

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	1.1x10 <sup>8</sup>	1.6x10 <sup>8</sup>	1/1.5	-
9	7.4x10 <sup>3</sup>	3.1x10 <sup>2</sup>	24	34
10	1.5x10 <sup>1</sup>	8.4x10 <sup>2</sup>	18	26
11	1.6x10 <sup>2</sup>	5.1x10 <sup>2</sup>	1/3.2	0.4
12	5.4x10 <sup>3</sup>	2.3x10 <sup>2</sup>	23	33
13	1.6x10 <sup>3</sup>	2.3x10 <sup>2</sup>	7	10
14	9.1x10 <sup>2</sup>	9.9x10 <sup>2</sup>	1/1.1	1.3
15	5.9x10 <sup>1</sup>	4.5x10 <sup>2</sup>	130	190
16	1.8x10 <sup>3</sup>	4.0x10 <sup>2</sup>	4.5	6.4
17	2.3x10 <sup>2</sup>	5.2x10 <sup>2</sup>	1/2.3	0.4
18	6.7x10 <sup>4</sup>	3.8x10 <sup>2</sup>	180	260
19	1.7x10 <sup>2</sup>	1.2x10 <sup>2</sup>	1.4	2.0
20	6.7x10 <sup>1</sup>	1.5x10 <sup>3</sup>	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

