

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21760645

研究課題名（和文）逆プロテオミクス研究を可能にする基盤技術の開発研究

研究課題名（英文）Toward REVERSE PROTEOMICS: a selection platform of a peptide fragment that specifically inhibits the targeted protein-protein interaction.

研究代表者

河原崎 泰昌 (KAWARASAKI YASUAKI)

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：80303585

研究成果の概要（和文）：標的蛋白質間相互作用を特異的に阻害するペプチド・蛋白質断片の効率の創製法の開発研究を行った。相互作用領域の精密同定法を確立し、同定された相互作用領域およびその改変体が、生体内において標的相互作用を競合阻害することを明らかにした。より力価の高い阻害ペプチドの創製を容易にするため、新たな相互作用レポーターを開発し、これを基盤とした相互作用蛋白質の定量的高速スクリーニング系を構築し、スクリーニングを実施した。

研究成果の概要（英文）：An efficient methodology that facilitates selecting a polypeptide fragment that specifically inhibits the targeted protein-protein interaction has been established in this research. I have demonstrated an interaction domain, or a polypeptide responsible for the binding surface-formation, from either of the targeted proteins can be a competitive inhibitor against the interaction between the native proteins *in vivo*. A novel screening system with a quantitative reporter gene (an engineered fungal cDNA for secretory beta-galactosidase, LacA3) was also developed to facilitate a directed evolution of the inhibitor fragment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,100,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,310,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオテクノロジー・プロテオーム・ゲノム・蛋白質・酵素

## 1. 研究開始当初の背景

蛋白質間の相互作用は細胞外・細胞内のあらゆる生命活動において中心的な役割を担う。それ故、個体を構成する全相互作用蛋白

質のゲノムスケール解析（インタラクトーム解析）はポストゲノム科学の中軸プロジェクトとなり、これまでに各種のモデル生物（出芽酵母・線虫・ヒト等）および病原性微生物

のインタラクトームが報告されていた。また、ヒトインタラクトーム解析の結果、65万の相互作用が統計的に予測され、実験的に同定された2,800の相互作用の内、既知の疾患関連蛋白質が関与する相互作用が300以上にのぼることが示された。このことはヒトインタラクトーム全体で約7万の疾患関連相互作用があることを意味している。しかしながら、個々の機能未知相互作用を系統的に機能解析できる有効な手段は無く、機能インタラクトーム解析の領域は未開拓のまま残されていた。

## 2. 研究の目的

「任意の相互作用蛋白質について、相互作用領域の精密同定を行い、さらにそれに変異を導入して高結合型変異体を取得する。高結合型変異体を阻害剤として用い、標的とする蛋白質間相互作用の機能解析を行う」という、一連の相互作用ターゲティングのプロセスをストリームライン化することが本課題の目標である。これにより、相互作用を標的とするペプチド性阻害剤の開発を実現可能なものとして提案する。これを達成するため、具体的な項目として以下の「3. 研究の方法」に記載した課題を設定した。また、選択された蛋白質断片・ペプチドを効率的に生産するための検討を行った。

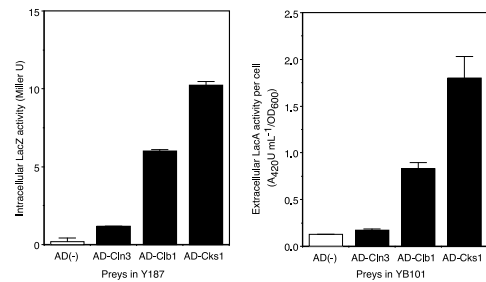
## 3. 研究の方法

- (1) より高いターゲット結合能を獲得した変異体を効率よく選択するためのY2Hレポーター遺伝子(糸状菌由来分泌型LacA)の開発と同レポーター遺伝子を用いた変異体ライブラリの定量的高速スクリーニング系の確立。
- (2) モデル相互作用蛋白質(酵母およびヒト由来スピンドルチェック蛋白質Mad1およびMad2)を用いた変異体ライブラリのスクリーニング、および得られた高結合活性型変異体の性質決定。
- (3) オーロラキナーゼIpl1や酵母キネトコア蛋白質複合体等を用いた相互作用領域の精密同定と高結合型変異体群の取得、それらを用いた標的相互作用の選択的破壊と表現型観察。
- (4) 選択された相互作用阻害蛋白質・ペプチド断片の効率的生産法の確立。

