

学位論文審査の結果の要旨

平成 25年 11月 22日

審査委員	主査	神鳥 成弘	
	副主査	上田 夏生	
	副主査	上野 正樹	
申請者	伊藤 愛子		
論文題目	Optimization of the inter-domain structure of galectin-9 for recombinant production		
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格	<input type="radio"/> 不合格	(該当するものを○で囲むこと。)

〔 要 旨 〕

ガレクチンファミリーは、 β -ガラクトシド特異的動物レクチンであり、免疫応答・細胞接着等において興味深い生理活性を示すことから、近年注目されている。特に、ガレクチン9は、免疫システムの破綻を修正する機能（過剰な免疫反応の抑制やがん免疫の活性化）を持つことが知られている。このような免疫調節機能は、自己免疫疾患、アレルギーなどに対する治療薬としてガレクチン9が利用できる可能性を示している。ガレクチン9は、異なる2つの糖鎖認識ドメインがリンカーペプチドで繋がった構造（タンDEMリピート型構造）を持つ。リンカーペプチドはプロテアーゼに対する感受性が高く、リンカー一部が切断されるとガレクチン9の活性は大きく低下する。ガレクチン9のプロテアーゼ感受性を改善する目的で、リンカーペプチドを短くすることにより、高いプロテアーゼ耐性を持つ改変体（安定化ガレクチン9）が得られている。安定化ガレクチン9は、野生型ガレクチン9と同程度の生理活性を示すが、2つの問題点（低溶解性と組換え蛋白質の低収量）がある。最近の研究結果から、安定化ガレクチン9の2つの糖鎖結合ドメインの間には、リンカーペプチドと考えられる約20アミノ酸の領域が残存していることが明らかとなったので、本論文では、この領域の改変を行い、安定化ガレクチン9の可溶性と収量に対する効果を検討している。

本論文では、ドメイン間領域のアミノ酸残基を、N-末端側から順次削除した改変体を作製した結果、8-13残基削除した改変体において、活性の低下を伴うことなく、可溶性と収量が向上することを示している。さらに、これらの改変体について、この領域のプロリン残基に注目してアミノ酸置換体を作製した結果、アミノ酸置換体の中で、プロリン残基の数を減らしたものはすべて溶解度が低下し、特に、最もC-末端側に存在するプロリン残基の影響が大きいことを明らかにしている。最終的に、安定化ガレクチン9のドメイン間領域のアミノ酸残基を10残基削除し、かつ削除部位のC-末端側に存在する1つのアラニン残基をプロリン残基に置換した改変体 (ssG9) は、安定化ガレクチン9と比較して溶解性・収量を4倍以上に増加させることに成功している。ヒトT細胞株に対する細胞死誘導活性とマスト細胞の脱顆粒抑制活性を指標としてssG9の活性を検討した結果、ssG9は安定化ガレクチン9と同等以上の活性を保持していることを明らかにし、また、この構造改変により、プロテアーゼ耐性が低下しないことも確かめている。これらの結果は、ガレクチン9をベースとした治療薬開発において、ssG9が優れた性質を備えていると結論づけている。

上記発表後、審査委員等と以下の質儀応答を行い、科学的かつ論理的な回答が得られた。

- (1) 論文中に示している溶解度の測定方法、および最大溶解度と解釈している根拠は何か。
- (2) 実験動物内でのガレクチン9の動態についてはどの程度解明されているのか。
- (3) なぜ、プロリンからグリシンではなくアラニンに置換したのか。
- (4) 本研究により得られた溶解度は、実用化を見据えた場合、十分か。
- (5) ガレクチン9改変体の安全性について検討したか。
- (6) リンカー部分を取り除くことによりタンパク質全体の構造変化が変わらないか。
- (7) リンカー部分の長さが、どのように溶解度に影響を与えているのか。
- (8) ガレクチン9の細胞質中における機能については同程度わかっているのか。

以上、総合的に判断して、審査委員は、一致して本論文が博士論文としてふさわしいものであると判断した。

掲 載 誌 名	Glycobiology		第23巻, 第8号
(公表予定) 掲 載 年 月	平成25年 8月	出版社(等)名	Oxford Journal

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。