

論文の内容の要旨

論文題目 Generation of Library of Genetically Engineered Plant Lectins and Its
Application (遺伝子工学的手法による人工植物レクチンライブラリー
の作製とその応用)

氏名 林 美正

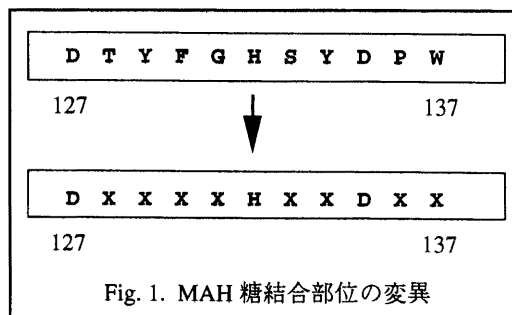
【序】

糖鎖に書き込まれた暗号を解読することができれば、生物学に新しい地平が開かれると言われている。多様な糖鎖を解析するためのツールとして、また生体内で暗号を読みとっている分子候補として糖結合蛋白質（レクチン）が挙げられる。しかし、糖鎖の種類に対してそれを認識する既知のレクチンの種類は限られており、動物及び植物由来のものを合わせても糖鎖の多様性と対応させるには十分とは言えないのが現状である。もし、異なる糖鎖認識スペクトルを有する人工レクチンが多様な内容を持つライブラリーとして得られれば、その中から、特定の細胞挙動に関与する糖鎖に特異的な新規レクチンを得たり、多様なレクチンを固相化したレクチンチップを作製して細胞の同定に用いるなどの応用が期待される。そこで私は、1) シアル酸を含む糖鎖に特異的なマメ科レクチンである *Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH) の糖結合部位を遺伝子工学的手法でランダムに改変し、異なる糖鎖のバリエーションを見分けられる人工レクチンのライブラリーを作製すること、2) 得られた人工レクチンライブラリーを利用して、種類の異なる細胞への結合パターンから細胞の種類の違いを見分けること、3) 人工レクチンライブラリーから、生物学的に重要な糖鎖に特異的なレクチンを選別するための、スクリーニング系を確立することを目標とした。

【結果および考察】

1. 人工レクチンライブラリーの作製

種々のマメ科レクチンのアミノ酸配列と糖結合部位の構造から得られた情報に基づき、MAH レクチンの 285 個のアミノ酸のうち、糖結合部位である 127 番目から 137 番目の部分の塩基配列を合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてオーバーラップエクステンション PCR によりランダム化した。ただし、シアル酸との相互作用に必須と考えられるアスパラギン酸 135、また金属イオンとの配位に必須と考えられるアスパラギン酸 127 とヒスチジン 132 は固定した (Fig. 1)。ダイターミネーター法で DNA 配列を決定したところ、変異 MAH の場合、最初に固定した 3 つのアミノ酸を除いてすべて異なり、ランダム化が達成されていることがわかった。



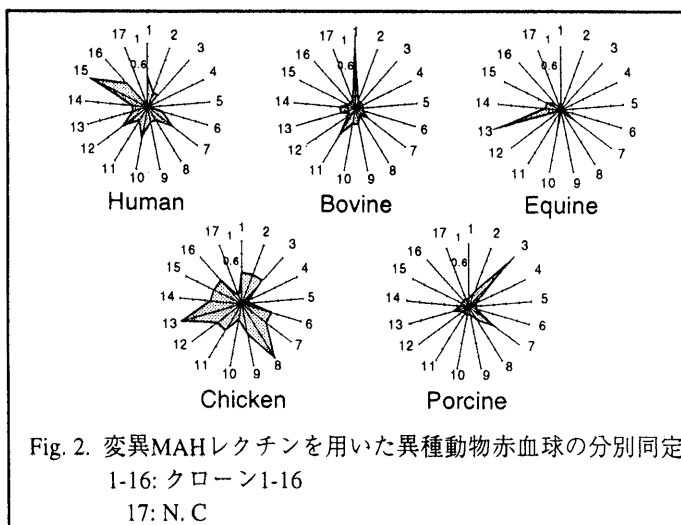
2. レクチンライブラリーを用いた細胞の分別同定

作製したレクチンライブラリーを pGEX ベクターに組み込んで大腸菌に GST 融合蛋白質として発現させた。ランダムに 50 個のクローンを取り、そのうち、タンパクを発現していると思われる 16 個のクローンを得た。抗 MAH ポリクローナル抗体で Western blotting を行ったところ、すべてのクローンが反応性を示した。これらのクローンの DNA 配列を決定したところ、糖結合部位のアミノ酸配列は固定したアミノ酸を除いてすべてのクローンで異なることがわかった。

