

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 508066

(P2003 - 508066A)

(43)公表日 平成15年3月4日(2003.3.4)

| (51) Int. Cl ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マコード* (参考) |
|---------------------------|------|---------------|--------------|
| C 1 2 Q 1/68 | | C 1 2 Q 1/68 | A 2 G 0 4 5 |
| G 0 1 N 33/50 | | G 0 1 N 33/50 | P 4 B 0 2 4 |
| 33/53 | | 33/53 | M 4 B 0 6 3 |
| 33/566 | | 33/566 | |
| // C 1 2 N 15/09 | | C 1 2 N 15/00 | A |

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 43数)

(21)出願番号 特願2001 - 520923(P2001 - 520923)

(86)(22)出願日 平成12年9月1日(2000.9.1)

(85)翻訳文提出日 平成14年3月1日(2002.3.1)

(86)国際出願番号 PCT/US00/24358

(87)国際公開番号 W001/016378

(87)国際公開日 平成13年3月8日(2001.3.8)

(31)優先権主張番号 60/151,972

(32)優先日 平成11年9月1日(1999.9.1)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , C A , J P

(71)出願人 ホワイトヘッド インステチュート フォ
アー バイオメディカル リサーチ
アメリカ合衆国 02142 マサチューセツ
州,ケンブリッジ,ナイン ケンブリッジ
センター (番地なし)

(72)発明者 ウィリック, ジョン
アメリカ合衆国 マサチューセツ 0214
2 ケンブリッジ,アパートメント 10ディ
ー,ワズワース ストリート 60

(74)代理人 弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 タンパク質 - DNA相互作用の染色体全体の解析

(57)【要約】

本発明は目的タンパク質が結合する細胞のゲノム内の (1 つまたはそれ以上の) 領域を同定する方法に関する。本明細書に記載する方法では細胞のDNA結合タンパク質は細胞のゲノムDNAに結合 (例えば共有結合により架橋) する。DNA結合タンパク質が結合したゲノムDNAを取り出し、同定されたゲノムDNAと細胞のゲノムDNAに相補的な配列との間でハイブリダイゼーションが起こる条件下で、該ゲノムDNAに相補的な配列を含んでなるDNAと合わせるかまたは接触させる。ハイブリダイゼーションの (1 つまたは複数の) 領域は該タンパク質が結合する細胞のゲノム内の (1 つまたは複数の) 領域である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 a) 細胞内のDNA結合タンパク質を該細胞のゲノムDNAに架橋し、それにより、ゲノムDNAに架橋したDNA結合タンパク質を作製する工程、

b) a)のDNA結合タンパク質に架橋したゲノムDNAのDNAフラグメントを作製し、それにより、DNA結合タンパク質が結合したDNAフラグメントを含有する混合物を作製する工程、

c) 目的タンパク質が結合したDNAフラグメントを、b)で作製した混合物から取り出す工程、

d) c)で同定したDNAフラグメントを目的タンパク質から分離する工程、

e) d)のDNAフラグメントを増幅する工程、

f) e)のDNAフラグメントを、該細胞のゲノムDNAに相補的な配列を含有するDNAと、該DNAフラグメントと該ゲノムDNAに相補的な配列の領域との間でハイブリダイゼーションが起こる条件下で合わせる工程、ならびに

g) 該DNAフラグメントがハイブリダイズする、f)のゲノムDNAに相補的な配列の領域を同定する工程

を含み、ここで、g)で同定された領域が、目的タンパク質が結合する細胞のゲノム内の領域である、目的タンパク質が結合する細胞のゲノム内の領域を同定する方法。

【請求項2】 該細胞が真核細胞である請求項1記載の方法。

【請求項3】 目的タンパク質が、転写因子および癌遺伝子からなる群より選ばれる請求項1記載の方法。

【請求項4】 該細胞のDNA結合タンパク質をホルムアルデヒドを用いて該細胞のゲノムに架橋する請求項1記載の方法。

【請求項5】 目的タンパク質が結合したc)のDNAフラグメントを、目的タンパク質に結合する抗体を用いて同定する請求項1記載の方法。

【請求項6】 e)のDNAフラグメントをライゲーション媒介ポリメラーゼ連鎖反応を用いて増幅する請求項1記載の方法。

【請求項7】 f)のゲノムの相補的な配列がDNAマイクロアレイである

請求項1記載の方法。

【請求項8】 h) g) で同定した領域を対照と比較する工程をさらに含む請求項1記載の方法。

【請求項9】 a) 細胞内のDNA結合タンパク質を該細胞のゲノムDNAにホルムアルデヒド架橋し、それにより、ゲノムDNAに架橋したDNA結合タンパク質を作製する工程、

b) a) のDNA結合タンパク質に架橋したゲノムDNAのDNAフラグメントを作製し、それにより、DNA結合タンパク質が結合したDNAフラグメントを作製する工程、

c) b) で作製した、目的タンパク質が結合したDNAフラグメントを、目的タンパク質に特異的に結合する抗体を用いて免疫沈降させる工程、

d) c) で同定したDNAフラグメントを目的タンパク質から分離する工程、

e) d) のDNAフラグメントを、ライゲーション媒介ポリメラーゼ連鎖反応を用いて増幅する工程、

f) e) のDNAフラグメントを蛍光標識する工程、

g) e) の標識DNAフラグメントを、該細胞のゲノムDNAに相補的な配列を含有するDNAマイクロアレイと、該DNAフラグメントと該ゲノムDNAに相補的な配列の領域との間でハイブリダイゼーションが起こる条件下で合わせる工程、

h) 該DNAフラグメントがハイブリダイズするゲノムDNAに相補的な配列の領域を、蛍光強度を測定することにより同定する工程、ならびに

i) h) で測定した蛍光強度を対照の蛍光強度と比較する工程

を含み、ここで、該ゲノムの領域における蛍光強度が該領域の対照の蛍光強度より高いことが、目的タンパク質が結合する細胞のゲノム内の領域を示す、目的タンパク質が結合する細胞のゲノム内の領域を同定する方法。

【請求項10】 a) 細胞内のDNA結合タンパク質を該細胞のゲノムDNAに架橋し、それにより、ゲノムDNAに架橋したDNA結合タンパク質を作製する工程、

b) a) のDNA結合タンパク質に架橋したゲノムDNAのDNAフラグメン

トを作製し、それにより、DNA結合タンパク質が結合したDNAフラグメントを含有する混合物を作製する工程、

c) 目的タンパク質が結合したDNAフラグメントを、b)で作製した混合物から取り出す工程、

d) c)で同定したDNAフラグメントを目的タンパク質から分離する工程、

e) d)のDNAフラグメントを増幅する工程、

f) e)のDNAフラグメントを、該細胞のゲノムDNAに相補的な配列を含有するDNAと、該DNAフラグメントと該ゲノムDNAに相補的な配列の領域との間でハイブリダイゼーションが起こる条件下で合わせる工程、

g) 該DNAフラグメントがハイブリダイズする、f)のゲノムDNAに相補的な配列の領域を同定する工程、ならびに

h) g)で同定した領域の特性付けを行なう工程

を含み、ここで、h)の領域の特性が、該細胞のゲノムに結合する目的タンパク質の機能を示す、細胞のゲノムに結合する目的タンパク質の機能の決定方法。

【請求項11】 a) 細胞内のDNA結合タンパク質を該細胞のゲノムDNAに架橋し、それにより、ゲノムDNAに架橋したDNA結合タンパク質を作製する工程、

b) a)のDNA結合タンパク質に架橋したゲノムDNAのDNAフラグメントを作製し、それにより、DNA結合タンパク質が結合したDNAフラグメントを含有する混合物を作製する工程、

c) 目的タンパク質が結合したDNAフラグメントを、b)で作製した混合物から取り出す工程、

d) c)で同定したDNAフラグメントを目的タンパク質から分離する工程、

e) d)のDNAフラグメントを増幅する工程、

f) e)のDNAフラグメントを、該細胞のゲノムDNAに相補的な配列を含有するDNAと、該DNAフラグメントと該ゲノムDNAに相補的な配列の領域との間でハイブリダイゼーションが起こる条件下で合わせる工程、ならびに

g) 該DNAフラグメントがハイブリダイズする、f)のゲノムDNAに相補的な配列の領域を同定する工程

を含み、ここで、g)のゲノムDNAに相補的な配列の領域が調節領域であれば、目的タンパク質が転写因子である、細胞のゲノムに結合する目的タンパク質が転写因子として機能するか否かを決定する方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の背景**

多くのタンパク質はゲノムの特定の部位に結合する能力によりゲノム発現、染色体複製および細胞増殖機能の調節に関与する。例えば転写アクチベーターは特定のプロモーター配列に結合し、クロマチン修飾複合体および転写器官(apparatus)を動員(recruit)し、RNA合成を開始する。細胞が細胞サイクルを回る場合、または細胞が環境の変化を感じる時に、転写アクチベーターのDNA結合状態の変化により遺伝子発現のリモデリングがいくらか生じる。別のDNA結合タンパク質はまたセントロメア、テロメアおよびDNA複製起点にも結合し、染色体複製および維持を調節する。遺伝子発現およびDNA複製の多くの基本的な態様のかなりの知識がDNA結合タンパク質の研究から得られているが、これらのタンパク質およびその機能の理解はゲノムの結合部位に対する知識により限定されている。

【0002】

DNAの特定の領域に結合するタンパク質を公知の方法を用いて検出できる。しかしながら、生物の全ゲノムのわたるDNAに対するタンパク質結合を研究できる方法が必要とされている。

