

生体分子パスウェイ・ネットワークの定量計測技術と攪乱法の開発

●伊藤 隆司¹⁾ ◆紀藤 圭治²⁾

1) 東京大学大学院理学系研究科 2) 明治大学農学部

＜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、ゲノム解析に代表されるオーミクスはその基盤を形成するものである。要素同定に続く段階は要素間の相互作用の解明であるとの認識に基づき、我々は先駆的なインタラクトーム解析を行った。こうしたアプローチはその後発展を続け、生体分子ネットワークの全貌が次第に明らかにされつつあるが、それはまだ時間的・空間的分解能と定量性を欠いた静的なものに留まっている。生命システムの挙動を高精度に（定量的に）予測できるレベルにまで理解を深めるには、ネットワークのトポロジーだけではなく、ダイナミクスと特性をも理解する必要がある。そのためには定量性・実時間性を備えた計測技術の開発が不可欠であり、数理解析もそれに基づいたものでないと意味がない。したがって、現時点で特に重要性が高いのは、システム動態の理解につながるデータを取得できる定量的計測技術の開発であると考え、今回の研究の目的とした。またモデルから導かれる予測の実証を行うには、系にパターベーションを与えることも重要であることから、攪乱法の開発も目指した。

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した。

なお研究期間中に、研究発足時には想定されていなかった次世代シーケンス技術が登場したので、その積極的活用と独自応用技術の開発も目的に加えて研究を遂行した。

＜研究開始時の研究計画＞

1. 遺伝子発現

- ① 先行研究で有用性を実証した転写因子のキメラ化による活性化（CMA: Chimerization-Mediated Activation）を利用した遺伝子ネットワーク解析を、出芽酵母の転写因子中で最大の Zn_2Cys_6 ファミリー全体へと拡大する。
- ② 出芽酵母遺伝子の発現絶対定量法として開発に取り組んできた GATC-PCR 法を発展させて、ヒト遺伝子の発現絶対定量を試みる。

2. 蛋白質間相互作用

- ① 蛋白質複合体の構成成分の変容を、安定同位元素標識と質量分析（MS）を用いて定量的に解析する新しい実験法を確立する。

3. 蛋白質翻訳後修飾

- ① 安定同位元素標識と MS による蛋白質リン酸化の絶対定量技術を確立する。
- ② 独自のパラレルアフィニティタグ精製法と安定同位元素標識によるユビキチン化のプロファイリング法を確立する。

4. 代謝物の視覚化

- ① 細菌ペリプラズム結合蛋白質の両末端に蛍光蛋白質を連結し、基質の結合によるコンフォメーション変化を蛍光共鳴

エネルギー転移（FRET）で検出する蛍光ナノセンサー蛋白質を作成する。

＜研究期間の成果＞

1. 遺伝子発現

転写因子の人工活性化を利用した遺伝子ネットワーク解析

我々は先行研究において、転写因子の人工活性化による遺伝子ネットワークの攪乱が標的遺伝子同定における有効な手段となることを実証してきた。今回は、この手法を拡大して、出芽酵母の Zn_2Cys_6 型転写因子のうち、キメラ転写因子の発現誘導に利用する Gal4 を除く全 51 種類について CMA 株を作成し GeneChip 解析を行った。その結果、標的遺伝子が既知の 31 転写因子のうち 20 については既知標的遺伝子を誘導することができた。これらのうち 24 転写因子に関しては Young らによる ChIP-Chip 解析のデータがあるので両者の結果の比較を行った。24 転写因子中、CMA では 18 転写因子、ChIP-Chip では 9 転写因子に関して、それぞれ標的遺伝子が捉えられており、重複は 7 転写因子であった。但し、ChIP-Chip で成果の出た 9 転写因子のうち 4 転写因子は、それぞれの転写因子に関する予備知識に基づいて培養条件に工夫を加えたものである。機能未知転写因子を解析する場合には、転写因子を活性化させる条件を予め予想することは不可能なし相当に困難なので、CMA の方が格段に有効であることが示された（投稿準備中）。

同定された標的遺伝子候補群から予測された転写因子の機能に関する仮説を実証した例としては、プロピオン酸代謝との関連が示唆された機能未知転写因子 Sef1 の例を挙げることができる。SEF1 遺伝子の破壊株を作成したところ、プロピオン酸存在下で致死になることが明らかになった。更に、標的遺伝子群の上流配列解析から Sef1 結合モチーフを予測し、レポーターアッセイ、組換え Sef1 蛋白質との結合実験および ChIP 実験等によって、これがプロピオン酸存在下で Sef1 を介して遺伝子発現を誘導するシス制御配列であることを実証した（投稿準備中）。

