

# 主 論 文 要 旨

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	堀澤 健一
主 論 文 題 目： <i>In vitro virus</i> (IVV) 法を用いた蛋白質相互作用解析システムの構築と 転写因子 Jun の相互作用因子の探索および機能解析				
(内容の要旨)				
<p>蛋白質間相互作用ネットワークの網羅的解析は、システム生物学の実践に向けての大きな課題の1つである。本研究では、表現型(蛋白質)とそれをコードする遺伝子型(RNA)を特異的に結びつける技術である <i>in vitro virus</i> (IVV) 法を用い、網羅的な蛋白質間相互作用解析システムの構築を目標に検討を行った。モデル系により IVV スクリーニング技術の有用性を実証すると共に、転写因子 Jun の basic leucine zipper (bZIP) ドメインに結合する蛋白質を、マウス脳 cDNA ライブラリーから探索した。その結果、20 種類の相互作用因子候補が同定され、うち 16 種類は新規であった。これらの新規の相互作用は、real-time PCR、<i>in vitro</i> pull-down assay、共免疫沈降などで、その信頼性を確認した。また Gene Ontology (GO) の機能アノテーション情報を基にクラスタリングを行ない新規相互作用因子の機能予測を行なった。以上の結果から IVV を用いた蛋白質相互作用解析システムの評価を行ない、網羅的なシステム構築に向けての議論も行った。</p> <p>第1章は序論としてゲノム配列情報からシステム生物学への流れという観点から、網羅的な蛋白質間相互作用解析の重要性を論じると共に、IVV 法および既往の解析手法について解説した。</p> <p>第2章ではモデル系を用いた IVV スクリーニングシステムの構築に関して説明した。この結果、IVV 法はごく低濃度に存在するターゲット蛋白質を検出できることが明らかになった。</p> <p>第3章では転写因子 Jun の機能・構造について概説すると共に、Jun の bZIP ドメインに結合する蛋白質をマウス脳由来の cDNA ライブラリーからスクリーニングを行ない、その結果を示した。5 ラウンドの IVV スクリーニングを行ない、泳動像から十分な濃縮がなされたと判断された DNA ライブラリーのクローニング・シーケンシングを行ない、特異的に選択されたクローンを同定した。</p> <p>第4章では、第3章で配列を決定した 217 クローンの配列解析に関して説明した。共通配列の除去、フレームの確認、BLAST を利用した遺伝子の同定、CLUSTALW を利用した配列のクラスタリング、ネガティブコントロールとの比較による偽陽性の排除などの過程を解説した。また、本解析の結果、得られた 217 のクローンのうち、136 クローンがポジティブであり、20 種類の異なる遺伝子としてクラスタリングされることが判った。</p> <p>第5章では、得られた 16 種類の新規の Jun の相互作用因子候補に関して、real-time PCR、<i>in vitro</i> pull-down assay、共免疫沈降などでその信頼性を確認する実験を行なった結果を示した。これによって、6 種類が培養細胞内においても Jun と特異的に結合することが明らかになり、また他の候補も間接的に Jun と結合する可能性が示された。</p> <p>第6章では公共データベースである GO のアノテーション情報を用い、取得された候補の機能クラスタリングによる機能予測を行なった。</p> <p>第7章では本研究を総括し、構築した解析システムを評価すると共に、より網羅的な蛋白質間相互作用解析システムの構築に向けての議論を行った。</p> <p style="text-align: right;">以上</p>				