

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658111

研究課題名（和文） オンチップ共発現マイクロアレイによる転写制御ネットワークの精密解析

研究課題名（英文） On-Chip Co-expression Microarrays for Precise Analysis of Transcriptional Regulatory Networks

研究代表者

土居 信英 (DOI NOBUHIDE)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：50327673

研究成果の概要（和文）：

プロテインマイクロアレイは、1枚のスライド上に数千種類のタンパク質を固定したもので、大規模なタンパク質相互作用の検出などに利用されている。我々は、鋳型 DNA と抗体をスライド上に固定し、スライド上でタンパク質を合成・捕捉するオンチップ転写翻訳マイクロアレイを開発した。さらに我々は、1つのスポット内で2種類のタンパク質を同時に発現させ、相互作用解析を行うオンチップ共発現マイクロアレイを開発した。この手法では解析するタンパク質をマトリックス状に組み合わせることで、1枚のスライド上で多対多の相互作用解析が可能となる。この系を用いて、転写因子 Jun とその結合候補因子群をモデルとして、タンパク質間およびタンパク質・DNA 相互作用の検出に成功した。

研究成果の概要（英文）：

Protein microarrays, in which thousands of proteins are spotted on a slide glass, is a powerful proteomic tool for high-throughput parallel analysis of protein interactions. We have developed an on-chip transcription/translation microarray, in which protein synthesis is done on a slide glass by cell-free expression systems and subsequently captured by antibodies immobilized on the slide glass. We further developed on-chip co-expression microarrays that co-express a bait protein and a prey protein in a single spot. This approach has an advantage that a variety of combination of bait and prey proteins can be analyzed immediately on a slide. We used transcription factors Jun and Jun-binding proteins as a model, and successfully detected protein-protein and protein-DNA interactions by the on-chip co-expression microarray.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：プロテオーム 蛋白質 遺伝子 バイオテクノロジー 発現制御

1. 研究開始当初の背景

転写因子とシス調節 DNA エLEMENTの分子間相互作用からなる転写制御ネットワークは、細胞の成長・分化や外部刺激に対する応答における数千もの遺伝子発現を制御する重要な役割を果たしている。これまでに転写因子・DNA相互作用を明らかにするために、mRNA 発現プロファイルからのネットワーク予測や、ゲルシフトアッセイなどの生化学的手法が用いられてきた。最近では、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) と DNA チップや次世代シーケンサーを組み合わせた手法がよく用いられている。この手法は特定の転写因子に結合する DNA 配列を探索できる強力な手法であるが、逆に、特定の遺伝子の発現を制御するシス調節 DNA 領域に結合する転写因子群を探索できる強力な手法は今のところ存在せず、新しい手法の開発が囑望されていた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、特定のシス調節 DNA 配列と結合する転写因子群の組み合わせを簡便かつ迅速に検出できる、全く新しい着想に基づくオンチップ共発現マイクロアレイを開発し、最初の例としてロイシンジッパーモチーフをもつ転写因子を中心とした大規模な転写因子・DNA 相互作用解析を行い、従来よりも精密な転写制御ネットワークを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ビオチン化プライマーで PCR 増幅した遺伝子発現用 cDNA のアビジンスライド上への固定

遺伝子発現用 cDNA のリソースとして、ヒト約 30,000 のカタログ化された cDNA の中から転写因子 Fos および Jun とその相互作用因子の cDNA を選んで、ビオチン化プライマーによる PCR を行い、無細胞転写・翻訳に必要なプロモーター配列および kozak 配列と、捕捉用の T7 タグおよび検出用のエピトープタグ遺伝子を付加した。このとき共発現用異なるエピトープタグを付加した 2 セットの遺伝子を準備した。また同様にして、転写因子と相互作用するシス調節 DNA 配列を含むビオチン化 DNA も PCR により調製した。これらのビオチン化 DNA を、様々な組み合わせで、マイクロアレイヤーを用いてアビジン固定化スライドガラスにスポッティングした (スポット径約 200 μm)。

