

氏 名	おお にわ りょう すけ 大 庭 良 介
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 95 号
学位授与の日付	平 成 19 年 1 月 23 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	生 命 科 学 研 究 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Comparative Analyses of Genome Architectures among Prokaryote, Organelle and Eukaryote by Nano-scale imaging, Molecular genetics and Bioinformatics (染色体構築機構の生物種間における比較解析; ナノバイオロジー, 分子遺伝学, 生物情報学からのアプローチ)
論文調査委員	(主 査) 教 授 竹 安 邦 夫 教 授 石 川 冬 木 教 授 河 内 孝 之

論 文 内 容 の 要 旨

原核生物・真核生物を問わず、染色体はタンパク質等によって階層的に折り畳まれ、細胞あるいは核内に収められている。この階層構造の制御機構の解明は、転写・翻訳・複製の機構を知るのに重要であるとともに、ストレス因子（UV やヒドロキシラジカル等）から DNA を守る機構を理解するためにも重要である。本研究では、遺伝学、ナノバイオロジー、さらには比較ゲノム学の手法を用い、バクテリア染色体折りたたみ機構の解明を目指した。さらに、得られた知見を真核生物染色体構築機構と比較することで、染色体折りたたみ機構の一般原理を探究した。

バクテリアにおいては、ゲノム（ヌクレオイド）を凝集させ、DNA をストレス因子から守る役割を果たしているタンパクとして Dps タンパク質が知られている。Chapter2 において、本研究では、まず、大腸菌における Dps 依存的なヌクレオイド凝集機構を解析した。その結果、①対数増殖期において Fis タンパク質が Dps 依存的なヌクレオイド凝集を阻害する、②Fis が TopoisomeraseI と DNAgyrase の発現を抑制している、③TopoisomeraseI と DNAgyrase の発現が Dps 依存的なヌクレオイド凝集を促進することが分かった。ヌクレオイド凝集が起きる細胞内の DNA トポロジーの状態を調べるため、細胞質抽出液を用いてプラスミド DNA のトポロジー変化を調べたところ、④ヌクレオイド凝集が起こる株では DNA トポロジーが変化することが分かった。以上の結果は、『DNA のトポロジーが動的である』ことが Dps 依存的なヌクレオイド凝集に必要なことを示唆している。近年、真核生物の M 期染色体の構築に TopoII や Condensine を介した DNA トポロジーコントロールの重要性が示されてきており、今回の結果は、染色体一般的に、凝集構造体の構築に DNA トポロジーのコントロールが重要であることを示唆している。

次に、Chapter3 と 4 において原核生物・真核生物の染色体階層構造の比較解析を行った。原子間力顕微鏡を用いた観察から、原核生物・真核生物ともに、太さ 30nm と 80nm のファイバー構造という、2つの共通する折り畳み段階があることがわかった。さらに RNase 等を用いた実験から、原核生物ではヌクレオソーム構造の代わりに太さ 10nm のファイバー構造が存在し、30nm ファイバー以上の構造体の保持に新生合成一本鎖 RNA が関与していることがわかった。一方、真核生物では、80nm の以上の構造保持に RNA が関与していることが示唆された。バクテリアと真核生物では染色体を構築する基本タンパク質が異なっており、本結果は『染色体を構成する部品によらず、見た目に似た高次構造体を形成する』ことを示唆している。今後、染色体各階層構造体の物理的性質の解析、さらには、古細菌をも含めた染色体構築機構の進化プロセスの解析を進めることで、①なぜ見た目に同じ構造体作り上げられるのか、②それぞれの構造体の生物学的意味は何か、といったことに解答が得られると考えられる。本研究で得られた成果は、その第一歩である。また、マクロ分子複合体の動態を種間比較しながら解析するという手法が、ポストゲノム時代における生物一般の原理・現象の探索に有用であることを示したものとして重要である。

論文審査の結果の要旨

真核生物・原核生物を問わず、cm～mスケールのゲノムが階層的に折りたたまれて μm スケールの細胞（または核）内に収まっている。本研究は原核生物ゲノムの折りたたみ機構の解析を起点とし、真核生物ゲノム折りたたみ機構との比較解析までを行ったものであり、その評価できる点は以下の通りである。

- 1) Dps 依存的なバクテリアゲノム凝集機構の解析（第2章）：欠損株等を用いた実験からDps 依存的なゲノム凝集を阻害する因子がFisタンパク質であることを同定した。さらに、FisがTopoisomeraseI, DNAgyraseの発現を抑制していること、TopoisomeraseI, DNAgyraseの発現によってDps 依存的なゲノム凝集が促進されることを示した。そして、細胞抽出液を用いた実験から、Dps 依存的な凝集が起こる細胞内では実際にDNAトポロジーが動的に変化することを実証した。以上の結果は、Invivoにおけるバクテリアゲノム凝集機構を解明した点において価値ある業績である。
- 2) Dps 依存的なバクテリアゲノム凝集機構の進化過程の解明（第2章）；比較ゲノム学的手法による解析から、もともと酸化ストレスによるDps 依存的なヌクレオイド凝集の機構が存在したこと、大腸菌を含むgamma-Proteobacteriaが他のバクテリアから分岐した後、酸化ストレス下でDps 依存的なヌクレオイドの凝集が起こらない機構が発達したことを示した。
- 3) RNAによるバクテリアゲノム階層構造の維持機構（第4章）；原子間力顕微鏡を用いた解析によって、バクテリアではヌクレオソーム構造の代わりに太さ10nmのファイバー構造が存在し、30nmファイバー以上の構造体の保持に新生合成一本鎖RNAが関与していることが示した。この結果は、転写自身が染色体構造を制御しているということ、さらに新しいヌクレオイド階層構造『DNA～10nmファイバー～30nmファイバー～80nmファイバー～高次凝集体』の存在を示した点において重要である。
- 4) 葉緑体・核ゲノムとの比較（第3章）；葉緑体・核ゲノムともに太さ30nmと80nmのファイバー構造という、2つの共通する折り畳み段階があることを示した。さらに葉緑体では細菌と同様に10nmのファイバー構造が存在し、30nmファイバー以上の構造体の保持に新生合成一本鎖RNAが関与していること、真核生物では、80nmの以上の構造保持にRNAが関与していることを示した。

以上の結果は、転写・複製の調節、さらには、ゲノムDNAの分配やストレス因子からの保護に重要な役割を果たしている染色体の階層的な折りたたみ構造の制御機構に新しい知見をもたらした研究として、一般的な分子細胞生物学にも寄与することが大きい。よって、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。

なお、平成18年12月20日、論文内容及びそれに関連した分野にわたり口頭試問を行った結果、博士（生命科学）の学位を授与される能力が十分にあるものと認めた。