

N-22

非還元末端 N-アセチルグルコサミン糖鎖を有する糖脂質構造解析とその特異的モノクローナル抗体 (MAC) の単鎖型抗体の性質

Structural characterizations of N-acetylglucosamine-terminating neolacto-series glycosphingolipids using monoclonal antibodies specific to N-acetylglucosamine residues (MAC) and its scFv mAbs properties

○中村有希¹, 戸井田竜憲², 鈴木佑典³, 櫛泰典³

Nakamura Yuuki¹, Toita Tatsunori², Suzuki Yuusuke³, Kushi Yasunori³

Abstract : Four glycosphingolipids (GSLs) carrying terminal GlcNAc residues were detected by immunological analysis using monoclonal antibody (mAb) MAC-1, and purified by ion-exchange and repeated silica bead column chromatography by using bovine erythrocytes. Structures of MAC-1 reactive glycosphingolipids-I, -II, -III and -IV (GSLs-I to -IV) had similar N-acetylglucosamine-terminating neolacto-series glycosphingolipid structures at the non-reducing terminal. Being based on the antigen epitope findings above, we are currently investigating and comparing similar series of the mAbs and their specificities using variable regions analysis by RT-PCR method. Use of thus generated scFv mAbs by phage display technology were found to be useful in further characterizations of defined specificity of similar carbohydrate antigen epitopes.

1. 緒言

細胞膜上で流動的に存在している糖脂質はウイルス感染やシグナル伝達に関与している。その糖脂質の発現様式を解析することで様々な生命現象を解明するひとつの手段となる。中でもラクト・ネオラクト系統脂質は血液型抗原や生物の分化に関連し、その前駆体である Lc₃Cer (GlcNAc β1-3 Gal β1-4 Glc β1-1 Cer) 以降を生合成する Lc₃ 合成酵素をノックアウト及びノックダウンしたマウスなどでは重篤な症状が現れることが報告された¹⁾²⁾。これらの報告より Lc₃Cer は体内で重要な役割を担っているのではないかと考えられている。

それらの糖脂質の役割を解析するためのツールとして Lc₃Cer 関連抗原の構造解析と Lc₃Cer に対するモノクローナル抗体を複数作製し、総合的な解析を行った。その際、scFv を作製することにより詳細に解析を行った。

2. 実験操作

2. 1 糖脂質の精製と構造解析

常法により精製と解析を行った³⁾。

2. 2 マウスモノクローナル抗体 (mAbs) の作製

既法⁴⁾により作製した mAb 産生細胞の培地上清を使用し、種々の糖脂質(Lc₃Cer, Gb₃Cer, nLc₄Cer, LacCer)を用いた ELISA 法, TLC 免疫染色法により作製した抗体の性質を調べた。

2. 3 mAb の可変領域遺伝子の解析

TRIzol[®] 試薬を用い、mAb 産生細胞からトータル RNA を抽出した。トータル RNA から SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System を用い、逆転写酵素反応により first-strand cDNA を作製した。作製した cDNA を鋳型として、H 鎖可変

領域遺伝子は 36 通り、L 鎖可変領域遺伝子では 40 通りのプライマーの組み合わせ⁵⁾ をデータベース (IgBlast) を用いて解析した。

2. 4 scFv の作製とその性質の確認

H 鎖、L 鎖可変領域遺伝子を挿入した 2 種のプラスミド DNA、アミノ酸 (GGGGS)₃ をエンコードした linker 遺伝子を用い、overlap extension PCR によって scFv (H 鎖-linker-L 鎖) 遺伝子を増幅した。scFv 遺伝子を作製し、可変領域遺伝子を増幅した。増幅した遺伝子を精製し、TA クローニング法によりクローニングベクター (pCR[®]II) に挿入し、大腸菌 (DH5α) に形質転換した。得られた形質転換体からプラスミド DNA を抽出し、DNA シークエンス解析によって H 鎖、L 鎖可変領域遺伝子の配列を確認した。確認した可変領域遺伝子は、する際に、H 鎖の 5' 末端、L 鎖の 3' 末端にそれぞれ制限酵素サイト (*Sfi*I, *Spe*I) を付加した。増幅した scFv 遺伝子を精製し、TA クローニング法によりクローニングベクター (pCR[®]II) に挿入し、大腸菌 (DH5α) に形質転換した。得られた形質転換体からプラスミド DNA を抽出し 2 種類の制限酵素 (*Sfi*I, *Spe*I) で同時に処理した。制限酵素によって切り出された scFv 遺伝子を精製し、2 種類の制限酵素 (*Sfi*I, *Spe*I) で処理したファージミドベクター (pCANTAB 5 E + His-Tag) に scFv 遺伝子を挿入した。このプラスミド DNA を大腸菌 TG-1 に導入し、M13KO7 ヘルパーファージを感染させることで、scFv タンパク質を発現したファージを作製した。ファージミドベクター上に E-Tag タンパク質の遺伝子がコードされているので E-Tag タンパク質をサンドウィッチ ELISA 法で検出し、scFv タンパク質が

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

ファージに発現しているかを確認した。また、4つの糖脂質 (Lc_3Cer , Gb_3Cer , nLc_4Cer , $LacCer$) を用いた ELISA 法により、元の抗体と同様の反応性を有しているかの確認を行った。

3. 結果

3.1 糖脂質の解析

精製した MAC-1 に反応する糖脂質構造は種々の解析により明らかとなった。

I, $GlcNAc\beta 1-3Gal\beta 1-4GlcNAc\beta 1-3Gal\beta 1-4Glc-1Cer$, (nLc_5Cer)

