

論文の内容の要旨

論文題目：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)

氏名：曾我 慶介

【序論】

ポストゲノムと呼ばれる現在、真核細胞の高度な翻訳後修飾として付加される「糖鎖」に関する多くの生物学的役割が解明されてきた。糖鎖はタンパク質の安定性向上、行き先指定など様々な生理的機能を示す他に、近年では細胞の状態を反映することから、細胞表面やその細胞が分泌するタンパク質の糖鎖構造をプロファイルすることで癌などの疾病の診断技術への応用も試みられる。これら糖鎖をモニターするツールとして、抗体、レクチン(糖結合タンパク質)が汎用される。しかし、糖鎖の構造は複雑で多様性に富み、既知の構造だけでも1,000を越えるため、既存のプローブだけではすべてを網羅することは、不可能である。

抗糖鎖抗体は、体内に普遍的に存在する糖骨格の免疫原性の低さから作製はとても困難であり、また、植物から大量に得られるレクチンも種類が限られているため、すべての糖鎖構造をカバーできていない。このような現状を打破するために、新規の糖鎖プローブ開発へのアプローチが必要である。

本研究は、新規の糖結合特異性を持つレクチンを探索することで打開策を見出す。著者は、レクチンの中で最も大きなファミリーを形成し、ファミリー間で相同性が高いにも関わらず、糖結合特異性の種類は多岐に渡っているマメ科レクチンに着目した。既存のマメ科レクチンの骨格を鋳型に、NFAT-activation molecule cloning system (NACS) を利用した

Mammalian Cell Surface Display (MCSD) 法による糖結合特異性改変レクチンのスクリーニング系を立ち上げ、実際にプローブとして利用できるか検討することを目的とした。

【結果・考察】

(I) Peanut agglutinin (PNA) の変異体ライブラリー作製

マメ科レクチンの糖結合部位は4つのループから構成される(図1)。中でも、糖結合特異性に大きく寄与するループCとループDに着目した。本研究では、 β ガラクトース結合性の Peanut agglutinin (PNA) を骨格として、糖結合特異性を改変するために、糖結合部位であるループCとループDのそれぞれにランダム変異を導入したライブラリーを作製した。ループCにおいて、金属イオンとの配位に寄与する127残基目のNを保存または類似アミノ酸に変え、かつ糖結合ポケットを拡張することを狙いアミノ酸残基数を増やしたライブラリーを6種類デザインした(図1)。また、ループDにおいて、アミノ酸残基数を増減させたものを4種類デ

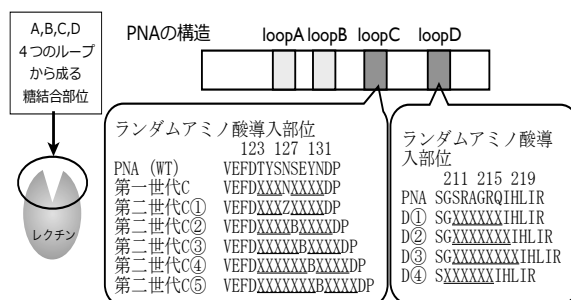


図1. PNAの構造とライブラリーの変異導入部位

X: ランダムアミノ酸残基、Z: D,E,H,Q、B: D,E,H,K,N,Q

ザインした（図1）。規模としては、総じて 2.0×10^7 cfu 作製した。

（Ⅱ）PNA 変異体ライブラリーレポーター細胞の樹立

糖鎖とレクチンの相互作用は弱く、解離定数は $10^{-6} \sim 10^{-3}$ M 程である。そのため、従来のファージディスプレイ法のような洗浄操作が必要なスクリーニング法では、糖からレクチンが外れてしまうことが懸念されたが、本研究では「MCSD 法」を用いることでこの問題点を解消した。また、哺乳動物細胞発現系を用いることで、大腸菌などの宿主を用いる方法と比較し、高いレクチン提示率が期待できる。実際には、作製したレクチンライブラリーをレトロウイルスベクターに組み込み、マウス T cell 2B4 細胞に導入することで、細胞表面に PNA 変異体を発現させ、糖鎖との相互作用を検出するレポーター細胞を作製した。作製したレポーター細胞は糖とレクチンの弱い結合でも、レクチン分子が架橋されることで、細胞内にシグナルが伝達され、IL-2 プロモーターに作用する転写因子 NFAT を介して GFP 発現が誘導される（図2）。洗浄操作を行うことで、仮に結合が外れてもその相互作用の形跡を細胞内に残すために、培養したレポーター細胞を解析することで相互作用の有無を検出することができる。本発表で述べるこの相互作用検出法は、洗浄操作で外れてしまうレクチン・糖鎖間の弱い結合も、検出できる斬新な方法論と言える。

