

審査の結果の要旨

氏 名 前沼 圭佐

「*Maackia amurensis* hemagglutinin を鋳型とした人工レクチンの作製と細胞の分別・同定への応用」と題する本研究は、植物レクチンの糖鎖認識ループを遺伝子レベルで改変して多様な糖鎖認識特異性を有するものを多数作出し、これらを同時に用いることによって細胞表面のプロファイリングを行う方法を確立した経緯が述べられている。

レクチンは特定の糖鎖に特異的に結合する蛋白質であり、生体内で糖鎖が機能を発揮するためには必須の分子であるとともに、糖鎖を含む分子の同定、精製、構造推定や、表面糖鎖による細胞の選別、染色、活性化等に用いる道具として、広く用いられてきた。しかし天然由来のレクチンの種類は限られており、糖鎖の多様性に対応する多様なレクチンを創成することができれば非常に有用と考えられた。これらの背景を持つ本論文では、*Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH) 遺伝子を材料に、次の 3 つの研究を行った成果が述べられている。第 1 章では、レクチンの糖鎖認識部位に遺伝子工学的改変を加えることで新規な遺伝子改変レクチンの作製を行い、多様な糖鎖認識特異性と高い結合性を兼ね備えた有用なレクチンを複数獲得した。第 2 章では、このように作製した人工レクチンの利便性を向上させることを目的に、人為的に人工レクチンを二量体化させた。第 3 章では、作製した複数の遺伝子改変レクチンを同時に用いて、細胞表面をプロファイリングすることによって、細胞のグループ分けが可能であることを証明した。

第 1 章では MAH を鋳型にした新しい遺伝子改変レクチンライブラリーの作製とその特性解析の結果が述べられている。以前に MAH のループ C の 6 アミノ酸を改変して作製したライブラリーをファージディスプレイ型とし、ヒト赤血球に対する結合性によって選別した結果、ループ C の 4 アミノ酸は野生型と同一で、2 アミノ酸 (¹³¹Gly、¹³³Ser) のみが改変されたものが得られた。そこでこの 2 アミノ酸をランダムに改変することで、結合性が高く多様な糖鎖認識特異性を有する人工レクチンが多数獲得できるものと仮定した。これらの 2 アミノ酸をランダムに site-directed mutagenesis PCR 法により改変し、2 アミノ酸をランダムに改変したライブラリーからクローニングによってレクチンを 25 種類選択した (clone 1-25)。これらと、上記のファージライブラリーよりヒト赤血球への結合性にて選別した 10 種類のクローン合計 35 種類を

FLAG タグを付加した形で大腸菌発現用ベクターに組み込み、蛋白質として発現させた。

作製した 35 種類の改変 MAH について、種々の糖鎖を複数含む可溶性ポリアクリルアミドおよびムチン様糖タンパク質との結合実験を行い、糖鎖認識特異性を比較した。改変レクチンの多くは、鋳型である野生型 MAH と同様に、硫酸化ガラクトース、硫酸化ルイス C、シアリル T および糖タンパク質グリコフォリンに結合し、その相対的な結合性はそれぞれ異なるものであった。改変レクチンの中には、野生型が結合しないフコース、シアル酸およびルイス A 糖鎖に結合性を示すものがあり、糖鎖認識特異性も拡大できたことが示された。

第 2 章では、二量体型レクチンの作製とその解析について述べられている。レクチンと糖鎖との結合は、レクチン自身が多量体構造をとることで増強されているが、MAH を鋳型として作製した改変レクチンは単量体であり、糖鎖解析ツールとして利用する際の欠点であった。そこで改変レクチンに Cys を導入することで二量体形成を促し、結合性を高めることに取り組んだ。非還元状態下での SDS-PAGE により、単量体 MAH に相当する 30 kDa に加えて、60 kDa 付近にもバンドが確認され、グリコフォリンに対する結合性は、単量体構造しか存在しない野生型 MAH と比較して、二量体構造も存在する Cys-MAH の方が上昇していることが示された。

第 3 章では、改変レクチンライブラリーを利用した細胞のグループ分け、と題して、全く新しい方法による、細胞の系統と分化の段階を定義する方法を開発した経緯が述べられている。細胞は表面に種類や量においてその細胞に特徴的な糖鎖を持つことが知られており、その違いに基づいて細胞をグループ分けすることが可能であると従来から考えられていた。しかし従来は、ごく限られた種類のレクチンあるいは抗糖鎖抗体により検出された、細胞表面糖鎖の一部の情報を、補助的に用いて細胞の種類が記述されてきた。本研究では、多数のレクチンを利用することで、細胞表面糖鎖の全体像を網羅的に検出し、その情報に基づいて種々の細胞をより詳細にグループ分けすることが目指された。

35 種類の細胞株 (マウス細胞 7 種、ヒト細胞 28 種) について細胞の結合実験を行い、結合した細胞数を指標に、各改変レクチンと細胞間の結合を数値化した。このようにして得られたシグナルを最大値が 1 になるよう標準化してレーダーチャートで表すと、それぞれの細胞種に固有のパターンが示された。各細胞の規格化した結合シグナルに基づいたクラスター解析が次に行われた。この統計処理では、それぞれ結合パターンの類似度は横軸の距離で示され、より類似している細胞から順にグループが形成される。クラスター解析によって形成されたグループには、中に一部例外はあるが、骨髄系細胞、メラノーマ細胞、大腸癌細胞からなるグループが

確認され、細胞の表面糖鎖に基づいて形成されたグループが、含まれる細胞の由来や背景を反映していることが明らかとなった。すなわち、作製した複数の MAH 由来の改変レクチンのライブラリーが極めて有用であることが判明した。

以上のように、本研究では遺伝子改変 MAH の作製を行い、多様な糖認識特異性と高い結合性を兼ね備えた遺伝子改変レクチンを多数獲得することに成功した。また、作製した改変レクチンを人為的に二量体化することにより、糖鎖解析ツールとしての利便性を向上させた。さらに、作製した改変レクチンを利用して細胞表面糖鎖情報を検出することで、細胞の由来や背景を反映したグループ分けが可能なことを明らかにした。多数の人工レクチンを利用したこの方法は細胞診断や疾病に関わる糖鎖マーカーの網羅的検出法をとっても有用であることが明らかとなった。以上の点に鑑み、前沼圭佐は博士（薬学）の学位を得るに相応しいと判断した。