

論文の内容の要旨

論文題目 *Maackia amurensis* hemagglutinin を鋳型とした人工レクチンの作製と細胞の分別・同定への応用

氏名 前沼 圭佐

【序】

レクチンは糖鎖を特異的に検出できる有用なプローブであり、特に植物レクチンは、その利便性から基礎研究および臨床研究において広く利用されてきた。しかし糖鎖側の多様性と比較して、利用できる天然由来レクチンの種類は限られている。天然由来レクチンでは検出できない糖鎖も含めた解析を行うためには、天然由来レクチンに変異を導入した人工レクチンの利用が考えられるが、実際に糖鎖解析ツールとして利用できる人工レクチンはほとんど獲得できておらず、その有用性が示された例はなかった。そこで本研究では次の3つの研究を行った。まず初めに、レクチンの糖鎖認識部位に遺伝子工学的改変を加えることで新規人工レクチンの作製を行い、多様な糖認識特異性と高い結合性を兼ね備えた有用な人工レクチンの獲得に成功した。次に、このように作製した人工レクチンの利便性を向上させることを目的に、人為的に人工レクチンを二量体化させることに取り組んだ。最後に、作製した人工レクチンを用いた実際の応用例として、複数の人工レクチンを利用した細胞のグループ分けが可能であることを証明した。

1. 新規人工レクチンの作製とその解析

当研究室では、マメ科レクチンの1種である *Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH) を鋳型にした人工レクチンライブラリーを作製し、有用な人工レクチンの獲得を試みてきた。例

えば、MAHの糖鎖認識部位を形成するループCの糖鎖認識部位の6アミノ酸を改変し、ヒト赤血球に対するパニングにより選別されたヒト赤血球結合性人工レクチンは、糖認識特異性は限られるものの高い結合性を有しており、比較的有用な人工レクチンであった。しかしその他に獲得された人工レクチンは総じて結合性が低く、実用に耐えうる有用な人工レクチンは限られていた。そこで私は今までとは異なる新たな改変方法を採用することで、有用な人工レクチンを多数作製することにした。

【結果】 先に述べたヒト赤血球結合性人工レクチンは、実際はすべてループCの2アミノ酸(131Gly、133Ser)のみが改変されていた。そこで私は、この2アミノ酸のみをランダムに改変することで、結合性が高く多様な糖鎖認識特異性を有する人工レクチンが多数獲得できるものと考えた。今回、site-directed mutagenesis PCR法により、2アミノ酸をランダムに改変した人工レクチンを新たに25種類作製し(clone 1-25、Table.1)、先の赤血球結合性人工レクチン10種類(clone 26-35)と合わせた計35種類の人工レクチンを、FLAGタグを付加した形で大腸菌発現用ベクターに組み込み、以下の実験に利用した。

wild-type	DTYFGHSYDPW		
clone 1	DTYFPHIYDPW	clone 19	DTYFMHGYPDW
clone 2	DTYFGHAYDPW	clone 20	DTYFPHVYDPW
clone 3	DTYFVHVYDPW	clone 21	DTYFVHLYDPW
clone 4	DTYFRHAYDPW	clone 22	DTYFCHFYDPW
clone 5	DTYFRHWYDPW	clone 23	DTYFVHIYDPW
clone 6	DTYFAHFYDPW	clone 24	DTYFMHLYDPW
clone 7	DTYFRHQYDPW	clone 25	DTYFSHFYDPW
clone 8	DTYFGHMYDPW		
clone 9	DTYFQHCYDPW	clone 26	DTYFGHGYPDW
clone 10	DTYFAHMYDPW	clone 27	DTYFRHNYDPW
clone 11	DTYFHRYDPW	clone 28	DTYFSHNYDPW
clone 12	DTYFLHRYDPW	clone 29	DTYFGHRYDPW
clone 13	DTYFSHAYDPW	clone 30	DTYFGHVYDPW
clone 14	DTYFAHTYDPW	clone 31	DTYFAHNYDPW
clone 15	DTYFTHVYDPW	clone 32	DTYFGHLYDPW
clone 16	DTYFVHGYPDW	clone 33	DTYFGHLYDPW
clone 17	DTYFRHVYDPW	clone 34	DTYFYHNYDPW
clone 18	DTYFRHEYDPW	clone 35	DTYFGHWYDPW

