

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

I 試験研究の全体計画

1. 研究の趣旨

我々の作製した1,000億種の独立したクローンからなるファージ抗体ライブラリーは、タンパク質表面のどのような構造（エピトープ）も認識し、特異的に結合する抗体を必ず含んでいる。現在ゲノムサイエンスの急速な展開により様々な生物種の全ゲノム一次配列が決定されつつある。今後個々の遺伝子の機能、とりわけそこにコードされるタンパク質の機能解析が焦点となるが、そのためには多数のタンパク質を対象とする網羅的及び体系的解析法が開発される必要がある。作製した抗体ライブラリーは多数のタンパク質に対する抗体を短期間に単離調製することが可能であるという特性を有するので、本研究では線虫 (*C. elegans*) を例に多数の mRNA によって出来るタンパク質に対する抗体を網羅的かつ体系的に単離調製し、発生分化段階におけるタンパク質レベルでの個々の遺伝子の発現プロフィールを体系的に解析する。この研究を通して多数の抗原に対する抗体を単離する上で生じる全ての問題点を解決し、さらに mRNA の発現プロフィール解析（転写物の有無）とタンパク質レベルでの発現プロフィール解析（タンパク質の有無とその局在等）より得られる情報の相違を比較検討する。この解析によりヒトを含めた様々な生物種に適用できる抗体を用いたタンパク質レベルでの遺伝子発現プロフィールの体系的解析技術の確立を目指す。本研究で単離する多数の抗体の中から有効なものをチップ化（多数の抗体をシリコン上に固定する）し、発現している個々のタンパク質を定量できれば、タンパク質レベルでの細胞/組織/個体などの生理状態を俯瞰的に眺めることが可能になる。この抗体チップ作製を進める上で、抗体がタンパク質の構造を様々な様式で認識しているものと予想されることから、何をどのように認識し結合しているかを原理的に理解する基礎研究も行う。そのことを通して抗体チップの作製法を確立し、抗体チップの応用範囲を広げると同時に抗体チップを具体的に作製する。この解析から得られる情報を mRNA の発現プロフィールの解る DNA チップの情報とあわせて、生体機能情報をゲノム科学的に理解する基盤として確立する。

タンパク質の発現情報だけではその生体機能が推定されるとは限らない。生体機能を知るには、既に確立している遺伝子欠損による特定のタンパク質欠損の方法（遺伝子 knock out 技術）の他に、特異的なタンパク質構造（例えばリン酸化された時）だけに結合し、それを不活化するよう

な抗体を個体に封じ込めておき、それを外部条件を操作することによって適当な時期に特定の組織で発現させ、それによって生じる個体の変化から生体機能を推定する方法の開発が重要である。そこで本研究では網羅的かつ体系的抗体単離法によって得られた抗体遺伝子を、線虫、さらにマウスに導入し、特定の組織で特定の時期に発現させてタンパク質機能を阻害する技術を開発する。

2. 研究内容及び目標

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

ゲノムサイエンスの急速な展開により様々な生物種の全ゲノム一次配列が決定されつつある。今後個々の遺伝子の機能、とりわけそこにコードされるタンパク質の機能解析が焦点となるが、ゲノムにコードされた遺伝子の総数が莫大な数になることから網羅的及び体系的解析法が開発され、適用される必要がある。現在までに開発された方法を用いて具体的にはアミノ酸一次配列情報に基づき既に機能の解ったタンパク質の配列と類似性を比較することからその機能を推定すること、またその発現プロフィールの解析を mRNA レベルで行うことが体系的に実施されている。特定の遺伝子欠損（遺伝子 knock out）を起こさせたミュータント動物の解析はその機能を知る上で強力な手段であるが、マウスの場合にはゲノムプロジェクトで対象となる多数の遺伝子を取り扱うことが容易ではない。しかし、*C. elegans* では RNAi という強力な転写阻害をもたらす方法が開発されて全遺伝子（19,000種）を対象とすることも可能になっている。mRNA レベルでの発現プロフィールの解析により様々な貴重な情報をもたらすことが予想されているが、実際に生物機能を担うのはタンパク質である。mRNA が存在しても翻訳されない例も多数知られており、さらにタンパク質は細胞内で局在することが多い。タンパク質レベルで遺伝子発現プロフィールを解析するには、個々のタンパク質に特異的に結合する抗体を単離調製し、それを試薬として用いることによって初めて可能になる。従来の方法で抗体を単離調製するには動物（主としてマウス、ラット、ウサギ）が利用され個々の抗原を大量に精製した後、動物に免疫し、抗血清を得るまたはさらに細胞融合法を用いてモノクローン抗体を得るという手間と時間のかかる方法が主流であった。そこで数千、数万種といったゲノムサイエンスで対象となる数多くのタンパク質について個々に抗体を得ることは現実的方針とはなり難く思われていた。しかし、ファージディスプレイ法を用いて抗体ライブラリーを

