

特集：無細胞生命科学の創成

無細胞タンパク質合成法を用いたハイスループットタンパク質機能解析法の開発とタンパク質生物学分野開拓に向けた応用

澤崎達也, 遠藤弥重太

タンパク質をコードしている機能未知遺伝子がゲノム上には多数存在している。これらの遺伝子を理解するためには、タンパク質の網羅的な生化学的解析が必要である。本章では、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を基盤として、我々が進めているハイスループットな、遺伝子情報の生化学的な同定手法の開発と、これを利用した、転写因子のDNA結合配列同定、プロテインキナーゼカスケードの探索、プロテアーゼの基質探索の例等を紹介する。

はじめに

ヒトのゲノムシーケンスが終了¹⁾し、遺伝子について、バイオインフォマティクスの発展を促しながら、種を越えて保存されているアミノ酸配列（ドメイン）の探索、それを基にしたオーソログ遺伝子の分類など、核酸やアミノ酸配列を中心とした解析がなされている²⁾。しかし、未だゲノム上の遺伝子の半数近くは、機能未知のままである¹⁾。遺伝子には、タンパク質情報をコードしたものと、tRNAやrRNAのようにタンパク質情報をコードしないものが存在する。近年のRNAiの発見や革新的なDNAマイクロアレイ技術の発展により、タンパク質をコードしないRNAが大量に発現していることが見出されているが、これらのRNAが遺伝子として配列依存的な役割をもつのか、またペプチドなどのアミノ酸情報をまったくコードしていないのかなど結論づけるには、まだ時間がかかるものと推察される。そのため、ここでは、大半の遺伝子の本体はタンパ

ク質であるとして話を進める。

ゲノム上に見出された、機能がまったく未知の遺伝子はもちろんのこと、実は、アノテーションされた遺伝子でさえ、生化学的な機能はまだわかっていない遺伝子が大半を占める。例えば、高等生物のゲノムには、転写因子に分類されている1,000種類以上のDNA結合ドメインをもつ遺伝子が見つかるが、それらが結合するDNA配列が同定されている転写因子は、数十種類である。bZIPのような解析が進んだDNA結合ドメインでさえ、調べてみると転写因子に結合する配列は異なっている。そのため、ゲノムシーケンス後のポストゲノム時代において、膨大な予算を投入して見つかった2万5千種を超える遺伝子に関して、より有効な情報を得るためには、タンパク質の生化学的な機能を網羅的に解析する技術の発展が必須である。

タンパク質の生化学的解析のスループットを上げるには、1) cDNAリソースの確保、2) ハイスループットなタンパク質発現、3) ハイスループットな検出系の開発、の3点が集約される必要がある。1) については、理化学研究所の林崎グループや東京大学の菅野グループなどのように、世界をリードする日本の完全長cDNA単離技術³⁾があり、我々もそれらの技術により得られたクローンを利用している。2) については、遠藤の章でも述べられているように、我々はコムギ無細胞系を基盤にハイスループットなタンパク質合成系を構築し⁴⁾、それを基盤に自動タンパク質合成装置の開発に成功した⁵⁾。この章の前半では、その

愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター（〒790-8577 松山市文京町3番）

Development of a high-throughput biochemical annotation method of genetic information based on cell-free protein synthesis, and its application to protein biology

Tatsuya Sawasaki and Yaeta Endo (Cell-Free Science and Technology Research Center, Ehime University, 3 Bunkyocho, Matsuyama 790-8577, Japan)

装置の開発秘話を盛り込みながら、ハイスループット化に向けた方法論の構築や“機械化（自動化）”への問題点を述べることにする。そして、完全長cDNAと無細胞を組み合わせるにより、従来では不可能だったタンパク質ライブラリーの構築と、その意義を紹介する。後半は、本章の主な目的である、我々が進めている無細胞系を基盤とした3種類のハイスループットなタンパク質発現・機能解析を例に挙げながら、3)のハイスループットなタンパク質機能解析の意義と、検出系の現状と課題、そして今後の方向性について述べたい。

1. ハイスループットタンパク質合成へ向けた方法論の開発

生化学的な解析に用いるためには、タンパク質を用意する必要がある。細胞や組織から目的のタンパク質を精製することは、大変困難であるため、現実的には、組換えタンパク質を用いることとなる。また、タンパク質の生化学的解析には、活性を保持したタンパク質の発現、および精製を行う必要がある。遺伝子のクローニングや解析には各社から便利なキットが多数用意されているが、タンパク質の生化学的解析は、まだそれほど便利なキットはなく、前時代的な“職人技”を必要とするような響きを含んだテクニックやノウハウが多数存在するのが現状である。我々は、これらを打破するために、コムギ無細胞系を利用して、DNAシーケンサーやPCR法のように、DNAを機械にセットするだけで、目的のタンパク質が手に入る“装置”の開発をも目指してきた。コムギ無細胞系の詳細やその技術の概要は、遠藤の章や他の文献を見ていただくとして、ここでは、先ずハイスループットなタンパク質発現の自動化技術開発について述べる。

