

機能的ゲノミクスに向けた新たなアプローチ

ブルース ブルンバーク

米国 カリフォルニア大学アーバイン校

菅野先生、御紹介ありがとうございます。私はこの会合へご招待くださった主催者、ならびに特に菅野先生と井上先生に感謝の意を表したいと思います。

本日はお話しするのは、私の研究室で取り組んでいる比較的新しい方法です。我々の研究目標の1つは、ゲノム研究と高スループットスクリーニングの間のギャップを埋めることです。そのためには、化学物質の作用を媒介している新しい標的遺伝子を同定することが必要であり、それをもとにして化学物質が生命体に影響を及ぼす機序を十分に理解することができます。

基本的な問題は、ゲノムや EST の塩基配列から数多くの遺伝子情報が集まってきており、これらの遺伝子にどのような機能があるかを知りたいということです。

遺伝子機能を理解するために現在用いられている方法の多くは、遺伝子が発現する時期と場所に関連しています。主にこのような方法が機能するのは、既にどのような遺伝子であるかが分かっており、Affymetrix GeneChips や様々な形態のマイクロアレイチップのような既知の遺伝子を搭載したチップを作成できる場合です。

この方法にも新たな遺伝子を調べる能力が多少はありますが、十分に確立された能力ではありません。我々が遺伝子機能を理解するのに有用と考えている方法の一つは、遺伝子が相互作用しているものが何かを同定することです。従って、研究対象とする標的がある場合は、その標的と相互作用する他の遺伝子産物が何であるかが問題となります。

それにはいくつかの方法があります。古典的な生化学的方法は馴染みの方法の1つで、十分に機能しますが、スループットはあまり高くありません。この用途に利用できる様々なイーストベースのスクリーンがあります。例えば、フェージディスプレイ、発現クローニング、および全く新しい分野のプロテオミクスがこれに利用できます。

基本的な問題は、細胞内では大半の遺伝子が極めて複雑に相互作用していることであり、従って、単一のタンパク質が単独で1つの機能を達成している例はほとんどありません。このスライドは、Wnt 信号伝達経路を用いてこれを例証しています。

ご覧の通り、細胞外の1個の分子である信号を例にとると、その信号は既に多数の分子の複合体である受容体を介して作用し、次いで、細胞内の信号伝達経路に入り、そこでは複数の相互作用でさらに複雑になります。ここにくると非常に大きな高分子複合体になり、最終的には、遺伝子発現を直接調整する転写因子が存在する細胞核に行きつきます。

この経路のごく一部の要素しか分かっていない場合は、どのようにすれば他の要素を速やかに解明することができるか考えてみましょう。なぜなら複合体のこれら他の要素は、薬理学および毒物学的研究や内分泌攪乱化合物としての可能性のある作用を研究する際の重要な新たな標的になることがあるからです。現状に達するまでに世界各地の数十ヶ所の研究室がほぼ20年をかけていますので、ゲノム全体についての解明作業を迅速に行うことが望ましいと言えます。

一般に採用される方法はフェージディスプレイ法であり、この方法でフェージ粒子の表面に融合タンパク質を発現させ、このタンパク質が研究対象とした標的と相互作用するかを検討します。これは非常に有益な方法であり、優れた情報が得られます。フェージディスプレイ法は二元的試験系です。1個のタンパク質があり、それが別のタンパク質と相互作用します。

優れているのは生化学的な厳密さを操作できる点で、これはすべての方法で行えるわけではありません。これが機能するように最適化するには、何度も試行することが必要で、すべての標的に利用できるわけではありません。また、ほとんどの場合、すべての行程を完了して最も近似した標的に到達するまでには、長期間を要するという結果になるでしょう。

イースト・ツー・ハイブリッド試験系は恐らく皆さんがご存知だと思いますが、この方法では DNA 結合ドメインと標的の融合タンパク質を使用し、タンパク質の他のフラグメントを活性化ドメインに融合させたときに、どちらが標的と相互作用して活性転写因子を再構成し、レポーター遺伝子の作用を誘導するかを観察します。

この試験系は非常に広範囲に使用されていますが、解決すべきいくつかの難問があります。これも二元的試験系です。結合パラメータは操作できません。従って、イースト細胞の何らかの細胞間特性にぶつかります。タンパク質と複合体の相互作用を検出することはできません。この試験系も長期間を要し、数多くの偽陽性が現れます。

発現クローニングは、理想的とされるタイプの試験系に若干近い方法です。発現クローニングでは、一般に大量の cDNA プールを使用し、プールに研究対象とする機能があるかどうかを試験します。試験の方法は数多くあります。陽性を示すプールが発見されたら、求めている作用を有する単一のコンポーネントが得られるまで、分離と再試験を繰り返します。

