

(4) 今後の展開 (総括) ～次期プロジェクトと海外共同研究～

既に現在2つのプロジェクトがこれらのJSTのこの地域結集の成果を基にして応募し採択された。一つは我々の古閑主任研究員がプロジェクトリーダーとなるゲノムネットワークプロジェクト(文部科学省)で、地域結集事業で得た知見を元にして、転写関連(DNAからRNAを作る時に必要な因子)に対する全てのライブラリーを完結する国家プロジェクトである。もう一つは、かずさDNA研究所ヒトゲノム応用研究部小原部長の地域新生コンソーシアム研究開発事業(経済産業省)「テーマ名:超微量バイオ分子間相互作用測定システムの開発」である。地域結集事業のサブテーマ3の検討課題でもあるアレイを、さらに一歩進めて、目的とする超微量蛋白質を少量・高感度にて検出していこうというものである。

これらと同時に、国際共同研究事業を推進する。具体的には、米国ウィスコンシン州のバイオテクノロジー企業であるプロメガ社と「ヒト蛋白質発現クローン」に係る研究開発を実施中であり、千葉県から支援を受けている。また、モルフォシス社(ドイツ)は、かずさDNA研究所・プロテイン・エクスプレス社とで3者ライセンス契約を締結し、平成18年9月には組み換えモノクローナル抗体を欧州から販売開始した。平成18年5月には、堂本知事がデュッセルドルフ市を訪問し、11月にデュッセルドルフ市長が千葉県を訪問して経済交流を推進した。これにより、千葉県地域結集型共同研究事業の成果を、BioEurope2006(平成18年11月、デュッセルドルフ市)において千葉県ブース内に展出した。

今後、さらなる共同研究開発を進めていき、環境に恵まれた「かずさ」の地を日本のバイオテクノロジーの中心地とすべく、各位の御助言、ご助力、あるいはアドバイスを期待しながら、地域結集プロジェクトに係わってこられた方々と一緒に尽くしていきたい。

(5) その他 (研究目標及び研究成果の補足)

○ コア研究室「かずさDNA研究所」

本事業のコア研究室であるかずさDNA研究所は平成6年に千葉県木更津市に開所し、現在約20億円の予算を持って運営しており、その大半は千葉県からの援助にて成り立っている。開所以来、いろいろ研究成果があり、世界一流のジェノミクス即ち、DNA研究に仲間入りすることができている。同研究所の専門誌DNA Researchは、日本で化学・物理・天文・その他を含めて約180前後の雑誌の格を示すインパクトファクター—論文がどれくらい注目されているかという目安—はここ数年間第1位である。他の多くは大きな学会がサポートしている学会誌であり非常にユニークな存在である。

Kazusa DNA Research Institute
かずさDNA研究所

法人設立:平成3年 3月
開 所 :平成6年10月
支持母体:千葉県
基本財産:50億円
年間予算:約20億円
主要事業:DNAの構造解析
機能等の研究
スタッフ数:162名
敷地面積:19.1ha
延床面積:16,500㎡

インパクトファクター
4.596
日本の自然科学系学術誌
中、第一位(2004年)



ホームページ(<http://www.kazusa.or.jp>)
アクセス数:1,661万件(2005年)
視察者数
年平均 9,324人
開所以来 107,195人(2006年3月末)

