

「遺伝子発現と機能に関する抗体を用いたタンパク質レベルでの網羅的及び体系的解析法の開発」

(H11年～H15年)

平成13年度予算額 1.6億円

研究代表者：黒澤良和（藤田保健衛生大学） 研究体制：藤田保健衛生大学他3機関

研究の概要・目標	諸外国等の現状	研究進展・成果がもたらす利点
<p>1 何を目標しているのか 抗体を用いた遺伝子発現状況と機能を体系的に解析する方法の開発。</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>I期の目標： ●タンパク質レベルで遺伝子発現状況やそれらのネットワークを体系的に解析できる技術を開発し、1,000種類のタンパク質について、その発現状況やネットワークの解析を目指す。 ●タンパク機能欠損動物作成のための技術確立し、<u>キョウト動物</u>を作製する。</p> <p>II期の目標： ●解析の自動化を図り年間数1,000種のタンパク質について、その発現状況やネットワークの解析を目指す。 ●100種以上のキョウト動物の作製を目指す。</p> </div> <p>2 何を研究しているのか 抗体による遺伝子発現・ネットワークの体系的解析法の開発及び、抗体を用いた体系的遺伝子機能解析法の開発</p> <p>3 何が新しいのか 動物が作り得るほぼあらゆる抗体を網羅した抗体ライブラリを用いて、体系的な遺伝子発現・ネットワーク解析法及び、遺伝子機能解析法を確立しようとする点が新しい。</p>	<p>1 現状及び我が国の水準</p> <p>遺伝子関連特許出願件数では欧米に大きく差をつけられているのが現状である。本プロジェクトと同様なほぼあらゆる抗体を網羅したようなライブラリはなく、また、このような抗体ライブラリを用いた、体系的な遺伝子発現状況解析法や遺伝子機能解析法の開発が行われているとは聞いていない。</p> <p>抗体：高等動物に非自己物質が生体内に侵入するとこれと特異的に結合するタンパク質が生産される。このタンパク質を抗体と呼ぶ。</p>	<p>1 世界の水準との関係</p> <p>本解析法が確立することにより、各種生物の機能解析が効率的に行われることとなり、特許取得競争における欧米との差が縮められることが期待される。</p> <p>2 波及効果</p> <p>生物現象や生体機能の解明が進むといった生物、医学、薬学分野への幅広い波及効果が期待される。</p>

遺伝子発現と機能に関する抗体を用いたタンパク質レベルでの網羅的及び体系的解析法の開発

研究代表者 黒澤良和(藤田保健衛生大学教授)

遺伝子発現・ネットワークと機能の体系的解析法の開発

抗体による遺伝子発現・ネットワークの体系的解析法の開発

タンパク質レベルで遺伝子発現・ネットワークを体系的に解析する技術の開発

(国立遺伝学研究所 藤田保健衛生大学 (株)医学生物学研究所)

線虫を使った遺伝子発現・ネットワーク解析

抗原-抗体結合様式の研究

抗体作成法の効率化

(今後自動化技術等について
適宜特許出願予定)

抗体を用いた体系的遺伝子機能解析法の開発

抗体の細胞内発現技術の研究 (藤田保健衛生大学)

タンパク質機能欠損C.elegansの
作成に関する研究

(国立遺伝学研究所)

タンパク質機能欠損マウスの
作成に関する研究

(農業生物資源研究所)

第 I 期研究における所用経費

「遺伝子発現と機能に関する抗体を用いたタンパク質レベルでの網羅的及び体系的解析法の開発」

(単位:千円)			
研究項目	担当機関等	研究担当者	所用経費
1. 網羅的抗体作製による遺伝子発現の体系的解析法の開発			402,619
(1)抗原の発現と精製—精製抗原を用いたマウスの免疫—抗血清の調製及び脾臓滴出—mRNAの調製に関する研究	(株)医学生物学研究所	扇居久義	157,011
(2)網羅的抗体作製による遺伝子発現の体系的解析法の確立	藤田保健衛生大学	黒澤良和	158,264
(3) <i>C.elegans</i> を用いた発現プロフィールの解析に関する研究	国立遺伝学研究所	小原雄治	87,344
2. <i>in vivo</i> 自己抗体発現による体系的遺伝子機能解析法の開発			78,221
(1) <i>in vivo</i> 自己抗体発現による体系的遺伝子機能解析の開発	藤田保健衛生大学	黒澤良和	21,454
(2)細胞内発現抗体(<i>intrabody</i>)を用いたタンパク質機能欠損 <i>C.elegans</i> 作製に関する研究	国立遺伝学研究所	小原雄治	11,360
(3)細胞内発現抗体(<i>intrabody</i>)を用いたタンパク質機能欠損マウスの作製に関する研究	農業生物資源研究所	関川賢二	45,407
3. 研究管理	(株)医学生物学研究所		1,882
合 計			482,722

