

学 位 論 文 題 名

法医物体検査における
分子生物学的手法の応用に関する研究

学位論文内容の要旨

法医物体検査における主要な検査項目の一つである人獣識別は、従来からヒト血清やヒトヘモグロビン抗体に対する反応性を指標として血清学的方法で行われてきたが、ヒトと進化的に近縁である、霊長類に属する動物（チンパンジー、ニホンザルなど）に由来する試料は、ヒト抗体に対して交差反応を示すため、霊長類間における識別の特異性が問題とされる。

本論文の第 1 部では、この問題を解決し、さらに簡便で特異性の高い人獣識別法を開発することを目的として、分子生物学的手法による人獣識別法の検討を行った。

人獣識別の指標として、これまでに、セキツイ動物において広く保存されていることが示されている、歯のエナメルタンパク質の一つである、アメロゲニンタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列を用いた。アメロゲニン遺伝子のイントロン領域の塩基配列をヒトとヒト以外の 7 種の霊長類、すなわち、ニホンザル (*Macaca fuscata*)、フランソワルトン (*Presbytis francoisi*)、ブラッザゲノン (*Cercopithecus neglectus*)、ムーアモンキー (*Macaca maurus*)、ボルネオオランウータン (*Pongo pygmaeus pygmaeus*)、ゴリラ (*Gorilla gorilla*) およびチンパンジー (*Pan troglodytes*) について解析したところ、ヒト以外の 7 種の霊長類におけるアメロゲニン遺伝子は、いずれもヒトと非常に高い相同性を示したが、ヒト以外の 7 種に共通して 2/3 塩基の違いが認められる部位が存在していた。この部位の塩基の違いをアレル特異的プライマーを用いた PCR によって検出する方法を確立し、本法を用いることによって、ヒトとヒト以外の霊長類を明確に識別することができた。

本論文の第 2 部では、法医物体検査における血液型検査のうちで最も一般的な血液型である、ABO 式血液型の検査において、抗 A・B 血清と共に抗 H 凝集素として用いられている、

ハリエニシダ (*Ulex europaeus*) の種子由来の抗 H レクチンに関する分子生物学的研究を行い、遺伝子配列を基にして組換え抗 H レクチンを生産する方法を開発するための検討を行った。

ハリエニシダゲノム DNA 中から既知のレクチンタンパク質である、*Ulex europaeus* agglutinin I, UEA-I と非常に相同性の高いタンパク質をコードする遺伝子、*Ulex europaeus* lectin 1, *UEL1* 遺伝子を単離し、同遺伝子がコードするタンパク質の構造解析を行った。その結果、UEL1 タンパク質は UEA-I タンパク質にみられる、マメ科レクチンに共通した立体構造をとることが示された。

ハリエニシダ植物体における *UEL1* 遺伝子の発現をノーザン解析により解析したところ、*UEL1* 遺伝子は、種子に特異的に発現しており、種子の成熟期において一過的に転写されることが示された。また、抗 UEL1 抗体を用いたウェスタン解析によって、UEL1 タンパク質は、種子においては成熟期以降に蓄積されていることが示され、種子以外にも根、茎において抗 UEL1 抗体に対して交差反応を示すタンパク質が検出された。これらの結果とハリエニシダゲノム DNA のサザン解析の結果から、ハリエニシダ中には、UEL1 タンパク質以外のイソレクチンが存在している可能性が示され、ゲノム DNA の部分ライブラリを作製してスクリーニングを行ったところ、2 つのイソレクチンをコードすると考えられる遺伝子、*UEL2* および *UEL3* 遺伝子を単離した。

UEL1 遺伝子を導入した大腸菌発現系および大腸菌由来の無細胞発現系において、得られた組換え UEL1 タンパク質は、不溶性の凝集体を形成しており、血球凝集活性を示さなかったことから、レクチン活性の発現には翻訳後の修飾の過程が必須であると考えられた。

UEL1 遺伝子を導入したトランスジェニックタバコ BY-2 培養細胞から得られた組換え UEL1 タンパク質は、フコ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って容易に精製され、得られた精製 UEL1 タンパク質は、血球凝集活性、糖鎖特異性において UEA-I と同様の活性を示し、ABO 血液型検査における抗 H 凝集素として応用しうることが示された。また、本法は、均一な性質をもつ高力価の抗 H 凝集素を安定して生産することができ、血液型検査においても有用であると考えられた。

以上の結果から、法医物体検査において、分子生物学的手法を用いることで、人獣識別においては近縁の種間における特異性の問題を解決することができ、また、ABO 式血液型判

定においては、抗 H 凝集素の安定した生産が可能になることが示され、以上の 2 点から、分子生物学的手法を応用することの有用性が明らかにされた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 藤 哲
副 査 教 授 富 田 房 男
副 査 助 教 授 石 川 雅 之