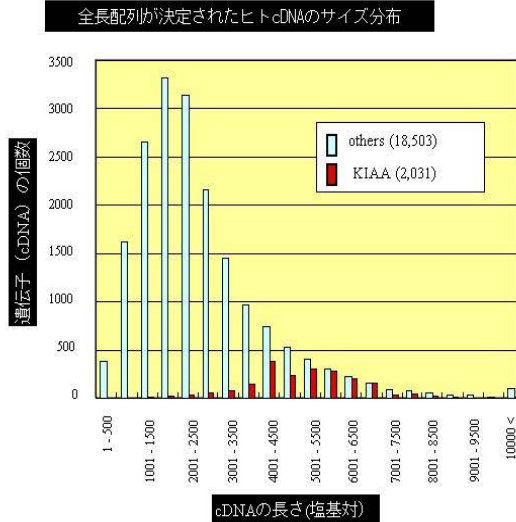
○ 本事業の基礎となったヒトcDNA(KIAA)プロジェクト

本プロジェクトの基になったのはヒトcDNA(KIAA)プロジェクトである。実際に、我々の健康に関係するヒトの遺伝子で、4000塩基以上という大きなものは、そこに非常に多くの病気の原因に関係している遺伝子が集中しており、その約50%を同研究所で見出していた。

ここにほんの一例であるが50数例ある中から、それらの遺伝子に何か欠陥があった場合に起こる様々な病気を示す。このヒトcDNA(KIAA)プロジェクトの成果を基にして、千葉県の有効な様々企業(株)プロテイン・エクスプレス、(株)カケンジェネックス、富士写真フイルム(株)、新日鉄ソリューションズ(株)、並びにそれに関係する大学等の研究機関のプロジェクトフォーメーションにてプロジェクトが発足したのである。

ヒトcDNA(KIAA)プロジェクト～かずさDNA研究所～

現在、全世界で知られている「4,000塩基以上のヒト遺伝子」の約50%が“かずさDNA研究所”で見出されコンテンツとして蓄積されている。



遺伝子疾患の病因遺伝子

KIAA番号	疾患名
KIAA0006	非特異性x連鎖精神遅滞症
KIAA0023	急性骨髄性白血病
KIAA0207	ラッセルシルバー症候群
KIAA0243	結節性硬化症
KIAA0347	睡眠相前進症候群
KIAA0382	急性骨髄性白血病
KIAA0567	視神経萎縮症
KIAA0621	若年性白血病
KIAA0730	癡性失調歩行
KIAA0837	急性骨髄性白血病
KIAA0845	筋萎縮不全性側索硬化症
KIAA0849	円柱腫症
KIAA0898	筋肝臓眼小人症
KIAA0991	急性骨髄性白血病
KIAA1073	チャーコットマリトウス症
KIAA1083	癡性対麻痺
KIAA1347	良性家族性天疱瘡
KIAA1385	モリブデン補助因子欠損症
KIAA1774	アッシュャー症候群
KIAA1788	頭頸孔分離
KIAA1845	インスリン非依存型糖尿病

○ 4つのテーマー目標と達成度ー

基本的にはコア研究室であるかずさDNA研究所の技術を使い、ヒト遺伝子2000個に対応する全てのマウスの遺伝子を取得し、それらから抗原蛋白質、そしてそれらの抗体を作製した。さらにそれらの遺伝子・抗体から様々な病気の検出、あるいは色々な薬の作製に必要なDNAアレイ、抗体アレイを作製した。良く知られているように、ヒトというのは個人であり倫理的に実験に使うことができない、例えば新薬の開発等には実験動物を使わなければならない。現在、いろいろな実験動物が使われているが、そのマウス・ラットなどの齧歯類使用例が多く特にその中心であるマウスを実験動物として選択した。

基本計画の研究開発数値目標で最も重要なものの一つはサブテーマ2「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」におけるモデル動物遺伝子産物に対する2,000抗体の作製・評価である。目標達成度としては、現在それも上回る2,340抗原、2,014抗体の作製を終了している。

さらに、サブテーマ3「DNA・抗体マイクロアレイの作製技術開発及びその作製・評価」においては、2,400個DNA搭載アレイ並びに960種の抗体(全スポット数3,888個)を搭載する抗体アレイの既に作製を完了し、それらを様々な公的機関に提供している。

また、最近のバイオサイエンスの特徴は取り扱う情報の量が非常に膨大であるので、データを編集し直して、データベースとして世界に公表していくことが大事である。世界の研究機関・製薬企業・その他がアクセスできる色々な情報・解析系である「Rouge, InGaP, InCeP」というようなデータベースをサブテーマ4「共同研究全般にわたるデータベース構築・管理」において構築した。