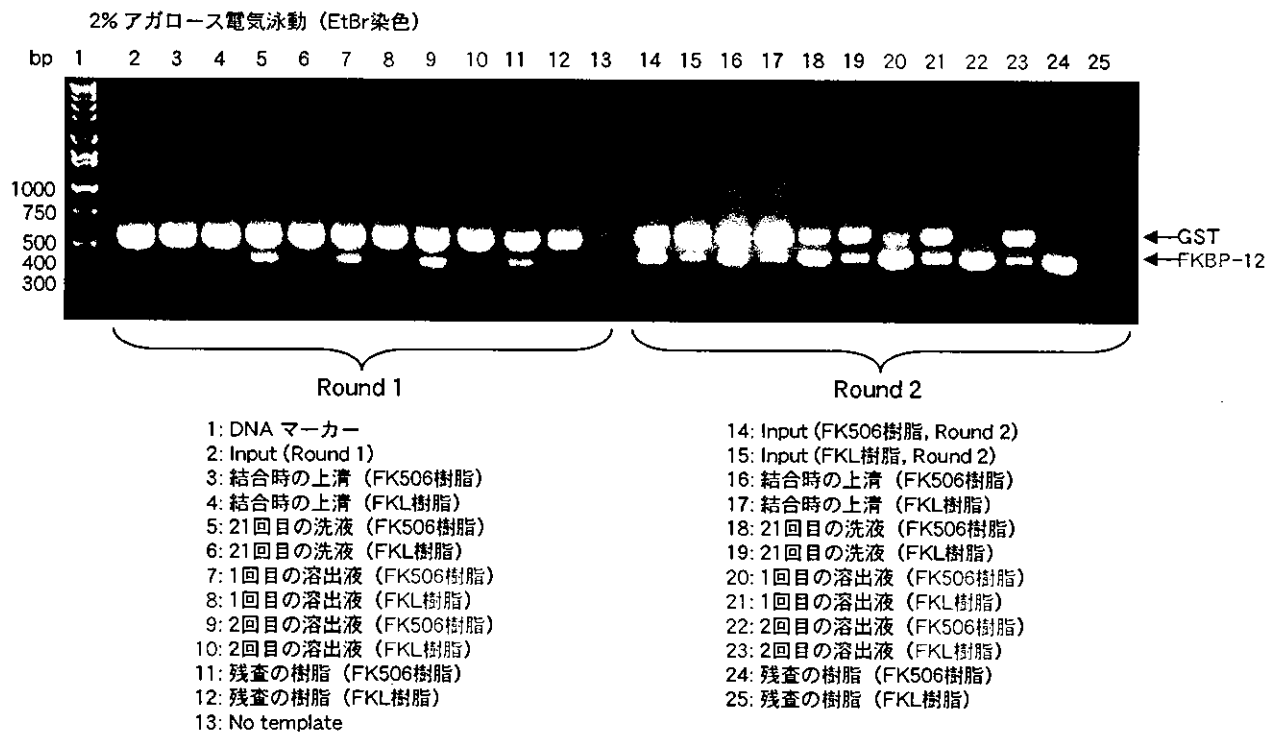


表 2 : リアルタイムRT-PCRによる定量

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

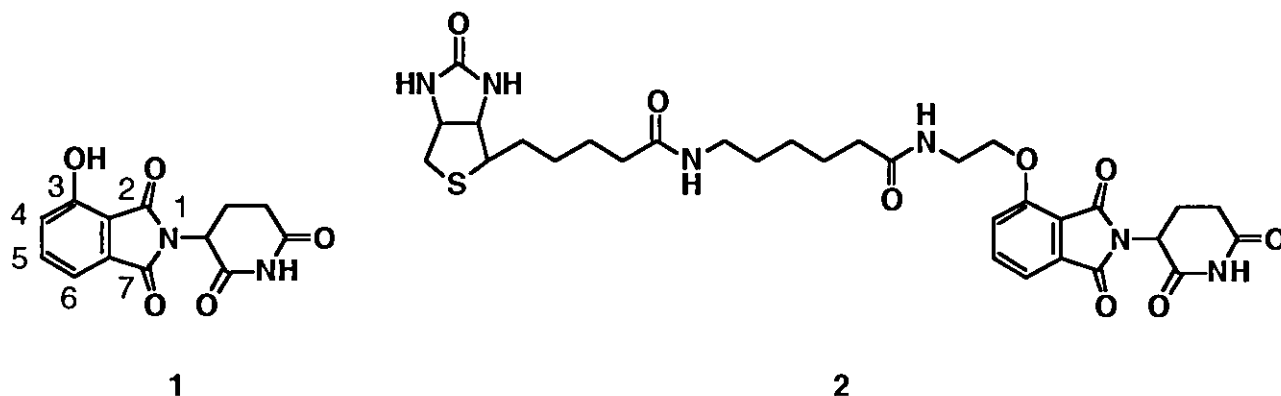


図 1 1 : ビオチンリンカーを導入したサリドマイド誘導体 (2) の合成

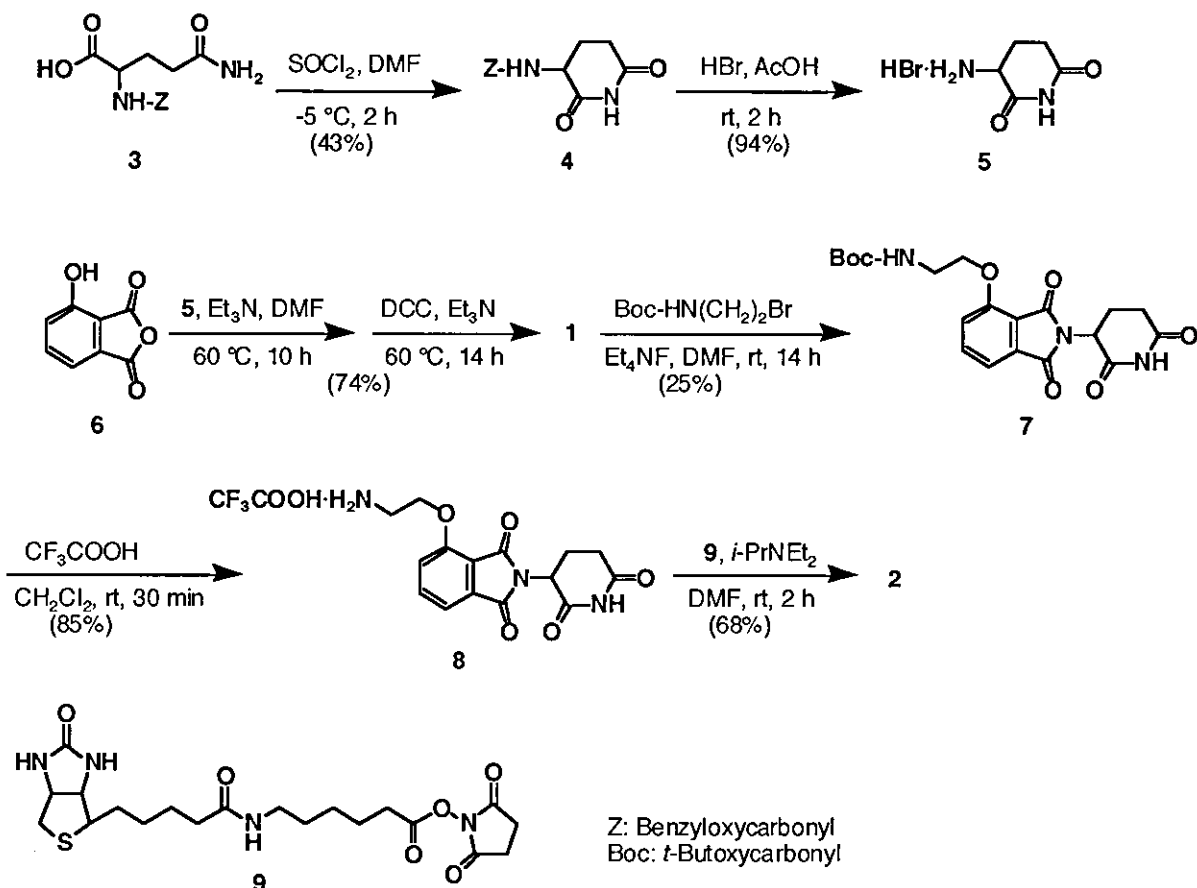


図 1 2 : イレッサおよびイレッサ中間体

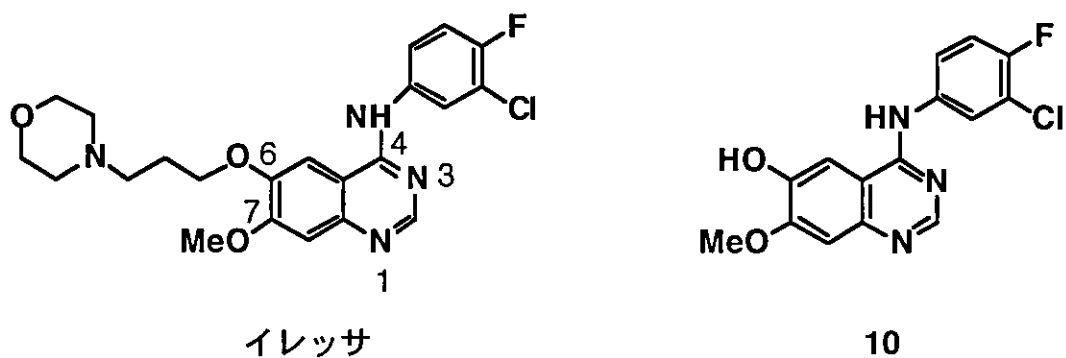


