

令和元年6月17日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07685

研究課題名(和文) 小孔形成レクチンを基盤とした細胞傷害能を有する新規機能性分子の構築

研究課題名(英文) Studies on construction of a novel cytotoxic functional molecule using pore-forming lectin

研究代表者

上妻 由章 (KOUZUMA, Yoshiaki)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：10284556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、小孔形成レクチンであるCEL-IIIを利用して活性制御が可能な新規細胞傷害性機能性分子の創出を目的に研究を行った。活性制御のために2つのCys残基を導入した6種のCEL-III変異体のうち、変異体E331C/S350Cのみが、還元剤非存在下で溶血活性を發揮せず、還元剤存在化で溶血活性を回復した。そこで、この変異体のガン化細胞に対する活性を調査したところ、K562細胞およびMOLT-4細胞に対してGSH存在下でのみ、その増殖を有意に抑制した。一方、ファージディスプレイ法により、ガン化細胞特異的に結合すると考えられるCEL-IIIの糖結合ドメインCRD1変異体についても得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、小孔形成レクチンCEL-IIIのE331とS350にCys残基を導入することで細胞等に対する活性を還元剤によって制御することが可能になり、ファージディスプレイ法を用いて得られたガン化細胞特異的に結合するCRD変異体の糖結合部位の配列を上記のCEL-IIIに組み込むことによって、還元剤による活性制御が可能な新規ガン化細胞傷害機能性分子の構築が可能になり、ガン細胞除去などのためのツールとしての応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we tried to construct a novel cytotoxic functional molecule with controlling the activities using pore-forming lectin, CEL-III. Among six CEL-III mutants in which two cysteine residues were introduced for activity control, only E331C/S351C mutant did not exert the hemolytic activity in the absence of a reducing agent and the activity was recovered in the presence of it. Furthermore, E331C/S351C mutant showed proliferation inhibition activities toward K562 and MOLT-4 cells only in the presence of reducing agent (GSH) significantly. On the other hand, we were able to obtain CRD1 mutants of CEL-III that might bind to cancer cells specifically using phage-display method.

研究分野：生物化学

キーワード：小孔形成レクチン ガン細胞傷害

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

CEL-III（分子量 47457、432 残基）はナマコの近縁種であるグミ (*Cucumaria echinata*) から発見された Ca^{2+} 依存性のガラクトース/N-アセチルガラクトサミン特異的レクチンの 1 種である。このレクチンは一般的なレクチンとは異なり、「溶血活性」を保持する唯一の動物由来レクチンである。CEL-III による溶血は、赤血球膜上の糖鎖を介した細胞膜への結合と、7 つの CEL-III 分子同士の会合による小孔形成の結果として起こる。立体構造解析により、3 つのサブドメイン (α 、 β 、 γ) からなる 2 つの糖認識ドメイン (carbohydrate recognition domain: CRD1 と CRD2) を介して細胞に結合し、小孔形成ドメイン (pore-forming domain: PFD) 中の 2 つの α -ヘリックスが β -シート構造に変化して、7 量体からなる小孔を形成することが明らかになっている (図 1)。

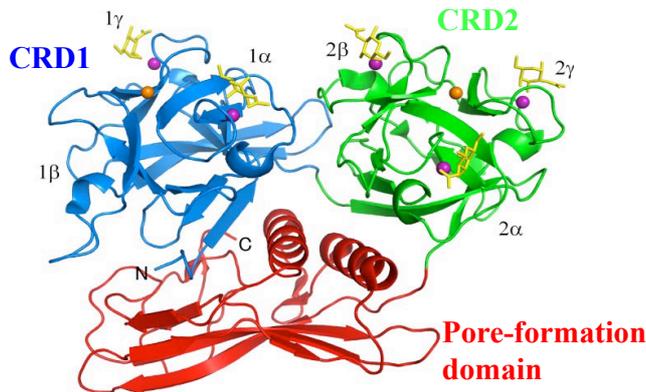


図1. CEL-IIIの立体構造
黄色の分子はN-アセチルガラクトサミン、球(紫)はCaイオン。

CEL-III の小孔形成による溶血メカニズムは、細菌毒素の

1 グループである小孔形成型細菌毒素 (Pore-forming toxin: PFT) のそれと類似している。しかし、PFT は細胞表面に存在する特定のタンパク質やコレステロールを介して標的細胞に結合するのに対し、CEL-III はそのレクチン活性を利用して、細胞表面上の糖鎖を介して結合する点で異なっている。PFT については細胞に小孔をあけるという性質から、機能性ツールとしての用途が考えられている。たとえば、細胞内へ薬物を投与する機能性分子としての用途や、ガン化した細胞への結合特異性の付加によるガン細胞の破壊などの用途である。しかし、PFT が一般的な細胞に普遍的に存在するタンパク質やコレステロールを結合のためのリガンドにしていることから、特定の細胞 (例えばガン細胞) への特異性という点で技術的ハードルが高い状況にあった。

