

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と評価

テーマ2の3-1 (地域分), 2の3-2 (地域分)

① 抗原部位推定技術の開発 ② ハイスループットな抗体作製技術 (フェーズ I)

① 組換え完全長 mKIAA 蛋白質の産生 (フェーズ II)

① 抗体精製の歩留まりと費用概算の提示、②組織染色を利用した作製抗体の評価、③抗ヒト KIAA 蛋白質ウサギポリクローナル抗体の100個の取得 (フェーズ II)、

①mKIAA 抗体の商品化に向けての品揃え、②組織染色を利用した作製抗体の評価 (フェーズ II)

(株) プロテイン・エクスプレス (共同研究員) 岸フク子、竹内淳、恵比須省吾、高木広明

【目的と概要】

抗体は蛋白質解析ツールとして重要であり、組換え蛋白質に特異的な抗体は遺伝子と蛋白質をつなぐ重要なツールとなる。従って、高品質の抗体を保有することは、ポストゲノム研究として重要なプロテオーム研究や創薬研究開発をより発展させると期待される。本事業において、マウス長鎖 cDNA がコードするタンパク質を大腸菌で発現精製し、ウサギに免疫して抗血清を作製する。本テーマは、この研究開発を支援するものである。具体的には、効率的な抗原タンパク質と抗体作製技術の構築と開発、抗体の品質評価を行なった。これらの研究成果の概要に加え、創薬研究や遺伝子解析等の基礎研究用ツールとして有償配布した抗体について紹介する。

【研究成果の概要と今後の取り組み】

(1) 抗原作製の標準化

ショットガン断片の発現プラスミドへのクローニングを目的に 3 系統の GateWay 発現ベクターを作製した (図 1)。このベクターの使用で、1 反応のコストを 3000 円から 600 円に低下させた。宿主大腸菌として通常用いられている BL21 とレアコドンに対する tRNA を導入した Rosetta との比較を行った。比較に用いた 8 個の内発現しなかった 1 個を除いてすべて Rosetta で強く発現した。この結果より、サブテーマ 1 で用いる発現株を Rosetta に決定した。発現させる cDNA が多種に亘ることから、ハイスループットな選択にはこれまでも抗体作製の実績が多い C 末端配列を機械的にとるのが最も効率的であると判断した。これらの成果を事業団研究チームに提案し、標準法として採用された。



図 1 ショットガン断片発現ベクターの構築

(2) 抗体の評価

2-1. 抗体精製の必要性

本事業では、GST 融合タンパク質として大腸菌で発現精製した抗原タンパク質をウサギに免疫して抗血清を作製している。得られた抗血清の精製の必要性ならびに特異的精製方法の開発を目的として、免疫前血清、抗血清、抗原アフィニティ精製抗体によるヒト組織パラフィン包埋切片に対する反応性を検討した。精製抗体は、抗原部位を MBP との融合タンパク質として大腸菌で調整後アミロース精製して作製したカラムで、抗血清硫酸安分画をアフィニティ精製して得た。

多くの抗血清で、1/160、1/64 希釈免疫前血清と比較して、1/160 希釈抗血清は強い反応性が認められた。例えば、ある KIAA (Ras GTPase-activating-like protein (IQGAP1)) に対する抗血清や精製抗体では、重層扁平上皮の細胞間の境界部に強く反応し、IQGAP1 が細胞膜に分布するという報告と矛盾せず、IQGAP1 に対する特異的な反応であると推測できた。同様な細胞間の境界部に対する反応性は、腎、尿細管や、胃の単層円柱上皮に対しても認められた。しかし、抗血清の胃組織に対するバックグラウンドが高いため、抗血清の結果のみ、または免疫前血清との比較から、特異的な反応性であると判断するのは困難と思われた。このような高いバックグラウンドは、他のクローンに対する抗血清においても認められたため、分布が知られていない未知抗原に対する特異的な反応性の判断には、抗原アフィニティ精製が重要であると思われた。

2-2. 抗体作製の歩留まりと問題点

204 種類の GST-KIAA 抗原をウサギに免疫し抗血清を作製した。免疫抗原を固相した ELISA 法で力価を検

定した。4000 倍に希釈した抗血清の吸光度が 1.0 以上を示すものが 90%であった。

高力価を示した 33 種の抗血清を、MBP 融合タンパク質で精製した。抗原設計から特異抗体評価までの工程を表 1 に示した。

表 1. 抗体作製工程

項目	方法
I 抗原設計 抗原領域長	100~200アミノ酸残基
II 投与抗原 投与抗原精製方法 樹脂	GST融合タンパク 可溶性発現 (不溶化の場合はグル切出し-溶出) Glutathione sepharoseカラム精製
III 特異精製用抗原 特異精製用抗原精製方法 樹脂	MBP融合タンパク 可溶性発現 アミロースカラム精製
IV 免疫 アジュバント 抗原投与方法 抗原投与量	FIA (初回のみFOA) 皮下注射 0.2mg/回 (初回のみ0.4mg) 4回
V 抗血清評価 力価検定 特異性試験	ELISA (免疫抗原GKD固相)
VI 特異精製 特異精製用カラム作成 抗血清からの精製	MBP-KDカラム AKTA
VII 特異抗体評価 力価検定 特異性試験	ELISA (免疫抗原GKD固相) ELISA (特異抗原MKD固相) 他のMKD抗原に対するW.B GST、E.coli固相ELISA

