

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770169

研究課題名（和文） 転写因子-DNA間相互作用と転写活性化の同時測定法の確立

研究課題名（英文） Establishment of simultaneous and quantitative assay for DNA binding and transcriptional activity of glucocorticoid receptor.

研究代表者

三國 新太郎 (MIKUNI SHINTARO)

北海道大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：40435954

研究成果の概要（和文）：

本研究ではこれまでにない「転写因子-DNA間相互作用」と「転写活性化」の同時定量化法の構築を目指した。結果、転写因子の精製法を確立し、蛍光相互相関分光法を用いた転写因子-DNA間相互作用の定量化に成功した。また、蛍光相互相関分光法を用いることで転写因子が認識するDNA配列内の一塩基変異の差異を解離定数の違いとして認識できることが確認された。さらに、転写活性化の定量化につながるRNA特異的結合タンパク質-RNA間相互作用の定量化に成功した。

研究成果の概要（英文）：

Regulation of transcriptional activity could be initiated by associating the transcriptional factors with its specific sequence of genomic DNA. However, the direct relationship between “the affinity for DNA” and “transcriptional activity” of transcriptional factors is not clarified. To clarify this relationship, we tried to establish the simultaneous and quantitative assay for DNA binding and transcriptional activity of glucocorticoid receptor (GR), which is one of transcriptional factors, using fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCCS). As a result, the dissociation constant between the purified GR fused with EGFP and the Alexa647-labeled GR specific sequences (glucocorticoid response element, GRE) could be determined as 0.63  $\mu$ M, and sequence-specificity of GR could be confirmed by FCCS. Moreover, the dissociation constant between the purified RNA-specific binding protein fused with mCherry (red fluorescent protein) and Alexa488-labeled RNA was also determined as 143 nM by FCCS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：タンパク質、核酸の構造・動態・機能、転写因子、バイオイメージング、分子間相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物における転写活性はプロモーター領域より上流領域における転写因子との結合より調節されている。その転写因子の1つ

である Glucocorticoid Receptor (GR) はステロイドホルモンリガンド依存的な転写因子であり、リガンド非存在下では細胞質に局在している。そして細胞外からのリガンド刺

激に応答し、核内へと移行、さらに、DNA のプロモーター領域より上流に位置する認識配列 (Glucocorticoid response element, GRE) にホモ二量体として結合することで目的遺伝子の転写を調節することが知られている。これまで、転写因子あるいは転写因子複合体と DNA 間相互作用の解析手法としてはゲルシフトアッセイ法、DNA フットプリント法、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) が主流である。しかし、これらの手法は転写因子-DNA 相互作用がもたらす転写活性化を評価することができない。

一方、転写活性化の評価法としてはリアルタイム RT-PCR による転写産物の定量化、ルシフェラーゼ等を用いたレポーターアッセイが用いられているが、この方法では転写活性を増強したシグナルとして検出するため、転写因子-DNA 間相互作用を直接的に定量するのは困難である。

このように「転写因子-DNA 間相互作用」と「転写活性化」が密接な関係にあるにもかかわらず、これらを同時に定量可能な系はこれまで存在しなかった。それ故、転写因子-DNA 間相互作用の「強さ」がそれに次いで起きる転写活性化に与える直接的な影響に関しては未だ明らかになっていない点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究では蛍光相互相関分光法 (FCCS) を用い、転写因子-DNA 間相互作用とそれに伴う転写活性化量を同時かつ経時的に定量可能な系の確立を行い、転写因子-DNA 間相互作用とそれに伴う転写活性化量の相関性を明らかにすること目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 蛍光相関分光法と蛍光相互相関分光法