4つのテーマー目標と達成度ー

プロジェクト参画機関

目標Ⅰ ヒト遺伝子に対応したモデル動物(マウス)の2,000遺伝子セットの獲得・構造解析

(達成度) 2,248個マウス長鎖cDNAクローンの取得・全塩基配列決定
→ 1,961 (mKIAA) をROUGEで公開

神戸大学、DNA研究所

目標Ⅱ モデル動物遺伝子産物に対する2,000抗体の作製・評価

(達成度) ・ 2340抗原蛋白質、2014抗体の作製及び評価
・ 246抗体免疫沈降法にて48内在性蛋白質同定、12抗体精製

(株)プロテイン・エクスプレス
国立精神・神経センター
産業創造研究所、DNA研究所

目標Ⅲ (i) モデル動物における遺伝子発現検索を可能にするDNAアレイの作製 (ii) 蛋白質レベルでの遺伝子発現検索を可能にする抗体アレイの作製

(達成度) (i) 2400個DNA搭載アレイを公的研究機関に提供
(ii) 抗体アレイ全スポット数3,888 (960種mKIAA抗体+12種コントロール抗体)×4
高感度(50pg/ml)

(株)カケンジェネックス
富士写真フイルム(株)
理化学研究所、
千葉県がんセンター
千葉大学、徳島大学
東京都精神医学総合研究所
東京大学、DNA研究所

目標Ⅳ ヒト、モデル動物遺伝子情報を横断的、包括的に検索しうる創薬・医学応用化のための 情報解析系の整備及び情報発信

(達成度) ① ROUGE (マウス遺伝子)、② InGaP (遺伝子産物の発現情報)
③ InCaP (細胞内蛋白質バスウェイ/研究者通しの情報交換可能)

新日鉄ソリューションズ(株)
(株)数理システム
DNA研究所

○ 研究開発内容

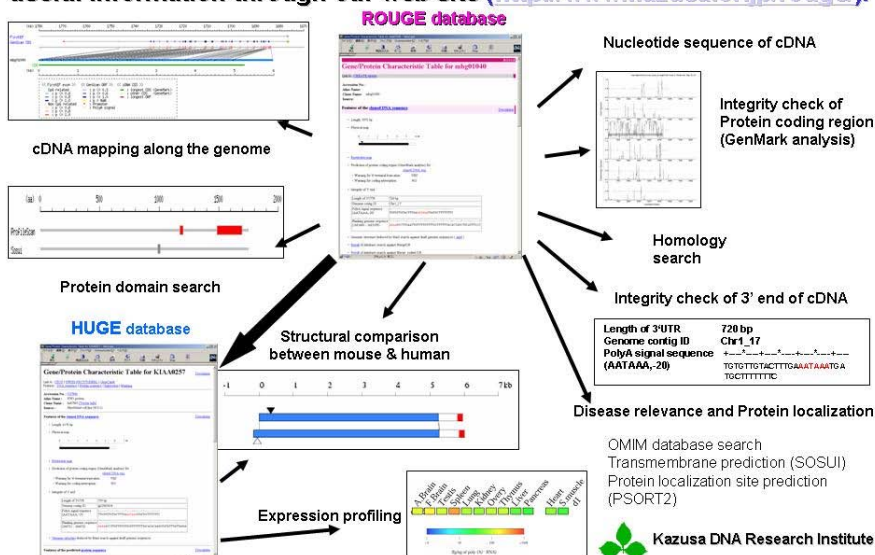
i) マウス KIAA 遺伝子の機能解析

簡単に概要を述べると、HUGE というのは元々あったヒト cDNA(KIAA) プロジェクトのデータベースである。ヒトの遺伝子のデータベースに対して ROUGEー口紅のことであるが一実はこの R というのは Rodent という齧歯類の英語から来ており、ヒトの場合は H、これ Human から来ている。ヒトのデータベースにマウスのデータベースを加えることによって、非常に奥深くかつ世界的にも高く評価されるデータベースを構築した。

