

氏 名	野呂 絵里花			
学位の種類	博士（医学）			
学位記番号	博甲第 7587 号			
学位授与年月	平成 27 年 12 月 31 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	Large-scale identification of <i>N</i> -glycan glycoproteins carrying Lewis x and site-specific <i>N</i> -glycan alterations in <i>Fut9</i> knockout mice (α 1,3-フコース転移酵素 9 ノックアウトマウス を用いた糖鎖および糖タンパク質の網羅的な解 析)			
主 査	筑波大学教授	博士（医学）	梶 正幸	
副 査	筑波大学准教授	医学博士	竹内 薫	
副 査	筑波大学准教授	博士（医学）	宮崎 淳	
副 査	筑波大学講師	博士（理学）	三輪 佳宏	

### 論文の内容の要旨

#### （目的）

ルイス x (Lewis x) 構造は、細胞接着に重要な糖鎖構造 (Gal β1-4 (Fuc α1-3) GlcNAc-R) であり、初期胚や神経幹細胞のマーカーである SSEA-1 抗原の糖鎖エピトープである。しかしながら、ルイス x の生物学的機能やキャリア蛋白についてはほとんど分かっていない。本研究では、ルイス x 構造合成に関わる糖転移酵素、α1,3-フコース転移酵素 9 (Fucosyltransferase 9, Fut9) のノックアウトマウスを用いてルイス x キャリア蛋白を網羅的に同定し、その糖鎖付加部位ごとのグライコーム情報を取得することを目的とした。

#### （対象と方法）

Fut9 が多量に発現している成獣マウスの腎臓を研究対象とし、野生型マウスと Fut9 ノックアウトマウスの腎臓ホモジネートをトリプシン処理した後、Amide 80 カラムを用いて糖ペプチドを捕集した。次に、AAL レクチン (*Aleuria aurantia* ヒイロチャワンタケレクチン)・アフィニティークロマトグラフィーでフコシル化糖鎖キャリアペプチドを捕集し、安定同位体標識された H<sub>2</sub><sup>18</sup>O 中で

PNGase 処理を行うことにより糖鎖付加部位を標識した (Isotope-coded Glycosylation site-specific Tagging 法 : IGOT 法) 後、LC/MS 法で候補蛋白質および糖鎖付加部位を同定した。さらに、新規に開発した部位特異的グライコーム解析法を用いて、ルイス x キャリアを選別、同定した。本解析手法は、糖ペプチドを断片化せずに精密質量を計測した後、糖鎖の不均一性を利用して同一ペプチドのクラスターを同定し、別個に高感度 IGOT 法でリスト化したコアペプチドの計算質量を参照して、コア蛋白と糖組成を同定するものである。

#### (結果)

トリプシン分解後に Amide 80 カラムを用いて HILIC (hydrophilic interaction chromatography) 法により精製した野生型マウス腎臓由来の糖ペプチドには、多数のルイス型フコシル化糖鎖が見出され、Fut9 ノックアウトマウスの腎臓でルイス x 構造が消失していた。従って、ルイス x 構造は腎臓で広範に存在することが明らかになった。

次にルイス型フコースを持つ糖鎖を結合しているキャリア蛋白質を同定するため、AAL(+)糖鎖ペプチドを IGOT-LC/MS 法で解析した。さらに、新規に開発したグライコプロテオミクス解析法を用いて、ルイス x キャリアを選別、同定した。その結果、野生型マウス腎臓では、32 種類の糖蛋白質 (51 個の糖鎖付加部位) の内 24 種類 (42 個の糖鎖付加部位) がルイス x 構造を含み、その内 21 個は Fut9 ノックアウトマウスの腎臓で消失した。

#### (考察)

野生型マウス腎臓の複合型糖鎖のほとんどがフコシル化されており、複合型 N 型糖鎖のほとんどがルイス型モチーフを持っていた。フコースを認識する AAL レクチンで捕集した糖ペプチドを IGOT 法で解析した結果、約 1600 個の糖ペプチド (800 個の糖蛋白質) が同定された。Fut9 ノックアウトマウスの腎臓ではルイス型モチーフが消失したことから、野生型のターミナルフコースはルイス x であると考えられる。野生型マウスで同定された蛋白質の約 75% でルイス x が存在し、Fut9 ノックアウトマウスで消失することから、これまで考えられていた以上にルイス x が普遍的に存在することが明らかになった。この研究結果は、ルイス x(+)糖蛋白質の腎臓における機能解明や疾患における変化などを調べるための基盤を与えるものである。

### 審査の結果の要旨

#### (批評)

本研究は、腎臓におけるルイス x 糖鎖構造を持つ糖蛋白質を網羅的に同定した優れた研究である。精密な実験を行うのみならず、新規のグライコプロテオミクス解析法を開発することにより、多数のルイス x(+)糖蛋白質を同定したことは高く評価できる。これまで考えられていた以上にルイス x(+)糖蛋白質が普遍的に存在することが明らかになり、ルイス型糖鎖の生物学を大きく推し進めるものである。さらに得られた糖蛋白質リストは、腎臓におけるルイス x(+)糖蛋白質の機能解明や病態時の変化などの将来の研究に基盤になるものであり、医学的価値が高い優れた研究であると評価できる。

## 審査様式 2－1

平成 27 年 10 月 28 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。