

# 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 6 (地域分)

### 遺伝子産物の細胞内局在観察に基づく抗体の評価

(財) 産業創造研究所 (共同研究員) 尾崎 照遵、瀧 景子、川上 泰

#### 目的と概要

ヒトをはじめとするゲノムの解読が行なわれ、次にそこから作られる蛋白質の機能の解析が重要な課題になっている。その為には個々の蛋白質を一つ一つ識別する必要があるが、DNA とは異なり個々の蛋白質を識別するのは容易でない。現在のところ個々の蛋白質を識別する方法として最も有効と考えられるのは、抗体を“プローブ”として用いる方法である。本プロジェクトでは得られたマウス KIAA 遺伝子 (以後 mKIAA 遺伝子と呼ぶ) から作られる個々の蛋白質に対する抗体を作製し、作成した抗体が実際に mKIAA 遺伝子の特異的に認識できるかどうかを評価しているが、特に個々の蛋白質を識別するプローブとして抗体を用いる為には、その特異性を厳密に評価する必要がある。今回我々は、動物細胞を用いて抗体の特異性を効率的かつ信頼性高く評価する方法を開発したので報告する。合わせて細胞染色を用い内在性の蛋白質を観察して得られた結果も報告する。

#### 研究成果の概要と今後の取り組み

##### (1) 発現ベクターを用いた効率的抗体の評価法の開発

mKIAA 蛋白質に対する抗体を、色々な臓器に由来する 11 種類のマウス培養細胞の抽出液を用いたウェスタンブロットで評価した結果、50%以上の抗体により予想分子量にほぼ相当するバンドが検出できた。しかしながら、検出されたバンドが目的としている mKIAA 蛋白質を認識しているのか、それとも偶然クロスリアクトする蛋白質が同じ分子量の場所に泳動されているのか判別することは困難であった。また、組織特異的な発現をする蛋白質の場合、バンドが出ないからといって評価している抗体が抗原を認識できないのか、それとも発現していないのかを見分けることが不可能であった。

一方、抗体の特異性は、抗体を使用する際に最も重要であるが、特異的抗体を精製するのは労力がある。その為、得られた血清の中に特異性を持つ抗体があり、精製するに値するかどうかを簡単に評価する方法の確立が求められた。そこで発現ベクターによりヒト HEK293 細胞中で強制発現を行ない、ウェスタンブロットで抗体の特異性を評価することにした。この方法の利点は、動物細胞中で強制発現させた蛋白質は、内在性の蛋白質と同様の修飾を受けると考えられる点である。そこで、Nakajima らが作製した、mKIAA/KIAA の ORF が  $\lambda$  ファージの 2 個の組換え配列の間にクローン化されているベクター<sup>1)</sup> (図 1) を利用して、発現ベクターをハイスルーブットで作製することにした。この時エンタリークローンの mKIAA/KIAA の終止コドンには変異が導入されている為、組換え後の発現ベクターを用いると、動物細胞中では CMV プロモーターからの転写で、3xFLAG 配列と融合した形の mKIAA/KIAA 蛋白質が発現できる。この発現ベクターをトランスフェクトした HEK293 細胞の抽出液を用い、強制発現させた蛋白質を抗 FLAG 抗体および抗 mKIAA 抗体を用いたウェスタンブロットで検出した。このとき、(1) もし抗 FLAG 抗体により認識されるバンドと抗 mKIAA 抗体で認識されるバンドが同じ位置に泳動され、かつ (2) mKIAA 蛋白質を発現させていないコントロールの抽出液では抗 mKIAA 抗体によりこのバンドが検出できない場合、評価している mKIAA 抗体が特異的に mKIAA 蛋白質を認識できると結論した (図 2A, B, C, D, E, F)。しかしながら、図 2A, B, C のレーン 3 と 4 の様に抗 mKIAA 抗体により、強制発現させた 3xFLAG 蛋白質の他に、少し分子量が小さいヒト HEK293 細胞の内在性蛋白質が認識されることがあった。これらのバンドは (1) 3xFLAG 蛋白質は内在性の蛋白質よりタグの分 (約 5kDa) だけ大きくなること、(2) mKIAA 蛋白質の抗原部位と対応するヒトの KIAA 蛋白質の部位ではアミノ酸配列が 75%以上同一であり、おそらく抗 mKIAA 抗体がヒト KIAA 蛋白質を認識できると考えられることより、内在性の KIAA 蛋白質であると考えられた。今回発現させた 3xFLAG 蛋白質はすべて抗 FLAG 抗体により検出できたが、図 2G のように発現レベルは遺伝子により違った。40 個の抗 mKIAA 抗体のうち 32 個が、発現させた 3xFLAG 蛋白質を特異的に認識でき、残りの 8 個は対応する 3xFLAG 蛋白質を認識することが出来なかった。興味深いことに、3 個の mKIAA/KIAA 蛋白質は予想分子量より 30kDa 以上大きく泳動された。また、13 個の mKIAA/KIAA 蛋白質の見かけの分子量は、予想分子量より 20%以上大きかった (例えば図 2D, F)。これに加えて mKIAA1465 蛋白質は図 2F のレーン 1 と 3 に示す様に、矢印で示したバ

