



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Anionic Glycan Diversity in Waterfowl Egg Whites through Glycoblotting-based Sulphoglycomics Approach [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	MONTALBAN, Bryan Murillo
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第15610号
Issue Date	2023-09-25
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/90797">https://hdl.handle.net/2115/90797</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Bryan_Montalban_review.pdf, 審査の要旨



# 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏名 Bryan M. Montalban

審査担当者	主査	教授	比能洋
	副査	教授	西村紳一郎
	副査	准教授	上原亮太
	副査	講師	北村朗

## 学位論文題名

Anionic Glycan Diversity in Waterfowl Egg Whites through  
Glycoblotting-based Sulphoglycomics Approach  
(グライコブロットイング運動型スルフォグライコムクス法による  
水鳥卵白中のアニオン性糖鎖多様性に関する研究)

## 博士学位論文審査等の結果について（報告）

糖鎖構造は対象生物の抗原性や感染宿主選択性等を決定するバイオマーカーである。質量分析法は感度と分解能に優れるため、糖鎖構造とそのパターンの一斉解析（グライコムクス）に広く使用されるようになった。しかし、質量分析技術は分析対象分子のイオン化を基盤としているため、中性糖鎖と電荷を有する糖鎖を同時に扱うことが困難であった。そのため、シアル酸やウロン酸等のカルボン酸を官能基として有する糖鎖はエステル化やアミド化等の修飾を行うことにより中性糖鎖として分析を行うことが慣例となっている。しかし、糖鎖水酸基の硫酸やリン酸修飾はカルボン酸と同一条件で中性化することが困難であり、その含量も少ないため「通常の」グライコムクス技術では検出困難であり、その存在を無視して取り扱われることが一般的であった。一方、糖鎖の硫酸化やリン酸化はタンパク質—糖鎖間の相互作用を制御する無視できない糖鎖機能の修飾因子である事実が数多く報告されており、存在量が少ない場合でも重要なバイオマーカーとなりうる。そのため、様々な研究者により様々な硫酸化およびリン酸化糖鎖の分析技術が提案されたが、中性糖鎖との存在量比の問題もあり、迅速並列解析が依然として困難であった。著者は北海道大学の西村らが開発した Glycoblotting 法を迅速化の鍵とし、通常の Glycoblotting 法プロトコルでは検出が困難であった硫酸化糖鎖やリン酸化糖鎖を効率的に検出するため、負電荷を有する糖鎖を分離する Weak anion Exchange (WAX) 処理を組み合わせることを考案した。さらに、様々な条件検討と最適化の試行錯誤を経て、様々な検体糖鎖中の微量の硫酸およびリン酸修飾を含めた一斉迅速測定 (Sulphoglycomics) が可能となることを実証した。本技術の特筆すべき点は、分子量が同じ硫酸基とリン酸基の識別に Glycoblotting 法のカルボン酸のメチルエステル化条件を活用し、リン酸基をモノメチル化し、硫酸基は修飾しないことに着目したことである。この糖鎖の硫酸とリン酸修飾の識別能をフォスファターゼ処理の有無により実証した。

さらに著者はこの Glycoblotting 法と WAX 処理法の組み合わせによる Sulphoglycomics 技術の迅速性を活用し、広範な鳥類卵白ライブラリを対象とした比較構造解析研究を実施した。水鳥の多くは渡り鳥であり、インフルエンザウイルスなど、様々な病原因子の運び屋となりうる。特にインフルエンザウイルスは自然宿主である水鳥から家禽への感染においてリガンド糖鎖の硫酸化状態が大きく影響することが報告されている。そこで著者らは広範な水鳥を対象とした卵白の Sulphoglycomics 研究を展開し、種ごとの糖鎖構造パターンとその硫酸化パターン情報を取得した。さらに、取得した膨大な Sulphoglycomics 情報とトリインフルエンザウイルス保有率などの

種間特性との相関解析を行いリン酸化ハイマンノース糖鎖の存在量がインフルエンザウイルス保有率と高い相関を示すことなどを見出し、インフルエンザの鳥類内伝播の根本的な分子メカニズム解明の基盤情報となりうることを示した。著者はこれらの研究を通じ、Glycoblottting 法に基づく Sulphoglycomics は、多検体の比較会解析に必要な感度とスループットを実現し、酸性糖鎖の包括的なバイオマーカー探索が可能となることを示した。階層的クラスタリングや主成分分析などの多変量解析との組み合わせより Sulphoglycomics 結果の可視化および明確なグループ分けや重要糖鎖修飾パターンの同定が容易となることも実証した。

本論文は、Glycoblottting 法に基づく Sulphoglycomics を実現し、この技術基盤を活用した水鳥卵白の酸性糖鎖多様性とそのウイルス学的特性に関する知見を与えることに成功している。これらの知見は糖鎖機能の構造活性相関研究において強力な手法を提供するとともに、糖鎖をリガンドとする様々な感染症における病原性、宿主選択性とその分子メカニズム情報等、感染症対策情報に関する重要な知見を与えるものである。また、感染症にとどまらず広範な疾患の診断、予防、および治療戦略につながる社会基盤技術となることが期待できる。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。