OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Production of A Recombinant Single Chain Variable Fragment (scFv) Antibody against Sulfoglycolipid
Author(s)	程, 新耀
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45457
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

氏名	程（テイ）　新耀（シンヨウ）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第　19262　号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Production of A Recombinant Single Chain Variable Fragment (scFv) Antibody against Sulfoglycolipid （硫酸化糖脂質に対する組換え単鎖可変領域（scFv）抗体の作製）
論文審査委員	（主査） 教授　谷口　直之 （副査） 教授　岡本　光弘　　教授　宮坂　昌之

論文内容の要旨

〔目　的〕

哺乳動物の主要な硫酸化糖脂質には、サルファタイドとセミノリピドがあり、前者はミエリンに多く、後者は精巣に存在する。両者は、脂質部分のみが異なり共通の糖鎖構造ガラクトース 3-硫酸を有し、共通の硫酸転移酵素セレブロシドスルホトランスフェラーゼ（CST）によって硫酸化される。CST 遺伝子の破壊により、サルファタイドとセミノリピドが、それぞれミエリン形成と精子形成に必須であることが証明された。しかし、これらの生命現象における硫酸化糖脂質が介在する分子メカニズムは不明である。そこで、生細胞における硫酸化糖脂質の動態を追うプローブを得るために、硫酸化糖脂質に対する組換え単鎖可変領域（scFv）抗体の作製を行った。

〔方法ならびに成績〕

牛脳から精製したサルファタイドを酸処理したサルモネラ菌体に吸着させて、CST ノックアウトマウスと野生型マウス各6匹に免疫した。3週間後、4匹の CST ノックアウトマウスの血中に抗サルファタイド活性が検出された。野生型マウスにはいずれも検出されなかった。最も反応性の強かったマウスに追加免疫をした後、脾細胞を調製し、ミエローマ細胞株 PAI 細胞と細胞融合させた。ハイブリドーマの培養上清液の抗サルファタイド活性を調べ、限界希釈法により、最終的に DI8 とよぶクローンを得た。DI8 が産生するイムノグロブリンは IgG3 であった。DI8 抗体は、ELISA でサルファタイドともセミノリピドとも同程度に反応したが、中性糖脂質のガラクトシルセラミドやガングリオシド GM3、他の硫酸化糖鎖であるヘパリン、バイグリカン、デコリンとは結合しなかった。また、DI8 抗体は、薄層クロマトグラム免疫染色法でサルファタイド、セミノリピド、ラクトシルサルファタイドと特異的に結合したが、硫酸基が内部のガラクトースに付加した SM2 や中性糖脂質やガングリオシドとは反応しなかった。このことから、DI8 抗体は末端に存在するガラクトース 3-硫酸構造を認識すると思われる。CST ノックアウトマウスと野生型マウス由来の精巣切片を DI8 抗体による免疫組織化学で観察したところ、野生型マウスの精巣において精子形成細胞の細胞表面に局在するセミノリピドが明瞭に染色された。

DI8 ハイブリドーマから RNA を抽出し、H 鎖と L 鎖の可変部（以下 VH、VL と略）をコードする遺伝子を得た。VH 遺伝子と VL 遺伝子の間に $(Gly_4Ser)_3$ をコードする DNA リンカーを挟んで scFv 遺伝子を作製し、ファージミ

ドベクターpCANTAB 5E に挿入した。得られたファージミド pCANTAB-DI8 を大腸菌株 TG1 に導入した後、ヘルパーファージ M13KO7 を感染させてファージ粒子をレスキューした。得られた多数のファージクローンに対して、M13 ファージの外被に g3p との融合タンパクとして発現される scFv を、サルファタイドとの結合性をもとにスクリーニングした。全ての陽性クローンは挿入 scFv 遺伝子を含んでおり、ファージディスプレイシステムが有効に機能していた。さらに、可溶性の scFv 抗体を得るために、陽性クローン由来のファージを大腸菌株 HB2151 に感染させた。その結果、感染 HB2151 細胞は、分子サイズ 30 kDa の可溶性 scFv 抗体をペリプラズムに分泌することがわかった。可溶性 scFv 抗体は、無処理の DI8 抗体と同様に、サルファタイドとセミノリピドに対して同程度に結合したが、他の糖脂質のガラクトシルセラミドや GM3、他の硫酸化糖鎖であるヘパリン、バイグリカン、デコリンとは結合せず、単鎖でありながら元の抗体の特異性を保持することができた。

〔総　括〕

CST ノックアウトマウスを用いることにより、DI8 とよぶ新しい抗硫酸化糖脂質単クローン抗体を作製した。さらに、この IgG3 抗体の VH 遺伝子と VL 遺伝子を基に、硫酸化糖脂質に対する組換え scFv 抗体を作製した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、ミエリン形成と精子形成に必須であることが遺伝学的に証明されている硫酸化糖脂質の生細胞における動態を追うために、硫酸化糖脂質に対する組換え単鎖可変領域（scFv）抗体の作製を行った。硫酸化糖脂質の合成に働くセレブロシドスルホトランスフェラーゼのノックアウトマウスにスルファチドを免疫して、抗硫酸化糖脂質単クローン抗体 DI8 を得た。DI8 は IgG3 で、脂質に結合した非還元末端のガラクトース 3-硫酸構造を認識することがわかった。DI8 の H 鎖と L 鎖の可変部をコードする cDNA を得、ファージミドベクターに組み込み、ファージディスプレイシステムで scFv 抗体がスルファチドと結合することを確認した。さらに、可溶性の scFv 断片を生産、精製して結合特性を調べ、結合力は弱いが元の DI8 抗体と同様の特異性を保持していることを示した。

本論文は、硫酸化糖脂質を認識する単鎖抗体を初めて作製し、生体内やの硫酸化糖脂質の動態を調べたり、機能を制御するための基盤技術の開発に寄与した。よって、本学の学位を授与するに値するものと判断した。