

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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22760605

研究課題名（和文）

糸状菌転写因子結合配列の網羅的解析とエンジニアリング

研究課題名（英文）

High-throughput analysis and engineering of fungi transcription factor binding sequences.

研究代表者

児島 孝明 (KOJIMA TAKAAKI)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：40509080

研究成果の概要（和文）：

ビーズディスプレイ法は、DNA ライブラリーをマイクロビーズ上に高集積に構築する手法である。この手法を用いてランダム DNA ライブラリー及びゲノムライブラリーを用いて糸状菌転写因子 AmyR の結合配列の解析を行い、AmyR 結合モチーフの抽出及び種々の新規 AmyR 結合配列の獲得に成功した。さらに、このビーズディスプレイ法とリガーゼリボザイムを用いたプロモーター活性ハイスループット解析法を確立した。

研究成果の概要（英文）：

Bead display is a novel library construction method in which clonal DNA molecules are displayed on a large population of microbeads. Comprehensive analysis of DNA binding regions of a fungal transcription factor, AmyR, was carried out with a random DNA library or *A. nidulans* genome library by using bead display. As the results, the extraction of AmyR binding motifs and the selection of various binding sites of AmyR were observed. In addition, a high-throughput screening method for promoter activity was developed by using bead display and a ligase ribozyme.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：転写因子、プロモーター活性、エマルジョン PCR、糸状菌、ハイスループットスクリーニング

1. 研究開始当初の背景

転写因子と呼ばれる DNA 結合蛋白質は、生体内において特別な役割を果たしており、これらの機能解析は、生体中での遺伝子発現制御システムの解明に繋がり、非常に注目を集めている。しかしながら転写因子は、多種多様であり、どのような配列に結合し、いかな

る遺伝子を制御するかなどその機能の詳細は解明されていなかった。そこで、これら DNA-転写因子間相互作用を幅広く迅速かつ正確に解析する手法が囑望されていた。

この状況を踏まえ、w/o エマルジョンを用いた pL-fL スケールでの極微細空間中で、マ

マイクロビーズに固定化したプライマーを用いた DNA1 分子からの PCR によって、DNA 分子ライブラリーをマイクロビーズ上に構築する、ビーズディスプレイ法を着想した。このビーズディスプレイ法により、数千分子以上の同一 DNA 断片をビーズ上に固定することに成功し、バクテリア由来の転写因子 (Kojima et al. Nucleic Acids Res. 2005, Kojima et al. J. Biosci. Bioeng. 2006) 及び糸状菌由来転写因子 (Kojima et al. J. Biosci. Bioeng.

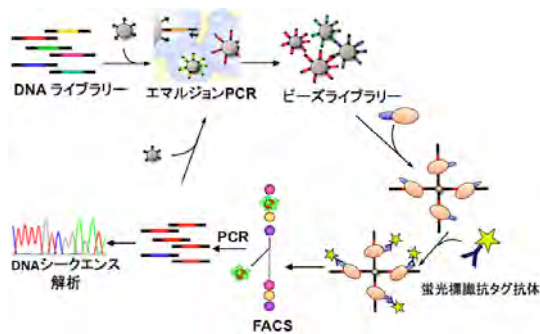


図1. 転写因子結合配列ハイスループットスクリーニング

2010) の標的配列の解析に応用した (図 1)。申請者らのグループは、マイクロビーズ上に固定化された DNA を鋳型として転写翻訳されるタンパク質を同一ビーズ上へ提示する、全く新しい遺伝子型-表現型の対応付けシステムの構築にも成功していた (Gan et al. Biotechnol. Prog. 2008, Gan et al. J. Biosci. Bioeng. 2010)。

この技術は、全く生細胞を用いずに、DNA1 分子からの増幅反応によりライブラリーを構築するため、原理的には無限ともいえる膨大な数の分子ライブラリーをマイクロビーズ上に作製できる画期的な手法として世界的な注目を浴びている。

2. 研究の目的

本研究では、上記 DNA のビーズディスプレイ法を駆使し、糸状菌由来の転写因子結合制御領域のハイスループット解析、新規結合配列の獲得を目指した。また同時に、転写活性に重要な役割を担うプロモーターのハイス

