Biocombinatorial Chemistry, a Novel Approach Using Phage-Displayed Libraries in Glycobiology —Special Reference to Glyco-Replica Peptides—

バイオコンビケム ファージライブラリーを用いた糖鎖生物学研究の新展開
—糖鎖レプリカペプチドを中心にして—

Ishikawa, Dai; and Taki, Takao

Cellular Technology Institute, Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.

Kawasuno, Kawauchi-cho, Tokushima 777-0192, Japan

FAX: 81 886-65-5662

Key Words : glyco-replica peptide, molecular mimicry, phage library

Abstract

Rapid *in vitro* screening from various molecular libraries has come of age as a molecular recognition technology, which we refer to as “Biocombinatorial Chemistry”. Phage-displayed library, a biocombinatorial chemistry tool, is a representative method based on the affinity binding between the displayed library and target molecule or tissue. Biopanning with the phage-displayed peptide library has been used to determine the epitope of the target antigen protein. We introduced this method to create peptides, which mimic carbohydrate structures using a monoclonal antibody against the carbohydrate moiety of the glycoconjugate. The peptide obtained by this procedure could mimic the function of the carbohydrate. Based on our observations, we proposed to call those peptides “Glyco-Replica Peptides”. In this review, preparation of the peptides and functional roles of the obtained peptides are described.

要 約

様々な分子ライブラリーを用いて迅速にスクリーニングできる分子認識工学の時代がきている。ここでは分子認識工学の一手法としてバイオコンビケムを位置づけている。そのバイオコンビケムとしてファージディスプレイライブラリーは、目的の分子または組織との親和性に基づくスクリーニングの代表的な手法である。抗原タンパク質のエピトープの決定にファージペプチドライブラリーによるパニングが有効な手段として使われてきた。我々はこの手法を導入して糖鎖認識抗体を用いて糖鎖構造を模倣するペプチドの作成を進めてきた。本法で得たペプチドはそれぞれの抗原糖鎖のもつ機能を代替えることが明らかとなった。このような実験事実から、我々はこれらのペプチドを「糖鎖レプリカペプチド」と呼んでいる。このレビューでは糖鎖レプリカペプチドの作成と、得られたペプチドがもつ機能についての解析を中心に紹介する。

A. Introduction

In 1988, Smith constructed a “fusion phage” expressing EcoRI at N-terminus of a phage surface protein, pIII protein which is necessary for infection into a host bacteria (1), and selected the fusion phage with high efficiency from the mixture of the fusion and parental phage by biopanning using an anti-EcoRI antibody. The affinity of the fusion phage against the anti-EcoRI antibody was more than 1000 times, compared with the parental phage. Furthermore, this fusion phage maintained the infectious ability to host bacterial cells. Together with these results, this kind of fusion phage clones became a novel tool for identification of epitopes that are recognized by specific antibodies, and for screening the protein or peptides that bind to the desired molecule. After this, some application techniques were also developed, for example, the cloning of humanized specific antibodies by insertion of the human immunoglobulin cDNA library or cloning of target molecule by insertion of cDNA frag-

A. はじめに

1988年 Smith はファージ(fd phage)表面タンパクの一種で、宿主大腸菌への感染に必須である pIII タンパク質の N 末端に制限酵素 EcoRI を挿入し、EcoRI と pIII タンパク質の融合タンパク質を発現する “フュージョンファージ” を構築した(1)。この “フュージョンファージ” をもとの親ファージと混合し、抗 EcoRI 抗体でバイオパニング(Affinity selection)を行ったところ、親ファージの 1000 倍以上の親和性で “フュージョンファージ” が選択されることが明らかとなった。この “フュージョンファージ” は、宿主への感染能を維持していることから、ある特異的抗体に結合する分子の同定または、微量成分に結合するタンパクの探索に有用であることが示された。この後、ヒト免疫グロブリンの cDNA を用いて、抗体を pIII タンパクと融合させて特異抗体をクローニングしたり、あるいは cDNA 断片を融合させて目的の分子をクローニングする方法など、幅広い応用が開発された。そして、1990 年 Scott と Smith らはランダム

ment into the pIII gene. In 1990, Scott and Smith obtained peptides that bind to an anti-myohemerythrin monoclonal antibody from a phage-displayed random hexamer peptide library(2). Devlin *et al.*(3) and Cwirla *et al.*(4) respectively selected the streptavidin binding peptides and the anti- α -endorphin monoclonal antibody binding peptides, from a pentadecamer and a hexamer peptide library. Until now, various kinds of peptide libraries, such as the library expressed on pVIII phage surface protein, flagellin of *E. coli*, and a surface protein of yeast, were developed, and peptides specifically recognizing the individual target molecules were reported (5–12).

In this paper, we introduce a new approach using the phage-displayed library to the glycobiology field. The following two technologies are described. i) Cloning of glyco-replica peptides that bind to the carbohydrate binding domain of anti-carbohydrate antibodies. ii) Cloning of carbohydrate binding-antibodies or proteins.

