

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～平成16年度 総合研究報告書

主任研究者 柳川 弘志

平成17（2005）年4月

目 次

I. 総合研究報告		
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	-----	34
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	36

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。平成14年度は、標的蛋白質既知のモデル薬剤である、免疫抑制剤FK506とFK506低分子アナログ(FKL)を固定したアフィニティ樹脂を作製した。また、FK506とFKLの標的蛋白質であるFK506結合蛋白質(FKBP-12)のcDNAのクローニング、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の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のIVVの選択的濃縮を確認した。以上より、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。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、ヒト肺、およびヒト脳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に関し、固定用ビオチンリンカー導入部位が異なる2種のイレッサ誘導体を合成し、レチノイド系薬剤であるAm80とCh55の誘導体をそれぞれ1種合成した。また、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のIVVの濃縮を確認した。以上より、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。平成16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が期待される。

平成14年度は、当該年度の計画である「モデル系でのアフィニティ選択の検討」に沿って、標的蛋白質既知のモデル薬剤を固定したアフィニティ樹脂の作製、標的蛋白質の対応付け分子（IVV）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）。

平成15年度の目標は、（1）マウスおよびヒト組織 mRNA 由来 IVV ライブラリーの作製法の確立。（2）モデル薬剤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。（3）アフィニティ樹脂への固定のための、ビオチンリンカーを導入した、副作用未知既存薬剤の誘導体の合成であった。

平成16年度の目標は、前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。

以下に各年度の研究結果について記載する。

B. 研究方法・結果

・平成14年度実施事項

1. モデル薬剤 (図4) とそのビオチンリンカー付き誘導体の合成、および薬剤固定アフィニティ樹脂の作製

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.) に従って行った。

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), 0.15 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、アフィニティ樹脂とした。

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、ネガティブコントロール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 Ω 29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。ネガティブコントロール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、ネガティブコントロール蛋白質 (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)、残渣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、ネガティブコントロールの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 1×10^1 – 1×10^9 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 2×10^6 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。

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、平成13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12）を既知の方法で（*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001, 11, 1911）合成した。

・平成15年度実施事項

1. IVVライブラリーの作製（図13）

市販マウス脳mRNA（BD Biosciences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14に示す。本法で作製した各IVVテンプレートは、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 1 5)。

上記と同様の方法を用い、ヒト肺mRNAおよびヒト脳mRNA由来IVVライブラリーも作製した。

2. 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mRNA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mRNA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、ライブラリー作製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 1 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 1 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 1 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: 5×10^9 copies) 中に 6×10^4 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 1.6×10^9 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 β -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. アフィニティ樹脂固定用イレッサ誘導体の合成、およびそれらの誘導体のEGFレセプターのチロシンキナーゼ領域蛋白質に対する結合性の確認

平成14年度実施事項に記載した理由により、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化合物 (Ire-1) を合成した (図 1 8)。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化合物 (Ire-2) を合成した (図 1 9)。これらの化合物はマススペクトルにより同定した。

Ire-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、5'側にSP6プロモーターと Ω 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。結合・洗浄bufferに

懸濁したIre-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。対照にはビオチン固定アフィニティ樹脂 (mock) を用いた。図20に示したように、Ire-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、mock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、Ire-1と特異的に結合した。またIre-2でも同様に結果が得られた。

4. アフィニティ樹脂固定用レチノイド誘導体の合成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。Am80 (図21) やCh55 (図21) は合成レチノイドの中でも活性の強い化合物であり、Am80は平成17年2月に白血病治療薬として認可されている。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Am80誘導体 (図22) とビオチン化Ch55誘導体 (図23) を得た。図22および図23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Am80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Am80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24)。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固定した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Am80固定樹脂と特異的に結合した (図24、Am80 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25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25a)、対応付け効率は30%程度 (図25b) であった。

最後にAm80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、Am80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、Am80 固定樹脂吸着した RAR と GST の割合を調べた(図 2 6)。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、30cyclePCR 増幅させると、双方が同時に同程度増幅された(図 2 6、レーン Input)。Am80 固定樹脂では RAR のバンドだけが検出され(図 2 6、レーン Am80 beads)、Am80 非固定樹脂では RAR と GST の両方とも検出されなかった(図 2 6、レーン Mock beads)。この実験結果は RAR の IVV ビリオンが Am80 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、Am80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/ μ 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 2.9×10^8 copies/ μ l、GSTのRNAが 3.5×10^8 copies/ μ lでそれぞれ存在するのに対し、Am80固定樹脂にはRAR(1.1×10^5 copies/ μ l)とGST(4.2×10^4 copies/ μ 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3)。

