

学 位 論 文 題 名

A novel glycomic/glycoproteomic approach based on LC/SSI-MS and MSⁿ spectral matching method

(LC/SSI-MS および MSⁿ スペクトルマッチング法を用いた
新規グライコミクス/グライコプロテオミクス解析法に関する研究)

学位論文内容の要旨

糖鎖修飾はタンパク質の機能制御機構にとって極めて重要な生合成プロセスであり、生体内タンパク質の約 50%以上は糖鎖修飾を受けた糖タンパク質であると考えられている。糖鎖は細胞の発生、分化、増殖さらには免疫やガンの転移などの生命現象に深く関わっている。また多くの疾患において糖鎖変化が報告されていることから、疾患マーカーとしても注目されはじめている。従来、糖鎖の構造解析は様々な分析法 (NMR, HPLC マッピング法, メチル化分析, 酵素消化等) により行われてきたが、スループットが低くまた熟練した技術を必要とするものであった。近年のゲノミクス、プロテオミクスの勃興にともない第三の生体鎖状分子である糖鎖についても微量・迅速・簡便な構造解析手法の確立が切望されている。

近年、質量分析法 (MS) はプロテオミクスにおいてタンパク質の微量・迅速・簡便な解析が可能であることが示されている。しかし、糖鎖は構成分子が直列にならんでいる核酸やタンパク質とは異なり、枝分かれ構造や立体異性の違いに基づく複雑な構造をしている。そのため、MS による糖鎖構造の詳細な解析は困難であり、依然として確立された方法論は存在しないが、これまでの研究から多段階タンデム質量分析スペクトル (MSⁿ スペクトル) における糖鎖フラグメントイオンの相対的強度に着目することにより、異性体糖鎖を識別できるとの報告がなされている (ライブラリー照合型の糖鎖同定法)。しかしながら、このアプローチはこれまで限られた種類の糖鎖のみしか議論されていなかった。そこで私は、この MSⁿ ライブラリー照合型の糖鎖同定方法を糖タンパク質糖鎖に応用することを考えた。さらに、HPLC マッピング法により蓄積されている HPLC における糖鎖溶出位置データを活用することも考え、LC/MS を用いた微量・簡便・高精度な糖鎖構造解析法の確立を目指した。

第一章では、MS を用いた糖鎖構造解析の現状を簡単にまとめ概説した。

第二、三章では、MSⁿ スペクトルによる異性体糖鎖の識別・同定方法について検討を行った。このアプローチが成立するには MSⁿ スペクトルの再現性と異性体識別能が必須である。そこで、私はまずソニックスプレーイオン化 (SSI) 法を用い、N 結合型異性体糖鎖の正/負イオンモードにおける MSⁿ スペクトルを取得した。次に、MSⁿ スペクトルの再現性および異性体識別能を評価するために、各 MSⁿ スペクトルデータ間を相関係数により数値化した (MSⁿ スペクトルマッチング法)。その結果、再現性の良い MSⁿ スペクトルの取得が可能であるこ

と及びN結合型糖鎖のような大きな糖鎖であっても異性体の識別・同定が可能であることを明らかとした。また、負イオンモードでのMSⁿ測定は、正イオンモードよりも遥かに有効かつ多くの糖鎖構造情報を得ることが可能であることを見出した。特にインターナルイオン(D, D-2H₂O イオン)は、有用な構造情報を与えた。以上の結果から、糖タンパク質糖鎖のMSⁿスペクトルライブラリーを構築することによりMSⁿスペクトルから糖鎖の同定が可能であることが明らかとなった。

第四、五章では、LC/MSを用いて糖鎖の分離と同時にMSⁿスペクトルを取得することで、より高精度な糖鎖同定および複雑な試料解析が可能であると考え、検討を行った。そこでまずイオン化条件、カラム、溶離液等を検討し、逆相カラムによる糖鎖の高分離条件を決定した。また、SSI 負イオンモードを用いることで、中性糖鎖及びイオン化の際に解裂のおこりやすいシアリル糖鎖(酸性糖鎖)をフラグメントさせることなく、かつ同程度の感度で検出できることがわかった。さらに、これまでHPLCマッピング法によって蓄積されてきた糖鎖溶出位置データもLC/MS分析に適用可能であることを明らかとし、溶出位置情報とMSⁿスペクトルライブラリーを組み合わせることでより高精度な糖鎖同定および複雑な試料の解析が可能であることを示した。

第六章では、本解析法をヒト免疫グロブリンGの糖鎖解析に応用した。免疫グロブリンGの糖鎖はこれまでさまざまな方法により解析がなされてきたが、本法により新規糖鎖の発見および効率的な構造解析に成功し、その有効性を示した。

