

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2（地域分）

- ① 蛋白発現プラスミドの作製
- ② 発現プラスミドを用いた大腸菌の形質転換
- ③ recombinant 抗体作製のための RNA 収集
- ④ 抗体の特異性評価1（ヒトサンプルに対する交差反応検出方を含む）

（財）かずさDNA研究所（部長）小原 收

【目的と概要】

本サブテーマの目的は、テーマ2-1と連携し、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・評価することにある。テーマ2-1で確立した手法を用いて、蛋白発現プラスミドの作製や発現プラスミドを用いた大腸菌の形質転換を約2000種類の分子に対して行なった。これらの産物は随時テーマ2-1で抗原蛋白質の発現に用いた。将来的に組換えモノクローナル抗体を作製できるよう、免疫初期の末梢血からB細胞由来の mRNA を精製し、保存・管理も行なった。更に、得られた抗体の評価を ELISA、マウス組織サンプルを用いたウェスタンブロッティング法で行なった。特に平成17年度からは、ヒトサンプルに対する交差反応検出系も確立して、フェーズ III 以降有用になるだろう情報の蓄積にも努めた。

【研究成果の概要と今後の取り組み】

（1）抗原蛋白質発現プラスミドの作製と形質転換体の調整

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 トラंस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、得られた結果をアッ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1）。このような戦略がとれたのは、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。

（2）recombinant 抗体作製のための RNA 収集

初回免疫が終了した 10-14 日目のウサギより、約 2 ml の採血を行い mRNA を抽出した。収集した mRNA は、総計 1612（取得総数 1677 からウサギ死亡によるやり直し分が 65 を差し引いた数）に達した。平均約 70 µl の mRNA が得られており、今後の研究には十分な量が得られたと考えている。将来的に recombinant 抗体が作製できるよう mRNA を -80°Cフリーザーで保管・管理するとともに、PCRに基づく抗体可変部位遺伝子増幅も行なった。

（3）抗体の特異性評価1（ヒトサンプルに対する交差反応検出方を含む）

初年度においては、ハイスループットの Western blot が行なえるような系の確立を目指した。その結果 10 種の抗体の評価を 1 回の transfer で行なえる系の確立に至った。以降この系を用いて成体マウス臓器から抽出した蛋白質を用いた Western blot を行ない、作製した全ての抗体について、その発現を Western blot で評価した。フェーズ III 以降その情報が有用にあるだろう、人サンプルとの交差反応の確認に関しては、平成 17 年度のその系を確立し、以降解析を重ねている、しかしながら中間評価以降に追加した、