得られた 16 クローンの糖結合特異性の違いを利用して、シアル酸を含むが、構造の異なる糖鎖をその表面に発現していると思われる、異種動物の赤血球の分別同定を試みた。

Fig. 2 は各々の赤血球に対する最大凝集力価をフルスケール、1 とし、16 クローンの異なるレクチンによる凝集力価を比較しグラフで表わした結果である。各々の赤血球が 16 種の変異レクチンによる凝集力価の相対強度に関して個有な特性を示すことがわかった。

この実験から、複数のレクチンを利用することによって結合パターンにより細胞の種類の違いを見分けることができることが示唆された。



3. ファージライブラリーの作製

人工レクチンライブラリーの応用のひとつとして、生物学的に有用な糖鎖に特異的なレクチンを選別することが考えられる。選別を行うためには発現クローニングができ、多数のライブラリーを扱うことのできる系を用いる必要がある。そこで、ファージディスプレイシステムを導入した。発現ベクターである λ foo、次に T7 ファージディスプレイシステムを試みた。しかし、レクチンを発現させたファージがレクチン遺伝子を持たないファ

ージに比べ増殖が遅くなり、パニングによる目的ファージの濃縮は不可能であることが判明した。そこでファージミド系である pComb3 と pComb8 を試みることにした。まず野生型 MAH を発現することにより、ファージの表面に発現させたレクチンが活性を有するかを調べた。野生型 MAH を発現していると思われる両ファージの抗 MAH 抗体に対する活性を調べたところ、両者とも抗 MAH 抗体に特異的に結合した。複数の MAH 蛋白質を表面に発現した pComb8 の方が単一の MAH 蛋白質を表面に発現した pComb3 より強い結合性を示した (Fig. 3)。次にファージ上に発現された野生型 MAH が糖鎖結合活性を保っているかを赤血球凝集能を指標に検討した。野生型 MAH を発現していると思われる両ファージは無処理の赤血球を凝集したが、シアリダーゼ処理した赤血球は凝集しなかった。赤血球凝集に必要なファージの最低 Titer は両者とも約 1×10^{10} cfu であった。このことにより、MAH の活性が保たれ、pComb ファージミド系ファージに糖鎖結合性を持つ MAH が発現したことが明らかになった。両ファージの活性をシアル酸を含む糖蛋白質であるヒトグリコフォリンに対する結合性でさらに詳しく調べたところ、予想に反し、ファージ1個あたり単一の MAH 蛋白質を発現している pComb3 の方がより強い活性を持つことがわかった (Fig. 4)。ELISA を用いたヒトグリコフォリンに対する結合性により検出できる pComb3 ファージの最低 Titer は約 1×10^7 cfu であった。

