

加藤たん白生態プロジェクトの研究成果

目次

1. ヒト完全長 cDNA がコードする新規蛋白質群	2
2. 新規蛋白質修飾システム NEDD8 経路の発見	6
3. NEDD8 化による細胞周期制御	8
4. インビトロ翻訳産物のマルチユビキチン化	9
5. WW ドメインを有する核蛋白質の発見	10
6. 新規核蛋白質複合体 Npw38-NpwBP の発見	12
7. 新規スプライセオソーム構成成分の発見	14
8. 不死化細胞で発現が増加する核蛋白質の同定	15
9. 細胞内蛋白質の O-グリコシル化の発見	17
10. 高感度レクチン検出法	18
11. 膜蛋白質のトポロジー解析	19
12. cDNA 免疫による抗体作製	21
13. 2-ハイブリッド局在化法による蛋白質-蛋白質相互作用の検出	22

1. ヒト完全長 cDNA がコードする新規蛋白質群

ヒト完全長 cDNA バンクの中から新規 cDNA を選択し、それらの全長塩基配列決定、インビトロ翻訳、局在解析を行った。

研究成果の概要

新規ヒト完全長 cDNA について全長塩基配列を決定し、インビトロ翻訳によって翻訳産物の分子量を求めた。これらの cDNA のオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列を、親水性・疎水性度を縦軸に、アミノ酸残基を色別のバーで表示する方法（プロテオグラムと命名）を用いて可視化した（図1）。この中から選択した200個のクローンについて、ORFの配列から予想される蛋白質のC末端に緑色蛍光蛋白質(GFP)を融合させた蛋白質の発現ベクターを作製した。この発現ベクターをCOS7細胞に導入して発現させ、GFPの蛍光を観察することによって融合蛋白質の局在を決定した。その結果、一次構造が決定され、かつ局在部位がわかった新規蛋白質を同定することができた。図2に、ミトコンドリア蛋白質、ゴルジ体蛋白質、細胞質蛋白質の局在例を示す。これらの情報をもとに、ターゲット蛋白質を選択し、次の機能解析に移った。

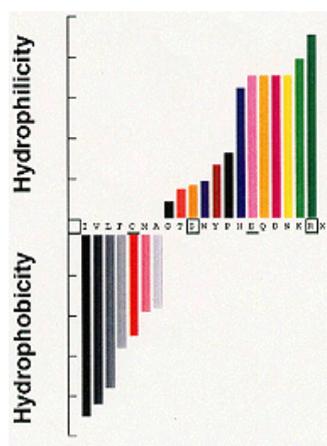


図1 プロテオグラム

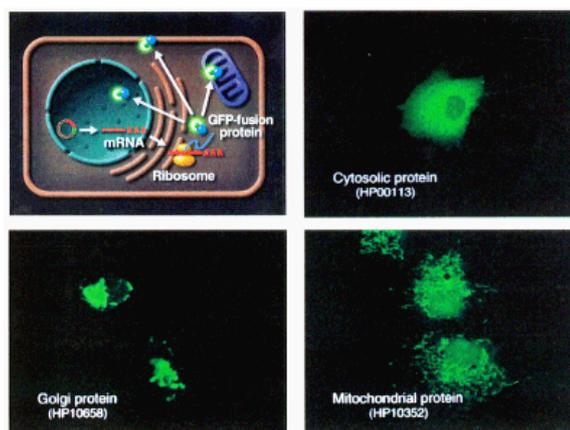


図2 GFP 融合蛋白質を用いた局在解析

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 低分子医薬のターゲット蛋白質
- 2) 新規蛋白質ネットワーク解明のための材料

特許出願

- 1) アミノ酸配列の表示方法

特 開：平 10-182692（平成 8 年 1 2 月 2 0 日）

出 願 人：科学技術振興事業団、加藤誠志

請求の概要：アミノ酸配列を、親水性・疎水性度を縦軸に、アミノ酸残基を色別のバーで表示する方法。

- 2) ドレブリン様配列と SH3 ドメインを有するヒト蛋白質とこの蛋白質をコードする cDNA
特 願 開：平 9-206940（平成 9 年 7 月 3 1 日）
出 願 人：科学技術振興事業団、加藤誠志
請求の概要：ドレブリン様配列と SH3 ドメインを有するヒト蛋白質とこの蛋白質をコードする cDNA、cDNA を保有する組換えベクター、この蛋白質に対する抗体。
- 3) ヒト蛋白質と cDNA[1]
特 願：平 11-214315（平成 1 1 年 7 月 2 8 日）
出 願 人：科学技術振興事業団、加藤誠志
請求の概要：2 種類の核蛋白質、4 種類のミトコンドリア蛋白質を含む 1 0 種類のヒト新規蛋白質と、それをコードする cDNA、cDNA の発現ベクター、蛋白質を発現しうる形質転換細胞、および蛋白質に対する抗体。
- 4) ヒト蛋白質と cDNA[2]
特 願：平 11-346863（平成 1 1 年 1 2 月 6 日）
出 願 人：科学技術振興事業団
請求の概要：2 種類の核蛋白質、3 種類のミトコンドリア蛋白質を含む 1 0 種類のヒト新規蛋白質と、それをコードする cDNA、cDNA の発現ベクター、蛋白質を発現しうる形質転換細胞、および蛋白質に対する抗体。
- 5) ヒト蛋白質と cDNA[3]
特 願：平 11-346864（平成 1 1 年 1 2 月 6 日）
出 願 人：科学技術振興事業団
請求の概要：1 0 種類のヒト新規蛋白質と、それをコードする cDNA、cDNA の発現ベクター、蛋白質を発現しうる形質転換細胞、および蛋白質に対する抗体。
- 6) ヒト蛋白質と cDNA[4]
特 願：2000-31062（平成 1 2 年 2 月 8 日）
出 願 人：科学技術振興事業団
請求の概要：2 種類の核蛋白質、3 種類のゴルジ体蛋白質を含む 1 0 種類のヒト新規蛋白質と、それをコードする cDNA、cDNA の発現ベクター、蛋白質を発現しうる形質転換細胞、および蛋白質に対する抗体。
- 7) ヒト蛋白質と cDNA[5]
特 願：2000-34091（平成 1 2 年 2 月 1 0 日）
出 願 人：科学技術振興事業団
請求の概要：3 種類の核蛋白質を含む 1 0 種類のヒト新規蛋白質と、それをコードする cDNA、cDNA の発現ベクター、蛋白質を発現しうる形質転換細胞、および蛋白質に対する抗体。
- 8) ヒト蛋白質と cDNA[6]
特 願：2000-34090（平成 1 2 年 2 月 1 0 日）

