

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16年度 総括研究報告書

主任研究者 柳川 弘志

平成17(2005)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	-----	15
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	16

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、副作用機序未知の既存薬剤をベイトに用いたIVVスクリーニングを行った。イレッサの誘導体であるIre-1とIre-2をベイトに用いた、ヒト肺mRNA由来IVVライブラリーのスクリーニングでは、TRPC4と呼ばれる蛋白質をコードするRNAの一部しか濃縮されなかった。そこで、IVVライブラリーの作製において、特定の遺伝子を除去する方法を開発し、TRPC4を含まないライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、Ire-1とIre-2の両者に結合する可能性がある20種の蛋白質を見出した。サリドマイド誘導体をベイトに用いた、ヒト胎児mRNA由来IVVライブラリーのスクリーニングでは、サリドマイドに結合する可能性がある18種の蛋白質を見出した。レチノイドであるAm80とCh55誘導体をベイトに用い、IVVの核酸部分を2本鎖化したヒト脳mRNA由来IVVライブラリーのスクリーニングを行い、Am80とCh55誘導体に結合する蛋白質を1種同定した。以上の結果より、トキシコゲノミックス（プロテオミックス）の手法としての、IVVを用いた網羅的な薬剤結合蛋白質解析技術を開発することができた。

A. 研究目的

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。また、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、遺伝子型（核酸）と表現型（蛋白質）の対応付け分子である *in vitro virus* (IVV, 図1)を提案し、その作製法やプロテオーム解析への応用について研究を行ってきた。IVVとは、mRNAとそれ自身をコードしている蛋白質を、ピューロマイシンという抗生物質を介し共有結合させた、対応付け分子である。プロテオーム解析にIVVを用いると、蛋白質配列を核酸配列で決定できるため、非常に高感度な解析手段を構

築することができる。

本研究の目的は、IVV を用いた、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。この手法を確立することができれば、薬剤と相互作用する蛋白質を網羅的に解析することができ、未知の副作用発現の予測が可能になる。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樹脂の作製（2）組織等由来mRNAライブラリーからのIVVライブラリーの作製（3）アフィニティ選択による薬剤と相互作用する蛋白質（IVV）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IVVライブラリーを作製し（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の濃縮度を上げること期待される。

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)、および蛋白質キナーゼ阻害剤purvalanol Bを固定したアフィニティ樹脂の作製を完了した。FK506とFKLを固定したアフィニティ樹脂用いた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FK506結合蛋白質(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樹脂作製に

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、*in vitro*の手法のみを用いたIVVライブラリー作製法を確立し、マウス脳およびヒト肺mRNA由来IVVライブラリーを作製した。FK506固定アフィニティ樹脂を用いた、マウス脳mRNA由来IVVライブラリーのスクリーニングを行い、FKBP-12の濃縮に成功した。副作用未知の既存薬剤のアフィニティ樹脂の作製に関して、イレッサの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。また、開発中のレチノイド系薬剤であるAm80とCh55にビオチンリンカーを導入した誘導体をそれぞれ1種、合成した。Am80固定アフィニティ樹脂を用いた、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。

本年度（平成16年度）の目標は、昨年度までに作製した、イレッサ（2種）、サリドマイド、およびレチノイド誘導体（Am80、Ch55）固定アフィニティ樹脂を用いた、IVVスクリーニングを実施し、薬剤結合蛋白質のプロテオーム解析を行い、副作用に関与する可能性がある蛋白質の同定につなげることであった。以下に平成16年度の研究結果について記載する。

B. 研究方法・結果

1. イレッサ誘導体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

イレッサ（図3）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、副作用機序の解明が望まれている。

構造活性相関情報より、主作用に影響が低いと考えられる部位にビオチンリンカーを導入した、イレッサ誘導体 1 (Ire-1; 図 4) およびイレッサ誘導体 2 (Ire-2; 図 5) を合成した。これらの化合物をアビジンアガロース樹脂に固定し、IVV スクリーニングを行った。スクリーニング方法は以下の通りである。ベイトとして Ire-1, Ire-2, あるいはビオチン (mock) を固定した NeutrAvidin agarose (Pierce 社) 樹脂を、結合・洗浄用 buffer で懸濁後、ヒト肺 mRNA 由来 IVV ライブラリーを加え、IVV を結合させた。各樹脂を結合・洗浄用 buffer で洗浄後、残渣の樹脂の懸濁液を逆転写 PCR (RT-PCR) し、2 本鎖 cDNA に変換・増幅後、mRNA に転写、ピューロマイシン含有スペーサーとのライゲーション、小麦胚芽無細胞翻訳系による翻訳・対応付けを行い (図 2 参照)、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 回行った後、cDNA ライブラリーをクローニングし、それぞれのベイトについて、96 個のクローンよりシーケンシングを行った。Mock で出現する非特異的に吸着したと考えられる蛋白質の配列を除き、DNA 配列のマルチプルアラインメントを行った。

Ire-1 をベイトにした場合は、52 クロウンが mock と共通だったので、44 クロウンのマルチプルアラインメントの模式図を図 6 に、Ire-2 をベイトにした場合は、同様に、41 クロウンのマルチプルアラインメントの模式図を図 7 に示す。ここで、Ire-1 (3 クロウン) と Ire-2 (11 クロウン) に共通する配列として、Homo sapiens transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4 (TRPC4, refseq: NM_015638) の部分配列が見出された。しかし、この TRPC4 の部分配列は、ストップコドンが出現するフレームで IVV に挿入されており (フレームシフトして IVV に挿入されている)、蛋白質に翻訳されない (IVV 対応付け分子を形成しない) 配列

であった。すなわち、IVV ライブラリー中の TRPC4 の RNA が、ベイトであるイレッサ誘導体に結合し濃縮されたと考えられる。

IVV ライブラリースクリーニングラウンドをさらにもう一度 (全体で 7 ラウンド) 行い、cDNA ライブラリーのクローニング・配列解析を行った。その結果、Ire-1, Ire-2 の両者とも TRPC4 を含むクローンの割合が 80% 程度になった。以上の結果を総合すると、スクリーニング前の IVV ライブラリーに TRPC4 の配列が含まれていると、TRPC4 だけが高効率で濃縮され、イレッサ誘導体に特異的に結合する蛋白質の濃縮を妨害すると考えられた。そこで、IVV ライブラリー作製時に、TRPC4 の配列を除去する方法を検討した。

IVV ライブラリー作成法は、昨年度の報告書に記載しているが、簡単に説明すると以下の通りである。(1) 組織等由来 mRNA (poly A⁺ RNA) ライブラリーのランダムプライミングによる逆転写 (cDNA ライブラリーの作製) (2) IVV 化のための共通 DNA 配列と cDNA ライブラリーの連結 (IVV テンプレート cDNA ライブラリーの作製)

(3) PCR を用いた、IVV テンプレート cDNA ライブラリーの増幅 (4) IVV テンプレート cDNA ライブラリーの転写 (IVV テンプレート mRNA ライブラリーの作製) (5) IVV テンプレート mRNA ライブラリーとピューロマイシン含有 PEG スペーサーとの連結 (6) 無細胞翻訳系を用いた蛋白質発現 (RNA と蛋白質の対応付け)。ここで、TRPC4 の配列を除去するため、ビオチン化された DNA プローブによるハイブリダイゼーションを利用した、サブトラクション法を検討した。まず、TRPC4 の部分配列を持つビオチン化された DNA (+鎖と-鎖の両方) を化学合成し、この DNA プローブを過剰量 PCR 増幅後の IVV テンプレート cDNA ライブラリーに加えハイブリダイズさせた。次に、ビオチン化 DNA プローブとハイブリダイズした TRPC4 DNA を NeutrAvidin agarose で除去した。上清の溶液中の DNA を精製後、PCR で増幅し、IVV テンプレート cDNA ライブラリーとした。この IVV テンプレート

cDNA ライブラリーを、上記の 4, 5, 6 の工程で処理し、TRPC4 を除去した IVV ライブラリーを作製した。

以上の TRPC4 除去 IVV ライブラリーを、Ire-1 あるいは Ire-2 固定アフィニティ樹脂でスクリーニングした。5 ラウンドのスクリーニング後の cDNA ライブラリーをクローニングし、配列解析を行った。5 ラウンド後の RNA の PAGE パターンを図 8 に示す。RNA の PAGE パターンより、Ire-1 と Ire-2 の場合とも mock に無いバンドが認められ、リガンド特異的な蛋白質 (IVV) の濃縮が推定される。配列解析後 (Ire-1 と Ire-2 ベイトの場合をマージ) の 530 配列のマルチプルアラインメントの模式図を図 9 に示す。マルチプルアラインメントの結果から、20 種の Ire-1 と Ire-2 の場合に共通する配列が見出された。現在、BLAST サーチやアノテーション解析を行い、バイオインフォマティカルな絞込みを実施中である。

