

アカパンカビにおけるDNA損傷応答に関する転写レベルの プロファイリング

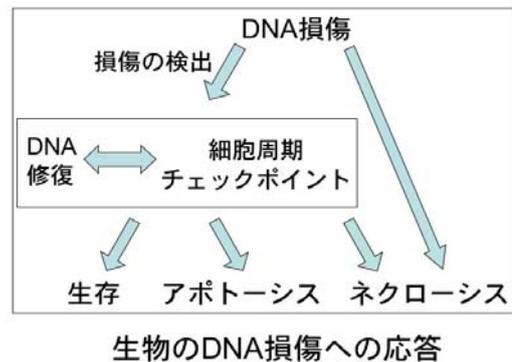
Transcriptional profiling of the DNA damage response in *Neurospora crassa*

プロジェクト代表者：田中 秀逸 (理工学研究科・准教授)

Shuuitsu Tanaka (Graduate School of Science and Engineering)

はじめに

この研究は、マイクロアレイを用いて、紫外線等によるDNA損傷に応答して発現変化するアカパンカビ遺伝子を網羅的に探索することを目的とした。この種の研究がヒトも含めいくつかの生物で行われ始めているが、扱いが容易でしかも遺伝学的バックグラウンドの豊富なアカパンカビで行うことは、その後の解析も考え非常に有効であり、早急に押し進める必要が有ると考えた。これまでのDNA修復系の解析は、紫外線も含めた変異原への感受性が変化した突然変異株を単離・解析することで行われて来た。しかしながら、この方法には実際にDNA修復に関わる遺伝子に対してのみ有効であること、変異株が得られない遺伝子については解析できない点など限界があった。近年、全ゲノムの解明や、マイクロアレイ技術開発により、機能不明及び、DNA修復に間接的に関わる遺伝子も含め、DNA損傷に対する広範囲の細胞の遺伝子の応答を直接検出することが可能となった。おそらくそれらには新たなDNA修復関連遺伝子以外に、細胞周期チェックポイント、細胞死/アポトーシスに関わる遺伝子のほか、細胞機能の根幹に関わるものも含まれるに違いない (右図参照)。



カリフォルニア大 (バークレー) のGlass博士のグループは、アカパンカビ研究の拠点の1つであり、彼女を中心にアカパンカビにおける遺伝子発現機構の解析が精力的に進められてきた。アカパンカビにおけるマイクロアレイ研究法は、ここ数年をかけて、Glassのもとで春日博士により立ち上げが進められた。既にそのマイクロアレイを用いた研究結果も彼らより報告されている (Kasuga et al., Nuc. Acid Res., 2005)。本研究では、その春日博士に共同研究者に加わって頂くことによりアカパンカビにおけるマイクロアレイを用いた最も有効な研究手段となると考えた。この研究により、新たな遺伝子を検出しそれらと当研究室でこれまでに明らかにされた遺伝子との関係を明らかにすることは、ヒトも含めた高等真核生物の遺伝情報の維持について新たな糸口を見つける可能性がある。

研究経過・成果の概要

国際共同研究・データ解析に関して：申請時は、国内で試料を調整し、マイクロアレイに

よる解析は北米カリフォルニア州バークレイ大学のGlass、春日両博士のもとで行う予定であった。しかし、予算の制限から、実験はすべて国内で行えるように組み立てた。共同研究としては、春日博士から、アカパンカビ用のマイクロアレイの供与、メールを介して随時に、及びカビ学会の際に直接に指導を受ける形に変更した。学会においては、春日博士以外にも複数のアカパンカビ用マイクロアレイを用いた研究についてのポスターによる発表やグラス博士によるレビュー的な口頭発表も行われ、有効な情報収集の機会を得ることが出来た。

マイクロアレイのデータ解析は、東洋大学生命科学部の藤村、福森、一石博士らの協力が得られることになり、東洋大学のスキャナーを用いて行うことにした。

研究経過：マイクロアレイを用いた遺伝子発現の解析においては、如何にバックグラウンドの遺伝子発現をそろえるかが鍵となる。春日博士の助言により、サーカディアンリズムを狂わせるために1週間明下で培養したカビから胞子を得ること、培養に伴うpH等の変化が少ない培地を用いること、細胞の分化状態が一定な時期の菌糸からRNAを得られるよう伸長する菌糸の先端から一定の範囲で菌糸を回収することにした。変異原の処理としては紫外線を用いることとし、カビに一定の紫外線（200 J）照射後3、7、18、30時間の菌糸及びそのコントロールとして無処理のカビの菌糸を回収した。

現在、7時間の試料についてのみ、マイクロアレイによる解析を行った。スキャナーで、シグナルの検出を行ったところ、アレイ上のオリゴDNAへ結合していることを示す強い蛍光シグナルを発するスポットも確認できたが、全体的にシグナルを得られるスポットの数が少なかった。

今後の課題：申請した研究期間内に解析まで行えたのは1回に留まってしまった。またその際良好な結果が得られなかった理由としては、マイクロアレイの扱い方に問題があり、結合していたオリゴDNA、またはそれに結合したラベルした合成cDNAが剥がれてしまったことが考えられる。その辺りの条件を再検討しながら、残りの試料、及び新たな試料を調整し今後も解析を進めたいと考えている。良好なデータが得られたならば、DNAの紫外線による損傷に対し発現変化する遺伝子の中から、標的となる遺伝子をしぼり込み、その詳細な解析を行う予定である。