

Title	糖タンパク質の部位特異的糖鎖構造解析法の開発と応用
Author(s)	伊藤, さつき
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47674
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	伊藤 幸樹
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 21423 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 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	糖タンパク質の部位特異的糖鎖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 深瀬 浩一 教授 高尾 敏文 助教授 長束 俊治

論文内容の要旨

従来、糖タンパク質の部位特異的糖鎖構造は、精製された糖タンパク質の酵素消化によって得られる糖ペプチドを用いて解析されてきた。しかし、生体内に微量しか存在しない糖タンパク質、類似構造の多い糖タンパク質等は、精製が困難である。そこで、アミノ酸配列が既知の糖タンパク質について、生体試料から調製したタンパク質混合物の酵素消化物を用いた場合でも、各糖タンパク質の部位特異的糖鎖構造解析が行えるように、液体クロマトグラフィー/多段階質量分析(LC/MSⁿ)を用いて検討を行った。

生体試料から調製したタンパク質混合物は、ゲル電気泳動で分画した。ゲル画分中には複数のタンパク質が含まれ、また、糖タンパク質の各糖鎖結合部位には多様な構造の糖鎖が結合している。そのため、LC/MSⁿによって得られる糖ペプチドのスペクトルは、膨大かつ複雑になり、解析が困難になることが予測された。そこで、最初にゲル画分内のタンパク質に結合する全糖鎖の構造解析を行い、次に、糖鎖結合部位毎の糖鎖構造解析を行った。

全糖鎖の構造は、ゲル内酵素消化によって遊離後、グラファイトカーボンカラムを用いた LC で分離し、質量分析によって解析した。質量分析計には、イオントラップ型質量分析計と、高分解能測定が可能なフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計を連結させた質量分析装置を新たに導入し、ポジティブ、及びネガティブのイオン化モードを切り替えながら、精密質量測定、及び MSⁿ 測定を行うことを検討した。

次に、糖ペプチドを用いた糖鎖結合部位毎の糖鎖構造解析を行った。ゲル内よりタンパク質混合物を一旦抽出し、プロテアーゼ消化し、消化物を逆相 LC で分離後、MSⁿ が可能なイオントラップ型質量分析計を用いて分析した。得られた全スペクトルから、糖ペプチドのスペクトルを選び出すために、1)データベース検索を利用する方法を導入して、糖ペプチドを同定した。同定された糖ペプチドのスペクトルを用いて、全糖鎖構造解析の結果を参照し、糖鎖構造を解析した。2)全糖鎖構造解析から推定される糖鎖部分に由来するプロダクトイオンのマスクロマトグラムを利用して、糖ペプチドの溶出位置を特定し、糖ペプチドのスペクトルを選び出した。全糖鎖構造解析の結果や、目的の糖タンパク質から得られるペプチドの理論分子量を参照して、糖鎖結合位置と糖鎖構造を解析した。

本方法を、ラット脳より分画したグリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型タンパク質の部位特異的糖鎖構造解析に応用した。本方法を用いて結合糖鎖構造既知の細胞接着分子である Thy-1 を解析し、本法が有用であることを確認すると共に、新たな糖鎖構造を見出すことができた。さらに本法を用いて、結合糖鎖構造が未知である脳・神経系特異的な細胞接着分子 IgLON ファミリータンパク質(LAMP、OBCAM、neurotrimin、Kilon)の部位特異的糖鎖構造を明らかにし、各タンパク質に共通する糖鎖結合位置に、類似の構造を持つ糖鎖が結合していることが判った。

論文審査の結果の要旨

生体内に存在するタンパク質の約半分は糖鎖が結合した糖タンパク質であると言われ、また、糖タンパク質の糖鎖構造は、発生、老化、疾患等によって変化することが知られている。そのため、糖タンパク質の機能解析を進める上で、アスパラギン残基に結合している結合部位毎の糖鎖構造解析が必要になる。

従来、部位特異的糖鎖構造解析は、糖タンパク質を精製後、プロテイナーゼ消化を行い、分画された糖ペプチドから遊離された糖鎖の構造が解析されている。しかし、生体内より得られた蛋白質は微量のことが多く、しかも蛋白質の混合物であることがほとんどである。伊藤さんは、この様な条件下でも、アミノ酸シーケンスが既知の場合、各糖タンパク質の部位特異的糖鎖構造が解析できるシステムを確立し、応用し、新しい知見を得た。

新しいシステムは、生体試料を、ゲル電気泳動で分画し、目的の蛋白質を含む画分について、

まず、ゲル内酵素消化により得られた全糖鎖を、液体クロマトグラフィーイオントラップ型質量分析計ーフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計を用い解析し、

次に、プロテアーゼ消化して得られた糖ペプチドを、逆相液体クロマトグラフィーイオントラップ型質量分析計を用いて分析を行った。糖ペプチドのスペクトルを選び出すために、既存のデータベースに Asn+GlcNAc を加えたものを新たに使用し、さらに糖鎖共通のプロダクトイオンをも利用し、糖ペプチドを特定した。ペプチドに結合した糖鎖構造は全糖鎖構造を参考にして解析した。

本解析システムを、既に報告のある Thy-1 に応用し、本方法が有用であることを確認した。さらに本方法を、糖鎖構造が未知の、脳・神経系特異的な細胞接着分子である IgLON ファミリーに属する 4 種のタンパク質 (LAMP、OBCAM、neurotrimin、Kilon) に応用し、合計 22 箇所の部位毎の糖鎖構造を明らかにした。その結果、各タンパク質に共通する糖鎖結合位置には、類似の構造を持つ糖鎖が結合していることが明らかになった。これらの成果は糖質科学の基礎に大きな寄与をするものである。

よって、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。