Table 1. 人工レクチンの改変部位のアミノ酸配列

各人工レクチンの改変部位の予想されるアミノ酸配列を示した。
clone 1-25: 今回新たに作製した人工レクチン
clone 26-35: ヒト赤血球結合性人工レクチン

作製した35種類の人工レクチンについて、種々の糖鎖プローブ(ビオチンと糖鎖を複数含む可溶性ポリアクリルアミドおよびビオチン化糖タンパク質)との結合実験を行い、その糖認識特異性の解析を行った(Fig.1)。人工レクチンの多くは、鋳型である野生型MAHと同様に、硫酸化ガラクトース、硫酸化ルイスC、シアリルTおよび糖タンパク質グライコホリンに結合するが、その相対的な結合性はそれぞれ異なるものであった。これら糖鎖プローブへの結合性は、野生型MAHと同等あるいはそれ以上であり、実用に耐えうる人工レクチンが作製できた

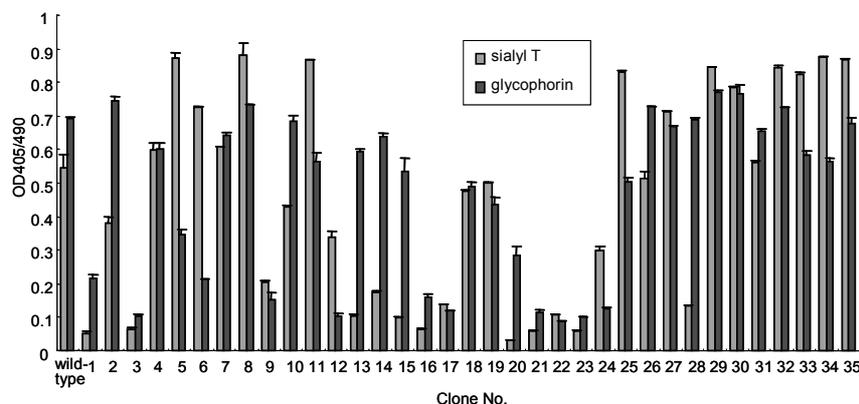


Fig.1 人工レクチンと糖鎖プローブとの結合実験例

各人工レクチンとシアリルT糖鎖および糖タンパク質グライコホリンとの結合を測定した。野生型MAHと同様にほとんどの人工レクチンがシアリルT、グライコホリンに対する結合性を示したが、その相対結合強度はそれぞれ異なった。

ことが明らかとなった。また、今回新たに作製した人工レクチンの中には、野生型が結合しないフコース、シアル酸およびルイスA糖鎖に結合性を示すものがあり、糖鎖認識特異性も拡大できたことが示された。

2. 二量体型人工レクチンの作製とその解析

レクチンの単量体と糖鎖との結合は、抗体と抗原との結合などと比較して一般に弱いものであり、レクチン自身が多量体構造をとることで糖鎖との強い結合を実現している。MAH を鋳型として作製した人工レクチンは、基本的に単量体でしか存在しないことが示唆されており、作製した人工レクチンを糖鎖解析ツールとして利用する際の欠点になっていた。そこで人工レクチンに改良を加えることで二量体形成を促し、結合性を高めることに取り組んだ。

