

機能性タンパク質の解析評価システムの開発

研究統括 横浜市立大学大学院生体超分子科学専攻 西村 善文

【目的】

本プロジェクトではポストゲノム科学研究の重要な課題であるタンパク質の機能を解明するとともに、合理的な薬物設計や機能性食品創成のためのタンパク質の分子間相互作用を解析し評価するシステムの開発や薬物基盤データの開発を目指した。タンパク質は各々が非常に特徴的な機能を有する。膜タンパク質や接着分子は膜にある。膜は油っぽく水に溶けにくい。膜外は酸化状態、細胞内は還元状態で酸素が少ない状態である。核内には DNA があり、そこで転写因子等が働いている。ゲノムプロジェクトにおける DNA の塩基配列の解析の場合とは異なり、ある一つの技術で特定のタンパク質の機能が解析できたからといって、その技術がすべてのタンパク質に適用できるわけではない。各タンパク質特有の機能を解析するシステムを作る必要がある。

タンパク質のネットワークを理解するためには、タンパク質と他の分子との相互作用を解析する技術が必要である。接着分子や分泌系のタンパク質を同定する技術の開発、シグナル伝達因子を同定する技術の開発、テロメア関連タンパク質や転写因子等 DNA に結合するタンパク質を同定する技術の開発といった、多面的なタンパク質同定技術を開発することを目指した。

プロジェクトの発足当時は、横浜市立大学大学院総合理学研究科の西村が研究統括、大阪大学蛋白質研の阿久津教授と横浜市立大学大学院総合理学研究科の白川教授が膜タンパク質と NMR 技術解析の研究、横浜市立大学大学院総合理学研究科の明石助教授は質量分析によるタンパク質の相互作用の研究、東京工業大学大学院生命理工学研究科の石川教授は染色体末端（テロメア）を中心としたゲノムダイナミクスに関するタンパク質の機能解析、横浜市立大学医学部の大野教授はシグナル伝達タンパク質の機能解析、横浜市立大学木原生研の宮崎教授は細胞接着因子や分泌タンパク質の機能研究を行う事とした。さらに横浜市立大学大学院総合理学研究科の古久保教授、木寺教授、岩崎助教授、廣明助教授も各テーマ内で参画した。

地域結集型共同研究の 1 つのテーマだった膜タンパク質に関しては、平成 16 年度から阿久津教授を領域代表とし白川教授（現京都大学大学院工学研究科教授）などがグループリーダーの「生命秩序の膜インターフェイスを制御するソフトな分子間相互作用」の特定研究（平成 16-21 年度）へと本格的に発展することになった。本事業では一部 NMR 技術解析に関して廣明助教授が担当した。テロメアを中心としたゲノムダイナミクス担当の石川教授はその後京都大学に移り、京都で本格的に研究を開始されたので、地域結集型共同研究ではテロメアの機能研究を静岡大学の上野助手（現広島大学大学院理学研究科助教授）が引き継いだ。さらにタンパク質同定チップに関しては横浜市立大学木原生研の平野教授が独立したチームとして研究を開始したが、そのテーマを地域新生コンソーシアム研究開発事業「疾患関連タンパク質ネットワークのハイスループット解析技術の開発」へと発展させた。さらに東京工業大学大学院生命理工学研究科の関根教授、清尾助教授が DNA チップ用の核酸合成法の開発で新たに本事業に参加した。また地域結集型のテーマを更に発展させるために、今年度から西村を代表として大野教授と平野教授を分担者とした都市エリア産学官連携促進事業「新技術システムを用いた疾患細胞動態プロテオミクスの応用」が始まり、本事業の一部を更に発展させることにした。以下本事業について各個別テーマごとに概略する。