B. Glyco-Replica Peptides

In 1985, Murai *et al.* reported that a tri-peptide WRY (Trp-Arg-Tyr, a sequence of No. 13–15 from NH₂ terminal) of HaimII, the α -amylase inhibitor of *Streptomyces griseosporus* YM-25, is a prerequisite for the inhibition of α -amylase activity(13). This result suggests that the structure of WRY mimics that of α 1-4 glucan. Westerink *et al.* showed that a tri-peptide sequence, YRY (Tyr-Arg-Tyr) in the anti- α 2-9 sialic acid monoclonal antibody is a prerequisite for the binding of the antibody to the antigen carbohydrate(14), and then, they demonstrated that the anti-YRY peptide antibody could cross-react with the structure of α 2-9 sialic acid(15).

Cloning of carbohydrate-mimicking peptides within a short time has become available by the introduction of the phage-displayed peptide library method, and many papers concerning this have been reported (16–23). Oldenburg *et al.* and Scott *et al.* (16, 17) simultaneously published the first two papers on the cloning of glyco-mimetic peptides using phage-displayed peptide libraries. They selected respectively octamer and hexamer peptides that bind to Concanavalin A from phage peptide libraries. They revealed that trimer peptide, YPY (Tyr-Pro-Tyr) mimics the mannose residue, and speculated that the epitope bearing the (W)YPY motif binds as a result of both hydrogen bonding with the hydroxyl group of tyrosine residue (which mimic OH group of the sugar) and hydrophilic interactions with carbons on the aromatic side chain (which mimic sugar carbons). Hoess *et al.* obtained a peptide APWLYGPA (Ala-Pro-Trp-Leu-Tyr-Gly-Pro-Ala) by biopanning using the anti-Lewis Y (Le^Y) monoclonal antibody(18), and showed that the octamer peptide inhibited the binding between the anti-Le^Y monoclonal antibody and A431 adenocarcinoma cells that highly express Le^Y. They reported that the tetra-peptide (PWLY) of the octamer was a prerequisite for the binding to the anti-Le^Y monoclonal antibody.

なヘキサペプチド(6 mer)を組み込んだファージディスプレイランダムペプチドライブラリーを作製し(2)、抗ヘムエリトリン抗体に特異的に結合するペプチドをクローニングすることに成功した。また Devlin(3)らおよび Cwirla(4)らはそれぞれ 15 mer および 6mer のペプチドライブラリーを用いて、ストレプトアビジンおよび、抗 α エンドルフィン抗体に特異的に結合するペプチドのクローニングに成功した。以降、pIII タンパク質よりも発現量の高い pVIII タンパク質、大腸菌の纖毛タンパク質または、酵母の表面タンパク質等を用いたいくつかのペプチドライブラリーが開発され、数多くの特定分子に結合するペプチドがクローニングされている(5–12)。

本稿では次の 2 つの話題を中心に我々の最近の知見を交えてファージライブラリーを用いた糖鎖生物学への新しいアプローチを紹介する。i)糖鎖抗体の抗原糖鎖結合ドメインに結合するペプチド(糖鎖レプリカペプチド)のクローニング。 ii)糖鎖結合抗体及び糖鎖結合タンパク質のクローニング。

B. 糖鎖レプリカペプチド

1985 年 Murai らは *Streptomyces griseosporus*YM-25 の α アミラーゼのタンパク性インヒビター(HaimII)のアミノ酸配列を決定し、N 末側の 13 番目から 15 番目の WRY(Trp-Arg-Tyr) の 3 残基が α アミラーゼの酵素活性阻害を起こす配列であることを明らかにした(13)。この結果は WRY が α 1-4 グルカンの構造を模倣し得ることを示唆している。またWesterinkらのグループは抗 α 2-9 シアル酸抗体に対する抗体中の 3mer (YRY;Tyr-Arg-Tyr)がこの抗 α 2-9 シアル酸抗体の結合に必須であることを示した(14)。そして、YRY ペプチドの抗体が α 2-9 シアル酸と交叉反応することも明らかとなった(15)。

最近では上述の分子模倣の考えに基づいた糖鎖構造を模倣するペプチドまたは抗体のクローニングを、ファージライブラリーを用いることで、短期間に行えることが可能になった(16–23)。ファージペプチドライブラリーを用いた糖鎖レプリカペプチドのクローニングは Oldenburg らおよび Scott らによって最初に報告された(16,17)。彼らは α マンノースに結合するレクチンであるコンカナバリン A(ConA)に特異的に結合するペプチドをそれぞれ、8 mer および 6 mer のペプチドライブラリーからクローニングし、3 mer (YPY;Tyr-Pro-Tyr) が α マンノースを模倣し得ることを示唆した。そして、2 つの Tyr 残基の水酸基および芳香環の炭素鎖がそれぞれ α マンノースの水酸基および、炭素鎖を模倣していると考察した。Hoess らは抗 Lewis Y (Le^Y; Le^Y) 抗体に特異的に結合する 8 mer のペプチド(APWLYGPA; Ala-Pro-Trp-Leu-Tyr-Gly-Pro-Ala)を選択した(18)。彼らは、このペプチドは抗 Le^Y 抗体の Le^Y を高発現するアデノカルシノーマ A431 細胞への結合を阻害し、そのペプチドのうちの 4 mer (PWLY)が抗 Le^Y 抗体の結合に必須であることを示した。

Biopanning

Screening of Peptides Which Specifically Bind to Target Molecule

Fig. 1. Biopanning procedure.

