

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15年度 総括研究報告書

主任研究者 柳川 弘志

平成16（2004）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	-----	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、*in vitro* の手法のみを用いた IVV ライブラリー構築法を確立し、マウス脳、ヒト肺、およびヒト脳由来 IVV ライブラリーを構築した。FK506 固定アフィニティ樹脂を用いた IVV ライブラリースクリーニングで FKBP-12 の特異的な濃縮に成功した。副作用未知既存薬剤のアフィニティプローブの合成に関し、イレッサについて固定用ビオチンリンカー導入部位が異なる 2 種の誘導体を合成し、開発中のレチノイド系薬剤である Am-80 と Ch-55 の誘導体をそれぞれ 1 種合成した。平成 16 年計画の実施事項であったイレッサ固定アフィニティ樹脂を用いた IVV ライブラリースクリーニングを前倒しにて一部実施し、新たなイレッサ結合蛋白質の可能性のある蛋白質の配列解析を実施した。最後に、Am-80 固定アフィニティ樹脂を用いたモデルアフィニティ選択実験で、RAR リガンド結合部位の IVV の濃縮を確認した。以上の結果より、本年度の目標であった、IVV ライブラリースクリーニングによる薬剤相互作用蛋白質のプロテオーム解析法の有用性を実証することができた。

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、IV

V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。

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が期待される。

本研究において、平成14年度筆者らは、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の作

製を完了した。FK506とFKLを固定したアフィニティプローブを用いたIVVスクリーニング実験を実施し、それら薬剤の標的蛋白質であるFKBP-12のIVV対応付け分子の選択的分離・回収を達成した。さらに、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リンカーを導入した誘導体を合成した。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。活性を保持した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い、化合物デザインを行った。

平成15年度はの目標は、

- (1) マウスおよびヒト組織mRNA由来IVVライブラリーの構築
- (2) モデル薬剤固定アフィニティプローブを用いた、IVVライブラリースクリーニング
- (3) 副作用未知既存薬剤のアフィニティプローブの合成

であった。以下に平成15年度の研究結果について記載する。

## B. 研究方法・結果

### 1. IVVライブラリーの構築(図3)

市販マウス脳由来mRNA(BDサイエンス社)をランダムプライミング法により逆転写後、5'共通領域であるT7タグ配列DNAをligationし、T7タグ配列と3'側の共通領域であるFlagタグ配列を足場に、IVV化に必要な5'UTR領域を付加しながら、PCR増幅を行い、IVV templateである2本鎖cDNAライブラリーを作製した。*In vitro*転写系を用いmRNAに転写後、puromycinを持つスペーサーをligationし、最後に*in vitro*翻訳系で対応付けを行いIVVライブラリーとした。2本鎖cDNAライブラリー、*in vitro*転写後のmRNAライブラリー、ligation後のRNAライブラリーのアガロースあるいはポリアクリルアミド電気泳動(PAGE)の結果を図4に示す。本法で作製した各IVVテンプレ

トは、鎖長が200-2k塩基で均一で偏りが認められず、均質なライブラリーを作製することができた。種々の蛋白質のcDNAに特異的なプライマーを用いたPCR実験により、様々な遺伝子が含まれていることを確認した(図5)。

上記と同様の方法を用い、ヒト肺およびヒト脳由来IVVライブラリーも構築した。

## 2. FK506固定アフィニティプローブを用いた、マウス脳由来IVVライブラリースクリーニング

免疫抑制剤FK506を固定したアフィニティ樹脂を用いたマウス脳由来IVVライブラリーのスクリーニングを行い、FK506結合蛋白質である12 Kd FK506結合蛋白質(FKBP12)の濃縮が認められるか検討した。

マウス脳由来IVVライブラリーを、結合・洗浄 bufferで懸濁したFK506あるいはビオチン(mock)を固定したNeutrAvidin agarose (Pierce社)樹脂に加え、IVVを結合させた。各樹脂を結合・洗浄 bufferで洗浄後、残査のアフィニティ樹脂の懸濁液を逆転写PCR (RT-PCR) し、2本鎖cDNAに変換・増幅後、ライブラリー構築時と同様の方法を用い、次ラウンドのスクリーニングに用いる、IVVライブラリーとした。このIVVライブラリースクリーニングラウンドを6回行った時の各ラウンド後のmRNAのPAGEの結果を図6に示す。FK506を固定した樹脂でスクリーニングした場合、6ラウンド後のmRNAにおいて、RNAの鎖長で約500塩基前後の所にFKBP-12のmRNA (IVV化のための5'UTRやタグ配列を含めたため450塩基) と考えられるバンドが認められた。Mock樹脂では約200塩基の所に2バンド認められ、同様のバンドはFK506固定樹脂でも確認された。

これらの両樹脂で認められたバンドは、ビオチン結合蛋白質であるNeutrAvidinに結合する蛋白質に由来すると考え、FK506を固定するビーズをstreptavidin agarose (Pierce社)樹脂に変え、さらに2ラウンド(全部で8ラウンド)のスクリーニングを行った。FK506固定樹脂における約500塩基のバンドは濃くなり、約200塩基の所の

バンドは消失した(図6、FK506 beads r8)。

8ラウンド後のIVVライブラリーを逆転写PCR (RT-PCR)によりcDNAに変換・増幅し、cDNAをクローニング後、80クローンについてDNA配列解析した。その結果、35クローンがFKBP-12であり、FK506固定樹脂を用いたIVVライブラリースクリーニングで、FKBP-12が特異的に濃縮されていた。

スクリーニングでのFKBP-12の濃縮度を算出するため、各スクリーニングラウンド後cDNAに変換したライブラリー中のFKBP-12のcDNA濃度を定量した。定量はリアルタイムPCR装置を用い行った。図7に示すように、スクリーニング前のライブラリーでは全cDNA (5 ng:  $5 \times 10^9$  copies)中に $6 \times 10^4$  copiesのFKBP-12のcDNAが含まれていた。8ラウンド後のライブラリーでは、FK506固定樹脂を用いた場合 $1.6 \times 10^9$  copies FKBP-12存在しており、約3万倍の濃縮が認められた。一方、FK506と相互作用しない $\beta$ -actinやmock樹脂におけるFK506の濃縮は認められず、FK506固定樹脂におけるFKBP-12の特異的な濃縮が確認できた。

## 3. イレッサ固定用アフィニティプローブの作製とIVVライブラリースクリーニング

イレッサ(図8)は、近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、副作用として重篤な間質性肺炎を併発する症例が多く報告され、副作用の機序解明が望まれている。

構造活性相関を検討した結果、主作用であるEGFレセプターとの結合による酵素阻害活性は、イレッサの母核である4-アニリノキナゾリン部分が担っており、母核以外の置換基は代謝を遅延するためのものであることがわかった。このことから、6位のモルフォリノプロピル基をアミノエトキシ基に置換し、ビオチンリンカーを導入した「イレッサ誘導体1」を合成した(図9)。また、4'位のフッ素をカルボン酸に置換し、ビオチンリンカーを導入した「イレッサ誘

導体 2」を合成した (図 1 0)。これらの化合物はマスペクトルにより同定した。

イレッサ誘導体 1 のチロシンキナーゼ結合能を調べる目的で pull down assay を行った。クローニングした EGF レセプターのチロシンキナーゼ領域の cDNA に PCR により、5' 側に SP6 プロモーターと  $\Omega$  29 エンハンサー配列を、3' 側に Flag tag 配列を付加した後、転写、無細胞翻訳系 (小麦胚芽由来およびウサギ網状赤血球由来) での翻訳を行い、EGF レセプターのチロシンキナーゼ領域の蛋白質 (EGFR-TK: 340 アミノ酸) を作製した。バッファーに懸濁したイレッサ誘導体 1 を固定したアフィニティ樹脂に、上記の蛋白質を結合させ、洗浄後、SDS PAGE を行い、ウエスタンブロット法により、抗 Flag tag で検出した。対照にはイレッサ誘導体 1 非固定アフィニティ樹脂を用いた。図 1 1 に示したように、イレッサ誘導体 1 固定アフィニティ樹脂では、EGFR-TK が検出された (Beads Iressa, Wheat germ and Beads Iressa, reticulocyte)。一方、非固定アフィニティ樹脂 (Beads Mock, Wheat germ and Beads Mock, reticulocyte) ではバンドは認められず、小麦胚芽由来およびウサギ網状赤血球由来の両方の無細胞翻訳系で発現した EGFR-TK 双方とも、イレッサ誘導体 1 と特異的に結合した。またイレッサ誘導体 2 でも同様に結果が得られた。

