

「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 林崎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、人工的にデザインされた融合タンパク質(ナノレゴ)を用いて“自己組織化”により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。この目的のためにこれまでに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ナノレゴ素子による相互作用のマクロレベルでの解析、③ナノレゴ素子の一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、④有用なナノレゴ素子を得るため、超高熱細菌*P. horikoshii* 遺伝子を用いた相互作用の大規模スクリーニング、⑤相互作用の*in vitro*での迅速確認法の開発を行ってきた。これらの研究成果によりナノレゴ素子についての多くの知見を得、どのようなナノレゴ素子がナノレゴ作成に適するかの見極めがいった。また、プロトタイプ of ナノレゴ作成において、構造体を作成するための条件、問題点が明らかとなってきた。今後は、現有の情報をベースとして、最適なナノレゴ素子の組み合わせによりナノレゴを作成し、その基本的物性の解析実験をマクロレベル、1分子レベルで行う。さらに、これらナノレゴを用いて構造体の作成に本格的に取り組むとともに、ナノレゴの応用についても着手する。

2. 研究実施内容

タンパク質-ペプチド間相互作用を利用したナノレゴ結合素子開発

培養細胞2-ハイブリッド法(M2H)によるマウス蛋白質間相互作用の解析結果よりランダムに選抜した分子量39 kDa以下の30組の結合素子候補タンパク質を、GST-及びHis-タグ融合タンパク発現系に導入し、組換え大腸菌における発現及び可溶性を調べた。その結果、15組のナノレゴ素子対が可溶性タンパク質として発現確認されたが、結合解析に十分な精製タンパク質として回収できたものはその内の5組であった。よって、多くのタンパク質は融合タンパク質として高分子化すると結合素子として利用が困難になるものと判断された。次にGST, とHis-タグの融合タンパク質化後も、最も効率よく可溶性タンパク質として

発現した相互作用対TIP-1 (13.7kDa), 及び β -catenin C末端ドメイン (10.7kDa) を利用し、ナノレゴ結合素子の開発を行った。融合タンパク質化した上記の精製タンパク質を用い、BIAcoreによる結合解離速度論解析を行った結果、解離定数 (K_D) で 10^{-9} M の値を示した。TIP-1は、PDZ domainのみから成るタンパク質であり、とりわけ β -cateninのC末端のロイシン残基がTIP-1との結合に重要であることが当研究室の解析によって明らかにされている。そこで我々は、 β -cateninのTIP-1結合部位の範囲をさらに縮小したC末端10残基のみをペプチド合成し、TIP-1-ペプチド間の相互作用をBIAcoreによって調べた。その結果、 β -catenin C末端ドメインと同程度の解離定数 ($K_D = 2.5 \times 10^{-9}$) を示した。これらのことから、このペプチドはTIP-1に対するナノレゴ結合素子として利用でき、ナノレゴ構築の際の融合タンパク質化に伴う高分子化に対して影響が軽減できるものと判断された。