We tried to prepare peptides which mimic structures of glycosphingolipids (Lc_4Cer and nLc_4Cer) using two monoclonal antibodies which discriminate the isomeric glycoside linkage (24). A randomly arranged pentadecamer peptide library displayed on pIII protein of filamentous phage was used. The biopanning procedure is shown in Fig. 1. We were able to select two phage clones (AD-1 and AD-2) which bind to a monoclonal antibody against lactotetraosylceramide (Lc_4Cer), AD117, and the peptide sequences expressed on the pIII were determined by DNA sequencing (Table I). The two peptides (AD-1 and AD-2) showed significant homology in nonamer peptide (VPPXFXXY) (Table 1). The same cloning was done using a monoclonal antibody against neolactotetraosylceramide (nLc_4Cer), H11. Three peptides (H11-1, -2 and -3) were obtained and the sequences are shown in Table I. Lc_4Cer and nLc_4Cer have the same carbohydrate sequence with isomeric linkage between Gal and GalNAc. The non-reducing terminal Gal of Lc_4Cer is linked to the penultimate GlcNAc through β 1-3 linkage. On the other hand, the Gal of nLc_4Cer is linked to the GlcNAc through β 1-4. Interestingly, one amino acid sequence of AD-2 is almost the same as that of H11-2, even if each monoclonal antibody has no cross-reactivity against each isomeric glycosphingolipid. Only one amino acid, isoleucine in AD-2 is replaced with tyrosine in H11-2. This replacement seems to reflect the isomeric linkage between Gal β 1-3GlcNAc and Gal β 1-4GlcNAc.

我々は、結合異性体の関係にある糖脂質(Lc_4Cer と nLc_4Cer)を識別する2つのモノクローナル抗体を用いて糖鎖模倣ペプチドを作成することを試みた(24)。実験には繊維状ファージの表面タンパク pIII に発現させた 15 mer ペプチドライブラリーを用いた。パニングの概要を図1に示した。ラクトテトラオシルセラミド(Lc_4Cer)に対するモノクローナル抗体AD117mに結合するクローニングから2つのファージクローン(AD-1およびAD-2)を得た。得られたファージの pIII タンパク質をコードするDNA配列実験から挿入されたアミノ酸配列を決定した(表1)。2つのペプチド(AD-1とAD-2)は9 mer(VPPXFXXY)にホモロジーをもっていた。同じクローニングをネオラクトテトラオシルセラミド(nLc_4Cer)に対するモノクローナル抗体H11を用いて行った(24)。3つ(H11-1,-2および-3)のペプチドが選られた(表1)。 Lc_4Cer と nLc_4Cer は同じ糖鎖配列をもつ結合異性体である。 Lc_4Cer の非還元末端Galは隣のGlcNAcに β 1-3結合しているが、一方 nLc_4Cer のGalはGlcNAcに β 1-4結合している。2つの抗体は異性体に対して互いに交叉反応は示さないが、興味深いことに、AD-2のアミノ酸配列はH11-2とほとんど同じで、AD-2のイソロイシンがH11-2ではチロシンに変わっているだけである。このアミノ酸の違いがGal β 1-3GlcNAcとGal β 1-4GlcNAcの違いを反映しているものと推測される。

Table I. Amino acid sequences (deduced from the DNA sequences) of 15-mer peptides expressed on pIII protein from selected phage clones by biopanning with anti-Lc4Cer antibody (AD117m) and anti-nL c₄Cer antibody (H11).

Consensus	VPPXFXXY
AD-1	RNV <u>P</u> PTFNDVYWIAF
AD-2	VPPCF <u>T</u> LMYCAGVVR
H11-1	FRSFHYHTGRWHWLR
H11-2	RNV <u>P</u> PIFNDVYWWIAF
H11-3	ARFPKELRGSVRSAH

AD-1 and -2 are peptides obtained from selected phage clones by biopanning with AD117m. H11-1, -2, and -3 are peptides obtained from selected phage clones by biopanning with H11. Consensus amino acids are underlined.

In glyco-replica peptides, aromatic amino acids such as tryptophan, phenylalanine, and tyrosine frequently appeared. The hydroxyl group or carbon side chain of these amino acids could mimic part of the carbohydrates. The existence of the aromatic or branched aliphatic amino acids in the glyco-replica peptides could reflect that the binding between carbohydrates and anti-carbohydrate antibodies (or lectins) is mainly occupied by hydrophobic interaction (25).