ンドの他に修飾されたと考えられるものがスメア状に検出された。また、これと同様の修飾をうけていると考えられる蛋白質は、mKIAA0455-3xFLAG と mKIAA1815-3xFLAG 発現ベクターをトランスフェクションした場合にも見られた (図 2G レーン 3, 6; この時 10 分間感光しても、レーン 1, 2, 4, 5 ではこの様な修飾を受けて生じたと考えられる蛋白質が検出できないことに注目)。以上より、翻訳後修飾を受けることで、多くの mKIAA/KIAA 蛋白質は予想分子量とは違った位置に泳動されることが示唆された。発現ベクターをトランスフェクションした HEK293 細胞抽出液のウェスタンや、マウス培養細胞抽出液を用いたウェスタンにおいて、抗 mKIAA 抗体は発現した蛋白質以外のバンドを認識することがあった。これらは先に述べた内在性の mKIAA/KIAA 蛋白質という可能性以外に、(1) スプライシングバリエントから作られる蛋白質、(2) 同じ読み枠で異なる翻訳開始コドンから生じた蛋白質、(3) mKIAA 遺伝子のパラログ (祖先は異なるが、遺伝子ファミリーの一員である為にある程度似ている遺伝子のこと) の産物、(4) たまたま認識された全く関係ない蛋白質、という可能性が考えられた。将来、これらのバンドがどのような蛋白質であるかを同定する為には、これらの抗体を用いて免疫沈降を行ない、マスペクトル解析を行なう必要があると考えられる。

今後我々が開発した方法を用いれば、抗体の評価の効率が上がり、信頼性が増し、有用な抗体が商品化されるまでの期間が短縮されると期待される。

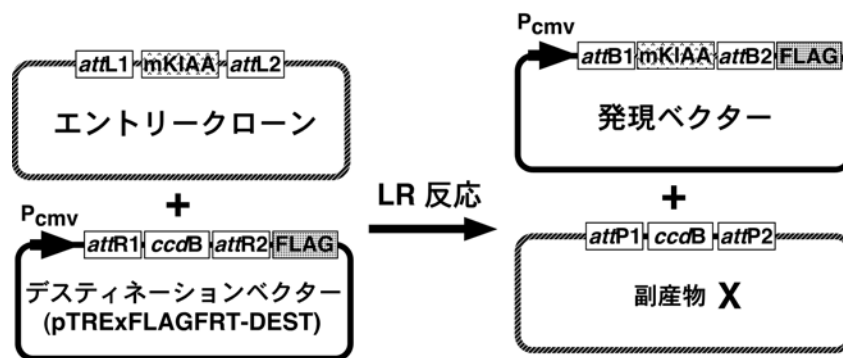


図 1 試験管内組換え反応を利用した mKIAA/KIAA-3xFLAG 蛋白質の動物細胞発現ベクター構築の概略 (参考文献 2 より改変して転載)

LR 反応を行なうことで、エントリークローン中の mKIAA/KIAA 遺伝子の ORF (図中では mKIAA) が、CMV プロモーター ( $P_{CMV}$ ) と 3xFLAG 配列 (FLAG) の間にクローニングされ、発現ベクターが構築される。ccdB は大腸菌の成育に必須な DNA ジャイレースの働きを阻害する蛋白質の遺伝子であり、attB、attP、attL、attR は  $\lambda$  フェージの組換え部位を示す。

