

ヒトオリゴマンノース糖鎖認識ドメインの酵母細胞表層提示

高山 勝己*, 大塚 滉生, 吹寄 晴輝, 松野 敏英
福井工業高等専門学校 物質工学科 (〒916-8507 福井県鯖江市下司町)
*takayama@fukui-nct.ac.jp

Surface display of human mannose binding lectin monomer on the *Saccharomyces cerevisiae*

Katsumi TAKAYAMA*, Koki OTSUKA,
Haruki FUKIYOSE and Toshihide MATSUNO
Department of Chemistry & Biology Engineering, Fukui National College of Technology
(Geshi-cho, Sabae-shi, Fukui 916-8507, Japan)

(Received January 16, 2026; Accepted February 20, 2026)

Abstract

In this study, we constructed a plasmid designed to express the carbohydrate-recognition domain (CRD) of human mannose-binding lectin (MBL) on the yeast cell surface using yeast cell-surface engineering technology and successfully displayed the CRD on the cell surface. In the future, yeast cells displaying the CRD on their surfaces are expected to be applied as adsorbents for bacteria such as *Salmonella* and *Escherichia coli*, which possess mannose- or N-acetylglucosamine-containing glycans on their cell surfaces.

Keywords: Surface display, *Saccharomyces cerevisiae*, Mannose-binding lectin

1. はじめに

ヒトは体内に侵入した病原体を破壊する免疫システムの一つとして補体系を有し、その一つにレクチン経路がある [1-2]. この経路は、マンノース結合レクチン (Mannose Binding Lectin : MBL) が微生物表面に存在するマンノースや N-アセチルグルコサミンから成る特定のオリゴ糖鎖構造を認識して活性化される [3, 4]. よって MBL の糖鎖認識ドメイン (Carbohydrate Recognition Domain : CRD) を適当な担体表面に提示できれば、特定構造の分岐オリゴ糖鎖を有する細菌の捕獲剤として活用できるはずである.

本報では、細胞表層工学技術 [5, 6] を用いて、CRD を *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) の細胞

表層に発現するためのプラスミド構築と CRD 表層提示の確認までについて報告する.

2. 実験方法

クローニング全体の流れを図 1 に示した. 大きく分けて 1) 酵母の表層に任意のタンパク質 (CRD) を表層発現させるための線状ベクターの作製, 2) CRD ポリペプチド鎖をコードする遺伝子配列断片 (インサート用 dsDNA 断片) の作製, 3) インサート dsDNA 断片の In fusion 法による線状ベクターへの組み込みの 3 ステップからなる.