ループット評価法の確立を試みた (図 2)。

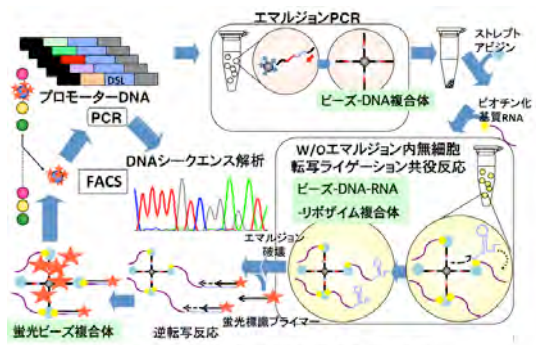


図2. 活性型プロモーターハイスループットスクリーニング

最終的に、これらによって得られる基礎的知見を基にした転写因子遺伝子発現制御機構の人工的改変による有用物質高効率生産への応用を目的とした。

3. 研究の方法

1) 転写因子結合部位ハイスループットスクリーニング

A. nidulans 由来転写因子の結合 DNA のスクリーニングを行った。本研究でターゲットとした転写因子は、糖代謝に関する AmyR を用いた。W/O エマルジョン PCR を用いてビーズ上に DNA ライブラリー (22 塩基をランダム化した DNA ライブラリーもしくは A. nidulans ゲノムライブラリー) を構築し、転写因子及び蛍光標識抗体をこのビーズライブラリーに加え、転写因子を介した蛍光複合体 [ビーズ-DNA-転写因子-蛍光標識抗体] が形成させ、高い蛍光強度を保持するビーズ複合体をセルソーターを用いて回収することにより目的転写因子結合配列が優先的に濃縮される (図 1)。得られた選択クローンの配列解析を行うことにより、ランダム DNA ライブラリーを用いた場合は AmyR 結合 DNA 配列モチーフ、ゲノムライブラリーを用いた場合はゲノム上において、AmyR がどの遺伝子の発現制御を行っているか、といった知見をハイスループットに獲得することができる。

2) プロモーター領域ハイスループット

トスクリーニング

各プロモーターからリガーゼ活性を保持する RNA 酵素 (リボザイム) が転写されるような鋳型 DNA を、エマルジョン PCR によってビーズ上に固定化し、エマルジョン内にて無細胞転写反応を行う。この際、転写反応液中にビオチン化 RNA 基質を加えておく事により、転写されたりボザイムは自身の活性によってストレプトアビジン・ビーズ上に提示される。続いて、このビーズに対して蛍光標識プライマーを用いた逆転写反応によって蛍光標識を施し、フローサイトメトリーによる蛍光検出を行い、特定の RNA ポリメラーゼ・プロモーターの組み合わせにおける転写活性を検出する (図 2)。プロモーターライブラリーを用いた本スクリーニングを行うことにより、用いた RNA ポリメラーゼに対して高い転写活性を保持するプロモーター配列が優先的に選択される。

4. 研究成果

1) ランダム DNA ライブラリーを用いた AmyR 結合モチーフ解析

N_{22} ランダムライブラリー 1 分子由来の DNA をエマルジョン PCR によってマイクロビーズ上に増幅、固定化したビーズライブラリーに対し、AmyR を用いた上記スクリーニング操作を 5 回繰り返した。獲得したクローンについて AmyR 結合活性解析を行ったところ、AmyR に対して優的な結合能を有するクローンは

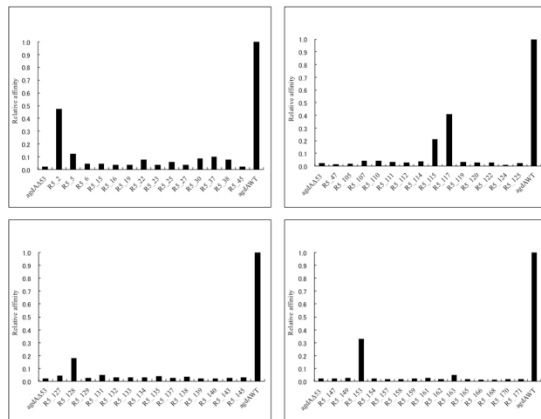


図3. ラウンド5由来選択クローンのAmyR相対結合活性解析

多数みられた (図 3)。そこで、これら陽性クローンをその結合活性に応じて 2 種類のグループ分けを行い、それぞれについて配列解析を行ったところ、AmyR に対して高い親和性を示したグループ 1 では既知の AmyR 結合モチーフ CGG_nCGG、またより低い親和性を示したグループ 2 では CGG triplet のコンセンサス