また、後述する完全長 cDNA 解析によって明らかにされた新規非コード RNA 群の解析にも、CMA 株の応用を試みた。具体的には、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について、ゲノムタイリングアレイによる比較を行った。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 群を同定することができた。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たものも認められ、この戦略の有効性が実証された。

GATC-PCRによる出芽遺伝子発現の絶対定量

我々は、全ての遺伝子を正確に 1 コピーずつ含むゲノム DNA を共通標準物質として各 cDNA の量を定量することによって、トランスクリプトームの絶対定量を行う一般化アダプタ付加競合 PCR 法（GATC-PCR）を開発してきた。そのための独自のブラ

イマー設計法および出芽酵母トランスクリプトームの絶対定量の成果をとりまとめた論文として発表した(論文1, 12)。従来、出芽酵母のトランスクリプトームは、細胞あたり 15,000 分子の mRNA から構成されているとされてきたが、GATC-PCR の結果は 30,000 分子以上という 2 倍以上大きなサイズを示した。この差異の原因を追及したところ、Rot 解析の結果に基づいて mRNA のコピー数を算定する際に、細胞あたりの総 RNA 量が過少に見積もられていたことが主な原因であることが判明し、この 30 年にわたって信じられてきた値を訂正することができた。

また、森下班員によるプライマー設計法の高度化とともに、この方法をヒトゲノムに応用してヒト遺伝子の絶対定量も可能であることを確認した。

出芽酵母の完全長 cDNA 解析

ベクターキャッピング法による出芽酵母の完全長 cDNA 解析の成果を取りまとめた論文として発表すると同時に、森下班員の協力を得て UT ゲノムブラウザ (<http://yeast.utgenome.org/>) を介してデータを公開した(論文3)。この解析によって、3,599ORF を含む 3,638 既知遺伝子に関して 11,575 の転写開始点(TSS)を同定し、出芽酵母では大半の遺伝子が複数の TSS を持つことを明らかにした。また 45 個の新規イントロンを見出し、4 個の既知イントロンの位置を修正した。これらの中には、出芽酵母では報告のないオルタナティブ・スプライシングや隣接遺伝子間でのスプライシングも含まれていた。

更に、遺伝子間領域由来の新規転写単位、アンチセンス転写単位、ORF 内に TSS を持つ転写単位を、それぞれ少なくとも 667、367、348 個同定し、出芽酵母トランスクリプトームの予想外の複雑さを明らかにした。これらの結果は、SAGE やタイリングアレイ解析による結果ともよい一致を示しており、高等生物で注目されてきたゲノム全般の転写や非コード RNA の解析において出芽酵母がよいモデル系を提供すると期待される(論文11)。

クローニング・フリー GIS-PET によるトランスクリプトーム解析

上記の完全長 cDNA 解析によって、出芽酵母といえども転写物が予想外に複雑であることが分かった。更に、既知遺伝子上流にマップされた TSS であっても、その遺伝子の mRNA ではなくて CUT(Cryptic Unstable Transcript)と呼ばれる短い転写物の TSS であることが少なくないことも明らかにされてきた。プロモーター領域から読まれる CUT は、転写干渉等の機構を介して、下流に位置する遺伝子の転写に対して阻害的に働くことが示されている。したがって、上流領域にマップされた TSS の数をもって遺伝子発現量の指標とするのは単純に過ぎる解釈であるばかりか、興味深い調節機構を見落とすことにもなりかねない。

この問題は、従来までのように TSS タグのみを計数しては解決しない。それぞれの TSS がどんな転写物をコードしているのかを識別しながら、その計数が行われねばならない。理想は全ての完全長 cDNA クローンについて全塩基配列決定を行うことであるが、それは現実的には困難である。しかし、TSS に加えて転写終結点(TTS)も同時に捉えることができれば、転写単位の確定という意味では非常に大きな進展となる。ここで注意しないといけないのは、TSS と TTS のペア情報は、多様な分子種の平均や合計としてしかデータが得られないタイリングアレイや RNA-Seq では取得不可能であるという点である。

TSS と TTS を同時に捉える手法としては、GIS-PET が開発されている。しかし、この方法は、大腸菌への形質転換を複数回含むために、集団構成比が歪む危険性が高いこと、そして形質転換効率によって集団サイズ(= 独立クローン数)に限界が生じ

