

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」
研究課題「糖鎖構造特異的単鎖抗体ライブラリー
の構築」

研究終了報告書

研究期間 平成15年10月～平成21年 3月

研究代表者：山口 陽子
(東海大学工学部 教授)

§ 1 研究実施の概要

ヒトゲノムの解読が終わり、今後2.2万の遺伝子の翻訳物に相当するタンパク質の構造・機能解析が加速的に進むことが明確である一方、複合糖質は、その合成においても解析に関しても複雑度がタンパク質の場合と数オーダー違うと言っても過言ではない。この大きなギャップを埋め、生体内で重要な役割を担っている複合糖質の全容を明らかにするには、新たなテクノロジーの創出が必須である。そこで本研究では、当初、糖鎖工学・遺伝子工学の最高レベルでの技術の導入、及び各分野のエキスパートとの共同研究により、天然に存在する糖鎖の迅速かつ網羅的解析が可能なシステムの開発を目指して開始された。

糖鎖構造の高効率かつ高精度な解析に求められるのは、天然に存在する各種糖鎖エピトープを特異的に検出できるシステムの構築である。従来進められてきたレクチンとの結合性を活用する糖鎖構造の解析とは異なり、また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単鎖抗体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った。その成果は複合糖質の効率的構造決定に利用されグリコーム解析の確立に貢献するだけでなく、細胞または組織での病態を反映する糖鎖マップのデータベース化、それに基づいた糖鎖解析マイクロアレイによる診断、さらには組織特異的遺伝子デリバリーシステムへの応用など、医療・産業分野へ発展が期待された。

本研究は平成 15 年 10 月から開始された。当初、東海大学と野口研の持つ糖鎖精製・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、各種糖鎖抗原に対するヒト型単鎖抗体提示ファージを単離し、単鎖抗体を発現・精製後、糖鎖結合性の解析を目指した。戦略会議を月 1 回(平成 18 年度からは 2 月に 1 回)の割合で開催し、グループ間での密接な相互交流を図り、物の供給、技術改革、情報交換を行った。

人工糖脂質に対するファージ提示型単鎖抗体のスクリーニングは、基本的には、抗原の固相化、ファージライブラリーとの反応、洗浄、大腸菌への感染、ヘルパーファージの重感染による抗体ファージの調製、というパンニングを繰り返すことにより濃縮・回収されたファージを、ELISA 法で発色し目的のクローンをスクリーニングするというものである。単離されたファージは、単鎖抗体インサートを PCR 増幅し、その DNA 配列によりグループ分けを行い、各々のグループの代表的抗体について、大腸菌での可溶性単鎖抗体の産生・部分精製の後、その特異性・親和性の確認をする。この初期解析の結果から選択された単鎖抗体について、大量発現・精製した上で、特異性・親和性の解析を行う。以上を経た後に、さらに親和性の改良を行い、診断・治療に使える糖鎖特異的抗体を作製が可能になる。

東海大学では、本研究開始時の予備実験で糖鎖(マンノトリオース:Man3)結合性抗体ファージが同定されていた従来法を用い、各種糖鎖に対する抗体ファージを単離し、その糖鎖特異性と遺伝子配列を解析した。同時進行で、各ステップでの技術改良に努力した。取れた抗体ファージの糖鎖特異性・親和性を初期解析するとともに、単鎖抗体として発現・精製を試み、非還元末端マンノースを認識する Man3 特異的単鎖抗体 10 数種の単離と初期解析について、さらにヒト型 2 価抗体として発現・精製後、その糖鎖特異性・親和性解析を進めた研究の成果が Biochemistry(2007)に 2 報として掲載された。後半の平成 18 年度からは、従来法で取れた各種抗体ファージの糖鎖特異性・親和性の解析、単鎖抗体の発現・精製後の糖鎖特異性・親和性解析を進める一方、目標とする糖鎖抗原をしぼり、すい臓がん診断薬、大腸がん分子標的治療薬に繋がる糖鎖結合性抗体ファージのスクリーニングを開始した。平成 19 年度から、慶応大で改良された新規ベクターシャペロン共発現ベクターおよび改良ヘルパーファージを利用することでレパートリーが増大した第 5 世代ヒト単鎖抗体ライブラリーの使用を開始し、上記糖鎖結合性抗体ファージのスクリーニングおよびクローンの解析が進行中である。

人工糖脂質を抗原として、糖鎖特異的単鎖抗体をファージライブラリーから作製するという課題は、達成できたと言えるが、様々な問題点が明らかになった。我々が最初に選んだ糖鎖抗原、Man3は糖タンパク質のN-結合型糖鎖が合成される際の中間体としてER中に出現する。一方、哺乳動物細胞で合成される抗Man3単鎖抗体(ここではscFv-Fcタイプ)は、生合成されたばかりの抗Man3単鎖抗体が、ER内でN-結合型糖鎖を持つ糖タンパク質前駆体のMan3エピトープと結合し、抗Man3単鎖抗体が産生されないだけでなく、細胞の生存に必須な種々の糖タンパク質の合成阻害を引き起こし、その結果、細胞致死性を引き起こすことになるかと推測される。1クローン(5A3)が、幸いにしてミエローマ細胞から分泌されたために、一連の流れが完成したが、我々が本課題採択時に取得していた、1A4と1G4クローンに関しては、ERに留まり、細胞致死性を引き起こしているというデータを得た。このような場合には、大腸菌の系での発現が必要になるが、単鎖抗体分子の大腸菌での発現は大方不溶性になるという難問を解決しなければならない。

Man3に加え、Le^x、T-antigen、Tn-antigen 特異的抗体が得られたが、当初に目的とした、“糖鎖特異的単鎖抗体ライブラリーを構築すること”は、方法論の確立に時間がかかったこと、ファージ提示単鎖抗体が安定性を欠くこと、単鎖抗体タンパク質の効率的発現が著しく困難なことなどの理由により、残念ながら達成は出来なかった。しかしながら、Man3に対する抗体はその性質上、これまでに得られていないもので、現在そのがん特異的組織染色性の検討や、M3との結合性をNMRで解析する新たな共同研究が、進行中である。また、診断薬・治療薬の開発の可能性が期待できる抗体を得ることができた。

慶應大学では、初年度から抗糖脂質抗体の単離を目指してきたが、平成19年度には、新規ファージ提示型ヒト単鎖抗体ライブラリーとスクリーニングシステムの開発により、効率的に抗糖脂質抗体の単離が可能となった。慶應グループは、独自に開発したCre-lox組換えを利用したレポーター数々の大きなファージ提示型ヒト単鎖抗体ライブラリー(特許WO02003/044198)を用いて抗ガングリオシド抗体のスクリーニングを行ってきた。また、その過程で、より高性能の抗体ライブラリーを開発し、自らのスクリーニングに使用すると同時に、東海大グループに第3世代～第5世代のライブラリーを供与した。慶應大・抗体ライブラリーの特徴はその作製法にある。すなわち、 $10^5 \sim 10^6$ (現第5世代は各 10^7 以上)レポーターを有する安定なVL・VH非発現型ライブラリーを個別に作製し、それらから調製したファージを大腸菌に共感染させて発現型ベクターに組み換えることにより、 10^{11} 以上のレポーターを有するファージ提示型ヒト単鎖抗体ライブラリーを創製している。また、抗体遺伝子の超可変領域(CDR)1-2領域とCDR3領域をPCRによるシャッフリングを行い鋳型(複数人由来末梢血cDNA・脾臓cDNA)には無い抗体遺伝子レポーターを創製している。本研究では、抗糖鎖抗体を効率良くスクリーニングするために、抗体ライブラリーの高性能化も行った。

野口研では、ファージディスプレイ単鎖抗体のパニングの為に必要となる単糖、オリゴ糖、天然型糖鎖等の糖鎖を有する糖鎖プローブの設計および合成を行うことを目的とした。糖鎖部分として、化学合成により調整した単糖誘導体や抗原性を有するオリゴ糖誘導体を用いる他、天然の糖タンパク質や糖脂質から切り出した糖鎖などもプローブに導入する手法の検討も行い、プローブの基本骨格は、パニングの方法により異なるため数種類の構造を検討した。マイクロプレート等との疎水性相互作用により固定化してパニングを行う場合には、糖脂質型のプローブとして3、5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(BDB)を持つものを主として使用し、ビオチン-アビジンの相互作用を利用した固定化する場合や水溶液中でのパニングを行う場合にはビオチンを持つプローブを調製した。本研究では、糖鎖認識抗体のパニングに必要な糖鎖プローブを提供するばかりでなく、ファージ抗体との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形にし、選択性の高い抗体のパニングを可能にする為に糖鎖プローブの改良を検討すること、また、合成した糖鎖プローブの簡便かつ均質な固相化の方法を検討し、パニングやELISA等を行う際の固定化の一般的な手法として使用されることを目指した。さらに、後半プロジェクトに向けて、新規糖鎖プローブの設計と合成に成功した。

本研究の成果は、平成21年1月現在、原著論文9報、投稿中1報、投稿準備中6報、国内特許申請10件、国際特許申請1件というものである。

§ 2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

研究開始時に、慶應大学で開発されていた第3世代ファージライブラリーから、東海大ですでに合成されていた DPPE 化人工糖脂質と、野口研から提供されたスペーサー付人工糖脂質を、糖鎖抗原として、抗体ファージをパンニング・スクリーニングした。同時に、慶應大学では、市販のガングリオシドを糖鎖抗原として抗体ファージのパンニング・スクリーニングを開始した。人工糖脂質を抗原とする際に、従来のタンパク質抗原と同様なパンニング・ELISA によるスクリーニング方法をそのまま適用できない為、至適条件の検討を行いながら実施し、特異的かつ親和性の高いクローンの単離を目指した。すなわち、ファージの非特異的結合を厳しい条件で洗浄しようとする、脂質を介してプラスチックに結合している糖鎖抗原が離脱してしまうため、洗浄の最適条件の選択が成功の鍵となる。そこで、至適条件の検討に、多大の時間を割いた。慶應大学では、ファージライブラリーの改良に努め第5世代まで作製した。さらに、大腸菌発現株の改良を順次行った。

前半の研究終了時に、研究開始時に目指した、人工糖脂質により糖鎖特異的抗体を生体外で作製することは出来たが、その過程で様々な問題点が明らかとなった。中でも、Tn-antigen スペーサー付人工糖脂質によるスクリーニングの負の結果から、単糖に対する抗体は取得できないとの結論を出したことが特筆できる。これは、抗体の抗原結合ドメインの大きさから考えて、予想されることでもあった。この間我々は、抗 Tn 抗原特異的モノクローナル抗体(MLS128: 京産大・中田博教授からの提供、共同研究)が、大腸がんと乳がん細胞の増殖阻害を誘起すること、その機構として IGF-I 受容体のダウンレギュレーションが関与しているという新知見を得た(in press)。そこで、後半では、すでに取得した各種糖鎖に対する単鎖抗体の発現・精製・糖鎖結合性解析を進めつつ、新規糖鎖抗原に対する抗体の作製に着手した。MLS128 は Tn-antigen が3連続したものを(Tn3)をエピトープとするので、この MLS128 と同様な特異性をもつヒト型抗体を作製すれば、将来のがん治療薬開発に繋がる。ここでは、人工糖脂質は使わずに、Tn3-peptide とコントロール peptide(バックボーン)を野口研で設計・合成し、糖鎖抗原として使用した。その結果、改良された第5世代ファージライブラリーからヒト型単鎖抗体を得ることが出来た。これは、分子標的治療薬に繋がる抗体と期待できる。さらに、早期すい臓がん診断薬になりうる糖鎖エピトープに対応する糖鎖抗原を野口研で設計・合成し、これを用いて東海大で抗体ファージのパンニング・スクリーニングが行われていた。

(2)実施体制

グループ名	研究代表者又は 主たる共同研究者氏名	所属機関・部署・役職名	研究題目
東海大学 山口グループ	山口 陽子	東海大学・工学部・教授	糖鎖特異的単鎖抗体の発現・特異性・親和性解析の研究
慶應大学 高柳グループ	高柳 淳	慶應義塾大学・医学部・講師	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・ガングリオシドに対する単鎖抗体の単離の研究
野口研 川上グループ	川上 宏子	(財)野口研究所・研究員	抗体ライブラリー取得の為の糖鎖プローブの合成および改良の研究

§ 3 研究実施内容及び成果

3. 1 サブテーマ名1(東海大学 山口グループ)

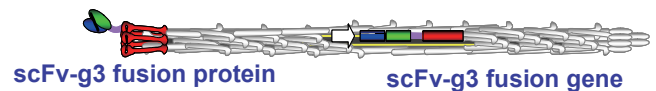
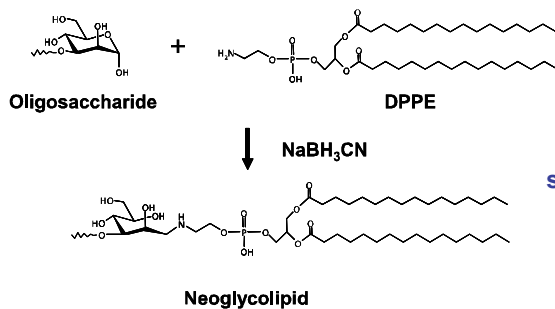
(1)研究実施内容及び成果