2. 研究の目的

CEL-III は小孔を形成するレクチンであり、細胞への結合には糖鎖をリガンドとしている。ガン化した細胞は通常細胞と比較して、細胞表面に発現する糖鎖構造に大きな変化が見られる場合が多く、その違いを認識するレクチンはガン化細胞の検出やガンの診断にも用いられてきた。レクチンは特定の糖に対しての結合特異性を示すことから、例えばガラクトース特異的レクチンやフコース特異的レクチンなどのように分類されているが、レクチンの糖特異性は遺伝子工学的にも改変可能であることが一般的となってきた。それゆえ CEL-III が示す糖特異性をガン化細胞特異的に改変することができれば、ガン化細胞を特異的に傷害することが可能になるはずである。他方、CEL-III には溶血活性が備わっているため、それがむやみに機能しないように制御する仕組みも必要になる。CEL-III による溶血の際には、前述したように CEL-III 分子の大きな構造変化が起こり、PFD 中の 2 本の α -ヘリックスが β -シート構造に変化して、そこを介して会合し、 β ステムという円柱状の構造の小孔が完成する。そこで、この構造変化が通常条件下では起こらないように、例えば 2 本の α -ヘリックス間や PFD と CRD 間にジスルフィド結合を導入すれば、生体内の還元剤であるグルタチオン (GSH) 濃度差 (細胞内の GSH 濃度は 0.1~10 mM であるのに対し細胞外はその 1/100 程度) から、小孔形成能の制御が可能になるものと考えられる。以上のことより、本研究は小孔形成能を制御する CEL-III 分子の構築を行い、ガン化細胞に対する新規細胞傷害性タンパク質を創出することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) CEL-III へのジスルフィド結合導入による活性制御機構の構築

①CEL-III へのジスルフィド結合の導入

CEL-III が本来有する溶血活性の制御の目的のために、まず小孔形成のための構造変化を容易に起こさないように、小孔形成ドメイン (PFD) にジスルフィド結合を導入することにした。具体的には、構造変化の主体となる分子内の 2 本の α -ヘリックス間を架橋するように、もしくは CRD と PFD の境界面に鍵を掛けるように、Cys 残基を導入することにしたが、それにあたっては作製すべき変異体の構造を評価・選定するために、分子モデルシミュレーションを用いてモデル構築し、検証した上で行った。検証の結果、I10C/S348C、Y155C/S328C、W286C/T329C、I330C/S350C、E331C/S350C、V341C/V345C の 6 種の変異体を作製することにした (図 2)。CEL-III への変異の導入は 2 本のオリゴヌクレオチドプライマーを利用した Unique site elimination 法により行い、得られたプラスミドの塩基配列を調査することにより変異導入を確認した。

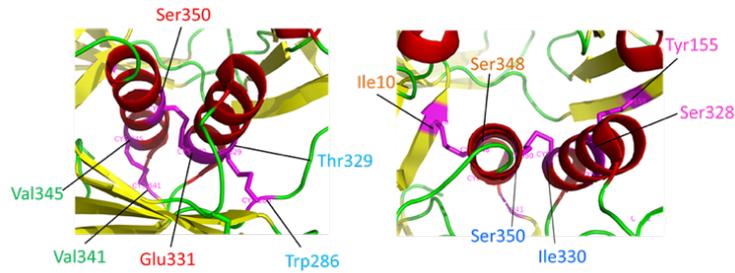


図2. CEL-III変異体におけるCys残基導入箇所
ジスルフィド結合のパートナーとなる2つの変異部位を同色で示した。

②CEL-III 変異体の発現、精製

6種のCEL-III変異体については、発現ベクターとしてpET-32b、宿主大腸菌としてBL21(DE3) codonplus RIL株を使用し、チオレドキシソとの融合タンパク質として発現した。封入体から巻き戻しを行ったのちに、ラクトースを付加したマトリクス(Lactose-cellufine)を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて組換えタンパク質を精製した。