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：10種類のヒト新規蛋白質と、それをコードする cDNA、cDNA の発現ベクター、蛋白質を発現しうる形質転換細胞、および蛋白質に対する抗体。

9) ヒト蛋白質と cDNA[7]

特 願：2000-35829 (平成12年2月14日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：10種類のヒト新規蛋白質と、それをコードする cDNA、cDNA の発現ベクター、蛋白質を発現しうる形質転換細胞、および蛋白質に対する抗体。

10) ヒト蛋白質と cDNA[8]

特 願：2000-35899 (平成12年2月14日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：3種類の核蛋白質を含む10種類のヒト新規蛋白質と、それをコードする cDNA、cDNA の発現ベクター、蛋白質を発現しうる形質転換細胞、および蛋白質に対する抗体。

11) ヒト蛋白質と cDNA[9]

特 願：2000-71161 (平成12年3月14日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：7種類のヒト新規蛋白質と、それをコードする cDNA、cDNA の発現ベクター、蛋白質を発現しうる形質転換細胞、および蛋白質に対する抗体。

12) ヒト蛋白質と cDNA[10]

特 願：2000-160851 (平成12年5月30日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：3種類の核蛋白質を含む9種類のヒト新規蛋白質と、それをコードする cDNA、cDNA の発現ベクター、蛋白質を発現しうる形質転換細胞、および蛋白質に対する抗体。

報告書他

- 1) S. Kato, S. Sekine, T. Yamaguchi, N. Aida, M. Saeki, M., and K. Kamata. Large-scale sequencing analysis of a full-length cDNA library prepared from human gastric adenocarcinoma grown in a SCID mouse. Human Genome Meeting '98, Turin, March 28-30, 1998, 31.
- 2) 加藤誠志. 蛋白質一次構造の視覚化-蛋白相を観る. 第21回分子生物学会年会, 横浜, Dec. 16-19, 1998, 327.
- 3) S. Kato, M. Saeki, S. Iwamuro, F. Osaka, C. Eguchi, and T. Yamaguchi. Large-scale in vitro translation analysis of human full-length cDNA clones. Human Genome Meeting '99, Brisbane, March 27-30, 1999, 48-49.

- 4) 佐伯美帆呂, 會田理子, 藤村尚子, 江口睦志, 長田直樹, 伏見典子, 木村知子, 加藤誠志. ヒト完全長 cDNA-GFP 融合遺伝子発現による新規ヒト蛋白質の局在解析. 第 22 回日本分子生物学会年会, 福岡, Dec. 7-10, 1999, 280.

〔研究者名〕 佐伯 美帆呂、江口 睦志、會田 理子、加藤 誠志

2. 新規蛋白質修飾システム NEDD8 経路の発見

蛋白質の共有結合によってカリンファミリー蛋白質を修飾する NEDD8 経路を発見した。

研究成果の概要

cDNA クローンの網羅的インビトロ翻訳の過程で、ユビキチン様蛋白質 NEDD8 をコードしている cDNA クローンが、本来生成すべき 9kDa の産物の他に約 100 kDa の産物を生成することを見いだした。非還元条件下ではさらに 30kDa と 66kDa の翻訳産物が認められた (図 1)。これらは NEDD8 のインビトロ翻訳産物がウサギ網状赤血球ライセートに含まれる蛋白質と共有結合することによって生成したものであることが分かった。それぞれの蛋白質をウサギ網状赤血球ライセートから NEDD8 アフィニティークロマトグラフィーによって単離精製して部分アミノ酸配列を決定後、対応するヒト cDNA のクローン化を行った結果、100 kDa の蛋白質はカリン-4A であること、また 66kDa と 30kDa の翻訳産物はそれぞれユビキチン経路の E1 と E2 に対応する新規蛋白質であることが判明した。NEDD8 化の最終ターゲット蛋白質カリンは、ユビキチン経路の最終段階でユビキチン結合反応を行っている E3 と呼ばれる複合体 (SCF 複合体) の一成分である。NEDD8 化は、現在知られているすべてのカリンファミリーに起こることから、これらの複合体の機能制御に参与している新しい修飾システムであることが示唆された (図 2)。

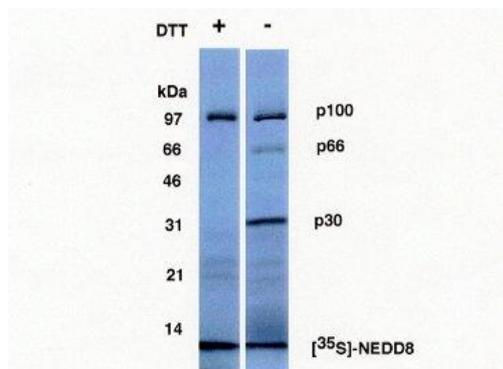


図 1 NEDD8cDNA のインビトロ翻訳産物

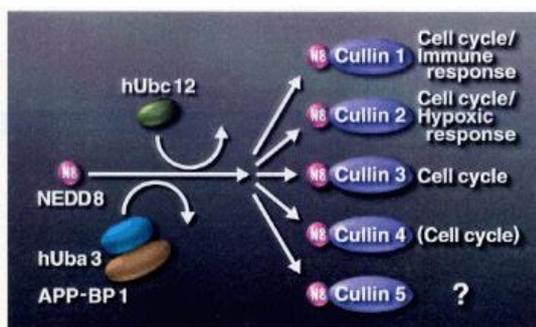


図 2 NEDD8 修飾経路

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) NEDD8 修飾経路の生理機能解明のための材料
- 2) 医薬のターゲット蛋白質

特許出願

- 1) ヒト蛋白質 hUbc12 とこの蛋白質をコードする cDNA

特 開：平 11-332576 (平成 10 年 5 月 29 日)