蛍光相関分光法 (Fluorescence correlation spectroscopy, FCS) では共焦点光学系によってサブフェムトリットル ( $10^{-16}$  L) まで絞られたレーザーの焦点領域における蛍光強度を測定する。その微小焦点領域を蛍光物質 (あるいは蛍光ラベルされた生体分子) が出入りすることによって生じる「蛍光強度の揺らぎ」を自己相関関数により解析し、蛍光物質の「拡散時間」と「数」を算出することができる。また、焦点領域の体積と分子の「数」から蛍光物質の濃度を求めることができる。さらに、蛍光相互相関分光法 (Fluorescence

cross-correlation spectroscopy, FCCS) では二色のレーザーを用いて二種類の蛍光物質を測定することで二色の蛍光物質 (タンパク質が二種類の蛍光物質でラベルされている場合は、それぞれのタンパク質間) の相互作用が解析可能となる。相互相関関数から算出される分子の数、すなわち濃度は相互作用している分子の濃度に相当するので、生体分子の相互作用の指標である解離定数を比較的簡便に算出することができる。

### (2) *in vitro* 転写因子-DNA 間相互作用と転写活性化の同時定量法の構築

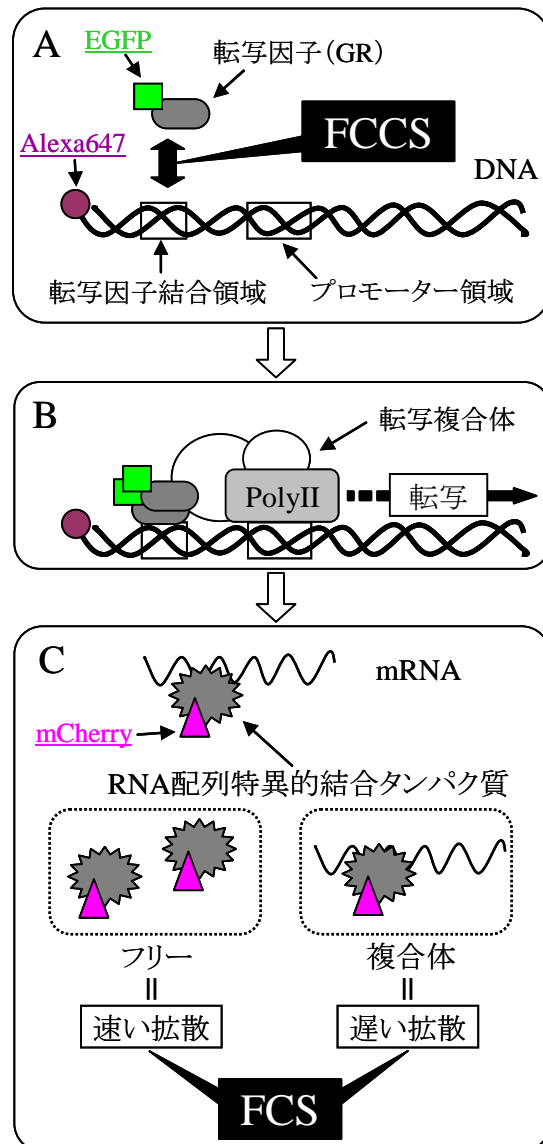


図1: *in vitro* 転写因子-DNA 間相互作用と転写活性化の同時定量法の概念図

転写因子として EGFP ラベルされたグルココルチコイド受容体 (EGFP-GR) は昆虫細胞から

抽出・精製する。Alexa647 ラベル化 DNA は Alexa647 ラベル化プライマーを用いてポリメラーゼ反応によって生成する。得られた EGFP-GR と Alexa647-DNA との相互作用を FCCS 測定により定量化する (図 1A)。同時に *in vitro* 転写系において転写を促進させる (図 1B)。生じた転写産物である mRNA の濃度は赤色蛍光タンパク質ラベル化 RNA 配列特異的タンパク質をプローブとして FCS を用いた拡散解析から定量化する (図 1C)。

#### 4. 研究成果

本研究計画においてもっとも重要な転写因子-DNA 間相互作用の定量化に必要なマテリアルであるグルココルチコイド受容体 (Glucocorticoid Receptor : GR) の EGFP 融合体 (EGFP-GR) を昆虫細胞から単離・精製する方法を確立した。そして、精製した EGFP-GR と Alexa647 ラベルされた GR 認識配列 (Glucocorticoid Response Element : GRE) の相互作用を FCCS を用いて定量化し、解離定数  $0.63 \mu\text{M}$  を算出するに至った。また、精製した EGFP-GR の配列特異性を確認するために GRE に変異を導入した数種類の配列との比較を行ったところ、FCCS を用いることで、GRE 内の一塩基変異の差異を解離定数の違いとして認識できることが確認された (図 2)。

