

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

宮本悦子・柳川弘志

ポストゲノム研究として、網羅的な遺伝子ネットワーク解析や蛋白質間相互作用解析が期待されている。筆者らは、進化の研究を目的に、ビューロマイシンを利用した遺伝子型 (mRNA) と表現型 (蛋白質) の対応づけ分子として *in vitro* virus (IVV) を開発した。その際に、偶然見いだしたビューロマイシンの特異的な性質を利用して、蛋白質の C 末端ラベル化法も開発した。これらを総称してビューロマイシン・テクノロジーと名づけた。ここでは、ビューロマイシン・テクノロジーのポストゲノム研究への応用として、網羅的でハイスループットな遺伝子ネットワーク解析システムを提案する。

Key words ◆ *in vitro* virus ポストゲノム研究 対応づけ分子 ビューロマイシン 蛋白質 C 末端ラベル化
蛋白質間相互作用解析 遺伝子ネットワーク解析

● はじめに

「試験管内で蛋白質の進化を実現する」ためのツールとして、*in vitro* virus (IVV) は、1997 年ころに世界に先駆けて日本で産声を上げたバイオテクノロジーである。IVV は、ビューロマイシンというよく知られた抗生物質の化学的特性を利用した遺伝子型 (mRNA) と表現型 (蛋白質) の対応づけ分子である。筆者らは IVV 構築の実験過程で、これまで知られていなかったビューロマイシンの性質を偶然見いだすことができた。この性質は、IVV のみならず、蛋白質 C 末端ラベル化という、もうひとつのテクノロジーを誕生させた。この 2 つの技術を、ビューロマイシン・テクノロジーと総称する。ここでは、IVV は試験管内で蛋白質の進化を研究するツールであるのみならず、ポストゲノム研究へ応用可能であることを示し、ビューロマイシン・テクノロジーを土台とした網羅的な蛋白質間相互作用解析による遺伝子ネットワーク解析システムを提案する。とくに、この分野の最近の動向や既存の技術と比較しながら、筆者らが目指すセレクション法や遺伝子ネットワーク解析システムのハイスループット化のための工夫について述べる。

I. 化学と生物の接点としてのビューロマイシン

抗生物質であるビューロマイシン (図 1a) は、化学と生物の接点を取りなす物質といえる。1959 年、ビューロマイシンが、無細胞翻訳系で蛋白質の合成を阻害することが発見された¹⁾。さらに、ビューロマイシンは、アミノアシル-tRNA 3'末端アナログ (図 1b および c) であることが示された²⁾。すなわち、ビューロマイシンが蛋白質合成を阻害する理由は、アミノアシル-tRNA と競争して、リボソームの A 部位に入り、ペプチジル転移酵素の基質となり、伸長中の蛋白質と結合するためである。ビューロマイシンは翻訳の機構を調べるための重要なツールとしておおいに注目された。実際、ビューロマイシンが未成熟なペプチドの C 末端に結合することから、蛋白質の合成が N 末端から C 末端に進むことが明らかとなった。

一方、1981 年、リボザイムが発見され³⁾、1990 年代に入って、RNA ワールド仮説の検証を目的として、RNA の試験管内進化実験系 (*in vitro* RNA selection) が構築された⁴⁾。この系は、淘汰による自然選択が進化の原動

Etsuko Miyamoto-Sato, Hiroshi Yanagawa, 慶應義塾大学理工学部 生命情報学科 E-mail: nekoneko@educ.cc.keio.ac.jp hyana@bio.keio.ac.jp
Application of *in vitro* virus and C-terminal protein labeling to the post-genome research

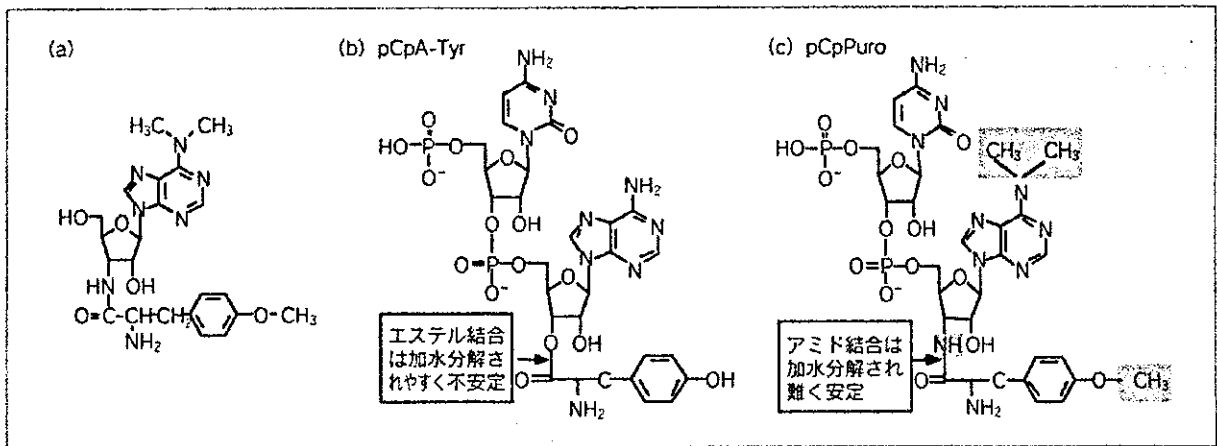


図1 ビューロマイシンとアミノアシル-tRNA アナログ

(a) ビューロマイシン. (b) アミノアシル-tRNA 3'末端 (pCpA-Tyr) と (c) アミノアシル-tRNA アナログであるビューロマイシン誘導体 (pCpPuro). 網掛け部分の構造のみが異なる. (文献8より転載)

力だとするダーウィン進化のモデル実験系として構築され、「選択(セレクション)」、「増幅」、「変異」の工程を繰り返すことで、淘汰が人工的にはたらく仕組みをもつ(図2a)。このセレクション系は、RNAの進化実験系としてのみならず、新規のリボザイムなどの機能性物質の創製が可能なバイオテクノロジーとしてもおおいに注目された。

このような大きなテクノロジーの流れのなかで、次に蛋白質の試験管内進化実験系 (*in vitro* protein selection) の構築が期待された。すなわち、「選択」、「増幅」、「変異」の工程を繰り返すことが可能な、リボザイムのように遺伝子型(情報)と表現型(機能)の対応づけが実現した“蛋白質”が所望された⁹⁾。筆者らは、そのひとつの解として、遺伝子型(mRNA)と表現型(蛋白質)の対応づけを実現し、mRNAタグつき蛋白質(図2b)をビューロマイシンを利用して構築し、1997年に“*in vitro* virus”(IVV)として発表した⁹⁾。すなわち、1960年ころにビューロマイシンが翻訳の研究のためのツールとして見いだされてから約40年後に、筆者らはビューロマイシンを、蛋白質の進化の研究に利用しようと考えたのである。IVVは、「試験管内で蛋白質を創製する」ためのツールとして、蛋白質の進化実験および高機能性蛋白質の創製のための新しいバイオテクノロジーとして誕生したのである。そして2000年に入り、図2aに示したセレクション系の「選択」、「増幅」、「変異」の工程における進化の原動力である「変異」を省いた系を用いることによって、ポストゲノム研究への応用の可能性が広がり、IVV

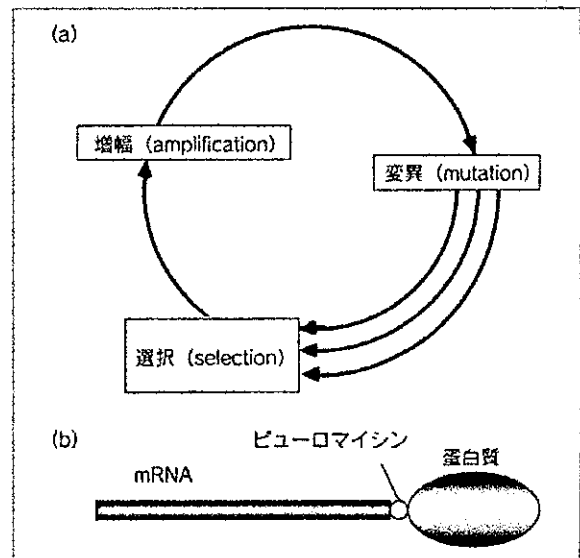


図2 ダーウィン進化の人工淘汰系と *in vitro* virus

(a) 3つの単位操作を基本とするダーウィン進化の人工淘汰系⁹⁾ (文献8より転載). (b) リボザイムと同様3つの単位操作が可能なmRNAと蛋白質をビューロマイシンで連結した *in vitro* virus⁹⁾. 蛋白質で「選択」し、mRNAで「増幅」と「変異」を実現する。

