

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	福手 淳平
論文題目	核小体内の力学環境におけるDNAアンツイスティング機構の解明		
(論文内容の要旨)			
<p>遺伝子の転写・複製などの核内プロセスは、DNAとタンパク質の相互作用の変化により制御される。これまで、<i>in vitro</i>再構成系を用いた研究から、DNA上の分子モーターが発生する力が、DNA二重らせん構造の変化(伸び・ねじれ)を誘導し、DNAに対するタンパク質の結合に影響を及ぼすことが示されてきた。しかしながら、種々の生体分子が存在する細胞内において、DNA二重らせん構造が変化する機構は未だ明らかでない。本論文では、核内構造体の1つである核小体に着目し、核小体内の力学環境において、DNAアンツイスティング(二重らせんのねじれ角の減少)が生じる機構を解明することを目的とした。</p> <p>DNAのアンツイスティングが生じるためには、トルクの発生に加え、DNAの軸回転拘束が必要となる。本研究では、核小体内において、RNAポリメラーゼI(RNAPI)によるトルクの発生、および、タンパク質集合体へのアンカリングによるDNAの軸回転拘束が連成することで、リボソームDNA(rDNA)のアンツイスティングが生じるとの仮説を立て、<i>in situ</i>イメージングに基づき検証した。</p> <p>まず、細胞内に存在するunderwound DNA(二重らせんのねじれ角が小さいDNA)を<i>in situ</i>で蛍光標識し、その標的特異性を検証した。Underwound DNAに結合する低分子であるビオチン化ソラレンを細胞に取り込ませたのち、蛍光アビジンにより標識した。Underwound DNAを解消させる薬剤の処理に応じて、ビオチン化ソラレンが結合したDNAの存在量、および、蛍光イメージングにおける蛍光強度が低下したことから、本手法の標識特異性が確かめられた。</p> <p>次に、核小体内におけるrDNAのアンツイスティングを確認するため、underwound DNAとともに、rDNAに対する蛍光<i>in situ</i>ハイブリダイゼーション、および、核小体の構成タンパク質に対する免疫蛍光染色を行い、格子構造化照明顕微鏡(Lattice-SIM)による高解像度イメージングを実施した。その結果、核小体内において、rDNAのアンツイスティングが生じることが明らかとなった。</p> <p>さらに、核小体内においてrDNAがアンツイスティングする機構を検証した。RNAPIの転写活性に対する摂動実験を行った結果、RNAPIによるトルクの発生が、核小体内におけるrDNAのアンツイスティングに寄与することが示された。また、DNAの軸回転拘束を担う因子として、核小体の外殻を構成するnucleophosmin(NPM)に着目した摂動実験、および、クロマチン免疫沈降解析を行った。その結果、NPMの集合体がrDNA上のグアニン四重鎖に結合することで、DNAの軸回転拘束を介して、rDNAのアンツイスティングを誘導することが示された。</p> <p>以上のように、本研究では、核小体内の力学環境においてDNAアンツイスティングが生じる機構を明らかとした。本研究は、個々の核内構造体において動的に変化する力学環境のもとで核内プロセスが制御される可能性を示唆しており、外部からのシグナルに応じた細胞分化などの運命選択機構を理解する一助となる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

細胞内の力学環境において、ゲノム DNA の二重らせんには局所的に伸び・ねじれが生じている。特に、DNA アンツイスティングは、タンパク質の結合親和性の変化や、DNA の高次構造の形成を介して、核内プロセスの制御に寄与することが知られている。生物物理学・メカノバイオロジー分野においては、*in vitro* 再構成系を用いた実験が行われており、基板に固定した DNA にトルクを作用させることで、DNA アンツイスティングが生じることが示されている。しかしながら、多種多様な生体分子が織りなす細胞内の力学環境において、DNA アンツイスティングが生じる機構は未だ明らかでない。本論文は、核内構造体の 1 つである核小体に着目し、核小体内の力学環境における DNA アンツイスティング機構の解明を目指したものである。

申請者は、細胞内の *underwound* DNA を *in situ* で蛍光標識する手法を進展させるとともに、Lattice-SIM による高解像度イメージングを実施することで、核小体内の rDNA においてアンツイスティングが生じることを見出した。本成果は、数多くの対照実験を通じて手法の標的特異性を慎重に検証することで得られており、申請者の優れた研究能力によるものである。また、DNA アンツイスティングが核小体内において発生することは、先行研究において行われてきた *underwound* DNA に対するシーケンス解析では示されていない新たな発見であり、rDNA の転写・損傷・修復の制御機構において、DNA アンツイスティングが重要な役割を担う可能性を示している。

さらに、申請者は、核小体内における DNA アンツイスティング機構の解明を目指し、核小体構成タンパク質に対して摂動を与えた時の DNA アンツイスティングの発生領域の変化を検証した。その結果、核小体内においては、RNAPI がトルクを発生するとともに、NPM 集合体へのアンカリングが DNA の軸回転を拘束することで rDNA のアンツイスティングを誘導することを明らかとした。これまでは、トルクの発生源である RNAP に着目した研究が主に行われてきたが、本研究では、細胞内における DNA の軸回転拘束の仕組みにまで視野を広げることで、DNA アンツイスティング機構の根本的な理解に貢献している。さらに、本成果は、核内構造体が DNA 二重らせん構造の変化を誘導する場として機能する可能性を示しており、細胞内の力学環境に応じた核内プロセスの制御機構の解明に一助をなすと期待される。

以上のように、本論文は生命科学に関する高度で幅広い学識、生物物理学・メカノバイオロジー分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新たな発見および概念が示されており、論理的かつ一貫性をもって記述されている。よって、博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。さらに、令和 6 年 1 月 24 日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、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。(ただし、学位規則第 8 条の規定により、猶予期間は学位授与日から 3 ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日