

サブテーマ名：マウス長鎖 cDNA がコードする蛋白質に対する抗体作製技術の開発及びその作製・評価

テーマ2の1 (J1)

- ① 抗原蛋白質の作製
- ② 抗体の作製・精製・特異性評価
- ③ 質量分析装置を用いた評価系の確立

(財)千葉県産業振興センター 古閑 比佐志

【目的と概要】

本サブテーマの目的は、先行して cDNA クローンを整備するテーマ1のリソースと情報を利用して、約2000種類のマウス蛋白質に対して抗体を作製することにある。まず始めに効率的抗体作製システムを確立すること、そしてそれを用いてフェーズIIにおいて、約2000種類の抗体を滞りなく作製・評価することである。具体的には、抗原蛋白質は大腸菌内でグルタチオントランスフェラーゼ(GST)との融合蛋白質として合成させ、それを精製後、ウサギにポリクロナール抗体を産生させることとした。できた抗体はルーチンワークとして以下の初期評価をおこなった：①ELISA、②成体マウス臓器から抽出した蛋白質を用いた Western blot 法、③マウス培養細胞から抽出した蛋白質を用いた Western blot 法、④マウス脳還流固定サンプルを用いた浮遊法による増感組織免疫染色。これらのルーチンワークに加え、質量分析装置を用いた蛋白質複合体解析も随時加えていった。

その結果、当初目標であった2000種類の抗マウス KIAA 抗体を作製するとともに、十分は特異性及び力価の評価を行なうことができた。質量分析装置を用いた蛋白質複合体解析は、当初計画にはなかったが、これを行なうことでフェーズIII移行で重要になる抗体の付加価値を増すことにも成功した。

【研究成果の概要と今後の取り組み】

(1) 抗原部位選択システムの構築

1000 アミノ酸を越えるような高分子量蛋白質から簡便に100アミノ酸前後の抗原に適切な部位を選択できるような、抗原性の指標となる情報(予測される膜貫通領域、疎水度、surface probability, flexibility, 二次構造予測)を遺伝子・アミノ酸配列に沿って表示できるシステムを構築し運用している(図1)。またこのシステムはヒトとマウスの遺伝子・蛋白質情報を並列させているので、種間を越えて交差反応が期待できるように抗原部位をデザインできる。現時点でこのシステムは外部へ配布していないが、将来的に他機関にも利用してもらえようシステムの再構築を検討している。このシステムで決定した抗原部位に関して、実際の発現量・可溶化度とアミノ酸の一次構造に基づくパラメータを決定木を用いて統計処理し、疎水度・等電点・分子量によって、実際の発現量・可溶化度がある程度予測できることを明らかにした(<http://www.kazusa.or.jp/ingap/real/dtree.html>)。さらに特定のアミノ酸への偏りが、抗原蛋白質の発現量・可溶化度に影響を与えることも明らかとした。フェーズIIIでは、これらの結果を抗原蛋白質のデザインにフィードバックし、より効率的蛋白質発現系を確立する。

(2) 抗原蛋白質発現系

比較的大量の抗原蛋白質を簡便に発現・精製するため、我々は conventional な大腸菌発現系を選択した。融合蛋白質の可溶性を高めるために、精製用のタグとしてN端にグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)を付加した。また大腸菌株で使用頻度の低いコドン considering、それらに対応する tRNA をコードするプラスミドを導入した大腸菌株[Rosetta(DE3)pLysS]を用い発現量の向上にも努めている。ハイスループットという観点から、一連の作業は全て96well フォーマットで行った。

我々は、テーマ1で行なったショットガンシーケンス法(cDNAを断片化後サブクローニングしシーケンスを行い、得られた結果をアセンブルすることで全長配列を決定する方法)によるcDNAクローンの全長配列解析産物をテーマ2に流用して、効率化を図った。この際、cDNA断片をクローニングサイトの両端に相同組換え配列を付加したベクターにサブクローニングすることで、ショットガン断片を容易に融合蛋白質発現ベクターへ組み込めるシステムを構築した(図2)。このようなストラテジーがとれたのは、我々研究チームが、テーマ間で綿密な連携をとってきたからである。

同様な手法を用いて、マルトース結合蛋白質(MBP)との融合蛋白質も作製しており、この蛋白質を用いた affinity 精製でより特異性の高い抗体の作製を進めている。in vitro recombination-assisted method は、

簡便かつハイスループットに cDNA 断片を様々な用途のコンストラクトへ組み替えることを可能にする。また cDNA 断片のみでなく全長の長鎖 cDNA にも適応できることから、我々は様々な発現コンストラクトへの全長 KIAA/mKIAA 遺伝子の組換えも進めている。

