

20020778

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

既存薬剤の副作用に関与する遺伝子の探索技術の開発

平成14年度 総括研究報告書

主任研究者 柳川 弘志

平成15（2003）年 4月

## 目 次

I. 総括研究報告		
既存薬剤の副作用に関与する遺伝子の探索技術の開発	-----	1
主任研究者 慶應義塾大学工学部教授 柳川弘志		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	16
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	17

既存薬剤の副作用に関与する遺伝子の探索技術の開発

主任研究者 柳川弘志 慶應義塾大学 理工学部教授

研究要旨：薬剤と相互作用する蛋白質を網羅的にスクリーニング（プロテオーム解析）することが可能になれば、既存薬剤の副作用機序の解明に大きく役立ち、未知の副作用発現の予測も可能になると期待される。本研究は、筆者らが開発してきた、蛋白質とそれをコードする核酸を対応付ける手法である *in vitro virus* (IVV) 法や STABLE 法を用いて薬剤と相互作用するプロテオーム解析のための技術開発を行うものである。本年度の研究において、標的蛋白質既知のモデル薬剤として、免疫抑制剤 FK506、FK506 低分子アナログ (FKL)、および蛋白質リン酸化酵素阻害剤 purvalanol B を固定したアフィニティプローブを作製した。また、FK506 と FKL の標的蛋白質である FK506 結合蛋白質 (FKBP-12)、および purvalanol B の標的蛋白質である CDC-2 と cyclin B1 の cDNA をクローニング、転写等を行い、IVV 対応付け分子を作製した。FK506 および FKL を固定したアフィニティプローブと FKBP-12 IVV を用いた、モデル系でのアフィニティ選択条件の検討を行い、FKBP-12 IVV の選択的濃縮を確認した。以上の結果より、IVV 法を用いた薬剤と相互作用するプロテオーム解析が、実現可能であることをモデル系で示すことができた。

A. 研究目的

本研究の目的は、遺伝子型（核酸）と表現型（蛋白質）の対応付け手法である *in vitro virus* (IVV) 法や STABLE 法を用いて、薬剤と相互作用する蛋白質を迅速かつ網羅的にスクリーニングするプロテオーム解析技術を開発することである。

医薬品開発において、非臨床試験で見出される候補化合物が、臨床試験で予期せぬ毒性や副作用で脱落することは頻繁にある。サイドマイドや、最近の例では糖尿病治療薬であるトログリタゾン、抗高脂血症薬であるセリバスタチン、肺癌治療薬であるイレッサ（ゲフィチニブ）のように、上市され臨床使用されている治療薬でさえも、催奇性、肝毒性、横紋筋融解症、間質性肺炎等、死亡を含む重篤な副作用が発現し問題になることがしばしばある。副作用は、薬剤が主作用に対する標的蛋白質とは異なる

蛋白質と相互作用し、引き起されるとも考えられる。従って、薬剤と相互作用する蛋白質を網羅的にスクリーニング（プロテオーム解析）することが可能になれば、既存薬剤の副作用機序の解明に大きく役立つ。また、未知の副作用発現の予測も可能になると期待される。

筆者らは、進化分子工学の *in vitro* スクリーニング系としてウイルス型対応付け分子を利用した IVV を提案し、その構築に世界に先駆けて成功した（図 1）。また、IVV 法を補完する異なる対応付け分子構築法として、STABLE 法を開発した（図 1）。IVV 法や STABLE 法は、蛋白質にそれ自身をコードしている核酸を情報タグとして連結させたライブラリーを構築することができるため、蛋白質配列を核酸配列で決定することが可能であり、プロテオーム解析の簡便で高感度な手段になる。すなわち、筆者ら

が開発した基盤技術であるIVV法やSTABLE法を実用化することができれば、薬剤と相互作用するプロテオーム解析のための手法を確立することができる。以上の手法は、既存医薬品だけでなく前臨床段階の薬剤にも応用可能であり、厚生労働省が課題と掲げている「安全性に重点をおいた迅速な医薬品開発技術の確立」につながり、国民医療の向上に寄与すると考えられる。

## B. 研究方法・結果

本研究は、以下の工程（1）から（5）により構成される。（図2）

- （1）薬剤を固定したアフィニティプローブの作製
- （2）cDNAライブラリー由来遺伝子蛋白質対応付け分子ライブラリーの構築（IVV法あるいはSTABLE法）
- （3）アフィニティ選択による薬剤と相互作用する蛋白質（対応付け分子）の分離
- （4）蛋白質に連結した核酸部分のPCRによる増幅
- （5）塩基配列解析による蛋白質の同定

アフィニティ選択後、精製・濃縮が不十分で標的蛋白質が検出されない場合、上記の工程4で得られるcDNAライブラリーを鋳型として、再度対応付け分子ライブラリーを構築し（工程2に戻る）、再アフィニティ選択を行う（工程3）。すなわち、本法では工程2→工程3→工程4→工程2とサイクルを回転させ、複数ラウンドのアフィニティ選択を行うことにより標的蛋白質（対応付け分子）の濃縮度を上げること期待される。

本年度の計画である、「モデル系でのアフィニティ選択の検討」に沿って、標的蛋白質既知の既存モデル薬剤の樹脂に固定したアフィニティプローブの作製、標的蛋白質の対応付け分子の作製、モデル系での選択的分離条件の検討を行った（図3）。

1. モデル薬剤とそのビオチンリンカー付き誘導体の合成、およびアフィニティプローブ作製

モデル薬剤として免疫抑制剤FK506、FK506低分子アナログ（FKL）、および蛋白質リン酸化酵素阻害剤purvalanol B（図4）を用いることとし、FKLとpurvalanol Bの合成を行った。そしてFK506（購入品）を含む、3種の薬剤についてアフィニティ樹脂固定のためのビオチンリンカー付き誘導体を合成した。

合成に関しては、文献記載の方法（FK506; McPherson, M. et al. *Chemistry & Biology*, **2002**, 9, 691. FKL; Dubowchik, G. M. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 559. Purvalanol B; Knockaert, M. et al. *Chemistry & Biology*, **2000**, 7, 411.）に従った。

各化合物のビオチンリンカー付き誘導体のEtOH溶液を、結合・洗浄 buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.7), 0.5 M NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% Tween20] に懸濁したアビジン化アフィニティ樹脂に加え混合後、ビオチン溶液でブロッキング、結合・洗浄 buffer で洗浄し、アフィニティプローブとした。

2. モデル薬剤結合蛋白質cDNAの単離とIVV対応付け分子の作製

FK506とFKLの標的蛋白質であるFKBP-12、およびpurvalanol Bの標的蛋白質であるCDC-2とcyclin B1のクローニングを行い、各蛋白質のcDNAを単離した。また、陰性対照蛋白質としてグルタチオン-S-転移酵素（GST）の断片蛋白質のcDNAを作製した。PCRにより各ORFに5'UTR（SP6プロモーターとΩ29配列）、Flag-tag、および3'tail（オリゴA）を付加し（FKBP-12: 402 bp, GST: 558 bp）、転写、PEGスペーサーとのライゲーション、コムギ無細胞翻訳系での蛋白質合成を行い、IVV対応付け分子（IVVビリオン）を作製した（図5）。ライゲーション収率は60%程度、IVVビリオンの形成効率（対応付け効率）は50%程度であった（図6）。

