

「細胞内でネットワークを構成しているタンパク質の相互作用を 試験管内で解析するための新しいツールの開発」

(H11年度～H15年度)

平成13年度予算額：2.0億円

研究代表者：柳川弘志（慶應義塾大学） 研究体制：慶應義塾大学（中核機関）他4機関

研究の概要・目標

1 何を目指しているのか

タンパク質-タンパク質相互作用やタンパク質-DNA相互作用を指標にして、遺伝子ネットワークを大規模、迅速に解析するための新しい基盤技術を開発すること。

第Ⅰ期の目標：

●各技術（下記2項）の最適化及び簡便化

●各技術（下記2項）の遺伝子ネットワーク解析における有用性の検証

第Ⅱ期の目標：

●各技術（下記2項）を組み合わせた高効率遺伝子ネットワーク解析技術の確立

2 何を研究しているのか

- ・タンパク質に情報タグ（mRNA, DNA）をつける技術とそれを用いた相互作用スクリーニング法の開発。
- ・タンパク質に蛍光ラベルをつける技術の開発。
- ・無細胞系でタンパク質を大量に合成する技術の開発。
- ・蛍光を用いて相互作用を高感度、高効率で検出する技術の開発。

3 何が新しいのか

- ・タンパク質に情報タグや蛍光ラベルをつける独自の技術、無細胞系でタンパク質を大量合成する独自技術及び蛍光によって相互作用を検出するための独自技術の組み合わせによって開発される、遺伝子ネットワークの大規模、迅速な解析のためのツールが新しい。

諸外国等の現状

1 現状及び我が国の水準

- ・ゲノムの機能解明の分野では、全体として我が国は欧米に大きな遅れをとっている。
- ・ただし、今後ますます発生するであろう大量のゲノム情報を系統的かつ迅速に解析する技術は、世界的に見てもまだ不十分。
- ・個別の解析技術を見れば、我が国も独自の優れた技術を有する。