・平成16年度実施事項

1. イレッサ誘導体 (Ire-1, Ire-2) 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

前年度に合成した、ビオチンリンカーを導入したイレッサ誘導体である、Ire-1 および Ire-2 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。Ire-1, Ire-2, あるいはビオチン (mock) を固定した NeutrAvidin agarose 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、残査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、PEG 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 2 7 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 2 8 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 を含むクロウンの割合が 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、平成 15 年度の項に記載しているが、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 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 29 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 30 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 31 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

平成 15 年度合成したビオチンリンカーを導入した Am80 誘導体 (図 22) あるいは Ch55 誘導体 (図 23) 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3-2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3-3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4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4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の部分で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トティングによりT7-tag抗体で検出した。

図3-4に蛋白質1の場合のウェスタンブロット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、ウェスタンブロットティングにより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

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 2×10^6 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。

平成15年度には、mRNAライブラリーからのIVVライブラリーの作製法を検討した。ベクター組込みや形質転換等遺伝子組換えを用いない、PCR等*in vitro*の手法のみを用いた方法で、市販マウス脳mRNAライブラリーよりIVVライブラリーを作製した結果、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mRNA由来IVVライブラリーも作製することができ、汎用的なIVVライブラリー作製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mRNA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、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。(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作製については、分子標的抗癌剤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、レチノイド系薬剤であるAm80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、先の複合蛋白質の例も含め、本法の応用例の広さを示したと考えられる。

平成16年度の目標は、前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)

本研究で同定した、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. 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、ネガティブコントロール蛋白

質であるGST断片蛋白質のIVVを作製した。また、FK506とFKLを固定したアフィニティ樹脂を作製した。

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. アフィニティ樹脂固定用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、イレッサの構造活性相関を調査、化合物デザインを行った。

4. *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mRNA由来IVVライブラリーを作製した。

5. 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。

6. 副作用機序未知既存薬剤である、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。また、レチノイド系薬剤であるAm80とCh55の同様の誘導体をそれぞれ1種、合成した。

7. Am80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。

8. 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。

9. 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。

10. 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。

11. 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。

1 2. 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 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.

2 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.

3 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.

4 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. *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, 1474-1480, 2003.

2 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.

