

機関番号：34506

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21850027

研究課題名（和文） 動物由来の生細胞内におけるタンパク質間相互作用の定量的解析

研究課題名（英文） Quantitative analysis of protein-protein interaction
inside animal-derived cells

研究代表者

臼井 健二 (USUI KENJI)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・講師

研究者番号：70543792

研究成果の概要（和文）：

相互作用に関与する2種のタンパク質の発現量を、ペプチド核酸導入ペプチドを用いることにより自在に変化させることで、動物由来の生細胞内でのタンパク質同士の相互作用を詳細かつ定量的に解析できる系の構築を目指した。具体的には、新規タンパク質発現制御システムの構築、自己相互作用をモデルにした細胞内外における相互作用検出系の構築、高効率解析を実現するための細胞アレイの構築の三点の基盤的事項の確立に成功した。

研究成果の概要（英文）：

Construction of quantitative analysis system for protein-protein interaction inside animal-derived cells was attempted with controlling those protein expression levels using peptide nucleic acid (PNA)-peptide conjugates. We successfully achieved three indispensable basic elements for the system as follows: (1) construction of novel protein-expression control system, (2) construction of detection system for self-assembly reaction as a first step in establishing the analysis system of protein-protein interaction inside cells, (3) construction of cell array system for high-throughput analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,090,000	327,000	1,417,000
2010年度	990,000	297,000	1,287,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,080,000	624,000	2,704,000

研究分野：生体高分子科学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：(1)タンパク質 (2)発現制御 (3)細胞アレイ (4)ナノバイオ (5)タンパク質の自己相互作用 (6)ペプチド核酸(PNA) (7)核酸の四重鎖構造 (8) アミロイド

1. 研究開始当初の背景

細胞内では、機能特性をもった生体分子の相互作用によるネットワークが、様々な生命現象の根幹をなしている。これら生体分子間の連続的かつ複雑に絡むネットワークは、生体

分子の量や機能活性・結合力などにより緻密かつ動的に制御されている。ポストゲノム時代と言われる現在、この細胞内分子間ネットワークを解析するためには、細胞内において目的生体分子の発現量を調節して、相互作用

を詳細かつ定量的に評価できる系が必要となる。試験管内とは異なり、細胞内は分子がかなり込み合ったクラウディング状態である。一部の生体分子、例えばDNAなどでは、PEGを利用した擬似細胞環境における相互作用解析に成功している (S. Nakano *et al.* (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 14330 など)。しかしながら、実際の細胞内での挙動との比較や、DNAのみならずタンパク質など他の生体分子の相互作用を評価するためには、細胞内で直接測定できる系が必要となる。細胞内相互作用の結合定数などの詳細なパラメータを求めることが出来れば、試験管内とは異なり正確に細胞内での実際の相互作用を把握できることになる。以上が達成できれば、タンパク質ネットワークの化学的視点による詳細な解析が可能となり、それを応用したタンパク質工学・細胞工学への展開など、医療・材料・学術分野に大きく貢献できると考えられる。

2. 研究の目的

細胞内でタンパク質の相互作用を定量的に解析できる技術は、試験管内よりもより正確な細胞内での実際のタンパク質の相互作用や作用機序の把握につながり、この知見をもとに細胞内タンパク質間ネットワークの制御や、成長・分化・細胞死といった細胞の生理的活動の調節などへの展開が期待できる。本研究では、目的の相互作用に關与する2種のタンパク質の発現量を、ペプチド核酸(PNA)導入ペプチドなどを用いることにより自在に変化させることで、動物由来の生細胞内でのタンパク質同士の相互作用を詳細かつ定量的に解析できる系の構築を目指した。そのために、(1) 新規タンパク質発現制御システムの構築、(2) 自己相互作用をモデルにした細胞内、近傍における相互作用検出系の構築、(3) 高効率解析を実現するための細胞アレイの構築、の三点の基盤的事項の確立を主に行った。これらの技術を組み合わせることで、今後、細胞内タンパク質の相互作用を詳細に解析できる系の確立が期待できる。このような系が構築できれば、その知見から細胞工学やタンパク質工学への応用が期待でき、医療・材料・学術分野に大きく貢献できると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 新規タンパク質発現制御システムの構築