出 願 人：科学技術振興事業団、加藤誠志

請求の概要：ヒト蛋白質 hUbc12 とこの蛋白質をコードする cDNA、この cDNA を含む組換えベクター、この蛋白質に対する抗体。

報告書他

- 1) F. Osaka, H. Kawasaki, N. Aida, M. Saeki, T. Chiba, S. Kawashima, K. Tanaka, and S. Kato. A new NEDD8-ligating system for cullin-4A. *Genes Dev.* 12: 2263-2268, 1998.
- 2) T. Hori, F. Osaka, T. Chiba, C. Miyamoto, K. Okabayashi, N. Shimbara, S. Kato, and K. Tanaka. Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8. *Oncogene* 18: 6829-6834, 1999.
- 3) 逢坂文男. ユビキチン様蛋白質 Nedd8 による Cullin/Cdc53 family 蛋白質群の新しい修飾システム. *ぷろておりしす* 第8号 66-71, 1998.
- 4) 千葉智樹、逢坂文男. ユビキチン様蛋白質とその蛋白質修飾システム. *蛋白質核酸酵素* 44: 744-747, 1999.

〔研究者名〕 逢坂 文男、佐伯 美帆呂、逢坂（會田） 理子

3. NEDD8 化による細胞周期制御

分裂酵母においてカリン-1のNEDD8化が細胞周期制御に関わっていることを明らかにした。

研究成果の概要

NEDD8 修飾の生理的な役割を検討するため、分裂酵母を用いた遺伝子破壊実験を行った。NEDD8 を始めとするこの経路に関わる全遺伝子と二種類のカリン（カリン-1, カリン-4）の遺伝子を、分裂酵母のゲノムプロジェクトによって得られたデータベースから見つけることができたので、それらの遺伝子破壊を行った。その結果、この修飾システムが分裂酵母の生存に必須であることがわかった（図1）。

そこでもっともよく研究が進んでいるカリン-1の系でさらにNEDD8化の役割について検討を進めた。カリン-1はSCF (Skp1-cullin-F-box)と呼ばれる蛋白質複合体の構成成分である。SCFは細胞周期の制御因子であるCDKインヒビターRum1のユビキチン化を行って、その分解を制御している装置(ユビキチンリガーゼ)である(図2)。SCF依存的にRum1の分解が起こるためには、カリン-1のNEDD8化が必須であることを示すことができ、NEDD8化が確かに細胞周期の制御に関与していることを証明した。

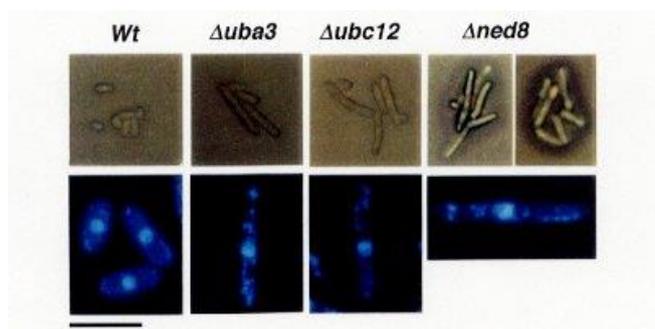


図1 NEDD8 経路遺伝子の破壊による分裂酵母の表現型変化

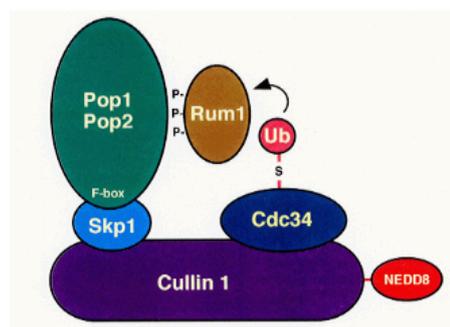


図2 SCF 複合体による Rum1 のユビキチン化

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 細胞周期研究の新しい展開
- 2) 抗癌剤の開発

特許出願 なし

報告書他

- 1) F. Osaka, M. Saeki, N. Aida, A. Toh-e, K. Kominami, T. Toda, T. Chiba, K. Tanaka, and S. Kato. Covalent modifier NEDD8 is essential for function of SCF ubiquitin-ligase in fission yeast. EMBO J. 19: 3475-3484, 2000.

〔研究者名〕 逢坂 文男、佐伯 美帆呂、逢坂（會田） 理子

4. インビトロ翻訳産物のマルチユビキチン化

インビトロ翻訳産物がマルチユビキチン化を受けることを見いだした。

研究成果の概要

cDNA クローンの網羅的インビトロ翻訳の過程で、cDNA がコードしている蛋白質のバンドより大きな分子量の位置にラダーバンドを生成する多くのクローンを見いだした (図 1)。このようなラダーの生成機構を調べたところ、ラダーバンドはユビキチンが複数個共有結合した翻訳産物に由来することが示された。これらのクローンがコードする蛋白質のアミノ酸配列に特徴的なことは、膜貫通ドメインを有することである。そこで典型的なラダーパターンを示すクローン HP10122 と HP10041 についてその局在を調べたところ、小胞体膜に存在することが示された。インビトロ翻訳系にマイクロソームを添加するとこれらのラダーバンドが消失することから、膜蛋白質が膜に移行できない場合速やかにユビキチン化され、プロテアソームによる分解が起こるものと思われる。この系を使用することによって、ユビキチン化を受ける部位を特定することが出来た (図 2)。

