

蛋白質相互作用予測に向けての基盤情報の組織的収集

●伊藤 隆司¹⁾ ◆住本 英樹²⁾ ◆太田 一寿¹⁾ ◆山田 洋一³⁾

1) 東京大学大学院新領域創成科学研究科 2) 九州大学生体防御医学研究所 3) 金沢大学大学院自然科学研究科

〈研究の目的と進め方〉

様々な生命現象の根幹で重要な役割を果たしている蛋白質相互作用の系統的解析は細胞システムの理解に不可欠である。

そこで本研究では、モデル細胞として出芽酵母をとりあげ、まず全ORF間での網羅的2ハイブリッド解析を行い、蛋白質相互作用ネットワーク解明の核を形成する。

次に、これらの相互作用の生物学的意義付けを行う為の実験的手法の開発を行う。具体的には、相互作用領域を迅速に同定して相互作用の変異体を取得する「相互作用ターゲットング」のための方法論を、酵母2ハイブリッドシステムをベースに進める。

これはまた相互作用ドメインの同定にもつながるので、新規相互作用ドメインに関しては、酵母での情報に基づいてその機能を高等生物細胞で検証し、普遍的な相互作用ルールの発見を目指す。更に、複数の相互作用によって結び付けられた機能ユニットとしての「相互作用分子系」に着目し、このレベルでの相同性検索からその進化や構築原理を考察する。

また蛋白質間相互作用がいつどこでどのくらい起こるのかを探る為に、複合体の精製と質量分析による方法の開発を試みる。

蛋白質と核酸の相互作用を解析する為の新たな手法、および相互作用予測に向けて欠けている基盤情報の収集を進める。

これにより蛋白質相互作用の系統的解析と予測に向けての基盤を構築することを本研究の目的とする。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) 出芽酵母の網羅的2ハイブリッド解析を完成させる。
- 2) 相互作用ターゲットングのために、相互作用ドメインの迅速マッピング法および相互作用変異体単離法の開発を行う。
- 3) 新規相互作用ドメインの発見に基づく普遍的ルールの発見や複数の相互作用からなる結び付けられた機能モジュールとしての「相互作用分子系」に着目し、この階層での相同性の検討からその進化や構築原理を考察する。
- 4) 相互作用プロファイリングのために、蛋白質複合体の精製法と質量分析による解析法を開発する。
- 5) 蛋白質-核酸相互作用解析の為に欠けている基盤情報収集技術の開発を行う。

〈研究期間の成果〉

1) 出芽酵母の網羅的2ハイブリッド解析

特定領域研究「ゲノムサイエンス」の支援によって開始した、出芽酵母の約6000個のORF全部を対象に全ての可能な組み合わせで相互作用を検討する網羅的2ハイブリッド解析を終了した(1, 6)。その結果、総計4549種の相互作用が同定され、世界最大のデータセットが構築された。各相互作用に関して、蛋白質のアノテーション、両者の文献中での共起情報、他者による報告の有無、両遺伝子間の遺伝的

相互作用および共発現情報、他種における相同相互作用の有無等々の情報を付加したYeast Interacting Proteins Databaseを作成し、解析ソフトウェアツールとともに公開した(27)。現在は<http://itolab.cb.k.u-tokyo.ac.jp/Y2H/>より公開している(図1)。

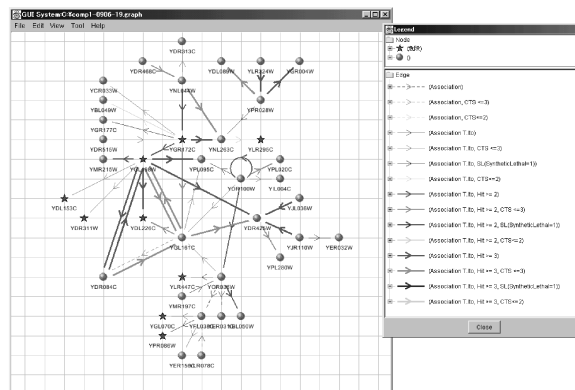


図1：Yeast Interacting Protein Databaseの画面

網羅的2ハイブリッド解析の結果、様々なことが明らかになった。まず得られた4549種類の相互作用のうち2/3が1回しか検出されておらず、スクリーニングが飽和していないことが判明した。また3回以上検出された841相互作用(コアデータ)を同様のプロジェクトを行ったCuraGen社による691相互作用と比較したところ、重複したのは141と予想外に少なかった。これには、双方のシステムの違いもあるが、基本的には偽陰性と偽陽性の影響が大きなものと考えられる。またコアデータの精度に関しては、既知蛋白質同士の相互作用のマニュアルキュレーションの結果や、遺伝子発現との相関解析等から50～60%と予想されている。結果的には両者のデータが補いあって酵母の相互作用データが格段に充実することになった。これらのY2H解析に続いて、蛋白質複合体の大規模プルダウンMS解析も欧米の企業によって行われ、更に相互作用データは充実した(図2)。

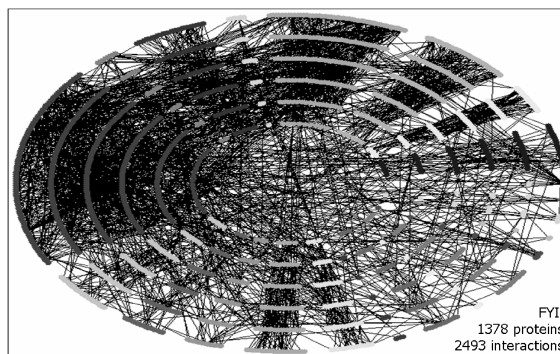


図2：出芽酵母の蛋白質相互作用ネットワーク

これらの相互作用データは酵母の研究コミュニティにお

いてはリファレンスとして確立した感がある。と同時に、各種データベースにも取り込まれている。そして、様々なインタラクトームのインフォマティクスを産む契機ともなった。また酵母データを元に哺乳類での相互作用解析を行った例も生まれた (21)。

網羅的Y2H解析に用いた2ハイブリッドクローンのリソースはリクエストに応じて世界中の研究者に提供を行ってきた。また全セットを活用して以下のようなゲノムワイドスクリーンも行った。

①クロマチンのバリア蛋白質のスクリーニング (24)

サイレンサーの効果に対してバリアとして機能する蛋白質が存在することをKamakakaのグループは示してきた。この際に彼らはGAL4とUASの相互作用を利用して、蛋白質をゲノム上の特定の位置にリクルートして、サイレンサー活性に対するバリアとして働くことを示すという戦略を取った。このような機能を持つ蛋白質を網羅的に解析する為に、我々が保持する酵母の全ORFのGAL4 DNA結合ドメイン融合蛋白質コレクションを活用することにした。その結果、55種のバリア活性を持つ蛋白質の同定に成功した。これらに関する研究によってサイレンシング研究に新しい局面を開くことが出来た。

②酵母の転写活性化因子 (32)

ゲノムワイド2ハイブリッド解析では、それぞれのベイト (=GAL4 DNA結合ドメイン融合蛋白質) が単独でレポーター遺伝子を活性化しないかを最初にチェックをして、活性化するのはスクリーニングから取り除いている。このプロセスによって、実はゲノムワイドの1ハイブリッドアッセイを行ったことになる。そこで我々ともう一方のゲノムワイドスクリーンに関わったUetzとの共同研究で、これらの約400のself-activatorの再解析を行い、活性化能の定量解析と配列上の特徴の解析などを行い、新しい転写活性化因子を予測した。