II, $GlcNAc\beta 1-3(GlcNAc\beta 1-6)Gal\beta 1-4GlcNAc\beta 1-3Gal\beta 1-4Glc-1Cer$, ($IV^6GlcNAc-nLc_5Cer$)

III, $GlcNAc\beta 1-3(Gal\beta 1-3GlcNAc\beta 1-6)Gal\beta 1-4GlcNAc\beta 1-3Gal\beta 1-4Glc-1Cer$, ($IV^6Gal\beta 1-4GlcNAc-iso-nLc_5Cer$)

IV, $GlcNAc\beta 1-3(Gal\alpha 1-3Gal\beta 1-3GlcNAc\beta 1-6)Gal\beta 1-4GlcNAc\beta 1-3Gal\beta 1-4Glc-1Cer$, ($IV^6Gal\alpha 1-3Gal\beta 1-4GlcNAc-iso-nLc_5Cer$)

3.2 マウスモノクローナル抗体 (mAbs) の作製

上記の方法を用いてスクリーニングした結果、 Lc_3Cer を特異的に認識する 8 種の mAb 産生細胞を作製した。4つの糖脂質を用いた ELISA は全ての作製した mAbs で Lc_3Cer に強い反応性を示した。本研究室で精製した牛赤血球膜由来中性糖脂質を用いた TLC 免疫染色では、Fig. 1 のように作製した mAb の中に Lc_3Cer 以外の複数の糖脂質に反応性を示す抗体が確認された。反応した糖脂質の構造を確認すると、それぞれの糖鎖末端に $GlcNAc\beta 1-3Gal$ の共通構造が存在した。したがって、作製した抗体は上記の共通構造を認識している抗体とそれとは異なる反応性を有している抗体に分類された。

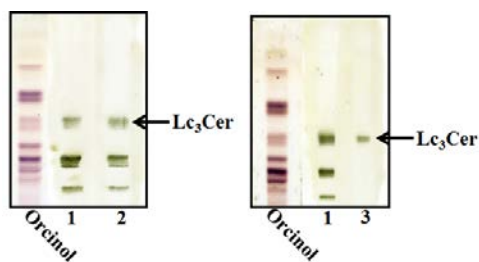


Fig. 1 TLC 免疫染色による作成した抗体の反応性の確認 (ウシ赤血球膜由来中性糖脂質:5 μ g, 1:MAC-1, 2:MAC-14, 3:MAC-8)

3.3 mAb の抗体可変領域の解析

解析した可変領域遺伝子の配列からアミノ酸配列を推定し、先行研究で既に推定されたアミノ酸配列と比較を行ったところ、超可変領域内では変異がみられたが可変領域遺伝子を構成しているゲノム遺伝子、また可変領域を構成しているアミノ酸の種類に予想されたほど大きな違いは見られな

かった。但し、超可変領域内の CDR1, CDR2, CDR3 内のいくつかの変異が検出された。

3.4 scFv の作製とその性質の確認

糖脂質への反応性が ELISA や TLC 免疫反応において同程度であった MAC-4, MAC-9, MAC-14 の抗体可変領域遺伝子を用いて作製した。その後、まず予備的に Fig. 2 のように MAC-4 にヘルパーファージを感染させ、ファージディスプレイを行い scFv タンパク質の糖脂質への反応性の確認を行った。十分ではないが糖脂質への反応性が得られた。

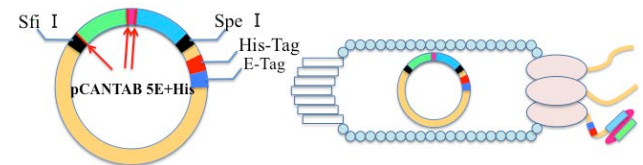


Fig. 2 M13KO7 ヘルパーファージへの scFv タンパク質ディスプレイ

4. 考察

本研究において MAC 抗体に反応する Lc_3Cer 以外の 4 種の抗原の化学構造が明らかになり、さらに特異的な抗体としては 14 種のマウスモノクローナル抗体を樹立することができた。上の結果より、抗原と抗体の特異性に関する特異性の違いや相同性がより明らかになった。また、その原因を明らかにするために分子生物学的手法を用いて各抗体クローンを用いて可変領域の解析を行ったが、可変領域内での微小な変異は存在するものの、予想されたほど大きな変異は現在のところ得られていない。これと平衡して抗体の可変領域のみを一本鎖のタンパクとして繋いだ scFv を作製し、ファージにディスプレイすることを行い、その検証を進めている。今後はより詳細な解析と超可変領域内での変異と特異性の関連を明らかにすることが必要と考えられる。それには結合解離を正確に解析できる手法の導入は欠かせない。

5. 参考文献

- 1) C, T. Kuan, *et al.*, *BMC Dev Biol.* **10**, 114-133 (2010)
- 2) F, Biellmann, *et al.*, *BMC Dev Biol.* **8**, 109-118 (2008)
- 3) K, Shiotani, J. Minaniyama, A. Mathew, K. Yoshinaga, Y, Suzuki, S. Watanabe, and Y. Kushi 投稿準備中
- 4) H. Nozaki, M. Yanagida, K-I. Koide, K. Shiotani, M. Kinoshita, Y. Kobayashi, S. Watarai, K. Nakamura, A. Suzuki, T. Ariga, Y. Kushi. *Glycobiology* **20**, 1631-1642(2010)
- 5) P, Amersdorfer, *et al.*, *IAI.* **65**, 3743-3752 (1997)