

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

| | |
|---------|---|
| 氏名 | 野々村 頼子 |
| 学位 | 博士 (医学) |
| 学位記番号 | 新大院博 (医) 第 874 号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 |
| 博士論文名 | Characterisation of N-glycans in the epithelial-like tissue of the rat cochlea(ラット蝸牛の上皮様組織に発現する N-結合型糖鎖の解析) |
| 論文審査委員 | 主査 教授 小野寺 理 副査 教授 竹林 浩秀 副査 教授 堀井 新 |

博士論文の要旨

【背景と目的】

チャンネル、トランスポーターや受容体などの膜タンパク質や分泌タンパク質は、細胞の生命活動の維持に不可欠である。これらのタンパク質の 50%以上は糖鎖修飾を受けている。タンパク質のアスパラギン残基に結合する糖鎖は N-結合型糖鎖と呼ばれ、タンパク質の安定性や輸送のシグナル、膜タンパク質の機能調節に重要な役割を果たす。

聴覚を司る内耳蝸牛を満たす内リンパ液は、細胞外液でありながら 150 mM の K^+ 濃度と +80 mV の高電位を示す。この特殊体液では、浸透圧や酸塩基平衡も厳密に保たれている。このような内リンパ液環境は、聴覚にとって必須であり、主に蝸牛側壁の上皮様組織「血管条」によるイオンや小分子の輸送により維持されている。物質輸送を担う膜タンパク質も、N-結合型糖鎖による制御を受けていると考えられる。しかし、内耳蝸牛に発現する糖鎖は、未だ網羅的に解析されていない。本研究では、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と質量分析 (MS) を駆使して、血管条に発現する N-結合型糖鎖の包括的なプロファイルを明らかにした。

【方法と結果】

1) 血管条分離の精度解析：

BN/SsNSic ラット (7 週齢オス) 64 匹から、実体顕微鏡下に血管条を単離した。この組織は蝸牛内で螺旋靭帯と隣接する。単離サンプルに対し各組織のマーカー遺伝子の発現を real-time PCR で調べ、螺旋靭帯の混入が極めて少ないことを確認した。

2) 血管条に発現する N-結合型糖鎖の分離：

単離した血管条にヒドラジンを加え、タンパク質から糖鎖を遊離した。加えて、標本を 2-アミノピリジンで処理した。その結果標識された糖鎖を、3 種類の HPLC (陰イオン交換 HPLC、逆相 HPLC、サイズ分画 HPLC) に順にかけることで、シアル酸の数、疎水性、分子サイズにより分離した。さらに、逆相 HPLC で分離した糖鎖を、Liquid chromatography-electrospray ionization-MS (LC-ESI-MS) and MS^2 で解析した。77 種類の N-結合型糖鎖が同定された。

3) N-結合型糖鎖の構造解析：

MS と MS^2 の spectra から、糖鎖を構成する単糖の組成や、部分的な糖鎖構造の情報を得ることが

できる。また、逆相 HPLC とサイズ分画 HPLC の溶出時間は、糖鎖構造ごとに固有の値を示す。上記のデータを基に、N-結合型糖鎖の構造を解析した。

4) シアル酸の結合様式の解析：

上記の手法で構造解析した糖鎖のうち、シアル酸の結合様式が同定できなかったものについては、sialic-acid-linkage-specific alkylamidation: SALSA と matrix-assisted laser desorption quadrupole ion trap time-of-flight MS: MALDI-QIT-TOF MS で詳細に解析した。この手法は、 α 2,3 結合または α 2,6 結合シアル酸をそれぞれ異なる分子で修飾することで発生する質量差を MS で検出することで、2 種の結合様式を区別する。その結果、全ての糖鎖についてシアル酸の結合様式が明らかとなった。また、HPLC と LC-ESI-MS だけでは分離できなかった糖鎖が 2 種同定された。A3-13 糖鎖については、SALSA と positive ion mode MALDI-QIT-TOF MS により、LC-ESI-MS and MS² 解析から推測した構造と異なる構造を持つことが示唆された。そのため、Negative ion mode MALDI-QIT-TOF MSⁿ でさらに解析した結果、硫酸基を含む糖鎖であることがわかった。以上より、計 79 種類の N-結合型糖鎖を同定し、その構造を示した。

5) 血管条に発現する N-結合型糖鎖のプロファイル：

これら 79 種類の内訳としては paucimannose が 5.8%、High mannose type が 38.1%、Complex type が 34.8%、Hybrid type が 21.0%含まれていた。さらに、Complex type の 25.4%、Hybrid type の 18.2%がシアル酸を含有し、High mannose type の 2.6%、Complex type の 23.3%、Hybrid type の 2.4%がコアフコースを含有した。

【考察】

本研究では、蝸牛血管条に発現する N-結合型糖鎖を網羅的に解析し、79 種類の N-結合型糖鎖とその構造を同定した。本糖鎖プロファイルは、難聴の基礎研究及び病態解明の足がかりとなることが期待される。ムンプス難聴を引き起こすムンプスウィルスは、血管条に感染することが報告されている。このウィルスは、 α 2,3 結合シアル酸を有する構造に強く結合することが知られる。本研究にて、このような構造を持つ糖鎖が実際に血管条に発現していることが明らかとなった。この結果は、今後の創薬、治療の一助となると考えられる。

審査結果の要旨

チャンネル、トランスポーターや受容体などの膜タンパク質や分泌タンパク質の 50%以上は糖鎖修飾を受けている。タンパク質のアスパラギン残基に結合する糖鎖は N-結合型糖鎖と呼ばれ、タンパク質の安定性や輸送のシグナル、膜タンパク質の機能調節に重要な役割を果たす。聴覚を司る内耳蝸牛を満たす内リンパ液環境は、聴覚にとって必須であり、主に蝸牛側壁の上皮様組織「血管条」によるイオンや小分子の輸送により維持されている。物質輸送を担う膜タンパク質も、N-結合型糖鎖による制御を受けていると考えられる。しかし、内耳蝸牛に発現する糖鎖は、未だ網羅的に解析されていない。さらにムンプス難聴を引き起こすムンプスウィルスは、 α 2,3 結合シアル酸を有する構造に強く結合し血管条に感染することが報告されているが、実際このような構造を持つ糖鎖が血管条に発現しているか不明であった。申請者は、高速液体クロマトグラフィーと質量分析を駆使し、蝸牛血管条に発現する N-結合型糖鎖を網羅的に解析し、79 種類の N-結合型糖鎖とその構造を同定した。さらに、その中に α 2,3 結合シアル酸を有する構造を持つ物の存在を明らかとした。本糖鎖プロファイルは、難聴の基

礎研究及び病態解明の足がかりとなり、今後の創薬、治療の一助となると考えられ、学位論文としての価値を認める。