この試験系は、完全に機能的であるという点で他のアプローチよりも若干優れており、*in vivo* で実施することが可能であり、試験系は分泌されたタンパク質と受容体により機能しますが、これはすべての方法で行えるわけではありません。もちろん、問題点はあまり迅速には行えないことです。数多くのスクリーニングと再スクリーニングを行い、繰り返し同じ分子を観察することが必要です。プールのサイズに起因する感受性の問題があり、広範囲な再試験があります。

我々は、"molecular interaction screening (分子相互作用スクリーニング)" と名付けた新しい方法を開発しました。この方法の原理は、大量のプールを使う代わりに、比較的少量の cDNA プールを使用し、これらを用いてタンパク質のプールを作り、そのタンパク質プールから機能を分析します。利用可能な数多くの機能アッセイがあります。

我々の基礎的な資料は、収集した一連の cDNA です。それは、cDNA ライブラリー、すなわち個々の遺伝子を集めたものであり、UniGenes と称されることがあります。個々の遺伝子は、384 のウェルを有するプレートに配置されています。我々は、実験用自動装置を利用して、これらのソースプレートを娘プレートにプールします。プールのサイズは最適化することができます。我々は非常に使いやすいサイズとして 96 個を選択しています。

我々は、自動化した方法で、バクテリアを使用して DNA プールを調製し、それらを使用してタンパク質を調製します。次に、このタンパク質を機能アッセイに使用します。このスクリーニングにより陽性が得られたら、次のステップに進み、その陽性のプールからコンポーネントを分離して、再び試験します。これらの陽性のプールは、既知の原資料から作成されているため、構成は既に明らかです。この試験系は、スクリーニング開始から完了までわずか 2 段階のプロセスです。

ここにプールの様子を描写した画像があります。我々はこの個々のプレートを配置しており、これらは娘プレートにプールされます。我々は 96 種のタンパク質を含むプール 96 個を使用しています。このアッセイを行うために現在我々が採用している方法は放射性シンチレーション近接アッセイです。我々は *in vitro* で放射性タンパク質を作成し、このタンパク質が特殊なプレート上に我々が固定した標的と相互作用するかどうかを検討します。プール中の何かと標的との間に相互作用がある場合は、検出可能なシンチレーション現象が得られます。

このアッセイは多くの非常に優れた点があります。重要なものの 1 つは、研究者が生産できるものであれば何でも標的とすることができる点です。タンパク質のフラグメントである必要はありません。どんなに複雑であっても構いません。2 つ目は、我々が勾配法と呼んでいるもので、この方法では未結合のコンポーネントの洗浄や除去は行いません。従って、解離速度の速いタンパク質には感受性を示しません。

先ほど申しました通り、この利点は、任意のサイズと複雑さの産物を使用できることです。高分子の複合体を作成することができるならば、それを使用することができるということです。この cDNA プールは比較的標準化されています。すなわち、96 個のコンポーネントで構成され、それぞれのコンポーネントはほぼ同量です。このため、通常は発生量の少ない分子を観察できる高い可能性があります。

様々なエンドポイントアッセイが可能です。現在我々が選択しているアッセイは放射性アッセイですが、蛍光または発光、あるいは Biacore タイプのアッセイを簡単に使用することもできます。重要な点は、ゲノムの飽和度をスクリーニングできる点です。我々のシステムは、1 回のスクリーニングで 150,000 個の cDNA を処理

できます。最も複雑なゲノムであるヒトゲノムには、ほぼ 45,000 の遺伝子があります。従って、我々のシステムはヒトゲノムを容易に飽和させる能力があります。

このスクリーニングプロセスは開始から完了まで 2 つのステップしかなく、約 2 週間を要します。不都合な点は、設備が必要であり、消耗品は安価ではないことです。しかし、最終的なスクリーニングのコストは、伝統的な方法で行う場合の労賃と比較すれば非常に低コストです。

では、どのような種類のスクリーニングが可能でしょうか？標準的なタンパク質間相互作用アッセイを、イースト、ファージディスプレイ、またはプロテオミックアッセイの場合と同じ方法で行うことが確実に可能です。

我々の方法が他の方法よりも優れている点の 1 つは、1 個のタンパク質と 1 個のタンパク質複合体の相互作用を検出することができることです。私の研究室は核ホルモン受容体について研究を行っていますが、例えば、レセプターダイマーを簡単に標的として使用することができますし、さらに複雑なタンパク質も使用できます。また、タンパク質と高分子の複合体を作ることもできます。例えば、リガンドの存在または非存在下で、標的 DNA 配列に結合した核受容体ヘテロダイマー等です。

