

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 年度 ～ 2012 年度

課題番号：22570125

研究課題名（和文）新規糖鎖特異的単鎖抗体の大腸菌発現系による大量発現と糖鎖結合性解析

研究課題名（英文）Expression of novel carbohydrate-specific single chain antibodies in *E. coli* and analyses of carbohydrate-binding activities of purified antibodies.

研究代表者 山口 陽子 (YAMAGUCHI YOKO)

東海大学・工学部・教授

研究者番号：10328106

研究成果の概要（和文）：タンパク質の 50%以上が糖鎖で修飾されており、この糖鎖の変動が病態を反映することから、がんで露出する糖鎖に対する抗体作製を目指してきた。糖鎖に対する抗体は通常の免疫では取得困難なため、免疫法を体外で実現するファージ活用法でヒト型単鎖抗体を作製してきた。本研究では、取得した単鎖抗体の遺伝子からタンパク質をいかにして生産し、性質を見極めるかに重点を置き、単鎖抗体の大腸菌での大量生産・糖鎖結合活性の測定の確立と、昆虫細胞での生産にも成功した。

研究成果の概要（英文）：Aberration of carbohydrates on cell surface is often associated with pathogenic changes in diseases. Towards developing anti-cancer therapeutics, we had obtained genes for anti-carbohydrate single chain antibodies (scFvs) against carbohydrate moieties expressed specifically in cancer cells using phage-display methods. In this study, expression of scFv genes in *E. coli* and insect cells was successfully carried out to produce antibody proteins, whose carbohydrate binding activities were confirmed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：大腸菌発現系、単鎖抗体、封入体、リフォールディング、糖鎖結合性、糖鎖親和性、昆虫細胞発現系

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、2003-2008 年度の 5 年半、科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業（CREST タイプ）研究領域「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」研究課題「糖鎖構造特異的単鎖抗体ライブラリーの構築」の研究代表者として、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”も含めた、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てきた。これまでに、人工糖脂質化した mannotriose (Man3) や LeX、T 抗原、Tn 抗原、および 3 残基連続して Tn 抗原をもつ糖ペプチド (Tn3) の糖鎖抗原プローブを使用し、ヒト型単鎖抗体提示ファージライブラリ

一からパニング・スクリーニングをし、多数の単鎖抗体を得た。単鎖抗体(scFv)そのもの、あるいはFc化単鎖抗体(scFv-Fc)の遺伝子を発現ベクターに挿入し、大腸菌または哺乳細胞系で発現・精製し、糖鎖結合性・特異性を解析した。Man3結合性 5A3 および Le^x結合性 1F12 については、ミエローマ細胞での scFv-Fc 産生と精製に成功し、KD=10⁻⁹と 10⁻⁸M の高親和性が確認されたが、この発現系では、発現株の樹立が出来ない scFvs が多いという困難にも直面した。一方、大腸菌での scFv タンパク質の発現では、ペリプラズムに回収されず、ほとんどのクローンが封入体に回収された。しかし、研究代表者らは取得した T 抗原特異的 scFv 遺伝子を大腸菌で大量発現させ、封入体からリフォールディング操作により活性のある単鎖抗体を効率的に得ることに成功した。

本研究ではこの技術を発展させ、治療応用に向けたヒト型抗体作製を目標として、これまで取得が困難であった糖鎖に対する単鎖抗体の糖鎖結合性の SPR と NMR による詳細な解析を行い、基礎データを提供する。本研究に比較できる研究は、申請者が知る限り国内・国外を含めてなされていない。

2. 研究の目的

本研究は、困難であった scFv の大量調製に成功した予備実験を元に以下の研究を実施する。本研究は抗体医薬創成を長期目標とした基礎研究と位置付けられる。

(1) 抗 T-抗原 scFvs の大量調製と糖鎖結合性解析：すでに解析が進行中の抗 T-抗原 scFvs 1E8, 1E6, 1E10, 1G11 の 4 クローンについて、完全精製と一次構造確認後に SPR 解析を行う。さらには研究連携者に精製 scFvs を提供することで、NMR 解析を進める。

