

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Analysis of gene regulatory network : an approach based on
chimerization-mediated activation of transcription factors
and expression profiling

和訳 遺伝子発現制御ネットワークの解析：転写因子のキメラ化による活性化
と発現プロファイリングを用いた標的遺伝子探索

指導教官 榊 佳之教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月 進学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 恩田美雪

近年の急速なゲノム解析の進展により、多くの生物において全ゲノム塩基配列が決定され多数の遺伝子が発見されたが、その大半は構造からは機能の推測すら出来ないものである。これらの新規遺伝子の機能解明に有効な手段のひとつと考えられるのは、遺伝子制御ネットワークを明らかにし、そこにその遺伝子を位置づけることである。機能既知の転写因子の支配下に機能未知遺伝子が存在することがわかれば、その制御関係情報は機能未知遺伝子の機能推定の重要な手がかりになる。逆に機能未知の転写因子もそれが支配する遺伝子群の中に機能の判明している遺伝子があれば、そこから転写因子の生物学的役割を推測することができる。従来転写因子の標的遺伝子群の検索には、転写因子の変異株を作製しそれにより発現が変動する遺伝子の網羅的検索が有効であるとさ

れてきた。しかし多くの転写因子がその活性化（核移行、標的配列結合能の獲得、転写活性化能の獲得など）に上流からのシグナル伝達を必要とすることから、活性化刺激を先験的に知ることが出来ない新規転写因子では有益な変異体を作成することは困難であり、また破壊株や単純な過剰発現株を用いた標的探索には限界がある。

この問題を解決するためには、転写因子の DNA 結合 domain に上流からの活性化刺激なしで恒常的に転写を活性化し得る domain を融合したキメラ転写因子を用いることが有効であると思われる。そこで本研究では、全ゲノム構造が解明されて全遺伝子の発現プロファイリングも可能な出芽酵母をモデルとし、Zn₂Cy6 型 zinc finger 転写因子を対象にキメラ転写因子を作製して、それによる標的遺伝子の発現を解析することでこの戦略の有効性を検証することにした。

そのために DNA 結合 domain および coiled-coil 領域の後ろに二量体化を促進する domain と VP16 転写活性化 domain とをノックインするためのカセットを作製した。これを用いてまず、その機能や下流標的遺伝子がよく研究されている Galactose 代謝を制御する転写因子 Gal4p について、相同組換えでゲノム上にキメラ転写因子を構築した。この株と Wild type とを通常の Glucose を糖原とする培地で培養し、RNA を抽出して代表的標的遺伝子 *Gal1*、*Gal7*、*Gal10* の発現を RT-PCR 法で検討した。その結果、本来 Galactose によって活性化される Gal4p はキメラ化する事により、Galactose 非存在下で代表的標的遺伝子の発現を誘導できることが確認された。

次に標的遺伝子の解析も進んでいる酵母の多剤耐性を制御する転写因子 Pdr1p についても同様に、キメラ転写因子を作製した。得られた株を Galactose で誘導し、RNA を抽出して代表的標的遺伝子 *PDR5*、*SNQ2*、*YOR1* の発現を RT-PCR 法で検討した。その結果、単純な過剰発現では下流遺伝子を誘導できない Pdr1p はキメラ化する事により、野生株と比較して代表的標的遺伝子の発現を誘導することが確認された。これは機能獲得型アレル *Pdr1-3* による誘導と比べても同等ないしそれ以上の増加であった。

更に Pdr1 キメラ転写因子によって発現が誘導される遺伝子をより包括的に検討するために DNA microarray を用いて解析を行った。その結果、従来の研究で単離された機能獲得型アレル *PDR1-3* とほぼ同等に標的遺伝子群の発現を誘導できることが判明し、この戦略の有効性が実証された。38 遺伝子が Pdr1 キメラ転写因子によって 5 倍以上発現が誘導されており、これらの遺伝子群に

は薬剤応答に関与する遺伝子が多く含まれていた。さらに、機能獲得型アリル *PDR1-3* によって発現が誘導されると報告のある 26 遺伝子中 23 遺伝子が Pdr1 キメラ転写因子によって 3 倍以上 (20 遺伝子は 5 倍以上) 発現が誘導された。

