

# 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

## I 試験研究の全体計画

### 1. 研究の趣旨

ゲノム機能の解明と統合化は、医療・環境問題は言うに及ばず、物質・エネルギー生産、食糧等への貢献に向けた21世紀のバイオテクノロジーの最重要課題の一つである。その目的を達成するには、機能未知の遺伝子および遺伝子群の機能を一貫した手法で系統的かつ迅速に解析する手法が必要である。

本提案では、ネットワークを構成している遺伝子群を同定するために、cDNA ライブラリーからタンパク質-タンパク質相互作用やタンパク質-核酸相互作用を指標にして、大規模、迅速に *in vitro* でスクリーニングする新しい操作法を開発することを目的とする。この操作法は既存技術の効率化ではなく、我々が独自に開発を進めている新しい原理に基づく手法によって達成される。

その原理は、無細胞翻訳系において、ストップコドンで削除した mRNA を用いると、合成されるタンパク質の C 末端にピュロマイシン誘導体が効率よく取り込まれることに基づいている。この方法を用いると、*in vitro* で合成されるタンパク質の C 末端に mRNA や蛍光物質をピュロマイシンを介して、共有結合で連結させることが可能になる。ピュロマイシンの mRNA 誘導体を用いた場合には、“*in vitro virus*” と名付けられた対応付け分子が構築でき、それは遺伝子型(mRNA)と表現型(その mRNA の翻訳産物であるタンパク質)が一体化した分子で、タンパク質部分の相互作用(表現型)に基づくスクリーニングで得られる *in vitro virus* から、直ちにそれをコードする mRNA (遺伝子型)が同定できる仕組みになっている。この *in vitro virus* を用いるスクリーニング法は、タンパク質-タンパク質相互作用や核酸-タンパク質相互作用をしているタンパク質を、従来の手法では及ばないほど大規模、迅速、確実にすり上げ、検出することが可能である。

また、ピュロマイシンの蛍光物質誘導体を用いた場合には、タンパク質の C 末端を効率的に蛍光ラベル化できる。C 末端ラベル化は、タンパク質の立体構造や機能に影響を与えないので、相互作用の検定に威力を発揮する。この単一の原理に基づいて構築される *in vitro virus* と C 末端ラベル化タンパク質を用いれば、機能未知の遺伝子群の機能を一貫した手法で系統的かつ迅速に解析することが可能になる。さらに、C 末端ラベル化法と蛍光相関分光法(以下 FCS 法と略す)を組み合わせると、タンパク質-タンパク質相互作用や核酸-タンパク質相互作用などの分子間

相互作用を、従来の検出限界を越える高感度、高効率かつ細胞内と同じ均一溶媒中で検出することが可能になる。本手法はカタログ化された cDNA に対応するタンパク質の C 末端を無細胞翻訳系において温和な条件下でラベル化した後、FCS 法を用いて極微量の試料で、短時間で自動測定する高効率(High Throughput)の遺伝子ネットワークの解析手法である。

また、この基盤技術は、既にカタログ化されている大規模な cDNA 集団由来の遺伝子産物のラベル化および固定化(プロテインチップ化)にも適用可能である。将来的には、本格的な機能解析センターや、バイオベンチャーを含めたゲノム産業の育成、展開に多大な寄与をすると考えている。

### 2. 研究の内容及び目標

#### 1. *in vitro virus* を用いたゲノム機能解析法の開発

##### (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(㈱三菱化学生命科学研究所)

マウスやヒトの cDNA ライブラリーから機能未知遺伝子を *in vitro* でスクリーニングし、核酸-タンパク質相互作用およびタンパク質-タンパク質相互作用を微量かつ簡便に検出する基盤技術の開発に関する研究を行う。本課題の最終目標は、機能未知の遺伝子を迅速かつ確実にスクリーニングする手法の確立であり、3年後の中間達成目標は、*in vitro virus* を用いて、いくつかの機能既知および機能未知の遺伝子のネットワーク解析を行い、その最適条件を検討し、*in vitro virus* 法のネットワーク解析における有用性を検証することである。