研究進展・成果がもたらす利点

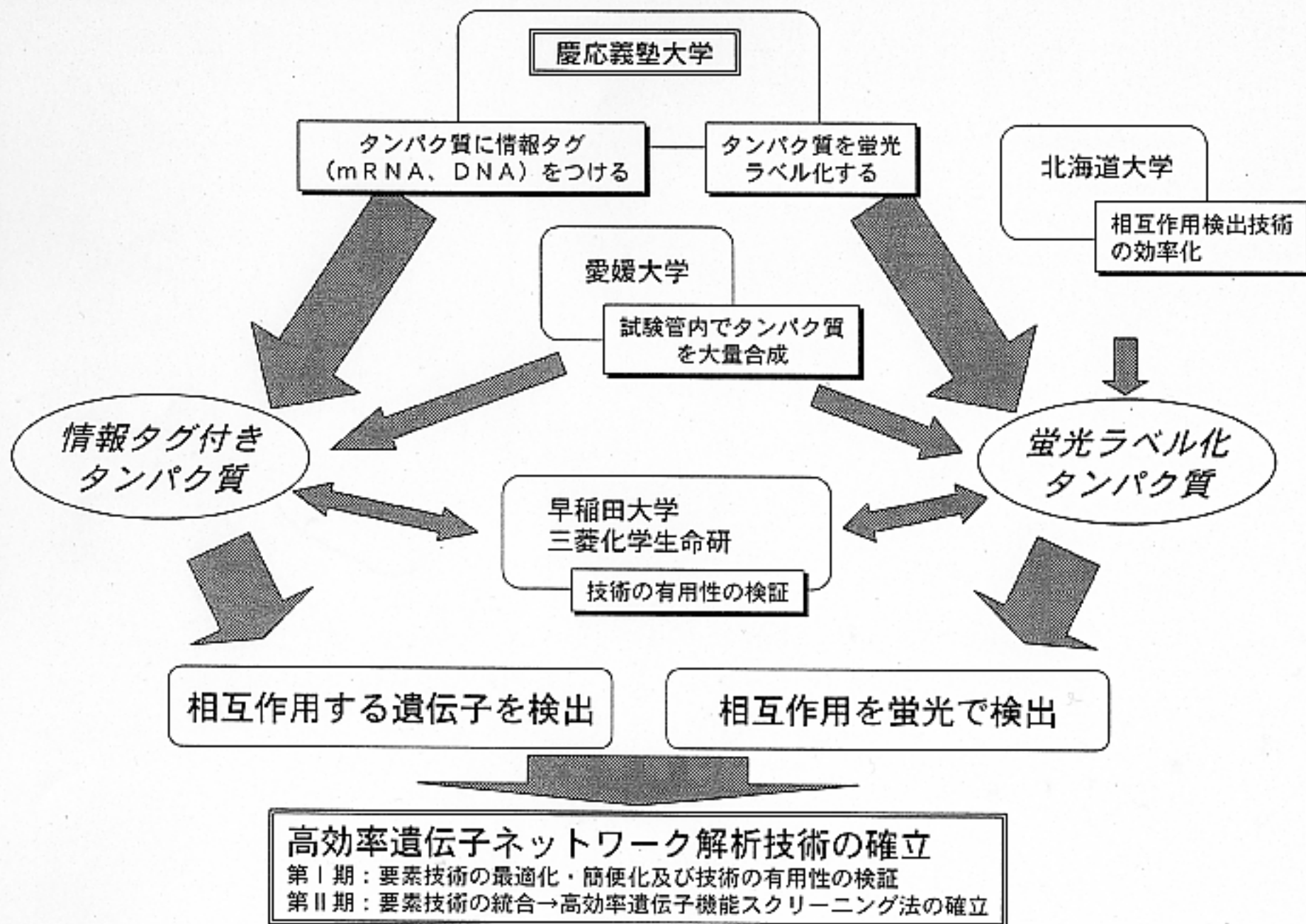
1 世界の水準との関係

本課題で開発されるツールは、我が国が持つ独自の優れた技術を組み合わせたものであり、これまで世界的に例がないもの。このツールは、ゲノムの機能解明の分野において欧米にキャッチアップするために役立つ有力な基盤となり得る。

2 波及効果

タンパク質に情報タグをつける技術は、新しい機能をもつタンパク質を創出する技術にも役立つ。
タンパク質に蛍光ラベルをつける技術については内分泌攪乱物質とタンパク質との相互作用を解析するためにも利用できる可能性がある等、本課題で開発されるツールは、基礎研究はもとよりバイオテクノロジーの広い分野で利用される可能性がある。

細胞内でネットワークを構成しているタンパク質の相互作用を試験管内で解析するための新しいツールの開発



第 I 期研究における所用経費

「細胞内でネットワークを構成しているタンパク質の相互作用を試験管内で解析するための新しいツールの開発」

(単位:千円)

研究項目	担当機関等	研究担当者	所用経費
1. In vitro virusを用いたゲノム機能解析法の開発			246,982
(1) In vitro virusを用いた機能未知遺伝子のスクリーニングと検出システムの開発	慶応大学理工学部	柳川弘志	164,839
(2) In vitro virusを用いたマウスポリコーム遺伝子群の機能解析	早稲田大学教育学部	東中川徹	58,491
(3) In vitro virusを用いたjumonji遺伝子の分子カスケード解析	(株)三菱化学生命科学研究所	竹内 陸	23,652
(4) タンパク質-ゲノムDNA相互作用解析手法の開発	(株)三菱化学生命科学研究所	板谷光泰	
2. タンパク質のC末端ラベル化手法と蛍光相互相関分光法やマイクロアレイ法を利用した高感度分子間相互作用検出システムの開発			288,148
(1) タンパク質の高効率C末端ラベル化手法と分子間相互作用検出システムの開発	慶応大学理工学部	柳川弘志	199,793
(2) 高効率コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システムの開発	愛媛大学工学部	遠藤弥重太	40,612
(3) 蛍光相関分光法を利用した高感度分子間相互作用検出装置の開発	北海道大学電子科学研究所	金城政孝	47,743
3. 研究管理	慶応大学理工学部		7,299
合 計			542,429

【研究成果の概要】

(1) *In vitro* virus を用いた機能未知遺伝子のスクリーニングと検出システムの開発

ウイルス型対応付け分子を利用した *in vitro* スクリーニング系として "*in vitro* virus" を提案し、その構築に世界にさきがけて成功した (FEBS Lett., 414, 405-408, 1997; Nucleic Acids Res., 28, 1176-1182, 2000)。この *in vitro* virus を用いて、プロテオーム探索として、所望のライブラリーから目的タンパク質を中心としたタンパク質間相互作用ネットワークおよびタンパク質-核酸相互作用ネットワークを解析するための基本的ツールの確立を目標として、*in vitro* virus を用いた機能既知遺伝子 (c-Fos/c-Jun) のスクリーニングと RT-PCR 検出システムの開発を行った。まず、実用化に向けて簡便な *in vitro* virus ゲノム構築のための mRNA の 3' 末端に付けるスペーサーについて検討した。ポリエチレングリコール (分子量 2000 と 3000) の 5' 末端にデオキシヌクレオチドの dC を 2 個連結させ、3' 末端に dC を 2 個とさらにビューロマイシンを 1 個連結させたスペーサーを化学合成した。この化学合成スペーサーを mRNA と T4 RNA リガーゼを用いて連結させると、90% 以上の効率で mRNA とスペーサーが連結し、*in vitro* virus ゲノムが構築できることを確認した。また、対応付け分子 (*in vitro* virus) の形成効率を向上するために、スペーサーと mRNA テンプレートを改善し、小麦胚芽の系ではじめて安定な対応付け分子の形成が確認された。対応付け分子は、小麦胚芽の無細胞翻訳系で 70%、ウサギ網状赤血球の無細胞翻訳系で 40% の形成効率を達成できた。このことによって、対応付け分子形成後に必要であった精製工程を一切省くことが出来るようになり、従来に比べて、小麦胚芽の系で 100 倍、ウサギの網状赤血球で 10 倍の大規模な対応付け分子のライブラリーを実現できた。また、スペーサーに蛍光物質を導入することで、放射性同位体を用いることなく簡単に対応付け分子を検出できるようになったことが、以上の成果を出す上で大きく貢献した。