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

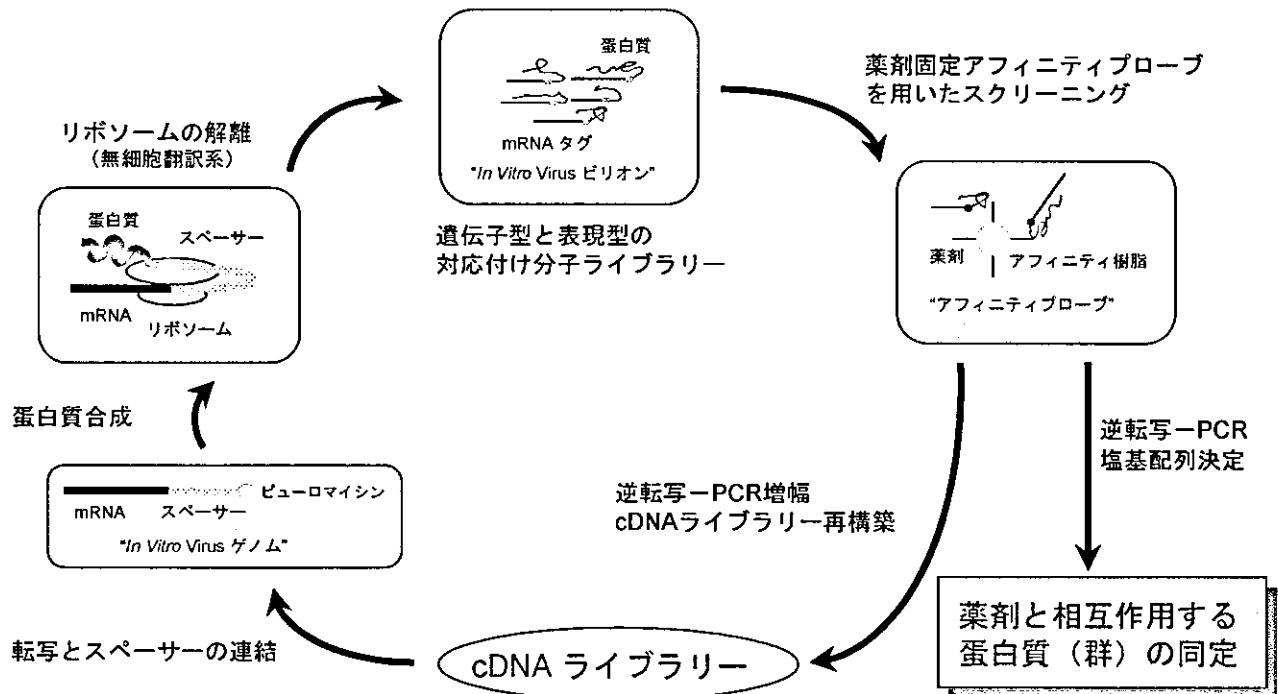


図 3 : FKBP-12・FK506を用いたモデル系でのアフィニティ選択

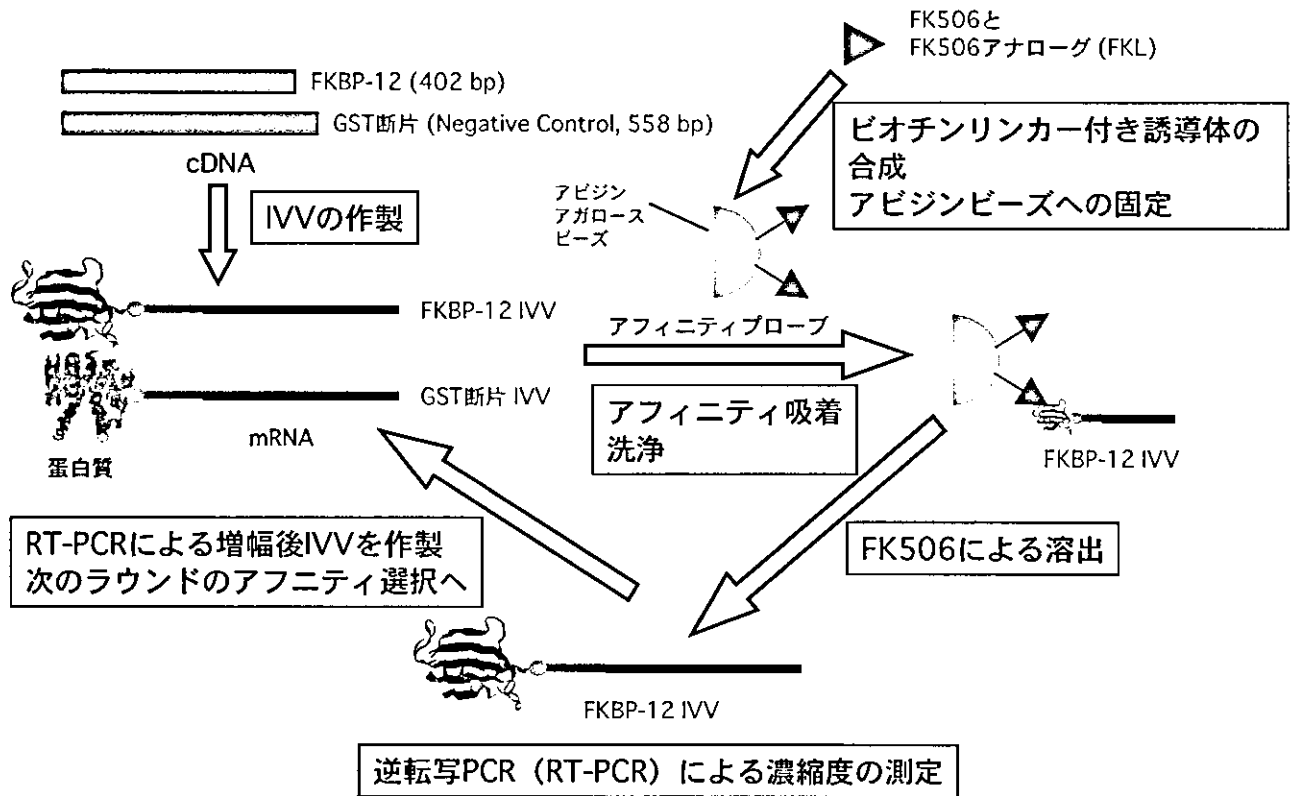


