

- Yamamura T, Arima K, Konno H: Neuromyelitis optica/Devic's disease: Gene expression profiling of brain lesions. *Neuropathology* 28 (6): 561-576, 2008.
2. Tabunoki H, Shimada T, Banno Y, Sato R, Kajiwarra H, Mita K, Satoh J: Identification of Bombyx mori 14-3-3 orthologs and the interactor Hsp60. *Neuroscience Research* 61(3): 271-280, 2008.
3. Satoh J, Misawa T, Tabunoki H, Yamamura T: Molecular network analysis of T-cell transcriptome suggests aberrant regulation of gene expression by NF- κ B as a biomarker for relapse of multiple sclerosis. *Disease Markers* 25(1): 27-35, 2008.
4. Satoh J, Obayashi S, Misawa T, Sumiyoshi K, Oosumi K, Tabunoki H: Protein microarray analysis identifies human cellular prion protein interactors. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 35: 16-35, 2009.
5. Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. *Multiple Sclerosis* 15: 531-541, 2009.
6. Obayashi S, Tabunoki H, Kim SU, Satoh J: Gene expression profiling of human neural progenitor cells following the serum-induced astrocyte differentiation. *Cellular and Molecular Neurobiology* 29: 423-438, 2009.
7. Watanabe H, Tabunoki H, Miura N, Matsui A, Sato R, Ando T: Identification of a new pheromone-binding protein in the antennae of a geometrid species and preparation of its antibody to analyze the antennal proteins of moths secreting type II sex pheromone components. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73(6): 1443-1446, 2009.
8. Satoh J, Tabunoki H, Arima K: Molecular network analysis suggests aberrant CREB-mediated gene regulation in the Alzheimer disease hippocampus. *Disease Markers* 27(5): 239-252, 2009.
9. Sumiyoshi K, Obasashi S, Tabunoki H, Arima K, Satoh J: Protein microarray analysis identifies cyclic nucleotide phosphodiesterase as an interactor of Nogo-A. *Neuropathology* 30(1): 7-14, 2010.
10. Satoh J, Obayashi S, Tabunoki H, Wakana T, Kim SU: Stable expression of neurogenin 1 induces LGR5, a novel stem cell marker, in an immortalized human neural stem cell line HB1.F3. *Cellular and Molecular Neurobiology*, in press, 2009.
11. Shiina Y, Arima K, Tabunoki H, Satoh J: TDP-43 dimerizes in human cells in culture. *Cellular and Molecular Neurobiology*, in press, 2009.
12. Shioya M, Obayashi S, Tabunoki H, Arima K, Saito Y, Ishida T, Satoh J: Aberrant microRNA expression in the brains of neurodegenerative diseases: miR-29a decreased in Alzheimer disease brains targets neuron navigator-3.

Neuropathology and Applied Neurobiology, in press, 2010.

2. 学会発表

国際学会

1. Satoh J, Misawa T, Tabunoki H: Protein microarray analysis identifies the human cellular prion protein interactome. 60th Annual Meeting of American Academy of Neurology. Chicago, 2008. 4.17.
2. Satoh J, Misawa T, Obayashi S, Tabunoki H, Yamamura T, Arima K, Konno H: Gene expression profile of neuromyelitis optica brain lesions. 9th International Congress of Neuroimmunology. Poster Session: MS pathogenesis and immunology. Fort Worth, 2008.10.27.
3. Obayashi S, Tabunoki H, Kim SU, Satoh J: Gene expression profiling of human neural progenitor cells following the serum-induced astrocyte differentiation. The JSPS 3rd Medicinal Chemistry Seminar of Asia/Africa Scientific Platform Program & the 2nd International Seminar of MPU Asia/Africa Center for Drug Discovery. Poster Presentation. Tokyo 2009.1.15.
4. Tabunoki H, Shimada T, Banno Y, Sato R, Kajiwara H, Mita K, Satoh J: Identification of Bombyx mori 14-3-3 orthologs and the interactor heat shock protein 60. The JSPS 3rd Medicinal Chemistry Seminar of Asia/Africa

Scientific Platform Program & the 2nd International Seminar of MPU Asia/Africa Center for Drug Discovery. Poster Presentation. Tokyo 2009.1.15.

5. Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. 61st Annual Meeting of American Academy of Neurology. Seattle, 2009. 4.28.
6. Satoh J, Obayashi S, Tabunoki H, Yamamura T: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. The 8th International Workshop on Advanced Genomics. Tokyo 2009.6.17.
7. Satoh J, Obayashi S, Tabunoki H: Molecular Network Analysis Suggests Aberrant CREB-Mediated Gene Regulation in the Alzheimer's Disease Hippocampus. The 20th International Conference on Genome Informatics. GIW2009. Yokohama, 2009.12.14.

国内学会

1. 尾林信哉、住吉健太、大隅貴美子、三澤多真子、天竺桂弘子、佐藤準一: ヒト神経前駆細胞からアストロサイトへの分化を制御する転写因子 ID1 と DLL1. 日本薬学会第 128 年会. 横浜、2008.3.27.
2. 大隅貴美子、住吉健太、尾林信哉、三澤多真子、天竺桂弘子、佐藤準一: ヒト神経系細胞におけるインターフェロンベータによる