作製する技術開発が行われ、多数のタンパク質を対象とする網羅的かつ体系的抗体単離が可能となりつつある。我々の作製した1,000億種類の独立したクローンからなるフェージ抗体ライブラリーは、タンパク質表面のどのような構造(エピトープ)も認識し特異的に結合する抗体が必ず含まれ、非常に優れた性能を有することが明らかになっている。そこで本プロジェクトではこの抗体ライブラリーを利用して、網羅的かつ体系的に抗体を作製するための技術開発を行う。具体的には *C. elegans* を対象にタンパク質レベルでの遺伝子発現プロフィールを体系的に解析することを例に、その技術開発上起こり得る全ての問題点を解決し、その解析から得られる情報の有用性を確かめる。さらに発現された mRNA の質的量的解析に用いられる DNA チップに相当するタンパク質の質的、量的発現パターンの解析を可能にする抗体チップの作製を目指して抗体の抗原認識様式を体系的に解析して原理的情報を蓄積し、具体的に抗体チップを作製し、その利用法を確立する。

(1) タンパク質レベルでの遺伝子発現プロフィールの体系的解析技術の開発に関する研究

タンパク質レベルでの遺伝子発現プロフィールの体系的解析を可能にする技術開発を行うために、*C. elegans* を対象として本研究を実施する。*C. elegans* は既に19,000種の遺伝子を含む全ゲノム一次構造が明らかになっており、さらに mRNA レベルでの発現パターンの解析と RNAi によるミュータント動物の作製とその表現型の解析が全遺伝子を対象に極めて精力的に進められている。*C. elegans* は受精卵から成虫に至る発生分化の各段階における全ての細胞の系譜も完全に明らかにされており、抗体を単離すればタンパク質レベルでの発現プロフィールの解析を体系的に実施できる優れた研究対象である。現在までに確立した抗体ライブラリースクリーニング技術では10数名規模の研究者と技術員を動員しても年間数百種の抗体を単離するのが限界であると予想されるが、具体的に多数の抗体を単離する中で各段階での自動化も含めたさらなる大量処理を可能にする道を模索し、将来的にはヒトも含めた様々な生物種に適用できる抗体を用いたタンパク質レベルでの遺伝子発現プロフィールの体系的解析を可能にする技術開発を目標に研究を進める。

① cDNA の発現—抗体ライブラリースクリーニング法の改良—抗体の最終形状に関する研究(藤田保健衛生大学総合医科学研究所)

cDNA を大腸菌中で発現し、作製した抗体ライブラリーをスクリーニングすることによって cDNA 産物に特異的に結合するフェージ抗体を単離した後、発現プロフィールの解析に最も適した形状の抗体を調製する。異なる抗原に対して同時に染色可能なシステムも作製する。多数の cDNA を対象とできるように最も効率の良いシステム構築を行う。抗体ライブラリーをスクリーニングして得られる

抗体が充分高い結合力を示さない場合にはランダムな変異の導入を行って、使用目的に合致した抗体が得られるシステム構築を行う。

② 抗体の単離—調製に関する研究(榑医学生物学研究所)

年間数百種の抗体を実際に単離する。そのためには分業体制を確立し、問題が起った時(抗原の種類によって抗体が単離できない例、使用するライブラリーの中の抗体に片寄りが生じる例等)に解決するフィードバック体制も必要となる(問題解決には1.(1)①のグループも参加する)。また、得られた抗体が発現プロフィール解析に適していない場合の抗体改良も体系的に処理できるようにする。具体的には特定のリーダー(1.(1)①にも参加する)の下に数名—10数名からなる研究体制を構築し、cDNA の発現—抗体ライブラリーのスクリーニング—抗体の調製を行う。得られた抗体の性能を発現プロフィールの解析に適切かどうか(その抗原特異性の高さと結合力を知る)段階までを担当する。

③ 遺伝子発現プロフィールの解析に関する研究(国立遺伝学研究所生物遺伝資源情報センター)

C. elegans の受精卵から成虫に至る発生分化段階に応じた試料を多数作製し、単離された抗体を用いてタンパク質レベルで遺伝子発現プロフィールを体系的に解析する。異なるタンパク質が類似の局所的発現を示し、発現部位に関する相互の詳細な比較が必要な場合には異なる蛍光を発する抗体を用いて同時染色を行う。小原研も含めて世界的に mRNA レベルでの発現プロフィールの解析と RNAi を用いたミュータントの表現型の解析が広範に進められているので(*C. elegans* 研究グループ間では解析結果の情報交換が real-time で行われている)、タンパク質レベルでの解析結果をそれらの解析結果と比較し、抗体を用いた解析によってしか得られない新知見が判明する可能性の高い遺伝子を選別して優先的に解析できるようにその情報を常に抗体作製グループにフィードバックしながら体系的解析を進める。

(2) 抗体チップ作製に関する研究

単離された多数の cDNA はシリコンチップ上に固定されて、個々の細胞や組織で発現された遺伝子を mRNA レベルで質的量的に解析するための DNA チップとして幅広く利用されている。本研究では類似の解析系をタンパク質レベルで可能にする抗体チップの作製を試みる。単離した抗体を抗原結合能を維持したままチップ上に固定する技術が開発されれば、対象とする試料を用いて個々の抗原の有無と量を解析することが原理的には可能となる。チップ作製のために用いる抗体が特定の抗原のみと特異的に結合する性質を持つならば、対象とする試料の中の特定の抗原に関する情報が得られる。一方、チップ作製に用いる抗体が α ヘリックスや β シートといった二次構造またはホメオド

