

# 学 位 論 文

## 新規糖結合性レクチンの創出と応用

(Development and application of engineered lectins with  
novel sugar-binding specificities)

平成26年3月 博士（生命科学）申請

東京大学大学院新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻

曾我 慶介

## もくじ

1. 略語表 .....	5
2. はじめに（レクチンとは） .....	7
3. 序論 .....	9
4. 材料と方法 .....	13
4-1. 基本的な実験操作 .....	13
<細胞培養に使用した材料> .....	13
<使用した細胞株・培養条件> .....	13
<使用した抗体> .....	14
<使用した緩衝液、調製した試薬等> .....	14
<大腸菌培養に使用した材料及び条件> .....	15
<DNA の分離・ゲル抽出・精製> .....	15
<プライマーのリン酸化> .....	15
<ライゲーション反応～形質転換> .....	15
<プラスミド抽出> .....	16
<DNA シークエンス解析> .....	16
<フローサイトメトリー> .....	16
<SDS-PAGE> .....	16
<ウェスタンブロッティング> .....	17
4-2. PNA 変異体ライブラリー作製 .....	17
<PNA 変異体（ループ C）ライブラリー作製> .....	19
<PNA 変異体（ループ D）ライブラリー作製> .....	22
<PNA 変異体（ループ C&D）ライブラリー作製> .....	25
4-3. PNA 変異体ライブラリーレポーター細胞（2B4-PNAfb）樹立 .....	27
<トランスフェクション（ウイルス感染）> .....	27
<PNA 変異体発現 2B4 レポーター細胞（2B4-PNAfb）上のレクチン発現確認> .....	28
<PNA 変異体ライブラリー発現レポーター細胞（2B4-PNAfb）の濃縮> .....	28
<糖鎖ポリマーを用いたレポーターアッセイ> .....	29
4-4. 新規レクチンを提示したレポーター細胞（2B4-PNAfb）のスクリーニング .....	30
<糖鎖ポリマーを用いたレポーター細胞（2B4-PNAfb）のスクリーニング> .....	30
<限界希釈による細胞のクローニング> .....	30
<レポーター細胞からのゲノム抽出> .....	31

＜ゲノムダイレクト PCR＞ .....	31
＜pBlueScript II SK(+)へのサブクローニング＞ .....	32
＜モノクローナル 2B4-PNAfb 細胞作製用発現ベクター-pMXs 構築＞ .....	32
＜改変レクチン発現モノクローナルレポーター2B4 細胞（2B4-PNA 変異体）作製＞ .....	33
＜改変レクチン cDNA／アミノ酸配列の同定＞ .....	33
<b>4-5. 改変レクチン-ヒト Fc 融合タンパク質の作製 .....</b>	<b>33</b>
＜pCAGGS-hCD8ss-myc-lectin の構築＞ .....	34
＜Fc 融合タンパク質発現ベクター-pCAGGS-hCD8ss-myc-lectin-hFc の構築＞ .....	35
＜改変レクチン Fc 融合タンパク質安定発現株の樹立＞ .....	36
＜改変レクチン Fc 融合タンパク質の精製＞ .....	37
<b>4-6. 改変レクチンの評価 .....</b>	<b>37</b>
＜糖鎖アレイ解析＞ .....	37
＜改変レクチンのヒト細胞株との結合性評価＞ .....	38
<b>5. 結果 .....</b>	<b>39</b>
<b>5-1. PNA 変異体ライブラリー（pMXs-PNAfb）作製 .....</b>	<b>39</b>
<b>5-2. PNA 変異体ライブラリーレポーター細胞（2B4-PNAfb）作製 .....</b>	<b>42</b>
＜ライブラリーC（初代）レポーター細胞（2B4-PNAfb-初代 C）作製＞ .....	42
＜ライブラリーC（第二世代）レポーター細胞（2B4-PNAfb-第二世代 C）作製＞ ....	42
＜ライブラリーC（第三世代）レポーター細胞（2B4-PNAfb-第三世代 C）作製＞ ....	43
＜ライブラリーC（all）レポーター細胞作製（2B4-PNAfb-C-all）＞ .....	43
＜ライブラリーD①②③レポーター細胞作製（2B4-PNAfb-D①②③）＞ .....	43
＜ライブラリーD④レポーター細胞作製（2B4-PNAfb-D④）＞ .....	43
＜ライブラリーC（all）とライブラリーCD レポーター細胞作製（2B4-PNAfb-CD）＞ .....	44
<b>5-3. 2B4-PNAfb 細胞と様々な糖鎖ポリマーを用いたスクリーニング .....</b>	<b>44</b>
<b>5-4. 特異性改変レクチン遺伝子配列同定 .....</b>	<b>47</b>
＜ライブラリーC（初代）を用いたスクリーニング～遺伝子同定＞ .....	47
＜ライブラリーC（all）から改変レクチンのスクリーニング～遺伝子同定＞ .....	49
＜ライブラリーC（all）と C&D を用いたスクリーニング～遺伝子同定＞ .....	51
＜ライブラリーC（初代）&ライブラリーC（all）を用いた Galβ1-3(NeuAcα2- 6)GalNAcα 結合性レクチンのスクリーニング～遺伝子同定＞ .....	52
<b>5-5. レクチン-Fc 融合タンパク質の作製 .....</b>	<b>54</b>
<b>5-6. 糖鎖アレイによる改変レクチン-Fc の糖結合特異性解析 .....</b>	<b>55</b>

5-7. ヒト培養細胞株とレクチン-Fc 融合タンパク質の結合試験.....	56
6. 考察 .....	58
6-1. PNA 変異体ライブラリーの作製について .....	58
6-2. “Mammalian Cell Surface Display (MCSD) 法”を用いたレクチンの創 出 .....	59
6-3. マメ科レクチンの糖結合部位について .....	62
6-4. 同定した改変レクチンに見られる特徴 .....	64
6-5. 改変レクチン実用に向けて .....	66
6-6. 改変レクチンのスクリーニングを効率的に行うためには .....	68
6-7. 今後の展望 .....	70
7. 総括 .....	73
8. 謝辞 .....	74
9. 参考文献 .....	75
10. 図 .....	83
11. 表 .....	127



## 1. 略語表

Amp	: アンピシリン、Ampicillin
AFP	: $\alpha$ -フェトプロテイン、alpha-fetoprotein
ATP	: アデノシン三リン酸、adenosine triphosphate
AP	: アルカリフォスファターゼ、alkaline phosphatase
BAP	: Bacterial Alkaline Phosphatase
BPB	: ブロモフェノールブルー、Bromophenol blue
BPL	: ムラサキモクワンジュレクチン、 <i>Bauhinia purpurea</i> Lectin
CAG	: modified chicken $\beta$ -actin promoter with CMV-IE enhancer
CBB	: Coomassie Brilliant Blue
CHO	: チャイニーズハムスター卵巣、Chinese hamster ovary
CPA	: ヒヨコマメ凝集素（レクチン）、 <i>Cicer arietinum</i> agglutinin
CSD	: 細胞表面提示、Cell Surface Display
CRD	: 糖認識領域、Carbohydrate recognition domain
DBA	: ドリコスマメ凝集素（レクチン）、 <i>Dolichos biflorus</i> agglutinin
ECorL	: サンドシドウレクチン、 <i>Erythrina corallodendron</i> lectin
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic
ELISA	: エライザ、Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FAC	: Frontal affinity chromatography
FACS	: Fluorescence-activated cell sorter
FBS	: ウシ胎児血清、Fetal bovine serum
Fuc	: フコース、Fucose
Fw	: フォワード、Forward
Gal	: ガラクトース、Galactose
GalNAc	: <i>N</i> -アセチルガラクトサミン、 <i>N</i> -Acetylgalactosamine
GAM	: Goat Anti-mouse IgG
GFP	: 緑色蛍光タンパク質、green fluorescent protein
Glc	: グルコース、Glucose
GlcNAc	: <i>N</i> -アセチルグルコサミン、 <i>N</i> -Acetylglucosamine
G418	: Geneticin （抗生物質名）
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
ITAM	: immunoreceptor tyrosine-based activation motif
Kd	: 解離定数、Dissociation constant
LB	: Luria-Bertani-broth
LBL	: リママメレクチン、Lima bean lectin

LCA：レンズマメ凝集素（レクチン）、*Lens culinaris* agglutinin  
MAH：イヌエンジュ赤血球凝集素（レクチン）、*Maackia amurensis* hemagglutinin  
Man：マンノース、Mannose  
MCSD：Mammalian Cell Surface Display  
NACS：NFAT-activation molecule cloning system  
NeuAc：N-アセチルノイラミン酸、N-Acetylneuraminic acid（一般的なシアル酸）  
NFAT：Nuclear factor of activated T-cells（IL-2プロモーターに作用する転写因子）  
NK：Natural Killer  
PAA：ポリアクリルアミド、Polyacrylamide  
PAGE：ポリアクリルアミドゲル電気泳動、Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis  
PBS：リン酸緩衝食塩水、Phosphate-buffered saline  
PCR：Polymerase Chain Reaction  
PE：フィコエリトリン（色素タンパク質）、Phycoerythrin  
PHA：インゲンマメ赤血球凝集素、*Phaseolus vulgaris* Erythoragglutinin  
PI：ヨウ化プロピジウム（死細胞染色試薬）、Propidium iodide  
PNA：ピーナッツ凝集素（レクチン）、*Peanut (Arachis hypogaea)* agglutinin  
PSA：エンドウマメ凝集素（レクチン）、*Pisum sativum* agglutinin  
PVDF：PolyVinylidene DiFluoride  
RT-PCR：Reverse transcription-polymerase chain reaction  
Rv：リバーズ、Reverse  
SA：ストレプトアビジン、Streptavidin（ビオチンと強固に結合するタンパク質）  
SDS：ドデシル硫酸ナトリウム、Sodium Dodecyl Sulfate  
SML：seeds mannose-binding lectin  
SS：シグナル配列、Signal Sequence  
SSA：（ニホン）ニワトコ凝集素（レクチン）、*Sambucus sieboldiana* agglutinin  
TB：Terrific-Broth  
TBS：トリス緩衝食塩水、Tris-buffered saline  
TEMED：tetramethylethylenediamine  
WT：野生型、Wild type  
2-ME：ジメルカプトエタノール、2-Mercaptoethanol

## 2. はじめに（レクチンとは）

レクチンとは、糖結合活性を持つタンパク質の総称である[1]（但し、抗体など免疫活性をもつもの、糖転移酵素、糖切断酵素などの酵素活性をもつものは除く）。レクチンは、1888 年に植物の抽出物に含まれていることが報告されたことを発端に、様々な生物から見つかった。現在では、微生物界を含めたほとんどすべての生物がレクチンを持っているとされる。

植物から発見された当初は、赤血球の凝集活性を示すことから、赤血球凝集素(ヘマグルチニン)と呼ばれ、有名なものではコンカナバリン A がその代表格として挙げられる。この頃は、タンパク質と糖質の反応が解明されていなかったため、それ以上陽の目を浴びることはなかったが、1948 年にこれら赤血球凝集素が様々な ABO 式血液型に特異的に反応するという報告をもって再び関心が持たれた。これらの凝集素が赤血球表面の糖鎖構造を厳密に識別していたのである。名前も、ラテン語で「選択する」という意味の「Legere」から派生した「レクチン(Lectin)」に改められた。研究が進み、インゲンマメレクチン(PHA)やコンカナバリン A にマイトジェン活性があることが解り[2,3,4]、細胞表面糖鎖の生物学的機能も重要視され、免疫学の分野においても取り立たされた。現在では、がん細胞を選別する医学的ツールとして応用されるまでに至る。

大半のレクチンは糖認識領域(CRD)で定義されたファミリーに属しており、アミノ酸配列や三次元構造において特異的な性質を有する。CRD は糖の特異的認識に関わるポリペプチド領域で、進化的に高度に保存されている。ファミリーには、最大のファミリーを有する「マメ科レクチン」をはじめ、そのマメ科が有するリシンに CRD が似ている「R 型レクチン」、マメ科と構造類似性をもつ「L 型レクチン」、マンノース-6-リン酸(M6P)を認識する「P 型レクチン」、カルシウムイオン依存型の「C 型レクチン」、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する「I 型レクチン」がある。また、その他では、動物において見られる $\beta$ -ガラクトースを認識する「ガレクチン」ファミリーや、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン、グリコサミノグリカンに結合するタンパク質もそれぞれ別のファミリーとして見られている。上述したレクチンファミリーによって、構造や機能も様々である。

現在、レクチンは特定糖タンパク質、細胞の検出、同定、分離を初め、臨床的に病状の違いに呼応する糖鎖の違いを見極めるためのプローブにまで応用されるように

なった。複数のファミリーがあることは述べたが、糖鎖を検出するプローブとして用いられているのは、いくつかの例外を除き、マメ科などの植物レクチンである。植物のレクチンは、種子から大量に入手できること、様々な特異性を持っていること、極めて安定であることなど、多くの利点を持っている。そして、レクチンプローブとしても一つ重要な点は、レクチンと糖タンパク質や細胞の結合は、糖によって容易に阻害できることが挙げられる。一度結合したら脱離することが難しい抗体と違い、細胞を分別するという点において、レクチンはダメージを負わせることなく細胞を回収することに長けている。現在は、レクチンブロット、レクチンアフィニティークロマトグラフィーや免疫組織化学染色、フローサイトメトリーの技術の進歩により、レクチンは有用な分別ツールとして根強い[5,6,7,8]。今後もレクチンの応用に期待は高まる。

### 3. 序論

ポストゲノム時代と呼ばれる現在、真核細胞の翻訳後修飾でタンパク質に付加される「糖鎖」は、核酸、タンパク質に次いで、「第三の生命鎖」として注目されている。昨今の研究により、糖鎖の構造や機能も少しずつ解明され、その見解が臨床の域においても使用され始めた。例えば、正常の細胞と癌化した細胞では、生産されるタンパク質の表面に発現している糖鎖の構造が異なることが知られており、実際に、いくつかの糖鎖の構造が癌などのバイオマーカーとして用いられている[9,10,11]。糖鎖構造の変化を捉えることで、がんの早期発見に寄与する場合もある。例えば、血中 $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)は胎児性蛋白質の代表的な腫瘍マーカーで、主に胎児の肝細胞と成人の肝細胞がんによって産生される。AFPは現在3分画にて測定されるが、中でもAFP-L3分画は肝細胞ガンで特異的に上昇する値で、正常のAFPには付加されにくいFucの量を定量する。このAFP-L3 値は、ガン確定診断前や治療後に再発する患者で陽性である場合が多い[12,13]。タンパク質の増減に加え、そのタンパク質に付加されている糖鎖の質的变化の双方から測定することで、偽陽性が激的に減る。この事例のように、今後、新たな糖鎖関連バイオマーカーが開発されることが大きく期待されている。

糖鎖構造の変化を定量するのに用いられているのは、抗体またはレクチンである。しかし、生物の体内に多く存在する糖鎖は、それ自体の免疫原性が低く、一般的に糖鎖を特異的に認識する抗体の作製が難しいため、糖鎖のモニタリングには、特異性既知の天然レクチンの利便性が脚光を浴びる。実際に、上述したAFP-L3分画は、マメ科のレクチンの一種であるフコース特異的レクチンLCA(レンズマメレクチン)で定量される。

最近では、産業技術総合研究所などで、レクチンマイクロアレイが開発された[14,15,16,17]。これらは、糖鎖プロファイリングを簡単に行えるシステムであり、特異性が既知のレクチン数十種類を、基板上に固定化し、試料との結合試験を行うことで試料の糖鎖構造を予測するというものだ。このシステムの導入は糖鎖バイオマーカー探索に大きく貢献できるシステムである。細胞の異常により生じる糖タンパク質の糖鎖の構造を調べるには、数多くの検体を用いて調べる必要があるが、このアレイを用いて網羅的に糖鎖構造を調べられるようになれば、複数の検体解析操作は格段に

早くなる。実際に、レクチンアレイを用いて、乳がん細胞と正常細胞が違う糖鎖プロファイルを持つことが確認され、転移性の乳がん患者の少量の血清と尿から糖鎖の違いを検出できる可能性が示唆された[18]。このように、糖鎖の解析技術は、日々格段に進歩している。

糖鎖解析技術は着実に進歩してはいるが、まだ現在のレクチンアレイなどの糖鎖構造解析技術では、十分に糖鎖構造を解析することは不可能である。なぜなら、糖鎖のバリエーション（ヒトにおいては主に Man、Glc、Gal、Fuc、GalNAc、GlcNAc、NeuAcの7種類：図1）に加え、分岐や結合異性・位置異性など（糖の骨格は、4～5つの水酸基を持ち、すべて結合に関与しうる。また糖は炭素グリコシド結合の $\alpha$ または $\beta$ の異性体を持つ。）の構造多様性に富むため、特異性の分かっているプローブだけでは種類が足りないからだ。そこで、抗糖鎖抗体を作製し、抗体アレイを作製することを想定すると、少なくとも現在知られている個々の糖鎖構造(エピトープ)に対応した1,000種類以上の抗体を用意しなければならないだろう。前述したように 抗糖鎖抗体は作製の難しさから、抗体アレイは現実的ではないとすると、次に考えられることは、斬新な糖結合特異性をもつレクチンを人工的に創出できないかということである。レクチンは、一般的に糖鎖に対して幅広い特異性を示すため、糖結合特異性が詳細に調べられているレクチンでは、抗体と比べて少ない種類でも糖鎖構造を予測することができる。例えば、単糖 $\beta$ Gal特異性と言われるレクチンでは、 $\beta$ Galを末端に持つ数種類の糖鎖構造に対して親和性を持つことが多い。

本研究では、各マメ科レクチンのアミノ酸配列が、ファミリー間で20%が同一でさらに20%が類似したアミノ酸であるという高い相同性をもっている[19]ことに着目した。マメ科レクチンはレクチンの中でも最大のファミリーを形成しており、現在までに100種類以上のものが知られている。一般に、各サブユニットが2量体または4量体で存在しているが、いずれのサブユニットも約260アミノ酸残基からなり、特に130-160アミノ酸残基に相当する領域に金属イオン結合部位を持ち、ここにカルシウムとマンガンが1分子ずつ配位することで糖結合部位を露出させる。現在までに、数十種類のマメ科レクチンの立体構造が解かれているが、いずれも重ね合わせることが可能なほどレクチンサブユニットの構造が似通っている。例えば、ピーナッツの凝集素であるPNAというガラクトース結合性レクチン[20]とエンドウマメのレクチンであるPSA[21]というマンノース結合性レクチンの立体構造を重ね合わせると、ほ

とんど合致することがわかる(図2A)。ここで注目すべきは、高い相同性を持っているのにも関わらず、糖結合特異性がそれぞれ異なっているという点である[19]。つまり、マメ科レクチンのスキフォールドは糖結合特異性のポテンシャルを高く秘めており、糖結合部位のアミノ酸配列を僅かに改良することで、全く新しい特異性をもったレクチンが創出できる可能性があると考えられる。また、マメ科レクチンの糖結合部位は4つのループから成っており、それぞれがループA、B、C、Dと呼ばれている。これらループの領域はマメ科レクチンの可変領域と言われ、レクチンによって配列は異なる(図2B)。とくに、ループCではこれまでも糖結合特異性を担う重要なループとの報告がいくらかされており[22,23]、特異性を改変するという点においてこれらの配列は注目すべきである。また、マメ科レクチンにおいて、ループA、B、Cは非常にアミノ酸配列が類似しているが、ループDに関しては異なっており(図2B)、糖と水素結合を形成するアミノ酸も異なると考えられる。ループDのもう一つの注目すべき点は、ループ長と糖結合特異性との間に相関が見られることだ。例えば、Manを認識するレクチンは、Gal/GalNAc認識レクチンよりもループDが短い(図2B)。また、モデリング解析により、ループDは、ManとGalを見分ける重要な決定因子との報告も存在する[24,25]。以上より、ループCに加え、ループDも糖結合特異性を決定しているループと考えられる。

これまでに、ファージ・ディスプレイ法とリボソーム・ディスプレイ法において、レクチンライブラリーから改変レクチンをスクリーニングした報告がある[26,27,28]。しかし、これらの方法では、洗浄操作を必要とするため、「レクチン-糖」のような弱い相互作用では、レクチンから糖が外れてしまうことが懸念された。実際に、抗体-抗原相互作用が解離定数(Kd)にして $10^{-6}$ ~ $10^{-9}$ Mであるのに対し、糖鎖-レクチン相互作用は、 $10^{-3}$ ~ $10^{-6}$ Mと親和性が1000倍ほど小さい。また、ファージ・ディスプレイ法では、大腸菌発現系を経由するため、ファージ上に提示できるタンパク質が大きさの制限を受けることや、遺伝子欠損が起こりやすいことが欠点として挙げられた。これらの既存の方法論の問題点を踏まえ、本研究では、哺乳動物の細胞の発現系に応用したMammalian Cell Surface Display(MCSD)法でレクチンの創出を試みる。本研究で述べるMCSD法とは、哺乳類細胞表面上にタンパク質を発現させ、標的との結合を指標に相互作用を検出する手法を指す。MCSD法の場合は哺乳動物の細胞という高度な発現系を利用するため、大腸菌などでは可溶性タンパク質

として発現の困難なレクチンも提示でき、遺伝子欠損などのエラーが起こりにくいと  
考えられる。さらに、本研究では、糖鎖とレクチンの結合を検出する術として、細胞  
内のGFPの発現を誘導するレポーター細胞の原理を利用する方法を採択した。この手  
法は、免疫学の分野では発現クローニングに用いられており、NFAT-activation  
molecule cloning system(NACS)と呼ばれる[29]。本手法で扱うレポーターアッセ  
イでは、レポーター細胞表面のレクチンが、リガンドによって架橋することで細胞内  
にGFP発現が誘導される(図3B)。つまり、例えば洗浄によって、レクチンから糖が外  
れてしまっても、その形跡をGFPの蛍光として細胞内に残すため、その蛍光を測定す  
ることで糖と相互作用したレクチンを選別できる。以上より、MCSD法を応用した  
新規改変レクチンのスクリーニングは、これまで一般的に行われてきた組み換えタン  
パク質を用いるスクリーニング法と比べて、糖鎖-レクチン相互作用の検出を効率的  
に行うことができると考えられる。

本研究では、マメ科レクチンのスキャフォールドとMCSD法の利点を活かすこと  
で、天然にない糖結合特異性を持つ改変レクチンを作製し、レクチンのスクリーニン  
グ法としてMCSD法の利便性を実証することを目的とした。

具体的には、マメ科レクチンの一種である Peanut agglutinin(PNA)の金属配位部  
位及び糖結合部位の両方を担うループ C、またループ D にランダムに変異を導入し  
たレクチンライブラリーを作製し、そのライブラリーから MCSD 法を用いて新規糖  
結合特異性を持ったレクチンをスクリーニングすることを試みる。そして、創出した  
改変レクチンを評価し、プローブとしての応用を検討する。



## 4. 材料と方法

### 4-1. 基本的な実験操作

#### <細胞培養に使用した材料>

特に記述の無い限り、細胞培養には、Tissue culture 100 mm dish(MIDSCI)を用いた。

細胞培養に使用した培地は以下に示した。

**R10 培地**：RPMI 1640(Invitrogen)に 10%の非働化 FBS(Invitrogen)、50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol(Sigma)、100 U/ml penicillin G(Sigma)、100  $\mu$ g/ml streptomycin (Sigma)を含む培地

**D10 培地**：DMEM(Invitrogen)に 10%の非働化 FBS、25 mM HEPES、50  $\mu$ M 2-mercaptoehanol、100 U/ml penicilin G、100  $\mu$ g/ml streptomycin を含む培地

**Medium 106**：Medium106(Gibco)に、1  $\times$ Low Serum Growth Supplement(Invitrogen)を含む培地

#### <使用した細胞株・培養条件>

レトロウイルスパッケージング細胞である Platinum-E(以後、Plat-E と表記)細胞は東京大学医科学研究所の北村俊雄博士から供与して頂いた[30]。マウス T 細胞ハイブリドーマである 2B4 細胞(NFAT-GFP が導入されている。転写因子 NFAT が IL-2 プロモーター領域に結合することで、GFP の発現が誘導される細胞) [29]は、大阪大学微生物病研究所の荒瀬尚博士から供与して頂いた。HEK293、A549、AZ521、CoLoTC、EBC-1、G361、HeLa、HeLaS3、HepG2、HL60、HO-1-u-1、HUT78、IMR32、K562、ME180、MIApaca2、PANC-1、PK-8、Raji、SK-MEL-28、THP-1 及び U937 細胞は、東北大学加齢医学研究所の医用細胞資源センターより譲渡して頂いた。C32TG、Daudi 及び Jurkat 細胞は、American Type Culture Collection(ATCC)から入手した。HOS 細胞は、理化学研究所より譲渡して頂いた。HDFa 細胞は、Invitrogen 社より購入した。CAL-1 細胞は、長崎大学大学院 離島医療研究所の前田隆浩博士から譲渡して頂いた。

すべての細胞株の培養は、37°Cで 5%の CO<sub>2</sub>を供給するインキュベーターで行った。Plat-E 細胞は D10 培地に 10  $\mu$ g/ml blasticidin S HCl (Invitrogen)、1  $\mu$ g/ml

puromycin (Sigma)を加えて培養した。HEK293、AZ521、Daudi、HepG2、HeLa、MIApaca2 は D10 培地で培養した。2B4、A549、CAL-1、CoLoTC、C32TG、EBC-1、G361、Jurkat、HeLaS3、HL60、HO-1-u-1、HOS、HUT78、IMR32、K562、ME180、PANC-1、PK-8、Raji、SK-MEL-28、THP-1 及び U937 は R10 で培養した。HDFa 細胞は、medium 106 で培養した。

#### <使用した抗体>

抗 myc 抗体(9E10)は、ハイブリドーマを ATCC より購入し、当研究室卒業生 胡博士が培養上清からプロテイン A カラムで精製したものを使用した。PE 標識抗マウス抗体は、Goat F(ab')<sub>2</sub> Anti-Mouse IgG(H+L) Phycoerythrin(PE) Conjugate を Beckman Coulter より購入した (以後、GAM-PE と表記)。AP 標識抗ヒト IgG Fc 特異的抗体は、Anti-human IgG(Fc specific)AP conjugate を Sigma-Aldrich より購入した。PE 標識抗ヒト IgG Fc 特異的抗体は、PE conjugated F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-human IgG Fc  $\gamma$  Fragment specific を Jackson ImmunoResearch より購入した。Cy3 標識抗ヒト IgG Fc  $\gamma$  特異的抗体は、Cy3 標識された Donkey anti-human IgG Fc  $\gamma$  fragment specific を Jackson ImmunoResearch より購入した。

#### <使用した緩衝液、調製した試薬等>

##### ・ PBS(-)

137 mM NaCl、2.68 mM KCl を含むリン酸緩衝液 (pH 7.4)

PBS-EDTA はさらに、0.5 mM の EDTA を含む溶液

##### ・ TBS

150 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl 溶液 (pH 7.5)

TBS-T はさらに、Tween 20 を 0.1%含む溶液

##### ・ FACS Buffer (フローサイトメトリーの時に使用した Buffer)

NaHCO<sub>3</sub> (0.35 g/l)、0.1% (w/v) NaN<sub>3</sub>、0.1% (w/v) BSA を含む Hanks' balanced salt solution (Gibco BRL)

##### ・ Probing buffer (糖鎖アレイの時に使用した Buffer)

0.15 M NaCl、1% (v/v) Triton-X100、1 mM MnCl<sub>2</sub>、1 mM CaCl<sub>2</sub> を含む 25 mM Tris-HCl 溶液(pH 7.4)

##### ・ LB 培地

液体培地は Bacto Trypton (Becton Dickinson)を 10 g、Bacto Yeast Extract (Becton Dickinson)を 5 g、NaCl を 5 g を全量で 1 L になるように精製水に溶解させた後、高圧蒸気滅菌した培地

寒天培地は、液体培地の組成にさらに Bacto Agar(Becton Dickinson)を 15 g 加えた組成で作製した。その後、必要に応じて ampicillin sodium salt(Sigma) を 100 µg/ml となるように溶かし、シャーレに撚いて固めた。

- TB 培地

Bacto Trypton を 12 g、Bacto Yeast Extract 24 g、D(+)glucose(Wako) 5 g、glycerol(Wako) 4 ml を精製水に 1 L に溶解させた後、高圧蒸気滅菌した培地

### ＜大腸菌培養に使用した材料及び条件＞

液体培養は LB 培地を用いた。形質転換に用いたプラスミドはすべてアンピシリン耐性のものなので、選択マーカーには ampicillin sodium salt を終濃度 100 µg/ml で加えて培養した。プラスミド抽出には、3 ml の LB/Amp 液体培地中に大腸菌コロニーをつついた爪楊枝を加え、37℃、16 時間の振盪培養を行った。

大腸菌のシングルコロニーを形成させる際には、培地に LB/Amp プレートを使用し、37℃で 16 時間インキュベートした。

### ＜DNA の分離・ゲル抽出・精製＞

Agarose standard 01(Solana)を用いて作製した 1%のアガロースゲルで電気泳動を行い、DNA 大きさに応じて分離した。ゲル抽出には、電気泳動後のゲルから目的とする分子量の DNA 断片を切りだして、QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)を用いて精製した。

### ＜プライマーのリン酸化＞

平滑末端のライゲーション時には、プライマーの 5'末端をリン酸化した。プライマー-forward と reverse を(各々50 µM) 2 µl、ATP (10 mM) 1 µl、T4 polynucleotide kinase(Takara)を (1 U/µl) 0.5 µl、10×T4 polynuceotide kinase buffer (Takara)を 1 µl 加え、精製水で全量を 10 µl にメスアップし、37℃で一時間反応させた。その後、70℃で 20 分インキュベートし、酵素を失活させた。これをプライマー-mixture とした。

### ＜ライゲーション反応～形質転換＞

ライゲーション反応は、Ligation Mix(Takara)を用いた。ベクターとインサートを

モル比 1 : 5~10 で混合した DNA 溶液 5  $\mu$ l に Ligation Mix を 5  $\mu$ l 加え、16°C で 1~2 時間ライゲーション反応を行った。その後、大腸菌コンピテントセル DH5 $\alpha$  50  $\mu$ l にライゲーション溶液を 5  $\mu$ l 加え、42°C、40 秒間のヒートショックを与えて、形質転換を行った。後に、4°C で 5 分間静置し、LB/Amp プレートに塗き、大腸菌を 37°C で一晩培養し、シングルコロニーを得た。

### <プラスミド抽出>

シーケンス解析用のプラスミドを大腸菌から抽出する時は、FastGene Plasmid Mini Kit(日本ジェネティクス)を使用した。細胞にトランスフェクションするプラスミドを大腸菌から抽出する際には、Nucleobond PC20 または PC100 (Macherey-Nagel)を使用した。方法は付随されてきた説明書記載のプロトコールに従った。

### <DNA シーケンス解析>

シーケンス解析は、BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit(ABI)を用いて、ABI prism 3130xl genetic analyzer (ABI)または ABI 3500 genetic analyzer(ABI)で塩基配列を解析した。アライメントなどの塩基配列解析ソフトウェアには、GENETYX-MAC (Genetyx)を用いた。

### <フローサイトメトリー>

回収した培養細胞は FACS Buffer で懸濁し、死細胞を染め分けるために PI (Sigma)を終濃度 0.5  $\mu$ g/ml で加え、FACS Calibur (Becton Dickson)で解析した。解析ソフトウェアには、FlowJo (Tree Star)を用いた。

### <SDS-PAGE>

SDS-PAGE を行うにあたり、下記のバッファーを使用した。

- Lower gel buffer (pH 8.8)  
: Tris 90.85 g (final 1.8 M) 、 SDS 4.0 g、精製水で 500 ml に調製
- Upper gel buffer (pH 6.8)  
: Tris 60.6 g (final 0.8 M) 、 SDS 2.0 g、精製水で 500 ml に調製
- 10 $\times$ Running buffer  
: Tris 90.9 g、 glycine (Wako) 432.0 g、 SDS 30.0 g、精製水で 3L に調製
- 6 $\times$ non-reducing SDS sample buffer  
: BPB (Wako) 1.2 mg、 SDS 1 g、 upper gel buffer 7 ml、 glycerol 3 ml

- ・ CBB 染色液

: CBB-R250(Nacalai tesque) 2.5 g、メタノール 500 ml、酢酸 100 ml、精製水で 1L に調製

- ・ 脱色液

: メタノール 250 ml、酢酸 500 ml、精製水で 1 L に調製

ゲルの作製から泳動までの方法は以下に示した。10% Lower gel 溶液[30% (w/v) アクリルアミド溶液 6.0 ml、lower gel buffer 4.5 ml、精製水 7.5 ml]に 120  $\mu$ l の 10%過硫酸アンモニウム(Wako) 、7.5  $\mu$ l の TEMED (Wako) を加え、適量をゲル板に流し込み、精製水で空気を遮断し重合させた。Lower gel の重合が完了したのを確認した後、上層の精製水を除去した。Upper gel 溶液 (30% (w/v)アクリルアミド溶液 7.5 ml、lower gel buffer 4.5 ml、精製水 6 ml) に 80  $\mu$ l の 10%過硫酸アンモニウム、7.5  $\mu$ l の TEMED を加え、Lower gel に重層させ、コームを挿入して重合させた。

サンプルに適量の 6×non-reducing SDS sample buffer (reducing condition ではさらに[5 %(v/v) 2-ME (Sigma)]を加える) を加え懸濁したのち、95℃で 5 分間熱処理を行ったもの SDS-PAGE に供した。泳動は、1×Running buffer (10×Running buffer を精製水で 10 倍希釈したもの)中で 200 V 定電圧下、60 分間行った。

SDS-PAGE が終了したゲルは、CBB 染色液で染色後、脱色液中で脱色し、タンパク質を確認した。

### <ウェスタンブロッティング>

SDS-PAGE の終了したゲルから PVDF 膜 Immobilon-P (Millipore) にタンパク質を Semi-dry 法を用いて転写した。転写装置には、trans blot SD semi-dry transfer cell (Bio-Rad)を用い、Transfer buffer (25 mM Tris、192 mM glycine)中で、15V 定電圧下、50 分間転写した。

## 4-2. PNA 変異体ライブラリー作製

本研究では、改変レクチンプローブを探索するにあたり、マメ科レクチンの糖結合部位の中でも金属イオンと配位することで糖結合ポケットを創りだしているループ C とアミノ酸残基の長さが特異性に関係しているループ D(図 2 B)にランダム変異を

加えたライブラリーを作製し、改変レクチンをスクリーニングする系を考案した。特にループ C は糖結合特異性を担う重要な要素としてみなされ[22,23]、これらループを改変することでレクチンの糖結合特異性の変化が期待される。

当研究室では、卒業生秦博士（2012 年度修了）によって、マメ科レクチンに属する Peanut agglutinin (PNA) と CD3 $\zeta$  の細胞内領域を融合したタンパク質を、NFAT-GFP が導入されたマウスの T 細胞ハイブリドーマ 2B4 細胞[29]（以後、この NFAT-GFP-2B4 細胞は 2B4 細胞と表記する）において発現させる系が確立された。PNA は癌関連 T 抗原と呼ばれる Gal $\beta$  1-3GalNAc $\alpha$  を特異的に認識することが知られており[31,32]、また、他のマメ科レクチンと相同性が高い[33]。具体的には、ピーナッツの種子から mRNA を抽出し、PNA の cDNA をクローニングした。この時クローニングされた cDNA のコードする PNA は、データベース（Uniprot entry P02872）に登録されているアミノ酸配列との相違が見られ、H116 Y と L212R、G213A の 3 種類のアミノ酸が異なるバリエーションであった(図 4)。当研究室卒業生高田（2008 年度修了）、河崎博士（2008 年度修了）、秦博士らが、レトロウイルスベクター pMXs の 5'側からヒト CD8 $\beta$  (Genbank : BC100914)シグナル配列（1~21 アミノ酸残基）、Myc タグ(アミノ酸配列：EQKLISEEDL)、PNA(シグナル配列と終止コドンを除いたレクチン領域、24~272 残基目)、NK 細胞受容体の一つで I 型タンパク質であるマウス NKp46(Genbank : NM\_010746)の 212~254 アミノ酸残基のストーク領域、I 型膜貫通タンパク質であるマウス CD8 $\alpha$  (Genbank : BC030679)の 143~181 アミノ酸残基の細胞外の膜近傍~膜貫通領域及び細胞内領域 4 アミノ酸残基、マウス CD3 $\zeta$  (Genbank : BC052824)の 52~164 アミノ酸残基の細胞内領域を繋いだコンストラクト (pMXs-myc-PNA-NKp46ST-CD8 $\alpha$  TM-CD3 $\zeta$  : pMXs-PNA ※なお、本研究で使用する pMXs ベクターは全て pMXs-myc-NKp46ST-CD8 $\alpha$  TM-CD3 $\zeta$  というコンストラクトのため、以後 pMXs と省略する)(図 3 A)を作製し、2B4 細胞に導入した(2B4 -PNA)。この 2B4-PNA 細胞は、N 末端から細胞表面に PNA、細胞内には ITAM を有する CD3 $\zeta$  の細胞内ドメインの融合キメラタンパク質が発現する。細胞外における PNA の糖鎖との結合により、細胞内 CD3 $\zeta$  同士が架橋されると、ITAM がリン酸化され、IL-2 プロモーターに結合する転写因子 NFAT が産生される。そして、最終的に GFP の発現が誘導される(図 3 B)。2B4-PNA 細胞は、糖鎖 : T 抗原 (Gal $\beta$  1-3 GalNAc $\alpha$ ) の固相化さ

れたプレートで一晩培養すると、細胞内において GFP を発現することがフローサイトメトリーにて確認され(図 5)、本研究では、この PNA を鋳型レクチンとして用いることにした。また、抗 myc 抗体を固相化したプレートで一晩培養しても、Myc タグによって架橋されるために、2B4-PNA 細胞の GFP 発現が確認されている(図 5)。

### ＜PNA 変異体（ループ C）ライブラリー作製＞

初めに、新規糖結合性を持ったレクチンを創出するために、PNA のループ C における金属イオンの配位に寄与する 127 残基目のアスパラギン(N127)を保存し、124～126、128～131 残基目の計 7 アミノ酸をランダムなアミノ酸とするレクチンライブラリー(ライブラリーC 初代)の作製を試みる(図 6)。また、このライブラリーC 初代ライブラリーの形質に加え、糖結合特異性に大きな変化をもたらすことを狙い、N127 を他の金属配位可能な類似アミノ酸であるアスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸及びイミダゾール基を持つヒスチジンに変化させたライブラリー(ライブラリーC 第二世代：N127→D、E、H、Q) も作製する(図 6)。さらに、127 残基目をアスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジンのいずれかとし、かつ糖結合ポケットに *N*アセチル基をもつような嵩高い糖を許容するために、ループ長 1～4 アミノ酸残基分拡張したライブラリー(ライブラリーC 第三世代①～④：N127→D、E、H、N、Q)も作製する(図 6)。これらは、レトロウイルスベクター-pMXs (東京大学医科学研究所、北村俊雄博士から譲渡していただいた) に組み込む(図 3A)。詳細を以下に示す。

(ライブラリー設計案：PNA の変異を導入する部位で PNAf (front) と PNAb (back) というように二分する。front 部位にランダム変異を導入するようにプライマーを設計し、PCR で PNAf(ランダム変異体)を増幅後に、ライゲーション反応で PNAf と PNAb を繋ぎ合わせることで PNAfb ランダム変異体を作製する。) 以上の概略は図 7 に示した (図 7)。

### ・ pMXs-PNAb の作製

pMXs に PNA のループ C のランダム部位以降の配列を組み込む。以下のプライマーを使用した。PNA(Stu I)はループ C の直後の 397 塩基目 (図 8) からアニールする。

PNA(Stu I)：5'-gaaggcctcccactgatcacgttgga-3'(Stu I 認識配列を斜体表記で示した。アニール部位は下線で示した。)

※Stu I サイトを導入することで PNA の塩基配列は変わるが、最終的に翻訳されるアミノ酸に変化はない。

PNA-R(Hpa I) : 5'-aacattctcgagtgcacttgccatattcat-3' (Xho I 認識配列を斜体表記で示した。アニール部位は下線で示した。)

上記プライマーの 5'側をリン酸化した。PCR 溶液組成は、10×KOD plus Buffer を 1×Buffer に、dNTPs 終濃度 0.2 mM、MgSO<sub>4</sub> 1.0 mM、各リン酸化プライマー 0.4 μM、ピーナッツから得た cDNA、KOD plus (Takara) 0.8 U の濃度で 30 μl とした。反応条件は、94°C 2 分間で熱変性した後、94°C 15 秒間の熱変性、52°C 30 秒間のアニーリング反応、68°C 1 分間の伸長反応を 30 サイクル繰り返し、最後に再度 68°C で 7 分間伸長させた。アガロース電気泳動にて、PNA<sub>b</sub>(371 bp)の PCR での特異的な増幅を確認後、ゲル抽出を行い、Hpa I、BAP 処理後の pMXs にライゲーション反応 (図 7)、DH5α への形質転換を行った。得られたコロニーからプラスミドを抽出し、シーケンス反応を確認した(pMXs-PNA<sub>b</sub>)。ライゲーションに用いる際には、pMXs -PNA<sub>b</sub> を Stu I (New England BioLabs)処理後に、EcoR I (Toyobo)処理し、さらに alkaline phosphatase (*E.coli* C75) (Takara) 処理した。alkaline phosphatase 処理後の溶液をゲル抽出して精製した。

#### ・ PNA<sub>f</sub> (ランダム変異挿入) 作製

EcoR I サイトを付加した PNA-Fw プライマー (Greiner) とランダム部位を付加するためのあらかじめリン酸化された PNA-Rv プライマー (Sigma) を用いて、変異体ライブラリーのランダム付加 PNA<sub>f</sub> を PCR にて増幅した。プライマー配列は以下に示した。

PNA-F(EcoR I) : 5'-cggaattcgccgaaacagtttccttc-3'

(EcoR I 認識配列を斜体表記で示した)

以下の塩基表記は m:a/c n:a/c/g/t s:c/g b:c/g/t とする。

PNA-R (Random 127N 保存) :

5'- atcmnnmnnmnnmnnngttmnnmnnmnnatcaaactccactccaac-3'

PNA-R (Random 127N→D、E、H、Q) :

5'- atcmnnmnnmnnmnnntsmnnmnnmnnatcaaactccactccaac-3'

PNA-R (拡張 1AA、127N→D、E、H、N、K、Q) :

5'- atcmnnmnnmnnmnnntbmnnmnnmnnmnnatcaaactccactccaac-3'



PNA-R (拡張 2AA、127N→D、E、H、N、K、Q) :

5'- atcmnnmnnmnnmnnntbmnnmnnmnnmnnmnnnatcaaactccactccaac-3'

PNA-R (拡張 3AA、127N→D、E、H、N、K、Q) :

5'- atcmnnmnnmnnmnnntbmnnmnnmnnmnnmnnmnnnatcaaactccactccaac-3'

PNA-R (拡張 4AA、127N→D、E、H、N、K、Q) :

5'-  
atcmnnmnnmnnmnnntbmnnmnnmnnmnnmnnmnnmnnnatcaaactccactccaac-3'

\* 其々アニール部位を下線で示した。

PCR 溶液組成は、10×KOD plus Buffer を 1×Buffer 中、dNTPs 終濃度 0.2 mM、MgSO<sub>4</sub> (終濃度 0.8、1.0、1.2、1.5、2.0、2.5 mM の 6 通り)、鋳型 PNA-pBlueScript プラスミド 7.5 ng、各プライマー 終濃度 0.6 μM、KOD plus 0.8 U で溶液を MgSO<sub>4</sub> の濃度別に、精製水で 50 μl に調製した (つまり 6 通り)。PCR 調製液 50 μl を 5 通りのアニーリング温度条件を振るために、それぞれ 10 μl ずつ分注し、反応条件は、94°C 2 分間で熱変性した後、94°C 15 秒間の熱変性、(52、54、55.8、57.8、60°C) の 5 通りの温度条件で 30 秒間のアニーリング反応、68°C 1 分間の伸長反応を 30 サイクル繰り返し、最後に再度 68°C で 7 分間伸長させた。その後、EcoR I 処理を行い、ゲル抽出によって DNA を精製した。

#### ・ pMXs-PNAf&b 構築

PNAf [EcoR I 処理済] 500 ng と pMXs-PNAb [Stu I、EcoR I、BAP 処理精製済] 1000 ng を混和し (モル比にして 7 : 1)、その溶液と等量の Ligation Mix を加え、16°C で一晩反応させた。

ヒートショック法と比較して高効率のエレクトロポレーション法を用いて形質転換を行うために、ライゲーション反応液をエタノール沈殿により脱塩した。まず、沈降キャリアとして Yeast tRNA (Invitrogen) 50 ng と電解質である酢酸アンモニウムを終濃度 2.5 M で加えた。その後に -20°C で冷やしておいたエタノールを終濃度 70% で加え、ボルテックスミキサーにて攪拌し、室温で 20 分間、20,400 g で遠心し、上清を捨てた。-20°C で冷やしておいた 70% (v/v) エタノールを 1 ml 加え、再度室温で 4 分間、20,400 g で遠心し、上清を捨てる操作を 2 回繰り返した。室温

で残留エタノールを揮発させた後、6  $\mu$ l の精製水で DNA ペレットを溶解した。

ElectroMAX DH10B Cells(Invitrogen)にエレクトロポレーション法を用いて形質転換した。エレクトロポレーション用の冷やしておいた三個のキュベットに、DH10B 大腸菌液を 25  $\mu$ l ずつとエタノール沈殿後の DNA 溶液（上記で 6  $\mu$ l に溶解してある）を各々 2  $\mu$ l ずつを加え（一個のキュベット内にこの時点で 27  $\mu$ l 入っている）、形質転換（エレクトロポレーション）を行った。エレクトロポレーターである BTX-600 electro cell manipulator (Harvard apparatus)の条件は 1.8 kV、186  $\Omega$ 、50  $\mu$ F で行った。pulse 後の大腸菌浮遊液に S.O.C 培地を 1 個のキュベットにつき 1 ml 加え、37°Cで一時間振盪培養した。その後、コンピテンシー算出とシーケンス解析をするために培養液から 2  $\mu$ l 使用して希釈系列を作製し、寒天培地に撒いた。その間、残りの培養液は、培養液 700  $\mu$ l に対し 80% (v/v) glycerol を 300  $\mu$ l 加え、-80°Cで三日間保存した。コンピテンシーを算出するとともに、寒天培地に生えたコロニーからプラスミドを抽出し、シーケンス解析によって PNAfb(図 7)に変異が導入されていることを確認した。