ハイスループット化への方法論の構築において最も重要な点は、できるだけステップ数を減らし、同様の方法や条件で反応を行うことである。ただし、これが非常に難しい。例えば、一般的な遺伝子工学的手法では、大腸菌を用いて遺伝子を含んだプラスミドを増殖させる。このステップでさえ、遺伝子の配列によっては、プラスミドのコピー数が極端に異なる。また、PCR法においても、遺伝子配列の違いによりDNA増幅に大きな差が見られる。ハイスループット化の方法論を構築していくには、各段階で最大公約数的な最適条件を見つける忍耐強さが求められる。これらの経験を通して得た最も有効なノウハウの一つは、目的の最終ステップを除き、それ以前の各ステップで“制限”を用意し、その系の最大パフォーマンスが発揮できないようにすることにある。例えば、転写・翻訳鋳型DNAを構築する場合を考えると、我々は鋳型作成時に、プロモーター配列を二つのプライマーに分断することにより、余分な転写反応が起らないようにした2段階のPCR法(split

primer PCR)を行っており、その実験は、プラスミドをもった大腸菌の増殖、1段階目PCR、2段階目PCRの三つの手順からなる。各ステップを例に挙げると、大腸菌を増殖させる場合、エアレーションを悪くし、さらに培地を工夫し、できるだけ増殖しにくい条件を見つける。そうすると、増殖しやすい遺伝子も、増殖しにくい遺伝子も、概ねコピー数はある範囲内に収束する。次に1段階目PCRは、それぞれの遺伝子特有のプライマーと3'側に共通のプライマーを用いる。この際、極端なプライマー濃度の低減(10nM. 標準濃度の10分の1以下)により、わざと増幅しにくい条件にする。これにより、初期の鋳型濃度や増幅効率にそれほど大きく影響されず、大半のクローンのPCR産物量はある範囲内で収まる。我々はこのようにして、数千種類の遺伝子の一つの条件で、転写・翻訳鋳型を構築できる系の開発に成功した⁴⁾。

無細胞系によるタンパク質発現は、非常にシンプルである。単純に、コムギ胚芽抽出液、基質溶液、核酸鋳型溶液、の3種の溶液を混合するだけで目的のタンパク質が合成できる。そのため、我々は簡単に機械化できると予想していた。ところが、タンパク質合成の自動化で問題となったのは、機械化にはステップ数が多すぎることであった。当時、ピペティングなどの細かい作業も含め、我々は70以上の手順を経て、RNA合成から始まりタンパク質合成まで行っていた。このままの手順を機械化すると、我々が1~2時間程度で完了していたものが、機械では10時間以上必要とし、交換用のチップを置く場所を確保することさえ不可能であった。我々、人間は事も無げに、複雑な手順をこなしていたのである。そこで、我々は自動化に向けて、不必要なステップをことごとく洗い出し、ピペティングやタッピングの必要性も調べ、最終的に26ステップでタンパク質合成が可能な“機械用”プロトコルを作り上げた。次の問題は、RNA合成後のバッファーが真核型翻訳系には適していないため、バッファーを交換する必要があったことである。様々な手法を試みたが、エタノール沈殿法によりバッファー交換を行うことが最も再現性よくデータが得られることがわかった。しかし、エタノール沈殿法において、上澄みを取り除く方法の機械化が困難であり、人間が行うようにチップを使って除くと、高い確率で必要なRNAの沈殿を吸い上げてしまう。そこで、チップを用いる方法をあきらめ、96穴マイクロプレート逆さまにして、落下させることにより上澄みのエタノールを取り除くという斬新なアイデアを盛り込んだ方法で機械化に成功した。以上のような、実験室で行っている際には気にもとめなかった事象を、一つ一つ機械化用にチューニングすることにより、一度に384種類(4枚の96マイクロプレート)のタンパク質を合成する自動タンパク質合成装置が完成した⁵⁾。

2. タンパク質ライブラリー

網羅的なタンパク質機能解析を行うためには、数百種類から数千種類のタンパク質からなる“タンパク質ライブラリー”の利用が有効であると考えている。タンパク質ライブラリーは、96マイクロプレートもしくは384プレートで供給され、それぞれのウェルに別々のタンパク質が入っている。そのためハイスループットな機能解析可能なタンパク質が集まったものと定義できる。このタンパク質ライブラリーを用いると、従来では考えられなかった、タンパク質に関する様々なスクリーニングが可能となる。我々は、この系を発展させることができれば、*in vitro* と *in vivo* の間を埋めるような方法論が構築できるのではないかと夢見ている (図1)。

例としてあげると、自己免疫疾患において、疾患に関与する自己抗体が認識する自己抗原を同定することは、診断や治療において非常に有用な情報を与えてくれる。ヒトやマウスのタンパク質ライブラリーとそのような患者血清を混合し、疾患特異的に反応する自己抗体を高感度に検出することができれば、自己免疫疾患のターゲットタンパク質を容易に同定できるものと期待される。また、マラリアなどの感染症において、感染患者血清特異的に反応するマラリア原虫タンパク質を同定することができれば、それらはワクチン候補になりうる。さらに細胞に目を向けると、細胞内のタンパク質の機能は様々なタンパク質によって制御されている。特に細胞内情報伝達に関与する、プロテインキナーゼやホスファターゼ、プロテアーゼ、ユビキチン化などの基質となるタンパク質のスクリーニングは、そのよ

うなタンパク質ネットワークを解明するために必要である。このような場合でも、基質タンパク質ライブラリーを構築して、上述の酵素との反応をハイスループットに検出できれば、従来の個別なタンパク質解析とは異なり、タンパク質の社会的解析へのアプローチが可能となる。これはDNAマイクロアレイ以上に、細胞内におけるタンパク質ネットワークの役割において、重要な知見をもたらすものと期待できる。