(3) 抗原蛋白質の精製における効率化

決定木による予測で可溶化できる可能性が極めて高い場合でも 100%可溶化するわけではなく、封入体を形成し不溶化する場合もある。無駄な精製労力を減らすため、本精製を行う前にスモールスケールで抗原蛋白質の発現量と可溶化度を数値化し、精製法や培養量を決定している。大腸菌に発現させた抗原蛋白質は、可溶化度に応じてグルタチオンセファロースビーズを用いたアフィニティ精製、あるいは調製した封入体を電気泳動しゲルより回収している。また、一回に複数のサンプルをこなせるように、可溶性精製の場合、破菌にマルチビーズショッカー (MB501PU(S), 安井器械, 4 サンプルかけ) を、不溶性精製の場合、バイオラピューター (UCW-201, COSMO BIO, 12 サンプルかけ) を封入体洗浄に導入し効率を上げている。MALDI-TOF-MS (AXIMA-CFR plus, 島津) で質量分析 (PMF 法) により精製度をチェック後、1 感作あたり 100~250ug の抗原蛋白質をウサギに皮内免疫している。基本的に計 4 回の感作後全採血し、力価チェック (ELISA) や各種アッセイ (Western blotting や免疫組織染色) でその特異性を検証している。我々は、平行して cDNA アレイによる遺伝子レベルでの発現解析を行っているので、抗体を用いた各種アッセイ結果と照らし合わせ、結果の妥当性を評価している (図 3)。この評価結果は InGaP (Integrative Gene and Protein expression) データベースを通して公開も開始した (<http://www.kazusa.or.jp/ingap/>)。このような検証が可能なのも、我々が cDNA クローンを保有し、そのリソース整備を平行して行っているからである。

【主たる特許】 (公開)

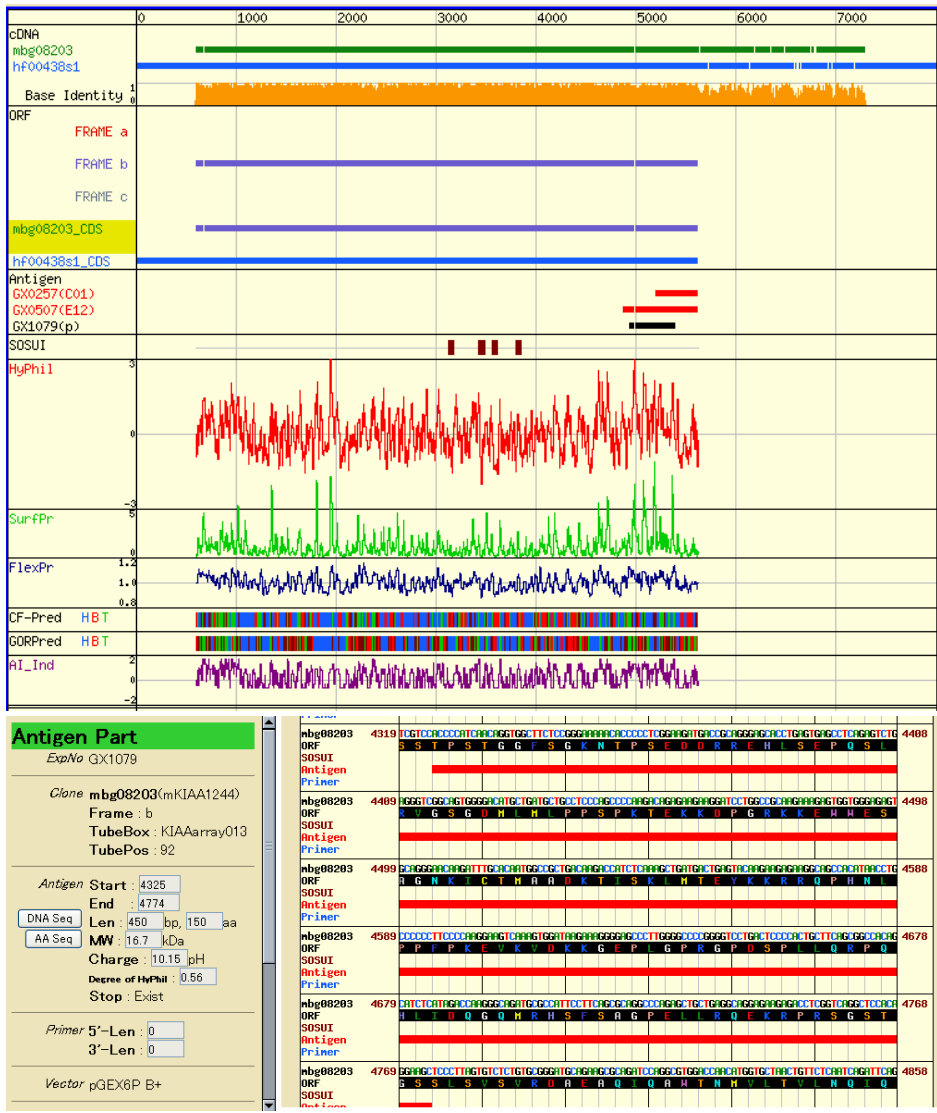
1. RasGEF モチーフを有する新規ポリペプチド及びそれをコードする DNA
特開 2004-081204
出願人：科学技術振興機構、かずさ DNA 研究所
2. BTB/POZ ドメインと Kelch 繰り返し配列を有する新規ポリペプチド及びそれをコードする DNA
特開 2004-073076
出願人：科学技術振興機構、かずさ DNA 研究所
3. HAT (Half-A-TPR) 繰り返しモチーフ及びプロリンに富む配列を有する新規ポリペプチド及びそれをコードする DNA
特許公開 2004-187668
出願人：科学技術振興機構、かずさ DNA 研究所
4. FHA、RING finger 及び D111/G-patch ドメインを有する新規ポリペプチド及びそれをコードする DNA
特許公開 2004-222680
出願人：科学技術振興機構、かずさ DNA 研究所
5. イムノグロブリン様繰り返しドメイン及びプロリンに富む配列を有する新規ポリペプチド及びそれをコードする DNA
特許公開 2004-283094
出願人：科学技術振興機構、かずさ DNA 研究所
6. FHA ドメイン及び膜アンカー領域を有する新規ポリペプチド及びそれをコードする DNA
特許公開 2004-337122
出願人：科学技術振興機構、かずさ DNA 研究所
7. UBA ドメインを有する新規ポリペプチド及びそれをコードする DNA
特許公開 2005-52003
出願人：科学技術振興機構、かずさ DNA 研究所