3. 磁性体樹脂を用いた薬剤と相互作用するIVV（FKBP-12）のアフィニティ選択

FK506およびFKLを固定した磁性体樹脂 (ダイナル社 Dynabeads M-270) を用い、FKBP-12 IVVのアフィニティ選択実験を行った。陰性対照のアフィニティプローブにビオチンのみを固定したDynabeads M-270を、陰性対照蛋白質 (IVV) にGSTの断片蛋白質 (160アミノ酸) を用いた。

FKBP-12とGSTのIVV (1 pmol) を1:1の割合で混合し、FK506、FKL、およびビオチンのみを固定したDynabeads M-270に加え、結合・洗浄 buffer中、IVVを結合させた。各樹脂を結合・洗浄 bufferで洗浄後、0.2 mM FK506-結合・洗浄 bufferでIVVを溶出した。InputしたIVV溶液、結合時の上清、洗浄時の溶液 (洗液)、溶出時の溶液 (溶出液)、残査のアフィニティ樹脂の懸濁液を逆転写PCR (RT-PCR) し、含有しているFKBP-12とGSTの割合を、アガロース電気泳動で調べた。RT-PCRは、FKBP-12 (402 base) とGST (558 base) IVV RNAの共通配列部分である5'UTRと3'tail部分をプライマーに用い、双方が同時に同程度増幅されるようにした。各溶液のRT-PCR (30 cycles) 後のアガロース電気泳動の結果を図7に示す。

FK506とFKLを固定したDynabeads M-270を用いFK506で溶出した場合、FKBP-12のバンドが、陰性対照のGSTに比べ濃く検出された。(図7: レーンNo 12, 13, 15, 16)。一方、FKBP-12とは相互作用しないビオチンを固定した場合、FKBP-12とGSTは同レベルであった (図7: レーンNo 14, 17)。Molecular Imager (Bio-Rad社) でアガロース電気泳動のFKBP-12とGSTのバンド濃度を定量した結果、input (レーン2) のFKBP-12とGSTのバンド濃度が約1:1であったのに対し、FK506樹脂の2回目の溶出液 (レーン12) は約3:1、FKL樹脂の溶出2回目の溶出液 (レーン13) 約4:1であった。すなわち、FK506を固定リガンドとした場合は約3倍、FKLの場合は約4倍、FKBP-12がGSTに対し濃縮された。

#### 4. NeutrAvidin Agaroseを用いたFKBP-12 IVVのアフィニティ選択

3に示したアフィニティ選択と同様の実

験をNeutrAvidin agarose (Pierce社) 用いて行った。磁性体樹脂を用いた時と同様の、RT-PCR (30 cycles) 後のアガロース電気泳動の結果を図8に示す。

FK506とFKLを固定したNeutrAvidin agaroseを用い、FK506で溶出した場合、FKBP-12のバンドが、GSTに比べ、濃く検出された (図8: レーンNo 9, 10, 12, 13, 15, 16)。一方、FKBP-12とは相互作用しないビオチンのみが固定されたagaroseの場合、FKBP-12とGSTの両方ともほぼ検出されなかった (図8: レーンNo 11, 14, 17)。

この実験では、各溶液に含有しているFKBP-12とGSTの割合を、リアルタイムPCR装置で定量した。リアルタイムRT-PCRによる定量は、FKBP-12あるいはGSTに選択的なプライマーを用いた、100bp程度の鎖長を増幅できる系を構築し行った。それぞれ、テンプレートRNAが $1 \times 10^1$ – $1 \times 10^9$  copies/tubeで定量性が得られる系を構築することができた。リアルタイムRT-PCRの結果を表1に示す。

リアルタイムRT-PCRで定量した結果、FK506が固定リガンドの場合のFKBP-12のGSTに対する最大濃縮率は190倍 (表1: No 15)、FKLの場合は26倍 (表1: No 10) であった。

#### 5. IVVライブラリーモデルでのFKBP-12 IVVのアフィニティ選択

細胞や組織より抽出したmRNAより作製した、実際のスクリーニングに用いるIVVライブラリーは、多様な蛋白質-核酸対応付け分子の混合物であり、極微量の薬剤特異的結合蛋白質が含有しているにすぎない。先に述べたように、対応付け分子を用いたアフィニティ選択法の特徴として、選択工程サイクルを回転させ、選択ラウンドを複数回行うことにより、標的蛋白質 (対応付け分子) が相乗的に濃縮されることが期待される。ここでは、多量の夾雑蛋白質 (対応付け分子) 存在下、微量の特異的結合蛋白質 (対応付け分子) が濃縮されるか、また、複数回の選択ラウンドによる相乗的な濃縮が認められるか、それらを検証する目

的で、FKBP-12とGSTのIVVを1:10,000の割合で混合し、アフィニティ選択を2ラウンド行った。各ラウンドのアフィニティ選択時の各溶液のRT-PCR (ラウンド1: 50 cycles, ラウンド2: 40 cycles)後のアガロース電気泳動の結果を図9に、リアルタイムRT-PCRでFKBP-12とGSTを定量した結果を表2に示す。

FK506が固定リガンドの場合、ラウンド1の溶出液のRT-PCRでも、アガロース電気泳動でFKBP-12のバンドが検出され、FKBP-12の選択的濃縮が認められた (図9: レーンNo 7, 9)。一方、アフィニティの低いFKLの場合、FKBP-12バンドは検出されなかった (図9: レーンNo 8, 10)。リアルタイムRT-PCRの定量では、両方の固定リガンドの場合でFKBP-12の選択的濃縮が認められ、FK506が固定リガンドの場合、FKBP-12のGSTに対する最大濃縮率は2300倍 (表2: No 9)、FKLの場合は280倍 (表2: No 8)であった。

ラウンド1での溶出液 (固定リガンドがFK506の時は1回目の溶出液、FKLの時は2回目の溶出液)をRT-PCR (35 cycles)で増幅し、引続き転写、PEGスパーサーとのライゲーション、コムギ無細胞翻訳系での蛋白質合成を行い、ラウンド2のinput IVVを作製した。ラウンド2のinputのFKBP-12:GSTの比率は、FK506の場合1:20、FKLの場合1:150であった。2回のアフィニティ選択ラウンドを行った結果、RT-PCR (40 cycles)後のアガロース電気泳動では、FK506が固定リガンドの場合FKBP-12がほぼ1バンドで検出されるようになり (図9: レーンNo 20, 22)、FKLでもFKBP-12が検出されるようになった (図9: レーンNo 21, 23)。リアルタイムRT-PCRの定量すると2ラウンドトータルで、FK506の場合は最大 $2 \times 10^6$ 倍、FKLの場合は最大2600倍、FKBP-12がGSTに対し濃縮されていた。

#### 6. ビオチンリンカーを付与したサリドマイド誘導体の合成

先にも述べたが、本研究の重要なステップとして、薬剤を固定したアフィニティプローブを用いたスクリーニングがあり、薬

剤を固定したアフィニティ樹脂は必須の材料である。薬剤を樹脂に固定するためには、末端にアミノ基やチオール基等反応性残基、あるいはビオチン等標的蛋白質特異的に強固に相互作用する残基を持つ固定用リンカーを導入した、薬剤誘導体を合成する必要がある。

平成15年度に行う予定であった、副作用機序未知の薬剤固定アフィニティプローブ作製に関し、前倒しにて、サリドマイドのアフィニティ樹脂固定のためのビオチン化誘導体を合成した。

