

クロマチンリモデリングに関与するヘリカーゼによる転写調節ネットワーク

●河野 憲二

奈良先端科学技術大学院大学遺伝子教育研究センター

研究の目的と進め方

RVB2 / TIH2 の高温感受性株を利用し、また酵母 DNA マイクロアレイ法を用いることにより、RVB2 / TIH2 依存的に転写調節を受ける遺伝子群を網羅的に探索し、その標的遺伝子群を明らかにする。次にこれらの遺伝子群が、クロマチンリモデリング活性を有する種々の複合体により影響を受ける遺伝子群とどこが重複し、どこが異なるのかを明らかにし、Tih1p, Tih2p がクロマチンリモデリングや転写調節にどのように関わっているかを明らかにする。

2001 年度の研究の当初計画

1 DNA マイクロアレイを用いた転写ネットワークの解析

野生型出芽酵母と RVB2 / TIH2 の高温感受性変異株 (tih2-160), ino80 変異株とを準制限温度下で培養し、抽出した total RNA をプローブにし、出芽酵母全遺伝子の DNA マイクロアレイによる解析を行い、RVB1 / TIH1, RVB2 / TIH2 に支配され特異的に転写制御される遺伝子群を探索する。大きく変化する遺伝子群については、ノザン解析を行いその変化を確認する。

2 生化学的、遺伝学的手法による RVB / TIH と基本転写因子群、又は RNA ポリメラーゼ II との機能的相互関係の解析

RVB2 / TIH2 遺伝子はアレル特異的に異なる表現型をとる。免疫共沈実験により Rvb2p / Tih2p は TBP と相互作用しているという結果を得ているので、Rvb2p / Tih2p の高温感受性変異株 2 種 (tih2-12, tih2-160) と TBP (TATA binding protein) の温度感受性変異株 (多数のアレルがある) との 2 重変異株を作成し、どのアレルと合成致死の表現型を示すかどうかについて明らかにする。

2001 年度の成果

1 マイクロアレイを行った結果、Rvb2p / Tih2p が不活性化すると転写が抑制されるもの、逆に転写が促進される遺伝子群があり、転写が抑制されるものの多くは Δ

ino80 でも転写が抑制されていた。一方転写が促進される遺伝子群は Δ ino80 とは挙動を共にしなかった。これらの結果をノザン解析を行うことにより確認した。この結果から、RVB 複合体は Ino80 複合体に含まれ転写を制御している場合と、Ino80 とは別の形で転写を制御している場合とがあることが予想される。

2 免疫共沈降実験により、Rvb2p / Tih2p と Rvb1p / Tih1p とは複合体を形成していることがわかったが、さらに GST-RVB 融合タンパク質を作製し、GST pull-down 実験を行うことにより、Rvb1p と Rvb2p とが直接結合している可能性が高いことが明らかとなった。また、同様な免疫沈降実験により RVB 複合体と TBP とは相互作用していることが判明した。TBP と RVB2 との 2 重変異株を作製すると、29℃での細胞の生育ができなくなる合成効果がみとめられ、両者が遺伝的にも関連していることが裏付けられた。面白いことに、この効果は TBP のアレルに特異的であり、その部位と RVB 複合体とが相互作用している可能性ができた。

国内外での成果の位置づけ

RVB1 / TIH1, RVB2 / TIH2 遺伝子は、酵母からヒトまで保存されており、その機能について関心がもたれているが、転写レベルでの機能を *in vivo* で解析しているグループは国内外を含めほとんどいない。我々の成果は、非常にオリジナリティーが高いと思う。

今後の課題

現在、RVB 複合体に含まれる個々のタンパク質を、MALDI-TOF を用いて解析しており、新しいタンパク質が同定されつつある。今後は、これらのタンパク質が転写制御にどのような役割を持つかを調べるとともに、標的遺伝子が明らかになったので、その転写制御に実際に RVB1 / TIH1, RVB2 / TIH2 が関わっているのかどうかを種々の方法で確認していきたい。