

N-24

特徴的な糖脂質に対するモノクローナル抗体の作製とその可変領域の解析

Production of monoclonal antibodies specific to the characteristic glycolipids and their variable region analyses

○藤庵 智貴¹, 戸井田 竜憲², 若松 美季², 鈴木 佑典³, 櫛 泰典³*Tomotaka Touan¹, Tatsunori Toita², Miki Wakamatsu², Yusuke Suzuki³, Yasunori Kushi³

Abstract: Glycosphingolipids (GSLs) are involved in infection of virus, cell-cell recognition and differentiation. Lactotriaosylceramide (Lc₃Cer, amino-CTH) is the important GSL which is elongated to lacto- and neolacto-series GSLs and separated from globo- and ganglio-series GSLs in the biosynthesis. We attempted to generate monoclonal antibodies (mAbs) specific to Lc₃Cer and have established about ten independent IgM mAbs. The differences in reactivity of these mAbs were observed. Being based on the differences in reactivity, we analyzed and compared the variable regions of these mAbs. It is expected that these mAbs are important tools to recognize the pattern of expression and localization of Lc₃Cer on the plasma membrane. In order to investigate more details, making and expressing of the molecules in phage or mammalian cells will be more useful for further study.

1. 諸言

糖鎖を結合した脂質である糖脂質は、細胞膜上に流動的に存在している。糖脂質の糖鎖部分は、細菌やウイルス感染、細胞間認識、情報の伝達、細胞の成長などにおいて重要な役割を担っている。そのため、糖脂質の細胞膜上での発現様式や局在を認識することは、様々な生命現象を解明するための大きな手段となる。細胞膜上の糖鎖を特異的に検出するツールとして抗体が挙げられる。単一の形質細胞由来のクローンが産生する抗体を、モノクローナル抗体 (mAb) と呼ぶ。

Lc₃Cer (Lactotriaosylceramide, GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcCer) は、セラミドにグルコース、ガラクトース、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が鎖状に結合した糖脂質である。末端に GlcNAc をもつ糖脂質は、生体内での存在量が少ない。しかし、GlcNAc は様々な疾患に関与することから、Lc₃Cer は重要な糖脂質であると考えられる。本研究では、糖脂質 Lc₃Cer を正確に認識するマウス mAb を作製し、Lc₃Cer の細胞膜上での発現様式や局在を認識するツールとして利用することを目指す。また得られた抗体の、抗原への結合に必要な抗体可変領域のアミノ酸配列を同定することで、その相同性の解析を目指す。

2. 方法

[mAb の作製]

雌の BALB/c マウスに、Lc₃Cer を腹腔内注射によって免疫した。10 日程度間隔を空け、マウスに計 4 回免疫した。毎回の免疫前に眼底採血を行い、血清の抗原に対する力価を ELISA にて測定し、目的の抗体の産生を確認した。力価が十分に上昇したマウスの脾臓細胞を取り出し、培養しておいたミエローマ細胞 P3U1 と融合させた。融合は、PEG (ポリエチレングリコール) を使用した。融合細胞を 96 穴培養プレート 8 枚に播き、HAT 培地で培養した。HAT 培地で培養することにより、脾臓細胞とミエローマ細胞の融合細胞のみを増殖させた。細胞が増殖してきたら、培養上清と ELISA 法を用い、目的の穴を 8 枚から選び出した。選び出した細胞を、2 回の限界希釈と ELISA によってモノクローナル化させた。2 回目の限界希釈後に、1 穴あたりの細胞のコロニーが 1 つであり、なおかつ ELISA で強く発色したものを選び、これを目的の mAb 産生細胞とした。また、この mAb が Lc₃Cer に特異的に反応するかどうか、薄層クロマトグラフィ (TLC) 上でのスポットテストで確認した。