- ISG15 化タンパク質の発現誘導. 日本薬学会第 128 年会. 横浜、2008.3.27.
3. 住吉健太、大隅貴美子、尾林信哉、三澤多真子、天竺桂弘子、佐藤準一: プロテインマイクロアレイによる神経突起伸長抑制因子 NIG 結合タンパク質の網羅的解析. 日本薬学会第 128 年会. 横浜、2008.3.27.
 4. 天竺桂弘子、三澤多真子、伴野豊、嶋田透、三田和英、佐藤令一、佐藤準一: カイコ 14-3-3 タンパク質と HSP60 の結合. 日本薬学会第 128 年会. 横浜、2008.3.27.
 5. 椎名有葵、塩谷真央、三澤多真子、天竺桂弘子、佐藤準一: デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者における oxandrolone の分子機序: KeyMolnet による解析. 日本薬学会第 128 年会. 横浜、2008.3.28.
 6. 三澤多真子、天竺桂弘子、水澤英洋、村田美穂、有馬邦正、佐藤準一: 水チャネル AQP1, AQP4 は神経変性疾患脳のアストログリアで高発現している. 第 20 回日本神経免疫学会学術集会 新潟、2008. 4.17.
 7. 三澤多真子、天竺桂弘子、水澤英洋、村田美穂、有馬邦正、佐藤準一: Alzheimer 病脳アストロサイトにおける AQP1 高発現. 第 49 回日本神経学会総会. 横浜、2008. 5.16.
 8. 佐藤準一、天竺桂弘子、三澤多真子、山村隆、有馬邦正、今野秀彦、南里悠介、黒田康夫: NMO 脳病巣の遺伝子発現プロフィール. 第 49 回日本神経学会総会. 横浜、2008. 5.17.
 9. 佐藤準一、三澤多真子、天竺桂弘子: ヒトプリオン結合タンパクの網羅的解析. 第 49 回日本神経病理学会学術研究会. 東京、2008. 5.20.
 10. 三澤多真子、天竺桂弘子、水澤英洋、村田美穂、有馬邦正、佐藤準一: Alzheimer 病脳アストロサイトにおける AQP1 高発現: 病態生理学的意義. 第 49 回日本神経病理学会総会. 東京、2008. 5.17.
 11. 佐藤準一、天竺桂弘子: プロテインマイクロアレイによるヒトプリオンタンパクインターラクトームの解析. 第 8 回日本タンパク質科学学会年会. 東京、2008. 6.11.
 12. Satoh J, Obayashi S, Tabunoki H: Gene expression profiling of brain lesions of neuromyelitis optica. 第 31 回日本神経科学大会. Neuro2008. 東京、2008. 7.9.
 13. Satoh J, Obayashi S, Tabunoki H: Molecular network analysis of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. 日本バイオインフォマティクス学会 2008 年会. 大阪、2008.12.15.
 14. 佐藤準一、住吉健太、尾林信哉、天竺桂弘子: 神経突起伸長抑制因子 Nogo 結合タンパク質 CNP. 第 21 回日本神経免疫学会学術集会 大阪、2009. 3.13.
 15. Satoh J, Obayashi S, Tabunoki H, Kim SU: Gene signature of human astrocyte differentiation in culture. 第 30 回神経組織培養研究会 湯河原、2009. 3.14.
 16. 尾出洋章、天竺桂弘子、嶋田透、伴野豊、三田和英、佐藤令一、佐藤準一: カイコ DJ-1 の

cDNA クローニングと組織分布. 日本薬学会
第 129 年会. 京都、2009.3.26.

17. 椎名有葵、天竺桂弘子、佐藤準一: 培養ヒト細胞株における TDP-43 のダイマー形成. 日本薬学会第 129 年会. 京都、2009.3.27.
18. 佐藤準一、天竺桂弘子、山村隆: MS 脳病巣プロテオームの分子ネットワーク解析. 第 50 回日本神経学会総会. 仙台、2009. 5.20.
19. 佐藤準一、椎名有葵、天竺桂弘子、有馬邦正: ヒト培養細胞・脳組織のける TDP-43 のダイマー形成. 第 50 回日本神経病理学会学術研究会. 高松、2009. 6.5.
20. Satoh J, Shiina Y, Tabunoki H: Constitutive dimer formation of TDP-43 in human cell lines. 第 32 回日本神経科学大会. Neuro2009. 名古屋、2009. 9.16. (Neuroscience Research : Suppl S 2009).
21. 尾出洋章、天竺桂弘子、嶋田透、伴野豊、三田和英、佐藤令一、佐藤準一: カイコ DJ-1 の cDNA クローニングと細胞分布. 第 82 回日本生化学会大会. 神戸、2009.10.23.
22. 佐藤準一、藤本幸太、吉野隆、天竺桂弘子: 遺伝子発現プロファイルから見た T 細胞活性

化に対する IFNbeta の効果. 第 22 回日本神経免疫学会学術集会 東京、2010. 3.18.

23. 吉野隆、天竺桂弘子、杉山重夫、石井啓太郎、Seung U. Kim, 佐藤準一: 培養ヒトマイクログリアにおける FTY720 のアポトーシス誘導能. 日本薬学会第 130 年会. 岡山、2010.3.28.
24. 小口翔、Raveney BJE, 大木伸司、天竺桂弘子、佐藤準一、山村隆: 合成レチノイド Am80 は Th17 依存性眼炎症を抑制し、Foxp3 陽性 T 細胞を誘導する. 日本薬学会第 130 年会. 岡山、2010.3.28.
25. 天竺桂弘子、尾出洋章、嶋田透、伴野豊、三田和英、佐藤令一、佐藤準一: カイコ DJ-1 の抗酸化作用. 日本薬学会第 130 年会. 岡山、2010.3.30.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
なし

