

「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、本研究の目的を達成する。戦略会議を月 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っている。

本研究開始時に、予備実験で糖鎖結合性抗体ファージが同定されていた従来法を使い、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・親和性を解析するとともに、単鎖抗体として発現・精製を試み、効率化を図るために発現ベクターの改良を行った。

本研究プロジェクト 2 年半の研究結果に基づいて、平成 18 年度からは新たな目標を掲げ、同時進行させる。すなわち、従来法で取れた抗体ファージの糖鎖特異性・親和性の解析を継続するとともに、単鎖抗体をヒト型 2 価抗体として発現・精製後、その糖鎖特異性・親和性解析を進める。一方、改良法の導入により、新たに糖鎖結合性抗体ファージのスクリーニングを開始する。また、目標とする糖鎖抗原をしぼり、それらの合成を開始する。

2. 研究実施内容

東海大学グループでは、糖鎖工学研究施設で調製・解析された人工糖脂質を用いた単鎖抗体の網羅的スクリーニングを開始したが、人工糖脂質を抗原とする際、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為、至適条件の検討を行い改良を加えながら、特異的かつ親和性の高いクローンの単離を目指し

た。平成 15 年度にパニング・ELISA による positive の判定・同定が進行中であった ① mannotriose (M3) ② Le^x (LNFP III)を抗原として得たクローンについては、DNA 配列決定、抗体ファージとして特異性・親和性の解析を進め、現在は、単鎖抗体タンパク質としての発現・精製・解析が進んだ。さらに、ヒト型 2 価抗体として、すなわち scFv-Fc(単鎖抗体プラス Fc ドメイン)の発現系を確立する目的でベクターを構築した。

一方、LNnT, LNFP I, LNFP II, LNFP III, LNDFH Iに加え、野口研で合成した 3,5-ビス(ドデシロキシ) ベンズアミドを基本骨格とした合成糖鎖プローブ、Tn 抗原と T 抗原での、従来法でのパニング・スクリーニングを条件を比較しつつ実施した。

慶應大学グループでは、ペリプラズムシャペロン発現ベクターを数種作製し、可溶性抗体の増大が確認できたため、このベクターを有する菌株を東海大グループに供与した。さらに、抗体の発現制御をより厳密に行え、末端タグを変更し精製を容易にした第 5 世代ベクターを作製した。

市販されている 8 種類の精製ガングリオシドを抗原に、平成 17 年度には東海大で開発・改良したガングリオシドを含む糖脂質の新しい固相化法と新規スクリーニング法を利用し、より特異性の高いクローンの単離を試みた。ガングリオシドを希釈する脂質の種類をパニングごとに変えることによって、脂質非特異的に結合するクローンを大幅に減らすことに成功した。その結果、試験的にスクリーニングした 2 種のガングリオシドに対して特異性の高いクローンが得られた。しかし野口研での解析の結果、中性脂質にも非特異的に結合するようであった。

野口研グループでは、人工糖脂質に改良を加えファージに提示される糖鎖抗体が結合するのに最適な構造を作ることを目指し、平成 17 年度までに、糖鎖構造特異的単鎖抗体のパニング、ELISA、及び、得られた抗体の糖鎖構造特異性の解析を目的として、3,5-ビス(ドデシロキシ) ベンズアミドにヘキサエチレングリコールを結合した人工脂質 (E6BDB)、及び、ビオチンにヘキサエチレングリコールを結合した化合物 (E6 ビオチン) に、糖鎖を導入した糖鎖プローブの合成を行ってきた。いくつかの合成ルートにより、Le^a 抗原を持つ糖鎖プローブの合成を検討したが、目的化合物の合成には至っていない。マンノース、ガラクトース、グルコース、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン等の単糖プローブを、TLC 等を用いた取得抗体の糖鎖構造特異性解析の為に提供した。

さらに、末端をアミノ基とした E6BDB を用いて、遊離糖鎖を還元アミノ化によって E6BDB 型の糖鎖プローブに誘導できることを示し、天然由来糖鎖のプローブ化の準備を行った。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。研究の過程で、本来、水溶性糖鎖プローブとして設計した E6 ビオチン型のプローブばかりでなく、E6BDB 型のプローブもミセルとして水中に可溶化することを見出した。これは、酵素反応による糖鎖導入、伸長等に利用できる可能性

を示す知見である。

3. 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（工・生命化学、教授）
- ②研究項目：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
単鎖抗体の発現・特異性・親和性の解析方法の改良と確立

「慶應義塾大学」グループ

- ①研究分担グループ長：高柳 淳（医・分子生物、講師）
- ②研究項目：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
人工糖脂質(ガングリオシド)を用いた単鎖抗体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：ファージ抗体パンニングの為の人工糖脂質の調製と改良

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1） 論文（原著論文）発表

- Taichi Yoshitomi, Sawataka Yabuki, Hiroko Kawakami, Reiko Sato, Kazunori Toma¹, Masahiko Furuhashi, and Yoshie Maitani. The structure of artificial lipids possessing oligo(ethylene glycol) and their behavior in water. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, in press.

（2） 特許出願

H17 年度出願件数：2 件（CREST 研究期間累積件数：6 件）