【2006 年までの主な成果】

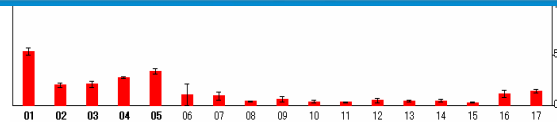
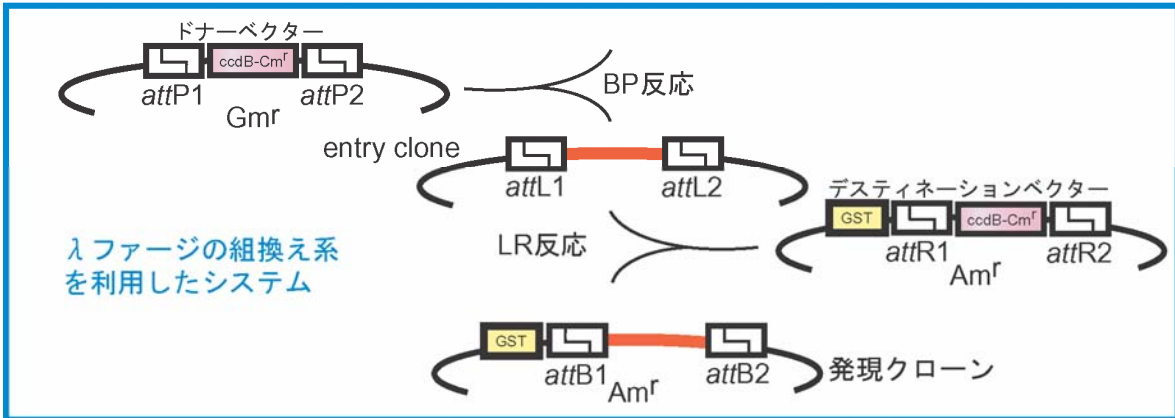
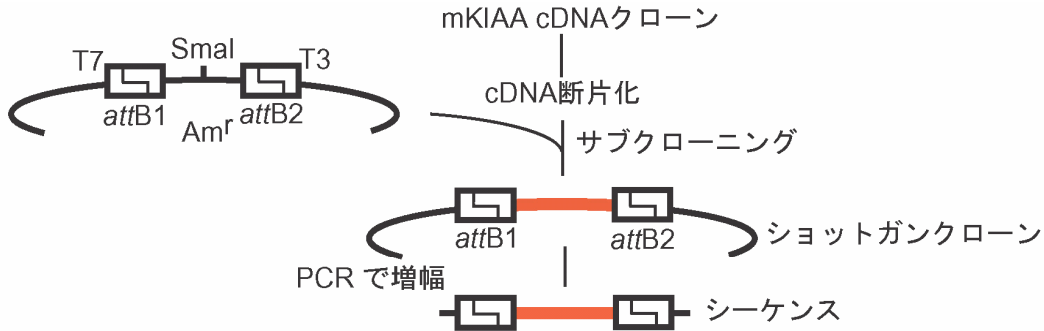
- 12 Hara Y, Shimada K, Kohga H, Ohara O, Koga H. High-throughput production of recombinant antigens for mouse KIAA proteins in *Escherichia coli*: computational allocation of possible antigenic regions, and construction of expression plasmids of glutathione-S-transferase-fused antigens by an in vitro recombination-assisted method. *DNA Res.* 2003, 10(3):129-136
- 13 Koga H, Yuasa S, Nagase T, Shimada K, Nagano M, Imai K, Ohara R, Nakajima D, Mur