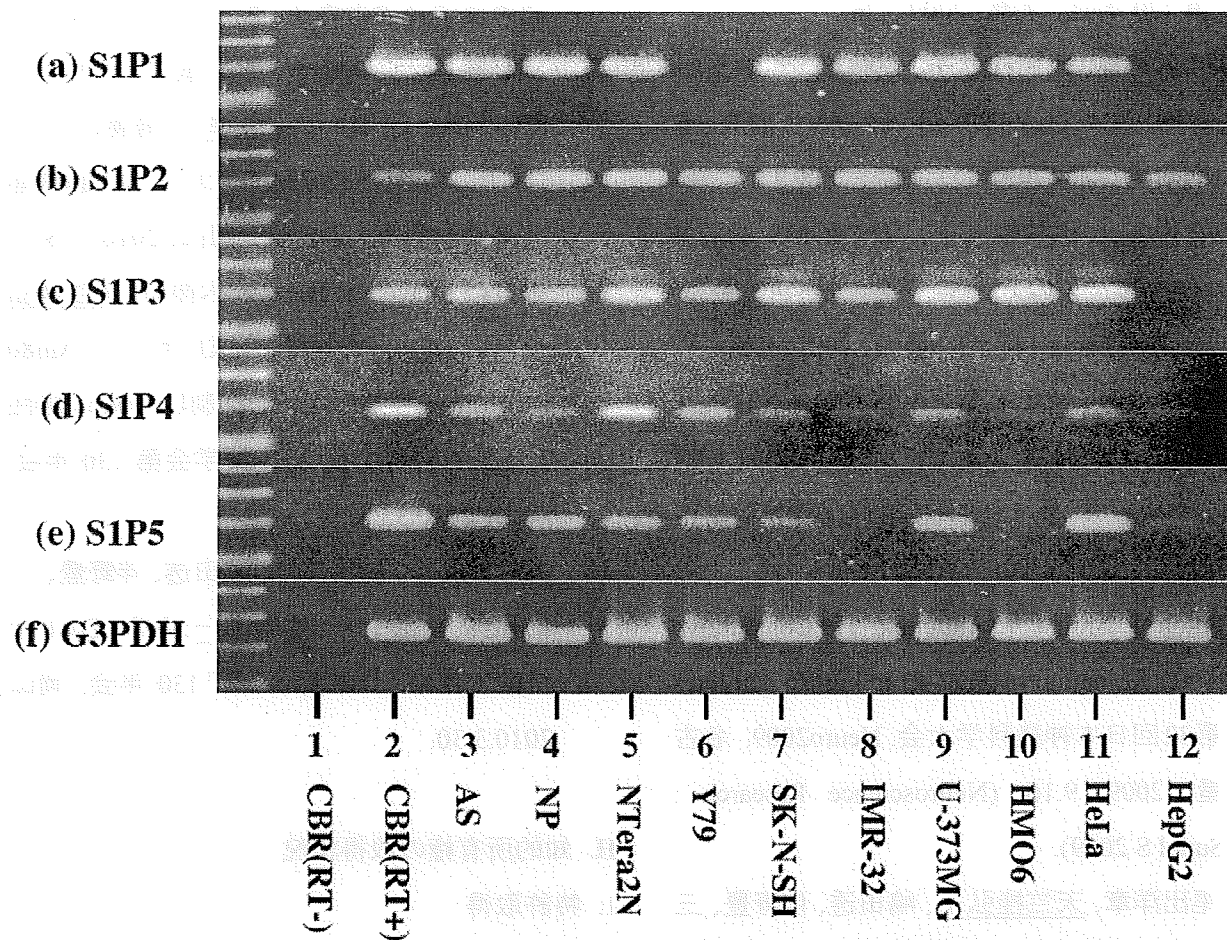


図 1. ヒト神経系・非神経系細胞株における S1P 受容体の発現.

RT-PCR で S1P1, S1P2, S1P3, S1P4, S1P5 mRNA の発現を解析した。Abbreviations: CBR, cerebrum; AS, astrocytes; NP, neural progenitor cells; NTera2N, NTera2-derived differentiated neurons; Y79, Y79 retinoblastoma; SK-N-SH, SK-N-SH neuroblastoma; IMR-32, IMR-32 neuroblastoma; U-373MG, U-373MG astrocytoma; HMO6, HMO6 microglia; HeLa, HeLa cervical carcinoma; and HepG2, Hep2 hepatoblastoma.

