

生体分子ネットワーク・パスウェイの定量計測技術と攪乱法の開発

●伊藤 隆司¹⁾ ◆住本 英樹²⁾

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

<研究の目的と進め方>

生命システム理解の第一歩は構成要素の同定であり、オームクスは網羅的な要素同定の為の努力である。要素同定に続くのが要素間の相互作用の同定であり、我々はその為にインタラクトーム解析を行ってきた。今後ともこうした網羅的解析にはこだわり続けていくが、それと同時に相互作用に基づく生体分子のネットワーク・パスウェイの動態理解とその生物学的意義付けも目指さねばならない。その為には、時間・空間分解能を備えた定量的な計測技術が必要だし、系を攪乱する方法論の開発も重要である。

このような認識に基づいて、これらの技術の開発を今回の研究の目的とする。具体的には、1) 遺伝子発現、2) 蛋白質間相互作用、3) 蛋白質翻訳後修飾、4) 細胞内代謝産物を対象に、絶対定量性・網羅性・リアルタイム性に重点を置いた技術開発を進め、それぞれの項目に関して独自の技術・方法論の確立を目指す。

と同時に、これらの技術を用いたキイ分子・キイイベントの精緻な計測と細胞応答の包括的観測の双方を組み合わせた解析を代謝ストレス応答や細胞極性を対象に進めたい。

<2007年度の研究の当初計画>

1) 遺伝子発現

新しい発現絶対定量法として、また転写単位同定法として454DNA シークエンサーによるクローニング・フリーの PET (Paired-End-Tag) 収集法の開発を進める。

また、酵母完全長 cDNA 解析 (PNAS 103, 17846-17851, 2006) で明らかにされた非コード RNA の発現プロファイル法を工夫して、機能性分子の探索戦略を考案する。

2) 蛋白質間相互作用

昨年度までに開発した蛋白質の発現絶対定量法である PCS-MS (Peptide-Concatenated Standard-MS) (J. Proteome Res. 6, 792-800, 2007) を、階層化することで定量の大規模化を図る。さらに精製操作中の複合体構成成分の交換速度から、コア成分とアタッチメント成分の識別とその定量表現を試みる。

スプライシング・バリエントの蛋白質レベルで定量へと応用を図る。最初の標的としてヒト Noxa1 バリエントに関する PCS-MS を試みる。

3) 蛋白質翻訳後修飾

開発済の PAP-MS (Parallel Affinity Purification-MS) を脱ユビキチン化酵素変異体のプロファイリングに応用する。

4) 細胞内代謝産物

開発を進めてきた PBP (Periplasm-Binding Protein) を骨格とするセンサーの設計法を確立し、FCM による計測を行なう。また転写因子を骨格とする新しい FRET センサーの開発を試みる。特に、分析化学的手法では取り扱いの難しい不安定代謝物のセンサーの開発を試みる。最初の標的として、転写因子 MetJ をベースにした SAM センサーの開発を試みる。

<2007年度の成果>

1) 遺伝子発現

新しい発現絶対定量法として、454DNA シークエンサーをプラットフォームとするクローニング・フリーの PET カウント法の開発を進めた。これまでに、2本鎖 cDNA 合成、自己環状化、type IIS 制限酵素消化、タグ切り出し、454 アダプタ付加までの各反応に検討が加えられ、得られた産物のサンガー法による確認が行われた。その結果、このプロトコルが予定通りに動き、予想通りの産物が得られることが確認された。一方で問題点としては、3' 側タグの複雑度が低く、一義的にマッピング出来ないケースが少なくない点と、自己環状化ではなくて分子間での連結反応が生じている点も明らかになった。

