

論文審査の結果の要旨

氏名 河崎 徳人

本論文はレクチン-糖鎖間相互作用の新しい解析法に関する論文であり、第一章は細胞表面糖鎖と多価にした組換え体レクチンを用いる相互作用解析方法、第二章はレポーターアッセイを用いる相互作用解析方法について記述されている。特定の糖鎖構造を認識するレクチンは、細胞外における細胞間接着や細胞の移動など、さまざまな生命現象に関与する。ヒトゲノム情報によると、生体内には300を超えるレクチン分子が存在すると推定されるが、その多くは機能が明らかにされていない。これらレクチンが関与する生命現象を理解するためには、新規レクチンの糖結合特異性を明らかにすることが必須であることから、簡便なレクチン-糖鎖間相互作用解析方法を確立し、それを利用してレクチンの糖結合特異性を明らかにすることを本研究の目的とした。

1. 細胞表面糖鎖と多価にしたレクチンを用いる相互作用解析方法

河崎は細胞表面には多様な糖鎖が発現していること、また、糖鎖合成阻害剤（デオキシマンノジリマイシン、キフネンシン、スワインソニン）や糖加水分解酵素を用いて細胞表面糖鎖を改変できることに着目した。さらに、特定の糖鎖構造を持っている糖鎖合成不全細胞株（CHO細胞Lec1, 2, 8株）を利用することもでき、糖鎖の精製を行うことなく、容易に未知のリガンド糖鎖を明らかにすることができる。一方、レクチンは、大腸菌発現系で可溶性の組換え体として発現させ、ビオチン化配列を付加して酵素的にビオチン化を行った。これらをR-フィコエリスリン（PE）標識ストレプトアビジン（SA-PE）と混合し4量体にし、細胞表面糖鎖への結合をサイトフローメトリーで定量する方法を用いた。詳細な糖結合特異性を決定するために、種々の糖鎖を外から加えることにより、レクチン-SA-PEの細胞への結合阻害能を比較検討した。これらの実験方法は、細胞内で糖タンパク質を輸送するレセプターVIP36を一つの例として示したが、この分子は植物レクチンに比べて糖結合活性が弱く、従来用いられていたさまざまな解析法ではことごとく解析が不可能であった。これらの手法を克服し解析を可能にした点で、画期的な成果として評価できる。

2. レポーターアッセイを用いる相互作用解析方法

第二の手法として、細胞表面にレクチン分子を発現したレポーター細胞を用いるレポー

ターアッセイを確立した。河崎は、レクチン分子の糖結合ドメインを、CD8 α の膜貫通ドメイン、および CD3 ζ の細胞質ドメインをつないだキメラ分子として発現させる系を考案した。この手法は、細胞表面にレクチン分子を提示することができる他に、細胞質内に T 細胞レセプターのシグナル伝達モジュール CD3 ζ を持つことから、IL-2 プロモーターの下流に β ガラクトシダーゼ遺伝子を組み込んだレポーター細胞を用いることにより、レクチン分子の糖結合活性を β ガラクトシダーゼ活性で定量化できる。他に、組換え体タンパク質の精製が不要であり、複数のレクチン候補遺伝子を一度にスクリーニングする際に適している。実際の解析例として、LCCL ドメインを持つ複数のレクチン候補分子に注目した。LCCL ドメインはリポ多糖 (LPS) 結合タンパク質であるカプトガニの生体防御因子 factor C に見いだされるドメインであり、ヒトには LCCL ドメインを持つ分子が 6 種類存在する。そこで、これら LCCL ドメインを持つ分子を細胞表面に発現するレポーター細胞を樹立し、さまざまな糖鎖リガンドを用いてレポーターアッセイを行った。Cochlin レポーター細胞はグリコサミノグリカン (GAG) を BSA に結合させた人口糖タンパク質 GAG-BSA に反応した。Vitrin、CRISPLD1、CRISPLD2 発現レポーター細胞はいくつかの GAG に反応し、DCBLD1、DCBLD2 発現レポーター細胞は GAG とは反応しなかった。また糖結合特異性に関しては、Cochlin、Vitrin、CRISPLD1、CRISPLD2 と GAG との結合には GAG の硫酸基が必須であること、Cochlin、Vitrin、CRISPLD1、CRISPLD2 はデルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリンに共通する構成糖であるイズロン酸を好んで認識することが示された。

以上、本研究では、新規レクチンをスクリーニングするための簡便な二つの手法を確立し、それらの有効性を明らかにした。前半の手法を用いた成果は、既に二つの論文として公表されており、高い評価を得ている。また、後半の手法は、レクチン解析のプロジェクトの標準法として大きな期待が寄せられている。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。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。