【0003】**発明の開示**

本発明は目的タンパク質が結合する細胞のゲノムの(1つまたはそれ以上の)領域を同定する方法に関する。本明細書に記載する方法では細胞のDNA結合タンパク質は細胞のゲノムDNAに結合(例えば共有結合により架橋)する。同定されたゲノムDNAとゲノムDNAに相補的な配列との間でハイブリダイゼーションが起こる条件下で、DNA結合タンパク質が結合するゲノムDNAが同定され、細胞のゲノムDNA(例えば細胞のゲノムDNAの全てまたは一部、例えば1つまたはそれ以上の染色体または染色体領域)に相補的な配列を含んでなるDNAと合わせるかまたは接触させる。ハイブリダイゼーションの(1つまたは複数の)領域は目的タンパク質が結合する細胞のゲノムの(1つまたは複数の)領

域である。本発明の方法は好ましくは生存細胞を用いて実施される。

【0004】

1つの態様では、細胞でDNAに結合するタンパク質を該細胞のDNAに架橋する。タンパク質が結合したDNAおよびタンパク質が結合していないDNAを含む、得られた混合物を剪断条件に供する。結果的にDNA結合タンパク質に架橋したゲノムのDNAフラグメントを生じ、目的タンパク質が結合した(1つまたはそれ以上の)DNAフラグメントが混合物から取り出される。次いで公知の方法を用いて、得られたDNAフラグメントを目的タンパク質から分離し、増幅する。DNAフラグメントとゲノムDNAに相補的な配列の領域との間でハイブリダイゼーションが起こる条件下で、DNAフラグメントを細胞のゲノムDNAに相補的な配列を含んでなるDNAと合わせ; DNAフラグメントがハイブリダイズするゲノムDNAに相補的な配列の領域を同定する。同定された(1つまたはそれ以上の)領域は細胞のゲノムの領域、例えば目的タンパク質が結合する1つまたは複数の選別された染色体である。

【0005】

特定の態様では、本発明は目的タンパク質が結合する細胞のゲノムの領域(例えば染色体の領域)を同定する方法に関し、該方法ではホルムアルデヒドを用いて細胞のDNA結合タンパク質を細胞のゲノムDNAに架橋する。架橋したゲノムのDNAフラグメントを生じ、例えば目的タンパク質に特異的に結合する抗体を用いる免疫沈降により、目的タンパク質が結合するDNAフラグメントを混合物から除去または分離する。結果的にDNA-タンパク質複合体が分離される。例えば複合体を、架橋を逆戻りさせる条件に供することにより、複合体のDNAフラグメントを目的タンパク質から分離する。分離したDNAフラグメントをライゲーション媒介ポリメラーゼ連鎖反応(ligation-mediated polymerase chain reaction)(LM-PCR)を用いて増幅し、次いで蛍光標識する。DNAフラグメントとゲノムDNAに相補的な配列の領域との間でハイブリダイゼーションが起こる条件下で、標識されたDNAフラグメントを細胞のゲノムDNAに相補的な配列を含んでなるDNAマイクロアレイと接触させる。DNAフラグメントがハイブリダイズするゲノムDNAに相補的な配列の領域が蛍光強度を測定す

ることにより同定され、DNAフラグメントがハイブリダイズするゲノムDNAに相補的な配列の領域の蛍光強度を対照の蛍光強度と比較する。ゲノムDNAに相補的な配列の該領域の対照の蛍光強度よりも大きい、ゲノムDNAに相補的な配列の領域の蛍光強度は目的タンパク質が結合する細胞のゲノムの領域を示す。

【0006】

細胞のゲノムDNAに結合する目的タンパク質の機能を決定する方法もまた本発明に包含される。この方法では、細胞のDNA結合タンパク質を細胞のゲノムDNAに架橋する。次いでDNA結合タンパク質に架橋するゲノムのDNAフラグメントを前記するように作製し、目的タンパク質が結合する(1つまたはそれ以上の)DNAフラグメントを混合物から除去する。得られたDNAフラグメントを次いで目的タンパク質から分離し、増幅する。DNAフラグメントとゲノムDNAに相補的な配列の領域との間でハイブリダイゼーションが起こる条件下で、DNAフラグメントを細胞のゲノムDNAに相補的な配列を含んでなるDNAと合わせ、DNAフラグメントがハイブリダイズするゲノムDNAに相補的な配列の領域を同定する。この同定された領域は目的タンパク質が結合する細胞のゲノムの領域である。同定された領域を特性付けし、同定された領域の特徴は目的タンパク質の機能を示す(例えば、転写因子、オンコプロテインのような調節タンパク質)。

【0007】

本発明はまた細胞のゲノムDNAに結合する目的タンパク質が転写因子として機能するかどうかを決定する方法に関する。1つの態様では、細胞のDNA結合タンパク質を細胞のゲノムDNAに架橋する。架橋したゲノムのDNAフラグメントを作製し、目的タンパク質が結合するDNAフラグメントを混合物から除去する。得られたDNAフラグメントを目的タンパク質から分離し、増幅する。DNAフラグメントとゲノムDNAに相補的な配列の領域との間でハイブリダイゼーションが起こる条件下で、DNAフラグメントを細胞のゲノムDNAに相補的な配列を含んでなるDNAと合わせる。DNAフラグメントがハイブリダイズするゲノムDNAに相補的な配列の領域が同定される;ここでゲノムの領域は調節領域であり、そして目的タンパク質は転写因子である。

【0008】

本明細書に記載する方法はゲノム全体にわたる遺伝子発現の細胞調節ネットワークの解明を促し、遺伝子機能の同定を助ける。

【0009】

本特許のファイルは少なくとも1枚のカラーで製作された図面を含む。カラーの(複数の)図面を有する本特許のコピーは、要請し、必要な手数料を支払うと米国特許庁(Patent and Trademark Office)により提供される。

【0010】

発明の詳細な説明

インビボでこれらのタンパク質が機能する染色体位置を同定することにより、どのようにDNA結合タンパク質が遺伝子発現、染色体複製および細胞増殖全体を制御するかを理解することが容易になる。本明細書にてDNA結合タンパク質に関するゲノム全体位置プロファイリング法(genome-wide location profiling method)について記載し、これを用いて遺伝子特異的転写因子および酵母細胞における一般的な転写器官の成分の結合動態をモニター観察した。ゲノム全体位置分析法(genome-wide location method)は転写アクチベーターGal4およびSte12の作用の公知の部位を正確に同定し、これらのアクチベーターの予期しない機能を明らかにした。発現および位置プロファイルの合わせにより、細胞が細胞外環境の変化に応答する場合に発現が特異的アクチベーターおよび転写器官の成分の直接の制御下にある遺伝子の全体の組が同定された。ゲノム全体位置分析により、さらに遺伝子調節ネットワークを解明する強力な手段が提供され、遺伝子機能が注釈され、ゲノムがどのように複製されるか探求される。

【0011】

従って、本発明は生物のゲノムのDNA(例えばゲノム全体またはその一部、例えば1つまたはそれ以上の染色体または染色体領域)に対するタンパク質の結合を検討方法を提供する。とりわけ、本発明は目的タンパク質が結合する細胞のゲノムDNAの(1つまたはそれ以上の)領域を同定する方法に関する。1つの態様では、細胞内でDNAに結合するタンパク質は細胞のDNAとに架橋する。

タンパク質が結合したDNAおよびタンパク質が結合していないDNAを含有する、得られた混合物を剪断条件に供する。結果的に、DNA結合タンパク質に架橋したゲノムのDNAフラグメントを作製し、目的タンパク質が結合する（1つまたはそれ以上の）DNAフラグメントを混合物から除去する。次いで得られたDNAフラグメントを目的タンパク質から分離し、公知の方法を用いて増幅する。次いでDNAフラグメントとゲノムDNAに相補的な配列との間でハイブリダイゼーションが起こる条件下で、DNAフラグメントを細胞のゲノムDNAに相補的な配列を含んでなるDNAと合わせ；そしてDNAフラグメントがハイブリダイズするゲノムDNAに相補的な配列の領域を同定する。同定された領域は目的タンパク質が結合する細胞のゲノムの領域である。

【0012】

細胞のゲノムDNAに結合する目的タンパク質の機能を決定する方法もまた本発明に包含される。この方法では、細胞のDNA結合タンパク質を細胞のゲノムDNAに架橋する。次いでDNA結合タンパク質に架橋したゲノムのDNAフラグメントを上述したように作製し、目的タンパク質が結合した（1つまたはそれ以上の）DNAフラグメントを除去する。次いで得られたDNAフラグメントを目的タンパク質から分離し、増幅する。次いでDNAフラグメントとゲノムDNAに相補的な配列の領域との間でハイブリダイゼーションが起こる条件下で、DNAフラグメントを細胞のゲノムDNAに相補的な配列を含んでなるDNAと合わせ；そしてDNAフラグメントがハイブリダイズするゲノムDNAに相補的な配列の領域が同定され、目的タンパク質が結合する細胞のゲノムの領域が同定される。同定された領域を特性付けし（例えば調節領域）、同定された領域の特徴が目的タンパク質の機能を示す（例えば転写因子、オンコプロテイン）。

【0013】

本発明はまた細胞のゲノムDNAに結合する目的タンパク質が転写因子として機能するかどうかを決定する方法にも関する。1つの態様では、細胞のDNA結合タンパク質を細胞のゲノムDNAに架橋し、架橋されたゲノムのDNAフラグメントを作製する。目的タンパク質が結合するDNAフラグメントを除去する。得られたDNAフラグメントを目的タンパク質から分離し、増幅する。DNAフ

ラグメントとゲノムDNAに相補的な配列との間でハイブリダイゼーションが起こる条件下で、DNAフラグメントを細胞のゲノムDNAに相補的な配列を含んでなるDNAと合わせる。DNAフラグメントがハイブリダイズするゲノムDNAに相補的な配列の領域が同定され、ここでゲノムの領域が調節領域である場合、目的タンパク質は転写因子である。

