

論文内容の要旨

氏名	山田佳太			
学位の種類	博士(薬学)			
学位記番号	薬第87号			
学位授与の日付	平成22年3月23日			
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当			
学位論文題目	ムチン型糖鎖の高速高感度分析法の開発及びその実用化研究			
論文審査委員 (主査)	教授	掛	桶	一 晃
(副主査)	教授	岩	城	正 宏
(副主査)	教授	鈴	木	茂 生

糖鎖によるタンパク質の修飾は最も普遍的な翻訳後修飾の一つであり、タンパク質の50%以上が糖鎖修飾を受けてその機能を発現していると言われている。糖鎖修飾はコアタンパク質のアスパラギン残基が修飾されるN-グリコシル化(N-結合型糖鎖)と、セリン・スレオニン残基が修飾されるO-グリコシル化(O-結合型糖鎖)に大別される。またO-結合型糖鎖はムチン上で高頻度に観察されるためムチン型糖鎖とも呼ばれている。

O-結合型糖鎖はウイルスや細菌による感染症や癌あるいは免疫疾患などの様々な疾病に関与し、疾病に伴いその構造が大きく変化することが明らかにされつつある。例えば癌組織では、Tn抗原(GalNAc-Thr/Ser)やシアリル Tn 抗原(NeuAcα2-6GalNAc-Thr/Ser)などの通常組織では観察されない低分子糖鎖が大量に発現することが明らかにされている。また糖鎖の非還元末端のシアル酸修飾の増加や硫酸化糖鎖の減少、ルイス抗原の増加等の構造的変化が病理組織で観察されることが報告されている。以上の背景から、O-結合型糖鎖は病態マーカーや新規医薬品のターゲット分子として期待され、疾患にともなうO-結合型糖鎖プロファイルの変化の解明が求められている。

極めて不均一で複雑な構造を持つ糖鎖を解析するためには、高度な分析手法が要求される。一般的に糖鎖の構造はコアタンパク質から糖鎖を遊離した後、2アミノピリジンやアミノベンゼン誘導体などにより蛍光標識し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)やキャピラリー電気泳動法(CE)などの分離分析法と質量分析法(MS)などの構造確認法を組み合わせる解析される。糖鎖分析で必須となるコアタンパク質からの糖鎖の切り離しについては、N-結合型糖鎖はN-グリコナーゼF(PNGaseF)やグリコアミダーゼAを用いる簡便な手法が確立されている。一方、O-結合型糖鎖については、コアタンパク質からすべてのO-結合型糖鎖を定量的に遊離する酵素はこれまでのところ発見されていないため、その遊離には煩雑な操作が要求される化学的な手法により行われている。アルカリ還元法はO-結合型糖鎖を遊離する方法として最も汎用されているが、糖鎖の分解反応を防ぐために遊離した糖鎖は安定な糖アルコールに変換され、還元性のヘミアセタール基が失われる。そのため高感度分析に必要な還元的アミノ化反応を利用する糖鎖の蛍光標識が利用できない。さらにアルカリ還元法による糖鎖遊離反応は緩やかな条件で長時間(24~72時間)要するために、糖鎖分析における律速段階となっている。これまでにヒドラジン分解法等のヘミアセタール基を有するムチン型糖鎖の遊離法が報告されているが、いずれの手法も煩雑な操作と長時間の反応を要する。O-結合型糖鎖解析が抱えるこれらの問題点は、糖鎖研究を進める上で大きな障壁となっていた。

本論文は上記の理由から解析が困難とされるO-結合型糖鎖の高速高感度解析を達成するための技術開発ならびにその応用例についてまとめたものである。

第1章ではO-結合型糖鎖解析の高感度化ならびにハイスループット化を実現する高速糖鎖自動切断装置(Autoglycocutter:AGC)の開発並びにその性能評価を実施し、アルカリ液による糖鎖の遊離反応から遊離反応に利用したアルカリの中和を一連の流路内で実行する In-line flow システムを利用する試作1号機(AGC-1)の開発に成功した。本装置による糖鎖遊離反応条件を最適化した結果、従来法と比べ糖鎖の遊離時間は1/500以下になり、O-結合型糖鎖解析のスループットを劇的に向上することに成功した。またAGC-1と蛍光検出法を組み合わせることで、数 pmol の糖タンパク試料中のO-結合型糖鎖の解析に成功した。さらにO-結合型糖鎖分析のさらなるスループット化を目指して、AGCとMALDI-TOF MS用のサンプリング装置である Accuspot の連結(AGC-MS システム)を検討した。Accuspot との連結に先立ち、AGC-1で問題となる流路内のサンプルの拡散を防ぐため、流路各部の体積を徹底的に低減した試作2号機AGC-2を製作した。さらに、MALDI-TOF MSにおける糖鎖の検出感度を向上させるためにフェニルヒドラジンによるオンライン標識化法を検討した。これらの結果検討結果から、AGC-MS システムで数 $\mu\text{g}$ の糖タンパク質試料中のO-結合型糖鎖解析を可能にした。