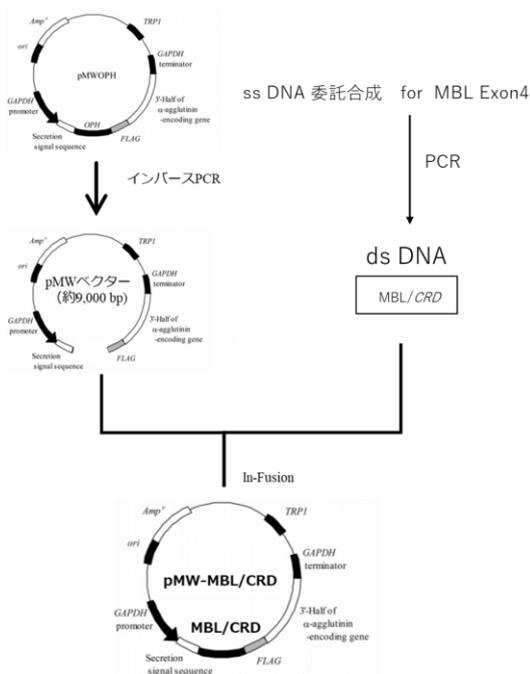


図1 酵母表面発現用プラスミドクローニング概略

2.1 酵母表面発現用ベクター (pMW) の調製

酵母表面発現用シャトルベクターとして、植田らによって開発されたpMWシャトルベクター (酵母-大腸菌シャトルベクター) を採用した[7]. これを用いる事で、GPIアンカーを介して任意のタンパク質を酵母細胞表面に提示させる事ができる. まず図1左上に示すように、本研究室で保有するpMWOPH (pMWベクターに有機リン酸加水分解酵素 (OPH) 遺伝子を組み込んだプラスミド) を鋳型として、OPHコード領域の外側をインバースPCR増幅した. サーマルサイクラー (T100TM Thermal Cycler (BIO-RAD)) を使用し、反応溶液組成とPCRプログラム条件を表1, 2にそれぞれ示した.

表1 pMWベクターのインバースPCR反応溶液の組成

構成成分	容量 (μL)
TaKaRa EX Premier DNA Polymerase (2×)	12.5
F-primer 1 (10 μM)	0.5
R-primer 1 (10 μM)	0.5
pMW-OPH plasmid	0.5
H ₂ O	11
Total	25

F-primer1: GGTGGATCTGATTACAAGG T_m: 51°C

R-primer1: TCTTTTATCCAAAGATACCCC T_m: 51°C

表2 pMWベクターのインバースPCR反応条件

	温度 (°C)	時間
熱変性	~94	1 min
熱変性	98	10sec
アニーリング	56	15 sec
伸長	68	5 min
保冷	12	∞

30 cycles

PCR反応後の溶液に対して1%アガロースゲル電気泳動 (Mupid-2X (Advance) 装置, 100 V, 30 min) を行い、増幅の成否確認 (線状pMWベクターサイズは約9,000 bpである) を行った.

増幅の成否を確認後、Ge1/PCRエクストラクションキット (日本ジェネティクス株式会社, 型番: FG-94602) を用いてアガロースゲルから線状となったpMWベクターを抽出・精製した.

2.2 MBL/CRD の遺伝子 s. s DNA の委託合成

図2に示すように、MBL全体を構成するポリペプチド鎖のアミノ酸配列をコードする遺伝子は、ヒト第10番染色体上にあり、4つのエクソンに分かれている [2, 8, 9]. ここでMBLの先端にある糖鎖認識ドメイン (CRD) はエクソン4がコードしている.

そこで、エクソン4の配列情報に基づいて、MBL/CRD遺伝子インサート一本鎖DNA (ssDNA) を業者に委託合成 (GenScript社) した.

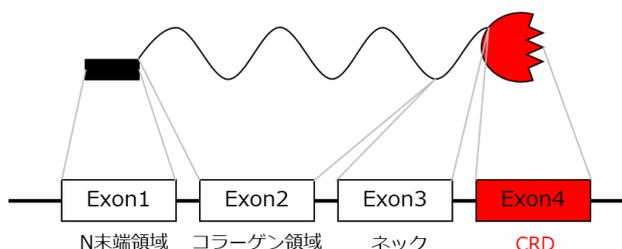


図2 マンノース結合レクチンのパーツ模式図とエクソンの関係

2.3 MBL/CRD (with ATG or without ATG) インサート DNA の合成

委託合成した MBL/CRD インサート DNA は ssDNA であるから、PCR 増幅反応によって二本鎖 (dsDNA) に変換する必要がある。PCR に用いた反応溶液組成と反応条件を表 3, 4 にそれぞれ示した。(図 1 右側)。

表 3 MBL/CRD の PCR 反応溶液の組成

構成成分	容量 (μL)
TaKaRa EX Premier DNA Polymerase (2 ×)	12.5
F-primer2 or F-primer3 (10 μM)	0.5
R-primer2 or R-primer3 (10 μM)	0.5
インサート DNA (MBL/CRD)	0.5
H ₂ O	11
Total	25

F-primer2 :

TCTTTGGATAAAAGAGGGCTGACCTTCTCTCTGG T_m:64.0°C

R-primer2 :

