

免疫精製法を用いた転写ネットワークの解析

●高橋直樹 ◆岡南政宏

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

〈研究の目的と進め方〉

増殖、分化など細胞の高次機能は、そのゲノム中に書き込まれた情報の制御された発現によって規定されている。遺伝情報の発現制御過程で最も重要な役割を果たしているのは、転写レベルでの制御だと考えられている。遺伝子の特異的転写は、遺伝子の近傍に存在するシスエレメント（エンハンサー）に複数の転写調節因子が結合することによって実現されていると考えられているが、どのような転写因子群がシスエレメントとどのように相互作用しているかは、ほとんど明らかにされていない。本研究の目的は、マウス発生過程で機能している転写因子のクロマチン中の結合領域を網羅的に同定する方法を開発し、転写調節の分子機構を細胞レベルで明らかにすることである。本研究の目的は、全ゲノム情報が明らかにされた、最も単純な真核生物である酵母をモデルとし、ゲノム配列から明らかになった、特異的配列を認識することによって転写調節に関わっていると考えられる転写調節蛋白群について、それらの細胞内での全結合配列をDNAマイクロアレイを用いて同定することである。

酵母をモデルとしたポストゲノムプロジェクトとして、プロテオーム、ファンクショナルゲノミクスといわれるような研究が国内外で盛んにおこなわれ始めている。転写ネットワーク解析としても、DNAマイクロアレイを用いた発現パターンの解析を、転写因子をコードする遺伝子の機能欠失酵母を用いておこない、情報科学を用いて転写ネットワークを明らかにしようという試みもあるが、転写機構の複雑性のためと思われるが、ゲノムレベルでの成果が得られているとはいいがたい。上記の発現プロファイルのデータに本研究で目的としているDNAと転写因子間の結合情報を加え、情報科学的解析を行えば、酵母転写ネットワークの全容解明に近づくことができると考えられるし、その成果やその過程で開発される技術は、多細胞生物への応用のための基礎データとなる可能性が高い。

〈研究開始時の研究計画〉

我々は、転写因子のゲノム中の結合配列を単離することを目的として、転写因子の抗体を用いた免疫精製法を開発し、マウスの転写因子の標的遺伝子群を同定してきた。この方法を酵母に使い、DNAマイクロアレイによってゲノム中の全結合配列を特定することを計画した。酵母にはそのゲノム配列から、約200の転写因子が存在すると考えられている。マウスの実験では転写因子に対する特異的な抗体を調製していたが、本研究計画では、効率よく標的配列を同定するため、転写因子をコードする遺伝子にタグを導入し、タグに対する抗体を用いる方法を計画した。すなわち、本研究計画は、

- 1) 転写因子にタグを結合した遺伝子を持つ菌体の作製。
- 2) 酵母を用いた免疫精製法による転写因子の標的DNA配列の濃縮法の確立。
- 3) 濃縮DNAとDNAマイクロアレイを用いた標的配列の網羅的同定法の開発。

の3つの計画からなっていた。

〈研究期間の成果〉

研究開始時の計画のうち、2の免疫精製法による標的DNA配列の濃縮法の確立および、3のマイクロアレイを用いた標的配列の網羅的同定法の確立は予定どおり成功した。1についても約30のタグ付きの転写因子遺伝子を持つ組み換え体の作製はおこなった。これらの組み換え体を用いて上記1, 2の方法で、酵母転写の標的遺伝子の網羅的同定をおこなった(図)。その結果、転写因子の種類によっていくつかのグループに分類できることが明らかになった。

- 1) MATalpha2, MCM1のように十分な濃縮が確認でき、ゲノム中の全標的配列を同定できていると考えられるもの。
- 2) YDR451, YOX1のように有意な結果は得られたが、濃縮の程度が十分でないためか、標的配列を確実に検出できないもの。
- 3) CRZ1, PHO4のように、シグナルに依存して発現制御している転写因子で、培養条件によって異なる結果が得られるもの。
- 4) UGA3のように、特異的濃縮が確認できなかったもの。

〈国内外での成果の位置づけ〉

上記の成果が得られた頃、国外のグループから、我々とほぼ同じ目的と技術を用いた研究の成果が公表された(Lee, T. I. et al Science, 298, 799(2002))。彼らは約100の酵母転写因子についてゲノム中の全結合配列を同定したと報告した。我々の成果の一部は、彼らの結果とほぼ一致していたしかし多くのものは我々の結果と異なるものであった。その理由の一つは、上記3のCRZ1やPHO4のような培養条件によって機能が異なる転写因子についてもすべて1種類の培養条件でおこなっているためと考えられた。

しかし、それ以外の転写因子についてもその結果が大きく異なるものが少なからずあり、この方法が信頼できる方法であると認められるためには、条件の検討が必要であると考えられた。その後、彼らを含めたいくつかのグループによって、培養条件等、実験法の改良がなされ、最近では信頼性の高いと考えられる成果が数多く報告されている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

研究開始時の計画のうち、2, 3の技術開発に関するものはほぼ計画通り、目的を達成できた。1の200の転写因子にタグを導入した組み換え体の作製とそれに続くアレイを用いた標的配列の網羅的同定は、研究期間終了時には完成していなかったが、技術的な問題は全くなく、時間的には数ヶ月の間に達成は可能であったと考えられた。しかし、経済的支援が得られなかったことや、研究組織がうまく組めなかったことから研究の継続が出来な

かった。本研究に必要な技術のうち、明らかに我々が世界的にリードしていたのは、免疫精製法による標的配列の同定だけであり、酵母やDNAマイクロアレイを用いた研究については、国外のグループの方が圧倒的に優れていた。

〈今後の課題〉

上記のように、研究終了時においては、我々の成果、技術は、国際的にもほぼ同等のレベルにあったと考えられる。残念ながら酵母転写ネットワーク研究の継続は出来なかったが、本研究の目的の一つは、酵母で確立した技術の高等生物を対象とした研究への応用である。我々はこの技術の一部を利用して、マウス標的遺伝子の同定、解析に成功している（論文1、特許1）。さらにマウス等の高等生物においても網羅的な標的遺伝子同定法の開発を続けており、いくつかの成果は得られている。このような動きは国際的にも起こっており、細胞の多様性、ゲノムサイズの大きさ等の困難はあるが、高等動物の転写ネットワーク解明までに長い時間はかからないかも知れない。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1.

Yamada, R., Mizutani-Koseki, Y., Hasegawa, T., Osumi, N., Koseki, H. and Takahashi, N. Cell-autonomous involvement of Mab21l1 is essential for lens placode development. *Development* 130, 1759-1770(2003).

2) 特許

1. 組織特異的に細胞増殖を制御する遺伝子

特許出願中（特願2003-143311）