(2) 抗 Man3、抗 Le^x scFvs の大量調製と糖鎖結合性解析：scFv-Fc として哺乳細胞での発現が達成できなかった抗 Man3(1A4, 1G4)、抗 Le^x(3F1)を中心に、scFv-Fc として哺乳細胞での発現が可能であった抗 Man3(5A3)、抗 Le^x(1F12)をも、scFv として大腸菌で大量発現させ、封入体からリフォールディング操作により活性のある単鎖抗体を効率的に精製し、SPR 解析により、各 scFv の詳細な糖鎖結合特性を調べる。その上で、研究連携者に精製 scFvs を提供することで、NMR 解析の戦略を検討する。

4. 研究成果

(1) 抗 T-抗原 scFvs の大量調製と糖鎖結合性解析は、scFvs 1E8, 1E6, 1E10, 1G11 の 4 クローンを大腸菌で発現し封入体からグアニジン塩酸で変性抗体として精製後、リフォールディング操作により可溶性単鎖抗体を取得した。さらに上記 4 クローンの昆虫細胞

(S2)発現系での発現、精製と解析の結果、1E8 と 1E6 について、それぞれ昆虫細胞と大腸菌発現系から十分量精製し、T-抗原結合性を SPR と NMR で解析し、一定の成果を上げることができた(論文投稿中)。

(2) 抗 Man3(1A4, 1G4, 5A3)を大腸菌で発現し封入体からグアニジン塩酸で変性抗体として精製後、リフォールディング操作により可溶性単鎖抗体として取得し、Mannotriose 結合性を SPR で比較検討した。先に scFv-Fc として発現精製が可能であった 5A3 scFv の親和性が最も低いという結果を得たことは、1A4, 1G4 の scFv-Fc が ER で滞留し糖タンパク質合成を阻害し、細胞死を促進するという作業仮説を裏付けた。(発表論文 5 と 6)

(3) 本研究課題申請以降に発展した研究成果

① グアニジン塩酸での変性より緩和はアミソフトの活用による封入体からのリフォールディングと精製に成功した。

② 昆虫細胞発現系での単鎖抗体発現と NMR 解析：すでに上記(1)に記載したが、新たに導入した S2 細胞での発現と精製に成功し、NMR による糖鎖特異性の詳細を明らかにした。抗体と T 抗原の結合の詳細を解析した初めての例と言える。

③ 抗 Tn 抗原 monoclonal antibody MLS128 からの単鎖抗体の作製と Tn 抗原結合性の NMR 解析：ファージから取得した scFvs との比較も兼ねて、ハイブリドーマから MLS128 scFv を作製した(発表論文 3)。この遺伝子を使い、MLS128 の Tn 抗原結合性の詳細な解析が NMR でなされ(発表論文 2)、現在更なる解析が進行中である。

④ MLS128 が 2 連続 Tn 抗原(Tn2)より 3 連続 Tn 抗原(Tn3)に 10 倍高い親和性を持つと報告されていたが、MLS128 scFv の Tn2 と Tn3 結合性の解析をする中で、この親和性が反応温度が高くなるとほぼ同等になることを見出した。そこで、MLS128 monoclonal antibody を使い、SPR と NMR で Tn2-peptide と Tn3-peptide をリガンドとして結合性の熱力学的解析を行い、Tn3 結合性の温度依存性の詳細を明らかにした。(発表論文 4)

