

「医療に向けた自己組織化等の分子配列制御による機能性材料・システムの創製」
平成14年度採択研究代表者

林崎 良英

(理化学研究所 生体分子機能研究室 主任研究員)

「ゲノムレベルの生体分子相互作用探索と医療に向けたナノレゴ開発」

1. 研究実施の概要

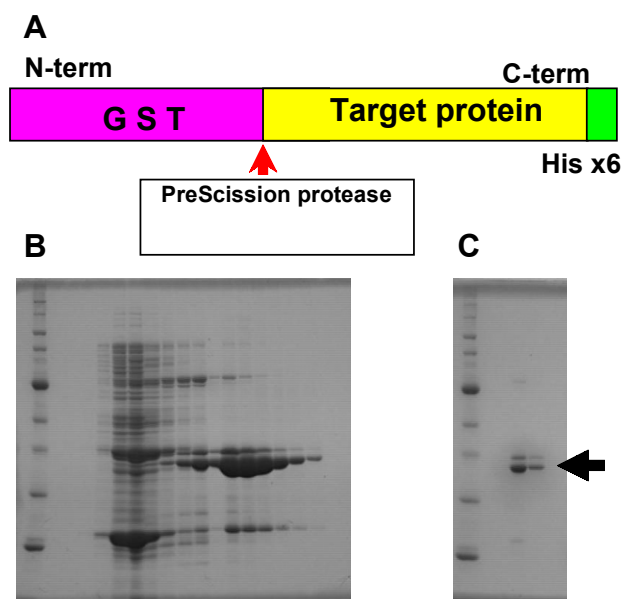
当研究は大規模スクリーニングにより見出される相互作用するタンパク質分子対(ナノレゴ素子)に着目し、相互作用の諸性質をマクロレベル、さらには1分子レベルで解析するとともに、解析データを基に人工的にデザインされた融合タンパク質(ナノレゴ)を作成し“自己組織化”させてたんぱく質の会合体を形成させるなど、全く新しい設計思想と素材による機能的医療材料(バイオマテリアル)を創製することを目的とする。平成15年度の成果として、①ナノレゴ素子の発現と精製を迅速に行うためのシステムの確立、②ナノレゴ素子の1分子レベルでの物性測定のため、高分子プローブを応用したタンパク質のソフトハンドリング方式によるリガンドーレセプタ力の高精度測定法の開発、③有用なナノレゴ素子を得るため、超高温細菌*P. horikoshii* 遺伝子を用いた相互作用の大規模スクリーニングがあげられる。平成15年度でナノレゴ素子解析の基盤が整ったので、今後はこれらシステムや技法を活用して相互作用の物性解析を中心に研究展開する。また、ナノレゴのプロトタイプを作成しその解析を行ってゆく。

2. 研究実施内容

① ナノレゴ素子の発現と精製を迅速に行うためのシステムの確立

タンパク質分子対(ナノレゴ素子)の物性測定を行うためには、比較的多量の精製タンパク質が必要となる。そこで簡便かつ迅速なタンパク質精製のためにN末側にGSTが、C末側にHisタグがついて目的タンパク質を発現するプラスミド(pGvH)を構築した(図1A)。特徴としてはGSTタグの直後にPreScission proteaseの認識配列が挿入してあるのでGSTタグでのアフィニティ精製と同時に比較的大きいGSTタグを切り離すことが可能であり、さらにプロテアーゼ除去目的の精製の必要がない。このプラスミドを用いてTip-1タンパク質の発現精製を行ったところ、Hisタグ精製(図1B)とGSTタグ精製(図1C)の2段階精製のみでほぼ単一の目的タンパク質を得ることができ、システムが確立した。そこでこのシステムを用いて大規模スクリーニングで見出された28個の相互作用ペアについて発現精製を試みた。発現させたタンパク質の可溶化を検討したところ14ペアにおいて両ペアが可溶化タンパクとして発現していることが明らかとなった。このうち数ペアについてはwタグ

による精製を終了し物性測定を開始した。



② 高分子プローブを応用したタンパク質のソフトハンドリング方式によるリガンドーレセプタ力の高精度測定法の開発

分子間力顕微鏡プローブチップにタンパク質を固定し、プローブのナノスケールでの位置制御によりタンパク質を操作する技術は、抗原-抗体相互作用力の解析やタンパク質のコンフォメーションのメカニクス解析などに応用されている。従来方法におけるタンパク質の固定方法としては、(1) プローブチップ上および基材表面上への直接固定、(2) スペーサー分子を用いる固定、が試みられているが、タンパク質の表面付着に伴う変性や力測定時の機械的変性等の問題点があり、高精度力測定の妨げとなっていた。本研究ではこれらの問題を解決する固定法として (3) チップ上・基材表面上に形成した高分子グラフト層の自由末端への固定を検討した。チップ上および基材表面上に形成されたCOOH基末端を有する *N,N*-Dimethylacrylamide グラフト層上にヒト血清アルブミン (HSA) および anti-HSA を固定後、それらの間のフォースカーブ測定を行った (図2)。表面グラフト重合はCOOH基を