プラスミドを抽出するために、上記で-80°C保存していたグリセロールストックを解凍し、15 cm の LB/Amp プレートに  $1 \times 10^5$  cfu/枚（各ライブラリーの cfu は図 6 参照）となるように撚いて、13 時間培養後、4°Cで一時間培地を固めた。プレートに生えたコロニーを 10 ml TB/Amp 培地で懸濁、回収し、さらにそのプレートを 5 ml の TB/Amp 培地でリンスしたものも合わせて回収した（プレート 40 枚分、つまり  $15 \times 40 = 600$  ml 回収した計算）。これを 500 ml 用コルベンに分取し（コルベン 5 本使用：一つのコルベンあたり 120 ml の液量）、37°Cで 3 時間振盪培養した。その培養液から Plasmid DNA Purification Kit の Midi-prep (low copy protocol に従った)を用いて pMXs -PNAfb プラスミド（図 7）を精製した。

#### <PNA 変異体（ループ D）ライブラリー作製>

ループ D も糖結合特異性を定義することに重要と考えられる[24,25]。また、ループの長さや糖結合特異性の関係に相関が見られることから、ループ D にランダム変異を導入し、ループ長を変化させたライブラリーを作製することにした。設計概略は図 9 に示した（図 9）。本実験は当研究室卒業生の京藤（2012 年度修了）と協力して行った。

#### ・ pMXs-PNAf(D)構築



した設計

pMXs-R (Not I) : 5'-cccttttctggagactaaat-3'

PCR 反応液は、1 ×Prime Star Buffer 内に、dNTPs 終濃度 0.2 mM、各プライマー 0.5 μM、pMXs-PNA (プラスミド) 1 ng、Prime Star-HS DNA polymerase (Takara) 1.25 U の濃度で、精製水で全量 50 μl とした。反応条件は、98°Cで 10 秒間の熱変性、45°Cで 5 秒間のアニーリング、72°Cで 1 分間での伸長反応を 32 サイクル繰り返した。各ランダムプライマーにつき、200 μl (50 μl×4 本) ずつ反応を行った。反応液は、ブタノール濃縮により溶液を濃縮し、Not I 処理を 48 時間行った後、ゲル抽出し、精製した。以上の断片を PNA<sub>b</sub>(D)~CD3 とした。

pMXs-PNA<sub>f</sub> (D) を Hpa I で 72 時間、Not I (Toyobo) で 48 時間処理し、目的のバンドをゲル抽出により精製した。精製した DNA と PNA<sub>b</sub>(D)~CD3 と断片をモル比 1 : 7 となるように混合し、その溶液と等量の Ligation Mix を加え、4°Cで 5 日間反応させた。エレクトロポレーション法を用いて形質転換を行うために、ライゲーション反応液をエタノール沈殿により脱塩した。まず、沈降キャリアとして Yeast tRNA 50 ng と電解質である酢酸アンモニウムを終濃度 2.5 M で加えた。その後に -20°Cで冷やしておいたエタノールを終濃度 70%で加え、ボルテックスミキサーにて攪拌し、4°Cで 20 分間、20,400 g で遠心し、上清を捨てた。-20°Cで冷やしておいた 70% (v/v) エタノールを 1 ml 加え、再度 4°Cで 4 分間、20,400 g で遠心し、上清を捨てる操作を 2 回繰り返した。室温で残留エタノールを揮発させた後、4 μl の精製水で DNA ペレットを溶解した。

ElectroMAX DH10B Cells にエレクトロポレーション法を用いて形質転換した。エレクトロポレーション用の冷やしておいたキューベットの、DH10B 大腸菌液を 25 μl ずつとエタノール沈殿後の DNA 溶液 (上記で 4 μl に溶解してあるので、各ライブラリーにつき 2 サンプルをエレクトロポレーションのサンプルとした) を各々 2 μl ずつを加え (1 個のキューベット内にこの時点で 27 μl 入っている)、形質転換 (エレクトロポレーション) を行った。エレクトロポレーターである BTX-600 electro cell manipulator の条件は 1.8 kV、186 Ω、50 μF で行った。pulse 後の大腸菌浮遊液に S.O.C 培地を 1 個のキューベットにつき 1 ml 加え、37°Cで一時間振盪培養した。その後、コンピテンシー算出とシークエンス解析をするために培養液から 2 μl 使用して希釈系列を作製し、寒天培地に撒いた。その間、残りの培養液は、培養液

700  $\mu$ l に対し 80% (v/v) glycerol を 300  $\mu$ l 加え、-80°Cで三日間保存した。コンピテンシーを算出するとともに、寒天培地に生えたコロニーから、プラスミドを抽出し、シーケンス解析によって PNAfb に変異が導入されていることを確認した。

プラスミドを抽出するために、上記で-80°C保存していたグリセロールストックを解凍し、15 cm の LB/Amp プレート 1 枚につき、各ライブラリーにつき  $1 \times 10^5$  cfu (各ライブラリーの cfu は図 6 B 参照) となるように撚いて、13 時間培養後、4°C で一時間培地を固めた。プレートに生えたコロニーを 10 ml TB/Amp 培地で懸濁、回収し、さらにそのプレートを 5 ml の TB/Amp 培地でリンスしたのも合わせて回収した。コロニーを懸濁回収した培養液は、37°Cで 3 時間振盪培養した。その培養液から Plasmid DNA Purification Kit の Midi-prep (low copy protocol) を用いて pMXs-PNAfb(D)プラスミド (図 9) を精製した。

### <PNA 変異体 (ループ C&D) ライブラリー作製>

#### ・ pMXs-PNAfb(CD)構築

ループ C とループ D の個々にランダム変異を導入したライブラリーに加え、両ループにランダム変異を導入したライブラリーは、ループ C 及びループ D 単独に変異を導入した場合よりも特異性改変に大きく寄与するのではないかと考え、既存のループ C 及びループ D のコンストラクトを用いて、pMXs-PNAfb(CD)を作製した。設計の概略図は図 10 に示した (図 10)。

まず、ループ C ランダム塩基挿入部位を含む断片を Pac I (New England Biolabs) と HindIII (Toyobo) で切り出した (図 10)。ライブラリー C 初代、ライブラリー C 第二世代、ライブラリー C 第三世代①～④の 6 種類の pMXs-PNAfb(C)をそれぞれ 2.5  $\mu$ g (合計 15  $\mu$ g) を Pac I で一晩消化した。その後、HindIII を加えさらに一晩消化した。消化した溶液はブタノール濃縮で液量を濃縮し、目的の DNA をゲル抽出で精製し、PNAf(C)断片とした (図 10)。

PNAf(C)を挿入するための pMXs-PNAfb(D)を作製するために、Pac I、HindIII で切り出しを行った。ライブラリー D①、②、④の 3 種類の pMXs-PNAfb(D)をそれぞれ別個で 10  $\mu$ g を HindIII で一晩消化した。直線状になったプラスミドをゲル抽出で精製し、全量をさらに Pac I で一晩消化した。消化後の DNA を BAP 処理 (60°C、2 時間) で脱リン酸化し、目的の DNA 断片をゲル抽出で精製した。この pMXs-PNAfb(D)断片とした (図 10)。

PNAf(C)断片と pMXs-PNAfb(D)をライゲーション反応により繋ぎ合わせる。PNAf(C)を 500 ng、pMXs-PNAfb(D)①、②、④をそれぞれ 120 ng(トータル 360 ng)(モル比 7 : 1)と液量と等量の Ligation Mix を加えて、4℃で一週間ライゲーション反応を行った。

エレクトロポレーション法を用いて形質転換を行うために、ライゲーション反応液をエタノール沈殿により脱塩した。まず、沈降キャリアとして Yeast tRNA 15 ng と電解質である酢酸ナトリウムを終濃度 0.3 M で加えた。その後、-20℃で冷やしておいたエタノールを終濃度 70%で加え、ボルテックスミキサーにて攪拌し、4℃で 20 分間、20,400 g で遠心し、上清を捨てた。-20℃で冷やしておいた 70%(v/v)エタノールを 0.5 ml 加え、4℃で 10 分間、20,400 g で遠心し、上清を捨てる操作を 2 回繰り返した。室温で残留エタノールを揮発させた後、8 µl の精製水で DNA ペレットを溶解した。

ElectroMAX DH10B Cells にエレクトロポレーション法を用いて形質転換した。エレクトロポレーション用の冷やしておいた 4 つのキュベットに、DH10B 大腸菌液を 25 µl ずつとエタノール沈殿後の DNA 溶液（上記で 8 µl に溶解してあるので、各ライブラリーにつき 4 サンプルをエレクトロポレーションのサンプルとした）を各々 2 µl ずつを加え（一個のキュベット内にこの時点で 27 µl 入っている）、形質転換（エレクトロポレーション）を行った。エレクトロポレーターである BTX-600 electro cell manipulator の条件は 2.5 kV mode、1.8 kV、186 Ω、50 µF で行った。pulse 後の大腸菌浮遊液に S.O.C 培地を 1 個のキュベットにつき 0.8 ml 加え、37℃で一時間振盪培養した。その後、コンピテンシー算出とシーケンス解析をするために培養液から 2 µl 使用して希釈系列を作製し、寒天培地に撒いた。その間、残りの培養液は、培養液 700 µl に対し 80%(v/v)glycerol を 300 µl 加え、-80℃で三日間保存した。コンピテンシーを算出するとともに、寒天培地に生えたコロニーから、プラスミドを抽出し、シーケンス解析によって PNAfb に変異が導入されていることを確認した。

プラスミドを抽出するために、上記で-80℃保存していたグリセロールストックを解凍し、15 cm の LB/Amp プレート 1 枚につき  $1 \times 10^5$  cfu（ライブラリーの cfu は図 6 B 参照）となるように撚いて、13 時間培養後、4℃で一時間培地を固めた。プレートに生えたコロニーを 10 ml TB/Amp 培地で懸濁、回収し、さらにそのプレ

ートを 5 ml の TB/Amp 培地でリンスしたのも合わせて回収した。これを 500 ml のコルベンに分取し（一つのコルベンあたり 125 ml の液量）、37°Cで 3 時間振盪培養した。その培養液から Plasmid DNA Purification Kit の Midi-prep(low copy protocol)を用いて pMXs -PNAfb(CD)プラスミド（図 10）を精製した。

#### 4-3. PNA 変異体ライブラリーレポーター細胞（2B4-PNAfb）樹立

pMXs-PNAfb(C)、(D)、(CD) を 2B4 細胞にトランスフェクションし、レクチンライブラリーのレポーター細胞（2B4-PNAfb）を作製した。方法を以下に示す。

##### <トランスフェクション（ウイルス感染）>

Plat-E 細胞を 6-well plate(Becton Dickinson)二枚分（計 3.5 cm dish 12 well 分に相当）に各 well につき 2 ml の D10 培地で 7~9 割コンフルエントの状態を用意した。各 well につき、レトロウイルスベクター-PNA 変異体ライブラリープラスミド pMXs-PNAfb(C)または(D)または(CD)4  $\mu\text{g}^*$ と無血清培地 OPTI-MEM (Invitrogen) 250  $\mu\text{l}$  とを混ぜて室温で 5 分間静置した溶液（溶液①）と lipofectamine 2000(Invitrogen) 10  $\mu\text{l}$  と OPTI-MEM 250  $\mu\text{l}$  とを混ぜて室温で 5 分間静置した溶液（溶液②）を混和して 20 分間静置したもの（各 well に約 500  $\mu\text{l}$ 、この時 DNA : lipofectamine 2000=1 : 2.5）を添加し、2 日間培養した。上記 Plat-E 培養上清を回収後、4°C、2,380 g で遠心し、その上清をレトロウイルス液として用いた。ウイルスを感染させる細胞として 2B4 細胞を 3 ml の R10 培地を加えた 3.5 cm dish に  $5 \times 10^4$  個用意し、ポリブレン(Wako)を終濃度 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で添加した。2B4 細胞にレトロウイルス液 2 ml 添加し、2 日間培養した。その後、12 well 分の細胞を一つのプールとして回収してレポーター細胞（2B4-PNAfb）とした。

（\*）本研究では、ライブラリーC（初代）、ライブラリーC（第二世代）、ライブラリーC（第三世代）①~④、ループ D①~④、ループ C&D など複数のライブラリーの種類を構築したので、2B4-PNAfb 細胞も複数種作製している(図 11)。複数種のライブラリープラスミドを混ぜて細胞に同時にトランスフェクションする場合は、4  $\mu\text{g}$  中の内訳はライブラリーの規模に依存させたものとした。例えば、 $3 \times 10^6$  cfu のプラスミド A と  $1 \times 10^6$  cfu のプラスミド B を混ぜて 4  $\mu\text{g}$  とする場合、各プラスミドができるだけ同じ頻度で出現するように、プラスミド A が 3  $\mu\text{g}$  とプラスミド B を 1  $\mu\text{g}$  となるように混ぜることとする。

### ＜PNA 変異体発現 2B4 レポーター細胞 (2B4-PNAfb) 上のレクチン発現確認＞

今回作製した 2B4-PNAfb は、発現するレクチンの更に N 末に myc (アミノ酸配列：EQKLISEEDL) が発現するようになっている。つまり、myc の発現を指標に、発現率及び発現量を調べることができる。

(細胞表面上のレクチンの発現確認法)

2B4-PNAfb 細胞を  $1 \times 10^5$  細胞と抗 myc 抗体 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) 20  $\mu\text{l}$  を 96-well 細胞培養用マイクロテストプレート平底 (Becton Dickinson) に加え、氷上で 30 分間反応させた。PBS(-)を 150  $\mu\text{l}$  加えて遠心し (510 g、3 分間)、結合しなかった抗体を洗浄した。この操作を二回繰り返した。その後、GAM-PE (10  $\mu\text{g/ml}$ ) を細胞に 20  $\mu\text{l}$  加え、氷上で 30 分間反応させた。PBS(-)を 150  $\mu\text{l}$  加えて遠心し (510 g、3 分間)、結合しなかった抗体を洗浄した。FACS buffer に懸濁後、PI を終濃度で 0.5  $\mu\text{g/ml}$  となるように加え、フローサイトメトリーにより PE 蛍光強度を測定することで発現を確認した。

(細胞上に提示したレクチンを介してレポーター細胞に架橋刺激が入るかの確認)

96-well ELISA plate (Greiner) に抗 myc 抗体 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) を 50  $\mu\text{l}$  加え、4°C で一晩固相化した。各 well を PBS(-)で二度洗い、2B4-PNAfb 細胞を各 well に  $5.0 \times 10^5$  個/R10 200  $\mu\text{l}$  を加え、12 時間培養した。培養上清を回収後、さらに接着している細胞を PBS-EDTA (0.5 mM) で剥がして回収した。フローサイトメトリーで GFP 蛍光強度を測定することで、架橋刺激が入るか確認した。

### ＜PNA 変異体ライブラリー発現レポーター細胞 (2B4-PNAfb) の濃縮＞

樹立した 2B4-PNAfb 細胞中にレクチンを提示した細胞の割合が少ない場合、その細胞集団から、レクチンが提示された細胞を細胞表面の myc の発現を指標に濃縮することができる。

2B4-PNAfb 細胞を  $1.5 \times 10^7$  細胞回収し、PBS(-)で洗った後、抗 myc 抗体 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) を 500  $\mu\text{l}$  加え、氷上で 30 分間反応させた。PBS(-)で洗った後、GAM-PE (10  $\mu\text{g/ml}$ ) を 500  $\mu\text{l}$  加え、氷上で 30 分間反応させた。PBS(-)と PBS-EDTA (0.5 mM) で一度ずつ細胞を洗った後、3%FBS を含む PBS-EDTA (0.5 mM) で  $1.0 \times 10^6$  cells/ml の濃度になるように懸濁し、セルストレーナー付き 5 ml チューブ (Becton Dickinson) 通した。細胞の濃縮には FACS vantage SE (Becton Dickinson) を



使用して、PE の蛍光強度の強い細胞を無菌ソーティングした。回収の際には、R10 を 2 ml 加えた 5 ml チューブにを使用した。

回収した細胞は遠心 (4°C、440 g、5 分間) 後に上清を 9 割除き、残液を R10 培地に懸濁し、細菌のコンタミを抑えるために、Gentamicin (Sigma) を (終濃度 100 µg/ml) で加え培養した。

#### ＜糖鎖ポリマーを用いたレポーターアッセイ＞

2B4-PNAfb 細胞表面に発現しているレクチンが糖鎖と相互作用するかを確認するために、2B4-PNAfb 細胞における GFP の発現を指標に相互作用を検出するレポーターアッセイを行った。糖鎖をプレート上に固定化するために、ポリアクリルアミド (PAA) が結合している糖鎖ポリマー (GlycoTech) を用いた。用いた糖鎖の種類を以下に示した。これら糖鎖ポリマーは、オートクレーブで滅菌した PBS(-) で 1 mg/ml に調製し、-80°C にて凍結保存した。

- ①T 抗原 (Gal $\beta$  1-3GalNAc $\alpha$ -PAA)、②Tn 抗原 ( $\alpha$ GalNAc-PAA)、③Le<sup>c</sup> 抗原 (Gal $\beta$  1-3GlcNAc $\beta$ -PAA)、④Gal $\alpha$  1-3GalNAc $\alpha$ -PAA、
- ⑤GalNAc $\alpha$  1-3Gal $\beta$ -PAA、⑥Gal $\alpha$  1-3Gal $\beta$ -PAA、
- ⑦GlcNAc $\beta$  1-3GalNAc $\alpha$ -PAA、⑧Le<sup>x</sup> 抗原 [Gal $\beta$  1-4(Fuc $\alpha$  1-3)GlcNAc $\beta$ -PAA]
- ⑨ $\alpha$ Man-PAA、⑩ $\beta$ GlcNAc-PAA、⑪Fuc $\alpha$  1-3GlcNAc $\beta$ -PAA、⑫Fuc $\alpha$  1-4GlcNAc $\beta$ -PAA、⑬ $\alpha$ Fuc-PAA、⑭Gal $\beta$  1-3(NeuAc $\alpha$  2-6)GalNAc $\alpha$ -bio-PAA、
- ⑮NeuAc $\alpha$  2-3Gal $\beta$  1-3GalNAc $\alpha$ -bio-PAA

96-well ELISA plate に糖鎖ポリマー (10 µg/ml) を 50 µl、ポジティブコントロールとして抗 myc 抗体 (5 µg/ml) を 50 µl、ネガティブコントロールとして PBS(-) を 50 µl 加え、4°C で一晩、固相化した。その後、各 well を PBS(-) 200 µl で 2 回洗い、各 2B4-PNAfb 細胞を R10 培地 200 µl 中に 5×10<sup>4</sup> cells となるように加え、37°C、CO<sub>2</sub> 5% 存在下で 12 時間培養した。培養した細胞の培養上清 (浮遊細胞) を全量回収し、さらに付着している細胞を PBS-EDTA (0.5 mM) で剥がして回収した。PI を終濃度 0.5 µg/ml で加え、GFP の蛍光強度をフローサイトメーターにより測定した。

#### 4-4. 新規レクチンを提示したレポーター細胞 (2B4-PNAfb) のスクリーニング

##### <糖鎖ポリマーを用いたレポーター細胞 (2B4-PNAfb) のスクリーニング>

糖に結合しうるレクチンを細胞表面に提示している 2B4-PNAfb 細胞を、GFP の発現を指標にスクリーニングすることを試みた (図 12A)。

特注した 6-well ELISA plate (Iwaki) に、各糖鎖ポリマー (10  $\mu$ g/ml) を 1 ml 加えて、4°Cで一晩、固相化を行った。翌日、well を PBS(-)で洗い、2B4-PNAfb 細胞を  $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$  cells/R10 3 ml を加え、12 時間培養した。培養した 2B4-PNAfb 細胞を回収し、PBS(-)と PBS-EDTA (0.5 mM) でそれぞれ一度ずつ洗った後、3% FBS を含む PBS-EDTA (0.5 mM) で  $1.0 \times 10^6$  cells/ml 細胞を懸濁し、大きな固形物を除くため、セルストレーナー付き 5 ml チューブに通した。その後、細胞を FACS vantage SE 使用して、細胞内におけるレポーター遺伝子である GFP 発現の高いものを選択的に回収した。実際には、GFP 蛍光強度の上位約 1~3% にゲートをかけて、R10 の入ったの 5 ml チューブに回収した。

回収した細胞は遠心 (440 g、5 分) 後に上清を 9 割除き、残液を R10 培地に懸濁しら。無菌ソーティングだが、雑菌のコンタミは避けられないため、3.5 cm dish に Gentamicin を (終濃度 100  $\mu$ g/ml) で加え、37°C、CO<sub>2</sub>5% 下で再培養して増殖させた。

各糖鎖でのスクリーニングは、この操作を 2~4 回繰り返すことで、糖鎖に結合しうるレクチン発現 2B4-PNAfb 細胞を濃縮した。初回のスクリーニングは、ライブラリーのバリエーションを多く含むため、各糖鎖につき、6-well プレート一枚分 (6 well 分) を使用して細胞を培養し、約 50,000 細胞を回収した。二回目以降は、6-well プレートの 2~3 well 分を使って細胞を培養し、約 30,000~50,000 細胞を回収した。

##### <限界希釈による細胞のクローニング>

Le<sup>c</sup> 抗原 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ )、Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 、GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 、 $\alpha$  Fuc、Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc $\beta$ 、Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$  の 6 種類の糖鎖でスクリーニングした 2B4-PNAfb 細胞に関しては、スクリーニングを 3 回繰り返して行った後での細胞と糖鎖とのレポーターアッセイの結果より、糖鎖に結合しうるレ

クチン発現 2B4-PNAfb 細胞が濃縮された。本項ではさらに、糖鎖に結合しうるレクチン発現 2B4-PNAfb 細胞のクローニングを行った。

各濃縮後 2B4-PNAfb 細胞を 5 cells/ml になるように R10 培地に希釈し、各糖鎖スクリーニングにつき、96-well 細胞培養用プレート (Becton Dickinson) 2 枚に (1well あたり 200  $\mu$ l の細胞懸濁液を撹いた) 細胞を撹いて、37°C、CO<sub>2</sub> 5%存在下で一週間培養した。増えてきた細胞の中から、培養上清を 200  $\mu$ l 回収後、さらに PBS-EDTA (0.5 mM) 50  $\mu$ l で付着している細胞を剥がして回収した。24-well 細胞培養用プレート (Becton Dickinson) に 2 ml の R10 を入れておき、回収した細胞液 250  $\mu$ l 加えて 37°C、CO<sub>2</sub> 5%存在下で二日間培養した。細胞の培養上清 (浮遊細胞) を回収し、さらに PBS-EDTA (0.5 mM) 500  $\mu$ l で付着している細胞を剥がして回収し、R10 を 5 ml 加えた 6-well 細胞培養用プレートに加えて、37°C CO<sub>2</sub> 5%で二日間培養した。この時点で増えてきたクローン化細胞をそれぞれプールし、96-well プレートの座標よりクローン名を名付けた。各クローンについて、レポーターアッセイを行った。＜レポーター細胞と糖鎖ポリマーとの結合試験＞参照

#### ＜レポーター細胞からのゲノム抽出＞

クローン化した 2B4-PNAfb 細胞に発現している糖結合活性をもつレクチンの塩基配列を同定するために (図 12)、クローンの中で、特に、Le<sup>c</sup>抗原

(Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ ) では、クローン名 2A1、2A10、2C1、2H10 の 4 種類、Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$  では、クローン名 1B12、2B1、2B7、2H4 の 4 種類、GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$  では、クローン名 1D2、1G11、1H3、2G4、の 4 種類、Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc $\beta$ では、20-7、20-14 の 2 種類、 $\alpha$ Fuc では、C18-2、C18-3、C18-4、c18-6、C18-8 の 5 種類、Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$ では、1B5、1B6、2C2、2D4、2C9、2C3、1D11 の 7 種類のゲノムを抽出した。各クローン化された細胞を 1~2 $\times$ 10<sup>6</sup> cells 用意し、Qiagen flexi gene DNA Kit (Qiagen)を用いて、ゲノムを抽出した。方法は添付されているプロトコールに従った。

#### ＜ゲノムダイレクト PCR＞

スクリーニングした 2B4-PNAfb 細胞から、糖結合活性を持つ改変レクチン遺伝子配列を同定するために、抽出したゲノムを鋳型にして、ダイレクト PCR を行った。

プライマーには、pMXs に再度クローニングしてモノクローナル 2B4-PNAfb 細胞を作製するために、Fw に EcoR I サイトを、Rv に Xho I サイトを付加したもの

を使用した。以下に配列を示す。

PNA-F (EcoR I) 5'-cggaattcgccgaaacagtttccttc-3'

PNA-R (Xho I) 5'-ccgctcgagtgcaacttgccatattcat-3'

※プライマー中の制限酵素認識部位は斜体で示した。

ゲノム DNA 1 µg を鋳型に dNTPs 終濃度 0.2 mM、MgSO<sub>4</sub> 終濃度 1 mM、リン酸化プライマー Mixture を終濃度 0.4 µM (項目<プライマーのリン酸化>参照)、KOD plus 0.8 U、1×KOD plus Buffer を 40 µl の系で調製して、94°C 2 分間熱変性処理し、94°C で 15 秒間、58°C で 30 秒間、68°C で 1 分間のサイクルを 30 サイクル繰り返し、最後に 68°C で 7 分間伸長反応を行った。

#### <pBlueScript II SK(+)へのサブクローニング>

ゲノムダイレクト PCR で得た DNA 断片をゲル抽出・精製し、pBlueScript II SK(+) にサブクローニングした。pBlueScript II SK(+) (Stratagene) を Sma I (Toyobo) 及び alkaline phosphatase (*E.coli* C75) 処理したベクター 50 ng と<ゲノムダイレクト PCR>で得た PCR 産物インサート 100 ng を混ぜ、(モル比でベクター：インサート=1:7.5) その溶液と等量の Ligation Mix を添加して、16°C で 2 時間ライゲーション反応をさせ、DH5α に形質転換した (<ライゲーション反応～形質転換>参照)。得られたシングルコロニーから、プラスミドを抽出し、シーケンス解析を行い、塩基配列を確認した。

#### <モノクローナル 2B4-PNAfb 細胞作製用発現ベクター pMXs 構築>

限界希釈でクローン化した細胞には、複数の改変レクチン候補遺伝子が挿入されていたため、個々の遺伝子について糖結合活性があるか調べる必要があった。<pBlueScript II SK(+)へのサブクローニング>で得られた塩基配列のうち、塩基脱落や終止コドンを含まない有効なリーディングフレームを持つ変異体について、それぞれ個別の 2B4-PNAfb 細胞を作製するために、pMXs へクローニングした。作製手順は以下に示す。まず、<pBlueScript II SK(+)へのサブクローニング>で作製した 18 種類の PNAfb-pBlueScript II SK(+) を EcoR I、Xho I (Toyobo) 処理した。後に、ゲル抽出・精製し、挿入する DNA 標品とした。ベクターには、pMXs-PNA を EcoR I、Xho I 処理し、ゲル抽出・精製したものをを用いた。(つまり、PNA (WT) の PNA 部位を入れ替える作業) 上述の処理を行ったベクター 50 ng とインサート 50 ng を (モル比にしてベクター：インサート=1:8) 4°C で 2 時間のライゲーション

ヨン反応の後、大腸菌 DH5 $\alpha$  に形質転換し（＜ライゲーション反応～形質転換＞参照）、その大腸菌のコロニーから pMXs-PNA 変異体プラスミドを抽出した（＜プラスミド抽出＞参照）。また、シーケンス解析により、それぞれの塩基配列を確認した（＜DNA シーケンス解析＞欄参照）。

#### ＜改変レクチン発現モノクローナルレポーター2B4 細胞（2B4-PNA 変異体）作製＞

作製した pMXs-PNA 変異体を 2B4 にトランスフェクションした。方法は以下に示す。

Plat-E 細胞を 3.5 cm dish (Becton Dickinson) に 2 ml の D10 倍地で 7~9 割コンフルエントの状態を用意した。変異体遺伝子の入ったレトロウイルスベクタープラスミド（pMXs-PNA 変異体）4  $\mu$ g と無血清培地 OPTI-MEM 250  $\mu$ l とを混ぜて室温で 5 分間置いた溶液（溶液①）と lipofectamine 2000 10  $\mu$ l と OPTI-MEM 250  $\mu$ l とを混ぜて室温で 5 分間置いた溶液（溶液②）を混和して室温で 20 分間静置した。その①+②溶液を用意しておいた Plat-E 細胞に添加し、2 日間培養した。

（DNA : lipofectamine 2000=1:2.5）上記 Plat-E 培養上清を回収後、4°C、2,380 g で遠心し、その上清をレトロウイルス液として用いた。ウイルスを 2B4 細胞に感染させるために、2B4 細胞を 3 ml の R10 培地を加えた 3.5 cm dish に  $5 \times 10^4$  個用意し、ポリブレンを終濃度 8  $\mu$ g/ml になるように添加した。2B4 細胞にウイルス液 2 ml 添加し、2 日間培養した。その後、回収して 2B4-PNA 変異体細胞とした。

#### ＜改変レクチン cDNA／アミノ酸配列の同定＞

作製した 2B4-PNA 変異体細胞は、発現確認を行い（＜2B4-PNAfb レポーター細胞上のレクチン発現確認＞参照）、レポーターアッセイを行うことで＜糖鎖ポリマーを用いたレポーターアッセイ＞、糖結合活性の有無を確認した。レポーターアッセイで糖結合活性が確認できたクローンに関しては、cDNA／アミノ酸配列を改変レクチンとして同定した。

### 4-5. 改変レクチン-ヒト Fc 融合タンパク質の作製

改変レクチンのレポーター細胞（2B4-PNA 変異体細胞）では、プローブとして扱うことが難しいため、組み換えタンパク質が必要であった。そこで、レクチンとヒト IgG の Fc 領域を融合したキメラタンパク質（図 13B）を作製することにした。CAG

プロモーターを有する pCAGGS ベクター[34]にレクチンとヒト Fc 領域の cDNA を組み込む方法を以下に示す(図 13A)。

ヒト IgG の Fc 領域の cDNA は、それを含んだ human IgG Fc/pME18s プラスミドとして大阪大学の荒瀬尚博士により分与していただいた。発現用ベクターには、pCAGGS ベクターを用いた。このベクターは、当研究室の卒業生亀田（2008 年修了）が pCAGGS ベクターにネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだコンストラクトに改変したため、G418 による薬剤セクションが可能となっている。

### <pCAGGS-hCD8ss-myc-lectin の構築>

レポーター細胞作製の時に使用した pMXs を鋳型に hCD8ss-myc-レクチン領域を増幅する PCR を行った。プライマーは以下のものを用いた。

hCD8ss-F (Mun I ) 5'-aacaattggccacgatgcggccac-3'

PNA-R (Xho I ) 5'-ccgctcgagtgcacttgccatattcat-3'

※制限酵素付加部位を斜体で示した。

PCR 溶液は、1 ×KOD plus buffer 中に、終濃度 0.2 mM dNTPs、1 mM MgSO<sub>4</sub>、0.5 μM リン酸化プライマー (Fw と Rv)、5 ng の pMXs-PNA、0.5 U KOD plus となるように混ぜ、精製水で最終的に 30 μl に調製した。反応条件は、94°C 2 分間で熱変性した後、94°C 30 秒間の熱変性、56°C 30 秒間のアニーリング、68°C 1 分間の伸長反応を 30 サイクル繰り返し、最後に再度 68°C で 7 分間伸長させた。増幅した DNA をゲル抽出し、精製した後に、pBlueScript II SK(+)を Sma I 及び alkaline phosphatase (*E.coli* C75)処理したベクターにサブクローニングした。作製した pBlueScript II SK(+)-hCD8ss-myc-PNA を M buffer (Takara) 中で Mun I (Takara)、0.01% BSA を加え消化し、アガロース電気泳動で切断を確認後、Xho I 消化した。その後、切断された hCD8ss-myc-PNA 断片をゲル抽出・精製し、インサートとした。pCAGGS を H buffer(Toyobo)中で、EcoR I と Xho I をダブル消化し、ゲル抽出・精製し、ベクターとした。hCD8ss-myc-PNA 断片を EcoR I と Xho I 処理済みの pCAGGS にクローニングし(<ライゲーション反応～形質転換>参照)、シーケンスを確認した。このコンストラクトは切断断片が compatible である EcoR I と Mun I という制限酵素で繋いだため、Ligation 以後は両酵素をもっても切断されない。以上、改変レクチン発現ベクター [pCAGGS-hCD8ss-Myc-lectin] を作製した。

## <Fc 融合タンパク質発現ベクターpCAGGS-hCD8ss-myc-lectin-hFc の構築>

pCAGGS-hCD8ss-Myc-lectin の lectin の cDNA の 3'側にヒト IgG の Fc 領域の cDNA を組み込み、レクチン-Fc 融合タンパク質作製用コンストラクトを作製する (図 13A)。

まず、Fc 領域をコードする cDNA 領域を PCR で増幅する。プライマーは以下のものを使用した。鋳型 cDNA には、河崎博士がヒト IgG の Fc 領域の cDNA を発現ベクターpRC/CMV に組み込んで構築したプラスミド (pRC/CMV-Myc-hIgG) を用いた。

hFc-Fw (Xba I +Xho I +Nhe I )

5'-aatctagactc*gag*ccccggggctagccccaatcttgtgac-3'

※ Xho I 認識部位を斜体で示した。

hFc-Rv (Sal I )

5'-ttgtc*gact*catttaccgcgagac-3'

※ Sal I 認識部位を斜体で示した。

PCR 溶液は、1 ×KOD plus buffer 中に、終濃度 0.2 mM dNTPs、1 mM MgSO<sub>4</sub>、1.6 μM プライマー (Fw と Rv)、5 ng の pRC/CMV-myc-hIgG、0.5 U KOD plus となるように混ぜ、精製水で最終的に 30 μl に調製した。反応条件は、94°C 2 分間熱変性した後、94°C 15 秒間の熱変性、56°C 30 秒間のアニーリング、68°C 1.5 分間の伸長反応を 30 サイクル繰り返し、最後に再度 68°C で 7 分間伸長させた。エタノール沈殿後、PCR 産物をリン酸化し、ゲル抽出・精製した。精製した human IgG Fc 断片は pBlueScript II SK(+)を Sma I 及び alkaline phosphatase (*E.coli* C75) 処理したベクターにサブクローニングした。作製した pBlueScript II SK(+)-hFc は H buffer 中で Xho I と Sal I (Toyobo)消化し、ゲル抽出・精製し、human IgG Fc 断片とした。

pCAGGS-hCD8ss-Myc-lectin を Xho I 消化し、ゲル抽出・精製し、ベクターとした。Xho I ・Sal I 消化後の human IgG Fc 断片と Xho I 処理済みの pCAGGS-hCD8ss-Myc-lectin にクローニングし (<ライゲーション反応～形質転換>参照)、シーケンスを確認した。このコンストラクトは切断断片が compatible である Xho I と Sal I という制限酵素で繋いだため、Ligation 以後は両酵素をもっ

ても切断されない。つまり、EcoR I と Xho I でレポーター細胞作製用コンストラクトである pMXs より切り出したレクチン断片を、直接組み換えタンパク質作製の pCAGGS コンストラクトに付け替えることができる汎用性の高いベクターである。以上、改変レクチン Fc 融合タンパク質発現ベクター

[pCAGGS-hCD8ss-Myc-lectin-hFc] とした。

以後、各変異体 Fc 融合タンパク質作製用コンストラクトの作製には以下の方法で作製した。pCAGGS-hCD8ss-Myc-lectin-hFc のレクチン部位を EcoR I と Xho I で切り出してベクターとし、変異体の部位は pMX s から同様に EcoR I と Xho I で切り出しインサートした。このベクターとインサートを（＜ライゲーション反応～形質転換＞参照）に従って作製した。

### ＜改変レクチン Fc 融合タンパク質安定発現株の樹立＞

細胞に改変レクチン Fc 融合タンパク質を産生させるために、作製した pCAGGS-hCD8ss-Myc-lectin-hFc を HEK293 細胞に導入し、薬剤セクションを行うことで、改変レクチン Fc 融合タンパク質安定発現細胞を作製した。方法は以下に示した。

3.5 cm dish に HEK293 細胞を  $1 \times 10^6$  細胞/D10 2ml でまき、細胞を接着させ、8 割コンフになっていることを確認した。Lipofectamine 2000 を 5  $\mu$ l を 250  $\mu$ l の OPTI-MEM で希釈した（①液）。pCAGGS-hCD8ss-Myc-lectin-hFc を Sca I 処理し、線状化したプラスミド 2  $\mu$ g を 250  $\mu$ l の OPTI-MEM で希釈した（②液）。①液、②液をそれぞれ常温で五分以上静置した後、①液と②液を良く混ぜ、さらに室温で 20 分間以上静置した。①+②液 500  $\mu$ l を準備しておいた HEK293 細胞に加え、2 日間培養した。

Fc 融合タンパク質の発現は、ウェスタンブロッティングを行い確認した。まず、培養上清を 500 g、10 分で遠心し、その上清を用いて SDS-PAGE を行い、タンパク質を PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜を 3% Difco Skim Milk（Becton Dickinson）を含む TBS-T 中にて 4°Cで一晩、ブロッキングを行った。ブロッキング後の PVDF 膜は、TBS-T で 6000 倍希釈した AP 標識抗ヒト IgG 抗体を室温で 1 時間反応させた。その後、PVDF 膜を TBS-T で 3 回洗浄し、終濃度 0.33 mg/ml で nitroblue tetrazolium (NBT；和光純薬工業) と 0.17 mg/ml で 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate disodium salt (BCIP; ICN)を含む 100



mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 溶液を加え発色させた。

Fc 融合タンパク質の発現が確認できた細胞は、6 cm dish に拡大培養し、同時に G418 (wako) を 1 mg/ml の濃度になるように加え、2 週間の薬剤セレクションを行った。維持中は 3 日毎にメディウムを新しいものに交換した。セレクション後の細胞を安定発現細胞株とした。

#### ＜改変レクチン Fc 融合タンパク質の精製＞

Protein A CIP Resin 1ml (GenScript) を用いて、樹立した安定発現細胞株の培養上清から、改変レクチン Fc 融合タンパク質のアフィニティー精製を行った。精製装置は、AKTA explorer (GE Healthcare) を用い、流速は全てカラム内圧力が 0.3 MPa を超えないように 0.5~1.0 ml/min の範囲で行った。また、用いる Buffer は脱気し、0.22 µm のフィルターを通したものを使用した。方法を以下に示す。

Binding Buffer には、20 mM リン酸バッファー pH 8.0 を用いた。培養上清は、遠心後 (8,000 g、15 分間)、その上清を 0.22 µm のフィルターを通してから、カラムに 0.5 ml/min の流速で負荷した。Elution Buffer には、0.1 M グリシン-塩酸 (pH 2.8) を用いた。Elution Buffer で 0~70 % の直線的グラジエントをかけ、目的のピークを分取した。溶出されたフラクションは、1M Tris-HCl pH 8.0 で直ちに中和した。精製度は SDS-PAGE によって確認し、目的のタンパク質をまとめて、PBS に完全に透析した。透析後のタンパク質濃度は BCA Protein assay Kit (Thermo) によって決定した。タンパク質サンプルには、0.1 % (w/v) Sodium azide (Wako) を加え、4°C 保存、長期保存する場合は -80°C にて保存した。

#### 4-6. 改変レクチンの評価

作製した改変レクチン Fc 融合タンパク質の糖結合特異性、細胞結合性を評価した。

##### ＜糖鎖アレイ解析＞

作製した改変レクチン-Fc 融合タンパク質を用いて、糖結合特異性を詳細に調べるために、産業技術総合研究所の平林博士、舘野博士の協力のもと、糖鎖アレイ解析 [35] を行った。本研究で使用する糖鎖アレイ上 (GP array ver. 4.2) には、96 種類の糖鎖または糖タンパク質が固定化されており、網羅的に糖結合特異性のパターンを比較することができる。糖鎖アレイ上にスポットされている糖鎖または糖タンパク質は表と図に示した (表 1 & 図 14)。方法を以下に示した。

作製した改変レクチン-Fc 融合タンパク質を Probing buffer [25 mM Tris-HCl

(pH 7.4)、0.15 M NaCl、1% (v/v) Triton-X100、1 mM  $\text{MnCl}_2$ 、1 mM  $\text{CaCl}_2$ ] で 50  $\mu\text{g/ml}$ 、20  $\mu\text{g/ml}$  または 10  $\mu\text{g/ml}$  に希釈し、100  $\mu\text{l}$  または 60  $\mu\text{l}$  を 1 つのスポットにアプライし、一晩、20°Cで反応させた。コントロールとして、Probing buffer をスポットにアプライした。タンパク質溶液を除去し、Probing Buffer で洗浄後、(1  $\mu\text{g/ml}$ ) Cy3 標識 anti-hlgG–Fc specific 二次抗体を 100  $\mu\text{l}$  添加し、20°C で 3 時間反応させた。スポットを Probing Buffer で洗浄後、スキャナーで結合を検出した。スキャナーには、エバネッセント波励起型蛍光スキャナーである GlycoStation Reader 1200 (GlycoTechnica) を用い、Cy3 モードでスキャンした。

### ＜改変レクチンのヒト細胞株との結合性評価＞

創出した改変レクチンをプローブとしてどのように応用できるか調べるために、がん細胞との当研究室で所持している 28 種類のヒトの細胞株 (表 2) との結合試験を行った。方法を以下に示した。

Dish に接着している細胞は、0.5 mM EDTA を含んだ PBS を加えて、剥がしてから回収した。浮遊している細胞は直接回収した。PBS で一度細胞を洗浄してから、 $1 \times 10^5$  cells/well で 96-well U 底プレートにまいた。20  $\mu\text{l}$  の改変レクチン Fc 融合タンパク質(10  $\mu\text{g/ml}$ )を各 well に加え、氷上で 30 分間静置した。FACS buffer で細胞を一度洗浄した後、20  $\mu\text{l}$  の PE 標識抗ヒト IgG Fc 抗体(5  $\mu\text{g/ml}$ )を各 well に加え、氷上で 30 分間静置した。FACS buffer で細胞を二度洗浄後、PI を終濃度 0.5  $\mu\text{g/ml}$  となるように加え、PE 蛍光強度を FACS Calibur で測定した。三重測定で行い、SD を算出した。

シアル酸の有無を検討するために、細胞のシアリダーゼ処理を行い、結合試験に供した。細胞を回収後、PBS で細胞  $3 \times 10^6$  cells を 50  $\mu\text{l}$  に懸濁し、5 mU の Neuraminidase from *Arthrobacter ureafaciens*(Nacalai)を加え、37°C、1 時間静置した。細胞を PBS で洗浄した後、通常通りの結合試験を行った。この時、シアル酸結合性レクチンとしてビオチン標識 SSA(5  $\mu\text{g/ml}$ )(J オイルミルズ)と、当研究室で精製された MAH を EZ-Link Sulfo-NHS-biotin (Thermo)を用いて (付随説明書に従い) ビオチン標識したレクチン(5  $\mu\text{g/ml}$ )も同時に細胞に対する結合試験に供した。ビオチン化レクチンの場合は、20  $\mu\text{l}$  の Streptavidin-PE (5  $\mu\text{g/ml}$ ) (Biolegend) で検出した。

## 5. 結果

### 5-1. PNA 変異体ライブラリー (pMXs-PNAfb) 作製

マメ科レクチンはファミリー間でアミノ酸配列に、高い相同性を持っている[19]。しかし、その糖結合特異性は各レクチンによって異なっており、糖結合特異性を定めているのはわずか数アミノ酸だと考えられる。本研究では、可変領域で糖結合特異性を担うと言われる糖結合部位のループ C 及びループ D においてランダム変異導入変異体ライブラリーを作製し、新規糖結合活性を持つタンパク質をスクリーニングすることを考えた。

当研究室では、ピーナッツの種子から mRNA を抽出し、マメ科レクチンの一種である PNA の cDNA をクローニングした。クローニングした cDNA はアミノ酸レベルでいくつかの変異が見られた。データベース (Uniprot entry P02872) に登録されているアミノ酸配列と比較すると、L212R、G213A はマイナーなバリエーションとして報告があったが[36]、H116Y は報告のないバリエーションであった (図 4、図 8)。この PNA の cDNA をレトロウイルスベクター pMXs に組み込み、図 3 で示したように N 末から myc タグ、レクチン領域、NKp46 のストーク領域、CD8 $\alpha$  の膜貫通領域、細胞内シグナル伝達領域である CD3 $\zeta$  をそれぞれ融合した膜貫通型キメラタンパク質として発現させるコンストラクトを構築した (図 3)。細胞表面にレクチンを提示したレポーター細胞を作製するために、レトロウイルス発現系を用いた。pMXs-PNA をウイルスパッケージング細胞株 Plat-E に導入し、レトロウイルス液を作製した。作製したレトロウイルスを 2B4 細胞に感染させ、PNA レポーター細胞を樹立した (2B4-PNA)。レトロウイルスは増殖中の細胞に感染し、宿主ゲノムに遺伝子を挿入するため、樹立したレポーター細胞は安定発現細胞株として用いることができる。PNA はもともと  $\beta$  Gal の中でも、特に T 抗原 (Gal $\beta$  1-3GalNAc $\alpha$ ) を特異的に認識することが知られている[31,32]。樹立した 2B4-PNA 細胞は、T 抗原 (Gal $\beta$  1-3GalNAc $\alpha$ )-PAA を固相化したプレートで 12 時間以上培養すると、細胞内に GFP が発現することを確認した (図 5)。また、抗 myc 抗体を固相化したプレートで培養した場合も細胞内に GFP を発現することが確認できたが、 $\alpha$  Gal 末端を持つ Gal $\alpha$  1-3Gal $\beta$ -PAA を固相化したプレートでは、GFP 発現は見られなかった (図 5)。以上より、細胞外に提示された PNA が T 抗原 (Gal $\beta$  1-3GalNAc $\alpha$ ) をリガ

ンドとして特異的に認識していることが示唆され、レポーターアッセイがワークすることを確認できた。レポーター細胞のアッセイ系を樹立できた経緯から、鋳型には PNA を用いてライブラリーを作製することにした。

ループ C 初代ライブラリーとして、ループ C の PNA の 127 残基目のアスパラギン (127N) を保存し、124~126 番目、128~131 番目のアミノ酸の計 7 アミノ酸にランダムに変異を導入したライブラリーを作製した (図 6)。127N は、金属イオンと配位することで糖結合ポケットを成し、マメ科レクチンファミリーではどのレクチンにも保存されている (図 2 B) 糖との結合に重要なアミノ酸であることから [37]、設計の際には保存した。ライブラリー構築の概略は図 7 に図示した (図 7)。PNA をランダム変異導入部位で二分し、ランダム塩基導入プライマーを用いた PCR で変異導入部位である PNAf 部位を増幅し、通常のプライマーで PNAb 部位を増幅した。ライゲーション反応でそれぞれの領域を繋ぎあわせ、pMXs ベクターを構築した (pMXs-PNAfb-初代 C)。コンピテンシー算出により、総じて  $4.0 \times 10^6$  cfu (図 6 B) の規模のライブラリープラスミドを作製した。