メインとか Zn フィンガーのような構造ドメインをおおまかに認識する性質を有するとすれば、個々のタンパク質を解析対象としてそのタンパク質を構成する各部分にどのような立体構造が含まれるかを推定できる。そこで本研究では抗体チップ作製に必要な技術開発（抗原結合能を保ったままチップに固定する方法、試料を標識する方法、抗原検出感度を高める工夫等）、抗体の抗原認識様式の体系的解析を通じた抗原抗体反応に関する理解を得るための基礎的研究、そして具体的に抗体チップを作製してその有用性を解析する。この研究を通して抗体チップ作製の技術開発を行う。

① コンピューターによる遺伝子の分類に関する研究（国立遺伝学研究所生物遺伝資源情報センター）

遺伝子とタンパク質に関して、コンピューターを用いてアミノ酸一次配列情報からその類似性に基づく様々な分類が可能となっている。タンパク質を構成する各部分は構造ドメイン（一定の長さの特定部分が決まった立体構造を採る時にその構造単位を指す）を形成して1個のタンパク質が複数の構造ドメインを含むことが多い。また、似た作用を持つタンパク質の機能部位（例えば酵素の作用部位）を構成するアミノ酸は相互に保存されていることが多い。このように一次配列、構造、機能に基づき遺伝子はファミリー、スーパーファミリーというカテゴリーで分類されている。抗原、抗体複合体が形成されるかどうかは抗原と抗体の表面の凸凹構造が相補的關係になっているか、その接触面で形成される水素結合、ファンデルワールス力、クーロン力、疎水結合によって生じる結合力が抗原と抗体が独立に存在するより複合体を形成した方がエネルギー的に有利になるかどうかで決定される。そこで抗体は抗原を特異的に認識し結合するという性質を示すが、抗原と抗体の關係は酵素と基質のように鍵と鍵穴の關係（進化的に予め対応關係が決定されている）に例えるよりは偶然性が強い。つまりAを抗原とする抗A抗体がA'やA"とも結合する（これをcross reactivity（交叉反応性）と呼ぶ）例も多い。そこで本研究では *C. elegans* の19,000種の遺伝子をタンパク質レベルでの一次配列、立体構造、機能に基づいてコンピューターを駆使して分類し、さらに各タンパクを分解して部分構造に基づく分類も詳細に行う。1.(1)の網羅的かつ体系的抗体単離の対象としてcDNAを選択する際に、その発現プロフィールの解析対象として興味ある遺伝子を優先するという視点とは別に、様々なカテゴリーに属する遺伝子をグループ毎に区分けする。この区分けに基づき同一グループに属する遺伝子をまとめてピックアップし②以降の研究に供する。

② 抗体の抗原認識様式の体系的解析に関する研究（藤田保健衛生大学総合医科学研究所）

従来抗原抗体反応の詳細な物理化学的解析対象となっていたものは抗原特異性が高い（cross-reactivityをあまり

示さないもの）抗体である。何故なら抗体の抗原特異性が何故生まれるかを説明することがその研究の主目的であったからである。一方、モノクローン抗体を単離する過程でcross-reactivityを示す抗体も数多く単離されている。本研究では網羅的かつ体系的に様々な抗原に対して数多くの抗体を単離する結果、抗原特異性の高い抗体及びcross-reactivityを示す抗体の両方が多数単離される可能性が高い。本研究で抗体チップ作製を目標とし、その利用法を開発しようとする時に両方の性質は各々別の目的に役立つことを期待できる。抗体チップに多数の抗体を固定して、発現されるタンパクの質的量的解析に用いるには個々の抗体の抗原特異性が高いことが必要である。一方で、個々のタンパク質を対象としてそのタンパク質を構成する各部分にどのような立体構造が含まれるかを推定するには、抗体チップに固定する抗体として立体構造を認識する（結果として認識される抗原側は多種となり、抗体としてはcross-reactivityが高い）という性質を示すことが必要となる。この2種の使用目的の異なる抗体チップ作製のための抗原抗体反応に関する原理的情報を得るために、本研究では抗体の抗原認識様式の体系的解析を実施する。

③ 抗体チップ作製に関する研究（医学生物学研究所）

抗体チップが試料として用いる抗原に関する質的、量的情報またはタンパク質の立体構造に関する情報を提供するために役立つには次の条件が満たされる必要がある。(I)抗体を抗原結合力を維持したままシリコンチップ上に固定できる。(II)試料となるタンパク質を何らかの手段で標識できる。(III)抗原抗体複合体を形成した以外の混在するタンパク質が非特異的にチップに付着することを抑えられる。その上でシリコン上に固定する抗体量等を調節し、検出感度を高める必要がある。本研究ではこのような抗体チップ作製に必要な実験条件を設定した上で具体的に各々の抗体を大量調製して抗体チップを作製する。