図 1 3 : IVVライブラリーの作製

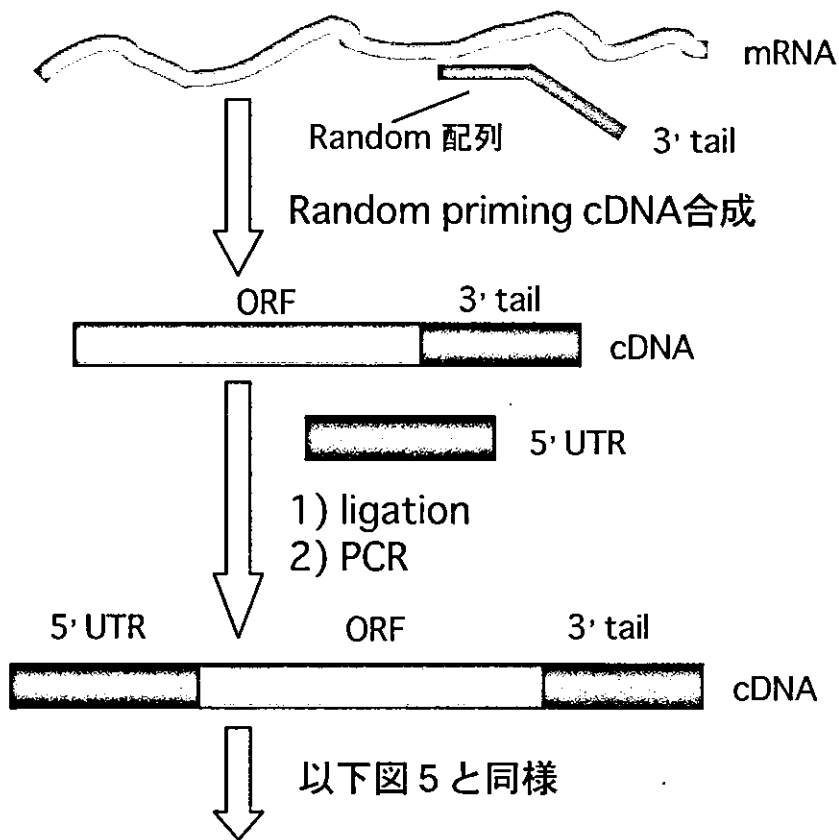


図 1 4 : マウス脳mRNA由来IVVライブラリー

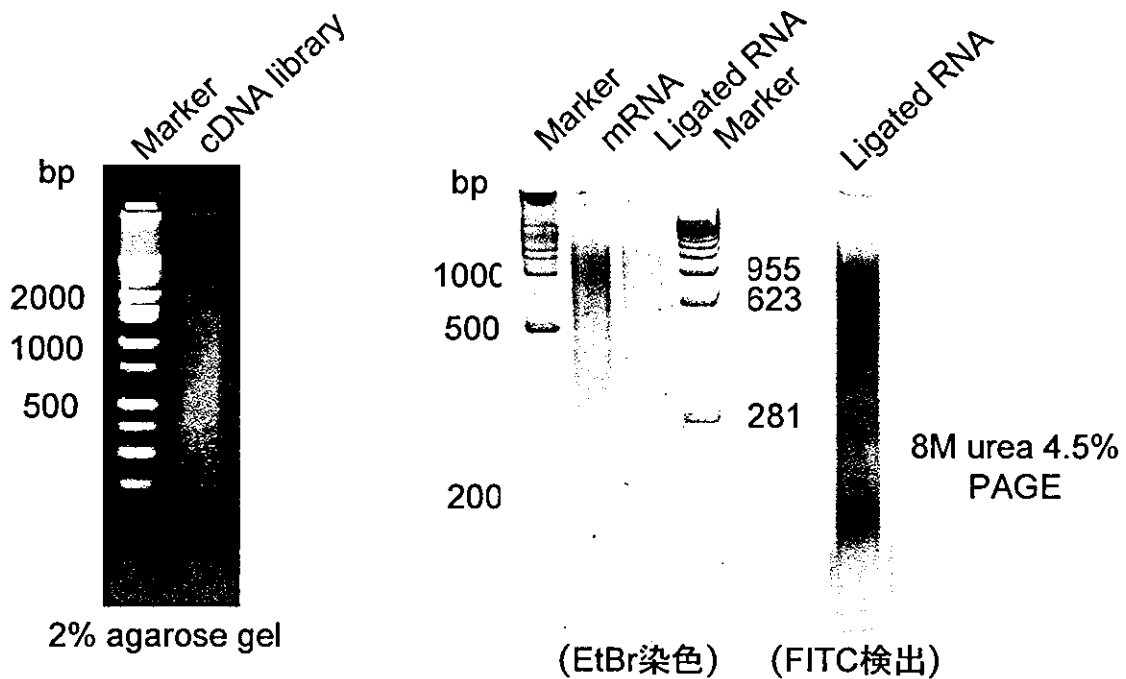


図15：ライブラリーの遺伝子構成

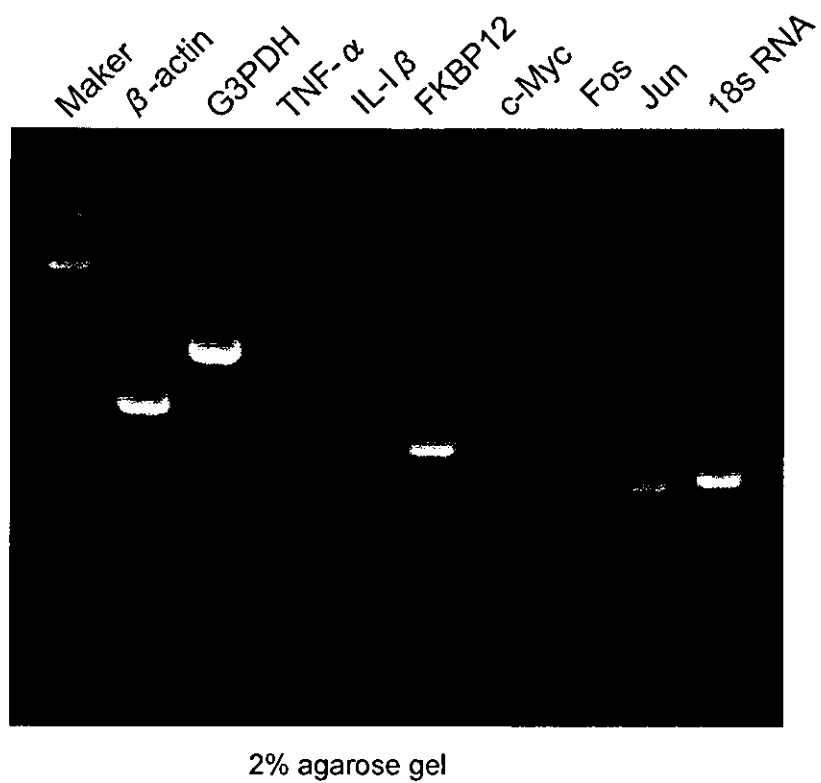
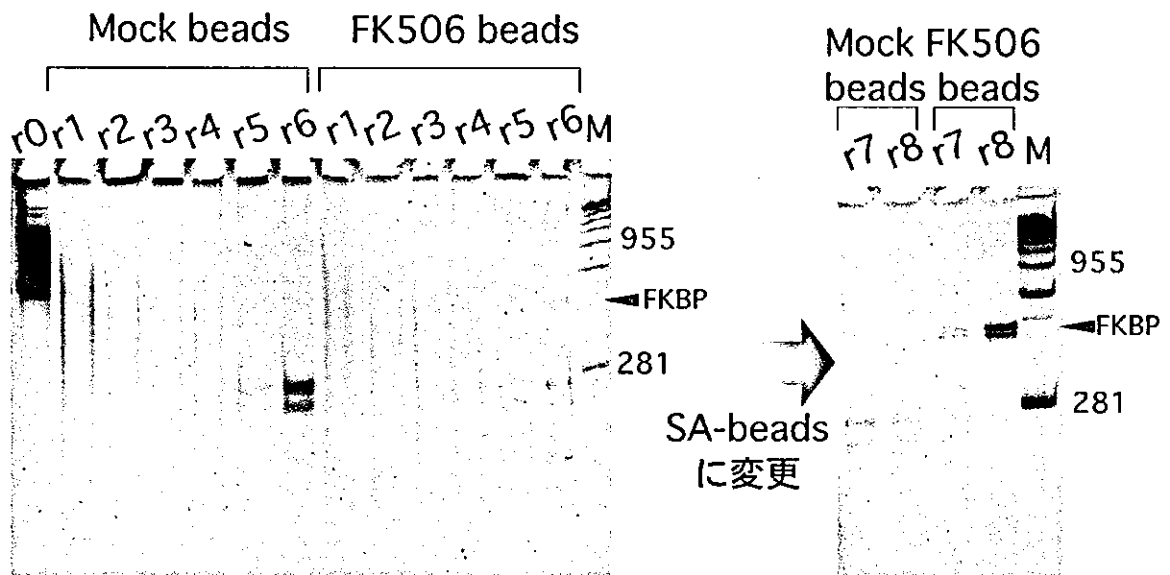


図16：各スクリーニングラウンド後の mRNAのurea-PAGE



(8M urea 4.5% PAGE、EtBr染色)

