

京都大学	博士（生命科学）	氏名	鈴木 勇輝
論文題目	Molecular events of protein-DNA interactions revealed by fast-scanning atomic force microscopy （高速液中原子間力顕微鏡によるタンパク質・DNA 相互作用解析）		
（論文内容の要旨）			
あらゆる生命現象の源泉は核酸の制御にあると言っても過言ではない．本論文では，DNA-タンパク質複合体 1 分子の‘構造’だけでなく‘動き’を含めた時空間可視化解析系を確立し，分子間の相互作用様式を解明することで，ゲノム機能制御のメカニズムに迫ることを目指した．測定デバイスとして高速液中原子間力顕微鏡（fast-scanning Atomic Force Microscopy: fast-scanning AFM, 高速 AFM）を利用し，以下の観察・解析に取り組んだ．			
【1】溶液中における DNA 鎖の運動が探針による高速走査の影響を受けていないか定量的に評価するために，環状プラスミドのイメージングを 1～3 fps (フレーム/秒)の異なる走査速度で行い，各走査条件における DNA 鎖平均曲げ弾性エネルギーの分布を算出した．その結果，我々の観察条件では，高速操作が DNA の形態や動きに与える影響はほとんどなく，観察される DNA 鎖の運動は熱揺らぎによるものであることを示した．			
【2】DNA 結合タンパク質の多くは DNA 鎖上の特定の配列に結合し，機能を発揮する．モデルケースとして，溶液中における <i>E.coli</i> の RNA ポリメラーゼと DNA 鎖との相互作用を可視化解析した．RNA ポリメラーゼが DNA 鎖の非特異的部位への解離と結合，DNA 鎖上の一次元拡散運動を組み合わせながら，プロモーター領域を探し出す直接的証拠を得た．			
【3】DNA 結合タンパク質の中には，その酵素活性に DNA 鎖上で空間的に隔てられた二つ以上の配列領域への結合が必要とされるものがある．特に認識配列が同一 DNA 鎖上に存在する場合，タンパク質分子の結合により DNA のループ構造が形成される．このようなループ構造の形成は，転写や DNA の組換え，DNA 修復など，様々な遺伝子制御プロセスにおいて示唆されている．本研究では，DNA 鎖上の二つの認識部位に同時に結合し，両方の部位で二本鎖 DNA を切断する IIF 型の制限酵素 SfiI を扱い，DNA ループ構造の形成と DNA 鎖の切断反応のメカニズムの解明を行った．			
【4】ヌクレオソーム構造が熱揺らぎにより動的な性質を示すことは，先行研究により示唆されてきたが，秒以下のタイムスケールで起こるその微細な構造変化を可視化解析することは不可能であった．本研究では，線状プラスミド DNA 上に再構成したヌクレオソームの動態を 2 fps という走査速度で可視化解析することで，①ヌクレオソームの相対的な位置関係が，溶液中において自発的に変化しうること．②ヌクレオソーム構造が崩壊する際には，ヒストン八量体が直接解離する，または，ヒストン八量体がサブユニットに分かれたのち順次解離するという二つの様式があることを示した．			
本論文で得られた種々の成果は，DNAとタンパク質の相互作用が織り成す機能的な複合体構造の形成過程，および酵素反応における分子の作用機序に対する一般的モデルの考察を可能とするものである．			

(論文審査の結果の要旨)

DNA結合タンパク質はゲノムの複製・修復や分配，転写に始まる遺伝子の発現調節，クロマチンの高次構造形成に密接に関与しており，生命の維持・継承に不可欠な分子機構を担っている．DNAが如何にゲノムとして機能しているかを理解するためには，個々の分子の性質に加えて，DNA鎖とタンパク質との相互作用とその結果生じる変化を理解しなければならない．

本研究において鈴木氏は，高速液中原子間力顕微鏡（高速AFM）による観察・解析系を応用し，DNA鎖上におけるDNA結合酵素1分子のダイナミクスの可視化解析を試みた．まず，第二章において，高速AFMにおける探針の走査運動が基板上でのDNA鎖の熱揺らぎに対して，影響を与えないことを物理的解析により示し，観察系の妥当性を証明している．続く第三章では，大腸菌のRNAポリメラーゼを解析対象とし，ポリメラーゼがDNA鎖の非特異的部位への解離と結合，DNA鎖上の一次元拡散運動を組み合わせながら，プロモーター領域を探し出すことを示した．さらに氏は，酵素活性にDNA鎖上の2つの認識部位への結合が要求されるタンパク質に興味を向け，第四章の制限酵素SfiIの解析においては（1）2つあるDNA鎖上の認識部位のうち，一方のみにタンパク質が結合すると，SfiIの四量体はその場所で結合を維持する．（2）しかし，DNA鎖が自身の柔軟性により屈曲運動をすることで，DNA鎖の任意の箇所とSfiIのもう一方のDNA結合部位が結合し，非特異的なループを形成する．（3）その後，DNA鎖がスライドしながら移動することで，最終的にSfiIは標的の認識部位に結合し，部位特異的なループ構造を形成する．等の興味深い知見を得た．加えて，第三・第四章においては，転写伸長過程におけるRNAポリメラーゼの運動，制限酵素によるDNA鎖の切断反応を捉えることで，酵素活性を確認し，反応における分子の作用機序を考察している．

第5章では，ポリヌクレオソームアレイ上で起こるヒストンの解離やヌクレオソーム構造の位置変化を示し，熱揺らぎによって惹起されるヌクレオソームの動態を考察している．

本博士論文で示された知見は，DNA結合酵素の作用機序に対する一般的モデルの考察を可能とするだけでなく，クロマチン動態のメカニズム解明への端緒となり得るものである．

以上から，本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた．

平成24年2月1日，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。

要旨公開可能日： 年 月 日