A yeast one-hybrid system to detect methylation-dependent DNA-protein interactions

メタデータ	言語: English
	出版者:
	公開日: 2017-10-05
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: Feng, Shu-Ying
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/15856

学位授与番号	甲第1632号
学位授与年月日	平成16年3月25日
氏　　名	馮　　疏　影
学位論文題目	A yeast one-hybrid system to detect methylation-dependent DNA-protein interactions （メチル化依存的DNA－タンパク質間相互作用が検出可能な酵母ワンハイブリットシステムの開発）
論文審査委員	主　査　教　授　村　上　清　史 副　査　教　授　山　本　　博 　　教　授　馬　渕　　宏

内容の要旨及び審査の結果の要旨

DNA のメチル化は、遺伝子の転写抑制やヘテロクロマチン形成を介して、ゲノムの機能を幅広く調節しており、エピジェネティクスの一環として、注目を集めている。しかし、メチル化動態の詳細な分子機構に関しては依然として不明な点が残されており、新しい系を用いた検証・解明が待たれる所である。本研究では、様々な分子遺伝学的手法が駆使出来る出芽酵母を DNA メチル化研究の「生きた試験管」として応用することを試みた。まず、本来は DNA メチル化機構を持たない出芽酵母において、標的配列をゲノムに LexA オペレーター配列と隣接する形で導入し、更に CpG DNA メチル化酵素である M.SssI と LexA タンパク質のキメラ蛋白質を発現させた。これにより、LexA とオペレーター配列との特異的な結合が DNA メチル化酵素を標的配列の近傍にリクルートし、部位特異的 DNA メチル化が達成されることが期待された。実際に改変酵母ゲノム DNA のメチル化パターンを定量的 HpaII-PCR 法 や重亜硫酸修飾シークエンス法により確認したところ、CpG アイランド部位のメチル化が認められた。また、メチル化 DNA のマイクロアレイ分析の結果、DNA メチル化酵素は選択的に標的部位周囲の領域をメチル化することが判明した。次の段階として、この方法を酵母ワンハイブリッドシステムに応用することを検討した。結果として、MBD1 融合蛋白質の存在と DNA のメチル化に依存したレポーター活性の増強を認め、MBD1 のメチル化依存的結合を *in vivo* で確認することができた。また、MBD1 とは別の遺伝子ファミリーに属するメチル化結合蛋白質・Kaiso に対しても同様のアッセイを行ったところ、メチル化依存的結合が再現された。

以上より、出芽酵母においてゲノム中の特定部位を選択的にメチル化する方法の有効性を実証し、メチル化依存的 DNA-タンパク質間相互作用が検出可能な酵母ワンハイブリッドシステムを開発した。

本研究は部位特異的 *in vivo* DNA メチル化する方法を確立し、さらに、メチル化依存的 DNA-タンパク質間相互作用を検出する酵母ワンハイブリッドシステムを実験的に立証したものである。本法はメチル化 DNA 認識蛋白質及びその制御因子の同定と解析や、種々の転写因子に対する DNA メチル化の影響の検討および脱メチル化酵素の同定など様々なエピジェネティクな研究に寄与するものと評価された。