C. Function of Glyco-Replica Peptides

C-1. Modification of Glycosidase

On the basis of the amino acid sequences of the selected phage clones, nonamer and pentadecamer peptides were synthesized (Table II), then the effects of these peptides on the antigen-antibody reaction as well as the binding activities to galactose binding lectin were examined. For the inhibition of binding in the ELISA system, much higher concentrations of the peptides are required compared with the antigen glycosphingolipid. However, in the case of the binding study on a solid phase such as silica coated glass plates, a small amount (10^{-7} – 10^{-6} g) of the peptides was sufficient to detect the binding. This observation is similar to the inhibition study of anti-glycosphingolipid antibody-antigen reaction by epitope oligosaccharide. The epitope concentration required to inhibit the reaction is more than 500–1,000 times compared with that of antigen glycosphingolipid. Furthermore, reactivity of the glycosphingolipid antigen with the antibody increases when the antigen is embedded in phospholipid-cholesterol liposome. The synthesized nonamer and pentadecamer peptides change their steric configurations freely in aqueous layer, and the frequency of forming a carbohydrate-like structure seems to be very low. But, when the peptides were immobilized on a solid phase or displayed on pIII protein, the frequency of mimicking the epitope structure seems to increase. These observations indicate that

これまで得られた糖鎖レプリカペプチドでは Trp、Phe や Tyr といった芳香族性アミノ酸が良く見られる。これらのアミノ酸の OH 基や側鎖が糖鎖構造を模倣していると推測される。この結果はおそらく、糖鎖と糖鎖抗体またはレクチンとの結合が主に疎水結合によるものである(25)ことを反映していると解釈される。

C. 糖脂質の機能を模倣する糖鎖レプリカペプチド

C-1. 糖鎖レプリカペプチドによる糖代謝酵素活性調節

得られたファージクロンのアミノ酸配列に基づいて表に示す 9 mer と 15 mer のペプチドを合成し、抗原抗体反応に対する影響とレクチンへの結合を調べた。ELISA 系での阻害反応には抗原糖脂質に比較して極めて高濃度のペプチドが必要であったが、一方、固相化したペプチドに対する結合実験では、少量 (10^{-7} – 10^{-6} g) のペプチドで結合が検出できた。この結果はオリゴ糖による抗原-抗体反応の阻害に良く似ている。エピトープのオリゴ糖鎖が抗原抗体反応を阻害するためには抗原糖脂質の 500–1,000 倍の濃度を必要とする。また糖脂質抗原がリン脂質-コレステロールのリポソームに組み込まれていれば抗体との反応性は著しく増加する。合成した 9 mer および 15 mer ペプチドは水溶液中では立体構造を自由に交換するので糖鎖に近い立体構造をとる頻度は極めて少ないと思われる。しかし、いったんペプチドが固相あるいは pIII タンパク質などに発現されるとエピトープ構造をとる頻度は大きく増加するものと推測される。この結果は目的の分子の微小環境が結合あるいは分子設計をする上でいかに重要であることを示している。

Table II . Synthesized amino acid sequences of 15-mer and 9-mer peptides, and their specificity for binding to the monoclonal antibodies and lectin.

	Amino acid sequence	AD117m(μ g) ^a	H11(μ g) ^a	IH ₅₀ (AD117m) (μ g/ml)	<i>R.communislectin</i> (μ g) ^a
AD-2-9a	VPPYFTLMY	2	8	540	2
AD-2-9b	VPPCFITLMY	8	8	150	nd
AD-2-9c	VPPTFTLMY	8	8	270	nd
AD-2-9d	VPPAFTLMY	nd	nd	1800	8
AD-2-9e	VPPSFTLMY	nd	nd	600	8
AD-1-9	VPPTFNCVY	nd	nd	1600	nd
H11-2-9	RNVPPTFNDVYWIAF	0.125	0.5	130	4
H11-2-15	VPPIFNDVY	nd	nd	>5000	nd
H11-1-15	RNVPIFNDVYWIAF	0.25	0.5	330	2
H11-3-15	FRGFHYHTGRWHWLR	nd	nd	1600	nd
H11-3-15	ARFPKELRGSVRSAH	nd	nd	>5000	nd

^aAmount of peptide required for binding of antibody and lectin. Binding study was done using the peptides immobilized on a silica gel coated plate. nd, not detected. IH₅₀ (AD117m) is the amount p'f each peptide required for 500/0 inhibition of the binding between Lc₄Cer and AD 117m in ELISA system.

the microenvironment surrounding the target molecules is important for affinity binding and molecular design.

Next, we examined the modification activity of the peptides on the β -galactosidase activity using nLc₄Cer as the substrate, in order to confirm whether the peptides really mimic the carbohydrate structure. The effects of the nLc₄Cer-replica peptides on Jack bean β -galactosidase activity were investigated. Figure 2 shows that dose-dependent inhibition by nLc₄Cer-replica using 10m units of the enzyme and 5 μ g of nLc₄Cer. Interestingly, some nLc₄Cer-replica peptides, especially H11-3 which has very weak binding activity to H11, showed remarkable stimulation of the enzyme activity at the very low enzyme concentration (0.1–1 m unit) in which a reaction product was hardly detected. An excess amount of the peptides seems to compete for the substrate-binding site with nLc₄Cer resulting in inhibition, and suitable amounts of substrate mimetic peptides may rather activate by some interaction with the enzyme. These results suggest that the glyco-replica peptides can be used to modify the glycosphingolipid-metabolizing enzyme.

