

# 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

【背景】ゲノムプロジェクトは、様々な生物種的全ゲノム塩基配列の決定及び全長cDNAの単離と塩基配列の決定を通じた全遺伝子の同定とそこにコードされた全タンパク質のアミノ酸一次配列決定が終了しつつある。次にくる最も重要な課題がタンパク質機能の網羅的かつ体系的解析であり、様々な角度からのアプローチが実施されている。DNAマイクロアレイを用いたmRNAレベルでの発現パターン解析もしくは生物種によってはcDNAをプローブとした分化過程での発現パターン解析が実施されている。タンパク質レベルの解析としては二次元電気泳動によるタンパク質の分離と個々のスポットのマススペクトロメーターによる同定が行われている。相互作用する、もしくは複合体を形成するタンパク質の相関関係図の作製がyeast two-hybridシステム、更には特定のタンパク質にタグをつけることにより複合体として単離し、その構成成分をマススペクトロメーターで同定するプロジェクトも進行している。このようなプロテオミクスと総称される解析に加えて、バイオインフォマティクス技術を駆使した情報の統合化が進んでいる。このようなタンパク質機能の網羅的解析手段として抗体を用いる技術開発を行うのが本プロジェクトの目標である。

【必要性】抗体はタンパク質の機能解析用研究試薬として必須である。多くの混合物が存在する中で対象とするタンパク質を同定する手段として抗体が最も有効である。抗体は、Western blottingや免疫組織染色で検出試薬として使われる。アフィニティクロマトグラフィーや免疫沈降法（immunoprecipitation）により対象とするタンパク質を単離するのに抗体が必要である。特定リガンドに対するレセプター分子に結合する抗体は、アゴニスト（リガンドの機能を代行する）やアンタゴニスト（リガンド機能の阻害活性を示す）として働く。酵素に対して阻害作用や場合によっては機能亢進作用を示す。タンパク質のセリン、トレオニン、チロシン基でリン酸化が起こったかを抗体で同定できる。以上列挙した抗体の使用例は、極めて広範に実施されているが、従来は特定のタンパク質（多くの場合、1種類）の機能解析を目的としている。抗体を研究試薬として用いる場合に、同じタンパク質が解析対象であっても、使用目的によって抗体に求められる性質が異なる。例えば、

Western blotではタンパク質は変性状態にあり、免疫組織染色ではタンパク質をホルマリン処理等で固定している（架橋を導入）し、ナチュラルな立体構造をした分子が対象であったり、複合体を形成しているタンパク質に対して複合体を破壊せずに抗体を結合させる場合もある。一方、ゲノムプロジェクトでは、多くのタンパク質に対して個々のタンパク質の相違を越えて網羅的に解析対象にできる方法の開発が求められている。タンパク質レベルでの発現パターン解析を行うに際し、細胞内の詳細な分布に関する情報を得ようとすれば、抗体を検出試薬とする方法が優れている。GFPをタグとして対象タンパク質に付加する等も行われているが、抗体は*in situ*での解析に優れている。本研究では*C. elegans*の母系遺伝子数百種を対象にして、その発現パターン解析を、抗体を用いてタンパク質レベルで実施することにした。この研究を通して得られる結果の価値を総合的に判断し、次の段階としてヒトやマウスを対象として如何なるアプローチが可能か、投資対効果も含めて充分実施する価値がある抗体利用法の開発を目指すことにした。

【研究の概要】プロジェクトは二つの柱を持つ。(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及び(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である。第一の課題では、*C. elegans*を対象とした。*C. elegans*に関しては国立遺伝研小原研究室に於いて、(1)約1万種のcDNAクローン単離（*C. elegans*は総数約19,000種の遺伝子を持つ）(2)各cDNAをプローブとしたmRNAレベルでの発現パターン解析、(3)RNAi技術を用いたミュータント動物の表現型の解析が進んでいた。そこで母系遺伝子約800種を対象にタンパク質レベルでの発現パターン解析を行うのが本プロジェクトの目標である。研究は次の素過程で構成される。(1)対象の選別、(2)抗原の調製、(3)抗体の調製、(4)抗体の検定、(5)発現パターンの解析、(6)結果の解釈。