2. サリドマイド誘導体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

サリドマイドの主要な副作用である催奇性は、ヒトの場合、妊娠 8 週までに服用した場合に多く発現している。従って、サリドマイドの副作用に関与している蛋白質のプロテオーム解析を IVV を用いて行う場合、その時期の胎児組織由来 mRNA ライブラリーより IVV ライブラリーを作製する必要がある。本実験では、BD Biosciences 社より販売されている、human fetus (7-11 weeks, whole) poly A+ RNA より IVV ライブラリーを作製した (昨年度実施)。

平成 14 年度に作製したビオチン化サリドマイド誘導体 (図 10) をベイトに用い、ヒト胎児 mRNA 由来 IVV ライブラリーをスクリーニングした。スクリーニング方法は、イレッサ誘導体の場合と同様であるので省略する。スクリーニング後の cDNA ライブラリーをクローニング・配列解析し、マルチプルアラインメントした結果の模式図を図 11 に示す。このスクリーニングでは、18 種のサリドマイド結合蛋白質を同定した。

この中には DNA の修復に関与する蛋白質や転写を抑制する蛋白質が含まれ、サリドマイドの副作用である催奇性との関連が興味深い。現在、これらの蛋白質のバイオインフォマティクスを用いたアノテーション解析や表面プラズモン法等を利用したサリドマイドとの結合性の解析を実施中である。

3. レチノイド誘導体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

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。Am80 (図 12) や Ch55 (図 12) は合成レチノイドの中でも活性の強い化合物であり、Am80 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。本年度は、昨年度合成したビオチンリンカーを導入した Am80 誘導体 (図 13) あるいは Ch55 誘導体 (図 14) を NeutrAvidin agarose 樹脂に固定したアフィニティ樹脂を用い、ヒト脳 mRNA 由来 IVV ライブラリーのスクリーニングを行った。

Am80 や Ch55 は疎水性が高く、核酸類に、特に 1 本鎖の RNA 部分を持つ IVV には強く、非特異的に吸着する可能性が考えられる。そこで、IVV スクリーニングに核酸部分を 2 本鎖 (RNA-DNA ハイブリッド) 化する工程を加えた、非特異的吸着を減少させる方法で、スクリーニングを行った。IVV スクリーニング方法は、イレッサ誘導体の場合と同様であるので省略するが、付け加えた 2 本鎖化の工程の概略を以下に示す。

(1) 通常の方法である、小麦胚芽無細胞翻訳系を用いた方法で、IVV ライブラリーを作製する。(2) IVV ライブラリーが共通配列部分に持つ Flag tag を用いて、アフィニティ精製する。(3) 逆転写酵素を用い

て、IVVのRNA部分を逆転写し、2本鎖化(RNA-DNAハイブリッド)する。(4)通常の方法と同様に、ベイト薬剤を固定したアフィニティ樹脂でスクリーニングする。

以上の方法で、IVVライブラリースクリーニングを12ラウンド行った。図15にAm80をベイトにした場合の8ラウンドから12ラウンド後のRNAのPEGEの結果を、図16にCh55をベイトにした場合のそれを、それぞれ示す。Am80, Ch55ともに350 base付近に、mockには無いRNAのバンド認められ、リガンド選択的にIVVが濃縮されたと考えられた。従って、12ラウンド後のcDNAをクローニングし、配列解析を行った。

表1にAm80を35クローン、Ch55を22クローン、mockを20クローン、計77個を塩基配列解析した結果を示す。表1でAm80, Ch55およびmockの右行に示す数字は、各番号の配列が見出されたクローンの数を示す。Am80の場合、35クローンが8種の配列に、Ch55の場合、22クローンが10種の配列に、mockの場合、20クローンが5種の配列に、それぞれ分類された。この配列の中で、mockで見出されず、IVVに挿入されたopen reading frame中に終止コドンの入っていないのは、Am80に結合した配列1 (261 bp) および配列2 (225 bp) だけであった。

配列1および配列2にコードされている蛋白質が、Am80に結合するかどうかの検証実験を行った。配列1および配列2を含む大腸菌クローンを液体培養後、IVVのcDNAを含むプラスミドを単離し、配列1あるいは配列2の部分をPCRで増幅した。配列1および配列2は、IVV化のための共通配列部分にSP6プロモーター配列を持つので、SP6 RNAポリメラーゼで転写し、得られたmRNAを小麦胚芽無細胞翻訳系で翻訳し、対応する蛋白質を得た。以後、配列1および配列2に対応する蛋白質を、それぞれ蛋白質1および蛋白質2とする。蛋白質1あるいは蛋白質2を、Am80あるいはCh55固定アガロース樹脂と吸着させ、樹脂を3回洗浄した後、樹脂に吸着した蛋白質をSDS-PAGEで分離した。蛋白質1および蛋白質2は共通配列部分にT7-tag配列を持つので、泳動

した蛋白質をウェスタンブロッティングによりT7-tag抗体で検出した。

図17に蛋白質1の場合のウェスタンブロッティングの結果を示す。この図で、Inputは小麦胚芽無細胞翻訳系で翻訳時の反応液、flow throughは樹脂結合時の上清画分、wash3は3回目の樹脂洗浄時の上清画分、beadsは3回目の洗浄後の樹脂画分を示す。蛋白質1は計算値で分子量9.8Kであるので、Inputのバンドは蛋白質1と判断できた。Am80 beadsのレーンに蛋白質1に対応するバンドが認められ、mock beadsレーンにはバンドがほとんど認められなかった。これは、Am80のリガンド選択的に蛋白質1が結合することを示している。また、Ch55固定樹脂とも結合が確認できたことから、蛋白質1はAm80だけでなく、Ch55とも相互作用することが明らかとなった。

蛋白質2に関しては、小麦胚芽無細胞翻訳系で翻訳時の反応液をPAGE後、ウェスタンブロッティングによりT7-tag抗体で検出したが、バンドが全く認められず、蛋白質が生成していないと考えられた。従って、それ以上の検討は行わなかった。

配列1と相同性のある既知DNA配列を検索する目的で、nucleotide-nucleotide BLAST (BLASTN) サーチを行った結果、データベースにmRNAとして登録されていないが、ヒト16番染色体上のゲノム配列の一部とほぼ一致した。また、蛋白質1のアミノ酸配列は、マウスのある感覚受容体の一部分と相同性を示した。

(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やmRNA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

本年度の目標は、昨年度までに作製した、イレッサ、サリドマイド、およびレチノイド誘導体 (Am80, Ch55) 固定アフィニティ樹脂を用いたIVVスクリーニングを実施し、薬剤結合蛋白質のプロテオーム解析を行い、副作用に関与する可能性がある蛋白質の同