そのために、我々が所属する無細胞生命工学研究センターでは、上述の完全長cDNAリソースが重要であるという認識で、現在、9千種類以上の完全長ヒトcDNA (MGCクローンセット)、1万種類以上の完全長マウスcDNA (FANTOM)、理化学研究所の篠崎グループとの共同研究で1万5千種類以上の完全長シロイヌナズナcDNA (RAFL)、熱帯熱マラリア原虫 (全遺伝子5,400種類) の1,500種類以上の完全長cDNAを保持している。これらの完全長cDNAと我々が開発してきた自動タンパク質合成装置を用いることにより、いつでも必要なタンパク質ライブラリーとして解析することができる。既に、シロイヌナズナプロテインキナーゼライブラリーを用いた解析により自己リン酸化能を有するクローンの同定等に成功している⁶⁾。

3. ハイスループットタンパク質機能解析へ向けた解析方法

無細胞系を基盤としたタンパク質ライブラリーを有効に活用するために、タンパク質機能解析のための方法論の開発を試みた。ハイスループットな検出系として、表面プラズモン法、蛍光相関分光法 (FCS法)、AlphaScreen法などいくつかのツールが可能性として考えられた。我々は、現在、FCS法とAlphaScreen法を解析ターゲットにより使い分けて併用している。そこで、それらについて紹介させていただく。また、利用にはまだ限定的ではあるが、プロテインアレイ技術の現状と我々の取り組みについて合わせて述べる。

(1) FCS法

この手法は1972年代に構築され、原理的には、共焦点顕微鏡を用いて非常に小さな領域 (フェムトリットルオーダー) にレーザーを照射し、蛍光分子がその領域を通過する時間を測定する⁷⁾。例えば、ある蛍光標識分子がタンパク質に結合すると分子量が変化するため、その領域を通過する時間 (並進拡散時間) が結合前と比較して遅延する。その並進拡散時間の差から、結合の有無や、場合によっては分子量の予測や、結合しているタンパク質の割合が測定できる。ただし、実際の測定には、蛍光分子と結合後の複合体を形成した分子の分子量差が大きいこと (4倍以上)、

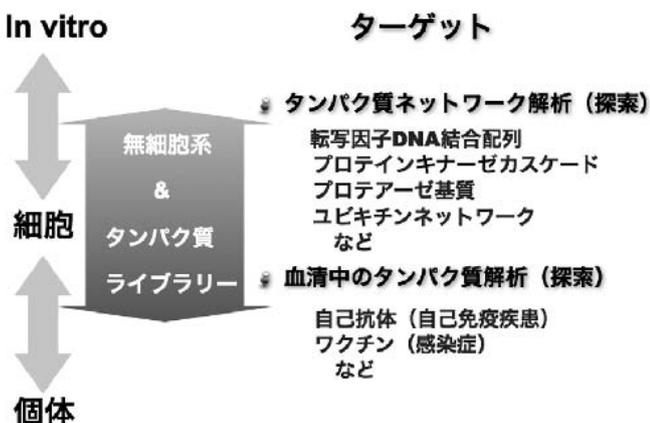


図1 無細胞系を基盤としたハイスループットタンパク質機能解析の応用範囲

細胞内および細胞外で起こりうる様々なタンパク質が対象となるが、特にタンパク質の修飾が関与したタンパク質ネットワーク解析 (探索) は、優先順位の高い重要な解析対象である。また、ヒトやマウスの血清を対象に加えることで、試験管内解析から、細胞のタンパク質ネットワーク、そして個体の解析まで利用範囲は広い。

計測領域中の蛍光分子数を常に数個以内とすることが必要であるため、数ナノMオーダーの希薄な分子濃度で計測をしなければならないなど、いくつかの制約がある。測定方法自体は古くから利用されているが、タンパク質解析への応用は比較的新しい^{8,9)}。現在、日本国内ではカールツァイス社、浜松ホトニクス社およびオリンパス社が測定装置を販売しているが、オリンパス社製(MF20)は384プレートに対応しているため、ハイスループット測定に適している。しかも、FCS法は溶液の混合のみで反応および測定可能という非常にシンプルな系であるため、ハイスループットアッセイに向けての応用範囲は広い。我々の研究室では、主にDNAに結合する転写因子のスクリーニングと、GFP融合したタンパク質と相互作用するタンパク質のスクリーニングに威力を発揮している。核内レセプターが結合するDNA配列の解析について、後述する。

(2) AlphaScreen 法

この手法は、680nm波長のレーザー照射でドナービーズが周りの酸素分子を一重項状態(一重項酸素)へ変換し、アクセプタービーズが近接しているとアクセプタービーズ内の化学発光物質と反応し、さらにそのビーズ内の蛍光分子を活性化し、最終的に520~620nmの光を発することを利用している。一般的な原理の詳細は、パーキンエルマー社のwebサイトをご覧頂くとして、この手法のハイスループットタンパク質機能解析における利点は、バックグラウンドが低く、高感度で、ダイナミックレンジが広く、シンプルな混合だけで反応が進むため自動化も可能であり、384プレートの測定が5分程度で終了するなど、アッセイ時間が短く、ハイスループットなスクリーニング向きであることである。慣れてくると一人で1日に2,000種類(384プレート6枚)以上の反応・検出処理を行うことができる。またコストにおいても、他のアッセイ系と比較し安価である。海外の製薬メーカーではすでにこの系を用いて、化合物スクリーニングが行われている。現在、数種類のタンパク質のアッセイ系が販売されており、パーキンエルマー社以外からも、AlphaScreen用のキットが販売され始めており、今後も増える勢いである。