[mAb の性質の確認]

mAb 産生細胞の培養上清を段階的に希釈し、ELISA を行うことで、Lc₃Cer への反応性を確認した。また、TLC 上で牛赤血球膜由来中性糖脂質を展開させ、そこに培養上清をのせて免疫染色を行うことで、mAb が結合する糖脂質を確認した。

1 : 日大理工・院 (前)・応化, 2 : 日大理工・学部・応化, 3 : 日大理工・教員・応化

3. 結果 ・ 考察

マウスに Lc_3Cer を免疫し、目的の抗体力価の上昇を血清から確認した。力価の上昇したマウスから脾臓細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合させた。ELISA 法、限界希釈法、TLC 上でのスポットテストにより、融合細胞から 5 クローン (MAC-II, MAC-III, MAC-IV, MAC-V, MAC-VI) の mAb 産生細胞を得ることができた。ELISA 法による解析で、MAC-II と MAC-V は他の mAb と違う反応性を確認できた。MAC-II, MAC-III, MAC-IV, MAC-V は、免疫染色において、以前に GlcNAc を認識する抗体として樹立した MAC-I^[1] と同じような反応性を示したため、全て GlcNAc に反応していると考えられる (Figure 1)。MAC-VI は、 Lc_3Cer 以外の中性糖脂質に反応せず、他の抗体とは違う反応性を示した (Figure 2)。MAC-VI は、 Lc_3Cer の GlcNAc ではない部分に結合していると推測できる。

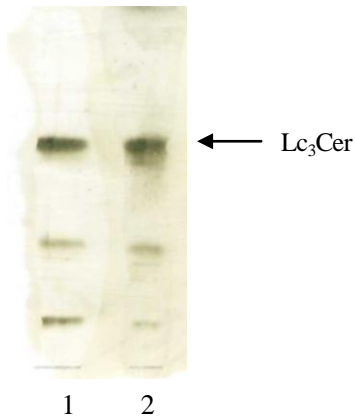


Figure 1. Reactions of established mAbs against neutral glycolipids derived from bovine erythrocyte membrane (lane 1: MAC- I , lane 2: MAC-VI)

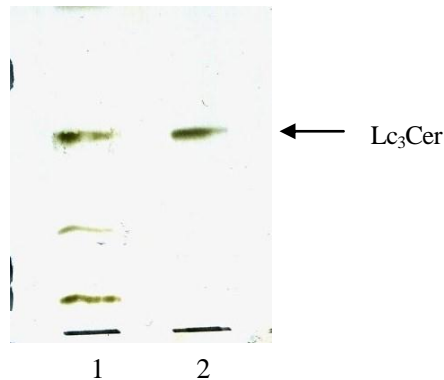


Figure 2. Reactions of established mAbs against neutral glycolipids derived from bovine erythrocyte membrane (lane 1: MAC- I , lane 2: MAC-VI)

4. 今 後

作製した mAb の可変領域遺伝子を解析する。解析することにより、可変領域のどのアミノ酸が結合力の違いを生み出しているかを調べる。また、MAC-VI をいろいろな糖脂質と反応させることで、この抗体のエピトープを決定する。これらの作製した抗体が、細胞膜上での Lc_3Cer の発現様式や局在を解析する上での重要なツールとして使用できることを明らかにする。GlcNAc に対する抗体は、リウマチ性心炎などの自己免疫疾患に関わる事例があるため^[2]、樹立した mAb がこれらの疾患の病因解明に役立つ可能性も有り得る。

5. 参考文献

- [1] Hirofumi Nozaki, *et al.*, “Production and characterization of monoclonal antibodies specific to lactotriaosylceramide”, *Glycobiology*, **20**, 1631-1642, 2010
- [2] E.E.Adderson, *et al.*, “Molecular Analysis of Polyreactive Monoclonal Antibodies from Rheumatic Carditis: Human Anti-N-Acetylglucosamine/Anti-Myosin Antibody V Region Genes”, *J.Immunol*, **161**, 2020-2031, 1998