

2. Y2Hスクリーニング(日立、配列解析は理研担当)

本研究では図2に示すように、13種類のヒト由来各種臓器・細胞と1種類のマウス由来の発現ライブラリーを用いた。スクリーニングするライブラリーは縦軸研究機関との研究打合せにより決定したが、特にリクエストがない場合は、ベイトの発現情報を確認した上で、なるべく Breast cancer/ Prostate cancer または Brain に集約するようにした。その理由は、核内受容体関連研究を推進する縦軸研究機関が比較的多かったことから、関連組織である Breast cancer/ Prostate cancer に注目したことと、Brain については遺伝子発現の多様性の最も高い臓器の一つであるからである。一方、Macrophage に関しては、中核機関の理化学研究所の研究テーマに沿って集中的にスクリーニングした。1スクリーニングあたりの平均プレイ数は4.4個、プレイ取得率は44%であった。

ヒト13種類・マウス1種類のライブラリスクリーニング結果

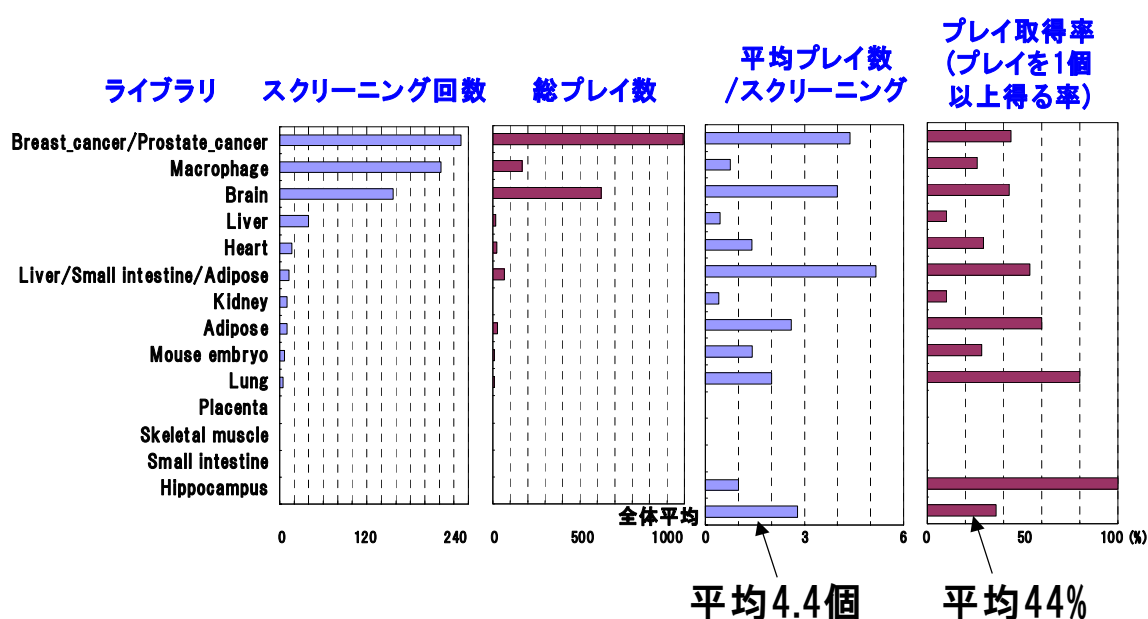


図2 日立Y2H解析により得られた新規転写調節因子ネットワーク

3. β -galアッセイによるY2H相互作用データ信頼性評価(日立)

Y2H データの実験によるバリデーションとして、 β -gal アッセイによる陽性クローンの相互作用の確認と偽陽性テストについて、代表的な結果の写真を図3にまとめた。各相互作用の判定レベルをA, B, C, Dの4段階で表示した。AとBは相互作用が確認され、特異性もあることから、最終陽性と判断している。ここでは、Aの方がBより特異性が高いことを意味する。Cは、相互作用は認められるものの特異性が無いか非常に低いケースとなり、ここでは偽陽性と判断する。Dは、 β -gal アッセイ系では相互作用が検出できなかったことを意味し、陰性と最終判断する。図5に示す通り、本Y2H法では陽性率は80%、偽陽性率は20%であることが分かった。特異性に関わらず相互作用の確認ができたクローンは、94%に達した。

なお、現在、HEK293細胞を用いて、 β -galアッセイとは原理の異なるプルダウンアッセイにおいても、Y2H相互作用データの信頼性を評価している。