

論文の内容の要旨

論文題目：

Diverse Plant Lectins Generated by Alterations of Carbohydrate Recognition Loops

(糖鎖認識部位の改変による多様なレクチンの創製)

氏名：小野 高

【序】

糖鎖とそれを認識する分子が細胞間の相互作用を制御し、細胞の生体内での交通様式を決定している例が数多く知られている。多様な細部表面糖鎖は、細胞交通様式を決定することによって癌、炎症、アレルギーなどに関与する。このような細胞認識に関わる糖鎖の研究において、糖鎖認識分子（レクチン）はプローブとして広く利用されてはいるが、糖鎖の多様性に比べてその数は圧倒的に少ない。もし新規な特異性を持つレクチンのライブラリーを作製することができれば、レクチンチップとして細胞の分別同定を行い、糖鎖構造をインフォーマティクスの方法に基づいて解析するなど、広範囲の応用ができる。

本研究では、シアル酸を含む糖鎖に結合能を有するマメ科植物レクチンである *Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH) の遺伝子の、糖鎖結合部位を改変し、新規な糖結合特異性を持つ人工レクチンを創製することを試みた。マメ科植物レクチンの糖鎖認識部位は4本のループで形成されている。他の種々のマメ科レクチンのX線構造解析、アミノ酸配列比較、およびコンピュータモデリングなどの結果から、特にループC、Dと呼ばれる2本のループを形成するアミノ酸の配列および長さが多様性に富んでおり、この部分が糖鎖認識特異性を決定していると考えられた。そこで、この2つのループのアミノ酸をランダムに改変すること、および伸長させることにより、新規な特異性を持つレクチンを創製することを試みた。本研究では種々の改変の方法によって、広い糖鎖結合特異性スペクトルを持つ人工レクチンライブラリーを創製することを主な長期的な目標とした。さらに、改変レクチンライブラリーを用いてレクチンチップを作製することを念頭に、多数の組換え体レクチンを簡便に精製、固定化し、細胞や糖鎖の結合を検出する系を確立することも重要な研究目標とした。

【第一章：ループCの伸長による多様なレクチンの作製】

目的：ループCの長さを、任意の位置に任意のアミノ酸を挿入することにより、アミノ酸1つ分伸長してライブラリーを作製し（図1）、おのおののクローンの結合特異性を調査すること。

方法：合成ヌクレオチドをプライマーとしたPCRによって、285個のアミノ酸のうち、対象となる127番目から137番目の部分で、それぞれのアミノ酸の間いずれか一カ所に、20種のアミ

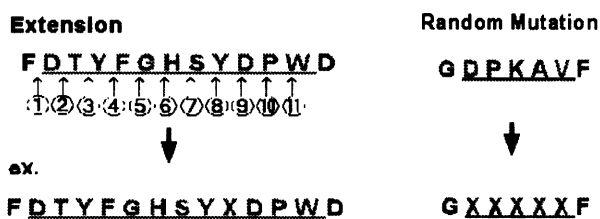


図1: MAH糖鎖認識部位の改良

ノ酸のうち1つをランダムに強制的に挿入した。作製したレクチンライブラリーcDNAをpFLAGベクターに組み込んで、大腸菌にFLAGタグが付随したレクチンタンパク質として発現させた。得られた大腸菌コロニーを回収し、それぞれのDNA配列を確認し、作製される220種すべての人工レクチンのcDNA、およびタンパク質を単離、同定することを目指した。特異性の検出のためには、ELISA法を用いた。ELISAプレートにまず抗FLAG抗体を固定化し、そこに一定量の培養大腸菌液から凍結／融解繰り返して得た溶解物を加えた。単離した人工レクチンタンパク質の細胞に対する結合特異性の違いは、それぞれ異なる糖鎖をその表面上に発現していると考えられるヒト、ウサギ、ニワトリ、ウマ、ウシ、ブタ、モルモットの赤血球の、固定化レクチンに対する結合性の検出によって確認した。

結果：現在までに180個のクローンを得た。これらのおのおののクローンがMAHレクチンを発現していることを、抗MAHポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングによって確認した。次いでFLAGエピトープを用いてレクチンをプレートに固定化した。固定化された人工レクチン量を、抗MAH抗体を用いて測定したところ、どのウェルにもほぼ同量の人工レクチンが固定化されていることが明らかになった。異種動物赤血球を用いた特異性の確認の結果、他の動物の赤血球には結合しないが、ウマの赤血球にのみ結合するクローンが存在することが判明した。またヒト赤血球に対する結合性を見ると、野生型よりも弱い結合ではあるが、約75%が陽性であった。これらは特異性は変化した。レクチンとして機能するクローンがあることを示唆している。また、異種動物赤血球との結合パターンと、アミノ酸挿入位置に関連がある可能性がある。