① 人工糖脂質を糖鎖抗原としてのヒト型単鎖抗体をファージライブラリーから作製

1) 従来法でのパンニング・スクリーニング全体のまとめ

提案書に記述したように、東海大で調製された DPPE 化糖(図1)と野口研で調製されたスパーサー入りの人工糖脂質(図10)を糖鎖抗原とし、慶應大学で作製されていたファージライブラリー(第3世代)(図2)から、ヒト型単鎖抗体提示ファージを単離した(図3)(従来法と呼ぶ)。その中からさらに単鎖抗体タンパク質として発現・精製・糖鎖結合性解析をした Man-DPPE で取得した単鎖抗体(scFv)を中心に研究を展開した。取得困難な糖鎖抗原については、スクリーニング法に改良を加え、候補クローンを得た。使用した糖鎖抗原ごとに、取得したファージクローンと解析済・解析中のクローン、または取得できなかった結果を表1にまとめた。

A. Synthesis of neoglycolipids



B. Man3-DPPE

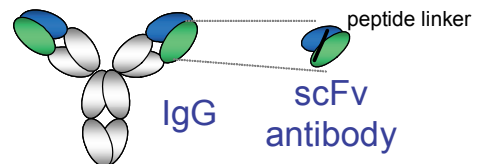
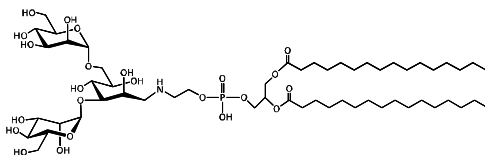


図1 人工糖脂質の合成(A)とマントリオース抗原 (Man3-DPPE) (B)

図2 M13 ファージに提示された単鎖抗体(scFv)の概念図

Phage antibody

Neoglycolipid

Solid phase

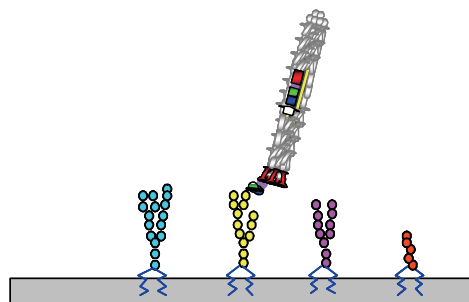


図3 ファージ提示型単鎖抗体と人工糖脂質の結合概念図

表 1: 従来法により単離されたクローンと平成 20 年 10 月現在解析中の単鎖抗体提示ファージ (抗体ファージ) のまとめ
分子は positive クローン数、分母はスクリーニングしたクローン数を表記

人工糖脂質	平成 16 年度までに単離		平成 16 年度後に単離	scFv gene 解析済	scFv protein の発現・精製済 又は解析中のクローン名
	After 1 st & 2 nd ELISA (S/N ratio)	scFv insert detected by PCR	Screened by alternative methods		
Mannotriose (Man3)-DPPE	26/672 (>2)	25/26		15	5A3, 1A4, 1G4, 5C10
Le ^x (LNFP III)-DPPE	100/1470 (>4)	5*/100	6/96	3	1F12, 3A1
Neoglycolipid mixture (LNnT, LNFP I, LNFP II, LNFP III, LNDFH I)-DPPE	11/288 (>2)	10*/11		8	0
LNnT-DPPE	12/1344 (>2)			0	0
LNFP I-DPPE	0/96	NA		0	0
LNFP II-DPPE	2/96 (~2)	2/2		0	0
LNDFH I-DPPE	5/96 (>2)	0/5	30/800 (5 clones sequenced)	4*	0
T-antigen-E6-BDB	25/96 (>4)	22/23		12	1E6, 1E8, 1E10, 1G11
Tn-antigen-E6-BDB	0/192	NA	4/736	0	0

*Of these, two clones are the same.

Abbreviation used: LNnT, LNFP I, LNFP II, LNFP III, and LNDFH I are lacto-*N*-neotetraose, lacto-*N*-fucopentaose I, lacto-*N*-fucopentaose II, lacto-*N*-fucopentaose III, and lacto-*N*-difucohexaose I, respectively.

2) Mannotriose(Man3)-DPPE でのパンニング・スクリーニングと scFv protein 発現・精製・糖鎖結合性解析 (論文 3 報掲載 3 報投稿準備中)

4 回のパンニング後に得られたファージの中から 672 クローンを ELISA によりスクリーニングした結果、26 のポジティブを得た (表 1)。15 クローンの DNA 配列から推定されたアミノ酸配列は、すべてのクローンが異なっているという予想外なものであった。この中から、最良の抗体を選択するために、ドットプロット法 (TLC-overlay 法) と表面プラズモン共鳴法 (Surface Plasmon Resonance: SPR) により、得られた抗体ファージの糖鎖結合特異性を簡易に解析する方法を確立した。ファージ抗体としての解析から、SPR と ELISA で Man3 部分に結合すること、単鎖抗体タンパク質として発現することなどを確認した (Sakai et al. Biochemistry 46, 253, 2007)。単鎖抗体の部分精製品で、SPR 解析を行い、解析した 3 クローンは Man3 と Man5-DPPE に親和性を持つが、Man1 に相当する Man2 には結合しないことが確認された。1A4-12 と 5A3 クローンについて、ビオチン化糖で SPR 解析を行い Man3 特異的に結合することが確認された。1A4-12 と 5A3 クローン及び、1G4 クローンについて、融合タンパク質として大量発現の系をいろいろ試みたが、結果的には、5A3 クローンにつ

いて、最も早く解析が進んだ。GST との融合タンパク質として大腸菌での発現と精製、ヒト IgG Fc と結合した 2 量体としてミエローマ細胞での発現と精製に成功した(Zhang et al. Biochemistry 46, 263, 2007)。精製した2種の単鎖抗体 5A3 融合タンパク質を糖鎖結合性を固定化した Man3-BSA に対し SPR 解析した結果、5A3 scFv-Fc が糖鎖に対する抗体としては非常に高い親和性を持つことが明らかになった(表2)。Man3 との結合性の詳しい NMR 解析は現在共同研究で進行中である。

表2 抗 Man3 単鎖抗体(5A3 scFv) 融合タンパク質の Man3-BSA 親和性の SPR 解析

Fusion proteins	k_a (M-1s)	k_d (s-1)	KA (M-1)	KD (M)
GST-5A3 scFv	3.08×10^3	6.71×10^{-2}	4.59×10^4	2.18×10^{-5}
5A3 scFv-Fc	6.04×10^4	2.68×10^{-4}	2.25×10^8	4.44×10^{-9}

人工糖脂質を抗原として、糖鎖特異的単鎖抗体をファージライブラリーから作製するという課題は、一応達成できたと言えるが、様々な問題点が明らかになった。

i) 我々が最初にモデル糖鎖抗原として使用した、Man3 は糖タンパク質の N-結合型糖鎖が合成される際の間体として ER 中に存在する。一方、哺乳動物細胞で合成される抗 Man3 単鎖抗体(ここでは scFv-Fc タイプ)は、生合成された抗 Man3 単鎖抗体が、ER 内で N-結合型糖鎖を持つ糖タンパク質になるべき前駆体と結合し、抗 Man3 単鎖抗体が産生されないだけでなく、細胞の生存に必須な種々の糖タンパク質の合成阻害を引き起こし、その結果、細胞致死性を引き起こすことになるかと推測される(表3)。5A3 クローンは、親和性か特異性の関係で、ミエローマ細胞から分泌されたために、一連の流れが完成したが、我々は、1A4 と 1G4 クローンに関しては、ER に留まり、細胞致死性を引き起こしているというデータを得ている(投稿準備中)。このような場合には、大腸菌などの系での発現が必要になる。

表3 2種の哺乳動物細胞での Man3 単鎖抗体発現と精製結果のまとめ

Cell line	scFv-Fc protein	Number of clones		Expression levels in SFM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^b
		ELISA	Fc-positive ^a	
CHO	1A4-12	48	5	0
	1G4	36	2	0
NS0	1A4-12	98	0	ND ^c
	1G4	80	0	ND
	5A3	25	6	48
	Fc alone ^d	12	10	120

^a Expression of various scFv-Fc and control Fc proteins in two mammalian systems was examined by sandwich ELISA using anti-human IgG (Fc fragment specific) antibody. ^b Expression levels of scFv-Fc proteins in SFM were estimated from the yields of the proteins after purification by protein A column chromatography. ^c not determined. ^d Fc domain only was expressed as a control.

ii) 単鎖抗体分子の大腸菌での発現は大方不溶性になるという難問を解決しなければならない。Man3 単鎖抗体の発現と精製を簡略に表4にまとめた。我々はこれまでに、様々な系

での活性を有する単鎖抗体の効率的発現を模索した。scFv protein そのままでも、GST fusion scFv としても、大腸菌内ではミスフォールドされ封入体になるか、シャペロンが誘導されることで活性を持つ単鎖抗体のみの精製が困難となるという事態が、ほぼすべてのケースで観察された。配列依存的に、大腸菌で比較的高発現するクローンも見られ、それらでは精製・解析が可能になった。酵母での発現系は Man3 単鎖抗体には、相応しくないのので検討していない。

表4 Man3 単鎖抗体発現のこれまでの戦略と結果のまとめ

発現細胞	単鎖抗体のデザイン	クローン名	発現・精製
哺乳細胞 CHO	scFv-Fc	1A4-12, 1G4	不可
NS0	scFv-Fc	1A4-12, 1G4	不可
NS0	scFv-Fc	5A3	1 クローン確立
大腸菌 HB2151	scFv	1A4-12, 1G4, 5A3, 5C10	不可
慶應大改良株	scFv	1A4-12, 1G4, 5A3, 5C10	不可
慶應大改良株	GST-scFv	5A3, 5C10	可能
慶應大改良株	GST-scFv	6 other clones	不可
BL21	scFv in pET	1A4	可能
BL21	scFv in pET	1G4	検討中
Rosetta 2	scFv in pET	5A3 multimers	可能

3) LNFPIII(Le^X)-DPPE でのパンニング・スクリーニングと scFv protein 発現・精製・糖鎖結合性解析

1470 フェージクローンのスクリーニングの結果、100 クローンが S/N 比が 4 以上という positive 性を見せたものの、最終的に3クローンの単離に留まった。その中で1F12と3A1について、scFv-Fc protein としての発現をしたところ、1F12scFv-Fc は発現し、細胞外に分泌した。培養上澄からの精製に成功したが(投稿準備中)、3A1 は細胞致死性となり、クローンの確立がかなわなかった。一過性発現系で解析したところ、単鎖抗体は発現されたが ER に局在し細胞外には分泌されなかった(投稿準備中)。

4) Neoglycolipid-DPPE mixture (LNnT, LNFP I, LNFP II, LNFP III, LNDFH I)及び LNnT-, LNFP I-, LNFP II-, LNDFH I-DPPE それぞれによるパンニング・スクリーニング

表 1 に要約したように、ある程度のフェージクローンは取れているが、解析がなかなか進まなかった。ただ、当初に狙った、Neoglycolipid-DPPE mixture によるパンニング・スクリーニングは、ヘテロな糖鎖抗原の凝集に由来するエピトープに結合した可能性が考えられ、人工糖脂質の節約と、短期で 5 種類の単鎖抗体を取得できるのではないかとの思惑は外れたと言える。

5) T-antigen-E6-BDB 及び Tn-antigen-E6-BDB 人工糖脂質によるパンニング・スクリーニング

野口研で合成された3, 5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(BDB)スパーサーをもつ人工糖脂質によるパンニング・スクリーニングの結果、T-antigen に対するフェージ抗体は12クローン取得できた。DNA 配列決定後に 4 グループに分類されたので、4 種の代表的クローンの解析を進めている。Tn-antigen では 736 フェージクローンをスクリーニングしたが、結合

するフェージは得られなかった。この結果、単糖に対する抗体は取得できないとの結論を出した。これは、抗体の抗原結合ドメインの大きさから考えて、予想されることでもあった。これを基にして、Tn3(Tn antigen 3 連続のエピトープ)特異的抗体を取得する方向に研究方針を切り替えた(次ページ参照)。

中間報告後は、後半の研究方向を文献または我々の未発表データに基づいたがん特異的糖鎖に対する抗体の作製を目指した。

② 膵臓がん特異的抗原糖鎖を持つ糖鎖プローブによるパンニング・スクリーニング:野口研で新規合成された各種糖鎖抗原と第5世代フェージライブラリーを使用

α 1,4-*N*-acetylglucosaminyltransferase (α 4GnT)により生成される GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β 残基はヒトの胃、膵臓の限定された細胞に局在し、 α 4GnT が膵臓がん・胃がんで高率に発現されていることから、GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β 残基に対する抗体は、新たな早期すい臓がん診断薬の開発に繋がる可能性が高い。市販されている IgM 抗体の HIK1083 により、野口研で合成された糖鎖 (GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal) (図5)を東海大で DPPE 化後精製し、TLC overlay 法で HIK1083 に対する反応性を見た結果(図6)、Gal が開環するにもかかわらず、その特異性を確認できた。よって、GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal-DPPE を使い、パンニングを開始した。より高い特異性を期待できる 3 糖からなる DPPE 化またはビオチン化した糖鎖抗原 (図5)を順次抗原として使用し、パンニングを行った。