2. *in vivo* 自己抗体発現による体系的遺伝子機能解析法の開発

個々のタンパク質の機能を知る上で最も有効な手段はミュータントの解析である。これは古典的な微生物遺伝学が全盛だった時代からタンパク質の*in vitro*における生化学的な機能解析とその変異体の表原型の解析を通して個々の役割が明らかにされてきたという事実が示している。遺伝子knock out技術、さらに組織特異的遺伝子欠損マウスの作製技術（Cre-loxを使用する）等の画期的方法が開発され、個々の遺伝子の*in vivo*機能が明らかにされつつある。この手法の威力は様々な遺伝子に応用されて明らかであるが、一つの遺伝子knock outマウス作製に運が良くて（精子や卵の遺伝子がknock outされて初めてミュータントマウスを確立できる状況にあり、遺伝子knock out細胞が生殖細胞系へ移らないというtroubleが頻繁に起っている）最低1年はかかる。*C. elegans*ではRNAiという技術（特

定の遺伝子についてある長さの2本鎖RNAを細胞に導入するとその遺伝子の転写が抑制される)が開発されたために、遺伝子の発現抑制が可能になった。本研究は網羅的かつ体系的に単離される抗体の中からその抗原となるタンパク質機能を抑制する性質を示す抗体を選び、それを細胞内で発現することによりタンパク質の機能レベルでの欠損動物を作製する技術開発を行う。抗体は元来細胞膜上に発現されるかまたは、分泌される分子である。抗体は免疫グロブリンホールドと呼ばれる構造ドメインが複数個数珠状につながり、さらに2本のL鎖と2本のH鎖からなる。抗体が機能を発揮するにはまずポリペプチドとして合成された後、ドメイン単位で正しくfoldingし(正しい三次構造をつくること)そしてH鎖とL鎖の会合が起る必要がある。各ドメイン内にはシステイン間でS-S結合が形成されさらにH-L鎖間とH-H鎖間でもS-S結合を介した橋渡しが起って抗体となる。システインのS-H基がS-S結合となるのは酸化反応であり、従来の考え方では細胞外環境のように酸化状態にある時にはS-S結合がつくられ、細胞内環境のように還元状態ではSH基のまま留まることが多いと思われていた。そこで細胞内で抗体を発現させると抗体は抗原結合力を示さないと考えられていた。このSH→S-S変換についてHL鎖間の架橋については確かにその通りだがドメイン内のS-S結合は細胞内でも充分起こり得ることが示された。そこでVHドメインとVLドメイン間にリンカーをつけて1本鎖Fv(VHドメインとVLドメインによりなる構造をFvと呼ぶ)(scFv)にさらに分子の安定性を増すためにCLをつないだ分子構成の抗体を細胞内で発現させると十分に抗原結合力を持つことが示された。この分子に細胞内局在シグナルペプチド(例えば核移行シグナル)を結合させれば、目的とする細胞内部位へ抗体が移行する。このような抗体をintrabodyと呼ぶが、このintrabody作製技術とトランスジェニック動物作製技術をあわせてタンパク質の機能レベルで欠損させたミュータント動物をつくる技術開発が本研究の目標である。

(1) 抗体の細胞内発現法(intrabody)の開発に関する研究(藤田保健衛生大学総合医科学研究所)

ここで計画している技術はintrabody発現技術とトランスジェニック動物作製技術という既に確立した技術を組み合わせているものだが、この方法自身は未だ誰も報告しておらず、ユニークなものであるため今後様々な問題点を克服しながら技術開発をする必要がある。まず我々の抗体ライブラリーはFab型抗体であるので、intrabodyにするためにはscFvに変換する必要がある。もしこの方法がタンパクの機能解析に強力な武器となることが判明すればFab型抗体ライブラリー全体をそのレパートリー(1,000億種)を保ったままscFv型抗体ライブラリーに変換する。さらにH鎖だけで抗体となる特殊な性質を示すラクダについてもラクダ抗体ライブラリーを作製する。最初の段階は現

有しているFab型抗体ライブラリーを用いて技術開発を行う。intrabodyの遺伝子構成は(特定の薬剤で発現を誘導できるプロモーター)-(組織特異的発現をするプロモーター)-(scFv-CLをコードする遺伝子)-(細胞内局在シグナル)となる。幾つかの抗体を標的にして抗体を単離し、まず細胞レベルで期待通りの効果をもたらすかを解析する。細胞レベルでintrabody発現の効果が確認できた後にトランスジェニック動物作製技術を用いて個体レベルの解析に移る。本研究で対象とする動物種は線虫とマウスとする。線虫に関しては数多くの抗体を単離するので抗体単離は既にその目標となっており、この技術の新規性と発展性から判断して解析の進んでいるほ乳動物であるマウスの系も対象とする。マウスの場合dominant-negativeの表現系を示すトランスジェニックマウスや遺伝子knock outマウスが様々な遺伝子について作製されているので、それらの結果と比較することにより本研究で計画している技術開発の結果得られる情報との差、また各々の技術の利点と欠点が明らかになると期待される。技術が一度確立すると上記遺伝子構成の中で組織特異的プロモーター部分のみを置き換えて同じタンパクの異なる組織での機能比較、さらに抗体をコードする部分を置き換える等体系的な遺伝子構築が可能となる。トランスジェニック動物が生まれた時に既にミュータント動物であることが期待できるために表現型の解析までの時間を従来の遺伝子knock outマウスと比較して大幅に短縮できるという効果をもたらすことが期待できる。