イレッサ誘導体 1 およびイレッサ誘導体 2 を固定したアフィニティ樹脂を用い、ヒト肺由来 IVV ライブラリーのスクリーニングを行った。方法は FK506 の場合と同様であるので省略するが、スクリーニングラウンドを 6 回行った後の mRNA の PAGE を図 1 2 に示す。イレッサ誘導体 1 およびイレッサ誘導体 2 を固定したアフィニティ樹脂でスクリーニングした場合、薬剤非結合 (mock) 樹脂の場合には検出されない RNA のバンドが認められ、イレッサ誘導体に特異的に結合した蛋白質の濃縮を示唆していた。cDNA に変換後、クローニング、DNA 配列解析を行ったところ、細胞内のシグナルトランスダクションに関与するレセプター結合蛋白質を複数クローン検出した。この蛋白質は

新たなイレッサの結合蛋白質の可能性があり、現在生化学的な解析を進めている。さらに、他の遺伝子配列も確認され BLAST 検索等アノテーション解析を行っている。

#### 4. レチノイド誘導体固定用アフィニティプローブの作製とモデル系でのアフィニティ選択実験

レチノイドとはビタミン A の代謝産物である retinoic acid と同等の生理活性をもつ化合物をいう。レチノイドは白血病や乾癬などの難治性皮膚疾患に対する治療薬で、核内受容体 retinoic acid receptor (RAR) を介し遺伝子の発現を調節し、白血病細胞や皮膚上皮細胞を分化させることにより効果を発揮する。Am-80 (図 1 3) や Ch-55 (図 1 3) は合成レチノイドの中でも活性の強い化合物であり、Am-80 は現在治験段階にある。しかし、副作用としてレチノイドシンドローム (骨の痛み、頭痛、吐き気など) が知られている。

ビオチンリンカーを付与したレチノイド誘導体は、影近らにより報告されている方法 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 1988, 155, 503.) にしたがって合成し、ビオチン化 Am-80 誘導体 (図 1 4) とビオチン化 Ch-55 誘導体 (図 1 5) を得た。図 1 4 および図 1 5 に示した各合成スキームは、既知であり詳細については省略する。これらの化合物を NeutrAvidin agarose 樹脂に固定し、アフィニティ樹脂を作製した。

無細胞翻訳系により作製した RAR と Am-80 固定アフィニティ樹脂の結合性を確認した。当研究室で開発した、無細胞翻訳系に蛍光標識 puromycin 誘導体を加える蛋白質の C 末端ラベル化法を用い、C 末端をフルオレセイン化 (蛍光標識) した RAR を作製した。前項目により作製した Am-80 固定樹脂と蛍光標識 RAR をアフィニティ吸着させ、樹脂を洗浄後、SDS-PAGE loading buffer で樹脂から蛋白を溶出させ、SDS-PAGE を行い、フルオレセインにより蛍光検出した (図 1 6)。このときネガティブコントロールとして、樹脂にビオチンのみを提示した mock 樹脂を用いた。この pull down assay

の結果、無細胞翻訳系により作製した RAR は Am-80 固定樹脂と特異的に結合した (図 1 6、Am-80 beads)。

RAR IVV ビリオンの作製については次の通りである。クローニングされた RAR の cDNA をもとに、PCR により、IVV 形成に必要な 5' 側非翻訳領域 (5' UTR: プロモーター配列など) と 3' tail (oligo A など) を付加後、転写し、mRNA を作製した。つぎに、ピューロマイシンを末端に持つポリエチレングリコール含有スペーサー (PEG スペーサー) を RNA リガーゼで連結し、IVV ゲノムを得た。ここで、PEG スペーサーには、IVV ビリオンの生成効率 (対応付け効率) 測定のために行うゲル電気泳動の蛍光検出の目的で、蛍光色素 (フルオレセイン) を導入してある。得られた IVV ゲノムをウサギ網状赤血球由来無細胞翻訳系に加え、RAR の C 末端が mRNA の 3' 末端に連結された IVV ビリオンを得た。ライゲーションと無細胞翻訳系の反応液のゲル電気泳動の結果を図 1 7 に示す。PEG スペーサーと mRNA の連結効率 (IVV ゲノムの収率) は 46% 程度 (図 1 7 a)、対応付け効率は 30% 程度 (図 1 7 b) であった。

最後に Am-80 固定樹脂を用いたモデル系での RAR IVV のアフィニティ選択実験を行った。RAR とネガティブコントロールに glutathione-S-transferase (GST) の断片蛋白質 (160 アミノ酸) の IVV ビリオンを等量混合し、Am-80 固定樹脂にアフィニティ吸着させた。ついで樹脂を洗浄後、樹脂をテンプレートにした RT-PCR を行い、それぞれの PCR 産物をアガロース電気泳動で分離することで、Am-80 固定樹脂吸着した RAR と GST の割合を調べた (図 1 8)。RT-PCR は、RAR (802base) と GST (541base) 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、30cycle PCR 増幅させると、双方が同時に同程度増幅された (図 1 8、レーン Input)。Am-80 固定樹脂では RAR のバンドだけが検出され (図 1 8、レーン Am-80 beads)、Am-80 非固定樹脂では RAR と GST の両方とも検出されなかった (図 1 8、レーン Mock beads)。こ

の実験結果は RAR の IVV ビリオンが Am-80 固定樹脂に選択的に吸着されたことを示す。

RAR の濃縮度を測定するため、リアルタイム PCR 装置を用い、Am-80 固定樹脂と Input の溶液に含有している RAR と GST の RNA 濃度を定量した。リアルタイム RT-PCR による定量は RAR あるいは GST に選択的なプライマーを用い、100 bp 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  $10^{-10^9}$  copies/ $\mu$ l の範囲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 で定量した結果、input では、RAR の RNA が  $2.9 \times 10^8$  copies/ $\mu$ l、GST の RNA が  $3.5 \times 10^8$  copies/ $\mu$ l でそれぞれ存在するのに対し、Am-80 固定樹脂には RAR ( $1.1 \times 10^5$  copies/ $\mu$ l) と GST ( $4.2 \times 10^4$  copies/ $\mu$ l) がそれぞれ存在し、RAR が GST に対し 3.2 倍濃縮されていた (表 1)。

(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

ベクター組込みや形質転換等遺伝子組換え法を用いない、PCR 等 *in vitro* の手法のみを用いた方法で、市販マウス脳由来 mRNA ライブラリーより IVV ライブラリーの構築を行った結果、最低鎖長が長く鎖長分布が均質でしかも多種の遺伝子を含むライブラリーを得ることができた。同様の方法でヒト肺およびヒト脳由来 IVV ライブラリーも構築することができ、汎用的な IVV ライブラリー構築法を確立することができた。

モデル薬剤固定アフィニティプローブを用いた、IVV ライブラリースクリーニングに関し、FK506 固定アフィニティ樹脂を用いた、マウス脳由来 IVV ライブラリースクリーニングの検討を行った。その結果、FKBP-12 の特異的濃縮が確認され、本法の有用性を実証することができた。この成果は第 26 回日本分子生物学会年会 (2003 年 12 月、神戸市) で報告した。このスクリーニング