2) 相互作用ターゲティングのための技術開発

①2ハイブリッドフットプリンティング

段階欠失変異体集団を2ハイブリッド選択にかけてその結果をフットプリントとして表示する独自の新技术2ハイブリッドフットプリント法 (2HF) を考案した。その為に、新たに開発した組み換えによる段階欠失変異体作成法を導入し、実際にMAPキナーゼカスケードの足場蛋白質であるSTE5とSTE11, STE7の相互作用領域マッピングに成功した。しかしながら、均一な欠失集団を安定して迅速に調製する手法の開発は困難を極めており、実用レベルの技術として育成するには至らなかった。

②デュアルベイト逆2ハイブリッド法

URA3をカウンター選択マーカーとして用いる逆2ハイブリッドシステムにおいてGAL4系とLexA系の2つのベイトを同時に用いるデュアルベイト逆2ハイブリッドシステムを開発した。

これを用いると、高次構造を大きく破壊せずに相互作用のみを選択的に障害するミスセンス変異の取得を可能とする保証付き逆2ハイブリッド法が可能になる (図3)。

今、X結合必要最小ドメインYにXとの相互作用を障害する変異を導入する場合を考える。まず、YのC末端にPCモチーフを付加して、これをpreyとして発現させる。XとYが相互作用するとURA3が発現して5FOAによるカウンター選択が可能になり、PCを認識するPB1ドメインを二つ目のbaitとして発現させてHIS3発現による3AT耐性獲得が可能となる宿主を用いる。目的とする変異の場合は、URA3は失われるがHIS3は保たれるので、5FOAと3ATの双方に耐性を示す。一方、ナンセンス変異の場合は、URA3もHIS3も発

現せず、5FOA耐性、3AT感受性になる。蛋白質を不安定化する変異の場合は3AT耐性が低下し生育が遅れる。つまりこの方法は、融合蛋白質Y-PCの存在をPC-PB1相互作用で保証することで、ナンセンス変異や不安定化変異を自動的に除外するものであり、双方の薬剤に耐性のクローンを選択するだけで目的の変異を同定できる。その有効性は既にGCN1-GCN2相互作用系におけるGIドメインの標的領域の解析等で実証されている (7)。

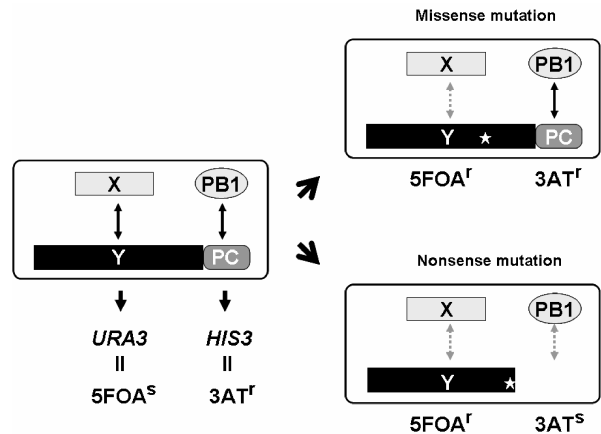


図3:保証付き逆2ハイブリッド法

デュアルベイト逆2ハイブリッド法は、蛋白質AとBの双方に結合する蛋白質Xに関して、Aには結合するがBには結合しない変異体を取得することが出来ることから、相互作用領域のマッピングと同時に機能分離型アレルの取得が出来る為に、機能解析には大変に有用である。この方法を用いてBEM1蛋白質上に新規のCDC42結合ドメインCIを発見することが出来た (Yamaguchi et al., 投稿中)。

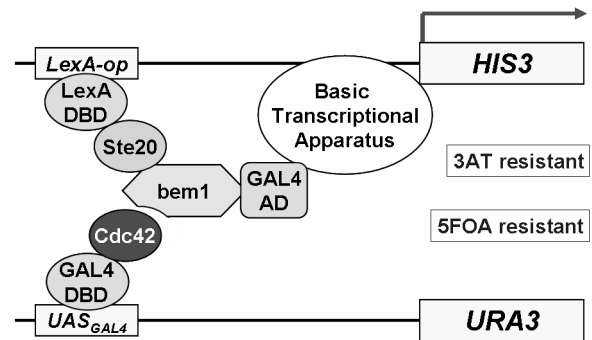


図4:デュアルベイト逆2ハイブリッド法による機能分離型アレルの単離

③加速化システムフットプリント法

上記のデュアルベイト逆2ハイブリッド法とは逆の発想で相互作用領域をマップする方法を考案した。

この方法では、エラープロンPCRを用いて試験管内で進化を加速させ、Y2Hを用いて特定の相互作用のみに選択圧をかけることで、相互作用に本質的ではない部分に変異を蓄積させ、それらの変異のフットプリントとして重要部位を同定しようとするものである。いわば実際の生物の配列に基づいて機能的に重要な部分を同定するシステムフットプリント法を試験管内で加速しようとするものである。この手法を更に蛋白質の表面予測と組み合わせることで、蛋白質の表面に露出しており、相互作用に必須な残基をマップすることで相互作用表面の予測を行うことが出来る。

実際に、我々が見出した新規相互作用ドメインであるGI (2) にこのアプローチを応用した結果は、立体構造解析から明らかにされた相互作用表面とよい一致を示し、この方法による相互作用領域あるいはサイトの予測が可能であることが示された。

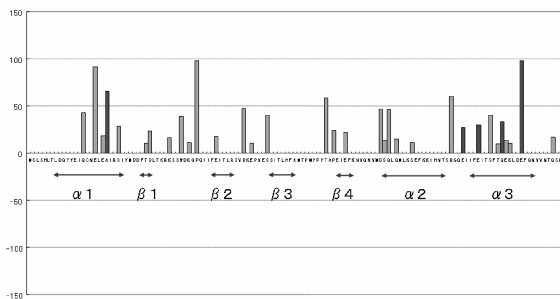


図5：加速化系統フットプリント法による相互作用表面の予測

3) 相互作用ルールの発見と相互作用分子系の解析

①相互作用ルールの発見

我々はこうした網羅的相互作用データの中から、相互作用に関するルールを情報学的に探す試みを行った (14)。具体的には、相関ルール発見の手法をこれらのデータに応用して、SH3ドメインがプロリンリッチ配列を認識すると言ったルールの発見に成功した (14)。これはこうしたタイプの研究としては最も初期に行われたもののひとつである。しかしながら、相互作用データが全長蛋白質同士であるために、ドメイン等の構造的特徴との相関付けが難しいことも分かった。こうしたルール発見を促進するには相互作用領域情報の取得が重要であると考えられた。その意味で上記の相互作用ドメインマップ法は有用なものになると考えられる。

②相互作用分子系の解析

酵母の細胞極性決定系とヒト食細胞の活性酸素産生系の比較解析の過程で我々が見出したPB1ドメインとPCモチーフに関しては、PCモチーフがPB1ドメインのファミリーのサブグループを特徴づける配列であることが明らかになった (8,9,19,20)。そこでPB1ドメインとPCモチーフ含有領域との名称の混乱を避けるために、PB1ドメインを統一名称として用いることとした (13)。また他の名称でも呼ばれていたPCモチーフに関しては、OPCAモチーフと呼ぶことが取り決められた。