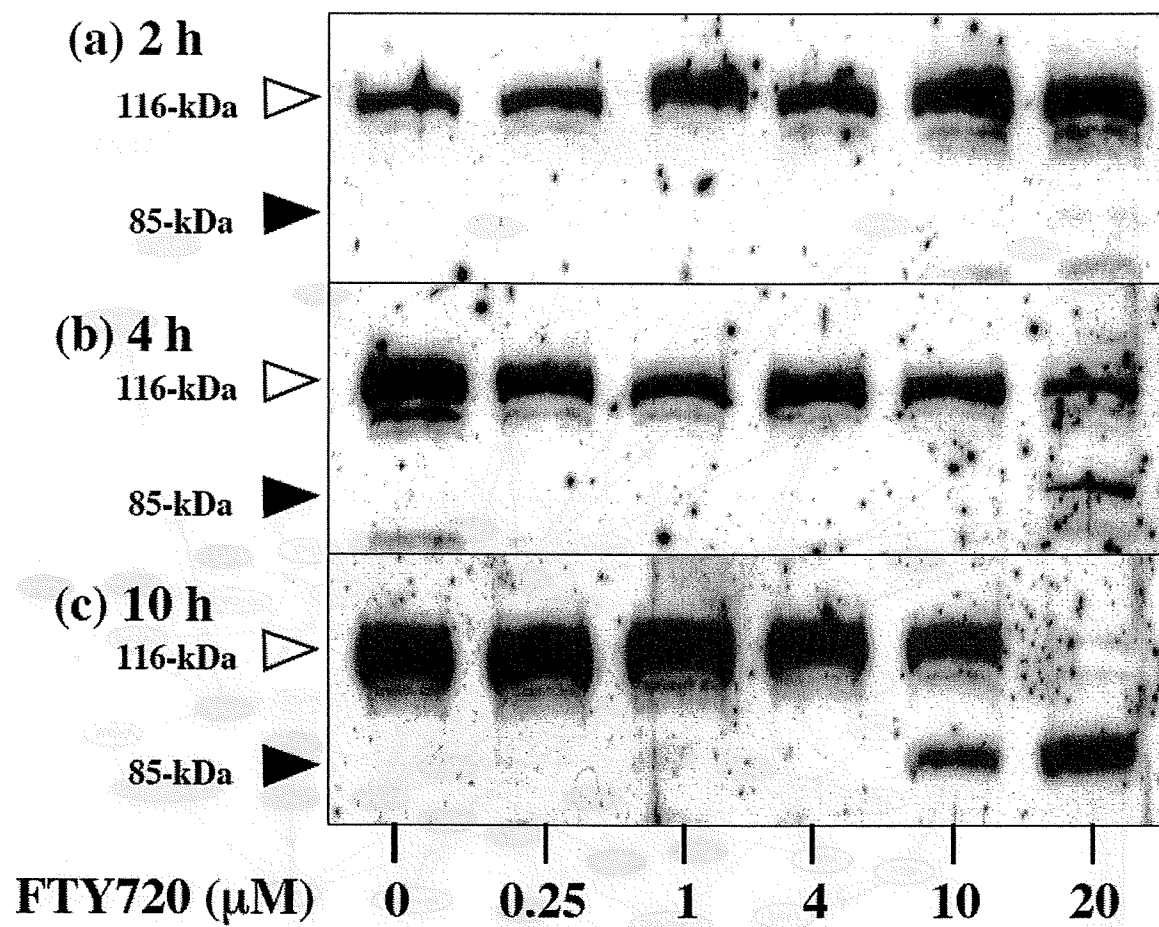


図 2. ヒトマイクログリア HMO6 に対する FTY720 のアポトーシス誘導能.

HMO6 を 0-20 μM FTY720 に 2-10 時間暴露後に、total protein を抽出、抗 PARP 抗体を用いて、ウェスタンブロットで 116-kDa non-cleaved PARP, 85-kDa PARP cleaved by caspases を検出した。

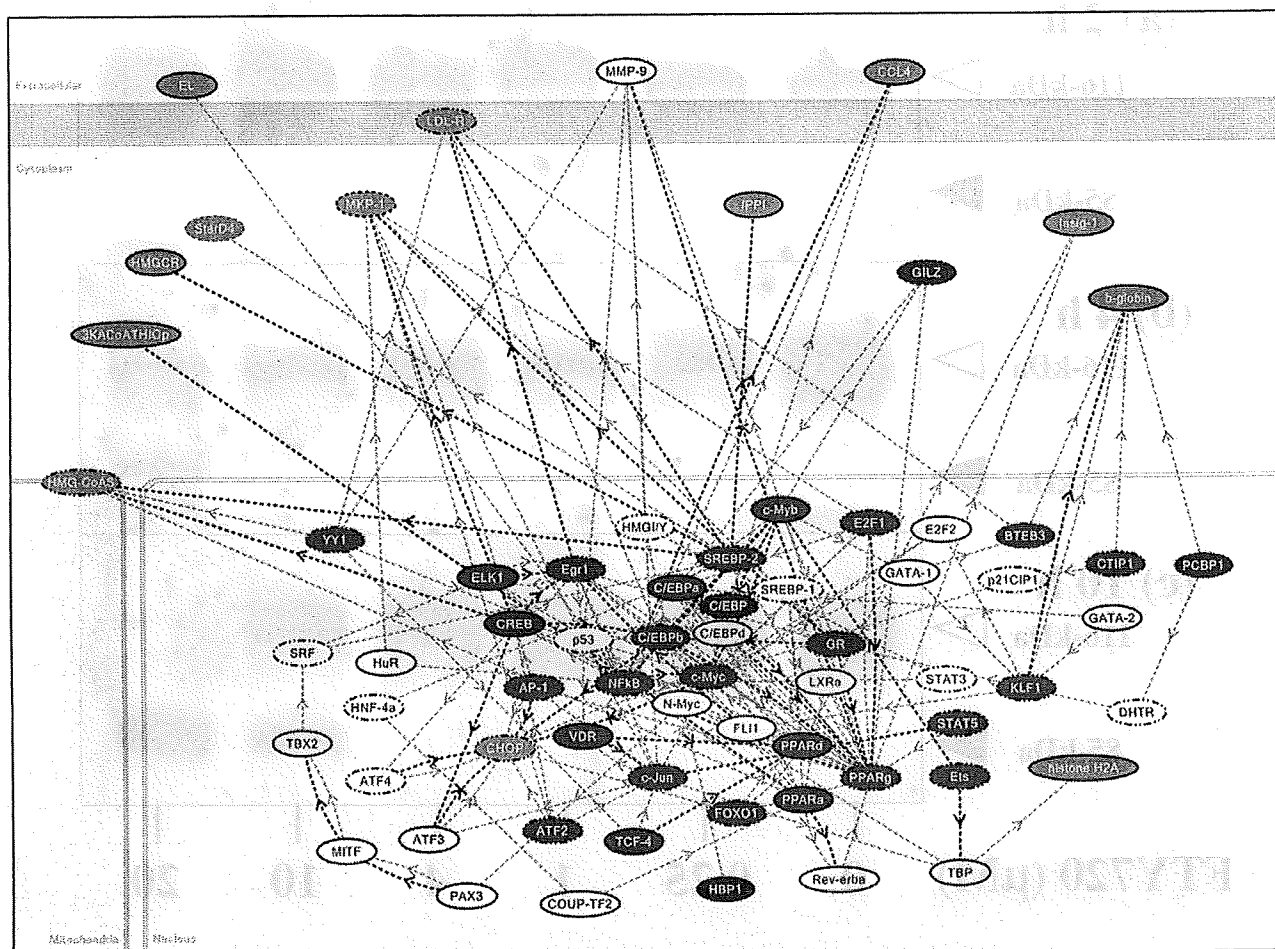


図 3. ヒトミクログリア HMO6 において FTY720 により発現上昇した遺伝子群のネットワーク。

HMO6を 10 μ M FTY720 or EtOH(vehicle)に 2 時間暴露後に、total RNA を抽出、Human Gene ST1.0 Array(Affymetrix)を用いて遺伝子発現プロファイルを解析した。KeyMolnet(医薬分子設計研究所)を用いて、FTY720 投与により 1.8 倍以上上昇した 39 遺伝子の共通上流分子ネットワークを解析した結果、転写因子 C/EBP($p = 8.178E-011$), SERBP($p = 2.092E-006$), CREB ($p = 5.972E-006$)による発現調節系の関与が示唆された。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
佐藤準一	プロトアレイによるタンパク質インターラクトーム解析	小田吉哉・長野光司	創薬研究のためのタンパク質・プロテオミクス解析技術	羊土社	東京	2010	in press