[研究成果の概要]

1. 網羅的かつ体系的抗体単離法の確立

本プロジェクトの根幹をなす技術は、ファージディスプレイ系を用いることにより、タンパク質表面の様々な構造を認識し、特異的に結合する抗体を数多く含む抗体ライブラリーを作製したことである。抗体を単離する過程は、対象抗原の調製—抗体ライブラリーのスクリーニング—得られた抗体の検定からなる。我々は AIMS ライブラリーと名付けた 10^{11} 個のクローンからなり、数 10 名分のヒト抗体レパートリーに相当する抗体ライブラリーを作製し、それを抗体のマスターソースとして用いる技術を開発することから開始した。線虫の場合、対象抗原は 19,000 種の遺伝子産物であり、ゲノムワイドな解析ツールとなり得るためには、多数の抗原に対する抗体単離の同時処理が必要となる。多数の対象抗原の同時作製法として、膜上でのオリゴペプチド合成 (96 穴プレートサイズの膜上に 384 種のペプチド同時合成可能) を試みたが、合成されたオリゴペプチドに結合する抗体の中でタンパク質に結合する性質を示すものが含まれなかった。cDNA を大腸菌中で合成させ、更に選択的にビオチン化するベクター (Pinpoint ベクター) を用いた場合は、スクリーニングの結果、単離される抗体集団の中でベクターにコードされた領域に結合する抗体の割合が高く、目的とする抗体の得られる率が極端に低かった。そこで、各抗原について His-tag を付加した形で発現させて、Ni-column で精製する方法を採用した。

抗体ライブラリーのスクリーニングに関しては、チューブに抗原を付着させるパニング法から 96 穴プレート使用へと変更し大幅なスケールダウンを可能とした。更に抗原にビオチンを付加し、ファージ抗体をストレプトアビジンビーズで回収する方法も導入した。Path-finder 法の導入により、抗原が混合物であっても対象とする抗原に結合した抗体を選択的に回収する方法を確立した。AIMS ライブラリーを抗体単離の唯一のソースとして用いる方法で残された最大の問題は、発現プロフィール解析試薬となり得る抗体が得られる頻度の低さであった。

本プロジェクトとは独立して小原研で実施されている *C. elegans* ゲノムプロジェクトの一部として、大腸菌で発現させた抗原を用いてラットを免疫し、その抗血清を用いて発現プロフィールを解析した結果は、非常に高い確率で抗血清が検出試薬として働くことを示していた。抗血清の場合は、ポリクローン抗体で cross-reactivity の問題があること、使用量に限界があること等の問題点があるが、免疫した動物の脾臓から mRNA を調製し、ファージディスプレイ法を用いてライブラリー化すれば、目的とする性質を示す抗体をモノクローンの形で単離できる。各抗原毎にライブラリー化することは、AIMS ライブラリーのようなマスターライブラリーを用いる方法と比較して、莫大な労力を要すると予想されたが、作製するライブラリーサイズが AIMS ライブラリーと比較して 1/100 程度で充分であること、更に作製したライブラリーに含まれる抗体は、発現プロフィール用抗体、Western ブロット用抗体、免疫沈降用抗体等、様々な性質のものを含むと期待でき、更にそれを単離できる見通しがついたのでこの方針に変更した。ライブラリーサイズが小さくて良いということ

は、目的とする抗体の存在頻度が高く、スクリーニングに必要なファージ粒子の数も大幅にスケールダウンできることを示す。

具体的には、大腸菌での cDNA の発現とその精製—マウスに対する免疫—抗血清の調製と脾臓の摘出—抗血清を用いた発現プロフィールの解析—脾臓 mRNA からライブラリーの調製—抗体のモノクローン化—それを用いた解析という行程からなり、先ず最初の目標として 10 抗原/週に対応できる体制を構築し、線虫母系遺伝子約 400 種を対象に実施している。