ループ C 第二世代ライブラリーとして、大きく糖結合特異性を変化させたレクチン (例えば、ガラクトース結合性からマンノース結合性に变化したようなレクチン) を創出するためには糖結合ポケットの構造を大きく変化させることが有効なのではないかと考え、初代ライブラリーの形質に加え、127N をその類似アミノ酸であるアスパラギン酸 (D)、グルタミン (Q)、グルタミン酸 (E)、ヒスチジン (H) という金属イオンと配位可能なアミノ酸に変化させたライブラリーを設計した。作製方法は、用いたランダム塩基導入プライマー以外は pMXs-PNAfb 初代と同様の作製法であり、図 7 に概略を示した (図 7)。コンピテンシーを算出し、総じて  $3.0 \times 10^6$  cfu (図 6 B) の規模のライブラリープラスミドを構築した (pMXs-PNAfb-第二世代 C)。

ループ C 第三世代ライブラリーとして、初代・第二世代ライブラリーの形質に加え、ループ長を変化させたライブラリーを作製することにした。マメ科レクチンの一次構造アライメントにおいて、*N*-アセチル基を持った嵩高い糖やシアル酸に糖結合特異性をもつレクチングループのループ C のループ長は、Gal や Man などの単糖に糖結合特異性を持つレクチングループのものと比べていくらか長いという特徴がある (図 2 B) [37]。以上より、GalNAc や GlcNAc に糖結合特異性を持つようなレクチンを得るには、ループ長を変化させたライブラリーを設計することが有効なのでは

ないかと考え、1 アミノ酸残基分 (①)、2 アミノ酸残基分 (②)、3 アミノ酸残基分 (③)、4 アミノ酸残基分 (④) とそれぞれ拡張したライブラリーを設計した。また、127N に関しては、N の他にも、D、E、H、Q を含むように設計した。この 127 残基目に関しては、コドンの関係でリジン (K) も含まれる。作製概略は、ランダム導入プライマー以外は、前述した (初代) や (第二世代) のライブラリー作製時と同じである。概略については図 7 に簡易的に図示した (図 7)。コンピテンシーを算出し、それぞれ① $1.8 \times 10^6$  cfu、② $1.6 \times 10^6$  cfu、③ $1.5 \times 10^6$  cfu、④ $2.0 \times 10^6$  cfu (図 6 B) の規模のライブラリーを構築した(pMXs-PNAfb-第三世代 C①～④)。

ループ C の他にもループ D も糖結合特異性を規定する重要なループと考えられる。また、マメ科レクチン一次構造のアライメントでは、ループ D の長さの特異性の関係にある相関が見られた (図 2 B)。例えば、ループ D の長さが短いレクチンでは特異性はマンノースのものが多いのに対し、長いものでは、ガラクトースに結合するレクチンが多い。本研究では、211 残基目～216 残基目までの部位にランダム変異を導入したものを作製し (D①)、さらにそのアミノ酸を 1 残基 (D②) または 2 残基 (D③) 付加したものを設計した。また、210 残基～216 残基目までにランダム変異を導入し、アミノ酸を 1 残基分除去したもの (D④) を設計した。作製概略は、図 9 に図示した (図 9)。構築には、PNA をループ D のランダム導入部位で二分し、ランダム塩基導入プライマーと通常プライマーを使用した PCR で PNAf(D) 及び PNAb(D)を増幅した。ライゲーション反応で、各断片を pMXs に繋ぎあわせ、pMXs ベクターを構築した。コンピテンシーをそれぞれ算出し、D① $1.4 \times 10^5$  cfu、D② $1.1 \times 10^5$  cfu、D③ $1.0 \times 10^5$  cfu、D④ $3.3 \times 10^5$  cfu (図 6 B)の規模のライブラリープラスミドを構築した(pMXs-PNAfb-D①～④)。

さらに、ループ C と D の両方を改変したライブラリーは、ループの C 及び D の単独のライブラリーよりも糖結合特異性の多様性がさらに広がると考え、ループ C と D の両方にランダム変異を導入したライブラリーを作製した。作製概略は図 10 に簡単に図示した (図 10)。まず、作製したループ C のライブラリー各種から、ランダム変異導入部位を含む cDNA の前半部位を制限酵素で切り出した。同様に、ループ D のライブラリー各種からループ D のランダム変異導入部位を残して、ループ C を含む cDNA の前半部位を同制限酵素で切り出し、除いた。切り出したループ C のランダム変異導入部位と、ループ D のランダム導入部位を残した pMXs を繋ぎ合わせ、

ループ C & D の両ループに変異を導入したプラスミドを構築した (pMXs-PNAfb-CD)。コンピテンシーを算出し、 $5.0 \times 10^6$  cfu の規模のライブラリープラスミドを構築した (図 6 B)。

以上のループ C とループ D の各ライブラリーを合算すると約  $2.0 \times 10^7$  cfu の規模のライブラリーを構築したことになる (図 6 B)。

## 5-2. PNA 変異体ライブラリーレポーター細胞 (2B4-PNAfb) 作製

作製した pMXs-PNAfb ライブラリーのプラスミド (図 6、7、9、10) を用いて、レトロウイルス発現系により 2B4 細胞にレクチンライブラリーを発現させた (2B4-PNAfb) (材料と方法 4-3 項参照)。2B4 細胞自体は、IL-2 プロモーター下流に GFP が導入されたマウスの胸腺由来細胞変異株である。2B4 細胞に pMXs-PNAfb を導入した細胞では、リガンドによりレクチン分子が架橋されると、C 末側の細胞内領域における CD3 $\zeta$  からのシグナルにより IL-2 プロモーターに作用する転写因子 NFAT が産生され、GFP 発現が誘導される。つまり、2B4-PNAfb はレポーター細胞として機能する (図 3)。今回、2B4-PNAfb 細胞の集団をライブラリーの種類毎に 7 種類作製した (図 11)。簡単に述べると、レトロウイルスパッケージング細胞である Plat-E 細胞にレトロウイルスベクター pMXs-PNAfb をリポフェクションし、ウイルスをパッケージングした。作製したウイルス液 (Plat-E 培養上清) を用いて、2B4 細胞に感染させ、レポーター細胞を作製した。以後この pMXs 由来のウイルスが感染したレポーター細胞は 2B4-PNAfb 細胞と記載する。これら細胞上のレクチン発現率は、myc タグを指標にフローサイトメトリーで解析した。その概略を以下に記述する。

### <ライブラリー C (初代) レポーター細胞 (2B4-PNAfb-初代 C) 作製>

レトロウイルスベクター pMXs-PNAfb-初代 C のプラスミドを 2B4 細胞にレトロウイルス感染によって導入した直後の 2B4-PNAfb-初代 C 細胞上のレクチン発現率は約 20% と低く (図 11A)、スクリーニング効率が良くないと判断したため、セルソーターを用いてレクチンの発現している細胞を、myc タグを指標に濃縮した (材料と方法 4-3 項参照)。結果的に 90% 以上の発現率を有した 2B4-PNAfb-初代 C 細胞集団とした (図 11A)。この濃縮した細胞をスクリーニングに用いた。

### <ライブラリー C (第二世代) レポーター細胞 (2B4-PNAfb-第二世代 C)>

## 作製＞

レトロウイルスベクターpMXs-PNAfb-第二世代 C をレトロウイルス感染によって 2B4 細胞に導入した 2B4-PNAfb-第二世代 C 細胞上のレクチン発現率は約 30% と低く（図 11B）、スクリーニング効率が良くないと判断したため、セルソーターを用いてレクチンの発現している細胞を濃縮した（材料と方法 4-3 項参照）。結果的に 50% 弱の発現率を有した 2B4-PNAfb-第二世代 C 細胞集団とした（図 11B）。この濃縮した細胞をスクリーニングに用いた。

## ＜ライブラリーC（第三世代）レポーター細胞（2B4-PNAfb-第三世代 C）作製＞

レトロウイルスベクターpMXs-PNAfb-第三世代 C①～④の 4 種類をミックスしたプラスミドをレトロウイルス感染によって 2B4 細胞に導入した 2B4-PNAfb-第三世代 C 細胞上のレクチン発現率は約 15% と低く（図 11C）、スクリーニング効率が良くないと判断したため、セルソーターを用いて myc タグを指標にレクチンの発現している細胞を濃縮した（材料と方法 4-3 項参照）。結果的に 90% 以上の発現率を有した 2B4-PNAfb-第三世代 C 細胞集団とした（図 11C）。この濃縮した細胞をスクリーニングに用いた。

## ＜ライブラリーC（all）レポーター細胞作製（2B4-PNAfb-C-all）＞

ループ C に関するライブラリーのレトロウイルスベクタープラスミド全て（pMXs-PNAfb-初代 C、pMXs-PNAfb 第二世代 C・pMXs-PNAfb-第三世代 C①～④）をミックスしたプラスミドをレトロウイルス感染によって 2B4 導入し、構築した 2B4-PNAfb-C-all 細胞のレクチン発現率は約 15% であった（図 11D）。今回は、セルソーターを用いてレクチンの発現している細胞を濃縮したもの（図 11E）と、濃縮しないもの（図 11D）両方をスクリーニングに用いた。濃縮した 2B4-PNAfb-C-all 細胞は、約 40% の発現率であった（図 11E）。

## ＜ライブラリーD①②③レポーター細胞作製（2B4-PNAfb-D①②③）＞

3 種類のレトロウイルスベクターpMXs-PNAfb-D①、②、③を用い、ウイルス感染によって導入した 2B4-PNAfb-D①②③細胞上のレクチン発現率は約 25% であった（図 11F）。スクリーニングには、特に濃縮操作を行わず直接用いた。

## ＜ライブラリーD④レポーター細胞作製（2B4-PNAfb-D④）＞

レトロウイルスベクターpMXs-PNAfb-D④を 2B4 細胞にウイルス感染によって

導入した 2B4-PNAfb-D④ 細胞上のレクチン発現率は約 10%と低く (図 11G)、スクリーニング効率が良くないと判断したため、セルソーターを用いてレクチンの発現している細胞を、myc タグを指標に濃縮した (材料と方法 4-3 項参照)。濃縮後は、細胞表面のレクチン発現率は約 80%となった (図 11G)。この濃縮した 2B4-PNAfb-D④細胞をスクリーニングに用いた。

#### ＜ライブラリーC (all) とライブラリーCD レポーター細胞作製 (2B4-PNAfb-CD) ＞

ループ C のレクチンライブラリー 6 種類全て (pMXs-PNAfb-初代 C、pMXs-PNAfb-第二世代 C、pMXs-PNAfb-第三世代①②③④) と pMXs-PNAfb-CD の合計 7 種類のレトロウイルスベクターをミックスしたプラスミドをレトロウイルス感染によって 2B4 細胞に導入し、2B4-PNAfb-C-all-CD 細胞を作製した。2B4-PNAfb-C-all-CD 細胞上のレクチン発現率は、約 30%であった (図 11H)。この 2B4-PNAfb-C-all-CD 細胞を、濃縮操作を行わずに直接スクリーニングに用いた。

### 5-3. 2B4-PNAfb 細胞と様々な糖鎖ポリマーを用いたスクリーニング

5-2 項で作製した各 2B4-PNAfb 細胞集団を用いて、Tn 抗原 ( $\alpha$ GalNAc)、Le<sup>c</sup> 抗原 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ )、Le<sup>x</sup> 抗原 [Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc $\beta$ ]、GalNAc $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 、Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 、Gal $\alpha$ 1-3GalNAc $\alpha$ 、GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 、 $\alpha$ Man、 $\alpha$ Fuc、 $\beta$ GlcNAc、Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc $\beta$ 、Fuc $\alpha$ 1-4GlcNAc $\beta$ 、Sialyl-T 抗原 (NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ )、Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$  の 14 種類の糖鎖に結合しうる改変レクチンを発現した 2B4-PNAfb 細胞のスクリーニングを試みた。方法は、各糖鎖固相化プレートにおいて、2B4-PNAfb 細胞を一晩培養し、その後細胞内の GFP 蛍光強度を指標にセルソーターを用いて、糖鎖に結合しうる改変レクチンを発現した 2B4-PNAfb 細胞を選択的に回収した (図 12A)。このセルソーターを用いた濃縮操作は各糖鎖ポリマーにつき 2~4 回行い、各ステップのレポーターアッセイにおける細胞集団中の GFP 陽性率を、フローサイトメトリーを行って解析した。本論文で述べる GFP 陽性率とは、「レポーターアッセイにおける固相糖鎖 (有) 時陽性率-固相糖鎖 (無) 時陽性率」で定義した。

まず、ライブラリーC (初代) を発現させた 2B4-PNAfb-初代 C 細胞を用いて、



$\alpha$ GalNAc、Le<sup>c</sup> 抗原 ( $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta$ )、 $\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}\beta$ 、 $\text{GalNAc}\alpha 1-3\text{Gal}\beta$ 、 $\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}\beta$ 、 $\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha$  という6種類の糖鎖構造を認識するようなレクチンのスクリーニングを行った。三回のセルソーティング操作を経て、特に、Le<sup>c</sup> 抗原 ( $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta$ )、 $\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}\beta$  では約20%、 $\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha$  も10%以上のGFP陽性率を含む細胞集団となった(図15)。 $\alpha$ GalNAc、 $\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}\beta$ 、 $\text{GalNAc}\alpha 1-3\text{Gal}\beta$  では、各ステップ後の陽性率の増加は横ばいであったが、Le<sup>c</sup> 抗原 ( $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta$ )、 $\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}\beta$ 、 $\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha$  の3種類の場合、スクリーニング糖鎖上で培養するとGFP発現を誘導するレクチン発現2B4-PNAfb-初代細胞を濃縮することが出来た。

ライブラリーC 第二世代を発現させた2B4-PNAfb-第二世代C細胞では、 $\alpha$ GalNAc、Le<sup>c</sup> 抗原 ( $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta$ )、 $\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}\beta$ 、 $\text{GalNAc}\alpha 1-3\text{Gal}\beta$ 、 $\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}\beta$ 、 $\text{Gal}\alpha 1-3\text{GalNAc}\alpha$  の6種類の糖鎖構造を認識するようなレクチンのスクリーニングを行った。しかし、ライブラリーC (初代)からのLe<sup>c</sup> 抗原 ( $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta$ ) 結合レクチンのスクリーニング時と比較し、細胞ソーティング毎のGFP陽性率の増加は横ばいであり、ターゲット糖鎖を認識するようなレクチン発現2B4-PNAfb-第二世代C細胞の濃縮には至らなかった(図16)。

ライブラリーC 第三世代①～④を発現させた2B4-PNAfb-第三世代C細胞を用いて、 $\alpha$ GalNAc、 $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta$ 、 $\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}\beta$ 、 $\alpha$ Man、 $\beta$ GlcNAc、 $\text{Fuc}\alpha 1-3\text{GlcNAc}\beta$  の6種類の糖鎖構造を認識するようなレクチンのスクリーニングを行った。しかし、これらのスクリーニングでは、細胞ソーティング毎のGFP陽性率の増加は横ばいであった(図17)。ライブラリーC (初代)からのLe<sup>c</sup> 抗原 ( $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta$ ) 結合レクチンのスクリーニング時と比較し、ターゲット糖鎖を認識するようなレクチン発現2B4-PNAfb-第三世代C細胞の濃縮には至らなかった。

ライブラリーC 初代、第二世代、第三世代すべて混合して発現させた2B4-PNAfb-C- all細胞では、 $\text{Gal}\alpha 1-3\text{GalNAc}\beta$ 、 $\text{Fuc}\alpha 1-3\text{GlcNAc}\beta$ 、 $\text{Fuc}\alpha 1-4\text{GlcNAc}\beta$ 、 $\alpha$ Fuc、 $\alpha$ Man の5種類の糖鎖を認識するようなレクチンのスクリーニングを行った。当研究室卒業生田中(2013年度卒)との協力で、レクチン発現細胞の濃縮を行った細胞集団(図11E)では、 $\text{Gal}\alpha 1-3\text{GalNAc}\alpha$ 、 $\text{Fuc}\alpha 1-$

3GlcNAc $\beta$ 、Fuc $\alpha$ 1-4GlcNAc $\beta$ の3種類の糖鎖に結合するようなレクチンの濃縮を試みた。3回のソーティングを経て、Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc $\beta$ とGal $\alpha$ 1-3GalNAc $\alpha$ を認識するようなレクチン発現2B4-PNAfb-C-all細胞が約15%のGFP陽性率となるまで濃縮された(図18)。また、当研究室卒業生京藤(2012年度卒)との協力で、レクチン発現細胞の濃縮を行わなかった2B4-PNAfb-C-all細胞(図11D)を用いて、 $\alpha$ Manと $\alpha$ Fucに結合するようなレクチンをスクリーニングした。この場合は、レクチン発現細胞の濃縮操作を行わなかったため、ソーティング操作を4回行った。4回めのソーティングを経て、 $\alpha$ Fucを認識するようなレクチン発現2B4-PNAfb-C-all細胞がGFP陽性率5%に上昇し、濃縮されていることが示唆された(図18)。

ライブラリーDの①～③をすべて混合して発現させた2B4-PNAfb-D①②③細胞(図11F)では、京藤の協力で $\alpha$ Man、 $\alpha$ Fuc、 $\beta$ GlcNAcの3種類の糖鎖に結合しうるレクチンのスクリーニングを行った。ソーティング操作は4回行ったが、GFP陽性率の増加は横ばいであり、有意にターゲット糖鎖を認識するようなレクチン発現細胞の濃縮には至らなかった(図19)。

ライブラリーD④だけを発現させた2B4-PNAfb-D④細胞(図11G)では、 $\alpha$ Man、 $\alpha$ Fuc、Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc $\beta$ の3種類の糖鎖を認識するようなレクチンのスクリーニングを行った。3回のソーティング操作を行ったが、GFP陽性率の増加は横ばいであり、ターゲット糖鎖を認識するようなレクチン発現2B4-PNAfb-D④細胞の濃縮には至らなかった(図20)。

ライブラリーC初代、第二世代、第三世代①～④及び、ライブラリーCDのプラスミドを混合して発現させた2B4-PNAfb-CD細胞(図11H)では、NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 、Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$ 、GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 、Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ の4種類の糖鎖に結合しうるレクチンのスクリーニングを行った。Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$ の場合、三回のソーティングを経た細胞では、GFP陽性率において、約70%まで濃縮することが出来た(図21)。他のNeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ では三回、その他糖鎖では一回のソーティングを行ったが、GFP陽性率の増加は横ばいであった(図21A)。

また、ライブラリー(初代)を発現させた2B4-PNAfb-初代C細胞(図11A)及び、ライブラリーC(all)を発現させた2B4-PNAfb-C-all細胞(図11D)を混合し

て、Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$  結合性レクチンをスクリーニングした。セルソーティング二回を経て、GFP 陽性率は 50%程になった (図 31A)。

以上、網羅的に行ったスクリーニングの中でも、ライブラリーのループ C (初代) を導入したレポーター細胞を含んだ 2B4-PNAfb-C 初代、2B4-PNAfb-C-all、2B4-PNAfb-CD の 3 種類の細胞を用いたスクリーニングでは、ソーティング操作を数回経て、数種類の糖鎖で GFP 陽性細胞の増加が見られるものがあった (図 15、18、21、31A)。一方、ライブラリー C (第二世代、第三世代) 及び、ライブラリー D①~④を導入したレポーター細胞 (2B4-PNAfb-第二世代 C、2B4-PNAfb-第三世代 C、2B4-PNAfb-D①②③、2B4-PNAfb-D④) を用いたスクリーニングでは、数回のソーティング操作を経たが、GFP 陽性細胞の増加率は横ばいであり、ライブラリー C (初代) と比べると GFP 陽性細胞となる細胞を濃縮出来なかった (図 16、17、19、20)。最終的に、数回のソーティングを経て、10%以上の GFP 陽性率に至ったのは、最も高い 70%であった Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$  を初めとして、Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$  (23%)、Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$  (20%)、GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$  (12%)、Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc $\beta$  (17%)、Gal $\alpha$ 1-3GalNAc $\alpha$  (10%) 結合性レクチンのスクリーニング時であった。傾向として、Gal 末端でかつ単糖ではなく 2 糖以上のオリゴ糖では濃縮率が高いことが示唆された。また、ライブラリー C (初代) を含んだライブラリーを用いたスクリーニングでは、濃縮率が他より高いことが示唆された。

#### 5-4. 特異性改変レクチン遺伝子配列同定

##### ＜ライブラリー C (初代) を用いたスクリーニング～遺伝子同定＞

Le<sup>c</sup> 抗原 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ )、Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 、GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$  の各糖鎖に結合性を示すレクチンの遺伝子を同定するために、(5-3 項) で濃縮した 2B4-PNAfb-初代 C 細胞群 (図 15) を限界希釈法によってクローン化し、レポーターアッセイを試みた。まず、各スクリーニングにつき 12 クローン合計 36 個のクローンについて糖鎖とのレポーターアッセイを行った結果、スクリーニングに使用した糖鎖にはほとんど結合しなかった (図 22)。クローン化した細胞はほとんどスクリーニングに使用した糖鎖には結合しなかったが、セルソーターを用いて三回濃縮した段階では、確かにスクリーニングに使用した糖鎖に対する結合性を示していた (図 15)。

限界希釈でクローン化した 2B4-PNAfb-初代 C 細胞と言っても、1 種類のクローン化細胞のゲノムにレトロウイルスによって複数のレクチン遺伝子が挿入されているポリクローナルなレポーター細胞であると仮定すると、実際の遺伝子配列を単離し、モノクローナルなレポーター細胞を作製してレポーターアッセイを行わない限り、真の糖結合活性を測定することができない。本項目では、これらの限界希釈したクローン化細胞から 12 種類( $\text{Le}^c$  抗原:  $\text{Gal}\beta 1\text{-}3\text{GlcNAc}\beta$  でスクリーニングしたもの 4 種類 [クローン名はそれぞれ 2A1、2A10、2C1、2H10]  $\text{Gal}\alpha 1\text{-}3\text{Gal}\beta$  でスクリーニングしたものを 4 種類 [クローン名はそれぞれ 2B1、1B12、2B7、2H4]、 $\text{GlcNAc}\beta 1\text{-}3\text{GalNAc}\alpha$  でスクリーニングしたもの 4 種類 [クローン名はそれぞれ 1G11、1H3、1D2、2G4] を合わせた 12 種類)をピックアップし、それぞれゲノムを抽出し、そのゲノムを鋳型に改変レクチン cDNA を増幅するダイレクト PCR を行った。ダイレクト PCR 産物をクローニング用プラスミドである pBlueScript SK II (+)にサブクローニングすることで、2B4-PNAfb-初代 C 細胞内に挿入されているレクチン遺伝子情報を抽出した。実際には、サブクローニングしたものを大腸菌 DH5 $\alpha$  に形質転換し、LB/Amp プレートにコロニーを形成させ、各クローン化細胞について、8 つのプラスミドを抽出し、シーケンス解析を行った (12 種類のクローン $\times$ 8 プラスミド=96 の解析を行った。但し、シーケンスが読めなかったものも含む) シーケンス結果は表にまとめた (図 23)。予想通り、1 種類のクローン化細胞中に、複数のレクチン遺伝子が挿入されていた (図 23)。スクリーニングに使用した糖鎖が違うクローン細胞間から、同じ配列が同定されるものもあった。例えば、図 23 において、黄色で色付けした配列は 2A1-1、2A10-1、2C2-3、2H10-1、1B12-1 と、5 種類あり、 $\text{Le}^c$  抗原 ( $\text{Gal}\beta 1\text{-}3\text{GlcNAc}\beta$ ) のスクリーニングと  $\text{Gal}\alpha 1\text{-}3\text{Gal}\beta$  のスクリーニングのどちらからも単離されたことになる (図 23)。このように、クローン間で同じレクチン cDNA が単離されることが多かったが、これらは同じ細胞由来のクローンだと考えられる。結果的にリーディングフレームがずれた配列を含めると 21 種類あり、そのうち有効なリーディングフレームとして 18 種類の独立配列を単離した。

限界希釈後の 2B4-PNAfb-初代 C 細胞は多数の遺伝子が 1 つのクローン化細胞に混在しているポリクローナルなレポーター細胞であることが解ったため、活性を持つ遺伝子を同定するべく、独立した配列 18 種類をそれぞれ別個で pMXs ベクターに

クローニングし、PNA 変異体のモノクローナルレポーター細胞を作製した (2B4-PNA 変異体)。さらに、スクリーニングに使用した糖鎖ポリマーとのレポーターアッセイを行うと、2B4-PNA 変異体 1G11-1 (=1H3-1、1D2-2、2A1-1、2A10-2) 細胞は、Le<sup>c</sup> 抗原 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ ) と GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$  の各ポリマーに反応した (図 24 の改変①)。また、2B4-PNA 変異体 2B1-2 細胞は、Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$  の糖鎖ポリマーと反応した (図 24 の改変②)。さらに、2B4-PNA 変異体 2C1-2 (=2H10-4、1B12-2) 細胞は、Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$  の糖鎖ポリマーと反応した (図 24 の改変③)。その他の 15 種類の変異体では、レポーターアッセイにより、糖鎖との相互作用を確認できなかった (data not shown)。糖鎖に反応性を示したレポーターアッセイの結果より、レクチン活性を持つ配列を 3 種類同定した。同定した順番で改変① (ループ C 配列: TWPNRSYK)、改変② (ループ C 配列: LWQNREFC)、改変③ (ループ C 配列: KWHNSFYD) と名付けた。改変①は、Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$  スクリーニング由来クローンの 2A1、2A10、また、GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$  スクリーニング由来クローンの 1G11、1H3、1D2 から得られた。改変②は、Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$  スクリーニング由来クローンの 2B1 から得た。改変③は、Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$  スクリーニング由来クローンの 2C1、2H10 及び Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$  スクリーニング由来クローンである 1B12 から得た。

#### ＜ライブラリーC (all) から改変レクチンのスクリーニング～遺伝子同定＞

まず、Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc $\beta$  に結合性を示すレクチンを同定するために、(5-3 項) で濃縮した 2B4-PNAfb-C-all 細胞 (図 18) を限界希釈によってクローン化し、得たクローン化細胞 10 種類においてレポーターアッセイを行うことで糖結合活性の有無を確認した。しかし、これら 10 種類のクローンは Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc $\beta$  に結合することが確認できなかった (図 25A)。しかし、20-1、20-2、20-7、20-9 や 20-14 などのクローンでは、フローサイトメトリーの結果から、糖鎖を固相化しない場合でも、GFP 発現を蛍光強度が 100 に近い細胞が確認できた (図 25A)。糖鎖と反応性を示す改変レクチンが得られる可能性があるため、フローサイトメトリーの結果、蛍光強度の高かった 20-7 と 20-14 のクローンからゲノムを抽出し、遺伝子を単離した。実際には、ゲノムダイレクト PCR 産物を pBlueScript SK II (+) にサブクローニングしたものを大腸菌 DH5 $\alpha$  に形質転換し、LB/Amp プレートにコロニーを形成さ

せ、各クローン化細胞について、4つのプラスミドを抽出し、シーケンス解析を行った。クローン 20-7、20-14 は、共に4つとも同じレクチン遺伝子が挿入されており、合計2種類の独立した改変レクチン候補遺伝子配列を単離した（図 25B）。これら2種類を別個でモノクローナルレポーター細胞を作製し（2B4-PNA 変異体）、糖結合活性をレポーターアッセイで確認すると、2B4-PNA 変異体 20-7 細胞（ループ C 配列：SWGNGRYS）が PNA の元々結合する T 抗原（Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ ）に対して反応した（図 25C）。しかし、2B4-PNA 変異体 20-7 細胞は、特異性ターゲットにしていた Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc $\beta$  の糖鎖ポリマーと反応しなかった（図 25C）。この 20-7 由来の改変レクチンは改変④（ループ C 配列：SWGNGRYS）として名付けた。2B4-PNA 変異体 20-14 細胞は、レポーターアッセイで糖と反応しなかった（data not shown）。

次に、 $\alpha$ Fuc に結合性を示すレクチンを同定するために、（5-3 項）で濃縮した 2B4-PNAfb-C-all 細胞（図 18）を限界希釈でクローン化し、各クローン化細胞をレポーターアッセイに供し、糖結合活性の有無を調べた。各クローン化細胞の  $\alpha$ Fuc への結合性は確認できなかった（図 26A）。しかし、これらのクローン化細胞のうち、C18-2、C18-4、C18-6、C18-8 の4種類のクローンについては、PNA の結合する T 抗原（Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ ）への結合性を確認できた（図 26B）。以上の4種類のクローンと、糖鎖なし条件で培養しても GFP 発現量が蛍光強度 100 付近に達する細胞が確認できたクローン C18-3 から糖結合活性をもつ改変レクチン遺伝子を同定するために、遺伝子を単離した。実際には、ゲノムダイレクト PCR 産物を pBlueScript SK II (+) にサブクローニングしたものを大腸菌 DH5 $\alpha$  に形質転換し、LB/Amp プレートにコロニーを形成させ、各クローン化細胞について、4つのプラスミドを抽出し、シーケンス解析を行った。C18-2、C18-4、C18-6、C18-8 の4種類のクローンでは、全て同じ配列（ループ C 配列：VWPNPYPYH）が見られた（図 27A）。これらのクローン細胞は同じ細胞由来のクローンだと考えられる。レポーターアッセイ時、糖鎖無しでも GFP を発現した C18-3 細胞からは別の配列が単離され、合計3種類の独立配列が得られた（図 27A）。各改変レクチン候補遺伝子の独立配列について、モノクローナルレポーター細胞を作製し（2B4-PNA 変異体）、糖結合活性をレポーターアッセイで確認すると、2B4-PNA 変異体 C18-2-a（C18-4-a、C18-6-a、C18-8-a）細胞は、特異性ターゲットであった  $\alpha$ Fuc への

相互作用は確認できなかったが、PNA の元々結合する T 抗原 ( $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha$ ) への反応性を示していることがわかった (図 27B)。この変異体は改変⑤ (ループ C 配列: VWPNNPPYK) として名付けた。他の 2 種類の独立配列の変異体では、レポーターアッセイで糖との反応性は認められなかった (data not shown)。

#### ＜ライブラリー C (all) と C&D を用いたスクリーニング～遺伝子同定

>

(5-3 項) で  $\text{Gal}\beta 1-3(\text{NeuAc}\alpha 2-6)\text{GalNAc}\alpha$  に結合するような改変レクチン発現細胞を濃縮した 2B4-PNAfb-CD 細胞集団 (図 21) を限界希釈によりクローン化した。クローン化した細胞 22 個のクローンについて、レポーターアッセイで糖結合活性を調べたところ、クローン 1E9 を除いた 21 個のクローンにおいて  $\text{Gal}\beta 1-3(\text{NeuAc}\alpha 2-6)\text{GalNAc}\alpha$  との反応性が認められた (図 28)。本研究では、1B5、1B6、2C2、2D4、2C9、2C3、1D11 の各クローンからゲノムを抽出し、改変遺伝子配列を単離した。実際には、ゲノムダイレクト PCR 産物を pBlueScript SK II (+) にサブクローニングしたものを大腸菌 DH5 $\alpha$  に形質転換し、LB/Amp プレートにコロニーを形成させ、各クローン化細胞について、4～6 個のプラスミドを抽出し、シーケンス解析を行った。各クローンから得られたアミノ酸配列情報は図 29 にまとめた (図 29)。クローン 1B5 からは独立した配列は 3 種類得られた。クローン 1B6 と 2C2 は 1B6-2 と 2C2-4 が同じアミノ酸配列をコードするレクチン cDNA を有していたので、同じ細胞由来のクローンだと判断し、総じて独立した配列を 6 種類得た。クローン 2D4、2C9、2C3、1D11 は同じ配列が複数見られたので、同じ細胞由来だと判断し、総じて独立配列を 6 種類得た。ループ C のアミノ酸残基伸長型の変異体や、他にも初めてループ D に変異が導入されたものも単離した。しかし、ループ D に変異が導入された変異体は終止コドンを含んでいたため、モノクローナルレポーター細胞を作製する段階で除外した。各改変レクチン候補遺伝子の独立配列で終止コドンを含まない有効なものに関して、モノクローナルレポーター細胞を作製し (2B4-PNA 変異体)、糖結合活性をレポーターアッセイで確認すると、2B4-PNA 変異体 1B5-2 細胞では、 $\text{Gal}\beta 1-3(\text{NeuAc}\alpha 2-6)\text{GalNAc}\alpha$  との反応性が認められたが、結合親和性が弱いのか抗 Myc 抗体での刺激時と比べ、GFP 発現量が少なかった (図 30 の改変⑥)。また、同様に、2B4-PNA 変異体 2C2-2 細胞、及び 2B4-PNA 変異体 2D4-1 細胞でも、 $\text{Gal}\beta 1-3(\text{NeuAc}\alpha 2-6)\text{GalNAc}\alpha$  との反応性が認められた

(それぞれ、図 30 の改変⑦と改変⑧)。2B4-PNA 変異体 2D4-1 (改変⑧) も、結合親和性が弱いのか抗 myc 抗体での刺激時と比べ、GFP 発現量が低かった (図 30-改変⑧)。その他の 2B4-PNA 変異体細胞では、Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$ との反応性は認められなかった (data not shown)。本項で同定した改変レクチン配列は、全てライブラリーC (初代) 由来の変異体であり、改変⑥ (ループ C 配列: CHQNRDYL)、改変⑦ (ループ C 配列: AWHNRELN)、改変⑧ (ループ C 配列: PHVNDEYC) とそれぞれ名付けた。

※なお、図 28 の限界希釈後クローン化細胞のうち、21 種類が Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$ と結合性を示しているが、今回、そのうち 7 種類のクローンしか遺伝子を抽出しなかった。その理由はその他のクローンからもゲノムを抽出し、そのゲノムを鋳型に改変⑥、⑦、⑧の変異導入部位の塩基配列に特異的なプライマーを用いた PCR を行うことで、ネガティブセクションを行っており (バンドが検出された場合は、その改変レクチンの遺伝子を含んでいる)、他の 14 種類のクローン化細胞からは遺伝子を個々に抽出する必要がないと考えたためである。

### **<ライブラリーC (初代) & ライブラリーC (all) を用いた Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$ 結合性レクチンのスクリーニング～遺伝子同定>**

Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$ でのスクリーニング結果が良好だったことを受けて、2B4-PNAfb-C (初代) (図 11A) と 2B4-PNAfb-C (all) (図 11D) をミックスした 2B4-PNAfb-初代 C&C-all 細胞集団を用いて、Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$ 結合性レクチンのスクリーニングを行った。二回のソーティング操作を行った後、レポーターアッセイで Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$ 結合性のレクチン発現細胞の割合を調べると 50%以上の GFP 陽性率であった (図 31A)。今回は初めて、限界希釈によるクローン化を行わずに、濃縮した細胞のバルクから直接ゲノムを抽出し、遺伝子配列同定を試みた。ゲノムを抽出し、レクチンの cDNA を増幅するゲノムダイレクト PCR 産物を pBlueScript ヘサブクロニングしたものを大腸菌 DH5 $\alpha$  に形質転換し、LB/Amp プレートにコロニーを形成させた。64 個のコロニーから選抜し、43 個のプラスミドを抽出し、36 個のシーケンスデータを得た (図 31B)。クローン 23 は前述した改変①と同じアミノ酸配列が得られた (図 23 の 1G11-1 と同じ)。また、クローン 33 は前述した改変⑥と同じアミノ酸配列が得



られた (図 29 の 1B5-1 と同じ)。得られた配列は、クローン 13 と 55、クローン 38 と 57、クローン 45 と 47 がそれぞれ同じ配列であったが、他は全て独立した配列であった。本研究ではこの中から、アミノ酸配列の規則性で 127 残基目の N と 125 残基目または 130 残基目に芳香族アミノ酸を持つようなレクチン活性を持つ可能性の高いと考えた改変レクチン候補分子 (クローン 7、38 [57]、52、62) のレポーター細胞を作製し (2B4-PNA 変異体)、レポーターアッセイを行うことで糖結合活性の有無を確認した。また、2B4-PNA 変異体 23 細胞は以前樹立した細胞を用いて同様に調べた (図 24 の改変①)。クローン 33 に関しては、図 30 の改変⑥において確認している (図 30)。2B4-PNA 変異体 7 細胞、2B4-PNA 変異体 23 細胞 (改変①)、2B4-PNA 変異体 38 (57) 細胞、2B4-PNA 変異体 62 細胞は、Gal  $\beta$  1-3(NeuAc  $\alpha$  2-6)GalNAc  $\alpha$  との反応性が認められた (それぞれ図 32 の改変⑨、改変⑩、改変⑪)。しかし、2B4-PNA 変異体 52 細胞では、Gal  $\beta$  1-3(NeuAc  $\alpha$  2-6)GalNAc  $\alpha$  との反応性が認められなかった (data not shown)。改変①に加え、新たにレポーターアッセイで糖結合活性が確認できた 3 種類の改変レクチンについては、それぞれ改変⑨ (クローン 7 ; ループ C 配列 : RHVNRYS)、改変⑩ (クローン 38 ; ループ C 配列 : VWTNSKFR)、改変⑪ (クローン 62 ; ループ C 配列 : TWSNPPHN) として同定した。また、同レポーターアッセイにおいて、Gal  $\beta$  1-3(NeuAc  $\alpha$  2-6)GalNAc  $\alpha$  に対する反応性が、発現確認で用いる抗 myc 抗体に対する反応性と比較して、2B4-改変⑨、2B4-改変⑪のそれぞれの細胞では弱かった (図 32)。一方で、2B4-改変①、2B4-改変⑩のそれぞれの細胞では、抗 myc 抗体と Gal  $\beta$  1-3(NeuAc  $\alpha$  2-6)GalNAc  $\alpha$  との反応性に大きな違いは見られなかった (図 32)。これらの違いをループ C のアミノ酸配列の規則性から推測すると、Gal  $\beta$  1-3(NeuAc  $\alpha$  2-6)GalNAc  $\alpha$  との反応性の弱い改変レクチン (改変⑨、⑪)、さらには前述した改変⑥、⑧では、125 残基目または 130 残基目の芳香族アミノ酸のどちらかが H に置換されている変異体であった (図 30、32、表 3)。改変①、⑩では、125 残基目、130 残基目は芳香族アミノ酸が保存されていた (図 32)。限界希釈によるクローニングを行わない場合は、限界希釈から細胞が増えるまでの期間を待つことがないので素早く改変レクチン遺伝子の同定可能であったが、今回 36 クローン解析して重複遺伝子がまだ 3 通りであったため、まだ改変レクチン遺伝子を取り切れていない可能性がある。

本項では、以上で同定した 11 種類の改変レクチンのアミノ酸配列を表 3 にまとめた (表 3)。11 種類はすべてループ C のライブラリー (初代) から得られた。また、これらの改変レクチンはすべて 127 残基目の N が保存され、かつ 125 残基目、130 残基目には芳香族アミノ酸 (W、Y、F) が高度に保存されていることがわかった (表 3)。

### 5-5. レクチン-Fc 融合タンパク質の作製

レポーターアッセイは洗浄操作という概念を無視でき、感度が高いためにスクリーニングには適していたが、結合親和性を定量することには適さない。例えば、多くのタンパク質の糖鎖との相互作用を調べる上で、各タンパク質の量を揃えてアッセイすることができれば定量も可能であるが、レポーター細胞の場合、細胞表面に発現しているレクチンの量が一様ではなく、細胞によって異なっているため、タンパク質量を揃えるのはとても難しい。また、レポーター遺伝子の発現量を指標に相互作用を議論する場合も、ある閾値を超えるとプラトーに達してしまい、定量性に欠けてしまう。そこで、本研究では作製した改変レクチンとヒト IgG-Fc 領域を融合させた二量体化組換えタンパク質を作製し (図 13)、それを用いて糖鎖との親和性の程度を見積もることを試みた。Fc 融合タンパク質では、多価になることのアビディティ効果によって、リガンドとなる分子との見かけ上の親和性が増加し、レクチン-糖鎖の弱い結合も検出されることが期待できる[38,39]。

発現ベクターには pCAGGS に 5'側から、hCD8 $\beta$  のシグナル配列、myc タグ、レクチン領域、hIgG の Fc 領域の cDNA からなるものを設計し (図 13A)、HEK293 細胞に導入した。遺伝子導入した細胞は、G418 によりセレクションを行い、組み換えタンパク質安定発現細胞株を樹立した。レクチン-Fc 融合タンパク質は、樹立した安定発現細胞の培養上清中に分泌されることを、ウェスタンブロッティングの結果より確認した (data not shown)。タンパク質の精製はヒト IgG Fc 領域と親和性のあるプロテイン A カラムにて親和性精製を行い、精製度を SDS-PAGE で確認した。還元条件においてマーカの 56~66kDa の辺りに主要バンドが検出され、タグ+レクチン (約 30kDa) 抗体の Fc 領域 (約 30kDa) の予想分子量から、レクチン-Fc 融合タンパク質と判断した (図 33)。一週間培養した培養液 50 ml から、100~300  $\mu$ g 程得ることができた。

## 5-6. 糖鎖アレイによる改変レクチン-Fc の糖結合特異性解析

作製したレクチン-Fc 融合タンパク質の糖結合特異性を解析するために、産総研にて平林博士、舘野博士の協力の下で糖鎖アレイ解析を行った。糖鎖アレイに固定化されている糖鎖及び糖タンパク質の一覧は図 14 と表 1 に示した (図 14、表 1)。

PNA-Fc は、ラクトース ( $\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta$ ) や T 抗原 ( $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha$ )、 $\text{Gal}\beta 1-3(\text{GlcNAc}\beta 1-6)\text{GalNAc}\alpha$  に結合した (図 34)。また、糖タンパク質では、脱シアル酸化された糖タンパク質である Fetuin (Asialo-FET) や  $\alpha 1$ -acid glycoprotein (Asialo-AGP)、Glycophorin (Asialo-GP) に結合した (図 34)。Fetuin は、N 型糖鎖 3 本、O 型糖鎖 3 本を持つことが知られている [40,41]。 $\alpha 1$ -acid glycoprotein は複合型の N 型糖鎖を 5 本持つことが知られている [42]。Glycophorin は、N 型糖鎖 1 本と O 型糖鎖 15~16 本持つことが知られている [43]。糖鎖アレイ上の糖タンパク質の結合性についての解釈は難しいが、O 型糖鎖はシアル酸が除去されると  $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha$  構造が表に出るために結合すると考えられる。糖鎖アレイ上には、これら糖タンパク質が脱シアル酸化されていないものも含まれるが、その糖タンパク質には強い結合は検出されなかった (図 34)。なお、二次抗体の非特異的な糖鎖アレイへの結合は特に検出されないことを確認している (図 37C)。

一方で、改変①-Fc は、PNA-Fc の結合する糖鎖に加え、各スクリーニングのターゲット糖鎖であった  $\text{Le}^c$  抗原 ( $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta$ ) と  $\text{Gal}\beta 1-3(\text{NeuAc}\alpha 2-6)\text{GalNAc}\alpha$  に結合することが示唆された (図 35)。興味深いことに、糖鎖アレイ上には、他にシアル酸末端を持った  $\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha$  やシアリルラクトース ( $\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta$ ) も固定化されているが、改変①-Fc は他のシアル酸末端の糖への結合は検出されなかった (図 35)。レクチン-糖の相互作用様式を考察する上で、類似構造への結合性を比較する場合、上述したように「結合しない」という情報も重要である。改変①は、他に  $\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha$  をターゲットとしたスクリーニングで得られたが、糖鎖アレイ解析では  $\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha$  への結合は検出できなかった (図 35)。改変②-Fc と改変⑤-Fc (図 37A) は、改変①-Fc と同等の蛍光強度を示し、結合特異性プロファイルも似ていた。しかし、改変①-Fc が PNA の元々結合する  $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha$  と、新たに結合性を示すようになった  $\text{Gal}\beta 1-3(\text{NeuAc}\alpha 2-6)\text{GalNAc}\alpha$  が同等の蛍光強度を示したのに対し (図

35)、改変②-Fc と改変⑤-Fc (図 37A) では、Gal  $\beta$  1-3(NeuAc  $\alpha$  2-6)GalNAc  $\alpha$  の蛍光強度は、Gal  $\beta$  1-3 GalNAc  $\alpha$  の蛍光強度の値と比べて 1/2 程であった。改変②-Fc はレポーターアッセイで確認できた Gal  $\alpha$  1-3Gal  $\beta$  への結合は、糖鎖アレイ解析では検出されなかった (data not shown)。改変③-Fc はレポーターアッセイで確認できた Gal  $\beta$  1-3GlcNAc  $\beta$  への結合は、糖鎖アレイ解析では検出されなかった (data not shown)。

改変③-Fc と改変⑦-Fc (図 37B) では、糖鎖アレイ解析の蛍光強度の値が全体的に、各糖鎖スポットにおいて PNA-Fc より低かったが、特異性プロファイルは PNA-Fc とほとんど同じであった。改変⑦ではレポーターアッセイで確認できた Gal  $\beta$  1-3(NeuAc  $\alpha$  2-6)GalNAc との相互作用は弱く、糖鎖アレイ解析において、わずかに検出されたほどであった (図 37B)。

また、改変⑥-Fc は、PNA の結合する  $\beta$  ガラクトース末端の糖鎖に対する結合は検出されなかったが、脱シアル化酸された Glycophorin (Asialo-GP) にだけ特異的に結合するスペクトルが得られた (図 36)。改変⑧-Fc も同様のスペクトルが得られた (data not shown)。

次に、同じ糖鎖アレイ上において、PNA-Fc と改変①-Fc と改変⑥-Fc と同様の解析を行い、糖結合強度及び糖結合性結合プロファイルを比較した (図 38)。すると、Gal  $\beta$  1-3GalNAc  $\alpha$  への結合力に関しては、PNA-Fc より改変①-Fc の方が 1.5 倍ほど強い蛍光強度を示した。また、Gal  $\beta$  1-3GlcNAc  $\beta$  と Gal  $\beta$  1-3(NeuAc  $\alpha$  2-6)GalNAc  $\alpha$  への結合力では、改変①-Fc は PNA-Fc よりも 3～4 倍程強い蛍光強度を示した。改変①-Fc は鋳型とした PNA とは異なる特異性を獲得していることが示唆された。⑥-Fc では、脱シアル化酸された Glycophorin (Asialo-GP) にだけ特異的なスペクトルが得られた。