定につなげることであった。

イレッサ誘導体である、Ire-1およびIre-2をベイトに用いた、ヒト肺mRNA由来IVVライブラリーのスクリーニングでは、通常通りの方法で作製したIVVライブラリーの場合、TRPC4という蛋白質をコードするRNAの断片が、高効率で濃縮され、副作用に関連する可能性がある蛋白質を見出すことができなかつた。筆者らは、IVVライブラリーの作製において、特定の遺伝子を除去する方法を開発し、TRPC4を含まないヒト肺mRNA由来IVVライブラリーを作製した。このライブラリーのスクリーニングを行ったところ、Ire-1とIre-2の両者に結合する可能性がある20種の蛋白質を見出した。今後の、バイオインフォマティカルな絞込みや、*in vitro*また培養細胞を用いた実験系を用いた研究により、イレッサの副作用の解明につながることを期待される。

サリドマイド誘導体をベイトに用いた、ヒト胎児mRNA由来IVVライブラリーのスクリーニングでは、18種のサリドマイドに結合する可能性がある蛋白質を同定した。この中にはDNAの修復に関与する蛋白質や転写を抑制する蛋白質が含まれ、サリドマイドの副作用である催奇性との関連に興味を持たれる。現在これらの蛋白質のバイオインフォマティクスを用いたアノテーション解析、表面プラズモン法等を利用したサリドマイドとの結合性を解析中である。

レチノイドであるAm80とCh55誘導体をベイトに用いた、ヒト脳mRNA由来IVVライブラリーのスクリーニングでは、1種のAm80とCh55誘導体に結合する蛋白質を同定した。このスクリーニングでは、IVVの核酸部分を2本鎖化したライブラリーを使用した。IVVを2本鎖化する工程で、ライブラリーのサイズ(多様性)が10%程度に減少することが判明している。このスクリーニングで、1種の蛋白質(蛋白質1)しか同定できなかったのは、2本鎖化時のライブラリーサイズの減少に起因しているのかもしれない。より多数のレチノイド結合蛋白質を同定するためには、IVV対応付け時のスケールアップ等ライブラリーサイズの増加を

図る必要がある。

蛋白質1がコードされているDNA配列(配列1)は、BLASTNサーチの結果、ヒト16番染色体上のゲノム配列の一部とほぼ一致した。配列1は、NCBI Reference SequencesデータベースにmRNAとして登録されていないが、染色体地図上で近隣の遺伝子から6 K base pairs (Kbp)と16 Kbp離れており、新規遺伝子の可能性も考えられる。また、蛋白質1のアミノ酸配列は、マウスのある感覚受容体の一部分と相同性を示し、レチノイドとの結合による生物活性の発現と副作用の関連に興味を持たれる。

本研究の目的は、薬剤と相互作用する蛋白質を、IVVを用い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り、3年間の研究で目的を達成することができた。すなわち、IVVを用いたプロテオーム解析に必要な、遺伝子の網羅性が維持されたIVVライブラリー作製法を開発し、薬剤と相互作用する蛋白質が実際に濃縮されるスクリーニング方法を確立した。また、副作用機序未知の医薬品である、サリドマイド、イレッサ、およびレチノイド誘導体と相互作用する蛋白質のスクリーニングを行い、新たな結合蛋白質を同定した。

蛋白質と遺伝子(mRNA)の対応付け分子であるIVVを用いた、薬剤と相互作用する蛋白質のプロテオーム解析法は、新たな薬剤標的蛋白質の発見だけでなく、それらの蛋白質の相互作用ネットワークの解明にも応用できる手法であり、学術的に大きな意義がある。本法を含むIVVを用いたプロテオーム解析法は、世界的にもユニークな手法であり、それらの論文は海外の一流学術雑誌にも掲載され、評価されている。本手法による薬剤と相互作用する蛋白質の網羅的解析は、新規薬剤標的蛋白質の発見をもたらす、医薬品の副作用解明・予測だけでなく、新規医薬品の開発につながる可能性もあり、社会的意義も大きいと考える。

現在までに見出した種々の薬剤結合蛋白質が、*in vitro*や細胞内等で、実際に薬剤と相互作用するかを確認する必要がある。

また、副作用機序の実際の解明のためには、それらの薬剤が、今回見出された蛋白質と相互作用することにより、どのような生命現象を引き起すかを研究する必要がある。今後、*in vitro*アッセイ系や細胞生物学的手法を用い、今回スクリーニングのベイトに用いた薬剤の副作用機序の解明の研究を実施したいと考えている。

(追記)

本年度同定した、薬剤と結合する蛋白質配列およびそれらをコードするDNA配列は、特許取得の可能性があるため、各配列データおよび蛋白質の具体的な名称の公表は、本報告書では差し控える。

D. 結論

1. イレッサの誘導体であるIre-1とIre-2をベイトにしたIVVスクリーニングを行った結果、通常のIVVライブラリーでは、TRPC4の部分配列RNAしか濃縮されなかった。

2. IVVライブラリーの作製において、特定の遺伝子を除去する方法を開発し、TRPC4を含まないヒト肺mRNA由来IVVライブラリーを作製した。このライブラリーのスクリーニングを行い、Ire-1とIre-2の両者に結合する可能性がある20種の蛋白質を見出した。

3. サリドマイド誘導体をベイトに用い、ヒト胎児mRNA由来IVVライブラリーをスクリーニングし、サリドマイドに結合する可能性がある18種の蛋白質を見出した。

4. レチノイドであるAm80とCh55誘導体をベイトに用い、IVVの核酸部分を2本鎖化したヒト脳mRNA由来IVVライブラリーのスクリーニングを行い、Am80とCh55誘導体に結合する蛋白質を1種同定した。

5. 以上の結果より、トキシコゲノミックス(プロテオミックス)の手法としての、IVVを用いた網羅的な薬剤結合蛋白質解析技術を開発することができた。

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 Horisawa K, Tateyama S, Ishizaka M, Matsumura N, Takashima H, Miyamoto-Sato E, Doi N, Yanagawa H. *In vitro* selection of Jun-associated proteins using mRNA display. *Nucleic Acids Res.* 32, e169, 2004.

2 Horisawa K, Doi N, Takashima H, Yanagawa H. Application of quantitative real-time PCR for monitoring the process of enrichment of clones on *In vitro* protein selection. *J Biochem (Tokyo)*, 137, 121-4, 2005.

3 Miyamoto-Sato E, Ishizaka M, Horisawa K, Tateyama S, Fuse S, Takashima H, Sue K, Yanagawa H. Cell-free co-translation and selection using *in vitro* virus for high-throughput analysis of protein-protein interactions and complexes. *Genome Res.* in press.

・総説

1 宮本悦子, 柳川弘志. 生物機能解明に向けた*In vitro* virus (IVV)法によるゲノムネットワーク解析. *蛋白質・核酸・酵素*, 49, 2768-2774, 2004.

2. 学会発表

1 高嶋秀昭, 石塚史人, 内海明子, 柳川弘志. *In vitro* virus法を用いた薬剤結合蛋白質の網羅的解析, 第23回メディシナルケミストリーシンポジウム, つくば, 2004.

G. 知的財産権の出願・登録状況

現在、本研究で見出した、各医薬品と結合する蛋白質及びそれらの遺伝子の特許を作成し、出願する予定である。

図 1 : *In Vitro Virus* (IVV)



***In vitro virus* (IVV, 蛋白質-核酸対応付け分子)**

- ・蛋白質にそれ自身をコードするmRNAを結合させた分子
- ・mRNA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^{1,2}

1) Nemoto, N. et al. *FEBS Lett.* **1997**, *414*, 405-408.
 2) Doi, N. and Yanagawa, H. *FEBS Lett.* **1999**, *457*, 227-230.

