

氏 名	古 志 洋 一 郎
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学位記番号	工 博 第 2955 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	工 学 研 究 科 合 成 ・ 生 物 化 学 専 攻
学位論文題目	Development of New Chemical Methods toward Lectin Engineering (レクチン工学を目指した化学的新手法の開発)

論文調査委員 (主査) 教授 濱 地 格 教授 森 泰 生 教授 白 川 昌 宏

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、生体内で糖質の認識を司る糖結合性タンパク質（レクチン）を利用・研究するための方法論（レクチン工学）の確立を目標に、レクチンの化学的機能化手法を開発する研究についてまとめたものであり、3章からなっている。

第1章では、糖質に対して高い認識特異性を保持するレクチンにランタノイドイオンを組み込むことで、高機能な発光性糖質バイオセンサーの構築を行っている。ランタノイドイオンの発光は発光寿命がミリ秒領域まで長いこと、励起光の散乱や自家蛍光のような短寿命の蛍光性不純物の影響を受けにくく、生体成分中での測定に適している。光アフィニティーラベル化後修飾法（P-PALM）を用いて糖結合部位の近傍に蛍光色素（FL）を導入したConcanavalin A（FL-Con A）に対して、ランタノイドイオンの1種で強い発光を示すテルビウムイオン（ Tb^{3+} ）を配位させることで長寿命発光型糖質バイオセンサー（FL-Con A/Tb）を構築している。

このFL-Con A/Tb上では遷移金属イオン結合サイトに配位した Tb^{3+} からFLへの発光共鳴エネルギー移動（LRET）が起き、FLの発光が長寿命化することが明らかとなっている。FL-Con A/TbにCon Aと結合するMannopentaoseを添加した結果、時間分解発光スペクトルにおいてレシオ型の変化が観測されている。このレシオ値の変化はCon Aと結合する糖種を添加した場合にのみ観測されることより、FL-Con A/TbはP-PALMと Tb^{3+} の配位という二重の修飾にも関わらず天然の糖選択性を保持したまま糖質センサーとして機能していることが明らかとなっている。長寿命発光の特性を生かし、蛍光性の不純物が共存する場合でも糖質を検出できることも確認されている。さらに糖タンパク質表面に修飾された糖鎖の切断反応を、FL-Con A/Tbを用いて経時的に追跡することに成功している。

第2章では、新たなレクチン標識法の開発を行っている。レクチンの糖認識能を利用した選択的な化学標識法は、新規レクチンの探索や1章で示したようなレクチンの機能改変に有効な技術である。しかしその手法は限られており、従来のアフィニティーラベル化法および光アフィニティーラベル化法は完璧な手法とはいえない。そこで新たな概念に基づくレクチン標識法として、糖リガンドを連結させたアシル転移触媒（ST-DMAP）を用いたレクチンへの選択的なアシル転移反応を開発している。ST-DMAPが標的レクチンに認識され、DMAPユニットがレクチン表面に近接した状態でアシル転位反応を触媒することにより、レクチンの糖結合部位近傍へ部位特異的に機能性分子を導入することができることを実証している。

モデルレクチンとしてCongerin II（Cong II）に対してラベル化を検討しており、Cong II—糖リガンド間の相互作用に基づきアシル基転移によるラベル化反応が進行すること、糖結合部位近傍のアミノ酸特異的に修飾されること、ラベル化後もレクチンの活性が保持されていることが明らかとなっている。またこの手法が高い一般性を保持していることが、糖リガンド部位の変更により糖選択性の異なるレクチンに対しても適用できること、およびアシル化剤の変更によりさまざまな機能性分子を導入できることより確認されている。この手法が精製したレクチンのみならず、標的レクチン以外のタンパク質が存在する夾雑系でも適用可能であることが、Congerin IIを過剰発現させた大腸菌破碎液中や、Congerinが天然に存在するアナゴ粘膜組織の破碎液中での選択的なラベル化により確認されている。

第3章では、糖質のハイスループット解析を目標とし、蛍光標識レクチンを超分子ヒドロゲルによって非共有結合的に基板に固定化した蛍光性レクチンマイクロアレイの開発を行っている。糖質の検出に用いた2分子消光・回復 (BFQR) 法は、糖リガンドを連結した消光剤を競合させることで蛍光標識したレクチンの蛍光を消光状態にしておき、ここに検体である糖質を加えることで、糖結合ポケットから消光剤が追い出され、それに伴う蛍光回復により糖質の検出を行う手法である。超分子ヒドロゲルマトリックス中でBFQRを行うことにより、検体への事前の標識を必要としない糖類の検出を実現している。

レクチンマイクロアレイを用いて単糖を分析することで、対応する単糖と結合するレクチンを固定したスポットでのみ蛍光回復が観測されている。糖タンパク質の場合にも修飾された糖鎖に対応した特異的な応答が観測され、その検出に成功している。さらに多数の糖種の混合物である細胞破碎液の解析を行うことで、糖種の違いに基づいた細胞プロファイリングの可能性を実証している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、生体内で糖質の認識を司る糖結合性タンパク質 (レクチン) を利用・研究するための方法論 (レクチン工学) の確立を目標に、レクチンの化学的機能化手法を開発する研究についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. レクチンを基体としてランタノイドイオンの長寿命発光を利用した高機能な糖質センサーを開発した。レクチンの遷移金属イオン結合サイトに配位させたテルビウムイオンから、光アフィニティーラベル化後修飾法 (P-PALM) により糖結合部位近傍に導入した蛍光色素への発光共鳴エネルギー移動を利用することで、長寿命発光による糖質の検出に成功した。このセンサーを用いて、蛍光性不純物存在下での糖質の検出や糖鎖切断酵素の反応追跡に成功した。

2. 新たな概念に基づくレクチン標識法として、糖リガンドを連結したアシル転移触媒を用いたレクチンへの選択的なアシル転移反応を開発した。この標識法では、糖リガンドの種類に対応したレクチンの部位選択的なラベル化可能であった。また本手法を用いることで精製したレクチンのみならず、生体組織破碎液中の天然に存在するレクチンに対しても選択的なラベル化に成功した。

3. 糖質の解析を目的とし、蛍光標識レクチンを超分子ヒドロゲルを用いて基板に固定することで、蛍光性レクチンマイクロアレイの構築に成功した。2分子消光・回復法 (BFQR) をアレイ上で利用することにより、検体への事前標識を必要としない糖類の検出を実現した。このレクチンマイクロアレイにより、単純な糖質の検出のみならず、糖タンパク質の解析や細胞の糖種に基づいたプロファイリングに成功した。

本論文は、上記の通り、レクチンに対する新たな化学的機能化手法を開発したものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成20年1月25日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。