■ 9章 ■

1. *lac* リプレッサーは，RNA ポリメラーゼがプロモーターに結合するのを遮断して転写を阻害する．リプレッサーをプロモーターの 100 塩基上流に配置すると，効果はなくなる．
2. RNA ポリメラーゼと結合するカタボライト活性化タンパク質（CAP）のドメインを *lac* リプレッサーに付加した組換えタンパク質を作製することができる．また，CAP の通常の結合部位と同様に，オペレーターを *lac* オペロンのプロモーターの約 60 塩基上流に移動させる必要がある．これで組換えタンパク質は，DNA に結合すると転写を活性化する．ラクトースが結合すると，DNA の結合と転写の活性化が妨げられる．
3. この配列は，線維芽細胞の転写を妨げるリプレッサーの結合部位となる．
4. 電気泳動移動度を利用して，細胞抽出液に配列 ACGTTG を含むオリゴヌクレオチドに結合するタンパク質が含まれていることを確認することができる．次に，アフィニティークロマトグラフィーを用いて，このタンパク質を精製することができる．
5. クロマチン免疫沈降法を用いて TXF と結合する DNA 断片を集め，その後，大規模 DNA シークエンシングを行い，両方の細胞における DNA 結合部位を特定する．
6. 伸長を阻害する因子である NELF と DSIF に対する抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い，遺伝子の開始点付近で RNA ポリメラーゼに結合しているかどうかを調べることができる．また，ポリメラーゼ CTD のリン酸化 Ser5 に対する抗体を用いて，転写が開始されたがポリメラーゼが開始点付近で停止しているかどうかを調べることができる．
7. エピジェネティクス的遺伝により，細胞分裂後も安定した遺伝子発現パターンが維持されるため，分化した細胞から分化した子孫が生まれることができる．
8. DNA のメチル化が阻害され，その結果，メチル化によって抑制された遺伝子が発現することになる．

Key Experiment　真核細胞の転写因子の単離

高塩濃度の緩衝液によって，タンパク質と DNA の間に形成されるイオン結合や水素結合が破壊された．

Key Experiment　ヒストン修飾の役割

ゲルに取込まれたヒストンがアセチル化される．

データ解析 9　電気泳動移動度シフト測定法

1. 放射能標識した HSF 配列を含む二本鎖オリゴヌクレオチドは，電気泳動中に正極側に移動した．バンド A は遊離オリゴヌクレオチドに相当する．核タンパク質抽出物にこの配列を認識して結合する転写因子が含まれている場合，電気泳動の際，そのフラグメントは遊離オリゴヌクレオチドに比べてゲル内で遅く移動する．そのため，このアッセイは，ゲル遅延度アッセイ，

またはゲルシフトアッセイともよばれる．この DNA−タンパク質複合体は，“シフトした”バンド B を形成する．試料に抗体を加えることで，DNA−タンパク質複合体のタンパク質成分を同定することができる．抗体がタンパク質を認識して結合すると，この DNA−タンパク質−抗体複合体の動きはさらに遅くなり，“スーパーシフト”したバンド C を形成する．

2. この研究では，HSF オリゴヌクレオチドとそれに結合するタンパク質からなる DNA−タンパク質複合体が電気泳動中に解離しないように，非変性ゲル電気泳動を使用している．SDS−PAGE を使用すると，タンパク質が変性して適切な DNA 断片に結合できなくなり，すべての試料が対照と同じように見えてしまう．

3. 対照試料（レーン 1）では，ゲルの上部領域にバンドが現れず，活性化した HSF が存在しないことを意味する．熱ショック（試料 2）により，HSF が発現または活性化され，標識オリゴヌクレオチドと結合してバンド B が形成される．

4. 高濃度（試料 5,6）では，インドメタシンが HSF の発現または活性化を誘導し，その結果，シフトしたバンド B が形成された．

5. 抗体を用いて，DNA−タンパク質複合体に含まれるタンパク質を同定した．試料 7,8 に抗 HSF−1 抗体を加えると，スーパーシフトしたバンド C が見られたが，抗 HSF−2 抗体は影響がなかった（試料 9,10）．インドメタシン処理は，HSF−1 の発現または活性化を特異的に誘導する．

6. この実験では，HSF の発現と活性の影響を区別していない．HSF の発現レベルに対する熱ショックとインドメタシンの影響は，電気泳動移動度シフト法に用いたタンパク質抽出液を，抗 HSF−1 抗体と抗 HSF−2 抗体を用いて免疫ブロット分析することで検証できる．抗体によって生じたバンドの強度がすべての試料で同じであれば，インドメタシンがこれらの転写因子の活性に影響を与えることを示している．