学位論文題名

Comparative avioglycomics: Insight into glycan diversity
and evolutionary lineage by large-scale glycomics(鳥類の比較グライコムクス：大規模グライコムクスによる糖鎖の多様性と
進化系統に関する研究)

学位論文内容の要旨

タンパク質の約半数は糖鎖による翻訳後修飾を受けている。ヒトゲノム解析によって判明した遺伝子は当初考えられていた数よりも少なかったということを鑑みても、翻訳後修飾が生物の多様性を生み出し、複雑な生命現象を解く鍵を握っていると考えられる。糖鎖は、細胞の増殖や分化、免疫、がんの転移や浸潤、シグナル伝達、感染や炎症などの生命現象に深く関わっていることが知られている。これらの生命現象に関わる糖鎖の構造は多様であり、その構造多様性から、タンパクに対して様々な機能を付与していると考えられている。この多様性は生物が環境に適応し、進化していく過程で獲得されてきたと考えられているが、生物進化との関連が解明されているものはごく一部であり、大部分の糖鎖修飾の具体的な役割は分かっていない。その理由の1つとして、複雑な構造をとる糖鎖の解析が煩雑で手間のかかるものであり、大規模な解析が従来では困難であったということが挙げられる。

近年、グライコムクス技術の進歩は著しく、質量分析を用いた解析により、ゲノム、タンパク質同様、糖鎖においてもハイスループットな解析が可能となってきた。グライコプロッティング法は、MALDI-TOF MS を用いた最新の糖鎖解析手法である。この手法の特徴は、糖鎖の捕捉・精製・標識の一連の操作を on-beads で完結させることである。生体サンプルから切り出した糖鎖の還元末端のアルデヒド基を、ヒドラジドビーズにより選択的に捕捉、ビーズを洗浄することで挟雑物を除去し、最終的には、標識試薬を加えて反応させることで、糖鎖を標識、遊離させる。さらに、内部標準物質を予め加えておくことにより、定量的な解析も可能である。グライコプロッティング法は、細胞、組織、血清などの生体サンプルの糖鎖を、簡便に精製、解析できるため、本法を駆使することにより、糖鎖の大規模解析が可能になり、糖鎖に関わる生命現象を明らかにするためのベースとなる情報量を飛躍的に増加させることが期待できる。

本研究では、グライコプロッティング法を応用することで、多様な構造をもつ糖鎖と生物進化との関連性を議論することを目的とした。

現在までに知られている特徴的な糖鎖構造は例えば、ヒトや旧世界霊長類では、Gal α 1 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc (α -Gal epitope) 構造が完全に欠損しており、鳥類では、キジカモ小綱以外の新顎類に Gal α 1 $\rightarrow$ 4Gal (α 1 $\rightarrow$ 4galabiose) 構造が見られる。このような生物種特異的な糖鎖構造は、進化を反映した系譜であると捉えられる。単糖構造が多様性を持つ例としては、シアル酸が挙げられる。シアル酸には、50種類以上の分子種が存在し、中でも代表的なものとして、Neu5Ac、Neu5Gc、KDNがある。その存在比は動物種や組織によって異なることが知られ、進化系譜を議論するよい材料のひとつになっている。しかし、これらの知見は、多様な糖鎖構造の中から見出された一部に過ぎず、その機能についても未知の部分が大きい。生物の糖鎖プロフィールから糖鎖の機能を明らかにし、異なった進化系統を洞察するためには、それらのベースとなる情報量が豊富である必要がある。DNA やタンパク質の情報が十分に解明されているターゲットを選択することで、それらの進化系統との比較評価が可能

になり、進化系統を1因子だけから無く、総合的に理解することが期待できる。

本研究のターゲットには、DNAでの鳥類進化の情報が豊富であり、インフルエンザの宿主としても知られる代表的な家禽、ニワトリ、アヒル、カモを含むキジカモ小綱の卵白を用いた。カモ目(63個体)とキジ目(25個体)の計88個体において、そのN-グリコームとシアル酸に着目した解析を行った。鳥の卵白は、その役割の一つとして、胚を様々な感染から防御する働きを担っている。卵白中の糖鎖は、細菌認識のおとりとして働き、細菌が胚に感染するのを防御すると考えられ、現在及び過去の病原体との攻防の歴史が卵白の糖鎖の多様性を生み出していると予想されることから、卵白は、糖鎖の多様性を観察する上で最適なサンプルであると考えられる。これらの糖鎖解析結果と、鳥の生息環境などの関連性を見ることで、その進化系統との関連性を議論した。

N-グリコーム解析では、卵白のN-グリカンをグリコプロッティング法及びMALDI-TOF MSを用いて解析した後、そのプロファイルをクラスター解析(階層クラスタリング及び主成分分析)により分類した。全88キジカモ小綱卵白において、61種類のN-グリカンのピークを検出した。この88データセットをクラスター解析することにより、2つの主要クラスター(クラスター1, 2)と3つの少数クラスター(クラスター3~5)を含む5つのクラスターに分けることができた。このうち主要クラスターであるクラスター1は、N-グリカン末端へのガラクトースの転移が少ない群で、キジ目全25個体及びカモ目39個体を含んでいた。もう1つの主要クラスターであるクラスター2は、N-グリカン末端へのガラクトースの転移が多い群で、カモ目のみ22個体含んでいた。種、属、形態、環境の違い、などで特徴的な糖鎖パターンがあるか、またDNAでみた進化分類(Sibley-Ahlquist鳥類分類)と相関がみられるかなどに着目し解析を進めたところ、カモ目において、クラスター1に分類された39個体中31個体が、カモやアヒルなどの小型の水鳥(カモ類)であった。一方、クラスター2に分類された22個体はすべて、ガンや白鳥などの大型の水鳥(ガン類)であった。このことから、大規模N-グリコミクスにより、鳥の形態で糖鎖パターンに違いがあることが見いだされた。