【結果】 MAH のイソレクチン、*Maackia amurensis* leucoagglutinin (MAL) は、C 末端付近の Cys 間のジスルフィド結合を介して、安定な二量体構造をとることが知られていた。そこで、野生型 MAH を鋳型として、MAL の Cys に相当する Ser を Cys に変換した新たな人工レクチン Cys-MAH を作製した。作製した Cys-MAH は、非還元状態下での SDS-PAGE により、単量体 MAH に相当する 30 kDa に加えて、60 kDa 付近にもバンドが確認された (Fig.2)。さらにこのバンドは還元状態下では消失することから、ジスルフィド結合を介した二量体 MAH に相当すると予想された。さらに MAH が結合するグライコフォリンに対する結合性は、単量体構造しか存在しない野生型 MAH と比較して、二量体構造も存在する Cys-MAH の方が上昇していることが示された (Fig.3)。すべての人工レクチンは野生型 MAH を鋳型として作製されているので、野生型 MAH 以外の他の人工レクチンについても同様の改良を行うことが可能であり、糖鎖解析ツールとして人工レクチンの利便性を高めることが可能であるものと期待される。

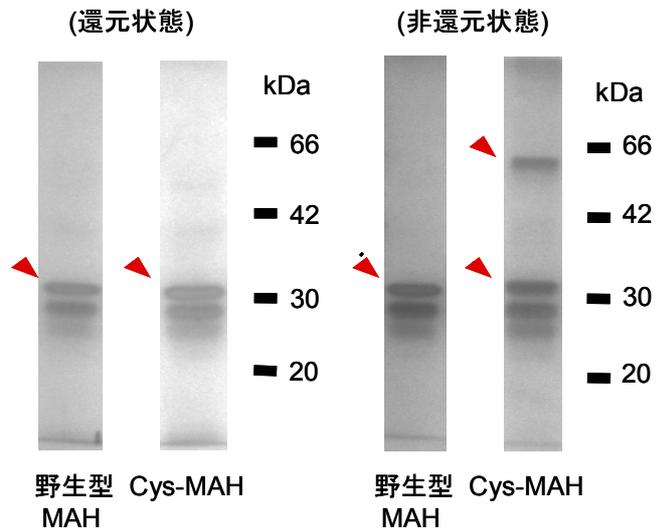


Fig.2 SDS-PAGE による二量体型人工レクチンの確認

野生型MAHおよびCys-MAHを2 µg/laneで泳動し、銀染色を行った。非還元状態下での泳動では、Cys-MAHではジスルフィド結合を介した二量体に相当するバンドが検出された。

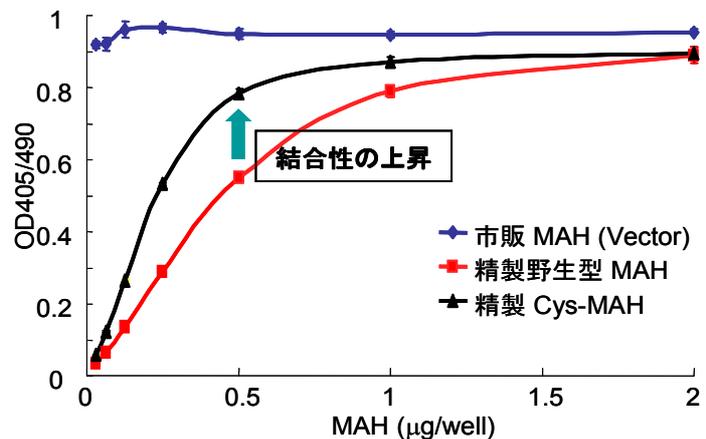


Fig.3 ELISA による二量体型人工レクチンの活性の確認

野生型MAHおよびCys-MAHと、グライコフォリンとの結合をELISAで確認した。単量体みの野生型MAHと比較して、二量体も含むCys-MAHでは結合性の上昇が確認された。