##### (2) *in vitro virus* を用いたマウスポリコム遺伝子群の機能解析(早稲田大学教育学部)

マウスポリコム遺伝子 M33 のノックアウトマウスおよびそれから樹立した培養細胞を mRNA ディフェレンシャル・ディスプレイ法にかけ、M33 遺伝子の下流遺伝子候補群をクローン化する。これら遺伝子間およびこれらと他の遺伝子との相互作用を *in vitro virus* 法を用いて解析する。さらに各遺伝子産物を精製し、たんぱく質分子間の相互作用をプル・ダウン法、高感度分子間相互作用検出装置を用いて調べ、遺伝子ネットワーク像を明らかにする。3年後の中間達成目標は、M33 遺伝子の下流遺伝子群を明らかにし、これら遺伝子間、および他の遺伝子との相互作用の実態を *in vitro virus* を用いて明らかにすることである。

##### (3) *in vitro virus* を用いた *jumonji* 遺伝子の分子カスケード解析(㈱三菱化学生命科学研究所)

*jmj* 遺伝子の生体内での機能の理解のため、*in vitro* virus 法を用い、*jmj* 遺伝子産物と結合するタンパク質の同定と遺伝子カスケードの解明をめざすと同時に *in vitro* virus 法の未知結合タンパク質の同定への有用性を検証する。3年後の中間達成目標は、*in vitro* virus 法を用い、*jumonji* 遺伝子周辺の遺伝子カスケードとタンパク質相互作用を明らかにし、*in vitro* virus 法のネットワーク解析における有用性を検証することである。

2. タンパク質のC末端ラベル化手法と蛍光相関分光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

(1) タンパク質の高効率C末端ラベル化手法の開発 (株三菱化学生命科学研究所)

タンパク質のC末端をピューロマイシンに蛍光色素を化学結合させた分子 (蛍光ラベル化合物) や種々の機能性化合物を化学結合させた分子 (たとえばビオチン) で効率的にラベル化する方法の開発を行う。3年後の中間達成目標は、効率的である、簡便である、経済的である、ラベル化されたタンパク質の機能を損なわない、などの条件を満たした小麦胚芽無細胞抽出液を用いた cDNA 由来のタンパク質のC末端ラベル化法の確立である

(2) 高効率コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システム開発 (愛媛大学工学部)

高効率無細胞タンパク質合成システムの開発は、本研究課題の基盤となる要素技術のひとつである。そこで、まず、3年後の無細胞系開発の達成目標を、1) 高分子量タンパク質合成能を保持した高翻訳効率化、2) 機能性の付与と安定化、3) 簡便性の3点に焦点を絞って研究を推進する。このため、研究課題として、「高効率コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システム開発の研究」を設定し、次の両面から研究を遂行する。(1)高翻訳活性胚芽抽出液の調製とタンパク質合成反応液のキット化、(2)高鑄型活性 mRNA 合成用の汎用性プラスミドの開発。

(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)

極微量領域からの蛍光発光をとらえる手法を利用して、大規模未知遺伝子翻訳産物を対象とした分子間相互作用解析システム (蛍光相関分光法) の開発を行う。蛍光相関分光装置は測定試料を細胞の環境と同じく、均一溶液系で想定できることや、微量試料を用いることから、大規模試料集団に対して、経済的にも非常に有利な手法である。この手法を用いて、微量試料で大多数のサンプルを対象とした自動化システムを構築する。まず、96もしくは384マイクロプレートを利用したプロトタイプの試作器を作り、測定上の、問題点を明確にする事を計画している。最終達成目標は、データ解析までのすべての過程を自動化した分子間相互作用システムを構築し、これまでになかった新たな概念の高効率遺伝子スクリーニング法を確立する。

### 3. 年次計画

本プロジェクトでは、ネットワークを構成している遺伝子群を同定するために、cDNA ライブラリーからタンパク質-タンパク質相互作用やタンパク質-核酸相互作用を指標にして、大規模、迅速に *in vitro* でスクリーニングする新しい操作法を開発することを目標とする。

