

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成15年度採択研究代表者

山口 陽子

(東海大学工学部 教授)

## 「糖鎖構造特異的単鎖抗体ライブラリーの構築」

### 1. 研究実施の概要

本研究の目的は、個体を免疫してポリまたはモノクローナル抗体を作らせる従来の方法とは本質的に異なる手法である“抗体産生の機構を生体外で達成できるファージディスプレイ法”を活用し、個体が認識できない“糖鎖抗原”をも含めて、各種糖鎖に特異的かつ高親和性で結合するファージ提示型ヒト単鎖抗体（抗体ファージ）を網羅的にスクリーニングし、糖鎖特異的単鎖抗体ライブラリーを構築することである。

本研究は平成15年10月から開始された。東海大学と野口研究所のもつ糖鎖精製・合成・解析技術を発展させ、慶應義塾大学で開発された“安定でレパートリー数の多いファージ提示型ヒト単鎖抗体ライブラリーの簡易システム”を活用することで、本研究の目的を達成する。戦略会議を毎月1回開催し、グループ間での密接な相互交流を図っている。

東海大グループの山口班では、糖鎖工学研究施設で調製・解析された人工糖脂質（マンノトリオース、Le<sup>x</sup>、その他）を用いた抗体ファージの網羅的スクリーニングを開始した。人工糖脂質を糖鎖抗原としており、従来のタンパク質抗原と同様なパニング・ELISAによるスクリーニング方法をそのまま適用できないため、至適条件の検討を行いながら実施した。現在、特異的かつ親和性の高いクローンの単離を目指し、得られたクローンの解析を進めている。また、東海大学で調製された人工糖脂質糖鎖抗原に加えて、野口研で合成されたTn抗原などの糖鎖プローブを用いて、抗体ファージクローンの単離を順次進めている。中田班では、得られた抗体ファージクローンや単鎖抗体の糖鎖結合特異性を簡易に解析する方法の確立を目指している。すでに、TLC-overlay法を応用し、数種のファージクローンにおいてマンノトリオースへの結合性を確認している。また、ファージ提示単鎖抗体の親和性解析への表面プラズモン共鳴法の応用や、精製・単離された単鎖抗体の特異性・親和性の解析法の構築を進めている。清水班は、抗体ファージの網羅的スクリーニングや単鎖抗体解析に必須となる広範な人工糖脂質ライブラリーの構築を行っている。糖鎖構造が明らかな数十種類のオリゴ糖鎖から人工糖脂質を合成し、高純度に精製した糖鎖抗原を提供している。自然界に大量に存在する糖タンパク質の糖鎖に関しても単鎖抗体ライブラリーを構築するため、少なくとも十数種類の糖鎖構造をもつことが知られている卵白由来の糖タンパク質をヒドラジン分解した後、遊離糖鎖を精製した。これらの精製糖鎖を人工糖

脂質化し、糖鎖抗原として抗体ファージのスクリーニングに用いる予定である。

慶應大グループは、ファージ提示型ヒト単鎖抗体ライブラリーの作製と改良を行い東海大グループへ供与している。平成15年度は抗体ファージライブラリーを用いて抗ガングリオシド抗体ファージのスクリーニングを開始した。牛脳由来ガングリオシド混合物を抗原とし、通常のタンパク性抗原と同様のスクリーニング方法を試みたが、ガングリオシドに結合するファージクローンをほとんど得ることができなかった。そのため、ブロッキング液、洗浄液、大腸菌株および培養法を検討しスクリーニング法の至適化を行い、ガングリオシド混合物に結合する多数の抗体ファージクローンの単離に成功した。これらの新知見は迅速に各グループと共有し評価している。現在、個別の精製ガングリオシドを用いて、より特異性の高いクローンの単離を試みている。人工糖脂質とガングリオシドの結果から、慶應大グループの抗体ファージライブラリーは、タンパク質抗原だけでなく各種の糖鎖抗原に対しても有効であることが示された。

野口研グループは、抗体ファージのスクリーニングのために、非特異的な吸着を低減させ、糖鎖密度のコントロールが可能な糖鎖抗原プローブを開発している。3,5-ビス（ドデシロキシ）ベンズアミドを基本骨格として、糖鎖との間にオリゴエチレングリコール構造を介する化合物を設計した。まず、3,5-ビス（ドデシロキシ）安息香酸にアミド結合でオリゴエチレングリコールを結合した人工脂質の合成を行い、この人工脂質によりタンパク質の非特異的な吸着が抑えられることを確認した。モデル糖鎖化合物として、人体にも抗体が存在することが知られているTおよびT<sub>n</sub>抗原を選択し、人工脂質にT<sub>n</sub>抗原の糖鎖を導入した糖鎖抗原プローブの合成を終了し、抗体ファージスクリーニング用として東海大グループに提供している。T抗原を結合した糖鎖抗原プローブの合成を、現在行っている。

## 2. 研究実施体制

### 東海大学グループ

- ① 研究分担グループ長：山口 陽子（東海大学工学部、教授）
- ② 研究項目：人工糖脂質を用いた抗体ファージの網羅的スクリーニング  
抗体ファージクローンおよび単鎖抗体の特異性・親和性の解析

### 慶應義塾大学グループ

- ① 研究分担グループ長：高柳 淳（慶應義塾大学医学部、助手）
- ② 研究項目：ファージ提示型ヒト単鎖抗体ライブラリー（抗体ファージ）の作製と改良  
ガングリオシドを用いた抗体ファージの網羅的スクリーニング

### 野口研究所グループ

- ① 研究分担グループ長：川上 宏子（（財）野口研究所、研究員）
- ② 研究項目：ファージ抗体スクリーニングのための糖鎖抗原プローブの調製と改良