

# 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(藤田保健衛生大学総合医学研究所)

## I 試験研究の全体計画

### 1. 研究の趣旨

ゲノムサイエンスの急速な展開により、ヒトを含む様々な生物種の全ゲノム一次配列を決定する段階は終了しつつある。ポストシーケンスの最大の課題として、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っており、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。本プロジェクトでは、ポストシーケンス時代のゲノム解析のツールとして抗体を用いる方法の開発を行う。従来より抗体はタンパク質の解析に極めて有効で、必要不可欠な研究試薬であり、様々な目的に使用されているが、ここではゲノムワイドな利用法の確立を目指している。プロジェクトは2本の柱からなる。線虫 (*C. elegans*) を例に、多数の mRNA によってでき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。このことを通して網羅的かつ体系的な抗体単離体制を確立し、費用対効果の観点を含めてその意義を明らかにする。具体的には母系遺伝子約 1500 種を対象として結果を得る。第二の柱は、抗体と共に単離される抗体遺伝子を用いて細胞内で抗体を発現させ、タンパクの機能を抑制し、その表現型を解析する方法の確立を目指す。これは従来より行われている遺伝子 knock-out 技術及び線虫での RNAi を用いた特異的転写阻害に相当する新技術開発と位置付けられる。

### 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

本プロジェクトとして開始時に描いた概略は、我々が作製した 1,000 億種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 (AIMS と名付けたもの) 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ことであった。この技術においては、抗原の調製—抗体ライブラリーのスクリーニング—単離された抗体の検定—各抗体の調製とそれを用いた解析、という一連の各ステップを全てが同じ速度で進行する必要がある。AIMS ライブラリーを用いた約 3 年にわたる研究の結果、このライブラリーを抗体を得るための唯一のソースとして用いることが必ずしも

能率的でないことが判明してきた。そこで従来通り AIMS ライブラリーを用いる方法以外に VH 単独ドメインからなる特殊な性質を持つラクダ抗体ライブラリー (HAC22 と名付けた) を用いる方法、動物 (とりわけマウス) を抗原で免疫して抗体価が高まった後に抗血清を発現パターン解析試薬として用いる、と共にフェージディスプレイ系を用いて脾臓細胞から発現されている抗体遺伝子を拾い出しモノクローン化する方法、この 3 通りを使用目的に応じて使い分けながら目標を達成することに変更した。さらに解析対象としては線虫の初期発生過程を支配する母系遺伝子 1,500 種を選んだ。この目標を効率的に達成するため、医学生物学研究所、黒澤グループ、小原グループの分業体制 (役割分担) を明確にした。

(1) 抗原調製—抗体単離調製 (年間数百抗原体制) の実施 (医学生物学研究所)

12 抗原/週の体制で cDNA を対象に主として大腸菌を用いて発現させ、抗原を精製する。マウスを免疫した後、抗体価が高まった段階で抗血清を調製すると共に脾臓を摘出する。その脾臓から mRNA を調製する。抗血清は小原研及び黒澤研に、mRNA は黒澤研に送付する。

(2) 抗原—抗体単離調製 (年間数千抗原に対応) システムの開発 (藤田保健衛生大学総合医科学研究所)

ゲノムワイドのタンパク質解析用試薬として抗体を用いるために解決すべき問題は、多数の抗体単離法の確立と、使用目的にあった性質を示す抗体の効率的な単離法及び検定法の確立である。本研究では、*C. elegans* の母系遺伝子 1,500 種を対象とすることにより、上述した 3 種類の抗体単離法が持つ長所と欠点を明らかにする。さらに発現パターンを解析するための試薬としての抗体及び Western blot 用試薬としての抗体に要求される条件について体系的検討を加える。さらに、本研究はヒトゲノム解析のためのパイロット的役割を果たしており、より大規模な (年間数千抗原に対応) 抗体単離を可能にするシステム開発を目指す。

(3) 遺伝子発現プロフィールの解析及びデータの統合に関する研究 (国立遺伝学研究所生物遺伝資源情報センター)

小原研究室においては、本プロジェクトで対象とする *C. elegans* の母系遺伝子 1,500 種について、本プロジェクトとは別の研究室固有のプロジェクトとして cDNA を用いた RNA レベルでの発現パターンの解析及び RNAi によるミュータント動物の表現型の解析を体系的に進めている。ここでは(1)(2)を担当するグループによって単離された抗体を用いてタンパク質レベルでの発現プロフィール解析を実施する。そして以上 3 つの異なる方法による解析結果を総

