

# 学位論文要旨

佐藤真由美

複合糖質はタンパク質や脂質に糖鎖が結合したもので情報分子として働く。このため糖鎖は、核酸、タンパク質に次ぐ第三の生命鎖とも呼ばれる。糖認識タンパク質レクチンは複合糖質と相互作用することで、白血球のローリングや血清タンパク質の品質管理、細胞分化、細胞接着などに関与している。しかし、レクチンの分子レベルの機能には不明な点も多く残されている。レクチンの分子レベルでの機能解明には、そのリガンドの単離・同定が不可欠だが、レクチンと糖鎖の相互作用は抗原抗体反応や酵素・基質間の結合と比較して弱いことが多く、従来のアフィニティークロマトグラフィーや免疫沈降法では本来のリガンドの単離ができない可能性がある。

レクチンの一種であるガレクチンは、*N*-アセチルラクトサミンなどの $\beta$ -ガラクトシド構造に親和性があり、糖認識部位に保存された配列を持ち、無脊椎動物から脊椎動物まで生物界に広く保存されている。ガレクチンが関わる機能として、発生、細胞分化、がん、アポトーシス、免疫機能の調節などがある。ガレクチンファミリーの1つであるヒトガレクチン-1 (hGal-1) は分子内に糖認識部位を1つ持ち、胎盤、脳、血管、消化管などの幅広い組織に分布している。hGal-1の機能として、T細胞のアポトーシス誘導や血管新生などが報告されているが、そのリガンドの情報についてはやはり充分とは言えない。

そこで本研究では、二価性の架橋試薬ベンゾフェノン-4-マレイミド (BPM) を用い、ガレクチンをそのリガンドと架橋することで、これまで同定できなかった新たなリガンドを単離する方法の確立をめざした。BPMはSH基と反応して共有結合を形成するマレイミド基と、紫外線照射により近傍の炭素原子と結合するベンゾフェノン基を持った二価性の架橋試薬である。

第1章では、BPMのマレイミド基と結合可能なCys残基を分子内に1つだけ持つ、Cys導入hGal-1変異体を複数作製した。線虫ガレクチンLEC-1とアシアロフェツイン (ASF: ガレクチンが結合する*N*-アセチルラクトサミン構造を持ち、モデル糖タンパク質リガンドとして用いた) のBPMを介した架橋産物形成に成功した際のLEC-1へのCys導入部位、および、hGal-1のX線結晶構造解析データをもとに、BPMがリガンドとの結合を阻害しないように、側鎖がリガンド側へ向いている糖認識部位周辺のアミノ酸残基を選択した。hGal-1の6か所Ser<sup>7</sup>、Lys<sup>28</sup>、Ala<sup>51</sup>、Lys<sup>63</sup>、Ala<sup>121</sup>、Asp<sup>123</sup>のいずれか1か所のアミノ酸残基をCys残基へ置換した6種類の変異体S7C、K28C、A51C、K63C、A121C、D123Cを作製した。各Cys導入hGal-1変異体は、大腸菌で発現後、ASF固定化セファロースカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、ガレクチンとしての糖結合能を保持していることを確認した。いずれの変異体もASF固定化セファロースカラムに結合し、競合糖ラクトースにより溶出された。このことから、ガレクチンとしての基本的な糖結合能を保持していることが確認できた。

第2章では、Cys導入が糖結合特性に大きく影響しないことを、フロンタルアフィニ

ティークロマトグラフィーを用いて、より詳細な糖結合プロファイルを解析することで確認した。FAC は、カラムに固定化された物質 B に、相互作用を調べたい物質 A をカラムに流し続け、A が漏れ出てきた溶出容積を測定し、A と B の相互作用を定量的に解析する方法である。本研究ではカラムに Cys 導入 hGal-1 変異体を固定化し、代表的な生体内の糖鎖 8 種を流すことで糖結合プロファイルを解析した。その結果、特に S7C、K28C、A51C、A121C は、野生型と比較して、糖結合特性が大きく変化していなかったため、Cys 導入変異の影響は大きくないと考えられる。

第 3 章では、Cys 導入 hGal-1 変異体とモデル糖タンパク質リガンドとの BPM を介した架橋産物形成を試みた。モデル糖タンパク質リガンドとして前述の ASF、および生体内での hGal-1 のリガンドとして知られているラミニンを用いた。各 Cys 導入 hGal-1 変異体と ASF との架橋産物形成を試みた結果、6 種類すべての変異体 S7C、K28C、A51C、K63C、A121C、D123C において、ASF との架橋産物が検出された。一方、ラミニンとの架橋産物が検出されたのは S7C、K28C、A51C だった。これらの架橋産物はラクトース存在下の反応では検出されなかったことから、この BPM を介した架橋産物形成はガレクチンがリガンドの糖鎖部分と相互作用している場合にのみ起こることが確認できた。ASF とラミニンの両方と架橋産物が検出された S7C、K28C、A51C が hGal-1 のリガンド探索に用いるのに適していると考えられた。