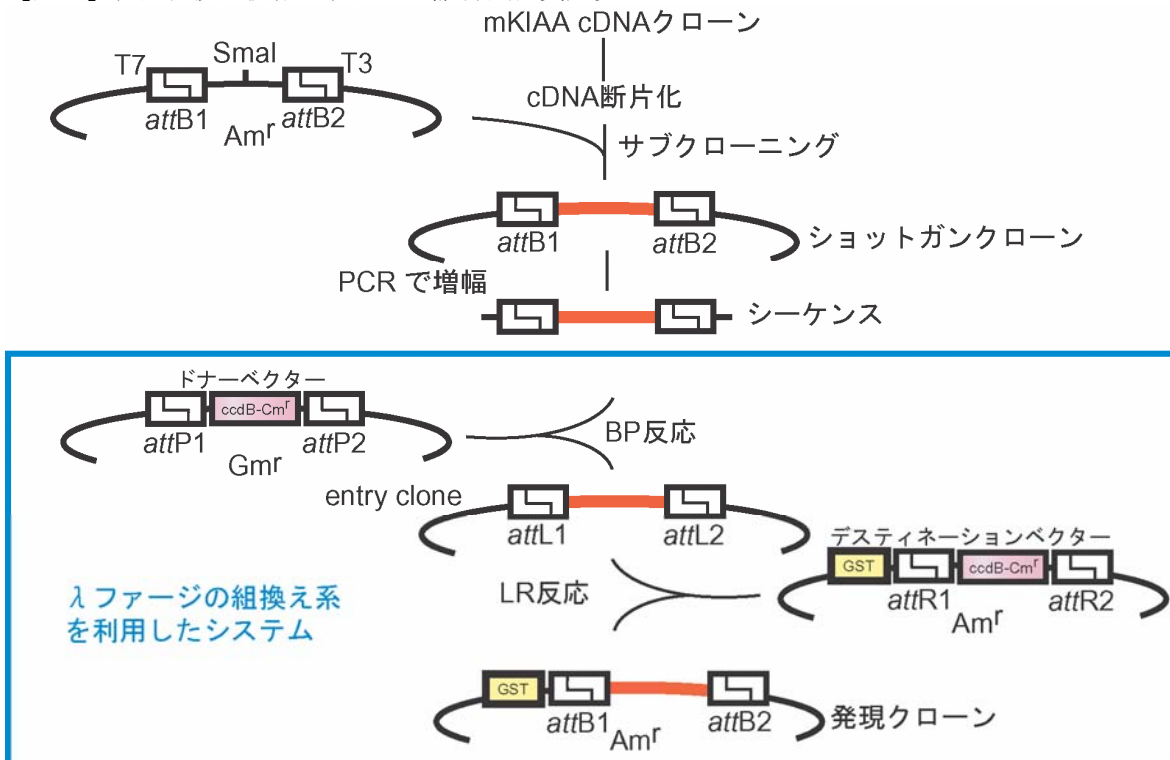
本実験は今だ解析途中であり、フェーズ III 以降においても継続して行っていく。

【特許の出願】

【2006年までの主な成果】

- 23 Ohno N, Terada N, Yamakawa H, Komada M, Ohara O, Trapp BD, Ohno S. Expression of protein 4.1G in Schwann cells of the peripheral nervous system. *J Neurosci Res.* 2006 Aug 15;84(3):568-77.
- 24 Ohno N, Terada N, Tanaka J, Yokoyama A, Yamakawa H, Fujii Y, Baba T, Ohara O, Ohno S. Protein 4.1 G localizes in rodent microglia. *Histochem Cell Biol.* 2005 Dec;124(6):477-86. Epub 2005 Sep 24.
- 25 Terada N, Ohno N, Yamakawa H, Ohara O, Liao X, Baba T, Ohno S. Immunohistochemical study of a membrane skeletal molecule, protein 4.1G, in mouse seminiferous tubules. *Histochem Cell Biol.* 2005 Sep;124(3-4):303-11. Epub 2005 Oct 28.
- 26 Terada N, Ohno N, Yamakawa H, Ohara O, Ohno S. Topographical significance of membrane skeletal component protein 4.1 B in mammalian organs. *Anat Sci Int.* 2005 Jun;80(2):61-70.
- 27 Isogawa Y, Kon T, Inoue T, Ohkura R, Yamakawa H, Ohara O, Sutoh K. The N-terminal domain of MYO18A has an ATP-insensitive actin-binding site. *Biochemistry.* 2005 Apr 26;44(16):6190-6.
- 28 Yamakawa H, Yokoyama S, Hirano T, Kitamura H, Ohara O. A simple and robust method for preparation of cDNA nylon microarrays. *DNA Res.* 2004 Oct 31;11(5):353-60.

【図1】 相同組換え技術を利用した融合蛋白質発現システム



【図2】 マルチレプリカブロッキングキットを用いた網羅的抗マウスK I A A抗体評価システムの確立

**サンプル; 成体マウス各種臓器から得られた可溶性蛋白
20 μ g/lane**

ブロッキング; Casein solution (Vector Lab)

一次抗体; GST吸収後の血清、一律500倍希釈

二次抗体; HRP-抗ウサギIg G (Amersham NA934)

検出; ECL Plus (Amersham PRN2132)

LAS 1000 Pluse (Fuji)

**Marker; MagicMark Western Protein Standard
(Invitrogen LC5600)**