【0014】

本発明の方法を用いて真核生物のゲノム全体にわたるタンパク質のDNA結合を試験(examine) および/または同定することができる。例えば、酵母、ショウジョウバエおよびヒトのような真核生物のゲノム全体にわたるDNA結合タンパク質を分析できる。あるいは、これを用いて目的の染色体全体または染色体の組に対するタンパク質のDNA結合を試験および/または同定することができる。

【0015】

DNAに結合する種々のタンパク質を分析できる。例えば、DNA複製に関するいずれかのタンパク質、例えば転写因子、またはオンコプロテインを本発明の方法で試験できる。

【0016】

細胞のDNA結合タンパク質を細胞のゲノムに結合するのに用いることができる種々の方法がある。例えば、UV光を用いることができる。特定の態様では、ホルムアルデヒドを用いてDNA結合タンパク質を細胞のゲノムDNAに架橋する。

【0017】

本発明の方法では、種々の方法を用いて、目的タンパク質に結合したDNAフラグメントの同定が、目的タンパク質に結合した(複数の)DNAフラグメントおよび目的タンパク質に結合していないDNAフラグメントを含んでなる混合物から除去できる。例えば、抗体(例えばポリクローナル、モノクローナル)または目的タンパク質に(特異的に)結合するその抗原結合フラグメントを使用する免疫沈降を用いることができる。加えて、例えば抗体エピトープ(例えば赤血球凝集素(HA))を用いて目的タンパク質を標識またはタグ化できる。

【0018】

本明細書に記載した方法におけるDNAフラグメントを例えばライゲーション媒介ポリメラーゼ連鎖反応(例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M.ら編(1991)、その教示は出展明示により本明細書の一部とする)を用いて増幅することができる。

【0019】

種々の方法を用いて、細胞のゲノムの相補的な配列を含んでなるDNAを、目的タンパク質が結合する単離されたDNAフラグメントと合わせることができる。例えば、相補的な配列をガラススライド上(例えばCorning Microarray Technology(CMT(商標))GAPS(商標))またはマイクロチップ上で固定できる。本発明の方法で用いるハイブリダイゼーションの条件には、例えば高ストリンジェント条件および/または穏やかな(moderate)ストリンジェント条件などがある。例えばCurrent Protocols in Molecular Biologyの2.10.1-2.10.16(とりわけ2.10.8-11)頁および6.3.1-6頁を参照。プローブの長さ、塩基組成、ハイブリダイズする配列間の誤対合パーセント、温度およびイオン強度のような因子がハイブリダイゼーションの安定性に影響する。従って、高度なまたは穏やかなストリンジェント条件を経験的に決定でき、いくらかは公知の核酸(DNA、RNA)および、それに対するハイブリダイゼーションが評価されるその他の核酸の特性に依存する。

【0020】

本発明の方法はさらに結果を対照と比較することを含んでよい。例えば、1つの態様では、DNA結合タンパク質ではない対照タンパク質を用いて本発明の方法を実施できる。1つの態様ではHAまたはMYCエピトープタグに対する抗体を用いて免疫沈降を実施する。タグを含有する目的タンパク質およびタグを有さない目的タンパク質を免疫沈降した結果を比較する。タグ化していないタンパク質は免疫沈降されないはずであり、従って陰性対照として機能する。

【0021】

実施例で記載するように、本発明の特定の態様はクロマチン免疫沈降(ChI

P) およびゲノム全体の発現のモニター観察マイクロアレイの合わせの使用を含んでなる。クロマチン免疫沈降によりDNAの特定の領域に結合するタンパク質を検出するのが可能になる。これには4つの工程がある：(1) 生存細胞においてタンパク質をDNAにホルムアルデヒド架橋すること、(2) 細胞を破碎し、次いで超音波処理して架橋DNAの小フラグメントを生じること、(3) 目的タンパク質に特異的に結合する抗体を用いてタンパク質-DNA架橋体を免疫沈降すること、および(4) 架橋を逆戻りさせ、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて目的のDNA領域を増幅することである。非免疫沈降対照と比較してPCR産物を分析することにより、目的タンパク質が試験されるDNA領域に結合するかどうかを決定する。しかしながら、DNAの各領域は個々にPCRにより試験されなければならない。従って、ChIP技術は試験対象に選択されたDNA領域の小数の組に限定される。

【0022】

対照的に、本発明の方法は特定のプライマーでPCRを実施することにより個々のDNA領域を増幅するという限定はない。むしろライゲーション媒介PCR(LMPCR)ストラテジーを用いて全ゲノムが増幅される。LM-PCR反応に蛍光的にタグ化されたヌクレオチドを含めることにより、増幅されたDNAを蛍光的に標識した。最終的に、標識DNAをゲノムの全てまたはサブセット(例えば1つまたは複数の染色体)を表すスポットを含有するDNAマイクロアレイにハイブリダイズさせた。非免疫沈降対照に対するマイクロアレイ上の各スポットの蛍光強度はDNA領域に結合した目的タンパク質がその特定のスポットに位置するかどうかを示した。従って、本明細書に記載する方法によりゲノム全体にわたるタンパク質-DNA相互作用の検出が可能になる。

【0023】

とりわけ、大部分の酵母染色体IIIおよび発現が十分研究されているおよそ15個のモデル遺伝子からなるDNAマイクロアレイを構築した。これらのアレイをChIP技術と合わせて使用して、転写因子のDNA結合特性およびゲノム全体の転写器官を研究した。本明細書に記載する方法により真核細胞における遺伝子発現のメカニズムおよび調節が洞察される。

【0024】

本明細書に記載するゲノム全体位置分析法により酵母ゲノム全体にわたりタンパク質 - DNA相互作用をモニター観察することが可能になり、これを図1に図解する。該方法は1つまたは少数の特異的DNA部位でインビボタンパク質 - DNA相互作用を研究するために以前に使用した修正クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法をDNAマイクロアレイ分析とを併用する。簡単には、細胞をホルムアルデヒドで固定し、超音波処理により回収し、目的タンパク質に架橋したDNAフラグメントを特異的抗体を用いる免疫沈降により富化する。架橋を逆戻りさせた後、富化されたDNAを増幅し、ライゲーション媒介PCR (LM-PCR) を用いて蛍光色素で標識する。免疫沈降により富化されたDNAのサンプルを異なる蛍光体の存在下LM-PCRに供し、標識DNAのIP富化および非富化の双方のプールを全酵母遺伝子間配列を含有する単一のDNAマイクロアレイにハイブリダイズさせる。3つの別個の実験から得られた蛍光強度のIP富化/非富化比率を、加重平均分析法を用い、アレイ上に提示された各配列に対する目的タンパク質の相対結合を算出できる (図2参照)。

【0025】

全体位置のプロファイリング法の4つの特徴は一貫して高品質な結果のために重要であることが見出された。第1に、一貫したスポット品質を有するDNAマイクロアレイおよび均一なシグナルバックグラウンドは明白な役割を果たす。本明細書に記載する技術により作成した画像の例を図5Aに示す。第2に、本明細書に記載するLM-PCR法を開発して、極少量のDNAの再現性のある増幅が可能になった; 1ngのゲノムDNAの個別のサンプルをLM-PCR法で増幅した場合、遺伝子の99.9%以上に対するシグナルは、誤差範囲内で本質的に同一であった (図5B)。第3に、各実験を3連で実施し、再現性のある結合データの評価が可能になった。そして第4に、Hughesら(2000)により記載された単一アレイエラーモデルを、低強度スポットと関係するノイズを扱い、適当な重量を有する反復実験を平均化するように適用した。

【0026】

少量のDNAの定量的増幅により低強度スポットに関するいくつかの不確実性

を生じる。その不確実性を追跡し、適当な関連する重量で反復実験を平均化できるように、最初にH u g h sら(2000)に記載された、単一アレイエラーモデルに適用した。このエラーモデルに従って、スポットでの測定比率の有意性が統計値Xにより定義され、これは式：

$$X = (a_2 - a_1) / [\sigma_1^2 + \sigma_2^2 + f^2 (a_1^2 + a_2^2)]^{1/2} \quad (1)$$

ここで $a_{1,2}$ は各スポットに関して2つのチャンネルで測定した強度であり、 σ_1, σ_2 はバックグラウンドを減じるために不定であり、 f は例えばハイブリダイゼーションの非一貫性、色素取り込み効率の変動、スキャナー利得変動等の分別乗法エラー(fractional multiplicative error)である；

の形態をとる。Xはほぼ正規である。パラメーター σ および f をXが単位分散を有するように選択した。次いで大きさ $|x|$ の変化の有意性を：

$$p = 2 \times (1 - \text{E r f } |X|) \quad (2)$$

として算出する。

【0027】

本発明をとりわけその好ましい態様を参考に示し記載したが、添付の請求の範囲に包含される本発明の範囲から逸脱することなく、本発明において形態および詳細の種々の変更を為すことができることは当業者に理解されよう。

【0028】

実施例

実施例1

酵母染色体IIIおよびタンパク質-DNA相互作用を特性付けするために選択される遺伝子モデルアレイの設計

アレイは染色体IIIの全ての非重複オープン・リーディング・フレーム(ORF)を含む(表を参照)。配列が2つの可能なリーディング・フレームの一部または全てを含む場合、ORFとしてより大きな配列を選択した。残りの配列はいずれも遺伝子間フラグメントに含まれた。