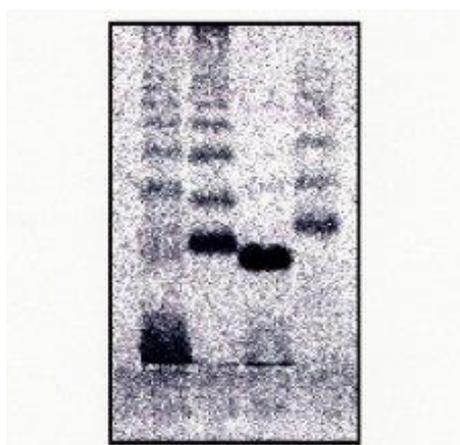


図 1 ラダーバンドを生成するインビトロ翻訳産物

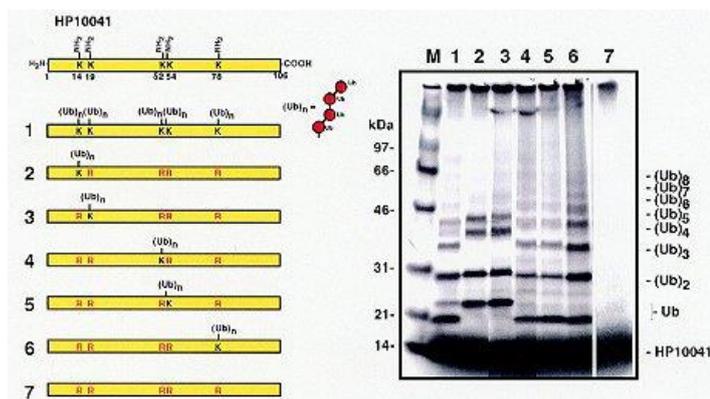


図 2 マルチユビキチン化部位の決定

成果展開可能なシーズ、用途等 ユビキチン化研究の材料

特許出願 なし

報告書他

- 1) N.-S. Kim, T. Yamaguchi, S. Sekine, M. Saeki, S. Iwamuro, and S. Kato. Cloning of human polyubiquitin cDNAs and a ubiquitin-binding assay involving its in vitro translation product. *J. Biochem.* 124: 35-39, 1998.
- 2) S. Iwamuro, M. Saeki, and S. Kato. Multi-ubiquitination of a nascent membrane protein produced in a rabbit reticulocyte lysate. *J. Biochem.* 126: 48-53, 1999.

〔研究者名〕 岩室 祥一、佐伯 美帆呂

5. WWドメインを有する核蛋白質の発見

WWドメインを有し、転写機構に関与する2種類の核蛋白質を見いだした。

研究成果の概要

完全長 cDNA バンクの中に、WWドメインと呼ばれる蛋白質間相互作用モチーフ配列を有する2種類の蛋白質をコードするクローン HP10345 と HP03494 を見いだした(表1)。クローン HP10345 がコードしている蛋白質は、分子量が 38kDa であり、核に局在することから Npw38 (Nuclear protein containing a WW domain with a molecular mass of 38 kDa) と命名した。酵母2-ハイブリッドスクリーニング系を用いて WWドメインに結合する蛋白質を探索しようとしたところ、GAL4 と WWドメインの融合遺伝子を発現させただけで、転写活性化が起こった(図1)。また、Npw38 は poly(G) に結合する RNA 結合蛋白質であることが分かった。もう一つのクローン HP03494 がコードする蛋白質は、RNA ポリメラーゼ II の C 末端ドメイン(CTD) と結合することがわかった。いずれの蛋白質も、転写制御に関与する新しいネットワークの一員と考えられる。

蛋白質	位置	アミノ酸配列	登録番号
保存配列		-----U-----G--YY-N-----U--P-----	
HP03494	43	ELVHAGWEKCMSRRENRPYYFMRFTNQSLWEMPVVLGQHD	
HP10345	46	EGLPPSWYKVFDPSCGLPYVMADTDLVSULSPHDPNSV	
Yap_Human	171	VPLPAGWEMAKTSS.GQRYFLNHIDQTTTQDPRKAMLS	P46937
Yap_Chick-1	169	VPLPPGWEMAKTFS.GQRYFLNHIDQTTTQDPRKAMLS	P46936
Yap_Mouse-1	156	VPLPAGWEMAKTSS.GQRYFLNHIDQTTTQDPRKAMLS	P46938
Hed4_Mouse-1	40	SPLPPGWEEERQDVL.GRTYYVNHESRRTQWKRPSPDDDL	P46935
Hed4_Human-1	218	SPLPPGWEEERQDIL.GRTYYVNHESRRTQWKRPTQDNL	P46934
Hed4_Mouse-2	196	SGLPPGWEEKQDDR.GRSYYVDHNSKTTTWSKPTHQDDP	P46935
Hed4_Human-2	375	SGLPPGWEEKQDER.GRSYYVDHNSRTTITWTKPTVQATV	P46934
Dad_Human	3055	TSVQGPWERAISP.N.KVPYYINHETQTTQDHPKNTELY	P11532
Dad_Mouse	3048	TSVQGPWERAISP.N.KVPYYINHETQTTQDHPKNTELY	P11531
FE65_Rat	42	SDLPAGWMRVQDTS.GTYVWHI.PTGTTQWEPGGRASPS	P46933
Hsb1/Human	249	IVLPFNWKTARDPE.GKIYYHVITRQTQWDPTWESP	
IQGA_Human	679	GDNNSKMWVKKWVKG.GYYYYHNLETQEGGWDEPPNFVQN	P46940
FBP11-1_Mouse	1WTEHKSFD.GRTYYVNTETKQSTWEKPDLLKTP	U40747
FBP11-2_Mouse	36	LLSKCPWKTYKSDS.GKPYVNSQTKESRWAKP.....	U40747

表1 WWドメインのアミノ酸配列の比較

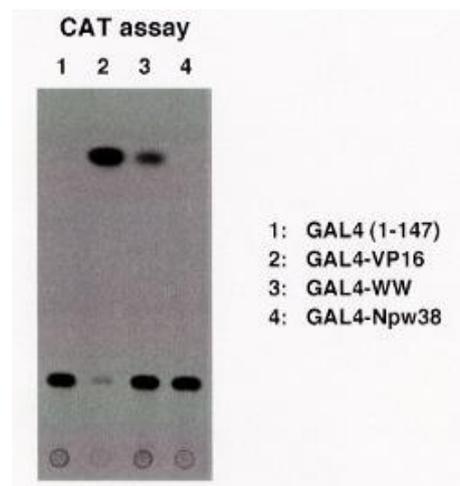


図1 WWドメインによる転写活性化

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 転写・スプライシング機構解明のための材料
- 2) 低分子医薬品のターゲット蛋白質。

特許出願

1) ヒト核蛋白質とこの蛋白質をコードするヒト遺伝子および cDNA

特 開：平 11-46766 (平成 9 年 7 月 3 1 日)

出 願 人：科学技術振興事業団、加藤誠志

請求の概要：WW ドメインを有するヒト核蛋白質 Npw38 とこの蛋白質をコードする cDNA、この cDNA を含む組換えベクター、この蛋白質に対する抗体。

2) WW ドメインを有するヒト核蛋白質とそれをコードする cDNA

特 願：平 11-332572 (平成 1 1 年 1 1 月 2 4 日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：WW ドメインを有するヒト核蛋白質とこの蛋白質をコードする cDNA、この cDNA を含む組換えベクター、この蛋白質を発現しうる形質転換細胞、この蛋白質に対する抗体。

報告書他

1) A. Komuro, M. Saeki, and S. Kato. Npw38, a novel nuclear protein possessing a WW domain capable of activating basal transcription. Nucl. Acids Res. 27:1957-1965, 1999.