図 17 : ライブラリー中のFKBP-12 cDNA濃度の定量

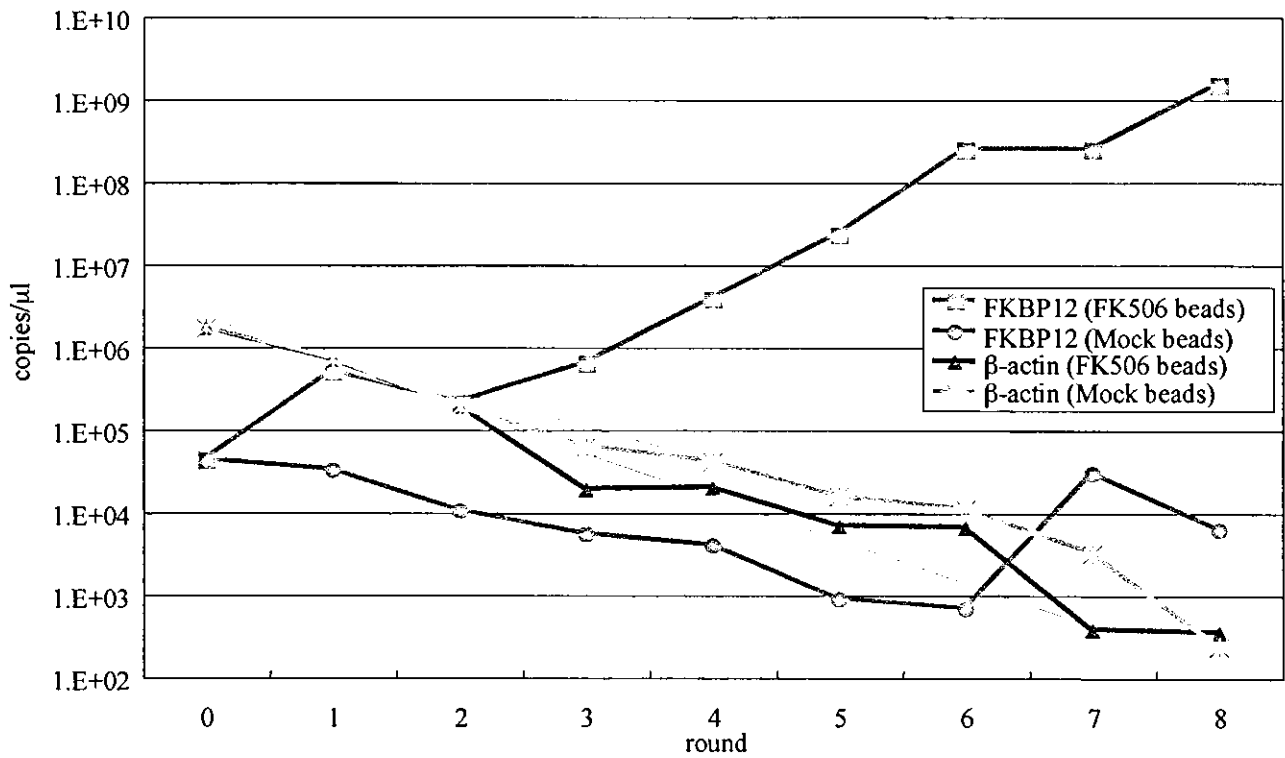


図 18 : イレッサ誘導体 (Ire-1) の合成

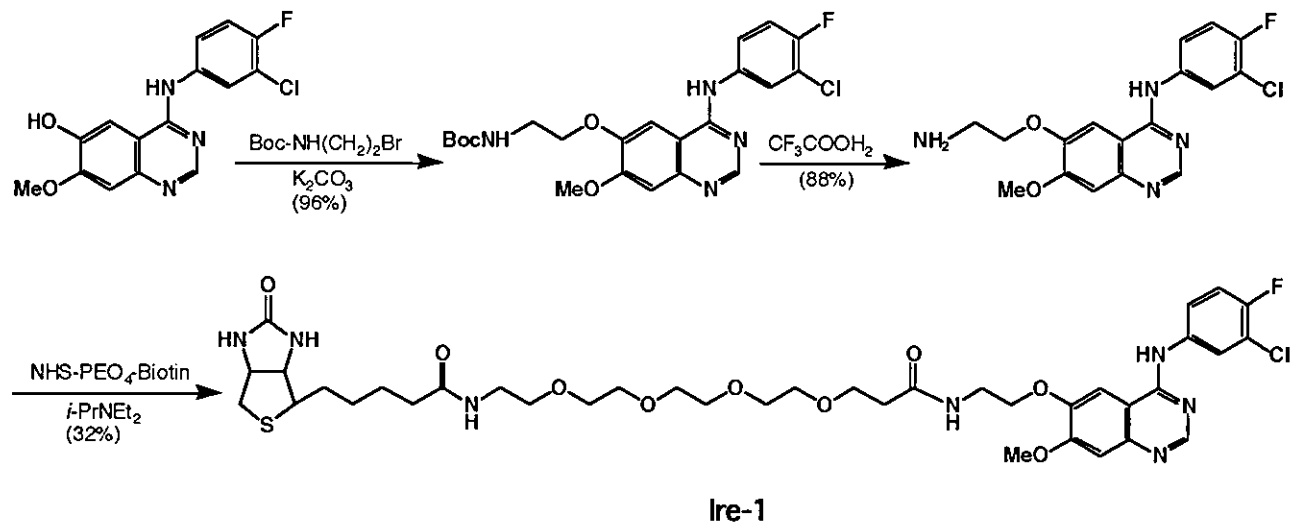


図 19 : イレッサ誘導体 (Ire-2) の合成

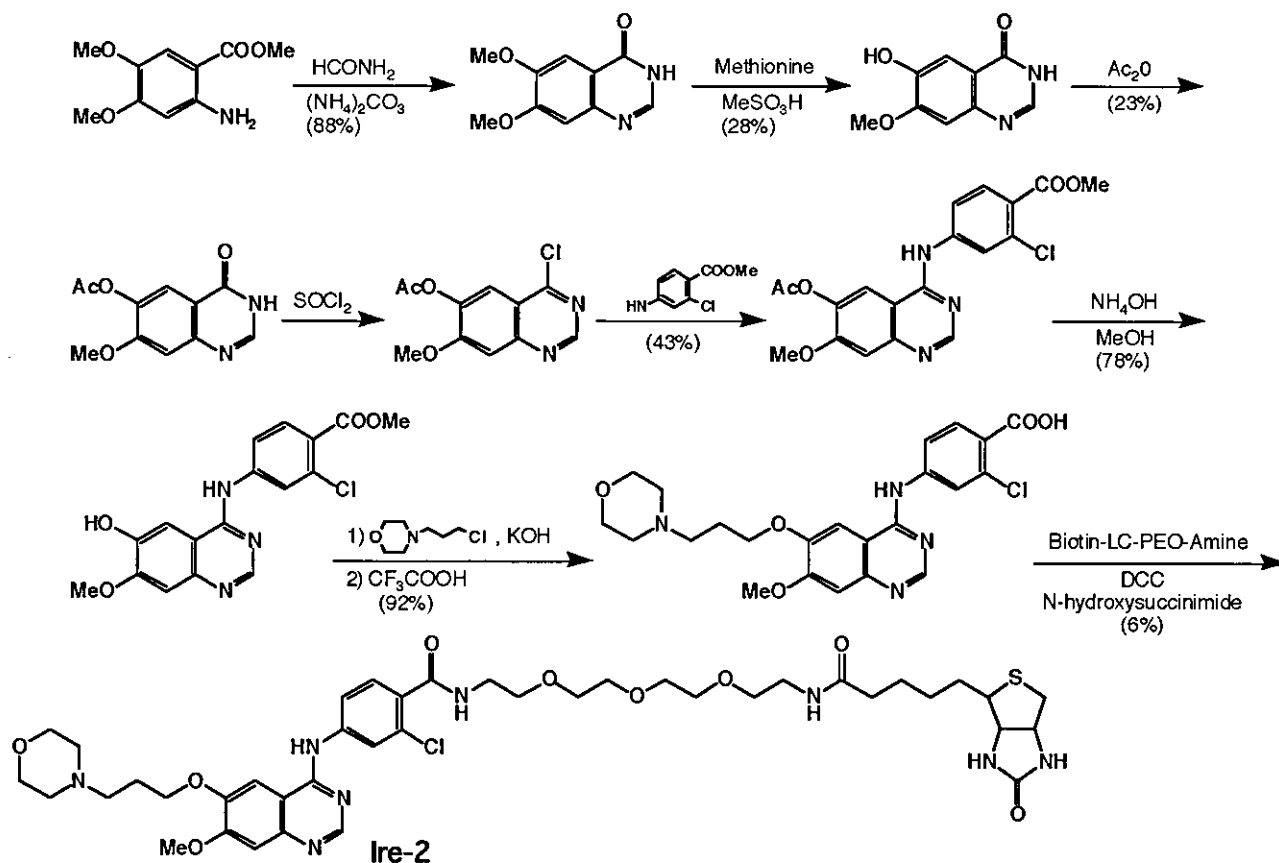


図 20 : イレッサ誘導体 1 固定樹脂を用いた pull down assay



図 2 1 : Am80とCh55

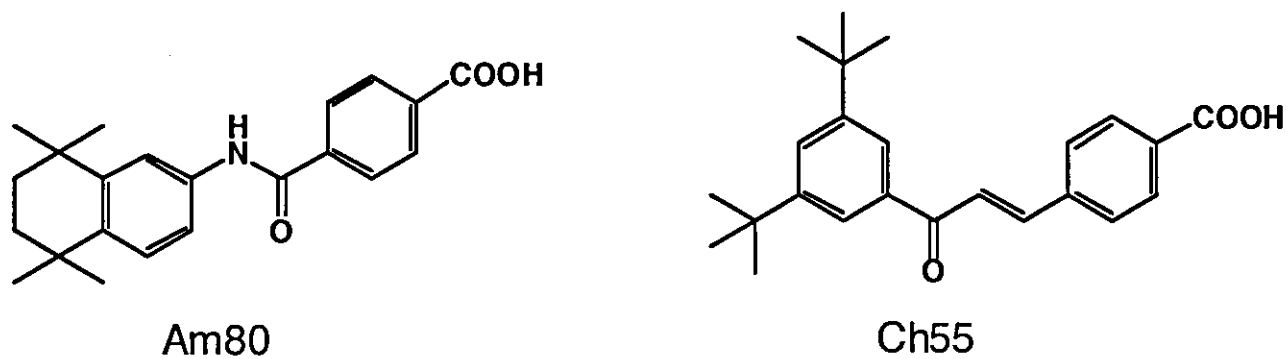


図 2 2 : ビオチン化Am80誘導体の合成

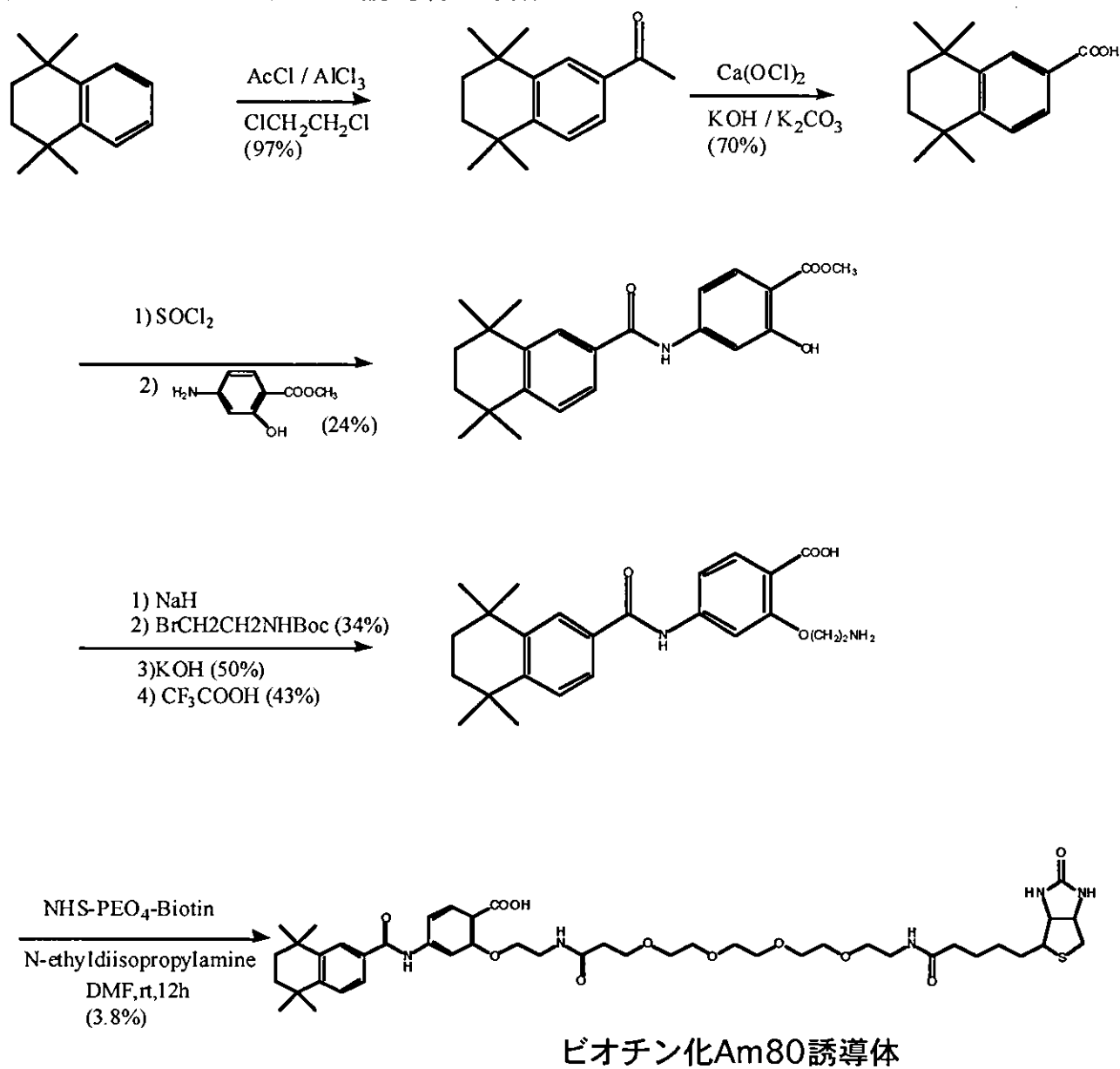




図 2 3 : ビオチン化Ch55誘導体の合成

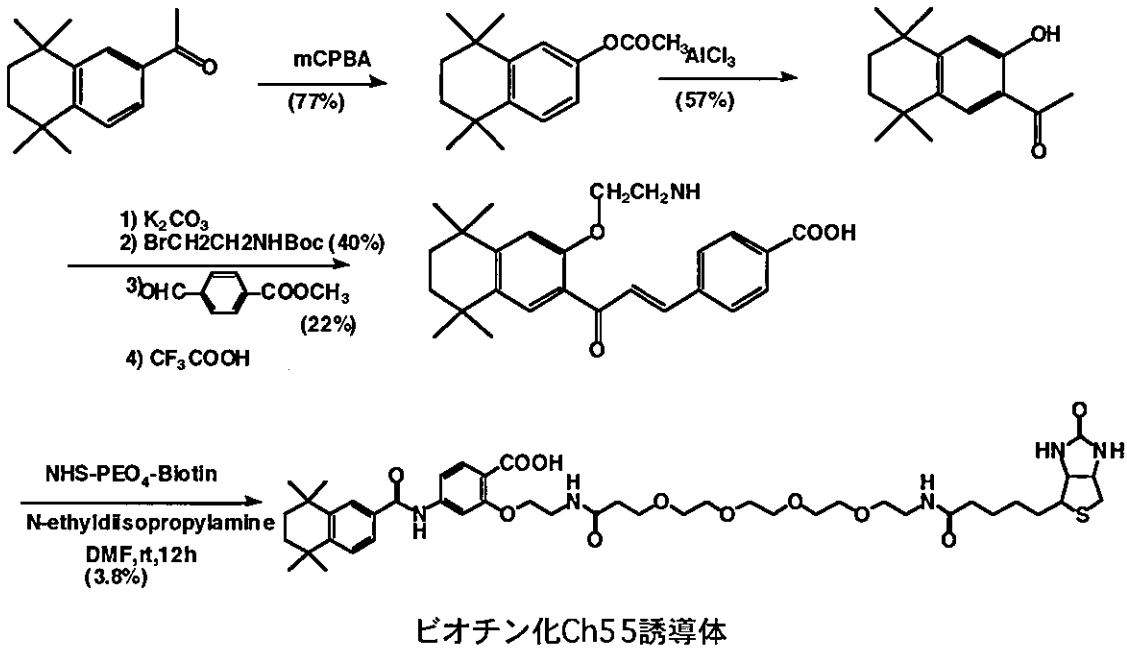


図 2 4 : Am80誘導体固定樹脂を用いたpull down assay

