

<お願い>
(独)農業生物資源研究所の省略形としては
「生物研」を使用願います。

平成25年12月11日
独立行政法人農業生物資源研究所

細胞内タンパク質の特定領域の働きを詳細に評価できる 新しい技術の開発に成功 —細胞内タンパク質の機能解析の加速化に貢献—

ポイント

- ・細胞内には酵素タンパク質や遺伝子の働きを調節するタンパク質などがあり、これらタンパク質は、それぞれ独自の働きをするために特異的な構造を持つ複数の領域から構成されています。
- ・これまでタンパク質のもととなる遺伝子を欠損させることでタンパク質の働きが調べられてきましたが、細胞内のタンパク質の特定の領域の働きを個別に調べることはできませんでした。
- ・今回、抗体が特定のタンパク質の領域に対して特異的な結合活性を持つという性質を利用し、抗体のうち、特定のタンパク質に結合する部分のみを細胞内に作り出すことで、標的となる細胞内タンパク質の特定の領域の働きを阻害させることに成功しました。
- ・本成果は、様々な細胞内タンパク質の働きを明らかにするのに役立つと期待されます。

概要

1. 細胞内には酵素タンパク質や遺伝子の働きを調節するタンパク質などがあり、これらタンパク質はそれぞれ独自の働きをするために特異的な構造を持つ複数の領域から構成されています。これまで広く利用されてきた遺伝子欠損（ノックアウト）法では、特定のタンパク質全体としての機能は評価できましたが、タンパク質を構成している個々の領域の役割を個別に評価することはできませんでした。
2. 抗体が特定のタンパク質の領域に対して特異的な結合活性を持つという性質を利用し、抗体の特定タンパク質への結合に関わる部分のみを細胞内で作らせて、タンパク質の特定の領域に結合させ、その働きを阻害させることができれば、様々な細胞内タンパク質の働きを非常に効率よく調べることが可能となります。
3. 独立行政法人農業生物資源研究所（生物研）は、**T細胞**¹⁾の免疫のシグナル伝達系で重要な役割を果たしている**WASタンパク質**²⁾の特定の領域を標的とした抗体に着目し、この抗体の**WASタンパク質**への結合に関わる部分のみからなる「**単一ドメイン抗体**³⁾」を細胞内で発現させた遺伝子組換えマウスを作ることによって成功しました。
4. 単一ドメイン抗体は、T細胞内で**WASタンパク質**の特定の領域に強く結合し、その働きを阻害することで、T細胞の免疫応答を抑制しました。このことから、単一ドメイン抗体を用いることで細胞内タンパク質の特定の領域の働きを特異的に阻害できることが証明されました。
5. 本研究により、単一ドメイン抗体は、タンパク質の特定領域の働きを個別に評価

できるこれまでにない新しい技術として、様々なタンパク質の機能解析に大きく貢献できると期待されます。

6. この成果は、10月21日に英国科学雑誌 **Scientific Reports** に発表されました。

予算：運営交付金

特許：特許第4938263号

問い合わせ先など

研究代表者：	(独)農業生物資源研究所 理事長	廣近 洋彦
研究推進責任者：	(独)農業生物資源研究所 動物科学研究領域長	栗田 崇
	：(独)農業生物資源研究所 動物科学研究領域 動物生体防御研究ユニット長	木谷 裕
研究担当者：	(独)農業生物資源研究所 動物科学研究領域 動物生体防御研究ユニット 主任研究員	佐藤 充
	電話：029-838-6041 E-mail :mitsuru.sato@affrc.go.jp	
広報担当者：	(独)農業生物資源研究所 広報室長	井濃内 順
	電話：029-838-8496	

本資料は文部科学記者会、科学記者会、筑波研究学園都市記者会、農政クラブ、農林記者会、農業技術クラブに配付しています。

開発の社会的背景

動物の生体では、ウイルスや細菌などの異物が侵入してくると、これらを排除するために免疫反応が起こります。抗体は生体の免疫応答により産生され、侵入物に対して特異的に結合するタンパク質です。抗体はその優れた分子認識機構により、基礎研究から医療に至る幅広い範囲での応用が期待されています。抗体は通常、抗体産生細胞から細胞外へ分泌されるタンパク質ですが、近年、低分子化した抗体を細胞内で発現させて特定の細胞内タンパク質に結合させることにより、タンパク質の機能阻害を誘導する「細胞内発現抗体（イントラボディ）技術⁴⁾」が開発され、新しいタンパク質機能の解析手法として注目されています。

