氏　　名　吉村成弘（よしむら しげひろ）
学位(専攻分野)　博士（人間・環境学）
学位記番号　人博第157号
学位授与の日付　平成14年3月25日
学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻　人間・環境学研究科人間・環境学専攻
学位論文題目　Nano-biology of the Gene: Application of Nano-technology to the Structural and Functional Analysis of the Gene
（遺伝子のナノバイオロジー：ナノテクノロジーによる遺伝子の構造・機能の解析）
（主　査）
論文調査委員　教授 速水正憲　教授 津田謹輔　助教授 倉橋和義
教授 竹安邦夫(生命科学研究科)

論文内容の要旨

分子生物学のあらゆる問題は核酸から始まると言っても過言ではない。すなわち，それらは多かれ少なかれDNAやRNAの高次構造と機能との関係を取り扱うことから出発する。真核生物の核内でDNAは，ヒストンと共にヌクレオソームを形成し，クロマチンファイバーやさらに太いファイバーへと高次に折りたたまれて存在している。さらに，転写の活性化や細胞周期に伴い，このクロマチンファイバーは大きく構造を変化させることが知られているが，その分子機構は全く理解されていない。これまでの生化学的手法や，X-線結晶解析やNMRなどの構造生物学的手法は，裸の短いDNAを用いた解析には威力を発揮してきたが，数千塩基対や，それ以上の長いDNAとタンパク質とが織り成す高次複合体の解析には非力であった。

本申請論文では，ポストゲノム時代と呼ばれる現代に，従来の生化学的手法の限界を超える次世代のテクノロジーを開発することを目的に，ナノテクノロジーを用いたDNAの高次構造解析法を確立する試みをおこなった。ここでは，ナノデバイスとして原子間力顕微鏡（Atomic Force Microscopy; AFM）を利用し，以下の成果を得た。

(1) コンデンシンは5つのサブユニットからなるタンパク質複合体であり，染色体凝縮で重要な役割を果たしている。これまで，結晶化や電子顕微鏡による構造解析がおこなわれてきたが，その構造は不明のままであった。ここでは，AFMをもちいた1分子観察により，はじめてコンデンシン複合体のサブユニット構造を明らかにした。5つのサブユニットのうち，SMCと呼ばれる2つのサブユニット（Cut3, Cut14）の2量体がhead-tail構造をとり，そのhead部にnon-SMCとよばれる他の3つのサブユニット（Cnd1, Cnd2, Cnd3）の3量体が結合することが明らかになった。さらに，DNAへの結合様式を解析すると，SMCの2量体がDNAに結合して凝集を引き起こしたのに対し，5量体は結合するだけで，凝集を引き起こすことはなかった。これにより，non-SMCの3量体は，SMC2量体のheadに結合して，DNA凝集を阻害する機能があることが明らかになった。

(2) βグロビン遺伝子のエンハンサー領域には，Bach1/MafKとよばれる転写因子が特異的に結合する部位があることが知られており，これにより，転写制御が行われている。AFMでの解析により，エンハンサー領域内に複数個存在する結合部位にBac1/MafKが結合すると，タンパク質どうしがさらに結合し，DNAループ構造を形成することが明らかになった。さらに，ループが一度形成されると，タンパク質のDNAに対する親和性が低下し，タンパク質がDNA上をスライドすることも明らかになった。この結果に基づいて提唱された，Kiss and Pullモデルは，エンハンサー領域に形成されるループ構造と，遺伝子発現調節との関連を理解するうえで，非常に示唆に富むものである。

(3) Mini-FプラスミドDNAの複製開始にはRepEとよばれる，複製開始因子が必要である，RepEが複製開始点に結合した時に引き起こされるDNAの高次構造変化をAFMで解析すると，興味深いことに，スーパーコイル構造をとっていたプラスミドが，弛緩状態に変化していた。AFMと生化学的な解析により，RepEがトポイソメラーゼ活性を持

たないこと，DNA を巻きつけないこと，二重らせんの開裂を引き起こさないことなどが明らかになった。これらの結果により，RepE が複製開始点に結合すると，プラスミド全体で DNA のらせん構造が変化し，塩基のピッチが増加するということが明らかになった。このことは，タンパク質の局所的な結合により，数 kb におよぶ DNA の高次構造が変化しうることを示すものである。

(4) 真核細胞内では，DNA はヌクレオソームを構成単位とするクロマチン構造をとっている。この構造は，DNA の折りたたみや，遺伝子の発現制御などに重要な役割を果たしていることが知られているが，核内でこのクロマチンがどのような構造をとり，どのような動態を示すかは全く明らかにされていない。ここでは，試験管内におけるクロマチン再構成系を確立し，AFM による解析をおこなった。その結果，隣り合うヌクレオソーム間の距離は塩濃度やリンカーヒストンに依存すること，クロマチンファイバーや，さらに高次な構造の構築には，数 10kb から数 100kb におよぶ長い DNA が必要であることが明らかになった。

本論文で得られた以上の結果は，DNA とタンパク質との単純な相互作用，それらが織り成す遺伝子の高次構造解析，構造的にさらに高次の染色体，それらを含む細胞核の動態を捉えるといった新しいナノバイオロジーの技法確立に AFM を用いた上述の解析法が非常に有用であることを示すものである。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

