 T リンパ球へのペプチドの提示に重要な機能を果たす。一方、CD80/CD86 は抗原提示細胞に発現しており、T 細胞の CD28 に結合し活性化させる副刺激分子である。ホンダワラ由来の糖ペプチド画分が、これら T 細胞上に発現される免疫系タンパク質の発現誘導を行うか否かの検討を行った。その結果、海藻糖ペプチドは低濃度で HLA-DR、CD80、CD86 発現をわずかに誘導した。

③ホンダワラ糖ペプチド画分が T 細胞のサイトカイン分泌に及ぼす影響

海藻糖ペプチド画分は、T 細胞からの 4 種のサイトカイン (IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-6、IL-17A) 産生を濃度依存的に上昇させた。一方、TNF- $\alpha$  産生量は、海藻糖ペプチド濃度が 1 および  $10 \mu\text{g/ml}$  の時に高まり、 $100 \mu\text{g/ml}$  では減少した。また、IL-4 と IL-10 は、どちらも産生量が非常に少なかったが、高濃度 ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) 処理でやや産生が高まったものの、IL-4 については  $100 \mu\text{g/ml}$  処理で低下する結果であった。

IFN- $\gamma$  と IL-4 は、活性化した CD4 陽性 T 細胞から主に産生したと考えられ、IFN- $\gamma$  産生が優位であったことから、ホンダワラ糖ペプチドは、Th1 型ヘルパー T 細胞の誘導能を有することが示唆された。一方、炎症性のサイトカイン IL-6、IL-17A、TNF- $\alpha$  は、海藻糖ペプチドにより、抗原提示細胞や T 細胞から産生されたものと考えられる。更に、ホンダワラ糖ペプチドは IL-2 産生を誘導しており、IL-2 により活性化増殖する NK 細胞の増殖を誘導したと思われる。

以上の結果から、ホンダワラ糖ペプチドは、抗原提示細胞の増殖を誘導し、Th1 型の CD4 陽性 T 細胞や NK 細胞の増殖を促進させることから、抗腫瘍効果を有する可能性が示唆された。今後、T 細胞への直接的な作用や NK 活性について解析が必要である。また、今回使用した糖ペプチド画分には数種の糖鎖成分が混在していることが考えられ、それらのどの成分が活性を示すのかを明らかにする必要がある。ホンダワラ中に含まれる N-グリカンには、ハイマンノース型糖鎖を主要構造としている。ハイマンノース型糖鎖が上述の免疫活性を有することは知られていないことから、今回観察された海藻糖ペプチドの免疫活性は、N-グリカン以外の糖鎖に由来する可能性がある。従って、今回使用した糖ペプチド画分に含まれる糖鎖についての詳細な化学構造を明らかにする必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- (1) Kimura, M., Hara, T., Kimura, Y. N-Glycans linked to glycoproteins in edible beans: Natural resources for bioactive oligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75 (1), 155-158, 2011, 査読有
- (2) Maeda, M., Kimura, M., Kimura, Y. Intracellular and extracellular free N-glycans produced by plant cells: Occurrence of unusual plant complex-type free N-glycans in extracellular spaces. *J. Biochem.*, 148(6), 681-692, 2010, 査読有
- (3) Kimura, Y., Nagai, H., Miyamoto, M., Kimura, M., Yonekura, M. Identification of royal jelly glyco-protein that carries unique complex type N-glycans harboring T-antigen(Gal $\beta$ 1-3GalNAc)unit. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 (10), 2148-2150, 2010, 査読有
- (4) Kimura, Y., Watanabe, T., Kimura, M., Maeada, M., Murata, Y., Fujiyama, K. Salt-adaptation of Tobacco BY2 cells induces change in glycoform of N-glycans. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 514-522, 2008, 査読有

[学会発表] (計7件)

- (1) Sakamura, S., Kimura, M., Fujiyama, K., Okihara, K., Hashimoto, K., Yamada, H., and Kimura, Y. A novel  $\beta$  1-3 galactosyltransferase involved in biosynthesis of honeybee N-glycan bearing T-antigen unit. 15<sup>th</sup> European Carbohydrate Symposium, Abstract p 487, 2009/7/19, Vienna, Austria
- (2) Takeoka, Y., Sakamura, S., Fujiyama, K., Kimura, M., and Kimura, Y., Suppression of endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase and peptide:N-glycanase activity in *Arabidopsis thaliana*. 15<sup>th</sup> European Carbohydrate Symposium, Abstract p 531, 2009/7/19, Vienna, Austria
- (3) 永井裕美, 木村万里子, 木村吉伸, 糖タンパク質薬剤開発に必要とされる有用糖ペプチドの多量調製法の確立, 日本農芸化学会大会, 講演要旨集 p 323, 2009/3, 福岡
- (4) Nakamura, K., Takeoka, Y., Sakamura, S., Hosoi, K., Fujiyama, K., Kimura, M., and Kimura, Y. Suppression of Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase activity in *Arabidopsis*

*thaliana* and Tomato Plant.

XXIV International Carbohydrate Symposium, 2008/7/27, Oslo, Norway

(5) 原 共紀, 木村万里子, 木村吉伸, 雑豆に含まれる糖タンパク質糖鎖の網羅的構造解析, 日本農芸化学会中四国支部例会, 2008/1, 徳島

(6) Takayuki U., Mariko K., Yoichiro H., Kiyoshi O., Hiroyuki S., Hideo Y., and Yoshinobu K.

Processing pathway of N-glycan with T-antigen in *Apis mellifera*: Structural features of N-glycans synthesized in *Apis Mellifera*, XIX International Symposium on Glycoconjugates, 2007/7/19, Cairns, Australia

(7) Hiromi N., Mariko K., Kiyoshi O., Ken H., Hiroyuki S., Hideo Y., Masami Y. and Yoshinobu K.

Identification of royal jelly glyco-protein bearing N-glycans with T-antigen unit. XIX International Symposium on Glycoconjugates, 2007/7/19, Cairns, Australia

[図書] (計2件)

- (1) 長澤治子, 木村万里子他, 医歯薬出版「食べ物と健康」食品学・食品機能学・食品加工学(改訂版), 水産食品(魚介類・藻類)担当, p182-194, 2010/2
- (2) 長澤治子, 木村万里子他, 青山社, 「食品学実験—基礎から応用まで—」(改訂版), p25, 26, 34-37, 40-43, 50-54, 132, 133, 2010/3

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 万里子 (KIMURA MARIKO)

くらしき作陽大学・食文化学部・准教授

研究者番号: 00351932