を含めたさまざまな対応づけ技術が、さらなる新しいバイオテクノロジーとして注目され始めている^{7,8,10,11)}。

II. ビューロマイシン・テクノロジー

ビューロマイシンは、未成熟な蛋白質のC末端に連結することがよく知られていたが、筆者らは、ビューロ

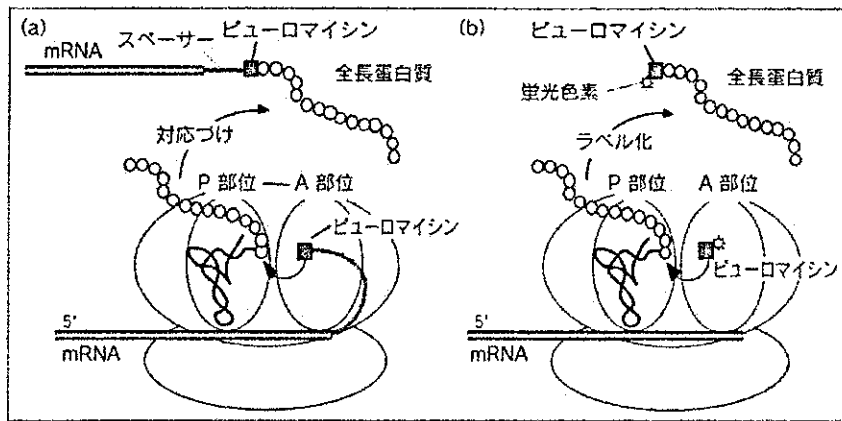


図3 ビューロマイシン・テクノロジー

(a) *in vitro* virus 対応づけ技術^{9,12)}: 無細胞翻訳系のリボソーム上で、ビューロマイシンをもつスパーサーをライゲーションした mRNA テンプレートと、mRNA の情報と完全に対応した全長蛋白質とを連結する技術。(b) 蛋白質の C 末端ラベル化技術^{12,14)}: 無細胞翻訳系のリボソーム上で、蛍光色素などが導入されたビューロマイシン誘導体を用いて、全長蛋白質の C 末端を標識する技術。(文献 7 より一部改訂して転載)

マイシンを用いて、mRNA の情報と完全に対応した全長蛋白質と連結した IVV を構築する方法を模索していた。筆者らは幸運にも、IVV 構築の実験中に、ビューロマイシンは低濃度では、全長蛋白質の C 末端と連結しうることを見いだした¹²⁾。ビューロマイシンのこの特性は、2つの技術を生み出した^{9,14)}。ひとつは、mRNA に対応した全長蛋白質と連結した IVV を形成する「*in vitro* virus 対応づけ技術」^{9,12)} (図 3a) であり、もうひとつは、「蛋白質の C 末端ラベル化技術」^{12,14)} (図 3b) である。

「*in vitro* virus 対応づけ技術」は、ビューロマイシンが特異的に全長蛋白質の C 末端に結合できる性質¹²⁾、およびアミノアシル-tRNA を T1 リボヌクレアーゼで切断した直鎖状断片が、リボソームの A 部位に入る性質¹³⁾ を利用した。すなわち、3' 末端にビューロマイシンをもったスパーサーを mRNA にライゲーションした単純な直鎖状の構成を IVV の mRNA テンプレートとし、スパーサーの長さ (ビューロマイシンの濃度に対応) を調節することにより、mRNA に対応した全長蛋白質と連結した IVV を形成する技術として「*in vitro* virus 対応づけ技術」^{9,12)} が完成した (図 3a)。さらに、ビューロマイシンに蛍光色素などを導入することにより、全長蛋白質の C 末端を標識できる技術として、「蛋白質の C 末端ラベル化技術」^{12,14)} が誕生した (図 3b)。これら 2つの技術を総称して、ビューロマイシン・テクノロジーとよぶ。

III. ポストゲノム機能解析への期待

2000年7月、ヒトゲノムの全塩基配列解読完了が宣

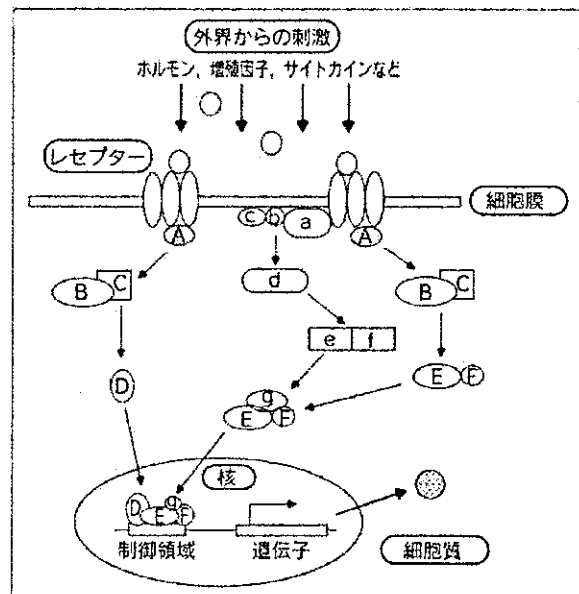


図4 遺伝子ネットワーク

細胞内で翻訳される蛋白質の多くは、複数でかかわり合って、相互作用しながら機能を果たしている。細胞が外界からホルモンなどの刺激を受けて、レセプターに結合すると、さまざまな蛋白質が構造を変え、さまざまな蛋白質と相互作用し、膜内と細胞質内の一連のシグナル伝達系が動き出し、最終的には核内の転写調節系に及び、特定の遺伝子の発現が制御される。(文献 7 より転載)

言され、これまで 70 種以上の真核・原核生物、真正・古細菌などの生物種のゲノムが解読されている。2002 年 1 月、チンパンジーのゲノムが解読され、ヒトのゲノム配列との差はわずか 1.23% しかないことがわかった。ヒトとチンパンジーの差はゲノム配列からだけではとても説明できないものであった。ここからわかることは、われわれはまだ、「進化」を記録したゲノム地図の読み方、ゲノム配列が意味することを知らないというこ

とである。ポストゲノム研究とは、このゲノム地図の読み方を知ることにあるだろう。すなわち、ヒトとチンパンジーの差は、ゲノム配列から翻訳される蛋白質とその蛋白質間相互作用に支えられた遺伝子ネットワーク(図4)のパターンの違いによる可能性がある。ポストゲノム研究に求められるものは、従来の一遺伝子を深く掘り下げる研究手法ではなく、網羅的な遺伝子群の解析手法であり、筆者らは、ポストゲノム研究に、ビューロマイシン・テクノロジーである IVV および蛋白質の C 末端ラベル化を用いた網羅的な遺伝子ネットワーク解析システムを提案する。

IV. ビューロマイシン・テクノロジーを用いた網羅的な遺伝子ネットワーク解析システム

1. さまざまな蛋白質間相互作用解析法

表1に示すように、蛋白質間相互作用の解析方法としてよく知られているのは、*in vivo* での発現を利用した方法で、酵母ツーハイブリッド法¹⁵⁾、タンデムアフィニティー精製 (TAP) 法¹⁶⁾ などである。これらの方法はいち早く網羅的な大規模解析に利用され始めた。酵母ツーハイブリッド法は1:1の総当たり解析法であるが、TAP法は、1分子:多分子解析法であり、網羅的な解析に、より有利である。IVV法は、原理的には*in vitro* で実現できる1分子:多分子解析法であり、かつ、TAP法のように蛋白質を解析する代わりに、IVV(図2b, 図3a)の mRNA の遺伝子情報を増幅して配列を解析することができる点が有利であり、また、細胞に毒性がある蛋白質は発現できないなどの、*in vivo* 発現系の問題から解放される。ここで、餌となる蛋白質をベイトとよ