さらに、核酸-タンパク質相互作用を試験し、エンハンサー結合タンパク質および RNA 結合タンパク質を同定することや cDNA でコード化されたタンパク質とプレート上に固定した小分子の相互作用を検出することができます。このような相互作用は、研究者が特異的な作用を有する放射性化合物を作成する能力を持っていない限り、他の方法で検出するのは容易ではありません。

我々が研究室で取り組んでいるアッセイは、レチノイン酸受容体に関するものです。ご存じの通り、これは核ホルモン受容体で、 α 、 β 、 γ の 3 つのタイプがあります。

興味深い特徴は、これら 3 種の受容体のすべてが同一細胞内で同時に発現することです。それらはすべて同じ天然のリガンドであるレチノイン酸に結合し、それらはすべて親和性が高い同じ DNA 標的エレメントに結合します。しかし、それら受容体が活性化させる標的遺伝子はそれぞれ異なることを示す証拠が数多くあります。受容体がそれぞれ同じ DNA 配列や同じホルモンと結合するならば、その特異性はどこから来るのでしょうか。その特異性はコファクターとの相互作用から生じると一般に考えられていますが、どのコファクターでしょうか。異なる核受容体を区別するが、RAR α 、 β 、または γ のような密接に関連している受容体を区別しない既知の受容体共活性体または抑制補体はありません。従って、我々は、ホルモンの存在下または非存在下でヘテロダイマー全体と相互作用することができる cDNA コーディングタンパク質を *in vitro* で同定することに大変関心を寄せています。

これは、このようなアッセイの様子を示した画像です。DNA エレメントと結合する前の RXR-RAR 複合体をプレートに配置します。ここに放射性タンパク質の混合物があります。この複合体と特異的に相互作用する何かがあるときだけ、信号が検出されます。

これは、このような実験で得られるデータの例です。これは、それぞれのプールに 96 種のタンパク質を含む 96 個のプールです。ここにあるこのプールは、その中に既知の相互作用をするタンパク質を 1 個含んでいます。このアッセイの目的は、他のプールのどれがもう 1 つの既知の相互作用をするタンパク質を含んでいるかを検出することでした。我々はやみくもにこれを行いました。背景から浮かび上がって見えるのが 1 個あるのがはっきり分かります。

In vitro アッセイは非常にうまくいきますが、*in vivo* の細胞ベースのアッセイができれば良いと思います。この試験系は、その種のアッセイも可能です。これら DNA プールから *in vitro* でタンパク質を作る代わりに、細胞中にプールを入れ、その後、機能を試験することができます。

例えば、細胞にこれらのプールを入れた場合、レポーター遺伝子が活性化されるでしょうか？細胞の成長は促進されるでしょうか、または抑制されるでしょうか？細胞は以前にはなかったリガンドや受容体を獲得するでしょうか？細胞の経路は相互作用する特徴を持っており、時として意外な方法で互いに相互作用するため、このことは重要です。

これは私が以前使用した Wnt 信号伝達経路です。簡単に説明すると、ここにその経路が見えますが、これは、同一のリガンド-受容体複合体と相互作用して全く異なった結果をもたらす他のいくつかの経路があることを示しています。

そのため、これと相互作用してその作用を活性化したり抑制したりする他の細胞経路を同定できれば良いと思います。非常に類似した方法でそれを行うことができます。経路における最終的イベントに影響を及ぼしたときに報告する能力を持つレポーター細胞を構築し、典型的なレポーター遺伝子アッセイでそれを検出することができます。我々はルシフェラーゼアッセイを利用しています。細胞に DNA プールを入れ、反応が見られるか観察します。

この方法を使ってどのような種類のスクリーニングができるのでしょうか？エンハンサーと相互作用するタンパク質の機能の検出が可能で、この検出を他の方法で実施することは少々困難です。細胞信号伝達経路の新しいコンポーネントを同定することができます。例えば、FGF 信号伝達経路は非常に重要ですが関与するコンポーネントが明確に定義されていません。

また、経路の特定のコンポーネントを変化させる薬剤のスクリーニングが可能です。UCI で現在進行中のプロジェクトの 1 つは、大腸癌における Wnt 信号伝達の研究です。私はホルモン受容体での経験がありますので、我々は、ホルモン受容体の作用に影響を及ぼす小分子、薬物、天然産物、および内分泌受容体を同定するアッセイも実施できます。