C-2. Tumor Suppression by Glyco-Replica Peptides

Carbohydrates-chains of glycoconjugates play important roles in the early stage of the lymphocyte at the inflammation site and tumor metastasis events. We reported that a disialoganglioside GD1 α expressed on the murine lymphosarcoma RAW117-H10, which have a high metastatic tendency for the liver, is involved in the adhesion between H10 cells and the target cells, HSE (Hepatic sinusoidal endothelial) cells (26). The adhesion was inhibited by the addition of GD1 α . The inhibitory effect on the adhesion was also observed by the addition of an anti-GD1 α monoclonal antibody (KA17) to the tumor cells. We next prepared GD1 α -replica peptides using the phage-dis-

次にペプチドが糖鎖構造を模倣しているかを調べるため

nLc₄Cer を基質に用いて β ガラクトシダーゼ活性に及ぼす影響を検討した(24)。5 μ g の nLc₄Cer を基質として用いた場合、10m unit β ガラクトシダーゼ活性はペプチドの量依存的に阻害された(図2)。ところが興味深いことに、この実験条件では 5 munit の酵素量を用いてはじめて活性が検出されるが、ある種の nLc₄Cer-レプリカペプチド、特に H11 抗体への結合性が最も弱いペプチド H11-3 は 0.1~1 munit の酵素量でグリコシダーゼ活性を強く活性化した。過量のペプチドは基質の nLc₄Cer と競合することが考えられるが、適量のペプチドはむしろ酵素を活性化している。この結果は糖鎖レプリカペプチドがスフィンゴ糖脂質代謝酵素を制御する道具として有用であることを示唆している。

C-2. 糖鎖レプリカペプチドによるがん転移阻止

糖鎖は炎症、がん転移における細胞細胞接着の初期反応に深く関与している。我々は肝臓への高い転移能を有するマウス悪性リンパ腫細胞 RAW117-H10 細胞にジシアロガングリオシド GD1 α を見出し、この糖脂質が H10 細胞とその標的組織由来の肝類洞内皮細胞(Hepatic sinusoidal endothelial cell, HSE cell)との細胞接着に関与していることを報告した(26)。がん細胞と内皮細胞との接着反応は GD1 α の添加によって阻害され、またがん細胞

Fig. 2. Inhibition of Jack bean β-galactosidase activity by the glyco-replica peptides. A: Incubation mixture contained 5μg of nLc₄Cer, 10mU of the β-galactosidase, and 50μg of peptide in 20 μl of 0.1 M acetate buffer, pH 4.5. Incubation was done at 37 C for 2h. B: Dose-dependent inhibition of the β-galactosidase activity by a nLc₄Cer-replica peptide, H11-1

played peptide library and KA17. Four phage clones having affinity to the monoclonal antibody KA17 were obtained and the amino acid sequences of the pentadecamer peptides were determined (27). The sequences are shown in Table 3. Peptide #3 with the following sequence WHWRHRIPLQLAAGR showed the highest affinity to KA17 and also inhibited the adhesion of RAW117H10 cells to the HSE cells (Fig. 3). The synthesized pentadecamer were used for *in vivo* study. RAW117-H10 cells (1×10^5 cells) and 200μg of the peptide were injected into BALB/c mice via the portal vein. At 5 days after injection, tissue weight was determined to evaluate the extent of metastasis. The experiment showed almost complete inhibition of the metastasis of the tumor cells to the lung and spleen, and about 50 % inhibition to the liver.

D. Development of Peptide Vaccines by Glyco-Replica Peptides

It has been demonstrated that antibodies raised by the immunization with a glyco-replica peptide can cross-react with the original antigen carbohydrates. (28, 29). Westerink *et al.* immunized a synthesized 9mer peptide (CARIYYRYDGFAY) containing tri peptide YRY, which mimics major capsular polysaccharide (MCP) α2-9 sialic acid of *N. meningitidis*, into BALB/c mice, and showed the inhibitory effect on the bacterial infection (14). Because of the similarity of structure between α2-9 sialic acid and Fucα1-3GlcNAc of Le^y antigen, they immunized with YRY peptide and mannose-mimicking tri-peptide YPY (Tyr-Pro-Tyr). Then, they examined whether the obtained anti-peptide anti-sera could protect the human immunodeficiency virus (HIV) infection (28, 29). These anti-peptide anti-sera rec-

を抗 GD1α モノクローナル抗体 KA17と反応させておくことによって阻害された。次に我々は KA17 および、ファージディスプレイペプチドライブラリーを用いて GD1α-レプリカペプチドを作成した。KA17 に結合する 4 種のファージクローンが得られ、そのペプチド配列を決定した(27)。その結果を表3にまとめた。ペプチド#3 (WHWRHRIPLQLAAGR)は中でも最も高い抗体結合性を示しRAW117-H10とHSE細胞との接着を抑制した(図3)(27)。また、GD1αレプリカペプチドとH10細胞(1×10^5)とを同時にマウス門脈から投与、5日後のH10細胞の肺、脾臓、および肝臓への転移を組織重量を測定して検討したところ、肺、脾臓へのH10細胞の転移はほぼ完全に阻止され、肝臓においても50%の阻害効果が認められた。

