

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23651190

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを活用するプロテオミクス技術の開発

研究課題名(英文)Development of proteomics technology using next generation sequencer

研究代表者

宮本 悦子 (Miyamoto-Sato, Etsuko)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：70327708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：mRNA ディスプレイ法の一つである *in vitro virus* (IVV) 法は、タンパク質間相互作用の大規模解析に適した技術である。これまでの IVV 法では、相互作用するタンパク質の一方をベイトとして個別に調製する工程が律速となることから、相互作用するタンパク質対の両方を精製することなく組み合わせを検出する手法の開発を実施した。その結果、相互作用のみられた対応付け分子複合体の架橋、エマルジョン PCR および次世代シーケンサーによる配列解析によって、ベイトフリーな相互作用対の検出が可能であることを明らかにした。今回開発した新手法により、簡便で網羅的なタンパク質間相互作用解析が可能となる。

研究成果の概要(英文)：In vitro virus (IVV) technology, a variation of mRNA display, is suitable for extensive protein-protein interaction analysis. Previous IVV method requires bait protein preparation which become the rate-limiting step. This work aimed to develop IVV method which is not need bait molecule purification. Chimeric DNA whose ends are corresponding to interacting pair can prepare by cross-linking of IVV molecule complex and following emulsion PCR, and next generation sequencing of the DNA can detect interacting pair data without bait preparation step. This novel method serves as the foundation of simple and comprehensive protein-protein interaction analysis.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：プロテオーム 次世代シーケンサー インタラクトーム IVV

1. 研究開始当初の背景

生命現象を動的な分子システムとして理解するには、核酸やタンパク質が関与する分子間相互作用を、網羅的に記述する必要がある。次世代型シーケンサをトランスクリプトームやプロテオーム解析に導入し、タンパク質・DNA・RNA に関する分子間相互作用情報を、大量に取得する試みがなされている (Review: Morozova & Marra, *Genome Res.* **19**, 521-532, 2009) が、タンパク質間相互作用におけるタンパク質情報を、次世代シーケンサから直接得ることはできない。相互作用に関与するタンパク質情報を DNA 塩基配列に変換し、次世代シーケンサで解析できれば、情報を大量に、そして迅速に得ることができ、プロテオミクス研究は飛躍的に進展する。

申請者らが開発した *in vitro* virus 法 (IVV 法、mRNA display 法の一つ) では、mRNA とそれがコードするタンパク質が共有結合で連結した対応付け分子を用いることで、タンパク質のアミノ酸配列情報を、DNA の塩基配列情報として取り出す。IVV 法は、サンガー型 DNA シーケンサと組み合わせることで、それまで知られていなかった多くのタンパク質間相互作用を明らかにした実績がある (Miyamoto-Sato *et al.*, *PLoS One*, 2010)。しかし、これまでの IVV 法では mRNA-protein 対応付け分子をアフィニティ選択するために、標的タンパク質 (bait と呼ぶ) をビースなどに固定する必要がある。したがって、大規模な解析を行うには数多くの bait をそれぞれ調製し、個別にアフィニティ選択を行うことになり、次世代型シーケンサが提供する情報量を十分活かすように試料を調製することは困難であった。

2. 研究の目的

IVV 法を次世代型シーケンサと組み合わせる際の最大の障壁は bait の調製である。そこで、本研究では bait の調製を必要としない次世代型の IVV 法を開発する。具体的には、mRNA-protein 対応付け分子どうしの会合を、2 種類の mRNA 配列が向い合せにつながった DNA 配列として取得できる方法を考案し、その技術的確立をめざす。

3. 研究の方法

申請者は、以下のような次世代型 IVV 法の実験スキームを考案した (括弧内アルファベットは、図 1 に対応)。

- (1) mRNA の 5' 側末端と 3' 側末端にそれぞれ共通の配列をもつような cDNA ライブラリを調製する。
- (2) 現在の IVV 法と同様の方法で、cDNA ライブラリから mRNA-protein 対応付け分子(a)を合成する。タンパク質間相互作用を形成した対応付け分子どうしは、mRNA の 5' 末端が近接する確率が上昇する(b)。
- (3) 対応付け分子の 5' 末端への相補性を有し、かつ自己相補配列を持つオリゴ DNA (リンカー DNA) を加える。対応付け分子どうしがタンパク質間相互作用を形成していれば、添加したオリゴ DNA を介して 5' 末端どうしが結び付けられる(c)。

