

【研究目的と成果の概要】

ヒトKIAA遺伝子に相同性を有するマウス脳cDNAをもとにして、各cDNAに対応する蛋白質に対して作製されたウサギポリクローン抗体について、脳の免疫組織化学的手法を用いて新たな抗体評価技術を開発し、これをもとにして抗体の性能評価と実用性の検討をおこなった。これまでマウス遺伝子cDNAのデータベースは作られているが、脳内長鎖cDNAに重点をおいて、各cDNAに対応する抗体を系統的、網羅的に作成する本プロジェクトは世界で初めてのものである。遺伝子塩基配列の情報のみでは遺伝子機能解析への貢献度はそれほど高くないが、本プロジェクトにおける遺伝子産物に対する抗体作成は、遺伝子産物の発現と局在をもとにした幅広いポストゲノムの機能解析を可能にするものである。

しかしながら網羅的に抗体の質をチェックすることは最も重要な過程である反面、時間・経費そして労力を取られる作業である。この過程に新技術を導入し抗体の評価を加速させることはプロジェクトとして極めて重要であるばかりでなく、網羅的抗体作製自体が新規な試みであると同様、網羅的抗体評価技術の開発をもとにして得られた各抗体に関する脳内発現様式の画像データベース作製も新しい試みであった。確立した抗体評価技術を用いて、作成された抗体の性能評価を行なうとともに、アウトプットとしてのmKIAAの免疫組織化学による脳内発現様式の電子画像ファイルを加えたデータベース作成を行ない、抗体商品化の基盤を形成した。抗体を用いた遺伝子産物レベルでのポストゲノム機能解析、特に網羅的に作製した抗体を用いた脳内マッピングは、今まで誰も手をつけたことのない領域で、遺伝子発現様式に関する情報をも含めたデータベースとしての価値は極めて高い。

【研究成果の概要と今後の取り組み】

(1) 酵素抗体法を用いたマウス脳組織の免疫組織化学による抗体の評価

マウス脳のピプラトーム切片を用いて、切片浮遊法による酵素抗体反応により多数の抗体をスクリーニングする方法を開発した。この方法ではhorseradish peroxidaseによるDAB反応をglucose oxidaseによって増感する発色方法をとった。この方法で小脳皮質を免疫染色すると、図1に示すように抗体によって、プルキンエ細胞に限局したもの(図1a)、Bergmann gliaに特異的なもの(図1b)、神経細胞の細胞核に限局したもの(図1c)のように、各抗体に特異的な発現パターンが明瞭に区別された。

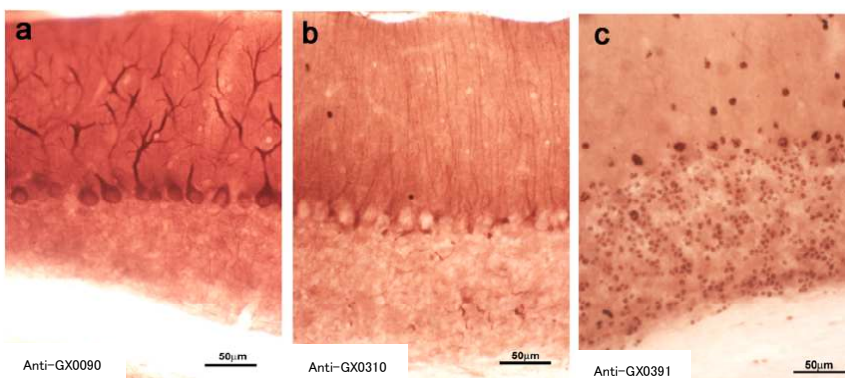


図1 マウス小脳皮質のmKIAA抗体による免疫染色像。a. mKIAA抗体(Anti-GX0090), プルキンエ細胞特異的な発現を示す。b. mKIAA抗体(Anti-GX0310), Bergmann glia特異的な発現を示す。c. mKIAA抗体(Anti-GX0391), 細胞核に特異的な発現を示す。Scale, 50 μm.

