

# 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

研究代表者：柳川 弘志（慶應義塾大学理工学部生命情報  
学科）

## 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的とする。この操作法は、遺伝子型と表現型の二つの新しい対応付け分子を用いて達成される。一つの対応付け分子は、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) がピューロマイシンを介して化学結合により一体化した分子 (*in vitro* virus) である。もう一つの対応付け分子は、遺伝子型 (DNA) と表現型 (その DNA の翻訳産物であるタンパク質) がストレプトアビジン・ビオチンの安定な結合を介して連結した分子 (STABLE 法) である。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対応付け分子から、直ちにそれをコードする遺伝子型である mRNA や DNA の配列が同定できる仕組みになっている。この *in vitro* virus 法や STABLE 法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ハイスループットにつり上げ、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互相関分光法 (以下 FCCS 法と略す) やマイクロアレイ法を組み合わせると、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、FCCS 法やマイクロアレイ法を用いて極微量の試料で、短時間で自動測定するハイスループットの遺伝子ネットワークの解析手法である。

### 2. 研究の内容及び目標

1. *In vitro* virus 法と STABLE 法を用いたゲノム機能解析法の開発

(1) *In vitro* virus 法と STABLE 法によるタンパク質相互作用のハイスループット・スクリーニング (慶應義塾大学理工学部)

*In vitro* virus を用いて、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、タンパク質間相互作用および核酸-タンパク質作用をハイスループットに検出する遺伝子ネットワーク解析システムを完成させていく。

第 I 期では、(1)*In vitro* virus をより安定で効率よく形成する方法を確立し、(2)*In vitro* virus の無細胞共翻訳スクリーニング法 (2 種類のタンパク質間相互作用解析法: PF/FF 法と核酸-タンパク質間相互作用解析法: DF 法) による効率的な機能既知遺伝子の濃縮方法および RT-PCR による検出方法の基盤となる技術を開発し、さらに、(3)*In vitro* virus 用の mouse testis cDNA ライブラリーを作成した。

第 II 期では、(1)*In vitro* virus の共翻訳スクリーニング法および cDNA ライブラリーのファインチューニングによる機能未知遺伝子の濃縮方法の確立、(2)ライブラリーからのハイスループットで網羅的な解析のためのシステムの設計と試作、(3)濃縮ライブラリーの効率的なネットワーク解析技術の開発などを Fos, Jun, p53 などの癌遺伝子をプロトタイプとして進める。また、本システムの応用として、(4)DF スクリーニング法による細胞増殖を制御する転写調節因子である *jumonji* 遺伝子のネットワーク解析についても展開していく。

STABLE 法では、タンパク質とそれをコードする DNA との対応付け分子を構築することができる。第 I 期において、STABLE 法による cDNA ライブラリーのスクリーニングのための基礎的条件をほぼ確立することができたので、第 II 期では、実際に、ポリコム遺伝子群 (Bmi1, M33 など)、細胞周期遺伝子群 (Cdc2, CyclinB など)、細胞増

殖・分化の制御遺伝子群 (Ras, Raf など), 第2メッセンジャーのカルモジュリンなどの遺伝子群のタンパク質相互作用を, cDNA ライブラリーからハイスループットにスクリーニングし, それらのネットワーク解析システムを確立すると共に, それらのタンパク質と相互作用する新規タンパク質を同定し, *in vitro* および *in vivo* で解析することも目指す。

(2) ポリコム遺伝子群とこれら遺伝子群の標的遺伝子群の探索 (早稲田大学教育学部)

発生や分化において, 「細胞メモリー」の実体をなす「遺伝子発現状態の維持」に機能すると考えられているポリコム遺伝子群が最近注目を集めている。我々は, 第I期において, マウスポリコム相同遺伝子群に焦点を絞って研究を進めてきた。第II期においては, 発生遺伝学的解析において数々の有利な点を有する小型魚類 (ゼブラフィッシュ, メダカ) に研究を拡張し, 本遺伝子群の発生・分化における機能について総合的理解を図ることを全体的目標とする。すでに, これら小型魚類においてもいくつかのポリコム相同遺伝子の存在を認めている。第II期においては, 遺伝子探索を *in vitro* virus 法等の手法を駆使して包括的に進めるとともに, 抗体作製, Morpholino アンチセンスオリゴの注入, 遺伝子ターゲティング, 細胞再構成系の構築などを通じて機能解明を図る。