び、獲物となる蛋白質をプレイとよぶが、*in vivo* 発現系である酵母ツーハイブリッド法と TAP 法では、ベイトは蛋白質に限られるが、*in vitro* 発現系である IVV 法では、蛋白質に制限されることはなく、DNA, RNA などの核酸、薬剤など低分子化合物をベイトにできる点も有利である。

IVV と同様に進化実験系として開発された技術としては、*in vivo* 発現系では、ファージ・ディスプレイ法¹⁷⁾ などがあり、*in vitro* 発現系では、mRNA-ペプチド融合法 (mRNA ディスプレイ法)¹⁸⁾、リボソーム・ディスプレイ法¹⁹⁾、STABLE 法²⁰⁾ などがある。最近、mRNA ディスプレイ法の蛋白質間相互作用への応用が発表された²¹⁾。ここで、mRNA ディスプレイ法は、IVV 法と同様にビューロマイシンを用いた技術である。IVV 法⁹⁾ と mRNA ディスプレイ法¹⁸⁾ は、発表された当初は、ほぼ同じ構成をもち、対応づけ分子としての性質はほぼ同じであった。しかし、現在の mRNA ディスプレイ法の対応づけ分子は、形成効率を向上するためにスペーサーの選択やスペーサーと mRNA のライゲーション方法の選択などを改変しているため、それぞれが実現可能なセレクション方法も異なってきたことから、以後2つの方法を区別する。ここではとくに、筆者らの IVV 法によるポストゲノム機能解析について述べる。

2. 遺伝子ネットワーク解析システム

筆者らが提案するハイスループットな網羅的遺伝子ネットワーク解析システム(図5)は、ビューロマイシン・テクノロジーを土台として構成され、IVV法を利用した1次スクリーニングと、蛋白質のC末端ラベル化を利用した2次スクリーニングからなる。1次スクリーニングでは、IVVによる蛋白質間相互作用解析を目的と

し、2次スクリーニングでは、1次スクリーニングで得られた遺伝子カタログについて、蛋白質のC末端ラベル化法により蛋白質間相互作用の検証および遺伝子ネットワークの詳細を解析することを目的としている。遺伝子ネットワーク解析システムの1次スクリーニングは、「cDNA ライブラリーの構築」、[IVV ライブラリーの構築]、

表1 蛋白質間相互作用解析における IVV 法の利点

発現系	解析方法	1:多分子解析	蛋白質発現制限	ベイト制限
<i>in vivo</i>	酵母ツーハイブリッド法 ¹⁵⁾	×	多い	あり
	TAP法 ¹⁶⁾	○		
	ファージ・ディスプレイ法 ¹⁷⁾	△ ^{a)}		
<i>in vitro</i>	IVV法 ⁹⁾	○ ^{b)}	少ない	なし
	mRNA ディスプレイ法 ¹⁸⁾			
	STABLE法 ²⁰⁾			
	リボソーム・ディスプレイ法 ¹⁹⁾	△ ^{a)}		

a)細胞やリボソームへの蛋白質の表示は、立体障害により複合体形成に不利。

b)原理的には可能であるが、まだ報告はない。

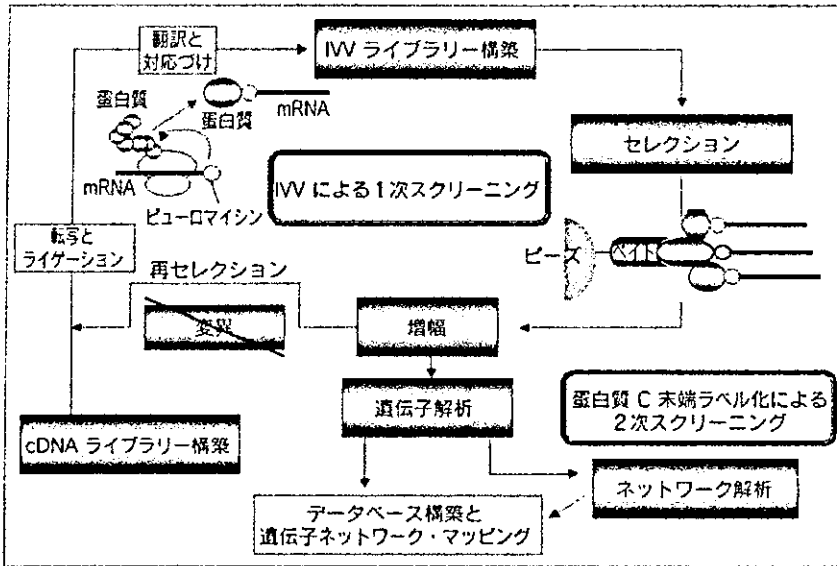


図5 遺伝子ネットワーク解析システム

ビューロマイシン・テクノロジーを土台とした遺伝子ネットワーク解析システム。1次スクリーニングでは、IVV法により、「変異」の工程を省く「セレクト」(選択)と「増幅」の工程により蛋白質間相互作用を解析し、2次スクリーニングでは、蛋白質のC末端ラベル化法により、遺伝子ネットワークの詳細を解析する。1次・2次スクリーニングの情報により、遺伝子カタログのデータベース構築や遺伝子ネットワーク・マッピングを行う。

「セレクト」、「増幅」、そして「遺伝子解析」の工程から構成され、2次スクリーニングは、「ネットワーク解析」の工程から構成されている。「cDNA ライブラリーの構築」では、組織から抽出した mRNA や既存の cDNA カタログなどから、IVV として利用できるような cDNA ライブラリーを構築する。「IVV ライブラリーの構築」では、cDNA ライブラリーを転写して mRNA ライブラリーとし、その mRNA に、ビューロマイシンを3'末端にもつスパーサーをライゲーションし、無細胞翻訳系で IVV ライブラリーを形成する。「セレクト」の工程では、IVV ライブラリーをプレイトとして、ベイト蛋白質と相互作用する蛋白質をコードする遺伝子群をセレクトし、「増幅」の工程では、IVV の mRNA をテンプレートとして、逆転写と PCR で増幅し、「遺伝子解析」の工程では、増幅した遺伝子群のクローニング・シーケンス解析を行う。1次スクリーニングでライブラリーの濃縮が足りなければ、再セレクトする。この際、進化の実験系では、ライブラリーの塩基配列に「変異」を施すが、ポストゲノム機能解析では、「変異」の工程を省略する。2次スクリーニングの「ネットワーク解析」では、1次スクリーニングで濃縮された遺伝子群について、蛋白質の C 末端ラベル化法を利用して、ベイト蛋白質との相互作用の詳細を解析する。そして最後に、「遺伝子解析」の結果をデータベース化し、「ネットワーク解析」の結果と併せて、遺伝子ネットワーク・マッピングを完成する。

3. 網羅的でハイスループットな解析のためのセレクト法

上記で解説した遺伝子ネットワーク解析システムにおいて、網羅的でハイスループットな解析システムを実現するためには、IVV による 1 次スクリーニングの「セレクト」工程での蛋白質間相互作用の検出方法が要となる。すなわち、「セレクト」工程でのベイト蛋白質とプレイト IVV ライブラリーとのネイティブな相互作用形成が重要となる。図 6a に示したように、TAP 法は、この問題に対してはもっとも理想的な解析方法である。なぜなら、*in vivo* での共発現によって、ベイト蛋白質とプレイト蛋白質がネイティブな状態で相互作用して複合体を形成するからである。形成された複合体は細胞を破壊して抽出され、未精製のままベイト蛋白質のタグでスクリーニングされる。このことによって、1 つのベイト蛋白質とライブラリーである複数のプレイト蛋白質との組合せによる直接的な相互作用とともに、さらに間接的な相互作用のある蛋白質をも含めた複合体の網羅的解析 (1 分子: 多分子解析) が可能となる (図 6a)。