図 5

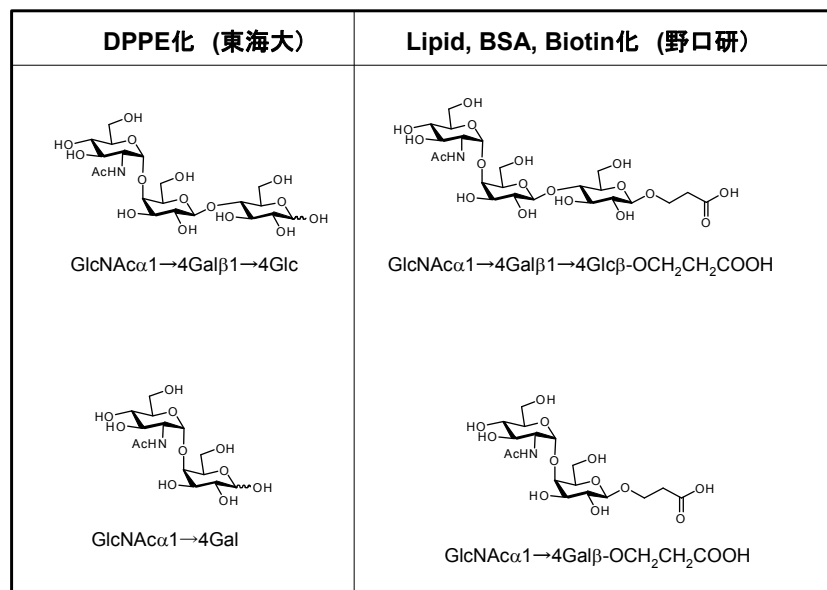
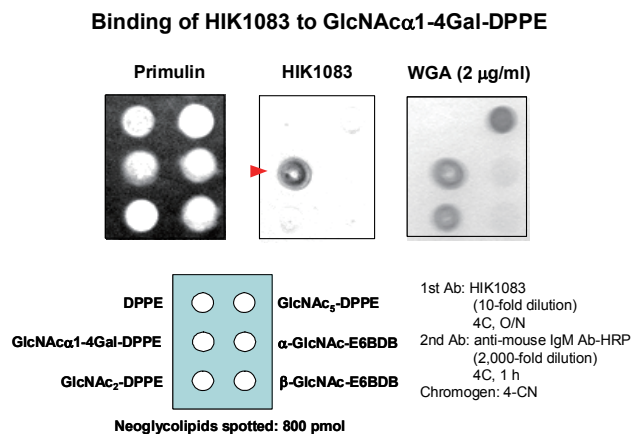


図 6



③ Tn 抗原結合糖ペプチドによる Tn3 特異的単鎖抗体のパンニング・スクリーニングと scFv protein 発現・精製・糖鎖結合性解析:第 5 世代ファージライブラリー と Tn3 peptide を使用

我々は、抗 Tn 抗原特異的モノクローナル抗体(MLS128: 京産大・中田博教授からの提供、共同研究)が、大腸がんと乳がん細胞の増殖阻害を誘起すること、その機構として IGF-I 受容体のダウンレギュレーションが関与しているという新知見を得た(in press)。そこで、新規糖鎖抗原にたいする抗体の作製に着手した。MLS128 は Tn-antigen が3連続したものを(Tn3)をエピトープとするので、この MLS128 と同様な特異性をもつヒト型抗体を作製すれば、将来のがん治療薬開発に繋がる。ここでは、人工糖脂質は使わずに、Tn3-peptide とコントロール peptide(バックボーン)を野口研で設計・合成し、糖鎖抗原として使用した。その結果、慶應大学で改良された第 5 世代ファージライブラリーから 8 クロウンを同定し、これまでに 2 クロウンからヒト型単鎖抗体を発現・精製・糖鎖結合性解析をすることが出来た(投稿準備中)。現在、さらに新たなクロウンを取得しつつ、2 クロウンの解析を進めている。これらは、分子標的治療薬に繋がる抗体と期待できる。

(2)研究成果の今後期待される効果

Man3 特異的抗体は、これまでに他では得られていない新規な抗体である。そこで、将来に発展するプロジェクトを開始した。5A3-scFv-Fc として発現・精製・糖鎖結合性解析を終了後、ヒト組織染色性を見るために、HA-tag を導入した 5A3-scFv-Fc-HA を作製し、NS0 細胞で発現・精製した(Yuasa et al. BST, 1, 102, 2007)。正常組織では、特殊なところしか染まらないが、乳がん、大腸がんなどを染色することから、信州大学医学部の中山淳教授との共同研究でさらに詳細な解析を続けている。本研究では scFv genes の DNA 配列から、CDR のアミノ酸配列を一義的に取得できるという利点を生かし、東海大学総合情報センターの日向寺祥子講師との共同研究を平成 19 年度から開始し、分子モデリングを駆使して、Man3 と単鎖抗体の結合ドメインとの相互作用を解析している。平成 20 年度からは、理研の山口芳樹グループと共同研究で、5A3-scFv-Fc-HA を使った NMR 解析を開始した。大腸菌での 5C10 GST-scFv 発現と refolding も山口芳樹グループで進展しており、今後 Man3 と抗体の結合の詳細な解析結果が期待される。同様に、Tn3 特異的単鎖抗体の糖鎖結合性解析も、理研・野口研・東海大の共同研究として進めており、糖鎖・抗体結合性の基礎的データの取得のみならず、今後の抗体治療薬・診断薬の開発に有効な情報を得られるものと期待できる。さらに、Man3 特異的 5A3 scFv の完全ヒト化抗体を慶應大学で開発されたベクター(図 8)で進めており、がん治療薬などに繋がるものが期待される。

3. 2 サブテーマ名 2(慶應大学 高柳グループ)

(1)研究実施内容及び成果

慶應グループは、独自に開発した Cre-lox 組換えを利用したレパートリー数の大きなファージ提示型ヒト型単鎖抗体ライブラリー(特許 WO02003/044198)を用いて抗ガングリオシド抗体のスクリーニングを行った。また、その過程で、より高性能の抗体ライブラリーを開発し、自らのスクリーニングに使用すると同時に、東海大グループに第3世代～第5世代のライブラリーを供与した。この抗体ライブラリーの特徴はその作製法にある。すなわち、 10^{5-6} (現第5世代は各 10^7 以上)レパートリーを有する安定な VL・VH 非発現型ライブラリーを個別に作製し、それらから調製したファージを大腸菌に共感染させて発現型ベクターに組み換えることにより、 10^{11} 以上のレパートリーを有するファージ提示型ヒト型単鎖抗体ライブラリーを創製している。また、抗体遺伝子の超可変領域(CDR)1-2 領域と CDR3 領域を PCR に

よるシャッフリングを行い鑄型(複数人由来末梢血 cDNA・脾臓 cDNA)には無い抗体遺伝子レパートリーを創製している。本研究では、抗糖鎖抗体を効率良くスクリーニングするために、抗体ライブラリーの高性能化も行った。

抗ガングリオシド抗体のスクリーニングは困難を極めたが、いくつかの成果が得られた。本研究で得られた実践的方法論を 80 ページに及ぶマニュアルにまとめた。

はじめに、ファージ提示型抗体ライブラリーからのスクリーニング方法を概説する。(1)固相化した抗原をブロックし、抗体ライブラリーと反応させる。(2)非結合ファージを洗浄し、結合したファージを回収する。(3)回収したファージを大腸菌に感染させ、ヘルパーファージを重感染させ、抗体提示ファージを増殖させる。以上をパンニングと呼ぶ。これを3-4回繰り返し、クローン化し、ELISA 等で陽性クローンを選別し、さらなる評価を行う。通常 3-4 週間で ELISA までの結果が得られるが、以下で述べるガングリオシドに対する抗体のスクリーニングには、数回の試行を実施しながら、改良を加えていった。

① 抗体ライブラリー(抗体ファージ)の改良

抗ガングリオシド抗体のスクリーニングにおいて当初のシステムでは困難と思われたため、様々な改良を行い第5世代ライブラリーまで改良・進化している。(1)第1世代ライブラリーのプロモーターでは非誘導時でも抗体が発現されクローンの安定性を損ねている可能性がある、(2)可溶性抗体の発現量が非常に少ないクローンが存在する、(3)現状のアフィニティタグではハイスループット精製に不向きであることなどが判明した。このため、レパートリーの増加も含めさらなる高性能化を目指し、12 箇所におよぶライブラリー作製システム・宿主菌の改良を行った。すなわち、ライブラリー構築用ベクターに関しては、(i) Lac プロモーターをより厳密に発現制御できる人工 tet プロモーターへに変更、(ii) 漏洩発現の潜在原因となるプロモーター様配列の除去、(iii) lox を組換え効率の高い新規 lox 配列に変換、(iv) クローン化効率を高める8塩基認識の制限酵素部位を導入、(v) 新たな自殺遺伝子の利用、(vi) scFv あるいは Fab 抗体どちらでも構築可能なプライマーセットおよび制限酵素部位を導入、(vii)培地からの直接精製を可能にする新規タグの導入、(viii) 高親和性抗体を提示するファージを回収するためにトリプシン切断部位の導入などを行った。

② scFv 発現用の大腸菌、ベクターの改良

上記(2)の課題を克服するため、大腸菌ペリプラズムシャペロン Skp, SkpA, DsbA,B,C,D 遺伝子を組み込んだ共発現ベクターを作製・改良した(投稿準備中)。少量の抗体しか発現しないファージは、抗体の特異性、親和性が高くても、スクリーニング中に失われる可能性がある。この同じベクター構成であるのに発現量に差がある原因として、タンパク質のフォールディングに注目した。そこで、ファージ提示型抗体の発現を増強するためのペリプラズムシャペロンベクター(pFS, pDFS)を開発し、これを有する大腸菌を用いて、抗体のスクリーニングを始めた(pFS を利用した第4世代ライブラリー、平成18年度)。

pFS には Skp, FkpA 遺伝子が組み込まれている。skp はフォールディングされたタンパク質の量を増加させる機能的なシャペロン分子として発見された。FkpA はペプチジルシス/トランスイソメラーゼで、ペリプラズム内でフォールディングを助ける機能を持っていると提唱されており、FkpA の共発現によりファージ提示型タンパク質が増加し、機能的 scFv フラグメントのペリプラズム内発現が劇的に改善されることが分かっている。さらに pDFS にはジスルフィドイソメラーゼ(DsbA, B, C, D)が組み込まれている。これは大腸菌内の酸化還元酵素のひとつで、タンパク質のジスルフィド構造とリフォールディングに関与している。大腸菌内での DsbA-D の共発現により、抗体タンパクの発現が増加することが分かっている(Sandee D et al., 2005)。Sandee らの研究では、不完全長の DsbD 遺伝子配列を用いているが、pDFS は完全長の DsbD 遺伝子配列を有している。pFS 共存下でファージ力価は約 50% 増加し、pDFS 共存下で可溶性 scFv 抗体量は約 10 倍に増加した。

しかし、その後 DsbA-D の過剰発現がファージの抗体発現を抑制することが判明したので、シャペロン発現量の至適化を行い、さらに抗体タンパク発現量の増大を目指し、大腸菌で低頻度なコドンを認識する 7 種の tRNA 遺伝子の組み込みを行った。すなわち skp、FkpA と DsbA-D の間に弱い転写終結配列を導入し DsbA-D の発現を弱めた。また、産生される抗体量の均一化を図るために、レアコドン tRNA (ヒト遺伝子でよく使われるコドンであるが、大腸菌では対応する tRNA 量が少ないもの) 7 種を組み込んだ新規ペリプラズムシャペロンベクター (pFSD) を作製した。これを基に、抗体遺伝子をコードするファージミドのコピー数を 10 分の 1 に減少させる rop 遺伝子を組み込んだベクター (pFSD2)、ストップコドン (TAG) をグルタミンに翻訳する tRNA (supE) を組み込んだベクター (pFSD3)、さらに、supE 遺伝子と rop 遺伝子を共に組み込んだベクター (pFSD4、図 7) を作製した。アンバー抑制遺伝子 (supE) はアンバー (TAG) ストップコドンをグルタミンに翻訳する tRNA である。これを組み込むことで本来、大腸菌 suE 株に 1 copy しか存在しない supE を 10~20 copy に増加させた。これによりファージ上に提示される g3 タンパク融合 scFv 抗体タンパクの発現が増加することが期待される。rop はプラスミドのコピー数維持のために、プライマータンパクを抑制する RNA を安定化させるタンパク質のコーディング配列で、プライマー抑制因子として機能する。これにより抗体遺伝子をコードするファージミドのコピー数を 10 分の 1 に減少させ、ファージミドを安定化させることが期待された。各発現ベクターを組み込んだ大腸菌によるファージ提示抗体量および、可溶性抗体量をウエスタンブロットで評価し、抗体発現条件の至適化を行った。その結果、pFSD4 により抗体ライブラリーのスクリーニング効率が向上し、pFSD2 により個々の可溶性抗体の大量調製が容易になった。このペリプラズムシャペロン共発現ベクター pFSD4 (図 7) は、前世代を上回る性能を有していた。すなわち、ライブラリーの安定性も向上し、前世代以上の可溶性抗体発現量の増大および抗体提示ファージの増加が観察された。この過程でヘルパーファージ M13KO7 を改造し新しい発現システムに適合する M13AX1 も作製した。また、高密度培養が可能な PDT 培地も開発した。これらを組み入れ、レパートリーも約 10 倍増大させた第 5 世代抗体ライブラリーを作製し、平成 19 年よりスクリーニングに供していた。

