

## 平成15年度実施方針

### 1. 件名：健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム タンパク質機能解析・活用プロジェクト

#### 2. 背景及び目的・目標

国際プロジェクトによりヒトゲノムの全塩基配列解析がほぼ終了したが、遺伝子解析研究は、塩基配列解析にとどまらず、本来、遺伝子の機能を解明することがその目的である。その遺伝子の機能は、遺伝子が転写・翻訳されてタンパク質になって初めて発揮されることから、タンパク質に焦点をあて遺伝子の機能について解明することが重要である。

本研究開発は、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機能解析を実施し、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の整備・拡充を図り、我が国の遺伝子を利用したバイオ産業活動の振興に資する。

#### 最終目標（平成17年度末）

スプライシング・バリエーション cDNA クローンを含むヒト完全長 cDNA クローン等を用いた約4万種類の導入ベクターの作製と、それを用いたタンパク質発現等に関するデータ整備を行うとともに、約3万種類の cDNA の約500種の細胞(組織)での発現頻度情報のデータベースを作成する。

また、相互作用タンパク質群情報のデータベース作成を行い、タンパク質相互作用に関する構造情報データの取得・解析を行う。

さらに、分子レベル及び細胞レベルでの機能解析及び相互作用解析システム、RNA干渉効果を用いた細胞レベル及びモデル動物レベルの機能解析技術を活用して重要タンパク質の機能解析を行う。

#### 3. 実施内容及び進捗（達成）状況

「タンパク質機能解析」プロジェクトとして、平成12年度補正から平成14年度まで研究開発を実施し、産業技術総合研究所生物情報解析研究センター野村信夫副センター長をプロジェクトリーダーとし、平成14年度は以下の研究開発を実施している。

#### 研究開発項目 「ヒトの完全長cDNA等を利用したタンパク質機能解析」

NEDOヒト完全長 cDNA プロジェクトで遺伝子情報解析に用いた cDNA クローンのうち、新規性が確認された cDNA 等を活用して以下のタンパク質の機能解析を実施している。

##### 1) スプライシング・バリエーション cDNA クローンの取得

NEDOヒト完全長 cDNA プロジェクトで遺伝子情報解析に用いた cDNA クローンの大規模 cDNA クローン群の大量末端 cDNA 配列と全長配列解析済み cDNA 配列、および、ヒト RefSeq cDNA 配列をヒトゲノムに in silico で貼り付けた。この結果より、cDNA クラスターを ゲノム上の ORF 範囲が一意に決まるクラスター、ゲノム上の ORF 範囲が複数通りあるクラスター、その他のクラスターに分別した。H14

年度は、「 」のクラスター群より、末端 cDNA 配列内にスプライシング・バリエーション cDNA パターンが存在するクローンを効率的に選別・評価する技術を開発し、全長 cDNA 配列を解析した。

(実施体制:(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、共同研究:(独)製品評価技術基盤機構)

## 2) 大量発現

平成14年度は Gateway システムを用いて 12,000 個の導入クローンを作製し、前年度までのものと合わせて作製導入クローンの総数は 24,000 個となった。それらの中から 10,000 個を選択し発現ベクターを作製し、タンパク質発現条件を検討中である。

(実施体制:(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、再委託:東京農工大学・大阪大学蛋白質研究所、共同研究:東京都立大学・(独)産業技術総合研究所)

## 3) 発現頻度解析

定量性に優れ、かつスループットも高い遺伝子発現頻度解析法である iAFLP 法等を用いて、平成14年度は 570 万データポイント(組織数×遺伝子数)の遺伝子発現情報を取得した。前年度までのデータを総計すると 906 万データポイント(組織数×遺伝子数)を達成した。

(実施体制:(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、共同研究:東京大学医科学研究所・(独)産業技術総合研究所)