さらに、スクリーニング系として、タンパク質の翻訳と相互作用をカップリングさせた *in vitro* virus の共翻訳法を開発し、小麦胚芽およびウサギ網状赤血球の系で TAP 法に基づく二段スクリーニング法とその後の RT-PCR で 100-10000 倍に目的の遺伝子が濃縮されることが確認できた。また、ベイト (餌) が DNA あるいは *in vitro* virus ピリオンである一段スクリーニング法の初期検討も行った。さらに、マウス Testis (睪丸) から抽出した mRNA を用いて、*in vitro* virus 法のためのランダムプライミング cDNA ライブラリーを構築した。以上のスクリーニングシステムの成果は、スペーサーや mRNA テンプレートの改良により、*in vitro* virus の形成効率が向上したことによる。ライブラリーは、これまでの 10-100 倍規模となり、二段スクリーニングが可能となった。同様に、*in vitro* virus の形成効率が向上したことで、全タンパク質生産量におけるフリーのタンパク量が減り、共翻訳法において、確実にベイトと *in vitro* virus が相互作用できる系が構築できた。また現在、*in vitro* virus 法の応用として、サイクリン D1 遺伝子の結合領域に相互作用することが明らかとなっている jumonji タンパク質 (JMJ) をプロトタイプとして、核酸-タンパク質間相互作用スクリーニング法である DNA-Fusion (DF) 法によるスクリーニングの確立を目指し、マウス testis ランダムプライミング cDNA ライブラリーから核酸および jumonji 蛋白質と相互作用のある遺伝子群を濃縮・解析しているところである。

以上により、ライゲーション工程の簡略化、スクリーニング前の *in vitro* virus の精製工程の簡略化、また、*in vitro* virus の共翻訳法により、ベイトの細胞での大量合成精製

工程の簡略化などを達成し、第 II 期のハイスループット化に適した *in vitro* virus 法によるタンパク質間相互作用の解析システムの基盤を確立できた。

(II) STABLE 法を用いた機能未知遺伝子のスクリーニングと検出システムの開発

In vitro virus 法を補完するもう 1 つの対応づけ分子構築法として、STABLE 法を開発した。STABLE 法は STreptAvidin-Biotin Linkage in Emulsion の略称であり、無細胞タンパク質合成系をオイルの中に分散させたエマルジョンの中で、ビオチンとストレプトアビジン (STA) との結合を介して cDNA とタンパク質を連結させる。STABLE 法の遺伝子型は mRNA ではなく DNA なので RNase に対して安定であり、また cDNA ライブラリーの終止コドンを除く必要がない等の利点がある。この方法の有効性を証明するために、STA の後ろにランダム配列を付加した対応づけ分子のライブラリーを構築し、ニッケル樹脂を用いたスクリーニングによってポリヒスチジン配列をコードする DNA を選択的に回収することに成功した (FEBS Lett., 457, 227-230 (1999))。

上記のランダムペプチドを用いたモデル実験では、エマルジョンとして Tawfik らが既に報告していた、大腸菌 S30 無細胞タンパク質合成系をミネラルオイルと界面活性剤の中に分散させたものを用いたが、この系では、DNA が分解されやすく、対応づけ分子の形成効率も約 1% と低かったため、必ずしも大きなタンパク質をコードする cDNA ライブラリーのスクリーニングには適していなかった。そこで、真核生物由来の無細胞タンパク質合成系を用いて、新たにエマルジョンの調製条件から詳しい条件検討を行なった。ウサギ網状赤血球および小麦胚芽由来の無細胞タンパク質合成系をさまざまな種類の界面活性剤を含むミネラルオイル中に加え、さまざまな回転数で攪拌してエマルジョンを調製し、レーザー光散乱粒度分布計によりミセルの粒径を測定した結果、どちらの系においても cDNA ライブラリー (10^6) をスクリーニングするのに十分な条件が得られた。また、エマルジョンの中で合成され、エマルジョンから回収されるタンパク質の活性が最も高くなる最適な条件について、ルシフェラーゼ活性を指標として検討を行ない、加える界面活性剤の種類や攪拌する際の回転数によりルシフェラーゼ活性が大きく影響を受けることが分かった。さらに、蛍光色素でラベルした cDNA とタンパク質とが結合した対応づけ分子の形成効率を電気泳動後、蛍光イメージアナライザーを用いて検出・定量した結果、5? 90% とコードするタンパク質により異なるものの、大腸菌 S30 無細胞合成系の場合 (1%) よりも高い値が得られた。