このような複合体の網羅的解析を、対応づけ分子を用いて、*in vitro* で実現することはできるだろうか? *In vitro* の翻訳系でも翻訳中に蛋白質がリボソーム上で折りたたまれ、さらに相互作用する相手と複合体を形成することが知られている²³⁾。よって、原理的には *in vitro* の翻訳系で、ベイト蛋白質とプレイト対応づけ分子がネイ

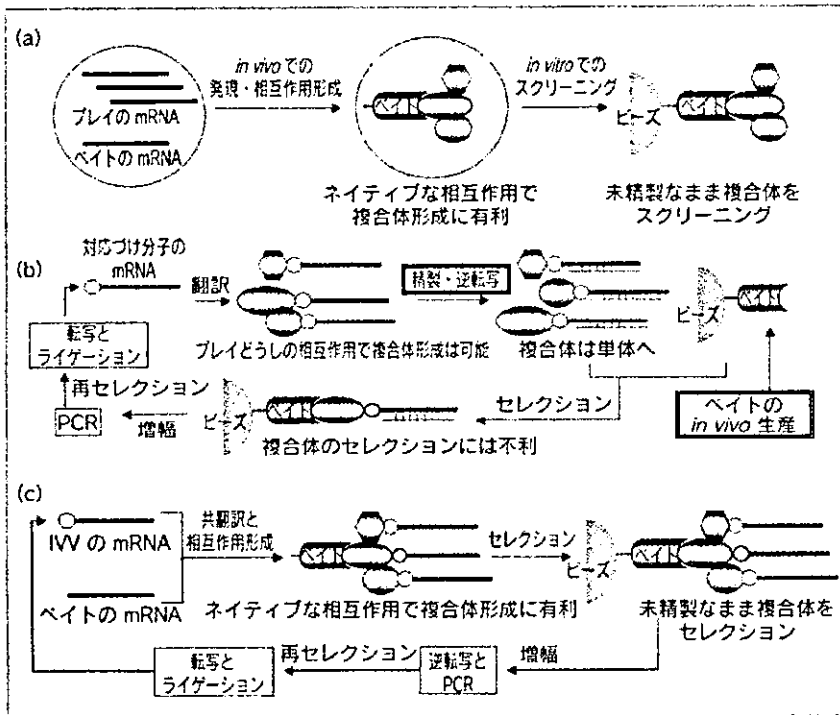


図6 *In vivo* および *in vitro* 発現系の蛋白質間相互作用解析技術
 (a) TAP法¹⁶⁾: ベイト蛋白質とプレイ蛋白質の *in vivo* “共”発現系でネイティブな相互作用形成に有利なスクリーニング法。(b) mRNAディスプレイ法¹⁷⁾: *in vitro* 発現系でのベイト蛋白質と精製されたプレイ mRNA-ペプチド融合体によるセレクション法。(c) IVV法が目指すハイスループットでネイティブな相互作用形成に有利なセレクション法。

ティブな状態で相互作用して、複合体を形成できるはずである。しかしながら、現在の mRNA ディスプレイ法¹⁷⁾ (図6b) では、翻訳後に mRNA-ペプチド融合体を一度精製してからセレクションに用いているため、翻訳中のネイティブな折りたたみ、および複合体の形成などを告げることになる。

このように、mRNA-ペプチド融合体の精製は、精製という余計な工程が必要となるだけでなく、翻訳中のネイティブな複合体形成に不利である。筆者らは、IVVによるセレクション法として、翻訳中のネイティブな複合体形成に有利なベイト蛋白質とプレイ対応づけ分子の共翻訳、およびそれに続く対応づけ分子の精製を行わず、未精製なままでのセレクション法を提案したい(図6c)。この方法を実現するためには、対応づけ分子(mRNA-ペプチド融合体)の精製を完全に省かなければならない。対応づけ分子の精製は、2つの目的をもっている。ひとつは、セレクションでのバックグラウンドを下げるためであり、もうひとつは、mRNA が分解されやすい不安定な無細胞翻訳系から少しでも早く分離するためである。よって、対応づけ分子の精製を完全に省略するには、現在の mRNA ディスプレイの対応づけ効率40%²⁰⁾をさらに向上するとともに、無細胞翻訳系での

mRNA の安定性を向上することが必須となる。また、mRNA の安定性を向上することができれば、精製後に逆転写することも必ずしも必要なくなる(図6b)。ここでの逆転写も2つの意味をもつ。セレクション中の mRNA の分解を防ぐ目的と、mRNA 部分が構造をつくり、ベイトによってはアプタマーとしてセレクションされる可能性を防ぐ目的である。さらに、翻訳中のネイティブな複合体形成に有利なベイト蛋白質とプレイ対応づけ分子の共翻訳を実現するためには、対応づけ分子の精製・逆転写工程のみならず、ベイト蛋白質の *in vivo* 生産の工程(図6bで2重に囲った2つの工程)を省いた方法を実現することが望まれる。また、ベイト蛋白質の *in vivo* 生産の工程が省ければ、“すべての操作を *in vitro*で行うシステム”となり、細胞による蛋白質発現の制限など、*in vivo* の問題から解放される。現在筆者らは、対応づけ分子としての IVV の性質について、対応づけ効率と安定性を大きく改変することを試みている。このことによって将来的には、*in vitro* でネイティブな相互作用による複合体形成に有利で、かつハイスループットなセレクション法の構築が実現できると考えている(図6c)。

4. 遺伝子ネットワーク・マッピング

ここまで筆者らの目指すセレクション法について述べたが、最終的には、IVVのセレクション(1次スクリーニング)で濃縮された遺伝子カタログのデータベース構築と、遺伝子ネットワーク・マッピングが目標となる。図5に示したように、セレクション(1次スクリーニング)で濃縮されたライブラリーについて、クローニングとシーケンスによる遺伝子解析で遺伝子カタログを得る。2次スクリーニングでは、蛋白質C末端ラベル化法を用いて、遺伝子ネットワークの詳細を解析する。実際筆者らは、2次スクリーニングの遺伝子ネットワーク解析に、マイクロアレイや蛍光相関分光法である FCCS (fluorescence cross-correlation spectroscopy) による解析^{24,25)}を提案している。さらに今後、遺伝子解析および遺伝子カタログのデータベース構築の自動化、構築したデータベースと解析した遺伝子ネットワークのマッピングの自動化、そして1次スクリーニングのセレクションにおけるベイト蛋白質やプレイ・ライブラリーの並列化に伴う解析技術の自動化などが整えば、IVVによる遺伝子ネットワークの大規模解析システムが実現することになる。

● おわりに

ゆとり教育の一環で指導要領が改訂になり、高等学校の生物Iの教科書から「進化」という言葉がなくなった。しかしながら、ゲノム研究やポストゲノム研究とともに、ふたたび「進化」にスポットライトが浴びせられようとしている。本稿では、ピューロマイシンの性質を利用して進化の研究のツールとして誕生したNEWバイオテクノロジーであるIVV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を提案した。現在筆者らは、紹介した遺伝子ネットワーク解析システムを用いて、cDNAライブラリーから網羅的でハイスループットなIVVのセレクション法による蛋白質間相互作用解析を進めている。ポストゲノム研究でのIVVの強みは、蛋白質の相互作用解析をcDNAやゲノムの解析から行うため、直接ゲノムからの知見が得られる点である。また、もともと進化を研究するツールであるため、ゲノムから得られた知見を元に、進化の仕組みを紐解く研究が可能な点である。今後、ピューロマイシン・テクノロジーであるIVVおよび蛋白質のC末端ラベル化法を駆使

して、ゲノムを軸とした「遺伝子ネットワーク」と「進化」の研究により、生命科学の総合的理解を深めていきたいと考えている。

本研究の一部は、文部科学省の科学技術振興調整費による「細胞内でネットワークを構成しているタンパク質の相互作用を試験管内で解析するための新しいツールの開発」の一環として行われた。