【進捗状況】

1-1 タンパク質回収フロー型自動 NMR 測定装置の開発

1-1-1 DNA 結合タンパク質の構造解析・結合能の条件検討及び NMR 新技術の検証

1-1-2 DNA 結合タンパク質の構造解析を通じた NMR 新技術の検証

研究者：横浜市立大学、長土居有隆、廣明秀一、木原財団雇用研究員

参加企業：大陽日酸㈱

<本サブテーマで出願した特許>

- 1 多重複合体の化学シフトを同化する方法、多重複合体の立体構造を解析する方法、多重複合体のモデルを構築する方法、新規核酸分子及び試薬

発明者：西村善文、出願人：日本酸素、公開番号：2003-294819

- 2 新規ベクター及びその利用

発明者：廣明秀一・天野剛志・合田名都子、出願人：横浜市、出願番号：2003-308773

- 3 ヒト TFIIIE α の新規な亜鉛結合ドメインの構造的特徴および機能

発明者：西村善文・奥田昌彦・大熊芳明、出願人：JST・横浜市、公開番号：2005-245202

- 4 酵母 DSK2 のユビキチン結合ドメインとモノユビキチンとの複合体の構造的特徴および酵母 DSK2 のユビキチン結合ドメインによるモノユビキチン認識機構

発明者：白川昌宏・廣明秀一・大野綾子、出願人：横浜市・木原財団、出願番号：2004-231652

- 5 新規ベクター及びその利用

発明者：廣明秀一・天野剛志・合田名都子、出願人：横浜市、PCT 出願

- 6 出芽酵母 CHD1 クロモドメインの製造方法およびその核磁気共鳴スペクトルの利用

発明者：西村善文・奥田昌彦、出願人：横浜市、木原財団、出願番号：2004-311481

- 7 新規ベクター及びその利用

発明者：廣明秀一・天野剛志・合田名都子、出願人：横浜市大、アメリカ・カナダなど 11 カ国へ出願

<成果の概要>

真核生物の遺伝子の発現制御において、クロマチン構造の変化が大きな課題になっている。クロマチンリモデリング因子の中のクロモドメインの構造を解析した。クロモドメインは今までは特定のヒストンのメチル化リシンを認識することが知られているが、本研究で構造解析の結果全く新たな機能を有することが推察された。

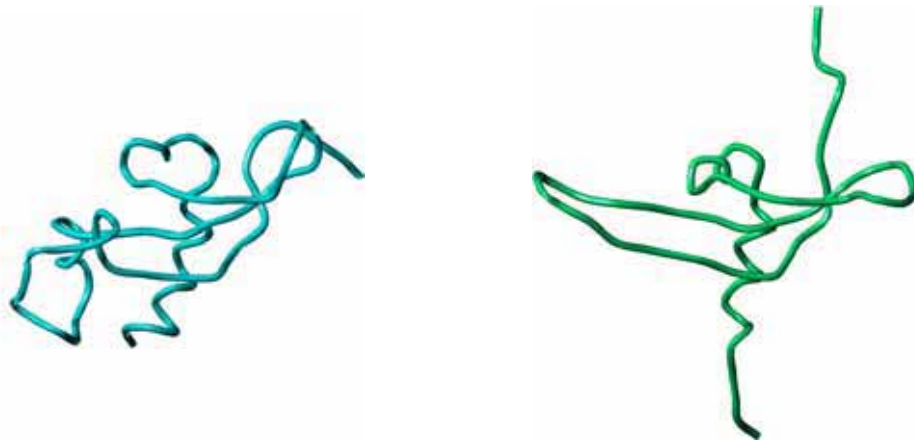


図1 クロマチンリモデリング因子の中のタンデムに並んだ2つのクロモドメインのNMRによる立体構造。両方とも構造的に新規なクロモドメインで新規な機能が推察された。

真核生物の遺伝子の発現制御においては、ヒストンのアセチル化や脱アセチル化が重要である。神経細胞特異的な転写抑制因子のNRSF/RESTは、神経特異的な遺伝子のサイレンサーに結合してコリプレッサーのSin3とヒストン脱アセチル化酵素を介して神経特異的な転写を抑制する。Sin3とNRSF/RESTの複合体構造をNMRで解析した。NRSF/RESTはがんや様々な神経関連疾病に関与しているため、本複合体構造はそれらの疾病の合理的な薬物設計に非常に重要である。