さらに、ファージ提示型抗体もしくは可溶性単鎖抗体だけではなく、多種類の抗体遺伝子を容易に組み込める IgG 型抗体発現ベクター (図 8) を作製した。単鎖抗体遺伝子から VH・VL 断片を PCR で増幅し、相同組換え反応でこれらのベクターに組み込むことができるため、利便性が高まった。すでに数種の抗ガングリオシド抗体遺伝子をこのベクターに組み込み IgG 型抗体の精製を試みた。

③ 抗ガングリオシド抗体のスクリーニング

まず抗体ライブラリー牛脳由来ガングリオシド混合物を抗原とし、タンパク性抗原と同様のスクリーニング方法を試みた。しかし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。精製タンパク抗原では 3 回のパンニング後約 10~30% の確率で抗原に結合するクローンが得られることから、抗ガングリオシド抗体のスクリーニングには困難が予想された。次いで、10 種の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た。その結果、一種類のガングリオシドにのみ結合する抗体ファージは得られなかったが、複数のガングリオシドに結合する抗体ファージが得られた。しかし、それらはスフィンゴミエリンに対しても結合することが判明した。そのため、スフィンゴミエリンであらかじめ吸収し、非結合ファージを目的ガングリオシドに結合させるサブトラクション法を試みたが、有望なクローンは得られなかった。

これまでの抗糖脂質抗体のスクリーニングにおいて、洗浄液成分に界面活性剤を使えないため十分な洗浄ができず非特異的な抗体クローンの排除が困難であるため、スクリーニング効率が低いと思われた。平成 19 年度にこれを克服するための Tween 20 を含む洗浄液と同等の効果をもつリン酸・アミノ酸ベースの新規洗浄剤の開発に成功した。さらに、糖脂質の固相化法の改良、合成高分子系ブロッキング剤の採用、ラクトシルセラミド、ガラクトシルセラミド、スフィンゴミエリン混合物を用いたサブトラクション法の導入を行い、ガングリ

オシド GM2、GD1a、GM4 に結合する抗体の単離に成功した。しかし GD1a、GM4 に対する抗体の遺伝子には欠失があった。正常な抗体分子として機能する VL 断片を移植することを検討している。興味深いことに、異なる抗原 (GM1、GM2、GD2) でのスクリーニングから独立に全く同一の抗体遺伝子を有するクローンが単離された。これらは、共通エピートプ(図 9)を認識していると考えられた。また、共同研究者の野口研グループより供与されたガングリオシド GM3 の糖鎖部分に親水性リンカーおよびビオチンを付加した合成糖鎖に結合する抗体も単離された。この抗体は GM3 にも結合することを ELISA 法にて確認した。現在、IgG 型抗体へ変換し、これらの特異性を調べるとともに、他の精製ガングリオシドに対してもスクリーニングを続行している。

図 7

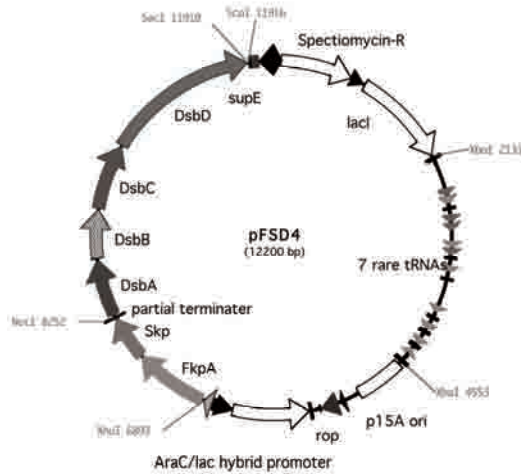


図 8

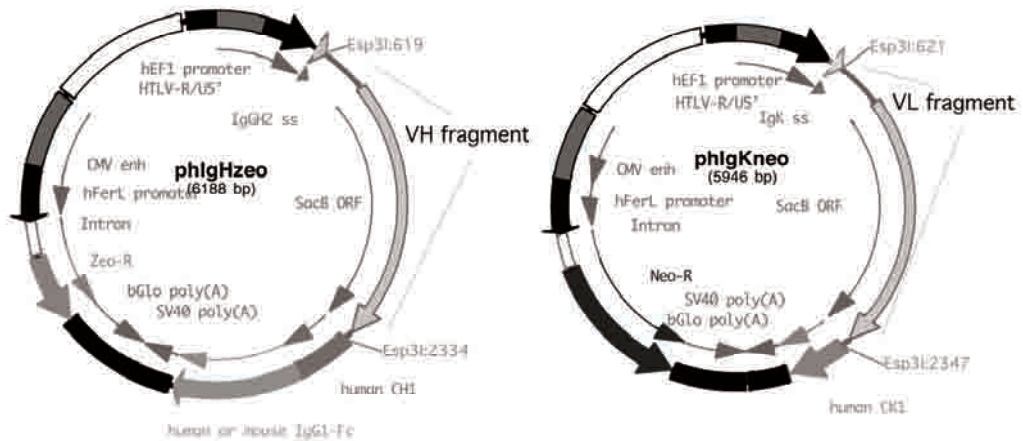


図 9



(2)研究成果の今後期待される効果

本研究で進歩した抗糖鎖抗体のスクリーニング技術は、複合糖鎖などにも応用可能である。そのため、これまで有用な抗体が得られていない糖鎖構造に対する抗体の単離が期待できる。抗ガングリオシド抗体も有用なものは少ないため、新しい抗体への要望は強く、新たな糖鎖機能発見に結びつけるためにもスクリーニングを続行する予定である。また、抗体ライブラリーを活用してもらうため、広く共同研究を進めていきたい。

本研究で単離された抗ガングリオシド抗体も共同研究を進め、新たな糖鎖機能解明へ有効に活用していきたい。ガングリオシドは細胞表面のレセプターを介したシグナル伝達を修飾すると言われており、この現象を解析する強力なツールとなろう。特に GM3 抗体は抗体医薬・診断薬になる可能性があるため、その性質を興味深く解析している。

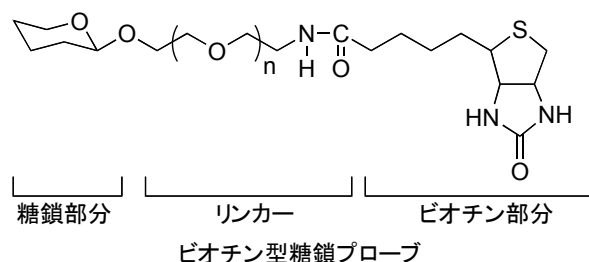
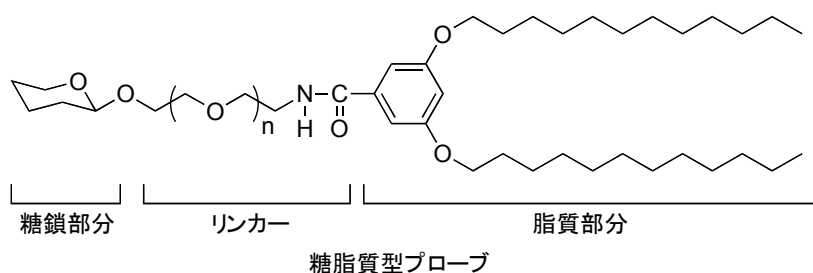
3.3 サブテーマ名3(野口研究所 川上グループ)

(1)研究実施内容及び成果

① 糖鎖プローブの基本構造の設計

最初に、ファージ抗体との非特異的な相互作用が起こりにくい構造の糖脂質型プローブの構造設計と合成を検討した。脂質部分としては、当グループのこれまでの研究結果から、合成および分析が容易で、プラスチックディッシュ等への固定化能を有し、細胞等に影響を与えないことを確認済みである 3、5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(BDB)を選択した。ファージ抗体との非特異的相互作用の抑制については、オリゴエチレングリコール(OEG)鎖を導入することを検討した。エチレングリコールはタンパク質等との非特異的な相互作用が起こりにくい化合物として知られているが、高分子であるためプローブに導入するとその長さや揺動性などから抗体の認識能が低下することが考えられる。そこで、エチレングリコール鎖の短いOEGを使用することにし、エチレングリコールユニット数が2から6個のエチレングリコール鎖長を持つ5種類のBDB誘導体を合成し、表面プラズモン共鳴センサ(SPR)を用いてBSA等のタンパク質との相互作用解析を行い、エチレングリコールの最適鎖長を検討した。その結果、BDBに6つのエチレングリコールが結合した人工脂質(E6BDB)では、ほとんどBSAの吸着が起こらないことを確認した。

図 10



脂質とプレートとの疎水性相互作用を利用した固定化方法以外に、アビジン固定化プレートを使用した方法、水溶液中でファージ抗体と結合した後アビジンビーズにより抗体との複合体を回収する為のツールとして、ビオチンに結合した糖鎖プローブの設計と合成を検討した。ビオチン結合型のプローブは、プレートに固定化した場合においては洗浄時にプレートからの解離が避けられる点で有用である。また、水溶性であることから固定化して使用するだけでなく水溶液の状態でも使用することも可能である。そこで、糖鎖にOEGを介してビオチンが結合した構造のビオチン結合型水溶性糖鎖プローブを合成し、アビジンキュベットに固定化し、SPRを用いて糖鎖を認識するタンパク質等との結合を確認することができた。

②単糖を有する糖鎖プローブの合成

単糖を有する糖鎖プローブは、 α -GlcNAcや α -Fuc等の単糖に対する抗体が知られていることに加え、今後、様々な糖鎖に対する抗体が得られた場合に、それらの抗体の単糖レベルでの認識を確認することが重要な作業になることから必要になると考えた。Man、Gal、Glc、Fuc、GlcNAc等の単糖を、糖脂質型およびビオチン結合型それぞれについて、 α および β アノマーとして結合した糖鎖プローブを合成した。糖鎖プローブは、それぞれの単糖のアセテート体をイミデート法により導入することにより合成した。

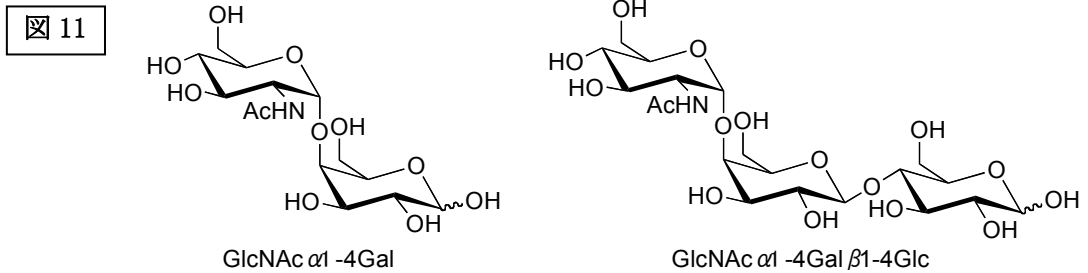
③抗原性糖鎖を有する糖鎖プローブの合成

糖鎖プローブに導入する為の抗原性糖鎖として、人体にも抗糖鎖抗体があることが知られているTn抗原(α -GalNAc)およびT抗原(Gal-GalNAc)を選択し、糖脂質型およびビオチン型の糖鎖プローブの合成を行った。Tn抗原の合成は、これまでに行った単糖型プローブの合成と同様の方法で行った。T抗原の合成方法は、まず、ガラクトサミン部分として2位がアジド基、3、4、6位がアセチル保護されたガラクトースを原料とし、アノマー位のTBDMS保護反応、脱アセテート化反応、4、6-ベンジリデン化反応を行い、糖受容体を合成し、ガラクトースのアセテート体とのカップリングをイミデート法で行った。TBDMS基を脱保護した後、イミデート基にし、Fmoc保護したヘキサエチレングリコールとのカップリングを行った。その後、ベンジリデン環の開裂反応とアセチル化反応、アジド基の還元反応とアセトアミド化反応を行い、リンカーのFmoc基を脱保護した後、BDBまたはビオチンとの縮合反応することにより、T抗原糖鎖プローブ

を糖脂質型、ビオチン型の両方で得ることができた。

④膵臓がん特異的抗原糖鎖を持つ糖鎖プローブの合成

膵臓がん細胞上では、 $\text{GlcNAc } \alpha 1-4\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc } \beta 1-6(\text{Gal } \beta 1-3)\text{GalNAc } \alpha 1-$ 構造を有するO結合型糖鎖が有為に発現することが報告されている。(Ishizone et al. *Cancer Sci.*, (2006) **97**, 119-126.) この糖鎖に対する単鎖抗体を得る為の抗原糖鎖として、エピトープと考えられる2糖 ($\text{GlcNAc } \alpha 1-4\text{Gal}$) と還元アミノ化反応による糖鎖プローブ化を考慮した還元末端にGlcを持つ3糖 ($\text{GlcNAc } \alpha 1-4\text{Gal } 1-4\text{Glc}$) をターゲット