(2) 細胞内発現抗体(intrabody)を用いたタンパク機能欠損*C. elegans*の作製に関する研究(国立遺伝学研究所生物遺伝資源情報センター)

全細胞系譜が明かになっている線虫では、個々の細胞のレベルで遺伝子の働きと相互作用を明かにすることがポストゲノム研究の中心課題である。これまでに、遺伝子そのものを壊す遺伝子ノックアウトや、遺伝子発現を転写レベルで抑制するRNAiの技術が開発されてきた。しかしこれらの技術では阻害の影響は全細胞に及んでしまう。そのため最近では、ある細胞でのみ発現するプロモーターを用いてその細胞のみでRNAiをおこなう試みが成功し始めている。一方遺伝子機能の直接の役者はタンパクであることを考えるなら、タンパク機能そのものを細胞特異的に阻害する技術が必要である。RNAiだけでは、すでにタンパク産物ができている場合には遺伝子機能を抑えきれないし、タンパク産物は単にできるかできないかだけでなく、局在化やリン酸化などの修飾を受けることで機能が変化しこれが遺伝子カスケード調節のカギになることが多いからである。このためには転写後の発現をコントロールをすることが必要で、たとえば目的細胞に抗体を打ち込むといった手法が望まれていたが、研究1(1)で単離された抗体遺伝子を細胞特異的に発現させれば正にこの目的に応用できるは

ずである。修飾構造を認識する抗体も用意すれば、遺伝子発現カスケードの個々の段階の検証を自由自在にできるようになるだろう。このような研究は、抗体ライブラリーとさまざまな発現パターンの遺伝子（すなわちプロモーター）コレクションをもつ我々にのみ可能なものであり、ゲノム機能解析の全く新しい道を開くものであるので、このような方法の早期確立を目標とする。

(3) 細胞内発現抗体 (intrabody) を用いたタンパク機能欠損マウスの作製に関する研究 (農林水産省家畜衛生試験場)

マウスを用いて特定の遺伝子を knock out し、そのミュータントマウスの表原型を解析することが様々な遺伝子に対して実施されている。さらに遺伝子 knock out を特定の組織のみで行う、または発生分化の特定の時期で行うことも可能になっている。この技術は極めて強力であるが非常に時間と労力を要する技術である。また、方法としても原理的に実際に機能を担うタンパクに関して all-or-nothing の効果を解析するものであり、タンパク質の特定の機能のみを (例えばリン酸化のような修飾、タンパク間相互作用等) を阻害することは非常に困難である。そこで本研究では特定の細胞内タンパク質の機能抑制をすることが可能な抗体を単離し、その抗体遺伝子を特定の組織で、また、特定の時期に発現できるプロモーター下につないだ遺伝子構成の DNA を作製し、トランスジェニックマウス作製技術と組み合わせてタンパク機能欠損マウスの作製法を確立する。この技術開発は極めて広い利用分野が拓けると予想される。このようにして作製されるトランスジェニックマウスは優性の表現型 (遺伝子 knock out の場合は 2 本の染色体上の該当遺伝子両方が欠損して (ホモ) 初めて表現型が示されるために遺伝子的に劣性であり、作ろうとしているトランスジェニックマウスの場合、抗体遺伝子が 1 個ゲノムに組み込まれて発現されれば表原型が出現するので遺伝的に優性である) を示すと期待されるので、生まれてくるマウスがその段階で既にミュータントとなり、実験開始から表原型を解析するマウスを入手するまでの研究期間を遺伝子 knock out 技術に比較して大幅に短縮できることを期待できる。この方法ではタンパク機能阻害作用を示す抗体単離に最も多くの時間が必要とされると予想されるが、一度単離した抗体遺伝子は様々な組織特異的プロモーター下流につなが換えることが容易であり体系的な (同じタンパク機能欠損を様々な組織で起こさせること) ミュータントマウス作製も可能となる。

3. 年次計画

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

(1) タンパク質レベルでの遺伝子発現プロファイルの体系的解析技術の開発に関する研究

本研究課題はゲノムサイエンスの対象となる多数のタンパク質に対して網羅的かつ体系的に抗体を単離し、それを試薬として用いることによってタンパク質レベルでの遺伝子発現プロファイルの体系的解析を可能にする技術開発を行う。全ゲノムの一次配列が明らかになり、総数 19,000 種の遺伝子が同定されている *C.elegans* を例に研究を実施する。具体的には I 期において年間数百種の抗体を単離できる体制を構築し、I 期末までに 1,000 種のタンパク質についてその受精卵から成虫に至る発生分化段階における発現プロファイルを解析する。そこで体系的抗体単離を行う上での問題点を解決し、また抗体ライブラリースクリーニング各ステップでの自動化も含めたより効率的な抗体単離法を模索する。細部にわたる詳細なタンパクレベルでの発現解析も可能にする抗体の形状も工夫する。抗体を用いた発現プロファイルの解析結果を mRNA の発現プロファイルの解析結果と比較し、タンパクレベルで解析することにより初めて明らかにされる新知見を示す遺伝子がどのような性質なものかを知り、第 II 期の解析対象として優先的に選別する。第 II 期においても年間数百種の抗体を単離し解析するとすると 5 年間で解析できるタンパク質の総数は 2,000 種ぐらいとなる。それで充分であるかどうか、または 19,000 種全てを解析対象とすべきか、そのことに必要な研究費 (新たな研究者の増員、抗体ライブラリースクリーニングに必要な自動化のための設備費) を算定し、第 I 期終了時点で判断する。