相互作用することが知られているモデルタンパク質として *cdc 2/cyclin B* を用いて、STABLE 法を用いたタンパク質相互作用のスクリーニングが原理的に可能であることを証明した。まず、ストレプトアビジン (STA) と *cdc 2* との融合遺伝子 STA-*cdc 2* を構築し、ウサギ網状赤血球由来タンパク質合成系で転写・翻訳させ対応づけ分子を形成させた。一方、*cyclin B* をベイトタンパク質として樹脂に固定化するため、プロテイン A の ZZ ドメインおよびカルモジュリン結合ペプチド (CBP) との融合タンパク質として発現させた。ベイトと対応づけ分子との複合体を、まず IgG ビーズで回収し、TEV プロテアーゼで ZZ ドメインを切断することにより溶出し、次にカルモジュリンビーズに吸着させ、EGTA で溶出するという 2 段階のアフィニティー精製により、*cyclin B* と特異的に結合する STA-*cdc 2* 対応づけ分子が選択的に回収されることを PCR により確認できた。エマルジョンを用いた系

でも同様の実験により cdc 2/cyclin B の相互作用を検出することができた。また、*in vitro* virus 法と同様に STABLE 法でも STA-cdc2 と cyclin B の共翻訳法が有効であることが示された。

さらに、ストレプトアビジンが連結された cDNA ライブラリーを構築するために、T7 プロモーターと Kozak 配列の下流に STA 遺伝子とリンカー配列をもつ DNA 断片と、同じリンカー配列を含む市販の cDNA ライブラリーとの間でオーバーラップ PCR を行ない、STA-cDNA ライブラリーを簡便に構築する方法を確立した。得られたライブラリーを転写・翻訳し、対応づけ分子のライブラリーが構築されることを確認した。現在、cyclin B をベイトとして cDNA ライブラリーのスクリーニングを行なっている。

研究成果公表等の状況

【研究発表件数】

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	0 件	8 件	5 件	13 件
国外	7 件	0 件	2 件	9 件
合計	7 件	8 件	7 件	22 件

注) 件数は既発表文及び投稿中のものを合計した数を記入

【主要雑誌への研究成果発表】

Journal	Impact	サブテーマ	サブテーマ	サブテーマ	サブテーマ	サブテーマ	サブテーマ	サブテーマ	合計
	Factor	1-(1)	1-(2)	1-(3)	1-(4)	2-(1)	2-(2)	2-(3)	
Cell	32.440							32.440	32.440
Nature	25.814		25.814						25.814
EMBO J.	13.999						13.999		13.999
Nat. Biotechnol.	11.542	11.542				11.542			23.084
Proc. Natl. Acad.	10.789						10.789		10.789
Sci. USA									
Blood	8.977			8.977					8.977
J. Neurosci.	8.502		8.502	8.502					17.004
J. Biol. Chem.	7.368						14.736		14.736
Molecular Endocrinology	6.251			12.502					12.502
Nucleic Acids Res.	5.396	10.792					5.396		16.188
J. Mol. Biol.	5.388	5.388							5.388
Mech. Dev.	4.154			4.154					4.154
J. Bacteriol.	3.506				3.506				3.506
FEBS Lett.	3.440	6.880					10.320		17.200
Genomics	3.425			3.425					3.425
Exp. Hematol.	3.261			3.261					3.261
Biochem. Biophys. Res. Commun.	3.055			3.055				6.110	9.165
主要雑誌小計		34.602	34.316	43.876	3.506	27.258	39.524	38.550	221.632
発表論文合計		36.718	34.316	43.876	5.622	27.258	45.872	47.938	241.600

サブテーマ 1-(1) (慶應義塾大学・柳川弘志) ; 1-(2) (早稲田大学・東中川徹) ; 1-(3) (三菱化学生命科学研究所・竹内 隆) ; 1-(4) (三菱化学生命科学研究所・板谷光泰) ; 2-(1) (慶應義塾大学・柳川弘志) ; 2-(2) (愛媛大学・遠藤弥重太) ; 2-(3) (北海道大学・金城政学)