さらに、シアル酸定量解析では、高感度解析法であるDMB-HPLC法を用いて、全88のキジカモ小綱卵白において、網羅的な解析を行った。複合糖質全体及びN-グリカンに付加するシアル酸ともに、キジ目、カモ目の両方で、Neu5Acが大部分のシアル酸分子種を占めるが、同卵白量当りのシアル酸総量は、キジ目がカモ目よりも多く、約3倍量程度であることが分かった。このことから、網羅的比較解析により、シアル酸総量で鳥種の区別が可能であることが示された。卵白中に、Neu5Ac以外のシアル酸分子種であるNeu5Gc及びKDNが見られることについては、種や形態、生息地域との相関が見られず、水鳥であるカモ目数種において特に多くなっていることから、小魚などNeu5Ac以外の分子種を多く含む餌や、低酸素状態になる潜水行動などの生活環境が起因しているのではないかと考えられた。

これらのグリコミクスの結果と、Sibley-Ahlquist鳥類分類を併せて考えることで、詳細な系統樹を作成した。本研究により、従来の遺伝子やタンパク質での進化系統に翻訳後修飾である糖鎖の情報を加えることで、新たな切り口からのより詳細な進化系統の理解に繋がる可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎
副 査 教 授 菅 原 一 幸
副 査 教 授 門 出 健 次
副 査 教 授 小 布 施 力 史

学位論文題名

Comparative avioglycomics: Insight into glycan diversity and evolutionary lineage by large-scale glycomics

(鳥類の比較グライコムクス：大規模グライコムクスによる糖鎖の多様性と
進化系統に関する研究)

タンパク質の約半数は糖鎖による翻訳後修飾を受けており、糖鎖の多様性が複雑な生命現象を解く鍵を握っていると注目されている。複雑で多様な構造である糖鎖の解析（グライコムクス）は困難かつ煩雑であり、ゲノミクスやプロテオミクスに比べ、技術的に未発達段階で今後の発展が待たれている状況にあった。

本学位論文では糖鎖の効率的精製法と質量分析、更には統計学的解析を組み合わせ大規模なグライコムクスの手法論を提唱し、実際に多検体の鳥類卵白サンプルを用いた糖鎖による進化系統についての議論を実現した。

第1章では、基本的な糖鎖修飾とその解析の重要性について述べられており、著者が所属している研究室でこれまでに確立した糖鎖の迅速精製法（グライコプロッティング法）とその背景について詳しく解説された。

第2章では、キジ目、カモ目における卵白大規模 *N*-グライコムクスについて述べられている。卵白の *N*-グライコムをグライコプロッティング法で解析し、そのプロファイルをクラスター解析（階層クラスタリング及び主成分分析）により分類した。全88キジカモ小綱卵白において、61種類の *N*-グリカンのピークを検出し、この88データセットをクラスター解析することにより、クラスター1~5の5つのクラスターに分けることに成功している。種、属、形態、環境の違い、などで特徴的な糖鎖パターンがあるか、またDNAでみた進化分類（Sibley-Ahlquist 鳥類分類）と相関がみられるかなどに着目し解析を進め、カモ目において、クラスター1に分類されたカモやアヒルなどの小型の水鳥（カモ類）、クラスター2に分類されたガンや白鳥などの大型の水鳥（ガン類）、クラスター4に分類されたサケビドリでガラクトース転移や糖鎖の分岐に差があることを示した。これらの結果から、大規模 *N*-グライコムクスにより、鳥の形態で糖鎖パターンに違いがあることを示した。

第3章では、高感度シアル酸解析法である DMB ラベル化法とグライコプロッティング法を組み合わせユニークな手法によるシアル酸定量解析について述べられている。全88のキジカモ小綱卵白において、網羅的な解析を行った。複合糖質全体及び *N*-グリカンに付

加するシアル酸ともに、キジ目、カモ目の両方で、Neu5Ac が大部分のシアル酸分子種を占めていることが証明されている。また、同卵白量当りのシアル酸総量はキジ目がカモ目よりも多く、約3倍量程度であることからシアル酸総量の網羅的比較解析により鳥種の区別が可能であることを示した。

第4章では、2章及び3章のグライコミクスの結果から予測される進化系統樹を作成し、DNAでの分類である Sibley-Ahlquist 鳥類分類を併せて考察している。

卵白の糖鎖の多様性は、鳥の生息環境の違いによって脅威となる病原体の種類も違うため、現在及び過去の病原体との攻防の歴史が卵白の糖鎖の多様性を生み出しているというユニークな仮説を提案している。卵白は多様な糖鎖構造を持つことで感染の際におとりとして働き、胚を感染から防御する役割を担っていることが予想できる。また、糖鎖生物学的アプローチのみでは利用できる情報が少ないため、糖鎖の機能や役割について未だ不明な点が多いが大規模グライコミクスが可能になったことで実測の多量のデータ解析で新しい事実が実証されていくだろうとの展望を示した。

本論文は、大規模グライコミクスによるデータプロファイリング法を確立し、糖鎖の多様性と鳥類進化との関連性を示した大規模グライコミクスの先駆けとなるものである。従来の遺伝子やタンパク質での進化系統に翻訳後修飾である糖鎖の情報を加えることで、新たな切り口からのより詳細な進化系統の理解に繋がることが期待される。今後の糖鎖生物学及び進化学の発展に大いに貢献する研究であるといえる。

よって審査員一同は、これらの成果を高く評価し、著者が博士（生命科学）の学位を授与されるのに十分な資格を有すると判定した。