

論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨の公表

学位規則第 8 条に基づき、論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

○氏名	永井 裕子 (ながい ゆうこ)
○学位の種類	博士 (薬学)
○授与番号	甲 第 1302 号
○授与年月日	2019 年 3 月 31 日
○学位授与の要件	本学学位規程第 18 条第 1 項 学位規則第 4 条第 1 項
○学位論文の題名	ヒト人工多能性幹細胞由来シアロ糖タンパク質ポドカリキシンの グライコムクス研究
○審査委員	(主査) 豊田 英尚 (立命館大学薬学部教授) 井之上 浩一 (立命館大学薬学部准教授) 北原 亮 (立命館大学薬学部教授)

<論文の内容の要旨>

本論文は第 1 章で蛍光ポストカラム HPLC を用いたシアル酸分析法の確立を、第 2 章でケラタン硫酸様構造認識抗体 R-10G および TRA-1-60 が認識するエピトープ構造の解析を、第 3 章および 4 章でヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が産生するポドカリキシンの精製およびウエスタンブロッティングによる解析を、第 5 章で蛍光ポストカラム HPLC を用いたケラタン硫酸分析法の確立に言及し、第 6 章でヒト iPS 細胞が産生するポドカリキシンの総合的な糖鎖分析による解析を経て結論をまとめている。

ポドカリキシンは糸球体上皮細胞に存在するシアル酸に富む複合糖質であり、腎では糸球体ろ過に必要なスリット構造を作るなどの重要な機能を担っている。最近、ヒト iPS 細胞を認識する多くの未分化マーカーのエピトープが細胞表面のポドカリキシンの結合している糖鎖であることが示され、その構造と機能が注目されている。ヒト iPS 細胞では分子量 200kDa 以上の高分子として存在し、多様な糖鎖が結合していると予想されている。このように、ヒト iPS 細胞が未分化状態を維持するための非常に重要な因子としてポドカリキシンに関心が集まっており、ポドカリキシンの特殊な糖鎖構造の解明は再生医療分野における重要な研究テーマである。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞が産生するポドカリキシン上の糖鎖構造解析を通じて未分化状態維持メカニズムの分子基盤解明を試みた。ヒト iPS 細胞 (201B7 株) の細胞抽出液を作製し、R-10G 抗体のアフィニティカラムに 2 回かけることによりポドカリキシンを単離した。LC/MS/MS 解析によるタンパク質の同定および各種のグリコシダーゼ消化、ウエスタンブロッティングによる解析を行った結果、ヒト iPS 細胞由

来 R-10G 抗原タンパク質は複雑な糖鎖修飾を受けたポドカリキシンであることが明らかになった。さらに、このタンパク質はケラタン硫酸様糖鎖に修飾されていることも示された。この糖鎖はエンド-β-ガラクトシダーゼ消化に対しては高い反応性が見られたが、ケラターゼ II 消化には消化抵抗性を示した。そこでエンド-β-ガラクトシダーゼ消化で産生するオリゴ糖の新しい分析法を含む、様々な化学的糖鎖分析法によってヒト iPS 細胞由来ポドカリキシンの糖鎖解析を行ったところ、腎ポドカリキシンと同様にシアル酸を多く含むシアロ糖タンパク質であること、ポリ-N-アセチルラクトサミン構造を含んだ、硫酸化度の非常に低い特殊なケラタン硫酸鎖が結合していることが明らかになった。ポドカリキシンはヒト iPS 細胞表面に高発現していることから、この特殊な糖鎖に細胞表面が覆われていることが、未分化状態の維持に重要な役割を担っていることが示唆された。

<論文審査の結果の要旨>

本論文は、ヒト iPS 細胞由来ポドカリキシンを単離して化学的に糖鎖構造を解析した初めての報告である。化学的に糖鎖構造を解析するために、シアル酸の蛍光ポストカラム HPLC およびケラタン硫酸の蛍光ポストカラム HPLC の二つの新規分析法を確立し、ヒト iPS 細胞由来ポドカリキシンを特徴付ける糖鎖構造を解明した点は高く評価できる。ヘパラン硫酸はケラタン硫酸と共にグリコサミノグリカンに分類される硫酸化多糖類であり、動物細胞が様々な生命活動を営むためには細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンが重要であることが知られている。細胞間シグナル伝達物質の多くがヘパラン硫酸をコファクターとすることから、学位申請者が構造を突き止めた特殊なケラタン硫酸鎖は、このヘパラン硫酸の機能をマスキングして未分化状態を維持する要因であると考えられ、再生医療研究における意義は大きい。

2019年1月25日(金)15時30分~16時30分にサイエンスコア5階会議室において公聴会を開催し、学位申請者による論文内容の説明の後、審査委員は学位申請者に対する口頭試問を行った。各審査委員および公聴会参加者より、ポドカリキシンのタンパク質部分に関する LC/MS/MS 解析の細部に関わる質問、新規の糖鎖分析法の有用性に関する質問があった。また、ヒト iPS 細胞におけるポドカリキシンの役割について、本研究で解明した特殊なケラタン硫酸鎖の関与に対する説明を求められた。学位申請者の回答は、いずれの質問に対しても適切であった。

以上のことから、公聴会での口頭試問結果を踏まえ、審査委員会は本論文が本研究科の博士学位論文審査基準を満たしており、博士学位を授与するに相応しい水準に達しているとの判断で一致した。

<試験または学力確認の結果の要旨>

本論文の公聴会は、2019年1月25日(金)15時30分~16時30分にサイエンスコア5階会議室において行われた。

学位申請者は、本学学位規程第 18 条第 1 項該当者であり、主査および副査は、論文内容および公聴会での質疑応答を通して、学位申請者が十分な学識と、博士学位に相応しい能力を有していることを確認した。

以上の点を総合し、学位申請者永井裕子に対して、本学学位規程第 18 条第 1 項に基づき「博士（薬学 立命館大学）」の学位を授与することが適当であると判断する。