

機能未知遺伝子の機能解析を指向した任意配列を認識する人工転写因子の構築

●鳥越 秀峰

東京理科大学理学部

＜研究の目的と進め方＞

近年様々な生物の染色体の全塩基配列が明らかにされ、多数の遺伝子が同定されている。機能未知の遺伝子の機能解析には、遺伝子発現を人工的に活性化・抑制し、表現型を検討するのが有力な手段である。しかし天然の転写因子は任意の遺伝子上流配列を認識し、下流の任意の遺伝子の発現を活性化・抑制することはできない。本研究課題では任意の遺伝子上流配列を認識し、下流の任意の遺伝子の発現を制御する人工転写因子を創製し、機能未知の遺伝子の機能解析に利用することを目的とする。具体的には次のような人工転写因子(図1)を構築する。つまり、標的遺伝子上流配列に結合して3重鎖核酸を形成しうる単鎖RNA(TFO)とRNA結合蛋白質の標的RNA配列(RS)との融合RNAと、RNA結合蛋白質(RBP)と転写因子の転写活性化or抑制ドメイン(ED)との融合蛋白質とが、RBP-RS相互作用で結合し、TFOとEDが一体化した新規の人工転写因子が構築される(図1)。この人工転写因子を標的遺伝子上流配列に結合させ、標的遺伝子の発現制御を可能にすることを目的とする。

＜研究開始時の研究計画＞

1) TFOとRSとの融合RNAを発現するプラスミド及びRBPとEDとの融合蛋白質を発現するプラスミドを構築する。出芽酵母にこれらを導入し、RBP-RS相互作用で結合し、TFOとEDが一体化した人工転写因子をin vivoで構築する。これが3重鎖核酸形成により標的遺伝子上流配列に結合する。

2) 出芽酵母アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)遺伝子のプロモーター配列の下流に β -ガラクトシダーゼ(lac Z)遺伝子を挿入したプラスミドを構築し、レポータープラスミドとして用いる。人工転写因子の非存在下と存在下とでlac Zの発現量に差が出るかを解析する。TFOの長さやTFOが認識する遺伝子上流配列の場所などの条件を検討して、人工転写因子の非存在下と存在下とでlac Zの発現量に最も大きな差が出る条件を探す。これにより人工転写因子を最適化する。

＜研究期間の成果＞

1) MS2ファージRNA結合蛋白質(RBP)とVP16蛋白質(ED)との融合蛋白質を発現するプラスミドを構築した。またADH遺伝子のプロモーター配列に結合して3重鎖核酸を形成しうる単鎖RNA(TFO)とMS2ファージRNA結合蛋白質の標的RNA(RS)との融合RNAを発現するプラスミドを構築した。出芽酵母FY23およびFY24にこれらを導入し、人工転写因子をin vivoで構築した。

2) ADH遺伝子のプロモーター配列の下流にlac Z遺伝子を挿入したレポータープラスミドを構築した。出芽酵母FY23株およびFY24株に、レポータープラスミドのみを導入した場合に比べて、レポータープラスミドと融合蛋白質を発現するプラスミドと融合RNAを発現するプラスミドとの3つのプラスミドを導入した場合のlac Zの発現量は1.5-2倍に有意に上昇していることが明らかとなった。

TFOの長さやTFOが認識する遺伝子上流配列の場所がlac Zの発現量に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。

＜国内外での成果の位置づけ＞

本研究課題のような、3重鎖核酸形成能と転写活性化・抑制能とを兼ね備えた複合体を構築し、人工転写因子として任意の遺伝子の発現制御に利用する研究はなく、斬新なアプローチであり、先駆的である。この人工転写因子は、ポストゲノムの一つの重要なテーマである機能未知の任意の遺伝子の機能解析に利用可能であり、非常に重要である。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

人工転写因子の最適化にあたり、TFOの長さやTFOが認識する遺伝子上流配列の場所のみならず、RBPおよびこれが結合するRSの種類やEDの種類についても検討する予定であったが、人工転写因子の構築に手間取り、これらについて十分な解析が行えなかった。

＜今後の課題＞

人工転写因子のさらなる最適化を進めると共に、上記のレポーター遺伝子以外の遺伝子発現を活性化・抑制できるかを解析し、人工転写因子の一般性を検討する。また、人工転写因子の存在下で、標的の遺伝子の発現のみを活性化・抑制しているか、他の遺伝子の発現まで制御してしまっているかを解析し、人工転写因子の特異性を検討する。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

1) 論文

1. 0303221947

Torigoe, H., Sato, S., Yamashita, K., Obika, S., Imanishi, T., and Takenaka, S., Binding of threading intercalator to nucleic acids: thermodynamic analyses, Nucleic Acids Res., s2, 55-56 (2002).

2. 0303222023

Torigoe, H., Hari, Y., Obika, S., and Imanishi, T., Triplex formation involving 2',4'-BNA with isoquinolone base analogue: efficient and selective recognition of C:G interruption, Nucleic Acids Res., s2, 183-184 (2002).

3. Torigoe, H., and Tsukamoto, Y., Development of triplex formation-based artificial transcription factor to recognize any upstream sequence of target genes, Nucleic Acids Symp. Ser., 49, 321-322 (2005).

2) 特許

1. 鳥越秀峰「遺伝子の転写調節方法」特願2005-35001.

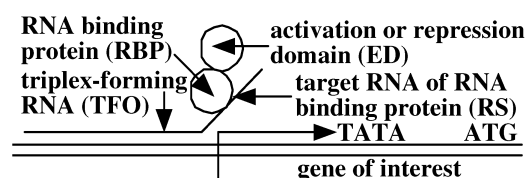


図1: 人工転写因子の模式図