D. 糖鎖レプリカペプチドワクチン

糖鎖レプリカペプチドを免疫すると、そのペプチド抗体はもとの抗原となる糖鎖と交叉反応し得ることが示されている(28, 29)。Westerink らは、前述の *N. meningitidis* (髄膜炎菌)の夾膜多糖(MCP)のα2-9シアル酸を模倣するトリペプチドYRYを含む9merのペプチド(CARIYYRYDGFAY)を合成し、これを抗原としてBALB/cマウスに免疫し、*N. meningitidis*の感染を抑えることを示した(14)。また、MCPのα2-9シアル酸とルイスY(Le^y)のFucα1-3GlcNAc構造が類似していることに着目し、YRYおよび、マンノースを模倣するトリペプチドYPY(Tyr-Pro-Tyr)を抗原として、これらの抗体がHIVの糖タンパクに反応することでHIV感染阻止を引き起こすかどうかを調べた(28, 29)。これらのペプチド抗体はHIVの糖タンパク質gp120などに結合するが糖

Table III . Epitope sequence of phage clones selected by biopanning with KA17

Phage	Epitope sequence ^a	Clones
#1	FRSDVRFW H WSTPFM	11
#2	VRVYFGFGPPYFGG	9
#3	WHWR H R I PLQLAAGR	2
#4	<u>RYWLYGDPASFPVNH</u>	2

^aEpitope sequences were deduced from DNA of the inserted pentadecapeptide. The amino acid sequence is expressed by single-letter abbreviation; aromatic amino acids are in bold type, positive charged amino acids are underlined.

Fig. 3. Effect of the GD1 α -replica peptides on the adhesion between RAW117-H10 cells and HSE cells. Indicated amounts of peptides were added to the co-culture system of 35S-labeled RAW117-H10 cells and HSE cells. After 30 min incubation, adhesion of the H10 cells to the HSE cells were observed under a microscope and counted with a scintillation counter.

ognized HIV glycoproteins such as gp120, but not the carbohydrates-removed HIV. Mice immunized with these peptides were protected from HIV infection. These results indicate that peptides, which mimic carbohydrate structures, could be better vaccines than carbohydrate vaccines for bacterial or virus infection diseases.

E. Cloning of Carbohydrate-Binding Proteins Using the Phage Libraries

E-1. Cloning of Human Single Chain Anti-Carbohydrate Antibody (V Gene Library)

Antibodies against disease-specific carbohydrate antigens are available for immune therapy. However, the monoclonal antibodies have to be humanized for therapeutic use. The ph-

鎖を除去した HIV には結合しなかった。そして、これらのペプチドを免疫したマウスでは HIV の感染が抑えられることを明らかにした。今後、細菌・ウイルスや寄生虫による感染症または腫瘍免疫におけるワクチンとして今後の研究が期待される。

E. ファージライブラリーによる糖鎖結合タンパクのクローニング

E-1. ヒト糖鎖抗体のクローニング(V gene ライブラリー)

ある疾患特異的糖鎖に対する糖鎖抗体(モノクローナル抗体)は、治療用抗体として利用されている。しかし、これらの中和抗体を疾患に応用する際に、ヒト型に変換する必要性が生じる場合がある。ファージディスプレイの技術はヒト型糖鎖抗体を

age-displayed library technique enabled us to produce human anti-carbohydrate antibodies within a short time (30–33). Reason *et al.* selected specific human anti-carbohydrate antibodies against *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide (Hib PS) from a phage-displayed V-gene library (33). They separated peripheral blood mononuclear cells from Hib PS vaccine-immunized human, and constructed a cDNA library encoded variable region of immunoglobulin. After this, the cDNA library was inserted into the pIII gene of M13 phage and the fusion proteins were expressed as a phage displayed human immunoglobulin library (V-gene library). Two distinct Hib PS-specific antibody displaying phage clones were isolated from the library. Compared with the sequences of Fab fragments of the obtained two phage clones, they found that the same V_H region paired with two different V_L regions.

E. Cloning of Carbohydrate-Binding Proteins

Yamamoto *et al.* constructed a phage-displayed protein library, in which cDNAs prepared from HeLa cells highly expressing human histo-blood group A transferase were inserted. The library size was 5.3×10^6 and the average of the inserted cDNA size was 760 bp. The library was reacted for the initial round of biopanning with mucin, which is a substrate for the A transferase. After three rounds of biopanning, they failed to clone the A transferase, possibly because of the enzyme's weak affinity with the target. However, they obtained selectively enriched phage clones expressed galectin-3, a galactose/lactose-specific animal lectin (34). This is the first report of the cloning of carbohydrate-binding proteins using a phage-displayed library.