一般に、リンカー導入部位により薬剤の活性 (蛋白質との親和性) は大きく変化する。サリドマイドの場合、3-ヒドロキシ誘導体 (1、図10) はサリドマイドと同等の活性を持ち、3-(2-アミノエトキシ) 誘導体が、サリドマイド結合蛋白質の光アフィニティラベルに用いられている (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 7552.)。そこで、種々のアビジン化アフィニティ樹脂に固定できる、末端にビオチン基を持つサリドマイド誘導体 (2、図10) をデザインし合成した。合成スキームおよび収率を図11に示すが、各反応は既知であり詳細については省略する。

#### 7. イレッサおよびトログリタゾン誘導体合成のための、構造活性相関の文献調査、化合物デザイン、およびイレッサ中間体の合成。

6の項目で述べた理由により、リンカー導入が可能な部位を調べるためイレッサおよびトログリタゾンの構造活性相関に関する文献調査を行った。

イレッサ (図12) は、昨年上市された肺癌治療剤であるが、EGF レセプターチロシンキナーゼ阻害作用を機序とし、新たな分子標的薬剤として注目されている。しかし、間質性肺炎の死亡例を含む副作用症例が数多く報告されており、副作用の機序解明が望まれている。

イレッサの母核である 4-アニリノキナゾリン部分が EGF レセプターと結合し酵素阻害活性を示すのであるが、X 線結晶解析

により、EGF レセプターの ATP 結合領域において Met769 がイレッサの 1 位の窒素に、Thr830 が 3 位の窒素に水素結合することが報告されている (*J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3244)。構造活性相関について、1 位あるいは 3 位窒素の炭素への置換は活性を減少させる。これは、上記の X 線結晶解析で示された結合様式とよく合致する。6 位への電子供与基 (モルフォリノプロピル基) の置換は半減期を延長させ、アニリンのメタ位とパラ位におけるハロゲンの置換は代謝を遅延させる (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1911)。従って、母核以外の置換基は *in vivo* における活性を強めるためのものと思われる。

以上の構造活性相関の結果から、EGF レセプター結合活性を保持したアフィニティ樹脂固定用リンカーを導入したイレッサ誘導体を得るには、キナゾリン環 1 位あるいは 3 位へのリンカー導入は避け、キナゾリン環 6 位あるいは 7 位、またはアニリン部のパラ位、メタ位への導入が妥当であると考えられる。

キナゾリン環 6 位にリンカーを導入するための合成中間体として、化合物 10 (図 1 2) を既知の方法で (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1911) 合成した。

トログリタゾン (図 1 2) は、インスリン抵抗性改善薬として 1997 年に上市され、注目されていた。しかし、死亡例を含む重篤な肝障害が報告され、2000 年に自主回収となった。

トログリタゾンは、抗酸化、脂質低下作用をもつ 6-ヒドロキシ 2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマンと血糖低下作用をもつ 5-ベンジル-2, 4-ジオキシチアゾリンをエーテル結合させた化合物である。抗酸化作用においては、6 位の水酸基と 5, 7, 8 位のメチル基が活性発現に重要であり、血糖低下作用においては 2, 4-ジオキシチアゾリンが PPAR- $\gamma$  に作用し、活性を高めることが知られている [*YAKUGAKU ZASSHI* **1997**, *117*(9), 597]。しかしながら、トログリタゾンの肝障害発症の作用機序については明らかになっておらず、副作用を担う骨格に

関しても報告がない。このため、以下に述べる 2 点についてリンカーを導入し、結合たんぱくの同定を試みる予定である。

(1) トログリタゾンの 2 つの骨格に副作用が関係する場合、上記の活性発現において重要でない部位へのリンカー導入が必要である。クロマン骨格においては 2 位のメチル基、3, 4 位の炭素、2, 4-ジオキシチアゾリン骨格においては 5-ベンジル基への導入が妥当であると考えられる。

(2) 2 つの骨格のうちどちらかに副作用が起因する場合、いずれかの骨格を保持したまま他の骨格にリンカーを導入する必要がある。クロマン骨格に副作用が起因する場合、血糖低下作用は消失する可能性はあるが、2, 4-ジオキシチアゾリンの 1 位の窒素に導入することが妥当である。2, 4-ジオキシチアゾリンに副作用が起因する場合、抗酸化作用はなくなるが 6 位の水酸基へのリンカー導入が必要であると考えられる。

(倫理面への配慮)

すべて試験管内の実験であり、また実験材料である cDNA に関しては市販品を使用したため、特記事項は無い。

### C. 考察

先にも述べたが、平成 14 年度の計画はモデル系での選択的分離・濃縮条件を検討することであった。筆者は上記目的を達成するため、FK506 および FKL を固定したアフィニティプローブを作製し、標的蛋白質である FKBP-12 の IVV の選択的分離・濃縮を試みた。

IVV の作製に関し、PEG スペーサーとのライゲーション収率、対応付け効率は 50% 以上であり、アフィニティ選択実験には十分な量の IVV ビリオンが得られた。

アフィニティ選択実験において、Dynabeads M-270 を担体として用いた場合、FKBP-12 と GST IVV を等量混合し input した後、結合、洗浄条件を検討したが、FKBP-12 の GST に対する選択的濃縮率は数倍以下程

度であった。一方、NeutrAvidin agaroseを用いた場合、選択的濃縮率は上昇し、FK506を固定した場合は最大190倍、FKLの場合は最大26倍であった。FKLのFKBP-12に対するアフィニティは、FK506のそれに比べ1/20~1/100程度であり (Harrison, R. K. et al. *Biochemistry* **1990**, *29*, 3813. Dragovich, P. S. et al. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1872. Dubowchik, G. M. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 559)、上記の濃縮率の結果とFKBP-12に対するアフィニティは相関があると考えられる。

細胞や組織より抽出したmRNAより作製した、実際のスクリーニングに用いるIVVライブラリーは、多様な蛋白質-核酸対応付け分子の混合物であり、極微量の薬剤特異的結合蛋白質が含有しているにすぎない。そのようなIVVライブラリーのモデルとして、FKBP-12とGST IVVを1:10,000の割合で混合し、アフィニティ選択を行った。その結果、FK-506とFKLをアフィニティプローブにした両方において、FKBP-12の選択的濃縮が確認できた。また、先にも述べたが、対応付け分子を用いたアフィニティ選択法の特徴として、複数ラウンドのアフィニティ選択サイクルを行い、標的蛋白質(対応付け分子)の濃縮度を上げることが期待される。今回の実験ではアフィニティ選択サイクルを2ラウンド行い、各ラウンドのFKBP-12の濃縮度を調べた。その結果ラウンド毎の濃縮が確認でき、2ラウンドトータルで、FK-506をアフィニティプローブにした場合 $2 \times 10^6$ 倍、FKLの場合2600倍、FKBP-12がGSTに対し濃縮された。この結果は、薬剤を結合したアフィニティプローブを用いたIVVライブラリーのスクリーニングにより、薬剤結合蛋白質の濃縮が可能であることを示し、IVV法を用いた薬剤と相互作用するプロテオーム解析が、実現可能であることをモデル系で示すことができたと考えられる。

