

論文審査の結果の要旨

氏名 曾我 慶介

本論文は序論、材料と方法、結果、考察、図表から構成され、新規糖結合性レクチンの創出法と創出した改変レクチンの応用について記述されている。糖鎖は様々な生理的機能を示す他に、細胞の置かれた微小環境を反映し構造を変化させることから、近年では細胞の糖鎖構造をプロファイルすることにより癌などの疾病の診断技術へ応用が試みられる。これら糖鎖構造をモニターするツールとして、抗体やレクチンが汎用される。しかし、糖鎖の構造は複雑で多様性に富み、既知の構造だけでも 1,000 を越えるのに対し、抗糖鎖抗体の作製は困難であり、また天然のレクチンにも限りがあり、すべての糖鎖構造をカバーすることは不可能である。そこで、新規糖結合性レクチンの創出法を確立する共に、改変レクチンをプローブとして応用することを目的とした。

マメ科レクチンはファミリー間で一次構造上高い相同性を有しているが、個々のレクチンで様々な糖結合特異性を持ち、多様な糖結合特異性を創出するポテンシャルが高いと考えられる。糖結合領域を構成する部位は、4つのループ（ループ A、B、C、D）からなるが、特に糖結合特異性を担うとされるループ C 及びループ D に着目した。ピーナッツレクチン（PNA）のループ C とループ D のアミノ酸配列にランダム変異を導入したライブラリーを 11 種類（計 2.0×10^7 cfu）作製した。スクリーニング方法には、免疫学の分野で用いられる NFAT-activation molecule cloning system (NACS) を利用した Mammalian Cell Surface Display (MCSD) 法を新たに考案した。この手法は、細胞表面に個々のレクチンを提示した細胞のライブラリーを作出すると共に、細胞外の糖鎖リガンドに結合すると細胞内に蛍光タンパク質（GFP）を発現する系である。実際に、レクチンライブラリーを発現させたレポーター細胞を用いて、14 種類の糖鎖を標的に、これらの糖鎖と結合能を有する改変レクチン発現 GFP 陽性の細胞をセルソーターで分取した。さらに濃縮した細胞よりゲノムを抽出し、それを鋳型に cDNA を PCR で増幅、糖結合活性を持つ改変レクチンの cDNA 配列を 11 種類同定した。

次に、これら中から、7種類の改変レクチンとヒト抗体のFc領域との融合タンパク質を作製し、さまざまな生化学的解析を行った。糖鎖アレイによる糖結合特異性解析を行ったところ、改変①-FcではGal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc α 構造に対して強い結合活性を示した。また、改変⑥-Fcでは、脱シアル酸化されたGlycophorin糖タンパク質にのみ特異的な結合を示した。さらに、結合強度を比較すると、Gal β 1-3GalNAc α への結合において改変①-FcはPNA-Fcより強いことが示された。また、28種類のヒトの培養細胞に対する改変レクチンの結合性を調べたところ、改変①、②、⑤-Fcでは、各細胞に対して、PNA-Fcと比べ強い結合能を示した。興味深いことに、改変①-FcはPNA-Fcに比べて前単球系の細胞株THP-1、HL-60に10倍以上の強い結合性を示した。この結果は、THP-1にGal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc α の糖鎖構造が他の細胞よりも多く発現しているものと推測でき、改変①-Fcは前単球系細胞に特異的なプローブとして応用できる可能性が示唆された。

また創出した改変レクチン間のアミノ酸配列に着目し比較したところ、特定の位置に芳香族アミノ酸や疎水性アミノ酸などが規則的に保存され、逆に結合活性を示さなかったレクチンでは保存されていないなど、結合能との相関も見出された。

以上、本研究では、マメ科レクチンを骨格とした糖結合性改変レクチンのスクリーニング系を確立し、効率よく改変レクチンを取得することができることを示した。さらに、多くの改変レクチンプローブを作製し、それらの糖鎖プローブとしての応用例を示した。これらをまとめた本論文は、論文提出者が単独で行った独創的な研究であり、また、糖鎖生物学における重要な知見を提言するものである。なお、本論文における糖鎖アレイ解析は、産業技術総合研究所の平林博士、館野博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったものであり、論文提出者の寄与は十分であると判断する。

従って、博士（生命科学）の学位を授与するに値するものと判断される。

以上 1,835 字