特異精製した抗体の品質評価の一例を図 2 に示した。

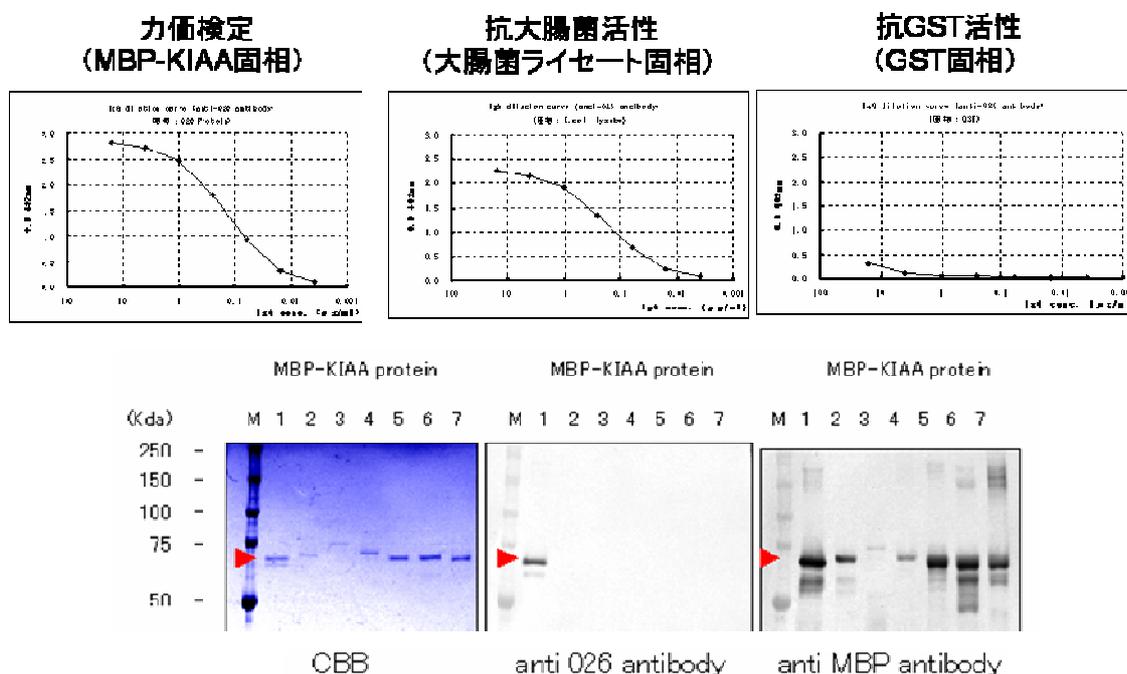


図 2. 特異精製した抗体の品質評価の一例

精製した抗体 33 例において、GST に対する抗体は除去されているが、大腸菌に対する抗体力価が高いものが多かった (図 2 上段の ELISA)。特異性 (図 2 下段中央のウエスタン) に関しては、21 種類の精製抗体が特異性 (他の抗原タンパク質と反応しない) を示した。特異性を示さなかったものは、大腸菌タンパク質 (Heat shock proteins) 由来の抗体を分離できず、検定抗原と結合した同タンパク質に反応したものと推定された。特異性を示さなかった 12 例について、同一領域で GST-抗原を再調整後再免疫し、MBP-抗原で再精製したところ、特異性を示したものは 3 例であった。

表2. 精製抗体作製の歩留まりと問題点

歩留まり	問題点 や 対策
抗原設計	<ul style="list-style-type: none"> 必要な抗体は、複数のエピトープ領域を設計 100アミノ酸残基 > 200アミノ酸残基
GST抗原作製	<ul style="list-style-type: none"> 大腸菌で発現 60-80% タンパク質の精製度が抗体の品質に影響 大腸菌由来タンパク質の除去(HSP70)
MBP抗原作製	<ul style="list-style-type: none"> 特異精製に使用可 50% 可溶性発現 宿主を変える(?)
免疫工程	<ul style="list-style-type: none"> 必要な抗体は3羽のウサギに免疫 conventionalとHealthyの使い分け
抗血清評価	力価のある抗血清 90%
特異精製	<ul style="list-style-type: none"> GSTに対する抗体の除去に有効 大腸菌に対する抗体の除去は困難
抗体評価	特異抗体 / 抗血清 70%