(2) 蛍光抗体法を用いたマウス脳組織の免疫組織化学による抗体の評価

マウス脳の切片をマイクロスライサーDTK-3000を用いて作製し、浮遊切片の蛍光抗体染色により多数の抗体をスクリーニングする方法を開発した。まず、電子画像取込みの迅速化のために導入した赤外線イメージングシステム Odysseyを用いて弱拡大の切片全体における発現分布に関する画像情報を取得した。これをもとに、共焦点レーザー顕微鏡 Zeiss LSM5 PASCALを用いて大脳新皮質、海馬、小脳等の主要な領域について蛍光抗体法により強拡大の画像を取得した。mKIAA抗体(Anti-GX0832)に関する解析例を示すと、まず、赤外線イメージングシステムにより、海馬に非常に強い発現が認められ、大脳新皮質、梨状葉、視床下部にも発現していることが明らかになった(図2A)。共焦点レーザー顕微鏡による強拡大像では、大脳新皮質のII-III層、V層の錐体細胞に発現し(図B, C)、海馬では歯状回ならびにアンモン角のニューロンに強く発現することが分かった(図D, E)。これらの所見から、Anti-GX0832抗体は抗原局在を明確に検出できることが明らかになった。

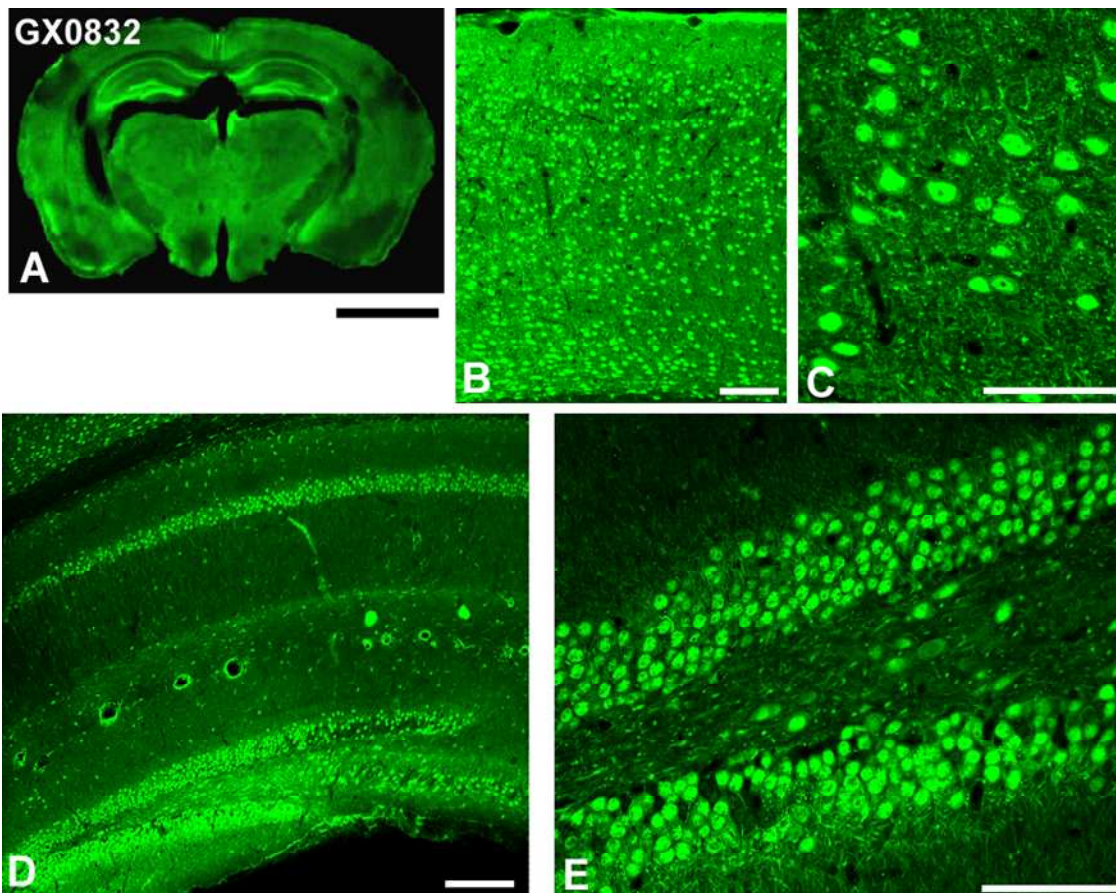


図2 Anti-GX0832抗体を用いた蛍光抗体染色による評価。A. 赤外線イメージングシステムによる前脳における発現分布の解析。B. 大脳新皮質弱拡大。C. 大脳新皮質V層の強拡大。D. 海馬弱拡大。E. 海馬歯状回の強拡大。 Scale bars: A, 2 mm; B-E, 50 μ m.

(3) mKIAA抗体の免疫電子顕微鏡技術への応用性に関する評価

免疫電子顕微鏡技術への応用性を評価するため、cDNAの機能が明らかになっているmKIAAに対するmKIAA抗体(Anti-GX0005)を用いて海馬CA3における発現分布の超微形態学的解析を行った。このmKIAAはGEF(guanine nucleotide exchange factor) -H1をコードし、この分子は微小管とアクチンフィラメントの協調的形成を制御する。mKIAA抗体(Anti-GX0005)によるWestern blotでは脳組織で110 kDのバンドが検出され(図3A)、蛍光抗体法ではCA3錐体細胞の先端樹状突起に強い発現が認められた(図3B)。酵素抗体法でhorseradish peroxidaseによるDAB反応をglucose oxidaseによって増感する発色方法を取り、反応後の切片をEpon包埋して超薄切片を作製し、FEI Tecnai G2 電子顕微鏡を用いて観察を行った(図3C, D)。低倍率の観察ではこのmKIAAは樹状突起に強く発現していることが明らかで(図3C)、高倍率の観察では樹状突起内の微小管周囲に局在していることが明らかとなった(図3D)。

