

## 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14日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657119

研究課題名（和文）新規なタンパク質-DNA 間相互作用検出法の開発とその転写因子機能解析への応用

研究課題名（英文）Development of a novel method detecting interaction between proteins and DNAs

研究代表者

伊藤 康博 (ITO YASUHIRO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品バイオテクノロジー研究領域・主任研究員

研究者番号：90353987

研究成果の概要（和文）：新規のタンパク質-DNA 間相互作用の高感度検出系を構築することを目的として、タンパク質に対する抗体にプローブ DNA を結合すると同時に、標的 DNA にもプローブ DNA を結合させたものを用いて、タンパク質-DNA 間相互作用をリアルタイム PCR 法により検出することを試みた。その結果、既知の結合強度に応じたタンパク質-DNA 間相互作用を検出することはできたが、その感度は期待よりはるかに低く、実用的な使用には更なる手法の改善が必要と思われた。

研究成果の概要（英文）：To develop a sensitive method detecting interaction of proteins with their binding DNAs, we applied a real-time PCR based methods with probe DNA-conjugated antibodies to a protein and also the target DNA conjugated another probe DNA. We detected interaction between a protein and the target DNAs by the method, but the sensitivity was much lower than that by the other authentic method. Thus, additional improvement is required for the practical use of this new method.

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	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：植物遺伝学

科研費の分科・細目：

キーワード：遺伝学、核酸、蛋白質、発現制御、分子認識

## 1. 研究開始当初の背景

転写因子は生体の外的・内的状況に応じて、生体を維持し、器官分化を適切に行うために適切な遺伝子の発現を活性化、または抑制する機能を担うタンパク質である。転写因子が機能する重要な要素として、mRNA の転写を活性化したりあるいは抑制したりといった活性を促す機能とともに、標的とする遺伝子における特異的な DNA 配列に対して結合する機能が極めて重要である。これまでに転

写因子と DNA の結合性を検討するために主に利用されてきたのがゲルシフトアッセイ法である。この方法では RI あるいは蛍光ラベルしたオリゴ DNA と転写因子を混合して結合反応を行った後に、非変成ゲルで電気泳動することによりラベル化オリゴ DNA がタンパク質の結合により移動度が変化するから、転写因子と DNA の結合性を同定するが、一般的に定量性に乏しいという問題点がある。

我々の研究グループではトマトの成熟の開始に関する制御メカニズムの解明を進めており、これまでに、MADS ボックスファミリーに属する転写因子 RIN の発現が成熟の開始の初発制御であるという知見を基に、RIN の生化学的研究を進めている。その成果として、RIN が特異的に結合する DNA 配列のパターンを明らかにしており、また、成熟に関連する遺伝子のプロモーター上に存在するこれらの配列に対して、成熟期特異的に RIN が結合することをクロマチン免疫沈降法により明らかにし、さらにゲノム中において、少なくとも 240 以上の遺伝子に関して RIN により直接的に発現が制御されていることを明らかにした。また、RIN は他の MADS ボックス転写因子 TDR4 および SIMBP7 と複合体を形成して、成熟果実細胞中の標的配列に結合していることも明らかにした。

これらの研究から、RIN を中心とした転写因子はある一定のパターンに含まれる多様な配列に結合するが、その結合の強度は配列によって異なるらしいことが、ゲルシフトアッセイで感覚的につかめてきた。この結合強度と発現調節に何らかの関係がある可能性を考慮し、様々な配列間での結合強度を高い定量性で検出する技術の開発が必要となった。

## 2. 研究の目的

本研究では、転写因子の機能を研究する上で必要となる、タンパク質-DNA の相互作用を検出する新たな手法を開発することを目的とした。そのために、タンパク質-タンパク質の結合を定量的に検出する手法として、近年開発された Proximity ligation assay (PLA) 法 (Fredriksson et al. 2002. Nat Biotechnol.20,473) を応用することを検討した。本法は抗体にオリゴヌクレオチドを標識したプローブを用い、リアルタイム PCR 法を適用することにより、タンパク質-タンパク質の相互作用を微量サンプルから検出・定量化が可能である。このシステムを応用し、タンパク質-タンパク質の相互作用をタンパク質-DNA に置き換えたシステムを構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

申請者が明らかにしているトマトの RIN 転写因子とその標的配列群との結合強度を異なる配列で比較できる実験系を確立する。次に示す実験の概要を基に検出条件の検討を行った。

### (1) 抗体-プローブ DNA 複合体の調製

RIN、TDR4、あるいは SIMBP7 に対する特異的抗体に対し、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin

キット(タカラ)でビオチンラベルを行った。このビオチンラベル RIN 抗体またはビオチンラベル GFP 抗体 (アブカム) に対し、TaqMan® Protein Assay Open Kit (アプライドバイオシステム) を用いて、抗体-プローブ DNA 複合体を調製した。