第I期では、*in vitro* virus 法とC末端ラベル化法を用いて、いくつかの機能既知および機能未知の遺伝子のネットワーク解析を行い、その最適条件を検討し、ネットワーク解析における有用性を検証することである。

第II期では、*in vitro* virus 法によりカタログ化された、あるいは既にカタログ化された cDNA 大規模遺伝子集団の翻訳産物をC末端ラベル化し、すべての過程を自動化した分子間相互作用解析システムを蛍光相関法を中心に構築し、これまでになかった新たな概念の高効率 (High Throughput) 遺伝子機能スクリーニング法を確立することである。

研究項目	11年度	12年度	13年度	14年度	15年度
1. <i>in vitro</i> virusを用いたゲノム機能解析法の開発 (1) <i>in vitro</i> 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 (2) <i>in vitro</i> virusを用いたマウスポリコム遺伝子群の機能解析 (3) <i>in vitro</i> virusを用いた <i>jumonji</i> 遺伝子の分子カスケード解析	cDNAライブラリーとスクリーニング手法の開発	最適, 簡便, 迅速化	機能既知, 機能未知遺伝子への適用		
	M33の下流遺伝子群の探索	各遺伝子の構造, 発現解析	各遺伝子間の相互作用	遺伝子ネットワークの解明	
	<i>jmj</i> タンパク質の探索	下流因子とその結合タンパク質の探索	上流因子の探索		
2. タンパク質のC末端ラベル化手法と蛍光相関分光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 (1) タンパク質の高効率C末端ラベル化手法の開発 (2) 高効率コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システム開発 (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	C末端の効率的ラベル化	蛍光相関法を用いた相互作用の検出	プロテインチップ化と相互作用の検出		
	簡便な合成キットの開発	全自動無細胞タンパク質合成システムの構築	全自動無細胞タンパク質合成システムによるタンパク質ライブラリーの作製		
	384ウェル対応FCS測定装置の開発	2波長励起FCS装置の開発	プロテインチップ化によるFCS測定法の開発		
所要経費(合計)	208百万円				

#### 4. 平成11年度における実施内容と達成目標

##### 1. *in vitro* virusを用いたゲノム機能解析法の開発

(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 (㈱三菱化学生命科学研究所)

*in vitro* virus法を用いて, 機能既知および機能未知の遺伝子のネットワーク解析を行い, その最適条件を検討し, *in vitro* virus法のネットワーク解析における有用性を検証するため, マウスポリコム遺伝子群と *jumonji* 遺伝子群の機能解析を行う。

(2) *in vitro* virusを用いたマウスポリコム遺伝子群の機能解析 (早稲田大学教育学部)

マウスポリコム遺伝子群の機能を明らかにするために, M33とその下流遺伝子候補群との相互作用を *in vitro* virus法を用いて解析する。さらに各遺伝子産物を精製し, タンパク質分子間の相互作用を高感度分子間相互作用検出

装置を用いて調べ, 遺伝子ネットワーク像を明らかにする。

(3) *in vitro* virusを用いた *jumonji* 遺伝子の分子カスケード解析 (㈱三菱化学生命科学研究所)

*jmj* 遺伝子の生体内での機能の理解のため, *in vitro* virus法を用い, *jmj* 遺伝子産物と結合するタンパク質の同定と遺伝子カスケードの解明をめざすと同時に *in vitro* virus法の未知結合タンパク質の同定への有用性を検証する。

2. タンパク質のC末端ラベル化手法と蛍光相関分光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

(1) タンパク質の高効率C末端ラベル化手法の開発 (㈱三菱化学生命科学研究所)

タンパク質のC末端を効率的にラベル化する方法を開発するために, 種々の条件検討を行う。また, ラベル化タンパク質の相互作用を蛍光相関分光法を用いて検出する。また, タンパク質の固定化(プロテインチップ化)について