化合物とし、糖脂質型およびビオチン型の糖鎖プローブを合成した。2糖部分の合成は、糖受容体として、1位がp-メトキシフェニル基のガラクトースアセテート体を出発原料に、脱アセチル化反応、4, 6-ベンジリデン化反応、2, 3-アセチル化反応、ベンジリデン環の還元開裂反応を経て、4位水酸基が無保護のガラクトース保護体を得た。この糖受容体に、別途調整した2位にアジド基を持つグルコースのアセテート体をイミデート法によりカップリングし、2位のアジド基の還元反応、生じたアミンのアセチル化反応、硝酸セリウムアンモニウムを用いたp-メトキシフェニル基の脱保護反応を経て目的の2糖を合成した。3糖部分の合成は、1位がp-メトキシフェニル基のラクトースアセテート体を出発原料に、脱アセチル化反応、4, 6-ベンジリデン化反応、アセチル化反応、ベンジリデン環の還元開裂反応を経て、非還元末端ガラクトースの4位がフリーのラクトース保護体を得た。このラクトース誘導体に、2糖合成の場合と同様の手法でガラクトサミンを導入し、脱保護反応を行うことで目的の3糖を合成した。

⑤糖鎖プローブ構造の改良

パニングの効率を上げる為の検討として、プローブの構造の改良を検討した。糖鎖部分とビオチンや脂質などをつなぐリンカー部分には、これまでヘキサエチレングリコールを使用していたが、東海大学のパニングの検討などから、リンカー部分が揺動しすぎるため抗体認識の妨げになっている可能性が示唆された。そこで、リンカー部分の自由度を制限する為のエチレングリコール鎖を短くし、リンカーと糖との結合部をエーテル結合からアミド結合にした構造のものを合成することを検討した。リンカー構造を検討した結果、非特異的吸着を抑える効果が確認でき、原料が安価で、合成上問題が少ないことからジエチレングリコール型の構造をもつリンカーを選択した。改良型リンカーを持つ膵臓がん抗原のエピトープ2糖のビオチン型プローブを、 $\text{GlcNAc } - \alpha 1-4\text{Gal}$ のイミデート体から6工程で合成した。

図 12



⑥ミセル溶液を用いた固定化の検討

ビオチン型のプローブは水溶性化合物であるが、E 6 B D B型のプローブも水に可溶化することがわかった。そこで、この溶液の臨界ミセル濃度 (CMC) を、ナイルレッド溶液を用いた蛍光プローブ法で測定し、水中でミセルを形成していることを確認した。

通常、糖脂質をプレートに固定化する場合、アルコールなどの有機溶媒に溶かした糖脂質をウェルに加えた後蒸発させるが、この方法では糖脂質がウェルの隅に片寄ることがあり、均一に固定化できないことや、プレートの材質によっては使用できる溶媒が制限されるなどの欠点がある。ミセル溶液を用いた固定化が可能となれば、溶媒を使用せずに固定化できることに加えて、溶液を蒸発させる過程がないために均一に固定化できると考えられる。そこで、E 6 B D B型の糖鎖プローブのミセル溶液を用いた表面プラズモン共鳴装置のキュベットやプラスチックディッシュなどの疎水表面への固定化法について検討した。M a n - E 6 B D Bに高純水を加え、4 0℃に昇温した後、超音波照射やボルテックスミキサーで攪拌することにより均一に分散したミセル溶液を調整し、S P Rの疎水性キュベットへの固定化を検討した。その結果、S P Rの固定化量から固定化できていることを確認し、コンカナバリンAとの相互作用を確認することができた。また、同様の手法でM a n - E 6 B D BとG a l - E 6 B D Bのミセル溶液をそれぞれマイクロプレートへ固定化し、コンカナバリンAとR C Aを使用して相互作用を測定した結果、それぞれ糖鎖特異的な相互作用が確認できた。これらの結果から、ミセル溶液を用いた固定化法は通常の固定化法と同程度に固定化することが可能であることがわかった。

⑦天然由来糖鎖の糖鎖プローブ化の検討

末端をアミノ基としたE 6 B D Bを用いることで、天然の糖タンパク質や糖脂質から酵素法により切り出した遊離糖鎖を還元アミノ化反応によってE 6 B D B型の糖鎖プローブに誘導できると考えた。また、イミデート法によって天然由来糖鎖のプローブ化を行う目的で、遊離糖鎖の完全アセチル化の検討も行った。これらは、化学合成では困難な大きな糖鎖を持つ新たな糖鎖プローブの作成法として有用であると考えた。

還元アミノ化反応の検討として、末端をアミノ基としたE 6 B D Bを酢酸緩衝液に分散させ、ミセル溶液を調製した後、ラクトースを加えて6 0℃で攪拌した。還元剤としてN a B H₃ C Nを加えて、さらに6 0℃で攪拌した。反応終了後、反応溶液をH P L Cにより解析し、L a c - E 6 B D Bの生成を確認した。

天然型糖鎖の切り出しと還元アミノ化反応による導入の検討としては、市販のラクトシルセラミドから酵素法によりラクトースを遊離させE 6 B D Bに導入することを試みた。市販のラクトシルセラミドを酢酸緩衝液に溶解させ、リコンビナントエンドグリコセラミダーゼI I (r E G C a s e I I) 溶液を加えて、3 7℃で2 0時間インキュベートした後、溶媒を留去した。末端をアミノ基としたE 6 B D Bを酢酸緩衝液に分散させ、ミセル溶液を調製した後、酵素反応粗生成物を加えて6 0℃で攪拌した。さらに、還元剤としてN a B H₃ C Nを加えて6 0℃で攪拌した。反応終了後、反応溶液をH P L Cにより解析し、L a c - E 6 B D Bの生成が確認できたことから、天然由来糖鎖を糖鎖プローブへ誘導することに成功した。

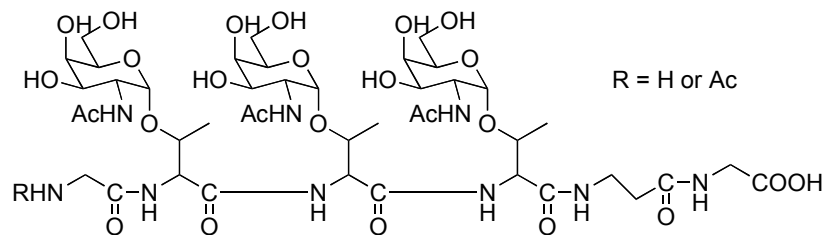
⑧T n抗原結合糖ペプチドの合成

T n抗原 (α - G a l N A c) 特異的単クローン抗体M L S 1 2 8により大腸がんの増殖が抑えられることが東海大グループで確認された (Morita et al. in press)

ことから、抗体療法につながるMLS128様ヒト型単鎖抗体の作成を目指した。Tn抗原は、過去の報告例 (Osinaga et al. *FEBS Letters*, (2000) 469, 24-28) や東海大学の実験結果から単糖では抗原として機能しにくく、少なくとも3個程度の α -GalNAcが近傍に存在する構造が必要であることがわかった。そこで、ペプチド鎖自体に強い抗原性が現れないように設計し、特定の電荷を持たないアミノ酸から成る6残基のペプチド鎖 (Gly-Thr-Thr-Thr- β Ala-Gly) を選択した。そのうちのThr残基にはそれぞれ α -GalNAcが結合した糖アミノ酸を使用し、3連続した α -GalNAcを持つ構造の糖ペプチドの合成を行った。合成はFmoc固相合成法により行い、使用目的により使い分けが可能となるようにN末端遊離型、N末端Ac保護型の2種類を合成した。化合物の生成はHPLCで行い、パニング用の糖鎖プローブとして提供した。

さらに、東海大学の研究結果から、この3連続した α -GalNAcを持つ構造の糖ペプチドは抗体クローンを取得することが可能であることがわかった為、抗原が特異的であることを確認する為の糖鎖プローブの合成を検討した。コントロールとして上記糖ペプチドと同配列の糖鎖を持たないペプチド鎖を合成するとともに、Thr残基に結合した α -GalNAcの数を2個に減らした糖ペプチドのN末端遊離型、N末端Ac保護型の2種類を同様の手法で合成した。

図 13



Tn抗原糖ペプチド

(2)研究成果の今後期待される効果

糖脂質型およびビオチン型の糖鎖プローブは、非特異的相互作用の低減と適度な揺動性を持つ構造に設計したものであるため、本研究の単鎖抗体取得のためだけでなく、糖鎖解析や糖鎖取得のための一般的なツールとなり得るものである。すでに合成済みの単糖および抗原性糖鎖を持つプローブも、上記の用途として使用可能である。また、糖鎖部分を他の生理活性化合物に置き換えることにより、さらなる汎用性が期待される。

ミセル溶液を使用した固定化方法は、プラスチック製のプレートなどでは使用可能な溶媒が制限されるため、溶媒を使用せずに固定化する方法として有用である。

糖鎖プローブの末端をアミノ基にすることで、還元アミノ化反応を利用した糖鎖プローブの合成が可能となり、ラクトシルセラミドから酵素法で切り出したラクトースを導入することが可能となった。このことから、酵素法により天然の糖タンパク質や糖脂質から切り出した糖鎖を持つ糖鎖プローブの調製が簡便にできるものと考えられる。

糖ペプチドを抗原性糖鎖として使用する手法は、ペプチド部分の疎水性を利用して固定化できることに加え、今回のTn抗原を持つペプチドのように、容易に糖鎖密度をコントロールすることが可能になるため、任意の種類と数の糖鎖を持つ化合物を作ることが可能となる。

§4 研究参加者

① 「東海大」グループ(糖鎖特異的単鎖抗体の発現・特異性・親和性の解析の研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	山口 陽子	東海大学 工・生命化学	教授	研究の総括・連携	H15.10～H21.3
	中田 宗宏	工・生命化学	教授	ファージ・単鎖抗体の解析	H15.10～H21.3
	浅沼 秀樹	工・生命化学	准教授	ファージライブラリーの作成	H15.10～H21.3
*	清水 佳隆	糖鎖工学研 究施設	CREST 研 究員	人工糖脂質ライブラリーの構築	H15.10～H18.3
*	酒井 恵子	糖鎖工学研 究施設 工・生命化学	CREST 技 術員 博士研究 員	糖鎖特異的単鎖抗体の調製	H15.10～H18.3 H18.4～H21.3
	森園 徹	工業化学系・ 院	院生	ファージライブラリーの作成	H16.1～H17.3
	鈴木 健吾	工業化学系・ 院	院生	糖鎖特異的単鎖抗体の調製	H15.10～H18.3
*	矢島 由紀子	糖鎖工学研 究施設 工・生命化学	研究支援 者	糖鎖特異的単鎖抗体の調製 Anti-Tn 抗原の抗がん作用機構	H16.4～H17.3 H19.4～H21.3
	宮越 隆史	工業化学系・ 院	院生	ファージライブラリーの作成	H16.4～H16.8
	神崎 博史	工業化学系・ 院	院生	ファージライブラリーの作成	H16.4～H16.8
	木村 美代	工・生命化学	学生	糖鎖特異的単鎖抗体の調製	H16.4～H17.3
*	大谷 昌弘	工・生命化学	院生	糖鎖特異的単鎖抗体の調製	H16.4～H19.3
*	千葉 朋希	工・生命化学	学生・院	糖鎖特異的単鎖抗体の調製	H16.4～H18.3

			生	製	
	鈴木 八潮	工・生命化学	学生	ファージ・単鎖抗体の解析	H16.9～H18.3
	藤野 侑子	工・生命化学	学生	糖鎖特異的単鎖抗体の調 製	H16.9～H17.3
*	堀江 仁一郎	工・生命化学	学生・院 生	糖鎖特異的単鎖抗体の調 製	H16.9～H20.3
	内山 智代枝	工・生命化学	学生	糖鎖特異的単鎖抗体の調 製	H16.9～H17.3
*	草田 融	工・生命化学	学生・院 生	単鎖抗体の発現・解析	H16.9～H20.3
*	Wei Zhang	工・生命化学	CREST 研 究員	単鎖抗体の発現・解析	H16.12～ H18.12
	高崎 綾乃	糖鎖工学研 究施設	研究支援 者 博士研究 員(RPD)	ファージ・単鎖抗体の解析 単鎖抗体の発現・解析	H17.1～H20.3 H20.4～H21.3
*	瀬崎 真理子	工・生命化学	CREST 研 究補助員	糖鎖特異的単鎖抗体の調 製	H17.4～H21.3
	古井 義博	工・生命化学	院生	糖鎖特異的単鎖抗体の調 製・発現・精製	H17.4～H19.3
	坂上 広行	工・生命化学	学生・院 生	単鎖抗体の発現・解析	H17.9～H20.3
	八木 洋介	工・生命化学	学生	単鎖抗体の発現・解析	H17.9～H18.3
	山下 香菜子	工・生命化学	学生	糖鎖特異的単鎖抗体の調 製	H17.9～H18.9
	佐藤 秀摩	工・生命化学	学生・院 生	ファージライブラリーの作 成	H17.9～H21.3
*	後藤 友尋	工・生命化学	学生・院 生	糖鎖特異的単鎖抗体の調 製	H18.4～H21.3
	杉山 豪海	工・生命化学	学生・院 生	糖鎖特異的単鎖抗体の調 製	H18.4～H21.3