## 4. 研究成果(要約)

- (1) 新規Y2Hレポーター遺伝子(糸状菌由来分泌型LacA)を用いた変異体ライブラリの定量的高速スクリーニング系を確

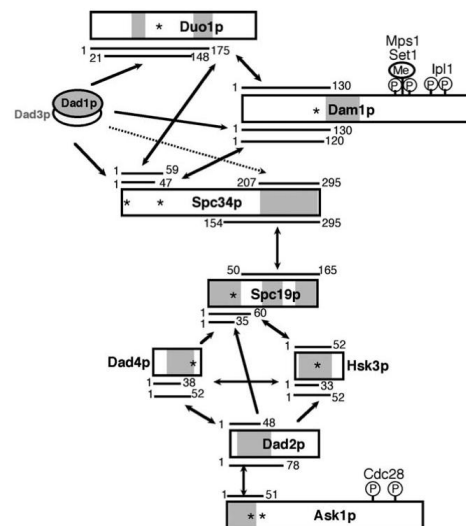
立した。その結果、大規模変異体ライブラリー(10<sup>6</sup>クローン)の高速定量的スクリーニングを実施できるようになった(論文1)。



図・従来法(左)と新規レポーター(右)の定量性の比較

この系を用い、Mad2に結合するペプチド断片のスクリーニングを試み、野生型結合配列の10-20倍も強力なTwo-hybridシグナルを与える人工的なペプチド断片のスクリーニングに成功した(論文1)。さらに、エマルジョン培養法ともいべき新たな集積培養法を確立し(関連論文4)、LacAの分泌シグナルの最適化を試みた。

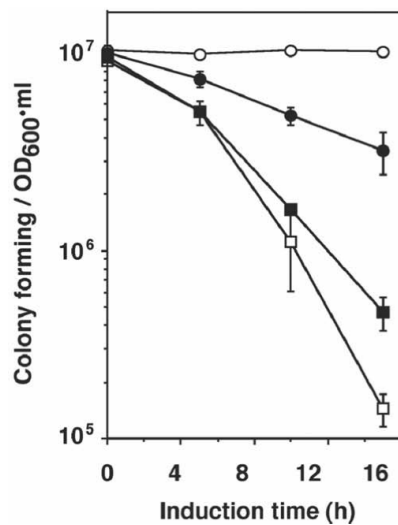
- (2) 新規酵母キネトコア蛋白質複合体であるDam1複合体のサブユニット間相互作用ドメインの網羅的精密同定(下図)を行い、ドメイン発現によりDam1複合体の機能を特異的に阻害することを実験的に証明した(論文2)。



図・精密同定されたDam1複合体サブユニット間相互作用地図

この研究では、複合体に含まれる蛋白質サブユニットのサブユニット間相互作用の全体像を容易に視覚化すること

ができ、かつ、複合体形成において他の複数のサブユニットが結合する足場となるドメインが、非常に効果的に複合体全体の機能を破壊できることを示すことができた（例・下図）。



図・相互作用ドメイン発現誘導による細胞生育能の低下。●■□；同定された各種ドメイン発現酵母株、○；コントロール

- (3) 同様の実験をオートファジー蛋白質に対して行い、ドメイン発現による相互作用阻害の様式や用量曲線などに関する知見を得た（論文投稿中）。細胞内のドメイン発現量が、標的相互作用蛋白質と等モル程度で標的相互作用に対する阻害効果が認められ、過剰発現することにより細胞内の標的相互作用のほとんどを阻害しうることが示された。当初計画に加えていたオーロラキナーゼに関しては、サブユニット間の相互作用を担う相互作用ドメインを同定することができなかった（Ipl1 蛋白質の全体構造が他のサブユニットとの相互作用に必要なであった）。
- (4) ヒト Mad2 蛋白質に強固に結合する 16 アミノ酸残基からなるペプチド断片を加算的なスクリーニング変異導入と高速スクリーニングにより作出した（論文投稿準備中・本研究成果の一部は、論文 1 に含まれる）。このペプチド断片を融合蛋白質として発現する組換え大腸菌株を作成し、融合蛋白質を調整後、標的蛋白質に対する結合能を試験管内で評価した（論文投稿準備中）。この結果、定量的スクリーニングで得られた高結合型断片は、試験管内でも標的蛋白質に強固に結合し、蛋白質間相互作用を競合阻害