GTAATCAGATCCACCGATAGGGAAGCTCAGACGG T_m:61.1°C

表 4 MBL/CRD の PCR 反応条件

	温度 (°C)	時間	
熱変性	~94	1 min	
熱変性	98	10sec	← 10 cycles
アニーリング	57	15 sec	
伸長	68	15 sec	
熱変性	98	10 sec	← 20 cycles
アニーリング+68	15 sec		
保冷	12	∞	

MBL/CRD インサートの PCR 増幅の成否を確認するために、PCR 反応液の 2% PCR 産物のアガロースゲル電気泳動 (Mupid-2X (ADVANCE), 100 V, 30 min) を行った。インサート (MBL/CRD) の塩基数の理論値は 402 bp であり、相当するバンドをゲル上で確認し、Gel/PCR エクストラクションキット (日本ジェネティクス株式会社) を用いてアガロースゲルからインサート DNA を抽出した。

2.4 In-Fusion 反応による pMW-MBL/CRD 構築, 大腸菌への形質転換, プラスミド塩基配列確認

2.2 で合成した pMW ベクター (線状 DNA) に 2.3 で合成した MBL/CRD インサート DNA を挿入して表層発現用プラスミドを構築した (図 1 下)。表 5 に示した反応溶液組成で 50°C, 15min, In-Fusion (In-Fusion Snap Assembly Master Mix, タカラバイオ) を行い、酵素反応精製キット (MinElute™ Reaction Cleanup Kit, QIAGEN) を用いて pMW-MBL/CRD を精製した。

表 5 In-Fusion 反応液の組成

構成成分	容量 (μL)
5×In-Fusion® HD Enzyme Premix	1
pMW ベクターの PCR 産物	0.5
MBL/CRD の PCR 産物	3.5

精製した pMW-MBL/CRD プラスミド溶液 1 μL と、コンピテントセル *E. coli* DH5α (タカラ製) 10 μL を混合し、ヒートショック (42°C, 45 sec) を行い氷上で静置 (2 min) した。この反応液を LB Amp 寒天培地上に塗布し、インキュベーター中にて静置培養 (37°C, 0/N) した。

LB Amp プレート上に生成した複数のコロニーの中から任意に 12 個を選択し、5 mL の LB Amp 液体培地を注入した 15 mL 容コーニングチューブに個々に釣菌し、BioShaker (V・BR-36, TAITEC) 中で振とう培養 (37°C, 0/N) した。

個々の培養液から FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit (FAVORGEN, 型番: FAPDE001) を用いて pMW-MBL/CRD を抽出した。抽出したプラスミド溶液を表 6, 7 に示す条件で PCR 増幅した。

表 6 インサートチェック PCR 反応溶液の組成

構成成分	容量 (μL)
TaKaRa EX Premier™ DNA Polymerase	2.5
F-primer 3 (10 μM)	0.1
R-primer 3 (10 μM)	0.1
pMW-MBL/CRD	0.5
H ₂ O	1.8
Total	5

F-primer3: CAGCACAATAACGG T_m:50.6°C

R-primer3: GTAGCAGTTGGAGACA T_m:48.6°C

表7 インサートチェックPCRの反応条件

	温度 (°C)	時間	
熱変性	~94	1 min	
熱変性	98	10sec	
アニーリング	56	15 sec	30 cycles
伸長	68	30 sec	
保冷	12	∞	

PCR反応液を1%アガロースゲル電気泳動(100 V, 30 min)に供し, *E. coli*へのpMW-MBL/CRDの導入確認ができたものを絞り込むと共に, pMW-MBL/CRDの全DNAシーケンス解析を業者委託(eurofin プラスミド丸読みサービス)し, 挿入配列に変異がないことを確認した.