真核生物の核内で DNA は，ヒストンと共にヌクレオソームを形成し，クロマチンファイバーやさらに太いファイバーへと高次に折りたたまれて存在している。転写の活性化や細胞周期に伴い，このクロマチンファイバーは大きく構造を変化させることが知られているが，その分子機構は全く理解されていない。これまでの構造生物学的手法は，裸の短い DNA を用いた構造解析には威力を発揮するが，数千塩基対や，それ以上の長い DNA とタンパク質との複合体の解析には非力であった。特に，数 kb に及ぶ DNA を含むタンパク質/DNA 複合体の結晶化となると，非常に困難である。

原子間力顕微鏡（Atomic Force Microscopy; AFM）は，この問題に一つの大きな解決策をもたらすと期待されているナノデバイスである。AFM は，先端の鋭利な探針（プローブ）が試料表面を走査する際に試料から受ける引力や斥力を感知し，その大きさから試料の形状を画像化するタイプの顕微鏡である。よって，原理的には試料を固定したり染色したりする必要がなく，しかも，数オングストロームから数ナノメートルという範囲で高い解像度が得られるという利点がある。また，AF は大気中ではもちろん，液中でも走査可能であり，生きた細胞や活性をもつタンパク質を可視化したりすることも可能である。本申請論文は，AFM のこの特性に着目し，生体試料を AFM で観察する技術と，生化学的な手法とを巧みに組み合わせ，ゲノムの高次構造と機能との関係を，初めて分子レベルで解析したものであり，ゲノムサイエンスやライフサイエンス分野での意義は非常に大きいといえる。

ゲノムの高次構造は，大きく 2 つの因子によって構築される。1 つは DNA 結合性のタンパク質と DNA との直接相互作用であり，もう 1 つは，DNA 二重鎖の物理的化学的性質によるものである。本申請論文の序章に続く第 2 章では，染色体の凝縮に必須なタンパク質であるコンデンシン複合体（5 量体）をとりあげ，これまで困難とされていた複合体のサブユニット構造をはじめて明らかにした。さらに，DNA との相互作用を解析した実験では，染色体凝集の基本的メカニズムであると思われる，タンパク質依存性の DNA 凝集を可視化し，タンパク質と DNA との相互作用による高次構造形成の基本的なメカニズムを見出したことは，非常に意義深い。

続く第 3 章では，β グロビン遺伝子を取り上げ，転写調節因子を介してエンハンサー領域に形成される DNA ループの機能に関する興味深い結果を得ている。エンハンサー領域に DNA ループが形成されるであろうことは，以前から提唱されていたが，その機能的役割に関しては不明のままであった。申請者が提唱した “Kiss and Pull” モデルでは，特定の DNA 配列に結合したタンパク質を起点に形成されたループが，DNA 上をスライドしながらその長さを変化させている。このことが，実際の核内で起こった場合，タンパク質が DNA 上をスライドするに伴い，近傍のヌクレオソーム構造に何らかの変化が生じると考えられる。ループ形成の意義は，この周辺のヌクレオソーム構造を変化させることにより，転写活性を制御することにあるのではないかという申請者の考えは，非常に斬新で興味深いものである。

第 4 章では，細菌の複製開始タンパク質をとりあげ，DNA の物理化学的な性質に関する解析を行っている。申請者は，

スーパーコイル構造をとるプラスミド上に存在する複製開始起点に複製開始因子が結合すると，プラスミドが弛緩することをAFMにより見出した。さらに，ここで見られたプラスミド弛緩のメカニズムをAFMや生化学的手法をもちいて詳細に解析し，局所的なタンパク質の結合により，数kbにおよぶDNAの構造が急激に変化する可能性を示した。この証明は，やや間接的なものではあるが，ゲノム高次構造の構築において，DNAの物理化学的な性質が非常に大きな役割を果たしていることを示す結果である。

第5章では，これからのゲノムサイエンスを視野に入れ，試験管内でのクロマチン再構成の技術とAFMによる構造解析とを組み合わせた解析を行っている。興味深いのは，100kbにおよぶ長いDNAとヒストンから塩透析法により再構成したクロマチンでは，ヌクレオソームの密度が疎である領域と，密である領域がはっきりと分かれたことである。このことは，クロマチンやさらに高次の構造形成には，たんぱく質とDNAとが協調的に作用しあうことが必要であることを証明している。この結果は，ゲノムの最小構成単位であるヌクレオソームやクロマチンから，実際の染色体がいかに構成されているのかを理解するうえで，非常に重要な概念であるといえる。

本論文で得られた以上の結果は，DNAとタンパク質との単純な相互作用や，DNA物理化学的な性質が，遺伝子の高次構造を形成するうえで非常に重要な役割を果たしていることを示すものであり，これからのライフサイエンスの分野における中心的テーマになると思われる。このように，本論文は，人間を含めた生き物のゲノム環境の問題に分子レベルで切り込んだものであり，人間・環境学専攻分子生命環境論講座にふさわしい内容を備えたものであるといえる。

よって本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値のあるものと認める。また，平成14年1月17日，論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果，合格と認めた。