以上より、特異性が変化したレクチン、結合親和性を増強したレクチンが得られたことが示唆された。

## **5-7. ヒト培養細胞株とレクチン-Fc 融合タンパク質の結合試験**

改変レクチンのプローブとしての有用性を評価するために、レクチン-Fc 融合タンパク質とヒトの培養細胞株 28 種類 (表 2) との結合性をフローサイトメトリーで評価した。

PNA-Fc は、Ho-1-u-1 や Raji といった細胞に強く結合した (図 39)。改変①-Fc、②-Fc、⑤-Fc は、PNA とよく似た結合パターンを示したが、全体的に 2~5 倍程 PNA-Fc よりも強い結合強度を示した (図 39)。改変③-Fc、⑦-Fc は PNA-Fc よりも弱い結合パターンであり、改変⑥-Fc、⑧-Fc はほとんど細胞への結合は見られなかった (図 39)。改変⑥と改変⑧の細胞結合性が弱かったことは、レポーターアッセイ時の糖への反応性が弱かった (図 30) という結果を反映していた。興味深いことに、改変①-Fc は、PNA-Fc では強い結合の見られない前単球系の細胞株である THP-1、HL-60 細胞に 10 倍以上の強い結合強度を示した (図 39)。

改変①-Fc の  $\text{Gal}\beta 1-3(\text{NeuAc}2-6)\text{GalNAc}\alpha$  に強く結合する特異性を考慮し、シアル酸の結合への影響を調べるために、シアリダーゼ処理を行った細胞と行っていない細胞において、結合強度の差が特に大きかった THP-1 細胞と差の小さかった赤血球に分化可能な赤芽球系の細胞である K562 細胞を同様の結合試験を行った。NeuAc  $\alpha 2-3$  Gal-のシアル酸に結合特異性をもつ MAH[44,45]及び NeuAc  $\alpha 2-6$  Gal-のシアル酸に結合特異性を持つ SSA[46]では、それぞれの細胞においてシアリダーゼ処理を行うと結合が低下した (図 40) ことから、シアリダーゼ処理が効いていることが確認できた。PNA-Fc では、THP-1 細胞のシアリダーゼ処理を行うと、細胞に対して約 30 倍結合強度が増加した (図 40)。改変①-Fc では、THP-1 細胞への結合はシアリダーゼ処理によって約 5 倍増加した (図 40)。K562 細胞では、PNA-Fc のシアリダーゼ処理を行うと、細胞に対する結合強度は約 5 倍増加した (図 40)。一方で、改変①-Fc では、シアリダーゼ処理によって K562 細胞への結合が約 1.5 倍増加した (図 40)。K562 細胞と比較し、THP-1 細胞の方がシアリダーゼ処理後の結合増加率 (PNA-Fc/改変①-Fc) が大きかったことから、 $\text{Gal}\beta 1-3(\text{NeuAc}2-6)\text{GalNAc}\alpha$  構造が THP-1 細胞には K562 細胞より多く発現していることが示唆された。

## 6. 考察

### 6-1. PNA 変異体ライブラリーの作製について

当研究室卒業生の秦博士は、改変レクチン作製にあたり、どのマメ科レクチンを鋳型に選ぶか検討した。PNA の他にも、Gal 結合性レクチン BPL、Man 結合性レクチン SML、Gal 結合性レクチン ECorL、GalNAc 結合性レクチン LBL、Glc 結合性レクチン CPA、GlcNAc 結合性レクチン PHA-E、PHA-L などの発現系を検討したが、最初にレポーター細胞の系を確立することができたのが PNA であった。他のレクチンでは cDNA をクローニングし、レポーター細胞の系がワークするか確認する段階で、何らかの弊害が生じた。LBL や CPA は cDNA のクローニングが難航した。Gal 結合性レクチン ECorL では、myc タグを付加して細胞表面に発現させたレポーター細胞の場合、抗 myc 抗体では架橋刺激が入ることが分かったが、Gal  $\beta$  1-3GalNAc  $\alpha$  の糖鎖ポリマーでは架橋刺激が入らなかった (data not shown)。発現量を検証するために、ウエスタンブロッティングにより、細胞のライセートを同じ抗 Myc 抗体で検出すると、PNA の場合はレクチンと CD3 $\zeta$  のキメラ融合タンパク質が十分検出できたのに対し、ECorL では検出できなかった (data not shown)。これらの原因はまだよくわかっていない。

本研究で行ったループ C：6 種とループ D：4 種の PNA 変異体ライブラリー作製法は、過去の報告[26,47]を参考に、ランダム塩基含有プライマーを購入し、変異導入断片を PCR で増幅した。増幅されるライブラリーのスケールは PCR を利用して構築するため、非常に簡便に、大きな規模のライブラリーを作製できるが、本研究で得た結果を踏まえると、合成されたプライマーの正確性に大きく依存することがわかる。例えば、図 31 において、得られた配列の中に、クローン 6、36、41、44 の配列は、塩基欠失や、より多くの塩基の挿入によりフレームシフトが起こり、有効なレクチンの配列ではなかった (図 31)。また、今回の系では、アミノ酸を拡張した場合や、ループ C とループ D の両方にランダム変異を導入した場合、バリエーションが上がる反面、終止コドンが挿入される確率も実質上がってしまうと考えられる。実際に、ループ C とループ D の両方にランダム変異を導入した変異体は図 29 において、4 種類 (1B6-1、1B6-2、2D4-2、2C3-1) 得られたが、すべて終止コドンが挿入されていた (図 29)。このように、高頻度で発現しないレクチンの遺伝子が含まれ

るため、大きなライブラリーを用意できても、質としては下がってしまう。この問題点は次回ライブラリーを作製する段階では改善すべき点の一つである。近年、ライブラリーを構築するのによく用いられているのは、Error Prone PCR という手法である[48,49]。この手法は、変異を導入したい部位を校正能のない DNA ポリメラーゼ *Taq* を使用して PCR で増幅することで変異を誘発させるものである。この手法は、適度に変異を入れる条件検討が難しいかもしれないが、一度確立できれば、とても安易でコストがかからない。ライブラリー作製に検討してみてもいい手法の一つである。実際に、リボソームディスプレイ法で創出された改変レクチンは、Error Prone PCR によって作られたライブラリーからスクリーニングされた [28]。問題点は、PCR で増幅する領域のどこに変異が導入されるか予測できない点である。本研究では、ループ C またはループ D の領域にだけ変異を導入したライブラリーから改変レクチンを得るというストラテジーなので、Error Prone PCR で変異を導入する場合は、どこからどこまでの領域を増幅するか、熟考する必要がある。

## 6-2. “Mammalian Cell Surface Display (MCSD) 法”を用いたレクチンの創出

歴史を遡ると、当初、組み換えタンパク質を使用しないレクチン-糖鎖の相互作用検出手法として、ファージや哺乳動物細胞表面にレクチンを発現させる方法が報告された[50,51]。しかし、これらの手法では、糖鎖リガンドを蛍光標識や放射性同位体で標識する操作、そして洗浄操作も必要であった。一方、免疫学の分野では、NK 細胞の受容体のリガンド同定などで、細胞表面に分子を提示した細胞を用いた NACS(NFAT-activation molecule cloning system)に基づくレポーター細胞のシステムがしばしば利用されてきた[52,53]。これらの報告に用いられた BWZ.36 細胞[54]は、NFAT の作用する IL-2 プロモーターの下流に  $\beta$  ガラクトシダーゼ遺伝子 *LacZ* が挿入されたコンストラクトを持っている。2B4 細胞同様、細胞表面上のレポーター分子の架橋によって刺激が入るが、細胞内には GFP ではなく  $\beta$  ガラクトシダーゼが産生される。このシステムでは、洗浄操作の概念を無視できたため、レクチン-糖鎖の弱い相互作用を検出することに関してはかなり効率的と考えられた。しかし、この場合、細胞に対して  $\beta$  ガラクトシダーゼの蛍光基質を加える必要があり、本研究でも検討したが、生細胞を回収することに関しては蛍光基質の細胞毒性・非特異的発

光など様々な問題が生じた。近年、同様に免疫学の分野のリガンド同定ツールとして、NACS の系で利用可能な 2B4-NFAT-GFP 細胞株も樹立され、頻繁に利用され始めた [29,55,56]。本研究では、この細胞株を用いた NACS と MCSD 法をレクチンのスクリーニングに応用して成功した初めての報告である。2B4 細胞では、架橋刺激を加えて GFP 発現を誘導した細胞を回収、再培養を行っても問題なく培養することができた。

本研究は、斬新な方法を用いて、自然界には存在しない糖結合特異性をもつレクチンを人工的に創出した。これまでに改変レクチンを同様にスクリーニングし、作製した報告は、ファージ・ディスプレイ及びリボソーム・ディスプレイで行われたものがあつた [26,27,28]。ファージ・ディスプレイでは、バクテリアファージに遺伝子を組み込んでファージ表面にタンパク質を発現させ、そのタンパク質と標的リガンドとの相互作用を指標に選択する [26]。ファージ・ディスプレイではライブラリーの大きさが大腸菌の培養スケールに限られることから、 $10^8$  以上のスケールのライブラリーには不向きであつた。一方、リボソーム・ディスプレイは無細胞翻訳系なため、細胞の培養スケールにライブラリーの大きさを制限受けることもなく、In vitro セレクションが可能であり、大腸菌よりも提示率が高いことが期待できる [27,28]。リボソーム・ディスプレイは扱えるライブラリーのスケールが細胞に依存しないため、ファージ・ディスプレイや MCSD 法に比べて大きい規模のライブラリーからスクリーニングできるという点において優れるが、ファージ・ディスプレイもリボソーム・ディスプレイも親和性選択によりセレクションするため、洗浄操作が必要であり、結合親和性の弱いとされるレクチンはスクリーニング中に除かれることが懸念された。本研究で用いた MCSD 法では、結合の指標を細胞内に GFP 発現として残すため、洗浄操作の概念を無視することが可能で、既存法よりもレクチン-糖鎖のような弱い相互作用のセレクションには適していると考えられる。また、スクリーニングの最中、レポーターアッセイにより簡易的に濃縮率のチェックが行えることも利点の一つである。実際に、糖鎖への結合親和性の弱い改変レクチンも複数得られ、アミノ酸配列の興味深い情報が得られた。また、さらなる利点として、発現系に哺乳動物細胞を用いる点にある。本研究では、ファージ・ディスプレイ法と比較し、哺乳動物細胞にレクチンを発現させて用いている点で、一般的に大腸菌などの可溶性組み換えタンパク質として発現が難しいレクチンにも適用できると考えられ、大腸菌などの細胞に基づ



いた系よりもスクリーニングや結合アッセイでは実用的と言える。

しかし、今回問題となったのは細胞に発現していると思われる糖鎖が細胞間の相互作用（トランスリガンドにレクチンが結合する）を及ぼし、それを偽陽性としてスクリーニングの際に濃縮してしまう点である。例えば、図 25A において、クローン 20-2 やクローン 20-7 では、レポーターアッセイ時、培養時に糖鎖を固相化しない場合でも GFP を発現しているように見える（図 25A）。これは 2B4-PNA 細胞が、一定の密度以上で培養すると細胞同士で凝集を起こし（PNA が細胞表面の糖鎖に結合することに起因する。2B4 細胞自体に目立った凝集能はない）、やがて死んでしまうという現象（data not shown）からも裏付けられる。2B4-PNA 細胞の凝集に関しては、通常培養時にラクトースを 5 mM 程の濃度で培地に加えることで、この顕微鏡下観察で凝集現象が阻害されることがわかった。しかし、スクリーニング時にラクトースを用いて行うのは、結合しうるレクチンを阻害すると予想されるため望ましくない。常時行う対策として、細胞密度を下げるなどの対策は取ることができる。さらに、レポーター細胞として用いる細胞表面の糖鎖を、細胞同士で相互作用しないような構造に一樣に制御したらどうか。

レクチンはリシンのように毒性サブユニットを持つものもあるが、持たないものでも細胞に対して高濃度で加えると、一般的に細胞毒性を示す。この現象は、細胞表面にレクチンが結合することに起因するものと考えられる。実際に、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞などでは、レクチンによるセレクションによって、細胞表面糖鎖の異なる変異株が複数得られている[57,58]。このメカニズムを利用し、2B4 細胞を PNA でセレクションし、PNA が結合しないような糖鎖変異細胞株を単離することを考え、いくらか検討を行った。しかし、PNA 低結合性株は取得できたが、完全に結合しなくなるような変異株は得られなかった（data not shown）。PNA の結合する T 抗原（Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ ）は O 型糖鎖のコアを成す構造であるため、どの細胞にも普遍的に発現しており、完全に無くすることが致死に繋がるからではないかと考えている。現段階では、決定的に改善はされなかったが、この細胞表面の糖鎖を一樣に変化させる手法は、鋳型レクチンを PNA ではなく他の特異性のレクチンに変えた場合などには有効になるかもしれない。

また、レポーター細胞の培養時の細胞密度も、偽陽性の問題に関係していた。2B4 細胞は半浮遊半付着性の細胞であり、一定の密度以上で培養すると凝集しやすくなる。

凝集すれば、必然と細胞-細胞間の相互作用が生まれ、偽陽性も出ると考えられる。これを避けるために、スクリーニング時は細胞密度を一定以上にしないこととした。材料と方法欄の 4-4 項<糖鎖ポリマーを用いたレポーター細胞 (2B4-PNAfb) のスクリーニング>で表記した「2B4-PNAfb 細胞を  $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$  cells/R10 3 ml (3.5 cm dish のスケール) を加え、12 時間培養した」とあるが、著者は  $0.5 \times 10^6$  cells/R10 3 ml 以下の細胞密度にすることを提案する。

以上の問題点もあるが、Gal  $\beta$  1-3 (NeuAc2-6) GalNAc  $\alpha$  のスクリーニングのように (図 21)、ライブラリー内にその結合特異性を持つレクチンポテンシャルがあれば、偽陽性細胞の問題もなく濃縮可能であった。言い換えれば、ライブラリーにそのポテンシャルを秘めていない場合において、細胞-細胞間の反応性を示す偽陽性細胞が濃縮される問題が生じるとも考えられる。今後、本研究では得られなかった特定糖鎖 (Man 結合性など) に結合するようなレクチンを創出するには、ライブラリーのデザインを再検討してスクリーニングする必要があると考えている。

### 6-3. マメ科レクチンの糖結合部位について

マメ科レクチンの糖結合部位は、ループ A、B、C、D の 4 つのループから構成されていることは述べた。これらのループのアミノ酸配列には、分子進化を経ても高度に保存されてきたアミノ酸が各ループに見受けられる。図 2B のマメ科レクチンのアミノ酸配列アライメントをループ A ではアスパラギン酸 (D)、ループ B ではグリシン (G)、ループ C ではアスパラギン (N)、疎水性アミノ酸がその例であり、各側鎖が水素結合に寄与している[37]。逆を言えば、それ以外の保存されていない部位では多様度は高く、ループ内のアミノ酸残基の置換や長さを調節することで、糖結合特異性を変えられるのではないかと考えられる。

マメ科レクチンの金属イオン結合部位 (ループ C) の構造は、糖結合特異性を規定することに重要である[23,26]。実例として、Gal/GalNAc 特異性レクチン BPL (ムラサキモクワンジュレクチン) のループ C の 9 アミノ酸を Man 特異性 LCA (レンズマメレクチン) の相同の部位であるペプチドと置き換えたところ、そのキメラレクチンは Gal ではなく Man に対して親和性を示した[22,23]。BPL と LCA は詳細な糖結合特異性も異なっており、この現象の理由は詳しいことは明らかになっていない。また、ループ C にランダムに変異を導入した BPL のレクチンライブラリーからファ

ージ・ディスプレイによって、異なる特異性のクローンを単離したという報告もある[26]。同様に、ループ C にランダム変異を導入した MAH レクチンライブラリーからも、異なる糖結合特異性や細胞結合性を持ったクローンも得られている[47,59,60]。これらの事実からも、マメ科レクチンの骨格の可能性はとても興味深く、ループ C は4つループの中でも特に注目される。また、マメ科レクチンにおいてループ A、B、C は非常に類似しているが、ループ D に関しては異なっており、糖と水素結合を形成するアミノ酸も様々である (図 2B)。さらに、マメ科レクチンに関して、ループ D の長さと糖結合特異性との間に相関が見られる (図 2B)。例えば、Man を認識するレクチンは同じ長さのループ D をもっており、この長さは Gal/GalNAc 認識レクチンなどより短い。また、モデリング解析により、ループ D は、Man と Gal を区別するための重要な決定因子であると報告もある[24,25]。これらの事例から、ループ C に加え、ループ D も糖結合特異性を決定しているループだといえる。

上記の事柄を踏まえ、今回のスクリーニングを実施した結果では、ループ C ではアミノ酸配列で特徴をもつレクチンが得られたが、ループ D においてはレクチン活性を確認できた変異体は得られなかった。2012 年度卒業生京藤の修士論文では、PNA のライブラリーのループ D①~④から、Le<sup>x</sup> 抗原 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ )、Gal $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc $\alpha$ 、 $\alpha$ Fuc、Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc $\beta$  に結合性を持つ改変レクチンのスクリーニングを実施したが、得られたクローンで糖結合活性の確認できたものは全て野生型 PNA の配列と一致していた (data not shown)。以上の結果から、PNA の変異体に関しては、ループ D にランダム変異を導入した場合、多くのレクチンにおいて糖との結合活性が失われ、スクリーニングされなかったのではないかと考えている。しかし、糖結合部位の数アミノ酸を変化させた場合、糖結合活性が失われるものがほとんどかもしれないが、それは見かけ上であり、著者は糖結合特異性が変化していると表現する。なぜなら、自然界に存在する単糖の骨格のバリエーションが少ないために、糖結合特異性があるのかどうかを厳密に評価できないからだ。ループ D にランダム変異を導入した場合は、ループ C にランダム変異を導入した場合に比べ、糖結合特異性が変化しやすいのかもしれない。今回ターゲット糖鎖として用いた数種類の糖鎖以外の糖鎖を選択した場合、ループ D の変異体も取得できたかもしれない。

#### 6-4. 同定した改変レクチンに見られる特徴

本研究で得られた改変レクチンは全て、ループ C だけに変異が導入された変異体であった。同定したレクチン活性を持つタンパク質 12 種類のアミノ酸配列を比較すると、興味深いことに、ある共通性が見られた (表 3)。ループ C の変異導入部位において、PNA を含め、それぞれの改変レクチンでは、芳香族のアミノ酸が特定の場所に保存されている。127 残基目の N に関しては、類似アミノ酸に変異させたライブラリーも作製したが、今回のスクリーニングで得た改変レクチンは全て N を持つ変異体であった。PNA に限らず、その他のマメ科レクチンにおいても、相当する 127N に相当する N は全て保存されており (図 2B)、且つこの N を別のアミノ酸に置換すると糖結合活性を失うことから[61,62,63]、この N は分子進化を経ても保存される程に糖結合活性の維持に重要であると考えられる。125 残基目の PNA における Y は、改変レクチンでは全て W か H の変異体であった。PNA の 130 残基目の Y において、改変レクチンでは Y の他に F、H、L であった。以上より、125 残基目、130 残基目は、疎水性アミノ酸で多くは芳香族アミノ酸が保存されていた。また、PNA における 128 残基目の S は、12 個中 6 個の改変レクチンで R に置換されていた。これらの特徴は、他の糖結合活性の確認できなかった変異体には当てはまらない。

一般的に糖鎖とタンパク質の結合様式は、水素結合と van der Waals 力に大別される。水素結合は糖が持つ親水性な水酸基とアミノ酸側鎖の水酸基間に形成される一方、糖のピラノース環が疎水的な一面を持ち、van der Waals 力に寄与する。具体的には、疎水面に、W、Y、F、H の芳香族側鎖がスタッキングし、van der Waals 力によって相互作用をする (スタッキング効果と呼ばれる)。糖の疎水面は OH 基の位置が axial または equatorial の違いにより形成の仕方が大きく異なっている。糖において、この立体配置の構造の違いは重要で、例えば同じ六員環である Gal と Glc/Man では 4-OH 基の向きが axial または equatorial と違うため (図 1)、認識されるレクチンが異なる。本研究で得られた改変レクチンは、糖結合特異性が似ている点 (どれも Gal 系の糖鎖を主に認識している) に注目すると、保存されている配列は PNA の一次構造上、結合特異性に重要なモチーフであると考えられる。他のマメ科レクチンでは、これらのスタッキングする芳香族アミノ酸を低分子の非芳香族アミノ酸に置換することで、レクチン活性が失われることが示されている[62,63]。さら

に、スタッキングする芳香族アミノ酸を異なる芳香族アミノ酸 F→Y や Y→F に置換した場合は糖結合活性を維持していたことから、芳香族アミノ酸の重要性を示唆している[62,63]。

糖鎖アレイや細胞への結合力の高かった改変①（ループ C 配列：TWPNRSYK）、②（ループ C 配列：LWQNREFC）及び⑤（ループ C 配列：VWPNPPYH）では、125 残基目が Y→W になっている特徴が見られた。PNA と糖との X 線共結晶構造解析の結果では、125 残基目の Y と  $\beta$  Gal がスタッキング効果で相互作用していると考えられる[64]（図 42）。PNA の Y の水酸基がなくなり、W の疎水性側鎖と Gal の疎水面との相互作用が増強した結果ではないかと考えている。また、Y125H の変異体では、全て糖鎖アレイや細胞への結合力が弱く（図 36、図 39）、レポーターアッセイでも糖との反応性が弱い傾向にあった（図 30、図 32）。H では、疎水相互作用が弱く適切にスタッキングしないためだと考えられる。もうひとつの疎水性アミノ酸が保存されている 130 残基目の変異体 Y130L、Y130H は PNA より糖との結合が弱いことから、この部位は Y の疎水効果や水素結合ネットワークなどの寄与が糖との結合に大きいと考えられる。今回得られた改変レクチンは、128 残基目の S が R に置換されている変異体が多かったが、S128R が結合様式にどのように寄与するのかまだ適切な考察できていない。改変①が特に、Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$ との相互作用が強いことに関して、現段階では、131 残基目の K が静電的相互作用により、シアル酸の負電荷と相互作用しているのではないかと予測している。明確な答えを出すには X 線結晶構造解析が必要だ。

ところで、GalNAc特異性のマメ科レクチンDBLはPNAの逆でGalには結合しない（PNAはGalNAcには結合しないが、Galに結合する）。その理由はDBLのPNAの125Yに相当する部位のアミノ酸がLに置換されているからであり、マメ科レクチンと糖が結合する際に形成される芳香環とのスタッキングの相互作用が形成されないためと考えられる[65]。しかし、他のアミノ酸（DBLの103番目のグリシン）が水素結合を形成し、異なる位置の芳香族アミノ酸（DBLの104番目と132番目のトリプトファン）が疎水結合をするためレクチン活性は失わず保たれる。PNAとDBLの間の特異性のギャップは、マメ科レクチンの糖結合特異性について、アミノ酸配列の規則性だけで議論することは難しいことを示唆する。アミノ酸配列に共通項は存在するものの、糖鎖とレクチンは実際にどのような相互作用を及ぼすかX線構造解析を行わな

い限り詳しくわからない。本研究は、ランダム変異を導入したライブラリーを作製し、レクチンをスクリーニングしたという点では、マメ科レクチンの糖結合特異性の可能性を探るために非常に意味があった(アミノ酸配列から性質が予想される改変レクチンではなく、予想外のアミノ酸配列から特定糖への糖結合活性のある改変レクチンを創出できる可能性がある)と考察すると共に、ライブラリー作製法にさらなる検討が必要だと感じた。

## **6-5. 改変レクチン実用に向けて**

糖鎖のモニタリング、プロファイリング技術開発を行うにあたり、天然由来レクチン、既存の抗体では、数ある糖鎖構造を十分に解析することに限界があった。そこで、抗体作製技術ではなく、自然界に存在しているレクチンを改変し、レクチンをデザインすることに、本研究の独創性がある。

本研究で鋳型にした PNA は、T 抗原 ( $\text{Gal}\beta 1\text{-3GalNAc}\alpha$ ) を特異的に認識することから、現在、ガンの悪性度をはかるプローブとして有用だという報告もある[66,67]。そのため、作製した改変レクチンの糖結合特異性を解析し、得られた結果によっては、PNA よりも感度のよいプローブになることも十分に考えられる。しかし、本研究で行った MCSD 法を用いたレポーターアッセイでは、糖鎖とレクチン間における糖鎖の結合親和性を相対的に定量することは難しい。そのようなプローブとして有用かどうか議論する以前に糖結合特異性を相対的に評価するために、何か簡便な評価ツールが必要であった。マメ科レクチンの組み換えタンパク質を作製する際、大腸菌発現系では多くは封入体を形成し、活性のある組み換えタンパク質が得られにくいことから、哺乳類細胞を用いる系を考え、本研究後半において、その評価法を検討・模索するために、改変レクチン Fc 融合タンパク質 (図 13) を作製することを試みた。Fc 融合タンパク質は、レクチンを二量体で発現するためにアビディティ効果が得られ、糖鎖-レクチン間相互作用を調べるためにこれまでにいくらか用いられている[68,69]。実際に、改変レクチン-Fc 融合タンパク質として HEK293 細胞にて発現させ、培養上清中に組み換えタンパク質を分泌させることが出来た。安定発現細胞株から回収した培養液 50 ml から 100~300  $\mu\text{g}$  得ることが出来た。発現系の構築としては十分なものが確立できたと考えている。

改変レクチンの応用とは少しそれてしまうが、天然のマメ科レクチンの問題として、レクチンを得るソースである種子のロットによって性質が異なる可能性があることである。今回クローニングした PNA の cDNA (図 4、図 8) も、データベース上に登録されているものと少し異なっていた。しかも、今回のケースは、ループ D のバリエーションであり (図 4)、糖結合特異性への影響を完全に無視できない。このような事例からも天然のマメ科レクチンでは、精製する種子のロットを変える度に糖結合特異性に関する問題が出るかもしれないが、改変レクチンの発現系を構築したならば、レクチンの品質管理は問題ないだろう。

本研究で得られた改変①レクチンは、28 種類のヒトの培養細胞との結合試験を行った際、PNA と比較して、前単球系の細胞である THP-1、HL-60 細胞に強く結合する性質を有した (図 39)。また、K-562 細胞と比較し、THP-1 細胞はシアリダーゼ処理を行うと、通常はほとんど結合性を示さない PNA の結合性が①-Fc と比べて激的に増加したことを受けて (図 40)、各細胞は図 41 のような細胞表面糖鎖構造を有しているのではないかと推測した (図 41)。THP-1 細胞には、Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$  という糖鎖構造を細胞表面に K562 細胞より多く有していることが考えられる。この糖鎖構造が単球への分化になんらかの機能を担っているのかもしれないが、現段階ではよく解っていないため、更なる研究が必要である。他の NeuAc $\alpha$ 2-3Gal 結合性の MAH[44]や NeuAc $\alpha$ 2-6Gal 結合性 SSA[46]はシアル酸に結合することが知られているが、その他の類似シアル酸構造を主に認識するために、Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$  を特異的に選別することはできない。それを考えると、本研究で得た改変①-Fc は、Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$  の根本の GalNAc $\alpha$  の 6 位に NeuAc $\alpha$  の 2 位がグリコシド結合した構造を認識し、他のシアル酸含有糖鎖は認識しない糖結合活性であるため (図 35)、他のシアル酸を認識するレクチンと比べて、Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$  を検出することに適している。現在、著者の知る限り、Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$  を特異的に検出する術はないため、どのような細胞に多く発現しているかなどの情報がほとんどないが、今回の PNA-Fc やその他レクチンを複数用いた結合パターンの違いから、糖鎖の発現量や発現意義が推測できるようになるかもしれない。また、改変レクチンは、今後、レクチンアレイ[14]などへの応用も期待できる。

さらに糖鎖との結合親和性の絶対的指標として解離定数を算出するには、Biacore、

フロンタルアフィニティクロマトグラフィー (FAC) [70]を行うことが要求されるだろう。

## 6-6. 改変レクチンのスクリーニングを効率的に行うためには

本研究では、Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$ というシアル酸含有糖鎖と相互作用をするレクチンを創出したことに加え、糖との結合を増強したレクチンを創出したことでインパクトを残した。レクチンの親和性を高めることは、一般的に糖-レクチン間の相互作用は弱いため、プローブとしては大いに役立つことだろう。しかし、まだレクチンの品薄の問題は残されている。本研究ではスクリーニング系の立ち上げを担ったが、今回得ることができなかった糖結合特異性を有するレクチンを得るには、どのような工夫をするべきか。

今回のレクチンスクリーニングを行う過程で、レクチンを濃縮することができた場合は、Gal 末端であったという特徴の他に、ターゲットとした糖鎖は全て2糖以上であった (図 15、図 18、図 21)。一般的に、レクチンと糖鎖の相互作用に寄与する力は、水素結合と Van der Waal 力によるスタッキングに大別される。単糖の場合、オリゴ糖と比べると水素結合に寄与できる水酸基の数が少ないため、強い相互作用をすることが難しいと考えられる。単糖をターゲットにしたスクリーニングは、レクチンと糖の相互作用様式を考慮すると限界がある。今回単糖で行った Man、GlcNAc、GalNAc、Fucなどをターゲットとするよりは、2糖以上のオリゴ糖を用いたスクリーニングを行うことを考えたほうが良いだろう。

本研究で用いた鋳型は PNA で T 抗原 (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ ) 特異的レクチンであった。創出したレクチンはすべてこの糖鎖構造への結合性を残しており、特異性を大きく変えることはできなかった。逆に、T 抗原 (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ ) 類似構造への特異性は得やすいことから、特定糖鎖への親和性を得ることを目指すにあたり、鋳型レクチンの選択はとても大切だと感じた。マメ科レクチンファミリーの糖結合特異性ポテンシャルも考慮に入れるが、効率の良いスクリーニングを行うには他のマメ科レクチンで Man 結合性レクチン、GlcNAc 結合性レクチンなどのライブラリーを創出し、各糖鎖骨格に基づいた特異性の適性度の棲み分けを行うことが理想であると考ええる。例えば、ある GlcNAc 末端を認識するレクチンを創出したい場合は、GlcNAc 特異的レクチンを鋳型に X 線構造解析の結果から、変異導入部位を決定し、MCSD



法でスクリーニングを行う。分子生物学・生化学・物理化学の間の意思疎通は、狙った特異性を持つレクチンを得ることに欠かせないだろう。これらは今後の課題である。

もう一つの明確な課題として、レクチンライブラリーのポテンシャルを測る技術を確立することだろう。作製したレクチンライブラリーが、どのような糖結合特異性のポテンシャルを持っているのかがある程度予測がつけば、効率の良いスクリーニングへと繋がると考えられる。本研究でも、細胞表面に提示したレクチンのライブラリーの糖結合特異性ポテンシャルを知るための系を検討するために、2B4-PNA 細胞のライセートを調製し、レクチンの N 末に付加した myc タグに対する抗体を用いて、糖鎖アレイ解析を行ったが、糖結合活性が検出できなかった (data not shown)。細胞内には  $\beta$  Gal 結合性のガレクチン[71,72]などの細胞内レクチンが豊富に存在するために、それらが拮抗して作用し、糖鎖アレイ解析における細胞ライセートでは上手く検出することができなかったのかもしれない。方法論に関して、もう少し工夫する必要がある。

本研究が、セルソーターを用いた系でレクチンのスクリーニングを行ったことを示したことに對し、当研究室卒業生京藤、田中らがマニピュレーションシステムを用いた、レクチンスクリーニング法を立ち上げた (京藤・田中の修士学位論文)。この系では、糖鎖などの固定リガンドを固相化したプレートで細胞を培養するところまでは本研究の手法と同じだが、GFP 陽性細胞を濃縮するのではなく、GFP 陽性細胞を蛍光顕微鏡下で目視により直接拾い上げるというものだ。この手法は、実際にタンパク質ライブラリーから目的タンパク質のスクリーニングに利用されているが[73]、本手法にも応用可能である。この系でレクチンをスクリーニングする場合、本研究で行ったセルソーターを用いた系よりいくらかメリットがあると考えられる。一つ目は、スクリーニングに要する期間が短いことである。セルソーターで細胞を濃縮していく手法では、回収した細胞を再培養するステップを踏むために、ある程度の時間を要する。対して、マニピュレーションシステムでは、顕微鏡下で GFP 陽性細胞をいくらか回収し、その細胞を培養することなく直接 mRNA 抽出～PCR を行い、改変レクチン遺伝子を一度に列挙した。本研究では一ヶ月程かかるステップを、マニピュレーションシステムを用いて一週間ほどで済んだ。現在では、まだ 50 細胞以上を拾い上げなければ、RT-PCR の増幅効率が悪いという難点も残しているが、将来的には GFP 陽性細胞 1～5 細胞からの改変レクチン同定の系を立ち上げることが可能になるかもし

れないということで興味深い。二つ目は、細胞の凝集から偽陽性が生じる場合、目視でその凝集している細胞を避ける事で、細胞-細胞間の偽陽性を除くことができる。また、がん細胞結合性レクチンのスクリーニングとしても威力を発揮する。当研究室卒業生岩崎は、がん細胞と 2B4-PNAfb とを共培養することで、がん細胞結合性レクチンのスクリーニングを行ったが（岩崎 修士学位論文）、がん細胞を薬剤セレクションで除き、GFP 陽性 2B4-PNAfb 細胞をセルソーターで濃縮するという煩雑な手法であった。しかし、マニピュレーションシステムの場合、通常がん細胞は GFP を発現していないため、がん細胞と 2B4-PNAfb 細胞を共培養しても、蛍光顕微鏡を用いて、GFP 陽性 2B4-PNAfb 細胞とその他細胞を瞬時に見分けることができる。以上より、マニピュレーションシステムの系を用いたレクチンスクリーニング手法も、今後注目したい。

## **6-7. 今後の展望**

本研究で創出した PNA 変異体は、新たな特異性を獲得したもの、PNA よりも糖結合活性が強いもの、PNA より糖結合活性が弱いもの、シアル酸除去したグライコフォリンへの特異的な結合性を獲得したものであった。実施した方法論は、マメ科レクチンの糖結合活性ポテンシャルを探るために、糖結合部位に変異を導入したライブラリーを作製し、様々な糖鎖構造をターゲットとして、それに結合しうる改変レクチンをスクリーニングした。結果的に、鋳型レクチンから得られやすい特異性と得られにくい特異性があることがわかった。本研究では、新規糖結合性レクチンのスクリーニング系を開発することに成功したが、本手法を用いて標的糖鎖に糖結合特異性を持った改変レクチンを得るにはどうするか。

これまでに、PNA の数アミノ酸レベルでの変異体を示す特異性についての報告はいくらかある[74,75,76]。一つは、ループ D の 212 残基目の L（※本研究で扱う PNA はバリエーションであるため、212 残基目は R である）が N または A に置換された L212N、L212A の変異体について調べられた。PNA とラクトース ( $\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta$ ) の共結晶 X 線構造解析の結果より、212 残基目の L は糖結合ポケットの縁に位置することが分かっており[20]、最も近い位置には Glc の 2 位の OH 基が存在する。この時、Glc と 2 位の OH 基は水素結合を形成していない。変異体 L212N では PNA(WT)と比べて、ラクトースへの結合を増したが、 $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta$  へ結合

しなくなった[76]。前者は、N の側鎖と Glc の 2 位の OH 基が付加的に相互作用し、後者では N の側鎖と GlcNAc の 2 位のアセチル基とでは、疎水的な相互作用が崩壊するために結合しなくなったと考察されている。変異体 L212A では逆に Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$  への結合力を増強したが、PNA (WT) の元々強く結合する T 抗原 (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ ) への結合性が失われた[76]。前者は、GlcNAc $\beta$  のアセチル基と A の短い側鎖が相互作用に寄与することは推測できたが、T 抗原 (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ ) への結合性が失われた理由はよくわかっていない。ループの一つのアミノ酸を置換するだけで、同じ  $\beta$ Gal 結合性でも微細な糖鎖構造の違いを識別しうることがよく分かる。また、PNA の GalNAc に結合せず、Gal に特異的に結合する理由に、ループ C の長さが GalNAc 結合性レクチンと比べて 1～2 アミノ酸残基分長いことが挙げられていたが (図 2B) [37]、さらに 129 残基目の E の立体障害の影響もあることが示唆された。変異体 E129D、E129A を用いた実験では、E129D が GalNAc に相互作用を示したのに対し、E129A が相互作用しなかったことから、立体障害だけが原因ではなく、アセチル基と D の側鎖が相互作用する必要性も示唆された[75]。また、糖結合部位を構成する 4 つのループの領域以外のアミノ酸残基である 41 残基目の N の変異体を用いた研究からは、糖と直接水素結合を成すのではなく、水分子を介した水素結合を成す残基を置換することによっても、糖との結合性を変えられることが示された[74]。著者の知る限り、PNA に変異を導入して  $\beta$ Gal 以外の Man や Glc に結合性を示すような激的な変化を生む報告はないが、アミノ酸レベルの点変異導入においても PNA(WT)では結合しない GalNAc 結合能を獲得したことから、レクチンと糖の立体構造から、糖と相互作用するアミノ酸を数個ピックアップし、そのアミノ酸に対してランダム変異を導入し、MCSD 法でスクリーニングすることも効率的な方法になるかもしれない。現在の MCSD 法では、培養細胞を扱うため、扱える細胞数に  $10^7$  オーダーという限界の数字が見えている。一方、ランダムアミノ酸を導入したライブラリーの理論上の数値は、アミノ酸 20 種類として扱うアミノ酸残基が増える毎に指数関数的に増加することを考えると、7 アミノ酸残基分のランダム部位 ( $20^7 \approx 10^9$ ) としても厳密に一度のスクリーニングにおいて篩にかけることができてるのは、理論値の数%程度と思われる。モデリング技術を駆使し、特定糖鎖構造に狙いをつけて、特定の数アミノ酸残基における (1～3 アミノ酸) ライブラリーを作製し、改変レクチンをスクリーニングすることは、MCSD 法が最も効果を発

揮することができる方法論になるかもしれない。

また、MCSD 法の利用はマメ科レクチンにだけ留めなくても良いだろう。これまでに、レクチンライブラリーからの改変レクチンスクリーニング以外にも、レクチンの部位特異的変異導入を施した変異体において、糖結合特異性を変化させたという報告は、マメ科レクチン[77]の他に、ガレクチン[78,79,80,81]、C 型レクチン[82]、R 型レクチン[28]、グラム陰性菌のレクチン[83]などでも多数報告されている。つまり、どのレクチンであっても、X 線結晶構造解析により糖とレクチンの詳細な相互作用様式が解っていれば、人為的に鑄型レクチンの糖結合特異性改変のチャンスがあるだろう。そして、標的とする糖鎖構造を定め、マメ科レクチンに限らず、数あるレクチンテンプレートの中から、特異性と、レクチンと糖の相互作用様式を吟味し、且つ、組み換えタンパク質の作製が困難であるかどうかのパラメータを考慮しながら、目標とする特異性を得ることにより最も相応しいテンプレートを決定することが目標達成の近道であると考え。最適な鑄型レクチンを決め、変異導入部位を明確にしたならば、本研究で確立した MCSD 法が最大限に活かされる時が来ると考えている。

## 7. 総括

本研究では、マメ科レクチンの糖結合部位にランダム変異を導入したライブラリーを作製し、そこから MCSD 法を用いて、糖結合性改変レクチンをスクリーニングする斬新な系を構築した。本手法は、一般的に親和性の弱いとされる「レクチン」のスクリーニングに適していると考えられる。そして、Fc 融合タンパク質発現系を構築し、タンパク質プローブとして応用する術を提案した。新たに創出したレクチンには、新しい糖結合性を示したものに加え、親和性を増したものも創出することができた。そして、創出した改変レクチンのアミノ酸配列のアライメントから、特異性や親和性に関するアミノ酸の興味深い知見を得た。

未だ、方法においては検討すべき点がいくつか残されているが、今後の改変レクチン創出に関する研究の発展に大きく貢献できる報告であると考えている。スクリーニングして単離されたレクチンの数が増えることで、データベースとして構築され、タンパク質モデリングとしても応用することができる。糖鎖生物学の発展には、新規レクチンの探索は必須である。本手法により、プローブとして質の良いレクチンが創出されたら、それは既知のレクチンを改良して作られた“サイボーグレクチン”と呼ぶことができるだろう。

## 8. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方々の御指導、御鞭撻、または精神面を支える激励を賜りました。この場では全てを記載することはできませんが、特に研究面において御世話になった方々を代表して謝辞を述べさせていただきます。

本研究の遂行にあたり、始終御助言を賜り、充実した研究環境また研究以外の活動にもご支援頂きました東京大学大学院新領域創成科学研究科 山本一夫教授に深く感謝するとともに、厚く御礼を申し上げます。

研究の効率的な進め方と論理的な考え方をご親切にご教授くださいました東京大学大学院新領域創成科学研究科 松本直樹准教授に深い感謝と御礼を申し上げます。

研究に関する壮大な考え方や心構えを参考にさせて頂きました東京大学大学院新領域創成科学研究科 小浪悠紀子博士に厚く御礼申し上げます。

実験や糖鎖関連の御相談にのっていただいた東京大学大学院新領域創成科学研究科 鈴木詔子博士に心から感謝を申し上げます。

本研究の実験手法から、ストラテジーなどを教えて頂きました東京大学大学院新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 医薬デザイン工学分野卒業生 秦盛エイ博士に多大なる感謝を申し上げます。

改変レクチンのスクリーニングを一緒に行い、苦楽を共にした東京大学大学院新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 医薬デザイン工学分野卒業生 岩崎禎氏、京藤拓也氏、田中敦洋氏に心より御礼申し上げます。

レクチンの解析において、産業技術総合研究所での研究、解析をサポートして頂き、多くのご助言をくださった独立行政法人 産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 平林淳博士、解析手法や研究の指針について親身にディスカッションに応じていただいた舘野浩章博士、糖鎖アレイの解析をお手伝いしていただいた比江森恵子研究員に盛大なる感謝と御礼を申し上げます。

学生生活を共に過ごした当研究室に所属する同期の方々、お世話になった先輩の方々、日々の学業とスポーツの両立をエンカレッジしてくれた後輩達、また他研究室でありながら、研究のご相談にのっていただいた方々には、この場を借りて感謝の気持ちを述べさせていただきます。

最後に、これまで生活面で支えて頂いた家族に御礼を申し上げます。

## 9. 参考文献

1. Goldstein IJ, Hayes CE (1978) The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* 35: 127-340.
2. Powell AE, Leon MA (1970) Reversible interaction of human lymphocytes with the mitogen concanavalin A. *Experimental cell research* 62: 315-325.
3. Allen LW, Svenson RH, Yachnin S (1969) Purification of mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*: isolation of potent and weak phytohemagglutinins possessing mitogenic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 63: 334-341.
4. Wecksler M, Levy A, Jaffe WG (1968) [Mitogenic effects of extracts of *Canavalia ensiformis* and Concanavalina A]. *Acta cientifica venezolana* 19: 154-156.
5. Matsuda A, Kuno A, Matsuzaki H, Kawamoto T, Shikanai T, et al. (2013) Glycoproteomics-based cancer marker discovery adopting dual enrichment with *Wisteria floribunda* agglutinin for high specific glyco-diagnosis of cholangiocarcinoma. *Journal of proteomics* 85: 1-11.
6. Liu L, Yan B, Huang J, Gu Q, Wang L, et al. (2013) The identification and characterization of novel N-glycan-based biomarkers in gastric cancer. *PloS one* 8: e77821.
7. Accogli G, Zizza S, Garcia-Lopez A, Sarasquete C, Desantis S (2012) Lectin-binding pattern of the Senegalese sole *Solea senegalensis* oogenesis. *Microscopy research and technique* 75: 1124-1135.
8. Sahu BR, Mohapatra AD, Majumder A, Das PK, Ravindran B (2005) A flow cytometry based method for studying embryogenesis and immune reactivity to embryogenic stages in filarial parasites. *Filaria journal* 4: 11.
9. Tocchi A, Costa G, Lepre L, Liotta G, Mazzoni G, et al. (1998) The role of serum and gastric juice levels of carcinoembryonic antigen, CA19.9 and CA72.4 in patients with gastric cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology* 124: 450-455.
10. Wang Z, Tian YP (2014) Clinical value of serum tumor markers CA19-9, CA125 and CA72-4 in the diagnosis of pancreatic carcinoma. *Molecular and clinical oncology* 2: 265-268.
11. Ghosh I, Bhattacharjee D, Das AK, Chakrabarti G, Dasgupta A, et al. (2013) Diagnostic Role of Tumour Markers CEA, CA15-3, CA19-9 and CA125 in

- Lung Cancer. Indian journal of clinical biochemistry : IJCB 28: 24-29.
12. Taketa K, Endo Y, Sekiya C, Tanikawa K, Koji T, et al. (1993) A collaborative study for the evaluation of lectin-reactive alpha-fetoproteins in early detection of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 53: 5419-5423.
  13. Aoyagi Y (1995) Carbohydrate-based measurements on  $\alpha$ fetoprotein in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Glycoconj J* 12: 194-199.
  14. Kuno A, Uchiyama N, Koseki-Kuno S, Ebe Y, Takashima S, et al. (2005) Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling. *Nat Methods* 2: 851-856.
  15. Uchiyama N, Kuno A, Koseki-Kuno S, Ebe Y, Horio K, et al. (2006) Development of a lectin microarray based on an evanescent-field fluorescence principle. *Methods Enzymol* 415: 341-351.
  16. Lee MR, Park S, Shin I (2006) Protein microarrays to study carbohydrate-recognition events. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 16: 5132-5135.
  17. Pilobello KT, Slawek DE, Mahal LK (2007) A ratiometric lectin microarray approach to analysis of the dynamic mammalian glycome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 11534-11539.
  18. Fry SA, Afrough B, Lomax-Browne HJ, Timms JF, Velentzis LS, et al. (2011) Lectin microarray profiling of metastatic breast cancers. *Glycobiology* 21: 1060-1070.
  19. Sharon N, Lis H (1990) Legume lectins--a large family of homologous proteins. *FASEB J* 4: 3198-3208.
  20. Banerjee R, Das K, Ravishankar R, Suguna K, Surolia A, et al. (1996) Conformation, protein-carbohydrate interactions and a novel subunit association in the refined structure of peanut lectin-lactose complex. *Journal of molecular biology* 259: 281-296.
  21. Prasthofer T, Phillips SR, Suddath FL, Engler JA (1989) Design, expression, and crystallization of recombinant lectin from the garden pea (*Pisum sativum*). *The Journal of biological chemistry* 264: 6793-6796.
  22. Yamamoto K, Konami Y, Osawa T, Irimura T (1992) Alteration of the carbohydrate-binding specificity of the *Bauhinia purpurea* lectin through the preparation of a chimeric lectin. *J Biochem* 111: 87-90.
  23. Yamamoto K, Konami Y, Osawa T (2000) A chimeric lectin formed from *Bauhinia*



- purpurea* lectin and *Lens culinaris* lectin recognizes a unique carbohydrate structure. J Biochem 127: 129-135.
24. Loris R, Hamelryck T, Bouckaert J, Wyns L (1998) Legume lectin structure. Biochim Biophys Acta 1383: 9-36.
  25. Pratap JV, Bradbrook GM, Reddy GB, Surolia A, Raftery J, et al. (2001) The combination of molecular dynamics with crystallography for elucidating protein-ligand interactions: a case study involving peanut lectin complexes with T-antigen and lactose. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 57: 1584-1594.
  26. Yamamoto K, Maruyama IN, Osawa T (2000) Cyborg lectins: novel leguminous lectins with unique specificities. J Biochem 127: 137-142.
  27. Yabe R, Suzuki R, Kuno A, Fujimoto Z, Jigami Y, et al. (2007) Tailoring a novel sialic acid-binding lectin from a ricin-B chain-like galactose-binding protein by natural evolution-mimicry. Journal of Biochemistry 141: 389-399.
  28. Hu D, Tateno H, Kuno A, Yabe R, Hirabayashi J (2012) Directed evolution of lectins with sugar-binding specificity for 6-sulfo-galactose. The Journal of biological chemistry 287: 20313-20320.
  29. Ohtsuka M, Arase H, Takeuchi A, Yamasaki S, Shiina R, et al. (2004) NFAM1, an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-bearing molecule that regulates B cell development and signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101: 8126-8131.
  30. Morita S, Kojima T, Kitamura T (2000) Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. Gene Ther 7: 1063-1066.
  31. Pereira ME, Kabat EA, Lotan R, Sharon N (1976) Immunochemical studies on the specificity of the peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin. Carbohydrate research 51: 107-118.
  32. Lotan R, Skutelsky E, Danon D, Sharon N (1975) The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). The Journal of biological chemistry 250: 8518-8523.
  33. Young NM, Oomen RP (1992) Analysis of sequence variation among legume lectins. A ring of hypervariable residues forms the perimeter of the carbohydrate-binding site. Journal of molecular biology 228: 924-934.
  34. Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. Gene 108: 193-199.
  35. Tateno H, Mori A, Uchiyama N, Yabe R, Iwaki J, et al. (2008) Glycoconjugate

- microarray based on an evanescent-field fluorescence-assisted detection principle for investigation of glycan-binding proteins. *Glycobiology* 18: 789-798.
36. Young NM, Johnston RA, Watson DC (1991) The amino acid sequence of peanut agglutinin. *European journal of biochemistry / FEBS* 196: 631-637.
  37. Sharma V, Surolia A (1997) Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. *J Mol Biol* 267: 433-445.
  38. Lee RT, Lee YC (2000) Affinity enhancement by multivalent lectin-carbohydrate interaction. *Glycoconj J* 17: 543-551.
  39. Knibbs RN, Takagaki M, Blake DA, Goldstein IJ (1998) The role of valence on the high-affinity binding of *Griffonia simplicifolia* isolectins to type A human erythrocytes. *Biochemistry* 37: 16952-16957.
  40. Spiro RG, Bhoyroo VD (1974) Structure of the *O*-glycosidically linked carbohydrate units of fetuin. *The Journal of biological chemistry* 249: 5704-5717.
  41. Green ED, Adelt G, Baenziger JU, Wilson S, Van Halbeek H (1988) The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. Structural analysis of *N*-glycanase-released oligosaccharides by 500-megahertz <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *The Journal of biological chemistry* 263: 18253-18268.
  42. Yoshima H, Matsumoto A, Mizuochi T, Kawasaki T, Kobata A (1981) Comparative study of the carbohydrate moieties of rat and human plasma  $\alpha$  1-acid glycoproteins. *The Journal of biological chemistry* 256: 8476-8484.
  43. Irimura T, Tsuji T, Tagami S, Yamamoto K, Osawa T (1981) Structure of a complex-type sugar chain of human glycophorin A. *Biochemistry* 20: 560-566.
  44. Konami Y, Yamamoto K, Osawa T, Irimura T (1994) Strong affinity of *Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH) for sialic acid-containing Ser/Thr-linked carbohydrate chains of *N*-terminal octapeptides from human glycophorin A. *FEBS letters* 342: 334-338.
  45. Yamamoto K, Konami Y, Irimura T (1997) Sialic acid-binding motif of *Maackia amurensis* lectins. *Journal of Biochemistry* 121: 756-761.
  46. Shibuya N, Tazaki K, Song ZW, Tarr GE, Goldstein IJ, et al. (1989) A comparative study of bark lectins from three elderberry (*Sambucus*) species. *Journal of Biochemistry* 106: 1098-1103.