合的に集積して、ゲノムプロジェクトとして遺伝子機能を明らかにする上での抗体の果たすべき役割とその意義を明確にする。

## 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

本研究は特定のタンパク質の機能を阻害する抗体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してその表現型を解析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)

特定のタンパク質の機能を阻害する抗体を細胞内で発現させることにより、その効果を解析するシステム構築を行う。とりわけトランスジェニック動物作製技術と組み合わせることにより個体レベルでの表現型の解析を中心に行う。抗原結合力がある抗体を細胞内で発現することを可能にするため、single-chain Fv型抗体を用いる。さらにVH単独ドメインで抗原結合力を示すラクダ抗体は、様々な酵素に対して活性阻害作用を持つことが多いので本研究目的に合致している。

(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。

(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 (畑農業生物資源研究所)

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

従来は多数のcDNA産物に対する発現パターン解析試薬としての抗体を得るソースとしてAIMSライブラリーを唯一のマスターソースとして用いる方針であったが、平成13年度に大幅に方針を変更し、12抗原/週で実施できる体制ができた。この中で次の問題点を解決する必要がある。

(1) ある頻度で発現パターンの中にノイズと思われるシグナルが出る。それを消去する方法の確立。

(2) 対象産物の量が非常に少ない場合、それを同定しようと抗体濃度を高めるとバックグラウンドが高まる。どれがバックグラウンドで、どの部分が真のパターンかを区別する方法の確立。

2. *in vivo* 自己抗体発現による体系的遺伝子解析法の開発

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。intrabodyとして発現された抗体が、必ずしも *in vitro* で示される抗体の性質を示さない場合がある。そこで細胞内で直接抗体ライブラリーをスクリーニングする方法を、yeastのtwo-hybrid系を用いて確立する。

研究項目	11年度	12年度	13年度	14年度	15年度
<p>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 (平成11, 12年度案)</p> <p>(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</p> <p>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</p> <p>② 抗体の単離・調製に関する研究</p> <p>③ 遺伝子発現プロフィールの解析に関する研究</p> <p>(2) 抗体チップ作成に関する研究</p> <p>① コンピューターによる遺伝子の分類に関する研究</p> <p>② 抗体の抗原認識様式の体系的解析に関する研究</p> <p>③ 抗体チップ作製に関する研究</p> <p>(平成13年度以降)</p> <p>(1) 抗原調製-抗体単離調製(年間数百抗原体制)の実施</p> <p>(2) 抗原-抗体単離調製(年間数千抗原に対応)システムの開発</p> <p>(3) 遺伝子発現プロフィールの解析及びデータの統合に関する研究</p>	<p>抗体単離に関する技術開発</p> <p>年間100種の抗体単離調製</p> <p>年間100種の遺伝子発現プロフィールの解析</p> <p><i>C.elegans</i>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</p> <p>抗体が認識できる構造に関する情報の蓄積</p> <p>抗体チップ作製法の検討</p>	<p>多数の抗体単離を可能にする技術開発</p> <p>年間数100種の抗体単離調製</p> <p>年間数100種の発現プロフィールの解析情報の解析結果の統合化</p> <p>多数の抗体単離と抗体チップの作製</p>	<p><i>C.elegans</i>母系遺伝子450種を対象に分業体制を構築して集中的に解析</p>	<p><i>C.elegans</i>母系遺伝子1,200種を対象に、12抗原/週の体制で発現パターンを解析する。</p>	
<p>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</p> <p>(1) 抗体の細胞内発現法(intrabody)の開発に関する研究</p> <p>(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</p> <p>(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</p>	<p>intrabody発現に関する基礎情報の蓄積</p> <p>プロモーターコレクションの作製</p> <p>抗WASP intrabodyミュータントマウスの作製</p>	<p>各種intrabody遺伝子の構築</p> <p>各種ミュータントの作製と表現型の解析</p> <p>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</p>			
所要経費(合計)	161百万円	161百万円	161百万円	160百万円	

#### 4. 平成14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) 抗原調製—抗体単離調製（年間数百抗原体制）の実施

*C. elegans* の母系遺伝子 600 種について大腸菌を宿主としてタンパク質を発現させる。各抗原を精製後マウスに免疫する。抗体価が高まったところで抗血清を採取すると共に脾臓を摘出する。各脾臓より mRNA を単離する。以上のプロセスの中で大腸菌中での発現を最適化する条件を含めてさらなる大量処理を可能にするシステム構築を行う。