③CEL-III 変異体の溶血活性

溶血活性の測定にあたってはウサギ赤血球懸濁液を用い、還元剤としてβ-メルカプトエタノール(β-ME)、ジチオトレイトール(DTT)、L-システイン塩酸塩(Cys)、還元型グルタチオン(GSH)を使用し、その存在、非存在下での溶血活性をマイクロタイタープレートにおける連続希釈法及び吸光度法によって測定した。さらに50%溶血に必要な還元剤濃度:HC₅₀値と50%溶血に必要な時間:HT₅₀値を求めた。

④CEL-III 変異体のガン化細胞に対する活性

CEL-III変異体の細胞傷害性についてはU937細胞、K562細胞、MOLT-4細胞、HeLa細胞を用いて評価した。CEL-III変異体および還元剤を培地に添加して1時間暴露させた後、Cell count-kit Fによって生細胞数を測定し、細胞生存率を調べることによって細胞傷害活性を評価した。

(2)ガン化細胞特異的なCEL-III変異体の探索

ガン化細胞特異的なCEL-III変異体の構築のために、CEL-IIIの糖認識ドメインのうちCRD1中のサブドメイン1αについて糖結合に関与するアミノ酸残基周辺にランダムに変異を導入した変異体を構築し、特定のガン化細胞に対する結合親和性が上昇したCRD1変異体分子をファージディスプレイ法によって探索することにした。具体的な方法としては、まずランダム変異を導入したオリゴヌクレオチドプライマーを使用してoverlap extension PCR法によって変異CRD1遺伝子を増幅した。次に、ファージミドベクターに、この遺伝子を連結し、大腸菌JM109に導入して、変異体ライブラリーを作製した。この大腸菌ライブラリーにヘルパーファージM13K07を感染させ、変異CRD1分子がファージ表面に提示された組換えファージライブラリーをガン化細胞株(K562、U937、またはMOLT-4)と結合させ、洗浄後、100 mM Lactose または10 mM EDTAで溶出し、得られたファージを再び、ガン化細胞に結合、洗浄、溶出するパニング操作を3回繰り返し、最終的に選択されたファージを大腸菌に感染させて、そこからファージミドを得て、その塩基配列を解析した。

4. 研究成果

(1) CEL-III へのジスルフィド結合導入による活性制御機構の構築

①ジスルフィド結合を導入したCEL-III変異体の発現・精製

CEL-IIIが示す小孔形成による細胞傷害能を制御することを目的に、還元剤の有無によりその制御を可能にするようにCEL-IIIに2つのシステイン残基を導入した6種のCEL-III変異体I10C/S348C、Y155C/S328C、W286C/T329C、I330C/S350C、E331C/S350C、V341C/V345Cのタンパク質発現系を構築した。変異遺伝子を組み込んだ発現プラスミドを保有する大腸菌を培養した培地にIPTGを添加したところ、すべてのCEL-III変異体タンパク質が封入体として発現することが明らかとなり、封入体を溶解後巻き戻して、Lactose-cellufineカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製を試みた。その

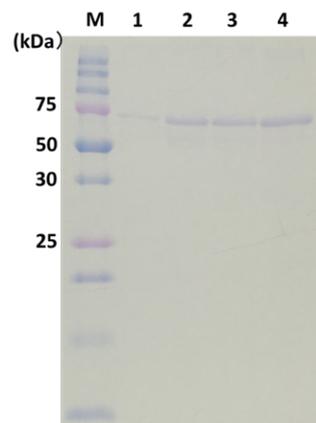


図3. 精製CEL-III変異体のSDS-PAGE
M: 分子量マーカー、1: Y155C/S329C、
2: I330C/S350C、3: E331C/S350C、
4: V341C/V345C。

結果、変異体 I10C/S348C および W286C/T329C についてはカラムに吸着しなかった一方、変異体 Y155C/S328C、I330C/S350C、E331C/S350C、V341C/V345C についてはカラムに吸着し、ラクトースの添加により溶出した。SDS-PAGE (図 3) で調査したところ、それぞれ均一バンドであったことから、4種の CEL-III 変異体が精製されたことがわかり、次のこの4種の CEL-III 変異体の活性について調査した。