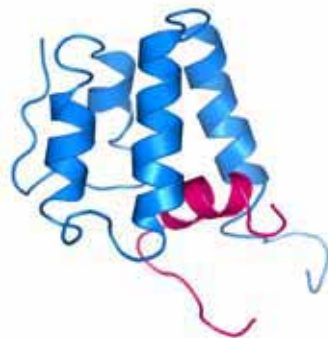


図2 NRSF/RESTとSin3の複合体構造。

1-1-3 フロー型NMR装置の構築技術の開発

参加企業：(株)資生堂、ブルカー・バイオスピン(株)、旭化成ファーマ(株)

<本サブテーマで出願した特許>

タンパク質の回収方法及びそのシステム

発明者：大久保綾・城田修、出願人：資生堂、公開番号：2004-168712

<成果の概要>

細胞機能上重要なタンパク質を迅速かつ網羅的に解析評価することは、薬物などの基盤データ開発を行う上で非常に重要である。目的のタンパク質とある低分子化合物との結合状態をフロー型NMR装置で調べた後、そのタンパク質を回収し、再び他の低分子化合物との結合状態を調べる「タンパク質回収フロー型NMR装置」を開発した。

タンパク質回収フロー型自動NMR装置

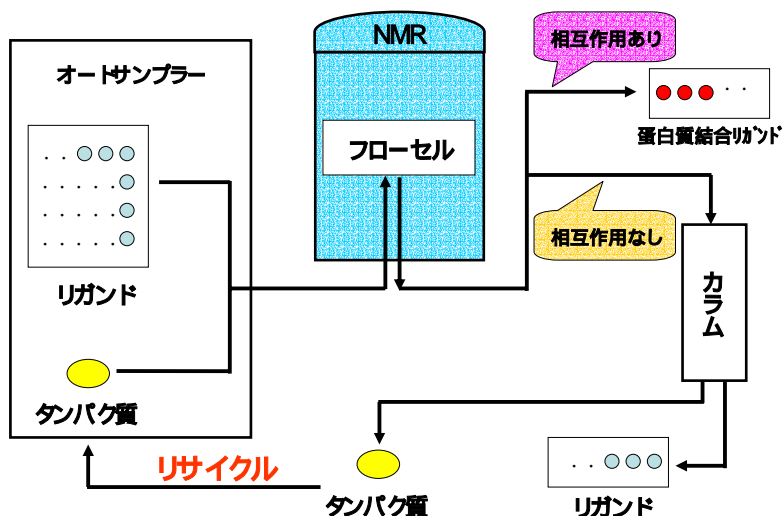


図3 タンパク質回収フロー型自動 NMR 装置の模式図

実際にこの装置を用いて DHFR を標的タンパク質として、TOCRIS 社製ライブラリー99 種のリガンドと既に結合することが知られているメトトレキサートを用いて、迅速かつ網羅的に相互作用を NMR で検討した。先ず 10 種類ずつ混合したリガンドで測定して結果、B グループのリガンドで相互作用が見つかった。あらためて B グループのリガンドを調べた結果、DHFR との相互作用既知物質が含まれていたので本システムは有効に働くことが確認された。