第二の課題は、抗体を細胞内で発現させることにより（intrabody技術）、対象とするタンパク質の特定の機能を抑制したミュータント動物を作製してその表現型を解析する技術開発を目標とした。個々の遺伝子を欠損したミュータントを作製する技術は変異誘発作用のある化学物質等の処理による網羅的ミュータントの作製、遺伝子knock-out技術を用いた多数のミュータント作製、RNAiによる特定mRNAの破壊等既に確立した技術を用いて実施されているが、タンパク質間相互作用の抑制とか、酵素反応阻害等といったタンパク質の特定機能のみをintrabody発現によ

て抑制する技術開発に意義があると判断した。

## 2. 研究の概要

### 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に関する研究

- (1) 抗原調製—抗体単離調製（年間数百抗原体制）の実施
- (2) 抗原—抗体単離調製（年間数千抗原）システムの開発
- (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

本研究課題は、研究代表者が所属する藤田保健衛生大学総合医科学研究所免疫学研究部門、中核機関である(株)医学生物研究所伊那研究所（鳥居グループ）、国立遺伝学研究所・小原研究室の完全な分業体制による極めて密接な共同研究として実施されている。一つの段階に問題が生じると、全過程に影響を与えるという関係にあるので、ここでは3研究試験項目からなる本サブテーマをまとめて記述する。

本研究では *C. elegans* の分化段階に於ける各遺伝子の発現パターンをタンパク質レベルで解析することを目標とした。そこで調製する抗体は(1)特定のタンパク質固定法を用いて固定されたタンパク質（一定の立体構造を持つが完全に native なものではない）に特異的に結合する。(2)対象とする抗原タンパク質以外の物質とは反応しないことが期待されている。しかし抗体は一般的に対象とする抗原以外に類似の立体構造をした物質と結合する交叉反応 (cross-reactivity) を示すことがしばしばある。更に対象とするタンパク質の量に関して大量から極微量まで様々な場合があり得るという問題点がある。小原研に於て、得られた発現パターンが対象としたタンパク質の挙動を真に反映しているかについて「RNAiによる検出像の特異的消失」技術を開発し、発現パターンの真偽を確かめることを可能にした。しかしRNAiに関しては表現型が見られない場合も多く、その際は判定が困難という限界がある。

本研究課題は第I期（平成11～13年度）に於いて最初1年半余は方針が紆余曲折した。計画立案時点では黒澤研究室で作製したファージディスプレイ系を用いた抗体ライブラリー（AIMS）が抗体のマスターソースとして有効であると考えていた。しかし抗体ライブラリーから特定抗原に結合する抗体を単離するスクリーニングを様々な抗原に対して実施する中で、AIMSライブラリーを用いることが本研究の目標に適していないことが次第に明らかになった。ライブラリー（1000億種のクローンを含む）から抗体を単離する原理は、抗原として用いる分子に抗体を発現したファージ粒子が結合するかどうかという性質のみに依存する。そこで用いる抗原として合成オリゴペプチドにするとそのオリゴペプチドを一部として含むタンパク質と結合する抗体を得ることは困難であり、更に本研究で主として使用した100-150アミノ酸残基からなるポリペプチド鎖（タンパク

質の一部を選んで大腸菌中で合成）を抗原とした場合も、AIMSライブラリーから単離した抗体の極一部のみが発現パターン試薬になるにすぎなかった。抗原として用いたポリペプチド鎖の立体構造と、免疫染色を実施する際の対象タンパク質の立体構造が大きく異なることが原因と推定された。

