

[ 別 紙 2 ]

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 佐々木 克敏

1980 年後半、ヒトや哺乳動物から目的遺伝子をクローン化するのは非常に難しかった。著者らは、医薬開発上有用な遺伝子を効率よくクローン化することを目的として、当時注目され始めていた発現クローニング法を用い、スクリーニング法の工夫を加えることで、当時注目されていたアンジオテンシン II 受容体と糖転移酵素のクローン化に世界に先駆けて成功した。本論文では、糖転移酵素のクローン化と解析、およびその応用について詳細に記載されている。

著者らは、従来の一過的発現系を用いる発現クローニング法では取得しにくい遺伝子の効率的取得を目的として、永続的な発現が可能な独自の発現クローニング系も開発した。本系は、Epstein-Barr virus の複製開始点 oriP を有する発現ベクターと Namalwa KJM-1 細胞（ヒト B 細胞株 Namalwa 由来の無血清馴化株）を用いる系で、効率的な cDNA ライブラリーの造成と安定形質転換株の取得が可能である。著者らは、本発現クローニング系を用い、以下の糖転移酵素のクローン化を試みた。

白血球の炎症部位への浸潤やリンパ節へのホーミングには、接着分子セレクチン（E-、P-、L-セレクチン）とその糖鎖リガンドの結合が重要な役割を果たしている。糖鎖リガンドとしては、シアリルルイス x [Sialyl Lewis x (sLe<sup>x</sup>) : NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc] 糖鎖が知られている。著者らは、白血球におけるセレクチンリガンドの生合成の鍵酵素である、α 2,3-シアル酸転移酵素 ST3Gal IV と α 1,3-フコース転移酵素 Fuc-TVII のクローニングに成功した。

ST3Gal IV は、レクチン耐性法というユニークなスクリーニング法を用いて効率よくクローン化された。ヒマメレクチン 120 は、sLe<sup>x</sup>糖鎖の骨格糖鎖 (Gal β 1-4GlcNAc) に高親和性で結合して細胞毒性を示すレクチンであり、末端のガラクトース残基にシアル酸が付加すると親和性が低下すると考えられた。著者らは、目的の α 2,3-シアル酸転移酵素活性を高発現するヒトメラノーマ細胞株 WM266-4 から cDNA ライブラリーを作製し、それを導入した Namalwa KJM-1 細胞を致死量のレクチン存在下で培養し、レクチン耐性となった細胞株から cDNA を回収することにより ST3Gal IV cDNA を取得した。同様の手法で、基質特異性の異なる他の α 2,3-シアル酸転移酵素 ST3Gal III もクローン化した。両酵素の *in vitro* 基質特異性、*in vivo* 酵素特性、発現分布を解析した結果、顆粒球や単球では、ST3Gal IV が sLe<sup>x</sup>糖鎖の生合成に関与すると考えられた。

Fuc-TVII は、抗 sLe<sup>x</sup>糖鎖抗体を用いた FACS スクリーニングによりクローン化された。

sLe<sup>x</sup>糖鎖を発現する単球系細胞株 THP-1 由来の cDNA ライブラリーを Namalwa KJM-1 細胞に導入後、FACS を用いて抗 sLe<sup>x</sup>糖鎖抗体への結合能が増加した細胞を取得し、それから cDNA を回収することにより Fuc-TVII cDNA を取得した。5 種の  $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素 (Fuc-TIII~Fuc-TVII) の転写物の発現量を解析した結果、Fuc-TIV と Fuc-TVII が、セレクトインリガンドを発現することが知られている顆粒球、単球、単球系細胞株 (HL-60、U-937、THP-1) で発現していた。Fuc-TIV と Fuc-TVII の *in vitro* 基質特異性、*in vivo* 酵素特性、発現分布、E-セレクトインに対する結合能を解析した結果、Fuc-TVII が白血球におけるセレクトインの糖鎖リガンドの生合成に関与すると考えられた。

白血球におけるセレクトインリガンドの合成に ST3Gal IV と Fuc-TVII が関与することは、その後のノックアウトマウスを用いた外部研究からも支持されている。両酵素は、セレクトインリガンドの生産、阻害剤のスクリーニング、蛋白医薬の糖鎖修飾等、医薬開発上有用と考えられる。現在、Wyeth Pharmaceuticals 社が製造した可溶性 P-セレクトインリガンド糖蛋白質 (セレクトイン・ブロッカー) の第 II 相臨床試験が進行中であるが、Fuc-TVII はその糖鎖修飾に使用されている。

本研究では、当時の最先端の手法を用いて、当時非常に注目されていた医薬開発上有用な受容体と酵素の遺伝子を、世界に先駆けてクローニングすることに成功した。その結果、世界中でこれらの受容体や酵素の生理機能や病気との関係に関する研究が進むと共に、実際の応用研究に利用され、社会における医薬開発に貢献した。よって、審査委員一同は、本論文が、博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。