

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 理学 )	氏名	清水 将裕
論文題目	バクテリアの複製起点開裂機構解明を目指した分子シミュレーション研究		
( 論文内容の要旨 )			
<p>本論文は、大腸菌DNA複製開始複合体の高次構造形成についての粗視化モデルによる分子シミュレーション研究 ( 第1章 ) と、その最終構造の評価のために用いる手法の一つ、粗視化モデルから原子レベルの構造を再構築するアルゴリズムの開発・評価に関する研究 ( 第2章 ) をまとめたものである。</p> <p>バクテリアのDNA複製ではまず、複製起点の特定の領域でDNA二重らせんがほどける。そして開裂した領域にDNAヘリカーゼが結合し、DNA複製が進行する。複製起点上のはじめにほどけるDNA領域はDNA unwinding element (DUE) と呼ばれる。複製起点上にDNA-タンパク質複合体 (複製開始複合体) を形成することがDUEの開裂に必要である。しかし、複製開始複合体が二重らせん開裂を促進する機構の詳細はまだ明らかになっていない。本論文第1章の研究は、大腸菌<i>Escherichia coli</i>をモデルとし、分子動力学シミュレーションを用いてメカニズムの解明を目指した。複製開始複合体は多数のタンパク質を含む巨大な系であるため、主に粗視化分子動力学計算によるアプローチを試みた。</p> <p>まず大腸菌<i>E. coli</i>の複製開始複合体の四次構造をモデリングした。<i>E. coli</i>の複製開始複合体は、複製起点<i>oriC</i>に11分子の複製開始タンパク質DnaAや、DNAを強く曲げるintegration host factor (IHF) が結合したものである。共同研究者である九州大学の片山勉教授らの生化学実験と筆者の分子動力学計算を組み合わせ、信頼性の高い構造モデルを近原子解像度で得た。特に<i>E. coli</i>の複製開始複合体は3領域に分かれていることが分かった。また、<i>oriC</i>上のDnaA結合サイトとIHF結合サイトの間隔が複製開始複合体の形成に重要であることを見出した。さらに、左側サブ複合体と右側サブ複合体の位置関係が、DNAヘリカーゼの一本鎖DNA結合効率に影響することを明らかにした。</p> <p>複製開始複合体の構造モデリングをした際、粗視化モデルに基づく原子解像度モデルを構築し、そのモデル構造を全原子分子動力学計算により評価することが有効であると分かった。そこで本研究第2章の研究では、DNA-タンパク質複合体の粗視化モデルから原子解像度モデルを構築する、一般的な方法を検討、確立した。はじめに粗視化DNAモデルから原子モデルを構築する方法を考案した。これは各粗視化ヌクレオチド単位に対し、合致する原子モデルを構造ライブラリから探索し、当てはめる方法である。続いてタンパク質の原子モデル構築法を検討した。既存のソフトウェアを利用しつつ、DNA結合面のアミノ酸側鎖に対しては既知のDNA-タンパク質複合体構造情報を利用した。開発した手法はワトソン-クリック塩基対構造をよく再現できた。既存のソフトウェアのみを利用した場合に比べ、既知構造で見られるDNA-タンパク相互作用を高い精度で再現した。</p>			

今後の課題として、DUE開裂の分子機構を1)解明するためには、B型DNAから大きく変形した状態、特に一本鎖DNAの性質を再現できる粗視化DNAモデルがさらに必要である。今後は、本研究で開発したDNA粗視化モデルから原子モデルを構築する手法を駆使し、先行研究の実験結果を再現するDNA粗視化力場を開発する予定である。それらを利用し、DUE開裂の機構を明らかにすることが可能になる。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

清水将裕氏の博士論文は、生命活動の基本的課題であるゲノム複製を開始する分子機構の解明を目指して行われた、大腸菌DNA複製開始複合体の高次構造形成についての粗視化モデルによる分子シミュレーション研究と、最終構造の評価のために用いる手法の一つ、粗視化モデルから原子レベルの構造を再構築するアルゴリズムの開発・評価に関する研究を報告している。

大腸菌のDNA複製開始の分子機構については、これまで生化学的方法、構造生物学的方法等により、多くの知見が得られてきた。大腸菌ゲノム上の*oriC*とよばれる領域に、複製開始蛋白質であるDnaA等が集積して、巨大な蛋白質・DNA複合体を形成することが必須であり、それら蛋白質のなんらかの作用によって、DUEと呼ばれるDNA部分の2重らせんが開裂する。詳細な分子機構・各蛋白質の作用については、未解明な部分が多い。とくにこれまで、巨大な分子複合体の定量的な全体構造モデルがなく、それが一つの課題であった。このような背景の中で、清水氏の博士論文第1章は、初めてDNA複製開始複合体のほぼ全体にわたる構造モデルを、ほぼ原子分解能で構築することに成功した。また、得られた野生型およびさまざまな変異体についての構造モデルは、共同研究者ら(九州大学・片山勉教授のグループ)の生化学実験によって検証され、計算構造モデルと生化学実験で整合性のある結果となった。

上記の計算で主に用いられたのは、粗視化分子モデルとよばれるもので、蛋白質ではアミノ酸粒度、DNAでは各ヌクレオチドを3粒子で表現するモデルである。より詳細な解析には全原子座標を含む構造を得ることが有益である。そこで本論文第2章では、蛋白質・DNA複合体について、粗視化分子モデルから全原子モデルを再構築する手法を開発し、その精度を評価している。蛋白質については、主に既存のツールを組み合わせる手法を用いている。DNAについては、既存の方法が皆無であったため、全く新規に原子モデル再構築法を開発した。標準的なB型2重らせんに限らず、Z型はG4重鎖等においても、高精度で原子モデルを生成できることが確かめられた。開発された原子モデル再構築法は、非常に汎用性のある方法であり本研究の成果は、今後、広範な蛋白質DNA複合体の構造モデリングに適用可能である。

今後残る課題として、本研究では大腸菌DNA複製開始複合体のうち、DNAが開裂するDUEと呼ばれる部分を含められなかったことが挙げられる。これは、本論文で用いたDNAモデルが1本鎖DNAの物性を良く再現できないからであり、粗視化DNAモデルの改良が求められる。また、改良したモデルを用いて、真に大腸菌DNA複製開始複合体の全体像を得ることが期待される。

以上のように本論文は、これまで未解明であったDNA複製開始複合体の高次構造を、ほぼ原子分解能でモデル化することに成功し、また、このような巨大蛋白質・DNA複合体の高次構造を原子分解能でモデル化するための方法論を開発したものである。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成30年1月16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。なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日：学位授与日から即時