- akami M, Kawai M, Miki F, Magae J, Inamoto S, Okazaki N, Ohara O. A comprehensive approach for establishment of the platform to analyze functions of KIAA proteins II: public release of inaugural version of InGaP database containing gene/protein expression profiles for 127 mouse KIAA genes/proteins. *DNA Res.* 2004, 11(4):293-304
- 14 Koga H, Shimada K, Hara Y, Nagano M, Kohga H, Yokoyama R, Kimura Y, Yuasa S, Magae J, Inamoto S, Okazaki N, Ohara O. A comprehensive approach for establishment of the platform to analyze functions of KIAA proteins: generation and evaluation of anti-mKIAA antibodies. *Proteomics.* 2004, 4(5):1412-1416
- 15 Usui-Aoki K, Shimada K, Nagano M, Kawai M, Koga H. A novel approach to protein expression profiling using antibody microarrays combined with surface plasmon resonance technology. *Proteomics.* 2005, 5(9):2396-2401
- 16 Shimada K, Nagano M, Kawai M, Koga H, Influences of amino acid features of glutathione S-transferase fusion proteins on their solubility, *Proteomics*, 2005, 5: 3859-3863
- 17 Ozaki A, Nagase T, Watanabe A, Nakajima D, Shimada K, Nagano M, Ohara O, Koga H, Inamoto S., Utilization of mammalian cells for efficient and reliable evaluation of specificity of antibodies to unravel the cellular function of mKIAA proteins, *Gene*, 2005, 360: 35-44
- 18 Kyo M, Usui-Aoki K, Koga H, Label-free detection of proteins in crude cell lysate with antibody arrays by a surface plasmon resonance imaging technique, *Anal Chem.*, 2005, 77: 7115-7121
- 19 Murakami M, Shimada K, Kawai M, Koga H. InCeP: Intracellular pathway based on KIAA protein-protein interactions, *DNA Res.*, 2005, 12 379-387
- 20 Ohara R, Knappik A, Shimada K, Frisch C, Ylera F, Koga H, Antibodies for Proteomic Research: Comparison of Traditional Immunization with Recombinant Antibody Technology, *Proteomics*, 2006, 6, 2638-2646
- 21 Oh-hashii K, Hirata Y, Koga H, Kiuchi K, GRP78-binding protein regulates cAMP-induced glial fibrillary acidic protein expression in rat C6 glioblastoma cells. *FEBS Letters* 580, 2006:3943-3947
- 22 Kamon H, Kawabe T, Kitamura H, Lee J, Kamimura D, Kaisho T, Akira S, Iwamatsu A, Koga H, Murakami M, Hirano T. TRIF-GEFH1-RhoB pathway is involved in MHCII expression on dendritic cells that is critical for CD4 T-cell activation. *EMBO J* 25. 2006: 4108-4119

【図1】 内部ブラウザによる抗原部位選択システム



【図2】 相同組換え技術を利用した融合蛋白質発現システム



- | | |
|---------------------|--------------|
| 01: whole brain | 11: testis |
| 02: cerebral cortex | 12: pancreas |
| 03: basal ganglia | 13: prostate |
| 04: cerebellum | 14: thymus |
| 05: brain stem | 15: spleen |
| 06: heart | 16: stomach |
| 07: lung | 17: colon |
| 08: liver | |
| 09: skeletal muscle | |
| 10: kidney | |