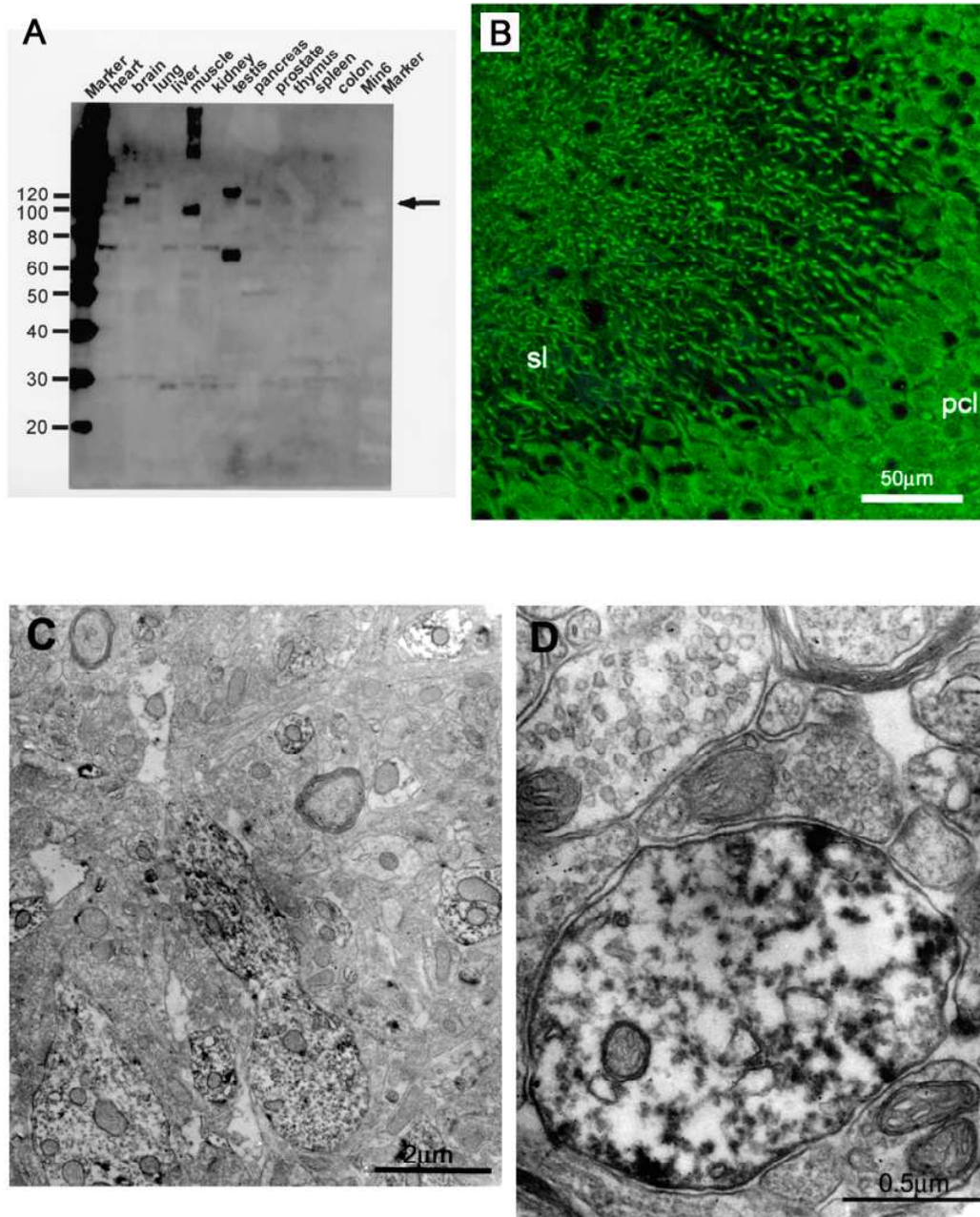


図3 mKIAA抗体の免疫電子顕微鏡技術への応用。A. Anti-GX0005抗体によるマウスの各組織のWestern blot解析。B. Anti-GX0005抗体を用いた蛍光抗体法によるマウス海馬CA3の免疫染色像。C. Anti-GX0005抗体を用いたマウス海馬CA3の免疫電顕像。低倍率観察で樹状突起が免疫陽性であることが明らかである。D. Anti-GX0005抗体を用いたマウス海馬CA3の免疫電顕像。高倍率観察で樹状突起内の微小管に免疫反応が分布することが明らかである。

Scale bars: B. 50 μm ; C. 2 μm ; D. 500 nm.

(4) mKIAA抗体のマウスモノクローン抗体との2重標識への応用可能性の評価

さらに、ウサギポリクローン抗体であるmKIAA抗体(Anti-GX0005)は、抗MAP2マウスモノクローン抗体とともに蛍光抗体法による二重標識が可能であることを明らかにした。このmKIAAは海馬CA3において錐体細胞先端樹状突起に強く発現し(図4a)、MAP2は大部分が同様に先端樹状突起に強く発現しており(図4b)、両者は大部分が先端樹状突起で共存することが明らかになった(図4c)。しかし、CA3ニューロンの一部で認められる細胞核内のこのmKIAAの局在に関してはMAP2との共存は認められなかった(図4c)。