基本的には、ストレプトアビジンが固定されているドナービーズと、protein Aや各種抗体などが固定されているアクセプタービーズを用いる。そのため、この系をタンパク質機能解析に有効活用するためには、タンパク質をビオチン化する必要がある。我々の研究室では、まず目的のタンパク質のN末端もしくはC末端にPCR法でビオチンリガーゼ認識配列(GLNDFEFAQKIEWHEもしくはASSLRQILDSQKMEWRNAGGS)を付加し、大腸菌からクローニングしたBirAをコムギ無細胞系で合成し、その反応液を目的の翻訳反応液にビオチンと共に加え、共役的

にタンパク質のビオチン化を行っている。この系でのビオチン化効率にはタンパク質の種類に依存しており20%~80%と幅があるが、平均すると50%程度はビオチン化されている。

我々の研究室では、現在、このアッセイを用いて、がん化やがん転移に関与する可能性のあるタンパク質ライブラリーを構築し、リン酸化カスケードや、アポトーシスに関与するプロテアーゼであるカスパーゼの基質探索、また患者血清を用いた診断マーカーや疾患関連タンパク質の探索、そして、我々が所属する無細胞センターの坪井グループでは、マラリア原虫タンパク質ライブラリーを用いたワクチン候補探索を行っている。プロテインキナーゼを用いた基質探索や、カスパーゼ基質の探索は後ほど紹介する。

(3) プロテインアレイ技術(プロテインチップ)

DNAマイクロアレイ技術に関しては、数社のメーカーから一般の研究室で利用できる実用的なDNAチップが供給されたため、遺伝子の発現プロファイルの情報量は飛躍的に増大した¹⁰⁾。プロテインアレイ技術は、DNAマイクロアレイと同様、数千から数万のタンパク質をターゲットにした非常に大規模な解析に威力を発揮するものと期待されている。理論上の必要量はfl~nlレベルで十分であるため、タンパク質解析のコストパフォーマンスは飛躍的に向上すると思われる¹¹⁾。今後、新しいアプリケーションが開発されるものと思われるが、現在は、相互作用するタンパク質の探索、特に得られた成果が直接プロテインバイオマーカーとして利用できる可能性があるため、患者血清内に含まれるタンパク質や抗体と相互作用するタンパク質の探索に関する技術開発が精力的に進められている。しかし、現在、様々な研究機関・会社が実用化を目指して開発に凌ぎを削っているが、未だ一般の研究室で容易に使えるようなプロテインアレイ技術とはいえない。4種類の類似した性質のヌクレオチドからなるDNAと異なり、タンパク質は20種類の性質の大きく異なるアミノ酸から構成されており、しかもその機能を発揮するには“構造”が非常に重要である。そのため、特に、活性を保持したタンパク質の固定化およびその安定化がプロテインアレイの開発における大きな課題となっている。まだ汎用性をもった機能解析可能なプロテインアレイ(機能プロテインアレイ)が完成していない段階である。現在利用できるプロテインアレイは、ニトロセルロース膜など、一層の平面上にタンパク質を固定するものである。この方法では、大半のタンパク質は固定中もしくは固定後に乾燥してしまい、溶液にもどしても機能を保持している頑丈なタンパク質の種類はそれほど多くない。現在、我々の研究室では、これらの問題点を打破するために、タンパク質の保存はあきらめ、上記の自動タンパク質合成装置を用いた、タンパク質の用時調