図 4 : モデル薬剤

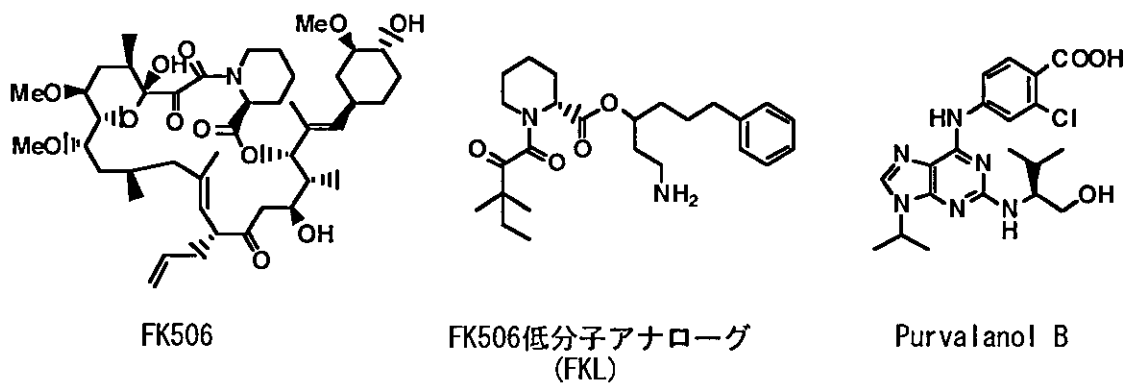


図5：IVV対応付け分子の作製

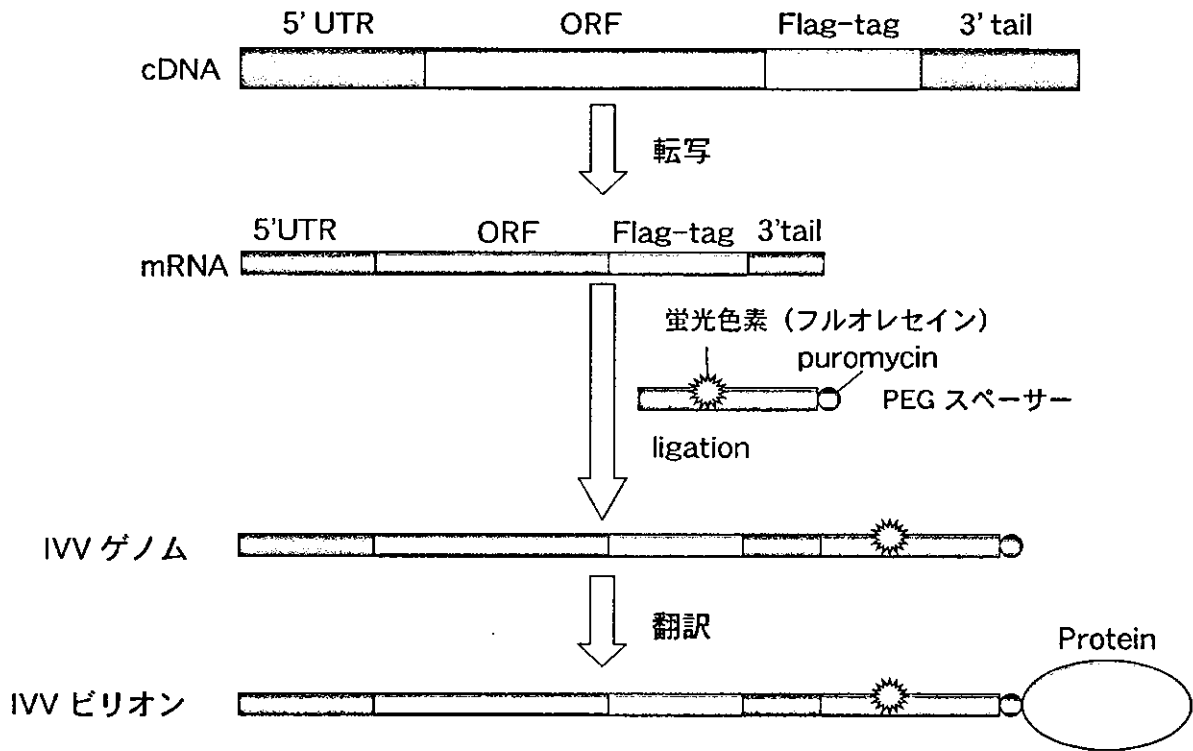


図6：FKBP-12 mRNAとIVVのPAGE