47. Yim M, Ono T, Irimura T (2001) Mutated plant lectin library useful to identify different cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 2222-2225.
48. McCullum EO, Williams BA, Zhang J, Chaput JC (2010) Random mutagenesis by error-prone PCR. *Methods Mol Biol* 634: 103-109.
49. Chusacultachai S, Yuthavong Y (2004) Random mutagenesis strategies for construction of large and diverse clone libraries of mutated DNA fragments. *Methods Mol Biol* 270: 319-334.
50. Yamamoto M, Kominato Y, Yamamoto F (1999) Phage display cDNA cloning of protein with carbohydrate affinity. *Biochemical and biophysical research communications* 255: 194-199.
51. Yamaji T, Teranishi T, Alpey MS, Crocker PR, Hashimoto Y (2002) A small region of the natural killer cell receptor, Siglec-7, is responsible for its preferred binding to  $\alpha$  2,8-disialyl and branched  $\alpha$  2,6-sialyl residues. A comparison with Siglec-9. *The Journal of biological chemistry* 277: 6324-6332.
52. Furukawa H, Iizuka K, Poursine-Laurent J, Shastri N, Yokoyama WM (2002) A ligand for the murine NK activation receptor Ly-49D: activation of tolerized NK cells from  $\beta$  2-microglobulin-deficient mice. *Journal of immunology* 169: 126-136.
53. Ito M, Maruyama T, Saito N, Koganei S, Yamamoto K, et al. (2006) Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *The Journal of experimental medicine* 203: 289-295.
54. Sanderson S, Shastri N (1994) LacZ inducible, antigen/MHC-specific T cell hybrids. *International Immunology* 6: 369-376.
55. Yamasaki S, Ishikawa E, Sakuma M, Hara H, Ogata K, et al. (2008) Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nature Immunology* 9: 1179-1188.
56. Izawa K, Yamanishi Y, Maehara A, Takahashi M, Isobe M, et al. (2012) The receptor LMIR3 negatively regulates mast cell activation and allergic responses by binding to extracellular ceramide. *Immunity* 37: 827-839.
57. Stanley P, Caillibot V, Siminovitch L (1975) Selection and characterization of eight phenotypically distinct lines of lectin-resistant Chinese hamster ovary cell. *Cell* 6: 121-128.

58. Stanley P, Sudo T, Carver JP (1980) Differential involvement of cell surface sialic acid residues in wheat germ agglutinin binding to parental and wheat germ agglutinin-resistant Chinese hamster ovary cells. *The Journal of cell biology* 85: 60-69.
59. Maenuma K, Yim M, Komatsu K, Hoshino M, Tachiki-Fujioka A, et al. (2009) A library of mutated *Maackia amurensis* hemagglutinin distinguishes putative glycoforms of immunoglobulin A1 from IgA nephropathy patients. *Journal of proteome research* 8: 3617-3624.
60. Maenuma K, Yim M, Komatsu K, Hoshino M, Takahashi Y, et al. (2008) Use of a library of mutated *Maackia amurensis* hemagglutinin for profiling the cell lineage and differentiation. *Proteomics* 8: 3274-3283.
61. van Eijsden RR, Hoedemaeker FJ, Diaz CL, Lugtenberg BJ, de Pater BS, et al. (1992) Mutational analysis of pea lectin. Substitution of Asn125 for Asp in the monosaccharide-binding site eliminates mannose/glucose-binding activity. *Plant molecular biology* 20: 1049-1058.
62. Adar R, Sharon N (1996) Mutational studies of the amino acid residues in the combining site of *Erythrina corallodendron* lectin. *European journal of biochemistry / FEBS* 239: 668-674.
63. Zhu K, Bressan RA, Hasegawa PM, Murdock LL (1996) Identification of *N*-acetylglucosamine binding residues in *Griffonia simplicifolia* lectin II. *FEBS letters* 390: 271-274.
64. Natchiar SK, Srinivas O, Mitra N, Surolia A, Jayaraman N, et al. (2006) Structural studies on peanut lectin complexed with disaccharides involving different linkages: further insights into the structure and interactions of the lectin. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 62: 1413-1421.
65. Hamelryck TW, Loris R, Bouckaert J, Dao-Thi MH, Strecker G, et al. (1999) Carbohydrate binding, quaternary structure and a novel hydrophobic binding site in two legume lectin oligomers from *Dolichos biflorus*. *J Mol Biol* 286: 1161-1177.
66. Aoki D, Nozawa S, Iizuka R, Kawakami H, Hirano H (1990) Differences in lectin binding patterns of normal endometrium and endometrial adenocarcinoma, with special reference to staining with *Ulex europaeus* agglutinin 1 and peanut agglutinin. *Gynecol Oncol* 37: 338-345.
67. Zebda N, Bailly M, Brown S, Dore JF, Berthier-Vergnes O (1994) Expression of PNA-binding sites on specific glycoproteins by human melanoma cells is

- associated with a high metastatic potential. *Journal of cellular biochemistry* 54: 161-173.
68. Tateno H, Ohnishi K, Yabe R, Hayatsu N, Sato T, et al. (2010) Dual specificity of Langerin to sulfated and mannosylated glycans via a single C-type carbohydrate recognition domain. *The Journal of biological chemistry* 285: 6390-6400.
  69. Yabe R, Tateno H, Hirabayashi J (2010) Frontal affinity chromatography analysis of constructs of DC-SIGN, DC-SIGNR and LSECtin extend evidence for affinity to agalactosylated *N*-glycans. *The FEBS journal* 277: 4010-4026.
  70. Tateno H, Nakamura-Tsuruta S, Hirabayashi J (2007) Frontal affinity chromatography: sugar-protein interactions. *Nat Protoc* 2: 2529-2537.
  71. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL (2002) Intracellular functions of galectins. *Biochimica et biophysica acta* 1572: 263-273.
  72. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, et al. (1994) Galectins: a family of animal  $\beta$  galactoside-binding lectins. *Cell* 76: 597-598.
  73. Siewert K, Malotka J, Kawakami N, Wekerle H, Hohlfield R, et al. (2012) Unbiased identification of target antigens of CD8<sup>+</sup> T cells with combinatorial libraries coding for short peptides. *Nature medicine* 18: 824-828.
  74. Adhikari P, Bachhawat-Sikder K, Thomas CJ, Ravishankar R, Jeyaprakash AA, et al. (2001) Mutational analysis at Asn-41 in peanut agglutinin. A residue critical for the binding of the tumor-associated Thomsen-Friedenreich antigen. *The Journal of biological chemistry* 276: 40734-40739.
  75. Sharma V, Srinivas VR, Adhikari P, Vijayan M, Surolia A (1998) Molecular basis of recognition by Gal/GalNAc specific legume lectins: influence of Glu 129 on the specificity of peanut agglutinin (PNA) towards C2-substituents of galactose. *Glycobiology* 8: 1007-1012.
  76. Sharma V, Vijayan M, Surolia A (1996) Imparting exquisite specificity to peanut agglutinin for the tumor-associated Thomsen-Friedenreich antigen by redesign of its combining site. *The Journal of biological chemistry* 271: 21209-21213.
  77. Arango R, Rodriguez-Arango E, Adar R, Belenky D, Loontjens FG, et al. (1993) Modification by site-directed mutagenesis of the specificity of *Erythrina corallodendron* lectin for galactose derivatives with bulky substituents at C-2. *FEBS letters* 330: 133-136.

78. Salomonsson E, Carlsson MC, Osla V, Hendus-Altenburger R, Kahl-Knutson B, et al. (2010) Mutational tuning of galectin-3 specificity and biological function. The Journal of biological chemistry 285: 35079-35091.
79. Konno A, Yonemaru S, Kitagawa A, Muramoto K, Shirai T, et al. (2010) Protein engineering of conger eel galectins by tracing of molecular evolution using probable ancestral mutants. BMC evolutionary biology 10: 43.
80. Imamura K, Takeuchi H, Yabe R, Tateno H, Hirabayashi J (2011) Engineering of the glycan-binding specificity of *Agrocybe cylindracea* galectin towards  $\alpha$  (2,3)-linked sialic acid by saturation mutagenesis. Journal of Biochemistry 150: 545-552.
81. Hu D, Tateno H, Sato T, Narimatsu H, Hirabayashi J (2013) Tailoring GalNAc $\alpha$  1-3Gal  $\beta$  specific lectins from a multi-specific fungal galectin: dramatic change of carbohydrate specificity by a single amino-acid substitution. The Biochemical journal 453: 261-270.
82. Iobst ST, Drickamer K (1994) Binding of sugar ligands to Ca<sup>2+</sup>-dependent animal lectins. II. Generation of high-affinity galactose binding by site-directed mutagenesis. The Journal of biological chemistry 269: 15512-15519.
83. Adam J, Pokorna M, Sabin C, Mitchell EP, Imberty A, et al. (2007) Engineering of PA-III lectin from *Pseudomonas aeruginosa* - Unravelling the role of the specificity loop for sugar preference. BMC structural biology 7: 36.

・京藤拓也（平成 24 年度 3 月修了） 東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 修士学位論文「糖結合部位改変レクチンの新規スクリーニング技術の開発～マイクロマニピレーションシステムを用いて～」

・田中敦洋（平成 25 年度 3 月修了） 東京大学大学院 薬学研究科 薬科学専攻 修士学位論文「がん糖鎖抗原を標的とした改変レクチンの探索」

・岩崎禎（平成 22 年度 3 月修了） 東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 修士学位論文「がん糖鎖抗原に対する改変レクチンプローブの探索」

・Nathan Sharon、Halina Lis（著）山本一夫/小浪悠紀子（訳）「レクチン 第二版 歴史、構造・機能から応用まで」

10. ☒

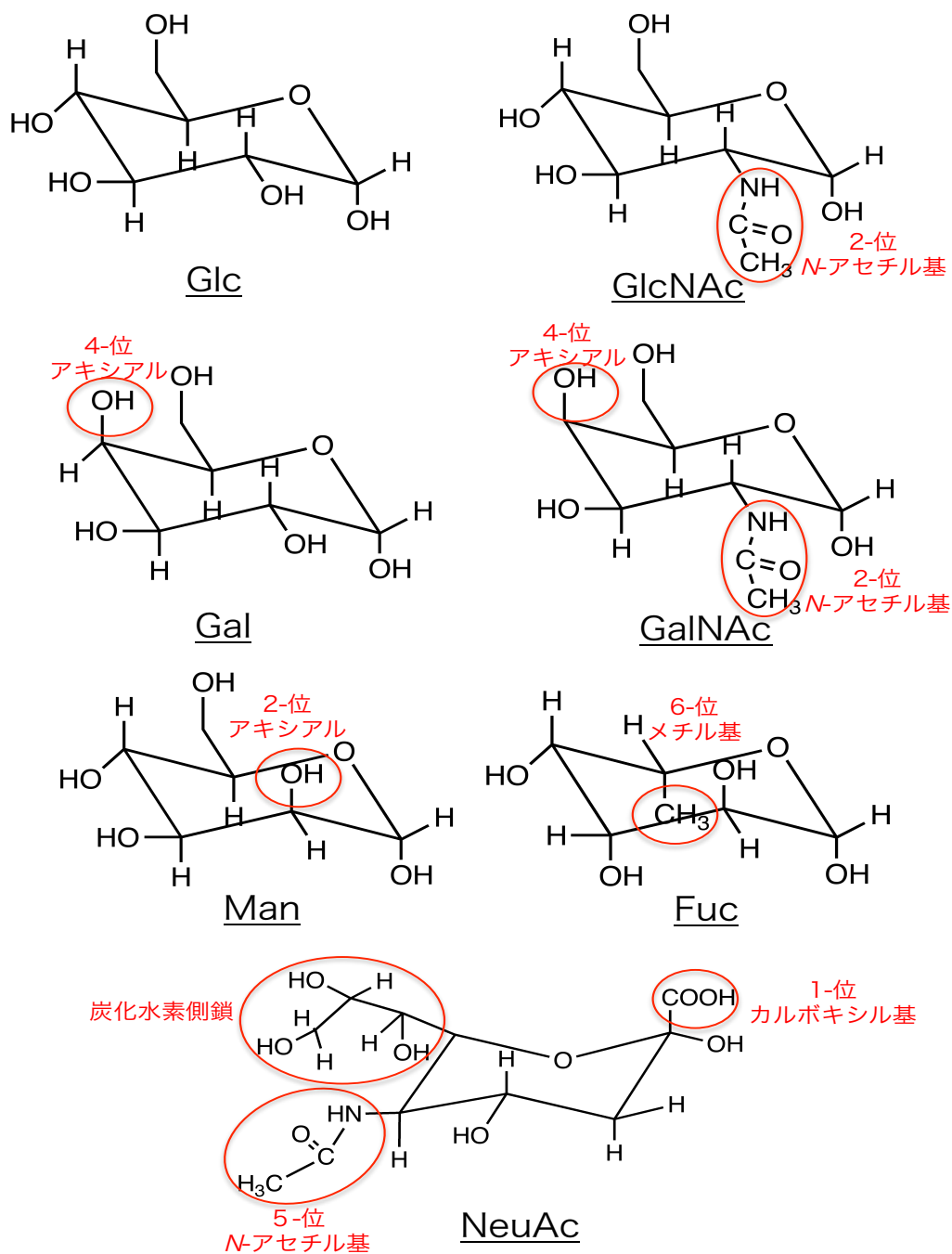
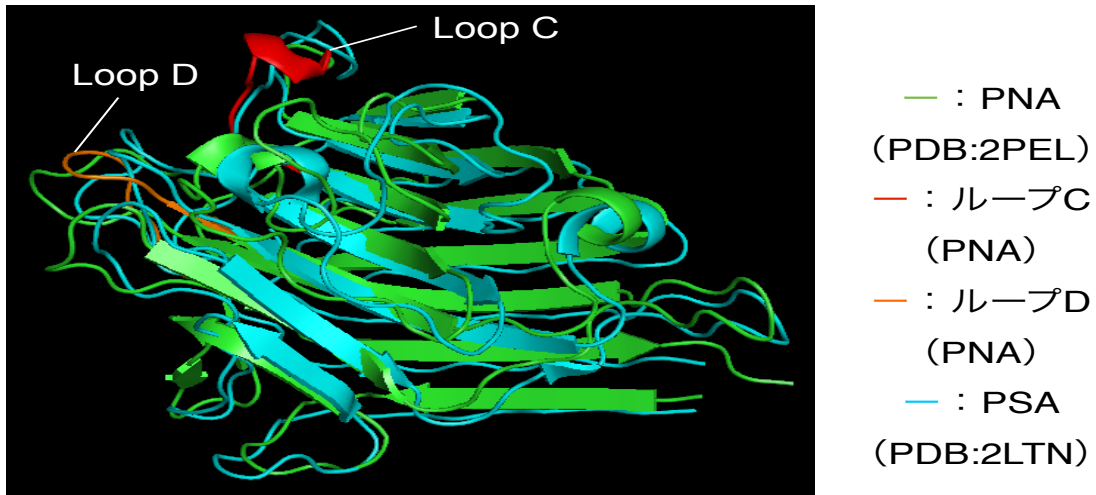


図1. 糖鎖の主要構成成分7種類の構造

グルコース (Glc)、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトース (Gal)、*N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、マンノース (Man)、フコース (Fuc)、*N*-アセチルノイラミン酸：シアル酸 (NeuAc) の7種類の糖の構造を、ソフト「ChemDraw」を用いて作図した。各糖骨格の特徴を赤色で示した。



A

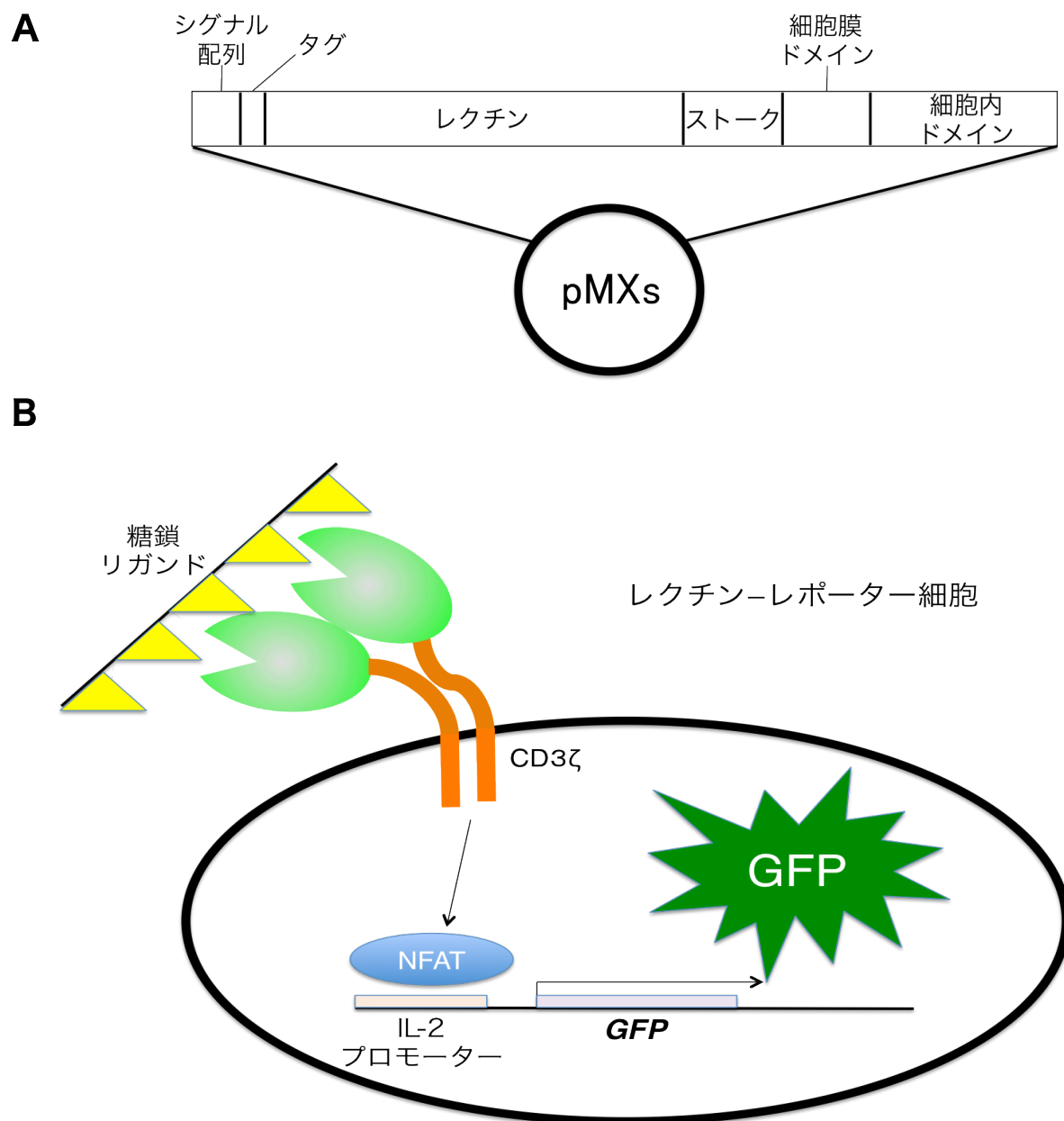


B

	レクチン	ループA	ループB	ループC	ループD
GalNAc	WBAI	APFP--RPHPADGLVF	GE-GGGYFG	VEFDTRF <b>N</b> ----TWDP	GFSATGDPGSGKQRNATETHDILSW
	EcorI	GPYT--RPLPADGLVF	AQ-GYGYLG	VEFDTF <b>S</b> N----PWDP	GLSGATG----AQRDAAETHDVYSW
	DBL	APSK---ASFADGIAF	RR-NGGYLG	VEFDTL <b>S</b> N <b>S</b> ---GWDP	GFSATTGLSEG----YIETHDVLWSW
	DB58	APNK---SSSADGIAF	KS-NSGFLG	VEFDTF <b>S</b> N <b>T</b> ---DWDP	GFSATTGFFEG----YTETHDVLWSW
	CSII	APNPS---TAATDGLAF	QSA-GGYLG	VEFDTY <b>N</b> S---AWDP	GFSATTGQTDN----YIETHDILSW
	GSIV	KNYG---APTADGLAF	KDY-GGFLG	VEFDTW <b>I</b> N <b>K</b> ---DWNDP	GFSAGVG-----YDEVTYILSW
	SBA	APDT---KRLADGLAF	QT-HAGYLG	VEFDTRF <b>N</b> ----SWDP	GFSATGLDIP-----GESHDVLWSW
複合型 糖鎖	PHAE	VPNN---SGPADGLAF	KD-KGGLLG	VEFDTL <b>I</b> N <b>V</b> ---HWDP	GFTATTGITKG----NVETNDILSW
	PHAL	VPNN---AGPADGLAF	KD-KGGFLG	VEFDTL <b>I</b> N <b>K</b> ---DWDP	GFSATTGINKG----NVETNDVLWSW
	PHAM	VPNN---AGPADGLAF	KD-KGGFLG	VEFDTL <b>I</b> N <b>K</b> ---DWDP	GFSATTGITKG---NVETNDILSW
Gal	<b>PNA</b>	KD--IKDYDPADGLIF	GSIGGGTLG	VEFDTY <b>S</b> N <b>S</b> --EYNDP	GFSASG <b>S</b> <b>R</b> ----- <b>AG</b> RQIHLIRSW
	BPL	IDVP---HITADGFAP	KDY-GGCLG	VEFDTW <b>P</b> N <b>T</b> --EWSDL	GFSGGTG-----FNETQYILSW
Fuc	LTA	IR--ELKYTPDGLVF	GS-TGGFLG	VEFDSY <b>H</b> <b>N</b> ----IWDP	GFSATTGN-----PEREKHDIYSW
	UEA1	SANP---KAATDGLTF	RRA-GGYFG	VEFD <b>T</b> I-GSP <b>V</b> N <b>F</b> DDP	GFSGGT <b>Y</b> <b>I</b> -----GRQATHEVLN <b>W</b>
GlcNAc	UEA2	EPDE--KIDGVDGLAF	GS-SAGMFG	VEFDSYFGK <b>T</b> <b>Y</b> <b>N</b> PWDP	GFSGGVGN-----AAK <b>F</b> DHDVL <b>S</b> <b>W</b>
	LAA1	PPIQSRKADGVDGLAF	GS-SAGMFG	VEFDTYFGK <b>A</b> <b>Y</b> <b>N</b> PWDP	GFSAGVGN-----AAK <b>F</b> NHDIL <b>S</b> <b>W</b>
	OVL	RENI---NRGGDGITF	KS-GGGYLG	VEFDTF <b>S</b> <b>N</b> ----RWDP	GLSAATGDLV-----EQHRLY <b>S</b> <b>W</b>
Man/ Glc	MTA	APYS---SNVADGLAF	IG-RAGFLG	VEIDTF <b>H</b> <b>N</b> ----TWDP	GFSATGAE <b>F</b> -----AEHDIRY <b>W</b>
	LSL	RPNSDS-QVVADGFTF	RG-DGGLLG	VEFDTF <b>H</b> <b>N</b> <b>Q</b> ---PWDP	GLSASTATY-----SAHEVY <b>S</b> <b>W</b>
	ConA	SPDS---HPADGIAF	GS-TGRLLG	VELDTY <b>P</b> <b>N</b> <b>T</b> --DIGDP	GLSASTGL-----YKETNTIL <b>S</b> <b>W</b>
	DlocI	SPDH---EPADGITF	GS-GGRLLG	VELDSY <b>P</b> <b>N</b> <b>T</b> --DIGDP	GLSATTGL-----YKETNTIL <b>S</b> <b>W</b>
	LOL1	APNS---YNVADGFTF	QT-GGGYLG	VEFDTFY <b>N</b> <b>T</b> ---AWDP	GFSATTGA <b>E</b> <b>F</b> -----AAHEVL <b>S</b> <b>W</b>
	LenI	SPNG---YNVADGFTF	QT-GGGYLG	VEFDTFY <b>N</b> <b>A</b> ---AWDP	GFSATTGA <b>E</b> <b>F</b> -----AAQEVH <b>S</b> <b>W</b>
	PSL	APNS---YNVADGFTF	QT-GGGYLG	VEFDTFY <b>N</b> <b>A</b> ---AWDP	GFSATTGA <b>E</b> <b>Y</b> -----AAHEVL <b>S</b> <b>W</b>
	Favin	APNG---YNVADGFTF	QT-GGGYLG	VEFDTFY <b>N</b> <b>A</b> ---AWDP	GFSATTGA <b>E</b> <b>Y</b> -----ATHEVL <b>S</b> <b>W</b>
	DlabI	TNYT---SRIADGLAF	SY-HGGFLG	VEFDTY <b>L</b> <b>N</b> --PDYGD <b>P</b>	GLSASTG <b>Q</b> -----NIERN <b>T</b> VH <b>S</b> <b>W</b>

図2. マメ科レクチン立体構造及び特異性毎の糖結合部位のアミノ酸配列

(A) ピーナッツレクチン (PNA) (PDB: 2PEL) とインゲンマメレクチン (PSA) (PDB: 2LTN) のレクチンサブユニットの PDB ファイルを、ソフト「PyMOL」を用い重ね合わせた。(B) 参考文献 [37] を参考に、マメ科レクチンの糖結合特異性と糖結合部位のアミノ酸配列の関係をアミノ酸アライメントで比較した。赤字は高度に保存されているアスパラギンを示す。青字は今回クローニングした PNA の配列で、データベースの配列と異なる部位を示す。



**図 3. レクチンレポーター細胞**

(A) レクチンレポーター細胞作製用コンストラクト。ウイルスベクターpMXs は、N 末から、CD8 $\beta$  のシグナル配列、myc タグ、レクチン領域 (PNA など)、mNKP46 のストーク領域、CD8 $\alpha$  膜貫通領域、CD3 $\zeta$  細胞内領域を発現するように設計されている。(B) レクチンレポーター細胞概略図。(A) のコンストラクトを IL-2 プロモーター配列下流に GFP 遺伝子を連結したコンストラクトを持つマウス T 細胞ハイブリドーマ 2B4 細胞に導入し、レクチンレポーター細胞とする。このレポーター細胞は、レクチンを細胞表面に提示する膜貫通型のタンパク質を発現しており、糖鎖との相互作用によってレクチン分子が架橋されると、細胞内に GFP の発現が誘導される。

1	50
PNA (P02871) → AETVSFNFNS FSEGNPAINF QGDVTVLSNG NIQLTNLNKV NSVGRVLYAM	
cloning PNA → AETVSFNFNS FSEGNPAINF QGDVTVLSNG NIQLTNLNKV NSVGRVLYAM	
51	100
PVRIWSSATG NVASFLTSFS FEMKDIKDYD PADGIIFFFIA PEDTQIPAGS	
PVRIWSSATG NVASFLTSFS FEMKDIKDYD <u>PADGIIFFFIA PEDTQIPAGS</u>	
	ループA
101	150
IGGGTLGVSD TKGAGHFVGV EFDITYSNSEY NDPPTDHSVGI DVNSVDSVKT	
<u>IGGGTLGVSD</u> TKGAGYFVGV <u>EFDITYSNSEY</u> NDPPTDHSVGI DVNSVDSVKT	
ループB	ループC
151	200
VPWNSVSGAV VKVTVIYDSS TKTLSVAVTN DNGDITTIAQ VVDLKAKLPE	
VPWNSVSGAV VKVTVIYDSS TKTLSVAVTN DNGDITTIAQ VVDLKAKLPE	
201	250
RVKFGFSASG SLGGRQIHLI RSWSFTSTLI TTTRRSIDNN EKKIMNMASA	
RVKFGFSASG <u>S</u> RAGROIHLI <u>RSWSFTSTLI</u> TTTRRSIDNN EKKIMNMASA	
	ループD

図 4. PNA (Uniprot entry P02871) のアミノ酸配列と本研究で使用する鋳型 PNA のアミノ酸配列の相違とループの位置

PNA のシグナル配列を除いたレクチン領域のアミノ酸配列を示す。本研究で、鋳型レクチンとして使用するために、ピーナッツの種子から mRNA を抽出し、cDNA を取得した。取得した PNA の cDNA は、登録されているデータベースの配列 (P02871) とはアミノ酸配列の異なる部位が 3 箇所存在し (H116→Y、L212→R、G213→A)、赤字で示した。また、糖結合部位を成す 4 つのループ (ループ A、B、C、D) は、下線で示した。

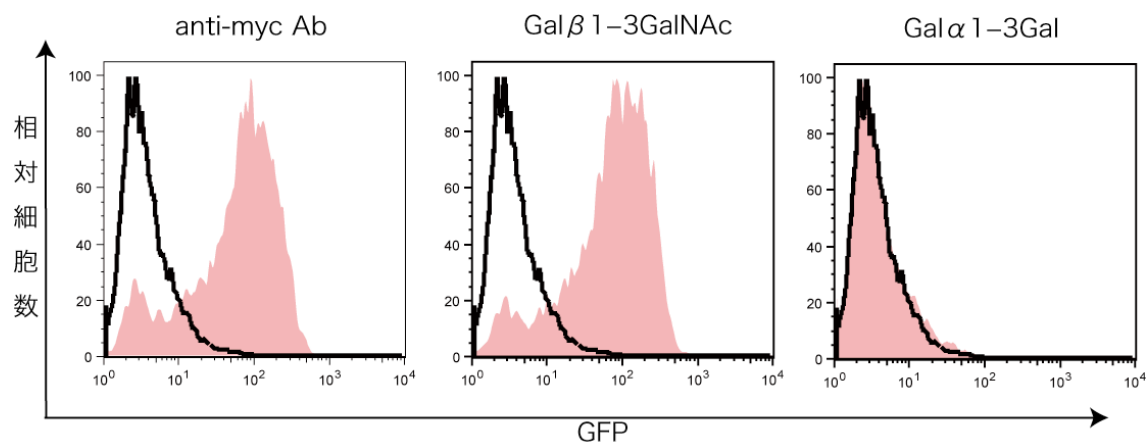
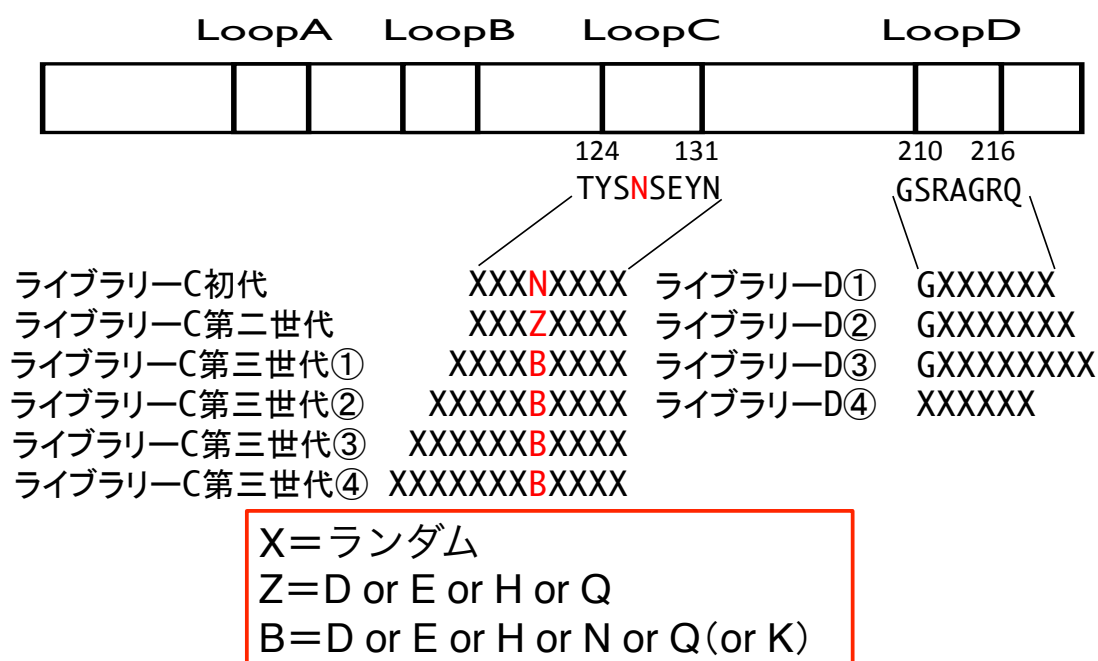


図5. 2B4-PNA 細胞のレポーターアッセイ

pMXs-PNA を Plat-E 細胞に導入してパッケージングしたレトロウイルスを 2B4 細胞に感染させて樹立した 2B4-PNA 細胞と抗 myc 抗体、Gal $\beta$  1-3GalNAc $\alpha$ -PAA と Gal $\alpha$  1-3Gal $\beta$ -PAA を固相化したプレートで 12 時間培養した。細胞を回収し、フローサイトメトリーによって、GFP 蛍光強度を解析した。何も固相化していないプレートでの培養後での解析値（黒線）と抗体または糖鎖ポリマーを固相化したプレートでの培養後での解析値（ピンクのヒストグラム）を示す。

**A**

改変レクチンのデザイン      テンプレート:PNA



**B**

ライブラリー名	作製した規模 (cfu)
ライブラリーC (初代)	$4.0 \times 10^6$
ライブラリーC (第二世代)	$3.0 \times 10^6$
ライブラリーC (第三世代) ①	$1.8 \times 10^6$
ライブラリーC (第三世代) ②	$1.6 \times 10^6$
ライブラリーC (第三世代) ③	$1.5 \times 10^6$
ライブラリーC (第三世代) ④	$2.0 \times 10^6$
ライブラリーD①	$1.4 \times 10^5$
ライブラリーD②	$1.1 \times 10^5$
ライブラリーD③	$1.0 \times 10^5$
ライブラリーD④	$3.3 \times 10^5$
ライブラリーC&D	$5.0 \times 10^6$

図6. PNA 変異体ライブラリーのデザインと作製規模

(A) ループCのライブラリーを6種類、ループDのライブラリーを4種類作製した。Xはランダムアミノ酸を導入した。ZはD、E、H、Qのいずれかのアミノ酸であり、BはD、E、H、N、Qの他にコドンの関係でK（リジン）も含まれる。(B) 各ライブラリーの本研究における作製規模を示した。

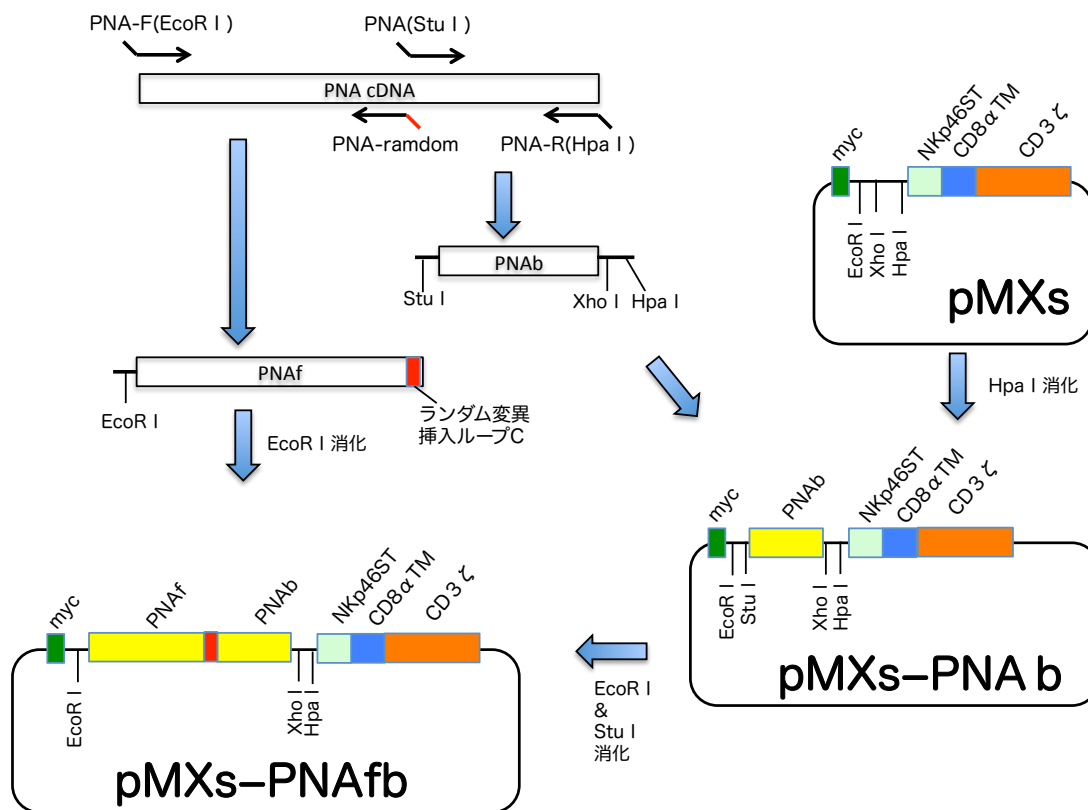


図 7. pMXs-PNAfb の設計図

PNAb 断片は PNA (Stu I) と PNA-R (Hpa I) の両プライマーを用いて PCR で増幅した。増幅した PNA b 断片を先に pMXs に組み込んだ。PNAf 断片は PNA-F(EcoR I) と PNA-random の両プライマーを用いて PCR で増幅した。その後、PNAf 断片を pMXs-PNAb に組み込んで、pMXs-PNAfb を構築した。

```

1
PNA (Genbank:S42352) → gccgaaacag tttccttcaa cttcaactct ttcagcgaag gaaaccccg c aataaat ttc
cloning PNA → gccgaaacag tttccttcaa cttcaactct ttcagcgaag gaaaccccg c aataaat ttc

61
caaggtgacg t cactgttct t tcaaatggc aatatacaac tcacgaacct caacaaggta
caaggtgacg t cactgttct t tcaaatggc aatatacaac tcacgaacct caacaaggta

121
aatagcgtcg gccgtgttct ttatgccatg ccggtgcgca tttggagcag tgccaccggc
aatagcgtcg gccgtgttct ttatgccatg ccggtgcgca tttggagcag tgccaccggc

181
aatgtcgcga gcttcctcac ctccttctct ttcgagatga aggatatcaa agattatgat
aatgtcgcga gcttcctcac ctccttctct ttcgagatga aggatatcaa agattatgat

241
cctgccgacg gtatcatctt tttcattgca ccggaagata cgcagattcc tgccggcagt
cctgccgacg gtatcatctt tttcattgca ccggaagata cgcagattcc tgccggcagt

301
attggtggtg gaaccttagg cgtctctgac actaaagggg cgggtcactt tgttgagtg
attggtggtg gaaccttagg cgtctctgac actaaagggg cgggtcactt tgttgagtg

361
gagtttgata cctattccaa cagtgagtac aacgatccac ccactgatca cgttggaatt
gagtttgata cctattccaa cagtgagtac aacgatccac ccactgatca cgttggaatt

421
gatgtaaata gcgtggattc ggtgaagacc gtgccatgga atagtgtgag tggagcagtg
gatgtaaa ca g tggattc ggtgaagacc gtgccatgga atagtgtgag tggagcagtg

481
gtgaaagtga ctgtgatata tgactcttca acaaagacat tgagtgttgc tgtgaccaac
gt t aaagtga ctgtgatata tgactcttca acaaagacat tgagtgttgc tgtgaccaac

541
gacaatggcg atattaccac cattgctcaa gttgttgatt tgaaggcgaa gcttccggag
gaca a ggcg atattaccac cattgctcaa gttgttgatt tgaaggcgaa gcttccggag

601
agggtcaagt tcgggttttc tgccctccggc tcccttggcg gtcgtcagat acatctcatc
agggtcaagt t tgggttttc tgccctccggc tccc g tgcg gtcgtcagat acatctcatc

661
cgttcattggt ctttcacttc aaccttgata acaacaacca gaagaagcat cgacaataac
cgttcattggt ctttcacttc aaccttgata acaacaacca gaagaagcat cgacaataac

721
gaaaagaaaa taatgaatat ggcaagtgc
gaaaagaaaa taatgaatat ggcaagtgc
750

```

図 8. PNA (Genbank:S42352) と本研究でクローニングした PNA のレクチンサブユニットの cDNA の塩基配列のアライメント

シグナル配列を除いた PNA をコードする塩基配列をデータベースの配列とクローニングした配列で比較した。赤字で示した塩基が相違点を示す。(全部で 8 塩基分異なる。)

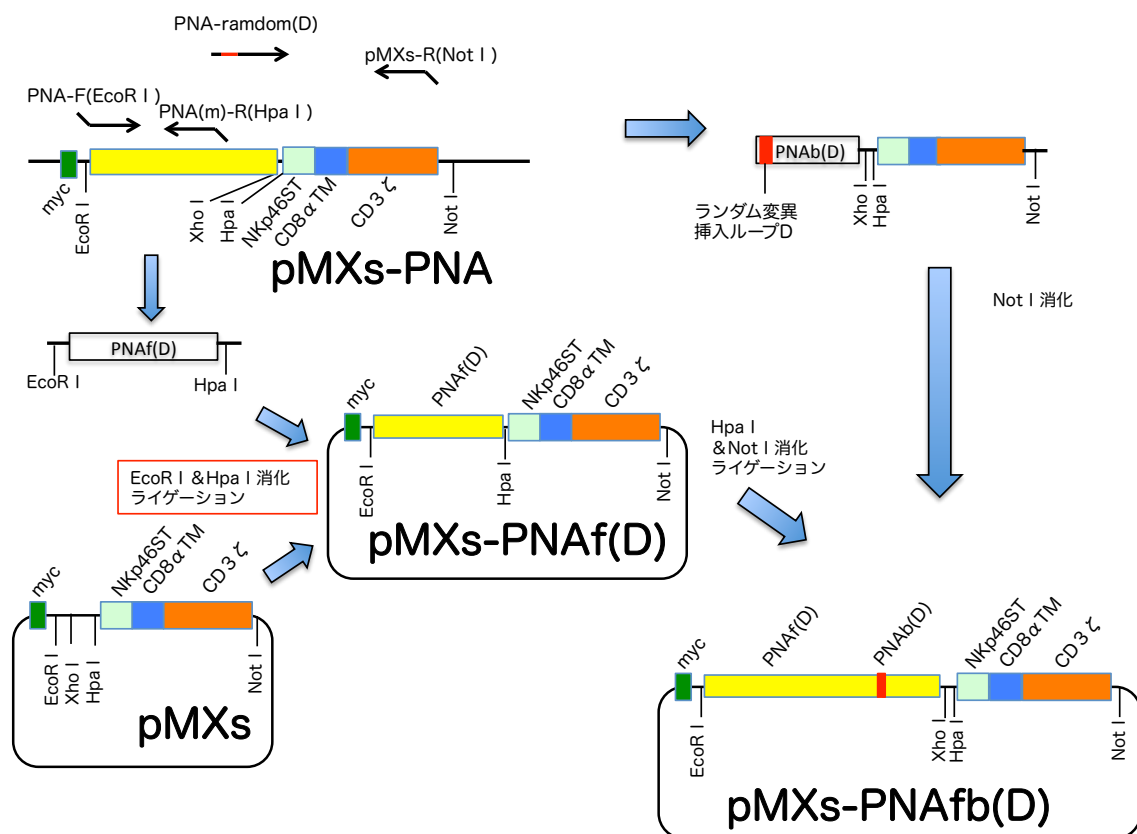


図 9. pMXs-PNAfb (D) の設計図

PNAf (D) 断片を PNA-F (EcoR I) と PNA(m)-R (Hpa I) の両プライマーを用いて PCR で増幅した。増幅した PNAf (D) を先に、pMXs に組み込んだ。次に、PNAb (D) 断片は PNA-random (D) と pMXs-R (Not I) の両プライマーを用いて PCR で増幅した。増幅した PNAb (D) を pMXs-PNAf (D) に組み込んで、pMXs-PNAfb(D)を構築した。