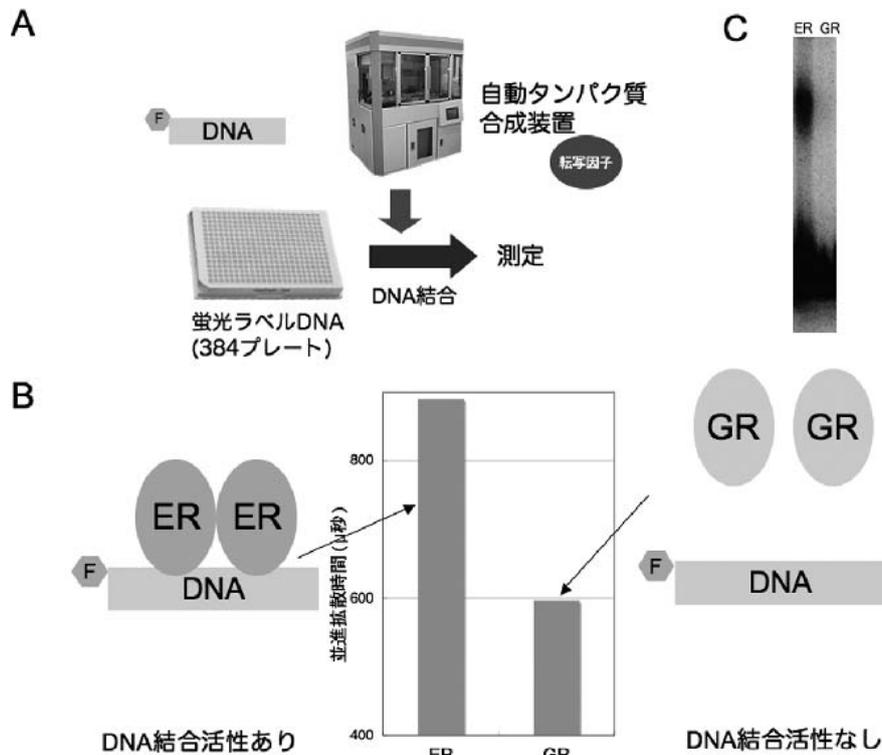


図2 無細胞系とFCS法による転写因子の結合DNA配列探索

(A) シンプルな転写因子の結合DNA配列探索のスキーム。(B) ヒトエストロゲンレセプター (ER) とグルココルチコイドレセプター (GR) を用いたFCS法の測定。プローブとしてはERE (AGGTCCTGTGACCT) を含む5'端に蛍光分子 (TAMRA) を付加したDNAを用いている。ERと混合したときのみ、並進拡散時間が遅延しているのがわかる。(C) 放射線ラベルされたDNAをプローブとして用いたゲルシフトアッセイ法。ERのレーンのみDNA結合が検出され、FCS法と相関がある。

製とチップ上での精製、そしてタンパク質の安定性を高めるために空気との接触を遮断したゲル構造中に三次元的な空間を確保した機能プロテインアレイの開発を目指して、研究を進めている。

4. ハイスループットタンパク質機能解析への応用

(1) 転写因子

最近よく利用されているDNAマイクロアレイ技術と抗体によるプルダウン法を上手に利用したChIP (chromatin immunoprecipitation) 法も非常に強力な転写因子の解析ツールである¹²⁾が、細胞内の目的転写因子の量や、特異性が高いモノクローナル抗体の有無などが問題となるため、解析ターゲットとなる転写因子は限定的であるといえる。*in vitro* 系を用いた転写因子のDNA結合確認には、ゲルシフトアッセイ (gel-retardation) 法が主に行われている。しかし、放射線ラベルしたDNAを使い、アクリルアミド電気泳動を行うなど、スループット性は高くない。そこで、我々はFCS法を利用したハイスループットな転写因子解析法の開発を目指した。方法の原理は、384プレート上で蛍光標識したDNAとコムギ無細胞系で合成した転写因子

を混合するというだけである (図2A)。そして、反応後、FCS法による測定を行う。例として、解析が進んでいるヒトの核内レセプター (ERとGR) のデータを示す (図2B)。ヒトERとGRは既に、結合配列が解析されており、ヒトERはERE (AGGTCCTGTGACCT) にダイマーで結合するが、ヒトGRはEREには結合しないことが知られている。この結合を従来のゲルシフトアッセイ法 (図2C) とFCS法で比較したところ非常に良い相関が得られた。最近、この方法を用いて、36種類のヒト核内レセプターと12種類のDNA結合配列をそれぞれ個別にモノマーもしくはホモダイマーとして432種類 (ヘテロダイマーとして数百種類) の結合解析を行った。そのうち、少なくとも97種類のDNA結合は新規な組み合わせであった。また、それら全てのデータをゲルシフトアッセイ法データと比較したところ、ほぼ同様の結果が得られた。以上のことから、FCS法とコムギ無細胞系を組み合わせた転写因子が結合するDNA配列を探索する方法は、網羅的な転写因子解析において非常に有用であるといえる。

(2) プロテインキナーゼ

プロテインキナーゼは、可逆的なタンパク質のリン酸化を触媒することにより、細胞外からのシグナルを細胞内へ伝え、細胞の増殖や分化、翻訳制御等、高等生命機構の制御において、重要な働きをしている。そのため疾患との関連が深く、特にがん細胞においては特定のプロテインキナーゼの活性を抑えるとがん細胞の分裂阻害やがん細胞の転移を抑制できる。このため、がん細胞内で特徴的に働いているプロテインキナーゼとそのターゲット基質タンパク質のリン酸化(プロテインキナーゼカスケード)の探索は、がん化や転移に関する機構の解明につながるものと期待されている。またプロテインキナーゼは、応用的に、最近の抗がん剤の分子標的薬のターゲットになっている。ヒトゲノムには、518種類のプロテインキナーゼが見出されており¹³⁾、我々の研究室では、マウスのオーソログを含め、コムギ無細胞系を用いて約400種類のプロテインキナーゼの発現に成功している(遠藤の章, 図8)。我々は、細胞のがん化に関与するプロテインキナーゼカスケードの探索を目指し、がん化に関与するタンパク質とがん細胞で高発現しているタンパク質を1,000種類程度集めた、がん関連タンパク質ライブラリーを作成した。これらは全てN末端がビオチン化されており、AlphaScreen法を用いた検出が可能である。実際のスクリーニングを例に挙げると、12連ピペッターもしくは分注機を用いて384プレートに無細胞系で合成した精製プロテインキナーゼ(例ではCaMKII δ isoform)とATPを含んだバッファーを分注する。分注後、自動タンパク質合成装置により合成した384種類のビオチン化がん関連タンパク質ライブラリーと反応させる。これにより、各ウェルでそれぞれ異なった384種類のタンパク質のリン酸化反応が行われる。リン酸化反応を検出するために、2種類のビーズと抗リン酸化Ser/Thr抗体を含んだ溶液を加え、さらに1時間反応後、検出装置で測定する(図3A)。もしTyrキナーゼの反応なら、抗リン酸化Tyr抗体を用いれば良い。タンパク質合成後のアッセイは、3種類の溶液を単に混合するのみであるため自動化が可能である。添加したプロテインキナーゼによる基質タンパク質のリン酸化が起こると、ビーズと共に加えた抗リン酸化アミノ酸抗体がそのリン酸化部位を認識し、その結果、2種類のビーズを含んだ複合体を形成する(図3B)。そこに、680nmのレーザーでドナービーズを励起させると蛍光が検出される。コントロールとして、同様に合成・精製したDHFRを用いた。96種類のタンパク質のスクリーニング結果を確認すると、コントロールと比較し、CaMKII δ と反応させることにより少なくともここでは16種類の基質タンパク質において、非常に高い値が検出された(図3C)。このように、非常にS/N比は高く、バックグラウンドのノイズ値は低い。最終的に、同じタンパク質

