

論文の内容の要旨

論文題目 糖蛋白質糖鎖の HPAEC 法によるマッピング
に関する研究

氏名 早瀬哲郎

糖蛋白質の糖鎖は、結合するアミノ酸の種類により大きく N-グリコシド結合型糖鎖と O-グリコシド結合型糖鎖に分類される。どちらのタイプの糖鎖も構造上の多様性が甚だしく、同一の糖蛋白質の糖鎖であっても多くの構造の糖鎖の集合体であることが一般的である。糖蛋白質の糖鎖は、糖蛋白質の水溶性等の物性やその代謝に大きな影響を及ぼすのみならず細胞間接着や免疫反応への関与も知られていて、その構造について多くの知見を得ることはきわめて重要である。特に、上述のように特定の糖蛋白質の糖鎖の構造的多様性（マイクロ不均一性）を把握すること、すなわちある糖蛋白質にどのような糖鎖がどのくらいの量結合しているかを知ること（糖鎖マッピング）は大いに興味があることながら、難しい課題として残されてきた。

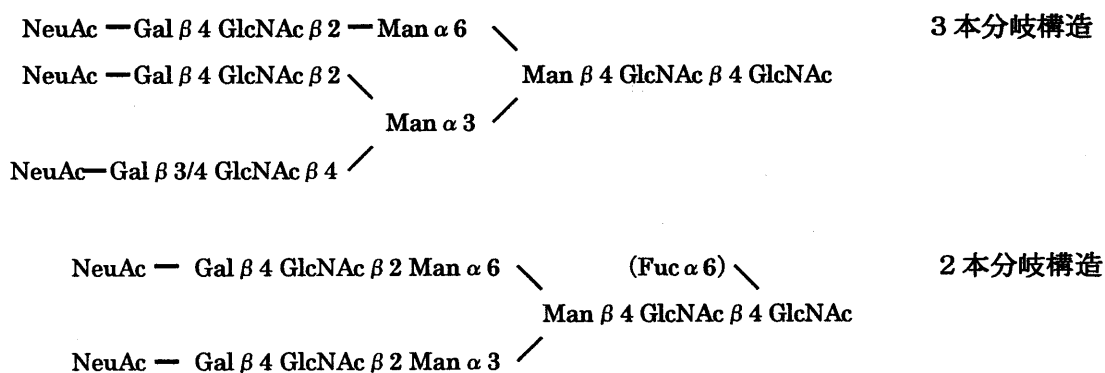
本論文は糖鎖マッピングの一つの有力な方法論である HPAEC (High-pH anion-exchange chromatography) に関する研究結果である。HPAEC は既に N-グリコシド結合型糖鎖のマッピング法としては定評ある方法であったが、O-グリコシド結合型糖鎖に関する応用例は数少なかった。本論文では以下 3 つの内容を報告する。

1) HPAEC による N-グリコシド結合型糖鎖の分析

異なる動物種（ウシ・ヒツジ・ブタ）から得られるフェツインは、アミノ酸配列のきわ

めて高い相同性を持ち、その N-グリコシド結合型糖鎖の結合位置（3ヶ所）も保存されている。また、ヒト・フェツイン（ α_2 -HS-糖蛋白質）もよく似たアミノ酸配列を持ち、上記 3ヶ所のうち 2ヶ所に N-グリコシド結合型糖鎖を持つ。このように、4種のきわめて類似した、しかし由来する動物種の異なる糖蛋白質の糖鎖構造を比較することにより、糖鎖の生合成過程でどのような要因が糖鎖の構造に大きな影響を与えるかを知らうと考えた。このような相互比較のための糖鎖マッピングには HPAEC 法は最適の方法である。

糖鎖マッピングの結果、ウシおよびヒツジのフェツインの N-グリコシド結合型糖鎖はいずれも 3 本分岐の複合型糖鎖が主流である一方、ブタおよびヒトのフェツインの糖鎖は 2 本分岐の複合型であり、ブタのそれにはフコース残基が含まれること、が分かった（下図）。