(4) mRNA の 3' 末端に相補的なプライマーを用いて逆転写反応を行う(d)。

(5) DNA リガーゼを用いて、伸長した cDNA とリンカー DNA を連結する(e)。

(6) RNase H を用いて RNA を分解する(f)。

(7) DNA ポリメラーゼを用いて cDNA の 3' 側を伸長し(g)、二本鎖 DNA とする(h)。

- (4) mRNA の 3' 末端に相補的なプライマーを用いて逆転写反応を行う(d)。
- (5) DNA リガーゼを用いて、伸長した cDNA とリンカー DNA を連結する(e)。
- (6) RNase H を用いて RNA を分解する(f)。
- (7) DNA ポリメラーゼを用いて cDNA の 3' 側を伸長し(g)、二本鎖 DNA とする(h)。

本研究では、まず考案したスキームで、2 種類の mRNA 配列が向い合せにつながった DNA 配列を簡便に得ることができるかどうかを検証した。

検証は、相互作用の形成が既知であるモデル分子 (転写因子 Fos および Jun の相互作用領域) を用い、従来の IVV 法からの改良点である 3~7 の工程に対して実施した。

4. 研究成果

近接ライゲーション法の検証

精製した IVV 分子の mRNA 部分を逆転写し、相補的な DNA を合成した。その後、回収した Fos および Jun に対応する IVV 分子を含む溶液にリンカーを添加し、DNA リガーゼを用いて連結反応を行った。さらに、RNA 分解酵素を用いて IVV 分子の mRNA 部分を分解し、DNA ポリメラーゼを用いて伸長反応を行った。最

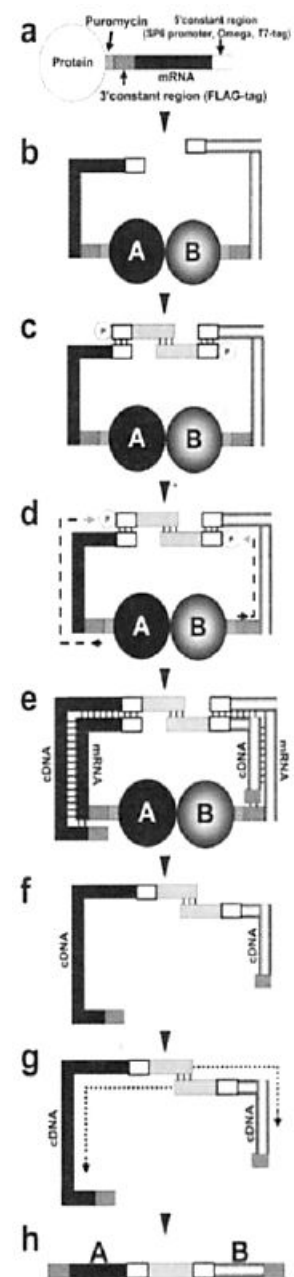


図 1. 次世代型 IVV 法の実験スキーム (近接ライゲーション法)

後に、Fos および Jun をコードする塩基配列に対するプライマーを用いて PCR を行った。その結果、目的産物の長さに対応する 300 400bp の塩基長をもつ DNA のバンドを確認した。しかし、リンカー-DNA を介して遺伝子が連結されたコンストラクトは、PCR での確認は可能であるものの、合成効率が著しく低いことが判明した。また、近接ライゲーション法は複雑な行程が多く、実験が長期化するという問題点も浮上した。以上より、図 1 で示した実験スキームは、タンパク質の相互作用と対応付けられる DNA コンストラクトを簡便に得る、という当初の要求を満たさないと判断した。

スキームの改良と検証

当初の実験スキームを変更し、対応付け分子の複合体を水滴内に 1 個だけ封入し、その中で PCR を行うことで分子間相互作用を検出する方法（エマルジョン PCR 法）を用いることを考案した（図 2）。これが実現できた場合、実験手順の大幅な短縮と特異的な相互作用の効率的な検出が可能となり、解析精度を飛躍的に向上できる。

