



High-throughput screening of DNA binding sites for transcription factor AmyR from *Aspergillus nidulans* using DNA beads display system

DNAのビーズディスプレイ法を用いた
糸状菌転写因子AmyR結合DNAハイスループットスクリーニング

(JBB, Vol. 109, No. 6, 519 – 525, 2010)

兒島 孝明・橋本 陽子^a・加藤 雅士^b・小林 哲夫・中野 秀雄*

糸状菌は古くから食品、醸造産業に幅広く用いられ、また近年ではバイオマスからのエタノール生産に糸状菌由来のセルラーゼが利用されるなど、常に時代のニーズの最先端に位置する、生物学的にも産業的にも重要な微生物である。この糸状菌が有する生物機能の高度発揮を行う為には、糸状菌中の個々の遺伝子やタンパク質の詳細な機能解析が必要とされる。とりわけ転写因子と呼ばれるDNA結合蛋白質の機能解析は、生体中での遺伝子発現制御システムを解明し生物の環境応答のメカニズムを理解するだけでなく、有用物質生産のパスウェイ強化の為に必要不可欠である。

筆者らが開発したW/Oエマルジョン内一分子PCR(エマルジョンPCR)を用いたビーズディスプレイシステムは、高集積化されたDNAライブラリーをマイクロビーズ上に構築できる画期的な*in vitro*ライブラリー作製法である。以前筆者らはこのシステムがバクテリア由来転写因子結合配列のハイスループット解析に大きな力を発揮することを示した^{1,2)}。本研究ではこの手法を用いた糸状菌由来転写因子結合部位の解析を行った。

AmyRは、アミラーゼ遺伝子群のプロモーター領域に結合する糸状菌*Aspergillus nidulans*由来のZn(II)₂-Cys₆型転写活性化因子であり、プロモーター領域のCGGN₈CGG配列などに結合することが明らかとなっていた³⁾。そこでまずこのAmyR結合配列*agdA*プロモーター配列(*agdA* WT)の2カ所のCGG部分をランダム化したライブラリーを作製し、AmyR結合配列の濃縮を試みた。選択されたクローンの配列解析を行った結果、もとのCGG/CGG配列が最も高い出現頻度で確認され、次いで高頻度に確認されたのはその相補的な配列CCG/CCGであった。これらの結果は、糸状菌転写因子を用いた本スクリーニングシステムの有効性を示すものであった。

次にAmyR結合配列のN₈領域に着目し、*agdA* WTのN₈領域をランダム化したライブラリーを作製し、“AmyRが好むN₈領域”の解析を試みた。スクリーニングによって選択されたDNAの塩基配列を解析したとこ

ろ、59%という高い割合で5番目の塩基にTが存在することが確認され、その他のいくつかの塩基においてもTの有意な偏りが確認された。これらの結果から、これまで任意の配列と思われていたAmyR結合モチーフのN₈領域は“N”ではなかったことが示唆された。そこでSurface plasmon resonance (SPR)解析により、AmyRに対する種々のCGGN₈CGG配列の親和性測定を行った。AmyRと*agdA* WTとのK_dは3.31 nMという高い親和性を示したのに対し、*agdA* WTのN₈部分とまったく異なる塩基を保持するクローンR1'-14はWTの5倍程度のK_d、つまり親和性が低いという結果が得られた。これらの結果から、AmyR結合配列のCGGに挟まれた領域の塩基もAmyR結合に影響を与えていた事が示された。また、その他のいくつかの選択クローンについて同様の解析を行ったところ、R1's-36はAmyRに対しWTに比べて高い親和性を有していた。そこでこの配列をゲノムデータベースに対して詳細に解析したところ、*A. nidulans*内においてAmyRによる転写活性化を受けることが既知の*amyB*⁴⁾の上流領域に同じ配列が存在していたことが確認された。これは、AmyRの機能解析における*in vivo*の結果と*in vitro*である本スクリーニング法を用いて得られた結果との密接な相関を示していた。

本手法は迅速かつ簡便な転写因子結合モチーフを抽出し、ゲノム上に点在する転写因子結合配列の網羅的な解析を可能とする。本手法と次世代DNAシーケンス解析技術を組み合わせることにより、さらなるスループット性の向上が期待できるであろう。筆者らはこの手法を用いて微生物の転写因子ネットワークを解析し、より効率的なバイオプロセスデザインへの応用を目指している。

- 1) Kojima, T. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **33**, e150 (2005).
- 2) Kojima, T. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 440 (2006).
- 3) Tani, S. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1568 (2001).
- 4) Nakamura, T. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2363 (2006).

*著者紹介 名古屋大学大学院生命農学研究科(教授) E-mail: hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp

^a現;株式会社湖池屋, ^b現;名城大学農学部