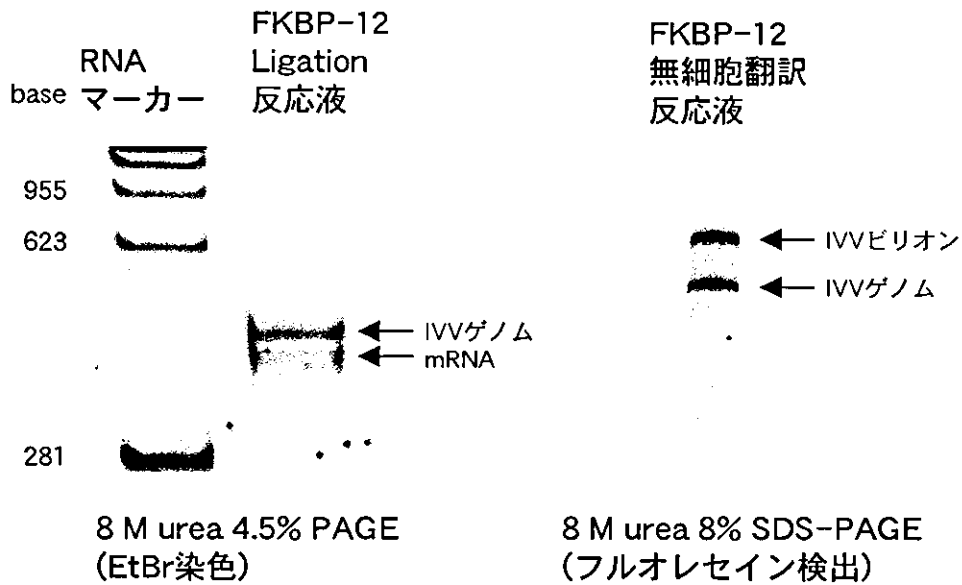


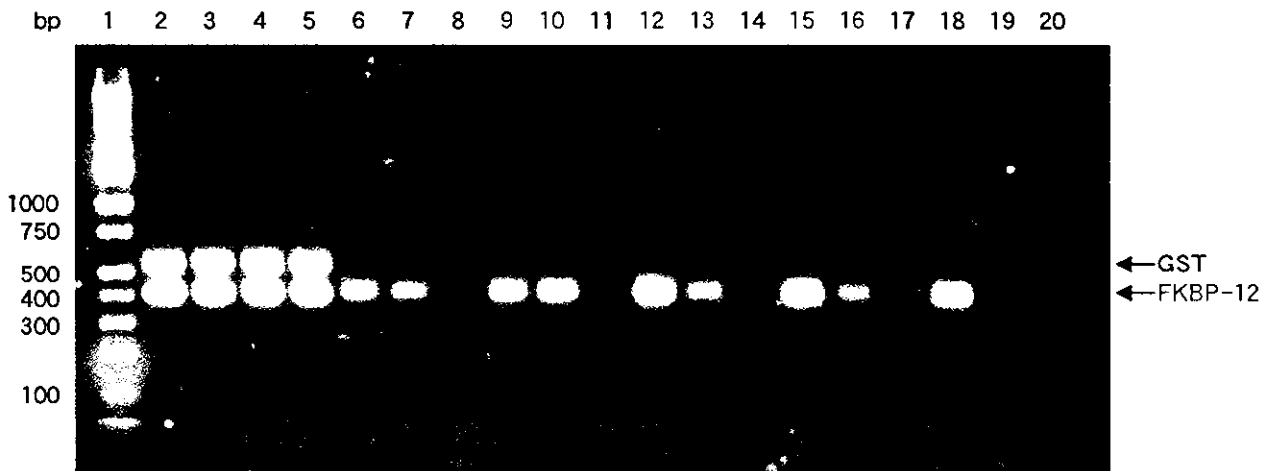
図7：アフィニティ選択（磁性体樹脂使用）各溶液のRT-PCR



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) | |