IVV 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 : IVVを用いた薬剤相互作用プロテオーム解析

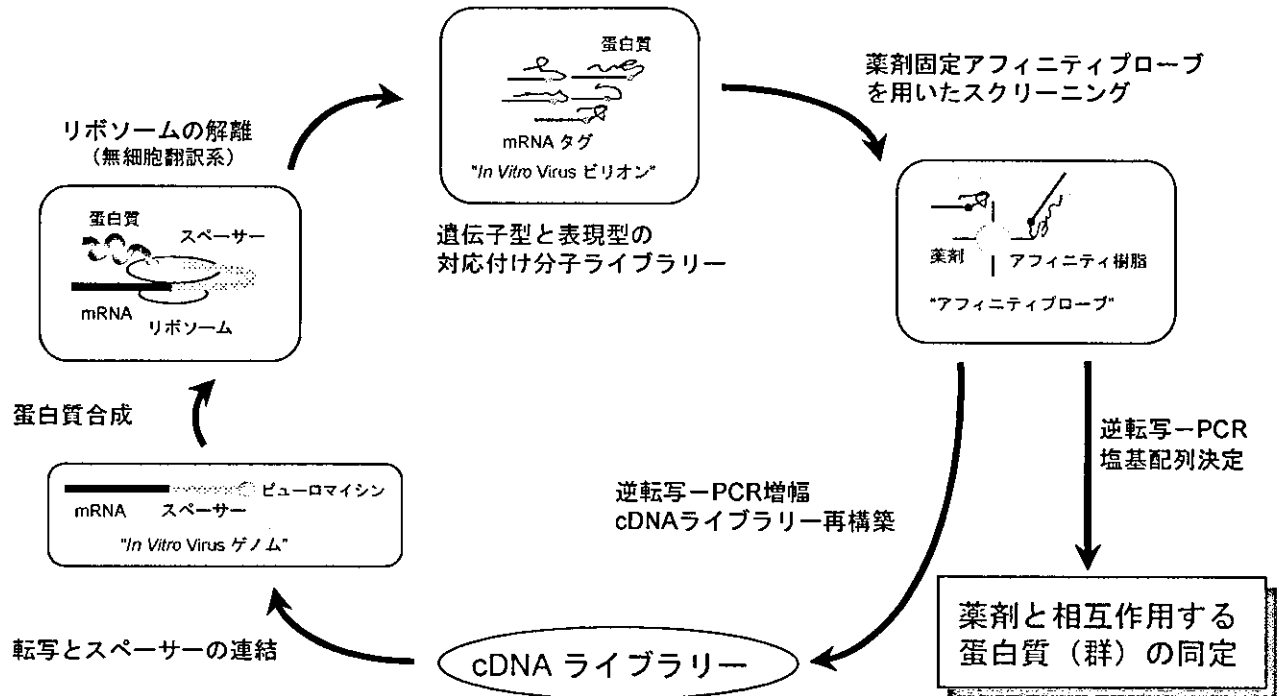


図7：Ire-2をベイトにした場合のスクリーニング後の
マルチプルアラインメントの結果



図8：5スクリーニングラウンド後のmRNA (8M urea, 4.5% PAGE)

