

「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)

## 「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（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っている。

本研究開始時の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・親和性を初期解析するとともに、単鎖抗体として発現・精製を試み、その効率化を図るために発現ベクターに種々改良を加えた。非還元末端マンノースを認識する単鎖抗体 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* に 2 報として掲載された。

平成 18 年度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。

慶応大では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次世代ヒト単鎖抗体ライブラリーを作製した。これを利用することで、スクリーニングおよびクローンの解析がハイスループットに行えるようになるため、研究の大幅なスピードアップが見込まれる。

## 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)-DPPE ② Le<sup>x</sup> (LNFP III)-DPPE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、単鎖抗体タンパク質としての発現・精製・解析がほぼ完了した。すなわち、GST化単鎖抗体とヒト型2価抗体のscFv-Fc(単鎖抗体プラスFcドメイン)を発現・精製し、糖鎖結合解析を進めた。①に関して、Biochemistryに2報として掲載された。

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・スクリーニングの改良・変更後の結果、数十種のクローンが得られ、その解析を順次進めた。

慶應大学グループでは、次世代抗体ライブラリーの作製と、平成17年度に実施した糖脂質の新しい固相化法とスクリーニング法を利用して得られた抗ガングリオシド抗体の解析を行った。しかし脂質にも非特異的に結合することが判明したため、これを克服するため、スクリーニング法の改良も引き続き行っている。具体的には、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や、洗浄液の改良などを並行して検討している。また、新規タグとそれを利用した大腸菌培地から組換え抗体直接精製法を確立した。新規タグを組み込んでさらに改良し、Fab抗体ライブラリーの作製も可能でハイスループット精製に適したヒト抗体ライブラリー用ベクターを作製した。共発現ベクターもさらに改良しより効率的に可溶性抗体が得られるようになった。また、外被タンパクに変異を導入しアルカリに対して耐性度が向上した改良ヘルパーファージを作製した。これによりスクリーニング過程で強いアルカリ洗浄が可能となったため高親和性抗体クローンのスクリーニング効率が向上すると考えられる。さらに、上記改良をすべて組み込み、また、抗体遺伝子のCDR3領域にランダム変異を導入し前世代より10倍以上レパートリーが増大した次世代ヒト単鎖抗体ライブラリーを作製した。

野口研グループでは、昨年度から引き続き、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に、オリゴエチレングリコールを結合した3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(BDB)を脂質部分とし、そこに糖鎖を導入した糖脂質型の糖鎖プローブの合成を行った。糖鎖プローブに導入する新たな抗原糖鎖として、膵臓がんの際に特異的に増加することが報告されている糖鎖のうち、エピトープと考えられる2糖(GlcNAc $\alpha$ 1-4Gal)および3糖(GlcNAc $\alpha$ 1-4Gal1-4Glc)を選択し、既に合成を終え試料を提供済みである。

パニングやELISAを行うときに、より抗体との結合能を向上させる為の糖鎖プローブの構造の改良も行った。具体的には脂質部分の構造をリジッドにすることにより抗体が結合しやすくなると考えられる為、エチレングリコール部分の鎖長の異なるものを合成中である。また、オリゴエチレングリコ

ールが結合した BDB はミセルとして水中に可溶化することを昨年度までに報告したが、その人工脂質のミセル溶液を用いて、市販の糖脂質から酵素法により切り出した糖鎖を還元アミノ化で脂質に導入できることを確認した。これは、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。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「東海大」グループ

##### ①研究者名

山口 陽子 (東海大学工学部生命化学科 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

#### (2)「慶應大」グループ

##### ①研究者名

高柳 淳 (慶應義塾大学医学部 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 (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

#### (3)「野口研」グループ

##### ①研究者名

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. 研究成果の発表等

#### (1) 論文発表 (原著論文)

- 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).
- 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.

- 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.

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願: 3件 (CREST 研究期間累積件数: 9件)