(2) スライド上での無細胞転写・翻訳反応 (オンチップ共発現)

上記 DNA 固定化スライド上に無細胞転写・翻訳反応液を静置し、「オンチップ共発現」を行った。無細胞タンパク質合成系は、近年、

プロテオーム解析のためのハイスループットなタンパク質合成手段として注目されており、活性を保持したタンパク質を効率よく合成できる様々な無細胞翻訳系が開発されている。本研究では、従来のウサギ網状赤血球由来抽出液、小麦胚芽由来抽出液および大腸菌由来 S30 抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系に加えて、昆虫細胞由来抽出液や、タンパク質合成に必要な因子を精製して集めた再構成系などの中から、遺伝子の由来に応じて最適な無細胞系を選択した。

(3) 蛍光標識抗体を用いた転写因子複合体・DNA 相互作用の検出

各スポットで共発現した 2 種類のタンパク質が標的 DNA と相互作用しているかどうかを蛍光標識抗体とマイクロアレイ専用の蛍光スキャナーを用いて検出した (図 1)。また、転写因子の発現量の違いを補正するために、シス DNA の代わりに捕捉用の抗 T7 タグ抗体を固定したスライドを用いたオンチップ共発現マイクロアレイの実験も並行して行った。

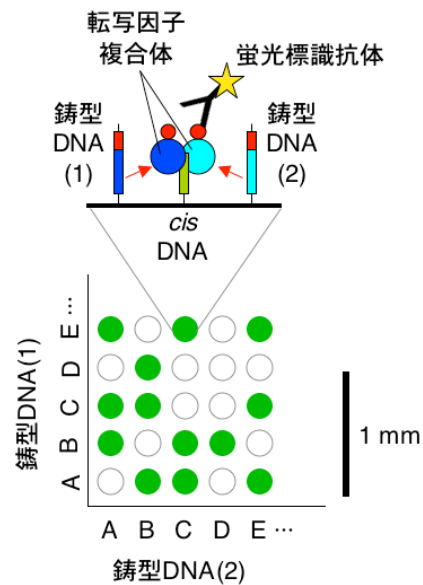


図 1 転写因子複合体のオンチップ共発現による組み合わせ相互作用解析の模式図

4. 研究成果

(1) 2010 年度の成果

まず、ロイシンジッパー構造により二量体を形成して DNA に結合することが知られている転写因子 Fos および Jun の遺伝子と、その結合配列であるシス調節 DNA (AP1) を用いたモデルとして、以下の 2 通りの相互作用解析について実験条件の最適化を図った。

①転写因子同士のタンパク質間相互作用解析：転写因子 Fos をコードする鋳型 DNA と捕捉用の抗体をスライド上に固定し、オンチップ転写翻訳した転写因子 Fos をスライド上に提示し、C 末端を Cy3 で蛍光標識した転写因子 Jun との相互作用をマイクロアレイ専用蛍光スキャナーにより検出する系を構築することができた。また、Fos に His タグまたは Halo タグを融合し、抗体よりも安定な抗 His タグ DNA アプタマーまたは Halo タグリガンドをタンパク質の固定に使用する方法について詳細に検討した結果、前者については Fos をスライド上に固定し、Cy3 標識 Jun との相互作用を検出することに成功した。

②転写因子とシス調節 DNA 間の相互作用解析：検出用 FLAG タグを付加した 2 つの転写因子 Fos および Jun をコードする遺伝子とシス調節 DNA をスライド上に固定し、無細胞タンパク質合成系によりスライド上でタンパク質を共発現させ、シス調節 DNA と相互作用した転写因子を蛍光標識抗 FLAG 抗体によって検出することに成功した (図 2)。