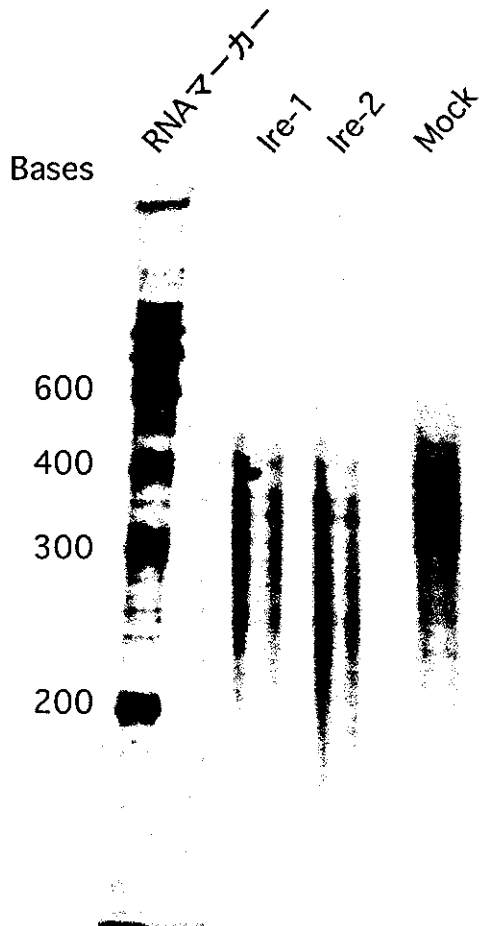


図 9 : TRPC4除去IVVライブラリーを用いたスクリーニング後の
マルチプルアラインメントの結果

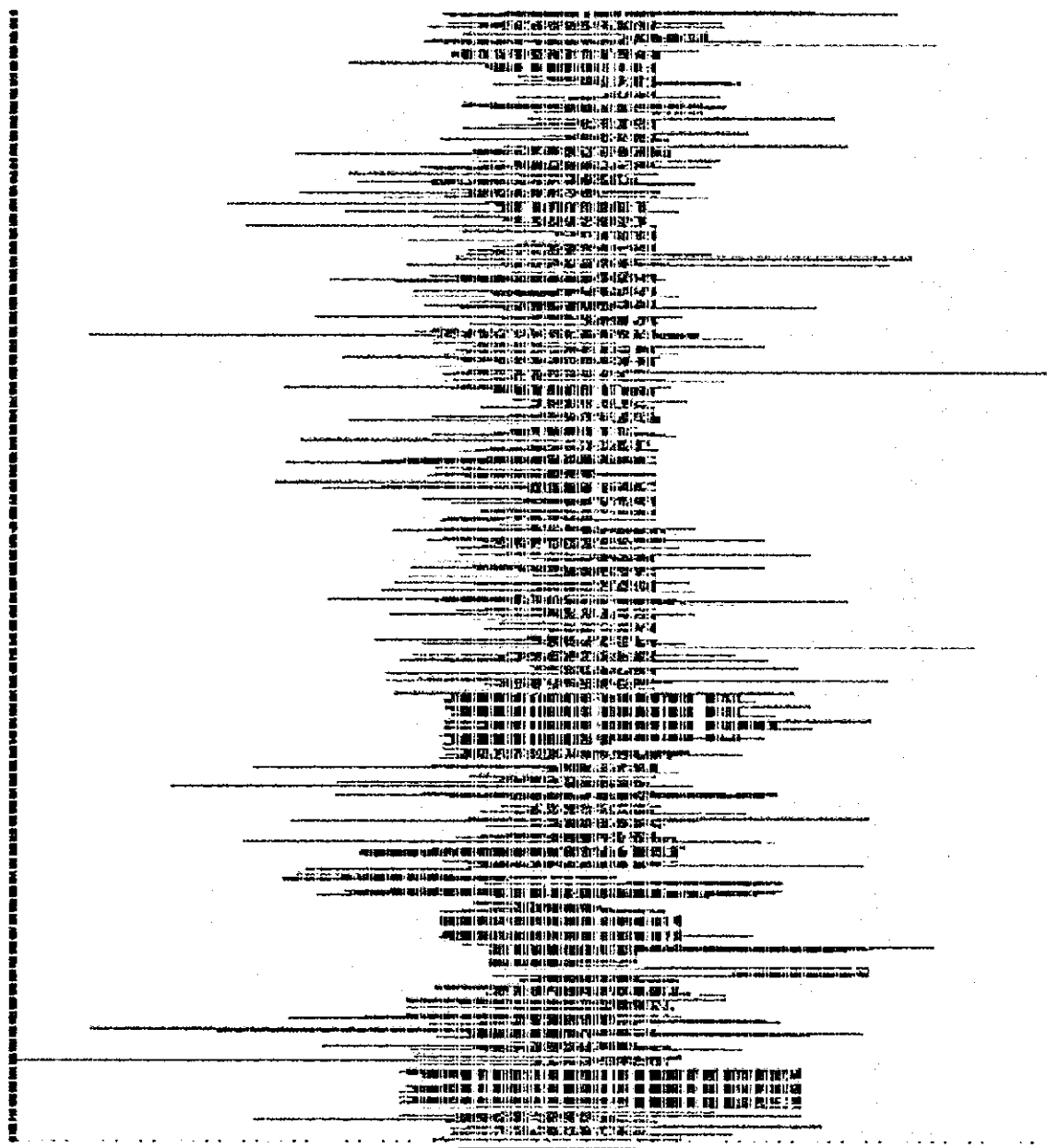


図 10 : ビオチン化サリドマイド誘導体

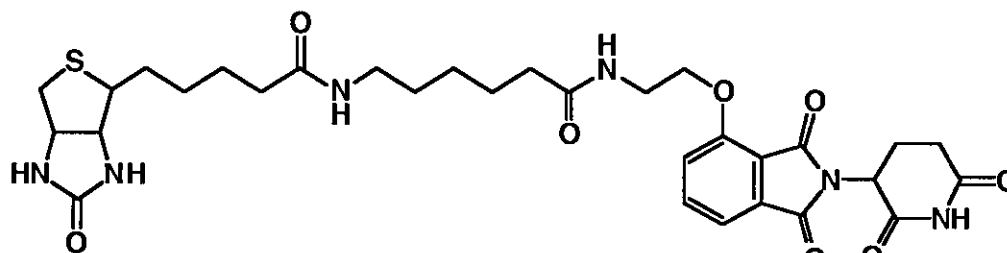


図 11 : サリドマイド誘導体をベイトにした場合のスクリーニング後の
マルチプルアラインメントの結果

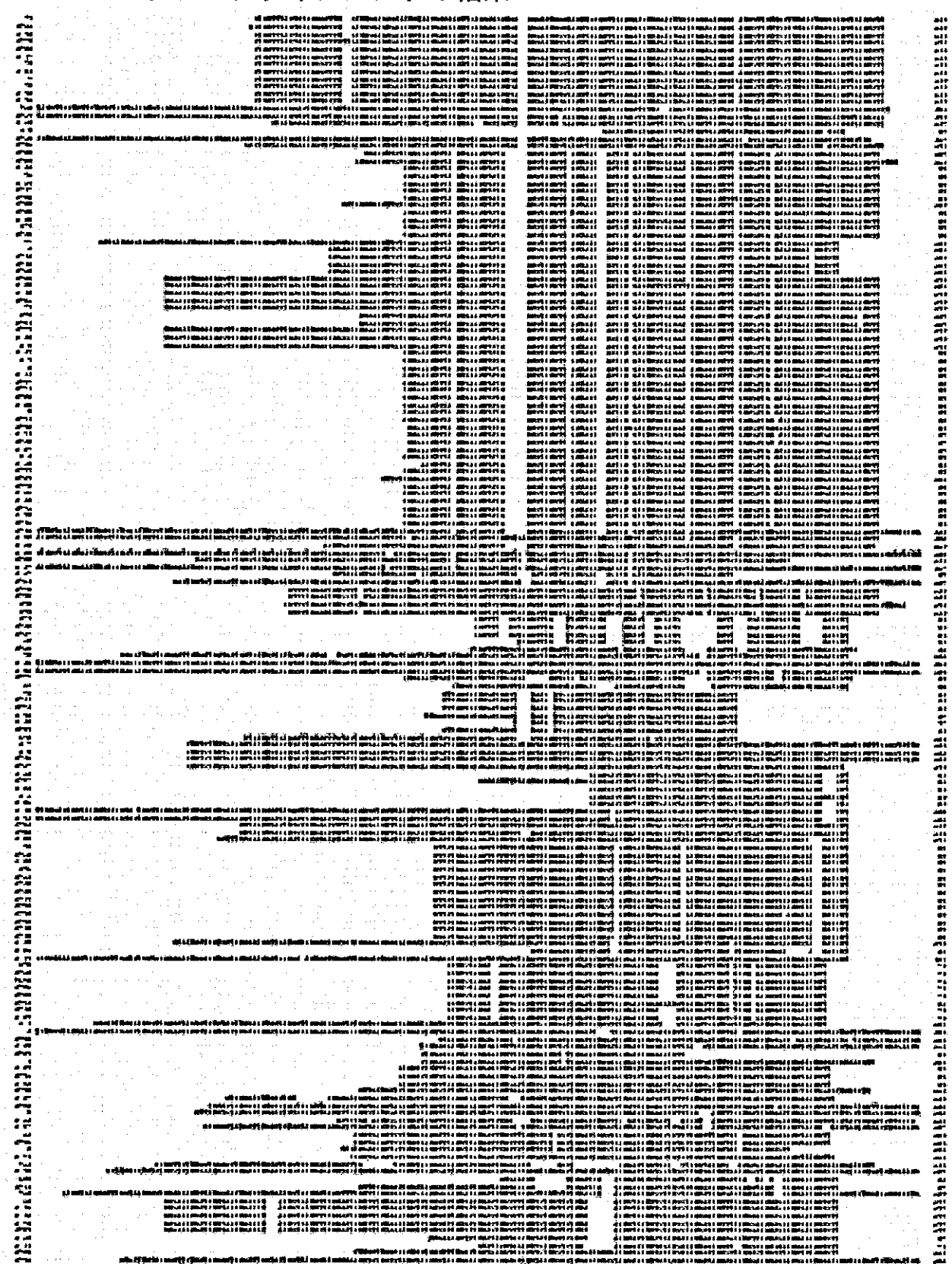


図 1 2 : Am80とCh55

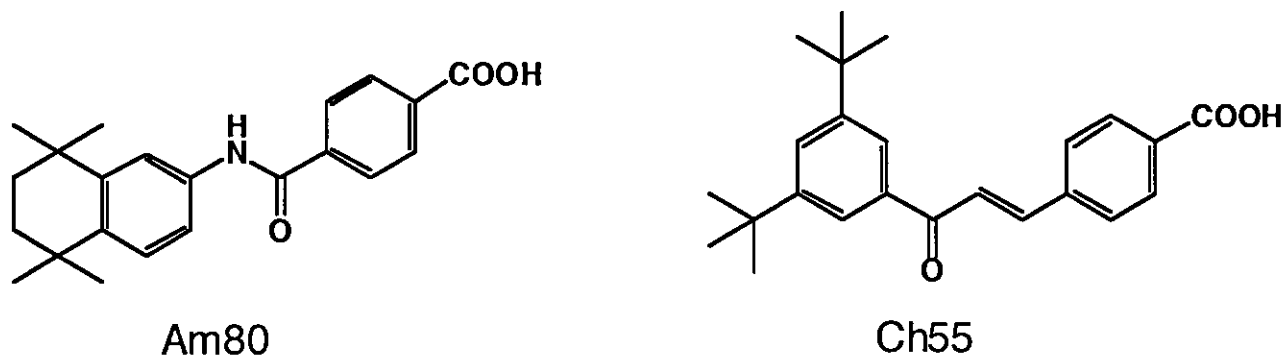


図 1 3 : ビオチン化Am80誘導体

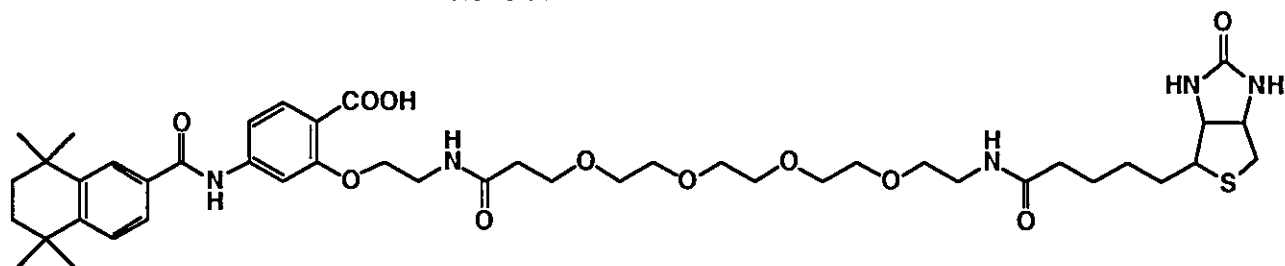


図 1 4 : ビオチン化Ch55誘導体

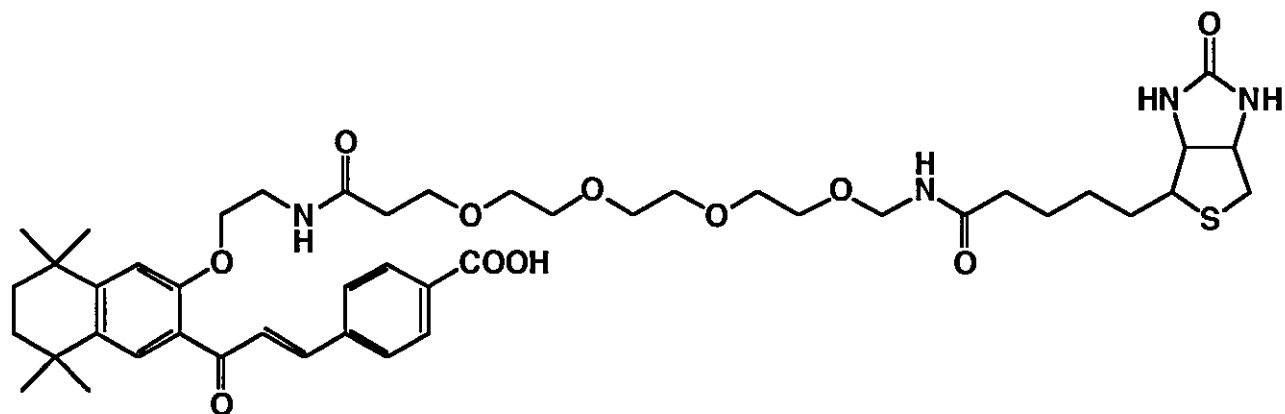


図 1 5 : 各スクリーニングラウンド後得られたmRNA
(Am80をベイトにした場合 ; 6M urea 4.5% PAGE, EtBr染色)

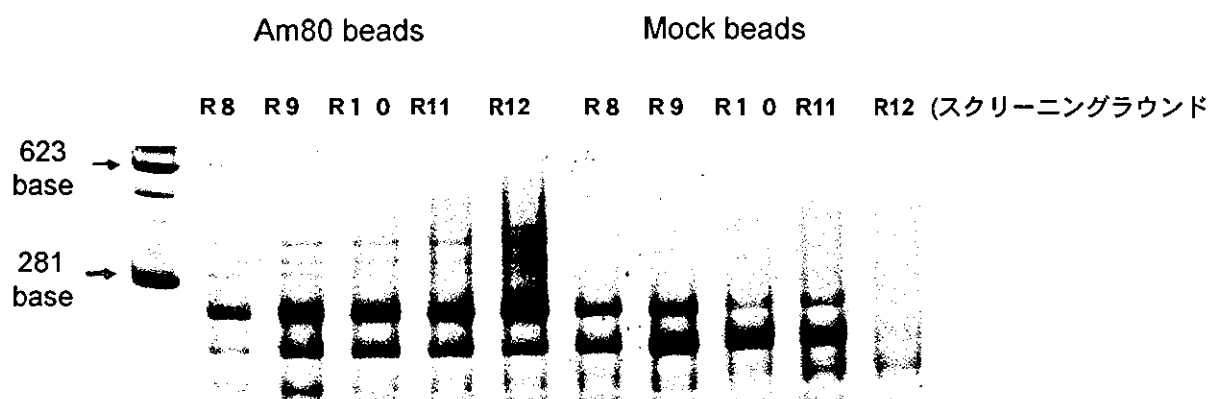


図16 : 各スクリーニングラウンド後得られたmRNA
(Ch55をベイトにした場合 ; 6M urea 4.5% PAGE, EtBr 染色)

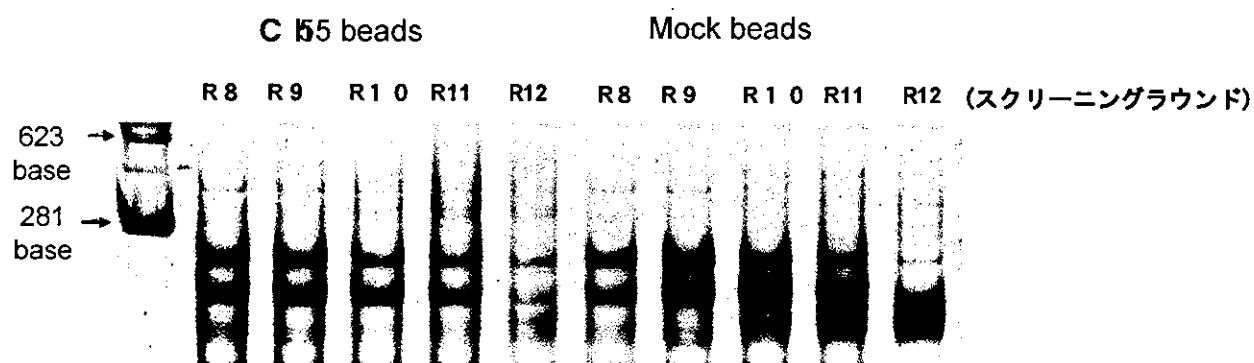
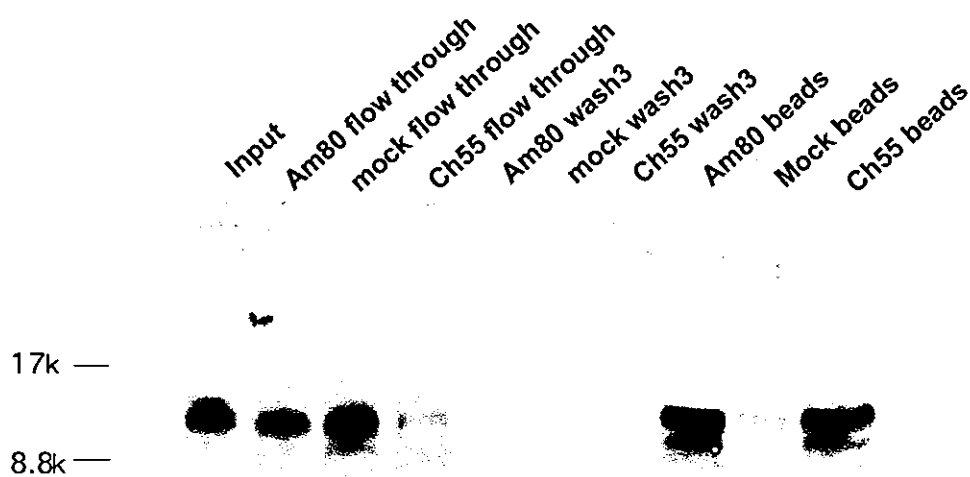


表1 : Am80およびCh55をベイトにしたIVVスクリーニング後の
配列解析結果

配列番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	total
Am80	1	2	23	4	1	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	35
Ch55	0	0	2	9	3	2	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	22
Mock	0	0	13	3	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	20

図17 : 蛋白質1のウエスタブロット



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
Horisawa K, Tateyama S, Ishizaka M, Matsumura N, Takashima H, Miyamoto-Sato E, Doi N, Yanagawa H.	<i>In vitro</i> selection of Jun-associated proteins using mRNA display.	<i>Nucleic Acids Res.</i>	32	e169	2004
Horisawa K, Doi N, Takashima H, Yanagawa H.	Application of quantitative real-time PCR for monitoring the process of enrichment of clones on <i>In vitro</i> protein selection.	<i>J Biochem (Tokyo)</i>	137	121-124	2005
Miyamoto-Sato E, Ishizaka M, Horisawa K, Tateyama S, Fuse S, Takashima H, Sue K, Yanagawa H.	Cell-free co-translation and selection using <i>in vitro</i> virus for high-throughput analysis of protein-protein interactions and complexes.	<i>Genome Res.</i>	in press		2005
宮本悦子, 柳川弘志	生物機能解明に向けた <i>In vitro</i> virus (IVV) 法によるゲノムネットワーク解析	蛋白質・核酸・酵素	49	2768-2774	2004