(3) *jumonji* 遺伝子が関与する遺伝子ネットワークの解明 (㈱三菱化学生命科学研究所)

発生過程において細胞の増殖は時空間プログラムにより精緻に制御されるが, その機構や分子ネットワークのほとんどが不明である。我々は第I期の研究により *jumonji* (*jmj*) 遺伝子がこの細胞増殖を制御する転写調節遺伝子の一つで cyclin D 遺伝子の発現を制御することを示した。しかし, その詳細な分子ネットワークや上流カスケードは未だ不明である。また, マウスの遺伝学的解析から *jmj* 遺伝子と同等の機能をもつ遺伝子の存在が示されているがその本体, 分子ネットワークは明らかではない。

第II期の研究では, 発生過程における細胞増殖の制御プログラムの分子理解のため, *in vitro* virus 法等を用いて *jmj* 遺伝子および同機能遺伝子の分子ネットワークを詳細に解明することを目指す。

(4) ゲノム遺伝子を迅速に操作する手法の開発 (㈱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を, 一貫した手法で系統的かつ迅速に解析できる手法が必要である。枯草菌ゲノムベクターに 100kb を越すマウスのゲノム DNA を確実に組み込み, 巨大 DNA を目的に会わせて加工, 操作する技術をハイスループット化するのが目標である。

2. タンパク質の C 末端ラベル化手法と蛍光相互相関分光法やマイクロアレイ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) C 末端ラベル化法によるタンパク質相互作用のハイスループット・スクリーニング (慶応義塾大学理工学部)

ピュロマイシン誘導体を用いた C 末端ラベル化法では, cDNA 翻訳産物を C 末端特異的に, 簡便に, 1 分子標識することが可能である。第I期において, 高効率な C 末端ラベル化法を確立し, この方法で蛍光標識された相互作用既知のタンパク質を用いて蛍光相互相関分光法やマイクロアレイ法による相互作用の検出が可能であることを証明した。第II期においては, *in vitro* virus 法および STABLE 法でカタログ化された, あるいは既存のカタログ化された cDNA の大規模遺伝子集団の翻訳産物を C 末端ラベル化し, マイクロアレイ法および蛍光相互相関分光法によりタンパク質相互作用をハイスループットで解析する自動化システムを構築することを目指す。

(2) ハイスループット小麦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)

第I期の研究において, 以下のような計画通りの大きな成果を得ることができた。すなわち, (1)高翻訳活性, 安定性を有する小麦胚芽抽出液の調製方法を開発, (2)高鋳型活性 mRNA 合成用プラスミドの構築, PCR 法を利用する効率的かつ簡便な転写鋳型構築法の開発, (3)これらの要素技術を総合した, 小麦胚芽を用いたハイスループット無細胞系タンパク質合成法の完成, 等である。

第II期の研究では, 第I期の成果を基盤として, (1)無半透膜方式連続無細胞タンパク質合成反応法の開発, (2)全自動無細胞タンパク質合成ロボットの試作, (3)動物および植物の cDNA ライブラリーから, それぞれのタンパク質カタログの作成技術の開発, (4)生理機能解明を目指した無細胞合成遺伝子情報産物 (タンパク質) のハイスループット機能解析法の開発を目指す。

(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)

未知のタンパク質-タンパク質間の相互作用は, 蛍光相関分光法 (FCS) においては, 分子量変化で検出可能であるが, しかし感度が低い。タンパク質-タンパク質相互作用は, 蛍光相互相関分光法 (FCCS) を用いると, 高感度かつ高効率で測定可能であることがわかった。このため第II期は FCCS の装置の開発に重点を置き, 装置全体の感度の上昇と操作性の改良など, 下の点に重点を置き研究開発を行う。具体的には, 自動焦点機構をもつ, すなわち, 試料のスポットに対して顕微鏡の視野を自動に操作し最適な場所にフォーカスを合わせることで自動焦点装置を開発する。ハイスループット化に向け, 一度に測定準備ができる試料の数を 1536 試料を目標とし, そのための自動ステージ駆動型の装置を開発する。また, 現在は研究者が測定結果 (データ) を実際に解析ソフトに入力し, キーボード上の操作を通して結果を出しているが, 多数の試料を解析するために, この操作の自動化も図る。