F. Future Directions

The phage-displayed library is a useful tool for selective cloning of glyco-replica peptides and carbohydrate-binding proteins in the short term. It would be generally accepted that peptides selected by biopanning of carbohydrate specific antibodies using the phage-displayed peptide library mimic the carbohydrate structure as well as their functions. It may be possible to select proteins with weak affinity but high specificity to the target molecule by using the protein library expressed on pVIII protein rather than pIII protein, because about 2,000 molecules of pVIII are expressed on the phage surface. Phage-displayed library technology made it possible to raise humanized antibodies against microorganism specific carbohydrates and toxins in an *in vitro* system. It will be possible to use the glyco-replica peptides or humanized antibody obtained by the phage-displayed library for therapeutic purposes in the near future. When the relationship between the peptide sequences and the carbohydrate structures is analyzed and the data base becomes available, it may be possible to design novel types of bio-active carbohydrate-replica peptides and to expect the carbohydrate functions from the peptide sequences.

簡便にクローニングすることを可能にした (30–33)。Reason らはインフルエンザウイルスの多糖(*Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide; HibPS)に対するヒト型抗体をファージディスプレイ法を用いてクローニングした。彼らは HibPS ワクチンを免疫したヒトから末梢血単核球細胞(peripheral blood mononuclear cells)を単離し、可変領域(variable region)の cDNA ライブラリーを作成した。その後、M13 ファージの pIII タンパクに融合させ、発現させることで、ファージディスプレイヒト免疫グロブリンライブラリー(V geneライブラリー)を構築した。このライブラリーから彼らは 2 種類の HibPS に特異的に結合するファージのクローニングに成功した。この 2 種類のファージに発現されている Fab フラグメントの配列を比較したところ、V_H鎖は同一のものであったが、V_L鎖の異なるものであることが判明した。

E. 糖鎖結合タンパクのクローニング

Yamamoto らは、A 型糖鎖抗原を高発現させた HeLa 細胞から作製した cDNA ライブラリーを組み込んだファージディスプレイ(5.3×10^6 クローン)を構築した。このライブラリーに挿入された DNA は平均 760bp であった。このファージライブラリーをムチンと反応させることで、糖鎖に結合するファージクローンを選別したところ、彼らが期待した A 型合成酵素のクローニングは失敗に終わったが、ガレクチン-3 (ガラクトース/ラク トース特異的動物レクチン)を発現するファージをクローニングすることに成功した (34)。

F. おわりに

ファージディスプレイペプチドライブラリーは非常に短期間のうちに目的とする糖鎖レプリカペプチドまたは糖鎖結合タンパク質をスクリーニングできる優れた方法である。これまで紹介した結果から、この方法を用いて作成したペプチドが糖鎖構造および機能を模倣することが一般的に受け入れられると思われる。pIII タンパク質はファージ上でわずか 5 分子程度しか発現していないため、結合親和性の非常に高い分子のスクリーニングに有効である。pIII タンパク質の代わりに、pVIII タンパクを使用することで、結合親和性の弱い(しかし、結合特異性の高い)分子も得ることが可能になると思われる。ファージライブラリーの技術により微生物特有の糖鎖や毒素に対するヒト型抗体の作成が可能になった。近い将来には、糖鎖レプリカペプチドや本法で作成されたヒト型抗体が治療的に使われるようになるであろう。今後、どのペプチド鎖がどの糖鎖構造を模倣しているかの相関関係が明らかにされ、そのデータベースが整えば、糖鎖構造から新規生理活性ペプチドを調製することが可能になり、またペプチドの配列から糖鎖の新しい機能を予測できるようになると考えられる。