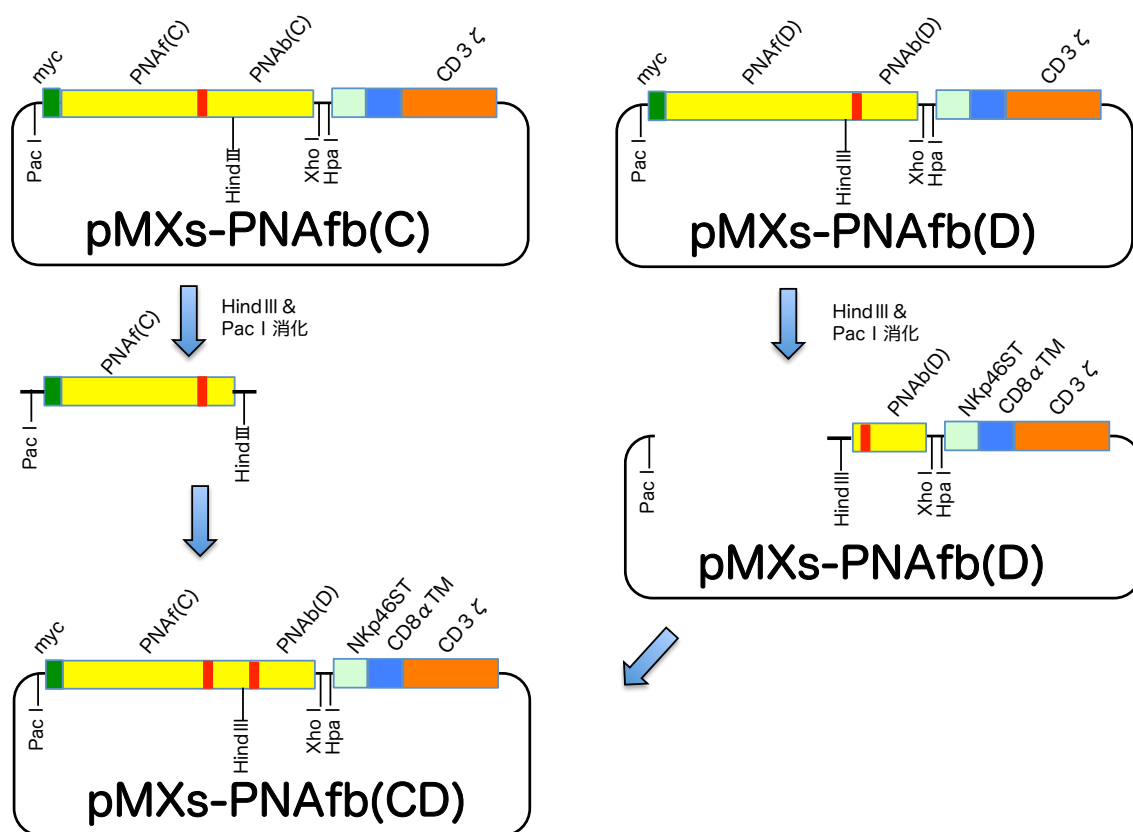


図 10. pMXs-PNAfb (CD) の設計図

pMXs-PNAfb (C) から、制限酵素を用いて PNAf(C)断片を切り出した（インサートとして用いる）。また、pMXs-PNAfb (D) を制限酵素で PNAf (D) 部分を取り除いた（ベクターとして用いる）。以上で作製したインサートとベクターを繋いで、pMXs-PNAfb(CD) を構築した。

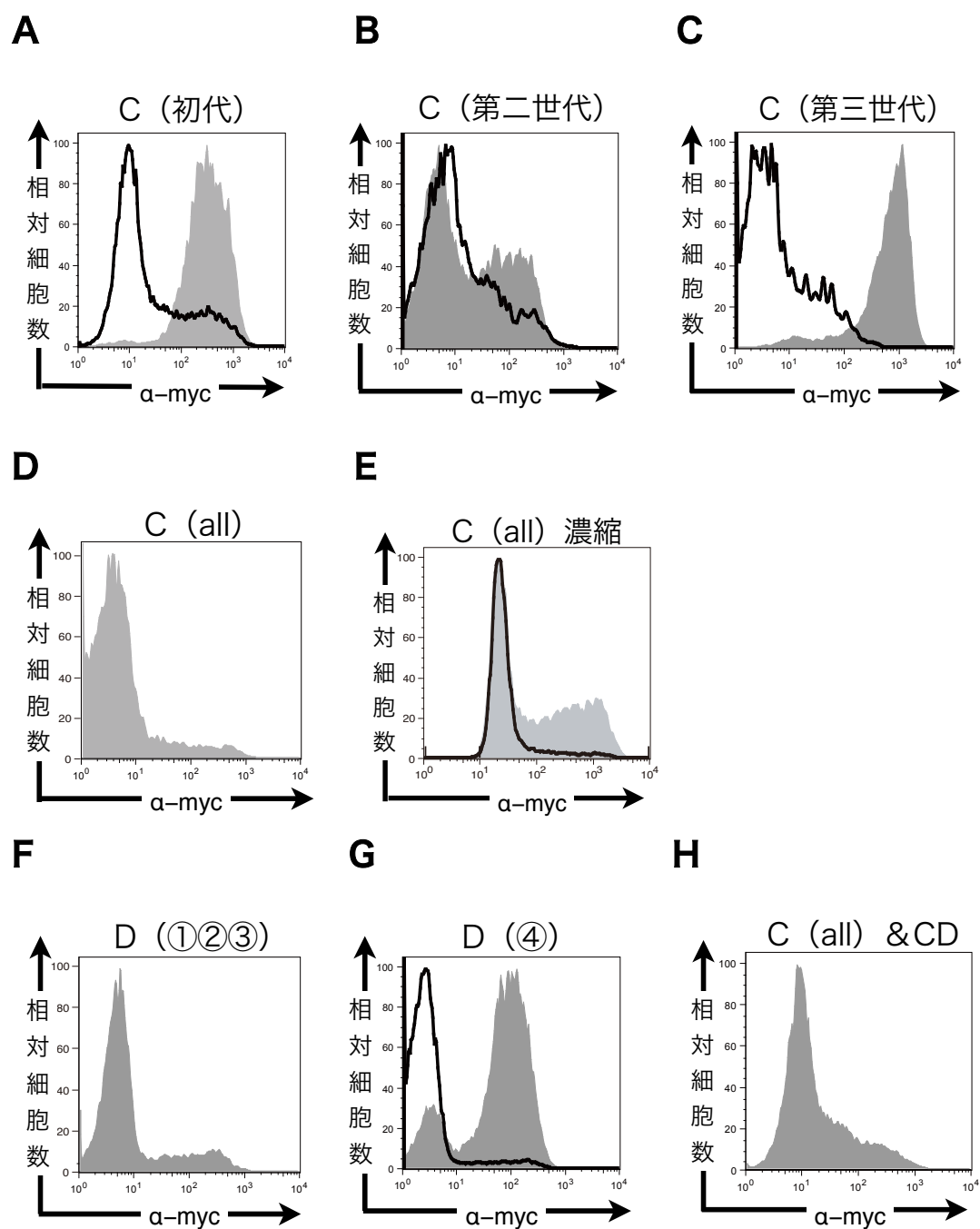
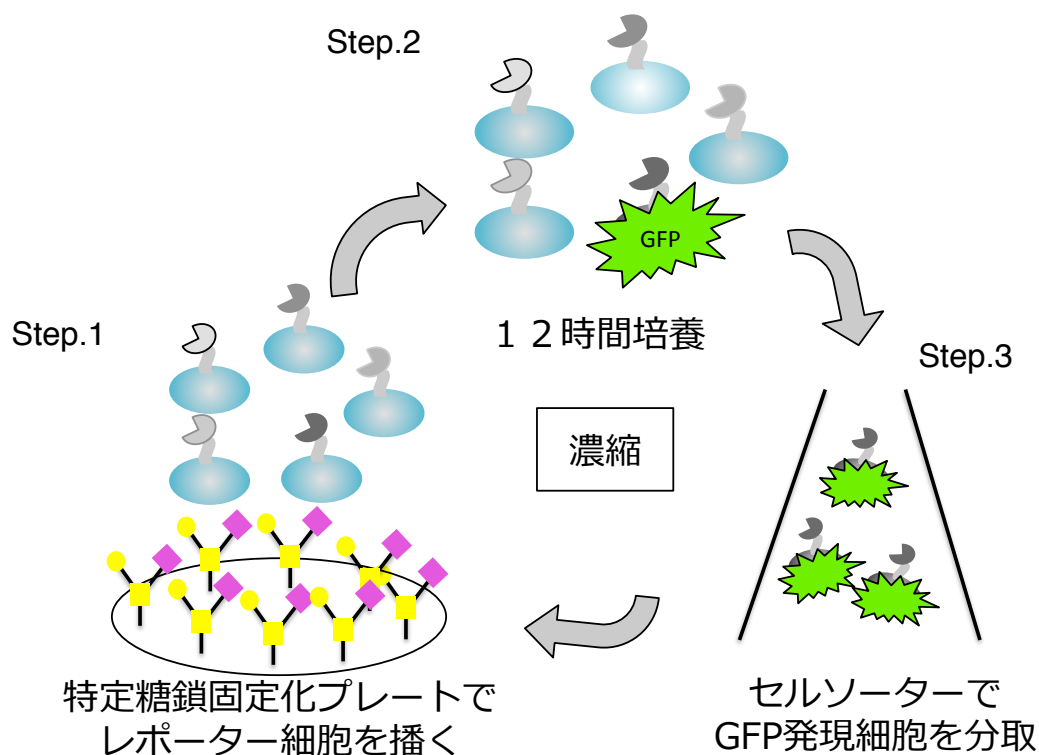


図 11. スクリーニングに使用した 2B4-PNAfb 細胞のレクチン発現率

(A) ~ (H) 各スクリーニングに使用した細胞の細胞表面レクチン提示率を、myc タグを指標にフローサイトメトリーで解析した。灰色のヒストグラムは myc タグを指標にセルソーターで濃縮した細胞、またはスクリーニングに直接用いた細胞を示す。白抜きヒストグラムを示したものは、レクチン提示細胞を、myc タグを指標にセルソーターで濃縮する前の細胞を解析したものを指す。

**A**



**B**

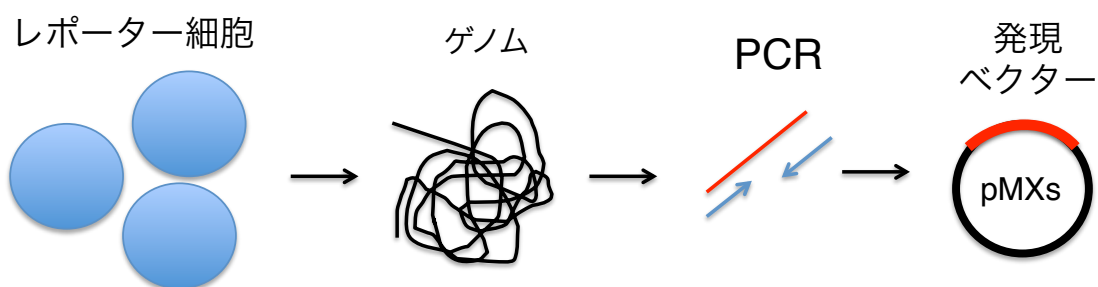
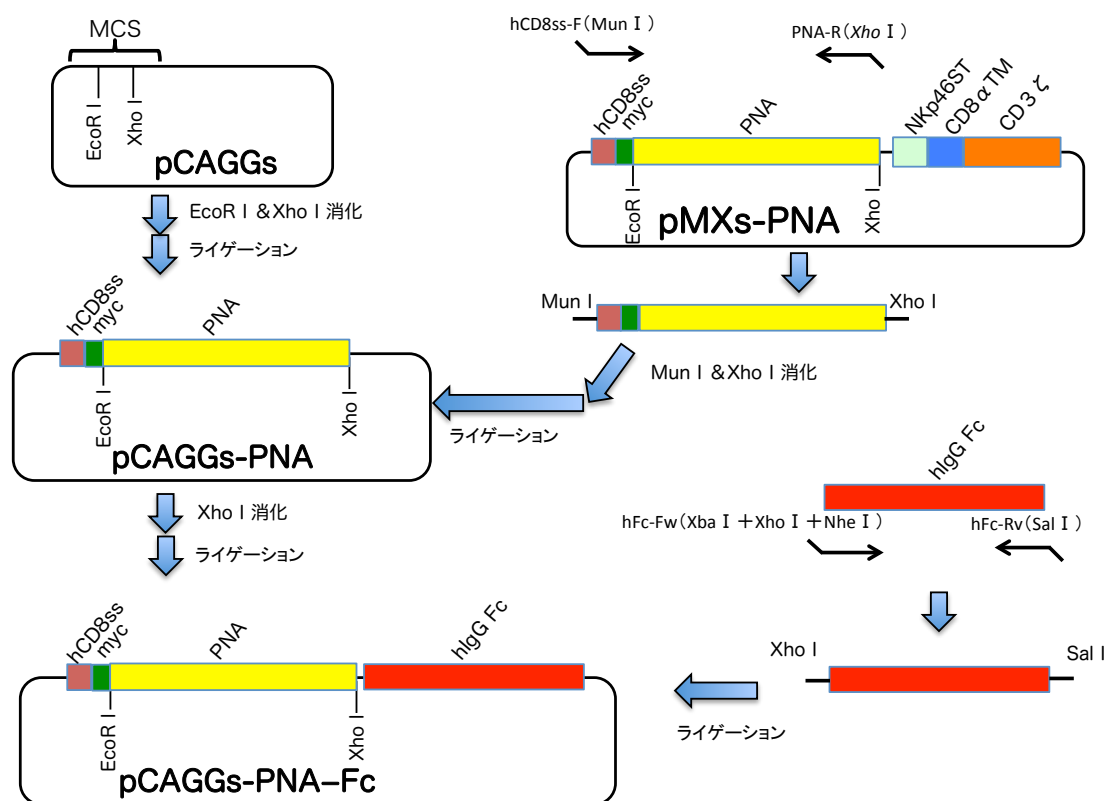


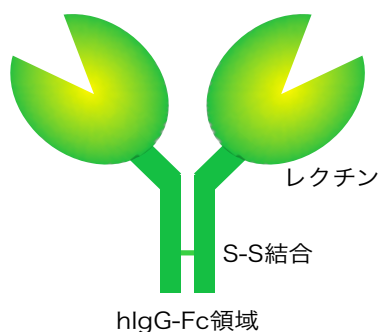
図 12. Mammalian cell surface Display(MCSD)法によるレクチンのスクリーニング概略

(A) 本手法では、糖鎖固定化プレート上でレポーター細胞を 12 時間培養し (Step.1～2)、GFP 陽性細胞を、セルソーターを用いて回収し (Step.3) する。この操作を数回繰り返す、新規糖結合性改変レクチン発現細胞のスクリーニングを行う。(B) 濃縮したレポーター細胞またはクローン化した細胞からゲノムを抽出し、PCR によって増幅した改変レクチン候補遺伝子の cDNA 情報をシーケンス解析により得る。活性の有無を調べるために、得た改変レクチン候補遺伝子を再度 pMXs ベクターに組み込む。

**A**



**B**



**図 13. pCAGGS-lectin-Fc の設計図**

(A) pMXs-PNA から PNA のレクチン部位を切り出し、pCAGGS につなぎ替えた。次に、ヒト IgG Fc 領域を PCR で増幅し、pCAGGS-PNA に付け加えた。構築したプラスミドは、pMXs から改変レクチン領域を **EcoRI** と **XhoI** で切り出して、直接 pCAGGS-Fc につなぎ替えることができる汎用性の高い設計である。(B) pCAGGS-PNA-Fc を細胞に導入した場合、理論上、レクチンのサブユニットは Fc 領域の S-S 結合により二量体として発現する。

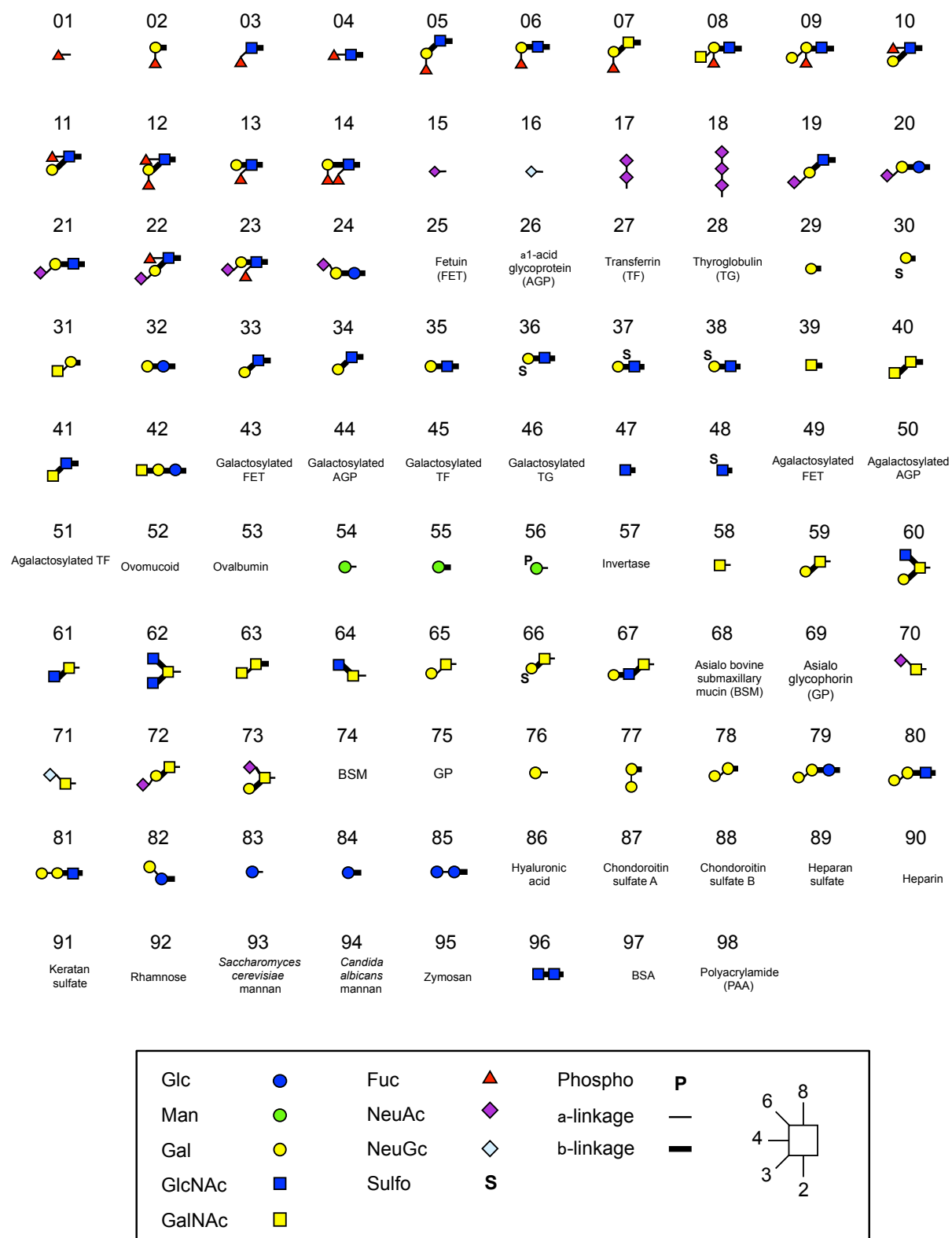


図 14.糖鎖アレイ上の糖鎖及び糖タンパク質一覧（構造）

詳細は表 1 に記載した。

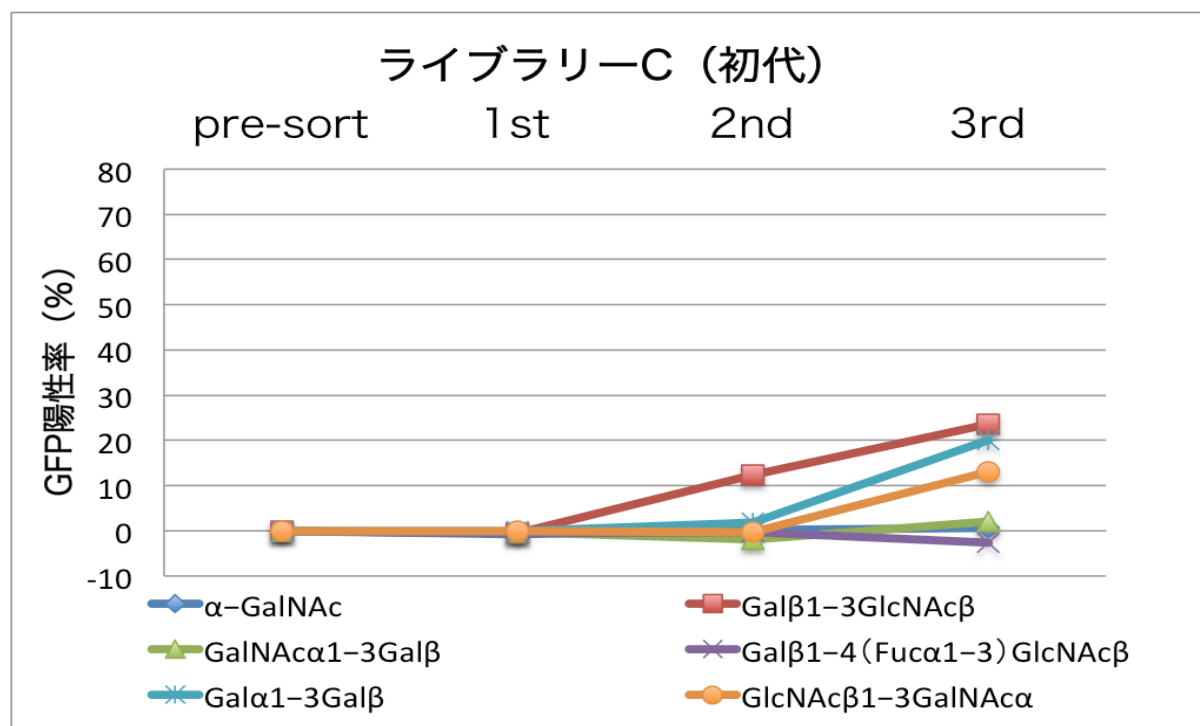


図 15. 各糖鎖に結合しうるレクチン発現のライブラリーC (初代) を用いたスクリーニング

ライブラリーC (初代) を導入した 2B4-PNAfb-初代 C 細胞を  $\alpha$ -GalNAc-PAA、Gal  $\beta$  1-3GlcNAc  $\beta$ -PAA、GalNAc  $\alpha$  1-3Gal  $\beta$ -PAA、Gal  $\beta$  1-4 (Fuc  $\alpha$  1-3) GlcNAc  $\beta$ -PAA、Gal  $\alpha$  1-3Gal  $\beta$ -PAA、GlcNAc  $\beta$  1-3GalNAc  $\alpha$ -PAA の各糖鎖を固相化したプレートで培養した後、セルソーターで GFP 蛍光強度の強い上位 1~3 % を回収した。以上の操作を 3 回繰り返し、回収した細胞をレポーターアッセイに供し、その陽性率を算出した。「陽性率 = 固相糖鎖 (有) 時陽性率 - 固相糖鎖 (無) 時陽性率」で定義する。

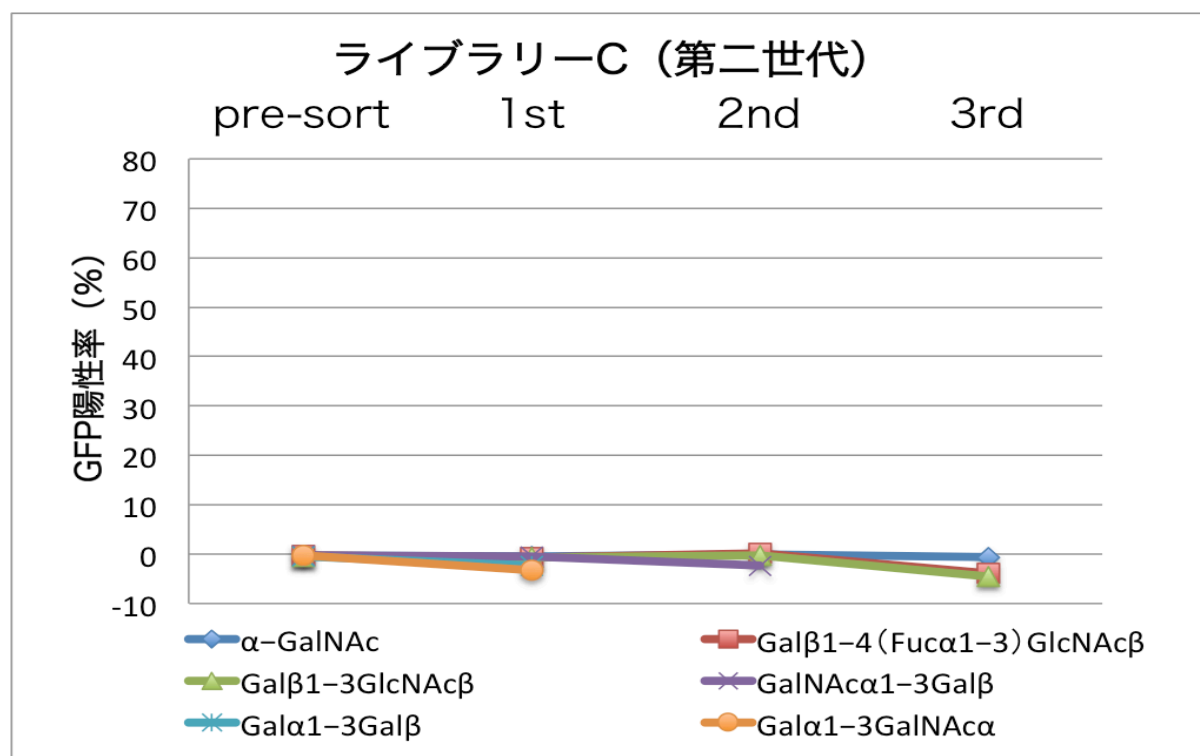


図 16. 各糖鎖に結合しうるレクチン発現のライブラリーC (第二世代) を用いたスクリーニング

ライブラリーC (第二世代) を導入した 2B4-PNAfb-第二世代 C 細胞を  $\alpha$ -GalNAc-PAA、Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ -PAA、GalNAc $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ -PAA、Gal $\beta$ 1-4 (Fuc $\alpha$ 1-3) GlcNAc $\beta$ -PAA、Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ -PAA、Gal $\alpha$ 1-3GalNAc $\alpha$ -PAA の各糖鎖を固相化したプレートで培養した後、セルソーターで GFP 蛍光強度の強い上位 1~3 % を回収した。以上の操作を 1~3 回繰り返して、回収した細胞をレポーターアッセイに供し、その陽性率を算出した。「陽性率 = 固相糖鎖 (有) 時陽性率 - 固相糖鎖 (無) 時陽性率」で定義する。

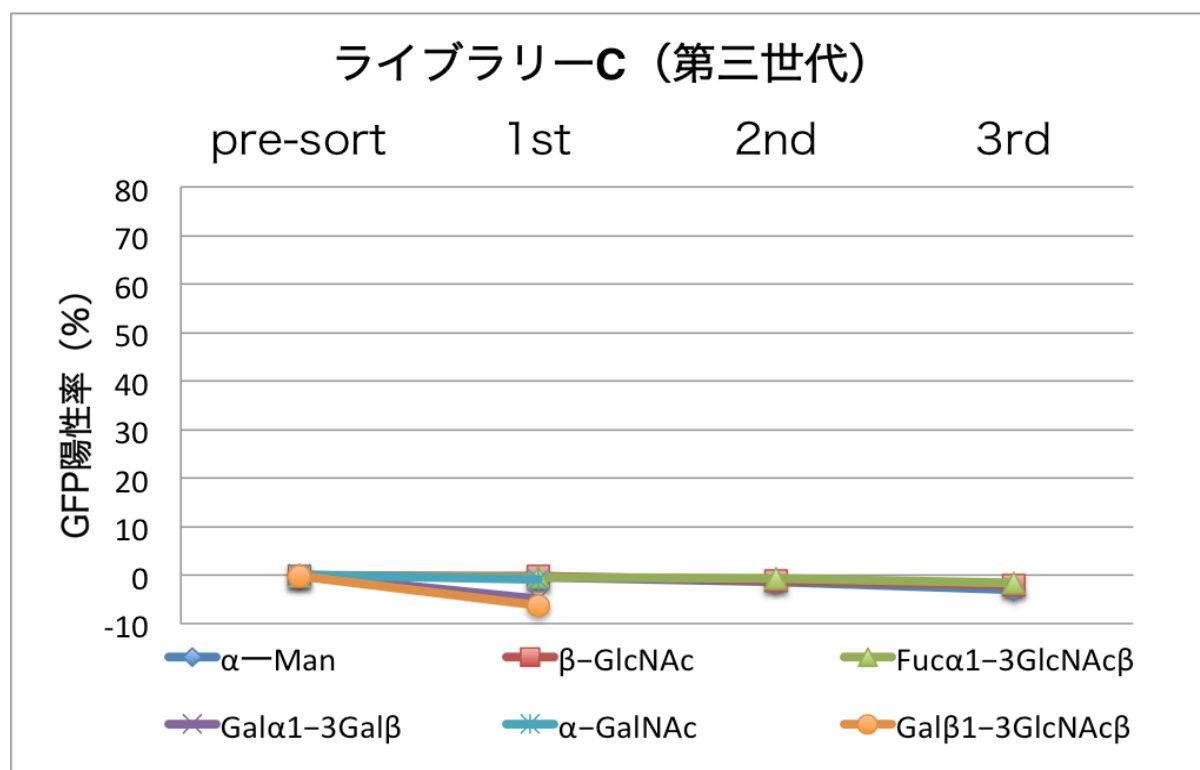


図 17. 各糖鎖に結合しうるレクチン発現のライブラリーC（第三世代）を用いたスクリーニング

ライブラリーC（第三世代）を導入した 2B4-PNAfb-第三世代 C 細胞を  $\alpha$ -GalNAc-PAA、 $\alpha$ -Man-PAA、 $\beta$ -GlcNAc-PAA、Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc $\beta$ -PAA、Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ -PAA、Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ -PAA の各糖鎖を固相化したプレートで培養した後、セルソーターで GFP 蛍光強度の強い上位 1~3% を回収した。以上の操作を 1~3 回繰り返し、回収した細胞をレポーターアッセイに供し、その陽性率を算出した。「陽性率 = 固相糖鎖（有）時陽性率 - 固相糖鎖（無）時陽性率」で定義する。



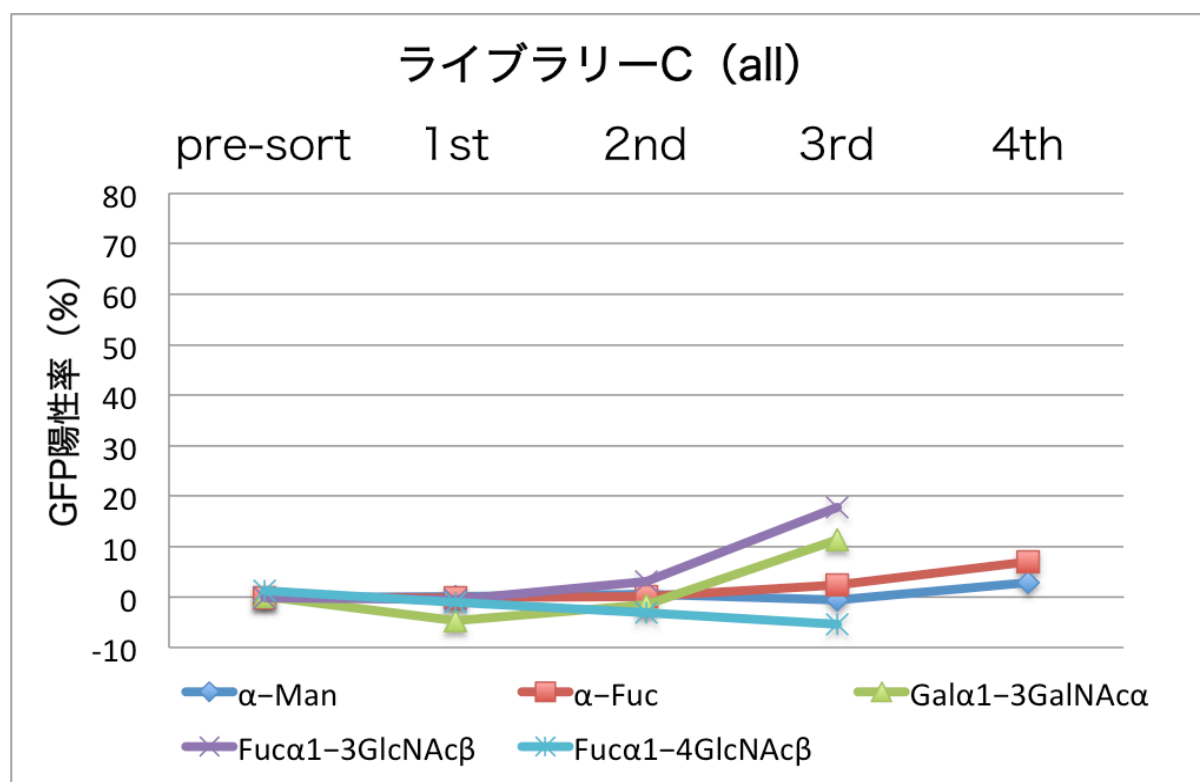


図 18. 各糖鎖に結合しうるレクチン発現のライブラリーC (all) を用いたスクリーニング

ライブラリーC (初代&第二世代&第三世代) を導入した 2B4-PNAfb-C-all 細胞を  $\alpha$ -GalNAc-PAA、Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ -PAA、GalNAc $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ -PAA、Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc $\beta$ -PAA、Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ -PAA、Gal $\alpha$ 1-3GalNAc $\alpha$ -PAA の各糖鎖を固相化したプレートで培養した後、セルソーターで GFP 蛍光強度の強い上位 1~3% を回収した。以上の操作を 3~4 回繰り返し、回収した細胞をレポーターアッセイに供し、その陽性率を算出した。「陽性率 = 固相糖鎖 (有) 時陽性率 - 固相糖鎖 (無) 時陽性率」で定義する。

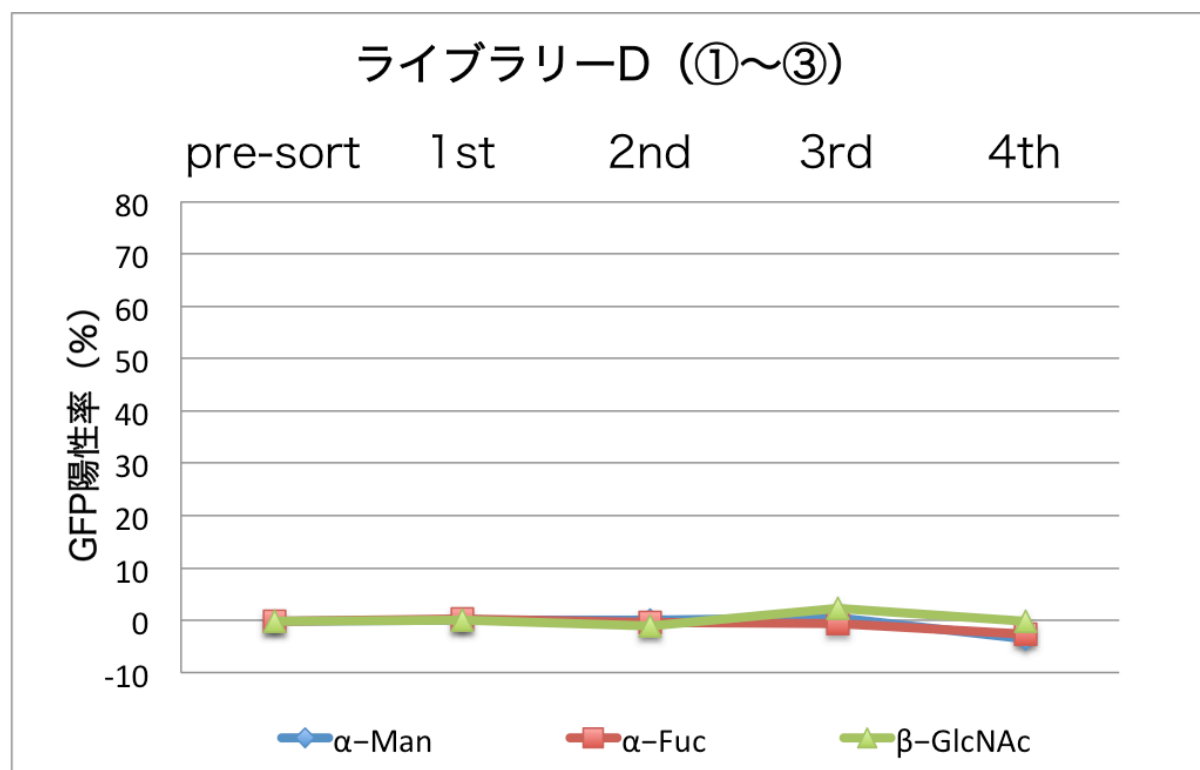


図 19. 各糖鎖に結合しうるレクチン発現のライブラリーD (①～③) を用いたスクリーニング

ライブラリーC (第三世代) を導入した 2B4 -PNAfb-D①②③細胞を  $\alpha$ Man-PAA、 $\alpha$ Fuc-PAA、 $\beta$ GlcNAc-PAA の各糖鎖を固相化したプレートで培養した後、セルソーターで GFP 蛍光強度の強い上位 1～3 % を回収した。以上の操作を 3～4 回繰り返し、回収した細胞をレポーターアッセイに供し、その陽性率を算出した。「陽性率 = 固相糖鎖 (有) 時陽性率 - 固相糖鎖 (無) 時陽性率」で定義する。

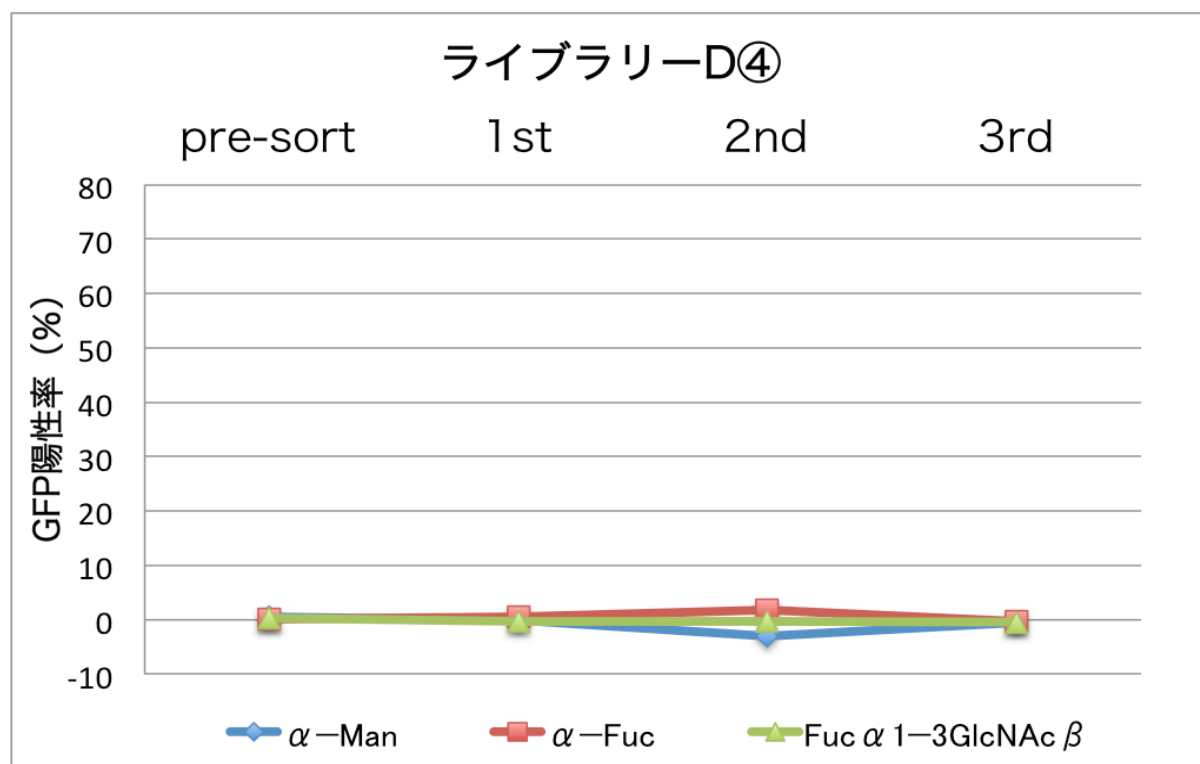
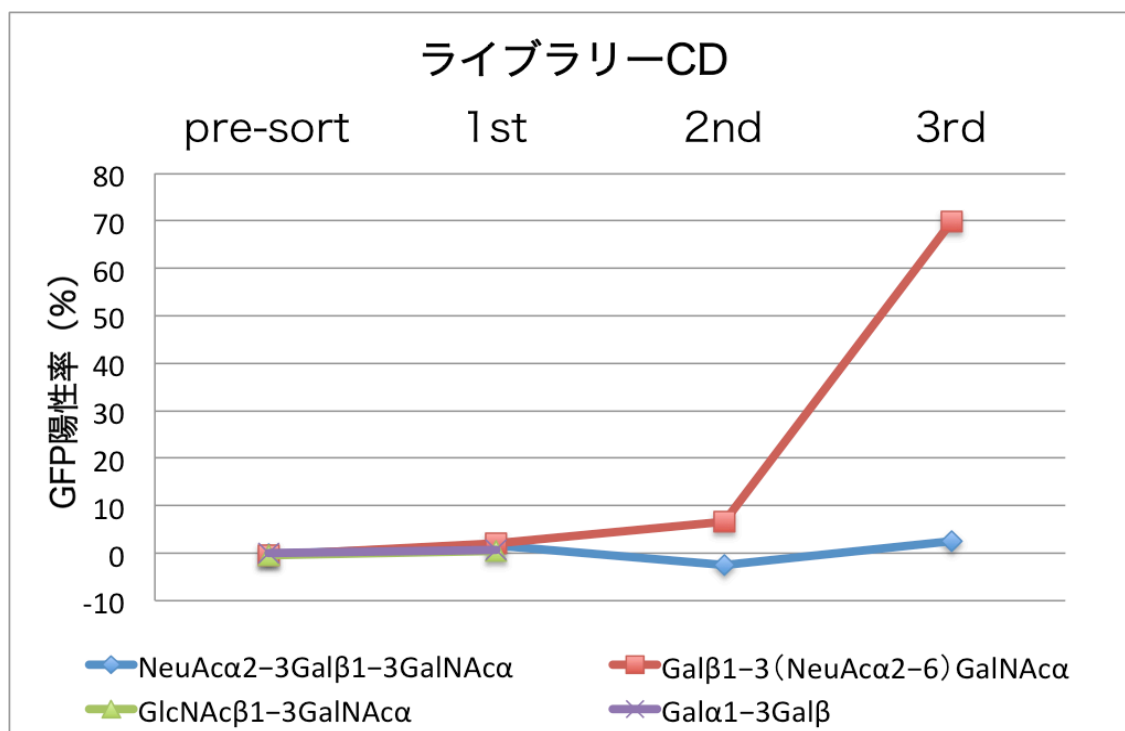
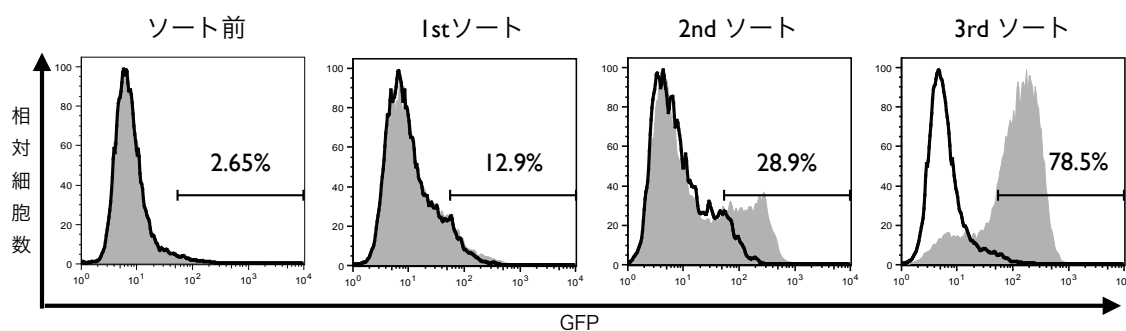


図 20. 各糖鎖に結合しうるレクチン発現のライブラリーD④を用いたスクリーニング

ライブラリーC（第三世代）を導入した 2B4-PNAfb-D④細胞を、 $\alpha$ Man-PAA、 $\alpha$ Fuc-PAA、Fuc  $\alpha$  1-3GlcNAc  $\beta$ -PAA の各糖鎖を固相化したプレートで培養した後、セルソーターで GFP 蛍光強度の強い上位 1~3 %を回収した。以上の操作を 3 回繰り返す、回収した細胞をレポーターアッセイに供し、その陽性率を算出した。「陽性率=固相糖鎖（有）時陽性率-固相糖鎖（無）時陽性率」で定義する。