文献

- 1) Yarmolinsky, M. B., De La Hara, G. L. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 45, 1721-1729 (1959)
- 2) Nathans, D. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 51, 585-592 (1964)
- 3) Cech, T. R., Zaug, A. J., Grabowski, P. J. : *Cell*, 27, 487-496 (1981)
- 4) Szostak, J. W., Ellington, A. D. : *Nature*, 346, 818-822 (1990)
- 5) 根本直人・上居信英・柳川弘志 : *生化学*, 70(10), 1251-1261 (1998)
- 6) 上居信英・柳川弘志 : *化学と生物*, 37(12), 811-815 (1999)
- 7) 宮本悦子・柳川弘志 : *プロテオミクス* (伊藤隆司, 谷口寿彦編), pp. 136-145, 中山書店 (2000)
- 8) 宮本悦子・柳川弘志 : *蛋白質 核酸 酵素*, 46(2), 138-147 (2001)
- 9) Nemoto, N., Miyamoto-Sato, E., Husimi, Y., Yanagawa, H. : *FEBS Lett.*, 414, 405-408 (1997)
- 10) 上居信英・柳川弘志 : *生物物理*, 41(3), 147-151 (2001)
- 11) Doi, N., Yanagawa, H. : *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 4(6), 497-509 (2001)
- 12) Miyamoto-Sato, E., Nemoto, N., Kobayashi, K., Yanagawa, H. : *Nucl. Acid. Res.*, 28, 1176-1182 (2000)
- 13) Takanami, M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 52, 1271-1276 (1964)
- 14) Nemoto, N., Miyamoto-Sato, E., Yanagawa, H. : *FEBS Lett.*, 462, 43-46 (1999)
- 15) Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., Sakaki, Y. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 4569-4574 (2001)
- 16) Gavin, A.-C. et al. : *Nature*, 415, 141-147 (2002)
- 17) Scott, J. K., Smith, G. P. : *Science*, 249, 386-390 (1990)
- 18) Roberts, R. W., Szostak, J. W. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12297-12302 (1997)
- 19) Hanes, J., Pückthun, A. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 4937-4942 (1997)
- 20) Doi, N., Yanagawa, H. : *FEBS Lett.*, 457, 227-230 (1999)
- 21) Hammond, P. W. et al. : *J. Biol. Chem.*, 276, 20898-20906 (2001)
- 22) Fedorov, A. N., Baldwin, T. O. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1227-1231 (1995)
- 23) Lui, R., Barrick, J. E., Szostak, J. W., Roberts, R. W. : *Methods in Enzymology*, vol. 318, pp. 268-293 (2000)
- 24) Doi, N. et al. : *Genome Res.*, 12, 487-492 (2002)
- 25) 上居信英・柳川弘志 : *Bioベンチャー*, 2(4), 102-105 (2002)

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

宮本悦子・柳川弘志

ゲノムネットワーク解析における蛋白質間相互作用 (PPI) 解析法として、筆者らはこれまで世界に先駆けて、独自性の高い *in vitro* virus (IVV) 法とC末端ラベル化法の2つの技術 (ビューロマイシン・テクノロジーと総称) を開発し、これらの試験管内で実現できる技術を応用したハイスループットで偽陽性の少ない PPI 解析法を構築してきた。本稿では、IVV法による大規模解析システムの構築を述べ、IVV法の特徴として、塩基配列解析による相互作用配列 (モチーフやドメイン) の抽出と1:多分子解析による複合体解析について解説し、IVV法の生物機能解析やゲノム創薬への可能性について言及する。

Key Words *in vitro* virus (IVV) C末端ラベル化 蛋白質間相互作用 PPI ゲノムネットワーク

●はじめに

ヒトとチンパンジーの塩基配列解説により、その塩基配列の差は約1%であるが、配列変化は遺伝子領域に集中しており、遺伝子の表現型である蛋白質で比較するとその差は80%であることが判明した¹⁾。このことは、ゲノムプロジェクトの塩基配列解析完了は決してゴールではなく通過点であり、ヒトがヒトであるゆえんについての知見を得るためには、ポストゲノムプロジェクトこそが重要な意味をもつ研究であることを示唆している。2003年4月、ヒトゲノムの全塩基配列解説が基本的に完了したことを契機として、米国で ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) 計画が発表され、本格的なゲノム機能解析の時代に入った。日本では、ヒトをはじめ、マウス、線虫、シロイヌナズナ、チンパンジー、イネなどの世界一を誇る cDNA コレクションの資源を今こそ有効利用し、世界に貢献できるゲノムネットワークの基盤データを創出し、生命現象の理解や創薬などゲノム産業の基盤を育てるべきときが到来している。

本稿では、ゲノムネットワーク解析の蛋白質間相互作用 (PPI) 解析法の1つとして、*in vitro* virus (IVV) 法²⁾

を紹介する。本手法は最初、蛋白質の進化分子工学として、蛋白質の試験管内進化 (*in vitro* selection) のためのツールとして誕生した。1997年に筆者らが世界に先駆けて発表し³⁾、次いで米国の Szostak らのグループが発表した⁴⁾。その目的は、蛋白質の進化の仕組みの解明と、その工学的応用として、分子レベルのダーウィン進化の仕組みを利用して、所望の機能をもつ蛋白質を試験管内で創出しようとするものであった。進化分子工学において、遺伝子型と表現型の対応づけは重要な要素技術であり、IVVはビューロマイシンを介した遺伝子型 (mRNA) と表現型 (蛋白質) の対応づけ分子である⁵⁾。

IVV法がゲノムネットワーク解析へ応用可能である理由は、進化分子工学の要素技術の1つである対応づけ分子を利用することで、ゲノムネットワークを形成している多数の遺伝子の遺伝子型 (mRNA) に対応した表現型 (蛋白質) の機能を一度に検出できるためである⁶⁾。

本稿では、ゲノムネットワーク解析における IVV 法の大規模解析システムについて概説し、IVV法により得られる大量のコンテンツを利用した生物機能解析やゲノム創薬への応用などの展開について述べる。

Etsuko Miyamoto-Sato, Hiroshi Yanagawa, 慶應義塾大学理工学部生命情報学科 E-mail: nekoneko@educ.cc.keio.ac.jp, hyana@bio.keio.ac.jp

Analysis of genome network toward understanding biological function using *in vitro* virus

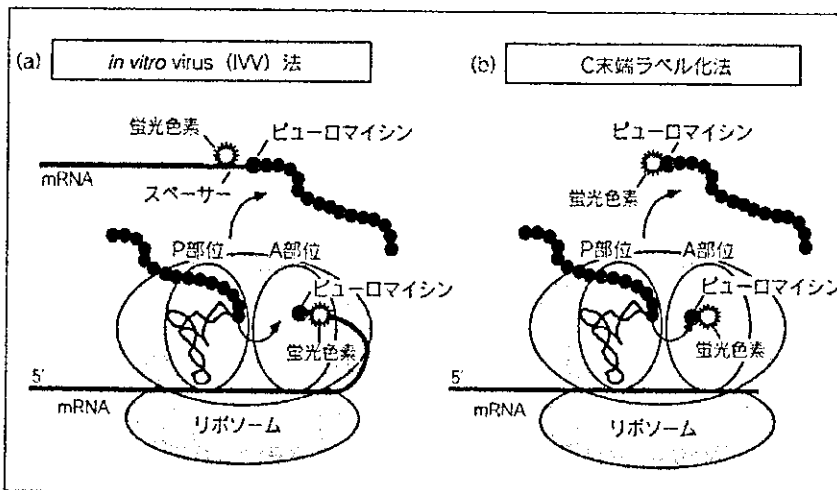


図1 ビューロマイシン・テクノロジー

(a) 無細胞翻訳系のリボソーム上で合成された表現型である蛋白質とその遺伝子型である mRNA がビューロマイシンを介して共有結合した対応づけ分子を *in vitro virus* (IVV) と名づけた³⁾。

(b) ビューロマイシン誘導体の濃度を調整することにより、無細胞翻訳系のリボソーム上で合成された全長蛋白質の C 末端にビューロマイシン誘導体が結合できる特性を利用したものが C 末端ラベル化法である⁷⁾。この図の場合、ビューロマイシン誘導体はビューロマイシンと蛍光色素の複合体である。