で2種の固定用アフィニティ樹脂を併用することにより、樹脂特異的なFK506非結合蛋白質の濃縮を防ぐことができた。また、昨年度作製したpurvalanol B固定アフィニティ樹脂を用いた、モデルアフィニティ選択実験でCDC-2のIVVとcyclin B蛋白質複合体の濃縮を確認し、本法が複合体で活性を示す蛋白質の解析にも有用であることを示すことができた。(昨年度報告のFK506固定アフィニティ樹脂を用いたモデルアフィニティ選択実験と同様の研究方法であり、詳細は省略する)。

副作用未知既存薬剤のアフィニティプローブの合成については、分子標的抗癌剤イレッサについて固定用ビオチンリンカー導入部位が異なる2種の誘導体を合成した。これらのイレッサ固定アフィニティ樹脂を用いたIVVライブラリースクリーニングについては、平成16年計画の実施事項であったが、前倒しにて一部実施し、新たなイレッサ結合蛋白質の可能性のある蛋白質の配列解析を実施することができた。また、レチノイド系薬剤であるAm-80固定アフィニティ樹脂を用いた、モデルアフィニティ選択実験でRARリガンド結合部位のIVVの濃縮を確認した。この結果は、本法を核内レセプターに応用した例であり、日本薬学会124年会(2004年3月、大阪市)で発表した。

#### D. 結論

1. *In vitro*の手法のみを用いたIVVライブラリー構築法を確立し、マウス脳およびヒト肺由来IVVライブラリーを構築した。
2. FK506固定アフィニティ樹脂を用いたIVVライブラリースクリーニング実験を実施し、FKBP-12の濃縮に成功した。
3. 副作用未知既存薬剤のアフィニティプローブの合成について、イレッサについて固定用ビオチンリンカー導入部位が異なる2種の誘導体を合成し、開発中のレチノイド系薬剤であるAm-80とCh-55の誘導体をそれぞれ1種、合成した。

4. 平成16年計画の実施事項であったイレッサ固定アフィニティ樹脂を用いたIVVライブラリースクリーニングを前倒しにて一部実施し、新たなイレッサ結合蛋白質の可能性のある蛋白質の配列解析を実施した。

5. Am-80固定アフィニティ樹脂を用いた、モデルアフィニティ選択実験でRARリガンド結合部位のIVVの濃縮を確認した。

#### 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

該当無し

・原著論文

- 1 Yonezawa, M., Doi, N., Higashinaka-gawa, T., and Yanagawa, H. DNA display for *in vitro* selection of diverse peptide libraries. *Nucleic Acids Res.*, *31*, e118, **2003**.
- 2 Miyamoto-Sato, E., Takashima, H., Fuse, S., Sue, K., Ishizaka, M., Tateyama, S., Horisawa, K., Sawasaki, T., Endo, Y., and Yanagawa, H. Highly stable and efficient mRNA templates for mRNA-protein fusions and C-terminal labeled proteins. *Nucleic Acids Res.*, *31*, e78, **2003**.
- 3 Kawahashi, Y., Doi, N., Takashima, H., Tsuda, C., Oishi, Y., Oyama, R., Yonezawa, M., Miyamoto-Sato, E., and Yanagawa, H. *In vitro* protein microarrays for detecting protein-protein interactions: Application of a new method for fluorescence labeling of proteins. *Proteomics*, *3*, 1236-1243, **2003**.
- 4 高嶋秀昭, 柳川弘志. *In vitro* virusを用いた網羅的蛋白質相互作用解析:



プロテオーム解析と創薬への展開.  
*Drug Delivery System*, 18, 519-527,  
2003.

・総説

- 1 宮本悦子, 柳川弘志, *In vitro virus*  
および 蛋白質C末端ラベル化法のポ  
ストゲノム研究への応用、化学と生  
物学の接点がつくる NEW バイオテク  
ノロジー, 多比良和誠、管裕明編、  
*蛋白質 核酸 酵素* 48 (11), 1474-  
1480, 2003.

2. 学会発表

本研究成果の一部は、26回日本分子生物  
学会年会（演題番号：4PA-189, 2003年12  
月、神戸）および日本薬学会124年会（演  
題番号：29 [P2] I-386, 2004年3月、大阪）  
で発表。

