

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 小テーマ名：①種々の抗体の評価法の開発及びそれによる評価 (H16-H18)
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 小テーマリーダー (所属、役職、氏名) (財) 産業創造研究所 (生物工学研究部長) 川上 泰 研究従事者 (所属、役職、氏名) (財) 産業創造研究所 (研究員) 尾崎 照遵、(研究員) 瀧 景子
研究の概要、新規性及び目標 ①研究の概要 (1) cDNAより動物細胞内で発現させた組換え蛋白質を用いた評価系の開発、(2) RNAiを用いた評価法の開発、(3) 蛍光顕微鏡を用いた細胞内での遺伝子産物の局在を研究するための抗体評価技術開発を通して、抗体の効率的かつ信頼性の高い評価法を開発する。 ②研究の独自性・新規性 ウェスタンブロットによって抗体の特異性の評価を行った結果、多くの抗体で、免疫後の血清において予想分子量をもつバンド以外に、特異的に強いシグナルを与えるバンドが検出されることがあるが、(1) 動物細胞中でcDNAを用いて組換え蛋白質を強制発現させてウェスタンブロッティングにより検出する、(2) 動物細胞中の内在性の蛋白質の発現をRNA干渉法により特異的に阻害してウェスタンブロッティングでバンドの消失を検出する、という2つの方法により、これらのバンドの由来を明らかにできる可能性がある。また従来の免疫蛍光染色法による蛋白質局在の研究はその多くが強制発現系を用いているため、内在性の蛋白質局在の観察により生理的条件下で働いている機能が明らかになることが期待される。 ③研究の目標 (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) : 該当しない。 フェーズⅡ (H16-H18) : GATEWAYシステムを利用した効率的な発現ベクターの構築及びそれを用いた抗体の評価を行なうと共に、siRNAを用いて発現抑制の条件を決める。また免疫蛍光染色をすると共に、種々の薬剤を用いて細胞内局在を確認する。 フェーズⅢ (H18. 11.25事業完了日以降) : 得られた評価技術を用い、効率的な抗体評価を行なうと共に、有用蛋白質の新規機能を探索する。
研究の進め方及び進捗状況 (目標と対比して) (1) GATEWAYシステムによる効率的な発現ベクター構築系をつくり、40個の抗mKIAA抗体を評価した。 (2) 6種のcDNAを鋳型として作成した二本鎖RNAをDicerで処理しsiRNAを得た。これを用いて発現阻害を行なった。 (3) 100種類以上の抗mKIAA抗体を用いて免疫蛍光染色を行なった。その内の幾つかのものに関して、高浸透圧、brefeldin A、leptomycin Bを用いて局在の変化を観察した。
主な成果 (1) 具体的な成果内容 : 40個のmKIAA抗体のうち、32個が発現させたmKIAA蛋白質を認識出来ることがわかった。 (2) 試験管内で作成したsiRNAを用いて強制発現させたmKIAA蛋白質の発現を抑えることができた。 (3) 抗mKIAA抗体を用いることで内在性のmKIAA蛋白質の細胞内局在の動態を観察した。特に以下のことが明らかになり、今回作成した抗体ライブラリーが内在性の蛋白質の研究に有用であることが示された。 (a) 高浸透圧によりmKIAA0827が核内に移行することが観察された。また、(b) mKIAA0376のゴルジ体様局在は、brefeldin A処理により消失することより、ゴルジ体局在が確認された。また、(c) 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。
特許件数 : 0 論文数 : 3 口頭発表件数 : 20 (海外9)

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

- (1) 種々の効率的抗体評価法を開発したことにより抗体の特異性評価が効率化され、有用な抗体のスクリーニングが効率化されたと考えられる。
- (2) 蛋白質の細胞内局在の網羅的解析に関しては、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することがあること、更に(b)強制発現が局在に影響を及ぼす可能性があることが欠点である。これに対して、我々の抗体ライブラリーを用いた内在性蛋白質の観察は、生理的条件下での蛋白質の機能を調べるのに有用である。

2 実用化に向けた波及効果

- (1) 抗体の評価の効率化が上がり、信頼性が増すと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。
- (2) 生理的条件下での蛋白質の局在を調べることで、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。

残された課題と対応方針について

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。その為、さらに検出感度をあげる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、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。

	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										1,021	1,037	1,026	511	3,595	3,595
設備費															
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)										1,005	1,017	1,000	503	3,525	3,525
旅費															
その他															
小 計										2,026	2,054	2,026	1,014	7,120	7,120

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：動物細胞培養装置、蛋白質検出装置、蛍光顕微鏡など

※複数の研究課題に共通した経費については按分する。