2.5 pMW MBL/CRD プラスミドの *S. cerevisiae* MT8-1 株への形質転換

2.4 で全プラスミド配列に変異がないことが確認できた pMW-MBL/CRD を Fast Yeast Transformation Kit (Takara 製) を用いて, 酵母 *S. cerevisiae* MT8-1 株 (トリプトファン合成遺伝子欠損株) に形質転換し, さらに SD-W (Synthetic Dextrose without tryptophan (W)) 寒天培地 (表 8) を用いて, 25°C でコロニーが生成するまで培養した.

表 8 SD-W 寒天培地の組成

試薬	添加量 (g/L)
D-Glucose (ナカライテクス, 特級)	20
Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Becton Dickinson)	6.7
アデニン硫酸塩二水和物 (関東化学, 鹿特級)	0.02
L-ヒスチジン-塩酸塩-水和物 (ナカライテクス, 特級)	0.02
ウラシル (和光純薬工業, 特級)	0.02
L-ロイシン-塩酸塩-水和物 (和光純薬工業, 特級)	0.03
Agar (ナカライテクス)	20

2.6 MBL/CRD 酵母表層発現の確認

5 mL の SD-W 培地を注入した L 型試験管に, pMW-MBL/CRD 形質転換酵母をそれぞれ植菌し, 前培養 (25°C, 3 days) を行った. 次に, 500 mL 三角フラスコに SD-W 液体培地を 200 mL 入れ, 前培養液を 2 mL 添加し本培養した (25°C, 5 days). 培養液を 12,000 rpm で 1 min 遠

心分離し, 上清を廃棄した後, 25 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0) を用いて 3 回繰り返し洗浄した.

ペレットを OD₆₆₀ = 1.0 となるように 25 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0) に再懸濁した. 最後に 12,000 rpm で 1 min 遠心分離を行い, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (表 9) で 3 回洗浄後, 300 μL の PBS に再懸濁した.

表 9 PBS バッファー溶液の組成 (pH 7.0)

試薬	添加量 (g/L)
リン酸二水素ナトリウム (ナカライテクス, 特級)	20
リン酸水素二ナトリウム (ナカライテクス, 特級)	6.7
塩化ナトリウム (ナカライテクス, 特級)	0.02
塩化カリウム (ナカライテクス, 特級)	0.02

2 mM の 2-アミノベンズアミド蛍光ラベル化分岐オリゴ糖鎖 (2AA Labeled M-3N2 Glycan (図 3) (Ludger Ltd. 品番: CAB-M3N2-01)) 含有 PBS 溶液 1 μL を, MBL/CRD 表層提示酵母懸濁液に添加し, 室温で 1.5 hr インキュベートした. それぞれの反応液を 12,000 rpm で 1 min 遠心分離し, 上清を捨てペレットを PBS で 3 回繰り返し洗浄した. また SD 培地で培養した *S. cerevisiae* MT8-1 株に対して同じ処理を行ったものをコントロールとして用いた.

逆円錐台型ウェルアレイシート (Funakoshi 製. 品番: MMA-0075-100-08-01) (3D 形状を図 4 に示した) に標識処理したコントロールまたは pMW-MBL/CRD 表層提示酵母いずれかを 5 μL 滴下してから, 倒立蛍光顕微鏡 (OLYMPUS, IX81) でウェル内を観察した (Ex: 360 nm, Em: 420 nm).

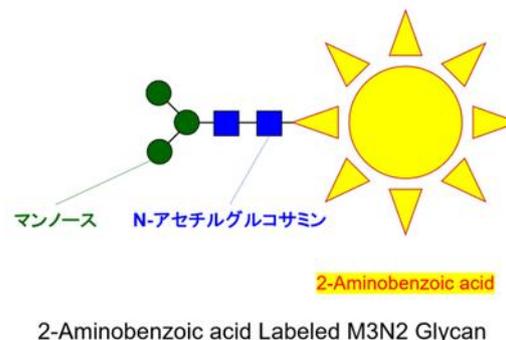


図 3 蛍光ラベル化オリゴマンノース糖鎖の構造

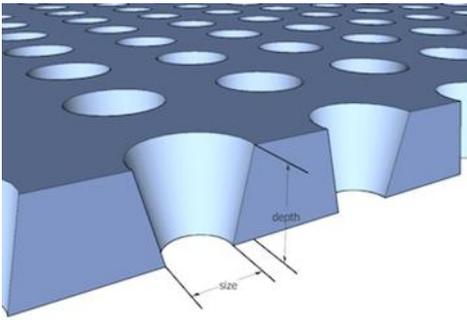


図4 逆円錐台型ウェル配置アレイ
(底面側の穴径 75 μm, ウェル深さ 100 μm)