酵母の出芽に必須であることを我々が示したBEM1とCDC24の相互作用はPB1ドメインのヘテロ二量体化として捉えられることになった。またこの系と比較しながら研究を進めてきたほ乳類食細胞の活性酸素産生系では、細胞質制御因子p67phoxとp40phoxの相互作用もPB1ドメインのヘテロ二量体化として捉え直された。p40phoxが活性酸素産生に与える影響はこれまで明確にされていなかったが、培養細胞中での活性酸素産生系の再構築実験から、これが活性酸素産生を正に制御することが示された。特に興味深いのはp40phoxの効果は、食作用をミミックするタイプの刺激を用いた際に顕著であり、食胞形成のような細胞の極性化との密接な関連が示唆された (16)。

興味深いことに酵母の細胞極性系と食細胞の活性酸素生成系では、よく似たドメイン構成の細胞質蛋白質が、相互作用しながら、膜へと移行する。両方の系ともSH3、PX/PB2、PB1ドメインを様々な組み合わせで持つ蛋白質が相互作用している。更にCdc42やRacが含まれており、

Rsr1/Bud1とRapの関与も示唆されており、低分子G蛋白質という観点でも両者は類似性が高い。こうしたことから、これらは相互作用する分子の系としてモジュラーに様々な系で利用されているのではないかと考えている。

更にほ乳類のPar蛋白質を中心とする細胞細胞極性制御系においてもPB1蛋白質が重要な構成成分になっていることが判明した (5)。特にPar6とaPKCはPB1ドメインによるヘテロ二量体化をしていることが示された (20)。また、aPKCに結合するZipもまたPB1ドメインを持ち、これを介してaPKCのPB1ドメインに結合することが明らかになった (20)。

これらのPB1ドメインの相互認識様式に関して更に検討を進めた結果、このドメインが相互作用表面として、N末側のリジン残基 (K) を用いる場合と、C末側のPCモチーフ (OPCA) を用いる場合があることを見出した。前者が以前よりPB1ドメインとして認識されていたもので、後者はPCモチーフとして認識されていたものに相当する。それぞれのPB1ドメインがどちらのタイプに属するかが配列から予測できることからヘテロ二量体化し得るペアを予測することが可能になった。またaPKCはKを用いてMEK5と、PCを用いてPar6やZIPと相互作用する。またZIPはKを用いてaPKCとヘテロ二量体を、ZIPとホモ二量体を形成する。ZIPのPCはホモ二量体形成に利用される。これらからPB1ドメイン相互作用における分子認識パターンが分類されて理解された。これらの結果は、構造生物学的解析によっても裏づけられた。

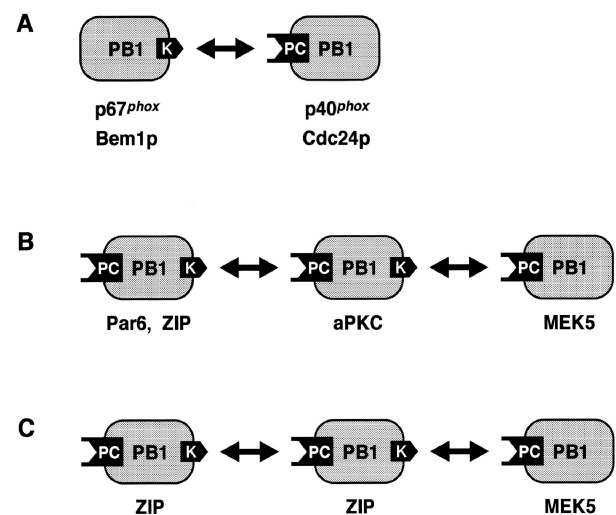


図6：PB1ドメインの認識様式

4) 相互作用プロファイリング

①新規タンデムアフィニティ精製法 (TAP) の開発

抗タグ抗体を用いた複合体精製による相互作用の確認、プロファイリング、および複合体の全構成成分の解明を効率的に進める為に、新規タンデムアフィニティ精製 (TAP) タグの開発に取り組んだ。特に弱い、早い相互作用の検出も念頭において、クロスリンカー使用と尿素などの変性剤存在下での精製に適用できるタグを目指して、His-tag、Streptag、FLAGの3種類を様々な順列で組み合わせたタグを作成した。それぞれを同一のモデル蛋白質に付加して、実際に精製を行い、効率を比較検討した。その結果、最も効率のよかったものSHSHFタグを使用することにした。

実際の応用例としては、出芽酵母の全SH3ドメイン蛋白質25種に関してChiba-tagをコードする配列をゲノム上の遺伝子にノックインした株を作成した。これらのタグング株にホルマリンによるクロスリンキング処理を行い、タンデ

ムアフィニティタグ精製を行った。このうちLSB1に関しては、熱処理によるクロスリンキングの解除に伴い、明確なバンドが現れることが判明し、LC/MS/MSによる解析を行い、結合蛋白質が酵母の14-3-3蛋白質であるBMH1/2であることを同定した。しかしその後の解析の結果、SHSHFタグ自体に14-3-3蛋白質が結合することが判明した。その原因はタグ間の連結配列にあることが判明したので、その部分を改めて14-3-3が結合しない改良型のタグを作成した。またこのタグを用いた複合体精製の為の細胞破碎条件や精製条件などに検討を加えた。現在ではクロスリンキング後に凍結した菌体をブレンダーで破碎することで良好な成績を修めている。

これまでにこの方法を用いて、3量体G蛋白質のフェロモン刺激による乖離の解析やマルチスパン膜蛋白質の生合成時に働くシャペロン用蛋白質の同定などで成果が得られている。

②新規パラレルアフィニティ精製法(PAP)によるユビキチン化蛋白質の解析

更にタンデムアフィニティ精製の応用として、蛋白質分解やエンドサイトーシスをはじめ様々な生命機能の制御に関わるユビキチンに着目して、ポリユビキチン化蛋白質を網羅的に解析するパラレルアフィニティ精製法(PAP)を考案した。

この方法では、それぞれ異なるタグで標識されたユビキチンを細胞内で同時に(パラレルに)発現させる。ポリユビキチン鎖には双方のタグが取り込まれる事が期待されるが、大量に存在するモノユビキチン化蛋白質やフリーのユビキチン分子はどちらか一方のタグしか持っていない。したがって、それぞれのタグに対するアフィニティ精製を連続して行うことで、ポリユビキチン化された蛋白質を選択的に高純度で精製する事が出来る。これがPAP法の原理である。

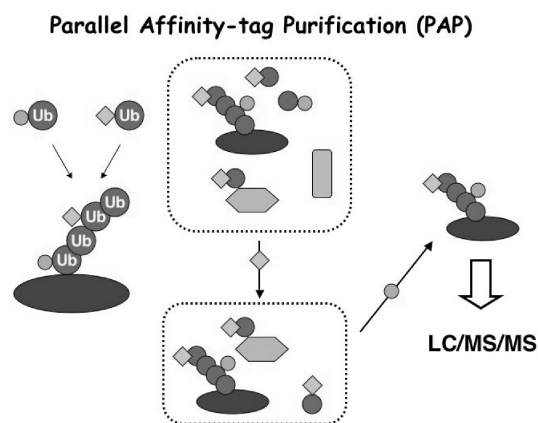


図7:パラレルアフィニティ精製法によるユビキチン化蛋白質の選択的濃縮

実際にこの方法で出芽酵母から精製した蛋白質をLC/MS/MSで解析して、130種のユビキチン化蛋白質候補を見出した。このうち10個について個別実験を行ったところ8個についてはユビキチン化が確認された。したがって、この方法はユビキチン化蛋白質を同定する上で有効な方法になると考えられた。