P 部位：ペプチジル部位、A 部位：アミノアシル部位。

I. IVV法の原理とゲノムネットワーク解析

遺伝子型と表現型の対応づけ手法である IVV 法²⁾は、図 1a に示すように、mRNA の 3' 末端にスパーサーを介して抗生物質の一種のビューロマイシンを結合し、それを鋳型として無細胞翻訳反応を行なうことにより、蛋白質と mRNA がビューロマイシンを介して共有結合した単純な mRNA-蛋白質連結分子 IVV が構築される。また、IVV 法の構築過程で、図 1b のように、低濃度のビューロマイシン誘導体を無細胞翻訳系に投入すると、合成された蛋白質の C 末端にビューロマイシン誘導体が特異的に結合することを見いだした⁷⁾。この原理を応用して、蛍光色素をビューロマイシンに連結させた化合物を用いることにより、蛋白質の C 末端を蛍光色素でラベルすることが可能になった⁸⁾。筆者らは、IVV 法と C 末端ラベル化法の 2 つの技術を、ビューロマイシン・テクノロジーと名づけた³⁾。その後、筆者らは、平成 11～15 年度「科学技術振興調整費によるゲノムフロンティア開拓推進制度」プロジェクト研究において、ゲノム機能解析の基盤技術として、ハイスループット解析に適した IVV 共翻訳セレクション法による複合体解析法⁹⁾、および C 末端ラベル化法を用いたプロテインチップあるいは蛍光相互相関分光法 (fluorescence cross correlation spectroscopy: FCCS) による PPI 解析法^{10,11)} による網羅的解析システムを構築してきた。

図 2 に示すように、本システムは、IVV ライブラリーのなかからベイト蛋白質と結合する蛋白質を含む

IVV を試験管内で釣り上げたのち、そこに連結している情報タグ (mRNA) を逆転写・PCR で増幅し、塩基配列を解説することによって、相互作用する蛋白質群を容易に同定することができるシステムである。

ゲノムネットワーク解析のための大規模 PPI 解析ツールとしてよく知られている方法は、酵母ツーハイブリッド法 (Y2H)¹²⁾ とタグ精製法である TAP (tandem affinity purification)-MS (質量分析) 法¹³⁾ である。しかしながら、表 1 に示すように、これらの方法では生きた細胞を使用するために、毒性やライブラリーサイズの制限などの問題があった。筆者らは、これらの欠点を克服する手法として IVV 法を実現した。IVV 法はツーハイブリッド法と比べて、間接的な相互作用を含めた複合体の解析が可能であり、転写因子など複合体を形成する分子群などの解析に有利である。また、IVV 法は蛋白質ではなく核酸による検出であるため、TAP-MS 法と比べて感度が百万倍も高く、ごく微量の蛋白質でも検出が可能な革新的な手法であり、かつ相互作用配列 (モチーフ、機能エレメント) を得ることが可能である。さらに、IVV 法は、スクリーニングに濃縮をくり返すセレクションを採用するため偽陽性が少なく、信頼性の高いデータが得られる。また、ネットワークの全体像を知るには、1 つで完璧な方法というものはなく、いくつかの方法で補うことが必要であることから、IVV 法はゲノムネットワーク解析の基盤データ創出において、重要な役割を担うツールの 1 つとして期待できる。

これまで *in vitro* で蛋白質間相互作用を解析する他の手法として、ファージディスプレイ法¹⁴⁾ やリボソーム

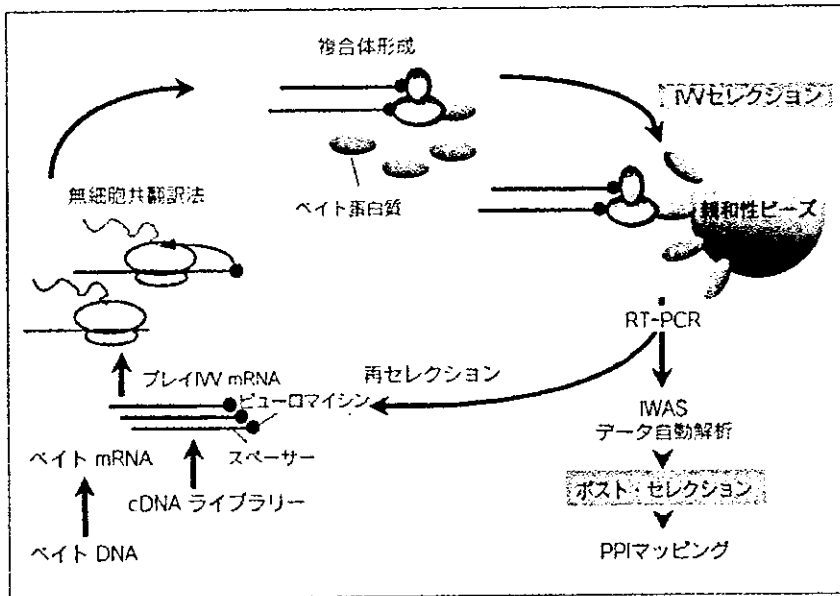


図2 IVV法による複合体とPPI解析
本システムは、セレクション、ポストセレクション（セレクションの検証工程）、シーケンス解析と遺伝子解析（IWASデータ解析）、PPIマッピングの工程から構成される。セレクションは、ベイト蛋白質とプレイIVVライブラリーを無細胞翻訳系で共翻訳することにより、ベイトとプレイの複合体を形成し、ベイトのタグでプレイをセレクションし、プレイIVVのmRNAを利用して、RT-PCR（逆転写PCR）によって検出されたプレイの遺伝子群を解析する⁹⁾。ポストセレクションは、C末端ラベル化法を用いたプロテインチップあるいは蛍光相互相関分光法（FCCS）によるPPI解析法^{10,11)}によりセレクションの検証を行なう。IWASデータ解析、PPIマッピングの工程については、図3を参照。

表1 IVV法と他の方法の特徴の比較

特徴	Y2H法	IVV法	TAP-MS法
相互作用解析	1:1分子	1:多分子	1:多分子
検出方法	核酸	核酸	蛋白質
<i>in vitro/in vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>

ディスプレイ法¹⁵⁾が提案されている。しかし、ファージディスプレイ法は大腸菌を用いるため、ライブラリーのサイズが制限され、大腸菌に対して毒性をもつ蛋白質は選択されないなどの欠点がある。一方、スイス・チューリッヒ大学のグループが開発したりボソームディスプレイ法は、IVV法と同様、無細胞翻訳系を用いた完全に *in vitro* の実験系であるため、細胞を使うことによる欠点はないが、mRNA-蛋白質-リボソーム三者複合体が不安定なため、スクリーニング中にmRNAと蛋白質が離れてしまう恐れがあり、さらに遺伝子型と表現型の対応づけ効率が0.1%と非常に低いという致命的な問題がある。

これに対して、IVV法は共有結合を介して対応づけられているため、リボソームディスプレイ法よりもはるかに安定性が高く、また対応づけ効率も約70%⁹⁾であり、リボソームディスプレイ法に比べて数百倍も高い。したがって、現時点でIVV法が蛋白質間相互作用の *in vitro* スクリーニングに最も有効な方法であるといえる。ヒトのゲノムワイドなネットワーク解析が、IVV法によって達成できれば、日本発の独自技術による初めての大規

模解析として、ポストゲノム時代における国際的な優位性を示せる。

II. IVV法による大規模解析システム

図2に示したIVV法によるPPI解析システムは、セレクション、ポストセレクション（セレクションの検証工程）、シーケンス解析と遺伝子解析、PPIマッピングとマップ解析の工程から構成される。IVV法によるゲノムネットワーク解析のための大規模解析を念頭におくとき、最も時間がかかる工程はセレクション後のシーケンス解析と遺伝子解析である。シーケンス解析は、GENETIXのコロニー・ピッカー（Qpix）とQiagenのラボロボット（BioRobot 8000）の導入により、一晩で数百個のシーケンスデータが得られるようになった。次に、これら大量のシーケンスデータを入力すると自動的に解析されて、遺伝子リストが得られるIVV自動解析システム（IWAS）を、富士通の協力を得て開発した（図3a）。このシステムでは、一晩で数百シーケンスの遺伝子解析が可能で、自動作成された遺伝子リストは、遺伝子解析ソフト（富士通 Genesphere：以前の名称 Xminer）にリンクし、PPIマップが自動的に作成できる（図3b）。さらに、Genesphereは、LocusLink、UniGene、PubMedなどのデータベースを利用したマッピング解析を提供してくれる。このシステムによって、これまで数