精製抗体作製歩留まりと問題点のサマリーを表2に示した。特に、留意すべき項目は下記3点である。

- ① 抗原の精製度が抗体の品質に大きく影響を及ぼす。特に、大腸菌 Heat Shock Proteins 由来抗体の除去は抗体精製では困難なため、抗原精製時に分離することが好ましい。
- ② 大腸菌による抗原作製、抗血清の取得、特異精製抗体の取得、それぞれの工程の歩留まりは、80%、90%、70%であり、全工程での特異精製取得率は50%であった。
- ③ 高品質抗体が取得できないとき、同一抗原部位での再調整による取得率は25%であった。

抗体が得られない場合は、別の抗原部位による抗体取得を試みるのが好ましい。

極めて特異性の高いポリクローナル抗体作製のためにはコストがかかる。コストと品質を両立できる新規抗体の製造方法や精製方法の開発が重要になる。

(3) 精製抗体を用いた肺がん組織の組織染色

(東京医大 第一外科 中村講師、加藤教授との共同研究)

13種類の精製抗体を選び、10症例の肺がん組織を染色し、6抗体が反応した(表3)。

表3. 13KIAA抗体の臨床検体に対する反応性

抗体番号	腫瘍組織				その他の疾病					正常組織
	肺癌	脳腫瘍		腎癌	結核性肉芽	橋本病甲状腺	肝硬変	肺炎		
		腫瘍	周辺部位					間質性	気管支性	
KD0219	13/25	15/18	10/18	6/6	ND	0/1	ND	ND	ND	5/16
KD0281	8/25	ND	ND	3/6	1/1	1/1	0/1	4/10	2/8	7/16
KD0019	6/10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KD0004	2/10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KD0229	2/10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KD0241	1/25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

KD0281に関して、肺がんにとどまらずその他の疾病組織に対する染色を行った。KD0281はB細胞性リンパ腫に選択的に反応し、T細胞性リンパ腫には反応しなかった。また、後腹膜線維症では腫瘍性のものに反応し、非腫瘍性には反応しなかった。核近傍に限らず細胞質が多く顆粒状に染まるという点で、腫瘍細胞の反応性とは明確に区別された(図3)。

疾病	リンパ腫		後腹膜線維症	
	B細胞性	T細胞性	腫瘍性	非腫瘍性
陽性率	17 / 18	0 / 2	5 / 5	0 / 3

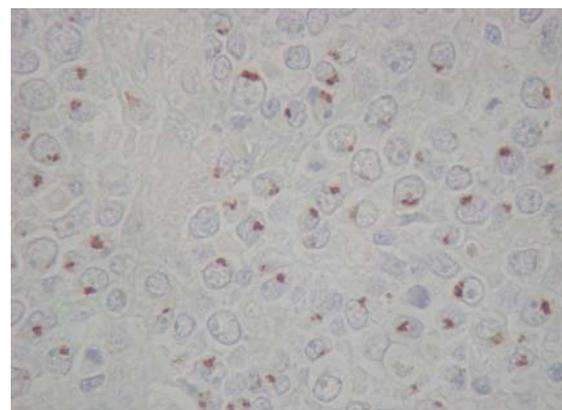


図3. KD0281 のリンパ腫への反応性

KD0281 およびこのタンパク質や遺伝子が、リンパ腫バイオマーカーとして診断や治療に有効か、創薬の標的分子となるかは今後の課題であるが、精製抗体による組織染色により疾病マーカータンパク質を発見できる可能性を示した。

(4) 抗体の商品化

本事業で作製した抗体を用い、マウス組織およびマウス由来培養細胞のウエスタンブロット解析および免疫組織化学による解析を行い、mKIAA 蛋白質発現情報データベースとして公開してきている(InGaP, <http://www.kauzsa.or.jp/ingap>)。これら作製抗体を、JST-CREATE における研究成果の実用化の観点から、研究用試薬として順次有償配布を開始した。

- ① InGaP にて公開した抗体のなかから、高付加価値が期待できる実用化抗体候補を選択し、抗原アフィニティ精製を行った5種類の精製抗体を有償配布した (H18.5)。

表4. 有償配布した精製抗体

抗原遺伝子	Alias Name	抗原部位
mKIAA0202	セブチン8	C-末端配列192アミノ酸
mKIAA0531	キネシン5C (KIF5C)	C-末端配列82アミノ酸
mKIAA1249	ASAP1/DEF-1	C-末端配列157アミノ酸
mKIAA0338	Neuronal protein4.1	C-末端配列221アミノ酸
mKIAA1293	Farnesyl diphosphate synthetase	C-末端配列116アミノ酸

- ② マウス組織およびマウス由来培養細胞を用いたウエスタンブロット解析により特異性の高い抗血清 16 種類、および小脳の異なる部位を特異的に染色できる5種類、合計21種類を選別し、ProteinA で簡易精製した抗体を有償配布準備中。
- ③ コア研究室にて作成された「医療情報の取得のためのパスウェイ」に関連するmKIAA抗体を次期有償配布候補として選定した。

今後、順次商品を拡大していく予定である。さらに、有用抗体を組み合わせた抗体アレイや抗体チップへの適用を図っていきたい。