3. 年次計画（年次計画表は別紙参照）

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 STABLE 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、遺伝子ネットワーク解析のための要素技術の開発を行っ

た。

第Ⅱ期では、*in vitro* virus 法と STABLE 法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自動化を図る。また、*in vitro* virus 法と STABLE 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互相関分光法（FCCS 法）とマイクロアレイ法を中心に構築し、これまででない新たな概念のハイスループットの遺伝子機能スクリーニング法を確立する。

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	← <i>in vitro</i> virus 法と STABLE 法を用いたスクリーニング手法の確立 →				
	← <i>in vitro</i> virus 法と STABLE 法の機能既知、機能未知遺伝子への適用 →				
	← <i>in vitro</i> virus 法と STABLE 法を用いたスクリーニング手法の HTP 化 →				
(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	← M33 の下流遺伝子群の探索 →				
	← 各遺伝子の構造、発現解析 →				
	← <i>in vitro</i> virus 法による各遺伝子間の相互作用解析 →				
(3) <i>in vitro</i> virus を用いた jumonji 遺伝子の分子カスケード解析	← <i>jmj</i> タンパク質の探索 →				
	← <i>jmj</i> 遺伝子の上流、下流カスケードの探索 →				
(4) ゲノム遺伝子を迅速に操作する手法の開発	← ゲノム遺伝子を迅速に操作する手法の開発 →				
2. タンパク質の C 末端ラベル化手法と蛍光相関分光法やマイクロアレイ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 末端ラベル化手法と分子間相互作用検出システムの開発	← 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システムの確立 →				
	← マイクロアレイ法を用いた相互作用の検出システムの確立 →				
	← 相互作用検出システムの HTP 化 →				
(2) ハイスループット小麦胚芽無細胞タンパク質合成システム開発	← 簡便な合成キットの開発 →				
	← 全自動無細胞タンパク質合成ロボットの試作 →				
	← ハイスループット小麦胚芽無細胞タンパク質合成システムの開発 →				
(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	← 384 ウェル対応 FCCS 測定装置の開発 →				
	← 蛍光相互相関分光装置の開発 →				
	← 蛍光相互相関分光法を用いた相互作用検出システムの HTP 化 →				
所要経費（合計）	208 百万円	188 百万円	198 百万円	238 百万円	

#### 4. 平成14年度における実施内容と達成目標

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

(1) *In vitro* virus法とSTABLE法によるタンパク質相互作用のハイスループット・スクリーニング（慶応義塾大学理工学部）

1) *In vitro* virusの共翻訳スクリーニング法およびcDNAライブラリーのファインチューニングによる機能未知遺伝子の濃縮方法の確立：ハイスループットなシステムを構築する上でのキー技術となる共翻訳スクリーニング法において、RT-PCR時のベイトタンパク質鑄型の非特異的増幅によるライブラリー濃縮阻害の問題を、ベイトタンパク質鑄型構成の改良およびスクリーニング後（RT-PCR直前）のベイトタンパク質鑄型の除去などで解決する。また、作成したmouse testis cDNAライブラリーの質向上検討として、スクリーニング時に非特異的にビーズを占有する対応付け分子を形成しない鑄型を除去するために、対応付け分子を作る鑄型を濃縮したライブラリーの作成を検討する。

2) ライブラリーからのハイスループットで網羅的な解析のためのシステムの設計と試作：ハイスループット化に適したFFおよびDFスクリーニング法を完成し、FFおよびDF法を軸としたハイスループットな解析システム構築を試みる。ここでは、DNAチップの利用などによるクローニングとシーケンス工程の簡略化も試みる。また、現在の機能ドメイン領域のみのベイトを完全長あるいは複合ベイトとすることにより、網羅的解析が実現できる条件を検討する。

3) 濃縮ライブラリーの効率的なネットワーク解析技術の開発：C末端ラベル化法によるFCCS解析法やDNA／プロテインチップ解析法の開発と並行して、より*in vitro* virusシステムのハイスループット化を目的として、*in vitro* virusの構成そのままを解析に利用可能な*in vitro* virus同士の相互作用を利用したFCCS解析法や、DNA／プロテインチップ解析法の開発を検討する。基本技術が固まり次第、実際に濃縮ライブラリーに適用出来ることを確認していく。