ること、の 2 点を回避できない。そこで、転写単位の網羅的な確定と正確な絶対定量を目的に、大腸菌へのクローニングステップを完全に排除して、形質転換による独立クローン数よりも多数の分子を計数できる次世代シーケンサをプラットフォームとする手法(クローニング・フリー GIS-PET 法)の開発に取り組んだ。

次世代シーケンサによる PET 解析は既に報告されているが、サイズが均一な集団を対象とするこれらの方法とは異なり、GIS-PET では様々な長さの cDNA から構成される集団を対象とせねばならず、サイズがヘテロな DNA 集団を対象に均一な自己環状化効率を達成することが技術的な課題となった。様々な方法を試行錯誤し、独自のエマルジョン・ライゲーション法によって一定の解決を得ることができた。その結果、二本鎖 cDNA 合成、GsuI による poly(A) 除去、ビオチン化アダプタ付加、自己環状化、type IIS 酵素切断、タグ断片回収、シーケンシングという一連の操作からなるプロトコルが確立された。現在、この方法を用いて出芽酵母の転写単位の確定が進められている。

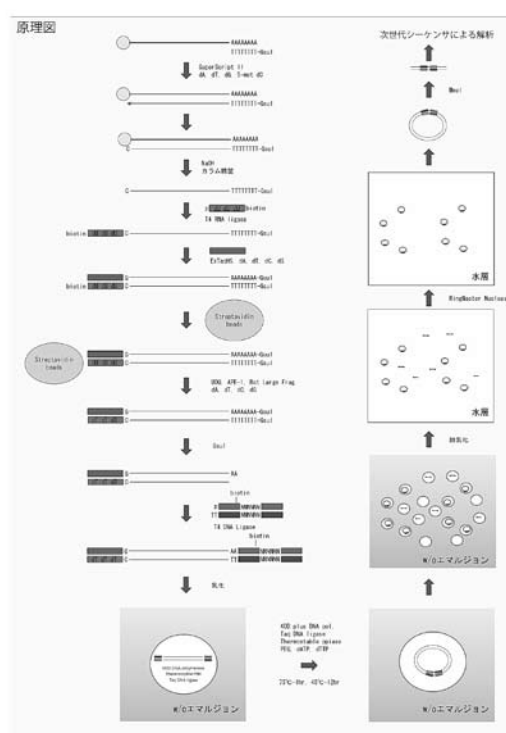


図1：クローニング・フリー GIS-PET の原理

2. 蛋白質間相互作用

PCS-MSによる複合体・パスウェイの定量解析

蛋白質間相互作用を定量的に解析するには、安定同位元素標識と MS による解析が有効な手段となる。重要な相互作用を多数同時に定量するには、多数の安定同位元素標識標準ペプチドの化学合成とサンプルへの正確な量の添加が必須であるが、これが現実問題としては相当に困難である。また既知量ペプチドを正確に添加できたとしても、標的蛋白質からの当該ペプチドの切断効率が必要しも 100% ではないために、その正確性には問題が残る。

これらの問題を解決するために、我々は定量に用いるペプチドを連結した人工タンパク質 Peptide-Concatenated Standard (PCS) を作成して用いるという着想を得た。PCS ではペプチドがコンカテネーションされて一つの分子となっているので、全ペプチドが必ず等モルでサンプルに添加される。この点に関しては、英国のグループが独立に発表した Q-Con-CAT と同様である。しかし、

PCS では各ペプチドが前後3残基のフランキンク配列を保持することで各標的タンパク質における切断効率を正確に反映するように設計されているので、切断効率の影響が相殺されて定量の正確性の向上が期待される。実際に、PCS の有用性を翻訳開始因子 eIF2B および eIF2B-eIF2 複合体の解析により実証し、論文として発表した。これにより様々な複合体や経路の変動を正確に追跡するための標準物質作成のための汎用性の高い方法論が開発された (論文 5)。

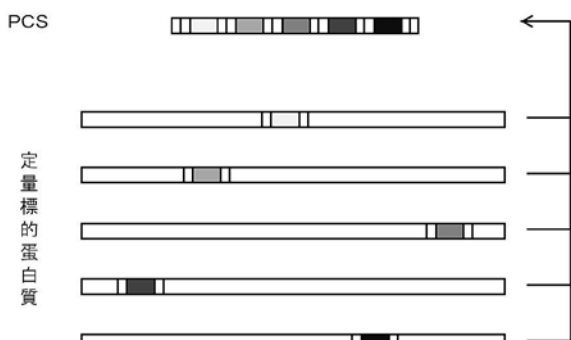


図2：PCSの原理

更に我々は、細胞周期エンジンであるサイクリン-Cdk 複合体に関する PCS-MS 定量システムを構築した。この系では出芽酵母の Cdk である Cdc28 と 9 種類のサイクリン、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サイクリン-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に成功した。