ヒトの遺伝子と所謂マウスの遺伝子が進化の過程が同じー今から恐らくは数千年位前に分岐したと思われるのだが、一その時間でこれらの中で遺伝子がいくらかは変わっているが基本的には同じということが色々な事から分かっていた。研究結果もそれを示唆しており、ヒトとマウスの同じような遺伝子で中における構造が非常に似ていると判明してきた、逆にいえばこれらの事をみこして、ヒト遺伝子の情報を用いてマウスの遺伝子を使用し、非常に効率的にマウスの遺伝子(クローン)を取ることができた。したがって、次の段階にある抗原蛋白質そして対する抗体を作ることができた。このようにサイエンスというものが過去の蓄積をいかに有効に利用するかということが、その後の発展にどれくらい大事かということが分かると思う。

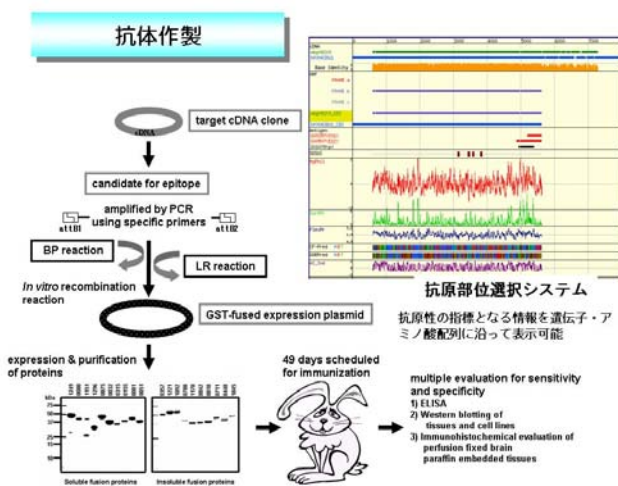
Annotation of mouse KIAA genes

We have cloned more than 2000 mKIAA cDNAs and provided several useful information through our web site (<http://www.kazusa.or.jp/rouge/>).



ii) 抗体作製と蛋白質の機能解析

遺伝子から抗原蛋白質そして抗体取得と研究開発を実施する段階でいろいろ課題・その解決があり、例えば、実際に抗原から抗体を作製する過程において、抗原蛋白の中で抗体を作るのに一番いい部分がどこかということをおこなうような計算科学的システムによりアミノ酸配列の中から選択致した。そのシステムを用いて、抗原蛋白を大腸菌でGST (グルタチオンSトランファラーゼ) タグを用いた融合蛋白として発現させた。詳細は省くが率直に言えば、非常に近代的な最新技術によりその抗原を精製して、さらにその抗体を作って、実際にそれらを従来の色々な知見と照らし合わせたのである。



Annotation of mouse KIAA proteins

We have generated more than 2000 mKIAA antibodies and provided several useful information through our web site (<http://www.kazusa.or.jp/ingap/index.html>).

Links to the **ROUGE** and **HUGE** databases
InGap database
 Functional description attributed by Gene Ontology
 Antigen information [amino acids length, corresponding localization on the mKIAA protein, exact amino acid sequence]
 Western blotting of 11 different cell lines
 Subcellular localization of ectopically expressed full length mKIAA protein
 Gene expression profiles obtained by mKIAA cDNA microarray analysis

Western blotting of adult mouse tissues: Liver, Heart, Brain, Lung, Kidney, Testis, Thymus, Spleen, Pancreas, Intestine, Stomach, Colon.