【0029】

100塩基対よりも大きな全ての遺伝子間領域を平均500塩基対のフラグメントにより提示する。領域が700塩基対よりも大きい場合、300ないし60

0塩基対の複数のフラグメントに分ける。各領域のPCRプライマーをスタンフォード大学(Stanford University)のサッカロミセス・ゲノミック・データベース(SGD)「設計プライマー」プログラムを用いて選択した。染色体IIIに関する遺伝子間フラグメントの全数は241に等しい。

【0030】

オープン・リーディング・フレームの位置および大きさをサッカロミセス・ゲノミック・データベース(SGD)機能的染色体マップから決定した。

【0031】

さらなる17個のモデル遺伝子(表を参照)を転写に関する文献における引用の頻度の高さに基づいて選別した。各遺伝子をコーディング領域の1ないし2キロ塩基対上流および500塩基対下流も同様に増幅した。

【0032】

ChIP - マイクロアレイプロトコル

非修飾酵母ORF DNAのPCR生成

100 μ lでの反応で通常約5ないし6 μ gのDNAを生成する。

RXNミックス:

10 \times PCRバッファー 10.0 μ l(Perkin Elmer, AmpliTaq)

25mM MgCl₂ 8.0 μ l(Perkin Elmer, AmpliTaq)

10 \times dNTP 10.0 μ l(各々2mM、Pharmacia 100mMストック)

ORF DNA 1.0ないし2.0 μ l(Research Genetics, およそ10ng)

各汎用プライマー 2.5 μ l(Research Genetics, 20 μ M 溶液)

希釈Pfu DNAポリメラーゼ 1.6 μ l(水で1:100に希釈、Stratagene, 0.02U)

AmpliTaq DNAポリメラーゼ 1.0 μ l(5単位、Perkin

Elmer)

ddH₂O 63.4 μl

【0033】

酵母遺伝子間領域のPCR生成

100 μlの反応物で通常およそ5ないし6 μgのDNAを生成する。

RXNミックス:

10×PCRバッファー 10.0 μl (Perkin Elmer, Ampli Taq)

25mM MgCl₂ 8.0 μl (Perkin Elmer, Ampli Taq)

10×dNTP 10.0 μl (各々2mM、Pharmacia 100mM ストック)

酵母ゲノムDNA 1.0 μl (Research Genetics, およそ 100ng)

各プライマー 5.0 μl (Research Genetics, 20 μM 溶液)

希釈Pfu DNAポリメラーゼ 1.6 μl (水で1:100に希釈、Stratagene, 0.02U)

Ampli Taq DNAポリメラーゼ 1.0 μl (5U、Perkin Elmer)

ddH₂O 58.4 μl

【0034】

ORFおよび遺伝子間DNAのためのサイクル

95 3分

30サイクルの、

94 30秒

60 30秒

72 2分

【0035】

PCRクリーンアップ

以下を例外として製造者プロトコルに従ってQiagen QIAquick 96 PCR精製キットにより反応物を清浄した。DNAをT.E.8.0 (10 mm Tris、1 mm EDTA、pH 8.0) 120 μ lで溶出した。T.E.8.0をQiagen膜に負荷し、溶出前に5分間置いた。DNAをCorningポリプロピレン96ウェルプレートに収集した。

【0036】

アガロースゲル上で精製DNA 1 μ lを可視化して反応物を定量し、Hind III (Promega)で切断した既知量のラムダDNAと比較した。

【0037】

DNAをプリンティングの直前まで-20で保存した。次いでCorningマイクロタイタープレート急速減圧(speed vac)によりDNAを5 μ l未満まで乾燥した。

【0038】

プリンティング

PCR反応物を3 \times SSC中およそ0.5 mg/mlに懸濁した。SSCを20倍ストック(3 M NaCl, 0.3 M クエン酸Na₃ · 2H₂O、HClでpHを7.0に)として作製し、H₂Oで望ましい濃度に希釈した。

【0039】

10ないし15 μ lのDNAをCorning 96または384ウェルプレートに置き、Cartesian Robotを用いてGAPS被覆スライドをプリントした。PCR産物は250 pb以上であるべきである。

【0040】

スライド処理

1. 高温ddH₂Oの皿にスライドを載せることによりアレイを再水和(約10秒)。
2. 100 高温プレート上約3秒間、各アレイを急速(snap)乾燥(DNA側を上にする)。
3. 60ミリジュールにセットしたStratalinkerを用いてガラスに

DNAをUV X - 結合。

4. n - メチルピリリジノン(pyrrilidinone) 315 ml 中無水コハク酸 (Al dr i c h) 5 g を溶解。

5. これに0.2 M ホウ酸Na (pH 8.0) 35 mL を添加、溶解するまで攪拌 (NaOH でホウ酸 pH 決定)。

6. この溶液中に、15 分間振盪してアレイを浸漬。

7. アレイを95 水浴に2 分間移す。

8. アレイを95% EtOH に1 分間、迅速に移す。

9. アレイ側をわずかな角度で上向け (垂直に近づける)、スライドを風乾。

【0041】

スライドの予備ハイブリダイゼーション

1. 3.5 × SSC、0.1% SDS、10 mg/ml BSA (Sigma) 中、Coplin ジャーで50 で20 分間、スライドをインキュベート (Coplin ジャーを水浴中に置く)。

2. スライドを水、次いでイソプロパノールに浸して洗浄。

3. アレイ側をわずかな角度で上向け (垂直に近づける)、風乾。

【0042】

プローブ調製

1. 小型のカバーガラス (25 mm²) にはプローブ容量を20 ないし30 μl に、大型のカバーガラス (24 (60 mm)) にはプローブ容量を40 ないし60 μl にすべきである。

2. 大腸菌 (E. coli) tRNA (Boehringer - Mannheim) 10 μg を含む3 × SSC、0.1% SDS 中でプローブ (cDNA または PCR 用) を最終ハイブリダイゼーション容量にする。

3. 加熱ブロックで3 ないし5 分間沸騰。

4. 氷上で急速冷却。そして回転。

【0043】

ハイブリダイゼーション

1. プローブをスライドにピペティング。気泡形成しないようにして液体にカ

カバーガラスを落とす。

2. ハイブリダイゼーションチャンバー中50 ℃の水浴上に組み込む。クランプで閉じる。

3. 50 ℃の水浴に一晩浸漬。

【0044】

スキャンニング

1. ハイブリダイゼーション表面(right) 側を上にして取り外す。

2. 指またはピンセットを用いてカバーガラスを除去。

3. 0.1×SSC、0.1% SDS 中室温で5ないし10分間置く。

4. スライドを0.1×SSCに2.5分間、そして再度2.5分間移す。

5. 吹き付け乾燥し、スライドをスキャン。

【0045】

データ分析

スキャンニングにより得られたデータをImageGeneソフトウェアを用いて分析した。

【0046】

表

| 酵母 ORF | | モデル遺伝子 | |
|-----------|-------|---------|-------|
| YCL001w | RER1 | YOL086c | ADH1 |
| YCL001w-a | | YBR115c | LYS2 |
| YCL002c | | YBR039c | PHO5 |
| YCL004w | PGS1 | YIR019c | FLO11 |
| YCL005w | | YDL215c | GDH2 |
| YCL006c | | YER103w | SSA4 |
| YCL007c | CWH36 | YHR053c | CUP1 |
| YCL008c | STP22 | YKL178c | STE3 |
| YCL009c | ILV6 | YIL163c | SUC2 |
| YCL010c | | YOR202w | HIS3 |
| YCL011c | GBP2 | YJR048w | CYC1 |
| YCL012w | | YJR153c | INO1 |
| YCL014w | BUD3 | YBR020w | GAL1 |
| YCL016c | | YBR019c | GAL10 |
| YCL017c | NSF1 | YDL227c | HO |
| YCL018w | LEU2 | YPL256c | CLN2 |
| YCL019w | | YGR108w | CLB1 |
| YCL020w | | | |
| YCL024w | | | |
| YCL025c | AGP1 | | |

【0047】

| 酵母 ORF | | モデル遺伝子 | |
|----------|-------|--------|--|
| YCL026ca | FRM2 | | |
| YCL027w | FUS1 | | |
| YCL028w | | | |
| YCL029w | BIK1 | | |
| YCL030c | HIS4 | | |
| YCL031c | RPB7 | | |
| YCL032w | STE50 | | |
| YCL033c | | | |
| YCL034w | | | |
| YCL035c | | | |
| YCL036w | | | |
| YCL037c | SRO9 | | |
| YCL038c | | | |
| YCL039w | | | |
| YCL040w | GLK1 | | |
| YCL041c | | | |
| YCL042w | | | |
| YCL043c | PDI1 | | |
| YCL044c | | | |
| YCL045c | | | |
| YCL046w | | | |
| YCL047c | | | |
| YCL048w | | | |
| YCL049c | | | |
| YCL050c | APA1 | | |
| 酵母 ORF | | モデル遺伝子 | |
| YCL051w | LRE1 | | |

【0048】

| | | | |
|---------|-----------|--|--|
| YCL052c | PBN1 | | |
| YCL054w | | | |
| YCL055w | KAR4 | | |
| YCL056w | | | |
| YCL057w | PRD1 | | |
| YCL058c | | | |
| YCL059c | KRR1 | | |
| YCL061c | | | |
| YCL063w | | | |
| YCL064c | CHA1 | | |
| YCL065w | | | |
| YCL066w | HMLALPHA1 | | |
| YCL067c | HMLALPHA2 | | |
| YCL068c | | | |
| YCL069w | | | |
| YCL073c | | | |
| YCL074w | | | |
| YCL075w | | | |
| YCL076w | | | |