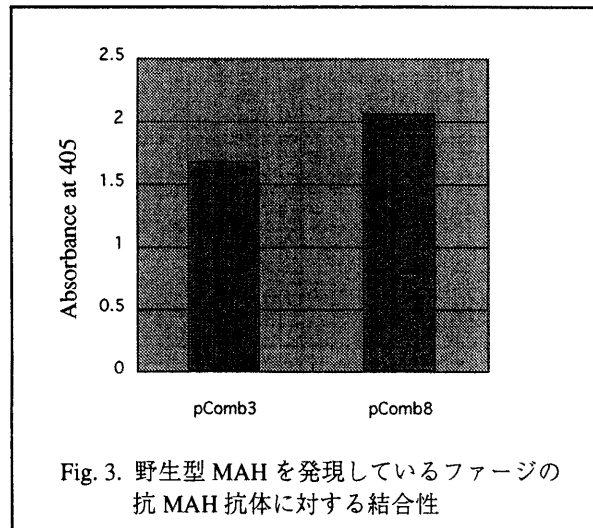


Fig. 3. 野生型 MAH を発現しているファージの抗 MAH 抗体に対する結合性

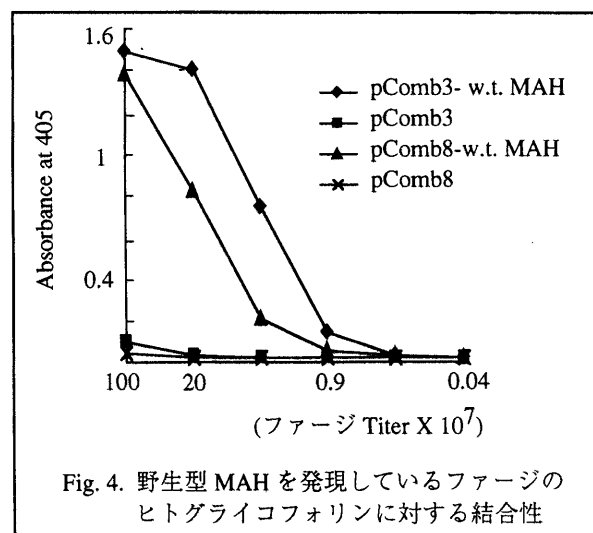


Fig. 4. 野生型 MAH を発現しているファージのヒトグリコフォリンに対する結合性

4. ファージライブラリーから特定レクチンの選別

以上の結果に基づき、1次構造を改変したレクチンライブラリーの作製は pComb3 のファージミドを用いて行うことにした。実現可能な範囲のライブラリーの作製のため、MAH の糖結合部位のアミノ酸の内、シアル酸との相互作用と金属イオンとの配位に必須と考えられる3つのアミノ酸以外に、他のマメ科レクチンで保存性が高い2個のアミノ酸をさらに固定し、6つのアミノ酸だけをランダムに改変した。その結果、理論的に予想される 6.25×10^7 をカバーしていると思われる約 1×10^8 のライブラリーを作製できた。

次に、pComb3 ファージのレクチンライブラリーを用いたパニング系を確立することを目標として、野生型 MAH が強い結合性をもっているヒト赤血球に対するパニングを試みた。1回目のパニングに比べ3回目においてはその回収率が約10倍に増加し、ヒ

ト赤血球に対する結合性を持つファージが濃縮されていることが判明した。3回目のパニングによって得られたファージから、ヒト赤血球を特異的に凝集するが、異なる糖結合特異性を持つ、いくつかのクローンが得られた (Fig. 5)。以上より、1次構造に変異を導入したレクチンライブラリーから生物学的に重要な糖鎖に特異的なレクチンを選別するための、スクリーニング系が確立できた。

【まとめ】

本研究で私は、レクチンライブラリーが細胞の分別同定に有用であることを証明した。

この新しい方法で細胞表面の糖鎖を分析することにより、遺伝子発現だけに依存していた細胞の同定が正確に行えることを意味し、細胞移植や細胞治療の開発に役立つと考える。また、本研究では人工レクチンライブラリーをファージミド系ファージの表面に発現させることに成功した。改変レクチンライブラリーから特異性の異なるものを選別する方法が確立したので、この系を用いて既存のレクチンやモノクローナル抗体にはない、新規な糖鎖特異性を有するものを得ることができると期待される。

【参考文献】

1. Yim M., Ono T., and Irimura T., Mutated plant lectin library useful to identify different cells, Proc Natl Acad Sci USA, in press (2001).
2. Yim M., Maenuma K., Ono T., and Irimura T., Selection and characterization of genetically engineered lectins through a phage display system, in preparation.

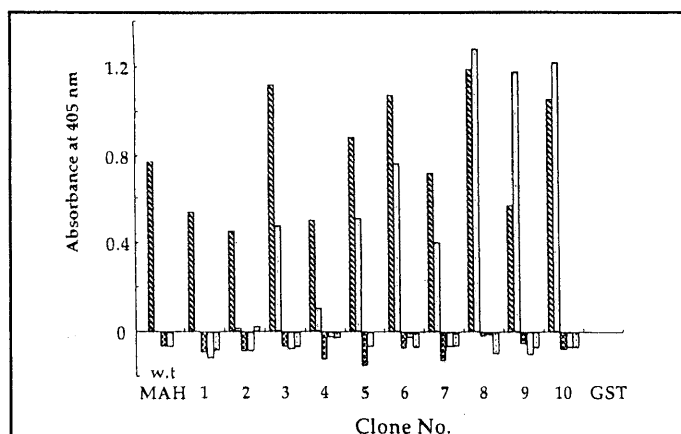


Fig. 5. パニングにより得られたヒト赤血球に特異的なクローンの糖鎖特異性

hatched bars, glycophorin; *gray bars*, Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcα-sp-biotin; *checked bars*, GalNAcα1-3GalNAcβ-sp-biotin; *white bars*, Neu5Acα2-6GalNAcα-sp-biotin; *dotted bars*, 3' sialyllactosamine-BSA.