上記目的を踏まえて、まずは細胞内で複数種のターゲットタンパク質の発現量を別々に制御できる系の構築を試みる。発現制御には、核酸に高次構造を取らせてその立体障害によって転写や翻訳を制御する、ペプチド核酸(PNA)導入ペプチドを用いる新規の方法を

検討した。具体的には、グアニンに富む核酸配列を四重鎖構造へ誘起させ、さらに特定の酵素の発現などの細胞内環境変化でその核酸構造を変化させる、PNA含有ペプチドの創製を行った。本ペプチドはグアニンPNAに富んだ配列により核酸の四重鎖形成を誘起させる部位と、プロテアーゼ基質配列部位から構成される。これにより、プロテアーゼ非存在下では本ペプチドは核酸の四重鎖構造形成を誘起し、プロテアーゼ存在下では本ペプチドが切断されてその構造誘起能を失うという核酸構造制御系が構築できる。

(2) 自己相互作用をモデルにした細胞内、近傍における相互作用検出系の構築

相互作用解析の第一段階として、細胞内でのアミロイドβペプチド(Aβ)の凝集(自己相互作用)の度合いを検出できる蛍光・発光タンパク質融合Aβを構築し、自己相互作用の詳細解析系の構築を試みることにした。実際に本タンパク質を外側から添加することによる細胞の外側、近傍でのAβの凝集の様子、あるいは本タンパク質を細胞内で発現させて内側でのAβの凝集の様子を観察した。

(3) 高効率解析を実現するための細胞アレイの構築

相互作用を詳細に解析するためには、目的タンパク質の発現量を様々に変化した多数の細胞を網羅的に測定できるシステムが求められる。そこで、網羅的検出・解析が可能となるように、細胞アレイの構築を行った。具体的には、細胞の生理的活動の度合いを検出・解析できる系の確立を目指し、そのモデルとして、ペプチドライブラリの細胞死活性を解析する系の確立を試みた。また、細胞内を詳細に解析できる共焦点顕微鏡を用いた解析法も構築した。

4. 研究成果

(1) 新規タンパク質発現制御システムの構築 (図1)

プロテアーゼ基質配列をもつPNA導入ペプチドの設計・合成をまず行った。次に、このペプチドの添加による核酸の四重鎖構造の誘起を円二色性スペクトル、紫外可視吸収スペクトルによる融解曲線などで、確認した。またプロテアーゼによるペプチドの切断を高速液体クロマトグラフィーやマススペクトルにより確認し、プロテアーゼによるペプチドの切断前後の核酸構造の変化も確認した。以上の知見をもとに今後、本ペプチドを用いて、実際に生体疑似環境などでの四重鎖構造制御や、細胞内などで

本法を利用したタンパク質発現制御などの系の構築が期待できる。本研究成果は、本目標達成のみならず、動物細胞内で成長や細胞死、分化や疾病などに関与するタンパク質の発現制御が可能であるので、細胞の生理的活動の調節などへの応用にもつながり、細胞工学分野における革新的な技術となり得ることが期待できる。(Peptides 2010, 2010, 608-609 (2010))