溶液を用いて、候補タンパク質をストレプトアビジンが結合したマグネットビーズで精製し、プロテインキナーゼカスケードと放射線ラベルしたATPを加えて、SDS-PAGEで目的タンパク質のリン酸化を確認している。この例では、768種類からなるがん細胞高発現タンパク質ライブラリーの中から、20種類の基質探索に成功した。これらのカスケードは全て新規であった。これらのデータが示すように、無細胞系により合成したタンパク質ライブラリーとAlphaScreen法を組み合わせることで、ハイスループットで網羅的なプロテインキナーゼカスケードの探索が可能となった。

(3) プロテアーゼ

ヒトゲノム上には約500種類のプロテアーゼが存在しており、基質の同定など生化学的な機能解析が待たれている¹⁴⁾。特に、がん細胞の転移に関与すると考えられている細胞膜上、もしくは細胞外マトリックスに局在するプロテアーゼは、重要な創薬ターゲットである。我々は、図4Aに示すようなプロテアーゼの基質探索を目指したアッセイ系を構築するために、比較的よく解析されており、アポトーシスの重要因子であるカスパーゼ3をモデルとして用いた。プロテアーゼ反応では、タンパク質の分解を検出する必要があるため基質タンパク質のデザインには少し工夫が必要となり、N末端にビオチン化、C末端にflag配列を付加している。これにより、図4Bのようにプロテアーゼにより基質タンパク質が切断されれば、蛍光値が検出できないという原理を用いて、プロテアーゼによる切断活性の検出を行う。この方法によって、カスパーゼ3により切断が既に報告されている3種類(カスパーゼ7, MDM2, ICAD)、また切断されない2種類の基質(カスパーゼ3, Bid)をコムギ無細胞系で合成し、カスパーゼ3処理サンプルと未処理サンプルの値を測定した。図4Cには、未切断反応率(%)を表している。期待通りに、切断活性が報告されているタンパク質のみに、切断が検出できた。現在、この手法を用いて、約170種類のヒトプロテインキナーゼを基質として、カスパーゼ3により切断される基質の探索を行い、23種類の切断されるプロテインキナーゼを見出した。その内訳は既知のものが11種類、新規が12種類であった。この他にも、カスパーゼ8の基質探索においても新規な基質を見出しており、カスパーゼが従来のアポトーシスでの役割以外にも広く機能している可能性を示唆するデータが得られている。このように、無細胞系とプロテアーゼ基質探索用にデザインした基質タンパク質ライブラリーを用いれば、カスパーゼだけでなくプロテアーゼの基質探索に広く応用できるものと思われる。