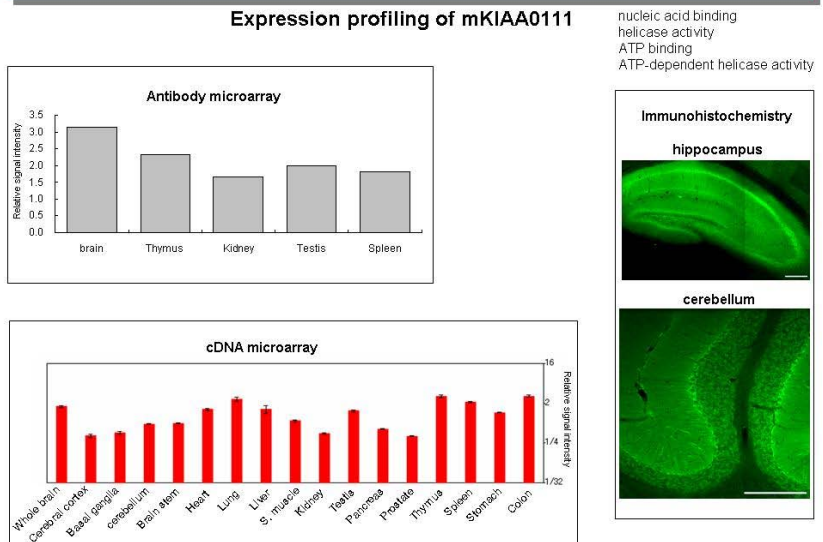
Immunohistochemical analysis of mouse brain. The visitor can also inspect the higher magnified views by clicking.

mKIAA0531

iii) 蛋白質アレイの有効性ー cDNAアレイの比較ー

現在のところ、DNAアレイ、RNAアレイなど様々なアレイがあるが、抗体アレイでは世界的に見ても信用するものがないと思われ、世界の様々なベンチャーが競争している状況にある。その原因は色々あるわけが専門的な事になるのでここでは詳細は述べない。従来は、蛋白が出来る前にDNAからの情報がまず、RNAについてそのRNAから最後に蛋白が作られる。それならば、RNA量を実際に測れば十分である。そこで、即ちDNAの発現パターンをDNAアレイで見るという方法に頼っていた。ところが、現実的にはDNAからRNAができる量と実際にはそこにおける蛋白量にギャップがあると色々な方から指摘されてきたのである。したがって、身体の色々な細胞の中の状態を調べて遺伝子がどれくらい発現しているかーこれは病気になった時とか様々な条件下で変動するがーそれをどのように正確にしかも大量にとらえるかということが現在の課題なのである。したがって、RNAはあくまでも中間体であって、最終産物である蛋白の動態を調べなければ正確な値が得られない、そこに蛋白アレイの重要性がある。ここにこのようなパターンとこのようなパターンを較べると、大まかでは一致するが、現実的に様々な discrepancy (矛盾) があることが分かる。

Validation of antibody microarray system Correspondence with cDNA microarray



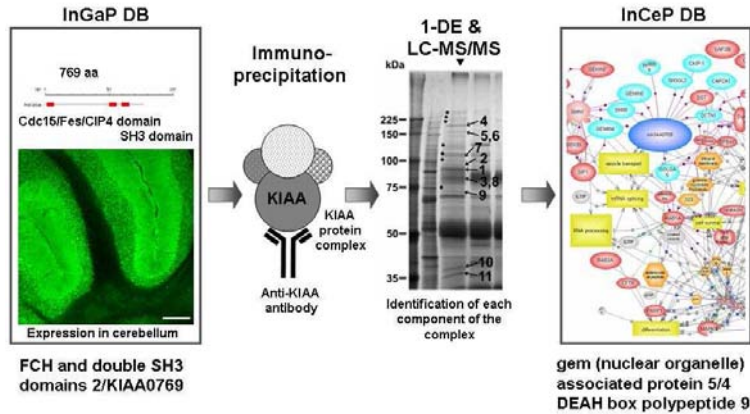
iv) 内在性蛋白質による相互作用の確認

もう一つは、我々の研究の主眼はこのような抗体を作ることにより、細胞の中にどのような蛋白がどこの位置にあるかということをおこなうのである。例えば、ヒトの脳の中の KIAA0769 蛋白の分布を示している。同時に、我々の体内の蛋白質ー身体の中には恐らくは遺伝子の数よりはるかに多い恐らく数万種に及ぶ蛋白質