来年度は、組織抽出mRNAよりIVVライブラリーを作製し、スクリーニングを行い、さらなるモデル系での検証を行うとともに、副作用機序未知の薬剤のアフィニティプローブ作製のため、イレッサとトログリタゾ

ン誘導体の合成を行う予定である。

#### D. 結論

1. 薬剤結合蛋白質のIVVを用いたスクリーニングのモデル系として、FKBP-12・FK506 (FKL)系を採用し、結合蛋白質であるFKBP-12、陰性対照蛋白質であるGST断片蛋白質のIVVを作製した。またアフィニティプローブとして、FK506とFKLを固定した樹脂を作製した。
2. アフィニティ樹脂の検討等、選択・分離条件を検討し、FKBP-12・FK506 (FKL)を用いたモデル系で、IVVが選択的に濃縮されることを確認した。
3. 副作用機序未知の薬剤のアフィニティプローブ作製のため、ビオチンリンカーを付与したサリドマイド誘導体を合成し、イレッサとトログリタゾンの構造活性相関を調査、化合物デザインを行った。

#### E. 健康危険情報

特記事項無し

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### ・書籍

Doi, N. and Yanagawa, H., Evolutionary Design of Generic Green Fluorescent Protein Biosensors, In: *Methods in Molecular Biology*, Vol 183, pp. 49-55, edited by Hicks, B. W., Human Press Inc., Totowa, NJ., 2002.

###### ・原著論文

Doi N., Takashima, H., Kinjo, M., Sakata, K., Kawahashi, Y., Oishi, Y., Oyama, R., Miyamoto-Sato, E., Sawasaki, T., Endo, Y., Yanagawa, H., Novel Fluorescence Labeling and High-throughput Assay Technologies for *In Vitro* Analysis of Protein Interactions. *Genome Res.*, **2002**, *12*, 487-492.

###### ・総説

土居信英、柳川弘志、タンパク質相互



作用のハイスループット解析に向けて—  
新しい蛍光標識法とマイクロアレイ技術  
の融合、Bioベンチャー、**2002**, 2 (No 4),  
102-105.

## 2. 学会発表

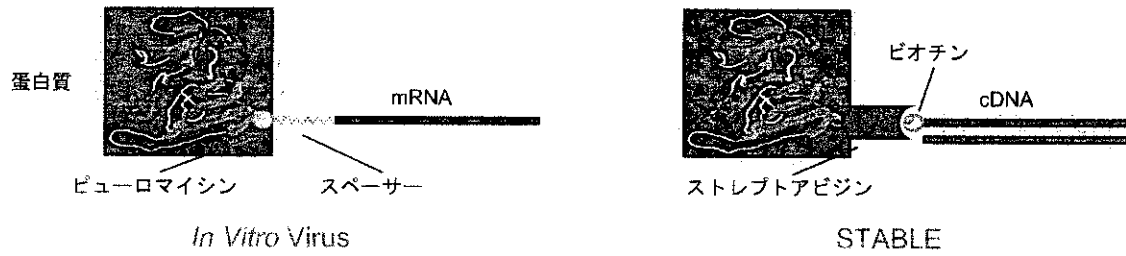
本研究成果の一部は、平成15年日  
本薬学会123年会（長崎）で発表。

[演題番号: 27(P1)II-211]

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

図 1 : 蛋白質-核酸対応付け分子 (*In Vitro Virus*, STABLE)



蛋白質-核酸対応付け分子 (*In Vitro Virus*, STABLE)

- ・蛋白質にそれ自身をコードする遺伝子 (mRNA, cDNA) を結合させた分子
- ・核酸部分は配列タグや増幅のためのPCRテンプレートとして利用可能
- ・当研究室で独自に開発