同様に Pdr1p のホモログで共通の下流標的遺伝子を持つことが知られていた Pdr3p についてキメラ転写因子を作成し、DNA microarray を用いて発現が誘導される遺伝子群の検出を行った。その結果 Pdr3 キメラ転写因子によって 66 遺伝子の発現が 5 倍以上誘導され、Pdr1 キメラ転写因子によって発現が誘導された 38 遺伝子の内 31 遺伝子の発現誘導が確認された。また、Pdr3 キメラ転写因子のみによって発現が誘導される遺伝子も多くあり、この結果から Pdr3p は Pdr1p と多くの下流標的遺伝子を共有しているが、独自の標的遺伝子も併せ持つことが明らかになった。

次に、単純な過剰発現では下流標的遺伝子の発現を誘導できなかった薬剤耐性を制御する転写因子 Yrr1p についても同様にキメラ転写因子を作成し、すでに報告のある Yrr1p の標的遺伝子 *SNQ2*、*YOR1* の転写を誘導することを確認した。さらに DNA microarray を用いた解析では Yrr1 キメラ転写因子によって薬剤耐性関連遺伝子群を多く含む 48 遺伝子の発現誘導が確認された。この結果から、Yrr1p がこれまでに示された小数の標的遺伝子以外にさらに多くの薬剤耐性関連遺伝子群の発現に関わることが明らかになった。

次に、Zn2Cy6 型 zinc finger 転写因子の系統樹上で Yrr1p と同じサブファミリーに属しながら機能不明な転写因子 *YOR172w*、*YKL222c*、*YLR266c* についてもキメラ転写因子を作成し、DNA microarray による発現解析を行った。その結果、これら新規転写因子も薬剤耐性に関与する遺伝子を標的とすることが示唆された。

また、これまで作成した 6 種の薬剤耐性関連転写因子の標的遺伝子群を比較したところ、Pdr1/Pdr3 と Yrr1/Ykl222c/Yor172w/Ylr266c の 2 つの大きなファミリーに分かれ、標的遺伝子の重複が転写因子の一次配列から作成した系統樹とよく一致することが判明した。これは、元来は共通の祖先から進化したこれらの転写因子が、標的遺伝子を共有しながらも、それぞれに独自の標的遺伝子を獲得することで機能的に分化しつつある様子をとらえたものであると考えられた。

さらに系統樹上でこれらの転写因子とは離れたところに位置する *LEU3*、*PUT3* についてもキメラ転写因子を作成し、報告されているそれぞれの標的遺

伝子の転写が誘導されることを確認し、DNA microarray による発現解析を行った。これら 2 種の転写因子の標的遺伝子群は前述の 6 種の薬剤耐性関連転写因子の標的遺伝子群とは殆ど重複せず、系統樹を反映したものとなった。このことから、この戦略によって特定の遺伝子群が常に誘導されてはいないことが確認された。

以上より、キメラ転写因子作成による恒常活性化アプローチは上流活性化シグナルが不明の場合でも下流標的遺伝子の検索を可能にし、遺伝子ネットワークの解明に有効な一般性の高い戦略となり得ることが示された。

Pdr1p と Pdr3p の機能がどのように分化しているかを調べるために Pdr3 キメラ転写因子によって発現高く誘導され、Pdr1 キメラ転写因子によって発現が誘導された割合が低い遺伝子群の解析を行った。その結果、これらの遺伝子群は NaCl によって発現が誘導されるまたは、これらの遺伝子を破壊した株では NaCl に対する感受性が上がる事が分かり、このことから Pdr3p は NaCl 耐性に関与すると考えられた。そこで Pdr1p 破壊株と Pdr3p 破壊株の NaCl に対する感受性を調べたところ Pdr3p 破壊株では NaCl 感受性が上昇しており、Pdr3p は NaCl 耐性に関与することが確認できた。このことから、この戦略により従来の方法ではとらえきれなかった Pdr1p と Pdr3p の機能分化をとらえることができたと言える。

以上より、キメラ化による恒常活性化戦略が、上流活性化シグナルが不明の場合でも下流標的遺伝子の検索を可能にするものであると同時に、近縁の転写因子間の機能分化をとらえることができ、冗長性を内包した遺伝子ネットワークの解明に有効な一般性の高い戦略となり得ることが示された。また、この方法は Zn2Cy6 型 zinc finger 転写因子以外の転写因子にも応用が可能であり、さらに遺伝子破壊が困難なヒトなどの生物における転写制御ネットワークの解明にも応用可能な将来性の高いものであると思われる。