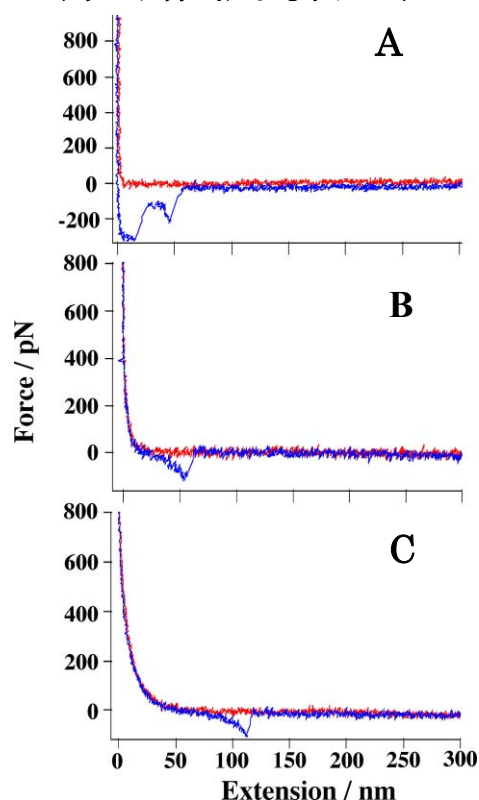


図2. 3種類の異なる方法でプローブチップ・基材表面に固定した抗原-抗体間の相互作用フォースカーブ。A. 表面直接固定法。B. スペーサーを介する固定法。C. ソフトハンドリング方式固定法

有する光イニフエータである、*N*-(dithiocarboxy)sarcosineを用いて行った。表面直接固定法 (A) では抗原-抗体結合力の他に非特異的付着力のピークが顕著であり、スパーサーを介する固定法 (B) では、そのような非特異的付着力ピークの出現は抑制されたが、全測定中15%の出現は避けられなかった。グラフト重合層上での固定法 (C) では非特異的付着力ピークは2%の出現率と大幅に抑制され、タンパク質の機械的変性を示す鋸型カーブの消失、力の分布のばらつきが減少が見られた一方、力を検出できているフォースカーブの出現率がA、Bに比べ低下し40%程度となった。グラフト重合層を活用したタンパク質のソフトハンドリング方式による力測定法は測定精度の向上には有効であることが確認されたが、力測定効率のさらなる向上の必要性が今後の課題となるものと考えられる。

③ 超高熱細菌*P. horikoshii* 遺伝子を用いた大規模な相互作用スクリーニング

超高熱細菌のタンパク質は高い熱安定性を有しており、これらタンパク質により形成される相互作用対は有用なナノレゴ素子となることが期待される。*P. horikoshii* には2,061の遺伝子が予測されている。我々はそのうちのクローニングされている1,390個の中から、膜たんぱく質や分泌タンパク質を除いた細胞内タンパク質に対するクローン960個を用いて哺乳動物細胞2ハイブリッド法による総当りの相互作用スクリーニングを行った。その結果、170個の相互作用 (71個の自己相互作用を含む) を得た。相互作用を形成する未知タンパク質については実在が強く示唆されるとともに、それらのうちのいくつかは相互作用相手から機能推定することができた。

3. 研究実施体制

理化学研究所グループ

①林崎良英 (理化学研究所 生体分子機能研究室、主任研究員)

②研究実施項目：相互作用をもつタンパク質の探索とナノレゴタンパク質の作製

九州大学グループ

①松田武久 (九州大学大学院医学研究院 医用工学分野、教授)

②研究実施項目：ナノレゴタンパク質の物性解析およびナノ秩序アーキテクチャーの構築

ダナフォームグループ

①林 利藏 (株)ダナフォーム、社長)

②研究実施項目：ナノレゴタンパク質の発現と精製

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Suzuki H., R. Saito, Kanamori M., Kai C., Schönbach C., Nagashima T., Hosaka J, and Hayashizaki Y., The mammalian protein-protein interaction database and its viewing system that is linked to the main FANTOM2 viewer, *Genome Research*, **13**, 1534-1541, 2003

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：1件）