そこでこの方法をユビキチンリガーゼ(E3)の変異株に適用することで各E3の基質同定を目指している。モデル系として行ったMET30の過剰発現株で基質MET4の濃縮を認められることを確認した。更にMDM30の過剰発現株の解析から、基質候補MDM34を同定することに成功し、個

別研究による検証を進めている。

5) 蛋白質核酸相互作用

①メチル化DNA-蛋白質相互作用の解析

蛋白質とDNAの相互作用を解析する際に忘れてならないのがDNAのメチル化の影響である。メチル化DNAと蛋白質の相互作用はこれまでin vitroの実験系で解析されており、in vivoでの解析法が存在しなかった。そこで我々は酵母の1ハイブリッドシステムを応用して、メチル化DNAと蛋白質の相互作用を解析するシステムの構築を目指した。

その原理は図に示すように、1ハイブリッドシステムのベイト配列をLexAとオペレータの相互作用を利用して繋留したDNAメチレースによってメチル化し、蛋白質との相互作用をレポーター遺伝子の発現で検出するというものである。メチレースとしては細菌由来のCpGメチレースであるM.SssIを、レポーターとしてはlacZを用いた。メチル化DNA結合蛋白質としては、MBDドメイン蛋白質であるMBD1, MBD2およびMeCP2を用いた。その結果、M.SssIの発現依存的にこれらの蛋白質がレポーターの発現を誘導することが確認された。これは1ハイブリッド法によるメチル化DNA-蛋白質相互作用検出の最初の例となった(22)。更に我々は最近注目されている非MBD型のメチル化DNA結合蛋白質であるKaisoについても同様の実験を行い、このタイプのメチル化DNA結合蛋白質もこの方法で検出できることを示した(22)。この方法は、cDNAライブラリーのスクリーニングや、蛋白質-DNA相互作用に対するDNAメチル化の影響の評価などに応用可能なユニークな実験であると言える。

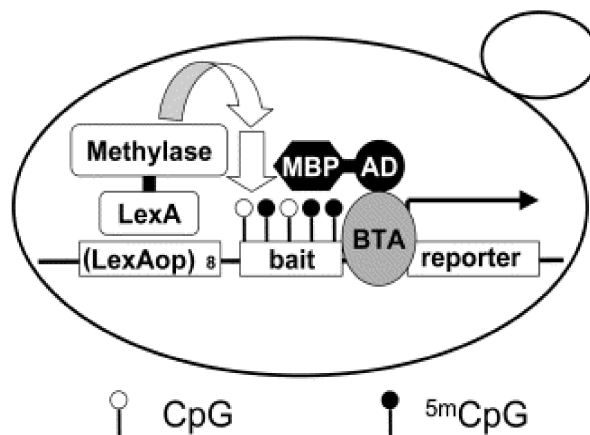


図8:メチル化依存性1ハイブリッドシステム

一方、DNA側のアレル別メチル化の状態を迅速に検出できるHpaII-McrBC PCR (HM-PCR)を開発した(23)。この方法はCpGメチル化に感受性の酵素HpaII/HhaIとメチル化に依存性の酵素McrBCを併せ用いることで、両アレルともメチル化、両アレルとも非メチル化、片側アレルのみがメチル化、そして両アレルとも不完全にメチル化という4つの状態をゲル電気泳動パターンから簡便に検索できる(図9)。この方法を用いてヒト21番染色体の全CpGアイランドのアレル別メチル化状態を調べた。その結果、CpGアイランドが正常組織中でもメチル化を受ける頻度が予想外に高いこと、片アレルメチル化を受けるCpGアイランドには由来する親の性に由来するインプリント型のもの他に、由来する親の性によらず特定のアレルがメチル化されるものなどのバリエーションがあることを明らかにした。更にヒト11番染色体に関しても解析を行い、両者におけるメチ

ル化状況の違いを明らかにした。

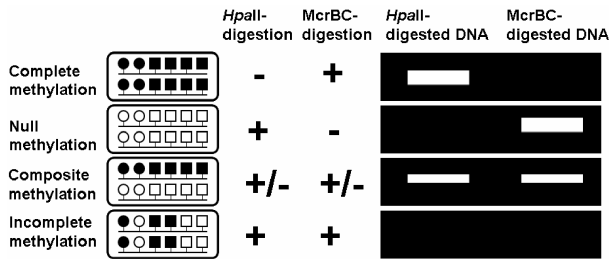


図9：HM-PCRの原理

②転写因子のキメラ化による活性化を利用した転写因子標的の探索

転写因子の標的遺伝子探索は遺伝子ネットワーク解析の基礎である。その為に転写因子破壊株や過剰発現株のトランスクリプトーム解析が行われてきたが、その成果は十分とは言えない。何故なら機能不明の転写因子を破壊しても過剰発現しても、その転写因子が活性化に上流からのシグナル伝達を必要とするものであった場合には、これらのやり方ではトランスクリプトームに変化を惹起できず、何の情報も得られないからである。また最近ではクロマチン免疫沈降法が直接の標的遺伝子を同定する上で大変に有効であることが示されて注目されている。しかしながら、この方法でも刺激に応じて標的と結合するような転写因子の場合は、活性化刺激を知らない限りは有効なデータを得ることは出来ない。我々はゲノム解析が明らかにした多数の機能不明転写因子の機能を標的遺伝子同定から探ることを目指しており、その為には上記の問題を解決する方策が必要である。

我々は転写因子のドメイン構造と機能の相関に関する知見に基づいて、以下のような戦略を考えた。つまりDNA結合ドメインを残して、他の部分は恒常的に転写を活性化するドメインで置換するキメラ化によって、その転写因子を上流活性化シグナルなしに活性化するというものである。その結果、発現が誘導された遺伝子は、本来の転写因子の標的候補となる。これらの標的候補の性格から、逆にその転写因子を活性化する刺激を予想することも可能になるかも知れない。

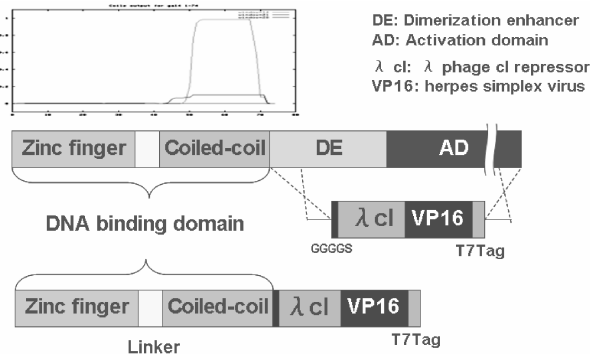


図10：転写因子のキメラ化による活性化

このような考えに基づいて、我々はお芽酵母の転写因子の中で最大のファミリーを形成しているZn2Cys6型転写因子に着目してキメラ化による活性化（Chimerization-Mediated Activation: CMA）の方法を検討した。その結果、Znフィンガーとcoiled-coilのみを残して、それ以外の部分は二量体化促進能を持つλclリプレッサーと恒常的に転写を活性化するVP16とに置換することで、活性化型転写因子