### (2) RIN 標的配列の調製

既に RIN に結合することが分かっている配列数種について、それぞれ pGEM7zf ベクターにクローニングした。クローニングサイトの両端にそれぞれ相補な配列を持ち、5' 末端にビオチンラベルしたプライマーをフォワード側、リバーズ側に合成した。これに対し、ラベルしたビオチンを介し、上記の TaqMan® Protein Assay Open Kit を利用して、ストレプトアビジンでラベルされた PLA 法のプローブ配列を結合させた。同様に、ネガティブコントロールとして部分的に塩基置換することで結合性を失った配列を用意し、プローブを合成した。

### (3) RIN-DNA 複合体形成

TNT Quick Coupled Transcription/Translation System を用いて、無細胞系による RIN タンパク質合成を行い、供試する DNA と混合してタンパク質-DNA 複合体を形成させた。

### (4) プローブ DNA 間の結合

抗体に結合しているプローブ DNA の末端、および結合 DNA 側に結合させたプローブ DNA の末端に、それぞれ相補となる配列を持つコネクター-DNA を混合して、DNA リガーゼにより酵素的にプローブ DNA 間の結合反応を行った。

### (5) Real-Time PCR 法による定量

定量 PCR により RIN タンパク質と結合した DNA 量を測定した。目的の PCR 産物を特異的に検出する精度を高めるために、抗体側 DNA と RIN 結合 DNA との結合部位にまたがる Taqman プローブを用いて、リアルタイム PCR によって検出した。

### (6) ゲルシフトアッセイとの比較

結合程度の差がはっきりとしたもの(強く結合する配列と、弱い結合が見られる配列)に関して、FITC ラベルを行ったプローブ配列に対し、合成 RIN タンパク質を混合し、ネイティブアクリルアミドゲルを用いて泳動を行った後、Typhoon (GE Healthcare) でラベル化プローブの移動度を検出してタンパク質-DNA 間の相互作用を検出し、結果の妥当性を比較した。

## 4. 研究成果

(1) まず、既知の RIN の結合配列のうち、結合が強いもの、若干弱いもの、さらに対照区として結合しない配列を選んで試験することにした（それぞれ、MADS6、MADS7、MADS9 とする）。これらは図 1 の通り、ゲルシフトアッセイで明確に結合強さの差が見られることを確かめた。

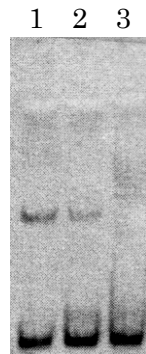


図 1 RIN タンパク質のゲルシフトアッセイ。無細胞系で合成した RIN タンパク質とラベル化 DNA、MADS6、MADS7、MADS9（それぞれレーン 1-3）を反応させ、泳動して移動度の変化を検出した。矢印がタンパク質に結合して移動度が変化した DNA。

(2) 次に PLA 法の準備として、RIN と RIN に結合する TDR4、S1MBP7 のそれぞれの抗体にビオチンラベルを行った。ビオチンラベルおよび、プローブ DNA 結合の可否を診断する Forced Proximity Probe Test において、リアルタイム PCR により RIN、TDR4、S1MBP7 のそれぞれに対する抗体に対してテスト値 ( $\Delta CT$  値) が 14.6、14.6、14.0 となり、いずれも基準値の 8.5 を上回っていたことから、

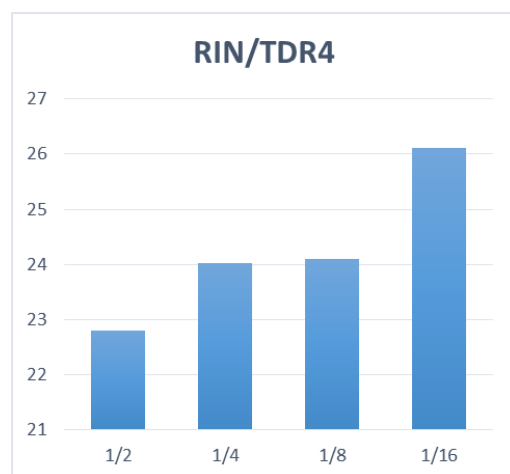


図 2 リアルタイム PCR による果実細胞中の RIN・TDR4 結合の検出。成熟果実から抽出した核タンパク質に対して、RIN と TDR4 に対する抗体プローブにより PLA 解析を行った。タンパク質の濃度(横軸)依存的に、リアルタイム PCR の検出値 (Ct 値; 縦軸) が変化しており、RIN と TDR4 のタンパク質間の結合が検出できていると考えられた。

抗体に対して適切なプローブ DNA 結合が行われることが確かめられた。

このプローブを用い、成熟果実細胞抽出液をサンプルとして RIN と TDR4 の複合体をリアルタイム PCR により検出したところ、タンパク質濃度依存的に増幅産物が得られることから、2 種のプローブ合成に成功したと考えられた(図 2)。