In vitro selection of Jun-associated proteins using mRNA display

Kenichi Horisawa, Seiji Tateyama, Masamichi Ishizaka, Nobutaka Matsumura, Hideaki Takashima, Etsuko Miyamoto-Sato, Nobuhide Doi and Hiroshi Yanagawa*

Department of Biosciences and Informatics, Faculty of Science and Technology, Keio University, Yokohama 223-8522, Japan

Received October 5, 2004; Revised and Accepted November 11, 2004

ABSTRACT

Although yeast two-hybrid assay and biochemical methods combined with mass spectrometry have been successfully employed for the analyses of protein–protein interactions in the field of proteomics, these methods encounter various difficulties arising from the usage of living cells, including inability to analyze toxic proteins and restriction of testable interaction conditions. Totally *in vitro* display technologies such as ribosome display and mRNA display are expected to circumvent these difficulties. In this study, we applied an mRNA display technique to screening for interactions of a basic leucine zipper domain of Jun protein in a mouse brain cDNA library. By performing iterative affinity selection and sequence analyses, we selected 16 novel Jun-associated protein candidates in addition to four known interactors. By means of real-time PCR and pull-down assay, 10 of the 16 newly discovered candidates were confirmed to be direct interactors with Jun *in vitro*. Furthermore, interaction of 6 of the 10 proteins with Jun was observed in cultured cells by means of co-immunoprecipitation and observation of subcellular localization. These results demonstrate that this *in vitro* display technology is effective for the discovery of novel protein–protein interactions and can contribute to the comprehensive mapping of protein–protein interactions.

INTRODUCTION

Comprehensive analysis of protein–protein interactions is an important task in the field of proteomics, functional genomics and systems biology. Protein–protein interactions are usually analyzed by means of biochemical methods such as pull-down assay and co-immunoprecipitation, yeast two-hybrid (Y2H) assay and phage display. Recently, the combined use of mass spectrometry (MS) with an affinity tag (1) has made the biochemical methods more comprehensive and reliable. However, the testable interaction conditions are restricted by the properties of the biological sources.

The Y2H assay is one of the major tools used in the discovery and characterization of protein–protein interactions (2). However, the results of Y2H analyses often include many false positives due to auto-activating bait or prey fusion proteins (3) and interactions of proteins that are toxic to yeast cells cannot be examined. Phage display, the most widely used display technology (4), is an effective alternative, because the interactions between libraries and target proteins occur *in vitro*, allowing optimal conditions to be used for many different target proteins. Further, very low copy number proteins can be identified by repeating the selection round. However, the use of phage display is similarly limited, because phage libraries are produced in living bacteria (5).

Totally *in vitro* display technologies such as ribosome display (6,7), mRNA display (8–10) and DNA display (11) can circumvent the above difficulties, because they do not need living cells. In mRNA display, a library of genotype–phenotype linking molecules is constructed in which mRNA (genotype) binds to protein (phenotype) through puromycin during cell-free translation. After affinity selection via the protein moiety of the molecules in the library, the mRNA moiety of the selected molecules can be amplified by means of RT-PCR. By performing iterative selection, very low copy number proteins can be detected from large-scale cDNA libraries, routinely in the range of 10^{13} members. In 1997, the prototype of mRNA display was originally developed in our laboratory and that of Szostak independently, and the conjugate of protein with its encoding mRNA was named *in vitro* virus (IVV) (8,9) and RNA–peptide fusion (10), respectively. So far, RNA–peptide fusion has been applied to the selection of various functional peptides and antibody mimics (12,13), but the application to protein–protein interaction analysis has been limited (14,15). Recently, we improved the stability of the template mRNA for IVV molecules and the efficiency of IVV formation by employing a polyethylene glycol (PEG) spacer and wheat germ cell-free translation system (16) to improve the selection ability of the IVV technique. In this study, we applied the improved IVV technique to the screening of protein–protein interactions. As a model bait protein, we chose a basic leucine zipper (bZIP) domain of Jun protein, an important transcription factor, to screen Jun interactors from a mouse brain cDNA library. The screening afforded several known and unknown Jun-associated protein candidates, and we confirmed that many

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +81 45 566 1775; Fax: +81 45 566 1440; Email: hyana@bio.keio.ac.jp

of the candidates interacted directly with Jun, not only *in vitro*, but also in cultured cells, by using pull-down assay and co-immunoprecipitation assay. These results demonstrate that our *in vitro* display technology is effective for discovery of novel protein-protein interactions and can contribute to the comprehensive mapping of protein-protein interactions.

METHODS

Preparation of bait template RNA

The cDNA of mouse Jun (167–319 amino acids) was amplified by PCR using a forward primer (5'-CCGCGGGATCCCCG-GTCTACGCCAACCTC-3') containing a BamHI site and a reverse primer (5'-CACCCCTCGAGAACGTGGTTCATGAC-TTTCTGCTTA-3') containing an XhoI site, and digested with BamHI and XhoI. The fragment was subcloned into the BamHI/XhoI site of pCMV-CBPzz vector (16), which contains a SP6 promoter, a part of the omega sequence named O' (5'-ACAATTACTATTTACAATTACA-3') (17), an N-terminal T7-tag coding sequence, and a C-terminal TAP tag coding sequence (1). From the resulting plasmid pCMV-JunCBPzz, a bait template DNA was PCR-amplified with primers 5'SP6(O')T7 (5'-GAATTTAGGTGACACTAT-AGAAACAATTACTATTTACAATTACAATGGCTAGCA-TGACTGGTGGACAG-3') and 3'FosCBPzz (5'-GGATCTC-CATTCGCCATTCA-3'). The PCR product was purified with a QIAquick PCR purification kit (Qiagen). The purified DNA was used as a template for *in vitro* transcription with a RiboMax large-scale RNA production system-SP6 (Promega). The RNA was purified with an RNeasy mini kit (Qiagen).

Preparation of IVV template RNA library

The architecture of IVV was described previously (16). Mouse brain poly(A)⁺ RNA (BD Biosciences) was primed using the oligonucleotide 5'-TCGTCATCGTCCTTGTA-GTCAAGCTTN₉-3' and cDNA was synthesized using a SuperScript double strand cDNA synthesis kit (Invitrogen). The cDNA was ligated with adaptor DNA (forward oligonucleotide: 5'-TAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGT-GCGGCCGGAATTCC-3'; reverse oligonucleotide: 5'-GGA-ATTCC-3') using a Ligation High kit (Toyobo). After ethanol precipitation, the ligated DNA was PCR-amplified with primers, 5'F3 (5'-GGAAGATCTATTTAGGTGACACTATAGAACA-CAACAACAACAACAACAACAATG-3') and 3'lib_PCR (5'-TTTTTTTCTTGTGTCGTCATCGTCCTTGAGTC-3'). The PCR product was purified with the QIAquick PCR purification kit and fractionated (over ~200 bp) with a CHROMA SPIN-1000 (BD Biosciences). The fractionated PCR product was used as a template for transcription using the RiboMax large RNA production system-SP6. The resulting RNA was ligated with PEG Puro spacer [p(dCp)₂-T(Fluor)p-PEGp-(dCp)₂-puromycin] using T4 RNA ligase (Takara). The ligated RNA was purified with the RNeasy mini kit.