を作成する方法を確立した（25）。

この方法を用いて、多剤耐性を制御する転写因子Pdr1およびPdr3とそのパラログ様の4種の転写因子を対象にCMA株を作成して、DNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、Pdr1やPdr3に関して既知の標的遺伝子が同定され、更にそれら以外の転写因子についても薬剤耐性関連遺伝子を共通にふくみながらそれぞれに個性的な標的遺伝子候補を同定することが出来た。この結果は同一の祖先を共有する転写因子が、標的を共有しながらも独自の機能分化を遂げつつあるところを捉えたものであると言える。またこれらの解析から、試験管内では同一の配列に結合し、ともに薬剤耐性の制御に関わるPdr1とPdr3が浸透圧ストレスに対しては、逆の働きをすることも明らかにした。ちなみにこれら6種の転写因子に関してはYoungらによるChIP-Chipのデータが発表されているが、いずれも既知標的遺伝子すら捕捉できていない。したがって、CMAによるアプローチがChIPを補完する上で重要な位置を占めることが示唆された。

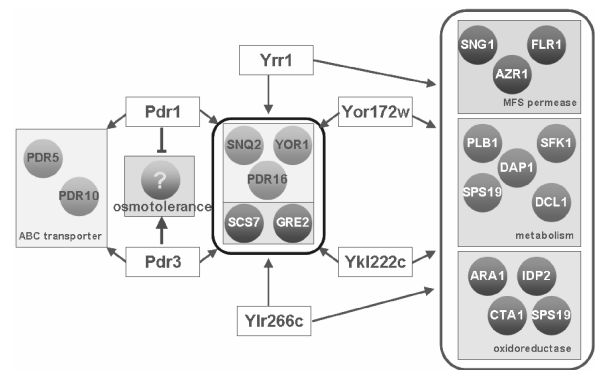


図11：多剤耐性制御遺伝子のネットワーク

③基礎データとしての酵母全長cDNA解析による転写開始点の同定

上記のような方法を用いながら、転写因子の標的を同定し、転写因子との相互作用を解析する際には、プロモータ領域の同定が必須である。ところが出芽酵母では転写開始点に関する情報、すなわちプロモータに関する情報が大きく欠落していることに気がついた。酵母では変異株をゲノミッククローンで相補することによって遺伝子が単離されてきたこともあり、cDNAの解析がされているものが非常に少ない。そのため、転写制御ネットワークの研究が最も進んでいる生物でありながら、転写開始点に関する情報が大きく欠落して、ORFの第1コドンATGのAを+1とするような解析が横行しているという奇妙な状況が出現している。転写開始点の情報は転写制御の研究のみならず、翻訳制御という意味でも大きな意味を持つものであり、蛋白質とDNA或いはRNAの相互作用を考える上での基盤情報となるものである。そこで我々は転写開始点の組織的決定を行うこととした。

その第一段階としては、全長cDNAクローンを単離して、その5'末端配列の決定を大規模に行うことにした。これによってカバーできない遺伝子に関しては、第二段階として組織的なRACEを行うこととした。

転写物の多様性を維持する為に、我々は基本培地中で対数増殖中の細胞と減数分裂期の細胞からRNAを抽出し、2種類のcDNAライブラリーを作成した。ライブラリーは加藤によって開発されたVキャップ法によって作成された。この方法では全長mRNA由来のクローンはゲノムにはコー

ドされていないdGを余計に5'末端に持つ。したがって、得られたcDNA配列をゲノム配列と比較することで、そのクローンが全長であるか否かを判断できるという点で他に類を見ない特徴を有している。

この2種類のライブラリーのクローンのワンパスシーケンスによって約49,000の有効データが得られた。これらによって、4000弱の遺伝子に関して転写開始点情報を得ることが出来た。転写開始点は遺伝子によっては特定の位置に集中しているものもあるが、様々なところから転写が開始されている遺伝子も少なくない。また対数増殖期と胞子形成期とで明らかに異なるプロモータを使用している遺伝子なども見出されている。これらのデータは貴重なものになると思われる。現在、データの取りまとめと公開の準備を進めている。

またこの過程で新規のイントロンを46個発見した。既知の酵母のイントロンが約300であるので、これは大きな数字であろう。興味深いことにオルタナティブスプライシングの例も見出されている。

なおこの解析の過程で予想外に多数の新規転写単位を発見することになった。既に500余りの新規小型転写単位の構造を確定しており、その総数は670程度に及びと推測されている。これらの中には小さいながら保存されたORFを持つものもあるが、全くORFを持たない非コードRNAとしか考えられないものも少なくない。これらの新規転写単位の発見は酵母のゲノムを理解する上で大きな意味を持つであろう。

また更に興味深いのは約600の既知遺伝子に関して、アンチセンス転写物が同定された。得られたクローン数としては、センスよりもアンチセンスが多い遺伝子もあり、これらの持つ意味に大いに興味を持たれる。これらのアンチセンス転写物の中には、センス鎖と発現する時期が異なるものもあるが、同時に誘導されるものもあるようである。いずれにせよ、高等生物で明らかになり注目されているゲノム全体の活発な転写と莫大な機能未知RNA分子の存在は、酵母でも見られるようであり、こうしたRNA研究の為に酵母がよい材料となりえることを示唆していると思われる。

これら一連のcDNA解析の結果は、現在、データ解析が進行中であり、まとまり次第公開してゆきたいと考えており、森下班員の協力を得てブラウザとデータベース構築を急いでいる。

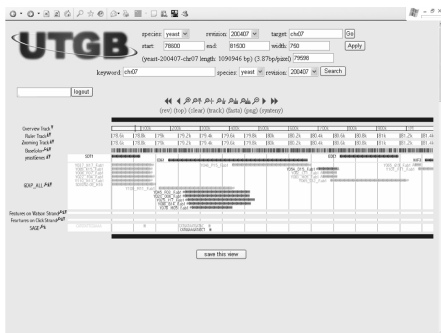


図12：酵母全長cDNAデータブラウザ

〈国内外での成果の位置づけ〉

1) 出芽酵母の網羅的2ハイブリッド解析

我々の業績はインタラクトーム解析の先駆的業績として高く評価されている。論文6が発表された号のPNAS誌ではCommentaryが掲載されたし、Scientist誌等のインタビューなども受けた。この論文はISIによるFast Breaking PaperそしてHot Paperに選定され、被引用数が高い。また

Essential Science Indicatorによって分野への影響がトップ1%内にランクされている。またインタラクトーム解析に関する総説の執筆依頼も相次いだ(12,15)。

また2ハイブリッドのクローンに関しては、全世界の研究者からリクエストがあり、5年間に渡ってクローンの供給を続けてきた。

2) 相互作用ターゲティング

2ハイブリッドフットプリント法に関しては特許の出願を行った。またデュアルベイト逆2ハイブリッド法に関してはユニークな方法としてシステムの分与の依頼が少なくない。

3) 相互作用ルールの発見

相関ルール発見の手法による相互作用ルール発見の試みは分野の中でのパイオニア的業績として認知されている。

新規相互作用ドメインに関して我々は、PB1、PB2/PX、GI/RWDなどを見出してきた(2,7,8,9,10,11,13,18,19,20)。これらはその発見から機能解析、そして共同研究による構造解析までを一貫して行って来た。なかでもPB1に関しては発見、機能解析、構造解析のすべてにおいて、我々が先陣を切った純国産の相互作用ドメインとして認知されている。その為に命名に関する議論においても結局我々の命名が採用されることとなった(13)。