3. 人工レクチンを利用した細胞のグループ分け

細胞は表面に種類や量においてその細胞に特徴的な糖鎖を持つことが知られており、その違

いに基づいて細胞をグループ分けすることが可能であると考えられる。しかし今まで行われてきたのは、ごく限られた種類のレクチンあるいは抗糖鎖抗体により検出された、細胞表面糖鎖の一部の情報に基づくグループ分けにすぎなかった。私は、多数のレクチンを利用することで、広範囲な細胞表面糖鎖情報を一度に検出でき、その情報に基づいて種々の細胞をより詳細にグループ分けできるものと考えた。そこで、作製した人工レクチンの応用例として、複数の人工レクチンを利用した細胞との結合実験を行い、その結合パターンに基づいて種々の細胞のグループ分けが可能かどうか検証した。

【結果】 35種類の細胞株（マウス細胞7種、ヒト細胞28種）について結合実験を行い、結合した細胞数を指標に、各人工レクチンと細胞間の結合を数値化した。このようにして得られた結合シグナルは、その最大値が1になるよう規格化してレーダーチャートで表すことで、それぞれの細胞種に固有のパターンを示すことが明らかとなった（Fig.4）。メラノーマ細胞株や一部の大腸癌細胞株などについては、細胞の由来を反映した特徴的かつ類似した結合パターンを確認することができ、このような結合パターンに基づいた細胞のグループ分けが可能であると予想された。

さらに各細胞の規格化した結合シグナルに基づいたクラスター解析を行った（Fig.5）。この統計処理では、それぞれ結合パターンの類似度は横軸の距離で示され、より類似している細胞から順にグループが形成される。形成されたグループには、中に一部例外はあるが、骨髄系細胞、メラノーマ細胞、大腸癌細胞からなるグループが確認され、細胞の表面糖鎖に基づいて形成されたグループが、含まれる細胞の由来や背景を反映していることが明らかとなった。特にヒト骨髄系細胞の中で、赤芽球由来の K562 細胞はヒト赤血球と最も類似しているものと判定され、細胞表面糖鎖の違いに基づいて、細胞の背景を正確に反映したグループ分けが行なわれていることが証明された。

【考察とまとめ】

今回新たな人工レクチンの作製を行い、多様な糖認識特異性と高い結合性を兼ね備えた人工レクチンを多数獲得することに成功した。また、作製した人工レクチンを人為的に二量体化することにより、人工レクチンの糖鎖解析ツールとしての利便性を向上させることが可能なことを示した。ここで作製された人工レクチンは、その糖認識特異性と結合性について、今までほとんど獲得できていなかった、糖鎖解析ツールとして有望なレクチンであり、今後種々の解析への応用が期待される。さらに、作製した人工レクチンを利用して細胞表面糖鎖情報を検出す

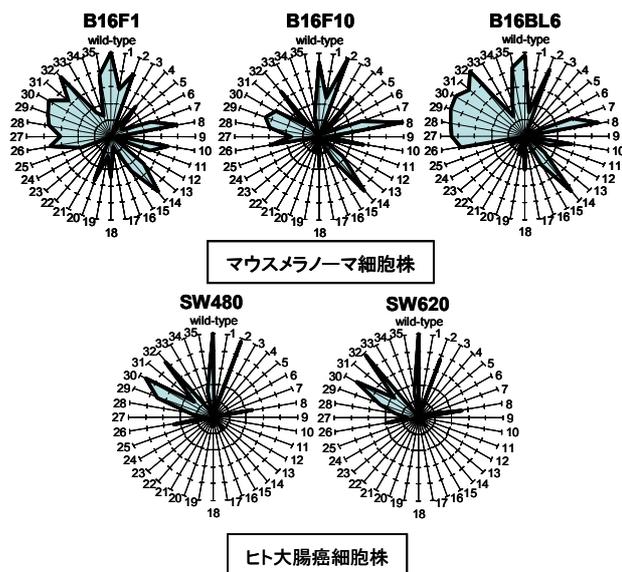


Fig.4 人工レクチンと細胞との結合パターン例

各人工レクチンと細胞との結合を測定し、それぞれの結合強度の規格化した値をレーダーチャートで表した。メラノーマ細胞株、大腸癌細胞株について、特徴的かつ類似した結合パターンを確認した。