###### (2) 抗原—抗体単離調製（年間数千抗原に対応）システムの開発

抗原で免疫したマウス脾臓 mRNA を出発材料にして発現している抗体 VH 遺伝子ライブラリーを作製後、共通に用いる VL 遺伝子セットと組み合わせて抗体ライブラリーを作製し、スクリーニングする。600 種の抗原を対象とすることにより、様々な抗原に対応できる系の最適化をはかる。目標としては、同じ抗原に結合する抗体であっても抗血清レベルで含まれる様々な性質の抗体全てをモノクローン化できる条件を見つけ出す。さらに大量抗原の同時処理を可能にする方法を、各ステップのロボット化を含めて開発する。

###### (3) 遺伝子発現プロファイルの解析及びデータの統合に関する研究

*C. elegans* の母系遺伝子 600 種についてそのタンパク質レベルでの発現プロファイルを抗体を用いて解析する。そ

の結果を本課題とは別のプロジェクトとして実施している mRNA レベルでの発現プロファイルの解析、RNAi を用いたミュータント動物の解析結果と総合することにより、ポストシーケンスに於けるゲノム解析ツールとしての抗体の役割及びその意義を明確にする。

##### 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

###### (1) 抗体の細胞内発現法（intrabody）の開発に関する研究

課題1で単離した抗体、yeast の two hybrid 系を利用してタンパク間相互作用を阻害する性質を持つことが示された抗体、ラクダ抗体ライブラリーから単離し、特定の酵素活性を抑制することが示された抗体について intrabody の形で発現できる抗体を *C. elegans* に関して 10 数種、マウスについては数種作製して(2)、(3)の実験に供する。

###### (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

母系遺伝子 600 種の中から選んだ 10 種類タンパク質についてその機能を抑制する抗体を発現した *C. elegans* の表現型を解析する。

###### (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

yeast two hybrid 系を用いて WASP-WIP 相互作用を阻害することが示された抗体を intrabody として発現させてその表現型を解析する。この例と類似の解析をタンパク質リン酸化酵素の阻害抗体についても実施する。

#### II 平成14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開発		
(1) 抗原調整—抗体単離調整（年間数百抗原体制）の実施	(株)医学生物学研究所	鳥居久義
(2) 抗原—抗体単離調整（年間数千抗原に対応）システムの開発	藤田保健衛生大学総合医科学研究所	伊庭善孝
(3) 遺伝子発現プロファイルの解析及びデータの統合に関する研究	国立遺伝学研究所	伊藤将弘
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	藤田保健衛生大学総合医科学研究所	森野和彦
(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	国立遺伝学研究所	鹿児島浩
(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	(株)農業生物資源研究所	佐藤充

### 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	国立遺伝学研究所 生物遺伝資源情報総合センター 教授
数 納 幸 子	(株)医学生物学研究所 会長
関 川 賢 二	(独)農業生物資源研究所 部長
西 田 克 彦	(株)医学生物学研究所 社長
[プロジェクト外委員]	
勝 木 元 也	岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所 所長
金 久 實	京都大学 化学研究所 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
堀 田 凱 樹	国立遺伝学研究所 所長
町 田 泰 則	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
赤 堀 泰	藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 助手
東 成 見	藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 研究員
伊 庭 善 孝	藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 助手
今 村 幸 治	(株)医学生物学研究所 主任技術員
鶴 飼 由 範	藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 研究員
岡 田 潤	藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 研究員
鹿 兒 島 浩	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
小 原 雄 治	国立遺伝学研究所 生物遺伝資源情報総合センター 教授
数 納 幸 子	(株)医学生物学研究所 会長
片 桐 慶 子	(株)医学生物学研究所 研究員
勝 見 治 恵	藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 研究員
川 崎 一 郎	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
黒 澤 良 和	藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 教授
佐 藤 充	(独)農業生物資源研究所 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
柴 田 昌 夫	(株)医学生物学研究所 部長
関 川 賢 二	(独)農業生物資源研究所 部長
鳥 居 久 義	(株)医学生物学研究所 研究員
西 田 克 彦	(株)医学生物学研究所 社長
本 多 俊 生	藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 研究員
森 野 和 彦	藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 研究員
渡 邊 眞	(株)医学生物学研究所 課長
渡 辺 裕 子	(株)医学生物学研究所 研究員