

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20710148  
 研究課題名（和文） In vitro virus 法による遺伝子発現カスケード解析技術の開発  
 研究課題名（英文） Development of analysis system of gene expression cascade using in vitro virus  
 研究代表者  
 館山 誠司（TATEYAMA SEIJI）  
 慶應義塾大学・理工学研究科・特別研究講師  
 研究者番号：90338202

## 研究成果の概要（和文）：

細胞分化や増殖、発生などの複雑な生命現象を分子レベルで理解するには、転写因子とシス DNA エLEMENTとの相互作用がもたらす遺伝子発現の厳密な制御機構（カスケード）を簡便かつ高効率に解析する手法が必要である。本研究において、研究代表者が独自に開発した In vitro virus (IVV) 法を応用し、新規な転写因子-シス DNA エLEMENT相互作用を見出し、新たな遺伝子発現制御機構を解明することに成功した。本研究で構築された手法は複雑な生命現象の分子レベルでの理解において有用なものであると言える。

## 研究成果の概要（英文）：

Since the specific interactions between *cis*-regulatory DNA elements and transcription factors are critical components of transcriptional regulatory networks, comprehensive analysis of DNA-transcription factor interactions is expected to provide a deep understanding of the mechanisms of cell proliferation, developmental processes in tissue morphogenesis, and disease. In this research program, I have shown for the first time that *in vitro* virus (IVV) selection system, an mRNA display technique, can be employed for the elucidation of new, biologically significant DNA-protein interactions. The IVV system described herein will facilitate the large-scale analysis of DNA-transcription factor interactions for mapping of transcriptional regulatory networks on a genome-wide scale.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学、基礎ゲノム科学

キーワード：転写制御因子、DNA 結合タンパク質、相互作用、mRNA ディスプレイ、転写制御領域、発現制御機構、複合体、モチーフ構造

## 1. 研究開始当初の背景

現在、国内外において様々なゲノム情報を活かしてタンパク質自身の機能解析および機能的なつながりを網羅的に解析するプロテオーム研究の一環として、タンパク質同士の相互作用解析が重点的かつ大規模に行われている (Ito *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4569-4574; Uetz *et al.* (2000) *Nature*, **403**, 623-627)。一方、細胞分化や増殖、発生などの複雑な生命現象を分子レベルで理解するには、転写因子とシス DNA エlementとの相互作用がもたらす遺伝子発現の厳密な制御機構 (カスケード) を解明する必要がある。現在クロマチン免疫沈降 (ChIP) と DNA マイクロアレイを併用した ChIP on Chip 法により転写因子が結合するシス DNA エlementの大規模な探索が行われているが、逆に、シス DNA エlementに結合する転写因子を大規模かつ効率的に探索する手法は皆無であった。これまでに研究代表者らはタンパク質とそれをコードする mRNA を連結した遺伝子型と表現型の対応付け分子 (*in vitro* virus; IVV, 図 1) のライブラリーを試験管内で構築する技術を開発し (Miyamoto-Sato *et al.* (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, 1176; Miyamoto-Sato *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, e78)、この IVV 法を用いてタンパク質間相互作用の大規模解析を行ってきた (Horisawa *et al.* (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, e169)。

さらに最近、研究代表者は IVV 法を用いてロイシンジッパーモチーフを持つ AP-1 ファミリーをモデルとして、シス DNA エlementと相互作用する転写制御因子を効率的にスクリーニングする手法を新たに確立することに成功した (Tateyama *et al.* (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, e27)。

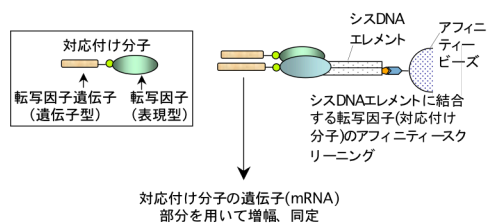


図 1: 対応付け分子(IVV)および IVV を用いたアフィニティスクリーニング

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者が独自に開発した IVV 法が汎用的な DNA 結合転写因子探索ツールとして様々な転写因子が関与する標的遺伝子の新規な発現制御機構 (カスケード) の解明に適用できることを証明することである。第一段階として、種々のシス DNA エlementを用いてスクリーニングを行い、ロイシンジッパーモチーフ以外にも様々な種類の転写因子がスクリーニング可能であることを証明する。第二段階として、新規カスケードの提案により応用研究への波及効果が高いもの (細胞の増殖や分化、発生の鍵となる細胞周期関連遺伝子のシス DNA エlement) を用いてスクリーニングを行う。新規相互作用を見出しすことができた場合、培養細胞を用いて複数の分子生物学的手法にて解析、検証していく。