**A****B**

**図 21. 各糖鎖に結合しうるレクチン発現のライブラリーC&D を用いたスクリーニング**

(A) ライブラリーC&D を導入した 2B4-PNAfb-CD 細胞を NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-3GalNAc  $\alpha$ -bio-PAA、Gal  $\beta$  1-3(NeuAc  $\alpha$  2-6)GalNAc  $\alpha$ -bio-PAA、GlcNAc  $\beta$  1-3GalNAc  $\alpha$ -PAA、Gal  $\alpha$  1-3Gal  $\beta$ -PAA の各糖鎖を固相化したプレートで培養した後、セルソーターで GFP 蛍光強度の強い上位 1~3 %を回収した。以上の操作を 1~3 回繰り返し、回収した細胞をレポーターアッセイに供し、その陽性率を算出した。「陽性率=固相糖鎖（有）時陽性率-固相糖鎖（無）時陽性率」で定義する。(B) Gal  $\beta$  1-3(NeuAc  $\alpha$  2-6)GalNAc  $\alpha$  結合性レクチンスクリーニングにおける、各ソーティング操作後の細胞の GFP 蛍光強度を解析した。数字は糖鎖固相（有）時の陽性率を示す。

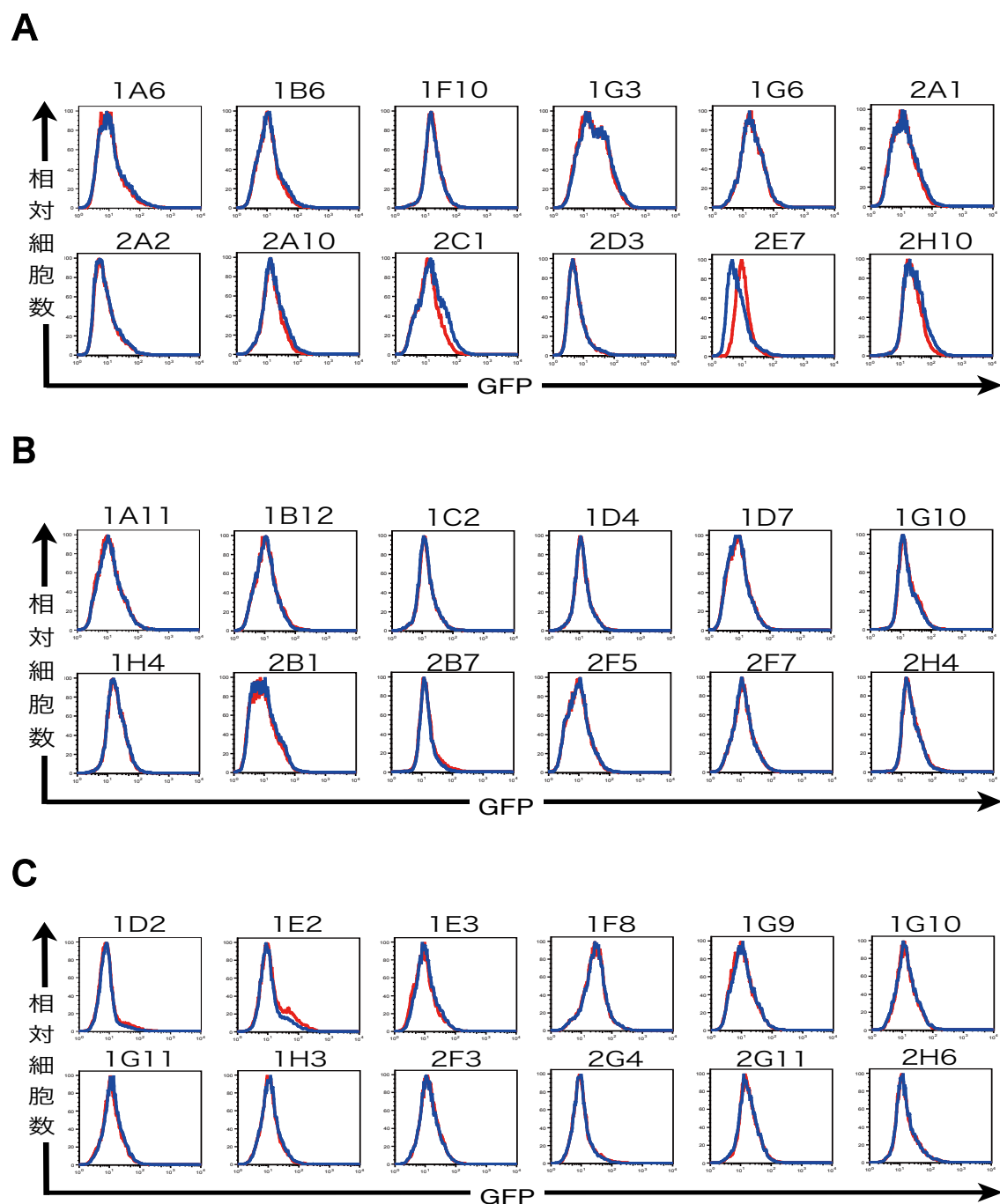


図 22. ライブラリーC (初代) から得た限界希釈後のクローンの糖鎖とのレポーターアッセイ

各クローン化細胞に発現しているレクチンとスクリーニングに使用した糖鎖との相互作用を、レポーターアッセイにより確認した。(A)  $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta$  におけるスクリーニングから得たクローン 12 種類 (B)  $\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}\beta$  におけるスクリーニングから得たクローン 12 種類 (C)  $\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha$  におけるスクリーニングから得たクローン 12 種類。青線は糖鎖有で培養、赤線は糖鎖無で培養した細胞でレポーターアッセイを行った解析を示す。

<Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ スクリーニング>			<Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ スクリーニング>		
クローン名	アミノ酸配列	数	クローン名	アミノ酸配列	数
2A1-1	V E G N P A R F	3	2B1-1	K * G N G H P V	2
2A1-2	T W P N R S Y K	1	2B1-2	L W Q N R E F C	2
2A1-3	Y M T N T P T P	2	2B1-3	K D D N V R G I	1
2A10-1	V E G N P A R F	2	1B12-1	V E G N P A R F	3
2A10-2	T W P N R S Y K	5	1B12-2	K W H N S F Y D	2
2A10-3	Y M T N T P T P	1	2B7-1	R L P N A F P Q	1
2C1-1	P E G N C R H R	5	2B7-2	G K L N S L D V	2
2C1-2	K W H N S F Y D	1	2H4-1	M G N N T E S I	1
2C2-3	V E G N P A R F	2	2H4-2	H Y Y N S Q S G	1
2H10-1	V E G N P A R F	3	2H4-3	A L G N L C V R	1
2H10-2	Y M T N T P T P	1	2H4-4	L N H N T S T W	1
2H10-3	P E G N C R H R	2			
2H10-4	K W H N S F Y D	2			

<GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ スクリーニング>		
クローン名	アミノ酸配列	数
1G11-1	T W P N R S Y K	4
1G11-2	Y M T N T P T P	4
1H3-1	T W P N R S Y K	5
1H3-2	Y M T N T P T P	2
1D2-1	V K T N K L W W	1
1D2-2	T W P N R S Y K	2
2G4-1	H T D N Y Y G S	1
2G4-2	G T D N F D G S	1
2G4-3	G W P N D V C L	1
2G4-4	V P T N E S Y G	1

図 23. ライブラリーC（初代）から得た限界希釈後のクローンから得られたレクチンのループCの配列とその得られた数

各糖でのスクリーニング（Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 、Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 、GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ ）における4つの限界希釈後の細胞クローンを選択し、そのクローン中に含まれていた改変レクチン候補 cDNA 配列を得た。そして、その配列から推定されるアミノ酸配列を列挙した。\*マークは STOP コドンを示す。クローン間で同じ配列が持っていた場合、同じ色で示した。

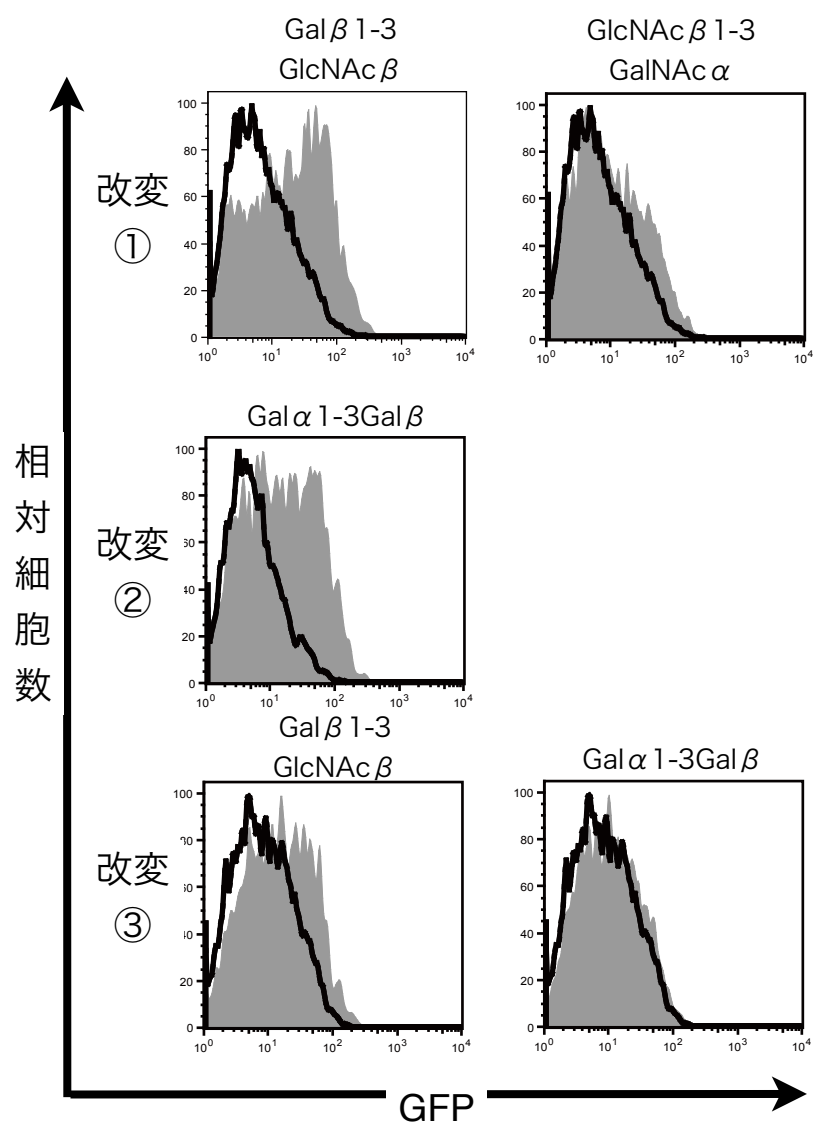


図 24. ライブラリーC (初代) から得た改変レクチン 3 種類のモノクローナルレポーター細胞と各スクリーニングに使用した糖鎖とのレポーターアッセイ

糖結合活性の確認できた 3 種類のモノクローナルレポーター細胞について各糖鎖ポリマーを用いて、レポーターアッセイを行った結果を示す。白抜きのヒストグラムは糖鎖無し、灰色の塗りつぶされたヒストグラムは糖鎖有条件下で培養した時の解析を示す。改変①は、2A1-2、2A10-2、1G11-1、1H3-1、1D2-2 の配列を、改変②は、2B1-2 の配列を、改変③は、2C1-2、2H10-4、1B12-2 の配列をそれぞれ指す。

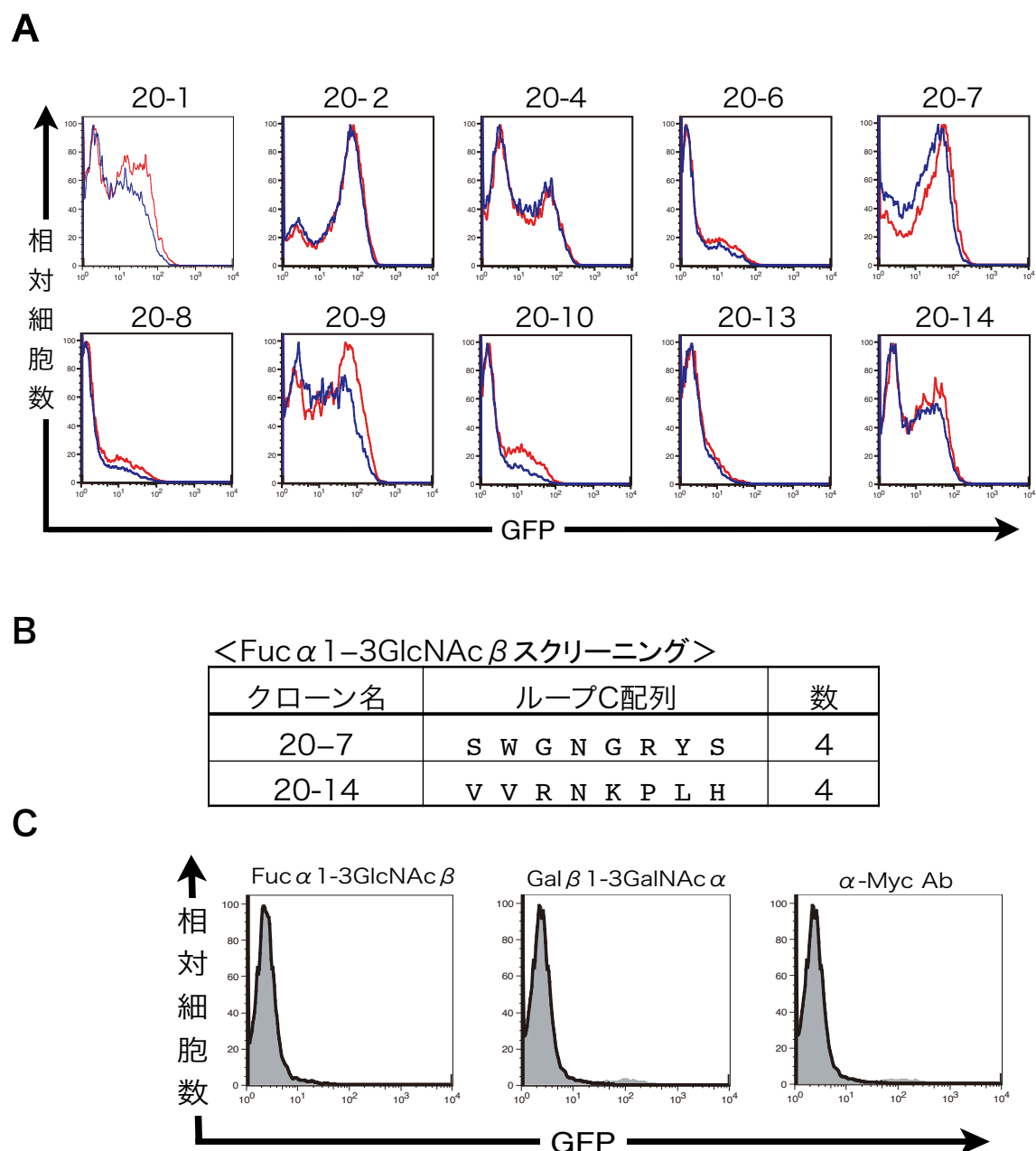
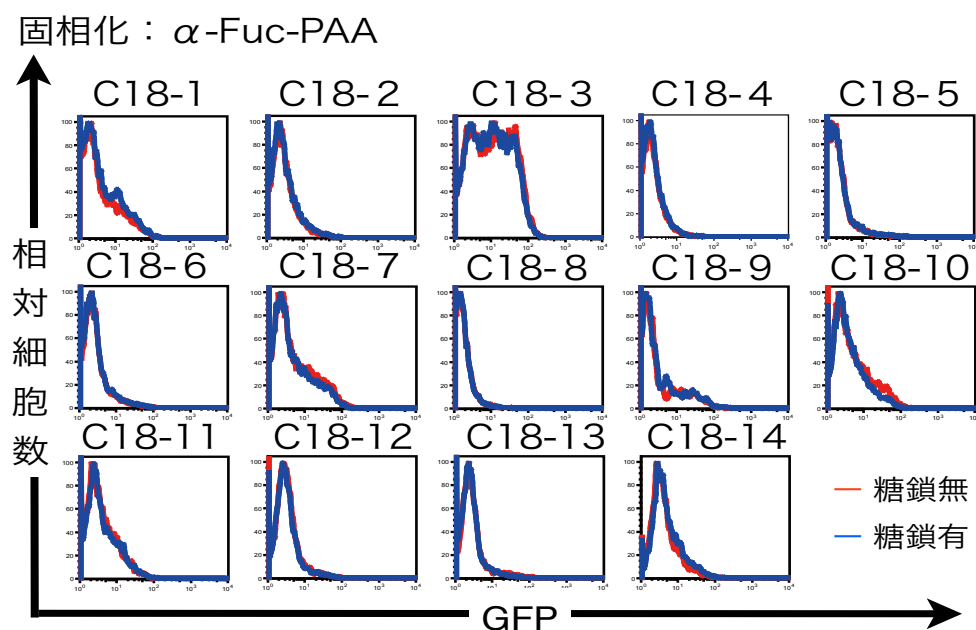


図 25. ライブラリーC (all) から得た限界希釈後の 10 種類のクローンと糖鎖ポリマーFuc  $\alpha$  1-3GlcNAc  $\beta$  とのレポーターアッセイと得られた配列情報及び、20-7 配列のモノクローナルレポーター細胞のレポーターアッセイ

(A) Fuc  $\alpha$  1-3GlcNAc  $\beta$  におけるスクリーニングから得たクローンの Fuc  $\alpha$  1-3GlcNAc  $\beta$  とのレポーターアッセイ (フローサイトメトリー)。青線は糖鎖 (有) で培養、赤線は糖鎖 (無) で培養した細胞でレポーターアッセイを行った解析値を示す。(B) 二種類のクローンから得たレクチン候補配列を列挙した。(C) レクチン活性を確認できた改変④ (20-7) のモノクローナルレポーター細胞でのレポーターアッセイ (フローサイトメトリー) 結果を示した。



**A**



**B**

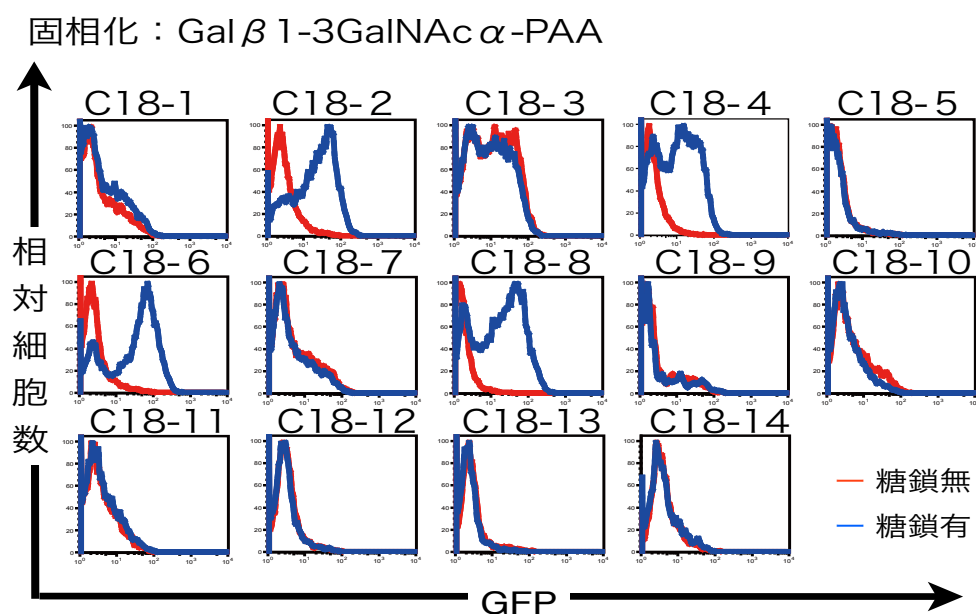


図 26. ライブラリーC (all) から Fuc 結合性レクチンスクリーニング時に得た限界希釈後のクローン 14 種類のレポーターアッセイ (フローサイトメトリー)

(A) 各クローン化細胞に発現しているレクチンと  $\alpha$ Fuc との結合性をレポーターアッセイで解析した。(B) 各クローン化細胞に発現しているレクチンと Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$  との結合性をレポーターアッセイで解析した。赤いヒストグラムは糖鎖 (無)、青いヒストグラムは糖鎖 (有) 条件で培養した時の解析を示す。

**A**

<  $\alpha$ Fucスクリーニング >

クローン名	ループC配列	数
C18-2-a	V W P N P P Y H	4
C18-3-a	R L R N Y I Y R	3
C18-4-a	V W P N P P Y H	1
C18-4-b	F G R I Q Q K L K P	1
C18-6-a	V W P N P P Y H	2
C18-6-b	F G R I Q Q K L K P	1
C18-8-a	V W P N P P Y H	1

**B**

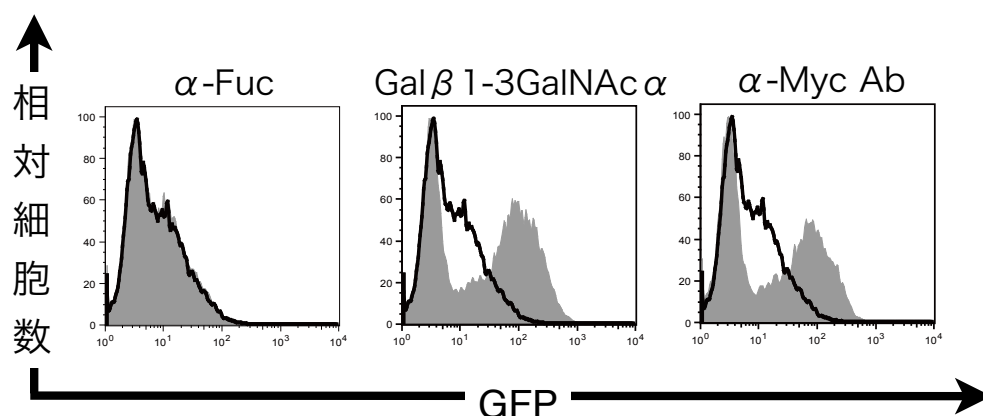


図 27. ライブラリーC (all) から  $\alpha$ Fuc 結合性レクチンスクリーニング時、限界希釈後のクローン5種類から得られたレクチン候補配列、活性の確認

(A) 各クローン化細胞5種類に含まれた遺伝子配列を列挙した。クローン間で同じ配列には色分けした。(B) 活性の確認できた改変⑤ (C18-2-a、C18-4a、C18-6-1、C18-8-a) モノクローナルレポーター細胞と  $\alpha$ Fuc、Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 、抗 Myc 抗体との結合性をレポーターアッセイで解析した。白抜きヒストグラムは固相（無）で、灰色のヒストグラムは糖鎖または抗体（有）条件で培養した時の解析を示す。

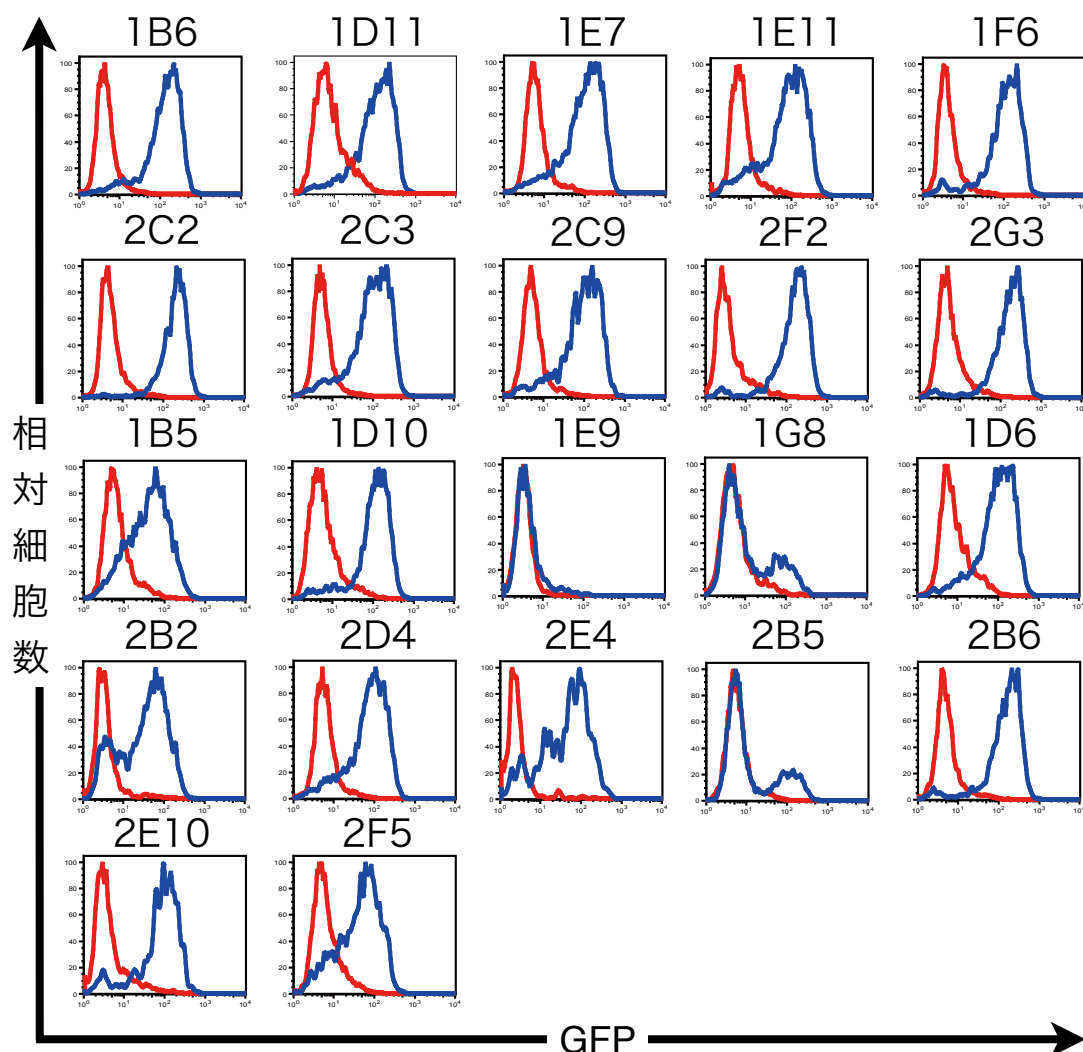


図 28. Gal $\beta$ 1-3 (NeuAc $\alpha$ 2-6) GalNAc $\alpha$ 結合性レクチンのスクリーニングにおいて、限界希釈後のクローン化細胞のレポーターアッセイ（フローサイトメトリー）

濃縮した 2B4-PNAfb-CD 細胞の限界希釈後のクローン化細胞 22 種類を、Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$ に結合するかレポーターアッセイで確認した。赤線は、糖鎖（無）で、青線は糖鎖（有）の条件で培養し、GFP 蛍光強度をフローサイトメトリーで解析した。

クローン名	ループC配列	ループD配列	数
1B5-1	P P P I Y S M H M P T G	G S R A G R Q	2
1B5-2	C H Q N R D Y L	G S R A G R Q	1
1B5-3	R H A S V Y K G G D K R	G S R A G R Q	1
1B6-1	L * A N S Q T T	R F S F L C	1
1B6-2	* P P T	F F C G I Y	1
1B6-3	* P D F L K I R W R R	G S R A G R Q	1
2C2-1	* P E P R H T V A P	G S R A G R Q	2
2C2-2	A W H N R E L N	G S R A G R Q	2
2C2-3	S R K Q T N E E	G S R A G R Q	1
2C2-4	* P P T	F F C G I Y	1
2D4-1	P H V N D E Y C	G S R A G R Q	1
2D4-2	P S L M Y W K Q S S A	H I * G * K	1
2D4-3	K V A N * H S D	G S R A G R Q	1
2D4-4	K A T T * N M L I	G S R A G R Q	1
2C9-1	K V A N * H S D	G S R A G R Q	2
2C9-2	P S L M Y W K Q S S A	H I * G * K	1
2C3-1	K M G R * I R E	C S P A A Y E	1
2C3-2	W A M T E K M L M	G S R A G R Q	1
2C3-3	P S L M Y W K Q S S A	H I * G * K	1
2C3-4	K V A N * H S D	G S R A G R Q	1
1D11-1	W A M T E K M L M	G S R A G R Q	1
1D11-2	P S L M Y W K Q S S A	H I * G * K	1

図 29. ライブラリーC (all) と C&D から Gal $\beta$  1-3 (NeuAc $\alpha$  2-6) GalNAc  $\alpha$  結合性レクチンをスクリーニング時、限界希釈後のクローンから得られたレクチンのループ C 及びループ D のアミノ酸配列と得られた数

7 種類の限界希釈後の細胞クローンを選択し、そのクローン中に含まれていた改変レクチン候補 cDNA 配列を得た。そして、その配列から推定されるアミノ酸配列を列挙した。\*マークは STOP コドンを示す。クローン間で同じ配列を含むものには、同じ色を付けた。

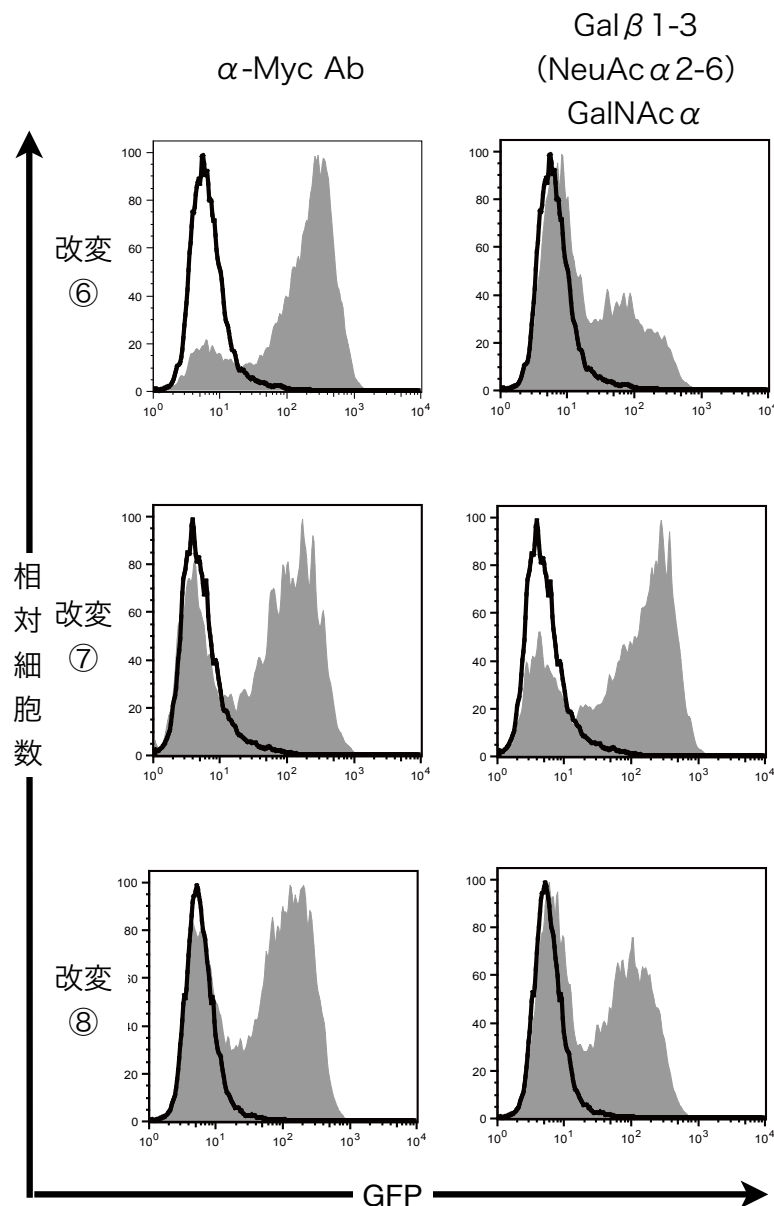
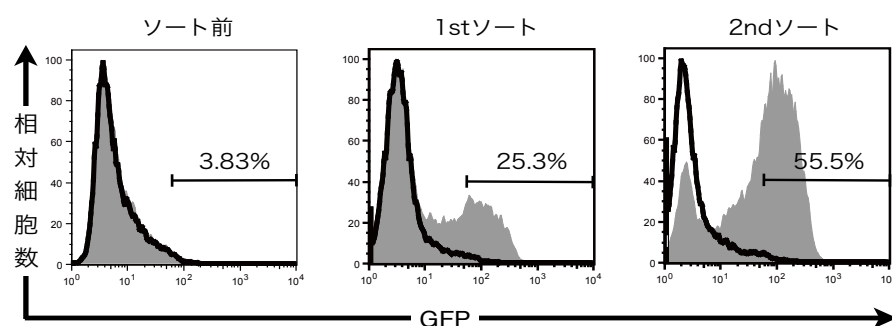


図 30. ライブラリーC (all) と C&D から得た改変レクチン 3 種類のモノクローナルレポーター細胞と、抗 myc 抗体及びスクリーニングに使用した Gal $\beta$  1-3 (NeuAc  $\alpha$  2-6) GalNAc  $\alpha$  とのレポーターアッセイ (フローサイトメトリー)

糖結合活性の確認できた 3 種類のモノクローナルレポーター細胞について各糖鎖ポリマーを用いて、レポーターアッセイを行った結果を示す。白抜きのヒストグラムは糖鎖 (無)、灰色の塗りつぶされたヒストグラムは糖鎖 (有) 条件で培養した時の解析を示す。

**A**



**B**

<Gal $\beta$  1-3 (NeuAc $\alpha$  2-6) GalNAc $\alpha$ スクリーニング>

クローン名	ループC配列
1	P D L N I T L C
3	D I T N R D E L
5	P R R N T N E P
6	フレームシフト
7	R H V N R R Y S
10	S R T N S Y P L
11	T N R N M D A Q
12	S G F N G L T A
13	G L G N L A S M
14	E E T I * K D L
15	Y L V N S W L P
16	C A Y N G M E D
18	W M T N L L P R
20	S L W N N N R *
22	Q S M N L K V C
23	T W P N R S Y K
25	A L D N N T G A
29	V E A F P C N G L I L P *
32	V A Q N P I I K

クローン名	ループC配列
33	C H Q N R D Y L
34	R V * N W X W W
36	フレームシフト
38	V W T N S L F R
39	V X M N P A F D
41	フレームシフト
42	Q S D N V W L H
43	A N L N I N L S
44	フレームシフト
45	V E G N P A R F
47	V E G N P A R F
50	L K R N N C T T
52	A R D N P V W N
55	G L G N L A S M
57	V W T N S L F R
58	D L G N X D * T
59	S G W N N R T Y
62	T W S N P P H N
64	W S N N Q A L M

図 31. ライブラリーC (初代) & (all) を混合したレポーター細胞から、Gal $\beta$  1-3 (NeuAc $\alpha$  2-6) GalNAc $\alpha$  結合性レクチンのスクリーニングと得られたレクチン候補配列一覧

(A) 二回の細胞ソーティング操作毎の細胞と Gal $\beta$  1-3 (NeuAc $\alpha$  2-6) GalNAc $\alpha$  との結合性をレポーターアッセイで解析した。(B) 二回ソーティングした後の細胞群からゲノムを抽出し、改変レクチン候補配列を列挙した。\*はストップコドン、X はまだアミノ酸未確定部位を指し、同じ配列を含むものには色分けした。またクローン 23 は改変①と同じ配列であった。クローン 33 は改変⑥と同じ配列だった。

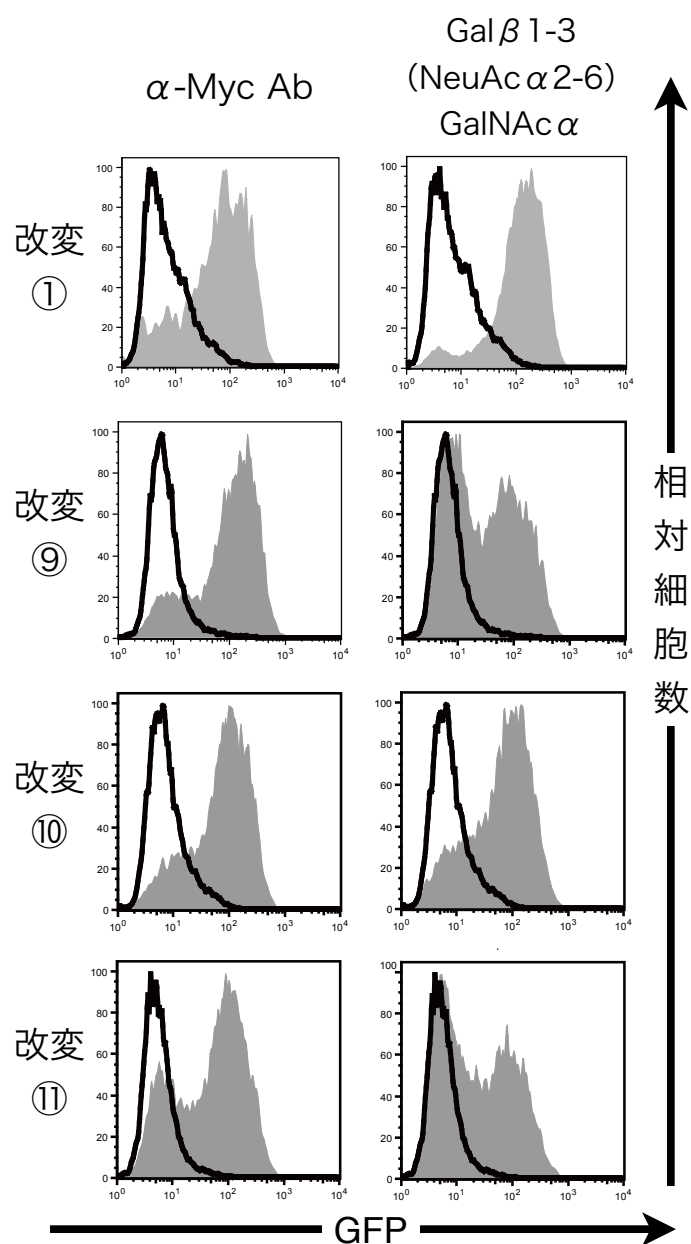
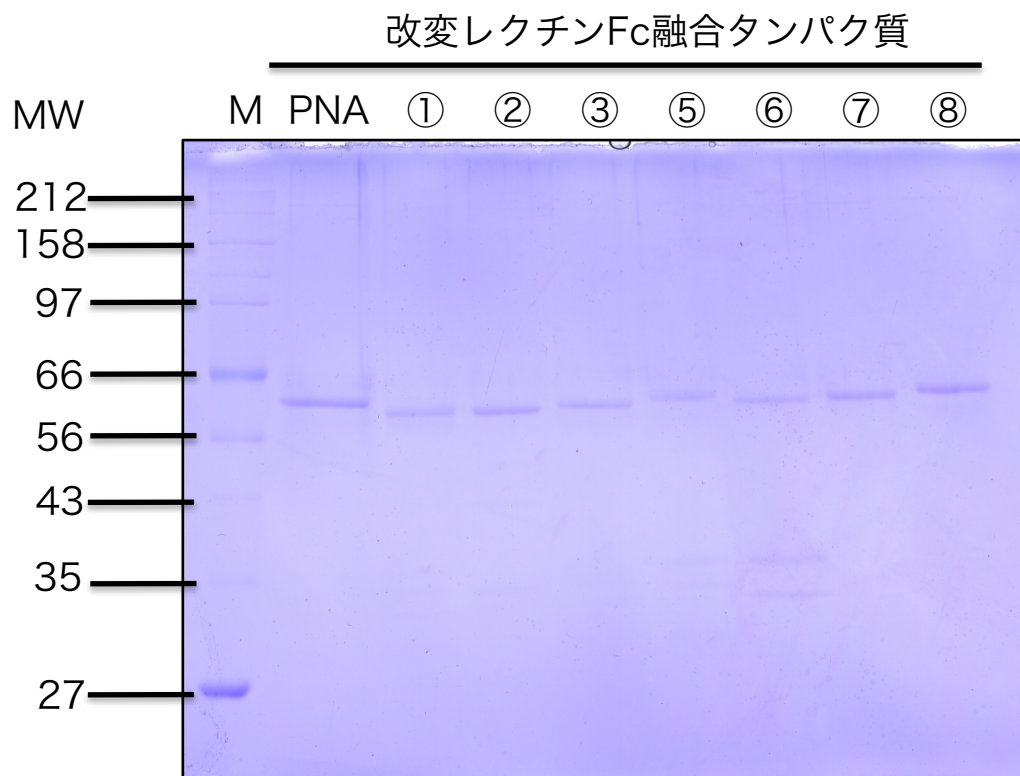


図 32. ライブラリーC (all) と C&D から得た改変レクチン 4 種類のモノクローナルレポーター細胞と、抗 myc 抗体及びスクリーニングに使用した Galβ 1-3 (NeuAcα 2-6) GalNAcα とのレポーターアッセイ (フローサイトメトリー)

糖結合活性の確認できた 4 種類について各糖鎖ポリマーを用いて、レポーターアッセイを行った結果を示す。白抜きのヒストグラムは糖鎖無し、灰色の塗りつぶされたヒストグラムは糖鎖有条件下で培養した時の解析を示す。改変①は 23 番、改変⑨は 7 番、改変⑩は 38 (57) 番、改変⑪は 62 番クローンの配列がそれぞれ導入されたモノクローナルレポーター細胞で解析した。

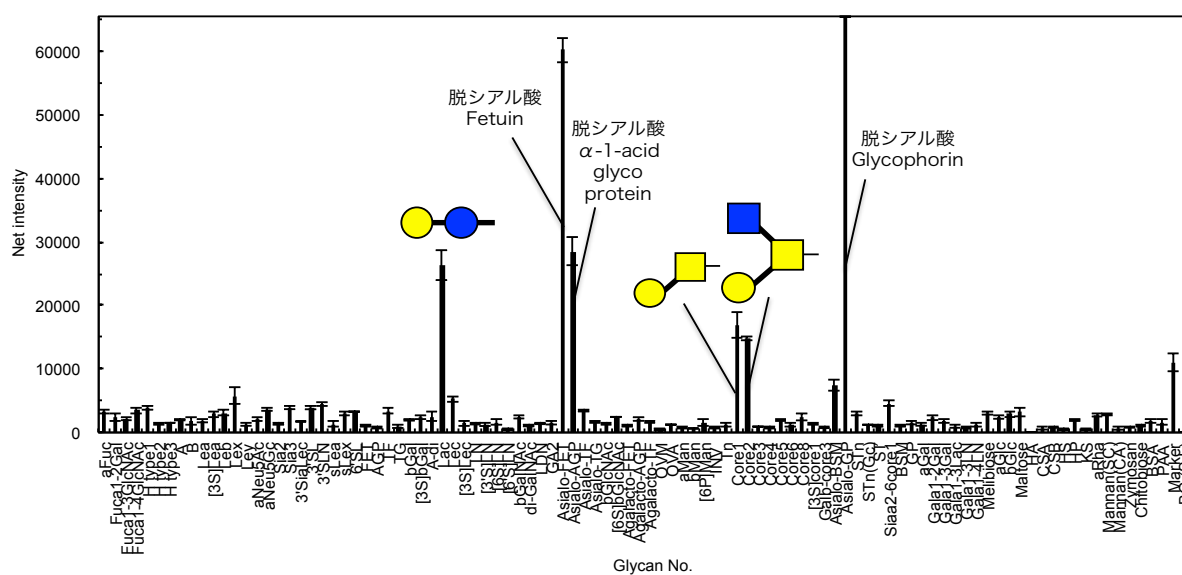


**図 33. 精製後の改変レクチン-Fc 融合タンパク質の SDS-PAGE**

PNA (WT)、改変①、②、③、⑤、⑥、⑦、⑧の各 cDNA の 3'側にヒト IgG の Fc の cDNA を繋いだコンストラクトを HEK293 細胞に発現させ、その培養上清から ProteinA カラムを用いて改変レクチン-Fc 融合タンパク質を精製した。精製したタンパク質は、還元条件下、10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、CBB で染色した。各レーンには、0.5  $\mu$ g 相当を泳動した。M のレーンには、マーカーを泳動した。線横の数値は分子量の単位 kDa を表し、56~66kDa の間のバンドが Fc 融合タンパク質の単量体のバンドと推測される。



**A**



**B**

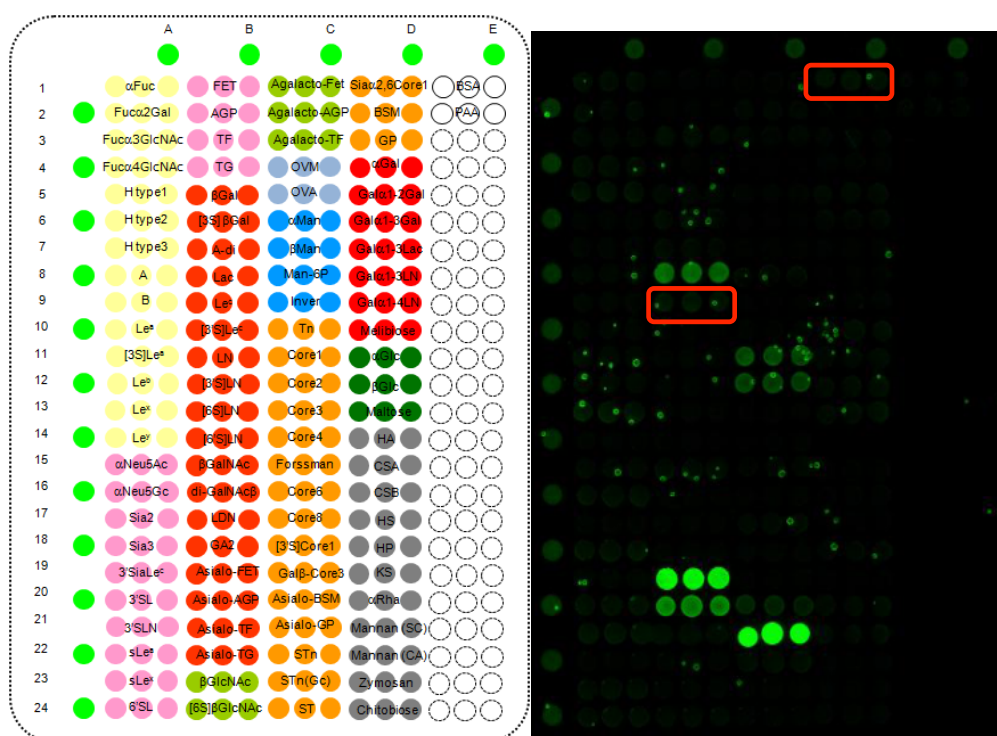
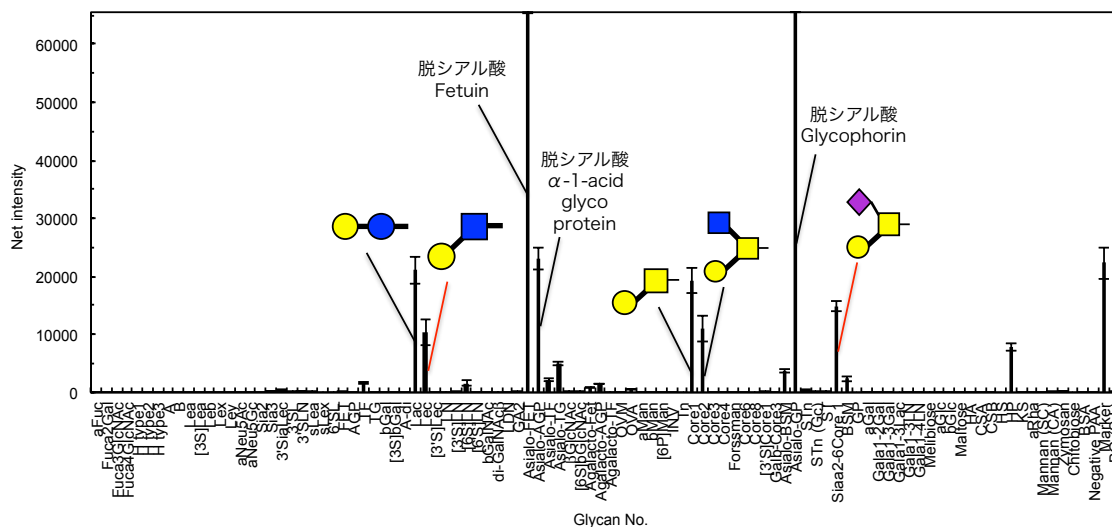