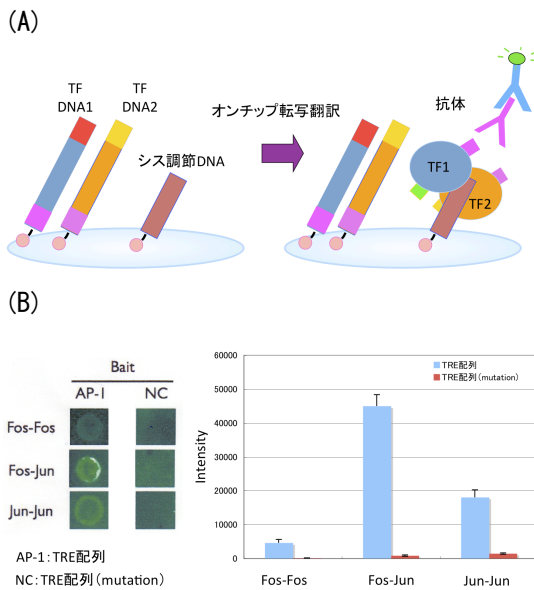


図 2 オンチップ共発現マイクロアレイによる転写因子・DNA 相互作用解析 (A) 模式図 (B) Fos-Jun-DNA (AP1) 相互作用の検出

(2) 2011 年度の成果

前年度までに確立した手法を用いて、ホモまたはヘテロダイマーを形成することで複雑なネットワークを構築しているロイシンジッパーモチーフを有する数十種類の転写因子群をモデルとして、以下の 2 通りの相互作用解析を行った。

①転写因子同士のタンパク質間相互作用解析：転写因子 (TF1) をコードする鋳型 DNA と捕捉用の抗体をスライド上に固定し、オンチップ転写翻訳した転写因子 (TF1) をスライド上に提示し、C 末端を Cy3 で蛍光標識した転写因子 (TF2) との相互作用をマイクロアレイ専用蛍光スキャナーにより検出した。その結果、転写因子 Jun と相互作用することが知られている Fos、SNAP19 および Kif5C の鋳型 DNA を固定したスポットでは Cy3 標識した Jun との相互作用による蛍光シグナルが検出されたが、ネガティブコントロールである GFAP や DNA を固定していないスポットではシグナルは検出されなかったことから本手法の有効性が確認できた (図 3)。

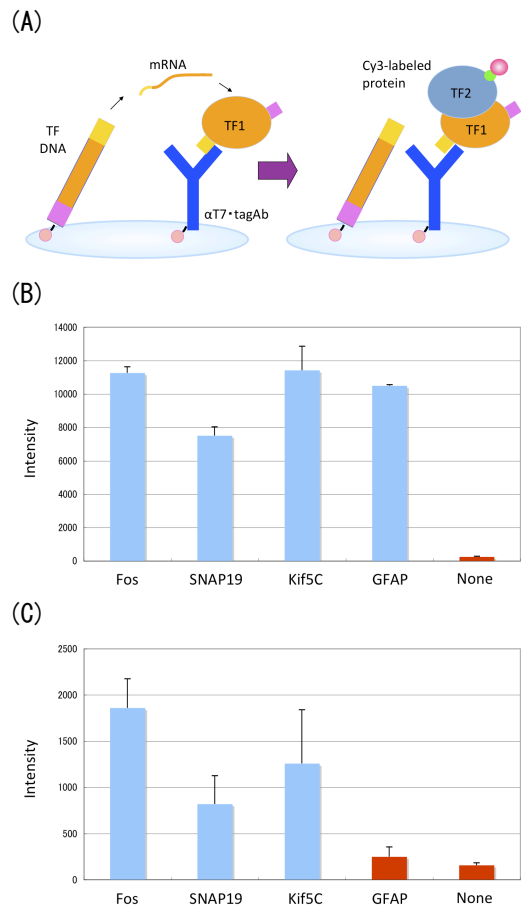
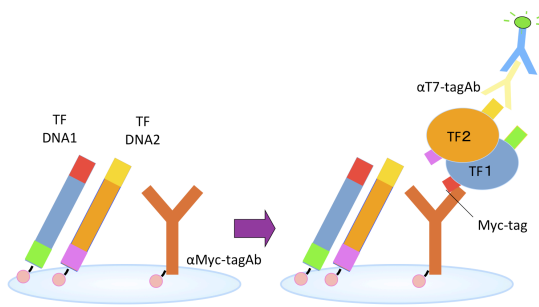