更に我々は、PCS-MS の対象となる蛋白質数を増大させること、及び定量のダイナミクスレンジを拡大することを目指して、階層的 PCS-MS の開発に取り組んだ。この方法では複数の PCS (一次 PCS) を同時に利用するが、それぞれに独自の ID ペプチドを付加しておく。これらの ID ペプチドだけを連結した二次 PCS を用いることで、それぞれの一次 PCS による計測データを正確に統合して利用する。更に一次 PCS と二次 PCS 中の ID ペプチドのコピー数の比を様々に変えておくことにより、ダイナミクスレンジを拡大することもできる。

そこで、一次 PCS に付加する ID ペプチドの設計、定量対象ペプチドの選択基準に関する基礎的検討を進めて戦略を策定した。その上で、酵母の粗抽出液を LC-MS/MS 解析して得た 159 蛋白質 / 1006 ペプチドから、様々な基準に応じて定量に適した 64 蛋白質 / 105 ペプチドを選択した。各ペプチドの同定回数から推定された発現量に基づいてこれらを 5 つのグループに分け、それぞれに独自の ID ペプチドを持った 5 種類の PCS を設計し、安定同位元素標識体として調製した。更に、これらの ID ペプチドを、コピー数を変えながら連結した二次 PCS を設計して、非標識体として調製した。これらを組み合わせた階層的 PCS-MS 計測を行い、64 種の蛋白質の定量に成功した。これにより、定量蛋白質数を増大させるとともに、計測のダイナミクスレンジを従来の 10 倍程度から 100 倍程度にまで拡大することにも成功したことから、階層的 PCS の proof-of-concept を示すことができたと考えている (投稿準備中)。

蛋白質間相互作用の安定性の解析

相互作用の化学量論比の定量に加えて、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 SILAC 法で安定同位元素標識する。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 LC-MS 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のか、ダイナミックなのかを明らかにしてくれると期待される。

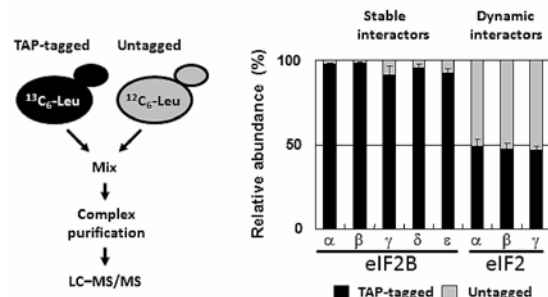


図3：安定な相互作用とダイナミックな相互作用の識別

実際に、翻訳開始因子 eIF2B と eIF2 の超複合体にこの方法を適用したところ、グアニン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 の 3 つのサブユニットでは 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、この方法をサイクリン-Cdk 複合体に適用したところ、サイクリンと Cdk の相互作用が安定であるのに対して、サイクリン-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る。以上の結果は、この方法の有効性を示すものと考えられた (論文 7)。

3. 蛋白質翻訳後修飾

リン酸化の定量

GCN 経路の制御の中心となる eIF2 α の Ser-51 のリン酸化をモデルに、脱リン酸化処理による非リン酸化型ペプチドの増加を計測することによって、標的部位のリン酸化を定量する方法を開発した。この方法を精製した eIF2B に適用して、細胞内全体の eIF2 α のリン酸化レベルと eIF2B と複合体を形成している eIF2 α のリン酸化レベルとをアミノ酸飢餓刺激の有無で計測した。

ユビキチン化の解析

独自のパラレルアフィニティタグ精製法 (PAP) によるユビキチン化蛋白質の網羅的同定法を開発した。PAP では、それぞれ異なるアフィニティタグで標識された 2 種類のユビキチンを同一細胞内でパラレルに発現させる。その上で、それぞれのタグに対するアフィニティ精製を行うことで、双方のタグ付加ユビキチンを併せ持つ分子のみを選択的に精製する。これにより、大量に存在する遊離のユビキチンやモノユビキチン化蛋白質を除去して、ポリユビキチン化蛋白質 (及びマルチプルモノユビキチン化蛋白質) を選択的に濃縮することができる。こうして得た PAP 画分を質

