

(3) IVV法より得られたPPIデータの検証および複合体解析 (斎藤)

相互作用の信頼性指標をもとに、ユーザが任意の指標を用いて信頼性の高い相互作用を絞り込んだ後、データの再現性などを視覚的に確認できるようなGUI (graphical user interface) を整備し、遺伝研へアップロードした。

(4) IVV法より得られるデータのスプライス・バリエーション解析 (宮本)

縦軸研究機関のリクエストに応じて実施されたIVV実験から得られた相互作用領域データに関して、スプライス・バリエーションの変化によって相互作用が変化していると予想されるものについて、その解析結果がゲノムネットワークプラットフォームから平成20年9月にコンソーシアムへ公開される予定である。これを利用することで、縦軸研究機関が興味のある結果についてさらに詳細に検討することが可能となる。

【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

実験によって得られた配列データのマッピングおよび、そのアノテーションに以下のデータベースを主に活用した。

NCBI Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>)

NCBI RefSeq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>)

NCBI OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/portal/query.fcgi?db=omim>)

NCBI dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)

EBI InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)

また、スプライス・バリエーション解析において、以下の5つのデータベースから取得したタンパク質配列を比較し、バリエーション領域を決定している。

NCBI RefSeq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>)

NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>)

UniProt (<http://www.uniprot.org/>)

DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>)

PDB (<http://www.rcsb.org/>)

さらに、IVVデータより得られた相互作用データが他の手法で得られたそれとどれくらい重なるかを調べるために、GNPコンソーシアム(日立製作所)の酵母ツーハイブリッド法の解析で得られた相互作用データを用いた。

【主な研究論文とその概要】

1. Miyamoto-Sato,E., Ishizaka,M., Horisawa,K., Tateyama,S., Takashima,H., Fuse,S., Sue,K., Hirai,N., Masuoka,K., and Yanagawa,H.: Cell-free co-translation and selection using *in vitro* virus for high-throughput analysis of protein-protein interactions and complexes. *Genome Res.*, **15** (5): 710-717 (2005)

概要： *in vitro* virus法（IVV法）を用いたタンパク質間相互作用のハイスループットな解析システムを構築した。煩雑だった実験系を単純化するとともに、実験から産出される膨大なデータの解析を高速化するソフトも富士通と共同で開発した。

2. Tateyama, S., Horisawa, K., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Doi, N., Yanagawa, H.: Affinity selection of DNA-binding protein complexes using mRNA display. *Nucleic Acids Res.*, **34**, e27(2006)

概要： *in vitro* virus法（IVV法）を用いたタンパク質-DNA相互作用解析の基盤技術確立。

3. Miyamoto-Sato,E., and Yanagawa,H.: Toward functional analysis of protein interactome using “*in vitro* virus”: *in silico* analyses of Fos/Jun interactors. *Journal of Drug Targeting*, **14** (7): 505-511 (2006)

概要： *in vitro* virus法（IVV法）を用いた大規模解析とそのデータ処理に向けたプロトタイプとして、Fos/Junを中心としたタンパク質間相互作用検出とそのインフォ解析。

【特許出願数の実績】

宮本悦子、鷺尾尊規、石坂正道、柳川弘志「配列データの取得方法ならびにそれを利用したターゲット遺伝子の抽出方法及びタンパク質の設計方法」特願 2005-354344 （2005.12.8 出願）

概要：従来法では、タンパク質 A と B の相互作用相手が解析されるに過ぎないが、*in vitro* virus(IVV)法では、どのような領域で相互作用しているかを詳細に検出することが可能であり、このことにより構造解析を初め各種公共データベースと重ね合わせて解析することで、相互作用部位に新規の機能を見出すことが可能である。このことによって、遺伝子の機能解析や疾患メカニズムの解明が加速される。さらに、相互作用部位の塩基配列の変化（スプライスバリエント、 SNPs、変異、遺伝子融合など）と疾患との関わりを解析することで、疾患関連遺伝子の抽出が可能となる。そのために必要な IVV 法のセレクションにおける大規模タンパク質間相互作用解析条件などに関する発明。