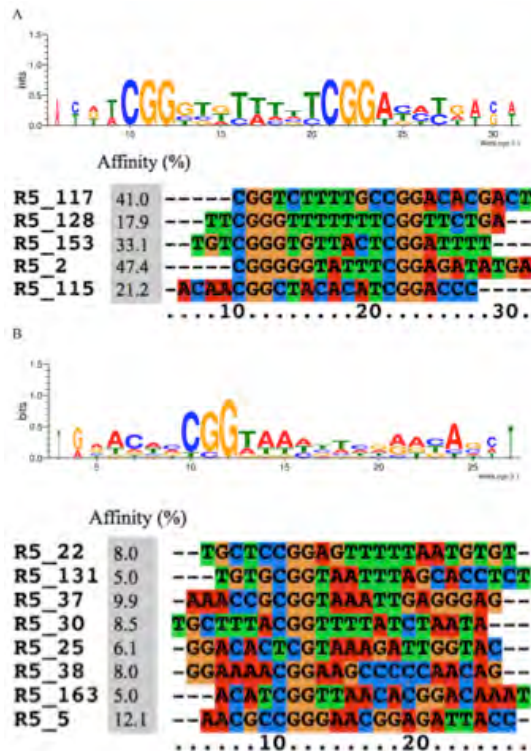


図4. AmyR結合選択クローン配列

配列がそれぞれ抽出された (図 4)。これらの結果は、本手法が転写因子結合配列モチーフの同定に大きな力を発揮できることを示すものであった。尚、上記研究成果は Biosci. Biotechnol. Biochem.において掲載許可を得た (Wang et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2012)。

2) *A. nidulans* ゲノムライブラリーを用いた AmyR 結合部位のスクリーニング

平均断片長 100 bp の *A. nidulans* ゲノムライブラリーを作製し、これを鋳型としたエマルジョン PCR によってビーズゲノムライブラリーを調製した。このライブラリーに対し、AmyR を用いた上記スクリーニング操作を 2

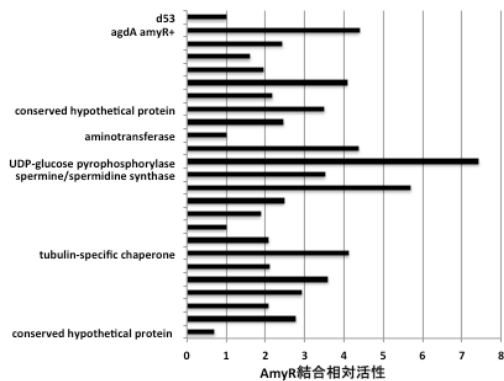


図5. *A. nidulans* ゲノムライブラリーより選択された各クローンのAmyR結合活性解析 (R2)

回行った。この際、FACSによる分取の条件を高い結合シグナルとやや高い結合シグナルのようにAmyR結合シグナルについて選択圧を2種類設けた。各ラウンド及び選択条件によって得られたクローンそれぞれについて配列解析およびAmyR結合活性解析を行ったところ、AmyR結合活性を保持する*A. nidulans*ゲノム由来の配列が多数獲得された。とりわけ、1ラウンド目で高い選択圧かつ2ラウンド目で緩やかな選択圧によって得られたクローン、SL5はAmyRに対して非常に高い結合活性を示した(図5)。このSL5はAmyR結合モチーフCGGN₈CGGとCGGN₈AGGをそれぞれ保持するUDP-glucose pyrophosphorylaseプロモーター配列を含んでいた。このクローンについてさらに詳細な解析を行ったところ、結合モチーフCGGN₈CGGのみを含む断片ではAmyRに対する結合活性はほとんど見られない一方、CGGN₈AGGを含む領域に対してAmyRが優先的に結合するとい