〔研究者名〕 小室 晃彦、佐伯 美帆呂

6. 新規核蛋白質複合体 Npw38-NpwBP の発見

転写機構に関与していると考えられる新しい核蛋白質複合体を発見した。

研究成果の概要

WWドメインを有する核蛋白質 Npw38 と結合する相手の蛋白質 NpwBP を、HeLa 細胞の核抽出物から GST-Npw38 プルダウン法を用いて単離精製した。NpwBP をコードする cDNA をクローン化しその塩基配列を決定したところ、プロリン含量の高い 641 アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしていた。Npw38 と NpwBP はインビトロや細胞内で結合していることが証明でき、両者の細胞内局在も一致していた (図 1)。Npw38 の WW ドメインと結合するモチーフを、オリゴペプチドを固定化した膜を用いる結合実験によって検索した結果、アルギニンが近接している PPGPPP という配列 (PGR モチーフと命名) を特異的に認識することが示された。また、NpwBP は、Npw38 と同様、G に富む RNA や一本鎖 DNA と結合した。さらに、NpwBP はヘリカーゼ類との結合活性も認められた。これらの結果から、新しい蛋白質核酸複合体 Npw38-NpwBP-RNA/DNA が核内に存在し (図 2)、転写・スプライシングに関与している可能性が示唆された。

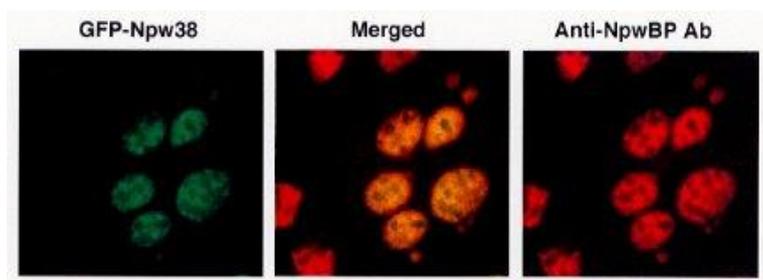


図 1 Npw38 と NpwBP の細胞内局在

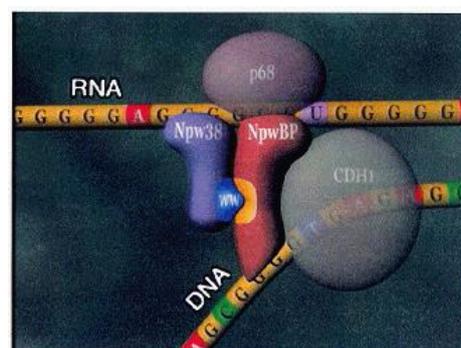


図 2 Npw38-NpwBP 複合体

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 転写・スプライシング機構解明のための材料
- 2) 低分子医薬のターゲット蛋白質

特許出願

- 1) ヒト転写関連蛋白質とこの蛋白質をコードする cDNA

特 開：2000-60562 (平成 10 年 8 月 21 日)

出 願 人：科学技術振興事業団、加藤誠志

請求の概要：ヒト転写関連蛋白質 NpwBP とこの蛋白質をコードする cDNA、この cDNA を含む組換えベクター、この蛋白質に対する抗体。

報告書他

- 1) A. Komuro, M. Saeki, and S. Kato. Association of two nuclear proteins, Npw38 and NPwBP, via the interaction between the WW domain and a novel proline-rich motif containing glycine and arginine. *J. Biol. Chem.* 274: 36513-36519, 1999.

〔研究者名〕 小室 晃彦、佐伯 美帆呂

7. 新規スプライセオソーム構成成分の発見

新しいスプライセオソーム構成蛋白質 Nps20 を発見した。

研究成果の概要

cDNA クローンの GFP 融合蛋白質発現による局在解析の過程で、核内に斑点状のパターンで局在するクローン HP10496 を見いだした。この局在パターンは、pre-mRNA のスプライシング因子の一つである SC35 と一致したことから (図 1)、スプライセオソームを構成する蛋白質であると考えられる。見かけの分子量が 20kDa である核のスプライセオソーム構成蛋白質ということで、Nps20 (nuclear protein co-localized with spliceosome with a molecular mass of 20 kDa) と命名した。Nps20 内の局在化シグナルを検討した結果、N 末端に核内移行シグナルが、また C 末端側には新しい型の核外移行シグナルが同定された (図 2)。相互作用する蛋白質を探索したところ、スプライシング因子である SF3a60/SAP61 の C 末端側と結合することが分かった。Nps20 は、細胞質と核の間をシャトルしながら、SF3a60/SAP61 と相互作用してスプライシングに関与している蛋白質であると考えられる。

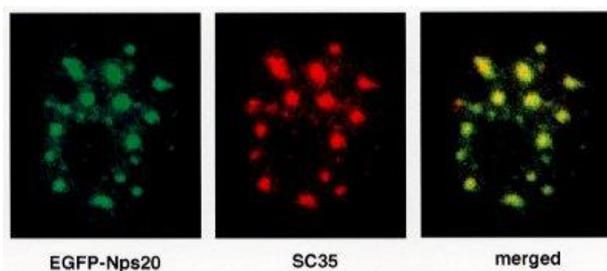


図 1 Nps20 はスプライセオソームに局在する

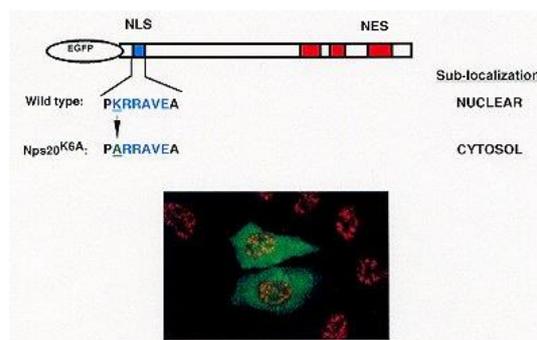


図 2 Nps20 は核内移行シグナルと核外移行シグナルを有する

成果展開可能なシーズ、用途等 スプライシング機構解明のための材料

特許出願 なし

報告書他

- 1) N. Nagata, M. Saeki, N. Aida, Y. Ishizuka, N. Fujimura, and S. Kato. Nps20, a novel mammalian spliceosome component that interacts with SF3a60/SAP61. THE FIFTH ANNUAL MEETING of THE RNA SOCIETY, Madison, 2000, 523.