した。

- (5) 高結合型蛋白質断片は、時として細胞内の相同蛋白質に作用するため、過剰発現を誘導すると、宿主細胞に致死的なダメージを与える（例・論文 2）。選択された高結合型蛋白質・ペプチド断片を効率的に生産するため、菌体外蛋白質発現系を組換え酵母を用いて構築した。この過程で、難生産性である分泌型蛋白質の生産性を数千倍以上に向上させることができる新規な発現誘導法（高密度菌体懸濁液を用いる発現誘導法）を開発し、その特性を調べた（論文 3）。その結果、本発現誘導法は、ある特定の範囲の分泌蛋白質の生産量を著しく増大させることが分かった。

以上の研究により、「任意の相互作用蛋白質について、相互作用領域の精密同定を行い、さらにそれに変異を導入して高結合型変異体を取得する。高結合型変異体を阻害剤として用い、標的とする蛋白質間相互作用の機能解析を行う」という機能インタラクトーム解析を実施するにあたって、必要不可欠な要素技術を開発することができた。

また本研究の過程で、相互作用阻害作用をもつ蛋白質断片創成の出発点は相互作用ドメインでなくてもよく、ランダムなアミノ酸配列を持ったペプチドライブラリーを出発点としうることが示された。これは、(i) 任意の標的蛋白質に対して結合活性を示すペプチド断片群を定量的スクリーニングにより複数単離し、(ii) 進化工学的に配列最適化を行ったのち、(iii) 標的蛋白質が関わる蛋白質間相互作用を修飾しうるペプチド断片を選ぶ、という新たな相互作用阻害剤の創製法が現実的に実施可能であるということの意味するものである。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 4 件）

- (1) Kamiya T, Ojima T, Sugimoto K, Nakano H, \*Kawarasaki Y. Quantitative Y2H screening: Cloning and signal peptide engineering of a fungal secretory LacA gene and its application to yeast two-hybrid system as a quantitative reporter. *J. Biotechnol.* **146**, 151-159, (2010) 査読有  
doi:10.1016/j.jbiotec.2010.02.007
- (2) Ikeuchi A., Kamiya T., Sugimoto K., Yamane T., Nakano H., and \*Kawarasaki Y., A method for reverse interactome

- analysis: High-resolution mapping of interdomain interaction network in Dam1 complex and its specific disorganization based on interaction domain expression. *Biotech. Progr.* **26**, 945-53 (2010) 査読有 DOI 10.1002/btpr.403
- (3) Kimata K., Yamaguchi M., Saito Y., Hata H., Miyake K., Yamane T., Nakagawa Y., Yano A., Ito K., and \*Kawarasaki Y., High cell-density expression system: A novel method for extracellular production of "difficult-to-express" proteins. *J. Biosci. Bioeng.* **113**, 154-159 (2012) 査読有 doi:10.1016/j.jbiosc.2011.10.007
- (4) (関連文献) Kojima T, Nagao N, Ando D, Ojima T, Kawarasaki Y, Kobayashi I, Nakajima M, \*Nakano H. Emulsion culture: A miniaturized library screening system based on micro-droplets in an emulsified medium. *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 299-303 (2011) 査読有 doi:10.1016/j.jbiosc.2011.05.017

[学会発表] (計 12 件)