ることで、細胞の由来や背景を反映したグループ分けが可能なことを明らかにした。この結果は、人工レクチンの糖鎖解析ツールとしての有用性を初めて実証した重要な知見である。また、今回作製した人工レクチンが比較的類似した糖鎖認識特異性を有していたにも関わらず、このような細胞のグループ分けが達成されたことは、作製した人工レクチンが糖鎖の種類だけでなく、糖鎖の細胞上での配置の違いなどのより高度な糖鎖情報を識別している可能性を示唆している。今後、異なる人工レクチンも追加して利用することで、より詳細な細胞のグループ分けが可能になるものと期待される。

人工レクチンを作製し利用する最大の利点は、レクチンの種類を飛躍的に増やせる点と、作成した多数のレクチンをすべて統一した規格で扱うことが出来る点である。これらのことは、作製した人工レクチンが、レクチンチップのようなハイスループットな測定系へ応用できることを意味している。将来的には、より多数の人工レクチンを扱えるようにさらなる改良を行い、多数の人工レクチンを利用した細胞診断や疾病に関わる糖鎖マーカーの網羅的検出法を開発したいと考えている。

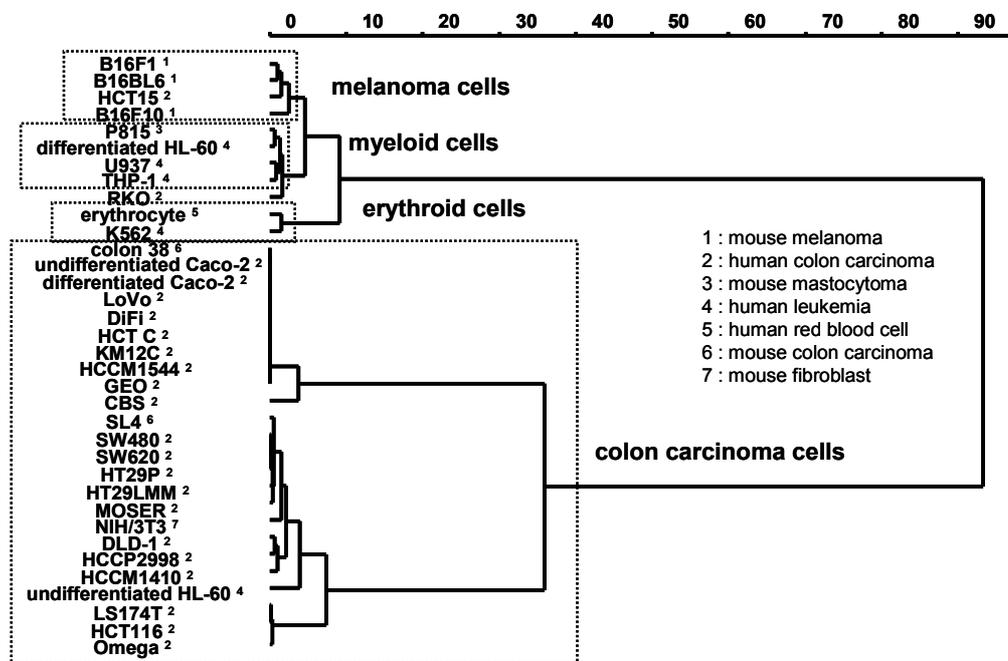


Fig.5 結合パターンに基づくクラスター解析

各細胞の規格化した結合シグナルを用いてクラスター解析を行い、結合パターンの類似性に基づいたグループ形成を行った。その結果、メラノーマ細胞、骨髄系細胞、赤血球系細胞からなるグループが確認された。さらに大腸癌細胞からなるグループも確認された。