第2章では第1章で開発した高速糖鎖自動切断装置(AGC)の実用化に向けた応用例として、培養癌細胞中に発現するO-結合型糖鎖を網羅的に解析した。効率的なO-結合型糖鎖の調製法を検討した結果、培養癌細胞 $5.0 \times 10^6$  cell からO-結合型糖鎖の解析を可能にした。順相HPLCによるプロファイリング、セロトニンアフィニティークロマトグラフィー法による分画及び、タンデム質量分析法を用いて白血病細胞4種(U937、K562、Jurkat、HL-60)、上皮性癌細胞6種(PANC1、BxPC3、LS174T、HCT-15、MKN45、MKN7)の計10種類の培養癌細胞中のO-結合型糖鎖を解析した結果、80種類のO-結合型糖鎖構造を同定することに成功した。白血病細胞群を比較すると、U937、K562、JurkatはSialyl-T(NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc)やDisialyl-T(NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc)を主要な糖鎖とするシンプルなプロファイルを持つことが明らかになった。一方、分化能が高いHL-60細胞では、Sialyl-T並びにDisialyl-Tの他にコア2型糖鎖Gal $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc)やポリラクトサミン型糖鎖((Gal-GlcNAc) $n$ -R)等が伸長したO-結合型糖鎖が観察された。上皮性癌細胞群ではHCT-15細胞を除く全ての細胞が白血病細胞と比較しO-結合型糖鎖の発現量が高い値を示した。また糖鎖発現量が著しく多い膵臓癌細胞BxPC3、結腸腺癌細胞LS174Tや胃腺癌細胞MKN45ではポリラクトサミン型糖鎖が大量に観察され、複雑な糖鎖プロファイルを示した。中でもLS174Tではジフコシル化糖鎖や硫酸化糖鎖等が大量に観察され、今回解析した上皮性癌細胞の中で最も複雑な糖鎖プロファイルを示した。また胃腺癌細胞MKN45ではO-結合型糖鎖では報告例のほとんどないトリシアロ型糖鎖が大量に観察された。さらにMKN45中で観察されるトリシアロ型糖鎖は、コア1構造(Gal $\beta$ 1-3GalNAc)

を形成するGalにラクトサミンユニットが高度に伸長した新規性の高い構造を持つことが明らかになった。興味深い事に、低分化型胃腺癌細胞であるMKN45細胞で大量に観察されたポリラクトサミン型糖鎖が、高分化型細胞であるMKN7細胞では全く観察されなかった。またこの現象とは対比的に、ある程度分化した膵臓癌細胞BxPC3ではポリラクトサミン型糖鎖が大量に観察されたが、未分化な膵臓癌細胞PANC1ではT抗原からの糖鎖の伸長が全く観察されなかった。これらの結果から、癌細胞の分化度の違いによってO-結合型糖鎖プロファイルが大きく変化することが明らかになり、O-結合型糖鎖が細胞の分化度並びに癌細胞の悪性度のマーカーになる可能性が示唆された。また培養癌細胞のO-結合型糖鎖を解析する中で、従来法ではTn抗原が検出できないことが明らかになったため、第2章ではTn抗原の検出法についても検討した。従来法でTn抗原を損失する原因となった標識糖鎖のクリーンアップ法を再検討し、逆相HPLC法による定量的なTn抗原の定量的な回収法を確立した。さらにキャピラリー電気泳動法並びにキャピラリーアフィニティー電気泳動法を用いてTn抗原を同定する手段を確立した。開発したTn抗原検出法を上記の10種類の培養癌細胞に適用した結果、Tn抗原発現量の比較解析を達成した。比較解析の結果から、転移能が高いと言われているLS174T細胞のTn抗原の発現量が他の培養癌細胞に比べて約10倍も高い値を示した。今後解析例を増やす必要があるが、Tn抗原を癌細胞の転移性のマーカーとして応用することが期待できる。