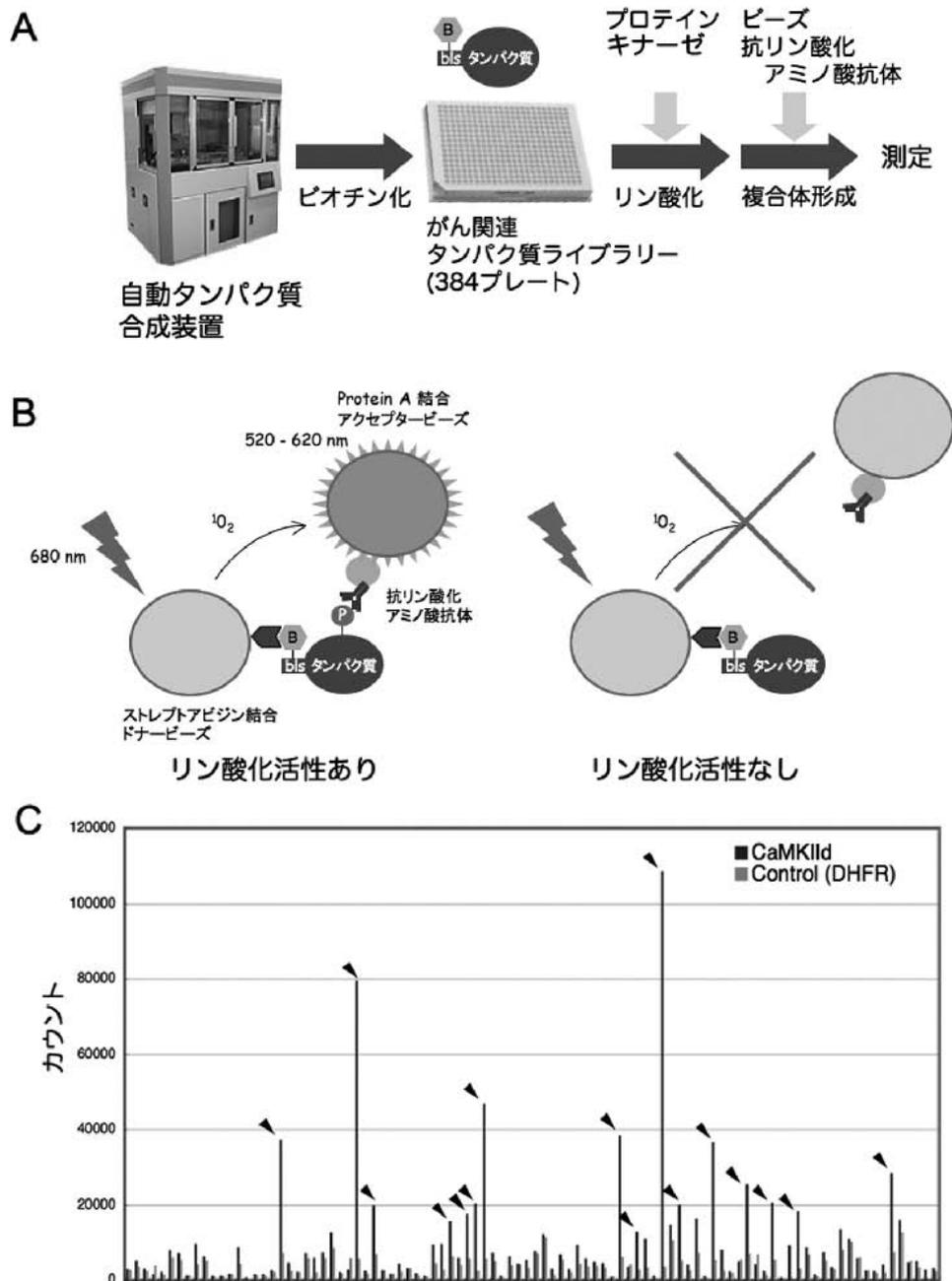


図3 無細胞系と AlphaScreen 法を組み合わせたプロテインキナーゼカスケード探索法
(A) がん関連タンパク質ライブラリーを用いたプロテインキナーゼカスケード探索のスキーム。(B) AlphaScreen 法を用いた、プロテインキナーゼによるリン酸化活性の検出原理。ピオチン化された基質タンパク質がリン酸化されると、抗リン酸化アミノ酸抗体 (抗リン酸化 Ser/Thr or Tyr 抗体) によりリン酸化部位が認識される。その結果、ストレプトアビジンが結合したドナービーズと protein A が結合したアクセプタービーズとの複合体が形成され、レーザーによりドナービーズが励起されて、アクセプタービーズが蛍光を発する。基質タンパク質へのリン酸化活性がなければ、複合体が形成されず、蛍光が得られない。(C) CaMKIId を用いたスクリーニング例。コントロール (CaMKIId の代わりに DHFR と反応させたもの) との比較から、数倍カウントが高いものが複合体を形成したものである。