〔研究者名〕 長田 直樹、佐伯 美帆、會田 理子、石塚 芳子、藤村 尚子

8. 不死化細胞で発現が増加する核蛋白質の同定

不死化細胞で発現が増加する2種類の核蛋白質 IMUP-1、IMUP-2 を見いだした。

研究成果の概要

cDNA バンクの中に、老化や不死化に関与しているものがないかを、cDNA 全長配列の情報に基づいて作製したプライマーを用いて RT-PCR を行い、得られた産物の量を測定する方法でスクリーニングを行った。分裂回数の異なる繊維芽細胞株 WI-38 と、SV40 で形質転換した繊維芽細胞株 WI-38 VA13 から単離したポリ(A)⁺RNA をそれぞれ鋳型にして RT-PCR を行ったところ、WI-38 ではほとんど発現が認められないのに、不死化した細胞 WI-38 VA13 において発現量が増加するクローン HP10514 が見いだされた(図1)。このクローンにはスプライシング変異体が存在したので、それぞれを IMUP-1 (Immortalization-upregulated protein 1)、IMUP-2 と命名した。両者のアミノ酸配列を比較すると、N 末端46 残基は一致するが、C 末端は挿入によるフレームシフトのため異なってくる。いずれも、核に局在する蛋白質であり、IMUP-1 は塩基性アミノ酸残基からなる核移行シグナルを有していた(図2)。

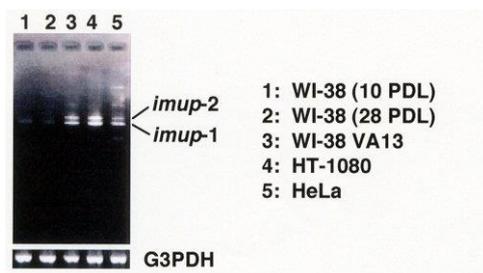


図1 不死化細胞で発現増加する遺伝子

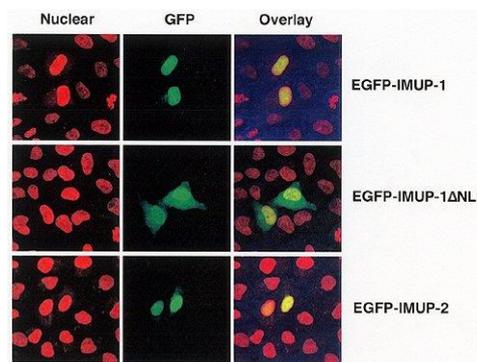


図2 IMUP-1、IMUP-2 の核局在

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 不死化機構解明のための材料
- 2) 抗癌剤のターゲット蛋白質

特許出願

- 1) ヒト核蛋白質とこれをコードする cDNA

特 願：2000-31063 (平成12年2月8日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：ヒト核蛋白質 IMUP-1 と IMUP-2 とこの蛋白質をコードする cDNA、この蛋白質に対する抗体。

報告書他

- 1) J.-K. Kim, R. Ryll, Y. Ishizuka and S. Kato. Identification of cDNAs encoding two novel nuclear proteins, IMUP-1 and IMUP-2, upregulated in SV40 immortalized human fibroblasts. *Gene* 257: 327-334, 2000.

〔研究者名〕 金 鎮京、ローランド リル、石塚 芳子

9. 細胞内蛋白質のO-グリコシル化の発見

細胞内蛋白質が新規の糖鎖修飾を受けていることを見いだした。

研究成果の概要

ウサギ筋由来の代謝酵素について蛍光色素標識糖鎖電気泳動法(FACE)による糖鎖成分の分析を行ったところ、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ、アルドラーゼを始めとする試したほとんどの代謝酵素が、O-グリコシド型結合ではあるが、従来知られているGlcNAcを含まず、それぞれに特徴的な糖鎖を有することが示唆された。例えば、ウサギ筋由来細胞質クレアチンキナーゼは、FACE解析によって一分子当たり0.4個のグルコースを含んでいることがわかった(図1)。糖鎖が結合しているアミノ酸残基を決定するために、プロテアーゼによる限定分解産物のアミノ酸配列決定(図2)ならびにマスマスペクトロメトリーによる解析を行ったところ、複数のセリン、スレオニン残基にグルコースが結合していることが示された。以上の結果から、細胞内蛋白質にはO-GlcNAc以外の糖鎖修飾が存在し、細胞内蛋白質の調節に関わっている可能性が示唆された。

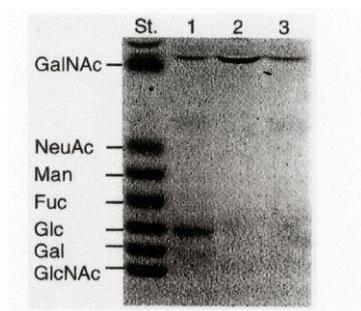


図1 クレアチンキナーゼのFACE解析

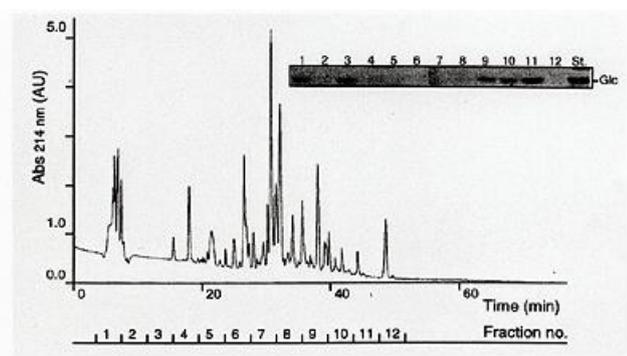


図2 トリプシン消化物に含まれるグリコペプチド画分

成果展開可能なシーズ、用途等 新規糖鎖修飾機構解明への展開

特許出願 なし

報告書他

- 1) K. Kamemura and S. Kato. Cytoplasmic proteins possessing sugar chains different from O-GlcNAc. International Symposium on Sialobiology and Other Novel Forms of Glycosylation, Taipei, 1998.