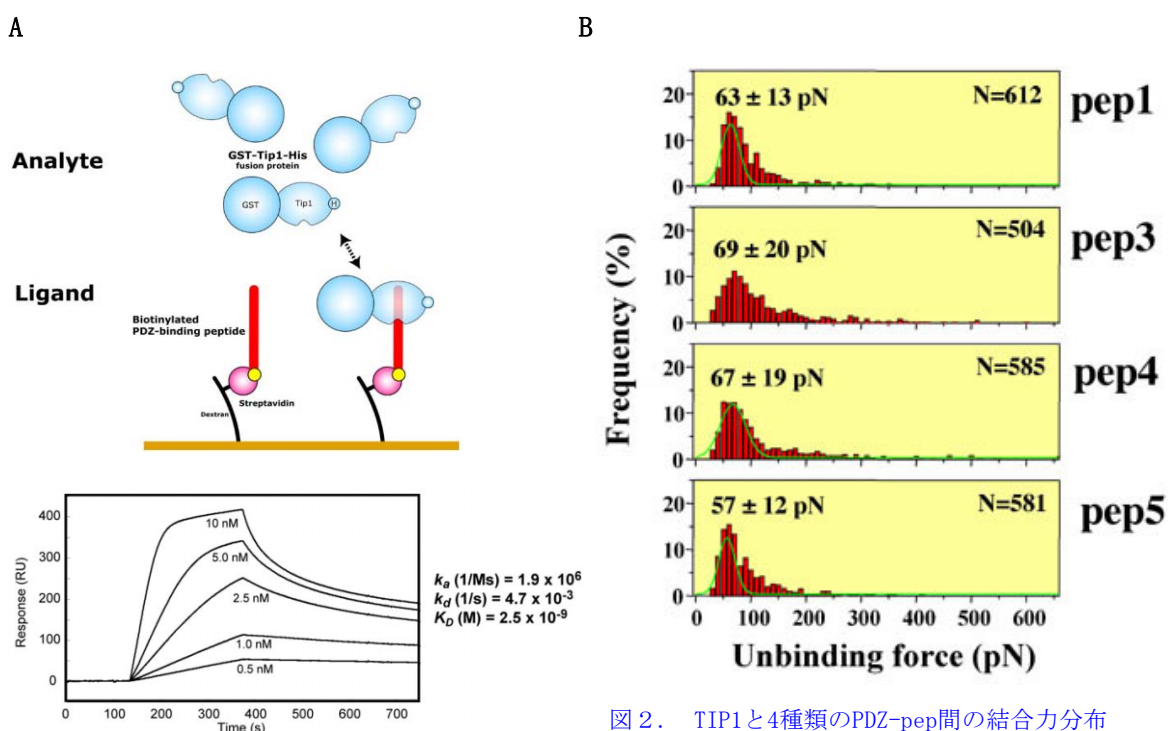


図2. TIP1と4種類のPDZ-pep間の結合力分布

図1. TIP-1- β -catenin C末端ペプチド間の相互作用解析

A, BIAcore解析の模式図。 β -catenin C末端ペプチド ($H_2N-CQLAWFDL-COO^-$, 10アミノ酸残基) は、N末端をビオチン化し、ストレプトアビジンが架橋されているSensorchip SA (BIAcore) に固定化した。AnalyteとしてGST, His-タグを融合したGST-TIP-1-His 精製

レゴ素子対間相互作用力の実測

H16年度は、前年度までに確立したタンパク質間相互作用力の精密測定法を活用し、選定された4種類のレゴ素子対 (PDZドメインを有するタンパク質TIP-1とPDZドメインの異なる認識配列を有する4種類の合成ペプチド (PDZ-pep) との各対) についての結合力の決定を行った。TIP-1およびPDZ-pepを、高分子スペーサーを介して原子間力顕微鏡プローブおよ

び基材の表面に固定し、プローブの昇降による結合の強制解離の力を測定した結果、今回の引き離し速度条件下（500 nm/s）では、結合力はいずれのペプチドの場合でも60 pN程度と決定され（図2）、過去に報告のあるビオチン-アビジン間の結合力にも匹敵する強度であることがわかった。TIP-1とPDZ-pepの組み合わせは、その機械的強度の強さからナノレゴ集合体を形成させるための素子として有効であることが示唆された。一方、4種類のペプチド間で結合力の差異は認められなかったが、タンパク質相互作用の強制解離力は引き離し速度に依存することが知られており、差の現れない速度条件であった可能性も考えられる。結合力への引き離し速度条件の影響とともに、ペプチド配列の寄与の詳細を調べ、結合強度の異なるレゴ素子の拡充を進める必要がある。今後は、ナノ測定で実測されるレゴ素子間の結合力値とマクロ測定で決定される平衡定数および速度定数の両者をナノレゴ集合体形成の基本情報として踏まえ、特に強い結合力を有することが確認されたレゴ素子ペアを活用してナノレゴの秩序集合体の構築を検討する。

相互作用の *in vitro* 迅速確認法の開発

2 ハイブリッド法でのタンパク質間相互作用のスクリーニングでは、得られる相互作用には多くの偽陽性が含まれており、相互作用の確認が必要である。そこで我々は簡単かつ迅速な *in vitro* プルダウンアッセイ法の開発を行った（図3）。我々の手法では *in vitro* 転写/翻訳キットを用いて作成したRIラベルタンパク質とビオチンラベルタンパク質とを単純に混合インキュベートしたのち、ストレプトアビジンビーズを用いてプルダウンし、SDS-PAGE等で相互作用を確認する。サンプル調製から結果解析まで1日以内に終了する。GST融合タンパク質で検出できた相互作用10組以上について我々の手法を適用したところ、ほとんどの相互作用が確認でき、GST法と同様に *in vitro* での相互作用確認法として有用なことが示された。