④ MLS128 のがん細胞増殖抑制作用：先に MLS128 が乳がんと大腸がんの細胞増殖を阻害すること、insulin-like growth factor-I receptor (IGFIR) signaling の関与の可能性を報告をした。そのメカニズムを検討し発表論文 1 にまとめた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Zamri, N., Masuda, N., Oura, F., Yajima, Y., Nakada, H., and Fujita-Yamaguchi, Y. Effects of two monoclonal antibodies, MLS128 against Tn-antigen and 1H7 against insulin-like growth factor-I receptor, on the growth of colon cancer cells. *Biosci Trends* 差読有、6 (2012), 303-312.
 2. Subedi, G.P., Satoh, T., Hanashima, S., Ikeda, A., Nakada, H., Sato, R., Mizuno M., Yuasa, N., Fujita-Yamaguchi, Y., and Yamaguchi, Y. Overproduction of anti-Tn antibody MLS128 single-chain Fv fragment in *Escherichia coli* cytoplasm using a novel pCold-PDI vector. *Protein Expr. Puri.* 差読有、82 (2012), 197-204.
 3. Yuasa, N., Ogawa, H., Koizumi, T., Tsukamoto, K., Matsumoto-Takasaki, A., Asanuma, H., Nakada, H., and Fujita-Yamaguchi, Y. Construction and expression of anti-Tn-antigen-specific single chain antibody genes from hybridoma producing MLS128 monoclonal antibody. *J Biochem.* 差読有、151 (2012), 371-381.
 4. Matsumoto-Takasaki, A., Hanashima, S., Aoki, A., Yuasa, N., Ogawa, H., Sato, R., Kawakami, H., Mizuno, M., Nakada, H., Yamaguchi, Y., and Fujita-Yamaguchi, Y. Surface plasmon resonance and NMR analyses of anti Tn-antigen MLS128 monoclonal antibody binding to two or three consecutive Tn-antigen cluster. *J Biochem.* 差読有、151 (2012), 273-282.
 5. Matsumoto-Takasaki, A., Yuasa, N., Katagiri, D., Koyama, T., Sakai, K., Zamri, N., Phung, S., Chen, S., Nakada, H., Nakata, M., Fujita-Yamaguchi, Y. Characterization of three different single chain antibodies recognizing nonreducing terminal mannose residues expressed in *Escherichia coli* by an inducible T7 expression system. *J Biochem.* 差読有、150 (2011). 439-450.
 6. 山口 (藤田) 陽子、高崎 (松本) 綾乃、酒井恵子、湯浅德行 がん診断薬・抗体療法向け創薬を目指した糖鎖特異的ヒト型抗体の開発 *Journal of the Society of Japanese Women Scientists*, 差読無、11 (2011), 19-28.
 7. Yuasa, N., Zhang, W., Goto, T., Sakae, H., Matsumoto-Takasaki, A., Kimura, M., Ohshima, H., Tsuchida, Y., Koizumi, T., Sakai, K., Kojima, T., Yamamoto, K., Nakata, M., and Fujita-Yamaguchi, Y. Production of anti-carbohydrate antibodies by phage-display technologies: Potential impairment of cell growth as a result of endogenous expression. *J. Biol. Chem.* 差読有、285 (2010), 30587-30597.
 8. Koizumi, T., Matsumoto-Takasaki, A., Nakada, H., Nakata, M., Fujita-Yamaguchi, Y. Preparation of asialo-agalactoglycophorin A for screening of anti-Tn antibodies. *BioScience Trends* 差読有、4 (2010), 308-311.
- [学会発表] (計 20 件)
1. Nakazawa, A. et al. Effects of domain shuffling in VH-CDR3 between MLS128 and 83D4 on their Tn-antigen specificities. The 85th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Dec. 14-16, 2012, Fukuoka
 2. Guo, Y.-M., et al. Effects of anti-insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) antibodies with or without KDEL ER-retention signal on cancer cell growth. The 85th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Dec. 14-16, 2012, Fukuoka
 3. Koyama, T. et al. Purification and characterization of anti-T-antigen single chain antibody expressed the *Drosophila* Schneider 2 Cell System. The 85th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Dec. 14-16, 2012, Fukuoka
 4. Fukuda, T. et al. Refolding of *E. coli* expressed scFv antibody using lauroyl-L-glutamate. The 85th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Dec. 14-16, 2012, Fukuoka
 5. Guo, Y.-M. et al. Effects of anti-insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) antibodies with or without the ER-retention signal KDEL on cancer cell growth. 244th American Chemical Society National Meeting, August 19-23, 2012, Philadelphia, PA, USA
 6. Koyama, T. et al. In vitro production of anti-carbohydrate antibodies: Purification of anti-T antigen antibodies (scFvs) from *E. coli* inclusion bodies and *Drosophila* S2 cell culture media. 244th American Chemical Society National