*	湯浅 徳行	工・生命化学	博士研究員 研究支援員 〔就職後〕	糖鎖特異的単鎖抗体の調製	H18.6～H20.9 H20.9～H21.3
	星野 郁子	工・生命化学	学生	単鎖抗体の発現・解析	H18.9～H19.9
	鈴木 基祐	工・生命化学	学生	単鎖抗体の発現・解析	H18.9～H20.3
*	倭文 敏行	工業化学系・院	M2	糖鎖特異的単鎖抗体の調製	H18.10～H19.3
	日向寺 祥子	東海大学総合情報センター	講師	単鎖抗体と糖鎖の結合の分子軌道法による解析	H19.4～H21.3
	河島 正倫	工・生命化学	学生	単鎖抗体の発現・解析	H19.4～H19.9
*	塚本 和浩	工・生命化学	学生・院生	糖鎖特異的単鎖抗体の調製	H19.4～H21.3
	森田 典行	工業化学系・院	M2	Anti-Tn 抗原の抗がん作用機構	H19.4～H20.3
	沼崎 麻希	工・生命化学	学生	Anti-Tn 抗原の抗がん作用機構	H19.4～H20.3
*	浅野 裕輝	工・生命化学	学生	Anti-Tn 抗原の抗がん作用機構	H19.4～H21.3
	木崎安紀子	工・生命化学	学生	糖鎖特異的単鎖抗体の調製	H19.9～H21.3
	春日部 将	工・生命化学	学生	Anti-Tn 抗原の抗がん作用機構	H19.9～H20.9
	熊倉 資	工・生命化学	学生	単鎖抗体の発現・解析	H19.9～H20.9
	澄田 紗弓	工・生命化学	学生	単鎖抗体の発現・解析	H19.9～H21.3
	和泉 遥	工・生命化学	学生	単鎖抗体と糖鎖の結合の分子軌道法による解析	H19.9～H21.3
	泉 翔子	工・生命化学	学生	単鎖抗体の発現・解析	H19.9～H20.9

② 「慶應大」グループ(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・ガングリオシドに対する単鎖抗体の単離の研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	高柳 淳	慶應義塾大学・医学部	講師	ヒト単鎖抗体ファージライブラリーの作成・改良 糖鎖特異的単鎖抗体の調製	H15.10～H21.3
	古橋 ミエ	慶應義塾大学	特別研究員	ヒト単鎖抗体ファージライブラリーの作成・改良 糖鎖特異的単鎖抗体の調製	H18.4～H19.12
	張 嘉倫	慶應義塾大学	大学院生	細胞表面糖タンパク特異的単鎖抗体の調製	H19.4～H20.3
	伊藤 慶	慶應義塾大学	大学院生	糖鎖特異的単鎖抗体の調製	H17.4～H19.2
*	森川 あゆみ	東京都立板橋看護専門学校	学生	器具洗浄滅菌・PCR・試薬調製	H17.4～H18.5
*	正岡 亜紀	東京都立板橋看護専門学校	学生	器具洗浄滅菌・PCR・試薬調製	H17.4～H18.5
*	三上 智子	東京都立板橋看護専門学校	学生	器具洗浄滅菌・PCR・試薬調製	H17.4～H18.5
*	小出 明日香	東京都立板橋看護専門学校	学生	器具洗浄滅菌・PCR・試薬調製	H17.8～H18.5
*	田中 麻衣子	東京テクニカルカレッジ専門学校	学生	器具洗浄滅菌・PCR・試薬調製	H18.6～H19.3
*	中村 直	東京テクニカルカレッジ専門学校	学生	器具洗浄滅菌・PCR・試薬調製	H18.6～H19.3
*	只木 真衣	東京テクニカルカレッジ専門学校	学生	器具洗浄滅菌・PCR・試薬調製	H18.6～H19.3
*	浦野 未希	東京テクニカルカレッジ専門学校	学生	器具洗浄滅菌・PCR・試薬調製	H18.6～H18.12
	讃岐 奈緒子	慶應義塾大学	非常勤職員	ヒト単鎖抗体ファージライブラリーの作成・改良	H19.4-H19.12
	小島麻紗子	東京テクニカルカレッジ専門学校	学生	器具洗浄滅菌・PCR・試薬調製	H19.4～H19.12

③ 「野口研」グループ(抗体ライブラリー取得の為の糖鎖プローブの合成および改良の研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	川上 宏子	(財)野口研究所	研究員	糖鎖プローブの設計、合成	H15.10～H20.9
*	佐藤玲子	(財)野口研究所	CREST 技術員 研究員	糖鎖プローブの設計、合成、評価	H15.10～H20.3 H20.3～H20.9
	戸潤一孔	(財)野口研究所	主任研究員	糖鎖プローブの構造設計	H15.10～H18.9
	吉野 慶	東海大学	院生	糖鎖プローブの合成	H16.4～H18.3

§ 5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Anna Wu, Ph.D. UCLA, Associate Prof.	抗体工学のセミナーを2回開催 東海大学・慶応大学	東京	H16.10.2～11.3
山崎シゲ子 NIH、客員研究員	大腸菌で発現された単鎖抗体の精製	秦野	H19.5.13～7.1 H21.1.17～1.24

§ 6 成果発表等

- (1) 原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 8件)

主論文

1. Yoshitomi, T, Yabuki, S., Kawakami, H, Sato, R, Toma, K, Furuhata, M and Maitani, Y. The Structure of Artificial Lipids Possessing Oligo(ethylene glycol) and Their Behavior in Water. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspect* 284-285, 276-283 (2006)
2. Sakai, K., Shimizu, Y., Chiba, T., Matsumoto-Takasaki, A., Kusada, Y., Zhang, W., Nakata, M., Kojima, N., Toma, K., Takayanagi, A., Shimizu, N., and Fujita-Yamaguchi, Y. Isolation and characterization of phage-displayed single chain antibodies recognizing non-reducing terminal mannose residues. 1. A new strategy for generation of anti-carbohydrate antibodies. *Biochemistry* 46, 253-262, 2007.
3. Zhang, W., Matsumoto-Takasaki, A., Kusada, Y., Sakaue, H., Sakai, K., Nakata, M., and Fujita-Yamaguchi, Y. Isolation and characterization of phage-displayed single chain antibodies recognizing non-reducing terminal mannose residues. 2. Expression, purification, and characterization of recombinant single chain antibodies. *Biochemistry* 46, 263-270, 2007.
4. Yuasa, N., Iida, N., Sakaue, H., Wilczynski, S., and Fujita-Yamaguchi, Y. (2007) Construction of a recombinant single chain antibody recognizing nonreducing terminal mannose residues applicable to immunohistochemistry. *BioScience Trends*. 1: 108-112.
5. Kusada, Y., Morizono, T., Matsumoto-Takasaki, A., Sakai, K., Sato, S., Asanuma, H.,

Takayanagi, A. and Fujita-Yamaguchi, Y. (2008) Construction and characterization of single-chain antibodies against human insulin-like growth factor-I receptor from hybridomas producing 1H7 or 3B7 monoclonal antibody. *J. Biochem.* 143: 9-19.

6. Asanuma, H., Matsumoto-Takasaki, A., Suzuki, Y., Tamura, S., Sata, S., Kusada, Y., Matsushita, M., and Fujita-Yamaguchi, Y. (2008) Influenza PR8 HA-specific Fab fragments produced by phage display methods. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366; 445-449.
7. Matsumoto-Takasaki, A., Kaneko, M., Miyawaki, S., Sato, R., Kawakami, H., Matsushita, M., Fujita-Yamaguchi, Y., and Nakata, M. (2008) Neoglycolipids as carbohydrate probes for pathogen biology. *J Pathogen Biol*, 3, 538-542.
8. Morita, N., Yajima, Y., Asanuma, H., Nakada, H., and Fujita-Yamaguchi, Y. Cancer cell growth inhibition by anti-Tn monoclonal antibody MLS128 (2009) *BioScience Trends* (in press).

関連論文

1. Suzuki M, Takayanagi A, and Shimizu N. Targeted gene delivery using humanized single-chain antibody with negatively charged oligopeptide tail. *Cancer Sci.* 95, 424-429 (2004)

(2)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 1件、国際会議 1件)

1. 山口陽子(東海大) 糖鎖構造特異的単鎖抗体ライブラリーの構築、第3回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム、12月6-7日東京コンファレンスセンター (2005)
2. Fujita-Yamaguchi, Y., Morita, N., Nakada, H., Yajima, Y., Numazaki, M., and Ohtani, M. Antibodies causing the IGF-I receptor signaling inhibition as potential cancer therapeutics. 13th World Congress on Advances in Oncology, Oct. 9-11, Crete, Greece (2008)

② 口頭発表 (国内会議 9件、国際会議 0件)

1. Chiba, T, Satoh, N, Shimizu, Y, Fujita-Yamaguchi, Y, Matsushita, M, Fujita, T, and Nakata, M (東海大・福医大): Application of neoglycolipids to surface plasmon resonance characterization of lectin-carbohydrate interactions. 第77回日本生化学会(横浜)2004年10月13~16日.
2. 吉野慶、佐藤玲子、戸潤一孔、(野口研、東海大工、CREST/JST)、水溶性糖鎖プローブの合成と評価、第85回化学会春季年会(2005年3月26-29日、横浜)
3. 高柳 淳、張 嘉倫、清水 信義(慶應大);ファージ提示型ヒト型一本鎖抗体ライブラリの改良、第12回日本遺伝子診療学会、松本、Abst. p.34 (Aug. 2005) 8/5-8/6
4. 張 嘉倫、高柳 淳、清水 信義(慶應大);ヒト抗体ライブラリを用いた細胞表面特異抗体の単離、第12回日本遺伝子診療学会、松本、Abst. p.35 (Aug. 2005) 8/5-8/6
5. 高柳 淳、張 嘉倫、清水 信義、アルカリ・有機溶媒耐性ヘルパーファージによるヒト型一本鎖抗体ライブラリの改良、第13回日本遺伝子診療学会、東京、7/28-29・07
6. 高柳 淳、張 嘉倫、清水 信義(慶應義塾大学医学部)、モノクローナル抗体をガイド分子としたエピトープの異なる組換え抗体のスクリーニング、第65回日本癌学会学術総会、横浜、9/28-30/07

7. 草田融、関根寛子、藤田侑子、高柳淳、清水信義、山口陽子(東海大・工・生命化学、東海大・糖鎖工学、慶大・医・分子生物) がん細胞に発現するインスリン受容体 A 型特異的単鎖抗体の調製、第 11 回がん分子標的治療研究会学術総会、大阪、2007年 7 月 5 日
8. 高柳淳、清水信義(慶大・医・分子生物、慶大・先導研 GSP) フェージ提示型抗体ライブラリを高性能化する新規発現ベクターの開発、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、横浜、2007年 12 月 11 日
9. 坂上広行、湯浅徳行、草田融、高崎(松本)綾乃、ジャン ウェイ、酒井恵子、高柳淳、中田宗宏、山口(藤田)陽子 (東海大・工・生命化学、東海大・糖鎖工学、慶大・医・分子生物) 抗 LNFPⅢ_{scFv}-Fc 抗体の発現と精製、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、横浜、2007 年 12 月 11 日

③ ポスター発表 (国内会議 36 件、国際会議 17 件)

国内会議

1. 奥井 理予、高柳 淳、清水信義(慶應大):ヒト型一本鎖抗体ライブラリの作製とペプチド抗原によるスクリーニング、第11回日本遺伝子診療学会大会、9/17-18/2004 東京
2. 鈴木 正崇、高柳 淳、清水信義(慶應大):組換えイムノジーン法:腫瘍特異的遺伝子導入法の開発、第11回日本遺伝子診療学会大会、9/17-18/2004 東京
3. 高柳 淳、鈴木正崇、清水信義(慶應大):正電荷性23アミノ酸テイルを用いた組換えイムノジーン法、第63回日本癌学会総会、9/29-10/1/2004 福岡
4. 川上宏子、戸澗一孔(野口研、CREST/JST)、Mini-lectin can be different from original protein in carbohydrate selectivity、第77回生化学会(2004年10月13-16日、横浜)
5. 高柳淳、奥井理予、戸澗一孔、山口(藤田)陽子、清水信義(1 慶應大・医・分子生物、2CREST/JST、3 野口研、4 東海大・糖鎖工学研)、Screening of anti-ganglioside antibodies using the original human scFv-antibody library、第77回生化学会(2004年10月13-16日、横浜)
6. 清水佳隆、酒井恵子、千葉朋希、高崎(松本)綾乃、中田宗宏、高柳淳、清水信義、山口(藤田)陽子(東海大・慶應大) マンノース残基結合性フェージ提示型単鎖抗体の作製 第25回日本糖質学会、2005年7月20-22日、大津
7. 高柳淳、清水佳隆、戸澗一孔、山口陽子、清水信義、(慶應大・医・分子生物、CREST/JST、野口研、東海大・糖鎖工学研)抗体ライブラリの改良と抗ガングリオシド抗体のスクリーニング(ポスター)、第25回日本糖質学会(2005年7月20-22日、大津)
8. 佐藤玲子、吉野慶、戸澗一孔(野口研究所、CREST/JST、東海大学)、SPRを用いた各種糖鎖プローブの比較、第25回日本糖質学会(2005年7月20-22日、大津)
9. 川上宏子、戸澗一孔(野口研究所、CREST/JST)、ミニレクチンによるガラクトースとマンノースの識別(ポスター)、第25回日本糖質学会(2005年7月20-22日、大津)
10. 高柳 淳、張 嘉倫、清水 信義(慶應大);ヒト型一本鎖抗体ライブラリの改良とがん細胞表面抗原を認識する抗体の新規スクリーニング法の開発、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、