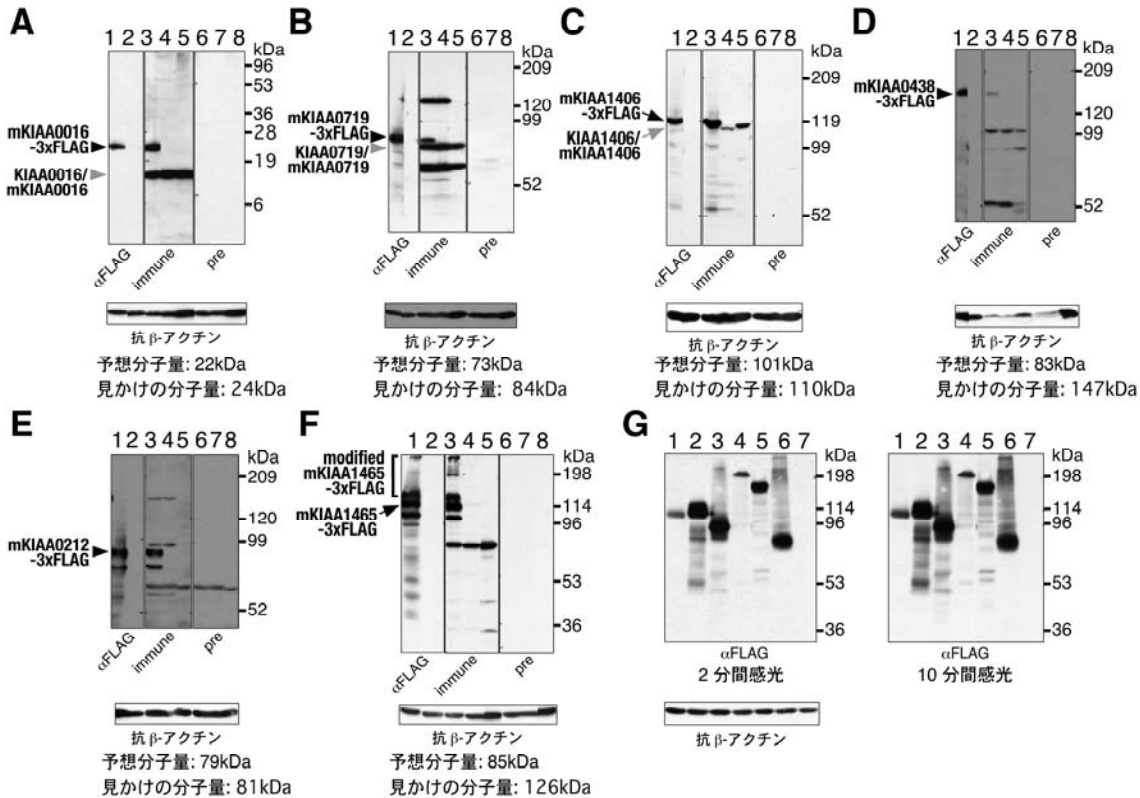


図2 強制発現させた mKIAA 蛋白質を抗 FLAG 抗体及び、抗 mKIAA 抗体を用いてウェスタンブロットにより検出した例 (参考文献 2 より改変して転載)

(A, B, C, D, E, F) レーン 1、3、6 には、3xFLAG タグを付けた mKIAA0016 (A)、mKIAA0719 (B)、mKIAA1406 (C)、mKIAA0438 (D)、mKIAA0212 (E)、mKIAA1465 (F) を発現させた HEK293 細胞の抽出液を泳動した。レーン 2、4、7 には、コントロールとして pUC18 の DNA を導入した HEK293 細胞の抽出液を泳動した。レーン 5、8 には内在性の mKIAA 蛋白質を検出する為に、Swiss3T3 細胞 (A)、P388D1 細胞 (B, C, D)、L929 細胞 (E, F) の抽出液を泳動した。レーン 1 及び 2 は抗 FLAG 抗体 ( $\alpha$ FLAG) で検出した。レーン 3、4、5 は抗 mKIAA0016 抗体 (A)、抗 mKIAA0719 抗体 (B)、抗 mKIAA1406 抗体 (C)、抗 mKIAA0438 抗体 (D)、抗 mKIAA0212 抗体 (E)、抗 mKIAA1465 抗体 (F) (immune) で検出した。一方、レーン 6、7、8 はそれぞれに対応する免疫前の血清 (pre) で検出した。各パネルにおいて、抗 FLAG 抗体による検出で最も強く検出されたバンドの位置を黒矢印で示した。A、B、及び C において、抗 mKIAA 抗体により認識された内在性の KIAA/mKIAA 蛋白質と考えられるバンドの位置を灰色の矢印により示した。F においては、修飾されたと考えられる mKIAA1465-3xFLAG 蛋白質の位置を示した。各 mKIAA-3xFLAG 蛋白質の予想分子量、及び見かけの分子量を各パネルの一番下に記載した。(G) 3xFLAG タグを付けた mKIAA0215 (レーン 1)、mKIAA0429 (レーン 2)、mKIAA0455 (レーン 3)、mKIAA1151 (レーン 4)、mKIAA1626 (レーン 5)、mKIAA1815 (レーン 6) を発現させた HEK293 細胞の抽出液を泳動した。レーン 7 には、コントロールとして pUC18 の DNA を導入した HEK293 細胞の抽出液を泳動した。フィルターは抗 FLAG 抗体で検出し、2 分間 (左上) 又は 10 分間 (右上) 感光させた。

