

## 学位論文の要旨

氏名

佐藤 昌紀

学位論文題目

微量糖鎖の構造解析と固定化を同時に可能とする新規蛍光性リンカー化合物の開発とそれを用いた成人T細胞白血病 (ATL) 細胞表層特異的糖鎖マーカーの発見に関する研究

本論文は、微量糖鎖の構造解析と固定化を同時に可能とする新規蛍光性リンカー化合物の開発とそれを用いた成人T細胞白血病 (ATL) 細胞表層特異的糖鎖マーカーの発見に関する研究をまとめたものである。

第1章では、序章として本研究の意義について記載した。

ヒトT細胞白血病ウイルス1型 (HTLV-1) はCD4陽性T細胞に感染して成人T細胞白血病 (ATL) を引き起こし、血液系、免疫系、神経系に重篤な影響を及ぼす。ATLは特に西南日本に多く見られ、HTLV-1キャリアは鹿児島県では10%、沖縄県では20%といわれている。全国で毎年約2000人以上の新たなATL患者が発生し、約1000人が死亡している。増殖したATL細胞は容易に血管外に遊走し臓器浸潤を引き起こすため、一度発症するときわめて予後の悪い造血器腫瘍である。ウイルスの伝播はHIVと同様、輸血、性的接触、母子感染が主である。

ATLに対するこれまでの研究はウイルス遺伝子産物Taxに注目したものが多く、細胞増殖に関してTaxの細胞周期促進、アポトーシス抑制、また接着分子の誘導などが報告されているが、未だに有効な治療法は確立されていない。そこで我々は、新規ATL抗体療法足の足がかりとして、細胞間感染で増殖するATL感染細胞表層の糖鎖抗原を特定することを目指した。我々はこれまでもSPR測定に用いる金チップとオリゴ糖鎖を繋ぐリンカー化合物を考案してきたが、疾病に関わる超微量でしか得ることができないオリゴ糖鎖に対応するため、質量分析による構造解析と抗体スクリーニングのための糖鎖固定化チップ (シュガーチップ) の作製を同時に達成する新規蛍光性リンカーを開発した。それは自然界から単離、精製して得られる種々の微量オリゴ糖をそのまま用いて一段階で蛋白質分析用の支持体表面にオリゴ糖鎖を簡便に固定化することができ、種々の蛋白質との結合相互作用を連続的かつ定量的に評価できる蛋白質分析用の支持体となると同時に、構造解析への可能性も保持している。

第2章では、新規蛍光リンカー (fmono リンカー) の合成、並びに評価実験に用いるGalβ1-4Glc-fmono リンカー、Glcα1-4Glc-fmono リンカーの合成を行った。Fmono リンカーの構造的長は、金チップに固定化するためのジズルフィド結合と蛍光性を有するピリジン環を同時に併せ持っているということである。

第3章は、第2章で調製したf-mono リンカー、Gal $\beta$ 1-4Glc fmono、Glc $\alpha$ 1-4Glc fmonoの評価実験について記載した。まず、f-mono リンカーの蛍光測定を行ったところ、励起波長335nm、蛍光波長380nmを有することがわかった。このことによって従来の1000分の1の量の糖鎖を補足、検出することができるようになった。次に、Gal $\beta$ 1-4Glc-fmono、Glc $\alpha$ 1-4Glc-fmonoを金チップに固定化し、SPR測定を行ったところ、非特異的吸着を起こすことなく、それぞれ特異的なレクチンとの相互作用を確認することができた。続いて、Gal $\beta$ 1-4Glc-fmono、Glc $\alpha$ 1-4Glc-fmonoのMS解析、さらにMS/MS解析を行った。質量分析測定では構造内のジスルフィド結合の開裂のために生じた2Daずれた特徴的なピークを観測することができ、この特性は第4章での未知糖鎖のMS解析に有効であった。MS/MS解析では非還元末端の糖鎖が外れたフラグメントを観測することができ、MS/MS解析にも有効に使用できることがわかった。

第4章では、f-mono リンカーを用いてヒトイムノグロブリンG (IgG) 由来N型糖鎖の探索研究を行った。まず、IgGからPNGaseでN型糖鎖を切り出した。糖鎖の濃縮には市販のBlot Glyco法を使用し、糖鎖を再遊離後f-monoリンカーと縮合した。この際コントロールとして、同じ処理を施し調製したN型糖鎖をBlot Glyco推奨のMS解析用再遊離試薬 (aoWRs) で標識化し、MS解析で比較した。その結果、aoWRsで標識した糖鎖と同じ構造を有したN型糖鎖が同等の感度で検出され、6~11糖体が確認された。ここで第3章に記した、2Daずれた特徴的なピークのため、簡便にf-mono化された糖鎖ピークを識別することができた。引き続き行ったMS/MS解析では、aoWRs試薬で標識した糖鎖のフラグメントは検出できなかったのに対し、f-mono化された糖鎖は還元末端、非還元末端からのフラグメンテーションが鮮明に観測され、相対的な糖鎖構造を推測することができた。また、HPLC測定を行ったところ、従来のリンカーでは検出できなかった天然由来の糖鎖ピークを観測することができた。