3. 結果と考察

3.1 インバース PCR 増幅による pMW ベクター合成

本研究室で保有する pMWOPH を鋳型として、OPH コード領域の外側配列のインバース PCR 増幅を行った。PCR 増幅した反応液のアガロースゲル電気泳動の結果を図5に示した。理論値である約 9,000 bp 付近にバンドが確認できたため、線状の pMW ベクターの増幅に成功したと判断した。

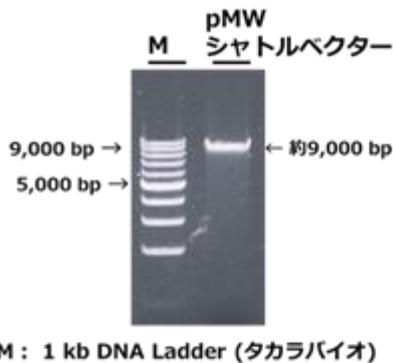


図5 pMW ベクターのインバース PCR 増幅の結果

3.2 MBL/CRD の遺伝子インサート s. sDNA の委託合成

MBL/CRD の塩基配列を図6に示した。MBL/CRD (エクソン4配列) の塩基配列数は 372 bp であり、これと同じ塩基配列をもつ ssDNA を委託合成した。

```
GGGCTGACCTTCTCTCTGGGCAAACAAGTTGGGAACAAGTTCTTCTGAC
CAATGGTGAATAATGACCTTTGAAAAGTGAAGGCCTTGTGTGCAAGT
TCCAGGCCTCTGTGGCCACCCCAAGGAATGCTGCAGAGAATGGAGCCATT
CAGAATCTAATCAAGGAGGAAGCCTTCTGGGCATCACTGATGAGAAGAC
AGAAGGGCAGTTTGTGGATCTGACAGGAAATAGACTGACCTACACAACT
GGAACGAGGGTGAACCAACAATGCTGGTTCTGATGAAGATTGTGTATTG
CTACTGAAAAATGGCCAGTGAATGACGTCCCCTGTTCCACCTCCCATCT
GGCCGTCTGTGAGTTCCTATC
```

図6 MBL/CRD の塩基配列情報 (372 bp)

3.3 MBL/CRD インサート dsDNA の合成

MBL/CRD の ssDNA を鋳型として、PCR により dsDNA 鎖を合成し、その反応液を電気泳動により確認した結果を図7に示した。400 bp 付近にバンドが確認されたことから、dsDNA の合成に成功したと判断した。

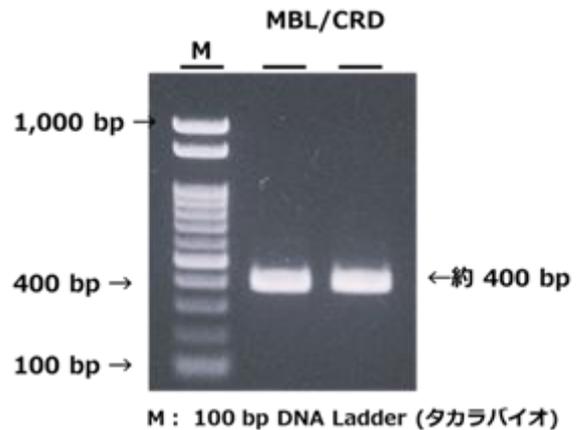


図7 MBL/CRD の PCR 増幅結果(右側 2 レーン)