## 4) 相互作用解析

少量の細胞より抽出されたタンパク質複合体の精製方法、サンプルの質量分析計への導入方法、質量分析計の自動化、アミノ酸配列からのタンパク質の同定アルゴリズムの高度化等、微量化・ハイスループット化に必要な基本技術を確認した。相互作用が既知の 150 種の遺伝子を用いて確認研究を行ったところ、既に知られている相互作用タンパク質の 80%が検出され、本方法の完成度が高いことが確認された。

構造情報解析については、細胞周期監視機構関連タンパク質 PCNA/RFC/DNA 複合体の電子顕微鏡像について PCNA,RFC の位置を同定するため、各構成要素を金属クラスター等で標識することに成功した。また、PCNA,RFC の各種変異体を作成し、クランプローディングの分子機構解明を進めた。さらに、アポトーシス関連タンパク質 CAD/ICAD のシステイン残基へ変異を導入することにより機能に必須の 4 つのシステイン残基を同定し、そのうちの 2 箇所の変異は複合体を不安定化することが示唆された。

(実施体制:(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、(組)生物分子工学研究所、共同研究:(独)産業技術総合研究所)

## 5) 細胞レベルの機能解析

浮遊細胞の系において、細胞や核の大きさや円形度の測定システム「蛍光フローサイトメーター」の開発に成功した。60 種類の薬剤による細胞の形態変化情報を取得した。浮遊細胞の系において、細胞や核の大きさや円形度の測定システムの開発に成功した。付着細胞の系においては、アポトーシスや神経細胞への分化等をモデルに形態変化を検出するための画像処理技術の開発を行った。また、タンパク質局在の判定を行うための技術の開発を行い、完全長 cDNA クローンの局在情報の取得を開始した。

(実施体制:(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、共同研究:東京大学医科学研究所)

## 6) モデル動物を活用した機能解析

RNA 干渉効果 (RNA interference 効果または RNAi 効果) 等を用いて遺伝子機能を抑制したモデル動物 (マウス等) を活用し、完全長 cDNA に対応する遺伝子について、迅速、かつ、簡便な機能解析法の技術開発を行った。本年度は特に RNAi 効果に対して高感受性を示す ES 細胞株を取得する技術を開発した。

(実施体制:(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、再委託:基礎生物学研究所、共同研究:東京大学・徳島大学)

予算推移 (百万円) :	12年度 (補正含む)	13年度	14年度
一般会計	1,832	1,594	1,932
特許出願件数 (件) :	1	2	6
論文 (学会) 発表数 (報) :	21	23	33

#### 4. 事業内容

##### (1) 平成15年度事業内容

産業技術総合研究所生物情報解析研究センター野村信夫副センター長をプロジェクトリーダーとし、以下の研究開発を実施する。実施体制については、別紙を参照のこと。

研究開発項目 「ヒトの完全長cDNA等を利用したタンパク質機能解析」

NEDOヒト完全長 cDNA プロジェクトで遺伝子情報解析に用いた cDNA クローンのうち、新規性が確認された cDNA 及び新たに取得する未知のスプライシング・バリエーション cDNA クローン等を活用してタンパク質の機能解析を行う。具体的には、以下の研究開発を行う。

##### 1) スプライシング・バリエーション cDNA クローンの取得

NEDOヒト完全長 cDNA プロジェクトで遺伝子情報解析に用いた cDNA クローン等の大規模 cDNA クローン群から、スプライシング・バリエーション cDNA クローンを効率的に探索・取得する技術を開発する。

(実施体制:(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、共同研究:(独)製品評価技術基盤機構)

##### 2) 大量発現

Gateway システムを用いてヒト cDNA をもつ 12,000 個(これまでの成果と合わせて総計 36,000 個)の導入クローンを作成し、多目的発現解析の基盤を整備する。7,500 個の発現ベクターよりタンパク質発現条件の検討を行い、そのうち蚕の蛹の発現系を用いる 1,500 個のクローンについては、機能解析に必要な大量発現を行う。

(実施体制:(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、再委託:東京農工大学・大阪大学蛋白質研究所、共同研究:東京都立大学・(独)産業技術総合研究所)