完全長 cDNA 解析によって見出した非コーディング RNA に対しては、それらの検出を簡便化すべく、タイリングアレイを用いた発現プロファイル法を検討した。市販の Affymetrix 酵母タイリングアレイは、片側の鎖のみをカバーしており、cDNA の両鎖を標識してハイブリダイズさせることになっている。しかし、多数のアンチセンス転写物の存在を考慮すると、シグナルの鎖特異性を識別できるラベル法が要求される。我々は、第1鎖のみを標識した場合と、両鎖ともに標識した場合のシグナルを比較することで、明確に転写物の鎖特異性を識別できることを見出した。これにより、必要な場合には鎖を識別することが可能になった。

更に、我々は機能性の非コード RNA を同定する為の試みとして、前年度までに進めてきた転写因子の恒常活性化戦略を利用して、それぞれの転写因子に支配されている非コード RNA の検索を試みた。モデル系として、減数分裂を制御する転写因子である Ume6 を恒常的に活性化した一倍体細胞と、対数増殖期および減数分裂期の二倍体細胞のトランスクリプトーム比較をタイリングアレイを用いて行った。その結果、Ume6 に支配され、しかも減数分裂期に誘導される非コード RNA を同定することが出来た。これらの中には、ChIP 解析によって Ume6 が上流部分に結合することが確認されているものも認められ、今後それらの機能を解析することでこの戦略の有効性を実証したい。

2) 蛋白質間相互作用

PCS-MS に関しては、Cyclin-Cdk28 複合体に関する定量システムを構築した。この系では、Cdc28 と 9 種類の Cyclin、そして 2 種類の Cdk inhibitor (Sic1, Csk1) を定量的に計測できる。このシステムを同調培養した細胞集団に適用することで、細胞周期の進行に伴う Cyclin-Cdk 複合体の化学量論的構成の変動を初めて定量的に明らかにすることが出来た。

こうした相互作用の定量的解析に加えて、その速度論的性質を明らかにする手法も開発した。この手法では、解析対象の複合体の構成因子にアフィニティタグがノックインされた細胞を安定同位元素で標識する (SILAC)。一方でタグを持たない親株を通常の培地で培養する。この両者を等量混合してから、アフィニティ精製を行い質量分析に供する。複合体の構成因子がいずれも安定に

結合しているものであれば、それぞれに由来するペプチドは全てが“重いペプチド”になる。ところが、ダイナミックな構成因子は、抽出液中で精製工程中に交換反応を起こしてしまうので、平衡に達するような極端な場合にはその50%が“軽いペプチド”に置換される。この方法は、精製における非特異的成分の識別を目的に開発されたI-DIRT法と操作は同様であるが、構成因子が確定している複合体に関しては、相互作用の性質が安定なものなのか、ダイナミックなものなのかを明らかにしてくれる。

実際、昨年度までに解析を行ってきた翻訳開始因子eIF2BとeIF2Bにこの方法を適用したところ、 Guaninヌクレオチド交換因子であるeIF2Bの5つのサブユニット間では交換が全く認められなかったのに対して、その基質GTPaseであるeIF2は50%が非標識分子に交換されていた。これは、酵素と基質という、この相互作用の性質をよく反映したものであった。

次に、この方法をCyclin-Cdk複合体にも適用してみたところ、CyclinとCdkの相互作用は安定であるのに対して、Cyclin-CdkとCdk inhibitorであるSic1の相互作用はダイナミックであることが示された。この場合も、複合体を機能モジュールに分割できたことになり、この方法の有効性が示された。

大規模な複合体解析の情報科学的解析から、複合体構成のモジュール構造が明らかにされつつあるが、そのデータを見るとeIF2BとeIF2はモジュールとして正しく切り分けられてはおらず、eIF2を構成する3因子が別モジュールにアサインされている。したがって、より正確な情報を得るためには、この方法が有効であると考えられた。またこの方法はPCS-MSの結果の解釈においても貴重な情報となるので、両者を上手に組み合わせることで蛋白質相互作用データを定量的に機能的に解釈することが出来ると期待される。

