

審査の結果の要旨

氏名 益田 勝吉

質量分析法による免疫グロブリンGの糖鎖解析に関する研究と題する本論文は、MSの手法により、様々なIgG分子の糖鎖を含めた高感度、高精度、簡便な分析法を確立することを目的として詳細な構造解析を行った研究に関するものである。本論文は、全6章から構成されており、第1章に序論、第2章ではIgGの遊離オリゴ糖のシーケンス解析、第3章ではIgGのFc糖型の定量解析、第4章および第5章においてはIgGの変異に伴う翻訳後修飾の構造解析に関する研究成果を記述している。そして第6章では、総括と今後の展望について述べている。

第2章では、MALDIイオン化法とQIT-TOFMSによる多段階質量分析(MSⁿ)を用いて、IgGから遊離されたPAオリゴ糖の高感度なシーケンス解析を試みている。糖鎖は多くの構造異性体が存在するため、枝分かれなどの複雑な構造では従来のMS/MS法により得られる情報のみではシーケンス解析を行うことは困難であった。これに対し、本論文では積極的にフラグメントイオンを生成させ多くの構造情報を得るために、アルカリ金属イオンを利用するとともに多段階質量分析(MSⁿ)を用いて、IgGから遊離されたPAオリゴ糖のMSⁿ解析を行っている。

まず、アルカリ金属イオンを添加したNa付加イオンである[M+Na]⁺イオンは、断片化により若干のクロスリング²A断片と共にBおよびY断片イオンが複合的に生成することを見出し、[M+Na]⁺イオンのMSⁿ分析が、従来の[M+H]⁺イオンのMS/MS分析よりも感度が高く、また構造情報がより豊富であるために複雑なオリゴ糖シーケンス解析に有用であることを示していた。さらに、2種類の構造異性体のオリゴ糖は、分岐構造は異なるものの[M+Na]⁺イオンからなるMS³スペクトルにおける断片イオンの相対的ピーク強度を比較することにより識別可能であることを示していた。以上より、これまで解析が困難であったIgGに由来する遊離オリゴ糖の構造は、MALDI-QIT-TOFMSを用いたMSⁿ解析により簡便に同定できることを実証していた。

第3章では、nano ESIイオン化法とQ-TOFMSを用いて、IgGのFc糖型の精密な定量解析を試みている。これまで、タンパク質中の糖鎖の存在割合などの構造情報を得るためには、タンパク質から切り出した糖鎖を誘導体に調製し、HPLC法を用いて分析していたが、誘導体化に時間を要することや一分子中に複数個の糖鎖結合部位が存在する場合は、従来の方法で解析するのは極めて困難であった。これに対し、本論文ではIgGのFcから直接糖鎖の構造情報を得るために、nano ESIイオン化法を適応してIgGのFc糖型の存在様式について解析を行っている。

まず、Fc糖型のグライコシレーションプロファイルを解析するために、IgGのFc/2フラグメントを用いて、遊離オリゴ糖のHPLC溶出プロファイルとnano ESI-MSを詳細に比較解析している。この結果、Fc/2フラグメントのnano ESIマスペクトルは、HPLC溶出プロファイルから得られる糖

鎖の個々の割合を忠実に反映していることが明らかとなり、IgG のFc から直接糖型の個々のグライコシレーションプロファイルの割合を定量的に求めることができることを示していた。これにより、これまで多くのバイオ医薬品の構造特性解析のボトルネックとなっていた糖鎖分析時間が大幅に短縮できるようになり、今後迅速且つ簡便な手法として広く利用されていくものと期待できる。

次に、Fc 中の糖鎖のペアリングに関するグライコフォームを解析するために、IgG Fc フラグメントを用いて、Fc フラグメントとFc/2 フラグメントの nano ESI-MS を詳細に比較解析している。この結果、Fc に結合している糖鎖のペアは同一な糖鎖構造の組み合わせが存在する場合と、異なった糖鎖構造の組み合わせが存在することを示していた。また、それぞれの糖鎖の組み合わせの比率は、ノンランダムな組み合わせで存在していることを明らかとしている。本研究は、IgG Fc 糖鎖の1分子中の完全なグライコフォームの存在様式を正確に求めた最初の例である。このような糖鎖の存在様式を詳細に観察することは、ある特定の治療目的に最も有効なFc 糖型を利用することを意図とする抗体医薬品の開発や製剤の安定した品質の管理を行う上で大変重要であるため、今後より有用な手法となることが期待できる。

第4章及び第5章では、MS を用いてIgG の変異に伴う翻訳後修飾の構造解析を試みている。

第4章では抗体工学技術による改変型抗体としてC_H1ドメインが欠落したマウスIgG2a変異体を研究の対象として、ドメインの欠落に伴う影響についてMSを用いた構造解析を試みている。IgG2a変異体を様々な酵素を用いてフラグメント化を行い、MSにより詳細に解析を行った結果、重鎖の約14%がThr220AにGalとGalNAcからなる2糖を結合しており、IgG2a変異体はC_H1ドメインの欠落の結果として、ヒンジ領域(Thr220A)がO-グルコシル化されることを示していた。

第5章では糖タンパク質糖鎖の有無による活性確認を目的としたIgG糖鎖の結合部位であるAsn297を遺伝子工学的にAlaに置換したIgG2b変異体を研究の対象として、糖鎖の欠落に伴う影響についてMSを用いた構造解析を試みている。IgG2b変異体のFc/2フラグメントのMS及び野生型とのペプチドマッピングによる詳細な解析を行った結果、Tyr296の約80%が硫酸化されていることを示していた。これにより、IgG2b変異体は糖鎖の欠落の結果として、Fc中の本来の糖鎖結合部位のN末端に隣接するTyr296が1箇所硫酸化されていることを明らかとしている。

このように本論文では、ドメインや糖鎖の欠落に伴う変異は、翻訳段階後の予期しない変異を誘発し、そのタンパク質の機能性、免疫反応性さらには薬剤性などの性状に影響を及ぼす可能性があることを示していた。

本研究では、MSを用いて様々なIgGから糖鎖の微視的ならびに巨視的不均一性などのグライコシレーションプロファイルやグライコフォームに関する情報を簡便に得ることが可能であることを示していた。本研究成果は、今後はすべての糖タンパク質の生物学的活性を、単に遊離された糖鎖組成よりもこのような糖タンパク質分子丸ごとのグライコフォームと関連づけることが重要であることを示唆しており、本研究により確立した迅速且つ高精度・高感度分析法は、疾病解明や

治療、診断などを目的とした抗体医薬やバイオ医薬品の開発に大きく貢献すると期待されることから、これを行った学位申請者は博士(薬学)の学位授与に値すると判断した。