

論文の内容の要旨

論文題目 タイリングアレイを用いた
転写因子複合体 β -catenin/TCF4 の結合部位の同定

氏 名 野中 綾

生体反応を制御する遺伝子やタンパク質の発現は、時間的および空間的に厳密な制御を受けている。遺伝子の発現の制御は、転写因子や転写制御因子と呼ばれる一連のタンパク質によって行われている。細胞に外来または内因性のシグナルが入ると、それに応答し、転写因子がプロモーターに結合して転写が制御される。

転写制御の複雑さの一因は、プロモーターに結合する分子の組み合わせのパターンが多数存在することにある。例えば、同じ転写因子でも、複合体を形成する分子によって異なる転写制御能を示す。そのため、転写のメカニズムを理解するには、転写複合体の構成を理解する必要がある。

複合体を形成し、転写を制御する分子として β -catenin と TCF4 の転写複合体が知られている。この TCF4 と β -catenin は癌においてシグナルの異常が報告されている Wnt シグナルの制御因子である。Wnt シグナルが活性化されている状況下では、TCF4 は β -catenin と複合体を形成して *cyclin D1 (CCND1)* や *c-MYC* といった増殖を促す遺伝子群の転写を亢進させる。一方、 β -catenin は TCF4 を介して間接的に DNA に結合するが、TCF4 以外の分子とも複合体を形成し、転写の制御に関わっている。このように、TCF4 と β -catenin は協調的に転写を制御することもあれば、各々が別の分子と複合体を形成し、転写を制御していることもある。

転写複合体の構成分子を一つ一つ同定するプロテオーム解析が現在進められている。一方で、DNA-転写因子の相互作用解析には Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) 法やフットプリンティング法が用いられてきた。しかし、EMSA 法は主に合成オリゴヌクレオチドを用いる *in vitro* での解析であり、フットプリンティング法ではその煩雑さから網羅的な解析が行えなかった。このため、より生体内で起きている反応に近い状態での、転写制御の網羅的な解析が望まれていた。この点を満たす手法が、*in vivo* での転写因子と DNA の相互作用を検出できるクロマチン免疫沈降法と、マイクロアレイ解析を組み合わせた ChIP-on-chip 法である。

これまでの ChIP-on-chip 法では、多くは DNA に直接結合する分子に対して用いられてきたが、転写複合体を構成する分子で、DNA に直接結合しない分子に対してはほとんどなされていない。TCF4 などの転写因子を介して DNA と相互作用をする β -catenin の結合を同定できれば、複雑な転写制御の解明につながると考えられる。そこで本研究では、ChIP-on-chip 法による β -catenin/TCF4 の転写複合体と DNA の相互作用の解析方法を確立し、結合領域を同定することを目的とした。

β -catenin の ChIP 解析では、一般的なホルムアルデヒドを用いた架橋では、DNA フラグメントの濃縮は見られなかった。そこで、架橋剤の検討を行い β -catenin の ChIP を行い、フラグメントの濃縮率を求めた。その結果本研究で、架橋剤である DSP が β -catenin と TCF4 の架橋に適していることを示した。この架橋方法は、ホルムアルデヒドのみや、今回検討に使用した架橋剤と比較し、*CCND1* や *cMYC* のプロモーター部位の DNA フラグメントを有意に濃縮されていることを示した。

さらに裸核を行い核分画を濃縮してから架橋を行うことによって、*CCND1*、*cMYC* の領域がより ChIP で濃縮されたことを示した。

このことより、架橋剤である DSP を使用し、さらに核分画を濃縮することで、転写複合体である β -catenin の ChIP 解析が効率よく行えることとなった。

さらに、 β -catenin および TCF4 の ChIP で回収された DNA フラグメントの配列を、ENCODE 領域についてゲノムタイリングアレイによって同定した。TCF4 の ChIP-on-chip で同定された部位には、14 箇所中 13 箇所に TCF4 コンセンサス配列が含まれていた。この結果について χ 二乗検定を行うと、 $p < 10^{-6}$ であった。また β -catenin の ChIP-on-chip では、TCF4 と共通の結合部位では、11 箇所すべてに TCF4 のコンセンサス配列が存在した。この結果について χ 二乗検定を行うと、 $p < 10^{-6}$ であった。また、 β -catenin 単独の結合部位には、TCF4 コンセンサス配列が存在しなかった。この結果より、今回の DSP を用いた ChIP-on-chip 解析を行うことで、 β -catenin および TCF4 の転写複合体の結合部位を網羅的に同定することが可能となった。

プロモーター領域の β -catenin の ChIP-on-chip 解析では、880 領域を同定した。この領域の 56% には TCF4 のコンセンサス配列が存在した。 β -catenin の候補結合領域近傍の遺伝子と、LEF1 導入の DLD1 の遺伝子発現変化を比較すると、362 遺伝子中、123 遺伝子で 2 倍以上の発現増加がみられた。このことより、ChIP-on-chip 実験で明らかとなった β -catenin の結合の一部は、近傍の遺伝子の発現制御に関与している可能性が考えられる。