



Title	蛍光標識法による糖タンパク質O-配糖体糖鎖の高感度な構造解析法の開発と応用
Author(s)	倉屋, 奈穂樹
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38857">https://hdl.handle.net/11094/38857</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	倉屋 奈穂樹
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 11216 号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科有機化学専攻
学位論文名	蛍光標識法による糖タンパク質O-配糖体糖鎖の高感度な構造解析法の開発と応用
論文審査委員	(主査) 教授 長谷 純宏  (副査) 教授 下西 康嗣 教授 楠本 正一

### 論文内容の要旨

糖タンパク質の糖鎖レベルにおける生体機能調節が広く注目されるに従い、その生理的意義を解明する上で高感度な構造解析が不可欠となってきた。糖タンパク質の糖鎖は構造により *N*-配糖体糖鎖と *O*-配糖体糖鎖とに大別されている。*O*-配糖体糖鎖はムチン、プロテオグリカン等生体内に広く存在し、癌関連抗原や血液型物質等の生理活性を担っていることも多く、これらの糖鎖の解析は生理活性の研究や臨床検査において重要である。しかし現在まで主に *N*-配糖体糖鎖が中心に研究され、解析法の改良が進行したのに比し、*O*-配糖体糖鎖の研究は遅れている。一方、糖鎖の2-アミノピリジンによる蛍光標識法(ピリジルアミノ化)が開発され、*N*-配糖体糖鎖の高感度な構造解析に用いられてきた。この方法は感度や二次元 HPLC マップの高分離能、簡便さの点で従来法と比べ優れている。これらの長所を持つピリジルアミノ化法を *O*-配糖体糖鎖にも応用するため以下の研究を行った。

1) 天然の *O*-配糖体糖鎖はシアル酸が結合していることが多い。従来のピリジルアミノ化反応条件下ではシアル酸残基が一部脱離する。このため反応条件を再検討し、ほとんど脱シアロ化せず、かつ定量的にピリジルアミノ化できる反応条件を設定した。

2) *O*-配糖体糖鎖のピリジルアミノ化(PA-)糖鎖を得るため、糖タンパク質より *O*-配糖体糖鎖の切り出し条件を調べた。切り出しに用いる塩基を検討した結果、無水ヒドラジンが最も良い結果を与えた。その反応条件を検討し、約85%の収率で *O*-配糖体糖鎖を切り出せる条件を設定した。またこの条件下で *N*-配糖体糖鎖も同時に切り出すことができた。

3) 1), 2) の反応条件を用いて天然より種々の構造のPA-*O*-配糖体糖鎖を調製し、HPLCによる分離条件を設定した。逆相 HPLC とサイズ分画 HPLC の分離原理の異なる二種類の HPLC で高分離能が得られ、溶出位置から二次元 HPLC マップを作成した。さらに PA-*N*-配糖体糖鎖で見られた、PA-糖鎖の構造と逆相 HPLC における溶出位置との規則性が PA-*O*-配糖体糖鎖でも成り立つことが明らかになった。

4) 1)~3) で開発した方法をヒト血液凝固 IX 因子に応用し、その *O*-配糖体糖鎖の構造を解析した。新しい型の Fuc-Ser/Thr 型 *O*-配糖体糖鎖の構造を、酵素消化、メチル化分析、Smith 分解等により以下のように明らかにでき、本法の有用性を確認した: Neu5Ac $\alpha$ -2-6Gal $\beta$ 1-4G1cNAc $\beta$ 1-3Fuc。さらに IX 因子中に GalNAc-Ser/Thr 型 *O*-配糖対糖鎖を発見し、3) の二次元マップと逆相 HPLC における溶出位置の規則性を利用することにより、それらの構造をモノシアロ及びジシアロ Gal $\beta$ 1-3GalNAc と推定することができ、これらの分析システムの有用性も確認で

きた。また、PA-糖鎖の還元末端分析を行うことにより、IX 因子中の糖鎖を系統的にタイプ別に解析でき、N-配糖体糖鎖を含めた糖鎖の全体像を調べることができた。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は糖蛋白質糖鎖の内、セリンやトレオニンに結合しているO-配糖体糖鎖の切り出し、糖鎖の蛍光標識、2次元糖鎖マップの作成法を開発し、高感度にO-配糖体糖鎖の構造解析を行う道筋を開いたものである。この方法でアスパラギン結合糖鎖も同時に分析でき、糖蛋白質糖鎖の全体像を見るのに適していることが分かった。本方法を血液凝固IX因子に応用し、糖鎖の構造決定の結果、新しいタイプの糖鎖が含まれていることを発見した。以上により本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。