〔研究者名〕 亀村 和生

10. 高感度レクチン検出法

細胞ライセートなどに含まれている微量レクチンの検出法。

研究成果の概要

完全長 cDNA がコードする蛋白質や細胞ライセートの中から、レクチン活性を持っているものを探索するために、高感度のレクチン検出法を開発した。蛋白質を SDS-PAGE で分離した後、糖-ビオチン化ポリアクリルアミドポリマープローブで検出する方法である (図 1)。植物由来のレクチンに適用してみたところ、従来法に比べ 10 倍以上の感度で検出することができた (図 2)。さらに、この方法で大腸菌で発現させたガレクチン-3 やヒト血清中のマンナン結合蛋白質の糖鎖特異的な結合を検出することができた。

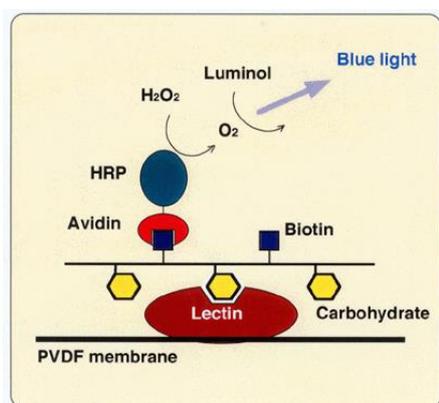


図 1 高感度レクチン検出法の原理

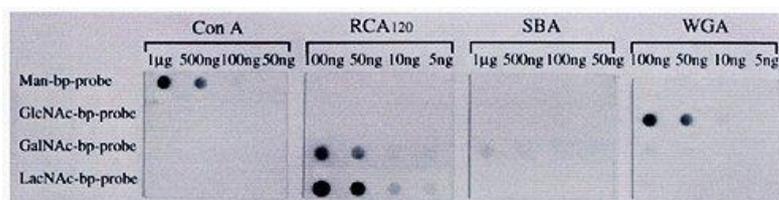


図 2 植物レクチンの検出

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) レクチンの検出・定量
- 2) 新規レクチンの探索

特許出願

なし

報告書他

- 1) K. Kamemura and S. Kato. Detection of lectins using ligand blotting and polyacrylamide-type glycoconjugate probes. Anal. Biochem. 258: 305-310,1998.

〔研究者名〕 亀村 和生

11. 膜蛋白質のトポロジー解析

膜蛋白質の膜貫通ドメインのトポロジーを決定する方法を開発した。

研究成果の概要

cDNA がコードしている蛋白質のアミノ酸配列情報を基に、疎水性の膜貫通ドメインを有しているクローンを選別し、この蛋白質がいかなるタイプの膜蛋白質かを実験的に同定するための方法を考案した。膜貫通ドメインと思われる配列の下流にウロキナーゼのプロテアーゼドメインを融合させたものを培養細胞内で発現させ、細胞表面にウロキナーゼ活性があるかないかを、フィブリンシートを細胞表面に直接接触させることによって測定する方法である (図1)。この方法を、N末端に一箇所の膜貫通ドメインを有する蛋白質に適用して、完全長 cDNA バンクの中から5種類の新規II型膜蛋白質を同定することができた。さらに、この方法を4個および7個の膜貫通ドメインを有する蛋白質に適用し、それぞれのドメインの細胞膜に対するトポロジーを決定することができた (図2)。

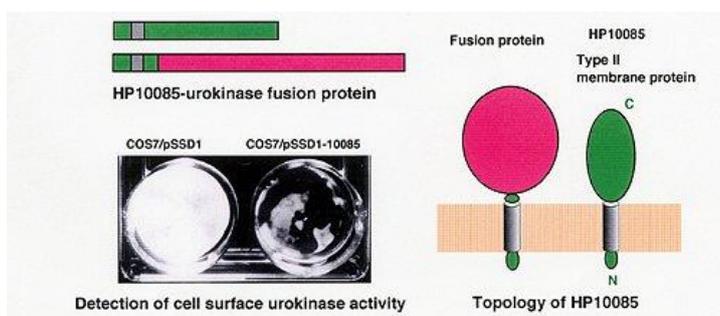


図1 ウロキナーゼ融合蛋白質を用いる膜蛋白質トポロジー解析

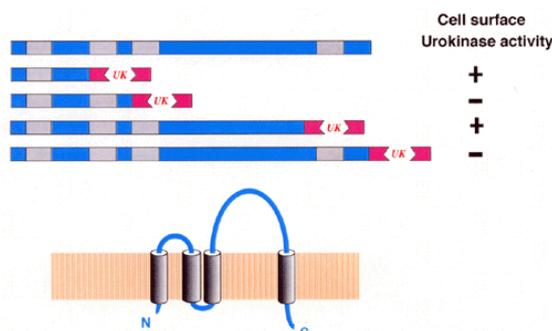


図2 4回膜貫通ドメインを有する膜蛋白質のトポロジー

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 新規II型膜蛋白質のスクリーニング
- 2) レセプター蛋白質のトポロジー決定

特許出願

- 1) 膜蛋白質のトポロジー決定法

特 開：平11-46765 (平成9年7月31日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：膜貫通ドメインの下流にリポーター蛋白質を融合させたものを動物細胞で発現させ、リポーター蛋白質の存在部位を指標として膜蛋白質のトポロジーを決定する方法。

報告書他

- 1) M. Yokoyama-Kobayashi, T. Yamaguchi, S. Sekine, and S. Kato. Selection of cDNAs encoding putative type II membrane proteins on the cell surface from a human full-length cDNA bank. *Gene* 228:161-167,1999.