Affinity screening

The IVV formation reaction was performed as described previously (16), with some modifications. Briefly, a 50 µl aliquot of wheat germ extract reaction mixture (Promega) containing 10 pmol of the bait Jun RNA, 10 pmol of the ligated library

RNA, 80 µM amino acid mixture, 76 mM potassium acetate and 40 U of RNase inhibitor (Invitrogen) was incubated for 1 h at 26°C. Subsequently, the reaction mixture was added to 50 µl of rabbit immunoglobulin G (IgG) agarose beads (Sigma) equilibrated with 50 µl of IPP150 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl and 0.1% NP-40), and mixed on a rotator for 2 h at 4°C. The beads were washed with 800 µl of IPP150 buffer once and with 800 µl of TEV cleavage buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 0.5 mM EDTA and 1 mM DTT) five times, then 100 µl of TEV cleavage buffer containing 100 U of TEV protease was added, and rotation was continued for 2 h at 16°C. The resulting eluate was used as the RT-PCR template. RT-PCR was performed with a OneStep RT-PCR kit (Qiagen) using primers, 5'F3 and 3'Flag-1AL (5'-TTTTTTTTCTTGTGTCGTCATCG-TCCCTGTAG-3'). The optimal number of PCR cycles without reaching a plateau was 26–30 cycles at each RT-PCR step. The RT-PCR product was used for the next round of selection as described above. After five rounds of affinity screening, the RT-PCR product was cloned using a PCR cloning kit (Qiagen) and sequenced with an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Sequence analysis

The selected clones were subjected to nucleotide-nucleotide BLAST (BLASTN) search (18) to identify the protein represented by each clone. The nucleotide database obtained from the NCBI ftp site (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/>) was employed as a reference database. The threshold of the *E*-value was configured at 1.0×10^{-1} . Clustering of the clones was performed using the CLUSTALW program (19).

Real-time PCR analysis

Real-time PCR were performed with LightCycler FastStart DNA master SYBR green I kit (Roche) and protein-specific primer sets (Supplementary Table 1) on the LightCycler (Roche). The standard template DNA was PCR-amplified from each selected sequence on pDrive vectors (Qiagen) using primers, 5'M13F (5'-GTTTTCCAGTCACGACGTTG-3') and 3'M13R (5'-GAAACAGCTATGACCATGATTACG-3').

Pull-down assay

Pull-down assay using the C-terminal fluorescence labeling technique was performed according to the method of Miyamoto-Sato *et al.* (16). The DNA templates were PCR-amplified from the cloned plasmids with primers, 5'F3 and 3'R3 (5'-TTTTTTTTCTGAGCTTGTGTCGTCATCG-3'). The amplicons were used as templates for transcription. The resulting mRNAs were translated in the presence of fluorescence-labeled puromycin to make fluorescence-labeled proteins. Bait Jun was also translated in the cell-free translation system separately. These translated proteins were mixed together, incubated with rabbit IgG agarose beads, and washed as described above. The binding proteins were eluted with sample buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue and 20% glycerol) at 100°C for 5 min, subjected to 17.5% SDS-PAGE, and analyzed with a Molecular Imager FX (Bio-Rad Laboratories).

Co-immunoprecipitation assay

Full-length cDNA of Jun was inserted into a pCMV-Tag5 expression vector (Stratagene). DNA fragments of the selected proteins were subcloned into the pQBI25f expression vector (Qbiogene), in which the peptide linker has been replaced with a HL4 helix linker (20) and a C-terminal FLAG-tag added. Neuro2a cells were co-transfected with both pCMV-Tag5 coding Jun and pQBI25f coding each selected protein sequence or GFP-HL4-FLAG alone (mock) using LipofectAMINE2000 (Invitrogen). After 24 h, the cells in a 6 cm dish were rinsed once with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and scraped using cell-scrapers with 1.5 ml of PBS. The cells in the suspension were collected by centrifugation at 5000 r.p.m. for 5 min and lysed in 375 μ l of NP lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 50 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 and 2 mM EDTA) containing a Complete protease inhibitor cocktail (Roche) with sonication for 1 min at 170 W and rotation for 1 h at 4°C. The lysate was centrifuged at 15000 r.p.m. for 15 min at 4°C. An aliquot of 15 μ l of the supernatant was separated and used for western-blot analysis to compare protein expression levels. For co-immunoprecipitation, 30 μ l of anti-FLAG M2 agarose beads (Sigma) was added to 350 μ l of the cell lysate and the mixture was incubated 2 h at 4°C with rotation. Finally, the agarose beads were washed four times with lysis buffer and resuspended in SDS-PAGE loading buffer for immunoblot analysis.

For western-blot analysis, the polyacrylamide gel was transferred onto a PVDF membrane. Duplicate blots were made from the identical immunoprecipitation experiment. One blot was probed with a rabbit anti-Jun polyclonal antibody (Calbiochem) to detect co-immunoprecipitated Jun, and the other was probed with a rabbit anti-green fluorescent protein (GFP) polyclonal antibody (Molecular Probes) to monitor the amount of GFP- and FLAG-tagged selected proteins that had been immunoprecipitated by the anti-FLAG M2 agarose beads in each reaction. The blots were revealed by an ECF western blotting kit (Amersham Biosciences) and Molecular Imager FX.

Subcellular localization analysis

COS7 cells in a 3.5 cm glass dish were co-transfected with an expression vector pQBI25f coding each newly selected protein fragment interacting with Jun *in vitro*, selected Fos, or GFP-HL4-FLAG alone (mock), together with an expression vector pCMV-Tag5B coding full-length Jun, using LipofectAMINE2000 reagent for 24 h. Before observation, the transfected cells were treated with 100 ng/ml of Hoechst33342 (Molecular Probes) for 5 min to stain the nucleus. The cells transfected with each GFP-tagged protein were observed with an Axiovert 200 M system (Carl Zeiss).

Functional clustering using annotation data

The functional annotations of the selected proteins were searched in the entries under Gene Ontology (GO) in the Mouse Genome Informatics (MGI) website (<http://www.informatics.jax.org/>) and those under Refseq in the Locuslink website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>). The selected proteins were clustered based on the common terms of the annotations.

RESULTS

Preparation and confirmation of IVV template library

Figure 1A shows the principle of the formation of an IVV molecule, a conjugate of protein (phenotype) and RNA (genotype). A library of IVV molecules was constructed from a cDNA library derived from mouse brain poly(A)⁺ RNA. Because each process in the IVV template construction, i.e. reverse transcription, ligation of the PEG Puro spacer, and especially PCR-amplification (21), can be a cause of bias, which may prevent enrichment of specifically selected clones, we confirmed that no significant bias had occurred in the process of construction of the IVV template library before affinity selection. We performed RT-PCR analysis for several genes with specific primers to compare the amounts in the original mouse brain poly(A)⁺ RNA and the constructed IVV template RNA library: all genes tested were found in both libraries in almost equal amounts (data not shown). The result indicates that this IVV template library is suitable for selection. Indeed, this test of the library was critical for success in the selection of novel interactions.

Co-translation of IVV library and bait protein

As shown in Figure 1B, we employed cell-free co-translation of bait protein with the IVV library. This protocol does not require a separate preparation of bait proteins, as was performed in the previous study (14). Thus, we considered that this convenient approach would be more suitable for high-throughput screening for protein-protein interactions. We examined the optimal concentration of mRNA template for bait Jun (Figure 1C) to generate a sufficient amount of bait protein in a cell-free translation system. The largest amount of the bait protein (\sim 10 ng/ μ l) was obtained when the mRNA concentration was 200 nM (data not shown).

Selection of Jun-associated proteins from cDNA library

We then applied the IVV selection system to discover Jun-associated proteins in the mouse brain cDNA library. We performed two different kinds of selection, one being selection of the IVV library in the presence of the Jun bait protein, and the other being selection in the absence of the bait protein. Co-translated bait protein with its interactors was captured by IgG agarose beads through the added affinity tag. After five rounds of selection, the resulting libraries were cloned and sequenced. Consequently, 217 clones were obtained from the 5th round library of the bait (+) selection, and 151 clones were obtained from the 5th round library of the bait (-) selection. In the bait (-) library, it seems that materials specifically bound to the rabbit IgG agarose beads are enriched; and thus we considered clones also detected in the bait (-) library to be false positives [50 of 217 clones in the bait (+) library were removed in this step]. This simple approach to remove false positives was lacking in the previous protocols of mRNA display (14) and other display technologies (22).

Also, 24 clones including stop codons were removed, because such clones cannot form IVV and thus cannot interact with the bait protein as an IVV containing a protein moiety. The remaining 143 clones were subjected to nucleotide-nucleotide BLAST (BLASTN) search to identify the coded