PCS-MSのスプライシング・バリエーション産物の定量に関しては、ヒトNoxa1のバリエーションに関するPCSを設計して、定量を行う系を構築した。

3) 蛋白質翻訳後修飾

安定同位元素標識法であるSILACと昨年度までに開発してきたPAP-MS (Parallel Affinity Purification-MS) を組み合わせたSILAC-PAP-MSの効率化を図った。SILAC-PAP-MSはユビキチンリガーゼの基質探索に有用であることをF-box蛋白質Mdm30で示してきたが、今度は更に解析が遅れている脱ユビキチン化酵素の基質探索を試みた。その結果、Ubp6欠失株においてユビキチン化が亢進する蛋白質を見出した。その後の個別解析で、この亢進が確認され、この方法の有用性が示された。

4) 細胞内代謝産物

昨年度、PBPを骨格とする低分子のFRETセンサー開発において、独自の円順列変異導入による手法を開発したが、その後もその適用例を増やして、この手法の普遍性を確認した。従来法ではセンサーとして使えなかったものも、この方法でセンサー化してきた例もあり、PBPの範囲を拡大という意味でも有効な手法として期待される。

また、分析化学的手法では取り扱いの難しい不安定な代謝物のセンサーの開発の最初の標的として転写因子MetJをベースにしたSAM(S-adenosylmethionine)センサーの開発を試みた。SAMの結合によるMetJのコンフォメーション変化のFRETによる検出は困難であったが、レポーター遺伝子の誘導には成功した。

<国内外での成果の位置づけ>

酵母完全長cDNA解析で見いだした多数の新規非コードRNA

は大いに注目を集めており、Saccharomyces Genome Database (SGD)も我々のデータを表示するトラックをブラウザから公開を開始し、森下班員と構築してきたUT Genome BrowserにもSGDからのリンクが張られることになった。また、国内の学会のみならず米国生化学分子生物学会における講演依頼や、国際誌からの総説執筆依頼などが来ており、国際的にも十分に認知されていると考える。

また、PCS-MSに関しても、定量プロテオミクスに関する総説でも取り上げられ始めるなど、次第にその認知度が次第に高まりつつある。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

454DNAシーケンサーによるクローニング・フリーのPETカウント法の開発は、シーケンサー導入の予想外の遅れによって十分な評価を行うところまで開発が進まなかった。更に、3'側タグの複雑度が低く、一義的にマッピング出来ないケースが少なくない点と、自己環状化ではなくて分子間での連結反応が生じている点が問題点として浮上した。前者はより長いタグを取り出せるtype IIS制限酵素の使用で対応し、後者に関しては反応条件の指摘化を図りつつある。

PCS-MSの階層的利用は、相互作用ダイナミクスの計測法開発に注力した為に、今年度中には達成できなかった。スプライシング・バリエーションのPCS-MSによる計測に関しては、計測系は構築できたが実サンプルの調製に手間取っている。

<今後の課題>

1) 遺伝子発現

454DNAシーケンサーによるクローニング・フリーのPETカウント法の開発は、導入されたシーケンサーを駆使して早期に完成させる。また、転写物のみならずあらゆる核酸を対象に、ユニークなアプリケーションを考案する。

2) 蛋白質間相互作用

これまでに開発した2つの手法を組み合わせ、相互作用の質と量を同時に明らかにする手法を開発する。その為には、2重に標識されたPCSが必要となるので試験管内蛋白質合成の活用も検討する。また、システム生物学上の実問題への応用を展開する。

3) 蛋白質翻訳後修飾

ユビキチン化部位の選択的検出法の開発・導入による高度化を図る。

4) 細胞内代謝物

センサーの高感度化とin vivo計測系の確立を図る。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

1. 0708031712

Sumimoto, H., Kamakura, S. and Ito, T.: Structure and function of the PB1 domain, a protein-interaction module conserved in animals, fungi, amoebas, and plants. *Science's STKE* 2007(401), re6 (2007).

2. 0801181441

Kito, K., and Ito, T.: Methods for protein-protein interactions. *Introduction to Systems Biology* (Ed. Choi, S.) pp.160-182 (2007)

2) データベース/ソフトウェア

特になし