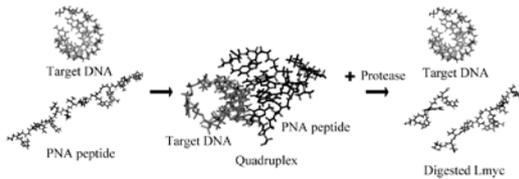


図1 本研究の概要

(2) 自己相互作用をモデルにした細胞内、近傍における相互作用検出系の構築
 $A\beta$ との親和性および構造変化を見込むために、 $A\beta$ 認識・構造変化部位として、 $A\beta$ の全配列や部分配列を用い、構造変化に伴う蛍光・発光変化には蛍光タンパク質 EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein)と発光タンパク質 hRluc (humanized Renilla luciferase)を $A\beta$ 配列両末端にそれぞれ配置した融合タンパク質を構築した(図2)。その結果、蛍光により $A\beta$ の分布を把握することができ、発光により $A\beta$ の構造変化を把握することができる検出系を確立することができた。細胞にこの融合タンパク質と $A\beta$ を混合し凝集させたものを添加したところ、 $A\beta$ の細胞表面の局在を蛍光によって検出することができた。今後は共焦点顕微鏡を用いて、細胞内の詳細な $A\beta$ 分布の解析を行っていく。以上の知見は、いまだ完全には解明されていない $A\beta$ の神経細胞毒性機構および、細胞内外や近傍での挙動、オリゴマーや線維と毒性の関係などの解明にもつながり、医療分野にも大きく貢献できると考えられる。(Peptide Science 2009, 2009, 111 (2010), Peptides 2010, 2010, 488 (2010))

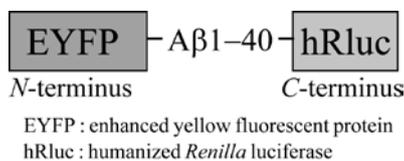


図2 本研究で用いた融合タンパク質

(3) 高効率解析を実現するための細胞アレイの構築
 多数の定量的データを一度に迅速に取得できるよう「細胞の生理的活動解析用アレイ」の構築も行った。まず、細胞死活性を有する

ペプチドの高効率探索法をモデルとしてアレイ構築法を検討することにした(図3)。細胞種や分化の違いなどによって、細胞死活性が異なるペプチドを見出せば、組織構築の際にある特定の細胞を除去し、別の特定の細胞だけの成長を促すことができ、細胞工学、組織工学への応用が期待できる。 α -ヘリックスペプチドアレイ (FEBS J., 277, 1996 (2010), Methods. Mol. Biol., 570, 273 (2009))を用いてアッセイで得られた結果を、色のバーコードで表したものが「セルフィンガープリント(CFP)」であり、細胞死などの応答を指標に、細胞種や分化の度合いなどが特徴づけられることを示せた。さらにCFPを解析することにより、ある特定の細胞種のみ細胞死を導くペプチドも見出せる。また、詳細な解析が可能な細胞観察用アレイ開発に向け、共焦点顕微鏡を用いた検出法も確立した。モデルとして、細胞膜透過活性を有するペプチドの探索を行った。近年、膜透過ペプチドをキャリアとして、様々な機能分子を細胞内に導入する研究が盛んに報告されており、前述の細胞死との結果も組み合わせ、特定の細胞に導入されて細胞死させるペプチドや導入されても局在の仕方が異なるペプチドなどが探索できれば、工学的意義高いものとなる。このような観点から、共焦点顕微鏡を用いてより詳細な膜透過活性の解析を行うことで、新規膜透過ペプチドの探索を目指した。本法は現状では効率性には欠けるものの、一細胞ごとに細胞内の様子を観察できる点で重要な方法である。また、膜透過に限らず、細胞制御分子による細胞の局所的な変化の解析は今後、さらに需要が高まると考えられ、共焦点顕微鏡の自動スキャンなどの機械工学的な技術の開発や、情報処理技術との融合による画像の高効率なデータ化方法の確立などが必要となる。本アレイは、次世代アレイの有力な候補であり、本解析だけではなく、創薬スクリーニングや診断にも応用が可能であり生命科学分野の有用なツールの一つになると期待できる。(「化学フロンティア 22 生命現象を理解する分子ツール」、化学同人、79 (2010)、「シングルセル解析の最前線」、シーエムシー出版、17 (2010))

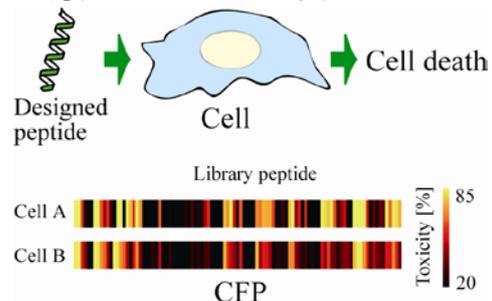


図3 細胞死活性検出用細胞アレイの概要

以上を総合的に組み合わせることで、当初の目的である細胞内のタンパク質相互作用の詳細な解析が可能となる。これより、本研究の目的であった解析システムの基盤的技術の確立が達成でき、予定していた成果を挙げることができた。