学 位 論 文 題 名

法医学物体検査における 分子生物学的手法の応用に関する研究

法医学物体検査における主要な検査項目の一つである人獣識別は、従来からヒト血清やヒトヘモグロビン抗体に対する反応性を指標として血清学的方法で行われてきた。しかしながら、ヒトと進化的に近縁である霊長類に属する動物（チンパンジー、ニホンザルなど）に由来する試料はヒト抗体に対して交差反応を示すため、霊長類間における識別の特異性が問題となっている。

本論文の第1部では、この問題を解決し、さらに簡便で特異性の高い人獣識別法を開発することを目的として、分子生物学的手法による人獣識別法の検討を行った。

人獣識別の指標として、歯のエナメルタンパク質の一つでセキツイ動物において広く保存されていることが示されているアメロゲニンをコードする遺伝子の塩基配列を用いた。アメロゲニン遺伝子のイントロン領域の塩基配列をヒトとヒト以外の7種の霊長類、すなわち、ニホンザル (*Macaca fuscata*)、フランソワルトン (*Presbytis francoisi*)、ブラッザゲノン (*Cercopithecus neglectus*)、ムーアモンキー (*Macaca maurus*)、ボルネオオランウータン (*Pongo pygmaeus pygmaeus*)、ゴリラ (*Gorilla gorilla*) およびチンパンジー (*Pan troglodytes*) について解析したところ、ヒト以外の7種の霊長類におけるアメロゲニン遺伝子は、いずれもヒトと非常に高い相同性を示したが、ヒト以外の7種に共通して2/3塩基の違いが認められる部位が見いだされた。この部位の塩基の違いを配列特異的プライマーを用いたPCR法によって検出する方法を確立し、本法を用いることによって、ヒトとヒト以外の霊長類を明確に識別することができることを実証した。

本論文の第2部では、法医学物体検査における血液型検査のうちで最も一般的な血液型であるABO式血液型の検査において、抗Aおよび抗B血清と共に抗H凝集素として用いられて

いる、ハリエニシダ (*Ulex europaeus*) の種子由来の抗Hレクチンに関する分子生物学的研究を行い、単離した遺伝子配列をもとにして組換え抗Hレクチンを生産する方法を開発するための検討を行った。

ハリエニシダゲノムDNAから既知のレクチンタンパク質である、UEA-I (*Ulex europaeus* agglutinin I) と非常に相同性の高いタンパク質をコードする UEL1 (*Ulex europaeus* lectin 1) 遺伝子を単離し、同遺伝子がコードするタンパク質の構造解析を行った。その結果、UEL1タンパク質はUEA-Iタンパク質にみられる、マメ科レクチンに共通した立体構造をとることが示された。

ハリエニシダ植物体における UEL1 遺伝子の発現をノーザン法により解析した結果、UEL1 遺伝子は種子に特異的に発現しており、種子の成熟期において一過的に発現することが示された。また、抗UEL1抗体を用いたウェスタン解析によって、UEL1タンパク質は種子において成熟中期以降に蓄積されることが示された。また、種子以外にも根や茎において抗UEL1抗体に対して交差反応を示すタンパク質が検出された。これらの結果とハリエニシダゲノムDNAのサザン解析の結果から、ハリエニシダゲノムには、UEL1タンパク質以外のイソレクチンが存在している可能性が示された。そこで、ゲノムDNAの部分ライブラリーを作製してスクリーニングを行い、2つのイソレクチンをコードすると考えられる遺伝子、UEL2およびUEL3遺伝子を単離した。

UEL1遺伝子を導入した大腸菌発現系および大腸菌由来の無細胞発現系において、得られた組換えUEL1タンパク質は不溶性の凝集体を形成しており、血球凝集活性を示さなかったことから、レクチン活性の発現には翻訳後の修飾の過程が必須であると考えられた。

UEL1遺伝子を導入したトランスジェニックタバコBY-2培養細胞から得られた組換えUEL1タンパク質は、フコ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って容易に精製され、得られた精製UEL1タンパク質は、血球凝集活性、糖鎖特異性においてUEA-Iと同様の活性を示し、ABO式血液型検査における抗H凝集素として応用しうることが示された。また、本法により、均一な性質をもつ高力価の抗H凝集素を安定して生産することができ、血液型検査において有用であることを示した。

以上のように、法医物体検査において分子生物学的手法を用いることにより、人獣識別においては近縁の種間における特異性の問題を解決することができることを、また、ABO式血液型判定においては抗H凝集素の安定した生産が可能になることを実証した。

よって審査員一同は、福島 久代が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。