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

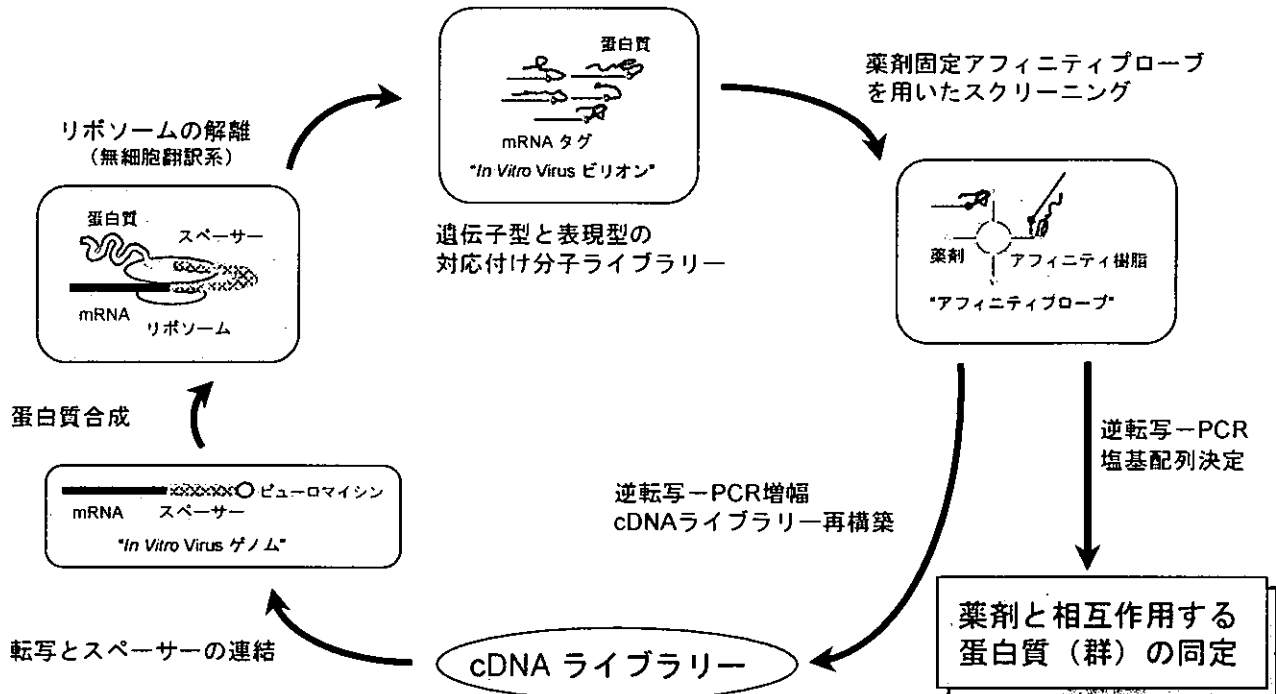


図3 : IVVライブラリーの構築

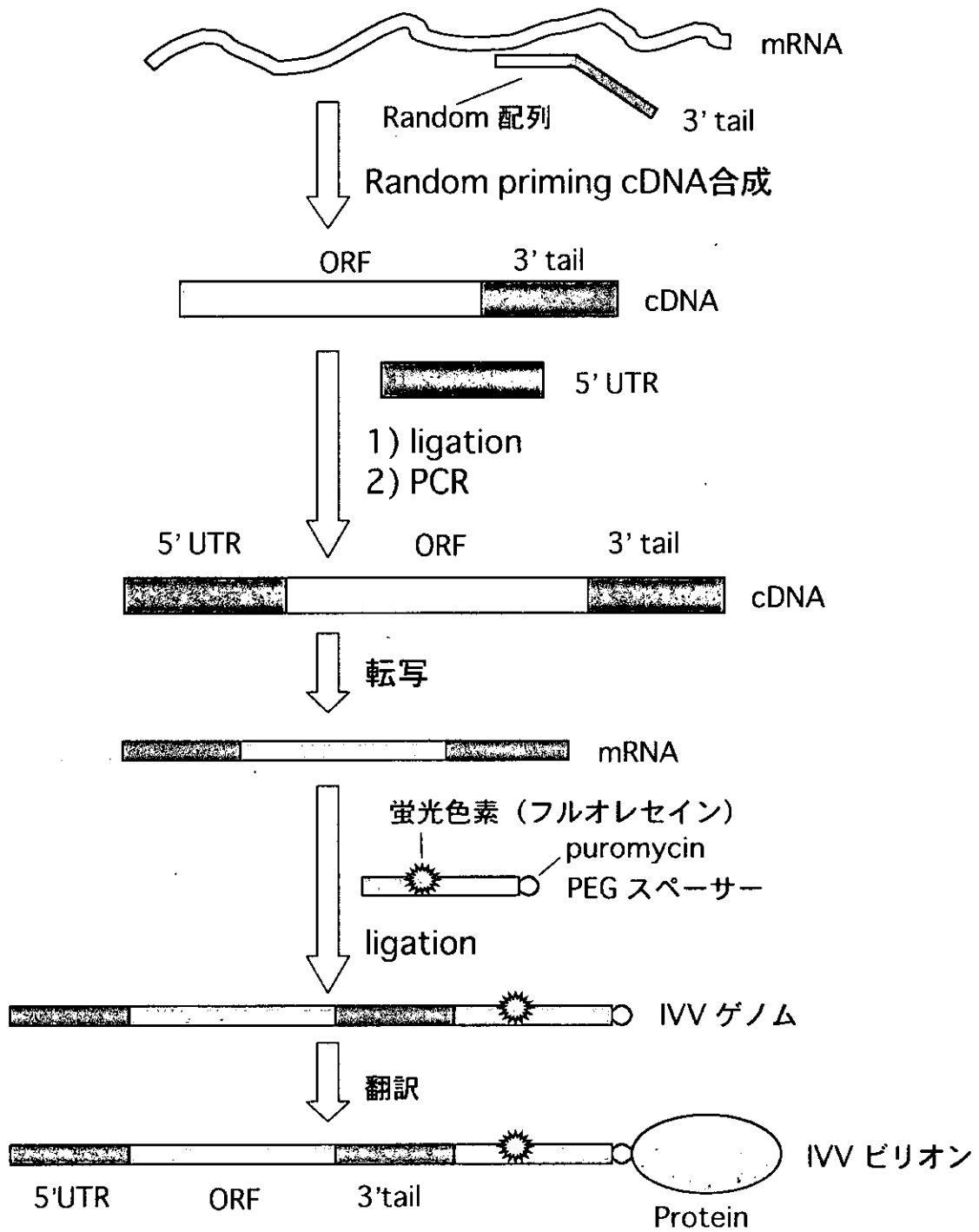


図4：マウス脳由来ライブラリー