量分析に供すると (PAP-MS)、効率的にユビキチン化蛋白質を同定することができる (論文 8)。

この PAP-MS 法を安定同位元素標識法と組み合わせて用いることで (SILAC-PAP-MS)、野生株とユビキチンリガーゼ (E3) の変異体の比較を行った。モデル実験で既知基質を同定できることが確認できたので、基質未知 E3 の解析を行なった。その結果、F-box 蛋白質 Mdm30 を含む SCF 複合体 SCF(Mdm30) の基質候補としてミトコンドリア外膜蛋白質 Mdm34 が同定された。詳細な機能解析実験の結果、両者の酵素基質関係が実証され、更にそれがミトコンドリアの維持に重要であることも明らかになり、本アプローチの有効性を実証することができた (論文 11)。また、この方法を出芽酵母の脱ユビキチン化酵素 16 種の欠失株にも適用して、基質候補の組織的同定を進めている。

これに関連して、最大の E3 ファミリーを形成する SCF 複合体の構成が様々な条件で再編されるか否かを SILAC-MS で解析した。その結果、diauxic shift によって F-box 蛋白質 Saf1 を含む複合体 SCF(Saf1) が増えること、基質 Met4 の過剰発現によってそのユビキチン化を触媒する SCF(Met30) 複合体が増えることを明らかにして、SCF 複合体によるユビキチン化システム構成の可塑性を示した (論文 14)。また、SCF 複合体のコア因子 Cdc53 の NEDD8 化が、SCF 複合体構成因子間の相互作用を安定化することを見出した (投稿準備中)。

4. 代謝物の視覚化

ヒスチジンをリガンドとする大腸菌のペリプラズム結合蛋白質 (PBP) である HisJ を骨格とするナノセンサー蛋白質 FLIP-His (Venus-HisJ-ECFP) を開発した。更に細胞内 His 濃度に応答可能なように、Kd を増大させる変異を導入した。その過程で各種アミノ酸に対する Kd を計測したところ、予想外にも HisJ がサブ mM の Kd で Gln と結合することが判明した。そこで His と His J の複合体の X 線構造解析データに基づくドッキングシミュレーションを行い Gln の結合様式を予測した。この結果に基づいて、His との結合には影響を与えず、Gln の結合を不安定化する変異を予測し、事実上 Gln に殆ど結合しないセンサーの開発に成功した。

FLIP-His センサーおよびその誘導体はダイナミクスレンジが小さいものが多く、in vivo での信頼性の高い計測には不向きであった。その改善のため、宮脇班員によって開発された cpVenus (circularly permuted Venus) の利用、リンカーの改変など、種々の方策を試みたが、いずれによっても改善は得られなかった。また、他の 5 種類のアミノ酸を認識する PBP についてもセンサー化を試みたが、そのうち 3 種類ではリガンド結合による FRET 効率の変化が全く観察されず、センサーとして機能しないことが分かった。

PBP は 2 つの lobe からなり、そのヒンジに近い部分でリガンドと結合する。結合により lobe が大きく移動するが、HisJ などの PBP では N 末端と C 末端が同一 lobe に存在しているために、両末端に付加された Venus と ECFP の距離には大きな変化が生じず、ダイナミクスレンジが大きくなると考えられた。

そこで、HisJ に円順列変異を加えることで、N 末端と C 末端が別々の lobe に存在するような蛋白質 cpHisJ を作成できれば、大きなダイナミクスレンジを持つセンサーを開発できる可能性があると考えた。

実際に、cpFLIP-His (Venus-cpHisJ-ECFP) を作成したところ、ダイナミクスレンジの拡大が認められた。更に、通常の方法では全く機能しなかった 3 種の PBP を含めて、テストした 6 種の PBP の全てにおいてダイナミクスレンジの拡大に成功した。

したがって、cpPBP (circularly permuted PBP) を用いるこの手法は一般性の高いものであり、FRET センサー化できる PBP の範囲を拡大する上でも有効な手法になると考えられた (論文 13)。蛍光蛋白質ではなくて FRET センサーの骨格分子自体に円順列変異のような大胆な改変を加えた例はこれまでになく、その意味でも独創的な手法であると云えよう。