分子量マーカの泳動位置とその分子量 (単位は kilodalton; kDa) を各プロットの右側に示した。泳動した蛋白質量がほぼ同量であることを示す為、結合させた抗体を剥がした後、各フィルターを抗  $\beta$ -アクチン抗体で再検出した。

## (2) 蛍光顕微鏡を用いた細胞内での内在性蛋白質の局在観察による抗体の評価法の開発

蛋白質の細胞内局在の網羅的解析に関しては、例えば German Cancer Research Center が蛍光蛋白質を N 末及び C 末に融合させて観察している。しかしながら (a) 蛍光蛋白質の融合部位により局在が変化したり、(b) 強制発現により局在が影響を受ける可能性があり、本来の局在を反映しているかどうかの判断が困難である。これに対して、我々の抗体ライブラリーを用いれば内在性蛋白質の観察を行なうことができ、生理的条件下での蛋白質の局在を調べることが出来る。例えば図 3 には抗 mKIAA0827 抗体による Swiss3T3 細胞の免疫蛍光染色の例を示している。この KIAA 蛋白質は高浸透圧下で、核に移行することが知られている。免疫蛍光染色の結果、細胞を 200mM raffinose を含む高浸透圧の培地で培養した場合、無処理の培地で培養

した場合に比べて明らかに核が強く染色された。これと同様の結果は 100mM NaCl を含む高浸透圧の培地で培養した場合にも得られた。この染色結果により、内在性の mKIAA0827 蛋白質が高浸透圧に応答して核に移行することが示された。また、mKIAA0376 蛋白質は機能未知であるが、抗 mKIAA0376 抗体によりゴルジ体様染色像が得られる。実際、ゴルジ体を破壊する薬剤、brefeldin A で処理することによりこの染色像が消失することより、ゴルジ体への局在が確認された。この他に、蛋白質の核から細胞質への輸送を阻害する薬剤、レプトマイシン B で処理した細胞を免疫蛍光染色することにより、mKIAA3014、mKIAA4011、mKIAA0201 は細胞質と核をシャトルしていることが分かった。内在性の蛋白質によっては細胞内の分子数が少なく、観察が困難なことがある為、さらに検出感度が高い方法を取る必要がある。現在、二次抗体は FITC によりラベルされたものを用いているが、今後これ以外でラベルされているものを用いて感度をあげることにより、より多くの蛋白質の観察が可能になると考えられる。