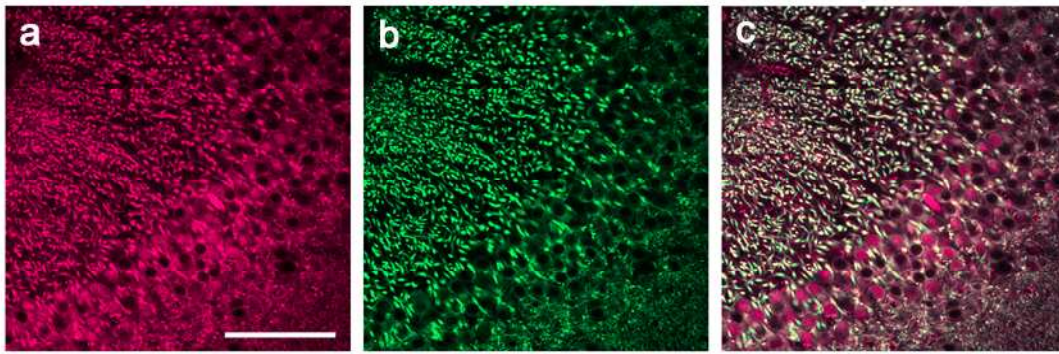


図4 mKIAAウサギポリクローン抗体(Anti-GX0005)と抗MAP2マウスモノクローン抗体によるマウス海馬CA3の2重標識。 a.. Anti-GX0005抗体による免疫染色。 b. 抗MAP2抗体による免疫染色。 c. aとbを重ね合わせたもの。 Scale bar: 100 μ m.

(5) 蛍光抗体法を用いた神経系培養細胞株の免疫細胞化学による抗体の評価

神経系培養細胞株Neuro2Aにレチノイン酸を添加することによりニューロン様分化が誘導された場合、(3),(4)で示したmKIAAとMAP2の発現分布がどのように変化するかを、蛍光抗体法で共焦点レーザー顕微鏡を用いた2重標識により検討した。レチノイン酸添加前にはNeuro2A細胞は突起を殆ど伸長していない(図5a,b,c)。このmKIAAは細胞体内には発現が認められるが突起における発現は非常に弱い(図5a)。MAP2は細胞体ならびに突起に強い発現が認められる(図5b)。両者の局在を2重標識により比較すると、MAP2陽性の突起には殆どこのmKIAA発現が認められない(図5c)。これに対し、Neuro2A細胞にレチノイン酸 20 μ Mを添加すると、突起の著しい増加が認められた(図5d,e,f)。このmKIAAは細胞体とともに伸長した突起にも強く発現する(図5d)。MAP2も同様に細胞体と伸長した突起に発現分布が認められた(図5e)。このmKIAAとMAP2はレチノイン酸により突起を多数伸長したNeuro2Aにおいては細胞体ならびに突起において共存することが明らかになった(図5f)。