があると想定され、しかも、それらは互いに相互作用している。即ち、複数の蛋白質同士がくっついたり、離れたたりしている、あるいはくっつき放しにしている。実際に、どの蛋白質がどのような蛋白質とどう相互作用しているかと言うことが重要なであり、それも我々の抗体の技術を使ってその一部がここに解明された。例えば、この蛋白質はこういう蛋白質と色んな形で相互作用して、これはこれとは相互作用しているけれども、これとは直接、相互作用していない、そういうことが色々分かってきた。

内在性蛋白質による相互作用の確認

抗体を用いた免疫沈降法で内在性蛋白質での蛋白質-蛋白質相互作用を同定

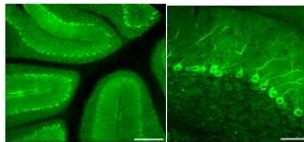


○ 研究成果 (まとめ)

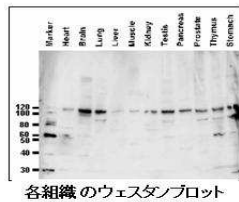
下の図には、遺伝子解析・ウエスタンブロット法等の蛋白解析・データベースを総括し、例えばその蛋白質がどのようにお互いに相互作用しているか、今までに合った方法と新しい我々が開発した方法とどのように違いがあるのかなどが総括されている。mKIAA 抗原蛋白質が 2,340 個、mKIAA 抗体が 2,014 個とプロジェクト数値目標も目的以上にここにできあがったと判断している。

ところで、本事業のコア研究室であるかずさDNA研究所は今まで基礎研究を実施して約12年の歴史がある。数年前に至り、このような基礎的知見を何からの形で、将来のもっと実用化方面に応用に行かなければならないと研究統括(かずさDNA研究所長)はそういうような思いを強くした経緯がある。逆に言えば、現在のバイオテクノロジー・バイオサイエンスの動向として、我々自身がすぐ応用に行ってもそう簡単には出来るわけではない。そういうことは大体の目に付くようなアイデアはすべてもう取られている。そこで、一番必要な事は基礎的な研究をやると同時に、誰もがそれまでに見つけなかった知的な情報を如何に早く実用化に繋げるかと、そういうような創造的プロセスなしには、応用的あるいは実用的な研究が出来ないと思われる。最後に総合的所感を述べさせていただいたが、5年間のプロジェクト目標は達成できたのではないかと判断している。

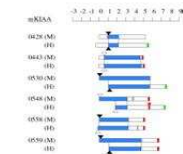
研究成果 (まとめ)



マウス脳の免疫組織染色



各組織のウエスタンブロット



マウスとヒトの遺伝子構造比較

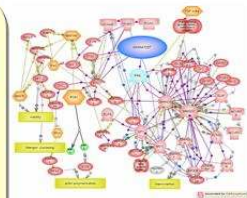
HUGE Rouge
InGaP InCeP
公開データベース



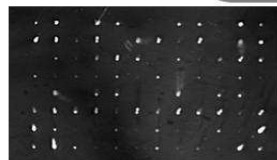
mKIAA 取得・配列決定: 2,248個
ROUGE公開: 1,961個



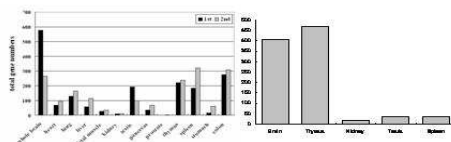
mKIAA抗原蛋白質: 2340個
mKIAA抗体: 2014個
InGaP公開: 276個



細胞内パスウェイDatabase



抗体アレイスポット (化学発光法)



cDNAと蛋白質の発現量比較 (アレイ法)