

「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。東海大学と野口研究所の持つ糖鎖精製・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、慶應義塾大学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次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。

さらに、慶應義塾大学では、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。

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 年度にパンニング・ELISA による positive の判定・同定が進行中であった ① mannotriose (M3)-DPPE ② Le^x (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、M3 特異的クローンに関して、方法論から取れた単鎖抗体の発現・精製・解析の一連の流れが *Biochemistry* に 2 報(Sakai *et al.* & Zhang *et al.*, 2007)として掲載された(平成 18 年度報告)。今年度は、scFv-Fc-HA という HA タグを挿入した M3 特異的抗体を作製・調製し、組織染色を実施した(Yuasa *et al.* 2007)。Le^x特異的クローンに関しては、投稿準備中である。

一方、LNnT, LNFP I, LNFP II, LNDFH I-DPPE に加え、野口研究所で合成された 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、従来法でのパンニング・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結果、T 抗原クローンに関しては特異性から見て有望であったので、単鎖抗体の精製・解析を進め特許申請をしたが、その他の糖鎖抗原で取れたクローンは非特異的と判断せざるをえなかった。

平成 19 年度には、野口研究所で新規に合成された、GlcNAc α 1-4Lac 三糖を持つ糖鎖プローブ、及び 3 連続した Thr にそれぞれ α -GalNAc を結合させた構造の糖ペプチドを糖鎖抗原として、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。慶應義塾大学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次世代ヒト単鎖抗体ライブラリーから得られたクローンの解析が進行中である。

慶應義塾大学グループでは、独自に作製したファージ提示型ヒト単鎖抗体ライブラリーの改良と、それを利用した抗糖脂質抗体の単離を目的としている。平成 19 年度は、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。すなわち、人工テトラサイクリンプロモーターの利用を始めとするベクター細部の見直しを行い、ベクターを新規に作製した。このベクターにより、ライブラリーの安定性、レパートリーが増大した新ライブラリーの構築に成功し、これを東海大学に供与した。また、平成 17 年度に開発したペリプラズムシヤペロン発現ベクターをさらに改良し、さらなる産生ファージ量の増加および可溶性抗体の増加が認められた。この新抗体ライブラリーを利用して、抗ガングリオシド抗体を効率よく単離するため、スクリーニング法の改良を行った。すなわち、糖脂質の固相化法の改良、ブロッキング剤の選抜、Lactosyl Ceramide, Galactosyl Ceramide, Sphingomyelin 混合物を用いたサブトラクション法の導入、リン酸塩および 4 種アミノ酸を含む界面活性剤を含まない優れた洗浄液の開発を行った。これにより、抗 GD3, GD1a, GM4 抗体の単離に成功した。現在、これらの性質を調べるとともに、他の精製ガングリオシドに対してスクリーニングを行っている。また、これを応用して、構造が明らかになっていないガングリオシドに対するスクリーニング方法の開発を続行している。

野口研究所では、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及び合成を行うことを目的としている。平成 19 年度は、前年度までの知見から、より抗体取得に適した糖鎖構造を持つプローブを設計し合成した。具体的には、すい臓がんのマーカーとなりうる GlcNAc α 1-4Lac 三糖を持つ糖鎖プローブの合成を行い、既に合成を終え、試料を東海大学に提供済みである。次に、Tn 抗原を取得する際に単糖では抗原として機能しにくいことから、複数の糖が近傍に存在する構造のプローブの必要性があることがわかった。そこで、6 残基のペプチド鎖を選択し、そのうちの 3 連続したアミノ酸にそれぞれ α -GalNAc を結合させた構造の糖ペプチドを合成ターゲットとし、N 末端遊離型、N 末端 Ac 保護型、コントロールとなるペプチド鎖など、計 4 種類の化合物を固相合成法により合成した。さらに、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、これまでヘキサエチレングリコールを使用していたが、リンカー部分の動きの自由度を制限する為にエチレングリコール鎖を短くした構造のものを考案し、GlcNAc α 1-4Gal-ビオチンプローブ 2 種類を合成した。

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)

② 研究項目

1. 糖鎖特異的単鎖抗体の発現・特異性・親和性の解析方法の改良と確立
2. すでに取りれているクローンの解析
3. 新規糖鎖抗原に対する単鎖抗体のスクリーニングと解析

(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)

② 研究項目

1. フェージ提示型ヒト単鎖抗体ライブラリー(抗体フェージ)の作製と改良
2. ガングリオシドを用いた抗体フェ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)

② 研究項目

1. 抗体ライブラリー取得の為に人工糖脂質の合成および改良
2. 人工糖脂質を用いた固相化条件の最適化

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Yuasa, N., Iida, N., Sakaue, H., Wilczynski, S., and Fujita-Yamaguchi, Y.: Construction of a recombinant single chain antibody recognizing nonreducing terminal mannose residues applicable to immunohistochemistry. *BioScience Trends*. 1, 108-112 (2007).
- Kusada, Y., Morizono, T., Matsumoto-Takasaki, A., Sakai, K., Sato, S., Asanuma, H., Takayanagi, A. and Fujita-Yamaguchi, Y.: 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 (2008).
- Asanuma, H., Matsumoto-Takasaki, A., Suzuki, Y., Tamura, S., Sata, S., Kusada, Y., Matsushita, M., and Fujita-Yamaguchi, Y.: Influenza PR8 HA-specific Fab fragments produced by phage display methods. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 445-449 (2008).

(2) 特許出願

平成 19 年度 国内特許出願件数:1件(CREST 研究期間累積件数:10 件)