References

1. Smith, G.P.(1985) *Science* **228**, 1315–1317
2. Scott, J.K., and Smith, G.P.(1990) *Science* **249**, 386–390
3. Devlin, J.J., Panganiban, L.C., and Devlin, P.E.(1990) *Science* **249**, 404–406
4. Cwirla, S.E., Peters, E.A., Barrett, R.W., and Dower, W.J.(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6378–6382
5. Blond-Elguindi, S., Cwirla, S.E., Dower, W.J., Lipshutz, R.J., Sprang, S.R., Sambrook, J.F., and Gething, M.-J.H.(1993) *Cell* **75**, 717–728
6. Nishi, T., Budde, R.J.A., McMurtry, J.S., Obeyesekere, N.U., Safdar, N., Levin, V.A., and Saya, H.(1996) *FEBS Lett.* **399**, 237–240
7. Barry, M.A., Dower, W.J., and Johnston, S.A.(1996) *Nature Med.* **2**, 299–305
8. Pasqualini, R., and Rouslahti, E.(1996) *Nature* **380**, 364–366
9. Boder, E.T., and Wittrup, K.D.(1997) *Nature Biotech.* **15**, 553–557
10. Schumacher, T.N.M., Mayr, L.M., Minor Jr, D.L., Mihollen, M.A., Burgess, M.W., and Kim, P.S.(1996) *Science* **271**, 1854–1857
11. Wrighton, N.C., Farrell, F.X., Chang, R., Kashyap, A.K., Barbone, F.P., Mulcahy, L.S., Johnson, D.L., Barrett, R.W., Jolliffe, L.K., and Dower, W.J.(1996) *Science* **273**, 458–463
12. Fukumoto, T., Torigoe, N., Kawabata, S., Murakami, M., Uede, T., Nishi, T., Ito, Y., and Sugimura, K.(1998) *Nature Biotech.* **16**, 267–270
13. Murai, H., Hara, S., Ikenaka, T., Goto, A., Arai, M., and Murao, S.(1985) *J.Biochem.* **97**, 1129–1133
14. Westerink, M.A., Giardina, P.C., Apicella, M.A., and Kieber-Emmons, T.(1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4021–4025
15. Hutchins, W.A., Adkins, A.R., Kieber-Emmons, T., and Westerink, M.A.(1996) *Mol. Immunol.* **33**, 503–510
16. Oldenburg, K.R., Loganathan, D., Goldstein, I.J., Schultz, P.G., and Gallop, M.A.(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5393–5397
17. Scott, J.K., Loganathan, D., Easley, R.B., Gong, X., and Goldstein, I.J.(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5398–5402
18. Hoess, R., Brinkmann, U., Handel, T., and Pastan, I.(1993) *Gene* **128**, 43–49
19. Phalipon, A., Folgori, A., Arondel, J., Sgaramella, G., Fortugno, P., Cortese, R., Sansonetti, P.J., and Felici, F.(1997) *Eur.J.Immunol.* **27**, 2620–2625
20. Zhang, H., Zhong, Z., and Pirofski, L.A.(1997) *Infect.Immun.* **65**, 1158–1164
21. Kieber-Emmons, T., Luo, P., Qiu, J., Agadjanyan, M., Carey, L., Hutchins, W., Westerink, M.A., and Steplewski, Z.(1997) *Hybridoma* **16**, 3–10
22. Harris, S.L., Craig, L., Mehroke, J.S., Rashed, M., Zwick, M.B., Kenar, K., Toone, E.J., Greenspan, N., Auzanneau, F.-I., Marino-Albernas, J.-R., Pinto, B.M., and Scott, J.K.(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2454–2459
23. Pincus, S.H., Smith, M.J., Jennings, H.J., Burritt, J.B., and Glee, P.M.(1998) *J.Immunol.* **160**, 293–298
24. Taki, T., Ishikawa, D., Hamasaki, H., and Handa, S.(1997) *FEBS Letter.* **418**, 219–223
25. Elgavish, S., and Shaanan, B.(1997) *TIBS* **22**, 462–467
26. Taki, T., Ishikawa, D., Ogura, M., Nakajima, M., and Handa, S.(1997) *Cancer Res.* **57**, 1882–1888
27. Ishikawa, D., Kikkawa, H., Ogino, K., Hirabayashi, Y., Oku, N., and Taki, T.(1998) *FEBS Lett.* **441**, 20–24
28. Agadjanyan, M., Luo, P., Westerink, M.A., Carey, L.A., Hutchins, W., Steplewski, Z., Weiner, D.B., and Kieber-Emmons, T.(1997) *Nature Biotech.* **15**, 547–551
29. Kieber-Emmons, T.(1998) *Immunol. Res.* **17**, 95–108
30. Deng, S.-J., MacKenzie C.R., Sadowska, J., Michniewicz, J., Young, N.M., Bundle, D.R., and Narang, S.A.(1994) *J.Biol.Chem.* **269**, 9533–9538
31. Deng, S.-J., MacKenzie C.R., Hiram, T., Brousseau, R., Lowary, T.L., Young, N.M., Bundle, D.R., and Narang, S.A.(1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4992–4996
32. Dinh, Q., Weng, N.-P., Kiso, M., Ishida, H., Hasegawa, A., and Marcus, D.M.(1996) *J.Immunol.* **157**, 732–738
33. Reason, D.C., Wagner, T.C., and Lucas, A.H.(1997) *Infect.Immun.* **65**, 261–266
34. Yamamoto, M., Kominato, Y., and Yamamoto, F.(1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 194–199

Received on June 25, 1999, accepted on August 10, 1999

Profile of Authors

Takao Taki is Director General of the Molecular Medical Science Institute of Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. He graduated in Biochemistry in 1966 at the Shizuoka College of Pharmacy and obtained his PhD in 1975 from the same university. From 1976 to 1978, he held a post-doctoral position at Professor J.

Kanfer's lab. in the University of Manitoba and isolated phospholipase D from rat brain. He moved to Tokyo Medical and Dental University as associate professor in 1988. In 1997, he moved to his present position. His major research interests focus on the sensitive detection of disease-associated molecules and therapeutic approach by molecular design using phage peptide libraries.

Dai Ishikawa was born in 1968 and studied biochemistry at the Saitama University. He received his Ph.D. in 1997 with Dr. T. Taki and Prof. Dr. S. Handa at the Tokyo Medical and Dental University on the development of the transferring lipids from TLC plates to plastic plates (TLC blotting). He is working on the preparation of glyco-

replica peptides, which mimic carbohydrate structures, using a phage displayed-peptide library at the Molecular Medical Science Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. Currently, his research interests are the development of vaccines using glyco-replica peptides or peptide mimetics.