*In Vitro Virus* や STABLE を用いると、簡易で高感度なプロテオーム解析法の開発が可能

図 2 : *In Vitro Virus* を用いた薬剤相互作用プロテオーム解析

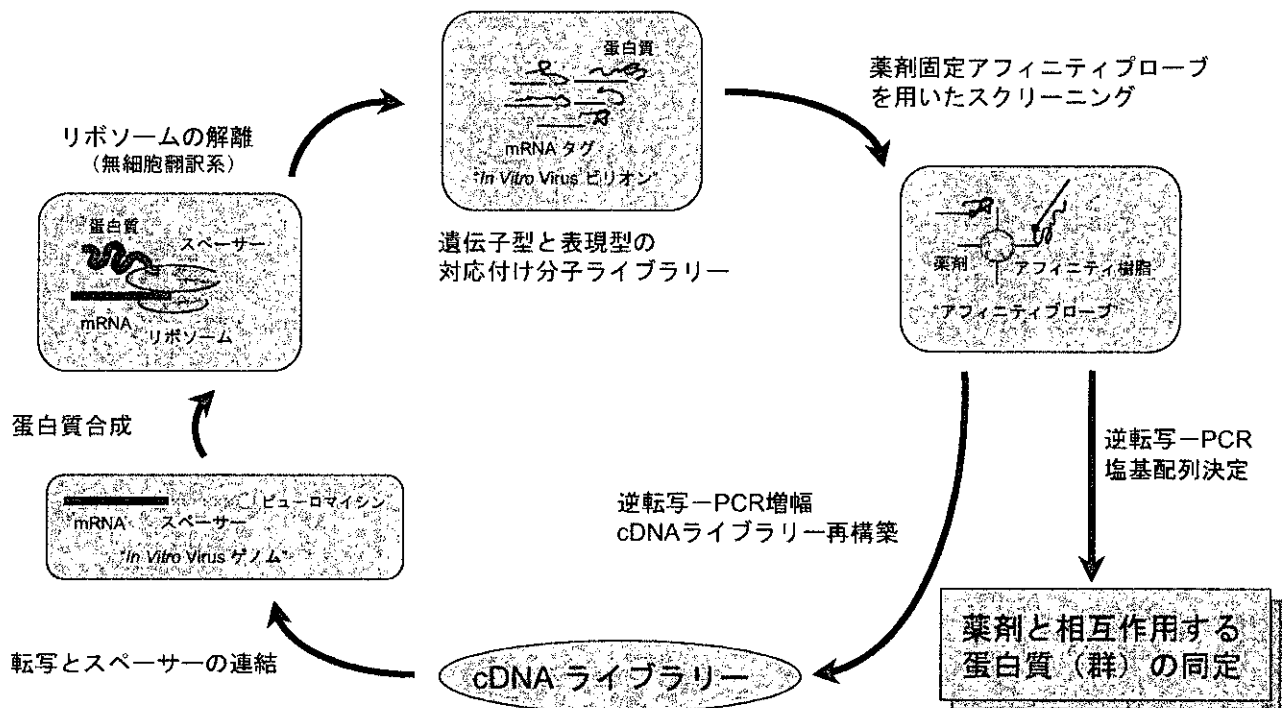


図 3 : FKBP-12・FK506を用いたモデル系でのアフィニティ選択

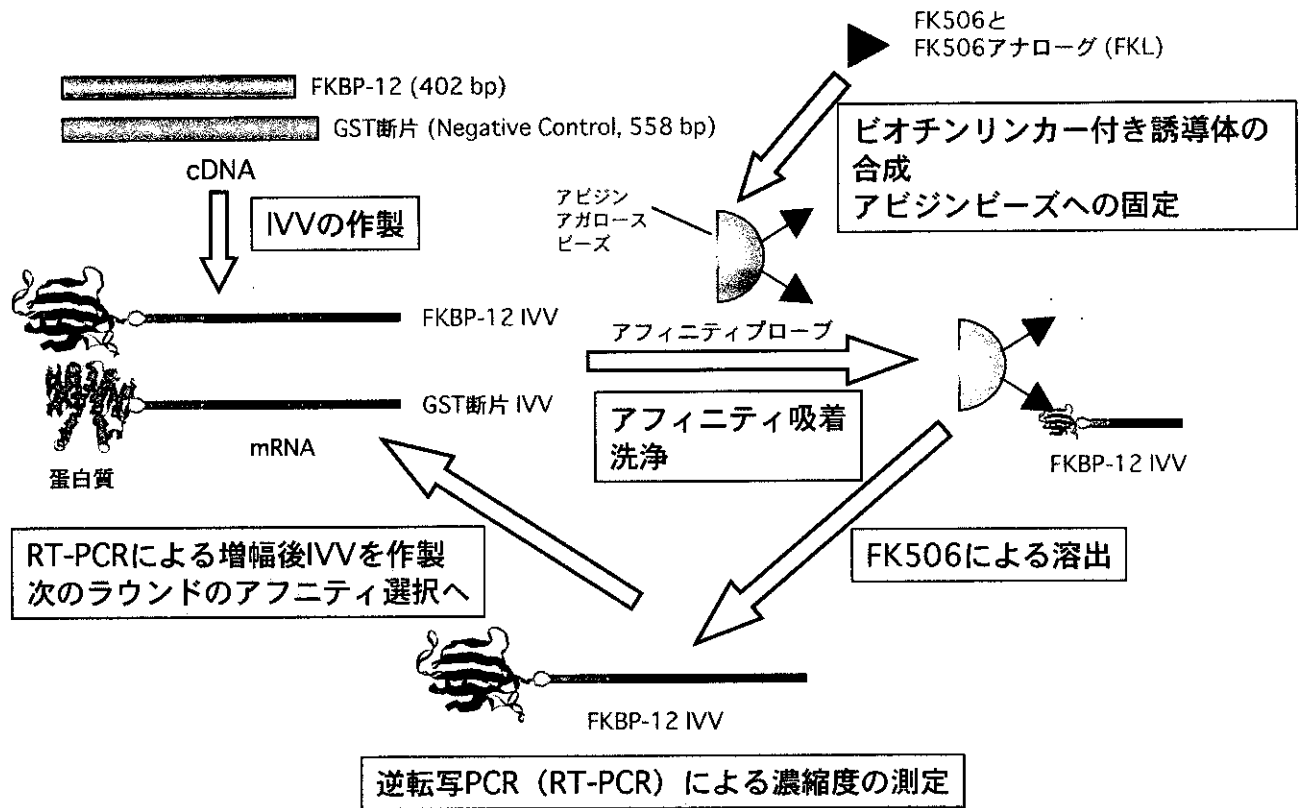


図 4 : モデル薬剤

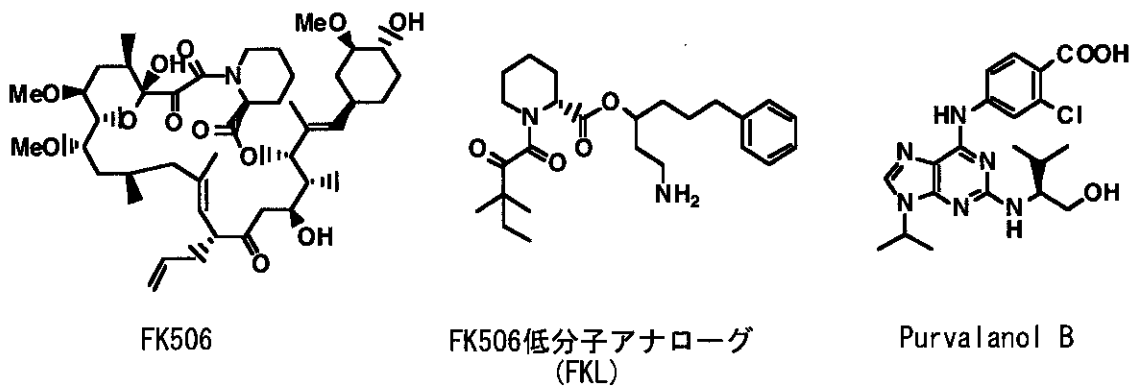


図5：IVV対応付け分子の作製

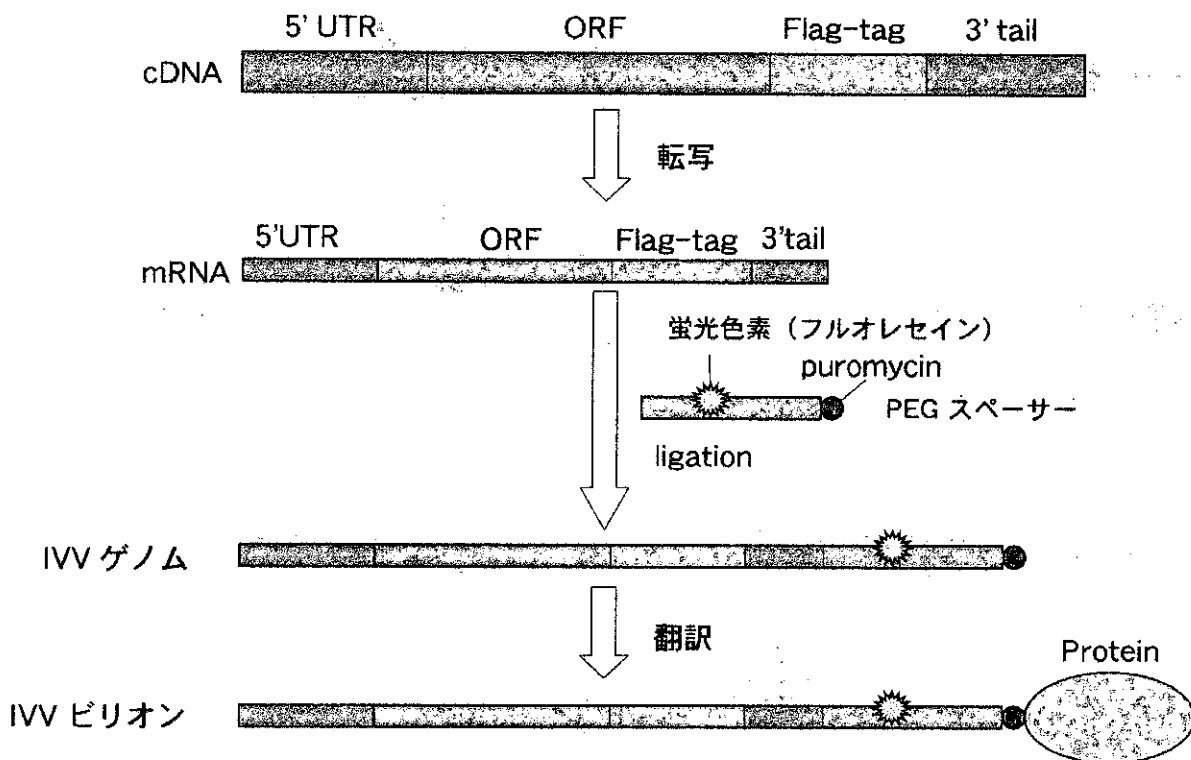


図6：FKBP-12 mRNAとIVVのPAGE

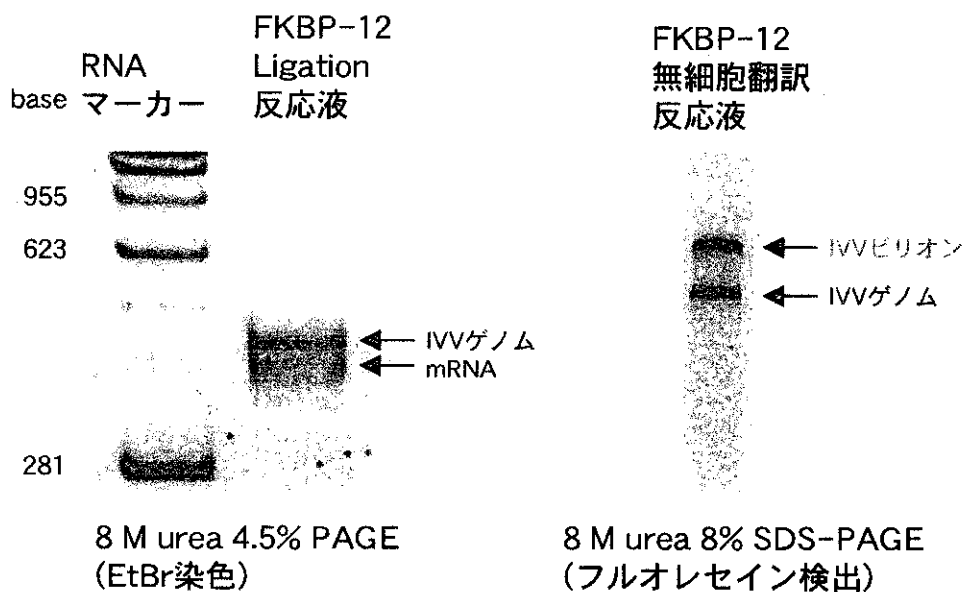
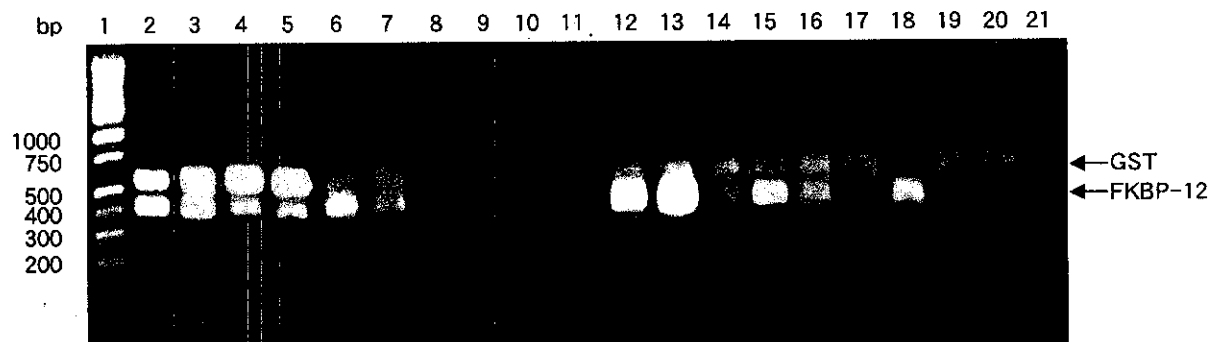


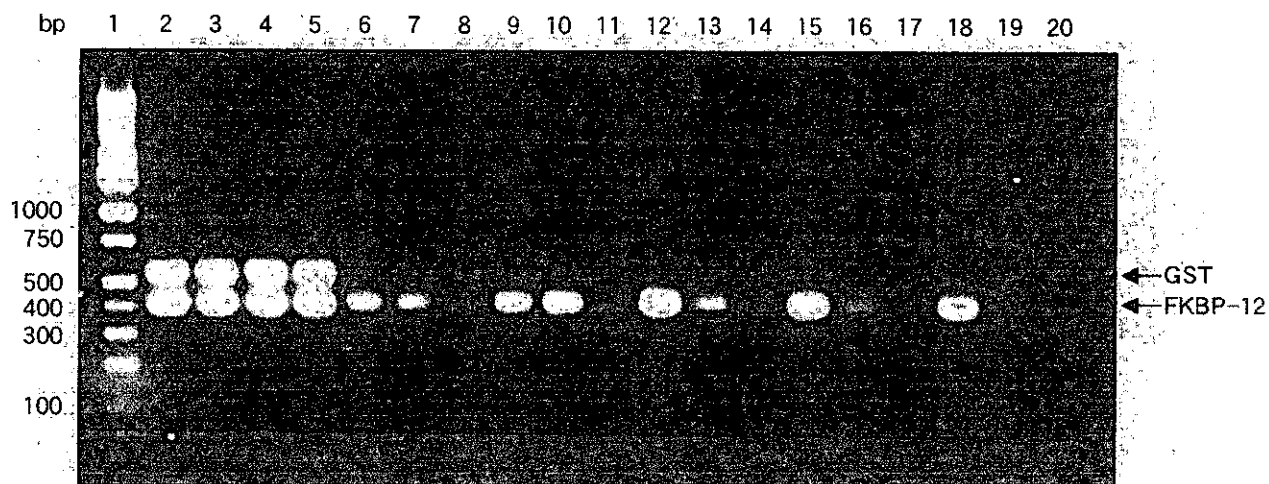
図7：アフィニティ選択（磁性体樹脂使用）各溶液のRT-PCR



2% アガロース電気泳動 (EtBr染色)

- |                     |                       |                      |
|---------------------|-----------------------|----------------------|