(2) 抗体チップ作製に関する研究

本研究ではシリコン上に多数の抗体を固定した抗体チップを作製し、それに標識されたタンパク質を結合させてその結合パターンからタンパクに関する質的量的発現情報を得るまたは、個々のタンパク質中の立体構造に関する情報を得ることを可能にする技術開発を行う。この抗体チップ作製は全く新しい試みであるので、第 I 期においてはチップ作製に必要な基礎的技術開発、抗体によって認識される抗原の性質を体系的に調べる。具体的には *C.elegans* 19,000 種の遺伝子がコードするタンパク質についてその各部分の細部にわたる構造ドメインを含めて分類し、その情報に基づき抗体を単離する対象とする。単離される抗体を 2 種類に分類する。具体的には個々のタンパクを特異的に認識する抗体、及び同じ立体構造をとるものをまとめて認識し結合する抗体に分ける。抗原結合力を保ったままシリコン上に抗体を固定する技術開発を行う。1. (1) で単離した抗体の中で、特異性の高い抗体について抗体チップを作製する。立体構造を認識できるものについては、*C.elegans* 以外の生物種由来のタンパク質にも適用できる可能性が高い。第 I 期で抗体チップ作製のための基礎的条件を確立した後、第 II 期ではなるべく多くのタンパク質及び立体構造を対象にできるようにスケールアップして抗体チップを作製する。この適用範囲は抗体の種類が多い程より広がる。

2. *in vivo* 自己抗体発現による体系的遺伝子機能解析法の開発

本研究はタンパク質の機能を抑制する抗体の遺伝子を細胞内で発現させる (intrabody) 技術と、トランスジェニック動物作製技術を組み合わせてタンパク機能欠損動物を作るという我々のオリジナルなアイデアに基づく全く新しい技術開発である。そこで第Ⅰ期においては *C. elegans* とマウスを対象としてこの技術開発に必要な条件設定を行う。最初に対象とするタンパク質を選びそのタンパク質の機能抑制抗体を抗体ライブラリーより単離する。具体的には1.の研究で抗原に結合するという性質に基づき単離した多数の抗体の中から機能を抑制するものを捜し出す。そして(特定の薬剤で発現と誘導できるプロモーター)―(組織特異的発現プロモーター)―(scFv-DLをコードする遺伝子)

―(細胞内局在シグナル) という遺伝子構成をした DNA を構築する。これを細胞内に導入して期待通り細胞内で抗体が発現し、細胞内で働くことが解れば次はトランスジェニック動物を作製する。Ⅰ期において *C. elegans* では数10種、マウスでは10数種のミュータント動物作製を目標とする。この技術開発を終了し、有効性が確認されればより大規模に、また様々なタンパク質を対象にできるように Fab型抗体で作製した抗体ライブラリーをそのレパートリーを維持したまま scFv型抗体ライブラリーに変換する。L鎖を持たず VHドメインだけで抗原と結合し、酵素の阻害剤として働くことが知られたラクダ抗体についてもライブラリー化する。そして第Ⅱ期においては様々な遺伝子系に導入し、体系的なタンパク機能 knock out 動物作製技術として確立し応用する。

研究項目	11年度	12年度	13年度	14年度	15年度
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					
(1) タンパク質レベルでの遺伝子発現プロフィールの体系的解析技術の開発に関する研究					
① cDNAの発現-抗体ライブラリーのスクリーニング法の改良-抗体の最終形状に関する研究	抗体単離に関する技術開発	→	多数の抗体単離を可能にする技術開発		
② 抗体の単離-調製に関する研究	年間100種の抗体単離調製	→	年間数100種の抗体単離調製	→	年間数1,000種を対象とする抗体単離体制の構築と実施
③ 遺伝子発現プロフィールの解析に関する研究	年間100種の遺伝子発現プロフィールの解析	→	年間数100種の発現プロフィールの解析結果の統合化	→	年間数1,000種を対象とする発現プロフィール解析体制の構築と実施
(2) 抗体チップ作成に関する研究					
① コンピューターによる遺伝子の分類に関する研究	C.elegansのタンパク一次配列情報から構造に基づく分類を可能にするソフトの開発と情報とcDNAの提供				
② 抗体の抗原認識様式の体系的解析に関する研究	抗体の認識できる構造に関する情報の蓄積	→	抗体チップの適用範囲拡大の検討		
③ 抗体チップ作製に関する研究	抗体チップ作製法の検討	→	多数の抗体単離と抗体チップの作製	→	C.elegans以外の動物種への抗体チップの応用
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					
(1) 抗体の細胞内発現法(intrabody)の開発に関する研究	intrabody発現に関する基礎情報の蓄積	→	各種 intrabody 遺伝子の構築		
(2) 細胞内発現抗体(intrabody)を用いたタンパク質機能欠損 <i>C.elegans</i> の作製に関する研究	プロモーターコレクションの作製	→	各種ミュータントの作製と表現型の解析		
(3) 細胞内発現抗体(intrabody)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	抗 WASP intrabody ミュータントマウスの作製	→	各種ミュータントマウス作製技術開発とその応用範囲の拡大		
所要経費(合計)	161百万円				