### 3. 研究の方法

#### (1) IVV ライブラリーの構築

IVV ライブラリーはヒト組織由来 (脳、肝臓など) の mRNA を鋳型として、これまでと同様の方法 (Tateyama, *et al.* (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, e27) にて調製した。

#### (2) 各種シス DNA エlementと相互作用するタンパク質のスクリーニング

本スクリーニングは各種シス DNA エlementをベイト (餌) とするものである。ベイト DNA はビオチン化したオリゴヌクレオチドを用いて二本鎖化することで調製した。シス DNA エlementとして、①モデルケースとして様々なモチーフ構造 (ヘリックス-ターン-ヘリックス、ベーシック-ヘリックス-ループ-ヘリックス、ベーシック-ヘリックス-ループ-ヘリックスロイシンジッパー、Zn フィンガー、 $\beta$  サンドイッチ、Rel ドメインなど) を持った転写因子の標的配列を含んだ DNA 配列、および②転写因子細胞の増殖や分化、発生の鍵となる細胞周期関連遺伝子のプロモーター配列を選択した。IVV スクリーニングはこれまでと同様の方法 (Tateyama, *et al.* (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, e27) にて行った (図 2)。スクリーニング後、可能な限りの数のクローニング、シーケンシングを行うことで相互作用候補を複数種類得ていった。

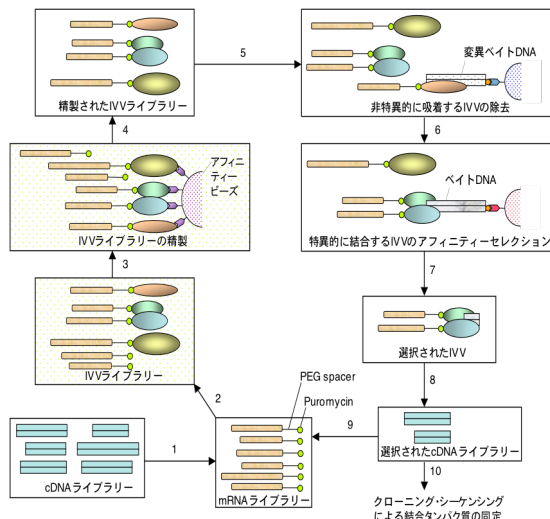


図2; IVV法を用いたDNA結合タンパク質のスクリーニングの概略

### (3)スクリーニングされた相互作用候補の検証実験

#### ① *in vitro*での相互作用の検証

相互作用候補がバイト DNA と特異的に結合するかどうかを、プルダウンアッセイおよびゲルシフトアッセイを用いて検証した。このときに当研究室で開発された C 末端ラベル化法 (Doi, *et. al.* (2002) *Genome Res.*, **12**, 487-492) を用いて相互作用候補を簡便に蛍光標識して検出を行った。

#### ② 培養細胞を用いての相互作用の検証・証明

相互作用候補が培養細胞内にて実際に相互作用が見られるかどうかを免疫沈降法、クロマチン免疫沈降法、および核抽出液を用いてのゲルシフトアッセイを用いて相互作用の検証を行った。相互作用候補タンパク質は培養細胞内で強制発現あるいは細胞内在性のものを用いた。

#### ③ 培養細胞を用いての相互作用候補がもたらす標的遺伝子の発現への影響の検証

培養細胞内でシス DNA エlementと相互作用候補が相互作用して標的遺伝子の発現に対してどのような影響を及ぼすかをルシフェラーゼアッセイを用いて検証した。次に、相互作用候補を強制発現させた際に標的遺伝子 (mRNA) の発現量がどのように変化するかをリアルタイム RT-PCR 法を用いて分析した。同時に、タンパク質の発現量が変化するかどうかをウェスタンブロット法を用いて分析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 各種シス DNA エlementと相互作用するタンパク質のスクリーニング

まず最初に、様々な転写因子を網羅し、かつ多様性と複雑性を兼ね備えた IVV ライブラリーを構築した。次にこの IVV ライブラリーを用いて、様々なモチーフ構造を持った転写因子の標的配列を含んだ DNA 配列をバイトとしてモデル IVV スクリーニングを試みた。その結果、ヘリックス-ターン-ヘリックス (c-Myb など)、ベーシック-ヘリックス-ループ-ヘリックス (TCF など) ベーシック-ヘリックス-ループ-ヘリックスロイジンジッパー (Myc, Max, Mad など)、および Zn フィンガー (PARP, Sp1 など)モチーフ構造を持った転写因子の濃縮および選択に成功した。一方、 $\beta$  サンドイッチおよび Rel ドメインを持った転写因子については濃縮が見られなかった。理由として、これらのモチーフ構造を持った IVV 分子が標的 DNA 配列を認識できなかったことが考えられる。