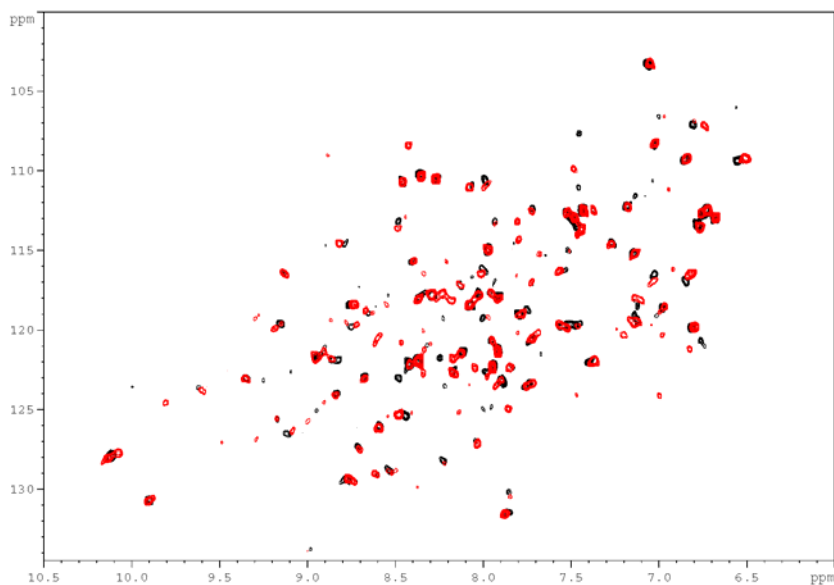


図4 実際に DHFR (ジヒドロ葉酸還元酵素) を用いてグループ B 中に DHFR と相互作用する化合物が含まれていた。グループ B の化合物を見直したところ、トリメトプリム (DHFR との相互作用既知物質) が含まれていた。(黒: DHFR、赤: DHFR+グループ B)

1-2 アフィニティー型キャピラリー電気泳動質量分析装置の開発

1-2-1 タンパク質の構造解析における質量分析関連技術の開発

研究者：横浜市立大学 明石知子、木原財団雇用研究員

参加企業：味の素(株)、キッセイ薬品工業(株)

<本サブテーマで出願した特許>

1 質量分析用ナノ・スプレーイオン化用極細管

発明者：山田尚之他、出願人：味の素(株)他、公開番号：2004-317469

2 タンパク質と DNA との複合体の結合の強さを定量的に解析する方法及び装置

発明者：明石知子・西村善文、出願人：横浜市、公開番号：2005-221263

3 アロステリックタンパク質における基質若しくはそのアナログ及び/又はアロステリックリガンドの結合部位又はその近傍を同定する方法、アロステリックタンパク質にリガンドが結合する順番を決定する方法、並びにアロステリックリガンドを検出する方法

発明者：明石知子・岡崎浩輔・百瀬傳一、出願人：横浜市・キッセイ薬品工業(株)、出願番号：2004-150601

4 質量分析計によるアミノ酸分析方法

発明者：明石知子・鈴木功一・山田尚之、

出願人：横浜市大・(株)島津製作所・味の素(株)他、出願番号：2005-363512

<成果の概要>

転写因子の c-Myb の DNA 結合ドメインと様々な DNA との複合体の親和性を、MS によってかなり定量的に得ることができた。

1-2-2 アフィニティー型マイクロチップキャピラリー電気泳動-質量分析システムの開発

参加企業：(株)島津製作所

<本サブテーマで出願した特許>

1 電気泳動分離-エレクトロスプレーイオン化法及び装置

発明者：鈴木功一他、出願人：(株)島津製作所、公開番号：2004-219247

2 微粒子充填型マイクロチップ

発明者：鈴木功一他、出願人：(株)島津製作所、出願番号：2004-308790

<成果の概要>

アフィニティー電気泳動部位に受容体・抗体・酵素などのタンパク質や核酸、医薬品などの低分子化合物を結合させ、結合させた物質に親和性を持つ物質（タンパク質・アミノ酸・核酸など）を網羅的・短時間に検出・同定し、結合の強さに関する情報を合わせて得る。創薬のみならず、食品・化粧品業界など広い分野における研究開発の加速化に役立つ。