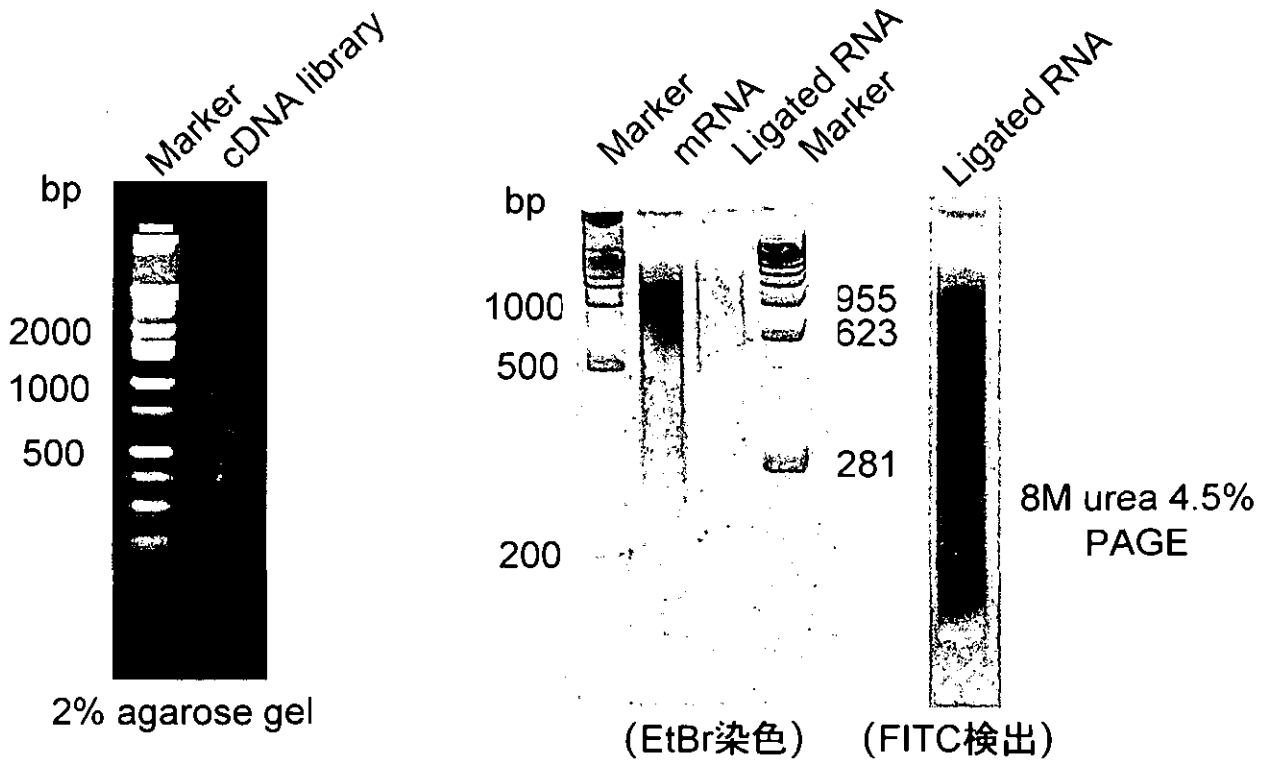


図5：ライブラリーの遺伝子構成

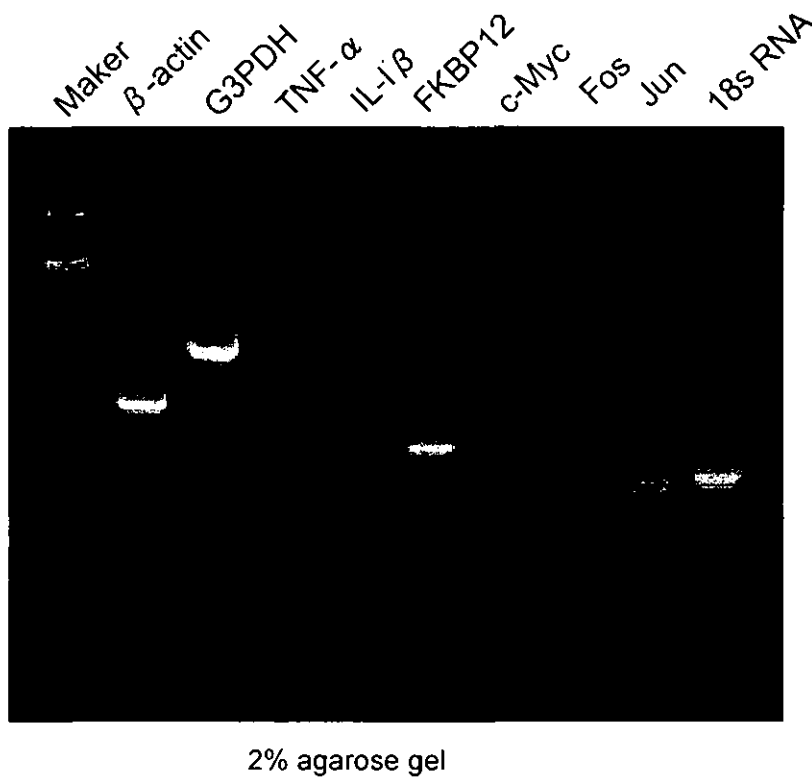
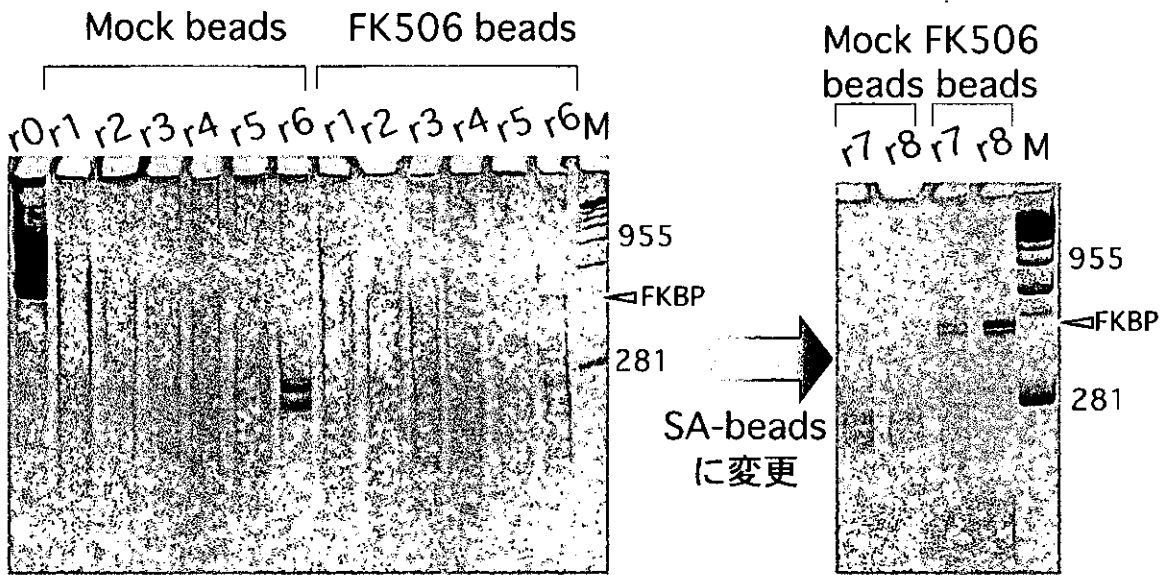


図6：各スクリーニングラウンド後の mRNA の urea-PAGE



(8M urea 4.5% PAGE、EtBr染色)