②CEL-III 変異体の溶血活性

精製された4種の CEL-III 変異体 Y155C/S328C、I330C/S350C、E331C/S350C、V341C/V345C の溶血活性をマイクロタイタープレートによる連続希釈法によって調べたところ、全ての変異体において還元剤非存在下で溶血活性を示さず赤血球凝集活性のみを示し (図 4)、このことから分子内ジスルフィド架橋形成によって小孔形成時の構造変化の阻止が可能であることが明らかとなった。一方、還元剤 β -ME 存在下においては Y155C/S328C、I330C/S350C、V341C/V345C は赤血球凝集活性を示したままであったが、変異体 E331C/S350C のみが還元剤存在下で溶血活性を回復した (図 4)。このことから、還元剤による CEL-III の小孔形成能の制御が可能であることが示された。

次に、変異体 E331C/S350C に関して他の還元剤の影響を調べるために、様々な濃度の β -ME、DTT、Cys および GSH の存在下でその溶血活性を調査した。マイクロタイタープレートを用いた実験では、いずれの還元剤存在下でも溶血活性を回復することが明らかになった (図 5) が、回復するのに必要な濃度や時間には違いがあることが示唆された。そこで、より定量的に調査するため、溶血後のヘモグロビンの吸光度を測定して、50%溶血に必要な還元剤濃度である HC_{50} 値を求めたところ、 β -ME: 0.154 mM、DTT: 0.132 mM、Cys: 0.581 mM、GSH: 1.78 mM であった (図 6)。

また、還元剤濃度 6.25 mM における 50%溶血に必要な時間である HT_{50} 値を求めたところ、 β -ME においては $HT_{50} < 0.5$ min であり、DTT: 1.02 min、L-Cys: 5.61 min、GSH: 10.8 min であった (図 7)。

以上のように、作製した CEL-III 変異体のうち、E331C/S350C のみが還元剤により、その溶血活性の制御が可能であり、濃度の違いはあるものの、使用した全ての還元剤が CEL-III 変異体の活性制御に利用可能であることが示された。

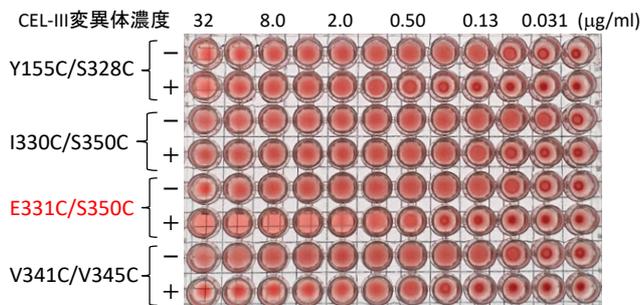


図4. CEL-III変異体の還元剤存在下、非存在下における赤血球に対する活性
赤血球が一樣に広がって沈降: 赤血球凝集、プレート下の線が見える: 溶血。
-: 還元剤 (β -ME) 非存在下、+: 還元剤存在下。

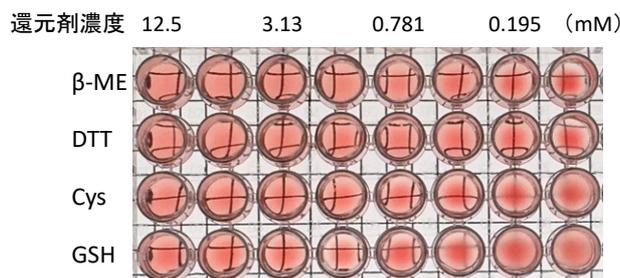


図5. 変異体E331C/S350Cの各種還元剤存在下における溶血活性
終濃度100 μ g/ml のE331C/S350C、ウサギ赤血球、各濃度の還元剤添加後、30分間静置した。

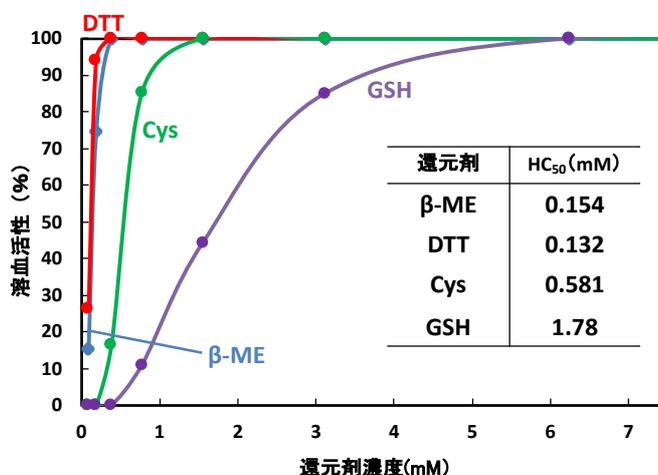


図6. 変異体E331C/S350Cの各種還元剤存在下における溶血活性
終濃度100 μ g/ml のE331C/S350C、ウサギ赤血球、各濃度の還元剤添加後、20 $^{\circ}$ Cで15分静置し、上清の吸光度を測定した。溶血活性はCEL-III変異体の代わりにTBS-Ca²⁺を添加した時の吸光度を0%、0.1% TritonX-100を添加した時の吸光度を100%として算出した。