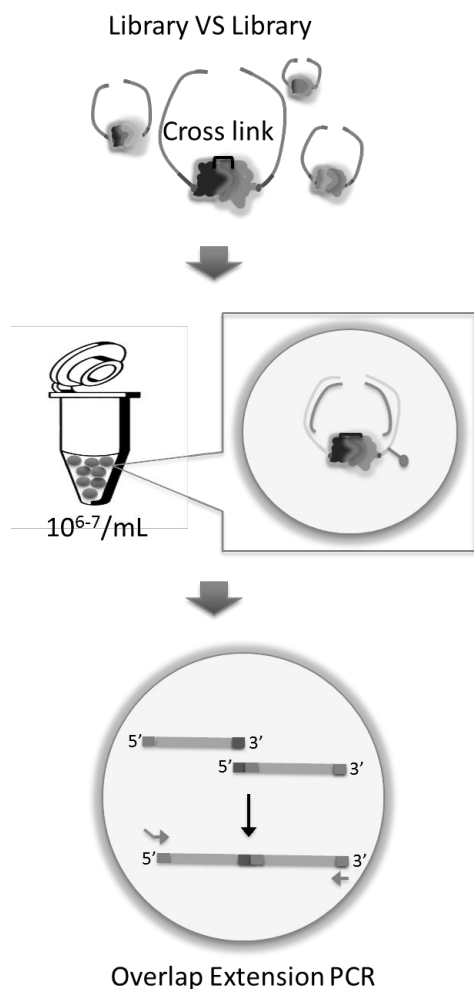


図 2. 次世代型 IVV 法の改良スキーム（エマルジョン PCR 法による検出）

エマルジョン PCR による解析を想定した予備的な実験において、目的の分子どうしが相

互作用すること、さらにその相互作用がコントロールと比較して 30 倍以上の濃縮効率を示すことを確認した。

また、弱い相互作用によって形成された複合体では、エマルジョンへの封入処理の際にタンパク質どうしが解離することが想定されるため、複合体を形成したタンパク質どうしを架橋することで複合体の安定化が可能か検討した。モデル分子として Fos-Jun を用いた系では、架橋反応によって複合体の濃縮効率が 20 倍になること、相互作用がみられない既知の IVV 分子の共存によって架橋反応が競合する系においても、Fos-Jun の組み合わせで架橋された分子が多く検出されることを確認した（図 3）。以上より、架橋反応によって、IVV 対応付け分子複合体の安定化と、それに続くエマルジョン PCR による増幅が可能であることを明らかにした。

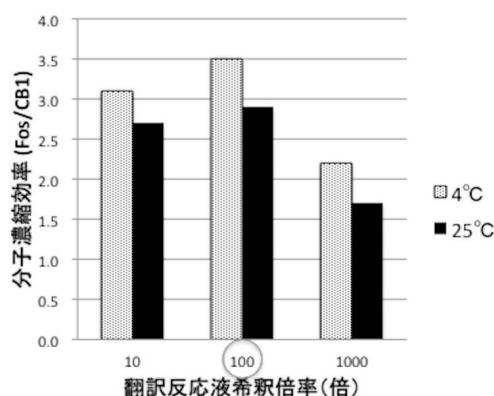


図 3. 競合分子存在下での架橋反応時における温度と翻訳反応液の濃度の影響（Fos-Jun 系、競合分子：CB1）

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 11 件)

Ohashi, H. and Miyamoto-Sato, E.: A next generation evolutionary molecular engineering system and the future prospects. *Viva Origino* **40**, 25 (2012) 査読有

Fujimori, S., Hirai, N., Masuoka, K., Oshikubo, T., Yamashita, T., Washio, T., Saito, A., Nagasaki, M., Miyano, S. and Miyamoto-Sato, E.: IRView: a database and viewer for protein interacting regions. *Bioinformatics* **28**(14), 1949-1950 (2012), doi: 10.1093/bioinformatics/bts289 査読有

