

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末端にピュー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や蛍光物質をピュー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。ピューロマイシンの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、ピュー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。

第I期の目標は、タンパク質に情報タグ(mRNA)をつける技術とそれを用いた相互作用スクリーニング法の開発、タンパク質に蛍光ラベルをつける技術の開発、無細胞系でタンパク質を大量に合成する技術の開発と蛍光を用いて相互作用を高感度、高効率で検出する技術の開発の各技術の最適化及び簡便化と遺伝子ネットワーク解析における有用性の検証であり、第II期の目標は、上記各技術を組み合わせた高効率遺伝子ネットワーク解析技術の確立である。

2. 研究概要

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(慶應義塾大学理工学部)

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、タンパク質-タンパク質相互作用およびタンパク質-核酸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、タンパク質分子間の相互作用をプル・ダウン法や FCS 法を用いて調べ、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 法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(株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。

(4) タンパク質-ゲノム DNA 相互作用解析手法の開発(株三菱化学生命科学研究所)

イントロンを含む巨大なゲノム遺伝子の機能解析は、最終的には個別の遺伝子の適切な変異体の作製とその遺伝子発現の解析手段に依存する。そのために、このプロセスを一貫した手法で系統的かつ迅速に解析する手法の開発を目指す。ゲノム遺伝子はそのサイズが百 kb を越えることがしばしばある。目的とする巨大 DNA だけを直接クローニングしたり、希望する遺伝子変異体に改変する操作法の開発を行う。3年後の中間達成目標は重要な遺伝子発現の制御領域の解析のための長大な DNA 領域の自由な取り扱いと、迅速なスクリーニング手法の確立である。

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(慶應義塾大学理工学部)

タンパク質の C 末端をピュエ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、先ず、

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点に焦点を絞り研究を推進する。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を試作器を作り、測定上の、問題点を明確にする事を計画している。3年後の中間達成目標は、FCSを用いたC末端蛍光ラベル化タンパク質間の相互作用検定の基本手法の確立である。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 FCS を用いた分子間相互作用システムを構築し、これまでにない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分光法(FCS法)を中心に構築し、これまでにない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. 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	in vitro virusを用いたスクリーニング手法の最適, 簡便, 迅速化				
(2) in vitro virusを用いたマウスポリコム遺伝子群の機能解析	in vitro virus法の機能既知, 機能未知遺伝子への適用				
(3) in vitro virusを用いた jumonji 遺伝子の分子カスケード解析	M33の下流遺伝子群の探索				
(4) タンパク質-ゲノムDNA相互作用解析手法の開発	各遺伝子の構造, 発現解析				
2. タンパク質のC末端ラベル化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	in vitro virus法による各遺伝子間の相互作用解析				
(1) タンパク質の高効率C末端ラベル化手法の開発	jnj タンパク質の探索				
(2) 高効率コム胚芽無細胞タンパク質合成システム開発	下流因子及び上流因子と結合するタンパク質の探索				
(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	巨大DNAの迅速なクローニング法の開発				
	in vitro virusを用いたゲノム上の制御領域の探索				
	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SFCS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	188百万円			

4. 平成12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 (慶應義塾大学理工学部)

In vitro virusを構築するための2つの方法, すなわちピューロマイシン連結法ならびに前年度新たに開発したSTABLE法について, それらの簡便, 迅速, 効率化を図る。In vitro virusを用いたスクリーニング法を検証するためのモデル系として, マウス由来がん遺伝子産物であるc-Fosとc-Junとの間のタンパク質間相互作用を利用する。具体的には, 大量合成したc-Fosをおとり(Bait)として樹脂に固定し, マウスcDNAライブラリーを提示したIn vitro virusライブラリーの中から, c-Junとその遺伝子が結合した対応付け分子がin vitroでスクリーニングされることを確認する。機能未知の遺伝子をcDNA

からスクリーニングするための準備段階として, マウスポリコム遺伝子群に属するM33や, jumonjiタンパク質など, おとり(Bait)とするタンパク質の大量合成系の構築を行う。精製したタンパク質の機能・構造を円二色分散計(CD)等を用いて確認する。

(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より樹立した培養細胞よりmRNAを抽出し, mRNAディフェレンシャル・ディスプレイ法を用いてM33の遺伝子の下流遺伝子候補群を選別する。得られた下流遺伝子群のメンバーについて塩基配列決定, 未知, 既知の同定を行い, in vitro virus法やSTABLE法への応用を図る。M33下流遺伝子のcDNAあるいはその改良型DNAをマウス胚, または培養細胞に顕微注入し, 発現を

検出する。

(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)

培養細胞系で jmj タンパク質もしくは欠失体を発現させ、jmj タンパク質の各領域の機能 (細胞増殖, 核局在, タンパク質結合性) およびタンパク質修飾性を検討する。培養細胞系およびマウス変異体を用いて下流因子の同定をめざす。このため, 細胞増殖に関与する分子等に注目し, その発現変動を検討する。上記の結果を参考に jmj タンパク質と結合するタンパク質の同定をめざす。そのため, 培養細胞およびマウス組織を用いて免疫沈降法, in vitro virus 法, STABLE 法等で結合タンパク質を探索する。

(4) タンパク質-ゲノム DNA 相互作用解析手法の開発 (㈱三菱化学生命科学研究所)