図 3 オンチップ転写翻訳によるタンパク質間相互作用解析 (A) 模式図 (B) T7 タグ抗体による Jun 結合タンパク質の固定化確認 (C) Jun-Cy3 との相互作用の検出

さらに、捕捉用 Myc タグを付加した転写因子 (TF1) をコードする鋳型 DNA、検出用 T7 タグを付加した転写因子 (TF2) をコードする鋳型 DNA、および捕捉用の抗体をスライド上に固定し、無細胞タンパク質合成系によりスライド上でタンパク質を共発現させ、転

転写因子 Jun とその結合候補因子群との特異的な相互作用を蛍光標識抗 T7 タグ抗体によって検出することに成功した (図 4)。

(A)



(B)

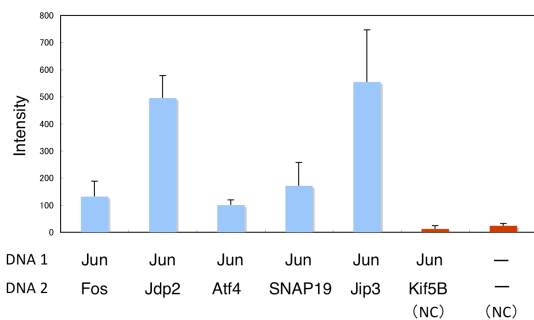


図 4 オンチップ共発現マイクロアレイによるタンパク質間相互作用解析 (A) 模式図 (B) 各種 Jun 結合タンパク質と Jun との相互作用の検出

②転写因子とシス調節 DNA 間の相互作用解析：数十種類の転写因子群をモデルとして、検出用タグを付加した2つずつの転写因子をコードする遺伝子とシス調節 DNA をスライド上に固定し、無細胞タンパク質合成系によりスライド上でタンパク質を共発現させ、シス調節 DNA と相互作用した転写因子を抗原・抗体反応によって蛍光検出した。この方法により、数十種類の転写因子をマトリックス状に組み合わせて1枚のスライド上で多対多の相互作用を検証することに成功した。

今後は、オンチップ転写翻訳マイクロアレイの技術をさらに発展させ、本研究で検討したタンパク質 (転写因子) と DNA との相互作用に限らず、近年注目されている機能性 RNA と RNA 結合タンパク質との相互作用についても適用することが期待される。

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)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

① Doi, N., Yamakawa, N., Matsumoto, H., Yamamoto, Y., Nagano, T., Matsumura, N., Horisawa, K., Yanagawa, H.: DNA display selection of peptide ligands for a full-length human G protein-coupled receptor on CHO-K1 cells. *PLoS ONE*, 7, e30084 (2012) 査読有

〔学会発表〕 (計 2 件)

① 大川皓司, 堀澤健一, 柳川弘志, 土居信英: Translationally-regulated proteomics using biotinylated puromycin. 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜, 2011. 12. 13)

② 早坂俊二, 井上鈴代, 堀澤健一, 柳川弘志, 土居信英: オンチップ共発現マイクロアレイによる転写制御ネットワーク解析. 第 33 回日本分子生物学会年会 (神戸, 2010. 12. 8)

6. 研究組織

(1)研究代表者

土居 信英 (DOI NOBUHIDE)
慶應義塾大学・理工学部・准教授
研究者番号：50327673

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

柳川 弘志 (YANAGAWA HIROSHI)
慶應義塾大学・理工学部・訪問教授
研究者番号：40327672
堀澤 健一 (HORISAWA KENICHI)
慶應義塾大学・理工学部・助教
研究者番号：70424207