

## 事後評価報告書

1. 研究課題名：単一細胞における遺伝子の発現と転写産物の共局在の解析

2. 研究代表者名：

2-1. 日本側研究代表者：

林崎 良英 【(独)理化学研究所 横浜研究所 ゲノム科学総合研究センター  
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】

2-2. 相手国（スウェーデン）側研究代表者：

Ulf Landegren 【ウプサラ大学 遺伝・病理学部門 教授】

総合評価： 秀

3. 研究交流実施内容及び成果：

本プロジェクトでは、細胞内の生体分子や、分子間の相互作用を検出する **Proximity Study** の開発および、検出した結果の生物学的意義を検討した。RNA 結合活性を有するタンパク（**Dicer** など）を対象に **M2H 法（Mammalian two-hybrid 法）** により相互作用タンパクをスクリーニングした結果、数種のタンパクが候補としてあげられた（日本側）。タンパク相互作用を検出する **proximity study** を開発、改良し（日本側およびスウェーデン側）、上記の候補ペアの存在を確認した。これは、**Dicer** による新たな転写制御メカニズムを示唆している。

以下、日本とスウェーデンの研究分担に沿って、成果を報告する。

(1) **M2H**による **PP1** 相互作用ペアの検索（日本側）

日本側研究グループが有する完全長 **cDNA** クローン（ヒトおよびマウスのタンパク遺伝子 **21, 000**）および、独自に開発した **M2H**法により、**RNA** 結合タンパクと結合するタンパクをスクリーニングした。**Dicer** や **RNA** 結合タンパクなどの、**9**組の新規の相互作用が見出された。

(2) **Proximity Study** による相互作用検出技術の開発（主にスウェーデン側）

2つの分子が物理的に近接していることを検出する **proximity study** の開発および改良を行った。題材として **c-Myc** と **Max** タンパクの相互作用を用いた。相互作用がクリアなドット状の蛍光シグナルで検出できた。シグナルは細胞質全体に散在して観察され、**c-Myc** と **Max** タンパクが細胞質に存在することと符合する。**Proximity study** のシグナルにより相互作用が細胞内のどの領域で起こっているかを判断できることは非常に優れた点である。一方、検出手法の開発の過程で明らかになった課題としては、(1) 検出の可否は抗体のよしあしに依存する、(2) **S/N**比を高めるには抗体ごとに反応条件を設定する必要があることがある。これらの点はプローブと細胞標本のブロッキング試薬の検討、洗浄操作の温度

や洗浄溶液の検討、そして、これまでオリゴの連結反応操作ではオリゴの会合反応と連結反応を同時に行っていたがこれを分断して行うなどして、擬陽性の少ない条件を見出すことが出来た。今後も条件を最適化し汎用性を高めることは重要である。

(3) Dicer-タンパクの新規相互作用の proximity study による確認 (主に日本側)

理研 M2H 法により見出された RNA 結合性タンパク (Dicer) の新規相互作用を proximity study で確認することを試みた。qRT-PCR およびウェスタンブロッティングで両遺伝子が発現していることが確認できた Hela 細胞をもちいた。Proximity study においては、シグナルの増幅 (rolling circle 法) を行うために、非特異的なシグナルが得られ結果の解釈ができないことも観察された。さまざまな実験条件を検討することで、非特異的なシグナルを低減する重要なポイントは、もちいる抗体の特異性および抗体による検出条件であることが明らかになった。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 総合評価

今後更なる検討は必要であるが、タンパク相互作用を検出する Proximity study を日瑞共同で開発及び改良し、Dicer とタンパク質の相互作用の生理学的な意義を把握するとともに、RNA 結合性タンパクが有する新たな転写メカニズムの解明の可能性が得られた成果は大きい。報告書にはスウェーデン側の成果が記載されていないことから評価しにくい面はあるものの、これは日瑞双方の研究が協力的に、かつ相乗的に進められたことによる成果であると考えられる。

日本側研究者がスウェーデンを訪問し、中期的に滞在して実験研究に従事するなど、今後の人材育成やネットワーク強化にもつながったと考えられ、国際交流事業としては成功したと評価できる。

##### 4-2. 研究交流の有効性

スウェーデン側の研究成果について十分な記載がなく、評価できない面があるが、日本側の研究は進展していて申し分ないと考えられる。ただし、当初の計画にあった mRNA 相互作用に関する結果が報告されていないこと、研究期間中の学会・シンポジウムでの発表は多いが、原著論文は 2 報が準備中だけであることが残念である。

人材育成については、双方向による訪問は長期の滞在も含め十分に行われていて、若手研究者にとってよい経験になったと考えられ、今後の人材育成にはつながったと思われる。

本研究交流では日本側研究機関は、既にスウェーデンからのポスドクを採用しており、今後の研究交流の増加、持続的な発展の可能性は高いと考える。本事業に採択される以前より両国の研究室は既に良好な関係を築いていたが、本事業が更に有効に働いたとすれば、大いに評価できる。

#### 4-3. 当初目標の達成度

日本側は多くのファンドを獲得している研究機関であるために、豊富な人材を用意されており、また、スウェーデン側と非常に相補的な関係で実施体制が作られていることから適切であったと考える。

交流計画については、当初の計画からプロジェクト単独で行うワークショップ等の開催は、予定されていなかった。相互派遣による交流は計画通り達成されており、十分な交流がなされたと考える。