小原研で単離したcDNAを用いて、それを鋳型にして100-150アミノ酸残基をコードする部分をPCRで増幅し、sequenceを確認した後発現ベクターに組み込み、大腸菌で発現させて精製抗原を調製する方法は非常に高い率（85%）で成功した。その抗原を用いて動物（最初の頃はマウス、途中からラットへ切り換えた）を免疫し、その抗血清を検出試薬として用いる方法はかなり高い率で発現パターン解析に有効であった。この場合もある頻度で問題が生じた。対象としたタンパク質の発現パターンとは異なる、ある種のノイズと推定される幾つかの典型的なパターンが検出されることがあった。各種抗原に対してマウスに関しては必ず2匹を免疫し、問題になるサンプルについてラットを免疫した。抗体遺伝子のレベルでマウスとラットの相違があるとは考えにくい、マウスとラットでは免疫系を構成するBリンパ球の総数が数倍異なる。そこで100-150アミノ酸残基からなるポリペプチド鎖に対応して作られる抗体の種類もそれに比例して異なることがわかった。我々の場合、抗原で免疫したマウス及びラットの脾臓を用いてファージディスプレイ系で抗体ライブラリーを作製してモノクローン抗体の単離を行う技術確立がすすんでいる。そこで、抗血清中に存在し、発現パターン解析試薬として機能している抗体を、労力が必要だがモノクローン化できる。その結果、マウス抗血清よりラット抗血清の方がより高頻度に解析試薬として有効なことが多い理由が、主として免疫系のcapacityの差に由来することがわかった。

この研究の過程で、ノイズもしくはartifactを起こし得る様々な問題の所在が判明した。SPFレベルのマウスやラットを購入していても、抗原による免疫前の抗血清中に既にノイズを作る抗体が含まれている例がある。しかし、一方で確実な答えを出す抗血清の例も多く、方法の有効性は明らかであり、そのような場合は脾臓を用いてモノクローン抗体として確実に入手できる。本プロジェクト終了時（平成16年3月）で800種程度の母系遺伝子の発現パターンが出揃っている予定で、研究が進行している。

現在の体制は、毎週10抗原に対応するので、年間数百抗原が対象となる。今後年間数千を対象とする巨大プロジェクトが実現可能かを判断する場合、そのまま10倍のスケールアップというのも方針たり得る。一方、今後抗原として intact な正しい立体構造のタンパク質が多数調製された場合には、AIMSライブラリーを抗体のマスターソースとする方針（本プロジェクトで初期に試みた）と、そのタンパク質を抗原として動物を免疫する方針（今回我々が用いて

いる)が両立する。

本プロジェクトで得られる結果を、既に広範に実施されているmRNAレベルでの解析, RNAiによるミュータントの表現型の解析, タンパク間相互作用解析と組み合わせる如何なる結論を導きだせるかはプロジェクト終了後、詳細に検討される必要がある。

## 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に関する研究

- (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

本サブテーマについては、黒澤研究室で抗体を単離し、小原研究室とは *C.elegans* を対象に、関川研究室とはマウスの系を対象に共同研究体制を築いてミュータント動物を作製する。相互に極めて密接な関係にあるために、ここではまとめて記述する。

抗体は生理的条件としては、細胞膜上に発現される、または細胞外に分泌されて働くタンパク質分子である。細胞外と細胞内では、前者が酸化的環境下であり、後者が還元的环境下にある点で大いに異なる。タンパク質は一定の立体構造をとって機能を発揮するが、抗体の場合は免疫グロブリンホールドと呼ばれる球状構造をしたドメインが数珠状につながり、そのドメイン内に1対のS-S結合がある。更にHL鎖間及びH鎖間でもS-S結合を介して架橋されている。通常還元状態下ではシステイン基は-SHのままであり、酸化状態になるとS-S結合が形成される。細胞内の還元状態はそれほど強いものではなく、調製された抗体を、キャピラリー等を用いて細胞内に注入してもS-S結合は破壊されることなく充分機能をする。しかし、遺伝子からの転写-翻訳全ての過程を細胞内で *de novo* に発現させた抗体ではS-S結合はかからないというのが定説である。しかしsingle chain Fv ( $V_H$ 及び $V_L$ ドメインをリンカーでつなぐ)の形でintrabodyとして発現させた抗体は抗原結合力を持つ例があることが示され、我々もその技術を利用した