も検討する。

(2) 高効率コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システム開発  
(愛媛大学工学部)

簡便な高効率無細胞タンパク質合成システムの開発を目標に、高鋳型活性 mRNA 合成用の汎用プラスミドのさらなる改良を行い、簡便なコムギ胚芽無細胞タンパク質合成キットの開発を行う。

(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）

微量試料で大多数のサンプルを対象とした自動化システムを開発することを目標に研究を行う。まず、96 もしくは 384 マイクロプレートを利用したプロトタイプを試作器を作り、種々の条件で測定実績を積み上げ、測定上の問題点を明確にする。また、プロテインチップ化による蛍光相関分光法の開発も行う。

II 平成11年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
1. <i>in vitro</i> virus を用いたゲノム機能解析法の開発		
(1) <i>in vitro</i> 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	(株)三菱化学生命科学研究所	柳川弘志
(2) <i>in vitro</i> virus を用いたマウスポリコーン遺伝子群の機能解析	(株)三菱化学生命科学研究所 早稲田大学教育学部	柳川弘志 東中川徹
(3) <i>in vitro</i> virus を用いた <i>jumonji</i> 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	竹内隆
2. タンパク質のC末端ラベル化手法と蛍光相関分光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		
(1) タンパク質の高効率C末端ラベル化手法の開発	(株)三菱化学生命科学研究所	柳川弘志
(2) 高効率コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システム開発	(株)三菱化学生命科学研究所 愛媛大学工学部	柳川弘志 遠藤弥重太
(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	(株)三菱化学生命科学研究所 北海道大学電子科学研究所	柳川弘志 金城政孝
3. 研究運営	(株)三菱化学生命科学研究所 (中核機関)	柳川弘志

### Ⅲ 研究推進委員会

委 員	所	属
[プロジェクト内委員]		
○柳 川 弘 志	(株)三菱化学生命科学研究所	ゲノム機能工学研究室 室長
板 谷 光 泰	(株)三菱化学生命科学研究所	ゲノム機能工学研究室 主任研究員
竹 内 隆	(株)三菱化学生命科学研究所	先端研究部門 主任研究員
東 中 川 徹	早稲田大学 教育学部生物学教室	分子遺伝学研究室 教授
金 城 政 孝	北海道大学 電子科学研究所	電子機能素子部門 助教授
遠 藤 弥 重 太	愛媛大学 工学部応用化学科	応用生物化学研究室 教授
[プロジェクト外委員]		
榊 桂 之	東京大学 医科学研究所	教授
水 野 猛	名古屋大学 大学院生命農学研究科	教授
宮 川 厚 夫	浜松フォトニクス(株)	システム事業部部長
西 沢 正 文	慶応大学 医学部	講師

(注：○は研究推進委員長)

### Ⅳ 研究連絡会議

委 員	所	属
柳 川 弘 志	(株)三菱化学生命科学研究所	ゲノム機能工学研究室長
板 谷 光 泰	(株)三菱化学生命科学研究所	ゲノム機能工学研究室主任研究員
竹 内 隆	(株)三菱化学生命科学研究所	先端部門主任研究員
東中川 徹	早稲田大学 教育学部生物学教室	分子遺伝学研究室教授
金 城 政 孝	北海道大学 電子科学研究所	電子機能素子部門助教授
遠 藤 弥 重 太	愛媛大学 工学部応用化学科	応用生物化学研究室教授
澤 崎 達 也	愛媛大学 工学部応用化学科	応用生物化学研究室助手
根 本 直 人	(株)三菱化学生命科学研究所	ゲノム機能工学研究室特別研究員
土 居 信 秀	(株)三菱化学生命科学研究所	ゲノム機能工学研究室特別研究員
柘 植 謙 爾	(株)三菱化学生命科学研究所	ゲノム機能工学研究室特別研究員
小 川 洋 子	(株)三菱化学生命科学研究所	ゲノム機能工学研究室研究補佐職
藤 田 京 子	(株)三菱化学生命科学研究所	ゲノム機能工学研究室研究補佐職