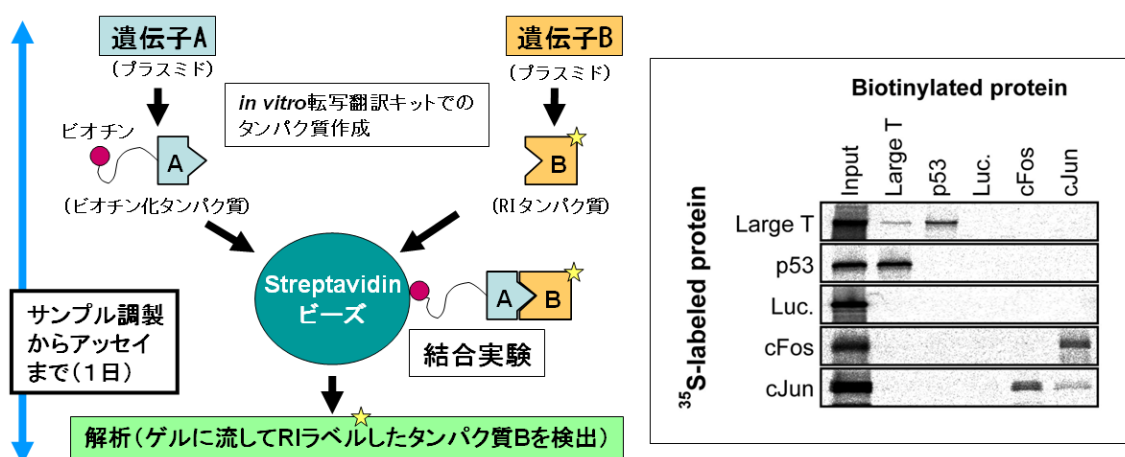


図3. 超迅速 *in vitro* プルダウンアッセイ法の概要（左図）と、この方法を用いた large T-P53 および cFos-cJun 相互作用の検出 (SDS-PAGE)。

多項（複合体）ナノレゴ素子候補のスクリーニングを目的としたSMN 複合体の解析

生体超分子のコンポーネント間の相互作用を調べることにより多項（複合体）ナノレゴ素子候補を得る目的で、small nuclear ribonucleoproteins（snRNPs）の会合や再生に関与することが知られているSMN（Survival Motor Neuron）複合体の解析を行った。SMN複合体の主要コンポーネントにはGemin2, 3, 4, 5, 6 及び 7 があり、複合体モデルが提唱されているが、未解明な部分も残されている。そこで哺乳細胞2ハイブリッド法を用いてSMN complex の主要コンポーネント間の相互作用をより詳細に解析した。その結果、既知相互作用を全て確認し、かつGemin2-Gemin7 間の新規相互作用が同定された。この相互作用は *in vitro* プルダウン法でも観察され、直接相互作用が確認された。これらの結果より、SMN、Gemin2、7 がお互いに相互作用することでより安定な超分子複合体を形成し得るというモデルが構築できた。

超高熱細菌*P. horikoshii* 遺伝子を用いた相互作用の大規模スクリーニング

同定した170個の相互作用のうち、107個の相互作用を信頼性の高い相互作用として選択した。相互作用したORFはゲノム上で隣接し、かつ同方向にコードされている割合が高く、これら相互作用ペアはオペロンを形成しており、機能的に関連性が高いものと推測された。このうちいくつかの相互作用ペアについては他生物種との比較ゲノム解析により、この推測が裏付けられた。

3. 研究実施体制

理化学研究所グループ

- ①研究分担グループ長：林崎 良英（理化学研究所 林崎生体分子機能研究室 主任研究員、G S Cセンター 遺伝子構造・機能研究グループ プロジェクトディレクター）
- ②研究項目：ナノレゴタンパク質の作製とその応用

九州大学グループ

- ①研究分担グループ長：松田 武久（九州大学大学院 医学研究院 教授）
- ②研究項目：ナノレゴタンパク質の自発的秩序集合体の形成と構造解析

ダナフォームグループ

- ③研究分担グループ長：林 利藏（株式会社ダナフォーム 社長）
- ④研究項目：DNA Bookの作成、ナノレゴタンパク質の発現精製

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

- “Harukazu Suzuki, Chihiro Ogawa, Kengo Usui, and Yoshihide Hayashizaki, In vitro pull-down assay without expression constructs. *Bio techniques*, **37**, 918-920 (2004)”
- “Miriam Barrios-Rodiles, Kevin R. Brown, Barish Ozdamar, Zhong Liu, Robert S. Donovan, Fukiko Shinjo, Yongmei Liu, Rohit Bose, Joanna Dembowy, Ian W. Taylor, Valbona Luga, Natasa Przulj, Mark Robinson, Harukazu Suzuki, Yoshihide Hayashizaki, Igor Jurisica, Jeffrey L., Wrana, High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells, *Science*, **307**, 1621-1625 (2005)”
- “Hiromi Nishida, Takahiro Suzuki, Yasuhiro Tomaru, Yoshihide Hayashizaki, A novel replication-independent histone H2a gene in mouse. *BMC Genetics*, **6**, 10 (2005)”

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：1件）