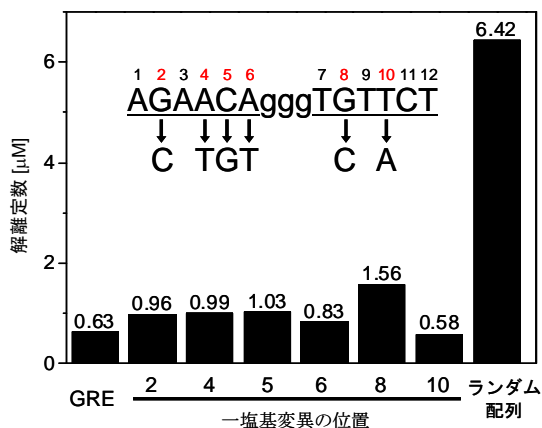


図 2 : EGFP-GR と Alexa647-GRE 間の解離定数  
図中の配列は GRE 配列と一塩基置換の位置を示す。また、バーの高さは低いほど相互作用が強いことを示す。

さらに、転写活性化量の定量化に必要なマテリアルとして赤色蛍光タンパク質融合 RNA 特異的結合タンパク質 (mCherry-MS2 coat protein) を大腸菌から単離・精製する方法を確立した。精製した mCherry-MS2 coat

protein の RNA 結合を確認するため、Alexa488 ラベルされた合成 RNA (20 base) との相互作用を FCCS を用いて定量化したところ、解離定数  $143 \text{ nM}$  を算出するに至った。

研究期間内では系の完全な確立には至らなかったものの、同時測定に必要なマテリアルの精製法を確立した。今後は高い再現性での EGFP-GR 精製法を目指した最適化を行うとともに、*in vitro* 転写系の最適化を行うことで同時定量法の確立を行い、確立された系を用いて、「転写因子-DNA 間相互作用」と「転写活性化」の関係を明らかにしたい。

#### 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) Yamada M, Kumamoto K, Mikuni S, Arai Y, Kinjo M, Nagai T, Tsukasaki Y, Watanabe TM, Fukui M, Jin M, Toba S, Hirotsune S. Rab6a releases LIS1 from a dynein idling complex and activates dynein for retrograde movement. *Scientific reports*, (in press) 査読有
- (2) Niikura K, Sugimura N, Musashi Y, Mikuni S, Matsuo Y, Kobayashi S, Nagakawa K, Takahara S, Takeuchi C, Sawa H, Kinjo M, Ijiro K. Virus-like particles with removable cyclodextrins enable glutathione-triggered drug release in cells. *Mol Biosyst*. 2013 Mar 5; 9(3): 501-7. 査読有  
DOI: 10.1111/gtc.12021

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 三國 新太郎  
蛍光相関分光法を用いた DNA-転写因子相互作用と転写活性化同時定量法の開発  
先端的光イメージング拠点形成プロジェクト・成果報告シンポジウム、2013.3.18、北海道大学 (札幌市)、口頭発表
- (2) Mikuni S and Kinjo M  
Determination of dissociation constant between glucocorticoid receptor and DNA using FCCS. 2012.9.22-24, 第 50 回日本生物物理学会年会、名古屋大学 (名古屋市)、ポスター発表
- (3) Kinjo M and Mikuni S  
Training course for FCS and FCCS  
Fluorescence Microscopy: from Basics to

Advanced, 2012.11.13-15, 沖縄科学技術大学院大学 (恩納村)、口頭発表

[その他]

ホームページ等

<http://www.lfsci.hokudai.ac.jp/labs/infmcd/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

三國 新太郎 (MIKUNI SHINTARO)

北海道大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：40435954