第5章では、新規抗体治療薬の開発を目的として、今回開発したf-monoリンカーを用いてATL細胞表層特異的糖鎖マーカーの探索を行った。実験方法としてATL細胞株であるSIT細胞、非ATL細胞であるMOLT4細胞それぞれから細胞表層糖鎖を切り出し、f-mono化後HPLC測定で比較した。細胞表層に存在する糖鎖だけを抽出するためトリトンX114 (TX-114) 相分離法を用いて膜蛋白を得た後、第4章で行った処理法を用いてN型糖鎖を抽出した。O型糖鎖に関しては、N型糖鎖を切り出した後の蛋白を回収しヒドラジン分解を用いて糖鎖を遊離後、f-mono化を施した。N型糖鎖において、HPLC測定を行ったところ、SIT細胞のみに存在する糖鎖を検出することができた。現在、特徴的なf-mono化された糖鎖を精製し、チップに固定化して抗体のスクリーニングに供している。

第6章では本研究を総括した。F-mono linkerは簡便に合成でき、糖鎖と縮合することで糖鎖に蛍光性を持たせ、HPLCでの微量検出を可能とした。ここまでならば、PA化をはじめこれまでに広く使用されてきた蛍光性ラベルと相違はない。しかし、これまでの蛍光性ラベルにはなかったジスルフィド結合を持たせることによって、その後金チップに固定化しSPR測定を行える機能を有するようになった。蛋白質との相互作用解析では非特異的吸着も起こることなく、理想どおりの結果を出すことができた。質量分析において、現時点ではGlc、Gal、ManそしてGlcNAcとGalNAcの区別、結合位置とアノメリック位の立体配置は未だ判断が難しいが、f-mono linker構造内のジスルフィド結合の開裂による2Daのズレによって、ラベル化された糖鎖を瞬時に見つけ出すことができ、またMS/MS解析でPA化糖鎖同様に適度なフラグメンテーションを観測できたことは、今後構造解析において期待できる。また応用研究としてATL細胞表層に存在する特異的糖鎖抗原の特定も可能となり、新規治療法の足掛けとなり、さらに今後様々な細胞に存在する微量糖鎖のチップ化へ発展していこう。

## 論文審査の要旨

報告番号	理工研 第307号	氏名	佐藤 昌紀
審査委員	主査	隅田 泰生 教授	
	副査	門川 淳一 教授	伊東 祐二 准教授
		橋本 雅仁 准教授	
<p>学位論文題目 微量糖鎖の構造解析と固定化を同時に可能とする新規蛍光性リンカー化合物の開発とそれを用いた成人T細胞白血病 (ATL) 細胞表面特異的糖鎖マーカーの発見に関する研究 (Study on the development of a novel fluorescent linker molecule for both structural analysis and immobilization, as well as its application to the discovery of sugar-chain markers specific for adult T-cell leukemia (ATL) cell surface.)</p> <p>審査要旨</p> <p>提出された学位論文及び論文目録等を基に学位論文審査を実施した。本論文は微量糖鎖の構造解析と固定化を同時に可能とする新規蛍光性リンカー化合物の開発とそれを用いた成人T細胞白血病 (ATL) 細胞表面特異的糖鎖マーカーの発見に関する研究をまとめたものである。</p> <p>第1章では、序章として本研究の意義について記載した。ヒトT細胞白血病ウイルス1型 (HTLV-1) はCD4陽性T細胞に感染して成人T細胞白血病 (ATL) を引き起こし、血液系、免疫系、神経系に重篤な影響を及ぼすが、未だに有効な治療法は確立されていない。そこで我々は、新規ATL抗体療法の足がかりとして、ATL感染細胞表面の糖鎖抗原を特定することを目指すと共に疾病に関わる超微量でしか得ることができないオリゴ糖鎖に対応するため、質量分析による構造解析と抗体スクリーニングのための糖鎖固定化チップ (シュガーチップ) の作製を同時に達成する新規蛍光性リンカー (f-mono リンカー) を開発した。</p> <p>第2章では、f-mono リンカーの合成、並びに評価実験に用いるための蛍光性リガンド複合体Gal<math>\beta</math>1-4Glc-fmonoとGlc<math>\alpha</math>1-4Glc-fmonoの合成を行った。f-mono リンカーの構造的長は、金チップに固定化するためのジスルフィド結合と蛍光性を有するピリジン環を同時に併せ持っているということである。</p> <p>第3章は、f-mono リンカーの蛍光測定、蛍光性リガンド複合体のSPR測定、MS解析、さらにMS/MS解析を行った。質量分析測定では構造内のジスルフィド結合の開裂のために生じた2Daずれた特徴的なピークを観測することができた。MS/MS解析では非還元末端の糖鎖が外れたフラグメントを観測することができ、MS/MS解析にも有効に使用できることがわかった。</p> <p>第4章では、f-mono リンカーを用いてヒトイムノグロブリンG (IgG) 由来N型糖鎖の探索研究を行った。IgGからPNGaseでN型糖鎖を切り出しBlot Glyco法で糖鎖精製を行った。糖鎖を再遊離後f-monoリンカーと縮合した結果、MS解析において既知N型糖鎖が確認された。ここで第3章に記した特徴的なピークのため、簡便にf-mono化された糖鎖ピークを識別することができた。引き続き行ったMS/MS解析では還元末端、非還元末端からのフラグメンテーションが鮮明に観測され、相対的な糖鎖構造を推測することができた。またHPLC測定を行ったところ、100 ugのIgGから500 pmolのN型糖鎖を回収できたことがわかった。</p> <p>第5章では、新規抗体治療薬の開発を目的として、今回開発したf-monoリンカーを用いてATL細胞表面特異的糖鎖マーカーの探索を行った。実験方法としてATL細胞株であるS1T細胞、非ATL細胞であるMOLT4細胞それぞれから細胞表面糖鎖を切り出し、f-mono化後HPLC測定で比較したところ、S1T細胞のみに存在するN-型糖鎖を検出することができた。</p> <p>第6章では本研究を総括した。本論文で開発したf-monoリンカーは有意な蛍光性を有し、チップへの固定化も可能であり、MS/MS解析によって糖鎖構造を推測することも可能であった。さらにMS解析においては特徴的なピークを観測することができた。応用研究としてもATL細胞表面に存在する特異的糖鎖抗原の特定が可能となり、新規治療法の足掛けとなった。さらに今後様々な細胞に存在する微量糖鎖のチップ化へ発展していくことが大いに期待できる。f-monoリンカーの開発及びその評価研究、応用研究はその内容、期待度共に博士論文として十分に通用するものであり、よって審査委員会は博士 (工学) の学位論文として合格と判定する。</p>			