【0049】

| 酵母 ORF | | モデル遺伝子 | |
|----------|--------|--------|--|
| YCR001W | | | |
| YYCR002c | CDC10 | | |
| YCR003w | MRPL32 | | |
| YCR004c | YCP4 | | |
| YCR005c | CIT2 | | |
| YCR006c | | | |
| YCR007c | | | |
| YCR008w | SAT4 | | |
| YCR009c | RVS161 | | |
| YCR010c | | | |
| YCR011c | ADP1 | | |
| YCR012w | PGK1 | | |
| YCR014c | POL4 | | |
| YCR015c | | | |
| YCR016w | | | |
| YCR017c | | | |
| YCR018c | SRD1 | | |
| YCR018ca | | | |
| YCR019w | | | |
| YCR020c | PET18 | | |
| YCR020CA | MAK31 | | |
| YCR020wb | HTL1 | | |
| YCR021c | HSP30 | | |

【 0 0 5 0 】

| 酵母 ORF | | モデル遺伝子 | |
|----------|-----------|--------|--|
| YCR022c | | | |
| YCR023c | | | |
| YCR024c | | | |
| YCR024CA | PMP1 | | |
| YCR025c | | | |
| YCR026c | | | |
| YCR027c | | | |
| YCR028c | FEN2 | | |
| YCR028CA | RIM1 | | |
| YCR030c | | | |
| YCR031c | RPS14A | | |
| YCR032w | BPH1 | | |
| YCR033w | | | |
| YCR034w | FEN1 | | |
| YCR035c | RRP43 | | |
| YCR036w | RBK1 | | |
| YCR037c | PHO87 | | |
| YCR038c | BUD5 | | |
| YCR039c | MATALPHA2 | | |
| YCR040w | MATALPHA1 | | |
| YCR041w | | | |
| YCR042c | TSM1 | | |
| YCR043c | | | |

【 0 0 5 1 】

| 酵母 ORF | | モデル遺伝子 | |
|---------|-------|--------|--|
| YCR044c | | | |
| YCR045c | | | |
| YCR046c | IMG1 | | |
| YCR047c | | | |
| YCR048w | ARE1 | | |
| YCR051w | | | |
| YCR052w | RSC6 | | |
| YCR053w | THR4 | | |
| YCR054c | CTR86 | | |
| YCR057c | PWP2 | | |
| YCR059c | | | |
| YCR060w | | | |
| YCR061W | | | |
| YCR063w | | | |
| YCR064c | | | |
| YCR065w | HCM1 | | |
| YCR066w | RAD18 | | |
| YCR067c | SED4 | | |
| YCR068w | | | |
| YCR069w | SCC3 | | |
| YCR071c | IMG2 | | |
| YCR072c | | | |
| YCR073c | SSK22 | | |

| 酵母 ORF | | モデル遺伝子 | |
|----------|------|--------|--|
| YCR073wa | SOL2 | | |
| YCR075c | ERS1 | | |

【0052】

| | | | |
|---------|-------|--|--|
| YCR076c | | | |
| YCR077c | PAT1 | | |
| YCR079w | | | |
| YCR081w | SRB8 | | |
| YCR082w | | | |
| YCR083w | | | |
| YCR084c | TUP1 | | |
| YCR085w | | | |
| YCR086w | | | |
| YCR087w | | | |
| YCR088w | ABP1 | | |
| YCR089w | FIG2 | | |
| YCR090c | | | |
| YCR091w | KIN82 | | |
| YCR092c | MSH3 | | |
| YCR093w | CDC39 | | |
| YCR094w | CDC50 | | |
| YCR095c | | | |
| YCR096c | A2 | | |
| YCR097w | A1 | | |
| YCR098c | GIT1 | | |

【0053】

| 酵母 ORF | | モデル遺伝子 | |
|----------|------|--------|--|
| YCR099c | | | |
| YCR100c | | | |
| YCR101c | | | |
| YCR102c | | | |
| YCR102wa | | | |
| YCR103 | | | |
| YCR104w | PAU3 | | |
| YCR105w | | | |
| YCR106w | | | |
| YCR107w | AAD3 | | |
| | | | |

【0054】

実施例 2

DNA 結合タンパク質のゲノム全体の位置および機能

G a l 4 結合部位の包括的分析

ゲノム全体位置分析法の精度を調べるために、該分析を用いて酵母ゲノムの転写アクチベーター G a l 4 による結合部位を同定した。とりわけ最もよく特性付けされた転写アクチベーターであり、ガラクトース代謝に必要な 10 個の遺伝子の誘導に寄与することが知られているために G a l 4 を選択し、G A L 遺伝子のプロモーターの G A L 4 のコンセンサス DNA 結合配列 (U A S_o) を同定した。細胞をグルコース中で成長させた場合 (抑制状態)、極わずかな G a l 4 しか G A L 1 および G A L 10 プロモーターの U A S_o に結合しないが、ガラクトース中では比較的高レベルの G a l 4 が結合する。

【0055】

以下により詳細に記載する 3 つの独立した実験で、グルコースおよびガラクトースの双方の培地中でエピトープタグ化 G a l 4 p のゲノム全体位置を試験した。位置分析実験により、以前に G a l 4 により調節されると報告された 7 個の遺伝子および単独の炭素源としてガラクトースを利用する細胞に生理学的に関連する活性をコードするさらに 3 つの遺伝子を同定したが、これらは、以前にはこの

アクチベーターにより調節されることは知られていなかった(図6A)。

【0056】

本明細書に記載する分析基準(p 値 < 0.00001)によりプロモーター領域にGal4が結合している可能性が最も高い24個の遺伝子の組を図6Aに列挙する。しかしながら、Gal4が結合する遺伝子間領域を共有する遺伝子のサブセットのみがこのアクチベーターにより調節されるので(図6B)、Gal4はこれらの遺伝子全てを機能的に活性化しない。Gal4が結合し、かつガラクトースで活性化される遺伝子を同定するために、ゲノム全体発現分析を実施した。図6Aの上側パネルはガラクトース中で発現が誘導される遺伝子を示し、一方下側パネルは発現がガラクトースに依存しない遺伝子を示す。以前にGal4(GAL1、GAL2、GAL3、GAL7、GAL10、GAL80およびGCY1)に調節されると報告された7個の遺伝子はGal4に結合し、ガラクトース中で活性化された。以前には発現がGal4アクチベーターとは関連づけられていなかった3個の遺伝子、MTH、PCL10およびFUR4にもまたGal4が結合し、ガラクトース中で活性化されることが見出された。実質的には、予想どおりグルコース中の方が成長した細胞のこれらのプロモーターの各々と結合するGal4は少ない。Gal4pは、以前Gal4により調節されると考えられていた遺伝子であるGAL4およびPGM2のプロモーターに結合しなかったが、これらのプロモーターに対するGal4結合の直接的な証拠は示されていなかった。これらの結果の各々は慣用的なChIP分析により確認され(図6C)、マイクロアレイの結果が、現在まで個々の結合部位を研究するために用いられてきた慣用的なアプローチにより得られた結果を正確に反映することを示す。

【0057】

Gal4により結合および調節の双方がなされる10個の遺伝子を選別し、AlignAceプログラムを用いてこのアクチベーターのコンセンサス結合部位を同定した(図6D)。この結合部位配列は以前にGal4に関して決定された配列に類似するが、精製(refine)されている。Gal4結合が検出されない酵母ゲノムのおよそ50の部位でGal4結合配列を生じ、これはGal4結合には単にこの配列の存在では十分ではないことを示している。

【0058】

以前には発現がGal4アクチベーターとは関連づけられていなかった3個の遺伝子、MTH、PCL10およびFUR4にもまたGal4が結合し、ガラクトース中で活性化されることが見出された。これらの3個の遺伝子は以下の3つの特徴を十分確立されたGal4-依存性GAL遺伝子と共有するので、これらの3つの遺伝子は本物の(genuine)Gal4p標的である可能性がある。MTH、PCL10およびFUR4はガラクトース誘導される(図6A)。ガラクトース誘導はGal4に依存する(図6C)。細胞がグルコース中ではなくて、ガラクトース中で成長した場合、MTH、PCL10およびFUR4プロモーターにGal4が結合する(図6A)。Gal4pのMTH、PCL10およびFUR4プロモーターへの結合は慣用されるChIP分析により確認された(図6C)。

【0059】

MTH1およびMTH、PCL10およびFUR4をGal4調節遺伝子であると同定することにより、いくつかの異なる代謝経路の調節がどのように相互に関連しているかがわかる(図6F)。MTH1は細胞がガラクトースを単一の炭素源として利用する場合に必要とされる代謝経路に関与する多くの遺伝子の転写レプレッサーをコードする。中でも最も興味深い標的はヘキソース輸送に関与するHTX遺伝子のサブセットである。膜でGal4依存の様式でそのヘキソーストランスポーターの濃度を変調することにより細胞がガラクトースに応答すること; Gal4がガラクトーストランスポーター遺伝子GAL2を活性化し、MTH1レプレッサーの活性化によりグルコーストランスポーターの発現レベル低下を引き起こすことが本明細書に記載される結果により示される。Pc110サイクリンはPho85pと結合し、グリコーゲンの形成を抑制するようである。PCL10がGal4活性化されるという観察により、グリコーゲン生成の低減がガラクトース代謝から得られるエネルギーを最大化することが示される。FUR4はウラシルペンネアーゼ(pennease)をコードし、Gal4によるその誘導はウラシルの細胞内プールを増加させる必要性を反映し、Gal7により触媒されるUDPのガラクトースへの付加を効率よく行わせる。

【0060】

前記の実験は、細胞がガラクトース以外の炭素供給源上で成長する場合、グルコースが存在しない限り、Gal4が少なくともいくつかのGAL遺伝子プロモーターと結合することを示している。ラフィノース上で成長した細胞のGal4のゲノム全体位置分析を繰り返し、結果は細胞をガラクトース上で成長させた場合に得られる結果と本質的に同一であることが示された。これらの結果により、Gal4がそのゲノム結合部位で同一の結合挙動を呈することが示され、ゲノム全体位置法が高度に再現性があることが示される。