次に、私は糖ペプチドの解析に着目した。糖鎖をタンパク質から切り出すことなく糖ペプチドのまま分析することができれば、1)糖鎖構造 2)ペプチド配列 3)糖鎖とペプチドとの結合位置の情報を得る事ができることから、近年糖ペプチドの解析研究が盛んに行われている。

第七章では、糖ペプチドの精製および分離について検討を行った。糖ペプチドは、タンパク質をプロテアーゼ消化することにより調製するため、サンプルの複雑性を著しく増大させてしまう。これまでに糖ペプチドの精製や分離に関する報告がなされてきたが、異性体糖ペプチド(同じペプチド配列であるが異性体糖鎖を有する分子)の分離については不十分であった。私は両性イオン型親水性クロマトグラフィーを初めて糖ペプチドの分離に応用し、タンパク質のプロテアーゼ消化物から、糖ペプチドを選択的かつ高分離能で分離することに成功した。

第八章では、糖ペプチドの構造解析について検討を行った。これまで、糖ペプチドの解析において、ペプチド配列、糖鎖結合部位、糖鎖配列の決定については様々な報告がなされてきたが、糖鎖構造の同定については議論されていなかった。私は、糖ペプチドのMSⁿ解析と糖鎖MSⁿライブラリーを比較することで、異性体糖ペプチドの解析が可能であることを示した。

第九章では第一章から第八章までの総括とこれからの展望について短く述べた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎
副 査 教 授 河 野 敬 一
副 査 教 授 石 森 浩一郎
副 査 教 授 小布施 力 史 (生命科学院)

学 位 論 文 題 名

A novel glycomic/glycoproteomic approach based on LC/SSI-MS and MSⁿ spectral matching method

(LC/SSI-MS および MSⁿ スペクトルマッチング法を用いた
新規グライコミクス/グライコプロテオミクス解析法に関する研究)

生体内タンパク質の約 50%以上は糖鎖修飾を受けたものであり、この種の糖タンパク質では糖鎖部分がタンパク質の安定性や機能発現に深く関与している。近年、質量分析 (MS) を用いたタンパク質の網羅的解析研究が盛んであるが、糖鎖修飾解析についてはその困難さから解析が遅れているのが現状である。特に、糖鎖構造の同定や未知構造の決定に関しては依然として良い手法は存在せず、新たな解析法の確立が切望されている。本論文は、このような現状にあるタンパク質糖鎖修飾解析について、質量分析を用いた高感度・簡便な構造解析法の確立を目的として研究したものであり、糖鎖生物学上大きな意義がある。

MS による糖鎖構造解析を困難にしているのは、構成単糖に異性体が存在する事や結合の多様性から起因する異性体糖鎖が数多く存在するためである。これら異性体糖鎖は、MS/MS 測定におけるフラグメントイオンも同じ質量数を示すことが多く、従来プロテオミクスで用いられている理論上のフラグメントイオン (m/z) との一致度を比較する方法では糖鎖の同定は困難であった。著者は、異性体糖鎖であっても結合様式や立体構造の違いからグリコシド結合の開裂のしやすさが異なる事に着目し、フラグメントイオンの相対的強度を利用するという方法を用いることにより、MSⁿ スペクトルライブラリーから簡便に糖鎖構造を同定できる方法論を確立した。また、これまで解析が非常に困難であったシアリアル糖鎖の詳細な解析も可能であることを実証した。さらに、本方法論を用いることでこれまで発見されていなかった新規糖鎖の構造を決定することにも成功し、糖鎖生物学に与えるインパクトは大きい。一方、近年タンパク質から糖鎖を切り出すことなく糖ペプチドのまま分析する事により、糖鎖とタンパク質との結合位置を決定できる事という報告がなされ、注目を集めている。しかし、従来法では糖鎖とタンパク質との結合位置の決定はできても、糖鎖構造を同定することは極めて難しかったが、著者は糖ペプチドの構造解析に糖鎖の MSⁿ スペクトルライブラリーを応用することで、糖鎖部分を含む糖ペプチドの解析が可能であることを示した。これにより、タンパク質のどの位置にどのような糖鎖が結合しているかを解析する事が可能となった。

これを要約するに、本論文は質量分析を用いたタンパク質の N-結合型糖鎖修飾の高感度・簡便な構造解析法を確立したものであり、糖鎖科学、タンパク質科学はもちろんのこと、医学、創薬科学を始めとした各分野にも大きな波及効果があり、多方面の科学の進展に大きく貢献するものと確信している。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。