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
Satoh J, Obayashi S, Misawa T, Sumiyoshi K, Oosumi K, Tabunoki H.	Protein microarray analysis identifies human cellular prion protein interactors.	Neuropathology and Applied Neurobiology	35 (1)	16-35	2009
Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T.	Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain-lesion proteome.	Multiple Sclerosis	15 (5)	531-541	2009
Obayashi S, Tabunoki H, Kim SU, Satoh J.	Gene expression profiling of human neural progenitor cells following the serum-induced astrocyte differentiation.	Cellular and Molecular Neurobiology	29 (3)	423-438	2009
Satoh J, Tabunoki H, Arima K.	Molecular network analysis suggests aberrant CREB-mediated gene regulation in the Alzheimer disease hippocampus.	Disease Markers	27 (5)	239-252	2009
Watanabe H, Tabunoki H, Miura N, Matsui A, Sato R, Ando T.	Identification of a new pheromone-binding protein in the antennae of a geometrid species and preparation of its antibody to analyze the antennal proteins of moths secreting type II sex pheromone components.	Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	73 (6)	1443-1446	2009
Sumiyoshi K, Obayashi S, Tabunoki H, Arima K, Satoh J.	Protein microarray analysis identifies cyclic nucleotide phosphodiesterase as an interactor of Nogo-A.	Neuropathology	30 (1)	7-14	2010
Satoh J, Obayashi S, Tabunoki H, Wakana T, Kim SU.	Stable expression of neurogenin 1 induces LGR5, a novel stem cell marker, in an immortalized human neural stem cell line HB1.F3.	Cellular and Molecular Neurobiology		in press	2009
Shiina Y, Arima K, Tabunoki H, Satoh J.	TDP-43 dimerizes in human cells in culture.	Cellular and Molecular Neurobiology		in press	2009
Shioya M, Obayashi S, Tabunoki H, Arima K, Saito Y, Ishida T, Satoh J	Aberrant microRNA expression in the brains of neurodegenerative diseases: miR-29a decreased in Alzheimer disease brains targets neuron navigator-3.	Neuropathology and Applied Neurobiology		in press	2010
佐藤準一	ゲノムワイド解析により同定された多発性硬化症のリスクアレル.	Medical Briefs in Brain & Nerve	17 (1)	10-11	2009

IV. 研究成果の刊行物・別刷

羊土社

創薬研究のためのタンパク質・プロテオミクス解析技術

プロトアレイによるタンパク質インターラクトーム解析

佐藤 準一

明治薬科大学薬学部生命創薬科学科バイオインフォマティクス

〒204-8588 東京都清瀬市野塩 2-522-1

E-mail: satoj@my-pharm.ac.jp

サマリー

近年、数千種類のリコンビナントタンパク質をスライドガラス基盤上に高密度固定したプロテインマイクロアレイが登場し、目的とするタンパク質の標識プローブさえあれば簡便、迅速かつ網羅的にタンパク質間相互作用・インターラクトームを解析出来るようになった。プロテインマイクロアレイを利用することにより、結合タンパク質、酵素の基質、抗体の標的抗原、低分子化合物の標的タンパク質に関して、ハイスループットなスクリーニングが比較的安価で可能であり、創薬研究に重要なプロテオミクス解析ツールとなりつつある。本稿では既に商品化されているプロトアレイを中心に、解析方法、応用例、問題点について概説する。

1. 技術開発の歴史と現状

2003 年にヒトゲノムプロジェクトが完了し、全ヒト遺伝子約 22,000 の塩基配列が解読された。システムズバイオロジーの観点からすると、ヒトは大規模な分子ネットワークで精密に構築された複雑系であり、多くの難病がシステムの持つロバストネスの破綻に起因すると考えられている¹⁾。従って難病の病態解明のためには、ゲノムワイドの分子ネットワーク解析が重要な研究課題となる。DNA マイクロアレイは、スライドガラス基盤上に数万遺伝子のオリゴヌクレオチドを高密度に固定したチップであり、一度の実験で個々の細胞における全遺伝子発現情報を、包括的に解析出来るツールである。2000 年代前半に DNA マイクロアレイのタンパク質バージョンとして登場したのが、プロテインマイクロアレイである。DNA マイクロアレイと同様に、アレイヤーを用いて高密度のスポットイングが自動化され、ラージスケールでの定量的解析が可能となっている。プロテインマイクロアレイの登場以前は、タンパク質間相互作用(protein-protein interaction; PPI)・インターラクトーム(interactome)は、主としてイーストツーハイブリッド(yeast two-hybrid; Y2H)法で解析されていたが、偽陽性と偽陰性が多く労力と時間がかかり、結合条件としてイオン濃度や pH を制御出来ないなどの問題点があった。プロテインマイクロアレイを用いれば、目的とするタンパク質の標識プローブさえあれば、Y2H 法に比較して簡便、迅速、安価でかつ網羅的に PPI を解析可能である²⁾。タンパク質を酵母で発現させる Y2H 法に比較して偽陽性や偽陰性が少なく、翻訳後修飾、イオン濃度、pH の影響も直接検討出来る²⁾。商品化されているプロトアレイ(ProtoArray®、Invitrogen)では、昆虫細胞で発現させたリコンビナントタンパク質を構造や機能が保持されたまま固定しており、PPI の解析のみならず、酵素の基質や核酸、脂質、低分子化合物の結合タンパク質のハイスループットスクリーニング(high throughput screening; HTS)にも応用可能である。現在プロテインマイクロアレイは、創薬研究に重要なプロテオミクス解析ツールとなりつつある。