ヒトおよび多くの脊椎動物の抗体は、それぞれ相同な2本の重鎖と2本の軽鎖が分子内結合により組み合わさり、Y字型の構造をとっています。この中の重鎖と軽鎖の可変部（V_HとV_L）が対となり、抗原を認識して結合します。（図1）。近年、組換え抗体技術⁵⁾を用いて、V_HとV_Lだけをつないで完全長抗体の約1/5に低分子化した「一本鎖抗体（single-chain variable fragment: scFv）⁶⁾」がデザインされ、このscFvを細胞内で発現させて特定のタンパク質の機能阻害を誘導する細胞内発現抗体（イントラボディ）技術が開発されました。しかしながら、細胞内で発現させたscFvが抗原結合に必要な分子内構造をとることが出来ないなど、イントラボディとして機能しないケースがしばしばみられ、イントラボディのデザインについてはまだ改善すべき点が残されていました。

研究の経緯

ラクダ、リャマ、アルパカなどのラクダ科の動物の抗体の中から、軽鎖を持たずに重鎖単一で抗原に結合するものが発見されました。同様にサメからも単一鎖で抗原に結合できるものが見つかっています。そこで私たちの研究グループでは、イントラボディの新しい形状として、V_HあるいはV_L単一の抗原結合部位からなる「単一ドメイン抗体」が利用できるのではないかと考え、その開発に取り組みました。

研究の内容

1. 単一ドメイン抗体の標的タンパク質として、T細胞でのインターロイキン2（IL-2）遺伝子の発現に関わる『WASP』というタンパク質に着目しました。
2. 以下の手順で、『WASP』に結合する単一ドメイン抗体を発現する遺伝子組換えマウス」を作出しました（図1）。
 - 1) WASPのN末端領域に特異的な抗体を産生する細胞から、抗体の重鎖および軽鎖の可変部の遺伝子を単離。
 - 2) V_HまたはV_Lの単一ドメイン抗体として発現するDNAコンストラクトを作成。
 - 3) DNAコンストラクトをマウス受精卵に注入し、細胞内でこれらの単一ドメイン抗体を発現する遺伝子組換えマウスを作出。
3. 作出した遺伝子組換えマウスのT細胞では、単一ドメイン抗体が細胞内で発現し、WASPに強く結合していました。その結果、WASPの機能が阻害され、通常の免疫応答では起こる「IL-2遺伝子の発現」が抑制されました（図2）。
4. これらの結果から、抗体の重鎖または軽鎖の可変部のみからなる単一ドメイン抗体でも、イントラボディとして標的となる細胞内タンパク質に特異的に結合し、このタンパク質の働きを阻害できることが明らかになりました。

今後の期待

抗体の優れた特異性を活用したイントラボディ技術は、既存の遺伝子ノックアウト法や RNA 干渉法とは異なり、標的タンパク質の特定の部位（ドメイン）をピンポイントに狙い撃ちし、機能阻害を誘導することが出来る手法です。このことから、イントラボディ技術は個々のタンパク質のドメイン機能解析に非常に有効であると考えられます。さらに様々な疾患の研究や医薬品開発の分野において大きく貢献できると考えられます。今後、タンパク質構造解析技術と合わせて単一ドメイン抗体の標的分子への作用を模倣した化合物等の薬剤をデザインすることにより、副作用の少ない動物やヒトの医薬品を開発できると期待されます。また、単一ドメイン抗体を標的となる細胞や組織へ導入して、様々な細胞応答を制御できるような技術開発が期待されます。

今回開発した「単一ドメイン抗体」は従来のイントラボディである一本鎖抗体より低分子で構造も単純なことから、より使いやすいイントラボディとして、多くの利用が期待されます。

発表論文

Sato M, Sawahata R, Sakuma C, Takenouchi T, Kitani H. **Single domain intrabodies against WASP inhibit TCR-induced immune responses in transgenic mice T cells.** Scientific Reports DOI: 10.1038/srep03003.