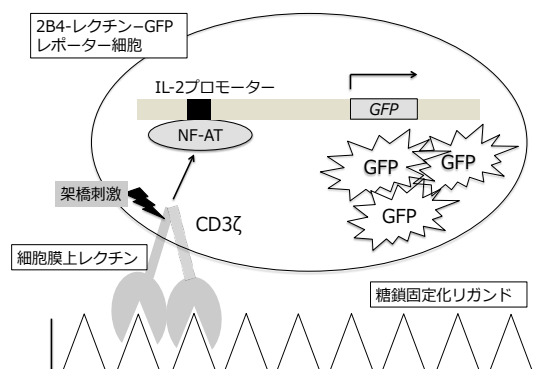


図2. レクチンレポーター細胞概略図
糖鎖との結合により、CD3ζ（細胞内領域）からのシグナルが伝達され、転写因子NFATにより細胞内にGFP発現が誘導される。

（Ⅲ）新規レクチン発現レポーター細胞のスクリーニング系の確立

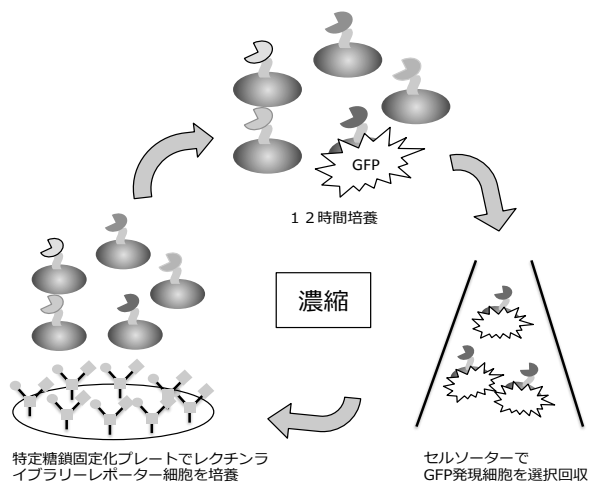


図3. Cell Surface Display法概略図
糖鎖固定化プレート上でレポーター細胞を12時間培養し、GFP陽性細胞をセルソーターを用いて回収し、再培養する。この濃縮のステップを数回繰り返し、十分な濃縮がされたところで、改変レクチンcDNAの同定を行う。

特定の糖鎖構造に結合活性を有するレクチンをスクリーニングするために、MCSD 法を用いた（図3）。本研究では、一般的な糖であるガラクトース、N-アセチルグルコサミンの他に、汎用プローブの少ないフコース、シアル酸末端を持つ糖鎖構造など合計14種類をターゲットとし、順次スクリーニングを試みた。糖鎖を固定化したプレート上で培養したレクチンライブラリーレポーター細胞から、GFP 陽性の細胞をセルソーターで分取した。Galβ1-3(NeuAc2-6)GalNAcα を認識するレクチンを発現したレポーター細胞では、三回の濃縮ステップを経て顕著に濃縮されたことがレポーターアッセイにより確認できた（図4）。

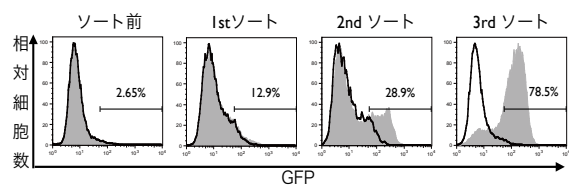


図4. Galβ1-3(NeuAc2-6)GalNAcα認識レクチン発現細胞の濃縮過程
レクチンライブラリーを発現したレポーター細胞群から、GFP蛍光強度上位1%～3%の細胞をセルソーターで分取し、濃縮した。図では、三回の各ステップで濃縮したレポーター細胞を糖鎖固定化プレートで培養した後、フローサイトメトリーを行い、GFP蛍光強度を解析したものを示す。白抜きヒストグラムは糖鎖なしプレートで培養した時、塗りつぶされたヒストグラムは糖鎖固定化プレートで培養した時の解析を指す。

