

## 学位論文題名

## A comprehensive approach for glycobiology by electron capture dissociation MS, NMR, and bioinformatics

(電子捕獲解離型 MS 法、NMR、およびバイオインフォマティクスによる  
系統的糖鎖生物学研究)

## 学位論文内容の要旨

糖鎖は細胞の分化・成長や臓器形成、免疫反応、老化といった多くの生命現象において重要な役割を果たしていることが知られている。特に癌やリウマチといった特定の疾患において生体内の糖鎖量が変化することが分かってきており、次世代のバイオマーカー候補としても注目を浴びている。しかしそれにも関わらず、糖鎖の網羅的な構造解析及び機能解析は進んでおらず、遺伝子やタンパク質のようなデータベース化も未熟なままであった。これは、生体試料から糖鎖を精製する、迅速で簡便な手法が無かったことや、モデル研究に用いるための糖鎖化合物の合成に手間と時間が掛かる等の原因によるものであった。近年の分析装置・合成技術の進歩により、糖鎖の簡便迅速な精製手法や様々な糖鎖化合物の合成等が容易になりつつあり、糖鎖化合物に関する生物学的知見も増え始めている。こうした状況下で更なる糖鎖研究の推進を加速させる為には、遺伝子やタンパク質がそうであったように、バイオインフォマティクスが重要な役割を果たすものと考えられる。しかし糖鎖のデータベースは未だ黎明期で、遺伝子・タンパク質にとっての GenBank や EMBL のような誰もが利用する有益なデータベースというものが存在しない。また、先にも述べたように糖鎖の精製、組成解析には非常な困難を要してきた為、糖鎖の組成と機能を結びつけるデータは未だ少なく、その組成を生み出す根本である糖転移酵素等の関連遺伝子と機能に関する知見が多い。

そこで私は糖鎖組成を主キーと置くのではなく、糖鎖及びそれを取り巻く生体分子との関係に着目し、その分子間の関係性とそれに従って発生する生物学的現象を包括的なグラフとして表現した機能糖鎖データベース Glyco-Net の開発を行った。最初に用いたデータセットとして、市販されている糖転移酵素ハンドブックの内容を用い、糖鎖機能の新しい表現手法として有効であることを示した。今後このデータベースの拡充を進めて行く事が課題であるが、様々な形態で存在する糖鎖を構造機能解析する為の方法論は未だ確立されていない。特にムチン糖タンパク質等で見られる O 結合型糖鎖転移は N 結合型糖鎖と異なり、糖鎖転移するための特定の共通配列というものはない。又、O 結合型糖鎖付加の最初の  $\alpha$  GalNAc を転移する酵素である ppGalNAcT は 20 種類以上にも上り、配列上の Ser/Thr に  $\alpha$  GalNAc をそれぞれの基質特異性を発揮して転移し、非常に複雑で高密度なムチンドメインを形成している。このメカニズムはムチン型糖タンパク質の機能制御において重要な役割を担っていると考えられる。

私は、この複雑なムチン糖タンパク質構造的機能的解析の包括的な方法論の構築を目的として、ppGalNAcT2 糖転移酵素と、基質として MUC4 及び MUC5AC ペプチドをモデルとして ECD (電子捕獲解離法) -MS/MS を用いた糖付加部位の解析及び NMR による糖転移による構造変化の解析を行った。その結果、*in vitro* で ppGalNAcT2 によってモデルペプチドに転移された  $\alpha$  GalNAc の糖転移部位及びその転移の順序を明らかにし、ECD-MS/MS による

糖転移部位の解析の有効性を示した。又、ppGalNAcT2がMUC4及びMUC5Acに転移した中間体糖ペプチドを化学合成し NMR 解析と構造計算によってMUC4 に最初に転移した $\alpha$ GalNAcがこの領域のペプチド骨格の安定化に重要なステップであると事を示した。また、MUC5ACの連続するThr残基への糖鎖付加が伸長したペプチド骨格の形成にとって重要であることを明らかにした。モデルペプチドを用いた糖転移酵素の基質特異性及び、その構造との因果関係を電子捕獲解離法MS/MSとNMR構造解析によって明らかにする新たなストラテジーを確立した。

# 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 (生命科学学院)  
副 査 教 授 出 村 誠  
副 査 教 授 門 出 健 次

## 学位論文題名

### A comprehensive approach for glycobiology by electron capture dissociation MS, NMR, and bioinformatics

(電子捕獲解離型 MS 法、NMR、およびバイオインフォマティクスによる  
系統的糖鎖生物学研究)