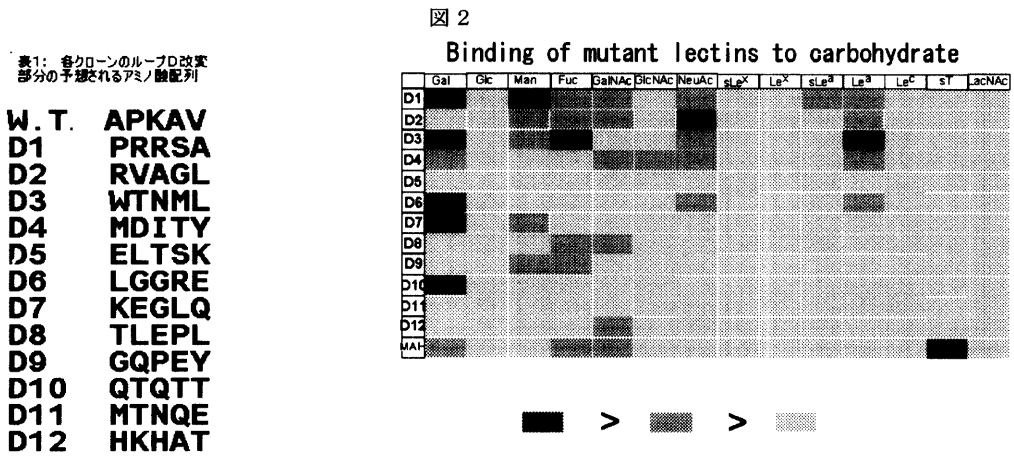
また、20クローンが調査したいずれの異種動物赤血球に結合しなかった。これらの立体構造をコンピュータモデリングで推測したところ、糖認識部位のループ環の空間が、明らかに狭くなってしまっていること、または逆に大きく開いてしまっていることが明らかになった。ウマ赤血球に強く結合性を示したクローンは野生型と同程度の空間が存在することも確認された。このことから、結合性を示さなかったクローンは、糖結合部位空間が変化したことで、糖を挟み込めなくなり、レクチンとしての機能を失った可能性が高いことが予想される（図3、最終ページ）。

【第二章：ループDへの変異導入による改変とファージライブラリーを用いた上皮細胞結合性レクチンの選別、ならびにその特異性の確認】

目的：ループDにあたるアミノ酸のうち、5つをランダムに改変して、異なるアミノ酸に置換し（図1）、得られたライブラリーをファージミド pComb3 に組み入れ、ヒト上皮様細胞に結合性の高いものを選別し、これらの特異性を明らかにすること。

方法：合成ヌクレオチドをプライマーとして、ループDを形成すると考えられるアミノ酸のうち 219 番目から 223 番目の部分の塩基配列を PCR によってランダム化させた。この人工レクチンライブラリーをファージディスプレイシステムに組み込んだ。人工レクチン cDNA ライブラリーを pComb3 ファージミドに組み込み、ファージ表面に人工レクチンを提示させた。このファージレクチンライブラリーを用い、表面に多様な糖鎖を発現しているヒト消化管由来の Caco-2 細胞に対してパニングを実施した。計 3 回のパニング操作を行ったところ、回が進むごとにファージ回収率が上昇し、この細胞に結合性を持つレクチンを含むファージが濃縮されたことが予想された。得られたコロニーをクローンとして回収し、そこに含まれている改変 MAH の DNA を配列決定した。これらのクローンを FLAG 系に組換え、FLAG タグつきタンパク質として大腸菌に発現させた。これらの人工レクチンの細胞および糖鎖に対する特異性の違いを確認するために、異種動物赤血球、糖鎖含有ビオチン化ポリアクリルアミドを用いて、ELISA 法によりこれらに対する結合性を比較した。

結果：改変により理論上 3.2×10^5 個の人工レクチンが創製されたことになる。パニングの後 12 種類のクローンを得た。これらのクローンの DNA 配列および予想されるアミノ酸配列は野生型とは全く異なっていた（表1）。赤血球に対する結合性を比較したところ、それぞれのクローンが異なる結合力、および特異性を持つことが明らかになった。さらに、糖鎖含有ビオチン化ポリアクリルアミドを用いた結合実験の結果も、これらのレクチンが異なる特異性を持つことを示している（図2）。結合親和性も比較的高く、天然には存在しない、新規な特異性を持つレクチンが創製された。



【考察】

本研究の結果、植物レクチンの遺伝子をフレームとして、さまざまな改変の仕方によって新規のレクチンが生み出せることが明らかになった。また実際に野生型とは結合特異性が違うが、比較的親和力が高い人工レクチンを得ることができた。特にループDを改変したレクチンライブラリーは、非常に興味深い新たな糖認識特異性を持ち、かつその親和性が強いものが含まれ、今後のレクチンチップなどへの応用によって、よりインフォーマティブに、糖鎖や細胞の分別・同定を可能にするようなツールとして利用できる可能性を強く示唆している。今後は、これらのクローンのさらに詳細な結合特異性の検証をすること、ならびに他のパニング方法によるさらに異なる特異性を持つと考えられるクローンを取得することなどを中心に、ツールとして有用なレクチンライブラリーの構築を進めていくことが重要であると考えられる。

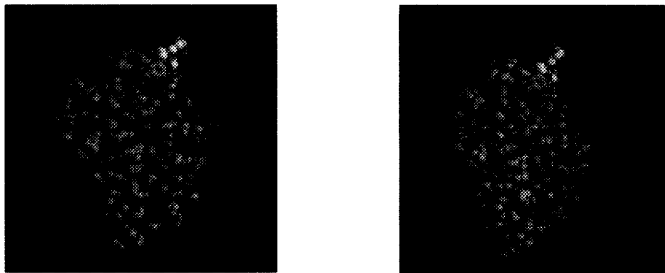


図3. SWISS-MODELによって予想される立体構造

左：野生型 MAH

右：クローン 9Asn

クローン 9Asn は糖結合部位が野生型に比べ広がってしまったため、糖に結合できなくなったと考えられる。