

(2) 抗体評価のための各種発現系の作製

昨年度作製した KRAB zinc finger protein、PHD finger protein、Jumonji domain containing protein、Nuclear pore complex protein 等に加え、Histone deacetylase や AT rich interactive domain などをも有する遺伝子についても、発現細胞をヒト腎臓上皮細胞由来 HEK293 細胞株で順次作製した。現時点で、昨年度からの総計 75 株を作製した。導入した遺伝子の発現については、1 次元電気泳動ゲルの直接蛍光観察で確認した。さらに、一部はテトラサイクリンによる遺伝子発現誘導前後のサンプルを、マイクロアレイ解析や昨年度確立した 2 次元電気泳動解析系に供し、遺伝子及び蛋白質の変動を網羅的に解析した (ZNF224、ZNF286A、ZNF436)。

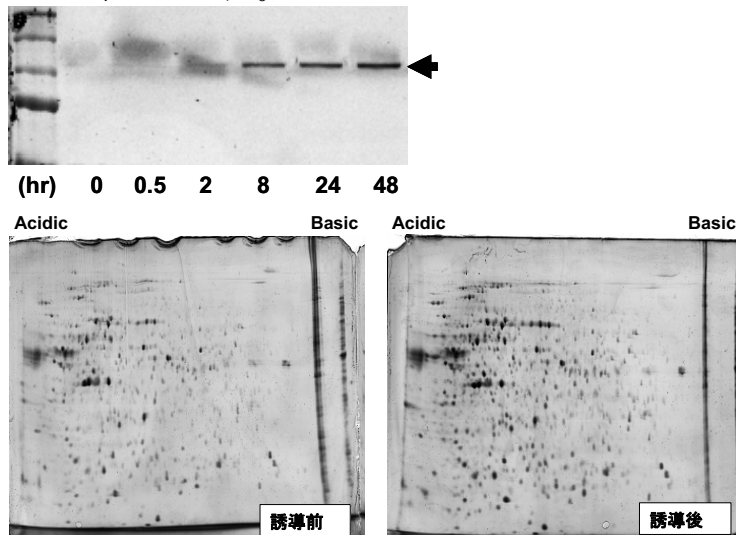


図 1 : ZNF224 のテトラサイクリンによる発現誘導 (上図)

時間経過とともに ZNF224 タンパク質が発現してくる様子が観察された。さらに発現誘導前後のタンパク質サンプルを 2 次元電気泳動で展開しタンパク質レベルでの発現様式を比較した。

(3) 免疫沈降産物の質量分析解析による蛋白質複合体解析

プロジェクト開始後早期に解析システムを確立した。その解析システムにより、作製した抗体を用いた免疫沈降産物を取得し、トリプシン消化後質量分析を行った。その結果、現時点までに、40 複合体構成因子を同定することができ、既に 3 年間での目標値に到達している。また、本解析においては、対象とするサンプルに関して、あらかじめ Western blot によりターゲット蛋白質の発現の高いものを選択し、実験の効率化を図った。

(4) クロマチン免疫沈降法による DNA-蛋白質複合体解析

作製した抗体を用いた免疫沈降によって共沈してきた DNA 断片の配列決定を行うため、まずその解析システムの確立に注力した。1 年目は担当研究員を白髭研究室に派遣して、集中的に短期間で必要な技術取得を行うことができた。その結果、目標とする解析システムをかずさ DNA 研究所内に構築することができた。これにより、平成 19 年度以降、徐々にではあるが、確実に DNA-蛋白質複合体解析が行なわれている。現時点で 8 分子での解析を終了している。

(5) データベースへの反映

初年度は、上記 (1) ~ (4) の研究項目における進捗状況と逐次蓄積されるデータを、ゲノムネットワークプロジェクトのデータベースとしての的確に蓄積、活用及び進捗管理できることを目標として統合データベースを所内に構築した。19 年度からは、かずさ DNA 研究所内での運用に留まらず、ゲノムネットワークプロジェクトのデータベースとリンクさせ、プロジェクトメンバーへの閲覧が可能な状況を構築することを目標として作業を進めた。遺伝研スタッフの強力なサポートにより、現在 GNP メンバーへ向けた公開が行なわれている。