4) 相互作用のプロファイリング

新規パラレルアフィニティ精製法によるユビキチン化蛋白質同定法を応用して、ユビキチンリガーゼの基質を同定するアプローチは、蛋白質分解分野の研究者に注目されている。

5) 蛋白質核酸相互作用解析

メチル化依存性1ハイブリッドシステムおよびHM-PCRは、ともに独自のユニークな技術として注目されている。国内ではこれらを基盤技術としたメチル化解析がゲノムネットワークプロジェクトの技術開発課題として採択されて、更なる発展を見せている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

1) 酵母の網羅的2ハイブリッド解析

網羅的2ハイブリッド解析においては、各相互作用を平均5回カバーする効率での接合反応を進めたが、結果的には1ヒットしかしない相互作用が多数検出されてしまった。これはプール中のクローンの偏りの問題と同時に、弱いセルフ・アクティベーターの混入によるバックグラウンドノイズが生じたのが原因であると考えられる。

セルフ・アクティベーターの除去に関しては、96穴式の形質転換でスポット上のプレーティングを採用した。したがって、1スポットあたりの菌数が少なく低頻度でstochasticにレポーターを活性化するようなものはこのテストを潜り抜けてしまったようである。これらの除去の為に、十分に多くの数の細胞をテストできるように普通のプレートへのプレーティングを行うべきであったと考える。

2) 相互作用ターゲティング

2ハイブリッドフットプリント法のアイディアはユニークなものであり、その有効性を実験的に示すことは出来たが、実用レベルの技術にまで育成することは出来なかった。その原因は簡便な手法で複雑度の高い段階欠失変異集団を作成する方法の開発が困難であったことによる。末端部分の配列をランダム化しておいて組換えを起こす方法が手法としては最も簡便であったが、組換えのホットスポットが出現して最適化が難しかった。また酵素を用いる手法などは高い複雑度の集団の作成には向いていたが、多数のサンプルの処理に適した方法としては手技が複雑になり過ぎ

た。これらに変わるものを見出すことが出来なかった為に、実用レベルのプロトコル開発は頓挫した。

また加速化系統フットプリント法は、基盤となる技術がエラーブローンPCR、スタンダードな2ハイブリッド選択、そしてDNAシークエンスである為に、ストリームライン化は可能であると考えられる。但し、エラーブローンPCRによる変異のスペクトルに限界があり、単一種の蛋白質から出発した際のバラエティが大きくなれない欠点がある。これは他の種のオルソログも用いることで解決できる可能性はある。また表面予測との統合が必要であり、その為にどの手法を用いるのがよいのかもまだ最適化はできていない。これらの問題を時間をかけて検討するとより完成度の高い技術として公表出来るかも知れない。

3) 相互作用ルールの発見

相関ルール発見の手法による相互作用ルールの発見では既知ルールの再発見は達成されたが、新規ルールの発見には至っていない。既知ルールも多数のノイズ的なルール候補の中に埋もれており、そこを丹念に人が見てゆかねばならない。これらのノイズを低下させる為には、相互作用領域の情報が必要であると思われる。今回用いたデータは全長蛋白質同士のデータであり、相互作用領域以外の構造的特徴がルール発見における混戦の原因になる。マルチドメイン蛋白質が多い真核生物では特に問題であるので、このような相互作用領域情報の取得が重要であると思われる。

4) 相互作用プロファイリング

複合体の精製に関しては酵母といえども、まだ大量の培養を必要とすることから、スルーブットを上昇させるのは難しい。また細胞壁を持つ酵母細胞は破碎のためのよい方法がすぐないことも困難の原因のひとつであった。

新規TAPタグによってクロスリンカーの使用と変性剤存在下での精製が可能になったために、高純度標品の取得が可能になった。しかしながら、過度のクロスリンクにより精製が困難になる場合も少なくなく、クロスリンク条件の検討が欠かせず、統一的に利用できる手法ではまだない。また質量分析に関してもマシンとマンパワーの双方で限界を感じた。

新規PAP法によるユビキチン化蛋白質の解析はユニークなものであるが、それでもなお大量のユビキチン存在下での質量分析を強いられる。大量に存在するユビキチン由来ペプチドを除去出来れば更に効率よく基質の同定を進めることが出来ると思われる。

5) 蛋白質核酸相互作用

メチル化依存性酵母1ハイブリッドシステムはその原理を実証することが出来た。しかしながら、このシステムのままではライブラリーのスクリーニングが出来ない。この点は栄養要求性マーカーの使用で克服は可能であろう。更にもう一点の問題としてはベイトのメチル化効率を高く保つことに困難がある。元来ゲノムがメチル化されない酵母にとって、メチル化は異物でありこれを修復する機能が存在するらしい。したがって、この修復を抑えないとメチル化を高率に保つことは難しい。この問題に関しては酵母の破壊株コレクションを用いた予備スクリーンで、修復系酵素の欠失で改善できる結果を得ている。

もう一つの問題は、メチル化効率と形質転換能のトレードオフである。メチル化効率のよいクローンでは形質転換能が低く、それがスクリーニング効率の上昇のネックになっている。ベイト以外の部分にもメチル化が及びそれが酵母の生育を悪くしている可能性も考えてホストの二倍体化などの方策を試みているが、この問題は解決していない。

HM-PCRに関しては簡便な方法ではあるが、McrBCの特性がまだよく分かっておらず、予想外の結果を得ることも

ある。また、プライマーの設計などにもコツが必要であり、完全な酵素消化を達成するにもコツが要る。これらの点を克服しないと一般性の高い方法とはならない。また使用するDNAの量が多いので、希少サンプルの解析には向かない。これらの問題点はゲノムネットワークプロジェクトにおける高度化で解決されつつある。

転写因子のキメラ化による活性化は多剤耐性制御転写因子群の解析でその有効性が示された。しかし、キメラ株では転写因子の過剰発現に起因すると思われるストレス応答的なトランスクリプトーム変動も起こっており、その上に本来の標的候補が乗っているというのが実情である。発現量の制御などをより厳密に行う必要があるかも知れない。またこれまではゲノムにノックインしてきたが、スルーブットを上げるにはエピソーマルな発現の方が望ましい。またこうして得られた標的候補から2次的なものを取り除き、1次標的のみを抽出するには工夫が必要である。

酵母の全長cDNA解析では予想通りに転写開始点情報が得られたが、キャップ配列が単純なGだけではない複雑なパターンでの配列であるケースも多く、それらと5'部分にイントロンを含んだ配列の場合との識別など、配列解析上のいくつかの問題が残っている。またワンパスシークエンスがORFまで達していないクローンが、そのORFのcDNAなのか、新しい転写単位なのかというのも悩ましい問題である。結局、新規転写単位候補に関しては、ポリA部分までの全長構造決定を行うことになる。