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8件)

- ① S. Pramanik, K. Nakamura, K. Usui, S. Nakano, S. Saxena, J. Matsui, D. Miyoshi, N. Sugimoto, "Thermodynamic stability of Hoogsteen and Watson-Crick base pairs in the presence of histone H3-mimicking peptide" *Chem. Commun.*, **47**, 2790-2792 (2011) 査読有
- ② K. Usui, J. D. Hulleman, J. F. Paulsson, S. J. Siegel, E. T. Powers, J. W. Kelly, "Nanomolar aggregation of amyloid-beta peptides covalently and site-specifically modified by cholesterol oxidation products", *Peptides* **2008**, **2008**, 588-599 (2010) 査読有
- ③ K. Usui, M. Mie, T. Andou, N. Sugimoto, H. Mihara, E. Kobatake, "Construction of detection system for Amyloid beta peptide localization and aggregation using fluorescent and luminescent fusion proteins" *Peptide Science 2009* (K. Okamoto, Ed.), **2009**, 111-112 (2010) 査読有
- ④ K. Usui, M. Mie, T. Andou, N. Sugimoto, H. Mihara, E. Kobatake, "Fluorescent and luminescent fusion proteins for detection of Amyloid beta peptide localization and aggregation", *Peptides* **2010**, **2010**, 488-489 (2010) 査読有
- ⑤ K. Usui, K. Kobayashi, N. Sugimoto, "PNA-peptide conjugates for regulation of DNA and RNA G-quadruplex structures depending on a particular protease concentration", *Peptides* **2010**, **2010**, 608-609 (2010) 査読有
- ⑥ K.-Y. Tomizaki, K. Usui, H. Mihara, "Protein-protein interactions and selection: array-based techniques for screening disease-associated biomarkers in predictive/early diagnosis", *FEBS J.*, **277**, 1996-2005 (2010) 査読有
- ⑦ K. Usui, K.-Y. Tomizaki, H. Mihara, "A designed peptide chip: protein fingerprinting technology with a dry peptide array and statistical data mining" *Methods. Mol. Biol.*, **570**, 273-284 (2009) 査読有
- ⑧ K. Usui, J. D. Hulleman, J. F. Paulsson, S. J. Siegel, E. T. Powers, J. W. Kelly, "Site-specific modification of Alzheimer's peptides by cholesterol oxidation products enhances aggregation energetics and neurotoxicity" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 18563-18568 (2009) 査読有

[学会発表] (計16件)

- ① 宮崎洋、白井健二、藤井敏司、「蛍光標識ペプチドとジチオカルバメート鉄錯体による新規NOセンサーの構築」、日本化学会第91春季年会、2011年3月26日～3月29日、神奈川県横浜市
- ② 白井健二、小林慶太、杉本直己、「PNA含有ペプチドを用いてDNA四重鎖構造を特定プロテアーゼの有無によって制御する」、第13回生命化学研究会シンポジウム、2011年1月7日、宮城県仙台市
- ③ K. Usui, E. T. Powers, J. F. Paulsson, S. J. Siegel, J. W. Kelly, "Nanomolar aggregation and neurotoxicity of Amyloid beta peptides with site-specific modification of oxidized cholesterol", 5th International Peptide Symposium, 2010年12月4日～12月9日, Kyoto, Japan
- ④ T. Kikuchi, K. Usui, T. Takahashi, H. Mihara, "Designed peptide libraries for protein and cell analyses", 5th International Peptide Symposium, 2010年12月4日～12月9日, Kyoto, Japan
- ⑤ 白井健二、小林慶太、杉本直己、「核酸の四重鎖構造を特定のプロテアーゼの有無によって制御できるPNA含有ペプチド」第4回バイオ関連化学シンポジウム、2010年9月24日～9月26日、大阪府豊中市
- ⑥ K. Usui, E. T. Powers, J. F. Paulsson, S. J. Siegel, J. W. Kelly, "Enhancement of aggregation energetics and neurotoxicity by site-specific modification of amyloid beta peptides with oxidized cholesterol", 31st European Peptide Symposium, 2010年9月5日～9月9日, Copenhagen, Denmark
- ⑦ K. Usui, K. Kobayashi, N. Sugimoto, "PNA-peptide conjugates for regulation of DNA and RNA G-quadruplex structures depending on a particular protease concentration", 31st European Peptide Symposium, 2010年9月5日～9月9日, Copenhagen, Denmark
- ⑧ K. Usui, M. Mie, T. Andou, N. Sugimoto, H. Mihara, E. Kobatake, "Fluorescent