【0061】

Ste12結合部位の全体分析

DNA結合転写アクチベーターSte12のゲノム全体の結合プロファイルもまた研究した。Ste12は明確な細胞での役割を有する（接合フェロモンに対する1倍体酵母の応答に重要である）ので興味深い、Ste12により調節される遺伝子は極わずかしか同定されていない。フェロモン応答経路の活性化により細胞サイクル停止および100個を超える遺伝子の転写活性化が引き起こされる。ste12変異細胞を用いる発現分析によりSte12がこれらの遺伝子全てのフェロモン誘導に必要であることが示された。しかしながら、Ste12がフェロモンに反応してこれらの遺伝子の転写を活性化するメカニズムは解明されていない。

【0062】

3つの独立した実験で、フェロモン処置の前および後でエピトープタグ化Ste12pのゲノム全体位置を研究した。本明細書に記載する分析基準（ p 値 < 0.005 ）により、プロモーター領域がSte12に結合する可能性が最も高い遺伝子の組を図7に列挙する；上側パネルは発現がアルファ因子により誘導される遺伝子を示し、一方下側パネルは発現がアルファ因子により有意に誘導されない遺伝子を示す。アルファ因子により誘導され、Ste12が結合する36個の遺伝子のうち、12個は接合過程の種々の工程に参加することが知られている（FIG2、AFR1、GIC2、STE12、CHS1、KAR5、FUS1、AGA1、FUS3、CIK1、FAR1、FIG1）。

【0063】

St e 1 2はフェロモンシグナル発生の非存在下でいくつかのプロモーターに結合するが、たいていの遺伝子に対するその結合はアルファ遺伝子により増強される。興味深いことに、St e 1 2はフェロモン処置の前および後の双方でその自己プロモーターに結合する。それと共に、結合および発現データはSTE 1 2の調節が陽性フィードバックループに関与することを立証している。STE 1 2発現はフェロモン処置の直後に増加し、これは結合しているが不活性なSt e 1 2アクチベーターが迅速に活性形態に変換することを示している。STE 1 2遺伝子の発現増加によりSt e 1 2がさらに生成され、今度はこれがその遺伝子を活性化する。

【0064】

その発現が以前はSt e 1 2および接合過程に関連づけられていなかった24個の遺伝子にSt e 1 2が結合し、アルファ因子により活性化されることが見出された。そのフェロモン誘導がst e 1 2変異細胞で削除されていることを鑑み、これらの24個の遺伝子もまた本物のSt e 1 2標的である可能性がある。これらの遺伝子の同定により接合過程の種々の工程について興味深い詳細が示される。例えば、あるSt e 1 2標的遺伝子、PCL 2はサイクリン依存性キナーゼ(cdk)Pho 85との複合体を形成するG1サイクリンをコードする。Pc 1 2 - Pho 85およびPC 1 1 - Pho 85複合体はCl n 1 - Cdc 2 8およびCl n - 2 - Cdc 2 8サイクリン依存性キナーゼ複合体と協働して作用し、G1細胞サイクル進行を促進する(Measdayら、1994)。Pc 1 2 - Pho 85キナーゼ複合体はCl n 1 - Cdc 2 8およびCl n 2 - Cdc 2 8と重複するが異なる基質特異性を有する。接合過程において、1倍体酵母細胞は、別のSt e 1 2標的遺伝子によりコードされるFar 1によるCl n 1 - Cdc 2 8およびCl n 2 - Cdc 2 8活性阻害のために、後期G1期の開始が停止される。フェロモン処置後のSt e 1 2によるPLC 2活性化は、Pho 85複合体活性の増加がCdc 2 8活性の喪失を補填するのに必要である可能性があることを示している。

【0065】

フェロモン誘導中のSte12のゲノム位置および発現プロファイルの分析により同定されるたいていのSte12標的遺伝子は、接合応答の種々の工程に係るタンパク質をコードする。中でも11個は以前に特性付けされていない。従って、YNL279W、YOR129C、YOR343C、YPL129C、YER019W、YIL083C、YIL037C、YIL169C、YNL105W、YOL155CおよびYNR064Cなどのこれらの遺伝子の細胞での役割は接合に最も関係している可能性がある。

【0066】

Ste12は別の細胞でのプロセスにも密接に関係している。Tec1と共に、Ste12は2倍体細胞のフィラメント形成(filamentation)を調節し、1倍体の侵襲性の(invasive)成長を調節する。2個の遺伝子、TEC1およびFLO11はパルプ状生育経路におけるSte12標的として同定された。アルファ因子の存在下または非存在下のいずれかでのこれらの遺伝子に対するSte12の結合は検出されなかった。これらのプロモーターに対するSte12pの結合は異なる生理学的条件により調節される可能性がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は本明細書に記載するタンパク質-DNA相互作用のゲノム全体のモニター観察の説明である。

【図2】

図2はどのようにアレイ上に示される各配列に対する目的タンパク質の相対結合を加重平均分析を用いて算出したかを示す。

【図3】

図3はタンパク質-DNA相互作用のゲノム全体のモニター観察の倍数変化対染色体位置のグラフである。

【図4】

図4は酵母染色体IIIに対するORC1の結合に関する非タグ化に対するタグ化の比率対染色体位置のグラフである。

【図5】

図5 Aはスキャンした像の例である。富化していないおよびIP富化したDNAは各々緑色蛍光および赤色蛍光を生じる。クローズアップした像は赤色の強度が提示した以上であるスポットを例示し、これらのDNA配列に対して標的化されたタンパク質の結合を示している。

図5 Bは少量のDNAを定量的に増幅し、Cy3およびCy5蛍光体で標識できることを示している。参考書(text)に記載されているLM-PCR法を用いて酵母ゲノムDNA 1 ngからCy3およびCy5標識DNAを調製した。得られたDNAサンプルを混合し、酵母遺伝子内DNAマイクロアレイにハイブリダイズした。恐らくバックグラウンドのノイズのために、低強度スポットは高強度スポットよりも大きな変動(variation)を有する。

【図6】

図6 Aは本明細書に記載する分析基準により、プロモーター領域がGal4に結合する可能性が最も高い24個の遺伝子の組を示す。

図6 BはGal4結合遺伝子間領域の概略図である。

図6 Cは慣用的なChIP分析の結果を示す。

図6 DはGal4アクチベーターのコンセンサス結合部位を同定するために用いられるAlignAceプログラムの結果を示す。

図6 EはPLC10およびMTH1の相対発現を示す棒グラフである。

図6 FはMTH1およびMTH、PLC10およびFUR4をGal4調節遺伝子として同定することにより、どのようにいくつかの異なる代謝経路が相互に関連しているかを示す方法を説明する概略図である。