ミュータント動物作製を目標として研究をデザインした。

実際にWASP-WIP相互作用を阻止する抗体をintrabodyとして発現させるという実験系を例にしてシステムを構築する目標で研究を開始すると、様々な問題点があることが判明してきた。最初yeast two-hybridを用いてWASP-WIP相互作用を検出する系に、更に加えて第三のタンパク質として抗体を発現させた。この場合、発現した抗体によりWASP-WIP相互作用が抑制されることを期待したが、それとは異なる様々な要因で見かけ上、WASP-WIP相互作用の阻害が起こった。例えば抗体の凝集 (aggregation) によっても阻害が起こる。結局、抗原-抗体反応を直接yeast two-hybrid系にのせて、intrabodyとして働く抗体単離法を確立した。この系ではintrabodyとして機能する抗体の単離は可能であるが、現時点では非効率であり、更にタンパク質の特定の機能を抑制するという本研究の目標に合致した抗体単離法になっていない。

本研究プロジェクトの目標が「ポストゲノム時代のタンパク質機能解析のツールとして抗体利用法の開発」であることを考慮して、最初本プロジェクトとは独立に実施してfeasibilityが高まった二つのテーマを本プロジェクトに組み込むことにした。現在、タンパク質の立体構造をハイスループットに行う研究が実施されているが、nativeな立体構造をしたタンパク質を如何に効率的に合成するかが問題となっている。多くの *in vitro* で合成されたタンパク質が不溶化してしまう。その問題を解決するために抗体を個々のタンパク質特異的シャペロンとして用いる技術開発がテーマの一つである。

タンパク質の機能解析に抗体を用いる方法として、*C.elegans* では発現パターンを網羅的に解析することが可能だが、ヒトやマウスを対象とすると試料の調製が容易でない。そこで抗体を用いた解析対象とし易い細胞膜上に発現した全分子を対象に抗体を単離する方法の開発を行っている。そこで開発した方法は、複合体を形成する全構成成分に対する抗体を一網打尽で単離する方法としても応用できる。これが第二のテーマである。

3. 年次計画

研究項目	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確立に関する研究 (1) 抗原調製—抗体単離調製(年間数百抗原体制)の実施に関する研究 (2) 抗原—抗体単離調製(年間数千抗原)システムの開発に関する研究 (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 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 (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 (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 3. 研究進捗管理	← 第Ⅱ期 →	
	抗体調製の実施	
	システム構築	
	解析の実施	解析の実施とデータの統合
	システム構築	
	ミュータント動物作製	システム評価
ミュータント動物作製	ミュータント動物の解析と評価	
所要経費(合計)	160百万円	130百万円

## II 平成15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に関する研究 (1) 抗原調製—抗体単離調製（年間数百抗原体制）の実施に関する研究 (2) 抗原—抗体単離調製（年間数千抗原）システムの開発に関する研究 (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	(株)医学生物学研究所伊那研究所 藤田保健衛生大学総合医科学研究所 国立遺伝学研究所	鳥居久義 ○伊庭善孝 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 (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 (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 国立遺伝学研究所 農林水産技術会議事務局 (株)農業生物資源研究所 (株)医学生物学研究所	○赤堀泰 鹿兒島浩 佐藤充
3. 研究進捗管理		

(注：○はサブテーマ責任者)

## 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 関川賢二 数納幸子 西田克彦	藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 教授 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)農業生物資源研究所 部長 (株)医学生物学研究所 会長 (株)医学生物学研究所 社長
[プロジェクト外委員] 勝木元也 堀田凱樹 金久實 町田泰則 中村春木	岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所 所長 国立遺伝学研究所 所長 京都大学 化学研究所 教授 名古屋大学 理学部 教授 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
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 児 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	(株)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	(株)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