II. タンパク機能に影響を及ぼす抗体単離と利用技術開発

ファージディスプレイ抗体の場合、抗原に物理的に結合するという性質に依存して単離するために、どのように調製された抗原を用いるか、又、そのライブラリーの中にその抗原に結合する様々な抗体がどのような存在頻度で含まれているかが結果を大きく左右する。又、スクリーニングを複数回繰り返すため、得られた抗体に大きな片寄りが生じることも頻繁に起こる。そこで我々は AIMS ライブラリーを抗体のマスターソースとして利用する方法、その場合も Fab 型抗体、single-chain Fv 型抗体の選択肢が存在する、1 で記したように、抗原で免疫したマウスの脾臓を用いて抗原毎に作製した抗体ライブラリーを利用する方法を使い分けることとした。更に L 鎖を持たず H 鎖のみで抗原と結合する特異な性質をしたラクダ抗体についても利用可能にした。オーストラリアで食肉用としてと殺されるラクダ 22 頭分脾臓をフレッシュな形で入手し、それを材料に 10^{10} クローンからなる VIII 型ラクダ抗体ライブラリーを作製した。このラクダ抗体ライブラリーをスクリーニングしたところ、抗原に結合する抗体は必ず単離できた。抗原が酵素の場合はその酵素作用を抑制するのみならず亢進する抗体も高い確率で得られた。以上、性質が大きく異なる 3 種の抗体ライブラリーを使い分けて以下のような成果が得られた。

1. タンパクの相互作用を阻害する抗体

ポストゲノム時代における解析対象の柱の一つとして相互作用するタンパク間の関係を示すマップ作製が進行している。その多くは酵母の two-hybrid 系を利用している。ここで明らかにされるタンパク相互作用を阻害するとどのような効果をもたらすか、その表現型解析手段の一つとして抗体をもちいる方法の開発を進めている。具体的には、関川研究室で実施されている WASP タンパクの dominant-negative 型トランスジェニックマウスの系を用いて WASP-WIP 相互作用を抑制する抗体単離を行った。ここで開発した方法は、より一般的に two-hybrid 系で相互作用することが示されるタンパク間の相互作用を阻害する抗体単離に用いることができる。

2. 酵素機能を抑制する抗体

ラクダ抗体ライブラリーから酵素機能を抑制する性質を示す抗体が高頻度に単離できることが判明したので、*C. elegans* の vulva 形成に関与するタンパク、マウスでのシグナル伝達に関与するタンパクの機能阻害抗体を利用したトランスジェニック動物作製を進めている。

3. レセプターに対するアゴニスト、アンタゴニスト作用を示す抗体単離

レセプターに特定の標識をつけた形で細胞膜やウイルス粒子上に発現し、その標的をメルクマールにして、そのレセプターに結合する抗体を単離する方法(path-finder法)を導入したことにより、様々なレセプター（とりわけ7回膜貫通型）に結合する抗体単離が可能になった。抗体単離にラクダ抗体ライブラリーを利用するとアゴニスト及びアンタゴニスト作用を示す抗体の単離が期待できる。

研究成果公表等の状況

【研究発表等】

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	1 件	1 件	35 件	37 件
国外	6 + (2) 件	3 件	12 件	21 + (2) 件
合計	7 + (2) 件	4 件	47 件	58 + (2) 件

(注：既発表論文について記載し、投稿中の論文については括弧書きで記載のこと)

【特許出願等】 2 件 (国内 2 件、 国外 2 件)

【受賞等】 0 件 (国内 0 件、 国外 0 件)

【主要雑誌への研究成果発表】

Journal	Impact Factor	サブテーマ 1	サブテーマ 2	合計
J. Immunol. Methods	1.950	1		1
Protein Engineer.	3.209	1		1
Development	10.088	1		1
Current Biol.	8.733	1		1
J. Biol. Chem.	7.666	1		1
Nature Genetics	30.693	1		1
主要雑誌小計	62.339	6		6
発表論文合計	62.339	6		6