

## 審査の結果の要旨

氏名 小野 高

「糖鎖認識部位の改変による多様なレクチンの創製 (Diverse Plant Lectins Generated by Alterations of Carbohydrate Recognition Loops)」の題目を持つ本論文には、マメ科植物レクチンである *Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH) の遺伝子の、糖鎖結合部位を改変し、新規な糖結合特異性を持つ改変レクチンを創製することを目的とした研究の成果が述べられている。この研究はマメ科植物レクチンの一次構造は類似し、糖鎖認識部位は4本のループで形成され、糖鎖認識特異性の異なる植物レクチンはループの構造が異なるという事実に基づく。学位申請者は、種々のマメ科植物レクチンの X 線構造解析、アミノ酸配列比較、およびコンピュータモデリングなどの結果から、特にループ C とループ D の2本のループを形成するアミノ酸の配列及び長さが多様性に富んでおり、この部分が糖鎖認識特異性を決定している可能性が高い事に注目した。この考えに基づき、この2つのループのアミノ酸をランダムに改変すること、および伸長させることにより、新規な特異性を持つレクチンを創製することが試みられた。

レクチンは糖鎖認識プローブとして広く利用されてはいるが、糖鎖の多様性に比べてその数は圧倒的に少ない。もし新規な特異性を持つレクチンのライブラリーを作製することができれば、レクチンチップなどとして細胞の分別同定を行い、糖鎖構造をインフォーマティクスの方法に基づいて解析するなど、広範囲の応用ができる。本研究では、シアル酸を含む糖鎖に結合能を有するマメ科植物レクチンである MAH の遺伝子の、糖鎖結合部位を改変し、新規な糖結合特異性を持つ改変レクチンを創製することを試みた。マメ科植物レクチンの糖鎖認識部位は4本のループで形成されている。他の種々のマメ科レクチンの X 線構造解析、アミノ酸配列比較、およびコンピュータモデリングなどの結果から、特にループ C、D と呼ばれる2本のループを形成するアミノ酸の配列および長さが多様性に富んでおり、この部分が糖鎖認識特異性を決定していると考えられた。そこで、この2つのループのアミノ酸をランダムに改変すること、および伸長させることにより、新規な特異性を持つレクチンを創製することを試みた。さらに、改変レクチンライブラリーを用いてレクチンチップを作製することを念頭に、多数の組換え体レクチンを簡便に精製、固定化し、細胞や糖鎖の結合を検出する系を確立することも重要な研究目標であった。

第一章ではループ C の127番目の Phe から137番目の Asp の間に任意の位置に任意のアミノ酸を挿入することにより、アミノ酸1つ分伸長して多様な糖鎖認識特異性を有するレクチンを作製することが目標となった。作製したレクチンライブラリー cDNA を pFLAG ベクターに組み込んで、大腸菌に FLAG タグが付随したレクチン蛋白質として発現させた。得られた大腸菌コロニーを回収し、それぞれの DNA 配列を確認し、作製されうる220種すべての改変レクチンの cDNA、および蛋白質を単離、同定す

ることが目指されたが、結果としては180種がクローンとして得られた。これらがMAHレクチンを発現していることを、抗MAHポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングによって確認した。特異性の検出のためには、ELISAプレートにまず抗FLAG抗体を固定化し、そこに一定量の培養大腸菌液から凍結融解を繰り返して得た溶解物を加えた。単離した改変レクチン蛋白質の細胞に対する結合特異性の違いは、それぞれ異なる糖鎖をその表面上に発現していると考えられる7種の動物の赤血球が、固定化レクチンに対して異なる結合性を示すかどうか検定する事によった。一例として他の動物の赤血球には結合しないが、ウマの赤血球にのみ結合するクローンが存在することが判明した。このレクチンは野生型では132番目の His の後ろに Gly が挿入されていた。180個のクローンの内には、ユニークな特異性を有するものが他にも複数含まれていた。ヒト赤血球に対する結合性を有するものは、全体の約75%であった。20クローンは試験したいずれの動物赤血球にも結合しなかった。これらの立体構造をコンピュータモデリングで推測したところ、糖鎖認識部位のループの間の空間が狭いかまたは大きく開いていることが明らかになった。以上から、MAHのループCを1アミノ酸伸長する事によって、多様な特異性を有するレクチンのライブラリーが創製された事が明かとなった。

次の章では、ループDへの変異導入によるMAHのランダムな改変、ファージライブラリーを用いた上皮細胞に結合性を有するレクチンの選別、及び選別されたレクチンの糖鎖認識特異性を確認した結果が述べられている。具体的には、ループDを形成すると考えられるアミノ酸のうち219番目から223番目に相当する5つのアミノ酸をランダムに改変して、異なるアミノ酸に置換し、得られたライブラリーをファージミド pComb3 に組み入れた。理論上  $3.2 \times 10^5$  個の改変レクチンから、ヒト小腸上皮様に分化した細胞に結合性の高いものをパニングにより選別した。結合性を持つレクチンを含むファージのコロニーからクローンを回収し、DNAの配列を決定した。これらの内12種を、FLAGタグを持つ蛋白質として大腸菌に発現させた。発現した改変レクチンの細胞および糖鎖に対する特異性の違いを確認するために、7種の動物の赤血球、14種の糖鎖含有ビオチン化ポリアクリルアミドのこれらのレクチンに対する結合性をELISA法により比較した。7種の動物の赤血球のこれらのレクチンに対する結合性は、それぞれのクローンにより異なることが明らかになった。さらに、糖鎖含有ビオチン化ポリアクリルアミドを用いた結合実験の結果も、これらのレクチンが異なる特異性を持つことを示した。

本研究の結果、植物レクチンの遺伝子をフレームとして、異なる方法と異なる標的配列を用いた改変により、新規のレクチンが多数生み出せることが明らかになった。また実際に野生型とは結合特異性が違うが、比較的親和力が高い改変レクチンを複数得ることができた。ループDを改変したレクチンライブラリーには、新たな糖認識特異性を持ち親和性が高いものが含まれたが、それらのパニングによる選別に成功した。これらの改変レクチンはレクチンチップなどへの応用を通して、バイオインフォーマティクスの手法を用いて、糖鎖や細胞の分別と同定を可能にするツールとして広範囲に利用できる可能性を強く示唆した。このように糖鎖生物学とバイオテクノロジーの新しい分野に強いインパクトを有する本研究を行った学位申請者である小野高は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。