3.4 In-Fusion 反応と大腸菌への形質転換

3.1 で合成が確認された線状の pMW ベクターに 3.2 で合成が確認された MBL/CRD 遺伝子を In-Fusion 法を用いて挿入し、MBL/CRD 酵母表層発現用プラスミド pMW-MBL/CRD を構築した。

次に大腸菌への形質転換を行うとともに、12 のコロニーからアルカリミニプレップにより抽出した pMW-MBL/CRD に対して、インサート挿入配列の両外側(ベ

クター側)からPCR増幅を行い、反応後溶液のアガロースゲル電気泳動を行った結果を図8に示した。670 bp付近(MBL/CRD インサートの両外側にあるプロモーターとアグルチニン遺伝子領域から増幅している)にバンドが確認でき、目的とするpMW-MBL/CRDが完成したと判断した。

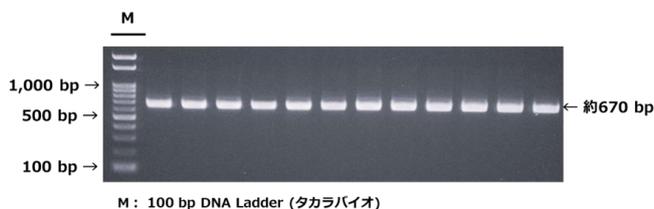


図8 pMW MBL/CRD プラスミドのインサートチェック

さらに pMW-MBL/CRD の塩基配列シーケンスを業者(eurofin プラスミド丸読みサービス)に委託し、挿入配列に変異がないことを確認した [補足資料1]。

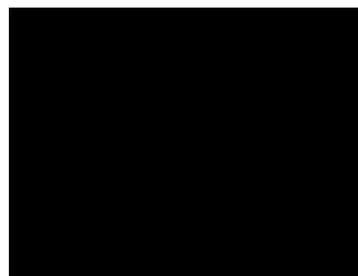
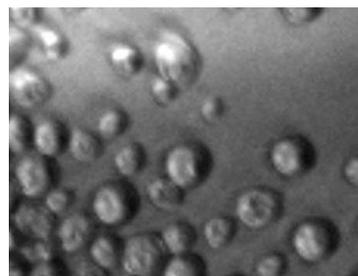
3.5 pMW-MBL/CRD構築プラスミドの *S. cerevisiae* MT8-1株への形質転換

3.4で構築に成功したpMW-MBL/CRDをFast Yeast Transformation Kit (Takara) を用いて、*S. cerevisiae* MT8-1株に形質転換し、SD-W寒天選択培地上で、25°Cで培養した結果、コロニーの形成に成功した。

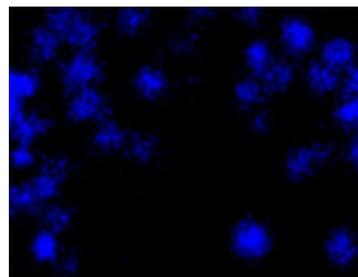
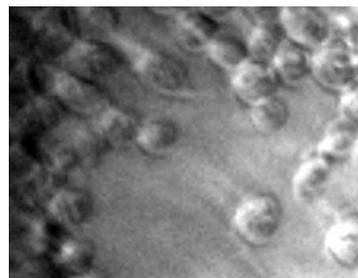
3.6 MBL/CRD酵母表層提示の確認

pMW-MBL/CRD形質転換 *S. cerevisiae* MT8-1をSD-W培地で培養し、非形質転換 *S. cerevisiae* MT8-1株はSD培地を用いてそれぞれ培養したものを、最終的に等濃度になるようにPBSに懸濁した(濁度を等しくすれば、懸濁液中に含まれる酵母細胞数は等しいとみなした)。