以上の結果を踏まえ、相互作用する因子の全貌が明らかになっていない細胞周期関連遺伝子のシス DNA エlementを用いた IVV スクリーニングを行った。その結果、転写因子としての機能は知られているものの、相互作用が未知である 3 種類の転写因子 (相互作用候補) の選択に成功した。

### (2)スクリーニングされた相互作用候補の検証実験

最初に、3 種類の相互作用候補がシス DNA エlementと特異的に相互作用することを、*in vitro* プルダウンアッセイにて確認した。次に、シス DNA エlement内のどの塩基配列を認識しているのかについて検証すべく、ゲルシフトアッセイを行った。その結果、3 候補のうち 2 候補については、他の転写因子が認識することが明らかになっている塩基配列を認識することが分かった。残りの 1 候補については配列特異性を見出すことはできなかった。次に、細胞内における前述の 2 候補と細胞周期関連遺伝子のシス DNA エlementとの相互作用を検証すべく、HEK293 細胞を用いてクロマチン免疫沈降実験を行った。その結果、2 候補共に有意に相互作用していることが分かった。

### (3)培養細胞を用いての相互作用候補がもたらす標的遺伝子の発現への影響の検証

上記 2 因子が細胞周期関連遺伝子のシス DNA エlementと相互作用することで、細胞周期関連遺伝子の発現にどのような影響を及ぼすのかを調べるため、HEK293 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、2 因子共に細胞周期関連遺伝子の発現の活性化に関与していることが分かった。さらに、HEK293 細胞内において 2 因子を強制発現させて細胞周期関連遺伝子の発現量が変化するかどうかを見たところ、ルシフェ

レーザーアッセイの結果とは対照的に、発現量が低下していることが分かった。この理由として、2因子はHEK293細胞において間接的に細胞周期関連遺伝子の発現制御を行っていることが考えられる。

以上より、IVV法を用いて既存の手法では得られない新規な相互作用を見出し、新しい生物学的知見を得ることに成功した。本研究において確立した手法は、単に新規なDNA-タンパク質相互作用を見出すのみならず、(1)「シスDNAエレメントとスクリーニングされた相互作用転写因子との複合体」と相互作用するタンパク質の探索、および(2)「スクリーニングされた相互作用転写因子」のシスDNAエレメントに相互作用する上流のタンパク質の探索が同様の手法を用いることで可能となる。すなわち、本手法は新規なDNA-タンパク質相互作用を元に次々と上流の相互作用を提示することにより、新規なカスケードを提案することが可能なものであることを示唆している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計6件)

1. 舘山誠司, 永野修, 佐谷秀行, 柳川弘志. In vitro virus (IVV) 法を用いたCD44を介した細胞内シグナルカスケードの解析 第32回日本分子生物学会年会 (MBSJ2009), 2009年12月12日, パシフィコ横浜, 横浜

2. 児玉達史, 舘山誠司, 土居信英, 柳川弘志. In vitro virus 法によるOct3/4、Sox2およびKlf4の分子ネットワークの解析 第32回日本分子生物学会年会 (MBSJ2009), 2009年12月12日, パシフィコ横浜, 横浜

3. 柚木修, 舘山誠司, 土居信英, 柳川弘志. In vitro virus 法を用いたNanog複合体の解析 第32回日本分子生物学会年会 (MBSJ2009), 2009年12月12日, パシフィコ横浜, 横浜

4. 舘山誠司, 児玉達史, 土居信英, 柳川弘志. 無細胞翻訳系を用いたmRNAディスプレイ法による遺伝子発現カスケード解析手法の確立とその応用 第3回無細胞生命科学研究会, 2009年3月17日, 弘前大学創立50周年記念会館, 弘前

5. 舘山誠司, 高嶋秀昭, 宮本悦子, 土居信英, 柳川弘志. In vitro virus (IVV) 法を用いたDNA-転写制御因子相互作用解析と遺伝子発現カスケードの解明 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合

同大会(BMB2008), 2008年12月12日, 神戸ポートアイランド, 神戸

6. 児玉達史, 舘山誠司, 土居信英, 柳川弘志. In vitro virus法を用いた転写制御因子のDNA結合ドメインの解析 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会(BMB2008), 2008年12月12日, 神戸ポートアイランド, 神戸

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

舘山 誠司 (TATEYAMA SEIJI)  
慶應義塾大学・理工学研究科・特別研究講師  
研究者番号：90338202

##### (2) 研究分担者

該当なし

##### (3) 連携研究者

該当なし