

論文の内容の要旨

論文題目

From cataloging to profiling of information on transcriptional regulation – Establishment of a competitive-PCR-based system for accurate quantification of nucleic acids.

〔 転写制御情報のカタログ化からプロファイリングへ –
競合PCRを用いた高精度な核酸定量システムの確立 〕

氏名 三 浦 史 仁

転写制御因子の標的遺伝子を同定しカタログ化することは、それぞれの転写制御因子による転写制御機構を明らかにする上での基本情報として非常に重要である。また、遺伝子同士の相互関係を見いだすという意味合いでも重要であり、これは特にゲノム構造解析の結果存在が確認された機能未知の遺伝子を解析する上で大きな手がかりとなるものである。各転写因子の標的遺伝子の同定は、それぞれの転写因子において異なる活性化状態を作り出し、それぞれの状態間で比較転写物解析を行い、変動のあった遺伝子をリストアップすることで達成されるだろう。こうした解析のモデル実験として、私は出芽酵母における多剤耐性関連転写因子である *PDR1* に注目し、この転写因子の異なる三つの状態を持つ変異体間で Fluorescent Differential Display 法による比較転写物解析を行った。

その結果、標的候補遺伝子として 20 の遺伝子を同定するに至ったが、この中には既にその標的として確立された *PDR5*、*SNQ2*、*YOR1* 遺伝子が含まれており、比較転写物解析を通じて標的遺伝子を同定する目的が達成されることが確認できた。また、*Pdr1p*

の新規標的遺伝子としてプロテオソーム関連の転写因子である *RPN4* や糖代謝系の転写抑制因子である *MIG2* 遺伝子が同定されたことは、従来薬剤耐性のカテゴリのみで議論されていた PDR ネットワークが細胞内で様々な系と綿密な関係があることを示しており、これらの解析に新たな切り口を提供するきっかけをもたらした。機能未知であった ORF、YNL231C は、私がこの遺伝子を Pdr1p の標的として同定した後、他のグループからこの遺伝子が実際に薬剤耐性に関連していることが示され、その結果 *PDR16* と命名された。このことは、標的遺伝子のカタログ化により機能未知の遺伝子を既存の機能カテゴリと関連づけることが可能であることを改めて示す結果といえよう。一方で、私は Pdr1p の既知標的であるいくつかの遺伝子を同定できなかった。このことは FDD 法が包括性という意味合いで限定的であることを示す結果であったが、それにも関わらず、同定された標的候補遺伝子群のプロモータ中から YEBISU プログラムによる情報科学的解析から既知シスエレメントである PDRE を抽出することができたことは転写因子の標的遺伝子をカタログ化することそのものがそれらの間に眠る共通な制御機構を明らかにする上で基礎となる情報になり得ることを示していた。おもしろいことには、同定された標的遺伝子の中には 100 アミノ酸にも満たない、それ故に既存のデータベースには登録されていないような転写単位があった。この遺伝子は、既に機能が知られている 2 つの ORF に挟まれた 1Kbp 程度の領域にマップされたが、そのプロモータ領域には Pdr1p が認識する PDRE 様配列があった。実際に LacZ を用いたレポーター遺伝子解析によって、この遺伝子がこの PDRE を介して Pdr1p の制御を受けていることが明らかになり、また、翻訳されている可能性も示された。レポーター遺伝子解析だけでなく、直接ゲノム上から発現している mRNA も同様の挙動を示しており、この転写単位が Pdr1p の支配を受けていることを一層支持する結果となった。

FDD 解析によって同定された標的候補遺伝子群は、大まかにはその挙動が似通ってはいるが、それぞれに対し、個別に詳細な定量解析を行ってみると、その動態は繊細であり、また、それぞれの遺伝子によって特徴があった。おそらくこれらの遺伝子の多くは Pdr1p だけではなく、他の転写因子によっても同時に制御を受けているものと考えられ、あるいは、同じ Pdr1p による制御でもそれぞれの応答性が異なっていると考えられた。私は、これら似通った発現パターンによって同定され、カタログ化された遺伝子群の中にある違いを明らかにすることで、より詳細な転写制御の記述や解析が可能になるのではないかと考えた。FDD 法が PCR 法を原理とすることによる高い感度と、微妙な変化さえも検出できた高い定量性を持つことは認めざるを得ないながらも、ランダムに選択されたプライマーを用いることに由来する限定的包括性は、これからのゲノム解析に用いる手法としては決定的な負の要素であった。マイクロアレイや GeneChip 等の最新の包括的解析手法