(3) 次に、結合する DNA 配列について、ビオチン化オリゴ DNA をプライマーに結合配列を PCR で増幅し、ストレプトアビジンラベルされた PLA 法用のオリゴ DNA でラベル反応を施した。この DNA を、網状赤血球細胞由来、または小麦胚芽系の無細胞タンパク質合成系で合成した RIN と TDR4 と混合して、定量 PCR により結合の程度の検出を行ったが、対照区と有意な差が検出できなかった。

(4) そこで、RIN タンパク質に GFP タンパク質を融合したキメラタンパク質を用意し、GFP タンパク質全体に対するポリクローナル抗体をプローブとして使用することにした。キメラタンパク質が DNA 結合性を有することはゲルシフトアッセイにより確認した。キメラタンパク質を無細胞系で合成し、標的 DNA と結合反応させ、本系での検出を試みた。

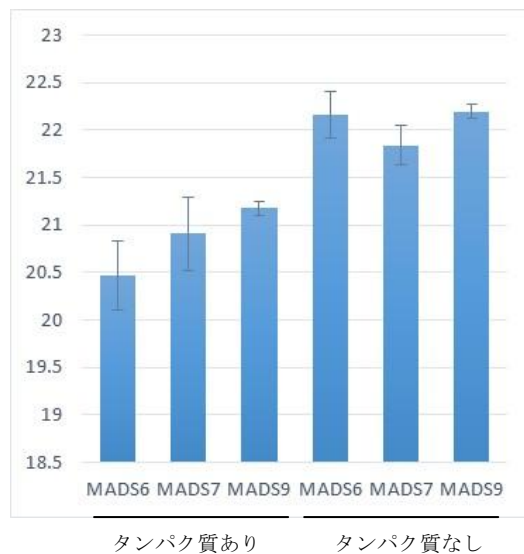


図 3 リアルタイム PCR によるタンパク質-DNA 結合の検出。RIN タンパク質に対して図 1 で使用した DNA の結合度合いを PLA 法の応用により検出を試みた。縦軸はリアルタイム PCR の Ct 値。反応系にタンパク質を加える、または加えない試験区を比較。Ct 値の高低は予想される順番であったが、その差は小さく、ゲルシフトアッセイ(図 1)と比べて定量的とは言い難い。

その結果、リアルタイム PCR により、既知の結合強度の順にプローブ DNA 間の結合反応が生じた割合が高かったが、その差は期待ほ

どには大きくなかった。タンパク質を加えない場合と比べて、明らかに反応が進んでいると考えられる結果となったが、これも十分な差があるとはいえない結果である。プローブ濃度、タンパク質量、反応バッファー等の種々の実験パラメーターの調節を行ったが、本研究期間内に統計的な有意差を示すには至らず、ゲルシフトアッセイよりも検出感度的に劣っていると判断せざるを得ない結果となった(図3)。

(5) 原理的には、本法によるタンパク質-DNA 間の相互作用検出が可能であるはずであるが、予想以上にその感度が低かったことに大きな問題がある。原因として考えられたのが、PLA 法自体の検出感度の問題である。メーカーの説明書に記載されているタンパク質-タンパク質間相互作用で成功しているのは、使用する抗体がポリクローナル抗体に限られており、モノクローナル抗体では検出が困難である傾向にあると考えられる。つまりポリクローナル抗体は、標的の分子に対して、様々な認識サイトをもつ抗体の混合物であるが、モノクローナル抗体は、一種類の認識部位をもつ単一種の抗体であるために、PLA 法で検出できる程度のプローブ DNA 間の結合が確保しにくい可能性が考えられる。本研究で用いた RIN、TDR4、SIMBP7 の抗体は、ポリクローナル抗体ではあるが、抗原として、短鎖のペプチドを使用しており、抗原の認識部位が限られるという点では、モノクローナル抗体に近いといえる。この問題を回避するために、使用するタンパク質として RIN に GFP を融合し、GFP のポリクローナル抗体を使用してみた (GFP のほぼ全長のタンパク質を抗原として作成されている)。しかしながら、検出感度の向上には、大きな寄与が見られなかった。さらなる問題点としては、標的 DNA 側のプローブ結合法である。今回使用した標的 DNA には、末端にビオチンを 1 分子ずつ結合させて、プローブ DNA を結合させるので、1 乃至 2 個のプローブ DNA を結合させるのが限界である。別の方法で、プローブ DNA を多数結合させる方法があれば感度向上に貢献するかもしれない。

分子間の結合度を定量的に測定できることは非常に重要であり、リアルタイム PCR 法のような簡便な方法での検出法が開発できれば、応用範囲はタンパク質-DNA にとどまらず、各種分子の相互作用まで広げられると考えられる。ここまでの研究で一定の傾向と、手法改善に対するヒントが見えてきており、これらを解決していくことが今後の課題である。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 康博 (ITO YASUHIRO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品バイオテクノロジー研究領域・主任研究員

研究者番号：90353987