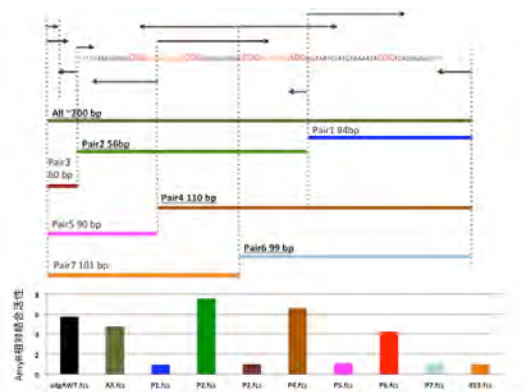


図6. UDPグルコースピロホスホリラーゼプロモーター領域の断片化とAmyR結合活性解析

う非常に興味深い結果が得られた(図6)。

さらに、このSL5が得られた選択プールを鏡型として3ラウンド目のスクリーニングを行った。選択されたクローンについて配列解析及びAmyR結合活性解析を行ったところ、AmyRに対して優位な活性を保持するプロモーター領域が多数獲得された(図7)。現在、これら

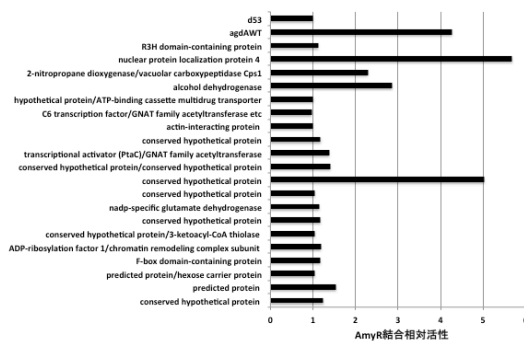


図7. *A. nidulans* ゲノムライブラリーより選択された各クローンのAmyR結合活性解析 (R3)

のプロモーター領域下流に位置する遺伝子のAmyRによる*in vivo*での転写活性化についてリアルタイムPCRを用いた解析を行っており、これらの成果をまとめた上で論文投稿を行う予定である。

以上の結果は、本スクリーニング法が転写因子結合部位をゲノムワイドに解析できることを示すものであり、またAmyRが様々な遺伝子発現制御に深く関わっていることを示すものである。本結果より得られた知見を基に今後、*A. nidulans*の糖代謝に基づいた転写因子結合部位の改変を試み、糸状菌バイオプロセスデザイン技術の確立を行う。

3) リガーゼリボザイムを用いた新規 *in vitro* プロモーター活性ハイスループットスクリーニング法の開発

まず、各種プロモーターとリガーゼ活性を保持するリボザイムDSLを用いて図2に示したスクリーニング系の確立を試みた。T7プロモーターとその変異プロモーター2種類、またT7RNAポリメラーゼとその変異体2種類を用いてそれぞれプロモーター活性を解析し

たところ、特定の RNA ポリメラーゼ・プロモーターの組み合わせのみ、その転写活性を示す蛍光シグナルが検出された (図 8)。次に、

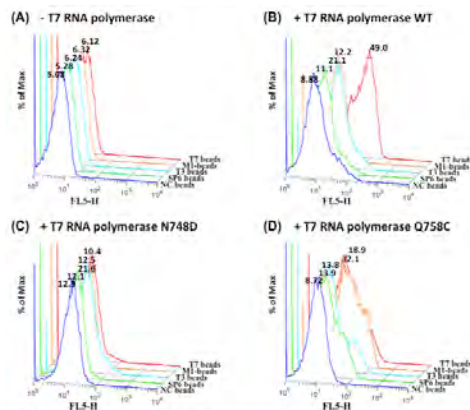


図8. 種々のT7RNAポリメラーゼ及びプロモーターを用いたプロモーター活性測定
T7プロモーターとSP6プロモーターをモル比1:100で混合し、T7RNAポリメラーゼを用いたスクリーニングを2ラウンド行ったところ、T7プロモーター配列の有意な濃縮が確認され、本系が活性型プロモータースクリーニングに有効であることが示された(図9)。