ゲノムネットワークプロジェクトの
課題の報告

プログラム名		(1) <u>ゲノム機能情報の解析</u> (2) ヒトゲノムネットワークプラットフォームの構築 (3) 次世代ゲノム解析技術の開発 (4) 個別生命機能の解析 (5) 動的ネットワーク解析技術開発			
課題の分類		(1) 中核機関 (2) 指定課題 (3) <u>公募課題</u>			
課 題 名 (和英併記)		抗体を用いた転写因子複合体解析によるゲノムネットワークの理解 (Understanding of the Genome Network through Transcription Factor Complex Analyses using the Antibodies)			
代表研究者名 (所属機関・職名)		古閑 比佐志 (財団法人かずさDNA研究所・室長)			
年度別研究費 (千円)		1 8 年度	1 9 年度	2 0 年度	合 計
		45, 000	63, 766	40, 000	148, 766
		研究者名	所属機関・部局・職		専門分野
研究組織図	代表機関	☆古閑 比佐志	かずさDNA研究所・ゲノム医学研究室・室長		分子生物学
		小原 玲子	かずさDNA研究所・ゲノム医学研究室・研究員		分子生物学
		島田 希代	かずさDNA研究所・ゲノム医学研究室・研究員		分子生物学
		長瀬 隆弘	かずさDNA研究所・ヒト遺伝子応用技術研究室・室長		分子生物学
		池田 俊	かずさDNA研究所・ゲノム医学研究室・技術員		バイオインフォ
		柳川 聡秀	かずさDNA研究所・ゲノム医学研究室・技術員		生化学
【研究目的】					
蛋白質としての転写因子は、発現量も低くかつ時期・部位特異的な一過性の発現のため、その全貌を捉えるのは極めて困難である。特異的に微量分子を捕捉することが可能な抗体は、このような研究を精力的に推進するため必須の研究ツールと考えられる。本研究課題では、プロジェクトで詳細な解析が必要な転写因子に関する抗体のライブラリーを構築し、コンソーシアム内に提供すると共に、メンバーの要請に従い蛋白質-蛋白質あるいは DNA-蛋白質複合体の同定を行っていくことを目的とする。					

【課題の概要】

（１）転写関連蛋白質に対するウサギポリクローナル抗体の作製・評価

年間200抗体を目標に、転写関連蛋白質に対する抗体を作製する。特にゲノムネットワークコンソーシアム内の要請に基づき、優先権をつけて作製していく。かずさDNA研究所が現有する、あるいは市販の抗体で十分な特異性が確認されているものに関しては、これを流用する。作製した抗体は、免疫染色やWestern blotなどで随時評価していく。

（２）抗体評価のための各種発現系の作製

抗体の評価に必要な各種遺伝子発現系及び発現培養細胞株を、相同組換え技術を用いて作製する。当面はHEK293細胞を対象に遺伝子発現株を作製してくが、HEK293細胞では観察できない事象も考えられるので、その際は異なる細胞株への遺伝子組み換えも随時考慮する。

（３）免疫沈降産物の質量分析解析による蛋白質複合体解析

作製した抗体を用いた免疫沈降産物を質量分析し、複合体構成因子を同定する。結合蛋白質をトリプシン消化後、質量分析装置で解析し、データベースサーチすることで、蛋白質複合体の各要素を同定していく。

（４）クロマチン免疫沈降法によるDNA-蛋白質複合体解析

作製した抗体を用いた免疫沈降で共沈してきたDNA断片の配列を決定する。その手法としては、白髭博士らの確立した手法を当研究グループの岡崎研究員が改変したものを用いる。

（５）データベースへの反映

内部データベースを整備する一方で、上記（１）～（４）で蓄積されるデータをゲノムネットワークのデータベースに反映できるよう処理する。

【平成20年8月末までの研究成果】

（１）転写関連蛋白質に対するウサギポリクローナル抗体の作製・評価

計画通り年間200種の転写関連蛋白質に対する抗血清を作製し、3年間の総計600種の作製は達成見込みである。得られた抗体に関して、順次Western blotや免疫染色などの特異性の評価を進捗させた。

また、縦軸研究との連携には特に配慮し、ゲノムネットワークコンソーシアム内で要請のあった蛋白質に関しては、優先的にその作製にあたり、以下に記載したGNP参画研究機関の12名の先生方からの依頼による合計95種の抗体を作製または作製中である。

【 95種の作製依頼抗体の内訳 】

- ① 窪崎 敦隆 先生（理研、遺伝子構造・機能研究グループ）、10種
- ② 原 英二 先生（徳島大学 ゲノム機能研究センター）、1種
- ③ 井上 聡 先生（東大病院 抗加齢医学）、15種
- ④ 福井 宣規 先生（九州大学 生体防御医学研究所）、7種
- ⑤ 白澤 専二 先生（福岡大学 医学部）、1種
- ⑥ 安井 明 先生（東北大学 加齢医学研究所）、2種
- ⑦ 相賀 裕美子 先生（国立遺伝学研究所）、4種
- ⑧ 眞貝 洋一 先生（京都大学 ウイルス研究所）、6種
- ⑨ 古関 明彦 先生（理研、免疫アレルギー科学総合研究センター）、9種
- ⑩ 岡崎 康司 先生（埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター）、11種
- ⑪ 浅原 弘嗣 先生（国立成育医療センター研究所）、9種
- ⑫ 高柳 広 先生（東京医科歯科大学）、20種