

氏 名 徳 舛 富 由 樹
 学位(専攻分野) 博 士 (人間・環境学)
 学 位 記 番 号 人 博 第 80 号
 学位授与の日付 平成 12 年 1 月 24 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 人間・環境学研究科 人間・環境学専攻
 学位論文題目 DNA-Protein Interactions Studied by Atomic Force Microscopy
 (原子間力顕微鏡による DNA-蛋白質相互作用の解析)

論文調査委員 (主 査) 教 授 豊 島 喜 則 教 授 池 永 満 生 教 授 速 水 正 憲
 教 授 竹 安 邦 夫

論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質と DNA の相互作用は、真核生物遺伝子の転写制御機構において中心的な役割を果たしている。「プロモーター・エンハンサー領域への転写因子の結合」、それによる「転写の活性化」や「転写の抑制」といった事象は組織特異的、細胞周期特異的な蛋白質の発現に深く関わっている。DNA-蛋白質相互作用の研究は、従来ゲルシフトやフットプリントなどによって行われてきたが、これらの手法は比較的短い DNA 断片を使用しなければならず、遺伝子全体の構造とそれに伴う転写や複製といった機能との関係を調べるには最適ではなかった。また、高分解能電子顕微鏡は長い DNA と蛋白質との相互作用の解析に用いることはできるが、生の試料を取り扱うことができず、生化学的手法と組み合わせることは困難であった。

本研究は、これらの点を克服するために原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて、数万塩基対以上の DNA と、そこに特異的に結合する蛋白質との相互作用を構造的に解析し、その機能との関係を明らかにしようとしたものである。

原子間力顕微鏡は、走査型トンネル顕微鏡 (STM) に代表される走査型プローブ顕微鏡の一つである。STM が試料に導電体を必要とするのに対し、AFM では先端径 5-20 nm のプローブが直接試料に接するため、基本的に電気を通さない生物試料への応用に適している。本研究の第一段階として、AFM が以下の点で DNA-蛋白質相互作用の研究において定性的、かつ定量的な解析に応用できることを示した。(1) Sp1, Ap2 といった転写因子と、それらの結合部位がわかっている DNA を用いて、数千塩基対以上にわたる DNA 上での蛋白質の結合部位を決定できること。(2) 可視化された蛋白質の大きさより、DNA に結合した蛋白質の重合度を決定できること。(3) 従来の生化学的手法では検知できなかった、逆回文配列 (パリンドローム) によるステムループ構造等の、DNA の局所的高次構造を可視化できること。また、ここで可視化されたステムループ構造は短い DNA 上では検出されないため、長い DNA に存在する“緊張”がステムループの発生に大きく関与していると結論づけた。

本研究の第二段階では、このように確立した AFM の手法を、DNA-蛋白質相互作用により生じるさらに複雑な高次構造の解析と、その定量解析に応用した。数万塩基対からなる β グロビン遺伝子のエンハンサー領域 (Locus Control Region (LCR)) には、DNaseI に対する高感受性領域 (Hypersensitive Site) が 5 カ所 (HS1~HS5) 存在している。調節蛋白質の各 HS への結合はグロビン遺伝子座のクロマチン構造を壊すと言われているが、具体的機序はよくわかっていない。そこで LCR に結合する調節蛋白質のうち、多量体化する Bach1/MafK 複合体を介する LCR の構造変化を AFM を用いて解析し、次のような結果を得た。(a) Bach1/MafK 複合体は HS 中の特異的部位 (MARE) に 8 量体として結合し、なおかつ HS2 には高頻度で結合する。(b) HS1, HS3, HS4, HS5 にはそれぞれ 1 つずつの MARE があるが、HS2 には MARE が 2 つあるため、Bach1/MafK 8 量体の親和性が高い。(c) HS2 は複数の Bach1/MafK 複合体 (ヘテロ 16 量体) を介して、HS3, HS4 との間で DNA ループが形成される。(d) Bach1 分子中の蛋白質会合領域 (BTB ドメイン) が多量体形成

に必要であること。これらの結果から、Bach 1 /MafK が LCR の Hypersensitive Site に結合することによりループが形成され、その構造的緊張により安定なクロマチン状態が壊れるという可能性が考えられる。以前より注目されてきた構造転写因子は、おもに DNA の折れ曲がりを誘導するものであったが、Bach 1 は結合配列間の相互作用を仲介するまったく新しい型の構造転写因子であることがわかった。

DNA-蛋白質相互作用と転写制御の関係は単離した DNA では比較的良好に研究されてきたが、染色体レベルで説明できるまでには至っていない。DNA-蛋白質相互作用の結果生じる最も高次の構造は、ヌクレオソームがクロマチンを経て染色体に至る DNA のパッキングである。DNA と共にヌクレオソーム構造を形成するヒストンには H1, H2A, H2B, H3, H4 があり、H2A, H2B, H3, H4 がそれぞれ 2 分子、計 8 量体 (コアヒストン) となって一つのヌクレオソームを作る。

本研究の第三段階では、数千塩基対からなるクロマチン全体の長さと、同じクロマチン上に再構成されているヌクレオソームの数との関係をグラフ化し一つのヌクレオソームあたり 146 塩基対の DNA が取り込まれていることを AFM を用いて示した。また *Xenopus* 5S RNA 遺伝子を含む DNA とコアヒストンとからヌクレオソームを再構成すると、ヌクレオソームが 5S RNA 遺伝子の特定の位置にポジショニングすること、さらに、この系にヒストン H1 を加えるとヌクレオソーム上の DNA の巻き方が更に密になる、いわゆるコンパクションを生じることを示した。