4. 平成11年度における実施内容と達成目標

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

(1) タンパク質レベルでの遺伝子発現プロフィールの体系的解析技術の開発に関する研究

① cDNAの発現—抗体ライブラリースクリーニング法の改良—抗体の最終形状に関する研究

cDNAをPinPointベクター（カルボキシラーゼがビオチン化される）に組み込み発現させた後、大量のカルボキシラーゼ共存下で抗体ライブラリーをスクリーニングし、cDNAにコードされた部分の産物に対する抗体を単離する。この際、cDNAのどの部分を対象とすると役に立つ抗体が得易いかを検討して安定に抗体を単離できるシステム構築を行う。また、合成ペプチドを抗原とする方が有利な例もあり、その検討を行う。複数の抗原に対して同時染色可能な系を構築する。十分な抗原結合力を持たない抗体への変異導入—抗原結合力によるファージ抗体の選別法を確立する。

② 抗体の単離—調製に関する研究

*C. elegans*の既に精製抗原がavailableな60種を最初スクリーニングし、次にcDNAを出発材料にして総計100種の抗原についてスクリーニングして抗体を単離調製する。この際既に小原研でラットを用いて得られた抗血清と同じ抗原に対して抗体ライブラリーから得られる抗体の性能を比較する。*C. elegans*のタンパク質抽出液に対するWestern blotting（タンパク質をゲル電気泳動し、膜に移した後抗体で抗原タンパクを同定する）でsingle bandを検出できた段階（対象とする抗原以外には抗体が非特異的結合をしないことを示す）で発現プロフィール解析に回す。この過程で平成12年度より年間数百種の抗体を単離調製できる体制（設備の整備及び技術者のトレーニングも含めて）を構築する。

③ 遺伝子発現プロフィールの解析に関する研究

様々な性質のタンパク質（膜タンパク、細胞質内タンパク、核タンパク、分泌タンパク等）の代表となる様に100種のcDNAを選択し、抗体調製に供する。得られた抗体について受精卵から成虫に至る発生分化各段階の試料を調製して発現プロフィールを解析する。得られた情報をフィードバックして解析に役立つ抗体はどのようなものか（抗原結合力、バックグラウンド、Western blottingとの対応、抗体の最終形状）を明確化する。

(2) 抗体チップ作製に関する研究

① コンピューターによる遺伝子の分類に関する研究

*C. elegans*で同定された19,000種類の遺伝子についてアミノ酸一次配列情報に基づき遺伝子ファミリーとして分類する。その際、各タンパク質毎にさらに分けし、ドメ

イン単位で発現させるcDNAを準備する。

② 抗体の抗原結合様式の体系的解析に関する研究

*C. elegans*のゲノムにコードされたタンパク質の中にホメオドメインを有するものが61種含まれている。そのホメオドメイン部分を大腸菌中で発現させて抗体ライブラリーをスクリーニングして抗体を単離する。ホメオドメインは三次元立体構造は相互に酷似しているが、アミノ酸側鎖が異なる。得られる抗体の中で各ホメオドメイン特異的抗体と幾つかのホメオドメインを共通に認識する抗体の性質を比較して抗体チップ作製の可能性を検討する。

③ 抗体チップ作製に関する研究

抗体チップ作製に必要な次の基礎的実験条件を検討する。(I)抗体を抗原結合力を維持したままシリコンチップ上に固定する条件、(II)試料とするタンパク質の標識法(III)シリコンチップに非特異的にタンパク質が吸着することを抑える。(IV)抗体に結合したタンパク質（抗原）の検出感度を上げる工夫等である。

2. *in vivo*自己抗体発現による体系的遺伝子機能解析法の開発

(1) 抗体の細胞内発現法 (intrabody) の開発に関する研究

*C. elegans*の幾つかの抗原タンパク質を選び1(1)で単離した抗体の中からその機能を阻害する活性を持つ抗体を選んでscFv型抗体に変換する。その上で（特定の薬剤で発現を誘導できるプロモーター）—（組織特異的発現プロモーター）—（scFv-CLをコードする遺伝子）—（細胞内局在シグナル）という遺伝子構成をしたDNAを構築する。そのDNAを細胞内に導入して抗体が発現しタンパク機能を抑制するかを解析する。マウスについてはWiskott-Aldrich病の原因遺伝子であるWASPタンパク質の機能ドメインに対する抗体を単離しintrabodyをコードする遺伝子構成に変換する。