〔研究者名〕 小林 みどり

12. cDNA 免疫による抗体作製

抗原蛋白質の分離・精製工程を必要としない遺伝子免疫法による抗体作製を検討した。

研究成果の概要

完全長 cDNA 発現ベクターを注射や遺伝子銃を用いて動物に接種することによって、抗体が産生することを確認した (図 1)。抗体産生能は、抗原の種類、接種方法、発現部位、動物の系統などの影響を受けることがわかった。得られた抗体は、免疫染色、免疫沈降、ウェスタンブロットリング法などに使用できることも示された (図 2)。さらに、抗原蛋白質を II 型膜蛋白質の膜貫通ドメインと融合させたもので免疫することによって、抗体産生能を向上させることができた。

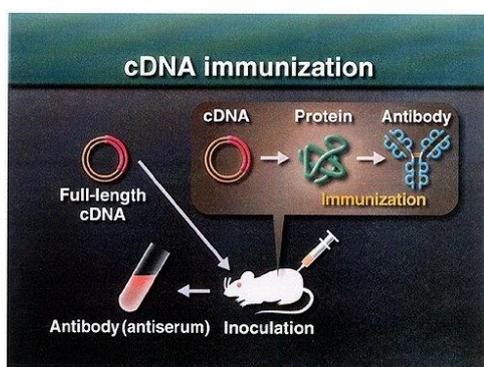


図 1 cDNA 免疫法

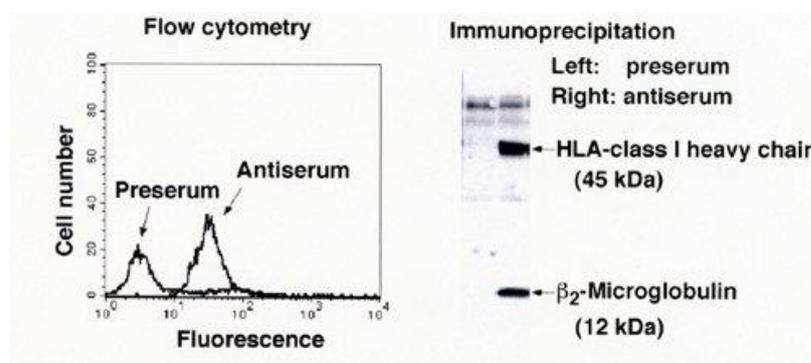


図 2 cDNA 免疫で作製した抗体の利用

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 蛋白質の精製・検出
- 2) 抗体医薬

特許出願

- 1) 遺伝子免疫による抗体作製法

特 願：2000-222743 (平成 12 年 7 月 24 日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：II 型膜蛋白質の膜貫通ドメインと抗原蛋白質の融合蛋白質発現ベクターを接種することによって抗体産生能を上げる方法。

報告書他

- 1) K. Ito, Y. Takeuchi, K. Ito, and S. Kato. Strain-dependent antibody response induced by DNA immunization. Immunol. Lett. 74: 245-250, 2000.

- 2) 伊藤巧一、加藤誠志. 遺伝子免疫による抗体作製「分子細胞生物学基礎実験法」南江堂、印刷中。

〔研究者名〕伊藤巧一、竹内康雄、長田直樹、藤村尚子、小林みどり、石塚芳子、三品史江

13. 2-ハイブリッド局在化法による蛋白質-蛋白質相互作用の検出

レポーター融合蛋白質の局在変化を指標として、蛋白質-蛋白質相互作用を検出する方法を開発した。

研究成果の概要

GFPのようなレポーターを融合した蛋白質と、局在化シグナルを融合した蛋白質を培養細胞内で同時発現させて、レポーター融合蛋白質の局在変化を指標として、両者の結合を検出するというシステムである(図1)。すでに結合することがわかっている Npw38 と NpwBP などを用いてモデル実験を行ったところ、このシステムがうまく働くことが分かった(図2)。そこで、この方法を2ハイブリッド局在化法と命名した。この方法により、蛋白質間相互作用を細胞内の環境下で迅速に検出することが出来る。また従来よく使われてきた酵母ツーハイブリッド系では困難であった、転写活性を有するもの同士の相互作用や、様々な局在パターンを有する蛋白質同士の相互作用の検出を行うことが出来る。

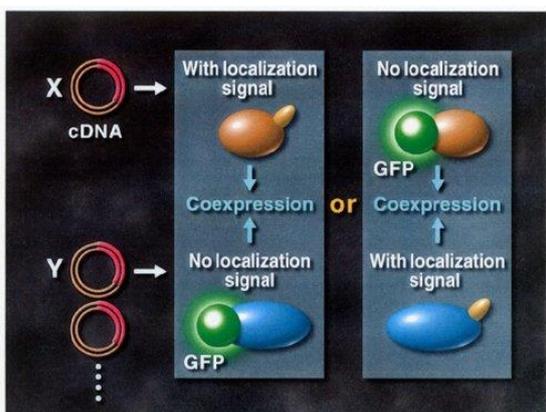


図1 2ハイブリッド局在化法のシステム

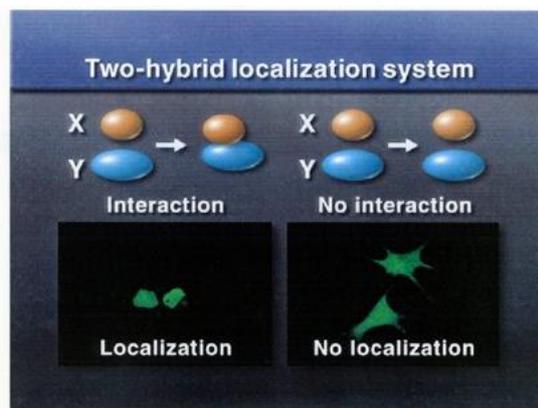


図2 蛋白質-蛋白質相互作用による局在変化

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 蛋白質-蛋白質相互作用の検出
- 2) 蛋白質相互作用阻害剤のスクリーニング

特許出願

- 1) 蛋白質-蛋白質相互作用検出法

特 願：2000-73095 (平成12年3月15日)

出 願人：科学技術振興事業団

請求の概要：局在化シグナルを有する蛋白質 X とレポーター機能を有する蛋白質 Y との真核細胞内における相互作用の検出方法。

報告書他 なし

〔研究者名〕江口睦志、長田直樹、藤村尚子、大竹美弥子