第 4 章では、糖結合特性が野生型と大きく変わらず、モデル糖タンパク質 ASF およびラミニンと BPM を介した架橋産物を形成した Cys 導入 hGal-1 変異体 K28C と BPM を用いて、ガレクチン-1 の T 細胞アポトーシス誘導に関与するリガンドの探索を試みた。ガレクチン-1 は、サイトカインの産生やアポトーシス誘導により、T 細胞の分化や機能に関与すると考えられている。ガレクチン-1 誘導性 T 細胞アポトーシスのリガンドとして、CD3、CD4、CD7、CD43、CD45 などが報告されている。しかし、アポトーシス誘導に CD45 が必須でない場合もあり、詳細な分子メカニズムに不明な点も残されている。そこで、T 細胞の研究によく用いられてきたヒト T 細胞株 Jurkat 細胞の、ガレクチン-1 誘導性アポトーシスに関与する hGal-1 リガンドの探索を行った。架橋反応液をウエスタンブロット法により検出した結果、K28C が Jurkat 細胞上のリガンドの糖鎖と相互作用しているときにのみ、BPM を介した架橋が形成されたと考えられるバンドが検出された。検出された架橋産物と考えられるバンドは、ガレクチン-1 の細胞死誘導に関わるリガンドを含む可能性がある。この架橋産物は BPM を介した共有結合により架橋しているため、架橋産物の抽出（細胞の溶解）とその後の精製過程（免疫沈降など）で解離しない。このため、従来のアフィニティークロマトグラフィーや免疫沈降法などによるリガンドの抽出・精製では同定できなかったガレクチン-1 リガンドの同定が可能になると考えている。

Cys 導入 hGal-1 変異体と架橋試薬 BPM を用いた本手法により、ガレクチンリガンドの網羅的な単離・解析によるガレクチンの分子レベルでの機能解明に近づけると考えられる。また、本手法は「相互作用は弱くても重要な生体物質」の単離・同定・解析にも応用できると期待している。

## 論文審査の結果の要旨

複合糖質はタンパク質や脂質に糖鎖が結合したもので情報分子としても働く。糖鎖は、核酸、タンパク質に次ぐ第三の生命鎖とも呼ばれ、特定の糖鎖構造を認識するタンパク質であるレクチンは、複合糖質と相互作用することで、白血球のローリングや血清タンパク質の品質管理、細胞分化、細胞接着など多くの生命現象に関与していることが知られている。しかし、レクチンの分子レベルでの機能には不明な点も多く残されており、その解明にはレクチンが相互作用している複合糖質リガンドの単離・同定が不可欠である。しかしながら、レクチンと糖鎖の相互作用は抗原抗体反応や酵素・基質間の結合と比較して弱いことが多く、アフィニティークロマトグラフィーや免疫沈降法といった従来用いられている手法では、レクチンに対する本来のリガンドの単離ができない可能性がある。

レクチンの一種であるガレクチンは、*N*-アセチルラクトサミンなどの $\beta$ -ガラクトシド構造に親和性があり、糖認識部位にガレクチンファミリー間で保存された配列を持ち、無脊椎動物から脊椎動物まで生物界に広く保存されている。ガレクチンが関わる機能として、発生、細胞分化、がん、アポトーシス、免疫機能の調節などが知られている。ガレクチンファミリーの1つであるヒトガレクチン-1 (hGal-1) は分子内に糖認識部位を1つ持ち、胎盤、脳、血管、消化管などの幅広い組織に分布している。hGal-1の機能として、T細胞のアポトーシス誘導や血管新生などが報告されているが、そのリガンドの情報についてはやはり充分とはいえない。

そこで本研究では、二価性の架橋試薬ベンゾフェノン-4-マレイミド (BPM) を用い、ガレクチンとそのリガンドを架橋することで、これまで同定できなかった新たなリガンドを単離する方法の確立をめざした。BPMはチオール基 (-SH) と反応して共有結合を形成するマレイミド基と、紫外線照射により近傍の炭素原子と結合するベンゾフェノン基を同一分子内にもつ。遺伝子工学的手法により分子内に1つだけシステイン (Cys) 残基をもつ hGal-1 変異体を作製し、導入した Cys 残基の-SH を介して hGal-1 とそのリガンドを BPM により架橋することで、リガンドの単離・同定が容易になると考えられる。

