

様式 I

博士学位論文調査報告書

論文題目

Study of the recognition of G-quadruplex DNA by human ORC protein

(ヒト ORC タンパク質によるグアニン四重鎖 DNA の認識に関する研究)

申請者 Afaf Sobhi Mohamed Mahmoud Eladl

最終学歴 令和5年1月23日

京都大学大学院エネルギー科学研究科エネルギー基礎科学専攻博士後期課程
研究指導認定見込

学識確認 平成 年 月 日 (論文博士のみ)

調査委員 京都大学大学院エネルギー科学研究科
(主査) 教授 片平 正人

調査委員 京都大学大学院エネルギー科学研究科
教授 森井 孝

調査委員 京都大学大学院理学研究科
教授 朽尾 豪人

(続紙 1)

京都大学	博士 (エネルギー科学)	氏名	Afaf Sobhi Mohamed Mahmoud Eladl
論文題目	Study of the recognition of G-quadruplex DNA by human ORC protein (ヒト ORC タンパク質によるグアニン四重鎖 DNA の認識に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、4重鎖 DNA (G-4 DNA) に結合する事で複製開始点 (ori) を認識し、複製を開始すると考えられる human origin recognition complex (ヒト ORC、hORC) のサブユニット 1 (hORC1) に関し、構造及び G-4 DNA との相互作用様式を研究した結果をまとめたもので、5章からなっている。</p> <p>第1章は序論で、DNA の複製は最も基本的な生命現象の一つであり、バイオマスから生物の力を活用してエネルギーや有用物質を獲得する系を確立する上でも、複製に関する理解は必須である事を説明している。真核生物における複製は、染色体上の特定の部位 ori から開始される。ヒトにおいては、6個のサブユニットからなる hORC が ori に結合する事で、複製が開始される。しかしヒトの ori は特定の塩基配列を有さない為、hORC がいかにして ori を認識しているのかは謎である。最近、ori 周辺にはグアニン塩基に富み G-4 DNA を形成する可能性がある塩基配列が存在する事が見出されたことから、hORC は G-4 DNA に結合する事で ori を認識している可能性が指摘され始めた。そこで本論文では、hORC による G-4 DNA の認識に関する研究を行うという事を述べている。</p> <p>第2章では、hORC1 が G-4 DNA への結合に関与しており、特に残基番号 413-511 の領域 (hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹) が結合を担っていることを見出した。なお、G-4 DNA としては、癌遺伝子 <i>c-myc</i> のプロモーター領域の DNA 及び染色体末端のテロメアの DNA を用いた。前者は主鎖が平行型のトポロジーの G-4 DNA を形成し、一方後者は主鎖が (3+1) 型のトポロジーの G-4 DNA を形成する事が知られている。hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ は、2重鎖 DNA よりも 4重鎖 DNA に強く結合する事が示された。また、hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ は G-4 DNA における上部及び下部のグアニンテトラッド平面と相互作用する事が分かった。さらに、G-4 DNA の構造は hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ が結合した際にも維持される事が分かった。</p> <p>第3章では、hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ の構造に関する解析を行った。¹³C、¹⁵N 標識した hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ を調製し、各種の異種核多次元 NMR 法を駆使する事で、hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ の ¹H、¹³C 及び ¹⁵N の共鳴線の帰属を行った。化学シフト値を TALOS+プログラムを用いて解析した結果、hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ はごく一部が αヘリックス様の構造をとる以外は特定の2次構造を形成せず、天然変性状態にある事が示された。この事は、円偏光二色性を用いた2次構造解析及び AlphaFold2 プログラムを用いた3次元構造予測によっても支持された。</p> <p>第4章では、NMR の化学シフトの摂動に基づいて、hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ と G-4 DNA の相互作用様式を解析した。まず hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ は、G-4 DNA との結合状態においても天然変性状態にある事が示された。次に hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ は、<i>c-myc</i> のプロモーター領域の DNA が形成する平行型 G-4 DNA 及び</p>			

テロメアの DNA が形成する (3+1) 型の G-4 DNA と、ほぼ同様な相互作用様式で結合する事が分かった。この際 hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ の塩基性残基(アルギニン及びリジン残基)と極性残基(セリン及スレオニン残基)が G-4 DNA への結合を担っていた。前者は静電相互作用及びカチオン- π 相互作用/ π - π 相互作用によって、また後者は水素結合によって結合に寄与していると考えられた。

第 5 章は総括で、hORC は 4 重鎖という DNA の特定の立体構造に結合する事で、特定の塩基配列を有さない ori を特異的に認識し、複製を開始するというメカニズムが要約されている。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

DNA の複製は最も基本的な生命現象の一つであり、バイオマスから生物の力を活用してエネルギーや有用物質を獲得する系を確立する上でも、複製に関する理解は必須である。そこで本論文では、4重鎖 DNA (G-4 DNA) に結合する事で複製開始点 (ori) を認識して複製を開始すると考えられる human origin recognition complex (ヒト ORC、hORC) のサブユニット 1 (hORC1) に関し、構造及び G-4 DNA との相互作用を解析し、hORC がいかにして ori を認識するのかを研究した結果をまとめており、得られた主な成果は次の通りである。

1. hORC1 が G-4 DNA への結合に関与しており、特に残基番号 413-511 の領域 (hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹) が結合を担っていることを見出した。hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ は、2重鎖 DNA よりも 4重鎖 DNA に強く結合する事が示された。また、hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ は G-4 DNA における上部及び下部のグアニンテトラッド平面と相互作用する事が分かった。さらに、G-4 DNA の構造は hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ が結合した際にも維持される事が分かった。

2. ¹³C、¹⁵N 標識した hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ を調製し、各種の異種核多次元 NMR 法を駆使する事で、hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ の ¹H、¹³C 及び ¹⁵N の共鳴線の帰属を行った。化学シフト値を TALOS+プログラムを用いて解析した結果、hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ はごく一部が α ヘリックス様の構造をとる以外は、天然変性状態にある事が示された。この事は、円偏光二色性を用いた 2次構造解析及び AlphaFold2 プログラムを用いた 3次元構造予測によっても支持された。

3. NMR の化学シフトの摂動に基づいて、hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ と G-4 DNA の相互作用を解析した。まず hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ は、G-4 DNA との結合状態においても天然変性状態にある事が示された。次に hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ は、*c-myc* のプロモーター領域の DNA が形成する平行型 4重鎖及びテロメアの DNA が形成する (3+1) 型の 4重鎖と、ほぼ同様な相互作用様式で結合する事が分かった。この際 hORC1⁴¹³⁻⁵¹¹ の塩基性残基 (アルギニン及びリジン残基) と極性残基 (セリン及スレオニン残基) が G-4 DNA への結合を担っていた。前者は静電相互作用及びカチオン- π 相互作用/ π - π 相互作用によって、また後者は水素結合によって結合に寄与していると考えられた。

以上本論文では、hORC は 4重鎖という DNA の特定の立体構造に結合する事で、特定の塩基配列を有さない ori を特異的に認識し、複製を開始する事が解明された。得られた知見は、バイオマスからエネルギーや有用物質を生物の力を活用して獲得する際の基盤となり、エネルギー科学の研究に寄与するところ大である。よって、本論文は博士 (エネルギー科学) の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 4 年 12 月 15 日に実施した論文内容とそれに関連した試問の結果、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。

論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文の全文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 2023年4月23日以降