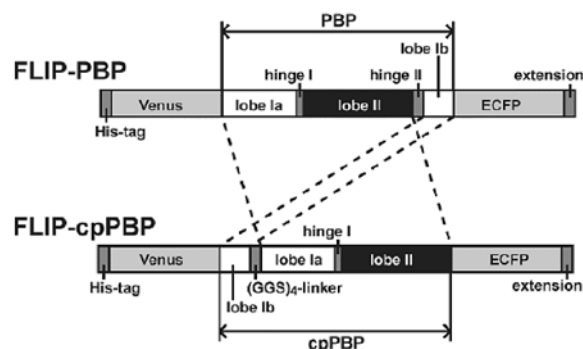


図 4 : cpPBP を利用した代謝物 FRET センサーの開発

一方、計測手法に関しては、フローサイトメーターによる計測に成功し、統計処理に耐え得る数のデータを迅速かつ高感度に取り得る方法を確認した。これを用いて細胞質内 His 濃度の計測を行い、環境中の His 濃度変化に伴うインフラックスの観察、アミノ酸飢餓刺激に伴う細胞内アミノ酸濃度変化と GCN 経路活性化による eIF2 α リン酸化の同時計測などを行った。更に、TOR 経路の阻害剤であるラパマイシンに対する応答の計測に端を発して低温や DNA 傷害等のストレス下での計測を行い、細胞内 His 濃度変化が翻訳速度ときれいな逆相関を示す結果を得た。

一方で、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のモデルとして、大腸菌の転写因子 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を FRET で検出することはできなかったが、人工遺伝子回路を用いたセンサーシステムの開発に成功した。これを用いて、更に様々な論理ゲートの構築にも成功した。

<国内外での成果の位置づけ>

完全長 cDNA 解析による出芽酵母の TSS データは、様々な解析におけるリファレンスデータとして活発に利用されている。Saccharomyces Genome Database (SGD) も我々のデータを表示するトラックを作成して公開を開始しており、UT Genome Browser にも SGD からのリンクが張られた。それと同時にこの解析の過程で明らかにされた多数の新規非コード RNA も注目を集めており、米国生化学分子生物学会における講演や、国際誌の総説執筆を依頼されるなど、国際的にも十分に認知されている (論文 10)。また、遺伝子発現の絶対定量に関しては、発表論文が highly accessed の認定を受けた (論文 12)。

PCS-MS は蛋白質の絶対定量のユニークな手法として注目されており、国内外から総説執筆を依頼された (論文 9)。また、蛋白質間相互作用の安定性を計測する手法を報じた論文は、掲載誌である Proteomics 誌において注目論文と認定され、筆頭著者である分担研究者は同誌の PodCast に出演した。

SILAC-PAP-MS によるユビキチン化酵素の基質探索を報じた論文は発表直後にも拘わらず Science 誌のユビキチン関連のニュース記事にも引用されるなど注目されている (論文 11)。

円順列変異導入 PBP による FRET センサーの設計法に関する論文は、掲載誌である Protein Science 誌において注目論文として採りあげられた（論文 13）。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

1. 遺伝子発現

転写因子人工活性化による遺伝子ネットワークの攪乱解析では、有効な結果が得られたものもある一方で、標的遺伝子候補が全く検出できないものもあった。極めて近縁の転写因子のペアであっても、一方がうまく機能するのに対して他方が全く機能しないなど、予想外の困難を経験した。キメラ蛋白質の安定性、核への移行など、考えられる可能性に検討を加えたが、その原因は把握できなかった。また、それとは逆に全く予想外の経路を活性化してしまう例もあったことから、人工産物を含む可能性も否定はできない。また生理的な標的遺伝子群を同定できた場合でも、それら以外の標的遺伝子候補については説明を付けることが難しかった。

GATC-PCR 法は、プライマー設計の高度化によってヒトゲノムに適用することは可能であったが、制限酵素部位や周辺配列による影響が大きいため、その汎用性は高くないと判断された。また、出芽酵母といえどもゲノムの転写パターンが予想外に複雑であることが明らかになり、転写物中の一点のみを捉えた計測では複数種の転写物を同時に計測しようケースも少なくないことが判明した。そこで転写単位（転写範囲）を確定しつつ、定量できる手法が必要と考えて、GIS-PET の開発に研究の方向を転換した。

GIS-PET に関しては、バイアスを除き次世代シーケンサのパワーを活かすために大腸菌へのクローニングを排除し、転写物のサイズによらず均一のタグ取得効率を得るために独自のエマルジョン・ライゲーション法を考案した。しかし、現時点では出発材料として 25 μ g の全 RNA が必要とされる上に、タグを最終的に PCR で増幅する必要がある。より正確な定量のためには PCR 増幅を行わない手法が望ましく、様々なサンプルへの適用には出発材料の量を減少させることが望ましい。この 2 点に関しては、現在の技術レベルではまだ達成できていない。

2. 蛋白質相互作用

PCS-MS という独自の手法を開発し、それを階層化することで大規模化の目途も立った。PCS に用いるペプチドの選定に関しては、現時点では個々の蛋白質の MS スペクトルを取得してから選択しており、情報科学的に最適のペプチドを選択できるような仕組みが望まれる。