用語の解説

1) T 細胞

リンパ球の1種。胸腺(thymus)由来の細胞なので、頭文字をとって T 細胞と名付けられました。T 細胞は免疫応答の司令塔として異物を認識するとマクロファージや好中球などの他の免疫系細胞に指令を出します。

2) WAS タンパク質

先天性免疫不全症 Wiskott-Aldrich syndrome (WAS)の原因遺伝子がコードするタンパク質が WAS タンパク質(WASP)です。WASP は免疫系細胞特異的に発現し、細胞内の複数の分子と相互作用し、免疫応答に関わるシグナル伝達に重要な役割を果たしています。

3) 単一ドメイン抗体 (single domain)

抗体の抗原結合部位である重鎖(heavy chain)あるいは軽鎖(light chain)の可変部(variable region)のみの最小単位(領域)タンパク質からなる抗体分子。分子量は約15kDa で、完全長抗体の10分の1の大きさです。

4) 細胞内発現抗体 (イントラボディ)

従来抗体は細胞外の標的または細胞表面分子に対して作用するものと考えられていたが、組換え抗体技術により低分子化した抗体を細胞内で発現させて、特定の細胞内タンパク質の機能阻害を誘導する細胞内発現抗体技術が開発された。

5) 組換え抗体技術

遺伝子工学的手法を用いて、高い特異性と親和性をあわせもつ抗体分子種を人工的に創造する技術。

6) 一本鎖抗体(single-chain variable fragment: scFv)

抗体のもつ特異性・結合活性に重要な重鎖と軽鎖の可変部(V_H と V_L)を1本につないだ形状の抗体分子。分子量は約 30kDa で、完全長抗体の 5 分の 1 の大きさです。

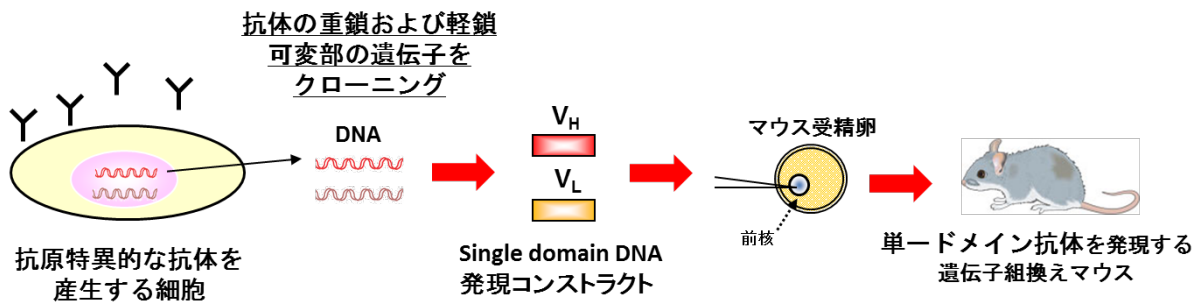
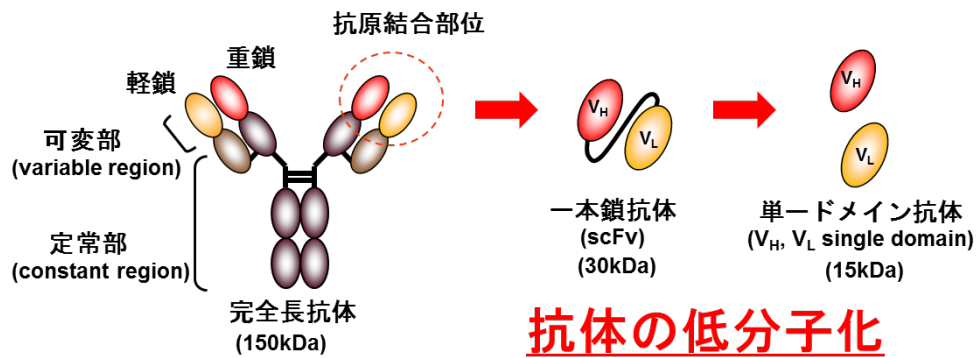


図1. 低分子化した単一ドメイン抗体をイントラボディとして発現する遺伝子組換えマウスの作出

抗体はそれぞれ相同な2本の重鎖と2本の軽鎖が分子内結合により組み合わさり、Y字型の構造をとっています。この中の重鎖と軽鎖の可変部(V_H と V_L)が対となり、抗原を認識して結合します。この抗原認識に必要な V_H と V_L をつないで完全長抗体の約1/5に低分子化したものを一本鎖抗体(single-chain variable fragment: scFv)と呼びます。さらに V_H 単独あるいは V_L 単独の最小な抗体分子を単一ドメイン抗体(single domain)と呼びます。単一ドメイン抗体は完全長抗体の約1/10の大きさとなります。