(2) 細胞内発現抗体 (intrabody) を用いたタンパク質機能欠損 *C. elegans* の作製に関する研究

別に進行中であるmRNA発現解析プロジェクトから得られた種々の細胞/組織/時期特異的プロモーターの候補について、その活性を確認しプロモーターコレクションを作製する。

(3) 細胞内発現抗体 (intrabody) 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

特定の薬剤で発現を誘導できるプロモーター及び組織特異的発現プロモーターを選別し、その活性を確認する。その上で抗WASP抗体をintrabodyとして発現したトランスジェニックマウスを作製する。その表現型が既に作製したWASPのdominant negativeな表現型を示すトランスジェニックマウスと比較し、新技術の有効性を解析する。

II 平成11年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
1. 羅的抗体作製による遺伝子発現の体系的解析法の確立		
(1) タンパク質レベルでの遺伝子発現プロフィールの体系的解析技術の開発に関する研究		
① cDNAの発現-抗体ライブラリーのスクリーニング法の改良-抗体の最終形状に関する研究	藤田保健衛生大学総合医科学研究所	赤堀 泰
② 抗体の単離-調製に関する研究	(株)医学生物学研究所	鳥居 久義
③ 遺伝子発現プロフィールの解析に関する研究	文部省国立遺伝学研究所生物遺伝資源センター	長岡 圭美
(2) 抗体チップ作製に関する研究		
① コンピューターによる遺伝子の分類に関する研究	文部省国立遺伝学研究所生物遺伝資源センター	伊藤 将弘
② 抗体の抗原認識様式の体系的解析に関する研究	藤田保健衛生大学総合医科学研究所	森野 和彦
③ 抗体チップの作製に関する研究	(株)医学生物学研究所	片桐 慶子
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		
(1) 抗体の細胞内発現法 (intrabody) 開発に関する研究	藤田保健衛生大学総合医科学研究所	伊庭 善孝
(2) 細胞内発現抗体 (intrabody) を用いたタンパク機能欠損 <i>C.elegans</i> の作製に関する研究	文部省国立遺伝学研究所生物遺伝資源センター	川崎 一郎
(3) 細胞内発現抗体 (intrabody) を用いたタンパク機能欠損マウスの作製に関する研究	農林水産省家畜衛生試験場生態防御部	山中 晴道

III 研究推進委員会

委員	所属
[プロジェクト内委員]	
○黒澤 良和	藤田保健衛生大学 総合医科学研究所教授
小原 雄治	文部省 国立遺伝学研究所生物遺伝資源情報総合センター教授
関川 賢二	農林水産省 家畜衛生試験場生体防御研究部長
数納 幸子	(株)医学生物学研究所 社長
西田 克彦	(株)医学生物学研究所 専務
[プロジェクト外委員]	
勝木 元也	東京大学 医科学研究所教授
堀田 凱樹	文部省 国立遺伝学研究所長
金久 實	京都大学 化学研究所教授
町田 泰則	名古屋大学 理学部教授
中村 春木	大阪大学 蛋白質研究所生体分子解析研究センター教授

(注：○は研究推進委員長)

IV 研究連絡会議

委 員	所 属
黒 澤 良 和	藤田保健衛生大学 総合医科学研究所教授
赤 堀 泰	藤田保健衛生大学 総合医科学研究所助手
伊 庭 善 孝	藤田保健衛生大学 総合医科学研究所助手
森 野 和 彦	藤田保健衛生大学 総合医科学研究所研究員
篠 原 みどり	藤田保健衛生大学 総合医科学研究所研究員
唐 澤 智 司	(株)医学微生物学研究所 研究員
蜂 矢 隆 久	(株)医学微生物学研究所 研究員
恒 川 伸 二	(株)医学微生物学研究所 研究員
小 原 雄 治	文部省 国立遺伝学研究所生物遺伝資源情報総合センター教授
伊 藤 将 弘	文部省 国立遺伝学研究所生物遺伝資源情報総合センター研究員
川 崎 一 郎	文部省 国立遺伝学研究所生物遺伝資源情報総合センター研究員
長 岡 圭 美	文部省 国立遺伝学研究所生物遺伝資源情報総合センター研究員
関 川 賢 二	農林水産省 家畜衛生試験場生体防御研究部長
山 中 晴 道	農林水産省 家畜衛生試験場生体防御研究部室長
高 田 益 宏	農林水産省 家畜衛生試験場生体防御研究部研究員
須 藤 淳 一	農林水産省 家畜衛生試験場生体防御研究部研究員
数 納 幸 子	(株)医学微生物学研究所 社長
西 田 克 彦	(株)医学微生物学研究所 専務
片 桐 慶 子	(株)医学微生物学研究所 研究員
鈴 木 進	(株)医学微生物学研究所 主任研究員
北 村 忍	(株)医学微生物学研究所 主任研究員
渡 邊 眞	(株)医学微生物学研究所 課長
鳥 居 久 義	(株)医学微生物学研究所 研究員
柴 田 昌 夫	(株)医学微生物学研究所 部長
今 村 幸 治	(株)医学微生物学研究所 主任技術員