PCS-MS は、原理的にはスプライシングバリエントの蛋白質産物の定量にも応用が可能である。様々なバリエントにコードされる蛋白質が本当に蛋白質として安定に存在するか否かは疑問が持たれているところであるが、実際に検証された例は少ない。そこでいくつかのモデル遺伝子についてその検証を試みたが、PCS に適したペプチドが選択できない等の理由で計測できないバリエントが生じてしまい、汎用性には問題があることが分かった。

3. 蛋白質翻訳後修飾

ユビキチン化の解析においては、圧倒的に大量のユビキチン由来ペプチドの共存下での基質由来ペプチドの安定な検出と検索にはしばしば困難が伴い、なかなか網羅性が上がらないという問題を抱えている。ユビキチンが付加された部位のペプチドを選択的に濃縮する方法も何種類か試みたが、実用には至っていない。

4. 代謝物の視覚化

PBP を骨格とするセンサーの設計においては、PBP 本体に円順列変異を導入する汎用性の高い独自手法を確立した。しかし、立体構造とドッキングシミュレーションによる特異性の改善に関しては、最初の一例は成功したものその後の例では成功せず、信頼性の高い手法とは言い難かった。また、ダイナミクスレンジ拡大のためのリンカー部分の最適化に関しても、分子動力学シミュレーション等も行ったが成果は芳しくなかった。このため、基本デザインの部分においては汎用性の高い手法を確立できたものの、実用レベルまでの性能改善に関しては依然として試行錯誤に頼らざるを得ない状況を打破できていない。

＜今後の課題、展望＞

1. 遺伝子発現

今後の方向性としては、クローニング・フリー GIS-PET の完成と洗練を目指すことになる。特に出発材料の量を低下させることが重要である。第 3 世代シーケンサによる長鎖の解析が実用化されるまでは、この手法が大きな意味を持つと考えられるので、その開発を急ぎたい。

また転写物以外にも、サイズがヘテロな DNA 集団からの PET 解析には、この技術が応用できる。具体的には、マイクロコッカルヌクレアーゼ消化におけるヌクレオソーム調製時に高分子量のまま残る分画の解析や、がん細胞における染色体転座の転写物レベルでの検出等に有効であると考えられる。

2. 蛋白質間相互作用

PCS の設計は計測に適したペプチドがあるか否かに依存しており、計測したいペプチド（例えばオルタナティブなスプライス・ジャンクションを跨いだペプチド）が確実に計測できるわけではない。この問題を克服しないと完全に汎用的な技術にはならないので、化学修飾によるイオン化効率の改善などの手法の開発が望まれる。また、通常のペプチドのみならず、リン酸化等の翻訳後修飾を受けたペプチドの計測への応用も今後の課題であろう。そのため、大腸菌あるいは試験管内で修飾蛋白質を合成する必要がある。特殊なコドンと改変 tRNA を利用して修飾アミノ酸を導入する技術も開発されつつあるので、それらを取り入れてゆくことも重要な課題となるであろう。

また、PCS を用いて各パスウェイの構成を定量的に計測することが可能になってきたので、今後は実問題への適用に焦点が移ってゆく。当然、様々な刺激による変動の解析も行われるが、生育環境が異なる近縁種の解析にも興味深いものがある。同一パスウェイを構成する因子間の構成成分比は進化の過程で保存されているのか、異なっているのか、定量的データからパスウェイの進化を考えることが可能になると期待される。

3. 翻訳後修飾

ユビキチン化システムの全貌はまだ不明であり、特に酵素基質関係の解明は依然として大きな課題のまま残されている。SILAC-PAP-MS によるアプローチは其中で一定の役割を果たすと期待される。特に脱ユビキチン化に関してはその有効性を示す結果が得られつつあり、質量分析計自体の進歩や高度化とも相俟って今後の展開が期待される。

4. 代謝物の視覚化

代謝物の視覚化は、時間・空間分解能という現在のメタボローム解析の弱い部分を補うものであり、システムの挙動を把握する上で重要なテーマであろう。FRET のみならず、様々な蛍光蛋白

質を用いた技術との組み合わせが期待される。また骨格となる PBP については、メタゲノム解析の進展で様々なメンバーが見出されてくると期待される。それらの中から標的低分子を予測できるようにになれば、その有用性を一段と高めることが可能になる。また、特定のリガンドを認識できる人工 PBP の設計例も報告されている。こうした両方向からのアプローチによって、PBP が認識できる低分子リガンドのレパートリーは、今後ますます拡大すると期待される。したがって、我々の開発した FLIP-cpPBP によるセンサー設計法もその応用の機会が増大するものと期待される。

