

氏名(本籍)	京 基 樹 (滋賀県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博乙第2235号		
学位授与年月日	平成18年9月30日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Evaluation of interactions between DNA and transcription factors by surface plasmon resonance imaging technique (表面プラズモン共鳴イメージング法によるDNA-転写因子相互作用の評価)		
主査	筑波大学教授	理学博士	石井哲郎
副査	筑波大学教授	医学博士	久武幸司
副査	筑波大学教授	薬学博士	金保安則
副査	筑波大学講師	博士(理学)	依馬正次

論文の内容の要旨

目的：転写因子と特定のDNA塩基配列との結合特異性を評価する方法として、ゲルシフトアッセイ法(GMSA)が汎用されているが多種類のDNA配列を効率よく解析するには適していない。そこで、本研究では表面プラズモン共鳴(SPR)法を応用して転写因子とDNAの相互作用を網羅的に解析する技術と装置を開発し、塩基性領域ロイシンジッパー(bZip)モチーフを有する転写因子Maf群因子の一つであるMafGとその認識配列MARE(Maf recognition elements)の相互作用を解析する。

対象と方法：表面プラズモン共鳴(SPR)法は、金属薄層がコーティングされた透明基板に偏光束を照射し、表面近傍の屈折率変化・層の厚みの変化をCCDカメラで撮影し反射光強度として測定する方法である。本方法を用いれば、基板上の測定領域に複数の異なるDNAを固定化したアレイを用いて、それらと転写因子との相互作用を表面近傍の屈折率変化・層の厚みの変化として定量的に解析することができる。しかし、従来のSPR装置では測定点が1から4点と少なく、多くの試料を同時に比較し定量的に解析することは困難だった。そこで、SPRイメージング法を用いた96点相互作用解析装置を開発した。金基盤表面にMAREを含むDNAを固定化したチップを作製し、MafGをチップ上に流し、固定化DNAへのMafGの結合を解析した。

結果：ポリエチレングリコール(PEG)を有する架橋剤を用いてDNAを固定化することでMafGとMAREの結合をSPRイメージング法によって観察する手法を確立できた。PEGは分子鎖長が長く分子鎖が柔軟であるために、DNAが基板から離れた場所で可動な状態で固定化されているために、転写因子MafGが結合可能となったと推察する。また、SPRイメージング法によって得た解離平衡定数(K_D)はGMSA法によって得た K_D と絶対値は異なったが相関がみられた。

40種類の一塩基置換したMARE関連配列に対し、MafGホモ2量体とMafG/Nrf2ヘテロ2量体の結合特性の同時解析を試みた。MafGとNrf2の混合比を変えることで、MafG/Nrf2ヘテロ2量体の解析を可能と

し、MafG ホモ 2 量体とのアフィニティの違いを観察することに成功した。また、一塩基の違いが転写因子との親和性を規定していることが明らかとなった。そこで、MafG/Nrf2 ヘテロ 2 量体 MafG ホモ 2 量体を共存させて SPR 解析を行い、結合の選択性・優先性より、40 種の MARE 関連配列を 5 つのグループに分類した。得られたグループ分類の規則性から 6 種類の内在性 MARE 配列のグループ帰属を予想し、SPR 及び GMSA による解析結果が予想と一致することを確認できた。さらに、ルシフェラーゼレポーターアッセイから、MARE への結合親和性が転写活性化能に反映されることも観察できた。

考 察：MARE 関連配列に作用する転写因子群が、実際にどのような配列に対して親和性が高いかという点については、これまで厳密な検討はなされてこなかったが、本研究から高親和性を示す配列が明らかになり、MARE 関連配列の多様性が遺伝子制御の多様性の基盤となっていることが示された。今回確立した解析システムは、シス因子とトランス因子間の定量的な相互作用を解析する一般的な方法として広く活用できることを示した。

結 論：MafG 結合の観察に適した DNA 固定化方法を確立した。MARE コンセンサス配列を一塩基ずつ置換した 40 通りの MARE 類似配列を固定化したアレイを用いて、MafG のホモ 2 量体、MafG と Nrf2 のヘテロ 2 量体が優先的／選択的に結合する配列を解析し、結合の規則性を見出した。さらに、実存する MARE の結合特異性を観察し、規則性が反映していることを確認した。また、結合特異性を GMSA とレポーターアッセイでも確認し、見出した結合法則の妥当性を検証した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、転写因子と特定の DNA 塩基配列との結合特異性を評価する方法として表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を応用してその相互作用を網羅的に解析するすぐれた技術と実用的な装置を開発し、具体的な応用例として転写因子 Maf 群因子の一つである MafG とその認識配列 MARE (Maf recognition elements) の相互作用の結合特異性を丁寧な実験で解析したものであり、本方法の有効性を証明し転写制御の多様性の理解を深めた研究であり、高く評価できる。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。