（Ⅳ）改変レクチン遺伝子の同定

（Ⅲ）で濃縮したレクチン発現レポーター

細胞から、改変レクチンの cDNA を同定するために、細胞から遺伝子を単離した。単離した候補遺伝子から、レポーターアッセイで糖結合活性の有無を確認し、最終的に 12 種類のレクチン cDNA を同定した (図 5)。同定した配列は、すべてループ C にのみ変異の導入されたものであった。しかし、ループ長の長いもの (アミノ酸残基数を増やしたもの) や金属配位部位の N を類似アミノ酸に改変したものは、今回のスクリーニングでは得られなかった。糖結合活性が確認できたレクチンのアミノ酸配列を比較すると、127 残基目の N が全て保存されており、125 残基目、130 残基目において、Y、W、F、H などの芳香族アミノ酸が高度に保存されていることが見出された。しかし、レポーターアッセイの結果より、H に置き換わった変異体は、芳香族アミノ酸の場合に比べて糖との結合が弱いと考えられる。128 残基目の S は、多くの変異体において、塩基性アミノ酸である R に置換されていた。これらの規則性は、今後、新規にレクチンをデザインする上で、重要なデータとなるだろう。

名前	DNA配列/アミノ酸配列									
	123	125	127	129	131					
PNA (WT)	D	T	Y	S	N	S	E	Y	N	D
GlcNAc β 1-3GalNAc α スクリーニング										
改変①	D	T	W	P	N	R	S	Y	K	D
Gal α 1-3Gal β スクリーニング										
改変②	D	L	W	Q	N	R	E	F	C	D
改変③	D	K	W	H	N	S	F	Y	D	D
Gal β 1-3GlcNAc β スクリーニング										
改変①	D	T	W	P	N	R	S	Y	K	D
改変③	D	K	W	H	N	S	F	Y	D	D
Fuc α 1-3GlcNAc β スクリーニング										
改変④	D	S	W	G	N	G	R	Y	S	D
Fuc α スクリーニング										
改変⑤	D	V	W	P	N	P	P	Y	H	D
Gal β 1-3(NeuAc2-6)GalNAc α スクリーニング										
改変①	D	T	W	P	N	R	S	Y	K	D
改変⑥	D	C	H	Q	N	R	D	Y	L	D
改変⑦	D	A	W	H	N	R	E	L	N	D
改変⑧	D	P	H	V	N	D	E	Y	C	D
改変⑨	D	R	H	V	N	R	R	Y	S	D
改変⑩	D	C	H	Q	N	R	D	Y	L	D
改変⑪	D	V	W	T	N	S	K	F	R	D
改変⑫	D	T	W	S	N	P	P	H	N	D

図5. 得られた12種類の改変レクチンのCループの配列
*改変①と③は複数の糖とのスクリーニングで重複して取得した。

(V) 改変レクチン-Fc 融合タンパク質作製系の構築

改変レクチンを発現させたレポーター細胞では、感度が良い反面、プローブとして扱うのは難しい。そこで同定した改変レクチン cDNA の 3' 側にヒト抗体 Fc 領域の cDNA を繋いだプラスミドを作製し、HEK293 細胞に導入することで、レクチン-Fc 融合タンパク質を発現させた。Fc 融合タンパク質は、発現させた細胞の培養上清中に分泌され、Protein A により精製することができ、細胞を一週間培養した培養液 50 ml から 100~300 μ g 得ることができた。本研究では、改変①、②、③、⑤、⑥、⑦、⑧ (図 5) の合計 7 種類の改変レクチン-Fc 融合タンパク質を発現させた。

(VI) 改変レクチンの評価

第一に、糖結合特異性について評価した。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、糖鎖アレイ解析を行った。糖鎖

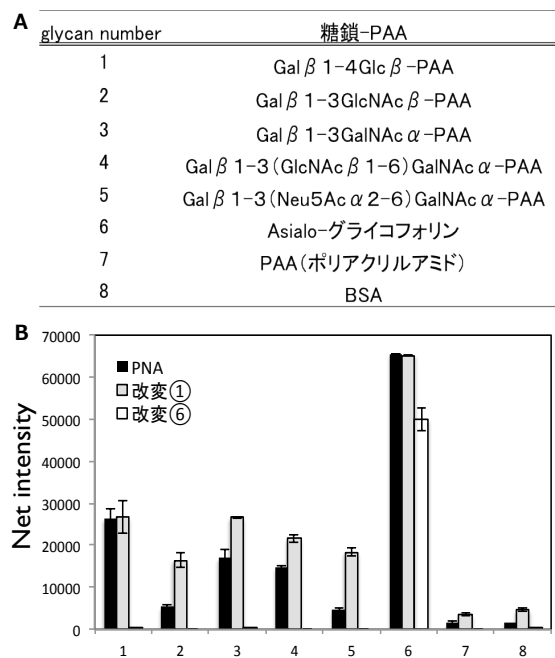


図6. 糖鎖アレイ解析 (抜粋)