##### 3) 発現頻度解析

iAFLP 法を用いて、500 万データポイント(組織数×遺伝子数)の遺伝子発現情報を取得することを目標とする。取得した大量の遺伝子発現情報の解析により、知識発見を行う。

(実施体制:(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、共同研究:東京大学医科学研究所・(独)産業技術総合研究所)

##### 4) 相互作用解析

蛋白質複合体精製技術の高精度化を行い、細胞より抽出された 500 種類のタンパク

質複合体サンプルを質量分析計で分析し、新規の相互作用候補タンパク質を見出すとともに、大規模解析の準備を行う。また、従来技術では検出が困難であった非常に弱い相互作用を示すタンパク質やホモダイマーを形成するタンパク質を対象とした高感度・高精度の相互作用解析法の開発を行い、当該タンパク質分子の相互作用データを取得に着手する。

構造情報解析については、細胞周期監視機構関連タンパク質 PCNA/RFC/DNA ポリメラーゼ/DNA 複合体の電子顕微鏡単粒子解析による立体構造解析を試みる。また、アポトーシス関連タンパク質 MutS ,MutL を介したアポトーシス誘導機能複合体の構成因子の単離、同定を試みるとともに CAD/ICAD 複合体の形成に必須な部分を抽出し、DNA 等の相互作用し得る分子と共に結晶化を試みる。

(実施体制：(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、(組)生物分子工学研究所、共同研究：(独)産業技術総合研究所)

#### 5) 細胞レベルの機能解析

付着細胞の顕微鏡画像自動解析技術の開発では、引き続き形態変化画像自動解析の高精度化を行うとともに、顕微鏡画像自動取得の高速化を行う。浮遊細胞の自動解析技術の開発では、自動トランスフェクションのシステムを開発するとともに、細胞の形態変化に影響を及ぼす遺伝子を検出し、解析を行う。また、2,000 個の未知遺伝子に対する細胞内局在情報の取得を行う。

また、ヒト培養細胞に対応する siRNA (short interfering RNA) 発現ベクターライブラリーの構築を行い、ヒト培養細胞レベルでの機能未知遺伝子の解析に着手する。併せて、siRNA 効果を最大限に活用し得るターゲットサイトを迅速・高精度に決定するためのプログラムの開発に着手する。

(実施体制：(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、共同研究：東京大学医科学研究所)

#### 6) モデル動物を活用した機能解析

モデル動物(マウス等)の個体において遺伝子機能抑制効果のある技術の開発するために、RNAi効果に対して高感受性を示すES細胞株を取得する技術の開発を引き続き行う。また、マウスの個体におけるsiRNA発現ベクターによる遺伝子機能抑制効果についての検討を行う。

(実施体制：(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、再委託：基礎生物学研究所、共同研究：東京大学・徳島大学)

上記の研究開発項目の他、本プロジェクトに関連する技術動向・特許情報等の調査やプロジェクト内外との迅速な情報交換等を行うために総合調査研究を実施し、本プロジェクトの円滑で効率的な推進を図る。

### (2) 平成15年度予算における事業規模

一般会計	上期：	1,270 百万円(継続)
		<u>120 百万円(追加公募)</u>
	下期：	868 百万円
		<u>100 百万円</u>
	計	2,358百万円

### 5. その他重要事項

#### (1) 運営・管理

委託先において、プロジェクトリーダー、各研究開発項目に係わるチームリーダー、関連研究分野の有識者等を委員とした研究開発委員会を年4回程度開催する。

( 2 ) 年間スケジュール： 平成 1 5 年 3 月中旬・・・追加公募開始  
4 月中旬・・・追加公募締切  
4 月下旬・・・技術審査委員会  
4 月下旬・・・契約審査委員会  
5 月上旬・・・契約

( 注 ) 事業規模については、多少の変動があり得る。

(別紙)事業実施体制の全体図

### 「タンパク質機能解析・活用プロジェクト」実施体制