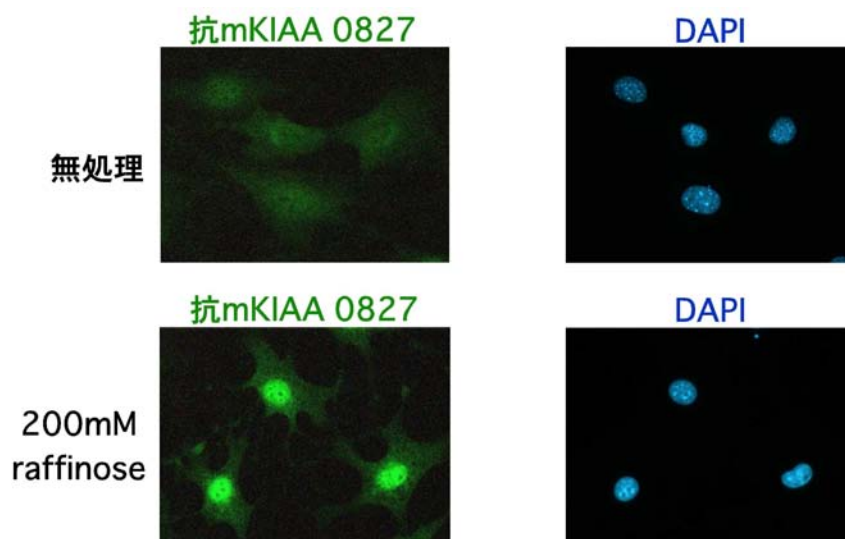


図3 浸透圧の増加によって抗mKIAA 0827抗体により認識される蛋白質（緑）は核（青）に移行する

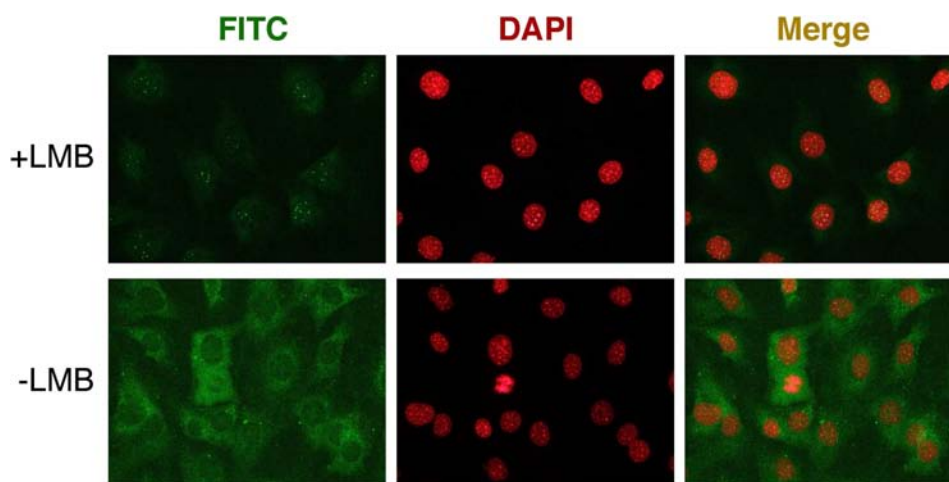


図4 レプトマイシンBの処理により抗mKIAA4011抗体が認識する蛋白質（緑）は核内（赤）でドット状の分布を示す様になる

以上の結果より、本研究で得られた網羅的抗体コレクションが、細胞外からの刺激による蛋白質の細胞内での局在の変化など、今まで困難であった KIAA/mKIAA 蛋白質の機能解析を可能にする有用なツールとなることが示された。更に生理的条件下で蛋白質の局在を調べることにより、生理条件下で意味のある創薬ターゲットの絞り込みにつながる情報が得られると期待される。

### 3. 参考文献

1. Nakajima, D., Saito, K., Yamakawa, H., Kikuno, R. F., Nakayama, M., Ohara, R., Okazaki, N., Koga, H., Takahiro Nagase, T., and Ohara, O.  
Preparation of a set of expression-ready clones of mammalian long cDNAs encoding large proteins by the ORF trap cloning method. *DNA Res.* **12**: pp257-267, 2005
2. Ozaki, A., Nagase, T., Watanabe, A., Nakajima, D., Shimada, K., Nagano, M., Ohara, O., Koga, H., and Inamoto, S.  
Utilization of mammalian cells for efficient and reliable evaluation of specificity of antibodies to unravel the cellular function of mKIAA proteins. *Gene* **360**: pp35-44, 2005
3. 稲本進、朱怡、古川智春、渡辺眞理、本條秀子、馬替純二、川上泰  
「マウス長鎖cDNAの構造解析及びその遺伝子産物に対する抗体の評価」財団法人産業創造研究所 紀要 Vol.23 No.4 (通巻92号 2003年12月) p12-16
4. 稲本進、尾崎照遵、渡部綾子、南雲利之、渡辺眞理、瀧景子、川上泰  
「ポストゲノムのツールとしての抗体の特異性の評価-動物細胞を用いた効率的かつ信頼性の高い抗マウスKIAA蛋白質抗体の特異性の評価法-」財団法人産業創造研究所 紀要 Vol.25 No.3 (通巻99号 2005年9月) p12-16