Fujimori, S., Hino, K., Saito, A., Miyano, S. and Miyamoto-Sato, E.: PRD: A protein-RNA interaction database. *Bioinformatics* **8**(15), 729-730 (2012), doi: 10.6026/97320630008729 査読有

Fujimori, S., Hirai, N., Ohashi, H., Masuoka, K., Nishikimi, A., Fukui, Y., Washio, T., Oshikubo, T., Yamashita, T. and Miyamoto-Sato, E.: Next-generation sequencing coupled with a cell-free display technology for high-throughput production of reliable interactome data. *Scientific Reports* **2**, 691 (2012), doi: 10.1038/srep00691 査読有
Ohashi, H., Ishizaka, M., Hirai, N., and Miyamoto-Sato, E.: Efficiency of puromycin-based technologies mediated by release factors and a ribosome recycling factor. *Protein Engineering, Design and Selection* **8**, 533-537 (2013), doi: 10.1093/protein/gzt031 査読有

Ohashi, H. and Miyamoto-Sato, E.: Toward personalized medicine mediated by mRNA display-based interactome approaches. *International Journal of Molecular Sciences* (in press) 査読有

Akiyama, T., Shiraiishi, T., Qin, J., Konno, H., Akiyama, N., Shinzawa, M., Miyauchi, M., Takizawa, N., Yanai, H., Ohashi, H., Miyamoto-Sato, E., Yanagawa H., Yong, W., Shou, W., and Inoue, J.: Mitochondria-nucleus shuttling FK506-binding protein 51 interacts with TRAF proteins and facilitates the RIG-I-like receptor-mediated expression of type I IFN. *PLoS ONE* (in press) 査読有

Ohashi, H. and Miyamoto-Sato, E.: Next-generation sequencing technologies for multi-omics approaches. *BioMed Research International* (in press) 査読有

Ohashi, H., Fujimori, S., Hirai, N., Yanagawa H. and Miyamoto-Sato, E.: Analysis of Transcription Factor Networks using IVV Method. *Methods in Molecular Biology* (in press)

Miyamoto-Sato, E.: Next-generation Sequencing Coupled with a Cell-free Display Technology for Reliable Interactome of Translational Factors. *Methods in Molecular Biology* (in press)

宮本悦子、西川純一: インタラクトームが拓くパーソナル医療への展望『実験医学』(増刊)「ゲノム 医学・生命科学研究」総集編 **31**(15), 2405-2411 (2013)

[学会発表](計 14 件)

大橋広行、宮本悦子; 次世代型進化分子工学的手法の構築とその展望; 第 37 回生

命の起原および進化学会学術講演会、2012 年 3 月 8 日、大阪薬科大学(大阪府)

Miyamoto-Sato, E.; Next-generation sequencing to generate interactome data for understanding and control of cancer stem cells.; The 19th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research., 2012 年 8 月 23 日~2012 年 8 月 24 日、Seoul National University (Seoul, Korea) 招待

Miyamoto-Sato, E.; Toward Understanding and Control of Cancer Stem Cells using IVV-HiTSeq for Personal Omics.; 第 7 回研究所ネットワーク国際シンポジウム、2012 年 6 月 14 日~2012 年 6 月 15 日、東北大学(宮城県) 招待

宮本悦子、藤森茂雄、大橋広行、平井直也、清水孝恒、佐谷秀行、井本清哉、山口類、宮野悟、森泰昌、川畑順子、増岡和代; 統合的オミクス解析に基づく癌幹細胞の個性の理解と制御に向けて; 第 7 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日、ロイトン札幌(北海道)

宮本悦子; ピューロマイシンテクノロジーのあゆみ -第 3 回資生堂女性研究者サイエンスグラント賞のインパクト-; 日本女性科学者の会 第 9 回学術大会、2012 年 10 月 8 日、アルカディア市ヶ谷(東京都) 藤森茂雄、清水孝恒、山口類、大橋広行、井本清哉、平井直也、川畑順子、佐谷秀行、宮野悟、宮本悦子; パーソナルゲノム医療: 細胞丸ごとオミクス解析によるがん幹細胞の理解と制御; 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、マリンメッセ福岡(福岡県)