Meeting, August 19-23, 2012, Philadelphia, PA, USA

7. Nakazawa, A. et al. Purification of anti-insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) single chain antibody (scFv) expressed in *Drosophila* S2 cells. 244th American Chemical Society National Meeting, August 19-23, 2012, Philadelphia, PA, USA

8. Kato, H. et al. Expression, purification, and refolding of single chain antibodies (scFvs) from inclusion bodies. 244th American Chemical Society National Meeting, August 19-23, 2012, Philadelphia, PA, USA

9. Subedia, G.P. et al. NMR analysis of an anti-carbohydrate antibody MLS128 single-chain Fv fragment toward elucidation of the multivalent recognition mechanism. The 50th Memorial Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan, Nov. 15-18, 2011, Yokohama (Osanbashi Hall)

10. Subedia, G.P. et al. NMR analysis of an anti-carbohydrate antibody MLS128 single-chain Fv fragment toward elucidation of the multivalent recognition mechanism. 2011 Annual Conference of the Society for Glycobiology, Nov. 9-1, 2011, Seattle, WA, USA

11. Fukuda, T. et al. Purification and characterization of anti-Tn-antigen 4E10 single chain antibody expressed in *E. coli*. The 84th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society. Sept. 21-24., 2011, Kyoto (京都国際会館)

12. Koyama, T. et al. Purification and characterization of anti-T-antigen single chain antibody expressed in *E. coli* or the *Drosophila* Schneider 2 Cell System. The 84th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society. Sept. 21-24., 2011, Kyoto (京都国際会館)

13. Kato, H. et al. Expression and purification of single chain antibodies (scFvs) isolated from a phage-displayed library with LNFPIII (Lex) probe. American Chemical Society National Meeting and Exposition. 2011年3月 Anaheim, CA, USA

14. Tsuchida, Y. et al. Purification and characterization of anti-LNFPIII single chain antibody (scFv) conjugated with Fc from CHO cells transfected with 3F1 scFv-Fc gene. 241st American Chemical Society National Meeting and Exposition. 2011年3月 Anaheim, CA, USA

15. Katagiri, D. et al. In vitro production of anti-carbohydrate antibodies: Purification of anti-trimannose single chain antibodies (scFvs) from inclusion bodies. 241st American Chemical Society National Meeting and Exposition. 2011年3月 Anaheim, CA, USA

16. Subedi, G. P., Satoh, T., Hanashima, S., Ikeda, A, Nakada, H., Sato, R., Mizuno, M., Yuasa, N., Fujita-Yamaguchi, Y., and Yamaguchi, Y. Establishment of overproduction procedure for anti-Tn antigen MLS128 single-chain Fv fragment toward the structural studies. BMB2010 (日本生化学会・分子生物学会) 2010年12月7日 - 9日 神戸ポトアイベント (兵庫県)

17. Tsutida, Y. et al. Purification and characterization of anti-LNFPIII antibody expressed in CHO cells. BMB2010 (日本生化学会・分子生物学会) 2010年12月7日 - 9日 神戸ポトアイベント (兵庫県)

18. Katagiri, D. et al. Refolding and characterization of three anti-mannotriose single chain antibodies. BMB2010 (日本生化学会・分子生物学会) 2010年12月7日 - 9日 神戸ポトアイベント (兵庫県)

19. Ogawa, H. et al. Construction and expression of anti-Tn-antigen (GalNAc-Ser/Thr)-specific MLS128 single chain antibody (scFv) genes. 240th American Chemical Society National Meeting and Exposition 2010年8月22-25日 Boston, MA, USA

20. Matsumoto-Takasaki, A. et al. In vitro production of anti-carbohydrate antibodies: Purification of anti-T-antigen (beta Gal1-3GalNAc-Thr/Ser) single chain antibodies (scFvs) from inclusion bodies. 240th American Chemical Society National Meeting and Exposition 2010年8月22-25日 Boston, MA, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 陽子 (YAMAGUCHI YOKO)
東海大学・工学部・教授
研究者番号：10328108

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

山口 芳樹 (YAMAGUCHI YOSHIKI)
理研・システム糖鎖・チームリーダー
研究者番号：90323451