以上、本論文は AFM と生化学的手法とを組み合わせ、遺伝子全体で起こっている転写制御の構造的ダイナミクスを統合的に理解しようとした新しい試みである。

論文審査の結果の要旨

遺伝子の特異的発現は遺伝子側に存在するシスエレメントとそこに結合するトランス因子との特異的相互作用によって調節されている。このような相互作用は DNA 上に形成された蛋白質複合体や、それによるシスエレメント間の相互作用なども含まれる。従って、DNA-蛋白質相互作用の構造的な理解は組織特異的、細胞周期特異的な蛋白質の発現機構を知る上でも非常に重要である。

現在までの DNA-蛋白質相互作用に関する研究は、ゲルシフトやフットプリントによる DNA 上における転写因子の結合部位の同定など、塩基配列レベルの解析が主であった。これらの手法は比較的短い DNA 断片を使用しなければならず DNA-蛋白質相互作用によって発生する遺伝子の空間的構造と機能との関係を解析するには不向きであった。

そこで、本学位申請者は、DNA と蛋白質が織りなす高次構造とその機能との関係を明らかにするために、解像力数 Å-数 nm の原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy: AFM) を用いて、遺伝子全体からみた DNA-蛋白質相互作用を直接可視化した。AFM は数万塩基対にも及ぶ長い DNA をそのまま可視化することができ、従来の生化学的手法で検出できなかった高次現象を形態的に解析することが可能である。本学位申請論文では、AFM の生化学・分子細胞生物学における応用法を確立し、遺伝子の発現調節部位への転写因子の結合様式や遺伝子の構造変化を直接可視化して、複数の離れたシスエレメントがどのように一つの遺伝子の発現調節に貢献し得るかを検討した結果を報告している。

この論文は 3 章より構成される。第一章では研究の背景を論じている。第二章では、転写因子の数万塩基対の DNA 上での結合部位を AFM により決定する方法や、可視化された蛋白質の大きさと分子量をもとに予測・計算された蛋白径を比較し、DNA に結合した蛋白質の重合度を算出するなどの定量解析法を確立している。一方 DNA 中には、時にパリンドロームという特殊配列が存在し、ステムループ構造と呼ばれる局所構造が生じると予想されてきた。申請者は AFM の高解像力を利用し、この構造の可視化に成功した。興味深いことにこの構造は、一般に予想されてきた十字型ではなく、片方のみに突出部分のある T 字状であった。第三章では、さらに複雑な高次構造の可視化と定量解析が報告されている。 β グロビン遺伝子座調節領域 (Locus Control Region, LCR) には DNaseI 高感受性部位 (Hypersensitive Site) が 5 カ所 (HS1~5) 存在し、それぞれの中には血球系転写因子 (NF-E2) の結合配列 (Maf Recognition Element; MARE) が存在する。MARE に結合する分子のうち Bach 1 /MafK 複合体はクロマチン構造を変化させると想像されてきた。そこで、Bach 1 /MafK 複合体による LCR の構造変化を AFM を用いて解析した。その結果、Bach 1 /MafK 複合体は MARE に 8 量体として結合し、かつ HS2 には MARE が 2 つあるため高い親和力で結合すること、従って HS2 を中心に複数の Bach 1 /MafK 複合体 (16 量体) を介して HS3, 4 との間で DNA ループが形成されることを示した。さらに、Bach 1 分子中の蛋白質会合領域 (BTB ドメイン) が多量体形成に必要であることから、Bach 1 /MafK が HS に結合し、Bach 1 を介して重合することによ

りループが形成されることを明らかにした。このことは、ループ形成から生じる構造的緊張により安定なクロマチン状態が壊れるという可能性を示唆するものである。また、これまで明らかになっている DNA の折れ曲がり調節する転写因子（構造転写因子）に対し、Bach/MafK 複合体はループを形成するという新しいタイプの構造転写因子であることを明らかにした。

遺伝子発現調節機構は最終的にはヌクレオソームのレベルでの理解が必要である。本申請者はこのクロマチンレベルでの転写制御の解明を目指し、精製ヒストン、DNA、調節蛋白質を用いてヌクレオソームを再構成し、AFM による構造解析を行った。その結果、数千塩基対の DNA と精製ヒストンにより再構成されたクロマチンに 146 bp の DNA が取りこまれていることを示した。次に、ポジショニングシグナルを含んだ遺伝子を用いて再構成した結果、シグナルの位置にヌクレオソームが再構成されていること、さらに、ヒストン H1 の付加によりヌクレオソーム上の DNA の巻き方が密になることを示している。これらの結果は、今日まで論争的であったクロマチンの基本構造としての“ジグザグモデル”を支持するものである。このような再構成されたヌクレオソーム構造の AFM による定量解析は本研究が初めての試みであり、本研究で開発した分子生物学的手法（ヌクレオソーム再構成）と構造生物学的手法（AFM）とを組み合わせる方法は、将来のクロマチンレベルでの転写機構解明に向けて一つの有効な技術となることが期待される。

本申請者が所属する分子・生命環境論講座の目的の 1 つは生命現象と環境の相関を分子レベルで追求していくことにあり、本研究はこの目的に沿ったものである。

よって本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値のあるものと認める。また、平成 11 年 11 月 12 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。