1-3 DNA 結合タンパク質同定装置の開発

1-3-1 DNA 結合タンパク質の構造解析・結合能の条件検討及び新技術の検証

1-3-2 DNA 結合タンパク質の構造解析を通じた新技術の検証

研究者：広島大学 上野勝、横浜市立大学 長土居有隆・古久保哲朗・岩崎博史・木寺詔紀、木原財団雇用研究員

参加企業：(株)パイケーキ

＜本サブテーマで出願した特許＞

- 1 テロメア DNA とヒト TRF1 複合体の立体構造の利用
発明者：西村善文、出願人：味の素、公開番号：2003-135087
- 2 真核生物のテロメアの長さを調整する方法
発明者：上野勝、出願人：JST、公開番号：2005-168354
- 3 遺伝子発現制御方法及びそれに使用する核酸及びポリペプチド
発明者：古久保哲朗、出願人：横浜市、公開番号：2005-224116
- 4 テロメアタンパク質 TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質、テロメア DNA 変異体及び TRF2 DNA 結合ドメインと二重らせん DNA との複合体構造の利用
発明者：西村善文・花岡慎悟、出願人：JST・横浜市、公開番号：2005-229957
- 5 テロメアタンパク質 TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質、テロメア DNA 変異体及び TRF2 DNA 結合ドメインと二重らせん DNA との複合体構造の利用
発明者：西村善文・花岡慎悟、出願人：横浜市大・木原財団、PCT 出願

＜成果の概要＞

テロメアタンパク質の TRF2 とテロメア二重らせん DNA との複合体の構造を NMR 法で決定した。TRF1 とテロメア二重らせん DNA との構造と比較して、TRF2 と TRF1 の認識様式を比較した。

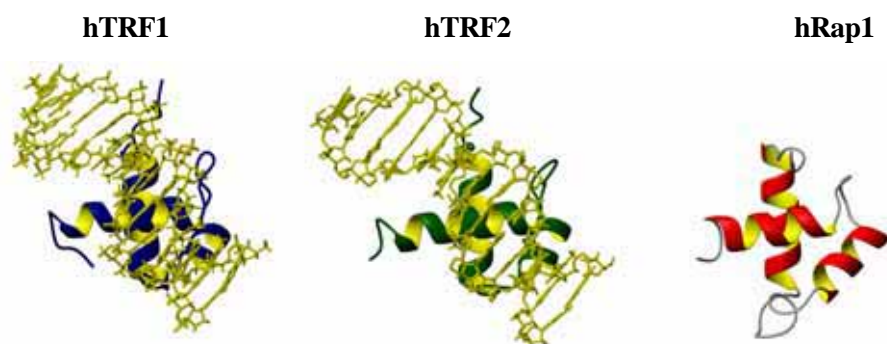


図5 テロメアタンパク質の hTRF1 および hTRF2 の Myb ドメインとテロメア DNA との複合体構造とテロメアタンパク質 hRap1 の Myb ドメインの構造

TRF1 と TRF2 のアミノ酸は 50%以上異なっているが、構造比較の結果 TRF2 の 4 個のアミノ酸のみを TRF1 型に置換することによって TRF2 の DNA 結合能を TRF1 型に変換することに成功した。TRF2 のテロメア二重らせん DNA 結合能が、野生型より非常に強い変異体を作成できた。