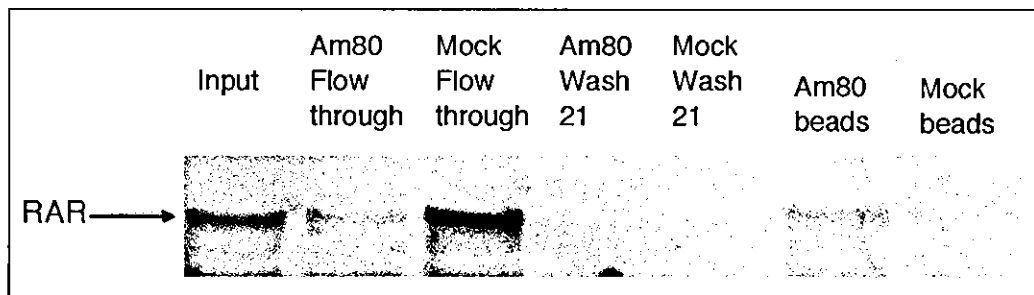


図 2 5 : RARのmRNAとIVVのPAGE

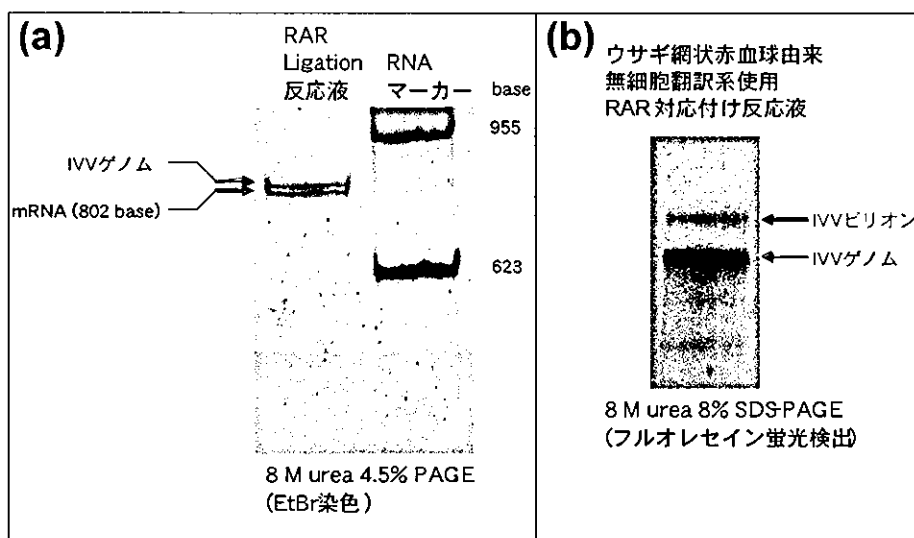


図26：アフィニティ選択各溶液のRT-PCR

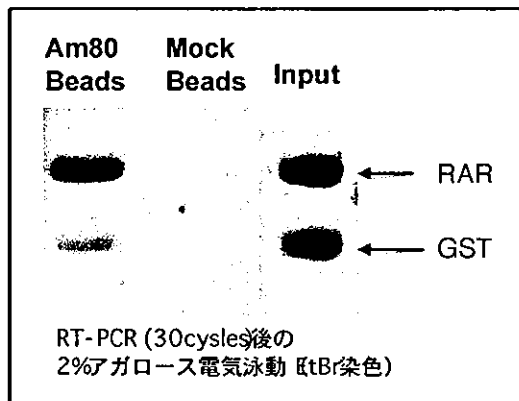


表3 RARの濃縮率

Sample	copies/ $\mu$ L		比	濃縮率*
	RAR	GST	(RAR/GST)	
Input	$2.9 \times 10^8$	$3.5 \times 10^8$	0.8	-
Am80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

図27：Ire-1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 28 : 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 29 : 5スクリーニングラウンド後のmRNA (8M urea, 4.5% PAGE)