この結果とこれまでに報告されたいくつかの糖蛋白質の糖鎖構造を考え合わせて、4種のフェツインの糖鎖構造の違いには、動物種に特異的な要因（糖鎖合成酵素の種類）が強く現れている側面とアミノ酸配列の微細な違いが寄与していると考えられる側面があることが分かった。

2) HPAEC による O-グリコシド結合糖鎖の分析（シアロ糖鎖の分析）

糖蛋白質から O-グリコシド結合糖鎖を切り出す際にはアルカリによる β 脱離/還元反応を用いるため、得られる糖鎖は糖アルコールの形であり還元末端のアルデヒド基を欠いている。そのため、N-グリコシド結合糖鎖に比べて HPAEC での保持が弱く、多様な構造をもつ O-グリコシド結合糖鎖を系統的に分離することは難しいと考えられてきた。実際、O-グリコシド結合糖鎖の HPAEC によるマッピングはこれまでごくわずかな報告例しかなかった。

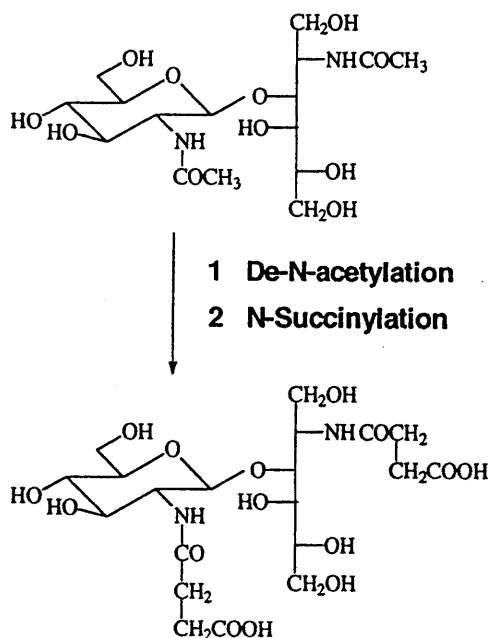
今回、13 種類の O-グリコシド結合糖鎖（シアロ糖鎖）の標準品をそろえて、これらの HPAEC での最適分離条件を検討した。その結果、13 種の標準糖鎖をよく分離できる溶出条件を設定した。また、この分離条件を用いてウシ顎下腺ムチンおよびウシ・フェツインの O-グリコシド結合糖鎖のマッピングを行った。その結果は、従来他の手法で得られたも

の一致した。これにより、N-グリコシド結合糖鎖だけでなく O-グリコシド結合糖鎖に関しても、HPAEC による簡便なマッピング法を確立することができた。

なお、O-グリコシド結合糖鎖の定量を行うに際しては、糖鎖の加水分解物中の GalN-ol を定量するのが便利であるが、この糖アルコールを分離分析する適当な HPLC 系がこれまでなかった。今回、この目的のために新しい分析系である HPCEC (High-pH cation-exchange chromatography) 法を開発し、GalN-ol の定量に有用であることを示した。

3) HPAEC による O-グリコシド結合糖鎖の分析 (アシアロ糖鎖の分析)

上述のように、O-グリコシド結合糖鎖に関しても末端のシアル酸を含むシアロ糖鎖であれば HPAEC 法によるマッピングが有用であることが分かった。しかしながら、シアル酸を除いた後のアシアロ糖鎖はアニオン交換カラムを用いる HPAEC には全く保持されないため、そのままでは HPAEC によるマッピングは不可能である。シアロ糖鎖の HPAEC クロマトグラムを解析するためには対応するアシアロ糖鎖のマッピングが是非とも必要である。そのため、アシアロ糖鎖を予め誘導体化した上で HPAEC で分析する方法 (脱 N-アセチル化-N-サクシニル化; 下図) を開発した。



誘導体化反応の2つの工程 (脱 N-アセチル化工程と N-サクシニル化工程) それぞれの反応条件を最適化し誘導体化法を確立した。この手法を用いて、ウシ顎下腺ムチンおよびウシ・フェツインのアシアロ糖鎖の HPAEC 分析を行った。その結果は、2) で述べた対応するシアロ糖鎖のマッピングの結果とよく一致した。