| 1: DNA マーカー         | 9: 1回目の溶出液 (FK506樹脂)  | 17: 3回目の溶出液 (ビオチン樹脂) |
| 2: Input            | 10: 1回目の溶出液 (FKL樹脂)   | 18: 残査の樹脂 (FK506樹脂)  |
| 3: 結合時の上清 (FK506樹脂) | 11: 1回目の溶出液 (ビオチン樹脂)  | 19: 残査の樹脂 (FKL樹脂)    |
| 4: 結合時の上清 (FKL樹脂)   | 12: 2回目の溶出液 (FK506樹脂) | 20: 残査の樹脂 (ビオチン樹脂)   |
| 5: 結合時の上清 (ビオチン樹脂)  | 13: 2回目の溶出液 (FKL樹脂)   | 21: No template      |
| 6: 7回目の洗液 (FK506樹脂) | 14: 2回目の溶出液 (ビオチン樹脂)  |                      |
| 7: 7回目の洗液 (FKL樹脂)   | 15: 3回目の溶出液 (FK506樹脂) |                      |
| 8: 7回目の洗液 (ビオチン樹脂)  | 16: 3回目の溶出液 (FKL樹脂)   |                      |

図8：アフィニティ選択 (NeutrAvidin Agarose使用) 各溶液のRT-PCR



2% アガロース電気泳動 (EtBr染色)