図 34. PNA-Fc の糖鎖アレイ解析

(A) PNA-Fc (50 μg/ml) 60 μl をスポットに加え、一晚 20°C でインキュベートした。洗浄後、Cy3-anti-hlgG-Fc (1 μg/ml) を 100 μl スポットに加え 20°C で 3 時間静置した。洗浄後、Cy3 モードでスキャンした。(Gain:105) (B) 各スポットの対応とスポットの励起光照射時の写真

A



B

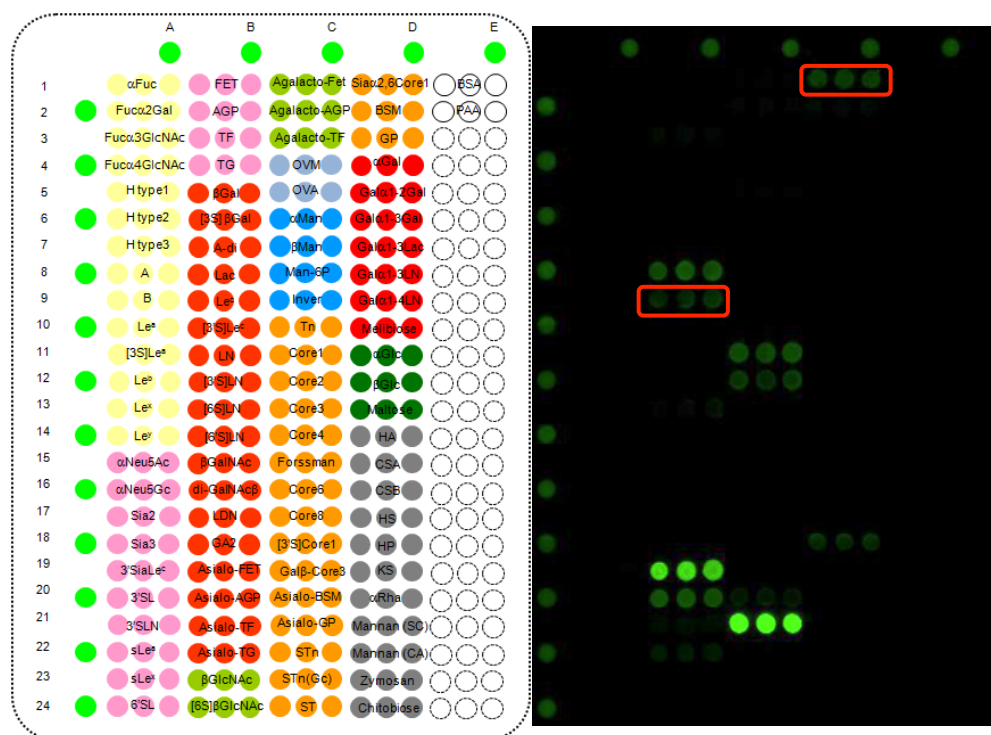
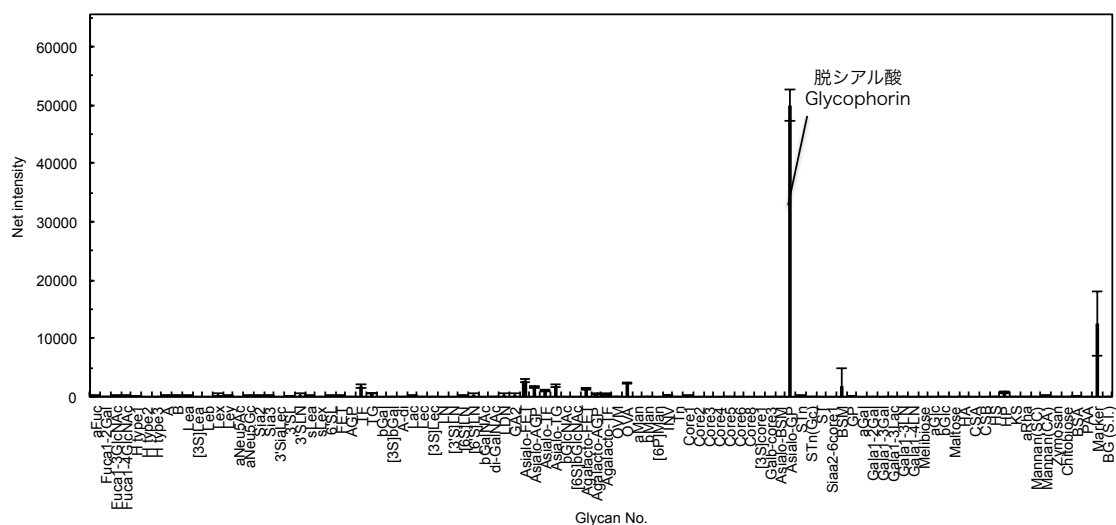


図 35. 改変①-Fc の糖鎖アレイ解析

(A) 改変①-Fc (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 60  $\mu\text{l}$  をスポットに加え、一晩 20°C でインキュベートした。洗浄後、Cy3-anti-hIgG-Fc (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を 100  $\mu\text{l}$  スポットに加え 20°C で 3 時間静置した。洗浄後、Cy3 モードでスキャンした。(Gain:110) (B) 各スポットの対応とスポットの励起光照射時の写真

**A**



**B**

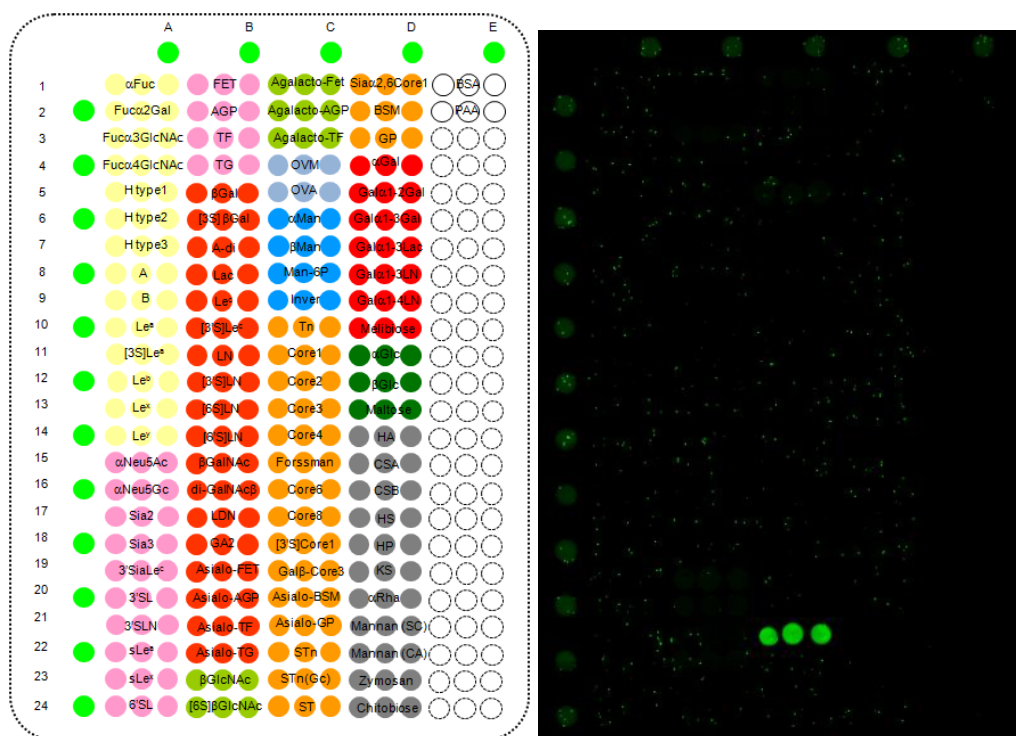
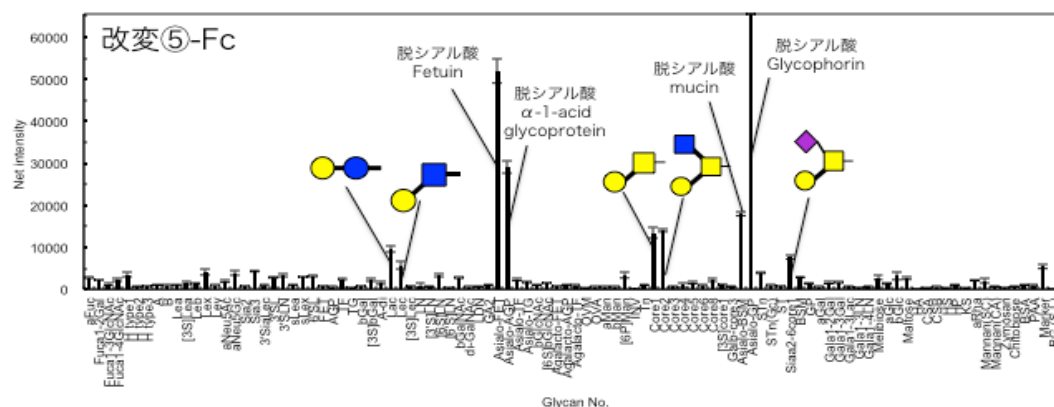


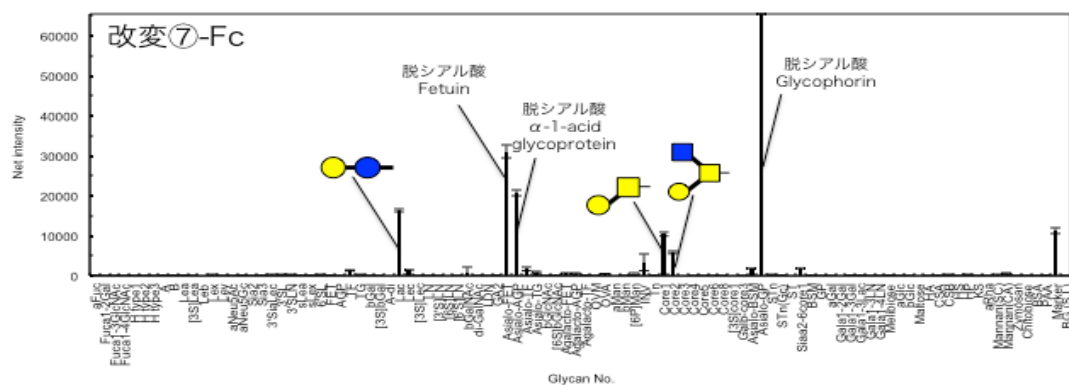
図 36. 改変⑥-Fc の糖鎖アレイ解析

(A) 改変⑥-Fc (50  $\mu$ g/ml) 60  $\mu$ l をスポットに加え、一晚 20°C でインキュベートした。洗浄後、Cy3-anti-hlgG-Fc (1  $\mu$ g/ml) を 100  $\mu$ l スポットに加え 20°C で 3 時間静置した。洗浄後、Cy3 モードでスキャンした。(Gain:105) (B) 各スポットの対応とスポットの励起光照射時の写真

A



B



C

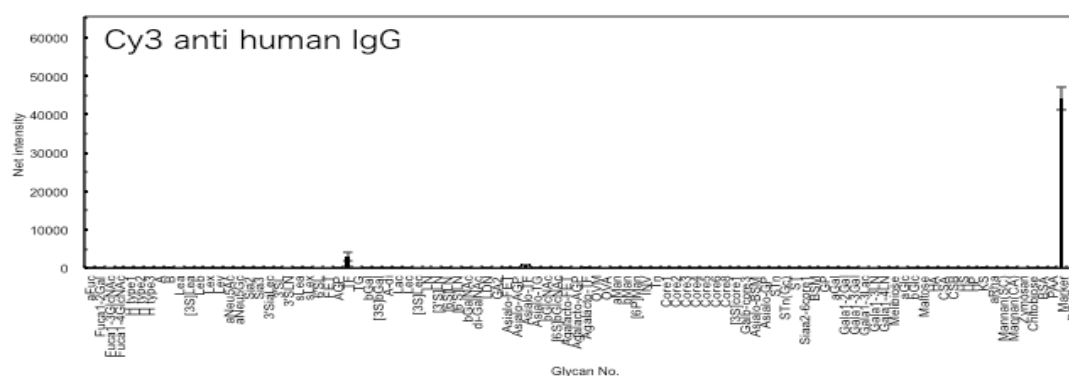


図 37. 改変⑤-Fc、改変⑦-Fc、二次抗体のみの糖鎖アレイ解析

Fc 融合タンパク質をスポットに加え、20℃で一晩インキュベートした。洗浄後、Cy3-anti-hlgG-Fc(1μg/ml)を加え、20℃で3時間反応させ、洗浄後、Cy3 モードで検出した。(A) 改変⑤-Fc (20 μg/ml) 100 μl 用いた解析 (Gain:105) (B) 改変⑦-Fc (50 μg/ml) 100 μl を用いた解析 (Gain:105) (C) コントロールとして、二次抗体：Cy3-anti-hlgG-Fc (1 μg/ml) のみを用いた解析 (Gain:115)

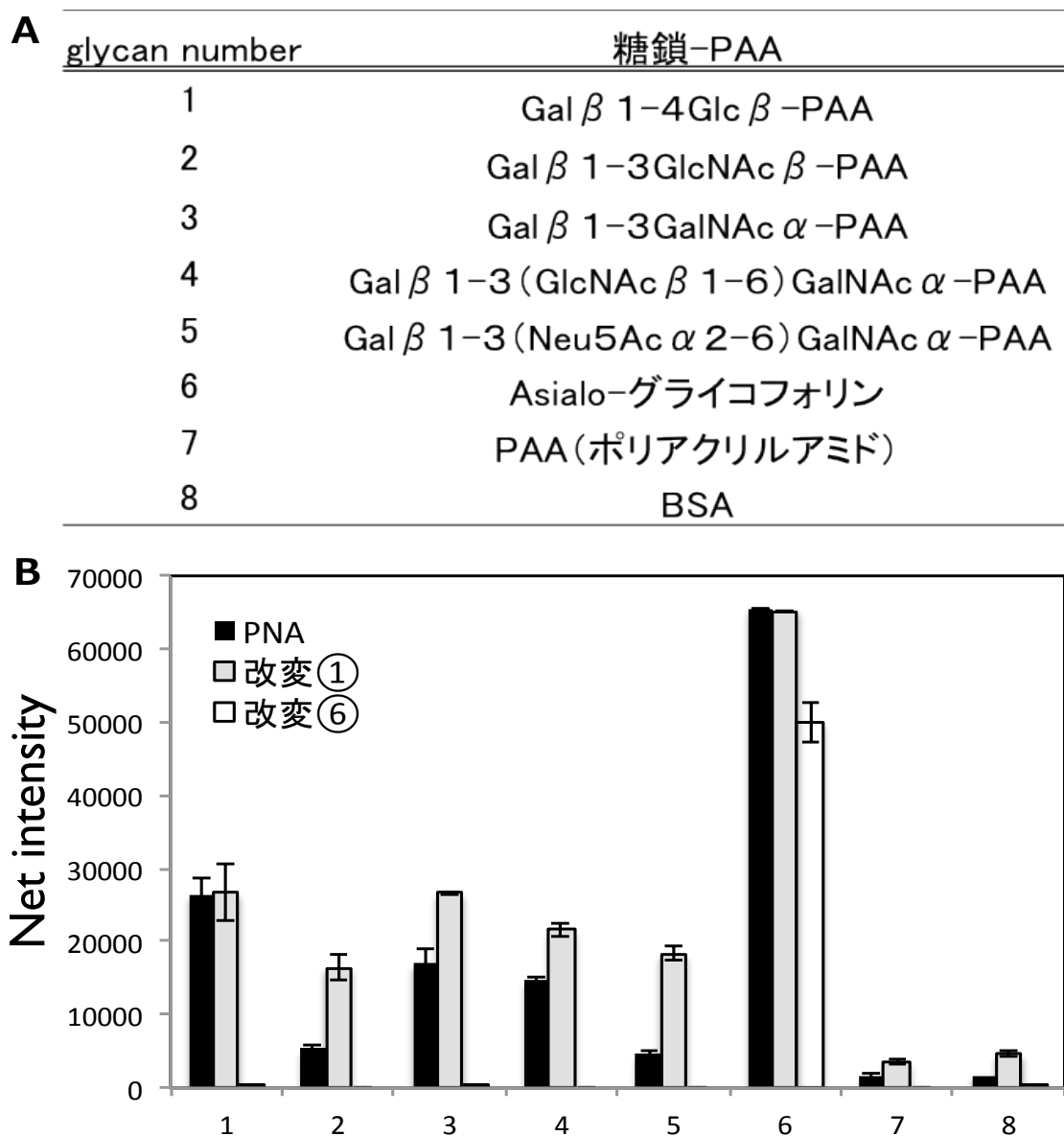


図 38. PNA-Fc、改変①-Fc、改変⑥-Fc の同じ糖鎖アレイ上で解析を行ったプロファイル比較(抜粋)

(A) PNA-Fc、改変①-Fc、改変⑥-Fc の 3 種類のレクチンの特異性、結合強度の違いを議論するために、8 スポットについてピックアップした。(B) PNA-Fc、改変①-Fc、改変⑥-Fc をそれぞれ (50  $\mu$ g/ml) 60  $\mu$ l をスポットに加え、一晩 20°C でインキュベートした。洗浄後、Cy3-anti-hIgG-Fc(1  $\mu$ g/ml)を 100  $\mu$ l スポットに加え 20°C で 3 時間静置した。洗浄後、Cy3 モードでスキャンした。(Gain:105)

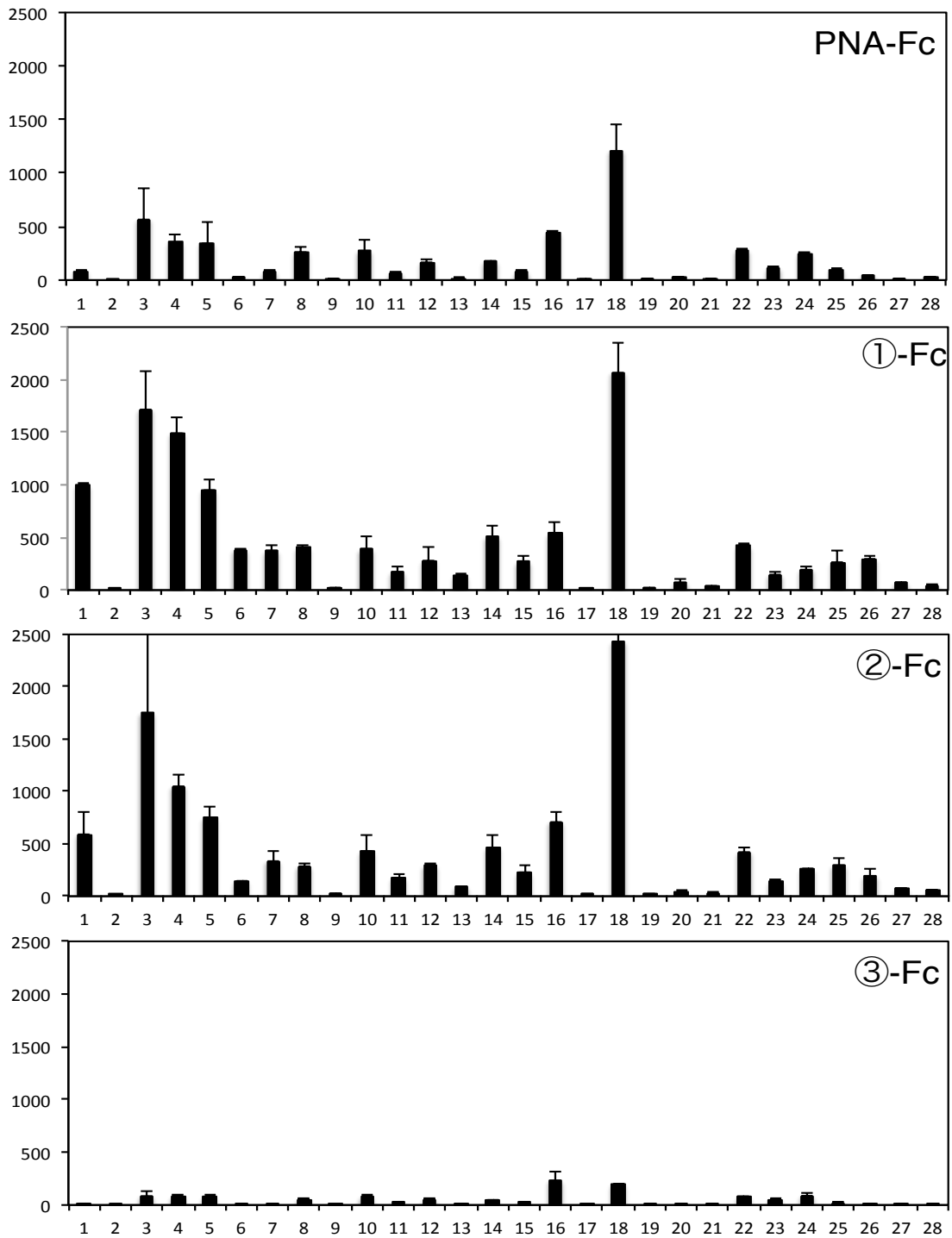


図 39-A. PNA-Fc、改変①-Fc、改変②-Fc、改変③-Fc の細胞株に対する結合試験

縦軸は 3 重測定で行ったフローサイトメトリーの平均蛍光強度の平均値を示す。横軸は、表 2 で示した細胞種の番号を示す。

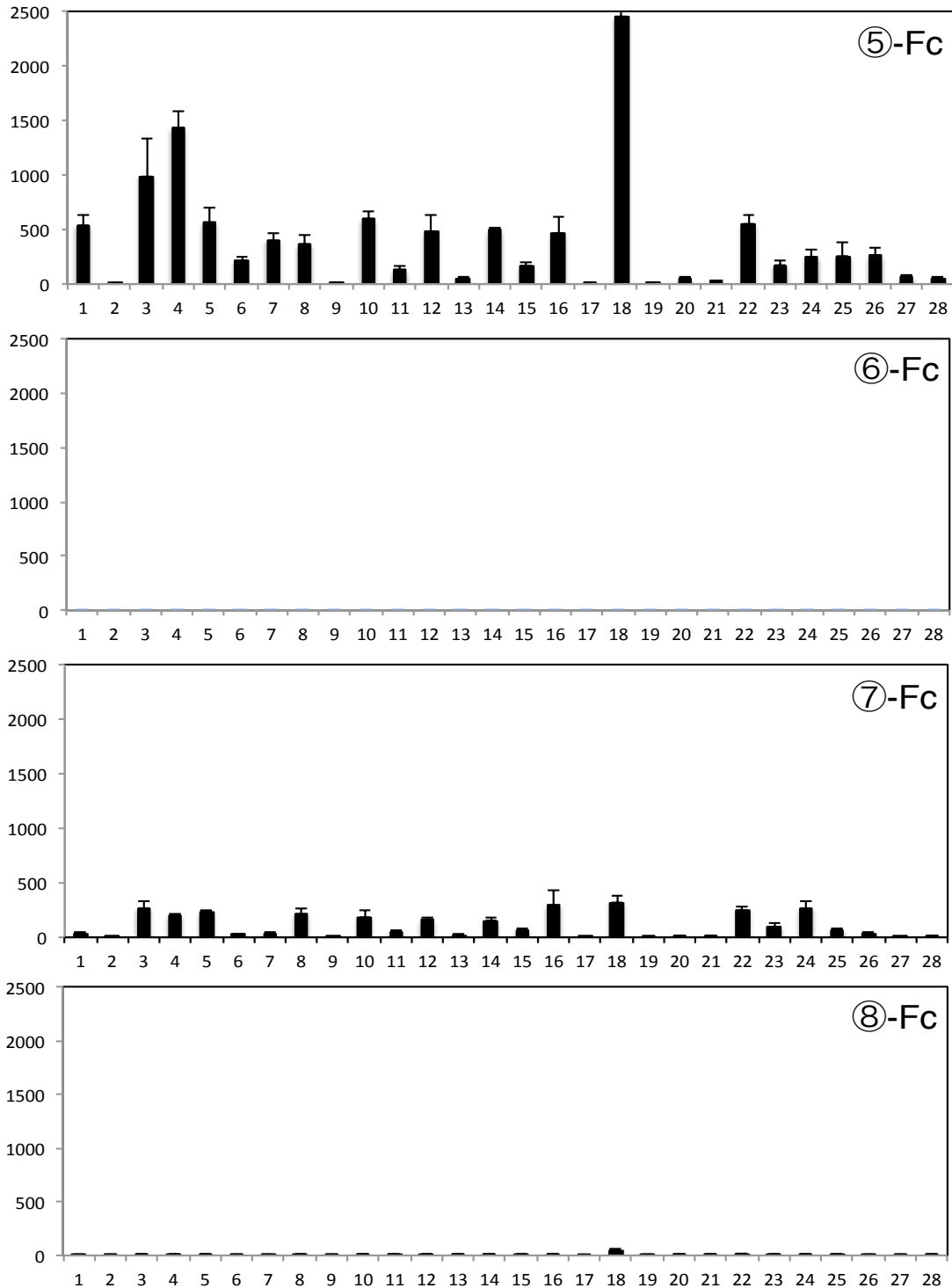


図 39-B. 改変⑤-Fc、改変⑥-Fc、改変⑦-Fc、改変⑧-Fc の培養細胞株に対する結合試験

縦軸は 3 重測定で行ったフローサイトメトリーの平均蛍光強度の平均値を示す。横軸は、表 2 で示した細胞種の番号を示す。

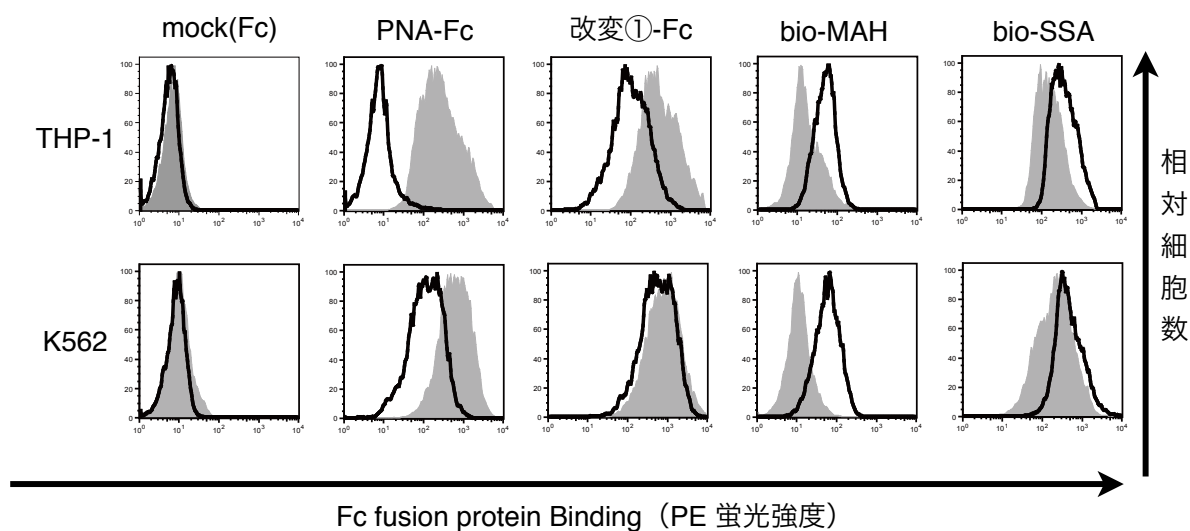
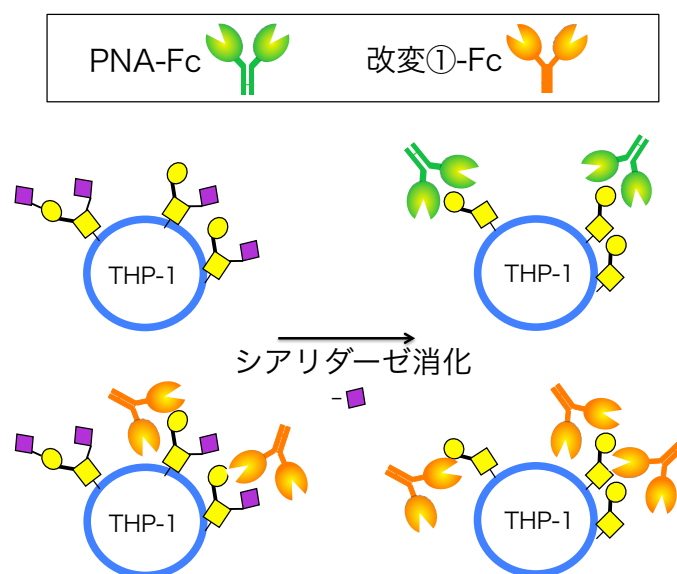


図 40. PNA-Fc、改変①-Fc、ビオチン化 MAH、ビオチン化 SSA のシアリダーゼ処理した THP-1 細胞と K562 細胞に対する結合試験

THP-1 細胞と K562 細胞をシアリダーゼ処理し、処理していない細胞と同時に結合試験を行い、フローサイトメーターで解析した。mock は Fc 領域だけの組み換えタンパク質でコントロールとして用いた。Bio-MAH、Bio-SSA はビオチン化されているシアル酸結合性レクチンである。白抜きのヒストグラムは、シアリダーゼ未処理細胞との、灰色の塗りつぶされたヒストグラムはシアリダーゼ処理した細胞との結合試験結果を指す。



**A**



**B**

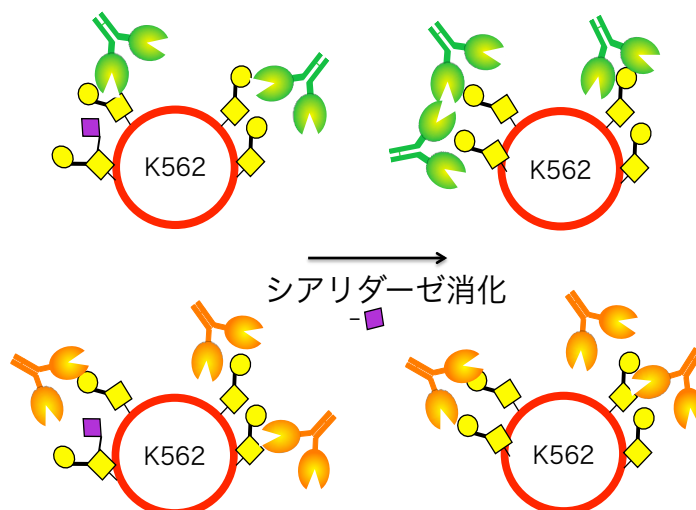


図 41. PNA-Fc と改変①の細胞結合性の違いから予想される THP-1 細胞と K562 細胞表面の糖鎖構造の仮説モデル図

上段が PNA-Fc、下段が改変①-Fc との結合性のモデルを示す。また、左側はシアリダーゼ未処理、右側がシアリダーゼ処理後の結合性のモデル (A) THP-1 細胞には、Gal $\beta$ 1-3 (NeuAc $\alpha$ 2-6) GalNAc $\alpha$  が細胞表面に多く発現していると推測できる。(B) K562 細胞には、Gal 末端を多く持つ糖鎖構造を細胞表面に有していると考えられる。

**A**

PNA/Gal $\beta$ 1-3GalNAc 複合体の立体構造



**B**

糖結合部位を構成するアミノ酸残基

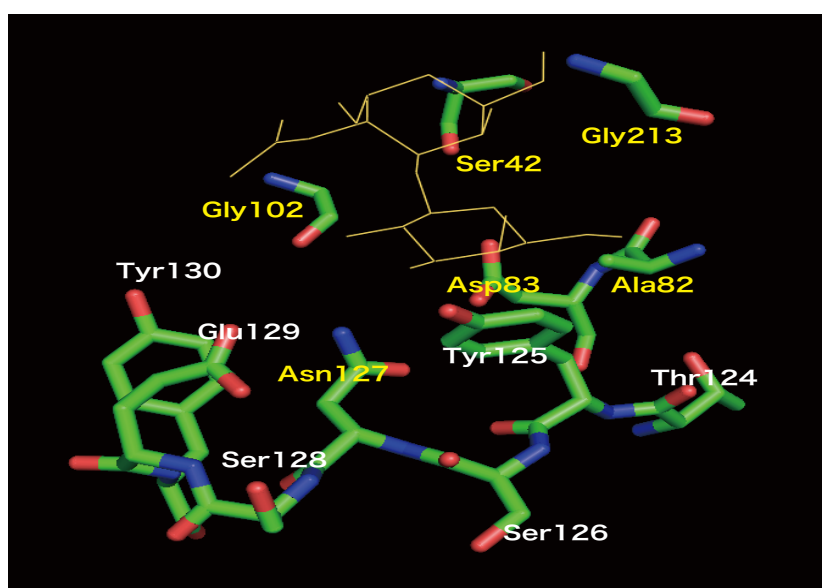


図 42. PNA と Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$  の共結晶構造解析データ (PDB: 2 DVA) をソフト PyMOL で解析

(A) PNA のサブユニットと Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$  との結合を全体から見た図 (B) 糖結合部位を構成するアミノ酸残基に着目した図

## 11. 表

Number	Trivial name	Presentation	Glycans	Co.	Cat#
1	$\alpha$ Fuc	PAA	Fuc $\alpha$ 1-PAA	Glycotect	01-007
2	Fuc $\alpha$ 2Gal	PAA	Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-019
3	Fuc $\alpha$ 3GlcNAc	PAA	Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-024
4	Fuc $\alpha$ 4GlcNAc	PAA	Fuc $\alpha$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-025
5	H type1	PAA	Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-037
6	H type2	PAA	Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	08-034
7	H type3	PAA	Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotect	08-060
8	A	PAA	GalNAc $\alpha$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-2)Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	08-091
9	B	PAA	Gal $\alpha$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-2)Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	08-092
10	Le <sup>a</sup>	PAA	Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-035
11	[3S]Le <sup>a</sup>	PAA	(3OSO <sub>3</sub> )Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-040
12	Le <sup>b</sup>	PAA	Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	08-042
13	Le <sup>x</sup>	PAA	Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-036
14	Le <sup>y</sup>	PAA	Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	08-043
15	$\alpha$ Neu5Ac	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-PAA	Glycotect	01-012
16	$\alpha$ Neu5Gc	PAA	Neu5Gc $\alpha$ 2-PAA	Glycotect	01-051
17	Sia2	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-8Neu5Ac $\alpha$ 2-PAA	Glycotect	08-064
18	Sia3	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-8Neu5Ac $\alpha$ 2-8Neu5Ac $\alpha$ 2-PAA	Glycotect	01-081
19	3'SiaLe <sup>c</sup>	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-078
20	3'SL	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-038
21	3'SLN	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-077
22	sLe <sup>a</sup>	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	08-044
23	sLe <sup>x</sup>	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-045
24	6'SL	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-039
25	FET	Glycoprotein	Fetuin (Complex-type N-glycans and O-glycans)	Sigma	F3004
26	AGP	Glycoprotein	$\alpha$ 1-acid glycoprotein (Complex-type N-glycans)	Sigma	G9885
27	TF	Glycoprotein	Transferrin (Complex-type N-glycans)	Sigma	T3309
28	TG	Glycoprotein	Porcine thyroglobulin (Complex and high-mannose-type N-glycans)	Sigma	T1126
29	$\beta$ Gal	PAA	Gal $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-004
30	[3S] $\beta$ Gal	PAA	(3OSO <sub>3</sub> )Gal $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-015
31	A-di	PAA	GalNAc $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-017
32	Lac	PAA	Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-021
33	Le <sup>e</sup>	PAA	Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-020
34	[3'S]Le <sup>e</sup>	PAA	(3OSO <sub>3</sub> )Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-062
35	LN	PAA	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-022
36	[3'S]LN	PAA	(3OSO <sub>3</sub> )Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-061
37	[6'S]LN	PAA	Gal $\beta$ 1-4(6OSO <sub>3</sub> )GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-066
38	[6'S]LN	PAA	(6OSO <sub>3</sub> )Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-068
39	$\beta$ GalNAc	PAA	GalNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-011
40	di-GalNAc $\beta$	PAA	GalNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-070
41	LDN	PAA	GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-057
42	GA2	PAA	GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	08-074
43	Asialo-FET	Glycoprotein	Asialo fetuin (Desialylated complex-type N- and O-glycans)	Sigma	F3004 (Acid)
44	Asialo-AGP	Glycoprotein	Asialo $\alpha$ 1-acid glycoprotein (Desialylated complex-type N-glycans)	Sigma	G9885 (Acid)
45	Asialo-TF	Glycoprotein	Asialo transferrin (Desialylated complex-type N-glycans)	Sigma	T3309 (Acid)
46	Asialo-TG	Glycoprotein	Asialo porcine thyroglobulin (Desialylated complex-type N-glycans)	Sigma	T1126 (Acid)
47	$\beta$ GlcNAc	PAA	GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-009
48	[6S] $\beta$ GlcNAc	PAA	(6OSO <sub>3</sub> )GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-016
49	Agalacto-Fet	Glycoprotein	Agalacto fetuin (Agalactosylated complex-type N- and O-glycans)	Sigma	F3004
50	Agalacto-AGP	Glycoprotein	Agalacto $\alpha$ 1-acid glycoprotein (Agalactosylated complex-type N-glycans)	Sigma	G9885
51	Agalacto-TF	Glycoprotein	Agalacto transferrin (Agalactosylated complex-type N-glycans)	Sigma	T3309
52	OMV	Glycoprotein	Ovomucoid (Complex-type N-glycans)	Sigma	T2011
53	OVA	Glycoprotein	Ovalbumin (Hybrid-type N-glycans)	Sigma	A2512
54	$\alpha$ Man	PAA	Man $\alpha$ 1-PAA	Glycotect	01-005
55	$\beta$ Man	PAA	Man $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-050
56	[6P]Man	PAA	(6OPO <sub>3</sub> )Man $\alpha$ 1-PAA	Glycotect	01-006
57	INV	Glycoprotein	Yeast invertase (High mannose-type N-glycans)	Sigma	I4504
58	Tn	PAA	GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotect	01-010
59	Core1	PAA	Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotect	08-023
60	Core2	PAA	Gal $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotect	01-083
61	Core3	PAA	GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotect	01-071
62	Core4	PAA	GlcNAc $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotect	01-089
63	Forsman	PAA	GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-026
64	Core6	PAA	GlcNAc $\beta$ 1-6GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotect	01-072
65	Core8	PAA	Gal $\alpha$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotect	01-028
66	[3'S]Core1	PAA	(3OSO <sub>3</sub> )Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotect	08-069
67	Gal $\beta$ -Core3	PAA	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotect	01-116
68	Asialo-BSM	Glycoprotein	Asialo bovine submaxillary mucin (Tn)	Sigma	M3895 (Acid)
69	Asialo-GP	Glycoprotein	Asialo human glycophorin MN (T)	Sigma	A9791 (Acid)
70	STn	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotect	01-059
71	STn (Gc)	PAA	Neu5Gc $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotect	01-107
72	ST	PAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotect	01-088
73	Sia $\alpha$ 2-6Core1	PAA	Gal $\beta$ 1-3(Neu5Ac $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$ 1-PAA	Glycotect	01-113
74	BSM	Glycoprotein	Bovine submaxillary mucin (Sialyl Tn)	Sigma	M3895
75	GP	Glycoprotein	Human glycophorin (Disialyl T and sialyl Tn)	Sigma	G5017
76	$\alpha$ Gal	PAA	Gal $\alpha$ 1-PAA	Glycotect	01-003
77	Gal $\alpha$ 1-2Gal	PAA	Gal $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-056
78	Gal $\alpha$ 1-3Gal	PAA	Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-018
79	Gal $\alpha$ 1-3Lac	PAA	Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-075
80	Gal $\alpha$ 1-3LN	PAA	Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-079
81	Gal $\alpha$ 1-4LN	PAA	Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-110
82	Melibiose	PAA	Gal $\alpha$ 1-6Glc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-063
83	$\alpha$ Glc	PAA	Glc $\alpha$ 1-PAA	Glycotect	01-001
84	$\beta$ Glc	PAA	Glc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-002
85	Maltose	PAA	Glc $\alpha$ 1-4Glc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	01-054
86	HA	BSA	Hyaluronic acid-BSA	Seikagaku	400720
87	CSA	BSA	Chondroitin Sulfate A-BSA	Seikagaku	400655
88	CSB	BSA	Chondroitin Sulfate B-BSA	Seikagaku	400660
89	HS	BSA	Heparan Sulfate-BSA	Seikagaku	400700
90	HP	BSA	Heparin-BSA	Calbiochem	375095
91	KS	BSA	Keratan Sulfate-BSA	Seikagaku	400760
92	$\alpha$ Rha	PAA	Rhamnose $\alpha$ 1-PAA	Glycotect	01-008
93	Mannan (SC)	Glycoprotein	<i>S. cerevisiae</i> mannan	Sigma	M7504
94	Mannan (CA)	Glycoprotein	<i>C. albicans</i> mannan	Takara	MG001
95	Zy mosan	Glycoprotein	Zy mosan	Sigma	Z4250
96	Chitobiose	PAA	GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-PAA	Glycotect	08-057
97	BSA	BSA	-	Sigma	A7638
98	Negative PAA	PAA	-	Glycotect	01-000

表 1.糖鎖アレイ上の糖鎖及び糖タンパク質一覧

GP array ver.4.2 の 98 種類のスポットの一覧。糖は PAA（ポリアクリルアミド）、グリコサミノグリカンは BSA を介して固定化されている。

No	由来	細胞名
1	急性単球性白血病	THP-1
2	リンパ腫	U937
3	バーキットリンパ腫	Raji
4	バーキットリンパ腫	Daudi
5	T リンパ腫	HUT78
6	急性骨髄性白血病	HL60
7	T 細胞性白血病	Jurkat
8	赤白血病	K562
9	芽細胞性 NK 細胞リンパ腫	CAL-1
10	胃がん	AZ521
11	肺扁平上皮がん	EBC1
12	肺腺がん	A549
13	結腸がん	CoLoTC
14	膵がん	MIAPaca2
15	膵がん	PK-8
16	膵がん	PANC1
17	肝細胞がん	HepG2
18	口腔扁平上皮がん	Ho-1-u-1
19	メラノーマ	C32TG
20	メラノーマ	G361
21	メラノーマ	SK-MEL-28
22	子宮がん	HeLa
23	子宮がん(浮遊型)	HeLaS3
24	子宮頸扁平上皮がん	ME180
25	胎児腎	HEK293
26	神経芽細胞腫	IMR32
27	骨肉腫	HOS
28	線維芽細胞	HDFa

表 2. 使用したがん細胞一覧

がん細胞の由来を示した。細胞 No は図 39 の結合試験に対応している。

名前	アミノ酸配列 (ループ C)	アミノ酸配列 (ループ D)
残基	123 125 127 129 131	211 213 215
PNA	D T Y S <b>N</b> S E <b>Y</b> N D	G S R A G R Q
GlcNAc $\beta$ 1-3 GalNAc $\alpha$ スクリーニング		
①	D T <b>W</b> P <b>N</b> R S <b>Y</b> K D	G S R A G R Q
Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ スクリーニング		
②	D L <b>W</b> Q <b>N</b> R E <b>F</b> C D	G S R A G R Q
③	D K <b>W</b> H <b>N</b> S F <b>Y</b> D D	G S R A G R Q
Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ スクリーニング		
①	D T <b>W</b> P <b>N</b> R S <b>Y</b> K D	G S R A G R Q
③	D K <b>W</b> H <b>N</b> S F <b>Y</b> D D	G S R A G R Q
Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc $\beta$ スクリーニング		
④	D S <b>W</b> G <b>N</b> G R <b>Y</b> S D	G S R A G R Q
$\alpha$ Fuc スクリーニング		
⑤	D V <b>W</b> P <b>N</b> P P <b>Y</b> H D	G S R A G R Q
Gal $\beta$ 1-3 (NeuAc $\alpha$ 2-6) GalNAc $\alpha$ スクリーニング		
①	D T <b>W</b> P <b>N</b> R S <b>Y</b> K D	G S R A G R Q
⑥	D C H Q <b>N</b> R D <b>Y</b> L D	G S R A G R Q
⑦	D A <b>W</b> H <b>N</b> R E L N D	G S R A G R Q
⑧	D P H V <b>N</b> D E <b>Y</b> C D	G S R A G R Q
⑨	D R H V <b>N</b> R R <b>Y</b> S D	G S R A G R Q
⑩	D V <b>W</b> T <b>N</b> S K <b>F</b> R D	G S R A G R Q
⑪	D T <b>W</b> S <b>N</b> P P H N D	G S R A G R Q

表 3. 同定した改変レクチンのループ C と D のアミノ酸配列

PNA と同定した 11 種類の改変レクチンのアミノ酸配列の一部を記載した。改変①と改変③は複数の糖とのスクリーニングで重複して取得した。赤字で示したのは、保存されている 127 残基目のアスパラギンを指す。また、青字で示したものは、125 残基目のトリプトファンや 130 残基目のチロシンやフェニルアラニンなどの芳香族アミノ酸が高度に保存されている部位を指す。