本研究で開発したO-結合型糖鎖の分析法は細胞のみならず、血清や組織等に容易に適用できる手法であり、今後開発した技術を臨床試料へ適用し、糖鎖を指標とする癌マーカーなどの疾病マーカーの探索を元にした医療への貢献が期待できる。

論文審査結果の要旨

申請者の博士後期課程論文「ムチン型糖鎖の高速高感度分析法の開発及びその実用化研究」は、糖タンパク質糖鎖の一種であるムチン型糖鎖の分析法の開発とその応用例をまとめた内容である。ムチン型糖鎖に代表される O-型糖鎖はウイルスや細菌による感染症や癌あるいは免疫疾患などの様々な疾病に関与し、疾病に伴いその構造が大きく変化することが明らかにされつつある。このような背景から O-結合型糖鎖は病態マーカーや新規医薬品のターゲット分子として期待され、疾患にともなう O-結合型糖鎖プロファイルの変化の解明が求められている。通常糖タンパク質糖鎖の解析はコアタンパク質から糖鎖を遊離した後、蛍光標識、分離分析と質量分析を組み合わせる方法が用いられる。糖タンパク質糖鎖の一種である N-結合型糖鎖では上記した手法による解析が進んでいる。一方 O-結合型糖鎖では有効なコアタンパク質からの糖鎖遊離法がなく、解析は困難を極めていた。

本論文では O-結合型糖鎖の高速高感度分析を可能にする高速糖鎖自動切断装置 (AutoGlycoCutter:AGC)を開発し、従来日単位を要した O-結合型糖鎖の遊離反応を僅か1分に短縮し500倍以上のハイスループット化を達成している。また従来法では不可能であった O-結合型糖鎖の蛍光標識化を達成し、O-結合型糖鎖の高感度分析法を確立している。また開発した AGC と質量分析装置を連結した AGC-MS システムを開発し、MALDI-TOF MS を用いた O-結合型糖鎖の高速高感度分析法を確立した。

さらに本論文ではバイオマーカーの探索を目指した実践的なモデル実験として、AGC を用いて培養癌細胞中の O-結合型糖鎖の網羅的解析を実施している。培養癌細胞として 10<sup>6</sup> cell から O-結合型糖鎖の解析が可能なプロトコルを確立し、10 種類の培養癌細胞中から 80 種類の O-結合型糖鎖構造の同定に成功している。観察された 80 種類の糖鎖の発現量を元に 10 種類の培養癌細胞の個性解析を実施した結果、細胞の分化度の違いによって O-結合型糖鎖プロファイルが大きく変化することを明らかにした。また未分化な胃腺癌細胞である MKN45 細胞中に新規性が高い、分子内にシアル酸を 3 分子持つ高度に伸張された O-結合型糖鎖が高発現することを明らかにしている。さらに O-結合型糖鎖の中でも解析が困難な構造として認識されている Tn 抗原の同定法の開発に取り組み、転移能が高い結腸腺癌細胞(LS174T)で Tn 抗原が高発現することを明らかにしている。培養癌細胞の O-結合型糖鎖解析を実施した結果得られたこれらの知見は、O-結合型糖鎖を細胞の分化マーカーや癌の悪性度の指標として利用できる可能性を強く示唆するものであり、基礎研究領域だけでなく臨床研究的観点からも非常に価値が高い内容であると判断できる。また本研究で開発した技術は培養癌細胞だけでなく血清や組織等の臨床試料に容易に適用することができるため、今後さらなる臨床応用が期待される。

これらの研究内容は 2007 年の Analytical biochemistry、2009 年の Journal of proteome research、2010 年の Analytical biochemistry の 3 つの学術誌で公表されており、学位論文として高く評価される。

氏名	きかい 堀	とし 俊	ひろ 博
学位の種類	博 士 (薬学)		
学位記番号	薬 第 8 8 号		
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	液体クロマトグラフィー／エレクトロスプレーイオン化質量分析法による胆汁酸の新規抱合体と疾患関連タンパク質の同定		
論文審査委員 (主査)	教授	池	川 繁 男
(副主査)	教授	掛	桶 一 晃
(副主査)	教授	仲	西 功