2. 解析の原理

プロトアレイ(ProtoArray®, Invitrogen)は、発売当初はヒトとイーストの 2 種類のタイプがあったが、2009 年現在、ヒトプロトアレイのみ入手可能である(最新バージョンは

v5.0)。ヒトプロトアレイ v1.0 は 1,928, v2.0 は 3,017, v3.0 は 5,004, v4.0 は 8,222 のタンパク質が固定されていた。プロトアレイ v5.0 では、ニトロセルロースでコートされた 1 枚のスライドガラス上に過去最大数である 9,483 種類のリコンビナントタンパク質がデュープリケートでスポットされている。プロテインキナーゼ、転写因子、膜タンパク質、シグナル伝達因子、代謝系制御因子など広範囲な分子をカバーしている。全タンパク質のリストは Invitrogen ホームページからダウンロード出来る。タンパク質は Ultimate human open-reading-frame (ORF) clone collection(Invitrogen) を Gateway expression vector(Invitrogen) に クローニングし、Bac-to-Bac baculovirus expression system(Invitrogen)を用いて昆虫細胞 Sf9 で発現させている。高次構造が保持されるように未変性条件下で、グルタチオンセファロース 4B を用いて精製したタンパク質全長または部分長をアレイヤーでスポットしている。各タンパク質には N 末端に glutathione-S transferase(GST)タグと 6X histidine(HIS)タグが結合しており、GST をスパーサーとしてタンパク質の本体がスライドガラス表面から突出し、標識プローブが各スポットのタンパク質の全周囲にアクセス出来るように工夫されている。ポジティブコントロールとして、Alexa Fluor 647 標識抗体、ビオチン標識抗マウス抗体(マウスモノクローナル抗 V5 抗体と結合)および V5 がスポットされている。ネガティブコントロールとして、bovine serum albumin(BSA), GST, バッファーのみ、ウサギ抗 GST 抗体、ヒト IgG サブクラス、抗ビオチン抗体がスポットされている。Invitrogen ではアレイの品質管理のために、各ロットを抗 GST 抗体と反応させ、GST 濃度勾配スポットのシグナルから作成した標準曲線を用いて、各スポットのタンパク質濃度を算出している。ロット毎のタンパク質濃度情報に関しても Invitrogen ホームページからダウンロード出来る。

以下、プロトアレイ(ProtoArray®, Invitrogen)を用いた PPI 解析に関して、実験方法の概略を述べる。プロトアレイでは、標識プローブとして V5 タグ融合タンパク質(PPI kits for epitope-tagged proteins)またはビオチン化タンパク質(PPI kits for biotinylated proteins)を選択出来る。前者では Alexa Fluor 647 標識抗 V5 抗体を、後者では Alexa Fluor 647 標識 Streptavidin を検出系に用いる。本稿では V5 タグ融合タンパク質プローブ作成法について述べる(図 1)³⁾。構造が保持されていて純度が高いプローブを作

成するためには、V5 タグ融合タンパク質を無血清培養上清中に分泌させた方がよい(私見)。Step 1: 目的の遺伝子を分泌型発現ベクターpSecTag/FRT/V5(Invitrogen)にクローニングし、Flp recombinase 発現ベクターpOG44(Invitrogen)と共に Flp-In HEK293 細胞(Invitrogen)に導入する。遺伝子導入細胞を Hygromycin B で選択し、安定発現細胞株を樹立する。V5 タグ融合タンパク質発現細胞を無血清培地 DMEM/F12 で72時間培養し、培養上清を回収して Amicon Ultra(Millipore)で濃縮する。次に V5 タグ融合タンパク質には HIS タグも結合していることを利用して、HIS-select spin カラム(Sigma)で精製する。さらに Centricon(Millipore)で再度濃縮し、遠心して不溶物を除去後、プロービングバッファーで 50 $\mu\text{g/ml}$ に調整する。プローブの一部を SDS-PAGE で泳動し、銀染色と抗 V5 抗体のウェスタンブロットで純度を確認する。Step 2: アレイを PBST バッファーで 4°C, 1 時間ブロック後、上記のプローブ 120 μl をアレイ上に滴下し、カバースリップで封じて 4°C, 90 分間反応させる。カバースリップをのせる際に、気泡が入るとシグナル欠損領域を生ずるので細心の注意が必要である。プロービングバッファーで 1 分間 3 回洗浄後、Alexa Fluor 647 標識抗 V5 抗体 260 ng/ml, 25 ml と 4°C, 30 分間反応させる。プロービングバッファーで 1 分間 3 回洗浄後、50 ml 遠心管に移して 1,000 rpm, 5 分間遠心して水分を除去し、遮光したスライドボックスに収納して室温で 1 時間乾燥させる。実験で用いる全てのバッファーは調製時に泡立でない事と 0.22 μm フィルターを通して夾雑物を除去しておくことが非常に大切である。乾燥後は蛍光シグナルが退色しないうちにスキャナーで取り込む。われわれは GenePix 4200A(Axon Instruments)を用いて波長 635 nm で検出し、GenePix Pro 6.0(Axon Instruments)で数値化して、GPR ファイルを ProtoArray Prospector(Invitrogen)で解析している。解析ソフト ProtoArray Prospector(最新バージョンは v5.2)は、Invitrogen ホームページからダウンロード出来る。デフォルト設定では、有意な結合と判定されるのは Z-score 3.0 以上の場合である。またネガティブコントロールとポジティブコントロールのシグナル値から、実験の成否を確認出来る。標識プローブ作成(Step 1)以降のステップ(Step 2)は 5 時間程度で遂行出来る。