図7：ライブラリー中のFKBP-12 cDNA濃度の定量

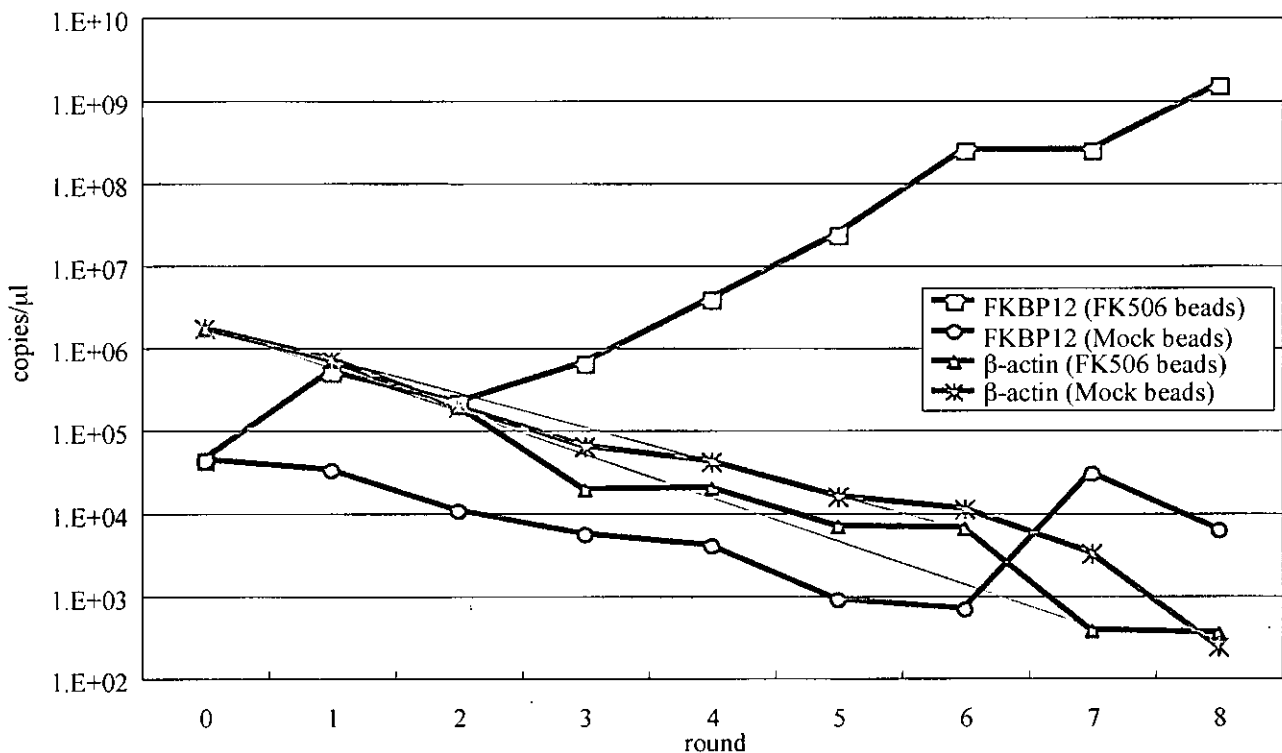


図 8 : イレッサの構造

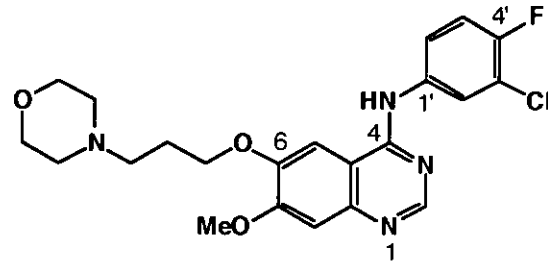


図 9 : イレッサ誘導体 1 の合成

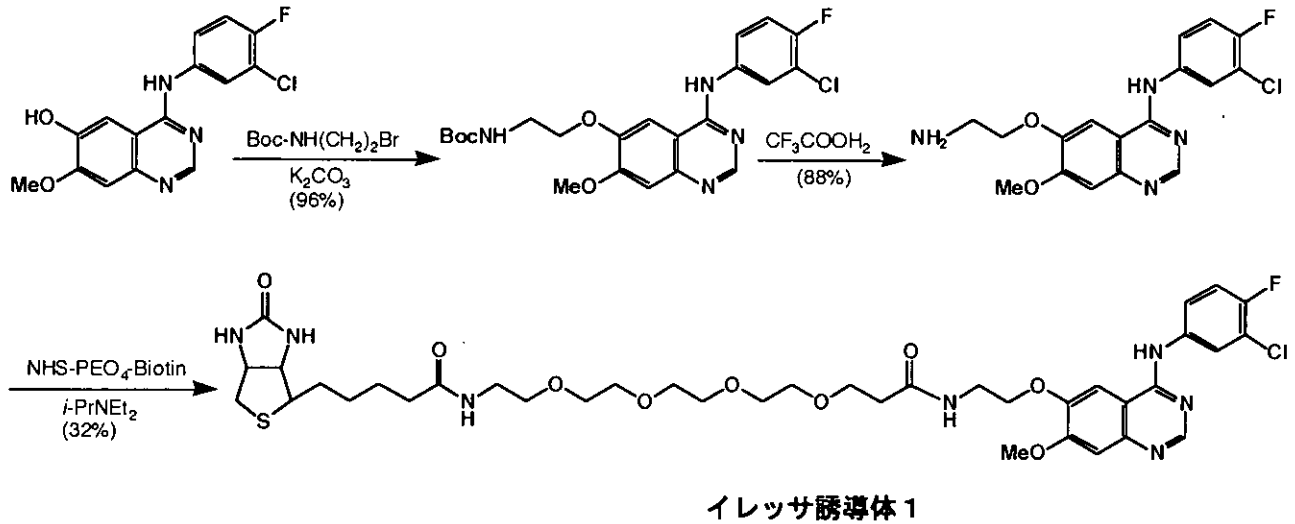


図 10 : イレッサ誘導体 2 の合成

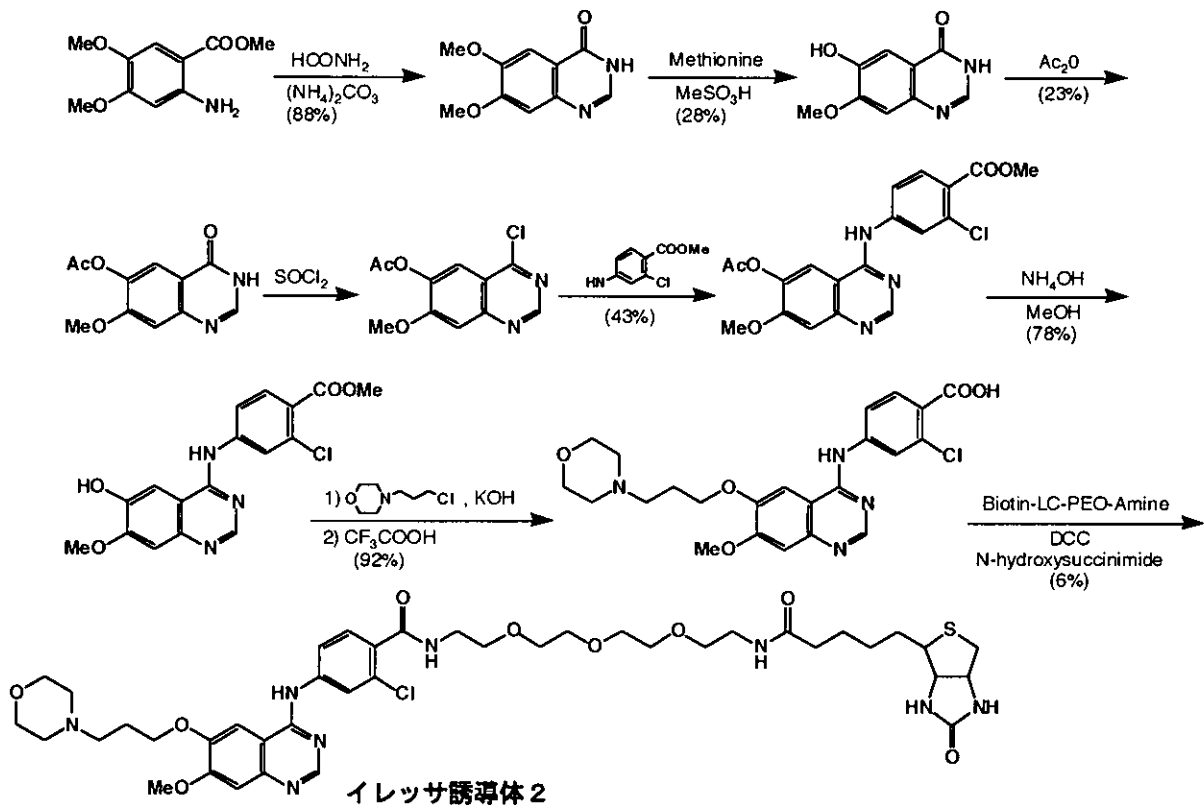


図 1 1 : イレッサ誘導体 1 固定樹脂を用いたpull down assay

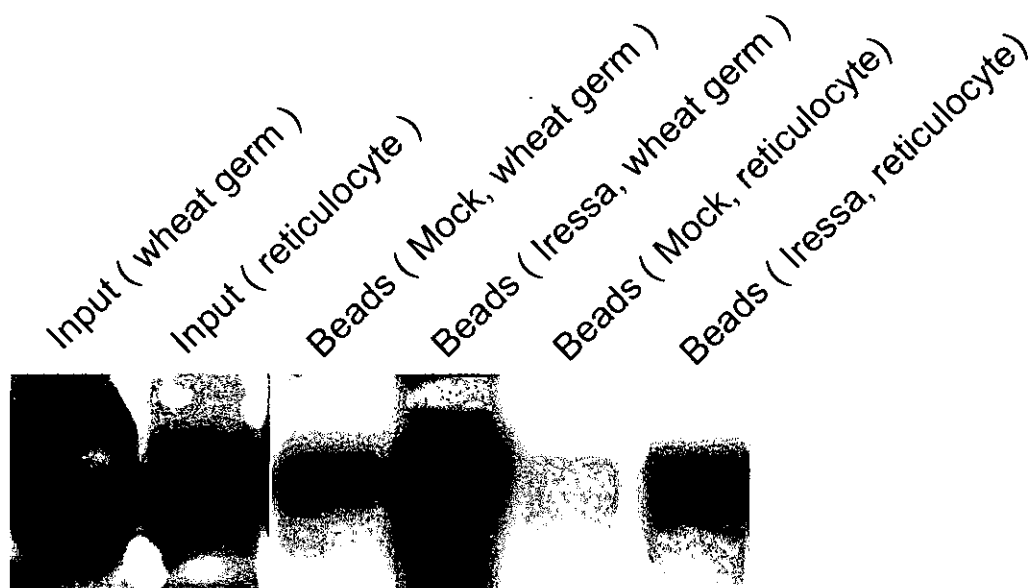
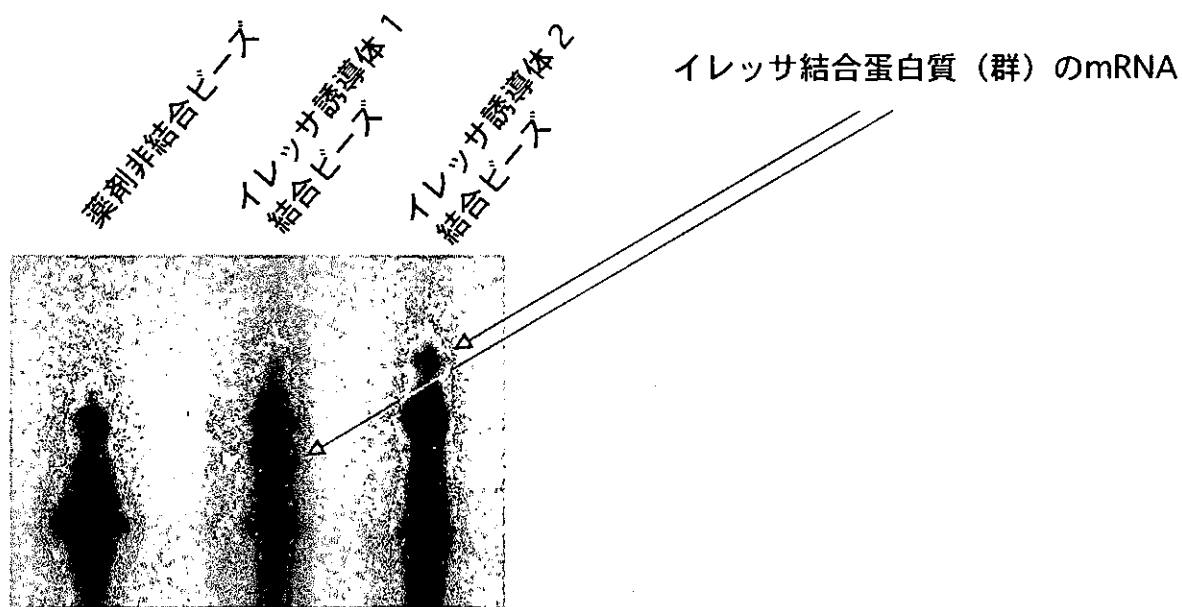