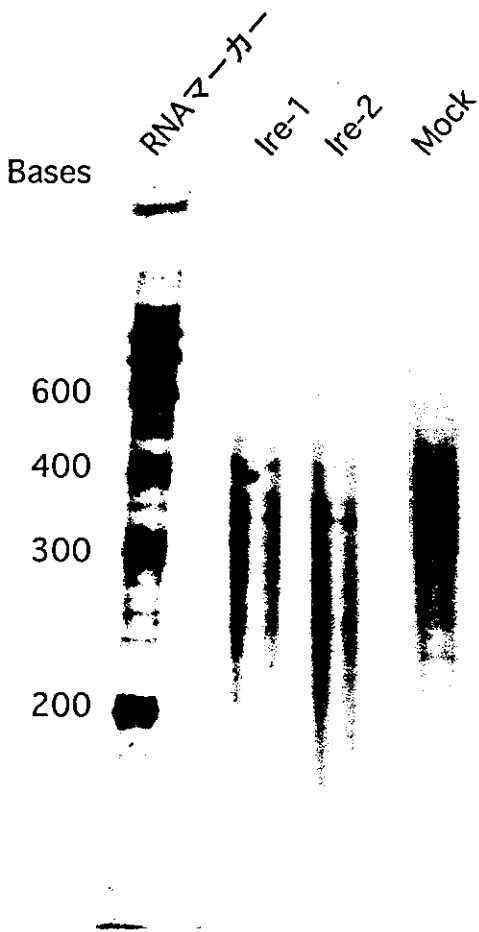


図 3 0 : TRPC4除去IVVライブラリーを用いたスクリーニング後の  
マルチプルアラインメントの結果

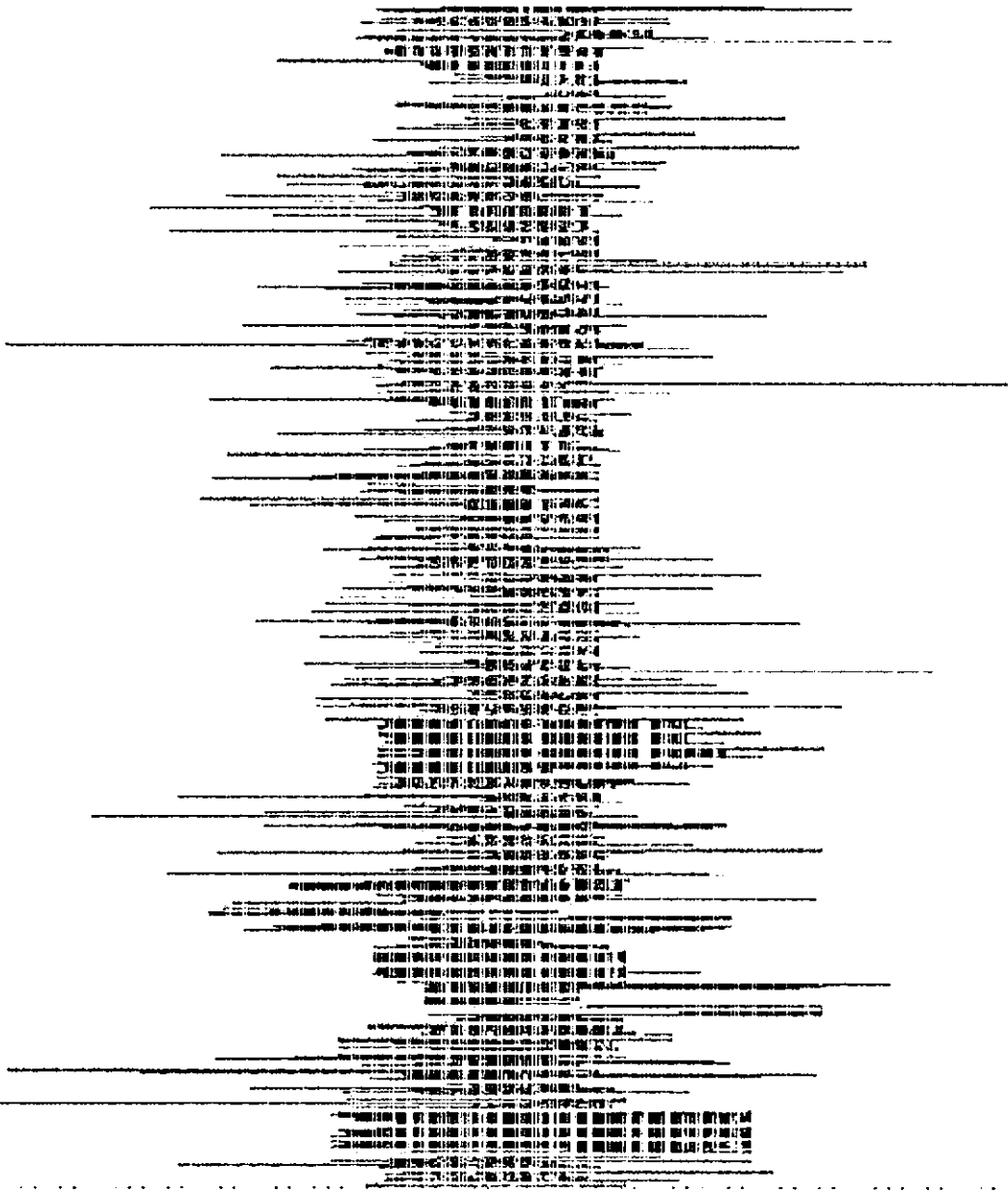


図 31 : サリドマイド誘導体をベイトにした場合のスクリーニング後のマルチプルアラインメントの結果

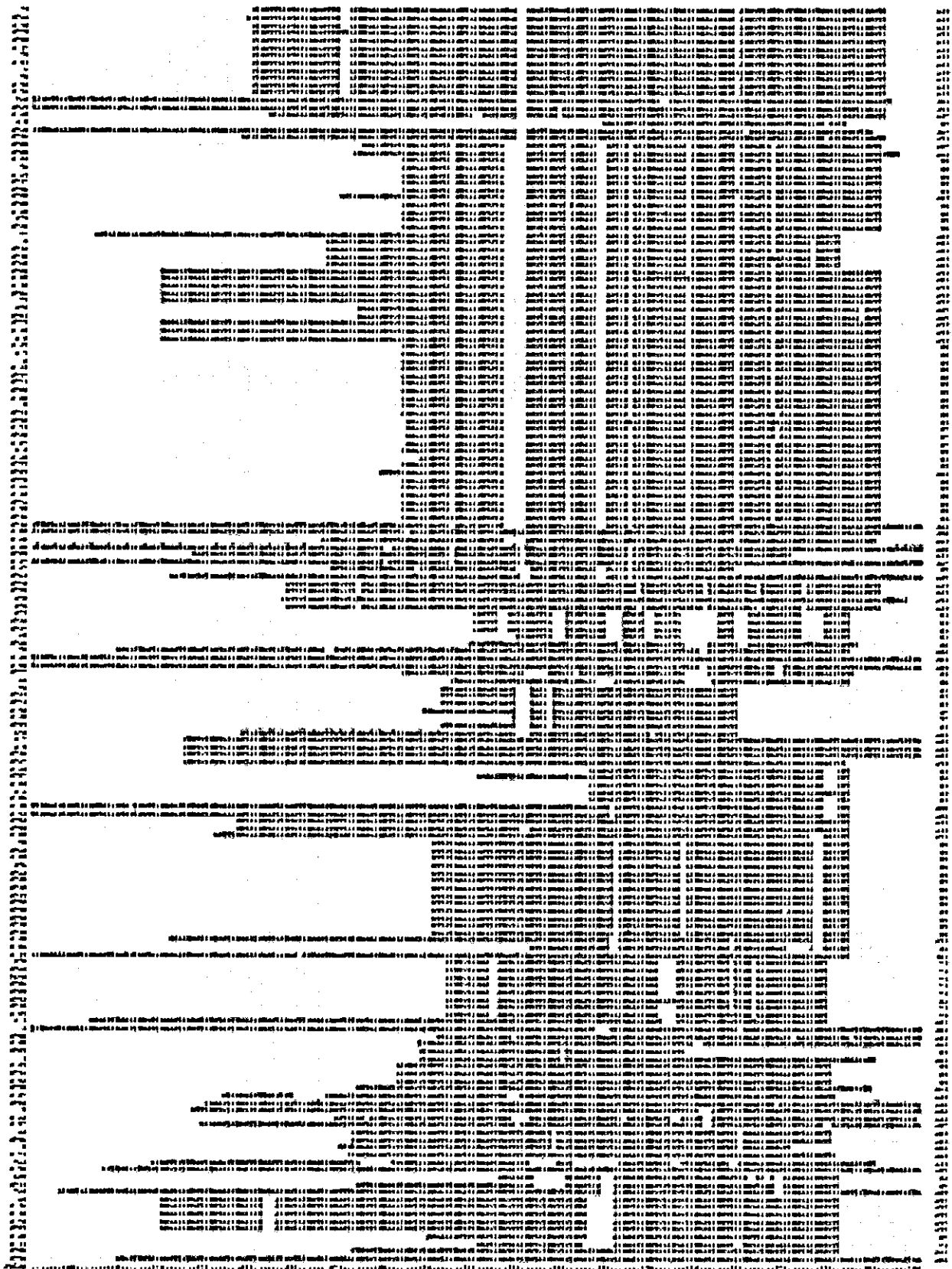


図 3 2 : 各スクリーニングラウンド後得られたmRNA  
 (Am80をベイトにした場合 ; 6M urea 4.5% PAGE, EtBr 染色)

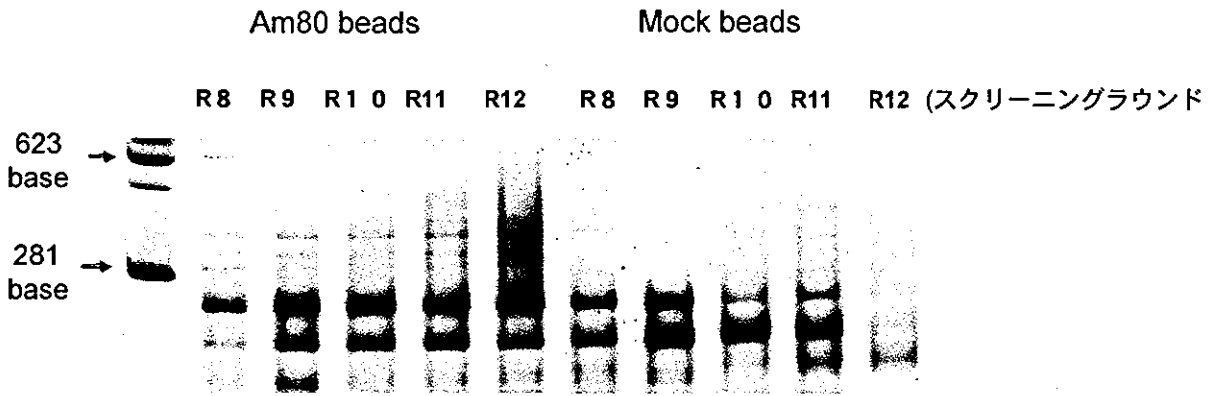


図 3 3 : 各スクリーニングラウンド後得られたmRNA  
 (Ch55をベイトにした場合 ; 6M urea 4.5% PAGE, EtBr 染色)