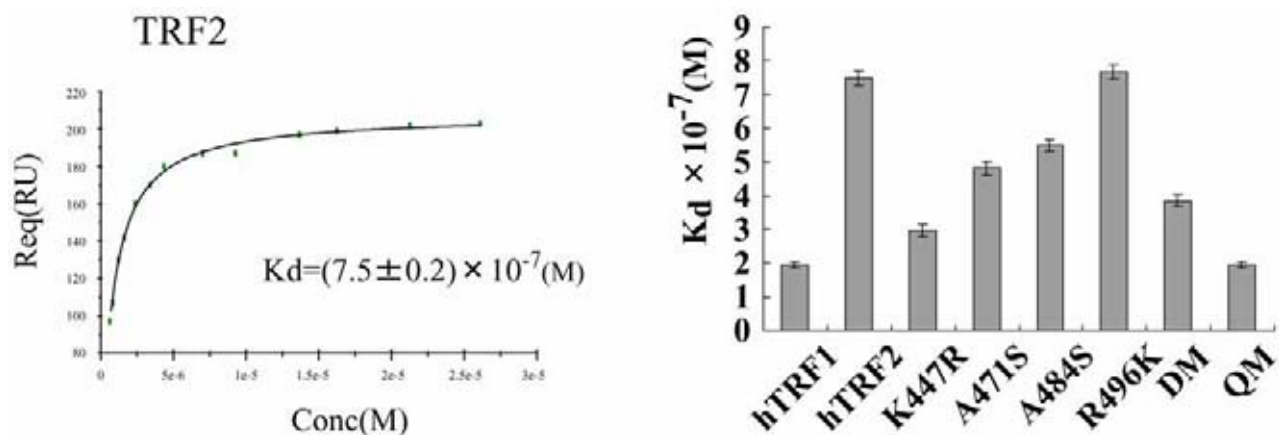


図6 テロメアタンパク質のhTRF1、hTRF2およびhTRF2の変異体のテロメアDNAとの解離定数

さらにヒト cDNA ライブラリーからの核内タンパク質の網羅的発現の構築を試みた。実験的な核局在シグナル (NLS) を持つ 725 遺伝子を横浜市大木寺研の協力で選択し、東大医科研菅野研のヒト cDNA ライブラリーから 315 クローンを得た。その内 96 クローンを小麦胚芽無細胞発現系での全長発現チェックを行ったところ、65 クローンのタンパク質の全長発現を確認した。これらのタンパク質を大量調製するために、その内先ず 11 クローンで全長やドメインの発現を大腸菌で行った。37 大腸菌発現ベクターを作成し、11 クローン由来の 27 発現ベクターでタンパク質の発現を確認し、9 クローン由来の 18 発現ベクターで可溶性画分に回収した。

1-3-3 二重鎖 DNA チップの開発

参加企業：日立ソフトウェアエンジニアリング(株)

<本サブテーマで出願した特許>

- 1 イオン性高分子同定用高分子チップを用いた結合定数及び解離定数の算出方法
発明者：西村善文・村井洋志・中尾素直・森田敏樹、
出願人：日立ソフトウェアエンジニアリング(株)、公開番号：2004-117201
- 2 イオン性高分子同定用高分子チップを用いた結合定数及び解離定数の算出方法
発明者：西村善文・村井洋志・中尾素直・森田敏樹、
出願人：日立ソフトウェアエンジニアリング(株)、
アメリカ・イギリス・ドイツ・フランスへ出願
- 3 核酸の立体構造を推定する方法
発明者：西村善文、出願人：横浜市、公開番号：2005-185135

<成果の概要>

現在転写因子が結合する特異的な DNA 配列は、各個別の転写因子の研究から解明されてきた。遺伝子産物として発現したタンパク質がどの遺伝子の配列にどの程度の強度で結合するかを同定することは、遺伝子ネットワークを理解する上で必須のことである。種々の DNA 配列を持った 2 重鎖 DNA チップを開発し、タンパク質の結合により 2 重鎖が安定化することを利用してタンパク質を同定する 2 重鎖 DNA チップを開発した。DNA は化学的にはリン酸骨格を持つ負に荷電した高分子なので、2 重鎖を安定化するためには必ず正に荷電した K

イオンや Na イオンが必要である。タンパク質が結合した 2 重鎖は、正に荷電した K イオンや Na イオンが無くても安定化されている。よって網羅的に蛍光色素をラベルした 2 重鎖 DNA を用意し、タンパク質を結合させた後純水で洗い流すと、タンパク質が結合した 2 重鎖 DNA は安定化され蛍光で検出できるが、タンパク質が結合していない 2 重鎖 DNA は不安定ですぐに 2 重鎖が壊れ蛍光ラベルの相補鎖が解離する。この原理に基づき、タンパク質結合用 2 重鎖 DNA チップを開発した。