改変レクチン-Fc糖鎖結合性プロファイルを網羅的に解析した。一部を抜粋して示す。

A. 抜粋糖鎖構造式,

B. PNA-Fcと①-Fcと⑥-Fcの糖鎖アレイのデータ

アレイ上には、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調べることができる。創出した改変レクチン①の特異性は、PNA の結合する糖鎖に加え、スクリーニングに使用した糖鎖 Gal β 1-3GlcNAc β と

Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α への結合活性を獲得したことが示された (図 6)。②-Fc と⑤-Fc は、Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α への結合は比較的弱い、①-Fc と似たような結合パターンを示した。⑥-Fc と⑧-Fc という 125 残基目が H に改変した変異体では、糖鎖との結合は確認できなかったが、脱シアル化したグライコフォリン (Gal β 1-3GalNAc α 末端を多数持つ) にだけ特異的に結合が検出された (図 6)。③-Fc と⑦-Fc は特異性プロファイルが PNA-Fc に似ていたが、やや弱い結合パターンを示した。以上より、特異性という点において、新たな特異性を獲得した改変レクチンと、特異性がより厳密になった改変レクチンを得ることができた。

次に、結合親和性について評価した。同じ糖鎖アレイ上における解析では、PNA が結合する糖鎖構造 Gal β 1-3GalNAc α では、改変①-Fc は、PNA-Fc よりも約 1.5 倍以上の結合強度を示した (図 6)。また、28 種類のヒトの培養細胞に対する改変レクチン-Fc 融合タンパク質の結合試験では、改変①、②、⑤-Fc では、各細胞に対して、PNA-Fc と比べると 2~5 倍の結合強度を示した。以上より、プローブとして鋳型レクチンよりも結合親和性を増強した変異体を得ることができた。

興味深いことに、PNA-Fc では強い結合の見られない前単球の細胞株 THP-1、HL-60 において、改変①-Fc では 10 倍以上の強い結合強度を示した。また、THP-1 をシアリダーゼ処理して同様の結合試験を行うと、PNA-Fc では約 30 倍の結合強度の増加が見られたのに対し、改変①-Fc では、約 5 倍程であった (図 7)。すなわち、THP-1 には、Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α のような糖鎖構造が他の細胞よりも多く発現していると

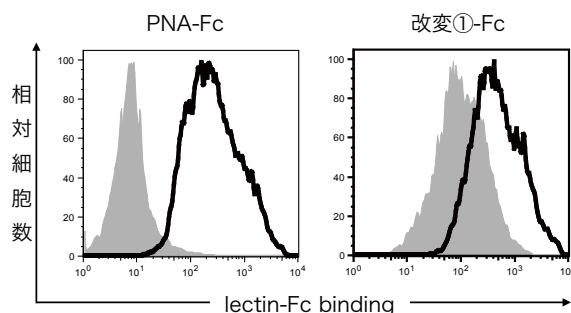


図7. THP-1細胞とレクチン-Fcとの結合試験
塗りつぶされたヒストグラムが無処理、白抜きのヒストグラムがシアリダーゼ処理した細胞との結合試験を指す。(フローサイトメトリー)

推測できる。

改変③-Fc と改変⑦-Fc は、細胞に対する結合は PNA-Fc より弱かった。改変⑥-Fc と⑧-Fc は細胞への結合がほとんど見られなかった。結合の弱い変異体は W125→H になっている傾向が再確認された (図 5)。この現象は糖との結合に重要な疎水的相互作用が弱まった結果ではないかと考えられる。また、改変①-Fc がシアル酸と相互作用するメカニズムは、ループ C の配列中の 131 残基目の K がシアル酸の負電荷と相互作用した結果ではないかと推測している。

【総括】

本研究では、マメ科レクチンを骨格とした糖結合特異性改変レクチンスクリーニング系を確立した。そして、改変レクチンの組換えタンパク質発現系を構築し、その性質を解析した。本手法を用いて、骨格として用いたレクチンとは異なる特異性を持った改変レクチンが複数得ることができた。特に本研究では、Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α という汎用プローブの少ない構造を認識するレクチンを得たという点で、糖鎖生物学分野に貢献できるだろう。また、結合親和性を増強したレクチンを得ることができたことは、一般的にレクチン-糖は結合が弱い、大きなインパクトがあると考えている。そして、得られた変異体のアミノ酸配列を元に、今後はモデリングなども取り組むべきだろう。本手法を応用し、より有用なレクチンプローブが開発されることが望まれる。