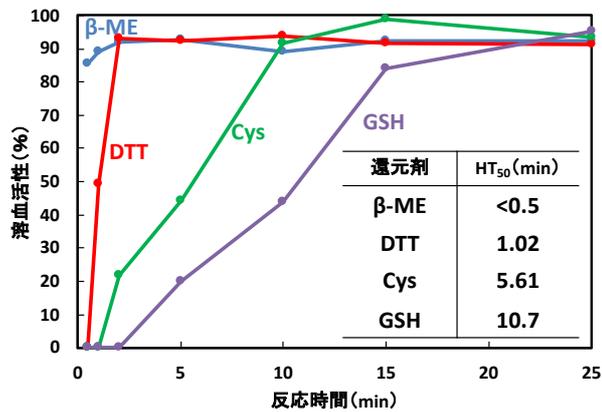


図7. 変異体E331C/S350Cの各種還元剤存在下における溶血速度
終濃度100 μ g/mlのE331C/S350C、ウサギ赤血球、6.25 mMの還元剤添加後、20 $^{\circ}$ Cで0.5~25分静置し、上清の吸光度を測定した。溶血活性はCEL-III変異体の代わりにTBS-Ca²⁺を添加した時の吸光度を0%、0.1% TritonX-100を添加した時の吸光度を100%として算出した。

③CEL-III 変異体のガン化細胞株に対する活性

CEL-III 変異体の細胞傷害性については血球由来の株化細胞である U937 細胞 (ヒトリンパ腫由来細胞)、K562 細胞 (ヒト慢性骨髄性白血病細胞)、MOLT-4 細胞 (ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞) およびヒト子宮頸部類上皮ガン細胞である HeLa 細胞を用いて評価した。また、使用する還元剤については、4種の還元剤存在下で各細胞の増殖への影響を調べた結果、 β -ME および DTT については、細胞増殖の抑制が見られたため、そのような影響がない GSH を使用することにした。

4種の細胞に対して変異体 E331C/S350C (終濃度 100 μ g/ml) と還元剤 GSH (終濃度 6.25 mM) を添加し、1時間後に生細胞数を測定し、無添加のコントロールを 100%としたときの細胞生存率の相対値を求めた (図 8)。まず、U937 細胞では E331C/S350C および GSH の添加の有無による細胞生存率の有意な低下は見られなかった。一方、K562 細胞と MOLT-4 細胞においては還元剤非存在下で E331C/S350C を添加した場合では細胞生存率の有意な低下が見られないのに対して、還元剤 GSH を添加した場合では細胞生存率の有意な低下が見出された。HeLa 細胞に対しては、還元剤非存在下で E331C/S350C を添加した場合で細胞生存率の有意な低下が見られたが、還元剤 GSH を添加した場合にはさらに細胞生存率の低下が見出された。以上のことから、変異体 E331C/S350C は、K562 細胞と MOLT-4 細胞に対して還元剤存在下においてのみ細胞傷害による増殖抑制活性を発揮しうることが示唆された。つまり、変異体 E331C/S350C はそのガン化細胞傷害活性が還元剤 GSH の添加により制御されうることが初めて明らかにした。

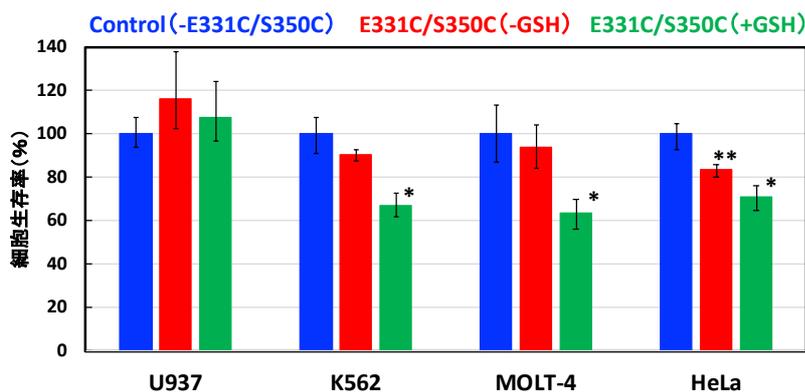


図8. 変異体E331C/S350Cの各種ガン細胞に対する活性
還元剤GSH非存在下(赤)または存在下(緑)における各種ガン細胞のコントロール(CEL-III変異体非存在下:青)に対する相対的な細胞生存率を示した。Controlとの有意差 * : p<0.05 ** : p<0.01