一方で SAM のセンシングシステムに関しては、人工遺伝子回路との融合によって、論理演算処理を含んだ内在性代謝物動態の高度なモニタリングという新しい視点が拓けつつある。これにより、細胞周期によってその濃度が変動する SAM に関して、その最大濃度をレポートするシステムの構築も可能になると考えられる。濃度が変動する代謝物に関してその最大値をレポートするシステムは、同調培養等の複雑な手順を用いずに高生産株をスクリーニングできるという意味で実用的にも意義が大きい。また、有用代謝物 SAM の濃度が標準株よりも高いが、関連する有害代謝物である硫化水素が低い株を選択する等々の複雑なスクリーニングも可能になる筈であり、まずはその proof-of-concept を示すことが今後の重要課題と考えている。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文

1. 0601231913

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)

2. 0608051211

Titz, B., Thomas, S., Rajagopala, S., Chiba, T., Ito, T. and Uetz, P.: Transcriptional activators in yeast, *Nucleic Acids Res.*, 34, 955-967 (2006)

3. 0612231206

Miura, F., Kawaguchi, N., Sese, J., Toyoda, A., Hattori, M., Morishita, S., and Ito, T.: A large-scale full-length cDNA analysis to explore the budding yeast transcriptome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 17846-17851 (2006)

4. 0612231223

Yamaguchi, Y., Ota, K. and Ito, T.: A novel Cdc42-interacting domain of the yeast polarity establishment protein Bem1: implications for modulation of mating pheromone signaling, *J. Biol. Chem.*, 282, 29-38 (2007)

5. 0612231238

Kito, K., Ota, K., Fujita, T. and Ito, T.: A synthetic protein approach toward accurate mass spectrometric quantification of component stoichiometry of multiprotein complexes, *J. Proteome Res.*, 6, 792-800 (2007)

6. 0708031712

Sumimoto, H., Kamakura, S. and Ito, T.: Structure and function of the PBI domain, a protein-interaction module conserved in animals, fungi, amoebas, and plants, *Sci. STKE*, 2007, re6 (2007)

7. 0804301926

Kito, K., Kawaguchi, N., Okada, S. and Ito, T.: Discrimination between stable and dynamic components of protein complexes

by means of quantitative proteomics, *Proteomics*, 8, 2366-2370 (2008)

8. 0804301932

Ota, K., Kito, K., Iemura, S., Natsume, T. and Ito, T.: A parallel affinity purification method for selective isolation of polyubiquitinated proteins, *Proteomics*, 8, 3004-3007 (2008)

9. 0804301937

Kito, K. and Ito, T.: Mass spectrometry-based approaches toward absolute quantitative proteomics, *Curr. Genomics*, 9, 263-274 (2008)

10. 0806242224

Ito, T., Miura, F. and Onda, M.: Unexpected complexity of the budding yeast transcriptome, *IUBMB Life*, 60, 775-781 (2008)

11. 0812291820

Ota, K., Kito, K., Okada, S. and Ito, T.: A proteomic screen reveals the mitochondrial outer membrane protein Mdm34p as an essential target of the F-box protein Mdm30p, *Genes Cells*, 13, 1075-1085 (2008)

12. 0812291831

Miura, F., Kawaguchi, N., Yoshida, M., Uematsu, C., Kito, K., Sakaki, Y. and Ito, T.: Absolute quantification of the budding yeast transcriptome by means of competitive PCR between genomic and complementary DNAs, *BMC Genomics*, 9, 574 (2008)

13. 0911131942

Okada, S., Ota, K. and Ito, T.: Circular permutation of ligand-binding module improves dynamic range of genetically encoded FRET-based nanosensor, *Protein Sci.*, 18, 2518-2527 (2009)

14. 0911131946

Kato, M., Kito, K., Ota, K. and Ito, T.: Remodeling of the SCF complex-mediated ubiquitination system by compositional alteration of incorporated F-box proteins, *Proteomics*, in press.

2) データベース / ソフトウェア

1. 0911131947 (データベース)

Annotation Rating Tool (ART), 遺伝子発現データ等の解釈支援
<http://itolab.cb.k.u-tokyo.ac.jp/ART/ART.pl>

2. 0911131949 (データベース)

Gene function HOmology Search Tool(GHOST), 遺伝子発現データ等の解釈支援
<http://itolab.cb.k.u-tokyo.ac.jp/GHOST/GHOST.pl>

3) 著書

1. 0801181441

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