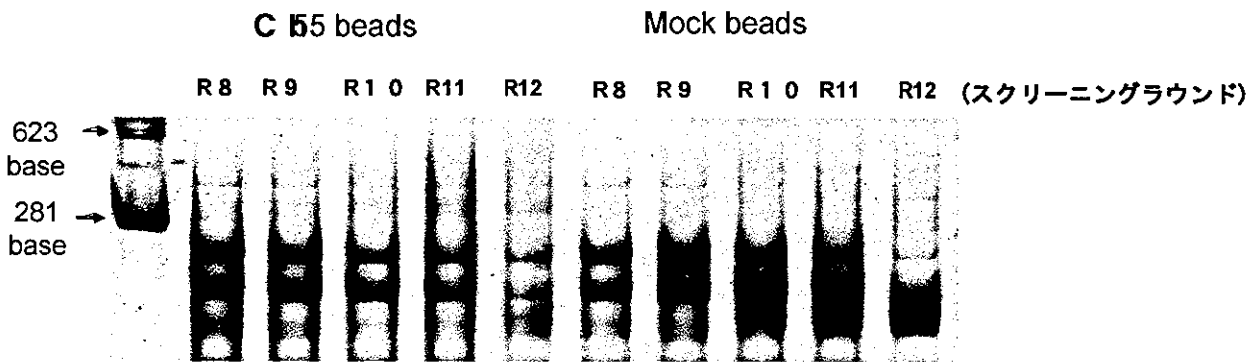
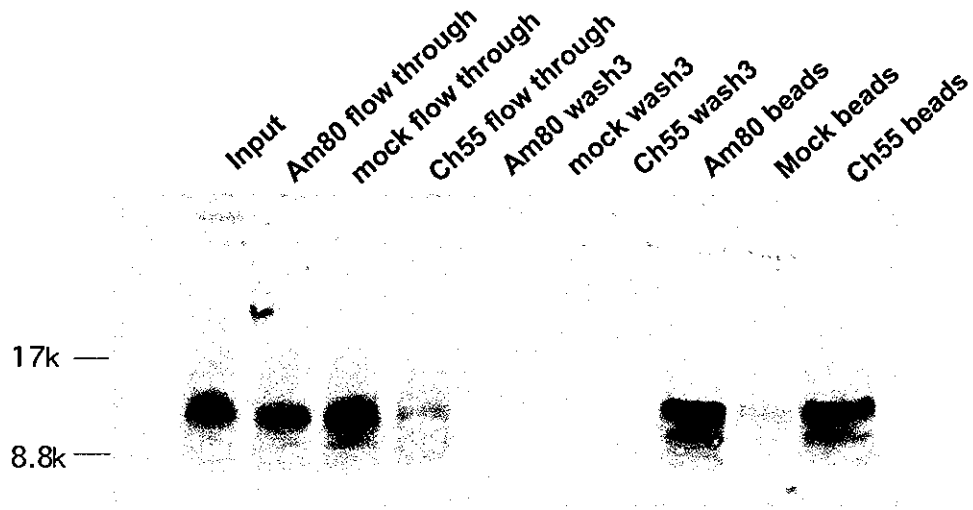


表 4 : Am80およびCh55をベイトにしたIVVスクリーニング後の  
 配列解析結果

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34 : 蛋白質1のウェスタンブロット



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
高嶋秀昭、 柳川弘志	<i>In vitro</i> 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.	<i>Drug Delivery System</i>	18	519-527	2003
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	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
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

# 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 —

特集 プロテオーム創薬とDDS

高橋秀昭・柳川弘志\*

*Comprehensive protein-protein interaction analysis (proteome analysis) using "in vitro virus" and its application for drug target exploration*

*In vitro virus (IVV)* is an assignment molecule in which the genotype molecule (mRNA) binds to the phenotype molecule (protein). We have demonstrated that an IVV selection system is useful for the comprehensive analysis of protein-protein interactions (proteome analysis). We are studying to apply the IVV selection system to the analysis of drug-protein interactions to explore the drug target proteins or to understand the mode of action of drugs. In this review, we describe about the structure and the property of IVV. The application of the IVV selection system for proteome analysis and the analysis of drug-protein interactions is also explained.

筆者らが、1997年に世界に先駆けて報告した *in vitro virus* (IVV) は、蛋白質とそれをコードする mRNA が結合した、表現型(機能)と遺伝子型(情報)との対応付け分子である。現在、当研究室では、IVV を用いた網羅的な蛋白質相互作用解析(プロテオーム解析)の研究を進めている。また、筆者らは、薬剤ターゲット蛋白質の発見や作用機序解明につながる、薬剤-蛋白質相互作用解析への IVV の応用も研究中である。ここでは、IVV の構造や特徴について述べるとともに、IVV を用いたプロテオーム解析法や薬剤-蛋白質相互作用解析法について概説する。

Hideaki Takashima・Hiroshi Yanagawa\*

key words : *in vitro virus*, proteome analysis, affinity selection, drug-protein interaction, drug targets

本年4月にヒトゲノム配列解析が完了したことにより<sup>1)</sup>、膨大なゲノム情報が蓄積され、DNA アレイ等ゲノミクスの手法を用いて、遺伝子発現の変化を網羅的に追跡することが可能になった<sup>2)</sup>。薬剤の作用・毒性研究においても、ゲノミクスの手法を用いた研究(薬理ゲノミクス<sup>3)</sup>・トキシコゲノミクス<sup>4)</sup>が行われている。すなわち、薬剤を与えた場合の遺伝子(mRNA-cDNA)発現パターンの変化を調べる手法が開発され、薬剤の作用や毒性の機序解析研究に用いられるようになってきている。しかしながら、このようなゲノミクスの手法では、薬剤投与(原因)に対する遺伝子発現パターンの変化(結果)がわかるのみであり、原因と結果間の薬剤-蛋白質や蛋白質-蛋白質相互作用が明確になるわけではない。

一方、薬剤を固定したアフィニティプローブを用

い、薬剤と相互作用する蛋白質を分離・同定する研究が進められてきている<sup>5)</sup>。この方法は、最近の二次元電気泳動と質量分析法を用いたプロテオミクスの手法の進歩により、薬剤と直接相互作用する蛋白質だけでなく、これらの蛋白質に相互作用する蛋白質も網羅的に解析できる手法になりつつある。しかし、蛋白質の配列決定において、高価で熟練した技術が必要である質量分析法を使用する点、蛋白質を増幅する手法がないため、極微量の蛋白質を同定するときの感度の点などに問題がある。

筆者らが、1997年に世界に先駆けて報告した *in vitro virus* (IVV) は、蛋白質とそれをコードする mRNA が結合した、表現型(機能)と遺伝子型(情報)の対応付け分子である<sup>6)</sup>。上述したように、ある特定の機能を持つ蛋白質を、多様な配列の組み合わせのなかから選択(機能スクリーニング)する場合、極微量の蛋白質を直接配列解析することは、現状では容易ではない。しかし、IVV を蛋白質の機能スク

\* Center for Life Science and Technology, School of Fundamental Science and Technology, Graduate School of Science and Technology, Keio University 慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻生命理工学専修

