

○均一糖鎖構造を有する糖タンパク質の調製と評価

“糖鎖リモデリング技術”は、糖タンパク質などに付加する糖鎖構造を改変する技術のことである。我々が行っている“糖鎖リモデリング技術”は、酵素反応を利用して糖タンパク質上の糖鎖を切除した均一なタンパク質（これをアクセプターと呼ぶ）を調製し、別途人為的に調製した任意の糖鎖（これをドナーと呼ぶ）を用意して、このアクセプターとドナーを酵素反応により人為的に連結する。この技術は、任意の糖鎖構造を持つ均一な糖タンパク質を自由自在に合成でき、その糖タンパク質の働きに及ぼす糖鎖の役割などを明らかにすることができる。

現在標的としている糖タンパク質は、免疫グロブリン G (IgG) 抗体である。IgG 抗体は各 2 本の重鎖および軽鎖から構成され、2 本の重鎖の Fc 領域に位置する 297 番目のアスパラギン (Asn297) に N 結合型糖鎖が結合している。抗体医薬品の製造では、ヒト型糖鎖を付加するチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞等の哺乳動物細胞を宿主細胞として用いる場合が多いが、産生された抗体の N 結合型糖鎖の構造は不均一な状態で存在している。我々はその抗体医薬品の糖鎖構造が不均一であることに着目し、乳癌治療薬として使用されている抗 HER2 抗体のトラスツズマブをモデル抗体として、“糖鎖リモデリング技術”により均一糖鎖構造を有する糖タンパク質として調製することで、糖鎖構造と機能に関する研究を進めている。

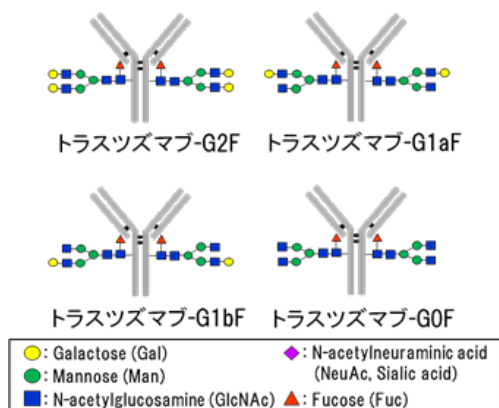
近年、IgG モノクローナル抗体に結合した N 結合型糖鎖から根元のフコース（これをコアフコースと呼ぶ）を欠損させると、抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性が増大することが報告されている。我々は、コアフコースを有する抗 HER2 抗体のアクセプターを用いて、4 種類の複合型糖鎖 (G2F、G1aF、G1bF または G0F) がそれぞれ結合した均一な構造を持つ抗体の調製方法を確立した。さらに、それらに対応するコアフコースを有さない複合型糖鎖 (G2、G1a、G1b または G0) がそれぞれ結合した抗体を含めた均一糖鎖構造を持つ抗体間での生物活性比較を通して糖鎖構造とコアフコースの役割を調べた。その結果、いずれの複合型糖鎖構造においてもコアフコースを有する抗体は Fcγ 受容体に対する解離定数がコアフコースを有さない抗体よりも 10 倍以上の高い値を示した。また、コアフコースを有する抗体の ADCC 活性はコアフコースを有さない抗体に比べて大

Table 1. Dissociation constants (K_D) of mAbs having N-glycans with distinctive structures.

Symbol	Dissociation constant* (K_D , M)
Untreated	$(2.90 \pm 0.49) \times 10^{-7}$
G2	$(1.27 \pm 0.14) \times 10^{-8}$
G1a	$(1.40 \pm 0.21) \times 10^{-8}$
G1b	$(2.36 \pm 0.17) \times 10^{-8}$
G0	$(2.45 \pm 0.15) \times 10^{-8}$
G2F	$(5.36 \pm 0.29) \times 10^{-7}$
G1aF	$(6.37 \pm 0.17) \times 10^{-7}$
G1bF	$(3.69 \pm 0.18) \times 10^{-7}$
G0F	$(3.83 \pm 0.09) \times 10^{-7}$

Notes: K_D values were determined at the steady state from SPR measurements of the affinity between mAbs with N-glycans having structures shown in Fig. 1 and recombinant human FcγRIIIa-V158.

*Values are means ± SE; similar results were obtained in two other experiments.



きく減少・消失した。つまり、抗 HER2 抗体に結合した複合型糖鎖にコアフコースが存在すると抗体の生物活性が著しく低下することを示すことができた。これら調製した抗体は 100%近い純度に精製して評価を行うなど、我々独自の技術やアイデアを駆使することで成果に至っている。

この様な“糖鎖リモデリング技術”では、糖鎖構造の切断や連結を担うエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) という一連の酵素の特性を理解することが非常に重要な鍵となる。つまり、タンパク質の種類、コアフコースの有無、糖鎖構造などに応じてその効果が異なる ENGase を巧みに使い分けて選択する必要がある。しかし、現在見出されている ENGase を使用しても目的の反応が進行しないケースも依然として存在することから、この解決には使用できる ENGase の種類をさらに拡充して特性に関する情報を蓄積する必要がある。その一例として、我々は *Tannerella* 属という歯周病原性細菌より ENGase を新たに単離することに成功し、その基質としての糖鎖構造特異性の解明を行うことで、新規な酵素活性と共に“糖鎖リモデリング技術”への応用の可能性を示している。

この様に、我々は抗体を標的とした“糖鎖リモデリング技術”を確立し、現在はその応用としての検討を進めると共に、他の糖タンパク質への展開も視野に研究を継続している。