【図7】

図7は本明細書に記載する分析基準により、プロモーター領域がSte112に結合する可能性が最も高い遺伝子の組を示す。

【図1】

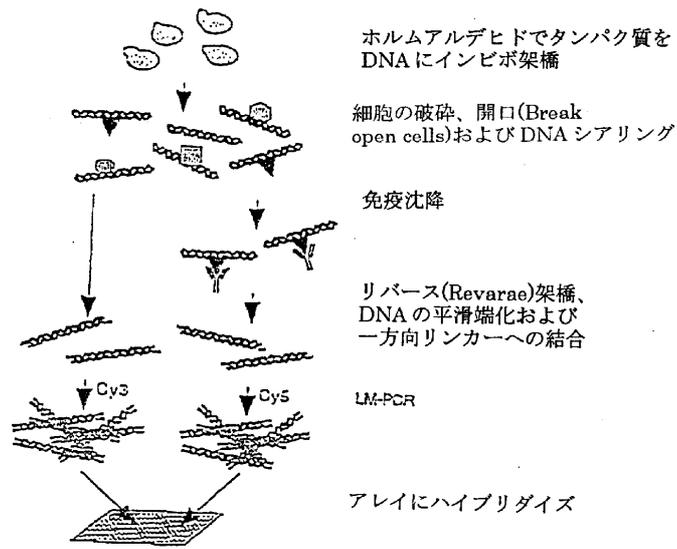


FIGURE 1

【図2】

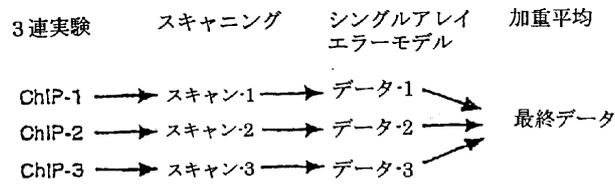


FIGURE 2

【図3】

タンパク質-DNA相互作用のゲノム全体のモニター観察

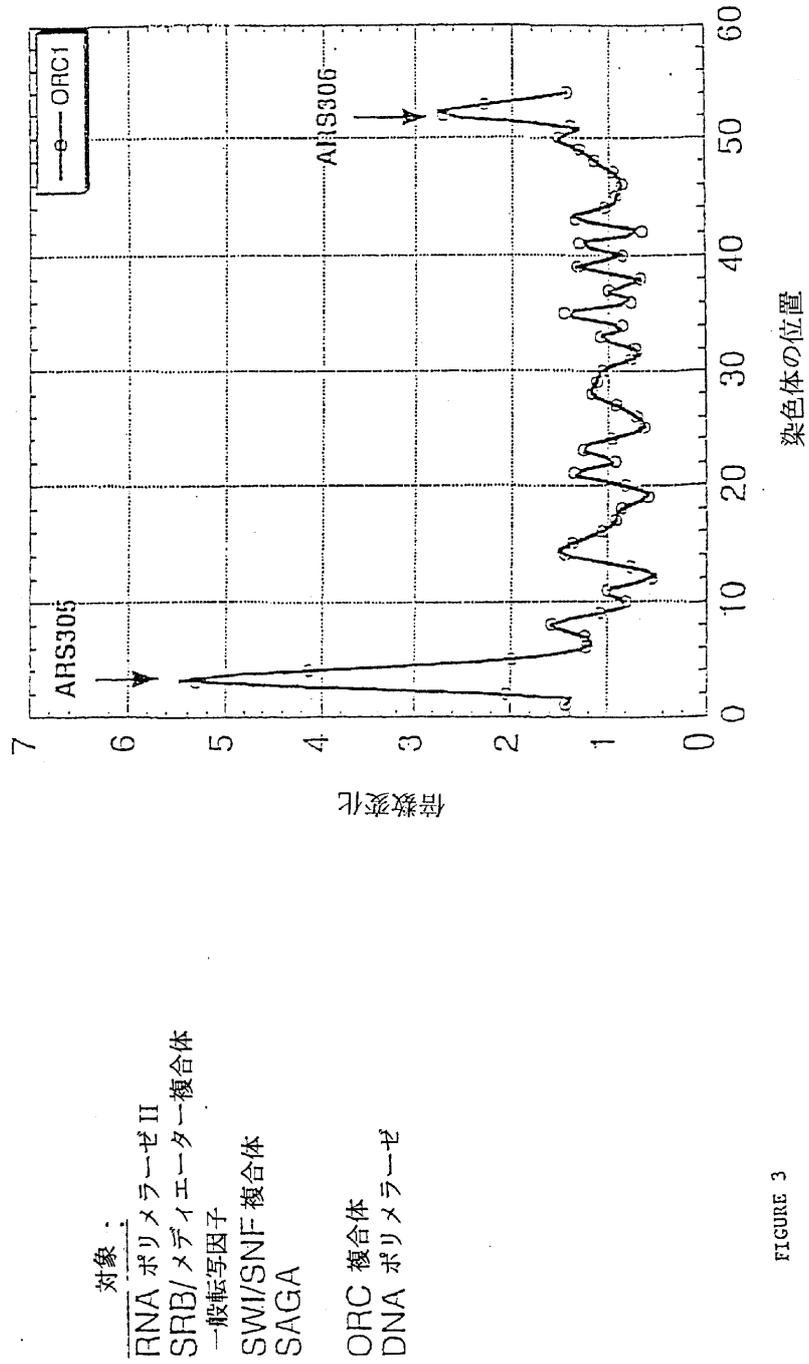


FIGURE 3

ORC1 の染色体 III への結合

【図4】

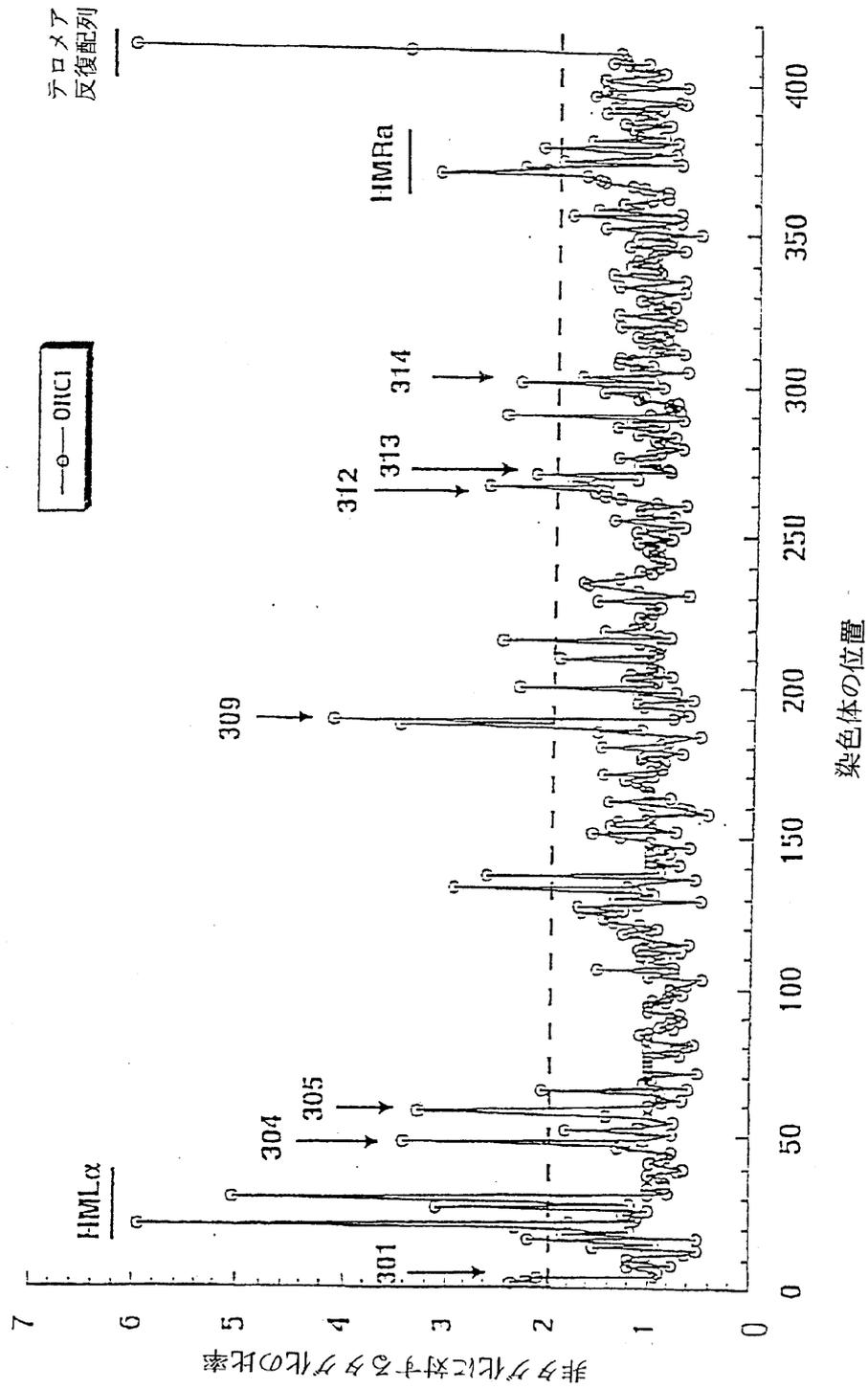


FIGURE 4

【図5】

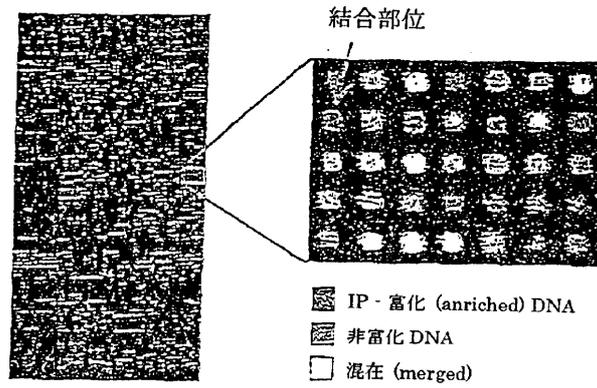


FIGURE 5A

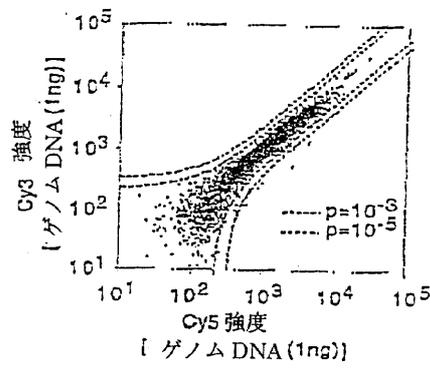


FIGURE 5B

【図6】

FIGURE 6A

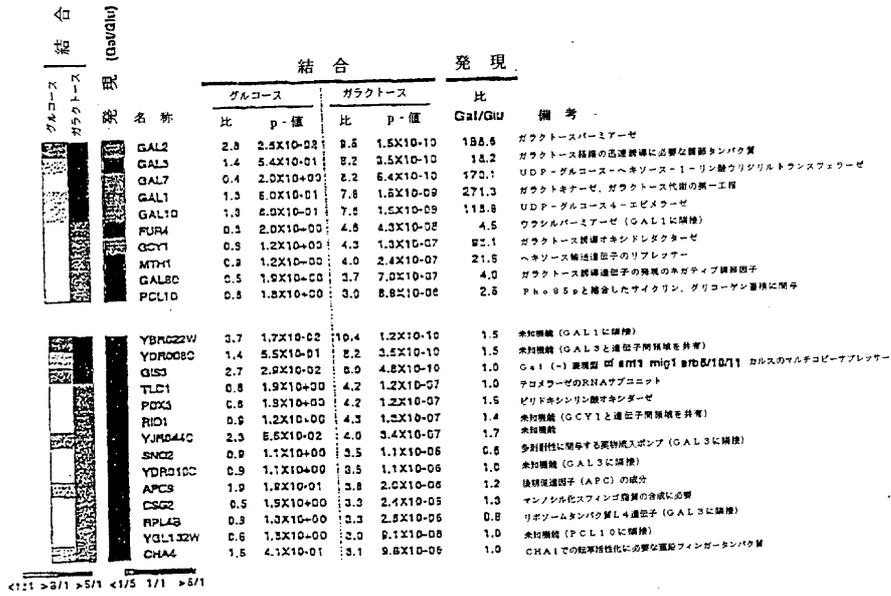


FIGURE 6B

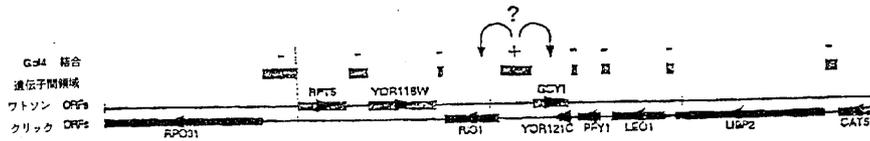


FIGURE 6C



FIGURE 6D

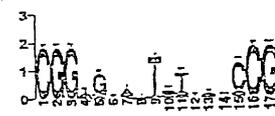


FIGURE 6E

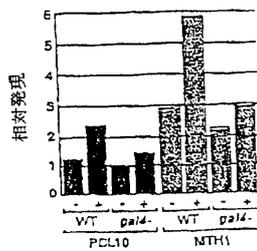
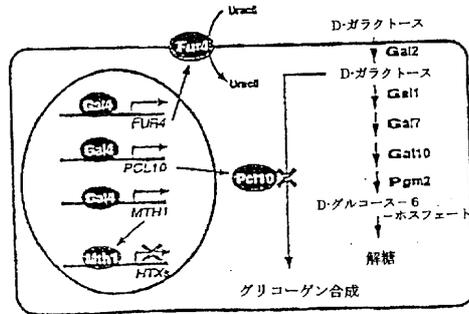


FIGURE 6F



【図7】

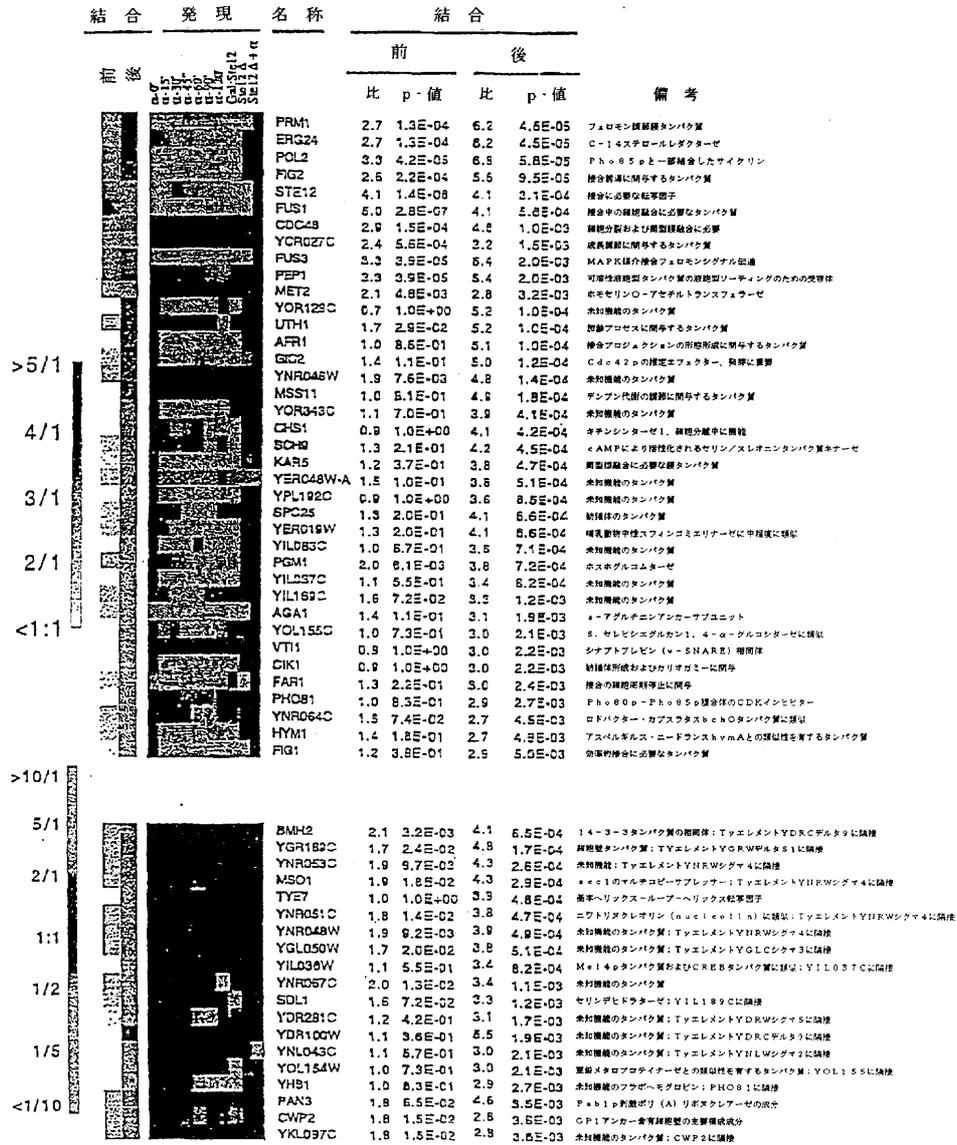


FIGURE 7

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| | | |
|---|---|---|
| International Application No. PCT/US 00/24358 | | |
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 G0IN33/68 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q G0IN | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | BLAT Y ET AL: "Cohesins bind to preferential sites along yeast chromosome III, with differential regulation along arms versus centric region" CELL, vol. 98, July 1999 (1999-07), pages 249-59, XP002170838 page 250, paragraph 3 -page 252; figure 1 page 257, paragraph 3 -page 258, paragraph 2 --- | 1-11 |
| A | HECHT A ET AL: "Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin" NATURE, vol. 383, 5 September 1996 (1996-09-05), pages 92-96, XP002170839 the whole document --- | 1-11 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search 29 June 2001 | Date of mailing of the international search report 13/07/2001 | |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Osborne, H | |

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/24358

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| T | REN B ET AL: "Genome-wide location and function of DNA binding proteins" CELL, vol. 290, December 2000 (2000-12), pages 2306-309, XP002170840 the whole document ----- | 1-11 |

1

フロントページの続き

- (72)発明者 ヤング, リチャード, エイ.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ
02193 ウェストン, ハイランド ストリ
ート 216
- (72)発明者 レン, ピング
アメリカ合衆国 マサチューセッツ
02143 サマヴィル, スプリングフィール
ド ストリート 39