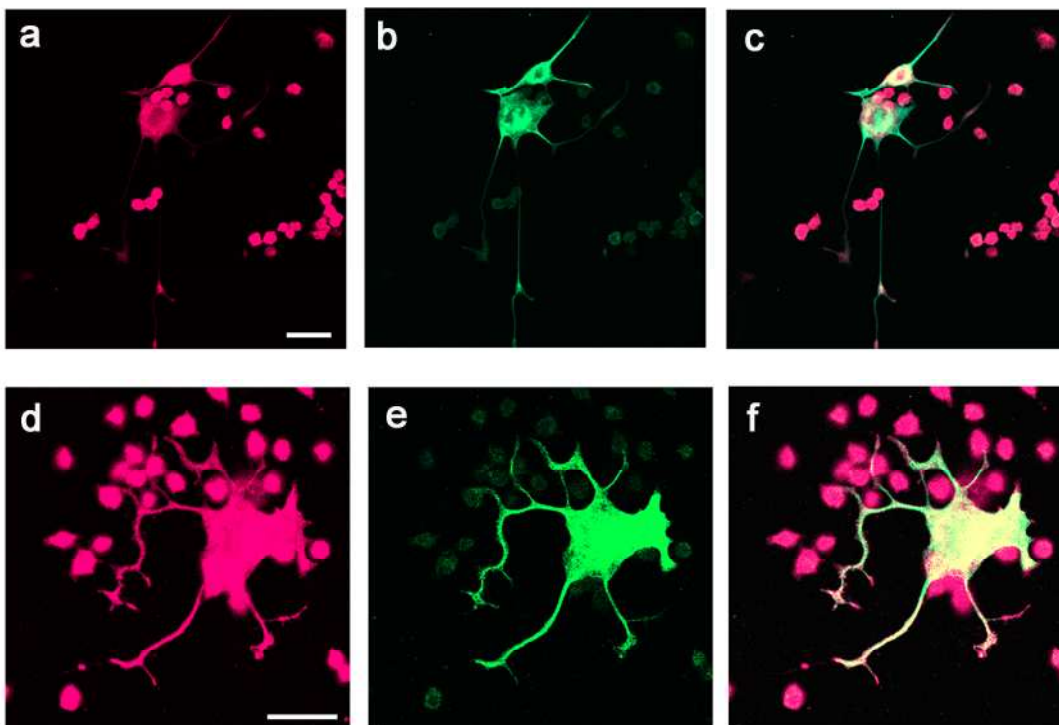


図5 神経系培養細胞株Neuro2Aにおけるレチノイン酸 20 μ M添加によるニューロン様分化の誘導とmKIAAの発現分布の変化。レチノイン酸添加前(a,b,c)にはmKIAAの発現は細胞体に局限し突起には殆ど認められない(a)。MAP2は細胞体並びに突起に発現し(b)、mKIAAとMAP2の局在の相関は2重標識により明らかである(c)。レチノイン酸添加によりNeuro2Aの突起が著しく伸長し(d,e,f)、mKIAAの強い発現は細胞体とともに伸長した突起にも認められた(d)。MAP2の発現も同様の分布を示し(e)、mKIAAとMAP2の局在の相関は2重標識により明らかである(f)。 Scale bar: 50 μ m.

(6) 今後の取り組み

mKIAA抗体を用いた免疫組織染色による遺伝子産物の局在パターンに関する情報は電子画像として系統的に作成、保存してデータベース化することにより、ポストゲノムの機能解析における実用化促進に今後益々有用な資産となるため、整備充実することが必要であろう。このためには、免疫染色作業と画像取込みの迅速化について更なる工夫を要する。更にmKIAA抗体(Anti-GX番号などで示す抗体)を用いた免疫染色技術を神経系培養細胞系へ拡充し、神経系腫瘍細胞を中心としたin vitroの系でのmKIAAの発現制御や機能解析のデータを構築することにより、創薬の基盤としての脳内遺伝子機能解析システムを作り出すことが可能である。

また、本プロジェクトの過程で、mKIAAのcDNA microarrayを用いて、扁桃体内の領域特異的に情動反応に関連して変動する遺伝子としてmKIAA1577を同定した。この分子は新規のimmediately early geneでもあり、分子の発現解析にはmKIAA抗体の使用が非常に有効であった(Brain Res., 2006)。本分子の機能的意義は未だ不明であるが、恐怖情動と関連した発現と機能の解析を現在進めている。

【研究発表】

1. 論文

A comprehensive approach for establishment of the platform to analyze functions of KIAA proteins: Generation and evaluation of anti-mKIAA antibodies.

