

審査の結果の要旨

氏名 林 美 正

糖鎖に書き込まれた暗号を解読することができれば、生物学に新しい地平が開かれると言われている。多様な糖鎖を解析するためのツールとして、また生体内で暗号を読みとっている分子候補として糖結合蛋白質（レクチン）が挙げられる。しかし、糖鎖の種類に対してそれを認識する既知のレクチンの種類は限られており、動物及び植物由来のものを合わせても糖鎖の多様性と対応させるには十分とは言えないのが現状である。もし、異なる糖鎖認識スペクトルを有する人工レクチンが多様な内容を持つライブラリーとして得られれば、その中から、特定の細胞挙動に関与する糖鎖に特異的な新規レクチンを得たり、多様なレクチンを固相化したレクチンチップを作製して細胞の同定に用いるなどの応用が期待される。「Generation of Library of Genetically Engineered Plant Lectins and Its Application（遺伝子工学的的手法による人工植物レクチンライブラリーの作製と応用）」と題する本論文では、シアル酸を含む糖鎖に特異的なマメ科レクチンである *Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH) の糖結合部位を遺伝子工学的的手法でランダムに改変し、異なる糖鎖のバリエーションを見分けられる人工レクチンのライブラリーを作製することが目論まれ、成功を修めた。さらに、得られた人工レクチンライブラリーを利用して、種類の異なる細胞への結合パターンから細胞の種類の違いを見分けることに成功した。また、人工レクチンライブラリーから、生物学的に重要な糖鎖に特異的なレクチンを選別するための、スクリーニング系を確立するという、ライブラリーを広範に応用するための重要なステップがクリアされた。

大きく四部に分けられる本論文の最初の部分では、人工レクチンライブラリーの作製法に関するアイデアと、結果として作製されたものの内容について詳しく述べられている。種々のマメ科レクチンのアミノ酸配列と糖結合部位の構造から得られた情報に基づき、MAH レクチンの 285 個のアミノ酸のうち、糖結合部位である 127 番目から 137 番目の部分の塩基配列を合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてオーバーラップエクステンションPCRによりランダム化させた。ただし、シアル酸との相互作用に必須と考えられるアスパラギン酸 135、また金属イオンとの配位に必須と考えられるアスパラギン酸 127 とヒスチジン 132 は固定した。ダイターミネーター法で DNA 配列を決定したところ、変異 MAH の場合、最初に固定した 3 つのアミノ酸を除いてすべて異なり、ランダム化が達成されていることがわかった。

第二部では、レクチンライブラリーを用いた細胞の分別同定が研究対象である。作製したレクチンライブラリーを pGEX ベクターに組み込んで大腸菌に GST 融合蛋白質として発現させた。ランダムに 50 個のクローンをとり、そのうち、タンパクを発現していると思われる 16 個のクローンを得た。これらのクローンの DNA 配列を決定したところ、糖結合部位のアミノ酸配列は固定したアミノ酸を除いてすべてのクローンで異なることがわかった。得られた 16 クローンの糖結合特異性の違いを利用し

て、シアル酸を含むが、構造の異なる糖鎖をその表面に発現していると思われる、異種動物の赤血球の分別同定を試みた。各々の赤血球が16種の変異レクチンによる凝集力価の相対強度に関して固有な特性を示すことがわかった。以上から、複数の改変レクチンを利用することによって結合パターンにより細胞の種類の違いを見分けることができることが示唆された。

第三部では、ファージライブラリーの作製とパニングによる選別を行った結果である。ファージミド系である pComb3 と pComb8 を使い、先ずファージの表面に野生型レクチンが発現し、活性を有するかを調べた。抗 MAH 抗体の結合性、ヒト赤血球凝集能及びグリコフォリンに対する結合性により、糖鎖結合性を持つ MAH が発現したことが明らかになった。ELISA を用いたヒトグリコフォリンに対する結合性により検出できる pComb3 ファージの最低力価は約 1×10^7 cfu であった。

第四部では、ファージライブラリーから特定レクチンを選別する方法を確立することが目標となった。MAH の糖結合部位 (ループC) のアミノ酸の内、シアル酸との相互作用と金属イオンとの配位に必須と考えられる3つのアミノ酸以外に、他のマメ科レクチンで保存性が高い2個のアミノ酸をさらに固定し、6つのアミノ酸をランダムに改変した。その結果、理論的に予想される 6.25×10^7 をカバーしていると思われる約 1×10^8 のライブラリーを作製できた。pComb3 ファージのレクチンライブラリーを用いたパニング系を確立することを目標として、野生型 MAH が強い結合性をもっているヒト赤血球に対するパニングを試みた。1回目のパニングに比べ3回目においてはその回収率が約10倍に増加し、ヒト赤血球に対する結合性を持つファージが濃縮されていることが判明した。3回目のパニングによって得られたファージの95%以上は野生型と同一のアミノ酸配列を有した。300クローンの内の異なるアミノ酸配列を持つ10クローンには、最も親和性の高いオリゴ糖が野生型における NeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc ではなく、NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc であるものが含まれていた。以上より、1次構造に変異を導入したレクチンライブラリーから生物学的に重要な糖鎖に特異的なレクチンを選別するための、スクリーニング系が確立できた。

本研究によって、多様な特異性を持つレクチンライブラリーが遺伝子工学的に作製できること、これらが、細胞の分別同定に有用であること、ライブラリーから特定の特異性を持つレクチンを選別して大量に生産できることが証明された。細胞移植や細胞治療においては、利用する細胞を分別同定することがぜひとも必要であるが、確かな方法がなく、遺伝子発現解析に期待が集まっていたが、この新しい方法で細胞表面の糖鎖を分析することにより、全く新しい角度から細胞の同定が正確に行うことができるようになった。人工レクチンライブラリーをファージミド系ファージの表面に発現させ、選別する方法が確立されたことにより、既存のレクチンやモノクローナル抗体にはない、新規な糖鎖特異性を有するレクチンを得ることができる。これらの成果は糖鎖生物学の発展に強いインパクトを与えるものであり、本研究を行った林美正は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。