Abst. p405. (Sep. 2005) 9/14-16

11. 佐藤玲子、吉野慶、戸潤一孔(野口研究所、CREST/JST) 糖鎖プローブの構造と非特異的相互作用 第78回日本生化学会大会、2005年10月19-22日、神戸
12. 千葉朋希、酒井恵子、清水佳隆、高崎(松本)綾乃、中田宗宏、高柳淳、清水信義、山口(藤田)陽子(東海大学、慶應大学、CREST/JST) マンノース残基結合性フェージ提示型単鎖抗体の特異性解析. 第78回日本生化学会大会、2005年10月19-22日、神戸
13. 戸潤一孔、川上宏子(野口研究所、CREST/JST) マンノース認識ミニレクチンの設計と合成、第42回ペプチド討論会(2005年10月27-29日、大阪)
14. 高柳 淳、張 嘉倫、清水 信義(慶應大); フェージ提示型抗体ライブラリの高性能化、第28回日本分子生物学会年会、福岡、Abst. p.767 (Dec. 2005) 12/7-10
15. 吉富太一、川上宏子、戸潤一孔、綱島亮、中村貴義、古幡昌彦、米谷芳枝(野口研、東海大、CREST/JST、北大、星薬大) Nanostructure formation of ,4,5-tris(dodecyloxy)benzamide N-substituted with oligo(ethylene glycol) of various length in water、第4回ナノテクノロジー総合シンポジウム(東京、2006年2月20-21日)
16. 吉富太一、川上宏子、戸潤一孔(野口研、東海大、CREST/JST) オリゴエチレングリコールが結合した人工脂質の水中での挙動に対する温度や濃度の影響、日本化学会春季年会(2006年3月27-30日、船橋)
17. 吉富太一、川上宏子、戸潤一孔、綱島亮、中村貴義、古幡昌彦、米谷芳枝(野口研、東海大、CREST/JST、北大、星薬大) オリゴエチレングリコールが結合した3,4,5-トリス(ドデシルオキシ)ベンズアミド誘導体の水中での挙動、日本化学会春季年会(2006年3月27-30日、船橋)
18. 吉野慶、佐藤玲子、戸潤一孔(野口研、東海大、CREST/JST) ミセルを用いる人工糖脂質の固定化法の検討、日本化学会春季年会(2006年3月27-30日、船橋)
19. 酒井恵子、Zhang Wei、草田融、坂上広行、高崎(松本)綾乃、後藤友尋、中田宗宏、高柳淳、山口(藤田)陽子(東海大学工学部、JST CREST、東海大・糖鎖工学、4.慶應大学医学部) 第26回日本糖質学会年会(2006年8月23-25日、仙台) 糖鎖特異的単鎖抗体(scFv)の scFv-Fc 型としての発現・精製と特異性の解析
20. 戸潤一孔、川上宏子(野口研究所、CREST/JST) ミニレクチン候補フラグメントの Protein Data Bank 探索、第26回日本糖質学会年会(2006年8月23-25日、仙台)
21. 吉野慶、佐藤玲子、戸潤一孔(野口研究所、東海大学工学部、CREST/JST) ミセル溶液を用いた糖鎖プローブのディッシュへの固定化、第26回日本糖質学会年会(2006年8月23-25日、仙台)
22. 吉野慶、佐藤玲子、戸潤一孔(野口研究所、東海大工、CREST/JST) 水溶液中での還元アミノ化による人工脂質の合成(ポスター)、日本化学会第87回春季年会(2007年3月25-28日、大阪)
23. 杉山豪海、湯浅徳行、草田融、高崎(松本)綾乃、酒井恵子、高柳淳、中田宗宏、山口(藤田)陽子(東海大・工・生命化学、JST CREST、東海大・糖鎖工学、慶大・医・分子生物) マ

ンノース残基に結合する GST 融合単鎖抗体の発現と精製、日本糖質学会第 27 回年会、
2007 年 8 月 1～3 日

24. Sugiyama, T, Yuasa, N., Kusuda, Y, Takasaki(Matsumoto), A., Sakai, K, Takayanagi, A., Nakata, M., and Yamaguchi(Fujita), Y (Tokai Univ. Sch.Eng., JST Crest, Inst. Glycotech., Tokai Univ, ⁴Keio Univ. Sch.Med.) Expression and Purification of mannose-Binding GST-fused scFv, 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、横浜、2007 年 12 月 11～15 日
25. 張嘉倫、高柳淳、清水信義(慶大・医・分子生物、JST CREST、慶大・先導研 GSP セ)、ストレプトアビジン結合性新規ペプチドを用いた培地からの組換え抗体精製法、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、横浜、2007 年 12 月 11～15 日
26. 高崎(松本)綾乃、酒井恵子、堀江仁一郎、古井義博、山崎シゲ子、草田融、高柳淳、清水信義、佐藤玲子、川上宏子、戸潤一孔、中田宗宏、山口(藤田)陽子(東海大・工・生命化学、JST CREST、東海大・糖鎖工学、慶大・医・分子生物、(財)野口研)、T-抗原特異的単鎖抗体の単離・発現・精製とその特異性解析、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、横浜、2007 年 12 月 11～15 日
27. 堀江仁一郎、酒井恵子、佐藤玲子、川上宏子、戸潤一孔、高柳淳、中田博、浅沼秀樹、山口(藤田)陽子(東海大・工・生命化学、JST CREST、東海大・糖鎖工学、(財)野口研、慶大・医・分子生物、京都産業大・工・生物工学)、ムチン型糖鎖抗原に対する単鎖抗体の調製とその性質、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、横浜、2007 年 12 月 11～15 日
28. 日向寺(合田)祥子、草田融、山口(藤田)陽子(東海大・総合情報センター、JST CREST、東海大・工・生命化学) Structure modeling and ligand-docking simulation of anti-mannotriose (M3) single-chain antibodies (scFvs)、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、横浜、2007 年 12 月 11 日～15 日
29. 後藤友尋、山崎シゲ子、高崎(松本)綾乃、湯浅徳行、山口(藤田)陽子(東海大・工・生命化学、JST CREST、東海大・糖鎖工学) 抗マンノトリオース(M3)単鎖抗体(scFv)の封入体からのリフォールディング、第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、横浜、2007 年 12 月 11 日～15 日
30. 高柳淳 (高柳淳) フェージ提示型抗体ライブラリを用いた抗ガングリオンド抗体の単離、日本糖質学会第 27 回年会、2008 年 8 月 20-22 日
31. 高崎(松本)綾乃、酒井恵子、湯浅徳行、堀江仁一郎、高柳淳、中田宗宏、佐藤玲子、川上宏子、戸潤一孔、山口(藤田)陽子(東海大・工・生命化学、JST CREST、東海大・糖鎖工学、慶大・医・分子生物、(財)野口研)、抗 T-抗原単鎖抗体の作製とその親和性の解析、日本糖質学会第 27 回年会、2008 年 8 月 20-22 日
32. 日向寺(合田)祥子、和泉遥、日下部哲弘、草田融、山口(藤田)陽子(東海大・総合情報センター、JST CREST、東海大・工・生命化学) Tn 抗原特異的単クローン抗体 MLS128 と 83D4 由来単鎖抗体の分子モデリング、日本糖質学会第 27 回年会、2008 年 8 月 20-22 日
33. 酒井恵子、塚本和浩、高崎(松本)綾乃、佐藤玲子、川上宏子、水野真盛、高柳淳、山口(藤田)陽子(東海大学・工・生命化学、JST CREST、東海大・糖鎖科学研、(財)野口研、

慶應大・医・分子生物) Tn 抗原クラスター(Tn3) 特異的ヒト型単鎖抗体の調製と性質、日本糖質学会第 27 回年会、2008 年 8 月 20-22 日

34. 後藤 友尋、湯浅 徳行、泉 翔子、ジャン ウェイ、酒井 恵子、高柳淳、山口(藤田) 陽子 (東海大学・工・生命化学、JST CREST、東海大・糖鎖科学研、慶應大・医・分子生物) 動物培養細胞を用いた各種糖鎖特異的(Mannotriose/ Le^x) scFv-Fc 型抗体の発現と細胞内局在性の解析 日本糖質学会第 27 回年会、2008 年 8 月 20-22 日
35. 佐藤玲子、川上宏子、高崎(松本)綾乃、山口(藤田)陽子、水野真盛(東海大・工・生命化学、JST CREST、東海大・糖鎖科学研、(財)野口研究所、慶應大・医・分子生物)、抗体スクリーニングのための Tn 抗原糖ペプチドの合成、日本糖質学会第 27 回年会、2008 年 8 月 20-22 日
36. 塚本和浩、酒井恵子、木崎安紀子、湯浅 徳行、高崎(松本)綾乃、浅沼秀樹、佐藤玲子、川上宏子、水野真盛、高柳淳、中田博、山口(藤田)陽子 (東海大・工・生命化学、JST CREST、東海大・糖鎖科学研、(財)野口研究所、慶應大・医・分子生物)、糖質学会第 27 回年会、2008 年 8 月 20-22 日

国際会議

1. Chiba T, Sakai K, Nakata M, Takayanagi A, and Fujita-Yamaguchi Y (Dept. Applied Biochem., Tokai Univ.; CREST JST; Inst. Glycotech., Tokai Univ.; Dept. Mol. Biol., Keio Univ. Sch. Med.) Neoglycolipid macroarray to characterize specificity of phage-displaying antibodies against carbohydrate antigens. US/Japan Glyco 2004. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. Nov 17-20, 2004, Honolulu, Hawaii.
2. Kimura M, Sakai K Shimizu Y, Chiba T, Nakata M, Takayanagi A, Shimizu N, and Fujita-Yamaguchi Y. (Dept. Applied Biochem., Tokai Univ.; CREST JST; Inst. Glycotech., Tokai Univ.; 4. Dept. Mol. Biol., Keio Univ. Sch. Med.) Screening of single chain antibodies (scFvs) against a variety of carbohydrate moieties. US/Japan Glyco 2004. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. Nov. 17-20, 2004, Honolulu, Hawaii.
3. 佐藤玲子、川上宏子、戸澗一孔(The Noguchi Institute, CREST/JST) Novel Artificial Lipid for the Construction of Neoglycolipid Probes、日米合同糖質学会(2004年11月17-21日、ホノルル)
4. 川上宏子、戸澗一孔(The Noguchi Institute, CREST/JST) Synthesis of mini-lectins and their carbohydrate selectivity、日米合同糖質学会(2004年11月17-21日、ホノルル)
5. 吉富太一、矢吹佐和貴、川上宏子、佐藤玲子、戸澗一孔、古幡昌彦、米谷芳枝 (野口研、東海大、CREST/JST、星薬大)、The structure of artificial lipids possessing oligo-(ethylene glycol) and their behavior in water. The 11th International Conference on Organized Molecular Films(2005年6月26-30日、札幌)
6. Sakai, K., Chiba, T., Ohtani, M., Horie, J., Shimizu, Y, Takasaki-Matsumoto, A., Nakata, M., Takayanagi, A., Shimizu, N, Sato, R., Kawakami, H., Toma, K., Fujita-Yamaguchi, Y., (Inst. Glycotech., Tokai Univ., CREST/JST, Dept. Appl. Biochem., Tokai Univ., Dept. Mol. Biol., Keio Univ., Sch. Med, The Noguchi Institute) Characterization of single chain

antibodies (scFvs) against various types of carbohydrate epitopes、第18回国際複合糖質シンポジウム (2005年9月4-9日、フローレンス)

7. Takayanagi,A. and Shimizu,N. (慶應大学)、Significant improvements of phage display library of human scFv antibody、Antibody Engineering Conference , Kagoshima, 6/16-17(2006)
8. Wei Zhang, Yu Kusada, Hiroyuki Sakaue, Keiko Sakai, Ayano Takasaki-Matsumoto, Atsushi Takayanagi, Nobuyoshi Shimizu, and Yoko Fujita-Yamaguchi (Dept. Applied Biochem., Tokai Univ.; CREST JST; Inst. Glycotech., Tokai Univ.; Dept. Mol. Biol., Keio Univ. Sch. Med.) Production of human antibodies against a variety of carbohydrate epitopes. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, 6/18-23(2006)
9. Yoshino, K., Sato, R., Toma, K.(野口研究所、東海大学工学部、CREST/JST) Micelle formation and immobilization of neoglycolipids and their interaction with proteins, The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (6/18-23/2006, Kyoto)
10. Takayanagi, A., Sato, R., Shimizu, Y., Toma, K., Yamaguchi, Y., Shimizu, N. (Dept. Mol. Biol. Sch. Med., Keio Univ., CREST/JST, The Noguchi Institute, Inst. Glycotech., Tokai Univ.) Screening of anti-ganglioside antibodies using the original phage-display library of human scFv antibody, The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (6/18-23/2006, Kyoto)
11. Kaneko, M., Sato, R., Chiba, T., Nakata, M., Fujita-Yamaguchi, Y., Toma, K.(Department of Applied Biochemistry, Tokai University, The Noguchi Institute, CREST/JST), Availability of neoglycolipids with different linkers for lectin-carbohydrate interaction analysis, The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (6/18-23/2006, Kyoto)
12. Ito, K., Takayanagi, A. and Shimizu, N. (慶應大学)、 Periplasmic Chaperonins and Disulfide Isomerases Enhance Production of ScFv Antibody in Soluble Form, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, 6/18-23(2006)
13. Toma, K., Yoshino, K., Yoshitomi, T., Sato, R., Kawakami, H.(The Noguchi Institute, CREST/JST), Micelle formation of neoglycolipids possessing oligo(ethylene glycol) linker between carbohydrate and lipid portion, The 23rd International Carbohydrate Symposium (7/23-28/2006, Whistler, Canada)
14. Kusada, Y. , Sekine, K., Sato, S., Asanuma, H., Takayanagi, A. , Shimizu, N., and Fujita-Yamaguchi, Y.(Tokai Univ. Sch. Eng., JST CREST , Keio Univ. Sch.Med.) (2007) Comparison of monoclonal antibodies against human IGF-I receptor prepared from mice to those prepared by phage-display technology *in vitro*. WIRC, Davos, Switzerland, April. 11-14.
15. Horie, J., Sakai, K., Matsumoto-Takasaki, A., Furui, Y., Kusada, Y., Nakata, M., Takayanagi, A., Shimizu, N., Sato, R., Kawakami, H., Toma, K., Fujita-Yamaguchi, Y.