さらに、蛍光ラベル化オリゴマンノース糖鎖で処理した後、各反応液の一部を逆円錐台型ウェル配置アレイ上に滴下してから、倒立蛍光顕微鏡を用いて観察した結果を図9(a: 非形質転換酵母, b: pMW-MBL/CRD形質転換酵母)に示した。pMW-MBL/CRD形質転換体に対して、明瞭な蛍光が観察(Ex : 360 nm, Em : 420 nm)されたことからMBL/CRDの表層提示に成功したと判断した。



a : 非形質転換 *S. cerevisiae* MT8-1酵母の位相差像(上)と蛍光像(下)



b : pMW-MBL/CRD形質転換 *S. cerevisiae* MT8-1酵母の位相差像(上)と蛍光像(下)

図9 蛍光ラベル化オリゴマンノース糖鎖処理した各酵母に対する位相差並びに蛍光顕微鏡観察結果(Ex : 360 nm, Em : 420 nm)

4. 結論

本研究では、酵母細胞表面工学技術を用いることによって、ヒトマンノース結合レクチン (MBL) の糖鎖認識ドメイン (CRD) を酵母細胞表面に発現するためのプラスミドを構築し、その細胞表面提示に成功した。ここで、MBL/CRDはGPIアンカーを介して細胞表面に発現している。

開発されたCRD表面提示酵母は、マンノースやN-アセチルグルコサミンからなる分岐オリゴ糖鎖を細胞表面に持つサルモネラや大腸菌などの細菌に対する吸着剤としての可能性が期待できる。

謝辞

本研究は、科学研究費助成事業 JP22K05162 の支援を受けて実施されたものであり感謝の意を表す。

参考文献

- [1] Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman and Shiv Pillai, *Functions and Disorders of the Immune System* Forth edition, Elsevier, (2014) pp.40-41
- [2] 遠藤守人, マンノース結合レクチン (MBL) と疾患, 八戸大学紀要第 32 号, (2006) pp. 13-18
- [3] Nitin U. Jain, Schroeder Noble and James H. Prestegard, Structural Characterization of Mannose-binding Protein-Trimannoside Complex using Residual Dipolar Couplings, (2003) *J. Mol. Biol.*, **328**, 451-462
- [4] W. K. Eddie Ip, Kazue Takahashi, R. Alan Ezekowitz and Lynda M. Stuart, Mannose-binding lectin and innate immunity, (2009) *Immunological Rev.*, **230**, 9-21
- [5] 植田充美 監修, 細胞表面工学の進展 Development of Cell Surface Engineering, シーエムシー出版, (2020) pp.1-9
- [6] Mitsuyoshi Ueda *Editor*, *Yeast cell Surface Engineering*, Springer, (2019) pp.3-14
- [7] Katsumi Takayama, Shin-ichiro Suye, Kouichi

Kuroda, Mitsuyoshi Ueda, Tetsuya Kitaguchi, Kouta Tsuchiyama, Takeshi Fukuda, Wilfred Chen and Ashok Mulchandani, Surface Display of Organophosphorus Hydrolase *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology progress*, (2006) *Biotechnol. Prog.*, **22**, 939-943

[8] Kedarnath Sastry, Gary A. Herman, Linda Day, Elleen Deignan, Gail Bruns, Cynthia C. Morton and R. Alan B. Ezekowitz, The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10, (1989) *J. Exp. Med.*, **170**, 1175-1189

[9] Maureen E. Taylor, Paul M. Brickell, Roger K. Craig and John A. Summerfield, (1989) Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein *Biochem. J.*, **262**, 763-771

補足資料 1 : pMW ベクターへの MBL/CRD 遺伝子断片の挿入部位前後の塩基配列シーケンス結果

上段（黄色の塩基配列を含むもの）がシーケンス結果であり，下段（黒の塩基配列のみのもの）は理論配列である。

黄色の配列部分は CRD 配列(372bp)であり，上段と下段の塩基配列が一致しており，CRD 配列がベクターの分泌シグナル配列と *FLAG* 配列の間に正確に挿入されたことが証明された。