<今後の課題>

1) 網羅的2ハイブリッド解析

網羅的な相互作用データに関しては、酵母では2ハイブリッドおよびプルダウンMS解析のものが揃っている。勿論、これで十分とは言えないが、今後はこれらの方法で取得が難しい弱い、早い相互作用や膜蛋白質の関わる相互作用の取得が課題となるであろう。既にスプリットユビキチンシステムを用いた膜蛋白質の大規模解析も行われており、今後これらのデータも加わってゆくとと思われるが、方法論自体に未熟な部分も多い。今後の技術の進展に伴い、適宜、新しいものを取り入れた解析が成されるべきであろう。特にin vivoでの相互作用を観測する方法論の開発が期待される。In vivoとなると当然バイオイメージングによるものが中心となる。FRETを利用したものがこれまでも報告されているが、これはプローブの作成自体が困難であり、高出力化は望み難いと思われる。一方でFCCSはそれぞれの蛋白質を蛍光蛋白質との融合蛋白質として発現するだけでよい。酵母の場合には全てのORFをGFPでタグングしたりソースがあるので、FCCSによる大規模解析も可能かも知れない。但し律速段階は顕微鏡による計測であろう。この部分を高度に並行化することは現時点では不可能であるが、ここがクリアされると一気に解析を行うことも可能になるかも知れない。いずれにせよin vivoでの相互作用計測に関しては今後の課題として取り組んでゆきたい。

2) 相互作用ターゲティング

相互作用の変異体取得は、相互作用ドメインの同定のみならず、機能解析においても大変に重要なポイントである。デュアルベイト逆2ハイブリッド法により基本的な部分の技術は完成しており、今後はこれを様々な系に應用してゆきたい。

またこのシステムは低分子化合物による相互作用阻害剤スクリーニングのプラットフォームとしても有用であろう。生体内での相互作用のうち、モジュラードメインによるものは、薬剤の標的とする場合に、特に副作用に注意をしなくてはならない。例えば、特定のSH3ドメインXと

プロリンリッチ配列Yとの相互作用を阻害する薬剤をスクリーニングする際に、同一細胞内で別のSH3ドメインAとプロリンリッチ配列Bの2ハイブリッドシステムをパラレルに走らせておき、X-YによってURA3が、A-BによってADE2が誘導されるようにシステムを組んでおけば、X-Yのみを障害してA-Bには障害を与えない薬剤のスクリーニングも可能になるであろう。この例のように、デュアルベイト逆2ハイブリッド法は様々な応用が可能なプラットフォームであるので、今後もその応用を積極的に考えてゆきたい。

また同様の発想は1ハイブリッドや3ハイブリッドにも拡張が出来るので、蛋白質-核酸相互作用においてもその構造基盤解明や機能解析に有効な手段を提供できるであろう。

3) 相互作用ルール発見

酵母の細胞極性制御系と食細胞の活性酸素産生系の分子構築の類似性は興味深い問題であり、相互作用ネットワーク機能の進化を考える上で興味深い例になると期待される。今後もこの系の比較解析を解析した様々な技術を用いて進めてゆきたい。またこれらの系の動きを実際の生体内で計測することも視野に入れて、FRETやFCCSなどの利用にも取り組むたい。

4) 相互作用プロファイリング

相互作用研究の今後の焦点は言うまでもなく時間空間分解能と定量性の獲得にある。前者に関しては、繰り返しになるがバイオイメージングの利用が欠かせないし、後者に関しては質量分析の応用が欠かせない。

前者に関しては、先にも述べたようにFRETやFCCSの導入を図ってゆきたい。特に単量体蛋白質同士の相互作用ではなくて、多量体(複合体)同士の会合や乖離の観察を目指した取り組みを進めたい。

後者に関しては、同位元素標識と質量分析を組み合わせた複合体の定量的解析を進めてゆく。既に開発した複合体の精製法と組み合わせ、特にクロスリンクを用いる方法で、早く弱い相互作用の検出と定量を目指したい。特に標準ペプチドを利用することから、絶対定量化も可能になるので、最終的には相互作用・複合体の絶対定量化技術の開発を目指してゆきたい。

また翻訳後修飾に関しても質量分析は大変に強力な武器となるので、翻訳後修飾の同定のみならず定量解析にも応用を進めてゆきたい。特にリン酸化に関しては、抗リン酸化抗体の作成よりも迅速に絶対定量化を備えた計測系を構築することが可能であるので、その特徴を活かしてゆきたい。これらの技術開発のモデルとして我々は栄養ストレス応答におけるGCN2によるeIF2のリン酸化とリン酸化によるeIF2Bとの相互作用の変動を取り上げて開発を進めている。ここから出来るだけ汎用性の高い技術を開発したい。

翻訳後修飾のうちユビキチン化は、蛋白質分解の重要性がクローズアップされて大変に注目を集めている。この方法を利用すると特定の分枝パターンを取るポリユビキチン鎖を持つ蛋白質のみを選択的に取得したり、或いは同一分子上の複数の部位においてユビキチン化を受ける分子を取得したり、様々な応用が可能である。またユビキチン様分子による修飾の解析にも応用が可能である。こうした特性を活かした解析を進めたい。また同位元素標識との組み合わせによって、ユビキチン化のディファレンシャルディスプレイも可能である。様々な刺激によるユビキチン化プロファイルの解析や、ユビキチンリガーゼE3の変異体解析などにも広く応用してゆきたい。既に後者に関しては、基質候補の同定と個別実験による検証に入っているものもあり、蛋白質分解研究にとってインパクトのある手段として育つ可能性も視野に入りつつあるので、今後期待したい。

5) 蛋白質核酸相互作用

メチル化依存性1ハイブリッドシステムに関しては、ライブラリースクリーニングシステムの開発と高度化を進める。またHM-PCRに関しては、微量化、多重化、そして実験の設計やデータ解析を支援するシステムも含めて開発を進めたい。これらにより、エピジェネティクス研究の強力なツールとしてこれらの技術を発展させたい。この点に関しては、ゲノムネットワークプロジェクトによる支援を受けて順調に高度化が進展している。

転写因子のキメラ化による活性化は、酵母転写因子の中で最大のファミリーを形成しているZn2Cys6型転写因子全体への解析拡大を計画している。ここではノックインではなく、エピソーマルな発現を行う。

酵母の全長cDNA解析に関しては、データ解析と公開を目指している。既に森下班員の協力を得てデータブラウザも構築されている。酵母の転写物に関する最大のデータベースとなるので早期の公開を目指したい。

多数のアンチセンスを含む新規転写単位の発見は、酵母トランスクリプトームの想像以上の複雑さを浮き彫りにした。ゲノム全般の活発な転写は、高等動物のcDNA解析から明らかになり、大きな注目を集めているが、その機能に関しては殆どが不明のままである。しかし、我々の結果は、ゲノム全般の活発な転写が、高等生物のみならず、真核細胞に共通の特性であることを示唆している。したがって、その解析において、酵母は貴重な実験系となるであろう。実験生物としての酵母の優れた特性を活用して、謎の多い非コードRNAの解析に新しい展開を開拓してゆきたい。特に蛍光蛋白質レポーターを利用したセンス・アンチセンス転写の単一細胞解析に力を入れて、これらの転写のノイズ性の解析やセンス転写との相関の検証を1細胞レベルで進めたいと考えている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Ito, T., Tashiro, K., Muta, S., Ozawa, R., Chiba, T., Nishizawa, M., Yamamoto, K., Kuhara, S., and Sakaki, Y.,
Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: a comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 1143-1147 (2000) .
2. Kubota, H., Sakaki, Y., and Ito, T., GI domain-mediated association of the eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase GCN2 with its activator GCN1 is required for general amino acid control in budding yeast, J. Biol. Chem. 275, 20243-20246 (2000) .
3. Takeya, R., Takeshige, K., and Sumimoto, H., Interaction of the PDZ domain of human PICK1 with class I ADP-ribosylation factors, Biochem. Biophys. Res. Commun. 267, 149-155 (2000) .
4. Shiose, A & Sumimoto, H., Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase, J. Biol. Chem. 275, 13793-13801 (2000) .
5. Noda, Y., Takeya, R., Ohno, S., Naito, S., Ito, T., and Sumimoto, H., Human homologues of the *Caenorhabditis elegans* cell polarity protein PAR6 as an adaptor that links the small GTPases Rac and Cdc42 to atypical protein kinase C, Genes Cells 6, 107-120 (2001) .
6.011292136
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, T., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y., A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein

