

転写制御の基本的枠組を探る：モデル制御系の構築とその定量的解析

- 細胞内で"見た"調節因子の標的DNA への結合 -

田中 正史

(東海大学・医学部 共同研究員)

1. 研究のねらい

遺伝子の転写反応のオン・オフや、転写量増減の基本を理解することを目的として、発現スイッチオンの引き金に当たる「転写活性化因子が特定のプロモーターに結合する過程」に焦点を絞って研究を進めた。従来は、主に試験管内反応を通じて精力的に解析されて来たが、本研究では、その"生きた細胞内での実像"を明らかにするために、この結合を直接観察する方法を確立し、結合に関わる基本的要素に検討を加えた。

2. 研究結果及び自己評価

研究結果

(1) 転写活性化因子のプロモーターへの結合の可視化

緑色蛍光タンパク (GFP) 派生体等を用いて、転写活性化因子の標的プロモーターへの結合を、生きた細胞内で可視化した。古典的な転写活性化因子として、極めてよく解析されている酵母Gal4を用い、GAL1プロモーター (Gal4の標的としてよく知られている) に結合したGal4分子を、黄色の蛍光輝点として検出した。細胞内におけるこの結合は非常に効率的で、核内の遊離Gal4分子が検出できないような低濃度でもGal4黄色蛍光輝点が見られる (図)。このアッセイ系の確立によって、転写活性化因子がプロモーターに効率的に結合するために必要な要素 (Gal4自身の機能ドメインや、DNA一次構造上での結合配列の存在様式) を、生きた"細胞内"で検討することが可能になった。

(2) 新たな機能ドメイン「DNA結合モデュレーター」の同定

GAL1プロモーターへの効率的結合に必要なGal4自身の機能領域を解析し、既に良く知られている「DNA結合ドメイン」(試験管内ではDNA結合に必要な十分の領域)、「転写活性化ドメイン」(転写促進に関わる領域)と協調する第三の機能ドメイン「DNA結合モデュレーター」を新たに同定した。Gal4のDNA結合ドメインは、試験管内とは異なり、細胞内ではGAL1プロモーターに効率的に結合出来ないが、DNA結合モデュレーターを持つことによって、結合効率が飛躍的に上昇する。Gal4タンパクは、各々独立に機能する二つのDNA結合モデュレーターを持つが、これらは、DNA結合ドメインや転写活性化ドメインと、物理的、もしくは、機能的に区別出来る。

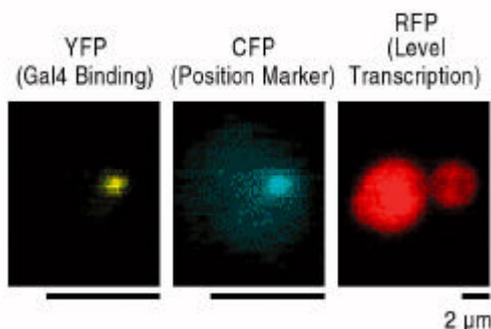


図 Gal4 のGAL1プロモーターへの結合

GAL1プロモーターに結合したGal4-YFP融合タンパクは黄色輝点を形成しており、その核内での位置は、位置マーカーであるシアン色輝点と一致している。シアン色輝点は、lacO配列 (GAL1プロモーター近傍に挿入した) に結合したLacI-CFPによるものである。GAL1プロモーターの転写活性は、プロモーター下流に挿入したRFP (赤色蛍光タンパク) の発現量によってモニターした。

(3) 結合DNA配列のコンテキストの効果

DNA結合モデュレーターの効果は、自然のGAL1プロモーターの他にも、Gal4結合配列を無関係のプロモーターに融合した場合等にも見られ、ある程度の一般性を示す。しかし、DNA一次構造上における結合塩基配列の存在様式が影響を及ぼさないということではなく、極端な場合 (例えば、Gal4結合配列を数十個連結した場合) には、DNA結合モデュレーターの効果が見られない。従って、DNA結合モデュレーターへの依存性は普遍的なものではなく、結合DNA配列のコンテキストに左右され得るものである。

(4) まとめと展望

転写活性化因子そのもの、さらには、DNA結合ドメインや転写活性化ドメイン等の基本的概念の確立に中心的な役割を果たしてきたGal4の場合でさえ、細胞内での実態は従来ほとんど解析されてなかった。本研究では、Gal4の細胞内解析を通して、第三の機能領域(DNA結合モデュレーター)を新たに同定した。Gal4の場合以外にも、転写やDNAの複製・修復等に関与する他のDNA結合性の因子が標的DNAに結合する際に、あるいは、他の生物種において、DNA結合モデュレーターと同様の機能領域が関わっている可能性が考えられる。そのような可能性の検証は、DNA結合モデュレーターの作用機構の解明と共に、今後の重要な課題である。

他方、DNA結合の可視化は、反応動態の細胞内解析にも道を開くものである。転写活性化因子の結合と解離を細胞内で既に可視化しており、DNA結合モデュレーターの主な機能は、結合の安定化であることを示す結果を得ている。このようなリアルタイム解析法の拡充によって、「遺伝子発現スイッチ」の動的な実像にさらに迫ることが出来ればと考えている。

自己評価

進展度としては、当初の計画の相半ばでもあり反省点もあるが、鍵であった「転写調節因子の標的DNA領域への結合の、細胞内での定量的解析」に関しては、独自の解析法を開発・確立し、さらに、転写調節因子の細胞内動態のリアルタイム解析にも着手することができた。「単なるプレーヤーの同定と、その役割の定性的理解」にとどまらず、転写制御機構の動的・定量的な理解に向けた *in vivo* 研究の端緒となればと考えている。

3. 領域総括の見解

真核生物の出芽酵母において、これまで提唱されてきた遺伝子転写制御機構について、緑色蛍光タンパク質で可視化した転写因子タンパク質の動きを *in vivo* で確認する実験を行ってきた。これまでの成果として、転写因子タンパク質がプロモーター上の特異的認識配列への結合には、既知のDNA結合ドメインの外に、新にDNA結合モデュレーターと称するドメインが関与することを示唆している。