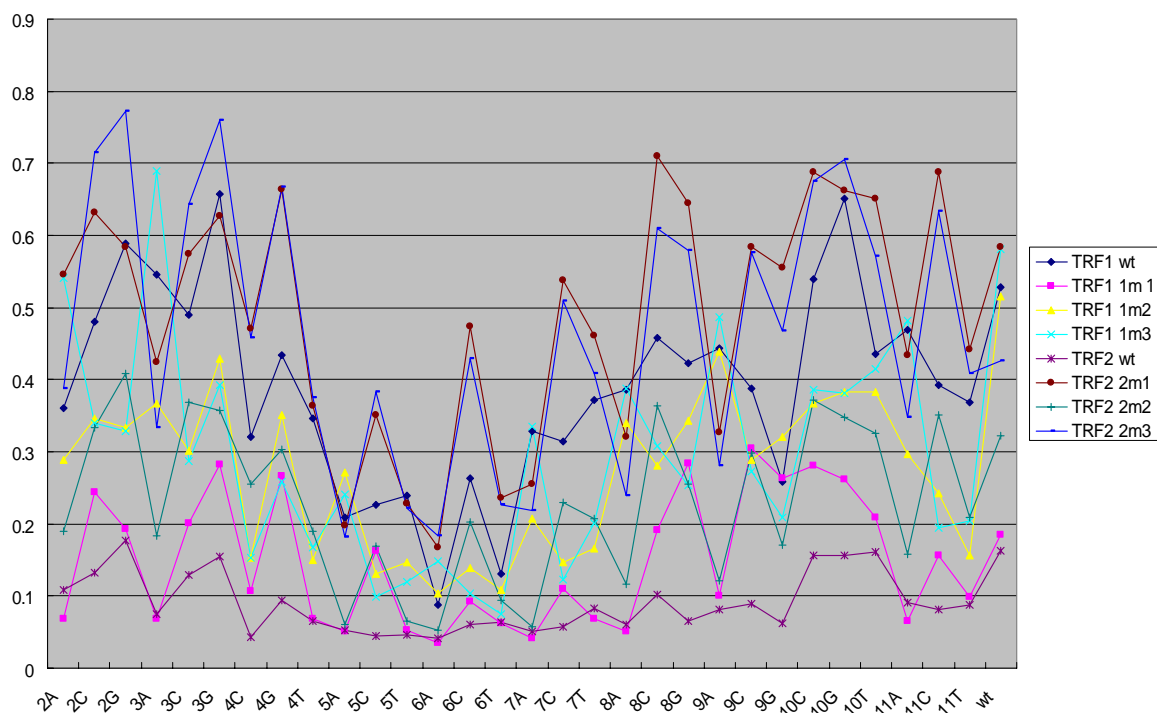


図7 2重鎖DNAチップを用いてテロメアDNA結合タンパク質のTRF1、TRF2、およびそれらの変異体の塩基配列特異性を網羅的に調べた。GTTAGGGTTAGGG配列のDNAを2番目から11番目までの塩基を網羅的に変更した2重鎖DNAチップを作成した。縦軸の強度が結合の強さを示している。