- interactome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4569-4574 (2001) .
- 7.011292144
Kubota, H., Ota, K., Sakaki, Y., and Ito, T., Budding yeast GCN1 binds the GI domain to activate the eIF2alpha kinase GCN2, *J. Biol. Chem.* 276, 17591-17596 (2001) .
- 8.011292151
Ito, T., Matsui, Y., Ago, T., Ota, K., and Sumimoto, H., Novel modular domain PB1 recognizes PC motif to mediate functional protein-protein interactions, *EMBO J.* 20, 3938-3946 (2001) .
- 9.0202111107
Terasawa, H., Noda, Y., Ito, T., Hatanaka, H., Ichikawa, S., Ogura, K., Sumimoto, H., and Inagaki, F., Structure and ligand recognition of the PB1 domain: a novel protein module binding to the PC motif, *EMBO J.* 20, 3947-3956 (2001) .
- 10.0202111124
Hiroaki, H., Ago, T., Ito, T., Sumimoto, H., and Kohda, D., Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain, *Nature Struct. Biol.* 8, 526-530 (2001) .
- 11.0202111136
Ago, T., Takeya, R., Kuribayashi, F., Hiroaki, H., Ito, T., Kohda, D., and Sumimoto, H., The PX domain as a novel phosphoinositide-binding module, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 733-738 (2001) .
- 12.0202111143
Ito, T., Chiba, T., and Yoshida, M., Exploring the protein interactome using comprehensive two-hybrid projects, *Trends Biotechnol.* 19, S23-S27 (2001) .
- 13.0303211554
Ponting, C.P., Ito, T., Moscat, J., Diaz-Meco, M.T., Inagaki, F., and Sumimoto, H., OPR, PC and AID: all in the PB1 family, *Trends Biochem. Sci.* 27, 10 (2002) .
- 14.0303211603
Oyama, T., Kitano, K., Satou, K., and Ito, T., Extraction of knowledge on protein-protein interaction by association rule discovery, *Bioinformatics* 18, 705-714 (2002) .
- 15.0303211617
Ito, T., Ota, K., Kubota, H., Yamaguchi, Y., Chiba, T., Sakuraba, K., and Yoshida, M., Roles for the two-hybrid system in exploration of the yeast protein interactome, *Mol. Cell. Proteomics* 1, 561-566 (2002) .
- 16.303211635
Kuribayashi, F., Nunoi, H., Wakamatsu, K., Tsunawaki, S., Sato, K., Ito, T., and Sumimoto, H., Adaptor protein p40phox as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase, *EMBO J.* 21, 6312-6320 (2003) .
- 17.0308161315
Kubota, H., Obata, T., Ota, K., Sasaki, T., and Ito, T., Rapamycin-induced translational derepression of GCN4 mRNA involves a novel mechanism for activation of the eIF2alpha kinase GCN2, *J. Biol. Chem.* 278, 20457-20460 (2003) .
- 18.0308161351
Ago, T., Kuribayashi, F., Hiroaki, H., Takeya, R., Ito, T., Kohda, D., and Sumimoto, H., Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositide, leading to phagocyte NADPH oxidase activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4474-4479 (2003) .
- 19.0404010754
Yoshinaga, S., Kohjima, M., Ogura, K., Yokochi, M., Takeya, R., Ito, T., Sumimoto, H., and Inagaki, F., The PB1 domain and the PC motif containing region are structurally similar protein binding modules, *EMBO J.*, 22, 4888-4897 (2003) .
- 20.0404010826
Noda, Y., Kohjima, M., Izaki, T., Ota, K., Yoshinaga, S., Inagaki, F., Ito, T., and Sumimoto, H., Molecular recognition in dimerization between PB1 domains, *J. Biol. Chem.*, 278, 43516-43524 (2003)
- 21.0404010834
Shakoori, A., Fujii, G., Yoshimura, S., Kitamura, M., Nakayama, K., Ito, T., Ohno, H., and Nakamura, N., Identification of a five-pass transmembrane protein family localizing in the Golgi apparatus and the ER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 850-857 (2003) .
- 22.0404010845
Feng, S.-Y., Ota, K., Yamada, Y., Sawabu, N., and Ito, T., A yeast one-hybrid system to detect methylation-dependent DNA-protein interactions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 922-925 (2004) .
- 23.040401085
Yamada, Y., Watanabe, H., Miura, F., Soejima, H., Uchiyama, M., Iwasaka, T., Mukai, T., Sakaki, Y., and Ito, T., A comprehensive analysis of allelic methylation status of CpG islands on human chromosome 21q, *Genome Res.* 14, 247-266 (2004) .
- 24.0404010906
Oki, M., Valenzuela, L., Chiba, T., Ito, T., and Kamakaka, R., Barrier proteins remodel and modify chromatin to restrict silenced domains, *Mol. Cell. Biol.* 24, 1956-1967 (2004) .
- 25.0408131840
Onda, M., Ota, K., Chiba, T., Sakaki, Y., and Ito, T., Analysis of gene network regulating yeast multidrug resistance by artificial activation of transcription factors: involvement of Pdr3 in salt resistance, *Gene* 332, 51-59 (2004) .
- 26.0408131851
Ichimura, T., Kubota, H., Goma, T., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Iwago, M., Kakiuchi, K., Shekhar, H. U., Shinkawa, T., Taoka, M., Ito, T., and Isobe, T., Transcriptomic and proteomic analysis of a 14-3-3 gene-deficient yeast, *Biochemistry* 43, 6149-6158 (2004) .
27.
Kito, K., and Ito, T., Mass spectrometry-based proteomics for quantitative description of cellular events, *Curr. Genomics* 5, 629-635 (2004) .
28.
Okamura, K., Yamada, Y., Sakaki, Y. and Ito, T., An evolutionary scenario for genomic imprinting of Impact lying between nonimprinted neighbors. *DNA Res.* 11, 381-390 (2004) .
29.
Okamura, K., Sakaki, Y. and Ito, T., Comparative genomics approach toward critical determinants for the imprinting of an evolutionarily conserved gene Impact. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 824-830 (2005) .
30.
Matsuo, R., Kubota, H., Obata, T., Kito, K., Ota, K., Kitazono, T., Ibayashi, S., Sasaki, T., Iida, M., and Ito, T. The yeast eIF4E-associated protein Eap1p attenuates GCN4 translation upon TOR inactivation. *FEBS Lett.* 579, 2433-2438 (2005) .
31.
Miura, F., Uematsu, C., Sakaki, Y. and Ito, T., A novel strategy to design highly specific PCR primers based on the stability and uniqueness of 3'-end subsequences, *Bioinformatics* 21, 4363-4370 (2005) .
32.
Titz, B., Seesandra, T., Rajagopala, S.V., Chiba, T., Ito, T. & Uetz, P., Transcriptional activators in yeast, *Nucleic Acids Res.* 34, 955-967 (2006) .
- 33.0111292109
Yeast Interacting Proteins Database