第1章では、BPMのマレイミド基と結合可能な Cys 残基を分子内に1つだけもつ、Cys 導入 hGal-1 変異体を複数作製した。BPMを介した架橋産物形成に成功している線虫由来のガレクチン LEC-1 の Cys 残基導入部位、および、hGal-1 の X 線結晶構造解析データをもとに、BPM がリガンドとの結合を阻害しないように、側鎖がリガンド側へ向いている糖認識部位周辺のアミノ酸残基を Cys 変異導入部位として選択した。本研究で用いたのは、Ser<sup>7</sup>、Lys<sup>28</sup>、Ala<sup>51</sup>、Lys<sup>63</sup>、Ala<sup>121</sup>、Asp<sup>123</sup> のいずれか1か所のアミノ酸残基を Cys 残基へ置換した6種類の変異体 S7C、K28C、A51C、K63C、A121C、D123C である。各 Cys 導入 hGal-1 変異体は、大腸菌で発現後、ラクトサミン構造を豊富にもつアシアロフェツイン (ASF) を固定化したセファロースカラムに吸着し、ラクトースにより特異的に溶出されたことから、ガレクチンとしての基本的な糖結合能を保持していることが確認できた。

第2章では、Cys 変異導入が糖結合特性に大きく影響しないことを、フロントアルアフィニティークロマトグラフィーを用いて、より詳細な糖結合プロファイルを解析することで確認した。微細な糖構造の違いに対する結合力の変化を検出できる本手法は、認識の基本二糖であるラクトサミン構造に対する様々な糖修飾により変化するガレクチンの結合力を解析するのに有効である。Cys 導入

変異体のうち、特に S7C、K28C、A51C、A121C は、野生型と同様な糖結合特性を保持していたため、Cys 導入変異の影響を受けず、導入した Cys 残基を介した BPM による架橋により生体内における本来のリガンドを単離できると考えられる。

第 3 章では、Cys 導入 hGal-1 変異体とモデル糖タンパク質リガンドとの、BPM を介した架橋産物形成を試みた。モデル糖タンパク質リガンドとして前述の ASF、および生体内での hGal-1 のリガンドとして知られているラミニンを用いた。各 Cys 導入 hGal-1 変異体と ASF との架橋産物形成を試みた結果、6 種類の変異体 S7C、K28C、A51C、K63C、A121C、D123C すべてにおいて、ASF との架橋産物が検出された。一方、ラミニンとの架橋産物が検出されたのは、S7C、K28C、A51C であった。これらの架橋産物は競合糖であるラクトース存在下では検出されなかったことから、BPM を介した架橋産物形成は、ガレクチンがリガンドの糖鎖部分と相互作用している場合にのみ起こることが確認できた。ASF とラミニンの両方と架橋産物が検出された S7C、K28C、A51C が hGal-1 の生体内におけるリガンド探索に用いるのに適していると考えられる。

第 4 章では、Cys 導入 hGal-1 変異体 (K28C) と BPM を用いて、ガレクチン-1 の T 細胞アポトーシス誘導に関与するリガンドの探索を試みた。ガレクチン-1 は、サイトカインの産生やアポトーシスの誘導により、T 細胞の分化や機能の調節に関与すると考えられている。ガレクチン-1 誘導性 T 細胞アポトーシスのリガンドとして CD3、CD4、CD7、CD43、CD45 などが報告されているが、アポトーシス誘導に CD45 が必須でない場合もあり、詳細な分子メカニズムに不明な点も残されている。そこで、T 細胞の研究によく用いられてきたヒト T 細胞株 Jurkat 細胞の、ガレクチン-1 誘導性アポトーシスに関与する hGal-1 リガンドの探索を行った。架橋反応液をウエスタンブロット法により検出した結果、Cys 導入 hGal-1 変異体が Jurkat 細胞上のリガンドの糖鎖と相互作用しているときにのみ、BPM を介した架橋が形成されたと考えられるバンドが検出された。この架橋産物は、ガレクチン-1 の細胞死誘導に関わるリガンドを含む可能性が高く、BPM を介して hGal-1 と共有結合により架橋されていることから、抽出（細胞の溶解）とその後の精製過程（免疫沈降など）で解離しない。このため、従来のアフィニティークロマトグラフィーや免疫沈降法などによるリガンドの抽出・精製では同定できなかった新たなガレクチン-1 リガンドの同定が可能になると考えている。

Cys 導入 hGal-1 変異体と架橋試薬 BPM を用いてリガンドとの架橋産物を形成させる本手法を新たに確立したことは、その独創性と共に高く評価でき、ガレクチンリガンドの網羅的な単離・解析によるガレクチンの分子レベルでの機能解明に近づくことができると考えられる。糖鎖とレクチンは比較的弱い相互作用を繰り返すことで、生体内における重要な役割を果たしており、本研究で確立した手法は今後、こうした「相互作用は弱くても重要な生体物質」の単離・同定・解析にも応用できると期待される。以上、本研究結果は糖鎖生物学のみならず、薬学分野において重要な生体物質間相互作用を解析する手法の発展にも大きく貢献するものであり、本論文は、本研究科課程によらない博士（薬学）論文に十分値するものと判定した。