1-3-4 機能性核酸の合成法の開発

研究者：東京工業大学 関根光雄・清尾康志

<本サブテーマで出願した特許>

- 1 芳香属性置換基を導入した4-N-カルバモイルデオキシシチジン

発明者：関根光男・清尾康志 他

出願人：(財)理工学振興会、出願番号：2004-61627

- 2 スクレオシド誘導体

発明者：関根光男・清尾康志 他

出願人：(財)理工学振興会、出願番号：2004-232955

- 3 置換カルバモイル基を保護基とした核酸の合成方法

発明者：関根光男・清尾康志 他

出願人：(財)理工学振興会、出願番号：2005-064892

2-1 分泌タンパク質マッピング技術の開発

2-1-1 動物細胞の分泌タンパク質に対する分析技術の開発と応用

研究者：横浜市立大学 宮崎香・安光英太郎、木原財団雇用研究員

参加企業：キリンビール(株)、(株)ファンケル

2-1-2 細胞接着分子ラミニン5及び6の機能解析と応用

研究者：横浜市立大学 宮崎香・東昌市、木原財団雇用研究員

参加企業：(株)エーシーバイオテクノロジーズ、(株)ファンケル

<本サブテーマで出願した特許>

- 1 皮膚基底膜賦活用組成物
発明者：宮田智、出願人：(株)ファンケル、公開番号：2002-338460
- 2 ラミニン $\alpha 3$ 鎖の改変体
発明者：宮崎香、出願人：JST・木原財団、公開番号：2003-093064
- 3 皮膚基底膜賦活用組成物
発明者：宮田智、出願人：(株)ファンケル、公開番号：2003-183121
- 4 ラミニン-6を含む、細胞接着活性及び/又は細胞運動活性調節用組成物
発明者：宮崎香、出願人：JST、公開番号：2003-212791
- 5 ラミニン-5産生促進剤およびインテグリン $\alpha 6\beta 4$ 産生促進剤を含む組成物
発明者：宮田智、出願人：(株)ファンケル、公開番号：2003-226655
- 6 表皮の扁平化を予防、防止、改善する皮膚老化防止用組成物
発明者：宮田智、出願人：(株)ファンケル、公開番号：2004-91397
- 7 I型コラーゲン及び/又はエラスチン産生促進用組成物
発明者：宮田智、出願人：(株)ファンケル、公開番号：2003-083943
- 8 I型コラーゲン及び/又はエラスチン産生促進用組成物
発明者：宮田智、出願人：(株)ファンケル、PCT出願
- 9 ラミニン5を利用した間葉系幹細胞の培養技術
発明者：宮崎香他、出願人：横浜市大・木原財団、出願番号：2005-240814
- 10 皮膚老化マーカーとその利用技術
発明者：宮崎香他、出願人：横浜市大他、出願番号：2005-240820
- 11 I型コラーゲン産生促進用組成物
発明者：宮田智、出願人：(株)ファンケル、出願番号：2005-283271
- 12 異常タンパク質除去用組成物
発明者：宮田智、出願人：(株)ファンケル、出願番号：2005-289491
- 13 アトピー性皮膚マーカーとその利用技術
発明者：宮崎香他、出願人：横浜市大他、出願番号：2005-306498

2-2 シグナル伝達モニタリング技術の開発

2-2-1 mRNAサーベイランス系の操作技術の展開応用

2-2-2 リン酸化特異的抗体を用いたシグナル伝達のモニタリング

2-2-3 免疫及びスクリーニングに用いるリン酸化ペプチドの合成、抗体作製とスクリーニング

と特異性評価

研究者：横浜市立大学 大野茂男・平井秀一・水野恵子、木原財団雇用研究員

参加企業：キリンビール(株)、大鵬薬品工業(株)、(株)医学生物学研究所

<本サブテーマで出願した特許>

1 新規な SMG-1

発明者：大野茂男、出願人：JST・木原財団、公開番号：2003-038189

2 新規な SMG-1

発明者：大野茂男、出願人：JST、PCT 出願

3 SMG-1 結合タンパク質及びその活性を制御する物質のスクリーニング方法

発明者：大野茂男・大西哲生・山下暁朗、出願人：横浜市・JST、公開番号：2004-097029

4 SMG-1 特異的 siRNA 及び mRNA サーベイランス機構抑制剤

発明者：大野茂男・大西哲生・山下暁朗、出願人：横浜市・JST、公開番号：2005-21094

5 SMG-1 結合タンパク質及びその活性を制御する物質のスクリーニング方法

発明者：大野茂男・大西哲生・山下暁朗、出願人：横浜市・JST、PCT 出願

6 新規な SMG-1

発明者：大野茂男、出願人：JST、アメリカ・カナダへ出願

7 SMG-1 結合タンパク質及びその活性を制御する物質のスクリーニング方法

発明者：大野茂男・大西哲生・山下暁朗、出願人：横浜市・JST、アメリカ・カナダ
など 10 カ国へ出願

2-3 プロテオーム解析技術の開発（地域新生コンソーシアムへ発展的移行）

2-3-1 新素材プロテインチップ技術の開発

2-3-2 新素材プロテインチップに固定化されたタンパク質と相互作用するタンパク質の同定法開発

研究者：横浜市立大学 平野久、木原財団雇用研究員

参加企業：東洋鋼鈑(株)、SUS(株)

<本サブテーマで出願した特許>

固体支持体上の生体分子を質量分析する方法およびそのための固体支持体

発明者：平野久他、出願人：横浜市他、出願番号：2004-364934