

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 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 *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著しく、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で、その構造に関して多くの知見を得ることはきわめて重要である。本研究では、糖鎖構造の構造多様性をトータルで捉えることができる方法として HPLC 法によるマッピング法を開発することを目指した。糖鎖のマッピング法という目的に適した HPLC 法として HPAEC-PAD (High-pH Anion-exchange Chromatography - Pulsed Amperometric Detector) 法に着目し、いくつかの観点から研究を行った。

第 I 章では序論として本研究の背景を述べ、この分野での位置づけを明確にしている。

第 II 章では糖蛋白質の *N*-グリコシド結合型糖鎖の HPAEC 法によるマッピングについて述べている。HPAEC 法による *N*-グリコシド結合型糖鎖の分析については既に多くの研究報告があったので、それらを踏まえてフェツインを材料に比較生化学的検討を展開した。フェツインはウシの胎仔血清から得られる糖蛋白質であり、これまでも糖鎖の研究の材料に多用されてきた。近年ウシ以外のいくつかの動物種のフェツイン (に相当する糖蛋白質) のアミノ酸配列が決定され、それらが高い相同性をもち、かつ *N*-グリコシド結合型糖鎖の結合位置も保存されていることが分かった。したがって、異なる動物種 (ウシ、ヒツジ、ブタ、ヒトの 4 種) から得られたフェツインの糖鎖の構造多様性はきわめて興味深い問題と考え、HPAEC 法による糖鎖マッピングを行った。その結果、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。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が強く現れている側面と各フェツインの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。

第 III 章では糖蛋白質の *O*-グリコシド結合型糖鎖のシアロ糖鎖の HPAEC 法によるマッピングについて述べている。*O*-グリコシド結合型糖鎖への HPAEC 法の応用に関してはこれまでわずかな研究報告しかなくされていない。これは、*O*-グリコシド結合型糖鎖の場合、糖蛋白質から切り出す際にアルカリによる β 脱離/還元反応を用いるため得られる糖鎖が糖アルコールの形であり、*N*-グリコシド結合型糖鎖に比べて HPAEC での保持が弱く良好な分離が得にくいことが原因である。本研究では、13 種類の代表的な *O*-グリコシド結合型糖鎖 (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。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*-グリコシド結合型糖鎖のマッピングを行った。その結果は、他の手法で得られたものに一致した。これにより、*N*-グリコシド結合型糖鎖だけでなく *O*-グリコシド結合型糖鎖に関しても、

HPAEC 法による糖鎖マッピングの手法を確立することができた。

第IV章では糖蛋白質の *O*-グリコシド結合型糖鎖のアシアロ糖鎖の HPAEC 法によるマッピングについて述べている。アシアロ糖鎖の場合、糖鎖が HPAEC に保持される主たる要因であるシアル酸と還元末端のアルデヒド基の両方を欠くために、第III章で述べたシアロ糖鎖よりも HPAEC での保持がさらに弱く実際上分析が不可能である。このため、新たな前処理法を考案してアシアロ糖鎖の HPAEC 分析を可能にした。*O*-グリコシド結合型糖鎖には *N*-アセチル基を有する糖残基が少なくとも1つはある。この *N*-アセチル基をヒドラジン分解で外し、その後のフリーのアミノ基をサクシニル基で置換することにより、糖鎖に負電荷を導入する方法を開発した。この「脱 *N*-アセチル化-*N*-サクシニル化」の反応条件を最適化し、*O*-グリコシド結合型糖鎖のアシアロ糖鎖の前処理方法として確立した。また、この方法をウシ顎下腺ムチンおよびウシ・フェツインの *O*-グリコシド結合型糖鎖に適用し、アシアロ糖鎖の HPAEC 法によるマッピングができることを示した。

第V章では以上の結果をまとめ、糖蛋白質糖鎖のマッピング法としての HPAEC 法の有用性について論じている。

本研究では、糖蛋白質の糖鎖の構造多様性をトータルで把握するための手法として HPAEC 法によるマッピングがきわめて有用であることをいくつかの観点から示した。この成果は、複合糖質に関連する多くの分野で貢献するところ大であると考えられる。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。