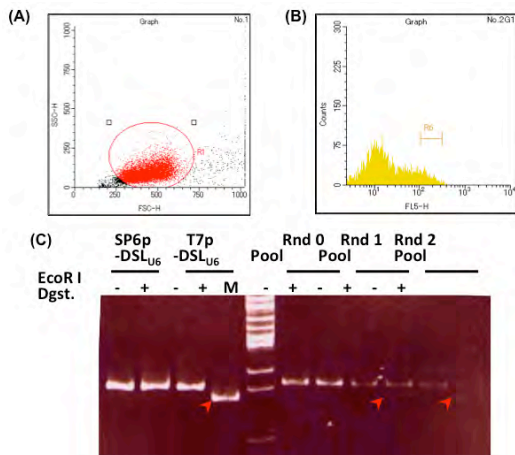


図9. T7RNAポリメラーゼを用いたモデルライブラリースクリーニング
尚、以上の研究成果は J. Biosci. Bioeng.において掲載許可を得ている(Kojima et al., J. Biosci. Bioeng. 2012)。

さらに、高いリガーゼ活性を保持するリボザイム、BcI23を用いて当系の改良を試みたところ、DSLを用いた場合にはその活性の低さから検出が困難であったSP6プロモーターの活性が、このBcI23を用いることによりその活性を検出出来ることを示した(図10)。このBcI23を用いてT7プロモーター:SP6プロ

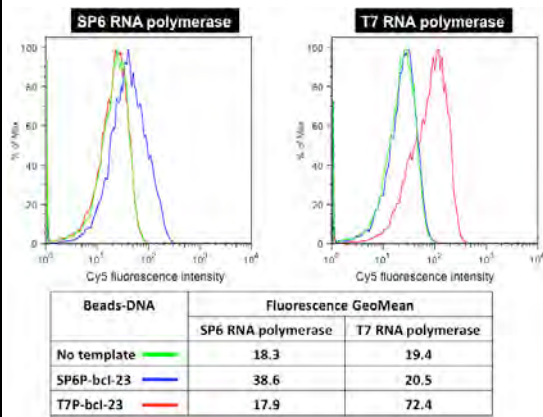


図10. リボザイムBcI23を用いたプロモーター活性測定

モーター1:1000のモル比で混合したライブラリーとT7RNAポリメラーゼを用いてスクリーニングを行ったところ、2ラウンド後、T7プロモーター配列の100倍以上濃縮が確認された(Data not shown)。現在変異プロモーターライブラリーからの新規プロモーターの取得を試みており、これらの成果をまとめて論文投稿を行う予定である。

以上の結果はビーズディスプレイ法がプロモーター領域のハイスループット解析に大きな力を発揮することを示したものであり、今後、本成果を基に *A. nidulans* 核抽出液を用いた糸状菌プロモーター領域解析技術の確立を行い、糸状菌プロモーター領域の改変を試みる。

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 2 件)

1) Wang, P., Kojima, T., Kobayashi, T., and Nakano, H. (2012) Comprehensive Analysis of the DNA-Binding Specificity of an *Aspergillus nidulans* Transcription Factor, AmyR, by using a Bead Display System. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 1128-1134. 査読有り

DOI:http://dx.doi.org/10.1271/bbb.110949

2) Kojima, T., Ohuchi, S., Ito, Y., Nakano, H. (2012) High-throughput screening method for promoter activity using bead display and a ligase ribozyme. *J. Biosci.*

Bioeng. 114, 671-676. 査読有り
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.06.011,

[学会発表] (計 17 件)