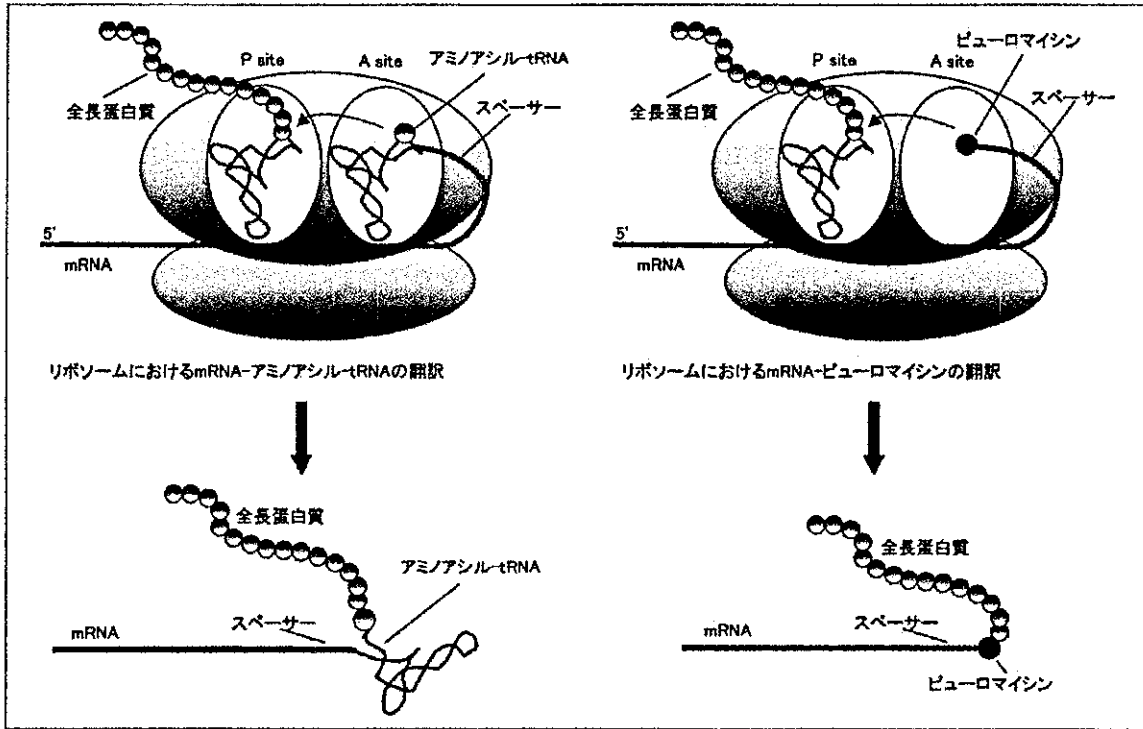


図 1 *In vitro* 蛋白質発現系を利用した対応付け分子

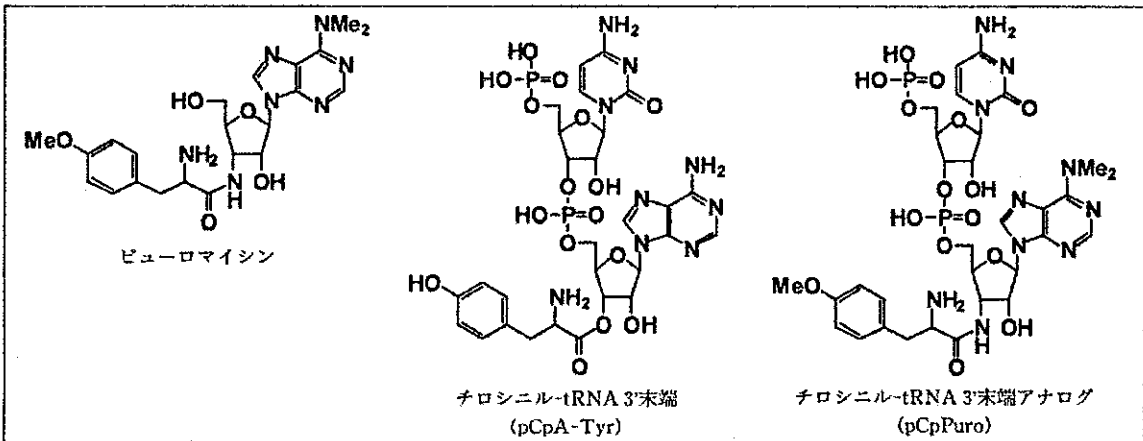


図 2 ピュロマイシンとチロシニル-tRNA アナログ

リーニングに応用すれば, IVV は同一分子内に機能部位(蛋白質:表現型)と情報部位(核酸:遺伝子型)を持つため, 核酸部分の PCR による増幅によって, 配列解析を容易に行うことができる. IVV は, “試験管内で蛋白質の進化を実現する” ための, 進化分子工学のツールとして開発されてきたが, その後, 網羅的な蛋白質相互作用解析(プロテオーム解析)への

応用が進められてきている. また, 筆者らは, IVV を用いたプロテオーム解析法の薬剤-蛋白質相互作用の網羅的な解析への応用についても, 研究を進めている.

本稿では, 蛋白質と核酸の対応付け分子である IVV の構造や特徴について紹介するとともに, それを用いたプロテオーム解析や薬剤-蛋白質相互作用の網羅的な解析の試みについても紹介する.

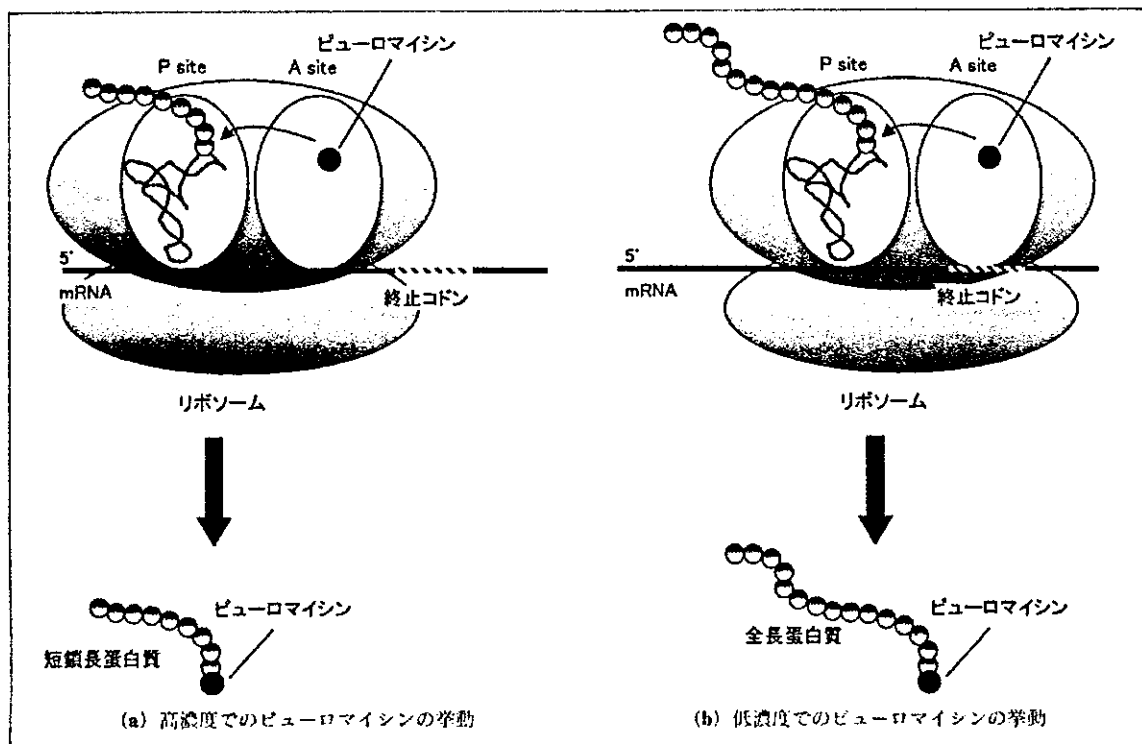


図3 ピューロマイシンと全長蛋白質の結合モラル

### In vitro virus (IVV)

生体内には、酵素、ホルモン、レセプターなどさまざまな蛋白質が存在する。この多様な蛋白質の中から特定の機能を持つ蛋白質を選択(機能スクリーニング)するための分子生物学的手法が、近年盛んに開発されてきている。これらの手法として、酵母2ハイブリッド法<sup>7)</sup>やファージディスプレイ法<sup>8)</sup>があるが、これらの手法は、蛋白質合成を生細胞内で行うため(*in vivo* 発現系の利用)毒性のある蛋白質は発現されない、細胞数の問題で発現される蛋白質の種類(ライブラリーの多様性)が $10^6 \sim 10^8$ 程度と少ないという大きな欠点を持つ。*In vitro* 蛋白質発現系を利用し、上記の欠点を改善したリボソームディスプレイ法が報告され、蛋白質の機能スクリーニングに成果を上げている<sup>9)</sup>。

筆者らは、1995年からリボソームディスプレイと同様の *in vitro* 蛋白質発現系を利用した、遺伝子型(核酸)と表現型(蛋白質)が共有結合で一つの結合体になったウイルス型の対応付け分子の構築を目指し

研究を進めてきた<sup>10-12)</sup>。当初、mRNAの3'末端にアミノアシル-tRNAを結合させた人工遺伝子を作製し、*in vitro* 蛋白質発現系に投入すると、リボソームにおいて対応付け分子が形成されると考えた(図1)。しかし、このようなmRNA-アミノアシル-tRNA複合体からは、効率よく対応付け分子を作製することはできなかった。

ピューロマイシン(図2)は、1950年代に発見された蛋白質合成を阻害する抗生物質であるが、アミノアシル-tRNAの3'末端と類似した構造を持ち、伸長中の蛋白質のC末端に共有結合し、蛋白質合成を阻害する<sup>13)</sup>。

筆者らは、ピューロマイシンのその性質に着目し、アミノアシル-tRNAの代わりにピューロマイシンをmRNAの3'末端に結合させた分子が、対応付け分子を形成するのではないかと考えた(図1)。そして、その研究の過程で、*in vitro* 蛋白質発現系において、チロシニル-tRNAの3'末端アナログであるpCpPuro(図2)が、蛋白質合成を阻害しない $0.04 \mu\text{M}$ という低濃度では、全長蛋白質の3'末端に取り