

Title	0-配糖体型糖鎖の新しい解析法の確立と顆粒球コロニー刺激因子の糖鎖研究への応用
Author(s)	大枝, 匡義
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/39425
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏 名	おお 枝 匡 義
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 1 8 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 1 2 月 2 1 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	O-配糖体型糖鎖の新しい解析法の確立と顆粒球コロニー刺激因子の糖鎖研究への応用
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 長 谷 純 宏 (副査) 教 授 相 本 三 郎 教 授 楠 本 正 一 教 授 下 西 康 嗣

論 文 内 容 の 要 旨

O-配糖体型糖鎖の解析法は、これまでにCarlsonらのアルカリ還元処理が主として用いられ、最近Kurayaらによってヒドラジン分解法とピリジルアミノ化法を組み合わせた高感度解析法が開発された。しかしながら、前者では糖鎖の分離モードに限界があり、また、後者では副産物が18%認められる等、これまでに開発されたO-配糖体型糖鎖の解析法は必ずしも満足のいくものではなかった。

そこで、新たにO-配糖体型糖鎖調製法の確立を目的として検討を行った。

目的とする糖蛋白質をポリビニリデンジフルオライド (PVDF) 膜に固定化し、アルカリ溶液 (0.1N NaOH/10% methanol) を流し、遊離した糖鎖を含む溶液を酢酸により中和して、安定な形で還元末端をintactな形で糖鎖を調製するO-配糖体型糖鎖調製システムを構築した。糖鎖画分をHase等の開発したピリジルアミノ (PA) 化により蛍光標識し、得られたPA化糖鎖をHPLCにより分析した結果、目的の糖鎖が55%の回収率で得られ、副産物は2.4%であった。このO-配糖体型糖鎖調製システムは、O-配糖体型糖鎖の蛋白質からの定量的な切り出しが可能であり、またpeeling反応による副産物を目的糖鎖に対して5%以下に抑えられた。ピリジルアミノ化による蛍光標識法との組み合わせにより、高感度な糖鎖解析が可能なO-配糖体型糖鎖解析法が構築できた。

ここで確立したO-配糖体型糖鎖解析法を用いてヒト顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の糖鎖研究を行った。

ヒトG-CSFは、天然型、及びチャイニーズハムスター卵巣細胞により発現させた組換え型ともに、その糖組成からO-配糖体型糖鎖が結合していることが予想された。

そこで、新たに確立したO-配糖体型糖鎖解析法を用いて、量の確保が困難な天然型ヒトG-CSFのO-配糖体型糖鎖の構造解析を行った。O-配糖体型糖鎖調製システムにより天然型ヒトG-CSFから糖鎖を調製し、PA化後、イオン交換HPLCにより分画した各PA化糖鎖を糖組成分析、シアリダーゼ消化、及びスミス分解により構造解析した。

また、量の確保が容易な組換え型ヒトG-CSFの糖鎖はアルカリ還元処理により切り出し、糖鎖をゲル濾過、イオン交換HPLCにより精製し、糖組成分析及び500MHz¹H-NMRにより構造を解析した。

その結果、両G-CSFの主要糖鎖の構造は、いずれも NeuAc α 2 - 3Gal β 1 - 3 (NeuAc α 2 - 6) GalNAc 及

び NeuAc α 2 - 3Gal β 1 - 3GalNAc の二種類で、それらの糖鎖は両 G - CSF でともに等量含まれていることが明らかになった。

ヒト G - CSF におけるこれら糖鎖の機能を調べるため脱糖鎖体を調製し、無処理の G - CSF と比較検討した結果、これら糖鎖はヒト G - CSF のポリマー形成や蛋白質主鎖の構造変化を抑えることで、G - CSF の活性の保持に寄与していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

大枝匡義君は、糖蛋白質の O - 配糖体糖鎖の新しい切り出し法を開発し、蛍光標識法と組み合わせて、微量の糖蛋白質でも O - 配糖体糖鎖の構造解析が可能な事を示した。この方法を用いて、顆粒球コロニー刺激因子の O - 配糖体糖鎖の構造決定を行い、O - 配糖体糖鎖の役割を解析した本論文は、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。