

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

我々の作製したファージ抗体ライブラリーは、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多く含んでいる。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。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、更に 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。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。そこで抗体チップの作製法を確立し、そ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。しかし、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。本研究では抗体と共に単離される抗体遺伝子を、線虫、更にマウスに導入し、特定の組織で特定の時期に発現させてタンパク機能を *in vivo* で阻害する技術開発も実施する。

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

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、多数の抗原に対して抗体を単離調製する技術開発を行う。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。更に発現された 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す。

(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 種のタンパク質をコードする遺伝子を含む全ゲノム一次構造が明らかになっており、更に 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。

・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ァ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。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。膜上で合成させたオリゴペプチドを抗原として抗体を得る方法を確立することにより多数の抗原の同時処理を可能にするシステム構築も行う。

・抗体の単離・調製に関する研究 (医学生物学研究所)

年間数百種の抗体を実際に単離する。そのために分業体制を確立し、特定のリーダー (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。合成オリゴペプチドを抗原とするスクリーニング法についても上記・で確立後は直ちに導入する。

・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。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、総合的に遺伝子機能を明らかにする方法を確立する。

(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。

・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）

C. elegans ゲノム上にコードされる遺伝子を様々な観点から分類することが可能である。アミノ酸一次配列の類似性に基づく分類、予想される立体構造に基づく分類、更に mRNA レベルでの発現及びミュータント解析による表現型上の分類も可能である。本研究ではコンピューターに基づく分類を行い、様々なカテゴリーに属する遺伝子を区分けして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、以降の研究に供する。

・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）

本研究では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。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、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。

・抗体チップ作製に関する研究（医学生物学研究所）

抗体チップが技術確立のため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

本研究は単離された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。

(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を組み合わせたユニークなもので様々な問題点を克服しながら技術開発をする。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。細胞内でタンパク機能を阻害する抗体を発現させるが、まず細胞レベルで期待通りの効果をもたらすかを解析し、続いて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。

(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ら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。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。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。

(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（農水省家畜衛生試験場）

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、又、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。

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抗体を単離し、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。C.elegans を例に研究を実施するが I 期に於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ィールを解析する。第 II 期に於ては 19,000 種全てを解析対象とする。

(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、タンパクに関する質的量的発現情報を得る技術開発を行う。第 I 期に於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得る抗原の性質を体系的に調べる。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、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。そして 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。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。

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新しい技術開発を目標とする。第 I 期に於ては 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。I 期に於て 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第 II 期に於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情報の統合化		年間数 1,000 程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 C. elegans 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	161 百万円			

II 平成12年度における実施体制

研 究 項 目	担 当 機 関	研究担当者
1. 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 (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 ・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 ・抗体の単離・調製に関する研究 ・遺伝子発現プロフィールの解析に関する研究 (2) 抗体チップ作製に関する研究 ・コンピューターによる遺伝子の分類に関する研究 ・抗体の抗原認識様式の体系的解析に関する研究 ・抗体チップの作製に関する研究	藤田保健衛生大学総合医科学研究所 (株)医学生物学研究所 文部省国立遺伝学研究所生物遺伝資源センター 文部省国立遺伝学研究所生物遺伝資源センター 藤田保健衛生大学総合医科学研究所 (株)医学生物学研究所	赤 堀 泰 鳥 居 久 義 長 岡 圭 美 伊 藤 将 弘 森 野 和 彦 片 桐 慶 子
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 (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 (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	藤田保健衛生大学総合医科学研究所 文部省国立遺伝学研究所生物遺伝資源センター 農林水産省家畜衛生試験場生態防御部	伊 庭 善 孝 川 崎 一 郎 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 小 原 雄 治 数 納 幸 子 関 川 賢 二 西 田 克 彦	藤田保健衛生大学 総合医科学研究所教授 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 (株)医学生物学研究所 社長 農林水産省 家畜衛生試験場生体防御研究部長 (株)医学生物学研究所 専務
[プロジェクト外委員] 勝 木 元 也 金 久 實 中 村 春 木 堀 田 凱 樹 町 田 泰 則	東京大学 医科学研究所教授 京都大学 化学研究所教授 大阪大学 タンパク質研究所生体分子解析研究センター教授 文部省 国立遺伝学研究所所長 名古屋大学 理学部教授

(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 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)医学生物学研究所 研究員
蜂 矢 隆 久	(株)医学生物学研究所 研究員
恒 川 伸 二	(株)医学生物学研究所 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)医学生物学研究所 社長
西 田 克 彦	(株)医学生物学研究所 専務
片 桐 慶 子	(株)医学生物学研究所 研究員
鈴 木 進	(株)医学生物学研究所 主任研究員
北 村 忍	(株)医学生物学研究所 主任研究員
渡 邊 眞	(株)医学生物学研究所 課長
鳥 居 久 義	(株)医学生物学研究所 研究員
柴 田 昌 夫	(株)医学生物学研究所 部長
今 村 幸 治	(株)医学生物学研究所 主任技術員