(2) ガン化細胞特異的な CEL-III 変異体の探索

上述したように、変異体 E331C/S350C は還元剤によりその特定のガン化細胞に対する増殖抑制活性の制御が可能で、CEL-III 変異体であることが示された。しかし、一方でこの変異体は赤血球を溶解させる活性を保持しているため、このままではその利用が難しい。よって、その糖

特異性をガン化細胞特異的にすることを目的に、CEL-III の糖結合部位付近にランダムに変異を導入して、ガン化細胞特異的に結合する変異体の探索を行った。

ランダム変異を導入した CEL-III の CRD1 遺伝子をファージミドベクターに連結し、大腸菌を形質転換して得られた数万のライブラリーより、ヘルパーファージを用いて CRD1 タンパク質が表面に提示された組換えファージを形成した。それを U937 細胞、K562 細胞、または MOLT-4 細胞と結合させ、結合したファージを溶出して得て、この増殖、結合、溶出のサイクルを 3 回繰り返した後に得られたファージミドの塩基配列を解析した。

図9ではK562細胞をリガンドにして得られたファージクローンのうちの一部の変異導入部分のアミノ酸配列を示した。今回得られたクローンの中で野生型と同じ配列を持つものはなく、また糖または Ca との結合に関与するアミノ酸についても部分的に保存されているアミノ酸残基は存在するものの、全体的に多様に変異しているようであった。1つの特徴として、Asp43はCaへの結合に関わるアミノ酸残基であるが、これが置換されているクローンではその近傍に Asp 残基 (図9の青) が導入されており、これらの残基が代わりにCa結合へ寄与していることが推察された。さらに Asp23 もCaへの結合に関わるアミノ酸残基であるが、これが置換されているクローンもあり、Ca依存性、ひいては糖結合性や糖特異性に大きな変化が生じている可能性も示唆された。

以上のようにファージディスプレイ法を用いて糖特異性等が変化していることが示唆されるクローンを得たことから、この配列をCEL-IIIに組み込み、得られた組換えタンパク質の赤血球およびガン細胞に対する活性を調査することによって、ガン化細胞特異的に傷害を引き起こす機能性分子の構築を行い、さらには上述したE331とS350へCys残基を導入することによって、還元剤による活性制御が可能な新規ガン化細胞傷害機能性分子としての利用が期待できる。

	19	** *	30	*	*40	*	47
WT	KQCV	DI	VG	NQ	SG	NI	ATYDCDGLSDQQII
s1	KQCV	HV	GG	LQ	SG	NI	ATR-CGSLFDHDI
s2	KQCV	HV	AG	SQ	SG	NI	ATRTCGLSNNDI
s3	KQCV	DV	GG	PQ	SG	NI	AT--CSKLTDDNI
s4	KQCV	DV	TG	VQ	SG	NI	ATRYCNKLYDHNI
s5	KQCV	DI	GG	NQ	SG	NI	ATYRCGMLFHDDII
s6	KQCV	HV	LG	EQ	SG	NI	ATCDCHRIPNDNI
s7	KQCV	HI	GG	-Q	SG	NI	ATCDCDVLSHNHI
s8	KQCV	HI	GI	Q	SG	NI	ATQRCSRLVHDNI

図9. K562細胞をリガンドにして得られたファージクローンのCRD1のサブドメイン1αの糖結合に関与するアミノ酸残基付近の配列
*は糖またはCa結合に関与するアミノ酸残基。赤文字はランダム変異を導入したアミノ酸残基および、それと各クローン (S1-9) で同一のアミノ酸残基。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計2件)

- ①榎本野乃花、孫コウ、上妻由章、中島崇、「小孔形成レクチンを用いた新規細胞傷害性機能分子の構築に関する研究」、第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会 (2019年)
- ②榎本野乃花、上妻由章、「小孔形成レクチン CEL-III の活性制御機構の導入に関する研究」、第18回日本蛋白質科学会年会 (2018年)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：中島 崇
ローマ字氏名：(NAKASHIMA, Takashi)
所属研究機関名：九州大学
部局名：農学研究院
職名：助教
研究者番号 (8桁)：20380553

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。