3. 本技術でわかること

3-1. 結合タンパク質の網羅的解析と同定

少量の標識プローブが手元にあれば、プロテインマイクロアレイを用いてタンパク質間相互作用のみならず、タンパク質と脂質、核酸、低分子化合物の結合を解析することが出来る。Singh らは、脊髄性筋萎縮症(spinal muscular atrophy; SMA)の病態改善遺伝子 SMN2 の発現レベルを上昇させる低分子化合物に関して、運動ニューロン培養系でスクリーニングし、C5-substituted quinazoline D156844 を発見した⁴⁾。¹²⁵I 標識 D156844 をプローブとして、ヒトプロトアレイ v3.0 と反応させ、mRNA decapping enzyme DcpS を結合タンパク質として同定した。また DcpS と D156844 の共結晶の X 線構造解析により、両者の結合関係を確認した。彼らの結果は、プロテインマイクロアレイを用いることにより、種々の創薬シード化合物の標的となるタンパク質を網羅的に解析可能なことを示唆している。パーキンソン病の中脳では、黒質神経細胞に α -synuclein の凝集封入体を認め、Lewy 小体と呼ばれている。Schnack らは、Alexa Fluor 488 標識リコンビナント α -synuclein オリゴマーをプローブとして、ヒトプロトアレイ v3.0 と反応させ、13 種類の結合タンパク質を同定した⁵⁾。 α -synuclein オリゴマー結合タンパク質の多くに、cdc42/Rac interactive binding domain が存在していた。

14-3-3 タンパク質は、脳に豊富に含まれている 30-kDa の酸性タンパク質で、7 種類のアイソフォームが存在する。14-3-3 はダイマーを形成し、種々のタンパク質のリン酸化セリンコンセンサス配列(RSXpSXP, RXXXpSXP)に結合し、細胞内シグナル伝達因子のアダプター分子として働く。われわれは V5 タグ融合 14-3-3 epsilon をプローブとして、ヒトプロトアレイ v1.0 と反応させ、20 種類の 14-3-3 結合タンパク質を同定した⁶⁾。免疫沈降法で 14-3-3 と EAP30, DDX54, STAC の結合を確認した。プリオン病は、proteinase K 抵抗性の異常型プリオンタンパク質 PrP^{Sc} が脳に蓄積し、神経変性を来す難病である。健常脳では、神経細胞は正常型プリオンタンパク質 PrP^C を高レベル発現している。 α -helix に富む PrP^C は分子シャペロン X を介して β -sheet に富む PrP^{Sc} に構造変換されると考えられているが、X の正体は明らかではない。われわれは V5 タグ融合 PrP^C23-231 をプローブとして、ヒトプロトアレイ v3.0 と反応させ、47 種類の PrP^C 結合タンパク質(X の候補)を同定した⁷⁾。免疫沈降法と細胞イメージングで、PrP^C と FAM64A, HOXA1, PLK3, MPG の結合を確認した。また 47 種類の PrP^C 結合タンパク

質に関して、KeyMolnet で分子ネットワークを解析し、AKT, JNK, MAPK シグナル伝達系との有意な関連性を認めた。中枢神経系では、軸索損傷時には再生能力が極めて乏しい。その原因として髄鞘に含まれる神経突起伸長阻害因子 Nogo の存在が挙げられている。Nogo-A の C 末端部分 Nogo-66 は、神経細胞膜上の Nogo 受容体 NgR に結合して、神経突起伸長抑制シグナルを伝達する。NIG と呼ばれる Nogo-A 中央部分にも神経突起伸長抑制活性が存在するが、NIG 受容体は明らかではない。われわれは V5 融合 NIG567-748 をプローブとして、ヒトプロトアレイ v3.0 と反応させ、12 種類の NIG 結合タンパク質を同定した⁸⁾。免疫沈降法と細胞イメージングで、髄鞘形成細胞オリゴデンドロサイト特異的に発現している酵素 CNP と NIG の結合を確認した。

3-2. 抗体のプロファイリング

プロテインマイクロアレイを用いて、癌や自己免疫疾患の血清バイオマーカー、特に自己抗体のスクリーニングが可能である。抗体プロファイリングの場合は、アレイをブロッキング後に、希釈した患者血清または精製 IgG と反応させる。次に Alexa Fluor 647 標識抗ヒト IgG 抗体と反応させて検出する。Lalivie らは、5 例の視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica; NMO) 患者の血清 IgG をプローブとして、ヒトプロトアレイ v1.0 と反応させ、神経細胞抗原 CPSF3 に対する自己抗体を同定した⁹⁾。実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) は、マウスやラットを髄鞘タンパク質抗原で感作して惹起される炎症性脱髄疾患で、多発性硬化症の動物モデルである。Robinson らは、232 種類の髄鞘プロテオームアレイを自作し、EAE 発症時や再発時の血清をプローブとして反応させ、エピトープ拡散現象を見出した¹⁰⁾。また抗体に対応する様々な抗原の DNA ワクチンを EAE モデルに投与すると、顕著な治療効果を認めた。Hudson らは、30 例の卵巣癌患者の血清をプローブとして、ヒトプロトアレイ v3.0 と反応させ、患者で上昇している 94 種類の IgG 自己抗体を同定した¹¹⁾。彼らは lamin A/C, SSRP1 を癌特異的バイオマーカーとして選択し、イムノブロットとヒト組織アレイを用いて卵巣癌における発現上昇を確認した。Li らは、18 例の小児腎臓移植患者の移植前後の血清をプローブとして、ヒトプロトアレイ v3.0 と反応させた¹²⁾。移植

