

*タンパク質機能解析・活用プロジェクト

1) 概要

本事業は、我が国が優位性を保持するヒト完全長 cDNA 等を利用して、多数のタンパク質の多方面からの機能解析を実施し、系統的で網羅的な機能情報データ等を蓄積することにより知的基盤を整備し、我が国のバイオ産業活動の振興に資することを目的としている。

これまでの研究開発の成果として、タンパク質発現および機能解析のための知的基盤の整備がほぼ終了し、17年度はこの知的基盤を用いたタンパク質の機能解析および産業化応用研究、そして次期展開も踏まえた研究開発を実施した。

2) 内容・成果

(1) スプライシング・バリエント cDNA クローンの取得技術の開発

スプライシング・バリエント (SV) cDNA を、プロジェクト開始時からの累積で1万4千個取得し、またその過程で対照となる既知 cDNA についても7千個取得できた。その中でも発現特異性のある転写開始点および選択的スプライシング (例えば組織選択的) にかかわる相当数のバリエントを取得し、疾患との関連を解析した。また、ヒト cDNA とそのスプライシング・バリエントの解析結果をデータベース化し、公開を予定している。

(2) タンパク質の大量発現技術の開発

ヒト cDNA の Gateway 導入クローンを全長 ORF 型で 47,000 クローン以上を、ドメイン ORF 型やプロセッシング ORF 型を含めると 60,000 クローン以上を作製した。これらの導入クローンを基に、コムギ胚芽無細胞タンパク質発現系を用いてハイスループットタンパク質発現技術の開発を行い、約 24,000 種類の導入クローンからタンパク質発現を行った。さらにこれらの発現タンパク質を用いてプロテインマイクロアレイの作製を行った。また、300 種以上のプロテインキナーゼをコムギ胚芽無細胞タンパク質発現系を用いて発現させ、活性評価を行った。一方、プロテインファクトリーによって、大腸菌 *in vivo* および *in vitro* 発現系、カイコーバキュロウイルス発現系、ブレビバチルス発現系等を Gateway システム化し、作製した導入クローンのタンパク質発現を行い、各種発現系でのタンパク質発現情報をデータベース化した。また、これらの発現系で産生したタンパク質の一部について、活性の評価も行った。

(3) タンパク質の発現頻度解析技術の開発

① DNA マイクロアレイによる発現頻度解析

合成 DNA マイクロアレイシステムによる発現頻度解析では、1,536 種の SV を含め、31,872 種類の解析対象配列を同一平面上 (18 mm x 36 mm) に含むマイクロアレイの作製

を行い、約 1,200 種類のサンプル（培養細胞・組織）について、その遺伝子発現頻度情報を取得し、そのデータベース化を行った。これにより、全データから任意のサンプルと遺伝子の組み合わせを抽出して相互比較解析可能なデータシステムが構築できた。また、婦人科領域の悪性腫瘍・成人 T 細胞性白血病・エイズ等の臨床検体の遺伝子発現情報をプロファイリングした臨床情報および病理組織学的情報との関連性を解析できるデータを収集した。

② iAFLP 法による発現頻度解析

iAFLP 法による発現頻度解析では、ヒトについては約 32,000 種類のプライマーを用いて、389 件のサンプルでの発現頻度情報の取得とデータベース作成を行った。また、ラットについては、約 10,000 種類のプライマを用いて 29 種類の組織で、マウスについては約 18,000 種類のプライマーを用いて 30 種類の組織で、それぞれ発現頻度情報の取得を行った。この結果、ヒト、マウス、ラットの様々な組織に対して合計で 14,000,000 データポイントの発現頻度データを取得し、データベース化を行い、ヒトのデータの一部は成果活用推進事業Ⅱにて開示した。

(4) タンパク質相互作用解析技術の開発

① 質量分析計を用いた相互作用解析

質量分析計によるタンパク質相互作用解析では、大規模な相互作用解析システム（DNLC-MSMS システム）の自動化、効率化を実施し、17 年度は 3 つの質量分析計システムの同時稼働を実現し、スループットは合計で 450 サンプル/月が可能となった。17 年度は 2,762 個のサンプルについて解析を行い、今までの累積で 10,000 個以上のサンプルについて解析を終了した。高感度タンパク質分析技術を駆使し、発見された疾患関連相互作用は、創薬ターゲットとして重要なものが含まれている。発表論文は Nature 誌を含む主要な科学雑誌に 15 報報告した。

② 蛍光イメージングによる相互作用解析

蛍光イメージングによるタンパク質相互作用解析では、従来技術では検出が困難であった非常に弱い相互作用、瞬間的な相互作用をメモリーダイにて検出した。50 種類のタンパク質での相互作用シグナルを *in vitro*、*in situ* で測定し、シグナルの有無、局在情報を取得した。また、FCCS、マルチカラーイメージングに有用な蛍光タンパク質を 3 種開発した。FCCS は蛍光プローブの相対的な位置を考慮せずに相互作用解析ができる。通常は複数レーザーでそれぞれを励起しなければならないが、色収差の問題を解決することは困難を極める。そこで、一波長でそれぞれを励起できる蛍光タンパク質を開発した。

(5) 細胞レベルでのタンパク質機能解析技術の開発

① 細胞画像を用いた機能解析

高輝度蛍光発現クローン、ハイスループットな発現クローン調製、遺伝子導入技術、高感度・高精画像取得技術を確立し、24,000 検体/年の局在解析が可能となった。16,000 の FLJ cDNA クローンをもとに N 末、C 末に蛍光タグを付けた 32,000 の発現クローンを作製し、局在解析を行った。そして局在情報データベースを構築した。また、本局在解析技術を用いた有用遺伝子スクリーニングの検討を実施し、細胞外分泌タンパク質の検出系、局在変化を指標とした GPCR のリガンドスクリーニング系を構築した。細胞外分泌タンパク質については分泌予測クローン（約 1,000 クローン）についてスクリーニングを行い、約半数をポジティブクローンと判定した。

② 合成 siRNA を用いた機能解析

siRNA 医薬を実現するためには、in vivo においてサブナノモルで高活性を有するための配列デザイン、さらには類似配列をノックダウンする副作用の回避が最重要課題として挙げられる。siRNA の高機能化に関しては、エフェクター配列と RNAi 活性との相関を詳細に検討した結果、最適なエフェクター配列を導入することで RNAi 活性を 20-60% 向上させた。エフェクター配列を搭載した高機能性 siRNA は、1 nano mol 以下で十分な RNAi 効果を発揮する次世代型 siRNA として実用化可能であり、エフェクター配列を用いることで、最大で 5 倍の RNAi 効果の活性向上に成功した。本技術を用いて、ヒト遺伝子の効果的なノックダウンに成功しており、Nature 誌等主要な科学雑誌に 18 報を報告した。

(6) 総合調査研究

タンパク質機能解析プロジェクト研究推進委員会、及びタンパク質大量発現研究推進小委員会をそれぞれ 2 回開催し、研究進捗の委員による評価を行った。国内外の学会等の出席、外部機関による本分野の研究動向調査を実施した。

*：一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム事業報告書

(<http://www.jbic.or.jp/about/report/archive.html>) 事業最終年度より抜粋。