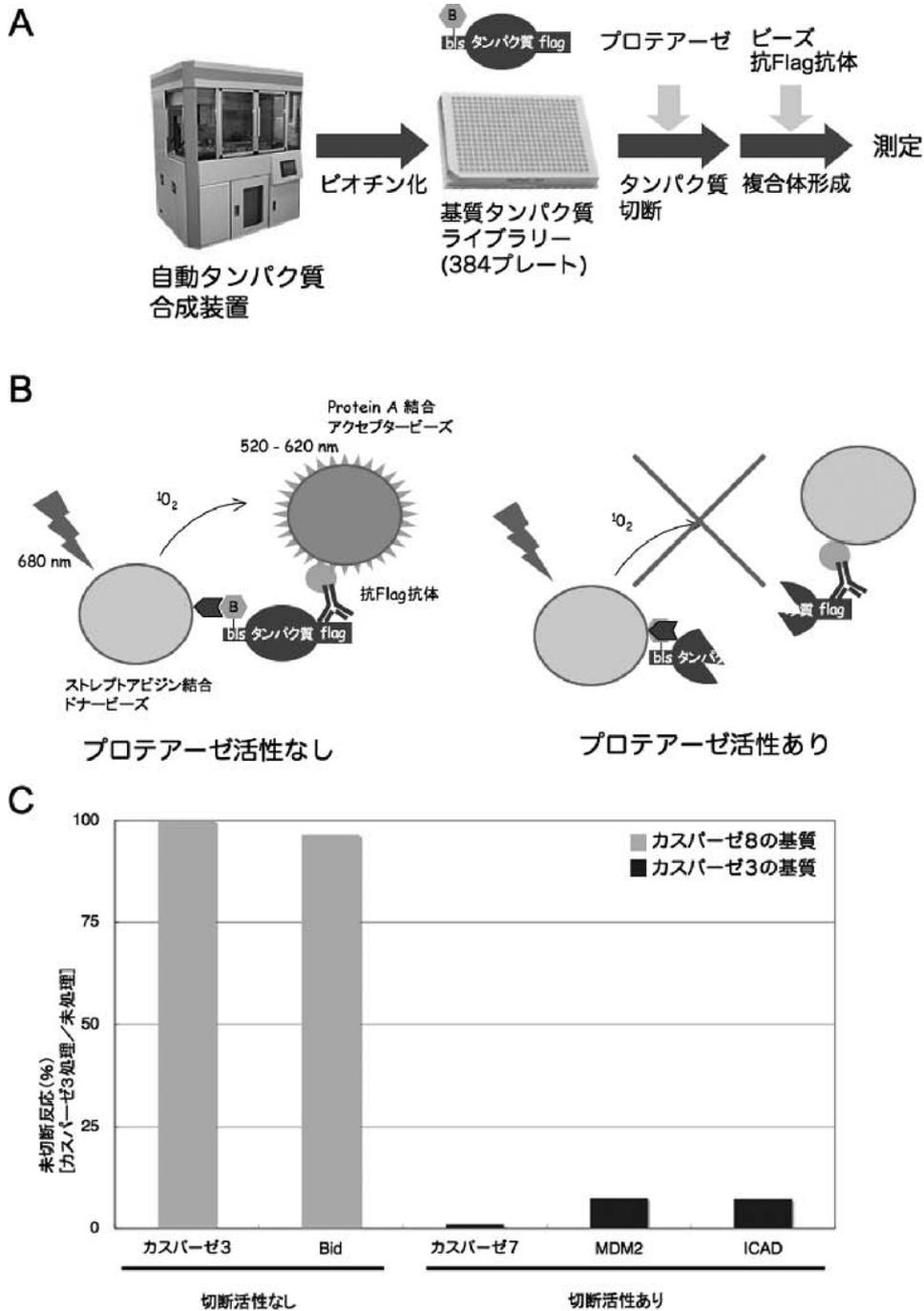


図4 無細胞系と AlphaScreen 法を組み合わせたプロテアーゼの基質探索法

(A) 基質タンパク質ライブラリーを用いたプロテアーゼ基質探索のスキーム。(B) AlphaScreen 法を用いた、プロテアーゼによるタンパク質切断活性の検出原理。N 末端にはバイオチン化、C 末端には Flag 配列が付加された基質タンパク質が特徴である。バイオチン化された基質タンパク質への切断活性がなければ、抗 Flag 抗体が基質タンパク質の C 末端に付加した Flag 配列と結合する。その結果、バイオチン化基質タンパク質を介してストレプトアビジンが結合したドナービーズと protein A が結合したアクセプタービーズとの複合体が形成され、レーザーによりドナービーズが励起されて、アクセプタービーズが蛍光を発する。逆に、基質タンパク質が切断されれば、複合体が形成されず、蛍光が得られない。つまりプロテアーゼの添加により蛍光値が低下したものが、切断された基質タンパク質を示す。(C) カスパーゼ3による基質特異的切断の検出。カスパーゼ3処理したサンプルと、カスパーゼ3未処理のサンプルをそれぞれ測定し、相対的な未切断反応の割合 (%) [カスパーゼ3処理サンプル/カスパーゼ3未処理サンプル×100] を表したものの。値が低いほど、基質が切断されたことを示す。既知の報告とおりの切断活性が検出された。

5. おわりに

我々のコムギ無細胞タンパク質合成法を基盤技術としたハイスループットタンパク質機能解析技術開発と共に、来るべきタンパク質生物学に備えたその応用について紹介した。DNA マイクロアレイ技術が世に現れた時に、単にノザン解析を沢山ならべただけだ、と揶揄する人もいたが、遺伝子の発現を数千から数万種レベルで解析すると、予想以上に細胞や組織の遺伝子発現の概略が見えてくるようになった。これはDNA マイクロアレイ技術でしかできなかったことである。繰り返しになるが、タンパク質は遺伝子の本体である。遺伝子を細胞に導入し、“断片的な事象を切り取る”現在の手法も、細胞内での生命現象の方向性を探る上で大変重要である。しかし、細胞内のタンパク質が単独で働くことは希であり、数種類、時には数十種類のタンパク質からなる複雑でエキサイティングなタンパク質ネットワークが形成されている。我々はそれらを明らかにして、初めて生命の成り立ちに近づけるのではないだろうか。タンパク質生物学は、遺伝子情報の網羅的・生化学的な解析技術の今後の進展にかかっているだろう。

文 献

- 1) Venter, J.C. *et al.* (2001) *Science*, **291**, 1304–1351.
- 2) Mayor, L.R., Fleming, K.P., Muller, A., Balding, D.J., & Sternberg, M.J. (2004) *J. Mol. Biol.*, **340**, 991–1004.
- 3) Hayashizaki, Y. & Kanamori, M. (2004) *Trends Biotechnol.*, **22**, 161–167.
- 4) Sawasaki, T., Ogasawara, T., Morishita, R., & Endo, Y. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14652–14657.
- 5) Endo, Y. & Sawasaki, T. (2003) *Biotechnol. Adv.*, **21**, 695–713.
- 6) Sawasaki, T., Hasegawa, Y., Morishita, R., Seki, M., Shinozaki, K., & Endo, Y. (2004) *Phytochemistry* **65**, 1549–1555.
- 7) Magde, D., Elson, E.L., & Webb, W.W. (1974) *Biopolymers*, **13**, 29–61.
- 8) Wolcke, J., Reimann, M., Klumpp, M., Gohler, T., Kim, E., & Deppert, W. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 32587–32595.
- 9) Kobayashi, T., Okamoto, N., Sawasaki, T., & Endo, Y. (2004) *Anal. Biochem.*, **332**, 58–66.
- 10) van't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., Schreiber, G.J., Kerkhoven, R.M., Roberts, C., Linsley, P.S., Bernards, R., & Friend, S.H. (2002) *Nature*, **415**, 530–536.
- 11) Zhu, H. & Snyder, M. (2003) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**, 55–63.
- 12) Horak, C.E. & Snyder, M. (2002) *Methods Enzymol.*, **350**, 469–483.
- 13) Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002) *Science*, **298**, 1912–1934.
- 14) Puente, X.S., Sanchez, L.M., Overall, C.M., & Lopez-Otin, C. (2003) *Nat. Rev. Genet.*, **4**, 544–558.