図 1 2 : イレッサ誘導体 1 および 2 固定樹脂を用いたIVVライブラリースクリーニング



6スクリーニングラウンド後のライブラリー mRNAの8M urea-PAGE (4.5%)

図 1 3 : Am-80 と Ch-55

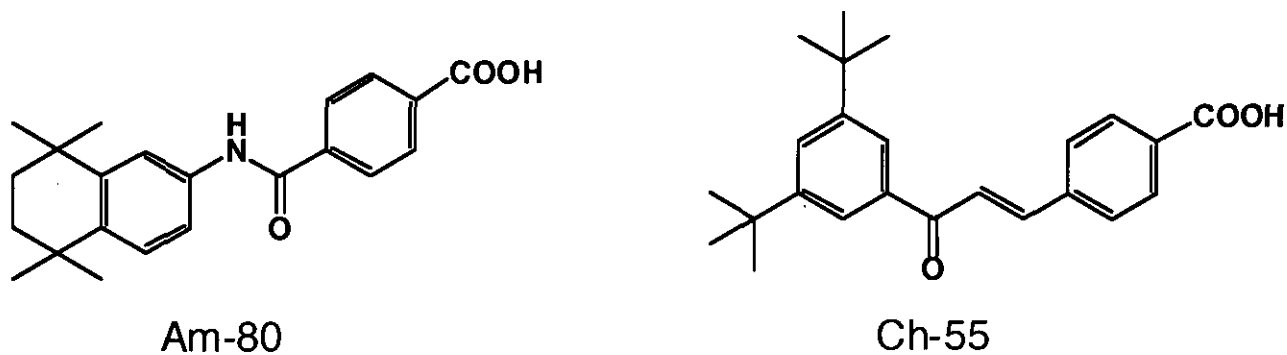


図 1 4 : ビオチン化Am-80誘導体の合成

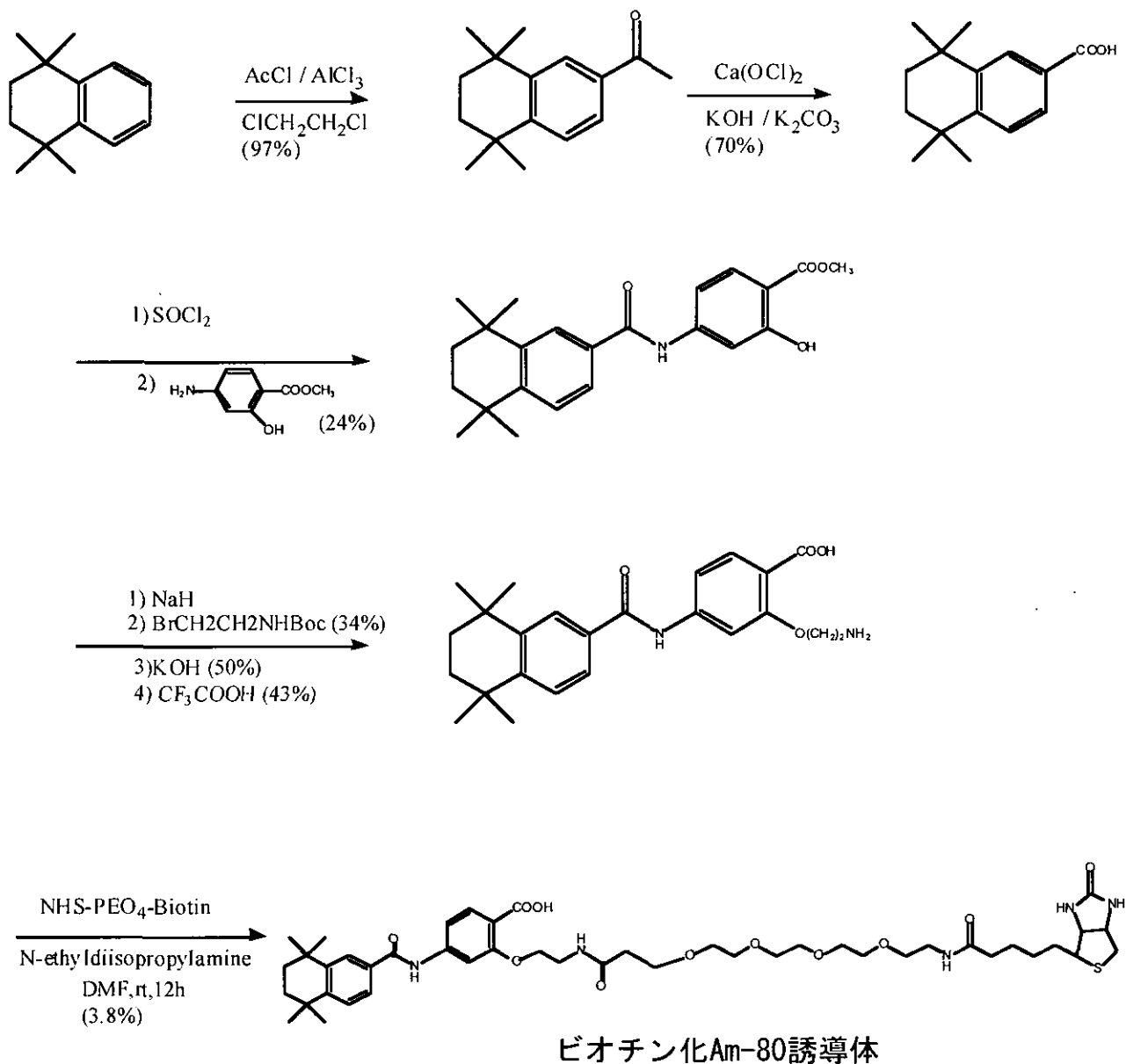




図15：ビオチン化Ch-55誘導体の合成

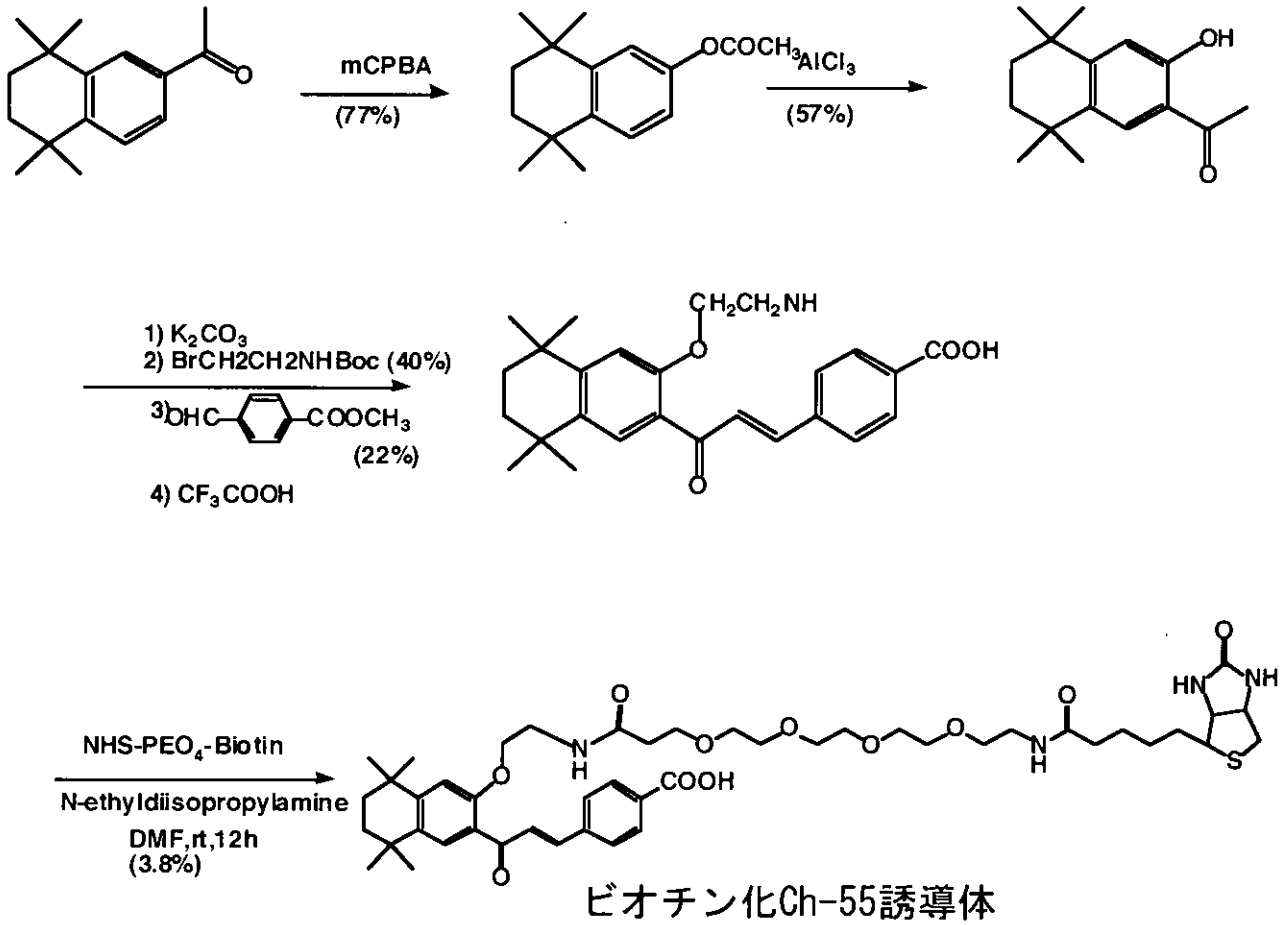


図16：Am-80誘導体固定樹脂を用いたpull down assay

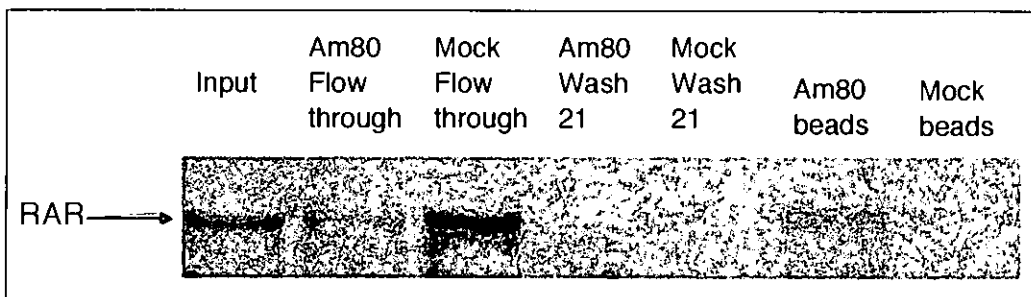


図 1 7 : RARのmRNAとIVVのPAGE

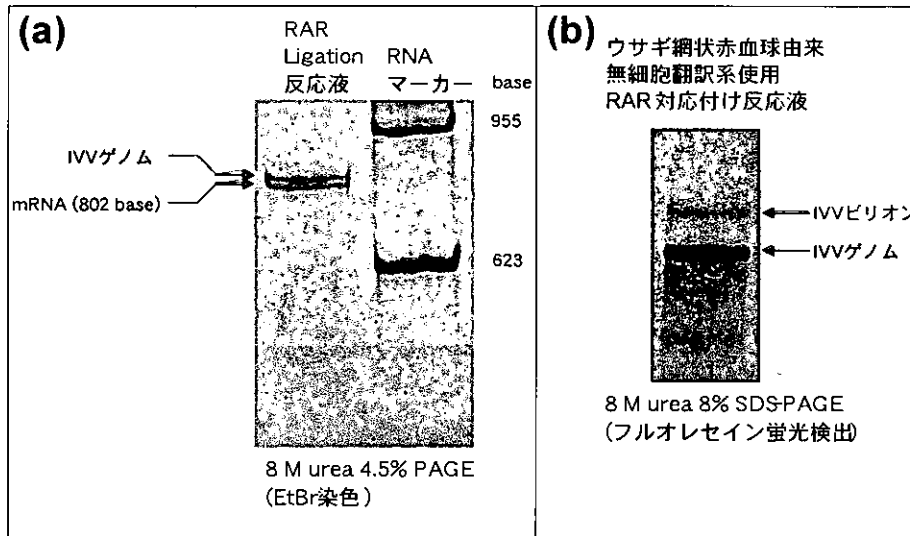


図 1 8 : アフィニティ選択各溶液のRT-PCR

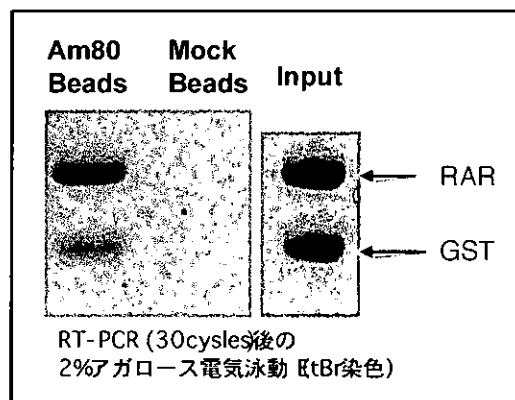


表 1 RAR の濃縮率

Sample	copies/ $\mu$ L		比 (RAR/GST)	濃縮率*
	RAR	GST		
Input	$2.9 \times 10^8$	$3.5 \times 10^8$	0.8	-
Am-80樹脂	$1.1 \times 10^5$	$4.2 \times 10^4$	2.6	3.2

\*濃縮率はAm-80樹脂の比をInputのそれで除した数値  
Inputに対するRARの濃縮率を示す

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

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