我々が細胞ベースのアッセイの妥当性を検査するために行っているアッセイでは、我々が同定した核受容体であるステロイド異生物性受容体 (SXR) を使用します。この受容体は、チトクローム P450、特に CYP3 ファミリーである標的遺伝子を持っています。

P450 を使用して研究された経験がある方ならばご存知でしょうが、プロモーターが細胞系では活性を示さないという厄介な特性が P450 にあります。これらプロモーターの活性の測定には、初代肝細胞しか使用できません。初代肝細胞は取扱いが面倒で高価であり、我々が初代肝細胞を入手するには誰かが死亡しなければなりません。

従って、細胞中に、このプロモーターに活性能力を与える因子が不足していると考えられます。我々の方法では、肝実質細胞系から得た肝ライブラリーから得たこれらの cDNA プールをルシフェラーゼに結合させた P450 プロモーターを含有する肝細胞系-我々は HepG2 を使用しています-にトランスフェクトし、これらのプールのどれがこのプロモーターに活性を与えるかを判断します。

これは、このシステムの様子です。システムは CRS ロボットアームをベースにしています。我々は様々な液体ハンドラーと自動カルーセルを所有しており、無人で 400 個のプレート进行处理する能力があり、システムに装填するだけで放置しておくことができます。このシステムは *in vitro* での生化学的な細胞ベースアッセイ向けに設計されています。また、我々が実施できる必要のある要件は、この種の実験に適用できるよう、バクテリアを培養基で培養した状態に変換することです。ごく最近、我々の特許が認可されたため、この技術を実現させるために懸命に研究を行っています。

まとめると、我々が開発したこの自動分子相互作用スクリーニングシステムは、遺伝子機能を同定するための理想的なシステムであると考えています。遺伝子の機能、すなわち研究対象とする他の遺伝子と相互作用する能力によって厳密に遺伝子を同定しているという点で、このシステムは真の機能的ゲノミックスです。

このシステムは生物学的問題に広範囲に適用することができます。我々は、主に核受容体を研究するために使用していますが、他の転写因子や細胞外分子に適用することが可能です。

本システムについて我々が最も気に入っていることの 1 つは、任意の複雑さを持った標的との相互作用を検出することができることです。つまり、標的は、DNA に結合した 1 個のタンパク質、2 個のタンパク質、または 5 個タンパク質でも構わないことを意味します。標的の複雑さは問題ではありません。研究者が複合体を調製することができる限り、調製した複合体と相互作用するタンパク質を検出することができます。 *In vitro* と *in vivo* の両方のスクリーニングを非常に迅速に行うことができ、開始から完了までわずか 2、3 週間です。

cDNA ライブラリーまたは理研で開発されているようなコレクションからの全長にわたる cDNA 配列が利用可能になれば、将来このシステムは陳腐化せずにさらに有用になるでしょう。

私の持ち時間が終わりそうですので、最後に、私の協力者に感謝の意を表したいと思います。研究室には才能に溢れた3名の学生がいます。Ameel Patel、Bridget Riggs、およびGaurav Sharmaの3名がこのアッセイの開発に取り組んでいます。

以上で私の話を終わり、質問にお答えしたいと思います。

質疑応答

菅野：ありがとうございます。質問やコメントはございませんか？

質問：作用を元に戻すために複数のタンパク質が必要な場合、例えば、Hep2G 細胞における 3A4 誘導などの場合どうなりますか？

ブルンバーグ：1 つの分子では不十分であったらということですか・・・。

質問：必要だが、不十分という意味です。

ブルンバーグ：我々がプールを検査することが可能であるため、異なる方法でそれらのプールを組み合わせ、あなたが活性を得るために必要と仮定しておられる複数の因子を構成することができる可能性はあります。単一のタンパク質とすることは私自身の先入観によるもので、複数である可能性は常にあります。

質問：これは少し的外れな質問かもしれませんが、どのようにして蛋白因数の燐との化合状態が相互作用となるのでしょうか？

ブルンバーグ：それは的外れな質問ではありません。実は非常に良い質問です。確かにタンパク質が燐と化合するかどうか、そのタンパク質と他のタンパク質との相互作用に影響を及ぼします。皆さんが試験なされたいならば、ターゲットの燐との化合状態を調節することとなります。皆さんが燐との化合状態または非化合状態のものを生成し、次に、他の状態に対し特にある状態で相互作用するタンパク質を探します。

質問：それでは、さらに複雑さを増すことになりませんか・・・。

ブルンバーグ：はい。

菅野：どうもありがとうございます。