の有用性は誰もが認める事実ではあるが、私はより詳細な転写制御の記述を目指しており、そのためにはより定量的な解析を実現する原理が必要であった。そこで私は、近年発表されたアダプター付加競合(Adaptpr-tagged competitive: ATAC)PCR 法に注目し、これを基に正確で包括的な核酸定量システムを出芽酵母の解析に向けて構築することにした。

ATAC-PCR 法は一度の実験で複数のサンプル間の発現量の違いを高い感度と精度で定量可能な非常に優れた方法である。加藤菊也(1997)によって提唱された原法 ATAC-PCR 法は cDNA の 3'最末端にしか応用出来なかったが、私はアダプターに改良を加えることでいかなる二本鎖 DNA 分子にもこの原理を応用可能にし、さらには反応条件の最適化を行った。私はこの方法を一般化アダプター付加競合(Generalized Adaptor-tagged Competitive: GATC)-PCR 法と名付けた。ウサギ網状赤血球由来 β -globin mRNA をスパイクキングしたモデル実験によると、GATC-PCR 法は反応溶液中に 1000 コピーのオーダーで標的配列が含まれていれば 1.5 倍の変化を見分けることが可能であった。同様に出芽酵母の 168 標的遺伝子に関して定量的増幅が可能かどうかを検定してみたが、そのうちおよそ 70%の増幅単位において 1.5 倍の変化を正確に検出可能であることがわかり、GATC-PCR の定量における高い力量が示された。

GATC-PCR 法は、対象フラグメントを、アダプター特異的プライマーとそれぞれの対象遺伝子に対する遺伝子特異的プライマーを用いて増幅する。従来の PCR では、それぞれの標的に対して一対のプライマーを用いたため、個々のプライマーの特異性がそれほど高い必要性は無かったが、GATC-PCR 法では標的の特異性を決定するプライマーが単一の遺伝子特異的プライマーであるために、このプライマーには非常に高い特異性が要求される。従って、プライマーのデザイン時には、プライマー配列の特異性をより正確に判定する指標が必要であった。そこで、私は、Nearest-Neighbor 熱力学による計算から導き出せる会合比率をプライマー末端の安定性を考慮する際の指標として、ゲノム配列や cDNA 配列を基に作成した配列の出現頻度ライブラリをその配列のユニークさを判定する指標として、それぞれの遺伝子のたまかな発現量比を他の遺伝子の増幅時に非特異的増幅産物として出現しうるかどうか判定する際の指標として、この三者を用いて動的に最も特異的な配列を抽出するアルゴリズムを考案した。これをプログラムとして実装した結果抽出されたプライマー群は、配列の特異性のみを考慮してデザインされたプライマーよりも 20%以上も非特異的増幅産物の出現を抑制することが可能であった。このことにより GATC-PCR 法を、より一般的に使用することが可能な基盤を整えることができた。

さらには、GATC-PCR 法がどういったタイプの二重鎖 DNA の定量にも応用可能であるという利点を生かし、cDNA とゲノム DNA の競合増幅を試みた。異なる遺伝子間の

転写量の比較は、原法 ATAC-PCR 法や DNA microarray 法ではそれぞれの遺伝子における PCR の増幅効率や蛍光標識効率が異なるために不可能である。しかし、GATC-PCR 法は基本的に標的遺伝子のほとんどを正確に同じ数だけ含むゲノム DNA を標準として用いることが可能であるため、異なる遺伝子間の転写量の比較が可能となる。つまり、ゲノム DNA を標準に用いた GATC-PCR 法による解析は、転写物の絶対量を記述することに他ならず、これにより、容易にトランスクリプトームの全体像を決定することが可能となる。このような記述は従来不可能ではなかったが、全面的に BodyMap、SAGE あるいは MPSS といった大規模なタグ配列解析に依っていた。したがって、今までは個々の状態間で容易にそのトランスクリプトームの構造比較を行えるほど単純化された系が無かったのだが、GATC-PCR 法はこういった比較トランスクリプトーム解析を真に定量的にしかもより高速なものへと発展させることが出来るだろう。この目的のために、私は既に 5000 のプライマーを設計し、その検定を終えており、出芽酵母のゲノムとトランスクリプトームに対する解析に向けた準備が整いつつある。このシステムから得られる定量的情報は、様々な生物情報学的解析にとって理想的なものになるだろう。