- |                      |                       |                      |
|----------------------|-----------------------|----------------------|
| 1: DNA マーカー          | 9: 1回目の溶出液 (FK506樹脂)  | 17: 3回目の溶出液 (ビオチン樹脂) |
| 2: Input             | 10: 1回目の溶出液 (FKL樹脂)   | 18: 残査の樹脂 (FK506樹脂)  |
| 3: 結合時の上清 (FK506樹脂)  | 11: 1回目の溶出液 (ビオチン樹脂)  | 19: 残査の樹脂 (FKL樹脂)    |
| 4: 結合時の上清 (FKL樹脂)    | 12: 2回目の溶出液 (FK506樹脂) | 20: 残査の樹脂 (ビオチン樹脂)   |
| 5: 結合時の上清 (ビオチン樹脂)   | 13: 2回目の溶出液 (FKL樹脂)   |                      |
| 6: 21回目の洗液 (FK506樹脂) | 14: 2回目の溶出液 (ビオチン樹脂)  |                      |
| 7: 21回目の洗液 (FKL樹脂)   | 15: 3回目の溶出液 (FK506樹脂) |                      |
| 8: 21回目の洗液 (ビオチン樹脂)  | 16: 3回目の溶出液 (FKL樹脂)   |                      |

表1：リアルタイムRT-PCRによる定量

No	Copies/tube		比 (FKBP/GST)	濃縮率
	FKBP	GST		
2	$1.1 \times 10^8$	$1.6 \times 10^8$	1/1.5	-
9	$7.4 \times 10^3$	$3.1 \times 10^2$	24	34
10	$1.5 \times 10^4$	$8.4 \times 10^2$	18	26
11	$1.6 \times 10^2$	$5.1 \times 10^2$	1/3.2	0.4
12	$5.4 \times 10^3$	$2.3 \times 10^2$	23	33
13	$1.6 \times 10^3$	$2.3 \times 10^2$	7	10
14	$9.1 \times 10^2$	$9.9 \times 10^2$	1/1.1	1.3
15	$5.9 \times 10^4$	$4.5 \times 10^2$	130	190
16	$1.8 \times 10^3$	$4.0 \times 10^2$	4.5	6.4
17	$2.3 \times 10^2$	$5.2 \times 10^2$	1/2.3	0.4
18	$6.7 \times 10^4$	$3.8 \times 10^2$	180	260
19	$1.7 \times 10^2$	$1.2 \times 10^2$	1.4	2.0
20	$6.7 \times 10^1$	$1.5 \times 10^3$	1/22	0.07

Noは図8の各レーンNoに対応

濃縮率は各Noの比をNo2 (input)のそれで除算した数値

Inputに対するFKBP-12の濃縮度を示す

図9：アフィニティ選択 (FKBP:GST = 1:10,000; NeutrAvidin Agarose使用)  
各溶液のRT-PCR

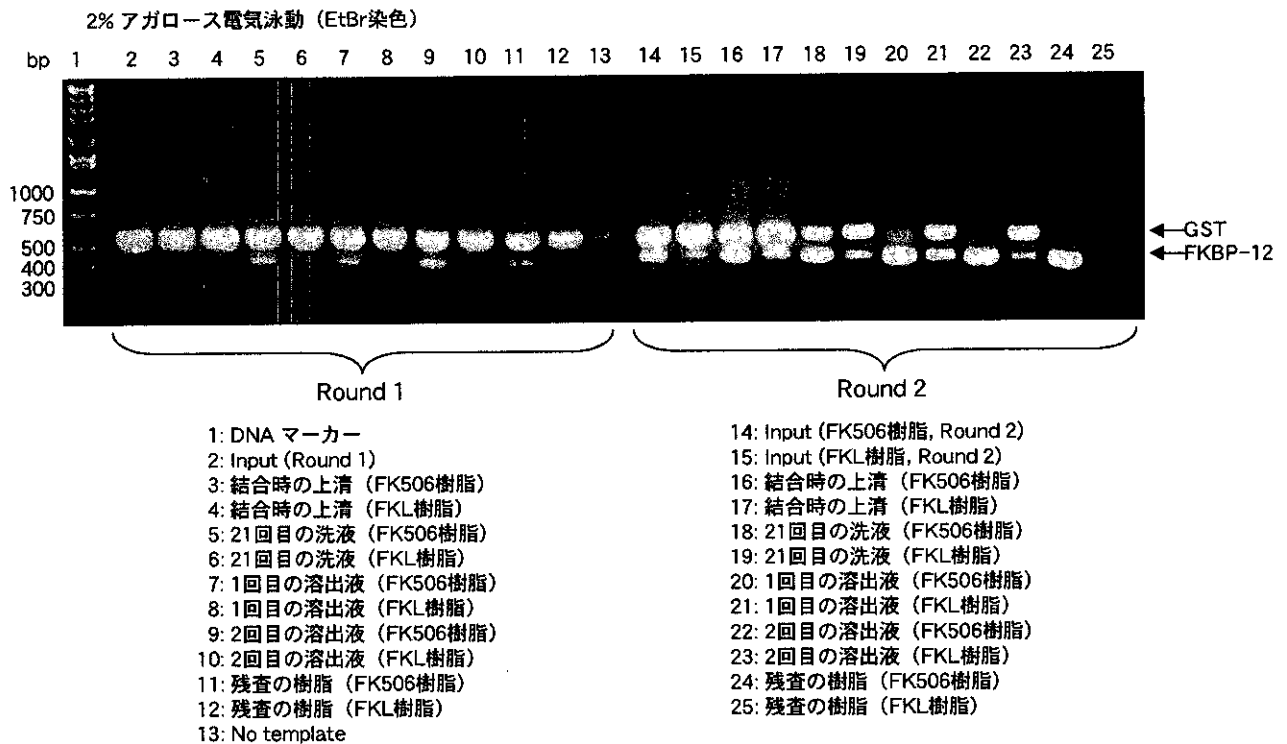


表2：リアルタイムRT-PCRによる定量

No	Copies/tube		比 (FKBP/GST)	濃縮率
	FKBP	GST		
2	$1.7 \times 10^4$	$2.8 \times 10^8$	1/16000	-
7	$1.5 \times 10^2$	$5.3 \times 10^3$	1/35	450
8	$2.5 \times 10^1$	$1.4 \times 10^3$	1/56	280
9	$7.0 \times 10^1$	$5.1 \times 10^2$	1/7	2300
10	$6.4 \times 10^0$	$2.0 \times 10^3$	1/310	51
14	$2.3 \times 10^7$	$4.7 \times 10^8$	1/20	
15	$2.8 \times 10^6$	$4.3 \times 10^8$	1/150	
20	$3.2 \times 10^4$	$4.3 \times 10^2$	75	$1.2 \times 10^6$
21	$1.7 \times 10^2$	$1.0 \times 10^3$	1/6.1	2600
22	$1.4 \times 10^5$	$1.1 \times 10^3$	125	$2.0 \times 10^6$
23	$7.0 \times 10^1$	$8.8 \times 10^2$	1/13	1200