(Tokai Univ. Sch. Eng., JST CREST, Inst. Glycotech., Tokai Univ., Keio Univ. Sch. Med. Noguchi Inst.) (2007) Isolation and characterization of single chain antibodies against T-antigen from a phage display library. "GLYCO 19" XIX International Symposium on Glycoconjugates, Cairns, Australia, July 15-20

16. Morita, N., Yajima, Y., Nakada, M., and Fujita-Yamaguchi, Y. (Tokai Univ. Sch. Eng., JST CREST, Inst. Glycotech., Tokai Univ., Faculty of Eng., Kyoto Sangyo Univ.) (2007) Effects of an anti-GalNAc α -Ser(Thr) (anti-Tn) monoclonal antibody, MLS 128, on human colon cancer LS180 cell lines. Glyco 19, Cairns, Australia, July 15-20.

17. Kusada, Y., Matsumoto-Takasaki, A., Asanuma, H., and Fujita-Yamaguchi, Y. (2007) (Tokai Univ. Sch. Eng., JST CREST, Inst. Glycotech., Tokai Univ.) Construction and characterization of single-chain antibodies against insulin-like growth factor-I receptor from hybridomas producing 1H7 or 3B7 monoclonal antibody. Antibodies-Europe. Vienna, Austria. Nov. 7-8.

(3)特許出願

①国内出願 (10 件)

1. (名称) 糖鎖構造に特異的な抗体の同定方法 (発明者) 山口陽子、小島直也、中田宗宏、酒井恵子、清水佳隆、千葉朋希、木村美代、清水信義、高柳淳 (出願人) 学校法人 東海大学、学校法人 慶応義塾 (出願日) 平成 16 年 8 月 24 日 (出願番号) 特願 2004-243198 公開 2006-58260

2. (名称) 糖結合性フェージ提示抗体の解析方法 (発明者) 中田宗宏、山口陽子、酒井恵子、清水佳隆、千葉朋希、清水信義、高柳淳 (出願人) 学校法人 東海大学、学校法人 慶応義塾 (出願日) 平成 16 年 8 月 24 日 (出願番号) 特願 2004-243199 公開 2006-55141

3. (名称) 水溶性糖鎖プローブ、(発明者) 佐藤玲子、戸潤一孔、(出願人) 野口研究所、科学技術振興機構、(出願日) 平成 17 年 2 月 9 日出願、(出願番号) 特願 2005-33012

4. (名称) 低非特異相互作用糖鎖プローブ、(発明者) 佐藤玲子、戸潤一孔、(出願人) 野口研究所、科学技術振興機構、(出願日) 平成 17 年 5 月 31 日出願、(出願番号) 特願 2006-159038

5. (名称) 糖鎖結合物質の精製法、(発明者) 佐藤玲子、戸潤一孔、(出願人) 野口研究所、科学技術振興機構、(出願日) 平成 18 年 3 月 7 日出願、(出願番号) 特願 2006-061921

6. (名称) 非還元マンノース残基を認識するフェージ提示型単鎖抗体 (発明者) 山口陽子、中田宗宏、酒井恵子、清水佳隆、高崎綾乃、千葉朋希、草田融、清水信義、高柳淳 (出願人) 学校法人 東海大学、学校法人 慶応義塾 (出願日) 平成 18 年 5 月 17 日 (出願番号) 特願 2006-137604

7. (名称) 糖鎖結合物質の精製法、(発明者) 佐藤玲子、戸潤一孔、(出願人) 野

口研究所、科学技術振興機構、(出願日)平成18年7月20日出願、(出願番号)特願2006-061921

8. (名称) フェージライブラリー由来のT抗原糖鎖を認識する単鎖抗体
(発明者) 山口陽子、酒井恵子、高崎綾乃、中田宗宏、戸潤一孔、佐藤玲子、高柳淳、清水信義 (出願人) 学校法人東海大学、財団法人野口研究所、学校法人慶應義塾 (出願日)平成19年7月13日 (出願番号)2007-184074

関連特許

1. (名称) マンノース認識型低分子レクチン、(発明者) 川上宏子、戸潤一孔、(出願人)野口研究所、(出願日)平成17年7月4日出願、(出願番号)特願2005-195440

2. (名称) ミセル水溶液を用いた人工糖脂質の合成 (発明者) 佐藤玲子、戸潤一孔、(出願人) 野口研究所、代表者 河野満男 (出願日)平成19年2月22日 (出願番号) 特願2007-42458

②海外出願 (1件)

1. (名称) 非還元マンノース残基を認識するフェージ提示型単鎖抗体 (発明者) 山口陽子、中田宗宏、酒井恵子、清水佳隆、高崎綾乃、千葉朋希、草田融、清水信義、高柳淳 (PCT出願番号) PCT/JP2007/060146 (出願人) 学校法人慶應義塾、学校法人東海大学 (出願日) 2007年5月17日

1. Kusada, Y. and Fujita-Yamaguchi, Y. An overview of currently available anti-insulin-like growth factor I receptor antibodies. (2007) *BisScience Trends*. 1:128-133.

2. 高崎(松本)綾乃、山口(藤田)陽子、中田宗宏 人工糖脂質を用いたレクチンの糖鎖結合性測定法 (2008)臨床検査 第52巻 第8号 922-925

3. 山口(藤田)陽子 新規がん診断薬・抗体療法向け装薬を目指した糖鎖特異的抗体の開発 (2008) バイオ医薬の開発技術とシーズ(仮題) in press

§7 研究期間中の主な活動

ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H16年10月23日	第1回戦略会議	野口研	9名	キックオフ
H16年11月13日	第2回戦略会議	東海大学	11名	チーム間打合わせ
H16年10月28日	糖鎖工学研究施設講演会 by Anna Wu, Ph. D.	東海大学17号館第2研修室	約40名	From Proteins to Pharmaceuticals: Antibody Engineering
H16年11月2日	慶應医学会例会 By Anna Wu, Ph. D.	慶應大学総合医科学研1F	約80名	Shedding Light on Cancer: Tailoring Antibodies for Imaging and Therapy of Cancer

H16年1月 22日	第3回戦略会議	慶應大学	11名	チーム間打合わせ
H16年3月9 日	第4回戦略会議	東海大学	13名	チーム間打合わせ
H16年5月 13日	第5回戦略会議	東海大学	12名	チーム間打合わせ
H16年6月 17日	第6回戦略会議	野口研	14名	チーム間打合わせ
H16年7月 15日	第7回戦略会議	東海大学	14名	チーム間打合わせ
H16年9月 21日	第8回戦略会議	東海大学	18名	チーム間打合わせ
H16年11月 2日	第9回戦略会議	慶應大学	14名	チーム間打合わせ
H16年12月 15日	第10回戦略会議	野口研	11名	チーム間打合わせ
H17年1月 21日	第11回戦略会議	東海大学	14名	チーム間打合わせ
H17年3月 10日	第12回戦略会議	慶應大学	17名	チーム間打合わせ
H17年4月 20日	第13回戦略会議	野口研	13名	チーム間打合わせ
H17年5月 31日	第14回戦略会議	東海大学	18名	チーム間打合わせ
H17年7月7 日	第15回戦略会議	慶應大学	15名	チーム間打合わせ
H17年8月 30日	第16回戦略会議	野口研	12名	チーム間打合わせ
H17年9月 29日	第17回戦略会議	東海大学	16名	チーム間打合わせ
H17年11月 1日	第18回戦略会議	慶應大学	16名	チーム間打合わせ
H17年11月 29日	第19回戦略会議	東海大学	17名	チーム間打合わせ
H18年1月 13日	第20回戦略会議	野口研	14名	チーム間打合わせ
H18年2月 23日	第21回戦略会議	東海大学	13名	チーム間打合わせ
H18年3月 16日	第22回戦略会議	慶應大学	11名	チーム間打合わせ
H18年5月 25日	第23回戦略会議	野口研	15名	チーム間打合わせ
H18年7月 18日	第24回戦略会議	東海大学	17名	チーム間打合わせ
H18年9月 14日	第25回戦略会議	東海大学	14名	チーム間打合わせ
H18年11月 9日	第26回戦略会議	慶應大学	15名	チーム間打合わせ

H19年1月 11日	第27回戦略会議	東海大学	14名	チーム間打合わせ
H19年3月 13日	第28回戦略会議	東海大学	15名	チーム間打合わせ
H19年5月 22日	第29回戦略会議	東海大学	18名	チーム間打合わせ
H19年7月 11日	第30回戦略会議	東海大学	14名	チーム間打合わせ
H19年9月2 日	第31回戦略会議	野口研	13名	チーム間打合わせ
H19年11月 22日	第32回戦略会議	東海大学	12名	チーム間打合わせ
H20年1月 17日	第33回戦略会議	野口研	13名	チーム間打合わせ
H20年3月 24日	第34回戦略会議	東海大学	9名	チーム間打合わせ
H20年5月 30日	第35回戦略会議	東海大学	12名	チーム間打合わせ
H20年7月 22日	第36回戦略会議	野口研	12名	チーム間打合わせ
H20年9月 16日	第37回戦略会議	東海大学	18名	チーム間打合わせ 最終回懇親会

§8 結び

我々の、「ファージライブラリーから人工糖脂質を抗原として、糖鎖に結合するヒト型単鎖抗体を得る」というアイデア自体は、誰にでも考えられることであるが、これまでに報告がないという事実は、容易にこの目的を達成できるものではないことを物語っている。中間審査の時にも、述べたが、我々のプロジェクトは予備的なデータは出ていたものの、すでに進んでいる研究の先ではなく、新規の提案であったことから、目標達成の為に種々の困難を乗り越えなければならなかった。提案した手法により糖鎖特異的抗体が取れることを前半で示せたことは、大きな成果であったと考えている。さて、モデル人工糖脂質として使用した Man3 は、N-glycosylation を阻害する為に、哺乳細胞で発現できないクローンが多かったなど、逆に細胞の生存に糖タンパク質の重要性を証明することにもなった。それゆえに Man3 特異的抗体は、これまで生体を免疫してでは得られなかった新規な抗体である。

将来に発展するプロジェクトとして、信州大学医学部の中山淳教授との共同研究(組織染色)、scFv genes の DNA 配列から、CDR のアミノ酸配列を一義的に取得できるという利点を生かし、東海大学総合情報センターの日向寺祥子講師との共同研究(分子モデリング)、理研の山口芳樹グループと共同研究で、5A3-scFv の NMR 解析を展開している。同様に、Tn3 特異的単鎖抗体の糖鎖結合性解析も、理研(NMR)・野口研(糖鎖プローブ合成)・東海大(単鎖抗体調製・分子モデリング)の共同研究として展開の予定である。

本研究実施に当たり、チーム間の結束と、若手へのサポートを最優先した。東海大学・野口研・慶應大学と廻り、戦略会議を月1回(平成18年度からは2月に1回)の割合で開催し、計37回に及ぶ戦略会議を開催した。グループ間での密接な相互交流を図り、物の供給、技術改革、情報交換を行った結果、良い研究環境と人間関係が構築されたと信じている。なお、アメリカ人の専門家の招聘、中国人のポスドク(Wei Zhang)の雇用を通して、英語での presentation をする環境も提供

した。

第37回戦略会議には、共同研究者の理研の山口芳樹グループから2名の参加も得た。最終回の戦略会議の様々と、その後の打上げ食事会の写真を以下に添付する。



(上)第37回山ロレスト戦略会議(東海大学17号館) (下) 打上食事会と全員集合写真 (コムスクエア)