- (72)発明者 ロバート, フランソワ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ
02116 ボストン, ナンバー1エフ, ビー
コン ストリート 395
- F ターム(参考) 2G045 BA20 BB50 DA13 FB02
4B024 AA11 AA20 CA01 HA14
4B063 QA11 QA18 QQ05 QQ42 QR32
QR41 QR56 QR82 QS11 QS12
QS25 QX02

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 蛋白质-DNA相互作用的全染色体分析 | | |
| 公开(公告)号 | JP2003508066A | 公开(公告)日 | 2003-03-04 |
| 申请号 | JP2001520923 | 申请日 | 2000-09-01 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 怀特黑德研究所前在生物医学研究 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 怀特黑德研究所福阿生物医学研究 | | |
| [标]发明人 | ウイリックジョン ヤングリチャードエイ レンピング ロバートフランソワ | | |
| 发明人 | ウイリック,ジョン ヤング,リチャード,エイ. レン,ピング ロバート,フランソワ | | |
| IPC分类号 | G01N33/50 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6804 C12Q1/6809 C12Q1/6855 G01N33/53 G01N33/566 | | |
| CPC分类号 | C12Q1/6809 C12Q1/6804 C12Q1/6855 G01N33/5308 C12Q2522/101 C12Q2523/101 C12Q2525/191 C12Q2565/501 C12Q2539/101 | | |
| FI分类号 | C12Q1/68.A G01N33/50.P G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.A | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/BA20 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/FB02 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/HA14 4B063/QA11 4B063/QA18 4B063/QQ05 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR56 4B063/QR82 4B063/QS11 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QX02 | | |
| 优先权 | 60/151972 1999-09-01 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明涉及一种鉴定细胞基因组中与目标蛋白质结合的区域的方法。在本文描述的方法中，细胞DNA结合蛋白与细胞基因组DNA结合（例如，共价交联）。取出与DNA结合蛋白结合的基因组DNA，并在与鉴定出的基因组DNA和与细胞基因组DNA互补的序列之间发生杂交的条件下，包含与鉴定出的基因组DNA互补的序列。与DNA结合或接触。杂交区域是蛋白质结合的细胞基因组中的区域。

| 酵母 ORF | | モデル遺伝子 | |
|-----------|-------|---------|-------|
| YCL001w | RER1 | YOL086c | ADH1 |
| YCL001w-a | | YBR115c | LYS2 |
| YCL002c | | YBR039c | PHO5 |
| YCL004w | PGS1 | YIR019c | FLO11 |
| YCL005w | | YDL215c | GDH2 |
| YCL006c | | YER103w | SSA4 |
| YCL007c | CWH36 | YHR053c | CUP1 |
| YCL008c | STP22 | YKL178c | STE3 |
| YCL009c | ILV6 | YIL163c | SUC2 |
| YCL010c | | YOR202w | HIS3 |
| YCL011c | GBP2 | YJR048w | CYC1 |
| YCL012w | | YJR153c | INO1 |
| YCL014w | BUD3 | YBR020w | GAL1 |
| YCL016c | | YBR019c | GAL10 |
| YCL017c | NSF1 | YDL227c | HO |
| YCL018w | LEU2 | YPL256c | CLN2 |
| YCL019w | | YGR108w | CLB1 |
| YCL020w | | | |
| YCL024w | | | |
| YCL025c | AGP1 | | |