これまでの成果を踏まえ, マウスポリコム遺伝子群の遺伝子 M33 を枯草菌ゲノムベクターに組み込むことを試みる。M33 は cDNA しか得られていないので, BAC クローンを入手する。組み込んだ遺伝子の upstream 部分を枯草菌ゲノムベクターに 1.0 kb 単位で延長する手法を試みる。延長した DNA を回収して, In vitro virus 法で作製されるマウス cDNA ライブラリーから, M33 遺伝子の upstream 領域と相互作用するタンパク質をスクリーニングする。

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 (慶應義塾大学理工学部)

小麦胚芽抽出液を用いた無細胞翻訳系において, 全長タンパク質を効率的に蛍光ラベル化するための諸条件, たとえば, 高誘活性 mRNA 合成用の汎用プラスミドの構築, ラベル化の反応条件, 最適な蛍光物質の構造探索等の検討を行う。蛍光ラベル化した後の蛍光ラベル化タンパク質の精製条件の検討を行う。マウス由来がん遺伝子産物の c-Fos と c-Jun およびショウジョウバエ由来の Ras と Canoe タンパク質の C 末端を発光波長の異なる二つの蛍光物質, たとえば, ローダミングリーンと Cy5 でそれぞれラベル化し, 蛍光相互相関分光法 (Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy, FCCS 法)によりタンパク質-タンパク質相互作用を検定し, 相互作用および測定の際の諸条件について

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)

これまでの成果を踏まえ, 更なる高翻訳活性・安定性を有するコムギ胚芽抽出液の調製方法を開発するとともに, キット化に向けて, 系の安定性・保存性に関する基盤技術を確認することを目標とする。新たに開発したコムギ胚芽無細胞系を用いて, 高誘活性 mRNA 合成用の汎用性プラスミドを構築する。翻訳開始活性に関与する 5' 非翻訳塩基配列および安定性に関する 3' 非翻訳塩基配列はポリソームデディスプレイ法によってそれらの配列を創製する。新たに開発した高効率のコムギ胚芽無細胞系の in vitro virus 法, STABLE 法, C 末端ラベル化法への適用を図る。

(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)

FCS 測定は分子量の変化に鈍感である欠点はあるものの, 蛍光修飾が一カ所でよい利点がある。そのため, 前年度の成果をふまえ, 分子量変化が少ないときのタンパク質-タンパク質相互作用を検出するための, 主として, タグ抗体, アビジン-ビオチンシステムの測定を確立し, 他のタンパク質検出系への応用を計る。蛍光相互相関分光法 (FCCS) 測定のためには, 2 種類の蛍光色素でそれぞれ別のタンパク質をラベルする必要がある。タンパク質間相互作用の検出のためには, そのラベル蛍光色素が分子間相互作用に影響を及ぼさないことが重要である。そのため, 種々の蛍光ピューロマイシン誘導体を合成し, その C 末端取り込み効率や測定に及ぼす影響などを検討する。FCCS 測定の効率は蛍光色素の種類や, ラベル化法などの生化学的な手法の改善の他, レーザー励起光源, 蛍光発光を効率よく集めるための対物レンズや, 蛍光を検出器へ導くための光学フィルターやダイクロイックミラーなどのハードウェアの性能にも依存する。このため生化学的な手法と密接に連携して, 光学的な装置の改良を行う。特に, 現行の FCS 装置を利用して, 新たにレーザー, 並びに検出系を組み合わせ, 2 波長励起・検出システムとして試作する。大規模な試料集団を対象として, 96 ウェル, 並びに 384 ウェルのシステムを構築した。この装置を利用して, 自動的なデータ転送や解析システムの確立を図る。

II 平成12年度における実施体制

研 究 項 目	担 当 機 関	研究担当者
「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」		
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	慶應義塾大学工学部	柳 川 弘 志
(2) In vitro virus を用いたマウスポリコーン遺伝子群の機能解析	慶應義塾大学工学部 早稲田大学教育学部	柳 川 弘 志 東 中 川 徹
(3) In vitro virus を用いた jumonji 遺伝子の分子カスケード解析	慶應義塾大学工学部 (株)三菱化学学生命科学研究所	柳 川 弘 志 竹 内 隆
(4) タンパク質-ゲノム DNA 相互作用解析手法の開発	慶應義塾大学工学部 (株)三菱化学学生命科学研究所	柳 川 弘 志 板 谷 光 泰
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	慶應義塾大学工学部	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	慶應義塾大学工学部 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	慶應義塾大学工学部 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	慶應義塾大学工学部	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	慶應義塾大学 工学部応用化学科生命分子工学研究室教授
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
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
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
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
[プロジェクト外委員]	
榊 桂 之	東京大学 医科学研究所教授
西 沢 正 文	慶應義塾大学 医学部講師
水 野 猛	名古屋大学 大学院生命農学研究科教授
宮 川 厚 夫	浜松ホトニクス(株) システム事業部部長

(注：○は研究推進委員長)

IV 研究連絡会議

委 員	所 属
板 谷 光 泰	㈱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
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
小 川 洋 子	㈱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
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
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
高 嶋 秀 昭	㈱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	㈱三菱化学 生命科学研究所先端部門主任研究員
土 居 信 秀	慶應義塾大学 理工学部応用化学科生命分子工学研究室助手
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
柳 川 弘 志	慶應義塾大学 理工学部応用化学科生命分子工学研究室教授