- (1) 神谷拓摩、池内暁紀、山根恒夫、中野秀雄、河原崎泰昌「相互作用ドメイン過剰発現による出芽酵母オートファジーの阻害機構の解析」日本生物工学会 2009 年度大会 (名古屋) 2009 年 9 月
- (2) 杉本佳乃子、神谷拓摩、小島晃代、中野秀雄、河原崎泰昌「新規な定量的高速スクリーニング法を用いたヒト Mad2 蛋白質結合ペプチドの創成」日本生物工学会 2009 年度大会 (名古屋) 2009 年 9 月
- (3) Kawarasaki Y.; Toward reverse interactome analysis: Interaction targeting based on interaction domain overexpression. The 2nd International Conference on Health and Longevity Sciences, Oct 1, 2009, University of Shizuoka, Shizuoka, Japan.
- (4) 杉本佳乃子、小島晃代、神谷拓摩、中野秀雄、河原崎泰昌「ヒト Mad2 高結合型ペプチドの創製と機能解析」日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京) 2010 年 3 月
- (5) Kawarasaki Y., Kamiya T., Sugimoto K., and Ito K.; Quantitative Y2H screening: Cloning and signal peptide engineering of a fungal secretory LacA gene and its application to yeast two-hybrid system as a quantitative reporter, The 3rd International Conference on Health and Longevity Sciences, Oct. 16, 2010, University of Shizuoka, Shizuoka, Japan.
- (6) Sugimoto K., Ojima T., Kamiya T., Nakano H., Ito K., and Kawarasaki Y.; Novel quantitative yeast two-hybrid system: a key technique for discovering peptide-based drugs., Pacificchem 2010, December 2010, Waikiki, Hawaii, USA.
- (7) 大石章司、杉本佳乃子、伊藤圭介、河原崎泰昌「寿命延伸物質ラパマイシンの標的結合活性を技対するペプチド断片の大規模探索」第 12 回静岡ライフサイエンスシンポジウム (静岡) 2011 年 3 月
- (8) 杉本溪、杉本佳乃子、伊藤圭祐、河原崎泰昌「Mad2 高結合型ペプチドの動力学的解析」第 13 回静岡ライフサイエンスシンポジウム (静岡) 2012 年 3 月
- (9) (関連する研究課題の学会発表) 原翔一、菅原知宏、佐原健彦<sup>1</sup>、扇谷悟<sup>1</sup>、河原崎泰昌<sup>2</sup>、兒島孝明、中野秀雄「酵母シグナルペプチドライブラリーを用いたシグナルペプチド最適化ツールの開発」日本農芸化学会 2012 年度大会 (京都) 2012 年 3 月
- (10) (関連する研究課題の学会発表) 齋藤雄太、木全浩一、山口真也、山根 恒夫、矢野 明、伊藤圭祐、河原崎泰昌「組換え出芽酵母高密度懸濁液による難生産性ラッカーゼの効率的生産」日本農芸化学会 2012 年度大会 (京都) 2012 年 3 月
- (11) (関連する研究課題の学会発表) Kimata K., Yamaguchi M., Saito Y., Yamane T., Nakagawa Y., Yano A., Ito K., Kawarasaki Y.: High cell-density expression system: A novel method for extracellular production of "difficult-to-express" proteins, The 23rd Annual Meeting of the Thai Society of Biotechnology Systems Biotechnology, Bangkok, Thailand, Feb 1-2 (2012)
- (12) (関連する研究課題の学会発表) 長尾伸人、安東大介、小島晃代、河原崎泰昌、兒島孝明、中野秀雄「エマルジョン培養法による分泌酵素産生菌の選択的濃縮」日本生物工学会 2009 年度大会 (名古屋) 2009 年 9 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

研究成果の一部は、研究室ホームページ  
(<http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/geneng/index.html>)に記載、解説し、広く一般への公開に努めている。

## 6. 研究組織

研究代表者

- (1) 河原崎 泰昌
- (2) 静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授
- (3) 研究者番号 80303585

研究協力者

- (1) 伊藤圭祐
- (2) 静岡県立大学・食品栄養科学部・助教
- (3) 研究者番号 40580460

研究協力者

- (1) 中野秀雄
- (2) 名古屋大学大学院・生命農学研究科・教授
- (3) 研究者番号 00237348

研究協力者

- (1) 兒島孝明
- (2) 名古屋大学大学院・生命農学研究科・助教
- (3) 研究者番号 40509080