

[様式6]

<p>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</p> <p>小テーマ名：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</p>
<p>サブテーマリーダー（所属、役職、氏名）千葉県産業振興センター（研究員）原康洋→島田希代</p> <p>研究従事者（所属、役職、氏名）千葉県産業振興センター（同主任研究員）古閑比佐志、（研究員）島田希代、長野美穂子、馬替純二、竹内淳（H16）、岸フク子（H16）（技術員）小塚芳道、鎌形雄美子</p>
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>①研究の概要</p> <p>マウスKIAA相同遺伝子情報を用いて、マウスKIAA蛋白質に対するウサギポリクローナル抗体を作製しその評価を行う。</p> <p>ウサギに免疫する抗原は全長配列解析に用いたショットガン遺伝子断片を利用し相同組換え技術を用いて抗原発現プラスミドに組み込むが、この工程は地域側の負担として行った。</p> <p>作製された抗原発現プラスミドを大腸菌に組み込み大量培養したものを、その蛋白質の特性を考慮して精製する。得られた抗原蛋白質（GST；グルタチオン還元酵素融合蛋白質として産生）は免疫業者に送付し、49日のスケジュールでウサギに免疫する。抗体の評価はELISA・マウス組織から抽出した蛋白質を用いたWestern blotting・マウス培養細胞から抽出した蛋白質を用いたWestern blotting及び還流固定脳組織の浮遊法による増強免疫染色法でその強度ならびに特異性を評価する。更に質量分析装置を用いた抗体による免疫沈降産物の解析を加え、総合的に抗体の評価を下した。一方、抗体の精製に関しては、抗体アレイの作製を念頭に入れてすべての抗体に対してProtein Aによる粗精製を行い、さらに特異性向上のために必要な場合は抗原に用いた蛋白質と異なるタグ（MBP；マルトース結合蛋白）を融合させたKIAA蛋白質に対するアフィニティーで最終的に精製した。これら精製抗体の一部は商品化を達成した。</p> <p>②研究の独自性・新規性</p> <p>現在までにcDNAプロジェクトの成果を利用した網羅的抗体作製の試みは行われていない。この観点から本プロジェクトは新規な取り組みであるばかりでなく、cDNAプロジェクトの成果の有効利用という意味からも極めて意義深い。また我々が利用している <i>in vitro</i> recombination-assisted法は塩基配列決定後、直ぐに抗体作製を可能とするシステムであり、この方法論の導入は我々独自の発想である。</p> <p>一方、一つの手法による抗体の評価はそれぞれの評価法の特異性から信頼性が低い。我々は異なる方法を組み合わせることで評価の信頼性を高めている。網羅的抗体作製の試み自体がごく限られた施設でしか行われていないが、我々のように多方面からの評価を加えている施設は他にはない。これらの作業により我々はヒト及びモデル生物（マウス）の遺伝子セットを保有するに留まらず、これらの遺伝子産物を解析するための重要なツールである抗体をも手にすることになった。このように遺伝子・抗体を合わせ持つことは他に類を見ない独自性のある研究をフェーズIIIにおいて可能せしめるだろう。</p> <p>③研究の目標（各フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に）</p> <p>フェーズⅠ・Ⅱを通して最終的に2000種類を超える全てのマウスKIAA・FLJ蛋白質に対する抗体作製を達成した。平成13年度には主としてコア研究室の整備・方法の確立に主眼を置いたが、平成14及び15年度の各年度においては確立したシステムを最大限に生かしそれぞれ400抗体の作製を行なった。平成16年度以降は更に抗体作製・評価のシステムを改善して年間500抗体をこなし、平成18年度上期には残り200抗体の作製・評価を終え最終的に前記目標に凌駕した（作製抗体数2021）。</p> <p>フェーズⅢ（H18.11.25事業完了日以降）：フェーズⅢにおいてはこれらの商品化を進め、既に開始している研究用抗体販売事業の拡充に努める。</p>
<p>研究の進め方及び進捗状況（目標と対比して）</p> <p>基本計画におけるフェーズⅠ・Ⅱの数値目標である「2000種の実用に耐えうる抗体の作製」は、最終的に2021種の抗体を作製することで完全に達成された。フェーズⅡであたらに追加した抗体精製作業も順調に経過し、一部の抗体に関してはその商品化にも成功した。</p>
<p>主な成果</p> <p>具体的な成果内容：</p> <p>特許件数：13 論文数：4 口頭発表件数：27（海外11）</p>

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

国内外を問わず同様のプロジェクトは行われていない。網羅的抗体作製のみであれば、スウェーデンのThe KTH Genome Centerが4年間で14,000種類のポリクローナル抗体を作製するという偉業に取り組んでいる。しかしその評価は免疫組織化学で行われるのみである。NIHではマウスに一度に24種類のペプチド抗原を免疫し、ハイブリドーマの上清の段階でスクリーニングするという手法を用いて網羅的な抗体の作製を試みているがまだその成果は公表されていない。また抗原性に偏りがあることを考慮すると、特定の抗体のみが産生される危険性をはらんでいる。我々の手法は抗原の精製段階では従来法を用いているが、抗原蛋白発現プラスミドの構築に*in vitro* recombination-assisted法を利用してそのハイスループット化を図っているため、前記したような問題は生じない。今後抗体作製法に新たな技術革新が生じない限り、現行では我々の方法は網羅的抗体作製としてもっとも妥当な方法と考えられる。また我々のごとく多角的にその評価を行っている施設はなく、この点からも当プロジェクトは世界的に見てもトップレベルの水準にあると言えよう。このことは後継プロジェクトとして、「抗体を用いた転写因子複合体解析によるゲノムネットワークの理解」が文部科学省のゲノムネットワークプロジェクトに採択されたことから明らかである。

2 実用化に向けた波及効果

現時点における最も可能性のある網羅的に収集した抗体利用法は抗体アレイへの適応であろう。本事業において、当初から得られた抗体の抗体アレイへの適応のための予備的検討を開始していた（サブテーマ3を参照）が、これもほぼ実用化のレベルまで到達した。フェーズIIIにおいては個々の抗体同様、こちらも研究用標品としての展開を目指す。

残された課題と対応方針について

フェーズIIから開始したヒトサンプルでの交差反応の確認やaffinity精製に関しては、まだ全ての抗体に関して取り組めたわけではない。今後後継プロジェクトをとおしてこの問題に取り組み、より多くのものの商品化を図るとともに、生物学的に有用な実験的情報の蓄積も行なっていく。

	J S T負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合 計
	H 13	H 14	H 15	H 16	H 17	H 18	小計	H 13	H 14	H 15	H 16	H 17	H 18	小計	
人件費	1,500	16,205	27,334	37,718	36,616	15,123	134,496								134,496
設備費	54,400	61,302	39,496	64,418	12,318		231,934								231,934
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	2,052	36,905	38,980	54,986	54,839	43,439	231,201								231,201
旅費		821	1,275	1,531	1,358	1,352	6,337								6,337
その他	433	4,233	6,853	6,362	6,058	3,738	27,677								27,677
小 計	58,385	119,466	113,938	165,015	111,189	63,652	631,645								631,645

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

J S T負担による設備：自動分注システム (パッカード社：前掲)、自動分注システム、蛋白質解析装置 (島津)、蛋白質解析装置 (ナノLC/MSシステム)、画像解析システム、全自動たんぱく精製装置、抗体精製装置、免疫組織画像解析装置 (場所：国立精神神経センター) など

地域負担による設備：電気泳動装置、遠心分離装置など

※複数の研究課題に共通した経費については按分する。