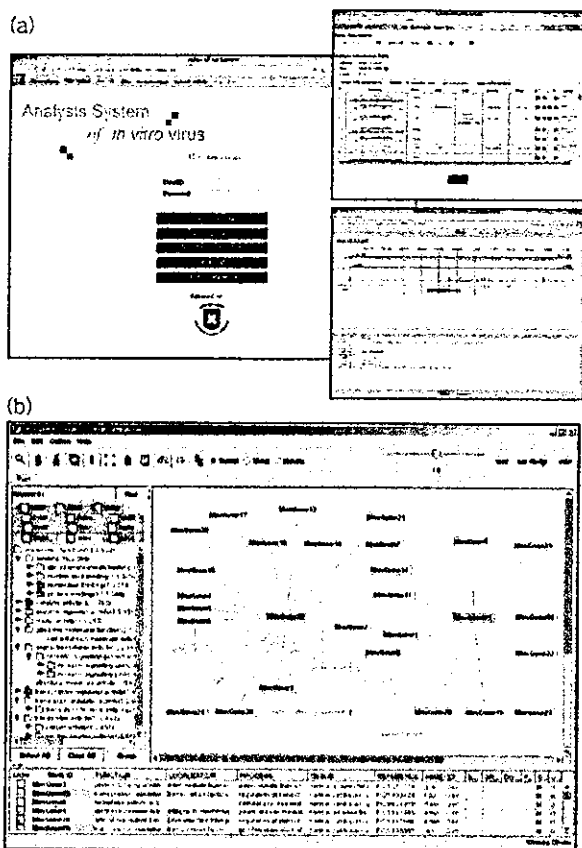


図3 IVVデータ自動解析システム

(a) 図2によって検出されたプレートの遺伝子群のシーケンス解析データを自動的に遺伝子検索にかけ、遺伝子リストやゲノムビューアとして表示できるIVV解析システム (IWAS)¹⁷⁾、(b) IWASによって解析された遺伝子群のリストは、遺伝子解析ソフト (富士通 Genesphere) とリンクしており、IVV法で検出された複合体やPPIマップが自動的に表示でき、機能解析や疾患解析などが可能である¹⁷⁾。

か月かかっていたシーケンスと遺伝子解析、およびPPIマッピングとマップ解析の工程が数日で可能になり、ゲノムワイドなネットワーク解析のための土台が出来上がった。

IVV法による大規模解析を実現するために、図4に示すようなシステムの構築を目指している。日本のゲノムプロジェクトの資産であるヒトやマウスのcDNAコレクションを利用して数百単位のベイトを設計し、ラボロボット (BioRobot 8000) をシステム化したIVVセレクション・ロボットによる並列セレクション解析、さらにクローニング・シーケンス解析による数万に及ぶ大量データの高速処理システムとして、IWAS (一晩で数千シーケンス処理)、および遺伝子機能解析が可能な相互作用マッピングツールとして Genesphere などを利用した大規模解析を構想している。IVV法では、1つのベイトを用いたセレクションで平均数十の相互作用が得られるので、数百ベイトのセレクションで数千の相互作用が解析されると予想される。

ここで、IVV法の相互作用は、先に述べたように、1:1分子解析としてのPPI解析のみならず、1:多分子解析としての複合体解析が実現できる。一方、C末端ラベル化法のプロテインチップによる解析は、1:1分子解析としてのPPI解析データである。IVV法では、偽陽性は少ないが偽陰性が多い。反対に、プロテインチップでは、偽陰性は少ないが偽陽性が多いので、相補しあえる関係にある。よって、同じベイトを用いたIVV法によるデータとプロテインチップによるデータをマージすることにより、バイオインフォマティクスによる複合

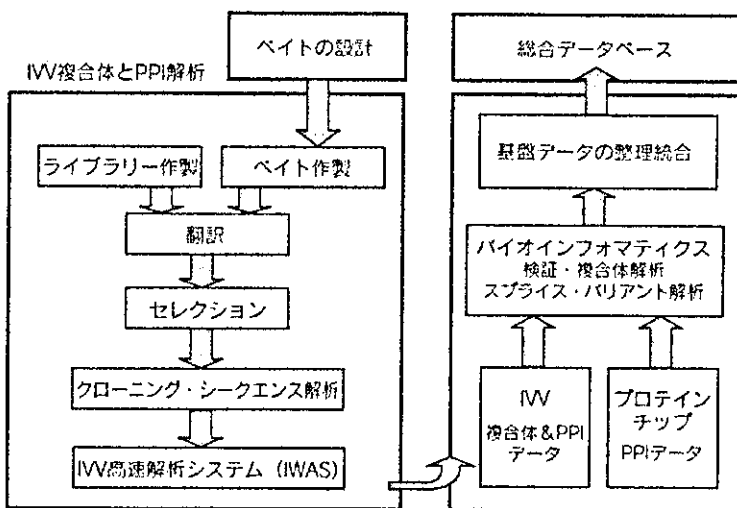


図4 IVV法による大規模解析システム

IVV法で得た複合体データと、プロテインチップでのPPIデータを統合して、バイオインフォマティクスで信頼性の高い複合体情報を抽出し、さらにスプライス・バリエーション解析などによるアノテーション情報を備えた基盤データを創出し、データベース化することを目指している。

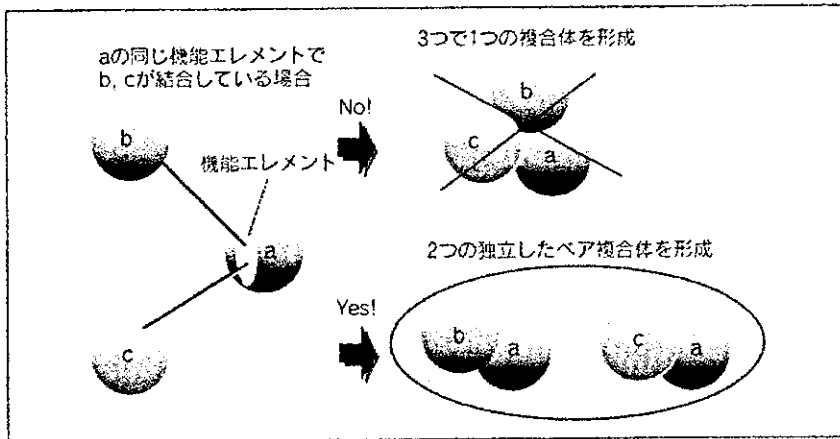


図5 モチーフあるいは機能エレメントに基づく複合体予測
 蛋白質aの同じ機能エレメントによって、蛋白質aが蛋白質bおよびcと相互作用していれば、複合体の形成は3つの蛋白質による複合体ではなくて、2つの独立したペア複合体を形成していると推測できる。

体の抽出や、データの信頼性が向上することが可能と考えられる。さらに、IVV法が塩基配列の解析法であるため、疾患関連情報として重要なスプライス・バリエーション解析¹⁰⁾が可能なることから、複合体情報とモチーフ情報のみならず、スプライス・バリエーション情報などもアノテーションとしてもIVVデータベースを得ることを目指している。

III. モチーフ抽出に基づくIVV法による複合体解析

図4に示したゲノムネットワーク解析のための大規模解析システムの特徴として、他のPPI解析法と区別できる点を強調しておきたい。まず、① 1：多分子解析により複合体解析が可能であること、② 相互作用に必要な最低限の結合配列(モチーフあるいは機能エレメント)領域を同時に解析可能であることがあげられる。複合体の解析はTAP-MS法が可能であるが、解析と同時に機能エレメントの情報を得ることはできない。すなわち、同じ複合体の解析方法でも、TAP-MS法の場合とIVV法の場合では、解析後のバイオインフォマティクスのレベルでの複合体解析のための情報量が格段に違ってくるのである。