## 最終試験結果の要旨

報告番号	理工研 第307号	氏名	佐藤 昌紀
審査委員	主査	隅田 泰生 教授	
	副査	門川 淳一 教授	伊東 祐二 准教授
		橋本 雅仁 准教授	
<p>平成 21 年 2 月 12 日 14:00 から行われた学位論文発表会において、審査委員を含む 13 名の前で学位論文の内容が説明され、その後、以下に示すような質疑応答が行われた。いずれについても満足すべき回答を得ることが出来た。</p> <p>[質問 1] 蛍光は溶媒などの環境によって強度が増減するが、定量測定障害とならないのか？  [回答] 糖鎖の精製にはHPLCを用いるが、溶媒系は主に親水性で統一されており、蛍光性に影響を与えるほどの環境の変化、例えば、疎水性から親水性への極端なグラジエントなどは考えられない。よって糖鎖精製におけるf-monoリンカーの蛍光性はこれまでの従来標識剤同様に有効である。</p> <p>[質問 2] f-monoリンカーは糖鎖に比べ疎水性だが、もっと親水性にしたほうがHPLCを用いた場合優位なのではないか？  [回答] f-monoリンカーの研究では親水性を持たせる為、チオクト酸と2,6-ジアミノピリジンの間にTEGを組み込んだリンカーも開発した。現在、詳しい評価実験を行っているが、MS解析などに支障が生じることが予想される。よって、HPLC測定においてはリンカー構造を変化させるよりも、f-monoに適した溶媒系を新しく構築する方が妥当であり、またその必要性はある。</p> <p>[質問 3] IgGから精製した糖鎖の収率はどのくらいか？  [回答] 100 µgのIgGから500 pmolの糖鎖を得ることができた。IgGの分子量を10万とすると100 µgのIgGは1 nmolとなり、よって全てのIgGに糖鎖が修飾されているとして、50%となる。</p> <p>[質問 4] MALDI用標識剤 aoWRs はなぜ高感度なのか？  [回答] MALDI用標識剤 aoWRsは構造上、芳香環を4つ含む分子量442の結晶性の高い化合物で、マトリックスの結晶性を促すためだと考えている。MS解析に関してF-monoリンカーよりも高感度ではあるが、親イオンとフラグメントイオンを見分けることができないこと、MSMS解析が困難なことから未知化合物の構造解析には不向きである。また、蛍光性も低く検出できない。一方、f-monoリンカーは感度が低いわけではなく、そして特徴的なピークを観測すること、MSMS解析が容易であることから未知化合物に対して有効である。結果としてIgGの構造を推測することが可能であった。</p> <p>[質問 5] MS解析の結果と遺伝子解析の結果が一致しているのはどの部分か？  [回答] MS解析の結果フコースが付加した糖鎖構造を多く観測した。遺伝子解析の結果でもシアリルルイス構造に関係するフコース転移酵素の遺伝子が多く発現していることが分かった。</p> <p>以上のことから審査委員会は、申請者が博士課程の修了者としての学力ならびに見識を有するものと認め、博士（工学）の学位を与えるに足る資格を有するものと判定した。</p>			