これらの低分子化抗体は、細胞内で発現させて特定のタンパク質を標的としたイントラボディとしての利用が可能となっています。なかでも単一ドメイン抗体はサイズをより小さくすることにより、細胞内の様々な標的タンパク質へアクセスできるように改良されています。

本研究では WAS タンパク質(WASP)のN末端領域に特異的な抗体を産生する細胞から抗体の重鎖および軽鎖の可変部(V_H , V_L)の遺伝子を単離しました。それぞれの単一ドメイン抗体を発現するDNAコンストラクトを構築し、マウス受精卵の前核に注入して、細胞内でこれらの単一ドメイン抗体を発現する遺伝子組換えマウスを作出しました。

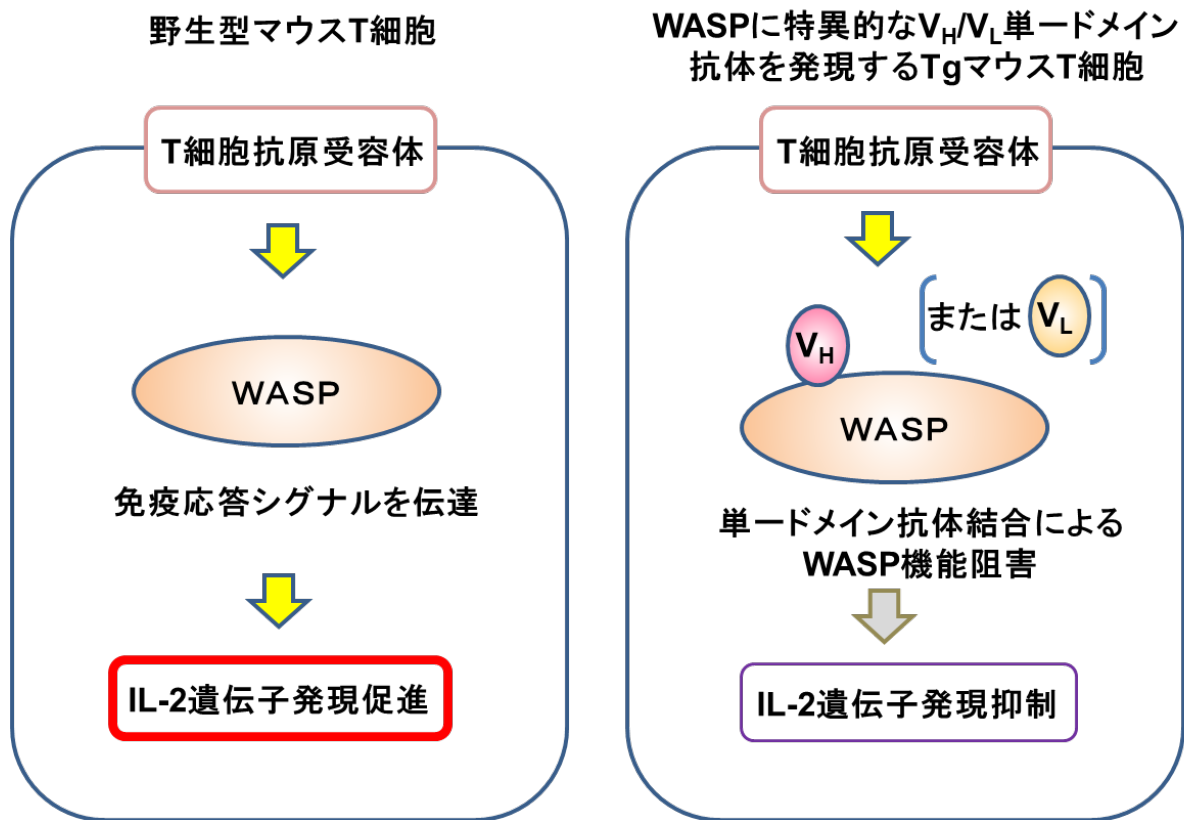


図2. 単一ドメイン抗体発現による WAS タンパク質(WASP)の機能阻害

WASP の N 末端領域に特異的な V_Hあるいは V_L単一ドメイン抗体を発現する遺伝子組換えマウスの T 細胞では、WASP の特定部位に単一ドメイン抗体が結合して、WASP の機能を阻害し、T 細胞抗原受容体刺激に伴うサイトカイン・インターロイキン(IL)-2 の産生を抑制しました。このことから、V_Hおよび V_L単一ドメイン抗体が最小のイントラボディとして機能し、WASP が関与する T 細胞シグナル伝達経路を特異的に阻害することに成功しました。