後の血清で ARHGEF6, STMN3 に対する自己抗体を同定し、免疫組織化学的に腎盂における自己抗原の発現を確認した。

3-3. 酵素基質の同定

アレイに固定されているタンパク質の機能や活性が保持されていれば、酵素をプローブとして基質をスクリーニング出来る(functional proteomics)。Boyle らは、チロシンキナーゼ Abl-related gene(Arg) をプローブとして、 $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ の存在下でヒトプロトアレイ v2.0 と反応させ、Arg の基質として cortactin を同定した¹³⁾。線維芽細胞では、PDGF は非受容体型チロシンキナーゼ src を活性化し、src により Abl, Arg が活性化されると、cortactin がチロシンリン酸化されて、アクチン再構成依存性の形態変化(dorsal wave) が誘導されることがわかった。Gupta らは、酵母ユビキチンプロテインリガーゼ E3 である Rsp5 プローブとして、E1, E2, FITC 標識ユビキチン、ATP の存在下でイーストプロトアレイ v1.1 と反応させ、ユビキチン化されたタンパク質(Rsp5 の基質)を同定した¹⁴⁾。また同時に Alexa Fluor 647 標識 Rsp5 をプローブとして、イーストプロトアレイ v1.1 と反応させ、Rsp5 結合タンパク質を網羅的に解析した。155 種類の Rsp5 結合タンパク質の 34% が Rsp5 の基質となることがわかり、その多くには Rsp5 認識配列 PPXY, LPXY が存在していた。

4. 展望

プロテインマイクロアレイを用いれば、結合タンパク質、酵素の基質、抗体の標的抗原、低分子化合物の標的タンパク質に関して、ハイスループットなスクリーニングが可能である。現在プロテインマイクロアレイは、創薬研究に重要なプロテオミクス解析ツールとなりつつある。しかしながら、以下に述べるような将来解決すべき問題点が存在する。

ヒトには約 22,000 個の遺伝子が存在するが、これらに由来するタンパク質は 50 万個を超えると推測されている。ヒト遺伝子の約 90% は、選択的スプライシングにより複数の転写産物を発現している。個々の細胞や組織のスプライシングプロファイルは、エクソン型 DNA マイクロアレイを用いることにより解析可能である。しかしながら、現時点ではスプライシングバリエントのタンパク質産物を網羅的にカバーしたプロテインア

レイは市販されていない。また PPI の解析では、タンパク質のリン酸化、糖鎖修飾、ユビキチン化、アセチル化、メチル化、脂質修飾などの翻訳後修飾の有無も重要なファクターとなる。プロトアレイ(ProtoArray®, Invitrogen)では、昆虫細胞でタンパク質を発現させているので、比較的哺乳類細胞に近い翻訳後修飾を受けているとされている(Invitrogen 社内データ)が、実際には各々のタンパク質の翻訳後修飾の程度は確認されていない。またプロテインマイクロアレイではタンパク質の細胞内局在は考慮されないため、分泌タンパク質が核タンパク質と直接結合するような不自然な結果も観察される。さらに複合体や多量体を形成して初めて結合能や活性を示すタンパク質の検出は不可能である。また解離定数が大きいような弱い結合や短時間一過性の結合は見逃される可能性が高い。プロテインマイクロアレイでは、生体内における環境(イオン濃度、pH, 補助因子)とは完全には一致していない条件下で反応させているため、人工的な結果を観察している可能性がある。酵素基質のスクリーニングでは、酵素阻害剤による特異的な反応抑制を必ず確認する必要がある。プロトアレイでは各スポット間でプリントされているタンパク質の濃度のばらつきが大きく、PPI の解析の場合、濃度が高いスポットが陽性として検出され易い(私見)。上記のような問題点があるため、プロテインマイクロアレイで得られた結合関係は、免疫沈降法、Y2H 法、表面プラズモン共鳴法(Biacore)などで、必ず検証する必要がある。またプローブ X に対する結合タンパク質として Y を同定した場合は、プローブ Y に対する結合タンパク質として X を同定出来るか検討する事も重要である(reciprocal validation)。最終的に、得られた結果が既知の報告に該当するのか、種々のタンパク質インターラクトームデータベース HPRD(www.hprd.org), IntAct(www.ebi.ac.uk/intact), STRING(string.embl.de), PubGene(www.pubgene.org), MINT(mint.bio.uniroma2.it/mint), BOND(bond.unleashedinformatics.com/Action?), Genome Network Platform(genomenetwork.nig.ac.jp)を検索しておくことも非常に重要である。

5. 文献

- (1) Kitano, H.: Nat Rev Drug Discov, 6: 202-210, 2007
- (2) Bertone, P. & Snyder, M.: FEBS J, 272: 5400-5411, 2005
- (3) Satoh, J.: Protein Microarray Analysis for Rapid Identification of 14-3-3 Protein Binding Partners. In Functional Protein Microarrays in Drug Discovery, ed by Predki, P.F., pp239-259, CRC Press, 2007
- (4) Singh, J. et al.: ACS Chem Biol, 3: 711-722, 2008
- (5) Schnack, C. et al.: Neuroscience, 154: 1450-1457, 2008
- (6) Satoh, J. et al.: J Neurosci Methods, 152: 278-288, 2006
- (7) Satoh, J. et al.: Neuropathol Appl Neurobiol, 35: 16-35, 2009
- (8) Sumiyoshi, K. et al.: Neuropathology, in press, 2009
- (9) Lalive, P.H. et al.: Neurology, 67: 176-177, 2006
- (10) Robinson, W.H. et al.: Nat Biotechnol, 21: 1033-1039, 2003
- (11) Hudson, M.E. et al.: Proc Natl Acad Sci USA, 104: 17494-17499, 2007
- (12) Li, L. et al.: Proc Natl Acad Sci USA, 106: 4148-4153, 2009
- (13) Boyle, S.N. et al.: Curr Biol, 17: 445-451, 2007
- (14) Gupta, R. et al.: Mol Syst Biol, 3: 116, 2007