糖鎖は細胞の分化・成長や臓器形成、免疫反応、老化といった多くの生命現象において重要な役割を果たしていることが知られている。特に癌やリウマチといった特定の疾患において生体内の糖鎖量が増加する事が分かってきており、次世代のバイオマーカー候補としても注目を浴びている。

第一章で述べられている様に、糖鎖の網羅的な構造解析及び機能解析は進んでおらず、遺伝子やタンパク質のようなデータベース化も未熟なままであった。これは、生体試料から糖鎖を精製する迅速で簡便な手法が無かったことや、広範な研究に用いるための糖鎖化合物の合成に手間と時間が掛かる等の原因によるものであった。しかし、近年の分析装置・合成技術の進歩により、糖鎖の簡便迅速な精製手法や様々な糖鎖化合物の合成等が容易になりつつあり、糖鎖化合物に関する生物学的知見も増え始めている。こうした状況下で更なる糖鎖研究の推進を加速させる為には、遺伝子やタンパク質がそうであったように、バイオインフォマティクスが重要な役割を果たすものと考えられる。しかし糖鎖のデータベースは未だ黎明期で、遺伝子・タンパク質にとっての GenBank や EMBL のような誰もが利用する有益なデータベースというものが存在しない。また、先にも述べたように糖鎖の精製、組成解析には非常な困難を要してきた為、糖鎖の組成と機能を結びつけるデータは未だ少なく、その組成を生み出す根本である糖転移酵素等の関連遺伝子と機能に関する知見が多い。

第二章では糖鎖構造を主体に置くのではなく、糖鎖及びそれを取り巻く生体分子との相互関係に着目し、その分子間の関係性とそれによって発生する生物学的現象を包括的なグラフとして表現した機能糖鎖データベース Glyco-Net の開発について議論した。最初に用いたデータセットとして、市販されている糖転移酵素ハンドブックの内容を用いることで、糖鎖機能の新しい表現手法として極めて有効である事を示した。

今後このデータベースの拡充を進めて行く事が課題であるが、様々な形態で存在する糖鎖を構造機能解析する為の方法論は未だ確立されていない。特にムチン糖タンパク質等で見られる O 結合型糖鎖転移は N 結合型糖鎖と異なり、糖鎖が転移されるための特定の共通配列は特に決まっていない。また、O 結合型糖鎖付加の最初の  $\alpha$  GalNAc を転移する

酵素である ppGalNAcT は 20 種類以上にも上り、配列上の Ser/Thr に  $\alpha$ GalNAc をそれぞれの基質特異性を発揮して転移しており、非常に複雑で高密度なムチンドメインを形成している。このメカニズムはムチン型糖タンパク質の構造と機能の制御において重要な役割を担っていると考えられる。

第三章では、この複雑なムチン糖タンパク質の構造的・機能的解析の包括的な新しいアプローチとして、ppGalNAcT2 糖転移酵素と基質として MUC4 及び MUC5AC ペプチドをモデルとして ECD (電子捕獲解離法) -MS/MS を用いた糖付加部位の解析及び NMR による糖転移反応に伴う構造変化に関する系統的な研究成果について述べている。

その結果、in vitro で ppGalNAcT2 によってモデルペプチドに転移された  $\alpha$ GalNAc の糖転移部位及びその転移の機序を明らかにすることに成功して、ECD-MS/MS による糖転移部位の解析の有効性を示した。また、ppGalNAcT2 が MUC4 及び MUC5Ac に GalNAc を実際に転移した中間体糖ペプチドを化学合成し、NMR 解析と構造計算によって MUC4 に最初に転移した  $\alpha$ GalNAc がこの領域のペプチド骨格の安定化に重要なステップである事を証明した。また、MUC5AC の連続する Thr 残基への糖鎖付加が伸長したペプチド骨格の形成にとって重要であることを初めて明らかにした。

本学位論文はモデルペプチドを用いた糖転移酵素の基質特異性及び、その構造との因果関係を電子捕獲解離法 MS/MS と NMR 構造解析によって明らかにする新たな戦略を確立した初めての研究であった。糖鎖生物学研究にバイオインフォマティクスの手法を取り入れるとともに、質量分析、NMR 等を駆使した系統的なアプローチと評価できる。よって審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格がある者と認める。