4) DFスクリーニング法による*jumonji*遺伝子の遺伝子ネットワーク解析：ハイスループット化が期待出来るDFスクリーニング法（この方法はまた、転写制御因子の領域を決定するゲルシフト法よりも高感度解析・並行解析も期待できる）を利用して、mouse testis cDNAライブラリーからの*jumonji*遺伝子を中心とした遺伝子ネットワーク解析を行う。

ための条件検討を行う。また、現在クローニングの際には大腸菌を利用しているが、自動化・効率化のためには全ての行程を*in vitro*で行うことが望ましいので、1分子PCR法などを利用した新しい*in vitro*クローニング法の開発を試みる。

6) STABLE法による新規相互作用の探索：Bmi1-M33, Cdc2-CyclinB, Ras-Raf, カルモジュリンなどをベイトタンパク質として、それらのタンパク質と相互作用する新規タンパク質をcDNAライブラリーからスクリーニングし、得られたタンパク質との相互作用を*in vitro*および*in vivo*で解析する。

(3) ポリコム遺伝子群とこれら遺伝子群の標的遺伝子群の探索（早稲田大学教育学部）

マウスポリコム相同遺伝子については、第I期において得たM33遺伝子の下流遺伝子候補についてM33遺伝子との関連を追究する。小型魚類のポリコム相同遺伝子群については、*in vitro* virus法を初めとする種々の手法を用いて遺伝子群メンバーの分離を先ず行う。得られた各メンバーについては、構造、発現パターン等の基本的性状を記述する。同時に、高効率*in vitro*タンパク質合成系（PROTEIOS）により遺伝子産物を多量に調製し、抗体調製に供するとともに、プル・ダウン法、高感度分子間相互作用検出装置を用いてタンパク質間の相互作用を解析する。同時に、平成14、15年度において展開を図る、Morpholinoアンチセンスオリゴによるノック・ダウン実験、遺伝子ターゲティングに対する試行、準備を行う。

平成15年度以降に、真に本遺伝子群の機能解明が円滑に進行するために、平成14年度において上記の研究が必須であり、その達成を平成14年度の目標とする。

(4) *jumonji*遺伝子が関与する遺伝子ネットワークの解明（㈱三菱化学生命科学研究所）

1) *jmj*蛋白複合体の探索：*jmj*蛋白は転写調節因子として複合体を形成していると考えられる。当該年度では*in vitro* virus法、two hybrid法等を用いてスクリーニングし、この複合体を構成する分子候補をより多く同定する。

2) *jmj*遺伝子の上流カスケードの探索：*jmj*遺伝子のプロモーターを用いてヒト、マウス間で配列が保存されている領域を中心に*jmj*遺伝子特異的発現を制御する配列を推定する。また、その領域を用いてトランスジェニックマウスにより個体レベルで発現検定を行う。

3) *jmj*遺伝子の下流カスケードの探索：cyclin D1が*jmj*遺伝子の下流遺伝子としての寄与範囲を*jmj*/cyclin D1ダブルノックアウトマウスの作成により遺伝学的に検定する。また、これまでに明らかにしたcyclin D1以外の*jmj*蛋白により転写調節を受ける下流遺伝子としてcyclin D3が考えられ、その正否を明らかにする。さらに、DNAチップを用いて網羅的に下流遺伝子を探索する。

4) *jmj*遺伝子同機能遺伝子の探索と分子ネットワークの

解明：マウス系統により *jmj* 変異体の増殖異常の表現型は異なる。この両者で発現もしくは構造が異なる遺伝子を探索することにより *jmj* 遺伝子同機能遺伝子を探索する。当該年度では DNA チップと subtraction により発現量の差違のある遺伝子を同定する。

(4) ゲノム遺伝子を迅速に操作する手法の開発 (株三菱化学生命科学研究所)