藤森茂雄、大橋広行、平井直也、押久保朋宏、山下辰博、鷲尾尊規、斉藤あゆむ、宮野悟、宮本悦子; *In vitro* virus 法を用いたインタラクトーム解析とタンパク質相互作用領域データベースの構築; 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、マリンメッセ福岡(福岡県) 大橋広行、藤森茂雄、平井直也、清水孝恒、佐谷秀行、宮本悦子; パーソナルゲノム医療に向けた細胞丸ごとインタラクトーム解析技術の開発; 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、マリンメッセ福岡(福岡県)

宮本悦子; ピューロマイシンを利用したたんぱく質検出技術が拓くインタラクトーム医科学; 東京理科大 第 5 1 回同窓学位取得者記念講演会・祝賀会、2013 年 7 月 20 日、東京理科大学 葛飾キャンパス(東京都)

西川純一、清水孝恒、井元清哉、山口類、佐谷秀行、宮野悟、宮本悦子; IVV スクエア: パーソナル医療に向けた細胞丸ごとインタラクトーム解析法; 第 72 回日

本癌学会学術総会、2013年10月4日、
パシフィコ横浜（神奈川県）

西川純一、佐々木啓孝、大橋広行、平井直也、與儀琢也、宮本悦子；次世代の個の医療に向けたIVVスクエア法を基盤としたケミカルインタラクティブ技術の開発；第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日、神戸ポートアイランド（兵庫県）

西川純一、佐々木啓孝、大橋広行、平井直也、與儀琢也、清水孝恒、山口類、井元清哉、鷲尾尊規、山下辰博、佐谷秀行、宮野悟、宮本悦子；次世代の個の医療に向けたがんオミクス解析による標的たんぱく質抽出と分子標的薬の設計；第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日、神戸ポートアイランド（兵庫県）

佐々木啓孝、西川純一、内海典之、大橋広行、平井直也、與儀琢也、堤邦彦、宮本悦子；次世代の個の医療に向けたケミカルロックダウン法を基盤とした標的たんぱく質制御技術の開発；第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日、神戸ポートアイランド（兵庫県）

宮本悦子；次世代の個の医療のためのIVVディスプレイ法を基盤としたインタラクティブ医科学の展開；東京理科大学 生命医科学研究所 招待セミナー、2014年1月14日、東京理科大学 生命医科学研究所（千葉県） 招待

〔図書〕（計 1 件）

Miyamoto-Sato, E., Ohashi, H., Sasaki, H., Nishikawa, J. and Yanagawa, H (eds.): Springer: Transcription Factor Regulatory Networks - Methods and Protocols. (*Methods in Molecular Biology*, Vol. 1164)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：標的物質と相互作用するタンパク質の検出方法

発明者：宮本悦子，藤森茂雄

権利者：東京大学

種類：特許

番号：特願 2011-213424

出願年月日：2011年09月28日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

・報道関連情報

月刊化学経済5月号（2011年5月1日）に掲載

<http://www.kagakukogyonippo.com/monthly/backnumber/201105.html>

（記事全文）

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/int>

[eractome/web_materials/kagakukezai.pdf](http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/interactome/web_materials/kagakukezai.pdf)

日経バイオテク（2012年10月9日）に掲載

<https://bio.nikkeibp.co.jp/article/news/20121005/163633/>

東京大学医科学研究所ホームページに掲載

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/research/papers/ivv.php>

マイナビニュース（2012年10月24日）に掲載

<http://news.mynavi.jp/news/2012/10/24/033/>

Yahoo!Japan ニュースに掲載

日本経済新聞（2012年11月20日）に掲載

<http://www.nikkei.com/article/DGXNZ048609040Z11C12A1TJM000/>

（記事全文）

http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/interactome/web_materials/nikkei_2012-11-20.pdf

Nature Japan「注目の論文」に掲載

<http://www.natureasia.com/ja-jp/srep/abstracts/40682>

日経産業新聞（2012年12月6日）に掲載

（記事全文）

http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/interactome/web_materials/press_sentanjin.pdf

・ホームページ情報

研究室

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/interactome/info.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本悦子 (MIYAMOTO-SATO ETSUKO)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：70327708