Koga H, Shimada K, Hara Y, Nagano M, Kohga H, Yokoyama R, Kimura Y, Yuasa S, Magae J, Inamoto S, Okazaki N, Ohara O.
Proteomics, 4(5) 1412-1416, 2004

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.

Koga H, Yuasa S, Nagase T, Shimada K, Nagano M, Imai K, Ohara R, Nakajima D, Murakami M, Kawai M, Miki F, Magae J, Inamoto S, Okazaki N, Ohara O.
DNA Res. 11(4) 293-304, 2004

Altered gene expression in the subdivisions of the amygdala of Fyn-deficient mice as revealed by laser capture microdissection and mKIAA cDNA array analysis.

Kai N, Iwase K, Imai K, Nakahira E, Soma M, Ohtsuka S, Yagi T, Kobayashi K, Koga H, Takiguchi M, Yuasa S.
Brain Res. 1073-1074C: 60-70, 2006

2. 学会発表

グアニンヌクレオチド交換因子(mKIAA0651)の成体ならびに発達期マウス脳内神経細胞における局在
相澤秀紀、古閑比佐志、原 康洋、島田希代、湯浅茂樹
第26回日本神経科学大会, 2003. 7. 23 名古屋

グアニンヌクレオチド交換因子(GEF-H1, mKIAA0651)のマウス脳発生過程における発現
湯浅茂樹、長谷川明子、湯浅稚子、原 康洋、島田希代、古閑比佐志
第28回日本神経科学大会, 2005. 7. 26 横浜