- and luminescent fusion proteins for detection of Amyloid beta peptide localization and aggregation”, 31st European Peptide Symposium, 2010年9月5日～9月9日, Copenhagen, Denmark
- ⑨ K. Usui, "Data mining of protein fingerprints and cell fingerprints from designed alpha-helical peptide arrays", 第4回 HiPep 沖縄国際ワークショップ, 2010年7月9日～7月11日, 沖縄県那覇市
- ⑩ 菊池卓哉、臼井健二、高橋剛、三原久和、「 α ヘリックスペプチドの細胞導入活性スクリーニング及び細胞死活性評価」、日本化学会第90春季年会、2010年3月26日～29日、大阪府東大阪市
- ⑪ 小林慶太、臼井健二、杉本直己、「核酸四重鎖構造を制御するPNA含有ペプチドの構築」、日本化学会第90春季年会、2010年3月26日～29日、大阪府東大阪市
- ⑫ 臼井健二、「タンパク質解析・細胞解析用ペプチドチップ」、バイオプロセッシング研究会（バイオ単分子研究会）、2010年3月23日、東京都千代田区
- ⑬ T. Kikuchi, K. Usui, T. Takahashi, H. Mihara, "Screening of peptides with cell penetrating activity against various types of cells from a novel alpha-helical peptide library", 3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium, Nov. 8-11, 2009, Jeju (Korea)
- ⑭ K. Usui, M. Mie, T. Andou, N. Sugimoto, H. Mihara, E. Kobatake, "Construction of detection system for Amyloid beta peptide localization and aggregation using fluorescent and luminescent fusion proteins", 第46回ペプチド討論会, 2009年11月4日～6日, 福岡県北九州市
- ⑮ 臼井健二、三重正和、杉本直己、三原久和、小島英理、「細胞内外でのアミロイド β ペプチドの局在と構造変化を検出できる発光・蛍光タンパク質の構築」、第24回生体機能関連化学シンポジウム、第12回バイオテクノロジー部会シンポジウム、2009年9月13日～15日、福岡県福岡市
- ⑯ 菊池卓哉、臼井健二、高橋剛、三原久和、「種々の細胞系を用いた新規 α ヘリックスペプチドの細胞導入活性スクリーニング」、第24回生体機能関連化学シンポジウム、第12回バイオテクノロジー部会シンポジウム、2009年9月13日～15日、福岡県福岡市

〔図書〕(計3件)

- ① 臼井健二、富崎欣也、三原久和、株式会社化学同人、「化学フロンティア22 生命

現象を理解する分子ツール」 ”第10章 デザインペプチドを用いたプロテインアレイと細胞アレイ”、79-87 (2010)

- ② 臼井健二、菊池卓哉、三原久和、株式会社シーエムシー出版、「シングルセル解析の最前線」 ”タンパク質・細胞分析用デザインペプチドチップ”、17-24 (2010)
- ③ 臼井健二、富崎欣也、三原久和、株式会社エヌ・ティー・エス、「超分子サイエンス&テクノロジー」 ”プロテインチップデバイス”、1067-1075 (2009)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.usui-lab.com/>

および

http://www.konan-first.jp/graduate/ti_205_a.html

および

http://www.konan-first.jp/database/search.php?keyword=&author=2&from_year=0&to_year=0&searchEssay=Search&hideInfo=essay#resultList

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼井 健二 (USUI KENJI)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部
・講師

研究者番号：70543792

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：