- 1) Kojima, T., Hashimoto, Y., Kato, M., Kobayashi, T. and Nakano, H.: High-throughput Screening of DNA Binding Sites for Fungus Transcription Factor, AmyR, Using Beads Display System of DNA. グローバル COE 第 4 回リトリート、平成 22 年 9 月、豊橋
- 2) Wang, P., Kojima T. and Nakano, H. : Detections of DNA-transcription factor interactions using a Microbeads Display System. グローバル COE 第 4 回リトリート、平成 22 年 9 月、豊橋
- 3) 中野秀雄、兒島孝明: 無細胞蛋白質合成系を用いた 1 分子・1 細胞由来 mRNA の解析技術。日本生物工学会、平成 22 年 10 月、宮崎
- 4) 兒島孝明、大内将司、中野秀雄: ビーズディスプレイ法とリガーゼ・リボザイムを用いたプロモーター活性選別法の開発。日本生物工学会 2010 年 62 回大会、平成 22 年 10 月、宮崎
- 5) Kojima, T. and Nakano, H.: Beads display: A Novel High-throughput Screening Technology to Explore Functional Biomolecules. The Eleventh China-Japan-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, 2010, November, Chengdu, China
- 6) 王 漢輝、兒島 孝明、中野 秀雄: DNA のビーズディスプレイ法を用いた DNA-糸状菌転写因子相互作用のハイスループット検出法。日本農芸化学会 2011 年度大会、平成 23 年 3 月、京都→震災の為発表中止
- 7) 兒島孝明、伊藤祐里恵、大内将司、中野秀雄: ビーズディスプレイ法とリガーゼ・リボザイムを用いたプロモーター活性 in vitro 選別法。生物工学若手研究者の集い 夏のセミナー2011、平成 23 年 7 月、笛吹
- 8) Kojima, T., Ito, Y., Ohuchi, S. and Nakano, H.: Novel screening method for promoter activity using a bead display and a ligase ribozyme. 第 5 回 GCOE リトリート、平成 23 年 9 月、長浜
- 9) Wang, P., Kojima, T. and Nakano, H. : Detections of DNA-Transcription Factor Interactions using a Microbeads Display System. 第 5 回 GCOE リトリート、平成 23 年 9 月、長浜
- 10) 兒島孝明、伊藤祐里恵、大内将司、中野秀雄: ビーズディスプレイ法とクラス I リガーゼ・リボザイムを用いたプロモーター活性 in vitro ハイスループットスクリーニング。日本生物工学会 2011 年 63 回大会、平成 23 年 9

月、小金井

- 11) 中野秀雄、兒島孝明: エマルジョン PCR を用いた分子間相互作用ハイスループットスクリーニング系 平成 23 年度生物工学技術セミナー企画 「創薬のための最新スクリーニング技術」、平成 23 年 11 月、東京
- 12) 伊藤祐里恵、兒島孝明、大内将司、中野秀雄: ビーズディスプレイ法とクラス I リガーゼ・リボザイムを用いたハイスループットな in vitro スクリーニング法の確立 日本農芸化学会 2012 大会 京都 2012 年 3 月
- 13) 王 漢輝、兒島孝明、中野秀雄: ビーズディスプレイを用いた DNA-転写因子相互作用検出システムに関する研究 日本農芸化学会 2012 大会 京都 2012 年 3 月
- 14) Nakano, H., Wang, P.W. and Kojima, T.: Comprehensive analysis of transcription factor binding site using bead display of DNA. The 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, 2012, May, Kanazawa
- 15) Ito, Y., Kojima, T., Ohuchi, S. and Nakano, H.: In vitro high-throughput promoter screening system using a bead display and a class I ligase ribozyme. The 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, 2012, May, Kanazawa
- 16) 伊藤祐里恵、兒島孝明、大内将司、中野秀雄: ビーズディスプレイ法を用いた in vitro プロモーターハイスループットスクリーニング法の確立。日本農芸化学会中部支部第 165 回例会、平成 24 年 10 月、名古屋
- 17) 江崎俊文、王 漢輝、兒島孝明、中野秀雄: ビーズディスプレイ法を用いた DNA-糸状菌転写因子相互作用検出システム。日本農芸化学会中部支部第 165 回例会、平成 24 年 10 月、名古屋

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兒島孝明 (KOJIMA TAKAAKI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号: 40509080

(2) 研究分担者 研究分担者なし

(3) 連携研究者 連携分担者なし