1) 100kb を越すマウスのゲノム DNA を迅速にしかも確実に操作する技術のハイスループット化に必要な要件の一つは迅速性である。そこでクローンする対象の DNA を既に BAC にクローンされている 100~200 kb のマウスゲノム DNA に絞って迅速に、かつ大規模に枯草菌ゲノムベクターに移す手法を開発する。そのために、総ての BAC クローンに共通の BAC ベクター部分約 7 kb を有効に活用する。具体的には BAC ベクターを枯草菌ゲノムベクターのクローニング部位に予め組込む。BAC ベクターはすべての BAC クローンに共通なので、「しゃくとり虫法」に必要な 2 つの足場配列のうち一つはこれを共通の足場配列として利用できる。もう一つの足場を (PCR 等で) 用意すれば「しゃくとり虫法」は原理的にはうまく行くと思われる。しかし、BAC クローン中のマウス DNA の方向はランダムである。従って、順序と方向を考慮した 4 種類の BAC ベクター専用のゲノムベクターが必要で、これらを全て構築することを第一目標にする。この構築されたゲノムベクターを用いて、既知の *jumonji* ゲノム領域、Ts 領域を従来の「しゃくとり虫法」よりも迅速にクローニングする実績を第 2 の目標とする。この迅速化のための技術が有効ならば、多くのマウスゲノムは BAC クローンの contig としてまとめられているので対象ゲノム領域を迅速に入手することが可能になる。

2) タンパク質-ゲノムの相互作用を見積もるための巨大 DNA 調製法としては、既に回収ベクターを開発した。しかしながら、これを用いて回収したマウスゲノムの実績は 30~40 kb が最高である。原因は不明だが、初代の回収ベクターはコピー数が多く、枯草菌体内で相互作用して不安定になることが考えられた。この点を考慮して、コピー数を制御できる第二世代の回収ベクターの構築とその適用に取り組む。具体的には、複製開始タンパク質の発現量を調節するシステムを回収ベクターに取り入れて、最低でも 1 コピーで回収できることを目標にする。

2. タンパク質の C 末端ラベル化手法と蛍光相互相関分光法やマイクロアレイ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) C 末端ラベル化法によるタンパク質相互作用のハイスループット・スクリーニング (慶応義塾大学理工学部)

タンパク質の高効率な C 末端蛍光ラベル化とマイクロアレイおよび蛍光相互相関分光法による Fos-Jun 相互作用の簡便な検出法の確立という第 I 期の成果を踏まえ、本

年度はタンパク質相互作用検出のハイスループット化を目指す。

1) これまでマイクロアレイにタンパク質を固定化する方法として、ヒスタグ融合タンパク質とニッケルプレート、またはストレプトアビジン融合タンパク質とビオチンプレートの組み合わせを検討してきたが、他の固定化タグについても検討を行う。例えば、ビオチンラベル化タンパク質とアビジンプレート、プロテイン A 融合タンパク質と IgG プレートなど。

2) 固定化するタンパク質として 0.1~1mg/ml 程度の濃度のサンプルが必要となるので、C 末端ラベル化法によるビオチンラベル化タンパク質のさらなる収量増大の条件について引き続き検討を行う。

3) マイクロアレイに用いる多検体のタンパク質の合成、保存、固定化、などについて最適な条件の検討を行う。

4) これまででモデルタンパク質として用いてきた Fos-Jun 以外のさまざまなタンパク質 (Ras-Raf, カルモジュリンなど) について、マイクロアレイを作成し相互作用の検出を行う。

5) 蛍光相互相関分光法についても、Fos-Jun 以外のさまざまなタンパク質を用いて、ラベル化タンパク質の精製、FCCS 測定および解析による解離定数 (Kd) の決定などの検討を行う。

(2) ハイスループット小麦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)

1) 無半透膜方式連続無細胞タンパク質合成反応法の開発：連続無細胞タンパク質合成反応法としては、Spirin の開発した限外ろ過膜や透析膜を利用する反応方法が用いられているが、これらいずれの反応槽も膜系を装着することが必要であることから反応装置が複雑となり、自動システム化に向けての大きな難点となっている。ここでは、溶質の拡散と溶液粘性の特性を利用する、重層方式連続無細胞タンパク質合成反応法を開発する。

2) 全自動無細胞タンパク質合成ロボットの試作：96 穴タイタープレートを反応容器とし、上記の重層方式連続無細胞タンパク質合成反応方式を採用し、先ず、市販の分注機器を代用して全自動タンパク質合成装置を試作する。

3) ハイスループットタンパク質カタログ化技術の開発：市販されているヒト、マウスなどの動物および、シロイヌナズナなどの cDNA ライブラリーをもとに、我々の確立した PCR 法を利用する無細胞タンパク質合成法によって、100 種類程度の遺伝子からタンパク質を合成する。次に、それらの標品を用いて、精製法と容器への固定化法を開発する。