たとえば、図5に示すように、3つの蛋白質がどのような複合体を形成して機能しているかを予測する場合、モチーフが抽出されていない場合は3つで複合体を形成して機能しているのか、あるいは2つのペアで複合体を形成して機能しているのかを予想することは困難である。モチーフが抽出されている場合、aの蛋白質のもつ同じモチーフがbの蛋白質とcの蛋白質との相互作用に

使われていれば、(a, b, c)の3つで複合体を形成しているのではなく、(a, b), (a, c)の2つのペアで複合体を形成して機能していることが予想される。このことはさらに、今まで単に遺伝子同士を結ぶだけのマッピングであったものを、マップからその複合体のあり方を具体的に抽出することによって、カスケードの予測に繋げていける可能性も期待できる。

IV. IVV法による生物機能解析やカスケード解析へ向けて

IVV法による解析には、あらゆる生物の種や組織への適用の壁がない。すなわち、あらゆる生物の種や組織由来の少量のmRNAがあれば、自由に実験に用いられる点も大きな特徴である。このことから、容易に組織間やマウスとヒトなどの種間で¹¹⁾、あるいは正常系と疾患系の組織間などでネットワークパターンの違いを比較していくことが可能な実験系である(図6)。

これまでmRNAプロファイルなどで量的な変動の差は計測されていたが、PPI解析の相互作用パターンを比較することができれば、具体的な相互作用の変化などをおとして、どのような機能に影響するかを解析できる。これらの解析をおとして、IVV法による生物機能解明やゲノム創薬を実現していくためには、ゲノムネットワーク解析によって、カスケード解析に繋がるようなPPI解析を戦略的に行なっていくことが必要である。そのためには、先に説明したIVV法によって1：多分子解析が可能なることと、相互作用に必要な配列としてモチーフあるいは機能エレメントが解析できる点を利用して、具

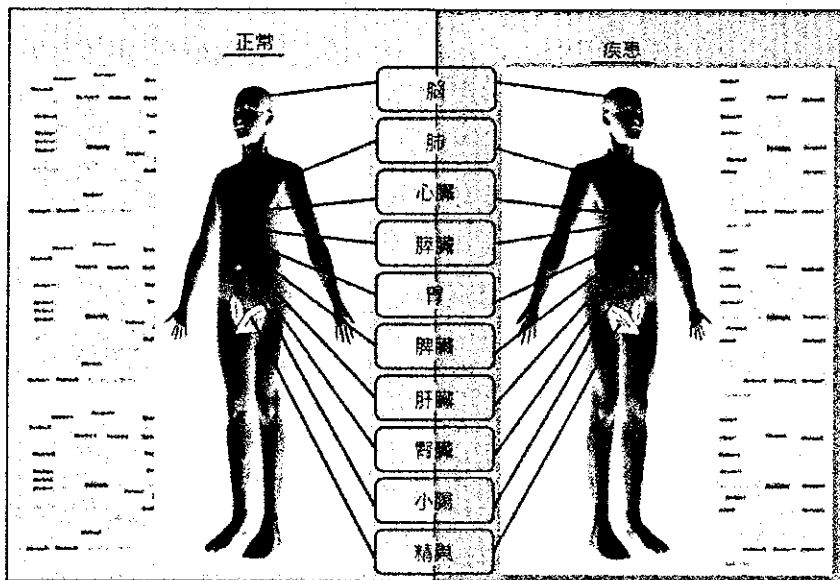


図6 ヒト正常・疾患組織のネットワーク・パターン比較

IVV法では、市販の疾患ライブラリーを用いて、あるいは疾患組織からmRNAを少量抽出できればライブラリーを構築できるため、ヒト正常・疾患組織のネットワーク・パターンの比較が可能である。

体的な複合体予想やその複合体の機能予想からカスケード解析に近づけること、および生物現象にとって最も重要なイベントとして、ゲノムネットワークの要である転写制御について着目し、転写因子複合体とDNA結合部位のプロモーター配列を1つの組として解析していくことが重要であると考えている。なぜなら、多くの生物機能で転写因子複合体の組換え、あるいは転写因子複合体へのコファクターの結合によりその転写因子複合体と結合するプロモーターをもつ遺伝子が変わることによって、さまざまな機能や疾患が発生している例が見られるためである¹⁶⁾。

これらのことから、ゲノムネットワーク解析によるカスケード解析のための情報として、先に示したスプライス・バリエーション情報、複合体情報、モチーフ情報のみならず、プロモーター情報などもアノテーションとしてもIVVデータベースを得ることを目指している。

●おわりに

ゲノムネットワーク解析におけるIVV法の大規模解析の構想を述べた。今後、あらゆるツールによるあらゆる角度からのゲノムネットワーク解析が進み、大量のコンテンツがデータベースとして公開されることになるであろう。それらのコンテンツをいかに利用し、どのようにしてそこから個別の機能や疾患を解明していくかが重要になってくる。しかしながら、*in vitro*のPPI解析結果から個別機能や疾患解明を実現するには、*in silico*の

解析により生物機能に重要な遺伝子や創薬ターゲット分子を絞り込み、さらに*in vivo*解析などで検証していく必要がある。*in silico*の解析では、バイオインフォマティクスの活躍が期待され、*in vivo*解析では、IVV法を本来の進化分子工学的手法として利用することで、ターゲット分子の抗体やアンタゴニストを得ることができるので¹⁷⁾、培養細胞、組織、モデル動物実験で検証していくことが可能になる。このように、ゲノムネットワーク解析で大量のコンテンツを創出するだけでなく、生物機能解明への道筋をきちんと検証していくことが今後重要であり、これは、IVV法の信頼性の確立にとっても避けて通ることのできない道だと考えている。

IVV自動解析システム (IWAS) は、富士通ライフサイエンスシステム事業部とバイオIT事業開発本部の協力を得て開発された。また、本研究の一部は、文部科学省の科学技術振興調整費による「細胞内でネットワークを構成しているタンパク質の相互作用を試験管内で解析するための新しいツールの開発」の一環として行なわれた。

文献

- 1) Sakaki, Y. *et al.* : *Nature*, 429, 382-388 (2004)
- 2) Nemoto, N., Miyamoto-Sato, E., Husimi, Y., Yanagawa, H. : *FEBS Lett.*, 414, 405-408 (1997)
- 3) Miyamoto-Sato, E. *et al.* : *Nucleic Acids Res.*, 31, e78 (2003)
- 4) Roberts, R. W., Szostak, J. W. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12297-12302 (1997)
- 5) 宮本悦子・柳川弘志: 蛋白質 核酸 酵素, 46, 138-147 (2001)

- 6) 宮本悦子・柳川弘志: プロテオミクス (伊藤隆司・谷口寿幸編), pp.136-145, 中山書店 (2000)
- 7) Miyamoto-Sato, E., Nemoto, N., Kobayashi, K., Yanagawa, H.: *Nucleic Acids Res.*, 28, 1176-1182 (2000)
- 8) Nemoto, N., Miyamoto-Sato, E., Yanagawa, H.: *FEBS Lett.*, 462, 43-46 (1999)
- 9) 宮本悦子・柳川弘志: 蛋白質 核酸 酵素 増刊, 化学と生物学の接点がつくる New バイオロジー, 48, 1474-1480 (2003)
- 10) Doi, N. *et al.*: *Genome Res.*, 12, 487-492 (2002)
- 11) Kawahashi, Y. *et al.*: *Proteomics*, 3, 1236-1243 (2003)
- 12) Ito, T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 4569-4574 (2001)
- 13) Uetz, P. *et al.*: *Nature*, 403, 623-627 (2000)
- 14) Tong, A. H. Y. *et al.*: *Science*, 295, 321-324 (2002)
- 15) Hanes, J. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, 12, 1287-1292 (2000)
- 16) Resch, A. *et al.*: *J. Proteome Res.*, 3, 76-83 (2004)
- 17) 宮本悦子・柳川弘志: Bioベンチャー, 7-8, 61-64 (2004)