Yonezawa, M., Doi, N., Higashinakaga wa, T., Yanagawa, H.	DNA display for in vitro selection of diverse peptide libraries.	<i>Nucleic Acids Res.</i>	31	e118	2003
Miyamoto- Sato, E., Takashima, H., Fuse, S., Sue, K., Ishizaka, M., Tateyama, S., Horisawa, K., Sawasaki, T., Endo, Y., Yanagawa, H.	Highly stable and efficient mRNA templates for mRNA-protein fusions and C- terminal labeled proteins.	<i>Nucleic Acids Res.</i>	31	e78	2003
Kawahashi, Y., Doi, N., Takashima, H., Tsuda, C., Oishi, Y., Oyama, R., Yonezawa, M., Miyamoto- Sato, E., Yanagawa, H.	<i>In vitro</i> protein microarrays for detecting protein- protein interactions: Application of a new method for fluorescence labeling of proteins.	<i>Proteo- mics</i>	3	1236- 1243	2003

高嶋秀昭、 柳川弘志	In vitro virus を用いた網羅的蛋 白質相互作用解 析：プロテオーム 解析と創薬への展 開.	Drug Delivery System	18	519-527	2003
宮本悦子、 柳川弘志	In vitro virus および 蛋白質C末 端ラベル化法のポ ストゲノム研究へ の応用、化学と生 物学の接点がつく るNEWバイオテク ノロジー	蛋白質・核 酸・酵素	48	1474- 1480	2003