4) 遺伝子情報産物 (タンパク質) のハイスループット機能解析法の開発：cDNA ライブラリーから、上記のタンパク質カタログ化技術を用いて、核遺伝子産物の機能解析法を開発する。本年度は、植物の転写因子とシグナル伝達関

連タンパク質に焦点を定めて研究を推進する。

(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）

第Ⅱ期では、多数検体を対照とした FCCS の装置の開発に重点を置き、装置全体の感度の上昇と操作性の改良など、下記に示す点に重点を置き研究開発を行う。

- 1) 自動焦点機構をもつ。試料のスポットに対して顕微鏡の視野を自動に操作し最適な場所にフォーカスを合わせる（自動焦点）
- 2) FCCS は高精度な顕微鏡の水浸対物レンズを用いている。その性能を引き出すためには常に水を供給する事が必要であり、自動注水機構を備える。
- 3) 一度に測定準備ができる試料の数の目標を 1536 とし、そのための自動ステージ駆動を行う。
- 4) 測定結果（データ）をオンラインで解析用 PC へ転送して保存すること。蛍光色素は種々のものが市販され、また開発が行われている。その中で、タンパク質に適切なものを選択していくのが有利である。その選択基準はまずタンパク質に蛍光プローブを結合させた時、タンパク質の機能を変えないことが需要である。次にタンパク質-タンパク質相互作用を行っても蛍光発光の特性が変化しないか、

変化する場合はその特性が理解できることである。一方で蛍光色素に合わせて検出器側の励起光波長や検出波長を対応させることが可能であるなら、多くの種類の蛍光色素から利用できる色素を選択することで、プロジェクトの進展に非常に有利となる。第Ⅱ期ではこれまでの成果を生かしてさらに、蛍光色素の利用範囲の幅を広げるために、利用可能なレーザ波長や新たな検出装置の波長についても検討を行う。現在 FCCS で利用できる蛍光の励起波長は 488 nm-633nm の組み合わせだけであるが、それを種々の蛍光性色素並びに蛍光性タンパク質の組み合わせに対応するようにする。利用できるレーザーラインの種類を現在の 2 種類（488nm と 633nm）から 5 種類（458nm, 488nm, 514nm, 543nm, 633nm）に増やす。それに伴い利用できる、蛍光色素の組み合わせを下のように増加させることが可能となる。波長の組み合わせと、目標とする代表的な色素と蛍光性タンパク質の組み合わせを下に示す。検出側の波長特性は色素の発光特性に応じてフレキシブルに対応するようにする。488-633nm (Fluorescein-Cy5, Rhodamine Green-Cy5) : 543-633nm (DsRed-Cy5) : 488-543nm (GFP-DsRed) : 458-543nm (CFP-DsRed) : 515-633nm (YFP-Cy5) : 458-515nm (CFP-YFP)。

## Ⅱ 平成 14 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 法と STABLE 法を用いたゲノム機能解析法の開発	慶応義塾大学理工学部	◎柳川弘志
(1) <i>in vitro</i> virus 法と STABLE 法によるタンパク質相互作用のハイスループット・スクリーニング	慶応義塾大学理工学部	柳川弘志
(2) ポリコム遺伝子群とこれら遺伝子群の標的遺伝子群の探索	早稲田大学教育学部	東中川 徹
(3) <i>jumonji</i> 遺伝子が関与する遺伝子ネットワークの解明	㈱三菱化学生命科学研究所	竹内 隆
(4) ゲノム遺伝子を迅速に操作する手法の開発	㈱三菱化学生命科学研究所	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やマイクロアレイ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	慶応義塾大学理工学部	柳川弘志
(1) C 末端ラベル化法によるタンパク質相互作用のハイスループット・スクリーニング	慶応義塾大学理工学部	柳川弘志
(2) ハイスループット小麦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	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	北海道大学電子科学研究所	金城 政孝
3. 研究運営	慶応義塾大学理工学部（中核機関）	柳川弘志

（注：◎は研究代表者）

### 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 理工学部生命情報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
土 居 信 秀	慶應義塾大学 理工学部生命情報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
[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	(株)三菱化学生命科学研究所 トランスレイショナル研究部 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	(株)三菱化学生命科学研究所 トランスレイショナル研究部 研究助手
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	(株)三菱化学生命科学研究所 トランスレイショナル研究部 主任研究員
竹 内 隆	(株)三菱化学生命科学研究所 生命科学研究部 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 理工学部生命情報学科生命分子工学研究室 教授