

[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 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）</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>小テーマリーダー（所属、役職、氏名）かずさDNA研究所（ヒトゲノム応用研究部部長）小原 収</p> <p>研究従事者（所属、役職、氏名）かずさDNA研究所（研究員）山川 央、岡崎 規理子、小原 令子</p>
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>①研究の概要 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産生させるための抗原発現プラスミドを作製した。抗原発現プラスミド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網羅的に行った。作製された抗原発現プラスミドを大腸菌に組み込み、抗原蛋白質精製のための大量培養に供した。以降の作業はコア研究室が行った。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。抗体affinity精製用のMBP（マルトース結合蛋白質）融合蛋白質発現プラスミドの作製も、前記したごとく過程をGST同様、本サブテーマで行なった。 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トング法、ヒトサンプルに対する交差反応検出方で行なった。</p> <p>②研究の独自性・新規性 我々のプロジェクトを除き、<i>in vitro</i> recombination-assisted法を全長塩基配列決定のためのショットガン法に利用し、直接抗原蛋白質の発現に用いた試みは見当たらない。また我々は抗原発現プラスミドへの組み換えや大腸菌への形質転換をハイスループットで行うべく96サンプル同時の反応を行っている。このような取り組みはコンピュータを用いた情報管理システムとの組み合わせで（テーマ4参照）、その正確性を確実なものとして実現可能となった。このようなシステムの構築は我々の独自のアイデアであるばかりでなく、網羅的抗体作製を目指している他の研究者に対しても大変参考になる試みと思われる。一方、recombinant抗体の作製はポリクローナル抗体がモノクローナル抗体と異なり有限の産物であることを考えると、ぜひ準備しておきたい成果産物である。現在の技術で作製可能なrecombinant抗体はアフィニティーの面でポリクローナル抗体に遙かに劣っている。しかしながら今後の技術革新でその改善は十分期待できることから、recombinant抗体作製のためのRNA収集も平行して行ってきた。ポリクローナル抗体を作製するとともに、RNA収集も行ってきたことも我々のプロジェクトにおける特記事項の一つとして良いだろう。</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） フェーズI（H13-H15）-II（H16-H18）を通して最終的に2000種類全てのマウスKIAA蛋白質に対する抗体を作製することを目標に掲げた。そのため平成13年度には96サンプル同時に抗原発現プラスミドへの組み換えそして大腸菌への形質転換を行えるシステムの確立に主眼を置いた。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400形質転換体の作製を達成した。平成16年度以降は更に形質転換体作製システムを改善して年間500反応をこなし、平成18年度上期には残り200形質転換体の作製を全て終え最終的に前記目標に到達している。またaffinity精製用のMBP融合蛋白質発現プラスミドに関しても、GSTに対応する全ての形質転換体の作製を完了した。 フェーズIII（H18. 11.25事業完了日以降）：確立したヒトサンプルに対する交差反応検出方を用いて、プロジェクト中に終了しなかった抗体に関しても、随時交差反応の確認を行いその付加価値を高めていく。</p>
<p>研究の進め方及び進捗状況（目標と対比して）</p> <p>平成13年度は目標どおり、96サンプル同時の抗原発現プラスミドへの組み換え・大腸菌への形質転換システムの確立を達成した。平成14年度は前年度確立したシステムを用い、目標であった400形質転換体の作製を達成した。平成15年度以降それぞれの年度目標値を滞りなく達成した。ヒトサンプルに対する交差反応の検出は目標値であった250を達成したが、全体1/8にしか及ばない。今後は後継プロジェクトにおいて、さらに解析を進めたい。</p>
<p>主な成果</p> <p>具体的な成果内容： 特許件数：2 論文数：30 口頭発表件数：4（海外2）</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

in vitro recombination-assisted法は近年コマーシャルレベルでも販売されるようになり、様々な研究に利用されるようになってきた。またその簡便性・正確性から網羅的プロジェクトでの利用も徐々に報告されるようになってきた。たとえばMax-Planck-InstituteのCahillらは、*in vitro* recombination-assisted法を用いてライブラリーから直接His-tagの発現ベクターに組み換え、大量のHis-tag蛋白質を作製し蛋白アレイを作製している。しかしながらこの方法を利用して全長配列解析・抗体作製までを一気に行っているのは国内外を通して我々のプロジェクトのみである。更に将来的にrecombinant抗体作製までを念頭に入れたプロジェクトは類がなく、この点においても世界水準の研究を行っていると言えよう。

2 実用化に向けた波及効果

我々が本テーマで行っている網羅的組み換え反応は様々な応用が考えられる。我々はこの手法を用いてショットガンで作製したKIAA遺伝子の部分配列を抗原蛋白質の発現に利用したが、昆虫細胞の発現系などを組み合わせれば全長KIAA遺伝子配列を蛋白質発現に用いることも可能である。またこの手法で哺乳類培養細胞系での発現システムも構築することが可能であり、今後多方面への波及効果が期待できる。実際に我々はフェーズIIにおいて、これらの事項に取り組み、バキュロウイルスでの発現系は確立し、また哺乳類培養細胞系ではすでに数十種の発現系をHEK293細胞株において作製開始している。

残された課題と対応方針について

今後の課題としてはやはりrecombinant抗体作製法の確立が一番に挙げられる。このことを鑑みフェーズIIではファージ抗体の作製やDT40というニワトリB細胞由来細胞株での抗体作製にも取り組んできた。現時点でそれが最良の方法であると結論付けることは早計だが、この領域での技術革新に合わせ我々の手法を改善していくとともに、今後はいち早くこの領域におけるあたらしい技術革新を取り入れ、簡便でアフィニティーの高いrecombinant抗体の作製を目指す。これが確立されればポリクローナル抗体の欠点を克服できると共に、使用目的に合わせてポリクローナル・recombinant抗体の両者を使い分けていくことも可能となるだろう。

	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								1,467	4,823	8,848	8,998	23,838	20,925	68,899	68,899
設備費								23,436						23,436	23,436
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)								5,280	9,867	25,536	21,141	7,053	2,850	71,727	71,727
旅費															
その他															
小 計								30,183	14,690	34,384	30,139	30,891	23,775	164,062	164,062

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：なし

地域負担による設備：キャピラリーDNAシーケンサー、電気泳動装置、大型コンピューターなど

※複数の研究課題に共通した経費については按分する。