Noは図9の各レーンNoに対応

濃縮率は各Noの比をNo2 (ラウンド1のinput)のそれで除算した数値

ラウンド1のInputに対するFKBP-12の濃縮度を示す

図10：サリドマイド誘導体

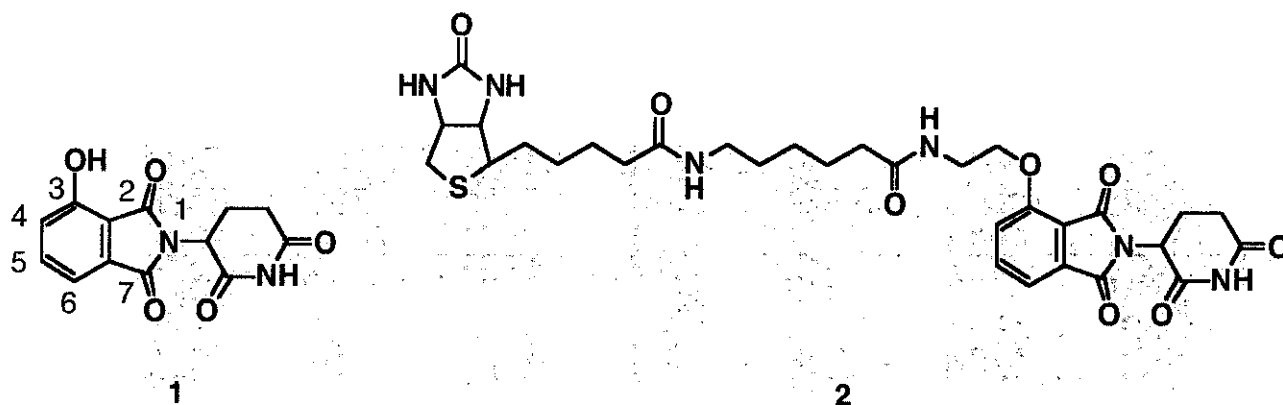


図11：ビオチンリンカーを導入したサリドマイド誘導体 (2) の合成

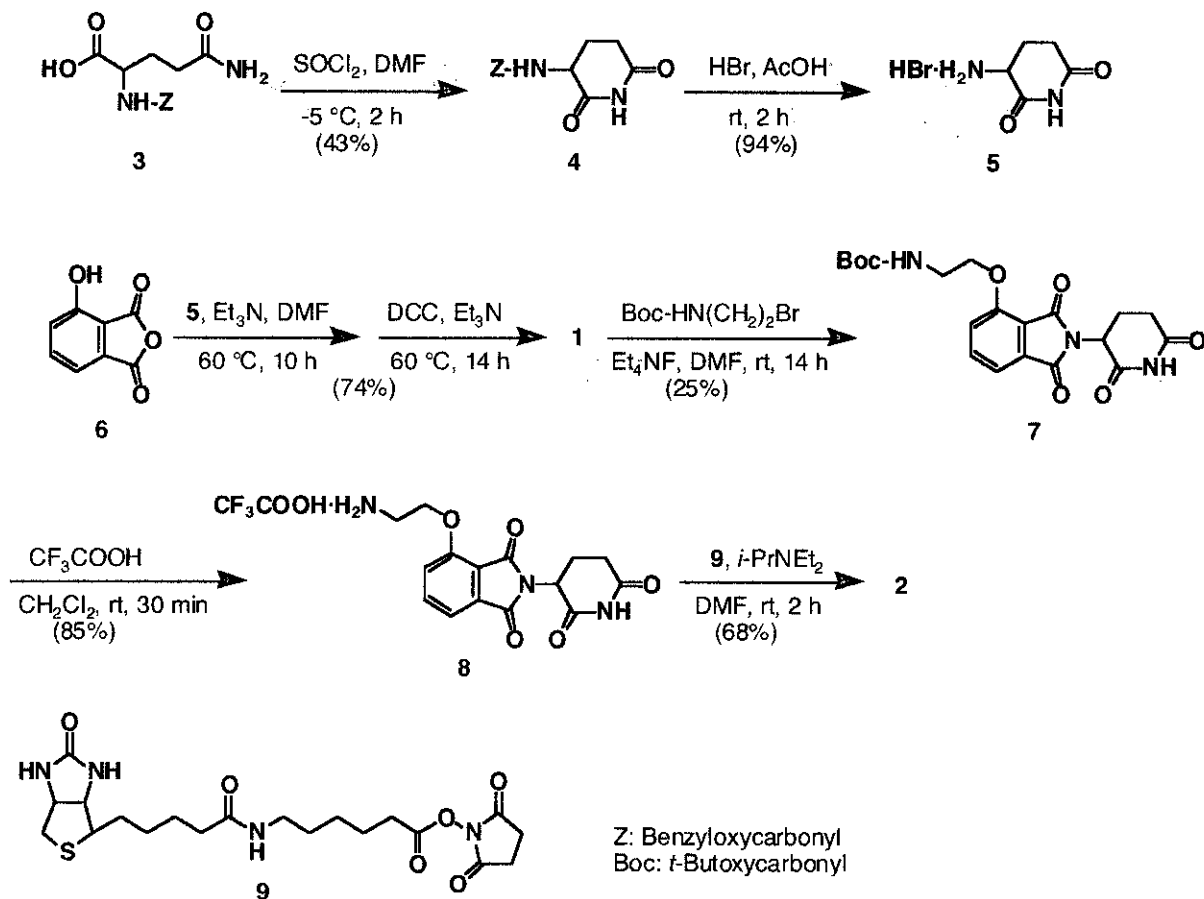
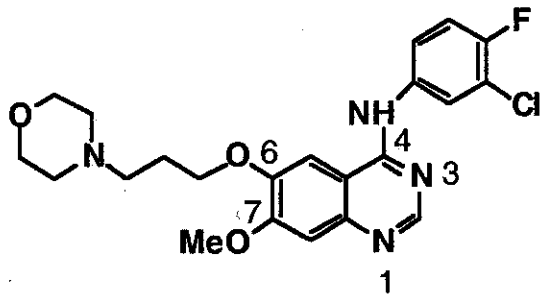
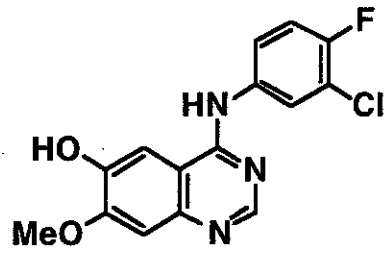




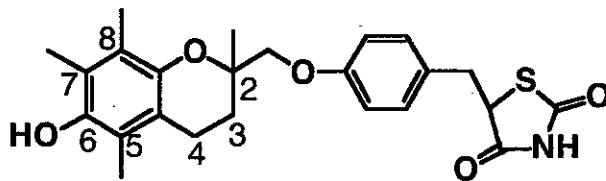
図12：イレッサ、イレッサ中間体(10)、およびトログリタゾン



イレッサ



10



トログリタゾン

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Doi, N. Yanagawa, H.	Evolutionary Design of Generic Green Fluorescent Protein Biosensors	Hicks, B. W.	Methods in Molecular Biology	Human Press Inc.	Totowa, NJ.	2002	49-55

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Doi N. Takashima, H. Kinjo, M. Sakata, K., Kawahashi, Y. Oishi, Y. Oyama, R. Miyamoto- Sato, E. Sawasaki, T. Endo, Y. Yanagawa, H.	Novel Fluorescence Labeling and High-throughput Assay Technologies for <i>In Vitro</i> Analysis of Protein Interactions.	Genome Res.	12	487-492	2002
土居信英、 柳川弘志	タンパク質相互作用のハイスループット解析に向けて - 新しい蛍光標識法とマイクロアレイ技術の融合	Bioベンチャー	2 (No 4)	102-105	2002

20020778

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
P.16の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。